



DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ MÉTODOS Y SISTEMAS PARA PURIFICAR LA NEUROTOXINA

BOTULÍNICA LIBRE DE COMPLEJO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ REVANCE THERAPEUTICS, INC.

DOMICILIO _____ NEWARK, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

74. APODERADO _____

22. BOGOTÁ, D. C., _____



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-070154- -00000-0000

Fecha: 2012-04-30 12:39:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **REVANCE THERAPEUTICS, INC.**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 7555 Gateway Blvd.,
Newark,
California 94560,
Estados Unidos de América

Domicilio: Newark,
California,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C.☐

C.E.☐

NIT☐

Otro☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.☒

C.E.☐

NIT☐

Otro☐

Cual

Número 35.456.344

T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. **Curtis L. RUEGG**
826 Shepard Way,
Redwood City,
California 94062,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2010/053389 Fecha: 20 de octubre de 2010
Publicación Internacional No. WO 2011/050072 A1 Fecha: 28 de abril de 2011

6

Título (54)
MÉTODOS Y SISTEMAS PARA PURIFICAR LA NEUROTOXINA BOTULÍNICA LIBRE DE COMPLEJO

7

Clasificación Internacional (51) C02F 001/028

8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
		<u>US</u>	<u>21 de octubre de 2009</u>	<u>61/253,810</u>

9

Comprobante de pago No.: 12-0036570
Comprobante de pago No.: 12-0032548
Comprobante de pago No.: 12-0029367
Comprobante de pago No.: 12-0029368

Fecha: 16 de abril de 2010
Fecha: 02 de abril de 2012
Fecha: 23 de marzo de 2012
Fecha: 23 de marzo de 2012

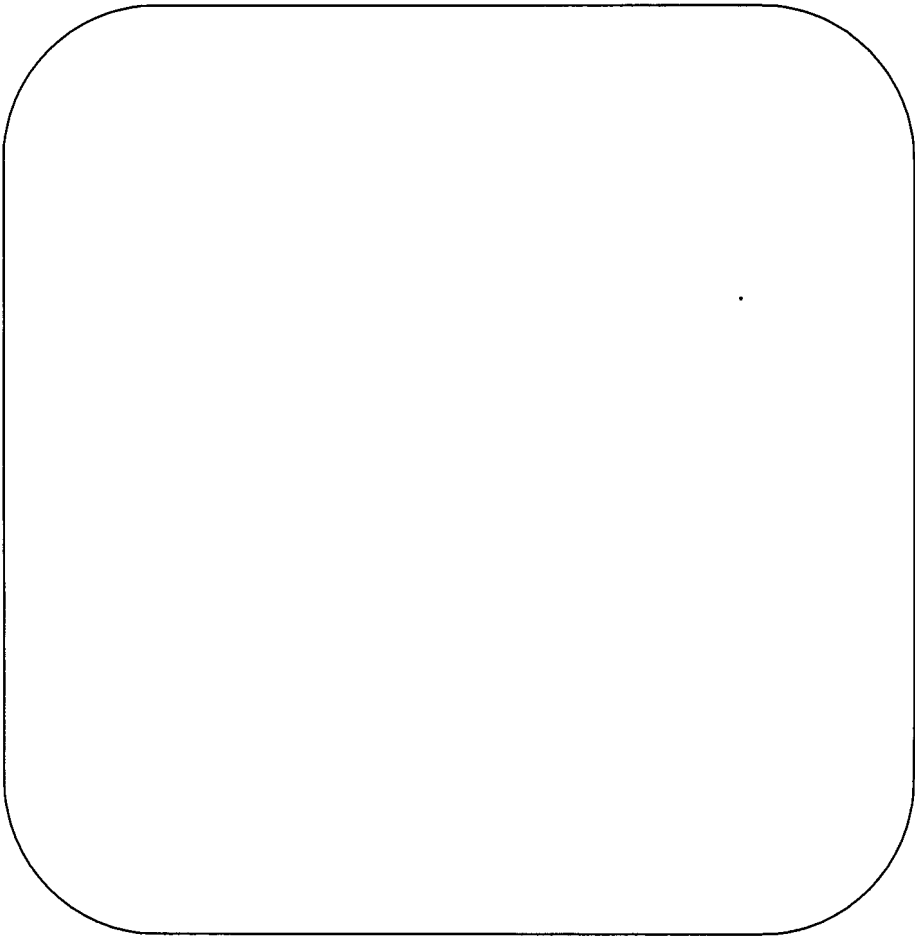
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 14 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$420.000.oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poder de **REVANCE THERAPEUTICS, INC.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2011/050072 A1.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia De Paez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1.  Publicación Internacional WO 2011/050072 A1

Descripción:

Páginas 32 en español

Reivindicaciones: Número (s) 24

Figuras: Número (s) 1

2.  **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3.  Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

State of California

SECRETARY OF STATE

Requested for use in Colombia.

Not for use within the United States of America.

The purpose of the Apostille is to certify the authenticity of the signature of the official signing the document, the capacity in which the official signing the document has acted, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp.

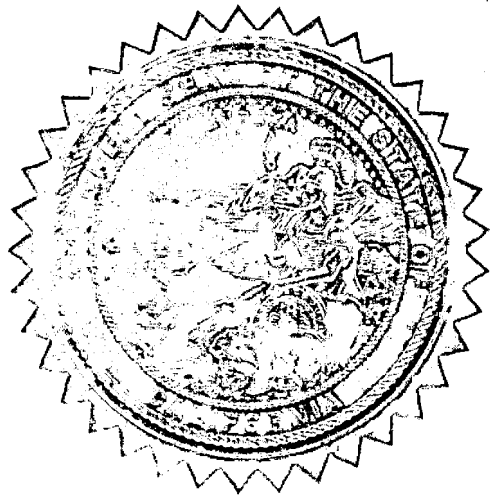
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

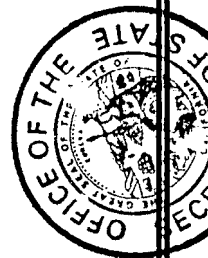
1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by Heidi Butler
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of Heidi Butler, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 4th day of February 2010
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 778289
9. Seal/Stamp:



10. Signature



Jana Bowen
Secretary of State

BY *[Signature]*

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned **REVANCE THERAPEUTICS, INC.**

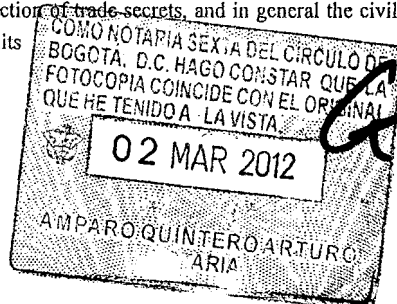
domiciliado (s) en/of **7555 Gateway Blvd., Newark, CA, 94560, United States of America**

por el presente nombramos a Luz Clemencia de Páez TPA.23.555, Nidia Osorio TPA. 73.366, Oscar Correa TPA. 71.027, Edna Sarmiento TPA. 65.794, Jorge Chávarro TPA. 40.119, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contenciosos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint Luz Clemencia de Páez TPA.23.555, Nidia Osorio TPA. 73.366, Oscar Correa TPA. 71.027, Edna Sarmiento TPA. 65.794, Jorge Chávarro TPA. 40.119, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits



administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy / Given and signed this _____

February 1, 2010

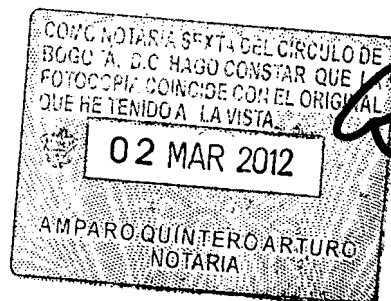
en/in Newark, CA

por/by L. Daniel Browne

Firma President, CEO - Revance Therapeutics Inc.

Signature [Signature]

(Please see attached CA
Notary Acknowledgment)



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of Alameda

On February 1, 2010 before me, Heidi Butler, Notary Public

personally appeared L. Daniel Browne



who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.
Signature Heidi Butler
Signature of Notary Public

Place Notary Seal Above

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Representation and Power of Attorney

Document Date: Number of Pages:

Signer(s) Other Than Named Above:

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: L. Daniel Browne

- ☐ Individual
- ☒ Corporate Officer — Title(s): CEO, President
- ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
- ☐ Attorney in Fact
- ☐ Trustee
- ☐ Guardian or Conservator
- ☐ Other:

Signer Is Representing:

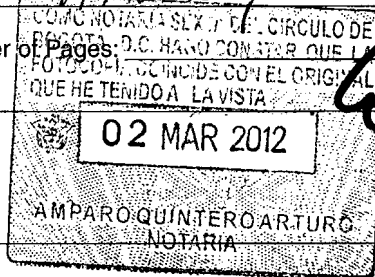
RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

Signer's Name:

- ☐ Individual
- ☐ Corporate Officer — Title(s):
- ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
- ☐ Attorney in Fact
- ☐ Trustee
- ☐ Guardian or Conservator
- ☐ Other:

Signer Is Representing:

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Jeffrey W. Bullock

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

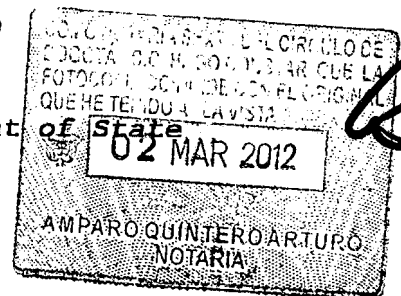
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-second day of April, A.D. 2010

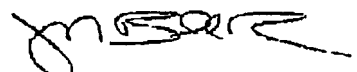
7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0412740

9. Seal/Stamp:



10. Signature:


Secretary of State

Delaware

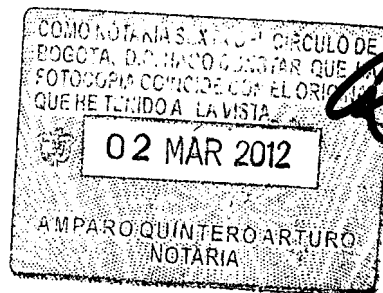
PAGE 1

The First State

I, JEFFREY W. BULLOCK, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "REVANCE THERAPEUTICS, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE TWENTY-SECOND DAY OF APRIL, A.D. 2010.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.



3074007 8300

100413396

You may verify this certificate online
at corp.delaware.gov/authver.shtml

Jeffrey W. Bullock, Secretary of State
AUTHENTICATION: 7948992

DATE: 04-22-10

11

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 05.20/10a realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia, registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **REVANCE THERAPEUTICS, INC.**, domiciliado en 7555 Gateway Blvd., Newark, CA 94560, Estados Unidos de América, otorga derechos de representación y poder a los Doctores Luz Clemencia de Páez, tpa. 23.555; Nidia Osorio, tpa. 73.366; Oscar Correa tpa. 71.027; Edna Sarmiento, tpa. 65.794 y Jorge Chávarro, tpa. 40.119, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 1 de febrero de 2010 en Newark, California, Estados Unidos de América por L. Daniel Browne, Presidente y Director Ejecutivo.

Firma Firma Ilegible
(Por favor ver el acto notarial de reconocimiento adjunto)

02 MAR 2012
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

ACTA NOTARIAL DE RECONOCIMIENTO MULTIPROPÓSITOS DE CALIFORNIA

Estado de California }
Condado de Alameda }

El 1 de febrero de 2010 ante mí, Heidi Butler, Notario Público,
Fecha Indique aquí el Nombre y Cargo del Funcionario
compareció personalmente L. Daniel Browne
Nombre(s) del Signatario(s)

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR OFICIAL
EN LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
RES. 0001 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

HEIDI BUTLER
Comisión # 1727224
Notario Público - California
Condado de Santa Clara

quien comprobó con fundamento en evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito en el instrumento anexo y reconoció ante mí que él suscribió el mismo en su calidad autorizada y que por medio de su firma en el instrumento la persona o la

Comisión Vence Mar. 23 de 2011

entidad a nombre de la cual dicha persona actuó, ejecutó el documento.

Certifico SO PENA DE PERJURIO según las leyes del Estado de California que el párrafo anterior es verdadero y correcto.

Fijar Sello Notarial Arriba

TESTIFICA mí firma y sello oficial.

Firma Ilegible

Firma del Notario Público

OPTIONAL

Aunque la siguiente información no es obligatoria por ley, esta podría tener valor para aquellas personas que admitan el documento y podría prevenir la remoción fraudulenta y anexión de este formato a otro documento.

DESCRIPCIÓN DEL DOCUMENTO ANEXO

Título o clase del documento: *Representación y Poder*

Fecha del Documento: Número de Páginas:

Otros Signatarios distintos a los anteriores:

CALIDAD (ES) REIVINDICADA(S) POR SIGNATARIO(S)

Nombre del signatario: *L. Daniel Browne*

Nombre del signatario:

- Individuo

Funcionario

Director Ejecutivo

☒ Corporativo Cargo(s): y Presidente

□ Individuo

Funcionario

☐ Corporativo Cargo(s): _____

☐ Socio ☐ Comanditario ☐ General

☐ Socio ☐ Comanditario ☐ General

☐ Apoderado☐ Fiduciario☐ Guardián o Curador

☐ Otro:

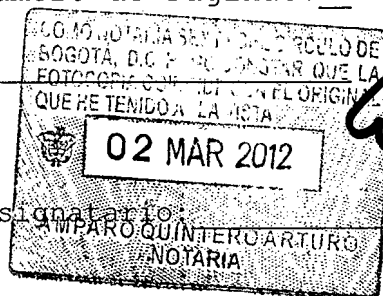
El Signatario representa a:

Revance Therapeutics, Inc.

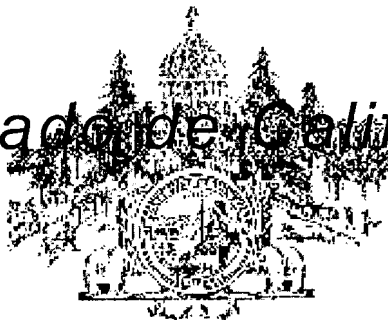
☐ Apoderado☐ Fiduciario☐ Guardián o Curador

☐ Otro: _____

El Signatario representa a:



Estado de California



Venezuela

ESTADO DE VENEZUELA
Tribunal de Justicia del Poder Judicial
E.E. J.J. - TRIBUNAL JUSTICIAL - ESPAÑOL
RES. C-000000040 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

SECRETARIO DE ESTADO

Solicitado para uso en Colombia

No puede ser usado dentro de los Estados Unidos de América

El objeto de esta Apostilla es certificar la autenticidad de la firma del funcionario que suscribe el documento, la calidad en la cual dicho funcionario ha actuado y en caso de ser indicado, la identidad del sello o timbre.

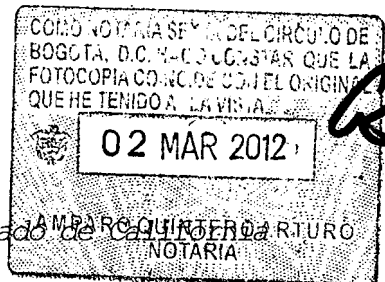
APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

- 1. País: Estados Unidos de América
- Este documento público
- 2. ha sido firmado por Heidi Butler
- 3. actuando en calidad de Notario Público, Estado de California
- 4. lleva el sello/estampilla de Heidi Butler, Notario Público, Estado de California

CERTIFICADO

- 5. En Sacramento, California
- 6. El 4 de febrero de 2010
- 7. por el Suplente del Secretario de Estado, Estado de California
- 8. No. 778289
- 9. Sello/estampilla:



10. Firma
Firma Ilegible
Secretario de Estado

BOGOTÁ D.C. 02 MAR 2012
J. AMPARO QUINTANA ROLDÁN
NOTARIA

Por Firma ilegible

EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA

DIANE E. VARGAS
DIANE E. VARGAS E.
TARJETAS DE IDENTIFICACION
ESPAÑOL - INGLÉS - FRENCH - ESPAÑOL
RES. 001 DEL ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

Delaware
El Primer Estado

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

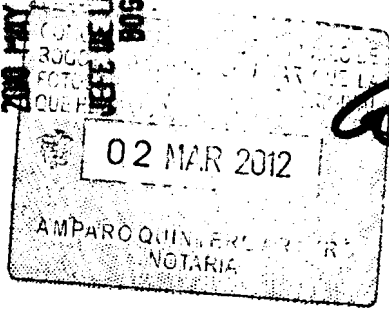
019483

Deo Vandas
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

700 MAY 21 A 1:04

[Signature]
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



14

YO, JEFFREY W. BULLOCK, SECRETARIO DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE LA SOCIEDAD "REVANCE THERAPEUTICS, INC." ESTÁ DEBIDAMENTE CONSTITUIDA DE CONFORMIDAD CON LAS LEYES DEL ESTADO DE DELAWARE Y CUMPLE CON SU OBJETO SOCIAL Y TIENE UNA EXISTENCIA LEGAL CORPORATIVA DE ACUERDO CON LO QUE MUESTRAN LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA A VEINTIDÓS DE ABRIL DE 2010.

Y ADICIONALMENTE CERTIFICO QUE LOS DERECHOS DE LICENCIA HAN SIDO PAGADOS A LA FECHA.

Y ADICIONALMENTE CERTIFICO QUE LOS INFORMES ANUALES HAN SIDO PRESENTADOS HASTA LA FECHA.

3074007 8300

100413396



Firma ilegible

Jeffrey W. Bullock, Secretario de Estado

AUTENTICACIÓN: 7948992

FECHA: 04-22-10

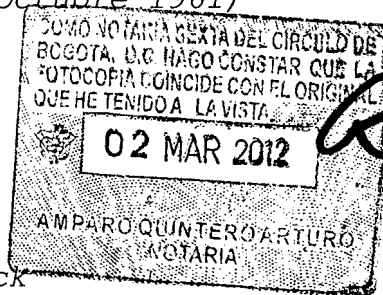
Apostilla

(Convention de La Haye du 5 Octubre 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público:

2. ha sido firmado por Jeffery W. Bullock
3. actuando en calidad de Secretario de Estado de Delaware
4. lleva el sello/estampilla de Secretario de Estado



Certificado

5. En Dover, Delaware
6. El veintidós de abril de 2010

Diego F. Vazquez
DIEGO F. VAZQUEZ
SECRETARIO DE ESTADO DE DELAWARE
REL. DEL. DE NOT. 4 DE 177
MINISTERIO DE JUSTICIA

5

RESPONSABLE
DEL TEXTO

019482

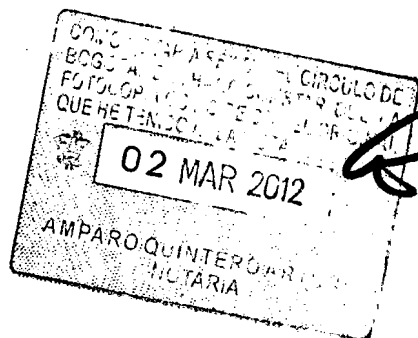
Drao Vayas

CUYA FIRMA PADECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2000 MAY 21 1:03

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
28 April 2011 (28.04.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/050072 A1

(51) International Patent Classification:
C02F 1/28 (2006.01) *B01D 15/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/053389

(22) International Filing Date:
20 October 2010 (20.10.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/253,810 21 October 2009 (21.10.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **RE-VANCE THERAPEUTICS, INC.** [US/US]; 7555 Gateway Boulevard, Newark, California 94560 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **RUEGG, Curtis, L.** [US/US]; 826 Shepard Way, Redwood City, California 94062 (US).

(74) Agent: **ENG, Joseph, D., Jr.**; King & Spalding LLP, 1185 Avenue of the Americas, New York, New York 10036 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: METHODS AND SYSTEMS FOR PURIFYING NON-COMPLEXED BOTULINUM NEUROTOXIN

(57) Abstract: Methods and systems for chromatographically purifying a *botulinum* neurotoxin are provided. These methods and systems allow for efficient purification of a non-complexed form of the *botulinum* neurotoxin in high purity and yield that can be used as an active ingredient in pharmaceutical preparations.

WO 2011/050072 A1

5 **MÉTODOS Y SISTEMAS PARA PURIFICAR LA NEUROTOXINA BOTULÍNICA
LIBRE DE COMPLEJO**

La presente solicitud reclama el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Número 61/253,810, presentada el 21 de octubre de 2009. El contenido de esta Solicitud Provisional de los Estados Unidos se tiene aquí reproducido en su totalidad.

10 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente a los métodos y sistemas cromatográficos para purificar una neurotoxina botulínica libre de cultivos celulares para producir un producto de alta pureza y alta potencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La toxina botulínica es una proteína neurotóxica producida por la bacteria *Clostridium botulinum*, así como también por otras especies *Clostridiales* como por ejemplo la *Clostridium butyricum* y la *Clostridium baraffi*. La toxina bloquea la transmisión neuromuscular y produce una neuroparálisis en los seres humanos y animales, conocida como botulismo. La *C. botulinum* y sus esporas generalmente se encuentran en el suelo y en
20 cadáveres de animales en grado de putrefacción y también puede crecer en contenedores de alimentos inadecuadamente esterilizados y sellados, lo cual es la causa de muchos casos de botulismo. Los síntomas del botulismo pueden incluir dificultad para caminar, tragar y hablar, y además pueden llegar a la parálisis de los músculos respiratorios y finalmente pueden producir la muerte.

25 La toxina botulínica tipo A es la sustancia natural más letal conocida por el hombre. Además del serotipo A, se han caracterizado otras seis toxinas botulínicas generalmente distintas a nivel inmunológico, a saber, los serotipos B, C₁, D, E, F, y G de toxina botulínica. Los distintos serotipos pueden distinguirse por neutralización con los anticuerpos de tipo específico y varían en cuanto a la gravedad de la parálisis que producen y la especie animal
30 que afectan principalmente. El peso molecular de la molécula proteica de la toxina botulínica, para cada uno de los serotipos de toxina botulínica conocidos, es de alrededor de 150 kD, compuesto de una cadena pesada de alrededor de 100 kD unida a una cadena liviana de

5 alrededor de 50 kD. No obstante, las toxinas botulínicas son liberadas por las bacterias *Clostridial* como complejos de la toxina de 150 kD con una o más proteínas no tóxicas. Por ejemplo, la toxina botulínica tipo A existe en complejos de 900 kD, de 500 kD y de 300 kD (pesos moleculares aproximados).

A pesar de los efectos tóxicos conocidos, la toxina botulínica Tipo A se utiliza
 10 clínicamente en varias indicaciones que incluyen por ejemplo, trastornos neuromusculares caracterizados por la hiperactividad del músculo esquelético. Por ejemplo, BOTOX® es la marca comercial de un complejo de toxina botulínica tipo A disponible comercialmente a través de Allergan, Inc., de Irvine, California. La toxina botulínica tipo A se usa, por ejemplo, en el tratamiento esencial del blefaroespasma, el estrabismo, la distonía cervical y las arrugas
 15 de la zona glabella (facial). También se han usado otros serotipos clínicamente. Una toxina botulínica tipo B, por ejemplo, se ha indicado para uso en el tratamiento de la distonía cervical. Se cree que las toxinas botulínicas se unen con alta afinidad a la membrana presináptica de las neuronas motoras, se translocan dentro de la neurona y de ahí en más bloquean la liberación presináptica de la acetilcolina.

20 La toxina botulínica para uso clínico generalmente se aísla de un cultivo celular y se han usado varios métodos de purificación. Históricamente, la toxina es purificada en forma de complejo por una serie de pasos de precipitación y filtración de flujo tangencial. Véase, por ej., Schantz E. J., *et al*, Properties and use of *botulinum* toxin and other microbial neurotoxins in medicine, Microbiol Rev 1992 March 56(1):80-99. Sin embargo, tales métodos han
 25 proporcionado rendimientos relativamente bajos, generalmente menores al 10% aproximadamente. Otros métodos han usado la exclusión por tamaño, el intercambio de iones y/o la cromatografía de afinidad. Véase, por ejemplo, Schmidt J. J., *et al*, Purification of type E *botulinum* neurotoxin by high-performance ion exchange chromatography, Anal. Biochem. 1986 July; 156(1):213-219; Simpson L. L., *et al*, Isolation and characterization of the
 30 *botulinum* neurotoxins, Harsman S, ed. Methods in Enzymology. Vol. 165, Microbial Toxins: Tools in Enzymology San Diego, Calif: Academic Press; vol 165: pages 76-85 (1988); Kannan K., *et al*, Methods development for the biochemical assessment of Neurobloc (*botulinum* toxin type B), Mov Disord 2000; 15(Suppl 2):20 (2000); Wang Y.C., The preparation and quality of *botulinum* toxin type A for injection (BTXA) and its clinical use,
 35 Dermatol Las Faci Cosm Surg 2002; 58 (2002); y U.S. Pat. Appl. Publ. No. 2003/0008367.

5 Sin embargo, otros métodos se han focalizado simplemente en una de las cadenas pesada o liviana de la toxina más que en la proteína de la toxina botulínica completa y biológicamente activa. Por ejemplo, una de estas cadenas está sintetizada individualmente por medios recombinantes. Véase, por ejemplo, Zhou L., et al., Expression and purification of the light chain of *botulinum* neurotoxin A: A single mutation abolishes its cleavage of SNAP-25 and neurotoxicity after reconstitution with the heavy chain, *Biochemistry* 10 1995; 34(46):15175-81(1995); y Johnson S. K., et al., Scale-up of the fermentation and purification of the recombination heavy chain fragment C of *botulinum* neurotoxin serotype F, expressed in *Pichia pastoris*, *Protein Expr and Purif* 2003; 32:1-9 (2003). Estos métodos, sin embargo, requieren pasos extra para reformar una proteína de la toxina botulínica completa y 15 biológicamente activa.

Un método más reciente incluye el uso de cromatografía de interacción hidrofóbica, modo mixto y/o cromatografía de intercambio iónico para purificar la toxina botulínica como complejo. Véase por ejemplo, U.S. Pat. Números 7,452,697 y 7,354,740, las que se incorporan a la presente como referencia.

20 De acuerdo con ello, existe una necesidad en el estado del arte para hallar mejores métodos de purificación para aislar proteínas completas de la toxina botulínica en forma estable y biológicamente activas y libres de complejo protéico. Por lo tanto, es objeto de la invención proporcionar composiciones y métodos que aborden estas y otras necesidades.

La discusión precedente se presenta solamente para proporcionar una mejor 25 comprensión de la naturaleza de los problemas que enfrenta el estado del arte y de ninguna manera debería interpretarse como un reconocimiento de estado del arte previo, ni la cita de toda referencia en el presente documento debe interpretarse como reconocimiento de que dicha referencia constituye “estado del arte previo” a la presente solicitud.

RESUMEN DE LA INVENCION

30 La presente invención se refiere a los sistemas y métodos para purificar una toxina botulínica libre de complejo. En una realización, el método incluye purificar la toxina botulínica libre de complejo en estado crudo para obtener una toxina botulínica libre de complejo purificada. En esta realización, el método comprende cargar una columna de

5 intercambio aniónico con la toxina botulínica libre de complejo en estado crudo para capturar la toxina botulínica libre de complejo en la columna de intercambio aniónico; eluir la toxina botulínica libre de complejo con un buffer para dar un eluyente que incluya la toxina botulínica libre de complejo; cargar una columna de intercambio catiónico con el eluyente del intercambio aniónico a la columna para permitir la captura de la toxina botulínica
10 libre de complejo; y eluir la toxina botulínica libre de complejo con otro buffer para dar un eluyente, obteniendo a partir de allí una toxina botulínica libre de complejo purificada.

En algunas realizaciones, el complejo de la toxina botulínica se obtiene a través de varios pasos cromatográficos. En algunas realizaciones, un método para la obtención del complejo de la toxina botulínica comprende la obtención de una muestra compuesta por el
15 complejo de la toxina botulínica; la carga de una columna de interacción hidrofóbica con la muestra para permitir la captura de la toxina, en donde la toxina botulínica capturada comprende el complejo de la toxina botulínica; y eluir la toxina botulínica compleja. La toxina botulínica libre de complejo es luego dissociada del complejo y purificada según el método descrito arriba. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene exponiendo un
20 cultivo de fermentación que comprenda la toxina botulínica a un ácido para obtener un precipitado ácido que puede ser sujeto a pasos adicionales de purificación pre-cromatográfica, ejemplos no limitantes de esto incluyen filtración de flujo tangencial para concentrar el material insoluble del precipitado, digestión con nucleasas, clarificación por centrifugación y/o filtración.

25 En algunas realizaciones, la muestra es sometida a una digestión con nucleasas antes de cargarla en la columna de interacción hidrofóbica. Preferentemente, las nucleasas son derivadas en un proceso libre de producto animal y, con mayor preferencia aún, todo el proceso de purificación está libre de producto animal o al menos sustancialmente libre de producto animal.

30 En algunas realizaciones, la muestra a usarse en las separaciones cromatográficas es preferentemente un sobrenadante o fracción de filtración.

La toxina botulínica libre de complejo purificada comprende al menos uno de los tipos de toxina botulínica tipo A, B, Ci, D, F, F y G, y con preferencia una toxina botulínica tipo A con un peso molecular de aproximadamente 150 kD. En algunas realizaciones preferidas, la

- 5 toxina botulínica libre de complejo purificada tiene una pureza de al menos 98%; y/o tiene una actividad de al menos 200 LD₅₀ unidades/ng. En algunas realizaciones, el método produce un rendimiento aproximado de al menos 2 mg/L de cultivo de fermentación. En otras realizaciones, el método produce un rendimiento de aproximadamente 1 a 2 mg/L de cultivo de fermentación.
- 10 Estos y otros aspectos de la invención serán mejor comprendidos por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- La Figura 1 es un diagrama de flujo general que compara una realización de un proceso según la presente invención para purificar directamente una toxina botulínica libre de complejo (Figura 1A) con un proceso para purificar una toxina botulínica en complejo (Figura 1B).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- La presente invención se refiere a sistemas y métodos para purificar una toxina botulínica libre de complejo. En ciertas realizaciones, el método comprende purificar una toxina botulínica libre de complejo en bruto cargando una columna de intercambio aniónico con la toxina libre de complejo en bruto para permitir la captura de la toxina botulínica libre de complejo por parte de la columna de intercambio aniónico. La toxina botulínica libre de complejo es luego eluída con buffer para dar un eluyente que comprenda la toxina botulínica libre de complejo. El eluyente de la columna aniónica se carga en una columna de intercambio catiónico para permitir la captura de la toxina botulínica libre de complejo y la toxina libre de complejo es eluída con buffer, obteniéndose de ahí una toxina botulínica libre de complejo purificada.

- En algunas realizaciones, la invención permite la purificación de la toxina botulínica libre de complejo en una cantidad relativamente pequeña de pasos para producir alto rendimiento, alta pureza, y un producto de alta potencia. Los procesos y los sistemas dentro del alcance de la invención pueden usarse para producir eficientemente una toxina botulínica estable y libre de complejo a partir de cultivos de fermentación. En otras realizaciones, el método además comprende proveer una muestra que comprenda el complejo de toxina

5 botulínica y cargar una columna de interacción hidrofóbica con la muestra como para permitir la captura del complejo de toxina botulínica por parte de la columna de interacción hidrofóbica. El complejo de la toxina botulínica es luego eluído de la columna con buffer. La toxina botulínica libre de complejo en bruto es disociada del complejo de la toxina botulínica para obtener una mezcla que comprende la toxina botulínica libre de complejo en bruto. En
10 esta realización, la mezcla que comprende la toxina libre de complejo en bruto es purificada para obtener toxina botulínica pura o sustancialmente pura según el método descripto precedentemente.

Un aspecto de la presente invención es el reconocimiento de que la composición farmacéutica que comprende la toxina botulínica libre de complejo como ingrediente activo
15 puede proporcionar mayor pureza en comparación con una que comprenda una forma en complejo. Las proteínas no tóxicas generalmente asociadas con un complejo de toxina botulínica pueden representar alrededor del 90% por peso del complejo. De este modo, proporcionar una toxina botulínica como un complejo necesariamente incluye al menos aproximadamente el 90% por peso de impurezas. En otras palabras, al menos
20 aproximadamente del 80 al 90% por peso de la composición farmacéutica incluirá impurezas celulares derivadas que no son parte de la molécula activa ni son necesarias para su actividad biológica. Dichas impurezas, sin embargo, representan materiales derivados de células que cuando se administran a un paciente pueden aumentar el riesgo de reacciones inmunológicas no deseadas a la droga; pueden aumentar el riesgo de efectos secundarios no deseados; y/o
25 pueden aumentar el riesgo de transmisión de agentes patógenos. Por el contrario, la alta pureza de un producto libre de complejo, que puede obtenerse por medio de los métodos y sistemas descriptos en el presente documento, reduce la cantidad de impurezas de la célula huésped que pueden permanecer en la composición farmacéutica, reduciendo a partir de allí los riesgos aledaños de reacciones y/o transmisión no deseadas. De acuerdo con ello, los procesos y
30 sistemas descriptos en el presente pueden proporcionar una toxina botulínica en una forma más apropiada para la preparación de composiciones farmacéuticas más seguras y puras.

Sin embargo, a diferencia de las formas en complejo, la toxina botulínica libre preparada de acuerdo con el método descripto en el presente no necesita ser estabilizada para su almacenamiento en productos derivados de la sangre. El complejo de la toxina botulínica
35 tipo A, por ejemplo, generalmente se estabiliza en un excipiente que comprende albúmina, derivada de sangre humana. Por ejemplo, el BOTOX® consiste en un complejo de toxina

5 botulínica tipo A purificada, seroalbúmina humana y cloruro de sodio presentados en
forma seca al vacío. Lo mismo ocurre con Dysport y Xeomin. Mientras que el tamizaje
reduce la probabilidad de la contaminación con agentes patógenos, el uso de la sangre
humana en preparaciones farmacéuticas generalmente aumenta el riesgo de la transmisión
indeseada de ciertos agentes patógenos, por ejemplo, los agentes que no son o no pueden ser
10 tamizados aún. En contraposición, la toxina botulínica libre preparada según la presente
invención puede almacenarse de manera estable, como se enseña aquí, en sulfato de amonio.
Además, en algunas realizaciones preferidas, los métodos y sistemas de la presente invención
están sustancial, esencial o totalmente libres de producto animal, como se discute aquí. La
capacidad de almacenar también de manera estable el producto de la toxina sustancial,
15 esencial o totalmente libre de producto animal, reduce además los riesgos potenciales
asociados con los productos derivados de animales. De acuerdo con esto, los procesos y
sistemas descritos aquí proporcionan una toxina botulínica en forma especialmente
adecuada para las aplicaciones farmacéuticas en términos de seguridad, por ejemplo, donde
la composición farmacéutica puede ser preparada y almacenada sustancial, esencial o
20 totalmente libre de producto animal.

En ciertas realizaciones preferidas, los procesos y sistemas descritos en el presente
son escalables y/o cumplen con las normas cGMP. De acuerdo con esto, los métodos y
sistemas descritos aquí pueden usarse a escala comercial e industrial para producir toxina
botulínica libre de complejo para uso, por ejemplo, en composiciones farmacéuticas. Un
25 proceso o sistema que cumple con las normas cGMP se refiere a uno que cumple con los
requisitos regulatorios en cuanto a buenas prácticas de fabricación, según lo requerido por el
Código de Reglamentos Federales de los Estados Unidos. En algunas realizaciones
preferidas, el producto de toxina botulínica libre de complejo es especialmente adecuado
para la producción a gran escala debido a su fácil almacenamiento y manejabilidad, alta
30 actividad, alta pureza, estabilidad y/o mejorada seguridad.

"La toxina botulínica" como es usada aquí se refiere a una molécula de
proteína neurotóxica que puede ser producida por una bacteria *Clostridial*, como así
también por formas de la misma producidas de manera recombinante. Una toxina botulínica
recombinante puede tener la cadena liviana y/o la cadena pesada de la proteína de toxina
35 sintetizada vía técnicas recombinantes, por ejemplo, por medio de una especie *Clostridial* y/o

5 no *Clostridial*. En el presente documento el término "toxina botulínica" se usa indistintamente con las expresiones relacionadas "neurotoxina botulínica", "neurotoxina" o simplemente "toxina". El término "toxina botulínica" abarca a cualquiera de los serotipos A, B, Ci, D, E, F y G de la toxina botulínica y también incluye tanto la forma en complejo como la forma libre de complejo.

10 La "forma en complejo" implica un complejo de toxina botulínica que comprende una proteína de toxina botulínica (*por ejemplo*, la molécula de toxina con un peso molecular de alrededor de 150 kD) como así también al menos una proteína nativa no tóxica asociada. Las proteínas no tóxicas que conforman los complejos generalmente incluyen la proteína no tóxica hemaglutinina y la proteína no tóxica no

15 hemaglutinina. Es por esto que las formas en complejo pueden comprender una molécula de toxina botulínica (el componente neurotóxico) y una o más proteínas no tóxicas de hemaglutinina y/o una o más proteínas no tóxicas no hemaglutininas. En ciertas realizaciones, el peso molecular del complejo es mayor de aproximadamente 150 kD. Por ejemplo, las formas en complejo de la toxina botulínica tipo A pueden tener pesos moleculares

20 de aproximadamente 900 kD, aproximadamente 500 kD o aproximadamente 300 kD. Las formas en complejo de la toxina botulínica tipos B y C₁ pueden tener un peso molecular de 500 kD. Las formas en complejo de toxina botulínica tipo D pueden tener un peso molecular de aproximadamente 300 kD o aproximadamente 500 kD. Finalmente, las formas en complejo de toxina botulínica tipos E y F pueden tener un peso molecular de

25 aproximadamente 300 kD.

La toxina botulínica "libre de complejo" se refiere a una proteína de toxina botulínica aislada, o esencial o sustancialmente aislada, que tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kD. Es decir que las formas "libres de complejo" excluyen las proteínas no tóxicas, como por ejemplo las proteínas no tóxicas de hemaglutinina y las

30 proteínas no tóxicas no hemaglutininas, normalmente asociadas con la forma en complejo. En el presente documento, el término toxina botulínica "libre de complejo" y el término toxina botulínica "libre" se usan indistintamente. Todos los serotipos de la toxina producidos por las bacterias *Clostridium botulinum* nativas son sintetizados por las bacterias como proteínas inactivas de cadena simple que luego son desprendidas o cortadas por las proteasas

35 para convertirse en neuroactivas. La proteína comprende una cadena pesada de

5 aproximadamente 100 kD unida por un enlace disulfuro a una cadena liviana de aproximadamente 50 kD.

Los complejos de toxina botulínica pueden disociarse en proteínas tóxicas y no tóxicas a través de varios medios incluyendo, por ejemplo, subir el pH a aproximadamente 7,0, tratando al complejo con glóbulos rojos a un pH de aproximadamente 7,3, y/o
10 sometiendo el complejo a un proceso de separación, como por ejemplo cromatografía en columna en un buffer adecuado a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

La presente invención abarca sistemas y métodos que permiten la purificación de una toxina botulínica libre de complejo sin proteínas no tóxicas asociadas que convencionalmente se creían necesarias durante el proceso de purificación para mantener la
15 estabilidad. En realizaciones preferidas, los métodos y sistemas descriptos en al presente documento facilitan la purificación de la toxina botulínica libre sin pérdida de estabilidad. Por “estabilidad” o “estable” se entiende que la molécula de la proteína de toxina botulínica retiene tanto a la cadena pesada de aproximadamente 100 kD y a la cadena liviana de aproximadamente 50 kD, unidas mutuamente por medio de un enlace disulfuro, y en una
20 conformación que permite la actividad biológica.

En algunas realizaciones, se opera un sistema especial dentro del alcance de la presente invención en conjunto con un método especial dentro del alcance de la presente invención. Un sistema dentro del alcance de la presente invención puede comprender una pluralidad (preferentemente una serie consecutiva) de columnas de cromatografías para usar
25 con una pluralidad correspondiente (preferentemente una serie consecutiva) de pasos cromatográficos. Además, un sistema dentro del alcance de la presente invención puede comprender una pluralidad (preferentemente una serie consecutiva) de dispositivos no cromatográficos como por ejemplo aparatos de filtración y/o centrifugación, para usar con una pluralidad correspondiente (preferentemente una serie consecutiva) de pasos
30 cromatográficos, por ejemplo, pasos pre-cromatográficos.

En realizaciones preferidas, un proceso dentro del alcance de la presente invención comprende obtener una muestra que comprenda toxina botulínica de un cultivo de fermentación; someterlo a una cantidad de purificaciones pre-cromatográficas; y luego pasarlo a través de una pluralidad de columnas de cromatografía para obtener una toxina
35 botulínica libre de complejo altamente purificada y muy potente. Dicha toxina botulínica libre

- 5 purificada se usa en la preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden la toxina botulínica libre como ingrediente activo.

Los pasos generales tanto para los procesos pre-cromatográficos y cromatográficos para algunas realizaciones preferidas de la presente invención están ilustrados en la Figura 1A. A los fines de poder realizarse una comparación, la Figura IB muestra un método

10 convencional para obtener el complejo de la toxina botulínica purificada. Sucintamente, la Figura IB describe un proceso que supone una filtración de profundidad en un cultivo de fermentación, seguido de filtración de flujo tangencial del filtrado obtenido (mediante ultramicrofiltración de 300kD); seguido de un paso de clarificación por centrifugación. El precipitado (fracción insoluble) resultante del paso de centrifugación es luego re-suspendido

15 en cloruro de sodio y cargado en una columna de interacción hidrofóbica o de intercambio de iones. El paso de purificación cromatográfica se repite por lo menos tres veces para dar un eluyente final que contiene el complejo de la toxina botulínica tipo A de 900 kD.

Fermentación y precipitado ácido

Como ilustra la Figura 1A, la toxina botulínica libre de complejo generalmente es

20 purificada a partir de un cultivo de fermentación. Un “cultivo de fermentación” según se usa aquí se refiere a un cultivo o medio que comprende células, y/o componentes de las mismas, que son sintetizados y/o han sintetizado al menos una toxina botulínica. Por ejemplo, las bacterias *Clostridiales*, tal como la *Clostridium botulinum*, puede cultivarse en placas de gelosa en un ambiente que propicie el crecimiento bacterial, como por ejemplo una

25 atmósfera anaeróbica cálida. El paso por el cultivo generalmente permite obtener colonias Clostridiales con la morfología y otras características deseables. Las colonias cultivadas seleccionadas pueden luego fermentarse en un medio adecuado para servir como cultivo de fermentación. Las células cultivadas pueden incluir especies no clostridiales como células huésped, como por ejemplo *E. coli* o células de levadura que pueden biosintetizar una toxina

30 botulínica por medio de tecnología recombinante. Las condiciones adecuadas del cultivo de fermentación pueden depender de las células huésped usadas y son generalmente conocidas en el estado del arte.

En realizaciones preferidas, puede permitirse que la fermentación progrese hasta el final para que las células estén maduras y hayan sintetizado una toxina botulínica. El

5 crecimiento de cultivos de *Clostridium botulinum* se completa luego de aproximadamente 24
a 36 horas. Luego de un cierto período adicional de tiempo, las bacterias generalmente se
lisan y liberan al medio el complejo de toxina botulínica sintetizada en una forma compleja.
Por ejemplo, durante una fermentación de aproximadamente 60 a 96 horas, la mayoría de
las células de la bacteria *Clostridium botulinum* se someten a lisis y liberan el complejo
10 de toxina botulínica tipo A.

En algunas realizaciones, el cultivo de fermentación puede comprender uno o más
productos animales como por ejemplo proteínas animales usadas en procedimientos
convencionales de cultivos de fermentación. Por ejemplo, la toxina botulínica puede
producirse a través de la fermentación anaeróbica de la *Clostridium botulinum* usando una
15 versión modificada del conocido proceso de Schantz (Véase por ejemplo Schantz E. J., et al.,
Properties and use of *botulinum* toxin and other microbial neurotoxins in medicine,
Microbiol Rev 1992 March; 56(1):80-99; Schantz E. J., et al., Preparation and
characterization of *botulinum* toxin type A for human treatment, chapter 3 in Jankovic J, ed.
Neurological Disease and Therapy. Therapy with *botulinum* toxin (1994), New York, Marcel
20 Dekker; 1994, pages 41-49, and; Schantz E. J., et al., Use of crystalline type A *botulinum*
toxin in medical research, in: Lewis G E Jr, ed. Biomedical Aspects of Botulism (1981)
New York, Academic Press, pages 143-50, ambos incluidos en el presente para
referenciar). Tanto el proceso de Schantz como el proceso de Schantz modificado para
obtener una toxina botulínica usan productos animales, incluyendo un medio de carne cocida
25 Bacto derivado de animales en el vial de cultivo y caseína en los medios de fermentación.
Además, la técnica Schantz de purificación de toxina usa DNasa y RNasa de fuentes bovinas
para hidrolizar ácidos nucleicos presentes en el cultivo de fermentación.

Sin embargo, la administración de un producto farmacéutico que contenga un
ingrediente activo que fue purificado mediante un proceso que incluya productos derivados de
30 animales puede someter a un paciente a un riesgo potencial de recibir varios agentes
patógenos. Por ejemplo, puede haber priones en una composición farmacéutica que
comprende productos derivados de animales contaminantes, como por ejemplo el prión
responsable de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. Como ejemplo adicional, existe riesgo
de transmisión de una encefalopatía espongiforme (EE), como por ejemplo una encefalopatía
35 espongiforme bovina (EEB) cuando se usan productos animales en el proceso de preparación

5 de una composición farmacéutica. El uso de una toxina botulínica obtenida vía procesos libres de productos animales, sin embargo, reduce tales riesgos. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, la invención proporciona un proceso que se encuentra libre de productos animales, o esencial o sustancialmente libre de productos animales (LPA). "Libre de producto animal", "esencialmente libre de producto animal", o "sustancialmente libre de producto animal" abarcan, respectivamente, "libre de proteína animal", "esencialmente libre de proteína animal", o "sustancialmente libre de proteína animal" y ello significa respectivamente ausencia, ausencia esencial o ausencia substancial de productos derivados de animales, cuyos ejemplos sin limitación incluyen productos derivados de la sangre o reserva de sangre. El término "animal" se usa aquí en referencia a un mamífero (por ejemplo, un ser humano), un ave, reptil, anfibio, pez, insecto, araña u otra especie animal, pero excluye a los microorganismos, como bacterias y levaduras.

Un proceso libre de producto animal (o un proceso libre sustancial o esencialmente de producto animal) se refiere a un proceso que está total, substancial o esencialmente libre de productos, re-agentes y proteínas derivados de animales, como por ejemplo las inmunoglobulinas, otros productos, subproductos o digestas; productos cárnicos, subproductos de la carne, digestas de la carne; y leche o productos lácteos, subproductos o digestas. De acuerdo con ello, un ejemplo de un procedimiento de cultivo de fermentación libre de producto animal es un proceso de fermentación, como por ejemplo un cultivo bacteriano, que excluye sangre, carne y productos lácteos, subproductos y digestiones. Un proceso de fermentación libre de producto animal para obtener una toxina botulínica libre de complejo reduce la posibilidad de contaminación con virus, priones u otros agentes indeseables que pueden luego acompañar a la toxina cuando se administra a seres humanos.

Se describen los procedimientos de fermentación libres de producto animal usando cultivos *Clostridium*, por ejemplo, en las Patentes estadounidenses Nros. 7,452,697 y 7,354,740, incorporadas por medio del presente como referencia. Por ejemplo, el medio de crecimiento para la producción de la toxina botulínica puede comprender productos vegetales en lugar de productos derivados de animales, como por ejemplo productos de soja y/o la semilla desamargada de *Lupinus campestris*. Los medios de fermentación con base de soja para uso en un cultivo de fermentación libre de producto animal, por ejemplo,

5 puede comprender un producto de soja, una fuente de carbono como por ejemplo la glucosa, sales como por ejemplo NaCl y KCl, ingredientes que contengan fosfato como por ejemplo Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 , cationes divalentes como por ejemplo hierro y magnesio, polvo de hierro, aminoácidos como por ejemplo L-cisteína y L-tirosina y similares. Preferentemente, la soja es soja hidrolizada y la hidrolización ha sido realizada usando enzimas no derivadas de
 10 animales. Las fuentes de soja hidrolizada incluyen pero no se limitan a Hy-Soy (Quest International), Soy peptone (Gibco) Bac-soytone (Difco), AMISOY (Quest), NZ soy (Quest), NZ soy BL4, NZ soy BL7, SE50M (DMV International Nutritionals, Fraser, N.Y.), y SE50MK (DMV).

Como ilustra la Figura 1A, en ciertas realizaciones se obtiene una muestra que
 15 comprende la toxina botulínica de un cultivo de fermentación. Por ejemplo, después de un cierto período de fermentación, en cualquier medio libre de producto animal o libre de producto no animal, el complejo de toxina botulínica se libera al medio y puede cosecharse mediante precipitación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, como en el conocido proceso de Schantz, el medio de fermentación que comprende la toxina botulínica puede ser
 20 sometido a un precipitado ácido para alentar a que los complejos de toxina botulínica se asocien con restos celulares y formen un precipitado ácido. En algunas realizaciones especialmente preferidas, puede agregarse una solución de ácido sulfúrico de 3 M aproximadamente al cultivo de fermentación para formar el precipitado ácido. Preferentemente, el pH se reduce aproximadamente a 3 - 4, más preferentemente a 3,2 - 3,8
 25 aproximadamente, y aún más preferentemente a aproximadamente 3,5. En algunas realizaciones, la temperatura del cultivo también se reduce, por ejemplo, a aproximadamente por debajo de 25°C, 24°C, 23°C, 22°C, 21°C, o 20°C. Estas condiciones mejoran más la relación de los complejos de toxina botulínica con restos celulares. El precipitado ácido formado comprenderá complejos de toxina botulínica ligados y puede usarse como material
 30 inicial en otros pasos de purificación, como por ejemplo en pasos de clarificación; donde el filtrado se descarta.

Por el contrario, el proceso convencional que se muestra en la Figura 1B no incluye un paso de precipitación ácida. Es decir, mientras que el proceso de depuración también comienza con un cultivo de fermentación que comprende un complejo de toxina
 35 botulínica, el medio de cultivo está sometido a una filtración de profundidad, y es el

5 filtrado en vez de los restos celulares, lo que se usa en los siguientes pasos de purificación. En el proceso de la Figura 1B, se descartan los restos celulares en vez del filtrado, pro cuanto, como se muestra en la Figura 1A, el filtrado es descartado y los restos celulares (precipitado ácido) se usan para otros pasos de purificación, por ejemplo, en las purificaciones previas a la cromatografía discutidas a continuación.

10 *Purificaciones previas a la Cromatografía*

En algunas realizaciones, la muestra obtenida del medio de fermentación se somete a una o más purificaciones previas a la cromatografía. Estas purificaciones pueden incluir al menos una filtración de flujo tangencial, digestión con nucleasas, y centrifugación y/o filtración por clarificación. La Figura 1A proporciona un ejemplo no limitante de un flujo de proceso que contiene una purificación pre-cromatográfica contemplada por la invención. Como se observa, en realizaciones preferidas, los procedimientos pre-cromatográficos se realizan en un precipitado (o fracción insoluble) de un cultivo de fermentación que comprende la toxina botulínica, en vez de en el mismo cultivo de fermentación o en un filtrado derivado del mismo, como en el proceso ilustrado en la Figura 1B. Es decir, en realizaciones preferidas de la invención, los pasos pre-cromatográficos (clarificación) comienzan con el precipitado de ácido (fracción insoluble).

En algunas realizaciones, la muestra (precipitado ácido o fracción insoluble) que comprende una toxina botulínica se somete a una filtración de flujo tangencial. La filtración de flujo tangencial es un proceso generalmente usado para clarificar, concentrar y/o purificar proteínas. A diferencia de la filtración de flujo normal, donde el fluido se mueve directamente hacia una membrana de filtrado bajo presión, en la filtración de flujo tangencial, el fluido se mueve tangencialmente a lo largo de, o en paralelo a la superficie de la membrana. La presión aplicada sirve para forzar una porción del fluido a través de la membrana de filtrado, al costado de filtrado, mientras que las partículas y las macromoléculas demasiado grandes para pasar por los poros de la membrana son retenidas. A diferencia del filtrado de flujo normal, sin embargo, los componentes retenidos no se acumulan en la superficie de la membrana sino que son barridos por el fluido de flujo tangencial. En ciertas realizaciones preferidas, la filtración de flujo tangencial se usa para concentrar el material insoluble (restos celulares) con el cual el complejo botulínico está asociado, mientras permite que el filtrado pase por los poros de la membrana. (Véase, por ejemplo, la Figura 1A.) Los

5 parámetros de filtración de flujo tangencial, como por ejemplo el tamaño de los poros, el
flujo de alimentación, la presión aplicada, etc. pueden ser seleccionados por aquellos
capacitados en la técnica para concentrar restos celulares y producir una muestra más
concentrada que comprenda el complejo de toxina botulínica. En algunas realizaciones
especialmente preferidas, por ejemplo, puede usarse una filtración de flujo tangencial con
10 filtros que tengan un tamaño de poros de aproximadamente 0,1 μm .

En algunas realizaciones, la muestra que comprende una toxina botulínica está
sometida a digestión con nucleasas. La digestión con nucleasas puede facilitar la remoción de
los componentes de ácido nucléico con el cual tienden a relacionarse los complejos de toxina
botulínica. En ciertas realizaciones preferidas, la digestión con nucleasas sigue a la filtración
15 de flujo tangencial y es transportada en los restos celulares concentrados obtenidos a partir de
ella. (Véase, por ejemplo, la Figura 1A.) Por ejemplo, a la muestra de restos celulares
concentrados se le puede ajustar su pH para permitir la actividad de las nucleasas y puede
ser incubada con una o más nucleasas adecuadas, como por ejemplo las DNasas y/o
RNasas que digieren (hidrolizan) el ADN y/o el ARN, respectivamente. Dependiendo de la
20 enzima nucleasa usada, el pH adecuado puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente
7, preferentemente de aproximadamente 6. En algunas realizaciones, la benzamidina es usada
como un inhibidor de la proteasa para evitar la proteólisis de la toxina durante el paso de
digestión con nucleasas. La nucleasa usada puede derivar de cualquier fuente adecuada,
incluyendo fuentes animales y/o fuentes no animales.

25 En realizaciones más preferidas, la nucleasa se obtiene de una fuente no animal, para
obtener una nucleasa libre de producto animal y un proceso libre de producto animal. De
acuerdo con ello, la presente invención abarca procesos y sistemas libres de producto
animal (o sustancial o esencialmente procesos sistemas libres de producto animal) para
purificar la toxina botulínica que comprenden el uso de nucleasas. Una nucleasa libre de
30 producto animal puede producirse de manera recombinante, por ejemplo, usando bacterias
recombinantes, levaduras u otros microorganismos adecuados, que han sido transformados
para expresar una DNasa y/o RNasa para uso en un paso de digestión con nucleasas de
acuerdo con los procesos descritos en la presente. La digestión con nucleasas
generalmente reduce el contenido de ácido nucléico de la muestra, ya que los ácidos
35 nucléicos de las células huésped se degradan y su remoción se facilita. Por ejemplo, los

- 5 ácidos nucleicos hidrolizados y otras impurezas de bajo peso molecular pueden quitarse mediante pasos de purificación adicionales.

En ciertas realizaciones, la muestra que comprende la toxina botulínica puede estar sometida a clarificación por centrifugación y/o filtración. La clarificación por centrifugación o filtración se refiere a pasos de centrifugación o filtración usados para quitar elementos sucios, como por ejemplo células enteras y lisadas y restos celulares, de la muestra, dando como resultado una muestra más clara desde el punto de vista de su medición. En ciertas realizaciones, la centrifugación se realiza aproximadamente de 10.000xg a 30.000xg, con preferencia aproximadamente de 15.000xg a 20.000xg, y con mayor preferencia a aproximadamente 17.700xg. La filtración por clarificación generalmente comprenderá una filtración de flujo normal, también llamada filtración "sin salida", donde el fluido se mueve directamente hacia un medio de filtrado bajo presión, y las partículas demasiado grandes para pasar por los poros del filtro se acumulan en la superficie o dentro del medio mismo, mientras que las moléculas más pequeñas pasan al igual que el filtrado. En algunas realizaciones especialmente preferidas, la muestra se mezcla con sulfato de amonio y la filtración de flujo normal se realiza usando un filtro con un tamaño de poro de entre 0,1 y 0,3 μm aproximadamente, y con mayor preferencia un tamaño de poro de aproximadamente 0,2 μm . (Véase, por ejemplo, la Figura 1A.) En ciertas realizaciones especialmente preferidas, uno o más pasos de clarificación suceden al paso de la digestión con nucleasas. En algunas realizaciones aún más preferidas, uno o más pasos de clarificación preceden la purificación por cromatografía.

Particularmente, en realizaciones preferidas, el sobrenadante o filtrado clarificado proporciona la muestra que contiene la toxina botulínica para uso en pasos de purificación adicionales, como por ejemplo los pasos de purificación cromatográfica, en vez de la fracción insoluble, que se descarta. Esto se contrapone con el proceso esbozado en la Figura 1B, donde el complejo de toxina botulínica está contenido en la fracción insoluble de los pasos pre-cromatográficos que no involucran el precipitado ácido, como por ejemplo, un precipitado de centrifugación, obtenido de la centrifugación pre-cromatográfica, y el sobrenadante se descarta.

Sin embargo, y nuevamente en contraste con el proceso esbozado en la Figura 1B, los pasos cromatográficos en algunas realizaciones de la invención no requieren un paso de

5 filtración de flujo tangencial de un filtrado obtenido de cultivo de fermentación. Es decir que la muestra usada para la purificación cromatográfica en algunas realizaciones de la invención no se obtiene por el sometimiento de una fracción soluble del cultivo de fermentación a la filtración de flujo tangencial. Más bien, en ciertas realizaciones, la presente invención usa material insoluble (como por ejemplo un precipitado ácido), eliminando cualquier paso donde
 10 un filtrado de cultivo de fermentación es sometido a filtración de flujo tangencial en un intento por concentrar complejos solubles de toxina botulínica. De esta forma, en realizaciones preferidas, los pasos pre-cromatográficos de la invención eliminan la necesidad de cualquiera de tales pasos, usando en su lugar ácido para precipitar los complejos de toxina deseados con otro material insoluble (restos celulares).

15

Pasos de purificación cromatográfica

La Figura 1A también ilustra los pasos de purificación cromatográfica conforme a ciertas realizaciones de la presente invención. De conformidad con una realización de la invención, los métodos cromatográficos para purificar una toxina botulínica libre de complejo
 20 comprenden el paso de una muestra que comprende toxina botulínica a través de una pluralidad de columnas de cromatografía para obtener una forma libre de complejo altamente purificada y potente de la neurotoxina.

En ciertas realizaciones, se separa una toxina botulínica en complejo de otros componentes celulares utilizando una columna de interacción hidrofóbica (véase, *por*
 25 *ejemplo*, Figura 1A). Esta columna captura la toxina botulínica en forma en complejo, mientras permite que las impurezas fluyan a través de la columna. La columna utilizada puede ser cualquier columna de interacción hidrofóbica, conocida en el estado del arte, adecuada para tal fin, tal como la columna de Flujo rápido de butil-sefarosa o fenil-sefarosa HP, comercialmente disponible en GE Healthcare Life Sciences. En algunas realizaciones, el
 30 método también comprende el acondicionamiento de la muestra para la cromatografía de interacción hidrofóbica antes de cargarla en la columna. Por ejemplo, para el uso en la columna de Fenil-Sefarosa HP, la muestra puede combinarse con una solución de sulfato de amonio 0,5 M a pH 6, y fosfato 50 mM antes de la carga. Otras condiciones de columnas, buffers y pH que pueden utilizarse son las columnas como flujo rápido de Butil-Sefarosa con

- 5 sustitución alta, flujo rápido de Butil-Sefarosa con sustitución baja, Butil-Sefarosa y Octil-Sefarosa; los buffers tales como acetato, citrato, Ácido Metanosulfónico, histidina, piperazina y malonato, cada uno en el rango de pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,0, más preferentemente alrededor de 4,5 a alrededor de 6,5, e incluso más preferentemente alrededor de 5,5. Pueden determinarse otras condiciones de buffer y pH a fin de optimizar el
- 10 rendimiento de una columna específica utilizada, como se conoce en el estado del arte, sobre la base de la práctica provista en la presente. Sin ánimo de apegarse a la teoría, se cree que la separación implica la unión del complejo de la toxina a la resina a un pH inferior a 7, a fin de evitar la disociación en este paso, mientras permite que fluyan muchas impurezas derivadas de las células, tales como, por ejemplo, proteínas más pequeñas, ácidos nucleicos y demás.
- 15 Para eluir la toxina capturada (unida) de la columna de interacción hidrofóbica, puede utilizarse un buffer adecuado, como se conoce en el estado del arte. En algunas realizaciones especialmente preferidas, se utiliza un gradiente descendente de sulfato de amonio. El rango de concentración del gradiente descendente puede oscilar de aproximadamente 0,6 M a aproximadamente 0,0 M, de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 0,0 M, o de
- 20 aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 0,0 M. Otros buffers eluentes que pueden utilizarse incluyen, por ejemplo, gradientes descendentes de sulfato de sodio (Na_2SO_4); cloruro de sodio (NaCl); cloruro de potasio (KCl); acetato de amonio (NH_4OAc); y demás. Pueden identificarse las fracciones que contienen un pico de producto, como se conoce en el estado del arte. Por lo general, la fracción pico se encuentra, por ejemplo, cuando se utiliza sulfato de amonio,
- 25 en un rango de concentración de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 0,0 M; más preferentemente de alrededor de 0,3 M a alrededor de 0,0 M; y más preferentemente sulfato de amonio de alrededor de 0,25 M a alrededor de 0,0 M, mientras que el pH se conserva a 6, aproximadamente, a fin de mantener el complejo. Es decir, las fracciones que contienen el complejo de toxina botulínica eluido pueden identificarse y utilizarse en los pasos de purificación subsiguientes.
- 30 En las realizaciones preferidas, el complejo de toxina botulínica obtenido es disociado para dar una forma libre de complejo. En ciertas realizaciones preferidas, el paso de disociación se lleva a cabo luego del paso de cromatografía de interacción hidrofóbica y/o antes de los pasos de cromatografía subsiguientes (Véase, *por ejemplo*, la Figura 1A). De la misma forma, en algunas realizaciones preferidas, la presente invención abarca métodos y
- 35 sistemas en los que la molécula objetivo de cromatografía difiere de un paso cromatográfico a

5 otro. Es decir, en un paso cromatográfico inicial, el objetivo comprende un complejo de
toxina botulínica, mientras que en los pasos cromatográficos subsiguientes, el objetivo
comprende la toxina botulínica libre, disociada de proteínas no tóxicas como proteínas
hemaglutinina y no hemaglutinina. En comparación, el proceso descrito en la Figura IB
implica los pasos de cromatografía que están diseñados para purificar los complejos de toxina
10 botulínica.

La disociación del complejo de toxina botulínica para producir la proteína de
toxina botulínica libre de complejo puede lograrse de varias formas, *por ejemplo*, como
se conoce en el estado del arte y/o como se describe en la presente. Por ejemplo, la
disociación puede lograrse elevando el pH a aproximadamente 7,0; o, en realizaciones en
15 las que la purificación libre de proteína animal no sea necesaria, tratando el complejo
con glóbulos rojos a un pH de aproximadamente 7,3.

En una realización preferida y para proporcionar toxina libre de producto
animal, el complejo se somete a un proceso de separación basado en el ajuste del
pH del complejo en un buffer adecuado. Los buffers adecuados incluyen, a título
20 enunciativo, los buffers catiónicos, preferentemente aquellos que no interactuarán, o no
interactuarán de forma considerable, con la columna de intercambio aniónico. Los buffers
catiónicos adecuados incluyen, *por ejemplo*, Tris, bis-Tris, trietanolamina, N-metil dietanolamina. Un
pH de entre 7 y 8,4 aproximadamente; más preferentemente de entre 7,4 y 8,2 aproximadamente; y
más preferentemente un pH de aproximadamente 7,8 es, por lo general, adecuado para disociar el
25 complejo a fin de liberar la toxina botulínica libre de complejo. En algunas realizaciones especialmente
preferidas, por ejemplo, el pH del eluyente de la columna de interacción hidrofóbica se eleva a
aproximadamente 7,5, a 7,8 o preferentemente a aproximadamente 8,0. Por ejemplo, en algunas
realizaciones, el eluyente puede diluirse en un buffer Tris que tiene un pH de aproximadamente 7,8 para
que el complejo se disocie en componentes individuales, incluida la proteína de toxina botulínica libre
30 de complejo de 150 kD aproximadamente. La mezcla resultante que comprende los componentes
disociados luego puede someterse a uno o más pasos de purificación cromatográfica adicionales, tales
como los pasos cromatográficos de intercambio iónico, diseñados para capturar y, luego, purificar la
toxina libre de complejo.

En ciertas realizaciones, de acuerdo con la invención, la toxina botulínica libre de
35 complejo puede purificarse utilizando uno o más pasos cromatográficos de intercambio iónico

5 (Véase, *por ejemplo*, Figura 1A). La cromatografía de intercambio iónico logra el fraccionamiento basado en la carga electrostática. La medida en la que una proteína determinada se une a la matriz de la columna es en función de la carga neta de la proteína, basada en su composición aminoácida individual y la carga de la matriz de la columna. Las columnas de intercambio de iones catiónicos tienen una matriz con carga positiva neta, mientras que las columnas de intercambio de iones aniónicos tienen una matriz con carga negativa neta. Las proteínas unidas pueden eluirse de forma selectiva de la columna utilizando un solvente (el eluyente) que contenga una sustancia cargada, tales como iones de sal, que compite con el soporte de la matriz cargada para unirse a las proteínas cargadas. De ese modo, las proteínas unidas pueden fraccionarse sobre la base de la fuerza de su carga.

10

15 Como alternativa, las proteínas pueden eluirse mediante el ajuste del pH, que puede alterar la carga neta de la proteína, y así alterar su afinidad con la matriz cargada.

De conformidad con algunas realizaciones preferidas de la invención, la mezcla que comprende la toxina botulínica libre de complejo se carga en una columna de intercambio aniónico (*Véase, por ejemplo*, Figura 1A). En particular, esta columna captura la toxina botulínica en forma libre de complejo, de manera que la proteína tóxica y las proteínas no tóxicas disociadas pueden eluirse en fracciones separadas. La columna utilizada puede ser cualquier columna aniónica conocida en el estado del arte como adecuada para separar proteínas cargadas; ejemplos de las cuales son, a título enunciativo, Q-Sefarosa HP, flujo rápido de Q-Sefarosa o Q-Sefarosa XL, comercialmente disponibles en GE Healthcare Life Sciences. En algunas realizaciones especialmente preferidas, se utiliza una columna de Q-Sefarosa XL. En algunas realizaciones, el método también comprende el acondicionamiento de la mezcla que comprende la toxina botulínica libre de complejo para cromatografía de intercambio aniónica antes de cargarla en la columna. Por ejemplo, pueden determinarse condiciones de buffer y pH a fin de optimizar el rendimiento de la columna específica utilizada, como se conoce en el estado del arte, sobre la base de la práctica provista en la presente. Para carga y uso en la columna, *por ejemplo*, los buffers adecuados incluyen, a título enunciativo, los buffers catiónicos, los buffers preferentemente catiónicos que no interactuarán, o no interactuarán de forma considerable, con la columna de intercambio aniónico. Los buffers catiónicos adecuados incluyen, *por ejemplo*, Tris, bis-Tris, trietanolamina, N-metil dietanolamina. Para cargar y equilibrar la columna, puede usarse un pH de entre 7,2 y 8,6 aproximadamente; más preferentemente de

20

25

30

35

5 entre 7,4 y 8,2 aproximadamente; y más preferentemente un pH de alrededor de 7,8.

Para eluir la toxina capturada (ligada) y otros componentes disociados de la columna de intercambio aniónico, puede utilizarse un buffer adecuado, como se conoce en el estado del arte. Los ejemplos de buffers adecuados incluyen, entre otros, cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de potasio (KCl). En algunas realizaciones
10 especialmente preferidas, se utiliza un gradiente ascendente de cloruro de sodio. Por ejemplo, puede utilizarse un buffer de cloruro de sodio que tiene un rango de concentración de aproximadamente 0,0 M a aproximadamente 0,4 M NaCl, más preferentemente de alrededor de 0,0 M a alrededor de 0,5 M NaCl, e incluso más preferentemente de alrededor de 0,0 M a alrededor de 0,6 M NaCl. Las impurezas separadas en distintas fracciones pueden
15 incluir, *por ejemplo*, una o más proteínas no tóxicas del complejo disociado, tales como las proteínas hemaglutinina y/o no hemaglutinina no tóxicas. Pueden identificarse las fracciones que contienen una cresta de producto, como se conoce en el estado del arte. La cresta puede tener lugar, por ejemplo, a aproximadamente 8 mSem hasta aproximadamente 22 mSem, a un pH de entre aproximadamente 7,4 a aproximadamente 8,4, y preferentemente a
20 aproximadamente 7,8, que corresponde a aproximadamente 0,08 M a aproximadamente 0,18 M NaCl. A la inversa, pueden eluirse otras impurezas a aproximadamente 30 hasta aproximadamente 45 mSem, lo que corresponde a aproximadamente 0,25 M hasta aproximadamente 0,35 M NaCl.

Las fracciones que contienen la toxina botulínica libre de complejo eluida
25 pueden identificarse para brindar un eluyente que comprende una toxina botulínica libre de complejo.

La cresta puede identificarse por métodos, como se conoce en el estado del arte, por ejemplo, utilizando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), análisis por Western Blot, ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), electroforesis en gel de poliacrilamida con
30 dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) no reducida, y demás. El SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, por ejemplo, puede identificar la banda de la toxina de aproximadamente 150 kDa, mientras que otras impurezas aparecerán en bandas correspondientes a moléculas más pequeñas. Este eluyente que comprende una forma libre de complejo puede luego someterse a otros pasos de purificación cromatográfica.

5 En una realización especialmente preferida, la pureza de la toxina es evaluada mediante SDS-PAGE. Como el especialista calificado apreciará, el análisis de SDS-PAGE puede realizarse en ausencia o presencia de agentes que dividen enlaces disulfuros presentes en la proteína (es decir, condiciones no reductoras o reductoras, respectivamente). Por ejemplo, con respecto a la toxina botulínica tipo A, la forma madura y activa de la

10 molécula de la proteína de la toxina botulínica tipo A está comprendida por dos cadenas de polipéptidos de 100 kD y 50 kD, respectivamente, que se unen por medio de interacciones no covalentes, así como de un enlace disulfuro. Cuando la toxina botulínica tipo A producida por el proceso de invención se valora utilizando condiciones no reductoras, las moléculas de la proteína de la toxina botulínica tipo A migran como una banda de proteína individual de

15 aproximadamente 150 kD, y la pureza medida, por lo general, es mayor al 98%. Cuando la cantidad de proteína de toxina botulínica tipo A cargada por canal de gel se mantiene dentro del rango dinámico del densitómetro, luego habrá algunas pocas bandas de impureza detectables que resulten en una pureza medida del 100%. Cuando la toxina botulínica tipo A se sobrecarga de manera que la banda de toxina principal se encuentra por encima del rango

20 dinámico del densitómetro, entonces algunas bandas de impurezas menores pueden detectarse (tanto como el 1-2%).

Sin embargo, cuando el análisis de SDS-PAGE de la toxina botulínica tipo A se lleva a cabo bajo condiciones reductoras, entonces el enlace disulfuro de la toxina botulínica se rompe, y la proteína de la toxina botulínica tipo A migra como dos componentes que

25 tienen pesos moleculares de 100 kD y 50 kD, respectivamente. Cuando la proteína de la toxina botulínica tipo A se carga de manera tal que las especies principales se encuentran por encima del rango dinámico del densitómetro, y el SDS-page se ejecuta bajo condiciones de reducción, entonces las especies de impureza menores pueden detectarse con mayor facilidad. Por ejemplo, bajo estas condiciones, puede haber tanto como el 5% de las especies de 150 kD

30 presentes, debido al procesamiento proteolítico incompleto durante el proceso de fermentación y recuperación. Bajo estas condiciones, el proceso de invención origina un producto de toxina (compuesto por las cadenas de polipéptidos activas y divididas de 100 kD y 50 kD) que, por lo general, es mayor al 90% del total de proteínas, y más probablemente, mayor al 95% del total de proteínas. Por lo cual, la pureza medida informada de la toxina depende de los detalles del

35 método de SDS-PAGE empleado, como se describe en la presente. Asimismo, mientras que el ejemplo anterior concierne a la toxina botulínica tipo A, el especialista calificado

5 apreciará que el análisis de SDS-PAGE descrito en la presente puede adaptarse fácilmente para evaluar la pureza de otros serotipos de toxina botulínica.

En ciertas realizaciones, el eluente de la columna aniónica que comprende la toxina botulínica libre de complejo se carga en una columna de intercambio catiónico (*Véase, por ejemplo*, Figura 1 A). En particular, esta columna también captura la toxina botulínica en
10 forma libre de complejo, de manera que la proteína toxínica y las proteínas no toxínicas disociadas pueden eluirse en fracciones separadas. La columna utilizada puede ser cualquier columna catiónica, conocida en el estado del arte, adecuada para separar proteínas, ejemplos de las cuales incluyen, a título enunciativo, columna de sefarosa SP, incluido el flujo rápido de sefarosa SP HP o sefarosa SP, una columna mono S o una columna Source-S, tal como una
15 columna Source-30S, o preferentemente, una columna Source-15S, ambas comercialmente disponibles en GE Healthcare Life Sciences. En algunas realizaciones, el método también comprende el acondicionamiento del eluente de las columnas de intercambio aniónico que comprenden la toxina botulínica libre de complejo para cromatografía de intercambio catiónica antes de cargarla en la columna. En algunas realizaciones preferidas, el pH se
20 ajusta para que el pH del eluente que se carga en la columna permita una unión eficiente de la toxina libre en la columna. Por ejemplo, el pH puede mantenerse dentro de un rango de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 7,5, más preferentemente de alrededor de 6 a alrededor de 7, y más preferentemente de alrededor de 7. Además, en algunas realizaciones, el eluente de la
25 columna aniónica puede tratarse para reducir la conductividad antes de cargar a la columna de intercambio catiónico, *por ejemplo*, utilizando un buffer de fosfato de sodio, un ejemplo del cual es, a título enunciativo, un buffer de fosfato de sodio de aproximadamente 20 mM NaH_2PO_4 . Por ejemplo, el eluente de la columna aniónica puede contener tanto como 0,15 M NaCl, aproximadamente, para que la disolución en un buffer de alrededor de 20 mM
30 NaH_2PC_4 reduzca la conductividad. En algunas realizaciones específicas, las conductividad se reduce de aproximadamente 12 mSem a 3,3 mSem aproximadamente. La dilución en buffer, diálisis u otros métodos conocidos en el estado del arte también pueden utilizarse para reducir la conductividad.

Para la carga y el uso en la columna, *por ejemplo*, los buffers adecuados incluyen, a
35 título enunciativo, los buffers aniónicos, los buffers preferentemente aniónicos que no

5 interactuarán, o no interactuarán de forma considerable, con la columna de intercambio
 catiónico. Los buffers aniónicos adecuados incluyen, *por ejemplo*, el ácido metanosulfónico,
 HEPES, y demás, y preferentemente, el buffer de fosfato de sodio. Para cargar y equilibrar la
 columna, puede usarse un pH de entre 4 y 8 aproximadamente; preferentemente de entre 5 y
 7,5 aproximadamente; más preferentemente de 6 a 7 aproximadamente; y más
 10 preferentemente, un pH de alrededor de 6,8 a alrededor de 7.

Para eluir la toxina capturada (ligada) de la columna de intercambio catiónico de
 forma separada de otras proteínas no tóxicas disociadas y otras impurezas, puede utilizarse
 un buffer adecuado, como se conoce en el estado del arte. En algunas realizaciones
 especialmente preferidas, se utiliza un gradiente ascendente de cloruro de sodio. Un rango de
 15 concentración adecuado para el gradiente del cloruro de sodio puede ser de
 aproximadamente 0,0 M a aproximadamente 1 M NaCl. Otras sales que pueden utilizarse
 incluyen, *por ejemplo*, cloruro de potasio, que puede utilizarse a un gradiente de
 concentración de aproximadamente 0,0 M a aproximadamente 0,5 M KCl. Pueden
 identificarse las fracciones que contienen un pico de producto, como se conoce en el estado del
 20 arte. La cresta puede tener lugar, por ejemplo de aproximadamente 18 a aproximadamente 25
 mSem, lo que corresponde a aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 0,4 M NaCl, a un pH
 de aproximadamente 6,7. Es decir, las fracciones que contienen la toxina botulínica libre de
 complejo eluida pueden identificarse para brindar un eluyente de la columna catiónica que
 comprende una toxina botulínica libre de complejo. En realizaciones especialmente
 25 preferidas, el eluyente de la columna catiónica representa una toxina botulínica libre de
 complejo de alta pureza, en alto rendimiento y con alta actividad. Por el contrario, el proceso
 descrito en la Figura IB proporciona un complejo de toxina botulínica tipo A de 900 kD en el
 eluyente final.

30 *Producto de toxina botulínica libre de complejo purificada*

Los métodos y sistemas descritos en la presente son útiles para brindar una toxina
 botulínica libre de complejo de alta pureza, en alto rendimiento y con alta actividad. Véase el
 Ejemplo 1 a continuación. El producto también se estabiliza fácilmente y se utiliza de
 forma conveniente para la preparación de composiciones farmacéuticas seguras.

5 En algunas realizaciones preferidas, la toxina botulínica libre de complejo purificada es al menos pura en un 80%, aproximadamente, de manera preferida, al menos alrededor del 90% pura, más preferentemente al menos alrededor del 95% pura, incluso más preferentemente al menos alrededor del 98% pura, y más preferentemente, al menos alrededor del 99% pura, o hasta aproximadamente el 100% pura. "Toxina botulínica libre de complejo purificada" hace referencia a una molécula de proteína de toxina botulínica libre que se aísla, 10 o se aísla de forma considerable, de otras proteínas e impurezas, que pueden de otra forma acompañar a la toxina botulínica libre de complejo, obtenida de un proceso de cultivo o fermentación. Una toxina botulínica libre de complejo purificada que, por ejemplo, es "80% pura" hace referencia a una proteína de toxina botulínica libre de complejo aislada, o aislada de 15 forma considerable, donde la proteína tóxica comprende el 80% del total de proteínas presentes, según se determine por una metodología analítica adecuada o de otro tipo, ejemplos de las cuales se incluyen, a título enunciativo, SDS-PAGE, electroforesis capilar (CE) y HPLC. Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, el eluyente de la columna catiónica que comprende la toxina botulínica libre de complejo es al menos 20 aproximadamente 99% puro y contiene menos de aproximadamente el 1% de proteínas de células huésped, que no son las toxinas botulínicas de aproximadamente 150 kD originalmente presentes.

En algunas realizaciones preferidas, la toxina botulínica libre de complejo purificada tiene una actividad de al menos aproximadamente 150 LD₅₀ unidades/ng, 25 preferentemente al menos alrededor de 180 LD₅₀ unidades/ng, más preferentemente al menos alrededor de 200 LD₅₀ unidades/ng, incluso más preferentemente al menos alrededor de 210 LD₅₀ unidades/ng, y más preferentemente aún de al menos alrededor de 220 LD₅₀ unidades/ng. Una unidad de toxina botulínica se define como la dosis letal media (LD₅₀) al momento de la inyección intraperitoneal en ratones hembra Swiss Webster 30 que pesan aproximadamente 18-20 gramos cada uno. En otras palabras, una unidad de toxina botulínica es la cantidad de toxina botulínica que mata el 50% de un grupo de ratones hembra Swiss Webster. "Actividad" se utiliza de forma indistinta en la presente, con expresiones relacionadas "actividad biológica", "potencia" y "toxicidad" para describir la acción de una toxina botulínica.

35 En realizaciones preferidas, las toxinas botulínicas libres de complejo obtenibles

5 mediante procesos y sistemas descritos en la presente demuestran actividad biológica.

Es decir, en realizaciones preferidas, la actividad biológica o toxicidad del producto no se pierde mediante la purificación de acuerdo con las realizaciones preferidas de la presente invención, a pesar de que las proteínas no tóxicas asociadas de forma nativa con la proteína tóxica se eliminan durante la purificación. En realizaciones aún más preferidas, la potencia
10 obtenida mediante el uso de un conjunto determinado de procesos y parámetros dentro del alcance de la invención es constante y/o reproducible. Por ejemplo, la medición de la potencia puede realizarse con menos de aproximadamente el 40% de variabilidad, preferentemente menos del 35% de variabilidad, aproximadamente, más preferentemente menos de aproximadamente el 30% de variabilidad, aún más preferentemente menos de
15 aproximadamente el 25% de variabilidad, y lo más preferentemente, menos de aproximadamente el 20% de variabilidad.

En algunas realizaciones preferidas, el proceso de purificación produce la toxina botulínica libre de complejo en alto rendimiento. Por ejemplo, el rendimiento obtenido de 30 L de un cultivo de fermentación puede ser al menos de alrededor de 30 mg,
20 preferentemente al menos de alrededor de 40 mg, más preferentemente al menos de alrededor de 70 mg, aún más preferentemente al menos de alrededor de 80 mg, y más preferentemente al menos alrededor de 90 mg, lo que corresponde a un rendimiento de al menos aproximadamente 1 mg/L, preferentemente al menos alrededor de 1,3 mg/L, más preferentemente al menos de alrededor de 2,3 mg/L, aún más preferentemente al menos de
25 alrededor de 2,7 mg/L, y más preferentemente al menos de alrededor de 3 mg/L, respectivamente. En realizaciones aún más preferidas, el rendimiento obtenido mediante el uso de un conjunto determinado de procesos y parámetros dentro del alcance de la invención es reproducible. Por ejemplo, el rendimiento puede medirse con menos de aproximadamente el 40% de variabilidad, preferentemente menos del 35% de variabilidad, aproximadamente,
30 más preferentemente menos de aproximadamente el 30% de variabilidad, aún más preferentemente menos de aproximadamente el 25% de variabilidad, y más preferentemente, menos de aproximadamente el 20% de variabilidad.

En algunas realizaciones especialmente preferidas, la toxina botulínica libre de complejo purificada es estable durante la purificación con los procesos y sistemas descritos
35 en la presente. Se creía que la eliminación de proteínas no tóxicas asociadas de un complejo

5 de toxina botulínica, como el complejo de toxina botulínica tipo A, resulta en un producto de toxina botulínica notablemente inestable. No obstante, la presente invención brinda métodos y sistemas que pueden aislar de forma estable la toxina botulínica libre, sin proteínas no tóxicas asociadas que, de manera convencional, se creyeron necesarias durante el proceso de purificación para mantener la estabilidad, como se indicó con anterioridad.

10 En algunas realizaciones preferidas, los métodos y sistemas descritos en la presente producen una toxina botulínica libre de complejo que requiere muy pocos pasos posteriores a la cromatografía, *por ejemplo*, en términos de mantenimiento de la estabilidad durante el almacenamiento, y en términos de aplicabilidad a usos farmacéuticos. Por ejemplo, como se conoce en el estado del arte, el sulfato de amonio puede agregarse a la toxina botulínica libre para preparar una suspensión de sulfato de amonio para almacenamiento. La composición que comprende la toxina botulínica libre y el sulfato de amonio puede almacenarse fácilmente en un refrigerador y, luego, recuperarse de manera simple para su uso en aplicaciones farmacéuticas. Efectivamente, la estabilidad, el alto rendimiento y la pureza, así como la potencia alta y consistente de la toxina obtenible mediante métodos descritos en la presente facilitan el uso farmacéutico del producto purificado, como se describe en mayor detalle a continuación.

Usos de la toxina botulínica libre de complejo purificada

La toxina botulínica libre de complejo purificada, de conformidad con esta invención, puede utilizarse en la preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden la toxina como un ingrediente activo para la administración a cualquier sujeto que reciba el beneficio de dichas composiciones farmacéuticas. En realizaciones preferidas, los sujetos que recibirán tratamiento son mamíferos, preferentemente seres humanos. "Composición farmacéutica", como se utiliza en la presente, hace referencia a una fórmula en la que un ingrediente activo puede ser una toxina botulínica. La fórmula contendrá al menos un ingrediente adicional y será adecuada para la administración diagnóstica, terapéutica y/o cosmética para un sujeto, como un paciente humano. La composición farmacéutica puede ser líquida o sólida; y puede ser un sistema de componentes individuales o múltiples, por ejemplo, una composición liofilizada reconstituida con un diluyente, como la solución salina.

5 Otro aspecto de la invención estipula la administración de una molécula de toxina botulínica purificada a un paciente. "Administración" hace referencia en la presente al suministro de una composición farmacéutica a un sujeto o paciente. La composición farmacéutica puede administrarse mediante cualquier método conocido en el estado del arte, que incluye, *por ejemplo*, administración intramuscular (i.m.), intradérmica, 10 intranasal o subcutánea, administración intratecal, intracraneal, intraperitoneal (i.p.) o vías de administración tópica (transdérmica) e implante (*por ejemplo*, de un dispositivo de liberación lenta). En ciertas realizaciones preferidas, la toxina botulínica libre de complejo purificada se administra de manera tópica o mediante inyección en composiciones, según se describe en las Solicitudes de patente de los Estados Unidos N° 09/910,432; 10/793,138; 15 11/072,026; 11/073,307, 11/824,393, y 12/154,982, que se incorporan en la presente a modo de referencia en su totalidad.

En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden la toxina botulínica libre de complejo en una suspensión de sulfato de amonio pueden integrarse fácilmente a una composición farmacéutica. Por ejemplo, una suspensión de sulfato de amonio que 20 comprende una proteína de toxina botulínica libre de complejo puede centrifugarse para recuperar la proteína, y esta puede disolverse de nuevo, diluirse e integrarse con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender una toxina botulínica libre de complejo como un ingrediente farmacéutico activo, y además, puede comprender uno o más buffers, transportadores, 25 estabilizadores, conservantes y/o agentes volumétricos. Las composiciones farmacéuticas pueden liofilizarse para convertirlas en polvo para su almacenamiento y reconstituirse para uso futuro. De la misma forma, los procesos y sistemas descritos en la presente pueden suministrar una toxina botulínica en una forma particularmente adecuada para aplicaciones farmacéuticas en términos de facilidad de preparación.

30 La composición farmacéutica puede utilizarse en aplicaciones terapéuticas, diagnósticas, de investigación y/o cosméticas. Por ejemplo, como se indicó con anterioridad, la toxina botulínica tipo A se utiliza clínicamente para tratar afecciones neuromusculares caracterizadas por hiperactividad músculo-esquelética, tales como el blefaroespasma, el estrabismo, la distonía cervical y las arrugas de la zona glabellar (faciales). Asimismo, en 35 ciertas aplicaciones, la toxina botulínica libre de complejo (de aproximadamente 150 kD) es

5 la forma preferida para el tratamiento en seres humanos. Véase, *por ejemplo*, Kohl A., *et al.*,
Comparison of the effect of botulinum toxin A (Botox®) with the highly-purified
neurotoxin (NT 201) in the extensor digitorum brevis muscle test, *Mov Disord* 2000;
15(Supl. 3): 165. De la misma forma, ciertas composiciones farmacéuticas de toxina
botulínica se preparan preferentemente utilizando toxina botulínica libre de complejo, en
10 oposición a un complejo de toxina botulínica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Comparación del Proceso Inventivo con el Proceso de Schantz Modificado

Se compararon directamente purificaciones de una toxina botulínica libre de
15 complejo tipo A usando procesos dentro del alcance de la presente invención ('proceso
inventivo') con purificaciones basadas en el enfoque tradicional de Schantz y se modificaron
posteriormente mediante la incorporación de pasos cromatográficos para proporcionar la forma
libre de complejo (Proceso modificado de Schantz "). En poco tiempo, se cultivaron y
dejaron crecer bacterias *Clostridium botulinum* hasta que se completó la fermentación
20 (generalmente entre aproximadamente 72 y 120 horas desde la inoculación a la cosecha). Se
usó luego un volumen de 30 L de cultivo de fermentación en cada uno de los siguientes
procedimientos de purificación.

El proceso modificado de Schantz incluía la acidificación típica del cultivo de
fermentación para precipitar la toxina, seguido por ultramicrofiltración (UF) y diafiltración
25 (DF) para concentrar la toxina en bruto. Se agregaron DNasa y RNasa a la toxina cosechada
para digerir (hidrolizar) ácidos nucleicos, los que fueron luego quitados por un por un paso
de UF adicional usando filtración de flujo tangencial (300kD UF). La toxina fue luego
extraída con buffer de fosfato, seguido por tres pasos de precipitado secuencial: precipitado
con etanol frío; precipitado con ácido hidrociorídrico y precipitado con sulfato de amonio
30 donde los sobrenadantes en cada momento fueron normalmente descartados. Este
procedimiento proporcionó un complejo de toxina botulínica tipo A de 900 kD, que luego
fue sometido a pasos adicionales de cromatografía para obtener la toxina libre.
Específicamente, el complejo de la toxina fue resolubilizado y sometido a absorción

5 negativa en lotes en la resina DEAE. El eluyente fue luego tratado en una columna de intercambio aniónico de flujo por gravedad (DEAE-Sefarosa), seguido de una columna de intercambio catiónico de flujo por gravedad (CM-Sefarosa). Se determinó el rendimiento, se registró el lapso de tiempo que llevaba el proceso (sin contar el período de fermentación) y se midió la pureza de la toxina botulínica libre de complejo tipo A purificada mediante un análisis SDS-PAGE y se realizó un ensayo de potencia, por ejemplo, mediante las técnicas conocidas por las personas capacitadas en la técnica. Se repitió todo el proceso de Schantz modificado para tres lotes distintos, los lotes números 1, 2 y 3, y los resultados se registraron en el Cuadro 1 siguiente.

El proceso inventivo se usó con tres lotes diferentes, los lotes número 4, 5 y 6 de acuerdo con los sistemas y métodos descritos en la presente. Por corto tiempo, el cultivo de fermentación se sometió a la precipitación ácida usando 3M de ácido sulfúrico para reducir el pH a 3,5, a una temperatura por debajo de los 25°C. El precipitado ácido fue luego sometido a una filtración de flujo tangencial de 0,1 μm para concentrar la masa celular. El pH fue luego ajustado a 6 y se agregaron nucleasas para reducir el contenido de ácido nucléico de las células huésped, luego se realizó la clarificación y centrifugación para quitar restos celulares y una filtración sin salida a 0,2 μm con agregado de sulfato de amonio. El filtrado fue luego cargado directamente en la columna de interacción hidrofóbica, Fenil-Sefarosa HP (GE Life Sciences), eluido con un gradiente descendente de sulfato de amonio y la cresta del producto se aisló. El eluyente fue luego diluido con buffer Tris a pH 7,8 para disociar el complejo de la toxina, el que luego se cargó en la columna de intercambio aniónico Q XL (GE Lifesciences), se eluyó con un gradiente ascendente de cloruro de sodio, y nuevamente se juntó la cresta del producto. Este eluyente fue luego diluido en un buffer con fosfato de sodio (para reducir la conductividad) y cargado en la columna de intercambio aniónico, Sefarosa Q XL (para los lotes N° 4 y N° 5), o en la columna de intercambio catiónico, Fuente-S (GE Life Sciences) (para el lote N° 6), nuevamente eluido con un gradiente ascendente de cloruro de sodio, y se juntó y almacenó la cresta del producto final. Este proceso produjo la toxina botulínica libre de complejo tipo A. Se determinó el rendimiento, se registró la extensión del tiempo del proceso (sin contar el período de fermentación), y se midió la pureza de la toxina mediante el análisis SDS-PAGE y se realizó un ensayo de su potencia, por ejemplo, mediante técnicas conocidas por personas capacitadas en la técnica. Los resultados también se registraron en el Cuadro 1 siguiente.

Cuadro 1

	Proceso Modificado de Schantz			Proceso Inventivo		
Lote N°	1	2	3	4	5	6
Tiempo de proceso	10 días			4 días		
% de Pureza	99	n/a	97	98,6	95,3	100
Rendimiento (escala SOL)	11 mg	0 mg	4 mg	43 mg	99 mg	89 mg
Potencia (LD50 Unidades/ng)	255	n/a	173	259	252	250

Tal como indica el Cuadro 1, hubo una falla de lote con respecto al lote N° 2 en el proceso modificado de Schantz. El lote total falló dando un rendimiento cero. Hubo también una falla parcial de lote con respecto al lote N°3. Allí la falla ocurrió en el paso del precipitado ácido hidroclicóricu, pero algúnu producto fue rescatado del sobrenadante normalmente descartado. El producto rescatado fue reprocesado con un paso de desviación, responsable del rendimiento reducido observado en comparación con el lote N°1 (4 mg en comparación con 11 mg) y la potencia reducida observada se comparó con el lote N°1 (173 LD50 unidades/ng en comparación con 255 LD50 unidades/ng).

Con respecto a los lotes usados con el proceso de la invención, el lote N° 4 mostró un rendimiento reducido, en comparación con el lote N°5 por ejemplo (43 mg en comparación con 99 mg) debido a una falla del sistema cromatográfico, constituida por un alto lavado con sal de una columna. Con la falla, hubo una elusión prematura de una porción de la toxina, dando como resultado el rendimiento reducido observado, pero también una mayor pureza (98,6 % de pureza en comparación con 95,3% de pureza).

El lote N° 6 representa los resultados de una realización altamente preferida de los procesos y sistemas de la presente invención, donde una columna de intercambio catiónico se usó en el tercer paso cromatográfico. Como indica el Cuadro 1, esta realización dio como resultado una mejor pureza en comparación con el lote N°5 por ejemplo (100% de pureza en comparación con 95,3% de pureza), mientras que el alto rendimiento (89 mg en comparación con 99 mg) y la alta potencia (250 LD50 unidades/ng en comparación con 252 LD50 unidades/ng) se mantuvieron.

5 Como también indica el Cuadro 1, la longitud total de la parificación puede reducirse en realizaciones preferidas de la presente invención. Por ejemplo, el lote N°6 se purificó solamente en 4 días, en comparación con los 10 días que llevó purificar la toxina botulínica libre de complejo usando el método modificado de Schantz que incluía tres pasos cromatográficos adicionales luego del método convencional de Schantz.

10 Los resultados indican que los procesos y sistemas enseñados aquí pueden usarse para preparar altos rendimientos de una toxina botulínica libre de complejo, a una alta potencia y pureza, y sugieren que los métodos y sistemas descritos en el presente pueden encontrar uso en una purificación eficaz a gran escala e una toxina botulínica libre de complejo adecuada para ser usada, por ejemplo, como ingrediente activo en composiciones farmacéuticas.

15 Todas las referencias que incluyan solicitudes y publicaciones de patentes en el presente documento se incorporan como referencias en su totalidad y para todos los propósitos con el mismo alcance como si se indicara que cada publicación individual o patente o solicitud de patente fuera específica e individualmente incorporada por referencia en su totalidad para todos los fines. Pueden hacerse muchas modificaciones y variaciones a esta
20 invención sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para todas aquellas personas capacitadas en la técnica. Las realizaciones específicas descritas en la presente se ofrecen a modo de ejemplo solamente, y la invención estará limitada solamente por los términos de las reivindicaciones que se acompañan, conjuntamente con el alcance pleno de los equivalentes a los cuales dichas reivindicaciones otorgan derecho.

25

5 REIVINDICACIONES:

Lo que se reivindica es:

1. Un método para purificar una toxina botulínica libre de complejo, dicho método que comprende:

(i) proporcionar una toxina botulínica libre de complejo en bruto;

10 (ii) cargar la toxina botulínica libre de complejo en bruto en una columna de intercambio aniónico de manera que permita la captura de dicha toxina por parte de la columna de intercambio aniónico;

(iii) eluir la toxina botulínica libre de complejo de la columna de intercambio aniónico para producir un eluyente que incluya la toxina botulínica libre de complejo;

15 (iv) cargar una columna de intercambio catiónico con el eluyente de la columna de intercambio aniónico como para permitir la captura de la toxina botulínica libre de complejo por parte de la columna de intercambio catiónico; y

(v) eluir la toxina botulínica libre de complejo purificada de la columna de intercambio catiónico.

20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se obtiene la toxina botulínica libre de complejo en bruto mediante

la obtención de una muestra que contiene el complejo de la toxina botulínica;

la carga de una columna de interacción hidrofóbica con la muestra como para permitir la captura del complejo de la toxina botulínica por parte de la columna de
25 interacción hidrofóbica;

la elusión del complejo de la toxina botulínica de la columna cromatográfica de interacción hidrofóbica; y

la disociación del complejo de la toxina botulínica para obtener una mezcla que comprenda la toxina botulínica libre de complejo en bruto.

- 5 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque la muestra es un sobrenadante o un filtrado que contiene el complejo de la toxina botulínica.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en que la muestra se obtiene mediante: el sometimiento del cultivo de fermentación que contiene la toxina botulínica a una precipitación ácida para obtener un precipitado ácido; y
- 10 la realización de una filtración de flujo tangencial sobre el precipitado para concentrar el precipitado.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en que la muestra se obtiene sometiendo una fracción insoluble de un cultivo de fermentación a una filtración de flujo tangencial.
- 15 6. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en que la muestra es sometida a digestión con nucleasas antes de cargarla en la columna de interacción hidrofóbica.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en que la nucleasa deriva de un proceso libre de producto animal.
- 20 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en que el método es sustancialmente libre de producto animal.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en que la toxina botulínica libre de complejo purificada comprende al menos uno de los tipos de toxina botulínica tipo A, B, Ci, D, F, F y G.
- 25 10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en que la toxina botulínica libre de complejo purificada comprende una toxina botulínica tipo A.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en que la toxina botulínica libre de complejo purificada es pura al menos en un 95%.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en que la toxina botulínica libre de complejo purificada tiene una actividad de al menos 200 LD₅₀ unidades/ng.
- 30

- 5 13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en que el método produce un rendimiento de al menos aproximadamente 2 mg/ L de cultivo de fermentación.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en que la columna aniónica se selecciona de un grupo que consiste en una Sefarosa Q HP, una Sefarosa Q de flujo rápido y una columna de Sefarosa Q XL, y caracterizado porque la columna catiónica se
- 10 selecciona de un grupo que consiste en una columna Sefarosa SP, Sefarosa SP HP, Sefarosa SP de flujo rápido, Mono S, Fuente-S, Fuente-30S, y Fuente-15S.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en que un buffer para la carga de la toxina botulínica libre de complejo en la columna aniónica es seleccionada de un grupo que consiste en Tris, bis-Tris, trietanolamina, y N-metilo dietanolamina.
- 15 16. El método de acuerdo con la reivindicación 15 en que el buffer es usado a un pH de 7,4 a 8,2.
17. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en que un buffer para cargar la toxina botulínica libre de complejo en la columna catiónica se selecciona de un grupo que consiste en fosfato de sodio, MES y HEPES.
- 20 18. El método de acuerdo con la reivindicación 17 en que el buffer es usado a un pH de 6,0 a 7,0.
19. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en que el pH de la columna aniónica es de 7,4 a 8,2.
20. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en que el pH de la columna catiónica
- 25 es de 6,0 a 7,0.
21. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en que un gradiente para eluir la toxina botulínica libre de complejo de la columna aniónica se selecciona de un grupo que consiste en un gradiente ascendiente de cloruro de sodio y un gradiente ascendiente de cloruro de potasio.
- 30 22. El método de acuerdo con la reivindicación 21 en que el gradiente se usa a un pH de 7,4 a 8,4.

- 5 23. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en que un gradiente para eluir la
toxina botulínica libre de complejo proteico de la columna catiónica se selecciona de
un grupo que consiste en un gradiente ascendiente de cloruro de sodio y un gradiente
ascendiente de cloruro de potasio.
- 10 24. El método de acuerdo con la reivindicación 23 en que el gradiente se usa a un pH de
6,0 a 7,0.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporcionan métodos y sistemas para la purificación cromatográfica de una neurotoxina botulínica. Estos métodos y sistemas permiten la purificación eficiente de la forma libre de complejo de la neurotoxina botulínica en un alto grado de pureza y rendimiento que pueda usarse como ingrediente activo en preparaciones farmacéuticas.

Figura 1

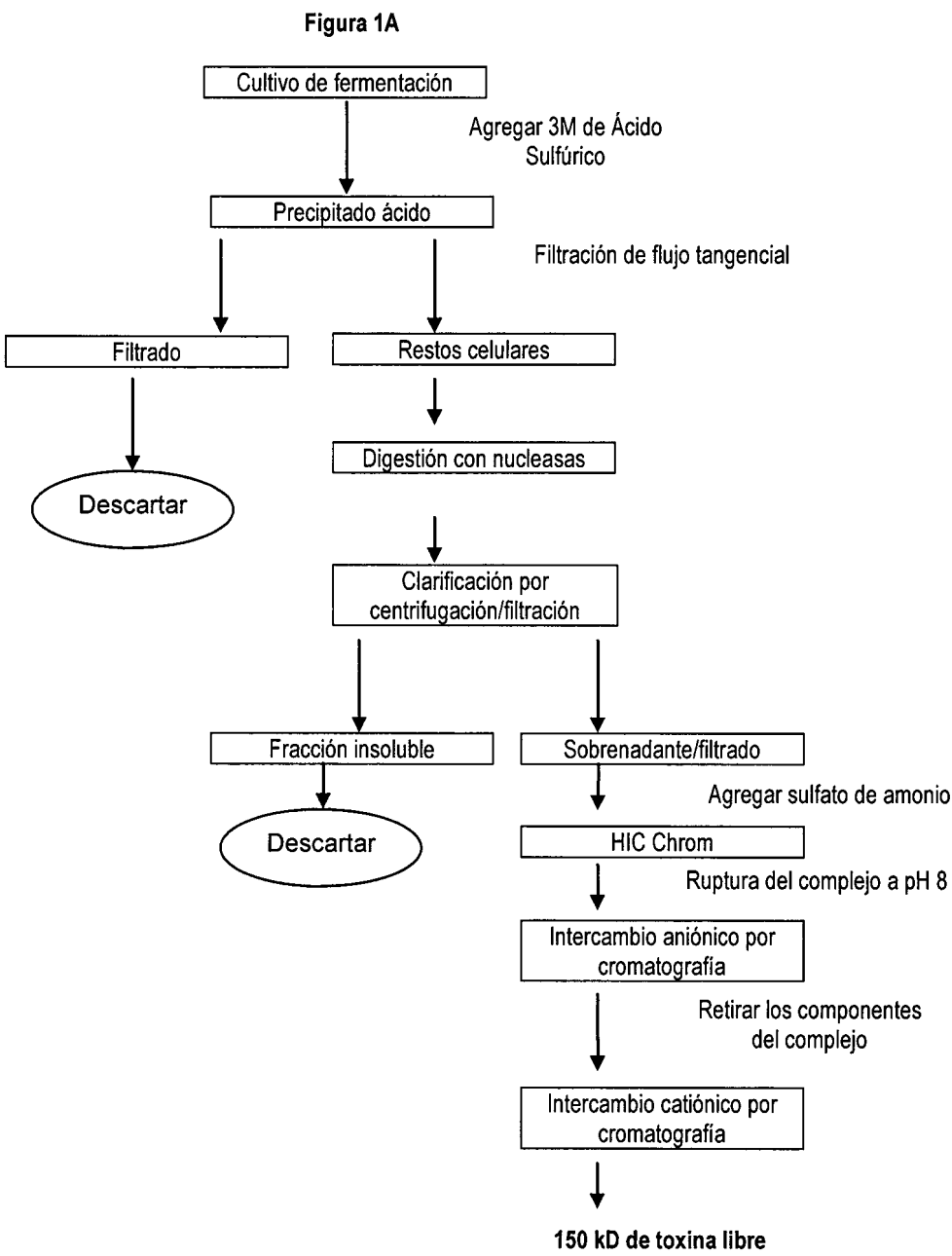
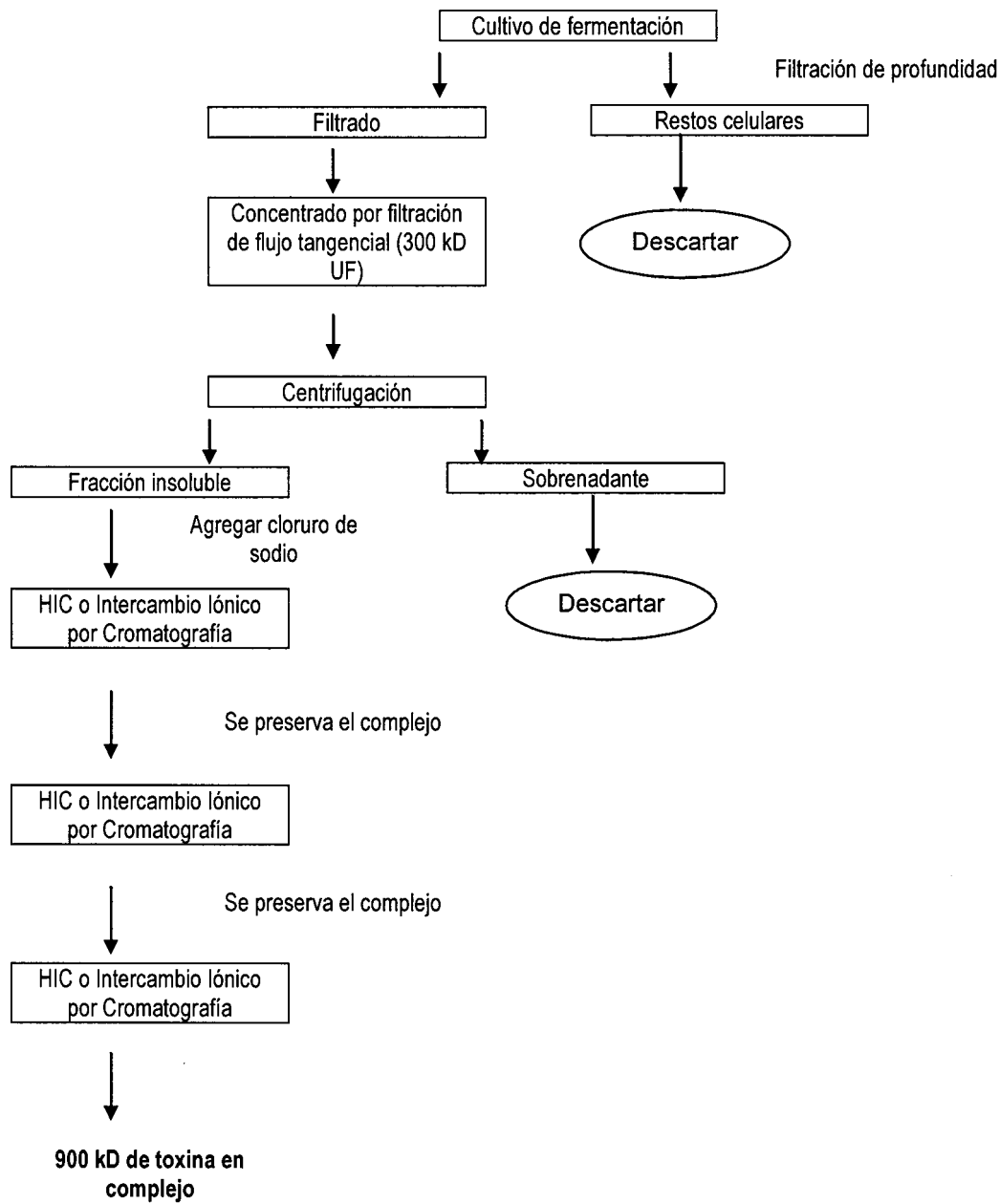


Figura 1B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/53389

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C02F 1/28; B01D 15/00 (2010.01) USPC - 210/681, 210/663, 530/412 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8)-C02F 1/28; B01D 15/00 (2010.01) USPC-210/681; 210/663; 530/412 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 210/683, 685, 660, 600; 530/350, 416, 415 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar botulinum toxin, purification, isolation, preparation, chromatography, ion exchange, cation exchange, anion exchange, hydrophobic interaction, filtration, ultrafiltration, tangential flow, tris, bis-tris, mes, phosphate, hepes, animal product free, nuclease		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/0228780 A1 (LUO et al.) 12 October 2006 (12.10.2006) (para [0042], [0070], [0093], [0094], [0194], [0200], [0253], [0257], [0262], [0293]-[0296], [0370]-[0376], [0415], [0442], [0461]-[0466], [0474], [0476], [0481], [0483], [0484])	1-5 and 8-24
Y		6, 7
Y	US 2004/0259197 A1 (Suppmann et al.) 23 December 2004 (23.12.2004) (abstract, paras [0029], [0031], [0033])	6, 7
Y	US 2005/0238669 A1 (XIANG et al.) 27 October 2005 (27.10.2005) (para [0058]-[0068], [0105]-[0115])	1-24
Y	US 2003/0008367 A1 (OGUMA) 09 January 2003 (09.01.2003) (para [0010], [0033])	1-24
Y	US 2007/0037257 A1 (SMITH et al.) 15 February 2007 (15.02.2007) (para [0016], [0122]-[0126])	1-24
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 December 2010 (08.12.2010)		Date of mailing of the international search report 17 DEC 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C02F 001/028	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) REVANCE THERAPEUTICS, INC.	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 61/253,810	(32) Fecha 21/10/2009	(33) País US
		(72) Inventor(es) CURTIS L. RUEGG	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 21/05/2012		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 28/04/2011
	Fecha de presentación de la solicitud: 20/10/2010		N° publicación: WO 2011/050072 A1
	No. de solicitud PCT/US2010/053389		
(54) Título: MÉTODOS Y SISTEMAS PARA PURIFICAR LA NEUROTOXINA BOTULÍNICA LIBRE DE COMPLEJO			

Resumen:

Se proporcionan métodos y sistemas para la purificación cromatográfica de una neurotoxina botulínica. Estos métodos y sistemas permiten la purificación eficiente de la forma libre de complejo de la neurotoxina botulínica en un alto grado de pureza y rendimiento que pueda usarse como ingrediente activo en preparaciones farmacéuticas.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0036570

Bogotá D.C., Abril 16 de 2012 - 08:28:54

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455953234	16/04/2012	48.143.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-070154- -00000-0000

Fecha: 2012-04-30 12:39:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59

Colo. 15861-841-008-4.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 16 de 2012 - 08:29:07

59

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0042085	
	Bogotá D.C., Abril 30 de 2012 - 12:20:00				
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	29367	23/03/2012		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	29368	23/03/2012		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	32548	02/04/2012		410.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
14 50005-01-01 SOLICITUDES	1657 REIVINDICACION ADICIONAL (UNITARIA A PARTIR DE LA UNDEC			30.000.00	420.000.00
					\$420.000.00
SON: **CUATROCIENTOS VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
					
No. 12-070164- -00000-0000					
Fecha: 2012-04-30 12:39:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Abril 30 de 2012 - 12:20:01					



No. 12-070154-00000-0000

Fecha: 2012-04-30 12:39:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILII

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐