

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 288**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/36** (2006.01)

**C07K 1/30** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2014 PCT/KR2014/004003**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15016462**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2014 E 14832966 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2920199**

54 Título: **Procedimiento de producción de toxina botulínica**

30 Prioridad:

**02.08.2013 KR 20130092024**

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

**25.04.2018**

73 Titular/es:

**DAEWONG CO., LTD. (100.0%)  
244, Galmachi-ro Jungwon-gu Seongnam-si  
Gyeonggi-do 462-807, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, CHUNG SEI;  
SONG, KWAN YOUNG;  
MIN, KYOUNG MIN y  
AN, YEONG DUK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 665 288 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

Procedimiento de producción de toxina botulínica

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de una toxina botulínica, y más particularmente a un procedimiento para la preparación de toxina botulínica, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) tratar un cultivo de una cepa productora de toxina botulínica con ácido para precipitar una toxina botulínica; (b) añadir tampón a la toxina botulínica precipitada, seguido de un tratamiento con un inhibidor de proteasa y nucleasa, extrayendo así la toxina botulínica; (c) tratar la toxina botulínica extraída con ácido para precipitar la toxina botulínica y disolver el precipitado en tampón; y (d) purificar la toxina botulínica mediante cromatografía de intercambio aniónico.

**Técnica antecedente**

Una diversidad de cepas *Clostridium sp.* que secretan neurotoxinas se han descubierto desde la década de 1890, y la caracterización de toxinas que se secretan a partir de estas cepas se ha realizado durante los últimos 70 años (Schant, EJ y col., Microbiol. Rev., 56:80, 1992).

15 Las neurotoxinas procedentes de las cepas de *Clostridium sp.*, es decir, toxinas botulínicas, se clasifican en siete tipos (tipos A a G) dependiendo de sus propiedades serológicas. Cada una de las toxinas tiene una proteína toxina que tiene un tamaño de aproximadamente 150 kDa y contiene naturalmente un complejo de varias proteínas no tóxicas. Un complejo medio (300 kDa) está compuesto de una proteína toxina y una proteína no hemaglutinina no tóxica, y un complejo grande (450 kDa) y un complejo muy grande (900 kDa) se componen del complejo medio unido a la hemaglutinina (Sugiyama, H., Microbiol. Rev., 44: 419, 1980). Se sabe que dichas proteínas de hemaglutinina no tóxicas funcionan para proteger la toxina del pH bajo y de diversas proteasas en el intestino.

20 La toxina se sintetiza como un único polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kDa en células, y luego se escinde en una posición de 1/3 que comienza desde el extremo N-terminal por la acción de la proteasa intracelular o el tratamiento con una enzima artificial tal como tripsina en dos unidades: una cadena ligera (L; peso molecular: 50 kDa) y una cadena pesada (P; peso molecular: 100 kDa). La toxina escindida ha aumentado enormemente la toxicidad en comparación con el único polipéptido. Las dos unidades están unidas entre sí por un enlace disulfuro y tienen diferentes funciones. La cadena pesada se une a un receptor de una célula diana (Park, MK, y col., FEMS Microbiol. Lett., 72: 243, 1990) y funciona para interactuar con una biomembrana a pH bajo (pH 4) para formar un canal (Mantecuccio, C. y col., TIBS., 18: 324, 1993), y la cadena ligera tiene actividad farmacológica, y por tanto transmite permeabilidad a las células usando un detergente o interfiere con la secreción de un neurotransmisor cuando se introduce en las células mediante, por ejemplo, electroporación (Poulain, B. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 85:4090, 1988).

35 La toxina inhibe la exocitosis de la acetilcolina en la presináptica colinérgica de una unión neuromuscular para causar astenia. Se ha considerado que el tratamiento con una cantidad muy pequeña de la toxina muestra toxicidad, lo que sugiere que la toxina tiene alguna actividad enzimática (Simpson, LL y col., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 26:427, 1986).

40 De acuerdo con un informe reciente, la toxina tiene actividad de metalopeptidasa, y su sustrato está compuesto de sinaptobrevina, syntaxina, una proteína sinaptosómica asociada de 25 kDa (SNAP25) o similares, que son las proteínas unitarias de un complejo de maquinaria de exocitosis. Cada tipo de toxina usa una de las tres proteínas anteriormente descritas como su sustrato, y se sabe que las toxinas de tipo B, D, F y G escinden la sinaptobrevina en un sitio específico, las toxinas de tipo A y E escinden SNAP25 en un sitio específico, y el tipo C escinde la syntaxina en un sitio específico (Binz, T. y col., J. Biol. Chem., 265:9153, 1994).

45 Particularmente, se sabe que la toxina botulínica de tipo A es soluble en una solución acuosa diluida a un pH de 4,0-6,8. Se sabe que una proteína estable no tóxica se separa de la neurotoxina a un pH de aproximadamente 7 o superior, y como resultado, la toxicidad se pierde gradualmente. Particularmente, se sabe que la toxicidad disminuye a medida que aumentan el pH y la temperatura.

50 La toxina botulínica es letal para el cuerpo humano incluso en pequeñas cantidades y es fácil de producir en grandes cantidades. Por tanto, constituye cuatro grandes armas bioterroristas junto con *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* y el virus de la viruela. Sin embargo, se encontró que cuando se inyecta toxina botulínica de tipo A a una dosis que no afecta sistemáticamente al cuerpo humano, puede paralizar el músculo local en el sitio inyectado. Basándose en esta característica, la toxina botulínica de tipo A puede usarse en un amplio intervalo de aplicaciones, que incluyen agentes antiarrugas, agentes para tratar la hemiplejía espástica y la parálisis cerebral, etc. Por tanto, la demanda de toxina botulínica de tipo A ha aumentado, y se han realizado activamente estudios sobre procedimientos para producir toxina botulínica para satisfacer la demanda.

55 Un producto comercial típico actual es BOTOX® (un complejo de neurotoxina purificada de toxina botulínica de tipo A) que está disponible en el mercado de Allergan, Inc., EE. UU. Un vial de 100 unidades de BOTOX® está

compuesto de aproximadamente 5 ng de un complejo de neurotoxina purificada de toxina botulínica de tipo A, 0,5 mg de albúmina de suero humano y 0,9 mg de cloruro de sodio y se reconstituye usando solución salina estéril sin conservante (inyección de cloruro de sodio al 0,9 %). Otros productos comerciales incluyen Dysport® (un complejo de toxina *Clostridium botulinum* de tipo A y hemaglutinina, que tiene lactosa y albúmina de suero humano en una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica y se reconstituye usando cloruro de sodio al 0,9 % antes del uso) que está disponible en el mercado de Ipsen Ltd., Reino Unido, MyoBloc™ (una solución inyectable (a pH de aproximadamente 5,6) que comprende toxina botulínica de tipo B, albúmina de suero humano, succinato de sodio y cloruro de sodio) que está disponible en el mercado de Solstice Neurosciences, Inc. Los procedimientos convencionales usados para producir toxinas botulínicas incluyen un procedimiento de precipitación ácida, un procedimiento de precipitación con sal, y un procedimiento cromatográfico.

Por ejemplo, la Publicación de Patente Japonesa abierta a la Inspección Pública N.º 1994-192296 desvela un procedimiento para producir una toxina botulínica de tipo A cristalina cultivando bacterias *Clostridium botulinum*, seguido de precipitación ácida, extracción, adición de nucleasa y cristalización. Además, la Patente de los EE.UU. N.º 5.696.077 desvela un procedimiento de una toxina botulínica de tipo B cristalina cultivando bacterias *Clostridium botulinum*, seguido de precipitación ácida, extracción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y cristalización.

Simpson y col., produjeron una toxina botulínica de tipo A purificando la neurotoxina botulínica mediante cromatografía de flujo por gravedad, seguido de HPLC, captura usando resina de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico (anión y catión) incluyendo el uso de dos columnas diferentes de intercambio iónico (Procedimiento en Enzimología, 165: 76, 1988), y Wang y col., usaron precipitación y cromatografía iónica para purificar una toxina botulínica de tipo A (Dermatol Las Faci Cosm Surg., 2002: 58, 2002).

Además, la Patente de los EE. UU. N.º 6.818.409 desvela el uso de columnas de intercambio iónico y lactosa para purificar una toxina botulínica, y la Patente de los EE.UU. N.º 7.452.697 desvela una toxina botulínica de tipo A mediante cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba. La Publicación de Patente Coreana Abierta a la Inspección Pública N.º 2009-0091501 desvela un procedimiento para purificar una toxina botulínica mediante precipitación ácida y cromatografía de intercambio aniónico, y la Publicación de los EE.UU. N.º 2013-0156756 desvela un procedimiento para purificar una toxina botulínica mediante cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico.

Sin embargo, los procedimientos convencionales tienen problemas en cuanto a que el uso de la cromatografía de intercambio aniónico afecta negativamente al patrón de bandas de gel de toxinas botulínicas (Patente de los EE.UU. N.º 7.452.697) y en cuanto a que estos procedimientos convencionales son difíciles de aplicar comercialmente, debido a un largo tiempo de purificación. Además, ya que *Clostridium botulinum* que es una cepa productora de toxina botulínica es una bacteria anaeróbica, existe el problema de que la fermentación de la bacteria debe realizarse en un sistema anaeróbico y, por tanto, es difícil producir toxinas botulínicas en grandes cantidades. Además, existe el problema de que la toxina botulínica del principio activo purificada mediante el procedimiento de purificación anteriormente descrito no está claramente separada e identificada, y por tanto contiene impurezas. Además, los procedimientos convencionales para la producción de toxinas botulínicas tienen el problema de que necesariamente se realiza un procedimiento de filtración o diálisis para purificar una toxina botulínica de alta pureza, lo que sugiere que el procedimiento de purificación es complejo y difícil.

Por consiguiente, los presentes inventores han realizado esfuerzos exhaustivos para resolver los problemas anteriormente descritos que se producen en la técnica anterior, y como resultado, han encontrado que cuando un cultivo de una cepa productora de toxina botulínica se trata con ácido para formar un precipitado de toxina botulínica y el precipitado formado se purifica mediante cromatografía de intercambio aniónico, se pueden omitir las etapas de filtración, diálisis y precipitación con etanol, y el procedimiento para la producción de la toxina botulínica es muy fácil, y una toxina botulínica que tiene una pureza del 98 % o superior puede ser producido por este procedimiento de producción, completando así la presente invención.

### **Sumario de la invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para producir una toxina botulínica de alta pureza mediante un procedimiento simple.

Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de toxina botulínica, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) tratar un cultivo de una cepa productora de toxina botulínica con ácido para precipitar una toxina botulínica; (b) añadir tampón a la toxina botulínica precipitada, seguido de tratamiento con un inhibidor de proteasa y nucleasa en presencia de un inhibidor de proteasa, extrayendo así la toxina botulínica; (c) tratar la toxina botulínica extraída con ácido clorhídrico o sulfúrico hasta un pH final de 2,5-4,5 para precipitar la toxina botulínica y disolver el precipitado en tampón; y (d) purificar la toxina botulínica mediante cromatografía de intercambio aniónico.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Fig 1 es una vista esquemática que muestra un procedimiento para producir una toxina botulínica de acuerdo

con la presente invención.

La Fig 2 muestra los resultados de medir la pureza de una toxina botulínica después de realizar la purificación por cromatografía de intercambio aniónico primaria.

La Fig 3 muestra los resultados de medir la pureza de una toxina botulínica después de realizar la purificación por cromatografía de intercambio aniónico secundaria.

La Fig 4 muestra los resultados de medir el aumento o la disminución en la amplitud del potencial de acción muscular compuesto causado por el tratamiento con una toxina botulínica producida por el procedimiento de la presente invención y BOTOX® (Allergan). N: sin inyección; S: S: inyección de solución salina; B2: BTX-A-1, dos unidades; D2: BTX-A-2, dos unidades; B4: BTX-A-1, cuatro unidades; D4: BTX-A-2, cuatro unidades; B8: BTX-A-1, ocho unidades; y D8: BTX-A-2, ocho unidades.

La Fig 5 muestra los resultados de medir las velocidades de conducción causadas por el tratamiento con una toxina botulínica producida por el procedimiento de la presente invención y BOTOX® (Allergan). N: sin inyección; S: S: inyección de solución salina; B2: BTX-A-1, dos unidades; D2: BTX-A-2, dos unidades; B4: BTX-A-1, cuatro unidades; D4: BTX-A-2, cuatro unidades; B8: BTX-A-1, ocho unidades; y D8: BTX-A-2, ocho unidades.

### 15 **Descripción detallada de la invención y realizaciones preferentes**

A menos que se indique otra cosa, Todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la cual se refiere la invención. Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos experimentales son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica.

20 En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de toxina botulínica, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) tratar un cultivo de una cepa productora de toxina botulínica con ácido para precipitar una toxina botulínica; (b) añadir tampón a la toxina botulínica precipitada, seguido de tratamiento con un inhibidor de proteasa y nucleasa en presencia de un inhibidor de proteasa, extrayendo así la toxina botulínica; (c) tratar la toxina botulínica extraída con ácido clorhídrico o sulfúrico hasta un pH final de 2,5-4,5 para precipitar la toxina botulínica y disolver el precipitado en tampón; y (d) purificar la toxina botulínica mediante cromatografía de intercambio aniónico (Fig 1).

La toxina botulínica resultante producida por el procedimiento de la presente invención se puede almacenar mediante diversos procedimientos, que incluyen almacenamiento congelado y almacenamiento liofilizado.

30 El procedimiento de la presente invención puede comprender además, después de la etapa (d), las etapas de: (e) tratar una fracción de cromatografía de intercambio aniónico que contiene la toxina botulínica con sulfato de amonio para formar un precipitado, y disolver el precipitado en tampón; y (f) purificar la toxina botulínica mediante cromatografía de intercambio aniónico.

35 En la presente invención, la cepa productora de toxina botulínica es preferentemente *Clostridium botulinum*, pero no está limitada a la misma, y será evidente para los expertos en la técnica que cualquier cepa que pueda producir una toxina botulínica puede usarse en la presente invención.

40 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "toxina botulínica" significa incluir no solo una neurotoxina producida por la cepa de *Clostridium botulinum*, sino también toxinas botulínicas modificadas, recombinantes, híbridas y quiméricas. Una toxina botulínica recombinante puede tener una cadena ligera y/o una cadena pesada producida por especies que no son de *Clostridium* de una manera recombinante. Además, la expresión "toxina botulínica" tal como se usa en el presente documento pretende incluir los serotipos de toxina botulínica A, B, C, D, E, F y G, complejos de toxina botulínica (es decir, complejos de 300, 600 y 900 kDa), y toxina botulínica pura (es decir, una molécula neurotóxica de 150 kDa), que son todos útiles en la práctica de la presente invención.

45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "toxina botulínica producida" significa una toxina botulínica pura o un complejo de toxina botulínica, que está separada o sustancialmente separada de otras proteínas o impurezas que pueden estar acompañadas por la toxina botulínica cuando la toxina botulínica se recoge de un cultivo o un procedimiento de fermentación. Por tanto, la toxina botulínica producida tiene una pureza de al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, y lo más preferentemente al menos 98 %. Particularmente, la toxina botulínica producida en la presente invención puede ser una proteína toxina de tipo A botulínica que tiene una pureza de al menos 98 %.

50 El cultivo de la cepa de *Clostridium botulinum* para producir la toxina botulínica puede realizarse usando un procedimiento convencional conocido en la técnica y un medio convencional que puede usarse para el cultivo.

A modo de ejemplo no limitante, un medio para el cultivo de la cepa de *Clostridium botulinum* puede incluir un hidrolizado de caseína, un extracto de levadura, glucosa y similares, y el cultivo se realiza a una temperatura de 25 a 40 °C durante 90-180 horas, y preferentemente 100-150 horas.

55 La precipitación ácida de la etapa (a) puede realizarse añadiendo ácido, preferentemente ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, a un cultivo de la cepa, de modo que el cultivo alcance un pH de 3,0-4,5, preferentemente 3,3-4,0, y lo más preferentemente 3,4-3,6, medido con un sensor de pH.

La precipitación ácida de la etapa (a) se basa en el principio en cual la adición de ácido a un cultivo que contiene muchos tipos de proteínas reduce el pH del cultivo al mismo tiempo que mata las bacterias botulínicas que quedan después del cultivo, de modo que las proteínas alcanzan el punto isoeléctrico para precipitar. Incluye la cristalización en un sentido amplio, y el procedimiento de precipitación es un procedimiento para separar aproximadamente el material deseado en un estado mixto, a diferencia de la cristalización que se centra en la purificación del material deseado con alta pureza. En el procedimiento de precipitación, las impurezas que tienen una estructura similar al material deseado también se precipitan. En el presente documento, el pH se ajusta a aproximadamente 3,0-4,5. La velocidad de recuperación de la toxina botulínica aumenta a medida que disminuye el pH. Si el pH es de 3,0 o menos, afectará a la toxina botulínica en sí, y si el pH es 4,5 o más, la velocidad de recuperación de la toxina botulínica disminuirá. Por estas razones, el pH está preferentemente dentro del intervalo específico anterior.

Particularmente, el pH es el más preferentemente de 3,4-3,6, porque la velocidad de recuperación de la toxina botulínica es la más alta en este intervalo de pH. Cuando el pH del cultivo de la cepa botulínica alcanza un intervalo adecuado después de la adición de ácido, el ácido se agrega al cultivo hasta que ya no aparece el cambio en el pH, y luego el cultivo se deja reposar a temperatura ambiente durante 15-30 horas, seguido de la eliminación del sobrenadante.

La etapa (b) de extracción de la toxina botulínica comprende una etapa de disolución de la toxina resultante de la etapa (a) en tampón de fosfato, preferentemente tampón de fosfato de sodio, y de eliminación del precipitado. En el presente documento, el pH del tampón de fosfato es preferentemente de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,0. El pH resultante se puede ajustar a 4,5-6,5, preferentemente de 5,0-6,0, mediante la adición de una base, preferentemente hidróxido de sodio, y la extracción de la toxina se puede realizar en el intervalo de pH anteriormente especificado.

Además, la nucleasa que se usa en la etapa (b) puede ser DNasa y RNasa, y el inhibidor de proteasa que se usa en la etapa (b) es preferentemente benzamidina HCl, pero sin limitación a los mismos, y cualquier material que pueda inhibir la actividad de la proteasa, conocido en la técnica, puede usarse en la presente invención. Mediante el tratamiento con nucleasa en la etapa (b) de extracción de la toxina botulínica, las impurezas tales como ADN y ARN contenidas en el precipitado formado por ácido en la etapa (a) pueden degradarse. Si la etapa del tratamiento con la enzima se lleva a cabo durante 1,5 horas o menos, la degradación de ADN y ARN puede ser insuficiente. Por esta razón, la etapa de tratamiento con la enzima se lleva a cabo durante 1,5-7 horas, preferentemente de 3-6 horas, y la ADNasa y RNasa se añaden preferentemente a una concentración de 0,05-1,0 g/l, preferentemente 0,1-0,5 g/l.

Debido a que el extracto obtenido por el tratamiento enzimático contiene la toxina botulínica y una proteína que tiene una polaridad similar a la de la toxina botulínica, se debe realizar una etapa de precipitación de la proteína con ácido clorhídrico. Específicamente, la etapa (c) de precipitación con ácido clorhídrico se realiza preferentemente centrifugando el extracto tratado enzimáticamente, ajustando el pH del sobrenadante a un pH de 2,5 a 4,5, preferentemente de 3,0 a 4,0, mediante la adición de ácido clorhídrico (HCl), y luego precipitando la proteína en el sobrenadante con ácido clorhídrico en un refrigerador a 4 °C. Particularmente, el pH en la etapa de precipitación con ácido clorhídrico se ajusta lo más preferentemente a 3,3-3,8 con el fin de mantener la actividad y la velocidad de recuperación de la toxina en altos niveles. Si la etapa de precipitación con ácido clorhídrico se lleva a cabo en el intervalo de pH anteriormente descrito, el título de la toxina botulínica será de hasta 90 % o más, y la coagulación de la proteína disminuirá significativamente. A continuación, el precipitado con ácido clorhídrico se puede disolver en tampón, y se puede realizar la etapa siguiente.

La etapa (d) que es la etapa más importante se realiza por cromatografía usando resina de intercambio aniónico después de completar la etapa de precipitación con ácido clorhídrico con el fin de eliminar la mayoría de las impurezas principales distintas de la toxina botulínica de tipo A. La resina de intercambio aniónico que se usa en la etapa (d) puede ser resina sustituida con un grupo de dietilaminoetil (DEAE) o de amonio cuaternario (C), pero sin limitación a los mismos. Por ejemplo, la resina de intercambio aniónico puede ser DEAE-Sephadex como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 5.696.077, la Publicación de Patente Internacional N.º WO96/05222 y la Patente de los EE.UU. N.º 5.846.929. Preferentemente, es una cualquiera de las resinas de intercambio aniónico que tiene un grupo de amonio cuaternario fuertemente básico o un grupo de dietilaminoetil (DEAE) débilmente básico.

Ejemplos del grupo de intercambio aniónico fuertemente básico que puede usarse en la presente invención pueden incluir Q Sepharose Fast Flow, Q Sepharose de alto rendimiento, Resource Q, Source 15Q, Source 30Q, Mono Q, Mini Q, Capto Q, Capto Q ImpRes, Q HyperCel, Q Cermic HyperD F, Nuvia Q, UNOSphere Q, Macrorep High Q, Macrorep 25 Q, Fractogel EMD TMAE (S), Fractogel EMD TMAE Hicap (M), Fractogel EMD TMAE (M), Eshmono Q, Toyopearl QAE-550C, Toyopearl SuperQ-650C, Toyopearl GigaCap Q-650M, Toyopearl Q-600C AR, Toyopearl SuperQ-650M, Toyopearl SuperQ-650S, TSKgel SuperQ-5PW (30), TSKgel SuperQ-5PW (20), o TSKgel SuperQ-5PW, pero sin limitación a los mismos y pueden usarse resinas de intercambio aniónico conocidas en la técnica.

El tampón de columna que se usa en la etapa (d) puede ser un tampón de fosfato de sodio o un tampón de citrato. Preferentemente, se usa tampón de fosfato de sodio. La concentración del tampón de la columna se controla a 30-70 mM, preferentemente de 40-60 mM. El pH de la columna se controla a aproximadamente 3,5-7,5, y la velocidad de flujo de la fase móvil se controla a 0,5-5,0 ml/min, preferentemente 1,0-3,0 ml/min. Además, la conductividad del

tampón se ajusta a 3-30 mS/cm, y la muestra se inyecta después de la finalización del equilibrado de la columna. La toxina se eluye como un flujo continuo, y la mayoría de las impurezas principales se adsorben. Específicamente, en la etapa (d) de purificación por cromatografía de intercambio aniónico, la toxina botulínica de tipo A no se adsorbe en la resina de intercambio aniónico, y la mayoría de las impurezas principales se eliminan por adsorción.

- 5 En la presente invención, la cromatografía de intercambio aniónico en la etapa (d) se realiza preferentemente a un pH de 3,5-7,5, preferentemente 4,5-7,0, y una conductividad de 3-30 mS/cm, preferentemente 5-20 mS/cm.

Con el fin de eliminar completamente las impurezas que quedan después de la cromatografía de intercambio aniónico de la etapa (d), el procedimiento para producir la toxina botulínica de acuerdo con la presente invención puede, si es necesario, comprender adicionalmente las etapas de: (e) tratar la fracción de cromatografía de intercambio aniónico que contiene la toxina botulínica con sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para formar un precipitado, y disolver el precipitado en tampón; y (f) purificar la toxina botulínica mediante cromatografía de intercambio aniónico secundaria.

10 En la etapa (e), la fracción de cromatografía de intercambio aniónico que contiene la toxina botulínica se trata con sulfato de amonio para formar un precipitado, y el precipitado formado se disuelve en tampón. La etapa de precipitación con sulfato de amonio corresponde a un procedimiento de precipitación de proteínas en el que una sal (sulfato de amonio, etc.) que se disuelve fácilmente en agua se añade a una mezcla de proteínas para aumentar la fuerza iónica para así formar un precipitado de proteína. Si una proteína deseada precipita principalmente tras la saturación con 30 % (p/v) de sulfato de amonio, la proteína deseada puede precipitarse precipitando proteínas distintas de la proteína deseada a una concentración de saturación de sulfato de amonio del 30 % (p/v) o inferior y luego añadir sulfato de amonio a una concentración de saturación de 30 % (p/v) y se puede recoger por centrifugación. La operación de precipitación de proteínas se usa frecuentemente como medio inicial. La solución de sulfato de amonio que se usa en la etapa (e) puede tener una concentración de sulfato de amonio de 10-50 % (p/v), preferentemente 20-40 % (p/v).

15 A continuación, en la etapa (f), la toxina botulínica puede purificarse mediante cromatografía de intercambio aniónico. La purificación de la toxina botulínica de alta pureza de acuerdo con la presente invención se realiza principalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico (cromatografía de intercambio aniónico primaria) de la etapa (d) y la cromatografía de intercambio aniónico (cromatografía de intercambio aniónico secundaria) en la etapa (f) se realiza con el fin de eliminar las impurezas restantes y se puede realizar de la misma manera que la cromatografía de intercambio aniónico de la etapa (d).

20 La fracción resultante que contiene la proteína botulínica de tipo A, obtenida por el procedimiento de purificación anteriormente descrito, puede esterilizarse y filtrarse para preparar un líquido bruto. El líquido bruto preparado puede congelarse y almacenarse hasta su uso.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una toxina botulínica producida por el procedimiento de la presente invención. Se analizó la pureza de la toxina botulínica purificada por HPLC y, como resultado, se pudo observar que la pureza de la toxina botulínica después de la cromatografía de intercambio aniónico primaria fue del 98,38 % (Fig. 2), que es mayor que la pureza (aproximadamente el 95 %) de BOTOX® disponible en el mercado de Allergan Inc., lo que sugiere que la mayoría de las impurezas se eliminaron en la etapa de cromatografía de intercambio aniónico primaria. Además, se demostró que la pureza de la toxina botulínica después de la cromatografía de intercambio aniónico secundaria era del 98,99 % (Fig. 3).

30 Además, el procedimiento para la producción de la toxina botulínica de acuerdo con la presente invención tiene la ventaja de que se pueden omitir las etapas de filtración, diálisis y precipitación con etanol, y por tanto el procedimiento para la producción de la toxina botulínica es fácil y simple. Particularmente, el procedimiento de la presente invención tiene la ventaja de que se pueden omitir las etapas de filtración y precipitación con etanol en el procedimiento para la producción de BOTOX® de Allergan Inc. (Publicación de Patente de los EE.UU. N.º 2012-0156756; procedimiento sin LPA) y por tanto se puede reducir el número de las etapas de purificación (de cinco etapas a tres etapas) para reducir el período de producción de un líquido bruto de la toxina botulínica (de 4 semanas a 2 semanas).

35 En otro ejemplo de la presente invención, se realizó un experimento para comparar con la seguridad de BOTOX® (Allergan, Inc.) con el fin de confirmar la seguridad de la proteína toxina de tipo A botulínica (DWP450) producida por el procedimiento de la presente invención. Como resultado, se demostró que la toxina botulínica (DWP450) producida por el procedimiento de la presente invención mostró un valor de NOAEL de 60 U/kg para las mujeres, lo que sugiere que es dos veces más segura que BOTOX® (Allergan, Inc.) que muestra un valor NOAEL de 30 U/kg. Se cree que la seguridad dos veces mayor de la toxina botulínica producida por el procedimiento de la presente invención se debe a que la toxina botulínica de la presente invención tiene una alta pureza y, por tanto, tiene una mayor capacidad para actuar en un área local de modo que la circulación sistémica de la toxina botulínica, que puede provocar efectos secundarios, se reduzca.

La toxina botulínica producida por el procedimiento de la presente invención se usa como principio activo en una composición farmacéutica. La toxina botulínica se puede usar para el tratamiento de trastornos neuromusculares

caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. Además, se puede usar para diversas afecciones, que incluyen dolor de cabeza, migraña, cefalea tensional, cefalea sinusal, cefalea cervicogénica, trastornos de sudoración, hiperhidrosis axilar, hiperhidrosis palmar, hiperhidrosis plantar, síndrome de Frey, una línea de piel hiperkinética, una arruga facial, líneas glabellares, patas de gallo, líneas de marioneta, un pliegue nasolabial, un trastorno de la piel, acalasia, estrabismo, fisura anal crónica, blefaroespasma, dolor musculoesquelético, fibromialgia, pancreatitis, taquicardia, agrandamiento de próstata, prostatitis, retención urinaria, incontinencia urinaria, vejiga hiperactiva, espasmo hemifacial, temblores, mioclonías, trastornos gastrointestinales, diabetes, sialorrea, disinergia detrusor-esfínter, espasticidad post ictus, cicatrización de heridas, parálisis cerebral juvenil, espasmo del músculo liso, reestenosis, distonía focal, epilepsia, distonía cervical, trastorno de la tiroides, hipercalcemia, un trastorno obsesivo compulsivo, dolor artrítico, síndrome de Raynaud, estrías gravídicas, adherencia peritoneal, vasoespasmos, rinorrea, contractura muscular, músculo dañado, distonía laríngea, calambre del escritor y síndrome del túnel carpiano.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" significa una formulación que comprende la toxina botulínica como principio activo, y la formulación puede comprender al menos un ingrediente adicional (excipiente) en la composición farmacéutica además del principio activo neurotoxina botulínica. El ingrediente adicional puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en albúmina, albúmina de suero humano, albúmina de suero humano recombinante, gelatina, sacarosa, trehalosa, hidroxietil almidón, colágeno, lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, polisacárido, caprilato, polivinilpirrolidona y sodio, pero sin limitación a los mismos. Además, un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende la toxina botulínica como principio activo comprende una etapa de combinar la toxina botulínica con un ingrediente adicional (excipiente), y la etapa de combinación puede seleccionarse de entre el grupo de procedimientos que consiste en secado por congelación, liofilización y secado al vacío.

Por lo tanto, una composición farmacéutica es una formulación que es adecuada para la administración diagnóstica, terapéutica o cosmética (p. ej., mediante la inyección intramuscular o subcutánea o mediante la inserción de un depósito o implante) a un sujeto, tal como un paciente humano. La composición farmacéutica puede ser: en un estado liofilizado o secado al vacío, una solución formada después de la reconstitución de la composición farmacéutica liofilizada o secada al vacío con solución salina o agua, o; como una solución que no requiere reconstitución. El principio activo puede ser uno de los serotipos de toxina botulínica A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F o G o una toxina botulínica, las cuales pueden prepararse de forma nativa con bacterias *Clostridial*. Como se indica, una composición farmacéutica puede ser líquida o sólida, por ejemplo, secada al vacío. Los procedimientos ejemplares para formular una composición farmacéutica de principio activo de toxina botulínica se desvelan en la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º 2003-0118598 publicada el 5 de noviembre de 2002.

En otro ejemplo de la presente invención, con el fin de confirmar el efecto de la proteína toxina de tipo A botulínica (DWP450) producida por el procedimiento de la presente invención, se midieron la amplitud del potencial de acción muscular compuesto (PAMC) y las velocidades de conducción (tC). En el experimento, se usaron dos proteínas diferentes de toxina botulínica de tipo A, BTX-A-1 (BOTOX®, Allergan Inc., California, EE. UU.) Y BTX-A-2 (DWP450) producidas por el Ejemplo 2 de la presente invención, en cuatro grupos divididos. En el grupo 1, se administraron 0,08 ml de cloruro de sodio (NaCl) a un músculo TA y no se trató otro músculo. En el grupo 2, se administraron 0,02 ml de BTX-A-1 (dos unidades) a un músculo TA y se administraron 0,02 ml de BTX-A-2 (dos unidades) a otro músculo TA. En el grupo 3, se administraron 0,04 ml de BTX-A-1 (cuatro unidades) a un músculo TA, y se administraron 0,04 ml de BTX-A-2 (cuatro unidades) a otro músculo TA. En el grupo 4, se administraron 0,08 ml de BTX-A-1 (ocho unidades) a un músculo TA y se administraron 0,08 ml de BTX-A-2 (ocho unidades) a otro músculo.

Una unidad de toxina botulínica se define como la LD<sub>50</sub> tras la inyección peritoneal en ratones hembra Swiss Webster que pesan aproximadamente 18-20 gramos cada uno. Una unidad de toxina botulínica es la cantidad de toxina botulínica que mata al 50% de un grupo de ratones hembra Swiss Webs.

Se midieron las amplitudes del potencial de acción muscular compuesto (PAMC) causadas por la administración de BTX-A-1 y BTX-A-2, y como resultado, a una velocidad de estímulo lenta de 2 Hz, los grupos administrados con BTX-A-1 y BTX-A-2 mostraron un efecto paralítico sobre el músculo TA (dY) a los 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y 4 semanas después de la administración (Fig. 4A), y a una velocidad de estímulo rápida de 20 Hz, los grupos administrados con BTX-A-1 y BTX-A-2 mostraron un efecto paralítico sobre el músculo TA (dY) a los 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y 4 semanas después de la administración (Fig. 4B). No hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre BTX-A-1 y BTX-A-2 a una velocidad de estímulo lenta de 2 Hz y a un evaluador de estímulo rápido de 20 Hz, y el efecto paralítico sobre el músculo TA (dY) en los grupos administrados con BTX-A-1 y BTX-A-2 se relacionó con la dosificación de toxina botulínica administrada.

Se midieron las velocidades de conducción (tC) causadas por la administración de BTX-A-1 y BTX-A-2, y como resultado, se demostró que los grupos administrados con BTX-A-1 y BTX-A-2 no indujeron un retraso en la velocidad de conducción a una velocidad de estímulo lenta de 2 Hz y a una velocidad de estímulo rápida de 20 Hz (Fig. 5).

Específicamente, la toxina botulínica producida por el procedimiento de la presente invención muestra un efecto similar al de BOTOX® disponible en el mercado (Allergan, Inc.) y es dos veces más segura, porque tiene una mayor

pureza que conduce a una disminución en la propiedad de circulación sistémica. de la toxina botulínica. Por tanto, se puede usar para diversos fines, incluido el tratamiento de trastornos neuromusculares, eliminación de arrugas y tratamiento de la hemiplejía espástica y parálisis cerebral.

### **Ejemplos**

- 5 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. Será obvio para un experto en la técnica que estos ejemplos son solo con fines ilustrativos y no deben interpretarse para limitar el alcance de la presente invención.

#### **Ejemplo 1: Cultivo de la cepa de *Clostridium botulinum***

1-1: Composición del medio usado en el cultivo

- 10 un medio que tiene una composición que comprende 2 % de hidrolizado de caseína, 1 % de extracto de levadura, 1 % de glucosa y 0,5 % de tioglicolato se usó para el cultivo de siembra y el cultivo principal de la cepa de *Clostridium botulinum* con el fin de producir una toxina botulínica.

1-2: Cultivo de siembra de la cepa de *Clostridium botulinum*

- 15 Se inocularon 20 µl de *Clostridium botulinum* (los Centros Coreanos para el Control y la Prevención de Enfermedades N.º de Acceso: 4-029-CBB-IS-001) en un tubo de cultivo que contenía 10 ml de un medio estéril que tiene la composición descrita en el Ejemplo 1-1 y se sometió a cultivo de siembra primario (cultivo estacionario) a 35 °C durante 22-30 horas en condiciones anaeróbicas. Cuando se confirmó el crecimiento de la cepa en el cultivo de siembra primario, se inocularon 8 ml del cultivo de siembra primario en un frasco de cultivo de 1 l que contenía 800 ml de un medio estéril que tenía la misma composición del medio y se sometió a un cultivo de siembra secundario
- 20 (cultivo estacionario) a 35 °C durante 8-15 horas en condiciones anaeróbicas.

1-3: Cultivo principal de la cepa de *Clostridium botulinum*

- 25 Con el fin de producir una toxina botulínica mediante el cultivo de la cepa de *Clostridium botulinum*, se realizó el cultivo principal de la cepa. Específicamente, se prepararon 9,3 l de un medio que tenía la composición descrita en el Ejemplo 1-1 y se colocaron en una incubadora de 10 l, seguido de la esterilización del medio. Se suministró nitrógeno para crear condiciones anaeróbicas, y el crecimiento de la cepa se realizó a una temperatura de 35 °C y a una velocidad de agitación de 50 rpm.

- 30 La cepa en el frasco de cultivo de 1 l sometida a cultivo de siembra secundario en el Ejemplo 1-2 se inoculó en una incubadora de 10 l a través de una línea de inoculación conectada al puerto de inoculación de la incubadora de 10 l. La cepa de *Clostridium botulinum* en la incubadora de 10 l se cultivó bajo las condiciones de 35 °C y 50 rpm y las condiciones de cultivo establecidas se mantuvieron, se verificaron y se registraron. Cuando la cepa se cultivó durante 100 horas o más, se completó el cultivo principal.

#### **Ejemplo 2: Producción de toxina botulínica**

2-1: Etapa de precipitación con ácido sulfúrico

- 35 La etapa de precipitación con ácido sulfúrico es un procedimiento de separación de proteínas en la que se añade ácido sulfúrico a un cultivo que contiene muchos tipos de proteínas para reducir el pH del cultivo al tiempo que mata las bacterias botulínicas que quedan después del cultivo de modo que las proteínas alcanzan el punto isoelectrónico para precipitar. El cultivo principal se realizó como se describe en el Ejemplo 1-3 y después de completar el cultivo principal, se añadió ácido sulfúrico 5N al cultivo mediante una bomba automática para alcanzar un pH de 3,4-3,6 medido con el sensor de pH de la incubadora de 10 l, y luego el cultivo se transfirió a un recipiente de 20 l (AS ONE, Cat. N.º AS5.372.06) a través de la línea de cosecha de la incubadora, y el recipiente de 20 l que contenía el precipitado de ácido sulfúrico se transfirió a una cabina de seguridad biológica (CSB). A continuación, se realizó la precipitación con ácido sulfúrico en la CSB.
- 40

2-2: Tratamiento enzimático y extracción de la toxina

- 45 Después de eliminar el sobrenadante del precipitado de ácido sulfúrico, se añadieron 700 ml de tampón de fosfato de sodio 1 M (pH 5,3) al precipitado. A continuación, la solución se ajustó a un pH de 5,0-6,0 mediante la adición de hidróxido de sodio 5N (NaOH). Para eliminar el ADN y el ARN del precipitado, se añadieron 60 ml de benzamidina HCl 0,4 M, 1 g de DNasa y 1 g de RNasa y se hicieron reaccionar con la solución durante aproximadamente 5 horas para extraer la toxina botulínica.

2-3: Precipitación del ácido clorhídrico y disolución de la toxina

- 50 El cultivo que incluía extracto de toxina se centrifugó a 4 °C a 12000 xg durante 15 minutos para separarlo en microgránulos y un sobrenadante, y el sobrenadante separado se transfirió a un frasco nuevo de 10 l (AS ONE, Cat. N.º AS5.372.04), y luego se ajustó a un pH de 3,4-3,6 mediante la adición de ácido clorhídrico 1N (HCl) y se

sometió a precipitación con ácido clorhídrico en un refrigerador a 4 °C. El precipitado de ácido clorhídrico se centrifugó a 4 °C a 12000 x g durante 15 minutos, y se retiró el sobrenadante, después de lo cual se añadieron 50 ml de tampón de fosfato de sodio (pH 6,5) a los microgránulos de toxina para disolver la toxina.

#### 2-4: Cromatografía de intercambio aniónico primaria

- 5 Después de la finalización del procedimiento de precipitación, con el fin de eliminar la mayoría de las impurezas principales distintas de la toxina botulínica de tipo A, se realizó la cromatografía usando resina de intercambio iónico. Específicamente, la resina de intercambio aniónico (Toyopearl SuperQ-650M, Tosoh Bioscience, P/N 17228) se empaquetó en una columna, después de lo cual la muestra que precipitó en el Ejemplo 2-3 se inyectó en la columna, y la toxina se eluyó con 50 mM. de tampón de elución de fosfato de sodio. En la etapa de purificación primaria, la proteína toxina de tipo A botulínica no se adsorbió en la resina de intercambio aniónico, y la mayoría de las impurezas principales se eliminaron por adsorción. Para la purificación de una toxina botulínica de alta pureza, la muestra se mantuvo a un pH de 4,5-7,0 y a una conductividad de 5-20 mS/cm.

#### 2-5: Precipitación con sulfato de amonio

- 15 Se recogieron las fracciones que contenían la proteína toxina de tipo A botulínica purificada por cromatografía de intercambio aniónico, y se añadió sulfato de amonio a las mismas a una concentración de 20-40 % (p/v) para precipitar de nuevo la proteína toxina de tipo A botulínica. La proteína toxina de tipo A botulínica precipitada se disolvió de nuevo en fosfato de sodio 50 mM (pH 6,5).

#### 2-6: Cromatografía de intercambio aniónico secundaria

- 20 Después de la finalización del procedimiento de precipitación con sulfato de amonio, con el fin de eliminar las impurezas menores distintas de la toxina botulínica de tipo A, se realizó cromatografía usando resina de intercambio iónico una vez más. Específicamente, la resina de intercambio aniónico (Toyopearl SuperQ-650M, Tosoh Bioscience, P/N 17228) se empaquetó en una columna, después de lo cual el precipitado de sulfato de amonio disuelto en el Ejemplo 2-5 se inyectó en la columna y la toxina se eluyó con tampón de elución de fosfato de sodio 50 mM. En este momento, la proteína toxina de tipo A botulínica no se adsorbió, y las impurezas menores se eliminaron por adsorción.

La purificación de una toxina botulínica de alta pureza se logra principalmente en la etapa de cromatografía de intercambio aniónico primaria, y la etapa de purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico secundaria se realiza con el fin de eliminar las impurezas restantes. Para la purificación de una toxina botulínica de alta pureza, el precipitado de sulfato de amonio se mantuvo a un pH de 4,5-7,0 y a una conductividad de 5-20 mS/cm.

#### 30 2-7: Preparación del líquido bruto

Las fracciones que contienen la proteína toxina de tipo A botulínica purificada mediante cromatografía de intercambio aniónico en el Ejemplo 2-6 se recogieron, se esterilizaron y se filtraron a través de un filtro de 0,2 mm para preparar un líquido bruto. El líquido bruto preparado se almacenó por debajo de -70 °C. La proteína toxina de tipo A botulínica producida se denominó "DWP450".

#### 35 **Ejemplo 3: Análisis de la pureza de la toxina botulínica purificada**

- La HPLC (e2695, Waters) se realizó mediante SEC (cromatografía de exclusión por tamaño). La fase móvil usada fue tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 6,5) y una columna TSK gel G4000SWXL (Tosoh Bioscience, P/N 08542) se conectó a una columna protectora (Tosoh Bioscience, P/N 08543) para P/N 08542 y se cargaron 20 µg de la proteína toxina de tipo A botulínica en la columna y se dejaron fluir a una velocidad de 1 ml/min durante 30 minutos. Como resultado, se demostró que la pureza de la toxina botulínica después de la cromatografía de intercambio aniónico primaria era del 98,38 % (Fig. 2) y la pureza de la toxina botulínica después de la cromatografía secundaria de intercambio aniónica fue del 98,99 % (Fig. 3).

#### **Ejemplo 4: Evaluación de la seguridad de la toxina botulínica purificada**

- 45 Con el fin de confirmar la seguridad de la proteína toxina de tipo A botulínica (DWP450) purificada en el Ejemplo 2, se realizó un experimento para comparar con la seguridad de BOTOX® (Allergan, Inc).

- Las ratas macho blancas SD (Sprague-Dawley) se dividieron en los siguientes cinco grupos, que consistían cada uno compuesto en 10 machos y 10 hembras: un grupo administrado con 30 U/kg de un material de ensayo (DWP450); un grupo administrado con 60 U/kg del material de ensayo; un grupo administrado con 30 U/kg de un material comparativo (BOTOX® disponible de Allergan, Inc.); un grupo administrado con 60 U/kg del material comparativo; y un grupo de control (solución salina). Cada uno de los materiales de ensayo, el material comparativo y la solución salina se administró por vía intramuscular un total de cinco veces por semana durante 5 semanas.

En los grupos administrados con 60 U/kg del material de ensayo y 60 U/kg del material comparativo (BOTOX®), se añadieron adicionalmente cinco hembras y cinco machos, y se realizó un ensayo de toxicidad comparativa durante un período de recuperación de 12 semanas con el fin de evaluar la reversibilidad de la toxicidad (Tabla 1).

Tabla 1

[Tabla 1]

Evaluación de la seguridad de la toxina botulínica purificada				
Ensayo	Especie	Dosificación (unidades/kg)	NOAEL/MLD (unidades/kg)	
			DWP450	Allergan
Toxicidad comparativa	Ratas SD	0, 30, 60	Macho: <30mujeres: 60	Macho: <30mujeres: 30

Como resultado, se demostró que la toxina botulínica (DWP450) producida por el procedimiento de la presente invención mostró un valor de NOAEL de 60 U/kg para las mujeres, lo que sugiere que es dos veces más segura que BOTOX® (Allergan, Inc.) que muestra un valor NOAEL de 30 U/kg. Se cree que la seguridad dos veces mayor de la toxina botulínica de la presente invención se debe a que la toxina botulínica de la presente invención tiene una alta pureza y, por tanto, tiene una mayor capacidad para actuar en un sitio local de modo que la circulación sistémica de la toxina botulínica, que puede provocar efectos secundarios, se reduzca.

#### Ejemplo 5: Examen del efecto de la toxina botulínica purificada

Con el fin de examinar el efecto de la proteína toxina de tipo A botulínica (DWP450) purificada en el Ejemplo 2, se midieron la amplitud del potencial de acción muscular compuesto (PAMC) y las velocidades de conducción (tC).

Específicamente, 24 ratas blancas SD (Sprague-Dawley) se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos, que consistían cada uno en seis ratas. Se usaron dos proteínas toxina de tipo A botulínicas diferentes, BTX-A-1 (BOTOX®, Allergan Inc., California, EE. UU.) y BTX-A-2 (DWP450) purificadas en el Ejemplo 2. Las dos formulaciones tenían características sustancialmente idénticas a las mostradas en la Tabla 2 a continuación, y la toxina botulínica diluida con solución salina al 0,9 % se usó en todos los procedimientos. Las ratas se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de 10 mg/kg de clorhidrato de ketamina, y luego se administraron BTX-A-1 y BTX-A-2 al músculo tibial anterior (TA) de las ratas.

Tabla 2

[Tabla 2]

Comparación de características entre BTX-A-1 y BTX-A-2		
	BTX-A-1(Allergan)	BTX-A-2
Cepa de <i>Clostridium botulinum</i>	Sala de tipo silvestre	Sala de tipo silvestre
Serotipo	Toxina botulínica de tipo A	Toxina botulínica de tipo A
Peso molecular del complejo (kDa)	900	900
Paquete (unidades/vial)	100	100
Excipientes-Estabilizador	Albúmina de suero humano	Albúmina de suero humano
Excipientes- Agente isotónico	Cloruro de sodio	Cloruro de sodio
Forma	Secada al vacío	Liofilizada
Condición de almacenamiento (°C)	2-8	2-8
Vida útil (meses)	36	36 (en curso)
pH	6,0 ± 0,5	6,0 ± 0,5

En el grupo 1, se administraron 0,08 ml de cloruro de sodio (NaCl) a un músculo TA y no se trató otro músculo TA. En el grupo 2, se administraron 0,02 ml de BTX-A-1 (dos unidades) a un músculo TA y se administraron 0,02 ml de BTX-A-2 (dos unidades) a otro músculo TA. En el grupo 3, se administraron 0,04 ml de BTX-A-1 (cuatro unidades) a un músculo TA, y se administraron 0,04 ml de BTX-A-2 (cuatro unidades) a otro músculo TA. En el grupo 4, se administraron 0,08 ml de BTX-A-1 (ocho unidades) a un músculo TA y se administraron 0,08 ml de BTX-A-2 (ocho unidades) a otro músculo.

El nivel de retraso en PAMC y las velocidades de conducción se midieron usando CyberAmp380 y Digidata1320 (Axon Instruments. Inc., EE. UU.). Los electrodos usados se unieron a la piel con una pinza de contacto. El electrodo negativo estaba unido al músculo poplíteo y el electrodo positivo estaba unido al espacio retropúbico y al trocánter mayor del fémur. El electrodo de registro se unió al músculo del vientre del músculo anterior de la tibia, y el electrodo de registro de referencia se unió al tendón del calcáneo posterior izquierdo y la suela.

Se aplicó una estimulación eléctrica de 1-5 mA a una velocidad de estímulo lenta de 2 Hz y a una velocidad de

estímulo rápida de 20 Hz. El efecto paralítico sobre el músculo TA se determinó midiendo la amplitud pico a pico de PAMC (dY), y el retraso en la velocidad de conducción se determinó midiendo el intervalo de tiempo entre el punto de estímulo y el punto máximo negativo.

5 El análisis por estimulación eléctrica se realizó antes de la administración de BTX-A-1 y BTX-A-2 y a los 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y 4 semanas después de la administración, y las PAMC y las velocidades de conducción causadas por la administración de BTX-A-1 y BTX-A-2 se analizaron mediante ANOVA usando SAS (Versión 9.2, SAS Institute Inc., EE. UU.).

10 Como resultado, se observó que, a una velocidad de estímulo lenta de 2 Hz, los grupos administrados con BTX-A-1 y BTX-A-2 mostraron un efecto paralítico sobre el músculo TA (dY) a los 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y 4 semanas después de la administración (Fig. 4A), y a una velocidad de estímulo rápida de 20 Hz, los grupos administrados con BTX-A-1 y BTX-A-2 mostraron un efecto paralítico sobre el músculo TA (dY) a los 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y 4 semanas después de la administración (Fig. 4B).

15 No hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre BTX-A-1 y BTX-A-2 a una velocidad de estímulo lenta de 2 Hz y a un evaluador de estímulo rápida de 20 Hz, y el efecto paralítico sobre el músculo TA (dY) en los grupos administrados con BTX-A-1 y BTX-A-2 se relacionó con la dosificación de toxina botulínica administrada.

Se midieron las velocidades de conducción (tC) causadas por la administración de BTX-A-1 y BTX-A-2, y como resultado, se demostró que los grupos administrados con BTX-A-1 y BTX-A-2 no indujeron un retraso en la velocidad de conducción a una velocidad de estímulo lenta de 2 Hz y a una velocidad de estímulo rápida de 20 Hz.

20 Específicamente, se encontró que la toxina botulínica producida por el procedimiento de la presente invención mostraba un efecto similar al de BOTOX® disponible en el mercado (Allergan, Inc.).

#### **Aplicabilidad industrial**

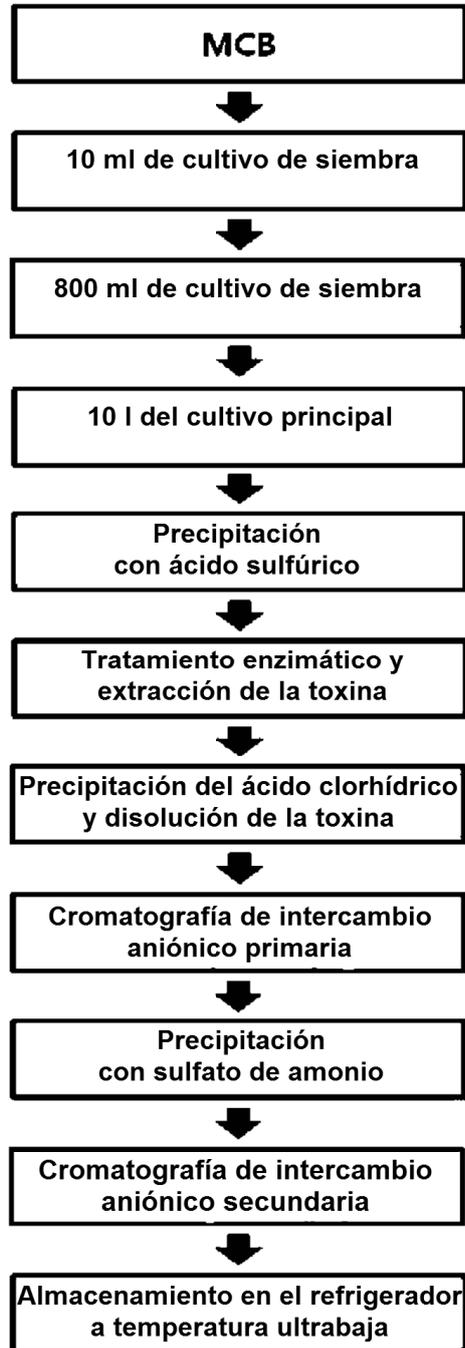
25 El uso del procedimiento de la invención para la producción de una toxina botulínica hace posible producir una toxina botulínica de alta pureza mediante un procedimiento simple, lo que sugiere que el procedimiento de la invención es muy económico y eficiente. La toxina botulínica producida por el procedimiento de la presente invención tiene alta pureza en comparación con las toxinas botulínicas producidas por procedimientos convencionales, y por tanto tiene una mayor capacidad para actuar en un área local. Por tanto, la circulación sistémica de la toxina botulínica, que puede provocar efectos secundarios, se reduce para aumentar la seguridad. Por consiguiente, la toxina botulínica de la presente invención se puede usar para diversos fines, que incluyen el tratamiento de trastornos neuromusculares, eliminación de arrugas y tratamiento de la hemiplejía espástica y parálisis cerebral.

30 Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en la técnica que esta descripción es solo para una realización preferente y no limita el alcance de la presente invención. Por tanto, el alcance sustancial de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

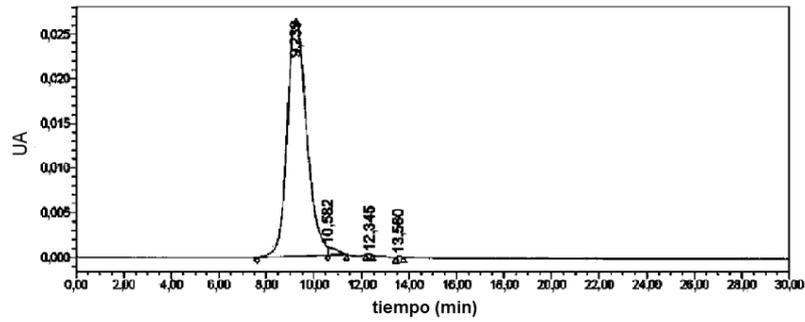
**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de producción de toxina botulínica, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- (a) tratar un cultivo de una cepa productora de toxina botulínica con ácido para precipitar una toxina botulínica;
  - (b) añadir tampón a la toxina botulínica precipitada, seguido de un tratamiento con un inhibidor de proteasa y nucleasa, extrayendo así la toxina botulínica;
  - (c) tratar la toxina botulínica extraída con ácido para precipitar la toxina botulínica y disolver el precipitado en tampón; y
  - (d) purificar la toxina botulínica mediante cromatografía de intercambio aniónico,
- en el que la precipitación ácida de la etapa (c) se realiza añadiendo ácido sulfúrico o ácido clorhídrico a la toxina botulínica extraída, de modo que la toxina botulínica alcance un pH de 2,5-4,5.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cepa productora de toxina botulínica es *Clostridium botulinum*.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la toxina botulínica purificada es una proteína de toxina botulínica de tipo A que tiene una pureza de al menos 98 %.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la precipitación ácida de la etapa (a) se realiza añadiendo ácido sulfúrico o ácido clorhídrico al cultivo de la cepa, de modo que el cultivo alcance un pH de 3,0-4,5.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el inhibidor de proteasa en la etapa (b) es benzamidina HCl.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la nucleasa en la etapa (b) es DNasa y RNasa.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la extracción de la toxina botulínica en la etapa (b) se realiza a un pH de 4,5-6,5.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tampón en la etapa (c) es tampón de fosfato de sodio.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cromatografía de intercambio aniónico en la etapa (d) se realiza a un pH de 3,5-7,5 y a una conductividad de 3-30 mS/cm.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además, después de la etapa (d), las etapas de:
- (e) tratar la fracción de cromatografía de intercambio aniónico que contiene la toxina botulínica con sulfato de amonio para formar un precipitado, y disolver el precipitado en tampón; y
  - (f) purificar la toxina botulínica mediante cromatografía de intercambio aniónico.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el sulfato de amonio en la etapa (e) se añade a una concentración de 10-50 % (p/v).
12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el tampón en la etapa (e) es tampón de fosfato de sodio.
13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la cromatografía de intercambio aniónico en la etapa (e) se realiza a un pH de 3,5-7,5 y a una conductividad de 3-30 mS/cm.

[Fig. 1]

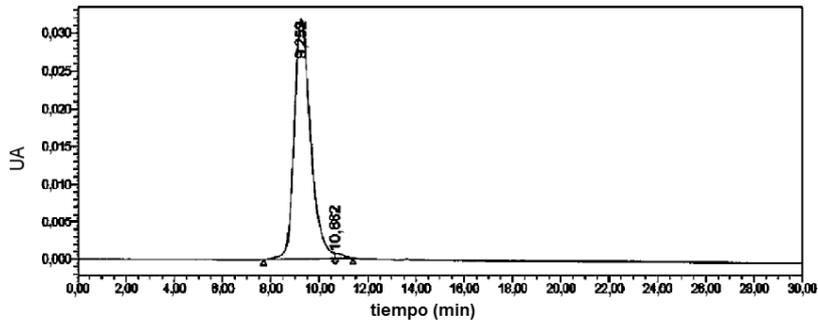


[Fig. 2]



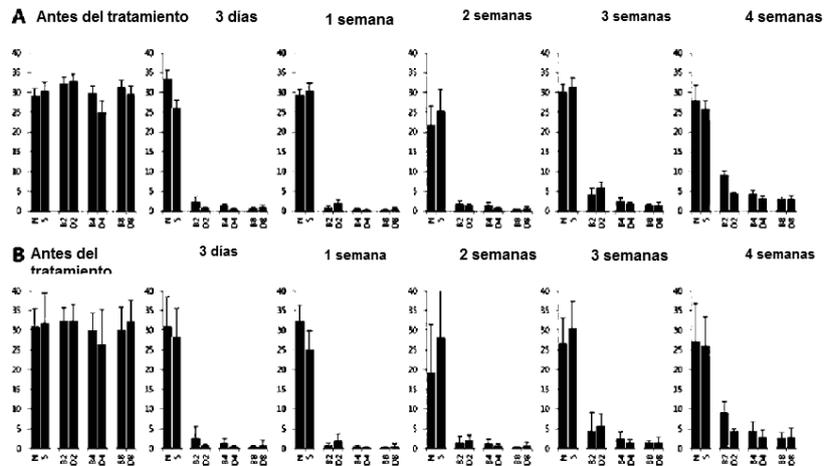
	tiempo de retención (min)	área (μV's)	área %
1	9,239	1506378	98,38
2	10,582	23129	1,51
3	12,345	744	0,05
4	13,560	938	0,06

[Fig. 3]



	tiempo de retención (min)	área (μV's)	área %
1	9,252	1489506	98,99
2	10,662	15157	1,01

[Fig. 4]



[Fig. 5]

