

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 230**

21 Número de solicitud: 202430045

51 Int. Cl.:

C07K 14/33 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C12R 1/145 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

19.01.2024

30 Prioridad:

20.01.2023 US 63/480,938

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.12.2024

71 Solicitantes:

ABBVIE INC. (100.00%)

1 North Waukegan Rd

60064 North Chicago, IL Illinois US

72 Inventor/es:

KEHRER, Robert R.;

WILG, Jared;

XIANG, Hui;

NGUYEN, Philip P.;

PATEL, Hemant A.;

NG, Connie J. y

GUERRERO, Cortnie M.

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **Composiciones de la neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A**

57 Resumen:

Composiciones de neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A.

La presente divulgación se refiere a composiciones de neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) con una pluralidad de especies de complejo de neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) de 900 kDa. En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden BoNT/A que tienen un bajo nivel de oxidación en posiciones específicas de metionina de BoNT/A de 150 kDa. Además, en el presente documento se proporcionan métodos de producción de una composición que comprende BoNT/A que usan una baja temperatura durante el procedimiento de fermentación de bacterias *Clostridium botulinum*.

ES 2 993 230 A2

DESCRIPCIÓN

COMPOSICIONES DE NEUROTOXINA DE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* SEROTIPO A

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 63/480.938, presentada el 20 de enero de 2023, que se incorpora como referencia en el presente documento en su totalidad.

REFERENCIA A LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

Esta solicitud incorpora como referencia un listado de secuencias presentado con esta solicitud como archivo xml.

1. CAMPO

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) que tienen un bajo nivel de oxidación en posiciones específicas de metionina de BoNT/A de 150 kDa. Además, en el presente documento se proporcionan métodos de producción de una composición que comprende BoNT/A que usan una baja temperatura durante el procedimiento de fermentación de bacterias *Clostridium botulinum*.

2. ANTECEDENTES

La neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) es una toxina altamente potente que provoca relajación muscular mediante la inhibición de la fusión y el acoplamiento de vesículas sinápticas, bloqueando de ese modo la liberación de acetilcolina en las uniones neuromusculares. BoNT/A se produce por cepas de *Clostridium botulinum* tipo A, que sintetizan un complejo de una neurotoxina de 150 kDa, junto con un grupo de proteínas asociadas a neurotoxinas (NAP) no tóxicas. BOTOX®, u onabotulinumtoxina A, es un producto de BoNT/A aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos en 1989 para una variedad de indicaciones terapéuticas y cosméticas.

Hasta la fecha, sigue existiendo la necesidad de desarrollar composiciones farmacéuticas de toxinas botulínicas con propiedades mejoradas.

La citación de una referencia en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que sea técnica anterior a la presente divulgación.

3. SUMARIO

La presente divulgación se basa, en parte, en el sorprendente hallazgo de que modular la temperatura durante el procedimiento de fermentación de *Clostridium botulinum* produjo composiciones con niveles variables de residuos de metionina oxidados de la neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) producida. Por ejemplo, usar una temperatura que es menor que la temperatura de fermentación convencional o bien durante un corto periodo de tiempo (es decir, choque frío) o bien de manera continua durante la fermentación de *Clostridium botulinum* en medios de cultivo celular libres de proteínas animales redujo el nivel de oxidación en uno o más de los residuos de metionina (por ejemplo, M411, M550, M1004 y/o M1144) del componente de neurotoxina de 150 kDa producido de BoNT/A. La presente divulgación también identifica una correlación negativa entre el nivel de oxidación y la potencia de BoNT/A, es decir, BoNT/A con un menor nivel de oxidación muestra una mayor potencia.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende una pluralidad de especies de complejo de neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) de 900 kDa, en la que el nivel de oxidación de las especies de neurotoxina de 150 kDa presentes en la composición es menor del 6 % en cada una de las siguientes posiciones: 411 (M411) tal como se muestra en SEQ ID NO: 2, 550 (M550) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3, 1004 (M1004) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 y 1144 (M1144) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3.

En una realización, el complejo de BoNT/A de 900 kDa es onabotulinumtoxina A.

En una realización, el nivel de oxidación en cada una de dichas posiciones es menor del 6 %.

En determinadas realizaciones, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es menor del 5 %. En determinadas realizaciones, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es de aproximadamente el 2 %.

En determinadas realizaciones, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es menor del 1 %. En determinadas realizaciones, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 0,5 %.

En determinadas realizaciones, el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es menor del 3 %. En determinadas realizaciones, el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 %.

En determinadas realizaciones, el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es menor del 6 %. En determinadas realizaciones, el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 2 %.

5

En determinadas realizaciones, el nivel de oxidación se determina mediante CL-EM/EM.

En determinadas realizaciones, la composición comprende menos del 3 % de proteína de células huésped.

10

En determinadas realizaciones, la composición tiene una potencia de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ unidades/mg a aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg. En determinadas realizaciones, la potencia se determina usando un ensayo de dosis letal del 50 % (DLM_{50}) en ratón. En determinadas realizaciones, la potencia se determina usando un ensayo de potencia basado en células.

15

En determinadas realizaciones, la composición comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, el portador farmacéuticamente aceptable comprende albúmina sérica humana y cloruro de sodio. En determinadas realizaciones, la composición se seca al vacío.

20

En determinadas realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce en una condición de fermentación que comprende una temperatura de fermentación de choque frío.

En determinadas realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce en una condición de fermentación de temperatura fría continua.

25

En determinadas realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se purifica mediante una o más etapas de cromatografía en columna. En determinadas realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se purifica mediante una o más etapas de cromatografía en columna que comprenden cromatografía de interacción hidrófoba. En determinadas realizaciones, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden además cromatografía de intercambio aniónico. En determinadas realizaciones, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden además cromatografía de intercambio catiónico.

30

En determinadas realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce por bacterias *Clostridium botulinum* cultivadas y expandidas a partir de un banco de células de trabajo libre de productos animales.

- 5 En determinadas realizaciones, la composición está libre de productos animales.

En determinadas realizaciones, la composición no contiene ningún inhibidor de proteasas.

En determinadas realizaciones, la composición no contiene clorhidrato de benzamidina.

10

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método de producción de una composición que comprende BoNT/A, comprendiendo dicho método incubar un cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en un fermentador de producción a una temperatura que es inferior a 35 °C durante un periodo de tiempo.

15

En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 72 horas. En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 160 horas.

20

En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo es de aproximadamente 5 horas. En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo es todo el periodo de fermentación.

En determinadas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 15 °C. En determinadas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 20 °C. En determinadas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 25 °C.

25

En determinadas realizaciones, el método comprende, en el siguiente orden: (a) incubar el cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en el fermentador de producción a 35 °C durante aproximadamente 12 horas; (b) ajustar la temperatura a 15 °C al final de la etapa (a); (c) cultivar a 15 °C hasta aproximadamente 5 horas después de la etapa (a); (d) ajustar la temperatura a 35 °C al final de la etapa (c); y (e) cultivar a 35 °C hasta aproximadamente 55 horas después de la etapa (c).

30

En determinadas realizaciones, el método comprende, en el siguiente orden: (a) incubar el cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en el fermentador de producción a 35 °C durante aproximadamente 12 horas; (b) ajustar la temperatura a 20 °C al final de la etapa (a); (c) cultivar a 20 °C hasta

aproximadamente 5 horas después de la etapa (a); (d) ajustar la temperatura a 35 °C al final de la etapa (c); y (e) cultivar a 35 °C hasta aproximadamente 55 horas después de la etapa (c).

En determinadas realizaciones, el método comprende incubar el cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en el fermentador de producción a 25 °C durante aproximadamente 160 horas.

En otro aspecto, la presente divulgación también se refiere a un método de tratamiento de un paciente que lo necesita, que comprende administrar una composición descrita en el presente documento.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** muestra la potencia relativa de PA de BoNT/A de 150 kDa tratado con hasta 100 pm de H₂O₂.

La **figura 2** muestra el porcentaje de aumento de la oxidación en los residuos de metionina de PA de BoNT/A de 150 kDa tratado con hasta 100 ppm de H₂O₂.

La **figura 3** muestra BoNT/A de 150 kDa con los sitios de oxidación predominantes marcados.

La **figura 4** muestra que la oxidación de la subunidad de BoNT/A de 150 kDa se correlaciona con la pérdida de potencia.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación proporciona nuevas composiciones de BoNT/A con niveles de oxidación reducidos y propiedades mejoradas, así como métodos para producir las mismas. Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende una pluralidad de especies de complejo de neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) de 900 kDa, en la que el nivel de oxidación de las especies de neurotoxina de 150 kDa presentes en la composición es menor del 6 % en cada una de las siguientes posiciones: 411 (M411) tal como se muestra en SEQ ID NO: 2, 550 (M550) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3, 1004 (M1004) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 y 1144 (M1144) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3.

Beneficios adicionales de la presente divulgación resultarán evidentes para el experto en la técnica a partir de la lectura de esta solicitud de patente. Se pretende que las realizaciones de la divulgación descritas en los párrafos siguientes ilustren la invención y no deben considerarse como limitativas del alcance de la invención.

5.1. Definiciones

Las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen los referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

- 5 Se pretende que el término “y/o” tal como se usa en una expresión tal como “A y/o B” en el presente documento signifique “A y B”, “A o B”, “A” o “B”.

Los términos “aproximadamente” y “de manera aproximada” se refieren generalmente a un intervalo de números que un experto en la técnica consideraría equivalente al valor recitado (es decir, que tiene la misma función o el mismo resultado). En muchos casos, los términos “aproximadamente” y “de manera aproximada” pueden incluir números que se redondean a la cifra significativa más cercana. En realizaciones específicas, debe interpretarse que los términos “aproximadamente” y “de manera aproximada” permiten una variación normal tal como juzga un experto habitual en la técnica, tal como, por ejemplo, una variación dentro del 20 % o el 10 % o el 5 %. En realizaciones específicas, los términos “aproximadamente” y “de manera aproximada” abarcan el valor exacto recitado.

“Libre de productos animales” (“APF”) o “sustancialmente libre de productos animales” abarca, respectivamente, la ausencia o ausencia sustancial de productos o compuestos derivados de la sangre, agrupados a partir de la sangre y otros derivados de animales. “Animal” excluye a los microorganismos, tales como las bacterias. Por tanto, un medio o procedimiento APF o un medio o procedimiento sustancialmente APF dentro del alcance de la presente invención puede incluir una toxina botulínica o una bacteria *Clostridium botulinum*. Por ejemplo, un procedimiento APF o un procedimiento sustancialmente APF significa un procedimiento que o bien está sustancialmente libre o bien está esencialmente libre o bien está completamente libre de proteínas derivadas de animales, tales como inmunoglobulinas, digesto cárnico, subproductos cárnicos y leche o productos o digestos lácteos.

“Neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A” o “BoNT/A” significa una neurotoxina producida por cepas de tipo A de *Clostridium botulinum*. Una de tales cepas de tipo A de *Clostridium botulinum* es la cepa Hall de tipo A, por ejemplo, la cepa Hall de tipo A (Allergan). Zhang *et al.* (2003) *Gene* 315:21, incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad. BoNT/A abarca tanto un complejo de BoNT/A (por ejemplo, los complejos de 300, 500, 760 y 900 kDa) así como una toxina BoNT/A pura (es decir, la molécula neurotóxica de aproximadamente 150 kDa). A menos que se especifique lo contrario, la BoNT/A usada en el presente documento incluye formas tanto oxidadas como no oxidadas.

“Complejos de BoNT/A” significa complejos de neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A que comprenden una molécula de BoNT/A (el componente neurotóxico) y una o más proteínas hemaglutinina (HA) y/o proteínas distintas de hemaglutinina no tóxicas (NTNH). Los complejos de BoNT/A pueden estar en las formas de, por ejemplo, aproximadamente 900 kDa, 760 kDa, 500 kDa o 300 kDa. En una realización, el complejo de BoNT/A está en forma de aproximadamente 900 kDa que comprende una molécula de BoNT/A de aproximadamente 150 kDa, hemaglutinina HA70, hemaglutinina HA34, hemaglutinina HA17 y proteínas distintas de hemaglutinina no tóxicas (NTNH). En una realización, el complejo de BoNT/A es una forma sustancialmente completa del complejo de BoNT/A de 900 kDa. En una realización, el complejo de BoNT/A es onabotulinumtoxina A.

“Neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A de 150 kDa” o “BoNT/A de 150 kDa” significa una neurotoxina de aproximadamente 150 kDa preparada a partir de un cultivo de una cepa de *Clostridium botulinum* tipo A (por ejemplo, la cepa Hall de *Clostridium botulinum*). Las secuencias preferidas de toxina botulínica tipo A (BoNT/A) de 150 kDa usadas en el contexto de la presente divulgación se muestran en la tabla 1. Por ejemplo, en una realización, la BoNT/A de 150 kDa usada en el contexto de la presente divulgación comprende (por ejemplo, consiste en) una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 2 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 3, con puentes disulfuro ubicados entre las posiciones 429 y 453 y entre las posiciones 1234 y 1279. A menos que se especifique lo contrario, la BoNT/A de 150 kDa usada en el presente documento incluye formas tanto oxidadas como no oxidadas.

“Composición de BoNT/A” se refiere a cualquier composición que comprende BoNT/A y abarca tanto composiciones sólidas como composiciones líquidas. En determinadas realizaciones, una composición de BoNT/A (por ejemplo, una composición sólida o composición líquida) descrita en el presente documento es una composición farmacéutica. En realizaciones específicas, una composición de BoNT/A (por ejemplo, una composición sólida o composición líquida) descrita en el presente documento es un producto farmacológico (es decir, una forma de dosificación terminada). En realizaciones específicas, una composición de BoNT/A (por ejemplo, una composición sólida o composición líquida) descrita en el presente documento es un principio activo. En una realización específica, una composición de BoNT/A descrita en el presente documento está en forma de una disolución. En una realización específica, una composición de BoNT/A descrita en el presente documento está en forma de polvo (por ejemplo, polvo secado al vacío o polvo secado por congelación).

“Choque frío” significa una temperatura de fermentación que es inferior a la temperatura de fermentación típica (es decir, a aproximadamente 35 ± 1 °C) durante un corto periodo de tiempo durante el procedimiento de fermentación.

- 5 “Neurotoxina de *Clostridium*” significa una neurotoxina producida, o nativa, de una bacteria *Clostridium*, tal como *Clostridium botulinum*, *Clostridium utyricum* o *Clostridium beratti*, así como una neurotoxina de *Clostridium* preparada de manera recombinante por una especie distinta de *Clostridium*.

10 El término “portador” usado en relación con un excipiente farmacéutico se refiere a todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, conservantes, recubrimientos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica.

15 El término “formas oxidadas de BoNT/A” usado en el presente documento se refiere a una proteína de BoNT/A que está oxidada en al menos un residuo de metionina. En una realización, las formas oxidadas de BoNT/A en las composiciones descritas en el presente documento comprenden una metionina oxidada en una o más de posiciones 411 (M411) en SEQ ID NO: 2 y 550 (M550), 1004 (M1004) y 1144 (M1144) de SEQ ID NO: 3. Las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender una pluralidad de formas oxidadas de BoNT/A, cada una de las cuales tiene un perfil de oxidación diferente (es decir, oxidación en un conjunto diferente de residuos de metionina).

20 El término “nivel de oxidación” usado en el presente documento se refiere al porcentaje de especies de BoNT/A dentro de una composición que tiene oxidación en un residuo de metionina específico de BoNT/A. La oxidación en el residuo de metionina específico de BoNT/A puede detectarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante CL-EM/EM, y el porcentaje de oxidación en
25 dicho residuo de metionina puede cuantificarse usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de oxidación}_{(\text{sitio n})} = \left(\frac{\text{área de pico del péptido oxidado}}{\text{área de pico del péptido oxidado} + \text{área de pico del péptido no oxidado}} \right) \times 100$$

30 El término “paciente”, “sujeto”, “individuo” y similar se refiere a seres humanos.

“Composición farmacéutica” significa una formulación en la que un principio activo puede ser una BoNT/A. La palabra “formulación” significa que hay al menos un componente adicional (tal como, por ejemplo y sin limitarse a, una albúmina (tal como una albúmina sérica humana (HSA) o una albúmina
35 humana recombinante) y/o cloruro de sodio) en la composición farmacéutica además de un principio activo de BoNT/A. El excipiente de albúmina sérica humana puede derivarse de plasma humano o

prepararse de manera recombinante. Por tanto, una composición farmacéutica es una formulación que es adecuada para administración diagnóstica, terapéutica y/o cosmética (por ejemplo, mediante inyección intramuscular o subcutánea o mediante la inserción de un depósito o implante) a un sujeto, tal como un paciente humano. Una composición farmacéutica puede estar en una condición secada al vacío o liofilizada, en una disolución reconstituida a partir de la composición farmacéutica secada al vacío o liofilizada con, por ejemplo, solución salina o agua, o como una disolución que no requiere reconstitución. En una realización, el principio activo es la toxina botulínica serotipo A preparada de manera nativa por bacterias *Clostridium*. En una realización, el principio activo es onabotulinumtoxina A. Tal como se indica, una composición farmacéutica puede ser líquida o sólida, por ejemplo, secada al vacío o liofilizada. Se dan a conocer métodos a modo de ejemplo para formular una composición farmacéutica de principio activo de BoNT/A en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0118598, presentada el 5 de noviembre de 2002, incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad. En una realización preferida, una composición farmacéutica descrita en el presente documento está en forma seca (por ejemplo, secada al vacío o liofilizada). Las composiciones farmacéuticas, que comprenden BoNT/A de 900 kDa, albúmina sérica humana (HSA) y cloruro de sodio, pueden secarse al vacío y son adecuadas para su administración mediante inyección o bien por vía subcutánea o bien por vía intramuscular tras su reconstitución con solución salina normal. Preferiblemente, tales composiciones farmacéuticas comprenden 0,5 mg de HSA y 0,9 mg de cloruro de sodio por 100 unidades de BoNT/A. Lo más preferiblemente, tales composiciones farmacéuticas comprenden 50, 100 ó 200 unidades de BoNT/A.

“Unidad” o “U” se refiere a la dosis DL_{50} o a la dosis determinada mediante un ensayo de potencia basado en células (CBPA). La dosis DL_{50} se define como la cantidad de BoNT/A que mataría al 50 % de los ratones a los que se les inyecta la BoNT/A. La dosis de CBPA se determina tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 8.618.261; 8.198.034; 9.249.216; 10.703.806; 11.261.240 y 11.332.518; cuyos detalles del ensayo se incorporan como referencia en el presente documento.

A menos que el contexto requiera lo contrario, los términos “comprenden”, “comprende” y “que comprende” se usan sobre la base y la clara comprensión de que deben interpretarse de forma inclusiva, en lugar de exclusiva, de manera que indican la inclusión de la característica recitada pero sin excluir una o más de otras tales características. Sin embargo, se entiende que donde quiera que se describan aspectos y realizaciones en el presente documento con el lenguaje “comprenden” (o “comprende” o “que comprende”), también se proporcionan aspectos por lo demás análogos descritos en términos de “consisten en” (o “consiste en” o “que consiste en”) y/o “consisten esencialmente en” (o “consiste esencialmente en” o “que consiste esencialmente en”).

5.2. Neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A)

En un aspecto, la composición comprende neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) de 150 kDa en formas tanto oxidadas como no oxidadas.

- 5 Una molécula de BoNT/A de 150 kDa es una endopeptidasa dependiente de zinc que puede hidrolizar específicamente un enlace peptídico de la proteína asociada a vesículas de membrana (VAMP, también denominada sinaptobrevina) proteína intracelular de 25 kiloDalton (kDa) asociada a sinaptosomas (SNAP-25).
- 10 Una molécula de BoNT/A de 150 kDa se traduce como un polipéptido de cadena sencilla de aproximadamente 150 kDa que posteriormente se escinde mediante escisión proteolítica dentro de un bucle de disulfuro por una proteasa que se produce de manera natural. Este procesamiento posterior a la traducción produce una molécula bicatenaria que comprende una cadena ligera (LC) de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada (HC) de aproximadamente 100 kDa que se mantienen
- 15 juntas por un enlace disulfuro sencillo e interacciones no covalentes. Las bacterias *Clostridium* pueden producir complejos de toxina botulínica tipo A en diversas formas, que incluyen, y no se limitan a, complejos de 900 kDa, 760 kDa, 500 kDa y 300 kDa (pesos moleculares aproximados). Los complejos (es decir, peso molecular mayor de aproximadamente 150 kDa) comprenden una molécula de toxina botulínica de 150 kDa (el componente neurotóxico) y una o más proteínas hemaglutinina (HA) y/o
- 20 proteínas distintas de hemaglutinina no tóxicas (NTNH).

En una realización, la molécula de BoNT/A de 150 kDa que puede usarse en el contexto de la presente divulgación tiene una secuencia mostrada en la tabla 1. En una realización, la molécula de BoNT/A de 150 kDa comprende una cadena ligera (LC: residuos 2-438, aproximadamente 50 kDa) y una cadena

- 25 pesada (HC: residuos 449-1296, aproximadamente 100 kDa). Los residuos 439-448 son el sitio de mellado y aparecen en cursiva. Los sitios de oxidación M411, M550, M1004 y M1144 aparecen subrayados. Las posiciones de residuos de aminoácido recitadas en diversas reivindicaciones, realizaciones y aspectos de esta divulgación se refieren a las posiciones de residuos de aminoácido representadas en la tabla 1. Según la tabla 1, el primer residuo de aminoácido de SEQ ID NO: 2 comienza
- 30 a partir de la posición 2 de SEQ ID NO: 2 en lugar de la posición 1 de SEQ ID NO: 2, y el primer residuo de aminoácido de SEQ ID NO: 3 comienza a partir de la posición 449 de SEQ ID NO: 3 en lugar de la posición 1 de SEQ ID NO: 3.

Tabla 1. Secuencias preferidas de moléculas de BoNT/A**SEQ ID NO. 1: Secuencia de aminoácidos de la molécula de BoNT/A de 150 kDa**

	MPFVNKQFNY	KDPVNGVDIA	YIKIPNAGQM	QPVKAFKIHN	KIWVIPERDT	50
	FTNPEEGDLN	PPPEAKQVPV	SYDSTYLST	DNEKDNLYLG	VTKLFERIYS	100
5	TDLGRMLLTS	IVRGIPFWGG	STIDTELKVI	DTNCINVIQP	DGSYRSEELN	150
	LVIIGPSADI	IQFECKSFGH	EVLNLTRNGY	GSTQYIRFSP	DFTFGFEESL	200
	EVDTNPLLGA	GKFATDPAVT	LAHELIHAGH	RLYGIAINPN	RVFKVNTNAY	250
	YEMSGLEVSF	EELRTFGGHD	AKFIDSLQEN	EFRLYYYNKF	KDIASTLNKA	300
	KSIVGTTASL	QYMKNVFKEK	YLLSEDTSGK	FSVDKLKFDK	LYKMLTEIYT	350
10	EDNFVKFFKV	LNRKTYLNFD	KAVFKINIVP	KVNYTIYDGF	NLRNTNLAAN	400
	FNGQNTTEINN	MNFTKLKNFT	GLFEFYKLLC	VRGIITSKTK	SLDKGYNK	
					AL 450	
	NDLCIKVNNW	DLFFSPSEDN	FTNDLNKGEE	ITSDTNIEAA	EENISLDLIQ	500
	QYYLTFNFDN	EPENISIENL	SSDIIGQLEL	MPNIERFPNG	KKYELDKYTM	550
15	FHYLRAQEFE	HGKSRIALTN	SVNEALLNPS	RVYTFSSDY	VKKVKNKATEA	600
	AMFLGWVEQL	VYDFTDETSE	VSTTDKIADI	TIIIPYIGPA	LNIGNMLYKD	650
	DFVGALIFSG	AVILLEFIPE	IAIPVLGTFA	LVSYIANKVL	TVQTIDNALS	700
	KRNEKWDEVY	KYIVTNWLAK	VNTQIDLIRK	KMKEALENQA	EATKAIINYQ	750
	YNQYTEEEKN	NINFNIDDL	SKLNESSINKA	MININKFLNQ	CSVSYLMNSM	800
20	IPYGVKRLED	FDASLKDALL	KYIYDNRGTL	IGQVDRLKDK	VNNTLSTDIP	850
	FQLSKYVDNQ	RLSTFTTEYI	KNIINTSILN	LRYESNHLID	LSRYASKINI	900
	GSKVNFDPID	KNQIQLFNLE	SSKIEVILKN	AIVYNSMYEN	FSTSFWIRIP	950
	KYFNSISLNN	EYTIINCMEN	NSGKWVSLNY	GEIIWTLQDT	QEIQRVVFEK	1000
	YSQMINISDY	INRWIFVTIT	NNRLNNSKIY	INGRLIDQKP	ISNLGNIHAS	1050
25	NNIMFKLDGC	RDTHRYIWIK	YFNLFDKELN	EKEIKDLYDN	QSNKGILKDF	1100
	WGDYLYQYDKP	YYMLNLYDPN	KYVDVNNVGI	RGYMYLKGPR	GSVMTTNIYL	1150
	NSSLYRGTKF	IIKKYASGNK	DNIVRNNDRV	YINVVVKNKE	YRLATNASQA	1200
	GVEKILSALE	IPDVGNLSQV	VVMKSKNDQG	ITNKCKMNLQ	DNNGNDIGFI	1250
	GFHQFNNAIAK	LVASNWNRRQ	IERSSRTLGC	SWEFIPVDDG	WGERPL	1296

30

SEQ ID NO. 2: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (LC) de la molécula de BoNT/A

PFVVKQFNY KDPVNGVDIA YIKIPNAGQM QPVKAFKIHN KIWVIPERDT 50
 FTNP EEGDLN PPPEAKQVPV SYDSTYLST DNEKDNYLKG VTKL FERIYS 100
 TDLGRMLLTS IVRGIPFWGG STIDTELKVI DTNCINVIQP DGSYRSEELN 150
 5 LVIIGPSADI IQFECKSFGH EVLNLTRNGY GSTQYIRFSP DFTFGFEESL 200
 EVDTNPLLGA GK FATDPAVT LAHEL IHAGH RLYGIAINPN RVFKVNTNAY 250
 YEMSGLEV SF EELRTFGGHD AKFIDSLQEN EFRLYYYNKF KDIAS TLNKA 300
 KSIVGTTASL QYMKNVFKEK YLLSEDTSGK FSVDKLKFDK LYKMLTEIYT 350
 EDNFVKFFKV LNRKTYLNFD KAVFKINIVP KVN YTIYDGF NLRNTNLAAN 400
 10 FNGQNT EINN MNFTKLKNFT GLFEFYKLLC VRGIITSK

SEQ ID NO. 3: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (HC) de la molécula de BoNT/A

AL 450
 NDLCIKVNNW DLFFSPSEDN FTNDLNKGEE ITS D TNIEAA EENISLDLIQ 500
 15 QYYLT FNFDN EPENISIENL SSDIIGQLEL MPNIERFPNG KKYELDKYTM 550
 FHYLRAQEFE HGKSRIALT N SVNEALLNPS RVYTFFSSDY VKKV NKATEA 600
 AMFLGWVEQL VYDFTDETSE VSTTDKIADI TIIIPYIGPA LNIGNM LYKD 650
 DFVGALIFSG AVILLEFIPE IAIPVLGTFA LVSYIANKVL TVQTIDNALS 700
 KRNEKWDEVY KYIVTNWLAK VNTQIDLRK KMKEALENQA EATKAIINYQ 750
 20 YNQYTEEEKN NINFNIDDL SSKL NESINKA MININKFLNQ CSVSYLMNSM 800
 IPYGVKRLED FDASLKDALL KYIIDNRGTL IGQVDRLKDK VNNTLSTDIP 850
 FQLSKYVDNQ RLLSTFTEYI KNIINTSILN LRYESNHLID LSR YASKINI 900
 GSKVNFDPID KNQIQLEFNLE SSKIEVILKN AIVYNSMYEN FSTSFWIRIP 950
 KYFNSISLNN EYTIINCMEN NSGKWVSLNY GEIIWTLQDT QEIKQRVVFK 1000
 25 YSQMINISDY INRWIFVTIT NNRLNNSKIY INGR LIDQKP ISNLGN IHAS 1050
 NNIMFKLDGC RDTHRYIWIK YFNLFDKELN EKEIKDLYDN QSN SGILKDF 1100
 WGDYLQYDKP YYMLNLYDPN KYVDVNNVGI RGYMYLKGPR GSVMTTNIYL 1150
 NSSLYRGTKF IIKKYASGNK DNIVRNNDRV YINVVVKNKE YRLATNASQA 1200
 GVEKILSALE IPDVGNLSQV VVMKSKNDQG ITNKCKMNLQ DNNGNDIGFI 1250
 30 GFHQFN NIAK LVASNWYNRQ IERSSRTLGC SWEFIPVDDG WGERPL 1296

En una realización, la BoNT/A descrita en el presente documento está presente como un complejo de BoNT/A de 900 kDa. En una realización, la BoNT/A descrita en el presente documento está presente como un complejo de BoNT/A de 900 kDa formado por la molécula de BoNT/A de 150 kDa y hemaglutinina HA70, hemaglutinina HA34, hemaglutinina HA17 y proteínas distintas de hemaglutinina no tóxica (NTNH). En una realización específica, la BoNT/A descrita en el presente documento (por ejemplo, el complejo de BoNT/A de 900 kDa) se produce en una cepa de tipo A de *Clostridium botulinum*. En una realización específica, la BoNT/A descrita en el presente documento (por ejemplo, el complejo de BoNT/A de 900 kDa) se produce en una cepa Hall de tipo A de *Clostridium botulinum*. En una realización preferida, la BoNT/A descrita en el presente documento es onabotulinumtoxina A.

En una realización, la molécula de BoNT/A de 150 kDa descrita en el presente documento comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 2 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 3, con puentes disulfuro ubicados entre las posiciones 429 y 453 y entre las posiciones 1234 y 1279.

5.3. Composiciones de BoNT/A oxidada

En una realización, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende una pluralidad de especies de complejo de neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) de 900 kDa, en la que el nivel de oxidación de las especies de neurotoxina de 150 kDa presentes en la composición es menor del 6 % en cada una de las siguientes posiciones: 411 (M411) tal como se muestra en SEQ ID NO: 2, 550 (M550) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3, 1004 (M1004) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 y 1144 (M1144) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, y sin limitación, el nivel de oxidación en una o más de dichas posiciones es menor del 5,5 %, menor del 5,0 %, menor del 4,5 %, menor del 4,0 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %, e intervalos y cantidades entre cualesquiera de estos porcentajes de oxidación mencionados anteriormente.

En una realización, el nivel de oxidación en cada una de las posiciones 411 (M411) de SEQ ID NO: 2 y 550 (M550), 1004 (M1004) y 1144 (M1144) de SEQ ID NO: 3 es menor del 6,0 %. Por ejemplo, y sin limitación, el nivel de oxidación en cada una de dichas posiciones es menor del 5,5 %, menor del 5,0 %, menor del 4,5 %, menor del 4,0 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %.

En una realización, las formas oxidadas de BoNT/A en las composiciones descritas en el presente documento comprenden una metionina oxidada en la posición 411 (M411) de SEQ ID NO. 2.

5 En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es menor del 5 % (por ejemplo, menor del 4,5 %, menor del 4 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 %, menor del 0,1 %).

10 En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 4 %, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 3 %, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 %, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 4 %, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 3 %, de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 5 % o de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 5 %.

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es de aproximadamente el 2 %.

20 En una realización, las formas oxidadas de BoNT/A en las composiciones descritas en el presente documento comprenden una metionina oxidada en la posición 550 (M550) de SEQ ID NO. 3.

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es menor del 1 % (por ejemplo, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 0,5 % (por ejemplo, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,35 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,45 % o aproximadamente el 0,5 %).

30 En una realización, las formas oxidadas de BoNT/A en las composiciones descritas en el presente documento comprenden una metionina oxidada en la posición 1004 (M1004) de SEQ ID NO. 3.

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es menor del 3 % (por ejemplo, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor

del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 % (por ejemplo, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,1 %, aproximadamente el 1,2 %, aproximadamente el 1,3 %, aproximadamente el 1,4 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,6 %, aproximadamente el 1,7 %, aproximadamente el 1,8 %, aproximadamente el 1,9 % o aproximadamente el 2 %).

En una realización, las formas oxidadas de BoNT/A en las composiciones descritas en el presente documento comprenden una metionina oxidada en la posición 1144 (M1144) de SEQ ID NO. 3.

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es menor del 6 % (por ejemplo, menor del 5,5 %, menor del 5,0 %, menor del 4,5 %, menor del 4,0 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 4 %, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 3 %, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 %, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 4 %, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 3 %, de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 5 % o de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 5 %.

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 2 %.

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es menor del 5 % (por ejemplo, menor del 4,5 %, menor del 4 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 %, menor del 0,1 %) y el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es menor del 1 % (por ejemplo, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es de aproximadamente el 2 % y el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO: 3 es de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 0,5 % (por ejemplo, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,35 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,45 % o aproximadamente el 0,5 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es menor del 5 % (por ejemplo, menor del 4,5 %, menor del 4 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 %, menor del 0,1 %) y el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO: 3 es menor del 3 % (por ejemplo, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es de aproximadamente el 2 % y el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO: 3 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 % (por ejemplo, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,1 %, aproximadamente el 1,2 %, aproximadamente el 1,3 %, aproximadamente el 1,4 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,6 %, aproximadamente el 1,7 %, aproximadamente el 1,8 %, aproximadamente el 1,9 % o aproximadamente el 2 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es menor del 5 % (por ejemplo, menor del 4,5 %, menor del 4 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 %, menor del 0,1 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO: 3 es menor del 6 % (por ejemplo, menor del 5,5 %, menor del 5,0 %, menor del 4,5 %, menor del 4,0 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es de aproximadamente el 2 % y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO: 3 es de aproximadamente el 2 %.

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO: 3 es menor del 1 % (por ejemplo, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %) y el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO: 3 es menor del 3 % (por ejemplo, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO: 3 es de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 0,5 % (por ejemplo, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,35 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,45 % o aproximadamente el 0,5 %) y el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO: 3 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 % (por ejemplo, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,1 %, aproximadamente el 1,2 %, aproximadamente el 1,3 %, aproximadamente el 1,4 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,6 %, aproximadamente el 1,7 %, aproximadamente el 1,8 %, aproximadamente el 1,9 % o aproximadamente el 2 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO: 3 es menor del 1 % (por ejemplo, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO: 3 es menor del 6 % (por ejemplo, menor del 5,5 %, menor del 5,0 %, menor del 4,5 %, menor del 4,0 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO: 3 es de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 0,5 % (por ejemplo, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,35 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,45 % o aproximadamente el 0,5 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO: 3 es de aproximadamente el 2 %.

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO: 3 es menor del 3 % (por ejemplo, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO: 3 es menor del 6 % (por ejemplo, menor del 5,5 %, menor del 5,0 %, menor del 4,5 %, menor del 4,0 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 % (por ejemplo, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,1 %, aproximadamente el 1,2 %, aproximadamente el 1,3 %, aproximadamente el 1,4 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,6 %, aproximadamente el 1,7 %, aproximadamente el 1,8 %, aproximadamente el 1,9 % o aproximadamente el 2 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 2 %.

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es menor del 5 % (por ejemplo, menor del 4,5 %, menor del 4 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 %, menor del 0,1 %), el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es menor del 1 % (por ejemplo, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %) y el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es menor del 3 % (por ejemplo, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es de aproximadamente el 2 %, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 0,5 % (por ejemplo, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,35 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,45 % o aproximadamente el 0,5 %) y el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 % (por ejemplo, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,1 %, aproximadamente el 1,2 %, aproximadamente el 1,3 %, aproximadamente el 1,4 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,6 %, aproximadamente el 1,7 %, aproximadamente el 1,8 %, aproximadamente el 1,9 % o aproximadamente el 2 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es menor del 5 % (por ejemplo, menor del 4,5 %, menor del 4 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 %, menor del

0,1 %), el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es menor del 1 % (por ejemplo, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es menor del 6 % (por ejemplo, menor del 5,5 %, menor del 5,0 %, menor del 4,5 %, menor del 4,0 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es de aproximadamente el 2 %, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 0,5 % (por ejemplo, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,35 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,45 % o aproximadamente el 0,5 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 2 %.

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es menor del 5 % (por ejemplo, menor del 4,5 %, menor del 4 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 %, menor del 0,1 %), el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es menor del 3 % (por ejemplo, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es menor del 6 % (por ejemplo, menor del 5,5 %, menor del 5,0 %, menor del 4,5 %, menor del 4,0 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 %, menor del 0,1 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es menor del 6 % (por ejemplo, menor del 5,5 %, menor del 5,0 %, menor del 4,5 %, menor del 4,0 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 %, menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es de aproximadamente el 2 %, el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 % (por ejemplo, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,1 %, aproximadamente el 1,2 %, aproximadamente el 1,3 %, aproximadamente el 1,4 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,6 %, aproximadamente el 1,7 %, aproximadamente el 1,8 %, aproximadamente el 1,9 % o aproximadamente el 2 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 2 %.

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es menor del 1 % (por ejemplo, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %), el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es menor del 3 % (por ejemplo, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es menor del 6 % (por ejemplo, menor del 5,5 %, menor del 5,0 %, menor del 4,5 %, menor del 4,0 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 0,5 % (por ejemplo, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,35 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,45 % o aproximadamente el 0,5 %), el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 % (por ejemplo, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,1 %, aproximadamente el 1,2 %, aproximadamente el 1,3 %, aproximadamente el 1,4 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,6 %, aproximadamente el 1,7 %, aproximadamente el 1,8 %, aproximadamente el 1,9 % o aproximadamente el 2 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 2 %.

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es menor del 5 % (por ejemplo, menor del 4,5 %, menor del 4 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 %, menor del 0,1 %), el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es menor del 1 % (por ejemplo, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %), el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es menor del 3 % (por ejemplo, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es menor del 6 % (por ejemplo, menor del 5,5 %, menor del 5,0 %, menor del 4,5 %, menor del 4,0 %, menor del 3,5 %, menor del 3 %, menor del 2,5 %, menor del 2,0 %, menor del 1,8 %, menor del 1,5 %, menor del 1,2 %, menor del 1,0 %, menor del 0,8 %, menor del 0,6 %, menor del 0,5 %, menor del 0,4 %, menor del 0,3 %, menor del 0,2 % o menor del 0,1 %).

En una realización, el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es de aproximadamente el 2 %, el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 0,5 % (por ejemplo, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,35 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,45 % o aproximadamente el 0,5 %), el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 % (por ejemplo, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,1 %, aproximadamente el 1,2 %, aproximadamente el 1,3 %, aproximadamente el 1,4 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,6 %, aproximadamente el 1,7 %, aproximadamente el 1,8 %, aproximadamente el 1,9 % o aproximadamente el 2 %) y el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 2 %.

El nivel de oxidación de las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante espectrometría de masas. En una realización, el nivel de oxidación se determina mediante cromatografía de líquidos con espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM), por ejemplo, sin limitación, usando el método de CL-EM/EM ilustrado en el ejemplo 2.

En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento comprende además albúmina sérica humana (HSA). En determinadas realizaciones, la composición comprende aproximadamente 0,5 mg de HSA por 100 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa. En determinadas realizaciones, la HSA es HSA recombinante. En realizaciones específicas, la HSA recombinante está libre de productos animales. En realizaciones específicas, la HSA recombinante no se produce a partir de un animal. En realizaciones específicas, la HSA recombinante se produce a partir de un microorganismo, tal como bacterias. En realizaciones específicas, la HSA recombinante se produce a partir de un sistema de expresión de origen vegetal. En determinadas realizaciones, la HSA se deriva de plasma humano.

En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento comprende además cloruro de sodio. En determinadas realizaciones, la composición comprende aproximadamente 0,9 mg de cloruro de sodio por 100 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa.

En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. En diversos aspectos y realizaciones, el portador farmacéuticamente aceptable comprende albúmina sérica humana y cloruro de sodio.

En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento es una composición líquida. En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento es una composición sólida. En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento es una composición secada al vacío. En determinadas realizaciones, la composición descrita en el presente documento es una composición secada por congelación. En determinadas realizaciones, la composición descrita en el presente documento es una composición farmacéutica en polvo. En realizaciones específicas, la composición descrita en el presente documento es un producto farmacológico. En una realización específica, la composición descrita en el presente documento es un producto farmacológico y comprende además HSA (por ejemplo, aproximadamente 0,5 mg de HSA por 100 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa) y cloruro de sodio (por ejemplo, aproximadamente 0,9 mg de cloruro de sodio por 100 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa). En realizaciones específicas, la composición descrita en el presente documento es un principio activo. En una realización específica, la composición descrita en el presente documento es un principio activo en una disolución adecuada para su almacenamiento.

En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento está libre de productos animales. En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento no contiene ningún inhibidor de proteasas. En determinadas realizaciones, la composición descrita en el presente documento no contiene clorhidrato de benzamidina. En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce por bacterias *Clostridium botulinum* cultivadas y expandidas a partir de un banco de células de trabajo libre de productos animales. El banco de células de trabajo libre de productos animales puede producirse, por ejemplo y sin limitación, tal como se describe en el ejemplo 6.

En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento comprende aproximadamente 50 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa. En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento comprende aproximadamente 100 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa. En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento comprende aproximadamente 200 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa.

En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce en una condición de fermentación que comprende una temperatura de fermentación de choque frío.

En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce en una condición de fermentación de temperatura fría continua.

5 En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce usando una condición de fermentación (por ejemplo, un ajuste de temperatura de fermentación) tal como se describe en la sección 5.4.

10 En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce usando una condición de fermentación (por ejemplo, un ajuste de temperatura de fermentación) tal como se describe en el ejemplo 1.

En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce tal como se describe en la sección 5.4.

15 En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce tal como se describe en el ejemplo 1.

20 En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce en una cepa de tipo A de *Clostridium botulinum* (por ejemplo, la cepa Hall de tipo A de *Clostridium botulinum*). En realizaciones específicas, el complejo de BoNT/A de 900 kDa es onabotulinumtoxina A.

25 En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se purifica mediante un procedimiento cromatográfico (por ejemplo, un procedimiento cromatográfico descrito en la sección 5.4).

En una realización, la presente divulgación también se refiere a un método de tratamiento de un paciente (preferiblemente, un paciente humano) que lo necesita, que comprende administrar una composición descrita en el presente documento.

30 En una realización, la presente divulgación también se refiere a la composición descrita en el presente documento para su uso como medicamento.

35 En una realización adicional, la presente divulgación también se refiere a la composición descrita en el presente documento para su uso como medicamento, en la que el medicamento es para su uso en un método de tratamiento de un paciente que lo necesita.

5.4. Producción de BoNT/A y producción de composiciones de BoNT/A

La toxina botulínica tipo A ha sido aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos para el tratamiento de blefaroespasmos esenciales, estrabismo y espasmo hemifacial en pacientes mayores de doce años, distonía cervical, arrugas de líneas glabellares (faciales) y para el tratamiento de la hiperhidrosis. Una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica tipo A disponible comercialmente se comercializa con la marca registrada BOTOX® (onabotulinumtoxina A), disponible comercialmente de Allergan, una empresa de AbbVie, North Chicago, Illinois, EE. UU. BOTOX® contiene un complejo de toxina botulínica tipo A de 900 kDa purificado, albúmina sérica humana y cloruro de sodio envasados en forma secada al vacío estéril. El complejo de toxina botulínica tipo A en BOTOX® se prepara a partir de un cultivo de la cepa Hall de *Clostridium botulinum* que se ha hecho crecer en un medio que contiene N-Z-amina-caseína y extracto de levadura (es decir, procedimiento no APF) y se ha purificado a partir de la disolución de cultivo mediante una serie de etapas de precipitación (incluyendo precipitación con ácido) para formar un complejo cristalino que consiste en la proteína tóxica de alto peso molecular activa y una proteína hemaglutinina asociada. El complejo cristalino se redisuelve en una disolución que contiene solución salina y albúmina y se somete a esterilización por filtración usando un filtro irradiado con rayos gamma (0,2 micrómetros) antes del secado al vacío. BOTOX® puede reconstituirse con solución salina no conservada estéril antes de la inyección intramuscular. Cada vial de 100 unidades de BOTOX® consiste en una forma secada al vacío de aproximadamente 5 ng de complejo de toxina botulínica tipo A purificado, 0,5 mg de albúmina sérica humana y 0,9 mg de cloruro de sodio y está destinado para su reconstitución con solución salina normal estéril sin ningún conservante (inyección de cloruro de sodio al 0,9 %).

Se requieren varias etapas para preparar las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento adecuadas para su administración a un ser humano o animal con fines terapéuticos, diagnósticos, investigacionales o cosméticos. En una realización, estas etapas pueden incluir obtener una neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) purificada con formas tanto oxidadas como no oxidadas y luego combinar la BoNT/A purificada. Una primera etapa puede ser cultivar bacterias *Clostridium* (por ejemplo, la cepa Hall de *Clostridium botulinum*), normalmente en placas de agar, en un entorno propicio al crecimiento bacteriano, tal como en una atmósfera anaerobia caliente. La etapa de cultivo usando placas de agar permite que se obtengan colonias de *Clostridium* con morfología y otras características deseables. La etapa de cultivo también puede realizarse con bacterias a partir de un banco de células de trabajo libre de productos animales (véase, por ejemplo, el ejemplo 6). En una segunda etapa, las colonias de *Clostridium* cultivadas seleccionadas pueden fermentarse en un medio adecuado. Después de un determinado periodo de fermentación, las bacterias *Clostridium*

normalmente experimentan lisis y liberan la toxina de *Clostridium* (por ejemplo, BoNT/A) al medio. En tercer lugar, la toxina puede purificarse a partir del medio de cultivo para obtener un principio activo de toxina BoNT/A a granel o sin procesar. Preferiblemente, el principio activo de toxina BoNT/A no se habrá sometido a precipitación (por ejemplo, precipitación con etanol frío, ácido clorhídrico y/o sulfato de amonio), por ejemplo, durante la purificación. También se prefiere el principio activo de toxina BoNT/A que se haya purificado mediante cromatografía en columna, particularmente el principio activo de toxina BoNT/A que se haya producido mediante purificación usando una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Cuando se usan múltiples columnas de cromatografía para purificar la BoNT/A, es preferible que la toxina se purifique usando un procedimiento en el que se usa una columna de HIC antes de todas las demás columnas de cromatografía. Es preferible que el principio activo de BoNT/A se produzca mediante un procedimiento que lo califique para su uso bajo las regulaciones de Buenas Prácticas de Fabricación promulgadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos.

En algunas realizaciones, las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento se obtienen usando un procedimiento sustancial, esencial o completamente libre de proteínas animales (APF). El procedimiento puede comprender las siguientes etapas secuenciales: cultivar bacterias *Clostridium botulinum* (por ejemplo, la cepa Hall de *Clostridium botulinum*) en un medio de cultivo sustancialmente APF; fermentar las bacterias *Clostridium botulinum* a partir del medio de cultivo en un medio de fermentación sustancialmente APF, recoger el medio de fermentación retirando el residuo celular presente en el medio de fermentación usando filtración o centrifugación; concentrar el medio de fermentación recogido mediante filtración, tal como mediante ultrafiltración (UF); diluir el medio de fermentación concentrado mediante la adición de un tampón. Tras la dilución con el tampón, puede llevarse a cabo un procedimiento cromatográfico sustancialmente APF para obtener un complejo de BoNT/A biológicamente activo altamente purificado. En algunas realizaciones, el procedimiento APF descrito en el presente documento no implica el uso de un inhibidor de proteasas. En algunas realizaciones, el procedimiento APF descrito en el presente documento no implica el uso de clorhidrato de benzamidina. En una realización, las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento se obtienen usando el procedimiento APF dado a conocer en el ejemplo 1.

El medio de cultivo y/o de fermentación sustancialmente APF puede contener un producto proteico obtenido a partir de levadura (por ejemplo, extracto de levadura o concentrado de extracto de levadura), o a partir de una planta (por ejemplo, trigo, soja, malta, lupino, maíz, semilla de algodón, semilla de *L. campestri*, etc.). El medio de cultivo y/o de fermentación APF puede comprender además una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa) y/o una fuente de sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En una

realización, el medio usado para la fermentación de *Clostridium botulinum* está libre de subproductos animales y comprende aproximadamente 10-100 g/l (por ejemplo, 20-60 g/l) de soja hidrolizada (Hy-Soy), aproximadamente 7,5 g/l de glucosa y 5,0 g/l de NaCl, tal como se da a conocer en la patente estadounidense n.º 7.354.740, que se incorpora como referencia en el presente documento en su totalidad. En una realización, el medio de fermentación puede comprender el 3 % p/v o el 5 % p/v de Hy-Soy; el 1 % p/v de Hy-Yeast; y el 1 % p/v de glucosa, tal como se da a conocer en la patente estadounidense n.º 8.129.139, que se incorpora como referencia en el presente documento en su totalidad. En una realización, el medio de fermentación APF puede comprender peptona de soja tipo II al 3,25 % p/v, extracto de levadura al 1,2 % p/v, glucosa al 1,5 % p/v, pH ajustado a 7,3 usando hidróxido de sodio, tal como se ilustra en el ejemplo 1 a continuación.

En algunas realizaciones, las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento se obtienen en una condición de choque frío, es decir, a una temperatura que es inferior a la temperatura de fermentación típica (es decir, a aproximadamente 35 ± 1 °C) durante un corto periodo de tiempo durante el procedimiento de fermentación. En algunas realizaciones, las composiciones de BoNT/A se obtienen en condiciones de choque frío a aproximadamente 33 °C, 30 °C, 27 °C, 25 °C, 22 °C, 20 °C, 19 °C, 18 °C, 17 °C, 16 °C o 15 °C. Las condiciones de choque frío pueden durar cualquier periodo de tiempo durante todo el procedimiento de fermentación, por ejemplo, durante aproximadamente 2 horas, 5 horas, 8 horas o 10 horas dentro de un procedimiento de fermentación de 72 horas. Las condiciones de choque frío pueden producirse una vez o múltiples veces durante el procedimiento de fermentación. En algunas realizaciones, las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento se obtienen usando choque frío a aproximadamente 15 °C-20 °C (por ejemplo, aproximadamente 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C) durante aproximadamente 5 horas (por ejemplo, desde la 13ª hasta la 17ª hora en un procedimiento de fermentación de 72 horas) durante la fermentación.

En algunas realizaciones, las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento se obtienen en una condición de frío continuo, es decir, a una temperatura que es continuamente inferior (por ejemplo, aproximadamente 25 °C) que la temperatura de fermentación típica (es decir, a aproximadamente 35 ± 1 °C) durante todo el procedimiento de fermentación. En algunas realizaciones, las composiciones de BoNT/A se obtienen en una condición de frío continuo a aproximadamente 33 °C, 30 °C, 27 °C, 25 °C, 22 °C, 20 °C, 19 °C, 18 °C, 17 °C, 16 °C o 15 °C. En algunas realizaciones, las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento se obtienen fermentando un cultivo de *Clostridium botulinum* a aproximadamente 25 °C durante aproximadamente 160 horas.

En un aspecto, en el presente documento se proporciona un método de producción de una composición que comprende un complejo de BoNT/A de 900 kDa (tal como onabotulinumtoxina A), comprendiendo dicho método incubar un cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* (por ejemplo, bacterias de la cepa Hall de tipo A de *Clostridium botulinum*) en un fermentador de producción a una temperatura que es inferior a 35 °C durante un periodo de tiempo.

En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 60 horas a aproximadamente 200 horas. En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 60 horas a aproximadamente 160 horas. En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 60 horas a aproximadamente 120 horas. En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 60 horas a aproximadamente 80 horas. En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 68 horas a aproximadamente 76 horas. En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 65 horas a aproximadamente 72 horas. En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 72 horas. En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 120 horas a aproximadamente 200 horas. En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 120 horas a aproximadamente 180 horas. En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 140 horas a aproximadamente 180 horas. En determinadas realizaciones, todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 160 horas.

En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo (para la incubación a baja temperatura) es de aproximadamente 2 horas. En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo es de aproximadamente 5 horas. En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo es de aproximadamente 8 horas. En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo es de aproximadamente 10 horas. En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo es de aproximadamente 2-5 horas. En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo es de aproximadamente 5-8 horas. En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo es de aproximadamente 8-10 horas. En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo es todo el periodo de fermentación.

En determinadas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 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 o 15 °C. En determinadas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 15 °C-20 °C (por ejemplo, aproximadamente 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C). En determinadas realizaciones, la

temperatura es de aproximadamente 15 °C. En determinadas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 20 °C. En determinadas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 25 °C.

En determinadas realizaciones, el método comprende, en el siguiente orden: (a) incubar el cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en el fermentador de producción a 35 °C durante aproximadamente 12 horas; (b) ajustar la temperatura a aproximadamente 15 °C-20 °C (por ejemplo, aproximadamente 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C) al final de la etapa (a); (c) cultivar a la temperatura ajustada hasta aproximadamente 5 horas después de la etapa (a); (d) ajustar la temperatura a 35 °C al final de la etapa (c); y (e) cultivar a 35 °C hasta aproximadamente 55 horas después de la etapa (c).

En determinadas realizaciones, el método comprende incubar el cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en el fermentador de producción a 25 °C durante aproximadamente 160 horas.

En determinadas realizaciones, el método se realiza tal como se describe en el ejemplo 1.

En diversos aspectos y realizaciones, la fermentación se realiza en medios de cultivo celular libres de proteínas animales.

Un procedimiento y un sistema cromatográfico libres de productos animales o sustancialmente libres de productos animales pueden usarse para purificar un cultivo clarificado de *Clostridium botulinum* obtenido a partir de los procedimientos de fermentación APF descritos en el presente documento. El procedimiento y el sistema cromatográfico pueden incluir una columna, dos columnas o tres columnas. Por ejemplo, el procedimiento y el sistema cromatográfico pueden comprender una, dos o tres etapas: una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y/o una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) y/o una cromatografía de intercambio catiónico. En algunas realizaciones, el procedimiento cromatográfico comprende una primera etapa de someter el cultivo de BoNT/A obtenido a partir del procedimiento APF a una HIC, seguido de someter un eluyente que contiene BoNT/A procedente de la HIC a una AEX y luego seguido de someter la disolución capturada que contiene BoNT/A procedente de la AEX a una CEX. En algunas realizaciones, el procedimiento de purificación basado en cromatografía comprende además procesar el eluyente procedente de las columnas mediante diafiltración (DF) y filtrar el eluyente procesado. En algunas realizaciones, el procedimiento de purificación basado en cromatografía es tal como se da a conocer en la patente estadounidense n.º 8.129.139, que se incorpora como referencia en el presente documento en su totalidad.

El complejo de BoNT/A obtenido a partir de los procedimientos de fermentación y purificación APF descritos en el presente documento es biológicamente activo y está altamente purificado. En una realización, las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento comprenden menos del 3 % (por ejemplo, menos del 2,5 %, menos del 2,0 %, menos del 1,8 %, menos del 1,5 %, menos del 1,2 %, menos del 1,0 %, menos del 0,8 %, menos del 0,6 %, menos del 0,5 %, menos del 0,4 %, menos del 0,3 %, menos del 0,2 % o menos del 0,1 %) de proteína de células huésped. El nivel de la proteína de células huésped puede evaluarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento-exclusión molecular (SEC-HPLC) o SEC-HPLC en conjugación con dispersión de luz láser de ángulo múltiple (MALLS) tal como se da a conocer en Lietzow *et al.* (2008) *Protein J* 27:420-425, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. En una realización, el porcentaje de la proteína de células huésped en las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento se determina usando SEC-HPLC, por ejemplo, usando el método de SEC-HPLC tal como se ilustra en el ejemplo 3.

En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce por una cepa de tipo A de *Clostridium botulinum* (por ejemplo, la cepa Hall de tipo A de *Clostridium botulinum*). En realizaciones específicas, el complejo de BoNT/A de 900 kDa es onabotulinumtoxina A.

En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce tal como se describe en el ejemplo 5, el ejemplo 6 o el ejemplo 7.

En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce usando una o más etapas tal como se describe en el ejemplo 5, el ejemplo 6 o el ejemplo 7.

En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que comprende una o más etapas de cromatografía en columna realizadas durante la purificación del complejo de BoNT/A de 900 kDa.

En realizaciones preferidas, la una o más etapas de cromatografía en columna realizadas durante la purificación del complejo de BoNT/A de 900 kDa comprenden cromatografía de interacción hidrófoba. En realizaciones específicas, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden cromatografía de intercambio aniónico. En realizaciones específicas, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden cromatografía de intercambio catiónico.

En realizaciones específicas, la una o más etapas de cromatografía en columna realizadas durante la purificación del complejo de BoNT/A de 900 kDa comprenden cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico. En una realización específica, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden, en el siguiente orden, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico. En una realización específica, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden, en el siguiente orden, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrófoba.

En realizaciones específicas, la una o más etapas de cromatografía en columna realizadas durante la purificación del complejo de BoNT/A de 900 kDa comprenden cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio catiónico. En una realización específica, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden, en el siguiente orden, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio catiónico. En una realización específica, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden, en el siguiente orden, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de interacción hidrófoba.

En realizaciones específicas, la una o más etapas de cromatografía en columna realizadas durante la purificación del complejo de BoNT/A de 900 kDa comprenden cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico. En una realización específica, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden, en el siguiente orden, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico. En una realización específica, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden, en el siguiente orden, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico.

En realizaciones específicas, la una o más etapas de cromatografía en columna realizadas durante la purificación del complejo de BoNT/A de 900 kDa comprenden cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico. En una realización preferida, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden, en el siguiente orden, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico. En una realización específica, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden, en el siguiente orden, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico. En una realización específica, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden, en el siguiente orden, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de interacción hidrófoba. En una realización específica, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden, en el

siguiente orden, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio catiónico. En una realización específica, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden, en el siguiente orden, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrófoba. En una realización

5 específica, la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden, en el siguiente orden, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico.

En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que no comprende ninguna etapa de precipitación con etanol frío, ácido clorhídrico o sulfato de amonio durante la purificación del complejo de BoNT/A de 900 kDa. En realizaciones

10 específicas, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que no comprende ninguna etapa de precipitación con etanol frío. En realizaciones específicas, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que no comprende ninguna etapa de precipitación con ácido clorhídrico. En realizaciones específicas, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que no comprende ninguna etapa de precipitación con sulfato de amonio.

15

En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas: someter el cultivo de fermentación a precipitación con ácido usando ácido sulfúrico 3 M para reducir el pH hasta 3,5 a una temperatura inferior a 25 °C, someter el precipitado ácido a filtración de flujo tangencial (por ejemplo, filtración de flujo tangencial de 0,1 µm) para concentrar la masa celular, ajustar el pH a aproximadamente 6,0, añadir una o más

20 nucleasas para reducir el contenido de ácido nucleico de células huésped, clarificar mediante centrifugación para retirar el residuo celular y filtrar a 0,2 µm con la adición de sulfato de amonio.

25

En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que comprende una o más de las siguientes etapas: someter el cultivo de fermentación a precipitación con ácido usando ácido sulfúrico 3 M para reducir el pH hasta 3,5 a una temperatura inferior a 25 °C, someter el precipitado ácido a filtración de flujo tangencial (por ejemplo, filtración de

30 flujo tangencial de 0,1 µm) para concentrar la masa celular, ajustar el pH a aproximadamente 6,0, añadir una o más nucleasas para reducir el contenido de ácido nucleico de células huésped, clarificar mediante centrifugación para retirar el residuo celular y filtrar a 0,2 µm con la adición de sulfato de amonio.

- En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas y en el siguiente orden: someter el cultivo de fermentación a precipitación con ácido usando ácido sulfúrico 3 M para reducir el pH hasta 3,5 a una temperatura inferior a 25 °C, someter el precipitado ácido a filtración de flujo tangencial (por ejemplo, 5 filtración de flujo tangencial de 0,1 µm) para concentrar la masa celular, ajustar el pH a aproximadamente 6,0, añadir una o más nucleasas para reducir el contenido de ácido nucleico de células huésped, clarificar mediante centrifugación para retirar el residuo celular y filtrar a 0,2 µm con la adición de sulfato de amonio.
- 10 En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas: someter el cultivo de fermentación a precipitación con ácido usando ácido sulfúrico 3 M para reducir el pH hasta 3,5 a una temperatura inferior a 25 °C, someter el precipitado ácido a filtración de flujo tangencial (por ejemplo, filtración de flujo tangencial de 0,1 µm) para concentrar la masa celular, ajustar el pH a aproximadamente 6,0, añadir una o más 15 nucleasas para reducir el contenido de ácido nucleico de células huésped, clarificar mediante centrifugación para retirar el residuo celular, filtrar a 0,2 µm con la adición de sulfato de amonio y someter el filtrado a cromatografía de interacción hidrófoba (opcionalmente seguido de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico).
- 20 En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que comprende una o más de las siguientes etapas: someter el cultivo de fermentación a precipitación con ácido usando ácido sulfúrico 3 M para reducir el pH hasta 3,5 a una temperatura inferior a 25 °C, someter el precipitado ácido a filtración de flujo tangencial (por ejemplo, filtración de 25 flujo tangencial de 0,1 µm) para concentrar la masa celular, ajustar el pH a aproximadamente 6,0, añadir una o más nucleasas para reducir el contenido de ácido nucleico de células huésped, clarificar mediante centrifugación para retirar el residuo celular, filtrar a 0,2 µm con la adición de sulfato de amonio y someter el filtrado a cromatografía de interacción hidrófoba (opcionalmente seguido de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico).
- 30 En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas y en el siguiente orden: someter el cultivo de fermentación a precipitación con ácido usando ácido sulfúrico 3 M para reducir el pH hasta 3,5 a una temperatura inferior a 25 °C, someter el precipitado ácido a filtración de flujo tangencial (por ejemplo, 35 filtración de flujo tangencial de 0,1 µm) para concentrar la masa celular, ajustar el pH a aproximadamente 6,0, añadir una o más nucleasas para reducir el contenido de ácido nucleico de células

huésped, clarificar mediante centrifugación para retirar el residuo celular, filtrar a 0,2 µm con la adición de sulfato de amonio y someter el filtrado a cromatografía de interacción hidrófoba (opcionalmente seguido de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico).

5 En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas: someter el cultivo de fermentación a precipitación con ácido usando ácido sulfúrico 3 M para reducir el pH hasta 3,5 a una temperatura inferior a 25 °C, someter el precipitado ácido a filtración de flujo tangencial (por ejemplo, filtración de flujo tangencial de 0,1 µm) para concentrar la masa celular, ajustar el pH a aproximadamente 6,0, añadir una o más
10 nucleasas para reducir el contenido de ácido nucleico de células huésped, clarificar mediante centrifugación para retirar el residuo celular, filtrar a 0,2 µm con la adición de sulfato de amonio, cargar el filtrado sobre una columna de interacción hidrófoba, eluir con un gradiente descendente de sulfato de amonio y aislar el pico de producto (opcionalmente seguido de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico).

15 En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que comprende una o más de las siguientes etapas: someter el cultivo de fermentación a precipitación con ácido usando ácido sulfúrico 3 M para reducir el pH hasta 3,5 a una temperatura inferior a 25 °C, someter el precipitado ácido a filtración de flujo tangencial (por ejemplo, filtración de
20 flujo tangencial de 0,1 µm) para concentrar la masa celular, ajustar el pH a aproximadamente 6,0, añadir una o más nucleasas para reducir el contenido de ácido nucleico de células huésped, clarificar mediante centrifugación para retirar el residuo celular, filtrar a 0,2 µm con la adición de sulfato de amonio, cargar el filtrado sobre una columna de interacción hidrófoba, eluir con un gradiente descendente de sulfato de amonio y aislar el pico de producto (opcionalmente seguido de cromatografía de intercambio aniónico
25 y cromatografía de intercambio catiónico).

En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas y en el siguiente orden: someter el cultivo de fermentación a precipitación con ácido usando ácido sulfúrico 3 M para reducir el pH hasta 3,5 a una
30 temperatura inferior a 25 °C, someter el precipitado ácido a filtración de flujo tangencial (por ejemplo, filtración de flujo tangencial de 0,1 µm) para concentrar la masa celular, ajustar el pH a aproximadamente 6,0, añadir una o más nucleasas para reducir el contenido de ácido nucleico de células huésped, clarificar mediante centrifugación para retirar el residuo celular, filtrar a 0,2 µm con la adición de sulfato de amonio, cargar el filtrado sobre una columna de interacción hidrófoba, eluir con un

gradiente descendente de sulfato de amonio y aislar el pico de producto (opcionalmente seguido de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico).

En determinadas realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce por bacterias
5 *Clostridium botulinum* cultivadas y expandidas a partir de un banco de células de trabajo libre de productos animales.

En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que no implica el uso de un inhibidor de proteasas. En determinadas realizaciones, el
10 complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce mediante un procedimiento que no implica el uso de clorhidrato de benzamidina.

Después de la estabilización en una disolución adecuada, el principio activo de BoNT/A a granel puede combinarse con uno o más excipientes (por ejemplo, albúmina sérica humana, tal como albúmina sérica
15 humana recombinante, y cloruro de sodio) y luego puede someterse a esterilización por filtración para preparar una composición farmacéutica adecuada para su administración a un ser humano. Un ejemplo de una BoNT/A de este tipo es onabotulinumtoxina A. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse como una forma sólida (por ejemplo, como polvo) mediante secado (por ejemplo, secado al vacío o secado por congelación). Las composiciones farmacéuticas sólidas pueden almacenarse y
20 reconstituirse antes de la inyección. La composición farmacéutica también puede estar en forma líquida (por ejemplo, como disolución). Las composiciones farmacéuticas líquidas pueden almacenarse y usarse directamente para la inyección. Las composiciones farmacéuticas de BoNT/A descritas en el presente documento pueden comprender un complejo de neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) de 900 kDa como principio farmacéutico activo. La composición farmacéutica también
25 puede incluir uno o más excipientes, tampones, portadores, estabilizadores, conservantes y/o espesantes. Preferiblemente, tales composiciones farmacéuticas son química y físicamente estables, de manera que el principio farmacéutico activo de BoNT/A sigue siendo adecuado para su uso como producto farmacéutico tras su almacenamiento. Los productos de BoNT/A pueden almacenarse a temperatura ambiente, en condiciones refrigerados o por debajo de 0 °C. Es preferible que la BoNT/A siga siendo
30 estable durante su almacenamiento durante al menos aproximadamente 12 meses, más preferiblemente al menos aproximadamente 18 meses.

En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento está libre de productos animales. En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente
35 documento no contiene ningún inhibidor de proteasas. En determinadas realizaciones, la composición

descrita en el presente documento no contiene clorhidrato de benzamidina. En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento se produce mediante un procedimiento que no implica el uso de un inhibidor de proteasas. En determinadas realizaciones, la composición descrita en el presente documento se produce mediante un procedimiento que no implica el uso de clorhidrato de benzamidina. En diversos aspectos y realizaciones, el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce por bacterias *Clostridium botulinum* cultivadas y expandidas a partir de un banco de células de trabajo libre de productos animales. El banco de células de trabajo libre de productos animales puede producirse, por ejemplo y sin limitación, tal como se describe en el ejemplo 6.

- 10 En algunas realizaciones, una composición libre de productos animales está libre de albúmina sérica humana (HSA) de origen humano. En algunas realizaciones, una composición libre de productos animales está libre de nucleasas de origen animal. En algunas realizaciones, una composición libre de productos animales comprende HSA producida de manera recombinante. En algunas realizaciones, la HSA producida de manera recombinante está disponible comercialmente o se conoce en la técnica. En 15 algunas realizaciones, una composición libre de productos animales está libre de sulfato de amonio. En algunas realizaciones, una composición libre de productos animales comprende resina de cromatografía.

- En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento comprende además albúmina sérica humana (HSA). En determinadas realizaciones, la composición comprende 20 aproximadamente 0,5 mg de HSA por 100 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa. En determinadas realizaciones, la HSA es HSA recombinante. En realizaciones específicas, la HSA recombinante está libre de productos animales. En realizaciones específicas, la HSA recombinante no se produce a partir de un animal. En realizaciones específicas, la HSA recombinante se produce a partir de un microorganismo, tal como bacterias. En realizaciones específicas, la HSA recombinante se produce a partir de un sistema de expresión de origen vegetal. En determinadas realizaciones, la HSA se deriva de plasma humano. 25

- En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento comprende además cloruro de sodio. En determinadas realizaciones, la composición comprende aproximadamente 30 0,9 mg de cloruro de sodio por 100 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa.

- En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento comprende aproximadamente 50 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa. En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento comprende aproximadamente 35 100 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa. En diversos aspectos y realizaciones, la

composición descrita en el presente documento comprende aproximadamente 200 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa.

En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento es una
 5 composición líquida. En diversos aspectos y realizaciones, la composición descrita en el presente documento es una composición sólida. En determinadas realizaciones, la composición descrita en el presente documento es una composición secada al vacío. En determinadas realizaciones, la composición descrita en el presente documento es una composición secada por congelación. En determinadas realizaciones, la composición descrita en el presente documento es una composición farmacéutica en
 10 polvo. En realizaciones específicas, la composición descrita en el presente documento es un producto farmacológico. En una realización específica, la composición descrita en el presente documento es un producto farmacológico y comprende además HSA (por ejemplo, aproximadamente 0,5 mg de HSA por 100 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa) y cloruro de sodio (por ejemplo, aproximadamente 0,9 mg de cloruro de sodio por 100 unidades del complejo de BoNT/A de 900 kDa). En realizaciones
 15 específicas, la composición descrita en el presente documento es un principio activo. En una realización específica, la composición descrita en el presente documento es un principio activo en una disolución adecuada para su almacenamiento.

En un aspecto, en el presente documento se proporciona una composición de BoNT/A producida
 20 mediante un método o procedimiento descrito en esta sección 5.4.

5.5. Caracterización de las composiciones de BoNT/A

En una realización, las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento tienen una potencia de al menos aproximadamente $1,5 \times 10^7$ unidades/mg o de al menos aproximadamente
 25 $2,0 \times 10^7$ unidades/mg, por ejemplo, de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ a aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg, de aproximadamente $2,0 \times 10^7$ a aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg, de aproximadamente $2,4 \times 10^7$ a aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg, de aproximadamente $2,4 \times 10^7$ a aproximadamente $5,9 \times 10^7$ unidades/mg, de aproximadamente $2,4 \times 10^7$ a aproximadamente $5,8 \times 10^7$ unidades/mg, de aproximadamente $2,4 \times 10^7$ a aproximadamente $5,7 \times 10^7$ unidades/mg, de
 30 aproximadamente $2,4 \times 10^7$ a aproximadamente $5,6 \times 10^7$ unidades/mg, de aproximadamente $2,4 \times 10^7$ a aproximadamente $5,5 \times 10^7$ unidades/mg, de aproximadamente $2,4 \times 10^7$ a aproximadamente $5,4 \times 10^7$ unidades/mg, de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ a aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg, de aproximadamente $2,6 \times 10^7$ a aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg, de aproximadamente $2,7 \times 10^7$ a aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg, de aproximadamente $2,8 \times 10^7$ a aproximadamente

6,0×10⁷ unidades/mg, de aproximadamente 2,9×10⁷ a aproximadamente 6,0×10⁷ unidades/mg, de aproximadamente 3,0×10⁷ a aproximadamente 6,0×10⁷ unidades/mg, o cualquier número entre tales intervalos.

- 5 En una realización, las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento tienen una potencia de aproximadamente 2,4×10⁷ unidades/mg a aproximadamente 5,4×10⁷ unidades/mg. En realizaciones preferidas, el término “unidad” usado en el presente documento se refiere a la dosis DL₅₀.

- En diversas realizaciones y aspectos, una composición de BoNT/A descrita en el presente documento
- 10 tiene una potencia mayor que una composición de BoNT/A disponible comercialmente que se conoce en la técnica. En determinadas realizaciones, una composición de BoNT/A descrita en el presente documento tiene una potencia que es al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 100 %, al menos 1,5 veces o al menos 2 veces mayor que la potencia de una composición de
- 15 BoNT/A disponible comercialmente que se conoce en la técnica. En determinadas realizaciones, una composición de BoNT/A descrita en el presente documento tiene una potencia que es al menos 0,1×10⁷ unidades/mg, al menos 0,2×10⁷ unidades/mg, al menos 0,3×10⁷ unidades/mg, al menos 0,4×10⁷ unidades/mg, al menos 0,5×10⁷ unidades/mg, al menos 0,6×10⁷ unidades/mg, al menos 0,7×10⁷ unidades/mg, al menos 0,8×10⁷ unidades/mg, al menos 0,9×10⁷ unidades/mg, al menos
- 20 1×10⁷ unidades/mg, al menos 1,5×10⁷ unidades/mg, al menos 2×10⁷ unidades/mg, al menos 3×10⁷ unidades/mg o al menos 4×10⁷ unidades/mg mayor que la potencia de una composición de BoNT/A disponible comercialmente que se conoce en la técnica.

- La potencia de las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento puede determinarse
- 25 con métodos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, por ejemplo, ensayo de cromatografía de líquidos de alto rendimiento-actividad de cadenas ligeras (LCA-HPLC), ensayo de dosis letal del 50 % (DLM₅₀) en ratón, ensayo de puntuación de abducción de los dedos (DAS) en ratón, ensayo de SNAP-25, ensayo de potencia basado en células (CBPA), etc.

- 30 El ensayo LCA-HPLC mide la especificidad de escisión de SNAP-25. Las muestras se hacen reaccionar con un sustrato fluorescente de BoNT/A disponible comercialmente derivado de la secuencia de SNAP-25. Se separan los productos de escisión marcados con fluorescencia y se detectan mediante un método de HPLC de fase inversa (RP). Pueden encontrarse una descripción adicional del ensayo LCA-HPLC en las publicaciones Hunt *et al.* (2010) *Toxins* 2(8):2198-2212 y Rupp *et al.* (2020) *Toxins* 12(6):393,
- 35 cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

En una realización, la potencia se determina usando un ensayo de dosis letal del 50 % (DLM₅₀) en ratón. El ensayo de dosis letal del 50 % (DLM₅₀) en ratón se ha descrito, por ejemplo, en Schantz y Kautter (1978) *Journal of the AOAC* 61(1):96-99, Hunt y Kenneth (2009) *Clinical Neuropharmacology* 32(1):28-31, la patente estadounidense n.º 7.160.699 y la patente estadounidense n.º 9.725.705, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. El ensayo de dosis letal del 50 % (DLM₅₀) en ratón es un método para medir la potencia de una toxina botulínica mediante inyección intraperitoneal de la toxina botulínica en ratonas (de aproximadamente cuatro semanas de edad) que pesan, cada una, 17-22 gramos al inicio del ensayo. Cada ratona se mantiene en decúbito supino con su cabeza inclinada hacia abajo y se le inyecta por vía intraperitoneal en el abdomen derecho inferior a un ángulo de aproximadamente 30 grados usando una aguja de 3/8" a 5/8" de calibre 25 a 27 con una de varias diluciones en serie de la toxina botulínica en solución salina. Se registran las tasas de mortalidad durante las 72 horas siguientes para cada dilución. Se preparan las diluciones de modo que la dilución más concentrada produzca una tasa de mortalidad de al menos el 80 % de los ratones inyectados y la dilución menos concentrada produzca una tasa de mortalidad de no más del 20 % de los ratones inyectados. Debe haber un mínimo de cuatro diluciones que se encuentren dentro del intervalo decreciente monótono de las tasas de mortalidad. El intervalo decreciente monótono comienza con una tasa de mortalidad de no menos del 80 %. Dentro de las cuatro o más tasas decrecientes monótonas, las dos tasas más grandes y las dos tasas más pequeñas deben ser decrecientes (es decir, no equivalentes). La dilución a la que mueren el 50 % de los ratones en el periodo de observación tras la inyección de tres días se define como una dilución que comprende una unidad (1 U) de la toxina botulínica.

El ensayo de puntuación de abducción de los dedos (DAS) en ratón es una evaluación *in vivo* de la parálisis muscular inducida por toxina tras la inyección de toxina BoNT/A en el músculo de la extremidad trasera de un roedor. El ensayo DAS puede usarse para evaluar la potencia de composiciones de BoNT/A en la parálisis muscular, así como la duración de acción. Se han dado a conocer protocolos detallados del ensayo DAS en Aoki *et al.* (1999) *Eur. J. Neurol.* 6:s3-s10, Aoki (2001) *Toxicon* 39: 1815-1820, Broide *et al.* (2013) *Toxicon* 71:18-24 y Rupp *et al.* (2020) *Toxins* 12(6):393, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Por ejemplo, el ensayo DAS puede realizarse mediante la inyección de una composición de BoNT/A descrita en el presente documento en el complejo gastrocnemio/sóleo del ratón, seguido de la evaluación de la puntuación de abducción de los dedos usando el método de Aoki (2001) *Toxicon* 39: 1815-1820. En el ensayo DAS, los ratones se suspenden brevemente por la cola con el fin de provocar una respuesta de sobresalto característica en la que el ratón extiende sus extremidades posteriores y abduce sus dedos posteriores.

Tras la inyección de la composición de BoNT/A, se puntúan los grados variables de abducción de los dedos en una escala de cinco puntos (de 0=normal a 4=reducción máxima en la abducción de los dedos y la extensión de las patas). También puede determinarse la razón de seguridad, la razón entre la cantidad de una toxina requerida para una disminución del 10 % en el peso corporal (medida a un efecto máximo en el plazo de los primeros siete días después de la administración de dosis en un ratón) y la cantidad de toxina requerida para una puntuación de DAS de 2, para evaluar el índice terapéutico de la composición de BoNT/A descrita en el presente documento, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 9.920.310, que se incorpora como referencia en el presente documento en su totalidad. Por tanto, se desean altas puntuaciones de razón de seguridad, e indican una toxina que puede paralizar eficazmente un músculo objetivo con pocos efectos inespecíficos no deseados.

El ensayo SNAP-25 es un método basado en ELISA para medir la actividad proteolítica de SNAP-25 de la toxina botulínica. El ensayo usa una proteína SNAP-25 truncada (el péptido de 206 residuos de aminoácido) unida a placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno y un anticuerpo monoclonal que reconoce el producto escindido (un péptido de 197 residuos de aminoácido) que se prepara mediante la hidrólisis enzimática entre los aminoácidos 197 y 198 de SNAP-25 por toxina botulínica tipo A reducida. Luego se detecta el anticuerpo monoclonal unido al producto escindido con un anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante HRP), que produce un cambio de color en presencia de un sustrato cromógeno (TMB). Se describen métodos de SNAP-25 a modo de ejemplo en Ekong *et al.* (1997) *Microbiology* 143:3337-3347 y la patente estadounidense n.º 7.160.699, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia.

El ensayo de potencia basado en células (CBPA) se ha descrito, por ejemplo, en Fernández-Salas *et al.* (2012) *PLOS ONE* 7(11):e49516, Rupp *et al.* (2020) *Toxins* 12(6):393, documento WO 2010/105234 y documento WO 2009/114748, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia. En una realización, se usa CBPA electroquimioluminiscente (ECL) de SiMa H1 y SNAP-25₁₉₇ para determinar la potencia de las composiciones de BoNT/A descritas en el presente documento. CBPA electroquimioluminiscente (ECL) de SiMa H1 y SNAP-25₁₉₇ es un ensayo basado en células *in vitro* que mide las etapas clave de la intoxicación por BoNT/A: unión a e internalización en las células mediadas por receptores, translocación del dominio de proteasa (cadena ligera) al citosol y escisión proteolítica de SNAP-25, lo que permite una comparación directa de la actividad biológica del producto de BoNT/A *in vitro* (Fernández-Salas *et al.* (2012) *PLOS ONE* 7(11):e49516; Rupp *et al.* (2020) *Toxins* 12(6):393). Brevemente, se siembran células SiMa H1 de neuroblastoma humano sobre placas de 96 pocillos de poli-D-lisina (PDL) en medio libre de suero (SFM) con 25 µg/ml de GT_{1b} durante tres días

y se tratan con muestras de toxina durante 24 horas. Después del tratamiento, se retiran las toxinas, se someten las células a lisis y se transfieren los lisados a placas MSD High Bind recubiertas con anticuerpo monoclonal (AcM) anti-SNAP-25₁₉₇ 2E2A6. Luego se lavan las placas y se incuban con anticuerpo policlonal (AcP) anti-SNAP-25 marcado con éster de NHS con etiqueta SULFO para la detección.

5 Luego se cuantifica SNAP-25 capturada y escindida por toxina BoNT/A en un lector de placas MSD.

5.6. Realizaciones ilustrativas

La presente divulgación incluye las siguientes realizaciones ilustrativas no limitativas.

- 10 1. Una composición que comprende una pluralidad de especies de complejo de neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) de 900 kDa, en la que el nivel de oxidación de las especies de neurotoxina de 150 kDa presentes en la composición es menor del 6 % en cada una de las siguientes posiciones: 411 (M411) tal como se muestra en SEQ ID NO: 2, 550 (M550) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3, 1004 (M1004) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 y 1144 (M1144) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3.
- 15 2. La composición según la realización 1, en la que el complejo de BoNT/A de 900 kDa es onabotulinumtoxina A.
3. La composición según la realización 1 ó 2, en la que el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es menor del 5 %.
- 20 4. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-3, en la que el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es de aproximadamente el 2 %.
5. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-4, en la que el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es menor del 1 %.
- 25 6. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-5, en la que el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 0,5 %.
7. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-6, en la que el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es menor del 3 %.
8. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-7, en la que el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 %.
- 30 9. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-8, en la que el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es menor del 6 %.
10. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-9, en la que el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 2 %.

11. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-10, en la que el nivel de oxidación se determina mediante CL-EM/EM.
12. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-11, en la que la composición comprende menos del 3 % de proteína de células huésped.
- 5 13. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-12, en la que la composición tiene una potencia de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ unidades/mg a aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg.
14. La composición según la realización 13, en la que la potencia se determina usando un ensayo de dosis letal del 50 % (DLM₅₀) en ratón.
- 10 15. La composición según la realización 13, en la que la potencia se determina usando un ensayo de potencia basado en células.
16. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-15, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
17. La composición según la realización 16, en la que el portador farmacéuticamente aceptable
15 comprende albúmina sérica humana y cloruro de sodio.
18. La composición según la realización 16, en la que la composición se seca al vacío.
19. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-15, en la que el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce en una condición de fermentación que comprende una temperatura de fermentación de choque frío.
- 20 20. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-15, en la que el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce en una condición de fermentación de temperatura fría continua.
21. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-15, en la que el complejo de BoNT/A de 900 kDa se purifica mediante una o más etapas de cromatografía en columna.
22. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-21, en la que la una o más etapas
25 de cromatografía en columna comprenden cromatografía de interacción hidrófoba.
23. La composición según la realización 22, en la que la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden además cromatografía de intercambio aniónico.
24. La composición según la realización 22 ó 23, en la que la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden además cromatografía de intercambio catiónico.
- 30 25. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-24, en la que el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce por bacterias *Clostridium botulinum* cultivadas y expandidas a partir de un banco de células de trabajo libre de productos animales.
26. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-25, que está libre de productos animales.

27. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-26, que no contiene ningún inhibidor de proteasas.
28. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-27, que no contiene clorhidrato de benzamidina.
- 5 29. Un método de producción de una composición que comprende BoNT/A, comprendiendo dicho método incubar un cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en un fermentador de producción a una temperatura que es inferior a 35 °C durante un periodo de tiempo.
30. El método según la realización 29, en el que todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 72 horas.
- 10 31. El método según la realización 29, en el que todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 160 horas.
32. El método según una cualquiera de las realizaciones 29-31, en el que el periodo de tiempo es de aproximadamente 5 horas.
33. El método según una cualquiera de las realizaciones 29-31, en el que el periodo de tiempo es todo el periodo de fermentación.
- 15 34. El método según una cualquiera de las realizaciones 29-33, en el que la temperatura es de aproximadamente 15 °C.
35. El método según una cualquiera de las realizaciones 29-33, en el que la temperatura es de aproximadamente 20 °C.
- 20 36. El método según una cualquiera de las realizaciones 29-33, en el que la temperatura es de aproximadamente 25 °C.
37. El método según la realización 29 ó 30, que comprende, en el siguiente orden: (a) incubar el cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en el fermentador de producción a 35 °C durante aproximadamente 12 horas; (b) ajustar la temperatura a 15 °C al final de la etapa (a); (c) cultivar a 15 °C hasta aproximadamente 5 horas después de la etapa (a); (d) ajustar la temperatura a 35 °C al final de la etapa (c); y (e) cultivar a 35 °C hasta aproximadamente 55 horas después de la etapa (c).
- 25 38. El método según la realización 29 ó 30, que comprende, en el siguiente orden: (a) incubar el cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en el fermentador de producción a 35 °C durante aproximadamente 12 horas; (b) ajustar la temperatura a 20 °C al final de la etapa (a); (c) cultivar a 20 °C hasta aproximadamente 5 horas después de la etapa (a); (d) ajustar la temperatura a 35 °C al final de la etapa (c); y (e) cultivar a 35 °C hasta aproximadamente 55 horas después de la etapa (c).
- 30

39. El método según la realización 29 ó 31, que comprende incubar el cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en el fermentador de producción a 25 °C durante aproximadamente 160 horas.

40. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-28, para su uso como medicamento.

41. La composición para su uso según la realización 40, en la que el medicamento es para su uso en un método de tratamiento de un paciente que lo necesita.

42. Un método de tratamiento de un paciente que lo necesita, que comprende administrar una composición según una cualquiera de las realizaciones 1-28.

43. Un método sustancialmente tal como se describe en el presente documento.

44. El método según una cualquiera de las realizaciones 29-39, sustancialmente tal como se describe en el presente documento.

45. Una composición sustancialmente tal como se describe en el presente documento.

46. La composición según una cualquiera de las realizaciones 1-28, sustancialmente tal como se describe en el presente documento.

6. EJEMPLOS

Se ilustran determinadas realizaciones proporcionadas en el presente documento mediante los siguientes ejemplos no limitativos, que describen diferentes métodos para obtener BoNT/A y demuestran que reducir la temperatura durante un corto periodo de tiempo o de manera continua durante la fermentación de *Clostridium botulinum* redujo los niveles de oxidación en uno o más de los residuos de metionina (por ejemplo, M411, M550, M1004 y/o M1144) del componente de neurotoxina de 150 kDa producido de BoNT/A y que hay una correlación negativa entre el nivel de oxidación de BoNT/A y su potencia.

6.1. Ejemplo 1: Producción de complejo de BoNT/A a diversas temperaturas de fermentación

1. Etapas previas

Hubo dos etapas generales para generar el material de complejo de BoNT/A antes del análisis de los atributos: una etapa previa y una etapa posterior. La etapa previa incluía el uso de un medio de cultivo de siembra APF de 50 ml en un frasco de vidrio de 150 ml (con una barra agitadora magnética) que contenía peptona de soja tipo II al 3,25 % p/v, extracto de levadura al 1,2 % p/v, glucosa al 1,5 % p/v, pH ajustado a 7,3 usando hidróxido de sodio. Se redujo el medio de cultivo de siembra para eliminar el oxígeno (en una cámara anaerobia Don Whitley Scientific A55) durante un mínimo de 48 horas antes de su uso. Se inoculó el medio de cultivo de siembra con 50 µl de un banco de células de trabajo descongelado de la cepa Hall de *C. botulinum* serotipo A. Se incubó el cultivo de siembra a 35±1 °C con agitación a 150 rpm en la cámara anaerobia.

Después de la incubación del cultivo de siembra durante la noche, se transfirieron 4 ml de cultivo ($DO_{600\text{ nm}}$ de $4,81 \pm 0,35$) a un fermentador de producción (Ambr[®] 250 Modular, Sartorius Stedim) que contenía 196 ml de medio de fermentación APF reducido (peptona de soja tipo II al 3,25 % p/v, extracto de levadura al 1,2 % p/v, glucosa al 1,5 % p/v, pH ajustado a 7,3 usando hidróxido de sodio). Se controló la temperatura para cada fermentación según la tabla 2. Los ajustes de temperatura para las fermentaciones con choque frío se iniciaron en la fase estacionaria temprana de crecimiento celular. Se controló la agitación a 150 rpm y se superpuso en el espacio de cabeza del fermentador N₂ a 50 ml/min para mantener un entorno anaerobio. Se monitorizaron el pH de la fermentación y el crecimiento celular mediante una sonda de pH en línea y un monitor de reflectancia, respectivamente. Las tres fases para la fermentación de producción incluyen las fases de crecimiento exponencial, estacionaria y de autólisis. Los tiempos de fermentación se variaron desde 72 h hasta 160 h (tabla 2) para garantizar que se produjera la lisis celular, lo que liberó BoNT/A activa al medio de cultivo.

Tabla 2

Descripción experimental	Condición de fermentación* de producción	Tiempo de fermentación de producción (horas)
Fermentación de control de nivel inicial	35 °C durante todo el periodo de fermentación	72
Choque frío a 20 °C	35 °C desde 0 hasta 12 h; temperatura ajustada a 20 °C a 12 h; cultivo a 20 °C hasta 17 h, luego temperatura ajustada a 35 °C a 17 h; cultivo a 35 °C hasta 72 h	72
Choque frío a 15 °C	35 °C desde 0 hasta 12 h; temperatura ajustada a 15 °C a 12 h; cultivo a 15 °C hasta 17 h, luego temperatura ajustada a 35 °C a 17 h; cultivo a 35 °C hasta 72 h	72
Fermentación a 25 °C	25 °C durante todo el periodo de fermentación	160

*El sistema Ambr® 250 Modular puede controlar la temperatura a dentro de $\pm 0,5$ °C.

La etapa de recogida de complejo de BoNT/A utilizó centrifugación seguido de filtración a 0,2 μ m para retirar el residuo celular a partir del caldo de cultivo, que contenía complejo de BoNT/A y otras proteínas de células huésped. El residuo celular se retiró inicialmente mediante centrifugación a 10.000 rcf durante 30 minutos. Luego se sometió el sobrenadante clarificado a filtración a 0,2 μ m en una cabina de bioseguridad para garantizar la retirada de cualquier organismo *C. botulinum* tipo A y residuo celular restante. Se confirmó la retirada completa de organismos (sembrando una porción del filtrado a 0,2 μ m en placas de agar-sangre Columbia reducido e incubando en condiciones anaerobias durante un tiempo suficiente para verificar la ausencia de *C. botulinum* tipo A viables) y se almacenó el material de recogida clarificado a 4 °C hasta el inicio de la etapa posterior.

2. Etapas posteriores

Las etapas posteriores incluían una concentración y un intercambio de tampón usando filtración de flujo tangencial (TFF), seguido de una captura de la neurotoxina botulínica en una columna de intercambio aniónico, elución a partir de la columna y separación adicional a partir de las impurezas mediante pulido en una columna de intercambio catiónico.

Se usó un sistema de filtración de flujo tangencial para concentrar (mediante ultrafiltración - UF) y diafiltrar el material de recogida de fermentación clarificado en tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5. Se usaron casetes Repligen TangenX® SIUS PD con una membrana de 100 kDa de corte de peso

molecular para las etapas de concentración y diafiltración. La etapa de UF/DF concentró el material de recogida clarificado de 3 a 4 veces y luego diafiltró usando tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5.

Los detalles del procedimiento de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) usado fueron los siguientes. La
5 unidad de UF/DF y la membrana Repligen de 100 kDa con un área de membrana de 0,02 m² se lavaron inicialmente con un mínimo de 0,2 l de agua para inyección (API) para eliminar la disolución de almacenamiento de membrana. A continuación, se equilibraron la membrana y el sistema de UF/DF con aproximadamente 0,2 l de tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5. Después del equilibrado de la membrana, se cargó el material de recogida de fermentación clarificado en el casete de filtración de flujo
10 tangencial TangenX[®] y se concentró de 3 a 4 veces a un intervalo de presión transmembrana de 5 a 6 psig (libras por pulgada cuadrada manométricas) y un caudal ajustado a 75 ml/min. Tras la etapa de concentración, se diafiltró el conjunto de retenido frente a un mínimo de 5 volúmenes de diafiltración del tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5 a un intervalo de presión transmembrana de 5 a 8 psig y un caudal ajustado a 75 ml/min. Después de completarse la diafiltración, se liberó la presión a partir de la
15 línea de retenido y se cerró la salida de permeado. Luego se recirculó el material de UF/DF durante al menos 5 minutos y luego se drenó el sistema, seguido de aclarado con tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5 a medida que se recuperaba el material de UF/DF en un recipiente independiente.

Luego se cargó el material recuperado (retenido de UF/DF) a partir de la etapa de UF/DF en una columna
20 de cromatografía de intercambio aniónico empaquetada con resina POROS[®] 50HQ. La columna tiene un diámetro interno de 1,13 cm y una altura de columna de aproximadamente 5 cm. Toda la cromatografía en columna de intercambio aniónico se realizó a temperatura ambiental y el flujo fue en la dirección descendente. Se eluyó el complejo de neurotoxina botulínica tipo A a partir de la columna de intercambio aniónico usando un cambio gradual de pH en el que las impurezas más negativamente
25 cargadas tales como los ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN) y otras proteínas de células huésped permanecieron unidos a la columna de intercambio aniónico.

Los detalles de la etapa de intercambio aniónico fueron: uso de la columna POROS[®] 50HQ equilibrada con un tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5 (al menos 5 volúmenes de columna). A continuación,
30 se cargó el retenido de UF/DF a 120 cm/hora en la columna de intercambio aniónico POROS[®] 50HQ, seguido de lavado con al menos aproximadamente 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5 a 120 cm/hora, seguido de elución con acetato de sodio 50 mM, pH 4,5 a 120 cm/hora. Cuando la absorbancia a 280 nm (A280) aumentó hasta al menos aproximadamente 0,05 UA y a lo largo del máximo de pico hasta igual a o menor de aproximadamente 0,03 UA en el borde posterior, se recogió

la fracción de pico en un recipiente con 5 ml de acetato de sodio 50 mM, pH 4,8. Este conjunto de elución se almacenó a de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C durante hasta 48 horas.

La segunda etapa de cromatografía en el procedimiento posterior usó una resina de cromatografía de intercambio catiónico POROS® 20HS empaquetada en una columna con un diámetro interno de 0,46 cm y una altura de columna de 10,0 cm. Toda la cromatografía en columna POROS® 20HS se realizó a temperatura ambiental y el flujo fue en la dirección descendente. El complejo de neurotoxina botulínica tipo A se une a la columna POROS® 20HS a pH 4,8. Después de las etapas de lavado para eliminar las impurezas, luego se eluyó el complejo de neurotoxina botulínica tipo A unido a partir de la columna con una concentración de NaCl aumentada. Se eluyeron las impurezas relacionadas con el producto con el tampón de lavado y la disolución de descontaminación.

Los detalles de la etapa de intercambio catiónico fueron: uso de la columna POROS® 20HS equilibrada con un tampón acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 (al menos aproximadamente 5 volúmenes de columna). A continuación, se cargó el conjunto de producto de POROS® 50HQ (recogido tal como se describió anteriormente, nuevo o procedente del almacenamiento a 2-8 °C) en la columna POROS® 20HS. Luego se lavó la columna con un tampón acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 (al menos aproximadamente 5 volúmenes de columna) y luego se lavó de nuevo con 10 volúmenes de columna de segundo tampón (tampón acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 80 mM, pH 4,8). Se eluyó el complejo de neurotoxina botulínica tipo A a partir de la columna POROS® 20HS con un tampón acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, pH 4,8 a 290 cm/hora. Se recogió el eluato en un recipiente con 3 ml de acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 cuando la A280 aumentó hasta aproximadamente $\geq 0,02$ UA a lo largo del máximo de pico hasta que la A280 del borde posterior del pico de elución disminuyó hasta un valor de $\leq 0,02$ UA o hasta el final de la etapa de elución, que tenía un total de 5 volúmenes de columna comenzando desde el final de la segunda etapa de lavado. Se almacenó el conjunto de producto de POROS® 20HS durante corto plazo a de aproximadamente 2 °C a 8 °C durante hasta 120 horas. A continuación se tomaron alícuotas del conjunto de producto en muestras de pequeño volumen y se almacenaron a largo plazo en una nevera a -70 °C antes de su análisis.

6.2. Ejemplo 2: Análisis por CL-EM/EM de muestras a partir de los estudios de temperatura

Las muestras se desnaturalizaron calentando a 90 ± 5 °C en presencia de RapiGest™ al 0,05 %, se redujeron con ditiotreitól 5 mM y se alquilaron con yodoacetamida 15 mM. El exceso yodoacetamida se retiró mediante columnas de centrifugación Zeba. Luego, las muestras se digirieron con una razón

1:10 de tripsina durante 4 ± 1 horas a 37 ± 3 °C. RapiGest™ se retiró mediante acidificación y posterior centrifugación a 20.000 rcf.

Los péptidos resultantes se analizaron usando un dispositivo Thermo Vanquish UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas Thermo Q Exactive Plus. Se inyectaron cinco picomol de cada digesto de muestra para el análisis por CL-EM/EM. La espectrometría de masas de los péptidos que eluyen a partir de la columna de fase inversa se realizó usando ionización por electropulverización en modo positivo. Los parámetros de CL-EM/EM usados para el análisis de las muestras de digesto se proporcionan en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones experimentales de CL-EM

Muestra	Digesto de tripsina del principio activo			
Carga de muestra	5 picomol			
Instrumento	Thermo Vanquish UHPLC y Thermo Q Exactive Plus			
Columna	Waters BEH C18 2,1 mm x 150 mm 1,7 µm			
Fase móvil A (MPA)	Ácido fórmico al 0,1 % en agua			
Fase móvil B (MPB)	Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo al 100 %			
Gradiente	Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	% de MPA	% de 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

Se realizó una búsqueda en los archivos de datos Q Exactive Plus (.raw) usando Thermo BiopharmaFinder. Los parámetros de búsqueda usados para el análisis de base de datos se proporcionan en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros de la búsqueda en BiopharmaFinder

Parámetro	Valor
Enzima	Tripsina
Escisiones omitidas máx.	1
Modificaciones fijas	Ninguna
Modificaciones variables	Carbamidometilación (C), desamidación (N), dioxidación (C), oxidación (MW)
Tolerancia peptídica	± 8 ppm
Búsqueda de iones en EM/EM	sí

Los niveles de oxidación en diversos residuos de metionina de BoNT/A se muestran en la tabla 5 a continuación:

5

Tabla 5

	Fermentación de control de nivel inicial	Choque frío a 20 °C	Choque frío a 15 °C	Fermentación a 25 °C
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
M1004	3	1	1	2
M1054	0,5	0,8	0,6	0,6
M1144	6	2	2	2

Las condiciones de fermentación en frío redujeron los niveles de oxidación en M411, M550, M1004 y M1144 de BoNT/A (tabla 5). M411 forma parte de la cadena ligera y los demás residuos de metionina (M550, M1004 y M1144) residen en la cadena pesada. Se ha resuelto la estructura cristalina del dominio de unión al receptor de toxina BoNT/A en el complejo con el receptor de SV2C (Benoit *et al.* (2017) *Sci Rep.* 7:43588). Se muestra que la interacción incluye los aminoácidos Thr1145, Thr1146 y Ser1294

10

en BoNT/A (Benoit *et al.* (2017) *Sci Rep.* 7:43588). Puesto que M1144 es adyacente a estos residuos de unión (Thr1145 y Thr1146) de BoNT/A con el receptor de SV2C, su oxidación puede provocar una disminución en la unión al receptor y, por tanto, la pérdida de potencia.

6.3. Ejemplo 3: Análisis por SEC-HPLC de muestras a partir de los estudios de temperatura

- 5 Las muestras se equilibraron a temperatura ambiente durante al menos 20 minutos. Se transfirieron 100 µl de cada muestra a un vial de HPLC de polipropileno de 0,3 ml para inyección directa. El análisis por SEC-HPLC se realizó usando un dispositivo de HPLC Waters® con detector UV siguiendo las condiciones del instrumento proporcionadas en la tabla 6.

10 **Tabla 6. Condiciones experimentales de SEC-HPLC**

Columna	Sepax SRT SEC-500, 7,8 x 300 mm, 5 micrómetros (n.º de artículo 215500-7830)
Temperatura de columna	30 °C
Fase móvil	Fosfato de sodio 40 mM + sulfato de amonio 200 mM, pH 6,5
Caudal	0,8 ml/min
Detección por UV	220 nm
Volumen de inyección	Ajustar volumen de inyección basándose en la concentración de UV para inyectar 20 µg
Temperatura de inyector automático	5 °C
Tiempo de ejecución	20 minutos

Los datos de cromatografía se procesaron con el software Waters® Empower. Las especies de mayor peso molecular eluyen antes que las de menor. Se integraron todos los picos no presentes en el análisis de tampón. Se notificó el área relativa de pico de cada pico.

15

Los datos de SEC (% de área) a UV 220 nm se muestran a continuación en la tabla 7.

Tabla 7

		HCP (<100 kDa)
Fermentación de control de nivel inicial	AEC	15,2
Choque frío a 20 °C		0,0
Choque frío a 15 °C		1,5
Fermentación a 25 °C		31,3
Fermentación de control de nivel inicial	CEC	0,0
Choque frío a 20 °C		0,0
Choque frío a 15 °C		0,0
Fermentación a 25 °C		3,6

La tabla 7 muestra que el porcentaje de la proteína de células huésped (HCP) se redujo en condiciones de choque frío tanto a 20 °C como a 15 °C en comparación con la condición de fermentación de control de nivel inicial después de la única purificación por columna de intercambio aniónico (AEC), mientras que la condición de fermentación fría continua a 25 °C tenía un mayor porcentaje de HCP en comparación con el control de nivel inicial. Después del procedimiento de purificación de dos columnas (es decir, AEC seguido de CEC), la HCP en la condición de fermentación fría continua a 25 °C fue mayor del 3 %, mientras que fue indetectable tanto en el control de nivel inicial como en las condiciones de choque frío.

6.4. Ejemplo 4: Caracterización de los sitios de oxidación de BoNT/A de 150 kDa y efectos relacionados sobre la potencia

Resumen ejecutivo

Se caracterizaron la ruta de oxidación y la potencia del complejo de neurotoxina de *Clostridium botulinum* tipo A (BoNT/A) después de la exposición a peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Se añadieron diversas cantidades de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que oscilaban entre 100 ppb y 100 ppm al principio activo (PA) de BoNT/A y se identificaron y cuantificaron los sitios de oxidación resultantes en la subunidad de neurotoxina de 150 kDa (NT de 150 kDa) mediante cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM). Los resultados mostraron que varios residuos de metionina en la NT de 150 kDa son susceptibles a la oxidación por H₂O₂ y lo más susceptibles son las metioninas en las posiciones 411, 531, 602, 968, 1004 y 1144. El análisis de potencia mediante el ensayo

de potencia basado en células (CBPA) reveló una pérdida de potencia dependiente de la dosis con cantidades crecientes de H₂O₂.

Material y métodos

5

1. Materiales y reactivos

Los materiales y reactivos se muestran en la tabla 8 a continuación.

10 **Tabla 8**

Artículo	Fabricante	Número de catálogo
Filtro de esterilización de 2 µm, Acrodisc	Pall	4652
Peróxido de hidrógeno	VWR	E882-10ML
DL-metionina	Sigma	M2768-100G
Fosfato de sodio monobásico, monohidratado	Macron Fine Chemicals	7892-04
Fosfato de sodio dibásico, anhidro	Macron Fine Chemicals	7917-04

2. Disolución de principio activo ("PA") de BoNT/A

Se diluyó el PA de BoNT/A almacenado como precipitado (concentración de partida: 2,5 mg/ml) con fosfato de sodio 40 mM, pH 6,5 hasta una concentración de 0,5 mg/ml y se incubó durante al menos 20 horas a 25 °C hasta que la muestra fue visiblemente transparente. Se esterilizaron por filtración las muestras disueltas y se tomaron alícuotas según los requisitos experimentales individuales.

3. Oxidación de PA de BoNT/A

20

Se trataron las muestras de PA disueltas con 0 ppm (control), 10 ppm, 50 ppm o 100 ppm de H₂O₂ durante 20 horas a 25 °C. La concentración de PA de BoNT/A se mantuvo igual en todas las muestras mediante la adición de un volumen constante de H₂O₂ (o agua para la muestra de control). La oxidación se extinguió con la adición de un exceso molar de 10 veces de metionina (en comparación con la concentración de H₂O₂). Puesto que la oxidación de la proteína (en residuos como el triptófano) puede afectar a la absorbancia de UV, se determinó la concentración de proteína de la muestra de control mediante espectrofotometría UV y se proporcionó como concentración representativa de todas las muestras. Las muestras se almacenaron a ≤ -70 °C.

30 4. Digestión de muestras y análisis por CL-EM/EM

Se desnaturalizaron las muestras mediante calentamiento a 99 °C en presencia de RapiGest™ al 0,05 %, se redujeron con ditiotreitól, se alquilaron con yodoacetamida y se digirieron con tripsina a una razón de enzima con respecto a proteína de 1:10 (peso de tripsina/peso de PA de BoNT/A) durante 18 horas a 37 °C. RapiGest™ se retiró mediante acidificación y posterior centrifugación a 23.500 rcf. Los péptidos resultantes se analizaron usando una estación de trabajo de HPLC capilar Agilent 1200 acoplada a un espectrómetro de masas Thermo LTQ-FT Ultra. Se inyectaron veinte picomol de cada digesto de muestra para el análisis por CL-EM/EM. La espectrometría de masas de los péptidos que eluyen a partir de la columna de fase inversa se realizó usando ionización por electropulverización en modo positivo.

Los parámetros de CL-EM/EM usados para el análisis de las muestras de digesto se proporcionan en la tabla 9. Se obtuvo una medición de masa precisa de los iones precursores usando el detector de resonancia de ciclotrón iónico con transformada de Fourier (FT), y los mejores cuatro iones precursores a partir de cada barrido de EM se fragmentaron y analizaron en la trampa iónica lineal en los barridos de EM/EM posteriores. Para el espectrómetro de masas, se realiza una calibración completa del instrumento trimestralmente, aunque se realiza calibración de precisión de masas con FT semanalmente usando la mezcla de calibración recomendada por el fabricante. Se evaluó el rendimiento del sistema antes del análisis de muestras inyectando dos picomol de una mezcla de péptidos patrón (Michrom, Auburn, CA).

Tabla 9. Condiciones experimentales de CL-EM

Muestra	Digestos de tripsina de PA de BoNT/A			
Carga de muestra	20 picomol			
Instrumento	HPLC capilar Agilent 1200 (bomba capilar, n.º de serie DE60555131) acoplada con un analizador de masas Thermo LTQ-FT Ultra (n.º de serie SN6126F) en el laboratorio TL-M204.			
Columna	Agilent Zorbax 300 SB-C18, 1,0x150 mm, 3,5 µm, 300 Å, a 45 °C			
Fase móvil A (MPA)	Ácido fórmico al 0,1 % en agua			
Fase móvil B (MPB)	Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo al 80 %			
Gradiente	Tiempo (min)	Caudal (µl/min)	% de MPA	% de 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. Análisis por CBPA

El análisis por CBPA se realizó para las muestras de BoNT/A oxidadas con H₂O₂ extinguidas con metionina siguiendo el método descrito en Fernández-Salas *et al.* (2012) PLOS ONE 7(11):e49516. Se cultivaron células de neuroblastoma humano SiMa en matraces IV con colágeno en medio recomendado de DSMZ. Para una diferenciación óptima, se sembraron las células SiMa en placas de 96 pocillos a 5x10⁴ células/pocillo en 100 µl de medio de diferenciación (medio esencial mínimo con GlutaMAX™ I 2 mM con sales de Earle, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM, 1x complemento N2 y 1x complemento B27) durante tres días. Luego se trataron las células SiMa con muestras de BoNT/A, seguido de reemplazar el medio por muestras de BoNT/A con medio nuevo sin toxina.

Las células se lavaron una vez con PBS y se sometieron a lisis en tampón de lisis con Triton X-100 recién preparado (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1 % y un comprimido de inhibidores de proteasas libres de EDTA) en hielo durante 20 min. Las células lisadas se centrifugaron en la placa a 4000 rpm durante 20 min a 4°C. Para el análisis por inmunotransferencia de tipo Western, los lisados se transfirieron a una placa de PCR de 96 pocillos, se añadió 2x tampón de carga con SDS-PAGE (Invitrogen) y se calentó la placa hasta 95°C durante 5 minutos. Los geles se ejecutaron en 1x tampón de ejecución con MOPS-SDS (Invitrogen) a 200 V durante 55 min. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) previamente humedecidas en tampón de transferencia de inmunotransferencia de tipo Western (Invitrogen) que contenía metanol al 20 % (Burdick y Jackson). Se realizó la inmunotransferencia de tipo Western a 800 mA durante 2 horas usando el aparato de celda de transferencia TE-62 (GE Healthcare). Las inmunotransferencias se bloquearon en agente de bloqueo ECL al 2 % (GE Healthcare) en 1x TBS/Tween 20 al 0,1 % (Bio-Rad) (TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal anti-SNAP25₁₉₇ diluido 1:1000, anticuerpo contra SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc.) diluido 1:5000 para evaluar los productos de SNAP25 intactos y escindidos (es decir, se detectaron SNAP25₂₀₆ y SNAP25₁₉₇). Los anticuerpos se diluyeron en agente de bloqueo al 2 %/tampón TBS-T y se incubaron durante la noche a 4°C con agitación suave. Los anticuerpos secundarios fueron anticuerpo anti-IgG de conejo o de ratón H+L conjugado con HRP (Invitrogen) diluido 1:5.000 ó 1:10.000 en agente de bloqueo al 2 %/tampón TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron y se expusieron durante 5 min a reactivos de detección de sistema de inmunotransferencia de tipo Western ECL Plus (GE Healthcare). Se capturó la

quimiofluorescencia mediante el barrido de las inmunotransferencias en el dispositivo de obtención de imágenes Typhoon 9410 (GE Healthcare) a λ_{ex} 452/ λ_{em} 520. Se calculó la intensidad de las bandas de gel usando el software ImageQuant TL (GE Healthcare). Los datos se analizaron usando SigmaPlot v 10.0 (Systat Software Inc.) o PLA2.0 (Stegmann Systems). Los valores de intensidad se representaron gráficamente frente a la concentración de la muestra de BoNT/A en escala logarítmica y se ajustaron a una función logística de 4 parámetros ($Y=Y_0+a/[1+(X/X_0)^b]$) sin restricciones. Basándose en las curvas ajustadas, se determinaron los valores de CE_{50} , correspondientes a “ X_0 ”.

Para el ELISA tipo sándwich ECL, las placas MSD High Bind (Meso Scale Discovery) previamente sembradas en puntos con AcM anti-SNAP25₁₉₇ 2E2A6 se bloquearon con 150 μ l de tampón de bloqueo durante 1 hora a TA. Después del bloqueo, se descartó el tampón y se añadieron 25 ml de lisado celular a cada pocillo de la placa seguido de incubación tal como se detalla en el texto. Las placas se lavaron con PBS-T y se añadió anticuerpo AcP anti-SNAP25 de detección marcado con éster de NHS con etiqueta SULFO (anticuerpo contra el extremo N-terminal de SNAP25, n.º de cat. S9684, Sigma) en tampón de dilución. Se sellaron las placas y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 h, se lavaron con PBS-T y se añadieron 150 ml de 1x tampón de lectura por pocillo. Las placas se leyeron inmediatamente en el lector de placas SI6000 Image. Para el ELISA tipo sándwich de quimioluminiscencia, se recubrieron placas blancas (Greiner) con 100 μ l/pocillo de AcM anti-SNAP25₁₉₇ 2E2A6 a 4 °C durante la noche. Las placas se bloquearon con agente de bloqueo ECL al 2 % con suero de cabra al 10 % durante 1 h a TA. Se añadieron cincuenta microlitros de lisado celular a cada pocillo y se incubaron las placas a 4°C. Se usó AcP anti-SNAP25 S9684 conjugado con HRP para la detección. Las placas se desarrollaron con mezcla SuperSignal ELISA Pico 1:1 (Pierce) y se leyeron a 395 nm en un luminómetro (Molecular Devices). Los datos se ajustaron a una función logística de 4 parámetros ($Y=Y_0+a/[1+(X/X_0)^b]$).

Se han considerado los posibles efectos de matriz de H_2O_2 y metionina en el ensayo CBPA. Puesto que el H_2O_2 o bien reacciona hasta la completitud o bien se extingue por el exceso de metionina, no queda H_2O_2 en las muestras en el momento del análisis por CBPA. Cualquier posible efecto de matriz de la metionina se mitiga por el hecho de que las muestras se diluyen 30.000 veces con medio de dilución antes del análisis por CBPA. La concentración más alta de metionina en una muestra antes de la dilución para el análisis por CBPA fue de 30 mM (metionina); por tanto, la concentración más alta de metionina añadida a células tratadas después de la dilución de 30.000 veces con medio de dilución fue de aproximadamente 1 μ M (metionina).

6. Análisis de datos de CL-EM/EM

Los archivos de datos LTQ-FT Xcalibur (.raw) se presentaron en Mascot Daemon versión 2.1.5 (disponible en la red informática mundial en mascot/mascot) para la búsqueda de base de datos. Los parámetros de búsqueda usados para el análisis de base de datos se proporcionan en la tabla 10.

5

Tabla 10. Parámetros de búsqueda de base de datos de Mascot

Parámetro	Valor
Base de datos	NG_SProt
Enzima	Tripsina
Escisiones omitidas máx.	0
Modificaciones fijas	Ninguna
Modificaciones variables	Carbamidometilación (C), desamidación (N,Q), dioxidación (C), dioxidación (W), oxidación (HW), oxidación (M), trioxidación (C) ¹
Masa monoisotópica	Sí
Tolerancia peptídica	± 7 ppm
Carga peptídica	+1, +2, y +3
Búsqueda de iones por EM/EM	Sí
Tolerancia de EM/EM	± 1 Da
Formato de datos	Mascot genérico
Instrumento	ESI-FTICR

¹ C = cisteína, N = asparagina, Q = glutamina, W = triptófano, M = metionina

Para la cuantificación del porcentaje de oxidación relativa en cada sitio, se usó el área del pico de cromatograma de iones extraídos de cada péptido oxidado y no oxidado correspondiente con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de oxidación}_{(\text{sitio n})} = \left(\frac{\text{área de pico del péptido oxidado}}{\text{área de pico del péptido oxidado} + \text{área de pico del péptido no oxidado}} \right) \times 100$$

15

Los porcentajes de aumento en la oxidación de cada muestra (en diversos residuos de aminoácido) se comparan con el control respectivo y se calculan usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de aumento en la oxidación}_{(\text{sitio n})} = \% \text{ de oxidación}_{(\text{sitio n})} (\text{muestra tratada}) - \% \text{ de oxidación}_{(\text{sitio n})} (\text{muestra de control})$$

20

Resultados y discusión

Se realizó un estudio para determinar los efectos de potencia y los niveles de oxidación en diversos aminoácidos tras el tratamiento con mayores cantidades de peróxido de hidrógeno. Los resultados del análisis de potencia de las muestras de PA de BoNT/A oxidadas con H₂O₂ a los niveles de 10 ppm, 50 ppm y 100 ppm (potencia relativa, en comparación con control no oxidado) se muestran en la figura 1.

Los resultados de CBPA de este estudio mostraron una pérdida de potencia en respuesta al tratamiento con 10 ppm de H₂O₂ (pérdida de aproximadamente el 30 %). Se observó una pérdida de potencia adicional tras el tratamiento con mayores cantidades de H₂O₂ con una pérdida de potencia total de aproximadamente el 70 % y el 85 % después del tratamiento con 50 ppm de H₂O₂ y 100 ppm de H₂O₂, respectivamente.

Para determinar los sitios y las cantidades de oxidación inducida por H₂O₂ de la subunidad de NT de 150 kDa del complejo de BoNT/A, se digirieron las muestras oxidadas y de control negativo y se analizaron los péptidos resultantes mediante CL-EM/EM. Los resultados de los análisis por CL-EM/EM se muestran en la figura 2.

El análisis por espectrometría de masas identificó seis sitios de oxidación de metionina primarios en la NT de 150 kDa (que tenían un porcentaje de aumento de oxidación >20 %): M411, M531, M602, M968, M1004 y M1144.

Los resultados de estos estudios demuestran que la potencia del complejo de BoNT/A puede tener un impacto negativo debido a la oxidación por H₂O₂. Se ha determinado la ruta de oxidación de la subunidad de NT de 150 kDa de BoNT/A por H₂O₂ e incluye principalmente seis residuos de metionina en las posiciones 411, 531, 602, 968, 1004 y 1144. La figura 3 muestra la ubicación de los seis residuos de metionina más propensos a la oxidación en la NT de 150 kDa.

El residuo M411 forma parte de la cadena ligera y los demás residuos residen en la cadena pesada: M531 en la región de bucle de la cadena pesada, M602 en el dominio de translocación de membrana y M968, M1004, M1144 en el dominio de unión a la membrana.

Se ha resuelto la estructura cristalina del dominio de unión al receptor de BoNT/A en el complejo con el receptor de SV2C (Benoit *et al.* (2017) *Sci Rep.* 7:43588). Se ha mostrado que la interacción incluye los aminoácidos Thr1145, Thr1146 y Ser1294 en BoNT/A. Puesto que M1144 se encuentra justo antes

de dos de estos aminoácidos, su oxidación puede provocar una disminución en la unión al receptor y, por tanto, una pérdida de potencia.

El grado de aumento de oxidación tras el tratamiento con H_2O_2 fue similar para los seis sitios de oxidación primarios (figura 2). El gráfico del porcentaje de aumento de oxidación promedio de los seis sitios de oxidación primarios frente al porcentaje de pérdida de potencia muestra una relación lineal (figura 4), con una pendiente de 1,1.

6.5. Ejemplo 5: Procedimiento no APF (Schantz) para la obtención de una toxina botulínica

Este ejemplo expone el procedimiento de Schantz de la técnica anterior para la obtención de neurotoxina botulínica. El procedimiento es un procedimiento no APF que usa medios y reactivos de origen animal (es decir, placas de agar-sangre de vacuno para el cultivo, caseína en el medio de fermentación y uso de enzimas ARNasa y ADNasa para la purificación de neurotoxina botulínica). El procedimiento de Schantz tiene de aproximadamente 16 a 20 etapas principales, usa un fermentador de 115 l para el trabajo a escala de producción y dura aproximadamente 3 semanas hasta su finalización. El procedimiento de Schantz comienza descongelando un vial de banco de células maestro (MCB) de *Clostridium botulinum* no APF hasta temperatura ambiente seguido de cuatro etapas de cultivo. En primer lugar, para seleccionar colonias con una morfología adecuada, se sembraron en estrías alícuotas del vial de MCB descongelado en las placas de agar-sangre Columbia (CBA) previamente reducido y se incuban en condiciones anaerobias durante 30-48 horas a $34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. En segundo lugar, se inoculan las colonias seleccionadas en tubos de ensayo de 9 ml que contienen un medio de crecimiento de caseína durante 6-12 horas a $34\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se cultiva adicionalmente el contenido del tubo de 9 ml con el crecimiento más rápido y la densidad más alta (etapa de selección de crecimiento) a través de dos incubaciones anaerobias en aumento (las etapas de cultivo tercera y cuarta), que son una incubación de 12-30 horas a $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un frasco de cultivo de siembra de 600 ml a 1 l, seguido de un cultivo en un fermentador de siembra de 15 l a 25 l que contiene un medio de crecimiento de caseína durante 6-16 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estos dos cultivos en aumento se llevan a cabo en un medio de nutrientes que contiene hidrolizado de caseína al 2 % (un digesto de caseína [proteína de la leche]), extracto de levadura al 1 % y glucosa (dextrosa) al 1 % en agua a pH 7,3.

A los cultivos en aumento les sigue una incubación adicional durante 60-96 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un fermentador de producción a escala comercial (es decir, 115 l) en un medio que contiene caseína bajo una atmósfera anaerobia controlada. El crecimiento de la bacteria se completa habitualmente después de 24 a 36 horas y durante la etapa de fermentación llevada a cabo durante de aproximadamente 65 a aproximadamente 72 horas, donde la mayoría de las células experimentan lisis y liberan neurotoxina

botulínica. Se cree que la toxina se libera por la lisis celular y se activa por las proteasas presentes en el medio. Puede prepararse un filtrado del medio de cultivo usando un filtro de profundidad de una sola capa para eliminar las impurezas grandes (es decir, células completas y rotas), obteniendo de ese modo una disolución transparente denominada cultivo clarificado. La recogida de neurotoxina botulínica a partir del cultivo clarificado se logra reduciendo el pH del cultivo clarificado hasta pH 3,5 con ácido sulfúrico 3 M para precipitar la toxina sin procesar a 20 °C (precipitación por acidificación). Luego se concentra la neurotoxina botulínica sin procesar (para lograr una reducción de volumen) mediante ultramicrofiltración (microfiltración) (denominada MF o UF) seguido de diafiltración (DF). Se usa un filtro de 0,1 µm para la etapa de microfiltración.

Luego se transfiere la toxina en bruto o sin procesar recogida a un recipiente de digestión y se estabiliza mediante la adición del inhibidor de proteasas clorhidrato de benzamidina. Se añaden ADNasa y ARNasa para digerir (hidrolizar) los ácidos nucleicos. Luego se extrae la toxina con tampón fosfato pH 6,0 y se retira el residuo celular mediante clarificación. Luego se retiran las impurezas de bajo peso molecular y los ácidos nucleicos hidrolizados mediante etapas de UF y DF adicionales. A continuación se llevan a cabo tres etapas de precipitación secuenciales (precipitaciones con etanol frío, ácido clorhídrico y sulfato de amonio). El complejo de neurotoxina botulínica purificado (toxina a granel) se almacena como una suspensión en un tampón fosfato de sodio/sulfato de amonio a de 2 °C a 8 °C.

La finalización de este procedimiento de Schantz (no APF) del ejemplo 5, incluyendo las etapas de recogida y purificación, dura de aproximadamente dos a tres semanas. La neurotoxina botulínica a granel resultante es una suspensión de alta calidad de complejo de toxina botulínica tipo A de 900 kDa preparado a partir de la cepa Hall A de *Clostridium botulinum* con una potencia específica de $\geq 2 \times 10^7$ U/mg, una A_{260}/A_{278} de menos de 0,6 y un patrón de bandas distinto en la electroforesis en gel, y es adecuada para su uso para la elaboración de una composición farmacéutica de toxina botulínica.

La neurotoxina botulínica también puede obtenerse a partir de un procedimiento no cromatográfico APF, tal como se expone en el ejemplo 7 de la patente estadounidense n.º 7.452.697, durando el procedimiento no cromatográfico APF completo (desde el comienzo del cultivo hasta el final de todas las etapas de purificación y procesamiento) de aproximadamente dos a tres semanas hasta la finalización. Alternativamente, la neurotoxina botulínica también puede obtenerse a partir de un procedimiento cromatográfico APF, tal como se expone en el ejemplo 16 de la patente estadounidense n.º 7.452.697, durando el procedimiento cromatográfico APF (desde el comienzo del cultivo hasta el final de todas las etapas de purificación y procesamiento) una semana o más hasta la finalización.

6.6. Ejemplo 6: Sistemas y procedimientos cromatográfico en columna APF para la obtención de una neurotoxina botulínica

Se desarrollan sistemas y procedimientos basados en cromatografía aniónica-catiónica APF rápidos para la obtención de neurotoxina botulínica con alto rendimiento y de alta pureza. El procedimiento de este ejemplo 6 para propósitos de producción (es decir, para obtener cantidades en gramos de la neurotoxina botulínica final) usa un recipiente de fermentación de 20 l y dura tan sólo 4-7 días, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 días, hasta completar todas las etapas del procedimiento desde el inicio del cultivo hasta la finalización de la purificación final y el almacenamiento de la toxina. El aparato utilizado en los sistemas dados a conocer en el presente documento se comenta a continuación.

Se desarrollan procedimientos de medios cromatográficos y se exponen en el presente documento. Estos procedimientos de medios cromatográficos usan una, dos o tres de las siguientes: cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico. Específicamente, los procedimientos de medios cromatográficos que se desarrollan incluyen: (1) un procedimiento de un medio que usa HIC; (2) un procedimiento de dos medios que usa HIC seguido de cromatografía de intercambio aniónico; (3) un procedimiento de dos medios que usa HIC seguido de cromatografía de intercambio catiónico; (4) un procedimiento de tres medios que usa HIC seguido de cromatografía de intercambio aniónico seguido de cromatografía de intercambio catiónico; (5) un procedimiento de tres medios que usa HIC seguido de cromatografía de intercambio catiónico seguido de cromatografía de intercambio aniónico; (6) un procedimiento de un medio que usa cromatografía de intercambio aniónico; (7) un procedimiento de dos medios que usa cromatografía de intercambio aniónico seguido de HIC; (8) un procedimiento de dos medios que usa cromatografía de intercambio aniónico seguido de cromatografía de intercambio catiónico; (9) un procedimiento de tres medios que usa cromatografía de intercambio aniónico seguido de HIC seguido de cromatografía de intercambio catiónico; (10) un procedimiento de tres medios que usa cromatografía de intercambio aniónico seguido de cromatografía de intercambio catiónico seguido de HIC; (11) un procedimiento de un medio que usa cromatografía de intercambio catiónico; (12) un procedimiento de dos medios que usa cromatografía de intercambio catiónico seguido de HIC; (13) un procedimiento de dos medios que usa cromatografía de intercambio catiónico seguido de cromatografía de intercambio aniónico; (14) un procedimiento de tres medios que usa cromatografía de intercambio catiónico seguido de HIC seguido de cromatografía de intercambio aniónico; y (15) un procedimiento de tres medios que usa cromatografía de intercambio catiónico seguido de cromatografía de intercambio aniónico seguido de HIC. La HIC elimina impurezas tales como una impureza de 49 kDa (que resulta que es una glucosa fosfato isomerasa de células huésped, tal como se comentó a continuación).

6.6.1. Preparación del banco de células de trabajo

Se desarrolla un nuevo banco de células de *Clostridium botulinum* (para su uso para iniciar la etapa de cultivo) sin el uso de placas de agar-sangre Columbia y que elimina la necesidad de seleccionar colonias antes del cultivo y también elimina la necesidad de llevar a cabo la etapa de procedimiento de Schantz hasta las etapas de cultivos en tubos y siembra múltiple (cultivo).

Para este propósito, se usa un banco de células maestro (MCB) de Schantz previamente establecido para crear un banco de células de investigación (RCB) APF a partir del cual se generan un nuevo banco de células maestro (MCB) APF y un banco de células de trabajo (WCB) posterior. Se prepara un banco de células de investigación (RCB) a partir de una colonia del MCB de Schantz (NAPF). Para retirar la proteína de origen animal a partir del vial de MCB, se lavan las células dos veces en medio APF que contiene SPTII (peptona de soja tipo II) al 2 % p/v, extracto de levadura al 1 % p/v y glucosa al 1 % p/v. Se siembran las células en medio APF en condiciones anaerobias estrictas usando una cámara anaerobia de sistema de atmósfera controlada modular (MACS). Se expande adicionalmente una colonia aislada y se almacena en medio APF que contiene glicerol a aproximadamente el 20 % por debajo de -135 °C.

Se prepara el MCB APF en condiciones de BPF expandiendo el RCB en medio APF libre de oxígeno (200 ml, reducido durante un mínimo de 12 horas en una cámara anaerobia) y se cultiva en una cámara anaerobia de MACS a 34,5 °C±1 °C (con agitación a 60 rpm) hasta que la DO₅₄₀ del cultivo alcanza 2,5±1,0 UA. Se añade glicerol estéril al cultivo resultante hasta una concentración final de aproximadamente el 20 %, después de lo cual se transfiere la mezcla a crioviales a 1 ml/vial (viales con MCB APF). Se ultracongelan los viales en nitrógeno líquido y luego se almacenan por debajo de -135 °C. Se prepara un WCB APF en condiciones de BPF expandiendo tal como antes. Los bancos de células APF resultantes se caracterizan para determinar su identidad, pureza, viabilidad y estabilidad genética.

6.6.2. Etapas previas (cultivo y fermentación)

Los procedimientos del ejemplo 6 tienen dos etapas generales: una etapa previa y una etapa posterior. La etapa previa incluye expansión de una línea celular de partida (crecimiento y reproducción de bacterias *Clostridium botulinum* en un medio de cultivo sustancialmente APF), fermentación, recogida (retirada de residuo celular) para proporcionar un cultivo recogido clarificado que luego se concentra y se diluye. Por tanto, en este ejemplo, las etapas de un procedimiento de tres columnas a modo de ejemplo pueden incluir cultivo, fermentación, filtración para la recogida, concentración, HIC, cromatografía de

captura (aniónica), cromatografía de pulido (catiónica), intercambio de tampón, reducción de carga biológica y llenado de viales.

La etapa previa incluye el uso de un medio de cultivo en un frasco de 1 l que contiene 400 ml de medio de cultivo APF de siembra reducido (en una cámara anaerobia) (SPTII al 2 % p/v, extracto de levadura al 1 % p/v (ajustado a pH 7,3 con hidróxido de sodio 1 N y/o ácido clorhídrico 1 N antes de la esterilización en autoclave), glucosa estéril al 1 % p/v añadida después de la esterilización en autoclave de los medios de cultivo). El medio de cultivo (siembra) se inocula con 400 µl de un WCB descongelado de *Clostridium botulinum*. La incubación/cultivo se produce a $34,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación a 150 rpm en una cámara anaerobia.

Cuando la densidad óptica del medio de cultivo a 540 nm es de $1,8 \pm 1,0$ UA, se transfiere todo el contenido del frasco de 1 l (aproximadamente 400 ml) a un fermentador de producción de 20 l que contiene medio de fermentación APF ajustado con hidróxido de sodio 1 N y/o ácido clorhídrico 1 N tras la esterilización con vapor hasta pH 7,3, el medio de fermentación se compone de SPTII al 3,25 % p/v, extracto de levadura al 1,2 % p/v, glucosa estéril al 1,5 % p/v (añadida tras la esterilización; esterilización, por ejemplo, a aproximadamente $122\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 0,5 horas). La temperatura y la agitación se controlan a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 70 rpm, respectivamente. Se ajusta la superposición de nitrógeno a 12 slpm y se ajusta la presión del espacio de cabeza a 5 psig para mantener un entorno anaerobio para el crecimiento celular. Se monitorizan la densidad celular y el pH de la fermentación mediante sondas de turbidez en línea y de pH, respectivamente. Las tres fases para la fermentación de producción incluyen las fases de crecimiento exponencial, estacionaria y de autólisis. Se observa que la autólisis celular, que libera complejo de BoNT/A activo al medio de cultivo, se produce de manera sistemática entre 35 horas y el final de la fermentación. Al final de la fermentación, se enfría el cultivo hasta $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la recogida.

Una vez enfriado el medio de fermentación hasta $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, se separa el residuo celular a partir del lisado que contiene complejo de neurotoxina botulínica tipo A mediante filtración de profundidad, en primer lugar a través de un prefiltro de gradiente de clasificación de retención nominal de 5 - 0,9 µm para retirar el residuo celular y luego a través de un gradiente de clasificación de retención nominal de 0,8 - 0,2 µm positivamente cargado para retirar el ADN (retirada de hasta aproximadamente el 80 %). Ambos filtros se enjuagan juntos con 20 l de agua para inyección (API) antes de su uso. Se requiere un mínimo de 15 l del filtrado para el procesamiento adicional, y cualquier material en exceso se descontamina después de completarse el muestreo en proceso. Se almacena el filtrado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ si no se procesa inmediatamente mediante ultrafiltración.

Dentro de una cabina de bioseguridad (BSC), se concentra el filtrado de la etapa de recogida desde 15 l hasta $5 \pm 0,5$ l usando una membrana de filtración de flujo tangencial (TFF) de fibra hueca de GE Healthcare. Luego se diluye el material ultrafiltrado con tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5 hasta un volumen final de 20 l. Se purifica este material mediante el uso de una columna de cromatografía, dos columnas de cromatografía o tres columnas de cromatografía (véase la sección de etapas posteriores). Se almacena el material de recogida ultrafiltrado diluido a 4 °C si no se procesa inmediatamente mediante purificación.

En el procedimiento de Schantz, finaliza la etapa de cultivo y comienza la etapa de fermentación basándose en el tiempo y la observación visual del crecimiento de cultivo. En cambio, en los procedimientos del ejemplo 6, la determinación de cuándo finalizar la etapa de cultivo se basa en el análisis de la densidad óptica del fluido de cultivo, lo que garantiza que el cultivo se encuentra en la fase de crecimiento logarítmico en el momento del inicio de la etapa de fermentación y permite la reducción de la duración de la etapa de cultivo a de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 14 horas. La etapa de cultivo finalizada basándose en el parámetro de DO maximiza la salud de las células cultivadas y fomenta una toxina botulínica robusta y abundante resultante de la etapa de fermentación. La densidad óptica promedio (a 540 nm) del medio de cultivo al final del cultivo es de 1,8 UA. La duración promedio de la etapa de fermentación es de 72 horas y la turbidez final promedio (A_{890}) del medio de fermentación al final de la etapa de fermentación es de 0,15 UA. La cantidad promedio de complejo de toxina botulínica tipo A presente (tal como se determina mediante ELISA) en el medio de fermentación de 20 l (caldo completo) al final de la etapa de fermentación es de aproximadamente 64 µg de complejo de toxina botulínica tipo A/ml de medio de fermentación.

La etapa de recogida usa filtración de profundidad para retirar el residuo celular y los ácidos nucleicos, seguido de ultrafiltración y dilución para preparar el medio de fermentación para la siguiente etapa en el procedimiento. Esta eliminación de residuo celular/recogida es fundamentalmente diferente del procedimiento de recogida de Schantz, que usa precipitación por acidificación seguido de microfiltración y diafiltración para concentrar e intercambiar tampones en la preparación para el procesamiento adicional.

6.6.3. Etapas posteriores (purificación)

Las etapas posteriores incluyen purificación mediante una columna de cromatografía, dos columnas de cromatografía o tres columnas de cromatografía (por ejemplo, captura de la neurotoxina botulínica en una columna de intercambio aniónico, elución a partir de la columna y separación adicional de las impurezas mediante pulido en una columna de intercambio catiónico, y preferiblemente (en el

procedimiento de tres columnas), pase de eluyente que contiene la neurotoxina botulínica deseada a través de una tercera columna, preferiblemente una columna de interacción hidrófoba (por ejemplo, cromatografía), antes (preferiblemente) o después del procedimiento de dos columnas), seguido de concentración e intercambio de tampón usando filtración de flujo tangencial (TFF) y reducción de carga biológica (por ejemplo, mediante filtración adicional usando un filtro de 0,2 μm) para obtener un complejo de neurotoxina botulínica tipo A final optimizado para su almacenamiento en frío, preferiblemente congelación, y elaboración eventual para dar una composición farmacéutica de complejo de neurotoxina botulínica tipo A. Se pretende que la secuencia de las etapas de cromatografía y filtración retire el producto y las impurezas relacionadas con el procedimiento, retire los posibles agentes accidentales y controle la concentración de complejo de neurotoxina botulínica tipo A y la matriz de tampón de la neurotoxina botulínica tipo A final con el fin de proporcionar un principio activo más estable.

A continuación se describen varias realizaciones de procedimientos posteriores de dos columnas y tres columnas a modo de ejemplo. Se contemplan realizaciones adicionales en las que se cambia el orden de las columnas y los procedimientos se ajustan por consiguiente según se considere apropiado en función de la opinión y el juicio de un experto en la técnica, pero que por lo demás son similares a o esencialmente idénticas a las realizaciones descritas a continuación. También se contemplan realizaciones adicionales de procedimientos posteriores de una columna, cuyas realizaciones implican el uso de tan sólo una columna de cromatografía, pero por lo demás son similares a o esencialmente idénticas a las realizaciones descritas a continuación. Específicamente, este ejemplo contempla un procedimiento posterior de tres columnas que implica (1) el uso de HIC seguido de cromatografía de intercambio aniónico seguido de cromatografía de intercambio catiónico, (2) el uso de HIC seguido de cromatografía de intercambio catiónico seguido de cromatografía de intercambio aniónico, (3) el uso de cromatografía de intercambio aniónico seguido de HIC seguido de cromatografía de intercambio catiónico, (4) el uso de cromatografía de intercambio aniónico seguido de cromatografía de intercambio catiónico seguido de HIC, (5) el uso de cromatografía de intercambio catiónico seguido de HIC seguido de cromatografía de intercambio aniónico o (6) el uso de cromatografía de intercambio catiónico seguido de cromatografía de intercambio aniónico seguido de HIC. Este ejemplo también contempla un procedimiento posterior de dos columnas que implica (1) el uso de HIC seguido de cromatografía de intercambio aniónico, (2) el uso de HIC seguido de cromatografía de intercambio catiónico, (3) el uso de cromatografía de intercambio aniónico seguido de HIC, (4) el uso de cromatografía de intercambio aniónico seguido de cromatografía de intercambio catiónico, (5) el uso de cromatografía de intercambio catiónico seguido de HIC o (6) el uso de cromatografía de intercambio catiónico seguido de cromatografía de intercambio aniónico. Este ejemplo también contempla un procedimiento posterior de

una columna que implica el uso de HIC, el uso de cromatografía de intercambio aniónico o el uso de cromatografía de intercambio catiónico.

Una primera realización detallada de un procedimiento posterior de tres columnas a modo de ejemplo
 5 llevado a cabo es la siguiente. Se hace pasar material ultrafiltrado clarificado (diluido) (20 l, tal como se dio a conocer anteriormente) a través de una resina de cromatografía de intercambio aniónico POROS® 50HQ, se eluye la neurotoxina botulínica capturada a partir de la columna de intercambio aniónico y luego se hace pasar a través de una resina de cromatografía de intercambio catiónico POROS® 20HS, cuyo eluyente se hace pasar a través de una resina de cromatografía Phenyl Sepharose
 10 HP. El eluyente a partir de la columna de HIC se somete a filtración de flujo tangencial de 100 kDa, seguido de filtración a 0,2 µm. El complejo de neurotoxina botulínica tipo A resultante se congela para su almacenamiento.

En esta primera realización del procedimiento posterior de tres columnas a modo de ejemplo, la primera
 15 etapa de cromatografía del procedimiento posterior usa una resina de cromatografía de intercambio aniónico POROS® 50HQ empaquetada en una columna con un diámetro interno de aproximadamente 8 cm y una altura de columna de aproximadamente 15 cm. Toda la operación de columna POROS® 50HQ se completa a temperatura ambiental y el flujo es en la dirección descendente. El complejo de neurotoxina botulínica tipo A se eluye a partir de la columna aniónica usando un cambio gradual de pH
 20 en el que los componentes más negativamente cargados tales como los ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN) y otras proteínas de células huésped permanecen unidos a la columna de intercambio aniónico.

Los detalles de la etapa de intercambio aniónico son: uso de la columna POROS® 50HQ usando
 25 hidróxido de sodio 0,1 N durante un tiempo de contacto mínimo de 30 minutos (al menos aproximadamente 3 volúmenes de columna, a 230 cm/hora). Luego se equilibra la columna con un tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5 (al menos 5 volúmenes de columna). A continuación, se carga el material diluido y ultrafiltrado clarificado (es decir, material de fermentación APF de lisado procesado) a 230 cm/hora en la columna de intercambio aniónico POROS® 50HQ, seguido de lavado
 30 con al menos aproximadamente 20 volúmenes de columna de fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5 a 230 cm/hora hasta que la absorbancia a 280 nm del efluente de columna disminuye hasta 0,10 UA, seguido de elución con acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 a 230 cm/hora. Cuando la absorbancia a 280 nm (A_{280}) aumenta hasta al menos aproximadamente 0,15 UA y a lo largo del máximo de pico hasta igual a o menor de aproximadamente 0,2 UA en el borde posterior, se recoge el conjunto de producto

en un recipiente que contiene 1 volumen de columna de acetato de sodio 50 mM, pH 4,8. Se almacena este conjunto de elución a de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C durante hasta 48 horas.

La segunda etapa de cromatografía en esta primera realización del procedimiento posterior de tres columnas a modo de ejemplo de este ejemplo 6 usa una resina de cromatografía de intercambio catiónico POROS® 20HS empaquetada en una columna con un diámetro interno de 8 cm y una altura de columna de 5 cm. Toda la operación de columna POROS® 20HS se completa a temperatura ambiental y el flujo es en la dirección descendente. El complejo de neurotoxina botulínica tipo A se asocia con la resina de columna POROS® 20HS. Luego se eluye el complejo de neurotoxina botulínica tipo A a partir de la columna usando un cambio gradual de sales. Se eluyen las impurezas relacionadas con el producto con el tampón de lavado y la disolución de descontaminación.

Los detalles de la etapa de intercambio catiónico son: uso de la columna POROS® 20HS usando disolución de hidróxido de sodio 0,1 N durante un tiempo de contacto mínimo de 30 minutos (al menos aproximadamente 3 volúmenes de columna, a 230 cm/hora). Luego se equilibra la columna con un tampón acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 (al menos aproximadamente 5 volúmenes de columna). A continuación, se carga el conjunto de producto de POROS® 50HQ (recogido tal como se describió anteriormente, nuevo o procedente de refrigeración) en la columna POROS® 20HS. Luego se lava la columna con un tampón acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 (al menos aproximadamente 3 volúmenes de columna) y luego se lava de nuevo con un tampón acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 4,8. Se eluye el complejo de neurotoxina botulínica tipo A a partir de la columna POROS® 20HS con un tampón acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 4,8 a 200 ml/min, se desvía el eluato a una bolsa de recogida para bioprocesamiento (que contiene 1 volumen de columna de $\text{NaH}_3\text{C}_2\text{O}_2$ 50 mM, pH 4,8) cuando la A_{280} aumenta hasta aproximadamente $\geq 0,1$ UA a lo largo del máximo de pico hasta que la A_{280} del borde posterior del pico de elución disminuye hasta un valor de borde posterior de $\leq 0,1$ UA. Se almacena el conjunto de producto de POROS® 20HS en la bolsa de recogida a temperatura ambiental durante hasta aproximadamente 6 horas.

En esta primera realización del procedimiento de tres medios de cromatografía en columna a modo de ejemplo de este ejemplo 6, se hace pasar el eluyente procedente de la segunda columna (intercambio catiónico) a través de una columna de HIC. La columna de HIC usada es una resina de cromatografía de interacción hidrófoba Phenyl Sepharose HP empaquetada en una columna con un diámetro interno de aproximadamente 8 cm y una altura de columna de aproximadamente 5 cm. Toda la operación de columna Phenyl Sepharose HP se completa a temperatura ambiental y el flujo es en la dirección descendente. Se eluye el complejo de neurotoxina botulínica tipo A a partir de la columna usando un

cambio gradual de sales decreciente. Las impurezas se eluyen durante la carga y con el tampón de lavado y la disolución de descontaminación.

Los detalles de la etapa de cromatografía de interacción hidrófoba son: inicialmente se desinfecta una columna Phenyl Sepharose HP con una disolución de hidróxido de sodio 0,1 N durante un tiempo de contacto mínimo de 30 minutos (con al menos aproximadamente 3 volúmenes de columna de una disolución de hidróxido de sodio 0,1 N a 200 cm/hora). Luego se equilibra la columna con al menos aproximadamente 5 volúmenes de columna de tampón acetato de sodio 50 mM, 0,4 M sulfato de amonio, pH 4,8. A continuación, se combina 1:1 el conjunto de producto de POROS® 20HS (columna de intercambio catiónico) (de antes) con un tampón acetato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 0,8 M, pH 4,8 y se carga en una columna Phenyl Sepharose HP. En primer lugar se lava la columna con al menos aproximadamente 3 volúmenes de columna de un tampón acetato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 0,4 M, pH 4,8 y luego se lava con un tampón fosfato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 0,4 M, pH 6,5. Se eluye el complejo de neurotoxina botulínica tipo A a partir de la columna con un tampón fosfato de sodio 10 mM, sulfato de amonio 0,14 M, pH 6,5. Se desvía el eluato a una bolsa de recogida para bioprocesamiento cuando la A_{280} aumenta hasta $\geq 0,05$ UA. Se recoge el eluato hasta que la A_{280} del borde posterior del pico de elución disminuye hasta un valor de $\leq 0,05$ UA. Se almacena el conjunto de producto de Phenyl Sepharose HP en la bolsa de recogida a temperatura ambiental durante hasta 6 horas.

Se usa un sistema de filtración de flujo tangencial para concentrar y diafiltrar el conjunto de producto de etapa de cromatografía de Phenyl Sepharose HP en el tampón de formulación de principio activo. Se usan casetes Pall® Filtron Minimate con una membrana de 100 kDa de corte de peso molecular para las etapas de concentración y diafiltración. Luego se hace pasar el material formulado a través de un filtro Pall Mini Kleenpak® de 0,2 μm para reducir la posible carga biológica. La etapa de UF/DF concentra el conjunto de producto de Phenyl Sepharose HP (eluyente de la columna de HIC) hasta una concentración de complejo de BoNT/A de 0,7 g/l y diafiltra el material concentrado con un tampón citrato de potasio 10 mM, pH 6,5.

Los detalles del procedimiento de ultrafiltración/diafiltración usado son los siguientes. Inicialmente se lavan la unidad de UF/DF y la membrana de poliéter sulfona de 100 kDa de Pall con un mínimo de 5 l de agua para inyección (API) para eliminar la disolución de empaquetamiento y se desinfectan con un mínimo de 200 ml de una disolución de hidróxido de sodio 1 N en condiciones de recirculación durante un mínimo de 10 minutos, preferiblemente al menos 30 minutos, para desinfectar la unidad de UF/DF. A continuación, se equilibran la membrana y el sistema de UF/DF con volúmenes suficientes del tampón

de formulación citrato de potasio 10 mM, pH 6,5 hasta que el pH del permeado y del retenido es pH 6,5. Después de eso, se carga el conjunto de producto de Phenyl Sepharose HP en el casete de filtración de flujo tangencial Minimate® y se concentra el eluato de HIC hasta 0,7 g/l. Tras la etapa de concentración, se diafiltra el conjunto de retenido frente a un mínimo de 5 volúmenes de diafiltración del tampón de formulación de principio activo (citrato de potasio 10 mM, pH 6,5) a una presión transmembrana de 7,5 psig (libras por pulgada cuadrada manométricas). Luego se cierra la salida de permeado y se ejecuta el sistema de UF/DF durante al menos 2 minutos y se enjuaga el sistema con 50 ml de tampón de formulación citrato de potasio 10 mM, pH 6,5. Después del enjuague, se determina la concentración de complejo de BoNT/A en el conjunto de retenido midiendo la A_{278} fuera de línea y, basándose en la lectura de A_{278} , se ajusta la concentración del conjunto de retenido a 0,5 g/l con tampón citrato de potasio 10 mM, pH 6,5. Luego se filtra el conjunto de retenido con la concentración ajustada a través de un filtro Pall Mini Kleenpak™ de 0,2 µm para reducir la posible carga biológica. Se almacena el conjunto de retenido con la concentración ajustada filtrado en una bolsa de recogida a 2 °C - 8 °C durante hasta 2 días.

Con el complejo de neurotoxina botulínica tipo A purificado final obtenido se llenan crioviales Nunc® de 1 ml a 700 µl por vial y se almacena congelado. La operación de llenado se lleva a cabo en una cabina de bioseguridad de clase 100 a temperatura ambiental.

El procedimiento posterior (incluyendo el uso de 1 ó 2 ó 3 columnas de cromatografía) se completa en tan sólo de 1 a 3 días y el complejo de neurotoxina botulínica tipo A obtenido se almacena congelado en un tampón citrato de potasio, pH 6,5 a una concentración de 0,5 g/l como una disolución. En comparación, el procedimiento posterior (purificación de toxina) de Schantz usa múltiples etapas de filtración, precipitación, extracción y centrifugación para purificar el complejo de neurotoxina botulínica tipo A y requiere 1-2 semanas para completar sólo las etapas posteriores, y el principio activo resultante (neurotoxina botulínica recuperada) se almacena refrigerado como una suspensión en sulfato de amonio a una concentración de aproximadamente 2,7 g/l. El uso de cromatografía en lugar de precipitación y el tiempo de procesamiento reducido dan como resultado un procedimiento posterior sistemático significativamente mejorado, tal como se da a conocer en el presente documento.

Según un aspecto, las concentraciones de productos de origen vegetal, tales como productos a base de soja, pueden ser peptona de soja tipo II Hy-Soy® o SE50MK (una peptona de soja de Kosher) en medios de cultivo y fermentación. Hy-Soy® en el medio de cultivo de siembra puede oscilar entre 10 y 200 g/l. Preferiblemente, la concentración de Hy-Soy® en el medio de siembra oscila entre 15 y 150 g/l. Lo más preferiblemente, la concentración de Hy-Soy® en el medio de siembra está, de manera aproximada,

entre aproximadamente 20 y 30 g/l o una cantidad entremedias. La concentración de glucosa en el medio de siembra puede oscilar entre 0,1 g/l y 20 g/l. Preferiblemente, la concentración de glucosa oscila entre 0,5 y 15 g/l. Lo más preferiblemente, la concentración de glucosa en el medio de cultivo es de aproximadamente 10 g/l. Las cantidades de extracto de levadura pueden ser de desde aproximadamente 5 hasta 20 g/l, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta 15 g/l o una cantidad entremedias. Por ejemplo, el pH del medio de cultivo antes del crecimiento de *Clostridium botulinum* puede ser aproximadamente pH 7,0-7,5 o entremedias, preferiblemente pH 7,3.

Como un ejemplo, las cantidades de Hy-Soy® en el medio de fermentación de producción pueden oscilar entre 10 y 200 g/l. Preferiblemente, la concentración de Hy-Soy® en el medio de fermentación oscila entre 15 y 150 g/l. Lo más preferiblemente, la concentración de Hy-Soy® en el medio de fermentación está, de manera aproximada, entre aproximadamente 20 y 40 g/l o una cantidad entremedias. La concentración de glucosa en el medio de fermentación puede oscilar entre 0,1 g/l y 20 g/l. Preferiblemente, la concentración de glucosa oscila entre 0,5 y 15 g/l o una cantidad entremedias. No necesariamente, pero tal como antes, la glucosa puede esterilizarse en autoclave junto con los demás componentes del medio de fermentación. El nivel de pH del medio de fermentación antes del crecimiento puede ser pH 7,0-7,8, de manera preferible aproximadamente 7,0-7,5 o entremedias, más preferiblemente pH 7,3.

Una realización de un procedimiento posterior de dos columnas a modo de ejemplo comprende las siguientes etapas: (a) cultivar bacterias, tales como bacterias *Clostridium botulinum*, a partir de un vial de WCB APF, en un frasco de siembra/cultivo, (b) luego fermentar las bacterias *Clostridium botulinum* en un fermentador (fermentador de producción de toxinas) que tiene medio de fermentación APF para expandir la línea celular, procediendo a la fermentación y la producción de toxina botulínica hasta alcanzar una fase de lisis celular deseada. A continuación, (c) recoger (por ejemplo, clarificar mediante filtración) el medio de fermentación APF para obtener un medio de fermentación recogido, (d) proceder a la concentración y la dilución, dando como resultado un medio de fermentación recogido diluido que (e) se hace pasar a través de una columna de captura para eliminar las impurezas, (f) poner en contacto el eluyente de la columna de captura con una columna de pulido para eliminar adicionalmente las impurezas, y opcionalmente una segunda columna de pulido, (g) realizar concentración e intercambio de tampón del eluyente de columna de pulido, seguido de (h) realizar filtración para la reducción de carga biológica e (i) llenar los viales.

En un ejemplo, el volumen de fermentación es de 20 l, el tiempo total de procedimiento para todas las etapas es de tan sólo de 4 a 6 días y se obtiene un alto rendimiento de neurotoxina botulínica.

A continuación se proporcionan más detalles de una realización particular dentro del alcance de la presente invención. La etapa de fermentación se lleva a cabo en medio APF usando un fermentador de acero inoxidable de 30 l.

5

En este ejemplo a continuación, se usa un volumen muy reducido de medio de fermentación al tiempo que todavía se proporciona un alto rendimiento de complejo de neurotoxina botulínica tipo A de alta potencia. Usando el siguiente protocolo, se requieren tan sólo 20 l o menos, por ejemplo, de medio de fermentación APF, en lugar de los volúmenes previos normalmente más grandes (por ejemplo, 115 l) de medio de fermentación requeridos para producir cantidades comercialmente útiles para obtener una neurotoxina botulínica.

10

La estación de trabajo anaerobia MACS (Don Whitley) con esclusa proporciona un entorno deficiente en oxígeno en el que se manipulan organismos anaerobios. El acceso a y la salida de la cámara es a través de un sistema de portillos compuesto por puertas internas y externas. La unidad tiene la temperatura controlada para mantener el ajuste de un usuario dentro de la cámara. Una placa de condensación controlada por higrostató garantiza la eliminación eficaz del exceso de humedad en la cámara. La cámara está iluminada para el uso del operario y tiene alarma para: condiciones de baja presión de gas, flujo continuo de gas y pérdida de potencia. La cámara está equipada con un filtro HEPA para reducir los niveles de material particulado viable y no viable en la cámara anaerobia. Las condiciones anaerobias se mantienen utilizando el sistema de depuración atmosférica "Anotox" y el catalizador Palladium Deoxo "D". Se recoge el agua condensada a partir de la placa de condensación y se manda a través de tuberías a un depósito externo donde se elimina.

15

20

25

Tal como se dio a conocer anteriormente, se usa un procedimiento APF para la preparación de un WCB APF, que tiene viales de banco de células almacenados por debajo de -135 °C. Se descongela un vial de banco de células WCB APF a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 min antes de la inoculación de medio de cultivo, seguido de una única etapa de cultivo tal como se dio a conocer anteriormente para establecer un cultivo "de siembra". Esto se lleva a cabo en un sistema controlado atmosférico modular utilizando técnicas asépticas en todo, para minimizar la carga biológica. El sistema controlado atmosférico modular se limpia antes de llevar a cabo la inoculación del vial de cultivo de siembra completado con el contenido del vial de WCB APF. El medio de cultivo se prepara usando ácido clorhídrico 1 N e hidróxido de sodio 1 N (para el ajuste de pH), D(+)-glucosa anhidra (Mallinckrodt Baker, n.º de cat. 7730, 4,00 g), peptona de soja tipo II (SPTII) (Marcor, n.º de cat. 1130, 8,00 g), 400,0 ml de agua para inyección (API) y extracto de levadura (YE) (BD, n.º de cat. 212730,

30

35

4,00 g). La disolución de peptona de soja tipo II y extracto de levadura se prepara midiendo 300 ml de API con una probeta de 500 ml y se vierte en un frasco de cultivo de siembra. Se coloca el frasco de cultivo de siembra sobre un agitador y se activa el agitador. Se añaden 8,00 g de SPTII y 4,00 g de extracto de levadura al frasco de cultivo de siembra y se mezclan hasta su disolución. Si la disolución no se completa después del mezclado, se calentará la mezcla a baja temperatura. Se mide el pH y se ajusta a aproximadamente $7,30 \pm 0,05$. Se lleva la disolución de medio hasta aproximadamente 360 ml con API. Se ventila adecuadamente el frasco de cultivo de siembra para permitir la transferencia de vapor y gas. Se prepara una disolución de glucosa al 10 % (p/v) midiendo aproximadamente 30 ml de API con una probeta de 100 ml y se coloca en el frasco de adición de glucosa previamente montado, que se coloca sobre un agitador y se activa el agitador. Se añaden aproximadamente 4,00 g de glucosa al frasco de adición de glucosa y se mezclan hasta su disolución (se usa calentamiento bajo si es necesario para la disolución) y c.s. (cantidad suficiente) de disolución de glucosa hasta 40 ml con API. Luego se tapa el frasco de adición de glucosa holgadamente con un tapón de ventilación. Ambos frascos de glucosa y cultivo de siembra se introducen en un autoclave a 123 °C durante 30 minutos para la esterilización. Después de la esterilización, ambos elementos se sacan del autoclave y se dejan enfriar en una cabina de bioseguridad. Después de enfriar asépticamente, se transfiere el 10 % de la disolución de glucosa al frasco de cultivo de siembra que contiene la disolución de extracto de levadura y peptona de soja II y se mezcla, proporcionando de ese modo un frasco de cultivo de siembra completado.

Este frasco de cultivo de siembra completado se coloca en el MACS previamente limpiado (en el que se coloca un indicador anaerobio preparado). Se afloja el tapón del frasco de cultivo de siembra completado. Luego se coloca el frasco de cultivo de siembra completado sobre una placa de agitación dentro del MACS (placa de agitación activada a aproximadamente 150 rpm) y se reduce el medio en el frasco de cultivo de siembra completado durante un mínimo de 12 horas a aproximadamente 34,5 °C $\pm$ 1 °C dentro del MACS, tras lo cual se toman muestras de un 1 ml de blanco de medio para la medición de densidad óptica (para la determinación de biomasa a 540 nm). Después de eso, se inocula el frasco de cultivo de siembra completado en el MACS (condiciones anaerobias). Se obtiene un vial de cultivo de WCB APF a partir del banco de células congelado y se lleva al MACS. Se descongela el vial durante aproximadamente 10-15 minutos, tras lo cual se colocan aproximadamente 400 µl del contenido del vial directamente en el medio en el frasco de cultivo de siembra completado. Se afloja completamente el tapón del frasco de cultivo de siembra completado y se deja reposar el tapón sobre la parte superior del frasco y se ajusta la velocidad de agitación a 150 rpm. Después de al menos aproximadamente 11 horas de incubación en el MACS, se lleva a cabo la producción de fermentación, tal como se describe a continuación.

Se verifican y calibran las sondas (por ejemplo, sonda redox, sonda de pH, sonda de turbidez, por ejemplo, de Broadley James y Optek) y la configuración de secuencia del fermentador, tal como un fermentador de acero inoxidable de 30 l, y se insertan en sus respectivos puertos de fermentador y ajustan en su lugar. Por ejemplo, un fermentador puede ser un sistema de fermentador ABEC 30 L (VT) que
 5 consiste en un recipiente de fermentador de 30 l de volumen, un sistema de accionamiento de agitador, un conjunto de tuberías para conexiones de servicios (CIP, vapor limpio, CDA, nitrógeno, oxígeno, agua enfriada del procedimiento, desechos biológicos y vapor de planta), instrumentación (pH, temperatura, presión, redox, densidad óptica y flujo másico) y cuatro bombas peristálticas. Se controla la velocidad de agitador montado en la parte inferior usando un accionador de frecuencia variable (VFD) de Allen-
 10 Bradley. Se manipula el control semiautomático y automático del sistema mediante un PLC ControlLogix de Allen-Bradley con programación. El sistema está diseñado para proporcionar un control PID (proporcional-integral-derivativo) de bucle cerrado de temperatura, presión, pH y redox del cultivo durante las operaciones de fermentación. Se utiliza un dispositivo DeviceNet® de Allen-Bradley (una red abierta a nivel de dispositivo) para el control y la comunicación con dispositivos y sensores en
 15 la plataforma.

Para los modos de mantenimiento en condiciones estériles, equilibrio, ejecución y recogida, la agitación, la temperatura, la presión y la superposición de nitrógeno se hacen funcionar con los siguientes puntos de consigna.

Para el modo de mantenimiento en condiciones estériles y equilibrio:

Parámetro controlado	Intervalo y puntos de consigna
Agitación	100 rpm $\pm$ 10
Superposición de nitrógeno	12 SLPM $\pm$ 2
Presión de fermentador	5 psig $\pm$ 1
Temperatura de fermentador	35 $\pm$ 1 °C
Redox	de -390 a -150 mV

Para el modo de ejecución:

Parámetro controlado	Intervalo y puntos de consigna
Agitación	70 rpm $\pm$ 5
Superposición de nitrógeno	12 SLPM $\pm$ 2
Presión de fermentador	5 psig $\pm$ 1
Temperatura de fermentador	35 $\pm$ 1 °C

Para el modo de recogida:

Parámetro controlado	Intervalo y puntos de consigna
Agitación	150 rpm $\pm$ 10
Superposición de nitrógeno	10 SLPM $\pm$ 2
Presión inicial de fermentador	0 psig
Temperatura de fermentador	25 $\pm$ 1 °C

Para preparar el medio de fermentación, el material necesario incluye D(+)-glucosa anhidra (Mallinckrodt Baker, n.º de cat. 7730, 300,0 g), peptona de soja tipo II (SPTII) (Marcor, n.º de cat. 1130, 650,0 g), agua para inyección (API, 13 l) y extracto de levadura (YE) (BD, n.º de cat. 212730, 240,0 g), junto con balanzas convencionales, una garrafa (20 l, por ejemplo), un frasco de vidrio (5 l), probetas, barras de agitación y agitadores. Se añaden aproximadamente 10 l de API a la garrafa junto con una barra de agitación. Se coloca la garrafa sobre un agitador y se activa el agitador, tras lo cual se añaden aproximadamente 650,0 g de peptona de soja tipo II, junto con aproximadamente 240,00 g de YE. El medio de fermentación es c.s. (cantidad suficiente) hasta 13 l con API, y se tapa la garrafa. Luego se prepara una disolución de glucosa al 10 % (p/v) añadiendo aproximadamente 2 l de API a un frasco de vidrio de 5 l (con barra de agitación en el mismo). Se coloca sobre un agitador y, con la barra girando, se añaden al frasco aproximadamente 300,00 g de glucosa y se mezclan hasta su disolución. La disolución de glucosa es c.s. hasta 3 l con API y se tapa el frasco, proporcionando así una disolución de glucosa al 10 %.

Se añade el medio de fermentación en la garrafa al fermentador y se registra el volumen de fermentador antes de la esterilización *in situ* y se avanza en la secuencia de operación de fermentación. Al final de SIP (esterilización *in situ*) (122 °C $\pm$ 1 °C), se anota el volumen de fermentador después de SIP. Se conecta al fermentador un conjunto de adición de glucosa, que comprende un recipiente que tiene un tubo desde el mismo con un filtro de 0,2 μ m en línea (PALL Corp.) y una bomba peristáltica y se somete la línea a SIP y se deja enfriar. Se abre un puerto de válvula de adición y se añaden aproximadamente 3 l de glucosa (esterilizada por filtración), y se añade la cantidad apropiada de API (esterilizada por filtración) hasta c.s. del volumen de fermentador total hasta 20 L al frasco de adición de glucosa y se bombea al fermentador a través de la misma línea de filtración de glucosa. Se cierra el puerto de válvula de adición. Después de eso, el medio de fermentación de producción tiene su pH ajustado, hasta aproximadamente pH 7,3 $\pm$ 0,05, con hidróxido de sodio 1 N o ácido clorhídrico 1 N estéril, utilizando SIP de líneas de adición, según se requiera. Después de eso, se ajustan los parámetros para el mantenimiento en condiciones estériles y se mantienen durante aproximadamente 12 horas antes de la inoculación. Se mide la concentración de glucosa inicial del medio usando un analizador de metabolitos y se registra la concentración de glucosa.

Tal como se indicó anteriormente, al final de la incubación del cultivo de siembra (aproximadamente 11 ± 1 horas), se toma 1 ml de muestra para la medición de densidad óptica (DO). La DO se mide fuera de línea a 540 nm usando un espectrofotómetro y, si está dentro del intervalo apropiado, se registra el valor de DO y se usa el cultivo para la fermentación. Se ajusta a cero por consiguiente la sonda de turbidez del fermentador. Se lleva el frasco de inóculo de siembra desde la cámara anaerobia hasta el fermentador y un conjunto de transferencia de inóculo de siembra (un recipiente de siembra con medio de cultivo APF en el mismo, teniendo el recipiente una línea de transferencia de inóculo de cultivo con un conjunto de conector Kleenpak™ estéril disponible de PALL Corp. o Millipore). Luego se fija la línea de transferencia de inóculo de siembra a una bomba peristáltica y se conecta la línea de transferencia de inóculo con el conector Kleenpak estéril al fermentador. Se reduce la presión del fermentador hasta 2 psig y se bombea todo el volumen del frasco de inóculo de siembra al fermentador. Al final de la inoculación, se registran las unidades de absorbancia (UA) en línea a partir del fermentador, se ajustan los parámetros del fermentador al modo de ejecución y se registra el tiempo.

Luego se procede a la fermentación (las ejecuciones de fermentación pueden ser de desde aproximadamente 60 horas hasta aproximadamente 80 horas, preferiblemente desde aproximadamente 68 horas hasta aproximadamente 76 horas, lo más preferiblemente durante aproximadamente 72 horas) mientras que se toman muestras del fermentador, a las 24 y 48 horas, por ejemplo, al tiempo que se mantienen condiciones asépticas. Las pruebas que se ejecutan en al menos una muestra tomada durante la fermentación pueden incluir, pero no se limitan a, mediciones de densidad óptica fuera de línea, mediciones de glucosa, ELISA, SDS-PAGE, inmunotransferencia de tipo Western, por ejemplo. Al final de la fermentación (el volumen de caldo al final de la fermentación es de aproximadamente 18-19 l, por ejemplo), puede tomarse una muestra (para las pruebas, por ejemplo, mediciones de densidad óptica fuera de línea, mediciones de glucosa, ELISA, SDS-PAGE, inmunotransferencia de tipo Western y cuantificación de ADN/ARN).

Al final de la fermentación, se registran la densidad óptica en línea, el EFT (tiempo de fermentación transcurrido) y el tiempo de finalización de fermentación, así como la agitación en rpm, la temperatura en °C, la presión en psig, la superposición de nitrógeno en slpm y el redox en mV. A continuación, se somete a recogida el caldo de fermentación de producción, es decir, se clarifica el caldo de fermentación de producción a través de filtración, mediante lo cual, por ejemplo, se recogen aproximadamente 15 l de filtrado. Se ajustan los parámetros de fermentación para la recogida y se prepara el conjunto de filtros para la clarificación (CUNO, filtración 3M) que incluye un prefiltro, un filtro de profundidad y al menos un manómetro. El prefiltro y el filtro de profundidad se lavan con aproximadamente 20 l de agua para

inyección. Después del lavado, se conecta el conjunto de filtración al puerto de recogida/drenaje del fermentador. Se disminuye la temperatura del fermentador hasta aproximadamente 25 °C, tras lo cual comienza la clarificación del caldo de fermentación (registro de tiempo de inicio de la clarificación, DO en línea inicial, pH inicial, temperatura inicial y volumen de fermentador inicial). Se aumenta la presión en el fermentador a una velocidad de aproximadamente 1 psi (libra por pulgada cuadrada) aproximadamente cada 10 minutos durante la filtración, hasta alcanzar una presión de aproximadamente 6 psi, presión a la que se mantiene hasta el final de la recogida. Este filtro retira aproximadamente el 80 % del ARN/ADN en el medio de fermentación APF (la parte restante se retira esencialmente durante las últimas etapas de cromatografía, tal como se comenta a continuación), acabando así con la dependencia/utilización previa de ARNasa y/o ADNasa para retirar tales componentes a partir del caldo de fermentación. Los parámetros del procedimiento, tales como presión de entrada al prefiltro, presión de entrada al filtro de profundidad, presión del fermentador, agitación y volumen de filtrado, se monitorizan cada 2 l de filtrado recogido, al final del cual se registran el tiempo de finalización de clarificación y el volumen de filtrado recogido. Tras completarse la etapa de recogida, se descontaminan y limpian los sistemas.

Se lleva la garrafa de filtrado a la BSC para el muestreo, de la cual se muestrean aproximadamente ≤10 ml de filtrado para las mediciones de DO fuera de línea y otros análisis (por ejemplo ELISA, SDS-PAGE, ADN/ARN e inmunotransferencia de tipo Western).

Luego se somete el filtrado a ultrafiltración/dilución. Se monta un conjunto de unidades de filtración de flujo tangencial (TFF). Se enjuaga la unidad de TFF durante aproximadamente 90 minutos con API a una velocidad preferida de aproximadamente 2 l por minuto y luego se desinfecta la unidad de TFF haciendo pasar hidróxido de sodio 0,1 N (recirculado) a través de la misma durante aproximadamente 60 minutos, tras lo cual se hace pasar 1 l de tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5 a través de la misma, seguido de un enjuague con API durante aproximadamente 30 minutos. Luego se hace pasar el filtrado procedente de la etapa de recogida (aproximadamente 15 l) a través de TFF (eso se lleva a cabo en una cabina de bioseguridad), concentrando el filtrado hasta aproximadamente 5 l +/- 0,5 l (la etapa de concentración avanza a aproximadamente 2 l por minuto y a una presión transmembrana de aproximadamente 5 psig). Puede tomarse una muestra del permeado y someterse a pruebas de ELISA, ADNbc, SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western, por ejemplo. Una vez concentrado hasta aproximadamente 5 l +/- 0,5 l, luego se diluye el conjunto de retenido hasta aproximadamente 20 l con aproximadamente 15 l de tampón fosfato de sodio 10 mM esterilizado por filtración, pH 6,5 a través de TFF, a una velocidad de aproximadamente 2 l por minuto. Luego puede tomarse de nuevo una muestra

y someterse a pruebas de ELISA, ADN/ARN, SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western, por ejemplo. El material de ultrafiltración/dilución (retenido) se almacena a 4 °C.

Tras el uso se descontaminan todos los sistemas usando o bien hidróxido de sodio 1 N o bien
5 temperaturas de esterilización (vapor) y se limpian.

Se usan los siguientes materiales, equipos y procedimientos para preparar las disoluciones, los
tampones, etc., expuestos a continuación para su uso en un procedimiento a modo de ejemplo, es decir,
en la purificación del medio de fermentación obtenido a partir de los procedimientos del ejemplo 6 para
10 obtener un complejo de neurotoxina botulínica tipo A purificado. Los tampones a modo de ejemplo
utilizados (filtrados a través de un filtro de vacío de 0,2 micrómetros y su conductividad medida en
mS/cm, para el mantenimiento de registros) incluyen: fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5; fosfato de sodio
50 mM, pH 6,5; acetato de sodio 50 mM, pH 4,8; acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 170 mM,
pH 4,8; acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 4,8; acetato de sodio 50 mM, cloruro de
15 sodio 1 M, pH 4,8; acetato de sodio 50 mM, pH 4,0 y citrato 10 mM, pH 6,5.

Lo siguiente es un ejemplo de operaciones para la purificación y la obtención de neurotoxina botulínica
tipo A a partir de los procedimientos del ejemplo 6. Todas las partes en contacto con producto están
diseñadas y construidas para garantizar que no son reactivas ni absorbentes. Adicionalmente, todos los
20 equipos están diseñados para permitir la utilización de sistemas desechables de un solo uso o están
diseñados y contruidos para facilitar la desinfección, la limpieza y la descontaminación según métodos
validados documentados. Los sistemas o las plataformas están diseñados para no estar en contacto con
producto, mientras que las trayectorias de flujo están diseñadas para ser desechable de un solo uso,
incluyendo las columnas de cromatografía y todas las tuberías asociadas. Los componentes de
25 cromatografía se obtienen de AlphaBio y los componentes de UF/DF se obtienen de Scilog Inc. Las
configuraciones de cromatografía usadas incluyen una bomba peristáltica para el suministro de
disolución con un accionador de velocidad variable, un colector de válvula de entrada con 5 entradas,
un colector de válvula de columna con una serie de 3 válvulas automáticas, un colector de válvula de
salida con 3 salidas, monitorización de efluente de columna, incluyendo pH, conductividad y UV,
30 recogida de picos basada en absorbancia UV, e instrumentación y controles requeridos para completar
las operaciones de purificación. El sistema de control tiene tanto el software como el hardware diseñados
para controlar el procedimiento de purificación. Las órdenes y los datos se introducen mediante un
terminal HMI (interfaz hombre-máquina). El operario inicia todas las funciones de procedimiento
automatizadas mediante órdenes a la HMI y monitoriza y ajusta los parámetros de procedimiento tales

como los caudales de alimentación, la presión, la conductividad, el pH, la absorbancia UV y las posiciones de válvulas individuales.

5 El sistema de UF/DF incluye una bomba de recirculación, una bomba de diafiltración, 2 balanzas y un soporte de filtro de flujo tangencial (TFF). La bomba de recirculación se interconecta con 3 sensores de presión desechables y una de las balanzas (ubicada en el depósito de permeado) para el control del caudal para mantener una presión transmembrana definida y la parada, basándose en el peso del depósito de permeado. La bomba de diafiltración se interconecta con la segunda balanza (ubicada en el depósito de retenido) para el inicio y la parada, basándose en el mantenimiento de un peso constante del depósito de retenido.

10 Después de la concentración y la dilución del material retenido procedente de la etapa de recogida (recogida del medio de fermentación libre de proteínas animales), se carga el material en una columna de intercambio aniónico. Lo siguiente es el procedimiento usado para empaquetar y someter a prueba la columna de intercambio aniónico útil en el procedimiento de dos columnas del ejemplo 6 a modo de ejemplo.

20 Se usan columnas preempaquetadas para las tres etapas cromatográficas. En primer lugar, se hace pasar el material de alimentación (medio APF recogido que se ha sometido a ultrafiltración/dilución) a través de la columna de intercambio aniónico (Poros 50HQ de ABI, tal como se describió anteriormente). Se utilizan al menos 5 volúmenes de columna (VC) de fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5 para equilibrar la columna de intercambio aniónico (en este ejemplo, una columna de captura).

25 Después del equilibrado, se realiza la etapa de carga, en la que se carga el material de alimentación (caldo de fermentación recogido después de la etapa de recogida, de aproximadamente 20 l, por ejemplo) en la columna de intercambio aniónico a una velocidad de aproximadamente 200 cm/h, por ejemplo. Después de haber pasado 0,5 volúmenes de columna de material cargado a través de la columna de intercambio aniónico, se recoge el conjunto de fracción no retenida (FT) en un receptáculo tal como un recipiente de poliéter sulfona, mientras que el complejo de toxina se une al material de la columna de intercambio aniónico. A esto le sigue una etapa de lavado, en la que se hacen pasar al menos aproximadamente 15 volúmenes de columna del tampón de lavado (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM a un pH de 6,5) a través de la columna de intercambio aniónico. La etapa de lavado se detiene cuando la lectura de UV, medida a la salida de la columna, en tiempo real, disminuye hasta menos de o igual a aproximadamente 80 mUA. Se registran el volumen de tampón de lavado y el volumen de conjunto de fracción no retenida/lavado y se toma y analiza una muestra de 1 ml del conjunto de fracción

no retenida/lavado, por ejemplo, para determinar la concentración de toxina, el contenido de ácido nucleico, proteínas de células completas, SDS-PAGE, qPCR, 2D CL y ELISA.

La siguiente etapa es la etapa de elución, en la que se bombea tampón de elución (por ejemplo, acetato de sodio 50 mM, pH 4,8) a la columna de intercambio aniónico. Cuando la lectura de UV a la salida de la columna, en tiempo real, aumenta hasta aproximadamente 150 mUA o más, se comienza la recogida de eluato en un recipiente llenado previamente con 1 VC de tampón de elución (acetato de sodio 50 mM, pH 4,8). La recogida de conjunto de eluato se detiene cuando la lectura de UV disminuye hasta menos de o igual a aproximadamente 200 mUA (el volumen recogido en este punto es de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 VC). Luego se descontamina y limpia el sistema de cromatografía usando hidróxido de sodio 1 N.

Luego se prepara el conjunto de eluato procedente de la columna de intercambio aniónico para su adición a la columna de intercambio catiónico. Se registran el volumen de eluato de intercambio, el pH, la conductividad y la temperatura de alimentación y se diluye el conjunto de eluato procedente de la columna de intercambio aniónico con 1 VC de acetato de sodio 50 mM, pH 4,8.

Tras el paso a través de la columna de intercambio aniónico, se lleva a cabo la operación de cromatografía de intercambio catiónico. Se equilibra la columna de intercambio catiónico (por ejemplo, Poros® 20HS) con un mínimo de 5 VC de tampón de equilibrado (acetato de sodio 50 mM, pH 4,8). Después del equilibrado, se carga el conjunto de eluato diluido procedente de la columna de intercambio aniónico en la columna de intercambio catiónico y se registra el volumen total cargado. Después de haber pasado 0,5 volúmenes de columna de conjunto de eluato diluido cargado a través de la columna de intercambio catiónico, se recoge el conjunto de fracción no retenida (FT). Se lleva a cabo un primer lavado de la columna de intercambio catiónico, en el que se hacen pasar aproximadamente 3-5 VC de acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 a través de la columna de intercambio catiónico (se registra el volumen del primer tampón de lavado utilizado). Se realiza un segundo lavado, en el que se bombean aproximadamente 3 VC de cloruro de sodio 170 mM, acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 a través de la columna, recogándose este eluato en un nuevo recipiente etiquetado como “pico de lavado 2”. La recogida se comienza cuando las lecturas de UV aumentan hasta más de o igual a 50 mUA. Se recoge 1 VC y se registra el volumen del segundo tampón de lavado utilizado.

La elución de complejo de toxina a granel a partir de la columna de intercambio catiónico se lleva a cabo utilizando tampón de elución (por ejemplo, cloruro de sodio 250 mM en acetato de sodio 50 mM, pH 4,8) que se bombea a la columna de intercambio catiónico. Cuando la lectura de UV de la elución

alcanza al menos aproximadamente 100 mUA, se comienza la recogida de eluato en los recipientes previamente llenados con tampones de dilución (40 ml de fosfato de potasio 100 mM, pH 6,8 y 60 ml de citrato de potasio 10 mM, pH 6,5). La recogida de eluato procedente de la columna de intercambio catiónico continúa hasta que la lectura de UV disminuye hasta aproximadamente 100 mUA o menos. Se registra el volumen total de eluato, después de la dilución. Luego se descontamina y limpia el sistema de cromatografía de intercambio catiónico.

Tras la elución a partir de la columna de intercambio catiónico, el eluato se somete a filtración. Se utiliza un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF), que usa tres membranas de 100 K de MWCO (Sartorius AG, Goettingen, Alemania) apiladas una encima de otra. Se anota el volumen inicial de conjunto de eluato de intercambio catiónico, al igual que las descripciones de la disolución de diafiltración/equilibrado y saneamiento. Por ejemplo, la disolución de diafiltración puede ser citrato de potasio 10 mM, pH 6,5 y la disolución de saneamiento puede ser hidróxido de sodio 0,1 N. Se procede a la configuración del sistema conectando un tubo desde el depósito que contiene el eluato o bien procedente de la columna catiónica (IAPF) o bien procedente de la columna de HIC (FAPF), conteniendo el eluato toxina botulínica, a través de la cabeza de bomba de ultrafiltración a la entrada de la membrana de filtración de flujo tangencial. Se conecta un segundo tubo desde la salida de permeado de la membrana de filtración de flujo tangencial al recipiente de permeado de ultrafiltración (UF). Se fija un tubo desde la salida de retenido de la membrana de filtración de flujo tangencial hasta el depósito de retenido y también se fija un cuarto tubo desde el depósito intermedio de diafiltración (DF) a través de la cabeza de bomba de diafiltración y al depósito de retenido. Se lava el depósito intermedio de almacenamiento del sistema, al igual que la membrana, lavando la membrana con al menos aproximadamente 720 ml de agua para inyección (API), dirigiendo el retenido al desecho, tras lo cual se lava adicionalmente la membrana con al menos aproximadamente 4200 ml de agua para inyección, recirculando el retenido al depósito. Después de esto, se lleva a cabo el saneamiento de la membrana (si es necesario) lavando la membrana con al menos aproximadamente 200 ml de hidróxido de sodio 1 N, dirigiendo el retenido al desecho, seguido de un lavado de la membrana con al menos aproximadamente 200 ml de NaOH 1 N, recirculando el retenido al depósito durante un mínimo de 30 minutos. Luego se realiza el equilibrado, lavando la membrana con tampón de equilibrado (citrato de potasio 10 mM a un pH de 6,5), dirigiendo el retenido al desecho hasta que el pH del retenido y permeado está dentro de +/- 0,2 unidades del pH del tampón de equilibrado (por ejemplo, dentro de +/- 0,2 unidades de pH 6,5).

Se determina la concentración del material (eluato (conjunto de producto) procedente de la columna de intercambio catiónico) para ver si es apropiada una dilución o concentración (procesamiento a modo de ejemplo) (una concentración objetivo de ejemplo puede ser de aproximadamente 0,7 mg/ml). La

dilución se logra utilizando citrato de potasio 10 mM, pH 6,5. Se determina un volumen objetivo, por ejemplo, para una concentración de producto de 0,7 mg/ml (volumen objetivo = (concentración inicial/volumen inicial)/0,7 mg/ml).

5 Se carga el conjunto de producto (eluato (procesado por consiguiente o no) procedente de la columna de intercambio catiónico) sobre la membrana y se ejecuta la recirculación (con la salida de permeado cerrada) del sistema (sistema de TFF) durante al menos 2 minutos sin contrapresión, tras lo cual se abre lentamente la válvula de permeado al tiempo que se ajusta la válvula de contrapresión del retenido a una presión transmembrana objetivo de aproximadamente 7 psig. Para la dilución, se añade citrato de potasio
10 10 mM, pH 6,5 hasta un volumen objetivo y se pasa a la diafiltración sin ultrafiltración; para la concentración, se comienza la ultrafiltración. Para la diafiltración, se recoge el desecho de permeado en un nuevo recipiente (el volumen de diafiltración objetivo es 5 veces el volumen de diafiltración) y se diafiltra con al menos 5 volúmenes de diafiltración de citrato de potasio 10 mM, pH 6,5. Se recogen los datos de procedimiento de diafiltración a intervalos de al menos 10 minutos (peso de permeado en
15 g/volumen en ml, presión de entrada (psig), presión de retenido (psig), presión de permeado (psig) y presión transmembrana (psig)). Para la recirculación/y el enjuague, con el filtro de salida de permeado cerrado, se recircula/ejecuta el sistema durante al menos 2 minutos sin contrapresión y se enjuaga el sistema con al menos 20 ml de citrato de potasio 10 mM, pH 6,5. El conjunto de producto incluye el retenido y el enjuague. Puede tomarse una muestra del conjunto de producto y someterse a análisis de
20 verificación incluyendo, por ejemplo, pruebas de UV a 278nm, SDS-Page, LcHPLC, SE-HPLC, qPCR, RP-HPLC, Native-Page, AUC, lisado de amebocitos de Limulus, inmunotransferencia de tipo Western y ELISA. Para la limpieza posterior al uso, se lava el sistema con hidróxido de sodio 1 N, se recircula durante al menos 10 minutos, tras lo cual se lava y se almacena el sistema con hidróxido de sodio 0,1 N en el mismo.

25 Luego se llevan a cabo la esterilización por filtración y el llenado para almacenar y dividir la neurotoxina a granel. Se realiza el ajuste de la concentración para ajustar la concentración de toxina, usando citrato de potasio 10 mM, pH 6,5, a aproximadamente 0,5 mg/ml con la muestra posterior al enjuague. Si la concentración de toxina es menor de aproximadamente 0,5 mg/ml, entonces no es necesario el ajuste de
30 concentración.

Usando una pipeta estéril, se preparan alícuotas de 10 ml/0,75 ml en cada uno de los tubos de muestra de 15 ml/1,5 ml estériles. Se agita suavemente el recipiente de producto a mano y se transfiere la cantidad requerida de disolución (que contiene principio activo a granel, es decir, toxina botulínica a granel) a

cada vial. Se almacenan las muestras un máximo de 5 días a 2 °C - 8 °C en una nevera o se transfieren 0,75 ml del conjunto de producto de filtrado a crioviales. Los crioviales se almacenan a -70 °C +/- 5 °C.

6.7. Ejemplo 7: Procedimiento cromatográfico en columna para la obtención de una neurotoxina botulínica

5 Este ejemplo describe un procedimiento cromatográfico en columna para la obtención de una neurotoxina botulínica. Se contempla que determinadas etapas descritas en el ejemplo 5, determinadas etapas descritas en el ejemplo 6 y determinadas etapas descritas en este ejemplo 7 pueden combinarse o intercambiarse entre sí para la obtención de la neurotoxina botulínica según se considere apropiado en función de la opinión y el juicio de un experto en la técnica.

10

Se cultivan las bacterias *Clostridium botulinum* y se les permite crecer hasta completarse la fermentación. Luego se usa el cultivo de fermentación en el siguiente procedimiento de purificación:

15 Se somete el cultivo de fermentación a precipitación con ácido usando ácido sulfúrico 3 M para reducir el pH hasta 3,5 a una temperatura que es inferior a 25 °C. Luego se somete el precipitado ácido a filtración de flujo tangencial de 0,1 µm para concentrar la masa celular. Luego se ajusta el pH a 6,0 y se añaden nucleasas para reducir el contenido de ácido nucleico de células huésped. Luego se realiza clarificación por centrifugación para retirar el residuo celular y se realiza filtración en línea a 0,2 µm con la adición de sulfato de amonio. Luego se carga directamente el filtrado en la columna de interacción

20 hidrófoba, Phenyl Sepharose HP (GE Life Sciences), se eluye con un gradiente descendente de sulfato de amonio y se aísla el pico de producto.

Opcionalmente se usan columna de intercambio aniónico y/o columna de intercambio catiónico antes o después de la columna de interacción hidrófoba. Si se usan columna de intercambio aniónico y/o

25 columna de intercambio catiónico, se usan preferiblemente después de la columna de interacción hidrófoba.

7. INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA

Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad y para todos los propósitos en la misma medida que si se indicara específica e

30 individualmente que cada publicación o patente o solicitud de patente individual se incorpora como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Pueden realizarse muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin alejarse de su espíritu y alcance, tal como resultará evidente para los expertos en la técnica. Las realizaciones específicas descritas en el presente documento se ofrecen a modo de ejemplo únicamente, y la invención debe limitarse únicamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de equivalentes a los que dan derecho tales reivindicaciones.

5

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una pluralidad de especies de complejo de neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipo A (BoNT/A) de 900 kDa, en la que el nivel de oxidación de las especies de neurotoxina de 150 kDa presentes en la composición es menor del 6 % en cada una de las siguientes posiciones: 411 (M411) tal como se muestra en SEQ ID NO: 2, 550 (M550) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3, 1004 (M1004) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 y 1144 (M1144) tal como se muestra en SEQ ID NO: 3.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que el complejo de BoNT/A de 900 kDa es onabotulinumtoxina A.
3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es menor del 5 %.
4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el nivel de oxidación en la posición M411 de SEQ ID NO. 2 es de aproximadamente el 2 %.
5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es menor del 1 %.
6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el nivel de oxidación en la posición M550 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 0,5 %.
7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es menor del 3 %.
8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el nivel de oxidación en la posición M1004 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 %.
9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es menor del 6 %.
10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el nivel de oxidación en la posición M1144 de SEQ ID NO. 3 es de aproximadamente el 2 %.

11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el nivel de oxidación se determina mediante CL-EM/EM.
- 5 12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la composición comprende menos del 3 % de proteína de células huésped.
13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la composición tiene una potencia de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ unidades/mg a aproximadamente $6,0 \times 10^7$ unidades/mg.
- 10 14. Composición según la reivindicación 13, en la que la potencia se determina usando un ensayo de dosis letal del 50 % (DLM_{50}) en ratón.
- 15 15. Composición según la reivindicación 13, en la que la potencia se determina usando un ensayo de potencia basado en células.
16. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 17. Composición según la reivindicación 16, en la que el portador farmacéuticamente aceptable comprende albúmina sérica humana y cloruro de sodio.
18. Composición según la reivindicación 16, en la que la composición se seca al vacío.
- 25 19. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce en una condición de fermentación que comprende una temperatura de fermentación de choque frío.
20. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que el complejo de BoNT/A
30 de 900 kDa se produce en una condición de fermentación de temperatura fría continua.
21. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que el complejo de BoNT/A de 900 kDa se purifica mediante una o más etapas de cromatografía en columna.

22. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en la que la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden cromatografía de interacción hidrófoba.
23. Composición según la reivindicación 22, en la que la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden además cromatografía de intercambio aniónico.
24. Composición según la reivindicación 22 ó 23, en la que la una o más etapas de cromatografía en columna comprenden además cromatografía de intercambio catiónico.
25. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en la que el complejo de BoNT/A de 900 kDa se produce por bacterias *Clostridium botulinum* cultivadas y expandidas a partir de un banco de células de trabajo libre de productos animales.
26. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-25, que está libre de productos animales.
27. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, que no contiene ningún inhibidor de proteasas.
28. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-27, que no contiene clorhidrato de benzamidina.
29. Método de producción de una composición que comprende BoNT/A, comprendiendo dicho método incubar un cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en un fermentador de producción a una temperatura que es inferior a 35 °C durante un periodo de tiempo.
30. Método según la reivindicación 29, en el que todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 72 horas.
31. Método según la reivindicación 29, en el que todo el periodo de fermentación es de aproximadamente 160 horas.
32. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 29-31, en el que el periodo de tiempo es de aproximadamente 5 horas.

33. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 29-31, en el que el periodo de tiempo es todo el periodo de fermentación.
34. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 29-33, en el que la temperatura es de aproximadamente 15 °C.
35. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 29-33, en el que la temperatura es de aproximadamente 20 °C.
36. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 29-33, en el que la temperatura es de aproximadamente 25 °C.
37. Método según la reivindicación 29 ó 30, que comprende, en el siguiente orden: (a) incubar el cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en el fermentador de producción a 35 °C durante aproximadamente 12 horas; (b) ajustar la temperatura a 15 °C al final de la etapa (a); (c) cultivar a 15 °C hasta aproximadamente 5 horas después de la etapa (a); (d) ajustar la temperatura a 35 °C al final de la etapa (c); y (e) cultivar a 35 °C hasta aproximadamente 55 horas después de la etapa (c).
38. Método según la reivindicación 29 ó 30, que comprende, en el siguiente orden: (a) incubar el cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en el fermentador de producción a 35 °C durante aproximadamente 12 horas; (b) ajustar la temperatura a 20 °C al final de la etapa (a); (c) cultivar a 20 °C hasta aproximadamente 5 horas después de la etapa (a); (d) ajustar la temperatura a 35 °C al final de la etapa (c); y (e) cultivar a 35 °C hasta aproximadamente 55 horas después de la etapa (c).
39. Método según la reivindicación 29 ó 31, que comprende incubar el cultivo de bacterias *Clostridium botulinum* en el fermentador de producción a 25 °C durante aproximadamente 160 horas.
40. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, para su uso como medicamento.
41. Composición para su uso según la reivindicación 40, en la que el medicamento es para su uso en un método de tratamiento de un paciente que lo necesita.
42. Método sustancialmente tal como se describe en el presente documento.

43. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 29-39, sustancialmente tal como se describe en el presente documento.

44. Composición sustancialmente tal como se describe en el presente documento.

5

45. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, sustancialmente tal como se describe en el presente documento.

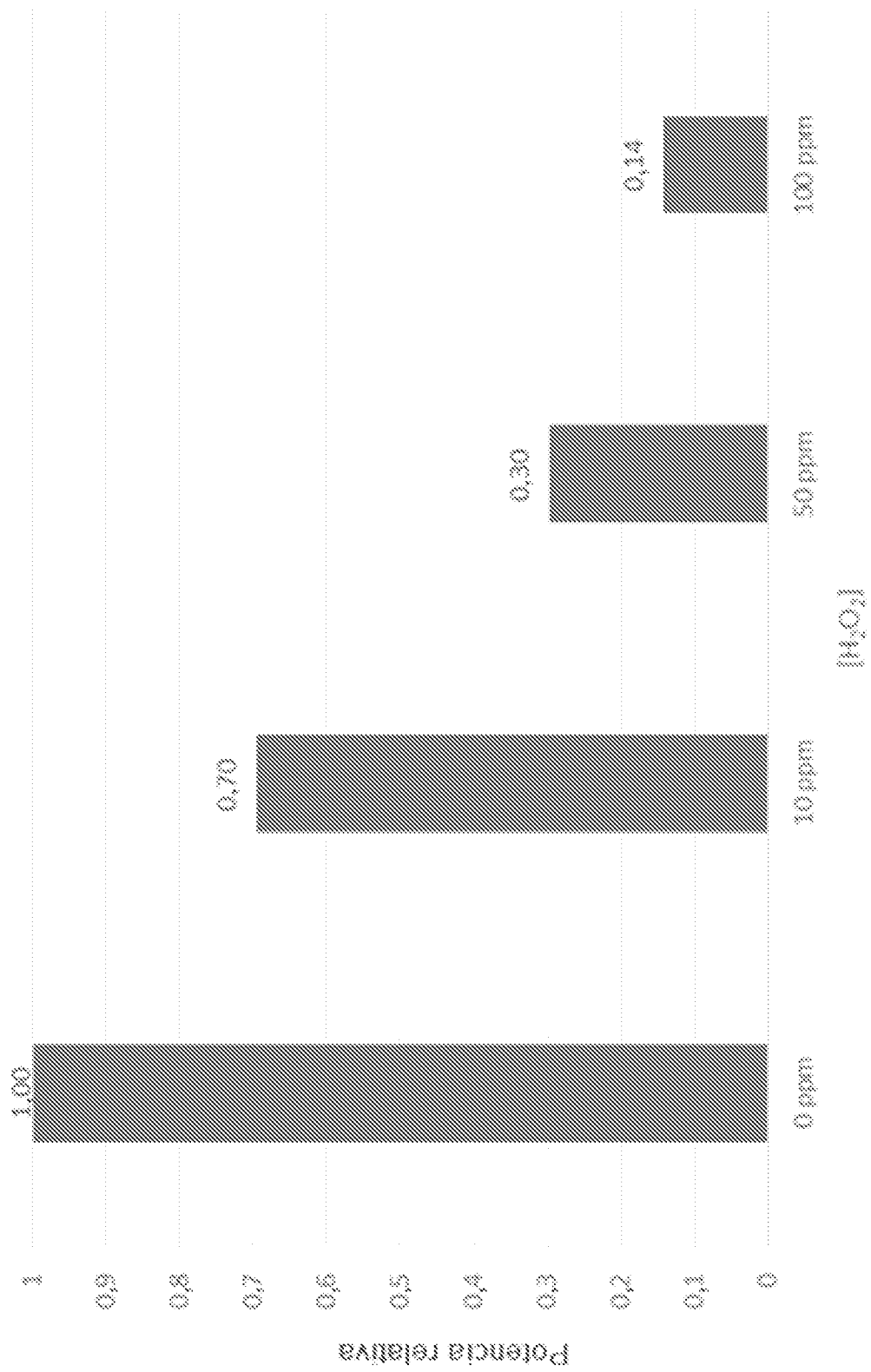


FIG. 1

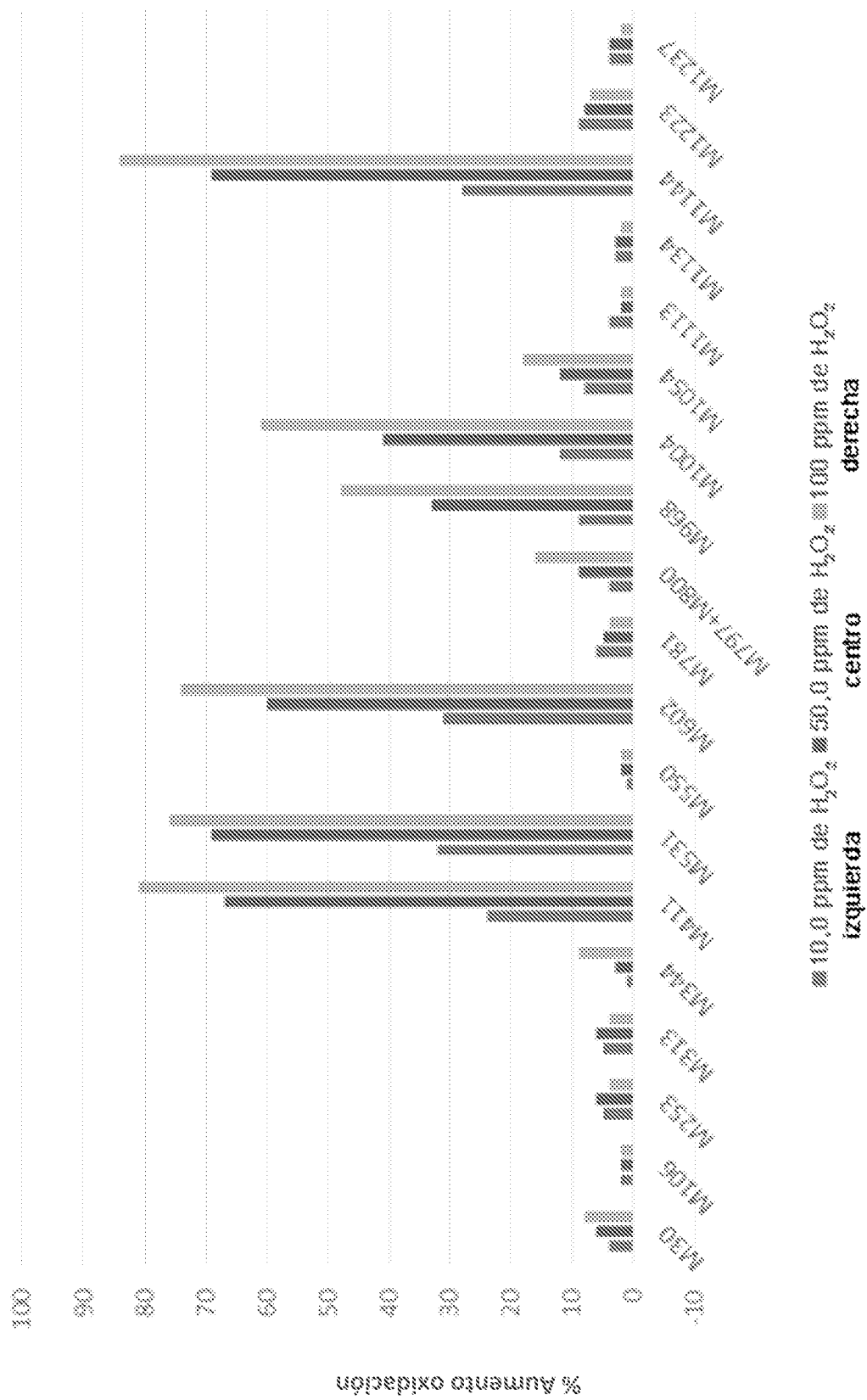


FIG. 2

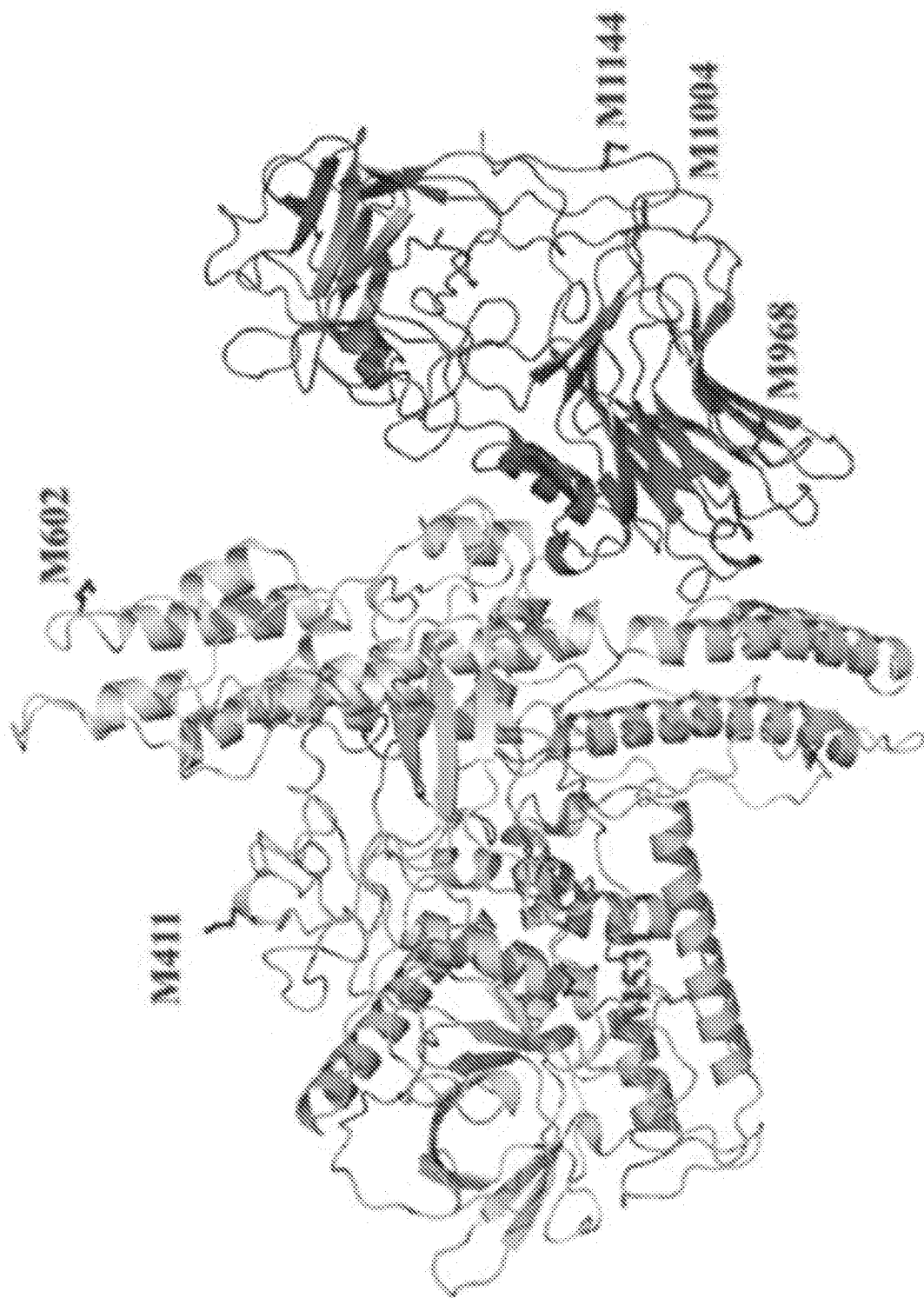


FIG. 3

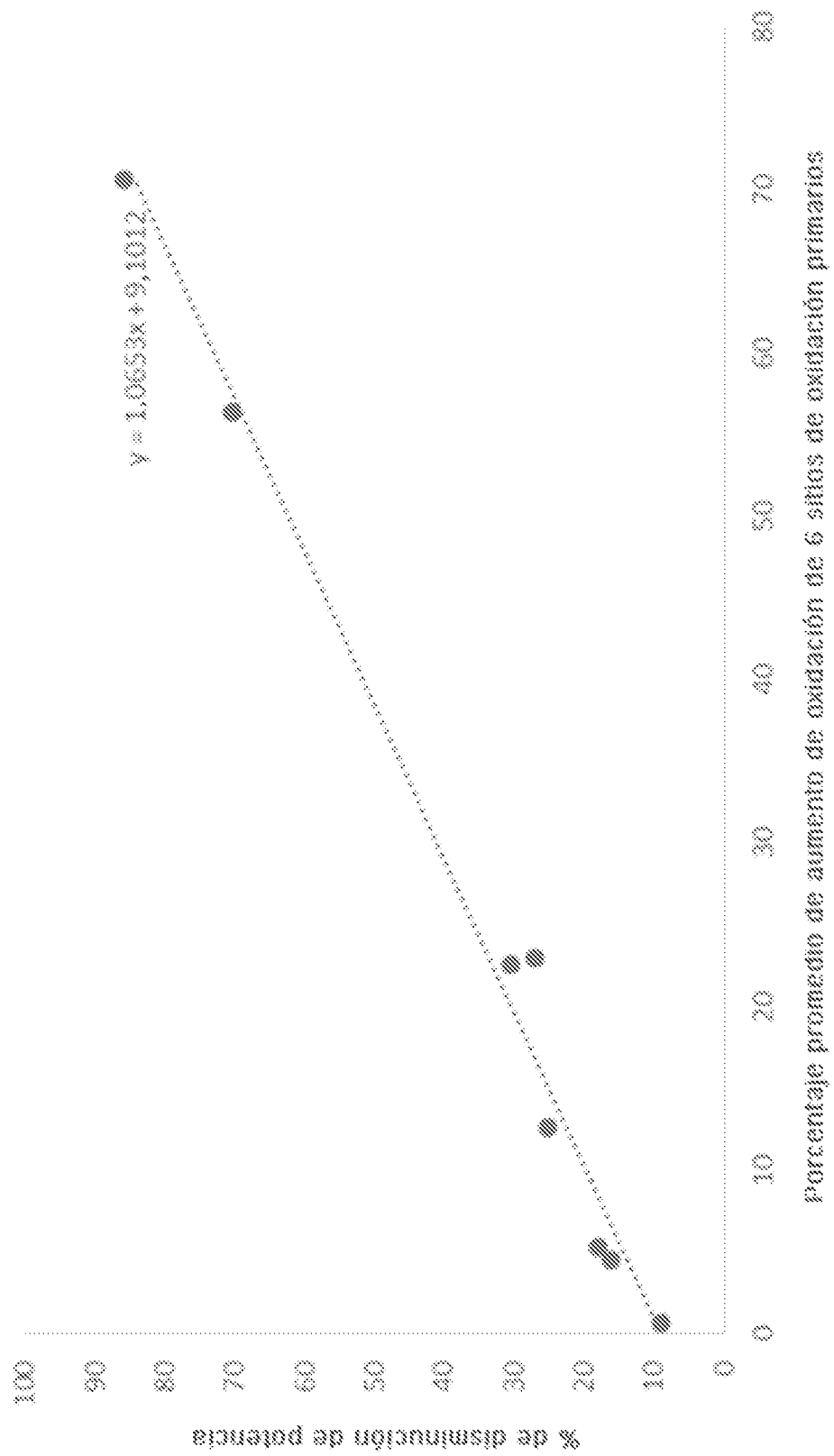


FIG. 4