

COMPOSICIÓN DE MEDIO PARA LA PREPARACIÓN DE TOXINA BOTULÍNICA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición de medio para la producción de toxina botulínica y, más específicamente, a una composición de medio para el cultivo de cepas de *Clostridium sp.* capaces de producir toxina botulínica. La composición de medio de la presente invención se caracteriza por contener peptonas vegetales, incluyendo peptona de trigo y peptona de guisante, D-(+)-glucosa y extracto de levadura.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se han descubierto una variedad de cepas de *Clostridium sp.* que secretan neurotoxinas desde la década de 1890, y la caracterización de las toxinas secretadas por estas cepas se ha llevado a cabo durante los últimos 70 años (Schant, EJ et al., Microbiol. Rev., 56:80, 1992).

Las neurotoxinas derivadas de las cepas de *Clostridium sp.*, es decir, las toxinas botulínicas, se clasifican en siete tipos (tipos A a G) dependiendo de sus propiedades serológicas. Cada una de las toxinas posee una proteína tóxica de aproximadamente 150 kDa y contiene de forma natural un complejo de varias proteínas no tóxicas. Un complejo mediano (300 kDa) está compuesto por una proteína tóxica y una proteína no tóxica no hemaglutinina, y complejo grande (450 kDa) y un complejo muy grande (900 kDa) están compuestos por el complejo mediano unido a la hemaglutinina (Sugiyama, H., Microbiol. Rev., 44:419, 1980). Tales proteínas hemaglutininas no tóxicas son conocidas por funcionar como protección de la toxina del pH bajo y de varias proteasas en los intestinos. La toxina se sintetiza en las células como un único polipéptido con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa y después, mediante la acción de una proteasa intracelular o el tratamiento con una enzima artificial como la tripsina, se escinde a un tercio del extremo N-terminal en dos unidades: una cadena ligera (L; peso molecular: 50 kDa) y una cadena pesada (H; peso molecular: 100 kDa). La toxina escindida tiene una toxicidad mucho mayor comparada con la del polipéptido original. Ambas unidades están enlazadas por una unión de disulfuro y tienen funciones diferentes. La cadena pesada se une a un receptor de una célula objetivo (Park. MK et al., FEMS Microbiol. Lett., 72:243, 1990) y funciona para interactuar con una biomembrana a pH bajo (pH 4) para formar un canal (Mantecuccio, C. et al., TIBS., 18:324, 1993), y la cadena ligera tiene actividad farmacológica e interfiere con la secreción de un neurotransmisor cuando las células han sido permeabilizadas usando

un detergente o la cadena ligera ha sido introducida en las células por, por ejemplo, electroporación (Poulain, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85:4090, 1988).

La toxina inhibe la exocitosis de acetilcolina en la presinapsis colinérgica de la unión neuromuscular, provocando astenia. Se creía que el tratamiento con cantidades muy pequeñas de la toxina producía toxicidad, lo que sugería que esta no tenía actividad enzimática (Simpson, LL et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 26:427, 1986).

Según un reporte reciente, la toxina tiene actividad metalopeptidasa y su sustrato está compuesto por sinaptobrevina, syntaxina, una proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa (SNAP25) y similares, que son las proteínas unitarias de un complejo de maquinaria de exocitosis. Cada tipo de toxina utiliza una de las tres proteínas descritas anteriormente como sustrato, y se sabe que las toxinas de tipo B, D, F y G escinden la sinaptobrevina en un sitio específico, las toxinas de tipo A y E escinden la SNAP25 en un sitio específico, y la toxina de tipo C escinde la syntaxina en un sitio específico (Binz, T. et al., J. Biol. Chem., 265:9153, 1994).

En particular, se sabe que la toxina botulínica tipo A es soluble en una solución acuosa diluida con un pH de 4,0 a 6,8. Se sabe que, a un pH de aproximadamente 7 o superior, se separa una proteína estable no tóxica de la neurotoxina, y como resultado la toxicidad se va perdiendo gradualmente. Particularmente, se sabe que la toxicidad disminuye a medida que aumentan el pH y la temperatura.

La toxina botulínica es mortal para los humanos incluso en pequeñas cantidades y se produce fácilmente en grandes cantidades. Por lo tanto, constituye una de las cuatro principales armas de bioterrorismo, junto con el *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* y el virus de la viruela. Sin embargo, se ha descubierto que, cuando se inyecta la toxina botulínica tipo A en una dosis que no afecta sistémicamente al cuerpo humano, puede paralizar la musculatura local alrededor del sitio de inyección. Basándose en esta característica, la toxina botulínica tipo A puede utilizarse en una amplia gama de aplicaciones, incluyendo agentes para eliminar arrugas, agentes para el tratamiento de la hemiplejía espástica y la parálisis cerebral, entre otros. Por lo tanto, la demanda de toxina botulínica tipo A ha aumentado y se están llevando a cabo activamente estudios sobre métodos de producción de toxina botulínica para satisfacer dicha demanda.

Un producto comercial típico actual es BOTOX® (un complejo de neurotoxina purificada de toxina botulínica tipo A) que está disponible comercialmente a través de Allergan, Inc., Estados Unidos. Un vial de 100 unidades de BOTOX® está compuesto por aproximadamente 5 ng de un complejo de toxina botulínica tipo A purificada, 0,5 mg de albúmina sérica humana y 0,9 mg de cloruro de sodio, se suministra en forma liofilizada y

se reconstituye con solución salina estéril sin conservantes (inyección de cloruro de sodio al 0,9%). Otros productos comerciales incluyen Dysport® (un complejo de toxina-hemaglutinina de *Clostridium botulinum* tipo A que contiene lactosa y albúmina sérica humana en una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica y se reconstituye con cloruro de sodio al 0,9% antes de su uso), disponible comercialmente a través de Ipsen Ltd., Reino Unido, y MyoBloc® (una solución inyectable con un pH de aproximadamente 5,6 que comprende toxina botulínica tipo B, albúmina sérica humana, succinato de sodio y cloruro de sodio), disponible comercialmente a través de Solstice Neurosciences, Inc.

Un medio de cultivo para una cepa de *Clostridium botulinum*, que se utiliza generalmente en un método para la producción de toxina botulínica descrito en la Patente Koreana No. 10-1339349, contiene componentes de origen animal. Por lo tanto, si un prión anormal de origen animal, conocido como agente causante de la encefalopatía espongiforme transmisible, se encuentra presente en los componentes animales debido a la contaminación, esto plantea problemas en el proceso de producción de la toxina botulínica. La encefalopatía espongiforme transmisible (TSE) es un tipo de trastorno neurodegenerativo que causa una grave degeneración neuronal. Algunos ejemplos son la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), la tembladera, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, el kuru, la encefalopatía transmisible del visón, la enfermedad del desgaste crónico y la encefalopatía espongiforme felina, entre otras, que afectan tanto a humanos como a animales. Se ha reportado que la BSE traspasa la barrera de especies y afecta incluso a los humanos.

El agente causante de la encefalopatía espongiforme transmisible se caracteriza por no ser inmunogénico y tener un largo período de incubación. El análisis post mortem de los cerebros de bovinos infectados con encefalopatía espongiforme bovina reveló la formación de un patrón único de vacuolas espongiformes en el cerebro, debido a la destrucción de neuronas y al depósito de fibras proteicas anormales.

Se cree que el patógeno causante de la encefalopatía espongiforme transmisible es una proteína infecciosa llamada prión anormal. A diferencia de los virus comunes, que requieren ácidos nucleicos, el prión anormal es una partícula infecciosa compuesta únicamente de proteína y que no contiene ácidos nucleicos. En el caso de las TSE, se sabe que cuando un prión anormal (PrP^{Sc}), que es una partícula infecciosa, se une a un prión normal (PrP^C), se convierte en un prión patógeno que se acumula en el cerebro (Prusiner SB, Alzheimer Dis Assoc Disord., 3:52-78, 1989).

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob es un trastorno neurodegenerativo poco frecuente, una encefalopatía espongiforme transmisible humana (TSE), donde el agente transmisible

es aparentemente una isoforma anormal de una proteína priónica. Una persona con la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob puede deteriorar una salud aparentemente perfecta a un mutismo acinético en tan solo seis meses. Por lo tanto, cuando una composición farmacéutica contiene un biológico, como la toxina botulínica, obtenido utilizando productos de origen animal, existe el riesgo de desarrollar una enfermedad mediada por priones, como la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. Por lo tanto, si una composición farmacéutica se prepara utilizando materias primas producidas con componentes de origen animal, existe el riesgo de que el paciente reciba varios patógenos o agentes infecciosos.

En consecuencia, se ha reportado que la adición de un hidrolizado de caseína (por ejemplo, hidrolizado de caseína certificado para TSE) a un medio libre de proteínas animales (APF) para prevenir la infección por TSE mejora la tasa de crecimiento de las cepas y la producción de toxina botulínica (Patente Coreana No. 17-1729251, etc.). Sin embargo, dado que el medio APF al que se ha añadido el hidrolizado de caseína todavía contiene caseína, que es un componente de origen animal, es necesario investigar para lograr altas tasas de crecimiento y una alta producción de toxinas de las cepas de *Clostridium botulinum* en un medio APF que no contenga componentes de origen animal.

En consecuencia, los presentes inventores han realizado grandes esfuerzos para desarrollar un medio que contiene peptonas vegetales que no causan riesgo de infección por TSE al cultivar cepas de *Clostridium botulinum* y que no contiene componentes de origen animal, con el fin de prevenir el riesgo de enfermedad mediada por priones, como se describió anteriormente. Como resultado, han descubierto que el medio puede mejorar la tasa de crecimiento de las cepas de *Clostridium botulinum* y la producción de toxinas de las cepas en comparación con los medios convencionales, completando así la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición de medio para el cultivo de cepas de *Clostridium botulinum* que no contenga componentes de origen animal. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para mejorar la producción de toxina botulínica mediante el cultivo de *Clostridium botulinum* en la composición de medio descrita anteriormente.

Solución técnica

Para lograr los objetos mencionados anteriormente, la presente invención proporciona una composición de medio para el cultivo de cepas de *Clostridium botulinum*, que contiene

peptonas vegetales, incluyendo peptona de trigo y peptona de guisante, D-(+)-glucosa y extracto de levadura, y no contiene componentes de origen animal.

La presente invención también proporciona un método para producir toxina botulínica, que comprende los pasos de: (a) producir toxina botulínica mediante el cultivo de *Clostridium botulinum* utilizando la composición del medio; y (b) recuperar la toxina botulínica producida.

Efectos ventajosos

Cuando se utiliza el medio de cultivo de acuerdo con la presente invención, que contiene peptonas vegetales, glucosa y extracto de levadura, y no contiene componentes de origen animal, para cultivar cepas de *Clostridium botulinum*, el medio puede aumentar la tasa de crecimiento de las cepas en comparación con los medios convencionales, e incrementar la producción de toxina botulínica mediante el cultivo de una manera segura de la cepa, ya que no contiene componentes de origen animal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra un diseño personalizado de JMP para determinar la proporción adecuada de peptonas vegetales utilizando tres peptonas vegetales (peptona de guisante, peptona de trigo y peptona de papas No. 2) como factores y un valor de OD_{540nm} de 3 o superior como respuesta.

La Figura 2 muestra los resultados de la evaluación del diseño mediante análisis de potencia del diseño personalizado y el gráfico de la fracción del espacio de diseño.

La Figura 3 muestra un medio que contiene componentes del medio APF.

La Figura 4A es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la tasa de crecimiento de una cepa de *Clostridium botulinum* a lo largo del tiempo en un medio APF que contiene dextrina como fuente de carbono, y la Figura 4B es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la tasa de crecimiento de una cepa de *Clostridium botulinum* a lo largo del tiempo en un medio APF que contiene glucosa como fuente de carbono.

La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la tasa de crecimiento de una cepa de *Clostridium botulinum* a lo largo del tiempo en 16 tipos diferentes de medios APF.

La Figura 6 muestra el análisis de distribución de los experimentos de diseño D-óptimo, y se puede observar que los resultados experimentales generalmente se distribuyen de manera uniforme.

La Figura 7 muestra el análisis de la matriz de diagramas de dispersión de los resultados del diseño D-óptimo, y se puede observar que la peptona de trigo y la peptona de guisante tienen una correlación positiva débil con la OD_{540nm} y la concentración de toxinas.

La Figura 8 muestra los resultados del análisis de valores atípicos, y se puede observar que no hay valores atípicos en los resultados experimentales.

La Figura 9 muestra el proceso para establecer un modelo de OD_{540nm} , y se puede observar que el valor VIF no supera 10 y está en el nivel 1, lo que sugiere que no hay ningún problema con el modelo y que todos los resultados de los residuos estudentizados están incluidos en el intervalo de confianza del 95%.

La Figura 10 muestra la fórmula de predicción para OD_{540nm} .

La Figura 11 muestra los perfiles de interacción de OD_{540nm} .

La Figura 12 muestra el proceso para establecer un modelo de OD_{540nm} , y se puede observar que el valor VIF no supera 10 y está en el nivel 1, lo que sugiere que no hay ningún problema con el modelo y que todos los resultados de los residuos estudentizados están incluidos en el intervalo de confianza del 95%.

La Figura 13 muestra la fórmula de predicción para la concentración de toxinas.

La Figura 14 muestra los perfiles de interacción.

La Figura 15 muestra el proceso de encontrar las condiciones del medio para la OD_{540nm} y la concentración de toxinas utilizando un perfilador de predicción basado en la fórmula de predicción para cada valor de respuesta.

Las Figuras 16A y 16B muestran la distribución de Y en Spec (Figura 16a) y el borde del análisis de falla (Figura 16b) después de realizar 5000 simulaciones en función de la variación aleatoria en los factores y el ruido del modelo utilizando la función del simulador.

La Figura 17 muestra el análisis de la capacidad del guisante con el rango correspondiente a 3σ establecido como NORs y el rango correspondiente a $4,5\sigma$ establecido como PARs.

La Figura 18 muestra el análisis de la capacidad del trigo con el rango correspondiente a 3σ establecido como NORs y el rango correspondiente a $4,5\sigma$ establecido como PARs.

La Figura 19 muestra los resultados del perfilador de contorno del medio APF, y se puede observar que, cuando se trazaron los NOR (3σ , línea roja) y los PAR ($4,5\sigma$, línea azul) en un gráfico de contorno, no excedieron el rango blanco, que es el rango que satisface el modelo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La Figura 20 muestra la curva de crecimiento de una cepa de botulismo en cada medio APF.

La Figura 21 muestra el nivel de expresión de la toxina para cada medio APF.

Mejor modo

Si bien un medio de cultivo libre de proteínas animales (APF) mostró una tasa de crecimiento mejorada para las cepas de *Clostridium botulinum* en comparación con los medios convencionales, es necesario añadir componentes que optimicen aún más el crecimiento de las cepas sin riesgo de infección, como la TSE. Recientemente, se ha añadido un hidrolizado de caseína (por ejemplo, hidrolizado de caseína certificado para TSE) que no se ha reportado que cause infección por TSE al medio APF para el cultivo de cepas y la producción de toxinas.

Sin embargo, el hidrolizado de caseína es un componente extraído de la leche, y la caseína representa aproximadamente el 80% de la proteína total que contiene. Si bien el medio APF que contiene hidrolizado de caseína no contiene componentes de origen animal como el suero fetal bovino (SFB), el hidrolizado de caseína en sí mismo es un componente de origen animal, y por lo que se necesita un medio altamente seguro para el cultivo de cepas de *Clostridium botulinum*, que contenga peptonas vegetales sin componentes de origen animal como el hidrolizado de caseína.

En consecuencia, la presente invención se refiere, en un aspecto, a una composición de medio para el cultivo de cepas de *Clostridium botulinum*, que contiene peptonas vegetales, incluyendo peptona de trigo y peptona de guisante, D-(+)-glucosa y extracto de levadura, y no contiene componentes de origen animal. En este contexto, “peptona vegetal” se refiere a la peptona extraída de trigo o guisante, y preferiblemente puede ser Millipore™ 96174 o Millipore™ 93492-500G-F, disponibles comercialmente, sin limitarse a ellas.

En la presente invención, el término “medio convencional” se refiere a un medio que contiene hidrolizado de caseína, extracto de levadura y tioglicolato, componentes de origen animal. Asimismo, el término “medio libre de proteínas animales (APF)” se refiere a un medio que no contiene proteínas de origen animal.

En un ejemplo de la presente invención, se prepararon medios APF que contenían varios ingredientes de medios de base vegetal, incluyendo peptona de guisante, peptona de trigo, peptona de papas No. 2, sólido de maceración de maíz, gluten de trigo, peptona de papa E210, polvo de plátano, jugo de tomate y extracto de malta, sin componentes de origen animal, en condiciones libres de encefalopatía espongiforme transmisible (TSE), y se compararon las tasas de crecimiento y los niveles de expresión de toxinas de la cepa en los medios. Como resultado, se pudo confirmar que los componentes del medio derivados de vegetales para el cultivo eficiente de la cepa de *Clostridium botulinum* incluían peptona

de guisante, peptona de trigo y peptona de papas No. 2, y en este caso, se confirmó que el crecimiento y la expresión de toxinas de la cepa fueron excelentes. Finalmente, como se muestra en las Tablas 4 y 5 a continuación y en la Figura 4. Se determinó que las peptonas vegetales contenidas en la composición final del medio seleccionado para el cultivo de la cepa de *Clostridium botulinum* eran peptona de guisante, peptona de trigo y peptona de papa.

En otro ejemplo de la presente invención, se prepararon medios APF que contenían peptona de guisante, peptona de trigo y peptona de papa en varias proporciones compositivas sin componentes derivados de animales en condiciones libres de encefalopatía espongiforme transmisible (TSE), y se compararon las tasas de crecimiento y los niveles de expresión de toxinas de la cepa en los medios. Como resultado, se pudo confirmar que la composición del medio para cultivar eficientemente la cepa de *Clostridium botulinum* contenía al menos una peptona vegetal seleccionada del grupo que consiste en peptona de trigo y peptona de guisante, además de una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa) y una fuente de nitrógeno (por ejemplo, extracto de levadura), y en este caso, el crecimiento y la expresión de toxinas de la cepa fueron excelentes. Finalmente, como se muestra en las Tablas 8 a 12 a continuación y en las Figuras 5 a 19, el contenido de peptonas vegetales en la composición final del medio seleccionado para el cultivo de la cepa de *Clostridium botulinum* fue de 18 g/L de peptona de guisante y 7 g/L de peptona de trigo.

En otro ejemplo de la presente invención, se realizó un experimento para comparar el patrón de crecimiento y la concentración de toxinas de la cepa de *Clostridium botulinum* cuando se cultivó en un medio APF que contenía la peptona vegetal final seleccionada de la presente invención y cuando se cultivó en un medio (Ejemplo comparativo 7) descrito en la Publicación de la Solicitud de Patente Coreana 10-2022-0140696, que se publicó antes de la presente invención. Como resultado, como se muestra en las Tablas 13 a 15 a continuación y en las Figuras 20 y 21, en el caso del medio de la presente invención, el valor de OD_{540nm} fue 7,1021 después de 28 horas de cultivo de la cepa de *Clostridium botulinum*, y luego el valor de OD disminuyó gradualmente, el valor de OD_{540nm} fue 5,5636 después de 48 horas, y la concentración de toxina en el sobrenadante de la toxina de *Clostridium botulinum* fue 588,8 µg (10 mL de medio de cultivo) después de 48 horas de cultivo. Mientras tanto, como se muestra en las Tablas 13 a 15 a continuación y en las Figuras 20 y 21, en el caso del medio del Ejemplo Comparativo 7, el valor de OD_{540nm} fue de 6,7739 después de 28 horas de cultivo de la cepa de *Clostridium botulinum*, y la concentración de toxina en el sobrenadante de la toxina de *Clostridium botulinum* fue de

263,7 µg (10 mL de medio de cultivo) después de 48 horas de cultivo, lo que sugiere que el nivel de expresión de la toxina disminuyó en un 55,2% en comparación con el caso del medio de la presente invención.

En otra modalidad de la presente invención, se realizó un experimento para comparar el patrón de crecimiento y la concentración de toxinas de la cepa de *Clostridium botulinum* entre el medio de la presente invención y los medios (Ejemplos comparativos 1 a 3) que además contienen monohidrato de hidrócloruro de L-cisteína y/o emulsión antiespumante médica C (Dow Corning®), que es/son el/los componente(s) compositivo(s) del medio descrito en la Publicación de la Solicitud de Patente Coreana No. 10-2022-0140696, además del medio de la presente invención. Como resultado, como se muestra en las Tablas 13 a 15 a continuación y en las Figuras 20 y 21, se puede confirmar que, en el caso de los Ejemplos Comparativos 1 a 3, el valor de OD_{540nm} fue menor que en el medio de la presente invención, y el nivel de expresión de toxinas después de 48 horas de cultivo disminuyó en 14,9 al 76,6% en comparación con el del medio de la presente invención.

En otro ejemplo de la presente invención, se realizó un experimento para comparar el patrón de crecimiento y la concentración de toxinas de la cepa de *Clostridium botulinum* entre el medio de la presente invención y medios (Ejemplos Comparativos 4 a 6) que contenían peptona de soja en lugar de peptona de guisante y/o peptona de trigo en el medio de la presente invención, y que además contenían monohidrato de hidrócloruro de L-cisteína y emulsión antiespumante médica C (Dow Corning®). Como resultado, tal como se muestra en las Tablas 13 a 15 y en las Figuras 20 y 21, se puede confirmar que, en el caso de los Ejemplos Comparativos 4 a 6, el valor de OD_{540nm} fue significativamente menor que en el medio de la presente invención, y el nivel de expresión de toxinas después de 48 horas de cultivo disminuyó entre un 87,0 y un 94,9% en comparación con el medio de la presente invención.

En la presente invención, la composición de medio para el cultivo de cepas de *Clostridium botulinum* puede contener al menos un componente derivado de vegetales seleccionado del grupo que consiste en peptona de guisante, peptona de trigo, peptona de papas No. 2, sólido de maceración de maíz, gluten de trigo, peptona de papa E210, polvo de plátano, zumo de tomate y extracto de malta, preferiblemente puede contener peptona de guisante, peptona de trigo y peptona de papas No. 2, y más preferiblemente puede contener peptona de guisante y peptona de trigo, sin limitarse a ello.

En el presente documento, los términos “peptona vegetal” o “hidrolizado vegetal” se refieren a los productos de la digestión de proteínas obtenidas de vegetal. Por ejemplo, la peptona de trigo (hidrolizado de trigo) se refiere al producto obtenido al digerir la proteína

total del trigo. Asimismo, el “hidrolizado de caseína” se refiere al producto de la digestión de la proteína caseína.

La digestión de la proteína vegetal o caseína se realiza preferiblemente mediante digestión parcial. Esta digestión se lleva a cabo preferiblemente mediante tratamiento ácido, básico, enzimático, a alta presión, térmico o físico; y, de forma más preferible, el hidrolizado de peptona o caseína vegetal puede tratarse enzimáticamente. El tratamiento físico consiste, por ejemplo, en la molienda.

El hidrolizado de peptona o caseína vegetal de la presente invención es un producto de degradación parcial de proteínas y está en forma de una mezcla que contiene no solo aminoácidos como moléculas individuales, sino también péptidos compuestos por varias o decenas de aminoácidos y moléculas de proteínas completas.

En la presente invención, el contenido de peptonas vegetales puede ser de 0,1 a 10% p/v (1 a 100 g/L), preferiblemente de 0,2 a 5 % p/v (2 a 50 g/L), más preferiblemente de 0,5 a 2 % p/v (5 a 20 g/L).

En la presente invención, el contenido de peptona de trigo puede ser de 0,1 a 4,0 % p/v (1 a 40 g/L), preferiblemente de 0,45 a 0,95 % p/v (4,5 a 9,5 g/L), preferiblemente de 0,48 a 0,92 % p/v (4,8 a 9,2 g/L), preferiblemente de 0,55 a 0,85 % p/v (5,5 a 8,5 g/L), más preferiblemente de 0,7 % p/v (7 g/L).

En la presente invención, el contenido de peptona de guisante puede ser de 0,1 a 3,5 % p/v (1 a 35 g/L), preferiblemente de 1,55 a 2,05 % p/v (15,5 a 20,5 g/L), preferiblemente de 1,58 a 2,03 % p/v (15,8 a 20,3 g/L), preferiblemente de 1,65 a 1,95 % p/v (16,5 a 19,5 g/L), más preferiblemente de 1,8 % p/v (18 g/L).

En la presente invención, la composición del medio para el cultivo de cepas de *Clostridium botulinum* no puede contener hidrócloruro de L- cisteína monohidrato y/o un agente antiespumante.

En el presente documento, el término “agente antiespumante” se refiere a una sustancia que previene total o parcialmente la formación de espuma y se utiliza indistintamente con “agente antiespumante”. El agente antiespumante puede incluir, sin limitarse a, un agente antiespumante de uso médico (Dow Corning®).

En la presente invención, la composición del medio para el cultivo de cepas de *Clostridium botulinum* puede contener una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno.

En la presente invención, la fuente de carbono puede ser un monosacárido (por ejemplo, glucosa, fructosa, etc.), un disacárido (por ejemplo, maltosa, sacarosa, etc.), un oligosacárido, un polisacárido (por ejemplo, dextrina, ciclodextrina, almidón, etc.) o un

alcohol de azúcar (por ejemplo, xilitol, sorbitol, eritritol, etc.), preferiblemente D-(+)-glucosa, sin limitarse a ello.

En la presente invención, el contenido de la fuente de carbono puede ser de 0,1 a 1,5 % p/v (1 a 15 g/L), preferiblemente de 0,25 a 1,5 % p/v (2,5 a 15 g/L), preferiblemente de 1,0 % p/v (10 g/L), sin estar limitado a ello.

Como se usa en el presente documento, el término “fuente de nitrógeno” se refiere a una sustancia orgánica o inorgánica que contiene átomos de nitrógeno esenciales para la síntesis de proteínas, purinas, pirimidinas y quitina (un polisacárido) en el crecimiento de las cepas. Preferiblemente, la fuente de nitrógeno es extracto de levadura, aunque no se limita a este.

En la presente invención, la fuente de nitrógeno puede ser extracto de levadura, polipeptona, triptona, extracto de malta, licor de maceración de maíz o soytone, preferiblemente extracto de levadura, sin limitarse a ello.

En la presente invención, el contenido de la fuente de nitrógeno puede ser de 0,5 a 2,0 % p/v (5 a 20 g/L), preferiblemente de 0,5 a 1,0 % p/v (5 a 10 g/L), preferiblemente 1,0 % p/v (10 g/L), sin estar limitado a ello.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir toxina botulínica, que comprende los pasos de: (a) producir toxina botulínica mediante el cultivo de *Clostridium botulinum* utilizando la composición del medio; y (b) recuperar la toxina botulínica producida.

En la presente invención, el cultivo puede realizarse en condiciones anaeróbicas, a una temperatura de entre 33 °C y 37 °C, durante 20 a 48 horas, y la toxina puede seleccionarse del grupo formado por las toxinas botulínicas A, B, C, D, E, F y G.

A continuación, la presente invención se describirá con mayor detalle mediante ejemplos. Estos ejemplos tienen como único fin ilustrar la presente invención, y resultará evidente para los expertos en la materia que el alcance de la misma no debe interpretarse como limitado por dichos ejemplos.

Ejemplo 1: Selección de peptonas vegetales

1-1: Composición del medio CYG utilizado para el cultivo (control)

El medio CYG (caseína, extracto de levadura y glucosa) para el cultivo de *Clostridium botulinum* se preparó disolviendo 2 % de hidrolizado de caseína [20 g/L], 1 % de extracto de levadura [10 g/L] y 1 % de glucosa [10 g/L] en 90 mL de agua destilada, ajustando el volumen final a 100 mL y dispensando alícuotas de 10 mL del medio preparado en tubos de cultivo de 15 mL. Posteriormente, el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 30 minutos y luego se mantuvo en condiciones anaeróbicas en una incubadora anaeróbica.

1-2: Composiciones de los medios APF utilizados para el cultivo

Como se muestra en las Tablas 1 y 2 a continuación, se añadieron 9 tipos de candidatos a peptona vegetal al 2% (Sigma™ C8160-500G, Millipore™ 96174, Millipore™ 93492-500G-F, Sigma-Aldrich™ G5004-500G, Millipore™ 38143-500G, Organotechnie™ 19425, Sigma-Aldrich™ B4032-500G, Sigma-Aldrich™ 17218-500G y Merck™ 1,05391,0500) [20g/L] a un extracto de levadura al 1% [10 g/L] y a una dextrina o glucosa al 1% [10 g/L], y luego se disolvieron en 90 ml de agua para inyección. Luego, se ajustó el volumen final a 100 mL y el pH de cada medio a 7,3. A continuación, se dispensaron alícuotas de 10 mL de los medios preparados en tubos de cultivo de 15 mL. Posteriormente, los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 30 minutos y se mantuvieron en condiciones anaeróbicas en una incubadora anaeróbica.

Tabla 1

Categoría	Medio (g/L)		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fuente de carbono	Dextrina		10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Glucosa										
Componentes derivados de plantas	Empanada de maíz	Maíz sólido de remojo	10								
	Guisante	Peptona de guisante		10							
	Gluten de trigo	Peptona de trigo			10						
		Gluten procedente del trigo				10					
	Papa	Peptona de papas No. 2					10				
		Peptona de papa E210						10			
	Plátano	Plátano en polvo							10		

	Tomate	Jugo de tomate								10	
	Malta	Extracto de malta									10
Fuente de nitrógeno	extracto de levadura		10	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabla 2

Categoría	Medio (g/L)		10	11	12	13	14	15	16	17	18
Fuente de carbono	Dextrina		10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Glucosa										
Componentes derivados de plantas	Empanada de maíz	Maíz sólido de remojo	10								
	Guisante	Peptona de guisante		10							
	Gluten de trigo	Peptona de trigo			10						
		Gluten procedente del trigo				10					
	Papa	Peptona de papas No. 2					10				
		Peptona de papa E210						10			
	Plátano	Plátano en polvo							10		
	Tomate	Jugo de tomate								10	
	Malta	Extracto de malta									10

Fuente de nitrógeno	Extracto de levadura	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
---------------------	----------------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

1-3: Cultivo de la cepa de *Clostridium botulinum*

Los tubos de cultivo que contenían las composiciones de medio 1 a 18 mostradas en las Tablas 1 y 2 anteriores se inocularon con 20 µL de *Clostridium botulinum* (Centro Coreano para el Control y la Prevención de Enfermedades, control No. 4-029-CBB-MF-2020001), y se tomaron muestras mientras la cepa se cultivaba en condiciones anaeróbicas a 35 °C ± 1 °C durante 20, 24, 28 y 48 horas. Posteriormente, se determinó la tasa de crecimiento de la cepa midiendo el valor de OD_{540nm} del cultivo muestreado en cada tiempo utilizando un espectrofotómetro UV, y el medio de cultivo se utilizó como blanco. Con base en el valor de OD_{540nm} medido, se seleccionaron candidatos a peptona vegetal para el medio por comparación con el control.

1-4: Tasa de crecimiento de la cepa

Entre los candidatos a peptonas vegetales, se excluyeron el extracto sólido de maíz, el polvo de plátano y el gluten de trigo debido a que formaban precipitados tras la esterilización del medio, lo que dificultaba el proceso de filtración y la medición precisa de la absorbancia a 540 nm. La composición de los medios que contenían los candidatos a peptonas vegetales se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Medio (g/L)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dextrina		10	10	10	10	10	10						
Glucosa								10	10	10	10	10	10
Guisante	Peptona de guisante	10						10					
Gluten de trigo	Peptona de trigo		10						10				
Papa	Peptona de papas No. 2			10						10			
	Peptona de papa E210				10						10		

Tomate	Jugo de tomate					10						10	
Malta	Extracto de malta						10						10
Extracto de levadura		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Se midieron los valores de OD_{540nm} de los cultivos muestreados en cada punto temporal para las composiciones de medio 1 a 12 que se muestran en la Tabla 3 anterior y dos medios de control (medio CYG) (Tabla 4), y se compararon los gráficos de los valores de OD_{540nm} de la fuente de carbono (dextrina o glucosa) de cada medio a lo largo del tiempo (Figura 4).

[Tabla 4]

Medio	Valor OD _{540nm} en el tiempo			
	20hr	24hr	28hr	48hr
1	1,8730	2,3500	3,2304	3,2722
2	1,8599	2,1685	2,5121	4,0037
3	1,4141	1,5862	2,0204	2,4978
4	1,4811	2,0280	2,3678	2,6301
5	1,0544	1,1912	1,3145	0,8669
6	1,1858	1,6250	1,8331	1,4966
7	2,2260	3,0544	3,7671	4,0443
8	2,3389	3,2501	3,6515	2,6177
9	1,5869	1,9006	1,9675	2,0508
10	1,2805	1,2364	1,1067	1,8789
11	0,9147	1,0896	1,1602	1,3564
12	1,0836	1,4444	1,6244	0,5030
Control 1	2,0969	2,8093	3,0028	2,3717
Control 2	1,1039	1,6976	2,0191	2,2898

Como resultado, tal como se muestra en la Tabla 4 anterior y en la Figura 4, se confirmó que la cepa mostró altas tasas de crecimiento comúnmente en los medios 1, 2, 3, 7, 8 y 9 que contienen componentes derivados de guisante, trigo y papa.

Además, se confirmó que, incluso utilizando las mismas peptonas vegetales derivadas de guisante, trigo y papa, la cepa mostró mayores tasas de crecimiento en los medios 7, 8 y

9 que contenían glucosa como fuente de carbono que en los medios 1, 2 y 3 que contenían dextrina. En particular, se confirmó que, en el caso de los componentes derivados del trigo, la cepa tendía a crecer incluso 48 horas después de la inoculación en el medio 2 que contenía dextrina (Figura 4). Esta tendencia de crecimiento podría retrasar innecesariamente el tiempo de producción de la solución madre en el futuro, lo que sugiere que el uso de glucosa como fuente de carbono para el medio es adecuado.

1-5: Concentración de toxina botulínica

Se midieron las cantidades de proteína de toxina en los medios 1, 2, 3, 7, 8 y 9, que mostraron altas tasas de crecimiento de la cepa en los Ejemplos 1-4. Dado que estudios previos recuperan toxinas durante la fase de muerte, las concentraciones de toxina se midieron mediante el método ELISA para el análisis cuantitativo del medio de cultivo de toxina botulínica tipo A a las 28 y 48 horas, que son las últimas partes del cultivo, y los resultados se muestran en la Tabla 5 a continuación (directriz ICH, Q2(R1)).

La antitoxina se diluyó y se dispensó en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, que luego se recubrió durante 16 horas o más. Se retiró el contenido de la placa, se bloqueó cada pocillo con solución de bloqueo y luego se lavó la placa tres veces con tampón de lavado. El estándar y el cultivo se diluyeron y se dispensaron en cada pocillo por triplicado, y la placa se incubó y luego se lavó tres veces con tampón de lavado. Se dispensó la solución de dilución del anticuerpo primario en cada pocillo, y la placa se incubó y luego se lavó tres veces con tampón de lavado. Se dispensó la solución de sustrato en cada pocillo y se incubó, y luego se dispensó la solución de parada en cada pocillo para detener la reacción. La absorbancia se midió en longitudes de onda de 450 a 540 nm.

Tabla 5

Medio	Componente derivado de plantas o animales	Fuente de carbono	Concentración de toxina (ng/mL)	
			28 horas	48 horas
Control (CYG)	Caseína	Glucosa	17826,0	20007,7
1	Guisante	Dextrina	11716,8	6676,7
2	Trigo		4294,4	5703,5
3	Papa		14732,2	9945,9
7	Guisante	Glucosa	20775,2	11772,9
8	Trigo		5135,8	17415,1
9	Papa		14440,7	16602,9

Como resultado, tal como se muestra en la Tabla 5, los niveles de expresión de la toxina fueron más altos en el siguiente orden: guisante, papa y trigo. Además, se confirmó que, al utilizar las mismas peptonas vegetales, los niveles de expresión de la toxina en los medios que contenían glucosa como fuente de carbono fueron superiores a los del medio que contenía dextrina, y que el uso de glucosa como fuente de carbono para el medio de producción de la toxina de la cepa *Clostridium botulinum* fue más adecuado.

Basándose en los resultados experimentales del Ejemplo 1, se seleccionaron tres peptonas vegetales como candidatas finales: peptona de guisante, peptona de trigo y peptona de papa (peptona de papas No. 2).

Ejemplo 2: Selección de la proporción de peptonas vegetales

2-1: Método para la selección de la proporción de peptonas vegetales

Para seleccionar la proporción de los tres candidatos a peptonas vegetales finalmente seleccionados en los Ejemplos 1-4 y 1-5, se utilizó un diseño personalizado de JMP para establecer el valor de OD_{540nm} como respuesta en 3 o más y la proporción de las tres peptonas vegetales como factores en 2% o menos. Además, de la misma manera que en los Ejemplos 1-1 y 1-2, la proporción de cada una de las fuentes de carbono y el extracto de levadura se fijó en 1% y el experimento se realizó por duplicado para cada condición de medio (Figura 1; Peptona 1: peptona de guisante; Peptona 2: peptona de trigo; Peptona 3: peptona de papa).

Para la evaluación del diseño, se realizó un análisis de potencia y se examinó la fracción del espacio de diseño (Figura 2; Peptona 1: peptona de guisante; Peptona 2: peptona de trigo; Peptona 3: peptona de papa).

El diseño experimental para los valores de OD_{540nm} de acuerdo con la proporción de peptonas vegetales obtenidas a través de un diseño personalizado se muestra en la Tabla 6 a continuación, y la concentración de toxina después de la finalización del cultivo bajo cada condición se midió y se agregó a los elementos de análisis (Peptona 1: peptona de guisante; Peptona 2: peptona de trigo; Peptona 3: peptona de papa).

Tabla 6

	Peptona 1	Peptona 2	Peptona 3	OD540nm
1	10	20	0	*
2	10	0	10	*
3	20	10	0	*
4	10	0	0	*

5	10	10	20	*
6	0	10	0	*
7	0	0	0	*
8	20	20	0	*
9	0	20	20	*
10	0	20	10	*
11	20	20	20	*
12	20	0	0	*
13	20	0	20	*
14	0	20	0	*
15	20	10	10	*
16	0	0	20	*

2-2: Composiciones de los medios APF utilizados para el cultivo

Como se muestra en la Tabla 7 a continuación, a una solución de glucosa al 1% [10 g/L] como fuente de carbono y extracto de levadura al 1% [10 g/L], se le añadieron tres peptonas vegetales al 2% [10 g/L]. Cada una de las mezclas se disolvió en 90 mL de agua para inyección, y el volumen final se ajustó a 100 mL. A continuación, se dispensaron alícuotas de 10 mL del medio preparado en tubos de cultivo de 15 mL, respectivamente. Posteriormente, los medios se esterizaron en autoclave a 121 °C durante 30 minutos y luego se mantuvieron en condiciones anaeróbicas en una incubadora anaeróbica.

Tabla 7

	Composición de medio (g/L)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Fuente de carbono	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
extracto de levadura	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Peptona de guisante	10	10	20	10	10	0	0	20	0	0	20	20	20	0	20	0

Peptona de trigo	20	0	10	0	10	10	0	20	20	20	20	0	0	20	10	0
Peptona de papa	0	10	0	0	20	0	0	0	20	10	20	0	20	0	10	20

2-3: Cultivo de la cepa de *Clostridium botulinum*

Los tubos de cultivo que contenían las composiciones de medio 1 a 16 mostradas en la Tabla 7 anterior se inocularon con 20 µL de *Clostridium botulinum* (Centro Coreano para el Control y la Prevención de Enfermedades, control No. 4-029-CBB-MF-2020001), y se tomaron muestras mientras la cepa se cultivaba en condiciones anaeróbicas a 35 °C ± 1 °C durante 20, 24, 28 y 48 horas. Posteriormente, se determinó la tasa de crecimiento de la cepa midiendo el valor de OD_{540nm} del cultivo muestreado en cada tiempo utilizando un espectrofotómetro UV, y el medio de cultivo se utilizó como blanco. Con base en el valor de OD_{540nm} medido, se seleccionaron los candidatos a peptonas vegetales para el medio por comparación con el control. Con base en el valor de OD_{540nm} medido, se seleccionó la proporción de adición de peptonas vegetales para el medio.

2-4: Tasa de crecimiento de la cepa

Se midieron los valores de OD_{540nm} de los cultivos muestreados en cada punto temporal para las composiciones de medio 1 a 16 que se muestran en la Tabla 7 anterior (Tabla 8), y los gráficos de los valores de OD_{540nm} se compararon los resultados a lo largo del tiempo para cada medio (Figura 5).

Tabla 8

Medio	Valor OD _{540nm} en el tiempo			
	20hr	24hr	28hr	48hr
1	4,2407	6,0792	6,6703	7,6256
2	2,9021	3,1707	3,7849	4,5212
3	4,3292	5,5489	6,7432	5,1707
4	2,3007	2,6335	3,6120	3,9954
5	3,3414	4,4627	4,8113	4,5013
6	2,2590	2,8932	3,7034	3,1049
7	0,2857	0,1835	1,1849	0,6199
8	4,2728	6,7621	8,1035	4,7047
9	4,2576	4,2045	5,4406	5,8829
10	3,3709	3,7021	5,1411	4,3266

11	5,1641	5,6140	6,6381	2,2498
12	3,7988	4,7715	5,9342	4,2629
13	5,3545	5,1057	6,5547	2,0944
14	2,8511	3,3602	3,7440	4,6341
15	4,8876	3,4032	5,8843	5,2539
16	2,2215	2,8578	2,7791	3,8910

2-5: Análisis de los resultados del Diseño de Experimentos (DoE)

Para las composiciones de medio 1 a 16 mostradas en la Tabla 7 anterior, se utilizó el valor de OD_{540nm} a las 24 horas, que es el tiempo de cultivo inicial en estudios previos sobre *Clostridium botulinum*, para el análisis, y dado que la toxina se recupera durante la fase de muerte, se utilizó la cantidad de proteína de toxina, el valor medido por ELISA a las 48 horas para la cantidad de proteína de toxina (Tabla 9). Con base en estos valores, los resultados se analizaron estadísticamente utilizando JMP.

Tabla 9

	Guisante	Trigo	Papa	OD a 24hr	Toxina a 48hr
1	10	20	0	6,0792	42041,2
2	10	0	10	3,1707	56296,2
3	20	10	0	5,54885	64887,3
4	10	0	0	2,6335	44518,3
5	10	10	20	4,46265	44377,2
6	0	10	0	2,89315	35791,2
7	0	0	0	0,18351	16789
8	20	20	0	6,7621	56713,4
9	0	20	20	4,2045	19848,6
10	0	20	10	3,7021	34152,4
11	20	20	20	5,61395	34592,6
12	20	0	0	4,7715	50099,6
13	20	0	20	5,10565	49023,4
14	0	20	0	3,36015	20371,4
15	20	10	10	3,4032	35153,9
16	0	0	20	2,8578	25383,1

Mediante el análisis de distribución de los resultados para cada condición, como se muestra en la Tabla 9 anterior, se confirmó que el diseño experimental era D-óptimo y que los resultados experimentales estaban generalmente distribuidos de manera uniforme (Figura 6).

Según el análisis de la matriz de diagramas de dispersión, todos los valores de correlación fueron de 0,75 o inferiores, lo que indica una correlación débil. Los valores de R entre las variables X (guisante, trigo y papa) fueron cercanos a 0, lo que indica una correlación muy débil, por lo que no hubo interacción. Se confirmó que existía una correlación positiva débil entre las variables Y (OD_{540nm} y concentración de toxina), entre el guisante y la variable Y, y entre el trigo y el valor de OD_{540nm} (Figura 7). El análisis de valores atípicos confirmó que no había valores atípicos en los resultados experimentales (Figura 8).

2-6: Análisis del valor de OD_{540nm} en función del tipo de peptona vegetal

Se estableció un modelo de ajuste basado en los resultados del análisis del valor de OD_{540nm} en función del tipo de peptona vegetal. El modelo se estableció mediante el método de apalancamiento de efectos utilizando mínimos cuadrados, y las variables X se analizaron mediante el método de superficie de respuesta. Para seleccionar el modelo óptimo, se consideraron conjuntamente el valor de R cuadrado y el valor de RMSE, y tras comprobar el resumen del efecto y el valor p de la prueba de efecto, se eliminaron los términos que no resultaron significativos.

Como resultado de comprobar el valor VIF del modelo óptimo establecido, se confirmó que no superaba 10 y se encontraba en el nivel 1, lo que indica que el modelo no presentaba ningún problema. En el análisis de residuos, se confirmó que los puntos estaban distribuidos uniformemente hacia arriba y hacia abajo, y que todos los resultados de los residuos estudentizados se encontraban dentro del intervalo de confianza del 95 % (Figura 9).

Como resultado de identificar los factores que influyen significativamente en el modelo mediante los resultados de la prueba de efectos, se observó que el guisante y el trigo tenían un efecto sobre el modelo (Tabla 10). Se obtuvo una fórmula de predicción para la absorbancia a 540 nm utilizando este modelo (Figura 10). Al examinar los perfiles de efectos principales e interacciones, se confirmó la existencia de interacciones entre el guisante y la papa, y entre el trigo y la papa, pero no entre los demás factores (Figura 11).

Tabla 10

Pruebas de efecto

Fuente	Nparm	DF	Suma de cuadrados	Tasa F	Prob > F
Guisante	1	1	19,476398	42,6410	0,0006*
Trigo	1	1	12,520622	27,4122	0,0019*
Papa	1	1	0,147585	0,3231	0,5904
Guisante* Guisante	1	1	0,695719	1,5232	0,2633
Guisante*Trigo	1	1	0,789833	1,7292	0,2365
Trigo*Trigo	1	1	0,170263	0,3728	0,5639
Guisante*Papa	1	1	2,003438	4,3863	0,0811
Trigo*Papa	1	1	2,272906	4,9762	0,0672
Papa*Papa	1	1	2,029966	4,4443	0,0796

2-7: Análisis del nivel de expresión de toxinas en función del tipo de peptona vegetal

Se estableció un modelo de ajuste basado en los resultados de ELISA. El modelo se elaboró mediante el método de apalancamiento de efectos utilizando mínimos cuadrados, y las variables X se analizaron mediante el método de superficie de respuesta. Para seleccionar el modelo óptimo, se consideraron conjuntamente el valor de R cuadrado y el valor de RMSE, y tras verificar el resumen del efecto y el valor p de la prueba de efecto, se eliminaron los términos que no resultaron significativos.

Como resultado de comprobar el valor VIF del modelo óptimo establecido, se confirmó que no superaba 10 y se encontraba en el nivel 1, lo que indica que el modelo no presentaba ningún problema. En el análisis de residuos, se confirmó que los puntos estaban distribuidos uniformemente hacia arriba y hacia abajo, y que todos los resultados de los residuos estudentizados se encontraban dentro del intervalo de confianza del 95 % (Figura 12).

Como resultado de identificar los factores que influyen significativamente en el modelo mediante los resultados de la prueba de efectos, se determinó que el guisante tenía un efecto sobre el modelo (Tabla 11). Se obtuvo una fórmula de predicción para la absorbancia a 540 nm utilizando este modelo (Figura 13). Al examinar los perfiles de efectos principales e interacciones, se confirmó la existencia de interacciones entre el guisante y la papa, y entre el trigo y la papa, pero no entre los demás factores (Figura 14).

Tabla 11

Pruebas de efecto

Fuente	Nparm	DF	Suma de cuadrados	Tasa F	Prob > F
Guisante	1	1	1432636114	15,5150	0,0043*
Trigo	1	1	16083929,8	0,1742	0,6874
Papa	1	1	107423198	1,1634	0,3122
Guisante* Guisante	1	1	239492040	2,5936	0,1460
Trigo*Trigo	1	1	43348778,2	0,4695	0,5126
Guisante*Papa	1	1	151433498	1,6400	0,2362
Trigo*Papa	1	1	94093681,4	1,0190	0,3423

2-8: Optimización robusta

Con base en la fórmula de predicción establecida para cada valor de respuesta, se identificaron condiciones de optimización robusta utilizando un perfilador para determinar las condiciones del medio que pueden obtener la OD_{540nm} apropiada y la concentración máxima de toxina. En el proceso de cultivo real, para el valor de OD_{540nm}, se selecciona un estado celular que puede continuar creciendo después del paso mientras mantiene la fase exponencial. Por lo tanto, como la concentración celular mínima para el paso en la fase exponencial fue en un valor de OD_{540nm} de 3 a 7, se exploraron las condiciones apropiadas estableciendo el valor de OD_{540nm} a un objetivo de coincidencia de 5 basado en la fórmula del modelo establecido. Para la concentración de toxina, el valor de ELISA se estableció en el valor máximo para encontrar la composición que produce la concentración más alta de toxina. Como resultado de realizar un análisis para maximizar la deseabilidad para los dos valores de respuesta, se determinó el uso de solo guisante y trigo, y la papa se excluyó de los análisis posteriores (Figura 15).

Después de realizar 5000 simulaciones en función de la variación aleatoria de los factores y el ruido del modelo mediante la función de simulación (Figura 16a), se presentaron los resultados de la simulación mediante un análisis de límites de fallo. Se confirmó que todos los valores de respuesta se encontraban dentro del límite especificado, excepto en un caso de los 5000 (Figura 16b).

Para obtener resultados en condiciones adecuadas, se determinaron los rangos aceptables para cada componente. El rango correspondiente a 3σ se estableció como NOR (un rango que representa el 99,7 % de la distribución real de los resultados), y el rango correspondiente a $4,5\sigma$ se estableció como PAR (Figuras 17 y 18). Con base en

esto, los rangos aceptables determinados para cada componente se muestran en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 12

Componente (g/L)	Punto de ajuste	NORs (3σ)	PAR ($4,5\sigma$)
Peptona de guisante	18 g/L	16,5 a 19,5	15,8 a 20,3
Peptona de trigo	7 g/L	5,5 a 8,5	4,8 a 9,2

Para facilitar la aplicación al proceso real por parte del operador, el punto de ajuste fue de 18 g/L para la peptona de guisante y de 7 g/L para la peptona de trigo. Al representar gráficamente los NOR (3σ , línea roja) y los PAR ($4,5\sigma$, línea azul) en un gráfico de contorno para determinar el rango que satisface el modelo, se confirmó que los NOR y los PAR no superaban el rango blanco que cumple las condiciones del proceso, lo que sugiere que los NOR y los PAR establecidos mediante esta prueba y análisis estadístico eran adecuados (FIG. 19).

Ejemplo 3: Medición comparativa de la absorbancia y el nivel de expresión de toxinas para medios APF

3-1: Composiciones de medios utilizados para la cultura

Al medio APF para el cultivo de *Clostridium botulinum*, se añadieron peptona de guisante y peptona de trigo en cantidades seleccionadas en los Ejemplos 2-8, y D-(+)-glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno se añadieron en cantidades idénticas a las de los Ejemplos 1-2.

Mientras tanto, para determinar el efecto del monohidrato de clorhidrato de L-cisteína o la emulsión de agente antiespumante en el medio APF, se añadieron 0,2 g/L de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína y/o 0,24 g/L de emulsión antiespumante médica C (Dow Corning®) al medio APF. Además, para determinar el efecto de la peptona de soja en el medio APF, se añadieron 18 g/L de peptona de soja en lugar de la peptona de guisante y/o la peptona de trigo del medio APF, y adicionalmente, se añadieron 0,2 g/L de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína y 0,24 g/L de emulsión antiespumante médica C (Dow Corning®).

Se dispensaron alícuotas de 10 ml del medio de cultivo en tubos de cultivo de 15 ml. Posteriormente, los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 30 minutos y se mantuvieron en condiciones anaeróbicas en una incubadora anaeróbica. El medio APF

para el cultivo de *Clostridium botulinum* y su composición específica se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13

Componente (g/L)	Medio APF	Ejemplo de Comp. 1	Ejemplo de Comp. 2	Ejemplo de comparación 3	Ejemplo de Comp. 4	Ejemplo de comparación 5	Ejemplo de comparación 6	Ejemplo de comparación 7
Peptona de guisante	10	10	10	10	-	-	-	-
Peptona de trigo	7	7	7	7	-	7	7	20
Extracto de levadura	10	10	10	10	10	10	10	20
D-(+)-glucosa	10	10	10	10	10	10	10	10
Peptona de soja	-	-	-	-	10	10	10	
Clorhidrato de L-cisteína	-	0,2	-	0,2	-	-	0,2	0,2
Emulsión antiespumante C	-	-	0,24	0,24	-	-	0,24	0,24

3-2: Cultivo de la cepa de *Clostridium botulinum*

Los tubos de cultivo que contenían los medios mostrados en la Tabla 13 se inocularon con 20 µL de *Clostridium botulinum* (Centro Coreano para el Control y la Prevención de Enfermedades, control No. 4-029-CBB-MF-2020001), y se tomaron muestras mientras la cepa se cultivaba en condiciones anaeróbicas a 35 °C ± 1 °C durante 20, 24, 28 y 48 horas. Posteriormente, se determinó la tasa de crecimiento de la cepa midiendo el valor de

OD_{540nm} del cultivo muestreado en cada tiempo mediante un espectrofotómetro UV, y el medio de cultivo se utilizó como blanco.

3-3: Tasa de crecimiento de la cepa y nivel de expresión de la toxina

Se midió el valor de OD_{540nm} de los cultivos muestreados en cada momento para los medios mostrados en la Tabla 13 anterior y los niveles de expresión de toxinas después de 48 horas de cultivo (Tablas 14 y 15, y Figuras 20 y 21).

Tabla 14

	Medio APF	Ejemplo de Com p. 1	Ejemplo de Com p. 2	Ejemplo de Com p. 3	Ejemplo de Com p. 4	Ejemplo de compara ción 5	Ejemplo de compara ción 6	Ejemplo de compara ción 7
OD a las 20 horas	4,04 74	3,714 4	1,772 1	3,955 7	2,220 5	2,8330	1,7535	3,7871
OD a las 24 horas	5,95 63	5,363 6	2,031 9	5,603 4	2,966 8	3,4903	2,7539	5,4549
OD a las 28 horas	7,10 21	6,257 6	1,756 7	7,166 7	3,525 2	4,2801	3,2109	6,7739
OD a las 48 horas	4,56 36	5,304 4	1,503 2	4,506 2	4,418 2	5,3889	3,7297	7,8900
Toxina (µg) a las 48 horas	588, 8	452,1	137,9	501,1	75,2	76,4	30,1	263,7
Expresión de toxina (%) en compara ción con el control	-	-23,2	-76,6	-14,3	-87,2	-87,0	-94,9	-55,2

Tabla 15

		Valor medido (ng/mL)	Valor promedio	Cultivo (mL)	Cantidad de toxina (µg)
Medio APF	Tubo 1	46894,1	58880,0	10	588,8
	Tubo 2	70867,4			
Ejemplo comparativo 1	Tubo 1	51505,6	45208,9	10	452,1
	Tubo 2	38912,1			
Ejemplo comparativo 2	Tubo 1	13052,2	13972,6	10	137,9
	Tubo 2	14533,0			
Ejemplo comparativo 3	Tubo 1	57599,9	50110,8	10	501,1
	Tubo 2	42621,6			
Ejemplo comparativo 4	Tubo 1	6196,3	7522,7	10	75,2
	Tubo 2	8849,1			
Ejemplo comparativo 5	Tubo 1	7051,5	7644,9	10	76,4
	Tubo 2	8238,4			
Ejemplo comparativo 6	Tubo 1	2696,2	3012,2	10	30,1
	Tubo 2	3328,3			
Ejemplo comparativo 7	Tubo 1	29852,4	26366,1	10	263,7

Como resultado, tal como se muestra en la Tabla 14 anterior y en las Figuras 20 y 21, se confirmó que, cuando *Clostridium botulinum* se cultivó en el medio APF de la presente invención, el crecimiento de APF fue óptimo entre las 20 y las 28 horas, y el nivel de expresión de la toxina fue máximo a las 48 horas después del crecimiento de la cepa.

Mientras tanto, se confirmó que, en los casos del Ejemplo Comparativo 1, en el que solo se añadió L-cisteína HCl monohidrato al medio APF de la presente invención, el Ejemplo

Comparativo 2, en el que solo se añadió emulsión C antiespumante médica al medio APF de la presente invención, y el Ejemplo Comparativo 3, en el que se añadieron L-cisteína HCl monohidrato y emulsión C antiespumante médica al medio APF de la presente invención, el crecimiento de la cepa fue menor que en el medio APF de la presente invención, y los niveles de expresión de toxinas disminuyeron en un 23,2 %, un 76,6 % y un 14,9%, respectivamente. En consecuencia, se puede confirmar que, incluso si se añade L-cisteína HCl monohidrato y/o emulsión C antiespumante médica a la composición del medio APF de la presente invención, el crecimiento de la cepa y la expresión de toxinas en la composición del medio APF de la presente invención son excelentes.

Mientras tanto, se confirmó que, en los casos del Ejemplo Comparativo 4, en el que se agregó peptona de soja en lugar de peptona de guisante y peptona de trigo al medio APF de la presente invención, el Ejemplo Comparativo 5, en el que se agregó peptona de soja en lugar de peptona de guisante al medio APF de la presente invención, el Ejemplo Comparativo 6, en el que se agregó peptona de soja en lugar de peptona de guisante al medio APF de la presente invención y adicionalmente se agregaron clorhidrato de L-cisteína monohidrato y emulsión antiespumante médica C, y el Ejemplo Comparativo 7, que tiene la misma composición que la de la Publicación de Solicitud de Patente Coreana No. 10-2022-0140696, el crecimiento de la cepa fue menor que en el medio APF de la presente invención, y los niveles de expresión de toxinas disminuyeron en un 87,2%, 87,0%, 94,9% y 55,2%, respectivamente. En consecuencia, considerando que se espera que el tiempo necesario para alcanzar la fase de muerte en la que se puede recuperar la toxina sea de 72 horas o más, se puede confirmar que el crecimiento de la cepa y la expresión de la toxina en la composición del medio APF de la presente invención son excelentes.