



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I854077 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：109145119

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 12 月 18 日

(51)Int. Cl. : C12P21/02 (2006.01)

C12N1/20 (2006.01)

C12R1/145 (2006.01)

(30)優先權：2019/12/20 美國

62/951,549

(71)申請人：瑞士商葛德瑪控股公司(瑞士) GALDERMA HOLDING SA (CH)

瑞士

(72)發明人：斯塔爾 歐夫 STAHL, ULF (SE)；法蘭克 彼得 FRANK, PETER (SE)；賈斯塔

安德斯 JARSTAD, ANDERS (SE)；皮凱特 安德魯 PICKETT, ANDREW (GB)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 202035679A

TW 202102681A

US 2011/0008843A1

WO 2005/035749A2

WO 2016/175565A1

WO 2018/200991A1

審查人員：蔡榮哲

申請專利範圍項數：24 項 圖式數：7 共 36 頁

(54)名稱

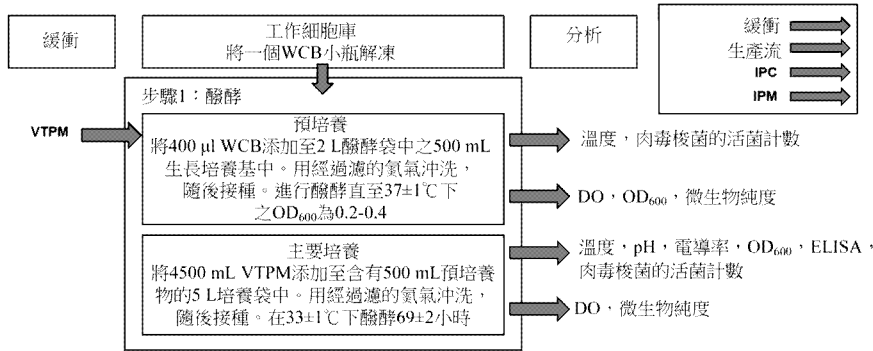
生產肉毒桿菌毒素的方法

(57)摘要

本發明大體上係關於生產肉毒桿菌毒素的領域。更特定言之，本發明係關於一種在不含或基本上不含動物產物之培養基中生產肉毒桿菌毒素的方法。本發明亦關於用於生產肉毒桿菌毒素、不含或基本上不含動物產物的培養基。

The present disclosure relates generally to the field of producing botulinum toxin. More specifically, the present disclosure relates to a method for producing botulinum toxin in a culture medium free or substantially free of animal product. The present disclosure also relates to the culture medium for producing botulinum toxin that is free or substantially free of animal product.

指定代表圖：



【圖1】



I854077

【發明摘要】

公告本

【中文發明名稱】

生產肉毒桿菌毒素的方法

【英文發明名稱】

METHOD OF PRODUCING BOTULINUM TOXIN

【中文】

本發明大體上係關於生產肉毒桿菌毒素的領域。更特定言之，本發明係關於一種在不含或基本上不含動物產物之培養基中生產肉毒桿菌毒素的方法。本發明亦關於用於生產肉毒桿菌毒素、不含或基本上不含動物產物的培養基。

【英文】

The present disclosure relates generally to the field of producing botulinum toxin. More specifically, the present disclosure relates to a method for producing botulinum toxin in a culture medium free or substantially free of animal product. The present disclosure also relates to the culture medium for producing botulinum toxin that is free or substantially free of animal product.

【指定代表圖】

圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

生產肉毒桿菌毒素的方法

【英文發明名稱】

METHOD OF PRODUCING BOTULINUM TOXIN

【技術領域】

【0001】 本發明大體上係關於生產肉毒桿菌毒素的領域。更特定言之，本發明係關於一種在不含或基本上不含動物產物之培養基中生產肉毒桿菌毒素的方法。本發明亦關於用於生產肉毒桿菌毒素、不含或基本上不含動物產物的培養基。

【先前技術】

【0002】 以下對本發明技術背景的描述僅為了有助於瞭解本發明技術而提供，並且並非承認是描述或構成本發明技術的先前技術。

【0003】 免疫學上大體有七種不同的肉毒桿菌神經毒素已被表徵：肉毒桿菌神經毒素血清型 A、B、C、D、E、F 及 G，其各自藉由類型特異性抗體中和加以區分。作為一個實例，BOTOX®為可購自 Irvine, California 之 Allergan, Inc. 之 A 型肉毒桿菌毒素經純化之神經毒素複合物的商標。Botox 為一種流行的基於注射之化妝處理品，其暫時減少細線及皺紋的出現。一個單位 (U) 的肉毒桿菌毒素係以腹膜內注射至體重各為 18-20 克的瑞士韋伯斯特雌性小鼠(female Swiss Webster mice)之後的 LD₅₀ 定義。換言之，一個單位的肉毒桿菌毒素為肉毒桿菌毒素殺死一組瑞士韋伯斯特雌性小鼠 50%的量。免疫學上大體有七種不同的肉毒桿菌神經毒素已被表徵：此等神經毒素分別為肉毒桿菌神經毒素血清型 A、B、C、D、E、F 及 G，其各自藉由類型特異性抗體中和加以區分。不同血清型

的肉毒桿菌毒素就其所影響的動物物種而言及就其所引起的麻痹嚴重程度及持續時間而言不同。舉例而言，已測定 A 型肉毒桿菌毒素比 B 型肉毒桿菌毒素強 500 倍，如根據在大鼠中產生麻痹的速率所量測。另外，已測定 B 型肉毒桿菌毒素對靈長類動物無毒性的劑量為 480 U/kg，是 A 型肉毒桿菌毒素在靈長類動物中之 LD₅₀ 的約 12 倍。已知肉毒桿菌毒素亦可用於治療多種病症。實例包括 1998 年 2 月 3 日頒予的美國專利第 5,714,468 號(偏頭痛)；2005 年 1 月 18 日提申的已公開美國專利申請案第 2005019132 號(頭痛)，序號 11/039,506；2004 年 2 月 26 日提申的已公開美國專利申請案第 20050191320 號(藥品過度使用型頭痛)，序號 10/789,180；及 2010 年 10 月 12 日頒予的美國專利第 7,811,587 號(神經精神病學病症)；所有此等文獻以引用的方式完整併入本文。

【0004】 肉毒桿菌毒素習知地經由使用一或多種動物來源之產物(諸如肉汁培養基，及血液分離部分或血液衍生賦形劑)的培養及醱酵製程獲得。將醫藥組合物(其中活性成分生物製劑係經由利用動物來源之產物的方法獲得)投與患者會使患者面臨接受多種病原體或感染性媒介物之潛在風險。舉例而言，醫藥組合物中可能存在朊病毒。朊病毒是一種感染性蛋白質顆粒，已假設其由製造正常蛋白質之相同核酸序列、作為異常的構形同功異型物產生。已進一步假設感染性存在於正常同功異型物蛋白質對朊病毒蛋白質同功異型物的處於轉譯後水準之「募集反應」。顯然，正常的內源細胞蛋白質經誘導而誤摺疊成病原性朊病毒構形。

【0005】 需要開發一種使用培養基生產肉毒桿菌毒素的方法，該培養基不含或基本上不含動物來源之產物，從而將與來自動物的非所需污染物有關的風險及問題降至最低。

【發明內容】

【0006】 本文提供用於生產肉毒桿菌毒素的方法，包含步驟：(a)提供包含肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)細菌的工作細胞庫(WCB)；(b)將工作細胞庫添加至含有植物毒素生產培養基(VTPM)的第一容器中且在 VTPM 中、在容許肉毒梭菌生長的條件下培養肉毒梭菌細菌以產生預培養物；(c)將預培養物添加至含有 VTPM 的第二容器中且在允許肉毒桿菌毒素產生的條件下培養肉毒梭菌細菌；以及(d)回收肉毒桿菌毒素；其中該 VTPM 基本上不含或不含動物來源的產物且包含植物來源之蛋白質。

【0007】 在一些實施例中，肉毒桿菌毒素為肉毒桿菌神經毒素 A 型(BoNT/A)。

【0008】 在一些實施例中，步驟(b)及(c)中所用的容器為醱酵袋。

【0009】 在一些實施例中，步驟(b)及(c)中的條件包含厭氧環境。在一些實施例中，厭氧環境具有<2%的溶氧(DO)濃度。在一些實施例中，厭氧環境具有<1%的溶氧(DO)濃度。在一些實施例中，厭氧環境具有<0.5%的溶氧(DO)濃度。

【0010】 在一些實施例中，步驟(b)中的條件包含約 35°C 與約 39°C 之間的溫度，或約 36°C 與約 38°C 之間的溫度(或其間的範圍)。在一些實施例中，步驟(b)中的條件包含約 35.0°C、約 35.5°C、約 36.0°C、約 36.5°C、約 37.0°C、約 37.5°C、約 38.0°C、約 38.5°C 或約 39.0°C 的溫度。在一些實施例中，步驟(b)中的條件包含約 37±1°C 的溫度。在一些實施例中，步驟(b)中的條件包含約 37±0.5°C 的溫度。在一些實施例中，步驟(b)中的條件包含約 37±0.2°C 的溫度。

【0011】 在一些實施例中，步驟(c)中的條件包含約 30°C 與約 37°C 之間、約 31°C 與約 36°C 之間、約 32°C 與約 35°C 之間或約 32°C 與約 34°C 之間的溫度(或其間的範圍)。在一些實施例中，步驟(c)中的條件包含約 33±1°C 的溫度。在一些實施例中，步驟(c)中的條件包含約 33±0.5°C 的溫度。在一些實施例中，步驟(c)中

的條件包含約 $33\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 的溫度。

【0012】 在一些實施例中，步驟(b)中之 WCB 相對於 VTPM 的體積比不大於約 2.0%、不大於約 1.9%、不大於約 1.8%、不大於約 1.7%、不大於約 1.6%、不大於約 1.5%、不大於約 1.4%、不大於約 1.3%、不大於約 1.2%、不大於約 1.1%、不大於約 1.0%、不大於約 0.9%、不大於約 0.8%、不大於約 0.7%、不大於約 0.6%、不大於約 0.5%、不大於約 0.4%、不大於約 0.3%、不大於約 0.2%、不大於約 0.1%、不大於約 0.09%、不大於約 0.08%、不大於約 0.07%、不大於約 0.06%、不大於約 0.05%、不大於約 0.04%、不大於約 0.03%、不大於約 0.02%，或不大於約 0.01% (或其間的範圍)。

【0013】 在一些實施例中，步驟(b)中之 WCB 相對於 VTPM 的體積比為約 0.01%、約 0.02%、約 0.03%、約 0.04%、約 0.05%、約 0.06%、約 0.07%、約 0.08%、約 0.09%、約 0.10%、約 0.15%、約 0.20%、約 0.25%、約 0.30%、約 0.35%、約 0.40%、約 0.45%、約 0.50%、約 0.55%、約 0.60%、約 0.65%、約 0.70%、約 0.75%、約 0.80%、約 0.85%、約 0.90%、約 0.95%、約 1.0%、約 1.1%、約 1.2%、約 1.3%、約 1.4%、約 1.5%、約 1.6%、約 1.7%、約 1.8%、約 1.9% 或約 2.0%。

【0014】 在一些實施例中，步驟(c)中之預培養物相對於 VTPM 的體積比係在約 1:2 與約 1:50 之間、約 1:3 與約 1:45 之間、約 1:4 與約 1:40 之間、約 1:5 與約 1:35 之間、約 1:6 與約 1:30 之間、約 1:7 與約 1:25 之間、約 1:8 與約 1:20 之間，或約 1:8 與約 1:10 之間(或其間的範圍)。在一些實施例中，步驟(c)中之預培養物相對於 VTPM 的體積比為約 1:2、約 1:3、約 1:4、約 1:5、約 1:6、約 1:7、約 1:8、約 1:9、約 1:10、約 1:15、約 1:20、約 1:25、約 1:30、約 1:35、約 1:40、約 1:45，或約 1:50。

【0015】 在一些實施例中，執行步驟(b)直至 OD₆₀₀ 達到約 0.1 至約 1.0、約 0.1 至約 0.05 或約 0.2 至約 0.4 之範圍。在一些實施例中，執行步驟(b)直至 OD₆₀₀ 達到約 0.1、約 0.2、約 0.3、約 0.4、約 0.5、約 0.6、約 0.7、約 0.8、約 0.9 或約 1.0。

【0016】 在一些實施例中，步驟(b)執行約 10 至約 30 小時、約 15 至約 25 小時，或約 17 至約 21 小時(其間的範圍)。在一些實施例中，步驟(b)執行約 10 小時、約 11 小時、約 12 小時、約 13 小時、約 14 小時、約 15 小時、約 16 小時、約 17 小時、約 18 小時、約 19 小時、約 20 小時、約 21 小時、約 22 小時、約 23 小時、約 24 小時、約 25 小時、約 26 小時、約 27 小時、約 28 小時、約 29 小時或約 30 小時。在一些實施例中，步驟(b)執行約 19±2 小時。在一些實施例中，步驟(b)執行約 19±1 小時。在一些實施例中，步驟(b)執行約 19±0.5 小時。在一些實施例中，步驟(b)執行約 19±0.2 小時。在一些實施例中，步驟(b)執行約 19 小時。

【0017】 在一些實施例中，步驟(c)執行約 60 小時至約 80 小時、約 65 小時至約 75 小時，或約 67 小時至約 71 小時(其間的範圍)。在一些實施例中，醱酵製程持續進行約 60 小時、約 65 小時、約 66 小時、約 67 小時、約 68 小時、約 69 小時、約 70 小時、約 71 小時、約 72 小時、約 73 小時、約 74 小時、約 75 小時、約 76 小時、約 77 小時、約 78 小時、約 79 小時或約 80 小時。在一些實施例中，醱酵製程持續進行約 69±2 小時、約 69±1 小時、約 69±0.5 小時或約 69±0.2 小時。在一個實施例中，步驟(c)執行約 69 小時。

【0018】 在一些實施例中，在步驟(b)之後且在步驟(c)之前，測試預培養物中之除肉毒梭菌之外之其它微生物的微生物純度。

【0019】 在一些實施例中，在步驟(c)之後且在步驟(d)之前，測試培養基中

之除肉毒梭菌之外之其它微生物的微生物純度。

【0020】 在一些實施例中，植物來源之蛋白質為小麥蛋白朊。在一些實施例中，VTPM 中之小麥蛋白朊濃度在約 10 公克/公升與約 30 公克/公升之間，例如約 20 公克/公升。在一些實施例中，VTPM 中之小麥蛋白朊濃度為約 20 公克/公升。在一些實施例中，VTPM 包含小麥蛋白朊、酵母萃、D-(+)-葡萄糖、L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物、醫用消泡劑 C 乳液。

【0021】 在一些實施例中，VTPM 包含小麥蛋白朊、酵母萃、D-(+)-葡萄糖、L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物、醫用消泡劑 C 乳液、蒸餾水、NaOH 及 HCl。在一個特定實施例中，VTPM 包含約 20 公克/公升的小麥蛋白朊、約 20 公克/公升的酵母萃、約 5 公克/公升的 D-(+)-葡萄糖；約 0.20 公克/公升的 L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物及約 0.24 公克/公升的醫用消泡劑 c 乳液。在一個特定實施例中，VTPM 之 pH 在約 6.7 與約 7.2 之間。

【0022】 在另一態樣中，本文提供包含肉毒梭菌及培養基以便生產肉毒桿菌毒素的組合物，其中該培養基不含或基本上不含動物來源之產物，且包含一或多種植物來源之蛋白質。在一些實施例中，一或多種植物來源之蛋白質為小麥蛋白朊、蠶豆蛋白朊、馬鈴薯蛋白朊、豌豆蛋白朊、稻米蛋白朊或大豆蛋白朊，或其組合。在一些實施例中，植物來源之蛋白質為小麥蛋白朊。

【0023】 在一些實施例中，VTPM 中之小麥蛋白朊濃度為約 20 公克/公升。在一些實施例中，VTPM 包含小麥蛋白朊、酵母萃、D-(+)-葡萄糖、L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物、醫用消泡劑 C 乳液。

【0024】 在一些實施例中，VTPM 包含小麥蛋白朊、酵母萃、D-(+)-葡萄糖、L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物、醫用消泡劑 C 乳液、蒸餾水、NaOH 及 HCl。在一個特定實施例中，VTPM 包含約 20 公克/公升的小麥蛋白朊、約 20 公克/公升的

酵母萃、約 5 公克/公升的 D-(+)-葡萄糖；約 0.20 公克/公升的 L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物及約 0.24 公克/公升的醫用消泡劑 c 乳液。

【圖式簡單說明】

【0025】圖 1 說明醱酵製程。將 400 μ l 工作細胞庫(WCB)添加至 2 L 醱酵袋中的 500 mL 生長培養基中。接種之前，用經過濾的氮氣沖洗袋。執行醱酵直至 $37\pm^{\circ}\text{C}$ 下的 OD_{600} 達到 0.2-0.4。接著，將 4500 mL 植物毒素生產培養基(VTPM)添加至含有 500 mL 預培養物的 5 L 培育袋中。接種之前，用經過濾的氮氣沖洗袋。在 $33\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下執行醱酵 69 ± 2 小時。

【0026】圖 2 顯示主要培養物之 600 nm 光學密度之曲線。該曲線係基於自幾次醱酵所抽取且分析(如下文實例 2 所述執行)的樣品。

【0027】圖 3 顯示主要培養物之 pH 曲線。該曲線係基於自幾次醱酵所抽取且分析(根據下文實例 2 執行)的樣品。

【0028】圖 4 顯示根據實例 2 對主要培養物中之 BoNT/A 重鏈變異體執行的西方墨點分析。在醱酵中的不同時間點抽取樣品且連同參考樣品一起跑電泳，其僅顯示譜帶 2 或顯示譜帶 1 與譜帶 2。

【0029】圖 5 顯示了表格，其中摺圖來自對不同溫度下進行主要培養之收集物樣品中之 BoNT/A 重鏈變異體的西方墨點分析。該表格亦提供相同樣品之 BoNT/A 濃度，如藉由 ELISA 所測定。

【0030】圖 6 顯示第 69 小時收集基於小麥蛋白朊之 VTPM 或基於大豆蛋白朊之 VTPM 中所生長之主要培養物而獲得的毒素含量。

【0031】圖 7 顯示第 69 小時收集基於馬鈴薯、蠶豆或小麥蛋白朊之 VTPM 中所生長之主要培養物而獲得的毒素濃度。

【實施方式】

相關申請案的交叉參照

【0032】本申請案依據 35 U.S.C. § 119(e)主張 2019 年 12 月 20 日提申之美國臨時申請案第 62/951,549 號的優先權，該臨時申請案以全文引用之方式併入本文中。

【0033】根據本發明之實施例將在下文中更充分地描述。然而，本發明之態樣可以不同形式實施，且不應視為限制於本文中所闡述之實施例。實情為，提供此等實施例係為了本發明透徹且全面且將把本發明之範圍完整地傳達給熟習此項技術者。應理解，本發明技術不限於特定方法、試劑、化合物組合物或生物系統，其當然可改變。本說明書中使用的術語僅用於描述特定實施例之目的，而不希望具有限制性。

【0034】除非另外定義，否則本文所用之所有術語(包括技術及科學術語)具有與本發明所屬領域中具通常知識者通常所理解相同的含義。應進一步理解，術語(諸如常用詞典中所定義的彼等術語)應依照與其在本申請案之上下文及相關技術中的含義一致的含義解釋，且除非本文中明確地如此定義，否則不應以理想化或過分正式意義來解釋。此類術語即使在下文中未明確定義，亦應根據其常用含義來解釋。

【0035】另外，在根據馬庫西群組(Markush groups)描述本發明之特徵或態樣時，熟習此項技術者應認識到，本發明由此亦根據馬庫西群組之任何個別成員或成員子群加以描述。

【0036】如熟習此項技術者將理解，出於任何及所有目的，尤其就提供書面說明而言，本文中所揭示之所有範圍亦涵蓋其任何及所有可能的子範圍及子範圍組合。任何所列範圍皆可輕鬆地視為充分描述且使相同範圍能夠分解為至少相等的兩半、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等。作為一個非限制

性實例，本文所討論的每個範圍皆可輕鬆地分解為下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如所屬領域的技術人員亦理解，諸如「至多」、「至少」、「大於」、「小於」等所有措辭皆包括所述值並且指隨後可分解為子範圍的範圍，如上文所論述。最後，如熟習此項技術者將理解，範圍包括每個個別成員。因此，舉例而言，具有 1-3 個細胞之群組係指具有 1 個、2 個或 3 個細胞之群組。類似地，具有 1-5 個細胞之群組係指具有 1 個、2 個、3 個、4 個或 5 個細胞之群組，諸如此類。

【0037】 除非上下文另外指示，否則具體意指本文所述技術之不同特徵可以任何組合使用。此外，本發明亦考慮了在一些實施例中，可排除或省去本文所闡述之任何特徵或特徵組合。為了說明，若說明書敘述複合物包含組分 A、B 及 C，則具體意指 A、B 或 C 中之任一者或其組合可以省去且不單個地或不以任何組合主張權利。

【0038】 除非另外明確指示，否則所有指定實施例、特徵及術語意欲包括所述實施例、特徵或術語及其生物學等效物。

【0039】 本文提及或引用之全部專利、專利申請案、臨時申請案及公開案，包括所有圖及表格，皆以全文引用之方式併入，引用的程度使其與本說明書之明確教示內容沒有不一致。

【0040】 定義

【0041】 如本文所用，除非明確陳述僅表示單數，否則單數形式「一(a/an)」及「該(the)」表示單數與複數。

【0042】 應理解，儘管未必總是明確陳述，但所有數值標示前存在術語「約」或「大約」。術語「約」或「大約」意指所涵蓋的數字不限於本文所闡述之確切數字，且意指基本上在所述數字附近而不背離本發明範圍之數字。如本文所用，

「約」或「大約」將被一般熟習此項技術者理解且在一定程度上將根據使用其之上下文而變化。若使用一般熟習此項技術者不清楚之術語(在使用其之上下文給定的情況下)，則「約」或「大約」將意謂所述項及該特定項之直至正或負 15%、10%、5%、1%或 0.1% (例如「約 10」應理解為 10 及 8.5-11.5 之範圍)。

【0043】 亦如本文所用，「及/或」係指且涵蓋相關所列項中之任一項及一或多項的所有可能組合，以及組合的缺乏(以替代項(「或」)解釋時)。

【0044】 如本文所用，「不含動物產物」、「實質上不含動物產物」或「基本上不含動物產物」分別涵蓋「不含動物蛋白質」、「實質上不含動物蛋白質」或「基本上不含動物蛋白質」且意謂血液來源、血液混合及其它動物來源之產物或化合物的缺乏、實質性缺乏或基本上缺乏。「動物」意謂哺乳動物(諸如人類)、鳥、爬行動物、魚、昆蟲、蛛狀或其他動物物種。「動物」不包括微生物，諸如細菌。因此，屬於本發明範圍內之不含動物產物的培養基或方法或基本上不含動物產物的培養基或方法可以包括肉毒桿菌毒素或肉毒梭菌細菌。舉例而言，不含動物產物的方法或基本上不含動物產物的方法意謂基本上不含或實質上不含或完全不含動物來源之蛋白質(諸如免疫球蛋白)、肉消化物、肉副產品及牛乳或乳製品或消化物的方法。因此，不含動物產物之方法的一個實例為不包括肉及乳製品或肉或乳副產品的方法(諸如細菌培養或細菌醱酵方法)。

【0045】 如本文所用，「肉毒桿菌毒素」意謂由肉毒梭菌產生的神經毒素，以及由非梭菌物種重組產生的肉毒桿菌毒素(或其輕鏈或重鏈)。如本文所用，片語「肉毒桿菌毒素」涵蓋肉毒桿菌毒素血清型 A、B、C、D、E、F 及 G。如本文所用，肉毒桿菌毒素亦涵蓋肉毒桿菌毒素複合物(亦即 300,600 及 900 kDa 複合物)以及經純化之肉毒桿菌毒素(亦即，約 150 kDa)。「經純化之肉毒桿菌毒素」定義為與其他蛋白質(包括形成肉毒桿菌毒素複合物的蛋白質)分離或基本上分

離的肉毒桿菌毒素。經純化之肉毒桿菌毒素的純度可大於 95%，純度較佳大於 99%。本發明之範圍內排除不是神經毒素的肉毒桿菌 C₂ 及 C₃ 細胞毒素。如本文所用，「肉毒桿菌毒素」亦涵蓋「經修飾的肉毒桿菌毒素」。

【0046】「經修飾的肉毒桿菌毒素」意謂其至少一個胺基酸相較於原生肉毒桿菌毒素已缺失、修飾或置換的肉毒桿菌毒素。另外，經修飾的肉毒桿菌毒素可以是重組產生的神經毒素，或重組製成之神經毒素的衍生物或片段。經修飾的肉毒桿菌毒素保持原生肉毒桿菌毒素之至少一種生物活性，諸如能夠結合至肉毒桿菌毒素受體或能夠抑制神經元釋放神經傳遞素。經修飾之肉毒桿菌毒素的一個實例是具有來自一種肉毒桿菌毒素血清型(諸如血清型 A)之輕鏈及來自不同肉毒桿菌毒素血清型(諸如血清型 B)之重鏈的肉毒桿菌毒素。經修飾之肉毒桿菌毒素的另一實例是與神經傳遞素(諸如 P 物質)偶合的肉毒桿菌毒素。

【0047】如本文所用，「培養基」或「醱酵培養基」意謂用於培養細菌的任何培養基，其培養是為了產生種子培養物以用於接種生產培養基，或細菌在其中生長且產生其毒素的生產培養基。根據本發明之醱酵培養基的一個實例是植物毒素生產培養基(VTPM)。

【0048】如本文所用，「梭菌神經毒素」意謂由梭菌細菌(諸如肉毒梭菌、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)或貝氏梭菌(*Clostridium beratti*))產生或原生的神經毒素，以及由非梭菌物種重組製成的梭菌神經毒素。由肉毒梭菌、破傷風梭菌、貝氏梭菌及丁酸梭菌產生的梭菌屬毒素在人類及其他哺乳動物之治療及化妝處理方面的使用最廣泛。肉毒梭菌菌株產生抗原性不同的七種類型之肉毒桿菌毒素(BoNT)，有的已藉由研究人類(BoNT/A、7B、FE 及 BoNT/F)、動物(BoNT/C 及 BoNT/D)中爆發之肉毒中毒而得到鑑定，有的已自土壤中分離出來(BoNT/G)。BoNT 彼此間具有大約 35%胺基酸一致性且共享相同的功能域組構及總體結構

架構。熟習此項技術者認識到，在每種類型的梭菌毒素內，可存在其胺基酸序列以及編碼此等蛋白質之核酸稍微不同的亞型。舉例而言，當前存在五種 BoNT/A 亞型：BoNT/A1、BoNT/A2、BoNT/A3、BoNT/A4 及 BoNT/A5，特定亞型相較於另一種 BoNT/A 亞型顯示大約 89%胺基酸一致性。雖然所有七種 BoNT 血清型具有相似的結構及藥理學特性，但每一種亦呈現異源細菌特徵。相比之下，均一的一組破傷風梭菌產生破傷風毒素(TeNT)。梭菌屬的其他兩個物種(貝氏梭菌及丁酸梭菌)亦分別產生毒素 BaNT 及 BuNT，其分別類似於 BoNT/F 及 BoNT/E。

【0049】 梭菌毒素以複合物形式被梭菌細菌釋放，該等複合物包含大約 150 kDa 梭菌毒素以及相連的非毒素蛋白質(NAP)。經鑑定的 NAP 包括具有血球凝集活性的蛋白質，諸如大約 17 kDa 的血球凝集素(HA-17)、大約 33 kDa 的血球凝集素(HA-33)及大約 70 kDa 的血球凝集素(HA-70)；以及無毒的非血球凝集素(NTNH)，大約 130 kDa 的蛋白質，參見例如 Eric A. Johnson 及 Marite Bradshaw, *Clostridial botulinum and its Neurotoxins: A Metabolic and Cellular Perspective*, 39 *Toxicon* 1703-1722 (2001)；及 Stephanie Raffestin 等人, *Organization and Regulation of the Neurotoxin Genes in Clostridium botulinum and Clostridium tetani*, 10 *Anaerobe* 93-100 (2004)。因此，肉毒桿菌毒素 A 型複合物可以 900 kDa、500 kDa 及 300 kDa 形式由梭菌細菌產生。肉毒桿菌毒素 B 型及 C 型明顯僅以 500 kDa 複合物產生。肉毒桿菌毒素 D 型係以 300 kDa 複合物與 500 kDa 複合物產生。最後，肉毒桿菌毒素 E 型及 F 型僅以大約 300 kDa 複合物產生。該等複合物的分子量差異係因 NAP 的比率不同而引起。毒素複合物對於中毒過程而言具有重要作用，原因在於其避免了有害的環境條件、抵抗蛋白酶消化且似乎促進毒素的內化及活化。

【0050】 梭菌毒素各自轉譯為單鏈多肽，隨後在二硫環內藉由天然存在之

蛋白酶的蛋白水解切割作用裂解。此裂解發生於不連續的雙鏈環區域內，該環區域在形成二硫橋鍵之兩個半胱胺酸殘基之間建立。此轉譯後加工產生了包含大約 50 kDa 輕鏈(LC)及大約 100 kDa 重鏈(HC)的雙鏈分子，該輕鏈與重鏈藉由介於兩條鏈之間的單一的二硫鍵及非共價相互作用結合在一起。用於將單鏈分子轉變為雙鏈的天然存在的蛋白酶當前未知。在一些血清型(諸如 BoNT/A)中，天然存在的蛋白酶係由細菌血清型內源地產生，並且在毒素釋放至環境之前，在細胞內發生裂解。然而，在其他血清型(諸如 BoNT/E)中，細菌菌株似乎不產生能夠將毒素的單鏈形式轉變成雙鏈形式的內源蛋白酶。在此等情形中，細胞釋放出呈單鏈毒素形式的毒素，該毒素隨後被存在於環境中的天然存在的蛋白酶轉變成雙鏈形式。

【0051】 如本文所用，「不含」或「完全不含」意指在正使用的儀器或方法的偵測範圍內，偵測不到該物質，或無法確認其存在。

【0052】 如本文所用，「實質上不含」意指僅能偵測到痕量的物質。在本發明中，「實質上不含」意指該物質在整個組合物中的含量小於 0.1 重量%，較佳小於 0.01 重量%，且最佳小於 0.001 重量%。

【0053】 如本文所用，「基本上不含」意指該物質在整個組合物中的含量小於 5 重量%，較佳小於 2 重量%，且最佳小於 1 重量%。

【0054】 如本文所用，「培養基」或「醱酵培養基」意謂用於培養細菌的任何培養基，其培養是為了產生種子培養物以用於接種生產培養基，或細菌在其中生長且產生其毒素的生產培養基。

【0055】 如本文所用，「工作細胞庫」或「WCB」意謂來源於單一主細胞庫(MCB)的實質上同源細胞群。WCB 在治療劑開發及製造期間通常是必需的。WCB 係由已生長若干繼代且低溫保存之 MCB 在單個小瓶中產生。換言之，WCB

細胞自 MCB 擴增而得。實際上，當細胞系欲在多個製造循環期間使用時，廣泛推薦由主細胞庫(MCB)及工作細胞庫(WCB)組成的兩層細胞庫系統。

【0056】如本文所用，「植物毒素生產培養基」或「VTPM」意謂含有來源於一或多種植物(例如小麥、大豆、蠶豆、馬鈴薯、豌豆等)之一或多種組分的細胞培養基。來源於一或多種植物的一或多種組分可以包括(但不限於)植物消化物、蛋白腴或萃取物。

【0057】如本文所用，「蛋白腴」意謂藉由酶或酸消化而形成的水解蛋白質材料。

【0058】如本文所用，「植物萃取物」意謂任何植物的水性萃取物，其含有胺基酸及低分子量肽、碳水化合物、維生素及其他生長因子。

【0059】如本文所用，「植物蛋白腴」意謂已藉由使用微生物或植物酶或藉由酸水解而水解的來源於植物之蛋白質材料。用於形成蛋白腴的蛋白質受質可以是來源於植物的任何蛋白質材料，或自例如稻米、小麥或大豆之麵粉分離出的蛋白質濃縮物。術語「酵母蛋白腴」意謂來源於酵母細胞的蛋白質材料，其已藉由自分解或藉由使用微生物或植物酶或藉由酸水解而水解。本發明中的植物蛋白腴係指植物來源之蛋白質的部分消化產物，其呈混合物形式，該混合物不僅包括單分子的胺基酸，而且包括由幾個或幾十個胺基酸組成的肽及完整蛋白質分子。較佳地，本發明中的植物蛋白腴為大豆蛋白腴、小麥蛋白腴、蠶豆蛋白腴、馬鈴薯蛋白腴、豌豆蛋白腴、木瓜蛋白酶消化的大豆蛋白腴或羽扇豆蛋白腴，最佳為豌豆蛋白腴及小麥蛋白腴。

【0060】如本文所用，「OD₆₀₀」意謂在 600 nm 波長下所量測的光學密度。一般技術者將認識到 OD₆₀₀ 量測是估計細胞(包括細菌)在液體中之濃度的常見方法。用於測定 OD₆₀₀ 的方法描述於例如 S.A. Janke 等人, *Microbiological Turbidity*

Using Standard Photometers, 6 BIOSPEKTRUM 501-02 (1999) ; K. Harnack 等人, *Turbidity Measurements (OD₆₀₀) with Absorption Spectrometers*, 6 BIOSPEKTRUM 503-04 (1999)。

【0061】 植物毒素生產培養基(VTPM)

【0062】 植物萃取物可在培養基中用於病原性細菌的生長及其毒素的產生。植物萃取物是植物的水性萃取物，其含有胺基酸及低分子量肽、相對較高濃度的碳水化合物、維生素及其他生長因子。根據本發明，植物來源之蛋白質，諸如來源於植物(包括馬鈴薯、小麥、稻米、小麥與稻米之混合物、棉花或豌豆)的蛋白腴，可以取代動物來源的產物以支持肉毒梭菌細菌的生長。可以用於所揭示之 VTPM 之目的蛋白腴可以包括(但不限於)小麥蛋白腴 CAS # 94350-06-8、小麥蛋白腴 E1、小麥蛋白腴 E260、豌豆蛋白腴 CAS # 100209-45-8、豌豆蛋白腴 A482、豌豆蛋白腴 A2501、馬鈴薯蛋白腴 CAS # 100209-45-8、馬鈴薯蛋白腴 E210、馬鈴薯蛋白腴 L8、馬鈴薯蛋白腴 A2401、稻米蛋白腴 19560、棉花蛋白腴 200、大豆蛋白腴 CAS # 91079-46-8、大豆蛋白腴 A3SC、大豆蛋白腴 A2SC，及其他植物或植物性蛋白腴。

【0063】 在一些實施例中，蛋白腴為小麥蛋白腴。在特定實施例中，小麥蛋白腴在醱酵培養基中的濃度係在 5-50 g/L 之間，較佳在 10-40 g/L 之間，較佳在 15-30 g/L 之間，較佳在 15-25 g/L 之間，且更佳為每公升醱酵培養基約 20 g。在一些實施例中，小麥蛋白腴在醱酵培養基中的濃度為約 5 g/L、約 10 g/L、約 15 g/L、約 20 g/L、約 25 g/L、約 30 g/L、約 35 g/L、約 40 g/L、約 45 g/L 或約 50 g/L。

【0064】 根據本發明，醱酵培養基包含酵母萃取物。酵母萃取物通常藉由原代酵母發生無鹽自分解且隨後進行大規模純化而獲得，從而使得酵母萃取物

不含非所需組分，諸如孢子及 DNA。

【0065】根據本發明，醱酵培養基進一步包含酵母萃取物。在一些實施例中，酵母萃取物在醱酵培養基中的濃度係在 5-50 g/L 之間，較佳在 10-40 g/L 之間，較佳在 15-30 g/L 之間，較佳在 15-25 g/L 之間，且更佳為每公升醱酵培養基約 20 g。在一些實施例中，酵母萃取物在醱酵培養基中的濃度為約 5 g/L、約 10 g/L、約 15 g/L、約 20 g/L、約 25 g/L、約 30 g/L、約 35 g/L、約 40 g/L、約 45 g/L 或約 50 g/L。

【0066】多種碳源已用於使肉毒梭菌生長，包括葡萄糖及甘油。若使用含碳的氮源(肉毒梭菌能使來自胺基酸的碳同化)，則單獨碳源的添加不是絕對必需的，但若存在另一種碳源，則醱酵期間的生長速率高得多。

【0067】根據本發明，醱酵培養基包含 D-(+)-葡萄糖。在一些實施例中，D-(+)-葡萄糖在醱酵培養基中的濃度係在 0.5-20 g/L 之間，較佳在 1.0-10 g/L 之間，較佳在 2.5-7.5 g/L 之間，較佳在 3.5-6.5 g/L 之間，且更佳為每公升醱酵培養基約 5 g。在一些實施例中，D-(+)-葡萄糖在醱酵培養基中的濃度為約 0.5 g/L、約 0.6 g/L、約 0.7 g/L、約 0.8 g/L、約 0.9 g/L、約 1.0 g/L、約 1.5 g/L、約 2.0 g/L、約 2.5 g/L、約 3.0 g/L、約 3.5 g/L、約 4.0 g/L、約 4.5 g/L、約 5.0 g/L、約 5.5 g/L、約 6.0 g/L、約 6.5 g/L、約 7.0 g/L、約 7.5 g/L、約 8.0 g/L、約 8.5 g/L、約 9.0 g/L、約 9.5 g/L、約 10.0 g/L、約 11.0 g/L、約 12.0 g/L、約 13.0 g/L、約 14.0 g/L、約 15.0 g/L、約 16.0 g/L、約 17.0 g/L、約 18.0 g/L、約 19.0 g/L 或約 20.0 g/L。

【0068】根據本發明，醱酵培養基亦包含 L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物。在一些實施例中，L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物在醱酵培養基中的濃度係在 0.05-5 g/L 之間，較佳在 0.1-5 g/L 之間，較佳在 0.1-2.5 g/L 之間，較佳在 0.15-1.5 g/L 之間，且更佳為每公升醱酵培養基約 0.2 g。在一些實施例中，L-半胱胺酸鹽酸

鹽單水合物在醱酵培養基中的濃度為約 0.05 g/L、約 0.06 g/L、約 0.07 g/L、約 0.08 g/L、約 0.09 g/L、約 0.10 g/L、約 0.15 g/L、約 0.20 g/L、約 0.25 g/L、約 0.30 g/L、約 0.35 g/L、約 0.40 g/L、約 0.45 g/L、約 0.50 g/L、約 0.55 g/L、約 0.60 g/L、約 0.70 g/L、約 0.75 g/L、約 0.80 g/L、約 0.85 g/L、約 0.90 g/L、約 0.95 g/L、約 1.0 g/L、約 1.5 g/L、約 2.0 g/L、約 2.5 g/L、約 3.0 g/L、約 3.5 g/L、約 4.0 g/L、約 4.5 g/L 或約 5.0 g/L。

【0069】 根據本發明，醱酵培養基可以包含醫用消泡劑 c 乳液(Dow Corning®)。在一些實施例中，醫用消泡劑 c 乳液在醱酵培養基中的濃度係在約 0.05 g/L 與約 0.50 g/L 之間、在約 0.10 g/L 與約 0.40 g/L 之間、在約 0.20 g/L 與約 0.30 g/L 之間，或在約 0.22 g/L 與約 0.26 g/L 之間(或其間的範圍)。在一些實施例中，醫用消泡劑 c 乳液在醱酵培養基中的濃度為約 0.05 g/L、約 0.10 g/L、約 0.12 g/L、約 0.14 g/L、約 0.16 g/L、約 0.18 g/L、約 0.20 g/L、約 0.22 g/L、約 0.24 g/L、約 0.26 g/L、約 0.28 g/L、約 0.30 g/L、約 0.32 g/L、約 0.34 g/L、約 0.36 g/L、約 0.38 g/L、約 0.40 g/L、約 0.45 g/L 或約 0.50 g/L，或其間的任何值。在一個實施例中，醫用消泡劑 c 乳液在醱酵培養基中的濃度為約 0.24 g/L。

【0070】 根據本發明，VTPM 之 pH 在 5 與 8 之間，較佳在 6 與 7.8 之間，例如約 6.1、6.3、6.5、6.7、6.9、7.0、7.1、7.3、7.5 及 7.7。

【0071】 培養條件

【0072】 根據本發明，生產肉毒桿菌毒素之第一步驟為預培養來自工作細胞庫(WCB)的肉毒梭菌細菌。在一個特定實施例中，藉由首先自土壤樣品中分離出獨特的肉毒梭菌 A1 型菌株來產生 WCB。進一步培養該菌株以產生孢子且以多個(例如 100 個) 0.5 mL 等分試樣冷凍作為主細胞庫(MCB)。進一步培養 MCB 之個別等分試樣以產生孢子，以多個(例如約 500 個) 0.5 mL 等分試樣冷凍作為

WCB。

【0073】 在一個特定實施例中，將 WCB 解凍且添加至含有植物毒素生產培養基(VTPM)的醱酵袋中。在一個特定實施例中，醱酵袋為無菌、一次性、可撓性醱酵袋，其含有用於培養基輸入、接種、抽樣、氣體輸入及氣體輸出的孔口及/或管。在一個特定實施例中，醱酵袋包括位於氣體入口及/或管上之 0.2 μm 氣體過濾器以確保無菌環境。在一個較佳實施例中，將 VTPM 預熱至約 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 且用經過濾的氮氣沖洗以達成厭氧環境。

【0074】 厭氧環境定義為溶氧(DO) $< 2\%$ 之環境。在一些實施例中，溶氧(DO)可以是 $< 2.0\%$ 、 $< 1.9\%$ 、 $< 1.8\%$ 、 $< 1.7\%$ 、 $< 1.6\%$ 、 $< 1.5\%$ 、 $< 1.4\%$ 、 $< 1.3\%$ 、 $< 1.2\%$ 、 $< 1.1\%$ 、 $< 1.0\%$ 、 $< 0.9\%$ 、 $< 0.8\%$ 、 $< 0.7\%$ 、 $< 0.6\%$ 、 $< 0.5\%$ 、 $< 0.4\%$ 、 $< 0.3\%$ 、 $< 0.2\%$ 、 $< 0.1\%$ 、 $< 0.09\%$ 、 $< 0.08\%$ 、 $< 0.07\%$ 、 $< 0.06\%$ 、 $< 0.05\%$ 、 $< 0.04\%$ 、 $< 0.03\%$ 、 $< 0.02\%$ 或 $< 0.01\%$ 。在一個特定實施例中，溶氧可以是約 0%。在一個特定實施例中，WCB 在室溫下解凍五分鐘，接著渦旋 3 次，每次 5 秒，隨後將 400 μl WCB 添加至含有 500 mL VTPM 的醱酵袋中。

【0075】 醱酵製程持續進行直至 OD_{600} 達到可接受之值，例如在約 0.1 與約 1.0 之間、在約 0.1 與約 0.5 之間，或較佳在約 0.2 與約 0.4 之間(或其間範圍)，以產生預培養物。在一些實施例中， OD_{600} 達到約 0.1、約 0.2、約 0.3、約 0.4、約 0.5、約 0.6、約 0.7、約 0.8、約 0.9 或約 1.0 之值。

【0076】 在一個特定實施例中，作為預培養製程內控制，對除肉毒梭菌之外之其他微生物的微生物純度進行測試。在一個特定實施例中，執行測試是為了偵測細菌培養物在醱酵期間的可能污染。應該僅存在且僅偵測到肉毒梭菌。為了篩選肉毒梭菌培養基中可能存在的任何污染性細菌或真菌，在不同培養基及環境條件下執行測試。在一個特定實施例中，為了偵測厭氧細菌，將綿羊血液瓊脂

培養盤上的 10 μ L 培養基劃線，在 30-35°C 下、在厭氧條件下培育。在一個特定實施例中，為了偵測好氧性細菌，將 1 mL 培養基與 TSA 混合且在 30-35°C 下培育。在一個特定實施例中，為了偵測酵母及黴菌，將 1 mL 樣品與 SAB 混合且在 20-25°C 下培育。TSA 及 SAB 培養盤不應該存在生長，且綿羊血液培養盤上生長的所有菌落應該具有相同(梭菌)形態。隨後對血液培養盤的菌落進行革蘭氏染色應該顯示革蘭氏陽性棒狀細菌及孢子。分析肉毒梭菌之活菌計數以便進行製程內監測。

【0077】 生產肉毒桿菌毒素之下一步驟為主要培養。在一個特定實施例中，將預培養物添加至含有 4500 ml VTPM 的醱酵袋中，預熱至 33 \pm 1°C 且用經過濾的氮氣沖洗以達成厭氧環境。厭氧環境定義為溶氧(DO) $<$ 2%之環境。在一些實施例中，溶氧(DO)可以是 $<$ 1.9%、 $<$ 1.8%、 $<$ 1.7%、 $<$ 1.6%、 $<$ 1.5%、 $<$ 1.4%、 $<$ 1.3%、 $<$ 1.2%、 $<$ 1.1%、 $<$ 1.0%、 $<$ 0.9%、 $<$ 0.8%、 $<$ 0.7%、 $<$ 0.6%、 $<$ 0.5%、 $<$ 0.4%、 $<$ 0.3%、 $<$ 0.2%、 $<$ 0.1%、 $<$ 0.09%、 $<$ 0.08%、 $<$ 0.07%、 $<$ 0.06%、 $<$ 0.05%、 $<$ 0.04%、 $<$ 0.03%、 $<$ 0.02%或 $<$ 0.01%(或其間的範圍)。在一個特定實施例中，溶氧可以是約 0%、約 0.01%、約 0.02%、約 0.03%、約 0.04%、約 0.05%、約 0.06%、約 0.07%、約 0.08%、約 0.09%、約 0.1%、約 0.2%、約 0.3%、約 0.4%、約 0.5%、約 0.6%、約 0.7%、約 0.8%、約 0.9%、約 1.0%、約 1.1%、約 1.2%、約 1.3%、約 1.4%、約 1.5%、約 1.6%、約 1.7%、約 1.8%、約 1.9%或約 2.0%。

【0078】 在一些實施例中，醱酵製程持續進行約 60 小時至約 80 小時、約 65 小時至約 75 小時，或約 67 小時至約 71 小時(或其間的範圍)。在一些實施例中，醱酵製程持續進行約 60 小時、約 65 小時、約 66 小時、約 67 小時、約 68 小時、約 69 小時、約 70 小時、約 71 小時、約 72 小時、約 73 小時、約 74 小

時、約 75 小時、約 76 小時、約 77 小時、約 78 小時、約 79 小時或約 80 小時。在一些實施例中，醱酵製程持續進行約 69 ± 2 小時、約 69 ± 1 小時、約 69 ± 0.5 小時或約 69 ± 0.2 小時。在一個實施例中，步驟(c)執行約 69 小時。

【0079】 在一個特定實施例中，作為預培養製程內控制，對除肉毒梭菌之外之其他微生物的微生物純度進行測試。分析肉毒梭菌之活菌計數以便進行製程內監測。

實例

【0080】 實例 1：預培養

【0081】 向 2 L 醱酵袋中添加 500 mL 植物毒素生產培養基(VTPM)(表 1)，預熱至 37°C 且用經過濾的氮氣沖洗以達成厭氧環境。對溶氧(DO)執行製程內控制，直至 $\text{DO} < 2\%$ 。使一個含有工作細胞庫(WCB)的小瓶在室溫下解凍五分鐘，接著渦旋 3 次，每次 5 秒，隨後在 A 級空氣源下使用移液管將 $400\ \mu\text{l}$ WCB 添加至醱酵袋中，接著置於生物反應器上。

【0082】 使用專有的細胞庫作為工作細胞庫(WCB)。簡言之，自土壤樣品分離出肉毒桿菌毒素 A1 型。對於此 WCB 而言，毒素操縱子與 Strain Hall (ATCC 3502，I 類(蛋白水解)肉毒桿菌毒素生產細菌的代表) 100%一致。

【0083】 溫度設定為 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，攪拌角度設定為 12° 且振盪頻率設定為 $12\ \text{min}^{-1}$ 。即時監測氧含量(DO)及 pH。醱酵持續進行且對 OD_{600} 進行製程內控制，直至大約 19 小時之後， OD_{600} 已達到 0.2 至 0.4 範圍內的值。

【0084】 在預培養步驟結束時，作為預培養製程內控制，對除肉毒梭菌之外之其他微生物的微生物純度進行測試。分析肉毒梭菌之活菌計數以便進行製程內監測。

表 1. 植物毒素生產培養基(VTPM)的組成

原料	量(每 L)
1. 小麥蛋白朊(Solabia, A2101)	20.0 ±0.2 g
2. 酵母萃取物(BD Biosciences, 212750)	20.0 ±0.2 g
3. D-(+)-葡萄糖	5.0 ±0.05 g
4. L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物	0.20 ±0.02 g
5. 醫用消泡劑 C 乳液	0.25 ±0.025 g
6. 蒸餾水	970 ± 10 mL
7. NaOH	用於 pH 調節
8. HCl	用於 pH 調節

【0085】 實例 2：主要培養及醱酵

【0086】 在氮氣流動下，用 4500 ml VTPM 填充 10 L 醱酵袋，在攪拌角度為 12°且振盪頻率為 12 min⁻¹的生物反應器上預熱至 33±1°C。藉由虹吸至醱酵袋中來添加得自前一步驟的預培養物。袋用氮氣沖洗以達成厭氧環境且對溶氧(DO)執行製程內控制直至 DO 穩定於 <2%。

【0087】 自主要培養物接種時點持續醱酵 69±2 小時。藉由測試除肉毒梭菌之外之微生物的微生物純度來對收集培養物進行製程內控制。分析肉毒梭菌之活菌計數以便進行製程內監測。

【0088】 簡言之，對微生物純度執行測試以偵測細菌培養物在醱酵期間可能存在的污染。應該僅存在且僅偵測到肉毒梭菌。為了篩選肉毒梭菌培養物中可能存在的任何污染性細菌或真菌，在不同培養基及環境條件下執行測試。為了偵測厭氧細菌，將綿羊血液瓊脂培養盤上的 10 µL 培養物劃線，在 30-35°C 下、在厭氧條件下培育。為了偵測好氧性細菌，將 1 mL 培養物與 TSA 混合且在 30-35°C 下培育。為了偵測酵母及黴菌，將 1 mL 培養物與 SAB 混合且在 20-25°C 下培育。TSA 及 SAB 培養盤上不應該存在生長，且綿羊血液培養盤上生長的所有菌落應該具有相同的(梭菌)形態。隨後對血液培養盤的菌落進行革蘭氏染色應該顯示革蘭氏陽性棒狀細菌及孢子。

表 2. 製程參數及範圍

參數	較佳範圍
<i>預培養</i>	
VTPM	500 ± 10 g
溫度	37 ± 1°C
WCB 接種體積	400 ± 7.5 µl
初始時的溶氧(DO)	< 2% , 較佳 < 0.2%
醱酵時間	19 ± 3 h
OD ₆₀₀	0.2 - 0.4 AU
攪拌角度	12°
攪拌速度	12 rpm
<i>主要培養</i>	
得自預培養的接種體積	500 ml
VTPM 生長培養基	4500 ± 10 g
溫度	33 ± 1°C
初始時的 DO	< 2% , 較佳 < 0.2%
醱酵時間	69 ± 2 h
攪拌角度	12°
攪拌速度	12 rpm

【0089】藉由對主要培養物取樣且在 600 nm 量測光學密度(OD₆₀₀)來監測肉毒梭菌生長。圖 2 顯示根據實例 2 執行的肉毒梭菌主要培養物在 VTPM 中的光學密度曲線(600 nm 吸光度)。隨時間變化的 600 nm 吸光度提供了主要培養物的生長曲線。在最初 15 小時期間觀測到快速生長，其中 OD₆₀₀ 增加至約 7，隨後 OD₆₀₀ 同樣快速降至約 1，因為細菌溶解且毒素分子釋放。在剩下的時間(約 40 小時，直至在第 69 ± 2 小時收集)內，OD₆₀₀ 相當穩定，僅顯示小幅增加。

【0090】圖 3 顯示在主要培養物醱酵期間，在線監測 pH 的結果。主要培養物之 pH 跡線展現典型的圖案，自初始的 pH 7 降至約 15 小時時的約 pH 5.7，此時間與 OD₆₀₀ 達到其峰值的時間大約相同。15 小時之後，pH 緩慢但連續升高至第 69 小時時(亦即，收集時)的 6.3。

【0091】收集時的主要培養物中之毒素產量可以利用 BoNT/A 特異性

ELISA 量測。根據實例 2 生長的主要培養物中所產生的的平均濃度為 4.9 $\mu\text{g/mL}$ ，標準差為 0.75。

【0092】 ELISA 方案為間接夾層 ELISA，其基於 USP <1103>，「免疫測試方法 - 酶聯免疫吸附分析」中所述的原理及通用方法。ELISA 方法係基於免疫結合及使用兩種不同類型之 BoNT/A 特異性多株抗體偵測 BoNT/A。

【0093】 藉由在 PBS-Tween 溶液(0.05% Tween-20)中將 BoNT/A 稀釋至 3-28 ng/mL 的濃度範圍來製備基於市售 BoNT/A 毒素的一系列蛋白質標準稀釋液。將 PBS-Tween 中稀釋至蛋白質標準稀釋度範圍的樣品三重複添加至塗有多株抗 BoNT/A 抗體的微量培養盤孔中。培育引起抗體識別及 BoNT/A 抗原結合至孔。每次培育之後為使用 PBS-Tween 溶液進行的自動化洗滌步驟。

【0094】 初始偵測係根據結合另一種類型之多株抗 BoNT/A 抗體、引起夾層複合物形成來進行。接著添加與辣根過氧化酶(HRP)偶聯的二級抗體。其結合到初級抗體允許偵測到夾層複合物內的 BoNT/A。接著將 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺 (TMB) 受質添加至樣品孔中。HRP 使 TMB 受質轉化而產生藍色反應產物。添加終止溶液，阻止 TMB 轉化且起始剩餘 TMB 顏色轉變為黃色。使用讀盤器偵測微量培養盤孔各孔在 450 nm 下的吸光度，所測吸光度與 BoNT/A 在孔中的量成正比。藉由針對標準曲線進行比較來計算樣品吸光度值，該標準曲線基於得自 BoNT/A 標準稀釋液的吸光度值。結果以平均值($\mu\text{g/mL}$)報導。

【0095】 在主要培養物醱酵期間，在約 15 小時之後，培養基中的毒素變得可偵測到。當使用多株抗 BoNT/A 抗體、藉由西方墨點分析法分析主要培養物之減少之醱酵樣品中的毒素含量時，偵測到不同的毒素重鏈變異體。圖 4 顯示此類西方墨點分析之實例，其在主要醱酵期間追蹤重鏈譜帶 1 及 2 形成(20-77 小時的樣品)。

【0096】在醱酵早期期間，存在三個可見的主要譜帶，其代表未裂解的 160 kDa 前毒素多肽、約 100 kDa 之重鏈譜帶 1，及泳速僅低於完全成熟 BoNT/A 之譜帶 1 的重鏈譜帶 2。在醱酵期間，未裂解的前毒素多肽及重鏈譜帶 1 逐漸消失且轉化成成熟重鏈譜帶 2 同功異型物。收集時(第 69±2 小時)，主要培養物中僅存在成熟重鏈譜帶 2 同功異型物。

【0097】BoNT/A 蛋白質成熟變成譜帶 2 重鏈同功異型物係根據醱酵時間控制，但醱酵溫度為另一種重要因素。圖 5 顯示了表格，其具有對不同溫度下執行主要培養之收集物之 BoNT/A 重鏈變異體的摺圖(來自西方墨點分析)。該表格亦提供相同樣品的 BoNT/A 濃度(如藉由 ELISA 所測定)。若溫度等於或低於 30 °C，則主要培養物在醱酵 69 小時時不能充分完成成熟。在處於或高於 35°C 的醱酵溫度下，第 69 小時時完成成熟變成譜帶 2 重鏈同功異型物，但 BoNT/A 在培養基中的濃度較低。總之，資料揭露用於主要培養的最佳溫度為約 33°C，其容許產生完全成熟的 BoNT/A，同時毒素產量高。

【0098】**實例 3：**與其他植物來源的蛋白腴進行比較

【0099】除小麥蛋白腴之外，VTPM 培養基可以基於用於肉毒梭菌生長及肉毒桿菌毒素產生的其他植物蛋白腴(例如大豆、馬鈴薯或蠶豆蛋白腴)。

【0100】圖 6 顯示肉毒梭菌在 30°C 下在總體積相等之基於大豆蛋白腴之 VTPM (實心條柱)或基於小麥蛋白腴之 VTPM (圖案化條柱)中生長之主要培養物中所獲得之肉毒桿菌毒素的量。資料顯示，小麥蛋白腴不僅得到稍微較高的毒素產量，而且得到較穩定、連貫的過程。

【0101】圖 7 顯示肉毒梭菌在 30°C 下、在基於馬鈴薯、蠶豆或小麥蛋白腴之 VTPM 中生長之主要培養物中所獲得之毒素濃度。所有三個 VTPM 培養基在收集時得到的毒素濃度均高於 1 µg/mL。然而，小麥蛋白腴產生的毒素量(大約 4 µg/mL)實質上高於基於馬鈴薯蛋白腴之 VTPM 與基於蠶豆蛋白腴之 VTPM。

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種用於生產肉毒桿菌毒素之方法，其包含以下步驟：

(a)提供包含肉毒梭菌細菌的工作細胞庫(WBC)；

(b)將該工作細胞庫添加至含有植物毒素生產培養基(VTPM)的第一容器中，且在該 VTPM 中、在容許該肉毒梭菌生長的條件下培養該肉毒梭菌細菌以產生預培養物；

(c)將該預培養物添加至含有 VTPM 的第二容器中，且在允許肉毒桿菌毒素產生的條件下培養該肉毒梭菌細菌；以及

(d)回收該肉毒桿菌毒素；

其中該 VTPM 基本上不含或者不含動物來源的產物，且包含濃度在 15-30 g/L 之間之小麥蛋白腓。

【請求項 2】 如請求項 1 之方法，其中步驟(c)中的該條件包含 30°C 與 37°C 之間的溫度。

【請求項 3】 如請求項 1 之方法，其中步驟(c)中的該條件包含 $33\pm 1^\circ\text{C}$ 的溫度。

【請求項 4】 如請求項 1 之方法，其中步驟(c)包含在 $33\pm 1^\circ\text{C}$ 的溫度下培養該肉毒梭菌細菌。

【請求項 5】 如請求項 1 之方法，其中步驟(c)包含在 $33\pm 0.5^\circ\text{C}$ 的溫度下培養該肉毒梭菌細菌。

【請求項 6】 如請求項 1 之方法，其中步驟(c)包含在 $33\pm 0.2^\circ\text{C}$ 的溫度下培養該肉毒梭菌細菌。

【請求項 7】 如請求項 1 之方法，其中該步驟(c)執行 60 小時至 80 小時。

【請求項 8】 如請求項 1 之方法，其中該步驟(c)執行 69 ± 2 小時。

【請求項 9】 如請求項 1 至 8 中任一項之方法，其中該肉毒桿菌毒素為肉毒桿菌神經毒素 A 型(BoNT/A)。

【請求項 10】 如請求項 1 至 8 中任一項之方法，其中該步驟(b)及(c)中所用的該容器為醱酵袋；及／或其中步驟(b)及(c)中之該等條件包含厭氧環境，視需要地，其中該厭氧環境具有 $<2\%$ 之溶氧(DO)濃度。

【請求項 11】 如請求項 1 至 8 中任一項之方法，其中步驟(b)中的該條件包含 35°C 與 39°C 之間的溫度。

【請求項 12】 如請求項 11 之方法，其中步驟(b)中的該條件包含 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的溫度。

【請求項 13】 如請求項 1 至 8 中任一項之方法，其中：

- (i) 步驟(b)中之該 WCB 相對於該 VTPM 的體積比不大於 2.0% ；
- (ii) 其中步驟(c)中之該預培養物相對於該 VTPM 的體積比係在 1:2 與 1:50 之間；
- (iii) 其中執行該步驟(b)直至 OD_{600} 達到 0.1 至 1.0 之範圍；及／或
- (iv) 其中該步驟(b)執行 10 小時至 30 小時。

【請求項 14】 如請求項 1 至 8 中任一項之方法，其中：

- (i) 步驟(b)中之該 WCB 相對於該 VTPM 的體積比為約 0.08% ；
- (ii) 步驟(c)中之該預培養物相對於該 VTPM 的體積比為約 1:9；
- (iii) 執行該步驟(b)直至 OD_{600} 達到 0.2 至 0.4 之範圍；及／或
- (iv) 該步驟(b)執行約 19 小時。

【請求項 15】 如請求項 1 至 8 中任一項之方法，其中在步驟(b)之後且在步驟(c)之前，測試該預培養物中之除肉毒梭菌之外之其他微生物的微生物純度；及／或

其中在步驟(c)之後且在步驟(d)之前，測試培養物中之除肉毒梭菌之外之其他微生物的微生物純度。

【請求項 16】如請求項 1 至 8 中任一項之方法，其中該小麥蛋白腩在該 VTPM 中的濃度介於 15 g/L 與 25 g/L 之間。

【請求項 17】如請求項 16 之方法，其中該小麥蛋白腩在該 VTPM 中的濃度為 20 g/L(±15%)。

【請求項 18】如請求項 1 至 8 中任一項之方法，其中該 VTPM 包含小麥蛋白腩、酵母萃取物、D-(+)-葡萄糖、L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物，及醫用消泡劑 C 乳液。

【請求項 19】如請求項 18 之方法，其中該 VTPM 包含：

15 g/L 與 25 g/L 之間的小麥蛋白腩；

5 g/L 與 50 g/L 之間的酵母萃取物；

0.05 g/L 與 20 g/L 之間的 D-(+)-葡萄糖；

0.05 g/L 與 0.50 g/L 之間的 L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物；及

0.05 g/L 與 0.50 g/L 之間的醫用消泡劑 c 乳液。

【請求項 20】如請求項 18 之方法，其中該 VTPM 包含：

20 g/L (±15%)的小麥蛋白腩；

約 20 g/L 的酵母萃取物；

約 5 g/L 的 D-(+)-葡萄糖；

約 0.20 g/L 的 L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物；及

約 0.24 g/L 的醫用消泡劑 c 乳液。

【請求項 21】如請求項 1 至 8 中任一項之方法，其中該 VPTM 之 pH 介於 6.7 與 7.2 之間。

【請求項 22】 一種組合物，其包含肉毒梭菌及培養基以便生產肉毒桿菌毒素，其中該培養基不含或基本上不含動物來源之產物，且包含濃度在 15-30 g/L 之間之小麥蛋白腴、酵母萃取物、D-(+)-葡萄糖、L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物及醫用消泡劑 C 乳液。

【請求項 23】 如請求項 22 之組合物，其中該培養基包含：

15 g/L 與 25 g/L 之間的小麥蛋白腴；

5 g/L 與 50 g/L 之間的酵母萃取物；

1 g/L 與 20 g/L 之間的 D-(+)-葡萄糖；

0.05 g/L 與 0.50 g/L 之間的 L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物；及

0.05 g/L 與 0.50 g/L 之間的醫用消泡劑 c 乳液。

【請求項 24】 如請求項 22 之組合物，其中該培養基包含：

20 g/L(±15%)的小麥蛋白腴；

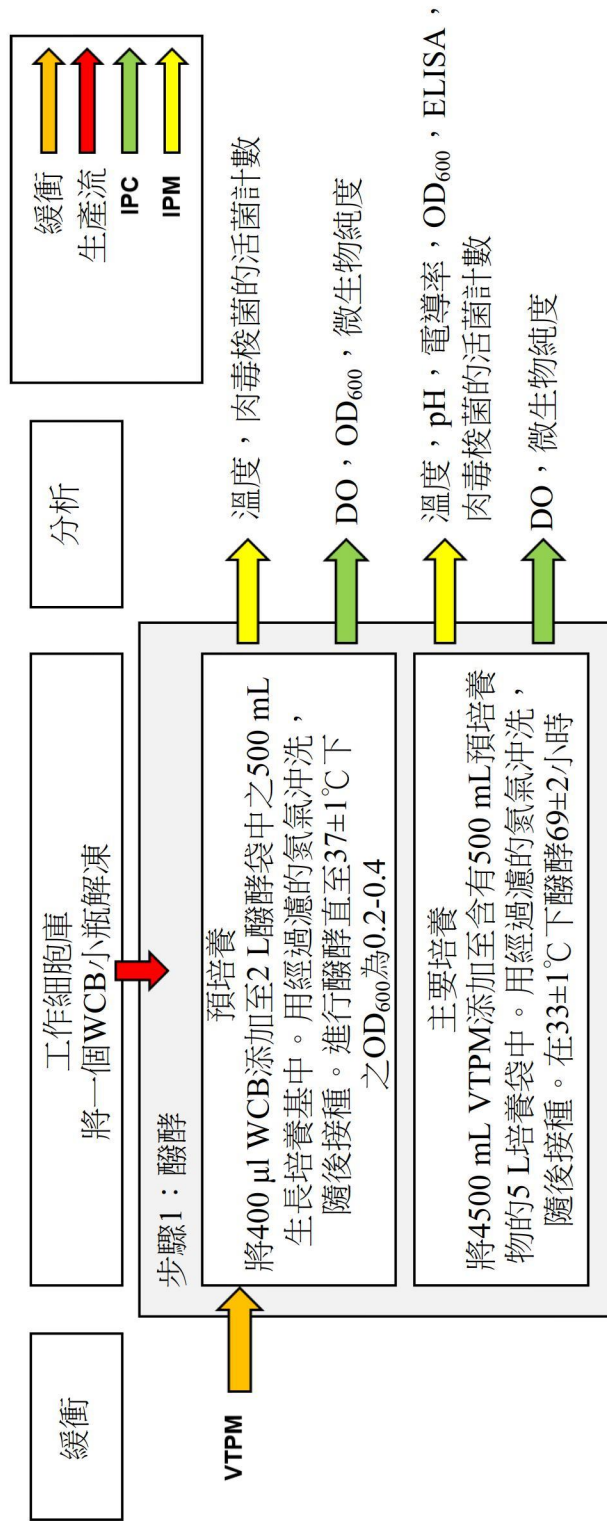
約 20 g/L 的酵母萃取物；

約 5 g/L 的 D-(+)-葡萄糖；

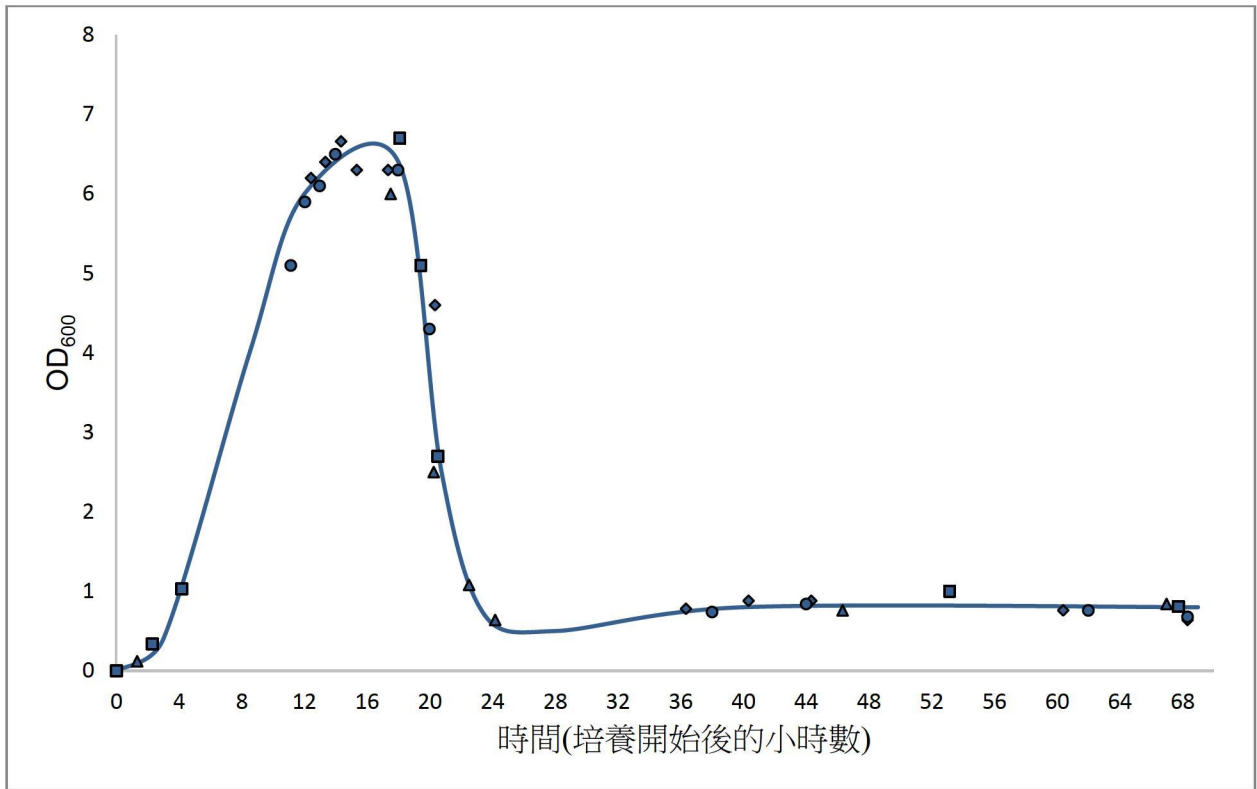
約 0.20 g/L 的 L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物；及

約 0.24 g/L 的醫用消泡劑 c 乳液。

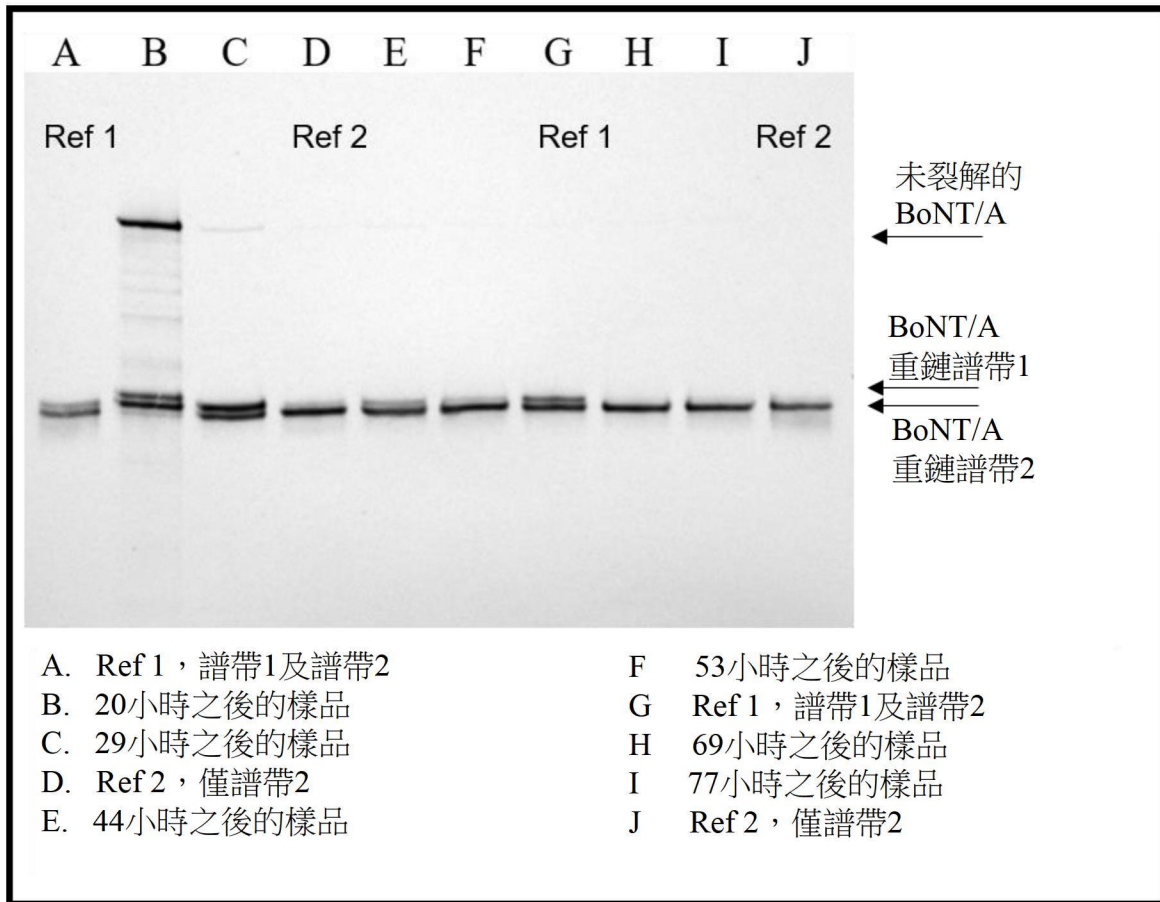
【發明圖式】



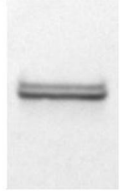
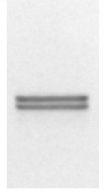

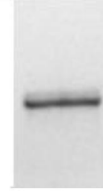
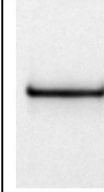
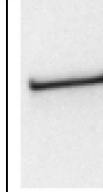

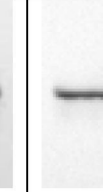
【圖1】



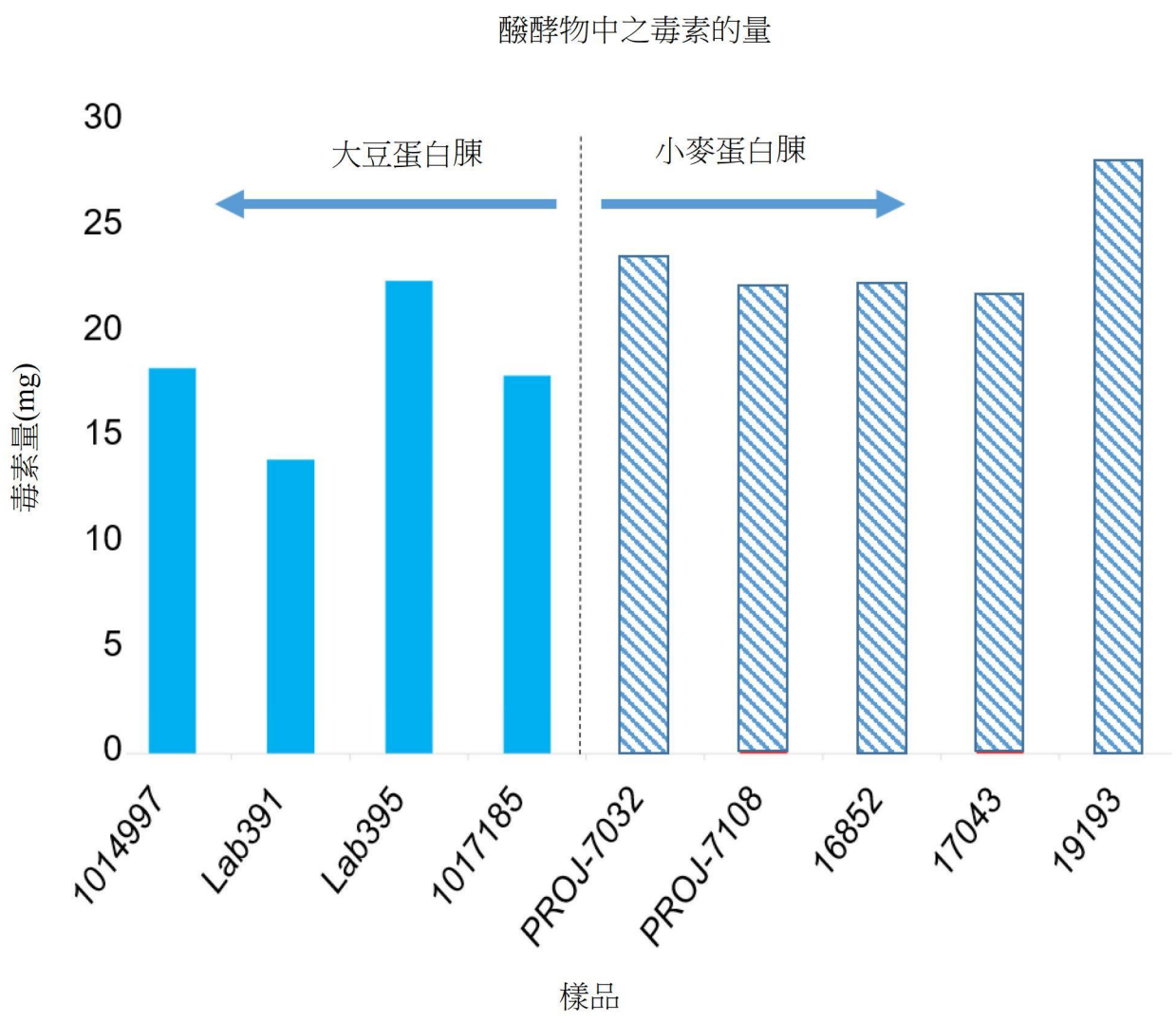
【圖2】



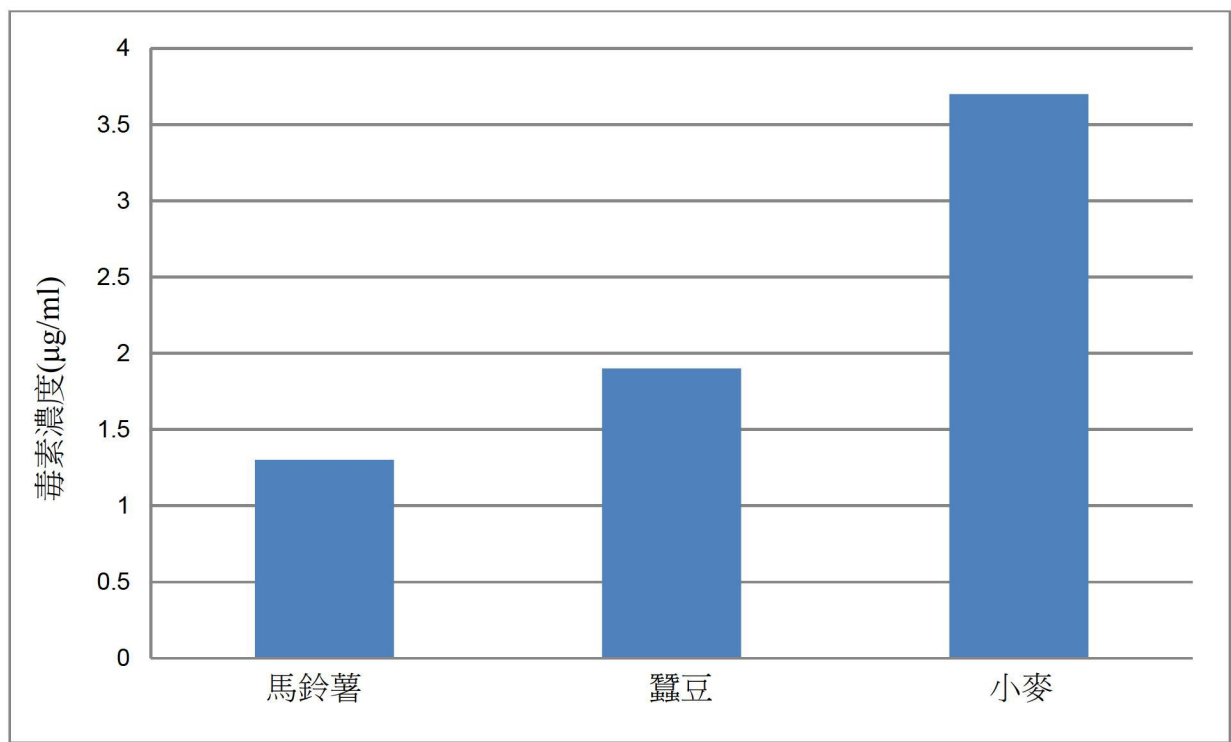
【圖4】

主要培養溫度 (°C)	27		30		33		35	37
KS ~69 h								
BoNT/A 含量 (µg/mL)	2.9	3.3	4.2	4.8	5.5	5.9	4.6	1.8

【圖5】



【圖6】



【圖7】