



(10) 授权公告号 CN 108350043 B

(45) 授权公告日 2022.06.14

(21) 申请号 201680061642.X

(22) 申请日 2016.11.23

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108350043 A

(43) 申请公布日 2018.07.31

(30) 优先权数据

10-2015-0168196 2015.11.30 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2016/013506 2016.11.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/095062 EN 2017.06.08

(73) 专利权人 株式会社大熊

地址 韩国京畿道

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 陈桉

(51) Int.Cl.

C07K 14/33 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/30 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

B01D 15/36 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101062009 A, 2007.10.31

US 2006228780 A1, 2006.10.12

AU 2005327458 A1, 2006.10.05

CN 1930186 A, 2007.03.14

审查员 刘帅

(72) 发明人 金敬伦 金清世 金明燮 薛德莹

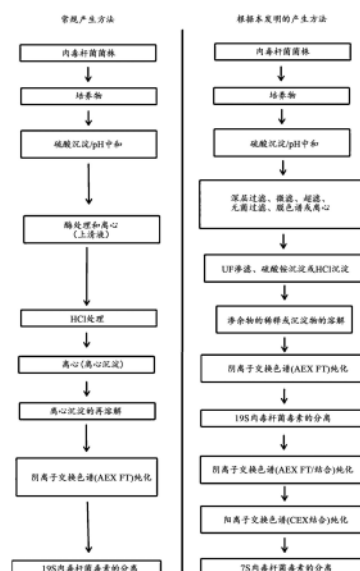
权利要求书2页 说明书14页 附图7页

(54) 发明名称

用于产生肉毒杆菌毒素的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于产生肉毒杆菌毒素的方法,其包括:(a)用酸处理肉毒杆菌毒素产生菌株的培养物以形成含有肉毒杆菌毒素的沉淀物;(b)将缓冲液添加至步骤(a)的含有肉毒杆菌毒素的沉淀物,随后通过选自以下组成的组的至少一个方法澄清:深层过滤(DF)、微滤(MF)、超滤(UF)、无菌过滤、膜色谱(MC)和离心;(c)使步骤(b)的含有肉毒杆菌毒素的溶液经过UF渗滤、硫酸铵沉淀或盐酸沉淀,然后在缓冲溶液中稀释由UF渗滤产生的渗余物,或在缓冲液中溶解由硫酸铵沉淀产生的沉淀物或盐酸沉淀物;和(d)使步骤(c)的渗余物稀释液、硫酸铵沉淀物溶液或盐酸沉淀物溶液经过阴离子交换色谱(AEX)以纯化所述肉毒杆菌毒素。



1. 一种用于产生肉毒杆菌毒素的方法,其包括:
  - (a) 用酸处理肉毒杆菌毒素产生菌株的培养物以形成含有肉毒杆菌毒素的沉淀物;
  - (b) 将缓冲液添加至所述步骤(a)的含有肉毒杆菌毒素的沉淀物,然后通过选自由以下组成的组的一个或多个方法澄清:深层过滤(DF)、微滤(MF)、超滤(UF)、无菌过滤和膜色谱(MC);
  - (c) 使所述步骤(b)的含有肉毒杆菌毒素的溶液经过盐酸沉淀,然后在缓冲溶液中溶解所述盐酸沉淀产生的沉淀物;和
  - (d) 使所述步骤(c)的盐酸沉淀物溶液经过阴离子交换色谱(AEX),由此纯化所述肉毒杆菌毒素其中所述方法不包括使用动物产品的酶处理步骤。
2. 权利要求1的方法,其中所述肉毒杆菌毒素产生菌株为肉毒杆菌(*Clostridium botulinum*)或其突变菌株。
3. 权利要求1的方法,其中所述肉毒杆菌毒素选自由以下组成的组:肉毒杆菌毒素血清型A、B、C、D、E、F和G。
4. 权利要求1的方法,其中所述纯化的肉毒杆菌毒素为具有至少98%的纯度的肉毒杆菌毒素A型蛋白。
5. 权利要求1的方法,其中所述步骤(a)中的酸处理如下进行:通过将硫酸或盐酸添加至所述菌株的培养物中,由此所述培养物的pH为3.0-4.5。
6. 权利要求1的方法,其中所述步骤(a)中的酸沉淀进行一次或多次。
7. 权利要求1的方法,其中所述步骤(b)中的深层过滤(DF)使用蠕动泵进行,并且用于所述深层过滤的过滤器具有0.01-20 $\mu$ m的标称孔径。
8. 权利要求1的方法,其中步骤(c)中的盐酸沉淀进行一次或多次。
9. 权利要求1的方法,其中步骤(c)中的盐酸沉淀通过添加盐酸使pH为2-5来进行。
10. 权利要求1的方法,其中所述步骤(b)和步骤(c)中的缓冲液为磷酸钠缓冲液。
11. 权利要求10的方法,其中所述步骤(b)中的磷酸钠缓冲液的pH值为4.5-6.5,并且所述步骤(c)中的磷酸钠缓冲液的pH值为6-7。
12. 权利要求1的方法,其中所述步骤(d)中的阴离子交换色谱在2-9的pH和2-40mS/cm的电导率下进行。
13. 权利要求1的方法,其中所述步骤(d)中的肉毒杆菌毒素作为从阴离子交换色谱洗脱的流通(FT)级分的含有肉毒杆菌毒素的级分被收集。
14. 权利要求1的方法,其中所述纯化的肉毒杆菌毒素具有7S或19S的形式。
15. 权利要求1的方法,其进一步包括,在步骤(d)之后:
  - (e) 向上调节所述含有肉毒杆菌毒素的阴离子交换色谱级分的pH;
  - (f) 通过阴离子交换色谱纯化所述由步骤(e)产生的pH调节的阴离子交换色谱级分;和
  - (h) 使用阳离子交换色谱(CEX)纯化所述由步骤(f)产生的被稀释的肉毒杆菌毒素。
16. 权利要求15的方法,其中所述步骤(e)中的向上调节所述阴离子交换色谱级分的pH进行一次或多次。
17. 权利要求15的方法,其在步骤(f)和步骤(h)之间进一步包括,将缓冲液添加至所述纯化的阴离子交换色谱级分以稀释所述肉毒杆菌毒素的步骤(g)。

18. 权利要求15的方法,其中所述步骤(e)中的向上调节pH使用选自以下组成的组的一项或多项技术进行:UF渗滤、pH滴定、透析和缓冲液交换柱色谱。

19. 权利要求17的方法,其中所述步骤(g)中的缓冲液为磷酸钠缓冲液。

20. 权利要求19的方法,其中所述步骤(g)中的磷酸钠缓冲液具有6.5-7.5的pH。

21. 权利要求18的方法,其中所述步骤(e)中的向上调节所述阴离子交换色谱级分的pH使用Tris-HCl缓冲液进行。

22. 权利要求21的方法,其中所述步骤(e)中的Tris-HCl缓冲液具有7.3-8.3的pH。

23. 权利要求15的方法,其中所述步骤(f)中的阴离子交换色谱在2-9的pH和2-40mS/cm的电导率下进行。

24. 权利要求15的方法,其中所述步骤(f)中的肉毒杆菌毒素作为从阴离子交换色谱洗脱的流通(FT)级分的含有肉毒杆菌毒素的级分被收集,或作为含有结合至阴离子交换色谱树脂的所述肉毒杆菌毒素的级分被收集。

25. 权利要求15的方法,其中所述步骤(h)中的阳离子交换色谱在2-9的pH和2-40mS/cm的电导率下进行。

26. 权利要求15的方法,其中所述步骤(h)中的肉毒杆菌毒素作为含有结合至阳离子交换色谱树脂的所述肉毒杆菌毒素的级分被收集。

27. 权利要求15的方法,其中所述最终纯化的肉毒杆菌毒素具有7S的形式。

## 用于产生肉毒杆菌毒素的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于通过无动物产品 (APF) 过程产生肉毒杆菌毒素的方法, 并且更具体地, 涉及用于产生肉毒杆菌毒素的方法, 其包括以下步骤: (a) 用酸处理肉毒杆菌毒素产生菌株的培养物以形成含有肉毒杆菌毒素的沉淀物; (b) 将缓冲液添加至步骤 (a) 的含有肉毒杆菌毒素的沉淀物, 然后通过选自由以下组成的组的一个或多个方法澄清: 深层过滤 (DF)、微滤 (MF)、超滤 (UF)、无菌过滤、膜色谱 (MC) 和离心; (c) 使步骤 (b) 的含有肉毒杆菌毒素的溶液经过 UF 渗滤、硫酸铵沉淀或盐酸沉淀, 然后在缓冲溶液中稀释由所述 UF 渗滤产生的渗余物, 或在缓冲液中溶解由所述硫酸铵沉淀产生的沉淀物或盐酸沉淀物; 和 (d) 使步骤 (c) 的渗余物稀释液、硫酸铵沉淀物溶液或盐酸沉淀物溶液经过阴离子交换色谱 (AEX), 由此纯化所述肉毒杆菌毒素。

### 背景技术

[0002] 自 20 世纪 80 年代以来, 已经发现了分泌神经毒性毒素的多种梭菌属菌株, 并且在过去 70 年中对分泌自这些菌株的毒素进行了表征。

[0003] 源自梭菌属 (*Clostridium* sp.) 菌株的神经毒性毒素, 即肉毒杆菌毒素, 根据其血清学性质分为八种类型 (A 型至 H 型)。该毒素中的每种具有具有约 150kDa 大小的毒素蛋白, 并且天然含有若干个无毒蛋白与其结合的复合体。中等复合体 (300kDa) 由毒素蛋白和无毒非血凝素蛋白组成, 并且大型复合体 (450kDa) 和非常大的复合体 (900kDa) 由结合至血凝素的中等大小的复合体组成 (Sugiyama, H., *Microbiol. Rev.*, 44:419, 1980)。已知这样的无毒蛋白具有保护毒素免受低 pH 和肠内多种蛋白酶的作用。

[0004] 该毒素在细胞中被合成为具有约 150kDa 的分子量的单一多肽, 然后通过细胞内蛋白酶的作用或用人工酶如胰蛋白酶处理从 N-末端开始在 1/3 位置切割成两个单元: 轻链 (L; 分子量: 50kDa) 和重链 (H; 分子量: 100kDa)。与单一多肽相比, 裂解的毒素具有大大增加的毒性。这两个单元通过二硫键彼此连接并具有不同的功能。重链与靶细胞的受体结合 (Park, M.K. et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 72:243, 1990) 并且起在低 pH (pH 4) 下与生物膜相互作用以形成通道 (Mantecuccio, C. et al., *TIBS.*, 18:324, 1993) 的功能, 并且轻链具有药理学活性, 因此使用去垢剂赋予细胞通透性, 或者当通过例如电穿孔被引入细胞时干扰神经递质的分泌 (Poulain, B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85:4090, 1988)。

[0005] 该毒素抑制在神经肌肉接头的胆碱能突触前处的乙酰胆碱的胞外分泌而引起无力。认为, 即使用极少量的毒素处理也表现出毒性, 这表明毒素具有若干酶活性 (Simpson, L.L. et al., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 26:427, 1986)。

[0006] 根据最近的报道, 该毒素具有金属肽酶活性, 并且其底物包括突触泡蛋白、突触融合蛋白、25KDa 的突触体相关蛋白 (SNAP25) (它们是胞外分泌机械复合体 (exocytosis machinery complex) 的单元蛋白 (unit protein)) 等。每种类型的毒素使用上述三种蛋白之一作为其底物, 并且已知 B、D、F 和 G 型毒素在特定位点切割突触泡蛋白, A 和 E 型毒素在特定位点切割 SNAP25, 并且 C 型在特定位点切割突触融合蛋白 (Binz, T. et al.,

J.Biol.Chem.,265:9153,1994)。

[0007] 特别地,已知A型肉毒杆菌毒素可溶于pH为4.0-6.8的稀释水溶液中。已知在约7或更高的pH下从神经毒素中分离出稳定的无毒蛋白,因此毒性逐渐丧失。特别地,已知当pH和温度升高时毒性降低。

[0008] 肉毒杆菌毒素即使少量也对人体有致命作用,并且易于大量产生。因此,它与炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)和天花病毒一起构成四种主要的生物恐怖武器。然而,已经发现,当A型肉毒杆菌毒素以不系统地影响人体的剂量注射时,它可以使注射位点的局部肌肉麻痹。基于该特征,A型肉毒杆菌毒素可用于广泛范围的应用,包括除皱剂、用于治疗痉挛性偏瘫和脑瘫的药剂等。因此,对A型肉毒杆菌毒素的需求增加,并且已经积极进行关于产生满足需求的肉毒杆菌毒素的方法的研究。

[0009] 目前典型的商品是**BOTOX<sup>®</sup>**(A型肉毒杆菌毒素的纯化的神经毒素复合体),其可从美国的Allergan公司商购。100单位小瓶的**BOTOX<sup>®</sup>**由约5ng的A型肉毒杆菌毒素的纯化的神经毒素复合体、0.5mg的人血清白蛋白和0.9mg的氯化钠组成,并使用无防腐剂的无菌盐水复溶(注射0.9%氯化钠)。其它商品包括**Dysport<sup>®</sup>**(A型肉毒杆菌(*Clostridium botulinum*)毒素和血凝素的复合体,其在含有肉毒杆菌毒素的药物组合物中具有乳糖和人血清白蛋白,并且在使用前使用0.9%氯化钠复溶),其可以从英国的Ipsen有限公司商购,和**MyoBloc<sup>®</sup>**(包含B型肉毒杆菌毒素、人血清白蛋白、琥珀酸钠和氯化钠的可注射溶液(pH约为5.6)),其可从Solstice Neurosciences公司商购获得。

[0010] 用于生产肉毒杆菌毒素的常规方法包括酸沉淀法、使用盐的沉淀方法和色谱法。

[0011] 例如,日本未审查的专利申请公开No.1994-192296公开了一种通过培养肉毒杆菌细菌,然后进行酸沉淀、提取、加入核酸酶和结晶来产生结晶的A型肉毒杆菌毒素的方法。此外,美国专利No.5696077公开了一种通过培养肉毒杆菌细菌,然后进行酸沉淀、提取、离子交换色谱、凝胶过滤色谱和结晶来制备结晶的B型肉毒杆菌毒素的方法。

[0012] Simpson等人通过重力流动色谱,随后进行HPLC,使用亲和树脂、尺寸排阻色谱以及包括使用两种不同的离子交换柱的离子(阴离子和阳离子)交换色谱捕获,来纯化肉毒杆菌神经毒素,(*Method in Enzymology*,165:76,1988),并且Wang等人使用沉淀和离子色谱纯化A型肉毒杆菌毒素(*Dermatol Las Faci Cosm Surg.*,2002:58,2002)。

[0013] 此外,美国专利No.6818409公开了使用离子交换和乳糖柱来纯化肉毒杆菌毒素,美国专利No.7452697公开了一种通过离子交换色谱和疏水色谱制备A型肉毒杆菌毒素的方法。韩国专利未审查的专利申请公开No.2009-0091501公开了一种通过酸沉淀和阴离子交换色谱纯化肉毒杆菌毒素的方法,美国专利公开No.2013-0156756公开了通过阴离子交换色谱和阳离子交换色谱纯化肉毒杆菌毒素的方法。

[0014] 然而,常规方法的问题在于使用阴离子交换色谱不利地影响肉毒杆菌毒素的凝胶条带图案(美国专利No.7452697),并且还在于由于长的纯化时间,这些常规方法难以商业应用。另外,由于肉毒杆菌毒素产生菌肉毒杆菌是厌氧菌,因此问题在于该细菌的发酵应该在厌氧系统中进行,因此难以大量生产肉毒杆菌毒素。另外,问题在于通过上述纯化方法纯化的活性成分肉毒杆菌毒素未被清楚地分离和鉴定,因此含有杂质。此外,生产肉毒杆菌毒素的常规方法的问题在于必须进行过滤或透析过程以纯化高纯度的肉毒杆菌毒素,这表明

纯化过程是复杂和困难的。

[0015] 另外,在用于产生肉毒杆菌毒素的常规方法中,使用酶如DNA酶或RNA酶来去除核酸如DNA或RNA(参见,例如,韩国专利No.10-1339349,以及如图1中所示的用于产生肉毒杆菌毒素的常规方法)。然而,由于酶如DNA酶或RNA酶等是动物来源的,因此这些酶具有含有多种导致疾病的物质,特别是已知导致传染性海绵状脑病的动物来源的异常朊病毒蛋白的潜力,因此在安全性方面存在问题。

[0016] 传染性海绵状脑病(TSE)被称为导致神经元的严重变性的神经变性病,并且其实例包括影响人类和动物的牛海绵状脑病(BSE)、羊痒病、克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)(CJD)、Gerstmann-Straussler-Scheinker综合征、库鲁病(Kuru)、传染性水貂脑病、慢性消耗性疾病、猫海绵状脑病等。报道了BSE跨越物种屏障,甚至影响人类。

[0017] 导致传染性海绵状脑病(TSE)的剂具有无免疫原性且潜伏期长的特征。从BSE感染的牛脑组织的组织病理学分析可见,由于神经元的损伤和异常蛋白纤维的沉积,在脑中形成了特殊的海绵状空泡。

[0018] TSE的病因是一种被称为异常朊病毒的传染性蛋白质。与需要核酸的一般病毒不同,异常朊病毒是一种仅由蛋白质组成而不含核酸的感染颗粒。关于TSE,已知,当感染颗粒异常朊病毒( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ )与正常朊病毒( $\text{PrP}^{\text{C}}$ )结合时,其转化为致病性朊病毒,然后所述致病性朊病毒在脑中积累(Prusiner SB, Alzheimer Dis Assoc Disord., 3:52-78, 1989)。

[0019] 克雅氏病是一种罕见的人类传染性海绵状脑病(TSE)的神经变性病,其中感染剂显然是朊病毒蛋白的异常的异构体。患有克雅氏病的个体在六个月内可从明显完美的健康恶化到运动不能性缄默症。因此,可能存在从施用含有使用动物来源的产物获得的生物制剂例如肉毒杆菌毒素的药物组合物获得朊病毒介导的疾病例如克雅氏病的潜在风险。因此,如果使用使用动物来源的成分产生的药物来制备药物组合物,则可能使患者承受接受多种病原体或感染剂的潜在风险。

[0020] 因此,迫切需要一种通过无动物产品(APF)过程来产生肉毒杆菌毒素的方法,以解决诸如全球范围内的由这样的从动物来源的组分导致的传染性海绵状脑病感染的安全性问题。

[0021] 在这样的技术背景下,本发的发明人已经做出广泛努力以开发能够防止暴露于朊病毒介导的疾病(传染性海绵状脑病(TSE))的风险并增加肉毒杆菌毒素的纯度的方法,并且作为结果,已经发现,当用酸处理肉毒杆菌毒素产生菌株的培养物以形成肉毒杆菌毒素沉淀物,并且作为预处理过程,使用选自以下组成的组的至少一个技术使形成的肉毒杆菌毒素沉淀物澄清:深层过滤(DF)、微滤(MF)、超滤(UF)、无菌过滤、膜色谱(MC)和离心(即预处理过程),随后进行从UF渗滤、硫酸铵沉淀和盐酸沉淀中选择的过程,随后使用阴离子/阳离子-交换色谱纯化,可以省略使用动物产品的酶处理步骤以消除导致朊病毒介导的疾病的风险,并且肉毒杆菌毒素的纯度可增加,由此完成本发明。

[0022] 发明公开

[0023] 技术问题

[0024] 本发明的目的是提供一种可在无动物产品(APF)条件下进行的用于产生肉毒杆菌毒素的更有效和安全的方法。

[0025] 更具体地,本发明的目的是提供一种用于产生肉毒杆菌毒素的方法,其中使用动

物产品 (AP) 的酶处理步骤由以下步骤代替:作为预处理过程的使用选自以下组成的组的至少一个技术使肉毒杆菌毒素澄清:深层过滤 (DF)、微滤 (MF)、超滤 (UF)、无菌过滤、膜色谱 (MC) 和离心,随后进行从UF渗滤、硫酸铵沉淀和盐酸沉淀中选择一个过程,随后使用阴离子/阳离子交换色谱进一步纯化,由此确保安全性和极高的产率。

#### [0026] 技术方案

[0027] 为实现上述目的,本发明提供了一种用于产生肉毒杆菌毒素的方法,其包括以下步骤:

[0028] (a) 用酸处理肉毒杆菌毒素产生菌株的培养物以形成含有肉毒杆菌毒素的沉淀物;

[0029] (b) 将缓冲液添加至步骤 (a) 的含有肉毒杆菌毒素的沉淀物,然后通过选自以下组成的组的一个或多个方法澄清:深层过滤 (DF)、微滤 (MF)、超滤 (UF)、无菌过滤、膜色谱 (MC) 和离心;

[0030] (c) 使步骤 (b) 的含有肉毒杆菌毒素的溶液经过UF渗滤、硫酸铵沉淀或盐酸沉淀,然后在缓冲溶液中稀释由所述UF渗滤产生的渗余物,或在缓冲液中溶解由所述硫酸铵沉淀产生的沉淀物或盐酸沉淀物;和

[0031] (d) 使步骤 (c) 的渗余物稀释液、硫酸铵沉淀物溶液或盐酸沉淀物溶液经过阴离子交换色谱 (AEX),由此纯化所述肉毒杆菌毒素。

#### 附图说明

[0032] 图1是比较根据本发明的用于产生肉毒杆菌毒素的过程与常规过程的示意图。

[0033] 图2显示用于纯化肉毒杆菌毒素的第一阴离子交换色谱纯化 (AEX) 步骤和第二阴离子交换色谱纯化 (AEX) 步骤的色谱图。

[0034] 图3显示在第一阴离子交换色谱纯化 (AEX) 步骤和第二阴离子交换色谱纯化 (AEX) 步骤之后,通过SDS-PAGE分析肉毒杆菌毒素的纯度的结果。

[0035] 图4显示用于肉毒杆菌毒素的第一离子交换色谱纯化 (AEX) 步骤、第二阴离子交换色谱纯化 (AEX, 结合模式) 步骤和阳离子交换色谱 (CEX) 步骤的色谱图。

[0036] 图5显示在第一离子交换色谱纯化 (AEX) 步骤、第二阴离子交换色谱纯化 (AEX, 结合模式) 步骤和阳离子交换色谱 (CEX) 步骤之后,通过SDS-PAGE分析肉毒杆菌毒素的纯度的结果。

[0037] 图6显示用于肉毒杆菌毒素的第一阴离子交换色谱纯化 (AEX) 步骤、第二阴离子交换色谱纯化 (AEX, 流通模式) 步骤和阳离子交换色谱 (CEX) 步骤的色谱图。

[0038] 图7显示在第一阴离子交换色谱纯化 (AEX) 步骤、第二阴离子交换色谱纯化 (AEX, 流通模式) 步骤和阳离子交换色谱 (CEX) 步骤之后,通过SDS-PAGE分析肉毒杆菌毒素的纯度的结果。

#### 具体实施方式

[0039] 除非另有定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。一般地,以下会描述的本文所使用的术语和实验方法是本领域中公知和通常使用的那些。

[0040] 在本发明中,为了开发APF(无动物产品)和低分子量肉毒杆菌毒素纯化过程,尝试开发一个过程来代替使用动物产品(AP)的常规过程的酶处理步骤。因此,进行使用深层过滤器的过滤、常规盐酸沉淀过程、使用硫酸铵的过程和使用UF系统的过程,并且因此,显示了所得肉毒杆菌毒素的纯度高于通过常规方法产生的肉毒杆菌毒素的纯度。这表明使用根据本发明的上述方法可以以安全方式在无TSE条件下从菌株的培养物产生高纯度的肉毒杆菌毒素。

[0041] 在本文中可互换使用的术语“过程”和“分离”指在纯化过程中使用至少一个方法或系统来实现特定目的(例如,肉毒杆菌毒素纯化)。

[0042] 在本发明的实施例中,当通过选自以下组成的组的至少一个方法进行澄清:深层过滤(DF)、微滤(MF)、超滤(UF)、无菌过滤、膜色谱(MC)和离心,随后进行UF渗滤、硫酸铵沉淀或酸沉淀时,甚至可通过单独的阴离子交换色谱(AEX)过程获得具有令人满意的纯度的肉毒杆菌毒素。

[0043] 因此,在一个方面,本发明涉及用于产生肉毒杆菌毒素的方法,并且更具体地,涉及包括以下步骤的用于产生肉毒杆菌毒素的方法:

[0044] (a) 用酸处理肉毒杆菌毒素产生菌株的培养物以形成含有肉毒杆菌毒素的沉淀物;

[0045] (b) 将缓冲液添加至步骤(a)的含有肉毒杆菌毒素的沉淀物,然后通过选自由以下组成的组的一个或多个方法澄清:深层过滤(DF)、微滤(MF)、超滤(UF)、无菌过滤、膜色谱(MC)和离心;

[0046] (c) 使步骤(b)的含有肉毒杆菌毒素的溶液经过UF渗滤、硫酸铵沉淀或盐酸沉淀,然后在缓冲溶液中稀释由所述UF渗滤产生的渗余物,或在缓冲液中溶解由所述硫酸铵沉淀产生的沉淀物或盐酸沉淀物;和

[0047] (d) 使步骤(c)的渗余物稀释液、硫酸铵沉淀物溶液或盐酸沉淀物溶液经过阴离子交换色谱(AEX),由此纯化所述肉毒杆菌毒素。

[0048] 根据本发明的产生方法纯化的肉毒杆菌毒素可具有7S或19S的形式(分子量150-900kDa)。

[0049] 在本发明中,肉毒杆菌毒素产生菌株优选为肉毒杆菌或其突变菌株,但不限于此,并且对本领域技术人员会显而易见的是可使用能够产生肉毒杆菌毒素的任何菌株。

[0050] 如本文所使用的术语“肉毒杆菌毒素”意指不但包括由肉毒杆菌菌株或其突变菌株产生的神经毒素(NTX),而且还包括经修饰的、重组、杂交和嵌合的肉毒杆菌毒素。重组肉毒杆菌毒素可具有由非梭菌属种以重组方式产生的轻链和/或重链。另外,本文所使用的术语“肉毒杆菌毒素”意指包括肉毒杆菌毒素血清型A、B、C、D、E、F和G,肉毒杆菌毒素复合体(即,300、600和900kDa复合体)和纯肉毒杆菌毒素(即,150kDa神经毒性分子),其在本发明的实践中全部是有用的。

[0051] 神经毒素的主要组分NTX(7S)在培养物或食物中与非毒性组分相连(associate),并变成大的复合体(Oguma et al., "Structure and function of Clostridium botulinum progenitor toxin.", J. Toxical-Toxin Reviews, 18:17-34, 1999)。产生肉毒杆菌毒素血清型A的A型菌株产生命名为LL(19S, 900kDa)、L(16S, 500kDa)和M(12S, 300kDa)毒素的三种形式的前体毒素,它们全部被认为是完全活化的,而B、C和D型菌株产生两种形



式,L和M。另外,E、F和G型仅产生单一形式的毒素;E和F型产生M毒素,并且G型产生L毒素。M毒素由NTX (7S, 150kDa) 和显示没有血凝素 (HA) 活性的无毒组分组成,其被描述为无毒的非HA (NTNH)。

[0052] 如本文所使用的术语“产生的肉毒杆菌毒素”意指当从培养或发酵过程中收集肉毒杆菌毒素时,将其与能够附有肉毒杆菌毒素的其他蛋白质或杂质分离或基本分离的纯肉毒杆菌毒素或肉毒杆菌毒素复合体。因此,产生的肉毒杆菌毒素具有至少90%,优选为至少95%,并且最优选为至少98%的纯度。特别地,在本发明中产生的肉毒杆菌毒素可为具有至少98%的纯度的肉毒杆菌毒素A型蛋白。

[0053] 用于产生肉毒杆菌毒素的肉毒杆菌菌株的培养可使用本领域中已知的常规方法和可用于培养的常规培养基进行。

[0054] 通过非限制性实例,用于肉毒杆菌菌株的培养的培养基可包括酪蛋白水解物、酵母抽提物、葡萄糖等,并且培养在25至40℃的温度下进行持续90-180小时,优选100-150小时。

[0055] 培养后,可通过将酸,优选为硫酸或盐酸,添加至菌株的培养物来进行步骤(a)的酸沉淀,以便培养物达到3.0-4.5,优选为3.3-4.0,最优选为3.4-3.6的pH。

[0056] 步骤(a)的酸沉淀基于以下原则:将酸添加至含有多种蛋白质的培养物会在杀死培养后剩余的肉毒杆菌细菌的同时降低培养物的pH,以便蛋白质达到等电点而沉淀。它包括广义上的结晶,并且与集中于以高纯度纯化所需物质的结晶不同,沉淀方法是一种粗略地分离混合状态的所需物质的方法。在沉淀方法中,具有与所需物质类似结构的杂质也被沉淀。在此,将pH调节至约3.0-4.5。肉毒杆菌毒素的回收率随着pH降低而增加。如果pH是3.0或更低,会影响肉毒杆菌毒素本身,并且如果pH是4.5或更高,肉毒杆菌毒素的回收率会降低。由于这些原因,pH优选在上述特定范围内。特别地,pH最优选为3.4-3.6,因为肉毒杆菌毒素的回收率在该pH范围内是最高的。当肉毒杆菌毒素培养物的pH在添加酸之后达到合适的范围时,将酸添加至培养物直到不再出现pH的变化,然后允许培养物在室温下静置10-30小时,随后去除上清液。

[0057] 在本发明中,步骤(a)中的酸沉淀可进行一次或多次。

[0058] 如本文所使用的术语“澄清”意指在缓冲液中再溶解沉淀物或类似物,然后从再溶解产生的溶液中去掉杂质。本发明中的“澄清”步骤通常可使用包括以下中单独的任一项或它们的多种组合的一个或多个步骤进行,例如,过滤、沉淀、絮凝和沉降。更具体地,澄清步骤可使用选自以下组成的组的至少一个技术进行:深层过滤 (DF)、微滤 (DF)、超滤 (UF)、无菌过滤、膜色谱和离心。通过本发明的澄清步骤,可去除包含在再溶解的毒素沉淀物中的杂质特别是核酸杂质、HCD、细胞碎片和内毒素。

[0059] 在一些实施方式中,本发明提供了对在多种纯化方案中通常使用的常规澄清步骤的改进。澄清步骤通常涉及去除一种或多种不需要的实体,并且通常在涉及捕获所需靶分子之前进行。澄清的另一方面是去除样品中的可能稍后在纯化过程中导致无菌过滤器结垢的可溶和不溶组分,从而使整个纯化过程更经济。此外,可使用用于增强澄清效率的方法,例如沉淀。可通过多种方法,如絮凝、pH调节 (酸沉淀)、温度改变、由于使用刺激反应性聚合物或小分子产生的相变,或这些方法的任何组合来进行杂质的沉淀。

[0060] 如本文所使用的术语“深层过滤 (DF)”意指使用具有减小的孔径的一系列过滤器

从溶液中去颗粒(例如杂质)。本文所使用的术语“深层过滤器”在过滤器材料的深层内实现过滤。这样的过滤器是那些包含结合以形成复杂的曲折的流动通道迷宫的随机纤维基质的过滤器。这些过滤器中的颗粒分离是由被纤维基质诱捕或吸附到纤维基质上造成的。最频繁使用的用于细胞培养肉汤和其他进料的生物工艺的深层过滤器介质包括纤维素纤维、助滤器诸如DE和带正电荷的树脂粘合剂。不同于绝对过滤器,深层过滤器介质使颗粒保留在整个多孔介质中,从而允许滞留大于孔径和小于孔径的颗粒。认为颗粒滞留涉及尺寸排阻和通过疏水相互作用、离子相互作用和其他相互作用的吸附。可商购的深层过滤器包括Millistak+Pod深层过滤器系统、XOHC介质(Millipore公司)、Zeta Plus<sup>TM</sup>深层过滤器(3M Purification公司)等。在本发明中,深层过滤可使用平行排列的两个或更多个深层过滤器进行。在这种情况下,可商购的深层过滤器可包括Millistak+mini DOHC(Millipore公司)和XOHC过滤器(Millipore公司)。

[0061] 在本发明中,深层过滤器一般具有0.01-20 $\mu\text{m}$ ,优选为0.1-8 $\mu\text{m}$ 的标称孔径,用于去除尺寸大于以上孔径的絮凝的细胞碎片和胶粒(colloidal particulate),和包含小于以上孔径的颗粒的细胞生物物质,并且可包括具有具备不同空隙率的多孔层的多孔深层过滤器介质。

[0062] 因此,当深层过滤用于本发明时,容易从肉毒杆菌毒素沉淀物中去除杂质(例如核酸)、细胞碎片、内毒素等。

[0063] 如本文所使用的术语“微滤(MF)”或“超滤(UF)”是一种根据混合物溶液的溶质的尺寸和结构使靶溶质(例如肉毒杆菌毒素)在特定压力下穿过膜的孔而分级的过程。例如,可在5-40psig的压力和4至60 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下通过使用用于0.1 $\mu\text{m}$ 尺寸或750kDa截留分子量(MWCO)分离的PS(聚砜)膜进行溶液的澄清。

[0064] 一般地,微滤是在超滤之前进行的过程,并且用来从溶液中分离具有0.1-10 $\mu\text{m}$ 的尺寸的颗粒。其通常用来分离具有 $1 \times 10^5 \text{g/mol}$ 的分子量的聚合物。另外,微滤可用来去除沉积物、原生动物、大的细菌等。在本发明中,微滤可容易地用来去除聚合物或细胞碎片。一般地,使用压力泵或真空泵以0.1-5m/s、优选1-3m/s的速度和50-600kPa、优选100-400kPa的压力进行微滤过程。

[0065] 超滤用来从溶液中分离具有0.01-0.1 $\mu\text{m}$ 的尺寸的颗粒,并且颗粒通常相当于具有 $1 \times 10^3$ - $1 \times 10^5 \text{Da}$ 的分子量的聚合物。超滤用来去除蛋白质、内毒素、病毒、二氧化硅(silica)等。在本发明中,当使用用于100-300kDa MWCO的超滤膜时,其可从肉毒杆菌毒素沉淀物中去除杂质并浓缩肉毒杆菌毒素。

[0066] 如本文所使用的“无菌过滤”是一种使用微米过滤器(microfilter)或膜过滤器的过程,其可代替加热、辐射或化学处理,并且可安全地澄清含有靶物质(例如,生物制剂、肉毒杆菌毒素等)的溶液。为去除可包含在溶液中的微生物,使用具有0.1-0.3 $\mu\text{m}$ 、优选0.15-0.25 $\mu\text{m}$ 、最优选0.2-0.22 $\mu\text{m}$ 的孔径的微过滤器,并且为去除和灭活病毒,使用具有20-50nm的孔径的纳米过滤器。另外,为了去除微生物、病毒等,还可使用具有特定孔径并且由纤维素酯或PES(聚醚砜)制成的膜过滤器进行澄清过程。

[0067] 在本发明中,“膜色谱(MC)”可以用作用于分离靶物质(例如肉毒杆菌毒素)的过程,其与“树脂色谱”形成对比。树脂色谱一般使用球形多孔树脂,并且基于溶液的比对流更大的扩散,而膜色谱使用平面大孔膜,并且基于溶液的比扩散更大的对流。因此,在膜色谱

中,溶液的分离效率相对高,并且因此使病毒、质粒、大蛋白质复合体等易于进入膜,由此易于分离。可商购的膜色谱可包括Mustang Q膜色谱胶囊(Pall公司)、Sartobind Q(Sartorius Stedim Biotech GmbH),但不限于此。

[0068] 在本发明中,离心可优选在优选12,000~15,000g的离心力下进行。

[0069] 在本发明中,步骤(b)的肉毒杆菌毒素的澄清包括以下步骤:通过添加磷酸盐缓冲液、优选磷酸钠缓冲液溶液溶解由步骤(a)产生的毒素沉淀物,并澄清该沉淀物。在此,磷酸盐缓冲液的pH约为3.0-8.0,优选地约为4.0-7.0,并且将溶液调节至4.5-6.5,优选为5.5-6.2,更优选为4.8-5.8的最终pH。在该pH范围内,可进行毒素的澄清。

[0070] 在本发明中,步骤(c)中的肉毒杆菌毒素的稀释或溶解包括以下步骤:将磷酸盐缓冲液、优选磷酸钠缓冲液添加至由步骤(b)产生的毒素以稀释渗余物或溶解沉淀物。在此,磷酸盐缓冲液的pH优选约为4.0-8.5,并且可添加碱将最终pH调节至4.5-8,优选为5.5-7.5,更优选为6-7。在该pH范围内,可进行毒素的稀释或溶解。

[0071] 在本发明中,步骤(b)中的肉毒杆菌毒素的深层过滤(DF)可使用蠕动泵进行,并且步骤(c)中的UF渗滤、硫酸铵沉淀或盐酸沉淀可进行一次或多次。

[0072] 如本文所使用的术语“UF渗滤”意指使用上述超滤(UF)进行渗滤,但不限于此。“渗滤”意指一种技术,其使用能够根据组分的分子量(分子尺寸)实现分离的可渗透过滤器,从靶物质(溶液)中去除或收集任何组分(例如颗粒),由此增加靶物质的纯度。

[0073] 使用硫酸铵的沉淀的步骤相当于盐析过程,其中将易于溶解于水的盐(硫酸铵等)添加至蛋白质混合物以增加离子强度,由此形成蛋白质沉淀物。如果所需蛋白质主要在用30% (w/v) 硫酸铵饱和时沉淀,所需蛋白质可通过在30% (w/v) 的硫酸铵饱和浓度或更低浓度下沉淀出除了所需蛋白质之外的蛋白质,然后添加硫酸铵至30% (w/v) 的饱和浓度来沉淀,并且可以通过离心来收集。盐析操作经常用作纯化的最初手段。使用的硫酸铵溶液可具有10-50% (w/v)、优选20-40% (w/v) 的硫酸铵浓度。另外,步骤(c)中的盐酸沉淀可通过添加盐酸以达到2-5、优选2.5-4.5的pH来进行。

[0074] 步骤(d)中的阴离子交换色谱可以在2-9、优选3-8的pH和2-40mS/cm、优选3-30mS/cm的电导率下进行。在步骤(d)中,肉毒杆菌毒素可以作为从阴离子交换色谱洗脱的流通(FT)级分的含有肉毒杆菌毒素级分(流通模式)被收集,或作为含有结合至阴离子交换色谱树脂的肉毒杆菌毒素的级分被收集。最终纯化的肉毒杆菌毒素可具有7S或19S的形式。

[0075] 在本文中可互换使用的术语“FT(流通)”、“流通过程”或“流通纯化”意指一种分离过程,其中包含在生物药物制剂中的至少一种靶分子(例如肉毒杆菌毒素)与一种或多种杂质一起穿过材料,并且一种或多种杂质一般结合至该材料并且靶分子一般不结合至该材料(即,流通过材料)。

[0076] 术语“电导率”指水溶液在两个电极之间传导电流的能力。在溶液中,电流通过离子运输流动。因此,随着在水溶液中存在的离子量的增加,溶液会具有更高的电导率。测量电导率的基本单位为Siemen(或mho)、mho/cm (mS/cm),并且可使用电导率仪如Orion电导率仪的多种模式来测量。由于电解质电导率是溶液中的离子携带电流的能力,因此可通过改变其中的离子的浓度来改变溶液的电导率。例如,可改变溶液中的缓冲剂的浓度和/或盐(例如氯化钠、乙酸钠或氯化钾)的浓度,以达到所需电导率。优选地,可改变多种缓冲液的盐浓度以达到所需电导率。

[0077] 在本发明中,用于步骤(d)中的阴离子交换色谱的柱缓冲液可为磷酸钠缓冲液、柠檬酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液,但不限于此。将柱缓冲液的浓度调节至15-70mM,优选约为20-60mM。将柱缓冲液的pH调节至2-9,优选为3-8,并且将流动相的流速控制到0.5-5.0mL/min,优选为1.0-3.0mL/min。在此,将缓冲液的电导率调节到2-40mS/cm,优选为3-30mS/cm,并且在完成柱的平衡之后,将样品装载到柱中。

[0078] 另外,在本发明中,可见,当向上调节从步骤(a)至(d)获得的含有肉毒杆菌毒素的阴离子交换色谱级分的pH时,并且当再次进行阴离子交换色谱,随后进行阳离子交换色谱(CEX)时,可获得具有极高纯度的肉毒杆菌毒素,特别是纯的肉毒神经毒素。

[0079] 因此,在另一方面,本发明提供一种用于产生肉毒杆菌毒素的方法,其在步骤(d)之后进一步包括以下步骤:

[0080] (e) 向上调节含有肉毒杆菌毒素的阴离子交换色谱级分的pH;

[0081] (f) 通过阴离子交换色谱纯化由步骤(e)产生的pH调节的阴离子交换色谱级分;和

[0082] (h) 使用阳离子交换色谱(CEX)纯化由步骤(f)产生的稀释的肉毒杆菌毒素。

[0083] 优选地,该方法在步骤(f)和步骤(h)之间可进一步包括以下步骤(g):将缓冲液添加至纯化的阴离子交换色谱级分以稀释肉毒杆菌毒素。

[0084] 在本发明中,当额外进行步骤(e)至(h)时,为解释的方便,将步骤(d)中的阴离子交换色谱(AEX)过程称为“第一阴离子交换色谱过程”,并且将步骤(f)中的AEX过程称为“第二阴离子交换色谱过程”。除非另有说明,否则步骤(d)中的AEX过程指步骤(d)中的第一阴离子交换色谱过程。另外,除非另有说明,否则实施例等中的TQ意指第一阴离子交换色谱过程,HQ意指第二阴离子交换色谱过程,并且XS意指阳离子交换色谱过程。

[0085] 在本发明中,溶液的“pH”意指相对于水样品的电离的酸度或碱度。水的pH是中性的,即7。大部分pH读数在0至14的范围。具有比水更高的[H<sup>+</sup>] (pH小于7)的溶液是酸性的;具有比水更低的[H<sup>+</sup>] (pH大于7)的溶液是碱性的(basic)或碱的(alkaline)。pH可使用pH计测量。缓冲液pH可使用酸或碱如HCl或NaOH调节。

[0086] 在本发明中,步骤(e)中的向上调节阴离子交换色谱级分的pH可以进行一次或多次,并且步骤(e)中的向上调节pH可使用选自以下组成的组的至少一项技术进行:UF渗滤、pH滴定、透析和缓冲液交换柱色谱。优选地,步骤(e)中的向上调节阴离子交换色谱级分的pH使用Tris-HCl缓冲液进行。在此,Tris-HCl缓冲液具有7.0-8.5、优选7.3-8.3的pH。因此,可将pH调节至7.0~8.5,优选为7.3~8.3,更优选为7.7~7.9。

[0087] 步骤(f)中的第二阴离子交换色谱可在2-9、优选3-8的pH和2-40mS/cm、优选3-30mS/cm的电导率下进行。在步骤(f)中,肉毒杆菌毒素可以作为从阴离子交换色谱洗脱的流通(FT)级分的含有肉毒杆菌毒素的级分(流通模式)被收集,或可以作为含有结合至阴离子交换色谱树脂的肉毒杆菌毒素的级分被收集。

[0088] 在本发明中,步骤(g)中的缓冲液优选为磷酸钠缓冲液,并且具有6-8、优选6.5-7.5的pH。

[0089] 在本发明中,步骤(h)中的阳离子交换色谱可在2-9、优选3-8的pH下进行。在步骤(h)的阳离子交换色谱中,肉毒杆菌毒素可以作为含有结合至阳离子交换色谱树脂的肉毒杆菌毒素的级分被收集,并且最终纯化的肉毒杆菌毒素可具有7S(分子量:150kDa)的形式。

[0090] 在根据本发明的用于产生肉毒杆菌毒素的方法中,在阴离子交换色谱过程中使用

的树脂包括二乙氨基乙基 (DEAE)、季氨基乙基 (QAE) 和季胺 (Q) 基团,但不限于此。优选地,可使用TQ650、HQ、XQ等。

[0091] 在根据本发明的用于产生肉毒杆菌毒素的方法中,在阳离子交换色谱过程中使用的树脂优选地包括羧甲基 (CM)、磺乙基 (SE)、磺丙基 (SP)、磷酸基 (P) 和磺酸基 (S),但不限于此。更优选地,可使用HS、XS等。

[0092] 纤维素离子交换树脂,例如DE23<sup>TM</sup>、DE32<sup>TM</sup>、DE52<sup>TM</sup>、CM-23<sup>TM</sup>、CM-32<sup>TM</sup>和CM-52<sup>TM</sup>可从制造商 (GE Healthcare, Lindesnes, Norway) 获得,并且基于SEPHADEX的和交联的离子交换也是已知的。例如,DEAE-、QAE-、CM-、SP-SEPHADEX和DEAE-、Q-、CM-和S-SEPHAROSE和SEPHAROSE Fast Flow均可从制造商 (GE Healthcare Bio-Sciences) 获得。另外,DEAE和CM衍生的乙二醇甲基丙烯酸酯共聚物 (例如TOYOPEARL<sup>TM</sup> DEAE-650S或M和TOYOPEARL<sup>TM</sup> CM-650S或M) 可从制造商 (Tosoh Bioscience LLC, King of Prussia, PA) 获得。

[0093] 实施例

[0094] 以下,会参考实施例进一步详细描述本发明。会对本领域普通技术人员显而易见的是,这些实施例仅用作示例说明的目的,并且不被解释为限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围会通过所附权利要求及其等同物来定义。

[0095] 实施例1:肉毒杆菌菌株的培养

[0096] 用于培养用于产生肉毒杆菌毒素的肉毒杆菌菌株的培养基具有包含2%酪蛋白水解产物、1%酵母抽提物、1%葡萄糖和0.5%硫乙醇酸盐的组成,并且在121℃下灭菌30分钟。然后,将20μL的肉毒杆菌 (韩国疾病控制和预防中心 (the Korean Centers for Disease Control and Prevention) 登录No.:4-029-CBB-IS-001) 接种至含有10ml的培养基的培养管中,并且在厌氧条件下在35℃使其经过初始种子培养 (静止培养) 持续22-30小时。当确认初始种子培养过程中的菌株生长时,将8mL的初始种子培养物接种到含有800ml的具有相同培养基组成的无菌培养基的培养瓶中,并在厌氧条件下在35℃使其经过第二种子培养 (静止培养) 持续8-15小时。当确认第二种子培养过程中的菌株生长时,将800mL的第二种子培养物接种到含有10L的具有相同灭菌培养基组成的无菌培养基的10L培养瓶中,并在厌氧条件下在35℃使其经过培养4-6天。

[0097] 实施例2:肉毒杆菌毒素的产生

[0098] 2-1:硫酸沉淀和pH中和

[0099] 用硫酸沉淀的步骤是蛋白质分离过程,其中将硫酸添加至含有许多种蛋白质的培养物以在杀死培养后剩余的肉毒杆菌细菌的同时降低培养物的pH,以便达到沉淀的等电点。如实施例1中所述进行主培养,在完成主培养后,将培养物收集在10L培养容器 (10L SUS 容器 (pot)) 中。然后,将5N硫酸添加至培养物以达到3.4-3.6的pH,并允许培养物在室温下静置12-20小时,以便将其分离成上清液和沉淀物。去除上清液,最后剩下2.5-3.0L的硫酸沉淀物。

[0100] 以以下方式进行去除上清液后剩余的硫酸沉淀物的pH中和 (例如通过pH滴定)。将700mL的1M磷酸钠 (pH5.3) 添加至硫酸沉淀物,随后搅拌。添加5N NaOH以将硫酸沉淀物的pH调节至5.9-6.1。收集pH中和的硫酸沉淀物。

[0101] 2-2:预处理过程

[0102] 1) 常规过程

[0103] 根据常规过程处理由实施例2-1产生的硫酸沉淀物。具体地,为了去除在沉淀物中剩余的DNA和RNA,添加60mL的0.4M盐酸苯甲脒、100mg的DNA酶和300mg的RNA酶,并且为了提取肉毒杆菌毒素,将沉淀物溶液孵育约3-7小时。然后,将孵育的沉淀物溶液在4℃和12,000xg下离心15分钟,随后收集上清液。通过添加1N盐酸将上清液的pH降低至3.4-3.6,然后允许在上清液在3至5℃的温度下静置12-20小时,由此进行用盐酸沉淀的过程。通过上述过程而形成的盐酸沉淀物在4℃和12000xg下离心15分钟以去除上清液,并且将剩余的毒素离心沉淀溶解于30mL的磷酸钠缓冲液(pH 6.5)。

[0104] 2) 深层过滤过程

[0105] 使用连接至蠕动泵的Zeta Plus™包封胶囊深层过滤器有效过滤(3M, BC0025S60SP05A)来过滤由实施例2-1产生的硫酸沉淀物。

[0106] i) 深层过滤后的UF

[0107] 使深层滤出液经过10次使用UF系统(PALL, TFF盒30kDa)使用50mM磷酸钠(pH6.5)的渗滤,然后调节至30mL的最终体积。

[0108] ii) 深层过滤后的硫酸铵沉淀

[0109] 将硫酸铵添加至深层滤出液至30% (w/v)的浓度,然后允许滤出液在3至5℃的温度下静置12-20小时。然后,将溶液在4℃和12,000xg下离心15分钟以去除上清液,然后将离心的离心沉淀再溶解于30mL的50mM磷酸钠(pH 6.5)中。

[0110] iii) 深层过滤后的盐酸沉淀

[0111] 将1N HCl添加至深层滤出液以将滤出液的pH降低至3.4-3.6,然后允许溶液在3至5℃的温度下静置12-20小时。然后,将溶液在4℃和12,000xg下离心15分钟以去除上清液,并且将离心的离心沉淀再溶解于30mL的50mM磷酸钠(pH 6.5)中。

[0112] 2-3:纯化过程

[0113] 使用HPLC(Waters e2695)通过SEC(尺寸排阻色谱)方法进行通过TQ过程(第一阴离子交换色谱过程)纯化的肉毒杆菌毒素的纯度的测量。在此,使用的流动相为100mM磷酸钠(pH 6.5),并且TSKgel G4000SWxl(Tosoh Bioscience,P/N 08542)柱连接至保护柱(Tosoh Bioscience,P/N 08543),并且将20μg的肉毒杆菌毒素蛋白质装载至柱中,并允许其以1mL/min的速率流动30分钟。

[0114] 为了在视觉上检查对于通过TQ过程(第一阴离子交换色谱过程)、HQ过程(第二阴离子交换色谱过程)和XS过程(阳离子交换色谱过程)纯化的肉毒杆菌毒素的每个纯化(过程)步骤中收集的样品中的肉毒杆菌毒素的混合状态/纯度/含量,进行蛋白质电泳(SDS-PAGE)。具体地,通过Bradford方法定量被认为含有肉毒杆菌毒素的样品,然后取一定量(例如40μg蛋白质)的每个样品并将其适当加热和/或溶解,并使用变性的蛋白质进行4-12% SDS-PAGE。用合适的染料(硝酸银或考马斯蓝)染色电泳凝胶,然后视觉上检查每个纯化步骤中肉毒杆菌毒素的纯度。

[0115] 2-3-1:TQ纯化(阴离子交换色谱流通(AEX FT))

[0116] 在完成实施例2-2的预处理过程后,为去除除了肉毒杆菌毒素之外的大多数主要杂质,使用离子交换树脂以以下方式进行色谱。

[0117] (1) 将TQ树脂装到XK 26/40柱中至30-34cm的高度,然后将该柱安装在AKTA Prime Plus中。

[0118] (2) 用平衡/洗脱缓冲液 (50mM磷酸钠 (pH 6.4-6.6和 $10 \pm 5$ mS/cm)) 平衡该柱。

[0119] (3) 将10mL的通过实施例2-2的常规方法预处理的样品装载到柱中并允许其以2mL/min的速率流动。完成注射后, 装载160-180mL的平衡/洗脱缓冲液, 并顺序收集级分, 直到在280nm的UV波长处的峰降至基线 (通过SDS-PAGE分析该级分)。

[0120] (4) 为了在收集这些级分后使该柱再生, 以5mL/min的流速装载200mL或更多的洗涤缓冲液 (50mM磷酸钠, pH6.4~6.6, 1M NaCl) 以洗涤该柱。

[0121] (5) 根据以上 (2) 至 (4) 的程序, 代替通过常规方法预处理的样品, 使用通过其他三种方法 (深层过滤后的UF、深层过滤后的硫酸铵沉淀和深层过滤后的盐酸沉淀) 预处理的样品进行TQ纯化。在此, 为了高纯度的肉毒杆菌毒素的纯化, 使pH保持在6.4-6.6, 并且使电导率保持在 $10 \pm 5$ mS/cm。

[0122] 作为结果, 显示肉毒杆菌毒素未被吸附到TQ树脂上, 并且通过吸附去除了大多数主要杂质, 并且因此可以高纯度产生肉毒杆菌毒素。另外, 所得肉毒杆菌毒素具有19S (分子量: 约900kDa) 的形式。

[0123] 2-3-2: HQ纯化 (阴离子交换色谱: AEX, 结合模式)

[0124] 完成TQ纯化后, 为了进一步纯化肉毒杆菌毒素, 进行使用HQ离子交换树脂 (以下称为“HQ过程”) 的色谱。在HQ过程中, 由TQ纯化产生的样品在结合或FT (流通) 模式下纯化。如本文所使用的术语“HQ (结合)”指基于能够结合靶物质的HQ树脂的电荷量的差异来分离 (或洗脱) 靶物质 (例如肉毒杆菌毒素) 的过程, 并且术语“HQ (FT)”指一种过程, 其中, 基于能够结合能与靶物质 (例如肉毒杆菌毒素) 混合的杂质的HQ树脂的电荷量的差异, 将流通 (FT) HQ树脂而不结合至HQ树脂的靶物质从样品中分离。

[0125] HQ (结合) 纯化 (AEX, 结合模式)

[0126] (1) 使根据常规过程预处理后通过TQ纯化的样品进行10次使用UF系统 (PALL, TFF 盒30kDa MWC0) 使用25mM Tris-HCl缓冲液 (pH7.7-7.9) 的渗滤。样品的最终pH为7.7-7.9, 并将体积调节至30mL。

[0127] (2) 将HQ树脂装到AKTAPrime Plus中。

[0128] (3) 用25mM Tris-HCl缓冲液 (pH7.7-7.9) 平衡该柱。

[0129] (4) 将 (1) 中制备的样品以2.5mL/min的流速装载至平衡柱中, 并用40mL的25mM Tris-HCl缓冲液 (pH7.7-7.9) 洗涤, 然后以20CV和10%的梯度洗脱。顺序收集对应于第一个峰的级分 (通过SDS-PAGE分析该级分)。

[0130] (5) 为了在收集该级分后使该柱再生, 以2.5mL/min的流速装载120mL或更多的洗涤缓冲液 (25mM Tris-HCl, pH 7.7-7.9, 1M NaCl) 以洗涤柱。

[0131] (6) 代替根据常规方法预处理后通过TQ纯化的样品, 使用根据其他3种方法处理后通过TQ纯化 (深层过滤后的UF、深层过滤后的硫酸铵沉淀、深层过滤后的盐酸沉淀后的TQ纯化) 的样品, 进行以上 (1) ~ (5) 的程序。

[0132] 作为结果, 显示可以高纯度产生肉毒杆菌毒素, 并且所得肉毒杆菌毒素具有7S (分子量: 约150kDa) 的形式 (图2和3)。

[0133] 2-3-3: HQ纯化 (AEX, 结合模式) 和XS纯化 (结合模式)

[0134] 完成根据实施例2-3-2的HQ纯化后, 为了进一步纯化肉毒杆菌毒素, 进一步进行XS阳离子交换色谱 (CEX, 结合模式)。

[0135] 具体地,以以下方式进行XS过程。

[0136] (1) 使用50mM磷酸钠缓冲液 (pH 6.9-7.1) 将根据实施例2-2的常规方法预处理后通过HQ纯化的样品稀释至1/4。

[0137] (2) 将XS树脂装到AKTA Prime Plus中。

[0138] (3) 用平衡/洗脱缓冲液 (50mM磷酸钠, pH 6.9-7.1) 平衡该柱。

[0139] (4) 将(1)的经稀释和HQ纯化的样品以1.6mL/min的流速装载至平衡的柱中,并用50mL的50mM磷酸钠缓冲液 (pH 6.9-7.1) 洗涤。然后,以20CV和12%梯度洗脱样品。顺序收集对应于第一个峰的级分(通过SDS-PAGE分析该级分)。

[0140] (5) 为了在收集该级分后使该柱再生,以1.6mL/min的流速装载20mL或更多的洗涤缓冲液 (50mM磷酸钠, pH 6.9-7.1, 1M NaCl) 以洗涤该柱。

[0141] (6) 代替根据常规方法预处理后通过HQ纯化的样品,使用根据其他三种方法(深层过滤后的UF后TQ纯化、深层过滤后的硫酸铵沉淀后TQ纯化和深层过滤后的盐酸沉淀后的TQ纯化)处理后通过TQ和HQ纯化的样品,进行以上(1)至(5)的程序。

[0142] 作为结果,显示肉毒杆菌毒素可以高纯度产生,并且最终的肉毒杆菌毒素具有7S (分子量:约150kDa) 的形式(图4和5)。

[0143] 2-3-4:HQ纯化(AEX,FT模式)和XS纯化(结合模式)

[0144] 根据以上实施例2-3-3中描述的肉毒杆菌毒素产生方法,使用HQ (AEX) 纯化过程中的流通模式而不是结合模式产生肉毒杆菌毒素。

[0145] HQ (AEX,FT模式) 过程

[0146] HQ纯化(AEX,FT模式)按以下方式进行。

[0147] 使根据常规过程预处理后通过TQ纯化的样品经过10次使用UF系统(PALL, TFF盒30kDa MWC0)使用25mM Tris-HCl缓冲液 (pH 7.7-7.9, 电导率7.0-7.5mS/cm) 的渗滤。样品的最终pH为7.7-7.9,并将样品的体积调节至30mL。然后,将样品进行HQ (FT模式) 过程。

[0148] (1) 将HQ树脂塞到AKTA Prime Plus中。

[0149] (2) 用25mM Tris-HCl缓冲液 (pH 7.7-7.9, 电导率:7.0-7.5mS/cm) 平衡该柱。

[0150] (3) 将TQ纯化的样品以1.5mL/min的流速装载,并用40mL的25mM Tris-HCl缓冲液 (pH7.7-7.9, 电导率:7.0-7.5mS/cm) 洗脱。收集对应于该峰的级分(通过SDS-PAGE分析该级分)。

[0151] (4) 为了在收集该级分后使该柱再生,以1.5mL/min的流速装载40mL或更多的洗涤缓冲液 (25mM Tris-HCl, pH 7.7-7.9, 1M NaCl) 以洗涤该柱。

[0152] 使用HQ (FT) 样品的XS过程

[0153] 为了增加肉毒杆菌毒素的纯度,通过XS (结合) 过程进一步纯化通过HQ (FT) 过程纯化的样品。

[0154] (1) 使用50mM磷酸钠缓冲液 (pH 6.9-7.1) 将通过HQ (FT) 过程纯化的样品稀释至1/4。

[0155] (2) 将XS树脂装载到AKTAPrime Plus中。

[0156] (3) 用50mM磷酸钠缓冲液 (pH 6.9-7.1) 平衡该柱。

[0157] (4) 将以上(1)中稀释的HQ纯化的样品以1.5mL/min的流速装载到柱中,并用50mL的50mM磷酸钠缓冲液 (pH 6.9-7.1) 洗涤。然后,以60CV和12%梯度洗脱样品。收集对应于第



一个峰的级分(通过SDS-PAGE分析该级分)。

[0158] (5) 为了在收集该级分后再使该柱再生,以1.5mL/min的流速装载20mL或更多的洗涤缓冲液(50mM磷酸钠,pH 6.9-7.1,1M NaCl)以洗涤该柱。

[0159] 作为结果,如图6和7中所示,发现能够以98%或更高的纯度产生7S(分子量:约150kDa)形式的肉毒杆菌毒素。

[0160] 总之,如图2至7中所示,在进行实施例2的常规方法或深层过滤后的盐酸沉淀过程之后,通过阴离子交换色谱纯化(TQ(结合或FT模式)纯化)获得的含有肉毒杆菌毒素的样品中,观察到最少量的除在毒素19S中天然观察到的138kDa (NTNH)、98kDa(重链)、52kDa(轻链)、50kDa(HA)、33kDa(HA)、20kDa(HA)和17kDa(HA)之外的杂质。

[0161] 此外,在深层过滤后的UF渗滤之后通过阴离子交换色谱(TQ(结合或FT模式)纯化)获得的含有肉毒杆菌毒素的样品中,观察到约13kDa的杂质蛋白条带。

[0162] 另外,在深层过滤后的硫酸铵沉淀之后通过阴离子交换色谱(TQ(结合或FT模式)纯化)获得的含肉毒杆菌毒素的样品中,观察到约37kDa的杂质蛋白条带。

[0163] 然而,从为了纯化低分子量肉毒杆菌毒素而解离毒素复合体后的HQ和XS纯化过程的结果可见,不管四种预处理过程(常规过程、深层过滤后的UF、深层过滤后的硫酸铵沉淀和深层过滤后的盐酸沉淀)的种类如何,在所有含有肉毒杆菌毒素的样品中均未观察到杂质蛋白条带,并且仅观察到98kDa(重链)和52kDa(轻链)的低分子量肉毒杆菌毒素。

[0164] 特别地,能够替代为了分离肉毒杆菌毒素19S而对含肉毒杆菌毒素的样品进行的酶处理和提取过程的最有效的过程是在每次硫酸沉淀、深层过滤和盐酸沉淀后进行的阴离子交换色谱纯化(TQ(结合或FT模式))。

[0165] 另一方面,在为了分离肉毒杆菌毒素7S(低分子量肉毒杆菌毒素)的过程中,在四个预处理过程(常规过程、深层过滤后的UF、深层过滤后的硫酸铵沉淀和深层过滤后的盐酸沉淀)中的每一个之后,顺序进行阴离子交换色谱(HQ(结合模式或FT模式))和阳离子交换色谱(XS(结合模式))时,出现最高纯化效率。

[0166] 工业实用性

[0167] 根据本发明的用于产生肉毒杆菌毒素的新方法使从根本上防止动物来源的组分的进入成为可能,由此确保增加的安全性。另外,使用本发明的方法使通过简单过程产生高纯度的肉毒杆菌毒素成为可能,这表明该方法非常经济和有效。与通过常规方法产生的肉毒杆菌毒素相比,通过本发明的方法产生的肉毒杆菌毒素具有相对高的纯度,并且因此局部区域具有增加的行动能力。因此,可导致副作用的肉毒杆菌毒素的系统循环减少以增加安全性。因此,本发明的肉毒杆菌毒素可用于多种目的,其包括神经肌肉紊乱的治疗、皱纹的去除以及痉挛性偏瘫和脑瘫的治疗。

[0168] 尽管已经参考具体特征详细描述了本发明,但是对于本领域技术人员显而易见的是,该描述仅用于优选的实施方案并且不限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围将由所附权利要求及其等同物来定义。

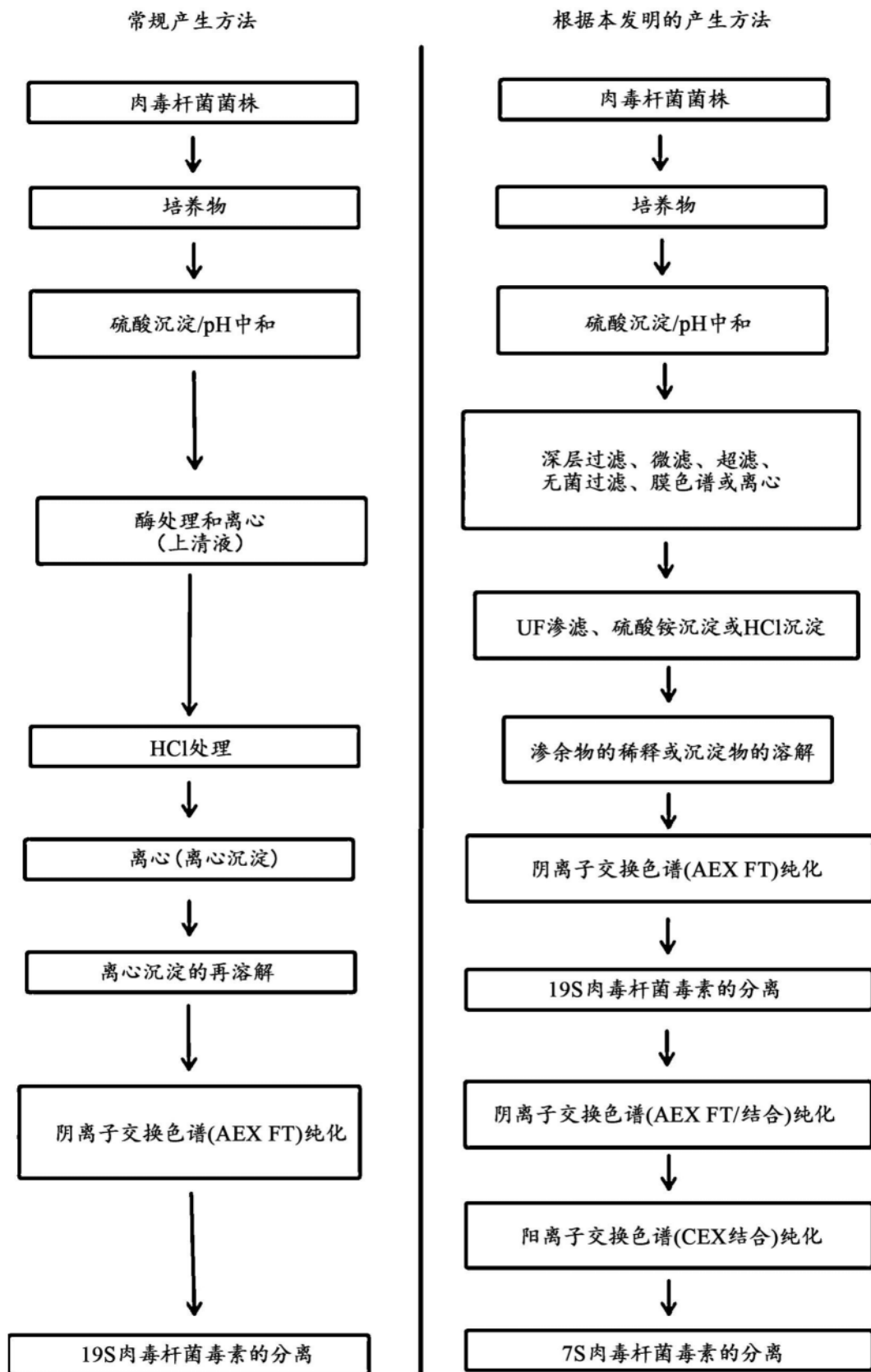


图1

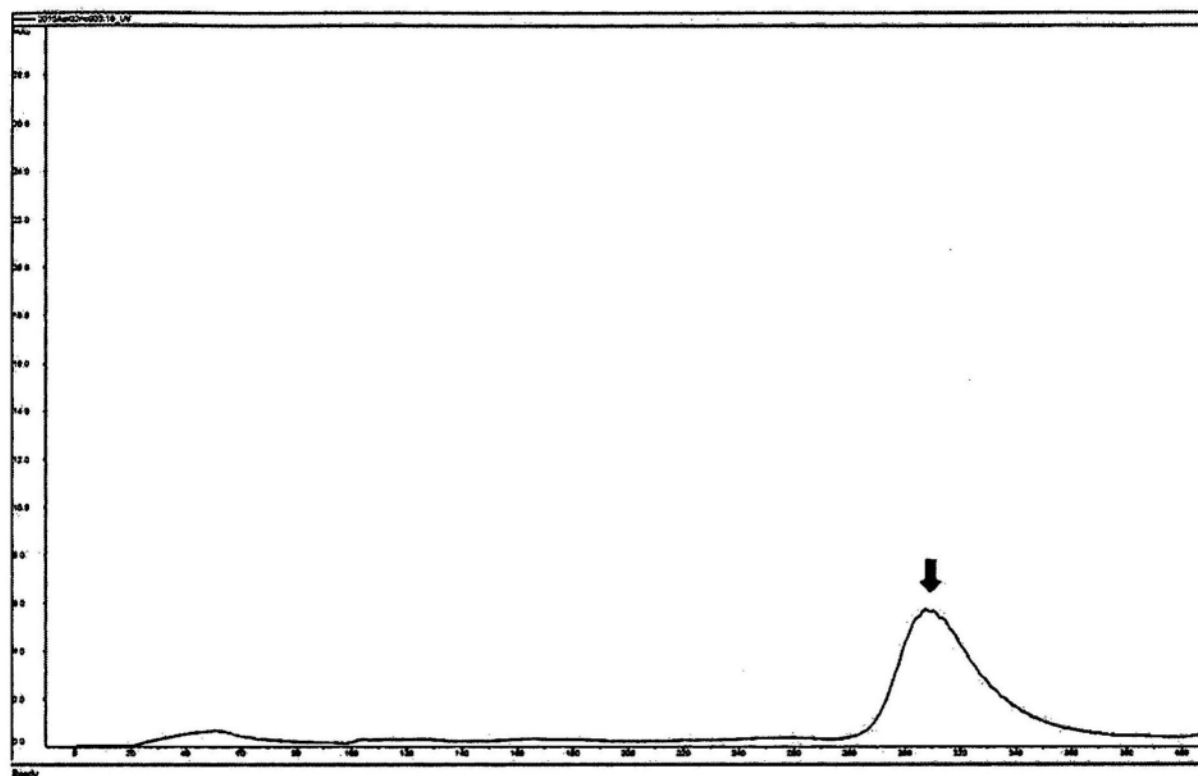


图2

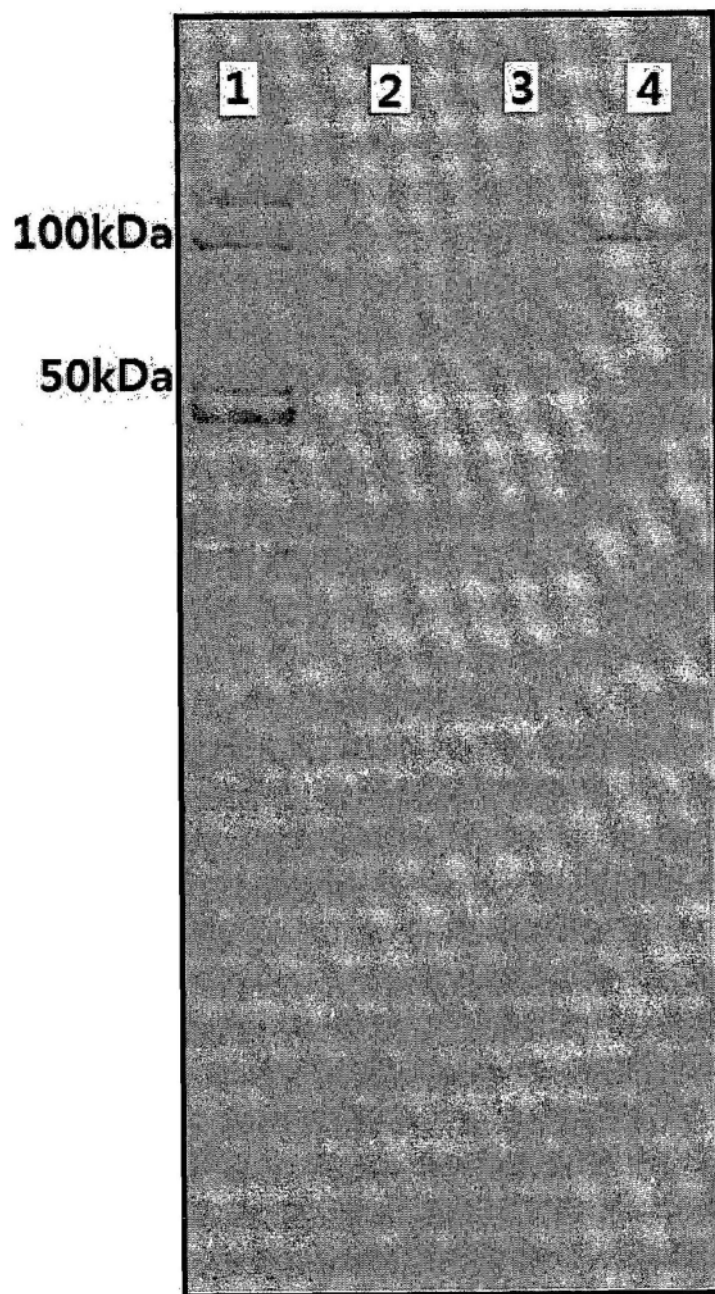


图3

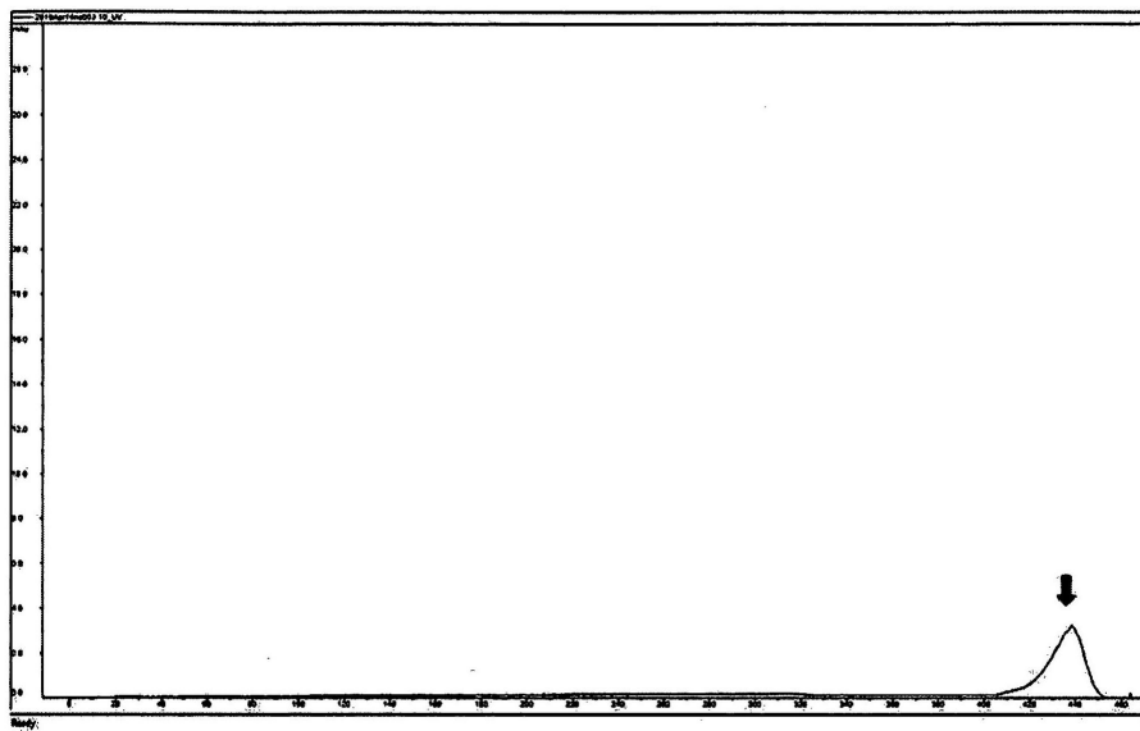


图4

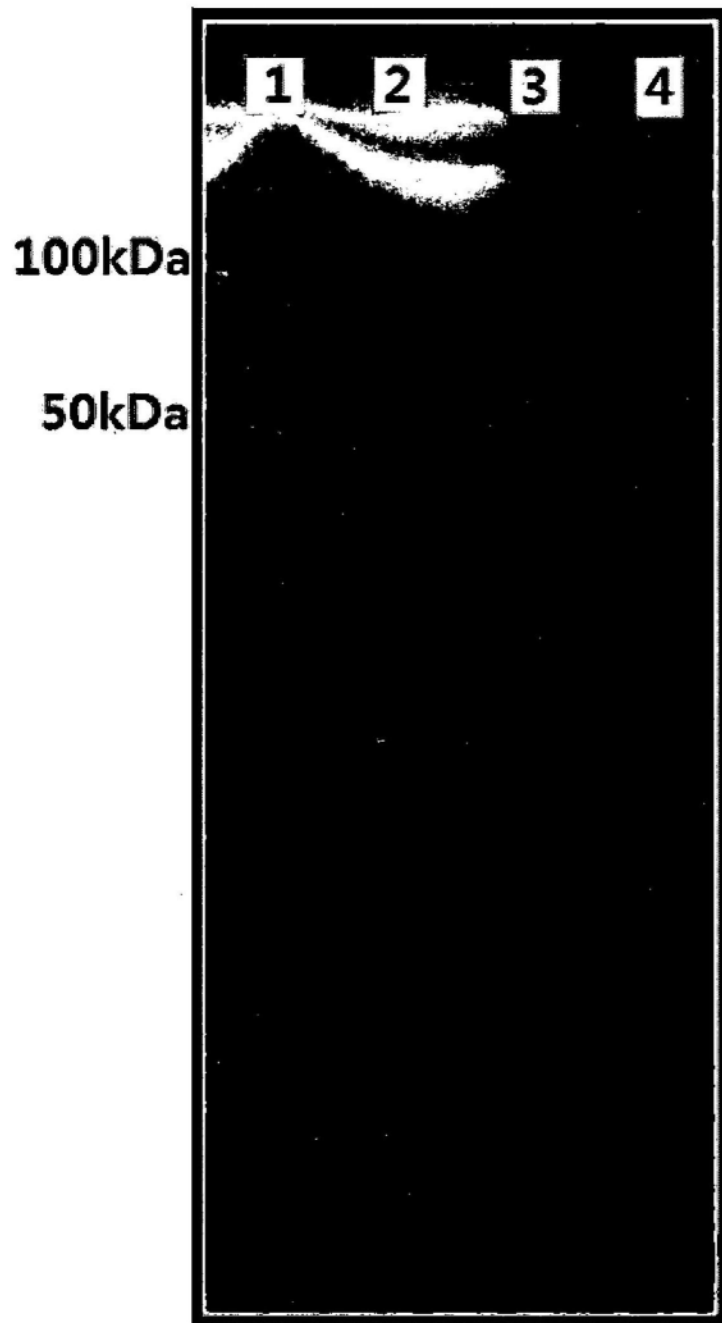


图5

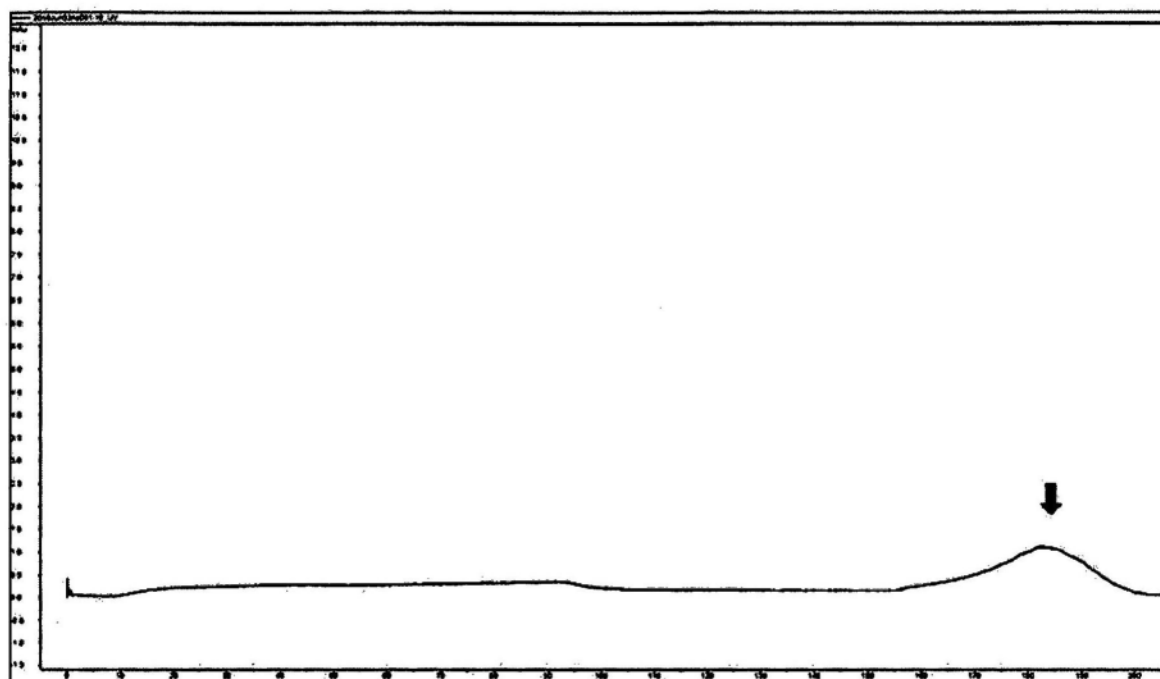


图6

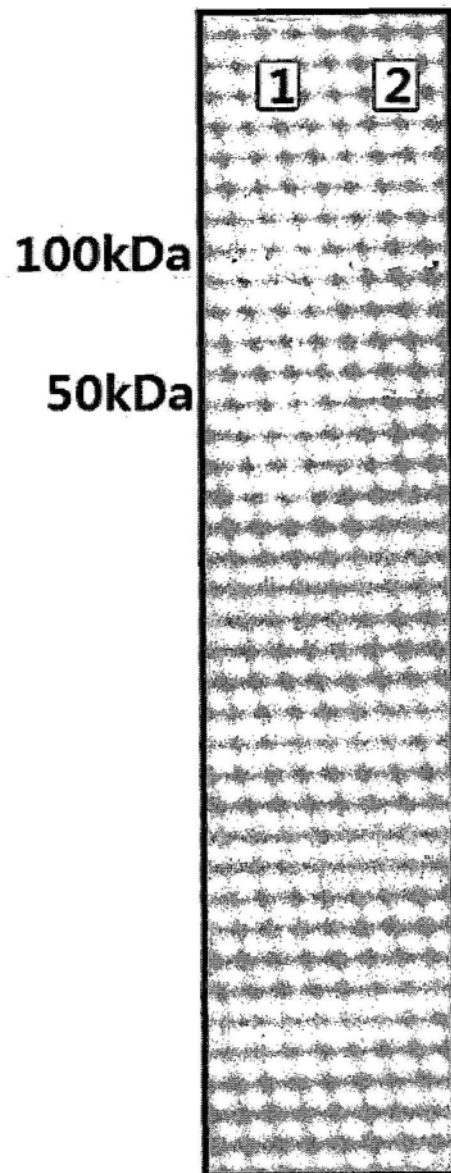


图7