



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) **CH** **720 447 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)
A61P **21/00** (2006.01)
C12N **15/11** (2006.01)

(12) **PATENTANMELDUNG**

(21) Anmeldenummer: 000063/2024

(22) Anmeldedatum: 18.01.2024

(43) Anmeldung veröffentlicht: 31.07.2024

(30) Priorität: 20.01.2023 US 63/480,938

(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) **ZUSAMMENSETZUNGEN VON CLOSTRIDIUM BOTULINUM NEUROTOXIN SEROTYP A**

(57) Die vorliegende Offenbarung bezieht sich auf Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A (BoNT/A)-Zusammensetzungen mit einer Vielzahl von 900 kDa Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A (BoNT/A)-Komplex-Spezies. Hierin werden Zusammensetzungen bereitgestellt, die BoNT/A umfassen, die eine geringe Stufe der Oxidation an spezifischen Methioninpositionen von 150 kDa BoNT/A aufweisen. Ferner werden hierin Verfahren zur Herstellung einer BoNT/A umfassenden Zusammensetzung unter Verwendung einer niedrigen Temperatur während des Prozesses der Fermentierung von Clostridium botulinum-Bakterien bereitgestellt.

Beschreibung

QUERVERWEIS AUF VERWANDTE ANMELDUNGEN

[0001] Diese Anmeldung beansprucht die Vorteile der vorläufigen US-Anmeldung Nr. 63/480.938, die am 20. Januar 2023 eingereicht wurde und hierin in vollem Umfang enthalten ist.

VERWEIS AUF DAS ELEKTRONISCH ÜBERMITTELTE SEQUENZPROTOKOLL

[0002] Diese Anmeldung enthält durch Bezugnahme ein Sequenzprotokoll, das mit dieser Anmeldung als xml-Datei mit dem Titel „13371-270-228_SEQ_LISTING.xml“ eingereicht wurde.

1. GEBIET

[0003] Hierin werden Zusammensetzungen bereitgestellt, die Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A (BoNT/A) umfassen, das eine geringe Stufe der Oxidation an spezifischen Methioninpositionen von 150 kDa BoNT/A aufweist. Ferner werden hierin Verfahren zur Herstellung einer BoNT/A umfassenden Zusammensetzung unter Verwendung einer niedrigen Temperatur während des Prozesses der Fermentierung von Clostridium botulinum-Bakterien bereitgestellt.

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, dem Neurotoxin zugeordneten Proteinen (NAPs) synthetisieren. BOTOX®, oder OnabotulinumtoxinA, ist ein BoNT/A-Produkt, das 1989 von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für eine Vielzahl 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 der überraschenden Erkenntnis, dass die Modulation der Temperatur während des Prozesses der Fermentierung von Clostridium botulinum zu Zusammensetzungen mit unterschiedlichen Stufen an oxidierten Methioninresten des produzierten Clostridium botulinum Neurotoxins Serotyp A (BoNT/A) führt. Zum Beispiel reduzierte die Verwendung einer Temperatur, die niedriger ist als die Standardfermentationstemperatur, entweder für eine kurze Zeit (d. h. Kälteschock) oder kontinuierlich während der Fermentation von Clostridium botulinum in lebewesenproteinfreien Zellkulturmedien die Oxidationsstufe an einem oder mehreren der Methioninreste (z. B. M411, M550, M1004, und/oder M1144) der produzierten 150 kDa Neurotoxin Komponente von BoNT/A. Die vorliegende Offenbarung zeigt auch eine negative Korrelation zwischen der Oxidationsstufe und der Potenz von BoNT/A auf - das bedeutet, dass BoNT/A mit einer niedrigeren Oxidationsstufe eine höhere Potenz aufweist.

[0008] Dementsprechend bezieht sich die vorliegende Offenbarung in einem Aspekt auf eine Zusammensetzung, die eine Vielzahl von 900 kDa Clostridium botulinum Serotyp A (BoNT/A) Neurotoxin-Komplex-Spezies umfasst, wobei die Oxidationsstufe der in der Zusammensetzung vorhandenen 150 kDa Neurotoxin-Spezies an jeder der folgenden Positionen weniger als 6 % beträgt: 411 (M411) wie in SEQ ID NO: 2 gezeigt, 550 (M550) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt, 1004 (M1004) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt und 1144 (M1144) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt.

[0009] In einer Ausführungsform ist der 900 kDa BoNT/A-Komplex OnabotulinumtoxinA.

[0010] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an jeder dieser Positionen weniger als 6 %.

[0011] In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als 5 %. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als etwa 2 %.

[0012] In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Oxidationsstufe an Position M550 der SEQ ID NO. 3 weniger als 1 %. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Oxidationsstufe an Position M550 der SEQ ID NO. 3 etwa 0,3 % bis etwa 0,5 %.

[0013] In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Oxidationsstufe an Position M1004 der SEQ ID NO. 3 weniger als 3 %. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Oxidationsstufe an Position M1004 der SEQ ID NO. 3 etwa 1 % bis etwa 2 % beträgt.

[0014] In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Oxidationsstufe an Position M1144 der SEQ ID NO. 3 weniger als 6 %. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Oxidationsstufe an Position M1144 der SEQ ID NO. 3 etwa 2 % beträgt.

[0015] In bestimmten Ausführungsformen wird die Oxidationsstufe durch LC-MS/MS bestimmt.

[0016] In bestimmten Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung weniger als 3 % des Wirtszellproteins.

[0017] In bestimmten Ausführungsformen weist die Zusammensetzung eine Potenz von etwa $1,5 \times 10^7$ Einheiten/mg bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg auf. In bestimmten Ausführungsformen wird die Potenz mit Hilfe eines Assays für die 50 %ige letale Dosis bei Mäusen (MLD50) bestimmt. In bestimmten Ausführungsformen wird die Potenz mit Hilfe eines auf Zellen basierenden Potenzassays bestimmt.

[0018] In bestimmten Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger. In bestimmten Ausführungsformen umfasst der pharmazeutisch verträgliche Träger menschliches Serumalbumin und Natriumchlorid. In bestimmten Ausführungsformen wird die Zusammensetzung vakuumgetrocknet.

[0019] In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex in einem Zustand der Fermentation produziert, der eine Kälteschock-Fermentationstemperatur umfasst.

[0020] In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex in einem kontinuierlichen Zustand der Kältefermentation produziert.

[0021] In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen oder mehrere Schritte der Säulenchromatographie gereinigt. In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen oder mehrere Schritte der Säulenchromatographie gereinigt, die eine hydrophobe Interaktionschromatographie umfassen. In bestimmten Ausführungsformen umfassen 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.

[0022] In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex von Clostridium botulinum-Bakterien produziert, die aus einer lebewesenproduktfreien Arbeitszellbank gezüchtet und erweitert wurden.

[0023] In bestimmten Ausführungsformen ist die Zusammensetzung lebewesenproduktfrei.

[0024] In bestimmten Ausführungsformen enthält die Zusammensetzung keinen Proteaseinhibitor.

[0025] In bestimmten Ausführungsformen enthält die Zusammensetzung kein Benzamidinhydrochlorid.

[0026] 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 bei einer Temperatur von unter 35 °C für eine Zeitdauer umfasst.

[0027] In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 72 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 160 Stunden.

[0028] In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Zeitdauer etwa 5 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen ist die Zeitdauer die gesamte Fermentationsdauer.

[0029] In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Temperatur etwa 15 °C. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Temperatur etwa 20 °C. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Temperatur etwa 25 °C.

[0030] 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 15 °C am Ende von Schritt (a); (c) Kultivieren bei 15 °C bis etwa 5 Stunden nach Schritt (a); (d) Einstellen der Temperatur auf 35 °C am Ende von Schritt (c); und (e) Kultivieren bei 35 °C bis etwa 55 Stunden nach Schritt (c).

[0031] 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 20 °C am Ende von Schritt (a); (c) Kultivieren bei 20 °C bis etwa 5 Stunden nach Schritt (a); (d) Einstellen der Temperatur auf 35 °C am Ende von Schritt (c); und (e) Kultivieren bei 35 °C bis etwa 55 Stunden nach Schritt (c).

[0032] In bestimmten Ausführungsformen umfasst das Verfahren die Inkubation der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien in dem Produktionsfermenter bei 25 °C für etwa 160 Stunden.

[0033] 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

[0034]

FIG. 1

zeigt die relative Potenz von 150 kDa BoNT/A DS, behandelt mit bis zu 100 ppm H₂O₂.

FIG. 2

zeigt die prozentuale Zunahme der Oxidation an Methioninresten von 150 kDa BoNT/A DS, die mit bis zu 100 ppm H₂O₂ behandelt wurden.

FIG. 3 zeigt 150 kDa BoNT/A mit einer Kennzeichnung der überwiegenden Oxidationsstellen.

FIG. 4 zeigt, dass die Oxidation der 150 kDa BoNT/A-Untereinheit mit einem Potenzialverlust korreliert.

5. DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0035] Die vorliegende Offenbarung stellt neue BoNT/A-Zusammensetzungen mit reduzierter Oxidationsstufe und verbesserten Eigenschaften sowie Verfahren zu deren Herstellung bereit. Dementsprechend bezieht sich die vorliegende Offenbarung in einem Aspekt auf eine Zusammensetzung, die eine Vielzahl von 900 kDa Clostridium botulinum Serotyp A (BoNT/A) Neurotoxin-Komplex-Spezies umfasst, wobei die Oxidationsstufe der in der Zusammensetzung vorhandenen 150 kDa Neurotoxin-Spezies an jeder der folgenden Positionen weniger als 6 % beträgt: 411 (M411) wie in SEQ ID NO: 2 gezeigt, 550 (M550) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt, 1004 (M1004) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt und 1144 (M1144) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt.

[0036] 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

[0037] Die Singularformen „ein“, „eine“, „ein“ und „der“, „die“, „das“ schließen den Plural ein, es sei denn, aus dem Kontext geht eindeutig etwas anderes hervor.

[0038] 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.

[0039] 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 Durchschnittsfachmann beurteilt werden kann, wie z. B. eine Variation innerhalb von 20 % oder 10 % oder 5 %. In bestimmten Ausführungsformen umfassen die Begriffe „ungefähr“ und „etwa“ den genauen Wert, der angegeben ist.

[0040] „Lebewesenproduktfrei“ („APF, animal product free“) 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.

[0041] „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 durch Bezugnahme 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 (d. h. das etwa 150 kDa neurotoxische Molekül). Sofern nicht anders angegeben, schließt das hierin verwendete BoNT/A sowohl oxidierte als auch nicht oxidierte Formen ein.

[0042] „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-Hämagglutinin-Protein (NTNH-Protein) umfassen. Die BoNT/A-Komplexe können in Form von 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 BoNT/A-Molekül von etwa 150 kDa, Hämagglutinin HA70, Hämagglutinin HA34, Hämagglutinin HA17 und nicht-toxische Nicht-Hämagglutinin-Proteine (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.

[0043] „150 kDa Clostridium botulinum Serotyp A Neurotoxin“ oder „150 kDa BoNT/A“ bedeutet 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 bevorzugten Sequenzen von 150 kDa Botulinum Toxin Typ A (BoNT/A), die im Zusammenhang mit der vorliegenden Offenbarung verwendet werden, sind in Tabelle 1 aufgeführt. In einer Ausführungsform umfasst das im Rahmen der vorliegenden Offenbarung verwendete 150 kDa BoNT/A beispielsweise (z. B. besteht aus) eine leichte Kette mit einer in SEQ ID NO. 2 dargelegten Aminosäuresequenz und einer schweren Kette mit einer in SEQ ID NO.

3 dargelegten Aminosäuresequenz, wobei sich die Disulfidbrücken zwischen den Positionen 429 und 453 und zwischen den Positionen 1234 und 1279 befinden. Sofern nicht anders angegeben, schließt das hierin verwendete 150 kDa BoNT/A sowohl oxidierte als auch nicht oxidierte Formen ein.

[0044] 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.

[0045] „Kälteschock“ bedeutet eine Fermentationstemperatur, die für eine kurze Zeit während des Fermentationsprozesses niedriger ist als die übliche Fermentationstemperatur (d. h., bei etwa 35 ± 1 °C).

[0046] „Clostridien Neurotoxin“ bedeutet ein Neurotoxin, das von einem Clostridien Bakterium wie Clostridium botulinum, Clostridium utricum oder Clostridium beratti produziert wird oder von diesem stammt, sowie ein Clostridien Neurotoxin, das rekombinant von einer Nicht-Clostridien Art hergestellt wird.

[0047] 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.

[0048] Der hierin verwendete Begriff „oxidierte Formen von BoNT/A“ bezieht sich auf BoNT/A-Protein, das an mindestens einem Methioninrest oxidiert ist. In einer Ausführungsform umfassen die oxidierten Formen von BoNT/A in den hierin beschriebenen Zusammensetzungen ein oxidiertes Methionin an einer oder mehreren der Positionen 411 (M411) der SEQ ID NO: 2 und 550 (M550), 1004 (M1004) und 1144 (M1144) der SEQ ID NO: 3. Die hierin beschriebenen Zusammensetzungen können eine Vielzahl von oxidierten Formen von BoNT/A umfassen, von denen jede ein anderes Oxidationsprofil aufweist (d. h. Oxidation an einem anderen Satz von Methioninresten).

[0049] Der hierin verwendete Begriff „Oxidationsstufe“ bezieht sich auf den Prozentsatz von BoNT/A-Arten innerhalb einer Zusammensetzung, die eine Oxidation an einem bestimmten Methioninrest von BoNT/A aufweist. Die Oxidation am spezifischen Methioninrest von BoNT/A kann mit Verfahren festgestellt werden, die im Fachgebiet bekannt sind, z. B. durch LC-MS/MS, und der Prozentsatz der Oxidation am besagten Methioninrest kann unter Verwendung der folgenden Formel quantifiziert werden:

$$\% \text{ Oxidation}_{(\text{Stelle } n)} = \frac{(\text{Spitzenbereich des oxidierten Peptids})}{(\text{Spitzenbereich des oxidierten Peptids} + \text{Spitzenbereich des nicht oxidierten Peptids})} \times 100$$

[0050] Der Begriff „Patient“, „Subjekt“, „Individuum“ und dergleichen bezieht sich auf Menschen.

[0051] „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 gefriergetrockneten oder vakuumgetrockneten Zustand, als Lösung, die aus der gefriergetrockneten oder vakuumgetrockneten 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 Zusammensetzung mit BoNT/A aktivem Wirkstoff sind in der US-Patentanmeldung Nr. 2003/0118598 offenbart, die am 5. November 2002 eingereicht wurde und hierin durch Bezugnahme in vollem Umfang enthalten ist. 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, die 900 kDa BoNT/A, menschliches Serumalbumin (HSA) und Natriumchlorid

rid umfasst. Vorzugsweise umfassen solche pharmazeutischen Zusammensetzungen 0,5 mg HSA und 0,9 mg Natriumchlorid pro 100 Einheiten BoNT/A. Am meisten bevorzugt umfassen solche pharmazeutischen Zusammensetzungen 50, 100 oder 200 Einheiten BoNT/A.

[0052] „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 den US-Patentnummern 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.

[0053] 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)

[0054] In einem Aspekt umfasst die Zusammensetzung 150-kDa Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A (BoNT/A) sowohl in oxidiert als auch in nicht oxidiert Form.

[0055] Ein 150 kDa BoNT/A-Molekül ist eine Zink-Endopeptidase, die spezifisch eine Peptidverknüpfung des intrazellulären, vesikel-zugeordneten Proteins (VAMP, auch Synaptobrevin genannt) 25 KiloDalton (kDa) synaptosomal zugeordneten Proteins (SNAP-25) hydrolysieren kann.

[0056] 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 werden. Clostridien-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-Proteine (HA-Proteine) und/oder Nicht-Toxin-Nicht-Hämagglutinin-Proteine (NTNH-Proteine).

[0057] In einer Ausführungsform weist das 150 kDa BoNT/A-Molekül, das im Rahmen der vorliegenden Offenbarung verwendet werden kann, die in Tabelle 1 dargestellte 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). Die Reste 439-448 sind die Einkerbungsstelle und sind kursiv gedruckt. Die Oxidationsstellen M411, M550, M1004 und M1144 sind unterstrichen. Die in verschiedenen Ansprüchen, Ausführungsformen und Aspekten dieser Offenbarung genannten Positionen der Aminosäurereste beziehen sich auf die in Tabelle 1 dargestellten Positionen der Aminosäurereste. Nach Tabelle 1 beginnt der erste Aminosäurerest der SEQ ID NO: 2 an Position 2 der SEQ ID NO: 2 und nicht an Position 1 der SEQ ID NO: 2, und der erste Aminosäurerest der SEQ ID NO: 3 beginnt an Position 449 der SEQ ID NO: 3 und nicht an Position 1 der SEQ ID NO: 3.

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

[0058]

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

MPFVNKQFNY	KDPVNGVDIA	YIKIPNAGQM	QPVKAFKIHN	KIWWIPERDT	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	FSVDKLFKDK	LYKMLTEIYT	350
EDNFVKFFKV	LNRKTYLNFD	KAVFKINIVP	KVNYTIYDGF	NLRNTNLAAN	400
FNGQNTINN	MNFTKLKNFT	GLFEFYKLLC	VRGIITSKTK	SLDKGYNK	

CH 720 447 A2

				AL	450
NDLCIKVNNW	DLFFSPSEDN	FTNDLNKGEE	ITSDTNIEAA	EENISLDLIQ	500
QYYLTNFNFDN	EPENISIENL	SSDIIGQLEL	MPNIERFPNG	KKYELDKYTM	550
FHYLRAQEFE	HGKSRIALTN	SVNEALLNPS	RVYTFSSDY	VKKVKNKATEA	600
AMFLGWVEQL	VYDFTDETSE	VSTTDKIADI	TIIPYIGPA	LNIGNMLYKD	650
DFVGALIFSG	AVILLEFIPE	IAIPVLGTFA	LVSYIANKVL	TVQTIDNALS	700
KRNEKWDEVY	KYIVTNWLAK	VNTQIDLIRK	KMKEALENQA	EATKAIINYQ	750
YNQYTEEEKN	NINFNIDDL	SKLNESSINKA	MININKFLNQ	CSVSYLMNSM	800
IPYGVKRLED	FDASLKDALL	KYIYDNRGTL	IGQVDRLKDK	VNNTLSTDIP	850
FQLSKYVDNQ	RLSTFTFYI	KNIINTSILN	LYESNHLID	LSRYASKINI	900
GSKVNFDPID	KNQIQLFNLE	SSKIEVILKN	AIVYNSMYEN	FSTSFWRIP	950
KYFNSISLNN	EYTIINCMEN	NSGWKVSILNY	GEIHWTLQDT	QEIQRVVFVK	1000
YSQMINISDY	INRWIFVTIT	NNRLNNSKIY	INGRLIDQKP	ISNLGNIHAS	1050
NNIMFKLDGC	RDTHRYIWIK	YFNLFDKELN	EKEIKDLYDN	QSNKGILKDF	1100
WGDYLYQYDKP	YYMLNLYDPN	KYVDVNNVGI	RGYMYLKGPR	GSMVTNNIYL	1150
NSSLYRGTKF	IKKYASGNK	DNIVRNNDRV	YINVVVKNKE	YRLATNASQA	1200
GVEKILSALE	IPDVGNLSQV	VVMKSKNDQG	ITNKCKMNLQ	DNNGNDIGFI	1250
GFHQFNNAIAK	LVASNWNRRQ	IERSSRTLGC	SWEFIPVDDG	WGERPL	1296

SEQ ID NO. 2: Aminosäuresequenz der leichten Kette (LC) des BoNT/A-Moleküls

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

SEQ ID NO. 3: Aminosäuresequenz der schweren Kette (HC) des BoNT/A-Moleküls

				AL	50
NDLCIKVNNW	DLFFSPSEDN	FTNDLNKGEE	ITSDTNIEAA	EENISLDLIQ	500
QYYLTNFNFDN	EPENISIENL	SSDIIGQLEL	MPNIERFPNG	KKYELDKYTM	550
FHYLRAQEFE	HGKSRIALTN	SVNEALLNPS	RVYTFSSDY	VKKVKNKATEA	600
AMFLGWVEQL	VYDFTDETSE	VSTTDKIADI	TIIPYIGPA	LNIGNMLYKD	650
DFVGALIFSG	AVILLEFIPE	IAIPVLGTFA	LVSYIANKVL	TVQTIDNALS	700
KRNEKWDEVY	KYIVTNWLAK	VNTQIDLIRK	KMKEALENQA	EATKAIINYQ	750

YNQYTEEEKN	NINFNIDDL	SKLNEINKA	MININKFLNQ	CSVSYLMNSM	800
IPYGVKRLD	FDASLKDALL	KYIYDNRGTL	IGQVDRLKDK	VNNTLSTDIP	850
FQLSKYVDNQ	RLSTFTFYI	KNIINTSILN	LYESNHLID	LSRYASKINI	900
GSKVNFDPID	KNQIQLFNLE	SSKIEVILKN	AIVYNSMYEN	FSTSFWRIP	950
KYFNSISLNN	EYTIINC MEN	NSGWKVS LNY	GEIIWTLQDT	QEIQRVVKF	1000
YSQMINISDY	INRWIFVTIT	NNRLNNSKIY	INGRLIDQKP	ISNLGNIHAS	1050
NNIMFKLDGC	RDTHRYIWIK	YFNLFDKELN	EKEIKDLYDN	QSN SGILKDF	1100
WGDYLGQYDKP	YYMLNLYDPN	KYVDVNNVGI	RGYMYLKGPR	GSMVTNNIYL	1150
NSSLYRGTKF	IKKYASGNK	DNIVRNNDRV	YINVVVKNKE	YRLATNASQA	1200
GVEKILSALE	IPDVGNLSQV	VVMKSKNDQG	ITNKCKMNLQ	DNNGNDIGFI	1250
GFHQFNNAIK	LVASNWYNRQ	IERSSRTLGC	SWEFIPVDDG	WGERPL	1296

[0059] 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 in Form eines 900 kDa BoNT/A-Komplexes vor, der aus dem 150 kDa BoNT/A-Molekül und den Proteinen Hämagglutinin HA70, Hämagglutinin HA34, Hämagglutinin HA17 und nicht-toxischem Nicht-Hämagglutinin (NTNH) hergestellt ist. 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 von Clostridium botulinum produziert. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das hierin beschriebene BoNT/A OnabotulinumtoxinA.

[0060] In einer Ausführungsform umfasst das hierin beschriebene 150 kDa BoNT/A-Molekül eine leichte Kette mit der in SEQ ID NO. 2 dargelegten Aminosäuresequenz und einer schweren Kette mit einer in SEQ ID NO. 3 dargelegten Aminosäuresequenz, wobei sich die Disulfidbrücken zwischen den Positionen 429 und 453 und zwischen den Positionen 1234 und 1279 befinden.

5.3. Oxidierte BoNT/A-Zusammensetzungen

[0061] In einer Ausführungsform bezieht sich die vorliegende Offenbarung auf eine Zusammensetzung, die eine Vielzahl von 900 kDa Clostridium botulinum Serotyp A (BoNT/A) Neurotoxin-Komplex-Spezies umfasst, wobei die Oxidationsstufe der in der Zusammensetzung vorhandenen 150 kDa Neurotoxin-Spezies an jeder der folgenden Positionen weniger als 6 % beträgt: 411 (M411) wie in SEQ ID NO: 2 gezeigt, 550 (M550) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt, 1004 (M1004) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt und 1144 (M1144) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt. Beispielsweise und ohne Einschränkung ist die Oxidationsstufe an einer oder mehreren der Positionen weniger als 5,5 %, weniger als 5,0 %, weniger als 4,5 %, weniger als 4,0 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 % oder weniger als 0,1 %, sowie Bereiche und Mengen zwischen jedem dieser vorgenannten Oxidationsprozentsätze.

[0062] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an jeder der Positionen 411 (M411) der SEQ ID NO: 2 und 550 (M550), 1004 (M1004) und 1144 (M1144) der SEQ ID NO: 3 weniger als 6,0 %. Beispielsweise und ohne Einschränkung beträgt die Oxidationsstufe an jeder der Positionen weniger als 5,5 %, weniger als 5,0 %, weniger als 4,5 %, weniger als 4,0 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, oder weniger als 0,1 %.

[0063] In einer Ausführungsform umfassen die oxidierten Formen von BoNT/A in den hierin beschriebenen Zusammensetzungen ein oxidiertes Methionin an Position 411 (M411) der SEQ ID NO. 2.

[0064] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als 5 % (z. B., weniger als 4,5 %, weniger als 4 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, weniger als 0,1 %).

[0065] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 etwa 1 % bis etwa 5 %, etwa 1 % bis etwa 4 %, etwa 1 % bis etwa 3 %, etwa 1 % bis etwa 2 %, etwa 2 % bis etwa 5 %, etwa 2 % bis etwa 4 %, etwa 2 % bis etwa 3 % oder etwa 3 % bis etwa 5 % oder etwa 4 % bis etwa 5 %.

- [0066] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als etwa 2 %.
- [0067] In einer Ausführungsform umfassen die oxidierten Formen von BoNT/A in den hierin beschriebenen Zusammensetzungen ein oxidiertes Methionin an Position 550 (M550) der SEQ ID NO. 3.
- [0068] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M550 der SEQ ID NO. 3 weniger als 1 % (z. B., weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 % oder weniger als 0,1 %).
- [0069] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M550 der SEQ ID NO. 3 etwa 0,3 % bis etwa 0,5 % (z. B. etwa 0,3 %, etwa 0,35 %, etwa 0,4 %, etwa 0,45 % oder etwa 0,5 %).
- [0070] In einer Ausführungsform umfassen die oxidierten Formen von BoNT/A in den hierin beschriebenen Zusammensetzungen ein oxidiertes Methionin an Position 1004 (M1004) der SEQ ID NO. 3.
- [0071] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M1004 der SEQ ID NO. 3 weniger als 3 % (z. B., weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 % oder weniger als 0,1 %).
- [0072] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M1004 der SEQ ID NO. 3 beträgt etwa 1 % bis etwa 2 % (z. B. etwa 1 %, etwa 1,1 %, etwa 1,2 %, etwa 1,3 %, etwa 1,4 %, etwa 1,5 %, etwa 1,6 %, etwa 1,7 %, etwa 1,8 %, etwa 1,9 % oder etwa 2 %).
- [0073] In einer Ausführungsform umfassen die oxidierten Formen von BoNT/A in den hierin beschriebenen Zusammensetzungen ein oxidiertes Methionin an Position 1144 (M1144) der SEQ ID NO. 3.
- [0074] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M1144 der SEQ ID NO. 3 weniger als 6 % (z. B., weniger als 5,5 %, weniger als 5,0 %, weniger als 4,5 %, weniger als 4,0 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, oder weniger als 0,1 %).
- [0075] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M1144 der SEQ ID NO. 3 etwa 1 % bis etwa 5 %, etwa 1 % bis etwa 4 %, etwa 1 % bis etwa 3 %, etwa 1 % bis etwa 2 %, etwa 2 % bis etwa 5 %, etwa 2 % bis etwa 4 %, etwa 2 % bis etwa 3 % oder etwa 3 % bis etwa 5 % oder etwa 4 % bis etwa 5 %.
- [0076] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M1144 der SEQ ID NO. 3 etwa 2 % beträgt.
- [0077] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als 5 % (z. B., weniger als 4,5 %, weniger als 4 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, weniger als 0,1 %) und die Oxidationsstufe an der Position M550 der SEQ ID NO: 3 beträgt weniger als 1 % (z. B., weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 % oder weniger als 0,1 %).
- [0078] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 etwa 2 % und die Oxidationsstufe an Position M550 der SEQ ID NO: 3 etwa 0,3 % bis etwa 0,5 % (z. B. etwa 0,3 %, etwa 0,35 %, etwa 0,4 %, etwa 0,45 % oder etwa 0,5 %).
- [0079] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als 5 % (z. B., weniger als 4,5 %, weniger als 4 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, weniger als 0,1 %) und die Oxidationsstufe an Position M1004 der SEQ ID NO: 3 beträgt weniger als 3 % (z. B., z. B., weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, oder weniger als 0,1 %).
- [0080] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 etwa 2 % und die Oxidationsstufe an Position M1004 der SEQ ID NO: 3 beträgt etwa 1 % bis etwa 2 % (z. B. etwa 1 %, etwa 1,1 %, etwa 1,2 %, etwa 1,3 %, etwa 1,4 %, etwa 1,5 %, etwa 1,6 %, etwa 1,7 %, etwa 1,8 %, etwa 1,9 % oder etwa 2 %).
- [0081] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als 5 % (z. B., weniger als 4,5 %, weniger als 4 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, weniger als 0,1 %) und die Oxidationsstufe an der Position M1144 der SEQ ID NO: 3 beträgt weniger als 6 % (z. B., weniger als 5,5 %, weniger als 5,0 %, weniger als 4,5 %, weniger als 4,0 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, oder weniger als 0,1 %).

[0093] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als 5 % (z. B., weniger als 4,5 %, weniger als 4 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, weniger als 0,1 %), die Oxidationsstufe an der Position M1004 der SEQ ID NO. 3 beträgt weniger als 3 % (z. B., weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 % oder weniger als 0,1 %) und die Oxidationsstufe an der Position M1144 der SEQ ID NO. 3 beträgt weniger als 6 % (z. B., weniger als 5,5 %, weniger als 5,0 %, weniger als 4,5 %, weniger als 4,0 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, oder weniger als 0,1 %).

[0094] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 etwa 2 %, die Oxidationsstufe beträgt an Position M1004 der SEQ ID NO. 3 etwa 1 % bis etwa 2 % (z. B. etwa 1 %, etwa 1,1 %, etwa 1,2 %, etwa 1,3 %, etwa 1,4 %, etwa 1,5 %, etwa 1,6 %, etwa 1,7 %, etwa 1,8 %, etwa 1,9 % oder etwa 2 %), und die Oxidationsstufe an Position M1144 der SEQ ID NO. 3 etwa 2 % beträgt.

[0095] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M550 der SEQ ID NO. 3 weniger als 1 % (z. B., weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 % oder weniger als 0,1 %), die Oxidationsstufe an Position M1004 der SEQ ID NO. 3 beträgt weniger als 3 % (z. B., weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 % oder weniger als 0,1 %) und die Oxidationsstufe an Position M1144 der SEQ ID NO. 3 beträgt weniger als 6 % (z. B., weniger als 5,5 %, weniger als 5,0 %, weniger als 4,5 %, weniger als 4,0 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, oder weniger als 0,1 %).

[0096] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M550 der SEQ ID NO. 3 etwa 0,3 % bis etwa 0,5 % (z. B. etwa 0,3 %, etwa 0,35 %, etwa 0,4 %, etwa 0,45 %, oder etwa 0,5 %), die Oxidationsstufe beträgt an Position M1004 der SEQ ID NO. 3 etwa 1 % bis etwa 2 % (z. B. etwa 1 %, etwa 1,1 %, etwa 1,2 %, etwa 1,3 %, etwa 1,4 %, etwa 1,5 %, etwa 1,6 %, etwa 1,7 %, etwa 1,8 %, etwa 1,9 % oder etwa 2 %), und die Oxidationsstufe an Position M1144 der SEQ ID NO. 3 etwa 2 % beträgt. In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als 5 % (z. B., weniger als 4,5 %, weniger als 4 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, weniger als 0,1 %), die Oxidationsstufe an Position M550 der SEQ ID NO. 3 beträgt weniger als 1 % (z. B., weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 % oder weniger als 0,1 %), die Oxidationsstufe an Position M1004 der SEQ ID NO. 3 beträgt weniger als 3 % (z. B., weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 % oder weniger als 0,1 %) und die Oxidationsstufe an Position M1144 der SEQ ID NO. 3 beträgt weniger als 6 % (z. B., weniger als 5,5 %, weniger als 5,0 %, weniger als 4,5 %, weniger als 4,0 %, weniger als 3,5 %, weniger als 3 %, weniger als 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 %, oder weniger als 0,1 %).

[0097] In einer Ausführungsform beträgt die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 etwa 2 %, die Oxidationsstufe beträgt an Position M550 der SEQ ID NO. 3 etwa 0,3 % bis etwa 0,5 % (z. B. etwa 0,3 %, etwa 0,35 %, etwa 0,4 %, etwa 0,45 %, oder etwa 0,5 %), die Oxidationsstufe beträgt an Position M1004 der SEQ ID NO. 3 etwa 1 % bis etwa 2 % (z. B. etwa 1 %, etwa 1,1 %, etwa 1,2 %, etwa 1,3 %, etwa 1,4 %, etwa 1,5 %, etwa 1,6 %, etwa 1,7 %, etwa 1,8 %, etwa 1,9 % oder etwa 2 %), und die Oxidationsstufe an Position M1144 der SEQ ID NO. 3 etwa 2 % beträgt.

[0098] Die Oxidationsstufe der hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen kann mit auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren, z. B. mittels Massenspektrometrie bestimmt werden. In einer Ausführungsform wird die Oxidationsstufe durch Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) bestimmt, zum Beispiel, ohne Einschränkung, unter Verwendung des in Beispiel 2 veranschaulichten LC-MS/MS-Verfahrens.

[0099] 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.

[0100] 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.

[0101] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen umfasst die hierin beschriebene Zusammensetzung ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger. In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen umfasst der pharmazeutisch verträgliche Träger menschliches Serumalbumin und Natriumchlorid.

[0102] 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 verschiedenen Aspekten und 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.

[0103] 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 lebewesenproduktfreien Arbeitszellbank gezüchtet und erweitert wurden. Die lebewesenproduktfreie Arbeitszellbank kann zum Beispiel und ohne Einschränkung wie in Beispiel 6 beschrieben hergestellt werden.

[0104] 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.

[0105] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex in einem Zustand der Fermentation produziert, der eine Kaltschock-Fermentationstemperatur umfasst.

[0106] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex in einem kontinuierlichen Zustand der Fermentation bei kalten Temperaturen produziert.

[0107] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex unter Verwendung eines Zustands der Fermentation (z. B. einer Einstellung der Fermentationstemperatur) hergestellt, wie in Abschnitt 5.4 beschrieben.

[0108] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex unter Verwendung eines Zustands der Fermentation (z. B. einer Einstellung der Fermentationstemperatur) hergestellt, wie in Beispiel 1 beschrieben.

[0109] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex wie in Abschnitt 5.4 beschrieben hergestellt.

[0110] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt.

[0111] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex in einem Clostridium botulinum 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.

[0112] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen chromatographischen Prozess gereinigt (z. B. ein in Abschnitt 5.4 beschriebener chromatographischer Prozess).

[0113] 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

[0114] Botulinum-Toxin Typ A wurde von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung von essentiellem Blepharospasmus, Strabismus und hemifazialen Spasmus bei Patienten über zwölf Jahren, zervikaler Dystonie, Glabellafalten (Gesichtsfalten) und zur Behandlung von Hyperhidrose zugelassen. Eine im Handel erhältli-

che 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, die Kochsalzlösung und Albumin enthält, 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. Jedes Fläschchen 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 in vakuumgetrockneter Form und ist für die Rekonstitution mit steriler normaler Kochsalzlösung ohne Konservierungsmittel (0,9 % Natriumchlorid-Injektion) bestimmt.

[0115] 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) mit sowohl oxidierten als auch nicht oxidierten Formen 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 einer lebewesenproduktfreien Arbeitszellbank ausgeführt 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 z. B. während der Reinigung keinem Niederschlag (z. B. Niederschlag mit kaltem Ethanol, Salzsäure und/oder Ammoniumsulfat) 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.

[0116] 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. In einer Ausführungsform werden die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen unter Verwendung des in Beispiel 1 offenbartes APF-Prozesses ermittelt.

[0117] 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. campestri 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 für die Fermentation von Clostridium botulinum verwendete Medium frei von Lebewesen 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 ist, auf das hierin in vollem Umfang Bezug genommen wird. In einer Ausführungsform kann das Fermentationsmedium 3 Gew.-%/Vol.-% oder 5 Gew.-%/Vol.-% HySoy; 1 Gew.-%/Vol.-% HyHefe; und 1 Gew.-%/Vol.-% 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 Gew.-%/Vol.-% Sojapepton Typ II, 1,2 Gew.-%/Vol.-% Hefeextrakt,

1,5 Gew./Vol.-% Glukose umfassen, wobei der pH-Wert mit Natriumhydroxid auf 7,3 eingestellt wird, wie in Beispiel 1 unten veranschaulicht.

[0118] In einigen Ausführungsformen werden die hierin beschriebenen Zusammensetzungen unter einem Kälteschockzustand, d. h. bei einer Temperatur, die niedriger ist als die übliche Fermentationstemperatur (d. h. bei etwa 35 ± 1 °C), für eine kurze Zeit innerhalb des Fermentationsprozesses ermittelt. In einigen Ausführungsformen werden die 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 ermittelt. Die Kälteschockbedingungen können während des gesamten Fermentationsprozesses eine beliebige Zeitdauer dauern, zum Beispiel 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 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. bis 17. Stunde in einem 72-stündigen Fermentationsprozess) während der Fermentation ermittelt.

[0119] In einigen Ausführungsformen werden die hierin beschriebenen Zusammensetzungen unter einem kontinuierlichen kalten Zustand ermittelt, z. B. bei einer Temperatur, die während des gesamten Fermentationsprozesses kontinuierlich niedriger ist (z. B. etwa 25 °C) als die übliche Fermentationstemperatur (z. B. 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 ermittelt. In einigen Ausführungsformen werden die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen durch Fermentieren einer Kultur von Clostridium botulinum bei etwa 25 °C für etwa 160 Stunden ermittelt.

[0120] 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 von unter 35 °C für eine bestimmte Zeit umfasst.

[0121] In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 60 Stunden bis etwa 200 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 60 Stunden bis etwa 160 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 60 Stunden bis etwa 120 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 60 Stunden bis etwa 80 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 68 Stunden bis etwa 76 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 65 Stunden bis etwa 72 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 72 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 120 Stunden bis etwa 200 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 120 Stunden bis etwa 180 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 140 Stunden bis etwa 180 Stunden. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die gesamte Fermentationsdauer etwa 160 Stunden.

[0122] In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Zeitdauer (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.

[0123] 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 beträgt die Temperatur etwa 15 °C-20 °C (z. B. etwa 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, oder 20 °C). In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Temperatur etwa 15 °C. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Temperatur etwa 20 °C. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Temperatur etwa 25 °C.

[0124] 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. etwa 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) Kultivieren bei 35 °C bis etwa 55 Stunden nach Schritt (c).

[0125] In bestimmten Ausführungsformen umfasst das Verfahren die Inkubation der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien in dem Produktionsfermenter bei 25 °C für etwa 160 Stunden.

[0126] In bestimmten Ausführungsformen wird das Verfahren wie in Beispiel 1 beschrieben ausgeführt.

[0127] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird die Fermentation in lebewesenproteinfreien Zellkulturmedien ausgeführt.

[0128] 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 Säu-

le, 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.

[0129] 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 2,5 %, weniger als 2,0 %, weniger als 1,8 %, weniger als 1,5 %, weniger als 1,2 %, weniger als 1,0 %, weniger als 0,8 %, weniger als 0,6 %, weniger als 0,5 %, weniger als 0,4 %, weniger als 0,3 %, weniger als 0,2 % oder weniger als 0,1 %) an Wirtszellprotein. Die Stufe des Wirtszellproteins kann mit im Fachgebiet bekannten Verfahren z. B. unter Verwendung von Größenausschluss-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (SEC-HPLC) oder SEC-HPLC in Konjugation mit Multi-Angle Laser Light Scattering (MALLS), wie in Lietzow et al. (2008) Protein J 27:420-425 offenbart, bestimmt werden, die hierin in vollem Umfang durch Bezugnahme enthalten ist. In einer Ausführungsform wird der Prozentsatz des Wirtszellproteins in den hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen mit Hilfe der SEC-HPLC bestimmt, z.B., unter Verwendung des in Beispiel 3 veranschaulichten SEC-HPLC-Verfahrens.

[0130] 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.

[0131] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex wie in Beispiel 5, Beispiel 6 oder Beispiel 7 beschrieben hergestellt.

[0132] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex in einem oder mehreren Schritten wie in Beispiel 5, Beispiel 6 oder Beispiel 7 beschrieben hergestellt.

[0133] 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.

[0134] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie, die während der Aufreinigung des 900 kDa BoNT/A-Komplexes durchgeführt werden, die hydrophobe Interaktionschromatographie. In bestimmten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie die Anionenaustauschchromatographie. In bestimmten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie die Kationenaustauschchromatographie.

[0135] In bestimmten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie, die während der Aufreinigung des 900 kDa BoNT/A-Komplexes durchgeführt werden, hydrophobe Interaktionschromatographie 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.

[0136] In bestimmten Ausführungsformen umfasst der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie, die während der Aufreinigung 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.

[0137] 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.

[0138] 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 Wechselwirkungschromato-

graphie, Anionenaustauschchromatographie und 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.

[0139] 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 während der Reinigung des 900 kDa BoNT/A-Komplexes 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.

[0140] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess hergestellt, der die folgenden Schritte umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einem sauren Niederschlag 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, 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, und Filtrieren bei 0,2 µm mit zugesetztem Ammoniumsulfat.

[0141] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess hergestellt, der einen oder mehrere der folgenden Schritte umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einem sauren Niederschlag 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, 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, und Filtrieren bei 0,2 µm mit zugesetztem Ammoniumsulfat.

[0142] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess hergestellt, der die folgenden Schritte und in der folgenden Reihenfolge umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einem sauren Niederschlag 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, 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, und Filtrieren bei 0,2 µm mit zugesetztem Ammoniumsulfat.

[0143] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess hergestellt, der die folgenden Schritte umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einem sauren Niederschlag unter Verwendung von 3M-Schwefelsäure, um den pH-Wert bei einer Temperatur unter 25 °C auf 3,5 zu senken, 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 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).

[0144] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess hergestellt, der die einen oder mehreren folgenden Schritte umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einem sauren Niederschlag unter Verwendung von 3M-Schwefelsäure, um den pH-Wert bei einer Temperatur unter 25 °C auf 3,5 zu senken, 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 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).

[0145] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess hergestellt, der die folgenden Schritte und in der folgenden Reihenfolge umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einem sauren Niederschlag unter Verwendung von 3M-Schwefelsäure, um den pH-Wert bei einer Temperatur unter 25 °C auf 3,5 zu senken, 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 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).

[0146] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess hergestellt, der die folgenden Schritte umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einem sauren Niederschlag unter Verwendung von 3M-Schwefelsäure, um den pH-Wert bei einer Temperatur unter 25 °C auf 3,5 zu senken, Unterziehen des sauren Niederschlags einer tangentialen Flussfiltration (z. B. 0,1 µm tangentiale Strömungsfiltration), 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 der Produktspitze (optional gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie).

[0147] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess hergestellt, der die einen oder mehrere folgenden Schritte umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einem sauren Niederschlag unter Verwendung von 3M-Schwefelsäure, um den pH-Wert bei einer Temperatur unter 25 °C auf 3,5 zu senken, Unterziehen des sauren Niederschlags einer tangentialen Flussfiltration (z. B. 0,1 µm tangentiale Strömungsfiltration), 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 der Produktspitze (optional gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie).

[0148] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess hergestellt, der die folgenden Schritte und in der folgenden Reihenfolge umfasst: Unterziehen der Fermentationskultur einem sauren Niederschlag unter Verwendung von 3M-Schwefelsäure, um den pH-Wert bei einer Temperatur unter 25 °C auf 3,5 zu senken, Unterziehen des sauren Niederschlags einer tangentialen Flussfiltration (z. B. 0,1 µm tangentiale Strömungsfiltration), 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 der Produktspitze (optional gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie).

[0149] In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex von Clostridium botulinum-Bakterien produziert, die aus einer lebewesenproduktfreien Arbeitszellbank kultiviert und erweitert wurden.

[0150] In verschiedenen Aspekten und Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess hergestellt, bei dem kein Proteaseinhibitor verwendet wird. In bestimmten Ausführungsformen wird der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen Prozess hergestellt, bei dem kein Benzamidinhydrochlorid verwendet wird.

[0151] 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 BoNT/A pharmazeutischen Zusammensetzungen können einen 900 kDa Clostridium botulinum Neurotoxin Serotyp A (BoNT/A) Komplex als aktiven pharmazeutischen 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 gelagert werden. Vorzugsweise bleibt das BoNT/A während der Lagerung mindestens etwa 12 Monate, vorzugsweise mindestens etwa 18 Monate stabil.

[0152] 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 lebewesenproduktfreien Arbeitszellbank gezüchtet und erweitert wurden. Die lebewesenproduktfreie Arbeitszellbank kann zum Beispiel und ohne Einschränkung wie in Beispiel 6 beschrieben hergestellt werden.

[0153] 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.

[0154] 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.

[0155] 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.

[0156] 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.

[0157] 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.

[0158] In einem Aspekt wird hierin eine BoNT/A-Zusammensetzung bereitgestellt, die nach einem in diesem Abschnitt 5,4 beschriebenen Verfahren oder Prozess hergestellt wurde.

5.5. Charakterisierung von BoNT/A-Zusammensetzungen

[0159] In einer Ausführungsform weisen die hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen eine Potenz von mindestens etwa $1,5 \times 10^7$ Einheiten/mg, oder 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 oder beliebige Anzahlen zwischen diesen Bereichen.

[0160] 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.

[0161] 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 min-

destens 10 %, mindestens 20 %, mindestens 30 %, 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 kommerziell 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 kommerziell erhältlichen BoNT/A-Zusammensetzung ist, die auf dem Fachgebiet bekannt ist.

[0162] Die Potenz der hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen kann mit im Fachgebiet bekannten Verfahren bestimmt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf z. B. Light-Chain Activity High-Performance Liquid Chromatography-Assay (LCA-HPLC-Assay), Mouse 50 % lethal dose-Assay (MLD₅₀-Assay), Mouse Digit Abduction Score-Assay (DAS-Assay), SNAP-25-Assay, zellbasierter Potenzassay (CBPA), usw.

[0163] Der LCA-HPLC-Assay misst die Spezifität der SNAP-25-Spaltung. Die Proben reagieren mit einem handelsüblichen BoNT/A fluoreszierenden Substrat, das von der SNAP-25 Sequenz 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 finden Sie in den Veröffentlichungen Hunt et al. (2010) *Toxins* 2(8):2198-2212 und Rupp et al. (2020) *Toxins* 12(6):393, die hierin jeweils in vollem Umfang durch Bezugnahme enthalten sind.

[0164] In einer Ausführungsform wird die Potenz unter Verwendung eines Assays für die 50 %ige letale Dosis bei Mäusen (MLD₅₀) bestimmt. Der Assay für die 50 %ige letale Dosis bei Mäusen (MLD₅₀) ist 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 durch Bezugnahme enthalten sind. Der Mouse 50 % lethal dose-Assay (MLD₅₀-Assay) ist ein Verfahren zur Messung der Potenz eines Botulinumtoxins durch intraperitoneale Injektion des Botulinumtoxins 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 Sterberate von mindestens 80 % der injizierten Mäuse ergibt und die am wenigsten konzentrierte Verdünnung eine Sterberate von höchstens 20 % der injizierten Mäuse ergibt. Es müssen mindestens vier Verdünnungen vorliegen, die in den monoton abnehmenden Bereich der Sterberaten fallen. Die monoton abnehmende Spanne beginnt bei einer Sterberate von mindestens 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.

[0165] 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 zum DAS-Assay sind offenbart 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) *Toxine* 12(6):393, die hierin jeweils in vollem Umfang durch Bezugnahme enthalten sind. Zum Beispiel kann der DAS-Assay durch Injektion einer hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzung in den Gastrocnemius/Soleus-Komplex der Maus ausgeführt 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 verschiedenen Grade der Fingerabduktion auf einer fünfstufigen Skala (0=normal bis 4=maximale Reduktion der Fingerabduktion und der Beinstreckung) bewertet. Das Sicherheitsverhältnis (Safety Ratio), das Verhältnis zwischen der Menge eines Toxins, die für einen 10 %igen Rückgang des Körpergewichts erforderlich ist (gemessen an der Spitzenwirkung 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 in US-Patent. Nr. 9.920.310 beschrieben ist, das hierin in vollem Umfang durch Bezugnahme aufgenommen 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.

[0166] Der SNAP-25-Assay ist ein auf ELISA basierendes Verfahren zur Messung der proteolytischen Aktivität des Botulinumtoxins SNAP-25. Der Assay verwendet ein verkürztes SNAP-25-Protein (das Peptid mit 206 Aminosäureresten), das an Polystyrol-Mikrotiterplatten mit 96 Wells 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 entsteht. Der an das gespaltene Produkt gebundene monoklonale Antikörper wird dann mit einem sekundären Antikörper (Ziegen-Anti-Maus-IgG, konjugiert mit Meerrettichpero-

xidase HRP) festgestellt, der in Gegenwart eines chromogenen Substrats (TMB) einen Farbwechsel erzeugt. Beispielhafte SNAP-25-Verfahren sind in Ekong et al. (1997) Microbiology 143:3337-3347 und US-Patent Nr. 7.160.699 beschrieben, die hierin jeweils durch Bezugnahme aufgenommen sind.

[0167] Der zellbasierte Potenzassay (CBPA) wurde beschrieben in z. B. Fernandez-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 das SNAP-25₁₉₇ SiMa H1 Elektrochemilumineszenz (ECL) CBPA verwendet, um die Potenz der hierin beschriebenen BoNT/A-Zusammensetzungen zu bestimmen. Das SNAP-25₁₉₇ SiMa H1 Elektrochemilumineszenz (ECL) CBPA ist ein zellbasierter In-vitro-Assay, der die wichtigsten Schritte der BoNT/A-Intoxikation misst: rezeptorvermittelte 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). Kurz gesagt, menschliche Neuroblastomzellen SiMa H1 werden auf Poly-D-Lysin (PDL) 96 Well-Platten in serumfreiem Medium (SFM) mit 25 µg/ml GT_{1b} drei Tage lang plattiert und 24 Stunden lang mit Toxinproben behandelt. Nach der Behandlung werden die Toxine entfernt, die Zellen werden lysiert und die Lysate werden auf MSD High Bind Platten übertragen, die mit dem monoklonalen Antikörper (mAb) 2E2A6 gegen SNAP-25₁₉₇ beschichtet sind. Die Platten werden dann gewaschen und mit einem mit SULFO-TAG NHS-Ester markierten polyklonalen Anti-SNAP-25-Antikörper (pAb) zur Feststellung inkubiert. Das gefangene, durch BoNT/A-Toxin gespaltene SNAP-25 wird dann mit einem MSD-Plattenlesegerät quantifiziert.

5.6. Veranschaulichende Ausführungsformen

[0168] Die vorliegende Offenbarung schließt die folgenden nicht einschränkenden veranschaulichenden Ausführungsformen ein.

1. Eine Zusammensetzung umfassend eine Vielzahl von 900 kDa Clostridium botulinum Serotyp A (BoNT/A) Neurotoxin-Komplex-Spezies, wobei die Oxidationsstufe der in der Zusammensetzung vorhandenen 150 kDa Neurotoxin-Spezies an jeder der folgenden Positionen weniger als 6 % beträgt: 411 (M411) wie in SEQ ID NO: 2 gezeigt, 550 (M550) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt, 1004 (M1004) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt und 1144 (M1144) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt.
2. Die Zusammensetzung gemäß Ausführungsform 1, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex Onabotulinumtoxin A ist.
3. Die Zusammensetzung gemäß Ausführungsform 1 oder 2, wobei die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als 5 % beträgt.
4. Die Zusammensetzung gemäß einer der Ausführungsformen 1-3, wobei die Oxidationsstufe an Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als etwa 2 % beträgt.
5. Die Zusammensetzung gemäß einer der Ausführungsformen 1-4, wobei die Oxidationsstufe an Position M550 der SEQ ID NO. 3 weniger als 1 % beträgt.
6. Die Zusammensetzung gemäß einer der Ausführungsformen 1-5, wobei die Oxidationsstufe an Position M550 der SEQ ID NO. 3 etwa 0,3 % bis etwa 0,5 % beträgt.
7. Die Zusammensetzung gemäß einer der Ausführungsformen 1-6, wobei die Oxidationsstufe an Position M1004 der SEQ ID NO. 3 weniger als 3 % beträgt.
8. Die Zusammensetzung gemäß einer der Ausführungsformen 1-7, wobei die Oxidationsstufe an Position M1004 der SEQ ID NO. 3 etwa 1 % bis etwa 2 % beträgt.
9. Die Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-8, wobei die Oxidationsstufe an Position M1144 von SEQ ID NO. 3 weniger als 6 % beträgt.
10. Die Zusammensetzung gemäß einer der Ausführungsformen 1-9, wobei die Oxidationsstufe an Position M1144 der SEQ ID NO. 3 etwa 2 % beträgt.
11. Die Zusammensetzung gemäß einer der Ausführungsformen 1-10, wobei die Oxidationsstufe durch LC-MS/MS bestimmt wird.
12. Die Zusammensetzung gemäß einer der Ausführungsformen 1-11, wobei die Zusammensetzung weniger als 3 % Wirtszellprotein umfasst.
13. Die Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-12, wobei die Zusammensetzung eine Potenz von etwa $1,5 \times 10^7$ Einheiten/mg bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg aufweist.

14. Die Zusammensetzung gemäß Ausführungsform 13, wobei die Potenz unter Verwendung eines Assays für die 50 %ige letale Dosis bei Mäusen (MLD50) bestimmt wird.
15. Die Zusammensetzung gemäß Ausführungsform 13, wobei die Potenz unter Verwendung eines zellbasierten Potenzassays bestimmt wird.
16. Die Zusammensetzung gemäß einer der Ausführungsformen 1-15 ferner umfassend einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
17. Die Zusammensetzung gemäß Ausführungsform 16, wobei der pharmazeutisch verträgliche Träger menschliches Serumalbumin und Natriumchlorid umfasst.
18. Die Zusammensetzung gemäß Ausführungsform 16, wobei die Zusammensetzung vakuumgetrocknet ist.
19. Die Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-15, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex in einem Zustand der Fermentation produziert wird, der eine Kaltschock-Fermentationstemperatur umfasst.
20. Die Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-15, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex in einem kontinuierlichen Zustand der Fermentation bei kalter Temperatur produziert wird.
21. Die Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-15, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen oder mehrere Schritte der Säulenchromatographie gereinigt wird.
22. Die Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-21, wobei der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie umfassen.
23. Die Zusammensetzung nach Ausführungsform 22, wobei der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie ferner die Anionenaustauschchromatographie umfassen.
24. Die Zusammensetzung nach Ausführungsform 22 oder 23, wobei der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie ferner die Kationenaustauschchromatographie umfassen.
25. Die Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-24, 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.
26. Die Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-25, die frei von Tierprodukten ist.
27. Die Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-26, die keinen Proteaseinhibitor enthält.
28. Die Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-27, die kein Benzamidinhydrochlorid enthält.
29. Verfahren zur Herstellung einer BoNT/A umfassenden Zusammensetzung, wobei das Verfahren das Inkubieren einer Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien in einem Produktionsfermenter bei einer Temperatur von unter 35 °C für eine Zeitdauer umfasst.
30. Das Verfahren nach Ausführungsform 29, wobei der gesamte Zeitraum der Fermentation etwa 72 Stunden beträgt.
31. Das Verfahren nach Ausführungsform 29, wobei der gesamte Zeitraum der Fermentation etwa 160 Stunden beträgt.
32. Das Verfahren nach einer der Ausführungsformen 29-31, wobei die Zeitdauer etwa 5 Stunden beträgt.
33. Das Verfahren nach einer der Ausführungsformen 29-31, wobei die Zeitdauer die gesamte Fermentation ist.
34. Das Verfahren nach einer der Ausführungsformen 29-33, wobei die Temperatur etwa 15 °C beträgt.
35. Das Verfahren nach einer der Ausführungsformen 29-33, wobei die Temperatur etwa 20 °C beträgt.
36. Das Verfahren nach einer der Ausführungsformen 29-33, wobei die Temperatur etwa 25 °C beträgt.
37. Das Verfahren nach Ausführungsform 29 oder 30, das in der folgenden Reihenfolge umfasst: (a) Inkubieren der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien in dem Produktionsfermenter bei 35 °C für etwa 12 Stunden; (b) Einstellen der Temperatur auf 15 °C am Ende von Schritt (a); (c) Kultivieren bei 15 °C bis etwa 5 Stunden nach Schritt (a); (d) Einstellen der Temperatur auf 35 °C am Ende von Schritt (c); und (e) Kultivieren bei 35 °C bis etwa 55 Stunden nach Schritt (c).

38. Das Verfahren nach Ausführungsform 29 oder 30, das in der folgenden Reihenfolge umfasst: (a) Inkubieren der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien in dem Produktionsfermenter bei 35 °C für etwa 12 Stunden; (b) Einstellen der Temperatur auf 20 °C am Ende von Schritt (a); (c) Kultivieren bei 20 °C bis etwa 5 Stunden nach Schritt (a); (d) Einstellen der Temperatur auf 35 °C am Ende von Schritt (c); und (e) Kultivieren bei 35 °C bis etwa 55 Stunden nach Schritt (c).
39. Das Verfahren nach Ausführungsform 29 oder 31, das die Inkubation der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien im Produktionsfermenter bei 25 °C für etwa 160 Stunden umfasst
40. Das Verfahren zur Behandlung eines bedürftigen Patienten, umfassend die Verabreichung einer Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 1-28.
41. Das Verfahren, im Wesentlichen wie hierin beschrieben.
42. Die Zusammensetzung, im Wesentlichen wie hierin beschrieben.

6. BEISPIELE

[0169] Bestimmte hierin bereitgestellte Ausführungsformen werden durch die folgenden nicht einschränkenden Beispiele veranschaulicht, die verschiedene Verfahren zur Ermittlung von BoNT/A beschreiben und zeigen, dass die Senkung der Temperatur für eine kurze Zeitdauer oder kontinuierlich während der Fermentation von Clostridium botulinum die Oxidationsstufen an einem oder mehreren der Methioninreste (z. B. M411, M550, M1004 und/oder M1144) der hergestellten 150 kDa Neurotoxin-Komponente von BoNT/A reduziert und dass es eine negative Korrelation zwischen der Oxidationsstufe von BoNT/A und seiner Potenz gibt.

6.1. Beispiel 1: Produktion von BoNT/A-Komplexen bei verschiedenen Fermentationstemperaturen

1. Vorgelagerte Schritte

[0170] Es gab zwei allgemeine Stufen, um BoNT/A-Komplexmaterial vor der Analyse der Attribute zu erzeugen: eine vorgelagerte Stufe und eine nachgelagerte Stufe. In der vorgelagerten Stufe wurde ein 50 ml APF-Saatgutkulturmedium in einer 150 ml Glasflasche (mit Magnetrührer) verwendet, das 3,25 Gew.-% Sojapepton Typ II, 1,2 Gew.-% Hefeextrakt, 1,5 Gew.-% Glukose und einen mit Natriumhydroxid auf 7,3 eingestellten pH-Wert enthält. Das Saatgutkulturmedium wurde vor der Verwendung mindestens 48 Stunden lang reduziert, um Sauerstoff zu entfernen (in einer anaeroben Kammer von Don Whitley Scientific A55). Das Saatgutkulturmedium wurde mit 50 µl eines aufgetauten C. botulinum Serotyp A Hall-Stammes aus der Arbeitszellbank geimpft. Die Saatgutkultur wurde bei 35 ± 1 °C unter Rühren mit 150 U/min in der anaeroben Kammer inkubiert.

[0171] Nach der Inkubation der Saatgutkultur über Nacht wurden 4 ml der Kultur ($OD_{600\text{ nm}} 4,81 \pm 0,35$) in einen Produktionsfermenter (Ambr® 250 Modular, Sartorius Stedim) überführt, der 196 ml reduziertes APF-Fermentationsmedium (3,25 Gew.-% Sojapepton Typ II, 1,2 Gew.-% Hefeextrakt, 1,5 Gew.-% Glukose, mit Natriumhydroxid auf 7,3 eingestellten pH-Wert) enthielt. Die Temperatur wurde nach Tabelle 2 gesteuert. Die Temperaturanpassungen für die Kälteschockfermentationen wurden in der frühen stationären Phase des Zellwachstums begonnen. Die Steuerung der Agitation erfolgte mit 150 U/min und der Kopfraum des Fermenters 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. Die drei Phasen der Produktionsfermentation schließen die exponentielle Wachstumsphase, die stationäre Phase und die Autolyse ein. Die Fermentationszeiten wurden von 72 Stunden bis 160 Stunden variiert (Tabelle 2), um sicherzustellen, dass eine Zellyse stattfindet, die aktives BoNT/A in das Kulturmedium freisetzt.

Tabelle 2

[0172]

Experimentelle Beschreibung	Produktion Fermentation* Zustand	Produktion Fermentationszeit (Stunden)
Baseline-Kontrolle der Fermentation	35 °C während der gesamten Fermentationszeit	72
20 °C Kälteschock	35 °C von 0 bis 12 Stunden; Temperatur eingestellt auf 20 °C bei 12 Stunden; Kultur bei 20 °C bis 17 Std., dann Temperatur eingestellt bei 17 Std. auf 35 °C; Kultur bei 35 °C bis 72 Stunden	72

Experimentelle Beschreibung	Produktion Fermentation* Zustand	Produktion Fermentationszeit (Stunden)
15 °C Kälteschock	35 °C von 0 bis 12 Stunden; Temperatur eingestellt auf 15 °C bei 12 Stunden; Kultur bei 15 °C bis 17 Std., dann Temperatur bei 17 Std. auf 35 °C einstellen; Kultur bei 35 °C bis 72 Std.	72
25 °C Fermentation	25 °C während der gesamten Fermentationsdauer	160
* Das Ambr® 250 Modular System kann die Temperatur auf $\pm 0,5$ °C genau steuern.		

[0173] Die Ernte des BoNT/A-Komplexes erfolgte durch Zentrifugation und anschließende 0,2 µm-Filtration, um Zelltrümmer aus der Kulturbrühe zu entfernen, die BoNT/A-Komplex und andere Wirtszellproteine enthielt. Zelltrümmer wurden anfänglich durch Zentrifugation bei 10.000 rcf für 30 Minuten entfernt. Der geklärte Überstand wurde dann in einer biologischen Sicherheitskabine einer 0,2 µm-Filtration unterzogen, 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-Filtrats auf reduzierte Columbia Blood AgarPlatten und Inkubieren unter anaeroben Bedingungen für eine ausreichende Zeit, um das Fehlen von lebensfähigem *C. botulinum* Typ A zu verifizieren), und das geklärte Erntematerial wurde bis zum Beginn der nachgelagerten Phase bei 4 °C gelagert.

2. Nachgelagerte Schritte

[0174] 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.

[0175] Ein System zur Filtration mit tangentialen Fluss wurde verwendet, um das geklärte Erntematerial der Fermentation zu konzentrieren (durch Ultrafiltration - UF) und in 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 Puffer zu diafiltrieren. Repligen TangenX® SIUS PD-Kassetten mit einer Grenzmembran mit einem 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 unter Verwendung von 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5-Puffer diafiltriert.

[0176] 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 mindestens 0,21 Wasser für Injektionszwecke (WFI) gespült, um die Lagerungslösung der Membran zu entfernen. Anschließend wurden die Membran und das UF/DF-System mit etwa 0,2150 mM Natriumphosphat, pH 6,5 Puffer äquilibriert. Nach der Membranäquibrierung wurde das geklärte Erntematerial der Fermentation auf die TangenX® Tangentialflussfiltrationskassette geströmt und bei einem Transmembrandruck von 5 bis 6 psig (pounds per square inch gauge) und einer auf 75 ml/min eingestellten Flussrate 3- bis 4-fach konzentriert. Nach dem Konzentrationsschritt wurde der Retentatpool gegen ein Minimum von 5 Diafiltrationsvolumina des 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 Puffers bei einem Transmembrandruck von 5 bis 8 psig und einer auf 75 ml/min eingestellten Flussrate diafiltriert. Nach Abschluss der Diafiltration wurde der Druck aus der Retentatleitung abgelassen und der Permeatauslass geschlossen. Das UF/DF-Material wurde dann mindestens 5 Minuten lang 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 Container zurückgewonnen wurde.

[0177] Das zurückgewonnene Material (UF/DF-Retentat) aus dem UF/DF-Schritt wurde dann auf eine Anionenaustausch-Chromatographiesäule geladen, die mit POROS® 50HQ Harz gepackt war. Die Säule weist einen Innendurchmesser von 1,13 cm und eine Säulenhöhe von etwa 5 cm auf. Die gesamte Anionenaustauschersäulenchromatographie wurde bei Raumtemperatur ausgeführt, 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.

[0178] Einzelheiten des Anionenaustauschschritts waren: Verwendung der POROS® 50HQ Säule, die mit einem 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 Puffer äquilibriert wurde (mindestens 5 Säulenvolumen). Als nächstes wurde das UF/DF-Retentat bei 120 cm/Stunde auf die POROS® 50HQ Anionenaustauschersäule geladen, gefolgt von einem Waschen mit mindestens etwa 10 Säulenvolumina 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 bei 120 cm/Stunde, gefolgt von einer Elution mit 50 mM Natriumacetat, pH 4,5 bei 120 cm/Stunde. Die Spitzenfraktion wurde bei einem Anstieg der Absorption bei 280 nm (A280) auf mindestens etwa 0,05 AE und durch das Maximum der Spitze auf gleich oder weniger als etwa 0,03 AE an der hinteren Kante in einen Container mit 5 mL 50 mM Natriumacetat, pH 4,8, angesammelt. Dieser Elutionspool wurde bei etwa 2° C. bis etwa 8° C. für bis zu 48 Stunden gespeichert.

[0179] 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. Die gesamte POROS® 20HS Säulenchromatographie wurde bei Raumtemperatur ausgeführt, und der Fluss war abwärts gerichtet. 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. Einzelheiten des Kationenaustauschschritts waren: Verwendung der POROS® 20HS Säule, die mit einem 50 mM Natriumacetat, pH 4,8 Puffer äquilibriert wurde (mindestens etwa 5 Säulenvolumen). Als nächstes wurde der POROS® 50HQ Produktpool (wie oben beschrieben, frisch oder aus der Lagerung bei 2-8 °C) auf die POROS® 20HS Säule geladen. Die Säule wurde dann mit einem 50 mM Natriumacetat, pH 4,8 Puffer gewaschen (mindestens etwa 5 Säulenvolumina) und anschließend 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 Container mit 3 ml 50 mM Natriumacetat, pH 4,8 angesammelt, als die A280 auf etwa $\geq 0,02$ AE durch das Maximum der Spitze anstieg, bis die A280 der hinteren Kante der Elutionsspitze auf einen Wert von $\leq 0,02$ AE oder bis zum Ende des Elutionsschritts abnahm, der insgesamt 5 Säulenvolumina ab dem Ende des zweiten Waschschritts aufwies. Der POROS® 20HS Produktpool wurde kurzfristig bei etwa 2 °C bis 8 °C für bis zu 120 Stunden gelagert. Der Produktpool wurde dann in kleine Probenmengen aliquotiert und vor der Analyse für längere Zeit bei -70 °C im Gefrierschrank gelagert.

6.2. Beispiel 2: LC-MS/MS-Analyse von Proben aus Temperaturstudien

[0180] Die Proben wurden durch Erhitzen bei 90 ± 5 °C in Gegenwart von 0,05 % RapiGest™ denaturiert, mit 5 mM Dithiothreitol reduziert und mit 15 mM Iodacetamid alkylt. Überschüssiges Iodacetamin wurde mit Zeba-Spinsäulen entfernt. Dann wurden die Proben mit einem Verhältnis von 1: 10 Trypsin für 4 ± 1 Stunden bei 37 ± 3 °C verdaut. RapiGest™ wurde durch Ansäuern und anschließendes Zentrifugieren bei 20.000 rcf entfernt.

[0181] Die resultierenden Peptide wurden unter Verwendung von Thermo Vanquish UHPLC, gekoppelt mit einem Thermo Q Exactive Plus Massenspektrometer, analysiert. Fünf Pikomol jeder Probenverdauung wurden für die LC-MS/MS-Analyse injiziert. Die Massenspektrometrie der von der Umkehrphasensäule eluierten Peptide wurde unter Verwendung der Elektrospray-Ionisierung im positiven Modus ausgeführt. Die für die Analyse der Probenverdauung verwendeten LC-MS/MS-Parameter sind in Tabelle 3 bereitgestellt.

Tabelle 3 LC-MS experimentelle Zustände

[0182]

Probe	Trypsinverdauungen von Medikamentenwirkstoff			
Probenbeladung	5 Picomoles			
Instrument	Thermo Vanquish UHPLC und Thermo Q Exactive Plus			
Säule	Waters BEH C18 2,1 mm x 150 mm 1,7 µm			
Mobile Phase A (MPA)	0,1 % Ameisensäure in Wasser			
Mobile Phase B (MPB)	0,1 % Ameisensäure in 100 % Acetonitril			
Gradient	Zeit (Min.)	Flussrate (ml/min)	% MPA	% MPB
	0	0,2	99	1
	7	0,2	99	1
	7,1	0,2	95	5
	60	0,2	65	35
	70	0,2	20	80
	70,1	0,2	99	1
	75,0	0,2	99	1

[0183] Die Q Exactive Plus (.raw)-Dateien wurden mit Thermo BiopharmaFinder durchsucht. Die für die Datenbankanalyse verwendeten Suchparameter sind in Tabelle 4 bereitgestellt.

Tabelle 4 BiopharmaFinder Suchparameter**[0184]**

Parameter	Wert
Enzyme	Trypsin
Max. verpasste Spaltungen	1
Fixierte Änderungen	keine
Variable Änderungen	Carbamidomethylierung (C), Deamidiert (N), Dioxidation (C), Oxidation (MW)
Peptidtoleranz	± 8 ppm
MS/MS Ionen-Suche	ja

[0185] Die Oxidationsstufen an verschiedenen Methioninresten von BoNT/A sind in Tabelle 5 unten aufgeführt:

Tabelle 5**[0186]**

	Baseline-Kontrolle der Fermentation	20 °C Kaltschock	15 °C Kälteschock	25 °C Fermentation
M30	0,3	0,2	0,3	0,3
M106	1	1	1	1
M344	1	1	1	1
M411	5	2	2	2
M550	1	0,3	0,4	0,5
M 1004	3	1	1	2
M1054	0,5	0,8	0,6	0,6
M1144	6	2	2	2

[0187] Der Zustand der kalten Fermentation reduzierte die Oxidationsstufe bei M411, M550, M1004 und M1144 von BoNT/A (Tabelle 5). M411 ist Teil der leichten Kette und alle anderen Methioninreste (M550, M1004 und M1144) befinden sich in der schweren Kette. Die Kristallstruktur der BoNT/A-Toxin-Rezeptor-Bindungsdomäne im Komplex mit dem SV2C-Rezeptor ist gelöst worden (Benoit et al. (2017) Sei Rep. 7:43588). Es zeigt sich, dass die Interaktion die Aminosäuren Thr1145, Thr1146 und Ser1294 auf BoNT/A einschließt (Benoit et al. (2017) Sei Rep. 7:43588). Da M1144 an diese Bindungsreste (Thr1145 und Thr1146) von BONT/A mit dem SV2C-Rezeptor angrenzt, kann seine Oxidation zu einer Abnahme der Rezeptorbindung und damit zu einem Verlust der Potenz führen.

6.3. Beispiel 3: SEC-HPLC-Analyse von Proben aus Temperaturstudien

[0188] Die Proben wurden mindestens 20 Minuten lang bei Raumtemperatur 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 6 angegebenen Zustände des Instruments durchgeführt.

Tabelle 6 SEC-HPLC Experimentelle Zustände**[0189]**

Säule	Sepax SRT SEC-500, 7,8 × 300 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 basierend auf der UV-Konzentration anpassen, um 20 µg zu injizieren
Temperatur des automatischen Probenehmers	5 °C
Laufzeit	20 Minuten

[0190] Die Chromatographie-Daten wurden mit der Waters® Empower 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.

[0191] Die SEC-Daten (%Area) bei UV220 nm sind unten in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7

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

[0192] Tabelle 7 zeigt, dass der Prozentsatz des Wirtszellproteins (HCP) sowohl unter 20° C als auch unter 15° C Kälteschockbedingungen im Vergleich zum Zustand der Baseline-Kontrollfermentation nach der einmaligen Anionenaustauschersäule (AEC) reduziert war, während der Zustand der kontinuierlichen kalten Fermentation bei 25° C einen höheren Prozentsatz an HCP aufwies als die Baseline-Kontrolle. Nach dem zweisäuligen (i. e., AEC gefolgt von CEC) Reinigungsprozess war HCP im 25 °C kontinuierlichen Zustand der Kaltfermentation höher als 3 %, während es sowohl in der Baseline-Kontrolle als auch im Kälteschockzustand nicht nachweisbar war.

6.4. Beispiel 4: Charakterisierung der Oxidationsstellen von 150 kDa BoNT/A und deren Wirkung auf die Potenz

Zusammenfassung

[0193] Der Oxidationsweg und die Potenz des Clostridium botulinum Typ A Neurotoxin (BoNT/A)-Komplexes nach Exposition mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) wurde charakterisiert. Verschiedene Mengen an Wasserstoffperoxid (H₂O₂) im Bereich von 100 ppb bis 100 ppm wurden dem BoNT/A-Medikamentenwirkstoff (DS) hinzugefügt und die daraus resultierenden Oxidationsstellen auf der 150 kDa Neurotoxin (150 kDa NT)-Untereinheit wurden durch Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) identifiziert und quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass mehrere Methioninreste auf der 150 kDa NT für eine Oxidation durch H₂O₂ anfällig sind und die Methionine an den Positionen 411, 531, 602, 968, 1004 und 1144 am anfälligsten sind. Die Analyse der Potenz mittels eines zellbasierten Potenzassays (CBPA) zeigte einen dosisabhängigen Potenzverlust mit steigender Menge an H₂O₂.

Materialien und Verfahren

1. Materialien und Reagenzien

[0194] Materialien und Reagenzien sind in Tabelle 8 unten aufgeführt.

Tabelle 8

[0195]

Gegenstand	Hersteller	Katalognummer
2 µm Sterilisationsfilter, Acrodisk	Pall	4652
Wasserstoffperoxid	VWR	E882-10ML
DL-Methionin	Sigma	M2768-100G
Natriumphosphat monobasisch, Monohydrat	Macron Fine Chemicals	7892-04
Natriumphosphat zweibasisch, wasserfrei	Macron Fine Chemicals	7917-04

2. Auflösung von BoNT/A-Medikamentenwirkstoff („DS“)

[0196] Das als Niederschlag gelagerte BoNT/A DS (Ausgangskonzentration 2,5 mg/ml) wurde mit 40 mM Natriumphosphat, pH 6,5 auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml verdünnt und mindestens 20 Stunden bei 25 °C inkubiert, bis die Probe sichtbar klar war. Die gelösten Proben wurden steril gefiltert und nach den individuellen Anforderungen des Experiments aliquotiert.

3. Oxidation von BoNT/A DS

[0197] Gelöste DS-Proben wurden mit 0 ppm (Kontrolle), 10 ppm, 50 ppm oder 100 ppm H₂O₂ für 20 Stunden bei 25 °C behandelt. Die Konzentration von BoNT/A DS wurde in allen Proben durch Hinzufügen eines konstanten Volumens von H₂O₂ (oder Wasser für die Kontrollprobe) gleich gehalten. Die Oxidation wurde durch die Zugabe eines 10-fachen molaren Überschusses an Methionin (im Vergleich zur Konzentration von H₂O₂) gequencht. Da die Oxidation des Proteins (an Resten wie Tryptophan) die UV-Absorption beeinträchtigen kann, wurde die Proteinkonzentration der Kontrollprobe durch UV-Spektrophotometrie bestimmt und als repräsentative Konzentration für alle Proben bereitgestellt. Die Proben wurden bei ≤ -70 °C gelagert.

4. Probenverdauung und LC-MS/MS-Analyse

[0198] Die Proben wurden durch Erhitzen auf 99 °C in Gegenwart von 0,05 % RapiGest™ denaturiert, mit Dithiothreitol reduziert, mit Iodacetamid alkyliert und mit Trypsin in einem Verhältnis von Enzym zu Protein von 1: 10 (Gewicht Trypsin/ Gewicht BoNT/A DS) 18 Stunden lang bei 37 °C verdaut. RapiGest™ wurde durch Ansäuern und anschließendes Zentrifugieren bei 23.500 rcf entfernt. Die resultierenden Peptide wurden mit einer Agilent 1200 Kapillar-HPLC Arbeitsstation analysiert, die mit einem Thermo LTQ-FT Ultra Massenspektrometer gekoppelt war. Zwanzig Pikomol jeder Probenverdauung wurden für die LC-MS/MS-Analyse injiziert. Die Massenspektrometrie der von der Umkehrphasensäule eluierten Peptide wurde unter Verwendung der Elektrospray-Ionisierung im positiven Modus ausgeführt. Die für die Analyse der Verdauungsproben verwendeten LC-MS/MS-Parameter sind in Tabelle 9 aufgeführt. Mit dem Fourier-Transformations-Ionen-Zyklotron-Resonanz-Detektor (FT-Detektor) wurde eine genaue Massenmessung der Vorläuferionen ermittelt und die vier wichtigsten Vorläuferionen aus jedem MS-Scan wurden fragmentiert und in der linearen Ionenfalle in nachfolgenden MS/MS-Scans analysiert. Für das Massenspektrometer wird vierteljährlich eine vollständige Kalibrierung des Instruments ausgeführt, während die Kalibrierung der FT-Massengenauigkeit wöchentlich unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Kalibrierungsmischung erfolgt. Die Leistung des Systems wurde vor der Analyse der Proben durch Injektion von zwei Picomol einer Standard-Peptidmischung (Michrom, Auburn, CA) bewertet.

Tabelle 9 LC-MS Experimentelle Zustände

[0199]

Probe	Trypsin-Verdauungen von BoNT/A DS
Probenbeladung	20 Picomoles
Instrument	Agilent 1200 Kapillar-HPLC (Cap-Pumpe S/N DE60555131) gekoppelt mit einem Thermo LTQ-FT Ultra Massenanalysator (S/N SN6126F) im Labor TL-M204.
Säule	Agilent Zorbax 300 SB-C18, 1,0 × 150 mm, 3,5 µm, 300 Å, bei 45 °C

Probe	Trypsin-Verdauungen von BoNT/A DS			
Mobile Phase A (MPA)	0,1 % Ameisensäure in Wasser			
Mobile Phase B (MPB)	0,1 % Ameisensäure in 80 % Acetonitril			
Gradient	Zeit (Min.)	Flussrate (µl/min)	% MPA	% MPB
	0	30	100	0
	10	30	100	0
	100	30	65	35
	140	30	40	60
	155	30	20	80
	160	30	10	90
	170	30	10	90
	175	30	100	0
	200	30	100	0

5. CBPA-Analyse

[0200] Die CBPA-Analyse wurde für die Methionin-gequenchten H₂O₂-oxidierten BoNT/A-Proben gemäß dem in Fernández-Salas et al. (2012) PLOS ONE 7(11):e49516 beschriebenen Verfahren ausgeführt. Die menschlichen Neuroblastomzellen SiMa wurden in Kollagen-IV-Kolben in dem von DSMZ empfohlenen Medium kultiviert. Für eine optimale Differenzierung wurden die SiMa-Zellen in 96 Well-Platten mit 5×10⁴ Zellen/Well in 100 µl Differenzierungsmedium (Minimum Essential Medium mit 2 mM GlutaMAX™ I mit Earle's Salzen, 0,1 mM Non-Essential Amino-Acids, 10 mM HEPES, 1x N2 Supplement und 1x B27 Supplement) drei Tage lang plattiert. Die SiMa-Zellen wurden dann mit BoNT/A-Proben behandelt, anschließend wurde das Medium mit BoNT/A-Proben durch frisches Medium ohne Toxin ersetzt.

[0201] Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in frisch zubereitetem Triton X-100 Lysis Buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100 und eine Tablette EDTA-freier Proteaseinhibitoren) auf Eis für 20 Minuten lysiert. Die lysierten Zellen wurden in der Platte bei 4000 U/min für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Für die Western Blot-Analyse wurden die Lysate in eine 96 Well PCR-Platte überführt, 2x SDSPAGE-Ladepuffer (Invitrogen) hinzugefügt und die Platte für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Gele wurden in 1x MOPSSDS-Laufpuffer (Invitrogen) bei 200 V für 55 min gelaufen. Die Proteine wurden auf Nitrocellulosemembranen (Bio-Rad) übertragen, die zuvor in Western Blot Transferpuffer (Invitrogen) mit 20 % Methanol (Burdick and Jackson) angefeuchtet wurden. Der Western Blot wurde 2 Stunden lang bei 800 mA unter Verwendung des TE-62 Transferzellengeräts (GE Healthcare) übertragen. Die Blots wurden mit 2 % ECL-Blockierungsmittel (GE Healthcare) in 1x TBS/0,1 % Tween 20 (Bio-Rad) (TBS-T) für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die folgenden primären Antikörper wurden verwendet: Anti-SNAP25₁₉₇ polyklonaler Antikörper, verdünnt 1:1000, SMI-81 Antikörper (Sternberger Monoclonals Inc), verdünnt 1:5000, um die intakten und gespaltenen SNAP25-Produkte zu bewerten (d. h. SNAP25₂₀₆ und SNAP25₁₉₇ wurden festgestellt). Die Antikörper wurden in 2 % Blockierungsmittel/TBS-T-Puffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Bei den sekundären Antikörpern handelte es sich um Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG H+L HRP-konjugiert (Invitrogen), verdünnt 1:5.000 oder 1: 10.000 in 2 %igem Blockierungsmittel/TBS-T-Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden gewaschen und 5 Minuten lang mit ECL Plus Western Blotting System Detection Reagenzien (GE Healthcare) ausgesetzt. Die Chemifluoreszenz wurde erfasst, indem die Blots im Typhoon 9410 Imager (GE Healthcare) bei λ_{ex} 452/λ_{em} 520 gescannt wurden. Die Intensität der Streifen im Gel wurde mit der Software ImageQuant TL (GE Healthcare) berechnet. Die Daten wurden mit SigmaPlot v 10.0 (Systat Software Inc.) oder PLA2.0 (Stegmann Systems) analysiert. Die Intensitätswerte wurden gegen die Konzentration der BoNT/A-Probe im logarithmischen Maßstab aufgetragen und an eine 4-Parameter-Logistikfunktion ($Y=Y_0+a/[1+(X/X_0)^p]$) ohne Nebenbedingungen angepasst. Basierend auf den angepassten Kurven wurden die EC₅₀-Werte, die „X₀“ entsprechen, bestimmt.

[0202] Für den ECL-Sandwich-ELISA wurden MSD High Bind Platten (Meso Scale Discovery), die zuvor mit anti-SNAP25₁₉₇ MAb 2E2A6 gesprenkelt waren, mit 150 µl Blockierungspuffer für 1 Stunde bei RT blockiert. Nach dem Blockieren wurde der Puffer verworfen und 25 µl Zelllysate wurden zu jedem Well der Platte hinzugefügt, gefolgt von einer Inkubation wie im Text detailliert beschrieben. Die Platten wurden mit PBS-T gewaschen und der mit SULFO-TAG NHS-Ester markierte pAb Anti-SNAP25-Antikörper (Antikörper gegen den N-Terminus von SNAP25, Kat. S9684, Sigma) in Verdünnungspuffer hinzugefügt. Die Platten wurden gedichtet und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur geschüttelt, mit PBS-T gewaschen und 150 µl 1x Lesepuffer pro Well hinzugefügt. Die Platten wurden sofort mit dem SI6000 Image Plattenlese-

gerät abgelesen. Für den Chemilumineszenz-Sandwich-ELISA wurden weiße Platten (Greiner) über Nacht bei 4 °C mit 100 µl/Well von anti-SNAP25₁₉₇ 2E2A6 MAb beschichtet. Die Platten wurden mit 2 % ECL-Blocker mit 10 % Ziegen Serum für 1 Stunde bei RT blockiert. Fünfzig Mikroliter Zellysate wurden zu jedem Well hinzugefügt und die Platten wurden bei 4 °C inkubiert. Für die Feststellung wurde S9684 anti-SNAP25 pAb, konjugiert mit HRP, verwendet. Die Platten wurden mit der SuperSignal ELISA Pico 1:1 Mischung (Pierce) entwickelt und bei 395 nm auf einem Luminometer (Molecular Devices) abgelesen. Die Daten wurden an eine 4-Parameter-Logistikfunktion angepasst ($Y=Y_0+a/[1+(X/X_0)^b]$).

[0203] Mögliche Matrixwirkungen von H₂O₂ und Methionin auf den CBPA-Assay wurden berücksichtigt. Da H₂O₂ entweder vollständig reagiert oder durch das überschüssige Methionin gequenchet wird, ist zur Zeit der CBPA-Analyse kein H₂O₂ in den Proben vorhanden. Mögliche Wirkungen von Methionin auf die Matrix werden dadurch abgeschwächt, dass die Proben vor der CBPA-Analyse 30.000-fach mit Verdünnungsmedium verdünnt werden. Die höchste Methioninkonzentration in einer Probe vor der Verdünnung für die CBPA-Analyse war 30 mM (Methionin); die höchste Konzentration von Methionin, die den behandelten Zellen nach der 30.000-fachen Verdünnung mit Verdünnungsmedium hinzugefügt wurde, betrug daher etwa 1 µM (Methionin).

6. LC-MS/MS-Datenanalyse

[0204] Die LTQ-FT Xcalibur (.raw) Dateien wurden an Mascot Daemon Version 2.1.5 (verfügbar im World Wide Web unter mascot/mascot) zur Datenbanksuche übermittelt. Die für die Datenbankanalyse verwendeten Suchparameter sind in Tabelle 10 bereitgestellt.

Tabelle 10 Mascot Datenbank Suchparameter

[0205]

Parameter	Wert
Datenbank	NG SProt
Enzyme	Trypsin
Max. verpasste Spaltungen	0
Fixierte Änderungen	keine
Variable Änderungen	Carbamidomethy (C), Deamidiert (N,Q), Dioxidation (C), Dioxidation (W), Oxidation (HW), Oxidation (M), Trioxidation (C) ¹
Monoisotope Masse	ja
Peptidtoleranz	± 7 ppm
Peptidladung	+1, +2 und +3
MS/MS Ionen-Suche	ja
MS/MS Toleranz	± 1 Da
Datenformat	Mascot generisch
Instrument	ESI-FTICR
¹ C = Cystein, N = Asparagin, Q = Glutamin, W = Tryptophan, M = Methionin	

[0206] Für die Quantifizierung der relativen prozentualen Oxidation an jeder Stelle wurde der Bereich der extrahierten Ionenchromatogrammspitze jedes oxidierten und des entsprechenden nicht oxidierten Peptids mit der folgenden Formel verwendet:

$$\% \text{ Oxidation}_{(\text{Stelle } n)} = \frac{(\text{Spitzenbereich des oxidierten Peptids})}{(\text{Spitzenbereich des oxidierten Peptids} + \text{Spitzenbereich des nicht oxidierten Peptids})} \times 100$$

[0207] Die prozentuale Zunahme der Oxidation jeder Probe (an verschiedenen Aminosäureresten) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle wird anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\% \text{ Anstieg der Oxidation}_{(\text{Stelle } n)} = \% \text{ Oxidation}_{(\text{Stelle } n)} (\text{behandelte Probe}) - \% \text{ Oxidation}_{(\text{Stelle } n)} (\text{Kontrollprobe})$$

Ergebnisse und Diskussion

[0208] Es wurde eine Studie durchgeführt, um die Potenzwirkungen und Oxidationsstufen verschiedener Aminosäuren bei der Behandlung mit höheren Mengen von Wasserstoffperoxid zu bestimmen. Die Ergebnisse der Potenzanalyse der mit H₂O₂ oxidierten BoNT/A DS Proben auf den Stufen 10 ppm, 50 ppm und 100 ppm (relative Potenz im Vergleich zur nicht oxidierten Kontrolle) sind in FIG. 1 dargestellt.

[0209] Die CBPA-Ergebnisse dieser Studie zeigten einen Verlust der Potenz als Antwort auf die Behandlung mit 10 ppm H₂O₂ (etwa 30 % Verlust). Ein weiterer Verlust an Potenz wurde bei der Behandlung mit höheren Mengen an H₂O₂ beobachtet, mit einem Gesamtverlust von etwa 70 % bzw. 85 % der Potenz nach der Behandlung mit 50 ppm H₂O₂ bzw. 100 ppm H₂O₂.

[0210] Um die Stellen und Mengen der H₂O₂-induzierten Oxidation der 150 kDa NT-Untereinheit des BoNT/A-Komplexes zu bestimmen, wurden die negative Kontrolle und die oxidierten Proben verdaut und die resultierenden Peptide mittels LC-MS/MS analysiert. Die Ergebnisse der LC-MS/MS-Analysen sind in FIG. 2 dargestellt.

[0211] Die Massenspektrometrie-Analyse wies sechs primäre Methionin-Oxidationsstellen auf dem 150 kDa NT auf (mit einer prozentualen Zunahme der Oxidation > 20 %): M411, M531, M602, M968, M1004 und M1144.

[0212] Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass die Potenz des BoNT/A-Komplexes durch Oxidation mit H₂O₂ negativ beeinflusst werden kann. Der Oxidationsweg der 150 kDa NT-Untereinheit von BoNT/A durch H₂O₂ ist bestimmt worden und schließt in erster Linie sechs Methioninreste an den Positionen 411, 531, 602, 968, 1004 und 1144 ein. FIG. 3 zeigt die Stelle der sechs Methioninreste, die am anfälligsten für Oxidation auf der 150 kDa NT sind. Der Rest M411 ist Teil der leichten Kette und alle anderen Reste befinden sich in der schweren Kette: M531 in der Schleifenregion der schweren Kette, M602 in der Membrantranslokationsdomäne, und M968, M1004, M1144 in der Membranbindungsdomäne.

[0213] Die Kristallstruktur der BoNT/A-Rezeptor-Bindungsdomäne im Komplex mit dem SV2C-Rezeptor ist gelöst worden (Benoit et al. (2017) Sei Rep. 7:43588). Es hat sich gezeigt, dass die Interaktion die Aminosäuren Thr1145, Thr1146 und Ser1294 auf BoNT/A einschließt. Da M1144 unmittelbar vor zwei dieser Aminosäuren liegt, kann seine Oxidation zu einer Abnahme der Rezeptorbindung und damit zu einem Verlust der Potenz führen.

[0214] Das Ausmaß der Oxidationszunahme bei der Behandlung mit H₂O₂ war für die sechs primären Oxidationsstellen ähnlich (FIG. 2). Die Darstellung der durchschnittlichen prozentualen Oxidationszunahme der sechs primären Oxidationsstellen gegen den prozentualen Potenzverlust zeigt eine lineare Beziehung (FIG. 4) mit einer Steigung von 1,1.

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

[0215] 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 Produktionsumfungsarbeit wird ein 115-Liter-Fermenter verwendet und benötigt etwa 3 Wochen für den Abschluss. 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 auszuwählen, werden Aliquots aus dem aufgetauten MCB-Fläschchen auf vorreduzierte Columbia-Blutagar (CBA)-Platten gestreut und 30-48 Stunden lang bei 34 °C ± 1 °C anaerob inkubiert. Anschließend werden ausgewählte Kolonien in 9 ml große Testrohre mit einem Kasein-Wachstumsmedium für 6-12 Stunden bei 34 °C beimpft. Der Inhalt

des 9-ml-Rohrs mit dem schnellsten Wachstum und der höchsten Dichte (Wachstumsselektionsschritt) wird dann ferner in zwei Step-up anaeroben Inkubationsschritten (dritter und vierter Kultivierungsschritt) kultiviert, dabei handelt es sich um eine 12 bis 30 stündige Inkubation bei 34 °C in einer 600 ml bis 1 l Saatgutflasche, gefolgt von einer 6 bis 16 stündigen Kultivierung in einem 15 bis 25 l Saatgutfermenter mit einem Kasein-Wachstumsmedium bei 35 °C. Diese beiden Step-up Kultivierungen werden in einem Nährmedium durchgeführt, das 2 % Kaseinhydrolysat (ein Verdauungsprodukt aus Kasein [Milchprotein]), 1 % Hefeextrakt und 1 % Glukose (Dextrose) in Wasser bei einem pH-Wert von 7,3 enthält.

[0216] Auf die Step-up Kultivierungen 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 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 Einsicht-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 Ansammlung von Botulinum-Neurotoxin aus der geklärten Kultur erfolgt durch Absenken des pH-Werts der geklärten Kultur auf pH 3,5 mit 3M-Schwefelsäure, um das Roh toxin bei 20 °C niederzuschlagen (Säuerungs fällung). Das rohe Botulinum-Neurotoxin wird dann durch Ultramikrofiltration (Mikrofiltration) (MF oder UF genannt) und anschließende Diafiltration (DF) aufkonzentriert (um eine Volumenreduzierung zu erreichen). Für den Schritt der Mikrofiltration wird ein 0,1 µm Filter verwendet.

[0217] 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 Phosphatpuffer pH 6,0 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 gelagert.

[0218] Die Fertigstellung dieses Prozesses von Schantz von Beispiel 5 (ohne APF), einschließlich der Ernte- und Reinigungsschritte, dauert etwa zwei bis drei Wochen. Das resultierende Bulk-Botulinum-Neurotoxin ist eine hochwertige Suspension des 900 kDa Botulinum-Toxin Typ A-Komplexes, hergestellt 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 einem ausgeprägten Muster von Streifen auf der Gelelektrophorese, und geeignet zur Verwendung für die Verbindung einer pharmazeutischen Zusammensetzung von Botulinum-Toxin.

[0219] Das Botulinum-Neurotoxin kann auch durch einen nicht-chromatographischen APF-Prozess ermittelt werden, wie in Beispiel 7 des US-Patents 7.452.697 dargelegt, wobei der gesamte nicht-chromatographische APF-Prozess (vom Beginn der Kultivierung bis zum Ende aller Reinigungs- und Verarbeitungsschritte) etwa zwei bis drei Wochen in Anspruch nimmt. Alternativ kann Botulinum-Neurotoxin auch durch einen chromatographischen APF-Prozess ermittelt werden, wie in Beispiel 16 des US-Patents 7.452.697 dargelegt, wobei der chromatographische APF-Prozess (vom Beginn der Kultivierung bis zum Ende aller Reinigungs- und Verarbeitungsschritte) eine Woche oder länger in Anspruch nimmt.

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

[0220] 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 ein 20-Liter-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) ein einmedialer Prozess, der HIC verwendet; (2) ein zweimedialer Prozess, der HIC verwendet, gefolgt von Anionenaustauschchromatographie; (3) ein zweimedialer Prozess, der HIC verwendet, gefolgt von Kationenaustauschchromatographie; (4) ein dreimedialer Prozess, der HIC verwendet, gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie; (5) ein dreimedialer Prozess, der HIC verwendet, gefolgt von Kationenaustauschchromatographie und Anionenaustauschchromatographie; (6) ein einmedialer Prozess, der die Anionenaustauschchromatographie verwendet; (7) ein zweimedialer Prozess, der Anionenaustauschchromatographie verwendet, gefolgt von HIC; (8) ein zweimedialer Prozess, der Anionenaustauschchromatographie verwendet, gefolgt von Kationenaustauschchromatographie; (9) ein dreimedialer Prozess, der Anionenaustauschchromatographie verwendet, gefolgt von HIC und Kationenaustauschchromatographie; (10) ein dreimedialer Prozess, der Anionenaustauschchromatographie verwendet, gefolgt von Kationenaustauschchromatographie und HIC; (11) ein einmedialer Prozess, der die Kationenaustauschchromatographie verwendet; (12) ein zweimedialer Prozess, der Kationenaustauschchromatographie verwendet, gefolgt von

HIC; (13) ein zweimedialer Prozess, der Kationenaustauschchromatographie verwendet, gefolgt von Anionenaustauschchromatographie; (14) ein dreimedialer Prozess, der Kationenaustauschchromatographie verwendet, gefolgt von HIC und Anionenaustauschchromatographie; und (15) ein dreimedialer Prozess, der Kationenaustauschchromatographie verwendet, gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und HIC. Das HIC entfernt Verunreinigungen, wie beispielsweise eine 49 kDa-Verunreinigung (die sich als Glukosephosphat-Isomerase der Wirtszelle entpuppt, wie unten beschrieben).

6.6.1. Vorbereitung der Arbeitszellbank

[0221] 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.

[0222] 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 Gew.-%/Vol.-% SPTII (Sojapepton Typ II), 1 Gew.-%/Vol.-% Hefeextrakt und 1 Gew.-%/Vol.-% 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 erweitert und in APF-Medium mit etwa 20 % Glycerin unter -135 °C gelagert.

[0223] Die APF-MCB wird unter GMP-Bedingungen hergestellt, indem die RCB in sauerstofffreiem APF-Medium (200 ml, mindestens 12 Stunden lang in einer anaeroben Kammer reduziert) erweitert und in einer anaeroben MACS-Kammer bei 34,5 °C ± 1 °C (gerührt bei 60 U/min) kultiviert 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 % zugefügt und anschließend wird die Mischung in Kryoflaschen mit 1 ml/Fläschchen (APF-MCB-Fläschchen) überführt. 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)

[0224] 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 dreistufigen 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.

[0225] Die vorgelagerte Stufe schließt die Verwendung eines Kulturmediums in einer 1 L Flasche ein, die 400 ml eines (in einer anaeroben Kammer) reduzierten Saatgut-APF-Kulturmediums enthält (2 Gew.-%/Vol.-% SPTII, 1 Gew.-%/Vol.-% Hefeextrakt, (vor dem Autoklavieren mit 1 N Natriumhydroxid und/oder 1 N Salzsäure auf pH 7,3 eingestellt), 1 Gew.-%/Vol.-% sterile Glukose, die nach dem Autoklavieren der Kulturmedien hinzugefügt wird). Das Kulturmedium (Saatgutmedium) wird mit 400 µl eines aufgetauten Clostridium botulinum WCB geimpft. Die Inkubation/Kultivierung erfolgt bei 34,5 °C ± 1,0 °C mit 150 U/min Agitation in einer anaeroben Kammer.

[0226] Wenn die optische Dichte des Kulturmediums bei 540 nm bei 1,8 ± 1,0 AU beträgt, wird der gesamte Inhalt der 1 L Flasche (etwa 400 ml) in einen 20 L Produktionsfermenter überführt, der ein APF-Fermentationsmedium enthält, das mit 1 N Natriumhydroxid und/oder 1 N Salzsäure nach der Dampfsterilisation auf pH 7,3 eingestellt wurde, sowie ein Fermentationsmedium, das aus 3,25 Gew.-%/Vol.-% SPTII, 1,2 Gew.-%/Vol.-% Hefeextrakt, 1,5 Gew.-%/Vol.-% steriler Glukose (nach der Sterilisation hinzugefügt; Sterilisation, z. B. bei etwa 122 °C für 0,5 Stunden) besteht. Die Temperatur und die Agitation werden auf 35 °C ± 1 °C bzw. 70 U/min geregelt. Die Stickstoffüberlagerung ist 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, die den aktiven BoNT/A-Komplex in das Kulturmedium freisetzt, wird durchgängig zwischen 35 Stunden und dem Ende der Fermentation beobachtet. Am Ende der Fermentation wird die Kultur zur Ernte auf 25 °C abgekühlt.

[0227] 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 Vorfilter mit einer nominalen Retentionsrate von 5 - 0,9 µm, um Zelltrümmer zu entfernen, und dann durch einen positiv geladenen Gradienten mit einer nominalen Retentionsrate von 0,8 - 0,2 µm, um DNA zu entfernen (Entfernung von bis zu etwa 80 %). Beide Filter werden vor der Verwendung zusammen mit 20 l Wasser für Injektionszwecke (WFI) gespült. Für den weiteren Prozess

werden mindestens 15 l des Filtrats benötigt und überschüssiges Material wird nach Abschluss der prozessbegleitenden Probenahme dekontaminiert. Das Filtrat wird bei 4 °C gelagert, wenn es nicht sofort durch Ultrafiltration verarbeitet wird.

[0228] In einer Biosicherheitskabine (BSC) wird das Filtrat aus dem Ernteschritt unter Verwendung einer Hohlfaser-Tangentialflussfiltrationsmembran (TFF) von GE Healthcare von 15 l auf $5 \pm 0,5$ l konzentriert. Das ultrafiltrierte Material wird dann mit 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5 auf ein Endvolumen von 20 l verdünnt. Dieses Material wird gereinigt, indem eine Chromatographiesäule, zwei Chromatographiesäulen oder drei Chromatographiesäulen verwendet werden (siehe den Abschnitt Nachgelagerte Schritte). Das verdünnte, ultrafiltrierte Erntematerial wird bei 4 °C gelagert, wenn es nicht sofort durch Reinigung verarbeitet wird.

[0229] Im Schantz-Prozess wird der Kulturschritt beendet und der Schritt der Fermentation beginnt basierend auf Zeit und visueller Beobachtung des Kulturwachstums. In den Beispielprozessen 6 hingegen basiert die Bestimmung des Zeitpunkts für die Beendigung des Kultivierungsschritts auf der Analyse der optischen Dichte der Kulturflüssigkeit, wodurch sichergestellt wird, dass sich die Kultur zum Zeitpunkt des Beginns des Fermentationsschritts in der logarithmischen Wachstumsphase befindet, und die Dauer des Kultivierungsschritts auf etwa 8 bis 14 Stunden reduziert werden kann. 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 des Fermentationsschritts beträgt 72 Stunden und die durchschnittliche Endtrübung (A_{890}) des Fermentationsmediums am Ende des Fermentationsschritts beträgt 0,15 AU. Die durchschnittliche Menge an Botulinum-Toxin Typ A-Komplex, die (wie durch ELISA bestimmt) in dem 20 l Fermentationsmedium (ganze Brühe) am Ende des Fermentationsschritts vorhanden ist, beträgt etwa 64 µg Botulinum-Toxin Typ A-Komplex/ml Fermentationsmedium.

[0230] 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)

[0231] Nachgelagerte Schritte schließen die Reinigung durch eine Chromatographiesäule, zwei Chromatographiesäulen oder drei Chromatographiesäulen ein (z. B. Abtrennung des Botulinum-Neurotoxins auf einer Anionenaustauschersäule, Elution von der Säule und weitere Trennung von Verunreinigungen durch Polieren auf einer Kationenaustauschersäule und vorzugsweise (im dreisäuligen Prozess) Durchgang 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 Konzentration und Pufferaustausch unter Verwendung von Tangentialflussfiltration (TFF) und Keimbelastungs-Reduktion (z. B. durch weitere Filtration unter Verwendung eines 0,2 µm-Filter) zu einem endgültigen Botulinum-Neurotoxin Typ A-Komplex, der für die kalte Lagerung, vorzugsweise das Einfrieren, und die eventuelle Verbindung zu einer Botulinum-Neurotoxin Typ A-Komplex pharmazeutischen 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.

[0232] 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. Konkret wird in diesem Beispiel ein dreisäuliger nachgelagerter Prozess 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, (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 beinhaltet. Dieses Beispiel bezieht sich auch auf einen nachgelagerten Prozess mit zwei Säulen, 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, (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 beinhaltet. In diesem Beispiel ist auch ein nachgelagerter Prozess

mit nur einer Säule denkbar, bei dem HIC, Anionenaustauschchromatographie oder Kationenaustauschchromatographie verwendet werden.

[02333] Eine erste detaillierte Ausführungsform eines beispielhaften dreisäuligen nachgelagerten Prozesses wird wie folgt durchgeführt. Geklärtes (verdünntes) ultrafiltriertes Material (201, wie oben offenbart) wird durch ein POROS® 50HQ Anionenaustausch-Chromatographieharz geleitet, das eingefangene Botulinum-Neurotoxin wird von der Anionenaustauschersäule eluiert und läuft dann durch ein POROS® 20HS Kationenaustausch-Chromatographieharz, dessen Eluent durch ein Phenyl Sepharose HP Chromatographieharz läuft. Der Eluent aus der HIC-Säule wird einer tangentialen Flussfiltration mit 100 kDa und anschließender 0,2 µm-Filtration unterzogen. Der resultierende Botulinum-Neurotoxin Typ A Komplex wird zur Lagerung eingefroren.

[02344] 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. Die gesamte Operation der POROS® 50HQ Säule wird bei Umgebungstemperatur durchgeführt, und der Fluss ist abwärts gerichtet. 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.

[02355] Einzelheiten des Anionenaustauschs: Verwendung der POROS® 50HQ Säule unter Verwendung von 0,1 N Natriumhydroxid für eine Mindestkontaktzeit von 30 Minuten (mindestens etwa 3 Säulenvolumina, bei 230 cm/Stunde). Die Säule wird dann mit einem 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5 Puffer äquilibriert (mindestens 5 Säulenvolumen). Als nächstes wird das geklärte, ultrafiltrierte und verdünnte Material (d. h. verarbeitetes Lysat APF Fermentationsmaterial) 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 sinkt, gefolgt von einem Eluieren mit 50 mM Natriumacetat, pH 4,8 bei 230 cm/Stunde. Die Ansammlung des Produktpools erfolgt, wenn die Absorption bei 280 nm (A_{280}) auf mindestens etwa 0,15 AE ansteigt und durch die maximale Spitze auf gleich oder weniger als etwa 0,2 AE an der hinteren Kante, in ein Gefäß, das 1 Säulenvolumen 50 mM Natriumacetat, pH 4,8, enthält. Dieser Elutionspool wird bei etwa 2 °C bis etwa 8 °C für bis zu 48 Stunden gelagert.

[02366] 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. Die gesamte Operation der POROS® 20HS Säule wird bei Umgebungstemperatur durchgeführt, und der Fluss ist abwärts gerichtet. Der Botulinum-Neurotoxin Typ A Komplex ist dem POROS® 20HS Säulenharz zugeordnet. 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.

[02377] Einzelheiten des Kationenaustauschschriffs sind: Verwendung der POROS® 20HS Säule unter Verwendung von 0,1 N Natriumhydroxidlösung für eine minimale Kontaktzeit von 30 Minuten (mindestens etwa 3 Säulenvolumina, bei 230 cm/Stunde). Die Säule wird dann mit einem 50 mM Natriumacetat, pH 4,8 Puffer äquilibriert (mindestens etwa 5 Säulenvolumina). Als nächstes wird der POROS® 50HQ Produktpool (der wie oben beschrieben angesammelt wurde, 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 anschließend 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 eluiert, das Eluat wird in einen Bioprozess-Auffangbeutel umgeleitet (der 1 Säulenvolumen von 50 mM $\text{NaH}_3\text{C}_2\text{O}_2$, pH 4,8 enthält), wenn das A_{280} auf etwa $\geq 0,1$ AU ansteigt durch das Maximum der Spitze, bis das A_{280} der hinteren Kante der Elutionsspitze auf einen Wert der hinteren Kante von $\leq 0,1$ AU abnimmt. Der POROS® 20HS Produktpool wird im Auffangbeutel bei Raumtemperatur bis zu etwa 6 Stunden gelagert.

[02388] In dieser ersten Ausführungsform des beispielhaften dreisäuligen Chromatographie-Medienprozesses 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 Interaktionschromatographie, das in eine Säule mit einem Innendurchmesser von etwa 8 cm und einer Höhe von etwa 5 cm gepackt ist. Die gesamte Operation der Phenyl Sepharose HP Säule wird bei Umgebungstemperatur durchgeführt und der Fluss ist abwärts gerichtet. 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.

[02399] Die Einzelheiten der hydrophoben Interaktionschromatographie sind: eine Phenyl Sepharose HP Säule wird anfänglich mit einer 0,1 N Natriumhydroxidlösung für eine Kontaktzeit von mindestens 30 Minuten (mit mindestens etwa 3 Säulenvolumina einer 0,1 N Natriumhydroxidlösung bei 200 cm/Stunde) desinfiziert. Die Säule wird dann mit mindestens etwa 5 Säulenvolumina von 50 mM Natriumacetat, 0,4 M Ammoniumsulfat, pH 4,8 Puffer äquilibriert. Als nächstes wird der POROS® 20HS (Kationenaustauschersäule) Produktpool (von oben) 1: 1 mit 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 Puffers gewaschen und anschließend mit einem 50 mM Natriumphosphat, 0,4 M Ammoniumsulfat, pH 6,5 Puffer gewaschen. Der Botulinum-Neurotoxin Typ A Komplex wird von der Säule mit einem 10 mM Natriumphosphat, 0,14 M Ammoniumsulfat, pH 6,5 Puffer eluiert. Das Eluat wird in einen Bioprozess-Auffangbeutel umgeleitet, wenn der A_{280} auf $\geq 0,05$ AU ansteigt. Das Eluat wird so lange angesammelt, bis das A_{280} der hinteren Kante der Elutionsspitze auf einen Wert von $\leq 0,05$ AU abfällt. Der Phenyl Sepharose HP Produktpool wird im Auffangbeutel bis zu 6 Stunden bei Raumtemperatur gelagert.

[0240] 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. Pall® Filtron Minimate-Kassetten mit einer Grenzmembran mit einem Molekulargewicht von 100 kDa werden für die Konzentrations- und Diafiltrationsschritte verwendet. Das formulierte Material geht dann durch einen Pall Mini Kleenpak (R) 0,2 µm Filter, um die potenzielle Keimbelastung zu reduzieren. Der UF/DF-Schritt konzentriert den Phenyl Sepharose HP-Produktpool (Eluent der HIC-Säule) auf eine BoNT/A-Komplex-Konzentration von 0,7 g/l und diafiltriert das konzentrierte Material mit einem 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5 Puffer.

[0241] Die Einzelheiten des verwendeten Ultrafiltrations-/Diafiltrationsprozesses sind wie folgt. Die UF/DF-Einheit und die Pall 100 kDa Polyethersulfon-Membran werden anfänglich mit mindestens 5 L Wasser für Injektion (WFI) gespült, um die Packungslösung 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. Als nächstes 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 auf die Minimate® Tangentialfluss-Filtrationskassette geladen und das HIC-Eluat auf 0,7 g/l konzentriert. Nach dem Konzentrationsschritt wird der Retentatpool gegen mindestens 5 Diafiltrationsvolumina des Puffers für die Formulierung des Medikamentenwirkstoffs (10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5) bei einem Transmembrandruck von 7,5 psig (Pfund pro Quadratzoll Überdruck) diafiltriert. Der Permeatauslass wird dann geschlossen und das UF/DF-System mindestens 2 Minuten lang 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 Retentatpool durch Messung des Offline- A_{278} bestimmt und basierend auf der Ablesung von A_{278} wird die Konzentration des Retentatpools mit 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5-Puffer auf 0,5 g/l eingestellt. Der konzentrationsangepasste Retentatpool wird dann durch einen Pall Mini Kleenpak™ 0,2 µm Filter gefiltert, um die potentielle Keimbelastung zu reduzieren. Der gefilterte, konzentrationsangepasste Retentatpool wird in einem Auffangbeutel bei 2 °C - 8 °C für bis zu 2 Tage gelagert.

[0242] Der endgültig ermittelte gereinigte Botulinum-Neurotoxin Typ A Komplex wird in 1 ml Nunc® Kryofläschchen zu 700 µl pro Fläschchen gefüllt und gefroren gelagert. Die Operation der Füllung wird in einer Biosicherheitskabine der Klasse 100 bei Umgebungstemperatur durchgeführt.

[0243] 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 gelagert. 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 und der resultierende Medikamentenwirkstoff (zurückgewonnenes Botulinum-Neurotoxin) wird als Ammoniumsulfat-Suspension mit einer Konzentration von etwa 2,7 g/l gekühlt gelagert. 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.

[0244] Gemäß einem Aspekt können Konzentrationen von Produkten auf pflanzlicher Basis, wie beispielsweise Produkte auf Sojabasis, Sojapepton Typ II Hy-Soy® oder SE50MK (ein koscheres Sojapepton) in Kultur- und Fermentationsmedien sein. Hy-Soy® im Saatgutkulturmedium kann zwischen 10-200 g/l liegen. Vorzugsweise liegt die Konzentration von Hy-Soy® im Saatgutmedium zwischen 15-150 g/l. Am meisten bevorzugt liegt die Konzentration von Hy-Soy® im Saatgutmedium ungefähr zwischen etwa 20-30 g/l oder einer Menge dazwischen. Die Glukosekonzentration 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. Am meisten bevorzugt beträgt die Konzentration von Glukose im Kulturmedium etwa 10 g/l. Die Menge an Hefeextrakt kann etwa 5-20 g/l, mehr bevorzugt etwa 10-15 g/l oder eine Menge dazwischen betragen. Zum Beispiel kann der pH-Wert des Kulturmediums vor dem Wachstum von Clostridium botulinum etwa pH 7,0-7,5 oder dazwischen betragen, vorzugsweise pH 7,3.

[0245] Die Menge an Hy-Soy® im Fermentationsmedium der Produktion kann beispielsweise zwischen 10-200 g/l liegen. Vorzugsweise liegt die Konzentration von Hy-Soy® im Fermentationsmedium zwischen 15-150 g/l. Am meisten 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 Menge dazwischen. Nicht unbedingt, aber wie oben beschrieben, kann die Glukose zusammen mit den anderen Komponenten des Fermentationsmediums durch Autoklavieren sterilisiert werden. Die pH-Stufe des Fermentationsmediums vor dem Wachstum kann pH 7,0-7,8 betragen, vorzugsweise etwa 7,0-7,5 oder dazwischen, mehr bevorzugt pH 7,3.

[0246] 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.

[0247] In einem Beispiel beträgt das Fermentationsvolumen 20 l, die Gesamtprozesszeit für alle Schritte nur 4 bis 6 Tage und es wird eine hohe Ausbeute an Botulinum Neurotoxin ermittelt. Im Folgenden werden weitere Details zu einer besonderen Ausführungsform im Rahmen unserer Erfindung bereitgestellt. Der Fermentationsschritt wird in APF-Medium unter Verwendung eines 30-L-Edelstahlfermenters durchgeführt.

[0248] 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 beispielsweise nur 20 l oder weniger APF-Fermentationsmedium benötigt, anstelle der üblicherweise größeren, früheren Volumina (z. B. 115 l) des Fermentationsmediums, die für die Herstellung kommerziell nutzbarer Mengen zur Ermittlung eines Botulinum-Neurotoxins erforderlich waren.

[0249] 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.

[0250] Wie oben offenbart, wird ein APF-Prozess für die Zubereitung einer APF WCB verwendet, der Zellbankfläschchen aufweist, die unter -135 °C gelagert werden. Ein APF WCB-Zellbankfläschchen wird vor der Beimpfung mit dem Nährmedium etwa 15 Minuten lang bei Raumtemperatur aufgetaut, gefolgt von einem einzigen Kultivierungsschritt wie oben offenbart, um eine „Saatgut“-Kultur 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 unter Verwendung von 1 N Salzsäure und 1 N Natriumhydroxid (zur Einstellung des pH-Werts), D(+) Glukose, wasserfrei (Mallinckrodt Baker, Cat. Nr. 7730, 4,00 g), Sojapepton Typ II (SPTII) (Marcor, Cat. Nr. 1130, 8,00 g), Wasser für Injektionszwecke (WFI) 400,0 ml und Hefeextrakt (YE) (BD Cat. Nr. 212730, 4,00 g) zubereitet. Die Lösung aus Sojapepton Typ II und Hefeextrakt wird hergestellt, indem 300 ml WFI mit einem 500 mL Messzylinder abgemessen und in eine Saatgut-Kulturflasche gegossen werden. 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 Flasche mit der Saatgutkultur hinzugefügt 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 $7,30 \pm 0,05$ eingestellt. Die mittlere Lösung wird mit WFI auf etwa 360 ml aufgefüllt. Die Saatgutflasche ist ausreichend belüftet, um den Dampf- und Gastransfer zu ermöglichen. Eine 10 %ige Glukoselösung (Gew./Vol.-%) wird zubereitet, indem etwa 30 ml WFI mit einem 100 mL Messzylinder abgemessen und in die vormontierte Glukosezugabeflasche gegeben werden, die auf einen Rührer gestellt und der Rührer aktiviert wird. Etwa 4,00 g Glukose werden in die Glukosezugabeflasche hinzugefügt und gemischt, bis sie sich auflöst (niedrige Hitze wird verwendet, wenn dies für eine Auflösung erforderlich ist) 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 Saatgut-Kulturflaschen werden zur Sterilisation 30 Minuten lang bei 123 °C autoklaviert. Nach der Sterilisation werden beide Gegenstände aus dem Autoklaven genommen und in einer Biosicherheitskabine abgekühlt. Nach dem aseptischen Abkühlen werden 10 % der Glukoselösung in die Saatgut-Kulturflasche mit dem Hefeextrakt und der Sojapepton II-Lösung überführt und gemischt, wodurch eine fertige Saatgut-Kulturflasche bereitgestellt wird.

[0251] 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. Die fertige Saatgut-Kulturflasche wird dann auf eine Rührplatte im MACS gestellt (Rührplatte auf ca. 150 U/min aktiviert) und das Medium in der fertigen Saatgut-Kulturflasche wird mindestens 12 Stunden lang bei etwa 34,5 °C $\pm$ 1 °C im MACS reduziert, danach wird eine Probe von 1 ml Medium 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 etwa 10-15 Minuten lang aufgetaut, danach werden etwa 400 µl des Fläschcheninhalts direkt in das Medium in der fertigen Saatgutkulturflasche platziert. Der Deckel der fertigen Saatgut-Kulturflasche wird vollständig gelöst und der Deckel auf die Flasche gesetzt und das Rührwerk auf 150 U/min eingestellt. Nach mindestens etwa 11 Stunden Inkubation in der MACS wird die Fermentation wie unten beschrieben durchgeführt.

[0252] Die Sonden (z. B. Redoxsonde, pH-Sonde, Trübungssonde, z. B. von Broadley James und Optek) und die Konfiguration der Sequenz des Fermenters, z. B. eines 30-Liter-Fermenters 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) Fermentor System sein, das aus einem Fermenterbehälter mit einem Volumen von 30 l, einem Rührwerksantriebssystem, einer Baugruppe für die Verbindungen zu den Versorgungseinrichtungen (CIP, Reindampf, CDA, Stickstoff, Sauerstoff, Prozesskaltwasser, Bioabfall und Anlagendampf), Instrumenten (pH-Wert, Temperatur, Druck, Redox, optische Dichte und pro Masse Fluss) und vier peristaltischen Pumpen besteht. 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.

[0253] Für die Modi Sterilhaltung, Gleichgewicht, Lauf und Ernte werden Agitation, Temperatur, Druck und Stickstoffüberlagerung mit den folgenden Sollwerten betrieben.

[0254] Für den Sterilhaltungs- und Gleichgewichtsmodus:

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

[0255] Für den LAUF-Modus:

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

[0256] 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

[0257] Um das Fermentationsmedium zuzubereiten, schließt das benötigte Material D(+) Glukose, wasserfrei (Mallinckrodt Baker, Cat. Nr. 7730, 300,0 g), Sojapepton Typ II (SPTII) (Marcor, Cat Nr. 1130, 650,0 g), Wasser für Injektionszwecke (WFI, 13 l) und Hefeextrakt (YE) (BD Cat #212730, 240,0 g), zusammen mit Standardwaagen, einem Behälter (z. B. 201), einer Glasflasche (5 l), Messzylindern, Rührstäben und Rührern ein. Etwa 10 l WFI werden zusammen mit einem

Rührstab in dem Behälter hinzugefügt. Der Behälter 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 mit WFI in ausreichender Menge auf 13 l aufgefüllt und der Behälter wird verschlossen. Eine 10 %ige Glukoselösung (w/v) wird dann durch Hinzufügen von etwa 2 l WFI in eine 5 l Glasflasche (mit Rührstab darin) zubereitet. Auf einen Rührer gesetzt und mit dem Barren drehend, werden etwa 300,00 g Glukose in die Flasche hinzugefügt und gemischt, bis sie gelöst ist. Die Glukoselösung wird in ausreichender Menge auf 3 l mit WFI aufgefüllt und die Flasche verschlossen, wodurch eine 10 %ige Glukoselösung bereitgestellt wird.

[0258] 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, $\pm$ 1 °C) wird das Post-SIP-Fermentervolumen notiert. Eine Glukosezusatzbaugruppe, die ein Gefäß umfasst, das ein Rohr mit einem 0,2 µm Inline-Filter (PALL Corp.) und eine peristaltische Pumpe aufweist, wird mit dem Fermenter verbunden und die Leitung wird einem SIP unterzogen und abgekühlt. Ein Anschluss des Ventils für die Zugabe wird geöffnet und etwa 3 l Glukose (filtersterilisiert) hinzugefügt und die entsprechende Menge WFI (filtersterilisiert), um in ausreichender Menge das Gesamtvolumen des Fermenters auf 20 l zu erhöhen, wird in die Glukose-Zugabeflasche gegeben und durch dieselbe Glukose-Filterleitung in den Fermenter gepumpt. Der Anschluss des Ventils für die Zugabe wird geschlossen. Das Produktionsmedium für die Fermentation weist danach einen pH-Wert von etwa 7,3 $\pm$ 0,05 auf, der mit sterilem 1 N Natriumhydroxid oder 1 N Salzsäure eingestellt wird, wobei je nach Bedarf SIP-Zugabeleitungen verwendet werden. Anschließend werden die Parameter für die Sterilhaltung eingestellt und für etwa 12 Stunden vor der Impfung gehalten. Die Ausgangsglukosekonzentration des Mediums wird mit einem Metabolitenanalysator gemessen und die Glukosekonzentration aufgezeichnet.

[0259] Wie oben erwähnt, wird am Ende der Inkubation der Saatgutkultur (etwa 11 $\pm$ 1 Stunden) 1 ml der Probe für die Messung der optischen Dichte (OD) entnommen. Die OD wird offline bei 540 nm mit einem Spektralphotometer gemessen und wenn der OD-Wert innerhalb des entsprechenden Bereichs liegt, wird er aufgezeichnet und die Kultur wird 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 Saatgutflasche 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.

[0260] Die Fermentation wird dann fortgesetzt (die Fermentationsdauer kann von etwa 60 Stunden bis etwa 80 Stunden, vorzugsweise von etwa 68 Stunden bis etwa 76 Stunden, am meisten bevorzugt für etwa 72 Stunden betragen), während Proben aus dem Fermenter entnommen werden, zum Beispiel nach 24 und 48 Stunden, wobei die aseptischen 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 Fermentationsbrühe beträgt zum Beispiel etwa 18-19 Liter) kann eine Probe entnommen werden (z. B. für Offline-Messungen der optischen Dichte, Glukosemessungen, ELISA, SDS-PAGE, Western Blot und DNA/RNA-Quantifizierung).

[0261] 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. Als nächstes wird die Fermentationsbrühe der Produktion einer Ernte unterzogen, d. h. die Fermentationsbrühe der Produktion wird durch Filtration geklärt, wobei beispielsweise etwa 15 l Filtrat angesammelt wird. Die Parameter der Fermentation werden auf ERNTE eingestellt und die Baugruppe für die Klärung 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 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 (es wird die Zeit für den Beginn der Klärung, die anfängliche Online-OD, den anfänglichen pH-Wert, die anfängliche Temperatur und das anfängliche Volumen des Fermenters notiert). Der Druck im Fermenter wird mit einer Rate von etwa 1 psi (Pfund pro Quadratzoll) etwa alle 10 Minuten während der Filtration 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 durch spätere ChromatographieSchritte entfernt, wie unten beschrieben), damit entfällt die bisherige Abhängigkeit/Verwendung von RNase und/oder DNase zur Entfernung dieser Komponenten aus der Fermentationsbrühe. Prozessparameter wie der Eingangsdruck des Vorfilters, der Eingangsdruck des Tiefenfilters, der Druck im Fermenter, die Agitation und das Filtratvolumen werden alle 2 l des gesammelten Filtrats überwacht und am Ende werden die Zeit des Klärungsendes und das Volumen des gesammelten Filtrats aufgezeichnet. Nach Abschluss des Ernteschritts werden die Systeme dekontaminiert und gereinigt.

[0262] Der Filtratbehälter wird zur Probenahme in die BSC gebracht, aus der etwa $\leq$ 10 ml des Filtrats für Offline-OD-Messungen und andere Analysen (z. B. ELISA, SDS-PAGE, DNA/RNA und Western Blot) entnommen werden.

[0263] 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 bei einer bevorzugten Rate von etwa 2 L pro Minute gespült und anschließend wird die TFF-Einheit desinfiziert, indem 0,1 N Natriumhydroxid (im Kreislauf) etwa 60 Minuten lang hindurchgeleitet wird, woraufhin 1 L 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5, hindurchgeleitet wird, 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), wobei das Filtrat auf etwa 5 l $\pm$ 0,5 l konzentriert wird (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. Sobald der Retentatpool auf etwa 5 l $\pm$ 0,5 l konzentriert ist, wird er mit etwa 15 l sterilisiertem 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5, durch die TFF mit einer Rate von etwa 2 l pro Minute auf etwa 20 l verdünnt. 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 gelagert.

[0264] Nach der Verwendung werden alle Systeme entweder mit 1N Natriumhydroxid oder durch Sterilisationstemperaturen (Dampftemperaturen) dekontaminiert und gereinigt.

[0265] Die folgenden Materialien, Ausrüstungen und Verfahren werden verwendet, um die unten dargelegten Lösungen, Puffer usw. herzustellen, die in einem beispielhaften Prozess verwendet werden, d.h. bei der Reinigung des aus den Prozessen von Beispiel 6 ermittelten Fermentationsmediums, um einen gereinigten Botulinum-Neurotoxin Typ A Komplex zu ermitteln. Beispielhafte verwendete Puffer (die durch einen 0,2-Mikron-Vakuumfilter gefiltert und deren Leitfähigkeit in mS/cm gemessen wurde, um sie zu dokumentieren) schließen Folgendes 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.

[0266] Im Folgenden ist ein Beispiel für Operationen zur Reinigung und Ermittlung von Botulinum-Neurotoxin Typ A aus den Prozessen von Beispiel 6 dargelegt. 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-Sätze schließen eine peristaltische Pumpe für die Abgabe der Lösung mit variabler Geschwindigkeit, einen Einlassventil-Verteiler mit 5 Einlässen, einen Säulenventil-Verteiler mit einem Array von 3 automatisierten Ventilen, einen Auslassventil-Verteiler mit 3 Auslässen, eine Überwachung des Säulenabflusses, einschließlich pH, Leitfähigkeit und UV, eine auf UV-Absorption basierende Ansammlung von Spitzen sowie die Instrumente und Steuerungen ein, die für den Abschluss der Operationen zur Reinigung 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.

[0267] Das UF/DF-System schließt eine Rezirkulationspumpe, eine Diafiltrationspumpe, 2 Waagen und einen Halter für einen Tangentialflussfilter (TFF) ein. Die Rezirkulationspumpe verfügt über Schnittstellen zu 3 Einweg-Drucksensoren und einer der Waagen (die sich unter dem Permeat-Reservoir befindet), um die Flussrate so zu steuern, dass ein definierter Transmembrandruck und -stopp aufrecht erhalten wird, basierend auf dem Gewicht des Permeat-Reservoirs. 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.

[0268] Nach der Konzentration und Verdünnung des Retentatmaterials aus dem Ernteschritt (Ernten des lebewesenproteinfreien Fermentationsmediums) wird das Material auf eine Anionenaustauschersäule geladen. Im Folgenden ist das Verfahren beschrieben, das für das Packen und Testen der Anionenaustauschersäule verwendet wird, die für den beispielhaften zweisäuligen Prozess in Beispiel 6 nützlich ist.

[0269] Vorgepackte Säulen werden für alle drei chromatographischen Schritte verwendet. Zunächst wird das Ausgangsmaterial (geerntetes APF-Medium, das einer Ultrafiltration/Verdünnung unterzogen wurde) durch die Anionenaustauschersäule (Poros 50HQ, von ABI, wie oben beschrieben) hindurchgeführt. Mindestens 5 Säulenvolumina (CVs) von 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5, werden verwendet, um die Anionenaustauschersäule (in diesem Beispiel eine Capture-Säule) zu äquilibrieren.

[0270] Nach der Äquilibration wird der Ladeschritt ausgeführt, bei dem das Ausgangsmaterial (nach dem Ernteschritt geerntete Fermentationsbrühe, z. B. etwa 20 l) mit einer Rate von beispielsweise etwa 200 cm/Std. auf die Anionenaustauschersäule geladen wird. Nachdem 0,5 Säulenvolumina des geladenen Materials durch die Anionenaustauschersäule hindurchgegangen sind, wird der Fluss durch den Pool (FT) in einem Gefäß wie einem Polyethersulfonbehälter angesammelt, während der Toxinkomplex an das Material der Anionenaustauschersäule gebunden wird. Danach folgt ein Wasch-

schritt, bei dem mindestens etwa 15 Säulenvolumina des Waschpuffers (z. B. 50 mM Natriumphosphat bei einem pH-Wert von 6,5) durch die Anionenaustauschersäule hindurchgehen. Der Waschschrift wird gestoppt, wenn die in Echtzeit am Säulenausgang gemessene UV-Strahlung auf weniger als oder gleich etwa 80 mAU sinkt. Das Volumen des Waschpuffers und das Volumen des Flusses/des Waschpools werden aufgezeichnet, und eine 1 ml Probe des Flusses/des Waschpools wird entnommen und zum Beispiel auf Toxinkonzentration, Nukleinsäuregehalt, Ganzzellproteine, SDS-PAGE, qPCR, 2D LC und ELISA getestet. Der nächste 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, beginnt die Ansammlung des Eluats in einem Container, der mit 1 CV Elutionspuffer (50 mM Natriumacetat, pH 4,8) gefüllt ist. Die Ansammlung des Eluatpools wird gestoppt, wenn die UV-Ablesung auf weniger als oder gleich etwa 200 mAU sinkt (das gesammelte Volumen liegt zu diesem Zeitpunkt zwischen etwa 1 und etwa 2 CVs). Das Chromatographiesystem wird dann dekontaminiert und mit 1 N Natriumhydroxid gereinigt.

[0271] 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 50 mM Natriumacetat, pH 4,8 verdünnt.

[0272] Nach dem Durchlauf der Anionenaustauschersäule wird die Operation der Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Die Kationenaustauschersäule (z. B. Poros®20HS) wird mit mindestens 5 CVs Äquilibrierungspuffer (50 mM Natriumacetat, pH 4,8) äquilibriert. Nach der Äquilibrierung 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 hindurchgegangen sind, wird der durchströmte (FT) Pool gesammelt. Eine erste Wäsche der Kationenaustauschersäule wird durchgeführt, wobei etwa 3-5 CVs 50 mM Natriumacetat, pH 4,8, durch die Kationenaustauschersäule hindurchgehen (das Volumen des verwendeten ersten Waschpuffers wird aufgezeichnet). Ein zweiter Waschvorgang wird ausgeführt, bei dem etwa 3 CVs von 170 mM Natriumchlorid, 50 mM Natriumacetat, pH 4,8, durch die Säule gepumpt werden und dieses Eluat wird in einem neuen Container mit der Kennzeichnung „WASH 2 Peak“ angesammelt. Die Ansammlung beginnt, wenn die UV-Ablesungen auf mehr als oder gleich 50 mAU ansteigen. 1 CV wird angesammelt und das zweite verbrauchte Waschpuffervolumen wird aufgezeichnet.

[0273] 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 die Ansammlung des Eluats in Containern, die mit Verdünnungspuffern (40 ml 100 mM Kaliumphosphat, pH 6,8 und 60 ml 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5) gefüllt sind. Die Ansammlung des Eluats aus der Kationenaustauschersäule wird fortgesetzt, bis die UV-Ablesung auf etwa 100 mAU oder weniger sinkt. Das Gesamtvolumen des Eluats nach der Verdünnung wird aufgezeichnet. Das Kationenaustausch-Chromatographiesystem wird dann dekontaminiert und gereinigt. Nach der Elution von der Kationenaustauschersäule wird das Eluat einer Filtration unterzogen. Es wird ein System zur tangentialen Flussfiltration (TFF) verwendet, bei dem drei 100K 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 Sanitärösung. Die Diafiltrationslösung kann zum Beispiel 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5 und die Sanitärösung 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, wonach die Membran ferner mit mindestens etwa 4200 ml Wasser für Injektionszwecke gespült wird, wobei das Retentat in das Reservoir zurückgeführt wird. Danach erfolgt die Membranreinigung (falls erforderlich) durch Spülen der Membran mit mindestens etwa 200 ml 1N Natriumhydroxid, wobei das Retentat in den Abfall gerichtet wird, gefolgt von einer Spülung der Membran mit mindestens etwa 200 ml 1N NaOH, wobei das Retentat mindestens 30 Minuten lang in das Reservoir zurückgeführt wird. Die Äquilibrierung wird dann ausgeführt, indem die Membran mit Äquilibrierungspuffer (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 Äquilibrierungspuffers liegt (z. B. innerhalb von +/- 0,2 Einheiten von pH 6,5).

[0274] Die Konzentration des Materials (Eluat (Produktpool) aus der Kationenaustauschersäule) wird bestimmt, um zu sehen, ob eine Verdünnung oder eine Konzentration (beispielhafter Prozess) angemessen ist (eine beispielhafte Zielkonzentration kann etwa 0,7 mg/ml betragen). Die Verdünnung erfolgt unter Verwendung von 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5. Es wird ein Zielvolumen bestimmt, zum Beispiel für eine Produktkonzentration von 0,7 mg/ml (Zielvolumen = (Ausgangskonzentration/Startvolumen)/0,7 mg/ml).

[0275] 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, wonach das Permeatventil langsam geöffnet wird, während das Retentat-

Gegendruckventil auf ein Ziel von etwa 7 psig Transmembrandruck eingestellt wird. Zur Verdünnung wird 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5, zum Zielvolumen hinzugefügt und ohne Ultrafiltration auf die Diafiltration gebracht; für die Konzentration wird mit der Ultrafiltration begonnen. Für die Diafiltration: Permeatabfälle werden in einem neuen Container angesammelt (Ziel-Diafiltrationsvolumen ist das 5-fache Diafiltrationsvolumen) und mit mindestens 5 Diafiltrationsvolumina von 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5, diafiltriert. Daten zum Diafiltrationsprozess werden in mindestens 10-minütigen Intervallen angesammelt (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/laufen gelassen und mit mindestens 20 ml 10 mM Kaliumzitrat, pH 6,5, gespült. Der Produktpool schließt das Retentat und die Spülung ein. Eine Probe kann aus dem Produktpool entnommen und einer Verifizierungsanalyse unterzogen werden, die z. B. UV bei 278 nm, SDS-Page, LcHPLC, SE-HPLC, qPCR, RP-HPLC, Native-Page, AUC, Limulus-Amöbozyten-Lysat, Western Blot und ELISA-Tests einschließt. Für die Reinigung nach dem Gebrauch wird das System mit 1N Natriumhydroxid gespült, mindestens 10 Minuten lang rezirkuliert und anschließend mit 0,1 N Natriumhydroxid gespült und darin gelagert.

[0276] Anschließend erfolgt eine sterile Filtration und Füllung, um das Bulk-Neurotoxin zu lagern und zu teilen. Die Konzentrationsanpassung wird ausgeführt, um die Toxinkonzentration unter Verwendung von 10 mM Kaliumcitrat, pH 6,5, auf etwa 0,5 mg/ml mit der Probe nach dem Spülen einzustellen. Wenn die Toxinkonzentration unter etwa 0,5 mg/ml liegt, ist keine Konzentrationsanpassung erforderlich.

[0277] Unter Verwendung einer sterilen Pipette werden 10 ml/0,75 ml Aliquots in jedes sterile 15 ml/1,5 ml Probenrohr pipettiert. 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 gelagert oder 0,75 ml des Filtrat-Produktpools werden in Kryofläschchen überführt. Die Kryofläschchen werden bei -70 °C +/- 5 °C gelagert.

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

[0278] 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 geschaltet werden können, um das Botulinum-Neurotoxin zu ermitteln, wie es nach Meinung und Einschätzung eines Fachmanns angemessen ist.

[0279] Clostridium botulinum-Bakterien werden kultiviert und wachsen gelassen, bis die Fermentation abgeschlossen ist. Die Fermentationskultur wird dann im folgenden Reinigungsprozess verwendet:

Die Fermentationskultur wird einem sauren Niederschlag unter Verwendung von 3M-Schwefelsäure verwendet, um den pH-Wert auf 3,5 zu senken, und das bei einer Temperatur von unter 25 °C. Der saure Niederschlag wird dann einer 0,1 µm Tangentialflussfiltration unterzogen, um die Masse der Zellen zu konzentrieren. Dann wird der pH-Wert auf 6,0 eingestellt und Nukleasen hinzugefügt, um den Gehalt an Nukleinsäuren in den Wirtszellen zu reduzieren.

Dann wird eine Klärung durch Zentrifugation durchgeführt, um Zelltrümmer zu entfernen, und eine Dead-End-Filtration bei 0,2 µm wird mit hinzugefügtem Ammoniumsulfat ausgeführt. 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.

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

[0280] 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.

[0281] 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/P189567JSUB.xml>

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, umfassend eine Vielzahl von 900 kDa Clostridium botulinum Serotyp A (BoNT/A) Neurotoxin-Komplex-Spezies, wobei die Oxidationsstufe der in der Zusammensetzung vorhandenen 150 kDa Neurotoxin-Spezies an jeder der folgenden Positionen weniger als 6 % beträgt: 411 (M411) wie in SEQ ID NO: 2 gezeigt, 550 (M550) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt, 1004 (M1004) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt und 1144 (M1144) wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex OnabotulinumtoxinA ist.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Oxidationsstufe an der Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als 5 % beträgt.
4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Oxidationsstufe an der Position M411 der SEQ ID NO. 2 weniger als etwa 2 % beträgt.
5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Oxidationsstufe an der Position M550 der SEQ ID NO. 3 weniger als 1 % beträgt.
6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Oxidationsstufe an der Position M550 der SEQ ID NO. 3 etwa 0,3 % bis etwa 0,5 % beträgt.
7. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Oxidationsstufe an der Position M1004 der SEQ ID NO. 3 weniger als 3 % beträgt.
8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Oxidationsstufe an der Position M1004 der SEQ ID NO. 3 etwa 1 % bis etwa 2 % beträgt.
9. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Oxidationsstufe an der Position M1144 der SEQ ID NO. 3 weniger als 6 % beträgt.
10. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Oxidationsstufe an der Position M1144 der SEQ ID NO. 3 etwa 2 % beträgt.
11. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Oxidationsstufe durch LC-MS/MS bestimmt wird.
12. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Zusammensetzung weniger als 3 % Wirtszellprotein umfasst.
13. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Zusammensetzung eine Potenz von etwa $1,5 \times 10^7$ Einheiten/mg bis etwa $6,0 \times 10^7$ Einheiten/mg aufweist.
14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, wobei die Potenz unter Verwendung eines Assays für die 50 %ige letale Dosis bei Mäusen (MLD50) bestimmt wird.
15. Zusammensetzung nach Anspruch 13, wobei die Potenz unter Verwendung eines auf Zellen basierenden Potenzassays bestimmt wird.
16. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, ferner umfassend einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, wobei der pharmazeutisch verträgliche Träger menschliches Serumalbumin und Natriumchlorid umfasst.
18. Zusammensetzung nach Anspruch 16, wobei die Zusammensetzung vakuumgetrocknet ist.
19. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex in einem Zustand der Fermentation produziert wird, der eine Kälteschock-Fermentationstemperatur umfasst.
20. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex in einem kontinuierlichen Zustand der Fermentation bei kalter Temperatur produziert wird.
21. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex durch einen oder mehrere Schritte der Säulenchromatographie gereinigt wird.
22. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 21, wobei der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie umfassen.
23. Zusammensetzung nach Anspruch 22, wobei der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie ferner eine Anionenaustauschchromatographie umfassen.
24. Zusammensetzung nach Anspruch 22 oder 23, wobei der eine oder die mehreren Schritte der Säulenchromatographie ferner eine Kationenaustauschchromatographie umfassen.
25. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 24, wobei der 900 kDa BoNT/A-Komplex von Clostridium botulinum-Bakterien produziert wird, die aus einer von Lebewesen freien Arbeitszellbank kultiviert und erweitert wurden.
26. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 25, die frei von Tierprodukten ist.
27. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 26, die keinen Proteaseinhibitor enthält.

28. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 27, die kein Benzamidinhydrochlorid enthält.
29. Verfahren zur Herstellung einer BoNT/A umfassenden Zusammensetzung, wobei das Verfahren das Inkubieren einer Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien in einem Produktionsfermenter bei einer Temperatur von unter 35 °C für eine Zeitdauer umfasst.
30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei der gesamte Zeitraum der Fermentation etwa 72 Stunden beträgt.
31. Verfahren nach Anspruch 29, wobei der gesamte Zeitraum der Fermentation etwa 160 Stunden beträgt.
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 31, wobei die Zeitdauer etwa 5 Stunden beträgt.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 31, wobei die Zeitdauer die gesamte Fermentation ist.
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 33, wobei die Temperatur etwa 15 °C beträgt.
35. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 33, wobei die Temperatur etwa 20 °C beträgt.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 33, wobei die Temperatur etwa 25 °C beträgt.
37. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, das in der folgenden Reihenfolge umfasst:
 - (a) Inkubieren der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien in dem Produktionsfermenter bei 35 °C für etwa 12 Stunden;
 - (b) Einstellen der Temperatur auf 15 °C am Ende von Schritt (a);
 - (c) Kultivieren bei 15 °C bis etwa 5 Stunden nach Schritt (a);
 - (d) Einstellen der Temperatur auf 35 °C am Ende von Schritt (c); und
 - (e) Kultivieren bei 35 °C bis etwa 55 Stunden nach Schritt (c).
38. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, das in der folgenden Reihenfolge umfasst:
 - (a) Inkubieren der Kultur von Clostridium botulinum-Bakterien in dem Produktionsfermenter bei 35 °C für etwa 12 Stunden;
 - (b) Einstellen der Temperatur auf 20 °C am Ende von Schritt (a);
 - (c) Kultivieren bei 20 °C bis etwa 5 Stunden nach Schritt (a);
 - (d) Einstellen der Temperatur auf 35 °C am Ende von Schritt (c); und
 - (e) Kultivieren bei 35 °C bis etwa 55 Stunden nach Schritt (c).
39. Verfahren nach Anspruch 29 oder 31, das die Inkubation der Kultur von Clostridium botulinum Bakterien im Produktionsfermenter bei 25 °C für etwa 160 Stunden umfasst.
40. Verfahren zur Behandlung eines betroffenen Patienten, umfassend das Verabreichen einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 28.
41. Verfahren, im Wesentlichen wie hierin beschrieben.
42. Zusammensetzung, im Wesentlichen wie hierin beschrieben.

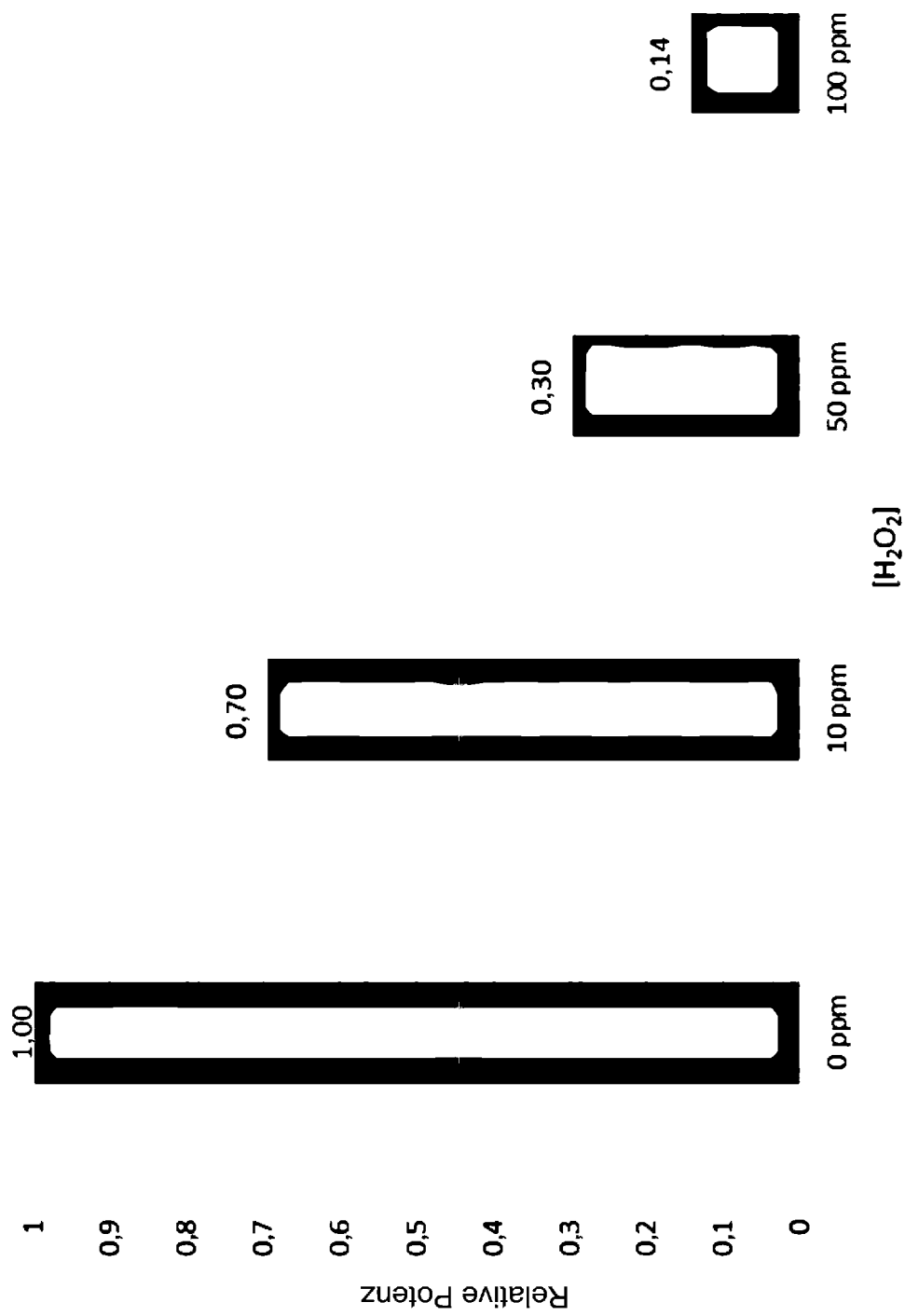


FIG. 1

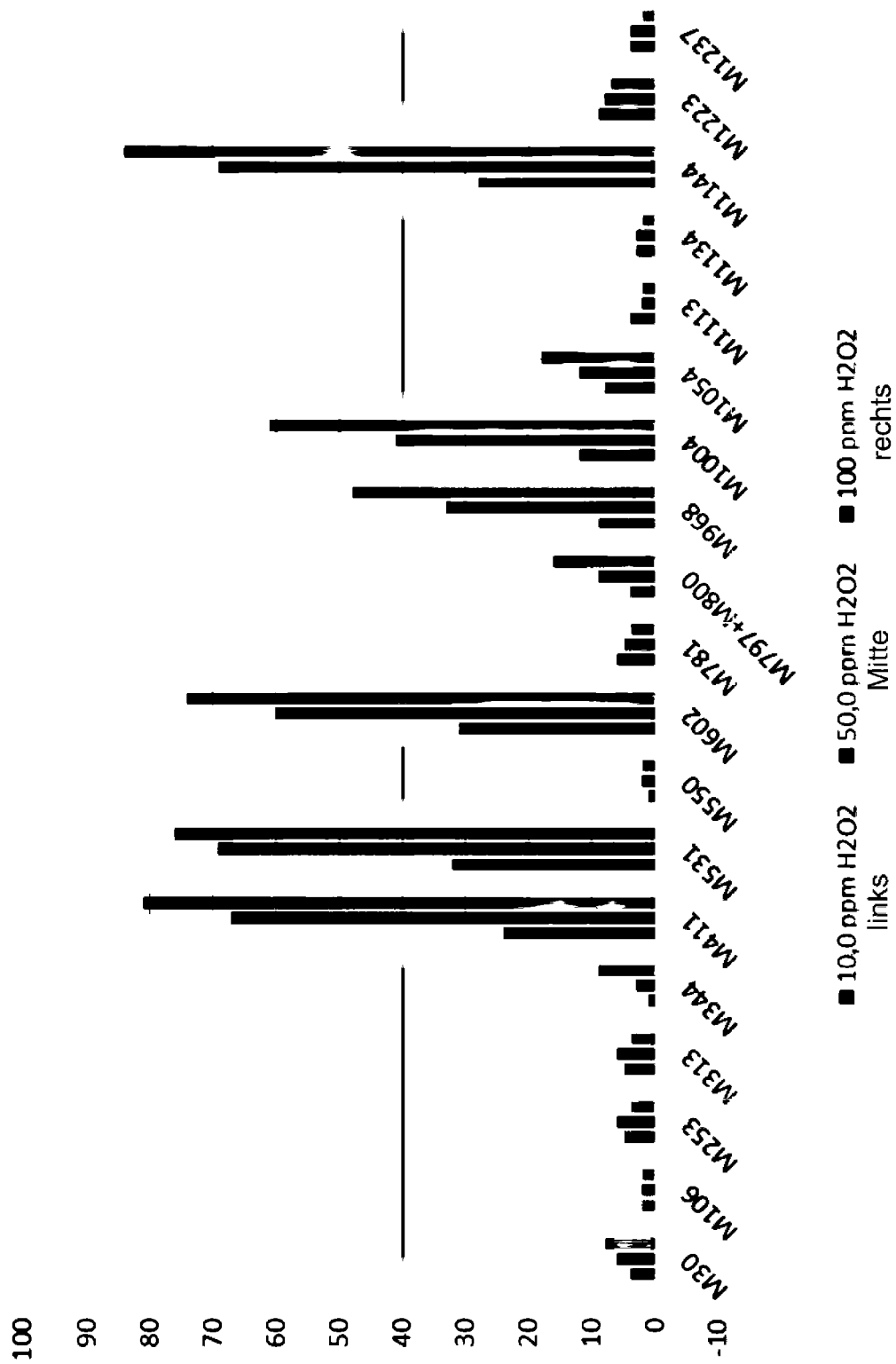
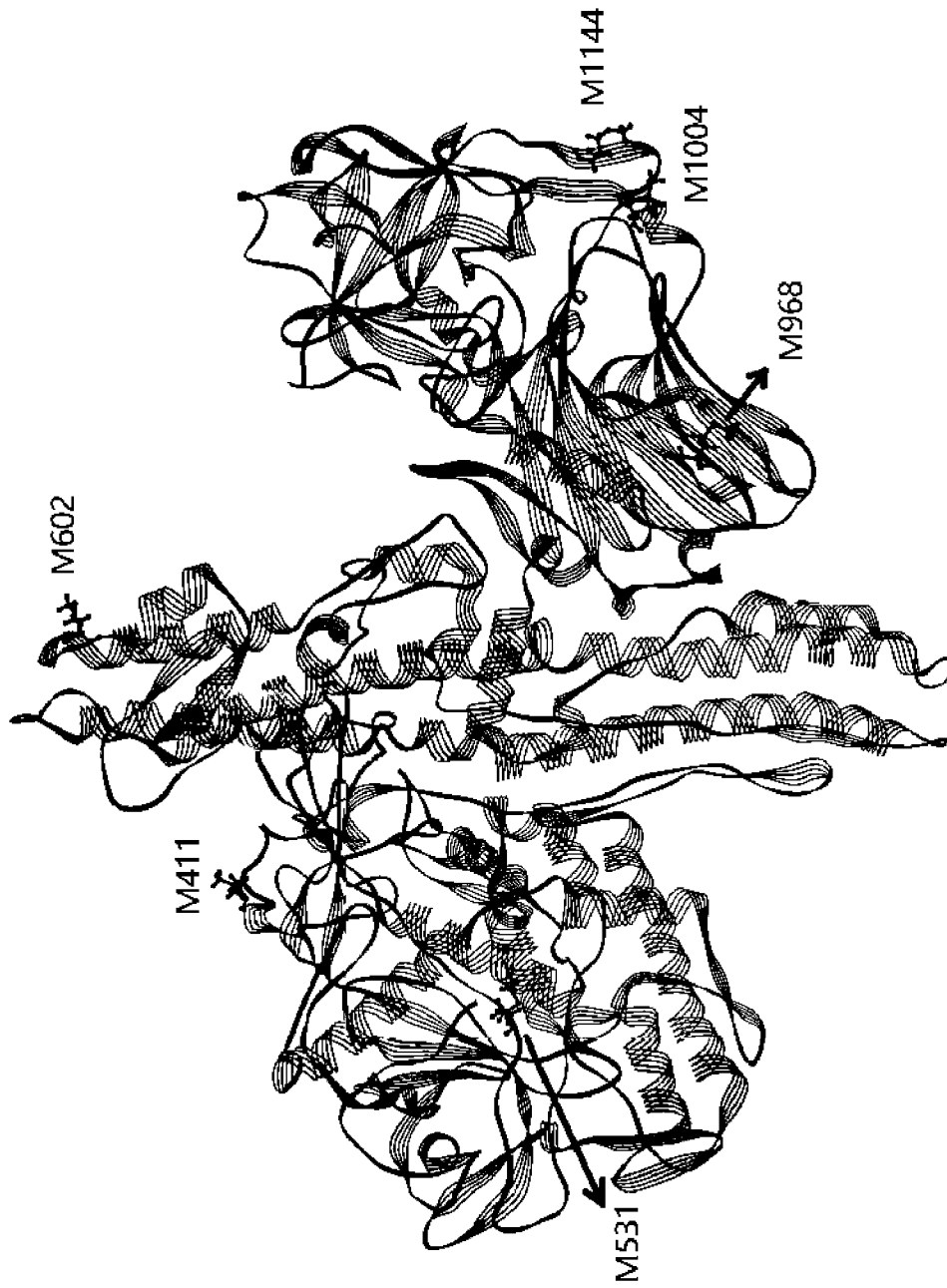


FIG. 2



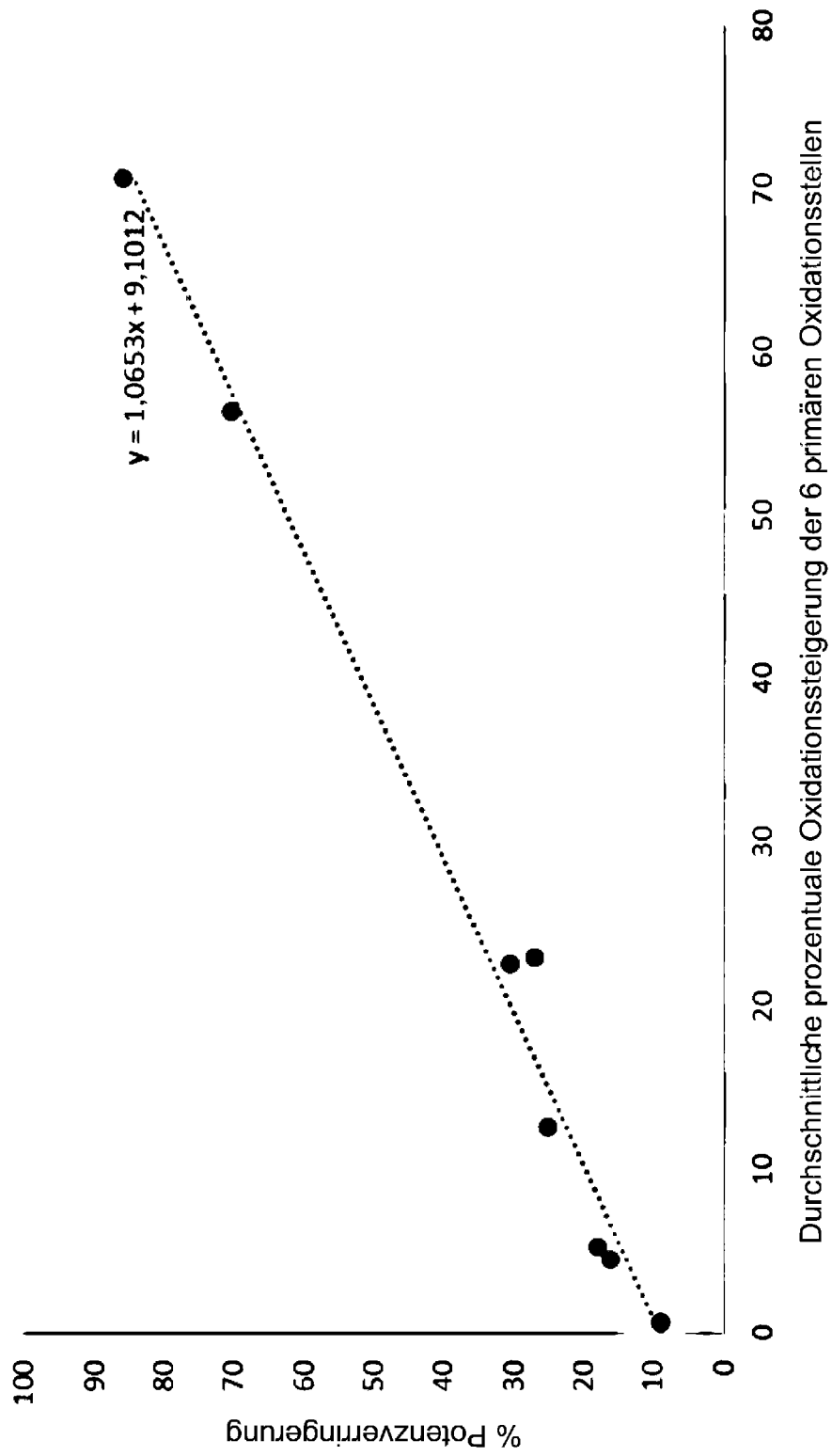


FIG. 4