

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291862** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.08.19

(51) Int. Cl. **C07K 14/33** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.19

(54) **СПОСОБ ОЧИСТКИ БОТУЛИНИЧЕСКОГО ТОКСИНА**

(31) **62/951,828**

(32) **2019.12.20**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2020/062249**

(87) **WO 2021/124295 2021.06.24**

(71) Заявитель:

**ГАЛЬДЕРМА ХОЛДИНГ СА (СН);
ИПСЕН БИОФАРМ ЛИМИТЕД (GB)**

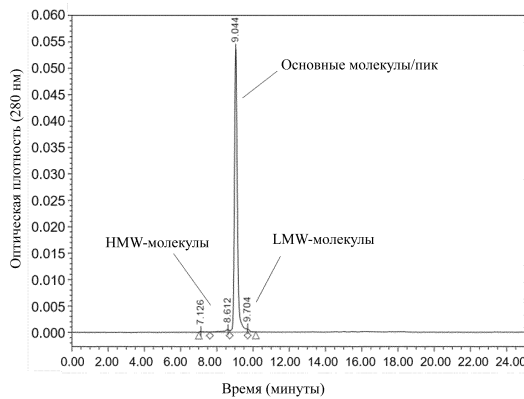
(72) Изобретатель:

**Столь Ульф, Франк Петер, Ярстад
Андерс, Муль Себастиан, Нолин
Джон, Нодквист Лена, Оберг Симон
(SE)**

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к промышленным способам очистки композиций ботулинического токсина, полученных из культур клеток. Способы очистки по настоящему изобретению основаны на серии стадий фильтрации и хроматографического разделения, которые дают высокочистую композицию ботулинического токсина, которая содержит белковые молекулы ботулинического токсина (приблизительно 150 кДа) в растворе, который не содержит, по существу не содержит или практически не содержит, ботулинических токсинных комплексов и продуктов животного происхождения, и не включают осаждение или лиофилизацию белковых молекул ботулинического токсина. В способе очистки по настоящему изобретению не использованы стадии осаждения, лиофилизации или центрифугирования, и он обеспечивает получение высокочистых, высокоактивных, свободных белковых молекул ботулинического токсина (приблизительно 150 кДа) в растворе без необходимости восстановления конечным пользователем.



202291862
A1

202291862
A1

СПОСОБ ОЧИСТКИ БОТУЛИНИЧЕСКОГО ТОКСИНА

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка претендует на приоритет и эффект изобретения согласно § 119(e) Раздела 35 Свода законов США в соответствии с предварительной заявкой на патент США с регистрационным номером 62/951,828, поданной 20 декабря 2019 г., содержание которой полностью включено в данную работу посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение в целом относится к области очистки белковых молекул нейротоксина. В частности, настоящее изобретение относится к способу очистки ботулинического токсина (ботулотоксина). Ботулинический токсин, очищенный этим способом, пригоден для применения в терапии, и в частности – для введения пациенту с целью достижения желаемого терапевтического или эстетического эффекта.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Приведенное ниже описание предшествующего уровня техники для предлагаемой технологии представлено исключительно в качестве помощи для понимания предлагаемой технологии, и не допускается его использование для описания предлагаемой технологии или включение в предлагаемую технологию.

Описано семь по существу иммунологически различных ботулинических нейротоксинов – серотипы А, В, С, D, Е, F и G ботулинического нейротоксина, которые различают по нейтрализации типоспецифическими антителами. В качестве примера, BOTOX® - это товарный знак очищенного нейротоксинового комплекса ботулинического токсина типа А, коммерчески поставляемого компанией Allergan, Inc. (Ирвайн, Калифорния). BOTOX® является популярной инъекционной косметической процедурой, которая временно визуально уменьшает тонкие линии и морщины.

Ботулинические токсины, включая токсины типа А, обычно получают из ферментации *C. botulinum*, которая может дать культуральный раствор, содержащий цельные бактерии, лизированные бактерии, питательные вещества культуральной среды и побочные продукты ферментации, кроме молекул ботулинического токсина. Фильтрация культуральных растворов *C. botulinum* для удаления цельных и/или лизированных клеточных компонентов и, необязательно, других остатков

ферментационной среды, дает осветленную культуру. Осветленный культуральный раствор содержит молекулы ботулинического токсина и различные примеси, которые можно удалить для получения концентрированного, очищенного ботулинического токсина (например, BoNT/A1), пригодного для включения в фармацевтическую композицию ботулинического токсина.

В существующих промышленных способах получения фармацевтически пригодных композиций ботулинического токсина в характерном случае используют многочисленные стадии осаждения для отделения токсинового комплекса от остаточных примесей из процесса ферментации. Например, холодное спиртовое фракционирование (например, способ Кона) или осаждение используют для удаления белков плазмы. К сожалению, способы осаждения для очистки ботулинического токсина обладают такими недостатками, как низкое разрешение, низкий выход, эксплуатационные затруднения, трудности с контролем и/или валидацией и отсутствие масштабируемости. Кроме того, сушка ботулинического токсина (например, посредством лиофилизации, осаждения и т.п.) существенно снижает его токсичность. Это является клинической проблемой, поскольку инактивированный токсин может формировать токсоид и иммунизировать пациентов против ботулинического токсина.

Тем не менее, продукты ботулинического токсина, в настоящее время одобренные для применения в США (например, BOTOX COSMETIC®, DYSPORT®, XEOMIN® и JEUVEAU®), хранят в лиофилизированной или сублимированной форме из соображений стабильности. Такие композиции нуждаются в восстановлении врачом в стерильном солевом растворе перед введением пациенту. Эта стадия восстановления связана с потерей времени врачом, риском ошибки при разведении и риском загрязнения. Поставщик ботулинического токсина должен также обучать врачей, чтобы гарантировать адекватное выполнение стадии восстановления.

Поэтому необходимы регулируемые, масштабируемые, высокопроизводительные способы очистки ботулинических токсинов из ферментационных сред для получения высокочистых, высокоактивных, фармацевтически пригодных композиций ботулинического токсина в форме, которая не содержит, по существу не содержит или практически не содержит продуктов животного происхождения, и которая не требует восстановления перед введением пациентам.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу очистки ботулинического токсина, включающему очистку токсина из раствора, содержащего токсин, причем способ не включает осаждения, центрифугирования или лиофилизации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения токсин является серотипом А. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полученный очищенный токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит ботулинических токсинных комплексов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит продуктов животного происхождения, в том числе человеческого альбумина.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очистка включает стадию фильтрации, предпочтительно – стадию фильтрации в тангенциальном потоке. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения во время стадии фильтрации используют полуволоконный фильтр. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очистка включает приведение первой хроматографической колонки в контакт с раствором, содержащим токсин, с получением токсинсодержащей фракции. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первая хроматографическая колонка включает анионообменную хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анионообменная хроматографическая колонка содержит Q Sepharose. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очистка дополнительно включает сбор токсинсодержащей фракции, причем токсинсодержащая фракция не адсорбируется на первой стационарной фазе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очистка дополнительно включает приведение второй хроматографической колонки в контакт с токсинсодержащей фракцией. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вторая хроматографическая колонка включает катионообменную хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения катионообменная хроматографическая колонка содержит SP Sepharose. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очистка

дополнительно включает элюирование ботулинического токсина из второй хроматографической колонки с получением первого токсинсодержащего элюата.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очистка дополнительно включает фильтрацию первого токсинсодержащего элюата с
5 получением токсинсодержащего ретентата. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фильтрация первого токсинсодержащего элюата включает замену буфера. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения посредством фильтрации первого токсинсодержащего элюата отделяют молекулы ботулинического токсина от нетоксиновых белков с получением свободных молекул
10 токсина.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очистка дополнительно включает приведение третьей хроматографической колонки в контакт с токсинсодержащим ретентатом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения третья хроматографическая колонка включает вторую
15 анионообменную хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вторая анионообменная хроматографическая колонка содержит Q Sepharose. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очистка дополнительно включает элюирование ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки с
20 получением второго токсинсодержащего элюата.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очистка дополнительно включает приведение четвертой хроматографической колонки в контакт со вторым токсинсодержащим элюатом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения токсинсодержащий элюат непосредственно
25 инжектируют на четвертую хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения третья хроматографическая колонка и четвертая хроматографическая колонка соединены друг с другом.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения четвертая хроматографическая колонка включает эксклюзионную хроматографическую
30 колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эксклюзионная хроматографическая колонка включает гель-фильтрационную хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гель-фильтрационная хроматографическая колонка содержит Superdex 200. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очистка

дополнительно включает элюирование ботулинического токсина из четвертой хроматографической колонки с получением очищенного ботулинического токсина.

В другом аспекте настоящего изобретения способ очистки ботулинического токсина из раствора, содержащего токсин, включает: (a) фильтрацию раствора, содержащего токсин; (b) приведение первой хроматографической колонки в контакт с профильтрованным раствором, содержащим токсин, со стадии (a), причем первая хроматографическая колонка является ионообменной хроматографической колонкой; (c) сбор токсинсодержащей фракции, причем токсинсодержащая фракция течет через первую хроматографическую колонку без адсорбции на стационарной фазе; (d) приведение второй хроматографической колонки в контакт с токсинсодержащей фракцией, причем вторая хроматографическая колонка является ионообменной хроматографической колонкой; (e) элюирование ботулинического токсина из второй хроматографической колонки с получением первого токсинсодержащего элюата; (f) фильтрацию первого токсинсодержащего элюата с получением токсинсодержащего ретентата; (g) приведение третьей хроматографической колонки в контакт с токсинсодержащим ретентатом со стадии фильтрации (f), причем третья хроматографическая колонка является ионообменной колонкой; (h) элюирование ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки с получением второго токсинсодержащего элюата; (i) приведение четвертой хроматографической колонки в контакт со вторым токсинсодержащим элюатом, причем четвертая хроматографическая колонка является эксклюзионной хроматографической колонкой; и (j) элюирование ботулинического токсина из четвертой хроматографической колонки с получением очищенного ботулинического токсина, причем способ не включает осаждения, центрифугирования или лиофилизации ботулинического токсина.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ботулинический токсин представляет собой ботулинический нейротоксин серотипа А. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полученный очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит ботулинических токсинных комплексов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полученный очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит продуктов животного происхождения, в том числе человеческого альбумина.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первая хроматографическая колонка включает анионообменную хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первая хроматографическая колонка содержит Q Sepharose.

5 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вторая хроматографическая колонка включает катионообменную хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вторая хроматографическая колонка содержит SP Sepharose.

10 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первая хроматографическая колонка включает анионообменную хроматографическую колонку, а вторая хроматографическая колонка включает катионообменную хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первая хроматографическая колонка содержит Q Sepharose, а вторая хроматографическая колонка содержит SP Sepharose.

15 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения третья хроматографическая колонка включает анионообменную хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения третья хроматографическая колонка содержит Q Sepharose.

20 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения четвертая хроматографическая колонка включает гель-фильтрационную колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения четвертая хроматографическая колонка содержит Superdex 200.

25 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения третья хроматографическая колонка включает анионообменную хроматографическую колонку, а четвертая хроматографическая колонка включает гель-фильтрационную хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения третья хроматографическая колонка содержит Q Sepharose, а четвертая хроматографическая колонка содержит Superdex 200. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения второй токсинсодержащий элюат непосредственно инжектируют на четвертую хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения третья хроматографическая колонка и четвертая хроматографическая колонка соединены друг с другом.

30

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первая хроматографическая колонка является анионообменной хроматографической колонкой, вторая хроматографическая колонка является катионообменной хроматографической колонкой, третья хроматографическая колонка является второй анионообменной хроматографической колонкой, а четвертая хроматографическая колонка является гель-фильтрационной хроматографической колонкой. В варианте осуществления настоящего изобретения первая хроматографическая колонка содержит Q Sepharose, вторая хроматографическая колонка содержит SP Sepharose, третья хроматографическая колонка содержит Q Sepharose, а четвертая хроматографическая колонка содержит Superdex 200.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первая, вторая, третья и четвертая хроматографические колонки являются одноразовыми хроматографическими системами.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фильтрация (f) отделяет белковые молекулы ботулинического токсина от нетоксиновых белков с получением свободных молекул токсина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фильтрация (f) включает замену буфера.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения раствор, содержащий ботулинический токсин, не содержит, по существу не содержит или практически не содержит продуктов животного происхождения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очистка включает приведение ботулинического токсина в контакт с буферным раствором, причем буферный раствор профильтрован для снижения микробиологической нагрузки.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к очищенному ботулиническому токсину, полученному посредством очистки токсина из раствора, содержащего токсин, причем способ не включает осаждения, центрифугирования или лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очищенный ботулинический токсин является серотипом А. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит токсинных комплексов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или

практически не содержит продуктов животного происхождения, в том числе человеческого альбумина.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей очищенный ботулинический токсин в буферном растворе, содержащем фосфат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор также содержит ацетат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор также содержит по меньшей мере один источник хлоридных ионов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один источник хлоридных ионов представляет собой хлорид натрия. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор также содержит по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения поверхностно-активное вещество является полисорбатом 20.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению ботулинический токсин является ботулиническим нейротоксином серотипа А. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция не содержит, по существу не содержит или практически не содержит ботулинических токсинных комплексов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция не содержит, по существу не содержит или практически не содержит продуктов животного происхождения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция не содержит, по существу не содержит или практически не содержит человеческого альбумина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция имеет значение pH, лежащее в диапазоне от примерно 6,6 до примерно 6,9.

Приведенное ниже подробное описание является иллюстративным и пояснительным, но не должно рассматриваться как ограничительное.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 является блок-схемой варианта осуществления способа очистки композиции ботулинического токсина от ферментационной среды по настоящему изобретению.

Фиг. 2 демонстрирует результаты анализа способом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE; от англ.: sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) с использованием окрашивания

коллоидным раствором кумасси синего продуктивного раствора токсина, полученного по настоящему изобретению.

Фиг. 3 демонстрирует результаты SDS-PAGE анализа трех различных продуктивных растворов токсина, полученных по настоящему изобретению.

5 Фиг. 4 демонстрирует результаты распределения по молекулярной массе, полученные способом эксклюзионной хроматографии (SEC; от англ.: size exclusion chromatography) для продуктивного раствора токсина, полученного по настоящему изобретению.

10 Фиг. 5 демонстрирует средний выход способа при последовательных стадиях очистки для трех различных продуктивных растворов токсина, полученных по настоящему изобретению.

Фиг. 6 демонстрирует средний аккумулированный выход способа при последовательных стадиях очистки для трех различных продуктивных растворов токсина, полученных по настоящему изобретению.

15 Фиг. 7 демонстрирует средний показатель повышения чистоты при последовательных стадиях очистки для трех различных продуктивных растворов токсина, полученных по настоящему изобретению.

20 Фиг. 8 демонстрирует средний аккумулированный показатель повышения чистоты при последовательных стадиях очистки для трех различных продуктивных растворов токсина, полученных по настоящему изобретению.

СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

25 Далее варианты осуществления настоящего изобретения будут описаны более подробно. Однако аспекты настоящего изобретения могут быть осуществлены в различных формах, и их не следует считать ограниченными вариантами осуществления, указанными в данной работе. Напротив, эти варианты осуществления представлены для того, чтобы описание настоящего изобретения было подробным и полным и полностью раскрыло объем настоящего изобретения специалистам в данной области техники. Следует понимать, что предложенная
30 технология не ограничена конкретными способами, реагентами, соединениями, композициями или биологическими системами, которые, конечно же, могут варьироваться. Терминология, используемая в данном описании, предназначена

исключительно для описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, и не является ограничительной.

Если не указано иное, все термины (включая технические и научные термины), использованные в данной работе, имеют стандартное значение, используемое специалистами в той области техники, к которой относится настоящее изобретение. Также следует понимать, что термины, например, определенные в обычно используемых словарях, следует интерпретировать как имеющие значение, соответствующее их значению в контексте данной заявки и в соответствующей области техники, и их не следует интерпретировать в идеализированном или чрезмерно формальном смысле, кроме тех случаев, когда такое определение в явной форме приведено в данной работе. Такие термины следует интерпретировать согласно их стандартному значению, кроме тех случаев, когда в явной форме указано иное.

Кроме того, там, где признаки или аспекты настоящего изобретения описаны в терминах группы Маркуша, специалистам в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение также при этом описано в терминах любого отдельного элемента или подгруппы элементов группы Маркуша.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, для любых целей, в частности – для обеспечения письменного описания, все диапазоны, указанные в данной работе, также включают все возможные поддиапазоны и комбинации поддиапазонов. Любой указанный диапазон легко можно признать достаточно описывающим и позволяющим разбить этот диапазон на по меньшей мере равные половины, трети, четверти, пятые части, десятые части и т.д. В качестве неограничивающего примера, любой диапазон, обсуждаемый в данной работе легко можно разбить на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть, и т.д. Также специалисту в данной области техники будет понятно, что все выражения, такие как «до», «по меньшей мере», «более чем», «менее чем» и т.п., включают указанное число и относятся к диапазонам, которые в дальнейшем можно разбить на поддиапазоны, как обсуждалось выше. Наконец, как будет понятно специалисту в данной области техники, диапазон включает каждый конкретный элемент. Соответственно, например, термин «группа, содержащая от 1 клетки до 3 клеток» относится к группам, содержащим 1 клетку, 2 клетки или 3 клетки. Сходным образом, термин «группа, содержащая от 1 клетки до 5 клеток», относится к группам, содержащим 1 клетку, 2 клетки, 3 клетки, 4 клетки или 5 клеток, и т.д.

Если из контекста не следует иное, то это конкретно означает, что различные признаки изобретения, описанного в данной работе, можно использовать в любой комбинации. Более того, настоящее изобретение также предусматривает, что в некоторых вариантах его осуществления можно исключить или удалить любой признак или комбинацию признаков, указанных в данной работе. В качестве иллюстрации, если в описании указано, что комплекс содержит компоненты А, В и С, то это конкретно означает, что любой компонент А, В или С или их комбинацию можно исключить и отказаться от них по отдельности или в любой комбинации.

Если в явной форме не указано иное, то все описанные варианты осуществления, признаки и термины включают как указанный вариант осуществления, признак или термин, так и их биологические эквиваленты.

Все патенты, заявки на патенты, предварительные заявки на патенты и публикации, на которые даны ссылки или которые цитируются в данной работе, полностью включены в данную работу посредством ссылок, включая все графические материалы и таблицы, в той мере, в которой они не являются несоответствующими выраженным в явной форме идеям данного описания.

Определения

При использовании в контексте настоящего изобретения формы единственного числа обозначают как единственное число, так и множественное число, если в явной форме не указано, что они обозначают только единственное число.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «и/или» относится к любым возможным комбинациям и охватывает любые возможные комбинации одного или более соответствующих указанных элементов, а также отсутствие комбинаций при интерпретации в альтернативной форме («или»).

Даже если это не указано в явной форме, всем числовым значениям предшествует термин «примерно» или «приблизительно». Термины «примерно» или «приблизительно» означают, что подразумеваемое число не ограничено точным числом, указанным в данной работе, а относится к числам, расположенным по существу вокруг указанного числа, если они входят в объем настоящего изобретения. При использовании в контексте настоящего изобретения термины «примерно» или «приблизительно» будут понятными для специалистов в данной области техники и будут варьироваться в определенной степени в зависимости от

контекста, в котором они использованы. Если имеются применения терминов, которые не очевидны специалистам в данной области техники, то в зависимости от контекста, в котором они использованы, термины «примерно» или «приблизительно» будут означать до плюс-минус 10%, 5%, 1% или 0,1% от конкретного числа.

При использовании в контексте настоящего изобретения термины «не содержит» или «вообще не содержит» означает, что в пределах диапазона обнаружения используемого прибора или способа вещество невозможно обнаружить или его присутствие невозможно подтвердить.

10 При использовании в контексте настоящего изобретения термин «по существу не содержит» означает, что можно обнаружить только следовые количества вещества. В настоящем изобретении «по существу не содержит» означает, что вещество присутствует в концентрации, составляющей менее 0,1%, предпочтительно – менее 0,01%, и наиболее предпочтительно – менее от 0,001% от массы всей композиции.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «практически не содержит» означает, что вещество содержится в концентрации, составляющей менее 5%, предпочтительно – менее 2%, и наиболее предпочтительно – менее 1% от массы всей композиции.

20 При использовании в контексте настоящего изобретения термин «ботулинический токсин» означает нейротоксин, продуцируемый *Clostridium botulinum*, и ботулинический токсин (или его легкую цепь, или его тяжелую цепь), полученный рекомбинантно с использованием неклостридиальных видов. Термин «ботулинический токсин» при использовании в контексте настоящего изобретения охватывает серотипы А, В, С, D, Е, F и G ботулинического токсина. Термин «ботулинический токсин» также охватывает термин «модифицированный ботулинический токсин».

30 При использовании в контексте настоящего изобретения термины «ботулинический токсинный комплекс» или «токсиновый комплекс» охватывают комплекс, выделяемый клостридиальными бактериями и содержащий белковую молекулу ботулинического токсина (приблизительно 150 кДа у всех серотипов) совместно с одним или более связанными нетоксиновыми белками. Комплексы (например, с молекулярными массами, равными примерно 300 кДа, 500 кДа или 900

кДа), как предполагается, содержат нетоксиновый гемагглютининовый белок («NTH-белок»; от англ.: non-toxin hemagglutinin protein) и нетоксиновый негемагглютининовый белок («NTNH-белок»; от англ.: non-toxin non-hemagglutinin protein). Соответственно, ботулинический токсин может содержать молекулу ботулинического токсина (нейротоксиновый компонент) и один или более NTH и/или NTNH белков. Эти два типа нетоксиновых белков могут стабилизировать молекулу токсина против денатурации и защищать против кислот пищеварительного тракта, если токсин принят внутрь. Кроме того, более крупные (300 кДа и более) ботулинические токсинные комплексы могут более медленно диффундировать из мест внутримышечной инъекции по сравнению с белком ботулинического токсина.

В качестве примера токсинного комплекса, комплекс ботулинического токсина типа А может продуцироваться клостридиальной бактерией в формах с молекулярными массами, равными 900 кДа, 500 кДа и 300 кДа. Ботулинические токсины типов В и С1 продуцируются в форме комплекса с молекулярной массой, равной 500 кДа. Ботулинический токсин типа D продуцируется в форме комплексов с молекулярной массой, равной 300 кДа и 500 кДа. Наконец, ботулинические токсины типов Е и F продуцируются в форме комплексов с молекулярной массой, равной примерно 300 кДа.

Что касается ботулинического токсина типа А1, то известно, что при значении рН, превышающем примерно 7, нетоксиновые белки отделяются от белковой молекулы ботулинического токсина (приблизительно 150 кДа). Соответственно, токсинные комплексы можно разделить на белок ботулинического токсина и гемагглютининовые белки, подвергнув комплекс способу разделения, например – колоночной хроматографии, в подходящем буферном растворе при значении рН, лежащем в диапазоне от примерно 7 до примерно 8. Однако известно, что белок ботулинического токсина нестабилен после удаления NTH и/или NTNH гемагглютининового белка (или белков), а токсин утрачивает свою токсичность при повышении рН и температуры или в результате растяжения поверхности или сушки (например, во время лиофилизации или осаждения). Кроме того, токсин теряет свою специфическую активность при разведении (например, при разведении во время культивирования, ферментации и очистки), если не присутствует стабилизирующий агент.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «модифицированный ботулинический токсин» означает ботулинический токсин, у

которого по меньшей мере одна из его аминокислот удалена, модифицирована или заменена по сравнению с нативным ботулиническим токсином. Кроме того, модифицированный ботулинический токсин может быть рекомбинантно полученным нейротоксином или производным или фрагментом рекомбинантно полученного нейротоксина. Модифицированный ботулинический токсин сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность нативного ботулинического токсина, например – способность связываться с рецептором ботулинического токсина или способность ингибировать выделение нейромедиатора из нейрона. Примером модифицированного ботулинического токсина является ботулинический токсин, который содержит легкую цепь от одного серотипа ботулинического токсина (например, серотипа А) и тяжелую цепь от другого серотипа ботулинического токсина (например, серотипа В). Соответственно, модифицированные ботулинические токсины могут содержать легкую и тяжелую цепи от двух различных серотипов, выбранных из любых серотипов А, В, С, D, Е, F или G. Другим примером модифицированного ботулинического токсина является ботулинический токсин, соединенный с нейромедиатором.

При использовании в контексте настоящего изобретения термины «очищенный ботулинический токсин», «чистый токсин», «свободный ботулинический токсин», «свободный токсин» или «белок ботулинического токсина» определены как ботулинический токсин, который отделен или по существу отделен от других белков, включающих NTN и/или NTNН белки, которые образуют ботулинический токсинный комплекс. Очищенный ботулинический токсин может иметь степень чистоты более 95%, и предпочтительно – более 99%.

При использовании в контексте настоящего изобретения термины «среда» или «ферментационная среда» означают любую среду для культивирования бактерий, то есть либо среду для их размножения для получения культуры для посева, используемой для инокуляции продукционной среды, либо продукционную среду, в которой бактерии размножаются и продуцируют токсин.

При использовании в контексте настоящего изобретения термины «не содержит продукта животного происхождения» («APF», от англ.: “Animal product free”), «по существу не содержит продукта животного происхождения» или «практически не содержит продукта животного происхождения» включают, соответственно, термины «не содержит белка животного происхождения», или «по существу не содержит белка животного происхождения», или «практически не

содержит белка животного происхождения», и означают отсутствие, по существу отсутствие или практическое отсутствие производных крови, кровяных депо и других продуктов или соединений животного происхождения. В этом контексте термины «не содержит», «по существу не содержит» и «практически не содержит» соответствуют 5 определениям, приведенным выше. Термин «животное» означает млекопитающее (например, человека), птицу, рептилию, рыбу, насекомое, паука или другие виды животных. Термин «животное» не включает микроорганизмы, такие как бактерии. Соответственно, среда или способ, не содержащие продукта животного происхождения (APF), или среда или способ, практически не содержащие продукта 10 животного происхождения, в объеме настоящего изобретения могут включать ботулинический токсин или бактерию *Clostridium botulinum*. Например, способ, не содержащий продукта животного происхождения, или способ, практически не содержащий продукта животного происхождения, означает способ, который не содержит или практически не содержит белков животного происхождения, таких как 15 иммуноглобулины, человеческий альбумин, мясной гидролизат, мясные субпродукты и молоко или молочные продукты или гидролизаты. Соответственно, примером способа, не содержащего продукта животного происхождения (APF), является способ (такой как способ культивирования бактерий или бактериальной ферментации), в котором исключено использование мясных и молочных продуктов 20 или мясных или молочных субпродуктов.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «микробиологическая нагрузка» означает бактерии, живущие на поверхности, внутри устройства или в растворе, который не был стерилизован. Например, варианты осуществления настоящего изобретения включают фильтрацию 25 буферных растворов для снижения «микробиологической нагрузки», то есть бактерий, живущих в буферном растворе, или бактерий, которые перенесены в раствор с поверхностей (например, поверхностей стеклянной посуды), контактировавших с раствором.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин 30 «фильтрация в тангенциальном потоке» или «TFF; от англ.: tangential flow filtration» относится к режиму фильтрации, который используют для осветления, концентрирования и очистки биологических материалов (например, белков). Во время TFF раствор или суспензию, содержащую макромолекулы или биологические материалы, могут прокачивать тангенциально вдоль поверхности мембраны. 35 Приложенное давление может протолкнуть часть раствора через поры в мембране.

Этот раствор в данной работе обозначают как «пермеат» (или «фильтрат»). Макромолекулы, биологические материалы и частицы, которые являются слишком большими для проникновения через поры мембраны, могут задерживаться на стороне впуска. Этот раствор в данной работе обозначают как «ретентат». В отличие от обычных способов фильтрации задержанные материалы не накапливаются на поверхности мембраны. Вместо этого они могут перемещаться вдоль лицевой поверхности мембраны с тангенциальным потоком текучей среды. См., например, публикацию L. Schwartz and K. Seeley, *Introduction to Tangential Flow Filtration for Laboratory and Process Development Applications*, Pall Life Sciences (2002), <https://laboratory.pall.com/content/dam/pall/laboratory/literature-library/non-gated/id-34212.pdf>.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «пермеат» относится к раствору, суспензии или их компонентам, которые преодолевают фильтр или мембрану (например, диафильтрационную мембрану, мембрану для фильтрации в тангенциальном потоке, ультрафильтрационную мембрану, микрофильтрационную мембрану или полволоконный фильтр) за счет проникновения через поры фильтра или мембраны, а также к раствору, который уже преодолел фильтр или мембрану или прошел через фильтр или мембрану. В общем, молекулы растворителя и молекулы растворенного вещества, которые меньше размера пор фильтра или мембраны, преодолеют фильтр или мембрану, тогда как молекулы, которые больше размера пор, не преодолеют фильтр или мембрану.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «токсинсодержащий пермеат» относится к пермеату, который содержит молекулы ботулинического токсина, то есть, если размер пор фильтра больше молекул ботулинического токсина, молекулы ботулинического токсина преодолевают фильтр.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «ретентат» относится к раствору, суспензии или их компонентам, которые не преодолевают фильтр или мембрану. Например, в случае фильтрации в тангенциальном потоке ретентат является компонентом или частью раствора или суспензии, которая течет тангенциально вдоль фильтра или мембраны, но не преодолевает фильтр или мембрану. В общем, молекулы, которые больше размера пор фильтра или мембраны, не преодолевают фильтр или мембрану.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «токсинсодержащий ретентат» относится к ретентату, который содержит молекулы ботулинического токсина, то есть, если размер пор фильтра меньше молекул ботулинического токсина, молекулы ботулинического токсина не могут преодолеть
5 фильтр.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «трансмембранное давление» или «TMP» (от англ.: transmembrane pressure) относится к дифференциальному градиенту давления, который приложен вдоль
10 длины фильтрационной мембраны для того, чтобы вызвать поток текучей среды и фильтруемых растворенных веществ через фильтр или мембрану или поперек фильтра или мембраны.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «диафильтрация» относится к специализированному классу фильтрации, при которой ретентат разбавляется растворителем и повторно фильтруется для
15 снижения концентрации растворимых компонентов пермеата. Диафильтрация может приводить или не приводить к повышению концентрации задержанных компонентов, в том числе белков (например, BoNT/A). Например, при непрерывной диафильтрации растворитель непрерывно добавляют к ретентату с той же скоростью, с которой образуется пермеат. В этом случае объем ретентата и
20 концентрация задержанных компонентов не изменяется во время процесса. С другой стороны, при прерывистой диафильтрации или диафильтрации с последовательным разбавлением за стадией фильтрации следует добавление растворителя к стороне ретентата; если объем растворителя, добавляемого к стороне ретентата, меньше объема образующегося пермеата, то задержанные
25 компоненты будут иметь более высокую концентрацию, чем в исходном растворе. Диафильтрацию можно использовать для изменения pH, ионной силы, солевого состава или других свойств раствора или суспензии макромолекул (например, белков, таких как BoNT/A). См., например, публикацию L. Schwartz, *Diafiltration: A Fast, Efficient, Method for Desalting, or Buffer Exchange of Biological Samples*, Pall Life
30 Sciences (2003), https://laboratory.pall.com/content/dam/pall/laboratory/literature-library/non-gated/02.0629_Buffer_Exchange_STR.pdf (last visited Dec. 9, 2019).

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «объем диафильтрации» или «DV» (от англ.: diafiltration volume) относится к общему объему, замененному во время процесса диафильтрации. Один DV равен объему ретентата

в начале диафильтрации. Например, если исходный объем раствора равен одному литру, процесс диафильтрации создает объем пермеата, примерно равный одному литру, и объем ретентата поддерживается равным 1 л или дополняется до 1 л (например, с использованием буферного раствора), то исходный раствор или исходная суспензия профильтрованы или промыты одним DV. Непрерывная диафильтрация обеспечивает обмен нескольких DV. Например, если исходный объем ретентата равен одному литру, и процесс диафильтрации создает объем пермеата, равный примерно пяти литрам, то исходный раствор или исходная суспензия профильтрованы или промыты пятью DV.

10 При использовании в контексте настоящего изобретения термин «микрофильтрация» относится к классу фильтрации, в которой в характерном случае используют размеры мембранных пор, лежащие в диапазоне от примерно 0,1 мкм до примерно 10 мкм и более. См., например, публикацию Munir Cheryan, *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook* (2d ed. 1998).

15 При использовании в контексте настоящего изобретения термин «ультрафильтрация» относится к классу фильтрации, в которой в характерном случае используют размеры мембранных пор, лежащие в диапазоне от примерно 0,1 мкм до примерно 0,01 мкм и менее. Альтернативно, номинальные размеры мембранных пор можно выразить в единицах молекулярной массы, например – от
20 примерно 30 кДа и менее до примерно 750 кДа и менее, предпочтительно – 50 кДа и менее или 30 кДа и менее. Термин может относиться к любому способу, в котором раствором или суспензией действуют на полупроницаемую мембрану, которая задерживает макромолекулы, но позволяет проникновение через нее растворителя и мелких молекул растворенного вещества. Ультрафильтрацию можно
25 использовать для концентрирования макромолекул (например, белков, таких как BoNT/A) в растворе или суспензии. См., например, публикацию Munir Cheryan, *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook* (2d ed. 1998).

При использовании в контексте настоящего изобретения термины «хроматография» или «хроматографическое разделение» относятся к способу
30 физического разделения, в котором компоненты (например, белки), подлежащие разделению, распределяют между двумя фазами: неподвижной фазой и подвижной фазой. Молекулы, подлежащие разделению, растворены в подвижной фазе, которая перемещается через неподвижную фазу (например, пористый гель, заряженные полимерные шарики и т.п.). Разделение возможно, поскольку

различные молекулы в образце будут проявлять различное сродство к неподвижной фазе, что приведет к разделению сходных молекул. Молекулы с более высоким сродством к неподвижной фазе будут иметь тенденцию к более медленному перемещению через неподвижную фазу, чем молекулы с более слабым сродством.

5 В применении к белкам (например, ботулиническим токсинам) посредством хроматографического разделения можно разделить белки на основании многих различных свойств. Например, при гель-фильтрационной хроматографии белки, находящиеся в подвижной фазе, разделяют на основании их размера, поскольку белки различного размера перемещаются через пористую неподвижную фазу, в
10 которой более мелкие белки задерживаются, и их перемещение замедляется. При ионообменной хроматографии белки разделяют на основании их заряда и результирующих кулоновских взаимодействий с неподвижной фазой.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «хроматографическая колонка», или просто «колонка», относится к компоненту,
15 содержащему хроматографическую матрицу (например, неподвижную фазу или твердую фазу) и устроенному так, что подвижная фаза, например – текучий образец или буфер, может пройти через колонку, при этом она проходит через неподвижную фазу, удерживаемую в колонке. Неограничивающими примерами таких колонок являются колонки, коммерчески поставляемые компанией G.E. Healthcare. См.,
20 например, публикацию *Chromatography Products: Chromatography columns, systems, resins, and buffer management solutions*, G.E. Healthcare, <https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/chromatography> (last visited Dec. 9, 2019).

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «фракция» относится к части подвижной фазы, которую собирают на выходе из колонки.
25 Компоненты, содержащиеся во «фракции», будут варьироваться в зависимости от времени, в течение которого они собраны. Более быстро движущиеся «фракции», собранные в начальные периоды времени, будут содержать относительно более высокие концентрации тех молекул, которые более быстро движутся через неподвижную фазу; более медленно движущиеся «фракции», собранные в более
30 поздние периоды времени, будут содержать относительно высокие концентрации молекул, которые более медленно движутся через неподвижную фазу.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «токсинсодержащая фракция» означает фракцию, собранную из хроматографической колонки в тот период времени, когда молекулы

ботулинического токсина (например, молекулы BoNT/A) выходят из колонки в подвижной фазе.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «ионообменная хроматография», или «IEX» (от англ.: ion exchange chromatography) относится к способу хроматографического разделения, в котором молекулы разделяют на основании их полярности и величины их зарядов (например, +2, +1, нейтральные, -1, -2, и т.д.). При IEX молекулы аналита (например, белки) удерживаются на неподвижной фазе на основании величины их кулоновских взаимодействий с неподвижной фазой. Поверхность неподвижной фазы обнаруживает ионные функциональные группы, которые взаимодействуют с ионами аналита (например, ботулинического токсина) противоположного знака. Для достижения электронейтральности эти неподвижные заряды взаимодействуют с заменяемыми противоионами в подвижной фазе. Молекулы аналита конкурируют с этими заменяемыми противоионами за связывание. Молекулы аналита удерживаются или «элюируются» в зависимости от их заряда. Вначале молекулы, которые не связываются или слабо связываются с неподвижной фазой, вымываются первыми. См., например, публикацию *Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods*, G.E. Healthcare (2016), <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=13101> (last visited Dec. 9, 2019).

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «анионообменная хроматография», или «AEX» (от англ.: anion exchange chromatography), относится к типу ионообменной хроматографии, в котором анионные молекулы аналита (например, белки) удерживаются на катионной неподвижной фазе. См. в целом, например, публикацию *Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods*, G.E. Healthcare (2016), <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=13101> (last visited Dec. 9, 2019).

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «катионообменная хроматография», или «CIEC» (от англ.: cation exchange chromatography), относится к типу ионообменной хроматографии, в котором катионные молекулы аналита (например, белки) удерживаются на анионной неподвижной фазе. См. в целом, например, публикацию *Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods*, G.E. Healthcare (2016),

<https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=13101> (last visited Dec. 9, 2019).

5 При использовании в контексте настоящего изобретения термин «элюирование» относится к десорбции молекул, присоединенных к неподвижной фазе, за счет изменения условий раствора в хроматографической колонке. Можно увеличить концентрации заменяемых противоионов или изменить pH с целью влияния на сродство аналита к связыванию. Молекулы, которые утрачивают сродство к неподвижной фазе и проникают в подвижную фазу, «элюируются» из колонки.

10 При использовании в контексте настоящего изобретения термины «элюент» или «промывочный раствор» относятся к агенту, в характерном случае – к раствору, который используют для модификации адсорбции аналита (например, молекулы ботулинического токсина) на неподвижной фазе и/или для удаления несвязанных материалов из неподвижной фазы. Элюционные характеристики элюента могут
15 зависеть, например, от pH, ионной силы и детергентной силы, среди других факторов.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «элюат» относится к раствору (например, промывочному раствору или буферному раствору), содержащему несвязанные материалы (включающие «элюированные» или
20 десорбированные молекулы аналита, например – молекулы ботулинического токсина), который перемещается через неподвижную фазу и выходит из колонки в ходе хроматографического разделения.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «токсинсодержащий элюат» относится к подвижной фазе, содержащей
25 элюированные молекулы ботулинического токсина, который выходит из колонки в ходе хроматографического разделения.

При использовании в контексте настоящего изобретения термины «гель-фильтрационная хроматография» или «гель-фильтрация» означают тип
30 эксклюзионной хроматографии, который можно использовать либо для фракционирования молекул (например, белков, белковых комплексов, полисахаридов, нуклеиновых кислот, мелких молекул и т.п.), содержащихся в образце, на фракции, каждая из которых имеет определенный диапазон размеров. Альтернативно, «гель-фильтрация» может удалять из образца все молекулы,

которые крупнее определенного размера отсечки. В колонке для геле-
фильтрационной хроматографии неподвижная фаза содержит пористую матрицу
(например, шарики), а подвижная фаза является раствором (например, буферным
раствором), который течет вокруг матрицы. Матрица может иметь размер пор,
5 лежащий в определенном диапазоне, который известен под названием «диапазон
фракционирования». Молекулы и комплексы, которые являются слишком крупными
для проникновения в поры, остаются в подвижной фазе и перемещаются через
колонку с буферным раствором. Более мелкие молекулы и комплексы, которые
могут войти в поры, проникают в неподвижную фазу и перемещаются через геле-
10 фильтрационную колонку по более длинному пути (то есть через поры, а не вокруг
шариков). Молекулы, которые могут проникнуть в неподвижную фазу,
фракционируются по размеру. Более мелкие молекулы будут мигрировать через
поры и поэтому будут замедляться в большей степени, чем более крупные
молекулы, которые не могут легко проникнуть в поры. Поэтому более крупные
15 молекулы элюируются быстрее. Соответственно, компоненты образца,
превышающие диапазон фракционирования, будут элюироваться раньше
компонентов, находящихся в диапазоне фракционирования. См. в целом, например,
публикацию *Size Exclusion Chromatography: Principles and Methods*, G.E. Healthcare
(2018),
20 [https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&de-
stinationid=10016&assetid=11639](https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11639) (last visited Dec. 9, 2019).

При использовании в отношении компонентов хроматографической системы
термин «одноразовый» относится к компонентам, которые имеют конфигурацию,
позволяющую заменить или уничтожить их после каждого употребления, и которые
25 не предназначены для повторного использования в системе.

Ферментационная среда

Согласно Фиг. 1, способ 100 очистки ботулинического токсина может
включать получение 104 раствора (например, ферментационной среды),
содержащего ботулинический токсин (например, BoNT/A). В некоторых вариантах
30 осуществления настоящего изобретения раствор может быть ферментационной
средой, предпочтительно – супернатантом от ферментационной среды,
содержащим цельные клетки *C. botulinum*, лизированные бактерии, питательные
вещества культуральной среды (например, растительные пептоны) и побочные
продукты ферментации. В некоторых вариантах осуществления настоящего

изобретения ферментационная среда может быть практически не содержащей, по существу не содержащей или не содержащей продуктов животного происхождения (то есть быть «APF» ферментационной средой), такой как ферментационная среда, описанная в одновременно поданной предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 62/951,549.

Ботулинический токсин можно выделить и очистить из ферментационной среды с использованием способов очистки белков, известных специалистам в области очистки белков. См. в целом, например, публикации Munir Cheryan, *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook* (2d ed. 1998); Ozutsumi et al., 49 *Appl. Environ. Microbiol.* 939 (1985); GE Healthcare, *Strategies for Protein Purification Handbook* (2010).

Способы очистки по настоящему изобретению, описанные в данной работе, могут включать очистку ботулинического токсинового комплекса (например, комплекса с молекулярной массой, равной 900 кДа), который является более стабильным, чем белковая молекула ботулинического токсина с молекулярной массой, равной 150 кДа, с последующим разделением и дальнейшей очисткой белковой молекулы токсина от нетоксиновых белков (например, NTN и/или NTNН белков) с получением очищенного продукта ботулинического токсина (приблизительно 150 кДа) без использования стадий осаждения, центрифугирования или лиофилизации. Продуктивный раствор токсина может быть не содержащим, по существу не содержащим или практически не содержащим токсинных комплексов и/или продуктов животного происхождения. Кроме того, поскольку не требуются стадии осаждения, лиофилизации или центрифугирования, ботулинический токсин можно получить в растворе, в отличие от порошка, который должен быть восстановлен конечным пользователем перед введением пациенту.

Фильтрация

Фильтрация 1

Согласно Фиг. 1, способ может включать первую фильтрацию («Фильтрацию 1») 106, которая включает фильтрацию среды или раствора культуры с целью удаления цельных или лизированных бактерий, спор (например, спор *C. botulinum*) и дебриса с получением токсинсодержащего пермеата 107. Токсинсодержащий пермеат 107 содержит ботулинический токсин и различные примеси и может быть

обработан с получением концентрированного ботулинического токсина (например, BoNT/A).

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения первая фильтрация 106 включает удаление цельных или лизированных клеток *C. Botulinum* (или их компонентов) из ферментационной среды с использованием подходящего способа фильтрации (например, диафильтрации, микрофильтрации в тангенциальном потоке, ультрафильтрации в тангенциальном потоке, полуволоконной фильтрации и т.п.). Способы фильтрации для очистки биомолекул, таких как белки, хорошо известны в данной области техники. См., например, публикации L. Schwartz and K. Seeley, *Introduction to Tangential Flow Filtration for Laboratory and Process Development Applications*, Pall Life Sciences (2002), <https://laboratory.pall.com/content/dam/pall/laboratory/literature-library/non-gated/id-34212.pdf> (last visited Dec. 9, 2019); Munir Cheryan, *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook* (2d ed. 1998). В варианте осуществления настоящего изобретения первая фильтрация 106 включает микрофильтрацию в тангенциальном потоке.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения на стадии первой фильтрации 106 может быть использован фильтр (например, полуволоконный фильтр, мембрана для фильтрации в тангенциальном потоке и т.п.), причем по меньшей мере растворитель и молекулы ботулинического токсина или токсиновые комплексы проходят через фильтр и дают токсинсодержащий пермеат 107, тогда как цельные или лизированные клетки, если они присутствуют, не проходят через фильтр и удерживаются в ретентате. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фильтр содержит поры с диаметром, лежащим в диапазоне от примерно 0,1 мкм до примерно 10 мкм (например, примерно 0,2 мкм). В варианте осуществления настоящего изобретения фильтр является полуволоконным фильтром.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадия первой фильтрации 106 может дополнительно включать концентрирование токсинсодержащего пермеата 107 и выделение дополнительных молекул ботулинического токсина из ретентата и/или токсинсодержащего пермеата 107 с использованием любого подходящего способа (например, диафильтрации).

Фильтрация 2

Согласно Фиг. 1, способ может дополнительно включать вторую фильтрацию («Фильтрацию 2») 108 для удаления остатков ферментационной среды (например, мелких пептидов, углеводов и т.п.) из токсинсодержащего пермеата 107. Эта стадия может включать любой подходящий способ фильтрации (например, диафильтрацию, микрофильтрацию в тангенциальном потоке, ультрафильтрацию в тангенциальном потоке, полуволоконную фильтрацию и т.п.). В варианте осуществления настоящего изобретения вторая фильтрация 108 для удаления остатков ферментационной среды включает ультрафильтрацию с использованием тангенциального фильтра (например, полуволоконного фильтра) с размером пор, который позволяет проникновение остатков ферментационной среды через фильтр, но задерживает молекулы ботулинического токсина и/или токсиновые комплексы. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фильтр может иметь размер пор, равный 150 кДа или менее, 100 кДа или менее или 50 кДа или менее. В этом случае молекулы ботулинического токсина или ботулинические токсиновые комплексы остаются в ретентате из второй фильтрации 108 и образуется осветленная культура 110, которая содержит молекулы ботулинического токсина или ботулинические токсиновые комплексы, но не содержит, по существу не содержит или практически не содержит цельных или лизированных клеток *C. botulinum* (или их компонентов) и остатков ферментационной среды (например, мелких пептидов, углеводов и т.п.).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения осветленную культуру 110 можно собрать и дополнительно очистить во время последующих стадий обработки без осаждения молекул ботулинического токсина или токсиновых комплексов из раствора в какой-либо момент времени во время процесса очистки. Выгодным является то, что при этом повышается общий выход процесса, сохраняется активность токсина и исключается необходимость восстановления лиофилизированного лекарственного продукта конечным пользователем.

30 Колоночная хроматография

Первое хроматографическое разделение

Согласно Фиг. 1, некоторые варианты осуществления способа 100 дополнительно включают очистку осветленной культуры 110 с использованием

первого хроматографического разделения 112 с получением первой токсинсодержащей фракции 114. Задачей этой стадии является отделение ботулинических токсиновых комплексов от нуклеиновых кислот (например, ДНК и РНК), которые присутствуют в осветленной культуре 110. Первое хроматографическое разделение 112 может включать любой подходящий способ хроматографического разделения (например, ионообменную хроматографию, включая анионообменную хроматографию или катионообменную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, аффинную хроматографию и т.п.). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первое хроматографическое разделение может включать анионообменную хроматографию (AEX). В варианте осуществления настоящего изобретения первое хроматографическое разделение включает AEX на Q Sepharose.

Первое хроматографическое разделение 112 может включать приведение первой хроматографической колонки в контакт с осветленной культурой 110, которая содержит ботулинические токсины или токсиновые комплексы. Подвижная фаза (содержащая осветленную культуру 110) может протекать через первую неподвижную фазу для отделения ботулинического токсина от других остаточных примесей (например, нуклеиновых кислот). Первая неподвижная фаза может содержать любую подходящую хроматографическую матрицу (например, среду на основе агарозных шариков, такую как Q Sepharose FF (производства компании GE Healthcare).

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения осветленная культура 110 может быть кондиционирована для колоночной хроматографии (например, посредством разведения в буферном растворе или посредством замены буфера). В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения осветленная культура 110 может быть кондиционирована в фосфатном буфере при pH, меньшем или равном примерно 7,5, предпочтительно – при pH, меньшем или равном примерно 7, более предпочтительно – при pH, равном примерно 6,1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения осветленная культура 110 может быть кондиционирована в фосфатном буфере при pH, равном примерно 7,5, примерно 7,4, примерно 7,3, примерно 7,2, примерно 7,1, примерно 7,0, примерно 6,9, примерно 6,8, примерно 6,7, примерно 6,6, примерно 6,5, примерно 6,4, примерно 6,3, примерно 6,2, примерно 6,1, примерно 6,0, примерно 5,9, примерно 5,8, примерно 5,7, примерно 5,6 или примерно 5,5.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения первое хроматографическое разделение 112 может дополнительно включать промывание ботулинических токсинов или токсиновых комплексов через неподвижную фазу с использованием подходящего буферного раствора (например, фосфатного буфера с рН 6,1). Задачей этой стадии является промывание как можно большего количества ботулинических токсиновых комплексов через колонку с отделением ботулинических токсиновых комплексов от других белков и удалением нуклеиновых кислот (РНК и ДНК). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация солей в этом буферном растворе может быть выбрана так, чтобы максимизировать количество ботулинических токсинов или токсиновых комплексов, протекающих через колонку, и минимизировать количество других белков, протекающих через колонку.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор содержит хлорид натрия (NaCl) в концентрации, равной не менее чем примерно 15 мМ, не менее чем примерно 20 мМ, не менее чем примерно 30 мМ, не менее чем примерно 40 мМ, не менее чем примерно 50 мМ, не менее чем примерно 60 мМ, не менее чем примерно 70 мМ, не менее чем примерно 80 мМ, не менее чем примерно 90 мМ, не менее чем примерно 100 мМ, не менее чем примерно 150 мМ, не менее чем примерно 200 мМ, не менее чем примерно 250 мМ, не менее чем примерно 300 мМ, не менее чем примерно 350 мМ, не менее чем примерно 400 мМ, не менее чем примерно 450 мМ или не менее чем примерно 500 мМ (или имеет промежуточное значение). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор содержит NaCl в концентрации, равной примерно 15 мМ, примерно 20 мМ, примерно 30 мМ, примерно 40 мМ, примерно 50 мМ, примерно 60 мМ, примерно 70 мМ, примерно 80 мМ, примерно 90 мМ, примерно 100 мМ, примерно 150 мМ, примерно 200 мМ, примерно 250 мМ, примерно 300 мМ, примерно 350 мМ, примерно 400 мМ, примерно 450 мМ или примерно 500 мМ. В варианте осуществления настоящего изобретения буферный раствор содержит NaCl в концентрации, равной примерно 150 мМ.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения первая хроматографическая колонка может работать в проточном режиме, причем ботулинические токсины и/или токсиновые комплексы могут проходить через колонку без адсорбции на стационарной фазе. В этой конфигурации не требуется элюирование ботулинического токсина или токсиновых комплексов. Вместо этого ботулинический токсин или токсиновые комплексы могут выходить из колонки в

токсинсодержащей фракции 114, которую можно собрать и дополнительно очистить во время последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мониторинг сбора токсинсодержащей фракции 114 осуществляют посредством определения оптической плотности потока при длине волны, равной 280 нм (« A_{280} »; от англ.: absorbance), причем токсинсодержащую фракцию 114 собирают во время появления пика A_{280} .

Второе хроматографическое разделение

Некоторые варианты осуществления способа 100 дополнительно включают стадию второго хроматографического разделения 116, во время которой токсинсодержащую фракцию 114 можно очистить с удалением основных примесей (например, других белков) и получением первого токсинсодержащего элюата 118. Второе хроматографическое разделение 116 может включать любой подходящий способ хроматографического разделения (например, ионообменную хроматографию, в том числе анионообменную хроматографию или катионообменную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, аффинную хроматографию и т.п.). В конкретном варианте осуществления второе хроматографическое разделение 116 включает катионообменную хроматографию (CIEX).

Второе хроматографическое разделение 116 может включать приведение ботулинических токсинов или токсиновых комплексов в контакт со второй хроматографической колонкой, причем подвижная фаза, содержащая токсинсодержащую фракцию 114, перемещается через вторую неподвижную фазу. Вторая неподвижная фаза может содержать любую подходящую хроматографическую матрицу (например, среду на основе агарозных шариков, такую как SP Sepharose FF (производства компании GE Healthcare)). В вариантах осуществления настоящего изобретения молекулы ботулинического токсина или токсиновые комплексы могут связываться со второй неподвижной фазой. В вариантах осуществления настоящего изобретения ботулинические токсины или токсиновые комплексы могут связываться со второй неподвижной фазой, при этом осуществляется мониторинг A_{280} раствора, промывающего колонку. В вариантах осуществления настоящего изобретения колонку промывают подходящим буферным раствором (например, раствором, содержащим 50 мМ ацетата натрия, 0,2% полисорбата 20, pH 4,5) до тех пор, пока A_{280} не вернется к исходному значению, что показывает, что весь токсинсодержащий элюат 118 прошел через

колонку, хотя ботулинические токсины и токсиновые комплексы могут оставаться связанными со второй неподвижной фазой.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения второе хроматографическое разделение 116 может также включать дополнительное промывание второй хроматографической колонки промывочным буфером для удаления слабо связанных белков, тогда как ботулинические токсины и токсиновые комплексы остаются прочно связанными со второй неподвижной фазой. Для этой стадии промывания можно использовать любой подходящий буферный раствор (например, раствор, содержащий 50 мМ ацетата натрия, 0,2% полисорбата 20, рН 4,5, 210 мМ NaCl). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения этот промывочный буфер может содержать NaCl в концентрации, равной 250 мМ или менее, 240 мМ или менее, 230 мМ или менее, 220 мМ или менее, 210 мМ или менее, 200 мМ или менее, 190 мМ или менее, 180 мМ или менее, 170 мМ или менее, 160 мМ или менее, 150 мМ или менее, 140 мМ или менее, 130 мМ или менее, 120 мМ или менее, 110 мМ или менее или 100 мМ или менее, или в еще более низких концентрациях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения этот промывочный буфер содержит NaCl в концентрации, равной примерно 100 мМ, примерно 110 мМ, примерно 120 мМ, примерно 130 мМ, примерно 140 мМ, примерно 150 мМ, примерно 160 мМ, примерно 170 мМ, примерно 180 мМ, примерно 190 мМ, примерно 200 мМ, примерно 210 мМ, примерно 220 мМ, примерно 230 мМ, примерно 240 мМ или примерно 250 мМ.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения второе хроматографическое разделение 116 может также включать кондиционирование токсинсодержащей фракции 114 для колоночной хроматографии (например, посредством разведения или замены буфера) перед контактом токсинсодержащей фракции 114 со второй хроматографической колонкой. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения токсинсодержащую фракцию 114 можно кондиционировать посредством разведения в уксусно-ацетатном буфере при значении рН, лежащем в диапазоне от примерно 3 до примерно 7, от примерно 3,5 до примерно 6 или от примерно 4 до примерно 5, предпочтительно – при значении рН, примерно равном 4,5. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения токсинсодержащую фракцию 114 кондиционируют в буфере, имеющем значение рН, равное примерно 3,5, примерно 3,6, примерно 3,7, примерно 3,8, примерно 3,9, примерно 4,0, примерно 4,1, примерно 4,2, примерно 4,3, примерно 4,4, примерно 4,5, примерно 4,6, примерно 4,7, примерно 4,8,

примерно 4,9, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3, примерно 5,4 или примерно 5,5.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения второе хроматографическое разделение 116 может дополнительно включать элюирование ботулинических токсинов или токсиновых комплексов из колонки с получением первого токсинсодержащего элюата 118. Элюирование может включать промывание колонки одним или более буферными растворами, которые способствуют отсоединению токсина (или токсинового комплекса) от неподвижной фазы (например, посредством изменения pH или ионной силы). Этот элюционный буфер может быть любым буферным раствором, подходящим для стимуляции отсоединения токсина или токсинового комплекса от второй неподвижной фазы (например, раствор, содержащий 50 мМ ацетата натрия, 0,2% полисорбата 20, pH 4,5). Например, такой буферный раствор может содержать уксусно-ацетатный буфер с pH, лежащим в диапазоне от примерно 3 до примерно 7, от примерно 4 до примерно 5 или с pH, примерно равным 4,5. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения токсинсодержащую фракцию элюируют из второй хроматографической колонки с использованием буфера, имеющего значение pH, равное примерно 3,5, примерно 3,6, примерно 3,7, примерно 3,8, примерно 3,9, примерно 4,0, примерно 4,1, примерно 4,2, примерно 4,3, примерно 4,4, примерно 4,5, примерно 4,6, примерно 4,7, примерно 4,8, примерно 4,9, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3, примерно 5,4 или примерно 5,5.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения этот элюционный буфер может содержать соль в концентрации, достаточной для стимуляции отсоединения ботулинических токсинов или токсиновых комплексов от второй неподвижной фазы. В вариантах осуществления настоящего изобретения этот элюционный буфер содержит NaCl в концентрации, равной 230 мМ или более, 240 мМ или более, 250 мМ или более, 260 мМ или более, 270 мМ или более, 280 мМ или более, 290 мМ или более, 300 мМ или более, 350 мМ или более или 400 мМ или более. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения этот элюционный буфер содержит NaCl в концентрации, равной примерно 230 мМ, примерно 240 мМ, примерно 250 мМ, примерно 260 мМ, примерно 270 мМ, примерно 280 мМ, примерно 290 мМ, примерно 300 мМ, примерно 310 мМ, примерно 320 мМ, примерно 330 мМ, примерно 340 мМ, примерно 350 мМ, примерно 360 мМ, примерно 370 мМ, примерно 380 М, примерно 390 мМ или примерно 400 мМ, или имеющей любое промежуточное значение.

В вариантах осуществления настоящего изобретения молекулы ботулинического токсина или токсиновые комплексы элюируют из колонки с получением первого токсинсодержащего элюата 118, который можно собрать и дополнительно очистить на последующих стадиях обработки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения во время элюирования из второй хроматографической колонки измеряют A_{280} для обнаружения присутствия молекул ботулинического токсина или токсиновых комплексов, элюированных из колонки, и пик A_{280} собирают в форме отдельной фракции с получением первого токсинсодержащего элюата 118.

5

Фильтрация 3

10

Некоторые варианты осуществления способа дополнительно включают стадию третьей фильтрации 120, осуществляемую после второго хроматографического разделения 116 и перед третьим хроматографическим разделением 124. В варианте осуществления настоящего изобретения во время третьей фильтрации 120 NTN и/или NTNН белки отсоединяются от ботулинических токсиновых комплексов. В вариантах осуществления настоящего изобретения третья фильтрация 120 включает замену буфера, за счет которой может быть повышен pH первого токсинсодержащего элюата 118 (например, от примерно 4,5 до примерно 8,0). В вариантах осуществления настоящего изобретения замена буфера может снизить концентрацию соли в токсинсодержащем элюате 118 (например, от примерно 270 мМ до примерно 50 мМ). В вариантах осуществления настоящего изобретения за счет третьей фильтрации 120 можно сконцентрировать токсинсодержащий элюат 118 (например, посредством снижения его объема от примерно 300 мл до примерно 50-60 мл).

15

20

25

Третья фильтрация 120 может включать любой подходящий способ фильтрации (например, диафильтрацию, микрофильтрацию в тангенциальном потоке, ультрафильтрацию в тангенциальном потоке, полволоконную фильтрацию и т.п.). В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения третья фильтрация 120 может включать ультрафильтрацию с использованием тангенциального фильтра (например, полволоконного фильтра) с размером пор, подходящим для удержания отсоединенных молекул ботулинического токсина (150 кДа) и NTN и/или NTNН белков. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фильтр может иметь размер пор, не превышающий примерно 150 кДа, не превышающий примерно 140 кДа, не превышающий примерно 130 кДа, не

30

превышающий примерно 120 кДа, не превышающий примерно 110 кДа, не
превышающий примерно 100 кДа, не превышающий примерно 90 кДа, не
превышающий примерно 80 кДа, не превышающий примерно 70 кДа, не
превышающий примерно 60 кДа, не превышающий примерно 50 кДа, не
5 превышающий примерно 40 кДа, не превышающий примерно 30 кДа или не
превышающий примерно 20 кДа (или имеющий промежуточное значение).
Например, тангенциальный фильтр может иметь размер пор, равный примерно 20
кДа, примерно 25 кДа, примерно 30 кДа, примерно 35 кДа, примерно 40 кДа,
примерно 45 кДа, примерно 50 кДа, примерно 55 кДа, примерно 60 кДа, примерно 65
10 кДа, примерно 70 кДа, примерно 75 кДа, примерно 80 кДа, примерно 85 кДа,
примерно 90 кДа, примерно 95 кДа, примерно 100 кДа, примерно 110 кДа, примерно
120 кДа, примерно 130 кДа, примерно 140 кДа или примерно 150 кДа, или имеющий
любое промежуточное значение. В варианте осуществления настоящего
изобретения фильтр имеет размер пор, равный примерно 30 кДа.

15 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения
токсинсодержащий элюат 118 можно сконцентрировать посредством
ультрафильтрации, затем промыть с использованием диафильтрации против
буферного раствора для отсоединения NTN и/или NTNН белков от ботулинических
токсиновых комплексов. В конкретном варианте осуществления настоящего
20 изобретения белковые молекулы ботулинического токсина и NTN и/или NTNН белки
могут оставаться в ретентате 121 (то есть, в токсинсодержащем ретентате), тогда
как другие остатки фильтрационной и хроматографической сред отделяют в
пермеат.

Буферный раствор, используемый для третьей фильтрации 120, может быть
25 любым буферным раствором (например, Трис-НСI буфером), подходящим для
отсоединения NTN и/или NTNН белков, содержащихся в токсиновых комплексах, от
молекул ботулинического токсина. В некоторых вариантах осуществления
настоящего изобретения буферный раствор, используемый для третьей
фильтрации 120, может быть тем же буфером, который использовали для
30 кондиционирования третьей хроматографической колонки (например, Трис-НСI
буфером с рН более 7, как обсуждается ниже).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный
раствор, используемый для третьей фильтрации 120, имеет рН, подходящий для
отсоединения NTN и/или NTNН белков от белковых молекул ботулинического

токсина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рН буферного раствора равен по меньшей мере примерно 7, предпочтительно – лежит в диапазоне от примерно 7 до примерно 10, предпочтительно – лежит в диапазоне от примерно 7 до примерно 9, предпочтительно – лежит в диапазоне от примерно 7,5 до примерно 8,5, предпочтительно – равен примерно 8,0. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рН буферного раствора для третьей фильтрации 120 может быть равен примерно 7,5, примерно 7,6, примерно 7,7, примерно 7,8, примерно 7,9, примерно 8,0, примерно 8,1, примерно 8,2, примерно 8,3, примерно 8,4, примерно 8,5, примерно 8,6, примерно 8,7, примерно 8,8, примерно 8,9, примерно 9,0, примерно 9,5 или примерно 10,0. В варианте осуществления настоящего изобретения рН буферного раствора для третьей фильтрации 120 равен примерно 8,0.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения токсинсодержащий ретентат 121 из третьей фильтрации 120 может быть собран и дополнительно очищен в последующих стадиях обработки без осаждения молекул ботулинического токсина или токсиновых комплексов из раствора в любой точке способа очистки. Это выгодно повышает общие выходы способа и исключает необходимость восстановления лиофилизированного лекарственного продукта в любой точке способа очистки или конечным пользователем.

20 Третье хроматографическое разделение

Некоторые варианты осуществления способа 100 дополнительно включают третье хроматографическое разделение 124 для отделения и удаления NTN и/или NTNH белков, отсоединенных от токсиновых комплексов во время предшествующей третьей фильтрации 120, с удержанием белковых молекул ботулинического токсина. Образующийся второй токсинсодержащий элюат 126 может содержать свободные белковые молекулы ботулинического токсина (приблизительно 150 кДа) и может не содержать, по существу не содержать или практически не содержать токсиновых комплексов. Третье хроматографическое разделение 124 может включать любой подходящий способ хроматографического разделения (например, ионообменную хроматографию, в том числе анионообменную хроматографию или катионообменную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, аффинную хроматографию и т.п.). В конкретном варианте осуществления третье хроматографическое разделение 124 может включать анионообменную хроматографию (AIEХ).

Третье хроматографическое разделение 124 может включать приведение ботулинических токсинов или токсиновых комплексов, содержащихся в токсинсодержащем ретентате 121 из третьей фильтрации 120, в контакт с третьей хроматографической колонкой, причем подвижная фаза, содержащая токсинсодержащий ретентат 121 (и находящиеся в нем свободные белковые молекулы ботулинического токсина), перемещается через третью неподвижную фазу. Третья неподвижная фаза может содержать любую подходящую хроматографическую матрицу (например, среду на основе агарозных шариков, такую как Q Sepharose FF (производства компании GE Healthcare)).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения третье хроматографическое разделение 124 может также включать кондиционирование токсинсодержащего ретентата 121 из третьей фильтрации 120 для колоночной хроматографии (например, посредством разведения, замены буфера, фильтрации или их комбинации). Например, токсинсодержащий ретентат 121 можно развести в буферном растворе, например – в Трис-HCl буфере при значении pH, превышающем 7, предпочтительно - лежащем в диапазоне от 7 до 10, предпочтительно - от примерно 7 до примерно 9, предпочтительно - от примерно 7,5 до примерно 8,5, или предпочтительно – при значении pH, равном примерно 8,0. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения pH буферного раствора равен примерно 7,5, примерно 7,6, примерно 7,7, примерно 7,8, примерно 7,9, примерно 8,0, примерно 8,1, примерно 8,2, примерно 8,3, примерно 8,4, примерно 8,5, примерно 8,6, примерно 8,7, примерно 8,8, примерно 8,9, примерно 9,0, примерно 9,5 или примерно 10,0.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения белковые молекулы ботулинического токсина, токсиновые комплексы и NTN и/или NTNН белки, содержащиеся в токсинсодержащем ретентате 121, могут адсорбироваться на третьей неподвижной фазе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения токсинсодержащий ретентат 121 загружают на третью хроматографическую колонку и промывают промывочным буферным раствором для удаления нетоксिनных примесей, которые остались не связанными с третьей неподвижной фазой. Промывочный буфер может быть любым подходящим буферным раствором (например, раствором, содержащим 20 mM трис/HCl, 50 mM NaCl, 0,2% полисорбата 20, pH 8,0), и A_{280} раствора, прошедшего через колонку, можно контролировать до тех пор, пока A_{280} не достигнет исходного значения, что

показывает, что весь несвязанный материал протек через третью хроматографическую колонку.

Третье хроматографическое разделение 124 может дополнительно включать элюирование белков ботулинического токсина, связанных с третьей неподвижной фазой, с получением второго токсинсодержащего элюата 126. Элюирование может включать промывание колонки одним или более буферными растворами для десорбции белковых молекул ботулинического токсина от неподвижной фазы (например, посредством изменения pH, ионной силы и т.п.) с использованием любого подходящего совместимого с белками буферного раствора. Например, молекулы ботулинического токсина можно элюировать из третьей неподвижной фазы с использованием Трис-HCl буферного раствора при pH, превышающем 7, предпочтительно – лежащем в диапазоне от 7 до 10, предпочтительно – от примерно 7 до примерно 9, предпочтительно – от примерно 7,5 до примерно 8,5 или предпочтительно – при pH, равном примерно 8,0. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения pH буферного раствора равен примерно 7,5, примерно 7,6, примерно 7,7, примерно 7,8, примерно 7,9, примерно 8,0, примерно 8,1, примерно 8,2, примерно 8,3, примерно 8,4 или примерно 8,5.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор, используемый для элюирования молекул ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки, может содержать соль (например, NaCl). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор, используемый для элюирования молекул ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки, содержит NaCl в концентрации, пригодной для стимулирования десорбции молекул ботулинического токсина от третьей неподвижной фазы. В вариантах осуществления настоящего изобретения этот элюионный буфер может содержать NaCl в концентрации, лежащей в диапазоне от примерно 25 мМ до примерно 250 мМ, предпочтительно – от примерно 50 мМ до примерно 200 мМ, предпочтительно – от примерно 100 мМ до примерно 150 мМ, предпочтительно – равной примерно 120 мМ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор, используемый для элюирования молекул ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки, содержит NaCl в концентрации, равной примерно 50 мМ, примерно 60 мМ, примерно 70 мМ, примерно 80 мМ, примерно 90 мМ, примерно 100 мМ, примерно 110 мМ, примерно 115 мМ, примерно 120 мМ, примерно 125 мМ, примерно 130 мМ, примерно 135 мМ, примерно 140 мМ, примерно 145 мМ, примерно 150 мМ,

примерно 155 мМ, примерно 160 мМ, примерно 165 мМ, примерно 170 мМ, примерно 175 мМ, примерно 180 мМ, примерно 185 мМ, примерно 190 мМ, примерно 195 мМ, примерно 200 мМ, примерно 210 мМ, примерно 220 мМ, примерно 230 мМ, примерно 240 мМ или примерно 250 мМ. В варианте осуществления настоящего изобретения буферный раствор, используемый для элюирования молекул ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки, содержит NaCl в концентрации, равной примерно 120 мМ или примерно 150 мМ.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор, используемый для элюирования молекул ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки, дополнительно содержит поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор, используемый для элюирования молекул ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки, содержит поверхностно-активное вещество в концентрации, лежащей в диапазоне от примерно 0,05 об. % до примерно 1,0 об. %, предпочтительно - от примерно 0,10 об. % до примерно 0,5 об. %, предпочтительно - от примерно 0,15 об. % до примерно 0,25 об. %, предпочтительно – в концентрации, равной примерно 0,20 об. %. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор, используемый для элюирования молекул ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки, содержит поверхностно-активное вещество в концентрации, равной примерно 0,05 об. %, примерно 0,10 об. %, примерно 0,15 об. %, примерно 0,20 об. %, примерно 0,25 об. %, примерно 0,30 об. %, примерно 0,35 об. %, примерно 0,40 об. %, примерно 0,45 об. %, примерно 0,50 об. %, примерно 0,55 об. %, примерно 0,60 об. %, примерно 0,65 об. %, примерно 0,70 об. %, примерно 0,75 об. %, примерно 0,80 об. %, примерно 0,85 об. %, примерно 0,90 об. %, примерно 0,95 об. % или примерно 1,0 об. %. В варианте осуществления настоящего изобретения буферный раствор, используемый для элюирования молекул ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки, содержит полисорбат 20 в концентрации, равной примерно 0,20 об. %.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения вторую токсинсодержащую фракцию 126 собирают, когда она элюируется из колонки, и дополнительно очищают во время последующих стадий способа без осаждения или лиофилизации ботулинических токсинных белков. В варианте осуществления настоящего изобретения вторую токсинсодержащую фракцию 126 прямо

инжектируют на четвертую хроматографическую колонку для конечной глубокой очистки (то есть удаления высокомолекулярных примесей, включающих агрегаты целевого белка, и низкомолекулярных примесей, включающих фрагменты целевого белка, и других примесей, которые могли быть не удалены во время предшествующих стадий очистки).

Четвертое хроматографическое разделение

Некоторые варианты осуществления способа 100 дополнительно включают стадию конечной глубокой очистки для удаления агрегатов и/или белковых примесей из второй токсинсодержащей фракции 126 с использованием четвертого хроматографического разделения 128 для получения третьего токсинсодержащего элюата 130. Четвертое хроматографическое разделение 128 может включать любой подходящий способ хроматографического разделения (например, ионообменную хроматографию, в том числе анионообменную хроматографию или катионообменную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, аффинную хроматографию и т.п.). Например, в варианте осуществления настоящего изобретения четвертое хроматографическое разделение 128 может включать гель-фильтрационную хроматографию.

В четвертом хроматографическом разделении 128 может быть использована любая подходящая совместимая с белками хроматографическая матрица, способная отделить чистые белковые молекулы ботулинического токсина от агрегированных ботулинических токсинов и других белковых примесей. Например, в четвертом хроматографическом разделении 128 может быть использована хроматографическая среда Superdex 200 (производства компании GE Healthcare).

Четвертое хроматографическое разделение 128 может также включать кондиционирование второго токсинсодержащего элюата 126 для колоночной хроматографии (например, посредством разведения, замены буфера, фильтрации или их комбинации). Альтернативно, в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения второй токсинсодержащий элюат 126 из третьего хроматографического разделения 124 может быть прямо инжектирован на четвертую хроматографическую колонку без дополнительного кондиционирования. В этой конфигурации третья и четвертая хроматографические колонки могут быть соединены друг с другом для обеспечения прямой загрузки второго токсинсодержащего элюата 126.

Четвертое хроматографическое разделение 128 может также включать промывание молекул ботулинического токсина через неподвижную фазу с использованием промывочного раствора или буфера для получения третьего токсинсодержащего элюата 130. Буферный раствор может быть любым подходящим совместимым с белками буферным раствором. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения буферный раствор может быть уксусно-ацетатным буферным раствором с pH менее примерно 7, предпочтительно - лежащим в диапазоне от примерно 5 до примерно 7, предпочтительно - от примерно 6 до примерно 7, предпочтительно - от примерно 6,6 до примерно 6,9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения pH этого буферного раствора может иметь значение, равное примерно 6,5, примерно 6,6, примерно 6,7, примерно 6,8, примерно 6,9 или примерно 7,0.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор, используемый для промывания молекул ботулинического токсина через неподвижную фазу в четвертой хроматографической колонке, дополнительно содержит соль (например, NaCl). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения этот промывочный буферный раствор содержит NaCl в концентрации, лежащей в диапазоне от примерно 100 мМ до примерно 1 М, предпочтительно - от примерно 200 мМ до примерно 600 мМ, более предпочтительно - от примерно 300 мМ до примерно 500 мМ, наиболее предпочтительно - равной примерно 400 мМ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения этот буферный раствор содержит NaCl в концентрации, равной примерно 100 мМ, примерно 150 мМ, примерно 200 мМ, примерно 250 мМ, примерно 300 мМ, примерно 310 мМ, примерно 320 мМ, примерно 330 мМ, примерно 340 мМ, примерно 350 мМ, примерно 360 мМ, примерно 370 мМ, примерно 380 мМ, примерно 390 мМ, примерно 400 мМ, примерно 410 мМ, примерно 420 мМ, примерно 430 мМ, примерно 440 мМ, примерно 450 мМ, примерно 500 мМ, примерно 550 мМ, примерно 600 мМ, примерно 650 мМ, примерно 700 мМ, примерно 750 мМ, примерно 800 мМ, примерно 850 мМ, примерно 900 мМ, примерно 950 мМ или примерно 1М. В варианте осуществления настоящего изобретения буферный раствор, используемый для промывания молекул ботулинического токсина через неподвижную фазу в четвертой хроматографической колонке, содержит примерно 350 мМ NaCl или примерно 370 мМ NaCl.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор, используемый для промывания молекул ботулинического токсина через

неподвижную фазу в четвертой хроматографической колонке, дополнительно содержит поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения этот буферный раствор содержит поверхностно-активное вещество в концентрации, лежащей в диапазоне от примерно 0,05 об. % до примерно 1,0 об. %, предпочтительно - от примерно 0,10 об. % до примерно 0,5 об. %, предпочтительно - от примерно 0,15 об. % до примерно 0,25 об. %, предпочтительно – в концентрации, равной примерно 0,20 об. %. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения этот буферный раствор содержит поверхностно-активное вещество в концентрации, равной примерно 0,05 об. %, примерно 0,10 об. %, примерно 0,15 об. %, примерно 0,20 об. %, примерно 0,25 об. %, примерно 0,30 об. %, примерно 0,35 об. %, примерно 0,40 об. %, примерно 0,45 об. %, примерно 0,50 об. %, примерно 0,55 об. %, примерно 0,60 об. %, примерно 0,65 об. %, примерно 0,70 об. %, примерно 0,75 об. %, примерно 0,80 об. %, примерно 0,85 об. %, примерно 0,90 об. %, примерно 0,95 об. % или примерно 1,0 об. %. В варианте осуществления настоящего изобретения буферный раствор, используемый для промывания молекул ботулинического токсина через неподвижную фазу четвертой хроматографической колонки, содержит полисорбат 20 в концентрации, равной примерно 0,20 об. %.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения присутствие свободных молекул ботулинического токсина в растворе, проходящем через колонку, контролируют посредством измерения A_{280} . В варианте осуществления настоящего изобретения пик A_{280} (указывающий на присутствие свободных молекул ботулинического токсина) собирают в качестве отдельной фракции для получения третьего токсинсодержащего элюата 130.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения третий токсинсодержащий элюат 130 можно собрать, когда он элюируется из четвертой хроматографической колонки, и либо разбавить, либо дополнительно очистить на последующих стадиях способа без осаждения или лиофилизации белков ботулинического токсина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения третий токсинсодержащий элюат 130 можно хранить при температуре, лежащей в диапазоне от примерно 2°C до примерно 8°C, до обработки после очистки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения третий токсинсодержащий элюат 130 можно разбавить, профильтровать и дозировать с получением продуктивного раствора 134 токсина.

Разведение, фильтрация и дозирование

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ 100 дополнительно включает разведение, фильтрацию и дозирование 132 третьего токсинсодержащего элюата 130 с получением продуктивного раствора 134 токсина.

5 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения третий токсинсодержащий элюат 130 можно развести до конечной концентрации с использованием любого подходящего буферного раствора. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буферный раствор-разбавитель может быть примерно идентичным по составу промывочному буферу, используемому в
10 четвертом хроматографическом разделении 128. Например, буферный раствор-разбавитель может содержать уксусно-ацетатный буфер с рН ниже примерно 7, предпочтительно – с рН в диапазоне от примерно 5 до примерно 7, предпочтительно – от примерно 6 до примерно 7, предпочтительно – от примерно 6,6 до примерно 6,9. В некоторых вариантах осуществления настоящего
15 изобретения рН этого буферного раствора равен примерно 6,5, примерно 6,6, примерно 6,7, примерно 6,8, примерно 6,9 или примерно 7,0.

Способ 100 может дополнительно включать фильтрацию третьего токсинсодержащего элюата 130 (или его разведенной формы) для снижения микробиологической нагрузки и получения продуктивного раствора 134 токсина.
20 Фильтрация третьего токсинсодержащего элюата 130 может включать любой подходящий способ фильтрации (например, диафильтрацию, микрофильтрацию в тангенциальном потоке, поволоконную фильтрацию и т.п.). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фильтр может иметь размер пор, лежащий в диапазоне от 0,1 мкм до 10 мкм (например, равный примерно 0,2
25 мкм).

Продуктивный раствор 134 токсина можно дозировать в контейнеры (например, криогенные флаконы), которые можно транспортировать и хранить в условиях, которые сохраняют активность содержащихся во флаконах белков ботулинического токсина. Например, продуктивный раствор 134 токсина можно
30 дозировать, транспортировать и/или хранить в предварительно охлажденных контейнерах для хранения (например, во флаконах, находящихся в предварительно охлажденных алюминиевых блоках).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дозирование продуктивного раствора 134 токсина может включать перекачивание продуктивного

раствора токсина из стерильного контейнера (например, стерильного одноразового мешка) в первичные контейнеры для хранения (например, криогенные флаконы). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первичные контейнеры для хранения можно предварительно охладить и хранить при 5 подходящей температуре (например, при 0°C или ниже), например, посредством хранения, транспортировки и замораживания первичных контейнеров для хранения в предварительно охлажденных алюминиевых блоках. При этом продуктивный раствор 134 токсина хранится при температуре, при которой молекулы ботулинического токсина являются стабильными и сохраняют нейротоксичность. 10 Это может также исключить необходимость лиофилизации продуктивного раствора 134 токсина. Продуктивный раствор 134 токсина также можно хранить при температуре, равной примерно 0°C или ниже, предпочтительно – при температуре, равной примерно -70°C или ниже.

Выход способа

15 Для оценки способа очистки можно рассчитать общий выход способа и выход каждой стадии. Выход можно рассчитать на основании полученной концентрации токсина в каждой фракции. Выход каждой стадии способа (то есть «Выход стадии способа») можно рассчитать согласно следующей формуле:

$$\text{Выход стадии способа (\%)} = \frac{(C_{\text{фракции}})(V_{\text{фракции}})}{(C_{\text{предыдущей фракции}})(V_{\text{предыдущей фракции}})} \times 100$$

(Уравнение 1)

20 где С – концентрация токсина, V – объем, подстрочный индекс *фракции* обозначает концентрацию токсина или объем из текущей стадии обработки, а подстрочный индекс *предыдущей фракции* обозначает концентрацию токсина или объем из предыдущей стадии обработки. Например, если стадия способа дала 1,0 мкг/мл токсина в объеме, равном 1000 мл, а предыдущая стадия способа дала 0,5 мкг/мл 25 токсина в объеме, равном 4000 мл, то выход стадии способа будет равен 50%. ([1,0 мкг/мл × 1000 мл] / [0,5 мкг/мл × 4000 мл]) × 100 = 50%).

Общий выход можно рассчитать с использованием следующей формулы:

$$\text{Общий выход (\%)} = \frac{(C_{DS})(V_{DS})}{(C_{KS})(V_{KS})} \times 100$$

(Уравнение 2)

где C – концентрация, V – объем, подстрочный индекс DS обозначает лекарственное вещество (то есть продуктивный раствор токсина), а подстрочный индекс KS обозначает культуру во время сбора, из которой клетки удалены посредством фильтрации через фильтр с размером пор, равным 0,2 мкм. Например, если DS содержит 50 мкг/мл токсина в объеме, равном 100 мл, а культура во время сбора содержит 5 мкг/мл токсина в объеме, равном 5000 мл, то общий выход будет равен 20%. ($[50 \text{ мкг/мл} \times 100 \text{ мл}] / [5 \text{ мкг/мл} \times 5000 \text{ мл}] \times 100 = 20\%$)

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения общий выход равен по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 15%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, или лежит в любом промежуточном диапазоне или имеет любое промежуточное значение. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения общий выход равен примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16%, примерно 17%, примерно 18%, примерно 19%, примерно 20%, примерно 21%, примерно 22%, примерно 23%, примерно 24%, примерно 25%, примерно 26%, примерно 27%, примерно 28%, примерно 29%, примерно 30%, примерно 31%, примерно 32%, примерно 33%, примерно 34%, примерно 35%, примерно 36%, примерно 37%, примерно 38%, примерно 39% или примерно 40%, или имеет любое промежуточное значение.

В варианте осуществления настоящего изобретения степень чистоты лекарственного вещества можно определить SDS-PAGE способом и/или посредством HPLC-SEC. В варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное вещество, полученное способом по настоящему изобретению, имеет степень чистоты, равную по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98% или по меньшей мере примерно 99% (или имеющую промежуточное значение). В варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное вещество может иметь степень чистоты, равную примерно 96,0%, примерно 96,5%, примерно 97,0%, примерно 97,5%, примерно 98,0%, примерно 98,5%, примерно 99,0%, примерно 99,5% или примерно 100,0% (или имеющую любое промежуточное значение).

ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯПример 1Четырехколоночный хроматографический способ очистки ботулинического токсина

В качестве примера вариант осуществления способа может быть
5 осуществлен согласно приведенному ниже описанию, при этом ботулинический
токсин А1 (приблизительно 150 кДа) выделяют из ферментационной среды,
практически не содержащей, по существу не содержащей или не содержащей
продуктов животного происхождения и содержащей клетки *C. botulinum* и белковые
10 молекулы ботулинического токсина А1 и токсиновые комплексы. Такая АРФ
ферментационная среда описана в одновременно поданной предварительной
заявке на патент США с регистрационным номером 62/951,549. Ботулинический
токсин, содержащийся в этой среде, отфильтровывают и очищают в соответствии со
стадиями способа, более подробно описанными ниже, с получением продуктивного
15 раствора токсина, содержащего белковые молекулы ботулинического токсина и не
содержащего, по существу не содержащего или практически не содержащего
токсиновых комплексов, без использования стадий осаждения или лиофилизации.

Приготовление буферного раствора

Как показано в Таблице 1, в этом варианте осуществления способа можно
использовать многие различные буферные растворы. В варианте осуществления
20 настоящего изобретения буферные растворы пропускают через фильтры с
размером пор, равным 0,2 мкм (для снижения микробиологической нагрузки), в
стерильные одноразовые мешки. Использованные фильтры отсоединяют, а мешки,
содержащие буферные растворы, хранят при комнатной температуре до
использования.

Таблица 1

Буферные растворы, использованные в способе очистки ВоNT/A1

Буферные растворы, использованные в способе очистки ВоNT/A1	
Колоночная хроматография	Использованные буферные растворы
Первое хроматографическое разделение <i>Q Sepharose FF</i>	1. 20 мМ фосфата Na, 1M NaCl, pH 6,1 2. 20 мМ фосфата Na, 150 мМ NaCl, pH 6,1 3. 20 мМ фосфата Na, 150 мМ NaCl, pH 6,1 4. 20 мМ фосфата Na, 150 мМ NaCl, pH 6,1
Второе хроматографическое разделение <i>SP Sepharose FF</i>	5. 50 мМ ацетата Na, 1M NaCl, 0,2% полисорбата 20, pH 4,5 6. 50 мМ ацетата Na, 0,2% полисорбата 20, pH 4,5 7. 100 мМ ацетата Na, 0,4% полисорбата 20, pH 4,5 8. 50 мМ ацетата Na, 210 мМ NaCl, 0,2% полисорбата 20, pH 4,5 9. 50 мМ ацетата Na, 270 мМ NaCl, 0,2% полисорбата 20, pH 4,5
Третье хроматографическое разделение <i>Q Sepharose FF</i>	10. 20 мМ трис-HCl, * 50 мМ NaCl, pH 8,0 11. 20 мМ трис-HCl, 1 M NaCl, 0,2% полисорбата 20, pH 8,0 12. 20 мМ трис-HCl, 50 мМ NaCl, 0,2% полисорбата 20, pH 8,0 13. 20 мМ трис-HCl, 50 мМ NaCl, 0,2% полисорбата 20, pH 8,0 14. 20 мМ трис-HCl, 120 мМ NaCl, 0,2% полисорбата 20, pH 8,0
Четвертое хроматографическое разделение <i>Superdex 200</i>	15. 50 мМ ацетата Na, 370 мМ NaCl, 0,2% полисорбата 20, 13 мМ Na ₂ HPO ₄ , 17 мМ NaOH, pH 6,6-6,9 16. 50 мМ ацетата Na, 370 мМ NaCl, 0,2% полисорбата 20, 13 мМ Na ₂ HPO ₄ , 17 мМ NaOH, pH 6,6-6,9
Посточистка	
Конечное разведение	17. 50 мМ ацетата Na, 370 мМ NaCl, 0,2% полисорбата 20, 13 мМ Na ₂ HPO ₄ , 17 мМ NaOH, pH 6,6-6,9
* <u>Аббревиатуры:</u> Трис-HCl = трис(гидроксиметил)аминометана гидрохлорид	

Указанные в Таблице 1 буферные растворы 1 и 2 были использованы для уравнивания первой хроматографической колонки; буферный раствор 3 был использован для кондиционирования осветленной культуры для колоночной хроматографии; буферный раствор 4 был использован для промывания ботулинических токсиновых комплексов через первую колонку в проточном режиме; буферные растворы 5 и 6 были использованы для уравнивания второй хроматографической колонки; буферный раствор 7 был использован для кондиционирования токсинсодержащей фракции из первого хроматографического разделения для второго хроматографического разделения; буферный раствор 8 был использован для промывания объемных примесей (например, белков) через

вторую хроматографическую колонку; буферный раствор 9 был использован для элюирования связанных ботулинических токсинных комплексов из второй хроматографической колонки; буферный раствор 10 был использован для отделения NTN и/или NTNH белков от белковых молекул ботулинического токсина (то есть для кондиционирования первого токсинсодержащего элюата из второго хроматографического разделения для третьего хроматографического разделения); буферные растворы 11 и 12 были использованы для уравнивания третьей хроматографической колонки; буферный раствор 13 был использован для вымывания примесей из третьей хроматографической колонки; буферный раствор 14 был использован для элюирования связанных белковых молекул ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки; буферный раствор 15 был использован для уравнивания четвертой хроматографической колонки; буферный раствор 16 был использован для промывания молекул ботулинического токсина через четвертую хроматографическую колонку; и буферный раствор 17 был использован для разведения токсинсодержащего элюата из четвертого хроматографического разделения до конечной концентрации перед дозированием его в первичные контейнеры для хранения для получения продуктивного раствора токсина.

Фильтрация

Ферментационную среду для *C. botulinum* получили из APF производственного процесса, описанного в одновременно поданной предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 62/951,549. Сразу же после сбора культуру (примерно 5 л) разбавили, используя примерно 280 мл буферного раствора (1М ацетата натрия, 4М HCl, pH 5,5), чтобы отрегулировать pH непосредственно перед фильтрацией. Разбавленный раствор профильтровали посредством микрофильтрации («Фильтрация 1» с использованием полуволоконного фильтра с размером пор, равным 0,2 мкм, для фильтрации в тангенциальном потоке для отделения спор, а также цельных и лизированных клеток *C. Botulinum* и получили осветленную культуру. Из осветленной культуры взяли образец для контроля в ходе процесса на отсутствие *C. botulinum*. Затем осветленную культуру очистили посредством удаления остатков ферментационной среды (например, белков, углеводов и т.п.) ультрафильтрацией в тангенциальном потоке («Фильтрация 2») с использованием полуволоконного фильтра с размером пор, равным 50 кДа. После этого осветленную культуру подвергли замене буфера в натрий-фосфатном буфере (с pH, равным примерно

6,1) для кондиционирования осветленной культуры для колоночной хроматографии. Этот и другие подходящие способы фильтрации белков известны в данной области техники. См., например, публикацию Munir Cheryan, *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook* (2d ed. 1998).

5

Очистка

Способ четырехколоночной хроматографии был разработан для очистки белковых молекул BoNT/A1 (приблизительно 150 кДа) без использования стадий осаждения, лиофилизации или центрифугирования. Этот способ обеспечивает продуктивный раствор токсина, которые не содержит, по существу не содержит или
10 практически не содержит ботулинических токсинных комплексов и/или продуктов животного происхождения. Это повышает выходы и исключает ошибки конечного пользователя, связанные с процедурами восстановления, которые, как известно, снижают активность лекарственных композиций ботулинического токсина.

Преимуществом способа является сохранение ботулинических токсинных
15 комплексов во время начальных стадий для защиты токсина, тогда как протеазы и другие объемные белковые загрязняющие примеси удаляют. Во время первой хроматографической стадии, которая является анионообменной хроматографией, удаляют большую часть нуклеиновых кислот, присутствовавших в культуральной среде при сборе, которые в противном случае мешали бы во время последующих
20 хроматографических стадий. Это ингибирует денатурацию молекул ботулинического токсина во время осуществления способа очистки. Затем в способе отделяют белковые молекулы ботулинического токсина от связанных с ними NTN и/или NTNН белков с получением продуктивного раствора токсина, который содержит чистые молекулы ботулинического токсина (приблизительно 150 кДа) и не содержит, по
25 существу не содержит или практически не содержит ботулинических токсинных комплексов.

Кроме того, все хроматографические стадии, используемые в данном способе, спланированы так, что их можно проводить на одноразовых хроматографических колонках, которые можно уничтожить после одной процедуры
30 очистки. Это исключает дорогостоящие и требующие длительного времени стадии регенерации колонок, которые связаны с многоразовыми хроматографическими системами. Весь способ осуществляют в замкнутой системе с использованием одноразовых мешков, трубок, фильтров и хроматографических колонок. Кроме того, исключены стадии открытой обработки, поскольку обрабатываемая текучая среда

предпочтительно постоянно находится внутри мешков, трубок, фильтров или колонок, что защищает продуктивный раствор токсина от загрязнения, а оператора – от воздействия токсина.

5 В Таблице 2 суммирован четырехколоночный способ хроматографической очистки BoNT/A1 согласно настоящему изобретению. Способ включает следующие стадии:

(1) Осветленную культуру непосредственно инжескировали на колонку, содержащую Q Sepharose FF (2,5 л набивали в колонку диаметром 80 мм и высотой 500 мм), в проточном режиме с использованием натрий-фосфатного буфера (pH 6,1) для отделения ботулинических токсиновых комплексов от нуклеиновых кислот. На этой стадии ботулинические токсиновые комплексы не присоединялись к неподвижной фазе, а вместо этого протекали через колонку в составе токсинсодержащей фракции.

(2) Токсинсодержащую фракцию из колонки с Q Sepharose FF (100 мл набивали в колонку диаметром 50 мм и высотой 50 мм) кондиционировали в натрий-ацетатном буферном растворе (pH 4,5) и пропускали через колонку с SP Sepharose FF с использованием натрий-ацетатного буфера (pH 4,5). На этой стадии ботулинические токсиновые комплексы адсорбировались на неподвижной фазе, тогда как объемные примеси (например, другие белки) промывались через колонку. Токсиновые комплексы, связанные с колонкой, элюировали с использованием натрий-ацетатного буфера (pH 4,5), содержавшего NaCl, и собирали в составе первого токсинсодержащего элюата.

(3) Первый токсинсодержащий элюат фильтровали для удаления остатков ферментационной среды и кондиционировали в подходящем буферном растворе посредством ультрафильтрации в тангенциальном потоке («Фильтрация 3») для замены буфера (трис-HCl буфер, pH 8,0) с использованием фильтра с размером пор, равным 30 кДа, для отсоединения молекул ботулинического токсина от NTN и/или NTNН белков в токсиновых комплексах. Затем ретентат пропускали через колонку с Q Sepharose FF (2 мл набивали в колонку диаметром 5 мм и высотой 100 мм) для отделения свободных ботулинических токсиновых белков от NTN и/или NTNН белков. На этой стадии молекулы ботулинического токсина адсорбировались на неподвижной фазе, тогда как NTN и/или NTNН белки (и другие объемные примеси) до некоторой степени промывались через колонку (но преимущественно адсорбировались на стационарной фазе даже сильнее, чем молекулы

ботулинического токсина). Белки ботулинического токсина элюировали с использованием трис-HCl буферного раствора (pH 8,0), содержавшего NaCl, и собирали в составе второго токсинсодержащего элюата.

(4) Второй токсинсодержащий элюат непосредственно инжесктировали на 5
гель-фильтрационную колонку с Superdex 200 (320 мл набивали в колонку диаметром 25 мм и высотой 600 мм) для конечной глубокой очистки (то есть удаления агрегатов). На этой стадии колонку промывали буферным раствором, содержавшим 50 мМ ацетата Na, 370 мМ NaCl, 0,2% полисорбата 20, 13 мМ Na₂HPO₄ и 17 мМ NaOH (pH 6,6-6,9), и очищенные белки ботулинического токсина 10
собирали в составе третьего токсинсодержащего элюата.

Таблица 2

Сводная информация о стадиях колоночной хроматографии в способе очистки BoNT/A1

Сводная информация о стадиях колоночной хроматографии			
Колонка	Способ	Неподвижная фаза	Цель
1	AIEX	Q Sepharose FF	Токсин в выходящем потоке, нуклеиновые кислоты связываются с колонкой
2	CIEX	SP Sepharose FF	Отделение объемных примесей (например, белков)
3	AIEX	Q Sepharose FF	Очистка от белков комплексов (то есть NTH и NTNН)
4	Гель-фильтрация	Superdex 200	Конечная глубокая очистка; удаление агрегатов; замена буфера

15 Каждая из стадий колоночной хроматографии, описанная выше, может включать процедуры безразборной очистки и другие стадии подготовки колонок перед проведением хроматографических разделений. Процедуры подготовки и эксплуатации колонок известны в данной области техники. См., например, публикации Ozutsumi et al., 49 Appl. Environ. Microbiol. 939 (1985); GE Healthcare, 20 *Strategies for Protein Purification Handbook* (2010); Schmidt et al., 156 Anal. Biochem. 213 (1986); Simpson et al., 165 Methods Enzymol. 76 (1988); Zhou et al., 34 Biochem. 15175 (1995); Kannan et al., 15 Mov. Disord. 20 (2000); Wang Y-c, Dermatol. Las Facial

Cosmet. Surg. 58 (2002); Johnson et al., 32 Protein Expr. & Purif. 1 (2003); US 2003/0008367 A1.

Разведение/фильтрация/дозирование

Очищенные белки ботулинического токсина разводили до конечной
5 концентрации в подходящем буферном растворе (например, содержащем 50 мМ
ацетата натрия, 0,2% полисорбата 20, 370 мМ NaCl, 13 мМ фосфата натрия, 17 мМ
NaOH) и осторожно перемешивали на платформенном встряхивателе в течение
примерно 30 минут. Разбавленный продукт фильтровали с использованием
10 фильтра с размером пор, равным 0,2 мкм, в стерильный одноразовый мешок и
дозировали аликвотами по 0,4 мл в криогенные флаконы объемом 1,8 мл с
использованием насоса-дозатора и иглы. Затем образцы быстро замораживали с
использованием предварительно охлажденных алюминиевых блоков, хранившихся
при температуре ниже -70°C. Конечные растворы, подготовленные для хранения
согласно способу, ниже обозначены как «лекарственное вещество» (или «DS»).

15 Согласно стадиям, описанным выше, приготовили три различные партии
лекарственного вещества: № 16852, № 17043 и № 19139. Партии DS затем
испытали на внешний вид, активность, удельную активность и концентрацию общего
белка, как обсуждается в следующих Примерах.

Пример 2

20 Испытание на внешний вид

Исследовали прозрачность и цвет, чтобы подтвердить, что лекарственное
вещество является прозрачным и бесцветным, поскольку опалесценция в растворе
может указывать на агрегацию или преципитацию белка. Способ является
визуальным способом, основанным на Европейской Фармакопее (Ph. Eur) 2.2.1, под
25 названием «Прозрачность и уровень опалесценции жидкостей», и Европейской
Фармакопее 2.2.2, под названием «Степень окрашенности жидкостей», однако с
модификацией, состоявшей в том, что использовали флакон и объем
лекарственного вещества, а не контейнер и объем, указанные в способах согласно
Фармакопее. В качестве эталонного раствора использовали воду.

30 Согласно этому способу все партии лекарственного вещества,
приготовленные согласно Примеру 1, были прозрачными и бесцветными

растворами, что свидетельствует об отсутствии обнаружимой агрегации или преципитации белковых молекул ботулинического токсина.

Пример 3

Активность

5 Активность очищенного лекарственного вещества, полученного в Примере 1, определяли посредством анализа на LD₅₀ для мышей. Это абсолютный анализ, который количественно измеряет активность исследованного образца. В качестве разбавителя использовали желатин-фосфатный буфер и установили 11 дозовых групп, центрированных вокруг целевого значения LD₅₀. Дозовые группы с
10 активностью, лежавшей в диапазоне от 3,0 до 0,4 единиц в дозе, были распределены равномерно с интервалами, равными примерно 0,0899 логарифмической единицы. Регистрировали число смертей через 72 часа после инъекции и рассчитывали LD₅₀ с использованием способа Спирмена-Кербера. Расчет по Спирмену-Керберу использовали в качестве математического средства
15 для определения средней точки (LD₅₀) логарифмической кривой разведения в отношении смерти. Активность очищенного лекарственного вещества выражают в единицах LD₅₀/мл. См., например, публикацию M.A. Ramakrishnan, *Determination of 50% Endpoint Titer Using a Simple Formula*, 5 World J. Virol. 85–86 (2016); см. также G. Kärber, 162 Pathol. u Pharmakol. 480–83 (1931); C. Spearman, *The Method of "Right and Wrong Cases" (Constant Stimuli) Without Gauss's Formula*, 2 Br. J. Psychol. 227–42
20 (1908).

 Партии очищенного лекарственного вещества № 16852, № 17043 и № 19139 показали значения активности, равные 11 x 10⁶ единиц LD₅₀/мл, 23 x 10⁶ единиц LD₅₀/мл и 19 x 10⁶ единиц LD₅₀/мл, соответственно. Эти значения активности, в
25 сочетании с полученным объемом DS, подтверждают, что выход способа является достаточным для получения большого числа доз лекарственного продукта из партии DS, что желательно для коммерческого производства DS.

Пример 4

Концентрация общего белка

30 Концентрацию общего белка в лекарственном веществе, полученном согласно Примеру 1, определяли способом с бичинхониновой кислотой (BCA; от англ.: b^{icⁱnch^oniⁿic acid), поскольку он обладает достаточно высокой}

чувствительностью для определения концентрации белка в стандартной партии лекарственного вещества, полученной согласно Примеру 1. См. Ph. Eur. 2.5.33 способ 4; см. также USP (United States Pharmacopoeia – Фармакопея США) <507> способ II.

- 5 Набор для анализа Micro BCA Protein Assay Kit используют для определения концентрации общего белка, и стандартную кривую для бычьего сывороточного альбумина используют для расчета концентрации белка по измеренной оптической плотности. Результат выражают как среднее значение для двух измерений в парных образцах.
- 10 В партиях очищенного лекарственного вещества № 16852, № 17043 и № 19139 была определена концентрация общего белка, равная 59,4 мкг/мл, 107,0 мкг/мл и 91,4 мкг/мл, соответственно. Эти значения концентрации белка, полученные для партий DS, являются достаточно высокими для того, чтобы гарантировать, что аналитические способы выделения и определения
- 15 характеристик являются точными и надежными.

Пример 5

Удельная активность

- Для лекарственного вещества, полученного согласно Примеру 1, удельную активность рассчитывают на основании значения активности лекарственного
- 20 вещества в единицах/мл, полученного способом определения LD₅₀ (Пример 3), и концентрации общего белка (Пример 4) в лекарственном веществе в мг/мл. Удельную активность рассчитывают согласно формуле:

$$\text{Удельная активность} \left(\frac{\text{Ед}}{\text{мг}} \right) = \frac{\text{Активность} \left(\frac{\text{Ед}}{\text{мл}} \right)}{\text{Концентрация общего белка} \left(\frac{\text{мг}}{\text{мл}} \right)}$$

(Уравнение 3)

- В партиях очищенного лекарственного вещества № 16852, № 17043 и №
- 25 19139 была определена удельная активность, равная $1,9 \times 10^8$ Ед/мг, $2,2 \times 10^8$ Ед/мг и $2,1 \times 10^8$ Ед/мг, соответственно. Это подтверждает высокую степень чистоты DS, что показывает, что способ пригоден для коммерческого производства высокоочищенного и полностью активного не содержащего комплексов ботулинического токсина.

Пример 6

Родственные белкам примеси

Способ, использованный для определения родственных белкам примесей в лекарственном веществе, приготовленном согласно Примеру 1, основан на принципах, описанных в Ph. Eur. 2.2.31 Electrophoresis, под названием «Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) – Uniform Percentage Gels». В этом способе используют SDS-PAGE в комбинации с окрашиванием коллоидным раствором кумасси синего. Стандартную кривую получают посредством разведения образца; анализируют невосстановленные и восстановленные образцы.

10 Примеси количественно определяют с использованием денситометрии по отношению интенсивности полосы примеси к стандартной кривой. Результаты по примесям выражают в процентах от общего количества белка, загруженного на гель.

Фиг. 2 демонстрирует результаты анализа чистоты партии DS № 17043, приготовленной согласно Примеру 1, полученные с использованием SDS-PAGE в комбинации с окрашиванием коллоидным раствором кумасси синего. Дорожки слева направо являются следующими: 1-5: невосстановленные образцы стандартной кривой (1,2-4,0 мкг/мл) из партии № 17043; 6-7: невосстановленные параллельные образцы 1 и 2 из партии № 17043 (140 мкг/мл); 8: маркер молекулярной массы; и 9-10: восстановленные параллельные образцы 1 и 2 из партии № 17043 (140 мкг/мл).

20 Во всех трех партиях лекарственного вещества, приготовленных согласно Примеру 1, родственные белкам примеси составили менее 6,0%, а партия № 16852, в частности, не продемонстрировала обнаружимых примесей.

Пример 7

Остаточные нуклеиновые кислоты

25 Анализ на предельно допустимое содержание остаточных нуклеиновых кислот был выполнен для обнаружения РНК и/или ДНК в лекарственном веществе, полученном согласно Примеру 1. В способе используют коммерчески доступный набор для количественного определения РНК RiboGreen RNA quantitation Kit. RiboGreen связывает нуклеиновые кислоты и генерирует флуоресцентный сигнал,

30 пропорциональный количеству нуклеиновой кислоты в образце. Поскольку ДНК генерирует более интенсивный сигнал, чем РНК, при связывании с RiboGreen, то содержание нуклеиновых кислот в ДНК-содержащих образцах будет завышено при использовании стандартов, содержащих РНК, поэтому регистрируемые значения

для нуклеиновых кислот соответствуют максимальным количествам нуклеиновой кислоты в образцах.

Партии очищенного лекарственного вещества № 16852, № 17043 и № 19139 сравнили с эталонной стандартной кривой с минимальным стандартным образцом, содержащим 0,15 мкг/мл РНК. Все три партии продемонстрировали флуоресценцию образца ниже, чем стандарт, что соответствовало $\leq 0,15$ мкг/мл остаточных нуклеиновых кислот (данные не показаны).

Пример 8

Профиль белков

Способ, использованный для определения профиля белков, основан на принципах, описанных в Ph. Eur. 2.2.31 Electrophoresis под названием «Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) – Uniform Percentage Gels». Партии очищенного лекарственного вещества № 16852, № 17043 и № 19139 проанализировали на 4-12%-ном бис-трис-геле для разделения присутствующих белков и окрасили с использованием окрашивания серебром (набор для окрашивания SilverQuest staining Kit). Фиг. 3 демонстрирует результаты SDS-PAGE для восстановленных (дорожки 6-9) и невосстановленных (дорожки 2-5) образцов лекарственного вещества в сравнении с маркерами молекулярной массы (1 и 10). Дорожки 3 и 7 соответствуют партии № 16852; дорожки 4 и 8 соответствуют партии № 17043; и дорожки 5 и 9 соответствуют партии № 19139. (Дорожки 2 и 6 демонстрируют результаты для партии лекарственного вещества (№ 1014997), приготовленной согласно способу четырехколоночной хроматографии с использованием немного отличающихся технологических параметров (например, немного более высокое значение pH буферных растворов в первом хроматографическом разделении)).

Партии очищенного лекарственного вещества № 1014997, № 16852, № 17043 и № 19139 продемонстрировали сравнимые профили белков с интенсивной полосой при примерно 150 кДа (дорожки 2, 3, 4 и 5, соответственно), показывающие, что основным белковым компонентом является свободный ВоNT/A. Восстановленные образцы в дорожках 6, 7, 8 и 9 показали два основных белковых компонента с молекулярной массой, равной примерно 100 кДа и 150 кДа, соответствующие тяжелой цепи и легкой цепи ВоNT/A, соответственно.

Пример 9Молекулярно-массовое распределение лекарственного вещества

Распределение по молекулярной массе компонентов лекарственного вещества контролировали с использованием эксклюзионной хроматографии (SEC).
5 Способ анализирует основные компоненты в образце, содержащем полученный токсин и высокомолекулярные и низкомолекулярные молекулы (HMW и LMW, соответственно), которые могут быть технологическими примесями или родственными продукту примесями. Для разделения используют эксклюзионную колонку UPLC® SEC. Подвижной фазой является буферный раствор 17 (см.
10 Таблицу 1 выше), дополненный 0,4 М L-аргинина, рН лежит в диапазоне от 6,6 до 6,9. L-аргинин добавляют в буферный раствор 17, чтобы минимизировать вторичные взаимодействия между разделяемыми белками и матрицей колонки, фильтрами и другим смачиваемыми частями хроматографической системы. С использованием объемной скорости, равной 0,25 мл/мин, анализировали парные
15 образцы (из одного флакона лекарственного вещества) без предварительной обработки или разведения. Детектирование проводят при длине волны, равной 280 нм. Полученные хроматограммы интегрируют и для каждой партии лекарственного вещества регистрируют полученную среднюю площадь в процентах (площадь, %) для основного компонента.

20 Фиг. 4 демонстрирует молекулярно-массовое распределения для партии DS № 17043, приготовленной согласно Примеру 1. Основной пик соответствует свободным молекулам полученного токсина. Все партии очищенного лекарственного вещества № 16852, № 17043 и № 19139 показали по меньшей мере 96% основного компонента (BoNT/A). Эти данные подтверждают высокий уровень
25 чистоты ботулинического токсина в продуктивных растворах токсина, полученных по настоящему изобретению.

Пример 10Выход стадии способа

30 Выход стадии способа получения BoNT/A определяют в качестве индикатора устойчивости каждой стадии способа очистки. Для расчета выхода стадии способа каждую фракцию взвешивали, чтобы определить объем. Для определения концентрации BoNT/A в каждой фракции использовали BoNT/A-специфический твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Протокол ELISA является непрямым сэндвич-анализом ELISA, основанным на принципах и общем способе, описанных в Фармакопее США (USP– United States Pharmacopoeia) <1103>, «Immunological Test Methods – Enzyme-linked Immunosorbent Assay». Способ ELISA основан на иммунологическом связывании и обнаружении

5 BoNT/A с использованием двух различных типов BoNT/A-специфических поликлональных антител.

Серию стандартных разведений белка на основе коммерческого BoNT/A токсина приготовили посредством разведения BoNT/A в фосфатном буферном растворе (PBS; от англ.: phosphate-buffered saline) с добавлением Tween (0,05%

10 Твин-20) до диапазона концентраций от 3 нг/мл до 28 нг/мл. Образец, разбавленный PBS-Tween до диапазона стандартных разведений белка, добавляли в виде трех параллельных проб в лунки микропланшета, покрытые поликлональным антителом к BoNT/A. Инкубация приводит к распознаванию антитела и связыванию BoNT/A антигена с лункой. После каждой инкубации осуществляют автоматизированную

15 стадию промывания с использованием раствора PBS-Tween.

Первичное обнаружение выполняют посредством связывания другого типа поликлонального антитела к BoNT/A, что приводит к образованию «сэндвич»-комплекса. Затем добавляют вторичное антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP; от англ.: horseradish peroxidase). Его связывание с первичным

20 антителом обеспечивает обнаружение BoNT/A внутри «сэндвич»-комплекса. Затем в лунки с образцами добавляют субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ; от англ.: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine). HRP преобразует субстрат ТМБ с образованием синего продукта реакции. Затем добавляют стоп-раствор, останавливающий конверсию ТМБ и инициирующий преобразование цвета остаточного ТМБ в желтый.

25 Оптическую плотность в каждой лунке микропланшета определяют при длине волны 450 нм с помощью спектрофотометра для чтения планшетов, причем измеренная оптическая плотность прямо пропорциональна количеству BoNT/A в лунке. Значения оптической плотности образца рассчитывают посредством сравнения со стандартной кривой, основанной на значениях оптической плотности в случае

30 стандартных разведений BoNT/A. Результаты представляют в форме средних значений в мкг/мл. Выход стадии способа затем рассчитывают согласно Уравнению 1, приведенному выше.

Фиг. 5 демонстрирует средние значения выхода стадии способа для каждой стадии способа очистки для партий № 16852, № 17043 и № 19139. Столбик,

отмеченный как «DS», демонстрирует суммарный выход двух последних хроматографических стадий, поскольку они взаимосвязаны, и между ними не производили забора образцов. Данные показывают, что выход стадий способа варьируется от примерно 100% до примерно 50%.

5

Пример 11

Аккумулятивный выход стадии способа

Аккумулятивный выход стадии способа для каждой конкретной стадии способа рассчитывают по формуле:

$$\text{Аккумулятивный выход стадии способа (\%)} = \frac{C_{\text{фракции}}(V_{\text{фракции}})}{(C_{KS})(V_{KS})} \times 100$$

10

(Уравнение 4)

где C – концентрация токсина; V – объем; подстрочный индекс *фракции* означает концентрацию или объем для текущей стадии обработки, а подстрочный индекс KS обозначает культуру во время сбора, из которой клетки удалены посредством фильтрации через фильтр с диаметром пор, равным 0,2 мкм. Аккумулятивный выход стадии способа для культуры во время сбора (KS) принят за 100%.

15

Фиг. 6 демонстрирует средний аккумулятивный выход стадии способа для каждой стадии способа очистки для партий очищенного лекарственного вещества № 16852, № 17043 и № 19139. Столбик, отмеченный как «DS», демонстрирует суммарный выход двух последних хроматографических стадий, поскольку они взаимосвязаны, и между ними не производили забора образцов.

20

Пример 12

Общий выход

Общий выход $BoNT/A$ в продуктивном растворе токсина (или «DS») по сравнению с культурой во время сбора («KS») определяют в качестве индикатора устойчивости всего способа очистки. Для расчета выхода способа KS и DS фракции взвешивали для определения их объемов. Концентрацию $BoNT/A$ в KS и DS определяли с использованием $BoNT/A$ -специфического твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Общий выход рассчитывали согласно Уравнению 2, приведенному выше.

25

Для партий очищенного лекарственного вещества № 16852, № 17043 и № 19139 были определены общие выходы, лежавшие в диапазоне от примерно 13% до примерно 29% (данные не показаны).

Пример 13

5 Показатель повышения чистоты (на стадиях)

Показатель повышения чистоты BoNT/A на каждой конкретной стадии способа определяют в качестве индикатора эффективности каждой стадии (и всего способа очистки) в отношении удаления нежелательных белковых компонентов (технологических примесей или родственных продукту примесей). Для расчета показателя повышения чистоты во время стадии каждую фракцию анализировали на концентрацию токсина с использованием BoNT/A-специфического ELISA и на концентрацию общего белка способом Micro BCA (Пример 4). Повышение чистоты на стадии рассчитывали согласно формуле:

$$\text{Показатель повышения чистоты на стадии (разы)} = \frac{\frac{(ToxC_{\text{фракции}})}{(TotPC_{\text{фракции}})}}{\frac{(ToxC_{\text{предыдущей фракции}})}{(ToxPC_{\text{предыдущей фракции}})}}$$

(Уравнение 5)

15 где $ToxC$ – концентрация токсина, $TotPC$ - концентрация общего белка, подстрочный индекс *фракции* обозначает концентрацию токсина или концентрацию общего белка на текущей стадии обработки, и подстрочный индекс *предыдущей фракции* обозначает концентрацию токсина или концентрацию общего белка на предыдущей стадии обработки.

20 Фиг. 7 демонстрирует средние значения показателя повышения чистоты на стадиях для партий очищенного лекарственного вещества № 16852, № 17043 и № 19139. Столбик, отмеченный как «DS», демонстрирует суммарный показатель повышения чистоты во время двух последних хроматографических стадий, поскольку они взаимосвязаны, и между ними не производили забора образцов. Из
25 данных очевидно, что вторая хроматографическая колонка является той стадией, которая вносит наибольший вклад в очистку токсина. Однако все стадии (кроме Фильтрации 1, которая удаляет цельные или лизированные клетки и клеточные компоненты) способствуют общей очистке токсина относительно концентрации общего белка.

Пример 14Аккумулятивный показатель повышения чистоты (на стадиях)

Аккумулятивный показатель повышения чистоты рассчитывали для каждой конкретной стадии способа следующим образом:

$$\text{Аккумулятивный показатель повышения чистоты на стадии (разы)} = \frac{\frac{(ToxC_{\text{фракции}})}{(TotPC_{\text{фракции}})}}{\frac{(ToxC_{KS})}{(TotPC_{KS})}}$$

5

(Уравнение 6)

где $ToxC$ – концентрация токсина, $TotPC$ - концентрация общего белка, подстрочный индекс *фракции* обозначает концентрацию токсина или концентрацию общего белка на текущей стадии обработки, и подстрочный индекс KS обозначает концентрацию токсина или концентрацию общего белка в культуре во время сбора, из которой клетки удалены посредством фильтрации через фильтр с размером пор, равным 0,2 мкм. Принято, что на первой технологической стадии способа очистки (ферментация во время сбора) показатель повышения чистоты равен 1.

Фиг. 8 демонстрирует средние значения аккумулятивного показателя повышения чистоты на стадиях для партий очищенного лекарственного вещества № 16852, № 17043 и № 19139. Столбик, отмеченный как «DS», демонстрирует суммарный аккумулятивный показатель повышения чистоты для двух последних хроматографических стадий, поскольку они взаимосвязаны, и между ними не производили забор образцов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки ботулинического токсина, включающий очистку токсина из раствора, содержащего токсин, причем способ не включает осаждения, центрифугирования или лиофилизации.
- 5 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ботулинический токсин является серотипом А.
3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что полученный очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит ботулинических токсиновых комплексов.
- 10 4. Способ по любому из пунктов с 1 по 3, отличающийся тем, что полученный очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит продуктов животного происхождения.
5. Способ по любому из пунктов с 1 по 4, отличающийся тем, что полученный очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит человеческого альбумина.
- 15 6. Способ по любому из пунктов с 1 по 5, отличающийся тем, что очистка включает стадию фильтрации, предпочтительно – стадию фильтрации в тангенциальном потоке.
7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что на стадии фильтрации
20 используют полволоконный фильтр.
8. Способ по любому из пунктов с 1 по 7, отличающийся тем, что очистка включает приведение первой хроматографической колонки в контакт с раствором, содержащим токсин, с получением токсинсодержащей фракции.
9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что первая хроматографическая
25 колонка включает анионообменную хроматографическую колонку.
10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что анионообменная хроматографическая колонка содержит Q Sepharose.
11. Способ по любому из пунктов с 1 по 10, отличающийся тем, что очистка дополнительно включает сбор токсинсодержащей фракции, причем
30 токсинсодержащая фракция не адсорбируется на первой неподвижной фазе.

12. Способ по любому из пунктов с 8 по 11, отличающийся тем, что очистка дополнительно включает приведение второй хроматографической колонки в контакт с токсинсодержащей фракцией.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что вторая хроматографическая колонка включает катионообменную хроматографическую колонку.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что катионообменная хроматографическая колонка содержит SP Sepharose.

15. Способ по любому из пунктов с 12 по 14, отличающийся тем, что он дополнительно включает элюирование ботулинического токсина из второй хроматографической колонки с получением первого токсинсодержащего элюата.

16. Способ по любому из пунктов с 12 по 15, отличающийся тем, что он дополнительно включает фильтрацию первого токсинсодержащего элюата с получением токсинсодержащего ретентата.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что фильтрация токсинсодержащего элюата включает замену буфера.

18. Способ по п. 16 или п. 17, отличающийся тем, что фильтрация первого токсинсодержащего элюата отделяет молекулы ботулинического токсина от нетоксиновых белков с получением свободных молекул токсина в токсинсодержащем ретентате.

19. Способ по любому из пунктов с 16 по 18, отличающийся тем, что он дополнительно включает приведение третьей хроматографической колонки в контакт с токсинсодержащим ретентатом.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что третья хроматографическая колонка включает вторую анионообменную хроматографическую колонку.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что третья анионообменная хроматографическая колонка содержит Q Sepharose.

22. Способ по любому из пунктов с 19 по 21, отличающийся тем, что он дополнительно включает элюирование ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки с получением второго токсинсодержащего элюата.

23. Способ по любому из пунктов с 19 по 22, отличающийся тем, что он дополнительно включает приведение четвертой хроматографической колонки в контакт со вторым токсинсодержащим элюатом.

5 24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что четвертая хроматографическая колонка включает эксклюзионную хроматографическую колонку.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что эксклюзионная хроматографическая колонка включает гель-фильтрационную хроматографическую колонку.

10 26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что гель-фильтрационная хроматографическая колонка содержит Superdex 200.

27. Способ по любому из пунктов с 23 по 26, отличающийся тем, что он дополнительно включает элюирование ботулинического токсина из четвертой хроматографической колонки с получением очищенного ботулинического токсина.

15 28. Способ очистки ботулинического токсина из раствора, содержащего токсин, включающий:

(a) фильтрацию раствора, содержащего токсин;

20 (b) приведение первой хроматографической колонки в контакт с профильтрованным раствором, содержащим токсин, со стадии (a), причем первая хроматографическая колонка является ионообменной хроматографической колонкой;

(c) сбор токсинсодержащей фракции, причем токсинсодержащая фракция течет через первую хроматографическую колонку без адсорбции на стационарной фазе;

25 (d) приведение второй хроматографической колонки в контакт с токсинсодержащей фракцией, причем вторая хроматографическая колонка является ионообменной хроматографической колонкой;

(e) элюирование ботулинического токсина из второй хроматографической колонки с получением первого токсинсодержащего элюата;

(f) фильтрацию первого токсинсодержащего элюата с получением токсинсодержащего ретентата;

(g) приведение третьей хроматографической колонки в контакт с токсинсодержащим ретентатом со стадии фильтрации (f), причем третья хроматографическая колонка является ионообменной колонкой;

(h) элюирование ботулинического токсина из третьей хроматографической колонки с получением второго токсинсодержащего элюата;

(i) приведение четвертой хроматографической колонки в контакт со вторым токсинсодержащим элюатом, причем четвертая хроматографическая колонка является эксклюзионной хроматографической колонкой;

(j) элюирование ботулинического токсина из четвертой хроматографической колонки с получением очищенного ботулинического токсина,

причем способ не включает осаждения, центрифугирования или лиофилизации ботулинического токсина.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что ботулинический токсин содержит ботулинический нейротоксин серотипа А.

30. Способ по п. 28 или п. 29, отличающийся тем, что полученный очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит ботулинических токсиновых комплексов.

31. Способ по любому из пунктов с 28 по 30, отличающийся тем, что полученный очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит продуктов животного происхождения.

32. Способ по любому из пунктов с 28 по 31, отличающийся тем, что очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит человеческого альбумина.

33. Способ по любому из пунктов с 28 по 32, отличающийся тем, что первая хроматографическая колонка включает анионообменную хроматографическую колонку.

34. Способ по любому из пунктов с 28 по 33, отличающийся тем, что первая хроматографическая колонка содержит Q Sepharose.

35. Способ по любому из пунктов с 28 по 34, отличающийся тем, что вторая хроматографическая колонка включает катионообменную хроматографическую колонку.

5 36. Способ по любому из пунктов с 28 по 35, отличающийся тем, что вторая хроматографическая колонка содержит SP Sepharose.

37. Способ по любому из пунктов с 28 по 36, отличающийся тем, что первая хроматографическая колонка включает анионообменную хроматографическую колонку, а вторая хроматографическая колонка включает катионообменную хроматографическую колонку.

10 38. Способ по любому из пунктов с 28 по 37, отличающийся тем, что первая хроматографическая колонка содержит Q Sepharose, а вторая хроматографическая колонка содержит SP Sepharose.

15 39. Способ по любому из пунктов с 28 по 38, отличающийся тем, что третья хроматографическая колонка включает анионообменную хроматографическую колонку.

40. Способ по любому из пунктов с 28 по 39, отличающийся тем, что третья хроматографическая колонка содержит Q Sepharose.

41. Способ по любому из пунктов с 28 по 40, отличающийся тем, что четвертая хроматографическая колонка включает гель-фильтрационную колонку.

20 42. Способ по любому из пунктов с 28 по 41, отличающийся тем, что четвертая хроматографическая колонка содержит Superdex 200.

25 43. Способ по любому из пунктов с 28 по 42, отличающийся тем, что третья хроматографическая колонка включает анионообменную хроматографическую колонку, а четвертая хроматографическая колонка включает гель-фильтрационную хроматографическую колонку.

44. Способ по любому из пунктов с 28 по 43, отличающийся тем, что третья хроматографическая колонка содержит Q Sepharose, а четвертая хроматографическая колонка содержит Superdex 200.

30 45. Способ по любому из пунктов с 28 по 44, отличающийся тем, что второй токсинсодержащий элюат инжектируют непосредственно на четвертую хроматографическую колонку.

46. Способ по любому из пунктов с 28 по 45, отличающийся тем, что третья хроматографическая колонка и четвертая хроматографическая колонка соединены друг с другом.

5 47. Способ по любому из пунктов с 28 по 46, отличающийся тем, что первая хроматографическая колонка является анионообменной хроматографической колонкой, вторая хроматографическая колонка является катионообменной хроматографической колонкой, третья хроматографическая колонка является второй анионообменной хроматографической колонкой, и
10 четвертая хроматографическая колонка является гель-фильтрационной хроматографической колонкой.

48. Способ по любому из пунктов с 28 по 47, отличающийся тем, что первая хроматографическая колонка содержит Q Sepharose, вторая хроматографическая колонка содержит SP Sepharose, третья хроматографическая колонка содержит Q Sepharose, и четвертая хроматографическая колонка содержит
15 Superdex 200.

49. Способ по любому из пунктов с 28 по 48, отличающийся тем, что первая, вторая, третья и четвертая хроматографические колонки являются одноразовыми хроматографическими системами.

50. Способ по любому из пунктов с 28 по 49, отличающийся тем, что
20 фильтрация (f) отделяет белковые молекулы ботулинического токсина от нетоксиновых белков с получением свободных молекул токсина.

51. Способ по любому из пунктов с 28 по 50, отличающийся тем, что фильтрация (f) включает замену буфера.

52. Способ по любому из пунктов с 1 по 27, отличающийся тем, что
25 раствор, содержащий ботулинический токсин, является не содержащей продуктов животного происхождения, по существу не содержащей продуктов животного происхождения или практически не содержащей продуктов животного происхождения ферментационной средой.

53. Способ по любому из пунктов с 28 по 51, отличающийся тем, что
30 раствор, содержащий ботулинический токсин, является не содержащей продуктов животного происхождения, по существу не содержащей продуктов животного

происхождения или практически не содержащей продуктов животного происхождения ферментационной средой.

54. Способ по любому из пунктов с 1 по 27, отличающийся тем, что он дополнительно включает приведение ботулинического токсина в контакт с 5 буферным раствором, причем буферный раствор профильтрован для снижения микробиологической нагрузки.

55. Способ по любому из пунктов с 28 по 51, отличающийся тем, что он дополнительно включает приведение ботулинического токсина в контакт с 10 буферным раствором, причем буферный раствор профильтрован для снижения микробиологической нагрузки.

56. Очищенный ботулинический токсин, полученный способом по любому из пунктов с 1 по 27.

57. Очищенный ботулинический токсин по п. 56, отличающийся тем, что ботулинический токсин является серотипом А.

58. Очищенный ботулинический токсин по п. 56 или п. 57, отличающийся 15 тем, что очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит токсинových комплексов.

59. Очищенный ботулинический токсин по любому из пунктов с 56 по 58, отличающийся тем, что очищенный ботулинический токсин не содержит, по 20 существу не содержит или практически не содержит продуктов животного происхождения.

60. Очищенный ботулинический токсин по любому из пунктов с 56 по 59, отличающийся тем, что очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит человеческого альбумина.

61. Очищенный ботулинический токсин, полученный способом по любому из пунктов с 28 по 51. 25

62. Очищенный ботулинический токсин по п. 61, отличающийся тем, что токсин является серотипом А.

63. Очищенный ботулинический токсин по п. 61 или п. 62, отличающийся 30 тем, что очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит токсинových комплексов.

64. Очищенный ботулинический токсин по любому из пунктов с 61 по 63, отличающийся тем, что очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит продуктов животного происхождения.

5 65. Очищенный ботулинический токсин по любому из пунктов с 61 по 64, отличающийся тем, что очищенный ботулинический токсин не содержит, по существу не содержит или практически не содержит человеческого альбумина.

66. Композиция, содержащая очищенный ботулинический токсин в буферном растворе, причем буферный раствор содержит фосфат.

10 67. Композиция по п. 66, отличающаяся тем, что буферный раствор дополнительно содержит ацетат.

68. Композиция по п. 66 или п. 67, отличающаяся тем, что буферный раствор дополнительно содержит по меньшей мере один источник хлоридных ионов.

15 69. Композиция по п. 68, отличающаяся тем, что по меньшей мере один источник хлоридных ионов является хлоридом натрия.

70. Композиция по любому из пунктов с 66 по 69, отличающаяся тем, что буферный раствор дополнительно содержит по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество.

20 71. Композиция по п. 70, отличающаяся тем, что по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество содержит полисорбат 20.

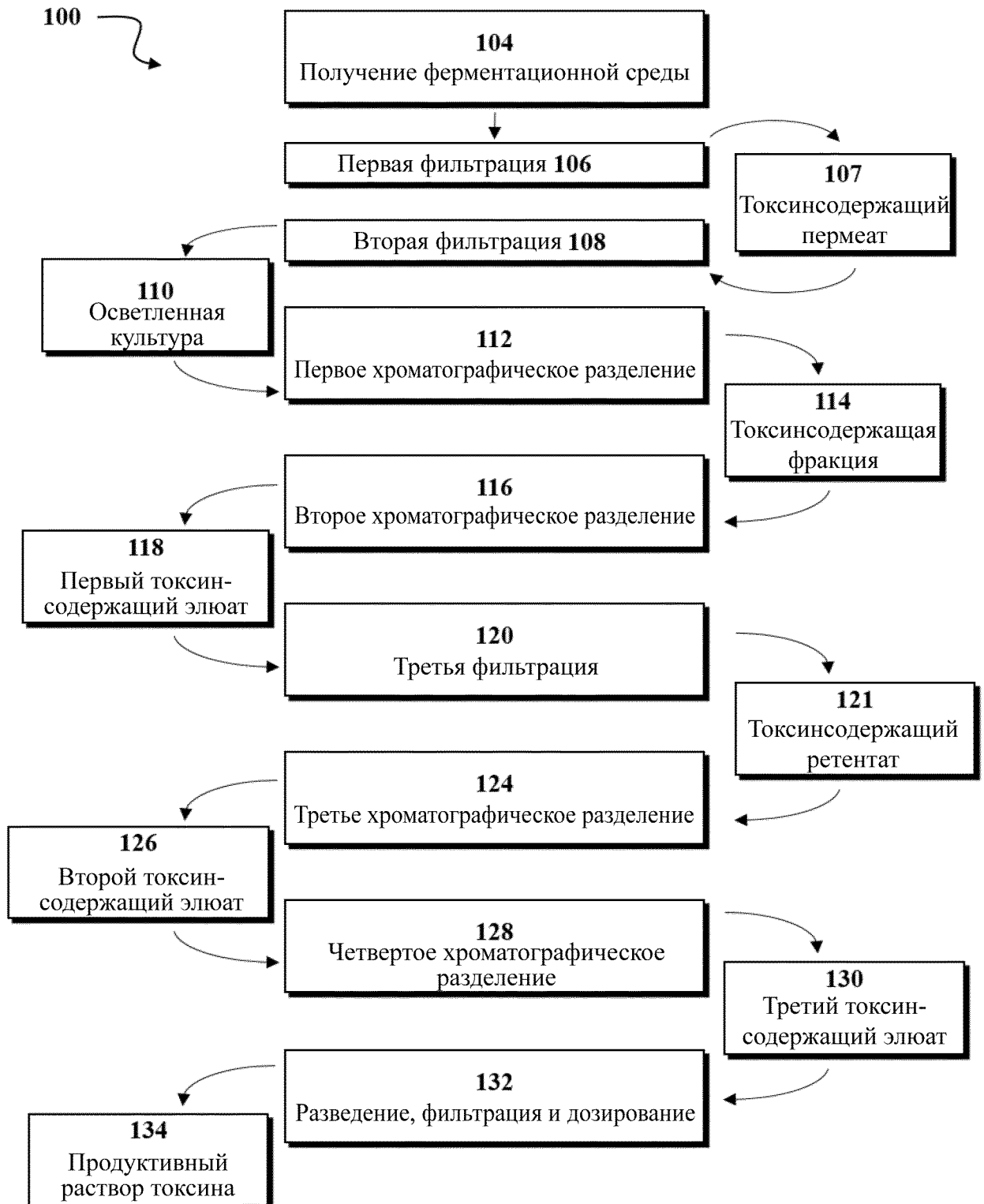
72. Композиция по любому из пунктов с 66 по 71, отличающаяся тем, что ботулинический токсин является ботулиническим нейротоксином серотипа А.

25 73. Композиция по любому из пунктов с 66 по 72, отличающаяся тем, что композиция не содержит, по существу не содержит или практически не содержит ботулинических токсиновых комплексов.

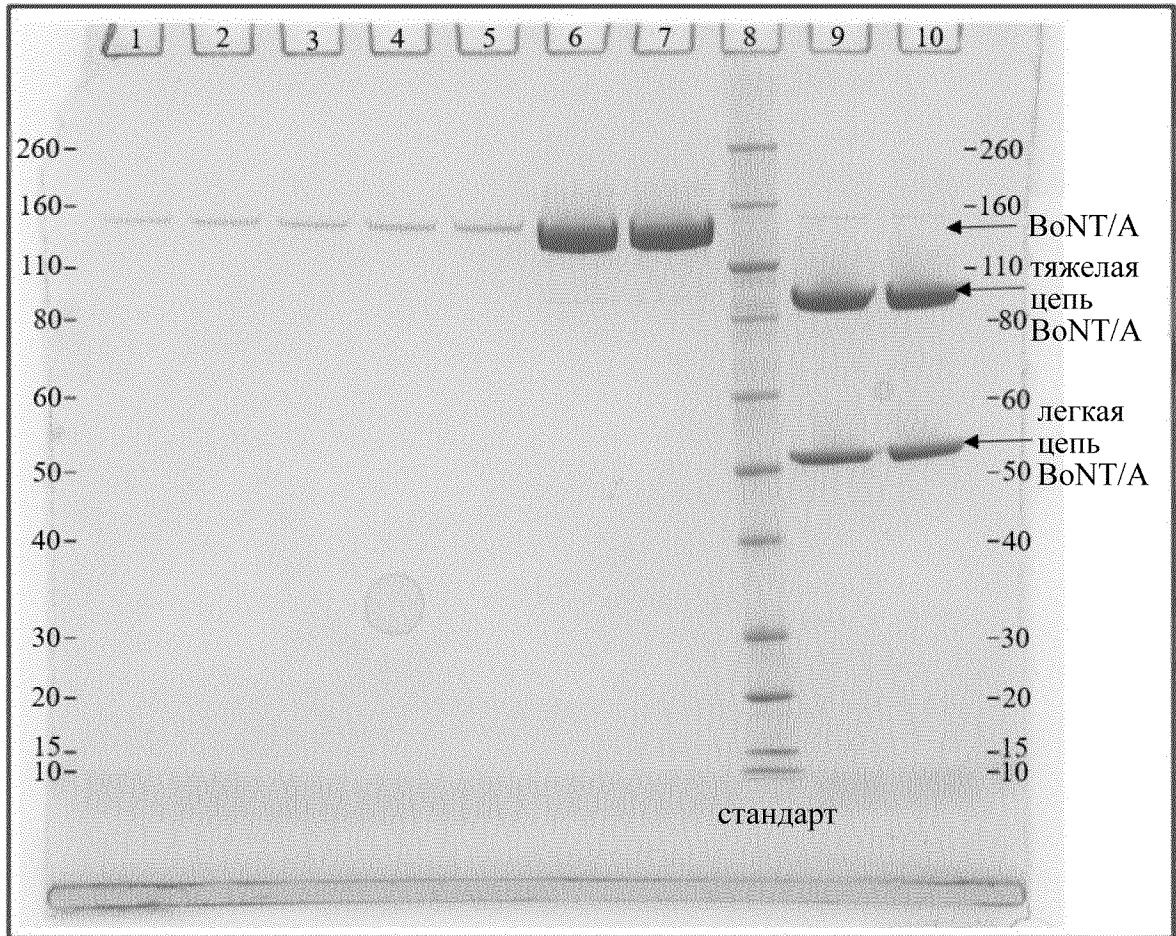
74. Композиция по любому из пунктов с 66 по 73, отличающаяся тем, что композиция не содержит, по существу не содержит или практически не содержит продуктов животного происхождения.

75. Композиция по любому из пунктов с 66 по 74, отличающаяся тем, что композиция не содержит, по существу не содержит или практически не содержит человеческого альбумина.

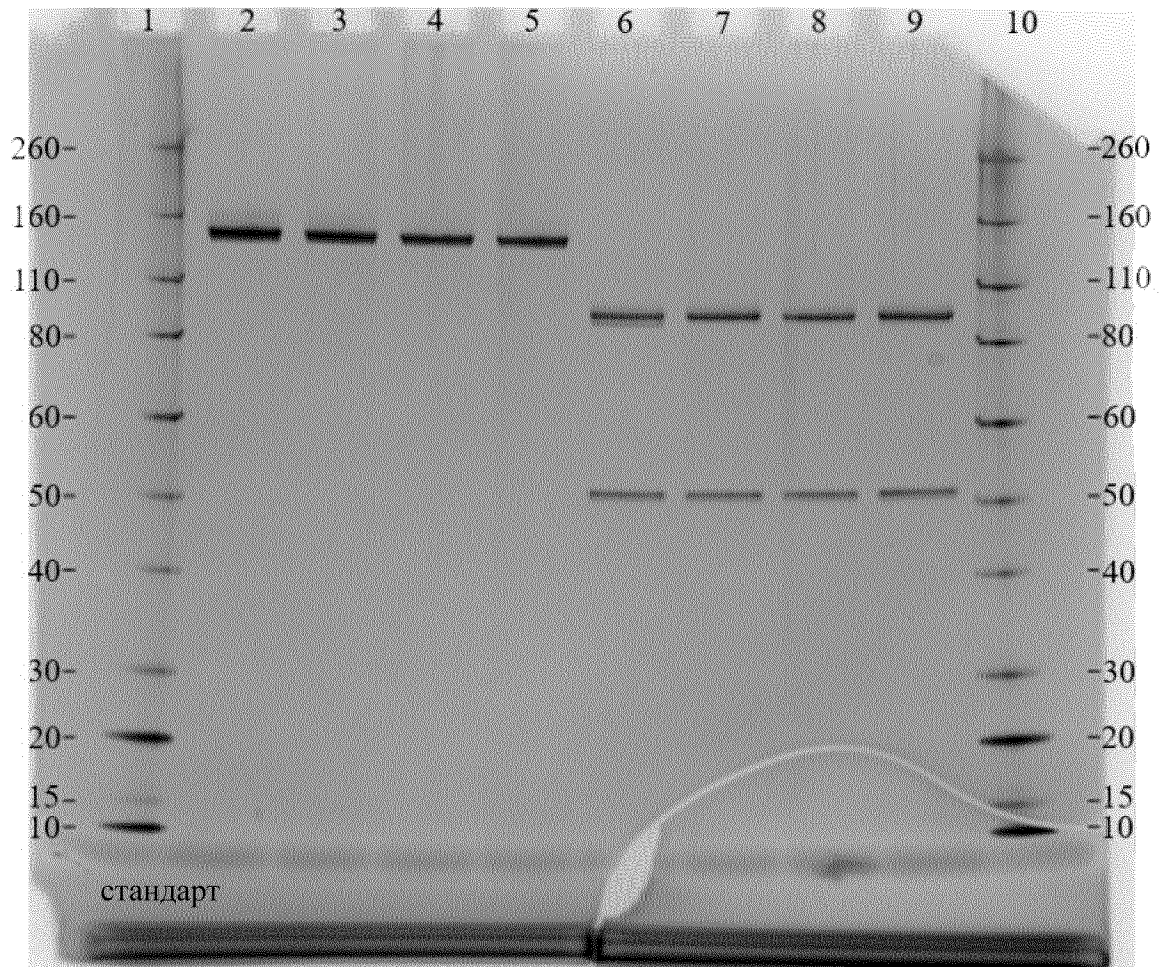
76. Композиция по любому из пунктов с 66 по 75, отличающаяся тем, что композиция имеет рН в диапазоне от примерно 6,6 до примерно 6,9.

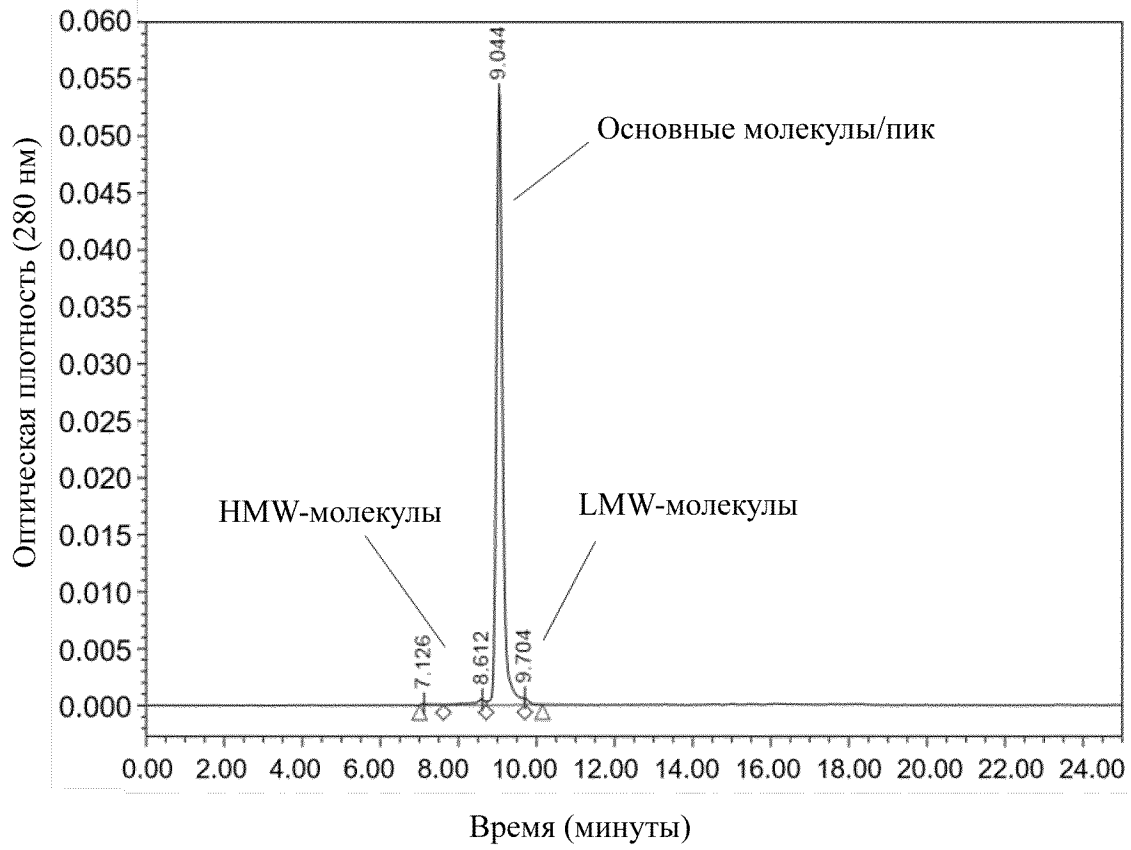


ФИГ. 1

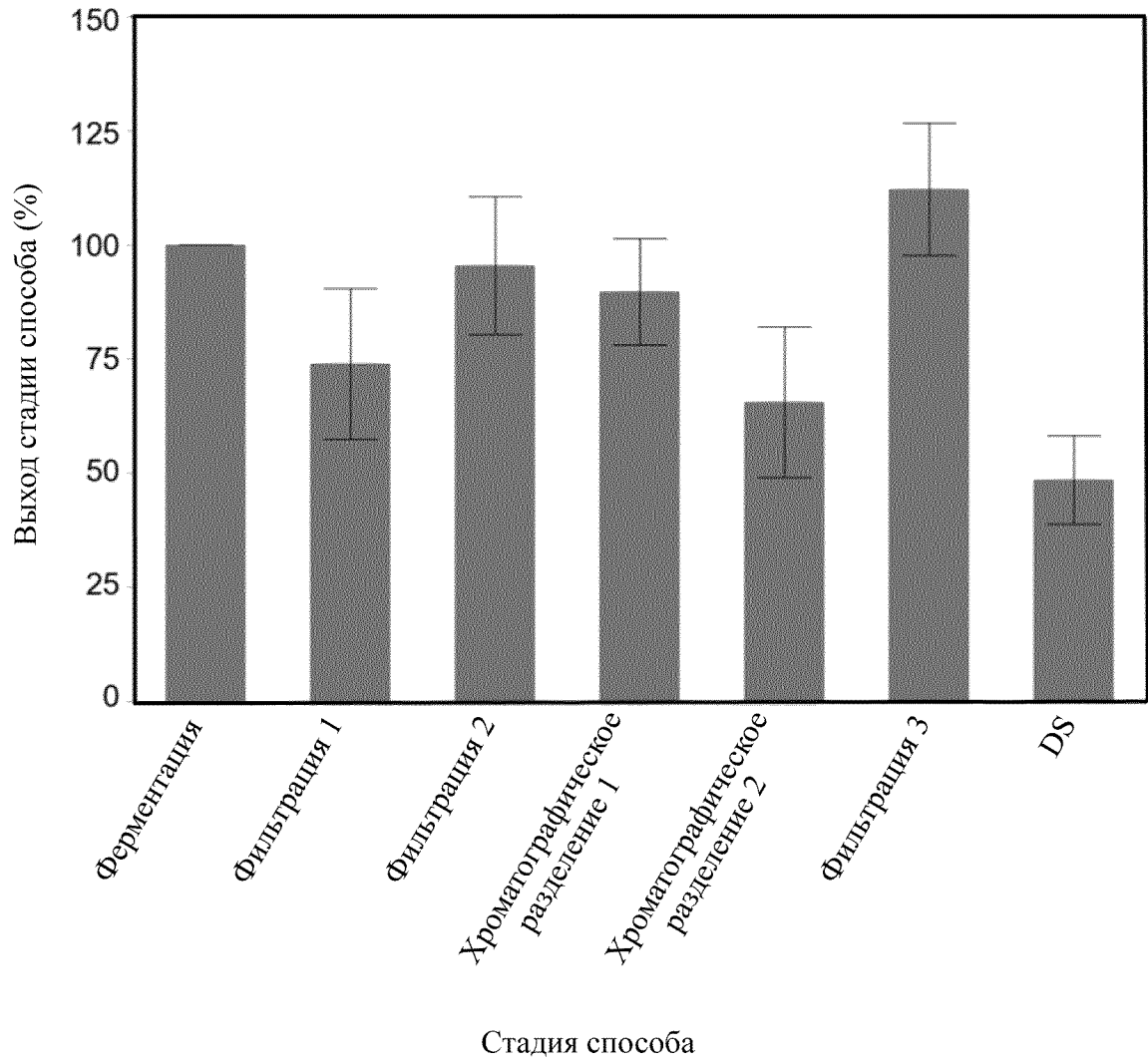


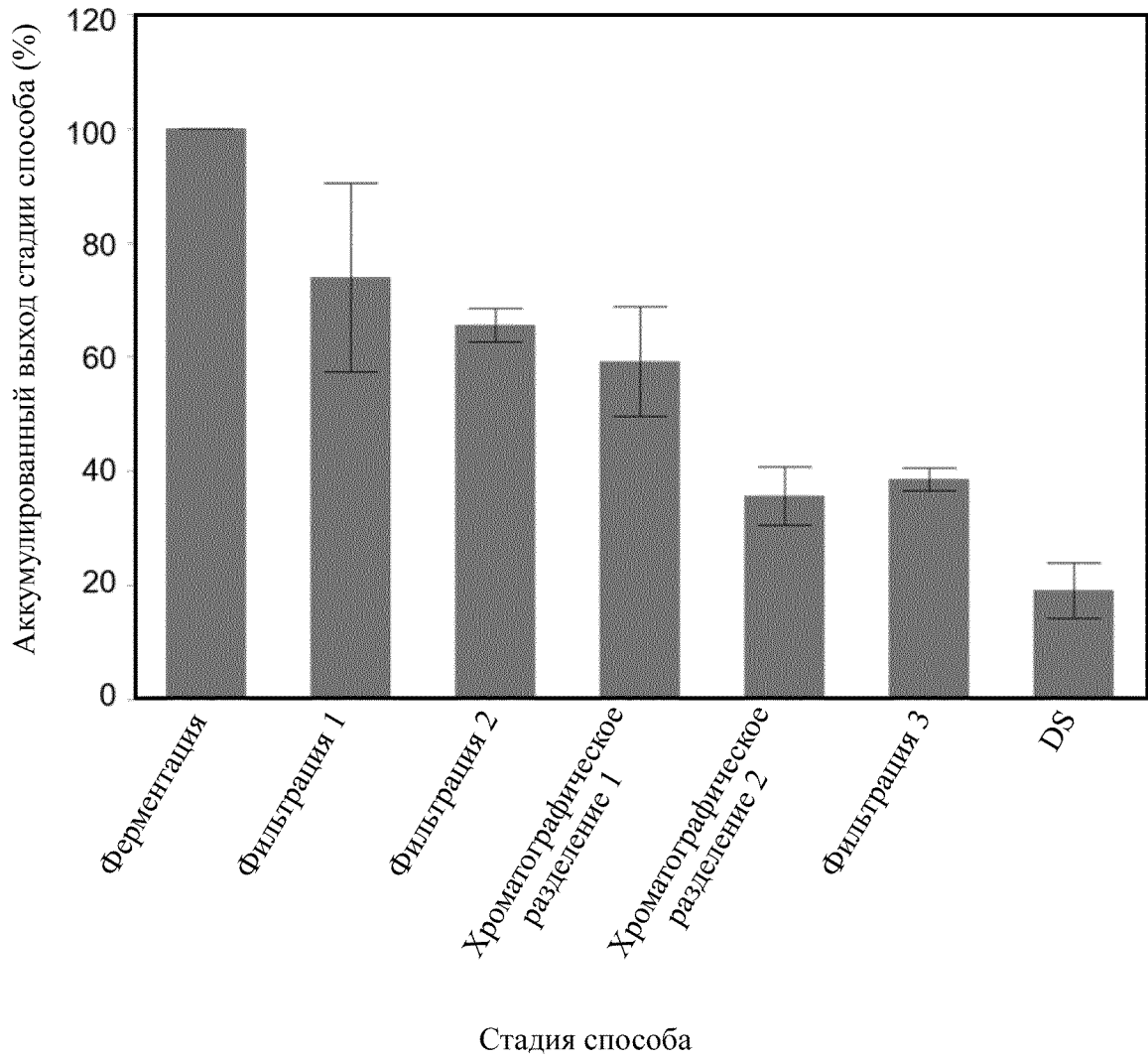
ФИГ. 2

**ФИГ. 3**

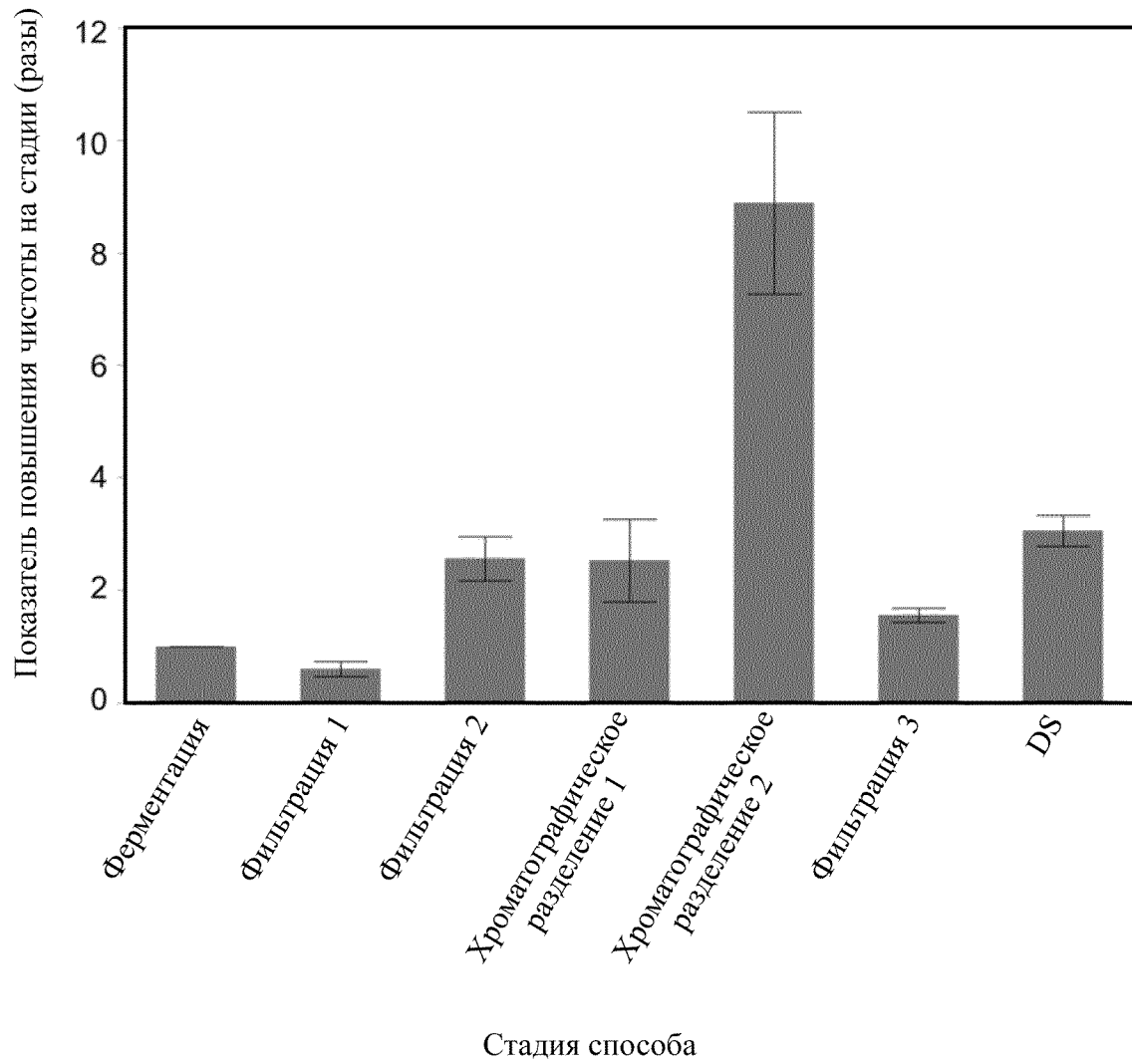


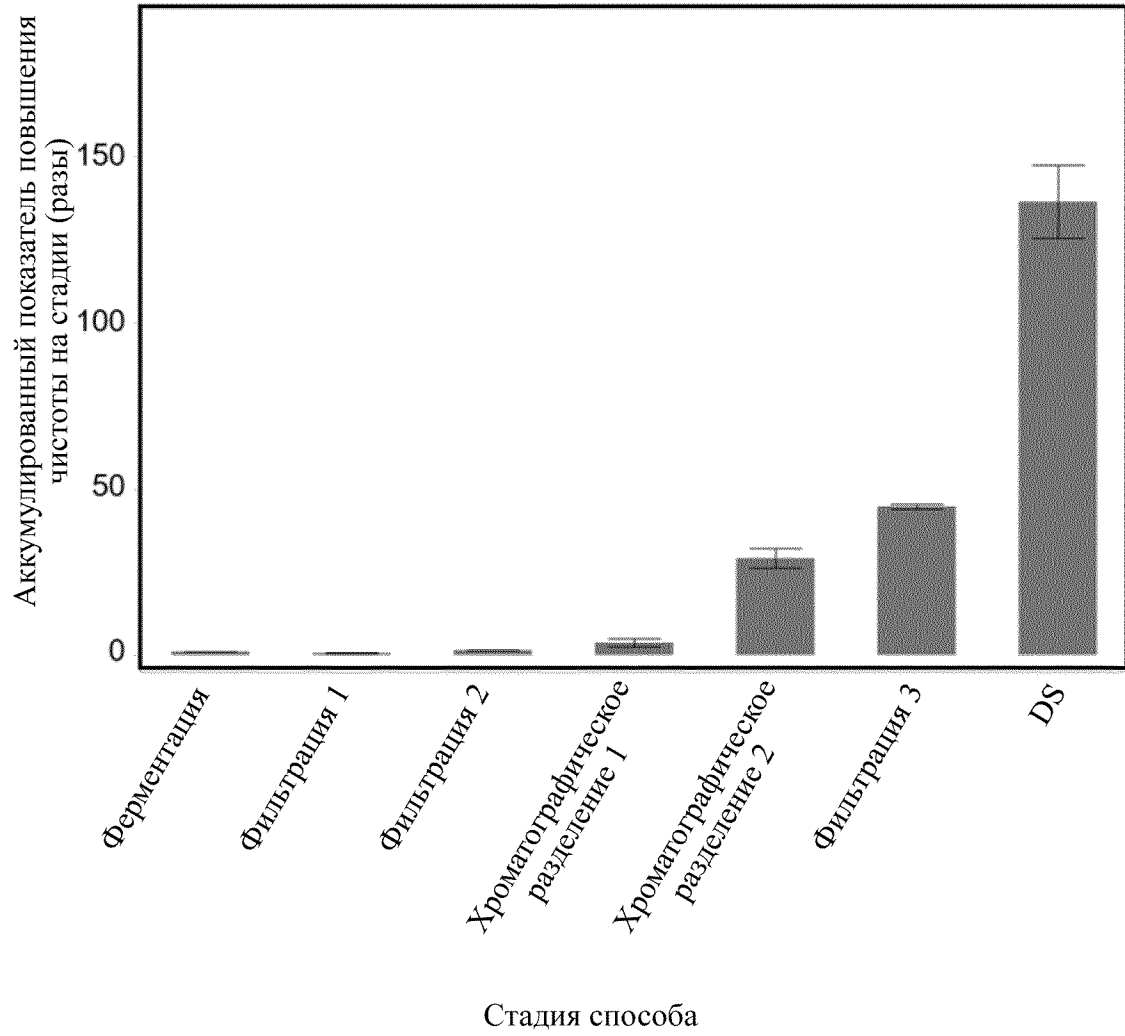
ФИГ. 4

**ФИГ. 5**



ФИГ. 6

**ФИГ. 7**



ФИГ. 8