

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 065**

51 Int. Cl.:

C02F 1/28 (2006.01)

B01D 15/00 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2010 PCT/US2010/053389**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11050072**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2010 E 10825598 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2490986**

54 Título: **Métodos y sistemas para purificar la neurotoxina botulínica no complejada**

30 Prioridad:

21.10.2009 US 253810 P

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

30.10.2018

73 Titular/es:

**REVANCE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
7555 Gateway Boulevard
Newark, CA 94560, US**

72 Inventor/es:

RUEGG, CURTIS L.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 688 065 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

Métodos y sistemas para purificar la neurotoxina botulínica no complejada

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/253.810, presentada el 21 de octubre de 2009.

Campo de la invención

- 10 Esta invención se refiere en general a métodos y sistemas cromatográficos para purificar la neurotoxina botulínica libre a partir de cultivos celulares para producir un producto de alta pureza y alta potencia.

Antecedentes de la invención

- 15 La toxina botulínica es una proteína neurotóxica producida por la bacteria *Clostridium botulinum*, así como otras especies de *Clostridium*, tales como *Clostridium butyricum* y *Clostridium baraffi*. La toxina bloquea la transmisión neuromuscular y causa una enfermedad neuro-paralítica en humanos y animales, conocida como botulismo. *C. botulinum* y sus esporas comúnmente se encuentran en el suelo y en la putrefacción de los cadáveres de los animales, y pueden crecer en envases de alimentos inapropiadamente esterilizados o mal sellados, que son la causa de muchos casos de botulismo. Los síntomas del botulismo pueden incluir dificultad para caminar, tragar y hablar, y pueden progresar a la parálisis de los músculos respiratorios y finalmente a la muerte.

- 20 La toxina botulínica tipo A es la sustancia natural más letal conocida por el hombre. Además del serotipo A, se han caracterizado otras seis toxinas botulínicas en general inmunológicamente distintas, a saber, los serotipos de toxina botulínica B, C₁, D, E, F y G. Los diferentes serotipos se pueden distinguir por neutralización con anticuerpos específicos de tipo y varían en la gravedad de la parálisis que provocan y en las especies animales a las que afectan principalmente. El peso molecular de la molécula de proteína de la toxina botulínica, para cada uno de los serotipos de toxina botulínica conocidos, es de aproximadamente 150 kD, compuesta por una cadena pesada de aproximadamente 100 kD unida a una cadena ligera de aproximadamente 50 kD. No obstante, las toxinas botulínicas son liberadas por las bacterias *Clostridial* como complejos de la toxina de 150 kD con una o más proteínas no tóxicas. Por ejemplo, la toxina botulínica tipo A existe como complejos de 900 kD, 500 kD y 300 kD (pesos moleculares aproximados).

- 35 A pesar de los efectos tóxicos conocidos, la toxina botulínica tipo A se utiliza clínicamente para tratar una variedad de indicaciones, que incluyen, por ejemplo, trastornos neuromusculares caracterizados por hiperactividad del músculo esquelético. Por ejemplo, BOTOX® es la marca registrada de un complejo de toxina botulínica tipo A disponible en el mercado en Allergan, Inc., de Irvine, California. La toxina botulínica tipo A es útil, por ejemplo, en el tratamiento del blefaroespasma esencial, estrabismo, distonía cervical, y arrugas de la línea glabellar (facial). También se han usado clínicamente otros serotipos. Una toxina botulínica tipo B, por ejemplo, se ha indicado para su uso en el tratamiento de la distonía cervical. Se cree que las toxinas botulínicas se unen con gran afinidad a la membrana presináptica de las neuronas motoras, se translocan a la neurona y a continuación bloquean la liberación presináptica de acetilcolina.

- 45 La toxina botulínica para su uso clínico se aísla normalmente del cultivo celular y se han usado diversos enfoques de purificación. Históricamente, la toxina se purifica en forma de complejo mediante una serie de etapas de precipitación y filtración de flujo tangencial. Véase, por ejemplo, Schantz E. J., et al., Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine, *Microbiol Rev* 1992 March 56(1):80-99. Sin embargo, dichos enfoques han proporcionado rendimientos relativamente bajos, normalmente menos de aproximadamente el 10 %. Otros enfoques han utilizado exclusión por tamaño, intercambio iónico y/o cromatografía de afinidad. Véase, por ejemplo, Schmidt J. J., et al., Purification of type E botulinum neurotoxin by high-performance ion exchange chromatography, *Anal. Biochem.* Julio 1986; 156(1):213-219; Simpson L. L., et al., Isolation and characterization of the botulinum neurotoxins, Harsman S, ed. *Methods in Enzymology*. Vol. 165, *Microbial Toxins: Tools in Enzymology* San Diego, Calif.: Academic Press; vol 165: págs. 76-85 (1988); Kannan K., et al., Methods development for the biochemical assessment of Neurobloc (botulinum toxin type B), *Mov Disord* 2000; 15(Suppl 2):20 (2000); Wang Y.C., The preparation and quality of botulinum toxin type A for injection (BTXA) and its clinical use, *Dermatol Las Faci Cosm Surg* 2002; 58 (2002); y la Patente de los Estados Unidos Appl. Publ. n.º 2003/0008367.

- 60 Todavía otros enfoques se han centrado en solo una de las cadenas pesadas o ligeras de la toxina, en lugar de una proteína de toxina botulínica completa y biológicamente activa. Por ejemplo, una de las cadenas se sintetiza individualmente por medios recombinantes. Véase, por ejemplo, Zhou L., et al., Expression and purification of the light chain of botulinum neurotoxin A: A single mutation abolishes its cleavage of SNAP-25 and neurotoxicity after reconstitution with the heavy chain, *Biochemistry* 1995; 34(46):15175-81 (1995); y Johnson S. K., et al., Scale-up of the fermentation and purification of the recombination heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype F, expressed in *Pichia pastoris*, *Protein Expr and Purif* 2003; 32:1-9 (2003). Estos enfoques, sin embargo, requieren etapas adicionales para reformar una proteína de toxina botulínica completa y biológicamente activa.

Un enfoque más reciente implica el uso de cromatografía de interacción hidrófoba, modo mixto y/o cromatografía de intercambio iónico para purificar una toxina botulínica como un complejo. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 7.452.697 y 7.354.740. Gessler, Journal of Biotechnology, 119 (2005) 204-211, describe un método escalable para la purificación de la neurotoxina botulínica tipo E.

5 La patente US 2006/0228780 A1, publicada el 12 de octubre de 2006, describe procesos y sistemas cromatográficos para purificar un complejo de toxina botulínica a partir de un medio de fermentación libre de proteína animal.

10 Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de métodos de purificación mejorados para aislar proteínas completas de toxina botulínica A en formas estables, biológicamente activas, pero no complejadas. Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar composiciones y métodos que aborden estas y otras necesidades.

15 La discusión anterior se presenta únicamente para proporcionar una mejor comprensión de la naturaleza de los problemas a los que se enfrenta la técnica y no debe interpretarse de ninguna manera como una admisión en el estado de la técnica ni debe interpretarse que la cita de cualquier referencia en el presente documento sea una admisión de que dicha la referencia constituye el "estado de la técnica" para la presente solicitud.

Sumario de la invención

20 Esta invención se refiere a sistemas y métodos para purificar una toxina botulínica no complejada de tipo A (toxina botulínica A). En una realización, el método comprende purificar la toxina botulínica A en bruto no complejada para obtener una toxina botulínica A purificada no complejada. En esta realización, el método comprende cargar una columna de intercambio de aniones con la toxina botulínica A en bruto no complejada para capturar la toxina botulínica no complejada en la columna de intercambio aniónico; eluir la toxina botulínica A no complejada con tampón para dar un eluyente que comprende la toxina botulínica A no complejada; la carga de una columna de
25 intercambio catiónico con el eluyente de la columna de intercambio aniónico para permitir la captura de la toxina botulínica A no complejada; y eluir la toxina botulínica A no complejada con otro tampón para dar un eluyente, obteniendo de ese modo una toxina botulínica A no complejada purificada.

30 En ciertas realizaciones, el complejo de toxina botulínica A se obtiene en sí mismo mediante varias etapas de cromatografía. En algunas realizaciones, un método para obtener el complejo de toxina botulínica A comprende obtener una muestra que comprende un complejo de toxina botulínica A; cargar una columna de interacción hidrófoba con la muestra para permitir la captura de la toxina, en el que la toxina botulínica A capturada comprende una toxina botulínica A complejada; y eluir la toxina botulínica A complejada. La toxina botulínica A no complejada se
35 disocia a continuación, a partir del complejo y la toxina botulínica A no complejada se purifica de acuerdo con el método descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene sometiendo un cultivo de fermentación que comprende toxina botulínica A a ácido para obtener un precipitado ácido, que puede someterse a etapas adicionales de purificación previa a la cromatografía, cuyos ejemplos no limitantes incluyen filtración de flujo tangencial para concentrar el material insoluble del precipitado, digestión con nucleasa, centrifugación y/o filtración clarificante.

40 En algunas realizaciones, la muestra se somete a una digestión con nucleasa antes de cargarla en la columna de interacción hidrófoba. Preferiblemente, la nucleasa se deriva en un proceso libre de producto animal, e incluso más preferiblemente todo el proceso de purificación está libre de producto animal o al menos sustancialmente libre de producto animal.

45 En algunas realizaciones, la muestra a usar en las separaciones cromatográficas es preferiblemente una fracción de sobrenadante o filtrado.

50 En algunas realizaciones preferidas, la toxina botulínica A no complejada purificada es al menos un 98 % pura; y/o tiene una actividad de al menos 200 unidades DL₅₀/ng. En algunas realizaciones, el método produce un rendimiento de al menos aproximadamente 2 mg/l de cultivo de fermentación. En otras realizaciones, el método produce un rendimiento de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 mg/l de cultivo de fermentación.

55 Estos y otros aspectos de la invención se entenderán mejor por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de las figuras

60 La Figura 1 es un diagrama de flujo resumido que compara una realización de un proceso según la presente invención para purificar directamente una toxina botulínica no complejada (Figura 1A) con un proceso para purificar una toxina botulínica complejada (Figura 1B).

Descripción detallada

65 Esta invención se refiere a sistemas y métodos para la purificación de una toxina botulínica A no complejada. En ciertas realizaciones, el método comprende purificar una toxina botulínica A en bruto no complejada mediante la

carga de una columna de intercambio de aniones con la toxina botulínica A en bruto no complejada para permitir la captura de la toxina botulínica A no complejada por la columna de intercambio aniónico. La toxina botulínica A no complejada se eluye entonces con tampón para dar un eluyente que comprende la toxina botulínica A no complejada. El eluyente de la columna de anión se carga en una columna de intercambio catiónico para permitir la
 5 captura de la toxina botulínica A no complejada y la toxina botulínica A no complejada purificada se eluye con tampón, obteniendo de ese modo una toxina botulínica A no complejada purificada.

En algunas realizaciones, la invención proporciona la purificación de la toxina botulínica A no complejada en un número relativamente pequeño de etapas para producir un producto de alto rendimiento, alta pureza y alta potencia.
 10 Los procesos y sistemas dentro del alcance de la invención se pueden usar para producir eficientemente una toxina botulínica A estable pero no complejada a partir de cultivos de fermentación. En otras realizaciones, el método comprende además proporcionar una muestra que comprende un complejo de toxina botulínica A y cargar una columna de interacción hidrófoba con la muestra para permitir la captura del complejo de toxina botulínica A por la
 15 columna de interacción hidrófoba. El complejo de toxina botulínica A se eluye de la columna con tampón. La toxina botulínica A en bruto no complejada se disocia del complejo de toxina botulínica A para obtener una mezcla que comprende la toxina botulínica A en bruto no complejada. En esta realización, la mezcla que comprende toxina botulínica A no purificada se purifica para obtener toxina botulínica A pura o sustancialmente pura según al método descrito anteriormente.

Un aspecto de esta invención es el reconocimiento de que una composición farmacéutica que comprende toxina botulínica no complejada como ingrediente activo puede proporcionar una mayor pureza en comparación con una que comprende una forma complejada. Las proteínas no tóxicas normalmente asociadas con un complejo de toxina botulínica pueden representar aproximadamente el 90 % en peso del complejo. Por lo tanto, proporcionar una toxina botulínica como un complejo incluye necesariamente al menos aproximadamente el 90 % en peso de impurezas. En
 20 otras palabras, al menos aproximadamente el 80 a aproximadamente el 90 % en peso de la composición farmacéutica incluirá impurezas derivadas de células que no son parte de la molécula activa ni necesarias para su actividad biológica. Dichas impurezas, sin embargo, representan materiales derivados de células que cuando se administran a un paciente pueden aumentar el riesgo de reacciones inmunológicas no deseadas al fármaco; puede aumentar el riesgo de efectos secundarios no deseados; y/o puede aumentar el riesgo de transmisión de agentes
 25 patógenos. Por el contrario, la alta pureza de un producto no complejo, obtenible mediante los métodos y sistemas descritos en la presente memoria, reduce la cantidad de impurezas de la célula hospedadora que puede permanecer en la composición farmacéutica, reduciendo así los riesgos concomitantes de reacciones y/o transmisión no deseadas. En consecuencia, los procesos y sistemas descritos en este documento pueden proporcionar una toxina botulínica en una forma más fácilmente adecuada para la preparación de composiciones
 30 farmacéuticas más seguras y puras.
 35

Además, a diferencia de las formas complejas, la toxina botulínica libre preparada de acuerdo con el método descrito en el presente documento no tiene que estabilizarse para el almacenamiento en productos derivados de sangre. El complejo de toxina botulínica tipo A, por ejemplo, normalmente se estabiliza en un excipiente que comprende
 40 albúmina, que se deriva de sangre humana. Por ejemplo, BOTOX® consiste en un complejo de toxina botulínica tipo A purificado, albúmina sérica humana y cloruro de sodio envasados en una forma secada al vacío. Lo mismo es cierto para Dysport y Xeomin. Si bien los exámenes de detección reducen la probabilidad de contaminación con agentes patógenos, el uso de sangre humana en preparaciones farmacéuticas generalmente aumenta el riesgo de transmisión no deseada de ciertos agentes patógenos, por ejemplo, agentes que no se han eliminado o aún no se
 45 pueden eliminar. Por el contrario, la toxina botulínica libre preparada de acuerdo con la presente invención puede almacenarse de manera estable, como se describe en este documento, en sulfato de amonio. Además, en algunas realizaciones preferidas, los métodos y sistemas de la presente invención están sustancial, esencial o totalmente libres de productos animales, como se describe en el presente documento. La capacidad de almacenar también de
 50 forma estable el producto de toxina sustancial, esencial, o totalmente libre de productos de origen animal, reduce aún más los riesgos potenciales asociados con los productos derivados de animales. En consecuencia, los procesos y sistemas descritos en este documento proporcionan una toxina botulínica en una forma particularmente adecuada para aplicaciones farmacéuticas en términos de seguridad, por ejemplo, cuando la composición farmacéutica puede prepararse y almacenarse sustancial, esencial, o totalmente libre de productos de origen animal.

En ciertas realizaciones preferidas, los procesos y sistemas descritos en este documento son escalables y/o cumplen con cGMP. De acuerdo con esto, los métodos y sistemas descritos en este documento se pueden usar a
 55 escala industrial comercial, para producir toxina botulínica no complejada para su uso, por ejemplo, en composiciones farmacéuticas. Un proceso o sistema que cumple con cGMP se refiere a uno que puede cumplir con los requisitos reglamentarios para las buenas prácticas de fabricación vigentes, tal como exige el Código de Regulaciones Federales de EE.UU. En algunas realizaciones preferidas, el producto de toxina botulínica A no
 60 complejo es particularmente adecuado para la producción a gran escala debido a su facilidad de almacenamiento y usabilidad, alta actividad, alta pureza, estabilidad y/o seguridad mejorada.

"Toxina botulínica", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de proteína de neurotoxina
 65 que puede producirse por una bacteria *Clostridial*, así como a formas producidas recombinantemente de la misma. Una toxina botulínica recombinante puede tener la cadena ligera y/o cadena pesada de la proteína de la toxina

5 sintetizada por medio de técnicas recombinantes, por ejemplo, por especies *Clostridial* y/o no *Clostridial* recombinantes. La "toxina botulínica" se usa de forma intercambiable en la presente memoria con las expresiones relacionadas "neurotoxina botulínica", "neurotoxina" o simplemente "toxina". "Toxina botulínica", abarca cualquiera de los serotipos de toxina botulínica A, B, C₁, D, E, F y G, y también abarca formas tanto complejadas como no complejadas.

10 Por "forma compleja" se quiere decir un complejo de toxina botulínica que comprende una proteína de toxina botulínica (es decir, la molécula de toxina con un peso molecular de aproximadamente 150 kD) así como al menos una proteína nativa no toxina asociada. Las proteínas no tóxicas que componen los complejos normalmente incluyen proteínas de hemaglutinina que no son toxinas y proteínas que no son hemaglutininas y que no son toxinas. Por lo tanto, las formas complejadas pueden comprender una molécula de toxina botulínica (el componente neurotóxico) y una o más proteínas de hemaglutinina que no son toxinas y/o una o más proteínas que no son hemaglutininas que no son toxinas. En ciertas realizaciones, el peso molecular del complejo es mayor que aproximadamente 150 kD. Por ejemplo, formas complejadas de la toxina botulínica tipo A pueden tener pesos moleculares de aproximadamente 900 kD, aproximadamente 500 kD o aproximadamente 300 kD. Las formas complejadas de la toxina botulínica de los tipos B y C₁ pueden tener un peso molecular de 500 kD. Las formas complejadas de toxina botulínica tipo D pueden tener un peso molecular de aproximadamente 300 kD o aproximadamente 500 kD. Finalmente, las formas complejadas de toxina botulínica tipo E y F pueden tener un peso molecular de aproximadamente 300 kD.

20 La toxina botulínica "no complejada" se refiere a una proteína de toxina botulínica aislada, o esencial o sustancialmente aislada, que tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kD. Es decir, las formas "no complejadas" excluyen las proteínas no tóxicas, tales como la hemaglutinina no toxina y las proteínas no hemaglutininas que no son toxinas, normalmente asociadas con la forma complejada. La toxina botulínica "no complejada" se usa de forma intercambiable en la presente memoria con toxina botulínica "libre". Todos los serotipos de toxina botulínica hechos por las bacterias *Clostridium botulinum* nativas son sintetizadas por las bacterias como proteínas de cadena simple inactivas que luego son escindidas o cortadas por proteasas para convertirse en neuroactivas. La proteína comprende una cadena pesada de aproximadamente 100 kD unida por un enlace disulfuro a una cadena ligera de aproximadamente 50 kD.

30 Los complejos de toxina botulínica se pueden disociar en toxinas y proteínas no tóxicas por varios medios, incluyendo, por ejemplo, elevar el pH a aproximadamente 7,0, tratar el complejo con glóbulos rojos a un pH de aproximadamente 7,3, y/o someter el complejo a un proceso de separación, tal como cromatografía en columna en un tampón adecuado a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

35 La presente invención abarca métodos que permiten la purificación de una toxina botulínica A no complejada, sin proteínas asociadas que no sean toxinas que convencionalmente se consideran necesarias durante el proceso de purificación para mantener la estabilidad. En realizaciones preferidas, los métodos descritos en este documento facilitan la purificación de la toxina botulínica A sin pérdida de estabilidad. Por "estabilidad" o "estable" se entiende que la molécula de proteína de toxina botulínica retiene tanto la cadena pesada de aproximadamente 100 kD como la cadena ligera de aproximadamente 50 kD, unidas entre sí mediante un enlace disulfuro y en una conformación que permite la actividad biológica.

45 En algunas realizaciones, se opera un sistema particular junto con un método particular dentro del alcance de la presente invención. Un sistema usado dentro del alcance de la presente invención puede comprender una pluralidad (preferiblemente series consecutivas) de columnas de cromatografía para su uso con una pluralidad correspondiente (preferiblemente series consecutivas) de etapas de cromatografía. Además, un sistema usado dentro del alcance de la presente invención puede comprender una pluralidad (preferiblemente una serie consecutiva) de dispositivos no cromatográficos, tales como un aparato de filtración y/o centrifugación, para usar con una pluralidad correspondiente (preferiblemente series consecutivas) de etapas no cromatográficas, por ejemplo, como etapas de precromatografía.

50 En realizaciones preferidas, un proceso dentro del alcance de la presente invención comprende obtener una muestra que comprende toxina botulínica A de un cultivo de fermentación; someténdolo a una serie de purificaciones previas a la cromatografía; y a continuación pasar a través de una pluralidad de columnas de cromatografía para obtener una toxina botulínica A no complejada muy potente y muy purificada. Dicha toxina botulínica A libre purificada encuentra uso en la preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden la toxina botulínica A libre como ingrediente activo.

60 Las etapas globales para ambos procesos de pre-cromatografía y cromatografía para algunas realizaciones preferidas de la presente invención se ilustran en la Figura 1A. Para comparación, la Figura 1B muestra un método convencional para obtener un complejo de toxina botulínica purificada. Brevemente, la Figura 1B representa un proceso que la implica filtración en profundidad de un cultivo de fermentación, seguido de filtración de flujo tangencial del filtrado obtenido (usando ultramicrofiltración de 300 kD); seguido por una etapa de centrifugación clarificante. El sedimento (fracción insoluble) resultante de la etapa de centrifugación se resuspende en cloruro de sodio y se carga en una columna de interacción hidrófoba o de intercambio iónico. La etapa de purificación cromatográfica se repite al menos tres veces para dar un eluyente final que contiene el complejo de toxina botulínica

tipo A de 900 kD.

Fermentación y precipitación ácida

5 Como ilustra la Figura 1A, la toxina botulínica no complejada se purifica generalmente a partir de un cultivo de fermentación. Un "cultivo de fermentación" como se usa en el presente documento se refiere a un cultivo o medio que comprende células, y/o componentes de los mismos, que están sintetizando y/o han sintetizado al menos una toxina botulínica. Por ejemplo, las bacterias *Clostridial*, tales como *Clostridium botulinum*, se pueden cultivar en placas de agar en un entorno propicio para el crecimiento bacteriano, tal como en una atmósfera anaerobia cálida.

10 La etapa de cultivo normalmente permite que se obtengan colonias *Clostridial* con morfología deseable y otras características. Las colonias *Clostridial* seleccionadas pueden fermentarse entonces en un medio adecuado como cultivo de fermentación. Las células cultivadas pueden incluir especies no *Clostridial* como las células hospedadoras, tales como *E. coli* o células de levadura, que se vuelven capaces de biosintetizar una toxina botulínica mediante tecnología recombinante. Las condiciones de cultivo de fermentación adecuadas pueden depender de las células hospedadoras utilizadas y son generalmente conocidas en la técnica.

En realizaciones preferidas, se puede permitir que la fermentación progrese hasta su finalización, de modo que las células sean maduras y hayan biosintetizado una toxina botulínica. El crecimiento de cultivos de *Clostridium botulinum* generalmente se completa después de aproximadamente 24 a aproximadamente 36 horas. Después de un cierto período de tiempo adicional, las bacterias normalmente se lisan y liberan en el medio el complejo de toxina botulínica sintetizado en una forma complejada. Por ejemplo, durante una fermentación de aproximadamente 60 a aproximadamente 96 horas, la mayoría de las células de *Clostridium botulinum* experimentan lisis y liberan el complejo de toxina botulínica tipo A.

25 En algunas realizaciones, el cultivo de fermentación puede comprender uno o más productos animales, tales como proteínas animales, usados en procedimientos de cultivo de fermentación convencionales. Por ejemplo, la toxina botulínica puede producirse por fermentación anaeróbica de *Clostridium botulinum* utilizando una versión modificada del proceso bien conocido de Schantz (véase, por ejemplo, Schantz E. J., et al., Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine, Microbiol Rev 1992 March; 56(1):80-99; Schantz E. J., et al., Preparation and characterization of botulinum toxin type A for human treatment, chapter 3 in Jankovic J, ed. Neurological Disease and Therapy. Therapy with botulinum toxin (1994), New York, Marcel Dekker; 1994, pág. 41-49, y; Schantz E. J., et al., Use of crystalline type A botulinum toxin in medical research, in: Lewis G E Jr, ed. Biomedical Aspects of Botulism (1981) New York, Academic Press, pág. 143-50). Tanto el proceso de Schantz como el proceso de Schantz modificado para obtener una toxina botulínica hacen uso de productos de origen animal, incluido el medio Bacto-Cooked Meat de origen animal en el vial de cultivo, y la caseína en los medios de fermentación. Además, la purificación de la toxina de Schantz hace uso de DNasa y RNasa de fuentes bovinas para hidrolizar ácidos nucleicos presentes en el cultivo de fermentación.

40 Sin embargo, la administración de un producto farmacéutico que contiene un ingrediente activo que se purificó usando un proceso que implica productos derivados de animales puede someter a un paciente a un riesgo potencial de recibir diversos agentes patógenos. Por ejemplo, puede haber presentes priones en una composición farmacéutica que comprende productos derivados de animales contaminantes, tales como el prion responsable de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. Como otro ejemplo, existe el riesgo de transmitir una encefalopatía espongiiforme (TEE), como una encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) cuando se utilizan productos animales en el proceso de fabricación de una composición farmacéutica. Sin embargo, el uso de una toxina botulínica obtenida a través de procesos libres de productos animales reduce dichos riesgos. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, la invención proporciona un proceso que está libre de productos de origen animal, o esencial o sustancialmente libre de producto de animal (LPA). "Libre de producto de animal", "esencialmente libre de producto animal", o "sustancialmente libre de producto animal" abarca, respectivamente, "libre de proteína animal", "esencialmente libre de proteínas animales", o "sustancialmente libre de proteínas animales" y significa respectivamente la ausencia, ausencia esencial, o ausencia sustancial, de productos derivados de animales, cuyos ejemplos no limitantes incluyen productos derivados de sangre o sangre reunida. "Animal" se utiliza en este documento para referirse a un mamífero (como un ser humano), ave, reptil, anfibio, pez, insecto, araña u otras especies animales, pero excluye microorganismos, como bacterias y levaduras.

55 Un proceso libre de productos de origen animal (o un proceso sustancial o esencialmente libre de productos de origen animal) se refiere a un proceso que está entera, sustancial o esencialmente libre de productos, reactivos y proteínas derivados de animales, como inmunoglobulinas, otros productos, subproductos o digeridos sanguíneos; productos cárnicos, subproductos cárnicos, digeridos cárnicos; y leche o productos, subproductos o digeridos lácteos. Por consiguiente, un ejemplo de un procedimiento de cultivo de fermentación libre de un producto animal es un proceso de fermentación, tal como cultivo bacteriano, que excluye productos, subproductos y digeridos de la sangre, la carne y la leche. Un proceso de fermentación libre de productos de origen animal para obtener una toxina botulínica no complejada reduce la posibilidad de contaminación con virus, priones u otros agentes indeseables, que pueden acompañar a la toxina cuando se administra a seres humanos.

65

Se describen procedimientos de fermentación libres de productos animales utilizando cultivos de *Clostridium*, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 7.452.697 y 7.354.740. Por ejemplo, los medios de crecimiento para la producción de la toxina botulínica pueden comprender productos basados en vegetales, en lugar de productos derivados de animales, tales como productos a base de soja y/o la semilla sin sabor de *Lupinus campestris*. Los medios de fermentación basados en soja para usar en un cultivo de fermentación libre de productos de origen animal, por ejemplo, pueden comprender un producto a base de soja, una fuente de carbono tal como glucosa, sales tales como NaCl y KCl, ingredientes que contienen fosfato tales como Na₂HPO₄ y KH₂PO₄, cationes divalentes tales como hierro y magnesio, polvo de hierro, aminoácidos tales como L-cisteína y L-tirosina, y similares. Preferiblemente, la soja es soja hidrolizada y la hidrolización se ha llevado a cabo usando enzimas no derivadas de animales. Las fuentes de soja hidrolizada 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, NY) y SE50MK (DMV).

Como ilustra la Figura 1A, en ciertas realizaciones, una muestra que comprende toxina botulínica A se obtiene de un cultivo de fermentación. Por ejemplo, después de un cierto período de fermentación, en medio libre de productos de origen animal o libre de productos de origen no animal, el complejo de toxina botulínica A se libera en el medio y se puede recoger por precipitación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, como en el proceso de Schantz bien conocido, el medio de fermentación que comprende la toxina botulínica A puede someterse a precipitación ácida para estimular que los complejos de toxina botulínica se asocien a desechos celulares y formen un precipitado ácido. En algunas realizaciones particularmente preferidas, se puede añadir aproximadamente 3 M de solución de ácido sulfúrico al cultivo de fermentación para formar el precipitado ácido. Preferiblemente, el pH se reduce de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, más preferiblemente de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,8, y aún más preferiblemente a aproximadamente 3,5. En algunas realizaciones, la temperatura de cultivo también se reduce, por ejemplo, a aproximadamente por debajo de 25 °C, 24 °C, 23 °C, 22 °C, 21 °C o 20 °C. Estas condiciones mejoran aún más la asociación de complejos de toxina botulínica con restos celulares. El precipitado ácido formado comprenderá complejos de toxina botulínica unidos y se pueden usar como material de partida en etapas de purificación adicionales, tales como etapas de clarificación; mientras que el filtrado se descarta.

Por el contrario, el proceso convencional representado en la Figura 1B no incluye una etapa de precipitación ácida. Es decir, mientras que el procedimiento de purificación también comienza con un cultivo de fermentación que comprende un complejo de toxina botulínica, el medio de cultivo se somete a filtración en profundidad, y se usa el filtrado, en lugar de los restos celulares, en etapas de purificación posteriores. En el proceso de la Figura 1B, los desechos celulares se descartan, en lugar del filtrado, mientras que, como se ilustra en la Figura 1A, el filtrado se descarta y los restos celulares (precipitado ácido) se usan para etapas de purificación adicionales, por ejemplo, en las purificaciones previas a la cromatografía discutidas a continuación.

Purificaciones previas a la cromatografía

En algunas realizaciones, la muestra obtenida del medio de fermentación se somete a una o más purificaciones previas a la cromatografía. Las purificaciones previas a la cromatografía pueden incluir al menos uno de filtración de flujo tangencial, digestión de nucleasa y centrifugación y/o filtración de clarificación. Un ejemplo no limitante de una purificación previa a la cromatografía que contiene un flujo de proceso contemplada por la invención se proporciona en la Figura 1A. Como se ha indicado anteriormente, en realizaciones preferidas, los procedimientos de precromatografía se llevan a cabo en un precipitado (o fracción insoluble) de un cultivo de fermentación que comprende la toxina botulínica A, en lugar de en el propio cultivo de fermentación o en un filtrado derivado del mismo, como en el proceso ilustrado en la Figura 1B. Es decir, en realizaciones preferidas de la invención, las etapas de precromatografía (clarificación) comienzan con el precipitado ácido (fracción insoluble).

En algunas realizaciones, la muestra (precipitado ácido o fracción insoluble) que comprende una toxina botulínica A se somete a filtración de flujo tangencial. La filtración de flujo tangencial es un proceso usado normalmente para clarificar, concentrar y/o purificar proteínas. A diferencia de la filtración de flujo normal, donde el fluido se mueve directamente hacia una membrana de filtro bajo presión aplicada, en la filtración de flujo tangencial, el fluido se mueve tangencialmente a lo largo o paralelo a la superficie de la membrana. La presión aplicada sirve para forzar una porción del fluido a través de la membrana del filtro, al lado del filtrado, mientras que las partículas y macromoléculas demasiado grandes para pasar a través de los poros de la membrana se retienen. Sin embargo, a diferencia de la filtración de flujo normal, los componentes retenidos no se acumulan en la superficie de la membrana sino que son arrastrados por el fluido de flujo tangencial. En ciertas realizaciones preferidas, el complejo botulínico se asocia, mientras que permite que el filtrado pase a través de los poros de la membrana. (Véase, por ejemplo, Figura 1A). Los parámetros de filtración de flujo tangencial, tales como el tamaño de poro, el flujo de alimentación, la presión aplicada y similares, pueden ser seleccionados por los expertos en la materia para concentrar desechos celulares y producir una muestra más concentrada que comprenda el complejo de toxina botulínica A. En algunas realizaciones particularmente preferidas, por ejemplo, se puede usar filtración de flujo tangencial con filtros que tienen un tamaño de poro de aproximadamente 0,1 µm.

En algunas realizaciones, la muestra que comprende una toxina botulínica A se somete a digestión con nucleasas. La digestión con nucleasa puede facilitar la eliminación de los componentes de ácido nucleico con los que tienden a

asociarse los complejos de toxina botulínica. En ciertas realizaciones preferidas, la digestión con nucleasas sigue a la filtración de flujo tangencial y se lleva a cabo en los residuos celulares concentrados obtenidos a partir de los mismos. (Véase, por ejemplo, Figura 1A). Por ejemplo, la muestra de residuos celulares concentrados puede tener su pH ajustado para permitir la actividad nucleasa y puede incubarse con una o más nucleasas adecuadas, tales como ADNasas y/o ARNasas que digieren (hidrolizan) el ADN y/o el ARN, respectivamente. Dependiendo de la enzima nucleasa usada, el pH adecuado puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, preferiblemente de aproximadamente 6. En algunas realizaciones, se usa benzamidina como inhibidor de proteasa para prevenir la proteólisis de la toxina durante la etapa de digestión con nucleasas. La nucleasa utilizada puede derivarse de cualquier fuente adecuada, incluidas fuentes animales y/o fuentes no animales.

En realizaciones más preferidas, la nucleasa se obtiene de una fuente no animal, para proporcionar una nucleasa libre de producto animal y un proceso libre de producto animal. Por consiguiente, la presente invención abarca procesos libres de productos animales (o procesos sustancial o esencialmente libres de productos animales) para purificar la toxina botulínica que comprende el uso de una nucleasa. Una nucleasa libre de producto animal puede prepararse de forma recombinante, por ejemplo, usando bacterias recombinantes, levaduras u otros microorganismos adecuados, que se han transformado para expresar una DNasa y/o RNasa para su uso en una etapa de digestión con nucleasas de acuerdo con los procesos descritos en este documento. La digestión con nucleasa normalmente reduce el contenido de ácido nucleico de la muestra, ya que los ácidos nucleicos de la célula hospedadora se degradan y se facilita su eliminación. Por ejemplo, los ácidos nucleicos hidrolizados y otras impurezas de bajo peso molecular se pueden eliminar mediante etapas de purificación adicionales.

En ciertas realizaciones, la muestra que comprende una toxina botulínica A puede someterse a centrifugación y/o filtración clarificante. La centrifugación o filtración clarificante se refiere a las etapas de centrifugación o filtración usadas para eliminar elementos gruesos, tales como células completas y lisadas y restos celulares, de la muestra, dando como resultado una muestra mensurablemente más clara. En ciertas realizaciones, la centrifugación se realiza de aproximadamente 10.000 x g a aproximadamente 30.000 x g, más preferiblemente de aproximadamente 15.000 x g a aproximadamente 20.000 x g, y lo más preferiblemente a aproximadamente 17.700 x g. La filtración clarificante generalmente comprenderá filtración de flujo normal, también llamada filtración "sin salida", donde el fluido se mueve directamente hacia un medio filtrante bajo presión aplicada, y las partículas demasiado grandes para atravesar los poros del filtro se acumulan en la superficie o dentro del propio medio, mientras que las moléculas más pequeñas pasan como filtrado. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la muestra se mezcla con sulfato de amonio y la filtración de flujo normal se realiza usando un filtro con un tamaño de poro de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 μm , y más preferiblemente un tamaño de poro de aproximadamente 0,2 μm . (Véase, por ejemplo, Figura 1A). En ciertas realizaciones particularmente preferidas, una o más etapas de clarificación siguen a la etapa de digestión con nucleasas. En ciertas realizaciones aún más preferidas, una o más etapas de clarificación preceden inmediatamente a la purificación por cromatografía.

Notablemente, en realizaciones preferidas, el sobrenadante o filtrado clarificado proporciona la muestra que contiene toxina botulínica A para usar en etapas de purificación adicionales, tales como las etapas de purificación por cromatografía, en lugar de la fracción insoluble, que se descarta. Esto está en contraste con el proceso descrito en la Figura 1B, donde el complejo de toxina botulínica está contenido en la fracción insoluble de las etapas de precromatografía que no implican precipitación ácida, tal como, por ejemplo, como un sedimento de centrifugación, obtenido a partir de la centrifugación previa a la cromatografía, y el sobrenadante se descarta.

Por otra parte, y de nuevo en contraste con el proceso descrito en la Figura 1B, las etapas de precromatografía en algunas realizaciones de la invención no requieren una etapa de filtración de flujo tangencial de un filtrado obtenido a partir de un cultivo de fermentación. Es decir, la muestra utilizada para la purificación por cromatografía en algunas realizaciones de la invención no se obtiene sometiendo una fracción soluble del cultivo de fermentación a filtración de flujo tangencial. Por el contrario, en ciertas realizaciones, la presente invención usa material insoluble (tal como un precipitado ácido), eliminando cualquier etapa en la que un filtrado de cultivo de fermentación se someta a filtración de flujo tangencial en un intento de concentrar los complejos solubles de toxina botulínica. Por lo tanto, en realizaciones preferidas, las etapas de precromatografía de la invención eliminan la necesidad de cualquier etapa de este tipo, usando en su lugar ácido para precipitar los complejos de toxinas deseados con otro material insoluble (desechos celulares).

Etapas de purificación cromatográfica

La Figura 1A también ilustra etapas de purificación cromatográfica de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención. Según una realización de la invención, los métodos cromatográficos para purificar una toxina botulínica A no complejada comprenden pasar una muestra que comprende toxina botulínica A a través de una pluralidad de columnas de cromatografía para obtener una forma muy purificada y muy potente no complejada de la neurotoxina.

En ciertas realizaciones, una toxina botulínica A complejada se separa de otros componentes celulares usando una columna de interacción hidrófoba (véase, por ejemplo, Figura 1A). Esta columna captura la toxina botulínica en forma de complejo, mientras permite que las impurezas fluyan a través de la columna. La columna utilizada puede

ser cualquier columna de interacción hidrófoba conocida en la técnica adecuada para dicho fin, tal como la columna Fast Flow de butil Sepharose o fenil Sepharose HP, disponible en el mercado en GE Healthcare Life Sciences. En algunas realizaciones, el método comprende además acondicionar la muestra para cromatografía de interacción hidrófoba antes de cargarla en la columna. Por ejemplo, para usar en la columna de fenil Sepharose HP, la muestra se puede combinar con una solución de sulfato de amonio 0,5 M a pH 6, y fosfato 50 mM antes de la carga. Otras columnas, tampones y condiciones de pH que se pueden usar incluyen columnas tales como fenil Sepharose Fast Flow de alta sustitución, fenil Sepharose Fast Flow de baja sustitución, butil Sepharose, y octil Sepharose; tampones como acetato, citrato, MES, histidina, piperazina y malonato, cada uno en el intervalo de pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,0, más preferiblemente de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, y aún más preferiblemente a aproximadamente 5,5. Se pueden determinar otras condiciones de tampón y pH para optimizar el rendimiento a partir de una columna particular usada, como se conoce en la técnica, en base a las enseñanzas proporcionadas en este documento. Sin desear estar ligados a la teoría, se cree que la separación implica la unión del complejo de toxina a la resina a un pH inferior a 7, para evitar la disociación en esta etapa, al tiempo que permite el paso de muchas impurezas derivadas de las células, tales como, por ejemplo, proteínas más pequeñas, ácidos nucleicos y similares.

Para eluir la toxina capturada (unida) de la columna de interacción hidrófoba, se puede usar un tampón adecuado, como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones particularmente preferidas, se usa un gradiente descendente de sulfato de amonio. El intervalo de concentración del gradiente descendente puede ser de aproximadamente 0,6 M a aproximadamente 0,0 M, de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 0,0 M, o de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 0,0 M. Otros tampones de elución que se pueden usar incluyen, por ejemplo, gradientes descendentes de sulfato de sodio (Na_2SO_4); cloruro de sodio (NaCl); cloruro de potasio (KCl); acetato de amonio (NH_4OAc); y similares. Las fracciones que contienen un pico del producto se pueden identificar, como se conoce en la técnica. La fracción del pico se encuentra normalmente, por ejemplo, cuando se usa sulfato de amonio, en un rango de concentración de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 0,0 M; más preferiblemente de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 0,0 M; y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,25 M a aproximadamente 0,0 M de sulfato de amonio, mientras que el pH se mantiene a aproximadamente 6 para mantener el complejo. Es decir, la fracción o fracciones que contienen el complejo de toxina botulínica A eluida se pueden identificar y usar en etapas de purificación posteriores.

En realizaciones preferidas, se provoca que el complejo de toxina botulínica A se disocie para dar una forma no complejada. En ciertas realizaciones preferidas, la etapa de disociación se realiza después de la etapa de cromatografía de interacción hidrófoba y/o antes de las etapas cromatográficas posteriores (por ejemplo, véase Figura 1A). Por consiguiente, en algunas realizaciones preferidas, la presente invención abarca métodos en los que la molécula diana cromatográfica difiere de una etapa cromatográfica a otra. Es decir, en una etapa cromatográfica inicial, la diana comprende un complejo de toxina botulínica A, mientras que en etapas cromatográficas posteriores, la diana comprende la toxina botulínica A libre, disociada de proteínas no tóxicas tales como proteínas de hemaglutinina y no hemaglutinina. Por el contrario, el proceso descrito en la Figura 1B implica etapas cromatográficas que están diseñadas para purificar complejos de toxina botulínica.

La disociación del complejo de toxina botulínica A para producir la proteína de toxina botulínica A no complejada se puede lograr de varias maneras, por ejemplo, como se conoce en la técnica y/o se describe en este documento. Por ejemplo, la disociación se puede lograr elevando el pH a aproximadamente 7,0; o, en realizaciones en las que no es necesaria la purificación libre de proteína animal, tratar el complejo con glóbulos rojos a un pH de aproximadamente 7,3.

En una realización preferida y para proporcionar toxina libre de proteína animal, el complejo se somete a un proceso de separación basado en el ajuste del pH del complejo en un tampón adecuado. Los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, tampones catiónicos, preferiblemente tampones catiónicos que no interactuarán o no interactuarán sustancialmente con la columna de intercambio aniónico. Los tampones catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, Tris, bis-Tris, trietanolamina, N-metil dietanolamina. Normalmente es adecuado un pH de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8,4; más preferiblemente de entre aproximadamente 7,4 y aproximadamente 8,2; y más preferiblemente un pH de aproximadamente 7,8 para disociar el complejo para liberar la toxina botulínica no complejada. En algunas realizaciones particularmente preferidas, por ejemplo, el pH del eluyente de la columna de interacción hidrófoba se eleva a aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,8, o preferiblemente a aproximadamente 8,0. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el eluyente se puede diluir en un tampón Tris que tiene un pH de aproximadamente 7,8 para provocar que el complejo se disocie en componentes individuales, que incluyen la proteína de toxina botulínica A no complejada de aproximadamente 150 kD. La mezcla resultante que comprende componentes disociados puede someterse después a una o más etapas de purificación por cromatografía adicionales, tales como etapas cromatográficas de intercambio iónico diseñadas para capturar y purificar adicionalmente la toxina no complejada.

En ciertas realizaciones de acuerdo con la invención, la toxina botulínica A no complejada puede purificarse usando una o más etapas cromatográficas de intercambio iónico (por ejemplo, véase Figura 1A). La cromatografía de intercambio iónico logra el fraccionamiento en función de la carga electrostática. El grado en que una proteína determinada se une a la matriz de la columna es una función de la carga neta de la proteína, en función de su

composición de aminoácidos individual y la carga de la matriz de la columna. Las columnas catiónicas de intercambio iónico tienen una matriz de carga neta positiva, mientras que las columnas aniónicas de intercambio iónico tienen una matriz de carga neta negativa. Las proteínas unidas pueden eluirse selectivamente de la columna usando un disolvente (el eluyente) que contiene una sustancia cargada, tal como iones de sal, que compite con el soporte de la matriz cargada para unirse a las proteínas cargadas. Las proteínas unidas pueden fraccionarse en función de la potencia de su carga. Alternativamente, las proteínas pueden eluirse ajustando el pH que puede alterar la carga neta de la proteína alterando así su afinidad a la matriz cargada.

De acuerdo con algunas realizaciones preferidas de la invención, la mezcla que comprende la toxina botulínica A no complejada se carga en una columna de intercambio aniónico (por ejemplo, véase Figura 1A). Notablemente, esta columna captura la toxina botulínica en forma no complejada, de manera que la proteína de la toxina y las proteínas no tóxicas disociadas pueden eluirse en fracciones separadas. La columna utilizada puede ser cualquier columna aniónica conocida en la técnica adecuada para separar proteínas cargadas, cuyos ejemplos no limitantes incluyen Q Sepharose HP, Q Sepharose Fast Flow o Q XL Sepharose, disponibles en el mercado de GE Healthcare Life Sciences. En algunas realizaciones particularmente preferidas, se usa una columna Q XL Sepharose. En algunas realizaciones, el método comprende además acondicionar la mezcla que comprende la toxina botulínica A no complejada para cromatografía de intercambio aniónico antes de cargarla en la columna. Por ejemplo, las condiciones de tampón y pH pueden determinarse para optimizar el rendimiento de la columna particular utilizada, como se conoce en la técnica, en base a las enseñanzas proporcionadas en este documento. Para cargar y usar en la columna, por ejemplo, los tampones adecuados incluyen, sin limitación, tampones catiónicos, preferiblemente tampones catiónicos que no interactuarán o no interactuarán sustancialmente con la columna de intercambio aniónico. Los tampones catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, Tris, bis-Tris, trietanolamina, N-metil dietanolamina. Para cargar y equilibrar la columna, se puede usar un pH de entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 8,6; más preferiblemente entre aproximadamente 7,4 y aproximadamente 8,2; y lo más preferiblemente un pH de aproximadamente 7,8.

Para eluir la toxina capturada (unida) y otros componentes disociados de la columna de intercambio aniónico, se puede usar un tampón adecuado, como se conoce en la técnica. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen, por ejemplo, cloruro de sodio (NaCl); y cloruro de potasio (KCl). En algunas realizaciones particularmente preferidas, se usa un gradiente ascendente de cloruro de sodio. Por ejemplo, se puede usar un tampón de cloruro de sodio que tiene un intervalo de concentración de aproximadamente 0,0 M a aproximadamente 0,4 M de NaCl, más preferiblemente de aproximadamente 0,0 M a aproximadamente 0,5 M de NaCl, y aún más preferiblemente de aproximadamente 0,0 M a aproximadamente 0,6 M de NaCl. Las impurezas separadas en diferentes fracciones pueden incluir, por ejemplo, una o más proteínas no tóxicas del complejo disociado, tales como las proteínas que no son de hemaglutinina y/o proteínas que no son de hemaglutinina que no son toxinas. Se pueden identificar las fracciones que contienen un pico del producto, como se conoce en la técnica. El pico puede ocurrir, por ejemplo, de aproximadamente 8 mSem a aproximadamente 22 mSem a un pH entre aproximadamente 7,4 y aproximadamente 8,4, y preferiblemente a aproximadamente 7,8, que corresponde de aproximadamente 0,08 M a aproximadamente 0,18 M de NaCl. Por el contrario, otras impurezas pueden eluir de aproximadamente 30 a aproximadamente 45 mSem, lo que corresponde de aproximadamente 0,25 M a aproximadamente 0,35 M de NaCl.

La fracción o fracciones que contienen la toxina botulínica A no eluida puede identificarse para proporcionar un eluyente que comprende una toxina botulínica A no complejada. El pico puede identificarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando HPLC, análisis de transferencia de Western, ELISA, SDS-PAGE no reducida, y similares. La SDS-PAGE en condiciones no reductoras, por ejemplo, puede identificar la banda de toxina de aproximadamente 150 kDa, mientras que otras impurezas aparecerán en bandas correspondientes a moléculas más pequeñas. Este eluyente que comprende una forma no complejada a continuación puede someterse a etapas de purificación cromatográfica adicionales.

En una realización particularmente preferida, la pureza de la toxina se evalúa mediante SDS-PAGE. Como apreciará el experto en la materia, el análisis SDS-PAGE puede realizarse en ausencia o presencia de agentes que escinden enlaces disulfuro presentes en la proteína (es decir, condiciones no reductoras o reductoras, respectivamente). Por ejemplo, con respecto a la toxina botulínica tipo A, la forma madura y activa de la molécula de proteína de toxina botulínica tipo A está compuesta por dos cadenas polipeptídicas de 100 kD y 50 kD, respectivamente, que se mantienen juntas por interacciones no covalentes así como enlaces disulfuro. Cuando la toxina botulínica tipo A producida por el proceso de la invención se analiza usando condiciones no reductoras, las moléculas de proteína tipo A de toxina botulínica migran como una sola banda de proteína de aproximadamente 150 kD y la pureza medida normalmente es superior al 98 %. Cuando la cantidad de proteína de tipo A de la toxina botulínica cargada por carril de gel se mantiene dentro del rango dinámico del densitómetro, entonces hay pocas, si las hay, bandas de impurezas detectables que dan como resultado una pureza medida del 100 %. Cuando la toxina botulínica tipo A está sobrecargada de modo que la banda de toxina principal está por encima del rango dinámico del densitómetro, entonces pueden detectarse algunas bandas de impurezas menores (tanto como el 1-2 %).

Sin embargo, cuando el análisis SDS-PAGE de toxina botulínica tipo A se realiza en condiciones reductoras, el enlace disulfuro de la toxina botulínica se escinde y la proteína tóxica botulínica tipo A migra como dos componentes que tienen pesos moleculares de 100 kD y 50 kD, respectivamente. Cuando la toxina botulínica tipo A

se carga de forma tal que las especies principales están por encima del rango dinámico del densitómetro y la SDS-PAGE se realiza en condiciones reductoras, las especies de impurezas menores se pueden detectar más fácilmente. Por ejemplo, bajo estas condiciones puede haber tanto como el 5 % de las especies de 150 kD presentes debido al procesamiento proteolítico incompleto durante el proceso de fermentación y recuperación. En estas condiciones, el proceso de la invención produce un producto de toxina (compuesto por las cadenas de polipéptidos de 100 kD y 50 kD escindidas y activas) que normalmente es superior al 90 % de proteína total y más probablemente superior al 95 % de proteína total. Por lo tanto, la pureza medida reportada de la toxina depende de los detalles del método de SDS-PAGE empleado, como se describe en este documento. Además, aunque el ejemplo anterior se refiere a la toxina botulínica tipo A, el experto en la materia apreciará que el análisis de SDS-PAGE descrito en la presente memoria puede adaptarse fácilmente para evaluar la pureza de otros serotipos de toxina botulínica.

En ciertas realizaciones, el eluyente de la columna aniónica que comprende la toxina botulínica A no complejada se carga en una columna de intercambio catiónico (véase, por ejemplo, Figura 1A). Notablemente, esta columna también captura la toxina botulínica en forma no complejada, de modo que la proteína de la toxina y las proteínas no tóxicas disociadas pueden eluirse en fracciones separadas. La columna utilizada puede ser cualquier columna de cationes conocida en la técnica adecuada para separar proteínas, cuyos ejemplos no limitantes incluyen una columna SP Sepharose, que incluye SP Sepharose HP o SP Sepharose Fast Flow; una columna Mono S; o una columna Source-S, tal como una columna Source-30S, o preferiblemente una columna Source-15S, ambas disponibles en el mercado en GE Healthcare Life Sciences. En algunas realizaciones, el método comprende además acondicionar el eluyente a partir de las columnas de intercambio aniónico que comprenden toxina botulínica A no complejada para cromatografía de intercambio catiónico antes de cargarla en la columna. En algunas realizaciones preferidas, el pH se ajusta de modo que el pH del eluyente que se está cargando en la columna permite la unión eficiente de la toxina libre a la columna. Por ejemplo, el pH puede mantenerse dentro de un intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 7,5, más preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, y lo más preferiblemente a aproximadamente 7. Además, en algunas realizaciones, el eluyente de la columna aniónica puede tratarse para reducir la conductividad antes de cargarlo en la columna de intercambio catiónico, por ejemplo, usando un tampón de fosfato sódico, cuyo ejemplo no limitante es un tampón de fosfato sódico de NaH_2PO_4 20 mM aproximadamente. Por ejemplo, el eluyente de la columna aniónica puede contener tanto como aproximadamente NaCl 0,15 M, de modo que la dilución en un tampón de NaH_2PO_4 20 mM aproximadamente reduce la conductividad. En algunas realizaciones específicas, la conductividad se reduce de aproximadamente 12 mSem a aproximadamente 3,3 mSem. También pueden usarse la dilución en tampón, diálisis u otros métodos conocidos en la técnica para reducir la conductividad.

Para la carga y el uso en la columna, por ejemplo, los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, tampones aniónicos, preferiblemente tampones aniónicos que no interactuarán o no interactuarán sustancialmente con la columna de intercambio catiónico. Los tampones aniónicos adecuados incluyen, por ejemplo, MES, HEPES, y similares, y preferiblemente tampón de fosfato de sodio. Para cargar y equilibrar la columna, se puede usar un pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8; preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7,5; más preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 7; y lo más preferiblemente un pH de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7.

Para eluir la toxina capturada (unida) de la columna de intercambio catiónico por separado de otras proteínas no tóxicas disociadas y otras impurezas, se puede usar un tampón adecuado, como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones particularmente preferidas, se usa un gradiente ascendente de cloruro de sodio. Un intervalo de concentración adecuado para el gradiente de cloruro de sodio puede ser de aproximadamente 0,0 M a aproximadamente 1 M de NaCl. Otras sales que pueden usarse incluyen, por ejemplo, cloruro de potasio, que puede usarse a un gradiente de concentración de aproximadamente 0,0 M a aproximadamente 0,5 M de KCl. Las fracciones que contienen un pico del producto se pueden identificar, como se conoce en la técnica. El pico puede ocurrir, por ejemplo, de aproximadamente 18 a aproximadamente 25 mSem, que corresponde de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 0,4 M de NaCl, a un pH de aproximadamente 6,7. Es decir, la fracción o fracciones que contienen la toxina botulínica no complejada eluida pueden identificarse para proporcionar un eluyente de la columna catiónica que comprende toxina botulínica no complejada. En realizaciones particularmente preferidas, el eluyente de la columna catiónica representa una toxina botulínica A no complejada de alta pureza, alto rendimiento y alta actividad. Por el contrario, el proceso descrito en la Figura 1B proporciona un complejo de toxina botulínica tipo A de 900 kD en el eluyente final.

Producto purificado de toxina botulínica no complejada

Los métodos y sistemas descritos en este documento son útiles para proporcionar una toxina botulínica no complejada de alta pureza, alto rendimiento y alta actividad. Véase el Ejemplo 1 a continuación. El producto también se estabiliza fácilmente y se usa convenientemente para la preparación de composiciones farmacéuticas seguras.

En algunas realizaciones preferidas, la toxina botulínica A no complejada purificada es al menos aproximadamente un 80 % pura, preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % pura, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % pura, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 98 % pura, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente un 99 % pura, o incluso aproximadamente un 100 % pura. "Toxina

botulínica no complejada purificada" se refiere a una molécula proteínica de toxina botulínica libre que está aislada o sustancialmente aislada de otras proteínas e impurezas que pueden acompañar a la toxina botulínica no complejada tal como se obtiene de un cultivo o proceso de fermentación. Una toxina botulínica no complejada purificada que es, por ejemplo, un "80 % pura" se refiere a una proteína de toxina botulínica no complejada aislada o sustancialmente aislada en la que la proteína tóxica comprende un 80 % de proteína total presente como se determina por u otra metodología analítica adecuada, cuyos ejemplos no limitantes incluyen SDS-PAGE, CE y HPLC. Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, el eluyente de la columna catiónica que comprende la toxina botulínica A no complejada es al menos aproximadamente un 99 % puro, y contiene menos de aproximadamente el 1 % de proteínas de la célula hospedadora que no son la toxina botulínica de aproximadamente 150 kD presente originalmente.

En algunas realizaciones preferidas, la toxina botulínica A no complejada purificada tiene una actividad de al menos aproximadamente 150 unidades DL_{50}/ng , preferiblemente de al menos aproximadamente 180 unidades DL_{50}/ng , más preferiblemente de al menos aproximadamente 200 unidades DL_{50}/ng , incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 210 unidades DL_{50}/ng , y lo más preferiblemente de al menos aproximadamente 220 unidades DL_{50}/ng . Una unidad de toxina botulínica se define como la DL_{50} tras la inyección intraperitoneal en ratones hembra Swiss Webster que pesan cerca de 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 hembras de ratones Swiss Webster. La "actividad" se usa de forma intercambiable en la presente memoria con expresiones relacionadas de "actividad biológica", "potencia" y "toxicidad" para describir la acción de una toxina botulínica.

En realizaciones preferidas, la toxina botulínica A no complejada que puede obtenerse mediante procesos y sistemas descritos en el presente documento demuestra actividad biológica. Es decir, en realizaciones preferidas, la actividad biológica o la toxicidad del producto no se pierden tras la purificación de acuerdo con las realizaciones preferidas de la presente invención, incluso aunque las proteínas no tóxicas asociadas de forma nativa con la proteína tóxica se eliminen durante la purificación. En realizaciones aún más preferidas, la potencia obtenida usando un conjunto dado de procesos y parámetros dentro del alcance de la invención es consistente y/o reproducible. Por ejemplo, la medición de potencia puede realizarse con menos de aproximadamente un 40 % de variabilidad, preferiblemente menos de aproximadamente un 35 % de variabilidad, más preferiblemente menos de aproximadamente un 30 % de variabilidad, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente un 25 % de variabilidad, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente un 20 % de variabilidad.

En algunas realizaciones preferidas, el proceso de purificación proporciona la toxina botulínica A no complejada con alto rendimiento. Por ejemplo, el rendimiento obtenido de 30 l de un cultivo de fermentación puede ser de al menos aproximadamente 30 mg, preferiblemente de al menos aproximadamente 40 mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 70 mg, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 80 mg, y lo más preferiblemente de al menos aproximadamente 90 mg, que corresponden a un rendimiento de al menos aproximadamente 1 mg/l, preferiblemente de al menos aproximadamente 1,3 mg/l, más preferiblemente de al menos aproximadamente 2,3 mg/l, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 2,7 mg/l, y lo más preferiblemente de al menos aproximadamente 3 mg/l, respectivamente. En realizaciones aún más preferidas, el rendimiento obtenido usando un conjunto dado de procesos y parámetros dentro del alcance de la invención es reproducible. Por ejemplo, el rendimiento puede medirse con menos de aproximadamente el 40 % de variabilidad, preferiblemente menos de aproximadamente el 35 % de variabilidad, más preferiblemente menos de aproximadamente el 30 % de variabilidad, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente el 25 % de variabilidad, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 20 % de variabilidad.

En algunas realizaciones particularmente preferidas, la toxina botulínica A no complejada purificada es estable durante la purificación usando los procesos y sistemas descritos en este documento. Se ha creído que la eliminación de las proteínas asociadas que no son toxinas de un complejo de toxina botulínica, tal como el complejo de toxina botulínica tipo A, da como resultado un producto de toxina botulínica marcadamente inestable. La presente invención, sin embargo, proporciona métodos que pueden aislar de manera estable la toxina botulínica libre, sin proteínas asociadas que no sean toxinas convencionalmente consideradas necesarias durante el proceso de purificación para mantener la estabilidad, como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones preferidas, los métodos descritos en este documento proporcionan una toxina botulínica A no complejada que requiere muy pocas etapas posteriores a la cromatografía, por ejemplo, en términos de mantener la estabilidad durante el almacenamiento, y en términos de aplicabilidad para usos farmacéuticos. Por ejemplo, como se conoce en la técnica, se puede añadir sulfato de amonio a la toxina botulínica libre para preparar una suspensión de sulfato de amonio para su almacenamiento. La composición que comprende la toxina botulínica libre y el sulfato de amonio se pueden almacenar fácilmente en un refrigerador y a continuación se pueden recuperar fácilmente para su uso en aplicaciones farmacéuticas. De hecho, la estabilidad, el alto rendimiento y la pureza, y la potencia alta y constante de la toxina obtenible mediante los métodos descritos en la presente memoria facilitan el uso farmacéutico del producto purificado, como se describe en más detalle a continuación.

Usos de la toxina botulínica purificada no complejada

La toxina botulínica A no complejada purificada de acuerdo con esta invención puede usarse en la preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden la toxina como ingrediente activo para la administración a cualquier sujeto que recibiría un beneficio de tales composiciones farmacéuticas. En realizaciones preferidas, los sujetos a tratar son mamíferos, preferiblemente seres humanos. "Composición farmacéutica" como se usa en el presente documento se refiere a una formulación en la que un ingrediente activo puede ser una toxina botulínica. La formulación contendrá al menos un ingrediente adicional y será adecuada para la administración diagnóstica, terapéutica y/o cosmética a un sujeto, tal como un paciente humano. La composición farmacéutica puede ser líquida o sólida; y puede ser un sistema de uno o varios componentes, por ejemplo, una composición liofilizada reconstituida con un diluyente tal como solución salina.

Otro aspecto de la divulgación proporciona la administración de una molécula de toxina botulínica purificada a un paciente. "Administración", como se usa en el presente documento, se refiere a proporcionar una composición farmacéutica a un sujeto o paciente. La composición farmacéutica puede administrarse mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, por ejemplo, administración por vía intramuscular (im), intradérmica, intranasal o subcutánea, administración intratecal, administración intracraneal, intraperitoneal (ip) o administración tópica (transdérmica) y vías de administración por implantación (por ejemplo, de un dispositivo de liberación lenta). En ciertos aspectos preferidos, la toxina botulínica no complejada purificada se administra tópicamente o mediante inyección en composiciones como se describe en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos n.º 09/910.432; 10/793.138; 11/072.026; 11/073.307, 11/824.393 y 12/154.982.

En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden toxina botulínica no complejada en una suspensión de sulfato de amonio se pueden combinar fácilmente en una composición farmacéutica. Por ejemplo, una suspensión de sulfato de amonio que comprende proteína de toxina botulínica no complejada se puede centrifugar para recuperar la proteína y la proteína se puede volver a solubilizar, diluir y combinar con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender una toxina botulínica no complejada como ingrediente farmacéutico activo, y puede comprender además uno o más tampones, vehículos, estabilizadores, conservantes y/o agentes de carga. Las composiciones farmacéuticas se pueden liofilizar en polvo para su almacenamiento y reconstituir para su uso posterior. Por consiguiente, los procesos y sistemas descritos en este documento pueden proporcionar una toxina botulínica en una forma particularmente adecuada para aplicaciones farmacéuticas en términos de facilidad de preparación.

La composición farmacéutica puede encontrar uso en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico, de investigación y/o cosméticas. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, la toxina botulínica tipo A se usa clínicamente para tratar trastornos neuromusculares caracterizados por hiperactividad del músculo esquelético, tales como blefaroespasma esencial, estrabismo, distonía cervical y arrugas de la línea glabellar (facial). Además, en ciertas aplicaciones, la toxina botulínica no complejada (aproximadamente 150 kD) es la forma preferida para tratar a seres humanos. Véase, por ejemplo, Kohl A., et al., Comparison of the effect of botulinum toxin A (Botox®) with the highly-purified neurotoxin (NT 201) in the extensor digitorum brevis muscle test, *Mov Disord* 2000; 15(Suppl 3):165. En consecuencia, ciertas composiciones farmacéuticas de toxina botulínica se preparan preferiblemente usando toxina botulínica no complejada, a diferencia de un complejo de toxina botulínica.

Ejemplos**Ejemplo 1: Comparación del proceso de la invención con un proceso de Schantz modificado**

Las purificaciones de toxina botulínica tipo A no complejada usando procesos dentro del alcance de la presente invención ("proceso inventivo") se compararon directamente con purificaciones basadas en el enfoque tradicional de Schantz, modificadas adicionalmente mediante la adición de etapas cromatográficas para proporcionar la forma no complejada ("Proceso de Schantz modificado"). Brevemente, se cultivaron las bacterias *Clostridium botulinum* y se dejaron crecer hasta que se completó la fermentación (habitualmente de aproximadamente 72 a aproximadamente 120 horas desde la inoculación hasta la recogida). Luego se usó un volumen de 30 l del cultivo de fermentación en cada uno de los siguientes procedimientos de purificación.

El proceso de Schantz modificado utilizado implicó la acidificación típica del cultivo de fermentación para precipitar la toxina, seguido de ultrafiltración (UF) y diafiltración (DF) para concentrar la toxina en bruto. Se añadieron DNasa y RNasa a la toxina cosechada para digerir (hidrolizar) los ácidos nucleicos, que luego se eliminaron mediante una etapa adicional de UF, usando filtración de flujo tangencial (300 kD UF). La toxina se extrajo a continuación con tampón de fosfato, seguido de tres etapas de precipitación secuencial: precipitación en etanol frío; precipitación con ácido clorhídrico y precipitación con sulfato de amonio, donde los sobrenadantes fueron descartados normalmente cada vez. Este procedimiento proporciona un complejo de toxina botulínica tipo A de kD 900, que luego se sometió a etapas cromatográficas adicionales para proporcionar la toxina libre. Específicamente, el complejo de toxina se resolubilizó y se sometió a adsorción por lotes negativos en una resina DEAE. El eluyente se procesó a continuación en una columna de intercambio aniónico de flujo por gravedad (DEAE-Sepharose), seguido de una columna de intercambio catiónico de flujo por gravedad (CM-Sepharose). Se determinó el

rendimiento, se registró la duración del proceso (sin contar el período de fermentación) y se midió la pureza de la toxina botulínica tipo A no complejada mediante análisis de SDS-PAGE y se analizó su potencia, por ejemplo, mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia. Se repitió todo el proceso de Schantz modificado para tres lotes diferentes, con los números de lote 1, 2 y 3, y los resultados que están registrados en la Tabla 1 a continuación.

El proceso inventivo se usó con tres lotes diferentes, números de lote 4, 5 y 6, de acuerdo con los sistemas y métodos descritos en este documento. Brevemente, el cultivo de fermentación se sometió a precipitación ácida usando ácido sulfúrico 3 M para reducir el pH a 3,5, a una temperatura por debajo de 25 °C. El precipitado ácido se sometió entonces a filtración de flujo tangencial de 0,1 µm para concentrar la masa celular. Luego se ajustó el pH a 6 y se añadieron nucleasas para reducir el contenido de ácidos nucleicos de la célula hospedadora, seguido de clarificación por centrifugación para eliminar los restos celulares y la filtración sin salida a 0,2 µm con sulfato de amonio añadido. El filtrado se cargó luego directamente en la columna de interacción hidrófoba, Fenil Sepharose HP (GE Life Sciences), se eluyó con un gradiente descendente de sulfato de amonio y se aisló el pico del producto. El eluyente se diluyó luego en tampón Tris pH 7,8 para disociar el complejo de toxina, que luego se cargó en la columna de intercambio aniónico Q XL Sepharose (GE Lifesciences), se eluyó con un gradiente ascendente de cloruro de sodio y nuevamente se recogió el pico del producto. Este eluyente se diluyó luego en un tampón de fosfato de sodio (para reducir la conductividad) y se cargó en la columna de intercambio aniónico, Q XL Sepharose (para los lotes n.º 4 y 5) o la columna de intercambio catiónico, Source-S (GE Life Sciences) (para el lote n.º 6), nuevamente se eluyó con un gradiente ascendente de cloruro de sodio y se recolectó y almacenó un pico final del producto. Este proceso produjo no complejado y nuevamente el pico del producto recolectado. Este eluyente se diluyó luego en un tampón de fosfato de sodio (para reducir la conductividad) y se cargó en la columna de intercambio aniónico, Q XL Sepharose (para los lotes n.º 4 y 5) o la columna de intercambio catiónico, Source-S (GE Life Sciences) (para el lote n.º 6), nuevamente se eluyó con un gradiente ascendente de cloruro de sodio y se recolectó y almacenó un pico final del producto. Este proceso produjo no complejado y nuevamente el pico del producto recolectado. Este eluyente se diluyó luego en un tampón de fosfato de sodio (para reducir la conductividad) y se cargó en la columna de intercambio aniónico, Q XL Sepharose (para los lotes n.º 4 y 5) o la columna de intercambio catiónico, Source-S (GE Life Sciences) (para el lote n.º 6), nuevamente se eluyó con un gradiente ascendente de cloruro de sodio y se recolectó y almacenó un pico final del producto. Este proceso produjo toxina botulínica tipo A no complejada. Se determinó el rendimiento, se registró la duración del tiempo de proceso (sin contar el período de fermentación) y la toxina se midió para su pureza mediante análisis de SDS-PAGE y se analizó su potencia, por ejemplo, mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia. Los resultados también registraron en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Lote n.º	Proceso de Schantz modificado			Proceso inventivo		
	1	2	3	4	5	6
Tiempo de procesamiento	10 días			4 días		
% de pureza	99	n/d	97	98,6	95,3	100
Rendimiento (escala 30 I)	11 mg	0 mg	4 mg	43 mg	99 mg	89 mg
Potencia (unidades LD50/s)	255	n/d	173	259	252	250

Como indica la Tabla 1, hubo un fallo de lote con respecto al lote n.º 2 en el proceso de Schantz modificado. El lote total falló dando rendimiento cero. También hubo un fallo parcial del lote con respecto al lote n.º 3. Allí el fallo se produjo en la etapa de precipitación con ácido clorhídrico, pero se rescató algo del sobrenadante normalmente descartado. El producto rescatado se reprocesó con una etapa de desviación, que representa el rendimiento reducido observado en comparación con el lote n.º 1 (4 mg en comparación con 11 mg) y la potencia reducida observada en comparación con el lote n.º 1 (173 unidades LD50/ng en comparación con 255 unidades LD50/ng).

Con respecto a los lotes usados con el proceso inventivo, el lote n.º 4 mostró un rendimiento reducido, comparado con el lote n.º 5 por ejemplo (43 mg en comparación con 99 mg) debido a un fallo del sistema de cromatografía, que implica lavado con alto contenido de sal de una columna. Con el fallo, hubo una elución prematura de una porción de la toxina, dando como resultado el rendimiento reducido observado, pero también una mayor pureza observada (98,6 % de pureza en comparación con el 95,3 % de pureza).

El lote n.º 6 representa los resultados de una realización altamente preferida de los procesos y sistemas de la invención actual, donde se usó una columna de intercambio catiónico en la tercera etapa de cromatografía. Como indica la Tabla 1, esta realización dio como resultado una pureza mejorada comparada con el lote n.º 5 por ejemplo (100 % de pureza comparada con el 95,3 % de pureza), mientras que se mantuvieron un alto rendimiento (89 mg comparado con 99 mg) y una alta potencia (250 unidades LD50/ng comparado con 252 unidades LD50/ng).

Como también indica la Tabla 1, la longitud total de la purificación puede acortarse en las realizaciones preferidas de la presente invención. Por ejemplo, el lote n.º 6 se purificó en solo 4 días, en comparación con los 10 días necesarios para purificar la toxina botulínica no complejada utilizando el método de Schantz modificado que

implicaba tres etapas cromatográficas adicionales después del método convencional de Schantz.

5 Los resultados indican que los procesos y sistemas enseñados en este documento pueden usarse para preparar altos rendimientos de una toxina botulínica no complejada, a alta potencia y pureza, y sugieren que los métodos y sistemas descritos en este documento pueden usarse en la purificación eficiente a gran escala de una toxina botulínica no complejada adecuada para su uso, por ejemplo, como ingrediente activo en composiciones farmacéuticas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar una toxina botulínica tipo A no complejada (toxina botulínica A), el método que comprende:
- 5 (i) proporcionar una mezcla que comprende una toxina botulínica A en bruto no complejada, en el que dicha toxina botulínica A en bruto no complejada se disocia de proteínas nativas no tóxicas;
- (ii) cargar la toxina botulínica A en bruto no complejada en una columna de intercambio aniónico para permitir la
- 10 (iii) eluir la toxina botulínica A no complejada de la columna de intercambio aniónico para dar un eluyente que comprende la toxina botulínica A no complejada;
- (iv) cargar una columna de intercambio catiónico con el eluyente de la columna de intercambio aniónico para permitir la captura de la toxina botulínica A no complejada por la columna de intercambio catiónico; y
- 15 (v) eluir la toxina botulínica A no complejada purificada de la columna de intercambio catiónico.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la toxina botulínica A en bruto no complejada se obtiene obteniendo una muestra que comprende complejo de toxina botulínica A;
- cargando una columna de interacción hidrófoba con la muestra para permitir la captura del complejo de toxina
- 20 botulínica A por la columna de interacción hidrófoba;
- eluyendo el complejo de toxina botulínica A de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba; y
- disociando el complejo de toxina botulínica A para obtener una mezcla que comprende la toxina botulínica A en bruto no complejada.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que:
- 25 (a) la muestra es un sobrenadante o filtrado celular que comprende el complejo de toxina botulínica A; o
- (b) la muestra que comprende un complejo de toxina botulínica A se somete a una digestión con nucleasa antes de cargarla en la columna de interacción hidrófoba, y opcionalmente en la que la nucleasa se deriva de un
- 30 proceso libre de producto animal.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la muestra que comprende un complejo de toxina botulínica A se obtiene:
- 35 sometiendo un cultivo de fermentación que comprende la toxina botulínica A a precipitación ácida para obtener un precipitado ácido; y
- realizando filtración de flujo tangencial en el precipitado para concentrar el precipitado.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la muestra que comprende un complejo de toxina botulínica A se obtiene sometiendo una fracción insoluble de un cultivo de fermentación a filtración de flujo
- 40 tangencial.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
- 45 (a) el método está sustancialmente libre de productos de origen animal, o
- (b) el método produce un rendimiento de al menos aproximadamente 2 mg/l de cultivo de fermentación.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
- 50 (a) la toxina botulínica A no complejada purificada tiene al menos un 95 % de pureza; o
- (b) la toxina botulínica A no complejada purificada tiene una actividad de al menos 200 unidades DL₅₀/ng.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la columna aniónica se selecciona del grupo que consiste en una columna Q Sepharose HP, Q Sepharose Fast Flow y Q XL Sepharose, y en el que la columna catiónica se selecciona del grupo que consiste en la columna SP Sepharose, SP Sepharose HP, SP Sepharose Fast Flow, Mono S, Source-S, Source-30S y Source-15S.
- 55
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un tampón para cargar la toxina botulínica A en bruto no complejada en la columna aniónica se selecciona del grupo que consiste en Tris, bis-Tris, trietanolamina y N-metil dietanolamina, y opcionalmente en el que el tampón se utiliza a un pH de 7,4 a 8,2.
- 60
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un tampón para cargar la toxina botulínica A en bruto no complejada en la columna catiónica se selecciona del grupo que consiste en fosfato de sodio, MES y HEPES, y opcionalmente en el que el tampón se usa a un pH de 6,0 a 7,0.
- 65
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pH de la columna aniónica es de 7,4 a 8,2.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pH de la columna catiónica es de 6,0 a 7,0.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gradiente para eluir la toxina botulínica A no complejada de la columna de intercambio aniónico se selecciona del grupo que consiste en un gradiente de concentración ascendente de cloruro de sodio y un gradiente de concentración ascendente de cloruro de potasio, y opcionalmente en el que la columna de intercambio aniónico se eluye a un pH de 7,4 a 8,4.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gradiente para eluir la toxina botulínica A no complejada de la columna de intercambio catiónico se selecciona del grupo que consiste en un gradiente de concentración ascendente de cloruro de sodio y un gradiente de concentración ascendente de cloruro de potasio, y opcionalmente la columna de intercambio catiónico se eluye a un pH de 6,0 a 7,0.
15. Un método para purificar una toxina botulínica tipo A no complejada (toxina botulínica A), el método que comprende:
- (a) proporcionar una mezcla que comprende una toxina botulínica A en bruto no complejada, en el que dicha toxina botulínica A en bruto no complejada se disocia de proteínas no tóxicas nativas; en el que dicha mezcla se obtiene:
 - (i) sometiendo un cultivo de fermentación que comprende toxina botulínica A a precipitación ácida para producir un precipitado de ácido insoluble;
 - (ii) concentrando el precipitado ácido de la etapa (i) para producir una muestra concentrada;
 - (iii) sometiendo la muestra a digestión con nucleasa en condiciones que reducen el contenido de ácido nucleico de la célula hospedadora y que mantienen un complejo de toxina botulínica A y proteínas no tóxicas;
 - (iv) eliminando restos celulares de la muestra de la etapa (iii) para producir una muestra clarificada;
 - (v) cargando una columna de interacción hidrófoba con la muestra clarificada de la etapa (iv) en condiciones para permitir la captura del complejo de toxina botulínica A por la columna de interacción hidrófoba y las impurezas para que fluyan a través de la columna;
 - (vi) eluyendo el complejo de toxina botulínica A de la columna de interacción hidrófoba de la etapa (v); y
 - (vii) disociando el complejo de toxina botulínica A obtenido de la etapa (vi) en condiciones que rompen el complejo y producen una mezcla que comprende toxina botulínica A en bruto no complejada, disociada de las proteínas no tóxicas nativas;
 - (b) cargar la mezcla que contiene la toxina botulínica A en bruto no complejada disociada de proteínas no tóxicas nativas de la etapa (a) en una columna de intercambio aniónico en condiciones que permiten la captura de la toxina botulínica A no complejada por la columna de intercambio aniónico;
 - (c) eluir la toxina botulínica A no complejada de la columna de intercambio aniónico de la etapa (b) para dar un eluyente que comprende la toxina botulínica A no complejada;
 - (d) cargar una columna de intercambio catiónico con el eluyente de la columna de intercambio aniónico de la etapa (c) en condiciones que permitan la captura de la toxina botulínica A no complejada por la columna de intercambio catiónico; y
 - (e) eluir la toxina botulínica A no complejada y purificada de la columna de intercambio catiónico de la etapa (d).
16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que, en la etapa (i), el cultivo de fermentación que comprende la toxina botulínica A precipita en ácido con ácido sulfúrico aproximadamente 3 M.
17. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la muestra concentrada de la etapa (ii) se obtiene realizando filtración de flujo tangencial sobre el precipitado ácido para concentrar el precipitado.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la muestra de la etapa (iii) se somete a digestión con nucleasa a un pH de 5 a 7.
19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la nucleasa se deriva de una fuente no animal.
20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en el que, en la etapa (iv), los restos celulares se eliminan por centrifugación y/o filtración para producir la muestra clarificada.
21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la muestra clarificada de la etapa (iv) se combina con un tampón que comprende sulfato de amonio antes de cargar la columna de interacción hidrófoba en la etapa (v).
22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en el que la muestra clarificada de la etapa (iv) se combina con una solución de sulfato de amonio 0,5 M a pH 6 y fosfato 50 mM antes de cargar la columna de interacción hidrófoba en la etapa (v).

23. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que, en la etapa (vii), el complejo de toxina botulínica A se disocia en un tampón que tiene un pH de 7,0 a 8,4 para obtener la mezcla que comprende la toxina botulínica A en bruto no complejada, disociada de las proteínas no tóxicas nativas.

5 24. El método de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el complejo de toxina botulínica A se disocia en tampón Tris a pH 7,8.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el método está sustancialmente libre de productos de origen animal.

10

Figura 1A

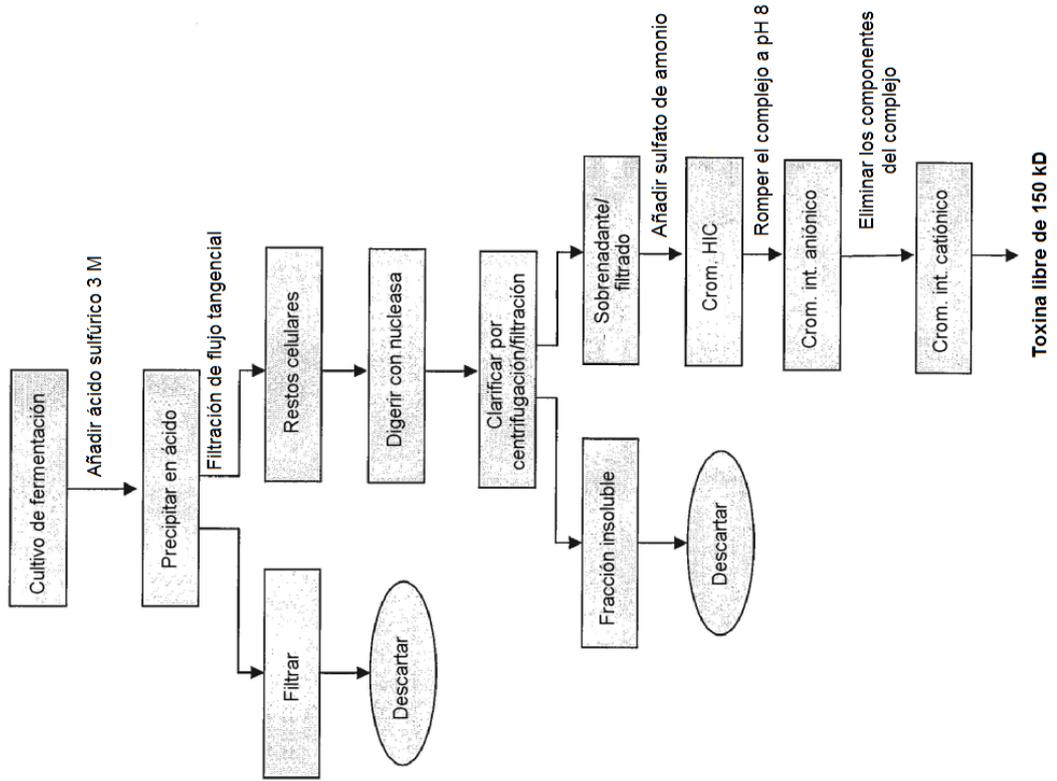


Figura 1B

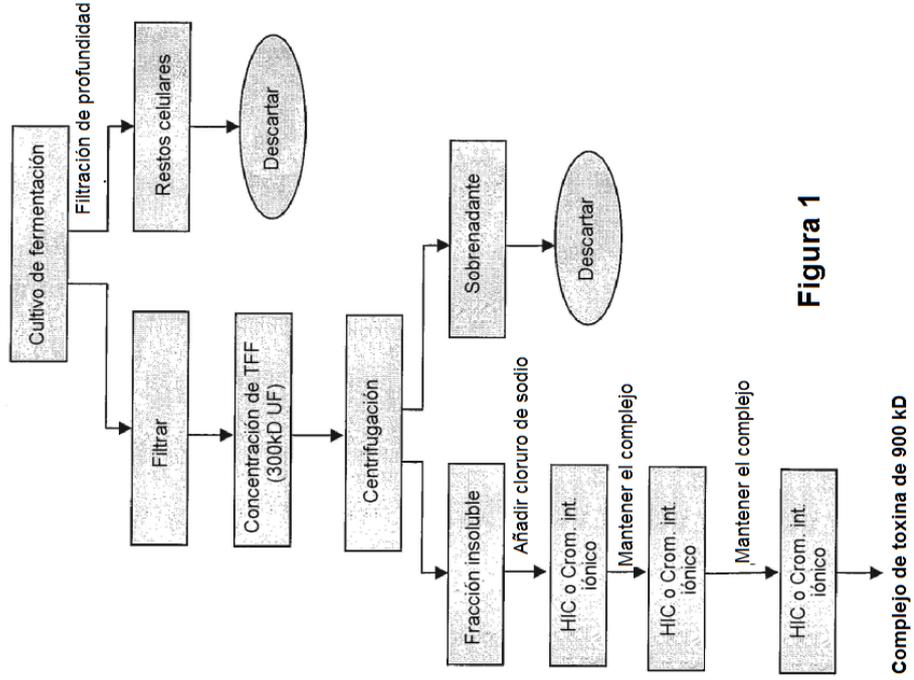


Figura 1