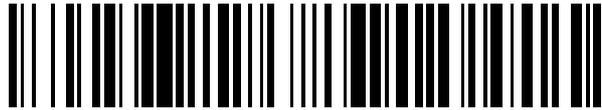


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 031**

51 Int. Cl.:

C07K 14/33 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2010** **E 17180720 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019** **EP 3252070**

54 Título: **Proceso y sistema para obtener neurotoxina botulínica**

30 Prioridad:

13.07.2009 US 502181

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

30.06.2020

73 Titular/es:

**ALLERGAN, INC. (100.0%)
2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US**

72 Inventor/es:

**TON, JENNIFER L.;
PATEL, HEMANT A.;
BATES, RONALD C. y
AHMAD, WAJDIE M.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 770 031 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

Proceso y sistema para obtener neurotoxina botulínica

5 **Antecedentes**

La presente invención se refiere a sistemas y procesos para obtener una neurotoxina clostridial. En particular, la presente invención se refiere a un proceso y sistema cromatográfico rápido, sin proteínas animales, para obtener una neurotoxina botulínica biológicamente activa de alta potencia, alta pureza y alto rendimiento.

10 Una composición farmacéutica adecuada para administración a un ser humano o animal con fines terapéuticos, diagnósticos, de investigación o cosméticos comprende un ingrediente activo y uno o más excipientes, tampones, vehículos, estabilizadores, ajustadores de tonicidad, conservantes y/o agentes de volumen. El ingrediente activo en una composición farmacéutica puede ser un biológico tal como una neurotoxina botulínica. Los métodos conocidos
15 (tales como el método de Schantz) para obtener una neurotoxina botulínica útil como ingrediente activo en una composición farmacéutica son procesos de cultivo, fermentación y purificación de varias semanas que utilizan proteínas derivadas de animales, tales como caldo de carne y caseína utilizadas en medios de cultivo y fermentación y enzimas de purificación derivadas de animales. La administración a un paciente de una composición farmacéutica hecha mediante el uso de productos derivados de animales puede implicar el riesgo de administrar patógenos o un agente infeccioso, tal como un prión. Además, los métodos conocidos sin proteínas de animales para obtener una
20 toxina botulínica son también procesos que consumen tiempo (es decir, tardan más de una semana en completarse) con numerosas etapas aguas arriba (cultivo y fermentación) y aguas abajo (purificación), y, aun así, resultan en la obtención de una neurotoxina botulínica con impurezas detectables.

25 Toxina botulínica

El género *Clostridium* tiene más de ciento veintisiete especies, agrupadas por morfología y función. La bacteria anaeróbica gram positiva *Clostridium botulinum* produce una potente neurotoxina polipeptídica, toxina botulínica (sinónimamente "toxina"), que causa una enfermedad neuroparalítica en seres humanos y animales conocida como
30 botulismo. Los síntomas de la intoxicación por toxina botulínica pueden progresar de dificultad para caminar, tragar y hablar a la parálisis de los músculos respiratorios y la muerte.

Una unidad de toxina botulínica se define como la DL₅₀ después de inyección intraperitoneal en ratones hembra Swiss Webster que pesaban aproximadamente 18-20 gramos cada uno. Una unidad de toxina botulínica es la
35 cantidad de toxina botulínica que mata al 50% de un grupo de ratones hembra Swiss Webster. Se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas generalmente inmunológicamente distintas, que son respectivamente serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C₁, D, E, F y G, cada uno de los cuales se distingue por neutralización con anticuerpos específicos de tipo. Los diferentes serotipos de la toxina botulínica varían en las especies animales que afectan y en la gravedad y duración de la parálisis que evocan. Las toxinas botulínicas aparentemente se unen con alta afinidad a
40 neuronas motoras colinérgicas y se transportan en la neurona y bloquean la liberación presináptica de acetilcolina.

Las toxinas botulínicas se han utilizado en entornos clínicos para el tratamiento, por ejemplo, de trastornos neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. La toxina botulínica tipo A ha sido
45 aprobada por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento del blefaroespasma esencial, estrabismo y espasmo hemifacial en pacientes mayores de doce años, distonía cervical, arrugas glabellares (faciales) y para el tratamiento de la hiperhidrosis. La FDA también ha aprobado una toxina botulínica tipo B para el tratamiento de la distonía cervical.

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

60 El peso molecular de la molécula de proteína toxina botulínica activa (también conocida como "toxina pura" o como el "componente neurotóxico") de un complejo de toxina botulínica, para los siete serotipos conocidos de toxina botulínica conocidos, es de aproximadamente 150 kDa. Curiosamente, las toxinas botulínicas son liberadas por la bacteria Clostridial como complejos que comprenden el componente neurotóxico de 150 kDa junto con una o más
65 proteínas asociadas no toxinas. Así, el complejo de toxina botulínica tipo A puede ser producido por la bacteria Clostridial como formas de 900 kDa, 500 kDa y 300 kDa (pesos moleculares aproximados). Las toxinas botulínicas de los tipos B y C₁ se producen aparentemente sólo como un complejo de 500 kDa. La toxina botulínica tipo D se

produce como complejos de 300 kDa y 500 kDa. Finalmente, los tipos E y F de la toxina botulínica se producen sólo como complejos de aproximadamente 300 kDa. Los complejos (es decir, peso molecular mayor de aproximadamente 150 kDa) contienen proteínas de hemaglutinina (HA) y una proteína no toxina no hemaglutinina (NTNH). De este modo, un complejo de toxina botulínica puede comprender una molécula de toxina botulínica (el componente neurotóxico) y una o más proteínas de HA y/o proteína NTNH. Estos dos tipos de proteínas no toxinas (que junto con la molécula de toxina botulínica pueden comprender el complejo de neurotoxina relevante) pueden actuar para proporcionar estabilidad frente a la desnaturalización de la molécula de toxina botulínica y protección contra ácidos digestivos cuando se ingiere toxina. Además, es posible que los complejos de toxina botulínica mayores (mayores de aproximadamente 150 kDa de peso molecular) puedan resultar en una velocidad de difusión más lenta de la toxina botulínica fuera de un sitio de inyección intramuscular de un complejo de toxina botulínica. El éxito de la toxina botulínica de tipo A para tratar una variedad de afecciones clínicas ha dado lugar a interés en otros serotipos de toxina botulínica. Por lo tanto, al menos los tipos de toxinas botulínicas, A, B, E y F se han utilizado clínicamente en seres humanos. Además, una formulación del componente neurotóxico (es decir, sin las proteínas no toxinas asociadas) se vende en Europa bajo el nombre comercial XEOMIN (Merz Pharmaceuticals, Frankfurt, Alemania).

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

Al igual que con las enzimas en general, las actividades biológicas de las toxinas botulínicas (que son peptidasas intracelulares) son dependientes, al menos en parte, de su conformación tridimensional. La dilución de la toxina a partir de cantidades de miligramos a una solución que contiene nanogramos por mililitro presenta dificultades significativas, tales como, por ejemplo, la tendencia de la toxina a adherirse a las superficies y, de este modo, reducir la cantidad de toxina disponible. Dado que la toxina puede usarse meses o años después de que se formula la composición farmacéutica que contiene toxina, la toxina se estabiliza con un agente estabilizante tal como albúmina, sacarosa, trehalosa y/o gelatina.

Una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica comercialmente disponible se vende bajo la marca comercial BOTOX® (complejo de neurotoxina purificada de toxina botulínica tipo A) disponible comercialmente de Allergan, Inc., de Irvine, California. Cada vial de 100 unidades de BOTOX® consta de aproximadamente 5 ng de complejo de toxina botulínica tipo A purificado, 0,5 mg de albúmina de suero humano y 0,9 mg de cloruro de sodio, secado al vacío y destinado a reconstitución con solución salina normal estéril sin conservante (inyección de cloruro de sodio al 0,9%). Otras composiciones farmacéuticas que contienen toxina botulínica comercialmente disponibles incluyen Dysport® (complejo de hemaglutinina toxina tipo A de *Clostridium botulinum* con albúmina de suero humano y lactosa en la composición farmacéutica de toxina botulínica), disponible en Ipsen Limited, Berkshire, Reino Unido, como polvo a reconstituir con cloruro sódico al 0,9% antes de su uso) y MyoBloc™ (una solución inyectable que comprende toxina botulínica de tipo B, albúmina de suero humano, succinato sódico y cloruro de sodio a aproximadamente pH 5,6, disponible en Solstice Neurosciences de San Diego, California. El componente neurotóxico (la molécula de toxina de 150 kDa) y los complejos de toxina botulínica (300 kDa a 900 kDa) pueden obtenerse, por ejemplo, de List Biological Laboratories, Inc., Campbell, California; el Centro de Microbiología Aplicada e Investigación, Porton Down, Reino Unido; Wako (Osaka, Japón), así como de Sigma Chemicals de St Louis, Missouri.

Los métodos sin proteínas de animal y/o cromatográficos para obtener una neurotoxina botulínica se describen en las patentes U.S. 7.445.914; 7.452.697; 7.354.740; 7.160.699; 7.148.041, y; 7.189.541. También de interés son las solicitudes de patente U.S. 11/609.449 titulada "Media for Clostridium Bacterium", presentada el 12 de diciembre, 2006; 12/098.896 titulada "Animal Product Free Media and Processes for Obtaining a Botulinum Toxin", presentada el 7 de abril, 2008; 11/932.689 titulada "Chromatographic Method and System for Purifying a Botulinum Toxin", presentada el 31 de octubre, 2007; 11/932.789 titulada "Chromatographic Method and System for Purifying a Botulinum Toxin" presentada el 31 de octubre, 2007, y; 12/234.537, titulada "Animal Product Free Media And Processes For Obtaining A Botulinum Toxin", presentada el 19 de septiembre, 2008.

La toxina botulínica para uso en una composición farmacéutica puede obtenerse por fermentación anaeróbica de *Clostridium botulinum* utilizando el proceso de Schantz bien conocido (véase por ejemplo, Schantz E.J., *et al.*, Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine, Microbial Rev. 1992 mar; 56 (1): 80-99; Schantz E.J., *et al.*, Preparation and characterization of botulinum toxin type A for human treatment, capítulo 3 en Jankovic J, ed. Neurological Disease and Therapy. Therapy with botulinum toxin (1994), Nueva York, Marcel Dekker, 1994, páginas 41-49, y; Schantz E.J., *et al.*, Use of crystalline type A botulinum toxin in medical research, en: Lewis GE Jr, ed. Biomedical Aspects of Botulism (1981) Nueva York, Academic Press, páginas 143-50). El proceso de Schantz para obtener una toxina botulínica hace uso de productos animales, por ejemplo, como reactivos y como parte de los medios de cultivo y fermentación.

Se requieren varias etapas para preparar una composición farmacéutica de toxina clostridial adecuada para la

administración a un ser humano o animal con fines terapéuticos, diagnósticos, de investigación o cosméticos. Estas etapas pueden incluir la obtención de una toxina clostridial purificada y luego la composición de la toxina clostridial purificada. Una primera etapa puede ser plaquear y crecer colonias de bacterias Clostridial, típicamente en placas de agar sangre, en un ambiente propicio para el crecimiento bacteriano anaerobio, tal como en una atmósfera anaeróbica caliente. Esta etapa permite la obtención de colonias clostridiales con morfología deseable y otras características. En una segunda etapa, las colonias clostridiales seleccionadas pueden fermentarse en un primer medio adecuado y si se desea adicionalmente, en un segundo medio de fermentación. Después de un cierto período de fermentación, las bacterias clostridiales típicamente lisan y liberan toxina clostridial en el medio. En tercer lugar, el medio puede purificarse para obtener una toxina a granel. Normalmente, la purificación del medio para obtener la toxina a granel se lleva a cabo utilizando, entre otros reactivos, enzimas derivadas de animales, tales como ADNasa y ARNasa, que se utilizan para degradar y facilitar la eliminación de ácidos nucleicos. La toxina a granel resultante puede ser una toxina altamente purificada con una actividad específica particular. Después de la estabilización en un tampón adecuado, la toxina a granel puede combinarse con uno o más excipientes para preparar una composición farmacéutica de toxina clostridial adecuada para administración a un ser humano. La composición farmacéutica de toxina clostridial puede comprender una toxina clostridial como ingrediente farmacéutico activo (API). La composición farmacéutica también puede incluir uno o más excipientes, tampones, vehículos, estabilizadores, conservantes y/o agentes de volumen.

La etapa de fermentación de la toxina Clostridium puede dar como resultado una solución de medio de fermentación que contiene bacterias enteras de Clostridium, bacterias lisadas, nutrientes de medio de cultivo y subproductos de fermentación. La filtración de esta solución de cultivo para eliminar elementos brutos, tales como bacterias enteras y lisadas, proporciona un medio de recolección/clarificación. El medio clarificado comprende una toxina clostridial y diversas impurezas y se procesa para obtener una toxina clostridial concentrada, que se denomina toxina a granel.

Se conocen los procesos de fermentación y purificación para obtener una toxina clostridial a granel utilizando uno o más productos derivados de animales (tales como la caseína de digestión de leche, ADNasa y ARNasa). Un ejemplo de un proceso conocido no libre de productos animales ("NAPF") para obtener un complejo de toxina botulínica es el proceso de Schantz y sus modificaciones. El proceso de Schantz (desde el plaqueo inicial, el cultivo celular hasta la fermentación y la purificación de toxinas) hace uso de una serie de productos derivados de fuentes animales tales como, por ejemplo, medio Bacto Cooked Meat derivado de animales en el vial de cultivo, placas de Agar Columbia Blood para el crecimiento y selección de colonias y caseína en los medios de fermentación. Además, el proceso de purificación de toxinas a granel de Schantz hace uso de ADNasa y ARNasa de fuentes bovinas para hidrolizar ácidos nucleicos presentes en el medio de fermentación que contiene toxina. Se han expresado dudas sobre un potencial para una contaminación de una encefalopatía esponjiforme transmisible y viral (EET), como la encefalopatía esponjiforme bovina (EEB), cuando se utilizan productos animales en un proceso para obtener un API y/o en un proceso de elaboración (composición) de una composición farmacéutica que usa tal API.

Se conoce un proceso de fermentación para obtener un toxoide tetánico que utiliza cantidades reducidas de productos derivados de animales (denominados procesos de fermentación libres de productos animales o "APF"; APF engloba sin proteínas animales), véase, por ejemplo, la patente U.S. 6.558.926. Un proceso de fermentación APF para la obtención de una toxina clostridial, tiene la ventaja potencial de reducir la (ya muy baja) posibilidad de contaminación de la toxina a granel resultante con virus, priones u otros elementos indeseables que pueden acompañar al ingrediente farmacéutico activo, la toxina clostridial, ya que se mezcla en una composición farmacéutica para administración a seres humanos.

La cromatografía, tal como la cromatografía en columna, por ejemplo, puede usarse para separar una proteína particular (tal como una neurotoxina botulínica) de una mezcla de proteínas, ácidos nucleicos, restos celulares, etc., en un proceso conocido como fraccionamiento o purificación. La mezcla de proteínas típicamente pasa a través de una columna de vidrio o de plástico que contiene, por ejemplo, un medio sólido, frecuentemente poroso (a menudo denominado perlas o resina). Diferentes proteínas y otros compuestos pasan a través de la matriz a diferentes velocidades en base a sus características químicas específicas y la forma en que estas características hacen que interactúen con los medios cromatográficos particulares utilizados.

La elección del medio determina el tipo de característica química por la que se basa el fraccionamiento de las proteínas. Hay cuatro tipos básicos de cromatografía en columna; intercambio de iones, filtración en gel, afinidad e interacción hidrófoba. La cromatografía de intercambio iónico lleva a cabo el fraccionamiento basado en la carga electrostática superficial usando una columna empaquetada con pequeñas perlas que llevan una carga positiva o negativa. En cromatografía de filtración en gel, las proteínas se fraccionan en base a su tamaño. En la cromatografía de afinidad, las proteínas se separan en base a su capacidad para unirse a grupos químicos específicos (ligando) unidos a perlas en la matriz de columna. Los ligandos pueden ser biológicamente específicos para una proteína diana. La cromatografía de interacción hidrofóbica realiza el fraccionamiento basado en la hidrofobicidad superficial.

La cromatografía en columna para purificar (fraccionar) una toxina clostridial es bien conocida. Véanse, por ejemplo, las siguientes publicaciones:

1. Ozutsumi K., *et al*, Rapid, simplified method for production and purification of tetanus toxin, *App & Environ Micro*,

abril 1985, p 939-943, vol. 49, no. 4. (1985) descubre el uso de filtración en gel de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para purificar toxina tetánica.

5 2. Schmidt J. J., *et al.*, Purification of type E botulinum neurotoxin by high-performance ion exchange chromatography, *Anal Biochem* 1986 julio; 156(1):213-219 describe el uso de cromatografía de exclusión de tamaño o cromatografía de intercambio iónico para purificar toxina botulínica de tipo E. También se describe el uso de sulfato de protamina en lugar de ribonucleasa (ARNasa).

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

15 4. 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) describe el uso de una columna de afinidad de amilosa para purificar proteínas de fusión de la cadena ligera de neurotoxina botulínica.

20 5. Kannan K., *et al.*, Methods development for the biochemical assessment of Neurobloc (botulinum toxin type B), *Mov Disord* 2000; 15(Supl 2):20 (2000) describe el uso de cromatografía de exclusión de tamaño para ensayar una toxina botulínica de tipo B..

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

30 7. 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) describe el uso de columnas de intercambio iónico e interacción hidrofóbica para purificar un fragmento de cadena pesada recombinante de una toxina botulínica de tipo F.

35 8. La solicitud de patente U.S. publicada 2003 0008367 A1 (Oguma) describe el uso de columnas de intercambio iónico y lactosa para purificar una toxina botulínica.

40 Los métodos de purificación resumidos anteriormente se refieren a la purificación a pequeña escala del componente neurotóxico de un complejo de toxina botulínica (es decir, la molécula neurotóxica de aproximadamente 150 kDa), o un componente específico del componente neurotóxico, en oposición a la purificación del complejo completo de toxina botulínica de 900 kDa.

45 Además, los procesos existentes, incluyendo procesos a escala comercial, para obtener una toxina botulínica adecuada para la composición en una composición farmacéutica de toxina botulínica incluyen típicamente una serie de etapas de precipitación para separar el complejo de toxina de las impurezas que acompañan a la toxina botulínica del proceso de fermentación. En particular, las técnicas de precipitación se usan ampliamente en la industria biofarmacéutica para purificar una toxina botulínica. Por ejemplo, el fraccionamiento de alcohol en frío (método de Cohn) o la precipitación se utiliza para eliminar las proteínas plasmáticas. Por desgracia, las técnicas de precipitación anteriores para purificar una toxina botulínica tienen los inconvenientes de baja resolución, baja productividad, dificultad de operación, dificultad para controlar y/o validar y/o dificultad para aumentar o disminuir la escala. La Solicitud de Patente Publicada U.S. No. de Serie 11/452.570, publicada el 12 de octubre, 2006, previa, describe etapas tales como centrifugación, precipitación con ácido, precipitación con etanol, etapas de acidificación y precipitación con sulfato de amonio utilizadas en diversos procesos libres de proteína animal y NAPF (para una discusión detallada, véase la Solicitud de Patente Publicada U.S. No. 2006/0228780). En este documento se muestran algunas distinciones entre un proceso libre de proteína no animal y un proceso libre de proteína animal para obtener una neurotoxina botulínica.

50 Se necesitan, por lo tanto, sistemas y procesos rápidos, de escala relativamente pequeña pero de alto rendimiento, para obtener neurotoxina botulínica altamente potente y de alta pureza, que se puedan utilizar con fines de investigación y/o para preparar una composición farmacéutica.

60 J. A. Giménez, *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, dic. 1987, vol. 53, n.º 12, págs. 2827-2830 se describe la purificación de toxina botulínica de tipo E en tres etapas cromatográficas, usando una columna DEAE-Sephadex, seguido por una columna de carboximetilo-Sepharose, seguido por una columna DEAE-Sephacel.

65 El documento US 2006/0228780 A1 se refiere a la purificación de toxina botulínica obtenida a partir de un medio de fermentación APF. En un método, la cromatografía de intercambio catiónico es seguida por cromatografía de

interacción hidrofóbica, seguida por cromatografía de modo mixto.

Resumen

5 La presente invención satisface esta necesidad y proporciona neurotoxinas botulínicas altamente potentes y de alta pureza, obtenibles mediante sistemas y procesos cromatográficos rápidos, de menor tamaño, comercialmente útiles y de alto rendimiento, libres de proteínas animales. La neurotoxina botulínica resultante es útil para preparar una composición farmacéutica. La toxina clostridial obtenida por la práctica de nuestra invención es preferiblemente un complejo de neurotoxina botulínica tipo A de aproximadamente 900 kDa o el componente neurotóxico de 150 kDa del mismo. Nuestra invención no requiere reactivos NAPF, tales como ADNasa y ARNasa.

Definiciones

15 Las siguientes palabras y términos usados aquí tienen las siguientes definiciones.

“Aproximadamente” significa que el ítem, parámetro o término así calificado abarca un rango de más o menos diez por ciento por encima y por debajo del valor del ítem, parámetro o término indicado.

20 “Administración” o “administrar” significa la etapa de proporcionar (es decir, administrar) una composición farmacéutica o ingrediente activo a un sujeto. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se “administran localmente”, por ejemplo, por las rutas de administración intramuscular (i.m.), intradérmica, subcutánea, administración intratecal, intracraneal, intraperitoneal (i.p.), tópica (transdérmica) e implante (es decir, de un dispositivo de liberación lenta tal como implante polimérico o bomba miniosmótica).

25 La expresión “libre de productos animales” o “sustancialmente libre de productos animales” abarca, respectivamente, “libre de proteína animal” o “sustancialmente libre de proteína animal” y significa la ausencia o ausencia sustancial de productos o compuestos derivados de sangre, combinados de sangre y otros derivados animales. “Animal” significa un mamífero (tal como un ser humano), pájaro, reptil, pez, insecto, araña u otra especie animal. “Animal” excluye microorganismos, tales como bacterias. De este modo, un medio o proceso APF o un medio o proceso sustancialmente APF dentro del alcance de la presente invención puede incluir una toxina botulínica o una bacteria *Clostridium botulinum*. Por ejemplo, un proceso APF o un proceso sustancialmente APF significa un proceso que es sustancialmente libre o esencialmente libre o totalmente libre de proteínas derivadas de animales, tales como inmunoglobulinas, digestión de carne, subproductos de carne y productos o digeridos de leche o lácteos.

35 “Toxina botulínica” o “neurotoxina botulínica”: significa una neurotoxina producida por *Clostridium botulinum*, así como toxinas botulínicas modificadas, recombinantes, híbridas y quiméricas. Una toxina botulínica recombinante puede tener la cadena ligera y/o la cadena pesada de la misma producida de forma recombinante por una especie no clostridial. “Toxina botulínica”, tal como se usa en el presente documento, abarca los serotipos de toxina botulínica A, B, C, D, E, F y G. La “toxina botulínica”, como se usa en la presente memoria, también abarca tanto un complejo de toxina botulínica (es decir, los complejos de 300, 600 y 900 kDa) así como la toxina botulínica pura (es decir, la molécula neurotóxica de aproximadamente 150 kDa), todos los cuales son útiles en la práctica de la presente invención. “Toxina botulínica purificada” significa una toxina botulínica pura o un complejo de toxina botulínica que se aísla o se aísla sustancialmente de otras proteínas e impurezas que pueden acompañar a la toxina botulínica a medida que se obtiene a partir de un proceso de cultivo o fermentación. De este modo, una toxina botulínica purificada puede tener al menos un 90%, preferiblemente más del 95%, y lo más preferiblemente más del 45 99% de las proteínas de la toxina no botulínica y las impurezas eliminadas. Las citotoxinas botulínicas C₂ y C₃, que no son neurotoxinas, están excluidas del alcance de la presente invención.

50 “Neurotoxina clostridial” significa una neurotoxina producida a partir de, o nativa de, una bacteria Clostridial, tal como *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* o *Clostridium beratti*, así como una neurotoxina Clostridial hecha recombinantemente por una especie no Clostridial.

“Totalmente libre” (terminología “que consiste en”) significa que dentro del rango de detección del instrumento o proceso que se está utilizando, la sustancia no puede ser detectada o su presencia no puede ser confirmada.

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

60 “Toxina botulínica modificada” significa una toxina botulínica a la que se ha delecionado, modificado o reemplazado al menos uno de sus aminoácidos, en comparación con una toxina botulínica nativa. Adicionalmente, la toxina botulínica modificada puede ser una neurotoxina producida de forma recombinante, o un derivado o fragmento de una neurotoxina producida de manera recombinante. Una toxina botulínica modificada retiene al menos una actividad biológica de la toxina botulínica nativa, tal como, la capacidad de unirse a un receptor de toxina botulínica, o la capacidad para inhibir la liberación de neurotransmisores desde una neurona. Un ejemplo de una toxina botulínica modificada es una toxina botulínica que tiene una cadena ligera de un serotipo de toxina botulínica (tal como serotipo A) y una cadena pesada de un serotipo de toxina botulínica diferente (tal como serotipo B). Otro

ejemplo de una toxina botulínica modificada es una toxina botulínica acoplada a un neurotransmisor, tal como la sustancia P.

5 “Composición farmacéutica” significa una formulación en la que un ingrediente activo puede ser una toxina botulínica. La palabra “formulación” significa que hay al menos un ingrediente adicional (tal como, por ejemplo y no limitado a, una albúmina [tal como una albúmina de suero humano o una albúmina humana recombinante] y/o cloruro sódico) en la composición farmacéutica además de un ingrediente activo de neurotoxina botulínica. Una composición farmacéutica es por lo tanto una formulación que es adecuada para la administración diagnóstica, terapéutica o cosmética (por ejemplo, por inyección intramuscular o subcutánea o por inserción de un depósito o implante) a un sujeto, tal como un paciente humano. La composición farmacéutica puede estar: en una condición liofilizada o secada al vacío, una solución formada después de la reconstitución de la composición farmacéutica liofilizada o secada al vacío con solución salina o agua, por ejemplo; o como una solución que no requiere reconstitución. El ingrediente activo puede ser uno de los serotipos de toxina botulínica A, B, C₁, D, E, F o G o una toxina botulínica, todas las cuales pueden ser hechas nativamente por bacterias clostridiales. Como se ha indicado, 10 una composición farmacéutica puede ser líquida o sólida, por ejemplo, secada al vacío. Los métodos ejemplares para formular una composición farmacéutica de ingrediente activo de toxina botulínica se describen en la publicación de patente publicada U.S. 20030118598, presentada el 5 de noviembre, 2002.

20 “Sustancialmente libre” significa presente a un nivel de menos de uno por ciento en peso de un medio de cultivo, medio de fermentación, composición farmacéutica u otro material en el que se evalúa el porcentaje en peso de una sustancia (tal como un producto animal, una proteína animal o un producto o proteína derivado de un animal).

25 “Formulación terapéutica” significa que una formulación puede usarse para tratar y, de este modo, aliviar un trastorno o una enfermedad y/o síntoma asociado de la misma, tal como un trastorno o una enfermedad caracterizada por hiperactividad (por ejemplo, espasticidad) de un músculo periférico o glándula (por ejemplo, glándula sudorípara).

30 “Cantidad terapéuticamente eficaz” significa el nivel, cantidad o concentración de un agente (por ejemplo, tal como una toxina botulínica o una composición farmacéutica que comprende toxina botulínica) necesaria para tratar una enfermedad, trastorno o afección sin causar efectos secundarios negativos o adversos significativos.

35 “Tratar”, “que trata” o “tratamiento” significa un alivio o una reducción (que incluye cierta reducción, una reducción significativa, una reducción casi total y una reducción total), resolución o prevención (temporal o permanente) de una enfermedad, trastorno o afección, tal como una deformidad de nalgas, para conseguir un resultado terapéutico o cosmético deseado, tal como mediante la cicatrización de tejido lesionado o dañado, o alterando, cambiando, aumentando, potenciando, mejorando y/o embelleciendo una enfermedad, trastorno o afección existente o percibido. Un efecto de tratamiento, tal como un efecto de alivio de la administración de una neurotoxina botulínica, puede no aparecer clínicamente durante entre 1 a 7 días después de la administración de la neurotoxina botulínica a un paciente por ejemplo y puede tener una duración de efecto de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 1 año o cualquier intervalo de tiempo entre ellos, por ejemplo, dependiendo de la afección y del caso particular que se esté tratando. Los porcentajes se basan en el peso por volumen a menos que se indique lo contrario.

40 APF significa libre de producto/proteína animal

45 CV significa volumen de la columna

DF significa diafiltración

50 ELISA significa ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima.

IAPF, como en el “sistema IAPF” o “proceso IAPF”, significa sistema o proceso “libre de proteína animal mejorado”. Un sistema o proceso IAPF incluye el uso de dos medios de cromatografía o tres medios de cromatografía para purificar un componente de toxina botulínica o neurotoxina, como se detalla específicamente en la presente memoria. Los medios de cromatografía incluyen resinas de cromatografía, como se conoce en la técnica. Los lotes de neurotoxina botulínica obtenidos mediante el uso de dos medios de cromatografía se denominan en este documento como IAPF.

60 FAPF, como en el “sistema FAPF” o “proceso FAPF”, significa sistema o proceso “libre de proteína animal mejorado adicionalmente”. Por consiguiente, FAPF es un proceso IAPF, y un sistema o proceso FAPF significa que tres medios de cromatografía se utilizan para purificar una toxina botulínica o un componente de neurotoxina. Los lotes de neurotoxina botulínica obtenidos mediante el uso de tres medios de cromatografía se denominan en este documento FAPF.

65 NAPF significa libre de proteína no animal

SDS-PAGE significa electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico SEC-HPLC significa

cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión de tamaño

UF significa ultrafiltración

5 Un aspecto de la invención es un proceso para producir una neurotoxina botulínica biológicamente activa, comprendiendo el método las siguientes etapas:

(a) proporcionar un medio de fermentación que está completamente libre de productos derivados de animales o que contiene productos derivados de animales en una cantidad inferior al 1% en peso;

10

(b) fermentar bacterias de *Clostridium botulinum* en el medio de fermentación;

(c) poner en contacto el medio de fermentación con un medio de cromatografía de intercambio aniónico;

15 (d) poner en contacto un eluato del medio de cromatografía de intercambio aniónico con un medio de cromatografía de intercambio catiónico; y

(e) eluir un eluato que contiene neurotoxina botulínica del medio de cromatografía catiónico;

20 en el que no se usa ninguna enzima derivada de un animal para purificar la neurotoxina botulínica.

En realizaciones particulares, el proceso puede proporcionar una neurotoxina botulínica que comprende menos de una parte por millón (ppm) de ácido nucleico residual, que es un nanogramo o menos de ácido nucleico residual por cada miligramo de la neurotoxina botulínica obtenida. En todavía otro aspecto, el proceso se lleva a cabo en una semana o menos.

25

En un ejemplo, los medios que tienen una proporción de 3:1:1 significa un cultivo de toxina botulínica/medio de fermentación que contiene HySoy al 3%, HyYeast al 1% y glucosa al 1%. HySoy (producto de Quest n.º 5X59022) es una fuente de péptidos elaborada mediante hidrólisis enzimática de soja. HyYeast (HyYest, producto de Quest n.º 5Z10102 o 5Z10313 es un extracto de levadura de panadería. En otro ejemplo, los medios que tienen una proporción de 5:1:1 significa un cultivo de toxina botulínica/medio de fermentación que contiene HySoy al 5%, HyYeast al 1% y glucosa al 1%.

30

Una realización proporciona un proceso cromatográfico sustancialmente APF para obtener un complejo de neurotoxina botulínica de tipo A biológicamente activo, comprendiendo el proceso las siguientes etapas secuenciales de cultivar bacterias de *Clostridium botulinum* en un medio de cultivo sustancialmente APF; fermentar bacterias de *Clostridium botulinum* del medio de cultivo en de aproximadamente 2 L a aproximadamente 75 L de un medio de fermentación sustancialmente APF, más preferiblemente en de aproximadamente 2 L a aproximadamente 50 L de un medio de fermentación sustancialmente APF, incluso más preferiblemente en de aproximadamente 2 L a aproximadamente 30 L de un medio de fermentación sustancialmente APF (las realizaciones particulares tienen al menos uno del medio de cultivo y el medio de fermentación que incluye una proteína vegetal y/o un derivado de proteína vegetal, por ejemplo, una proteína vegetal hidrolizada); recolectar el medio de fermentación eliminando los restos celulares presentes en el medio de fermentación usando filtración o centrifugación; concentrar el medio de fermentación recolectado mediante filtración, tal como mediante ultrafiltración (UF), por ejemplo; y diluir el medio de fermentación concentrado añadiendo un tampón. Tras la dilución con el tampón, se realiza una primera etapa de contacto en la que el medio de fermentación recogido diluido se pone en contacto con un medio de intercambio aniónico de manera que la neurotoxina botulínica biológicamente activa se captura por el medio de intercambio aniónico; seguido por la elución de la neurotoxina botulínica capturada del medio de intercambio aniónico obteniendo de este modo un primer eluato que contiene la toxina botulínica; realizar una segunda etapa de contacto en la que el primer eluato se pone en contacto con un medio de cromatografía de intercambio catiónico para eliminar las impurezas del primer eluato, obteniendo de este modo un segundo eluato que contiene la toxina botulínica; seguido por procesar el segundo eluato mediante diafiltración (DF); y filtrar el segundo eluato procesado, obteniendo de este modo un complejo de neurotoxina botulínica de tipo A biológicamente activo usando un proceso cromatográfico sustancialmente APF. El complejo de neurotoxina botulínica de tipo A obtenido puede tener una potencia de aproximadamente $2,0 \times 10^7$ unidades/mg a aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg de complejo de neurotoxina botulínica de tipo A. En ejemplos particulares, se puede obtener un complejo de neurotoxina botulínica tipo A que tiene una potencia comprendida entre aproximadamente $2,4 \times 10^7$ unidades/mg y aproximadamente $5,9 \times 10^7$ unidades/mg, por ejemplo.

55

En una realización particular, el proceso utiliza un medio de fermentación que comprende no más de aproximadamente 5% p/v de un producto proteico derivado de vegetales, no más de aproximadamente 2% p/v de un extracto de levadura y no más de aproximadamente 2% p/v de glucosa, y en el que el nivel de pH del medio de fermentación es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,0, más preferiblemente de aproximadamente pH 6,8 a aproximadamente pH 7,6, al comienzo de la etapa de fermentación. En una realización particular, la etapa de cultivo se lleva a cabo hasta que la densidad óptica del medio de cultivo a aproximadamente 540 nanómetros (nm) está entre aproximadamente 0,8 unidades de absorbancia (UA) y aproximadamente 4,5 UA. La etapa de cultivo se

65

5 inicia preferiblemente introduciendo un contenido del banco de células de trabajo APF de *Clostridium botulinum* en el medio de cultivo, donde el contenido del banco de células de trabajo comprende al menos aproximadamente 1×10^4 unidades formadoras de colonias, preferiblemente de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 5×10^7 unidades formadoras de colonias de *Clostridium botulinum* por mililitro del banco de células de trabajo, y donde la bacteria *Clostridium botulinum* en el banco de células de trabajo tiene una morfología sustancialmente uniforme. En todavía otra realización, la etapa de fermentación se lleva a cabo durante aproximadamente 60 a 80 horas y hasta que una densidad óptica del medio de fermentación a aproximadamente 890 nm disminuye a entre aproximadamente 0,05 UA a aproximadamente 0,7 UA. En un aspecto, la neurotoxina botulínica obtenida mediante un proceso cromatográfico sustancialmente APF comprende menos de 1 ppm de ácido nucleico residual y el proceso se lleva a cabo en una semana o menos.

15 En aún otra realización, se proporciona un proceso APF que utiliza cromatografía para obtener una neurotoxina botulínica biológicamente activa, que comprende las etapas secuenciales de: (a) añadir bacterias de *Clostridium botulinum* de un banco de células de trabajo APF a un medio de cultivo APF; (b) cultivar las bacterias de *Clostridium botulinum* en el medio de cultivo; (c) fermentar las bacterias de *Clostridium botulinum* de la etapa (b) en un medio de fermentación APF hasta que se produzca la lisis celular de *Clostridium botulinum*; (d) recolectar el cultivo de fermentación para proporcionar un medio de fermentación recolectado; (e) someter el medio de fermentación recolectado a concentración mediante filtración; (f) diluir el medio de fermentación filtrado mediante adición de un tampón para obtener un medio de fermentación diluido; (g) una primera etapa de contacto, en la que el medio de fermentación diluido se pone en contacto con un medio de cromatografía de captura, en la que el medio de cromatografía de captura es un medio de intercambio aniónico; (h) una segunda etapa de contacto en la que un eluato de la primera etapa de contacto se pone en contacto con un medio de cromatografía de pulido, en la que el medio de cromatografía de pulido es un medio de intercambio catiónico, y (i) filtrar el eluato de la segunda etapa de contacto, obteniendo de este modo neurotoxina botulínica biológicamente activa mediante el proceso APF mejorado, en el que la neurotoxina botulínica obtenida comprende 1 ppm de ácido nucleico residual o menos de 1 ppm de ácido nucleico residual y el proceso se lleva a cabo en una semana o menos.

Otro aspecto de la invención proporciona un sistema para producir una neurotoxina botulínica biológicamente activa, comprendiendo el sistema:

30 (a) un medio de fermentación que está completamente libre de productos derivados de animales o que contiene productos derivados de animales en una cantidad inferior al 1% en peso;

35 (b) bacterias *Clostridium botulinum* para la fermentación en el medio de fermentación;

(c) un medio de cromatografía de intercambio aniónico para recuperar neurotoxina botulínica del medio de fermentación; y

40 (d) un medio de cromatografía de intercambio catiónico para recuperar neurotoxina botulínica de un eluato del medio de cromatografía de intercambio aniónico;

en el que el sistema es capaz de purificar la neurotoxina botulínica sin el uso de una enzima derivada de un animal.

45 En configuraciones particulares, el sistema puede comprender además un primer aparato para cultivar de manera anaerobia las bacterias de *Clostridium botulinum* en un medio de cultivo sustancialmente APF, y puede comprender además un segundo aparato para fermentar de manera anaerobia las bacterias de *Clostridium botulinum* en el medio de fermentación sustancialmente APF, en las que las bacterias de *Clostridium botulinum* se obtienen del primer aparato. Para la clarificación, el sistema puede incluir un aparato de recolección para eliminar restos celulares del medio de fermentación obtenido del segundo aparato, proporcionando de este modo un medio de fermentación recolectado. El medio de fermentación recolectado puede hacerse pasar a través de un aparato de concentración y dilución para concentrar, luego diluir posteriormente el medio de fermentación recolectado. En un ejemplo particular, el sistema puede incluir también un medio de interacción hidrofóbico para recuperar además neurotoxina botulínica biológicamente activa purificada de un eluato del medio de cromatografía de intercambio catiónico. De manera adicional, un aparato de filtración para reducir la carga biológica en la neurotoxina botulínica biológicamente activa obtenida también puede componer el sistema, para reducir la carga biológica de la neurotoxina botulínica biológicamente activa obtenida utilizando o bien dos o bien tres medios de cromatografía. En un ejemplo específico, puede utilizarse una cámara anaeróbica que tiene un filtro integrado de partículas de aire de alta eficiencia dentro de su área de trabajo, para cultivar bacterias de *Clostridium botulinum* en el medio de cultivo sustancialmente APF. Los sistemas ejemplares pueden proporcionar neurotoxina botulínica que tiene una potencia de al menos aproximadamente $2,0 \times 10^7$ unidades/mg de neurotoxina botulínica y la neurotoxina botulínica obtenida comprende un ng o menos de un ng de ácido nucleico residual por cada mg de la neurotoxina botulínica obtenida. En realizaciones particulares, el medio de fermentación sustancialmente APF se proporciona en una cantidad de desde aproximadamente 2 L hasta aproximadamente 75 L; y se utiliza desde aproximadamente 200 mL hasta aproximadamente 1 L de medio de cultivo sustancialmente APF.

65 De acuerdo con los procesos y sistemas aquí descritos, se obtiene de este modo neurotoxina botulínica

biológicamente activa. En realizaciones particulares, la neurotoxina botulínica biológicamente activa obtenida mediante el proceso y los sistemas aquí descritos tiene un peso molecular de aproximadamente 900 kDa.

Una composición farmacéutica APF se puede preparar mezclando la neurotoxina botulínica biológicamente activa obtenida mediante los procesos y los sistemas aquí descritos. La etapa de composición puede comprender la etapa de secado de la neurotoxina botulínica mediante un proceso seleccionado del grupo de procesos que consiste en secado por congelación, liofilización y secado al vacío, y la composición puede llevarse a cabo en presencia de un excipiente en la que el excipiente adecuado se selecciona del grupo que consiste en albúmina, albúmina de suero humano, albúmina de suero humano recombinante, gelatina, sacarosa, trehalosa, almidón hidroxietilo, colágeno, lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, polisacárido, caprilato, polivinilpirrolidona y sodio.

Una composición farmacéutica en la que el ingrediente activo es una neurotoxina botulínica biológicamente activa obtenida mediante el proceso APF (es decir, procesos IAPF y FAPF) descrito en la presente invención puede usarse para tratar una afección en un paciente, comprendiendo el método la etapa de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica. Los ejemplos de afecciones a tratar se seleccionan del grupo que consiste en cefalea, cefalea con migraña, cefalea tensional, cefalea sinusal, cefalea cervicogénica, trastorno sudoriaco, hiperhidrosis axilar, hiperhidrosis palmar, hiperhidrosis plantar, síndrome de Frey, piel hiperkinética una arruga facial, líneas glabellares, patas de gallo, líneas de marioneta, un pliegue nasolabial, un trastorno cutáneo, acalasia, estrabismo, fisura anal crónica, blefaroespasmos, dolor musculoesquelético, fibromialgia, pancreatitis, taquicardia, agrandamiento prostático, prostatitis, retención urinaria, incontinencia urinaria, vejiga hiperactiva, espasmo hemifacial, temblores, mioclonía, trastornos gastrointestinales, diabetes, sialorrea, disinerxia detrusor-esfínter, espasticidad post-accidente cerebrovascular, cicatrización de heridas, parálisis cerebral juvenil, espasmo de músculo liso, restenosis, distonía focal, epilepsia, distonía cervical, trastorno de la tiroides, hipercalcemia, trastorno obsesivo compulsivo, dolor artrítico, síndrome de Raynaud, estrías de distensión, adhesión peritoneal, vasoespasmos, rinorrea, contractura muscular, músculo lesionado, distonía laríngea, calambre del escritor y síndrome del túnel carpiano, por ejemplo.

La administración local de cantidades terapéuticamente eficaces de composiciones farmacéuticas que comprenden una neurotoxina botulínica biológicamente activa proporcionada por el proceso/sistema IAPF aquí descrito, puede repetirse a intervalos de aproximadamente 2 meses a aproximadamente 6 meses o a intervalos de aproximadamente 2 meses a aproximadamente 3 meses, por ejemplo. Las dosis útiles ejemplares administradas localmente al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica sustancialmente APF hecha de acuerdo con la presente descripción, pueden tener cantidades unitarias de neurotoxina botulínica de entre aproximadamente 0,01 unidades y aproximadamente 10.000 unidades. En casos particulares, la neurotoxina botulínica se administra en una cantidad de entre aproximadamente 0,01 unidades y aproximadamente 3.000 unidades. En ejemplos particulares, la neurotoxina botulínica biológicamente activa que es el ingrediente farmacéutico activo en la composición farmacéutica es la neurotoxina botulínica tipo A o tipo B, por ejemplo.

Nuestra invención incluye un proceso sustancialmente APF, que utiliza cromatografía, para obtener una neurotoxina botulínica biológicamente activa. El proceso comprende las etapas secuenciales de proporcionar un medio de fermentación sustancialmente APF, seguido de fermentación de bacterias *Clostridium Botulinum* en el medio de fermentación y recuperar la neurotoxina botulínica biológicamente activa del medio de fermentación utilizando un medio de cromatografía de intercambio aniónico seguido por el uso de un medio de cromatografía de intercambio catiónico obteniendo de este modo la neurotoxina botulínica biológicamente activa del proceso cromatográfico sustancialmente APF. La etapa de recuperación también puede incluir el uso de un medio de interacción hidrofóbica después del uso del medio de cromatografía de intercambio catiónico. La neurotoxina botulínica biológicamente activa obtenida puede ser un complejo de neurotoxina botulínica o un componente neurotóxico de toxina botulínica aislado del mismo con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa libre de las proteínas formadoras de complejo de un complejo de toxina botulínica. Los procesos APF (que utilizan 2 columnas (IAPF), es decir, intercambio aniónico seguido de intercambio catiónico; o 3 columnas (FAPF), es decir, intercambio aniónico seguido de intercambio catiónico seguido de una columna de interacción hidrofóbica) pueden usarse para obtener una neurotoxina botulínica biológicamente activa tal como neurotoxinas botulínicas tipo A, B, C₁, D, E, F y G. La neurotoxina botulínica obtenida es preferiblemente un complejo de neurotoxina botulínica tipo A.

En un aspecto de nuestra invención, la cantidad de medio de fermentación utilizado puede comprender de aproximadamente 2 L a aproximadamente 75 L de medio de fermentación sustancialmente APF, preferiblemente de aproximadamente 2 L a aproximadamente 30 L de medio de fermentación sustancialmente APF. Como ejemplo, se obtiene del proceso de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 5 gramos, preferiblemente de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 3 gramos, más preferiblemente de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1 gramo de la neurotoxina botulínica biológicamente activa. A modo de ejemplo, se pueden obtener de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 100 mg o de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 80 mg de la neurotoxina biológicamente activa por litro del medio de fermentación utilizado. El medio de fermentación puede comprender un producto proteico derivado de vegetales, un extracto de levadura y glucosa, por ejemplo. Como ejemplo, el medio de fermentación comprende aproximadamente un 5% p/v o menos de un producto proteico derivado de vegetales. En aún otro ejemplo, el medio de fermentación comprende aproximadamente un 2% p/v o menos de un extracto de levadura. En una realización adicional, el medio de fermentación comprende

aproximadamente 2% p/v o menos de glucosa. En un ejemplo particular, el medio de fermentación comprende aproximadamente 5% p/v o menos de un producto proteico derivado de vegetales, aproximadamente 2% p/v o menos de un extracto de levadura y aproximadamente 2% p/v o menos de glucosa, el producto proteico derivado de vegetales, el extracto de levadura y la glucosa están en cualquier proporción de acuerdo con las cantidades de porcentaje p/v citadas. En algunas realizaciones, la etapa de fermentación continúa durante entre aproximadamente 60 horas y aproximadamente 80 horas.

En una realización, se proporciona un proceso sustancialmente APF que utiliza cromatografía para obtener una neurotoxina botulínica biológicamente activa, comprendiendo el proceso las siguientes etapas secuenciales, en las que el cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en un medio de cultivo sustancialmente APF, después fermentación de bacterias *Clostridium botulinum* del medio de cultivo en aproximadamente 2 L a aproximadamente 75 L de un medio de fermentación sustancialmente APF, más preferiblemente en aproximadamente 2 L a aproximadamente 30 L de un medio de fermentación sustancialmente APF, donde al menos uno del medio de cultivo sustancialmente APF y medio de fermentación sustancialmente APF incluye una proteína vegetal, seguido por la recolección del medio de fermentación mediante la eliminación de los residuos celulares presentes en el medio de fermentación y la concentración del medio de fermentación recogido por filtración, y la dilución del medio de fermentación concentrado mediante la adición de un tampón. Una vez tamponado, se ejecuta una primera etapa de contacto, en la que el medio de fermentación recogido diluido se pone en contacto con un medio de intercambio aniónico de modo que la neurotoxina botulínica biológicamente activa se asocia al medio de intercambio aniónico, después se procede a eluir la neurotoxina botulínica capturada del medio de intercambio aniónico para obtener de este modo un primer eluato, seguido de una segunda etapa de contacto en la que el primer eluato se pone en contacto con un medio de intercambio catiónico para eliminar las impurezas del primer eluato, obteniendo de este modo un segundo eluato que después se procesa, tal como por UF y/o DF y luego se filtra el segundo eluato procesado, obteniendo de este modo neurotoxina botulínica biológicamente activa usando un proceso sustancialmente APF que utiliza cromatografía.

Como ejemplo, el tiempo para completar el proceso, desde el cultivo de las bacterias hasta la obtención de la neurotoxina botulínica biológicamente activa, puede ser de entre aproximadamente 50 horas a aproximadamente 150 horas, más preferiblemente aproximadamente 80 horas a aproximadamente 120 horas, por ejemplo. En realizaciones particulares, el medio de cultivo comprende no más de aproximadamente el 4% p/v de un producto proteico derivado de vegetales, en otro, el medio de cultivo comprende no más de aproximadamente 2% p/v de un extracto de levadura y aún en otro, el medio de cultivo comprende no más de aproximadamente 2% p/v de glucosa. El medio de cultivo puede comprender el producto proteico derivado de vegetales, el extracto de levadura y la glucosa en cualquier proporción de acuerdo con las cantidades en peso en p/v indicadas. En un ejemplo específico, el nivel de pH del medio de cultivo puede ser de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,0, preferiblemente de aproximadamente pH 6,8 a aproximadamente pH 7,6, más preferiblemente 7,3 al comienzo de la etapa de cultivo. La etapa de cultivo se puede llevar a cabo entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 14 horas, aproximadamente 10 horas a 12 horas, preferiblemente aproximadamente 11 horas, a una temperatura de aproximadamente 33°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente a aproximadamente 34,5°C, en una cámara anaeróbica. En un ejemplo particular, la cámara anaeróbica puede contener un filtro particular integral de alta eficiencia dentro de su área de trabajo, donde se realiza el cultivo. La etapa de fermentación puede llevarse a cabo durante entre aproximadamente 60 horas y aproximadamente 80 horas, preferiblemente aproximadamente 72 horas a una temperatura de aproximadamente 33°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente a 35°C. De acuerdo con un aspecto de nuestra invención, la etapa de recolección puede eliminar al menos aproximadamente el 80% de ARN y ADN contenidos en el medio de fermentación y el medio de intercambio aniónico pueden eliminar todo el ADN y ARN remanentes medibles (por debajo del límite de detección) en el medio de fermentación recogido. En otro aspecto, la etapa de recolección puede llevarse a cabo durante entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 3 horas, preferiblemente aproximadamente 2,5 horas. En ejemplos particulares, la etapa de recolección puede llevarse a cabo hasta que se haya recogido el 75% del volumen del medio de fermentación original. En un aspecto de una realización, la etapa de concentración puede llevarse a cabo durante entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas, preferiblemente aproximadamente 0,75 horas. En otro aspecto, la etapa de dilución diluye el medio de fermentación recogido hasta el peso inicial del medio de fermentación al comienzo de la etapa de recolección. Una primera etapa de contacto se puede llevar a cabo durante, por ejemplo, entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 5 horas. En un ejemplo, el primer eluato de la resina de intercambio aniónico se recoge a lecturas de espectrofotómetro de aproximadamente 150 mUA o más, hasta que las lecturas del espectrofotómetro a 280 nm disminuyen desde el ápice máximo hasta aproximadamente 150 mUA. La segunda etapa de contacto se puede llevar a cabo durante entre 1 hora y aproximadamente 3 horas, preferiblemente durante aproximadamente 2 horas. Este segundo eluato se puede recoger de la resina de intercambio catiónico a lecturas de espectrofotómetro de aproximadamente 100 mUA o más, hasta que las lecturas del espectrofotómetro disminuyen desde el ápice máximo hasta aproximadamente 100 mUA, por ejemplo. Una etapa de procesamiento de este segundo eluato por concentración y diafiltración puede llevarse a cabo durante aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas, preferiblemente durante aproximadamente 1,5 horas. En una realización particular, la etapa de filtración incluye la reducción de la carga biológica haciendo pasar el segundo eluato a través de un filtro de reducción de la carga biológica. El filtro de reducción de la carga biológica puede tener un tamaño de poro de desde aproximadamente 0,1 µm hasta aproximadamente 0,3 µm, preferiblemente 0,2 µm. En realizaciones particulares, el proceso puede comprender además una tercera etapa de contacto después de la segunda etapa de contacto, poniendo en contacto el segundo eluato con un medio de interacción hidrofóbica para eliminar adicionalmente las impurezas del segundo

5 eluato y, de este modo, obtener un tercer eluato. Esta tercera etapa de contacto se puede llevar a cabo durante entre aproximadamente 1 hora y 3 horas, preferiblemente durante aproximadamente 2 horas. El tercer eluato se puede recoger del medio de interacción hidrofóbico lecturas de espectrofotómetro de aproximadamente 50 mUA o más, hasta que las lecturas del espectrofotómetro disminuyen desde el ápice máximo hasta aproximadamente 50 mUA, por ejemplo. Cuando existe una tercera etapa de contacto, la etapa de procesamiento por concentración y diafiltración se aplica al tercer eluato y se lleva a cabo durante entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 4 horas. La reducción de la carga biológica mediante el paso del eluato que es concentrado y diafiltrado (o bien de un proceso de 2 ó 3 columnas utilizado) a través de un filtro de reducción de la carga biológica se puede realizar en consecuencia. En realizaciones particulares, el proceso comprende además una etapa de congelación de la neurotoxina botulínica biológicamente activa obtenida.

10 En realizaciones particulares, el medio de cultivo sustancialmente APF comprende un volumen entre aproximadamente 100 ml y aproximadamente 500 ml. Se inician etapas de cultivo particulares introduciendo entre aproximadamente 100 μ l y aproximadamente 500 μ l de un medio de banco de células de trabajo APF que contiene *Clostridium botulinum*- al medio de cultivo sustancialmente APF. La etapa de cultivo puede entonces tener lugar en una cámara anaeróbica durante al menos aproximadamente 8 horas, preferiblemente aproximadamente 11 horas, a una temperatura de aproximadamente 34,5°C \pm 1°C, por ejemplo. En un ejemplo, los medios de banco de células de trabajo pueden tener un ensayo de recuento celular viable de al menos aproximadamente 1 x 10⁴ unidades formadoras de colonias/ml de medio de banco de células de trabajo, por ejemplo aproximadamente 1 x 10⁵ a aproximadamente 5 x 10⁷ unidades formadoras de colonias/ml de medios de banco de células y las bacterias *Clostridium botulinum* en el banco de células de trabajo pueden haber sido seleccionadas para tener una morfología sustancialmente uniforme.

25 En una realización, el medio de banco de células de trabajo incluye aproximadamente 20% en volumen de glicerol, tal como glicerol estéril, por ejemplo. El medio de banco de células de trabajo se puede hacer por (a) crecimiento de bacterias *Clostridium botulinum* en un medio APF que contiene aproximadamente 2% p/v de peptona de soja, aproximadamente 1% p/v de extracto de levadura y aproximadamente 1% p/v de glucosa en una cámara anaeróbica, a una temperatura de aproximadamente 34,5°C \pm 1°C hasta que una densidad óptica de una alícuota del medio medida a una longitud de onda de aproximadamente 540 nm es aproximadamente 2,5 \pm 1,0 UA, y; añadiendo glicerol para obtener una concentración de glicerol en el medio de aproximadamente 20%, obteniéndose así un banco de células de trabajo. Una forma de almacenamiento del banco de células de trabajo puede prepararse congelando el banco de células de trabajo a aproximadamente por debajo de -135°C, por ejemplo. La forma de almacenamiento del banco de células de trabajo, para uso en un proceso ejemplar de acuerdo con la presente descripción, se puede descongelar a temperatura ambiente y usarse para iniciar la etapa de cultivo.

35 La etapa de cultivo se puede llevar a cabo durante entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 14 horas, preferiblemente aproximadamente 11 horas a una temperatura de aproximadamente 33°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente a aproximadamente 34,5°C, en una cámara anaeróbica, tal como, por ejemplo, una cámara/cabina anaeróbica que tiene un filtro integrado de partículas de aire de alta eficiencia (HEPA), preferiblemente dentro de su área de trabajo. La etapa de fermentación se puede llevar a cabo durante entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 80 horas, preferiblemente de aproximadamente 60 horas a aproximadamente 80 horas, más preferiblemente durante aproximadamente 72 horas a una temperatura de aproximadamente 33°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente a 35°C. El proceso puede comprender además, por ejemplo y antes de la etapa de cultivo, una etapa de permitir la reducción oxidativa del medio de cultivo sustancialmente APF exponiendo el medio a la atmósfera de una cámara anaeróbica. El proceso también puede incluir antes de la etapa de fermentación, una etapa de permitir la reducción oxidativa del medio de fermentación sustancialmente de APF exponiendo también el medio de fermentación a la atmósfera de una cámara anaeróbica. Como un ejemplo, la etapa de permitir la reducción oxidativa del medio de cultivo sustancialmente APF puede llevarse a cabo durante entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 14 horas en la cámara anaeróbica. De manera similar, la etapa de permitir la reducción oxidativa del medio de fermentación sustancialmente APF en el fermentador puede llevarse a cabo durante entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 14 horas antes del comienzo de la etapa de fermentación.

55 En una realización, se describe un proceso APF, incluyendo cromatografía, para obtener una neurotoxina botulínica biológicamente activa, que comprende las siguientes etapas secuenciales de añadir bacterias de *Clostridium botulinum* de un banco de células de trabajo APF a un medio de cultivo APF; cultivar las bacterias de *Clostridium botulinum* en el medio de cultivo; fermentar bacterias de *Clostridium botulinum* de la etapa de cultivo en medio de fermentación APF hasta que se produzca la lisis celular de *Clostridium botulinum*; recolectar el cultivo de fermentación APF para proporcionar un medio de fermentación recolectado; someter el medio de fermentación recolectado a concentración por filtración; diluir el medio de fermentación filtrado por adición de un tampón para obtener un medio de fermentación diluido; una primera etapa de contacto en la que el medio de fermentación diluido se pone en contacto con un medio de cromatografía de captura, en la que el medio de cromatografía de captura es un medio de intercambio aniónico; una segunda etapa de contacto en la que un eluato de la primera etapa de contacto se pone en contacto con un medio de cromatografía de pulido, en la que el medio de cromatografía de pulido es un medio de intercambio catiónico, y filtrar el eluato de la segunda etapa de contacto, obteniendo de este modo neurotoxina botulínica biológicamente activa mediante el proceso APF mejorado. En realizaciones

particulares, el proceso puede comprender además la etapa de realización de una tercera etapa de contacto, después de la segunda etapa de contacto, y antes de la etapa de filtración poniendo en contacto el eluato de la segunda etapa de contacto con un medio de interacción hidrofóbica. La fase de lisis de *Clostridium botulinum* puede producirse, por ejemplo, entre aproximadamente 35 horas y aproximadamente 70 horas después del comienzo de la etapa de fermentación. El medio de fermentación puede tener un volumen de entre aproximadamente 2 L y aproximadamente 75 L, entre aproximadamente 2 L y aproximadamente 30 L, o entre aproximadamente 2 L y 20 L de medio de fermentación, por ejemplo. La totalidad de este proceso puede llevarse a cabo durante entre aproximadamente 50 horas a aproximadamente 150 horas, más preferiblemente de entre aproximadamente 80 horas a aproximadamente 120 horas. La neurotoxina botulínica biológicamente activa así obtenida por este proceso puede tener una potencia de aproximadamente $2,4 \times 10^7$ a aproximadamente $5,9 \times 10^7$ unidades/mg de neurotoxina botulínica biológicamente activa, por ejemplo.

De acuerdo con un aspecto, al final de la fermentación, se pueden obtener de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 85 mg de neurotoxina botulínica por litro de medio de fermentación. Después de varias etapas de procesamiento (operaciones de filtración/cromatografía/filtración), se pueden obtener de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 60 mg de neurotoxina botulínica por litro de medio de fermentación; de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg de neurotoxina botulínica por litro de medio de fermentación; de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 20 mg de neurotoxina botulínica por litro de medio de fermentación.

Como una realización, el pH del medio de fermentación se puede ajustar entre aproximadamente pH 6,0 y aproximadamente pH 8, preferiblemente entre aproximadamente pH 6,8 y aproximadamente pH 7,6 al comienzo de la etapa de fermentación, más preferiblemente aproximadamente pH 7,3. Como otro ejemplo, también se proporciona un proceso cromatográfico sustancialmente APF para obtener una neurotoxina botulínica biológicamente activa, comprendiendo el proceso las etapas de obtener un medio de fermentación sustancialmente APF que contiene una neurotoxina botulínica; poner en contacto el medio con una resina de cromatografía de intercambio aniónico para proporcionar un eluato purificado que contiene una neurotoxina botulínica; poner en contacto el eluato con una resina de cromatografía de intercambio catiónico para obtener de este modo una neurotoxina botulínica biológicamente activa purificada a partir de un proceso cromatográfico sustancialmente APF. En configuraciones particulares, se puede utilizar una columna de cromatografía aniónica que contiene de aproximadamente 600 ml a aproximadamente 800 ml de resina de cromatografía de intercambio aniónico. La columna de cromatografía aniónica puede tener un diámetro de aproximadamente 8 cm a aproximadamente 10 cm y una altura de lecho de resina de cromatografía de intercambio aniónico en la columna de aproximadamente 9 cm a aproximadamente 16 cm, por ejemplo. Una velocidad de flujo de medio de fermentación a través de la resina de cromatografía de intercambio aniónico puede ser de aproximadamente 140 cm/hora a aproximadamente 250 cm/hora, o de aproximadamente 150 cm/hora a aproximadamente 160 cm/hora, por ejemplo. En otro aspecto, puede utilizarse en el proceso de aproximadamente 150 ml a aproximadamente 300 ml de resina de cromatografía de intercambio catiónico en una columna de cromatografía en la que la columna de cromatografía de cationes tiene un diámetro de aproximadamente 5 cm a aproximadamente 8 cm y una altura de lecho de resina de cromatografía de intercambio catiónico de aproximadamente 5 cm a aproximadamente 11 cm, por ejemplo. El proceso puede incluir al menos una de una etapa de diafiltración y/o una etapa de reducción de la carga biológica. La etapa de reducción de la carga biológica puede utilizar un filtro de cápsula. La diafiltración de eluato purificado se realiza preferiblemente antes de una etapa de reducción de carga biológica. En un ejemplo, la etapa de diafiltrar el eluato purificado adicionalmente se continúa o se sigue ajustando la concentración del eluato purificado adicionalmente diafiltrado y pasando el eluato purificado adicionalmente diafiltrado ajustado por concentración a través de un filtro de reducción de carga biológica. El proceso puede proporcionar una neurotoxina botulínica obtenida que tiene potencia, determinada por un bioensayo de DL50 de ratón, de al menos aproximadamente $2,0 \times 10^7$ unidades/mg de toxina botulínica, tal como aproximadamente $2,4 \times 10^7$ a aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg de neurotoxina botulínica. Por ejemplo, puede recuperarse una recuperación ejemplar al final del proceso de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 25 mg de toxina botulínica por litro de medio de fermentación.

En otra realización, un proceso esencialmente APF para purificar una neurotoxina botulínica biológicamente activa puede comprender las etapas de obtener desde aproximadamente 2 L hasta aproximadamente 30 L de un medio de fermentación APF que incluye una neurotoxina botulínica; recolectar la etapa del medio de fermentación para proporcionar un medio de fermentación APF recolectado; realizar cromatografía de intercambio aniónico en el medio de fermentación APF recolectado para proporcionar de este modo un primer eluato; poner en contacto el eluato de la cromatografía de intercambio aniónico con un medio de cromatografía de intercambio catiónico para realizar cromatografía de intercambio catiónico para proporcionar de este modo un segundo eluato; y filtrar el segundo eluato del medio de cromatografía de intercambio catiónico, obteniendo de este modo una neurotoxina botulínica purificada, en la que la neurotoxina purificada obtenida tiene una potencia de desde aproximadamente $2,4 \times 10^7$ hasta aproximadamente $5,9 \times 10^7$ unidades/mg de neurotoxina botulínica biológicamente activa y puede obtenerse en una cantidad de entre aproximadamente 4 mg y aproximadamente 25 mg por litro de medio de fermentación APF usado.

Un método de composición para elaborar una composición farmacéutica sustancialmente APF en la que el principio activo es una neurotoxina botulínica biológicamente activa puede comprender las etapas de obtención de una neurotoxina botulínica biológicamente activa (i) proporcionando un medio de fermentación que está sustancialmente

libre de productos animales; (ii) fermentando bacterias de *Clostridium botulinum* en el medio de fermentación, y (iii) recuperando la neurotoxina botulínica biológicamente activa del medio de fermentación, usando un medio de cromatografía de intercambio aniónico seguido por el uso de un medio de cromatografía de intercambio catiónico; y luego preparando la composición de la neurotoxina botulínica con al menos un excipiente adecuado para elaborar de este modo una composición farmacéutica sustancialmente APF. En un ejemplo, el método incluye la etapa de secar la neurotoxina botulínica combinada y al menos un excipiente adecuado para obtener una forma estable para su envío o almacenamiento, por secado por congelación o liofilización o secado al vacío, en el que el ingrediente activo es la neurotoxina botulínica biológicamente activa, donde el medio de fermentación comprende un producto proteico obtenido a partir de un vegetal. El vegetal a partir del cual se puede obtener el producto proteico puede ser una soja, maíz o malta, semilla debilitada de *Lupinus campestris*, o productos hidrolizados a partir de los mismos. La neurotoxina botulínica obtenida puede tener una potencia entre aproximadamente $2,0 \times 10^7$ unidades/mg de neurotoxina botulínica y aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg de neurotoxina botulínica. La neurotoxina botulínica se selecciona del grupo que consiste en neurotoxinas botulínicas de tipos A, B, C₁, D, E, F y G, preferiblemente neurotoxina botulínica de tipo A. En casos particulares, la neurotoxina botulínica se obtiene como un componente neurotóxico de toxina botulínica con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa libre de las proteínas formadoras de complejo de un complejo de toxina botulínica. En realizaciones particulares, el excipiente adecuado se selecciona del grupo que consiste en albúmina, albúmina de suero humano, albúmina de suero humano recombinante, gelatina, sacarosa, trehalosa, almidón hidroxietilo, colágeno, lactosa, sacarosa, aminoácido, cloruro de sodio, cloruro de potasio, polisacárido, caprilato, polivinilpirrolidona y citrato de potasio. La obtención de la neurotoxina botulínica biológicamente activa puede comprender además la etapa de usar un medio de interacción hidrofóbico tras el uso del medio de intercambio catiónico. En ejemplos particulares, el secado al vacío tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C. En algunas realizaciones, el secado al vacío tiene lugar a una presión de aproximadamente 70 mmHg a aproximadamente 90 mmHg, por ejemplo. El tiempo para el secado al vacío puede ser desde aproximadamente 4 horas hasta aproximadamente 5 horas, por ejemplo.

Una composición farmacéutica puede comprender, por ejemplo, un complejo de neurotoxina botulínica biológicamente activa y un excipiente seleccionado del grupo que consiste en albúmina, albúmina de suero humano, albúmina de suero humano recombinante, gelatina, sacarosa, trehalosa, almidón hidroxietilo, colágeno, lactosa y sacarosa, en la que la composición farmacéutica está esencialmente libre de ácidos nucleicos.

En ejemplos particulares, una composición farmacéutica comprende una neurotoxina botulínica biológicamente activa, en la que la neurotoxina botulínica tiene una potencia entre aproximadamente $2,0 \times 10^7$ a aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg de neurotoxina botulínica biológicamente activa, y al menos un excipiente, donde la composición comprende menos de aproximadamente 12 ppm de ácido nucleico, preferiblemente menos de 1 ppm de ácido nucleico por mg de complejo de neurotoxina botulínica.

En una realización particular, un proceso cromatográfico sustancialmente APF para obtener una neurotoxina botulínica biológicamente activa comprende las siguientes etapas secuenciales de: cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en un medio de cultivo sustancialmente APF durante entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 12 horas, o hasta que una medición de biomasa del medio de cultivo tenga una densidad óptica, a una longitud de onda de aproximadamente 540 nanómetros (nm), de entre aproximadamente 0,8 UA y aproximadamente 4,5 UA ; fermentación de bacterias *Clostridium botulinum* del medio de cultivo en un medio de fermentación sustancialmente APF durante entre aproximadamente 65 horas a aproximadamente 75 horas o hasta que se una medición de biomasa tomada al final de la fermentación midiendo la densidad óptica del medio de fermentación usando una sonda de biomasa en línea a una longitud de onda de aproximadamente 890 nm está entre aproximadamente 0,05 UA y aproximadamente 0,7 UA; recoger el medio de fermentación durante aproximadamente 2,5 horas, eliminándose los residuos celulares en el medio de fermentación y reduciendo el peso del medio de fermentación a aproximadamente tres cuartos de su peso inicial al comienzo de la etapa de recolección; concentrar el medio de fermentación recogido mediante filtración de flujo tangencial a aproximadamente una cuarta parte de su volumen de partida al comienzo de la etapa de recolección; diluir el medio de fermentación concentrado por adición de un tampón, en el que las etapas de concentración y dilución tienen lugar durante entre aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 2 horas, por lo que durante la concentración el medio de fermentación se reduce a aproximadamente un cuarto de su peso inicial al comienzo de la etapa de recogida y luego se diluye, mediante la adición del tampón, de nuevo hasta su peso de partida original al comienzo de la etapa de recolección; poner en contacto el medio de fermentación diluido con un medio de cromatografía de captura de intercambio aniónico para capturar la neurotoxina botulínica biológicamente activa, durante un periodo de tiempo de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas; poner en contacto el eluato del medio de cromatografía de captura con un primer medio de cromatografía de pulido de intercambio catiónico para llevar a cabo una primera operación de pulido para eliminar impurezas de la misma durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1,5 horas a aproximadamente 2,5 horas; llevar a cabo una segunda operación de pulido haciendo pasar el primer eluato del medio de cromatografía de pulido a través de un medio de interacción hidrofóbica durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1,5 horas a aproximadamente 2,5 horas; procesar el eluato a partir del medio de interacción hidrofóbica por diafiltración, durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas; y filtrar el eluato procesado a través de un filtro de reducción de carga biológica, durante aproximadamente 0,5 horas, obteniendo de este modo neurotoxina botulínica biológicamente activa.

En otro aspecto, se describe un sistema cromatográfico sustancialmente APF para obtener neurotoxina botulínica biológicamente activa, comprendiendo el sistema un primer aparato para cultivar bacterias de *Clostridium botulinum*, el primer aparato capaz de contener un medio de cultivo sustancialmente APF; un segundo aparato para fermentar bacterias de *Clostridium botulinum* que se han cultivado en el primer aparato, el segundo aparato capaz de contener un medio de fermentación sustancialmente APF; un tercer aparato para recolectar el medio de fermentación; un cuarto aparato para llevar a cabo la concentración y dilución del medio recolectado del tercer aparato; un quinto aparato que comprende filtración de flujo tangencial (TFF); un quinto aparato para llevar a cabo una primera purificación de la neurotoxina botulínica del medio concentrado y diluido, comprendiendo el quinto aparato un medio de cromatografía de intercambio aniónico, obteniendo de este modo una primera neurotoxina botulínica; y un sexto aparato para llevar a cabo una segunda purificación de la primera neurotoxina botulínica purificada, comprendiendo el sexto aparato un medio de cromatografía de intercambio catiónico, y obteniendo de este modo una segunda neurotoxina botulínica purificada.

En una realización particular, el sistema puede comprender además un séptimo aparato para llevar a cabo una purificación adicional, purificando la segunda neurotoxina botulínica purificada del sexto aparato, en el que el séptimo aparato comprende un medio de interacción hidrofóbico, obteniendo de este modo una tercera neurotoxina botulínica purificada. Además, el sistema puede estar compuesto adicionalmente por un octavo aparato que tiene una membrana de filtración para filtrar el eluato del sexto o séptimo aparato.

En aún todavía otra realización, una columna de cromatografía con un diámetro entre aproximadamente 8 cm y aproximadamente 15 cm contiene el medio de cromatografía de intercambio aniónico y el medio de cromatografía de intercambio aniónico puede tener una altura de lecho en la columna de entre aproximadamente 8 cm y aproximadamente 15 cm, por ejemplo. En otro ejemplo más, el cuarto aparato del sistema comprende una columna de cromatografía que funciona a una velocidad de flujo de entre aproximadamente 125 cm/hora y aproximadamente 200 cm/hora, y la columna puede tener un volumen de columna entre aproximadamente 500 ml y aproximadamente 1 L. En un aspecto, el quinto aparato puede tener un volumen de columna de aproximadamente 50 ml y aproximadamente 500 ml, y una altura del lecho de aproximadamente 8 cm y aproximadamente 15 cm, por ejemplo. En algunos ejemplos, la columna de cromatografía del quinto aparato tiene un diámetro de columna de aproximadamente 2 cm y aproximadamente 10 cm, por ejemplo. La columna de cromatografía del quinto aparato puede tener una velocidad de flujo ejemplar de entre aproximadamente 100 cm y aproximadamente 200 cm/hora. El séptimo aparato del sistema puede comprender una membrana de filtración.

En otra realización, el sistema puede comprender además un noveno aparato, comprendiendo el noveno aparato una cámara anaeróbica para proporcionar una atmósfera anaeróbica en la que está contenido el primer aparato para cultivar bacterias *Clostridium botulinum*. Este noveno aparato incluye preferiblemente un filtro integrado de partículas de aire de alto rendimiento (HEPA) situado dentro de su cámara/estación de trabajo. El segundo aparato del sistema (para la fermentación) puede incluir al menos una sonda para detectar el potencial de oxidación-reducción o el pH o la densidad óptica. En un ejemplo particular, al menos una sonda desechable se selecciona del grupo que consiste en una sonda de reducción-oxidación, una sonda de pH y una sonda de turbidez. Un octavo aparato del sistema puede comprender un aparato de filtración de flujo tangencial para la concentración y el intercambio de tampón. En una realización adicional, el sistema puede comprender un décimo aparato que incluye un aparato de reducción de la carga biológica para reducir la carga biológica. En un ejemplo, el aparato de reducción de la carga biológica comprende un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente entre 0,1 μm y 0,3 μm , preferiblemente 0,2 μm . El sistema también puede incluir un undécimo aparato para su uso después de obtener la segunda neurotoxina botulínica purificada, para almacenar la neurotoxina botulínica purificada. En un ejemplo, este aparato de almacenamiento proporciona una temperatura de almacenamiento entre aproximadamente -25°C y aproximadamente -80°C.

Un método para tratar una afección en un paciente puede utilizar una composición farmacéutica que comprende la neurotoxina botulínica obtenida de acuerdo con los métodos aquí descritos. Una afección puede incluir una enfermedad, dolencia, enfermedad o deformidad o aspecto cosmético. En un ejemplo, el método de tratamiento de una afección en un paciente comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una neurotoxina botulínica y al menos un excipiente adecuado, donde la toxina botulínica tiene una potencia de aproximadamente 1 unidad \geq aproximadamente 0,02 picogramos para así tratar la afección del paciente.

En un ejemplo particular, la neurotoxina botulínica para tratar estas afecciones puede obtenerse mediante un proceso de cultivar bacterias de *Clostridium botulinum* en un medio de cultivo sustancialmente APF; obtener un medio de fermentación sustancialmente APF que contiene la neurotoxina botulínica; poner en contacto el medio con un medio de cromatografía de intercambio aniónico para proporcionar un eluato purificado que contiene la neurotoxina botulínica; poner en contacto el eluato con un medio de cromatografía de intercambio catiónico para obtener de este modo un eluato purificado adicional, y filtrar el eluato purificado adicional para obtener de este modo la neurotoxina botulínica biológicamente activa purificada a partir de un proceso cromatográfico sustancialmente APF.

En una realización se incluye un sistema cromatográfico sustancialmente APF para obtener una neurotoxina

botulínica biológicamente activa, comprendiendo el sistema un primer aparato para el cultivo anaeróbico de bacterias *Clostridium botulinum*, el primer aparato capaz de contener de aproximadamente 200 mL a aproximadamente 1 L de un medio de cultivo sustancialmente APF; un segundo aparato para la fermentación anaeróbica de bacterias *Clostridium botulinum* que han sido cultivadas en el primer aparato, el segundo aparato capaz de contener de aproximadamente 5 L a aproximadamente 75 L, o de aproximadamente 2 L a aproximadamente 75 L, o de aproximadamente 2 L a aproximadamente 30 L de un medio de fermentación sustancialmente APF e incluyendo al menos una sonda desechable seleccionada del grupo que consiste en una sonda de reducción-oxidación, una sonda de pH y una sonda de turbidez; un noveno aparato para proporcionar una atmósfera anaeróbica y capaz de contener el primer aparato, comprendiendo el noveno aparato una cámara anaeróbica que tiene un filtro de partículas de aire de alto rendimiento integrado dentro de la cámara, en el que dicha cámara puede contener el primer aparato para el cultivo anaeróbico de bacterias *Clostridium botulinum*; un tercer aparato para recoger el medio de fermentación; un cuarto aparato para llevar a cabo la concentración y dilución del medio recogido, un quinto aparato para llevar a cabo una primera purificación de la neurotoxina botulínica obtenida del cuarto aparato, el quinto aparato que comprende un medio de cromatografía de intercambio aniónico, obteniendo de este modo una primera neurotoxina botulínica purificada; un sexto aparato para llevar a cabo una segunda purificación de la primera neurotoxina botulínica purificada, comprendiendo el sexto aparato un medio de cromatografía de intercambio catiónico, obteniendo de este modo una segunda neurotoxina botulínica purificada; un séptimo aparato que realiza una tercera purificación de la segunda neurotoxina botulínica purificada, el séptimo aparato que comprende medio de interacción hidrofóbicos, obteniendo de este modo una tercera neurotoxina botulínica purificada; y un octavo aparato para la concentración y el intercambio de tampón de la tercera neurotoxina botulínica purificada, comprendiendo el octavo aparato una membrana TFF.

En los ejemplos particulares, el medio de fermentación comprende no más de aproximadamente 5% p/v de un producto proteico derivado de vegetales, no más de aproximadamente 2% p/v de un extracto de levadura y no más de aproximadamente 2% p/v de glucosa, y donde el nivel de pH del medio de fermentación es de aproximadamente pH 6,8 a aproximadamente 7,6, preferiblemente aproximadamente pH 7,3 al comienzo de una etapa de fermentación de aproximadamente 72 horas, por ejemplo. En una realización, el método puede comprender además la etapa de poner en contacto el eluato purificado adicional con un medio de interacción hidrofóbico para obtener un eluato incluso adicionalmente purificado que contiene la neurotoxina botulínica. En un ejemplo particular, el método de tratamiento de las afecciones puede ser empleando una neurotoxina botulínica que se obtiene como un componente neurotóxico de la toxina botulínica con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa, libre de las proteínas formadoras de complejo de un complejo de toxina botulínica. Las etapas de administración ejemplares se pueden seleccionar del grupo de vías de administración que consisten en administración intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraglandular, intratecal, rectal, oral y transdérmica, y la neurotoxina botulínica se selecciona del grupo que consiste en toxina botulínica tipo A, B, C₁, D, E, F o G. Preferiblemente, la neurotoxina botulínica es la neurotoxina botulínica de tipo A.

En algunos ejemplos, el sistema puede facilitar un proceso mediante el cual se puede obtener un complejo de neurotoxina botulínica biológicamente activo para uso como parte de una composición farmacéutica que comprende menos de aproximadamente 12 ng de ácido nucleico por mg de complejo de neurotoxina botulínica, preferiblemente por debajo de 1 ng de ácido nucleico por mg de complejo de neurotoxina botulínica, más preferiblemente sin ácido nucleico medible (por ejemplo, por debajo de un límite de detección).

Figuras

La Figura 1A es un diagrama de flujo que muestra las etapas principales en el proceso NAPF del Ejemplo 1. La Figura 1B es un diagrama de flujo que muestra las etapas principales en el proceso IAPF del Ejemplo 2, en el que las etapas de cromatografía de captura y pulido pueden utilizar bien 2 columnas (intercambio aniónico seguido de intercambio catiónico) o 3 columnas (FAPF) (intercambio aniónico seguido de intercambio catiónico seguido de una columna de interacción hidrofóbica).

Descripción

Nuestra invención se basa en el descubrimiento de que se puede obtener una neurotoxina clostridial biológicamente activa de alta potencia, con alta pureza, tal como una neurotoxina botulínica, mediante el uso de un sistema y un proceso cromatográfico de APF simple, rápido y económico. Significativamente, el uso de nuestro sistema y proceso puede resultar en una neurotoxina botulínica purificada que comprende 1 ng (o menos de 1 ng) de impurezas de ácido nucleico (ARN y ADN) por 1 mg de la neurotoxina botulínica purificada obtenida, aunque no se han usado enzimas derivadas de animales, tales como ARNasa y ADNasa, para purificar la neurotoxina botulínica fermentada. Por ejemplo, el uso de nuestro sistema y proceso puede resultar en una neurotoxina botulínica purificada que comprende menos de aproximadamente 0,6 ng de impurezas de ácido nucleico (ARN y ADN) por miligramo de neurotoxina botulínica purificada, obtenida. La neurotoxina botulínica obtenida puede ser un complejo de toxina botulínica tipo A, tal como un complejo de 300 kDa, 500 kDa o 900 kDa (pesos moleculares aproximados) o mezclas de los mismos. La neurotoxina botulínica obtenida puede ser también un componente neurotóxico del tipo de la toxina botulínica (es decir, sin las proteínas del complejo) con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. La neurotoxina botulínica puede ser una cualquiera de los serotipos A, B, C, D, E, F o G o mezclas de los mismos.

Además, los sistemas y procesos mejorados pueden practicarse conjuntamente con una toxina botulínica recombinante, híbrida, quimérica o modificada (cadena ligera, cadena pesada, o ambas cadenas juntas).

Un aspecto importante de nuestra invención es el uso de una cromatografía de un medio de intercambio aniónico (captura) seguido por el uso de una cromatografía de medio de intercambio catiónico (pulido) para purificar la neurotoxina botulínica a partir de un medio de fermentación de APF en el que las bacterias *Clostridium Botulinum* se han fermentado. Se encontró que el uso de cromatografía de intercambio aniónico seguido por el uso de cromatografía de intercambio catiónico proporciona un método eficaz y rápido para obtener neurotoxina botulínica de alto rendimiento, con alta pureza. Anteriormente, se había pensado que el uso de cromatografía de intercambio aniónico tenía un efecto perjudicial sobre los patrones de bandas de gel de la neurotoxina botulínica, desalentando así el uso de la cromatografía de intercambio aniónico para la purificación de neurotoxina botulínica. Véase, por ejemplo, la patente U.S. 7.452.697 en la columna 55, líneas 53-57.

Otro aspecto importante de nuestra invención es que da como resultado una neurotoxina botulínica de alta pureza (es decir, ≤ 1 ng de ácido nucleico/mg de neurotoxina botulínica obtenida), como se ha indicado anteriormente. Otro aspecto importante de nuestra invención es que mientras que el proceso de Schantz conocido requiere varias semanas (es decir, típicamente de aproximadamente 18 a aproximadamente 22 días) para cultivar, fermentar y purificar la neurotoxina botulínica, un sistema y proceso dentro del alcance de nuestra invención permite completar todas las etapas de cultivo, fermentación y purificación en una semana o menos. En una realización preferida de nuestra invención, todas las etapas de cultivo, fermentación y purificación pueden completarse en seis días o menos. En una realización más preferida de nuestra invención, todas las etapas de cultivo, fermentación y purificación pueden completarse en aproximadamente cuatro días o menos (por ejemplo, dentro de aproximadamente 80 a aproximadamente 144 horas o dentro de un tiempo/intervalo entre ellas). Hemos inventado esta realización rápida y más preferida de nuestra invención desarrollando un proceso de ocho o nueve etapas (y el sistema para llevar a cabo el proceso) y encontrando que cada una de las ocho o nueve etapas en una realización particular puede ser completada dentro de los períodos de tiempo que se exponen a continuación:

aproximadamente 8 horas a aproximadamente 14 horas para el cultivo;

aproximadamente 60 horas a aproximadamente 80 horas para la fermentación;

aproximadamente 2,5 horas para la recogida;

aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas para concentrar y diluir;

aproximadamente 4 horas a aproximadamente 6 horas para la cromatografía de intercambio aniónico (esto incluye el tiempo para eluir la toxina botulínica capturada)

aproximadamente 2 horas para cromatografía de intercambio catiónico;

aproximadamente 2 horas para una tercera etapa opcional de cromatografía (es decir, cromatografía de interacción hidrofóbica);

aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas para la concentración y diafiltración, y;

aproximadamente 1/2 hora para una posterior filtración. Por lo tanto, el tiempo total requerido para completar nuestra realización rápida, más preferida de 8 ó 9 etapas de nuestra invención es de aproximadamente 75 horas a aproximadamente 150 horas.

Nuestra invención es más eficiente y ahorra tiempo. En un aspecto, nuestro nuevo proceso utiliza líneas celulares pre-seleccionadas y verificadas, y por lo tanto elimina las etapas del proceso Shantz de la técnica anterior de plaquear y crecer células, seleccionar y recoger colonias y expandir la línea celular de las colonias recogidas (antes del cultivo celular y las etapas de fermentación) que se necesitaban para cultivar y luego inocular el medio de fermentación. En un aspecto, nuestra invención comienza directamente con el cultivo de células preseleccionadas para la inoculación de un medio de cultivo APF, ahorrando así tiempo y etapas del proceso.

A través de la experimentación desarrollamos sistemas de cromatografía de dos columnas de cromatografía ("IAPF") y de tres columnas ("FAPF"/"FIAPF") y procesos para purificar la neurotoxina botulínica presente en el medio de fermentación, el medio de fermentación resultante de una fermentación de APF de bacterias *Clostridium botulinum*. De manera significativa, mientras que un proceso de fermentación de APF puede reducir o eliminar productos derivados de animales (tales como caseína y caldo de carne) como nutrientes de los medios utilizados para cultivar y fermentar bacterias clostridiales, los procesos de fermentación APF conocidos son típicamente seguidos por una o más etapas de purificación que usan productos derivados de animales, tales como las enzimas ADNasa y ARNasa. Nuestros sistemas y procesos para purificar la neurotoxina botulínica presente en un medio de fermentación de APF no utilizan enzimas derivadas de animales.

Nuestra invención puede abarcar cargar un medio de fermentación recogido (por ejemplo, clarificado por filtración) sobre una columna de intercambio aniónico tal como una resina de cromatografía de intercambio aniónico POROS® 50HQ de Applied Biosystems. En un aspecto, se puede usar un medio de intercambio aniónico fuerte, que tiene una matriz de base de poliestireno/divinilbenceno y diámetro de partícula de aproximadamente 50 µm y capacidad dinámica (BSA mg/ml) de aproximadamente 60-70. La columna de intercambio aniónico captura la neurotoxina Clostridial (tal como un complejo de toxina botulínica) y reduce los niveles de impurezas. Se encontró que una columna de intercambio aniónico proporcionaba una captura eficiente de un complejo de toxina botulínica a partir del medio de fermentación recogido con retención de la actividad biológica del complejo de toxina botulínica, al tiempo que separaba muchas impurezas presentes con la toxina botulínica en el medio de fermentación. Se utiliza un tampón adecuado para eluir la neurotoxina de clostridial capturada (unida) de la columna de intercambio aniónico.

En una realización de dos columnas de nuestra invención, el eluato (que contiene la neurotoxina botulínica) de la columna de intercambio aniónico se carga sobre una columna de intercambio catiónico para purificar adicionalmente la neurotoxina botulínica de las impurezas. La columna de intercambio catiónico puede ser una resina de intercambio catiónico POROS® 20HS de Applied Biosystems. En un aspecto, se puede usar un medio de intercambio catiónico fuerte, que tiene una matriz de base de poliestireno/divinilbenceno y diámetro de partícula de aproximadamente 20 µm y capacidad de unión dinámica (lisosima mg/ml) de aproximadamente >75. En una realización de tres columnas (FAPF) de nuestra invención, el eluato de la columna de intercambio catiónico se carga sobre una columna de interacción hidrofóbica tal como resina de Fenil Sepharose HP de GE Healthcare para purificar adicionalmente la neurotoxina botulínica. En un aspecto, puede utilizarse una matriz de perlas de agarosa altamente reticuladas con un tamaño de partícula de aproximadamente 34 µm, que han sido derivatizadas con grupos fenilo y tienen una capacidad de unión dinámica (quimotripsinógeno mg/ml) de aproximadamente 45.

Después de o bien el proceso de dos columnas o de tres columnas, el eluato de la última columna usada puede procesarse adicionalmente para obtener un complejo de toxina botulínica a granel altamente purificado. Las etapas de procesamiento post-cromatografía pueden incluir concentración e intercambio de tampón mediante ultrafiltración y diafiltración, filtración estéril y preparación de una solución de complejo de toxina botulínica purificada en lugar de una suspensión (técnica anterior), preferiblemente en citrato de potasio, y en un ejemplo, a una concentración de citrato de potasio 10 mM a un pH de aproximadamente 6,5.

En ciertas realizaciones preferidas, los medios para el crecimiento (cultivo anaeróbico y fermentación anaeróbica) de *Clostridium botulinum* y la producción de toxina botulínica puede comprender productos a base de soja para reemplazar productos derivados de animales de manera que los medios utilizados estén sustancial o completamente libres de productos derivados de animales. La etapa de cultivo aumenta la cantidad de microorganismo para la fermentación posterior. El cultivo permite que las bacterias dormidas y previamente congeladas se rejuvenecen en cultivos que crecen activamente. Además, el volumen y la cantidad de microorganismos viables utilizados para inocular el medio de fermentación se pueden controlar más exactamente de un cultivo que crece activamente de lo que puede ser de un banco de células de *Clostridium botulinum* almacenado, sin propagación. Por lo tanto, una muestra de un banco de células de trabajo en medio de APF se descongela y se coloca en el medio de cultivo de APF seleccionado. Después de obtener un nivel adecuado de crecimiento bacteriano, el medio de cultivo se usa para inocular el medio de fermentación. Como un ejemplo, de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, o una cantidad entre ellos, del medio de cultivo que tiene *Clostridium botulinum* de la fase de crecimiento se usa para inocular el medio de fermentación. La fermentación se lleva a cabo para producir la cantidad máxima de células microbianas en un entorno anaeróbico a gran escala (Ljungdahl *et al.*, Manual of industrial microbiology and biotechnology (1986), editado por Demain *et al.*, American Society for Microbiology, Washington, D.C. página. 84). Alternativamente, el crecimiento de *Clostridium botulinum* en el medio de fermentación puede proceder añadiendo la muestra del banco de células de trabajo directamente al medio de fermentación.

En la técnica anterior, el crecimiento de *Clostridium botulinum* en el medio de cultivo se desarrolla típicamente en dos etapas, una primera etapa de plaqueo de células, crecimiento de colonias celulares, selección y crecimiento, seguido de una segunda etapa de inoculación de medio de cultivo (típicamente un cultivo en etapas de dos etapas) e inoculación de medio de fermentación y la producción de toxina botulínica. Preferiblemente, el crecimiento en el medio de cultivo en cualquier etapa no da lugar a la lisis celular antes de la inoculación del medio de fermentación con el crecimiento final en el medio de cultivo. Por lo tanto, antes de nuestra invención, se tardaba aproximadamente cuatro días en cultivar bacterias *Clostridium botulinum* antes de que se iniciara la etapa de fermentación. De acuerdo con nuestra invención, se puede completar todo el cultivo en sólo 8 a 14 horas debido a que no hay necesidad de las etapas previamente utilizados de plaquear células, tiempo de espera posterior para el crecimiento de colonias en placas de agar sangre, selección de colonias de las placas para crecimiento en pequeños volúmenes de cultivo (por ejemplo, 8-9 ml) que luego proporcionan un inóculo para el medio de cultivo. De acuerdo con un aspecto de nuestra invención, se utilizan directamente células pre-seleccionadas para inocular el medio de cultivo que se utiliza para inocular el medio de fermentación a escala completa a partir del cual se purifica eventualmente la toxina botulínica, eliminando así las etapas de plaqueo, formación de colonias, selección y escalonar previamente utilizadas para crecer células que inocularían un medio de cultivo que a su vez se utiliza para inocular el medio de fermentación.

Los medios de cultivo basados en animales (no APF o "NAPF") generalmente incluyen medios de infusión de cerebro corazón (BHI), bacto peptona, NaCl y glucosa. Los medios de cultivo dentro del alcance de nuestra

invención son medios de cultivo APF. Por ejemplo, se puede usar un producto a base de soja en lugar de BHI y bacto-peptona en el medio de cultivo y fermentación. Preferiblemente, el producto a base de soja es soluble en agua y comprende soja hidrolizada, aunque *Clostridium Botulinum* pueden crecer en medios que contienen soja insoluble. Cualquier fuente de productos a base de soja puede usarse de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, la soja es soja hidrolizada y la hidrolización se ha llevado a cabo utilizando enzimas no animales. Las fuentes de soja hidrolizada o soluble incluyen Hy-Soy (Quest International), Peptona de soja (Gibco) Bac-soja (Difco), AMISOY (Quest), NZ soja (Quest), NZ soja BL4, NZ soja BL7, SE50M (DMV International Nutritionals), y SE50MK (DMV).

Ejemplos

Los ejemplos siguientes exponen realizaciones particulares de nuestra invención y no pretende que limiten el alcance de nuestra invención. A menos que se indique lo contrario en los ejemplos, "toxina" o "toxina botulínica" significa un complejo de toxina botulínica tipo A con un peso molecular de aproximadamente 900 kDa. Los sistemas y métodos descritos en la presente memoria para purificar un complejo de toxina botulínica de tipo A con un peso molecular de aproximadamente 900 kDa, tienen una aplicabilidad directa para la purificación de toxinas, complejos, los serotipos de la toxina botulínica y el componente neurotóxico de la toxina botulínica de aproximadamente 150 kDa, aproximadamente 300 kDa, aproximadamente 500 kDa así como de otros pesos moleculares.

Ejemplo 1 (comparativo)

Proceso no APF (Schantz) para la obtención de una toxina botulínica

Este ejemplo expone el proceso de Schantz de la técnica anterior para obtener neurotoxina botulínica. El proceso es un proceso no APF usando medios y reactivos derivados de animales (es decir, placas de agar de sangre de vacuno para cultivo, caseína en el medio de fermentación y uso de enzimas ARNasa y ADNasa para la purificación de neurotoxina botulínica). La figura 1A es un diagrama de flujo que muestra las etapas principales del proceso de Schantz. El proceso de Schantz tiene alrededor de 16 a 20 etapas principales, para el trabajo de la escala de la producción utiliza un fermentador de 115 L y tarda cerca de 3 semanas para terminar. El proceso de Schantz se inicia descongelando un vial de banco de células madre de *Clostridium botulinum* no APF (MCB) a temperatura ambiente seguido por cuatro etapas de cultivo. Antes de seleccionar colonias con una morfología adecuada, se sembraron en estrías alícuotas del vial de MCB descongelado en placas de agar de sangre Columbia (CBA) prereducido y se incubaron anaeróticamente durante 30-48 horas a $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. En segundo lugar, se inocularon colonias seleccionadas en tubos de ensayo de 9 ml que contenían un medio de crecimiento de caseína durante 6-12 horas a 34°C . El contenido del tubo de 9 ml con el crecimiento más rápido y la densidad más alta (etapa de selección del crecimiento) se cultivaron posteriormente a través de dos incubaciones anaeróbicas escalonadas (la tercera y cuarta etapas de cultivo), siendo una incubación de 12-30 horas a 34°C en una botella de cultivo de siembra de 600 mL a 1L, seguido por un cultivo en un fermentador de siembra de 15L a 25L que contiene un medio de crecimiento de caseína durante 6-16 horas a 35°C . Estos dos cultivos escalonados se llevaron a cabo en un medio nutritivo que contenía 2% de hidrolizado de caseína (una digestión de caseína [proteína de leche]), 1% de extracto de levadura y 1% de glucosa (dextrosa) en agua a pH 7,3.

Los cultivos escalonados fueron seguidos por una incubación adicional durante 60-96 horas a 35°C en un fermentador de producción de escala comercial (es decir, 115 L) en un medio que contiene caseína bajo una atmósfera anaeróbica controlada. El crecimiento de la bacteria está normalmente completo después de 24 a 36 horas y durante la etapa de fermentación llevada a cabo durante aproximadamente 65 a aproximadamente 72 horas, donde la mayoría de las células experimentan lisis y liberan neurotoxina botulínica. Se cree que la toxina se libera por lisis celular y se activa por las proteasas presentes en el medio. Se puede preparar un filtrado del medio de cultivo usando un filtro de profundidad de una sola capa para eliminar impurezas groseras (es decir, células enteras y rotas) obteniendo de este modo una solución clara denominada cultivo clarificado. La recolección de neurotoxina botulínica del cultivo clarificado se consiguió reduciendo el pH del cultivo clarificado a pH 3,5 con ácido sulfúrico 3M para precipitar la toxina cruda a 20°C (precipitación por acidificación). La neurotoxina botulínica cruda se concentró entonces (para lograr una reducción de volumen) mediante ultramicrofiltración (microfiltración) (denominada MF o UF) seguida de diafiltración (DF). Se utilizó un filtro de $0,1 \mu\text{m}$ para la etapa de microfiltración.

La toxina cruda o en bruto recogida se transfirió entonces a un recipiente de digestión y se estabilizó por adición del inhibidor de proteasa hidrocloreuro de benzamidina. Se añadieron ADNasa y ARNasa para digerir (hidrolizar) ácidos nucleicos. A continuación, se eliminaron los ácidos nucleicos hidrolizados y las impurezas de bajo peso molecular mediante etapas adicionales de UF y DF. La toxina se extrajo entonces con tampón de fosfato de pH 6,0 y se eliminaron los restos celulares por clarificación. A continuación, se llevaron a cabo las siguientes tres etapas de precipitación secuencial (precipitaciones con etanol frío, ácido clorhídrico y sulfato de amoníaco). El complejo de neurotoxina botulínica purificada (toxina a granel) se almacenó como una suspensión en un tampón de fosfato de sodio/sulfato de amonio a 2°C a 8°C .

La terminación de este Ejemplo 1 del proceso de Schantz (no APF), incluyendo las etapas de recolección y purificación, dura aproximadamente de dos a tres semanas. La neurotoxina botulínica a granel resultante fue una suspensión de alta calidad del complejo de toxina botulínica tipo A de 900 kDa preparado a partir de la cepa Hall A

de *Clostridium botulinum* con una potencia específica de $\geq 2 \times 10^7$ U/mg, una A_{260}/A_{278} de menos de 0,6 y un patrón claro de bandas sobre electroforesis en gel, y adecuado para uso para la composición de una composición farmacéutica de toxina botulínica.

- 5 La neurotoxina botulínica también se puede obtener a partir de un proceso APF, no cromatográfico, como se expone en el Ejemplo 7 de la patente U.S. 7.452.697, tardando el proceso completo de APF, no cromatográfico (desde el inicio del cultivo hasta el final de todas las etapas de purificación y procesamiento) aproximadamente dos a tres semanas en completarse. Alternativamente, la neurotoxina botulínica también puede obtenerse a partir de un proceso cromatográfico APF, como se expone en el Ejemplo 16 de la patente U.S. 7.452.697, tardando el proceso APF, cromatográfico (desde el inicio del cultivo hasta el final de todas las etapas de purificación y procesamiento) una semana o más en completarse.

Ejemplo 2

- 15 Sistemas y procesos APF, cromatográficos de dos y tres columnas para la obtención de una neurotoxina botulínica

Desarrollamos sistemas y procesos rápidos APF, basados en cromatografía aniónica-catiónica para obtener neurotoxina botulínica de alto rendimiento y alta pureza. El proceso de este Ejemplo 2 tenía solamente 8-10 etapas principales, para propósitos de producción (es decir, para obtener cantidades en gramos de la neurotoxina botulínica final) usó un recipiente de fermentación de 20 L y tarda sólo 4-7 días, preferiblemente aproximadamente 4 a aproximadamente 6 días, para completar todas las etapas del proceso desde el inicio del cultivo hasta completar la purificación final y el almacenamiento de toxinas. El aparato utilizado en los sistemas aquí descritos se discute a continuación. Se desarrollaron un proceso de dos medios cromatográficos y un proceso de tres medios cromatográficos y se exponen en la presente memoria. El proceso de dos medios usó cromatografía de intercambio aniónico seguido de cromatografía de intercambio catiónico. El proceso de tres medios usó cromatografía de intercambio aniónico seguida de cromatografía de intercambio catiónico seguido por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). El HIC eliminó otras impurezas tales como una impureza de 49 kDa (que resulta ser glucosa fosfato isomerasa de una célula huésped, como se discute a continuación).

- 30 *Preparación del banco de células de trabajo*

Desarrollamos un nuevo banco de células de trabajo de *Clostridium botulinum* (que se utilizó para iniciar la etapa de cultivo) sin el uso de placas de agar de sangre de Columbia y que eliminó la necesidad de selección de colonias antes del cultivo y también eliminó la necesidad de llevar a cabo las etapas de cultivo en tubos y siembra múltiple (cultivo) del proceso Shantz.

Para ello, se utilizó un banco de células madre de Schantz (MCB) previamente establecido para crear un banco de células de investigación APF (RCB) a partir del cual se generó un nuevo banco de células madre APF (MCB) y un subsiguiente banco de células de trabajo (WCB). Un banco de células de investigación (RCB) se hizo a partir de una colonia del MCB de Schantz (NAPF). Para eliminar la proteína derivada de animales del vial MCB, las células se lavaron dos veces en medio APF que contenía SPTII al 2% p/v (Peptona de soja tipo II), extracto de levadura al 1% p/v y glucosa al 1% p/v. Las células se sembraron en placas sobre medio APF bajo condiciones anaeróbicas estrictas usando una cámara anaeróbica de Sistema de Control de Aire Modular (MACS). Una colonia aislada se expandió adicionalmente y se almacenó en medio APF que contenía aproximadamente 20% de glicerol por debajo de -135°C .

El APF-MCB se preparó bajo condiciones GMP expandiendo el RCB en medio APF libre de oxígeno (200 ml, reducido durante un mínimo de 12 horas en una cámara anaeróbica) y se cultivó en una cámara anaeróbica MACS a $34,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (agitado a 60 rpm) hasta que la DO_{540} del cultivo alcanzó $2,5 \pm 1,0$ UA. Se añadió glicerol estéril al cultivo resultante hasta una concentración final de aproximadamente 20%, después de lo cual la mezcla se transfirió a criviales a 1 ml/vial (viales APF-MCB). Los viales se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y después se almacenaron por debajo de -135°C . Un APF-WCB se hizo en condiciones GMP mediante la expansión de la anterior. Los bancos de células APF resultantes se caracterizaron por su identidad, pureza, viabilidad y estabilidad genética.

- 55 *Etapas aguas arriba (cultivo y fermentación)*

Nuestro proceso del Ejemplo 2 tuvo dos etapas generales; una etapa aguas arriba y una etapa aguas abajo. La etapa aguas arriba comprende la expansión de una línea celular de partida (crecimiento y reproducción de bacterias *Clostridium botulinum* en un medio de cultivo sustancialmente APF), fermentación, recolección (eliminación de restos celulares) para proporcionar un cultivo clarificado, recolectado, que se concentra y se diluye a continuación. Por lo tanto, en este ejemplo las nueve etapas de nuestro proceso de dos columnas son cultivo, fermentación, filtración de recogida, concentración, cromatografía de captura (anión), cromatografía de pulido (catión), intercambio de tampón, reducción de carga biológica y llenado de vial.

La etapa aguas arriba incluía el uso de un medio de cultivo en una botella de 1 L que contenía 400 ml de medio de

cultivo APF de siembra reducido (en una cámara anaeróbica) (SPTII al 2% p/v, extracto de levadura al 1% p/v (ajustado a pH 7,3 con hidróxido de sodio 1 N y/o ácido clorhídrico 1 N antes del autoclave)) 1% p/v de glucosa esterilizada añadida después del autoclavado de medio de cultivo). El medio de cultivo (siembra) se inoculó con 400 µl de un WCB descongelado de *Clostridium botulinum*. La incubación/cultivo ocurrió a 34,5°C ± 1,0°C con una agitación de 150 rpm en una cámara anaeróbica.

Cuando la densidad óptica del medio de cultivo a 540 nm fue de 1,8 ± 1,0 UA, se transfirieron los contenidos totales de la botella de 1 L (aproximadamente 400 ml) a un fermentador de producción de 20 L que contenía medio de fermentación APF ajustado con hidróxido de sodio 1 N y/o ácido clorhídrico 1N post-esterilización con vapor a pH 7,3, medio de fermentación compuesto por 3,25% p/v SPTII, extracto de levadura al 1,2% p/v, glucosa estéril al 1,5% p/v (añadido después de la esterilización; esterilización, por ejemplo, a aproximadamente 122°C durante 0,5 hora). La temperatura y la agitación se controlaron a 35°C ± 1°C y 70 rpm, respectivamente. La capa de nitrógeno se ajustó a 12 slpm y la presión del espacio de cabeza se estableció a 5 psig para mantener un entorno anaeróbico para el crecimiento celular. El pH de la fermentación y la densidad celular se controlaron por sondas de pH y de turbidez en línea, respectivamente. Las tres fases para la fermentación de producción incluyen fases de crecimiento exponencial, estacionarias y de autólisis. Se observó que la autólisis celular, que libera el complejo activo BoNT/A en el medio de cultivo, se produce de forma consistente entre 35 horas y el final de la fermentación. Al final de la fermentación, el cultivo se enfrió a 25°C para la recogida.

Una vez que el medio de fermentación se enfrió a 25°C, se separaron los restos celulares del complejo de neurotoxina botulínica tipo A que contenía lisado mediante filtración en profundidad, primero a través de un pre-filtro de gradiente de retención nominal de 5-0,9 µm para eliminar los restos celulares y luego a través de un gradiente nominal de retención nominal de 0,8-0,2 µm cargado positivamente para eliminar el ADN (eliminación de hasta aproximadamente 80%). Ambos filtros se enjuagaron junto con 20 L de agua para inyección (WFI) antes de su uso. Se requirió un mínimo de 15 L del filtrado para el procesamiento adicional, y cualquier material en exceso se descontaminó después de que se completó el muestreo en proceso. El filtrado se almacenó a 4°C si no se procesó inmediatamente por ultrafiltración.

Dentro de una cabina de bioseguridad (BSC), el filtrado de la etapa de recolección se concentró de 15 L a 5 ± 0,5 L usando una membrana de filtración de flujo tangencial de fibra hueca (TFF) de GE Healthcare. El material ultrafiltrado se diluyó a continuación con tampón de fosfato de sodio 10 mM pH 6,5 hasta un volumen final de 20 L. Este material se purificó mediante la utilización de 2 columnas (anión luego catión) o tres columnas cromatográficas (anión, catión y luego interacción hidrofóbica). El material de recogida ultrafiltrado diluido se almacenó a 4°C si no se procesó inmediatamente por purificación.

En el proceso de Schantz se termina la etapa de cultivo y se inicia la etapa de fermentación basada en el tiempo y en la observación visual del crecimiento del cultivo. Por el contrario, en nuestros procesos del Ejemplo 2 la determinación de cuándo finalizar la etapa de cultivo se basa en el análisis de la densidad óptica del fluido de cultivo, lo que garantiza que el cultivo se encuentra en la fase de crecimiento logarítmico en el momento del inicio de la etapa de fermentación y permite la reducción de duración de la etapa de cultivo hasta aproximadamente 8 horas a aproximadamente 14 horas. Nuestro parámetro de DO que culminó etapa de cultivo maximizó la salud de las células cultivadas y alentó la toxina botulínica robusta y abundante resultante de la etapa de fermentación. La densidad óptica media (a 540 nm) del medio de cultivo al final del cultivo fue de 1,8 UA. La duración media de la etapa de fermentación 72 horas y la turbidez final media (A_{690}) del medio de fermentación al final de la etapa de fermentación fue de 0,15 UA. La cantidad media de complejo de toxina botulínica de tipo A presente (como se determinó por ELISA) en el medio de fermentación de 20 L (caldo entero) al final de la etapa de fermentación fue de aproximadamente 64 µg de complejo de toxina botulínica tipo A/ml de medio de fermentación.

La etapa de recolección utilizó filtración en profundidad para eliminar los restos celulares y los ácidos nucleicos, seguido por ultrafiltración y dilución para preparar el medio de fermentación para la siguiente etapa del proceso. Esta recolección/eliminación de restos celulares es fundamentalmente diferente del proceso de recogida de Schantz, que utiliza la precipitación por acidificación seguida de microfiltración y diafiltración para concentrar e intercambiar tampones en preparación para su posterior procesamiento.

55 *Etapas aguas abajo (purificación)*

Las etapas aguas abajo incluyeron la captura de la neurotoxina botulínica en una columna de intercambio aniónico, la elución de la columna y la separación adicional de impurezas por pulido en una columna de intercambio catiónico, y preferiblemente (en el proceso de tres columnas), el paso del eluato que contiene la neurotoxina botulínica deseada a través de una tercera columna, preferiblemente una columna de interacción hidrofóbica (por ejemplo, cromatografía), seguido por la concentración y el intercambio de tampón utilizando filtración de flujo tangencial (TFF) y reducción de la carga biológica (por ejemplo, mediante filtración adicional con un filtro de 0,2 µm) hasta un complejo final de neurotoxina botulínica tipo A optimizado para almacenamiento en frío, preferiblemente congelación, y composición final en una composición farmacéutica de complejo de neurotoxina botulínica tipo A. La secuencia de las etapas de cromatografía y filtración estaba destinada a eliminar las impurezas relacionadas con el producto y el

proceso, eliminar agentes dañinos potenciales y controlar la concentración del complejo de neurotoxina botulínica tipo A y la matriz de tampón de la neurotoxina botulínica final tipo A con el fin de proporcionar una sustancia farmacológica más estable.

5 Una realización más detallada del proceso de tres columnas aguas abajo llevado a cabo es como sigue. Se hizo pasar material clarificado (diluido) ultrafiltrado (20 L, como se ha descrito anteriormente) a través de una resina de cromatografía de intercambio aniónico POROS® 50HQ, se eluyó la neurotoxina botulínica capturada de la columna de intercambio aniónico y luego se pasó a través de una resina cromatográfica de intercambio catiónico POROS® 20HS, el eluato de la cual se hizo pasar a través de una resina de cromatografía de Phenyl Sepharose HP. El eluato de la columna HIC se sometió a filtración de flujo tangencial de 100 kDa, seguido de filtración de 0,2 µm. El complejo de neurotoxina botulínica tipo A resultante se congeló para su almacenamiento.

10 En este Ejemplo, se utilizó en la primera etapa de cromatografía del proceso aguas abajo una resina de cromatografía de intercambio aniónico POROS® 50HQ empaquetada en una columna con un diámetro interior de aproximadamente 8 cm y una altura de columna de aproximadamente 15 cm. La operación completa de la columna POROS® 50HQ se completó a temperatura ambiente, y el flujo fue en dirección descendente. El complejo de neurotoxina botulínica de tipo A se eluyó a partir de la columna de anión usando un cambio de etapa de pH en el que los componentes cargados más negativamente tales como ácidos nucleicos (p. ADN y ARN) y otras proteínas de la célula huésped permanecieron unidas a la columna de intercambio aniónico.

15 Los detalles de la etapa de intercambio de aniones son los siguientes. Uso de la columna POROS® 50HQ usando hidróxido de sodio 0,1 N durante un tiempo de contacto mínimo de 30 minutos (al menos aproximadamente 3 volúmenes de columna, a 230 cm/hora). La columna se equilibró después con un tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5 (al menos 5 volúmenes de columna). A continuación, se cargó el material clarificado ultrafiltrado y diluido (es decir, material de fermentación APF de lisado procesado) a 230 cm/hora sobre la columna de intercambio aniónico POROS® 50HQ, seguido de lavado con al menos aproximadamente 20 volúmenes de columna de fosfato sódico 50 mM, pH 6,5 a 230 cm/hora hasta que la absorbancia a 280 nm del efluente de la columna disminuye hasta 0,10 UA, seguido de elución con acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 a 230 cm/hora. Se recogió el grupo de productos, cuando la absorbancia a 280 nm (A_{280}) aumenta hasta al menos aproximadamente 0,15 UA y a través del máximo de pico a igual o inferior a aproximadamente 0,2 UA en el borde de salida, en un recipiente que contiene 1 volumen de columna de acetato de sodio 50 mM, pH 4,8. Este combinado de elución se almacenó a aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C durante hasta 48 horas.

20 La segunda etapa de cromatografía en el proceso aguas abajo de este Ejemplo 2 usó una resina de cromatografía de intercambio catiónico POROS® 20HS empaquetada en una columna con un diámetro interior de 8 cm y una altura de columna de 5 cm. La operación completa de la columna POROS® 20HS se completó a temperatura ambiente, y el flujo fue en dirección descendente. El complejo de neurotoxina botulínica tipo A se asocia con la resina de columna POROS® 20HS. El complejo de neurotoxina botulínica de tipo A se eluyó después de la columna usando un cambio en la etapa salina. Las impurezas relacionadas con el producto se eluyeron con el tampón de lavado y la solución de descontaminación.

25 Los detalles de la etapa de intercambio de cationes son los siguientes. Uso de la columna POROS® 20HS usando solución de hidróxido de sodio 0,1 N durante un tiempo de contacto mínimo de 30 minutos (al menos aproximadamente 3 volúmenes de columna, a 230 cm/hora). La columna se equilibró después con un tampón de acetato sódico 50 mM, pH 4,8 (al menos aproximadamente 5 volúmenes de columna). A continuación, se cargó el conjunto de productos POROS® 50HQ (recogido como se describe anteriormente, fresco o de refrigeración) en la columna POROS® 20HS. La columna se lavó a continuación con un tampón de acetato sódico 50 mM, pH 4,8 (al menos aproximadamente 3 volúmenes de columna) y luego se lavó de nuevo con un tampón de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 4,8. El complejo de neurotoxina botulínica de tipo A se eluyó de la columna POROS® 20HS con un tampón de acetato sódico 50 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 4,8 a 200 mL/min, el eluato se desvió en una bolsa de recogida de bioprocesos (que contenía 1 volumen de columna de 50 mM $\text{NaH}_3\text{C}_2\text{O}_2$, pH 4,8) cuando la A_{280} aumenta hasta aproximadamente $\geq 0,1$ UA hasta el pico máximo hasta que la A_{280} del borde de salida del pico de elución disminuye hasta un valor del borde de salida de $\leq 0,1$ UA. El combinado de productos POROS® 20HS se almacenó en la bolsa de recogida a temperatura ambiente durante hasta aproximadamente 6 horas.

30 En el proceso de medios de cromatografía de tres columnas de este Ejemplo 2, el eluato de la segunda columna (intercambio catiónico) se hizo pasar a través de una columna HIC. La columna de HIC utilizada fue una resina de cromatografía de interacción hidrofóbica de Fenil Sepharose HP empaquetada en una columna con un diámetro interno de aproximadamente 8 cm y una altura de columna de aproximadamente 5 cm. La operación completa de la columna Fenil Sepharose HP se completó a temperatura ambiente, y el flujo fue en dirección descendente. El complejo de neurotoxina botulínica de tipo A se eluyó de la columna usando un cambio de etapa de sal decreciente. Las impurezas se eluyeron durante la carga y con el tampón de lavado y solución de descontaminación.

35 Los detalles de la etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica son los siguientes. Una columna de Fenil Sepharose HP se desinfectó inicialmente con una solución de hidróxido sódico 0,1 N durante un tiempo de contacto

mínimo de 30 minutos (con al menos aproximadamente 3 volúmenes de columna de una solución de hidróxido de sodio 0,1 N a 200 cm/hora). La columna se equilibró entonces con al menos aproximadamente 5 volúmenes de columna de tampón de acetato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 0,4 M, tampón de pH 4,8. A continuación, el conjunto de productos POROS® 20HS (columna de intercambio catiónico) (de arriba) se combinó 1:1 con un tampón de acetato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 0,8 M, pH 4,8 y se cargó en la columna Fenil Sepharose HP. La columna se lavó primero con al menos aproximadamente 3 volúmenes de columna de un tampón de acetato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 0,4 M, pH 4,8, y luego se lavó con un tampón de sodio 50 mM, sulfato de amonio 0,4 M, pH 6,5. El complejo de neurotoxina botulínica de tipo A se eluyó de la columna con un tampón de fosfato de sodio 10 mM, sulfato de amonio 0,14 M, pH 6,5. El eluato se desvió en una bolsa de recogida de bioprocesos cuando la A_{280} aumentó a $\geq 0,05$ UA. El eluato se recogió hasta que la A_{280} del borde de salida del pico de elución disminuyó hasta un valor de $\leq 0,05$ UA. El combinado de productos de Fenil Sepharose HP se almacenó en la bolsa de recogida a temperatura ambiente durante hasta 6 horas.

Se usó un sistema de filtración de flujo tangencial para concentrar y diafiltrar el combinado de productos de la etapa de cromatografía de Fenil Sepharose HP en el tampón de formulación de fármaco. Se utilizaron casetes Pall® Filtron Minimate con una membrana de corte de peso molecular de 100 kDa para las etapas de concentración y diafiltración. El material formulado se hizo pasar luego a través de un filtro Pall Mini Kleenpak® de 0,2 μ m para reducir la carga biológica potencial. Como se ha indicado anteriormente, la etapa de UF/DF concentró el combinado de productos de Fenil Sepharose HP (eluato de la columna HIC) a una concentración del complejo BoNT/A de 0,7 g/L y diafiltró el material concentrado con un tampón citrato de potasio 10 mM, tampón pH 6,5.

Los detalles del proceso de ultrafiltración/diafiltración utilizado son los siguientes. La unidad de UF/DF y la membrana de poliéter sulfona Pall de 100 kDa se enjuagaron inicialmente con un mínimo de 5 L de agua para inyección (WFI) para eliminar la solución de relleno y se desinfectaron con un mínimo de 200 ml de una solución de hidróxido de sodio 1N bajo condiciones de recirculación durante un mínimo de 10 minutos, preferiblemente al menos 30 minutos, para desinfectar la unidad UF/DF. A continuación, se equilibraron la membrana y el sistema UF/DF con volúmenes suficientes del tampón de formulación citrato de potasio 10 mM, pH 6,5, hasta que el pH del permeato y del retenido fueron de pH 6,5. Después de esto, el combinado de productos de Fenil Sepharose HP se cargó en el casete de filtración de flujo tangencial Minimate® y el eluato de HIC se concentró hasta 0,7 g/L. Después de la etapa de concentración, el combinado retenido se diafiltró contra un mínimo de 5 volúmenes de diafiltración del tampón de formulación de fármaco (citrato de potasio 10 mM, pH 6,5) a una presión transmembrana de 7,5 psig (libras por pulgada cuadrada). La salida de permeado se cerró entonces y el sistema UF/DF funcionó durante al menos 2 minutos y el sistema se enjuagó con 50 ml de tampón de formulación citrato de potasio 10 mM, pH 6,5. Después del enjuague, se determinó la concentración de complejo de BoNT/A en el combinado de retención midiendo el valor de A_{278} fuera de la línea y basado en la lectura de A_{278} , la concentración del combinado retenido se ajustó a 0,5 g/L con tampón citrato de potasio 10 mM, pH 6,5. El combinado retenido ajustado a la concentración se filtró a continuación a través de un filtro Pall Mini Kleenpak de 0,2 μ m para reducir la carga biológica potencial. El combinado retenido ajustado a la concentración filtrado se almacenó en una bolsa de recogida a 2°C-8°C durante hasta 2 días.

El complejo final de neurotoxina botulínica tipo A purificado obtenido se utilizó para llenar crioviales Nunc® de 1 mL a 700 μ l por vial y se almacenó congelado. La operación de llenado se llevó a cabo en una cabina de bioseguridad de clase 100 a temperatura ambiente.

El proceso aguas abajo (incluyendo el uso de 2 o 3 columnas de cromatografía) se completó en solo 1 a 3 días y el complejo de neurotoxina botulínica tipo A obtenido se almacenó congelado en un tampón de citrato de potasio, pH 6,5 a una concentración de 0,5 g/L como una solución. En comparación, el proceso de Schantz aguas abajo (purificación de toxinas) de la técnica anterior utiliza etapas múltiples de filtración, precipitación, extracción y centrifugación para purificar el complejo de neurotoxina botulínica de tipo A y requiere 1-2 semanas para completar sólo las etapas aguas abajo y la sustancia fármaco resultante (neurotoxina botulínica recuperada) se almacena refrigerada como una suspensión de sulfato amónico a una concentración de aproximadamente 2,7 g/L. El uso de la cromatografía en lugar de la precipitación y el reducido tiempo de procesamiento dieron lugar a un proceso aguas abajo significativamente mejorado, consistente como se describe en la presente memoria.

De acuerdo con un aspecto, las concentraciones de productos a base de vegetales, tales como productos a base de soja, pueden ser Peptona de Soja Tipo II Hy-Soy® o SE50MK (una peptona de soja Kosher) en los medios de cultivo y fermentación. Hy-Soy® en el medio de cultivo de siembra puede oscilar entre 10-200 g/L. Preferiblemente, la concentración de Hy-Soy® en el medio de siembra oscila entre 15-150 g/L. Más preferiblemente, la concentración de Hy-Soy® en el medio de siembra está aproximadamente entre aproximadamente 20-30 g/L o una cantidad entre ellos. La concentración de glucosa en medio de siembra puede oscilar entre 0,1 g/L y 20 g/L. Preferiblemente, la concentración de glucosa oscila entre 0,5-15 g/L. Más preferiblemente, la concentración de glucosa en el medio de cultivo es de aproximadamente 10 g/L. Las cantidades de extracto de levadura pueden ser de aproximadamente 5-20 g/L, más preferiblemente de aproximadamente 10-15 g/L o una cantidad entre ellas. Por ejemplo, el pH del medio de cultivo antes del crecimiento de *Clostridium botulinum* puede ser aproximadamente de pH 7,0-7,5, o entre ellos, preferiblemente pH 7,3.

Como ejemplo, las cantidades de Hy-Soy® en el medio de fermentación de producción pueden oscilar entre 10-

200 g/l. Preferiblemente, la concentración de Hy-Soy® en el medio de fermentación oscila entre 15-150 g/l. Más preferiblemente, la concentración de Hy-Soy® en el medio de fermentación está aproximadamente entre aproximadamente 20-40 g/L o una cantidad entre ellos. La concentración de glucosa en medio de fermentación puede oscilar entre 0,1 g/l y 20 g/l. Preferiblemente, la concentración de glucosa oscila entre 0,5-15 g/l o una cantidad entre ellos. No necesariamente, pero como antes, la glucosa se puede esterilizar por autoclave junto con los otros componentes del medio de fermentación. El nivel de pH del medio de fermentación antes del crecimiento puede ser de pH 7,0-7,8, preferiblemente de aproximadamente 7,0-7,5 o entre ellos, más preferiblemente pH 7,3.

Como se muestra por el lado derecho de la FIG. 1, el proceso APF de dos columnas utilizado en este Ejemplo 2 para obtener un complejo de neurotoxina botulínica biológicamente activo comprende las siguientes etapas: (a) cultivo de bacterias, tales como bacterias *Clostridium botulinum* de un vial WCB APF, en una botella de siembra/cultivo, (b) luego fermentación de bacterias *Clostridium botulinum* en un fermentador (fermentador de producción de toxina) que tiene un medio de fermentación APF para expandir la línea celular, procediendo con la fermentación y la producción de toxina botulínica hasta que se alcanza una fase de lisis celular deseada, (c) recogida (por ejemplo, clarificar por filtración) del medio de fermentación APF para obtener un medio de fermentación recogido, (d) proceder con concentración y dilución dando como resultado un medio de fermentación recogido diluido que se (e) pasa a través de una columna de captura aniónica para eliminar las impurezas, (f) poner en contacto el eluato de la columna de captura con una columna de pulido para eliminar adicionalmente las impurezas, (g) concentración y el intercambio de tampón del eluato de la columna de pulido, (h) seguido de filtración para la reducción de carga biológica y el (i) llenado de viales

En un ejemplo, el volumen de fermentación es de 20 l, el tiempo de proceso total para todas las etapas fue de sólo 4 a 6 días, y se obtuvo un alto rendimiento de neurotoxina botulínica.

A continuación, se proporcionan más detalles de una realización particular dentro del alcance de nuestra invención. La etapa de fermentación se llevó a cabo en medio APF utilizando un fermentador de acero inoxidable de 30 L.

En este ejemplo a continuación, se usó un volumen muy reducido de medio de fermentación, mientras que todavía proporcionaba un alto rendimiento de complejo de neurotoxina botulínica tipo A de alta potencia. Mediante el uso del siguiente protocolo, sólo se requerían 20 L o menos, por ejemplo, de medio de fermentación APF, en lugar de los volúmenes anteriores típicamente mayores (por ejemplo, 115 L) de medio de fermentación requerido para producir cantidades comercialmente útiles para obtener una neurotoxina botulínica.

La estación de trabajo anaeróbica MACS (Don Whitley) con hermetismo al aire proporcionó un ambiente deficiente en oxígeno en el que se pueden manipular organismos anaeróbicos. El acceso a y salida de la cámara era a través de un sistema de portilla, compuesto de puertas interiores y exteriores. La unidad tenía la temperatura controlada para mantener un ajuste del usuario dentro de la cámara. Una placa de condensación controlada por humidificación garantizó la eliminación efectiva del exceso de humedad en la cámara. La cámara se iluminó para uso del operador y alarma para: baja presión de gas, flujo continuo de gas y pérdida de condiciones de potencia. La cámara estaba equipada con un filtro HEPA para reducir los niveles de partículas viables y no viables en la cámara anaeróbica. Las condiciones anaerobias se mantuvieron utilizando el sistema de lavado atmosférico "Anotox" y catalizador Paladio Deoxo "D". El agua condensada de la placa de condensación fue recogida y canalizada a un depósito externo donde se retira.

Como se describió anteriormente, se usó un proceso APF para la preparación de un WCB APF, que tenía viales de banco de células almacenados por debajo de -135°C. Se descongeló un vial de banco de células WCB APF a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos antes de la inoculación del medio de cultivo, seguido por una única etapa de cultivo como se ha descrito anteriormente para establecer un cultivo de "siembra". Esto se llevó a cabo en un sistema controlado atmosférico modular utilizando técnicas asépticas en todas partes, para minimizar la carga biológica. El sistema de control atmosférico modular se limpió antes de iniciar la inoculación del vial de cultivo de siembra completado con el contenido de vial de WCB APF. El medio de cultivo se preparó usando ácido clorhídrico 1 N e hidróxido de sodio 1 N (para ajuste del pH), D (+) Glucosa, Anhidra (Mallinckrodt Baker, Cat # 7730, 4,00 g), Peptona de Soja Tipo II (SPTII) (Marcor, Cat # 1130, 8,00 g), agua para inyección (WFI) 400,0 ml y extracto de levadura (YE) (BD Cat # 212730, 4,00 g). La peptona de soja de tipo II y la solución de extracto de levadura se prepararon midiendo 300 mL de WFI con una probeta graduada de 500 mL y se vierte en una botella de cultivo de siembra. La botella de cultivo de siembra se colocó sobre un agitador y el agitador se activó. Se añadieron 8,00 g de SPTII y 4,00 g de extracto de levadura a la botella de cultivo de siembra y se mezcló hasta que se disolvió. Si la disolución no se completa después de mezclar, la mezcla se calentaría a baja temperatura. Se midió el pH y se ajustó a aproximadamente $7,30 \pm 0,05$. La solución de medio se llevó hasta aproximadamente 360 ml con WFI. La botella de cultivo de siembra se ventiló adecuadamente para permitir la transferencia de vapor y gas. Se preparó una solución de glucosa al 10% (p/v) midiendo aproximadamente 30 ml de WFI con una probeta graduada de 100 ml y se colocó en la botella de adición de glucosa pre-ensamblada, que se colocó en un agitador y se activó el agitador. Se añadieron aproximadamente 4,00 g de glucosa a la botella de adición de glucosa y se mezcló hasta que se disolvió (se utilizó calor bajo si era necesario para disolver) y se añadió una solución de glucosa en cs (cantidad suficiente) a 40 ml con WFI. La adición de glucosa se tapó entonces de forma suelta con la tapa de ventilación. Los frascos de cultivo de glucosa y siembra se autoclavan a 123°C durante 30 minutos para esterilización. Después de la

esterilización, ambos artículos se retiraron del autoclave y se dejaron enfriar en una cabina de bio-seguridad. Después de enfriar asépticamente, el 10% de la solución de glucosa se transfirió al frasco de cultivo de siembra que contenía el extracto de levadura y la solución de peptona II de soja y se mezcló, proporcionando de este modo una botella de cultivo de siembra completa.

5 Esta botella de cultivo de siembra completa se colocó en el MACS previamente lavado (en el que se colocó un indicador anaeróbico preparado). La tapa de la botella de cultivo de siembra completa se aflojó. La botella de cultivo de siembra completa se colocó después en una placa de agitación dentro del MACS (placa de agitación activada a aproximadamente 150 rpm) y el medio en la botella de cultivo de siembra completa se redujo durante un mínimo de 12 horas a aproximadamente 34,5°C +/- 1°C dentro del MACS, después de lo cual se tomó muestras de un blanco de medio de 1 ml para la medición de densidad óptica (para la determinación de biomasa a 540 nm).
 10 Posteriormente, se inoculó la botella de cultivo de siembra completa, en el MACS (anaeróbico). Se obtuvo un vial de cultivo WCB APF del banco de células congeladas y se introdujo en el MACS. El vial se descongeló durante aproximadamente 10-15 minutos, después de lo cual se colocaron aproximadamente 400 µl del contenido del vial directamente en el medio en la botella de cultivo de siembra completa. La tapa de la botella de cultivo de siembra completa se aflojó completamente y la tapa se apoyó sobre la parte superior de la botella y se ajustó el ritmo de agitación a 150 rpm. Después de al menos aproximadamente 11 horas de incubación en el MACS, se llevó a cabo la producción de fermentación, como se describe a continuación.

20 Se verificaron y calibraron sondas (por ejemplo, sonda redox, sonda de pH, sonda de turbidez, por ejemplo, por Broadley James y Optek) y configuración de secuencia del fermentador, tal como un fermentador de acero inoxidable de 30 L, y se insertaron en sus respectivos puertos del fermentador y se ajustaron en lugar. Por ejemplo, un fermentador puede ser un sistema de fermentador ABEC 30 L (VT) consistente en un recipiente de fermentador de 30 l de volumen, un sistema de accionamiento de agitador, un ensamblaje de tuberías para conexiones de servicios (CIP, vapor limpio, CDA, Nitrógeno, Oxígeno, Agua Enfriada del Proceso, bio-residuos y vapor de la planta), instrumentación (pH, temperatura, presión, ReDox, densidad óptica y flujo de masa) y cuatro bombas peristálticas. La velocidad del agitador montado en el fondo se controló utilizando un controlador de frecuencia variable Allen-Bradley (VFD). El control semiautomático y automático del sistema es manejado por un PLC Allen-Bradley ControlLogix con programación. El sistema fue diseñado para proporcionar un control en PID de bucle cerrado (derivado proporcional-integral) de la temperatura del cultivo, presión, pH y redox durante las operaciones de fermentación. Se utiliza una DeviceNet® de Allen-Bradley (una red de nivel de dispositivo abierto) para el control y la comunicación con dispositivos y sensores en la plataforma.

35 Para la retención estéril, los modos de equilibrio, funcionamiento y recogida, agitación, temperatura, presión y superposición de nitrógeno se hacen funcionar con los siguientes puntos de ajuste.

Para el modo de mantenimiento y equilibrio estéril:

Parámetro controlado	Establecer puntos y rango
Agitación	100 rpm ± 10
Superposición de nitrógeno	12 SLPM ± 2
Presión de Fermentador	5 psig ± 1
Temperatura del Fermentador	35 ± 1°C
Redox	-390 a -150 mV

40 Para el modo OPERACIÓN:

Parámetro controlado	Establecer puntos y rango
Agitación	70 rpm ± 5
Superposición de nitrógeno	12 SLPM ± 2
Presión de Fermentador	5 psig ± 1
Temperatura del Fermentador	35 ± 1°C

Para el modo Recogida:

Parámetro controlado	Establecer puntos y rango
Agitación	150 rpm ± 10
Superposición de nitrógeno	10 SLPM ± 2

Presión Inicial del Fermentador	0 psig
Temperatura del Fermentador	25 ± 1°C

5 Para preparar el medio de fermentación, el material necesario incluye D (+) Glucosa, Anhidra (Mallinckrodt Baker, Cat # 7730, 300,0 g), Peptona de Soja Tipo II (SPTII) (Marcor, Cat # 1130, 650,0 g), Agua para Inyección (WFI, 13 L) y Extracto de Levadura (YE) (BD Cat # 212730, 240,0 g), junto con balanzas estándar, un bidón (20 L, por ejemplo),
 10 botella de vidrio (5 l), probetas graduadas, barras de agitación y agitadores. Se añadieron aproximadamente 10 l de WFI en el bidón junto con una barra de agitación. El bidón se colocó sobre un agitador y el agitador se activó, después de lo cual se añadieron aproximadamente 650,0 g de peptona de soja de tipo II, junto con aproximadamente 240,00 g de YE. El medio de fermentación fue c.s. (cantidad suficiente) a 13 L con WFI, y el bidón se tapó. Después se preparó una solución de glucosa al 10% (p/v) añadiendo aproximadamente 2 l si WFI en una
 15 botella de vidrio de 5 l (con barra de agitación en su interior). Colocada sobre un agitador y con la barra girando, se añadieron aproximadamente 300,00 g de glucosa en la botella y se mezcló hasta que se disolvió. La solución de glucosa fue c.s. a 3 L con WFI y la botella se tapó, proporcionando así una solución de glucosa al 10%.

15 Se añadió el medio de fermentación en el bidón al fermentador y se registró el volumen de fermentador previo al vapor y se avanzó la secuencia de fermentación de la operación. Al final del SIP (vapor en el lugar) (122°C, +/- 1°C), se observó el volumen de fermentador post-SIP. Se conectó al fermentador un conjunto de adición de glucosa, que comprende un recipiente que tiene un tubo con el mismo y un filtro en línea de 0,2 µm (PALL Corp.) y una bomba peristáltica, y la línea se sometió a SIP y se dejó enfriar. Se abrió un puerto de válvula de adición y se añadieron
 20 aproximadamente 3 l de glucosa (esterilizada con filtro) y se añadió la cantidad apropiada de WFI (esterilizada con filtro) a c.s. el volumen de fermentador total a 20 l a la botella de adición de glucosa y se bombeó al fermentador a través de la misma línea de filtro de glucosa. El puerto de la válvula de adición fue cerrado. El medio de fermentación de producción tuvo su pH ajustado a partir de aquí, a aproximadamente pH 7,3 +/- 0,05, con hidróxido sódico 1 N estéril o ácido clorhídrico 1 N, utilizando SIP de líneas de adición, según se requiera. Posteriormente, se ajustaron los parámetros para la retención estéril y se mantuvieron durante aproximadamente 12 horas antes de la
 25 inoculación. La concentración inicial de glucosa del medio se midió usando un analizador de metabolitos y se registró la concentración de glucosa.

30 Como se indicó anteriormente, al final de la incubación del cultivo de siembra (aproximadamente 11 ± 1 horas), se tomó 1 ml de muestra para la medición de la densidad óptica (DO). La DO se midió fuera de línea a 540 nm usando un espectrofotómetro y si dentro del intervalo apropiado se registró el valor de DO y se utilizó el cultivo para la fermentación. Por consiguiente, la sonda de turbidez del fermentador se ajustó a cero. La botella de inóculo de siembra, procedente de la cámara anaeróbica, fue llevada al fermentador y un conjunto de transferencia de inóculo de siembra (un recipiente de siembra con medio de cultivo APF en el mismo, conteniendo el recipiente una línea de transferencia de inóculo de cultivo con un conjunto de Conector Kleenpak™ estéril disponible de PALL Corp. o
 35 Millipore sustituyeron la válvula del fermentador, y se fijó el tubo a la Bomba 1. La presión del fermentador se redujo a 2 psig y el volumen entero de la botella de inóculo de siembra se bombeó al fermentador. Al final de la inoculación, se registraron las Unidades de Absorbancia (UA) en línea del fermentador, los parámetros del fermentador se ajustaron al modo OPERACIÓN y se registró el tiempo.

40 Seguidamente se procedió a la fermentación (las operaciones de fermentación pueden ser de aproximadamente 60 horas a aproximadamente 80 horas, preferiblemente de aproximadamente 68 horas a aproximadamente 76 horas, lo más preferiblemente durante aproximadamente 72 horas) mientras que las muestras se tomaron del fermentador, a las 24 y 48 horas, por ejemplo, manteniendo al mismo tiempo condiciones asépticas. Los ensayos que se realizaron en al menos una muestra tomada durante la fermentación pueden incluir, pero no se limitan a, mediciones de densidad óptica fuera de línea, mediciones de glucosa, ELISA, SDS-PAGE, transferencia Western, por ejemplo. Al final de la fermentación (final del volumen de caldo de fermentación es de aproximadamente 18-19 L, por ejemplo), se puede tomar una muestra (para ensayo, por ejemplo, mediciones de densidad óptica fuera de línea, mediciones de glucosa, ELISA, SDS -PAGE, transferencia western y la cuantificación de ADN/ARN).

50 Al final de la fermentación, se registró la densidad óptica en línea, EFT (tiempo de fermentación transcurrido) y la hora de finalización de la fermentación, así como la rpm de agitación, la temperatura en °C, la presión psig y la superposición de nitrógeno slpm y redox mV. A continuación, el caldo de fermentación de producción se sometió a recolección, es decir, el caldo de fermentación de producción se clarificó mediante filtración, con lo que, por ejemplo, se recogieron aproximadamente 15 l de filtrado. Los parámetros de fermentación se fijaron para RECOGIDA y se preparó el conjunto de filtro para clarificación (CUNO, filtración 3M) que incluye un pre-filtro, filtro de profundidad, y al menos un manómetro. El pre-filtro y el filtro de profundidad se lavaron con aproximadamente 20 l de agua para
 55 inyección. Después del lavado, el conjunto de filtración se unió al puerto de recogida/drenaje del fermentador. La temperatura del fermentador se redujo a aproximadamente 25°C, después de lo cual comienza la clarificación del caldo de fermentación (registrar tiempo de inicio de la aclaración, DO inicial en línea, pH inicial, temperatura inicial y volumen inicial de fermentador). La presión en el fermentador se aumentó a una velocidad de aproximadamente 1 psi (libra por pulgada cuadrada) aproximadamente cada 10 minutos durante la filtración, hasta que se alcanzó una presión de aproximadamente 6 psi, en la que se mantuvo la presión hasta el final de la recolección. Este filtro elimina aproximadamente el 80% del ARN/ADN en el medio de fermentación APF (el resto esencialmente eliminado durante
 60

las etapas de cromatografía posteriores, como se discute más adelante), eliminando así la dependencia/uso previos de ARNasa y/o ADNasa para eliminar dichos componentes del caldo de fermentación. Se controlaron los parámetros del proceso, tales como la presión de entrada del pre-filtro, la presión de entrada del filtro de profundidad, la presión del fermentador, la agitación y el volumen del filtrado cada 2 l de filtrado recogido, al final del cual se registró el tiempo final de clarificación y el volumen de filtrado recogido. Después de la finalización de la etapa de recolección, los sistemas se descontaminaron y se limpiaron.

El bidón de filtrado se introdujo en el BSC para muestreo, del que se tomaron aproximadamente ≤ 10 ml de filtrado para mediciones de DO fuera de línea y otros análisis (p. ELISA, SDS-PAGE, ADN/ARN y transferencia Western).

El filtrado se sometió entonces a ultrafiltración/dilución. Se ensambló un conjunto de unidad de filtro de flujo tangencial (TFF). La unidad de TFF se enjuagó durante aproximadamente 90 minutos con WFI a una velocidad preferida de aproximadamente 2 l por minuto y después la unidad de TFF se desinfectó corriendo hidróxido de sodio 0,1 N (recirculado) a su través durante aproximadamente 60 minutos, después de lo cual se hizo pasar 1 L de un tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5, seguido de un enjuague con WFI durante aproximadamente 30 minutos. El filtrado de la etapa de recolección (aproximadamente 15 l) se hizo pasar a continuación a través de la TFF (esto se lleva a cabo en una cabina de bioseguridad), concentrando el filtrado hasta aproximadamente 5 l +/- 0,5 L (la etapa de concentración avanza a aproximadamente 2 L por minuto y a una presión trans-membrana de aproximadamente 5 psig). Una muestra del permeado se puede tomar y someter a ensayos ELISA, ADNds, SDS-PAGE y transferencia Western, por ejemplo. Una vez concentrado hasta aproximadamente 5 L +/- 0,5 L, el combinado de retenido se diluyó a continuación hasta aproximadamente 20 l con aproximadamente 15 l de tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5, esterilizado por filtración, a través de la TFF, aproximadamente a una velocidad de 2 l por minuto. Una muestra puede volver a tomarse y someterse a ensayos de ELISA, ADN/ARN, SDS-PAGE y transferencia Western, por ejemplo. El material de ultrafiltración/dilución (retenido) se almacenó a 4°C.

Después del uso, todos los sistemas se descontaminaron utilizando ya sea 1 N de hidróxido de sodio o las temperaturas de esterilización (vapor) y se limpiaron.

Los siguientes materiales, equipos y procesos se utilizaron para preparar las soluciones, tampones, etc., que se exponen a continuación para su uso en un proceso ejemplar, que consiste en la purificación del medio de fermentación obtenido a partir de los procesos del Ejemplo 2 para obtener un complejo de neurotoxina botulínica de tipo A purificado. Los tampones ejemplares utilizados (filtrados a través de un filtro de vacío de 0,2 micrómetros y su conductividad medida en mS/cm, para mantenimiento de registros) incluyen: fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5; fosfato sódico 50 mM, pH 6,5; acetato sódico 50 mM, pH 4,8; acetato sódico 50 mM, cloruro sódico 170 mM, pH 4,8; y acetato sódico 50 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 4,8; acetato sódico 50 mM, cloruro de sodio 1 M, pH 4,8; acetato sódico 50 mM, pH 4,0 y citrato 10 mM, pH 6,5.

Lo siguiente es un ejemplo de operaciones para purificación y obtención de neurotoxina botulínica tipo A partir de los procesos del Ejemplo 2. Todas las piezas de contacto con el producto fueron diseñadas y construidas para asegurar que no son reactivas y no absorbentes. Además, todos los equipos fueron diseñados para permitir la utilización de sistemas desechables de un solo uso o fueron diseñados y construidos para facilitar la desinfección, limpieza y descontaminación según métodos documentados y validados. Los sistemas o plataformas se diseñaron para que no entraran en contacto con el producto, mientras que los trayectos de flujo estaban diseñados para ser de un solo uso desechables, incluyendo las columnas de cromatografía y todos los tubos asociados. Los componentes de cromatografía se obtuvieron a partir de AlphaBio y los componentes de UF/DF se obtuvieron de Scilog Inc. Los sistemas de cromatografía utilizados incluyeron una bomba peristáltica para el suministro de solución con controlador de velocidad variable, un colector de válvula de entrada con 5 entradas, un colector de válvula de columna con un conjunto de 3 válvulas automatizadas, un colector de válvulas de salida con 3 salidas, monitorización del efluente de la columna, incluyendo pH, conductividad y UV, la recolección de pico basada en la absorbancia UV, y la instrumentación y los controles necesarios para completar las operaciones de purificación. El sistema de control tenía tanto el software como el hardware diseñados para controlar el proceso de purificación. Los comandos y datos se ingresaron a través de un terminal HMI (Human Machine Interface). El operador inició todas las funciones de proceso automatizadas mediante comandos en la HMI y monitorizó y ajustó parámetros de proceso tales como velocidades de flujo de alimentación, presión, conductividad, pH, absorbancia de UV y posiciones de válvulas individuales.

El sistema UF/DF incluyó una bomba de recirculación, una bomba de diafiltración, dos balanzas y un portafiltro de flujo tangencial (TFF). La bomba de recirculación se conecta con 3 sensores de presión desechables y una de las balanzas (situadas debajo del depósito de permeado) para controlar la velocidad de flujo para mantener una presión y un tope transmembrana definidos, basado en el peso del depósito de permeado. La bomba de diafiltración se interconecta con la segunda balanza (situada debajo del depósito de retención) para arrancar y parar, basado en mantener un peso constante del depósito de retenido.

Después de la concentración y dilución del material retenido de la etapa de recolección (recolección del medio de fermentación libre de proteína animal), el material se cargó en una columna de intercambio aniónico. Lo siguiente es el proceso usado para empaquetar y ensayar la columna de intercambio aniónico útil en el proceso de dos columnas

del Ejemplo 2.

Se utilizaron columnas pre-empaquetadas para las tres etapas cromatográficas. En primer lugar, el material de alimentación (medio APF recolectado que había sido sometido a ultrafiltración/dilución) se hizo pasar a través de la columna de intercambio aniónico (Poros 50HQ, de ABI como se ha descrito anteriormente). Se utilizaron al menos 5 volúmenes de columna (CV) de fosfato sódico 50 mM, pH 6,5, para equilibrar la columna de intercambio aniónico (en este ejemplo, una columna de captura).

Después de equilibrar, se llevó a cabo la etapa de carga, donde se cargó material de alimentación (etapa de post-recogida, caldo de fermentación recogido, de aproximadamente 20 l, por ejemplo) sobre la columna de intercambio aniónico a una velocidad de aproximadamente 200 cm/h, por ejemplo. Después de que se pasara 0,5 de volumen de la columna de material cargado a través de la columna de intercambio aniónico, el combinado de flujo a través (FT) se recogió en un receptáculo tal como un recipiente de poliétersulfona, mientras que el complejo de toxina se unió al material de columna de intercambio aniónico. A esto siguió una etapa de lavado, en la que al menos aproximadamente 15 volúmenes de columna del tampón de lavado (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM a un pH de 6,5) se pasaron a través de la columna de intercambio aniónico. Se detuvo la etapa de lavado cuando el UV, medido en la salida de la columna, en tiempo real, disminuyó a menos de o igual a aproximadamente 80 mUA. Se registraron el volumen del tampón de lavado y el volumen de combinado de flujo a través/lavado y se tomó una muestra de 1 ml del combinado de flujo a través/lavado y se ensayó, por ejemplo, la concentración de toxina, el contenido de ácido nucleico, las proteínas de células enteras, SDS-PAGE, qPCR, 2D LC y ELISA.

La siguiente etapa fue la etapa de elución, donde el tampón de elución (por ejemplo, acetato de sodio 50 mM, pH 4,8) se bombeó sobre la columna de intercambio aniónico. Cuando la lectura UV en la salida de la columna, en tiempo real, aumentó a aproximadamente 150 mUA o más, se comenzó la recogida del eluato en un contenedor prellenado con 1 CV de tampón de elución (acetato sódico 50 mM, pH 4,8). La recolección del combinado de eluato se detuvo cuando la lectura UV disminuyó a menos de o igual a aproximadamente 200 mUA (el volumen recogido en este punto está entre aproximadamente 1 a aproximadamente 2 CV). El sistema de cromatografía se descontaminó luego y se limpió usando hidróxido sódico 1 N.

El combinado de eluato de la columna de intercambio aniónico se preparó entonces para su adición a la columna de intercambio catiónico. El volumen de eluido de intercambio aniónico, el pH, la conductividad y la temperatura de alimentación se registraron y el combinado de eluato de la columna de intercambio aniónico se diluyó con 1 CV de acetato de sodio 50 mM, pH 4,8.

Tras la operación a través de la columna de intercambio aniónico, se llevó a cabo la operación de cromatografía de intercambio catiónico. La columna de intercambio catiónico (por ejemplo, Poros® 20HS) se equilibró con un mínimo de 5 CV de tampón de equilibrio (acetato de sodio 50 mM, pH 4,8). Después de equilibrar, se cargó el combinado de eluido diluido de la columna de intercambio aniónico sobre la columna de intercambio catiónico y se registró el volumen total cargado. Después de que hubieran pasado 0,5 volúmenes de la columna de combinado de eluato diluido cargado a través de la columna de intercambio catiónico, se recogió el combinado de flujo a través (FT). Se llevó a cabo un primer lavado de la columna de intercambio catiónico, donde se hicieron pasar aproximadamente 3-5 CV de acetato de sodio 50 mM, pH 4,8, a través de la columna de intercambio catiónico (se registró el volumen del primer tampón de lavado utilizado). Se realizó un segundo lavado, en el que se bombeó aproximadamente 3 CV de cloruro de sodio 170 mM, acetato de sodio 50 mM, pH 4,8, a través de la columna, recogándose este eluato en un nuevo contenedor etiquetado como "Pico de LAVADO 2". La recolección se inició cuando las lecturas UV aumentan a más de o igual a 50 mUA. Se recogió 1 CV y se registró el volumen del segundo lavado de tampón utilizado.

La elución del complejo de toxina a granel de la columna de intercambio catiónico se llevó a cabo utilizando tampón de elución (por ejemplo, cloruro sódico 250 mM en acetato sódico 50 mM, pH 4,8) que se bombeó a la columna de intercambio catiónico. Cuando la lectura UV de la elución alcanzó al menos aproximadamente 100 mUA, la recolección de eluato comenzó en contenedores previamente llenados con tampones de dilución (40 ml de fosfato de potasio 100 mM, pH 6,8 y 60 ml de citrato de potasio 10 mM, pH 6,5). La recogida del eluato de la columna de intercambio catiónico continuó hasta que las lecturas UV disminuyeron hasta aproximadamente 100 mUA o menos. Se registró el volumen total de eluato, después de la dilución. El sistema de cromatografía de intercambio catiónico se descontaminó después y se limpió.

Después de la elución de la columna de intercambio catiónico, el eluato se sometió a filtración. Se utilizó un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF), utilizando tres membranas MWCO de 100K (Sartorius AG, Goettingen, Alemania) apiladas una encima de la otra. Se observó el volumen inicial del combinado de eluato de intercambio de cationes, al igual que las descripciones de la solución de diafiltración/equilibrado y de saneamiento. Por ejemplo, la solución de diafiltración puede ser citrato de potasio 10 mM, pH 6,5 y la solución de saneamiento puede ser hidróxido de sodio 0,1 N. La instalación del sistema se realizó con la conexión de un tubo del depósito que contenía eluato de la columna de cationes (IAPF) o la columna HIC (FAPF), el eluato que contenía toxina botulínica, a través de la cabeza de la bomba de ultrafiltración a la entrada de la membrana de filtración de flujo tangencial. Se conectó un segundo tubo desde la salida del permeado de la membrana de filtración de flujo tangencial al contenedor de permeado de ultrafiltración (UF). Se aseguró un tubo desde la salida de retenido de la membrana de filtración de

flujo tangencial al depósito de retenido y se aseguró también un cuarto tubo desde el tampón de diafiltración (DF) a través del cabezal de la bomba de diafiltración y al depósito de retenido. El tampón de almacenamiento del sistema se lavó, al igual que la membrana, lavando la membrana con al menos aproximadamente 720 ml de agua para inyección (WFI) con el retenido dirigido a desecho, después de lo cual la membrana se lavó adicionalmente con al menos aproximadamente 4.200 ml de agua para inyección con el retenido que recircula al depósito. Después de esto, se llevó a cabo el saneamiento de la membrana (si fuera necesario) lavando la membrana con al menos aproximadamente 200 ml de hidróxido de sodio 1 N con el retenido dirigido al desecho, seguido de un lavado de la membrana con al menos aproximadamente 200 ml de 1 N NaOH con el retenido recirculando al depósito durante un mínimo de 30 minutos. El equilibrado se realizó después de enjuagar la membrana con tampón de equilibrio (citrato de potasio 10 mM a un pH de 6,5), con retenido dirigido al desecho hasta que el pH del retenido y del permeado estuviera dentro de +/- 0,2 unidades del pH del tampón de equilibrado (por ejemplo, dentro de +/- 0,2 unidades de pH 6,5).

Se determinó la concentración del material (eluato (combinado de productos) de la columna de intercambio catiónico), para ver si la dilución o concentración (procesamiento ejemplar) era apropiada (un ejemplo de concentración objetivo puede ser aproximadamente 0,7 mg/ml). La dilución se realizó utilizando citrato de potasio 10 mM, pH 6,5. Se determinó un volumen diana, por ejemplo, para una concentración de producto de 0,7 mg/ml (vol diana = (concentración de partida/volumen de partida)/0,7 mg/ml).

El combinado de producto (eluato (procesado o no de acuerdo con esto) de la columna de intercambio catiónico) se cargó sobre la membrana y la recirculación (con la salida de permeado cerrada) del sistema (sistema TFF) se hizo funcionar durante al menos 2 minutos sin contrapresión, después de lo cual se abrió lentamente la válvula de permeado mientras se ajustaba la válvula de contrapresión de retenido a un objetivo de aproximadamente 7 psig de presión transmembrana. Para la dilución, se añadió citrato de potasio 10 mM, pH 6,5 al volumen objetivo, y se trasladó a la diafiltración sin ultrafiltración; para la concentración, se comienza la ultrafiltración. Para la diafiltración: el residuo de permeado se recogió en un nuevo contenedor (el volumen de diafiltración objetivo fue de 5 veces el volumen de diafiltración) y se diafiltró con al menos 5 volúmenes de diafiltración de citrato de potasio 10 mM, pH 6,5. Los datos del proceso de diafiltración se recogieron a intervalos de 10 minutos como mínimo (peso del permeado g/vol ml, presión de entrada (psig), presión del retenido (psig), presión del permeado (psig) y presión transmembrana (psig)). Para recirculación y aclarado: con el filtro de salida de permeado cerrado, el sistema se recirculó/funcionó durante al menos 2 minutos sin contrapresión y el sistema se enjuagó con al menos 20 ml de citrato de potasio 10 mM, pH 6,5. El combinado de productos incluye el retenido y el enjuague. Se puede extraer una muestra del combinado de productos y someterla a un análisis de verificación que incluye, por ejemplo, UV a 278 nm, SDS-Page, LcHPLC, SE-HPLC, qPCR, RP-HPLC, Native-Page, AUC, lisado de amebocito Limulus, Transferencia Western y ELISA. Para la limpieza después del uso, el sistema se purgó con hidróxido de sodio 1 N, se recirculó durante al menos 10 minutos, después de lo cual se lavó el sistema y se almacenó con hidróxido de sodio 0,1 N en el mismo.

Luego se realizaron filtración y llenado estéril para almacenar y dividir la neurotoxina a granel. El ajuste de la concentración se realizó para ajustar la concentración de toxina, usando citrato de potasio 10 mM, pH 6,5, a aproximadamente 0,5 mg/ml con la muestra posterior al enjuague. Si la concentración de toxina era menor de aproximadamente 0,5 mg/ml, entonces no se necesita ajuste de la concentración.

Utilizando una pipeta estéril, se prepararon alícuotas de 10 ml/0,75 ml en cada uno de los tubos de muestra estériles de 15 ml/1,5 ml. El contenedor del producto se agitó suavemente a mano y se transfirió la cantidad requerida de solución (que contenía la sustancia farmacológica a granel, es decir, la toxina botulínica a granel) en cada vial. Las muestras se almacenaron durante un máximo de 5 días en un refrigerador a 2°C-8°C o se transfirieron 0,75 ml del combinado de productos filtrado a crioviales. Los crioviales se almacenan a -70°C +/- 5°C.

Ejemplo 3

Método de preparación de composiciones

Una composición farmacéutica adecuada para la administración a un paciente puede hacerse preparado una composición de una neurotoxina botulínica obtenida a partir de un proceso del Ejemplo 2 con uno o más excipientes. Un excipiente también puede actuar para estabilizar la toxina botulínica durante el proceso de composición y durante un período subsiguiente de almacenamiento antes del uso. Un excipiente también puede funcionar como un agente de volumen y/o para proporcionar una cierta tonicidad a la composición farmacéutica. La preparación de composiciones requiere una dilución de muchas veces de la neurotoxina botulínica obtenida a partir de un proceso del Ejemplo 2, mezclando con uno o más excipientes (tales como albúmina [tal como una albúmina de suero humano o una albúmina humana recombinante] y cloruro sódico) para formar así una composición de toxina, y preparación de una forma estable de almacenamiento y envío de la composición de toxina, como por liofilización, secado por congelación o secado al vacío de la composición. De este modo, aproximadamente 1,5 a 1,9 ng del complejo de la toxina botulínica de tipo A obtenido del Ejemplo 2 se compone con aproximadamente 0,5 miligramos de albúmina humana recombinante (Delta Biotechnologies) y aproximadamente 0,9 miligramos de cloruro de sodio mezclando estos tres ingredientes juntos seguido de secado al vacío. El secado al vacío puede tener lugar desde

aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 25°C, a una presión de aproximadamente 80 mm Hg, durante aproximadamente 5 horas, momento en el cual los viales en los que estos componentes están secados al vacío se sellan al vacío y se tapan, obteniendo de esta manera un vial con aproximadamente 100 unidades de complejo de neurotoxina botulínica tipo A. El producto secado al vacío sólido (en polvo) resultante se reconstituye, con el uso, con solución salina normal (0,9%) y se usa para tratar pacientes con diversas indicaciones, tales como distonía cervical e hiperhidrosis. La liofilización, secado al vacío o por congelación prepara una forma estable de almacenamiento y envío de la neurotoxina botulínica compuesta.

En otro ejemplo, de aproximadamente 1,5 a 1,9 ng de la toxina botulínica tipo A a granel se combina con aproximadamente 0,5 miligramos de albúmina de suero humano (Baxter/Immuno, Octapharma y Pharmacia & Upjohn) y aproximadamente 0,9 miligramos de cloruro sódico mezclando estos tres ingredientes juntos seguido de secado al vacío. Un ejemplo de secado al vacío puede tener lugar desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 25°C, a una presión de aproximadamente 80 μ m de Hg, durante aproximadamente 5 horas, momento en el cual los viales en los que estos componentes se secan al vacío se sellan al vacío y se tapan, obteniendo de este modo un vial con aproximadamente 100 unidades de toxina botulínica. El producto secado al vacío sólido (en polvo) resultante se reconstituye, con el uso, con solución salina normal (0,9%) y se usa para tratar pacientes con diversas indicaciones, tales como distonía cervical e hiperhidrosis. Además, una composición de toxina botulínica farmacéutica puede contener albúmina de suero humano y/o lactosa, por ejemplo. En un ejemplo, aproximadamente 1,5-1,9 ng de la toxina botulínica tipo A a granel se pueden combinar con aproximadamente 125 microgramos de albúmina de suero humano, y 2,5 miligramos de lactosa y se secan al vacío, se liofilizan o se secan por congelación para la estabilidad de almacenamiento, por ejemplo. En aún otro ejemplo, se pueden combinar aproximadamente 1,5-1,9 ng de neurotoxina botulínica obtenida por los procesos descritos en la presente memoria con aproximadamente 10 mg de trehalosa y aproximadamente 0,5 mg de albúmina de suero (tal como albúmina de suero humano, nativa o recombinante) y opcionalmente, aproximadamente 1 miligramo de metionina para proporcionar aproximadamente 100 unidades de producto secado con toxina botulínica. Esta composición se puede liofilizar y se puede reconstituir después con, antes de su uso, aproximadamente 1 ml de agua estéril destilada o solución salina estéril sin conservar (cloruro de sodio al 0,9% para inyección), por ejemplo. En ejemplos particulares, las composiciones farmacéuticas de toxina botulínica pueden incluir sacarosa, tal como en una formulación a modo de ejemplo que tiene aproximadamente 1,5-1,9 ng de neurotoxina botulínica obtenida mediante los procesos descritos en la presente memoria combinados con albúmina de suero humano 20% y sacarosa, que también puede liofilizarse para proporcionar aproximadamente 100 unidades de toxina botulínica de tipo A, y más tarde reconstituirse con solución salina sin conservar (en un volumen de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 8,0 ml, por ejemplo). En un ejemplo particular, se pueden combinar 200 unidades de neurotoxina botulínica con aproximadamente 10 mg de sacarosa y 2 mg de albúmina de suero humano por ml, y la composición resultante se coloca en viales y se seca por congelación, para reconstituirse más tarde antes de su uso con solución salina fisiológica.

Además, la preparación de composiciones también puede utilizar el componente neurotóxico (es decir, el componente de aproximadamente 150 kDa del complejo de toxina botulínica tipo A, libre de proteínas formadoras de complejo) del complejo de toxina botulínica tipo A obtenible mediante los procesos IAPF aquí descritos. En un método de purificación del componente neurotóxico de aproximadamente 150 kDa a partir de las proteínas no tóxicas asociadas (p. HAS, NTNH), la neurotoxina de tipo A se purifica a partir de las proteínas no tóxicas asociadas del complejo mediante una modificación del método de Tse *et al.* (1982) (Goodnough, M. C., 1994, Tesis, UW, Wis.). El complejo de neurotoxina botulínica obtenido mediante nuestro proceso IAPF (que utiliza las etapas de anión-cación de 2 columnas o de HIC de anión-cación de 3 columnas, como se discutió anteriormente) se recupera de una columna de DEAE-Sephadex A 50 (Sigma Chemical Co., St , Louis, Mo.), pH 5,5, y se precipita por adición de 39 g de sulfato de amonio sólido/100 ml. El complejo de toxina precipitado se recoge por centrifugación, se dializa contra fosfato de sodio 25 mM, pH 7,9 y se aplica a una columna DEAE-Sephadex A50 equilibrada con el mismo tampón. El componente neurotóxico se separa de las proteínas no tóxicas del complejo y se eluye de la columna con un gradiente de cloruro sódico lineal 0-0,5 M. El componente de neurotoxina parcialmente purificado se recupera de la columna DEAE-Sephadex A50 a pH 7,9 y se dializa contra fosfato sódico 25 mM, pH 7,0. La toxina dializada se aplica a SP-Sephadex C50 (Sigma Chemical Co.) en fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0. El material contaminante no se une a la columna en estas condiciones. La neurotoxina pura (el componente de aproximadamente 150 kDa) se eluye con un gradiente lineal de 0-0,25 M de cloruro de sodio. La neurotoxina pura de aproximadamente 150 kDa puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía de afinidad con metales, filtración en gel u otros métodos de cromatografía de proteínas. Como anteriormente, esta neurotoxina pura (el componente neurotóxico de aproximadamente 150 kDa de un complejo de toxina botulínica) puede ser liofilizada, secada al vacío o por congelación con los diversos excipientes (por ejemplo, albúmina sérica, sacarosa, lactosa, cloruro sódico, trehalosa, etc.) discutidos anteriormente.

El complejo de neurotoxina botulínica a granel obtenido por nuestro proceso IAPF, se puede combinar de muchas maneras. Patentes ejemplares que describen diversas formulaciones de toxinas botulínicas, tales como Pat. U.S. No. 6.087.327 (describe una composición de toxina botulínica de los tipos A y B formulados con gelatina); Pat. U.S. No. 5.512.547 (Johnson *et al.*) titulada "Pharmaceutical Composition of Botulinum Neurotoxin and Method of Preparation" emitido el 30 de abril, 1996 y reivindica una formulación botulínica de tipo A pura que comprende albúmina y trehalosa, estables en almacenamiento a 37°C; Pat. U.S. No. 5.756.468 (Johnson *et al.*) emitida el 26 de

5 mayo, 1998 ("Pharmaceutical Composition of Botulinum Toxin or Botulinum Neurotoxin and Method of Preparation"), y reivindica una formulación de toxina botulínica liofilizada que comprende un tialquilo, albúmina y trehalosa que puede almacenarse entre 25°C y 42°C; Pat. U.S. No. 5.696.077 (Johnson et al) titulada "Pharmaceutical Composition Containing Botulinum B Complex" emitida el 9 de dic., 1997 y reivindica una formación de complejo botulínico de tipo B secado por congelación, libre de cloruro sódico que comprende un complejo de tipo B y un excipiente de proteína; y publicación de solicitud de patente U.S. número 2003 0118598 (Hunt) describe usos de diversos excipientes tales como una albúmina recombinante, colágeno o un almidón para estabilizar una toxina botulínica, todos proporcionan ejemplos de diversas formulaciones/excipientes útiles que pueden usarse para preparar una composición de la neurotoxina botulínica a granel proporcionada por nuestro proceso IAPF y proporcionar una composición farmacéutica.

15 El complejo de toxina botulínica obtenido puede eluirse a partir de una columna de intercambio iónico en un tampón de pH 7-8 para disociar las proteínas del complejo no tóxico de la molécula de toxina botulínica, proporcionando así (dependiendo del tipo de bacteria *Clostridium botulinum* fermentada) componente neurotóxico de toxina botulínica tipo A con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa, y una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ DL₅₀ U/mg o mayor; o toxina botulínica tipo B purificada con un peso molecular de aproximadamente 156 kDa y una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ DL₅₀ U/mg o superior, o toxina botulínica tipo F purificada con un peso molecular de aproximadamente 155 kDa y una potencia específica de $1-2 \times 10^7$ DL₅₀ U/mg o mayor.

20 Nuestra invención proporciona muchos beneficios. En primer lugar, los procesos de dos o tres columnas del Ejemplo 2 eliminan el uso de reactivos y medios de origen animal (por ejemplo, hidrolizado de caseína y placas de agar de sangre de Columbia) disminuyendo así notablemente los riesgos teóricos de la exposición del paciente a agentes semejantes a prión u otros agentes infecciosos. En segundo lugar, los procesos cromatográficos de dos o tres columnas (y el sistema asociado) del ejemplo 2 son altamente reproducibles, como se evidencia por una excelente consistencia de lote a lote. Esta mejora se traduce en un perfil clínico más consistente en pacientes que requieren tratamientos repetidos con compuestos que contienen toxina botulínica comercialmente disponibles durante varios años. Los estudios analíticos de la sustancia farmacéutica (neurotoxina botulínica) de los procesos IAPF descritos aquí (2 y 3 columnas) revelaron una carga menor de impurezas de proteína y ácido nucleico. Esta menor carga de impurezas proteicas se traduce en un menor riesgo de inmunogenicidad (producción de anticuerpos). Además, la pureza mejorada del proceso IAPF se traduce en una menor incidencia de los síntomas no específicos comúnmente asociados con fármacos biológicos (por ejemplo, nasofaringitis, síntomas del tracto respiratorio superior, síntomas musculoesqueléticos, cefalea, etc.). Además, la escala reducida mejorada de este proceso disminuye el riesgo de exposición a BoNT/A en el personal de laboratorio y de la planta de fabricación.

35 Las ventajas ejemplares de la presente invención incluyen, por ejemplo:

40 1. Se mejora la seguridad porque no se utiliza ningún componente o sustancia derivada de una fuente animal (por ejemplo, humana o animal) en el proceso, se elimina el uso de ADNasa y ARNasa, placas de agar de sangre de Colombia, caseína (reemplazada, por ejemplo, por: filtración cargada durante la etapa de clarificación/recolección y técnicas de cromatografía modernas, sembrando medio de cultivo directamente con células de un banco de células de trabajo, es decir, células previamente seleccionadas y propagadas/mantenidas en medio APF, y medios de botellas de cultivo y fermentación reemplazados con Peptona de Soja Tipo II (SPTII) como una fuente de peptona).

45 2. Entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 200 mg de complejo de toxina botulínica de tipo A de alta calidad se pueden obtener por 10 L de medio de fermentación.

50 3. La toxina a granel purificada se obtiene a partir de un proceso que es robusto, consistente, escalable, validable y compatible con cGMP. Robusto significa que el proceso es reproducible incluso sobre un cambio de aproximadamente $\pm 10\%$ en uno o más de los parámetros del proceso. Validable significa que el proceso reproduciblemente proporciona rendimientos consistentes de toxina purificada. El cumplimiento de cGMP significa que el proceso se puede convertir fácilmente en un proceso de fabricación que cumpla con las actuales buenas prácticas de fabricación requeridas por la FDA.

55 4. La potencia del complejo de toxina botulínica purificada final cumple o excede la potencia (por ejemplo, determinada por el ensayo MLD50) del complejo de toxina botulínica purificada obtenido a partir de un proceso de Schantz o Schantz modificado.

60 5. Sustitución de cualquier etapa de precipitación por etapas cromatográficas para purificar un complejo de toxina botulínica a granel, que mejora la especificidad del proceso de purificación.

65 6. Un nuevo proceso mejorado facilita la reducción de la escala que da como resultado una manipulación mejorada y el logro de una tasa de éxito operacional $> 95\%$ (por ejemplo, reducido de los volúmenes típicos que utilizan 110 L - 120 L de medio de fermentación hasta aproximadamente 10 L a aproximadamente 50 L incluso hasta aproximadamente 2 l a aproximadamente 30 l de medio de fermentación o una cantidad entre ellos. La escala de producción actual típica para la sustancia farmacéutica a granel es 115 L de medio de fermentación no APF y, como un aspecto de nuestra invención, se ha reducido a 20 l de medio de fermentación. Esta reducción en la escala es

- 5 posible gracias a la optimización de la síntesis y liberación celular del complejo BoNT/A, así como el rendimiento global a través de las etapas de purificación, dando como resultado una cantidad similar de toxina botulínica a granel final (sustancia farmacéutica) a la obtenida en procesos anteriores que requiere, por ejemplo, 5X o incluso más volúmenes de fermentación (por ejemplo, 115 L). Esta escala reducida facilita el manejo más fácil del volumen de trabajo de la fermentación y minimiza así el riesgo potencial de exposición del operador al complejo BoNT/A, una importante ventaja operativa y de seguridad.
- 10 7. Debido a la naturaleza potencialmente letal del complejo BoNT/A, se han implementado sistemas cerrados durante todo el proceso de fabricación como se describe en la presente memoria. A diferencia de los métodos de la técnica anterior, ningún material de sustancia farmacéutica producido de acuerdo con aspectos de la presente invención se expone al medio ambiente durante la transferencia entre operaciones de unidad; todas las operaciones están totalmente contenidas.
- 15 8. El proceso de fabricación de toxina botulínica a granel descrito en la presente invención se simplifica en todas las etapas sin sacrificar la identidad, calidad, pureza o potencia de la sustancia farmacéutica durante la fabricación. Una serie de etapas utilizadas en un proceso no APF se han eliminado en el proceso IAPF rediseñado, reduciendo así el tiempo de producción de, por ejemplo, 21 días a 6 días o menos.
- 20 9. La condición de almacenamiento de la toxina botulínica a granel como una solución congelada mejora en gran medida la estabilidad de la sustancia farmacéutica.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir una neurotoxina botulínica biológicamente activa, comprendiendo el método las siguientes etapas:
- 5
- (a) proporcionar un medio de fermentación que está completamente libre de productos derivados de animales o que contiene productos derivados de animales en una cantidad inferior al 1% en peso;
- 10
- (b) fermentar bacterias de *Clostridium botulinum* en el medio de fermentación;
- (c) poner en contacto el medio de fermentación con un medio de cromatografía de intercambio aniónico;
- (d) poner en contacto un eluato del medio de cromatografía de intercambio aniónico con un medio de cromatografía de intercambio catiónico; y
- 15
- (e) eluir un eluato que contiene neurotoxina botulínica del medio de cromatografía de intercambio catiónico; en el que no se usa ninguna enzima derivada de un animal para purificar la neurotoxina botulínica;
- 20
2. Proceso según la reivindicación 1, que comprende además la etapa (f) de poner en contacto el eluato de la etapa (e) con un medio de cromatografía de interacción hidrofóbica y eluir un eluato que contiene neurotoxina botulínica.
- 25
3. Proceso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la toxina botulínica obtenida comprende no más de una parte de ácido nucleico residual por millón de partes de la toxina botulínica.
- 30
4. Sistema para producir una neurotoxina botulínica biológicamente activa, comprendiendo el sistema
- (a) un medio de fermentación que está completamente libre de productos derivados de animales o que contiene productos derivados de animales en una cantidad inferior al 1% en peso;
- 35
- (b) bacterias de *Clostridium botulinum* para la fermentación en el medio de fermentación;
- (c) un medio de cromatografía de intercambio aniónico para recuperar neurotoxina botulínica del medio de fermentación; y
- (d) un medio de cromatografía de intercambio catiónico para recuperar neurotoxina botulínica de un eluato del medio de cromatografía de intercambio aniónico;
- 40
- en el que el sistema es capaz de purificar la neurotoxina botulínica sin el uso de una enzima derivada de un animal.
- 45
5. Sistema según la reivindicación 4, que comprende además un medio de cromatografía de interacción hidrofóbica para recuperar la neurotoxina botulínica de un eluato del medio de cromatografía de intercambio catiónico.

