

METODI E SISTEMI PER PURIFICARE NEUROTOSSINA BOTULINICA NON COMPLESSATA

[0001] La presente domanda rivendica il beneficio di priorità alla Domanda statunitense Provvisoria n° 61/253.810, depositata in data 21 ottobre 2009.

CAMPO TECNICO DELL'INVENZIONE

[0002] La presente invenzione riguarda generalmente metodi e sistemi cromatografici per purificare neurotossina botulinica libera da colture cellulari per produrre un prodotto altamente puro dalla potenza elevata.

STATO DELLA TECNICA DELL'INVENZIONE

[0003] La tossina botulinica è una proteina neurotossica prodotta dal batterio *Clostridium botulinum*, nonché da altre specie clostridiali, quali *Clostridium butyricum* e *Clostridium baraffi*. La tossina blocca la trasmissione neuromuscolare e provoca una malattia neuro-paralitica in esseri umani e animali, nota come botulismo. *C. botulinum* e le sue spore sono comunemente presenti nel suolo e in carcasse di animali in putrefazione, e possono crescere in contenitori per alimenti impropriamente sterilizzati o impropriamente sigillati, provocando molti casi di botulismo. I sintomi del botulismo possono includere difficoltà a camminare, deglutire e parlare, e possono progredire in paralisi dei muscoli respiratori e, infine, decesso.

[0004] La tossina botulinica di tipo A è la sostanza naturale più letale nota all'uomo. Oltre al sierotipo A, sono state caratterizzate altre sei tossine botuliniche generalmente distinte immunologicamente, ossia i sierotipi di tossina botulinica B, C₁, D, E, F e G. I diversi sierotipi possono essere distinti mediante neutralizzazione con anticorpi tipo-specifici e variano relativamente

alla gravità della paralisi che provocano e alle specie animali che colpiscono principalmente. Il peso molecolare della molecola proteica di tossina botulinica, per ciascuno dei sierotipi di tossina botulinica noti, è di circa 150 kD, composto da una catena pesante di circa 100 kD unita a una catena leggera di circa 50 kD. Ciononostante, le tossine botuliniche vengono rilasciate da batteri clostridiali come complessi della tossina da 150 kD con una o più proteine non tossinogene. Per esempio, la tossina botulinica di tipo A esiste come complessi da 900 kD, 500 kD e 300 kD (pesi molecolari approssimativi).

[0005] Nonostante i noti effetti tossici, la tossina botulinica di tipo A è usata clinicamente per trattare una varietà di indicazioni, tra cui, ad es., disturbi neuromuscolari caratterizzati da iperattività del muscolo scheletrico. Per esempio, BOTOX® è il marchio registrato di un complesso di tossina botulinica di tipo A disponibile in commercio presso Allergan, Inc., di Irvine, California. La tossina botulinica di tipo A trova impiego, per esempio, nel trattamento di blefarospasmo essenziale, strabismo, distonia cervicale e rughe glabellari (del viso). Anche altri sierotipi sono stati usati clinicamente. Una tossina botulinica di tipo B, per esempio, è stata indicata per l'uso nel trattamento della distonia cervicale. Le tossine botuliniche sono ritenute in grado di legarsi con alta affinità alla membrana presinaptica di neuroni motori, traslocare nel neurone e dopodiché bloccare il rilascio presinaptico di acetilcolina.

[0006] La tossina botulinica per uso clinico è tipicamente isolata da colture cellulari e sono stati usati vari approcci di purificazione. Storicamente, la tossina è purificata in forma complessata mediante una serie di fasi di precipitazione e filtrazione a flusso tangenziale. Si veda, ad es., Schantz E.J., *et al.*, Properties and use of *botulinum* toxin and other microbial neurotoxins in

medicine, *Microbiol Rev*, marzo 1992, 56(1):80-99. Tali approcci hanno fornito, tuttavia, rese relativamente basse, tipicamente inferiori al 10% circa. Altri approcci hanno utilizzato cromatografia di esclusione dimensionale, scambio ionico e/o affinità. Si vedano, ad es., Schmidt J. J., *et al.*, Purification of type E *botulinum* neurotoxin by high-performance ion exchange chromatography, *Anal. Biochem.* luglio 1986; 156(1):213-219; Simpson L. L., *et al.*, Isolation and characterization of the *botulinum* neurotoxins, Harsman S, ed. *Methods in Enzymology*. Vol. 165, *Microbial Toxins: Tools in Enzymology* San Diego, California: Academic Press; vol 165: pagine 76-85 (1988); Kannan K., *et al.*, Methods development for the biochemical assessment of Neurobloc (*botulinum* toxin type B), *Mov Disord* 2000; 15(Suppl 2):20 (2000); Wang Y.C., The preparation and quality of *botulinum* toxin type A for injection (BTXA) and its clinical use, *Dermatol Las Faci Cosm Surg* 2002; 58 (2002); e la Pubblicazione di Domanda di Brevetto statunitense n° 2003/0008367.

[0007] Altri approcci ancora si sono focalizzati soltanto su una delle catene pesante o leggera della tossina, invece che su una proteina tossina botulinica completa e biologicamente attiva. Per esempio, una delle catene viene individualmente sintetizzata tramite mezzi ricombinanti. Si veda, ad es., Zhou L., *et al.*, Expression and purification of the light chain of *botulinum* neurotoxin A: A single mutation abolishes its cleavage of SNAP-25 and neurotoxicity after reconstitution with the heavy chain, *Biochemistry* 1995; 34(46):15175-81 (1995); e Johnson S. K., *et al.*, Scale-up of the fermentation and purification of the recombination heavy chain fragment C of *botulinum* neurotoxin serotype F, expressed in *Pichia pastoris*, *Protein Expr and Purif* 2003; 32:1-9 (2003). Questi

approcci richiedono tuttavia fasi aggiuntive per riformare una proteina tossina botulinica completa e biologicamente attiva.

[0008] Un approccio più recente comporta l'uso di cromatografia di interazione idrofoba, a modalità mista e/o cromatografia a scambio di ioni, per purificare una tossina botulinica come complesso. Si vedano, ad es., i Brevetti statunitensi n. 7.452.697 e 7.354.740. Gessler, Journal of Biotechnology, 119 (2005) 204-211 descrive un metodo scalabile per la purificazione di neurotossina botulinica di tipo E.

US 2006/0228780 A1, pubblicato in data 12 ottobre 2006, divulga processi e sistemi cromatografici per purificare un complesso di tossina botulinica da un mezzo di fermentazione privo di proteina animale.

[0009] Di conseguenza, esiste nella tecnica la necessità di metodi di purificazione migliorati per isolare proteine di tossina botulinica A complete in forme stabili, biologicamente attive, ma non complessate. È pertanto uno scopo dell'invenzione fornire composizioni e metodi per affrontare queste e altre necessità.

[0010] La discussione precedente è presentata esclusivamente al fine di fornire una migliore comprensione della natura dei problemi incontrati nella tecnica e non deve essere intesa in alcun modo come un'ammissione di tecnica nota, né si deve intendere la citazione di qualsiasi riferimento nel presente contesto come un'ammissione che tale riferimento costituisca "tecnica nota" della presente domanda.

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

[0011] La presente invenzione riguarda sistemi e metodi per purificare una tossina botulinica non complessata di tipo A (tossina botulinica A). In una

forma di realizzazione, il metodo comprende la purificazione di tossina botulinica A non complessata grezza per ottenere una tossina botulinica A non complessata purificata. In questa forma di realizzazione, il metodo comprende il caricamento di una colonna di scambio anionico con la tossina botulinica A non complessata grezza per catturare la tossina botulinica non complessata sulla colonna di scambio anionico; l'eluizione della tossina botulinica A non complessata con tampone per rendere un eluente comprendente la tossina botulinica A non complessata; il caricamento di una colonna di scambio cationico con l'eluente dalla colonna di scambio anionico per consentire la cattura della tossina botulinica A non complessata; e l'eluizione della tossina botulinica A non complessata con un altro tampone per rendere un eluente, ottenendo in tal modo una tossina botulinica A non complessata purificata.

[0012] In determinate forme di realizzazione, il complesso di tossina botulinica A è esso stesso ottenuto mediante una serie di fasi cromatografiche. In alcune forme di realizzazione, un metodo per ottenere il complesso di tossina botulinica A comprende l'ottenimento di un campione comprendente un complesso di tossina botulinica A; il caricamento di una colonna a interazione idrofoba con il campione per consentire la cattura della tossina, in cui la tossina botulinica A catturata comprende una tossina botulinica A complessata; e l'eluizione della tossina botulinica A complessata. La tossina botulinica A non complessata viene poi dissociata dal complesso e la tossina botulinica A non complessata viene purificata secondo il metodo descritto sopra. In alcune forme di realizzazione, il campione è ottenuto sottoponendo una coltura di fermentazione comprendente la tossina botulinica A ad acido per ottenere un precipitato acido, che può essere sottoposto a ulteriori fasi di purificazione pre-

cromatografiche, esempi non esaustivi delle quali includono filtrazione a flusso tangenziale per concentrare il materiale insolubile del precipitato, digestione da nucleasi, centrifugazione per chiarificazione e/o filtrazione.

[0013] In alcune forme di realizzazione, il campione è sottoposto a una digestione da nucleasi prima del caricamento sulla colonna a interazione idrofoba. Preferibilmente, la nucleasi è ricavata in un processo privo di prodotti animali e, ancora più preferibilmente, l'intero processo di purificazione è privo di prodotti animali o almeno sostanzialmente privo di prodotti animali.

[0014] In alcune forme di realizzazione, il campione da utilizzare nelle separazioni cromatografiche è preferibilmente un surnatante o frazione di filtrato.

[0015] In alcune forme di realizzazione preferite, la tossina botulinica A non complessata purificata è pura per il 98% almeno; e/o ha un'attività di almeno 200 LD₅₀ unità/ng. In alcune forme di realizzazione, il metodo produce una resa di almeno circa 2 mg/L di coltura di fermentazione. In altre forme di realizzazione, il metodo produce una resa da circa 1 a circa 2 mg/L di coltura di fermentazione.

[0016] Questi e altri aspetti dell'invenzione saranno meglio compresi facendo riferimento alla seguente descrizione dettagliata dell'invenzione.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

[0017] La Figura 1 è un diagramma di flusso riassuntivo che confronta una forma di realizzazione di un processo secondo la presente invenzione per la purificazione diretta di una tossina botulinica non complessata (Figura 1A) con un processo per purificare una tossina botulinica complessata (Figura 1B).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

[0018] La presente invenzione riguarda sistemi e metodi per purificare una tossina botulinica A non complessata. In determinate forme di realizzazione, il metodo comprende la purificazione di una tossina botulinica A non complessata grezza mediante il caricamento di una colonna di scambio anionico con la tossina botulinica A non complessata grezza per consentire la cattura della tossina botulinica A non complessata da parte della colonna di scambio anionico. La tossina botulinica A non complessata viene poi eluita con tampone per rendere un eluente comprendente la tossina botulinica A non complessata. L'eluente dalla colonna anionica è caricato su una colonna di scambio cationico per consentire la cattura della tossina botulinica A non complessata, e la tossina botulinica A non complessata purificata viene eluita con tampone, ottenendo in tal modo una tossina botulinica A non complessata purificata.

[0019] In alcune forme di realizzazione, l'invenzione fornisce la purificazione di tossina botulinica A non complessata in un numero relativamente ridotto di fasi per produrre un prodotto ad alta resa, alta purezza e alta potenza. Processi e sistemi nell'ambito dell'invenzione possono essere usati per produrre in modo efficiente una tossina botulinica A stabile ma non complessata da colture di fermentazione. In altre forme di realizzazione, il metodo comprende inoltre la fornitura di un campione comprendente un complesso di tossina botulinica A e il caricamento di una colonna a interazione idrofoba con il campione in modo da consentire la cattura del complesso di tossina botulinica A da parte della colonna a interazione idrofoba. Il complesso di tossina botulinica A viene poi eluito dalla colonna con un tampone. La tossina botulinica A non complessata grezza viene dissociata dal complesso di tossina botulinica A per ottenere una miscela comprendente la tossina botulinica A non

complessata grezza. In questa forma di realizzazione, la miscela comprendente la tossina botulinica A non complessata grezza viene purificata per ottenere tossina botulinica A pura o sostanzialmente pura secondo il metodo descritto sopra.

[0020] Un aspetto della presente invenzione è il riconoscimento che una composizione farmaceutica comprendente tossina botulinica non complessata come principio attivo può fornire una maggiore purezza in confronto a una comprendente una forma complessata. Proteine non tossinogene tipicamente associate a un complesso di tossina botulinica possono ammontare a circa il 90% in peso del complesso. Pertanto, la fornitura di una tossina botulinica come complesso include necessariamente almeno circa il 90% in peso di impurità. In altre parole, da almeno circa l'80 a circa il 90% in peso della composizione farmaceutica comprenderà impurità derivanti da cellule che non fanno parte della molecola attiva, né sono necessarie per la sua attività biologica. Tali impurità, tuttavia, rappresentano materiale derivante da cellule che, quando somministrato a un paziente, può aumentare il rischio di reazioni immunologiche indesiderate al farmaco; può aumentare il rischio di effetti collaterali indesiderati; e/o può aumentare il rischio di trasmissione di agenti patogeni. Invece la purezza elevata di un prodotto non complessato, ottenibile con i metodi e sistemi descritti nel presente documento, riduce la quantità di impurità da cellula ospite che possono rimanere nella composizione farmaceutica, riducendo in tal modo i rischi correlati di reazioni e/o trasmissioni indesiderate. Di conseguenza, i processi e sistemi descritti nel presente documento possono fornire una tossina botulinica in una forma più prontamente idonea alla preparazione di composizioni farmaceutiche più sicure e più pure.

[0021] Inoltre, a differenza delle forme complessate, la tossina botulinica libera preparata secondo il metodo qui descritto non necessita di essere stabilizzata per la conservazione in prodotti derivanti dal sangue. Il complesso di tossina botulinica di tipo A, per esempio, è tipicamente stabilizzato in un eccipiente comprendente albumina, che deriva dal sangue umano. Per esempio, BOTOX® è costituito da un complesso purificato di tossina botulinica di tipo A, albumina sierica umana e cloruro di sodio confezionati in forma essiccata sotto vuoto. Lo stesso vale per Dysport e Xeomin. Sebbene le filtrazioni riducano la probabilità di contaminazione con agenti patogeni, l'uso di sangue umano in preparazioni farmaceutiche aumenta generalmente il rischio di trasmissione indesiderata di determinati agenti patogeni, ad es. agenti che non sono o non possono ancora essere scartati. Invece la tossina botulinica libera preparata secondo la presente invenzione può essere stabilmente conservata, come insegnato nel presente documento, in solfato di ammonio. Inoltre, in alcune forme di realizzazione preferite, metodi e sistemi della presente invenzione sono sostanzialmente, essenzialmente o interamente privi di prodotti di origine animale, come discusso nel presente documento. Anche la capacità di conservare stabilmente il prodotto di tossina sostanzialmente, essenzialmente o interamente senza prodotti di origine animale riduce ulteriormente i rischi potenziali associati ai prodotti di origine animale. Di conseguenza, processi e sistemi descritti nel presente documento forniscono una tossina botulinica in una forma particolarmente idonea ad applicazioni farmaceutiche in termini di sicurezza, ad es. in cui la composizione farmaceutica può essere preparata e conservata sostanzialmente, essenzialmente o interamente senza prodotti di origine animale.

[0022] In determinate forme di realizzazione preferite, i processi e sistemi descritti nel presente documento sono scalabili e/o conformi alle norme cGMP. Di conseguenza, i metodi e i sistemi qui descritti possono essere usati su scala commerciale industriale per produrre tossina botulinica non complessata per l'uso, ad es., in composizioni farmaceutiche. Un processo o sistema conforme alle norme cGMP indica uno che può soddisfare i requisiti normativi per le buone pratiche di fabbricazione attuali, come sancito dal Codice dei regolamenti federali degli Stati Uniti. In alcune forme di realizzazione preferite, il prodotto di tossina botulinica A non complessata è particolarmente idoneo alla produzione su larga scala grazie alla sua facilità di stoccaggio e usabilità, all'elevata attività, purezza elevata, stabilità e/o migliore sicurezza.

[0023] “Tossina *botulinica*”, secondo l'uso fatto nel presente documento, si riferisce a una molecola di proteina neurotossina che può essere prodotta da un batterio clostridiale, nonché a forme di questa prodotte in maniera ricombinante. Una tossina botulinica ricombinante può avere la catena leggera e/o la catena pesante della proteina tossina sintetizzate mediante tecniche ricombinanti, ad es. mediante specie clostridiali e/o non clostridiali ricombinanti. L'espressione “tossina botulinica” è usata nel presente documento in maniera interscambiabile con le espressioni correlate “neurotossina botulinica”, “neurotossina” o semplicemente “tossina”. “Tossina botulinica” comprende qualsiasi dei sierotipi di tossina botulinica A, B, C₁, D, E, F e G, e comprende anche entrambe le forme complessata e non complessata.

[0024] Per “forma complessata” si intende un complesso di tossina botulinica comprendente una proteina tossina botulinica (ossia la molecola di tossina con un peso molecolare di circa 150 kD), nonché almeno una proteina

non tossinogena nativa associata. Proteine non tossinogene che costituiscono i complessi includono tipicamente proteina non tossinogena di emoagglutinina e proteina non tossinogena diversa da emoagglutinina. Forme complessate possono dunque comprendere una molecola di tossina botulinica (la componente neurotossica) e una o più proteine non tossinogene di emoagglutinina e/o una o più proteine non tossinogene diverse da emoagglutinina. In determinate forme di realizzazione, il peso molecolare del complesso è superiore a circa 150 kD. Per esempio, le forme complessate della tossina botulinica di tipo A possono avere pesi molecolari di circa 900 kD, circa 500 kD o circa 300 kD. Forme complessate di tossina botulinica di tipo B e C₁ possono avere un peso molecolare di 500 kD. Forme complessate di tossina botulinica di tipo D possono avere un peso molecolare di circa 300 kD o circa 500 kD. Infine, forme complessate di tossina botulinica di tipo E e F possono avere un peso molecolare di circa 300 kD.

[0025] Tossina botulinica “non complessata” si riferisce a una proteina tossina botulinica isolata, o essenzialmente o sostanzialmente isolata, avente un peso molecolare di circa 150 kD. Vale a dire, forme “non complessate” escludono proteine non tossinogene, quali proteine non tossinogene di emoagglutinina e non tossinogene diverse da emoagglutinina, normalmente associate con le forme complessate. L’espressione tossina botulinica “non complessata” è usata in maniera interscambiabile con tossina botulinica “libera”. Tutti i sierotipi di tossina botulinica prodotti da batteri *Clostridium botulinum* nativi sono sintetizzati dai batteri come proteine inattive a catena singola che sono poi scisse o recise da proteasi per diventare neuroattive. La proteina

comprende una catena pesante di circa 100 kD unita mediante un legame di disolfuro a una catena leggera di circa 50 kD.

[0026] Complessi di tossina botulinica possono essere dissociati in proteine tossinogene e non tossinogene mediante vari mezzi, per esempio innalzando il pH a circa 7,0, trattando il complesso con globuli rossi a un pH di circa 7,3 e/o sottoponendo il complesso a un processo di separazione, quale ad esempio cromatografia su colonna in un tampone idoneo a un pH da circa 7 a circa 8.

[0027] La presente invenzione comprende metodi che consentono la purificazione di una tossina botulinica A non complessata, senza proteine non tossinogene associate ritenute convenzionalmente necessarie durante il processo di purificazione per mantenere la stabilità. In forme di realizzazione preferite, i metodi descritti nel presente documento facilitano la purificazione della tossina botulinica A libera senza perdita di stabilità. Per “stabilità” o “stabile” si intende che la molecola proteica di tossina botulinica mantiene sia la catena pesante di circa 100 kD sia la catena leggera di circa 50 kD, unite tra loro mediante un legame di disolfuro, e in una conformazione che consente l’attività biologica.

[0028] In alcune forme di realizzazione, un sistema particolare è adoperato in combinazione con un metodo particolare nell’ambito della presente invenzione. Un sistema usato nell'ambito della presente invenzione può comprendere una pluralità (preferibilmente serie consecutiva) di colonne cromatografiche per l’uso con una corrispondente pluralità (preferibilmente serie consecutiva) di fasi cromatografiche. Inoltre, un sistema usato nell'ambito della presente invenzione può comprendere una pluralità (preferibilmente una serie consecutiva) di dispositivi non cromatografici, quali ad esempio

un'apparecchiatura di filtrazione e/o centrifugazione, per l'uso con una corrispondente pluralità (preferibilmente serie consecutiva) di fasi non cromatografiche, ad es. come fasi pre-cromatografiche.

[0029] In forme di realizzazione preferite, un processo nell'ambito della presente invenzione comprende l'ottenimento di un campione comprendente tossina botulinica A da una coltura di fermentazione; la sottoposizione di questo a una serie di purificazioni pre-cromatografiche; e in seguito il passaggio di questo attraverso una pluralità di colonne per cromatografia per ottenere una tossina botulinica A non complessata altamente purificata e altamente potente. Una tale tossina botulinica A libera purificata trova impiego nella preparazione di composizioni farmaceutiche comprendenti la tossina botulinica A libera come ingrediente attivo.

[0030] Le fasi complessive per entrambi i processi pre-cromatografico e cromatografico per alcune forme di realizzazione preferite della presente invenzione sono illustrate in Figura 1A. Per confronto, la Figura 1B mostra un metodo convenzionale per ottenere un complesso di tossina botulinica purificato. In breve, la Figura 1B rappresenta un processo che comprende una filtrazione in profondità di una coltura di fermentazione, seguita da filtrazione a flusso tangenziale del filtrato ottenuto (utilizzando ultramicrofiltrazione da 300kD); seguita da una fase di centrifugazione per chiarificazione. Il pellet (frazione insolubile) risultante dalla fase di centrifugazione viene quindi risospeso in cloruro di sodio e caricato su una colonna di scambio ionico o di interazione idrofoba. La fase di purificazione cromatografica viene ripetuta almeno tre volte per dare un eluente finale contenente il complesso di tossina botulinica di tipo A da 900 kD.

Fermentazione e precipitazione in acido

[0031] Come illustrato in Figura 1A, la tossina botulinica non complessata è generalmente purificata da una coltura di fermentazione. Una “coltura di fermentazione”, secondo l’uso fatto nel presente documento, si riferisce a una coltura o mezzo comprendente cellule e/o loro componenti, che sintetizzano e/o hanno sintetizzato almeno una tossina botulinica. Per esempio, batteri clostridiali quali *Clostridium botulinum* possono essere posti in coltura su piastre di agar in un ambiente favorevole per la crescita batterica, ad esempio in un’atmosfera calda anaerobica. La fase di coltura tipicamente consente alle colonie di *Clostridium* di ottenere morfologia desiderabile e altre caratteristiche. Colture selezionate di colonie clostridiali possono poi essere fatte fermentare in un mezzo idoneo come coltura di fermentazione. Le cellule coltivate possono includere specie non clostridiali come cellule ospiti, quali ad esempio *E. coli* o cellule di lievito, che sono rese capaci di biosintetizzare una tossina botulinica mediante tecnica ricombinante. Condizioni di coltura di fermentazione idonee possono dipendere dalle cellule ospiti usate e sono generalmente note nella tecnica.

[0032] In forme di realizzazione preferite, la fermentazione può essere lasciata proseguire fino a completamento, in modo tale che le cellule siano mature e abbiano biosintetizzato una tossina botulinica. La crescita di colture di *Clostridium botulinum* è solitamente completa dopo da circa 24 a circa 36 ore. Dopo un determinato periodo di tempo aggiuntivo, i batteri tipicamente effettuano la lisi e rilasciano nel mezzo il complesso di tossina botulinica sintetizzato in una forma complessata. Per esempio, durante una fermentazione

da circa 60 a circa 96 ore, la maggior parte delle cellule di *Clostridium botulinum* subisce lisi e rilascia il complesso di tossina botulinica di tipo A.

[0033] In alcune forme di realizzazione, la coltura di fermentazione può comprendere uno o più prodotti di origine animale, quali proteine animali, usati in procedure di coltura di fermentazione convenzionali. Per esempio, la tossina botulinica può essere prodotta mediante fermentazione anaerobica di *Clostridium botulinum* usando una versione modificata del ben noto processo di Schantz (si vedano, ad es., Schantz E.J., et al., Properties and use of *botulinum* toxin and other microbial neurotoxins in medicine, Microbiol Rev marzo 1992; 56(1):80-99; Schantz E. J., et al., Preparation and characterization of *botulinum* toxin type A for human treatment, capitolo 3 in Jankovic J, ed. Neurological Disease and Therapy. Therapy with *botulinum* toxin (1994), New York, Marcel Dekker; 1994, pagine 41-49, e; Schantz E. J., et al., Use of crystalline type A *botulinum* toxin in medical research, in: Lewis G E Jr, ed. Biomedical Aspects of Botulism (1981) New York, Academic Press, pagine 143-50). Sia il processo di Schantz sia il processo di Schantz modificato per ottenere una tossina botulinica utilizzano prodotti di origine animale, compreso mezzo di carne cotta con Bacto di origine animale nella fiala di coltura e caseina nei mezzi di fermentazione. Inoltre, la purificazione di tossina di Schantz utilizza DNasi e RNasi da fonti bovine per idrolizzare gli acidi nucleici presenti nella coltura di fermentazione.

[0034] Tuttavia, la somministrazione di una sostanza farmaceutica contenente un principio attivo che è stato purificato usando un processo comprendente prodotti di origine animale può sottoporre un paziente a un potenziale rischio di ricevere vari agenti patogeni. Per esempio, prioni possono

essere presenti in una composizione farmaceutica comprendente prodotti di origine animale contaminanti, quale ad esempio il prione responsabile della malattia di Creutzfeldt-Jacob. Come ulteriore esempio, esiste il rischio di trasmissione di un'encefalopatia spongiforme (TSE), ad esempio un'encefalopatia spongiforme bovina (BSE), quando si utilizzano prodotti di origine animale nel processo di realizzazione di una composizione farmaceutica. L'uso di una tossina botulinica ottenuta tramite processi privi di prodotti animali, tuttavia, riduce tali rischi. Pertanto, in alcune forme di realizzazione preferite, l'invenzione fornisce un processo che è privo di prodotti animali, o essenzialmente o sostanzialmente privo di prodotti animali (APF, animal-product-free). Le espressioni "privo di prodotti animali", "essenzialmente privo di prodotti animali" o "sostanzialmente privo di prodotti animali" includono rispettivamente le espressioni "privo di proteine animali", "essenzialmente privo di proteine animali" o "sostanzialmente privo di proteine animali" e indicano rispettivamente l'assenza, l'assenza essenziale o l'assenza sostanziale di prodotti di origine animale, esempi non esaustivi dei quali includono prodotti derivanti da sangue o pool di sangue. "Animale" è usato nel presente contesto per riferirsi a un mammifero (ad esempio un essere umano), un volatile, un rettile, un anfibio, un pesce, un insetto, un aracnide o altre specie animali, ma esclude microrganismi quali batteri e lieviti.

[0035] Un processo privo di prodotti animali (o un processo sostanzialmente o essenzialmente privo di prodotti animali) si riferisce a un processo che è interamente, sostanzialmente o essenzialmente privo di prodotti, reagenti e proteine di origine animale, quali immunoglobuline, altri prodotti, sottoprodotti o estratti del sangue; prodotti a base di carne, sottoprodotti di carne,

estratti di carne; e prodotti, sottoprodotti o estratti lattiero-caseari. Di conseguenza, un esempio di procedimento di coltura di fermentazione privo di prodotti animali è un processo di fermentazione quale, ad esempio, una coltura batterica, che esclude prodotti, sottoprodotti ed estratti derivanti da sangue, carne e prodotti lattiero-caseari. Un processo di fermentazione privo di prodotti animali per ottenere una tossina botulinica non complessata riduce la possibilità di contaminazione con virus prioni o altri agenti indesiderati che possono poi accompagnare la tossina quando somministrata ad esseri umani.

[0036] Procedure di fermentazione prive di prodotti animali che utilizzano colture di *Clostridium* sono descritte, ad esempio, nei Brevetti statunitensi n. 7.452.697 e 7.354.740. Per esempio, il terreno di crescita per la produzione della tossina botulinica può comprendere prodotti di origine vegetale invece di prodotti di origine animale, quali ad esempio prodotti a base di soia e/o semi deamarizzati di *Lupinus campestris*. Terreni di fermentazione a base di soia per l'uso in una coltura di fermentazione priva di prodotti animali possono comprendere, ad esempio, un prodotto a base di soia, una fonte di carbonio quale glucosio, sali quali NaCl e KCl, ingredienti contenenti fosfato quali Na₂HPO₄ e KH₂PO₄, cationi bivalenti quali ferro e magnesio, polvere di ferro, amminoacidi quali L-cisteina e L-tirosina e simili. Preferibilmente, la soia è soia idrolizzata e l'idrolizzazione è stata condotta utilizzando enzimi non derivati da animali. Fonti di soia idrolizzata includono, sebbene a titolo non esaustivo, Hy-Soy (Quest International), Soy peptone (Gibco) Bac-soytone (Difco), AMISOY (Quest), NZ soy (Quest), NZ soy BL4, NZ soy BL7, SE50M (DMV International Nutritionals, Fraser, N.Y.), e SE50MK (DMV).

[0037] Come illustrato dalla Figura 1A, in determinate forme di realizzazione, un campione comprendente tossina botulinica A è ottenuto da una coltura di fermentazione. Per esempio, dopo un determinato periodo di fermentazione, in mezzi privi di prodotti animali o non privi di prodotti animali, il complesso di tossina botulinica A viene rilasciato nel mezzo e può essere raccolto mediante precipitazione. Per esempio, in alcune forme di realizzazione, nonché nel ben noto processo di Schantz, il mezzo di fermentazione comprendente la tossina botulinica A può essere sottoposto a precipitazione in acido per indurre il complesso di tossina botulinica ad associarsi con i detriti cellulari e formare un precipitato acido. In alcune forme di realizzazione particolarmente preferite, circa 3 M di soluzione di acido solforico possono essere aggiunti alla coltura di fermentazione per formare il precipitato acido. Preferibilmente, il pH viene ridotto a un valore da circa 3 a circa 4, più preferibilmente da circa 3,2 a circa 3,8 e ancora più preferibilmente a circa 3,5. In alcune forme di realizzazione, anche la temperatura di coltura viene ridotta, ad es., a un valore inferiore a circa 25°C, 24°C, 23°C, 22°C, 21°C o 20°C. Queste condizioni esaltano ulteriormente l'associazione dei complessi di tossina botulinica con i detriti cellulari. La precipitazione in acido formata comprenderà complessi di tossina botulinica legati e potrà essere usata come materiale di partenza in ulteriori fasi di purificazione, quali ad esempio fasi di chiarificazione; mentre il filtrato viene scartato.

[0038] Il procedimento convenzionale rappresentato in Figura 1B, invece, non include una fase di precipitazione in acido. Vale a dire, sebbene la procedura di purificazione inizi anche con una coltura di fermentazione comprendente un complesso di tossina botulinica, il mezzo di coltura viene

sottoposto a filtrazione in profondità e il filtrato, invece che i detriti cellulari, viene usato nelle successive fasi di purificazione. Nel processo di Figura 1B, i detriti cellulari vengono scartati, invece che il filtrato, mentre, come illustrato in Figura 1A, il filtrato viene scartato e i detriti cellulari (precipitato acido) sono usati per ulteriori fasi di purificazione, ad es. nelle purificazioni pre-cromatografiche discusse qui di seguito.

Purificazioni pre-cromatografiche

[0039] In alcune forme di realizzazione, il campione ottenuto dal mezzo di fermentazione è sottoposto a una o più purificazioni pre-cromatografiche. Le purificazioni pre-cromatografiche possono includere almeno una tra filtrazione a flusso tangenziale, digestione da nucleasi e centrifugazione e/o filtrazione per chiarificazione. Un esempio non esaustivo di un flusso di processo contenente la purificazione pre-cromatografica contemplato dall'invenzione è fornito in Figura 1A. Come osservato sopra, in forme di realizzazione preferite, le procedure pre-cromatografiche sono effettuate su un precipitato (o frazione insolubile) di una coltura di fermentazione comprendente la tossina botulinica A, invece che sulla coltura di fermentazione stessa o su un filtrato ricavato da questa, come nel processo illustrato in Figura 1B. Vale a dire, in forme di realizzazione preferite, le fasi pre-cromatografiche (chiarificazione) iniziano con la precipitazione in acido (frazione insolubile).

[0040] In alcune forme di realizzazione, il campione (precipitato acido o frazione insolubile) comprendente una tossina botulinica A è sottoposto a filtrazione a flusso tangenziale. La filtrazione a flusso tangenziale è un processo utilizzato tipicamente per chiarificare, concentrare e/o purificare proteine. A differenza della normale filtrazione a flusso, in cui il fluido si sposta direttamente

verso una membrana filtrante sotto pressione applicata, nella filtrazione a flusso tangenziale il fluido si sposta tangenzialmente lungo o parallelamente alla superficie della membrana. La pressione applicata serve a spingere una parte del fluido attraverso la membrana filtrante, al lato del filtrato, mentre particelle e macromolecole troppo grandi per passare attraverso i pori della membrana vengono trattenute. A differenza della normale filtrazione a flusso, tuttavia, i componenti trattenuti non si accumulano sulla superficie della membrana ma sono spazzati via dal flusso che scorre tangenzialmente. In determinate forme di realizzazione preferite, la filtrazione a flusso tangenziale viene usata per concentrare il materiale insolubile (detriti cellulari) con cui il complesso botulinico è associato, consentendo al contempo al filtrato di passare attraverso i pori della membrana. (Si veda, ad es., Figura 1A). I parametri di filtrazione a flusso tangenziale, quali la dimensione dei pori, il flusso di alimentazione, la pressione applicata e simili, possono essere selezionati dagli esperti nel settore per concentrare detriti cellulari e per produrre un campione più concentrato comprendente il complesso di tossina botulinica A. In alcune forme di realizzazione particolarmente preferite, per esempio, si può usare una filtrazione a flusso tangenziale con filtri avente una dimensione dei pori di circa 0,1 μm .

[0041] In alcune forme di realizzazione, il campione comprendente una tossina botulinica A è sottoposto a digestione da nucleasi. La digestione da nucleasi può facilitare la rimozione di componenti di acido nucleico con cui i complessi di tossina botulinica tendono ad associarsi. In determinate forme di realizzazione preferite, la digestione da nucleasi segue la filtrazione a flusso tangenziale e si effettua sui detriti cellulari concentrati ottenuti da questa. (Si veda, ad es., Figura 1A). Per esempio, il campione di detriti cellulari concentrato

può avere il suo pH regolato per consentire attività di nucleasi e può essere incubato con una o più nucleasi idonee, quali DNasi e/o RNasi che digeriscono (idrolizzano) rispettivamente DNA e/o RNA. A seconda dell'enzima nucleasi usato, un pH idoneo può essere da circa 5 a circa 7, preferibilmente circa 6. In alcune forme di realizzazione, benzamidina è usato come un inibitore di proteasi per prevenire la proteolisi della tossina durante la fase di digestione. La nucleasi usata può essere ricavata da qualsiasi fonte idonea, comprese fonti animali e/o fonti non animali.

[0042] In forme di realizzazione più preferite, la nucleasi è ottenuta da una fonte non animale, per fornire una nucleasi priva di prodotti animali e un processo privo di prodotti animali. Di conseguenza, la presente invenzione comprende processi privi di prodotti animali (o processi sostanzialmente o essenzialmente privi di prodotti animali) per la purificazione di tossina botulinica che comprendono l'uso di una nucleasi. Una nucleasi priva di prodotti animali può essere realizzata in maniera ricombinante, ad es. usando batteri ricombinanti, lieviti o altri microrganismi idonei che sono stati trasformati per esprimere una DNasi e/o RNasi per l'uso in una fase di digestione da nucleasi secondo i procedimenti qui descritti. La digestione da nucleasi tipicamente riduce il contenuto di acido nucleico del campione, poiché gli acidi nucleici della cellula ospite vengono degradati e la loro rimozione è facilitata. Per esempio, acidi nucleici idrolizzati e altre impurità a basso peso molecolare possono essere rimossi mediante ulteriori fasi di purificazione.

[0043] In determinate forme di realizzazione, il campione comprendente una tossina botulinica A può essere sottoposto a centrifugazione e/o filtrazione per chiarificazione. Centrifugazione o filtrazione per chiarificazione si riferisce

a fasi di centrifugazione o filtrazione usate per rimuovere elementi macroscopici quali cellule intere e lisate e detriti cellulari dal campione risultando in un campione sensibilmente più chiaro. In determinate forme di realizzazione, la centrifugazione viene effettuata a una velocità da circa 10.000xg a circa 30.000 xg, più preferibilmente da circa 15.000xg a circa 20.000xg e in maniera massimamente preferita a circa 17.700xg. La filtrazione per chiarificazione comprenderà tipicamente filtrazione a flusso normale, anche chiamata filtrazione a “fondo cieco”, in cui il fluido si sposta direttamente verso un mezzo di filtrazione sotto pressione applicata e le particelle troppo grandi per passare attraverso i pori del filtro si accumulano sulla superficie o all'interno del mezzo stesso, mentre le molecole più piccole passano attraverso come filtrato. In alcune forme di realizzazione particolarmente preferite, il campione è miscelato con solfato di ammonio e si esegue filtrazione normale usando un filtro con una dimensione dei pori da circa 0,1 a circa 0,3 μm , e più preferibilmente una dimensione dei pori di circa 0,2 μm . (Si veda, ad es., Figura 1A). In determinate forme di realizzazione particolarmente preferite, una o più fasi di chiarificazione seguono la fase di digestione da nucleasi. In determinate forme di realizzazione ancora più preferite, una o più fasi di chiarificazione precedono immediatamente la purificazione mediante cromatografia.

[0044] In particolare, in forme di realizzazione preferite, il surnatante o filtrato chiarificato fornisce il campione contenente tossina botulinica A per l'uso in ulteriori fasi di purificazione, come ad esempio le fasi di purificazione cromatografica, al posto della frazione insolubile che viene scartata. Questo contrasta con il processo delineato in Figura 1B, in cui il complesso di tossina botulinica è contenuto nella frazione insolubile dalle fasi pre-cromatografiche

che non comprendono precipitazione in acido, come ad es. un pellet di centrifugazione ottenuto dalla centrifugazione pre-cromatografica, e il surnatante viene scartato.

[0045] Inoltre, e sempre in contrasto con il procedimento delineato in Figura 1B, le fasi pre-cromatografiche in alcune forme di realizzazione dell'invenzione non richiedono una fase di filtrazione a flusso tangenziale di un filtrato ottenuto da coltura di fermentazione. Vale a dire che il campione utilizzato per la purificazione cromatografica in alcune forme di realizzazione dell'invenzione non è ottenuto sottoponendo una frazione solubile della coltura di fermentazione a filtrazione a flusso tangenziale. In determinate forme di realizzazione, invece, la presente invenzione usa materiale insolubile (come un precipitato acido), eliminando qualsiasi fase in cui un filtrato da coltura di fermentazione è sottoposto a filtrazione a flusso tangenziale nel tentativo di concentrare complessi solubili di tossina botulinica. Dunque, in forme di realizzazione preferite, le fasi pre-cromatografiche dell'invenzione eliminano la necessità di qualsiasi fase di questo tipo, usando invece acido per far precipitare i complessi di tossina desiderati con altro materiale insolubile (detriti cellulari).

Fasi di purificazione cromatografica

[0046] La Figura 1A illustra anche fasi di purificazione cromatografica secondo determinate forme di realizzazione della presente invenzione. Secondo una forma di realizzazione dell'invenzione, i metodi cromatografici per purificare una tossina botulinica A non complessata comprendono il passaggio di un campione comprendente tossina botulinica A attraverso una pluralità di colonne per cromatografia per ottenere una forma altamente purificata, altamente potente e non complessata della neurotossina.

[0047] In determinate forme di realizzazione, una tossina botulinica A complessata viene separata da altre componenti cellulari usando una colonna a interazione idrofoba (si veda, ad es., Figura 1A). Questa colonna cattura la tossina botulinica in forma complessata, consentendo al contempo alle impurità di scorrere attraverso la colonna. La colonna usata può essere qualsiasi colonna a interazione idrofoba nota nella tecnica idonea per tale scopo, come ad esempio colonna Butyl Sepharose Fast Flow o Phenyl Sepharose HP disponibili in commercio presso GE Healthcare Life Sciences. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende inoltre il condizionamento del campione per cromatografia a interazione idrofoba prima di caricarlo sulla colonna. Per esempio, per l'uso nella colonna Phenyl Sepharose HP, il campione può essere combinato con una soluzione di solfato di ammonio a 0,5M a pH 6 e 50 mM di fosfato prima del caricamento. Altre condizioni di colonne, tamponi e pH che possono essere usate includono colonne quali Phenyl Sepharose Fast Flow ad alta sostituzione, Phenyl Sepharose Fast Flow a bassa sostituzione, Butyl Sepharose e Octyl Sepharose; tamponi come, ad esempio, acetato, citrato, MES, istidina, piperazina e malonato, ciascuno con pH nell'intervallo da circa 4,0 a circa 7,0, più preferibilmente da circa 4,5 a circa 6,5 e ancora più preferibilmente di circa 5,5. Altre condizioni di tampone e pH possono essere determinate per ottimizzare la resa di una particolare colonna usata, come noto nella tecnica, in base alla agli insegnamenti qui forniti. Senza voler essere legati alla teoria, si ritiene che la separazione comporti il legame del complesso di tossina a resina e un pH inferiore a 7, per evitare la dissociazione in questa fase, consentendo al contempo a molte impurità derivanti da cellule di scorrere attraverso, ad es. proteine più piccole, acidi nucleici e simili.

[0048] Per l'eluizione della tossina catturata (legata) dalla colonna a interazione idrofoba, si può usare un tampone idoneo, come noto nella tecnica. In alcune forme di realizzazione particolarmente preferite, si usa un gradiente discendente di solfato di ammonio. L'intervallo di concentrazione del gradiente discendente può essere da circa 0,6 M a circa 0,0 M, da circa 0,5 M a circa 0,0 M o da circa 0,4 M a circa 0,0 M. Altri tamponi di eluizione che possono essere usati includono, ad esempio, gradienti decrescenti di solfato di sodio (Na_2SO_4); cloruro di sodio (NaCl); cloruro di potassio (KCl); acetato di ammonio (NH_4OAc); e simili. Si possono identificare una o più frazioni contenenti un picco di prodotto, come noto nella tecnica. La frazione di picco si trova tipicamente, ad es., quando si utilizza solfato di ammonio, in un intervallo di concentrazione da circa 0,4 M a circa 0,0 M; più preferibilmente da circa 0,3 M a circa 0,0 M; e in maniera massimamente preferita da circa 0,25 M a circa 0,0 M di solfato di ammonio, mentre il pH è mantenuto a circa 6 per mantenere il complesso. Vale a dire, la frazione (o le frazioni) contenente il complesso di tossina botulinica A eluito può essere identificata e usata in successive fasi di purificazione.

[0049] In forme di realizzazione preferite, il complesso di tossina botulinica A ottenuto viene fatto dissociare per dare una forma non complessata. In determinate forme di realizzazione preferite, la fase di dissociazione viene eseguita dopo la fase di cromatografia a interazione idrofoba e/o prima di successive fasi cromatografiche (si veda, ad es., Figura 1A). Di conseguenza, in alcune forme di realizzazione preferite, la presente invenzione comprende metodi in cui la molecola bersaglio nella cromatografia differisce da una fase cromatografica all'altra. Vale a dire, in una fase cromatografica iniziale, il

bersaglio comprende un complesso di tossina botulinica A, mentre in fasi cromatografiche successive il bersaglio comprende la tossina botulinica A libera, dissociata da proteine non tossinogene quali emoagglutinina e proteine diverse da emoagglutinina. Invece il procedimento delineato in Figura 1B comporta fasi cromatografiche che sono tutte destinate a purificare complessi di tossina botulinica.

[0050] La dissociazione del complesso di tossina botulinica A per produrre la proteina tossina botulinica A non complessata può essere ottenuta in numerosi modi, ad es. come noto nella tecnica e/o qui descritto. Per esempio, la dissociazione può essere ottenuta innalzando il pH a circa 7,0; oppure, in forme di realizzazione in cui la purificazione priva di proteine animali non è necessaria, trattando il complesso con globuli rossi a un pH di circa 7,3.

[0051] In una forma di realizzazione preferita e per fornire una tossina priva di sostanze animali, il complesso è sottoposto a un processo di separazione basato sulla regolazione pH del complesso in un tampone idoneo. Tamponi idonei includono, sebbene a titolo non esaustivo, tamponi cationici, preferibilmente tamponi cationici che non interagiscono o non interagiscono sostanzialmente con la colonna di scambio anionico. Tamponi cationici idonei includono, ad es., Tris, bis-Tris, trietanolamina, N-metil dietanolamina. Un pH compreso tra circa 7 e circa 8,4; più preferibilmente tra circa 7,4 e circa 8,2; e, in maniera massimamente preferita, un pH di circa 7,8 è tipicamente idoneo per la dissociazione del complesso al fine di rilasciare la tossina botulinica non complessata. In alcune forme di realizzazione particolarmente preferite, per esempio, il pH dell'eluente della colonna a interazione idrofoba è innalzato a un valore da circa 7,5 a circa 7,8 o, preferibilmente, a circa 8,0. Per esempio, in

alcune forme di realizzazione, l'eluente può essere diluito in un tampone Tris avente un pH di circa 7,8 per far dissociare il complesso in componenti individuali, comprendenti la proteina tossina botulinica A non complessata di circa 150kD. La miscela risultante comprendente componenti dissociate può quindi essere sottoposta a una o più fasi di purificazione cromatografica aggiuntive, quali fasi di cromatografia a scambio ionico destinate alla cattura e ulteriore purificazione della tossina non complessata.

[0052] In determinate forme di realizzazione secondo l'invenzione, la tossina botulinica A non complessata può essere purificata usando una o più fasi di cromatografia a scambio ionico (si veda, ad es., Figura 1A). La cromatografia a scambio ionico ottiene il frazionamento in base alla carica elettrostatica. Il grado in cui una data proteina si lega alla matrice di colonna è in funzione della carica netta della proteina, in base alla sua composizione amminoacidica individuale e alla carica della matrice di colonna. Le colonne a scambio ionico hanno una matrice con carica netta positiva, mentre le colonne di scambio anionico hanno una matrice con carica netta negativa. Le proteine legate possono essere selettivamente eluite dalla colonna usando un solvente (l'eluente) contenente una sostanza caricata, quale ad esempio ioni di sale, che compete con il supporto della matrice caricata per il legame con le proteine caricate. Le proteine legate possono essere così frazionate in base alla forza della loro carica. In alternativa, le proteine possono essere eluite regolando il pH che può alterare la carica netta della proteina, alterando in tal modo la sua affinità alla matrice caricata.

[0053] Secondo alcune forme di realizzazione preferite dell'invenzione, la miscela comprendente la tossina botulinica A non complessata viene caricata

su una colonna di scambio anionico (si veda, ad es., Figura 1A). In particolare, questa colonna cattura la tossina botulinica in forma non complessata, in modo tale che proteina tossina e le proteine non tossinogene associate possano essere eluite in frazioni separate. La colonna usata può essere qualsiasi colonna anionica nota nella tecnica idonea per separare proteine caricate, esempi non esaustivi delle quali includono Q Sepharose HP, Q Sepharose Fast Flow o Q XL Sepharose, disponibili in commercio presso GE Healthcare Life Sciences. In alcune forme di realizzazione particolarmente preferite, si usa una colonna Q XL Sepharose. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende inoltre il condizionamento della miscela comprendente la tossina botulinica A non complessata per la cromatografia di scambio anionico prima del caricamento sulla colonna. Per esempio, condizioni di tampone e pH possono essere determinate per ottimizzare la resa della particolare colonna usata, come noto nella tecnica, in base alla agli insegnamenti qui forniti. Per il caricamento e l'uso nella colonna, tamponi idonei includono, sebbene a titolo non esaustivo, tamponi cationici, preferibilmente tamponi cationici che non interagiscono o non interagiscono sostanzialmente con la colonna di scambio anionico. Tamponi cationici idonei includono, ad es., Tris, bis-Tris, trietanolammina, N-metil dietanolammina. Per caricare ed equilibrare la colonna, si può usare un pH compreso tra circa 7,2 e circa 8,6; più preferibilmente tra circa 7,4 e circa 8,2; e, in maniera massimamente preferita, un pH di circa 7,8.

[0054] Per l'eluizione della tossina catturata (legata) e di altre componenti dissociate dalla colonna di scambio anionico, si può usare un tampone idoneo, come noto nella tecnica. Esempi di tamponi idonei includono, ad esempio, cloruro di sodio (NaCl); e cloruro di potassio (KCl). In alcune forme

di realizzazione particolarmente preferite, si usa un gradiente ascendente di cloruro di sodio. Per esempio, si può usare un tampone di cloruro di sodio avente un intervallo di concentrazione da circa 0,0 M a circa 0,4 M di NaCl, più preferibilmente da circa 0,0 M a circa 0,5 M di NaCl e ancora più preferibilmente da circa 0,0 M a circa 0,6 M di NaCl. Impurità separate in frazioni diverse possono includere, ad es., una o più proteine non tossinogene del complesso dissociato, quali le proteine non tossinogene di emoagglutinina e/o proteine non tossinogene diverse da emoagglutinina. Si possono identificare una o più frazioni contenenti un picco di prodotto, come noto nella tecnica. Il picco può verificarsi, per esempio, tra circa 8 mSem e circa 22 mSem a un pH compreso tra circa 7,4 e circa 8,4 e preferibilmente a circa 7,8, corrispondente a una concentrazione da circa 0,08 a circa 0,18 M di NaCl. Al contrario, altre impurità possono eluirsi da circa 30 a circa 45 mSem, corrispondente a una concentrazione da circa 0,25 M a circa 0,35 M di NaCl.

[0055] La frazione (o le frazioni) contenente la tossina botulinica A non complessata eluita può essere identificata per fornire un eluente comprendente una tossina botulinica A non complessata. Il picco può essere identificato mediante metodi noti nella tecnica, ad es. usando HPLC, analisi western blot, ELISA, SDS-PAGE non ridotta e simili. La SDS-PAGE in condizioni non riducenti, per esempio, può identificare la banda di tossina da circa 150 kDa, mentre altre impurità appariranno in fasce corrispondenti a molecole più piccole. Questo eluente comprendente una forma non complessata può poi essere sottoposto a ulteriori fasi di purificazione cromatografica.

[0056] In una forma di realizzazione particolarmente preferita, la purezza della tossina è valutata mediante SDS-PAGE. Come comprenderanno

gli esperti nel settore, l'analisi con SDS-PAGE può essere condotta in assenza o in presenza di agenti che scindono i legami di disolfuro presenti nella proteina (ossia rispettivamente in condizioni non riducenti o riducenti). Per esempio, relativamente alla tossina botulinica di tipo A, la forma matura e attiva della molecola proteica di tossina botulinica di tipo A è composta da due catene polipeptidiche di 100 kD e 50 kD rispettivamente, che sono tenute insieme da interazioni non covalenti oltre che da un legame di disolfuro. Quando la tossina botulinica di tipo A prodotta mediante il processo dell'invenzione viene saggiata usando condizioni non riducenti, le molecole di tossina botulinica di tipo A migrano come una singola banda proteica di circa 150 kD e la purezza misurata è tipicamente superiore al 98%. Quando la quantità di proteina tossina botulinica di tipo A caricata per corsia di gel viene mantenuta entro l'intervallo dinamico del densitometro, le bande di impurità rilevabili risultanti sono poche o nulle in una purezza misurata del 100%. Quando la tossina botulinica di tipo A è sovraccaricata in modo tale che la banda di tossina principale è al di sopra dell'intervallo dinamico del densitometro, alcune bande di impurità minime possono essere rilevabili (fino a 1-2%).

[0057] Tuttavia, quando l'analisi con SDS-PAGE della tossina botulinica di tipo A è condotta in condizioni riducenti, il legame di disolfuro della tossina botulinica viene scisso e la proteina tossina botulinica di tipo A migra come due componenti aventi peso molecolare di 100 kD e 50 kD rispettivamente. Quando la proteina tossina botulinica di tipo A viene caricata in modo tale che le specie principali siano al di sopra dell'intervallo dinamico del densitometro e la SDS-PAGE sia eseguita in condizioni riducenti, specie di impurità minori possono essere rilevate più facilmente. Per esempio, in queste

condizioni, può essere presente fino al 5% delle specie da 150 kD a causa di lavorazione proteolitica incompleta durante il processo di fermentazione e recupero. In queste condizioni, il procedimento dell'invenzione rende un prodotto di tossina (costituito dalle catene polipeptidiche da 100 kD e 50 kD scisse attive) che è tipicamente oltre il 90% della proteina totale e più probabilmente oltre il 95% della proteina totale. Pertanto, la purezza misurata riportata della tossina dipende dai dettagli del metodo SDS-PAGE impiegato, come descritto nel presente documento. Inoltre, sebbene il precedente esempio riguardi la tossina botulinica di tipo A, gli esperti del settore comprenderanno che l'analisi con SDS-PAGE descritta nel presente documento può essere facilmente adattata per valutare la purezza di altri sierotipi di tossina botulinica.

[0058] In determinate forme di realizzazione, l'eluente dalla colonna anionica comprendente la tossina botulinica A non complessata è caricato su una colonna di scambio cationico (si veda, ad es., Figura 1A). In particolare, questa colonna cattura anche la tossina botulinica in forma non complessata, in modo tale che proteina tossina e le proteine non tossinogene associate possano essere eluite in frazioni separate. La colonna usata può essere qualsiasi colonna cationica nota nella tecnica idonea per separare le proteine, esempi non esaustivi delle quali includono una colonna SP Sepharose, comprese SP Sepharose HP o SP Sepharose Fast Flow; una colonna Mono S; o una colonna Source-S, come ad esempio una colonna Source-30S o, preferibilmente, una colonna Source-15S, entrambe disponibili in commercio presso GE Healthcare Life Sciences. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende inoltre il condizionamento dell'eluente dalle colonne di scambio anionico comprendente la tossina botulinica A non complessata per la cromatografia di scambio cationico prima

del caricamento sulla colonna. In alcune forme di realizzazione preferite, il pH è regolato in modo tale che il pH dell'eluente caricato sulla colonna consenta un legame efficiente della tossina libera alla colonna. Per esempio, il pH può essere mantenuto entro un intervallo da circa 4 a circa 8, preferibilmente da circa 5 a circa 7,5, più preferibilmente da circa 6 a circa 7 e in maniera massimamente preferita a circa 7. Inoltre, in alcune forme di realizzazione, l'eluente dalla colonna anionica può essere trattato per ridurre la conduttività prima del caricamento sulla colonna di scambio cationico, ad es. usando un tampone di fosfato di sodio, un esempio non esaustivo del quale è un tampone di fosfato di sodio di circa 20 mM di NaH_2PO_4 . Per esempio, l'eluente dalla colonna anionica può contenere fino a 0,15 M di NaCl , in modo tale che la diluizione in un tampone di circa 20 mM di NaH_2PO_4 riduca la conduttività. In alcune forme di realizzazione specifiche, la conduttività è ridotto da circa 12 mSem a circa 3,3 mSem. Diluizione in tampone, dialisi o altri metodi noti nella tecnica possono essere usati per ridurre la conduttività.

[0059] Per il caricamento e l'uso nella colonna, tamponi idonei includono, sebbene a titolo non esaustivo, tamponi anionici, preferibilmente tamponi anionici che non interagiscono o non interagiscono sostanzialmente con la colonna di scambio cationico. Tamponi anionici includono, ad es., MES, HEPES e simili, e preferibilmente tampone di fosfato di sodio. Per caricare ed equilibrare la colonna, si può usare un pH compreso tra circa 4 e circa 8; preferibilmente tra circa 5 e circa 7,5; più preferibilmente tra circa 6 e circa 7; e, in maniera massimamente preferita, un pH tra circa 6,8 e circa 7.

[0060] Per l'eluizione della tossina catturata (legata) dalla colonna di scambio cationico separatamente da altre proteine non tossinogene e altre

impurità dissociate, si può usare un tampone idoneo, come noto nella tecnica. In alcune forme di realizzazione particolarmente preferite, si usa un gradiente ascendente di cloruro di sodio. Un intervallo di concentrazione idoneo per il gradiente di cloruro di sodio può essere da circa 0,0 M a circa 1 M di NaCl. Altri sali che possono essere usati includono, ad es., cloruro di potassio, che può essere usato a un gradiente di concentrazione da circa 0,0 M a circa 0,5 M di KCl. Si possono identificare una o più frazioni contenenti un picco di prodotto, come noto nella tecnica. Il picco può verificarsi, per esempio, tra circa 18 e circa 25 mSem, corrispondente a una concentrazione da circa 0,3 M a circa 0,4 M di NaCl, a un pH di circa 6,7. Vale a dire, la frazione (o le frazioni) contenente la tossina botulinica non complessata eluita può essere identificata per fornire un eluente dalla colonna cationica comprendente una tossina botulinica non complessata. In forme di realizzazione particolarmente preferite, l'eluente dalla colonna cationica rappresenta una tossina botulinica A non complessata di elevata purezza, con resa elevata e avente attività elevata. Invece il processo delineato in Figura 1B fornisce un complesso di tossina botulinica di tipo A da 900 kD nell'eluente finale.

Prodotto di tossina botulinica non complessata purificata

[0061] I metodi e sistemi qui descritti sono utili per fornire una tossina botulinica non complessata dalla purezza elevata, con una resa elevata e avente attività elevata. Si veda l'Esempio 1 di seguito. Il prodotto è anche facilmente stabilizzato e convenientemente utilizzato per la preparazione di composizioni farmaceutiche sicure.

[0062] In alcune forme di realizzazione preferite, la tossina botulinica A non complessata purificata ha una purezza di almeno circa 80%, preferibilmente

una purezza di almeno circa 90%, più preferibilmente una purezza di almeno circa 95%, ancora più preferibilmente una purezza di almeno circa 98% e in maniera massimamente preferita una purezza di almeno circa 99% o persino una purezza di circa 100%. “Tossina botulinica non complessata purificata” si riferisce a una molecola proteica di tossina botulinica libera che è isolata o sostanzialmente isolata da altre proteine e impurità, che possono altrimenti accompagnare la tossina botulinica non complessata così come ottenuta da un processo di coltura o fermentazione. Una tossina botulinica non complessata che è, per esempio, “pura all’80%” si riferisce a una proteina tossina botulinica non complessata isolata o sostanzialmente isolata in cui la proteina tossina comprende l’80% della proteina totale presente, secondo quanto determinato mediante o altra metodologia analitica idonea, esempi non esaustivi delle quali includono SDS-PAGE, CE e HPLC. Per esempio, in alcune forme di realizzazione preferite, l’eluente di colonna cationica comprendente la tossina botulinica A non complessata è puro almeno circa al 99% e contiene meno di circa 1% di proteine di cellule ospite che sono diverse dalla tossina botulinica di circa 150 kD originariamente presente.

[0063] In alcune forme di realizzazione preferite, la tossina botulinica A non complessata purificata ha un'attività di almeno circa 150 LD₅₀ unità/ng, preferibilmente almeno circa 180 LD₅₀ unità/ng, più preferibilmente almeno circa 200 LD₅₀ unità/ng, ancora più preferibilmente almeno circa 210 LD₅₀ unità/ng e in maniera massimamente preferita almeno circa 220 LD₅₀ unità/ng. Un’unità di tossina botulinica è definita come la LD₅₀ nell’iniezione intraperitoneale in topi Swiss Webster femmina del peso di circa 18-20 grammi ciascuno. In altre parole, un’unità di tossina botulinica è la quantità di tossina

botulinica letale per il 50% di un gruppo di topi Swiss Webster femmina. “Attività” è usato nel presente documento in maniera interscambiabile con le espressioni correlate “attività biologica”, “potenza” e “tossicità” per descrivere l’azione di una tossina botulinica.

[0064] In forme di realizzazione preferite, la tossina botulinica A non complessata ottenibile mediante processi e sistemi descritti nel presente documento dimostra attività biologica. Vale a dire, in forme di realizzazione preferite, l’attività biologica o tossicità del prodotto non viene persa durante la purificazione secondo le forme di realizzazione preferite della presente invenzione, anche se le proteine non tossinogene nativamente associate alla proteina tossina sono rimosse durante la purificazione. In forme di realizzazione ancora più preferite, la potenza ottenuta usando una data serie di processi e parametri nell’ambito dell’invenzione è coerente e/o riproducibile. Per esempio, la misurazione di potenza può essere realizzata con meno del 40% circa di variabilità, preferibilmente meno del 35% circa di variabilità, più preferibilmente meno del 30% circa di variabilità, ancora più preferibilmente meno del 25% circa di variabilità e in maniera massimamente preferita meno del 20% circa di variabilità.

[0065] In alcune forme di realizzazione preferite, il processo di purificazione fornisce la tossina botulinica A non complessata con alta resa. Per esempio, la resa ottenuta da 30 L di una coltura di fermentazione può essere di almeno circa 30 mg, preferibilmente di almeno circa 40 mg, più preferibilmente di almeno circa 70 mg, ancora più preferibilmente di almeno circa 80 mg e in maniera massimamente preferita di almeno circa 90 mg, corrispondenti rispettivamente a una resa di almeno circa 1 mg/L, preferibilmente almeno circa

1,3 mg/L, più preferibilmente almeno circa 2,3 mg/L, ancora più preferibilmente almeno circa 2,7 mg/L e in maniera massimamente preferita almeno circa 3 mg/L. In forme di realizzazione ancora più preferite, la resa ottenuta usando una data serie di processi e parametri nell'ambito dell'invenzione è riproducibile. Per esempio, la resa può essere misurata con meno del 40% circa di variabilità, preferibilmente meno del 35% circa di variabilità, più preferibilmente meno del 30% circa di variabilità, ancora più preferibilmente meno del 25% circa di variabilità e in maniera massimamente preferita meno del 20% circa di variabilità.

[0066] In alcune forme di realizzazione particolarmente preferite, la tossina botulinica A non complessata purificata è stabile durante la purificazione usando i processi e sistemi descritti nel presente documento. Si riteneva in passato che la rimozione di proteine non tossinogene associate da un complesso di tossina botulinica, quale ad esempio un complesso di tossina botulinica di tipo A, generasse un prodotto di tossina botulinica notevolmente instabile. La presente invenzione, tuttavia, fornisce metodi che possono isolare stabilmente la tossina botulinica libera, senza proteine non tossinogene associate ritenute convenzionalmente necessarie durante il processo di purificazione per mantenere la stabilità, come discusso sopra.

[0067] In alcune forme di realizzazione preferite, i metodi descritti nel presente documento forniscono una tossina botulinica A non complessata che richiede pochissime fasi post-cromatografiche, ad es. in termini di mantenimento della stabilità durante la conservazione e in termini di applicabilità per usi farmaceutici. Per esempio, come noto nella tecnica, solfato di ammonio può essere aggiunto alla tossina botulinica libera per preparare una sospensione di

solfato di ammonio per la conservazione. La composizione comprendente tossina botulinica libera e solfato di ammonio può essere facilmente conservata in un frigorifero e può essere facilmente recuperata in seguito per l'uso in applicazioni farmaceutiche. Infatti, la stabilità, la resa e purezza elevate e la potenza elevata e costante della tossina ottenibile con i metodi descritti nel presente documento facilitano l'uso farmaceutico del prodotto purificato, come descritto più in dettaglio di seguito.

Usi della tossina botulinica non complessata purificata

[0068] La tossina botulinica A non complessata purificata secondo la presente invenzione può essere usata nella preparazione di composizioni farmaceutiche comprendenti la tossina come principio attivo per la somministrazione a qualsiasi soggetto che trarrebbe beneficio da tali composizioni farmaceutiche. In forme di realizzazione preferite, i soggetti da trattare sono mammiferi, preferibilmente esseri umani. “Composizione farmaceutica”, secondo l'uso fatto nel presente documento, si riferisce a una formulazione in cui il principio attivo può essere una tossina botulinica. La formulazione conterrà almeno un ingrediente aggiuntivo e sarà idonea per la somministrazione diagnostica, terapeutica e/o cosmetica a un soggetto, ad esempio un paziente umano. La composizione farmaceutica può essere liquida o solida; e può essere un sistema a uno o più elementi, per esempio una composizione liofilizzata ricostituita con un diluente quale, ad esempio, soluzione salina.

[0069] Un altro aspetto della descrizione fornisce la somministrazione di una molecola di tossina botulinica purificata a un paziente. “Somministrazione”, secondo l'uso fatto nel presente documento, si riferisce alla fornitura di una

composizione farmaceutica a un soggetto o paziente. la composizione farmaceutica può essere somministrata mediante qualsiasi metodo noto nella tecnica, compresi, ad es., somministrazione intramuscolare (i.m.), intradermica, intranasale o sottocutanea, somministrazione intratecale, somministrazione intracranica, intraperitoneale (i.p.), o vie di somministrazione topiche (transdermica) e impianto (ad es. di un dispositivo a rilascio lento). In determinati aspetti preferiti, la tossina botulinica non complessata purificata è somministrata per via topica o mediante iniezione in composizioni come descritto nei Brevetti statunitensi n° 09/910.432 10/793.138; 11/072.026; 11/073.307, 11/824.393 e 12/154.982.

[0070] In determinate forme di realizzazione, composizioni comprendenti la tossina botulinica non complessata in una sospensione di solfato di ammonio possono essere facilmente combinate in una composizione farmaceutica. Per esempio, una sospensione di solfato di ammonio contenente la proteina tossina botulinica non complessata può essere centrifugata per recuperare la proteina e la proteina può essere risolubilizzata, diluita e mescolata con uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili. In determinate forme di realizzazione, la composizione farmaceutica può comprendere una tossina botulinica non complessata come ingrediente farmaceutico attivo, e può inoltre comprendere uno o più tamponi, veicolanti, stabilizzanti, conservanti e/o agenti di carica. Le composizioni farmaceutiche possono essere liofilizzate in polvere per la conservazione, e ricostituite per uso ulteriore. Di conseguenza, i processi e sistemi descritti nel presente documento possono fornire una tossina botulinica in una forma particolarmente idonea per applicazioni farmaceutiche in termini di facilità di preparazione.

[0071] La composizione farmaceutica può trovare impiego in applicazioni terapeutiche, diagnostiche, di ricerca e/o cosmetiche. Per esempio, come discusso sopra, la tossina botulinica di tipo A è clinicamente usata per trattare disturbi neuromuscolari caratterizzati da iperattività del muscolo scheletrico, quali blefarospasmo essenziale, strabismo, distonia cervicale e rughe glabellari (del viso). Inoltre, in determinate applicazioni, la tossina botulinica non complessata (circa 150 kD) è la forma preferita per il trattamento di esseri umani. Si veda, ad es., Kohl A., *et al.*, Comparison of the effect of botulinum toxin A (Botox®) with the highly-purified neurotoxin (NT 201) in the extensor digitorum brevis muscle test, *Mov Disord* 2000; 15(Suppl 3):165. Di conseguenza, determinate composizioni farmaceutiche di tossina botulinica sono preferibilmente preparati utilizzando tossina botulinica non complessata invece che un complesso di tossina botulinica.

ESEMPI

Esempio 1: Confronto del procedimento dell'invenzione con un procedimento di Schantz modificato

[0072] Purificazioni di tossina botulinica di tipo A non complessata usando procedimenti nell'ambito della presente invenzione ("procedimento dell'invenzione") sono state direttamente confrontate con purificazioni basate sull'approccio Schantz tradizionale, ulteriormente modificato dall'aggiunta di fasi cromatografiche per fornire la forma non complessata ("procedimento di Schantz modificato"). In breve, batteri *Clostridium botulinum* sono stati posti in coltura e lasciati crescere fino al completamento della fermentazione (solitamente da circa 72 a circa 120 ore dall'inoculazione alla raccolta). Un

volume di 30 L di coltura di fermentazione e poi è stato utilizzato in ciascuna delle procedure di purificazione seguenti.

[0073] Il procedimento Schantz modificato utilizzato comprendeva la tipica acidificazione della coltura di fermentazione per far precipitare la tossina, seguita da ultramicrofiltrazione (UF) e diafiltrazione (DF) per concentrare la tossina grezza. DNasi e RNasi sono state aggiunte alla tossina raccolta per digerire (idrolizzare) gli acidi nucleici, che sono stati poi rimossi mediante un'ulteriore fase di UF, usando filtrazione a flusso tangenziale (UF 300kD). La tossina è stata successivamente estratta con tampone fosfato, seguito da tre fasi in sequenza: precipitazione in etanolo a freddo; precipitazione in acido cloridrico e precipitazione in solfato di ammonio, in cui i surnatanti sono stati normalmente scartati ogni volta. Questa procedura ha fornito una tossina botulinica di tipo A di 900 kD che è stata quindi sottoposta a ulteriori fasi cromatografiche per fornire la tossina libera. Nello specifico, il complesso di tossina è stato risolubilizzato e sottoposto ad adsorbimento negativo in batch su una resina di DEAE. L'eluente è stato poi eseguito su una colonna a scambio anionico a caduta (DEAE-Sepharose), seguita da una colonna a scambio cationico a caduta (CM-Sepharose). Si è determinata la resa, si è registrata la durata del procedimento (non contando il periodo di fermentazione) e si è misurata la purezza della tossina botulinica di tipo A non complessata purificata mediante analisi con SDS-PAGE e se ne è valutata la potenza, ad es. mediante tecniche note agli esperti nel settore. L'intero procedimento di Schantz modificato è stato ripetuto per tre diversi lotti, lotti numero 1, 2 e 3, e i risultati registrati nella Tabella 1 seguente.

[0074] Il procedimento dell'invenzione è stato utilizzato con tre diversi lotti, lotti numero 4, 5 e 6, secondo i sistemi e metodi qui descritti. In breve, la coltura di fermentazione è stata sottoposta a precipitazione in acido usando 3M di acido solforico per ridurre il pH a 3,5 a una temperatura al di sotto di 25°C. Il precipitato acido è stato quindi sottoposto a filtrazione a flusso tangenziale da 0,1 µm per concentrare la massa cellulare. Il pH è stato quindi regolato a 6 e si sono aggiunte le nucleasi per ridurre il contenuto di acido nucleico nella cellula ospite, in seguito si è effettuata la chiarificazione mediante centrifugazione per rimuovere detriti cellulari e la filtrazione a fondo cieco a 0,2 µm con aggiunta di solfato di ammonio. Il filtrato è stato quindi direttamente caricato sulla colonna a interazione idrofoba, Phenyl Sepharose HP (GE Life Sciences), eluito con un gradiente discendente di solfato di ammonio e si è isolato il picco di prodotto. L'eluente è stato poi diluito in tampone Tris pH 7,8 per dissociare il complesso di tossina, che è stato poi caricato sulla colonna a scambio anionico Q XL Sepharose (GE Lifesciences), eluito con un gradiente ascendente di cloruro di sodio, e il picco di prodotto è stato nuovamente raccolto. Questo eluente è stato poi diluito in un tampone di fosfato di sodio (per ridurre la conduttività) e caricato sulla colonna a scambio anionico Q XL Sepharose (per i lotti n° 4 e 5) o sulla colonna a scambio cationico Source-S (GE Life Sciences) (per il lotto n° 6), nuovamente eluito con un gradiente ascendente di cloruro di sodio, e un picco di prodotto finale è stato raccolto e conservato. Questo procedimento ha reso tossina botulinica di tipo A non complessata. Si è determinata la resa, si è registrata la durata del procedimento (non contando il periodo di fermentazione) e si è misurata la purezza della tossina botulinica mediante analisi con SDS-

PAGE e se ne è valutata la potenza, ad es. mediante tecniche note agli esperti nel settore. I risultati sono stati inoltre registrati nella Tabella 1 seguente.

Tabella 1

Lotto n°	Procedimento di Schantz modificato			Procedimento dell'invenzione		
	1	2	3	4	5	6
Durata procedimento	10 giorni			4 giorni		
% purezza	99	n/a	97	98,6	95,3	100
Resa (scala 30L)	11 mg	0 mg	4 mg	43 mg	99 mg	89 mg
Potenza (LD50 Unità/ng)	255	n/a	173	259	252	250

[0075] Come indica la Tabella 1, si è verificato l'insuccesso di un lotto per quanto riguarda il lotto n° 2 nel procedimento di Schantz modificato. L'intero lotto non ha avuto successo dando una resa di zero. Si è verificato inoltre un insuccesso parziale per quanto riguarda il lotto n° 3. In questo caso l'insuccesso si è verificato nella fase di precipitazione in acido cloridrico, ma parte del prodotto è stato recuperato dal surnatante normalmente scartato. Il prodotto recuperato è stato rielaborato con una fase di deviazione, responsabile della ridotta resa osservata rispetto al lotto n° 1 (4 mg rispetto a 11 mg) e della ridotta potenza osservata rispetto al lotto n° 1 (173 LD50 unità/ng rispetto a 255 LD50 unità/ng).

[0076] Per quanto riguarda i lotti utilizzati con il procedimento dell'invenzione, il lotto n° 4 mostrava una resa ridotta rispetto, ad esempio, al lotto n° 5 (43 mg rispetto a 99 mg) a causa di guasto del sistema cromatografico, comprendente un lavaggio con alto contenuto di sale di una colonna. A causa del guasto, si è verificata un'eluizione prematura di una porzione della tossina,

generando la resa ridotta osservata, ma anche un'osservata purezza superiore (98,6 % di purezza rispetto al 95,3% di purezza).

[0077] Il lotto n° 6 rappresenta i risultati di una forma di realizzazione altamente preferita dei procedimenti e sistemi della presente invenzione, in cui una colonna a scambio cationico è stata utilizzata nella terza fase di cromatografia. Come indicato dalla Tabella 1, questa forma di realizzazione ha generato una purezza migliorata rispetto, per esempio, al lotto n° 5 (100% di purezza rispetto al 95,3% di purezza), mantenendo al contempo una resa elevata (89 mg rispetto a 99 mg) e una potenza elevata (250 LD50 unità/ng rispetto a 252 LD50 unità/ng).

[0078] Come indicato inoltre dalla Tabella 1, la durata complessiva della purificazione può essere ridotta in forme di realizzazione preferite della presente invenzione. Per esempio, il lotto n° 6 è stato purificato in soli 4 giorni, rispetto ai 10 giorni di tempo necessari per purificare la tossina botulinica non complessata usando il metodo Schantz modificato che comprendeva tre ulteriori fasi cromatografiche dopo il convenzionale metodo Schantz.

[0079] I risultati indicano che i processi e sistemi qui insegnati possono essere usati per preparare con resa elevata una tossina botulinica non complessata dalla purezza e potenza elevate, e suggeriscono che i metodi e sistemi descritti qui possono trovare impiego nella purificazione efficiente su larga scala di una tossina botulinica non complessata per l'uso, ad es., come principio attivo in composizioni farmaceutiche.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per purificare una tossina botulinica di tipo A non complessata (tossina botulinica A), il metodo comprendente:

(i) la fornitura di una miscela comprendente una tossina botulinica A non complessata grezza, in cui detta tossina botulinica A non complessata grezza è dissociata da proteine native non tossiche;

(ii) il caricamento della tossina botulinica A non complessata grezza su una colonna di scambio anionico in modo da consentire la cattura della tossina botulinica A non complessata da parte della colonna di scambio anionico;

(iii) l'eluizione della tossina botulinica A non complessata dalla colonna di scambio anionico per rendere un eluente comprendente la tossina botulinica A non complessata;

(iv) il caricamento di una colonna di scambio cationico con l'eluente dalla colonna di scambio anionico per consentire la cattura della tossina botulinica A non complessata da parte della colonna di scambio cationico; e

(v) l'eluizione di tossina botulinica A non complessata purificata dalla colonna di scambio cationico.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la tossina botulinica A non complessata grezza è ottenuta mediante

ottenimento di un campione comprendente un complesso di tossina botulinica A;

caricamento di una colonna a interazione idrofoba con il campione, in modo da consentire la cattura del complesso di tossina botulinica A da parte della colonna di interazione idrofoba;

eluizione del complesso di tossina botulinica A dalla colonna cromatografica a interazione idrofoba; e

dissociazione del complesso di tossina botulinica A per ottenere una miscela comprendente la tossina botulinica A non complessata grezza.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2, in cui:

(a) il campione è un surnatante o un filtrato cellulare comprendente il complesso di tossina botulinica A; o

(b) il campione comprendente un complesso di tossina botulinica A è sottoposto a una digestione da nucleasi prima del caricamento sulla colonna a interazione idrofoba, e facoltativamente in cui la nucleasi è ricavata da un processo privo di prodotti animali.

4. Metodo secondo la rivendicazione 2, in cui il campione comprendente un complesso di tossina botulinica A è ottenuto mediante:

sottoposizione di una coltura di fermentazione comprendente la tossina botulinica A a precipitazione in acido per ottenere un precipitato acido;
e

esecuzione di filtrazione a flusso tangenziale sul precipitato per concentrare il precipitato.

5. Metodo secondo la rivendicazione 2, in cui il campione comprendente un complesso di tossina botulinica A è ottenuto sottoponendo una frazione insolubile di una coltura di fermentazione a filtrazione a flusso tangenziale.

6. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui:
 - (a) il metodo è sostanzialmente privo di prodotti animali, o
 - (b) il metodo produce una resa di almeno circa 2 mg/L di coltura di fermentazione.

7. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui:
 - (a) la tossina botulinica A non complessata purificata è pura per il 95% almeno; o
 - (b) la tossina botulinica A non complessata purificata ha un'attività di almeno 200 LD₅₀ unità/ng.

8. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la colonna anionica è scelta dal gruppo costituito da una colonna Q Sepharose HP, Q Sepharose Fast Flow e Q XL Sepharose, e in cui la colonna cationica è scelta dal gruppo costituito da una colonna SP Sepharose, SP Sepharose HP, SP Sepharose Fast Flow, Mono S, Source-S, Source-30S e Source-15S.

9. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui un tampone per il caricamento della tossina botulinica A non complessata grezza sulla colonna anionica è scelto dal gruppo costituito da Tris, bis-Tris, trietanolamina e N-metil dietanolamina, e facoltativamente in cui il tampone è utilizzato a un pH da 7,4 a 8,2.

10. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui un tampone per il caricamento della tossina botulinica A non complessata grezza sulla colonna cationica è scelto dal gruppo costituito da fosfato di sodio, MES e HEPES, e facoltativamente in cui il tampone è utilizzato a un pH da 6,0 a 7,0.

11. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il pH della colonna anionica è tra 7,4 e 8,2.

12. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il pH della colonna cationica è tra 6,0 e 7,0.

13. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui un gradiente per l'eluizione della tossina botulinica A non complessata dalla colonna di scambio anionico è scelto dal gruppo costituito da un gradiente di concentrazione ascendente di cloruro di sodio e un gradiente di concentrazione ascendente di cloruro di potassio, e facoltativamente in cui la colonna di scambio anionico è eluita a un pH da 7,4 a 8,4.

14. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui un gradiente per l'eluizione della tossina botulinica A non complessata dalla colonna di scambio cationico è scelto dal gruppo costituito da un gradiente di concentrazione ascendente di cloruro di sodio e un gradiente di concentrazione ascendente di cloruro di potassio, e facoltativamente in cui la colonna di scambio cationico è eluita a un pH da 6,0 a 7,0.

15. Metodo per purificare una tossina botulinica di tipo A non complessata (tossina botulinica A), il metodo comprendente:

(a) la fornitura di una miscela comprendente una tossina botulinica A non complessata grezza, in cui detta tossina botulinica A non complessata grezza è dissociata da proteine native non tossinogene; in cui detta miscela è ottenuta mediante:

(i) sottoposizione di una coltura di fermentazione comprendente tossina botulinica A a precipitazione in acido per produrre un precipitato acido insolubile;

(ii) concentrazione del precipitato acido dalla fase (i) per produrre un campione concentrato;

(iii) sottoposizione del campione a digestione da nucleasi in condizioni che riducono il contenuto di acido nucleico nella cellula ospite e che mantengono un complesso di tossina botulinica A e proteine non tossinogene;

(iv) rimozione di detriti cellulari dal campione della fase (iii) per produrre un campione chiarificato;

(v) caricamento di una colonna a interazione idrofoba con il campione chiarificato dalla fase (iv) in condizioni tali da consentire la cattura del complesso di tossina botulinica A da parte della colonna di interazione idrofoba e lo scorrimento delle impurità attraverso la colonna;

(vi) eluizione del complesso di tossina botulinica A dalla colonna a interazione idrofoba di fase (iv); e

(vii) dissociazione del complesso di tossina botulinica A ottenuto dalla fase (vi) in condizioni che disgregano il complesso e producono

una miscela comprendente tossina botulinica A non complessata grezza dissociata dalle proteine non tossinogene native;

(b) il caricamento della miscela contenente la tossina botulinica A non complessata grezza dissociata da proteine non tossinogene native dalla fase (a) su una colonna di scambio anionico in condizioni che consentono la cattura della tossina botulinica A non complessata da parte della colonna di scambio anionico;

(c) l'eluizione della tossina botulinica A non complessata dalla colonna di scambio anionico di fase (b) per rendere un eluente comprendente la tossina botulinica A non complessata;

(d) il caricamento di una colonna di scambio cationico con l'eluente dalla colonna di scambio anionico della fase (c) in condizioni che consentono la cattura della tossina botulinica A non complessata da parte della colonna di scambio cationico; e

(e) l'eluizione di tossina botulinica A non complessata purificata dalla colonna di scambio cationico di fase (d).

16. Metodo secondo la rivendicazione 15, in cui nella fase (i) la coltura di fermentazione comprendente la tossina botulinica A è fatta precipitare in acido con circa 3M di acido solforico.

17. Metodo secondo la rivendicazione 15, in cui il campione concentrato della fase (ii) è ottenuto effettuando filtrazione a flusso tangenziale sul precipitato acido per concentrare il precipitato.

18. Metodo secondo la rivendicazione 15, in cui il campione di fase (iii) è sottoposto a digestione da nucleasi a un pH tra 5 e 7.

19. Metodo secondo la rivendicazione 18, in cui la nucleasi è ricavata da una fonte non animale.

20. Metodo secondo la rivendicazione 19, in cui nella fase (iv) il detrito cellulare è rimosso mediante centrifugazione e/o filtrazione per produrre il campione chiarificato.

21. Metodo secondo la rivendicazione 20, in cui il campione chiarificato della fase (iv) è combinato con un tampone comprendente solfato di ammonio prima del caricamento della colonna a interazione idrofoba nella fase (v).

22. Metodo secondo la rivendicazione 21, in cui il campione chiarificato di fase (iv) è combinato con una soluzione di solfato di ammonio a 0,5 M a pH 6 e 50 mM di fosfato prima del caricamento della colonna a interazione idrofoba nella fase (v).

23. Metodo secondo la rivendicazione 15, in cui nella fase (vii) il complesso di tossina botulinica A è dissociato in un tampone avente un pH da 7,0 a 8,4 per ottenere la miscela comprendente la tossina botulinica A non complessata grezza dissociata dalle proteine non tossinogene native.

24. Metodo secondo la rivendicazione 23, in cui il complesso di tossina botulinica A viene dissociato in tampone Tris a pH 7,8.

25. Metodo secondo la rivendicazione 24, in cui il metodo è sostanzialmente privo di prodotti animali.

Figura 1A

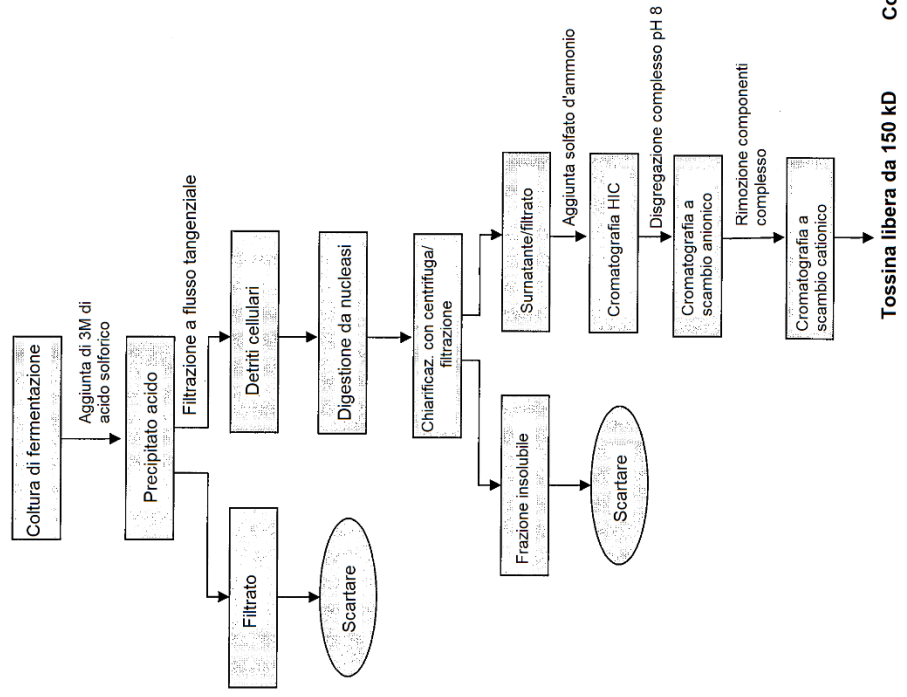


Figura 1B

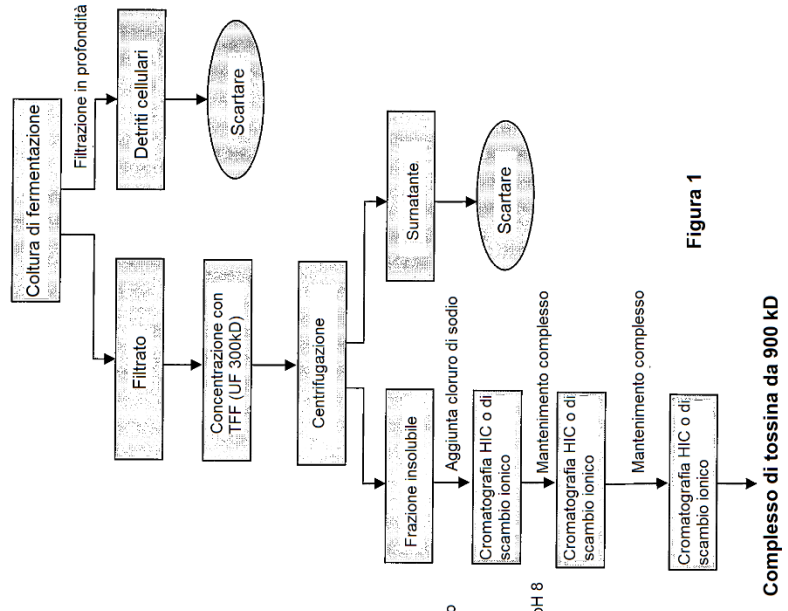


Figura 1