

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) **CH** **720 444 A2**

Patentanmeldung für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(51) Int. Cl.: **A61K** **39/08** (2006.01)
C07K **14/33** (2006.01)
C12N **15/11** (2006.01)
A61P **21/00** (2006.01)
A61K **47/42** (2017.01)

(12) **PATENTANMELDUNG**

(21) Anmeldenummer: 000067/2024

(22) Anmeldedatum: 18.01.2024

(43) Anmeldung veröffentlicht: 31.07.2024

(30) Priorität: 20.01.2023 US 63/480,937

(71) Anmelder:
Abbvie Inc., 1 North Waukegan Road
60064 North Chicago, IL (US)

(72) Erfinder:
Connie J. Ng, Irvine, CA 92614 (US)
Cortnie M. Guerrero, Costa Mesa, CA 92626 (US)
Hemant A. Patel,
Rancho Santa Margarita, CA 92688 (US)
Hui Xiang, Irvine, CA 92618 (US)
Jared Wiig, Fullerton, CA 92831 (US)
Phillip P. Nguyen, Irvine, CA 92620 (US)
Robert R. Kehr, Garden Grove, CA 92840 (US)

(74) Vertreter:
Isler & Pedrazzini AG, Postfach 1772
8027 Zürich (CH)

(54) **CLOSTRIDIUM BOTULINUM SEROTYP A NEUROTOXIN (BONT/A)- SEQUENZVARIANTEN**

(57) Hierin werden Zusammensetzungen bereitgestellt, die einen Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A (BoNT/A)-Komplex umfassen, der ein 150 kDa BoNT/A umfasst. Das 150 kDa BoNT/A liegt in Form einer Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies vor, wobei die Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette umfasst.

Beschreibung**QUERVERWEIS AUF VERWANDTE ANMELDUNGEN**

[0001] Diese Anmeldung beansprucht die Vorteile der vorläufigen US-Anmeldung Nr. 63/480,937, die am Januar 20, 2023 eingereicht wurde und durch Bezugnahme hierin in vollem Umfang enthalten ist.

VERWEIS AUF DAS ELEKTRONISCH ÜBERMITTELTE SEQUENZPROTOKOLL

[0002] Diese Anmeldung beinhaltet durch Bezugnahme ein Sequenzprotokoll, das mit dieser Anmeldung als xml-Datei mit dem Titel „13371-269-228_SEQ_LISTING.xml“ eingereicht wurde.

1. GEBIET

[0003] Hierin werden Zusammensetzungen bereitgestellt, die einen Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A (BoNT/A)-Komplex umfassen, der ein 150 kDa BoNT/A umfasst. Das 150 kDa BoNT/A liegt in Form einer Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies vor, wobei die Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette umfasst.

2. STAND DER TECHNIK

[0004] Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A (BoNT/A) ist ein hochwirksames Toxin, das eine Muskelentspannung durch Hemmung des Andockens und der Fusion synaptischer Vesikel bewirkt und dadurch die Freisetzung von Acetylcholin an neuromuskulären Abzweigungen blockiert. BoNT/A wird von Clostridium botulinum Typ A Stämmen produziert, die einen Komplex aus einem 150 kDa Neurotoxin zusammen mit einer Gruppe von nicht-toxischen Neurotoxin-assoziierten Proteinen (NAPs) synthetisieren. BOTOX®, oder OnabotulinumtoxinA, ist ein BoNT/A-Produkt, das von der amerikanischen Gesundheitsbehörde (Food and Drug Administration, FDA) im Jahr 1989 für eine Reihe von therapeutischen und kosmetischen Indikationen zugelassen wurde.

[0005] Bis heute besteht ein Bedarf an der Entwicklung von pharmazeutischen Zusammensetzungen von Botulinum-Toxinen mit verbesserten Eigenschaften.

[0006] Die Nennung einer Referenz hierin ist nicht als Eingeständnis zu verstehen, dass es sich um ein Fachgebiet handelt, das dem Stand der Technik der vorliegenden Offenbarung entspricht.

3. KURZDARSTELLUNG

[0007] Die vorliegende Offenbarung basiert zum Teil auf dem überraschenden Fund einer 150 kDa BoNT/A-Variante mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette, d. h., einer C-terminalen verkürzten leichten Kette mit einer in SEQ ID NO: 4 dargelegten Aminosäuresequenz (im Folgenden als „verkürztes 150 kDa BoNT/A“ bezeichnet), und dass das Vorhandensein und/oder die Menge einer solchen Variante die Eigenschaften des BoNT/A-Komplexes beeinflussen kann. Die vorliegende Offenbarung beschreibt auch, dass die Erhöhung der CO₂-Konzentration während der Gärung von Clostridium botulinum und die Verwendung einer Temperatur, die niedriger ist als die Standard-Fermentations-Temperatur während der Gärung (entweder für eine kurze Zeit (d. h. Kälteschock) oder kontinuierlich), beide die Menge an verkürztem 150 kDa BoNT/A reduzieren können. Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden sein zu wollen, ist im Vergleich zum vollständigen 150 kDa BoNT/A (d. h., dem 150 kDa BoNT/A, das eine leichte Kette mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 umfasst), die verkürzte 150 kDa BoNT/A-Variante aufgrund des Verlusts des C-terminalen positiv geladenen Lysinrests in der leichten Kette negativer geladen. Die stärker negativ geladene verkürzte BoNT/A-Variante kann an der Verabreichungsstelle eine kürzere Geweberetentionszeit zeigen als die BoNT/A-Spezies voller Länge, aufgrund ungünstiger elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den hierin beschriebenen verkürzten BoNT/A-Varianten und den anionischen extrazellulären Komponenten (wie Zellmembranen und Heparinsulfat-Proteoglykanen) an der Verabreichungsstelle. Somit können die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen durch Reduzieren des Gehalts an der stärker negativ geladenen verkürzten BoNT/A-Variante die Menge an biologisch aktivem BoNT/A reduzieren, das von der Verabreichungsstelle wegdiffundiert und somit die Geweberetention verbessert.

[0008] Das bedeutet, eine Zusammensetzung, umfassend einen 900 kDa Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A (BoNT/A) Komplex, wobei der 900 kDa BoNT/A Komplex ein 150 kDa BoNT/A umfasst, das in Form einer Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies vorliegt, wobei die Vielzahl der Sequenzvarianten-Spezies eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette und eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer leichten Kette in voller Länge umfasst, wobei die C-terminale verkürzte leichte Kette eine Aminosäuresequenz aufweist, die in SEQ ID NO: 4 dargelegt ist, und die leichte Kette in voller Länge eine Aminosäuresequenz aufweist, die in SEQ ID NO: 2 dargelegt ist, und wobei das Verhältnis der Häufigkeit der 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit der C-terminalen verkürzten leichten Kette zu der Häufigkeit der 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit der leichten Kette in voller Länge geringer als 3,9 ist.

[0009] In einem anderen Aspekt wird hierin eine Zusammensetzung bereitgestellt, die einen 900 kDa BoNT/A-Komplex umfasst, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex ein 150 kDa BoNT/A umfasst, das in Form einer Vielzahl von Sequenzvari-

anten-Spezies vorliegt, wobei die Vielzahl der Sequenzvarianten-Spezies eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette umfasst, wobei die C-terminale verkürzte leichte Kette eine in SEQ ID NO: 4 dargelegte Aminosäuresequenz aufweist, und wobei der Prozentsatz der Häufigkeit der 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit der C-terminalen verkürzten leichten Kette in der Häufigkeit der Vielzahl von 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies geringer als 79,5 %.

[0010] In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex von Clostridium botulinum-Bakterien produziert, die aus einer von Lebewesen freien Arbeitszellbank kultiviert und erweitert wurden.

[0011] In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A Komplex von einem Typ A Stamm von Clostridium botulinum produziert.

[0012] In bestimmten Ausführungsformen ist der Typ A Stamm von Clostridium botulinum ein Typ A Hall-Stamm von Clostridium botulinum.

[0013] In bestimmten Ausführungsformen ist der 900 kDa BoNT/A-Komplex Onabotulinumtoxin A.

[0014] In bestimmten Ausführungsformen umfasst die hierin bereitgestellte Zusammensetzung ferner Humanserumalbumin. In bestimmten Ausführungsformen umfasst die hierin enthaltene Zusammensetzung etwa 0,5 mg menschliches Serumalbumin pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes. In spezifischen Ausführungsformen ist das Humanserumalbumin rekombinantes Humanserumalbumin. In spezifischen Ausführungsformen wird das Humanserumalbumin aus menschlichem Plasma gewonnen.

[0015] In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin bereitgestellte Zusammensetzung lebewesenproduktfrei.

[0016] In bestimmten Ausführungsformen umfasst die hierin bereitgestellte Zusammensetzung ferner Natriumchlorid. In bestimmten Ausführungsformen umfasst die hierin enthaltene Zusammensetzung etwa 0,9 mg Natriumchlorid pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes.

[0017] In bestimmten Ausführungsformen enthält die hierin bereitgestellte Zusammensetzung keinen Proteaseinhibitor.

[0018] In bestimmten Ausführungsformen enthält die hierin bereitgestellte Zusammensetzung kein Benzamidinhydrochlorid.

[0019] In bestimmten Ausführungsformen umfasst die hierin bereitgestellte Zusammensetzung etwa 50 Einheiten, etwa 100 Einheiten oder etwa 200 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes.

[0020] In bestimmten Ausführungsformen weist die hierin bereitgestellte Zusammensetzung eine Potenz von etwa $1,5 \times 10^7$ Einheiten/mg bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg auf.

[0021] In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin bereitgestellte Zusammensetzung eine pharmazeutische Zusammensetzung in Pulverform.

[0022] In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin bereitgestellte Zusammensetzung vakuumgetrocknet.

[0023] In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der einen oder mehrere Schritte der Säulenchromatographie umfasst. In bestimmten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie. In bestimmten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie ferner die Anionenaustauschchromatographie. In bestimmten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie ferner die Kationenaustauschchromatographie.

[0024] In einem anderen Aspekt wird hierin ein Verfahren zur Herstellung einer BoNT/A umfassenden Zusammensetzung bereitgestellt, wobei das Verfahren das Inkubieren einer Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien in einem Produktionsfermenter in Gegenwart von CO₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses umfasst.

[0025] In bestimmten Ausführungsformen wird der Inkubationsschritt in Gegenwart von CO₂ und N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses durchgeführt. In bestimmten Ausführungsformen wird der Inkubationsschritt in Gegenwart von 25 % CO₂ und 75 % N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Prozesses der Gärung durchgeführt. In bestimmten Ausführungsformen wird der Inkubationsschritt in Gegenwart von 50 % CO₂ und 50 % N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Prozesses der Gärung durchgeführt. In bestimmten Ausführungsformen wird der Inkubationsschritt in Gegenwart von 75 % CO₂ und 25 % N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Prozesses der Gärung durchgeführt. In bestimmten Ausführungsformen wird der Inkubationsschritt in Gegenwart von 100 % CO₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses durchgeführt.

[0026] In einem anderen Aspekt bezieht sich die vorliegende Offenbarung auch auf ein Verfahren zur Behandlung eines bedürftigen Patienten, umfassend die Verabreichung einer hierin beschriebenen Zusammensetzung.

4. KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0027]

FIG. 1 zeigt den AEX-HPLC-Chromatographen für Proben, die unter Gärungsbedingungen mit unterschiedlichen CO₂ Konzentrationen enthalten wurden. CO₂ Studie 1: 25 % CO₂, CO₂ Studie 2: 50 % CO₂, CO₂ Studie 3: 75 % CO₂, CO₂ Studie 4: 100 % CO₂

FIG. 2A-2E zeigen die Häufigkeit von BoNT/A in voller Länge und C-terminal verkürzter leichter Kette, ermittelt aus Zuständen der Gärung mit unterschiedlichen CO₂ Konzentrationen. **FIG. 2A:** Baseline-Kontrolle der Fermentation. **FIG. 2B:** 25 % CO₂ Fermentation. **FIG. 2C:** 50 % CO₂ Fermentation. **FIG. 2D:** 75 % CO₂ Fermentation. **FIG. 2E:** 100 % CO₂ Fermentation.

FIG. 3 zeigt den AEX-HPLC-Chromatographen für Proben, die unter verschiedenen Temperaturbedingungen bei der Fermentation ermittelt wurden. CEC #1: Baseline-Kontrolle der Fermentation; CEC #5: 20 °C Kälteschock; CEC #7: 15 °C Kälteschock; CEC #8: 25 °C Fermentation.

FIG. 4 zeigt die Häufigkeit der vollständigen und der C-terminalen verkürzten leichten Kette von BoNT/A, die unter verschiedenen Temperaturbedingungen bei der Fermentation ermittelt wurde.

5. DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0028] In einem Aspekt wird hierin eine neu verbesserte Zusammensetzung bereitgestellt, die einen 900 kDa BoNT/A-Komplex umfasst, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex ein 150 kDa BoNT/A umfasst, das in Form einer Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies vorliegt, wobei die Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies ein verkürztes 150 kDa BoNT/A umfasst, und wobei das Verhältnis der Häufigkeit des verkürzten 150 kDa BoNT/A zur Häufigkeit des 150 kDa BoNT/A in voller Länge geringer ist als ein Referenzverhältnis (z. B., ein Referenzverhältnis von 3,9) oder der prozentuale Anteil der Häufigkeit des verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies geringer ist als ein Referenzprozentsatz (z. B., ein Referenzprozentsatz von 79,5 %). Die vorliegende Offenbarung stellt auch Verfahren zur Herstellung der hierin enthaltenen neuen Zusammensetzungen bereit.

[0029] Weitere Vorteile der vorliegenden Offenbarung werden für einen Fachmann aus dem Lesen dieser Patentanmeldung ersichtlich sein. Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Ausführungsformen der Offenbarung sollen die Erfindung veranschaulichen und sind nicht als Einschränkung des Umfangs der Erfindung zu verstehen.

5.1. Definitionen

[0030] Die Singularformen „ein“, „eine“, „ein“ und „der“, „die“, „das“ schließen den Plural ein, es sei denn, aus dem Kontext geht eindeutig etwas anderes hervor.

[0031] Der Begriff „und/oder“, wie er hierin in einer Phrase wie „A und/oder B“ verwendet wird, soll „A und B“, „A oder B“, „A“ oder „B“ bedeuten.

[0032] Die Begriffe „ungefähr“ und „etwa“ beziehen sich im Allgemeinen auf einen Bereich von Zahlen, die ein Fachmann als äquivalent zu dem angegebenen Wert ansehen würde (d. h. der die gleiche Funktion oder das gleiche Ergebnis aufweist). In vielen Fällen können die Begriffe „ungefähr“ und „etwa“ Zahlen einschließen, die auf die nächste signifikante Stelle gerundet sind. In bestimmten Ausführungsformen sind die Begriffe „ungefähr“ und „etwa“ so zu verstehen, dass sie eine normale Variation ermöglichen, wie sie von einem Fachmann beurteilt wird, wie beispielsweise eine Variation innerhalb von 20 % oder 10 % oder 5 %. In bestimmten Ausführungsformen umfassen die Begriffe „ungefähr“ und „etwa“ den genauen Wert, der angegeben ist.

[0033] „Lebewesenproduktfrei“ („APF“) oder „im Wesentlichen lebewesenproduktfrei“ umfasst das Fehlen bzw. das weitgehende Fehlen von aus Blut gewonnenen, aus Blut gepoolten und anderen aus Lebewesen gewonnenen Erzeugnissen oder Verbindungen. Der Begriff „Lebewesen“ schließt Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, aus. So kann ein APF-Medium oder -Prozess oder ein im Wesentlichen APF-Medium oder -Prozess innerhalb des Schutzzumfangs der vorliegenden Erfindung ein Botulinum-Toxin oder ein Clostridium botulinum-Bakterium einschließen. Zum Beispiel bedeutet ein APF-Prozess oder ein im Wesentlichen APF-Prozess einen Prozess, der entweder im Wesentlichen frei oder hauptsächlich frei oder völlig frei von Lebewesen stammenden Proteinen ist, wie beispielsweise Immunglobuline, Fleischverdauung, Fleischnebenprodukte und Milch- oder Molkereiprodukte oder Verdauungen.

[0034] „Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A“ oder „BoNT/A“ bezeichnet ein Neurotoxin, das von Clostridium botulinum Typ A Stämmen produziert wird. Ein solcher Clostridium botulinum Typ A-Stamm ist der Typ A Hall-Stamm, zum Beispiel der Typ A Hall (Allergan)-Stamm. Zhang et al. (2003) Gene 315:21, hierin in vollem Umfang enthalten. BoNT/A umfasst sowohl einen BoNT/A-Komplex (z. B. die 300, 500, 760 und 900 kDa Komplexe) als auch reines BoNT/A Toxin (z. B. das etwa 150 kDa neurotoxische Molekül).

[0035] „BoNT/A-Komplexe“ bedeutet Clostridium botulinum Serotyp A Neurotoxin-Komplexe, die ein BoNT/A-Molekül (die neurotoxische Komponente) und ein oder mehrere Hämagglutinin (HA)-Proteine und/oder Nicht-Toxin-Nicht-Hämagglu-

tinin-Protein (NTNH-Protein) umfassen. Die BoNT/A-Komplexe können in den Formen z. B., etwa 900 kDa, 760 kDa, 500 kDa oder 300 kDa vorliegen. In einer Ausführungsform liegt der BoNT/A-Komplex in einer Form von etwa 900 kDa vor, die ein etwa 150 kDa BoNT/A-Molekül, Hämagglutinin HA70, Hämagglutinin HA34, Hämagglutinin HA17 und ungiftige Nicht-Hämagglutinin (NTNH)-Proteine umfasst. In einer Ausführungsform ist der BoNT/A-Komplex eine im Wesentlichen vollständige Form des 900 kDa BoNT/A-Komplexes. In einer Ausführungsform ist der BoNT/A-Komplex OnabotulinumtoxinA.

[0036] „150 kDa Clostridium botulinum Serotyp A Neurotoxin“ oder „150 kDa BoNT/A“ bezeichnet ein Neurotoxin von etwa 150 kDa, das aus einer Kultur von Clostridium botulinum Typ A Stamm (z. B., dem Hall-Stamm von Clostridium botulinum) hergestellt wird. Die beispielhaften Sequenzen von 150 kDa Botulinum Toxin Typ A (BoNT/A), die im Zusammenhang mit der vorliegenden Offenbarung verwendet werden, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Beispielsweise umfasst in einer Ausführungsform das im Zusammenhang mit der vorliegenden Offenbarung verwendete 150 kDa BoNT/A (z. B., besteht aus) eine leichte Kette, die eine in SEQ ID NO. 2 dargelegte Aminosäuresequenz aufweist und eine schwere Kette, die eine in SEQ ID NO. 3 dargelegte Aminosäuresequenz aufweist, wobei Disulfidbrücken zwischen den Positionen 429 und 453 und zwischen den Positionen 1234 und 1279 positioniert sind. Ein weiteres Beispiel: In einer Ausführungsform umfasst das im Zusammenhang mit der vorliegenden Offenbarung verwendete 150 kDa BoNT/A (z. B., besteht aus) eine leichte Kette mit der in SEQ ID NO. 4 dargestellten Aminosäuresequenz und eine schwere Kette mit der in SEQ ID NO. 3 dargestellten Aminosäuresequenz, wobei sich Disulfidbrücken zwischen den Positionen 429 und 453 und zwischen den Positionen 1234 und 1279 befinden.

[0037] Der Begriff „BoNT/A in voller Länge 150 kDa“ bezieht sich auf das 150 kDa BoNT/A, das eine leichte Kette mit der in SEQ ID NO: 2 dargelegten Aminosäuresequenz und eine schwere Kette mit der in SEQ ID NO: 3 dargelegten Aminosäuresequenz umfasst.

[0038] Der Begriff „verkürztes 150 kDa BoNT/A“ bezieht sich auf das 150 kDa BoNT/A, das eine C-terminale verkürzte leichte Kette mit der in SEQ ID NO: 4 dargelegten Aminosäuresequenz und eine schwere Kette mit der in SEQ ID NO: 3 dargelegten Aminosäuresequenz umfasst.

[0039] Der Begriff „BoNT/A-Zusammensetzung“ bezieht sich auf jede Zusammensetzung, die BoNT/A umfasst, und schließt sowohl feste als auch flüssige Zusammensetzungen ein. In bestimmten Ausführungsformen ist eine hierin beschriebene BoNT/A-Zusammensetzung (z. B. eine feste Zusammensetzung oder eine flüssige Zusammensetzung) eine pharmazeutische Zusammensetzung. In bestimmten Ausführungsformen ist eine hierin beschriebene BoNT/A-Zusammensetzung (z. B. eine feste Zusammensetzung oder flüssige Zusammensetzung) ein Medikament (z. B. eine fertige Dosierungsform). In bestimmten Ausführungsformen ist eine hierin beschriebene BoNT/A-Zusammensetzung (z. B. eine feste Zusammensetzung oder eine flüssige Zusammensetzung) ein Medikamentenwirkstoff. In einer bestimmten Ausführungsform liegt eine hierin beschriebene BoNT/A-Zusammensetzung in Form einer Lösung vor. In einer spezifischen Ausführungsform liegt eine hierin beschriebene BoNT/A-Zusammensetzung in Form von Pulver (z. B. vakuumgetrocknetem Pulver oder gefriergetrocknetem Pulver) vor.

[0040] Der Begriff „Träger“, der in Verbindung mit einem pharmazeutischen Hilfsstoff verwendet wird, bezieht sich auf alle Lösungsmittel, Dispersionsmittel, Konservierungsmittel, Beschichtungen, isotonische und absorptionsverzögernde Mittel und dergleichen, die mit der pharmazeutischen Verabreichung vereinbar sind.

[0041] „Pharmazeutische Zusammensetzung“ bedeutet eine Formulierung, in der ein aktiver Wirkstoff ein BoNT/A sein kann. Das Wort „Formulierung“ bedeutet, dass in der pharmazeutischen Zusammensetzung neben einem BoNT/A aktiven Wirkstoff mindestens ein zusätzlicher Wirkstoff (wie zum Beispiel, aber nicht beschränkt auf, ein Albumin (wie ein menschliches Serumalbumin (HSA) oder ein rekombinantes menschliches Albumin) und/oder Natriumchlorid) vorhanden ist. Der menschliche Serumalbumin-Hilfsstoff kann aus menschlichem Plasma gewonnen oder rekombinant hergestellt werden. Eine pharmazeutische Zusammensetzung ist daher eine Formulierung, die zur diagnostischen, therapeutischen und/oder kosmetischen Verabreichung (z. B. durch intramuskuläre oder subkutane Injektion oder durch Einsetzen eines Depots oder Implantats) an ein Subjekt, wie einen menschlichen Patienten, geeignet ist. Eine pharmazeutische Zusammensetzung kann in einem vakuumgetrockneten oder gefriergetrockneten Zustand, als Lösung, die aus der vakuumgetrockneten oder gefriergetrockneten pharmazeutischen Zusammensetzung rekonstituiert wurde, zum Beispiel mit Kochsalzlösung oder Wasser, oder als Lösung, die keine Rekonstitution erfordert, vorliegen. In einer Ausführungsform ist der aktive Wirkstoff das Botulinum-Toxin Serotyp A, das nativ von Clostridien-Bakterien hergestellt wird. In einer Ausführungsform ist der aktive Wirkstoff OnabotulinumtoxinA. Wie bereits erwähnt, kann eine pharmazeutische Zusammensetzung flüssig oder fest sein, zum Beispiel vakuumgetrocknet oder gefriergetrocknet. Beispielhafte Verfahren zur Formulierung einer pharmazeutischen BoNT/A-Wirkstoff-Zusammensetzung sind in der US-Patentanmeldungsveröffentlichung Nr. 2003/0118598, eingereicht am 5. November, 2002, hierin in vollem Umfang enthalten, offenbart. In einer bevorzugten Ausführungsform liegt eine hierin beschriebene pharmazeutische Zusammensetzung in einer getrockneten Form (z. B. einer vakuumgetrockneten oder gefriergetrockneten Form) vor. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können vakuumgetrocknet werden und eignen sich zur Verabreichung durch Injektion entweder subkutan oder intramuskulär nach Rekonstitution mit normaler Kochsalzlösung, umfassend 900 kDa BoNT/A, humanes Serumalbumin (HSA) und Natriumchlorid. Vorzugsweise umfassen solche pharmazeutischen Zusammensetzungen 0,5 mg HSA und 0,9 mg Natriumchlorid pro 100 Einheiten von BoNT/A. Besonders bevorzugt umfassen solche pharmazeutischen Zusammensetzungen 50, 100 oder 200 Einheiten von BoNT/A.

[0042] Der Begriff „Patient“, „Subjekt“, „Individuum“ und dergleichen bezieht sich auf Menschen.

[0043] „Einheit“ oder „U“ bezieht sich auf die LD₅₀-Dosis oder die Dosis, die durch einen zellbasierten Potenzassay (CBPA) bestimmt wird. Die LD₅₀-Dosis ist definiert als die Menge an BoNT/A, die 50 % der Mäuse, denen das BoNT/A injiziert wurde, getötet hat. Die CBPA-Dosis wird bestimmt wie in US-Patent Nr. 8,618,261; 8,198,034; 9,249,216; 10,703,806; 11,261,240 und 11,332,518 beschrieben; deren Assay-Details durch Bezugnahme hierin enthalten sind.

[0044] Sofern der Kontext nichts anderes erfordert, werden die Begriffe „umfassen“, „umfasst“ und „umfassend“ auf der Grundlage und in dem klaren Verständnis verwendet, dass sie nicht exklusiv, sondern inklusiv zu interpretieren sind, so dass sie die Einbeziehung des genannten Merkmals anzeigen, ohne jedoch ein oder mehrere andere solche Merkmale auszuschließen. Es ist jedoch zu verstehen, dass überall dort, wo Aspekte und Ausführungsformen hierin mit der Formulierung „umfassen“ (oder „umfasst“ oder „umfassend“) beschrieben werden, ansonsten analoge Aspekte, die mit „bestehen aus“ (oder „besteht aus“ oder „bestehend aus“) und/oder „bestehen im Wesentlichen aus“ (oder „besteht hauptsächlich aus“ oder „bestehend hauptsächlich aus“) beschrieben sind, ebenfalls bereitgestellt werden.

5.2. Clostridium-Botulinum Neurotoxin-Serotyp A (BoNT/A) und BoNT/A-Zusammensetzungen

[0045] Ein 150 kDa BoNT/A-Molekül ist eine Zink-Endopeptidase, die spezifisch eine Peptidbindung des intrazellulären, Vesikel-assoziierten Proteins (VAMP, auch Synaptobrevin genannt) 25 KiloDalton (kDa) synaptosomal assoziierten Proteins (SNAP-25) hydrolysieren kann. Ein 150 kDa BoNT/A-Molekül wird als ein einkettiges Polypeptid von etwa 150 kDa übersetzt, das anschließend durch proteolytische Spaltung innerhalb einer Disulfidschleife durch eine natürlich vorkommende Protease gespalten wird. Dieser posttranslationale Prozess führt zu einem zweikettigen Molekül, das eine etwa 50 kDa leichte Kette (LC) und eine etwa 100 kDa schwere Kette (HC) umfasst, die durch eine einzelne Disulfidbindung und nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten wird.

[0046] Clostridiale Bakterien können Botulinum Toxin Typ A Komplexe in verschiedenen Formen produzieren, die 900 kDa, 760 kDa, 500 kDa und 300 kDa Komplexe (ungefähre Molekulargewichte) einschließen, aber nicht darauf beschränkt sind. Die Komplexe (d. h., Molekulargewicht größer als etwa 150 kDa) umfassen ein 150 kDa Botulinum Toxinmolekül (die neurotoxische Komponente) und ein oder mehrere Hämagglutinin (HA)-Proteine und/oder nicht-toxisches Nicht-Hämagglutinin (NTNH)-Protein.

[0047] In einer Ausführungsform weist das 150 kDa BoNT/A-Molekül, das im Zusammenhang mit der vorliegenden Offenbarung verwendet werden kann, eine in Tabelle 1 gezeigte Sequenz auf. In einer Ausführungsform umfasst das 150 kDa BoNT/A-Molekül eine leichte Kette (LC: Reste 2-438, etwa 50 kDa) und eine schwere Kette (HC: Reste 449-1296, etwa 100 kDa). In einer anderen Ausführungsform umfasst das 150 kDa BoNT/A-Molekül eine leichte Kette (LC: Reste 2-436, etwa 50 kDa) und eine schwere Kette (HC: Reste 449-1296, etwa 100 kDa). Die Reste 439-448 sind die Nicking-Stelle und sind kursiv gedruckt.

Tabelle 1. Bevorzugte Sequenzen von BoNT/A-Molekülen.

[0048]

SEQ ID NO. 1: Aminosäuresequenz des 150 kDa BoNT/A-Moleküls

MPFVNKQFNY	KDPVNGVDIA	YIKIPNAGQM	QPVKAFKIHN	KIWVIPERDT	50
FTNPEEGDLN	PPPEAKQVPV	SYDSTYLST	DNEKDNYLKG	VTKLFERIYS	100
TDLGRMLLTS	IVRGIPFWGG	STIDTELKVI	DTNCINVIQP	DGSYRSEELN	150
LVIIGPSADI	IQFECKSFGH	EVLNLTRNGY	GSTQYIRFSP	DFTFGFEESL	200
EVDTNPLLGA	GKFATDPAVT	LAHELIHAGH	RLYGIINPN	RVFKVNTNAY	250
YEMSGLEVSF	EELRTFGGHD	AKFIDSLQEN	EFRLYYYNKF	KDIASTLNKA	300
KSIVGTTASL	QYMKNVFKEK	YLLSEDTSGK	FSVDKLKFDK	LYKMLTEIYT	350
EDNFVKFFKV	LNRKTYLNFD	KAVFKINIVP	KVNYTIYDGF	NLRNTNLAAN	400
FNGQNTNINN	MNFTKLKNFT	GLFEFYKLLC	VRGIITSK7X	SLDKGYNK	
AL					450
NDLCIKVNNW	DLFFSPSEDN	FTNDLNKGEE	ITSDTNIEAA	EENISLDLIQ	500
QYYLTNFNFDN	EPENISIENL	SSDIIGQLEL	MPNIERFPNG	KKYELDKYTM	550
FHYLRAQEFE	HGKSRIALTN	SVNEALLNPS	RVYTFSSDY	VKKVKNKATEA	600

CH 720 444 A2

AMFLGW VEQL	VYDFTDETSE	VSTTDKIADI	TIIPYIGPA	LNIGNMLYKD	650
DFVGALIFSG	AVILLEFIPE	IAIPVLGTFA	LVSYIANKVL	TVQTDINALS	700
KRNEKWDEVY	KYIVTNWLAK	VNTQIDLIRK	KMKEALENQA	EATKAIINYQ	750
YNQYTEEEKN	NINFNIDDL	SKL NESINKA	MININKFLNQ	CSVSYLMNSM	800
IPYGVKRLED	FDASLKDALL	KYIYDNRGTL	IGQVDRLKDK	VNNTLSTDIP	850
FQLSKYVDNQ	RLLSTFTEYI	KNIINTSILN	LRYESNHLID	LSRYASKINI	900
GSKVNFDPID	KNQIQLFNLE	SSKIEVILKN	AIVYNSMYEN	FSTSFWIRIP	950
KYFNSISLNN	EYTIINCMEN	NSGWKVSLNY	GEIHWTLQDT	QEIKQRVVFVK	1000
YSQMINISDY	INRWIFVTIT	NNRLNNSKIY	INGRLIDQKP	ISNLGNIHAS	1050
NNIMFKLDGC	RDTHRYIWIK	YFNLFDKELN	EKEIKDLYDN	QSNHGILKDF	1100
WGDYLYQYDKP	YYMLNL YDPN	KYVDVNNVGI	RGYMYLKGPR	GSVMTTNIYL	1150
NSSLYRGTKF	IHKYASGNK	DNIVRNNDRV	YINVVVKNKE	YRLATNASQA	1200
GVEKILSALE	IPDVGNLSQV	VVMKSKNDQG	ITNKCKMNLQ	DNNGNDIGFI	1250
GFHQFNNAIK	LVASNWYNRQ	IERSSRTLGC	SWEFIPVDDG	WGERPL	1296

SEQ ID NO. 2: Aminosäuresequenz der leichten Kette (LC) von BoNT/A in voller Länge

150 kDa

PFVNKQFNY	KDPVNGVDIA	YIKIPNAGQM	QPVKAFKIHN	KIWWIPERDT	50
FTNPEEGDLN	PPPEAKQVPV	SYDYDSTYLS	DNEKDNLYLKG	VTKLFERIYS	100
TDLGRMLLTS	IVRGIPFWGG	STIDTELKVI	DTNCINVIQP	DGSYRSEELN	150
LVIIGPSADI	IQFECKSFGH	EVLNLTRNGY	GSTQYIRFSP	DFTFGFEESL	200
EVDTNPLLGA	GKFATDPAVT	LAHELIHAGH	RLYGIAINPN	RVFKVNTNAY	250
YEMSGLEVFS	EELRTFGGHD	AKFIDSLQEN	EFRLYYYNKF	KDIASTLNKA	300
KSIVGTTASL	QYMKNVFKEK	YLLSEDTSGK	FSVDKLKFDK	LYKMLTEIYT	350
EDNFVKFFKV	LNRKTYLNFD	KAVFKINIVP	KVNYTIYDGF	NLRNTNLAAN	400
FNGQNTINN	MNFTKLKNFT	GLFEFYKLLC	VRGIITSK		

SEQ ID NO. 3: Aminosäuresequenz der schweren Kette (HC) von 150 kDa BoNT/A

AL					450
NDLCIKVNNW	DLFFSPSEDN	FTNDLNKGEE	ITSDTNIEAA	EENISLDLIQ	500
QYYLTFNFDN	EPENISIENL	SSDIIGQLEL	MPNIERFPNG	KKYELDKYTM	550
FHYLRAQEFE	HGKSRIALTN	SVNEALLNPS	RVYTFSSDY	VKKVKNKATEA	600
AMFLGWVEQL	VYDFTDETSE	VSTTDKIADI	TIIPYIGPA	LNIGNMLYKD	650
DFVGALIFSG	AVILLEFIPE	IAIPVLGTFA	LVSYIANKVL	TVQTDINALS	700
KRNEKWDEVY	KYIVTNWLAK	VNTQIDLIRK	KMKEALENQA	EATKAIINYQ	750
YNQYTEEEKN	NINFNIDDL	SKL NESINKA	MININKFLNQ	CSVSYLMNSM	800
IPYGVKRLED	FDASLKDALL	KYIYDNRGTL	IGQVDRLKDK	VNNTLSTDIP	850
FQLSKYVDNQ	RLLSTFTEYI	KNIINTSILN	LRYESNHLID	LSRYASKINI	900

CH 720 444 A2

GSKVNFDPID	KNQIQLFNLE	SSKIEVILKN	AIVYNSMYEN	FSTSFWIRIP	950
KYFNSISLNN	EYTIINCMEN	NSGWKVSLNY	GEIIWTLQDT	QEIKQRVVFK	1000
YSQMINISDY	INRWIFVTIT	NNRLNNSKIY	INGRLIDQKP	ISNLGNIHAS	1050
NNIMFKLDGC	RDTHRYIWIK	YFNLFDKELN	EKEIKDLYDN	QSNNGILKDF	1100
WGDYLLQYDKP	YYMLNLYDPN	KYVDVNNVGI	RGYMYLKGP	GSVMTTNIYL	1150
NSSLYRGTKF	IHKYASGNK	DNIVRNNDRV	YINVVVKNKE	YRLATNASQA	1200
GVEKILSALE	IPDVGNLSQV	VVMKSKNDQG	ITNKCKMNLQ	DNNGNDIGFI	1250
GFHQFNNAK	LVASNWYNRQ	IERSSRTLGC	SWEFIPVDDG	WGERPL	1296

SEQ ID NO. 4: Aminosäuresequenz der leichten Kette (LC) des verkürzten 150 kDa BoNT/A

mit C-terminaler (-SK) Verkürzung

PFVKNQFNY	KDPVNGVDIA	YIKIPNAGQM	QPVKAFKIHN	KIWWIPERDT	50
FTNPEEGDLN	PPPEAKQVPV	SYDYSTYLSL	DNEKDNLYKG	VTKLFERIYS	100
TDLGRMLLTS	IVRGIPFWGG	STIDTELKVI	DTNCINVIQP	DGSYRSEELN	150
LVIIGPSADI	IQFECKSFGH	EVLNLTRNGY	GSTQYIRFSP	DFTFGFEESL	200
EVDTNPLLGA	GKFATDPAVT	LAHELIHAGH	RLYGIAINPN	RVFKVNTNAY	250
YEMSGLEVFS	EELRTFGGHD	AKFIDSLQEN	EFRLYYNKF	KDIASTLNKA	300
KSIVGTTASL	QYMKNVFKEK	YLLSEDTSGK	FSVDKLKFDK	LYKMLTEIYT	350
EDNFVKFFKV	LNRKTYLNFD	KAVFKINIVP	KVNYTIYDGF	NLRNTNLAAN	400
FNGQNTTEINN	MNFTKLKNFT	GLFEFYKLLC	VRGIIT		

[0049] In einer Ausführungsform liegt das hierin beschriebene BoNT/A in Form eines 900 kDa BoNT/A-Komplexes vor. In einer Ausführungsform liegt das hierin beschriebene BoNT/A als 900 kDa BoNT/A-Komplex vor, der durch das 150 kDa BoNT/A-Molekül und die Proteine Hämagglutinin HA70, Hämagglutinin HA34, Hämagglutinin HA17 und nicht-toxisches Nicht-Hämagglutinin (NTNH) gebildet wird. In einer spezifischen Ausführungsform wird das hierin beschriebene BoNT/A (z. B., der 900 kDa BoNT/A-Komplex) in einem Clostridium botulinum Typ A Stamm produziert. In einer spezifischen Ausführungsform wird das hierin beschriebene BoNT/A (z. B., der 900 kDa BoNT/A-Komplex) in einem Clostridium botulinum Typ A Hall-Stamm produziert. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das hierin beschriebene BoNT/A OnabotulinumtoxinA.

[0050] In einer Ausführungsform umfasst das hierin beschriebene BoNT/A-Molekül in voller Länge 150 kDa eine leichte Kette mit einer in SEQ ID NO. 2 dargelegten Aminosäuresequenz und eine schwere Kette mit einer in SEQ ID NO. 3 dargelegten Aminosäuresequenz, wobei die Disulfidbrücken zwischen den Positionen 429 und 453 und zwischen den Positionen 1234 und 1279 positioniert sind.

[0051] In einer anderen Ausführungsform umfasst das hierin beschriebene verkürzte 150 kDa BoNT/A-Molekül eine leichte Kette mit einer in SEQ ID NO. 4 dargelegten Aminosäuresequenz und eine schwere Kette mit einer in SEQ ID NO. 3 dargelegten Aminosäuresequenz, wobei sich Disulfidbrücken zwischen den Positionen 429 und 453 und zwischen den Positionen 1234 und 1279 befinden.

5.3. BoNT/A Zusammensetzungen

[0052] In einem Aspekt wird hierin eine Zusammensetzung bereitgestellt, die einen 900 kDa BoNT/A-Komplex umfasst, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex ein 150 kDa BoNT/A umfasst, das in Form einer Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies vorliegt, wobei die Vielzahl von Sequenzvarianten eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvariante mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette (verkürztes 150 kDa BoNT/A) und eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvariante mit einer leichten Kette in voller Länge (BoNT/A in voller Länge 150 kDa) umfasst, wobei die C-terminale verkürzte leichte Kette eine Aminosäuresequenz aufweist, die in SEQ ID NO: 4 dargelegt ist, und die leichte Kette in voller Länge eine Aminosäuresequenz aufweist, die in SEQ ID NO: 2 dargelegt ist, und wobei das Verhältnis der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A zur Häufigkeit der BoNT/A in voller Länge 150 kDa geringer ist als ein Referenzverhältnis. In einigen Ausführungsformen ist das Verhältnis der Häufigkeit des verkürzten 150 kDa BoNT/A zur Häufigkeit des BoNT/A in voller Länge 150 kDa kleiner als 3,9. In einigen Ausführungsformen ist das Verhältnis der Häufigkeit des verkürzten 150 kDa BoNT/A zur Häufigkeit

[illegible]

[0053] In einem weiteren Aspekt wird hierin eine Zusammensetzung bereitgestellt, die einen 900 kDa BoNT/A-Komplex umfasst, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex ein 150 kDa BoNT/A umfasst, das in Form einer Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies vorliegt, wobei die Vielzahl der Sequenzvarianten-Spezies eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette (verkürztes 150 kDa BoNT/A) umfasst, wobei die C-terminale verkürzte leichte Kette eine in SEQ ID NO: 4 dargelegte Aminosäuresequenz aufweist, und wobei der prozentuale Anteil der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl von 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies geringer ist als ein Referenzanteil. In einigen Ausführungsformen ist der prozentuale Anteil der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl von 150 kDa BoNT/A Sequenzvarianten-Spezies geringer als 79,5 %. In einigen Ausführungsformen beträgt der prozentuale Anteil der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit

[illegible]

[0054] BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl der 150 kDa BoNT/A Sequenzvarianten-Spezies geringer als 45 %. In einigen Ausführungsformen ist der prozentuale Anteil der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl der 150 kDa BoNT/A Sequenzvarianten-Spezies geringer als 44 %. In einigen Ausführungsformen ist der prozentuale Anteil der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl der 150 kDa BoNT/A Sequenzvarianten-Spezies geringer als 43 %. In einigen Ausführungsformen ist der prozentuale Anteil der Häufigkeit der

[illegible]

Häufigkeit der Vielzahl der 150 kDa BoNT/A Sequenzvarianten-Spezies geringer als 5 %. In einigen Ausführungsformen ist der prozentuale Anteil der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl der 150 kDa BoNT/A Sequenzvarianten-Spezies geringer als 4 %. In einigen Ausführungsformen ist der prozentuale Anteil der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl der 150 kDa BoNT/A Sequenzvarianten-Spezies geringer als 3 %. In einigen Ausführungsformen ist der prozentuale Anteil der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl der 150 kDa BoNT/A Sequenzvarianten-Spezies geringer als 2 %. In einigen Ausführungsformen ist der prozentuale Anteil der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl der 150 kDa BoNT/A Sequenzvarianten-Spezies geringer als 1 %. In einigen spezifischen Ausführungsformen umfasst die Vielzahl von 150 kDa BoNT/A Sequenzvarianten-Spezies ferner eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer leichten Kette in voller Länge (volle Länge 150 kDa BoNT/A), wobei die leichte Kette in voller Länge eine Aminosäuresequenz aufweist, die in SEQ ID NO: 2 dargelegt ist. In einigen spezifischen Ausführungsformen besteht das 150 kDa BoNT/A in der hierin bereitgestellten Zusammensetzung aus zwei Formen - einem verkürzten 150 kDa BoNT/A und dem anderen in voller Länge 150 kDa BoNT/A.

[0055] Das Verhältnis der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A zur Häufigkeit der 150 kDa BoNT/A in voller Länge oder der prozentuale Anteil der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl von 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies kann nach allen im Fachgebiet bekannten Technologien sowie den hierin speziell beschriebenen bestimmt werden, beispielsweise im Abschnitt Beispiele unten.

[0056] In einigen Ausführungsformen wird das Verhältnis der Häufigkeit des verkürzten 150 kDa BoNT/A zur Häufigkeit des BoNT/A in voller Länge 150 kDa oder der prozentuale Anteil der Häufigkeit des verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl der 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies durch Anionenaustauschchromatographie (AEX) bestimmt (z. B., Anionenaustausch-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (AEX-HPLC)). In einer Ausführungsform entspricht das verkürzte 150 kDa BoNT/A der Spitze, die später eluiert als (z. B., unmittelbar nach) der Spitze für die volle Länge 150 kDa BoNT/A in einem AEX-HPLC-Chromatographen. In einer Ausführungsform entspricht das abgeschnittene 150 kDa BoNT/A der zweiten 150 kDa BoNT/A-Spitze, die in einem AEX-HPLC-Chromatographen eluiert wird. Das hierin beschriebene AEX-HPLC-Chromatogramm kann unter Verwendung einer ersten mobilen Phase von 40 mM Tris-HCl (pH 8,0) und einer zweiten mobilen Phase von 1,0 M NaCl und 40 mM Tris-HCl (pH 8,0) erzeugt werden, wobei das AEX-HPLC-Chromatogramm unter Verwendung der Erfassung bei 220 nm erzeugt wird. In einer Ausführungsform wird das AEX-HPLC-Chromatogramm unter Verwendung der in Tabelle 4 angegebenen Zustände erzeugt. In einer Ausführungsform entspricht das verkürzte 150 kDa BoNT/A der 150 kDa-verkürzten Spitze, wie in FIG. 1 dargestellt. In einigen spezifischen Ausführungsformen, das Verhältnis der Abundanz des verkürzten 150 kDa BoNT/A zur Abundanz des BoNT/A mit voller Länge 150 kDa BoNT/A oder des prozentualen Anteils der Abundanz des verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Abundanz der Vielzahl von 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten wird bestimmt unter Verwendung des AEX-HPLC-Verfahrens, wie in Beispiel 1 unten veranschaulicht.

[0057] Es versteht sich, dass sich eine Spitze auf einem Chromatogramm nicht nur auf eine bezieht, die einen und nur einen hohen Punkt aufweist; d. h. den Scheitelpunkt), sondern sich auch auf eine bezieht, die einen Scheitelpunkt (was der höchste Punkt der Spitze ist) und einen oder mehrere lokale Hochpunkte aufweist.

[0058] Die chromatographische Spitzendetektion und -integration kann von einem Durchschnittsfachmann durchgeführt werden. In bestimmten Ausführungsformen wird die Spitzendetektion manuell durchgeführt. In bestimmten Ausführungsformen wird die Spitzenintegration manuell durchgeführt. In bestimmten Ausführungsformen wird die Spitzendetektion unter Verwendung eines Algorithmus durchgeführt. In bestimmten Ausführungsformen wird die Spitzenintegration unter Verwendung eines Algorithmus durchgeführt. In spezifischen Ausführungsformen berücksichtigt ein Algorithmus, der für die Spitzendetektion und/oder -integration verwendet werden kann, Faktoren wie Spitzenbreite, Schwellenwert, Spitzenhöhe und/oder Krümmung des Chromatogramms usw. In einer spezifischen Ausführungsform verwendet ein Algorithmus, der zur Spitzendetektion und/oder -integration verwendet werden kann, asymmetrische Cauchy-Kurven. In einer spezifischen Ausführungsform ist ein Algorithmus, der für die Spitzendetektion und/oder -integration verwendet werden kann, ein Algorithmus, der in eine Chromatographiesoftware eingebaut ist (z. B. in die Empower®-Software). In einer spezifischen Ausführungsform ist ein Algorithmus, der für die Spitzendetektion und/oder -integration verwendet werden kann, ApexTrack™.

[0059] In anderen Ausführungsformen wird das Verhältnis der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A zur Häufigkeit der 150 kDa BoNT/A in voller Länge oder der prozentuale Anteil der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A an der Häufigkeit der Vielzahl von 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) bestimmt. In einigen spezifischen Ausführungsformen wird das Verhältnis der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A zur Häufigkeit der 150 kDa BoNT/A in voller Länge oder der Prozentsatz der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa BoNT/A in der Häufigkeit der Vielzahl von 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten bestimmt unter Verwendung des in Beispiel 1 unten beschriebenen LC-MS-Verfahrens. In einer bestimmten Ausführungsform wird die LC-MS unter den in Tabelle 5 angegebenen Zuständen durchgeführt.

[0060] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex von einem Typ A Stamm von Clostridium botulinum (z. B., dem Typ A Hall-Stamm von Clostridium botulinum) produziert. In bestimmten Ausführungsformen ist der 900 kDa BoNT/A-Komplex Onabotulinumtoxin A.

[0061] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung lebewesenproduktfrei. In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen enthält die hierin beschriebene Zusammensetzung keinen Proteaseinhibitor. In bestimmten Ausführungsformen enthält die hierin beschriebene Zusammensetzung kein Benzamidinhydrochlorid. In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex von Clostridium botulinum Bakterien produziert, die aus einer von Lebewesen freien Arbeitszellbank kultiviert und erweitert wurden. Die von Tierprodukten freie Arbeitszellbank kann beispielsweise und ohne Einschränkung wie in Beispiel 6 beschrieben produziert werden.

[0062] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen umfasst die hierin beschriebene Zusammensetzung ferner menschliches Serumalbumin (HSA). In bestimmten Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung etwa 0,5 mg HSA pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes. In bestimmten Ausführungsformen ist das HSA rekombinantes HSA. In bestimmten Ausführungsformen ist das rekombinante HSA lebewesenproduktfrei. In bestimmten Ausführungsformen wird das rekombinante HSA nicht von einem Lebewesen hergestellt. In bestimmten Ausführungsformen wird das rekombinante HSA aus einem Mikroorganismus, wie beispielsweise Bakterien, hergestellt. In bestimmten Ausführungsformen wird das rekombinante HSA aus einem auf Pflanzen basierenden Expressionssystem hergestellt. In bestimmten Ausführungsformen ist das HSA aus menschlichem Plasma gewonnen.

[0063] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen umfasst die hierin beschriebene Zusammensetzung ferner Natriumchlorid. In bestimmten Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung etwa 0,9 mg Natriumchlorid pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes.

[0064] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen umfasst die hierin beschriebene Zusammensetzung etwa 50 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes. In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen umfasst die hierin beschriebene Zusammensetzung etwa 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes. In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen umfasst die hierin beschriebene Zusammensetzung etwa 200 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes.

[0065] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung eine flüssige Zusammensetzung. In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung eine feste Zusammensetzung. In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung eine vakuumgetrocknete Zusammensetzung. In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung eine gefriergetrocknete Zusammensetzung. In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung eine pharmazeutische Zusammensetzung in Pulverform. In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung ein Medikament. In einer bestimmten Ausführungsform ist die hierin beschriebene Zusammensetzung ein Medikament und umfasst ferner HSA (z. B., etwa 0,5 mg HSA pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A Komplexes) und Natriumchlorid (z. B., etwa 0,9 mg Natriumchlorid pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A Komplexes). In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung ein Medikamentenwirkstoff. In einer bestimmten Ausführungsform ist die hierin beschriebene Zusammensetzung ein Medikamentenwirkstoff in einer für die Lagerung geeigneten Lösung.

[0066] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex wie in Abschnitt 5.4 beschrieben produziert.

[0067] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex wie in Beispiel 1 beschrieben produziert.

[0068] In einer Ausführungsform bezieht sich die vorliegende Offenbarung auf ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten (vorzugsweise eines menschlichen Patienten), der dies benötigt, umfassend die Verabreichung einer hierin beschriebenen Zusammensetzung.

5.4. Herstellung von BoNT/A und Herstellung von BoNT/A-Zusammensetzungen

[0069] Botulinum-Toxin Typ A wurde von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung von essentiellen Blepharospasmus, Strabismus und hemifazialen Spasmus bei Patienten über zwölf Jahren, zervikaler Dystonie, Glabellafalten (Gesichtsfalten) und zur Behandlung von Hyperhidrose zugelassen. Eine im Handel erhältliche Botulinum-Toxin Typ A enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung wird unter der Marke BOTOX® (OnabotulinumtoxinA) verkauft und ist im Handel bei Allergan, einem Unternehmen der AbbVie-Gruppe, North Chicago, Illinois, USA, erhältlich. BOTOX® enthält einen gereinigten 900 kDa Botulinum Toxin Typ A Komplex, menschliches Serumalbumin und Natriumchlorid, verpackt in steriler, vakuumgetrockneter Form. Der Botulinum-Toxin Typ A-Komplex in BOTOX® wird aus einer Kultur des Hall-Stamms von Clostridium botulinum hergestellt, die in einem Medium wächst, das N-Z-Amin-Kasein und Hefeextrakt enthält (d. h. Nicht-APF-Prozess) und aus der Kulturlösung durch eine Reihe von Fällungsschritten (einschließlich Säurefällung) zu einem kristallinen Komplex gereinigt, der aus dem aktiven Toxinprotein mit hohem Molekulargewicht und einem zugeordneten Hämagglutininprotein besteht. Der kristalline Komplex wird in einer Lösung mit Kochsalzlösung und Albumin wieder aufgelöst und vor der Vakuumtrocknung mit einem gammabestrahlten Filter (0,2 Mikron) steril gefiltert. BOTOX® kann vor der intramuskulären Injektion mit steriler, nicht konservierter Kochsalzlösung rekonstituiert werden. Jede Durchstechflasche mit 100 Einheiten BOTOX® besteht aus etwa 5 ng gereinigtem Botulinum Toxin Typ A

Komplex, 0,5 mg menschlichem Serumalbumin und 0,9 mg Natriumchlorid, vakuumgetrockneter Form und bestimmt zur Rekonstitution mit steriler normaler Kochsalzlösung ohne Konservierungsmittel (0,9 % Natriumchlorid-Injektion).

[0070] Um die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen für die Verabreichung an einen Menschen oder ein Lebewesen zu therapeutischen, diagnostischen, Forschungs- oder kosmetischen Zwecken geeignet zu machen, sind eine Anzahl von Schritten erforderlich. In einer Ausführungsform können diese Schritte das Ermitteln eines gereinigten Clostridium botulinum Neurotoxins des Serotyps A (BoNT/A) und das anschließende Verbinden des gereinigten BoNT/A einschließen. Ein erster Schritt kann darin bestehen, eine Clostridien-Bakterie (z. B. den Hall-Stamm von Clostridium botulinum) zu kultivieren, üblicherweise auf Agarplatten in einer für das Bakterienwachstum förderlichen Umgebung, wie zum Beispiel in einer warmen anaeroben Atmosphäre. Der Kulturschritt unter Verwendung von Agarplatten ermöglicht die Ermittlung von Clostridien-Kolonien mit der gewünschten Morphologie und anderen Eigenschaften. Der Kulturschritt kann auch mit Bakterien aus einem Lebewesen mit freien Arbeitszellen durchgeführt werden (siehe, z. B., Beispiel 6). In einem zweiten Schritt können ausgewählte kultivierte Clostridien-Kolonien in einem geeigneten Medium fermentiert werden. Nach einer gewissen Zeit der Fermentation lysieren die Clostridien üblicherweise und geben Clostridien-Toxin (z. B. BoNT/A) in das Medium ab. Drittens kann das Toxin aus dem Kulturmedium gereinigt werden, um ein Bulk- oder Roh-BoNT/A-Toxin Medikamentenwirkstoff zu ermitteln. Vorzugsweise wird der BoNT/A-Toxin Medikamentenwirkstoff während der Reinigung keinen Niederschlägen (z. B. Niederschlag mit kaltem Ethanol, Salzsäure und/oder Ammoniumsulfat) z. B. ausgesetzt gewesen sein. Ebenfalls bevorzugt ist ein BoNT/A-Toxin Medikamentenwirkstoff, der durch Säulenchromatographie gereinigt wurde, insbesondere ein BoNT/A-Toxin Medikamentenwirkstoff, der durch Reinigung unter Verwendung einer hydrophoben Interaktionschromatographiesäule (HIC-Säule) hergestellt wurde. Wenn mehrere Chromatographiesäulen zur Reinigung des BoNT/A verwendet werden, ist es vorzuziehen, dass das Toxin in einem Prozess gereinigt wird, wobei eine HIC-Säule vor allen anderen Chromatographiesäulen verwendet wird. Der BoNT/A-Medikamentenwirkstoff sollte vorzugsweise in einem Prozess hergestellt werden, der gemäß den von der US-amerikanischen Food and Drug Administration erlassenen Vorschriften für die gute Herstellungspraxis verwendet werden kann.

[0071] In einigen Ausführungsformen werden die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen unter Verwendung eines im Wesentlichen, hauptsächlich oder vollständigen lebewesenproteinfreien Prozesses (APF-Prozess) ermittelt. Der Prozess kann die folgenden aufeinanderfolgenden Schritte umfassen: Kultivieren von Clostridium botulinum-Bakterien (z. B. dem Hall-Stamm von Clostridium botulinum) in einem im Wesentlichen APF-Kulturmedium; Fermentieren von Clostridium botulinum-Bakterien aus dem Kulturmedium in einem im Wesentlichen APF-Fermentationsmedium, Ernten des Fermentationsmediums durch Entfernen von Zelltrümmern, die in dem Fermentationsmedium vorhanden sind, durch Filtration oder Zentrifugation; Konzentrieren des geernteten Fermentationsmediums durch Filtration, wie beispielsweise durch Ultrafiltration (UF); Verdünnen des konzentrierten Fermentationsmediums durch Hinzufügen eines Puffers. Nach Verdünnung mit dem Puffer kann ein im Wesentlichen APF-chromatographischer Prozess durchgeführt werden, um einen biologisch aktiven, hoch gereinigten BoNT/A-Komplex zu ermitteln. In einigen Ausführungsformen beinhaltet der hierin beschriebene APF-Prozess nicht die Verwendung eines Proteaseinhibitors. In einigen Ausführungsformen beinhaltet der hierin beschriebene APF-Prozess nicht die Verwendung von Benzamidinhydrochlorid.

[0072] Das im Wesentlichen APF-Kultur- und/oder Fermentationsmedium kann ein aus Hefe (z. B. Hefeextrakt oder Hefeextraktkonzentrat) oder aus einer Pflanze (z. B. Weizen, Soja, Malz, Lupinus, Mais, Baumwollsaat, L. campestris Saat usw.) ermitteltes Proteinprodukt enthalten. Die APF-Kultur und/oder das Fermentationsmedium kann ferner eine Kohlenstoffquelle (z. B. Glukose) und/oder eine Salzquelle (z. B. Natriumchlorid) umfassen. In einer Ausführungsform ist das zur Fermentation von Clostridium botulinum verwendete Medium frei von tierischen Nebenprodukten und umfasst etwa 10-100 g/l (z. B., 20-60 g/l) hydrolysiertes Soja (Hy-Soy), etwa 7,5 g/l Glukose und 5,0 g/l NaCl, wie in US-Pat. Nr. 7,354,740 offenbart, auf das hierin in vollem Umfang Bezug genommen wird. In einer Ausführungsform kann das Fermentationsmedium 3 % w/v oder 5 % w/v HySoy; 1 % w/v HyYeast; und 1 % w/v Glukose umfassen, wie in US-Pat. Nr. 8,129,139 offenbart, auf das hierin in vollem Umfang Bezug genommen wird. In einer Ausführungsform kann das APF-Fermentationsmedium 3,25 % w/v Sojapepton Typ II, 1,2 % w/v Hefeextrakt, 1,5 % w/v Glukose, pH-Wert eingestellt auf 7,3 unter Verwendung von Natriumhydroxid, umfassen, wie in Beispiel 1 unten veranschaulicht.

[0073] In einigen Ausführungsformen werden die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen unter einem Kälteschock-Zustand (d. h.) bei einer Temperatur, die niedriger ist als die typische Fermentationstemperatur (d. h., bei etwa 35 ±1 °C), für eine kurze Zeit während des Prozesses ermittelt. In einigen Ausführungsformen werden die BoNT/A-Zusammensetzungen unter Kälteschockbedingungen bei etwa 33 °C, 30 °C, 27 °C, 25 °C, 22 °C, 20 °C, 19 °C, 18 °C, 17 °C, 16 °C, oder 15 °C erhalten. Der Zustand des Kälteschocks kann für eine beliebige Zeitspanne innerhalb des gesamten Fermentationsprozesses andauern, beispielsweise für etwa 2 Stunden, 5 Stunden, 8 Stunden oder 10 Stunden innerhalb eines 72-stündigen Fermentationsprozesses. Die Kälteschockbedingungen können einmal oder mehrmals während des Prozesses auftreten. In einigen Ausführungsformen werden die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen unter Verwendung von etwa 15 °C-20 °C (z. B., etwa 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, oder 20 °C) Kälteschock für etwa 5 Stunden (z. B., von der 13^{ten} bis 17^{ten} Stunde in einem 72-stündigen Prozess) während der Fermentation erhalten.

[0074] In einigen Ausführungsformen werden die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen unter einem kontinuierlichen kalten Zustand ermittelt, d. h., bei einer Temperatur, die während des gesamten Prozesses der Fermentation kontinuierlich niedriger ist (z. B., etwa 25 °C) als die typische Fermentationstemperatur (d. h., bei etwa 35 ±1 °C). In einigen Ausführungsformen werden die BoNT/A-Zusammensetzungen unter einem kontinuierlichen kalten Zustand bei etwa

33 °C, 30 °C, 27 °C, 25 °C, 22 °C, 20 °C, 19 °C, 18 °C, 17 °C, 16 °C oder 15 °C erhalten. In einigen Ausführungsformen werden die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen durch Fermentation einer Kultur von Clostridium botulinum bei etwa 25 °C für etwa 160 Stunden ermittelt.

[0075] In einem Aspekt wird hierin ein Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung bereitgestellt, die einen 900 kDa BoNT/A-Komplex (wie OnabotulinumtoxinA) umfasst, wobei das Verfahren das Inkubieren einer Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien (z. B., Clostridium botulinum Typ A Hall-Stamm-Bakterien) in einem Produktionsfermenter bei einer Temperatur, die unter 35 °C über einen bestimmten Zeitraum, umfasst.

[0076] In bestimmten Ausführungsformen beträgt der gesamte Zeitraum der Fermentation etwa 60 Stunden bis etwa 200 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt der gesamte Zeitraum der Fermentation etwa 60 Stunden bis etwa 160 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentation etwa 60 Stunden bis etwa 120 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt der gesamte Zeitraum der Fermentation etwa 60 Stunden bis etwa 80 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentation etwa 68 Stunden bis etwa 76 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentation etwa 65 Stunden bis etwa 72 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Dauer der Fermentation etwa 72 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentation etwa 120 Stunden bis etwa 200 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt der gesamte Zeitraum der Fermentation etwa 120 Stunden bis etwa 180 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt der gesamte Zeitraum der Fermentation etwa 140 Stunden bis etwa 180 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Dauer der Fermentation etwa 160 Stunden.

[0077] In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Zeitspanne (für die Inkubation bei niedriger Temperatur) etwa 2 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Zeitdauer etwa 5 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Zeitdauer etwa 8 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Zeitdauer etwa 10 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Zeitdauer etwa 2-5 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Zeitdauer etwa 5-8 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Zeitdauer etwa 8-10 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen ist die Zeitdauer die gesamte Fermentationsdauer.

[0078] In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Temperatur etwa 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 oder 15 °C. In bestimmten Ausführungsformen liegt die Temperatur bei etwa 15 °C-20 °C (z. B., etwa 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C oder 20 °C). In bestimmten Ausführungsformen liegt die Temperatur bei etwa 15 °C. In bestimmten Ausführungsformen liegt die Temperatur bei etwa 20 °C. In bestimmten Ausführungsformen liegt die Temperatur bei etwa 25 °C.

[0079] In bestimmten Ausführungsformen umfasst das Verfahren in der folgenden Reihenfolge: (a) Inkubieren der Kultur von Clostridium botulinum Bakterien in dem Produktionsfermenter bei 35 °C für etwa 12 Stunden; (b) Einstellen der Temperatur auf etwa 15 °C -20 °C (z. B., ca. 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, oder 20 °C) am Ende von Schritt (a); (c) Kultivieren bei der eingestellten Temperatur bis etwa 5 Stunden nach Schritt (a); (d) Einstellen der Temperatur auf 35 °C am Ende von Schritt (c); und (e) Züchten bei 35 °C bis etwa 55 Stunden nach Schritt (c).

[0080] In bestimmten Ausführungsformen umfasst das Verfahren das Inkubieren der Kultur von Clostridium botulinum Bakterien im Produktionsfermenter bei 25 °C für etwa 160 Stunden.

[0081] In bestimmten Ausführungsformen wird das Verfahren wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

[0082] In einigen Ausführungsformen werden die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen in Gegenwart von CO₂ in der Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses ermittelt, z. B., in Gegenwart von CO₂ in einer Konzentration von etwa 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, oder 100 % in der Kopfraumüberlagerung oder etwa 1 %-10 %, 10 %-20 %, 20 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 % oder 90 %-100 % in der Kopfraumüberlagerung. Die Kopfraumüberlagerung kann auch N₂ einschließen. Beispielsweise können die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen in Gegenwart von beispielsweise, ohne Einschränkung, etwa 1 % CO₂ mit 99 % N₂, 2 % CO₂ mit 98 % N₂, 5 % CO₂ mit 95 % N₂, 10 % CO₂ mit 90 % N₂, 15 % CO₂ mit 85 % N₂, 20 % CO₂ mit 80 % N₂, 25 % CO₂ mit 75 % N₂, 30 % CO₂ mit 70 % N₂, 35 % CO₂ mit 65 % N₂, 40 % CO₂ mit 60 % N₂, 45 % CO₂ mit 55 % N₂, 55 % CO₂ mit 45 % N₂, 60 % CO₂ mit 40 % N₂, 65 % CO₂ mit 35 % N₂, 70 % CO₂ mit 30 % N₂, 75 % CO₂ mit 25 % N₂, 80 % CO₂ mit 20 % N₂, 85 % CO₂ mit 15 % N₂, 90 % CO₂ mit 10 % N₂, 95 % CO₂ mit 5 % N₂ ermittelt werden oder 100 % CO₂ in der Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses oder etwa 1 %-10 %, 10 %-20 %, 20 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 % oder 90 %-99 % CO₂ in der Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses, wobei der Rest der Kopfraumüberlagerung N₂ ist.

[0083] In einem Aspekt wird hierin ein Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung bereitgestellt, die einen 900 kDa BoNT/A-Komplex (wie OnabotulinumtoxinA) umfasst, wobei das Verfahren die Inkubation einer Kultur von Clostridium botulinum Bakterien (z. B., Clostridium botulinum Typ A Hall-Stamm-Bakterien) in einem Produktionsfermenter in Gegenwart von CO₂ (und wahlweise N₂) in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses umfasst. In bestimmten Ausführungsformen umfasst die Fermenter-Kopfraumüberlagerung etwa 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % oder 100 % CO₂. In bestimmten Ausführungsformen umfasst die Fermenter-Kopfraumüberlagerung etwa 1 %-10 %, 10 %-20 %, 20 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 % oder 90 %-100 % CO₂.

30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 % oder 90 %-100 % CO₂. In bestimmten Ausführungsformen umfasst die Fermenter-Kopfraumüberlagerung etwa 1 % CO₂ und 99 % N₂, 2 % CO₂ und 98 % N₂, 5 % CO₂ und 95 % N₂, 10 % CO₂ und 90 % N₂, 15 % CO₂ und 85 % N₂, 20 % CO₂ und 80 % N₂, 25 % CO₂ und 75 % N₂, 30 % CO₂ und 70 % N₂, 35 % CO₂ und 65 % N₂, 40 % CO₂ und 60 % N₂, 45 % CO₂ und 55 % N₂, 55 % CO₂ und 45 % N₂, 60 % CO₂ und 40 % N₂, 65 % CO₂ und 35 % N₂, 70 % CO₂ und 30 % N₂, 75 % CO₂ und 25 % N₂, 80 % CO₂ und 20 % N₂, 85 % CO₂ und 15 % N₂, 90 % CO₂ und 10 % N₂, 95 % CO₂ und 5 % N₂, oder 100 % CO₂. In bestimmten Ausführungsformen umfasst die Fermenter-Kopfraumüberlagerung etwa 1 %-10 %, 10 %-20 %, 20 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 % oder 90 %-99 % CO₂, wobei der Rest der Kopfüberlagerung N₂ ist.

[0084] In bestimmten Ausführungsformen umfasst das Verfahren die Inkubation der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien (z. B., Clostridium botulinum Typ A Hall-Stamm-Bakterien) im Produktionsfermenter in Gegenwart von 25 % CO₂ (und optional 75 % N₂) in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Prozesses. In bestimmten Ausführungsformen umfasst das Verfahren die Inkubation der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien (z. B., Clostridium botulinum Typ A Hall-Stamm-Bakterien) im Produktionsfermenter in Gegenwart von 25 % CO₂ und 75 % N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses.

[0085] In bestimmten Ausführungsformen umfasst das Verfahren die Inkubation der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien (z. B., Clostridium botulinum Typ A Hall-Stamm-Bakterien) im Produktionsfermenter in Gegenwart von 50 % CO₂ (und optional 50 % N₂) in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Prozesses. In bestimmten Ausführungsformen umfasst das Verfahren die Inkubation der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien (z. B., Clostridium botulinum Typ A Hall-Stamm-Bakterien) im Produktionsfermenter in Gegenwart von 50 % CO₂ und 50 % N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses.

[0086] In bestimmten Ausführungsformen umfasst das Verfahren die Inkubation der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien (z. B., Clostridium botulinum Typ A Hall-Stamm-Bakterien) im Produktionsfermenter in Gegenwart von 75 % CO₂ (und optional 25 % N₂) in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Prozesses. In bestimmten Ausführungsformen umfasst das Verfahren die Inkubation der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien (z. B., Clostridium botulinum Typ A Hall-Stamm-Bakterien) im Produktionsfermenter in Gegenwart von 75 % CO₂ und 25 % N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses.

[0087] In bestimmten Ausführungsformen umfasst das Verfahren die Inkubation der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien (z. B., Clostridium botulinum Typ A Hall-Stamm-Bakterien) im Produktionsfermenter in Gegenwart von 100 % CO₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Prozesses.

[0088] In bestimmten Ausführungsformen wird das Verfahren wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

[0089] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird die Fermentation in lebewesenproteinfreien Zellkulturmedien ausgeführt.

[0090] Ein lebewesenproduktfreies oder im Wesentlichen lebewesenproduktfreies chromatographisches System und Prozess kann verwendet werden, um eine geklärte Kultur von Clostridium botulinum zu reinigen, die aus den hierin beschriebenen APF-Fermentationsprozessen ermittelt wurde. Das chromatographische System und der Prozess können eine Säule, zwei Säulen oder drei Säulen einschließen. Das chromatographische System und der Prozess können zum Beispiel einen, zwei oder drei Schritte umfassen: eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) und/oder eine Anionenaustauschchromatographie (AEX) und/oder eine Kationenaustauschchromatographie. In einigen Ausführungsformen umfasst der chromatographische Prozess einen ersten Schritt, bei dem die aus dem APF-Prozess ermittelte BoNT/A-Kultur einem HIC unterworfen wird, gefolgt von der Unterwerfung eines BoNT/A-haltigen Eluenten aus dem HIC einem AEX, und dann gefolgt von der Unterwerfung der BoNT/A-haltigen aufgefangenen Lösung aus dem AEX einem CEX. In einigen Ausführungsformen umfasst der auf Chromatographie basierende Reinigungsprozess ferner die Verarbeitung des Eluenten aus den Säulen durch Diafiltration (DF) und die Filterung des verarbeiteten Eluenten. In einigen Ausführungsformen ist der auf Chromatographie basierende Reinigungsprozess wie in US-Pat. Nr. 8,129,139 offenbart, auf das hierin in vollem Umfang Bezug genommen wird.

[0091] Der BoNT/A-Komplex, der aus den hierin beschriebenen Prozessen der APF-Fermentation und -Reinigung ermittelt wird, ist biologisch aktiv und hoch gereinigt. In einer Ausführungsform umfassen die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen weniger als 3 % (z. B., weniger als etwa 2,5 %, weniger als etwa 2,0 %, weniger als etwa 1,8 %, weniger als etwa 1,5 %, weniger als etwa 1,2 %, weniger als etwa 1,0 %, weniger als etwa 0,8 %, weniger als etwa 0,6 %, weniger als etwa 0,5 %, weniger als etwa 0,4 %, weniger als etwa 0,3 %, weniger als etwa 0,2 % oder weniger als etwa 0,1 %) an Wirtszellprotein. Der Gehalt des Wirtszellproteins kann mit im Fachgebiet bekannten Verfahren bestimmt werden, z. B. unter Verwendung von Größenausschluss-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (SEC-HPLC) oder SEC-HPLC in Verbindung mit Multi-Angle Laser Light Scattering (MALLS), wie in Lietzow et al. (2008) Protein J 27:420-425 offenbart, auf das hierin vollständig Bezug genommen wird. In einer Ausführungsform wird der Prozentsatz des Wirtszellproteins in den hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen unter Verwendung von SEC-HPLC bestimmt.

[0092] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex von einem Typ A Stamm von Clostridium botulinum (z. B., dem Typ A Hall-Stamm von Clostridium botulinum) produziert. In bestimmten Ausführungsformen ist der 900 kDa BoNT/A-Komplex Onabotulinumtoxin A.

[0093] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex wie in Beispiel 5, Beispiel 6 oder Beispiel 7 beschrieben produziert.

[0094] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex in einem oder mehreren Schritten produziert, wie in Beispiel 5, Beispiel 6 oder Beispiel 7 beschrieben.

[0095] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der einen oder mehrere Schritte der Säulenchromatographie umfasst, die während der Aufreinigung des 900 kDa BoNT/A-Komplexes durchgeführt werden.

[0096] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie, die während der Reinigung des 900 kDa BoNT/A-Komplexes durchgeführt werden, die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie und Anionenaustauschchromatographie. In bestimmten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie die Kationenaustauschchromatographie.

[0097] In bestimmten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie, die während der Reinigung des 900 kDa BoNT/A-Komplexes durchgeführt werden, hydrophobe Wechselwirkungschromatographie und Anionenaustauschchromatographie. In einer bestimmten Ausführungsform umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie in der folgenden Reihenfolge die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie und die Anionenaustauschchromatographie. In einer bestimmten Ausführungsform umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie in der folgenden Reihenfolge die Anionenaustauschchromatographie und die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie.

[0098] In bestimmten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie, die während der Reinigung des 900 kDa BoNT/A-Komplexes durchgeführt werden, hydrophobe Wechselwirkungschromatographie und Kationenaustauschchromatographie. In einer bestimmten Ausführungsform umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie in der folgenden Reihenfolge die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie und die Kationenaustauschchromatographie. In einer bestimmten Ausführungsform umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie in der folgenden Reihenfolge die Kationenaustauschchromatographie und die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie.

[0099] In bestimmten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie, die während der Aufreinigung des 900 kDa BoNT/A-Komplexes durchgeführt werden, Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie. In einer bestimmten Ausführungsform umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie in der folgenden Reihenfolge die Anionenaustauschchromatographie und die Kationenaustauschchromatographie. In einer bestimmten Ausführungsform umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie, in der folgenden Reihenfolge, Kationenaustauschchromatographie und Anionenaustauschchromatographie.

[0100] In bestimmten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie, die Anionenaustauschchromatographie und die Kationenaustauschchromatographie. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie in der folgenden Reihenfolge die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie, die Anionenaustauschchromatographie und die Kationenaustauschchromatographie. In einer bestimmten Ausführungsform umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie in der folgenden Reihenfolge die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie, die Kationenaustauschchromatographie und die Anionenaustauschchromatographie. In einer bestimmten Ausführungsform umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie in der folgenden Reihenfolge Anionenaustauschchromatographie, Kationenaustauschchromatographie und hydrophobe Wechselwirkungschromatographie. In einer bestimmten Ausführungsform umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie in der folgenden Reihenfolge die Anionenaustauschchromatographie, die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie und die Kationenaustauschchromatographie. In einer bestimmten Ausführungsform umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie in der folgenden Reihenfolge die Kationenaustauschchromatographie, die Anionenaustauschchromatographie und die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie. In einer bestimmten Ausführungsform umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie in der folgenden Reihenfolge die Kationenaustauschchromatographie, die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie und die Anionenaustauschchromatographie.

[0101] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der keinen Schritt der Fällung mit kaltem Ethanol, Salzsäure oder Ammoniumsulfat umfasst. In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der keinen Schritt der Ausfällung mit kaltem Ethanol umfasst. In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der keinen Schritt der Fällung mit Salzsäure umfasst. In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der keinen Schritt der Fällung mit Ammoniumsulfat umfasst.

[0102] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der die folgenden Schritte umfasst: Unterziehen der Gärungskultur einer sauren Fällung unter Verwendung von 3M Schwefelsäure, um den pH-Wert auf 3,5 bei einer Temperatur unter 25 °C zu senken, Unterziehen des sauren Präzipitats

einer Tangentialflussfiltration (z. B., 0,1 µm Tangentialflussfiltration), um die Zellmasse zu konzentrieren, den pH-Wert auf etwa 6,0 einzustellen, Hinzufügen einer oder mehrerer Nukleasen, um den Gehalt an Wirtszellnukleinsäuren zu reduzieren, durch Zentrifugation zu klären, um Zelltrümmer zu entfernen, und bei 0,2 µm mit hinzugefügtem Ammoniumsulfat zu filtrieren.

[0103] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der einen oder mehrere der folgenden Schritte umfasst: Unterziehen der Gärungskultur einer sauren Fällung unter Verwendung von 3M Schwefelsäure, um den pH-Wert auf 3,5 bei einer Temperatur unter 25 °C zu senken, Unterziehen des sauren Niederschlags einer Tangentialflussfiltration (z. B., 0,1 µm Tangentialflussfiltration), um die Zellmasse zu konzentrieren, den pH-Wert auf etwa 6,0 einzustellen, Hinzufügen einer oder mehrerer Nukleasen, um den Gehalt an Wirtszellnukleinsäuren zu reduzieren, durch Zentrifugation zu klären, um Zelltrümmer zu entfernen, und bei 0,2 µm mit hinzugefügtem Ammoniumsulfat zu filtrieren.

[0104] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der die folgenden Schritte und in der folgenden Reihenfolge umfasst: Unterziehen der Gärungskultur einer Säurefällung unter Verwendung von 3M Schwefelsäure, um den pH-Wert auf 3,5 bei einer Temperatur unter 25 °C zu senken, Unterziehen des Säurepräzipitats einer Tangentialflussfiltration (z. B., 0,1 µm Tangentialflussfiltration), um die Zellmasse zu konzentrieren, den pH-Wert auf etwa 6,0 einzustellen, Hinzufügen einer oder mehrerer Nukleasen, um den Gehalt an Wirtszellnukleinsäuren zu reduzieren, durch Zentrifugation zu klären, um Zelltrümmer zu entfernen, und bei 0,2 µm mit hinzugefügtem Ammoniumsulfat zu filtrieren.

[0105] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der die folgenden Schritte umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einer Säurefällung unter Verwendung von 3M Schwefelsäure, um den pH-Wert auf 3,5 bei einer Temperatur unter 25 °C zu senken, Unterziehen des Säurepräzipitats einer Tangentialflussfiltration (z. B., 0,1 µm Tangentialflussfiltration), um die Zellmasse zu konzentrieren, Einstellen des pH-Werts auf etwa 6,0, Hinzufügen einer oder mehrerer Nukleasen, um den Gehalt an Wirtszellnukleinsäuren zu reduzieren, Klären durch Zentrifugieren, um Zelltrümmer zu entfernen, Filtrieren bei 0,2 µm mit zugesetztem Ammoniumsulfat und Unterziehen des Filtrats einer hydrophoben Interaktionschromatographie (optional gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie).

[0106] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der einen oder mehrere der folgenden Schritte umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einer Säurefällung unter Verwendung von 3M Schwefelsäure, um den pH-Wert auf 3,5 bei einer Temperatur unter 25 °C zu senken, Unterziehen des Säurepräzipitats einer Tangentialflussfiltration (z. B., 0,1 µm Tangentialflussfiltration), um die Zellmasse zu konzentrieren, Einstellen des pH-Werts auf etwa 6,0, Hinzufügen einer oder mehrerer Nukleasen, um den Gehalt an Wirtszellnukleinsäuren zu reduzieren, Klären durch Zentrifugieren, um Zelltrümmer zu entfernen, Filtrieren bei 0,2 µm mit zugesetztem Ammoniumsulfat und Unterziehen des Filtrats einer hydrophoben Interaktionschromatographie (gegebenenfalls gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie).

[0107] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der die folgenden Schritte und in der folgenden Reihenfolge umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einer Säurefällung unter Verwendung von 3M Schwefelsäure, um den pH-Wert auf 3,5 bei einer Temperatur unter 25 °C zu senken, Unterziehen des Säurepräzipitats einer Tangentialflussfiltration (z. B., 0,1 µm Tangentialflussfiltration), um die Zellmasse zu konzentrieren, Einstellen des pH-Werts auf etwa 6,0, Hinzufügen einer oder mehrerer Nukleasen, um den Gehalt an Wirtszellnukleinsäuren zu reduzieren, Klären durch Zentrifugieren, um Zelltrümmer zu entfernen, Filtrieren bei 0,2 µm mit zugesetztem Ammoniumsulfat und Unterziehen des Filtrats einer hydrophoben Interaktionschromatographie (gegebenenfalls gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie).

[0108] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der die folgenden Schritte umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einer Säurefällung mit 3M Schwefelsäure, um den pH-Wert auf 3,5 bei einer Temperatur unter 25 °C, Unterziehen des sauren Niederschlags einer Tangentialflussfiltration (z. B., 0,1 µm Tangentialflussfiltration), um die Zellmasse zu konzentrieren, Einstellen des pH-Werts auf etwa 6,0, Hinzufügen einer oder mehrerer Nukleasen, um den Gehalt an Wirtszellnukleinsäuren zu reduzieren, Klären durch Zentrifugation, um Zelltrümmer zu entfernen, Filtrieren bei 0,2 µm mit zugesetztem Ammoniumsulfat, Laden des Filtrats auf eine hydrophobe Interaktionssäule, Eluieren mit einem absteigenden Gradienten von Ammoniumsulfat und Isolieren des Produktpeaks (optional gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie).

[0109] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der einen oder mehrere der folgenden Schritte umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einer Säureausfällung unter Verwendung von 3M Schwefelsäure, um den pH-Wert auf 3,5 bei einer Temperatur unter 25 °C, Unterziehen des sauren Niederschlags einer Tangentialflussfiltration (z. B., 0,1 µm Tangentialflussfiltration), um die Zellmasse zu konzentrieren, Einstellen des pH-Werts auf etwa 6,0, Hinzufügen einer oder mehrerer Nukleasen, um den Gehalt an Wirtszellnukleinsäuren zu reduzieren, Klären durch Zentrifugation, um Zelltrümmer zu entfernen, Filtrieren bei 0,2 µm mit zugesetztem Ammoniumsulfat, Laden des Filtrats auf eine hydrophobe Interaktionssäule, Eluieren mit einem absteigenden Gradienten von Ammoniumsulfat und Isolieren des Produktpeaks (optional gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie).

[0110] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der die folgenden Schritte und in der folgenden Reihenfolge umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einer Säureausfällung unter Verwendung von 3M Schwefelsäure, um den pH-Wert auf 3,5 bei einer Temperatur unter 25 °C, Unterziehen des sauren Niederschlags einer Tangentialflussfiltration (z. B., 0,1 µm Tangentialflussfiltration), um die Zellmasse zu konzentrieren, Einstellen des pH-Werts auf etwa 6,0, Hinzufügen einer oder mehrerer Nukleasen, um den Gehalt an Wirtszellnukleinsäuren zu reduzieren, Klären durch Zentrifugation, um Zelltrümmer zu entfernen, Filtrieren bei 0,2 µm mit zugesetztem Ammoniumsulfat, Laden des Filtrats auf eine hydrophobe Interaktionssäule, Eluieren mit einem absteigenden Gradienten von Ammoniumsulfat und Isolieren des Produktpeaks (optional gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie).

[0111] In bestimmten Ausführungsformen wird der BoNT/A-Komplex von Clostridium botulinum-Bakterien produziert, die aus einer lebewesenproduktfreien Arbeitszellbank gezüchtet und erweitert wurden.

[0112] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, der die Verwendung eines Proteaseinhibitors nicht erfordert. In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert, bei dem kein Benzamidinhydrochlorid verwendet wird.

[0113] Nach der Stabilisierung in einer geeigneten Lösung kann der Bulk-BoNT/A-Medikamentenwirkstoff mit einem oder mehreren Hilfsstoffen (z. B. humanem Serumalbumin, wie rekombinantem humanem Serumalbumin, und Natriumchlorid) verbunden und dann steril filtriert werden, um eine pharmazeutische Zusammensetzung herzustellen, die für die Verabreichung an einen Menschen geeignet ist. Ein Beispiel für ein solches BoNT/A ist OnabotulinumtoxinA. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können durch Trocknung (z. B. Vakuumtrocknung oder Gefriertrocknung) in eine feste Form (z. B. als Pulver) gebracht werden. Feste pharmazeutische Zusammensetzungen können gelagert und vor der Injektion rekonstituiert werden. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann auch in flüssiger Form (z. B. als Lösung) vorliegen. Flüssige pharmazeutische Zusammensetzungen können gelagert und direkt zur Injektion verwendet werden. Die hierin beschriebenen pharmazeutischen BoNT/A-Zusammensetzungen können einen 900 kDa Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A (BoNT/A) Komplex als aktiven Wirkstoff umfassen. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann auch einen oder mehrere Hilfsstoffe, Puffer, Träger, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und/oder Füllstoffe einschließen. Solche pharmazeutischen Zusammensetzungen sind vorzugsweise chemisch und physikalisch stabil, sodass der BoNT/A aktive pharmazeutische Wirkstoffe nach der Lagerung weiterhin als pharmazeutisches Produkt verwendet werden kann. BoNT/A-Produkte können bei Raumtemperatur, im gekühlten Zustand oder unter 0 °C gespeichert werden. Es ist vorzuziehen, dass das BoNT/A während der Lagerung mindestens 12 Monate, stärker bevorzugt mindestens 18 Monate, stabil bleibt.

[0114] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung lebewesenproduktfrei. In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen enthält die hierin beschriebene Zusammensetzung keinen Proteaseinhibitor. In bestimmten Ausführungsformen enthält die hierin beschriebene Zusammensetzung kein Benzamidinhydrochlorid. In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird die hierin beschriebene Zusammensetzung durch einen Prozess hergestellt, bei dem kein Proteaseinhibitor verwendet wird. In bestimmten Ausführungsformen wird die hierin beschriebene Zusammensetzung durch einen Prozess hergestellt, bei dem kein Benzamidinhydrochlorid verwendet wird. In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex von Clostridium botulinum Bakterien produziert, die aus einer von Lebewesen freien Arbeitszellbank kultiviert und erweitert wurden. Die von Tierprodukten freie Arbeitszellbank kann beispielsweise und ohne Einschränkung wie in Beispiel 6 beschrieben produziert werden.

[0115] In einigen Ausführungsformen ist eine lebewesenproduktfreie Zusammensetzung frei von Menschen stammendem menschlichem Serumalbumin (HSA). In einigen Ausführungsformen ist eine lebewesenproduktfreie Zusammensetzung frei von Nukleasen tierischen Ursprungs. In einigen Ausführungsformen umfasst eine lebewesenproduktfreie Zusammensetzung rekombinant hergestelltes HSA. In einigen Ausführungsformen ist das rekombinant hergestellte HSA im Handel erhältlich oder auf dem Fachgebiet bekannt. In einigen Ausführungsformen ist eine lebewesenproduktfreie Zusammensetzung frei von Ammoniumsulfat. In einigen Ausführungsformen umfasst eine lebewesenproduktfreie Zusammensetzung ein Chromatographieharz.

[0116] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen umfasst die hierin beschriebene Zusammensetzung ferner menschliches Serumalbumin (HSA). In bestimmten Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung etwa 0,5 mg HSA pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes. In bestimmten Ausführungsformen ist das HSA rekombinantes HSA. In bestimmten Ausführungsformen ist das rekombinante HSA lebewesenproduktfrei. In bestimmten Ausführungsformen wird das rekombinante HSA nicht von einem Lebewesen hergestellt. In bestimmten Ausführungsformen wird das rekombinante HSA aus einem Mikroorganismus, wie beispielsweise Bakterien, hergestellt. In bestimmten Ausführungsformen wird das rekombinante HSA aus einem auf Pflanzen basierenden Expressionssystem hergestellt. In bestimmten Ausführungsformen ist das HSA aus menschlichem Plasma gewonnen.

[0117] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen umfasst die hierin beschriebene Zusammensetzung ferner Natriumchlorid. In bestimmten Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung etwa 0,9 mg Natriumchlorid pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes.

[0118] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen umfasst die hierin beschriebene Zusammensetzung etwa 50 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes. In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen umfasst die hierin beschriebene Zusammensetzung etwa 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes. In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen umfasst die hierin beschriebene Zusammensetzung etwa 200 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes.

[0119] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung eine flüssige Zusammensetzung. In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung eine feste Zusammensetzung. In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung eine vakuumgetrocknete Zusammensetzung. In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung eine gefriergetrocknete Zusammensetzung. In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung eine pharmazeutische Zusammensetzung in Pulverform. In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung ein Medikament. In einer bestimmten Ausführungsform ist die hierin beschriebene Zusammensetzung ein Medikament und umfasst ferner HSA (z. B., etwa 0,5 mg HSA pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A Komplexes) und Natriumchlorid (z. B., etwa 0,9 mg Natriumchlorid pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A Komplexes). In bestimmten Ausführungsformen ist die hierin beschriebene Zusammensetzung ein Medikamentenwirkstoff. In einer bestimmten Ausführungsform ist die hierin beschriebene Zusammensetzung ein Medikamentenwirkstoff in einer für die Lagerung geeigneten Lösung.

[0120] In einem Aspekt wird hierin eine BoNT/A-Zusammensetzung bereitgestellt, die durch ein in diesem Abschnitt 5.4 beschriebenes Verfahren oder Prozess produziert wird.

5.5. Charakterisierung von BoNT/A-Zusammensetzungen

[0121] In einer Ausführungsform weisen die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen eine Potenz von mindestens etwa $1,5 \times 10^7$ Einheiten/mg, mindestens etwa $2,0 \times 10^7$ Einheiten/mg, z. B., etwa $1,5 \times 10^7$ bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,0 \times 10^7$ bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,4 \times 10^7$ bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,4 \times 10^7$ bis etwa $5,9 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,4 \times 10^7$ bis etwa $5,8 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,4 \times 10^7$ bis etwa $5,7 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,4 \times 10^7$ bis etwa $5,6 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,4 \times 10^7$ bis etwa $5,5 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,4 \times 10^7$ bis etwa $5,4 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,5 \times 10^7$ bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,6 \times 10^7$ bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,7 \times 10^7$ bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,8 \times 10^7$ bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $2,9 \times 10^7$ bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg, etwa $3,0 \times 10^7$ bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg auf, oder beliebige Anzahlen zwischen diesen Bereichen.

[0122] In einer Ausführungsform weisen die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen eine Potenz von etwa $2,4 \times 10^7$ Einheiten/mg bis etwa $5,4 \times 10^7$ Einheiten/mg auf. In bevorzugten Ausführungsformen bezieht sich der hierin verwendete Begriff „Einheit“ auf die LD₅₀-Dosis.

[0123] In verschiedenen Ausführungsformen und Aspekten weist eine hierin beschriebene BoNT/A-Zusammensetzung eine höhere Potenz auf als eine im Handel erhältliche BoNT/A-Zusammensetzung, die auf dem Fachgebiet bekannt ist. In bestimmten Ausführungsformen weist eine hierin beschriebene BoNT/A-Zusammensetzung eine Potenz auf, die mindestens 10 %, mindestens 20 %, mindestens 30 % beträgt, mindestens 40 %, mindestens 50 %, mindestens 60 %, mindestens 70 %, mindestens 80 %, mindestens 90 %, mindestens 100 %, mindestens 1,5-fach oder mindestens 2-fach höher ist als die Potenz einer im Handel erhältlichen BoNT/A-Zusammensetzung, die auf dem Fachgebiet bekannt ist. In bestimmten Ausführungsformen weist eine hierin beschriebene BoNT/A-Zusammensetzung eine Potenz auf, die mindestens $0,1 \times 10^7$ Einheiten/mg, mindestens $0,2 \times 10^7$ Einheiten/mg, mindestens $0,3 \times 10^7$ Einheiten/mg, mindestens $0,4 \times 10^7$ Einheiten/mg, mindestens $0,5 \times 10^7$ Einheiten/mg, mindestens $0,6 \times 10^7$ Einheiten/mg, mindestens $0,7 \times 10^7$ Einheiten/mg, mindestens $0,8 \times 10^7$ Einheiten/mg, mindestens $0,9 \times 10^7$ Einheiten/mg, mindestens 1×10^7 Einheiten/mg, mindestens $1,5 \times 10^7$ Einheiten/mg, mindestens 2×10^7 Einheiten/mg, mindestens 3×10^7 Einheiten/mg, oder mindestens 4×10^7 Einheiten/mg höher als die Potenz einer im Handel erhältlichen BoNT/A-Zusammensetzung beträgt, die auf dem Fachgebiet bekannt ist.

[0124] Die Potenz der hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen kann mit auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren bestimmt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf z. B., Light-Chain Activity High-Performance Liquid Chromatography (LCA-HPLC) Assay, Mouse 50 % lethal dose (MLD₅₀) Assay, Mouse Digit Abduction Score (DAS) Assay, SNAP-25 Assay, cell-based potency assay (CBPA) usw.

[0125] Der LCA-HPLC Assay misst die Spezifität der SNAP-25-Spaltung. Die Proben werden mit einem im Handel erhältlichen BoNT/A-Fluoreszenzsubstrat umgesetzt, das von der Sequenz SNAP-25 abgeleitet ist. Die fluoreszenzmarkierten Spaltprodukte werden über ein Reverse-Phase-HPLC-Verfahren (RP-HPLC-Verfahren) getrennt und festgestellt. Eine weitere Beschreibung des LCA-HPLC Assays ist in den Veröffentlichungen von Hunt et al. (2010) Toxins 2(8):2198-2212 und Rupp et al. (2020) Toxins 12(6):393 zu finden, die hierin jeweils in vollem Umfang enthalten sind.

[0126] In einer Ausführungsform wird die Wirksamkeit mit Hilfe eines Maus-Assays mit 50 % tödlicher Dosis (MLD₅₀) bestimmt. Der Maus-Assay mit 50 % tödlicher Dosis (MLD₅₀) wurde beschrieben in, z. B., Schantz und Kautter (1978) Journal of the AOAC. 61(1):96-99, Hunt und Kenneth (2009) Clinical Neuropharmacology 32(1):28-31, US-Patent Nr. 7,160,699, und US-Patent Nr. 9,725,705, die hierin jeweils in vollem Umfang enthalten sind. Der Maus-Assay mit 50 % tödlicher Dosis (MLD₅₀) ist ein Verfahren zur Messung der Wirksamkeit eines Botulinumtoxins durch intraperitoneale Injektion des Botu-

linumtoxins in weibliche Mäuse (etwa vier Wochen alt), die zu Beginn des Assays jeweils 17-22 Gramm wogen. Jede Maus wird in Rückenlage mit nach unten geneigtem Kopf gehalten und mit einer 25 bis 27 Gauge 3/8 Zoll bis 5/8 Zoll Nadel mit einer von mehreren seriellen Verdünnungen des Botulinumtoxins in Kochsalzlösung intraperitoneal in den rechten Unterbauch in einem Winkel von etwa 30 Grad injiziert. Die Sterberaten über die folgenden 72 Stunden für jede Verdünnung werden aufgezeichnet. Die Verdünnungen werden so zubereitet, dass die am stärksten konzentrierte Verdünnung eine Sterblichkeitsrate von mindestens 80 % der injizierten Mäuse produziert und die am wenigsten konzentrierte Verdünnung eine Sterblichkeitsrate von nicht mehr als 20 % der injizierten Mäuse produziert. Es müssen mindestens vier Verdünnungen vorliegen, die in den monoton abnehmenden Bereich der Sterberaten fallen. Der monoton abnehmende Bereich beginnt mit einer Sterberate von nicht weniger als 80 %. Innerhalb der vier oder mehr monoton abnehmenden Raten müssen die beiden größten und die beiden kleinsten Raten abnehmend sein (d. h. nicht gleichwertig). Die Verdünnung, bei der 50 % der Mäuse innerhalb des Beobachtungszeitraums von drei Tagen nach der Injektion sterben, ist definiert als eine Verdünnung, die eine Einheit (1 U) des Botulinumtoxins umfasst.

[0127] Der Digit Abduction Score-Assay (DAS-Assay) der Maus ist eine In-vivo-Bewertung der toxininduzierten Muskellähmung nach Injektion von BoNT/A-Toxin in den Muskel der hinteren Gliedmaßen eines Nagers. Der DAS-Assay kann verwendet werden, um die Potenz der BoNT/A-Zusammensetzungen auf die Muskellähmung sowie die Dauer der Wirkung zu beurteilen. Detaillierte Protokolle des DAS Assays sind in Aoki et al. (1999) Eur. J. Neurol. 6:s3-s10, Aoki (2001) Toxicon 39: 1815-1820, Broide et al. (2013) Toxicon 71:18-24 und Rupp et al. (2020) Toxins 12(6):393 beschrieben, die hierin in vollem Umfang enthalten sind. Beispielsweise kann der DAS Assay durch Injektion einer hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzung in den Gastrocnemius/Soleus-Komplex der Maus durchgeführt werden, gefolgt von einer Bewertung des Digital Abduction Score nach dem Verfahren von Aoki (2001) Toxicon 39: 1815-1820. Beim DAS-Assay werden die Mäuse kurz am Schwanz aufgehängt, um eine charakteristische Schreckreaktion auszulösen, bei der die Maus ihre Hinterbeine ausstreckt und die hinteren Finger abduziert. Nach der Injektion der BoNT/A-Zusammensetzung werden die unterschiedlichen Grade der Fingerabduktion auf einer Fünf-Punkte-Skala bewertet (0=normal bis 4=maximale Reduktion der Fingerabduktion und der Beinstreckung). Das Sicherheitsverhältnis, das Verhältnis zwischen der Menge eines Toxins, die für einen Rückgang des Körpergewichts um 10 % erforderlich ist (gemessen bei maximaler Wirkung innerhalb der ersten sieben Tage nach der Verabreichung an eine Maus), und der Menge des Toxins, die für einen DAS-Score von 2 erforderlich ist, kann ebenfalls bestimmt werden, um den therapeutischen Index der hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzung zu bewerten, wie im US-Patent Nr. 9,920,310 beschrieben ist, das hierin in vollem Umfang enthalten ist. Ein hoher Score für das Sicherheitsverhältnis ist daher wünschenswert und deutet auf ein Toxin hin, das in der Lage ist, einen Zielmuskel wirksam zu lähmen, ohne dass es zu unerwünschten Wirkungen außerhalb des Ziels kommt.

[0128] SNAP-25 Assay ist ein auf ELISA basierendes Verfahren zur Messung der SNAP-25 proteolytischen Aktivität des Botulinumtoxins. Der Assay verwendet ein verkürztes SNAP-25-Protein (das Peptid mit 206 Aminosäureresten), das an Polystyrol-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen gebunden ist, und einen monoklonalen Antikörper, der das gespaltene Produkt (ein Peptid mit 197 Aminosäureresten) erkennt, das durch enzymatische Hydrolyse zwischen den Aminosäuren 197 und 198 des SNAP- 25 durch reduziertes Botulinumtoxin vom Typ A. Der monoklonale Antikörper, der an das gespaltene Produkt gebunden ist, wird dann mit einem sekundären Antikörper (Ziegen-Anti-Maus-IgG, konjugiert mit Meerrettichperoxidase HRP) erfasst, der in Gegenwart eines chromogenen Substrats (TMB) einen Farbwechsel produziert. Beispielhafte SNAP-25 Verfahren sind beschrieben in Ekong et al. (1997) Microbiology 143:3337-3347 und US-Patent 7,160,699, die hierin jeweils durch Bezugnahme aufgenommen sind.

[0129] Zellbasierter Assay (CBPA) wurde beschrieben in, z. B., Fernández-Salas et al. (2012) PLOS ONE 7(11):e49516, Rupp et al. (2020) Toxins 12(6):393, WO 2010/105234 und WO 2009/114748, die hierin jeweils durch Bezugnahme aufgenommen sind. In einer Ausführungsform wird die SNAP-25₁₉₇ SiMa H1 Elektrochemilumineszenz (ECL) CBPA verwendet, um die Wirksamkeit der hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen zu bestimmen. Der SNAP-25₁₉₇ SiMa H1 elektrochemilumineszente (ECL) CBPA ist ein in vitro zellbasierter Assay, der die wichtigsten Schritte der BoNT/A-Intoxikation misst: Rezeptor-vermittelte Zellbindung und Internalisierung, Translokation der Proteasedomäne (leichte Kette) in das Zytosol und proteolytische Spaltung von SNAP-25, was einen direkten Vergleich der biologischen Aktivität von BoNT/A-Produkten in vitro ermöglicht (Fernández-Salas et al. (2012) PLOS ONE 7(11):e49516; Rupp et al. (2020) Toxins 12(6):393). In Kurzform: Humane Neuroblastom-Zellen SiMa H1 werden auf Poly-D-Lysin (PDL) 96-Well-Platten in serumfreien Medien (SFM) mit 25 µg/mL GT_{1b} für drei Tage plattiert und mit Toxin-Proben für 24 Stunden behandelt. Nach der Behandlung werden die Toxine entfernt, die Zellen lysiert und die Lysate auf MSD High Bind Platten übertragen, die mit dem monoklonalen Antikörper (mAb) Anti-SNAP-25₁₉₇ 2E2A6 beschichtet sind. Die Platten werden dann gewaschen und mit SULFO-TAG NHS-Ester-markierten polyklonalen Anti-SNAP-25-Antikörpern (pAb) zum Erfassen inkubiert. Das gefangene, durch BoNT/A-Toxin gespaltene SNAP-25 wird dann auf einem MSD-Plattenlesegerät quantifiziert.

5.6. Veranschaulichende Ausführungsformen

[0130] Die vorliegende Offenbarung schließt die folgenden nicht einschränkenden veranschaulichenden Ausführungsformen ein.

1. Zusammensetzung, umfassend einen 900 kDa Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A (BoNT/A) Komplex, wobei der 900 kDa BoNT/A Komplex ein 150 kDa BoNT/A umfasst, das in Form einer Vielzahl von

Sequenzvarianten vorliegt, wobei die Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette und eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer leichten Kette in voller Länge umfasst, wobei die C-terminale verkürzte leichte Kette eine Aminosäuresequenz aufweist, die in SEQ ID NO: 4 dargelegt ist und die leichte Kette in voller Länge weist eine Aminosäuresequenz auf, die in SEQ ID NO: 2 dargelegt ist, und wobei das Häufigkeitsverhältnis der 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit der C-terminalen verkürzten leichten Kette zu der 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit der leichten Kette in voller Länge geringer ist als 3,9.

2. Zusammensetzung, umfassend einen 900 kDa BoNT/A-Komplex, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex ein 150 kDa BoNT/A umfasst, das in Form einer Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies vorliegt, wobei die Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette umfasst, wobei die C-terminale verkürzte leichte Kette eine Aminosäuresequenz aufweist, die in SEQ ID NO: 4 dargelegt ist, und wobei der prozentuale Anteil der 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit der C-terminalen verkürzten leichten Kette in der Vielzahl der 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies geringer als 79,5 % ist.
3. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, wobei das Abundanzverhältnis durch Anionenaustauschchromatographie (AEX) gemessen wird.
4. Zusammensetzung nach Ausführungsform 2, wobei der prozentuale Anteil der Fülle durch AEX gemessen wird.
5. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-4, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex von Clostridium botulinum-Bakterien produziert wird, die aus einer von einem Tierprodukt freien Arbeitszellbank kultiviert und erweitert wurden.
6. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-5, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex von einem Typ A Stamm von Clostridium botulinum produziert wird.
7. Zusammensetzung nach Ausführungsform 6, wobei der Typ A Stamm von Clostridium botulinum ein Typ A Hall Stamm von Clostridium botulinum ist.
8. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-7, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex Onabotulinumtoxin A ist.
9. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-8, die ferner menschliches Serumalbumin umfasst.
10. Zusammensetzung nach Ausführungsform 9, die etwa 0,5 mg menschliches Serumalbumin pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes umfasst.
11. Zusammensetzung nach Ausführungsform 9 oder 10, wobei das Humanserumalbumin rekombinantes Humanserumalbumin ist.
12. Zusammensetzung nach Ausführungsform 9 oder 10, wobei das menschliche Serumalbumin aus menschlichem Plasma stammt.
13. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-11, die frei von Tierprodukten ist.
14. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-12, die ferner Natriumchlorid umfasst.
15. Zusammensetzung nach Ausführungsform 14, die etwa 0,9 mg Natriumchlorid pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A Komplexes umfasst.
16. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-15, die keinen Proteaseinhibitor enthält.
17. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-16, die kein Benzamidinhydrochlorid enthält.
18. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-17, die etwa 50 Einheiten, etwa 100 Einheiten oder etwa 200 Einheiten des 900 kDa BoNT/A Komplexes umfasst.
19. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-18, die eine Potenz von etwa $1,5 \times 10^7$ Einheiten/mg bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg aufweist.
20. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-19, die eine pharmazeutische Zusammensetzung in Pulverform ist.

21. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-20, die vakuumgetrocknet ist.
22. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-21, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert wird, der einen oder mehrere Schritte der Säulenchromatographie umfasst.
23. Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-22, wobei der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie umfassen.
24. Zusammensetzung nach Ausführungsform 23, wobei der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie ferner die Anionenaustauschchromatographie umfassen.
25. Zusammensetzung nach Ausführungsform 23 oder 24, wobei der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie ferner die Kationenaustauschchromatographie umfassen.
26. Verfahren zum Herstellen einer Zusammensetzung, die BoNT/A umfasst, wobei das Verfahren das Inkubieren einer Kultur von Clostridium botulinum Bakterien in einem Produktionsfermenter in Gegenwart von CO₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses umfasst.
27. Verfahren nach Ausführungsform 26, wobei der Inkubationsschritt in Gegenwart von CO₂ und N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Prozesses der Fermentation durchgeführt wird.
28. Verfahren nach Ausführungsform 27, wobei der Inkubationsschritt in Gegenwart von 25 % CO₂ und 75 % N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Prozesses der Fermentation durchgeführt wird.
29. Verfahren nach Ausführungsform 27, wobei der Inkubationsschritt in Gegenwart von 50 % CO₂ und 50 % N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Prozesses der Fermentation durchgeführt wird.
30. Verfahren nach Ausführungsform 27, wobei der Inkubationsschritt in Gegenwart von 75 % CO₂ und 25 % N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Prozesses der Fermentation durchgeführt wird.
31. Verfahren nach Ausführungsform 27, wobei der Inkubationsschritt in Gegenwart von 100 % CO₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Prozesses der Fermentation durchgeführt wird.
32. Verfahren zur Behandlung eines Patienten, der dessen bedarf, umfassend die Verabreichung einer Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-25.
33. Verfahren, im Wesentlichen wie hierin beschrieben.
34. Zusammensetzung, im Wesentlichen wie hierin beschrieben.

6. BEISPIELE

[0131] Bestimmte hierin enthaltene Ausführungsformen werden durch die folgenden nichtbegrenzenden Beispiele veranschaulicht, die verschiedene Verfahren zur Ermittlung von BoNT/A beschreiben und zeigen, dass die Verwendung einer Temperatur, die niedriger als die Standard-Fermentationstemperatur ist, und die Erhöhung der CO₂-Konzentration während der Fermentation beide das Verhältnis der Häufigkeit einer 150 kDa BoNT/A-Spezies mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette zur Häufigkeit der 150 kDa BoNT/A-Spezies mit der leichten Kette in voller Länge verringern können.

6.1. Beispiel 1: Verfahren und Materialien für die Beispiele 2-3

1. Vorgelagerte Schritte

A. Fermentation von C. botulinum Typ A Hall-Stamm mit kontinuierlichem Durchfluss (Overlay) von unterschiedlichem prozentualem Verhältnis von CO₂:N₂ im Kopfraum.

[0132] Fermentationen von Clostridium botulinum Typ A Hall-Stamm wurden in tierproduktfreiem (APF) Medium mit dem kontinuierlichen Durchfluss (Overlay) verschiedener prozentualer Verhältnisse von CO₂:N₂ (wie in Tabelle 2 beschrieben) durchgeführt, um die Auswirkungen auf die Eigenschaften des unter diesen Zuständen produzierten botulinum Neurotoxin Typ A (BoNT/A) Komplexes zu untersuchen. Die Upstream-Phase schloss die Verwendung eines 40 ml APF-Saatgut-Kulturmediums in einer 150 ml Glasflasche (mit einem magnetischen Rührstab) ein (3,25 % (w/v) Sojapepton Typ II, 1,2 % (w/v) Hefeextrakt, 1,5 % (w/v) Glukose, pH-Wert eingestellt auf 7,3 mit Natriumhydroxid). Das Saatgut-Kulturmedium wurde vor der Verwendung mindestens 48 Stunden lang reduziert, um Sauerstoff zu entfernen (in einer anaeroben Kammer von Don Whitley Scientific A55). Das Saatkulturmedium wurde mit 50 µl eines aufgetauten C. botulinum Serotyp A Hall-Stammes aus der Zellbank. Die Saatkultur wurde bei 35 ± 1 °C mit 150 U/min unter Rühren in der anaeroben Kammer inkubiert.

[0133] Nach Inkubation der Saatkultur über Nacht betrug die optische Dichte (bei 600 nm) 8,04, als 4 ml der Kultur in einen Produktionsfermenter (Ambr® 250 Modular, Sartorius Stedim) überführt wurden, der 196 ml reduziertes APF-Fermentationsmedium (3,25 % w/v Sojapepton Typ II, 1,2 % w/v Hefeextrakt, 1,5 % w/v Glukose, pH-Wert eingestellt auf 7,3 mit Natriumhydroxid). Die Kontrolle der Fermentationstemperatur lag bei $35 \pm 0,5$ °C. Die Rührbewegung wurde bei 150 U/min kontrolliert. Der Fermenter-Kopfraum wurde bei 50 ml/min Gasflussrate mit N₂ und einem zunehmenden Prozentsatz von CO₂ entsprechend dem Versuchsplan (Tabelle 2). Der N₂/CO₂-Anteil wurde mittels interner Massendurchflussteuerungen des Ambr® 250 modularen Systems gesteuert. Der pH-Wert der Fermentation und das Zellwachstum wurden mit einer Online-pH-Sonde bzw. einem Reflexionsmonitor überwacht. Die drei Phasen der Produktionsfermentation schließen die exponentielle Wachstumsphase, die stationäre Phase und die Autolyse ein. Die Fermentation dauerte 69 Stunden, was sicherstellte, dass eine zelluläre Autolyse stattfand und aktives BoNT/A in das Kulturmedium freigesetzt wurde.

Tabelle 2

[0134]

Beschreibung	Bedingung *
25 % CO ₂ Fermentation	25 % CO ₂ mit 75 % N ₂ im Kopfraum überlagert
50 % CO ₂ Fermentation	50 % CO ₂ mit 50 % N ₂ im Kopfraum überlagert
75 % CO ₂ Fermentation	75 % CO ₂ mit 25 % N ₂ im Kopfraum überlagert
100 % CO ₂ Fermentation	100 % CO ₂ in der Kopfraumüberlagerung
* Das Fermentationsmedium wurde vor der Beimpfung des Fermenters mit 100 % N ₂ reduziert. Nach der Impfung des Fermenters mit Saatkulturstoff wurde die Kopfraumüberlagerung geändert, um den geeigneten CO ₂ -Prozentsatz wie in dieser Tabelle aufgeführt einzuschließen.	

[0135] Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation, gefolgt von 0,2 µm Filtration, um Zelltrümmer aus der Kulturbrühe zu entfernen, die den BoNT/A-Komplex und andere Wirtszellproteine enthielt. Die Zelltrümmer wurden anfänglich durch Zentrifugation bei 10.000 rcf für 30 Minuten entfernt. Der geklärte Überstand wurde dann einer 0,2 µm in einer biologischen Sicherheitswerkbank filtriert, um sicherzustellen, dass alle verbleibenden C. botulinum Typ A Organismen und Zelltrümmer entfernt wurden. Die vollständige Entfernung des Organismus wurde bestätigt (durch Ausplattieren eines Abschnitts des 0,2 µm-Filtrat auf reduzierten Columbia Blood Agar-Platten und Bebrütung unter anaeroben Bedingungen für eine ausreichende Zeit, um die Abwesenheit von lebensfähigem C. botulinum Typ A zu überprüfen) und das geklärte Erntematerial wurde bei 4 °C bis zum Beginn der nachgelagerten Phase gelagert.

B. Niedrigtemperatur- oder Kälteschockfermentationen des C. botulinum Typ A Hall-Stamms

[0136] Fermentationen von Clostridium botulinum Typ A Hall-Stamm wurden in tierproduktfreiem (APF) Medium unter verschiedenen Temperaturbedingungen (wie in Tabelle 3 beschrieben) durchgeführt, um die Wirkung auf die Eigenschaften des produzierten Botulinum Neurotoxin Typ A (BoNT/A) Komplexes zu untersuchen. Die vorgelagerte Stufe schloss die Verwendung eines Keimkulturmediums in einer 150 ml Glasflasche (mit einem magnetischen Rührstab) ein, das 50 ml APF-Medium (3,25 % w/v Sojapepton Typ II, 1,2 % w/v Hefeextrakt, 1,5 % w/v Glukose, pH-Wert mit Natriumhydroxid auf 7,3 eingestellt). Das Saatkulturmmedium wurde vor der Verwendung mindestens 48 Stunden lang reduziert, um Sauerstoff zu entfernen (in einer anaeroben Kammer von Don Whitley Scientific A55). Das Saatkulturmmedium wurde mit 50 µl eines aufgetauten C. botulinum Typ A WCB beimpft. Die Saatkultur wurde bei 35 ± 1 °C mit 150 U/min unter Rühren in der anaeroben Kammer inkubiert.

[0137] Nach der Inkubation der Saatkultur über Nacht wurden 4 ml der Kultur (OD_{600} nm 4,81 \pm 0,35) in einen Produktionsfermenter (Ambr® 250 Modular, Sartorius Stedim) überführt, der 196 ml reduziertes APF-Fermentationsmedium (3,25 % w/v Sojapepton Typ II, 1,2 % w/v Hefeextrakt, 1,5 % w/v Glukose, pH-Wert eingestellt auf 7,3 mit Natriumhydroxid). Die Temperatur für jede Fermentation wurde gemäß der Tabelle 3 kontrolliert. Die Temperaturanpassungen für die Kälteschockfermentationen wurden in der frühen stationären Phase des Zellwachstums begonnen. Die Dauer des Kälteschocks von 5 Stunden basierte auf der erwarteten Zeit, um eine Veränderung des Expressionsprofils zu erreichen. Die Agitation wurde mit 150 U/min gesteuert und der Fermenter-Kopfraum wurde mit N₂ bei 50 ml/min überlagert, um eine anaerobe Umgebung aufrechtzuerhalten. Der pH-Wert der Fermentation und das Zellwachstum wurden mit einer Online-pH-Sonde bzw. einem Reflexionsmonitor überwacht. Am Ende der Fermentation wurden Offline-Proben zur Messung der Zelldichte (OD_{600}) genommen. Die drei Phasen der Produktionsfermentation schließen die exponentielle Wachstumsphase, die stationäre Phase und die Autolyse ein. Die Zeiten der Fermentation wurden von 72 Stunden bis 160 Stunden variiert (Tabelle 3), um sicherzustellen, dass eine Zellyse stattfand, die den aktiven BoNT/A-Komplex in das Kulturmedium freisetzte.

Tabelle 3

[0138]

Experimentelle Beschreibung	Produktion Fermentation* Zustand	Produktion Fermentationszeit (Stunden)
Baseline-Kontrolle der Fermentation	35 °C während der gesamten Fermentation	72
20 °C Kälteschock	35 °C von 0 bis 12 Stunden; Temperatur eingestellt auf 20 °C um 12 Uhr; Kultur bei 20 °C bis 17 Uhr, dann Temperatur auf 35 °C um 17 Uhr; Kultur bei 35 °C bis 72 Stunden	72
15 °C Kälteschock	35 °C von 0 bis 12 Stunden; Temperatur eingestellt auf 15 °C um 12 Uhr; Kultur bei 15 °C bis 17 Uhr, dann Temperatur auf 35 °C um 17 Uhr; Kultur bei 35 °C bis 72 Stunden.	72
25 °C Fermentation	25 °C während der gesamten Fermentation	160
*Das Ambr® 250 Modulsystem kann die Temperatur mit einer Genauigkeit von $\pm 0,5$ °C.		

[0139] Die Ernte des BoNT/E-Komplexes erfolgte durch Zentrifugation, gefolgt von 0,2 µm-Filtration, um Zelltrümmer aus der Kulturbrühe zu entfernen, die BoNT/A-Komplex und andere Wirtszellproteine enthielt. Die Zelltrümmer wurden anfänglich durch Zentrifugation bei 10.000 rcf für 30 Minuten entfernt. Der geklärte Überstand wurde dann einer 0,2 µm in einer biologischen Sicherheitswerkbank filtriert, um sicherzustellen, dass alle verbleibenden *C. botulinum* Typ A Organismen und Zelltrümmer entfernt wurden. Die vollständige Entfernung des Organismus wurde bestätigt (durch Ausplattieren eines Abschnitts des 0,2 µm-Filtrat auf reduzierten Columbia Blood Agar-Platten und Bebrütung unter anaeroben Bedingungen für eine ausreichende Zeit, um die Abwesenheit von lebensfähigem *C. botulinum* Typ A zu überprüfen) und das geklärte Erntematerial wurde bei 4 °C bis zum Beginn der nachgelagerten Phase gelagert.

2. Nachgelagerte Schritte

[0140] Die nachgelagerten Schritte schlossen eine Konzentration und einen Pufferaustausch unter Verwendung der Tangentialflussfiltration (TFF) ein, gefolgt von einer Abtrennung des Botulinum-Neurotoxins auf einer Anionenaustauschersäule, einer Elution von der Säule und einer weiteren Trennung von Verunreinigungen durch Polieren auf einer Kationenaustauschersäule.

[0141] Ein Tangentialflussfiltrationssystem wurde verwendet, um das geklärte Fermentation-Erntegut zu konzentrieren (durch Ultrafiltration - UF) und in 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 Puffer zu diafiltrieren. Repligen TangenX® SIUS PD-Kassetten mit einer Membran mit einem Cut-Off-Molekulargewicht von 100 kDa wurden für die Konzentrations- und Diafiltrationsschritte verwendet. Im UF/DF-Schritt wurde das geklärte Erntematerial 3- bis 4-fach konzentriert und dann mit 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5-Puffer diafiltriert.

[0142] Die Einzelheiten des verwendeten Prozesses der Ultrafiltration/Diafiltration (UF/DF) lauten wie folgt. Die UF/DF-Einheit und die Repligen 100 kDa-Membran mit 0,02 m² Membranbereich wurden anfänglich mit einem Minimum von 0,2 L Wasser für Injektionszwecke (WFI) gespült, um die Speicherlösung der Membran zu entfernen. Anschließend wurden die Membran und das UF/DF-System mit etwa 0,2 L 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 Puffer. Nach der Membranäquilibration wurde das geklärte Fermentations-Erntegut auf die TangenX®-Tangentialfluss-Filtrationskassette geladen und bei einem Transmembrandruck von 5 bis 6 psig (pounds per square inch gauge) und einer in dem Satz eingestellten Strömungsrate von 75 ml/min 3 bis 4-fach konzentriert. Nach dem Konzentrationsschritt wurde der Retentat-Pool gegen ein Minimum von 5 Diafiltrationsvolumina des 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 Puffers bei einem Transmembrandruckbereich von 5 bis 8 psig und einer Strömungsrate von 75 ml/min diafiltriert. Nach Abschluss der Diafiltration wurde der Druck aus der Retentatleitung abgelassen und der Permeatauslass geschlossen. Das UF/DF-Material wurde dann für mindestens 5 Minuten rezirkuliert und das System wurde dann entleert, gefolgt von einer Spülung mit 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 Puffer, während das UF/DF-Material in einen separaten Behälter zurückgewonnen wurde.

[0143] Das zurückgewonnene Material (UF/DF-Retentat) aus dem UF/DF-Schritt wurde dann auf eine Anionenaustausch-Chromatographiesäule geladen, die mit POROS® 50HQ-Harz gefüllt war. Die Säule weist einen Innendurchmesser von 1,13 cm und eine Säulenhöhe von etwa 5 cm auf. Die gesamte Anionenaustauschersäulenchromatographie wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und der Fluss erfolgte in Abwärtsrichtung. Der Botulinum Neurotoxin Typ A-Komplex wurde von der Anionenaustauschersäule eluiert, indem ein pH-Schrittwechsel verwendet wurde, bei dem die negativer geladenen Verunreinigungen wie Nukleinsäuren (z. B. DNA und RNA) und andere Wirtszellproteine an die Anionenaustauschersäule gebunden blieben.

[0144] Einzelheiten des Anionenaustauschschritts waren: Verwendung der POROS® 50HQ-Säule, äquilibriert mit einem 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 Puffer (mindestens 5 Säulenvolumen). Anschließend wurde das UF/DF-Retentat bei

120 cm/Stunde auf die POROS® 50HQ Anionenaustauschersäule geladen, gefolgt vom Waschen mit mindestens etwa 10 Säulenvolumina von 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 bei 120 cm/Stunde, gefolgt vom Eluieren mit 50 mM Natriumacetat, pH 4,5 bei 120 cm/Stunde. Die Peakfraktion wurde gesammelt, wenn die Absorption bei 280 nm (A280) auf mindestens etwa 0,05 AU und durch das Maximum des Peaks auf gleich oder geringer als etwa 0,03 AU an der hinteren Kante, in einen Behälter mit 5 ml 50 mM Natriumacetat, pH 4,8. Dieser Elutionspool wurde bei etwa 2 °C bis etwa 8 °C für bis zu 48 Stunden gespeichert. Im zweiten Chromatographieschritt des nachgelagerten Prozesses wurde ein POROS® 20HS Kationenaustausch-Chromatographieharz verwendet, das in eine Säule mit einem Innendurchmesser von 0,46 cm und einer Säulenhöhe von 10,0 cm gepackt war. Das gesamte POROS® 20HS-Säulenchromatographie wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, und der Fluss erfolgte in Abwärtsrichtung. Der Botulinum Neurotoxin Typ A Komplex bindet an die POROS® 20HS-Säule bei pH 4,8. Nach Waschschritten zur Entfernung von Verunreinigungen wurde der gebundene Botulinum Neurotoxin Typ A Komplex dann mit erhöhter NaCl-Konzentration von der Säule eluiert. Die produktbezogenen Verunreinigungen wurden mit dem Waschpuffer und der Dekontaminationslösung eluiert.

[0145] Einzelheiten des Kationenaustauschschritts waren: Verwendung der POROS® 20HS-Säule, die mit einem 50 mM Natriumacetat, pH 4,8 Puffer (mindestens etwa 5 Säulenvolumen) äquilibriert wurde. Anschließend wurde der POROS® 50HQ Produktpool (gesammelt wie oben beschrieben, frisch oder aus der Lagerung bei 2 - 8 °C) wurde auf die POROS® 20HS-Säule geladen. Die Säule wurde dann mit einem 50 mM Natriumacetat, pH 4,8 Puffer (mindestens etwa 5 Säulenvolumina) gewaschen und dann erneut mit 10 Säulenvolumina eines zweiten Puffers (50 mM Natriumacetat, 80 mM Natriumchlorid, pH 4,8 Puffer) gewaschen. Der Botulinum Neurotoxin Typ A Komplex wurde von der POROS® 20HS-Säule mit einem 50 mM Natriumacetat, 350 mM Natriumchlorid, pH 4,8 Puffer bei 290 cm/Stunde eluiert. Das Eluat wurde in einem Behälter mit 3 ml 50 mM Natriumacetat, pH 4,8 gesammelt, als der A280 auf etwa ≥0,02 AU durch das Maximum des Peaks, bis das A280 der hinteren Kante des Elutionspeaks auf einen Wert von ≤0,02 AU oder bis zum Ende des Elutionsschritts, der insgesamt 5 Säulenvolumina ab dem Ende des zweiten Waschschritts aufwies. Das POROS® 20HS Produktpool wurde kurzfristig bei etwa 2 °C bis 8 °C für bis zu 120 Stunden gespeichert. Anschließend wurde der Produktpool in kleine Probenmengen aliquotiert und vor der Analyse für längere Zeit in einem Gefrierschrank bei -70 °C gespeichert.

3. Probenanalyse

AEX-HPLC-Analyse

[0146] Die Proben wurden bei Raumtemperatur für mindestens 20 Minuten äquilibriert. 100 µl jeder Probe wurden zur direkten Injektion in ein 0,3 ml Polypropylen-HPLC-Fläschchen überführt. Die AEX-HPLC-Analyse wurde mit einem Agilent® HPLC mit UV-Detektor unter Einhaltung der in Tabelle 4 angegebenen Zustände des Instruments durchgeführt.

Tabelle 4. AEX-HPLC Experimentelle Zustände

[0147]

Parameter	Bedingungen		
Säule	Dionex ProPac WAX-10G, 4 × 50 mm, 10 µm (Teil Nr. 055150)		
Säulentemperatur	25 °C		
Mobile Phase A (MPA)	40 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0		
Mobile Phase B (MPB)	1,00 M NaCl + MPA		
Flussrate	1,00 ml/min		
UV-Erkennung	220 nm		
Probeninjektionsvolumen	Injektionsvolumen auf Basis der UV-Konzentration anpassen, um 5 µg		
Temperatur des automatischen Probennehmers	5 °C		
Laufzeit	35 min		
Gradient	Zeit (Min.)	% MPA	% MPB
	0,00	100	0
	17,00	40	60
	17,20	0	100

Parameter	Bedingungen		
	22,00	0	100
	22,20	100	0
	35,00	100	0

[0148] Die Chromatographie-Daten wurden mit der Waters® Empower 3 Software verarbeitet. Alle Spitzen, die in der Pufferanalyse nicht vorhanden waren, wurden integriert.

LC/MS-Analyse

[0149] Die Proben wurden mit 50 mM TCEP 90 Minuten bei 37±3 °C reduziert. Die reduzierten Proben wurden mit der Waters Acquity UPLC analysiert, die mit einem Waters Synapt G2 Massenspektrometer gekoppelt ist. Zwanzig Pikomol jeder Probenverdauung wurden für die LC-MS-Analyse injiziert. Die Massenspektrometrie der von der Umkehrphasensäule eluierten Komplexkomponenten wurde unter Verwendung der Elektrospray-Ionisierung im positiven Modus ausgeführt. Die für die Analyse der Proben verwendeten LC MS-Parameter sind in der folgenden Tabelle 5 aufgeführt.

[0150] Die Rohdaten wurden mit Waters MassLynx Version 4.1 oder höher mit MaxEnt1 dekonvolviert. Die Parameter sind in der folgenden Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 5. LC-MS Experimentelle Zustände

[0151]

Probe	Reduziert			
Probenbeladung	20 Pikomol			
Instrument	Waters Acquity UPLC und Waters Synapt G2			
Säule	Agilent Zorbax 300SB-C8, 2,1 mm x 150 mm, 3,5 µm			
Mobile Phase A (MPA)	0,1 % Ameisensäure, 0,01 % TFA in Wasser			
Mobile Phase B (MPB)	0,1 % Ameisensäure, 0,01 % TFA in 100 % Acetonitril			
Gradient	Zeit (Min.)	Flussrate (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

Tabelle 6. MassLynx MaxEnt1 Parameter für die BoNT/A-Probenanalyse

[0152]

Parameter			Wert
Ausgabemasse	Bereich	150 kDa HC	97500:98500
		150 kDa LC	49500:50500
		NTNH	137500:138500
		HA48	47500:48500

Parameter			Wert
		HA34	33000:34000
		HA20	19500:21000
		HA17	16500:17500
	Auflösung		0,1 Da/Kanal
Schadensmodell: Einheitlich Gauß	Spitzenbreite bei halber Höhe	150 kDa HC	0,25
		150 kDa LC	0,30
		NTNH	0,21
		HA48	0,33
		HA34	0,44
		HA20	0,48
		HA17	0,61
Minimale Intensitätsverhältnis- se	Links		33 %
	Rechts		33 %
Fertigstellungsoptionen			Iteriert auf Konvergenz

[0153] Hinweis: Die Spitzenbreite beim Halbhöhenwert wurde theoretisch unter Verwendung der Isotopenmodellierungsfunktionalität innerhalb des MassLynx bestimmt.

6.2. Beispiel 2: Die C-terminalen verkürzten Varianten der leichten Kette von BoNT/A wurden in Proben reduziert, die unter Fermentationsbedingungen mit höheren CO₂ Konzentrationen

[0154] Proben, die aus Fermentationskulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen von CO₂ wurden mit AEX-HPLC analysiert. Zwei Spitzen, die 150 kDa BoNT/A entsprechen, das eine leichte Kette in voller Länge aufweist (SEQ ID NO. 2) und 150 kDa BoNT/A mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette (SEQ ID NO. 4) wurden beobachtet (Figur 1) und werden in dieser Offenbarung als die 150 kDa-Spitze in voller Länge bzw. die verkürzte 150 kDa-Spitze bezeichnet. Die verkürzte 150 kDa-Spitze wurde zu einem etwas späteren Zeitpunkt eluiert als die 150 kDa-Spitze in voller Länge. Die relativen Bereiche für die beiden Spitzen sind unten in der Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7. CO₂ Studie AEX Daten Zusammenfassung (%Bereich), UV220 nm

[0155]

	vollständige Länge 150 kDa	verkürzt 150 kDa	Gesamt 150 kDa	150 kDa-Verhältnis (verkürzt:volle Länge)	verkürzt 150 kDa (% von Gesamt 150 kDa)
Baseline-Kontrolle der Fermentation	3,1	12,0	15,1	3,9	79,5 %
25 % CO ₂ Fermentation	7,5	7,2	14,7	1,0	49,0 %
50 % CO ₂ Fermentation	9,4	6,1	15,5	0,6	39,4 %
75 % CO ₂ Fermentation	9,9	4,4	14,3	0,4	30,8 %
100 % CO ₂ Fermentation	10,1	3,7	13,8	0,4	26,8 %

[0156] Tabelle 5 zeigt, dass der verkürzte 150 kDa-Spitzenbereich in den Proben, die aus Fermentationskulturen mit höherer CO₂ Konzentration ermittelt wurden, verringert war, während der 150 kDa-Spitzenbereich in voller Länge erhöht war. Dementsprechend waren das Verhältnis der Abundanz der verkürzten 150 kDa zur Abundanz der vollständigen 150 kDa und der prozentuale Anteil der Abundanz der verkürzten 150 kDa an der Abundanz der gesamten 150 kDa (d. h., die

Summe der Abundanz der 150 kDa in voller Länge und der Abundanz der verkürzten 150 kDa) waren beide in Proben reduziert, die aus Fermentationskulturen mit höherer CO₂ Konzentration erhalten wurden.

[0157] Proben, die aus Fermentationskulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen von CO₂ wurden ebenfalls mit LC-MS analysiert. Sowohl die leichte Kette voller Länge (SEQ ID NO. 2, Molekulargewicht von ~50025) und C-terminale verkürzte leichte Kette (SEQ ID NO. 4, Molekulargewicht von ~49810) von BoNT/A wurden identifiziert (Figur 2A-2E). Es wurde gezeigt, dass das Erhöhen der CO₂-Konzentration während der Fermentation zu einem verringerten Gehalt an C-terminaler verkürzter leichter Kette (LC) und einem erhöhten Gehalt an leichter Kette voller Länge in den hergestellten BoNT/A-Proben führte.

6.3. Beispiel 3: BoNT/A-Varianten mit C-terminaler verkürzter leichter Kette wurden in Proben aus Niedrigtemperatur- oder Kälteschockfermentationen reduziert

[0158] Proben aus Fermentationskulturen mit unterschiedlichen Fermentationstemperaturen wurden mit AEX-HPLC analysiert. Dieselben beiden Spitzen (150 kDa in voller Länge und verkürzte 150 kDa), die 150 kDa BoNT/A entsprechen, das eine leichte Kette in voller Länge aufweist (SEQ ID NO. 2) und 150 kDa BoNT/A mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette (SEQ ID NO. 4) wurden beobachtet (Figur 3). Die relativen Bereiche für die beiden Spitzen sind unten in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8. Thermische Studie AEX Daten Zusammenfassung (%Bereich), UV220 nm

[0159]

	vollständige Länge 150 kDa	verkürzt 150 kDa	Gesamt 150 kDa	150 kDa Verhältnis (verkürzt:vollständige Länge)	verkürzt 150 kDa (% von Gesamt 150 kDa)
Baseline-Kontrolle der Fermentation	3,1	12,0	15,1	3,9	79,5 %
20 °C Kälteschock	5,7	8,7	14,4	1,5	60,4 %
15 °C Kälteschock	6,7	8,0	14,7	1,2	54,4 %
25 °C Fermentation	10,0	4,9	14,9	0,5	32,9 %

[0160] Tabelle 6 zeigt, dass der verkürzte 150 kDa-Spitzenbereich verringert war, während der 150 kDa-Spitzenbereich in vollständiger Länge in Proben, die aus Fermentationskulturen mit entweder Kälteschock oder kontinuierlicher niedriger Temperatur ermittelt wurden, erhöht war. Dementsprechend waren das Verhältnis der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa zur Häufigkeit der vollständigen Länge 150 kDa und der Prozentsatz der Häufigkeit der verkürzten 150 kDa an der Häufigkeit der gesamten 150 kDa (d. h., die Summe der Abundanz der vollständigen Länge 150 kDa und der Abundanz der verkürzten 150 kDa) waren beide in Proben reduziert, die aus Fermentationskulturen mit entweder Kälteschock oder kontinuierlich niedriger Temperatur ermittelt wurden.

[0161] Proben aus Kulturen mit unterschiedlichen Fermentationstemperaturen wurden ebenfalls mit LC-MS analysiert. Sowohl die leichte Kette voller Länge (SEQ ID NO. 2, Molekulargewicht von ~50025) und C-terminale verkürzte leichte Kette (SEQ ID NO. 4, Molekulargewicht von ~49810) BoNT/A wurden identifiziert (Figur 4). Es wurde gezeigt, dass entweder Kälteschock oder kontinuierliche niedrige Temperatur während der Fermentation zu einem verringerten Gehalt an C-terminaler verkürzter leichter Kette (LC) und einem erhöhten Gehalt an leichter Kette voller Länge in den hergestellten BoNT/A-Proben führte.

6.4. Beispiel 4: SEC-HPLC-Analyse von Proben aus Niedrigtemperatur- oder Kälteschockfermentationen

[0162] Die Proben wurden bei Raumtemperatur für mindestens 20 Minuten äquilibriert. 100 µl jeder Probe wurden zur direkten Injektion in ein 0,3 ml Polypropylen-HPLC-Fläschchen überführt. Die SEC-HPLC-Analyse wurde mit einem Waters® HPLC-Gerät mit UV-Detektor unter Einhaltung der in Tabelle 9 angegebenen Zustände durchgeführt.

Tabelle 9. SEC-HPLC Experimentelle Zustände**[0163]**

Säule	Sepax SRT SEC-500, 7,8x300 mm, 5-Mikron (PN 215500-7830)
Säulentemperatur	30 °C
Mobile Phase	40 mM Natriumphosphat + 200 mM Ammoniumsulfat, pH 6,5
Flussrate	0,8 ml/min
UV-Erkennung	220 nm
Injektionsvolumen	Injektionsvolumen auf Basis der UV-Konzentration anpassen, um 20 µg zu injizieren
Temperatur des automatischen Probennehmers	5 °C
Laufzeit	20 Minuten

[0164] Die Chromatographie-Daten wurden mit der Waters® Empower 3 Software verarbeitet. Die Arten mit höherem Molekulargewicht eluieren früher als die Arten mit niedrigerem Gewicht. Alle Spitzen, die in der Pufferanalyse nicht vorhanden waren, wurden integriert. Über den relativen Bereich jeder Spitze wurde berichtet.

[0165] Die SEC-Daten (%Area) bei UV220 nm sind unten in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10

		HCP (<100KDa)
Baseline-Kontrolle der Fermentation	AEC	15,2
20 °C Kälteschock		0,0
15 °C Kälteschock		1,5
25 °C Fermentation		31,3
Baseline-Kontrolle der Fermentation	CEC	0,0
20 °C Kälteschock		0,0
15 °C Kälteschock		0,0
25 °C Fermentation		3,6

[0166] Tabelle 10 zeigt, dass der prozentuale Anteil des Wirtszellproteins (HCP) sowohl bei 20° C als auch bei 15° C unter dem Kälteschock im Vergleich zum Zustand der Baseline-Kontrolle der Fermentation nach der Reinigung mit einer Anionenaustauschersäule (AEC) reduziert war, während der Zustand der kontinuierlichen kalten Fermentation bei 25° C einen höheren prozentualen Anteil an HCP im Vergleich zur Baseline-Steuerung aufwies. Nach dem zweisäuligen Reinigungsprozess (d. h. AEC gefolgt von CEC) ist HCP im Zustand der kontinuierlichen kalten Fermentation bei 25° C höher als 3 %, während es sowohl im Zustand der Baseline-Kontrolle als auch im Zustand des Kälteschocks nicht nachweisbar ist.

6.5. Beispiel 5: Nicht-APF (Schantz) Prozess zum Ermitteln eines Botulinum-Toxins

[0167] Dieses Beispiel stellt den Prozess nach dem Stand der Technik von Schantz zur Ermittlung von Botulinum-Neurotoxin dar. Der Prozess ist ein Nicht-APF-Prozess, bei dem Medien und Reagenzien aus Lebewesen verwendet werden (d. h. Rinderblutagarplatten für die Kultivierung, Kasein im Fermentationsmedium und Verwendung von Rnase- und Dnase-Enzymen für die Reinigung von Botulinum-Neurotoxin). Der Prozess von Schantz weist etwa 16 bis 20 Hauptschritte auf, für die Arbeit im Produktionsmaßstab wird ein 115 L Fermenter und dauert etwa 3 Wochen. Der Prozess von Schantz beginnt mit dem Auftauen eines Fläschchens mit nicht-APF Clostridium botulinum Master Cell Bank (MCB) auf Raumtemperatur, gefolgt von vier Kultivierungsschritten. Um zunächst Kolonien mit einer geeigneten Morphologie zu selektieren, werden Aliquots aus dem aufgetauten MCB-Fläschchen auf vorreduzierte Columbia-Blutagar (CBA)-Platten gestreut und anaerob für 30-48 Stunden bei 34 °C ± 1 °C inkubiert. Anschließend werden ausgewählte Kolonien in 9 ml Röhrchen mit

einem Casein-Wachstumsmedium für 6-12 Stunden bei 34 °C beimpft. Der Inhalt des 9 ml Röhrchens mit dem schnellsten Wachstum und der höchsten Dichte (Wachstumsselektionsschritt) wird dann ferner durch zwei anaerobe Step-up-Inkubationen (dritter und vierter Kultivierungsschritt) kultiviert. Dabei handelt es sich um eine 12-30-stündige Inkubation bei 34 °C in einer 600 ml bis 1 l Saatgutkultivierungsflasche, gefolgt von einer Kultivierung in einem 15 l bis 25 l Fermenter, der ein Casein-Wachstumsmedium enthält, für 6-16 Stunden bei 35 °C. Diese beiden Step-up-Kulturen werden in einem Nährmedium durchgeführt, das 2 % Caseinhydrolysat (ein Casein [Milchprotein]-Verdau), 1 % Hefeextrakt und 1 % Glukose (Dextrose) in Wasser bei einem pH-Wert von 7,3 enthält.

[0168] Auf die Step-up-Kulturen folgt eine weitere Inkubation für 60-96 Stunden bei 35 °C in einem Produktionsfermenter im kommerziellen Maßstab (d. h., 115 l) in einem kaseinhaltigen Medium unter einer kontrollierten anaeroben Atmosphäre. Das Wachstum des Bakteriums ist in der Regel nach 24 bis 36 Stunden abgeschlossen, und während der Fermentation, die etwa 65 bis etwa 72 Stunden dauert, werden die meisten Zellen lysiert und setzen Botulinum-Neurotoxin frei. Es wird angenommen, dass das Toxin durch die Zellyse freigesetzt und durch die in den Medien vorhandenen Proteasen aktiviert wird. Ein Filtrat des Kulturmediums kann unter Verwendung eines Einsichts-Tiefenfilters zubereitet werden, um grobe Verunreinigungen (d. h. ganze und zerbrochene Zellen) zu entfernen und so eine klare Lösung zu ermitteln, die als geklärte Kultur bezeichnet wird. Die Gewinnung von Botulinum-Neurotoxin aus der geklärten Kultur erfolgt durch Absenken des pH-Werts der geklärten Kultur auf einen pH-Wert von 3,5 mit 3M Schwefelsäure, um das Roh toxin bei 20 °C auszufällen (Säuerungsfällung). Das rohe Botulinum-Neurotoxin wird dann durch Ultrafiltration (Mikrofiltration) (MF oder UF genannt) und anschließende Diafiltration (DF) aufkonzentriert (um eine Volumenreduzierung zu erreichen). A 0,1 µm-Filter wird für den Mikrofiltrationsschritt verwendet.

[0169] Das geerntete unverarbeitete oder rohe Toxin wird dann in ein Verdauungsgefäß überführt und durch Zugabe des Proteaseinhibitors Benzamidinhydrochlorid stabilisiert. Dnase und Rnase werden hinzugefügt, um Nukleinsäuren zu verdauen (zu hydrolysieren). Das Toxin wird dann mit pH 6,0 Phosphatpuffer extrahiert und die Zelltrümmer durch Klärung entfernt. Hydrolysierte Nukleinsäuren und Verunreinigungen mit niedrigem Molekulargewicht werden dann durch weitere UF- und DF-Schritte entfernt. Anschließend werden drei aufeinanderfolgende Niederschläge (kalter Ethanol-, Salzsäure- und Ammoniumsulfat-Niederschläge) durchgeführt. Der gereinigte Botulinum Neurotoxin-Komplex (Bulk-Toxin) wird als Suspension in einem Natriumphosphat/Ammoniumsulfat-Puffer bei 2 °C bis 8 °C gespeichert.

[0170] Die Fertigstellung dieses Beispiels 5 Schantz (nicht-APF) Prozesses, einschließlich der Ernte- und Reinigungsschritte, dauert etwa zwei bis drei Wochen. Das resultierende Bulk-Botulinum-Neurotoxin ist eine hochwertige Suspension des 900 kDa Botulinumtoxin Typ A Komplexes aus dem Hall A Stamm von Clostridium botulinum mit einer spezifischen Potenz von $\geq 2 \times 10^7$ U/mg, einem A_{260}/A_{278} von weniger als 0,6 und ein ausgeprägtes Bandenmuster bei der Gelelektrophorese aufweist und zur Verwendung für die Verbindung einer pharmazeutischen Botulinumtoxin-Zusammensetzung geeignet ist.

[0171] Das Neurotoxin Botulinum kann auch durch einen nicht-chromatographischen APF-Prozess ermittelt werden, wie in dem Satz 7 des US-Patents 7,452,697 beschrieben, wobei der gesamte nicht-chromatographische APF-Prozess (vom Beginn der Kultivierung bis zum Ende aller Reinigungs- und Verarbeitungsschritte) etwa zwei bis drei Wochen dauert. Alternativ kann Botulinum Neurotoxin auch durch einen APF, chromatographischen Prozess ermittelt werden, wie in dem Satz 16 des US-Patents 7,452,697 dargelegt, wobei der APF, chromatographische Prozess (vom Beginn der Kultivierung bis zum Ende aller Reinigungs- und Verarbeitungsschritte) eine Woche oder länger dauert.

6.6. Beispiel 6: APF, Säule Chromatographische Systeme und Prozesse zur Ermittlung eines Botulinum-Neurotoxins

[0172] Schnelle APF, auf Anionen-Kationen-Chromatographie basierende Systeme und Prozesse werden entwickelt, um eine hohe Ausbeute und hohe Reinheit von Botulinum-Neurotoxin zu ermitteln. Der Prozess dieses Beispiels 6 zu Produktionszwecken (d. h. zur Ermittlung von Grammengen des endgültigen Botulinum Neurotoxins) verwendet einen 20 l Fermentationsgefäß und benötigt nur 4-7 Tage, vorzugsweise etwa 4 bis etwa 6 Tage, um alle Schritte des Prozesses vom Beginn der Kultivierung bis zum Abschluss der endgültigen Reinigung und Lagerung des Toxins abzuschließen. Die Geräte, die in den hierin offenbaren Systemen verwendet werden, werden im Folgenden erläutert. Chromatographische Medienprozesse werden entwickelt und sind hierin dargelegt. Diese Prozesse mit chromatographischen Medien verwenden eine, zwei oder drei der folgenden Methoden: hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), Anionenaustauschchromatographie, Kationenaustauschchromatographie. Die entwickelten Prozesse für chromatographische Medien schließen insbesondere ein: (1) einen Prozess mit einem Medium, der HIC verwendet; (2) einen Prozess mit zwei Medien, bei dem HIC und anschließend Anionenaustauschchromatographie verwendet wird; (3) einen Prozess mit zwei Medien, bei dem HIC und anschließend Kationenaustauschchromatographie verwendet wird; (4) einen Prozess mit drei Medien, bei dem HIC, gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie zum Einsatz kommt; (5) einen Prozess mit drei Medien, bei dem HIC, gefolgt von Kationenaustauschchromatographie und Anionenaustauschchromatographie zum Einsatz kommt; (6) einen Prozess mit einem Medium, der Anionenaustauschchromatographie verwendet; (7) einen Prozess mit zwei Medien, bei dem Anionenaustauschchromatographie gefolgt von HIC verwendet wird; (8) einen Prozess mit zwei Medien, bei dem Anionenaustauschchromatographie gefolgt von Kationenaustauschchromatographie verwendet wird; (9) einen Prozess mit drei Medien, bei dem Anionenaustauschchromatographie, gefolgt von HIC und Kationenaustauschchromatographie zum Einsatz kommt; (10) einen Prozess mit drei Medien, bei dem Anionenaustausch-

chromatographie, gefolgt von Kationenaustauschchromatographie und HIC zum Einsatz kommt; (11) einen einmedialen Prozess, der Kationenaustauschchromatographie verwendet; (12) einen Prozess mit zwei Medien, bei dem Kationenaustauschchromatographie gefolgt von HIC verwendet wird; (13) einen Prozess mit zwei Medien, bei dem Kationenaustauschchromatographie gefolgt von Anionenaustauschchromatographie verwendet wird; (14) einen Prozess mit drei Medien, bei dem Kationenaustauschchromatographie, gefolgt von HIC und Anionenaustauschchromatographie zum Einsatz kommt; und (15) einen Drei-Medien-Prozess, der Kationenaustausch-Chromatographie gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und HIC verwendet. Das HIC entfernt Verunreinigungen wie eine 49 kDa-Verunreinigung (die sich als Wirtszell-Glukosephosphat-Isomerase herausstellt, wie unten beschrieben).

6.6.1. Vorbereitung der Arbeitszellbank

[0173] Es wird eine neue Clostridium botulinum Zellbank entwickelt (zur Verwendung zur Einleitung des Kultivierungsschritts), ohne dass Columbia-Blutagarplatten verwendet werden, und die die Notwendigkeit einer Kolonieauswahl vor der Kultivierung beseitigt und auch die Notwendigkeit zur Durchführung des Shantz-Prozess-Schrittes der Kultivierung in Röhren und mehrerer Saatgut-(Kultivierungs-)Schritte eliminiert.

[0174] Zu diesem Zweck wird eine zuvor erstellte Schantz Master-Zellbank (MCB) verwendet, um eine APF-Forschungszellbank (RCB) zu erstellen, aus der eine neue APF Master-Zellbank (MCB) und eine anschließende Arbeitszellbank (WCB) erzeugt wird. Eine Forschungszellbank (RCB) wird aus einer Kolonie der Schantz (NAPF) MCB hergestellt. Um das vom Lebewesen stammende Protein aus dem MCB-Fläschchen zu entfernen, werden die Zellen zweimal in APF-Medium gewaschen, das 2 % w/v SPTII (Sojapepton Typ II), 1 % w/v Hefeextrakt und 1 % w/v Glukose enthält. Die Zellen werden auf APF-Medium unter strengen anaeroben Bedingungen mit Hilfe einer anaeroben Kammer des Modular Atmosphere Controlled System (MACS) plattiert. Eine isolierte Kolonie wird ferner expandiert und in APF-Medium mit etwa 20 % Glycerin unter -135 °C gespeichert.

[0175] Die APF-MCB wird unter GMP-Bedingungen hergestellt, indem die RCB in sauerstofffreiem APF-Medium (200 ml, reduziert für mindestens 12 Stunden in einer anaeroben Kammer) expandiert und in einer anaeroben MACS-Kammer bei 34,5 °C ± 1 °C (gerührt bei 60 U/min) gezüchtet wird, bis die OD₅₄₀ der Kultur 2,5 ± 1,0 AU erreicht. Der resultierenden Kultur wird steriles Glycerin bis zu einer Endkonzentration von etwa 20 % hinzugefügt, woraufhin die Mischung in Kryoflaschen mit 1 ml/Fläschchen (APF-MCB-Fläschchen) überführt wird. Die Fläschchen werden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dann unter -135 °C gelagert. Ein APF-WCB wird unter GMP-Bedingungen hergestellt, indem es wie oben beschrieben erweitert wird. Die resultierenden APF-Zellbanken werden auf Identität, Reinheit, Lebensfähigkeit und genetische Stabilität charakterisiert.

6.6.2. Vorgelagerte Schritte (Kultivierung und Fermentation)

[0176] Die Prozesse in Beispiel 6 weisen zwei allgemeine Stufen auf: eine vorgelagerte Stufe und eine nachgelagerte Stufe. Die vorgelagerte Stufe schließt die Erweiterung einer Ausgangszelllinie (Wachstum und Vermehrung von Clostridium botulinum-Bakterien in einem im Wesentlichen APF-Kulturmedium), die Fermentation und die Ernte (Entfernung von Zelltrümmern) ein, um eine geklärte, geerntete Kultur bereitzustellen, die dann konzentriert und verdünnt wird. In diesem Beispiel können die Schritte eines beispielhaften dreisäuligen Prozesses die Kultivierung, die Fermentation, die Erntefiltration, die Konzentration, die HIC, die Einfangchromatographie (Anionenchromatographie), die Polierchromatographie (Kationenchromatographie), den Pufferaustausch, die Reduzierung der Keimbelastung und die Füllung der Fläschchen einschließen.

[0177] Die vorgelagerte Stufe schließt die Verwendung eines Kulturmediums in einer 1 L-Flasche, die 400 ml reduziertes (in einer anaeroben Kammer) Saatgut-APF-Kulturmedium enthält (2 % w/v SPTII, 1 % w/v Hefeextrakt, (eingestellt auf pH 7,3 mit 1 N Natriumhydroxid und/oder 1 N Salzsäure vor dem Autoklavieren)) 1 % w/v sterile Glukose, hinzugefügt nach dem Autoklavieren der Kulturmedien). Das Kulturmedium (Saatgut) wird mit 400 µl einer aufgetauten Clostridium botulinum WCB. Die Inkubation/Kultivierung erfolgt bei 34,5 °C ± 1,0 °C mit 150 U/min Bewegung in einer anaeroben Kammer.

[0178] Wenn die optische Dichte des Kulturmediums bei 540 nm 1,8 ± 1,0 AU, wird der gesamte Inhalt der 11 Flasche (etwa 400 ml) wird in einen 20 l Produktionsfermenter überführt, der APF-Fermentationsmedium enthält, das mit 1 N Natriumhydroxid und/oder 1 N Salzsäure nach der Dampfsterilisation auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt wurde, sowie ein Fermentationsmedium, das aus 3,25 % w/v SPTII, 1,2 % w/v Hefeextrakt, 1,5 % w/v steriler Glukose (nach der Sterilisation hinzugefügt; Sterilisation, z. B. bei etwa 122 °C für 0,5 Stunden). Die Temperatur und das Rührwerk werden bei 35 °C ± 1 °C bzw. 70 U/min gesteuert. Die Stickstoffüberlagerung wird auf 12 slpm und der Druck im Kopfraum auf 5 psig eingestellt, um eine anaerobe Umgebung für das Zellwachstum zu erhalten. Der pH-Wert der Fermentation und die Zelldichte werden mit pH- bzw. Online-Trübungssonden überwacht. Die drei Phasen der Produktionsfermentation schließen die exponentielle Wachstumsphase, die stationäre Phase und die Autolyse ein. Die zelluläre Autolyse, bei der der aktive BoNT/A-Komplex in das Kulturmedium freigesetzt wird, wird durchgängig zwischen 35 Stunden und dem Ende der Fermentation beobachtet. Am Ende der Fermentation wird die Kultur zur Ernte auf 25 °C abgekühlt.

[0179] Sobald das Fermentationsmedium auf 25 °C abgekühlt ist, werden die Zelltrümmer von dem Botulinum Neurotoxin Typ A Komplex enthaltenden Lysat durch Tiefenfiltration abgetrennt, zunächst durch einen 5 - 0,9 µm nominalen Retentionsgradienten-Vorfilter, um Zelltrümmer zu entfernen, und dann durch einen positiv geladenen 0,8 - 0,2 µm nominalen

Retentionsgradienten, um DNA zu entfernen (Entfernung von bis zu etwa 80 %). Beide Filter werden zusammen mit 20 L Wasser für Injektionszwecke (WFI) vor der Verwendung gespült. Ein Minimum von 15 l des Filtrats wird für den weiteren Prozess benötigt. Überschüssiges Material wird nach Abschluss der prozessbegleitenden Probenahme dekontaminiert. Das Filtrat wird bei 4 °C gespeichert, wenn es nicht sofort durch Ultrafiltration verarbeitet wird.

[0180] In einer Biosicherheitskabine (BSC) wird das Filtrat aus dem Ernteschritt von 15 L auf $5 \pm 0,5$ L aufkonzentriert. Dazu wird eine Tangentialflussfiltrationsmembran (TFF) aus Hohlfasern von GE Healthcare verwendet. Das ultrafiltrierte Material wird dann mit 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5 auf ein Endvolumen von 20 L verdünnt. L. Dieses Material wird mit einer Chromatographiesäule, zwei Chromatographiesäulen oder drei Chromatographiesäulen gereinigt (siehe Abschnitt „Nachgelagerte Schritte“). Das verdünnte, ultrafiltrierte Erntematerial wird bei 4 °C gespeichert, wenn es nicht sofort durch Aufreinigung verarbeitet wird.

[0181] Im Schantz-Prozess wird der Kulturschritt beendet und der Schritt der Fermentation beginnt basierend auf Zeit und visueller Beobachtung des Kulturwachstums. Im Gegensatz dazu basiert in den Beispiel 6 Prozessen die Bestimmung des Zeitpunkts für die Beendigung des Kultivierungsschritts auf der Analyse der optischen Dichte der Kulturflüssigkeit, die sicherstellt, dass sich die Kultur zum Zeitpunkt des Beginns des Fermentationsschritts in der logarithmischen Wachstumsphase befindet, und die eine Verkürzung der Dauer des Kultivierungsschritts auf etwa 8 Stunden bis etwa 14 Stunden ermöglicht. Der durch den OD-Parameter beendete Kultivierungsschritt maximiert die Gesundheit der kultivierten Zellen und fördert robustes und reichlich vorhandenes Botulinum-Toxin aus dem Fermentationsschritt. Die durchschnittliche optische Dichte (bei 540 nm) des Kulturmediums bei Abschluss der Kultivierung beträgt 1,8 AU. Die durchschnittliche Dauer der Fermentation beträgt 72 Stunden und die durchschnittliche Endtrübung (A_{690}) des Fermentationsmediums am Ende der Fermentation beträgt 0,15 AU. Die durchschnittliche Menge an vorhandenem botulinum Toxin Typ A Komplex (bestimmt durch ELISA) in dem 20 l Fermentationsmedium (ganze Brühe) am Ende des Fermentationsschritts für beträgt etwa 64 µg Botulinumtoxin Typ A Komplex/ml Fermentationsmedium.

[0182] Der Ernteschritt verwendet Tiefenfiltration, um Zelltrümmer und Nukleinsäuren zu entfernen, gefolgt von Ultrafiltration und Verdünnung, um das Fermentationsmedium für den nächsten Schritt im Prozess vorzubereiten. Dieses Ernten/Klären der Zelltrümmer unterscheidet sich grundlegend vom Schantz-Ernteprozess, der den Niederschlag durch Ansäuerung und anschließende Mikrofiltration und Diafiltration verwendet, um die Puffer zu konzentrieren und auszutauschen, um sie für die weitere Verarbeitung vorzubereiten.

6.6.3. Nachgelagerte Schritte (Reinigung)

[0183] Nachgelagerte Schritte schließen die Reinigung durch eine Chromatographiesäule, zwei Chromatographiesäulen oder drei Chromatographiesäulen ein (beispielsweise das Einfangen des Botulinum-Neurotoxins auf einer Anionenaustauschersäule, die Elution von der Säule und die weitere Abtrennung von Verunreinigungen durch Polieren auf einer Kationenaustauschersäule und vorzugsweise (beim Drei-Säulen-Prozess) die Passage des Eluenten, der das gewünschte Botulinum-Neurotoxin enthält, durch eine dritte Säule, vorzugsweise eine hydrophobe Interaktionssäule (z. B. Chromatographie), vor (vorzugsweise) oder nach dem zweisäuligen Prozess), gefolgt von der Konzentration und dem Pufferaustausch unter Verwendung der Tangentialflussfiltration (TFF) und der Reduzierung der biologischen Belastung (z. B. durch weitere Filtration unter Verwendung eines 0,2 µm-Filters) zu einem endgültigen Botulinum Neurotoxin Typ A-Komplex, der für die Kühlagerung, vorzugsweise das Einfrieren, und die eventuelle Verbindung zu einem Botulinum Neurotoxin Typ A-Komplex als pharmazeutische Zusammensetzung optimiert ist. Die Sequenz der Chromatographie- und Filtrationsstufen dient dazu, produkt- und prozessbedingte Verunreinigungen zu entfernen, potentielle zufällige Mittel zu entfernen und die Botulinum-Neurotoxin Typ A Komplexkonzentration und Puffermatrix des endgültigen Botulinum-Neurotoxin Typ A zu kontrollieren, um einen stabileren Medikamentenwirkstoff bereitzustellen.

[0184] Im Folgenden werden einige Ausführungsformen beispielhafter zweisäuliger und dreisäuliger nachgelagerter Prozesse beschrieben. Es sind weitere Ausführungsformen denkbar, bei denen die Reihenfolge der Säulen geändert wird und die Verfahren entsprechend angepasst werden, wie es nach Meinung und Einschätzung eines Fachmanns angemessen ist, die aber ansonsten den unten beschriebenen Ausführungsformen ähneln oder hauptsächlich mit ihnen identisch sind. Ferner sind weitere Ausführungsformen von nachgelagerten Prozessen mit einer Säule denkbar, bei denen nur eine Chromatographiesäule verwendet wird, die aber ansonsten den unten beschriebenen Ausführungsformen ähneln oder hauptsächlich mit ihnen identisch sind. Insbesondere wird in diesem Beispiel ein nachgelagerter Prozess mit drei Säulen betrachtet, der (1) die Verwendung von HIC gefolgt von Anionenaustauschchromatographie gefolgt von Kationenaustauschchromatographie, (2) die Verwendung von HIC gefolgt von Kationenaustauschchromatographie gefolgt von Anionenaustauschchromatographie, (3) die Verwendung von Anionenaustauschchromatographie gefolgt von HIC gefolgt von Kationenaustauschchromatographie umfasst, (4) die Verwendung von Anionenaustauschchromatographie gefolgt von Kationenaustauschchromatographie gefolgt von HIC, (5) die Verwendung von Kationenaustauschchromatographie gefolgt von HIC gefolgt von Anionenaustauschchromatographie, oder (6) die Verwendung von Kationenaustauschchromatographie gefolgt von Anionenaustauschchromatographie gefolgt von HIC. In diesem Beispiel ist auch ein nachgelagerter Prozess mit zwei Säulen denkbar, der (1) die Verwendung von HIC gefolgt von Anionenaustauschchromatographie, (2) die Verwendung von HIC gefolgt von Kationenaustauschchromatographie, (3) die Verwendung von Anionenaustauschchromatographie gefolgt von HIC umfasst, (4) die Verwendung von Anionenaustauschchromatographie gefolgt von Kationenaustauschchromatographie, (5) die Verwendung von Kationenaustauschchromatographie gefolgt von HIC, oder (6) die

Verwendung von Kationenaustauschchromatographie gefolgt von Anionenaustauschchromatographie. In diesem Beispiel ist auch ein nachgelagerter Prozess mit nur einer Säule denkbar, bei dem HIC, Anionenaustauschchromatographie oder Kationenaustauschchromatographie verwendet werden.

[0185] Eine erste detaillierte Ausführungsform eines beispielhaften dreisäuligen nachgelagerten Prozesses wird wie folgt durchgeführt. Geklärtes (verdünntes) ultrafiltriertes Material (20 L, wie oben beschrieben) wird durch ein POROS® 50HQ Anionenaustauscher-Chromatographieharz hindurchgeleitet, das eingefangene Botulinum-Neurotoxin wird von der Anionenaustauschersäule eluiert und dann durch ein POROS® 20HS Kationenaustauscher-Chromatographieharz geleitet, dessen Eluent durch ein Phenyl Sepharose HP Chromatographieharz hindurchgeht. Der Eluent aus der HIC-Säule wird gegenständig einer 100 kDa Tangentialflussfiltration unterzogen, gefolgt von einer 0,2 µm Filtration. Der resultierende Botulinum-Neurotoxin Typ A Komplex wird zur Lagerung eingefroren.

[0186] In dieser ersten Ausführungsform des beispielhaften dreisäuligen nachgelagerten Prozesses wird im ersten Chromatographieschritt des nachgelagerten Prozesses ein POROS® 50HQ Anionenaustausch-Chromatographieharz verwendet, das in eine Säule mit einem Innendurchmesser von etwa 8 cm und einer Säulenhöhe von etwa 15 cm gepackt ist. Der gesamte Vorgang der POROS® 50HQ Säule wird bei Umgebungstemperatur durchgeführt und der Fluss erfolgt in Abwärtsrichtung. Der Botulinum-Neurotoxin Typ A Komplex wird von der Anionensäule eluiert, indem ein pH-Schrittwechsel verwendet wird, bei dem die negativer geladenen Komponenten wie Nukleinsäuren (z. B. DNAs und RNAs) und andere Wirtszellproteine an die Anionenaustauschersäule gebunden bleiben.

[0187] Einzelheiten des Anionenaustauschschritts sind: Verwendung der POROS® 50HQ-Säule unter Verwendung von 0,1 N Natriumhydroxid für eine minimale Kontaktzeit von 30 Minuten (mindestens etwa 3 Säulenvolumen, bei 230 cm/Stunde). Die Säule wird dann mit einem 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 Puffer äquilibriert (mindestens 5 Säulenvolumen). Anschließend wird das geklärte, ultrafiltrierte und verdünnte Material (d. h. das aufbereitete Lysat der APF-Fermentation) bei 230 cm/Stunde auf die POROS® 50HQ Anionenaustauschersäule geladen, gefolgt von einem Waschen mit mindestens etwa 20 Säulenvolumina von 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 bei 230 cm/Stunde, bis die Absorption bei 280 nm des Säulenausflusses auf 0, 10 AU, gefolgt von der Elution mit 50 mM Natriumacetat, pH 4,8 bei 230 cm/Stunde. Der Produkt-pool wird gesammelt, wenn die Absorption bei 280 nm (A_{280}) auf mindestens etwa 0,15 AU und durch das Maximum des Peaks bis auf etwa 0,2 AU an der hinteren Kante, in einen Behälter mit 1 Säulenvolumen 50 mM Natriumacetat, pH 4,8. Dieser Elutionspool wird bei etwa 2 °C bis etwa 8 °C für bis zu 48 Stunden gespeichert.

[0188] Der zweite Chromatographieschritt in dieser ersten Ausführungsform des beispielhaften dreisäuligen nachgelagerten Prozesses dieses Beispiels 6 verwendet ein POROS® 20HS Kationenaustausch-Chromatographieharz, das in eine Säule mit einem Innendurchmesser von 8 cm und einer Säulenhöhe von 5 cm gepackt ist. Der gesamte Vorgang der POROS® 20HS Säule wird bei Umgebungstemperatur durchgeführt und der Fluss erfolgt in Abwärtsrichtung. Der Botulinum Neurotoxin Typ A Komplex verbindet sich mit dem POROS® 20HS Säulenharz. Der Botulinum-Neurotoxin Typ A Komplex wird dann unter Verwendung eines Salzschriftwechsels von der Säule eluiert. Die produktbezogenen Verunreinigungen werden mit dem Waschpuffer und der Dekontaminationslösung eluiert.

[0189] Einzelheiten des Kationenaustauschschritts sind: Verwendung der POROS® 20HS-Säule mit 0,1 N Natriumhydroxidlösung für eine minimale Kontaktzeit von 30 Minuten (mindestens etwa 3 Säulenvolumen, bei 230 cm/Stunde). Die Säule wird dann mit einem 50 mM Natriumacetat, pH 4,8 Puffer äquilibriert (mindestens etwa 5 Säulenvolumen). Anschließend wird der POROS® 50HQ Produkt-pool (gesammelt wie oben beschrieben, frisch oder aus der Kühlung) auf die POROS® 20HS Säule geladen. Die Säule wird dann mit einem 50 mM Natriumacetat, pH 4,8 Puffer gewaschen (mindestens etwa 3 Säulenvolumina) und dann erneut mit einem 50 mM Natriumacetat, 150 mM Natriumchlorid, pH 4,8 Puffer gewaschen. Der botulinum Neurotoxin Typ A Komplex wird von der POROS® 20HS Säule mit einem 50 mM Natriumacetat, 250 mM Natriumchlorid, pH 4,8 Puffer bei 200 mL/min, wird das Eluat in einen Bioprozess-Sammelbeutel (mit 1 Säulenvolumen von 50 mM $\text{NaH}_3\text{C}_2\text{O}_2$, pH 4,8) abgeleitet, wenn der A_{280} auf etwa $\geq 0,1$ AU durch das Maximum des Peaks, bis das A_{280} der hinteren Kante der Elutionsspitze auf einen Wert der hinteren Kante von \leq abnimmt 0,1 AU. Der POROS® 20HS Produkt-pool wird im Auffangbeutel bei Raumtemperatur bis zu etwa 6 Stunden gespeichert.

[0190] In dieser ersten Ausführungsform des beispielhaften dreisäuligen Chromatographie-Medien-Prozesses dieses Beispiels 6 wird der Eluent von der zweiten (Kationenaustausch-)Säule durch eine HIC-Säule hindurchgeleitet. Bei der verwendeten HIC-Säule handelt es sich um ein Phenyl-Sepharose-HP-Harz für die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie, das in eine Säule mit einem Innendurchmesser von etwa 8 cm und einer Säulenhöhe von etwa 5 cm gepackt ist. Der gesamte Vorgang der Phenyl Sepharose HP Säule wird bei Umgebungstemperatur durchgeführt und der Fluss erfolgt in Abwärtsrichtung. Der Botulinum-Neurotoxin Typ A Komplex wird von der Säule eluiert, indem ein abnehmender Salzstufenwechsel verwendet wird. Die Verunreinigungen werden während der Last und mit dem Waschpuffer und der Dekontaminationslösung eluiert.

[0191] Die Einzelheiten der hydrophoben Interaktionschromatographie sind:

eine Phenyl-Sepharose-HP-Säule wird anfänglich mit einer 0,1 N Natriumhydroxidlösung für eine minimale Kontaktzeit von 30 Minuten (mit mindestens etwa 3 Säulenvolumina einer 0,1 N Natriumhydroxidlösung bei 200 cm/Stunde). Die Säule wird dann mit mindestens etwa 5 Säulenvolumina von 50 mM Natriumacetat, 0,4 M Ammoniumsulfat, pH

4,8 Puffer. Anschließend wird der POROS® 20HS (Kationenaustauschersäule) Produktpool (von oben) mit 1:1 einem 50 mM Natriumacetat, 0,8 M Ammoniumsulfat, pH 4,8 Puffer kombiniert und auf die Phenyl Sepharose HP Säule geladen. Die Säule wird zunächst mit mindestens etwa 3 Säulenvolumina eines 50 mM Natriumacetat, 0,4 M Ammoniumsulfat, pH 4,8 Puffer, und dann mit einem 50 mM Natriumphosphat, 0,4 M Ammoniumsulfat, pH 6,5 Puffer. Der Botulinum Neurotoxin Typ A Komplex wird von der Säule mit einem 10 mM Natriumphosphat, 0,14 M Ammoniumsulfat, pH 6,5 Puffer. Das Eluat wird in einen Bioprozess-Sammelbeutel umgeleitet, wenn der A_{280} auf \geq steigt. 0,05 AU. Das Eluat wird gesammelt, bis das A_{280} der hinteren Kante der Elutionsspitze auf einen Wert von \leq abnimmt. 0,05 AU SINKT. Der Phenyl Sepharose HP Produktpool wird im Sammelbeutel bei Raumtemperatur bis zu 6 Stunden gespeichert.

[0192] Ein System für tangentielle Flussfiltration wird verwendet, um den Produktpool des Phenyl Sepharose HP-Chromatographieschritts zu konzentrieren und in den Puffer für die Formulierung des Medikamentenwirkstoffs zu diafiltrieren. Für die Konzentrations- und Diafiltrationsschritte werden Pall® Filtron Minimate-Kassetten mit einer Cut-Off-Membran mit einem Molekulargewicht von 100 kDa verwendet. Das formulierte Material wird dann durch einen Pall Mini Kleenpak® 0,2 µm Filter hindurchgeleitet, um die potentielle Keimbelastung zu reduzieren. Der UF/DF-Schritt konzentriert den Phenyl-Sepharose-HP-Produktpool (Eluent der HIC-Säule) auf eine BoNT/A-Komplexkonzentration von 0,7 g/L und diafiltriert das konzentrierte Material mit einem 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5 Puffer.

[0193] Die Einzelheiten des verwendeten Ultrafiltrations-/Diafiltrationsprozesses sind wie folgt. Die UF/DF-Einheit und die Pall 100 kDa Polyethersulfon-Membran werden anfänglich mit einem Minimum von 5 L Wasser für Injektionszwecke (WFI) gespült, um die Verpackungslösung zu entfernen, und mit mindestens 200 ml einer 1 N Natriumhydroxidlösung unter Rezirkulationsbedingungen für mindestens 10 Minuten, vorzugsweise mindestens 30 Minuten, desinfiziert, um die UF/DF-Einheit zu desinfizieren. Anschließend werden die Membran und das UF/DF-System mit ausreichenden Volumina des 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5 Formulierungspuffers äquilibriert, bis der pH-Wert von Permeat und Retentat 6,5 beträgt. Danach wird der Phenyl Sepharose HP Produktpool in die Minimate® Tangentialflussfiltrationskassette geladen und das HIC-Eluat auf 0,7 g/l konzentriert. Nach dem Konzentrationsschritt wird der Retentat-Pool gegen ein Minimum von 5 Diafiltrationsvolumina des Puffers für die Formulierung des Medikaments (10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5) bei einem Transmembrandruck von 7,5 psig diafiltriert. Der Permeatauslass wird dann geschlossen und das UF/DF-System für mindestens 2 Minuten betrieben und das System mit 50 ml 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5 Formulierungspuffer gespült. Nach der Spülung wird die Konzentration des BoNT/A-Komplexes im Retentat-Pool durch Messung des Offline- A_{278} bestimmt. Basierend auf der Ablesung von A_{278} wird die Konzentration des Retentat-Pools auf 0,5 g/l mit 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5 Puffer eingestellt. Der konzentrationsangepasste Retentatpool wird dann durch einen Pall Mini Kleenpak™ 0,2 µm-Filter gefiltert, um eine mögliche Keimbelastung zu reduzieren. Der gefilterte, konzentrationsangepasste Retentat-Pool wird in einem Sammelbeutel bei 2 °C - 8 °C für bis zu 2 Tage gespeichert.

[0194] Der endgültig ermittelte gereinigte Botulinum Neurotoxin Typ A Komplex wird in 1 ml Nunc® Kryofläschchen zu 700 µL pro Fläschchen gefüllt und gefroren gespeichert. Der Vorgang der Füllung wird in einer Biosicherheitskabine der Klasse 100 bei Umgebungstemperatur durchgeführt.

[0195] Der nachgelagerte Prozess (einschließlich der Verwendung von 1 oder 2 oder 3 Chromatographiesäulen) ist in nur 1 bis 3 Tagen abgeschlossen und der ermittelte botulinum Neurotoxin Typ A Komplex wird in einem Kaliumcitrat, pH 6,5 Puffer in einer Konzentration von 0,5 g/L als Lösung gefroren gespeichert. Im Vergleich dazu verwendet der nachgelagerte Prozess (Toxinreinigung) von Schantz mehrere Filtrations-, Fällungs-, Extraktions- und Zentrifugationsschritte, um den Botulinum-Neurotoxin Typ A-Komplex zu reinigen, und benötigt allein für die nachgelagerten Schritte 1-2 Wochen. Das resultierende Medikament (zurückgewonnenes Botulinum-Neurotoxin) wird als Ammoniumsulfat-Suspension in einer Konzentration von etwa 2,7 g/L gekühlt gespeichert. Die Verwendung von Chromatographie anstelle von Niederschlag und die reduzierte Zeit für die Verarbeitung führen zu einem deutlich verbesserten, konsistenten nachgelagerten Prozess, wie hierin offenbart.

[0196] Gemäß einem Aspekt können Konzentrationen von Produkten auf pflanzlicher Basis, wie z. B. Produkte auf Sojabasis, in Kultur- und Fermentationsmedien Sojapepton Typ II Hy-Soy® oder SE50MK (ein koscheres Sojapepton) sein. Hy-Soy® im Saatgutkulturmedium kann zwischen 10-200 g/L liegen. Vorzugsweise liegt die Konzentration von Hy-Soy® im Saatmedium zwischen 15-150 g/L. Besonders bevorzugt liegt die Konzentration von Hy-Soy® im Saatmedium etwa zwischen 20-30 g/L oder einer Menge dazwischen. Die Konzentration von Glukose im Saatgutmedium kann zwischen 0,1 g/L und 20 g/L liegen. Vorzugsweise liegt die Konzentration der Glukose zwischen 0,5-15 g/L. Besonders bevorzugt liegt die Konzentration von Glukose in dem Kulturmedium bei etwa 10 g/L. Hefeextraktmengen können von etwa 5-20 g/L, stärker bevorzugt von etwa 10-15 g/L oder einer Menge dazwischen liegen. Beispielsweise kann der pH-Wert des Kulturmediums vor dem Wachstum von Clostridium botulinum etwa pH 7,0-7,5 oder dazwischen liegen, vorzugsweise pH 7,3.

[0197] Beispielsweise können die Mengen an Hy-Soy® im Fermentationsmedium der Produktion zwischen 10-200 g/L liegen. Vorzugsweise liegt die Konzentration von Hy-Soy® im Fermentationsmedium zwischen 15-150 g/L. Besonders bevorzugt liegt die Konzentration von Hy-Soy® in dem Fermentationsmedium etwa zwischen 20-40 g/L oder einer Menge dazwischen. Die Konzentration von Glukose im Fermentationsmedium kann zwischen 0,1 g/L und 20 g/L liegen. Vorzugsweise liegt die Konzentration der Glukose zwischen 0,5-15 g/L oder einer dazwischen liegenden Menge. Nicht unbedingt, aber wie oben beschrieben, kann die Glukose zusammen mit den anderen Komponenten des Fermentationsmediums

durch Autoklavieren sterilisiert werden. Der pH-Wert des Fermentationsmediums vor dem Wachstum kann pH 7,0-7,8, vorzugsweise etwa 7,0-7,5 oder dazwischen liegen, stärker bevorzugt pH 7,3.

[0198] Eine beispielhafte Ausführungsform eines nachgelagerten zweisäuligen Prozesses umfasst die folgenden Schritte: (a) Kultivieren von Bakterien, wie beispielsweise Clostridium botulinum-Bakterien aus einem APF WCB-Fläschchen, in einer Saatgut-/Kulturflasche, (b) anschließendes Fermentieren von Clostridium botulinum-Bakterien in einem Fermenter (Toxinproduktionsfermenter) mit APF-Fermentationsmedium, um die Zelllinie zu erweitern, Fortfahren mit der Fermentation und der Botulinum-Toxinproduktion, bis eine gewünschte Zellysephase erreicht ist. Als nächstes (c) Ernten (z. B. Klärung durch Filtration) des APF-Fermentationsmediums, um ein geerntetes Fermentationsmedium zu ermitteln, (d) Fortfahren mit Konzentration und Verdünnung, was zu einem verdünnten geernteten Fermentationsmedium führt, das (e) durch eine Abtrennsäule hindurchgeht, um Verunreinigungen zu entfernen, (f) Inkontaktbringen des Eluenten aus der Abtrennsäule mit einer Poliersäule, um ferner Verunreinigungen zu entfernen, und optional einer zweiten Poliersäule, (g) Konzentration und Pufferaustausch des Eluenten der Poliersäule, (h) gefolgt von Filtration zur Reduzierung der Keimbelastung und der (i) Füllung von Fläschchen.

[0199] In einem Beispiel beträgt das Volumen der Fermentation 20 L, die Gesamtzeit für alle Prozesse beträgt nur 4 bis 6 Tage, und es wird eine hohe Botulinum Neurotoxin-Ausbeute ermittelt.

[0200] Im Folgenden werden weitere Details zu einer besonderen Ausführungsform im Rahmen unserer Erfindung bereitgestellt. Die Fermentation erfolgt in APF-Medium in einem 30 L Fermenter aus rostfreiem Stahl.

[0201] In diesem nachstehenden Beispiel wird ein wesentlich geringeres Volumen an Fermentationsmedium verwendet, das dennoch eine hohe Ausbeute an Botulinum-Neurotoxin Typ A Komplex mit hoher Potenz bereitstellt. Bei Verwendung des folgenden Protokolls werden nur 20 L oder weniger an APF-Fermentationsmedium benötigt, anstatt der üblicherweise größeren, früheren Volumina (z. B. 115 L) an Fermentationsmedium, die für die Herstellung kommerziell nutzbarer Mengen zur Ermittlung eines botulinum Neurotoxins erforderlich sind.

[0202] Die anaerobe Arbeitsstation MACS (Don Whitley) mit Luftschleuse stellt eine sauerstoffarme Umgebung bereit, in der anaerobe Organismen manipuliert werden können. Der Zugang zu und der Austritt aus der Kammer erfolgt über ein System von Bullaugen, das innere und äußere Türen umfasst. Die Einheit ist temperaturgesteuert, um einen vom Benutzereinstellung in der Kammer beizubehalten. Eine humidistatgesteuerte Kondensationsplatte sorgt für die wirksame Beseitigung von überschüssiger Feuchtigkeit in der Kammer. Die Kammer ist für die Operation beleuchtet und alarmiert bei: niedrigem Gasdruck, ununterbrochenem Gasfluss und dem Zustand des Energieausfalls. Die Kammer ist mit einem HEPA-Filter ausgestattet, um die Stufe der lebensfähigen und nicht lebensfähigen Partikel in der anaeroben Kammer zu reduzieren. Die anaeroben Zustände werden mit dem „Anotox“ und dem Palladium Deoxo „D“ Katalysatorsystem für die atmosphärische Reinigung aufrechterhalten. Das Kondenswasser aus der Kondensationsplatte wird gesammelt und in ein externes Reservoir geleitet, wo es abgeführt wird.

[0203] Wie oben offenbart, wird ein APF-Prozess zur Herstellung einer APF-WCB verwendet, die Zellbankfläschchen aufweist, die unter -135 °C gespeichert werden. Ein APF WCB Zellbank-Fläschchen wird bei Raumtemperatur für etwa 15 Minuten aufgetaut, bevor das Kulturmedium eingimpft wird, gefolgt von einem einzigen Kultivierungsschritt wie oben beschrieben, um eine „Saatkultur“ zu etablieren. Dies geschieht in einem modularen, atmosphärisch gesteuerten System, das durchgehend aseptische Techniken verwendet, um die Keimbelastung zu minimieren. Das modulare, atmosphärisch gesteuerte System wird gereinigt, bevor das fertige Saatgut-Fläschchen mit dem Inhalt des APF WCB-Fläschchens geimpft wird. Das Kulturmedium wird mit 1 N Salzsäure und 1 N Natriumhydroxid (zur Einstellung des pH-Wertes), D(+) Glukose, wasserfrei (Mallinckrodt Baker, Cat# 7730, 4,00 g), Sojapepton Typ II (SPTII) (Marcor, Cat #1130, 8,00 g), Wasser für Injektionszwecke (WFI) 400,0 ml und Hefeextrakt (YE) (BD Cat #212730, 4,00 g). Die Lösung aus Sojapepton Typ II und Hefeextrakt wird durch Abmessen von 300 ml WFI mit einem 500 ml Messzylinder hergestellt und in eine Saatkulturflasche gegossen. Die Flasche mit dem Saatgut wird auf einen Rührer gestellt und der Rührer aktiviert. 8,00 g SPTII und 4,00 g Hefeextrakt werden der Saatkulturflasche zugefügt und bis zur Auflösung gemischt. Wenn sich die Mischung nach dem Mischen nicht vollständig auflöst, wird sie auf niedriger Stufe erhitzt. Der pH-Wert wird gemessen und auf etwa 7,30 ± 0,05 eingestellt. Die mittlere Lösung wird mit WFI auf etwa 360 ml aufgefüllt. Die Saatkulturflasche ist ausreichend belüftet, um den Dampf- und Gastransfer zu ermöglichen. Eine 10%ige Glukoselösung (w/v) wird durch Abmessen von etwa 30 ml WFI mit einem 100 ml Messzylinder zubereitet und in die vormontierte Glukose-Zugabeflasche gegeben, die auf einen Rührer gestellt und der Rührer aktiviert wird. Etwa 4,00 g Glukose wird in die Glukose-Zusatzflasche hinzugefügt und gemischt, bis sie sich aufgelöst hat (bei Bedarf wird geringe Hitze für eine Auflösung verwendet) und qs (Menge ausreichend) Glukoselösung auf 40 ml mit WFI. Die Glukosezugabe wird dann locker mit einer Entlüftungskappe verschlossen. Sowohl die Glukose- als auch die Saatkulturflaschen werden zur Sterilisation bei 123 °C für 30 Minuten autoklaviert. Nach der Sterilisation werden beide Gegenstände aus den Autoklaven genommen und in einer Biosicherheitskabine abgekühlt. Nach dem aseptischen Abkühlen wird 10 % der Glukoselösung in die Saatkulturflasche mit dem Hefeextrakt und der Sojapepton II-Lösung überführt und gemischt, wodurch eine fertige Saatkulturflasche entsteht.

[0204] Diese fertige Saatgut-Kulturflasche wird in das vorgereinigte MACS gestellt (wobei ein zubereiteter anaerober Indikator eingesetzt wird). Der Deckel der fertigen Saatgut-Kulturflasche wird abgeschraubt. Das fertige Kulturmedium wird dann auf eine Rührplatte im MACS gestellt (die Rührplatte wird auf etwa 150 U/min aktiviert) und das Medium in der fertigen Kulturmediumflasche wird für mindestens 12 Stunden bei etwa 34,5 °C +/- 1 °C im MACS reduziert. Danach wird

eine Probe von 1 ml des Kulturmediums zur Messung der optischen Dichte (zur Bestimmung der Biomasse bei 540 nm) entnommen. Anschließend wird die fertige Saatgut-Kulturflasche im MACS (anaerob) beimpft. Ein APF WCB-Kulturfläschchen wird aus der Gefrierzellbank ermittelt und in die MACS gebracht. Das Fläschchen wird für etwa 10-15 Minuten aufgetaut. Danach werden etwa 400 µL des Fläschcheninhalts direkt in das Medium in der fertigen Saatgut-Kulturflasche gerichtet. Die Kappe auf der fertigen Saatgut-Kulturflasche wird vollständig gelöst und die Kappe auf die Flasche gelegt und die Rührgeschwindigkeit auf 150 U/min eingestellt. Nach mindestens 11 Stunden Inkubation in der MACS wird die Fermentation durchgeführt, wie unten beschrieben.

[0205] Sonden (z. B. Redoxsonde, pH-Sonde, Trübungssonde, z. B. von Broadley James und Optek) und Sequenz-Konfiguration des Fermenters, wie z. B. ein 30 L-Fermenter aus Edelstahl, werden überprüft und kalibriert und in die entsprechenden Anschlüsse des Fermenters eingesetzt und festgezogen. Ein Fermenter kann beispielsweise ein ABEC 30 L (VT) Fermenter System sein, das aus einem 30 L Fermenter-Behälter, einem Rührwerksantriebssystem, einer Rohrleitungsbaugruppe für Versorgungsanschlüsse (CIP, Reindampf, CDA, Stickstoff, Sauerstoff, Prozesskaltwasser, Bioabfall und Anlagendampf), Instrumenten (pH-Wert, Temperatur, Druck, Redox, optische Dichte und Massendurchfluss) und vier peristaltischen Pumpen. Die Geschwindigkeit des unten montierten Rührwerks wird mit einem Allen-Bradley Frequenzantrieb (VFD) gesteuert. Die halbautomatische und automatische Steuerung des Systems erfolgt über eine Allen-Bradley ControlLogix PLC mit Programmierung. Das System ist so konzipiert, dass es eine Regelkreis PID-Steuerung (Proportional-Integral-Derivativ) der Temperatur, des Drucks, des pH-Werts und des Redox-Gehalts der Kultur während der Operationen der Fermentation bereitstellt. Ein Allen-Bradley DeviceNet® (ein offenes Geräteebenen-Netzwerk) wird zur Steuerung und Kommunikation mit den Vorrichtungen und Sensoren auf dem Skid verwendet.

[0206] Für die Modi Sterilhaltung, Gleichgewicht, Lauf und Ernte werden Agitation, Temperatur, Druck und Stickstoffüberlagerung mit den folgenden Sollwerten betrieben.

[0207] Für den Sterilhaltungs- und Gleichgewichtsmodus:

Gesteuerter Parameter	Sollwerte und Bereich
Agitation	100 U/min \pm 10
Stickstoffüberlagerung	12 SLPM \pm 2
Fermenterdruck	5 psig \pm 1
Fermentertemperatur	35 \pm 1 °C
Redox	-390 bis - 150 mV

[0208] Für den LAUF-Modus:

Gesteuerter Parameter	Sollwerte und Bereich
Agitation	70 U/min \pm 5
Stickstoffüberlagerung	12 SLPM \pm 2
Fermenterdruck	5 psig \pm 1
Fermentertemperatur	35 \pm 1 °C

[0209] Für den Erntemodus:

Gesteuerter Parameter	Sollwerte und Bereich
Agitation	150 U/min \pm 10
Stickstoffüberlagerung	10 SLPM \pm 2
Fermenteranfangsdruck	0 psig
Fermentertemperatur	25 \pm 1 °C

[0210] Um das Fermentationsmedium zuzubereiten, müssen D(+) Glukose, wasserfrei (Mallinckrodt Baker, Cat# 7730, 300,0 g), Sojapepton Typ II (SPTII) (Marcor, Cat #1130, 650,0 g), Wasser für Injektionszwecke (WFI, 13 L) und Hefeextrakt (YE) (BD Cat #212730, 240,0 g), sowie Standardwaagen, ein Gefäß (beispielsweise 20 L), eine Glasflasche (5 L), Mess-

zylinder, Rührstäbe und Rührer. Etwa 10 L WFI wird zusammen mit einem Rührstab in das Gefäß hinzugefügt. Das Gefäß wird auf einen Rührer gestellt und der Rührer wird aktiviert, woraufhin etwa 650,0 g Sojapepton Typ II zusammen mit etwa 240,00 g YE hinzugefügt werden. Das Fermentationsmedium wird (Menge ausreichend) auf 13 L mit WFI aufgefüllt, und das Gefäß wird verschlossen. Eine 10%ige Glukose-Lösung (w/v) wird dann durch Hinzufügen von etwa 2 L WFI in eine gläserne 5 L Flasche (mit Rührstab darin). Auf einen Rührer gesetzt und mit dem Stab drehend, werden etwa 300,00 g Glukose in die Flasche hinzugefügt und gemischt, bis sie gelöst ist. Die Glukoselösung wird q.s. auf 3 L mit WFI aufgefüllt und in Flaschen abgefüllt, so dass eine 10%ige Glukoselösung entsteht.

[0211] Das Fermentationsmedium im Behälter wird dem Fermenter zugefügt, das Pre-Steam-In-Place-Fermentervolumen wird aufgezeichnet und die Fermentationsabfolge der Operation wird fortgesetzt. Am Ende des SIP (Steam in Place) (122 °C, +/- 1 °C) wird das Volumen des Fermenters nach dem SIP notiert. Eine Baugruppe zur Zugabe von Glukose, die ein Gefäß umfasst, das ein Rohr mit einem 0,2 µm-Filter (PALL Corp.) und eine peristaltische Pumpe aufweist, wird an den Fermenter angeschlossen, und die Leitung wird einem SIP unterzogen und ermöglicht eine Abkühlung. Ein Anschluss für ein Additivventil wird geöffnet und etwa 3 L Glukose (filtriert) hinzugefügt, und die entsprechende Menge WFI (filtriert), um das Gesamtvolumen des Fermenters auf 20 L hinzuzufügen und durch dieselbe Glukose-Filterleitung in den Fermenter zu pumpen. Der Anschluss des Ventils für die Zugabe wird geschlossen. Das Produktionsmedium für die Fermentation weist danach einen pH-Wert von etwa pH 7,3 auf. +/- 0,05, mit sterilem 1 N Natriumhydroxid oder 1 N Salzsäure unter Verwendung von SIP der Additiv-Linien, je nach Bedarf. Danach werden die Parameter für die Sterilhaltung eingestellt und für etwa 12 Stunden vor der Inokulation gehalten. Die Ausgangsglukosekonzentration des Mediums wird mit einem Metabolitenanalysator gemessen und die Glukosekonzentration aufgezeichnet.

[0212] Wie oben erwähnt, werden am Ende der Inkubation der Saatgutkultur (etwa 11 ± 1 Stunden) 1 ml der Probe für die Messung der optischen Dichte (OD) entnommen. Die OD wird offline bei 540 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Wenn der OD-Wert innerhalb des entsprechenden Bereichs liegt, wird er aufgezeichnet und die Kultur für die Fermentation verwendet. Die Trübungssonde des Fermenters wird entsprechend auf Null gestellt. Die Saatgut-Kulturflasche aus der anaeroben Kammer wird in den Fermenter und eine Saatgut-Transferbaugruppe gebracht (ein Saatgutgefäß mit APF-Kulturmedium darin, das eine Kulturinokulum-Transferleitung mit einer sterilen Kleenpak™ Verbinderbaugruppe aufweist, die von PALL Corp. oder Millipore erhältlich ist). Die Transferleitung für das Saatgut wird dann an einer peristaltischen Pumpe befestigt und die Transferleitung für das Inokulum mit einem sterilen Kleenpak-Verbinder an den Fermenter angeschlossen. Der Druck im Fermenter wird auf 2 psig gesenkt und das gesamte Volumen der Impfstoffflasche wird in den Fermenter gepumpt. Am Ende der Impfung werden die Online-Absorptionseinheiten (AU) aus dem Fermenter aufgezeichnet, die Parameter des Fermenters werden auf den LAUF-Modus eingestellt und die Zeit wird aufgezeichnet.

[0213] Die Fermentation schreitet dann fort (die Fermentationsdauer kann von etwa 60 Stunden bis etwa 80 Stunden, vorzugsweise von etwa 68 Stunden bis etwa 76 Stunden, besonders bevorzugt für etwa 72 Stunden, betragen), während Proben aus dem Fermenter entnommen werden, beispielsweise bei 24 und 48 Stunden, während aseptische Zustände beibehalten werden. Tests, die an mindestens einer während der Fermentation entnommenen Probe durchgeführt werden, können z. B. Offline-Messungen der optischen Dichte, Glukosemessungen, ELISA, SDS-PAGE, Western Blot einschließen, sind aber nicht darauf beschränkt. Am Ende der Fermentation (das Volumen der Brühe am Ende der Fermentation beträgt etwa 18-19 L, beispielhaft) kann eine Probe entnommen werden (für Tests, beispielsweise durch Offline-Messungen der optischen Dichte, Glukose-Messungen, ELISA, SDS-PAGE, Western Blot und DNA/RNA-Quantifizierung).

[0214] Am Ende der Fermentation werden online die optische Dichte, die EFT (verstrichene Zeit der Fermentation) und die Endzeit der Fermentation aufgezeichnet, ebenso wie die Agitation in U/min, die Temperatur in °C, der Druck in psig und die Stickstoffüberlagerung in slpm und Redox mV. Anschließend wird die Produktionsfermentationsbrühe einer Ernte unterzogen, d. h. die Produktionsfermentationsbrühe wird durch Filtration geklärt, wobei beispielsweise etwa 15 L Filtrat aufgefangen wird. Die Parameter für die Fermentation werden in dem Satz für HARVEST festgelegt und die Filterbaugruppe für die Klärung wird vorbereitet (CUNO, 3M-Filtration), die einen Vorfilter, einen Tiefenfilter und mindestens einen Druckmesser einschließt. Der Vorfilter und der Tiefenfilter werden mit etwa 20 L Wasser gespült. L Wasser für die Injektion gespült. Nach dem Spülen wird die Baugruppe an den Anschluss des Fermenters für die Ernte/den Abfluss angebracht. Die Temperatur des Fermenters wird auf etwa 25 °C gesenkt, woraufhin die Klärung der Fermentationsbrühe beginnt (notieren Sie die Zeit für den Beginn der Klärung, die anfängliche Online-OD, den anfänglichen pH-Wert, die anfängliche Temperatur und das anfängliche Volumen des Fermenters). Der Druck im Fermenter wird während der Filtration etwa alle 10 Minuten um etwa 1 psi (Pfund pro Quadratzoll) erhöht, bis ein Druck von etwa 6 psi erreicht ist, bei dem der Druck bis zum Ende der Ernte gehalten wird. Dieser Filter entfernt etwa 80 % der RNA/DNA im APF-Fermentationsmedium (der Rest wird im Wesentlichen in späteren Chromatographieschritten entfernt, wie weiter unten erläutert). Damit entfällt die frühere Abhängigkeit/Verwendung von RNase und/oder DNase zur Entfernung dieser Komponenten aus der Fermentationsbrühe. Prozess-Parameter wie der Eingangsdruck des Vorfilters, der Eingangsdruck des Tiefenfilters, der Druck im Fermenter, das Rühren und das Filtratvolumen werden bei jedem 2 L des gesammelten Filtrats überwacht. Am Ende werden die Zeit des Klärungsendes und das Volumen des gesammelten Filtrats aufgezeichnet. Nach Abschluss des Ernteschritts werden die Systeme dekontaminiert und gereinigt.

[0215] Das Gefäß mit dem Filtrat wird zur Probenahme in den BSC gebracht, aus dem etwa <10 ml des Filtrats für Offline-OD-Messungen und andere Analysen (z. B. ELISA, SDS-PAGE, DNA/RNA und Western Blot) entnommen werden.

[0216] Das Filtrat wird dann einer Ultrafiltration/Verdünnung unterzogen. Eine Baugruppe der Tangentialflussfilter-Einheit (TFF-Einheit) wird zusammengebaut. Die TFF-Einheit wird etwa 90 Minuten lang mit WFI mit einer bevorzugten Rate von etwa 2 gespült. L pro Minute gespült und dann wird die TFF-Einheit durch Durchlaufen von 0,1 N Natriumhydroxid (im Kreislauf) für etwa 60 Minuten durchläuft, wonach 1 L 10 mM Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,5 durchlaufen werden, gefolgt von einer Spülung mit WFI für etwa 30 Minuten. Das Filtrat aus dem Ernteschritt (etwa 15 L) wird dann durch die TFF hindurchgeleitet (dies geschieht in einer Biosicherheitskabine), wodurch das Filtrat auf etwa 5 L +/- 0,5 L (der Konzentrationsschritt erfolgt mit etwa 2 L pro Minute und bei einem Transmembrandruck von etwa 5 psig). Eine Probe des Permeats kann entnommen und zum Beispiel ELISA-, dsDNA-, SDS-PAGE- und Western-Blot-Tests unterzogen werden. Einmal konzentriert auf etwa 5 L +/- 0,5 L aufkonzentriert ist, wird der Retentat-Pool dann auf etwa 20 L mit etwa 15 L steril gefiltertem 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5, durch die TFF, mit einer Geschwindigkeit von etwa 2 L pro Minute. Eine Probe kann dann erneut entnommen und zum Beispiel ELISA-, DNA/RNA-, SDS-PAGE- und Western-Blot-Tests unterzogen werden. Das Ultrafiltrations-/Verdünnungsmaterial (Retentat) wird bei 4 °C gespeichert.

[0217] Nach dem Gebrauch werden alle Systeme entweder mit 1 N Natriumhydroxid oder mit Sterilisationstemperaturen (Dampf) dekontaminiert und gereinigt.

[0218] Die folgenden Materialien, Ausrüstungen und Verfahren werden verwendet, um die unten aufgeführten Lösungen, Puffer usw. für die Verwendung in einem beispielhaften Prozess herzustellen, d. h. bei der Reinigung des aus den Prozessen des Beispiels 6 ermittelten Fermentationsmediums, um einen gereinigten botulinum Neurotoxin Typ A Komplex zu ermitteln. Beispielhaft verwendete Puffer (gefiltert durch einen 0,2-Mikron-Vakuumfilter und ihre Leitfähigkeit gemessen in mS/cm, zur Aufzeichnung) schließen ein: 10 mM Natriumphosphat, pH 6,5; 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5; 50 mM Natriumacetat, pH 4,8; 50 mM Natriumacetat, 170 mM Natriumchlorid, pH 4,8; 50 mM Natriumacetat, 250 mM Natriumchlorid, pH 4,8; 50 mM Natriumacetat, 1 M Natriumchlorid, pH 4,8; 50 mM Natriumacetat, pH 4,0 und 10 mM Citrat, pH 6,5.

[0219] Im Folgenden finden Sie ein Beispiel für Vorgänge zur Reinigung und Ermittlung von botulinum Neurotoxin Typ A aus den Prozessen von Beispiel 6. Alle Teile, die mit dem Produkt in Berührung kommen, sind so gestaltet und konstruiert, dass sie nicht reaktiv und nicht absorbierend sind. Darüber hinaus sind alle Ausrüstungen so konzipiert, dass sie die Verwendung von Einwegsystemen ermöglichen oder so entworfen und konstruiert sind, dass sie die Desinfizierung, Reinigung und Dekontaminierung nach dokumentierten, validierten Verfahren erleichtern. Die Systeme oder Skids sind so konzipiert, dass sie nicht mit dem Produkt in Berührung kommen, während die Flusspfade so gestaltet sind, dass sie als Einwegprodukte verwendet werden können, einschließlich der Chromatographiesäulen und aller zugeordneten Rohre. Die Komponenten für die Chromatographie wurden von AlphaBio und die UF/DF-Komponenten von Scilog Inc. ermittelt. Die verwendeten Chromatographie-Setups schließen in dem Satz eine peristaltische Pumpe für die Abgabe der Lösung mit variabler Geschwindigkeit, einen Einlass-Ventilblock mit 5 Einlässen, einen Säulen-Ventilblock mit einem Array von 3 automatisierten Ventilen, einen Auslass-Ventilblock mit 3 Auslässen, eine Überwachung des Säulenabflusses einschließlich pH, Leitfähigkeit und UV, eine Peak-Erfassung auf der Basis der UV-Absorption sowie die Instrumente und Kontrollen ein, die für den Abschluss der Reinigungsvorgänge erforderlich sind. Das Steuersystem weist sowohl die Software als auch die Hardware auf, die für die Steuerung des Klärungsprozesses entwickelt wurden. Befehle und Daten werden über ein HMI (Human Machine Interface) Terminal eingegeben. Der Bediener initiiert alle automatisierten Prozessfunktionen durch Befehle an der HMI und überwacht und passt Prozessparameter wie Flussraten, Druck, Leitfähigkeit, pH-Wert, UV-Absorption und individuelle Ventilpositionen an.

[0220] Das UF/DF-System schließt eine Rezirkulationspumpe, eine Diafiltrationspumpe, 2-Waagen und einen Tangentialflussfilterhalter (TFF) ein. Die Rezirkulationspumpe ist mit 3 Einweg-Drucksensoren und einer der Waagen (die sich unter dem Permeatbehälter befinden) verbunden, um die Strömungsrate zu kontrollieren, um einen definierten Transmembrandruck und -stopp aufrechtzuerhalten, der auf dem Gewicht des Permeatbehälters basiert. Die Diafiltrationspumpe hat eine Schnittstelle zur zweiten Waage (die sich unter dem Retentatreservoir befindet), um basierend auf der Aufrechterhaltung eines konstanten Gewichts des Retentatreservoirs zu starten und zu stoppen.

[0221] Nach der Konzentration und Verdünnung des Retentatmaterials aus dem Ernteschritt (Ernten des lebewesenproteinfreien Fermentationsmediums) wird das Material auf eine Anionenaustauschersäule geladen. Im Folgenden wird das Verfahren zum Packen und Testen der Anionenaustauschersäule beschrieben, das in dem beispielhaften 6 zweisäuligen Prozess verwendet wird.

[0222] Vorgepackte Säulen werden für alle drei chromatographischen Schritte verwendet. Zunächst wird das Zuführungsmaterial (geerntete APF-Medien, die eine Ultrafiltration/Verdünnung aufwiesen) durch die Anionenaustauschersäule hindurchgeleitet (Poros 50HQ, von ABI wie oben beschrieben). Mindestens 5 Säulenvolumina (CVs) von 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5, werden verwendet, um die Anionenaustauschersäule (in diesem Beispiel eine Capture-Säule) zu equilibrieren.

[0223] Nach der Äquilibration wird der Beladungsschritt durchgeführt, bei dem das Zuführungsmaterial (nach dem Ernteschritt geerntete Fermentationbrühe, von etwa 20 L, beispielsweise) mit einer Geschwindigkeit von beispielsweise etwa 200 cm/h auf die Anionenaustauschersäule geladen wird. Nachdem 0,5 Säulenvolumen des beladenen Materials durch die Anionenaustauschersäule hindurchgeleitet wurde, wird der Durchflussspool (FT) in einem Gefäß wie einem Polyethersulfonbehälter gesammelt, während der Toxinkomplex an das Material der Anionenaustauschersäule gebunden wird. Danach folgt ein Waschschrift, bei dem mindestens etwa 15 Säulenvolumina des Waschpuffers (z. B. 50 mM Natriumphosphat bei

einem pH-Wert von 6,5) durch die Anionenaustauschersäule hindurchgeleitet werden. Der Waschschrift wird gestoppt, wenn die am Säulenausgang gemessene UV-Strahlung in Echtzeit auf weniger als oder gleich etwa 80 mAU abfällt. Das Volumen des Waschpuffers und das Volumen des Durchflusses/Waschpools werden aufgezeichnet und eine 1 ml Probe des Durchflusses/Waschpools wird entnommen und beispielsweise auf Toxinkonzentration, Nukleinsäuregehalt, Ganzzellproteine, SDS-PAGE, qPCR, 2D LC und ELISA getestet.

[0224] Der anschließende Schritt ist der Elutionsschritt, bei dem Elutionspuffer (z. B. 50 mM Natriumacetat, pH 4,8) auf die Anionenaustauschersäule gepumpt wird. Wenn die UV-Ablesung am Säulenausgang in Echtzeit auf etwa 150 mAU oder mehr ansteigt, wird das Eluat in einem Behälter gesammelt, der mit 1 CV Elutionspuffer (50 mM Natriumacetat, pH 4,8) gefüllt ist. Die Sammlung des Eluatpools wird gestoppt, wenn die Ablesung der UV-Strahlung auf weniger als oder gleich etwa 200 mAU sinkt (das gesammelte Volumen liegt zu diesem Zeitpunkt zwischen etwa 1 bis etwa 2 CVs). Das Chromatographiesystem wird dann dekontaminiert und mit 1 N Natriumhydroxid gereinigt.

[0225] Der Eluatpool aus der Anionenaustauschersäule wird dann für die Zugabe auf die Kationenaustauschersäule zubereitet. Das Anionenaustausch-Eluatvolumen, der pH-Wert, die Leitfähigkeit und die Zuführtemperatur werden aufgezeichnet und der Eluatpool aus der Anionenaustauschersäule wird mit 1 CV von 50 mM Natriumacetat, pH 4,8.

[0226] Nach dem Durchlauf der Anionenaustauschersäule wird die Operation der Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Die Kationenaustauschersäule (z. B. Poros® 20HS) wird mit einem Minimum von 5 CVs Äquilibriumspuffer (50 mM Natriumacetat, pH 4,8). Nach der Äquilibriumierung wird der verdünnte Eluatpool von der Anionenaustauschersäule auf die Kationenaustauschersäule geladen und das geladene Gesamtvolumen wird aufgezeichnet. Nachdem 0,5 Säulenvolumen des geladenen verdünnten Eluatpools durch die Kationenaustauschersäule hindurchgeleitet wurde, wird der Durchflussspool (FT) gesammelt. Ein erstes Waschen der Kationenaustauschersäule wird durchgeführt, wobei etwa 3-5 CVs von 50 mM Natriumacetat, pH 4,8, durch die Kationenaustauschersäule hindurchgeleitet werden (das Volumen des verwendeten ersten Waschpuffers wird aufgezeichnet). Ein zweiter Waschvorgang wird durchgeführt, bei dem etwa 3 CVs von 170 mM Natriumchlorid, 50 mM Natriumacetat, pH 4,8, durch die Säule gepumpt werden. Dieses Eluat wird in einem neuen Behälter mit der Bezeichnung „WASH 2 Peak“. Die Sammlung beginnt, wenn die UV-Ablesungen auf einen Wert größer oder gleich 50 mAU ansteigen. 1 CV wird gesammelt und das zweite verbrauchte Waschpuffervolumen wird aufgezeichnet.

[0227] Die Elution des Bulk-Toxin-Komplexes von der Kationenaustauschersäule erfolgt mit Hilfe von Elutionspuffer (z. B. 250 mM Natriumchlorid in 50 mM Natriumacetat, pH 4,8), der auf die Kationenaustauschersäule gepumpt wird. Wenn die UV-Ablesung der Elution mindestens etwa 100 mAU erreicht, beginnt das Sammeln des Eluats in Behältern, die mit Verdünnungspuffern (40 mL 100 mM Kaliumphosphat, pH 6,8 und 60 mL 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5) vorgefüllt sind. Die Sammlung des Eluats aus der Kationenaustauschersäule wird fortgesetzt, bis die UV-Ablesung auf etwa 100 mAU oder weniger abfällt. Das Gesamtvolumen des Eluats nach der Verdünnung wird aufgezeichnet. Das Kationenaustausch-Chromatographiesystem wird dann dekontaminiert und gereinigt.

[0228] Nach der Elution von der Kationenaustauschersäule wird das Eluat einer Filtration unterzogen. Es wird ein Tangentialflussfiltrationssystem (TFF) verwendet, bei dem drei 100 K MWCO-Membranen (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) übereinander gestapelt werden. Das anfängliche Volumen des Kationenaustauscheluat-Pools wird notiert, ebenso wie die Beschreibungen der Diafiltrations-/Equilibrations- und Sanitärreinigung. Beispielsweise kann die Diafiltrationslösung 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5 und die Sanierungsreinigung 0,1 N Natriumhydroxid sein. Das System wird eingestellt, indem ein Rohr aus dem Reservoir mit dem Eluat aus der Kationensäule (IAPF) oder der HIC-Säule (FAPF), wobei das Eluat Botulinum-Toxin enthält, durch den Ultrafiltrationspumpenkopf in den Einlass der Tangentialfluss-Filtrationsmembran verbunden wird. Ein zweites Rohr vom Permeatauslass der Tangentialfluss-Filtrationsmembran wird mit dem Ultrafiltrations- (UF) Permeat-Container verbunden. Ein Rohr vom Retentatauslass der Tangentialfluss-Filtrationsmembran zum Retentatreservoir wird gesichert, und ein viertes Rohr vom Diafiltrationspuffer (DF) durch den Diafiltrationspumpenkopf und in das Retentatreservoir wird ebenfalls gesichert. Der Speicherpuffer des Systems wird, ebenso wie die Membran, gespült, indem die Membran mit mindestens etwa 720 ml Wasser für Injektionszwecke (WFI) gespült wird, wobei das Retentat in den Abfall gerichtet wird. Danach wird die Membran ferner mit mindestens etwa 4200 ml Wasser für Injektionszwecke gespült, wobei das Retentat in den Speicher zurückgeführt wird. Danach erfolgt die Membranreinigung (falls erforderlich) durch Spülen der Membran mit mindestens 200 ml 1N Natriumhydroxid, wobei das Retentat in den Abfall gerichtet wird, gefolgt von einer Spülung der Membran mit mindestens 200 ml 1 N NaOH, wobei das Retentat für mindestens 30 Minuten in den Behälter zurückgeführt wird. Anschließend wird eine Äquilibriumierung durchgeführt, indem die Membran mit Äquilibriumspuffer (10 mM Kaliumcitrat bei einem pH-Wert von 6,5) gespült wird, wobei das Retentat in den Abfall gerichtet wird, bis der pH-Wert des Retentats und des Permeats innerhalb von +/- 0,2 Einheiten des pH-Werts des Äquilibriumspuffers liegt (beispielsweise innerhalb von +/- 0,2 Einheiten des pH-Werts 6,5).

[0229] Die Konzentration des Materials (Eluat (Produktpool) aus der Kationenaustauschersäule) wird bestimmt, um zu sehen, ob eine Verdünnung oder eine Konzentration (beispielhafte Verarbeitung) angemessen ist (eine beispielhafte Zielkonzentration kann etwa 0,7 mg/mL betragen). Die Verdünnung erfolgt mit 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5. Es wird ein Zielvolumen bestimmt, beispielsweise für eine Produktkonzentration von 0,7 mg/ml (Zielvolumen= (Ausgangskonzentration/Startvolumen)/0,7 mg/ml).

[0230] Der Produktpool (Eluat (entsprechend verarbeitet oder nicht) aus der Kationenaustauschersäule) wird auf die Membran geladen und die Rezirkulation (bei geschlossenem Permeatauslass) des Systems (TFF-System) wird mindestens

2 Minuten lang ohne Gegendruck betrieben. Danach wird das Permeatventil langsam geöffnet, während das Retentat-Gegendruckventil auf einen Zielwert von etwa 7 psig Transmembrandruck eingestellt wird. Zur Verdünnung wird 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5 zum Zielvolumen hinzugefügt und ohne Ultrafiltration zur Diafiltration gebracht; für die Konzentration wird mit der Ultrafiltration begonnen. Für die Diafiltration: Permeatabfälle werden in einem neuen Behälter gesammelt (Ziel-Diafiltrationsvolumen ist 5X Diafiltrationsvolumen) und mit mindestens 5 Diafiltrationsvolumen von 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5 diafiltriert. Die Daten des Diafiltrationsprozesses werden in mindestens 10-minütigen Intervallen erfasst (Permeatgewicht g/Vol. ml, Einlassdruck (psig), Retentatdruck (psig), Permeatdruck (psig) und Transmembrandruck (psig)). Für die Rezirkulation/und Spülung: Bei geschlossenem Permeatauslassfilter wird das System mindestens 2 Minuten lang ohne Gegendruck rezirkuliert/gelaufen und mit mindestens 20 mL 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5 gespült. Der Produktpool schließt das Retentat und die Spülung ein. Eine Probe kann dem Produktpool entnommen und einer Verifizierungsanalyse einschließlich beispielsweise UV bei 278 nm, SDS-Page, LcHPLC, SE-HPLC, qPCR, RP-HPLC, Native-Page, AUC, Limulus-Amöbozyten-Lysat, Western Blot und ELISA-Tests eingeschlossen werden. Für die Reinigung nach dem Gebrauch wird das System mit 1 N Natriumhydroxid gespült, mindestens 10 Minuten lang umgewälzt, danach wird das System mit 0,1 N Natriumhydroxid gespült und darin gelagert wird.

[0231] Anschließend erfolgt eine sterile Filtration und Füllung, um das Bulk-Neurotoxin zu lagern und zu teilen. Die Konzentrationsanpassung wird durchgeführt, um die Toxinkonzentration unter Verwendung von 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5, auf etwa 0,5 mg/ml mit der Nachspülprobe einzustellen. Wenn die Toxinkonzentration geringer als etwa 0,5 mg/ml ist, dann ist keine Konzentrationsanpassung erforderlich.

[0232] Mit einer sterilen Pipette werden 10 mL/0,75 mL Aliquots in jedes der sterilen 15 mL/1,5 mL Röhrchen der Probe gegeben. Der Produktcontainer wird vorsichtig von Hand umgerührt und die benötigte Menge der Lösung (die den Medikamentenwirkstoff als Bulkware enthält, d. h. Bulk Botulinum-Toxin) in jedes Fläschchen gefüllt. Die Proben werden maximal 5 Tage bei 2 °C - 8 °C im Kühlschrank gespeichert oder 0,75 ml des Filtrat-Produkt pools werden in Kryofläschchen übertragen. Die Kryofläschchen werden bei -70 °C +/- 5 °C gespeichert.

6.7. Beispiel 7: Ein Säulenchromatographie-Prozess zur Ermittlung eines Botulinum-Neurotoxins

[0233] Dieses Beispiel beschreibt einen Säulenchromatographie-Prozess zur Ermittlung eines Botulinum-Neurotoxins. Es ist denkbar, dass bestimmte Schritte, die in Beispiel 5 beschrieben sind, bestimmte Schritte, die in Beispiel 6 beschrieben sind, und bestimmte Schritte, die in diesem Beispiel 7 beschrieben sind, miteinander kombiniert oder vertauscht werden können, um das Botulinum-Neurotoxin zu ermitteln, wie es nach Meinung und Einschätzung eines Fachmanns geeignet ist.

[0234] Clostridium botulinum-Bakterien werden kultiviert und wachsen gelassen, bis die Fermentation abgeschlossen ist. Die Fermentationskultur wird dann im folgenden Reinigungsprozess verwendet:

Die Fermentationskultur wird einer Säurefällung mit 3M Schwefelsäure unterzogen, um den pH-Wert auf 3,5 zu senken, und zwar bei einer Temperatur, die unter 25 °C liegt. Das saure Präzipitat wird dann einer 0,1 µm Tangentialflussfiltration unterzogen, um die Zellmasse zu konzentrieren. Dann wird der pH-Wert auf 6,0 eingestellt und Nukleasen hinzugefügt, um den Gehalt an Nukleinsäuren der Wirtszellen zu reduzieren. Dann erfolgt eine Klärung durch Zentrifugation, um Zelltrümmer zu entfernen, und eine Dead-End-Filtration bei 0,2 µm wird mit hinzugefügtem Ammoniumsulfat durchgeführt. Das Filtrat wird dann direkt auf die hydrophobe Interaktionssäule, Phenyl Sepharose HP (GE Life Sciences), geladen, mit einem absteigenden Gradienten von Ammoniumsulfat eluiert und die Spitze des Produkts wird isoliert.

[0235] Die Anionenaustauschersäule und/oder die Kationenaustauschersäule werden optional vor oder nach der hydrophoben Interaktionssäule verwendet. Wenn Anionenaustauschersäulen und/oder Kationenaustauschersäulen verwendet werden, werden sie vorzugsweise nach der hydrophoben Interaktionssäule verwendet.

7. EINBEZIEHUNG DURCH VERWEIS

[0236] Alle hierin zitierten Referenzen sind durch Verweis in ihrer Gesamtheit und für alle Zwecke in demselben Umfang einbezogen, als ob jede einzelne Veröffentlichung oder jedes einzelne Patent oder jede einzelne Patentanmeldung ausdrücklich und individuell als durch Verweis in ihrer Gesamtheit für alle Zwecke einbezogen angegeben wäre.

[0237] Viele Änderungen und Variationen dieser Erfindung können vorgenommen werden, ohne von ihrem Geist und Umfang abzuweichen, wie für den Fachmann auf dem Fachgebiet offensichtlich ist. Die hierin beschriebenen Ausführungsformen sind nur beispielhaft, und die Erfindung ist nur durch die Bedingungen der beiliegenden Ansprüche beschränkt, zusammen mit dem vollen Umfang der Äquivalente, zu denen diese Ansprüche berechtigt sind.

Die XML-Datei zum Sequenzprotokoll kann über den folgenden Link aufgerufen werden:
<https://www.ige.ch/files/P189564JSUB.xml>

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, umfassend einen 900 kDa Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A (BoNT/A) Komplex, wobei der 900 kDa BoNT/A Komplex ein 150 kDa BoNT/A umfasst, das in Form einer Vielzahl von Sequenzvarianten vorliegt, wobei die Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette und eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer leichten Kette in voller Länge umfasst, wobei die C-terminale verkürzte leichte Kette eine Aminosäuresequenz aufweist, die in SEQ ID NO: 4 dargelegt ist, und die leichte Kette in voller Länge weist eine Aminosäuresequenz auf, die in SEQ ID NO: 2 dargelegt ist, und wobei das Häufigkeitsverhältnis der 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit der C-terminalen verkürzten leichten Kette zu der 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit der leichten Kette in voller Länge geringer ist als 3,9.
2. Zusammensetzung, umfassend einen 900 kDa BoNT/A-Komplex, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex ein 150 kDa BoNT/A umfasst, das in Form einer Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies vorliegt, wobei die Vielzahl von Sequenzvarianten-Spezies eine 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit einer C-terminalen verkürzten leichten Kette umfasst, wobei die C-terminale verkürzte leichte Kette eine Aminosäuresequenz aufweist, die in SEQ ID NO: 4 dargelegt ist, und wobei der prozentuale Anteil der 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies mit der C-terminalen verkürzten leichten Kette in der Vielzahl der 150 kDa BoNT/A-Sequenzvarianten-Spezies geringer als 79,5 % ist.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Abundanzverhältnis durch Anionenaustauschchromatographie (AEX) gemessen wird.
4. Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei der prozentuale Anteil der Abundanz durch AEX gemessen wird.
5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex von Clostridium botulinum-Bakterien produziert wird, die aus einer von einem Tierprodukt freien Arbeitszellbank kultiviert und erweitert wurden.
6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex von einem Typ A Stamm von Clostridium botulinum produziert wird.
7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei der Typ A Stamm von Clostridium botulinum ein Typ A Hall Stamm von Clostridium botulinum ist.
8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex Onabotulinumtoxin A ist.
9. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, die ferner menschliches Serumalbumin umfasst.
10. Zusammensetzung nach Anspruch 9, die etwa 0,5 mg menschliches Serumalbumin pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes umfasst.
11. Zusammensetzung nach Anspruch 9 oder 10, wobei das Humanserumalbumin rekombinantes Humanserumalbumin ist.
12. Zusammensetzung nach Anspruch 9 oder 10, wobei das menschliche Serumalbumin aus menschlichem Plasma gewonnen wird.
13. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, die frei von Tierprodukten ist.
14. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, die ferner Natriumchlorid umfasst.
15. Zusammensetzung nach Anspruch 14, die etwa 0,9 mg Natriumchlorid pro 100 Einheiten des 900 kDa BoNT/A-Komplexes umfasst.
16. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, die keinen Proteaseinhibitor enthält.
17. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, die kein Benzamidinhydrochlorid enthält.
18. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, die etwa 50 Einheiten, etwa 100 Einheiten oder etwa 200 Einheiten des 900 kDa BoNT/A Komplexes umfasst.
19. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, die eine Potenz von etwa $1,5 \times 10^7$ Einheiten/mg bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg aufweist.
20. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, die eine pharmazeutische Zusammensetzung in Pulverform ist.
21. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 20, die vakuumgetrocknet ist.
22. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 21, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess produziert wird, der einen oder mehrere Schritte der Säulenchromatographie umfasst.
23. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 22, wobei der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie umfassen.
24. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie ferner eine Anionenaustauschchromatographie umfassen.

25. Zusammensetzung nach Anspruch 23 oder 24, wobei der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie ferner eine Kationenaustauschchromatographie umfassen.
26. Verfahren zum Herstellen einer Zusammensetzung, die BoNT/A umfasst, wobei das Verfahren das Inkubieren einer Kultur von Clostridium botulinum Bakterien in einem Produktionsfermenter in Gegenwart von CO₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses umfasst.
27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei der Inkubationsschritt in Gegenwart von CO₂ und N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses durchgeführt wird.
28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei der Inkubationsschritt in Gegenwart von 25 % CO₂ und 75 % N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses durchgeführt wird.
29. Verfahren nach Anspruch 27, wobei der Inkubationsschritt in Gegenwart von 50 % CO₂ und 50 % N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses durchgeführt wird.
30. Verfahren nach Anspruch 27, wobei der Inkubationsschritt in Gegenwart von 75 % CO₂ und 25 % N₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses durchgeführt wird.
31. Verfahren nach Anspruch 27, wobei der Inkubationsschritt in Gegenwart von 100 % CO₂ in der Fermenter-Kopfraumüberlagerung während des Fermentationsprozesses durchgeführt wird.
32. Verfahren zur Behandlung eines Patienten, der dessen bedarf, umfassend die Verabreichung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 25.
33. Verfahren, im Wesentlichen wie hierin beschrieben.
34. Zusammensetzung, im Wesentlichen wie hierin beschrieben.

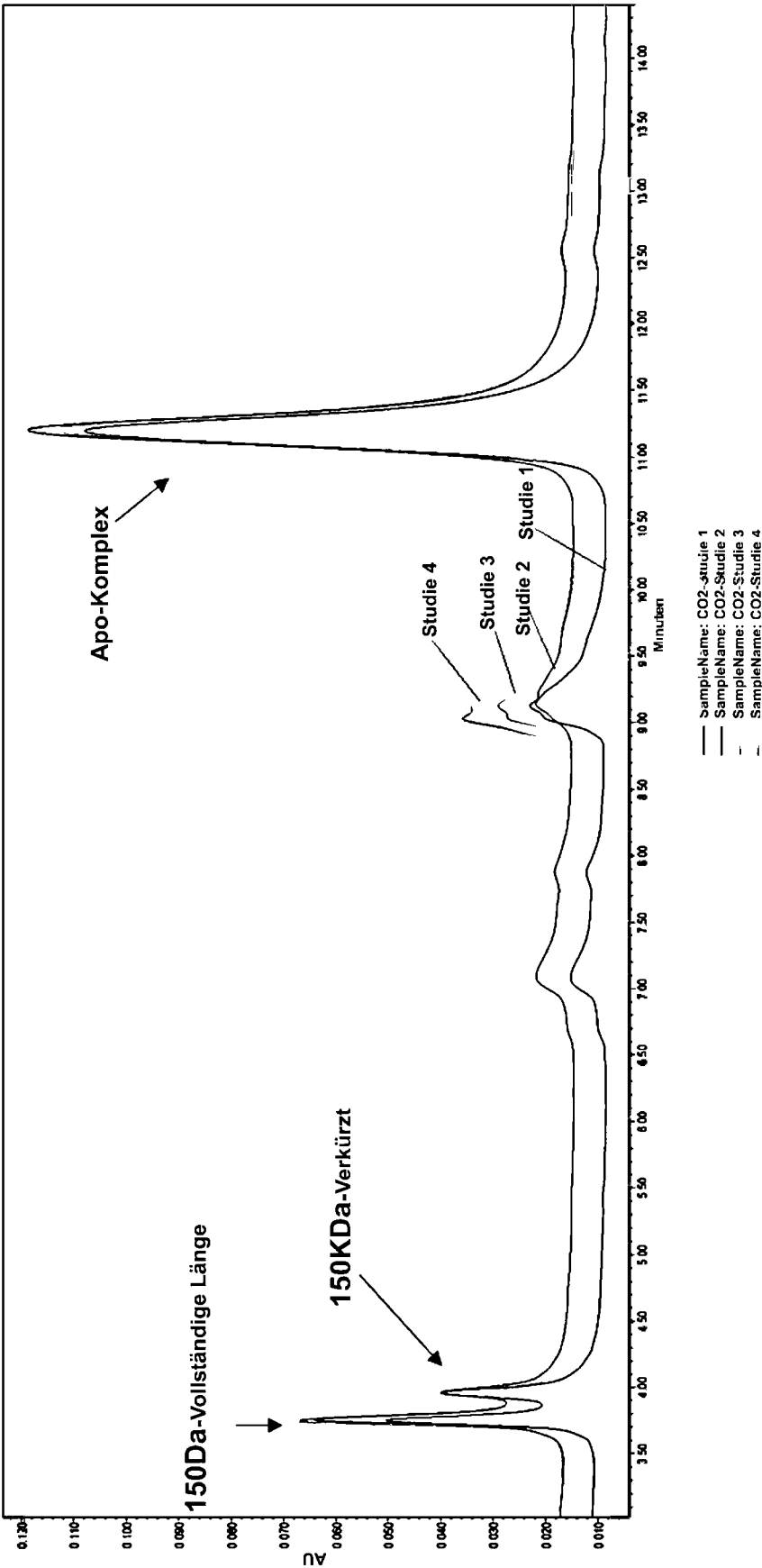


FIG. 1

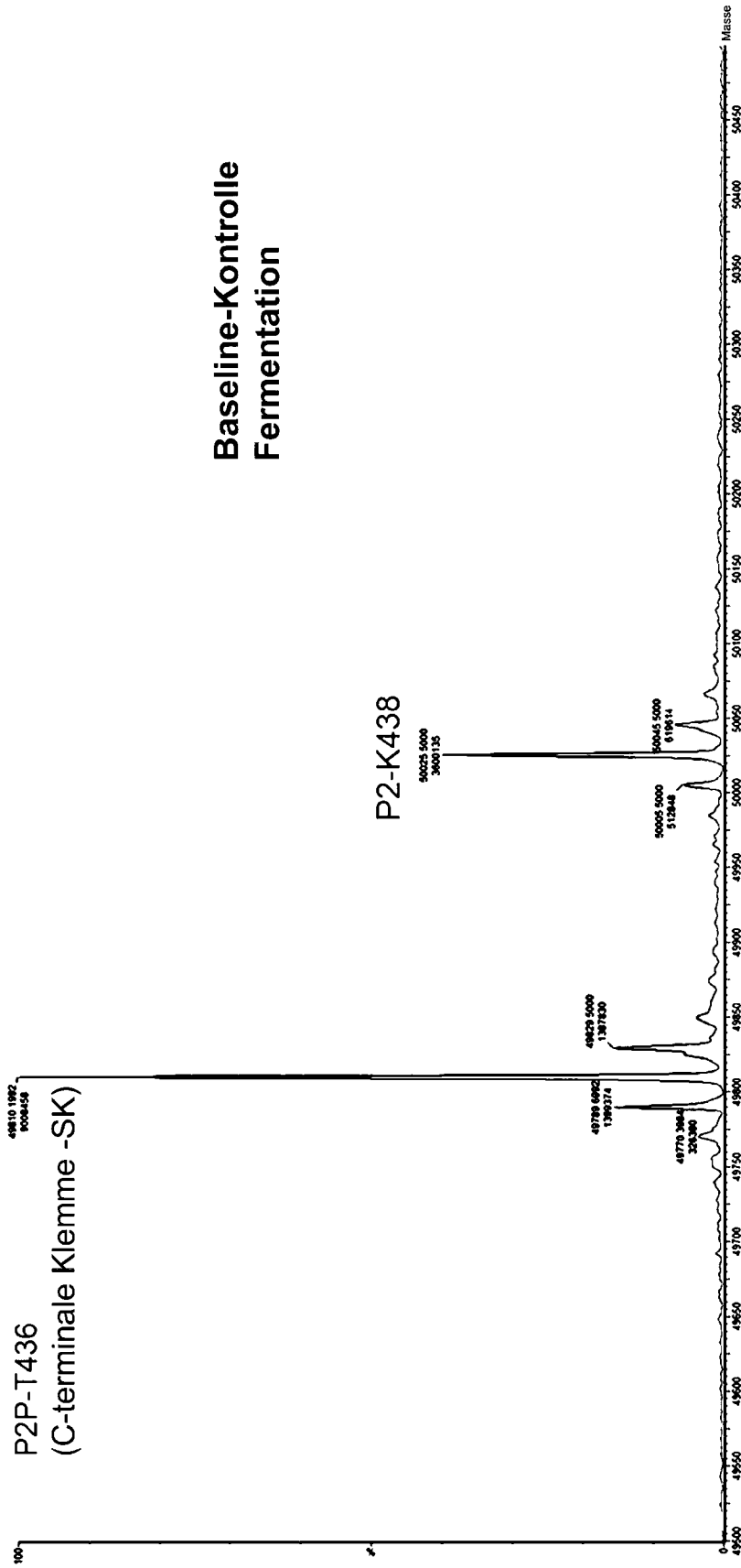


FIG. 2A

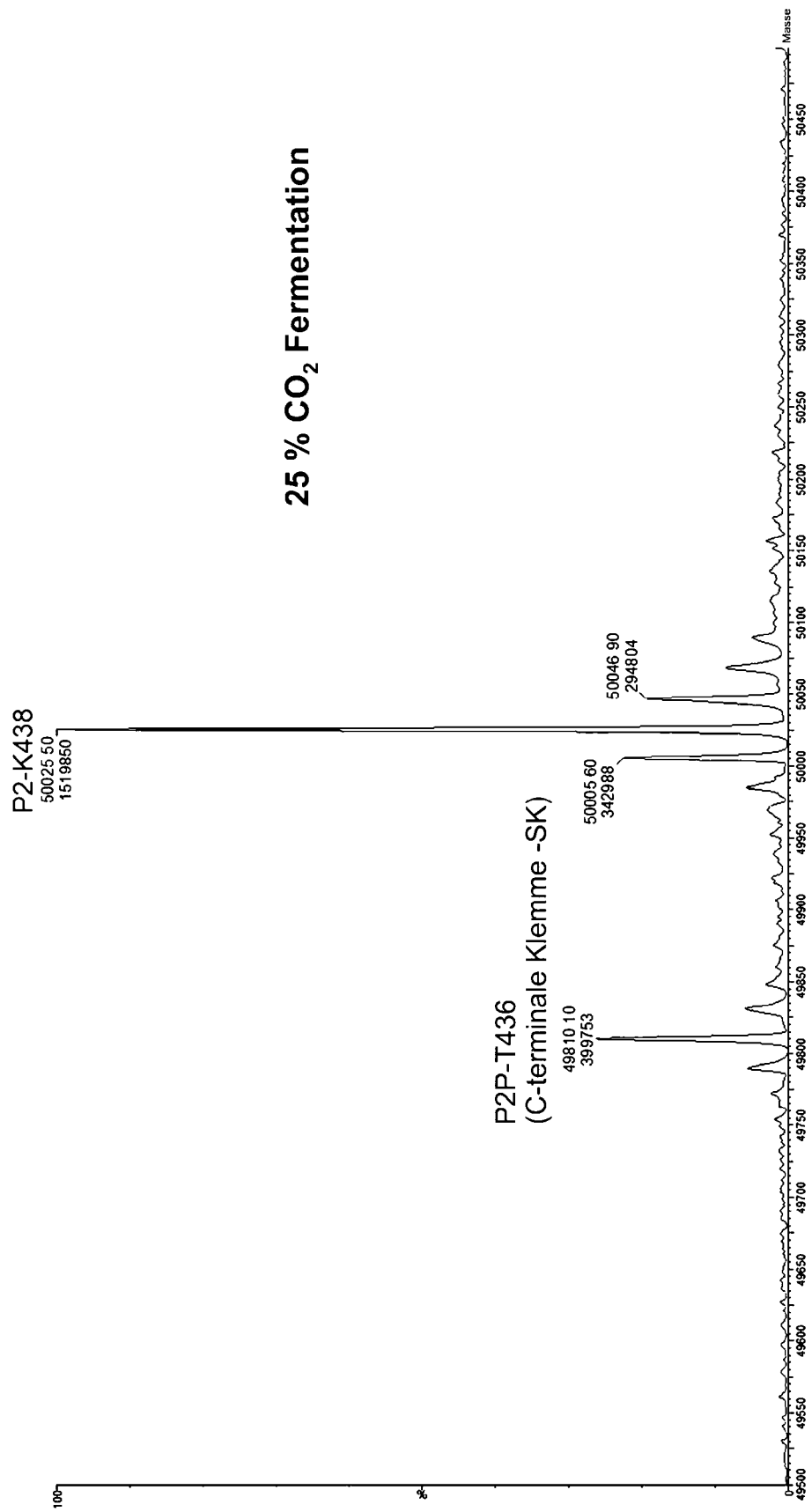


FIG. 2B

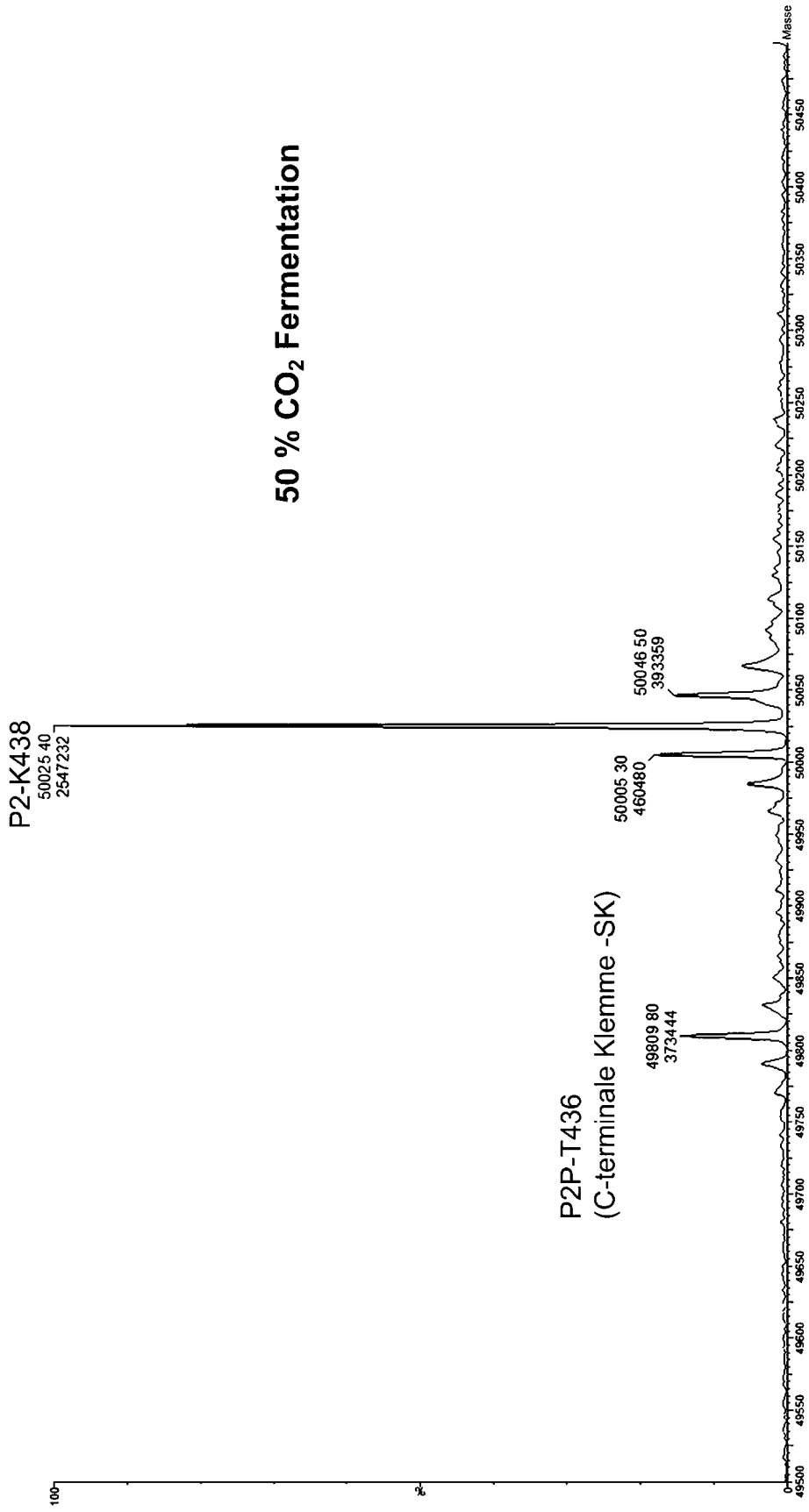


FIG. 2C

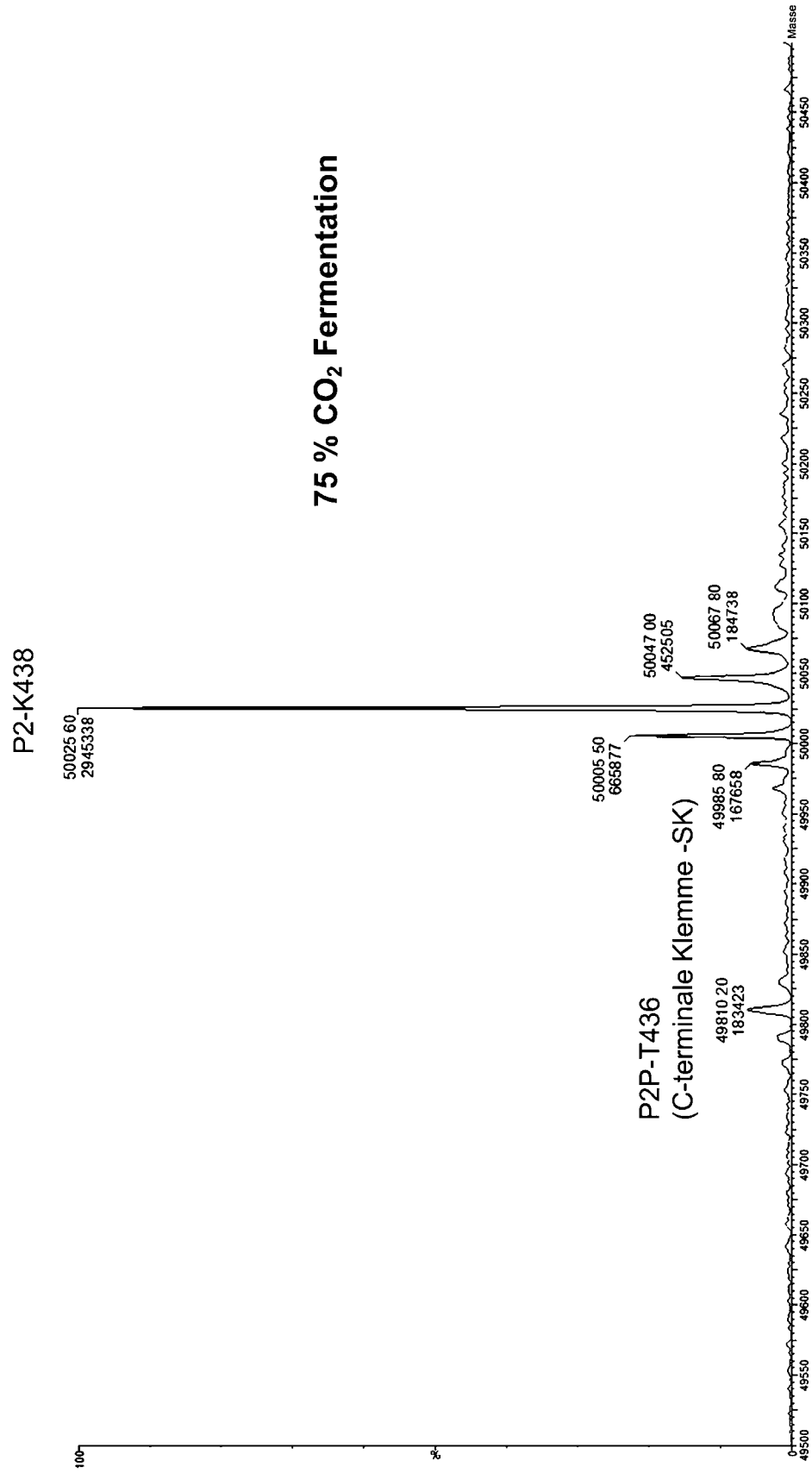


FIG. 2D

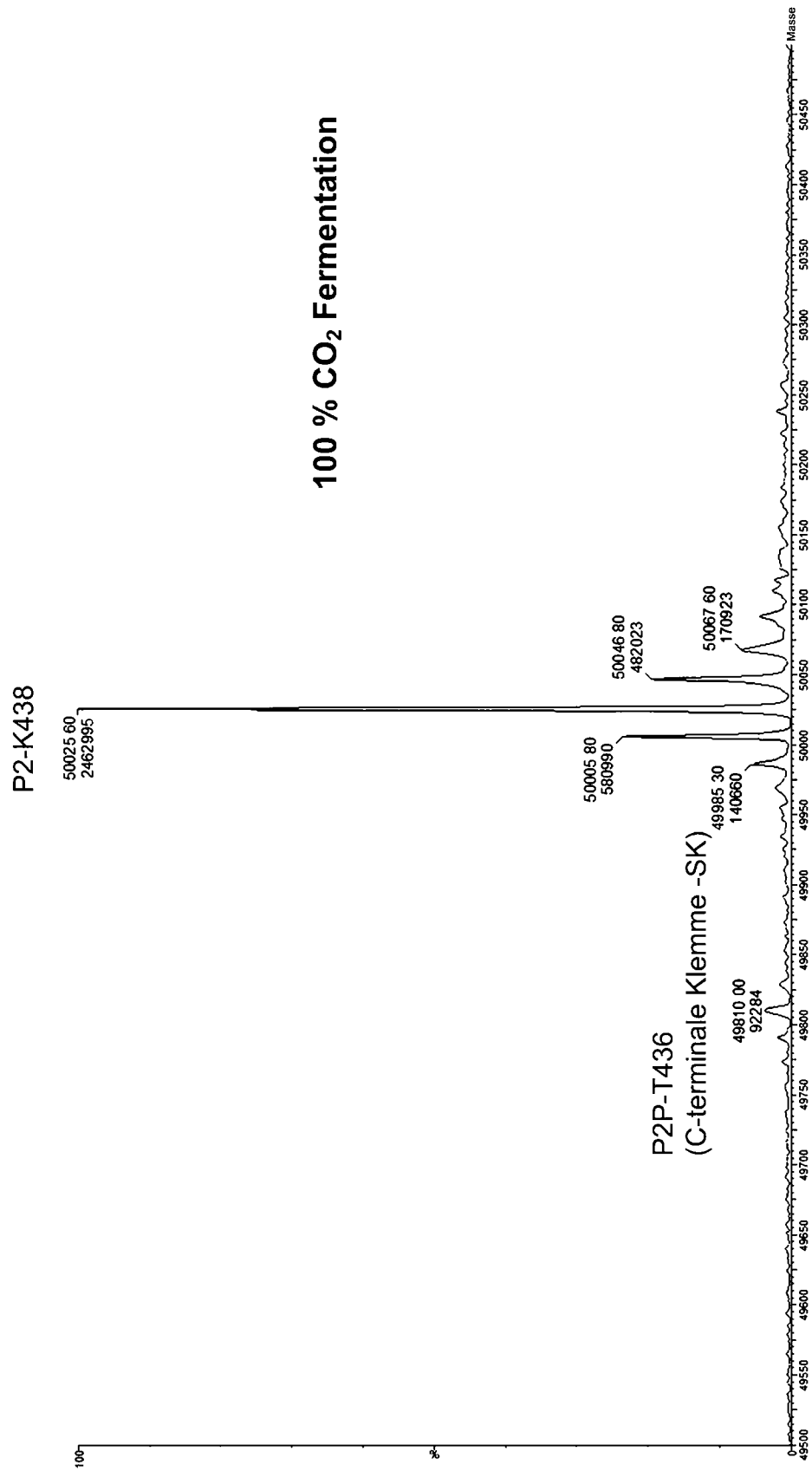


FIG. 2E

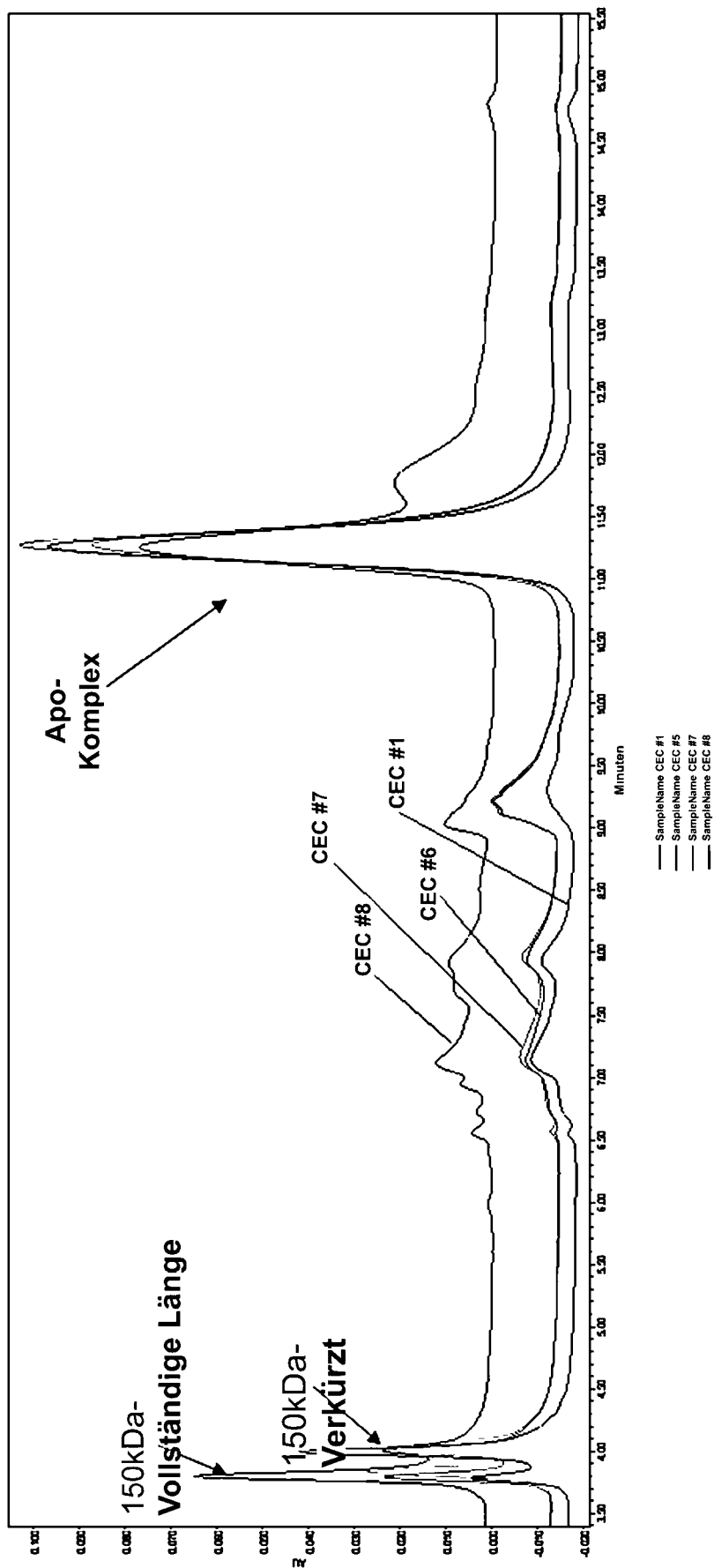


FIG. 3

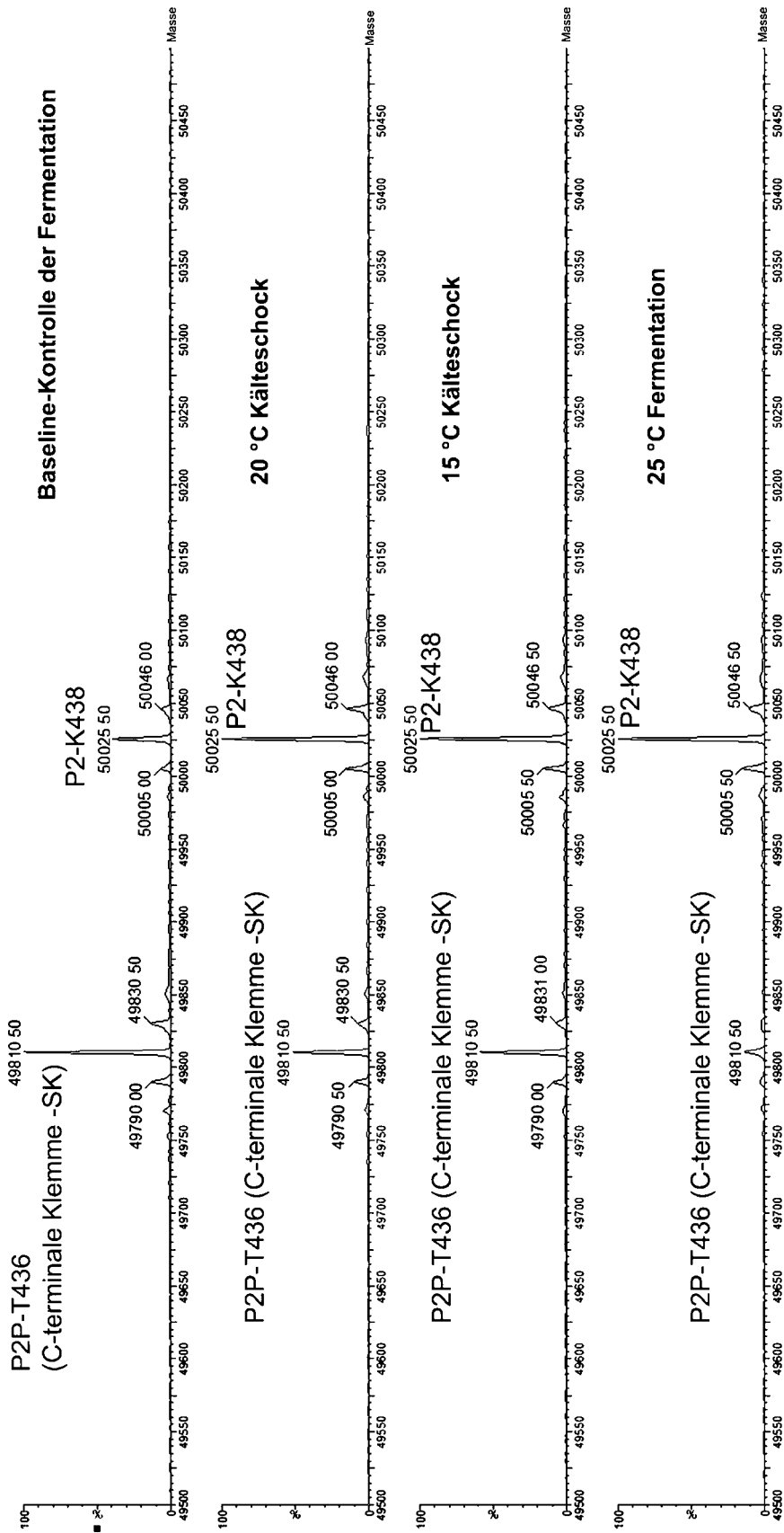


FIG. 4