

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 872**

51 Int. Cl.:

C07K 14/33 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2005 E 05759463 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 1853622**

54 Título: **Procedimientos para obtener una toxina clostrídica**

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:

20.10.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WANG, PING y
DONOVAN, STEPHEN

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 509 872 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

Procedimientos para obtener una toxina clostrídica

5 **Antecedentes**

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener toxina botulínica biológicamente activa. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de cultivo sustancialmente libre de producto animal y fermentación anaerobia usando la bacteria *Clostridium botulinum*, para obtener toxina botulínica biológicamente activa abundante.

Una composición farmacéutica adecuada para la administración a un ser humano o animal para un propósito terapéutico, de diagnóstico, de investigación o cosmético puede comprender un principio activo. La composición farmacéutica también puede incluir uno o más excipientes, tampones, portadores, estabilizadores, conservantes y/o agentes de carga. El principio activo en una composición farmacéutica puede ser un producto biológico tal como una toxina botulínica. El principio activo de toxina botulínica usado para preparar una composición farmacéutica de toxina botulínica puede obtenerse mediante un procedimiento en múltiples etapas de cultivo, fermentación y elaboración que usa uno o más productos derivados de animales (tales como caldo de carne y componentes 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 excipiente hemoderivado en la composición farmacéutica de toxina botulínica elaborada final). La administración a un paciente de una composición farmacéutica en la que se obtiene el principio activo biológico mediante un procedimiento que usa productos derivados de animales puede someter al paciente a un posible riesgo de recibir diversos patógenos o agentes infecciosos. Por ejemplo, pueden estar presentes priones en una composición farmacéutica. Un prión es una partícula infecciosa proteica que se supone que surge como isoforma conformacional anómala a partir de la misma secuencia de ácido nucleico que constituye la proteína normal. Se ha planteado además la hipótesis de que la infectividad reside en una "reacción de inclusión" de la proteína de isoforma normal en la isoforma de proteína de prión a un nivel postraducciona. Aparentemente se induce el plegamiento erróneo de la proteína celular endógena normal para obtener una conformación de prión patógena.

La enfermedad de Creutzfeldt-Jacob es un trastorno neurodegenerativo poco frecuente de encefalopatía espongiiforme transmisible humana en el que el agente transmisible es aparentemente una isoforma anómala de una proteína de prión. Un individuo con enfermedad de Creutzfeldt-Jacob puede deteriorarse desde una salud aparentemente perfecta hasta mutismo acinético en el plazo de seis meses. Por tanto, puede existir un posible riesgo de adquirir una enfermedad mediada por priones, tal como la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, por la administración de una composición farmacéutica que contiene un producto biológico, tal como una toxina botulínica, obtenido o elaborado usando productos derivados de animales.

Toxina botulínica

El género *Clostridium* tiene más de ciento veintisiete especies, agrupadas por morfología y función. La bacteria Gram positiva, anaerobia, *Clostridium botulinum*, produce una potente neurotoxina polipeptídica, la toxina botulínica, que provoca una enfermedad neuroparalítica en seres humanos y animales conocida como botulismo. *Clostridium botulinum* y sus esporas se encuentran comúnmente en el suelo y la bacteria puede crecer en recipientes de alimentos esterilizados y sellados de manera inapropiada de conservas caseras, que son la causa de muchos de los casos de botulismo. Los efectos del botulismo aparecen normalmente de 18 a 36 horas tras comer los productos alimenticios infectados por un cultivo o esporas de *Clostridium botulinum*. Aparentemente, la toxina botulínica puede pasar de forma no atenuada a través del revestimiento del intestino y atacar las neuronas motoras periféricas. Los síntomas de intoxicación por toxina botulínica pueden avanzar desde dificultad para caminar, tragar y hablar hasta parálisis de los músculos respiratorios y muerte.

La toxina botulínica tipo A es el agente biológico natural más letal conocido por el ser humano. Aproximadamente 50 picogramos de toxina botulínica (complejo de neurotoxina purificado) tipo A es una DL₅₀ en ratones. En base molar, la toxina botulínica tipo A es 1,8 billones de veces más letal que la difteria, 600 millones de veces más letal que el cianuro de sodio, 30 millones de veces más letal que la cobratoxina y 12 millones de veces más letal que el cólera. Singh, *Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins*, páginas 63-84 (capítulo 4) de *Natural Toxins II*, editado por B.R. Singh *et al.*, Plenum Press, Nueva York (1976) (en el que la DL₅₀ mencionada de toxina botulínica tipo A de 0,3 ng igual a 1 U se corrige por el hecho de que aproximadamente 0,05 ng de BOTOX[®] es igual a 1 unidad). BOTOX[®] es la marca comercial de un complejo de neurotoxina purificado de toxina botulínica tipo A disponible comercialmente de Allergan, Inc., de Irvine, California. Una unidad (U) de toxina botulínica se define como la DL₅₀ tras inyección intraperitoneal en ratones Swiss Webster hembra que pesan aproximadamente 18-20 gramos cada uno. En otras palabras, una unidad de toxina botulínica es la cantidad de toxina botulínica que mata al 50% de un grupo de ratones Swiss Webster hembra. Se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas generalmente distintas desde el punto de vista inmunológico, siendo estas respectivamente los serotipos A, B, C₁, D, E, F y G de neurotoxina botulínica, distinguiéndose cada uno de ellos mediante neutralización con anticuerpos específicos del tipo. Los diferentes serotipos de toxina botulínica varían en cuanto a la especie animal a la que afectan y en cuanto a la gravedad y la duración de la parálisis que provocan. Por ejemplo, se ha determinado que la toxina botulínica tipo

A es 500 veces más potente, medido por la tasa de parálisis producida en la rata, que la toxina botulínica tipo B. Adicionalmente, se ha determinado que la toxina botulínica tipo B no es tóxica en primates a una dosis de 480 U/kg, que es aproximadamente 12 veces la DL₅₀ en primates para la toxina botulínica tipo A. Las toxinas botulínicas se unen aparentemente con alta afinidad a neuronas motoras colinérgicas, se translocan al interior de la neurona y bloquean la liberación presináptica de acetilcolina.

Se han usado toxinas botulínicas en entornos clínicos para el tratamiento de, por ejemplo, trastornos neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. Se ha aprobado la toxina botulínica tipo A por la Food and Drug Administration estadounidense para el tratamiento de blefaroespasmos esenciales, estrabismo y espasmos hemifaciales en pacientes de más de doce años de edad, para el tratamiento de distonía cervical y para el tratamiento de arrugas de líneas glabellares (faciales). La FDA también ha aprobado una toxina botulínica tipo B para el tratamiento de distonía cervical. Habitualmente se observan efectos clínicos de la inyección periférica (es decir intramuscular o subcutánea) de toxina botulínica tipo A en el plazo de una semana desde la inyección, y con frecuencia en el plazo de algunas horas tras la inyección. La duración típica de alivio sintomático (es decir parálisis muscular flácida) de una única inyección intramuscular de toxina botulínica tipo A puede ser de aproximadamente tres meses a aproximadamente seis meses.

Aunque todos los serotipos de toxinas botulínicas inhiben aparentemente la liberación del neurotransmisor acetilcolina en la unión neuromuscular, lo hacen afectando a diferentes proteínas neurosecretoras y/o escindiendo estas proteínas en diferentes sitios. La toxina botulínica A es una cinc endopeptidasa que puede hidrolizar específicamente un enlace peptídico de la proteína intracelular asociada a vesículas, SNAP-25. La toxina botulínica tipo E también escinde la proteína asociada a sinaptosomas de 25 kiloDalton (kD) (SNAP-25), pero selecciona como diana secuencias de aminoácidos diferentes dentro de esta proteína, en comparación con la toxina botulínica tipo A. Las toxinas botulínicas tipo B, D, F y G actúan sobre la proteína asociada a vesículas (VAMP, también denominada sinaptobrevina), escindiendo cada serotipo a la proteína en un sitio diferente. Finalmente, se ha mostrado que la toxina botulínica tipo C₁ escinde tanto la sintaxina como SNAP-25. Estas diferencias en el mecanismo de acción pueden afectar a la potencia relativa y/o duración de acción de los diversos serotipos de toxina botulínica.

Independientemente del serotipo, el mecanismo molecular de intoxicación por toxina parece ser similar e implicar al menos tres etapas o fases. 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 de la superficie celular; se piensa que el receptor es diferente para cada serotipo de toxina botulínica. El segmento del extremo carboxilo de la cadena H, H_C, parece ser importante para el direccionamiento de la toxina a la superficie celular.

En la segunda etapa, la toxina atraviesa la membrana plasmática de la célula envenenada. En primer lugar, se envuelve la toxina por la célula a través de endocitosis mediada por receptor, y se forma un endosoma que contiene la toxina. Entonces la toxina escapa del endosoma al interior del citoplasma de la célula. Se piensa que esta última etapa está mediada por el segmento de extremo amino de la cadena H, H_N, que desencadena un cambio conformacional de la toxina en respuesta a un pH de aproximadamente 5,5 o inferior. Se sabe que los endosomas presentan una bomba de protones que disminuye el pH intraendosómico. El cambio conformacional expone residuos hidrófobos en la toxina, lo que permite a la toxina incrustarse en la membrana endosómica. Entonces la toxina se transloca a través de la membrana endosómica al interior del citosol.

La última etapa del mecanismo de actividad de la toxina botulínica parece implicar la reducción del enlace disulfuro que une las cadenas H y L. Toda la actividad tóxica de *botulinum* y las toxinas botulínicas está contenida en la cadena L de la holotoxina; la cadena L es una cinc (Zn⁺⁺) endopeptidasa 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 provocan la degradación de sinaptobrevina (también denominada proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP)), una proteína de la membrana sinaptosómica. La mayor parte de las VAMP presentes en la superficie citosólica de la vesícula sináptica se elimina como resultado de uno cualquiera de estos acontecimientos de escisión. Cada toxina escinde específicamente un enlace diferente.

El peso molecular de la molécula de proteína de la toxina botulínica, para los siete serotipos de toxina botulínica conocidos, es de aproximadamente 150 kD. Resulta interesante que las toxinas botulínicas se liberan por la bacteria clostrídica como complejos que comprenden la molécula de proteína de la toxina botulínica de 150 kD junto con una o más proteínas distintas de toxina asociadas. Por tanto, el complejo de toxina botulínica tipo A puede producirse por la bacteria clostrídica como formas de 900 kD, 500 kD y 300 kD. Los tipos B y C₁ de toxina botulínica sólo se producen aparentemente como un complejo de 500 kD. La toxina botulínica tipo D se produce como complejos tanto de 300 kD como de 500 kD. Finalmente, los tipos E y F de toxina botulínica sólo se producen como complejos de aproximadamente 300 kD. Se cree que los complejos (es decir peso molecular superior a aproximadamente 150 kD) contienen una proteína de hemaglutinina distinta de toxina y una proteína distinta de toxina y distinta de hemaglutinina, no tóxica. Por tanto, un complejo de toxina botulínica puede comprender una molécula de toxina botulínica (el componente neurotóxico) y una o más proteínas de hemaglutinina no tóxicas y/o proteínas distintas de toxina, distintas de hemaglutinina (estas últimas pueden denominarse proteínas NTNH). Estos dos tipos de proteínas

distintas de toxina (que junto con la molécula de toxina botulínica pueden comprender el complejo de neurotoxina relevante) pueden actuar para proporcionar estabilidad frente a la desnaturalización para la molécula de toxina botulínica y protección frente a ácidos digestivos cuando se ingiere la toxina. Adicionalmente, es posible que los complejos de toxina botulínica más grandes (peso molecular superior a aproximadamente 150 kD) pueden dar como resultado una tasa más lenta de difusión de la toxina botulínica alejándose de un sitio de inyección intramuscular de un complejo de toxina botulínica. Los complejos de toxina pueden disociarse para dar la proteína de toxina y proteínas de hemaglutinina tratando el 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 la retirada de la proteína de hemaglutinina.

Todos los serotipos de toxina botulínica se producen por bacterias *Clostridium botulinum* nativas como proteínas monocatenarias inactivas que deben escindirse o cortarse por proteasas para volverse neuroactivas. Las cepas bacterianas que producen los serotipos A y G de toxina botulínica presentan proteasas endógenas y por tanto los serotipos A y G pueden recuperarse a partir de cultivos bacterianos predominantemente en su forma activa. En cambio, los serotipos C₁, D y E de toxina botulínica se sintetizan por cepas no proteolíticas y por tanto normalmente no están activados cuando se recuperan de cultivo. Los serotipos B y F se producen por cepas tanto proteolíticas como no proteolíticas y por tanto pueden recuperarse en su forma o bien activa o bien inactiva. Sin embargo, incluso las cepas proteolíticas que producen, por ejemplo, el serotipo de toxina botulínica tipo B sólo escinden una parte de la toxina producida. La proporción exacta de moléculas cortadas frente a no cortadas depende de la duración de la incubación y la temperatura del cultivo. Por tanto, es probable que un determinado porcentaje de cualquier preparación, por ejemplo, de la toxina de toxina botulínica tipo B sea inactivo, lo que representa posiblemente la potencia significativamente inferior conocida de la toxina botulínica tipo B en comparación con la toxina botulínica tipo A. La presencia de moléculas de toxina botulínica inactiva en una preparación clínica contribuirá a la carga de proteína global de la preparación, lo que se ha asociado con una antigenicidad aumentada, 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 también es menos potente que la toxina botulínica tipo A al mismo nivel de dosis.

Estudios *in vitro* han indicado que la toxina botulínica inhibe la liberación inducida por catión de potasio tanto de acetilcolina como de norepinefrina a partir de cultivos celulares primarios de tejido de tronco encefálico. Adicionalmente, se ha notificado que la toxina botulínica inhibe la liberación provocada tanto de glicina como de glutamato en cultivos primarios de neuronas de médula espinal y que en preparaciones de sinaptosoma de cerebro la toxina botulínica inhibe la liberación de cada uno de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina, norepinefrina, CGRP y glutamato.

Puede obtenerse toxina botulínica para su uso en una composición farmacéutica mediante fermentación anaerobia de *Clostridium botulinum* usando una versión modificada del procedimiento de Schantz bien conocido (véase por ejemplo Schantz E.J., *et al.*, Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine, *Microbiol Rev*, Mar de 1992; 56(1):80-99; Schantz E.J., *et al.*, 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), Nueva York, Marcel Dekker; 1994, páginas 41-49, y; Schantz E.J., *et al.*, Use of crystalline type A botulinum toxin in medical research, en: Lewis GE Jr, ed. *Biomedical Aspects of Botulism* (1981) Nueva York, Academic Press, páginas 143-50).

Pueden obtenerse toxinas botulínicas (la molécula de 150 kilodalton) y complejos de toxina botulínica (de 300 kDa a 900 kDa), por ejemplo, de List Biological Laboratories, Inc., Campbell, California; el Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, R.U.; Wako (Osaka, Japón), así como de Sigma Chemicals de St Louis, Missouri. Las composiciones farmacéuticas que contienen toxina botulínica disponibles comercialmente incluyen BOTOX[®] (complejo de neurotoxina purificado de toxina botulínica tipo A con albúmina sérica humana y cloruro de sodio) disponible de Allergan, Inc., de Irvine, California en viales de 100 unidades como polvo liofilizado para reconstituirse con cloruro de sodio al 0,9% antes de su uso, Dysport[®] (complejo de hemaglutinina de toxina tipo A de *Clostridium botulinum* con albúmina sérica humana y lactosa en la composición farmacéutica de toxina botulínica), disponible de Ipsen Limited, Berkshire, R.U. como polvo para reconstituirse con cloruro de sodio al 0,9% antes de su uso, y MyoBloc[™] (una disolución inyectable que comprende toxina botulínica tipo B, albúmina sérica humana, succinato de sodio y cloruro de sodio aproximadamente a pH 5,6), disponible de Solstice Neurosciences (anteriormente disponible de Elan Corporation, Dublín, Irlanda) de San Diego, California.

El éxito de la toxina botulínica tipo A para tratar una variedad de estados clínicos ha conducido al interés en otros serotipos de toxina botulínica. Por tanto, al menos los tipos A, B, E y F de toxinas botulínicas se han usado clínicamente en seres humanos. Adicionalmente, se ha usado toxina botulínica pura (aproximadamente 150 kDa) para tratar seres humanos. Véase, por ejemplo, Kohl A., *et al.*, Comparison of the effect of botulinum toxin A (Botox (R)) with the highly-purified neurotoxin (NT 201) in the extensor digitorum brevis muscle test, *Mov Disord* 2000; 15 (sup. 3): 165. Por tanto, puede prepararse una composición farmacéutica de toxina botulínica usando una toxina botulínica pura (aproximadamente 150 kDa), al contrario que el uso de un complejo de toxina botulínica.

Se sabe que la toxina botulínica de tipo A es soluble en disoluciones acuosas diluidas a pH 4-6,8. A pH superior a

aproximadamente 7 las proteínas no tóxicas estabilizantes se disocian de la neurotoxina, dando como resultado una pérdida gradual de toxicidad, particularmente a medida que aumentan el pH y la temperatura. Schantz E.J., *et al* Preparation and characterization of botulinum toxin type A for human treatment (en particular las páginas 44-45), que es el capítulo 3 de Jankovic, J., *et al*, Therapy with Botulinum Toxin, Marcel Dekker, Inc (1994).

Como con las enzimas, generalmente las actividades biológicas de las toxinas botulínicas (que son peptidasas intracelulares) dependen, al menos en parte, de su conformación tridimensional. Por tanto, la toxina botulínica tipo A se detoxifica mediante calor, diversos productos químicos que estiran la superficie y secan la superficie. Adicionalmente, se sabe que la dilución del complejo de toxina obtenido a partir del conocido cultivo, fermentación y purificación para obtener las concentraciones de toxina muy, muy inferiores usadas para la formulación de composición farmacéutica da como resultado una rápida detoxificación de la toxina a menos que esté presente un agente estabilizante adecuado. La dilución de la toxina desde cantidades de miligramos hasta una disolución que contiene nanogramos por mililitro presenta dificultades significativas debido a la rápida pérdida de toxicidad específica tras tal gran dilución. Dado que la toxina puede usarse meses o años tras formularse la composición farmacéutica que contiene la toxina, la toxina puede estabilizarse con un agente estabilizante tal como albúmina y gelatina.

Se ha notificado que se ha usado una toxina botulínica en diversos entornos clínicos, incluyendo los siguientes:

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

(2) 5-10 unidades de BOTOX[®] por inyección intramuscular para tratar líneas glabellares (frente arrugada) (5 unidades inyectadas por vía intramuscular en el músculo prócer y 10 unidades inyectadas por vía intramuscular en cada músculo corrugador superciliar);

(3) aproximadamente 30-80 unidades de BOTOX[®] para tratar el estreñimiento mediante inyección intraesfínter del músculo puborrectal;

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

(5) para tratar estrabismo, se han inyectado por vía intramuscular en músculos extraoculares entre aproximadamente 1-5 unidades de BOTOX[®], variando la cantidad inyectada basándose tanto en el tamaño del músculo en el que va a inyectarse como en el grado de la parálisis muscular deseada (es decir cantidad de corrección de dioptrías deseada);

(6) para tratar espasticidad de extremidades superiores tras accidente cerebrovascular mediante inyecciones intramusculares de BOTOX[®] en cinco músculos flexores diferentes de extremidades superiores, de la siguiente manera:

(a) flexor profundo de los dedos: de 7,5 U a 30 U

(b) flexor superficial de los dedos: de 7,5 U a 30 U

(c) flexor cubital del carpo: de 10 U a 40 U

(d) flexor radial del carpo: de 15 U a 60 U

(e) bíceps braquial: de 50 U a 200 U.

Se administró la inyección en cada uno de los cinco músculos indicados en la misma sesión de tratamiento, de modo que el paciente recibe desde 90 U hasta 360 U de BOTOX[®] en músculos flexores de extremidad superior mediante inyección intramuscular en cada sesión de tratamiento.

(7) para tratar migrañas, la inyección pericraneal (inyección simétrica en músculos glabellar, frontal y temporal) de 25 U de BOTOX[®] ha mostrado un beneficio significativo como tratamiento profiláctico de migrañas en comparación con vehículo tal como se mide mediante medidas reducidas de frecuencia de migrañas, intensidad máxima, vómitos asociados y uso de medicación agudo a lo largo del periodo de tres meses tras la inyección de 25 U.

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

- Una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica disponible comercialmente se vende con el nombre comercial BOTOX® (disponible de Allergan, Inc., de Irvine, California). BOTOX® consiste en un complejo de toxina botulínica tipo A purificado, albúmina sérica humana y cloruro de sodio envasados en forma estéril, secada a vacío. La toxina botulínica tipo A se prepara a partir de un cultivo de la cepa Hall de *Clostridium botulinum* que se hace crecer en un medio que contiene N-Z amina-caseína y extracto de levadura. El complejo de toxina botulínica tipo A se purifica a partir de la disolución de cultivo mediante una serie de precipitaciones en ácido o ácido y etanol para obtener un complejo cristalino que consiste en la proteína de toxina de alto peso molecular, activa, y una proteína de hemaglutinina asociada. El complejo cristalino se redisuelve en una disolución que contiene solución salina y albúmina y se esteriliza por filtración (0,2 micrómetros) antes del secado a vacío. BOTOX® puede reconstituirse con solución salina estéril, sin conservantes, antes de la inyección intramuscular. Cada vial de BOTOX® contiene aproximadamente 100 unidades (U) de complejo de toxina tipo A de *Clostridium botulinum*, 0,5 miligramos de albúmina sérica humana y 0,9 miligramos de cloruro de sodio en una forma estéril, secada a vacío, sin conservantes.
- Para reconstituir BOTOX® secado a vacío, se usa solución salina normal estéril sin conservantes (inyección de cloruro de sodio al 0,9%) extrayendo la cantidad apropiada de diluyente en la jeringa de tamaño apropiado. Dado que el BOTOX® se desnaturaliza mediante burbujeo o agitación violenta similar, se inyecta suavemente el diluyente en el vial. BOTOX® reconstituido puede almacenarse en una nevera (de 2° a 8°C) y es un líquido transparente, incoloro y libre de material particulado. Hay informes de que BOTOX® reconstituido conserva su potencia durante hasta treinta días. Véase, por ejemplo, Guttman C., Botox retains its efficacy for blepharospasm treatment after freezing and storage, New York investigators find, EuroTimes Nov/Dic de 2000; 5(8):16. El producto secado a vacío se almacena en un congelador a, o por debajo de, -5°C.
- En general, se reconocen cuatro grupos fisiológicos de *C. botulinum* (I, II, III, IV). Los microorganismos que pueden producir una toxina serológicamente distinta pueden proceder de más de un grupo fisiológico. Por ejemplo, las toxinas tipo B y F pueden producirse por cepas del grupo I o II. Además, se han identificado otras cepas de especies clostrídicas (*C. baratii*, tipo F; *C. butyricum*, tipo E; *C. novyi*, tipo C₁ o D) que pueden producir neurotoxinas botulínicas.
- En la tabla I se indican los grupos fisiológicos de los tipos de *Clostridium botulinum*.

Tabla I. Grupos fisiológicos de *Clostridium botulinum*

Grupo	Serotipo de toxina	Bioquímica	Digesto lácteo	Fermentación de glucosa	Lipasa	Fagos y plásmidos	<i>Clostridium</i> fenotípicamente relacionado (no toxigénico)
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 mediante selección a partir del grupo fisiológico apropiado de microorganismos de *Clostridium botulinum*. Los microorganismos designados como grupo I se denominan habitualmente proteolíticos y producen toxinas botulínicas de tipos A, B y F. Los microorganismos designados como grupo II son sacarolíticos y producen toxinas botulínicas de tipos B, E y F. Los microorganismos designados como grupo III sólo producen los tipos C y D de toxina botulínica y se distinguen de los microorganismos de los grupos I y II por la producción de cantidades significativas de ácido propiónico. Los microorganismos del grupo IV sólo producen neurotoxina de tipo G.

- Se conoce obtener una toxina tetánica usando medios específicos sustancialmente libres de productos animales. Véase por ejemplo la patente estadounidense 6.558.926. Pero, de manera notable, incluso los medios "libres de productos animales" dados a conocer por esta patente usan peptona Bacto, un digesto cárnico. Significativamente, la producción de toxina tetánica por *Clostridium tetani* frente a la producción de una toxina botulínica por una bacteria *Clostridium botulinum* conlleva crecimiento, medios y parámetros de fermentación y consideraciones diferentes. Véase, por ejemplo, Johnson, E.A., et al., *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective, Toxicon 39 (2001), 1703-1722.

- Por tanto, lo que se necesitan son medios y procedimientos que estén libres o sustancialmente libres de productos animales, tales como proteínas derivadas de animales, para obtener o producir toxina botulínica biológicamente

activa.

El documento US-B-6.558.926 da a conocer un método para la producción de toxina tetánica que comprende las etapas de proporcionar un medio de fermentación que está sustancialmente libre de productos derivados de animales y comprende un producto de proteína derivado de un vegetal, cultivar un microorganismo de la especie *Clostridium tetani* en el medio de fermentación, y recuperar toxina tetánica. El método también puede incluir una etapa previa a la fermentación que implica cultivar el microorganismo *Clostridium tetani* en un medio de sembrado que está sustancialmente libre de productos derivados de animales y comprende un producto de proteína derivado de un vegetal.

El documento WO-A-96/05222 da a conocer un método para producir toxina botulínica tipo G que comprende las etapas de cultivar *Clostridium botulinum* tipo G para producir un caldo de cultivo, y purificar la toxina ajustando el pH del caldo a aproximadamente 3,4 para precipitar la toxina y someter la toxina a cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de exclusión molecular.

Sumario

La presente invención cumple esta necesidad y proporciona un procedimiento que está libre o sustancialmente libre de productos animales, tales como proteínas derivadas de animales, para obtener o producir una toxina botulínica biológicamente activa. La toxina botulínica obtenida puede usarse para preparar composiciones farmacéuticas con el principio activo toxina botulínica.

Definiciones

Tal como se usan en el presente documento, las palabras o los términos expuestos a continuación tienen las siguientes definiciones.

“Administración” o “administrar” significa la etapa de dar (es decir administrar) una composición farmacéutica a un sujeto. Las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento se “administran localmente”, por ejemplo, mediante vías de administración intramuscular (i.m.), intradérmica, administración subcutánea, administración intratecal, intracraneal, administración intraperitoneal (i.p.), tópica (transdérmica) y de implantación (es decir de un dispositivo de liberación lenta tal como implante polimérico o minibomba osmótica).

“Libre de productos animales” o “sustancialmente libre de productos animales” abarca, respectivamente, “libre de proteínas animales” o “sustancialmente libre de proteínas animales” y significa la ausencia o ausencia sustancial de hemoderivados, combinaciones de sangre y otros productos o compuestos derivados de animales. “Animal” significa un mamífero (tal como un ser humano), ave, reptil, pez, insecto, arácnido u otra especie animal. “Animal” excluye microorganismos, tales como bacterias. Por tanto, un medio o procedimiento libre de productos animales o un medio o procedimiento sustancialmente libre de productos animales dentro del alcance de la presente invención puede incluir una toxina botulínica o una bacteria *Clostridium botulinum*. Por ejemplo, un procedimiento libre de productos animales o un procedimiento sustancialmente libre de productos animales significa un procedimiento que está o bien sustancialmente libre o esencialmente libre o bien totalmente libre de proteínas derivadas de animales, tales como inmunoglobulinas, digesto cárnico, subproductos cárnicos y leche o productos o digestos lácteos. Por tanto, un ejemplo de un procedimiento libre de productos animales es un procedimiento (tal como un procedimiento de cultivo bacteriano o de fermentación bacteriana) que excluye productos cárnicos y lácteos o subproductos cárnicos o lácteos.

“Toxina botulínica” significa una neurotoxina producida por *Clostridium botulinum*, así como toxinas botulínicas modificadas, recombinantes, híbridas y quiméricas. Una toxina botulínica recombinante puede tener la cadena ligera y/o la cadena pesada de la misma producida de manera recombinante por una especie no clostrídica. “Toxina botulínica”, tal como se usa en el presente documento, abarca los serotipos A, B, C, D, E, F y G de toxina botulínica. “Toxina botulínica”, tal como se usa en el presente documento, también abarca tanto un complejo de toxina botulínica (es decir los complejos de 300, 600 y 900 kDa) así como toxina botulínica pura (es decir la molécula neurotóxica de aproximadamente 150 kDa), siendo útiles todos ellos en la práctica de la presente invención. “Toxina botulínica purificada” significa una toxina botulínica pura o un complejo de toxina botulínica que está aislado, o sustancialmente aislado, de otras proteínas e impurezas que pueden acompañar a la toxina botulínica cuando se obtiene de un procedimiento de cultivo o fermentación. Por tanto, una toxina botulínica purificada puede tener al menos el 90%, preferiblemente más del 95%, y lo más preferiblemente más del 99% de las proteínas distintas de toxina botulínica e impurezas eliminadas. Las citotoxinas botulínicas C₂ y C₃, al no ser neurotoxinas, se excluyen del alcance de la presente invención.

“Neurotoxina clostrídica” significa una neurotoxina producida a partir de, o nativa para, una bacteria clostrídica, tal como *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* o *Clostridium beratti*, así como una neurotoxina clostrídica preparada de manera recombinante por una especie no clostrídica.

“Totalmente libre” (es decir terminología de tipo “que consiste en”) significa que dentro del intervalo de detección del

instrumento o procedimiento que está usándose, no puede detectarse la sustancia o no puede confirmarse su presencia.

5 “Esencialmente libre” (o “que consiste esencialmente en”) significa que sólo pueden detectarse cantidades traza de la sustancia.

10 “Toxina botulínica modificada” significa una toxina botulínica en la que se ha delecionado, modificado o sustituido al menos uno de sus aminoácidos, en comparación 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 preparada 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 neurotransmisor a partir 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 serotipo A), y una cadena pesada de un serotipo de toxina botulínica diferente (tal como serotipo B). Otro ejemplo de una toxina botulínica modificada es una toxina botulínica acoplada a un neurotransmisor, tal como la sustancia P.

20 “Paciente” significa un sujeto humano o no humano que recibe atención médica o veterinaria. Por consiguiente, tal como se da a conocer en el presente documento, las composiciones pueden usarse en el tratamiento de cualquier animal, tal como mamíferos.

25 “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 componente adicional (tal como una albúmina y/o cloruro de sodio) en la composición farmacéutica además de un principio activo de neurotoxina. Por tanto, una composición farmacéutica es una formulación que es adecuada para su administración para diagnóstico, terapéutica o cosmética (es decir mediante inyección intramuscular o subcutánea o mediante 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 a vacío; una disolución formada tras la reconstitución de la composición farmacéutica liofilizada o secada a vacío con solución salina o agua, o; como disolución que no requiere reconstitución. El principio activo puede ser uno de los serotipos A, B, C₁, D, E, F o G de toxina botulínica o una toxina botulínica, pudiendo producirse todos ellos de manera nativa por bacterias clostrídicas. Tal como se menciona, una composición farmacéutica puede ser líquida o sólida, por ejemplo secada a vacío. Los componentes constituyentes de una composición farmacéutica pueden incluirse en una única composición (es decir todos los componentes constituyentes, excepto cualquier fluido de reconstitución requerido, están presentes en el momento de la elaboración inicial de la composición farmacéutica) o como un sistema de dos componentes, por ejemplo una composición secada a vacío reconstituida con un diluyente tal como solución salina, diluyente que contiene un componente que no está presente en la elaboración inicial de la composición farmacéutica. Un sistema de dos componentes proporciona el beneficio de permitir la incorporación de componentes que no son suficientemente compatibles para un almacenamiento a largo plazo con el primer componente del sistema de dos componentes. Por ejemplo, el vehículo o diluyente de reconstitución puede incluir un conservante que proporciona protección suficiente frente al crecimiento microbiano durante el periodo de uso, por ejemplo una semana de almacenamiento refrigerado, pero no está presente durante el periodo de almacenamiento en congelador de dos años, tiempo durante el cual podría degradar la toxina. De esta manera pueden incorporarse otros componentes que pueden no ser compatibles con una toxina clostrídica u otros componentes durante periodos de tiempo prolongados; es decir, se añaden en un segundo vehículo (es decir en el fluido de reconstitución) en el momento aproximado de uso. En la publicación de patente estadounidense 2003 0118598 A1 se dan a conocer métodos para formular una composición farmacéutica con principio activo de toxina botulínica.

50 “Sustancialmente libre” significa presente a un nivel inferior al uno por ciento en peso de la composición farmacéutica.

“Formulación terapéutica” significa una formulación que puede usarse para tratar y de ese modo aliviar un trastorno o una enfermedad, tal como un trastorno o una enfermedad caracterizada por hiperactividad (es decir espasticidad) de un músculo periférico.

55 La presente invención proporciona un método para obtener una toxina botulínica biológicamente activa, que comprende las etapas de:

60 (a) obtener un medio de cultivo que está sustancialmente libre de productos derivados de animales y comprende el 4-8% en peso de un derivado de soja, y cultivar una bacteria *Clostridium botulinum* en el medio de cultivo;

(b) proporcionar un medio de fermentación que está sustancialmente libre de productos derivados de animales y comprende:

65 (i) el 4-8% en peso de un derivado de soja,

(ii) el 0-3% en peso de un extracto de levadura, y

(iii) el 1-2% en peso de glucosa;

5 (c) fermentar la bacteria *Clostridium botulinum* en el medio de fermentación en condiciones que permiten la producción de una toxina botulínica, incluyendo:

(i) llevar a cabo la etapa de fermentación a un pH de entre 5,0 y 5,5 tras el crecimiento celular inicial,

10 (ii) llevar a cabo la etapa de fermentación durante entre 45 horas y 75 horas,

(iii) llevar a cabo la etapa de fermentación a una temperatura de entre 33°C y 36°C, y

(iv) llevar a cabo la etapa de fermentación en una atmósfera anaerobia; y

15 (d) recuperar una toxina botulínica biológicamente activa del medio de fermentación, en el que la etapa de recuperación es un procedimiento de purificación libre de productos animales.

Dibujos

20 Mediante los siguientes dibujos se explican o ilustran aspectos de la invención.

25 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 toxina botulínica determinada como: (1) en el eje Y del lado izquierdo la dosis letal para ratones 50 (DLR₅₀), y (2) en el eje Y del lado izquierdo la actividad de SNAP 25 de diversos medios APF en los tiempos de fermentación transcurridos mostrados en la parte superior de las barras, para el pH de medio APF tal como se muestra en el eje Y del lado derecho del pH, para medios APF con la cantidad en % en peso de concentrado de soja hidrolizado y concentrado de extracto de levadura tal como se muestra en el eje X. Todos los medios de la figura 1 también contenían glucosa al 1% en peso.

30 La figura 2 es un diagrama de flujo de resumen que compara un procedimiento distinto de APF para obtener una toxina botulínica (la mitad superior de la figura 1) con un procedimiento APF, dentro del alcance de la presente invención, para obtener una toxina botulínica (la mitad inferior de la figura 2), a través de las etapas de creación de un banco de células, cultivo y fermentación. La figura 2 omite las etapas de recogida y purificación.

35 La figura 3 es un gráfico que compara el efecto de la 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 glucosa al 1% en peso y el 1% en peso de un extracto de levadura. En la figura 3 el eje X representa la concentración en porcentaje en peso en el medio de fermentación de una proteína de soja hidrolizada particular (HySoy), el eje Y del lado izquierdo representa la potencia del complejo de toxina botulínica purificado final y el eje Y del lado derecho representa el porcentaje de lisis celular completada, determinado mediante la ecuación:

$$\text{Lisis celular (\%)} = \frac{\text{DO}_{600 \text{ max}} - \text{DO}_{600 \text{ punto final}}}{\text{DO}_{600 \text{ max}}} \times 100$$

45 donde DO_{600 max} corresponde a la densidad óptica medida a 600 nm en el momento de crecimiento máximo, y DO_{600 punto final} es en el momento de la recogida de la fermentación.

Descripción

50 La presente invención se basa en el descubrimiento de un procedimiento que está libre o sustancialmente libre de un producto animal o un subproducto animal, para el cultivo y la fermentación de bacteria *Clostridium botulinum* para producir toxina botulínica biológicamente activa. La toxina botulínica obtenida puede usarse para preparar composiciones farmacéuticas con principio activo de toxina botulínica. Por tanto, en el presente documento se dan a conocer medios de crecimiento que tienen niveles significativamente reducidos de subproductos cárnicos o lácteos. Los medios están sustancialmente libres de tales productos animales.

55 La presente invención abarca el sorprendente hallazgo de que no se requieren productos basados en animales en medios para el crecimiento de *Clostridium botulinum*, y particularmente que productos basados en vegetales pueden sustituir a productos basados en animales normalmente empleados en tales medios para el crecimiento de *Clostridium botulinum*.

60 Los medios que se usan actualmente para el crecimiento y la fermentación de bacterias comprenden habitualmente uno o más componentes derivados de animales, tales como carne cocinada. Según la invención, los medios preferidos para el crecimiento de *Clostridium botulinum* contienen componentes derivados de animales que

comprenden no más de aproximadamente el cinco a aproximadamente el diez por ciento del peso total de los medios. Más preferiblemente, los medios dentro del alcance de la invención comprenden no más de aproximadamente el uno a menos de aproximadamente el cinco por ciento del peso total de los medios de productos derivados de animales. Lo más preferiblemente, todos los medios y cultivos usados para el crecimiento de *Clostridium botulinum* para la producción de toxina botulínica están completamente libres de productos derivados de animales. Estos medios incluyen, pero no se limitan a, medios para fermentación a pequeña y gran escala de *Clostridium botulinum*, medios para el crecimiento de cultivos de *Clostridium botulinum* usados para inocular los medios de siembra (primeros) y medios de fermentación (segundos), así como medios usados para el almacenamiento a largo plazo de cultivos de *Clostridium botulinum* (por ejemplo cultivos de reserva).

Los medios para el crecimiento de *Clostridium botulinum* y la producción de toxina botulínica comprenden productos basados en soja para sustituir los productos derivados de animales. Preferiblemente, estos medios incluyen productos derivados de semilla de soja que están hidrolizados y que son solubles en agua. Sin embargo, también pueden usarse productos de soja insolubles en la presente invención para sustituir a productos animales. Los productos derivados de animales comunes que pueden sustituirse por productos de soja incluyen infusión de corazón de ternera (BHI), productos de peptona derivados de animales, tales como peptona Bacto, caseínas hidrolizadas y subproductos lácteos tales como leche de animales.

Preferiblemente los medios que contienen productos basados en soja para el crecimiento de *Clostridium botulinum* son similares a los medios de crecimiento comúnmente usados que contienen productos derivados de animales excepto porque sustancialmente todos los productos derivados de animales se sustituyen por productos derivados de vegetales. Por ejemplo, los medios de fermentación a base en soja pueden comprender un producto basado en soja, una fuente de carbono tal como glucosa, sales tales como NaCl y KCl, componentes que contienen fosfato tales como Na₂HPO₄, KH₂PO₄, cationes divalentes tales como hierro y magnesio, polvo de hierro y aminoácidos tales como L-cisteína y L-tirosina. Los medios usados para hacer crecer cultivos de *Clostridium botulinum* para la inoculación (es decir el medio de siembra o primero) de los medios de fermentación (segundos) contienen preferiblemente al menos un producto basado en soja, una fuente de sal tal como NaCl y una fuente de carbono tal como glucosa.

La presente invención proporciona un método para el crecimiento de *Clostridium botulinum* que maximiza la producción de una toxina botulínica usando medios que están sustancialmente libres de productos derivados de animales. El crecimiento de *Clostridium botulinum* para la producción de toxina botulínica puede tener lugar mediante fermentación en medios que contienen subproductos de soja que sustituyen a componentes derivados de subproductos animales. El inoculante para el medio de fermentación puede derivarse de un medio de crecimiento a menor escala (un medio de siembra). Dependiendo del tamaño y el volumen de la etapa de fermentación, puede variar el número de crecimientos sucesivos en medios de siembra para aumentar la biomasa del cultivo. Para hacer crecer una cantidad adecuada de *Clostridium botulinum* para inocular el medio de fermentación, pueden realizarse una etapa o múltiples etapas que implican crecimiento en un medio de siembra. Para un método de crecimiento de *Clostridium botulinum* que está libre de productos derivados de animales, es preferible que el crecimiento de *Clostridium botulinum* se origine de un cultivo almacenado en medios no derivados de animales. El cultivo almacenado, preferiblemente liofilizado, se produce mediante crecimiento en medios que contienen proteínas derivadas de soja y que carecen de subproductos animales. El crecimiento de *Clostridium botulinum* en un medio de fermentación puede tener lugar mediante inoculación directamente a partir de un cultivo almacenado, liofilizado.

En una realización preferida de la presente invención, el crecimiento de *Clostridium botulinum* se desarrolla en dos fases: crecimiento de siembra y fermentación. Estas dos fases se llevan a cabo en entornos anaerobios. La fase de crecimiento de siembra se usa generalmente para "aumentar a escala" la cantidad del microorganismo a partir de un cultivo almacenado. El propósito de la fase de crecimiento de siembra es aumentar la cantidad del microorganismo disponible para la fermentación. Además, la fase de crecimiento de siembra permite rejuvenecer microbios relativamente latentes en cultivos almacenados y hacerlos crecer para dar cultivos en crecimiento activo. Además, el volumen y la cantidad de microorganismos viables usados para inocular el cultivo de fermentación pueden controlarse con mayor precisión a partir de un cultivo en crecimiento activo que a partir de un cultivo almacenado. Además, puede usarse cualquier número de etapas consecutivas que implican crecimiento en medios de siembra para aumentar a escala la cantidad de *Clostridium botulinum* para la inoculación del medio de fermentación. Se indica que el crecimiento de *Clostridium botulinum* en la fase de fermentación puede desarrollarse directamente a partir del cultivo almacenado mediante inoculación directa.

En la fase de fermentación, se usa una parte de un medio de siembra o la totalidad de un medio de siembra que contiene *Clostridium botulinum* a partir del crecimiento de siembra para inocular un medio de fermentación. Preferiblemente, se usa aproximadamente el 2-4% de un medio de siembra que tiene *Clostridium botulinum* a partir de la fase de crecimiento de siembra para inocular el medio de fermentación. Se usa la fermentación para producir la cantidad máxima de microbios en un entorno anaerobio a gran escala (Ljungdahl *et al.*, Manual of industrial microbiology and biotechnology (1986), editado por Demain *et al.*, American Society for Microbiology, Washington, D.C. página 84).

Puede aislarse una toxina botulínica y purificarse usando métodos de purificación de proteínas bien conocidos por

los expertos habituales en la técnica de purificación de proteínas. Véase, por ejemplo, Coligan *et al.* Current Protocols in Protein Science, Wiley & Sons; Ozutsumi *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 49; 939-943:1985.

5 Para la producción de toxina botulínica, pueden hacerse crecer cultivos de *Clostridium botulinum* en un medio de siembra para la inoculación del medio de fermentación. El número de etapas sucesivas que implican crecimiento en un medio de siembra puede variar dependiendo de la escala de la producción de toxina botulínica en la fase de fermentación. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente, el crecimiento en la fase de fermentación puede desarrollarse directamente desde la inoculación a partir de un cultivo almacenado. Los medios de siembra basados en animales comprenden generalmente BHI, peptona Bacto, NaCl y glucosa para el crecimiento de *Clostridium botulinum*. Tal como se comentó anteriormente, según la presente invención se preparan medios de siembra alternativos en los que se sustituyen componentes basados en animales por componentes no basados en animales. Productos basados en soja pueden sustituir a BHI y peptona Bacto en el medio de siembra para el crecimiento de *Clostridium botulinum* y la producción de toxina botulínica. Preferiblemente, el producto basado en soja es soluble en agua y comprende soja hidrolizada, aunque los cultivos de *Clostridium botulinum* pueden crecer en medios que contienen soja insoluble. Sin embargo, los niveles de crecimiento y posterior producción de toxina son mayores en medios derivados de productos de soja solubles.

20 Puede usarse cualquier fuente de productos basados en soja según la presente invención. Preferiblemente, la soja es soja hidrolizada y la hidrolización se llevó a cabo usando enzimas no animales. Hay fuentes de soja hidrolizada disponibles de una variedad de proveedores comerciales. Estas incluyen, pero no se limitan a, Hy-Soy (Quest International), peptona de soja (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). Lo más preferiblemente, la fuente de soja hidrolizada es Hy-Soy o SE50MK. Se conocen otras posibles fuentes de soja hidrolizada.

25 Preferiblemente, la concentración de NaCl en el medio de siembra es de entre 0,1-2,0 g/l. Preferiblemente, la concentración de NaCl es de 0,2-1,0 g/l. Lo más preferiblemente, la concentración de NaCl en el medio de siembra es de aproximadamente 0,5 g/l. La concentración de glucosa oscila preferiblemente entre 0,1 g/l y 5,0 g/l. Más preferiblemente, la concentración de glucosa es de 0,5-2,0 g/l. Lo más preferiblemente, la concentración de glucosa en el medio de siembra es de aproximadamente 1,0 g/l. También se prefiere, pero no es necesario para la presente invención, que la glucosa se esterilice mediante tratamiento en autoclave junto con los demás componentes del medio de siembra. El nivel de pH del medio de siembra antes del crecimiento puede ser de 7,5-8,5. Por ejemplo, el pH del medio de siembra antes del crecimiento de *Clostridium botulinum* puede ser de aproximadamente 8,1.

35 El crecimiento de *Clostridium botulinum* en el medio de siembra puede desarrollarse en una o más fases. Preferiblemente, el crecimiento en el medio de siembra se desarrolla en dos fases. En la fase uno, se suspende un cultivo de *Clostridium botulinum* en una cantidad de medio de siembra y se incuba a $34\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-48 horas en un entorno anaerobio. Preferiblemente, el crecimiento en la fase uno se desarrolla durante aproximadamente 48 horas. En la fase dos, se usa una parte o la totalidad del medio de la fase uno que contiene *Clostridium botulinum* para inocular un medio de siembra de la fase dos para el crecimiento adicional. Tras la inoculación, se incuba el medio de la fase dos a $34\pm 1^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 1-4 días también en un entorno anaerobio. Preferiblemente, el crecimiento en el medio de siembra de la fase dos se desarrolla durante aproximadamente 3 días. También es preferible que el crecimiento en medios de siembra en cualquier fase no dé como resultado lisis celular antes de la inoculación de medios de fermentación con el crecimiento final en el medio de siembra.

45 Los medios de fermentación convencionales que contienen subproductos animales para el crecimiento de *Clostridium botulinum* pueden basarse en una receta de Mueller y Miller (MM; J. Bacteriol. 67:271, 1954). Los componentes en los medios MM que contienen subproductos animales incluyen BHI y NZ-CaseTT. NZ-CaseTT es una fuente disponible comercialmente de péptidos y aminoácidos que se derivan de la digestión enzimática de caseínas, un grupo de proteínas encontrado en la leche de animales. La presente invención demuestra que BHI y NZ-CaseTT pueden sustituirse por productos no basados en animales en medios de fermentación. En particular, productos basados en soja pueden sustituir a componentes basados en animales de medios MM usados para la fermentación de *Clostridium botulinum*. Preferiblemente, los productos basados en soja son solubles en agua y se derivan de soja hidrolizada, aunque, tal como se comentó anteriormente, también pueden usarse productos de soja insolubles para poner en práctica la presente invención.

55 Según la presente invención puede usarse cualquier fuente de productos basados en soja. Preferiblemente, la soja hidrolizada se obtiene de Quest International (Sheffield) con el nombre comercial Hy-Soy, o de DMV International Nutritionals (Fraser, N.Y.) con el nombre comercial SE50MK. También pueden obtenerse productos de soja solubles de una variedad de fuentes incluyendo, pero sin limitarse a, peptona de soja (Gibco), Bac-soytone (Difco), AMISOY (Quest), NZ-Soy (Quest), NZ-Soy BL4, NZ-Soy BL7 y SE50MK (DMV International Nutritionals, Fraser, N.Y.).

65 En otra realización preferida de la presente invención, el medio usado para la fermentación de *Clostridium botulinum* está libre de subproductos animales y comprende soja hidrolizada, glucosa, NaCl, Na_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , L-cisteína, L-tirosina y hierro en polvo. Tal como se dio a conocer para el medio de siembra, la soja hidrolizada puede sustituir a subproductos animales en el medio de fermentación. Estos subproductos animales incluyen BHI y NZ-Case TT (caseína digerida enzimáticamente).

5 Para la producción máxima de toxina botulínica, concentraciones particularmente preferidas de componentes en el medio de fermentación son aproximadamente 5,0 g/l de NaCl; 0,5 g/l de Na₂HPO₄; 175 mg/l de KH₂PO₄; 50 mg/l de MgSO₄·7H₂O; 125 mg/l de L-cisteína; y 125 mg/l de L-tirosina. La cantidad de hierro en polvo usada puede oscilar entre 50 mg/l y 2000 mg/l. Preferiblemente, la cantidad de hierro en polvo oscila entre aproximadamente 100 mg/l y 1000 mg/l. Lo más preferiblemente, la cantidad de hierro en polvo usada en medios de fermentación oscila entre aproximadamente 200 mg/l y 600 mg/l.

10 Para niveles óptimos de producción de toxina, el pH inicial (antes del tratamiento en autoclave) de los medios de fermentación basados en soja oscila preferiblemente entre aproximadamente 5,0 y 7,1. Se encontró que el control del pH mejora la recuperación de toxina botulínica. Preferiblemente, el pH inicial del medio de fermentación es de aproximadamente pH 7. Tal como se explica en el ejemplo 7, se ha encontrado que puede obtenerse un alto rendimiento de toxina botulínica estable si posteriormente se reduce el pH a, y se mantiene entre, pH 5-5,5. Tal como se describió para el medio de siembra, los componentes del medio de fermentación, incluyendo glucosa y hierro, se someten preferiblemente juntos a tratamiento en autoclave para la esterilización.

15 Preferiblemente, una parte del medio de siembra de la segunda fase usado para el crecimiento de *Clostridium botulinum* se usa para inocular el medio de fermentación. Puede monitorizarse el crecimiento bacteriano midiendo la densidad óptica (D.O.) del medio. Preferiblemente se detiene la fermentación después de que la lisis celular haya avanzado durante al menos 48 horas tal como se determina mediante la medición del crecimiento (densidad óptica). A medida que se lisan las células, la D.O. del medio disminuye.

20 En una realización preferida de la presente invención, se hacen crecer cultivos de *Clostridium botulinum* usados para el almacenamiento a largo plazo de *Clostridium botulinum* y la inoculación del medio de siembra y se liofilizan en leche de soja antes del almacenamiento a 4°C. Para la producción de toxina botulínica también pueden usarse cultivos de *Clostridium botulinum* en leche de animales liofilizados para el almacenamiento. Sin embargo, para mantener medios que están sustancialmente libres de subproductos animales a lo largo de toda la producción de toxina botulínica, se prefiere conservar el cultivo inicial de *Clostridium botulinum* en leche de soja y no en leche de animales.

30 Ejemplos

Los siguientes ejemplos exponen métodos específicos abarcados por la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Pueden obtenerse cultivos de *Clostridium botulinum* de varias fuentes, incluyendo List Laboratories, Campbell, California. En todos los ejemplos a continuación "*Clostridium botulinum*" significa la cepa Hall A (número de denominación de ATCC, 3502) de *Clostridium botulinum* tipo A.

Ejemplo 1

40 Preparación de un medio de siembra libre de productos animales para *Clostridium botulinum*

Puede prepararse un medio de siembra control usando los siguientes componentes por cada litro de medio: NaCl (5 g), peptona Bacto (10 g), glucosa (10 g), BHI (hasta 1 litro), pH 8,1 (ajustado con NaOH 5 N).

45 Puede prepararse un medio de siembra (libre de productos animales) de prueba usando los siguientes componentes por cada litro de medio: NaCl (5 g), peptona de soja (10 g), glucosa (10 g), Hy-Soy (35 g/litro, para constituir 1 litro de fluido de medios), pH 8,1 (ajustado con NaOH 5 N).

Ejemplo 2

50 Cultivar *Clostridium botulinum* en un medio de siembra libre de productos animales

Puede suspenderse un cultivo liofilizado de *Clostridium botulinum* en 1 ml de cada uno del medio de siembra control y de prueba del ejemplo 1, dividido (cada medio de siembra) en dos tubos, pudiendo contener cada uno 10 ml de los medios de siembra respectivos, y después se incuba a 34°C durante aproximadamente 24-48 horas. Entonces puede usarse un ml de cultivo para inocular un frasco de cultivo DeLong Bellco de 125 ml que contiene 40 ml de los medios de siembra (respectivos). Puede incubarse el cultivo inoculado a 33°C ±1°C durante 24 horas en una cámara anaerobia Coy (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, Mich.).

60 Ejemplo 3

Preparación de medios de fermentación libres de productos animales para *Clostridium botulinum*

65 Puede prepararse un medio de fermentación basal usando los siguientes componentes por cada dos litros de medio: glucosa (15 g), NaCl (10 g), NaH₂PO₄ (1 g), KH₂PO₄ (0,350 g), MgSO₄·7H₂O (0,1 g), cisteína-HC (0,250 g), tirosina-HCl (0,250 g), hierro en polvo (1 g), ZnCl₂ (0,250 g) y MnCl₂ (0,4 g).

Puede prepararse un medio de fermentación control usando los siguientes componentes por cada dos litros de medio preparado: BHI (500 ml; esto corresponde a aproximadamente 45,5 gramos de peso seco de infusión de corazón de ternera), NZ-CaseTT (30 g) y medio basal (hasta 2 litros), pH 6,8.

5 Puede prepararse en primer lugar el medio de fermentación basal y ajustarse su pH a pH 6,8. Entonces puede prepararse infusión de corazón de ternera (BHI) y ajustarse su pH a 6,8 con NaOH 5 N. Entonces puede añadirse el BHI al medio basal. A continuación, puede prepararse NZ-CaseTT. Entonces se añade NZ-Case TT al medio basal al que ya se le ha añadido la infusión de corazón de ternera, y se disuelve mediante adición de HCl. Entonces puede
10 ajustarse el pH a 6,8 con NaOH 5 N. Entonces puede separarse este medio en porciones de 8 ml a cada uno de dieciséis tubos de ensayo de 100 mm, seguido por tratamiento en autoclave durante 25 minutos a 120°C.

15 Puede prepararse un medio de fermentación de prueba (libre de productos animales) sustituyendo al BHI presente en el medio de fermentación control por una fuente de nitrógeno de prueba. Las fuentes de nitrógeno de medio de fermentación de prueba adecuadas 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), peptona de soja (Gibco), Bacto-Soyton (Difco), Nutrisoy 2207 (ADM), Bakes Nutrisoy (ADM), harina de Nutrisoy, harina de semilla de soja, extracto de levadura Bacto (Difco), extracto de levadura (Gibco), Hy-Yest 412 (Quest), Hy-Yest 441 (Quest), Hy-Yest 444 (Quest), Hy-Yest (455 (Quest), extracto de malta Bacto (Difco), maíz fermentado y Proflo (Traders).

20 Puede prepararse el medio de fermentación de prueba tal como se expuso anteriormente para un medio de fermentación control excepto porque se excluye BHI y puede ajustarse en primer lugar la fuente de nitrógeno relevante a pH 6,8 con HCl 3 N o con NaOH 5 N. Pueden asignarse los medios en porciones de 8 ml a dieciséis tubos de ensayo de 100 mm, seguido por tratamiento en autoclave durante 20-30 minutos a 120°C.

25 Ejemplo 4

Crecimiento de *Clostridium botulinum* en un medio de fermentación libre de productos animales

30 Puede usarse una porción de 40 µl del cultivo en medio de siembra de prueba (libre de productos animales) para inocular cada alícuota de 8 ml de medio de fermentación control o de prueba en un tubo de ensayo de 8 ml, 16 X 100 mm. Entonces pueden incubarse los cultivos a 33±1°C durante 24 horas. Entonces pueden incubarse los tubos en una cámara anaerobia para permitir el crecimiento de la bacteria. Cada ensayo de medio puede realizarse por triplicado (es decir, puede implicar tres inoculaciones independientes del mismo medio), y también puede incluir un control no inoculado, que puede usarse como blanco para el espectrofotómetro. Puede medirse el crecimiento (determinado mediante densidad óptica, DO) cada 24 horas con un espectrofotómetro Turner (modelo 330) a 660 nm. Debe detenerse el cultivo después de que la lisis celular hay durado aproximadamente 48 horas y entonces puede medirse la producción de toxina botulínica.

40 Pueden llevarse a cabo experimentos adicionales con un medio de fermentación de Hy-Soy que contiene los siguientes componentes por cada 500 ml del medio: Hy-Soy (17,5 g), glucosa (3,75 g); NaCl (2,5 g); Na₂HPO₄ (0,25 g), MgSO₄·7H₂O (0,025 g), KH₂PO₄ (0,0875 g), L-cisteína (0,0625 g), L-tirosina (0,0625 g), hierro en polvo (0,25 g), pH 6,8.

45 Ejemplo 5

Determinación de la producción de toxina botulínica por *Clostridium botulinum* que se hace crecer en un medio de fermentación libre de productos animales

50 Pueden centrifugarse las células cultivadas del ejemplo 4, y entonces determinarse el pH del sobrenadante. Pueden medirse los niveles de toxina botulínica en una muestra dada añadiendo una antitoxina convencional y midiendo el tiempo transcurrido antes de la floculación. Pueden determinarse tanto la Kf (el tiempo requerido para que se produzca la floculación, en minutos) como el Lf (el límite de floculación; equivalente a 1 unidad internacional de antitoxina convencional, establecido mediante floculación). Pueden tomarse 4 ml de caldo de fermentación de cada tubo de fermentación para un cultivo dado, y pueden combinarse entre sí de modo que puede mezclarse un total de 12 ml en un tubo de centrifuga de 15 ml. Pueden centrifugarse los tubos a 5000 rpm (3400g) durante 30 min a 4°C. Pueden añadirse alícuotas de 1 ml de sobrenadante a tubos que contienen 0,1-0,6 ml de antisuero frente a toxina botulínica convencional, y pueden agitarse cuidadosamente los tubos para mezclar sus contenidos. Entonces pueden colocarse los tubos en un baño de agua a 45±1°C y registrarse el tiempo inicial. Pueden comprobarse los tubos con frecuencia y puede registrarse el tiempo al que comienza la floculación como Kf. La concentración de toxina en el tubo en el que puede iniciarse la floculación en primer lugar puede denominarse LFFF. La concentración de toxina en el tubo en el que puede iniciarse la floculación en segundo lugar puede denominarse LFF.

65 Pueden llevarse a cabo ensayos paralelos de fermentación, crecimiento y producción de toxina tanto para: (a) el medio de siembra control (usado para inocular el medio de fermentación control) y el medio de fermentación control, como para; (2) el medio de siembra de prueba (libre de productos animales) (usado para inocular el medio de

fermentación de prueba) y el medio de fermentación de prueba (libre de productos animales). Significativamente, puede determinarse que la fermentación de *Clostridium botulinum* en medios libres de productos animales e inoculados a partir de cultivos también libres de productos animales (con productos basados en soja que sustituyen a los productos animales) puede dar como resultado un $L_{f_{toxina}}$ de aproximadamente 50 o más. Como mínimo, el $L_{f_{toxina}}$ es igual a aproximadamente 10. Preferiblemente el $L_{f_{toxina}}$ es de al menos 20. Lo más preferiblemente el $L_{f_{toxina}}$ es superior a 50.

Adicionalmente, puede determinarse que diversos productos de soja soportan el crecimiento de *Clostridium botulinum* en medios de fermentación que carecen de BHI. Por tanto, preparaciones de soja soluble pueden sustituir a BHI para el crecimiento de *Clostridium botulinum*. La mejor concentración puede ser de 12,5 ó 25 g/l. Hy-Soy (Sheffield) puede dar el mayor crecimiento. Las preparaciones de soja insoluble pueden ser menos eficaces.

Además, pueden obtenerse resultados para mostrar que Hy-Soy de Quest, SE50MK de DMV y NZ-Soy de Quest pueden ser productos de soja eficaces en cuanto a su capacidad para sustituir a BHI para el crecimiento 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 también pueden ser eficaces para sustituir a BHI para la producción de toxina. El mejor producto de soja para la producción de toxina puede ser Hy-Soy de Quest a 22,75 g/l. Concentraciones superiores de este producto pueden producir un mejor crecimiento pero no mejorar la producción de toxina. Se propone que pueden obtenerse resultados similares con SE50MK, para el que una concentración superior puede generar un aumento del crecimiento, pero no aumentar la producción de toxina. Por otro lado, NZ-Soy puede dar un crecimiento superior y una producción de toxina superior a su concentración superior.

Finalmente, puede determinarse que productos de soja pueden sustituir eficazmente a BHI así como a NZ-CaseTT. La eliminación de NZ-CaseTT de 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 sustituir tanto a BHI como a NZ-CaseTT para la producción de toxina. Sin embargo, puede ser necesario un ciclo de fermentación más largo de 1 ó 2 días. Hy-Soy puede sustituir tanto a BHI como a NZ-CaseTT en medios para la producción de toxina. Sin embargo, puede determinarse que los extractos de levadura pueden ser inhibidores para la producción de toxina.

Puede determinarse que Hy-Soy a 22,75 g/l puede sustituir completamente tanto a BHI como a HY-CaseTT para la producción de toxina. Al contrario que el efecto sobre el crecimiento en el que Hy-Soy 56,88 g/l puede ser lo mejor, Hy-Soy 34,13 g/l puede ser lo mejor para la fase de producción de toxina.

Por tanto, se determinó sorprendentemente que Hy-Soy o [Hy-Soy+Hy-Yest] puede sustituir a BHI y peptona Bacto en medios para el crecimiento de siembra de *Clostridium botulinum*. Además, pueden diseñarse experimentos para determinar las concentraciones óptimas de componentes en medios de siembra para producir los niveles máximos de producción de toxina botulínica por *Clostridium botulinum*. La producción de toxina mediante crecimiento de *Clostridium botulinum* en medio de siembra y medio de fermentación que está libre de BHI y NZ-CaseTT puede alcanzar o superar los niveles obtenidos en medios que contienen BHI y NZ-CaseTT.

Pueden determinarse las concentraciones óptimas de Hy-Soy o [Hy-Soy+Hy-Yest] para el crecimiento en el medio de siembra. Experimentos pueden confirmar que Hy-Soy puede sustituir a BHI y peptona Bacto como fuente de nitrógeno en medio de siembra para el crecimiento de *Clostridium botulinum* y para la producción de toxina botulínica en la fase de fermentación posterior. Además, Hy-Soy como fuente de nitrógeno en el medio de siembra, en comparación con Hy-Soy más Hy-Yest, puede producir niveles superiores de toxina botulínica en la etapa de fermentación posterior. Las concentraciones de Hy-Soy en medio de siembra que producen los mejores niveles de toxina oscilan entre aproximadamente 62,5 g/l y 100 g/l.

Pueden diseñarse experimentos adicionales para determinar las concentraciones óptimas de Hy-Soy en el medio de siembra para la producción máxima de toxina botulínica por *Clostridium botulinum* mediante fermentación. Por tanto, todos de 30 g, 50 g, 75 g y 100 g de Hy-Soy en el medio de siembra pueden dar como resultado la producción de toxina botulínica mediante fermentación de *Clostridium botulinum* y esto es comparable o supera los niveles de toxina botulínica preparada en medio de siembra que contiene BHI y peptona Bacto como fuente de nitrógeno.

Puede encontrarse que una concentración de Hy-Soy 100 g/l en el medio de siembra dio como resultado los niveles más altos de producción de toxina en la etapa de fermentación posterior. Además, los datos indican que la etapa de siembra 1 de medio de siembra de Hy-Soy produjo un mayor crecimiento tras 48 horas que tras 24 horas.

Ejemplo 6 (comparativo)

Procedimiento distinto de APF para obtener una toxina botulínica

Se obtuvo una toxina clostrídica mediante fermentación de una bacteria *Clostridium botulinum*. Por tanto, se llevó a cabo un procedimiento de Schantz modificado (distinto de APF) para obtener toxina de *Clostridium botulinum*

altamente potente y altamente purificada (es decir toxina a granel) de la siguiente manera. Un procedimiento de Schantz modificado (distinto de APF) puede proporcionar un alto rendimiento de toxina botulínica. Tanto el procedimiento de Schantz como de Schantz modificado usan caseína en todos los medios de fermentación.

5 *Preparación de cultivo de reserva*

Hay diversas bacterias clostrídicas disponibles de la colección americana de cultivos tipo (ATCC), Manassas, Virginia. Alternativamente, puede prepararse un vial de banco de células de *Clostridium botulinum* aislando *Clostridium botulinum* de diversas fuentes, incluyendo suelo o mediante toma de muestras profundas (en ubicaciones anaerobias o casi anaerobias) de canales de animales en descomposición. Comúnmente, puede obtenerse *Clostridium botulinum* de una muestra de un fluido fisiológico (es decir una muestra con hisopo de herida de un paciente con botulismo por herida) de un paciente con diagnóstico de botulismo. La mitad superior de la figura 2 resume el procedimiento distinto de APF usado para la preparación de un vial de banco de células, y para el cultivo y la fermentación de una toxina botulínica.

Se cultiva el *Clostridium botulinum* obtenido de una fuente natural o de paciente en placas de agar sangre, seguido por inoculación de colonias de alto crecimiento en un medio de vial de banco de células. El medio de vial de banco de células usado para *Clostridium botulinum* fue medio de carne cocinada que contiene ternera fresca cortada. Se mezclaron cultivos en crecimiento activo con glicerol para preparar un vial de banco de células (es decir un cultivo de reserva) de la bacteria *Clostridium botulinum* que se congeló para su uso posterior.

Cultivos de siembra

Se descongeló un vial de banco de células de *Clostridium botulinum* a temperatura ambiente, seguido por cuatro etapas de cultivo. (1) Para seleccionar colonias con una morfología adecuada, se cultivaron alícuotas del vial de banco de células descongelado mediante cultivo en estrías de la bacteria en placas de agar sangre Columbia previamente reducido e incubación anaerobia durante 30-48 horas a $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. (2) Entonces se inocularon colonias seleccionadas en tubos de ensayo que contenían un medio de crecimiento de caseína durante 6-12 horas a 34°C . Entonces se cultivó adicionalmente el contenido del tubo con el crecimiento más rápido y la mayor densidad (etapa de selección de crecimiento) mediante dos incubaciones anaerobias de aumento: (3) una primera incubación de 12-30 horas a 34°C en una botella de cultivo de siembra de un litro, seguido por (4) un segundo cultivo en un fermentador de siembra de 25 litros que contenía un medio de crecimiento de caseína durante 6-16 horas a 35°C . Estos dos cultivos de aumento se llevaron a cabo en medios nutritivos que contenían hidrolizado de caseína al 2% (un digesto de caseína [proteína de la leche]), extracto de levadura al 1% y glucosa al 1% (dextrosa) en agua a pH 7,3.

Fermentación

Los cultivos de aumento estuvieron seguidos por una incubación adicional durante 60-96 horas a 35°C en un fermentador a una escala comercial (es decir, 115 litros) en un medio que contenía caseína en una atmósfera anaerobia controlada. Habitualmente el crecimiento de la bacteria es completo tras de 24 a 36 horas, y durante la fermentación de 60-96 horas la mayor parte de las células experimentan lisis y liberan toxina botulínica. No se requiere control del pH del medio de fermentación en un procedimiento de Schantz o Schantz modificado. Se cree que la toxina se libera mediante lisis celular activada mediante proteasas presentes en el caldo de cultivo. Opcionalmente, puede prepararse una filtración de este medio de cultivo usando un filtro de profundidad de una única capa para eliminar impurezas macroscópicas (es decir células completas y rotas) para obtener una disolución transparente denominada cultivo aclarado.

Recogida

Puede lograrse la recogida de toxina reduciendo el pH a 3,5 con ácido sulfúrico para precipitar la toxina sin procesar a 20°C . Entonces se concentró la toxina sin procesar mediante ultramicrofiltración seguido por diafiltración.

Purificación

Entonces se transfirió la toxina en bruto recogida a un recipiente de digestión y se estabilizó mediante adición del inhibidor de proteasa clorhidrato de benzamidina. Se añadieron ADNasa y ARNasa para digerir ácidos nucleicos. Se sometió el material que contenía toxina a UF/DF y tres etapas de precipitación (precipitaciones en etanol frío, ácido clorhídrico y sulfato de amonio). Se almacenó el complejo de neurotoxina botulínica purificado (toxina a granel) como suspensión en un tampón de fosfato de sodio/sulfato de amonio a $2-8^{\circ}\text{C}$.

La toxina a granel resultante era un complejo de toxina botulínica tipo A de 900 kD cristalino, de alta calidad, preparado a partir de la cepa Hall A de *Clostridium botulinum* con una potencia específica de $\geq 3 \times 10^7$ U/mg, una A_{260}/A_{278} inferior a 0,60 y un patrón distintivo de formación de bandas en electroforesis en gel, y adecuado para su uso para la elaboración de una composición farmacéutica de toxina botulínica.

La elaboración puede abarcar una dilución en muchas veces de la toxina a granel, el mezclado con uno o más excipientes (tal como albúmina y cloruro de sodio) para así formar una composición de toxina, y la preparación de una forma estable en almacenamiento y transporte de la composición de toxina, tal como mediante liofilización, secado por congelación o secado a vacío de la composición.

5 El complejo de toxina botulínica purificado obtenido a partir de un procedimiento de Schantz o Schantz modificado puede eluirse de una columna de intercambio iónico en un tampón a pH 7-8 para disociar las proteínas distintas de complejo de toxina de la molécula de toxina botulínica, proporcionando así (dependiendo del tipo de bacteria *Clostridium botulinum* fermentada) toxina botulínica tipo A pura con un peso molecular de aproximadamente 150 kD, 10 y una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ U de DL₅₀/mg o superior; o toxina botulínica tipo B purificada con un peso molecular de aproximadamente 156 kD y una potencia específica de $1-2 \times 10^9$ U de DL₅₀/mg o superior, o toxina botulínica tipo F purificada con un peso molecular de aproximadamente 155 kD y una potencia específica de $1-2 \times 10^7$ U de DL₅₀/mg o superior.

15 Ejemplo 7

Medios y procedimiento APF para obtener una toxina botulínica

20 Este ejemplo expone un procedimiento APF llevado a cabo para obtener toxina de *Clostridium botulinum* tipo A altamente potente y altamente purificada (es decir toxina a granel). El procedimiento puede usarse con otros serotipos de toxina botulínica.

Preparación de cultivo de reserva

25 Tal como se expuso en el ejemplo 6, puede obtenerse *Clostridium botulinum* de la ATCC, de diversas fuentes en la naturaleza o de un paciente con botulismo. La mitad inferior de la figura 2 resume el procedimiento APF usado para la preparación de un vial de banco de células, y para el cultivo y la fermentación de una toxina botulínica. Se prepararon viales de banco de células APF cultivando *Clostridium botulinum* en placas de agar vegetal. Se prepararon las placas de agar vegetal mezclando el derivado de soja HySoy (Quest) con un extracto de levadura y glucosa en una razón de 3:1:1 (porcentaje en peso) con agar y dejando reposar. También se encontró que eran 30 adecuadas otras placas de agar APF disponibles comercialmente o polvo deshidratado para preparar las placas. Entonces se inocularon colonias con alto crecimiento seleccionadas en un medio de vial de banco de células APF. El medio de vial de banco de células APF usado comprendía proteína de soja hidrolizada, extracto de levaduras (no se usó ningún producto animal ni en el cultivo de la levadura ni en el procedimiento para la preparación del extracto de levadura preparado a partir del mismo) y glucosa en la misma razón de 3:1:1. También se encontró que eran 35 adecuadas otras razones de nutrientes (es decir 6:1:1, 6:0:1 y 6:3:1). Los concentrados de soja hidrolizada (HySoy) y extracto de levadura (HyYest) usados se obtuvieron de Quest International. Se combinó el cultivo de *Clostridium botulinum* en el medio APF con glicerol, se transfirieron alícuotas a crioviales y se congelaron para su uso posterior. Los medios APF desarrollados pueden usarse para almacenar las bacterias *Clostridium botulinum* durante un 40 periodo de un año o más sin pérdida de viabilidad. Estas mezclas de cultivo y glicerol congeladas en crioviales son los viales de banco de células APF.

Cultivos de siembra

45 Se descongeló un vial de banco de células APF a temperatura ambiente, seguido por una única etapa de cultivo: entonces se inoculó directamente una botella de cultivo de siembra de un litro (es decir sin un cultivo en agar sangre intermedio ni etapas de crecimiento en tubo) con el contenido del vial de banco de células APF usando el mismo medio APF (el medio de vial de banco de células APF [almacenamiento] puede ser diferente del medio de fermentación APF [crecimiento]) y se mantuvo a 35°C durante de 15 a 24 horas, con un pH de medio inicial de 7,0 50 en una atmósfera anaerobia (nitrógeno).

Fermentación

55 A continuación se transfirió el cultivo en botella de siembra a un fermentador de producción de 10 litros a escala comercial que contenía el medio APF (proteína de soja hidrolizada, extracto de levadura y glucosa al 1%) mantenido a 35°C durante 52-72 horas, con un pH de medio inicial de 7,0, en una atmósfera anaerobia (nitrógeno). Aproximadamente 15 horas tras comenzar la fermentación (el pH del cultivo disminuyó de manera natural hasta por debajo de 6,0), se inicia un programa de control del pH a un intervalo de pH 5,0-5,5 mediante adición de HCl al cultivo. Se encontró que era necesario controlar el pH del medio de fermentación APF dentro del intervalo estrecho 60 con el fin de obtener un rendimiento aceptable de toxina botulínica activa. Por tanto, se encontró que este control del pH a entre pH 5,0-5,5 evitaba sustancialmente la degradación y pérdida de potencia de la toxina botulínica. Se cree que durante la fermentación la mayor parte de las células experimentan lisis y liberan toxina botulínica y que la toxina liberada por la lisis celular se activa mediante proteasas presentes en el caldo de cultivo. La filtración de este medio de cultivo usando un filtro de profundidad de una única capa elimina impurezas macroscópicas (es decir 65 células completas y rotas) y da como resultado una disolución transparente denominada cultivo aclarado.

Recogida

Entonces puede desarrollarse la recogida de toxina botulínica como en el ejemplo 6 (es decir precipitación en ácido sulfúrico, seguido por concentración mediante microfiltración seguido por diafiltración).

Purificación

Entonces puede desarrollarse la purificación de la toxina tal como se expuso en el ejemplo 6: es decir adición de clorhidrato de benzamidina, y ADNasa y ARNasa, precipitación en ácido sulfúrico, precipitación en etanol frío, extracción con tampón fosfato, precipitación en ácido clorhídrico, extracción con tampón fosfato y almacenamiento de toxina a granel.

Como alternativa al procedimiento de recogida y purificación del ejemplo 6, puede llevarse a cabo un procedimiento de cromatografía en columna.

La toxina a granel resultante es un complejo de toxina botulínica tipo A de 900 kD cristalino, de alta calidad, preparado a partir de la cepa Hall A de *Clostridium botulinum* con una potencia específica de $\geq 3 \times 10^7$ U/mg, una A_{260}/A_{278} inferior a 0,60 y un patrón distintivo de formación de bandas en electroforesis en gel, y adecuado para su uso para la elaboración de una composición farmacéutica de toxina botulínica. Por tanto, este procedimiento APF para una toxina botulínica puede generar toxina de alta calidad.

El complejo de toxina botulínica purificado obtenido a partir de un procedimiento APF puede hacerse pasar a través de, y luirse de, una columna de intercambio iónico en un tampón a pH 7-8 para disociar las proteínas distintas de complejo de toxina de la molécula de toxina botulínica, proporcionando así (dependiendo del serotipo de bacteria *Clostridium botulinum* fermentada) toxina botulínica con un peso molecular de aproximadamente 150 kD, y una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ U de DL_{50}/mg o superior; o toxina botulínica tipo B purificada con un peso molecular de aproximadamente 156 kD y una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ U de DL_{50}/mg o superior, o toxina botulínica tipo F purificada con un peso molecular de aproximadamente 155 kD y una potencia específica de $1-2 \times 10^7$ U de DL_{50}/mg o superior. Por ejemplo, usando el medio APF fue posible obtener un complejo de toxina botulínica tipo A con una potencia específica de $1,02 \times 10^8$ U de DL_{50}/mg de la toxina botulínica.

En este ejemplo 7, se usaron medios APF con glucosa o bien al 1% en peso o bien al 2% en peso (obsérvese que glucosa al 1% significa 1 g de glucosa por 100 ml del medio de cultivo y glucosa al 2% significa que estaban presentes 2 g de glucosa por cada 100 ml del medio de cultivo) y se determinó que se producía crecimiento bacteriano máximo (determinado mediante densidad óptica máxima [la densidad óptica se midió a 600 nm] del cultivo) tras aproximadamente 20 horas de fermentación en el medio APF con glucosa al 1% frente a tras aproximadamente 40 horas de fermentación en el medio APF con glucosa al 2%, pero que las densidades ópticas máximas no diferían significativamente a medida que se variaba el contenido en glucosa de los medios de este modo. Se creía que la autólisis celular y liberación de toxina daban como resultado una cantidad máxima de toxina botulínica activa en los medios APF con glucosa al 1% (determinado mediante un ensayo de SNAP-25 para detectar toxina activa) tras aproximadamente 55 horas de fermentación, pero que con los medios APF con glucosa al 2% la cantidad de toxina botulínica activa presente en el medio en un momento posterior (determinado mediante un ensayo de SNAP-25 para detectar toxina activa) y todavía estaba aumentando tras 65 horas de fermentación. Por tanto, se produjo una liberación más rápida de toxina botulínica con el uso de una cantidad de medio APF con menos glucosa (al 1%) presente, lo que indica que puede llevarse a cabo un procedimiento de producción de toxina más eficaz (es decir más cantidad de toxina obtenida por unidad de tiempo) con el uso del medio con APF con menos glucosa (al 1%).

Tal como se muestra en la figura 1, también se determinó que los parámetros óptimos para la producción de toxina botulínica en un medio APF eran la combinación de los siguientes parámetros: (1) concentración de aproximadamente el 6% en peso de una soja hidrolizada ("Conc. de HySoy" en la figura 1) en el medio de fermentación APF. Soja al 6% significa 6 g de la proteína de soja por 100 ml del medio de cultivo; (2) concentrado de extracto de levadura a del 0% al 3% ("Conc. de YE" 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 anaerobias (atmósfera de nitrógeno); (4) pH del medio de fermentación mantenido entre aproximadamente pH 5,0 y 5,5 a lo largo de todo el periodo de fermentación tras el crecimiento celular inicial, y (5) glucosa al 1% en peso en el medio de fermentación APF.

Por tanto, tal como se muestra en la figura 1, cuando hay más proteína presente en el medio APF (como la cantidad total de HySoy y YE) el pH del medio tiende a aumentar con estabilidad de toxina inferior resultante y cuando se redujo el pH con el mismo contenido de nutriente de proteína total en el medio, el rendimiento de producción de toxina aumentó drásticamente. En el procedimiento distinto de APF el contenido de proteína total es inferior de modo que el pH no tiende a aumentar y por tanto no hay un pH elevado que tenga un efecto perjudicial sobre la producción de toxina. La figura 1 muestra que había sistemáticamente más actividad (determinada mediante los ensayos de DLR_{50} y SNAP-25) cuando se controlaba el pH del medio dentro de un intervalo estrecho de aproximadamente 5,3 a 5,5. La figura 1 también muestra que se obtuvo el mayor rendimiento de toxina (determinado mediante el ensayo de SNAP 25) con un medio que comprendía soja hidrolizada al 6% y extracto de levadura al 1%.

El ensayo de SNAP-25 usado fue un método basado en ELISA para medir la actividad proteolítica de SNAP-25 de la toxina botulínica. SNAP-25 es una abreviatura para proteína asociada a sinaptosomas con un peso molecular de 25 kDa. SNAP-25 es una proteína de la membrana plasmática de 206 aminoácidos implicada en la exocitosis neuronal.

5 El ensayo se basa en el método dado a conocer en Ekong T., *et al.*, 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 usa una proteína SNAP-25 truncada (el péptido de 206 residuos de aminoácido) unida a placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno y un anticuerpo monoclonal que reconoce el producto escindido (un péptido de 197 residuos de aminoácido) que se produce mediante hidrólisis enzimática entre los aminoácidos 197 y

10 198 de SNAP-25 por toxina botulínica tipo A reducida. Entonces se detecta el anticuerpo monoclonal unido al producto escindido con un anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa del rábano [HRP]), que produce un cambio de color en presencia de un sustrato cromogénico (TMB).

El ensayo de DLR₅₀ (dosis letal para ratones al 50%) es un método para medir la potencia de una toxina botulínica mediante inyección intraperitoneal de la toxina botulínica en ratones hembra (de aproximadamente cuatro semanas de edad) que pesan 17-22 gramos cada uno al inicio del ensayo. Se sujeta cada ratón en posición supina con su cabeza inclinada hacia abajo y se le inyecta por vía intraperitoneal, en la parte inferior derecha del abdomen con un ángulo de aproximadamente 30 grados usando una aguja de 3/8" a 5/8" de calibre 25 a 27, una de varias diluciones en serie de la toxina botulínica en solución salina. Se registran las tasas de mortalidad a lo largo de las 72 horas

15 siguientes para cada dilución. Se preparan las diluciones de modo que la dilución más concentrada produce una tasa de mortalidad de al menos el 80% de los ratones en los que se inyecta, y la última dilución de concentración produce una tasa de mortalidad no superior al 20% de los ratones en los que se inyecta. Debe haber un mínimo de cuatro diluciones que se encuentren dentro del intervalo de disminución monótona de las tasas de mortalidad. El intervalo de disminución monótona comienza con una tasa de mortalidad de no menos del 80%. Dentro de las cuatro

20 o más tasas de disminución monótona, las dos tasas más grandes y las dos más pequeñas deben ser decrecientes (es decir, no equivalentes). La dilución a la que muere el 50% de los ratones en el plazo del periodo de observación de tres días tras la inyección se define como una dilución que comprende una unidad (1 U) de la toxina botulínica.

Significativamente, el procedimiento APF se diferencia del procedimiento distinto de APF del ejemplo 6 en al menos:

30 (1) sustituir el medio de carne cocinada del vial de banco de células por un medio APF; (2) eliminar la etapa de selección de colonias en agar sangre; (3) eliminar la etapa posterior de crecimiento en tubo basada en medio de caseína, y; (4) sustituir los medios de fermentación distintos de APF por medios APF en su totalidad.

La figura 2 presenta un resumen de las diferencias entre un procedimiento de Schantz (distinto de APF) a escala industrial (ejemplo 6) y el procedimiento APF a escala industrial del ejemplo 7, a través de las etapas de creación de banco de células, cultivo y fermentación. La figura 2 omite las etapas de recogida y purificación.

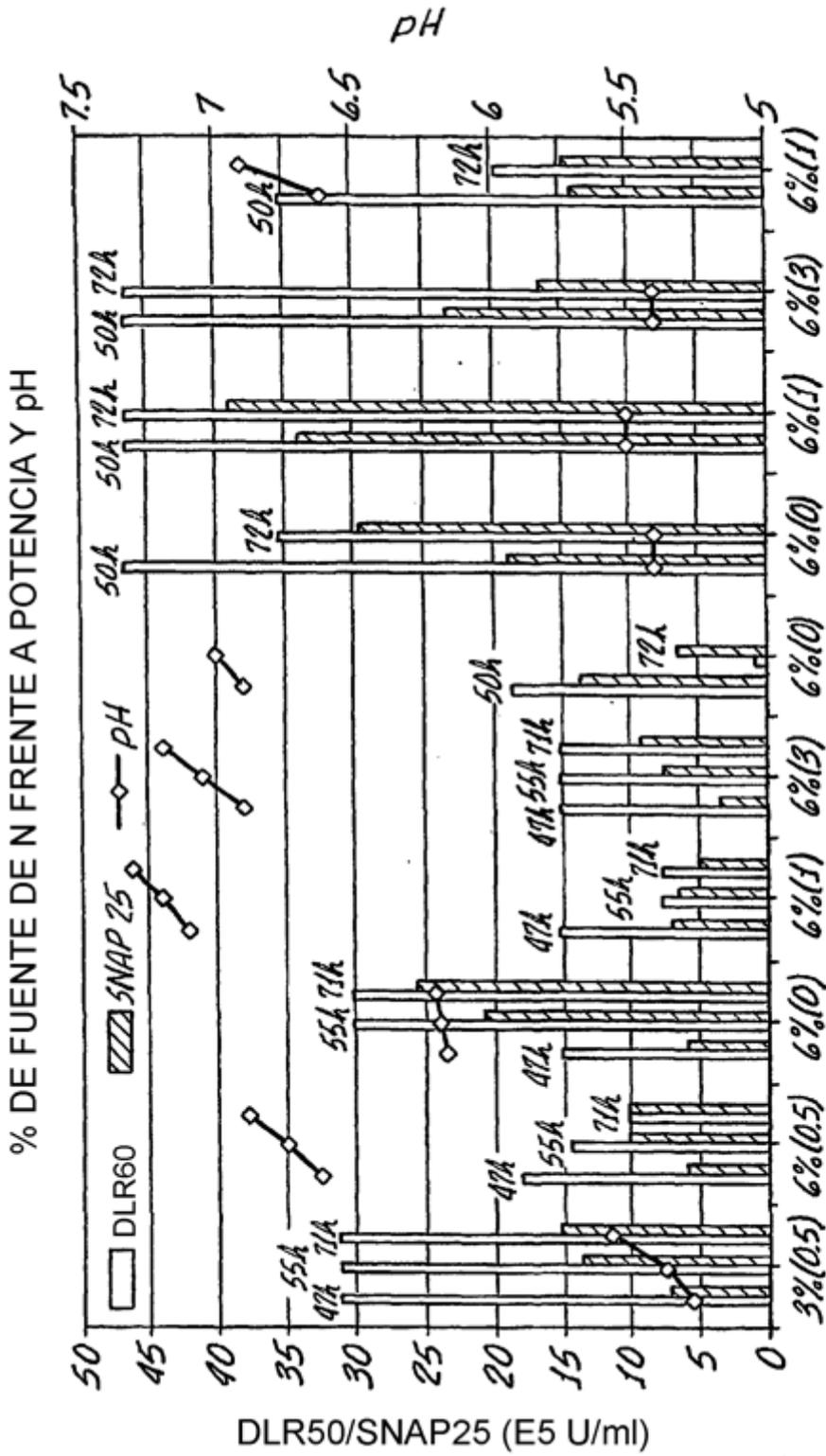
35

También se encontró que pueden usarse medios APF para seleccionar bacterias *Clostridium botulinum*. Por tanto, la práctica simultánea de las etapas de cultivo iniciales de los ejemplos 6 y 7 permite el aislamiento y el crecimiento de una bacteria *Clostridium botulinum* con características que conducen al crecimiento y la producción de toxinas botulínicas en o sobre un medio APF. La transferencia de cultivo de *Clostridium botulinum* de un medio distinto de APF a un medio APF enriquece y selecciona bacterias que pueden adaptarse al nuevo entorno o mediante muerte selectiva de bacterias que no pueden crecer y producirse en el nuevo entorno.

40

REIVINDICACIONES

1. Método para obtener una toxina botulínica biológicamente activa, que comprende las etapas de:
- 5 (a) obtener un medio de cultivo que está sustancialmente libre de productos derivados de animales y comprende el 4-8% en peso de un derivado de soja, y cultivar una bacteria *Clostridium botulinum* en el medio de cultivo;
- 10 (b) proporcionar un medio de fermentación que está sustancialmente libre de productos derivados de animales y comprende:
- 15 (i) el 4-8% en peso de un derivado de soja,
- (ii) el 0-3% en peso de un extracto de levadura, y
- (iii) el 1-2% en peso de glucosa;
- 20 (c) fermentar la bacteria *Clostridium botulinum* en el medio de fermentación en condiciones que permiten la producción de una toxina botulínica, incluyendo:
- (i) llevar a cabo la etapa de fermentación a un pH de entre 5,0 y 5,5 tras el crecimiento celular inicial,
- (ii) llevar a cabo la etapa de fermentación durante entre 45 horas y 75 horas,
- 25 (iii) llevar a cabo la etapa de fermentación a una temperatura de entre 33°C y 36°C, y
- (iv) llevar a cabo la etapa de fermentación en una atmósfera anaerobia; y
- 30 (d) recuperar una toxina botulínica biológicamente activa del medio de fermentación, en el que la etapa de recuperación es un procedimiento de purificación libre de productos animales.



CONC. DE HYSOY (CONC. DE YE)

FIG. 1

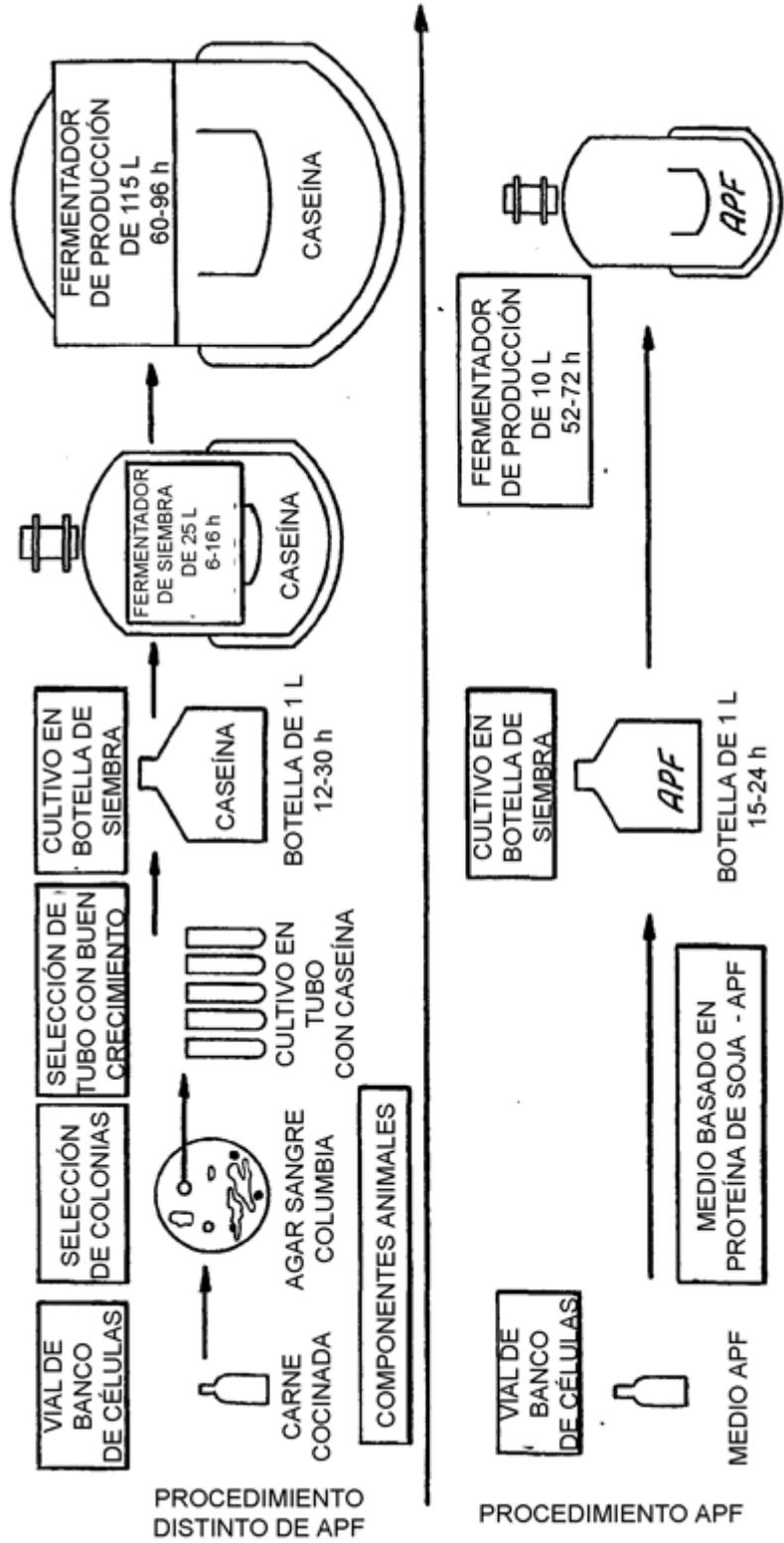


FIG. 2.

