

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

22 Date de dépôt : 19.01.24. 30 Priorité : 20.01.23 US 63/480,937.	71 Demandeur(s) : AbbVie Inc. Société régie par les lois de l'État du Delaware — US.
43 Date de mise à la disposition du public de la demande : 27.09.24 Bulletin 24/39.	72 Inventeur(s) : Kehrer Robert R., Wiig Jared, Xiang Hui, Nguyen Phillip P., Patel Hemant A., Ng Connie J. et Guerrero Cortnie M..
56 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Ce dernier n'a pas été établi à la date de publication de la demande.	73 Titulaire(s) : AbbVie Inc. Société régie par les lois de l'État du Delaware.
60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :	74 Mandataire(s) : HOYNG ROKH MONEGIER.
○ Demande(s) d'extension :	

54 Variantes de séquence de la neurotoxine de Clostridium botulinum de sérotype A (BoNT/A).

57 La présente invention concerne des compositions comprenant un complexe de neurotoxine de Clostridium botulinum de sérotype A (BoNT/A) comprenant une BoNT/A de 150 kDa. Ladite BoNT/A de 150 kDa se présente sous la forme d'une pluralité d'espèces de variants de séquence, dans laquelle la pluralité d'espèces de variants de séquence comprend une espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée.



Description

Titre de l'invention : Variantes de séquence de la neurotoxine de *Clostridium botulinum* de sérotype A (BoNT/A)

RÉFÉRENCE CROISÉE AUX DEMANDES APPARENTÉES

- [0001] La présente demande revendique le bénéfice de la demande provisoire U.S. No. 63/480 937, déposée le 20 janvier 2023.
- [0002] **RÉFÉRENCE À UNE LISTE DE SÉQUENCES SOUMISE PAR VOIE ÉLECTRONIQUE**
- [0003] Cette demande est soumise avec une liste de séquences comme fichier xml intitulé « 13371-269-228_SEQ_LISTIG.xml » ayant une taille de 8 297 octets.

1. DOMAINE

- [0004] La présente invention concerne des compositions comprenant un complexe de neurotoxine de *Clostridium botulinum* de sérotype A (BoNT/A) comprenant une BoNT/A de 150 kDa. Ladite BoNT/A de 150 kDa se présente sous la forme d'une pluralité d'espèces de variants de séquence, dans laquelle la pluralité d'espèces de variants de séquence comprend une espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée.

2. ARRIÈRE-PLAN

- [0005] La neurotoxine de *Clostridium botulinum* de sérotype A (BoNT/A) est une toxine hautement puissante qui provoque la relaxation musculaire par inhibition de l'amarrage et de la fusion des vésicules synaptiques, bloquant ainsi la libération de l'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaires. La BoNT/A est produite par des souches de *Clostridium botulinum* de type A, qui synthétisent un complexe d'une neurotoxine de 150 kDa, ainsi que d'un groupe de protéines associées à la neurotoxine (NAP) non toxiques. Le BOTOX®, ou onabotulinumtoxinA, est un produit de BoNT/A approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis en 1989 pour une variété d'indications thérapeutiques et cosmétiques.
- [0006] À ce jour, il subsiste un besoin de développer des compositions pharmaceutiques de toxines de *botulinum* présentant des propriétés améliorées.
- [0007] La citation d'une référence ici ne sera pas interprétée comme une reconnaissance de l'antériorité de cette référence par rapport à la présente description.

3. RÉSUMÉ

- [0008] La présente description repose, en partie, sur la découverte surprenante d'un variant de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée, à savoir une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée ayant une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 4 (ci-après dénommée « BoNT/A de 150 kDa

tronquée »), et que la présence et/ou la quantité d'un tel variant peuvent impacter les propriétés du complexe de BoNT/A. La présente description décrit également que l'augmentation de la concentration en CO₂ pendant la fermentation de *Clostridium botulinum* et l'utilisation d'une température qui est inférieure à la température de fermentation standard pendant la fermentation (soit pendant une période courte (à savoir, un choc à froid) ou en continu) permettent toutes deux de réduire la quantité de BoNT/A de 150 kDa tronquée. Sans vouloir être lié par une quelconque théorie, par comparaison avec la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur (à savoir, BoNT/A de 150 kDa comprenant une chaîne légère ayant la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 2), le variant de BoNT/A de 150 kDa tronquée est plus chargé négativement dû à la perte du résidu lysine chargé positivement C-terminal dans la chaîne légère. Le variant de BoNT/A tronquée plus chargé négativement peut afficher un temps de rétention des tissus plus court que les espèces BoNT/A pleine longueur au niveau du site d'administration en raison des interactions électrostatiques défavorables entre les variants de BoNT/A tronquée décrites ici et les composants extracellulaires anioniques (tels que les membranes cellulaires et les protéoglycanes de sulfate d'héparine) au niveau du site d'administration. Ainsi, en réduisant le niveau du variant de BoNT/A tronquée plus chargé négativement, les compositions de BoNT/A décrites ici peuvent réduire la quantité de BoNT/A biologiquement active qui se diffuse à distance du site d'administration, et ainsi améliorer la rétention des tissus.

[0009] Dans un aspect, il est fourni ici une composition comprenant un complexe de neurotoxine de *Clostridium botulinum* de sérotype A (BoNT/A) de 900 kDa, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa comprend une BoNT/A de 150 kDa qui est sous la forme d'une pluralité d'espèces de variants de séquence, dans laquelle la pluralité d'espèces de variants de séquence comprend une espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée et une espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère pleine longueur, dans laquelle la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée a une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 4, et la chaîne légère pleine longueur a une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 2, et dans laquelle le rapport de l'abondance des espèces de variants de séquences de BoNT/A de 150 kDa avec la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée à l'abondance des espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec la chaîne légère pleine longueur est inférieur à 3,9.

[0010] Dans un autre aspect, est fournie ici une composition comprenant un complexe de BoNT/A de 900 kDa, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa comprend une BoNT/A de 150 kDa qui est sous la forme d'une pluralité d'espèces de variants de séquence, dans laquelle la pluralité d'espèces de variants de séquence comprend une

espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée, dans laquelle la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée a une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 4, et dans laquelle le pourcentage de l'abondance des espèces de variants de séquence de 150 kDa/A avec la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée dans l'abondance de la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa est inférieur à 79,5 %.

- [0011] Dans certains modes de réalisation, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par des bactéries de *Clostridium botulinum* cultivées et développées à partir d'une banque de cellules actives exemptes de produit d'origine animale.
- [0012] Dans certains modes de réalisation, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par une souche de Type A de *Clostridium botulinum*.
- [0013] Dans certains modes de réalisation, la souche de Type A de *Clostridium botulinum* est une souche Hall de Type A de *Clostridium botulinum*.
- [0014] Dans certains modes de réalisation, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est l'onabotulinumtoxine A.
- [0015] Dans certains modes de réalisation, la composition fournie ici comprend en outre de l'albumine de sérum humain. Dans des modes de réalisation spécifiques, la composition fournie ici comprend environ 0,5 mg d'albumine sérique humaine pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa. Dans des modes de réalisation spécifiques, l'albumine sérique humaine est l'albumine sérique humaine recombinante. Dans des modes de réalisation particuliers, l'albumine sérique humaine est un plasma humain dérivé.
- [0016] Dans certains modes de réalisation, la composition fournie ici est exempte de produit d'origine animale.
- [0017] Dans certains modes de réalisation, la composition fournie ici comprend en outre du chlorure de sodium. Dans des modes de réalisation spécifiques, la composition fournie ici comprend environ 0,9 mg de chlorure de sodium pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa.
- [0018] Dans certains modes de réalisation, la composition fournie ici ne contient pas d'inhibiteur de protéase.
- [0019] Dans certains modes de réalisation, la composition fournie ici ne contient pas de chlorhydrate de benzamidine.
- [0020] Dans certains modes de réalisation, la composition fournie ici comprend environ 50 unités, environ 100 unités ou environ 200 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa.
- [0021] Dans certains modes de réalisation, la composition fournie ici a une puissance d'environ $1,5 \times 10^7$ unités/mg à environ $6,0 \times 10^7$ unités/mg.

- [0022] Dans certains modes de réalisation, la composition fournie ici est une composition pharmaceutique en poudre.
- [0023] Dans certains modes de réalisation, la composition fournie ici est séchée sous vide.
- [0024] Dans certains modes de réalisation, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé qui comprend une ou plusieurs étapes de chromatographie sur colonne. Dans certains modes de réalisation, les une ou plusieurs étapes de chromatographie sur colonne comprennent une chromatographie d'interaction hydrophobe. Dans certains modes de réalisation, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent en outre une chromatographie d'échange d'anions. Dans certains modes de réalisation, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent en outre une chromatographie d'échange de cations.
- [0025] Dans un autre aspect, est fourni ici un procédé de production d'une composition comprenant BoNT/A, ledit procédé comprenant l'incubation d'une culture de bactéries de *Clostridium botulinum* dans un fermenteur de production en présence de CO₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
- [0026] Dans certains modes de réalisation, l'étape d'incubation est réalisée en présence de CO₂ et N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation. Dans des modes de réalisation particuliers, l'étape d'incubation est réalisée en présence de 25 % de CO₂ et 75 % de N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation. Dans des modes de réalisation spécifiques, l'étape d'incubation est réalisée en présence de 50 % de CO₂ et 50 % de N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation. Dans des modes de réalisation spécifiques, l'étape d'incubation est réalisée en présence de 75 % de CO₂ et 25 % de N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation. Dans des modes de réalisation spécifiques, l'étape d'incubation est réalisée en présence de 100 % de CO₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
- [0027] Selon un autre aspect, la présente description concerne également un procédé de traitement d'un patient en ayant besoin, comprenant l'administration d'une composition décrite ici.

4. BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

- [0028] La [Fig.1] représente le chromatographe AEX-HPLC pour des échantillons obtenus à partir de conditions de fermentation avec différentes concentrations de CO₂. CO₂ étude 1 : 25 % de CO₂ ; CO₂ étude 2 : 50 % de CO₂ ; CO₂ étude 3 : 75 % de CO₂ ; CO₂ étude 4 : 100 % de CO₂.
- [0029] Les [Fig.2A]-2E montrent l'abondance de la chaîne légère de BoNT/A pleine longueur et à extrémité C-terminale tronquée obtenue à partir de conditions de fermentation avec différentes concentrations de CO₂.

- [0030] [Fig.2A] : fermentation de témoin de référence.
- [0031] [Fig.2B] : fermentation à 25 % de CO₂.
- [0032] [Fig.2C] : fermentation à 50 % de CO₂.
- [0033] [Fig.2D] : fermentation à 75 % de CO₂.
- [0034] [Fig.2E] : fermentation à 100 % de CO₂.
- [0035] La [Fig.3] montre le chromatographe AEX-HPLC pour des échantillons obtenus à partir de différentes conditions de température de fermentation. CEC #1 : Fermentation de témoin de référence ; CEC #5 : Choc à froid 20 °C ; CEC #7 : Choc à froid à 15 °C ; CEC #8 : Fermentation à 25 °C.
- [0036] La [Fig.4] montre l'abondance de chaîne légère de BoNT/A pleine longueur et à extrémité C-terminale tronquée obtenue à partir de différentes conditions de température de fermentation.

5. DESCRIPTION DÉTAILLÉE

- [0037] Dans un aspect, il est proposé ici une composition nouvellement améliorée comprenant un complexe de BoNT/A de 900 kDa, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa comprend une BoNT/A de 150 kDa qui se présente sous la forme d'une pluralité d'espèces de variants de séquence, dans lequel la pluralité d'espèces de variants de séquence comprend une BoNT/A de 150 kDa tronquée, et dans laquelle le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à un rapport de référence (*par exemple*, un rapport de référence de 3,9) ou le pourcentage de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée parmi l'abondance de la pluralité d'espèces de variants de séquence est inférieur à un pourcentage de référence (*par exemple*, un pourcentage de référence de 79,5 %). La présente description fournit également des procédés pour produire les nouvelles compositions fournies ici.
- [0038] D'autres avantages de la présente description apparaîtront à l'homme du métier à la lecture de cette demande de brevet. Les modes de réalisation de la description décrits dans les paragraphes suivants sont destinés à illustrer l'invention et ne doivent pas être considérés comme limitant la portée de l'invention.

5.1. Définitions

- [0039] Les formes singulières « un » et « le » comportent les référents pluriels sauf si le contexte indique clairement le contraire.
- [0040] Le terme « et/ou » tel qu'utilisé dans une expression telle que « A et/ou B » est ici destiné à signifier « A et B », « A ou B », « A » ou « B ».
- [0041] Les termes « environ » et « approximativement » désignent généralement une plage de nombres que l'homme de l'art considérera équivalente à la valeur citée (*à savoir* ayant la même fonction ou le même résultat). Dans de nombreux cas, les termes

« environ » et « approximativement » peuvent comporter des nombres qui sont arrondis au chiffre significatif le plus proche. Dans des modes de réalisation spécifiques, les termes « environ » et « approximativement » doivent être interprétés de façon à permettre une variation normale telle que jugée par une personne de compétence ordinaire dans la technique, comme, par exemple, une variation dans les 20 % ou 10 % ou 5 %. Dans des modes de réalisation spécifiques, les termes « environ » et « approximativement » englobent la valeur exacte citée.

[0042] « Exempt de produit d'origine animale » (« APF ») ou « essentiellement exempt de produit d'origine animale » englobent, respectivement, l'absence ou l'absence significative de sang dérivé, de sang accumulé et d'autres produits ou composés dérivés de l'animal. « Animaux » exclut les micro-organismes, tels que les bactéries. Ainsi, un milieu ou un procédé APF ou un milieu ou un procédé essentiellement APF dans le cadre de la présente invention peuvent comporter une toxine de *botulinum* ou une bactérie de *Clostridial botulinum*. Par exemple, un procédé APF ou un procédé essentiellement APF désigne un procédé qui est soit sensiblement exempt soit essentiellement soit entièrement exempt de protéines dérivées d'animaux, telles que des immunoglobulines, du condensé de viande, des produits secondaires de viande et du lait ou des produits ou condensés laitiers.

[0043] La « neurotoxine de *Clostridium botulinum* de sérotype A » ou « BoNT/A » signifie une neurotoxine produite par des souches de Type A de *Clostridium botulinum*. Une telle souche de Type A de *Clostridium botulinum* est la souche Hall de Type A, par exemple la souche Hall de Type A (Allergan). Zhang *et al.* (2003) *Gene* 315:21. La BoNT/A englobe à la fois un complexe de BoNT/A (*par exemple*, les complexes de 300, 500, 760 et 900 kDa) ainsi que la toxine BoNT/A pure (*à savoir* la molécule neurotoxique d'environ 150 kDa).

[0044] Les « complexes de BoNT/A » signifient les complexes de la neurotoxine de *Clostridium botulinum* de sérotype A comprenant une molécule de BoNT/A (la composante neurotoxique) et une ou plusieurs protéines hémagglutinine (HA) et/ou protéine de non-hémagglutinine non toxique (NTNH). Les complexes de BoNT/A peuvent être sous les formes *par exemple*, d'environ 900 kDa, 760 kDa, 500 kDa ou 300 kDa. Dans un mode de réalisation, le complexe de BoNT/A est sous forme d'environ 900 kDa comprenant une molécule de BoNT/A d'environ 150 kDa, des protéines hémagglutinine HA70, hémagglutinine HA34, hémagglutinine HA17, et non toxique non-hémagglutinine (NTNH). Dans un mode de réalisation, le complexe de BoNT/A est une forme sensiblement complète du complexe de BoNT/A de 900 kDa. Dans un mode de réalisation, le complexe de BoNT/A est l'onabotulinumtoxinA.

[0045] La « neurotoxine de *Clostridium botulinum* de sérotype A de 150 kDa » ou la « BoNT/A de 150 kDa » signifient une neurotoxine d'environ 150 kDa réalisée à partir

d'une culture de souche de type A de *Clostridium botulinum* (*par exemple*, la souche Hall de *Clostridium botulinum*). Les séquences données à titre d'exemple de toxine de *botulinum* de type A (BoNT/A) de 150 kDa utilisées dans le cadre de la présente description sont indiquées dans le tableau 1. Par exemple, dans un mode de réalisation, la BoNT/A de 150 kDa utilisée dans le cadre de la présente description comprend (*par exemple*, consiste en) une chaîne légère ayant une séquence d'acides aminés présentée dans la SEQ ID NO. 2 et une chaîne lourde ayant une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO. 3, avec des ponts disulfures situés entre les positions 429 et 453 et entre les positions 1234 et 1279. Dans un mode de réalisation, dans un mode de réalisation, la BoNT/A de 150 kDa utilisée dans le cadre de la présente description comprend (*par exemple*, consiste en) une chaîne légère ayant une séquence d'acides aminés présentée dans la SEQ ID NO. 4 et une chaîne lourde ayant une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO. 3, avec des ponts disulfures situés entre les positions 429 et 453 et entre les positions 1234 et 1279.

[0046] Par «BoNT/A de 150 kDa pleine longueur », on entend la BoNT/A de 150 kDa qui comprend une chaîne légère avec la séquence d'acides aminés présentée dans la SEQ ID NO : 2 et une chaîne lourde avec la séquence d'acides aminés présentée dans la SEQ ID NO : 3.

[0047] Par «BoNT/A de 150 kDa tronquée », on entend la BoNT/A de 150 kDa qui comprend une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée avec la séquence d'acides aminés présentée dans la SEQ ID NO : 4 et une chaîne lourde avec la séquence d'acides aminés présentée dans la SEQ ID NO : 3.

[0048] Par « composition de BoNT/A », on entend toute composition comprenant BoNT/A et englobe à la fois des compositions solides et des compositions liquides. Dans certains modes de réalisation, une composition de BoNT/A (*e/g*/, une composition solide ou une composition liquide) décrite ici est une composition pharmaceutique. Dans des modes de réalisation particuliers, une composition de BoNT/A (*par exemple*, une composition solide ou une composition liquide) décrite ici est un produit médicamenteux (*à savoir*, une forme posologique finie). Dans des modes de réalisation particuliers, une composition de BoNT/A (*par exemple*, une composition solide ou une composition liquide) décrite ici est une substance médicamenteuse. Dans un mode de réalisation spécifique, une composition de BoNT/A décrite ici est sous la forme d'une solution. Dans un mode de réalisation spécifique, une composition de BoNT/A décrite ici est sous la forme de poudre (*par exemple*, poudre séchée sous vide ou poudre lyophilisée).

[0049] Le terme « support » utilisé en relation avec un excipient pharmaceutique désigne tout solvant, milieu de dispersion, conservateurs, revêtements, agents retardateurs d'absorption et isotoniques, et similaires, compatibles avec une administration pharma-

ceutique.

[0050] Par « composition pharmaceutique », on entend une formulation dans laquelle un principe actif peut être une BoNT/A. Par « formulation », on entend qu'il y a au moins un ingrédient supplémentaire (tel que par exemple et non limité à une albumine (telle qu'une albumine sérique humaine (HSA) ou une albumine humaine recombinante) et/ou du chlorure de sodium) dans la composition pharmaceutique en plus d'un principe actif de BoNT/A. L'excipient d'albumine sérique humaine peut être dérivé de plasma humain ou réalisé de manière recombinante. Une composition pharmaceutique est donc une formulation adaptée à une administration diagnostique, thérapeutique et/ou cosmétique (*par exemple*, par injection intramusculaire ou sous-cutanée ou par insertion d'un dépôt ou d'un implant) à un sujet, tel qu'un patient humain. Une composition pharmaceutique peut être sous une condition séchée sous vide ou lyophilisée, une solution reconstituée à partir de la composition pharmaceutique séchée sous vide ou lyophilisée avec, par exemple, une solution saline ou de l'eau, ou en tant que solution qui ne nécessite pas de reconstitution. Dans un mode de réalisation, le principe actif est la toxine *botulinum* de sérotype A obtenue nativement par des bactéries de *Clostridial*. Dans un mode de réalisation, le principe actif est l'onabotulinumtoxinA. Comme précisé, une composition pharmaceutique peut être liquide ou solide, par exemple séchée sous vide ou lyophilisée. Des procédés donnés à titre d'exemple pour formuler une composition pharmaceutique à principe actif de BoNT/A sont décrits dans la Publication de demande de brevet U.S. No. 2003/0118598, déposé le 5 novembre 2002. Dans un mode de réalisation préféré, une composition pharmaceutique décrite ici est sous une forme séchée (*par exemple*, une forme séchée sous vide ou lyophilisée). Les compositions pharmaceutiques peuvent être séchées sous vide et adaptées à une administration par injection soit sous-cutanée soit intra-musculaire lors de la reconstitution avec une solution saline normale, comprenant de la BoNT/A de 900 kDa, de l'albumine sérique humaine (HSA), et du chlorure de sodium. De préférence, de telles compositions pharmaceutiques comprennent 0,5 mg de HSA et 0,9 mg de chlorure de sodium pour 100 unités de BoNT/A. Le plus préférablement de telles compositions pharmaceutiques comprennent 50, 100 ou 200 unités de BoNT/A.

[0051] Le terme « patient », « sujet », « individu » et similaires désigne l'homme.

[0052] « Unité » ou « U » désigne la dose de LD50 ou la dose déterminée par un test de puissance sur cellules (CBPA). La dose de LD50 est définie comme la quantité de BoNT/A qui a tué 50 % des souris injectées avec la BoNT/A. La dose CBPA est déterminée comme décrit dans les brevets U.S. No. 8 618 261 ; 8 198 034 ; 9 249 216 ; 10 703 806 ; 11 261 240 et 11 332 518.

[0053] Sauf si le contexte s'y oppose, les termes « comprennent », « comprend » et

« comprenant » sont utilisés sur la base et la compréhension claire qu'ils doivent être interprétés inclusivement, plutôt qu'exclusivement, de telle sorte qu'ils indiquent l'inclusion de la caractéristique citée mais sans exclure une ou plusieurs autres caractéristiques de ce type. Cependant, il convient de comprendre que partout où les aspects et modes de réalisation sont décrits ici avec le terme « comprennent » (ou « comprend » ou « comprenant »), des aspects autrement analogues décrits en termes de « constitués de » (ou « consiste en » ou « constitué de ») et/ou « constitué sensiblement de » (ou « consiste essentiellement en » ou « constitué sensiblement de ») sont également fournis.

[0054] **5.2. Neurotoxine de *Clostridium Botulinum* de sérotype A (BoNT/A) et compositions de BoNT/A**

[0055] Une molécule de BoNT/A de 150 kDa est une endopeptidase à zinc qui peut hydrolyser spécifiquement une liaison peptidique de la protéine intracellulaire, associée aux vésicules (VAMP, également appelée synaptobrevine) de 25 kiloDalton (kDa) de protéine associée aux synaptosomes (SNAP-25). Une molécule de BoNT/A de 150 kDa est traduite en un polypeptide à chaîne unique d'environ 150 kDa qui est ensuite clivée par scission protéolytique au sein d'une boucle disulfure par une protéase se produisant naturellement. Ce traitement post-traductionnel donne une molécule di-chaîne comprenant une chaîne légère (LC) d'environ 50 kDa et une chaîne lourde (HC) d'environ 100 kDa maintenues ensemble par une simple liaison disulfure et des interactions non covalentes.

[0056] Une bactérie de *Clostridial* peut produire des complexes de toxine *botulinum* de type A sous diverses formes, qui comprennent et ne sont pas limités à 900 kDa, 760 kDa, 500 kDa et 300 kDa (poids moléculaires approximatifs). Les complexes (à savoir, un poids moléculaire supérieur à environ 150 kDa) comprennent une molécule de toxine *botulinum* de 150 kDa (la composante neurotoxique) et une ou plusieurs protéines hémagglutinine (HA) et/ou protéine non-hémagglutinine non toxique (NTNH).

[0057] Dans un mode de réalisation, la molécule de BoNT/A de 150 kDa utilisable dans le cadre de la présente description présente une séquence représentée dans le tableau 1. Dans un mode de réalisation, la molécule de BoNT/A de 150 kDa comprend une chaîne légère (LC : résidus 2-438, environ 50 kDa) et une chaîne lourde (HC : résidus 449-1296, environ 100 kDa). Dans un autre mode de réalisation, la molécule de BoNT/A de 150 kDa comprend une chaîne légère (LC : résidus 2-436, environ 50 kDa) et une chaîne lourde (HC : résidus 449-1296, environ 100 kDa). Des résidus 439-448 sont le site d'accrochage et sont en italique.

[0058] [Tableau 1]. Séquences préférées de molécules de BoNT/A
SEQ ID NO. 1: Séquence d'acides aminés de la molécule de BoNT/A de 150 kDa

MPFVNKQFNY KDPVNGVDIA YIKIPNAGQM QPVKAFKIHN KIWVIPERDT 50
 FTNPEEGDLN PPPEAKQVPV SYYDSTYLST DNEKDNYLKG VTKLFERIYS
 100
 TDLGRMLLTS IVRGIPFWGG STIDTELKVI DTNCINVIQP DGSYRSEELN 150
 LVIIGPSADI IQFECKSFGH EVLNLTRNGY GSTQYIRFSP DFTFGFEESL 200
 EVDTNPLLGA GK FATDPAVT LAHELHAGH RLYGIAINPN RVFKVNTNAY
 250
 YEMSGLEVSF EELRTFGGHD AKFIDSLQEN EFRLYYYNKF KDIAS TLNKA
 300
 KSIVGTTASL QYMKNVFKEK YLLSEDTS GK FSVDKLKFDK LYKMLTEIYT
 350
 EDNFVKFFKV LNRKTYLNFD KAVFKINIVP KVNYTIYDGF NLRNTNLAAN
 400
 FNGQNT EINN MNFTKLKNFT GLFEFYKLLC VRGIITSKTK *SLDKGYNK*
 AL 450
 NDLCIKVNNW DLFFSPSEDN FTNDLNKGEE ITS DTNIEAA EENISLDLIQ 500
 QYYLTFNFDN EPENISIENL SSDIIGQLEL MPNIERFPNG KKYELDKYTM 550
 FHYLRAQEFE HGKSRIALT N SVNEALLNPS RVYTF FSSDY VKKVNKATEA
 600
 AMFLGWVEQL VYDFTDETSE VSTTDKIADI TIIPYIGPA LNIGNMLYKD 650
 DFGALIFSG AVILLEFIPE IAIPVLGTFA LVSYIANKVL TVQTIDNALS 700
 KRNEKWDEVY KYIVTNWLAK VNTQIDLIRK KMKEALENQA EATKAIINYQ
 750
 YNQYTEEEKN NINFNIDDL S SKL NESINKA MININKFLNQ CSVSYLMNSM
 800
 IPYGVKRLED FDASLKDALL KYIYDNRGTL IGQVDRLKDK VNNTLSTDIP
 850
 FQLSKYVDNQ RLLSTFTEYI KNIINTSILN LRYESNHLID LSR YASKINI 900
 GSKVNFDPID KNQIQLFNLE SSKIEVILKN AIVYN SMYEN FSTSFWIRIP 950
 KYFNSISLNN EYTIINCMEN NSGWKVSLNY GEI IWT LQDT QEIKQRVVK
 1000
 YSQMINISDY INRWIFVTIT NNRLNNSKIY INGR LIDQKP ISNLGNIHAS 1050
 NNIMFKLDGC RDTHRYIWIK YFNLFDKELN EKEIKDLYDN QSNSGILKDF
 1100
 WGDYLQYDKP YYMLNLYDPN KYVDVNNVGI RGYMYLKGPR
 GSVMTTNIYL 1150
 NSSLYRGTKF IIKKYASGNK DNIVRNNDRV YINVVVKNKE YRLATNASQA
 1200

GVEKILSALE IPDVGNLSQV VVMKSKNDQG ITNKCKMNLQ DNNGNDIGFI
1250

GFHQFNNAK LVASNWYNRQ IERSSRTLGC SWEFIPVDDG WGERPL 1296

[0059] SEQ ID NO. 2: Séquence d'acides aminés de la chaîne légère (LC) de BoNT/A
de 150 kDa pleine longueur

PFVNKQFNY KDPVNGVDIA YIKIPNAGQM QPVKAFKIHN KIWVIPERDT 50
FTNPEEGDLN PPPEAKQVPV SYYDSTYLST DNEKDNYLKG VTKLFERIYS
100

TDLGRMLLTS IVRGIPFWGG STIDTELKVI DTNCINVIQP DGSYRSEELN 150
LVIIGPSADI IQFECKSFGH EVLNLTRNGY GSTQYIRFSP DFTFGFEESL 200
EVDTNPLLGA GKFATDPAVT LAHELHAGH RLYGIAINPN RVFKVNTNAY
250

YEMSGLEVSF EELRTFGGHD AKFIDSLQEN EFRLYYYNKF KDIASLTNKA
300

KSIVGTTASL QYMKNVFKEK YLLSEDTSGK FSVDKLKFDK LYKMLTEIYT
350

EDNFVKFFKV LNRKTYLNFD KAVFKINIVP KVNVTIYDGF NLRNTNLAAN
400

FNGQNTTEINN MNFTKLKNFT GLFEFYKLLC VRGIITSK

[0060] SEQ ID NO. 3: Séquence d'acides aminés de la chaîne lourde (HC) de BoNT/A
de 150 kDa

AL 450

NDLCIKVNNW DLFFSPSEDN FTNDLNKGEE ITSDTNIEAA EENISLDLIQ 500
QYYLTFNFDN EPENISIENL SSDIIGQLEL MPNIERFPNG KKYELDKYTM 550
FHYLRAQEFE HGKSRIALTN SVNEALLNPS RVYTFSSDY VKKVNKATEA
600

AMFLGWVEQL VYDFTDETSE VSTTDKIADI TIIPYIGPA LNIGNMLYKD
650

DFVGALIFSG AVILLEFIPE IAIPVLGTFA LVSYIANKVL TVQTIDNALS 700
KRNEKWDEVY KYIVTNWLAK VNTQIDLIRK KMKEALENQA
EATKAIINYQ 750

YNQYTEEEKN NINFNIDDL SSKLNESINKA MININKFLNQ CSVSYLMNSM
800

IPYGVKRLED FDASLKDALL KYIYDNRGTL IGQVDRLKDK VNNTLSTDIP
850

FQLSKYVDNQ RLLSTFTEYI KNIINTSILN LRYESNHLID LSRYASKINI 900
GSKVNFDPID KNQIQLFNLE SSKIEVILKN AIVYNSMYEN FSTSFWIRIP 950
KYFNSISLNN EYTIINCMEN NSGWKVS LNY GEIIWTLQDT QEIKQRVVK

1000

YSQMINISDY INRWIFVTIT NNRLNNSKIY INGRLLIDQKP ISNLTGNIHAS 1050
 NNIMFKLDGC RDTHRYIWIK YFNLFDKELN EKEIKDLYDN QSNSGILKDF

1100

WGDYLQYDKP YYMLNLYDPN KYVDVNNVGI RGYMYLKGPR

GSVMTTNIYL 1150

NSSLYRGTKF IIKKYASGNK DNIVRNNDRV YINVVVKNKE YRLATNASQA

1200

GVEKILSALE IPDVGNLSQV VVMKSKNDQG ITNKCKMNLQ DNNGNDIGFI

1250

GFHQFNNAK LVASNWYNRQ IERSSRTLGC SWEFIPVDDG WGERPL 1296

[0061] SEQ ID NO. 4: Séquence d'acides aminés de la chaîne légère (LC) de BoNT/A
 de 150 kDa tronquée avec une troncature C-terminale (-SK)

PFVVKQFNY KDPVNGVDIA YIKIPNAGQM QPVKAFKIHN KIWVIPERDT 50
 FTNPEEGDLN PPPEAKQVPV SYYDSTYLST DNEKDNYLKG VTKLFERIYS

100

TDLGRMLLTS IVRGIPFWGG STIDTELKVI DTNCINVIQP DGSYRSEELN 150

LVIIGPSADI IQFECKSFGH EVLNLTRNGY GSTQYIRFSP DFTFGFEESL 200

EVDTNPLLGA GKFATDPAVT LAHELIHAGH RLYGIAINPN RVFKVNTNAY

250

YEMSGLEVSF EELRTFGGHD AKFIDSLQEN EFRLYYYNKF KDIASLTNKA

300

KSIVGTTASL QYMKNVFKEK YLLSEDTSKG FSVDKLFKFDK LYKMLTEIYT

350

EDNFVKFFKV LNRKTYLNFD KAVFKINIVP KVNYTIYDGF NLRNTNLAAN

400

FNGQNTEINN MNFTKLKNFT GLFEFYKLLC VRGIIT

[0062] Dans un mode de réalisation, la BoNT/A décrite ici est présente comme un complexe de BoNT/A de 900 kDa. Dans un mode de réalisation, la BoNT/A décrite ici est présente comme un complexe de BoNT/A de 900 kDa formé par la molécule de BoNT/A de 150 kDa et les protéines hémagglutinine HA70, hémagglutinine HA34, hémagglutinine HA17, et non toxique non-hémagglutinine (NTNH). Dans un mode de réalisation particulier, la BoNT/A décrite ici (*par exemple* le complexe de BoNT/A de 900 kDa) est produite dans une souche de *Clostridium botulinum* de type A. Dans un mode de réalisation particulier, la BoNT/A décrite ici (*par exemple* le complexe de BoNT/A de 900 kDa) est produite dans une souche Hall de *Clostridium botulinum* de type A. Dans un mode de réalisation préféré, la BoNT/A décrite ici est l'onabotulinumtoxinA.

[0063] Dans un mode de réalisation, la molécule de BoNT/A de 150 kDa pleine longueur décrite ici comprend une chaîne légère ayant une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO. 2 et une chaîne lourde ayant une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO. 3, avec des ponts disulfures situés entre les positions 429 et 453 et entre les positions 1234 et 1279.

[0064] Dans un autre mode de réalisation, la molécule de BoNT/A de 150 kDa tronquée décrite ici comprend une chaîne légère ayant une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO. 4 et une chaîne lourde ayant une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO. 3, avec des ponts disulfures situés entre les positions 429 et 453 et entre les positions 1234 et 1279.

5.3. Compositions de BoNT/A

[0065] Dans un aspect, il est proposé ici une composition comprenant un complexe de BoNT/A de 900 kDa, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa comprend une BoNT/A de 150 kDa qui est sous la forme d'une pluralité d'espèces de variants de séquence, dans laquelle la pluralité d'espèces de variants de séquence comprend une espèce de variant de séquence BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère tronquée C-terminale (BoNT/A de 150 kDa) et une séquence de variant de séquence BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère pleine longueur (BoNT/A de 150 kDa pleine longueur), dans laquelle la chaîne légère tronquée C-terminale a une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 4, et la chaîne légère pleine longueur a une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 2, et dans laquelle le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à un rapport de référence. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 3,9. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 3,8. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 3,7. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 3,6. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 3,5. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 3,4. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 3,3. Dans certains modes de réalisation, le

[illegible]

rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 1,3. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 1,2. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 1,1. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 1,0. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 0,9. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 0,8. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 0,7. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 0,6. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 0,5. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 0,4. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 0,3. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 0,2. Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur est inférieur à 0,1. Dans certains modes de réalisation particuliers, la BoNT/A de 150 kDa dans la composition proposée ici est constituée de deux formes : une est une BoNT/A de 150 kDa tronquée et l'autre est une BoNT/A de 150 kDa pleine longueur.

[0066] Dans un autre aspect, est fournie ici une composition comprenant un complexe de BoNT/A de 900 kDa, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa comprend une BoNT/A de 150 kDa qui est sous la forme d'une pluralité d'espèces de variants de séquence, dans laquelle la pluralité d'espèces de variants de séquence comprend une espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée (BoNT/A de 150 kDa tronquée), dans laquelle la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée a une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 4, et dans laquelle le pourcentage de l'abondance de la BoNT/A de 150 kDa tronquée dans l'abondance de la pluralité d'espèces de variants

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

l'abondance de la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa est inférieur à 5 %. Dans certains modes de réalisation, le pourcentage de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée dans l'abondance de la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa est inférieur à 4 %. Dans certains modes de réalisation, le pourcentage de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée dans l'abondance de la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa est inférieur à 3 %. Dans certains modes de réalisation, le pourcentage de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée dans l'abondance de la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa est inférieur à 2 %. Dans certains modes de réalisation, le pourcentage de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée dans l'abondance de la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa est inférieur à 1 %. Dans certains modes de réalisation particuliers, la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa comprend en outre une espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère pleine longueur (BoNT/A de 150 kDa pleine longueur), dans laquelle la chaîne légère pleine longueur A une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 2. Dans certains modes de réalisation particuliers, la BoNT/A de 150 kDa dans la composition proposée ici est constituée de deux formes : une est une BoNT/A de 150 kDa tronquée et l'autre est une BoNT/A de 150 kDa pleine longueur.

[0067] Le rapport de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de BoNT/A de 150 kDa pleine longueur ou le pourcentage de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée dans l'abondance de la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa, peut être déterminé selon toutes technologies connues dans la technique ainsi que celles spécifiquement décrites ici, par exemple, dans la section Exemples ci-dessous.

[0068] Dans certains modes de réalisation, le rapport de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de BoNT/A de 150 kDa pleine longueur ou le pourcentage de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée dans l'abondance de la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa, est déterminé à l'aide d'une chromatographie d'échange d'anions (AEX) (*par exemple*, chromatographie liquide haute performance d'échange d'anions (AEX-HPLC)). Dans un mode de réalisation, la BoNT/A de 150 kDa tronquée correspond au pic qui élue plus tard que (*par exemple*, immédiatement après) le pic pour la BoNT/A de 150 kDa pleine longueur dans un chromatographe AEX-HPLC. Dans un mode de réalisation, la BoNT/A de 150 kDa tronquée correspond au second pic de BoNT/A de 150 kDa élué dans un chromatographe AEX-HPLC. Le chromatographe AEX-HPLC décrit ici peut être généré en utilisant une première phase mobile de Tris-HCl 40 mM (pH 8,0) et une deuxième phase mobile de NaCl 1,0 M et de Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), et dans lequel

le chromatogramme AEX-HPLC est généré en utilisant une détection à 220 nm. Dans un mode de réalisation, le chromatogramme AEX-HPLC est généré en utilisant les conditions indiquées dans le Tableau 4. Dans un mode de réalisation, la BoNT/A de 150 kDa tronquée correspond au pic tronqué 150 kDa comme illustré dans la [Fig.1]. Dans certains modes de réalisation spécifiques, le rapport de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de BoNT/A de 150 kDa pleine longueur ou le pourcentage de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée dans l'abondance de la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa, est déterminé à l'aide du procédé AEX-HPLC tel qu'illustré dans l'Exemple 1 ci-dessous.

[0069] Il sera entendu qu'un pic sur un chromatogramme ne se réfère pas seulement à un qui a un et un seul point haut (*à savoir*, le sommet), mais fait également référence à celui qui a un sommet (qui est le point le plus haut du pic) et un ou plusieurs points hauts locaux.

[0070] La détection et l'intégration de pics chromatographiques peuvent être effectuées par un homme du métier. Dans certains modes de réalisation, la détection de pics est effectuée manuellement. Dans certains modes de réalisation, l'intégration de pics est effectuée manuellement. Dans certains modes de réalisation, la détection de pics est effectuée à l'aide d'un algorithme. Dans certains modes de réalisation, l'intégration de pics est effectuée à l'aide d'un algorithme. Dans des modes de réalisation spécifiques, un algorithme qui peut être utilisé pour la détection et/ou l'intégration de pics prend en considération des facteurs comportant une largeur de crête, un seuil, une hauteur de crête et/ou une courbure du chromatogramme, *etc.* Dans un mode de réalisation spécifique, un algorithme pouvant être utilisé pour la détection et/ou l'intégration de pics utilise des courbes de Cauchy asymétriques. Dans un mode de réalisation spécifique, un algorithme qui peut être utilisé pour la détection et/ou l'intégration de pics est un qui est construit dans un logiciel de chromatographie (*par exemple*, le logiciel Empower®). Dans un mode de réalisation spécifique, un algorithme qui peut être utilisé pour la détection et/ou l'intégration de pics est ApexTrac™.

[0071] Dans d'autres modes de réalisation, le rapport de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de BoNT/A de 150 kDa pleine longueur ou le pourcentage de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée dans l'abondance de la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa, est déterminé à l'aide d'une spectrométrie de masse par chromatographie liquide (LC-MS). Dans certains modes de réalisation spécifiques, le rapport de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée à l'abondance de BoNT/A de 150 kDa pleine longueur ou le pourcentage de l'abondance de BoNT/A de 150 kDa tronquée dans l'abondance de la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa, est déterminé à l'aide du procédé LC-MS tel que décrit dans l'Exemple 1 ci-dessous. Dans un mode de

réalisation spécifique, la LC-MS est effectuée en utilisant les conditions indiquées dans le Tableau 5.

- [0072] Dans divers aspects et modes de réalisation, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit par une souche de Type A de *Clostridium botulinum* (par exemple, la souche Hall de Type A de *Clostridium botulinum*). Dans des modes de réalisation spécifiques, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est l'onabotulinumtoxine A.
- [0073] Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici est exempte de produit d'origine animale. Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici ne contient pas d'inhibiteur de protéase. Dans certains modes de réalisation, la composition décrite ici ne contient pas de chlorhydrate de benzamidine. Dans divers aspects et modes de réalisation, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit par des bactéries de *Clostridium botulinum* cultivées et développées à partir d'une banque de cellules actives exemptes de produit d'origine animale. La banque de cellules actives exemptes de produit d'origine animale peut être produite, par exemple et sans limitation, comme décrit dans l'exemple 6.
- [0074] Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici comprend en outre de l'albumine sérique humaine (HSA). Dans certains modes de réalisation, la composition comprend environ 0,5 mg de HSA pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa. Dans certains modes de réalisation, la HSA est une HSA recombinante. Dans des modes de réalisation spécifiques, la HSA recombinante est exempte de produit d'origine animale. Dans des modes de réalisation spécifiques, la HSA recombinante n'est pas produite à partir d'un animal. Dans des modes de réalisation particuliers, la HSA recombinante est produite à partir d'un microorganisme, tel que des bactéries. Dans des modes de réalisation particuliers, la HSA recombinante est produite à partir d'un système d'expression à base de plantes. Dans certains modes de réalisation, la HSA est dérivée du plasma humain.
- [0075] Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici comprend en outre du chlorure de sodium. Dans certains modes de réalisation, la composition comprend environ 0,9 mg de chlorure de sodium pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa.
- [0076] Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici comprend environ 50 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa. Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici comprend environ 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa. Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici comprend environ 200 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa.
- [0077] Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici est une composition liquide. Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici est une composition solide. Dans certains modes de réalisation, la composition décrite

ici est une composition séchée sous vide. Dans certains modes de réalisation, la composition décrite ici est une composition lyophilisée. Dans certains modes de réalisation, la composition décrite ici est une composition pharmaceutique en poudre. Dans des modes de réalisation spécifiques, la composition décrite ici est un produit médicamenteux. Dans un mode de réalisation spécifique, la composition décrite ici est un produit médicamenteux et comprend en outre HSA (*par exemple*, environ 0,5 mg de HSA pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa) et chlorure de sodium (*par exemple*, environ 0,9 mg de chlorure de sodium pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa). Dans des modes de réalisation spécifiques, la composition décrite ici est une substance médicamenteuse. Dans un mode de réalisation spécifique, la composition décrite ici est une substance médicamenteuse dans une solution appropriée pour le stockage.

[0078] Dans divers aspects et modes de réalisation, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit comme décrit à la Section 5.4.

[0079] Dans divers aspects et modes de réalisation, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit comme décrit dans l'exemple 1.

[0080] Dans un mode de réalisation, la présente description concerne également un procédé de traitement d'un patient (de préférence, un patient humain) en ayant besoin, comprenant l'administration d'une composition décrite ici.

[0081] **5.4. Production de BoNT/A et Production de compositions de BoNT/A**

[0082] Une toxine de *Botulinum* de type A a été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis pour le traitement du blépharospasme essentiel, du strabisme et du spasme hémifacial chez les patients de plus de douze ans, de la dystonie cervicale, des rides de la ligne glabellaire (visage) et pour le traitement de l'hyperhydrose. Une composition pharmaceutique contenant de la toxine de *botulinum* de type A disponible dans le commerce est commercialisée sous la marque BOTOX® (onabotulinumtoxinA), disponible commercialement auprès de Allergan, société AbbVie, North Chicago, Illinois, États-Unis. BOTOX® contient un complexe de toxine de *botulinum* de 900 kDa de type A purifié, de l'albumine sérique humaine, et du chlorure de sodium conditionné sous forme stérile, séchée sous vide. Le complexe de toxine de *botulinum* de type A dans BOTOX® est réalisé à partir d'une culture de la souche Hall de *Clostridium botulinum* amenée à croître dans un milieu contenant de la caséine amine N-Z et de l'extrait de levure (*à savoir*, un procédé non APF) et purifiée à partir de la solution de culture par une série d'étapes de précipitation (y compris la précipitation acide) à un complexe cristallin constitué de la protéine de toxine active de haut poids moléculaire et d'une protéine d'hémagglutinine associée. Le complexe cristallin est de nouveau dissous dans une solution contenant une solution saline et de l'albumine et filtré stérile à l'aide d'un filtre irradié gamma (0,2 microns) avant

séchage sous vide. BOTOX® peut être ré-constitué avec une solution saline stérile non conservée avant injection intramusculaire. Chaque flacon de 100 unités de BOTOX® est constitué d'environ 5 ng de complexe de toxine de *botulinum* de type A, 0,5 mg d'albumine sérique humaine, et 0,9 mg de chlorure de sodium, sous forme séchée sous vide et destinée à reconstitution avec une solution saline normale stérile sans conservateur (injection de chlorure de sodium 0,9 %).

[0083] Plusieurs étapes sont requises pour fabriquer les compositions de BoNT/a décrites ici appropriées pour une administration à un humain ou un animal pour un but thérapeutique, diagnostic, de recherche ou cosmétique. Dans un mode de réalisation, ces étapes peuvent comporter l'obtention d'une neurotoxine de *Clostridium botulinum* de sérotype A (BoNT/A) puis le mélange de la BoNT/A purifiée. Une première étape peut être de cultiver des bactéries de *Clostridial* (*par exemple*, la souche Hall de *Clostridium botulinum*), typiquement sur des plaques d'agar, dans un environnement propice à la croissance bactérienne, comme dans une atmosphère anaérobie chaude. L'étape de culture à l'aide de plaques d'agar permet d'obtenir des colonies de *Clostridial* à morphologie et autres caractéristiques souhaitables. L'étape de culture peut également être effectuée avec des bactéries provenant d'une cellule active exempte de produit d'origine animale (*voir, par exemple*, exemple 6). Dans une deuxième étape, les colonies de *Clostridial* cultivées sélectionnées peuvent être fermentées dans un milieu approprié. Après une certaine période de fermentation les bactéries de *Clostridial* réalisent typiquement une lyse et libèrent la toxine *Clostridial* (*par exemple*, BoNT/A) dans le milieu. Troisièmement, la toxine peut être purifiée à partir du milieu de culture pour obtenir une substance médicamenteuse de toxine BoNT/A en vrac ou brute. De préférence, la substance médicamenteuse de toxine BoNT/A n'a pas été soumise à une précipitation (*par exemple*, précipitation avec éthanol froid, acide chlorhydrique et/ou sulfate d'ammonium), *par exemple*, lors de la purification. On préfère également la substance médicamenteuse de toxine BoNT/A qui a été purifiée par chromatographie sur colonne, en particulier la substance médicamenteuse de toxine BoNT/A produite par purification en utilisant une colonne de chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC). Lorsque plusieurs colonnes de chromatographie sont utilisées pour purifier la BoNT/A, il est préférable que la toxine soit purifiée à l'aide d'un procédé dans lequel une colonne HIC est utilisée avant toutes autres colonnes de chromatographie. Il est préférable que la substance médicamenteuse BoNT/A soit produite par un procédé qui se qualifie pour une utilisation sous les bonnes réglementations pratiques de fabrication promulguées par la Food and Drug Administration des États-Unis.

[0084] Dans certains modes de réalisation, les compositions de BoNT/A décrites ici sont obtenues en utilisant un procédé sensiblement, essentiellement ou totalement, exempt

de protéine d'origine animale (APF). Le procédé peut comprendre les étapes séquentielles suivantes : culture de bactéries de *Clostridium botulinum* (*par exemple*, la souche Hall de *Clostridium botulinum*) dans un milieu de culture essentiellement APF ; la fermentation des bactéries de *Clostridium botulinum* du milieu de culture dans un milieu de fermentation sensiblement APF, la récolte du milieu de fermentation en éliminant les débris cellulaires présents dans le milieu de fermentation par filtration ou centrifugation ; la concentration du milieu de fermentation récolté par filtration, telle que par ultrafiltration (UF) ; la dilution du milieu de fermentation concentré en ajoutant un tampon. Après dilution avec le tampon, un procédé chromatographique sensiblement APF peut être effectué pour obtenir un complexe BoNT/A biologiquement actif hautement purifié. Dans certains modes de réalisation, le procédé APF décrit ici n'implique pas l'utilisation d'un inhibiteur de protéase. Dans certains modes de réalisation, le procédé APF décrit ici n'implique pas l'utilisation de chlorhydrate de benzamidine.

[0085] Le milieu de culture et/ou de fermentation essentiellement APF peut contenir un produit protéique obtenu à partir de levure (*par exemple*, un extrait de levure ou un concentré d'extrait de levure), ou d'un légume (*par exemple*, blé, soja, malt, lupins, maïs, graine de coton, graine de *L. campestri*, etc.). Le milieu de culture et/ou de fermentation APF peut comprendre en outre une source de carbone (*par exemple*, glucose) et/ou source de sel (*par exemple*, du chlorure de sodium). Dans un mode de réalisation, le milieu utilisé pour la fermentation de *Clostridium botulinum* est exempt de produits dérivés d'origine animale et comprend environ 10 à 100 g/L (*par exemple*, de 20 à 60 g/L) de soja hydrolysé (Hy-Soy), environ 7,5 g/L de glucose, et 5,0 g/L de NaCl, comme décrit dans le brevet U.S. No. 7 354 740. Dans un mode de réalisation, le milieu de fermentation peut comprendre 3 % p/v ou 5 % p/v de Hysoy ; 1 % p/v de levure de Hy ; et 1 % p/v de glucose, comme décrit dans le brevet U.S. No. 8 129 139. Dans un mode de réalisation, le milieu de fermentation APF peut comprendre 3,25 % p/v de peptone de soja de type II, 1,2 % p/v d'extrait de levure, 1,5 % p/v de glucose, pH ajusté à 7,3 en utilisant de l'hydroxyde de sodium, comme illustré dans l'exemple 1 ci-dessous.

[0086] Dans certains modes de réalisation, les compositions de BoNT/A décrites ici sont obtenues sous une condition de choc à froid, à savoir, à une température inférieure à la température typique de fermentation (à savoir, à environ 35 ± 1 °C) pendant une courte période de temps au sein du processus de fermentation. Dans certains modes de réalisation, les compositions de BoNT/A sont obtenues dans des conditions de choc à froid d'environ 33 °C, 30 °C, 27 °C, 25 °C, 22 °C, 20 °C, 19 °C, 18 °C, 17 °C, 16 °C ou 15 °C. Les conditions de choc à froid peuvent durer pendant toute période de temps au sein du processus de fermentation entier, par exemple pendant

environ 2 heures, 5 heures, 8 heures, ou 10 heures dans un processus de fermentation de 72 heures. Les conditions de choc à froid peuvent se produire une fois ou plusieurs fois lors du processus de fermentation. Dans certains modes de réalisation, les compositions de BoNT/A décrites ici sont obtenues en utilisant un choc à froid d'environ 15 °C à 20 °C (*par exemple*, environ 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, ou 20 °C) pendant environ 5 heures (*par exemple*, de la 13^e à la 17^e heure dans un processus de fermentation de 72 heures) pendant la fermentation.

[0087] Dans certains modes de réalisation, les compositions de BoNT/A décrites ici sont obtenues sous une condition froide continue, à *savoir*, à une température inférieure en continu (*par exemple*, environ 25 °C) que la température typique de fermentation (à *savoir*, à environ 35 ± 1 °C) pendant toute la durée de fermentation. Dans certains modes de réalisation, les compositions de BoNT/A sont obtenues sous une condition froide continue à environ 33 °C, 30 °C, 27 °C, 25 °C, 22 °C, 20 °C, 19 °C, 18 °C, 17 °C, 16 °C, ou 15 °C. Dans certains modes de réalisation, les compositions de BoNT/A décrites ici sont obtenues par fermentation d'une culture de *Clostridium botulinum* à environ 25 °C pendant environ 160 heures.

[0088] Selon un aspect, la présente invention a pour objet un procédé de production d'une composition comprenant un complexe de BoNT/A de 900 kDa (tel que l'onabotulinumtoxinA), ledit procédé comprenant l'incubation d'une culture de bactéries de *Clostridium botulinum* (*par exemple*, bactéries de souche Hall de *Clostridium botulinum* de type A) dans un fermenteur de production à une température qui est inférieure à 35 °C pendant une période de temps.

[0089] Dans certains modes de réalisation, la totalité de la période de fermentation est d'environ 60 heures à environ 200 heures. Dans certains modes de réalisation, la totalité de la période de fermentation est d'environ 60 heures à environ 160 heures. Dans certains modes de réalisation, la totalité de la période de fermentation est d'environ 60 heures à environ 120 heures. Dans certains modes de réalisation, la totalité de la période de fermentation est d'environ 60 heures à environ 80 heures. Dans certains modes de réalisation, la totalité de la période de fermentation est d'environ 68 heures à environ 76 heures. Dans certains modes de réalisation, la totalité de la période de fermentation est d'environ 65 heures à environ 72 heures. Dans certains modes de réalisation, la totalité de la période de fermentation est d'environ 72 heures. Dans certains modes de réalisation, la totalité de la période de fermentation est d'environ 120 heures à environ 200 heures. Dans certains modes de réalisation, la totalité de la période de fermentation est d'environ 120 heures à environ 180 heures. Dans certains modes de réalisation, la totalité de la période de fermentation est d'environ 140 heures à environ 180 heures. Dans certains modes de réa-

lisation, la totalité de la période de fermentation est d'environ 160 heures.

- [0090] Dans certains modes de réalisation, la période de temps (pour une incubation basse température) est d'environ 2 heures. Dans certains modes de réalisation, la période de temps est d'environ 5 heures. Dans certains modes de réalisation, la période de temps est d'environ 8 heures. Dans certains modes de réalisation, la période de temps est d'environ 10 heures. Dans certains modes de réalisation, la période de temps est d'environ 2 à 5 heures. Dans certains modes de réalisation, la période de temps est d'environ 5 à 8 heures. Dans certains modes de réalisation, la période de temps est d'environ 8 à 10 heures. Dans certains modes de réalisation, la période de temps est la période de fermentation entière.
- [0091] Dans certains modes de réalisation, la température est d'environ 33 °C, 32 °C, 31 °C, 30 °C, 29 °C, 28 °C, 27 °C, 26 °C, 25 °C, 24 °C, 23 °C, 22 °C, 21 °C, 20 °C, 19 °C, 18 °C, 17 °C, 16 °C, ou 15 °C. Dans certains modes de réalisation, la température est d'environ 15 °C à 20 °C (*par exemple*, environ 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, ou 20 °C). Dans certains modes de réalisation, la température est d'environ 15 °C. Dans certains modes de réalisation, la température est d'environ 20 °C. Dans certains modes de réalisation, la température est d'environ 25 °C.
- [0092] Dans certains modes de réalisation, le procédé comprend, dans l'ordre suivant : (a) l'incubation de la culture de bactéries de *Clostridium botulinum* dans le fermenteur de production à 35 °C pendant environ 12 heures ; (b) le réglage de la température à environ 15 °C -20 °C (*par exemple*, environ 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, ou 20 °C) à la fin de l'étape (a) ; (c) la culture à la température réglée jusqu'à environ 5 heures après l'étape (a) ; (d) le réglage de la température à 35 °C à la fin de l'étape (c) ; et (e) la culture à 35 °C jusqu'à environ 55 heures après l'étape (c).
- [0093] Dans certains modes de réalisation, le procédé comprend l'incubation de la culture de bactéries de *Clostridium botulinum* dans le fermenteur de production à 25 °C pendant environ 160 heures.
- [0094] Dans certains modes de réalisation, le procédé est mis en œuvre comme décrit dans l'exemple 1.
- [0095] Dans certains modes de réalisation, les compositions de BoNT/A décrites ici sont obtenues en présence de CO₂ dans le recouvrement de l'espace de tête pendant le processus de fermentation, *par exemple*, en présence de CO₂ à une concentration d'environ 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % dans le recouvrement d'espace de tête, ou environ 1 %-10 %, 10 %-20 %, 20 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 %, ou 90 %-100 % dans le recouvrement de l'espace de

tête. Le recouvrement d'espace de tête peut également comporter N₂. Par exemple, les compositions de BoNT/A décrites ici peuvent être obtenues en présence, par exemple, sans limitation, d'environ 1 % CO₂ avec 99 % N₂, 2 % CO₂ avec 98 % N₂, 5 % CO₂ avec 95 % N₂, 10 % CO₂ avec 90 % N₂, 15 % CO₂ avec 85 % N₂, 20 % CO₂ avec 80 % N₂, 25 % CO₂ avec 75 % N₂, 30 % CO₂ avec 70 % N₂, 35 % CO₂ avec 65 % N₂, 40 % CO₂ avec 60 % N₂, 45 % CO₂ avec 55 % N₂, 55 % CO₂ avec 45 % N₂, 60 % CO₂ avec 40 % N₂, 65 % CO₂ avec 35 % N₂, 70 % CO₂ avec 30 % N₂, 75 % CO₂ avec 25 % N₂, 80 % CO₂ avec 20 % N₂, 85 % CO₂ avec 15 % N₂, 90 % CO₂ avec 10 % N₂, 95 % CO₂ avec 5 % N₂, ou 100 % CO₂ dans le recouvrement d'espace de tête pendant le processus de fermentation, ou environ 1 %-10 %, 10 %-20 %, 20 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 %, ou 90 %-99 % CO₂ dans le recouvrement de l'espace de tête lors du processus de fermentation avec le reste du recouvrement de l'espace de tête étant N₂.

- [0096] Selon un aspect, la présente invention a pour objet un procédé de production d'une composition comprenant un complexe de BoNT/A de 900 kDa (tel que l'onobotulinumtoxinA), ledit procédé comprenant l'incubation d'une culture de bactéries de *Clostridium botulinum* (par exemple, bactéries de souche Hall de *Clostridium botulinum* de type A) dans un fermenteur de production en présence de CO₂ (et éventuellement N₂) dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur au cours du processus de fermentation. Dans certains modes de réalisation, le recouvrement d'espace de tête de fermenteur comprend environ 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, ou 100 % de CO₂. Dans certains modes de réalisation, le recouvrement d'espace de tête de fermenteur comprend environ 1 %-10 %, 10 %-20 %, 20 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 %, ou 90 %-100 % de CO₂. Dans certains modes de réalisation, le recouvrement d'espace de tête de fermenteur comprend environ 1 % CO₂ et 99 % N₂, 2 % CO₂ et 98 % N₂, 5 % CO₂ et 95 % N₂, 10 % CO₂ et 90 % N₂, 15 % CO₂ et 85 % N₂, 20 % CO₂ et 80 % N₂, 25 % CO₂ et 75 % N₂, 30 % CO₂ et 70 % N₂, 35 % CO₂ et 65 % N₂, 40 % CO₂ et 60 % N₂, 45 % CO₂ et 55 % N₂, 55 % CO₂ et 45 % N₂, 60 % CO₂ et 40 % N₂, 65 % CO₂ et 35 % N₂, 70 % CO₂ et 30 % N₂, 75 % CO₂ et 25 % N₂, 80 % CO₂ et 20 % N₂, 85 % CO₂ et 15 % N₂, 90 % CO₂ et 10 % N₂, 95 % CO₂ et 5 % N₂, ou 100 % CO₂. Dans certains modes de réalisation, le recouvrement d'espace de tête de fermenteur comprend environ 1 %-10 %, 10 %-20 %, 20 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 %, ou 90 %-99 % de CO₂ avec le reste du recouvrement de l'espace de tête étant N₂.

- [0097] Dans certains modes de réalisation, le procédé comprend l'incubation de la culture de bactéries de *Clostridium botulinum* (*par exemple*, bactéries de souche Hall de *Clostridium botulinum* de type A) dans le fermenteur de production en présence de 25 % de CO₂ (et éventuellement 75 % N₂) dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur au cours du processus de fermentation. Dans des modes de réalisation spécifiques, le procédé comprend l'incubation de la culture de bactéries de *Clostridium botulinum* (*par exemple*, bactéries de souche Hall de *Clostridium botulinum* de type A) dans le fermenteur de production en présence de 25 % de CO₂ et 75 % N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
- [0098] Dans certains modes de réalisation, le procédé comprend l'incubation de la culture de bactéries de *Clostridium botulinum* (*par exemple*, bactéries de souche Hall de *Clostridium botulinum* de type A) dans le fermenteur de production en présence de 50 % de CO₂ (et éventuellement 50 % N₂) dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur au cours du processus de fermentation. Dans des modes de réalisation spécifiques, le procédé comprend l'incubation de la culture de bactéries de *Clostridium botulinum* (*par exemple*, bactéries de souche Hall de *Clostridium botulinum* de type A) dans le fermenteur de production en présence de 50 % de CO₂ et 50 % N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur au cours du processus de fermentation.
- [0099] Dans certains modes de réalisation, le procédé comprend l'incubation de la culture de bactéries de *Clostridium botulinum* (*par exemple*, bactéries de souche Hall de *Clostridium botulinum* de type A) dans le fermenteur de production en présence de 75 % de CO₂ (et éventuellement 25 % N₂) dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur au cours du processus de fermentation. Dans des modes de réalisation spécifiques, le procédé comprend l'incubation de la culture de bactéries de *Clostridium botulinum* (*par exemple*, bactéries de souche Hall de *Clostridium botulinum* de type A) dans le fermenteur de production en présence de 75 % de CO₂ et 25 % N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
- [0100] Dans certains modes de réalisation, le procédé comprend l'incubation de la culture de bactéries de *Clostridium botulinum* (*par exemple*, bactéries de souche Hall de *Clostridium botulinum* de type A) dans le fermenteur de production en présence de 100 % de CO₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur au cours du processus de fermentation.
- [0101] Dans certains modes de réalisation, le procédé est mis en œuvre comme décrit dans l'exemple 1.
- [0102] Dans divers aspects et modes de réalisation, la fermentation est effectuée dans des milieux de culture cellulaire exempts de protéines d'origine animale.
- [0103] Un système et un procédé chromatographiques exempts de produit d'origine animale ou sensiblement exempts de produit d'origine animale peuvent être utilisés pour

purifier une culture clarifiée de *Clostridium botulinum* obtenue à partir des procédés de fermentation APF décrits ici. Le système et le procédé chromatographiques peuvent comprendre une colonne, deux colonnes ou trois colonnes. Par exemple, le système et le procédé chromatographiques peuvent comprendre une, deux ou trois étapes : une chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC), et/ou une chromatographie d'échange d'anions (AEX), et/ou un chromatographe d'échange de cations. Dans certains modes de réalisation, le procédé chromatographique comprend une première étape consistant à soumettre la culture de BoNT/A obtenue à partir du processus APF à un HIC, suivie d'une soumission d'un éluant contenant une BoNT/A à partir du HIC à un AEX, puis suivie d'une soumission de la solution capturée contenant la BoNT/A de l'AAEX à un CEX. Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification par chromatographie comprend en outre le traitement de l'éluant provenant des colonnes par diafiltration (DF) et le filtrage de l'éluant traité. Dans certains modes de réalisation, le processus de purification par chromatographie est tel que décrit dans le brevet U.S. No. 8 129 139.

- [0104] Le complexe de BoNT/A obtenu à partir des procédés de fermentation et de purification APF décrits ici est biologiquement actif et hautement purifié. Dans un mode de réalisation, les compositions de BoNT/A décrites ici comprennent moins de 3 % (*par exemple* moins d'environ 2,5 %, moins d'environ 2,0 %, moins d'environ 1,8 %, moins d'environ 1,5 %, moins d'environ 1,2 %, moins d'environ 1,0 %, moins d'environ 0,8 %, moins d'environ 0,6 %, moins d'environ 0,5 %, moins d'environ 0,4 %, moins d'environ 0,3 %, moins d'environ 0,2 % ou moins d'environ 0,1 %) de la protéine de cellule hôte. Le taux de la protéine de la cellule hôte peut être évalué en utilisant des procédés connus dans la technique, *par exemple* en utilisant la chromatographie liquide haute Performance d'exclusion de taille (SEC-HPLC) ou la SEC-HPLC en conjugaison avec la diffusion de lumière laser à angles multiples (MALLS) comme décrit dans Lietzow *et al.* (2008) *Protéine J* 27:420-425. Dans un mode de réalisation, le pourcentage de la protéine de cellule hôte dans les compositions de BoNT/A décrites ici est déterminé en utilisant la SEC-HPLC.
- [0105] Dans divers aspects et modes de réalisation, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit par une souche de Type A de *Clostridium botulinum* (*par exemple*, la souche Hall de Type A de *Clostridium botulinum*). Dans des modes de réalisation spécifiques, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est l'onabotulinumtoxine A.
- [0106] Dans divers aspects et modes de réalisation, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit comme décrit dans l'exemple 5, l'exemple 6 ou l'exemple 7.
- [0107] Dans divers aspects et modes de réalisation, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit en utilisant une ou plusieurs étapes telles que décrites dans l'exemple 5, l'exemple 6 ou l'exemple 7.

- [0108] Dans divers aspects et modes de réalisation, le complexe de BNT/A de 900 kDa est produit par un procédé qui comprend une ou plusieurs étapes de chromatographie sur colonne réalisée lors de la purification des complexes de BoNT/A de 900 kDa.
- [0109] Dans des modes de réalisation préférés, les une ou plusieurs étapes de chromatographie sur colonne réalisées lors de la purification des complexes de BoNT/A de 900 kDa comprennent une chromatographie d'interaction hydrophobe. Dans des modes de réalisation particuliers, les une ou plusieurs étapes de chromatographie sur colonne comprennent une chromatographie d'échange d'anions. Dans des modes de réalisation spécifiques, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent une chromatographie d'échange de cations.
- [0110] Dans des modes de réalisation spécifiques, les une ou plusieurs étapes de chromatographie sur colonne réalisées lors de la purification des complexes de BoNT/A de 900 kDa comprennent la chromatographie d'interaction hydrophobe et la chromatographie d'échange d'anions. Dans un mode de réalisation spécifique, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent, dans l'ordre suivant, la chromatographie d'interaction hydrophobe et la chromatographie d'échange d'anions. Dans un mode de réalisation spécifique, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent, dans l'ordre suivant, la chromatographie d'échange d'anions et la chromatographie d'interaction hydrophobe.
- [0111] Dans des modes de réalisation particuliers, les une ou plusieurs étapes de chromatographie sur colonne mises en œuvre lors de la purification des complexes de BoNT/A de 900 kDa comprennent une chromatographie d'interaction hydrophobe et une chromatographie d'échange de cations. Dans un mode de réalisation spécifique, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent, dans l'ordre suivant, la chromatographie d'interaction hydrophobe et la chromatographie d'échange de cations. Dans un mode de réalisation spécifique, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent, dans l'ordre suivant, la chromatographie d'échange de cations et la chromatographie d'interaction hydrophobe.
- [0112] Dans des modes de réalisation particuliers, les une ou plusieurs étapes de chromatographie sur colonne mises en œuvre lors de la purification des complexes de BoNT/A de 900 kDa comprennent une chromatographie d'échange d'anions et une chromatographie d'échange de cations. Dans un mode de réalisation spécifique, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent, dans l'ordre suivant, la chromatographie d'échange d'anions et la chromatographie d'échange de cations. Dans un mode de réalisation spécifique, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent, dans l'ordre suivant, la chromatographie d'échange de cations et la chromatographie d'échange d'anions.
- [0113] Dans des modes de réalisation spécifiques, la ou les étapes de chromatographie sur

colonne comprennent une chromatographie d'interaction hydrophobe, une chromatographie d'échange d'anions, et une chromatographie d'échange de cations. Dans un mode de réalisation préféré, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent, dans l'ordre suivant, une chromatographie d'interaction hydrophobe, une chromatographie d'échange d'anions, et une chromatographie d'échange de cations. Dans un mode de réalisation spécifique, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent, dans l'ordre suivant, une chromatographie d'interaction hydrophobe, une chromatographie d'échange de cations et une chromatographie d'échange d'anions. Dans un mode de réalisation spécifique, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent, dans l'ordre suivant, une chromatographie d'échange d'anions, une chromatographie d'échange de cations et une chromatographie d'interaction hydrophobe. Dans un mode de réalisation spécifique, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent, dans l'ordre suivant, la chromatographie d'échange d'anions, la chromatographie d'interaction hydrophobe, et la chromatographie d'échange de cations. Dans un mode de réalisation spécifique, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent, dans l'ordre suivant, une chromatographie d'échange de cations, une chromatographie d'échange d'anions et une chromatographie d'interaction hydrophobe. Dans un mode de réalisation spécifique, la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent, dans l'ordre suivant, la chromatographie d'échange de cations, la chromatographie d'interaction hydrophobe et la chromatographie d'échange d'anions.

[0114] Dans divers aspects et modes de réalisation, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit par un procédé ne comprenant pas d'étape de précipitation avec de l'éthanol froid, de l'acide chlorhydrique ou du sulfate d'ammoniac. Dans des modes de réalisation spécifiques, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé ne comprenant pas d'étape de précipitation avec de l'éthanol froid. Dans des modes de réalisation spécifiques, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé ne comprenant pas d'étape de précipitation avec de l'acide chlorhydrique. Dans des modes de réalisation spécifiques, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé ne comprenant pas d'étape de précipitation avec le sulfate d'ammoniac.

[0115] Dans divers aspects et modes de réalisation, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé qui comprend les étapes suivantes : soumission de la culture de fermentation à une précipitation acide en utilisant de l'acide sulfurique 3M pour réduire le pH à 3,5 à une température inférieure à 25 °C, soumission du précipité acide à une filtration à flux tangential (*par exemple*, une filtration à flux tangential de 0,1 µm) pour concentrer la masse cellulaire, ajustement du pH à environ 6,0, ajout d'une ou plusieurs nucléases pour réduire la teneur en acide nucléique de cellule hôte,

clarification par centrifugation pour éliminer les débris cellulaires, et filtration à 0,2 µm avec du sulfate d'ammonium ajouté.

- [0116] Dans divers aspects et modes de réalisation, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé qui comprend une ou plusieurs des étapes suivantes : soumission de la culture de fermentation à une précipitation acide en utilisant de l'acide sulfurique 3M pour réduire le pH à 3,5 à une température inférieure à 25 °C, soumission du précipité acide à une filtration à flux tangentiel (*par exemple*, une filtration à flux tangentiel de 0,1 µm) pour concentrer la masse cellulaire, ajustement du pH à environ 6,0, ajout d'une ou plusieurs nucléases pour réduire la teneur en acide nucléique de cellule hôte, clarification par centrifugation pour éliminer les débris cellulaires, et filtration à 0,2 µm avec du sulfate d'ammonium ajouté.
- [0117] Dans divers aspects et modes de réalisation, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé qui comprend les étapes suivantes et dans l'ordre suivant : soumission de la culture de fermentation à une précipitation acide en utilisant de l'acide sulfurique 3M pour réduire le pH à 3,5 à une température inférieure à 25 °C, soumission du précipité acide à une filtration à flux tangentiel (*par exemple*, une filtration à flux tangentiel de 0,1 µm) pour concentrer la masse cellulaire, ajustement du pH à environ 6,0, ajout d'une ou plusieurs nucléases pour réduire la teneur en acide nucléique de cellule hôte, clarification par centrifugation pour éliminer les débris cellulaires, et filtration à 0,2 µm avec du sulfate d'ammonium ajouté.
- [0118] Dans divers aspects et modes de réalisation, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé qui comprend les étapes suivantes : soumission de la culture de fermentation à une précipitation acide en utilisant de l'acide sulfurique 3M pour réduire le pH à 3,5 à une température inférieure à 25 °C, soumission du précipité acide à une filtration à flux tangentiel (*par exemple*, une filtration à flux tangentiel de 0,1 µm) pour concentrer la masse cellulaire, l'ajustement du pH à environ 6,0, ajout d'une ou plusieurs nucléases pour réduire la teneur en acide nucléique de cellule hôte, clarification par centrifugation pour éliminer les débris cellulaires, filtration à 0,2 µm avec du sulfate d'ammonium ajouté et soumission du filtrat à une chromatographie d'interaction hydrophobe (éventuellement suivie d'une chromatographie d'échange d'anions et d'une chromatographie d'échange de cations).
- [0119] Dans divers aspects et modes de réalisation, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé qui comprend une ou plusieurs des étapes suivantes : soumission de la culture de fermentation à une précipitation acide en utilisant de l'acide sulfurique 3M pour réduire le pH à 3,5 à une température inférieure à 25 °C, soumission du précipité acide à une filtration à flux tangentiel (*par exemple*, une filtration à flux tangentiel de 0,1 µm) pour concentrer la masse cellulaire, ajustement du pH à environ 6,0, ajout d'une ou plusieurs nucléases pour réduire la teneur en acide

nucléique de cellule hôte, clarification par centrifugation pour éliminer les débris cellulaires, filtration à 0,2 µm avec du sulfate d'ammonium ajouté et soumission du filtrat à une chromatographie d'interaction hydrophobe (éventuellement suivie d'une chromatographie d'échange d'anions et d'une chromatographie d'échange de cations).

[0120] Dans divers aspects et modes de réalisation, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé qui comprend les étapes suivantes et dans l'ordre suivant : soumission de la culture de fermentation à une précipitation acide en utilisant de l'acide sulfurique 3M pour réduire le pH à 3,5 à une température inférieure à 25 °C, soumission du précipité acide à une filtration à flux tangentiel (*par exemple*, une filtration à flux tangentiel de 0,1 µm) pour concentrer la masse cellulaire, ajustement du pH à environ 6,0, ajout d'une ou plusieurs nucléases pour réduire la teneur en acide nucléique de cellule hôte, clarification par centrifugation pour éliminer les débris cellulaires, filtration à 0,2 µm avec du sulfate d'ammonium ajouté et soumission du filtrat à une chromatographie d'interaction hydrophobe (éventuellement suivie d'une chromatographie d'échange d'anions et d'une chromatographie d'échange de cations).

[0121] Dans divers aspects et modes de réalisation, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé qui comprend les étapes suivantes : soumission de la culture de fermentation à une précipitation acide en utilisant de l'acide sulfurique 3M pour réduire le pH à 3,5 à une température inférieure à 25 °C, soumission du précipité acide à une filtration à flux tangentiel (*par exemple*, une filtration à flux tangentiel de 0,1 µm) pour concentrer la masse cellulaire, ajustement du pH à environ 6,0, ajout d'une ou plusieurs nucléases pour réduire la teneur en acide nucléique de cellule hôte, filtration à 0,2 µm avec du sulfate d'ammonium ajouté, chargement du filtrat sur une colonne d'interaction hydrophobe, élution avec un gradient descendant de sulfate d'ammonium et isolation du pic de produit (éventuellement suivie d'une chromatographie d'échange d'anions et d'une chromatographie d'échange de cations).

[0122] Dans divers aspects et modes de réalisation, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé qui comprend une ou plusieurs des étapes suivantes : soumission de la culture de fermentation à une précipitation acide en utilisant de l'acide sulfurique 3M pour réduire le pH à 3,5 à une température inférieure à 25 °C, soumission du précipité acide à une filtration à flux tangentiel (*par exemple*, une filtration à flux tangentiel de 0,1 µm) pour concentrer la masse cellulaire, ajustement du pH à environ 6,0, ajout d'une ou plusieurs nucléases pour réduire la teneur en acide nucléique de cellule hôte, clarification par centrifugation pour éliminer les débris cellulaires, filtration à 0,2 µm avec du sulfate d'ammonium ajouté, chargement du filtrat sur une colonne d'interaction hydrophobe, élution avec un gradient descendant de sulfate d'ammonium, et isolation du pic de produit (éventuellement suivie d'une chromatographie d'échange d'anions et d'une chromatographie d'échange de cations).

- [0123] Dans divers aspects et modes de réalisation, les complexes de BoNT/A de 900 kDa sont produits par un procédé qui comprend les étapes suivantes et dans l'ordre suivant : soumission de la culture de fermentation à une précipitation acide en utilisant de l'acide sulfurique 3M pour réduire le pH à 3,5 à une température inférieure à 25 °C, soumission du précipité acide à une filtration à flux tangentiel (*par exemple*, une filtration à flux tangentiel de 0,1 µm) pour concentrer la masse cellulaire, ajustement du pH à environ 6,0, ajout d'une ou plusieurs nucléases pour réduire la teneur en acide nucléique de cellule hôte, clarification par centrifugation pour éliminer les débris cellulaires, filtration à 0,2 µm avec du sulfate d'ammonium ajouté, chargement du filtrat sur une colonne d'interaction hydrophobe, élution avec un gradient descendant de sulfate d'ammonium et isolation du pic de produit (éventuellement suivie d'une chromatographie d'échange d'anions et d'une chromatographie d'échange de cations).
- [0124] Dans certains modes de réalisation, le complexe de BoNT/A est produit par des bactéries de *Clostridium botulinum* cultivées et développées à partir d'une banque de cellules actives exemptes de produit d'origine animale.
- [0125] Dans divers aspects et modes de réalisation, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit par un procédé qui n'implique pas l'utilisation d'un inhibiteur de protéase. Dans certains modes de réalisation, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit par un procédé ne faisant pas intervenir le chlorhydrate de benzamidine.
- [0126] Après stabilisation dans une solution appropriée, la substance médicamenteuse BoNT/A en vrac peut être mélangée à un ou plusieurs excipients (*par exemple*, l'albumine sérique humaine, telle que l'albumine sérique humaine recombinante, et le chlorure de sodium) et peut ensuite être filtrée stérile pour fabriquer une composition pharmaceutique appropriée pour une administration à un humain. Un exemple d'une telle BoNT/A est l'onabotulinumtoxinA. Les compositions pharmaceutiques peuvent être réalisées sous forme solide (*par exemple*, en poudre) par séchage (*par exemple*, séchage sous vide ou lyophilisation). Des compositions pharmaceutiques solides peuvent être stockées et reconstituées avant injection. La composition pharmaceutique peut également être sous forme liquide (*par exemple*, en tant que solution). Des compositions pharmaceutiques liquides peuvent être stockées et utilisées directement pour l'injection. Les compositions pharmaceutiques de BoNT/A décrites ici peuvent comprendre un complexe de neurotoxine de *Clostridium botulinum* de sérotype A (BoNT/A) de 900 kDa en tant que principe actif pharmaceutique. La composition pharmaceutique peut également comporter un ou plusieurs excipients, tampons, supports, stabilisants, agents de conservation et/ou agents de remplissage. De telles compositions pharmaceutiques sont de préférence stables chimiquement et physiquement de sorte que le principe pharmaceutique actif BoNT/A reste adapté à une utilisation en tant que produit pharmaceutique à la suite du stockage. Les produits de BoNT/A peuvent être

stockés à température ambiante, dans des conditions réfrigérées, ou inférieures à 0 °C. Il est préférable que la BoNT/A reste stable lors du stockage pendant au moins environ 12 mois, plus préférentiellement au moins environ 18 mois.

- [0127] Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici est exempte de produit d'origine animale. Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici ne contient pas d'inhibiteur de protéase. Dans certains modes de réalisation, la composition décrite ici ne contient pas de chlorhydrate de benzamidine. Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici est produite par un procédé qui n'implique pas l'utilisation d'un inhibiteur de protéase. Dans certains modes de réalisation, la composition décrite ici est produite par un procédé qui n'implique pas l'utilisation de chlorhydrate de benzamidine. Dans divers aspects et modes de réalisation, le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit par des bactéries de *Clostridium botulinum* cultivées et développées à partir d'une banque de cellules actives exemptes de produit d'origine animale. La banque de cellules actives exemptes de produit d'origine animale peut être produite, par exemple et sans limitation, comme décrit dans l'exemple 6.
- [0128] Dans certains modes de réalisation, une composition exempte de produit d'origine animale est exempte d'albumine sérique humaine dérivée humaine (HSA). Dans certains modes de réalisation, une composition exempte de produit d'origine animale est exempte de nucléases dérivées animales. Dans certains modes de réalisation, une composition exempte de produit d'origine animale comprend une HSA produite de manière recombinante. Dans certains modes de réalisation, la HSA produite de manière recombinante est disponible dans le commerce ou connue dans la technique. Dans certains modes de réalisation, une composition exempte de produit d'origine animale est exempte de sulfate d'ammonium. Dans certains modes de réalisation, une composition exempte de produit d'origine animale comprend une résine de chromatographie.
- [0129] Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici comprend en outre de l'albumine sérique humaine (HSA). Dans certains modes de réalisation, la composition comprend environ 0,5 mg de HSA pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa. Dans certains modes de réalisation, la HSA est une HSA recombinante. Dans des modes de réalisation spécifiques, la HSA recombinante est exempte de produit d'origine animale. Dans des modes de réalisation spécifiques, la HSA recombinante n'est pas produite à partir d'un animal. Dans des modes de réalisation particuliers, la HSA recombinante est produite à partir d'un microorganisme, tel que des bactéries. Dans des modes de réalisation particuliers, la HSA recombinante est produite à partir d'un système d'expression à base de plantes. Dans certains modes de réalisation, la HSA est dérivée du plasma humain.

- [0130] Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici comprend en outre du chlorure de sodium. Dans certains modes de réalisation, la composition comprend environ 0,9 mg de chlorure de sodium pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa.
- [0131] Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici comprend environ 50 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa. Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici comprend environ 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa. Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici comprend environ 200 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa.
- [0132] Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici est une composition liquide. Dans divers aspects et modes de réalisation, la composition décrite ici est une composition solide. Dans certains modes de réalisation, la composition décrite ici est une composition séchée sous vide. Dans certains modes de réalisation, la composition décrite ici est une composition lyophilisée. Dans certains modes de réalisation, la composition décrite ici est une composition pharmaceutique en poudre. Dans des modes de réalisation spécifiques, la composition décrite ici est un produit médicamenteux. Dans un mode de réalisation spécifique, la composition décrite ici est un produit médicamenteux et comprend en outre HSA (*par exemple*, environ 0,5 mg de HSA pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa) et chlorure de sodium (*par exemple*, environ 0,9 mg de chlorure de sodium pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa). Dans des modes de réalisation spécifiques, la composition décrite ici est une substance médicamenteuse. Dans un mode de réalisation spécifique, la composition décrite ici est une substance médicamenteuse dans une solution appropriée pour le stockage.
- [0133] Dans un aspect, il est prévu ici une composition de BoNT/A produite par une méthode ou un procédé décrit dans cette Section 5.4.

5.5. Caractérisation des compositions de BoNT/A

- [0134] Dans un mode de réalisation, les compositions de BoNT/A décrites ici ont une puissance d'au moins environ $1,5 \times 10^7$ unités/mg, au moins environ $2,0 \times 10^7$ unités/mg, par exemple, environ $1,5 \times 10^7$ à environ $6,0 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,0 \times 10^7$ à environ $6,0 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,4 \times 10^7$ à environ $6,0 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,4 \times 10^7$ à environ $5,9 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,4 \times 10^7$ à environ $5,8 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,4 \times 10^7$ à environ $5,7 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,4 \times 10^7$ à environ $5,6 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,4 \times 10^7$ à environ $5,5 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,4 \times 10^7$ à environ $5,4 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,5 \times 10^7$ à environ $6,0 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,6 \times 10^7$ à environ $6,0 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,7 \times 10^7$ à environ $6,0 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,8 \times 10^7$ à

environ $6,0 \times 10^7$ unités/mg, environ $2,9 \times 10^7$ à environ $6,0 \times 10^7$ unités/mg, environ $3,0 \times 10^7$ à environ $6,0 \times 10^7$ unités/mg, ou tout nombre entre de telles plages.

[0135] Dans un mode de réalisation, les compositions de BoNT/A décrites ici ont une puissance d'environ $2,4 \times 10^7$ unités/mg à environ $5,4 \times 10^7$ unités/mg. Dans des modes de réalisation préférés, le terme « unité » utilisé ici désigne la dose LD₅₀.

[0136] Dans divers modes de réalisation et aspects, une composition de BoNT/A décrite ici a une puissance plus élevée qu'une composition de BoNT/A disponible dans le commerce qui est connue dans la technique. Dans certains modes de réalisation, une composition de BoNT/A décrite ici a une puissance qui est d'au moins 10 %, au moins 20 %, au moins 30 %, au moins 40 %, au moins 50 %, au moins 60 %, au moins 70 %, au moins 80 %, au moins 90 %, au moins 100 %, au moins 1,5 fois, ou au moins 2 fois supérieure à la puissance d'une composition de BoNT/A disponible dans le commerce qui est connue dans la technique. Dans certains modes de réalisation, une composition de BoNT/A décrite ici a une puissance qui est d'au moins $0,1 \times 10^7$ unités/mg, au moins $0,2 \times 10^7$ unités/mg, au moins $0,3 \times 10^7$ unités/mg, au moins $0,4 \times 10^7$ unités/mg, au moins $0,5 \times 10^7$ unités/mg, au moins $0,6 \times 10^7$ unités/mg, au moins $0,7 \times 10^7$ unités/mg, au moins $0,8 \times 10^7$ unités/mg, au moins $0,9 \times 10^7$ unités/mg, au moins 1×10^7 unités/mg, au moins $1,5 \times 10^7$ unités/mg, au moins 2×10^7 unités/mg, au moins 3×10^7 unités/mg, ou au moins 4×10^7 unités/mg supérieure à la puissance d'une composition de BoNT/A disponible dans le commerce qui est connue dans la technique.

[0137] La puissance des compositions de BoNT/A décrites ici peut être déterminée avec des procédés connus dans la technique, y compris mais sans s'y limiter, *par exemple* un test de chromatographie liquide haute performance d'activité de chaîne légère (LCA-HPLC), test de dose létale de 50 % (MLD50) de souris, test d'abduction digitale de souris (DAS), dosage de SNAP-25, test de la puissance à base de cellules (CBPA), *etc.*

[0138] Le test LCA-HPLC mesure la spécificité de clivage SNAP-25. Des échantillons sont mis en réaction avec un substrat fluorescent de BoNT/A disponible dans le commerce dérivé de la séquence SNAP-25. Les produits de clivage marqués par fluorescence sont séparés et détectés par l'intermédiaire d'un procédé HPLC à phase inverse (RP)-HPLC. Une description supplémentaire de test de LCA-HPLC peut être trouvée dans les publications Hunt *et al.* (2010) *Toxins* 2(8):2198-2212 et Rupp *et al.* (2020) *Toxins* 12(6):393.

[0139] Dans un mode de réalisation, la puissance est déterminée en utilisant un test de dose létale de 50 % (MLD50) de souris. Le dosage de la dose létale de 50 % (MLD50) de souris a été décrit dans, *par exemple*, Schantz et Kautter (1978) *Journal of the AOAC* 61(1):96-99, Hunt et Kenneth (2009) *Neuropharmacologie clinique* 32(1):28-31, brevet U.S. No. 7 160 699, et brevet U.S. No. 9 725 705. Un test de la dose létale

de 50 % (MLD50) de souris est un procédé de mesure de la puissance d'une toxine botulique par injection intrapéritonéale de la toxine botulique chez des souris femelles (âgées d'environ quatre semaines) de 17 à 22 grammes chacune au début du test. Chaque souris est maintenue dans une position allongée avec sa tête inclinée vers le bas et reçoit par injection par voie intrapéritonéale dans l'abdomen droit inférieur à un angle d'environ 30 degrés à l'aide d'une aiguille de 25 à 27 jauge 3/8'' à 5/8'' avec une de plusieurs dilutions en série de la toxine botulique en solution saline. Les taux de décès sur les 72 heures qui suivent pour chaque dilution sont enregistrés. Les dilutions sont préparées de sorte que la dilution la plus concentrée produit un taux de décès d'au moins 80 % des souris injectées, et la dilution de moindre concentration produit un taux de décès n'excédant pas 20 % des souris injectées. Il doit y avoir un minimum de quatre dilutions qui tombent dans la plage décroissante monotone des taux de décès. La plage décroissante monotone commence avec un taux de décès de pas moins de 80 %. Au sein des quatre taux décroissants monotones ou plus, les deux plus grands et les deux plus petits taux doivent être décroissants (*à savoir*, non équivalents). La dilution à laquelle 50 % des souris meurent dans la période d'observation post-injection de trois jours est définie comme une dilution qui comprend une unité (1 U) de la toxine botulique.

[0140] Le test digital d'abduction de souris (DAS) est une évaluation *in vivo* de la paralysie musculaire induite par toxine à la suite de l'injection de toxine BoNT/A dans le muscle du membre arrière d'un rongeur. Le test DAS peut être utilisé pour évaluer la puissance de compositions de BoNT/A sur la paralysie musculaire, ainsi que la durée d'action. Des protocoles détaillés de test DAS ont été décrits dans Aoki *et al.* (1999) Eur. J. Neurol. 6:s3-s10, Aoki (2001) Toxicon 39: 1815-1820, Broide *et al.* (2013) Toxicon 71:18-24, et Rupp *et al.* (2020) Toxins 12(6):393. Par exemple, le test DAS peut être effectué par injection d'une composition de BoNT/A décrite ici dans le complexe gastrocnémien/soleus de souris, suivi d'une évaluation du Score d'abduction digital en utilisant la méthode de Aoki (2001) Toxicon 39: 1815-1820. Dans le test DAS, les souris sont suspendues brièvement par la queue pour entraîner une réponse de surprise caractéristique dans laquelle la souris étend ses membres postérieurs et abaisse ses doigts postérieurs. Après l'injection de composition de BoNT/A, les degrés d'abduction digitale variables sont notés sur une échelle à cinq points (0=normal à 4=réduction maximale dans l'abduction digitale et extension de jambe). Le rapport de sécurité, le rapport entre la quantité d'une toxine requise pour une chute de 10 % d'un poids corporel (mesuré à effet de pic dans les sept premiers jours après test dans une souris) et la quantité de toxine requise pour un score DAS de 2, peut également être déterminé pour évaluer l'indice thérapeutique de la composition de BoNT/A décrite ici, comme décrit dans le brevet U.S. No. 9 920 310. Les scores élevés

de rapport de sécurité sont donc souhaités, et indiquent une toxine qui est apte à paralyser efficacement un muscle cible avec peu d'effets hors cible non souhaités.

[0141] Le test SNAP-25 est une méthode basée sur ELISA pour mesurer l'activité protéolytique SNAP-25 de la toxine botulique. Le test utilise une protéine de SNAP-25 tronquée (le peptide de résidu d'acide aminé 206) lié à des plaques de microtitration de 96 puits de polystyrène et un anticorps monoclonal qui reconnaît le produit clivé (un peptide de résidu d'acide aminé 197) qui est fabriqué par hydrolyse enzymatique entre les acides aminés 197 et 198 du SNAP-25 par réduction de la toxine botulique de type A. L'anticorps monoclonal lié au produit clivé est ensuite détecté avec un anticorps secondaire (IgG de chèvre anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort HRP), qui produit un changement de couleur en présence d'un substrat chromogène (TMB). Des procédés de SNAP-25 donnés à titre d'exemple sont décrits dans Ekong *et al.* (1997) *Microbiology* 143:3337-3347 et brevet U.S. 7 160 699.

[0142] Un test de puissance à base de cellules (CBPA) a été décrit dans, *par exemple*, Fernández-Salas *et al.* (2012) PLOS ONE 7(11):e499516, Rupp *et al.* (2020) *Toxins* 12(6):393, WO 2010/105234 et WO 2009/114748. Dans un mode de réalisation, le CBPA à SNAP-25₁₉₇ SiMa H1 électrochimiluminescent (ECL) est utilisé pour déterminer la puissance des compositions de BoNT/A décrites ici. Le CBPA à SNAP-25₁₉₇ SiMa H1 électrochimiluminescent (ECL) est un test *in vitro* à base de cellules qui mesure les étapes clés de l'intoxication à la BoNT/A : liaison cellulaire médiée par récepteur et internalisation, translocation du domaine de protéase (chaîne légère) dans le cytosol, et clivage protéolytique de SNAP-25, permettant une comparaison directe de l'activité biologique du produit de l'activité de BoNT/A *in vitro* (Fernández-Salen *et al.* (2012) PLOS ONE 7(11):e49516 ; Rupp *et al.* (2020) *Toxins* 12(6):393). En bref, les cellules neuroblastome SiMa H1 humaine sont plaquées sur des plaques de 96 puits de type polyD-lysine (PDL) dans des milieux sans sérum (SFM) avec 25 µg/mL de GT_{1b} pendant trois jours et traités avec des échantillons de toxine pendant 24 heures. Après traitement, les toxines sont éliminées, les cellules sont lysées et les lysats sont transférés vers des plaques de liaison haute MSD revêtues d'un anticorps monoclonal anti-SNAP-25₁₉₇ (mAb) 2E2A6. Des plaques sont ensuite lavées et incubées avec un anticorps polyclonal de type SULFO-TAG NHS-Ester marqué anti-SNAP-25 (pAb) pour la détection. Le SNAP-25 clivé par toxine BoNT/A capturé est ensuite quantifié sur un lecteur de plaque MSD.

5.6. Modes de réalisation illustratifs

[0143] La présente description comporte les modes de réalisation illustratifs et non limitatifs suivants.

1. Composition comprenant un complexe de neurotoxine de Clostridium botulinum de sérotype A (BoNT/A) de 900 kDa, dans laquelle le complexe de

BoNT/A de 900 kDa comprend une BoNT/A de 150 kDa qui est sous la forme d'une pluralité d'espèces de variants de séquence, dans laquelle la pluralité d'espèces de variants de séquence comprend une espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée et une espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère pleine longueur, dans laquelle la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée a une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 4, et la chaîne légère pleine longueur a une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 2, et dans laquelle le rapport de l'abondance des espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée aux espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec la chaîne légère pleine longueur est inférieur à 3,9.

2. Composition comprenant un complexe de BoNT/A de 900 kDa, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa comprend une BoNT/A de 150 kDa qui est sous la forme d'une pluralité d'espèces de variants de séquence, dans laquelle la pluralité d'espèces de variants de séquence comprend une espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée, dans laquelle la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée a une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 4, et dans laquelle le pourcentage d'abondance des espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée dans la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa est inférieure à 79,5 %.
3. Composition selon le mode de réalisation 1, dans laquelle le rapport d'abondance est mesuré par chromatographie d'échange d'anions (AEX).
4. Composition selon le mode de réalisation 2, dans laquelle le pourcentage d'abondance est mesuré par AEX.
5. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 4, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit par des bactéries de *Clostridium botulinum* cultivées et développées à partir d'une banque de cellules actives exemptes de produit d'origine animale.
6. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 5, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit par une souche de Type A de *Clostridium botulinum*.
7. Composition selon le mode de réalisation 6, dans laquelle la souche de Type A de *Clostridium botulinum* est une souche Hall de Type A de *Clostridium botulinum*.

8. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 7, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa est une onabotulinumtoxine A.
9. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 8, qui comprend en outre de l'albumine sérique humaine.
10. Composition selon le mode de réalisation 9, qui comprend environ 0,5 mg d'albumine sérique humaine pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa.
11. Composition selon le mode de réalisation 9 ou 10, dans laquelle l'albumine sérique humaine est l'albumine sérique humaine recombinante.
12. Composition selon le mode de réalisation 9 ou 10, dans laquelle l'albumine sérique humaine est dérivée du plasma humain.
13. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 11, qui est exempte de produit d'origine animale.
14. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 12, qui comprend en outre du chlorure de sodium.
15. Composition selon le mode de réalisation 14, qui comprend environ 0,9 mg de chlorure de sodium pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa.
16. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 15, qui ne contient pas d'inhibiteur de protéase.
17. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 16, qui ne contient pas de chlorhydrate de benzamidine.
18. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 17, qui comprend environ 50 unités, environ 100 unités ou environ 200 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa.
19. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 18, qui a une puissance d'environ $1,5 \times 10^7$ unités/mg à environ $6,0 \times 10^7$ unités/mg.
20. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 19, qui est une composition pharmaceutique en poudre.
21. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 20, qui est séchée sous vide.
22. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 21, dans laquelle le complexe de BoNT/a de 900 kDa est produit par un procédé qui comprend une ou plusieurs étapes de chromatographie sur colonne.
23. Composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 22, dans laquelle la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent une chromatographie d'interaction hydrophobe.
24. La composition de la forme de réalisation 23, dans laquelle la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent en outre une chromatographie

- d'échange d'anions.
25. La composition du mode de réalisation 23 ou 24, dans laquelle la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent en outre une chromatographie d'échange de cations.
 26. Procédé de production d'une composition comprenant BoNT/A, ledit procédé comprenant l'incubation d'une culture de bactéries de *Clostridium botulinum* dans un fermenteur de production en présence de CO₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
 27. Procédé selon le mode de réalisation 26, dans lequel l'étape d'incubation est réalisée en présence de CO₂ et N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
 28. Procédé selon le mode de réalisation 27, dans lequel l'étape d'incubation est réalisée en présence de 25 % de CO₂ et 75 % de N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
 29. Procédé selon le mode de réalisation 27, dans lequel l'étape d'incubation est réalisée en présence de 50 % de CO₂ et de 50 % de N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
 30. Procédé selon le mode de réalisation 27, dans lequel l'étape d'incubation est réalisée en présence de 75 % de CO₂ et 25 % de N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
 31. Procédé selon le mode de réalisation 27, dans lequel l'étape d'incubation est réalisée en présence de 100 % de CO₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
 32. Procédé de traitement d'un patient qui en a besoin, comprenant l'administration d'une composition selon l'un quelconque des modes de réalisation 1 à 25.
 33. Procédé sensiblement tel que décrit ici.
 34. Composition sensiblement telle que décrite ici.

6. Exemples

[0144] Certains modes de réalisation fournis ici sont illustrés par les exemples non limitatifs suivants, qui décrivent différents procédés d'obtention de BoNT/A et démontrent que l'utilisation d'une température inférieure à la température de fermentation standard et l'augmentation de la concentration en CO₂ lors de la fermentation, peuvent toutes deux réduire le rapport de l'abondance d'une espèce de BoNT/A de 150 kDa ayant une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée à l'abondance des espèces de BoNT/A de 150 kDa ayant la chaîne légère pleine longueur

[0145] 6.1 Exemple 1 : Procédés et matériaux pour les exemples 2 à 3

[0146] 1. Étapes en amont

- [0147] A. Fermentation d'une souche Hall de *C. botulinum* de type A à débit continu (recouvrement) de rapport de pourcentage variable de CO₂:N₂ dans l'espace de tête.
- [0148] Des fermentations d'une souche Hall de *Clostridium botulinum* de type A ont été réalisées en milieu exempt de produit d'origine animale (APF) avec le débit continu (recouvrement) de différents rapports en pourcentage de CO₂:N₂ (comme décrit dans le tableau 2) pour examiner l'impact sur les attributs du complexe de neurotoxine *botulique* de type A (BoNT/A) produit dans ces conditions. L'étage amont comportait l'utilisation d'un milieu de culture de semences APF de 40 mL dans une bouteille en verre de 150 mL (avec un barreau magnétique d'agitation) (de 3,25 % p/v de peptone de soja de type II, de 1,2 % p/v d'extrait de levure, de 1,5 % p/v de glucose, pH ajusté à 7,3 à l'aide d'hydroxyde de sodium). Le milieu de culture de semences a été réduit pour éliminer l'oxygène (dans une chambre anaérobie de Bon Whitley Scientific A55) pendant un minimum de 48 heures avant utilisation. Le milieu de culture de semences a été inoculé avec 50 µL d'une banque de cellules actives de souche Hall de *C. botulinum* de sérotype A décongelée. La culture de semences a été incubée à 35 ± 1 °C avec une agitation de 150 tr/min dans la chambre anaérobie.
- [0149] Après une incubation de la culture de semences d'une nuit, la densité optique (à 600 nm) était de 8,04 lorsque 4 mL de culture ont été transférés vers un fermenteur de production (Ambr® 250 Modular, Sartorius Stedim) contenant 196 mL de milieu de fermentation APF réduit (3,25 % p/v de peptone de soja de type II, 1,2 % p/v d'extrait de levure, 1,5 % p/v de glucose, pH ajusté à 7,3 à l'aide d'hydroxyde de sodium). La température de fermentation a été contrôlée à 35 ± 0,5 °C. L'agitation est contrôlée à 150 tr/min. L'espace de tête de fermenteur a été recouvert à 50 mL/min de débit de gaz avec N₂ et un pourcentage croissant de CO₂ selon la conception expérimentale (tableau 2). Le pourcentage de N₂/CO₂ a été contrôlé par l'intermédiaire de contrôleurs de débit massique interne du système modulaire Ambr® 250. Le pH de fermentation et la croissance cellulaire ont été surveillés par une sonde de pH et un moniteur de réflectance en ligne, respectivement. Les trois phases de la fermentation de production comportent des phases de croissance exponentielle, stationnaire et autolyse. Le temps de fermentation est de 69 heures, qui assure la production d'une autolyse cellulaire, libérant la BoNT/A active dans le milieu de culture.

[0150] [Tableaux2]

Description	Condition*
Fermentation à 25 % de CO ₂	25 % de CO ₂ avec 75 % N ₂ en recouvrement d'espace de tête
Fermentation à 50 % de CO ₂	50 % de CO ₂ avec 50 % N ₂ en recouvrement d'espace de tête
Fermentation à 75 % de CO ₂	75 % de CO ₂ avec 25 % N ₂ en recouvrement d'espace de tête
Fermentation à 100 % de CO ₂	100 % de CO ₂ en recouvrement d'espace de tête

[0151] * Le milieu de fermentation réduit avec 100 % N₂ avant l'inoculation de fermenteur. Lors de l'inoculation du fermenteur avec la culture de semences, le recouvrement de l'espace de tête a été modifié pour inclure le pourcentage de CO₂ approprié répertorié dans ce tableau.

[0152] La phase de récolte a fait appel à la centrifugation suivie de 0,2 µm de filtration pour éliminer les débris cellulaires du bouillon de culture, qui contenait un complexe BoNT/A et d'autres protéines de cellule hôte. Les débris cellulaires ont été préalablement éliminés par centrifugation à 10 000 rcf pendant 30 minutes. Le surnageant clarifié a ensuite subi une filtration de 0,2 µm dans une armoire de sécurité biologique pour assurer que tout organisme de *C. botulinum* de type A et des débris cellulaires restants ont été éliminés. L'élimination complète de l'organisme a été confirmée (par placage d'une partie du filtrat de 0,2 µm sur des plaques d'agar sanguin Columbia réduites et incubation en conditions anaérobies pendant un temps suffisant pour vérifier l'absence de *C. botulinum* de type A viable) et le matériau de récolte clarifié a été stocké à 4 °C jusqu'au début de l'étage en aval.

[0153] B. Fermentations à basse température ou de choc à froid de souche Hall de *C. botulinum* de type A

[0154] Des fermentations d'une souche Hall de *Clostridium botulinum* de type A ont été réalisées en milieu exempt de produit d'origine animale (APF) dans différentes conditions de température (comme décrit dans le tableau 3) pour examiner l'effet sur des attributs de complexe de neurotoxine botulique de type A (BoNT/A) produit. L'étage amont comportait l'utilisation d'un milieu de culture de semences dans une bouteille en verre de 150 mL (avec un barreau magnétique d'agitation) contenant 50 mL de milieu APF (3,25 % p/v de peptone de soja de type II, 1,2 % p/v d'extrait de levure, 1,5 % p/v de glucose, pH ajusté à 7,3 à l'aide d'hydroxyde de sodium). Le milieu de culture de semences a été réduit pour éliminer l'oxygène (dans une chambre

anaérobie de Bon Whitley Scientific A55) pendant un minimum de 48 heures avant utilisation. Le milieu de culture de semences a été inoculé avec 50 µL d'une WCB de *C. botulinum* de type A décongelée. La culture de semences a été incubée à 35 ± 1 °C avec une agitation de 150 tr/min dans la chambre anaérobie.

- [0155] Après une incubation de la culture de semences d'une nuit, 4 mL de culture (OD_{600} nm $4,81 \pm 0,35$) ont été transférés vers un fermenteur de production (Ambr® 250 Modular, Sartorius Stedim) contenant 196 mL de milieu de fermentation APF réduit (3,25 % p/v de peptone de soja de type II, 1,2 % p/v d'extrait de levure, 1,5 % p/v de glucose, pH ajusté à 7,3 à l'aide d'hydroxyde de sodium). La température pour chaque fermentation a été contrôlée selon le tableau 3. Des réglages de température pour des fermentations de choc à froid ont été démarrés à la phase stationnaire précoce de la croissance cellulaire. Une durée de choc à froid de 5 heures a été mise en œuvre sur la base du temps attendu pour obtenir un changement de profil d'expression. L'agitation a été contrôlée à 150 tr/min et l'espace de tête de fermenteur a été recouvert avec N₂ à 50 mL/min pour maintenir un environnement anaérobie. Le pH de fermentation et la croissance cellulaire ont été surveillés par une sonde de pH et un moniteur de réflectance en ligne, respectivement. Les échantillons hors ligne ont été prélevés pour mesurer la densité cellulaire (OD_{600}) à la fin de la fermentation. Les trois phases de la fermentation de production comportent des phases de croissance exponentielle, stationnaire et autolyse. Les temps de fermentation ont été variés de 72 h à 160 h (Tableau 3) pour assurer une lyse cellulaire, qui a libéré le complexe de BoNT/A actif dans le milieu de culture.

[0156] [Tableaux3]

Description expérimentale	Condition de fermentation de production*	Temps de fermentation de production (heures)
Fermentation de témoin de référence	35 °C pendant toute la durée de fermentation	72
Choc à froid à 20 °C	35 °C de 0 à 12 h ; température réglée à 20 °C à 12 h ; culture à 20 °C jusqu'à 17 h, puis température réglée à 35 °C à 17 h ; culture à 35 °C jusqu'à 72 heures	72
Choc à froid à 15 °C	35 °C de 0 à 12 h ; température réglée à 15 °C à 12 h ; culture à 15 °C jusqu'à 17 h, puis température réglée à 35 °C à 17 h ; culture à 35 °C jusqu'à 72 heures.	72
Fermentation à 25 °C	25 °C pendant toute la durée de fermentation	160

[0157] * Le système Ambr® 250 modulaire peut contrôler la température à $\pm 0,5$ °C.

[0158] La phase de récolte du complexe BoNT/E a fait appel à la centrifugation suivie de 0,2 μm de filtration pour éliminer les débris cellulaires du bouillon de culture, qui contenait un complexe BoNT/A et d'autres protéines de cellule hôte. Les débris cellulaires ont été préalablement éliminés par centrifugation à 10 000 rcf pendant 30 minutes. Le surnageant clarifié a ensuite subi une filtration de 0,2 μm dans une armoire de sécurité biologique pour assurer que tout organisme de *C. botulinum* de type A et des débris cellulaires restants ont été éliminés. L'élimination complète de l'organisme a été confirmée (par placage d'une partie du filtrat de 0,2 μm sur des plaques d'agar sanguin Columbia réduites et incubation en conditions anaérobies pendant un temps suffisant pour vérifier l'absence de *C. botulinum* de type A viable) et le matériau de récolte clarifié a été stocké à 4 °C jusqu'au début de l'étape en aval.

[0159] 2. Étapes en aval

[0160] Les étapes en aval comportaient une concentration et un échange tampon à l'aide

d'une filtration à flux tangentiel (TFF), suivi d'une capture de la neurotoxine *botulique* sur une colonne d'échange d'anions, élution de la colonne et séparation ultérieure des impuretés par polissage sur une colonne d'échange de cations.

- [0161] Un système de filtration à flux tangentiel a été utilisé pour concentrer (par ultra-filtration-UF) et diafiltrer le matériau de récolte de fermentation clarifié en tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6,5. Des cassettes Repligen TangenX® SIUS-PD avec une membrane de coupure de poids moléculaire 100 kDa ont été utilisées pour les étapes de concentration et de diafiltration. L'étape UF/DF a concentré le matériau de récolte clarifié 3 à 4 fois puis diafiltré à l'aide d'un tampon de phosphate de sodium 50 mM, pH 6,5.
- [0162] Des caractéristiques du procédé d'ultrafiltration/diafiltration (UF/DF) utilisées sont les suivantes. L'unité UF/DF et membrane Repligen 100 kDa avec une zone de membrane de 0,02 m² a initialement été balayée avec un minimum de 0,2 L d'eau pour injection (WFI) pour éliminer la solution de stockage membranaire. Ensuite, le système membrane et UF/DF a été équilibré avec environ 0,2 L de tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6,5. Après équilibrage membranaire, le matériau de récolte de fermentation clarifié a été chargé sur la cassette de filtration à flux tangentiel TangenX® et concentré 3 à 4 fois à une plage de pression transmembranaire de 5 à 6 psig (jauge de livres par pouce carré) et débit réglé à 75 mL/min. Après l'étape de concentration, le regroupement de rétentat a été diafiltré contre un minimum de 5 volumes de diafiltration du tampon de phosphate de sodium 50 mM, pH 6,5 à une plage de pression transmembranaire de 5 à 8 psig et débit réglé à 75 mL/min. Après achèvement de la diafiltration, la pression a été libérée de la ligne de rétentat et la sortie de perméat a été fermée. Le matériau UF/DF a été ensuite remis en circulation pendant au moins 5 minutes et le système a été ensuite purgé suivi d'un rinçage avec du tampon phosphate de sodium à 50 mM, pH 6,5 lorsque le matériau UF/DF a été récupéré dans un récipient séparé.
- [0163] Le matériau récupéré (rétentat UF/DF) de l'étape UF/DF a ensuite été chargé sur une colonne de chromatographie d'échange d'anions garnie de résine POROS® 50HQ. La colonne présente un diamètre intérieur de 1,13 cm et une hauteur de colonne d'environ 5 cm. La totalité de la chromatographie sur colonne d'échange d'anions a été réalisée à température ambiante, et le flux était dans la direction descendante. Le complexe de neurotoxine *botulinum* de type A a été élué de la colonne d'échange d'anions en utilisant un changement d'étape de pH où les impuretés plus chargées négativement telles que les acides nucléiques (par exemple, les ADN et les ARN) et d'autres protéines de cellules hôtes restent liées à la colonne d'échange d'anions.
- [0164] Les caractéristiques de l'étape d'échange d'anions étaient : utilisation de la colonne POROS® 50HQ équilibrée avec un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6,5 (au

moins 5 volumes de colonne). Ensuite le rétentat UF/DF a été chargé à 120 cm/heure sur la colonne d'échange d'anions POROS® 50HQ, suivi d'un lavage avec au moins environ 10 volumes de colonnes de phosphate de sodium 50 mM, pH 6,5 à 120 cm/heure, suivi d'une élution avec 50 mM d'acétate de sodium, pH 4,5 à 120 cm/heure. La fraction de pic a été recueillie, lorsque l'absorbance à 280 nm (A280) a augmenté à au moins environ 0,05 AU et à travers le maximum de pic à égale ou inférieure à environ 0,03 AU sur le bord de fuite, dans un récipient avec 5 mL d'acétate de sodium à 50 mM, pH 4,8. Ce regroupement d'élution a été stocké à environ 2 °C à environ 8 °C jusqu'à 48 heures.

[0165] La deuxième étape de chromatographie dans le procédé aval a utilisé une résine de chromatographie d'échange de cations POROS® 20HS remplie dans une colonne avec un diamètre interne de 0,46 cm et une hauteur de colonne de 10,0 cm. Toute la chromatographie sur colonne POROS® 20HS a été effectuée à température ambiante, et le flux était dans la direction descendante. Le complexe de neurotoxine *botulinum* de type A se lie à la colonne POROS® 20HS à pH 4,8. Après les étapes de lavage pour éliminer les impuretés, le complexe de neurotoxine *botulique* de type A a ensuite été élué de la colonne avec une concentration accrue en NaCl. Les impuretés liées au produit ont été éluées avec la solution de tampon de lavage et de décontamination.

[0166] Les caractéristiques de l'étape d'échange de cations étaient : utilisation de la colonne POROS® 20HS équilibrée avec un tampon acétate de sodium 50 mM, pH 4,8 (au moins environ 5 volumes de colonne). Ensuite le regroupement de produit POROS® 50HQ (recueilli comme décrit ci-dessus, fraîche ou de stockage à 2-8 °C) a été chargé sur la colonne POROS® 20HS. La colonne a ensuite été lavée avec un tampon acétate de sodium 50 mM pH 4,8 (au moins environ 5 volumes de colonne) puis lavée à nouveau avec 10 volumes de colonne de deuxième tampon (tampon 50 mM acétate de sodium, 80 mM chlorure de sodium, pH 4,8). Le complexe de neurotoxine *botulique* de type A a été élué à partir des colonnes POROS® 20HS avec un tampon acétate de sodium 50 mM, chlorure de sodium 350 mM, pH 4,8 à 290 cm/heure. L'éluat a été recueilli en récipient avec 3 mL d'acétate de sodium à 50 mM, pH 4,8 lorsque l'A280 a augmenté à environ $\geq 0,02$ AU par le maximum de pic jusqu'à ce que l'A280 du bord de fuite du pic d'élution diminue à une valeur de $\leq 0,02$ AU ou jusqu'à la fin de l'étape d'élution, qui avait un total de 5 volumes de colonne à partir de la fin de la deuxième étape de lavage. Le regroupement de produit POROS® 20HS a été stocké à court terme à environ 2 °C à 8 °C jusqu'à 120 heures. Le regroupement de produit a ensuite été aliquoté en petits échantillons de volume et conservé à plus long terme dans un congélateur à -70 °C avant analyse.

[0167] 3. Analyse des échantillons

[0168] Analyse AEX-HPLC

[0169] Des échantillons ont été équilibrés à température ambiante pendant au moins 20 minutes. 100 µL de chaque échantillon ont été transférés vers un flacon HPLC en polypropylène de 0,3 mL pour injection directe. L'analyse AEX-HPLC a été réalisée en utilisant un HPLC Agilent® avec détecteur UV suivant les conditions de l'instrument fournies dans le tableau 4.

[0170] **Tableau 4. Conditions expérimentales AEX-HPLC**

[0171] [Tableaux4]

Paramètre	Condition		
Colonne	Dionex ProPac WAX-10G, 4 x 50 mm, 10 µm (pièce No. 055150)		
Température de colonne	25 °C		
Phase Mobile A (MPA)	Tampon Tris-HCl 40 mM pH 8,0		
Phase Mobile B (MPB)	NaCl 1,00 M NaCl		
Débit	1,00 mL/min		
Détection UV	220 nm		
Volume d'injection d'échantillon	Régler le volume d'injection sur la base de la concentration en UV pour injecter 5 µg		
Température d'échantillonneur automatique	5 °C		
Temps d'exécution	35 min		
Gradient	Temps (min)	%MPA	%MPB
	0,00	100	0
	17,00	40	60
	17,20	0	100
	22,00	0	100
	22,20	100	0
	35,00	100	0

[0172] Les données de chromatographie ont été traitées avec le logiciel Waters® Empower 3. Tous les pics non présents dans l'analyse du tampon ont été intégrés.

[0173] Analyse LC-MS

[0174] Des échantillons ont été réduits avec 50 mM TCEP 90 minutes à 37 ± 3 °C. Les

échantillons réduits ont été analysés à l'aide d'un Waters Acquity UPLC couplé à un spectromètre de masse Waters Synapt G2. Vingt picomoles de chaque condensé d'échantillon ont été injectées pour analyse LC MS. La spectrométrie de masse des composants complexes en éluant à partir de la colonne de phase inversée a été effectuée en utilisant une ionisation par électronébulisation en mode positif. Les paramètres LC MS utilisés pour l'analyse des échantillons sont fournis dans le tableau 5 ci-dessous.

[0175] Les données brutes ont été déconvoluées en utilisant le Waters MassLynx version 4.1 ou ultérieure avec MaxEnt1. Les paramètres sont répertoriés dans le tableau 6 ci-dessous.

[0176] **Tableau 5. Conditions expérimentales LC-MS**

[0177] [Tableaux5]

Échantillon	Réduit			
Charge d'échantillon	20 picomoles			
Instrument	Waters Acquity UPLC et Waters Synapt G2			
Colonne	Agilent Zorbax 300SB-C8, 2,1 mm x 150 mm, 3,5 µm			
Phase Mobile A (MPA)	0,1 % acide formique, 0,01 % TFA dans l'eau			
Phase Mobile B (MPB)	0,1 % acide formique, 0,01 % TFA dans 100 % acétonitrile			
Gradient	Temps (min)	Débit (ml/min)	% MPA	% MPB
	0	0,3	95	5
	5,0	0,3	95	5
	6,0	0,1	65	35
	30,0	0,1	45	55
	40,0	0,1	25	75
	42,0	0,3	25	75
	42,1	0,3	95	5
	45,0	0,3	95	5

[0178] **Tableau 6. Paramètres MassLynx MaxEnt1 pour l'analyse des échantillons BoNT/A**

[0179] [Tableaux6]

Paramètre			Valeur
Masse de sortie	Plage	HC de 150 kDa	97500:98500
		LC de 150 kDa	49500:50500
		NTNH	137500:138500
		HA48	47500:48500
		HA34	33000:34000
		HA20	19500:21000
		HA17	16500:17500
	Résolution		0,1 Da/canal
Modèle d'endommagement : Gaussien uniforme	largeur de pic à mi-hauteur	HC de 150 kDa	0,25
		LC de 150 kDa	0,30
		NTNH	0,21
		HA48	0,33
		HA34	0,44
		HA20	0,48
		HA17	0,61
Rapports d'intensité minimale	Gauche		33 %
	Droite		33 %
Options d'achèvement			

[0180] Remarque : On a théoriquement déterminé la largeur de pic à mi-hauteur en utilisant la fonctionnalité de modélisation isotopique au sein de MassLynx.

[0181] **6.2. Exemple 2 : Des variants de troncature C-terminale de la chaîne légère de BoNT/A ont été réduits dans des échantillons obtenus à partir de Conditions de Fermentation avec des Concentrations de CO₂ plus élevées**

[0182] Des échantillons obtenus à partir de cultures de fermentation avec des concentrations différentes de CO₂ ont été analysés avec une AEX-HPLC. Deux pics correspondant à BoNT/A de 150 kDa ayant une chaîne légère pleine longueur (SEQ ID NO. 2) et BoNT/A de 150 kDa ayant une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée (SEQ ID NO. 4), respectivement, ont été observés ([Fig.1]) et sont désignés dans cette description comme le pic de 150 kDa de pleine longueur et le pic de 150 kDa tronqué, respectivement. Le pic de 150 kDa tronqué a été élué à un instant légèrement postérieur au pic de 150 kDa pleine longueur. Les zones de pic relatives pour les deux pics sont

indiquées ci-dessous dans le tableau 7.

[0183] **Tableau 7. Résumé de données AEX d'étude de CO₂ (%Aire), UV220 nm**

[0184] [Tableaux7]

	150 kDa pleine longueur	150 kDa tronquée	Total 150 kDa	Rapport de 150 kDa (tronqué:pleine longueur)	150 kDa tronquée (% du Total 150 kDa)
Fermentation de témoin de référence	3,1	12,0	15,1	3,9	79,5 %
Fermentation à 25 % de CO ₂	7,5	7,2	14,7	1,0	49,0 %
Fermentation à 50 % de CO ₂	9,4	6,1	15,5	0,6	39,4 %
Fermentation à 75 % de CO ₂	9,9	4,4	14,3	0,4	30,8 %
Fermentation à 100 % de CO ₂	10,1	3,7	13,8	0,4	26,8 %

[0185] Le tableau 5 montre que la zone de pic de 150 kDa tronquée a été diminuée tandis que la zone de pic de 150 kDa pleine longueur a été augmentée dans des échantillons obtenus à partir de cultures de fermentation avec une concentration en CO₂ plus élevée. Ainsi, le rapport entre l'abondance de 150 kDa tronquée et l'abondance de 150 kDa pleine longueur, et le pourcentage de l'abondance de 150 kDa tronquée parmi l'abondance du 150 kDa total (c'est-à-dire la somme de l'abondance de 150 kDa pleine longueur et l'abondance de 150 kDa tronquée) étaient tous deux réduits dans des échantillons obtenus à partir de cultures de fermentation avec des concentrations de CO₂ supérieures.

[0186] Des échantillons obtenus à partir de cultures de fermentation avec différentes concentrations en CO₂ ont également été analysés avec LC-MS. La chaîne légère pleine longueur (SEQ ID NO. 2, poids moléculaire de ~50025) et la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée (SEQ ID NO. 4, poids moléculaire de ~49810) de BoNT/A ont été identifiées (Figures 2A-2E). Il a été montré que l'augmentation de la concentration

en CO₂ lors de la fermentation a conduit à un taux diminué de chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée (LC) et un niveau accru de chaîne légère pleine longueur dans les échantillons de BoNT/A produits.

[0187] **Exemple 3 : Des variants de troncature C-terminale de la chaîne légère de BoNT /A ont été réduits dans des échantillons à partir de fermentations à basse température ou à choc à froid**

[0188] Des échantillons obtenus à partir de cultures de fermentation avec des températures de fermentation différentes ont été analysés avec la AEX-HPLC. Les deux mêmes pics (150 kDa pleine longueur et 150 kDa tronquée) correspondant à 150 kDa BoNT/A ayant une chaîne légère pleine longueur (SEQ ID NO. 2) et 150 kDa BoNT/A ayant une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée (SEQ ID NO. 4), respectivement, ont été observés ([Fig.3]). La zone de pic relative pour les deux pics est indiquée ci-dessous dans le tableau 8.

[0189] **Tableau 8. Résumé de données d'étude thermique AEX (%Aire), UV220 nm**

[0190] [Tableaux8]

	150 kDa pleine longueur	150 kDa tronquée	Total 150 kDa	Rapport de 150 kDa (tronqué:pleine longueur)	150 kDa tronquée (% du total 150 kDa)
Fermentation de témoin de référence	3,1	12,0	15,1	3,9	79,5 %
Choc à froid à 20 °C	5,7	8,7	14,4	1,5	60,4 %
Choc à froid à 15 °C	6,7	8,0	14,7	1,2	54,4 %
Fermentation à 25 °C	10,0	4,9	14,9	0,5	32,9 %

[0191] Le tableau 6 montre que la zone de pic de 150 kDa tronquée a été diminuée tandis que la zone de pic de 150 kDa pleine longueur a été augmentée dans des échantillons obtenus à partir de cultures de fermentation avec une température de choc à froid ou basse continue. Ainsi, le rapport entre l'abondance de 150 kDa tronquée et l'abondance de 150 kDa pleine longueur, et le pourcentage de l'abondance de 150 kDa tronquée parmi l'abondance du 150 kDa total (c'est-à-dire la somme de l'abondance de 150 kDa pleine longueur et l'abondance de 150 kDa tronquée) étaient tous deux réduits dans des

échantillons obtenus à partir de cultures de fermentation avec une température de choc à froid ou basse continue.

[0192] Des échantillons obtenus à partir de cultures avec des températures de fermentation différentes ont également été analysés avec la LC-MS. La chaîne légère pleine longueur (SEQ ID NO. 2, poids moléculaire de ~50025) et la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée (SEQ ID NO. 4, poids moléculaire de ~49810) de BoNT/A ont été identifiées ([Fig.4]). Il a été montré que la température de choc à froid ou basse continue lors de la fermentation a conduit à un taux diminué de chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée (LC) et un niveau accru de chaîne légère pleine longueur dans les échantillons de BoNT/A produits.

[0193] **6.4. Exemple 4 : Analyse SEC-HPLC d'échantillons à partir de fermentations à basse température ou de choc à froid**

[0194] Des échantillons ont été équilibrés à température ambiante pendant au moins 20 minutes. 100 µL de chaque échantillon ont été transférés vers un flacon HPLC en polypropylène de 0,3 mL pour injection directe. L'analyse SEC-HPLC a été réalisée en utilisant un HPLC Waters® avec détecteur UV suivant les conditions de l'instrument fournies dans le tableau 9.

[0195] **Tableau 9. Conditions expérimentales SEC-HPLC**

[0196] [Tableaux9]

Colonne	Sepax SRT SEC-500, 7,8x300 mm, 5 microns (PN 215500-7830)
Température de colonne	30 °C
Phase Mobile	Phosphate de sodium à 40 mM + Sulfate d'ammonium à 200 mM, pH 6,5
Débit	0,8 mL/min
Détection UV	220 nm
Volume d'injection	Régler le volume d'injection sur la base de la concentration en UV pour injecter 20 pg
Température d'échantillonneur automatique	5 °C
Temps d'exécution	20 minutes

[0197] Les données de chromatographie ont été traitées avec le logiciel Waters® Empower 3. L'espèce de poids moléculaire plus élevée a été éluée plus tôt que les plus basses. Tous les pics non présents dans l'analyse du tampon ont été intégrés. L'aire de

pic relative de chaque pic a été rapportée.

[0198] Les données SEC (%Aire) à UV220 nm sont montrées ci-dessous dans le Tableau 10.

[0199] [Tableaux10]

		HCP (<100 kDa)
Fermentation de témoin de référence	AEC	15,2
Choc à froid à 20 °C		0,0
Choc à froid à 15 °C		1,5
Fermentation à 25 °C		31,3
Fermentation de témoin de référence	CEC	0,0
Choc à froid à 20 °C		0,0
Choc à froid à 15 °C		0,0
Fermentation à 25 °C		3,6

[0200] Le Tableau 10 montre que le pourcentage de la protéine de cellule hôte (HCP) a été réduit à la fois dans des conditions de choc à froid de 20 °C et 15 °C par comparaison avec la condition de fermentation de témoin de référence après la purification de colonne d'échange d'anions (AEC) unique, alors que la condition de fermentation à froid continue de 25 °C avait un pourcentage plus élevé de HCP par comparaison avec le témoin de référence. Après le procédé de purification à deux colonnes (à savoir AEC suivi du CEC), HCP dans la condition de fermentation à froid continue à 25 °C est supérieure à 3 % alors qu'elle est indétectable à la fois dans le témoin de référence et dans les conditions de choc à froid.

[0201] **6.5. Exemple 5 : Procédé Non APF (Schantz) pour obtenir une toxine *Botulinum***

[0202] Cet exemple définit le processus de Schantz de l'art antérieur pour obtenir une neurotoxine *botulinum*. Le procédé est un procédé non-APF utilisant des milieux et réactifs dérivés de l'animal (à savoir, des plaques d'agar de sang de bœuf pour la culture, la caséine dans le milieu de fermentation et l'utilisation d'enzymes de Rnase et de Dnase pour la purification de neurotoxine botulique). Le processus de Schantz présente environ 16 à 20 étapes majeures, pour un travail à l'échelle de production utilise un fermenteur de 115 L et prend environ 3 semaines. Le processus de Schantz est débuté par décongélation d'un flacon de banque de cellules maîtres (MCB) de *Clostridium botulinum* non APF à température ambiante suivie de quatre étapes de culture. Premièrement pour sélectionner des colonies avec une morphologie appropriée, des aliquotes provenant du flacon MCB décongelé sont striées sur des

plaques d'agar sanguin Columbia pré-réduit (CBA) et incubées de manière anaérobie pendant 30 à 48 heures à $34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Deuxièmement, des colonies sélectionnées sont inoculées dans des tubes à essai de 9 mL contenant un milieu de croissance de caséine pendant 6 à 12 heures à $34\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le contenu du tube de 9 mL avec la croissance la plus rapide et la densité la plus élevée (étape de sélection de croissance) est ensuite en outre cultivé à travers deux incubations anaérobies d'intensification (les troisième et quatrième étapes de culture), étant une incubation de 12-30 heures à $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans une bouteille de culture de semences de 600 mL à 1 L, suivie d'une culture dans un fermenteur de semences de 15 L à 25 L contenant un milieu de croissance de caséine pendant 6 à 16 heures à $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ces deux cultures d'intensification sont réalisées dans un milieu nutritif contenant 2 % d'hydrolysate de caséine (un condensé de caséine [protéine de lait]), 1 % d'extrait de levure et 1 % de glucose (dextrose) dans l'eau à pH 7.3.

[0203] Les cultures d'intensification sont suivies d'une incubation supplémentaire pendant 60 à 96 heures à $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans un fermenteur de production à l'échelle commerciale (*à savoir* de 115 L) dans un milieu contenant de la caséine sous une atmosphère anaérobie contrôlée. La croissance de la bactérie est généralement complète après 24 à 36 heures, et lors de l'étape de fermentation réalisée pendant environ 65 à environ 72 heures où la plupart des cellules subissent une lyse et libèrent la neurotoxine botulique. On pense que la toxine est libérée par lyse cellulaire et activée par des protéases présentes dans le milieu. Un filtrat du milieu de culture peut être préparé en utilisant un filtre à profondeur de couche unique pour éliminer les impuretés brutes (*à savoir* des cellules entières et rompues) obtenant ainsi une solution limpide appelée culture clarifiée. La récolte de neurotoxine botulique à partir de culture clarifiée est réalisée en abaissant le pH de la culture clarifiée à pH 3,5 avec de l'acide sulfurique 3M pour précipiter la toxine brute à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (précipitation d'acidification). La neurotoxine botulique brute est ensuite concentrée (pour atteindre une réduction volumique) par ultrafiltration (microfiltration) (dite MF ou UF) suivie d'une diafiltration (DF). Un filtre de 0,1 μm est utilisé pour l'étape de microfiltration.

[0204] La toxine brute ou crue récoltée est ensuite transférée dans une cuve de digestion et stabilisée par addition du chlorhydrate de benzamidine inhibiteur de protéase. La Dnase et la Rnase sont ajoutées pour condenser (hydrolyser) les acides nucléiques. La toxine est ensuite extraite avec un tampon de phosphate pH 6,0 et les débris cellulaires éliminés par clarification. Les acides nucléiques hydrolysés et les impuretés de faible masse moléculaire sont ensuite éliminés par des étapes d'UF et de DF supplémentaires. On réalise ensuite trois étapes de précipitation séquentielles (précipitation éthanol froid, acide chlorhydrique et sulfate d'ammoniac). La neurotoxine botulique purifiée (toxine en vrac) est conservée en suspension dans un tampon phosphate de sodium/

sulfate d'ammonium de 2 °C à 8 °C.

[0205] L'achèvement de ce processus de Schantz (non-APF) de l'exemple 5, y compris les étapes de récolte et de purification, prend environ deux à trois semaines. La neurotoxine botulique en vrac résultante est une suspension de complexe de toxine botulique de haute qualité de 900 kDa de type A, réalisée à partir de la souche Hall A de *Clostridium botulinum* avec une puissance spécifique $\geq 2 \times 10^7$ U/mg, un A_{260}/A_{278} inférieur à 0,6 et un motif de bandes distinct sur électrophorèse sur gel, et convenant pour le mélange d'une composition pharmaceutique de toxine botulique.

[0206] La neurotoxine *botulinum* peut également être obtenue à partir d'un procédé APF, non chromatographique, tel que présenté dans l'exemple 7 du brevet US 7 452 697, le procédé APF complet, non chromatographique (du début de culture à la fin de toutes les étapes de purification et de traitement) prenant environ deux à trois semaines. Alternativement, la neurotoxine botulique peut également être obtenue à partir d'un procédé APF, chromatographique, tel que présenté dans l'exemple 16 du brevet US 7 452 697, le procédé APF, chromatographique (du début de culture à la fin de toutes les étapes de purification et de traitement) prenant une semaine ou plus.

[0207] **6.6. Exemple 6: Systèmes et procédés APF, chromatographiques sur colonne pour obtenir une neurotoxine *botulinum***

[0208] Des systèmes et procédés basés sur une chromatographie anion-cation rapide, APF, sont développés pour obtenir une neurotoxine *botulinum* à rendement élevé et haute pureté. Le procédé de cet exemple 6 à des fins de production (i.e pour obtenir des quantités de gramme de la neurotoxine *botulinum* finale) utilise un récipient de fermentation de 20 L et prend uniquement 4 à 7 jours, de préférence environ 4 à environ 6 jours, pour compléter toutes les étapes du processus du début de culture à l'achèvement du stockage final et de la purification de la toxine. Des appareils utilisés dans les systèmes décrits ici sont abordés ci-dessous. Les processus à milieux chromatographiques sont développés et sont présentés ici. Ces procédés à milieux chromatographiques utilisent un, deux ou trois des suivants : chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC), chromatographie d'échange d'anions, chromatographie d'échange de cations. Spécifiquement, les procédés de milieux chromatographiques développés comportent : (1) un procédé à un milieu qui utilise HIC ; (2) un procédé à deux milieux qui utilise HIC suivie d'une chromatographie d'échange d'anions ; (3) un procédé à deux milieux qui utilise HIC suivie d'une chromatographie d'échange de cations ; (4) un procédé à trois milieux qui utilise HIC suivie d'une chromatographie d'échange d'anions suivie d'une chromatographie d'échange de cations ; (5) un procédé à trois milieux qui utilise HIC suivie d'une chromatographie d'échange de cations suivie d'une chromatographie d'échange d'anions ; (6) un procédé à un milieu qui utilise une chromatographie d'échange d'anions ; (7) un procédé à deux milieux qui utilise une

chromatographie d'échange d'anions suivie d'une HIC ; (8) un procédé à deux milieux qui utilise une chromatographie d'échange d'anions suivie d'une chromatographie d'échange de cations ; (9) un procédé à trois milieux qui utilise une chromatographie d'échange d'anions suivie d'une HIC suivie d'une chromatographie d'échange de cations ; (10) un procédé à trois milieux qui utilise une chromatographie d'échange d'anions suivie d'une chromatographie d'échange de cations suivie d'une HIC ; (11) un procédé à un milieu qui utilise une chromatographie d'échange de cations ; (12) un procédé à deux milieux qui utilise une chromatographie d'échange de cations suivie d'une HIC ; (13) un procédé à deux milieux qui utilise une chromatographie d'échange de cations suivie d'une chromatographie d'échange d'anions ; (14) un procédé à trois milieux qui utilise une chromatographie d'échange de cations suivie d'une HIC suivie d'une chromatographie d'échange d'anions ; et (15) un procédé à trois milieux qui utilise une chromatographie d'échange de cations suivie d'une chromatographie d'échange d'anions suivie d'une HIC. La HIC élimine les impuretés telles qu'une impureté de 49 kDa (qui s'avère être une isomérase glucose phosphate de cellule hôte, comme discuté ci-après).

[0209] **6.6.1 Préparation de la banque de cellules actives**

[0210] Une nouvelle banque de cellules de *Clostridium botulinum* est développée (pour une utilisation pour initier l'étape de culture) sans utilisation de plaques d'agar de sang Columbia, et qui élimine la nécessité de sélection de colonies avant la culture et élimine également la nécessité d'effectuer la culture en tube d'intensification et les multiples étapes de semences (culture) du procédé de Shantz.

[0211] À cet effet, une banque de cellules maître de Schantz préalablement établie (MCB) est utilisée pour créer une banque de cellules de recherche APF (RCB) à partir de laquelle une nouvelle banque de cellules maîtres APF (MCB) et une banque de cellules actives ultérieure (WCB) sont générées. Une banque de cellules de recherche (RCB) est réalisée à partir d'une colonie issue de MCB de Schantz (NAPF). Pour éliminer la protéine dérivée animale du flacon MCB, les cellules sont lavées deux fois dans du milieu APF contenant 2 % p/v de SPTII (peptone de soja de type II), 1 % p/v d'extrait de levure, et 1 % p/v de glucose. Les cellules sont plaquées sur milieu APF dans des conditions anaérobies strictes en utilisant une chambre anaérobie de système commandé à l'atmosphère modulaire (MACS). Une colonie isolée est en outre étendue et stockée dans du milieu APF contenant environ 20 % de glycérol en dessous de -135 °C.

[0212] L'APF-MCB est faite dans des conditions de GMP en élargissant le RCB en milieu APF sans oxygène (200 mL, réduit pendant un minimum de 12 heures dans une chambre anaérobie) et en culture dans une chambre anaérobie MACS à 34,5 °C ±1 °C (agitée à 60 tr/min) jusqu'à ce que la OD₅₄₀ de la culture atteigne 2,5 ± 1,0 AU. Du

glycérol stérile est ajouté à la culture résultante à une concentration finale d'environ 20 % après quoi le mélange est transféré dans des cryoflacons à 1 mL/flacon (flacons APF-MCB). Les flacons sont surgelés dans de l'azote liquide, puis stockés en dessous de -135 °C. Une APF-WCB est réalisée en conditions GMP par extension comme ci-dessus. Les banques de cellules APF résultantes sont caractérisées pour une identité, une pureté, une viabilité et une stabilité génétique.

6.6.2. Étapes en amont (culture et fermentation)

- [0213] Les procédés de l'exemple 6 présentent deux étages généraux : un étage amont et un étage aval. L'étage amont comporte l'expansion d'une lignée cellulaire de départ (croissance et reproduction de bactéries de *Clostridium botulinum* dans un milieu de culture sensiblement APF), fermentation, récolte (élimination des débris cellulaires) pour fournir une culture clarifiée, récoltée puis concentrée et diluée. Ainsi, dans cet exemple, les étapes d'un procédé à trois colonnes donné à titre d'exemple peuvent comporter une culture, une fermentation, une filtration de récolte, une concentration, une HIC, une chromatographie de capture (anion), une chromatographie de polissage (cation), un échange de tampon, une réduction de biocharge et un remplissage de flacon.
- [0214] L'étage amont comporte l'utilisation d'un milieu de culture dans une bouteille de 1 L contenant 400 mL de milieu de culture d'APF de semences (chambre anaérobie) réduite (2 % p/v de SPTII, 1 % p/v d'extrait de levure, (ajusté à pH 7,3 avec de l'hydroxyde de sodium 1 N et/ou de l'acide chlorhydrique 1 N avant autoclavage)) 1 % p/v de glucose stérile post-autoclavage de milieux de culture). Le milieu de culture (semence) est inoculé avec 400 µL d'une WCB de *Clostridium botulinum* décongelée. L'incubation/culture se fait à 34,5 °C ± 1,0 °C sous agitation 150 tr/min dans une chambre anaérobie.
- [0215] Lorsque la densité optique du milieu de culture à 540 nm est de $1,8 \pm 1,0$ AU, le contenu entier de la bouteille de 1 L (environ 400 mL) est transféré vers un fermenteur de production de 20 L contenant un milieu de fermentation APF ajusté avec une stérilisation d'hydroxyde de sodium 1 N et/ou de l'acide chlorhydrique 1 N post-vapeur à pH 7.3, un milieu de fermentation composé de 3,25 % p/v de SPTII, d'extrait de levure à 1,2 % p/v, 1,5 % p/v de glucose stérile (ajouté après stérilisation ; stérilisation, *par exemple* à environ 122 °C pendant 0,5 heure). La température et l'agitation sont contrôlées respectivement à 35 °C ± 1 °C et 70 tr/min. Le recouvrement d'azote est fixé à 12 slpm et la pression d'espace de tête réglée à 5 psig pour maintenir un environnement anaérobie pour la croissance cellulaire. Le pH de fermentation et la densité cellulaire sont surveillés par des sondes de turbidité à pH et en ligne, respectivement. Les trois phases de la fermentation de production comportent des phases de croissance exponentielle, stationnaire et autolyse. L'autolyse cellulaire, qui libère le complexe

BoNT/A actif dans le milieu de culture, est observée de manière constante entre 35 heures et la fin de la fermentation. À la fin de la fermentation, la culture est refroidie à 25 °C pour la récolte.

- [0216] Une fois que le milieu de fermentation est refroidi à 25 °C, les débris cellulaires sont séparés du complexe de neurotoxine botulique de type A contenant du lysat par filtration en profondeur, d'abord par un pré-filtre à gradient nominal de rétention de 5 à 0,9 µm pour éliminer les débris cellulaires, puis par un gradient nominal de rétention chargé positivement de 0,8 à 0,2 µm pour éliminer l'ADN (élimination jusqu'à environ 80 %). Les deux filtres sont rincés ensemble avec 20 L d'eau pour injection (WFI) avant utilisation. Un minimum de 15 L du filtrat est nécessaire pour un traitement ultérieur, et tout excès de matière est décontaminé après l'achèvement pendant le procédé du prélèvement. Le filtrat est stocké à 4 °C si non immédiatement traité par ultrafiltration.
- [0217] Au sein d'une armoire de biosécurité (BSC) le filtrat issu de l'étape de récolte est concentré de 15 L à $5 \pm 0,5$ L en utilisant une membrane à fibre creuse, filtration à flux tangentiel (TFF) de GE Healthcare. Le matériau ultrafiltré est ensuite dilué avec du tampon phosphate de sodium à 10 mM pH 6,5 à un volume final de 20 L. Ce matériau est purifié par utilisation d'une colonne de chromatographie, deux colonnes de chromatographie ou trois colonnes de chromatographie (*voir* la section Étapes en aval). Le matériau de récolte ultrafiltré dilué est stocké à 4 °C si non immédiatement traité par purification.
- [0218] Dans le procédé de Schantz, l'étape de culture est terminée et l'étape de fermentation commence à partir du temps et de l'observation visuelle de croissance de culture. Au contraire, dans l'exemple 6, les procédés de détermination de fin de l'étape de culture sont basés sur l'analyse de densité optique de fluide de culture, qui assure que la culture est dans la phase de croissance logarithmique au moment du début de l'étape de fermentation, et permet une réduction de la durée de l'étape de culture jusqu'à environ 8 heures à environ 14 heures. L'étape de culture à terminaison de paramètres de OD maximise la santé des cellules cultivées et encourage une toxine *botulinum* robuste et abondante résultant de l'étape de fermentation. La densité optique moyenne (à 540 nm) du milieu de culture à l'issue de la culture est de 1,8 AU. La durée moyenne de l'étape de fermentation est de 72 heures et la turbidité finale moyenne (A_{890}) du milieu de fermentation à l'issue de l'étape de fermentation est de 0,15 AU. La quantité moyenne de complexe de toxine *botulinum* de type A présente (telle que déterminée par ELISA) dans le milieu de fermentation de 20 L (bouillon entier) à la fin de l'étape de fermentation est d'environ 64 µg de complexe de toxine botulique de type A/mL de milieu de fermentation.
- [0219] L'étape de récolte utilise une filtration en profondeur pour éliminer les débris cel-

lulaires et les acides nucléiques, suivie d'une ultrafiltration et dilution pour préparer le milieu de fermentation pour l'étape suivante du procédé. Cette récolte/élimination de débris cellulaire est fondamentalement différent du procédé de récolte de Schantz, qui utilise une précipitation par acidification suivie d'une microfiltration et d'une diafiltration pour concentrer et échanger des tampons en préparation pour un traitement ultérieur.

6.6.3. Étapes en aval (Purification)

- [0220] Les étapes en aval comportent la purification par une colonne de chromatographie, deux colonnes de chromatographie, ou trois colonnes de chromatographie (par exemple, capture de la neurotoxine *botulinum* sur colonne d'échange d'anions, élution de la colonne et séparation ultérieure des impuretés par polissage sur une colonne d'échange de cations, et de préférence (dans le procédé trois colonnes), passage d'éluant contenant de la neurotoxine botulique souhaitée à travers une troisième colonne, de préférence une colonne d'interaction hydrophobe (*par exemple* chromatographie), avant (de préférence) ou après le procédé à deux colonnes), suivie d'une concentration et d'un échange de tampon en utilisant une filtration à flux tangentiel (TFF), et une réduction de la biocharge (*par exemple* par filtration supplémentaire en utilisant un filtre de 0,2 µm) à un complexe de neurotoxine *botulique* de type A pour le stockage à froid, de préférence le gel, et un éventuel mélange en une composition pharmaceutique de complexe de neurotoxine *botulique* de type A. La séquence des étapes de chromatographie et de filtration est destinée à éliminer les impuretés liées au procédé et au produit, à éliminer les agents fortuits potentiels et à contrôler la concentration de complexe de neurotoxine *botulinum* de type A et une matrice tampon de la neurotoxine botulinum de type A finale pour fournir une substance médicalement plus stable.
- [0221] Plusieurs modes de réalisation d'exemples de procédés en aval à deux colonnes et trois colonnes sont décrits ci-après. Des modes de réalisation supplémentaires sont envisagés dans lesquels l'ordre des colonnes est modifié, et les procédures sont ajustées en conséquence comme jugé approprié dans l'avis et le jugement de l'homme du métier, mais qui sont autrement similaires ou essentiellement identiques aux modes de réalisation décrits ci-dessous. D'autres modes de réalisation de procédés en aval d'une colonne sont également envisagés, lesquels modes de réalisation impliquent l'utilisation d'une seule colonne de chromatographie mais sont autrement similaires ou essentiellement identiques aux modes de réalisation décrits ci-après. En effet, cet exemple envisage un processus en aval à trois colonnes qui implique (1) l'utilisation de HIC suivi d'une chromatographie d'échange d'anions suivie d'une chromatographie d'échange de cations, (2) l'utilisation de HIC suivie d'une chromatographie d'échange de cations suivie d'une chromatographie d'échange d'anions, (3) l'utilisation de chro-

matographie d'échange d'anions suivie de HIC suivie d'une chromatographie d'échange de cations, (4) l'utilisation de chromatographie d'échange d'anions suivie d'une chromatographie d'échange de cations suivie de HIC, (5) l'utilisation de chromatographie d'échange de cations suivie de HIC suivie d'une chromatographie d'échange d'anions, ou (6) l'utilisation de chromatographie d'échange de cations suivie d'une chromatographie d'échange d'anions suivie de HIC. Cet exemple envisage également un processus en aval à deux colonnes qui implique (1) l'utilisation de HIC suivie d'une chromatographie d'échange d'anions, (2) l'utilisation de HIC suivie d'une chromatographie d'échange de cations, (3) l'utilisation de chromatographie d'échange d'anions suivie de HIC, (4) l'utilisation de chromatographie d'échange d'anions suivie d'une chromatographie d'échange de cations, (5) l'utilisation de chromatographie d'échange de cations suivie de HIC, ou (6) l'utilisation de chromatographie d'échange de cations suivie d'une chromatographie d'échange d'anions. Cet exemple envisage également un processus aval mono-colonne qui implique l'utilisation de HIC, l'utilisation de chromatographie d'échange d'anions, ou l'utilisation de chromatographie d'échange de cations.

[0222] Un premier mode de réalisation détaillé d'un exemple de procédé en aval à trois colonnes réalisé est le suivant. Un matériau ultrafiltré clarifié (dilué) (20 L, tel que décrit ci-dessus) est passé à travers une résine de chromatographie d'échange d'anions POROS® 50HQ, la neurotoxine botulique capturée est éluée de la colonne d'échange d'anions puis passe à travers une résine de chromatographie d'échange de cations POROS® 20HS, dont l'éluant est passé à travers une résine de chromatographie de Phenyl Sepharose HP. L'éluant de la colonne HIC est soumis à une filtration à flux tangentiel à 100 kDa, suivi de 0,2 µm de filtration. La neurotoxine botulique de type A obtenue est congelée pour le stockage.

[0223] Dans ce premier mode de réalisation de l'exemple de procédé en aval à trois colonnes, la première étape de chromatographie du procédé aval utilise une résine de chromatographie d'échange d'anions POROS® 50HQ conditionnée dans une colonne de diamètre intérieur d'environ 8 cm et une hauteur de colonne d'environ 15 cm. L'ensemble de l'opération de colonne POROS® 50HQ est complété à température ambiante, et le flux est dans la direction descendante. Le complexe de neurotoxine *botulinum* de type A est élué de la colonne d'anions en utilisant un changement d'étape de pH où les composants plus chargés négativement tels que les acides nucléiques (par exemple, les ADN et les ARN) et d'autres protéines de cellules hôtes restent liées à la colonne d'échange d'anions.

[0224] Des caractéristiques de l'étape d'échange d'anions sont : utilisation de la colonne POROS® 50HQ à l'aide d'hydroxyde de sodium 0,1 N pendant un temps de contact minimum de 30 minutes (au moins environ 3 volumes de colonnes, à 230 cm/heure).

La colonne est ensuite équilibrée avec un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6,5 (au moins 5 volumes de colonne). Ensuite, le matériau ultra-filtré et dilué clarifié (à savoir le lysat traité de matériau de fermentation APF) est chargé à 230 cm/heure sur la colonne d'échange d'anions POROS® 50HQ, suivi d'un lavage avec au moins environ 20 volumes de colonnes de phosphate de sodium 50 mM, pH 6,5 à 230 cm/heure jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm d'effluent colonne diminue à 0,10 AU, puis en éluant avec 50 mM d'acétate de sodium pH 4,8 à 230 cm/heure. Le regroupement de produit est collecté, lorsque l'absorbance à 280 nm (A_{280}) augmente à au moins environ 0,15 AU et à travers le maximum de pic à égale ou inférieure à environ 0,2 AU sur le bord de fuite, dans un récipient contenant 1 volume de colonne de 50 mM d'acétate de sodium, pH 4,8. Ce regroupement d'élution est stocké à environ 2 °C à environ 8 °C jusqu'à 48 heures.

[0225] La seconde étape de chromatographie dans ce premier mode de réalisation du procédé en aval à trois colonnes exemplaire de cet exemple 6 utilise une résine de chromatographie d'échange de cations POROS® 20HS conditionnée dans une colonne avec un diamètre interne de 8 cm et une hauteur de colonne de 5 cm. L'ensemble de l'opération de colonne POROS® 20HS est achevé à température ambiante, et le flux est dans la direction vers le bas. Le complexe de neurotoxine *botulinum* de type A s'associe à la résine de colonne POROS® 20HS. Le complexe de neurotoxine *botulinum* de type A est ensuite élué à partir de la colonne à l'aide d'un changement d'étape de sel. Les impuretés liées au produit sont éluées avec la solution de tampon de lavage et de décontamination.

[0226] Des caractéristiques de l'étape d'échange de cations sont : utilisation de la colonne POROS® 20HS à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N pendant un temps de contact minimum de 30 minutes (au moins environ 3 volumes de colonnes, à 230 cm/heure). La colonne est ensuite équilibrée avec un tampon acétate de sodium 50 mM, pH 4,8 (au moins environ 5 volumes de colonne). Ensuite le regroupement de produit POROS® 50HQ (collecté comme décrit ci-dessus, fraîche ou de réfrigération) est chargé sur la colonne POROS® 20HS. La colonne est ensuite lavée avec un tampon acétate de sodium 50 mM pH 4,8 (au moins environ 3 volumes de colonnes) puis lavée à nouveau avec un tampon acétate de sodium 50 mM, chlorure de sodium 150 mM, pH 4,8. Le complexe de neurotoxine *botulinum* de type A est élué de la colonne POROS® 20HS avec un tampon acétate de sodium 50 mM, chlorure de sodium 250 mM, pH 4,8 à 200 mL/min, l'éluat est dévié dans un sac de collecte de bioprocédé (contenant 1 volume de colonne de 50 mM $\text{NaH}_3\text{C}_2\text{O}_2$, pH 4,8) lorsque l' A_{280} augmente jusqu'à environ $\geq 0,1$ AU par le maximum de pic jusqu'à ce que l' A_{280} du bord de fuite du pic d'élution diminue à une valeur de bord de fuite $\leq 0,1$ AU. Le regroupement de produit POROS® 20HS est stocké dans le sac de collecte à température

ambiante jusqu'à environ 6 heures.

[0227] Dans ce premier mode de réalisation de l'exemple de procédé de milieu de chromatographie en trois colonnes de cet exemple 6, l'éluant de la deuxième colonne (échange de cations) est passé à travers une colonne HIC. La colonne HIC utilisée est une résine de chromatographie d'interaction hydrophobe Phenyl Sepharose HP conditionnée en colonne avec un diamètre interne d'environ 8 cm et une hauteur de colonne d'environ 5 cm. L'ensemble de l'opération de colonne Phenyl Sepharose HP est achevé à température ambiante, et le flux est dans la direction descendante. Le complexe de neurotoxine *botulinum* de type A est ensuite élué à partir de la colonne à l'aide d'un changement d'étape de sel décroissante. Les impuretés sont éluées pendant la charge et avec la solution de tampon de lavage et de décontamination.

[0228] Les caractéristiques de l'étape de chromatographie d'interaction hydrophobe sont :

[0229] Une colonne Phenyl Sepharose HP est initialement aseptisée avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N pendant un temps de contact minimum de 30 minutes (avec au moins environ 3 volumes de colonnes d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N à 200 cm/heure). La colonne est ensuite équilibrée avec au moins environ 5 volumes de colonnes de 50 mM de tampon acétate de sodium, 0,4 M sulfate d'ammonium, pH 4,8. Ensuite le regroupement POROS® 20HS (« colonne d'échange de cations ») (de dessus) est combiné 1:1 avec un tampon acétate de sodium 50 mM, sulfate d'ammonium 0,8 M, pH 4,8 et chargé sur la colonne Phenyl Sepharose HP. La colonne est préalablement lavée avec au moins environ 3 volumes de colonnes de tampon 'acétate de sodium 50 mM, sulfate d'ammonium 0,4 M, pH 4,8, puis lavée avec un tampon phosphate de sodium 50 mM, sulfate d'ammonium 0,4 M, pH 6,5. Le complexe de neurotoxine *botulinum* de type A est élué de la colonne avec un tampon phosphate de sodium 10 mM, sulfate d'ammonium 0,14 M, pH 6,5. L'éluat est dévié dans un sac de collecte de bioprocédé lorsque l' A_{280} augmente jusqu'à $\geq 0,05$ AU. L'éluat est collecté jusqu'à ce que l' A_{280} du bord de fuite du pic d'élution diminue à une valeur $\leq 0,05$ AU. Le regroupement de produit Phenyl Sepharose HP est stocké dans le sac de collecte à température ambiante jusqu'à 6 heures.

[0230] Un système de filtration à flux tangentiel est utilisé pour concentrer et diafiltrer le regroupement de produit de l'étape de chromatographie de Phenyl Sepharose HP dans le tampon de formulation de substance médicamenteuse. Des cassettes Pall® Filtron Minimate avec une membrane de coupure de poids moléculaire 100 kDa sont utilisées pour les étapes de concentration et de diafiltration. Le matériau formulé est ensuite passé à travers un filtre Pall Mini Kleenpak® 0,2 μ m pour réduire la potentielle biocharge. L'étape UF/DF concentre le regroupement de produit Phenyl Sepharose HP (éluant de la colonne HIC) à une concentration complexe BoNT/A de 0,7 g/L et diafiltre le matériau concentré avec un tampon de citrate de potassium 10 mM, pH 6,5.

- [0231] Les caractéristiques du processus d'ultrafiltration/diafiltration utilisé sont les suivantes. L'unité UF/DF et la membrane polyéther sulfone Pall 100 kDa sont initialement rincées avec un minimum de 5 L d'eau pour injection (WFI) pour éliminer la solution de conditionnement et aseptisées avec un minimum de 200 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium 1 N dans des conditions de recirculation pendant un minimum de 10 minutes, de préférence au moins 30 minutes, pour assainir l'unité UF/DF. Ensuite, le système de membrane et UF/DF est équilibré avec des volumes suffisants du tampon de formulation de citrate de potassium 10 mM, pH 6,5 jusqu'à ce que le pH de perméat et de rétentat soit de pH 6,5. Après cela, le regroupement de produit Phényl Sepharose HP est chargé sur la cassette de filtration à flux tangentiel Minimate® et l'éluat HIC concentré à 0,7 g/L. Après l'étape de concentration, le regroupement de rétentat est diafiltré contre un minimum de 5 volumes de diafiltration du tampon de formulation de substance médicamenteuse (citrate de potassium 10 mM, pH 6,5) à une pression transmembranaire de 7,5 psig (livres par pouce carré). La sortie de perméat est ensuite fermée et le système UF/DF tourne pendant au moins 2 minutes et le système rincé avec 50 mL de tampon de formulation de citrate de potassium 10 mM, pH 6,5. Après le rinçage, la concentration de complexe BoNT/A dans le regroupement de rétentat est déterminée en mesurant la A_{278} hors ligne et sur la base de la lecture de A_{278} , la concentration du regroupement de rétentat est ajustée à 0,5 g/L avec un tampon de citrate de potassium 10 mM, pH 6,5. Le regroupement de rétentat à concentration ajustée est ensuite filtré au travers d'un filtre Pall Mini Kleenpak™ 0,2 µm pour réduire la potentielle biocharge. Le regroupement de rétentat à concentration ajustée filtré est stocké dans un sac de collecte à 2 °C à 8 °C pendant 2 jours.
- [0232] Le complexe de neurotoxine *botulinum* de type A final purifié obtenu est rempli dans des cryoflacons de 1 mL Nunc® à 700 µL par flacon et stockée congelée. L'opération de remplissage est réalisée dans une armoire de biosécurité de classe 100 à température ambiante.
- [0233] Le procédé en aval (y compris l'utilisation de 1 ou 2 ou 3 colonnes de chromatographie) est complété en seulement 1 à 3 jours et le complexe de neurotoxine *botulinum* de type A obtenu est conservé congelé dans un tampon citrate de potassium, pH 6,5 à une concentration de 0,5 g/L en tant que solution. En comparaison, le procédé de Schantz aval (purification de toxine) utilise plusieurs étapes de filtration, précipitation, extraction et centrifugation pour purifier le complexe de neurotoxine *botulinum* de type A et nécessite 1 à 2 semaines pour compléter seulement les étapes en aval, et la substance médicamenteuse résultante (neurotoxine *botulinum* récupérée) est réfrigérée en suspension de sulfate d'ammonium à une concentration d'environ 2,7 g/L. L'utilisation de chromatographie au lieu de précipitation et le temps de traitement réduit conduisent à un procédé en aval, cohérent, significativement

amélioré, comme décrit ici.

- [0234] Selon un aspect, des concentrations de produits à base de légumes, tels que des produits à base de soja, peuvent être de la peptone de soja Type II Hy-soy® ou SE50MK (une peptone de soja casher) en milieux de culture et de fermentation. Hy-Soy® dans le milieu de culture de semences peut être compris entre 10 et 200 g/L. De préférence, la concentration en Hy-Soy® dans le milieu de semences est comprise entre 15 et 150 g/L. Le plus préférablement, la concentration en Hy-Soy® dans le milieu de semences est approximativement comprise entre environ 20 et 30 g/L ou une quantité entre elles. La concentration en glucose dans le milieu de semences peut être comprise entre 0,1 g/L et 20 g/L. De préférence, la concentration en glucose est comprise entre 0,5 et 15 g/L. Le plus préférablement, la concentration en glucose dans le milieu de culture est d'environ 10 g/L. Les quantités d'extrait de levure peuvent être d'environ 5 à 20 g/L, plus préférablement d'environ 10 à 15 g/L ou d'une quantité entre elles. Par exemple, le pH du milieu de culture avant croissance de *Clostridium botulinum* peut être approximativement pH 7,0-7,5, ou entre eux, de préférence pH 7,3.
- [0235] A titre d'exemple, les quantités Hy-Soy® dans le milieu de fermentation de production peuvent être comprises entre 10-200 g/L. De préférence, la concentration en Hy-Soy® dans le milieu de fermentation est comprise entre 15 et 150 g/L. Le plus préférablement, la concentration en Hy-Soy® dans le milieu de fermentation est approximativement comprise entre environ 20 et 40 g/L ou une quantité entre elles. La concentration en glucose dans le milieu de fermentation peut être comprise entre 0,1 g/L et 20 g/L. De préférence, la concentration en glucose est comprise entre 0,5 et 15 g/L ou une quantité entre elles. Pas nécessairement, mais comme précédemment, le glucose peut être stérilisé par autoclavage conjointement avec les autres composants du milieu de fermentation. Le taux de pH du milieu de fermentation avant croissance peut être pH 7,0-7,8, de préférence environ 7,0-7,5 ou entre eux, plus préférablement pH 7,3.
- [0236] Un mode de réalisation d'un procédé en aval à deux colonnes donné à titre d'exemple comprend les étapes suivantes : (a) culture de bactéries, telles que des bactéries *Clostridium botulinum* provenant d'un flacon WCB APF, dans une bouteille de semences/culture, (b) puis fermentation des bactéries *Clostridium botulinum* dans un fermenteur (fermenteur de production de toxine) ayant un milieu de fermentation APF pour étendre la lignée cellulaire, réalisation de la fermentation et la production de toxine botulique jusqu'à ce qu'une phase de lyse cellulaire souhaitée soit atteinte. Ensuite, (c) récolte (par exemple, clarifier par filtration,) du milieu de fermentation APF pour obtenir un milieu de fermentation récolté, (d) réalisation d'une concentration et une dilution conduisant à un milieu de fermentation récolté dilué qui est (e) passé à travers une colonne de capture pour éliminer les impuretés, (f) mise en contact de

l'éluant de la colonne de capture avec une colonne de polissage pour éliminer davantage les impuretés, et éventuellement une deuxième concentration en colonne de polissage (g) et un échange de tampon de l'éluant de colonne de polissage, (h) suivi d'une filtration de réduction de biocharge et du (i) remplissage de flacons.

[0237] Dans un exemple, le volume de fermentation est de 20 L, le temps total de procédé pour toutes les étapes est seulement de 4 à 6 jours, et de la neurotoxine botulique à haut rendement est obtenue.

[0238] Ce qui suit fournit plus de détails d'un mode de réalisation particulier dans le cadre de notre invention. L'étape de fermentation est réalisée en milieu APF à l'aide d'un fermenteur en acier inoxydable 30 L.

[0239] Dans cet exemple ci-dessous, un volume de milieu de fermentation bien réduit est utilisé tout en fournissant toujours un rendement élevé en complexe de neurotoxine *botulinum* de type A hautement puissante. En utilisant le protocole suivant, seulement 20 L ou moins, par exemple, du milieu de fermentation APF est requis, au lieu des volumes supérieurs typiquement supérieurs, (par exemple 115 L) de milieu de fermentation nécessaires pour produire des quantités utiles dans le commerce pour obtenir une neurotoxine *botulinum*.

[0240] Le poste de travail anaérobie MACS (DSA Whitley) avec sas étanche à l'air fournit un environnement déficient en oxygène dans lequel manipuler les organismes anaérobies. L'accès et la sortie de la chambre se font par l'intermédiaire d'un système de hublot, comprenant des portes interne et externe. L'unité est commandée en température pour maintenir un réglage utilisateur dans la chambre. Une plaque de condensation à régulation de l'humidité assure l'élimination efficace de l'excès d'humidité dans la chambre. La chambre est éclairée pour l'utilisation par l'opérateur et fournit une alarme pour : basse pression de gaz, flux de gaz continu, et perte de conditions de puissance. La chambre est équipée d'un filtre HEPA pour réduire les taux particuliers viables et non viables dans la chambre anaérobie. Les conditions anaérobies sont maintenues en utilisant le système de lavage atmosphérique « Anotox » et le catalyseur Déoxo « D » au Palladium. L'eau de condensation de la plaque de condensation est recueillie et canalisée vers un réservoir externe où elle est retirée.

[0241] Comme décrit ci-dessus, un processus APF est utilisé pour la préparation d'une WCB APF, ayant des flacons de banque cellulaire stockés en dessous de -135 °C. Un flacon de banque de cellules APF WCB est décongelé à température ambiante pendant environ 15 min avant inoculation du milieu de culture, suivi par une seule étape de culture telle que décrite ci-dessus pour établir une culture « de semences ». Cela est effectué dans un système modulaire à régulation atmosphérique utilisant des techniques aseptiques tout au long, pour minimiser la biocharge. Le système modulaire

à régulation atmosphérique est nettoyé avant d'entreprendre l'inoculation du flacon de culture de semences terminé avec des teneurs en flacon APF WCB. Le milieu de culture est préparé à l'aide d'acide chlorhydrique 1 N et d'hydroxyde de sodium 1 N (pour l'ajustement du pH), D(+) Glucose, anhydre (Mallinckrodt Baker, cat# 7730, 4,00 g), Peptone de soja Type II (SPTII) (Marcor, cat# 1130, 8,00 g), eau pour injection (WFI) 400,0 mL et extrait de levure (YE) (BD cat# 212730, 4,00 g). La solution de peptone de soja de type II et d'extrait de levure est réalisée en mesurant 300 mL de WFI avec une éprouvette graduée de 500 mL et versée dans une bouteille de culture de semences. La bouteille de culture de semences est placée sur un agitateur et l'agitateur activé. 8,00 g de SPTII et 4,00 g d'extrait de levure sont ajoutés à la bouteille de culture de semences et mélangés jusqu'à dissolution. Si la dissolution n'est pas complète après le mélange, le mélange sera chauffé sur un réglage bas. Le pH est mesuré et ajusté à environ $7,30 \pm 0,05$. La solution de milieu est portée jusqu'à environ 360 mL avec WFI. La bouteille de culture de semences est ventilée de manière appropriée pour permettre le transfert de vapeur et de gaz. Une solution de glucose à 10 % (p/v) est préparée en mesurant environ 30 mL de WFI avec un cylindre gradué de 100 mL et placée dans la bouteille d'addition de glucose pré-assemblée, qui est placée sur un agitateur et l'agitateur activé. Environ 4,00 g de glucose sont ajoutés à la bouteille d'addition de glucose et mélangés jusqu'à dissolution (une faible chaleur est utilisée si nécessaire à une dissolution) et une solution de glucose de qs (quantité suffisante) à 40 mL avec WFI. L'addition du glucose est alors coiffée de manière lâche avec un capuchon d'évent. Les flacons de glucose et de culture de semences sont tous deux autoclavés à 123 °C pendant 30 minutes pour stérilisation. Après stérilisation, les deux articles sont retirés de l'autoclave et laissés à refroidir dans une armoire de bio-sécurité. Après refroidissement aseptique, 10 % de la solution de glucose sont transférés dans la bouteille de culture de semences contenant l'extrait de levure et la solution de peptone II de soja et mélangées, ce qui fournit un flacon de culture de semences complet.

- [0242] Cette bouteille de culture de semences complète est placée dans le MACS pré-nettoyé (dans lequel un indicateur anaérobie préparé est placé). Le capuchon de la bouteille de culture de semences terminée est desserré. La bouteille de culture de semences complète est ensuite placée sur une plaque d'agitation au sein du MACS (plaque d'agitation activée à environ 150 tours/minute) et le milieu dans la bouteille de culture de semences terminée est réduit pendant un minimum de 12 heures à environ 34,5 °C/1 °C au sein du MACS, puis on prélève une ébauche de milieu de 1 mL pour la mesure de densité optique (pour la détermination de la biomasse à 540 nm). Ensuite, la bouteille de culture de semences complète, dans le MACS (anaérobie) est inoculée. Un flacon de culture APF WCB est obtenu à partir de la

banque de cellules congelées et amené dans le MACS. Le flacon est décongelé pendant environ 10 à 15 minutes, après quoi environ 400 µL des contenus de flacon sont placés directement dans le milieu dans le flacon de culture de semences terminé. Le bouchon sur la bouteille de culture de semences complète est desserré complètement et le bouchon est placé au-dessus de la bouteille et le rythme d'agitation est fixé à 150 tr/min. Après au moins environ 11 heures d'incubation dans le MACS, la production de fermentation est entreprise, comme décrit ci-après.

[0243] Des sondes (par exemple, sonde redox, sonde à pH, sonde de turbidité, par exemple, par Broadley James et Optek) et la configuration de séquence du fermenteur, tel qu'un fermenteur en acier inoxydable 30 L, sont contrôlées et calibrées, et insérées dans leurs orifices fermenteurs respectifs et serrées en place. Par exemple, un fermenteur peut être un système de fermenteur ABEC 30 L (VT) constitué d'un récipient fermenteur de 30 L en volume, un système d'entraînement d'agitateur, un ensemble de tuyauterie pour raccords d'utilité (CIP, vapeur propre, CDA, azote, oxygène, eau réfrigérée de procédé, bio-déchets, et vapeur d'usine), une instrumentation (pH, température, pression, ReDox, densité optique, et débit massique), et quatre pompes péristaltiques. La vitesse d'agitation montée inférieure est contrôlée à l'aide d'un entraînement à fréquence variable Allen-Bradley (VFD). Le contrôle semi-automatique et automatique du système est géré par un automate Allen-Bradley ControlLogix avec programmation. Le système est conçu pour fournir un contrôle PID en boucle fermée (proportionnel-intégral-dérivé) de température, pression, pH, et redox de la culture lors des opérations de fermentation. Un Allen-Bradley DeviceNet® (un réseau à dispositif ouvert) est utilisé pour commander et communiquer avec des dispositifs et capteurs sur le patin.

[0244] Pour les modes de maintien stérile, d'équilibre, d'exécution et de récolte, l'agitation, la température, la pression et le recouvrement d'azote sont opérés avec les points de consigne suivants.

[0245] Pour le mode de maintien stérile et d'équilibre :

[0246] [Tableaux 11]

Paramètre contrôlé	Points de consigne et plage
Agitation	100 tr/min $\pm$ 10
Recouvrement d'azote	12 SLPM $\pm$ 2
Pression de fermenteur	5 psig $\pm$ 1
Température de fermenteur	35 $\pm$ 1 °C
Redox	-390 à 150 mV

[0247] Pour le mode EXÉCUTION :

[0248] [Tableaux12]

Paramètre contrôlé	Points de consigne et plage
Agitation	70 tr/min $\pm$ 5
Recouvrement d'azote	12 SLPM $\pm$ 2
Pression de fermenteur	5 psig $\pm$ 1
Température de fermenteur	35 $\pm$ 1 °C

[0249] Pour le mode récolte :

[0250] [Tableaux13]

Paramètre contrôlé	Points de consigne et plage
Agitation	150 tr/min $\pm$ 10
Recouvrement d'azote	10 SLPM $\pm$ 2
Pression initiale de fermenteur	0 psig
Température de fermenteur	25 $\pm$ 1 °C

[0251] Pour préparer un milieu de fermentation, le matériau nécessaire comprend D(+) Glucose, anhydride (Mallinckrodt Baker, cat# 7730, 300,0 g), Peptone de soja Type II (SPTII) (Marcor, cat# 1130, 650,0 g), eau pour injection (WFI, 13 L) et extrait de levure (YE) (BD Cat# 212730, 240,0 g), ainsi que des équilibres standards, une bonbonne (20 L par exemple), une bouteille en verre (5 L), des cylindres gradués, des barres d'agitation et des agitateurs. On ajoute environ 10 L de WFI dans la bonbonne avec une barre d'agitation. La bonbonne est placée sur un agitateur et l'agitateur est activé, après quoi on ajoute environ 650,0 g de peptone de soja de type II, ainsi qu'à environ 240,00 g de YE. Le milieu de fermentation est q.s. (quantité suffisante) à 13 L avec WFI, et la bonbonne est coiffée. Une solution de glucose à 10 % (p/v) est ensuite préparée en ajoutant environ 2 L de WFI dans une bouteille de verre 5 L (avec une barre d'agitation en son sein). Placés sur un agitateur et avec la barre en rotation, environ 300,00 g de glucose sont ajoutés dans la bouteille, et mélangés jusqu'à dissolution. La solution de glucose est de q.s. à 3 L avec WFI et le capuchon sur la bouteille, fournissant ainsi une solution de glucose à 10 %.

[0252] Le milieu de fermentation dans la bonbonne est ajouté au fermenteur et la pré-vapeur en place du volume fermenteur enregistré et la séquence de fonctionnement de fer-

mentation est avancée. À la fin du SIP (vapeur en place) ($122\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), le volume du fermenteur post-SIP est noté. Un ensemble d'ajout de glucose, comprenant un récipient ayant un tube à partir de celui-ci avec un filtre de $0,2\text{ }\mu\text{m}$ en ligne (PALL Corp.) et une pompe péristaltique, est connecté au fermenteur et la ligne est soumise au SIP et laissée à refroidir. Un orifice de vanne d'addition est ouvert et environ 3 L de glucose (filtre stérilisé) sont ajoutés, et la quantité appropriée de WFI (filtre stérilisé) à q.s. du volume total de fermenteur à 20 L est ajouté à la bouteille d'addition de glucose et pompé dans le fermenteur à travers la même ligne de filtre de glucose. Le port de vanne d'addition est fermé. Le milieu de fermentation de production a son pH ajusté ensuite, à environ pH $7,3 \pm 0,05$, avec de l'hydroxyde de sodium 1 N stérile ou de l'acide chlorhydrique 1 N, utilisant le SIP de lignes d'addition, comme requis. Par la suite, des paramètres de maintien stérile sont définis et maintenus pendant environ 12 heures avant l'inoculation. La concentration en glucose de départ du milieu est mesurée à l'aide d'un analyseur de métabolite et la concentration en glucose enregistrée.

[0253] Comme indiqué ci-dessus, à la fin de l'incubation de la culture de semences (environ 11 ± 1 heure), 1 mL d'échantillon est prélevé pour mesure de densité optique (OD). Une OD est mesurée hors ligne à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et si dans la plage appropriée la valeur de OD est enregistrée et la culture est utilisée pour la fermentation. La sonde de turbidité du fermenteur est par conséquent mise à zéro. La bouteille d'inoculation de semences, de la chambre anaérobie, est amenée au fermenteur et un ensemble de transfert d'inoculation de semences (un récipient de semence avec du milieu de culture APF dans celui-ci, le récipient ayant une ligne de transfert d'inoculation de culture avec un ensemble connecteur Kleenpak™ stérile disponible auprès de PALL Corp. ou Millipore). La ligne de transfert d'inoculation de semences est alors fixée à une pompe péristaltique et la ligne de transfert d'inoculation avec connecteur Kleenpak stérile est connectée au fermenteur. La pression de fermenteur est abaissée à 2 psig et tout le volume de la bouteille d'inoculation de semences est pompé dans le fermenteur. A la fin de l'inoculation, les unités d'absorbance en ligne (AU) du fermenteur sont enregistrées, les paramètres de fermenteur sont mis en mode EXÉCUTION et le temps est enregistré.

[0254] La fermentation procède ensuite (les cycles de fermentation peuvent aller d'environ 60 heures à environ 80 heures, de préférence d'environ 68 heures à environ 76 heures, le plus préférentiellement pendant environ 72 heures) alors que des échantillons sont prélevés du fermenteur, à 24 et 48 heures, par exemple, tout en maintenant des conditions aseptiques. Des tests qui sont exécutés sur au moins un échantillon prélevé pendant la fermentation peuvent comporter, mais sans s'y limiter, des mesures de densité optique hors ligne, des mesures de glucose, ELISA, SDS-

PAGE, Western blot, par exemple. À la fin de la fermentation (fin du volume de bouillon de fermentation est d'environ 18 à 19 L, par exemple), un échantillon peut être prélevé (pour tester par exemple les mesures de densité optique hors ligne, les mesures de glucose, ELISA, SDS-PAGE, Western blot et la quantification ADN/ARN.

[0255] À la fin de la fermentation, la densité optique en ligne, l'EFT (temps de fermentation écoulé), et le temps de fin de fermentation sont enregistrés, ainsi que les tr/min d'agitation, la température en °C, la pression psig et le recouvrement d'azote slpm et la redox mV. Ensuite, le bouillon de fermentation de production est soumis à une récolte, à savoir le bouillon de fermentation de production est clarifié par filtration moyennant quoi on recueille par exemple environ 15 L de filtrat. Les paramètres de fermentation sont fixés pour RÉCOLTE et l'ensemble filtre pour clarification est préparé (CUNO, 3M filtration) qui comporte un pré-filtre, un filtre de profondeur et au moins un manomètre. Le pré-filtre et filtre de profondeur sont rincés par environ 20 L d'eau pour injection. Après rinçage, l'ensemble de filtration est fixé au port de récolte/drain du fermenteur. La température de fermenteur est diminuée à environ 25 °C, après quoi la clarification du bouillon de fermentation commence (enregistrer le temps de début de clarification, la OD initiale, le pH initial, la température initiale et le volume initial de fermenteur). La pression dans le fermenteur est augmentée à un taux d'environ 1 psi (livre par pouce carré) environ toutes les 10 minutes pendant la filtration, jusqu'à atteindre une pression d'environ 6 psi, à laquelle la pression est maintenue jusqu'à la fin de la récolte. Ce filtre élimine environ 80 % de l'ARN/ADN dans le milieu de fermentation APF (le reste essentiellement éliminé lors des étapes de chromatographie ultérieures, comme abordé ci-dessous), ce qui s'affranchit de la prise en charge préalable de la RNase et/ou de la DNase pour éliminer de tels composants du bouillon de fermentation. Des paramètres de processus, tels que la pression d'entrée de pré-filtre, la pression d'entrée de filtre de profondeur, la pression de fermenteur, le volume d'agitation et de filtrat sont surveillés à tous les 2 L de filtrat collectés, à l'issue de quoi le temps de fin de clarification et le volume de filtrat collectés sont enregistrés. Après achèvement de l'étape de récolte, les systèmes sont décontaminés et nettoyés.

[0256] La bonbonne de filtrat est amenée dans le BSC pour l'échantillonnage, à partir duquel environ ≤ 10 mL de filtrat est prélevé pour des mesures de OD hors ligne et d'autres analyses (par exemple ELISA, SDS-PAGE, ADN/ARN et Western blot).

[0257] Le filtrat est ensuite soumis à une ultrafiltration/dilution. Un ensemble d'unité de filtre à flux tangentiel (TFF) est assemblé. L'unité TFF est rincée pendant environ 90 minutes avec WFI à un taux préféré d'environ 2 L par minute puis l'unité TFF est aseptisée en faisant circuler de l'hydroxyde de sodium à 0,1 N (re-circulée) à travers elle pendant environ 60 minutes, après quoi 1 L de tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 6,5 est amené à circuler à l'intérieur, suivi par un rinçage avec

WFI pendant environ 30 minutes. Le filtrat de l'étape de récolte (environ 15 L) est ensuite passé à travers la TFF (cela est effectué dans une armoire de biosécurité), concentrant le filtrat jusqu'à environ 5 L +/- 0,5 L (l'étape de concentration passe à environ 2 L par minute et à une pression trans-membranaire d'environ 5 psig). Un échantillon du perméat peut être prélevé et soumis à des tests ELISA, dsDNA, SDS-PAGE et Western blot par exemple. Une fois concentrée à environ 5 L +/- 0,5 L, le regroupement de rétentat est ensuite dilué jusqu'à environ 20 L avec environ 15 L de tampon phosphate de sodium 10 mM filtré stérile, pH 6,5, à travers la TFF, à environ une vitesse de 2 L par minute. Un échantillon peut ensuite être à nouveau prélevé et soumis à des tests ELISA, ADN/ARN, SDS-PAGE et western blot par exemple. Le matériau d'ultrafiltration/dilution (rétentat) est stocké à 4 °C.

- [0258] Après utilisation tous les systèmes sont décontaminés en utilisant soit de l'hydroxyde de sodium 1N soit des températures de stérilisation (vapeur) et nettoyés.
- [0259] Les matériaux, équipements et procédures suivants sont utilisés pour fabriquer les solutions, tampons, etc., présentés ci-après pour une utilisation dans un exemple de procédé, c'est-à-dire dans la purification du milieu de fermentation obtenu à partir des procédés de l'exemple 6, de manière à obtenir une solution purifiée de complexe de neurotoxine *botulinum* de type A. Des tampons exemplaires utilisés (filtrés à travers un filtre à vide de 0,2 micron et leur conductivité mesurée en mS/cm, pour un enregistrement) comportent : phosphate de sodium 10 mM, pH 6,5 ; phosphate de sodium 50 mM, pH 6,5 ; acétate de sodium 50 mM, pH 4,8 ; acétate de sodium 50 mM, chlorure de sodium 170 mM, pH 4,8 ; acétate de sodium 50 mM, chlorure de sodium 250 mM, pH 4,8 ; acétate de sodium 50 mM, chlorure de sodium 1 M, pH 4,8 ; acétate de sodium 50 mM, pH 4,0 et citrate 10 mM, pH 6,5.
- [0260] Voici un exemple d'opérations de purification et d'obtention de neurotoxine *botulinum* de type A des procédés de l'exemple 6. Toutes les pièces de contact avec le produit sont conçues et construites pour assurer qu'elles ne sont pas réactives et non absorbantes. En outre, tous les équipements sont conçus pour permettre l'utilisation de systèmes jetables à usage unique ou sont conçus et construits pour faciliter la stérilisation, le nettoyage et la décontamination selon des procédés documentés, validés. Les systèmes ou patins sont conçus pour ne pas être en contact avec le produit tandis que les chemins d'écoulement sont conçus pour être jetables à usage unique, y compris les colonnes de chromatographie et l'ensemble des tubes associés. Des composants de chromatographie sont obtenus auprès de AlphaBio et des composants UF/DF sont obtenus auprès de Scilog Inc. Les configurations de chromatographie utilisées comportent une pompe péristaltique pour une administration de solution avec un entraînement à vitesse variable, un collecteur de soupape d'admission avec 5 entrées, un collecteur de soupape de colonne avec un réseau de 3 vannes automatisées, un

collecteur de soupape de sortie avec 3 sorties, une surveillance d'effluents de colonne, y compris pH, conductivité et UV, une collection de pics sur la base d'absorbance UV, et d'une instrumentation et des commandes requises pour compléter les opérations de purification. Le système de contrôle dispose à la fois du logiciel et du matériel destiné à contrôler le procédé de purification. Des commandes et des données sont saisies par l'intermédiaire d'une borne IHM (Interface Homme Machine). L'opérateur lance toutes les fonctions de procédé automatisé par des commandes au niveau de la HMI et surveille et ajuste les paramètres de procédé tels que les débits d'alimentation, la pression, la conductivité, le pH, l'absorbance UV et les positions de vanne individuelles.

- [0261] Le système UF/DF comporte une pompe de recirculation, une pompe de diafiltration, 2 balances et un porte-filtre à flux tangentiel (TFF). La pompe de recirculation s'interface avec 3 capteurs de pression jetables et une des balances (situés sous le réservoir de perméat) pour contrôler le débit pour maintenir une pression transmembranaire définie et arrêter, en fonction du poids du réservoir de perméat. La pompe de diafiltration s'interface avec la seconde balance (située sous le réservoir de rétentat) pour démarrer et arrêter, sur la base du maintien d'un poids constant du réservoir de rétentat.
- [0262] Après concentration et dilution du matériau de rétentat de l'étape de récolte (récolte du milieu de fermentation exempt de protéine animale), le matériau est chargé sur une colonne d'échange d'anions. Ce qui suit décrit la procédure utilisée pour le conditionnement et le test de la colonne d'échange d'anions utile dans le procédé à deux colonnes de l'exemple 6.
- [0263] Des colonnes pré-conditionnées sont utilisées pour toutes les trois étapes chromatographiques. Tout d'abord, la matière première (milieu APF récolté qui a été soumis à l'ultrafiltration/dilution) est passée à travers la colonne d'échange d'anions (Poros 50HQ, de ABI comme décrit ci-dessus). Au moins 5 volumes de colonne (CV) de phosphate de sodium 50 mM, pH 6,5, sont utilisés pour équilibrer la colonne d'échange d'anions (dans cet exemple, une colonne de capture).
- [0264] Après équilibrage, l'étape de chargement est réalisée, où la matière première (bouillon de fermentation récolté après l'étape de récolte, d'environ 20 L, par exemple)) est chargée sur la colonne d'échange d'anions à une vitesse d'environ 200 cm/h par exemple. Après que 0,5 volume de colonne de matériau chargé a traversé la colonne échangeuse d'anions, le bain de circulation (FT) est collecté dans un récipient tel qu'une cuve de polyéthersulfone, tandis que le complexe de toxine est lié au matériau de colonne d'échange d'anions. Cela est suivi d'une étape de lavage, où au moins environ 15 volumes de colonne du tampon de lavage (par exemple, 50 mM de phosphate de sodium à un pH de 6,5) sont passés à travers la colonne d'échange

d'anions. L'étape de lavage est arrêtée lorsque l'UV, mesuré en sortie de colonne, en temps réel, diminue jusqu'à moins ou est égal à environ 80 mUA. Le volume du tampon de lavage et le volume de regroupement d'écoulement/de lavage sont enregistrés, et un échantillon de 1 mL du bain de flux/lavage est prélevé et testé, par exemple, pour la concentration de toxine, le contenu d'acide nucléique, les protéines de cellules entières, la SDS-PAGE, la qPCR, la 2D LC et l'ELISA.

- [0265] L'étape suivante est l'étape d'élution, où le tampon d'élution (par exemple 50 mM d'acétate de sodium, pH 4,8) est pompé sur la colonne d'échange d'anions. Lorsque la lecture UV en sortie de colonne, en temps réel, augmente jusqu'à environ 150 mUA ou plus, l'ensemble d'éluat dans un récipient pré-rempli avec 1 CV de tampon d'élution (50 mM d'acétate de sodium, pH 4,8) est commencé. La collecte de regroupement d'éluat est arrêtée lorsque la lecture UV diminue jusqu'à moins de 200 mUA (volume collecté à ce point est comprise entre environ 1 et environ 2 CV). Le système de chromatographie est ensuite décontaminé et nettoyé à l'aide d'hydroxyde de sodium 1 N.
- [0266] Le regroupement d'éluat de la colonne d'échange d'anions est ensuite préparé pour addition sur la colonne d'échange de cations. Le volume, le pH, la conductivité et la température d'alimentation d'un éluat d'échange d'anions sont enregistrés et le regroupement d'éluat de la colonne d'échange d'anions est dilué avec 1 CV d'acétate de sodium 50 mM, pH 4,8.
- [0267] Après la traversée de la colonne d'échange d'anions, on procède à une opération de chromatographie d'échange de cations. La colonne d'échange de cations (par exemple Poros® 20HS) est équilibrée avec un minimum de 5 CV de tampon d'équilibration (50 mM acétate de sodium, pH 4,8). Après équilibrage, le regroupement d'éluat dilué de la colonne d'échange d'anions est chargé sur la colonne d'échange de cations et le volume total chargé est enregistré. Après que 0,5 volume de colonne de regroupement d'éluat dilué chargé a traversé la colonne d'échange de cations, le regroupement d'écoulement (FT) est collecté. Un premier lavage de la colonne d'échange de cations est effectué où environ 3-5 CV d'acétate de sodium 50 mM, pH 4,8, est passé à travers la colonne d'échange de cations (volume de premier tampon de lavage utilisé est enregistré). Un deuxième lavage est effectué, où environ 3 CV de chlorure de sodium 170 mM, acétate de sodium 50 mM, pH 4,8, sont pompés à travers la colonne, cet éluat étant recueilli dans un nouveau récipient marqué « pic de LAVAGE 2 ». La collecte est lancée lorsque les lectures UV augmentent à plus ou moins 50 mUA. 1 CV est collecté et le deuxième volume tampon de lavage utilisé est enregistré.
- [0268] L'élution du complexe de toxine solide de la colonne d'échange de cations est effectuée en utilisant un tampon d'élution (par exemple, 250 mM de chlorure de sodium dans 50 mM d'acétate de sodium, pH 4,8) qui est pompé sur la colonne d'échange de cations. Lorsque la lecture UV de l'élution atteint au moins

environ 100 mUA, la collecte d'éluat commence dans des récipients préremplis de tampons de dilution (40 mL de phosphate de potassium 100 mM, pH 6,8 et 60 mL de citrate de potassium 10 mM, pH 6,5). La collecte d'éluat de la colonne d'échange de cations continue jusqu'à ce que les lectures UV diminuent jusqu'à environ 100 mU ou moins. Le volume total d'élution, après dilution, est enregistré. Le système de chromatographie d'échange de cations est ensuite décontaminé et nettoyé.

[0269] Après l'élution de la colonne d'échange de cations, l'éluat est soumis à une filtration. Un système de filtration à flux tangentiel (TFF) est utilisé, en utilisant trois membranes 100K MWCO (Sartorius AG, Goettingen, Allemagne) empilées les unes sur les autres. Le volume initial du regroupement d'éluat d'échange de cations est noté, comme sont les descriptions de diafiltration/équibration et d'assainissement. Par exemple, la solution de diafiltration peut être de 10 mM citrate de potassium, pH 6,5 et la solution sanitaire peut être de l'hydroxyde de sodium 0,1 N. L'ensemble du système procède au raccordement d'un tube du réservoir contenant l'éluat soit de la colonne cation (IAPF) soit de la colonne HIC (FAPF), l'éluat contenant la toxine botulique, à travers la tête de pompe d'ultrafiltration en entrée de la membrane de filtration à flux tangentiel. Un deuxième tube à partir de la sortie de perméat de la membrane de filtration à flux tangentiel est relié au récipient de perméat d'ultrafiltration (UF). Un tube de la sortie de rétentat de la membrane de filtration à flux tangentiel au réservoir de rétentat est fixé, et un quatrième tube à partir du tampon de diafiltration (DF) à travers la tête de pompe de diafiltration et dans le réservoir de rétentat est également fixé. Le tampon de stockage du système est rincé, comme la membrane, par rinçage de la membrane avec au moins environ 720 mL d'eau pour injection (WFI) avec le rétentat dirigé vers des déchets, après quoi la membrane est en outre rincée avec au moins environ 4200 mL d'eau pour injection avec le rétentat recirculant vers le réservoir. Après cela, l'assainissement membranaire (si nécessaire) est effectué par rinçage de la membrane avec au moins environ 200 mL d'hydroxyde de sodium 1N avec le rétentat dirigé vers des déchets, suivi d'un rinçage de la membrane avec au moins environ 200 mL de NaOH 1N avec le rétentat recirculant vers le réservoir pendant un minimum de 30 minutes. L'équilibrage est ensuite réalisé, en rinçant la membrane avec du tampon d'équilibrage (citrate de potassium 10 mM à un pH de 6,5), avec un rétentat dirigé vers des déchets jusqu'à ce que le pH du rétentat et du perméat soit compris entre 0,2 unités du pH du tampon d'équilibrage (par exemple, au sein de +/- 0,2 unités de pH 6,5).

[0270] La concentration du matériau (éluat (regroupement de produit) de la colonne d'échange de cations) est déterminée, pour voir si la dilution ou la concentration (exemple de traitement) est appropriée (un exemple de concentration cible peut être d'environ 0,7 mg/mL). La dilution est accomplie en utilisant le citrate de

potassium 10 mM, pH 6,5. Un volume cible est déterminé, par exemple pour une concentration de produit 0,7 mg/mL (cible vol = (concentration de départ/volume de départ)/0,7 mg/mL).

[0271] Le regroupement de produit (éluat (traité en conséquence ou non) de colonne d'échange de cations) est chargé sur la membrane et la recirculation (avec une sortie de perméat fermée) du système (système TFF) est effectuée pendant au moins 2 minutes sans contre-pression, après quoi la vanne de perméat est lentement ouverte en ajustant la vanne de contre-pression de rétentat à une cible d'environ 7 psig-pression transmembranaire. Pour la dilution, le citrate de potassium 10 mM, pH 6,5 est ajouté au volume cible, et déplacé sur diafiltration sans ultrafiltration ; pour la concentration, on commence par l'ultrafiltration. Pour la diafiltration : des déchets de perméat sont recueillis dans un nouveau récipient (volume de diafiltration cible est de 5X volume de diafiltration) et diafiltrés avec au moins 5 volumes de diafiltration de citrate de potassium 10 mM, pH 6,5. Des données de processus de condensation sont collectées à un minimum d'intervalles de 10 minutes (poids de perméat g/volume mL, pression d'entrée (psig), pression de rétentat (psig), pression de perméat (psig) et pression transmembranaire (psig)). Pour la recirculation/ et le rinçage : avec le filtre de sortie du perméat fermé, le système est remis en circulation/exécuté pendant au moins 2 minutes sans contre-pression et le système est rincé avec au moins 20 mL de citrate de potassium 10 mM, pH 6,5. Le regroupement de produit comporte le rétentat et le rinçage. Un échantillon peut être prélevé dans le regroupement de produit et soumis à une analyse de vérification y compris, par exemple, tests UV à 278 nm, SDS-Page, LcHPLC, SE-HPLC, qPCR, RP- HPLC, Native-Page, AUC, lysat d'améboocytes de *Limulus*, Western Blot et ELISA. Pour le nettoyage post-utilisation, le système est rincé par de l'hydroxyde de sodium 1N, remis en circulation pendant au moins 10 minutes, après quoi le système est rincé et stocké avec de l'hydroxyde de sodium 0,1 N en son sein.

[0272] On réalise ensuite une filtration stérile et un remplissage pour stocker et diviser la neurotoxine en vrac. Un ajustement de concentration est effectué pour ajuster la concentration de toxine, en utilisant le citrate de potassium 10 mM, pH 6,5, à environ 0,5 mg/mL avec l'échantillon de post-rinçage. Si la concentration de toxine est inférieure à environ 0,5 mg/mL, alors aucun ajustement de concentration n'est nécessaire.

[0273] En utilisant une pipette stérile, des aliquotes de 10 mL/0,75 mL dans chacun de tubes à essai de 15 mL/1,5 mL stériles sont réalisées. Le récipient de produit est agité doucement à la main et transfère la quantité requise de solution (contenant une substance médicamenteuse en vrac, i.e toxine *botulinum*) dans chaque flacon. Les échantillons sont conservés au maximum de 5 jours à 2 °C à 8 °C ou 0,75 mL du re-

groupement de produit de filtrat sont transférés dans des cryoflacons. Les cryoflacons sont conservés à $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[0274] **6.7. Exemple 7 : Procédé chromatographique sur colonne pour obtenir une neurotoxine botulique**

[0275] Cet exemple décrit un procédé chromatographique sur en colonne pour obtenir une neurotoxine *botulinum*. Il est envisagé que certaines étapes décrites dans l'exemple 5, certaines étapes décrites dans l'exemple 6, et certaines étapes décrites dans cet exemple 7 puissent être combinées ou commutées les unes avec les autres pour obtenir la neurotoxine *botulinum* telle que considérée comme appropriée de l'avis et le jugement de l'homme du métier.

[0276] Des bactéries de *Clostridium botulinum* sont cultivées et autorisées à croître jusqu'à la fermentation. La culture de fermentation est ensuite utilisée dans la procédure de purification suivante :

[0277] La culture de fermentation est soumise à une précipitation acide en utilisant de l'acide sulfurique 3M pour réduire le pH à 3,5 à une température qui est inférieure à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le précipité acide est ensuite soumis à une filtration à flux tangentiel de $0,1\text{ }\mu\text{m}$ pour concentrer la masse cellulaire. Ensuite, le pH est ajusté à 6,0 et des nucléases sont ajoutées pour réduire la teneur en acide nucléique de cellule hôte. Puis une clarification par centrifugation est effectuée pour éliminer les débris cellulaires et la filtration d'extrémité morte à $0,2\text{ }\mu\text{m}$ est effectuée avec du sulfate d'ammonium ajouté. Le filtrat est ensuite directement chargé sur la colonne d'interaction hydrophobe, Phenyl Sepharose HP (GE Life Sciences), éluée avec un gradient descendant de sulfate d'ammonium, et le pic de produit est isolé.

[0278] On utilise éventuellement une colonne d'échange d'anions et/ou de cations, avant ou après la colonne d'interaction hydrophobe. Si on utilise une colonne d'échange d'anions et/ou une colonne d'échange de cations, elles sont utilisées de préférence après la colonne d'interaction hydrophobe.

Revendications

- [Revendication 1] Composition comprenant un complexe de neurotoxine de *Clostridium botulinum* de sérotype A (BoNT/A) de 900 kDa, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa comprend une BoNT/A de 150 kDa qui est sous la forme d'une pluralité d'espèces de variants de séquence, dans laquelle la pluralité d'espèces de variants de séquence comprend une espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée et une espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère pleine longueur, dans laquelle la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée a une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 4, et la chaîne légère pleine longueur a une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 2, et dans laquelle le rapport de l'abondance des espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée aux espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec la chaîne légère pleine longueur est inférieur à 3,9.
- [Revendication 2] Composition comprenant un complexe de BoNT/A de 900 kDa, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa comprend une BoNT/A de 150 kDa qui est sous la forme d'une pluralité d'espèces de variants de séquence, dans laquelle la pluralité d'espèces de variants de séquence comprend une espèce de variant de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec une chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée, dans laquelle la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée a une séquence d'acides aminés présentée dans SEQ ID NO : 4, et dans laquelle le pourcentage d'abondance des espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa avec la chaîne légère à extrémité C-terminale tronquée dans la pluralité d'espèces de variants de séquence de BoNT/A de 150 kDa est inférieure à 79,5 %.
- [Revendication 3] Composition selon la revendication 1, dans laquelle le rapport d'abondance est mesuré par chromatographie d'échange d'anions (AEX).
- [Revendication 4] Composition selon la revendication 2, dans laquelle le pourcentage d'abondance est mesuré par AEX.
- [Revendication 5] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit par des bactéries de *Clostridium botulinum* cultivées et développées à partir

- d' une banque de cellules actives exemptes de produit d'origine animale.
- [Revendication 6] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa est produit par une souche de Type A de *Clostridium botulinum*.
- [Revendication 7] Composition selon la revendication 6, dans laquelle la souche de Type A de *Clostridium botulinum* est une souche Hall de Type A de *Clostridium botulinum*.
- [Revendication 8] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans laquelle le complexe de BoNT/A de 900 kDa est une onabotulinumtoxine A.
- [Revendication 9] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, qui comprend en outre de l'albumine sérique humaine.
- [Revendication 10] Composition selon la revendication 9, qui comprend environ 0,5 mg d'albumine sérique humaine pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa.
- [Revendication 11] Composition selon la revendication 9 ou 10, dans laquelle l'albumine sérique humaine est l'albumine sérique humaine recombinante.
- [Revendication 12] Composition selon la revendication 9 ou 10, dans laquelle l'albumine sérique humaine est dérivée du plasma humain.
- [Revendication 13] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, qui est exempte de produit d'origine animale.
- [Revendication 14] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, qui comprend en outre du chlorure de sodium.
- [Revendication 15] Composition selon la revendication 14, qui comprend environ 0,9 mg de chlorure de sodium pour 100 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa.
- [Revendication 16] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, qui ne contient pas d'inhibiteur de protéase.
- [Revendication 17] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, qui ne contient pas de chlorhydrate de benzamidine.
- [Revendication 18] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, qui comprend environ 50 unités, environ 100 unités ou environ 200 unités du complexe de BoNT/A de 900 kDa.
- [Revendication 19] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, qui a une puissance d'environ $1,5 \times 10^7$ unités/mg à environ $6,0 \times 10^7$ unités/mg.
- [Revendication 20] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, qui est une composition pharmaceutique en poudre.

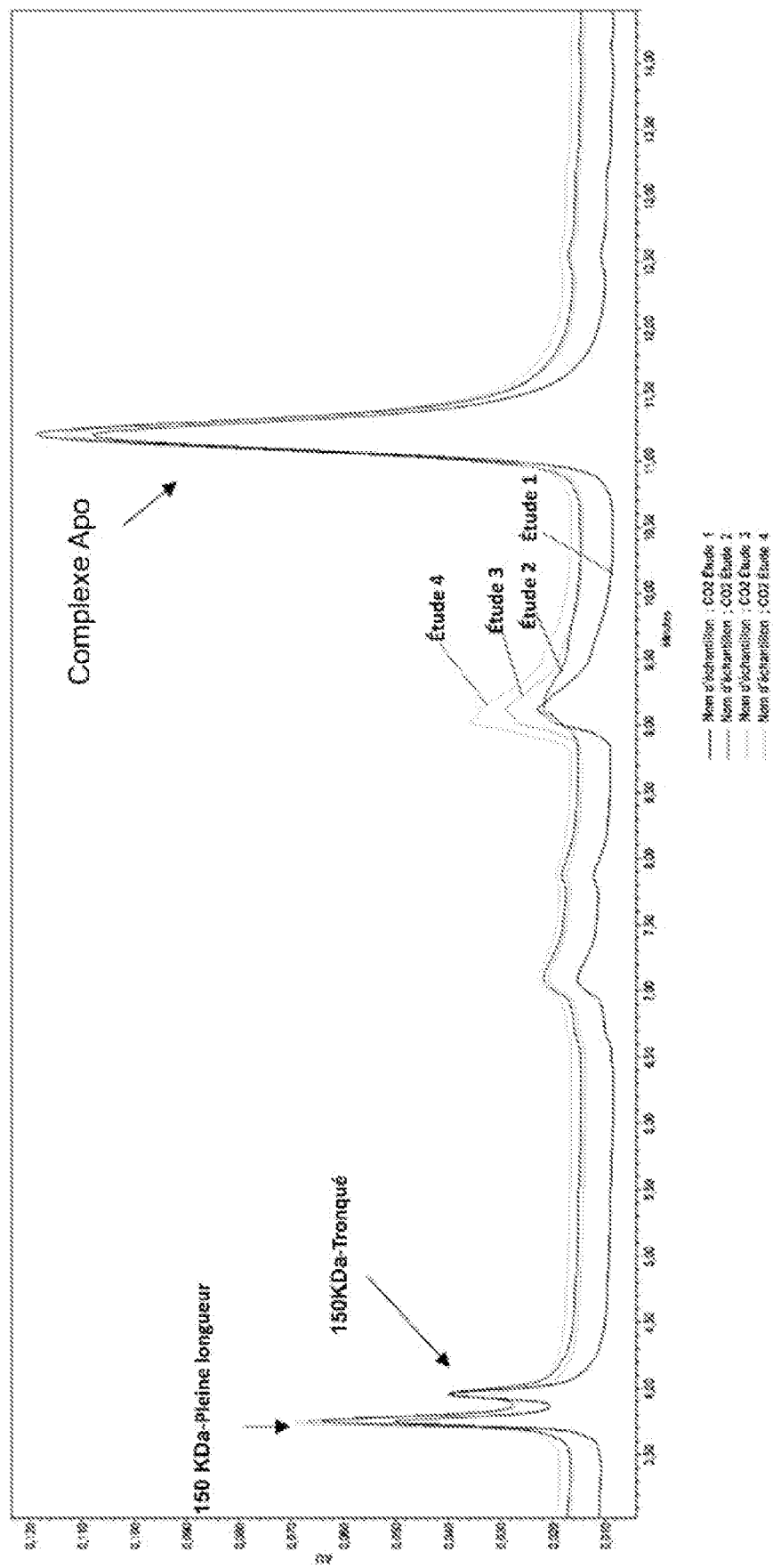
- [Revendication 21] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, qui est séchée sous vide.
- [Revendication 22] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 21, dans laquelle le complexe de BoNT/a de 900 kDa est produit par un procédé qui comprend une ou plusieurs étapes de chromatographie sur colonne.
- [Revendication 23] Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 22, dans laquelle la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent une chromatographie d'interaction hydrophobe.
- [Revendication 24] Composition selon la revendication 23, dans laquelle la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent en outre une chromatographie d'échange d'anions.
- [Revendication 25] Composition selon la revendication 23 ou 24, dans laquelle la ou les étapes de chromatographie sur colonne comprennent en outre une chromatographie d'échange de cations.
- [Revendication 26] Procédé de production d'une composition comprenant BoNT/A, ledit procédé comprenant l'incubation d'une culture de bactéries de *Clostridium botulinum* dans un fermenteur de production en présence de CO₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
- [Revendication 27] Procédé selon la revendication 26, dans lequel l'étape d'incubation est réalisée en présence de CO₂ et N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
- [Revendication 28] Procédé selon la revendication 27, dans lequel l'étape d'incubation est réalisée en présence de 25 % de CO₂ et 75 % de N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
- [Revendication 29] Procédé selon la revendication 27, dans lequel l'étape d'incubation est réalisée en présence de 50 % de CO₂ et de 50 % de N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
- [Revendication 30] Procédé selon la revendication 27, dans lequel l'étape d'incubation est réalisée en présence de 75 % CO₂ et 25 % N₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
- [Revendication 31] Procédé selon la revendication 27, dans lequel l'étape d'incubation est réalisée en présence de 100 % de CO₂ dans le recouvrement d'espace de tête de fermenteur pendant le processus de fermentation.
- [Revendication 32] Procédé de traitement d'un patient qui en a besoin, comprenant l'administration d'une composition selon l'une quelconque des reven-

dications 1 à 25.

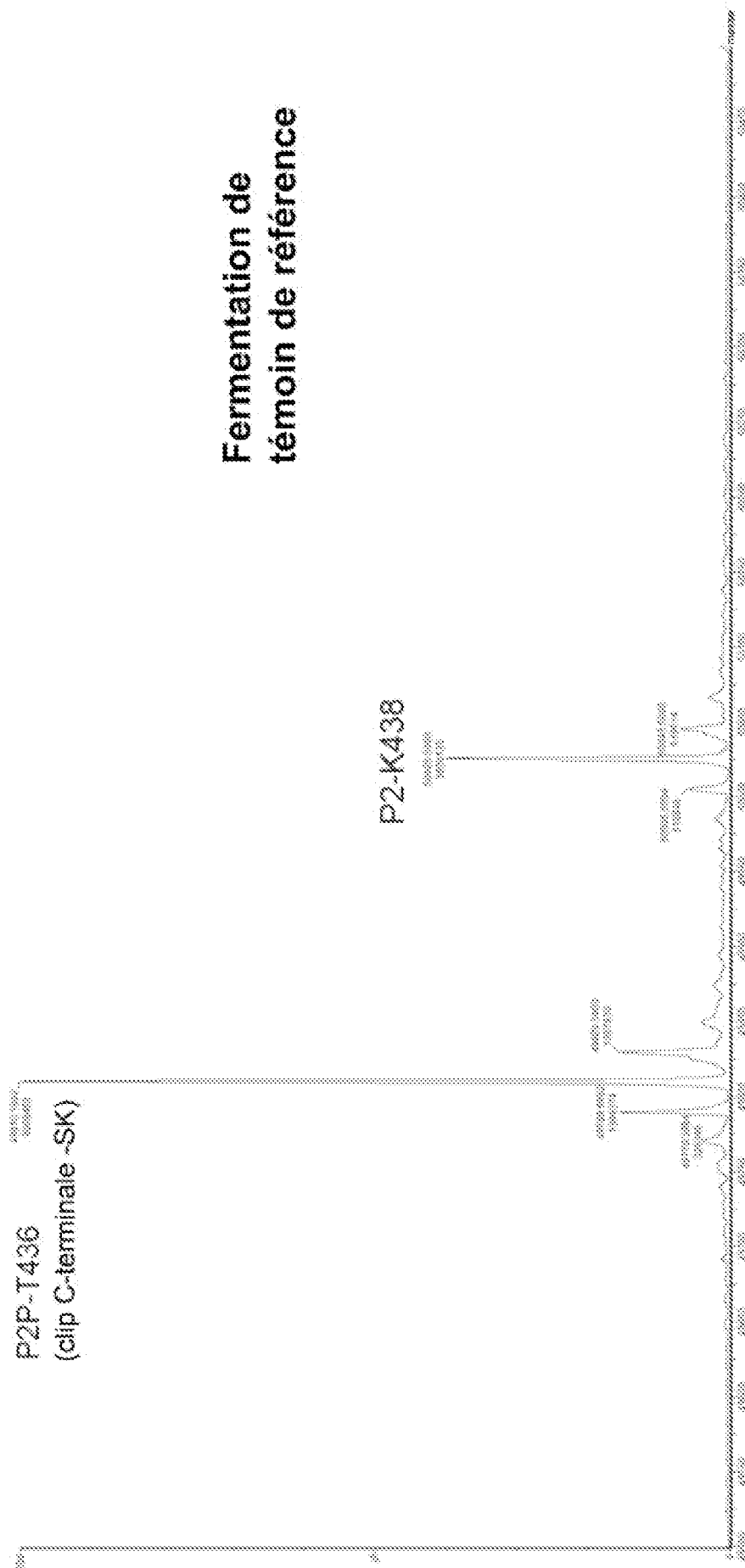
[Revendication 33] Procédé sensiblement tel que décrit ici.

[Revendication 34] Composition sensiblement telle que décrite ici.

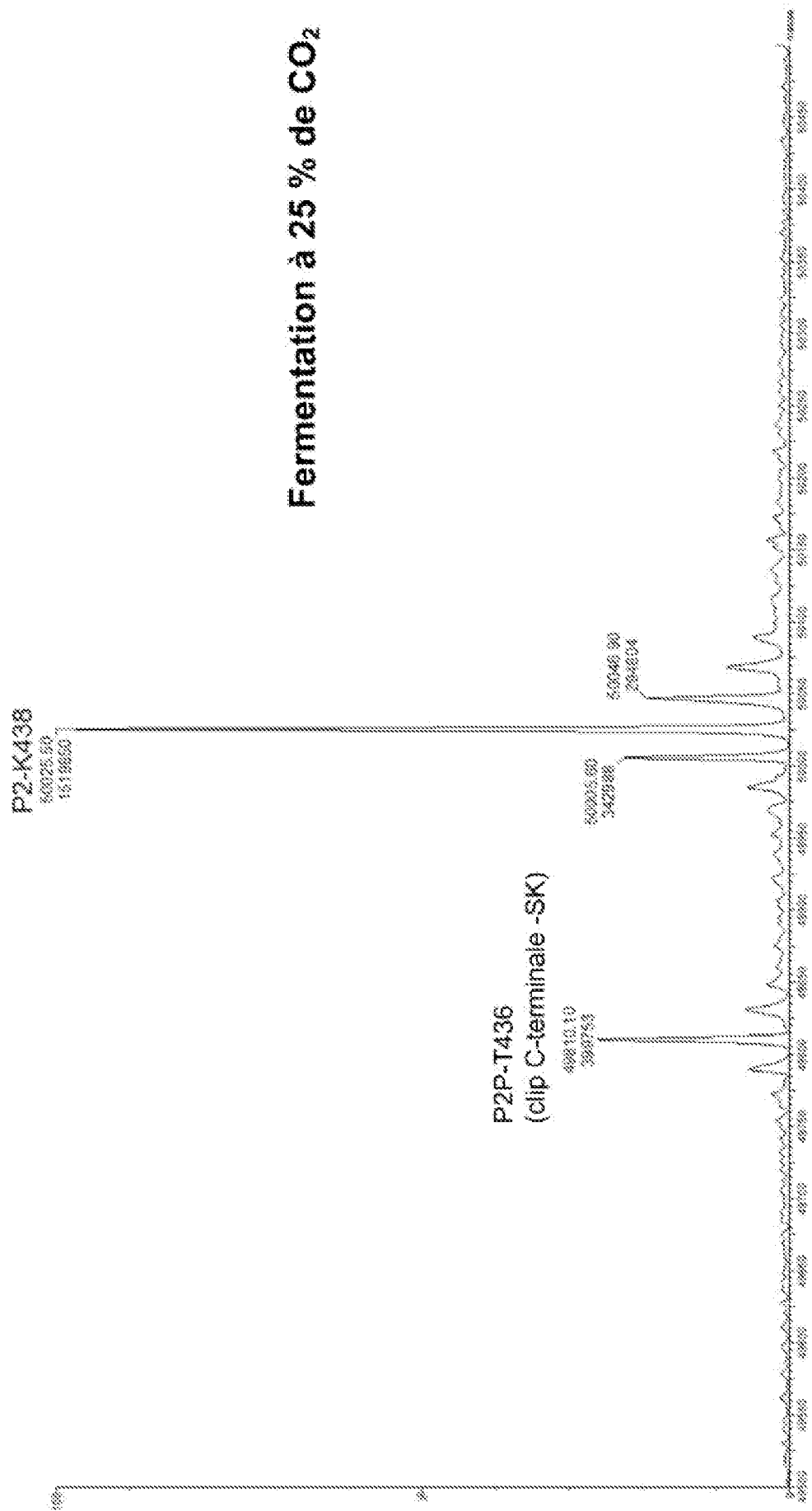
[Fig. 1]



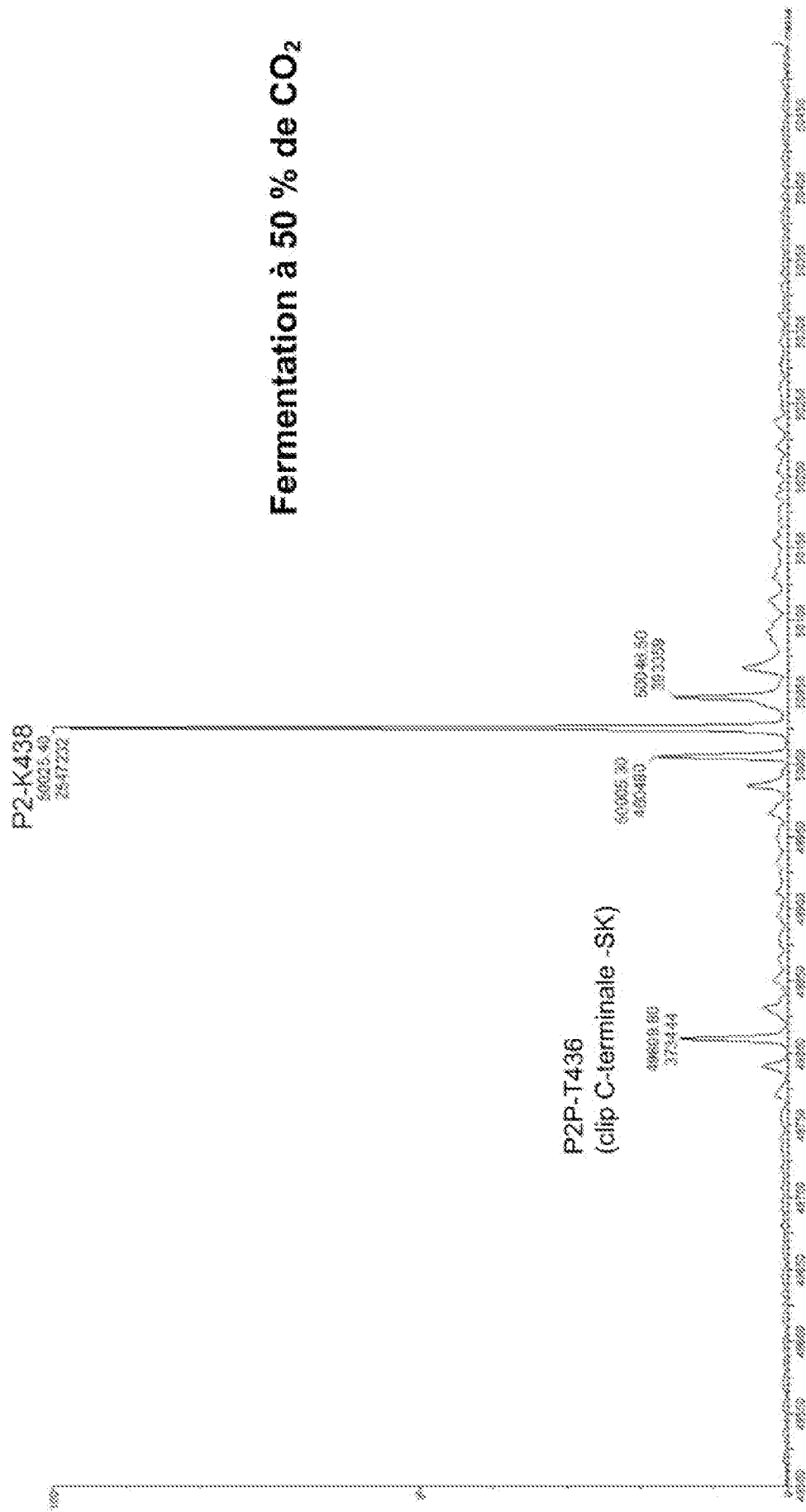
[Fig. 2A]



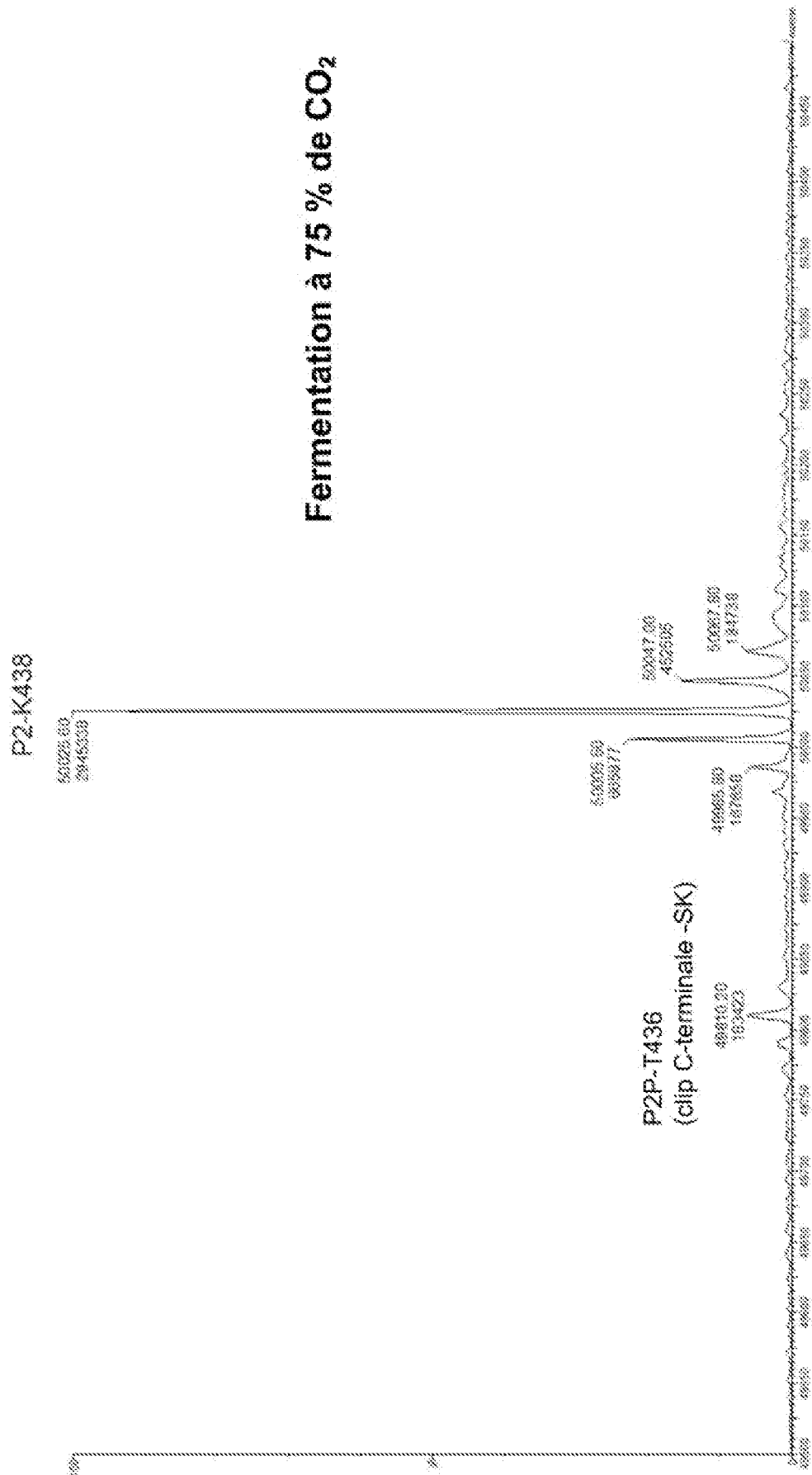
[Fig. 2B]



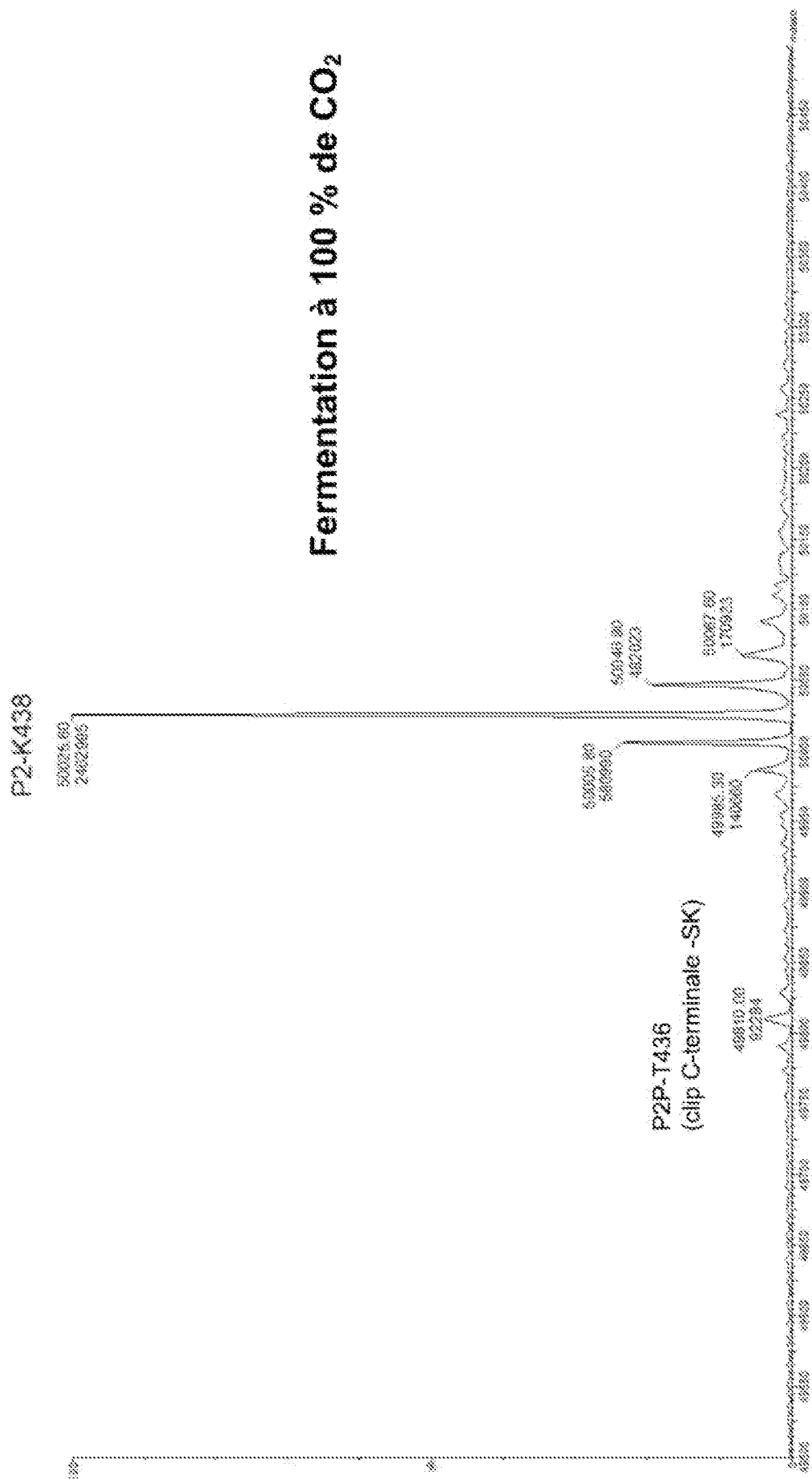
[Fig. 2C]



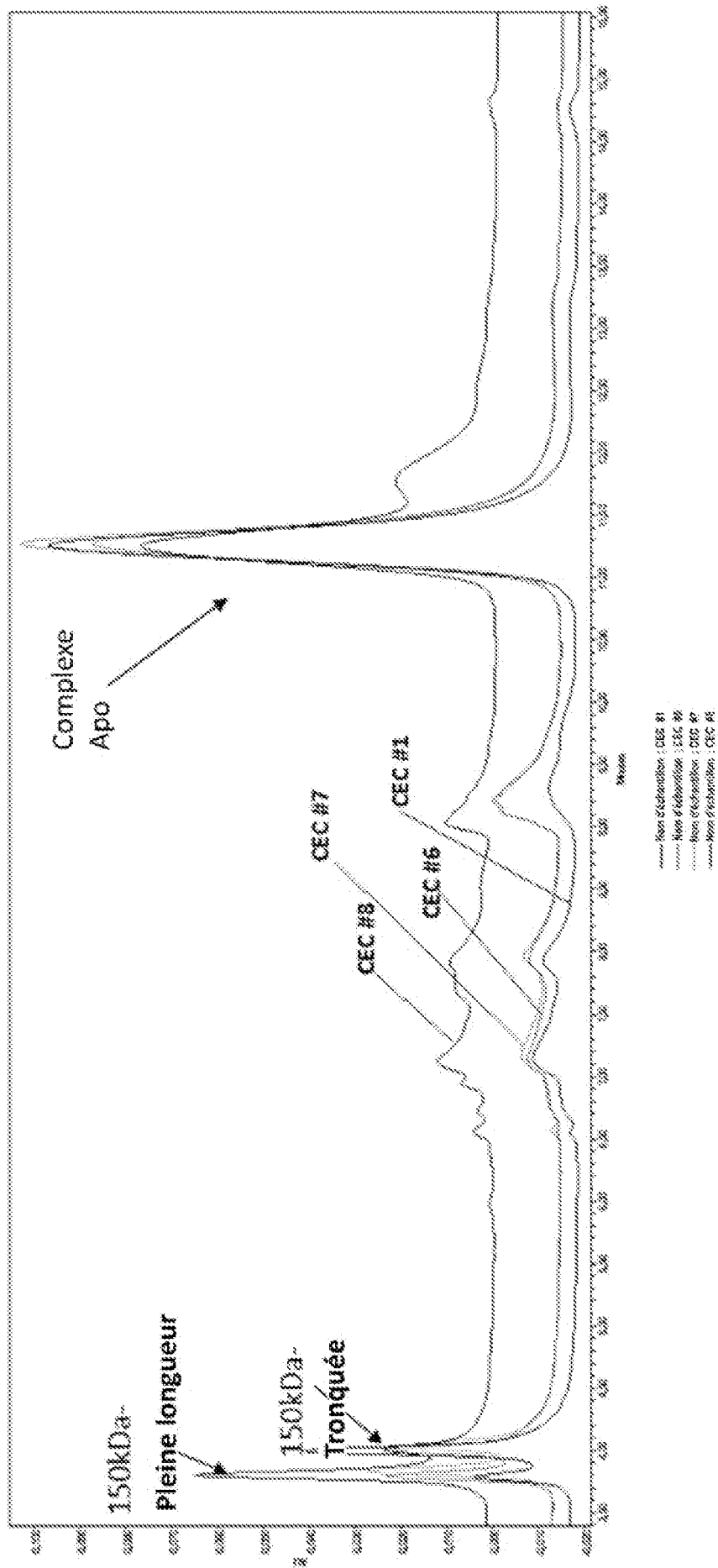
[Fig. 2D]



[Fig. 2E]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

