



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2454275 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 14/33 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2017.12.27
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.07.12
(86)	European Application Nr.	10733117.5
(86)	European Filing Date	2010.07.12
(87)	The European Application's Publication Date	2012.05.23
(30)	Priority	2009.07.13, US, 502181
(84)	Designated Contracting States:	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
(73)	Proprietor	ALLERGAN, INC., 2525 Dupont Drive, Irvine, CA 92612, US-USA
(72)	Inventor	TON, Jennifer L., 3595 Sego Street, Irvine California 92606, US-USA PATEL, Hemant A., 12 Twilight Lane, Rancho Santa Margarita California 92688, US-USA BATES, Ronald C., 457 Shadow Oaks, Irvine California 92618, US-USA AHMAD, Wajdie M., 2103 Anacapa, Irvine California 92602, US-USA
(74)	Agent or Attorney	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Title	PROCESS AND SYSTEM FOR OBTAINING BOTULINUM NEUROTOXIN
(56)	References Cited:	WO-A1-2006/096164 US-A1- 2006 228 780 GIMENEZ J. ET AL.: "SIMPLIFIED PURIFICATION METHOD FOR CLOSTRIDIUM BOTULINUM TYPE E TOXIN" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 53, no. 12, 1 January 1987 (1987-01-01), pages 2827-2830, XP002343950 SIMPSON L L ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE BOTULINUM NEUROTOXINS", METHODS IN ENZYMOLOGY; [METHODS IN ENZYMOLOGY], ACADEMIC PRESS, US, vol. 165, 1 January 1988 (1988-01-01), pages 76-85, XP002919764, ISSN: 0076-6879, DOI: 10.1016/S0076-6879(88)65015-4

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

PROSESS OG SYSTEM FOR Å FREMSTILLE BOTULINUM NEVROTOKSIN

Patentkrav

1. Prosess for å produsere et biologisk aktivt botulinum nevrotoksin type A-kompleks omfattende de sekvensielle trinn med:

- (a) dyrke clostridium botulinum-bakterier i et dyrkingsmiddel som er helt uten produkter avledet fra dyr eller inneholder produkter avledet fra dyr i en mengde under 1 % (v/v);
- (b) fermentere clostridium botulinum-bakterier fra dyrkningsmidlet i 1,8 til 82,5 l av et fermenteringsmiddel som er helt uten produkter avledet fra dyr eller inneholder produkter avledet fra dyr i en mengde under 1 % (v/v);
- (c) høste fermenteringsmidlet ved å fjerne celleavfall;
- (d) konsentrere det høstede fermenteringsmidlet ved filtrering;
- (e) fortynne det konsentrerte fermenteringsmidlet ved å tilsette en buffer dertil;
- (f) utføre et første kontakttrinn hvor det fortynnede, høstede fermenteringsmidlet kontaktes med et anionutvekslerkromatografimiddel slik at det biologisk aktive botulinum nevrotoksinet i midlet fanges av anionutvekslermidlet.
- (g) utvaske oppfanget botulinum nevrotoksin fra anionutvekslermidlet for å oppnå et første eluat;
- (h) utføre et andre kontakttrinn hvor det første eluatet kontaktes med et kationutvekslerkromatografimiddel for å fjerne urenheter fra det første eluatet, derved oppnå et andre eluat;
- (i) utføre et tredje kontakttrinn hvor det andre eluatet kontaktes med et hydrofobisk interaksjonskromatografimiddel og utvaskes for å oppnå et tredje eluat;
- (j) behandle det tredje eluatet med diafiltrering; og
- (k) filtrere det behandlede tredje eluatet for å oppnå et biologisk aktivt botulinum nevrotoksin type A kompleks-inneholdende produkt som har en virkeevne på $1,8 \times 10^7$ til $6,6 \times 10^7$ enheter/mg;

hvori minst ett av dyrkingsmidlet og fermenteringsmidlet inkluderer et grønnsaksprotein, og ingen enzymer avledet fra dyr brukes til å rense botulinum nevrotoksinet; og hvori prosessen utføres i en uke eller mindre.

2. Prosessen ifølge krav 1, hvori fermenteringsmidlet omfatter under 5,5 % (v/v) av et proteinprodukt avledet fra grønnsaker, under 2,2 % (v/v) gjærekstrakt og under 2,2 % (v/v) glukose, og hvori pH av fermenteringsmidlet er fra 5,85 til 8,8 ved igangsettingen av fermenteringstrinnet.

3. Prosessen ifølge krav 1, hvori dyrkingstrinnet utføres til den optiske tettheten til dyrkingsmidlet ved 540 nm er mellom 0,72 AU og 4,95 AU.

4. Prosessen ifølge krav 1, hvori fermenteringstrinnet utføres i 54 til 88 timer til den optiske tettheten til fermenteringsmidlet ved 890 nm minsker til mellom 0,045 AU og

0,77 AU.

5. Prosessen ifølge krav 1, hvori dyrkingstrinnet igangsettes ved å innføre en mengde av *clostridium botulinum* arbeidscellebank uten dyreprodukter til dyrkingsmidlet, arbeidscellebanken omfattende $0,9 \times 10^4$ til $5,5 \times 10^7$ kolonidannende enheter av *clostridium botulinum* per milliliter av arbeidscellebanken, og *clostridium botulinum*-bakterien i arbeidscellebanken har en hovedsakelig uniform morfologi.

6. Prosessen ifølge krav 1, hvori produktet til trinn (k) omfatter ikke mer enn 1 ng med rester av nukleinsyre per mg av produktet.

7. System for å produsere et biologisk aktivt botulinum nevrotoksin omfattende:
 første apparat for anaerobisk dyrking av *clostridium botulinum*-bakterier, det første apparatet kan inneholde fra 180 ml til 1,1 l av et dyrkingsmiddel som er helt uten produkter avledet fra dyr eller inneholder produkter avledet fra dyr i en mengde under 1 % (v/v);
 andre apparat for anaerobisk fermentering av *clostridium botulinum*-bakterier dyrket i det første apparatet, det andre apparatet kan inneholde fra 1,8 til 82,5 l av et fermenteringsmiddel som er helt uten produkter avledet fra dyr eller inneholder produkter avledet fra dyr i en mengde under 1 % (v/v), og det andre apparatet inkluderer minst én engangssonde valgt fra en reduksjonsoksidertingssonde, en pH-sonde og en turbiditetssonde;
 tredje apparat for å høste fermenteringsmidlet;
 fjerde apparat for å konsentrere det høstede fermenteringsmidlet ved filtrering og fortynne det filtrerte fermenteringsmidlet;
 femte apparat for å utføre en første rensing av botulinum nevrotoksin oppnådd fra det høstede fermenteringsmidlet, det femte apparatet omfattende et anionutvekslerkromatografimiddel som kan fange botulinum nevrotoksin;
 sjette apparat for å utføre en andre rensing av botulinum nevrotoksin utvasket fra anionutvekslerkromatografimidlet, det sjette apparatet omfattende et kationutvekslerkromatografimiddel;
 sjuende apparat for å utføre en tredje rensing av botulinum nevrotoksin utvasket fra kationutvekslerkromatografimidlet, det sjuende apparatet omfattende et hydrofobisk interaksjonskromatografimiddel; og
 åttende apparat for å filtrere rensed botulinum nevrotoksin fra det sjuende apparatet, hvori det åttende apparatet omfatter en filtreringsmembran, og hvori det oppnådde botulinum toksin-inneholdende produktet har en virkeevne på $1,8 \times 10^7$ til $6,6 \times 10^7$ enheter/mg, produktet omfatter 1,1 ng eller mindre av rester av nukleinsyre per mg av produktet, og prosessen kan utføres i én uke eller mindre; hvori systemet kan rense botulinum nevrotoksinet uten bruken av et enzym avledet fra dyr.

8. Systemet ifølge krav 7, videre omfattende et modulært atmosfærekontrollert apparat omfattende et anaerobisk kammer som kan inneholde det første apparatet, hvori det anaerobiske kammeret omfatter et integrert partikkelluftfilter med høy effektivitet.