

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 726**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**C07K 14/33** (2006.01)

**A61K 39/385** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2016 PCT/KR2016/004431**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16175566**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2016 E 16786752 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3289070**

54 Título: **Composición de medio para preparar toxina botulínica**

30 Prioridad:

**28.04.2015 KR 20150059655**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.02.2021**

73 Titular/es:

**DAEWOONG CO., LTD. (100.0%)  
244, Galmachi-ro Jungwon-gu, Seongnam-si  
Gyeonggi-do 13211, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, KYOUNG-YUN;  
SUL, HYE-YOUNG y  
MIN, KYOUNG-MIN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 805 726 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición de medio para preparar toxina botulínica

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición de medio para la producción de toxina botulínica y, más en particular, a una composición de medio para el cultivo de *Clostridium* sp. capaz de producir toxina botulínica. La composición de medio de la presente invención comprende un hidrolizado de caseína y al menos una peptona de origen vegetal seleccionada del grupo que consiste en un hidrolizado de guisante de jardín, un hidrolizado de semilla de algodón y un hidrolizado de gluten de trigo.

**Antecedentes técnicos**

15 Se han descubierto una variedad de *Clostridium* sp. que secretan toxinas neurotóxicas desde la década de 1890, y la caracterización de las toxinas que son secretadas de estas bacterias se ha hecho durante los últimos 70 años (Schantz, E. J. et al., *Microbiol. Rev.*, 56:80, 1992).

20 Las toxinas neurotóxicas derivadas de *Clostridium* sp., es decir, las toxinas botulínicas, se clasifican en siete serotipos (tipos A a G) dependiendo de sus propiedades serológicas. Cada una de las toxinas tiene una proteína toxina que tiene un tamaño de aproximadamente 150 kDa y comprende naturalmente un complejo de varias proteínas no tóxicas unidas a la misma. Un complejo medio (300 kDa) está compuesto de una proteína toxina y una proteína no hemaglutinina no tóxica, y un complejo grande (450 kDa) y un complejo muy grande (900 kDa) están compuestos del complejo de tamaño medio unido a hemaglutinina (Sugiyama, H., *Microbiol. Rev.*, 44:419, 1980). Se sabe que tales proteínas hemaglutininas no tóxicas funcionan para proteger a la toxina del bajo pH y varias proteasas en los intestinos.

30 La toxina se sintetiza como un único polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kDa en células, y después se corta en una posición de 1/3 empezando desde el extremo N-terminal por la acción de proteasa intracelular o tratamiento con una enzima artificial tal como tripsina en dos unidades: una cadena ligera (L; peso molecular: 50 kDa) y una cadena pesada (H; peso molecular: 100 kDa). La toxina cortada tiene toxicidad muy aumentada comparada con el polipéptido único. Las dos unidades están unidas entre sí por un enlace disulfuro y tienen diferentes funciones. La cadena pesada se une a un receptor de una célula diana (Park. M.K. et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 72:243, 1990) y funciona para interactuar con una biomembrana a bajo pH (pH 4) para formar un canal (Mantecuccio, C. et al., *TIBS.*, 18:324, 1993), y la cadena ligera tiene la actividad farmacológica de interferir con la secreción de neurotransmisores, cuando es permeable a células usando detergente o introducida por electroporación o etc. (Poullain, B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85:4090, 1988).

40 La toxina inhibe la exocitosis de acetilcolina en la presinapsis colinérgica de una unión neuromuscular para producir astenia. Se ha considerado que incluso el tratamiento con una cantidad muy pequeña de la toxina muestra toxicidad, lo que sugiere que la toxina tiene alguna actividad enzimática (Simpson, L. L. et al., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 26:427, 1986).

45 Según un artículo reciente, la toxina tiene actividad metalopeptidasa, y sus sustratos incluyen compuestos de sinaptobrevina, syntaxina, una proteína asociada a sinaptosoma de 25 kDa (SNAP25), etc., que son las proteínas unidades de un complejo de maquinaria de exocitosis. Cada tipo de toxina usa una de las tres proteínas descritas anteriormente como su sustrato, y se sabe que las toxinas de tipo B, D, F y G cortan sinaptobrevina en un sitio específico, las toxinas de tipo A y E cortan SNAP25 en un sitio específico, y el tipo C corta syntaxina en un sitio específico (Binz, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 265:9153, 1994).

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

55 La toxina botulínica es letal para el cuerpo humano incluso en pequeñas cantidades y es fácil de producir en grandes cantidades. Por tanto, constituye las cuatro principales armas bioterroristas junto con *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* y el virus de la viruela. Sin embargo, se ha encontrado que, cuando la toxina botulínica de tipo A se inyecta a una dosis que no afecta sistemáticamente el cuerpo humano, puede paralizar los músculos locales en el sitio inyectado. Basado en esta característica, la toxina botulínica de tipo A se puede usar en una amplia gama de aplicaciones, incluyendo agentes de eliminación de arrugas, agentes para tratar hemiplejía espástica y parálisis cerebral, etc. Por tanto, la demanda para toxina botulínica de tipo A ha aumentado, y se han realizado activamente estudios sobre métodos de producir toxina botulínica de modo que se satisfaga la demanda.

65 Un producto comercial típico actual es BOTOX® (un complejo de neurotoxina purificado de toxina botulínica de tipo A) que está comercialmente disponible de Allergan, Inc., EE UU. Un vial de 100 unidades de BOTOX® está compuesto de aproximadamente 5 ng de un complejo de neurotoxina purificado de toxina botulínica de tipo A, 0,5 mg de

seroalbúmina humana y 0,9 mg de cloruro de sodio y se reconstituye usando solución salina estéril sin un conservante (inyección de cloruro de sodio al 0,9%). Otros productos comerciales incluyen Dysport® (un complejo de toxina botulínica de tipo A de *Clostridium* y hemaglutinina, que tiene lactosa y seroalbúmina humana en una composición farmacéutica que comprende toxina botulínica y se reconstituye usando cloruro de sodio al 0,9% antes del uso) que está comercialmente disponible de Ipsen Ltd., RU, MyoBloc® (una solución inyectable (un pH de aproximadamente 5,6) que comprende toxina botulínica de tipo B, seroalbúmina humana, succinato de sodio y cloruro de sodio) que está comercialmente disponible de Solstice Neurosciences, Inc.

Un medio para el cultivo de *Clostridium botulinum*, que en general se usa en un método para la producción de toxina botulínica como se divulga en la patente coreana No. 10-1339349, comprende componentes animales. Por tanto, si un prion anómalo animal conocido como un agente que produce encefalopatía espongiforme transmisible está contenido en los componentes animales debido a contaminación, plantea problemas en un proceso para producir toxina botulínica.

La encefalopatía espongiforme transmisible (EET) se conoce como un trastorno neurodegenerativo que produce degeneración grave de neuronas, y ejemplos de la misma incluyen la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), tembladera, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, kuru, encefalopatía del visón transmisible, enfermedad consuntiva crónica, encefalopatía espongiforme felina, etc., que afectan a seres humanos y animales. Se ha descrito que la EEB cruza la barrera de especie e infecta incluso seres humanos.

El agente que causa la encefalopatía espongiforme transmisible (EET) tiene características en que no tiene inmunogenicidad y el periodo de incubación es largo. Del análisis histopatológico de tejido de cerebro bovino afectado con EEB, se ha podido ver que se formaron vacuolas espongiformes especiales en el cerebro debido al daño a neuronas y depósito de fibras de proteína anómalas.

La causa de la EET es una partícula infecciosa proteínica conocida como el prion anómalo. A diferencia de los virus generales que requieren ácido nucleico, el prion anómalo es una partícula infecciosa compuesta de proteína sola sin contener ácido nucleico. Respecto a la EET, se sabe que, cuando un prion anómalo (PrP<sup>sc</sup>) que es una partícula infecciosa se une a un prion normal (PrP<sup>c</sup>), se convierte a un prion patógeno que después se acumula en el cerebro (Prusiner SB, Alzheimer Dis Assoc Disord., 3:52-78, 1989).

El documento WO 01/05997 A2 divulga una composición que comprende un medio sustancialmente libre de productos de origen animal para cultivar un organismo y que comprende un organismo del género *Clostridium*, en donde la composición comprende al menos un compuesto derivado de soja hidrolizada.

El documento WO 2006/042542 A2 divulga que basado en no animal y no soja produce un crecimiento aumentado de *C. tetani*, *C. diphtheriae*, y *B. pertussis* y produce rendimiento equivalente o aumentado de toxina tetánica, toxina diftérica y toxina pertúsica, respectivamente, comparado con el cultivo de las bacterias en medios que contienen material proteínico derivado de animales o derivado de soja.

El documento EP 2 133 415 A1 divulga un medio líquido para el cultivo de *Clostridium histolyticum*, que comprende agua, una gelatina de pescado y una peptona vegetal, la fuente de la peptona se selecciona del grupo que consiste en haba de soja, haba, guisante, patata y una mezcla de las mismas.

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob es un trastorno neurodegenerativo raro de la encefalopatía espongiforme transmisible humana (EET) donde el agente transmisible es aparentemente una isoforma anómala de una proteína de prion. Un individuo con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob se puede deteriorar desde salud perfecta aparente a mutismo acinético en seis meses. Por tanto, puede existir un riesgo potencial de adquirir una enfermedad mediada por priones, tal como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, de la administración de una composición farmacéutica que comprende una toxina biológica, tal como botulínica, obtenida usando productos de origen animal. Por tanto, si una composición farmacéutica se prepara mediante sustancia farmacéutica producida usando componentes de origen animal, puede someter al paciente a un riesgo potencial de recibir varios patógenos o agentes infecciosos.

Bajo estos antecedentes técnicos, los presente inventores han encontrado que, cuando se usa un medio que comprende peptona de origen vegetal libre de encefalopatía espongiforme transmisible (EET), componentes minerales e hidrolizado de caseína libre de EET (por ejemplo, hidrolizado de caseína certificado para EET) para el cultivo de *Clostridium botulinum* con el fin de prevenir el riesgo de desarrollar la enfermedad anteriormente mencionada mediada por priones, el riesgo de desarrollo de la enfermedad mediada por priones que se puede producir en un medio que está en uso actual (medio original) se puede excluir, y la velocidad de crecimiento de *Clostridium botulinum* en el medio se puede aumentar comparada con esa en el medio que está en uso actual y el medio que contiene peptona de origen vegetal, completando de esta manera la presente invención.

## Divulgación de la invención

### Problema técnico

5 Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición de medio que comprende una peptona de origen vegetal que no tiene riesgo de infección de encefalopatía espongiforme transmisible (EET) y un hidrolizado de caseína que no tiene riesgo de infección de EET, y un método para la producción de toxina botulínica, que mejora la producción de toxina botulínica al cultivar *Clostridium botulinum* en la composición de medio.

**Solución técnica**

10 Para alcanzar el objeto anterior, la presente invención proporciona una composición de medio para el cultivo de *Clostridium botulinum*, la composición de medio comprende: al menos una peptona de origen vegetal libre de EET seleccionada del grupo que consiste en un hidrolizado de guisante de jardín, un hidrolizado de semilla de algodón y un hidrolizado de gluten de trigo con una proporción de 1:0,24-43,62:0,01-50,57 en peso; y un hidrolizado de caseína.

15 Las formas de realización de la presente invención se reflejan en las reivindicaciones independientes 1 y 8.

Las formas de realización preferidas de la presente invención se reflejan en las reivindicaciones dependientes 2 a 7, 9 y 10.

20 La presente invención también proporciona un método para producir toxina botulínica, que comprende las etapas de: (a) cultivar *Clostridium botulinum* usando la composición de medio para producir toxina botulínica; y (b) recuperar la toxina botulínica producida.

**Breve descripción de los dibujos**

25 La figura 1 muestra el crecimiento de *Clostridium botulinum* en un medio (medio APF) que comprende peptona de origen vegetal.

30 La figura 2 muestra el crecimiento de *Clostridium botulinum* en un medio que comprende peptonas de origen vegetal, minerales, aminoácidos y vitaminas.

La figura 3 muestra los resultados de examinar si se forma un precipitado después de la esterilización de un medio que comprende peptonas de origen vegetal, minerales, aminoácidos y vitaminas.

35 La figura 4 muestra los resultados de examinar si se forma un precipitado después de la esterilización de un medio que comprende peptonas de origen vegetal y minerales.

40 La figura 5 muestra el crecimiento de *Clostridium botulinum* en medios obtenidos al añadir adicionalmente vitaminas, aminoácidos y "BD Recharge™ sin glucosa ni L-glutamina" a medios para el cultivo de la bacteria, que contienen peptonas de origen vegetal y minerales.

La figura 6 muestra el crecimiento de *Clostridium botulinum* en medios para el cultivo de la bacteria, que contienen varios tipos de peptonas de origen vegetal.

45 La figura 7 muestra gráficos de nivel de FFD para cribado de minerales, y optimización de la respuesta. Figura 7a gráfico de nivel para ajuste alto; figura 7b gráfico de nivel para ajuste medio; figura 7c gráfico de nivel para ajuste bajo; y figura 7d optimización de la respuesta para DO máxima.

50 La figura 8 muestra gráficos de nivel de FFD para cribado de minerales, y optimización de la respuesta. Figura 8a gráfico de nivel para ajuste alto; figura 8b gráfico de nivel para ajuste medio; figura 8c gráfico de nivel para ajuste bajo; y figura 8d optimización de la respuesta para DO máxima.

55 La figura 9 muestra gráficos de nivel para cribado de peptona vegetal, y optimización de la respuesta. Figura 9a gráfico de nivel para ajuste medio; figura 9b gráfico de nivel para ajuste bajo; y figura 9c optimización de la respuesta para DO máxima.

La figura 10 muestra la curva de crecimiento de *Clostridium botulinum* en el medio APF finalmente seleccionado, y un cambio en la concentración de toxina.

60 La figura 11 muestra gráficos de nivel para un medio de cultivo 24 horas después de la inoculación de *Clostridium botulinum* en un medio que comprende peptonas de origen vegetal al que se ha añadido un hidrolizado de caseína. Figura 11a gráfico de nivel para ajuste bajo; figura 11b gráfico de nivel para ajuste medio.

65 La figura 12 muestra la optimización de la respuesta para un medio de cultivo 24 horas después de la inoculación de *Clostridium botulinum* en un medio que comprende peptonas de origen vegetal al que se ha añadido un hidrolizado de caseína.

La figura 13 muestra gráficos de nivel para un diseño CCF (compuesto central enfrentado). (A) gráfico de programa estadístico; y (B) gráfico de programa estadístico.

5 La figura 14 muestra gráficos de nivel (A) de un diseño CCF (compuesto central enfrentado), y un gráfico de optimización (B).

10 La figura 15 es un conjunto de gráficos que muestran los valores de DO dependientes del tiempo que indican el crecimiento de *Clostridium botulinum* en un medio que está en uso actual, un medio que comprende peptonas de origen vegetal y un medio de comprende peptonas de origen vegetal e hidrolizado de caseína.

### 10 Mejor manera para llevar a cabo la invención

15 En la presente invención, una composición de medio sin proteína animal (AFP) mostró una velocidad de crecimiento aumentada de *Clostridium botulinum* comparada con un medio que está en uso actual (medio original), pero se consideró añadir componentes de medio que aumenten más la velocidad de crecimiento de la bacteria y que no tengan riesgo de infecciones con EET o similares. Por tanto, un hidrolizado de caseína (por ejemplo, un hidrolizado de caseína certificado para EET), que no se ha descrito que produzca infección de EET, se añadió al medio AFP, y se examinó el crecimiento de la bacteria en el medio AFP. Como resultado, el medio AFP mostró una velocidad de crecimiento aumentada de la bacteria comparado con un medio que está en uso actual y un medio que comprende peptonas de origen vegetal solas. Por tanto, si se usa el medio anterior, se puede producir una alta concentración de toxina botulínica al cultivar una bacteria de una manera segura en condiciones libres de EET.

20 Como se usa en el presente documento, el término “medio que está en uso actual o medio original” significa un medio que comprende hidrolizado de caseína, extracto de levadura y medio de tioglicolato, que son componentes de medio derivados de animales. El término “medio APF (medio sin proteína animal)” significa un medio que no contiene proteína de origen animal y que contiene peptonas de origen vegetal, minerales y glucosa.

25 En un ejemplo de la presente invención, con el fin de producir toxina botulínica al cultivar *Clostridium botulinum* en condiciones libres de encefalopatía espongiforme transmisible (EET), se preparó un medio APF que comprende peptona de origen vegetal sin EET y se comparó con un medio que está en uso actual (que contiene un componente animal). Como resultado, se pudo ver que una composición de medio óptima para cultivar *Clostridium botulinum* es una que comprende una peptona de origen vegetal, al menos un mineral seleccionado del grupo que consiste en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , y una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa, y se encontró el crecimiento óptimo de la bacteria en este medio. Como resultado, como se muestra en la tabla 13, se determinó que los contenidos óptimos de peptonas de origen vegetal plantas en la composición de medio finalmente seleccionada para el cultivo de *Clostridium botulinum* son Hy-Pea™ 7404 5 g/l, UltraPep™ Cotton 10 g/l y HyPep™ 4601N 5 g/l, y los contenidos óptimos de minerales en la composición del medio son  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5,5 g/l y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3 g/l.

30 En otro ejemplo de la presente invención, se midieron el patrón de crecimiento de *Clostridium botulinum* en el medio APF finalmente seleccionado que comprende peptonas de origen vegetal y minerales y la concentración de toxina. Como resultado, como se muestra en la tabla 12 y la figura 10, el valor de DO empezó a aumentar después de 12 horas de cultivo de *Clostridium botulinum*, y a las 24 horas de cultivo, el medio de cultivo mostró una  $\text{DO}_{540\text{nm}}$  de 3,5465 y una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 3,0695. A continuación, el valor de DO disminuyó gradualmente, y a las 48 horas de cultivo, el medio de cultivo mostró una  $\text{DO}_{540\text{nm}}$  de 0,792 y una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,7224. La concentración de toxina en el sobrenadante del cultivo de *Clostridium botulinum* empezó a aumentar después de 5 horas de cultivo y mostró un valor final de 31,41  $\mu\text{g/ml}$ . Cuando la concentración de toxina se midió después de romper la bacteria, la toxina empezó a producirse después de 5 horas de cultivo, y la concentración de toxina siguió aumentando, se mantuvo a un nivel uniforme después de 28 horas de cultivo, y mostró un valor final de 38,39  $\mu\text{g/ml}$ .

35 En otro ejemplo de la presente invención, se examinó el patrón de crecimiento de *Clostridium botulinum* en un medio que contenía peptonas de origen vegetal e hidrolizado de caseína. Como resultado, como se muestra en la tabla 17 y la figura 15, un medio que está en uso actual mostró un aumento en la velocidad de crecimiento después de 24 horas de cultivo de *Clostridium botulinum* y mostró el valor pico de  $\text{DO}_{540\text{nm}}$  de 3,384 a las 39 horas de cultivo. Un medio APF que contiene peptonas de origen vegetal mostró un aumento en la velocidad de crecimiento después de 18 horas de cultivo y un valor pico de  $\text{DO}_{540\text{nm}}$  de 3,526 a las 28 horas de cultivo.

40 Además, un medio APF que contiene peptona de origen vegetal + hidrolizado de caseína mostró un aumento en la velocidad de crecimiento después de 18 horas de cultivo y mostró un valor pico de  $\text{DO}_{540\text{nm}}$  de 5,628 a las 26 horas de cultivo. Por tanto, se comparó el valor de  $\text{DO}_{540\text{nm}}$  a las 24 horas de cultivo, el medio que está en uso actual mostró un valor de  $\text{DO}_{540\text{nm}}$  de 1,2382, el medio APF que contenía peptonas de origen vegetal mostró un valor de  $\text{DO}_{540\text{nm}}$  de 2,8595, y el medio APF que contiene peptona de origen vegetal + hidrolizado de caseína mostró un valor de  $\text{DO}_{540\text{nm}}$  de 5,244. Por tanto, el valor de DO del medio APF que contiene peptona de origen vegetal + hidrolizado de caseína a las 24 horas de cultivo era aproximadamente 4,23 veces mayor que el del medio que está en uso actual y aproximadamente 1,83 veces mayor que el del medio APF que contiene peptona de origen vegetal. Y el valor pico de DO del medio APF que contiene peptona de origen vegetal + hidrolizado de caseína era aproximadamente 1,6 veces mayor que el del medio APF que contiene peptona de origen vegetal.

Como se muestra en la tabla 18, se determinó que los contenidos óptimos de peptonas de origen vegetal en la composición de medio finalmente seleccionada para el cultivo de *Clostridium botulinum*, que contiene un hidrolizado de caseína libre de encefalopatía espongiforme transmisible (EET), son Hy-Pea™ 7404 5 g/l, UltraPep™ Cotton 10 g/l y HyPep™ 4601N 5 g/l, y los contenidos óptimos de minerales en la composición del medio son K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,5 g/l y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g/l, y los contenidos de los hidrolizados de caseína son N-Z-Amine A 20 g/l y N-Z-Case TT 11 g/l.

Basado en esto, en un aspecto, la presente invención se dirige a una composición de medio para el cultivo de *Clostridium botulinum*, la composición de medio comprende: al menos una peptona de origen vegetal seleccionada del grupo que consiste en un hidrolizado de guisante de jardín, un hidrolizado de semilla de algodón y un hidrolizado de gluten de trigo; y un hidrolizado de caseína.

Como se usa en el presente documento, el término "peptona de origen vegetal" significa una peptona extraída de guisante de jardín, semilla de algodón o gluten de trigo. Preferiblemente, la peptona de origen vegetal puede ser, Hy-Pea™ 7404, UltraPep™ Cotton, HyPep™ 7504 o HyPep™ 4601N, comercialmente disponibles, pero no está limitada a las mismas. El término "hidrolizado de caseína" significa un componente extraído de la leche. Preferiblemente, el hidrolizado de caseína puede ser un hidrolizado de caseína que contiene aproximadamente el 85,5-94,5% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos, o un hidrolizado de caseína que contiene aproximadamente el 63,56-70,25% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos. Más preferiblemente, el hidrolizado de caseína puede ser N-Z-Amine A o N-Z-Case TT, comercialmente disponibles, pero no está limitado a los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "peptona de origen vegetal" o "hidrolizado de origen vegetal" significa un producto obtenido por degradación de una proteína aislada de una planta. Por ejemplo, la peptona de guisante de jardín (hidrolizado de guisante de jardín) significa un producto obtenido al degradar una proteína total aislada de guisante de jardín. Además, el término "hidrolizado de caseína" significa un producto obtenido al degradar la proteína caseína.

La degradación de la proteína de origen vegetal o la proteína caseína preferiblemente se realiza por digestión parcial. La degradación de la proteína preferiblemente se realiza por tratamiento ácido, tratamiento básico, tratamiento enzimático, tratamiento de alta presión, tratamiento con calor o tratamiento físico. Más preferiblemente, la peptona de origen vegetal o el hidrolizado de caseína puede ser uno obtenido por tratamiento enzimático. El tratamiento físico es, por ejemplo, moler.

La peptona de origen vegetal o hidrolizado de caseína que se usa en la presente invención es un producto de degradación parcial de proteína, es una mezcla que comprende no solo aminoácidos que son moléculas individuales, sino también péptidos compuestos de varios o varias decenas de aminoácidos, y moléculas de proteína intacta.

En la presente invención, el contenido de la peptona de origen vegetal en la composición de medio puede ser el 0,1-10% p/v (1-100 g/l), preferiblemente el 0,2-5% p/v (2-50 g/l), más preferiblemente el 0,5-2% p/v (5-20 g/l).

En la presente invención, la composición de medio contiene todos del hidrolizado de guisante de jardín, el hidrolizado de semilla de algodón y el hidrolizado de gluten de trigo, y la proporción de contenido del hidrolizado de guisante de jardín, el hidrolizado de semilla de algodón y el hidrolizado de gluten de trigo en la composición de medio puede ser 1:0,24-43,62:0,01-50,57 en peso, preferiblemente 1:0,68-14,46:0,09-9,87 en peso, más preferiblemente 1:1,6-2,4:0,6-1,4 en peso.

En la presente invención, el contenido del hidrolizado de caseína en la composición de medio puede ser el 0,22-15,5% p/v (2,2-155 g/l), preferiblemente el 0,44-7,75% p/v (4,4-77,5 g/l), más preferiblemente el 1,1-3,1% p/v (11-31 g/l).

En la presente invención, el hidrolizado de caseína puede ser un hidrolizado que contiene aproximadamente el 85,5-94,5% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos y/o un hidrolizado que contiene aproximadamente el 63,56-70,25% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos.

En la presente invención, el hidrolizado de caseína comprende tanto un hidrolizado que contiene aproximadamente el 85,5-94,5% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos como un hidrolizado que contiene aproximadamente el 63,56-70,25% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos, y la proporción de contenido del hidrolizado que contiene aproximadamente el 85,5-94,5% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos y el hidrolizado que contiene aproximadamente el 63,56-70,25% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos puede ser 0,01-40:0,01-22 en peso, preferiblemente 10-30:5,5-16,5 en peso, más preferiblemente 16-24:8,8-13,2 en peso.

En la presente invención, la composición de medio para el cultivo de *Clostridium botulinum* puede contener además una fuente de carbono y al menos un mineral seleccionado del grupo que consiste en K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato dipotásico), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato disódico) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (fosfato monopotásico).

En el presente documento, los ejemplos de la fuente de carbono incluyen, pero no están limitados a, monosacáridos (por ejemplo, glucosa, fructosa, etc.), disacáridos (por ejemplo, maltosa, sacarosa, etc.), oligosacáridos, polisacáridos (por ejemplo, dextrina, ciclodextrina, almidón, etc.), alcoholes de azúcar (por ejemplo, xilitol, sorbitol, eritritol, etc.).

- 5 En la presente invención, el contenido del mineral en la composición de medio puede ser el 0,05-3,5% p/v (0,5-35 g/l), preferiblemente el 0,1-1,75% p/v (1-17,5 g/l), y más preferiblemente el 0,25-0,7% p/v (2,5-7 g/l).

10 En otro aspecto, la presente invención se dirige a un método para producir toxina botulínica, que comprende las etapas de: (a) cultivar *Clostridium botulinum* usando la composición de medio descrita anteriormente para producir toxina botulínica; y (b) recuperar la toxina botulínica producida.

En la presente invención, el cultivo se puede realizar en condiciones anaerobias, y la toxina botulínica se puede seleccionar del grupo que consiste en toxina botulínica de tipos A, B, C, D, E, F y G.

## 15 Ejemplos

De aquí en adelante, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los ejemplos. Será obvio para un experto en la materia que estos ejemplos tienen fines ilustrativos solo y no se debe interpretar que limitan el ámbito de la presente invención. Por tanto, el ámbito sustancial de la presente invención se definirá mediante las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

### **Ejemplo 1: Cultivo de *Clostridium botulinum* en medio de peptona de origen vegetal**

#### 1-1: Composición de un medio actualmente usado en cultivo

25 Los reactivos y componentes de medio usados en la presente invención se compraron de Sigma (EE UU), Kerry Inc. (EE UU), BD Biosciences (EE UU), Gibco Life Technologies (EE UU), y Quest (EE UU).

30 Un medio que está en uso actual que tiene una composición que comprende hidrolizado de caseína al 2% (20 g/l), extracto de levadura al 1% (10 g/l), glucosa al 1% (10 g/l) y medio de tioglicolato al 0,5% (5 g/l) se usó para el cultivo semilla y el cultivo principal de *Clostridium botulinum* para producir toxina botulínica. 5 g del medio de tioglicolato por litro del medio que está en uso actual está compuesto de 2,52 g de un digerido enzimático de caseína, 0,84 g de extracto de levadura, 0,925 g de dextrosa, 0,085 g de tioglicolato de sodio, 0,42 g de NaCl, 0,085 g de L-cisteína, 0,00014 g de resazurina y 0,125 g de agar bacteriológico.

#### 1-2: Composición de medio APF usado en cultivo

40 Se preparó un medio control negativo eliminando el hidrolizado de caseína, extracto de levadura y medio de tioglicolato del medio que está en uso actual (medio original) para el cultivo de *Clostridium botulinum*, y se preparó un medio sin proteína animal (APF) añadiendo cuatro candidatos de peptona de origen vegetal (Hy-Pea™ 7404, UltraPep™ Cotton, HyPep™ 7504, y HyPep™ 4601N) al medio control negativo (Tabla 1).

La tabla 1 muestra los componentes del medio APF que contiene peptona de origen para el cultivo de *Clostridium botulinum* en comparación con el medio que está en uso actual.

45 Tabla 1

Componentes del medio	Conc. (g/L)	medio que está en uso actual	Control Negativo	medio APF
Glucosa	10	10	10	10
Cloruro de sodio (NaCl)	0.42	0.42	0.42	0.42
Hidolizado de caseína	20	20	-	-
Extracto de levadura	10	10	-	-
Medio de tioglicolato	5	5	-	-
Hy-Pea™ 7404	20	-	-	20
UltraPep™ Cotton	10	-	-	10
HyPep™ 7504	10	-	-	10
HyPep™ 4601N	10	-	-	10

50 1-3: Cultivo semilla de *Clostridium botulinum*

Se inocularon 20 µl de *Clostridium botulinum* (No. de registro de los Centros Coreanos para el Control y Prevención de Enfermedades: 4-029-CBB-IS-001) en un tubo de cultivo que contenía 10 ml de un medio estéril que tenía cada una de las composiciones descritas en los ejemplos 1-1 y 1-2 y se sometió a cultivo semilla primario (cultivo estacionario) a 35°C durante 22-30 horas en condiciones anaerobias. Cuando el crecimiento de la bacteria en el cultivo semilla primario se confirmó, se inocularon 8 ml del cultivo semilla primario en una botella de cultivo de 1 litro que contenía 800 ml de un medio estéril que tenía la misma composición de medio y se sometió a cultivo semilla secundario (cultivo estacionario) a 35°C durante 8-15 horas en condiciones anaerobias.

1-4: Cultivo principal de *Clostridium botulinum*

Con el fin de producir una toxina botulínica cultivando *Clostridium botulinum*, se realizó el cultivo principal de la bacteria. Específicamente, se prepararon 9,3 l de un medio que tenía cada una de las composiciones descritas en los ejemplos 1-1 y 1-2 y se colocaron en un incubador de 10 litros, seguido por esterilización del medio. Se suministró nitrógeno para hacer condiciones anaerobias, y el crecimiento de la bacteria se realizó a una temperatura de 35°C y una velocidad de agitación de 50 rpm.

El cultivo semilla secundario en la botella de cultivo de 1 litro en el ejemplo 1-3 se inoculó en un incubador de 10 litros a través de una línea de inoculación conectada al puerto de inoculación del incubador de 10 litros. Se cultivó *Clostridium botulinum* en el incubador de 10 litros en condiciones de 35°C y 50 rpm y las condiciones de cultivo ajustadas se siguieron y registraron. Cuando la bacteria se cultivó durante 100 horas o más, el cultivo principal se terminó.

El crecimiento de *Clostridium botulinum* en el medio sin proteína animal (APF) preparado añadiendo cuatro tipos de candidatos de peptona de origen animal (Hy-Pea™ 7404, UltraPep™ Cotton, HyPep™ 7504, y HyPep™ 4601N) al medio control negativo se comparó con el de la bacteria en el medio control negativo preparado al eliminar el hidrolizado de caseína, extracto de levadura y medio de tioglicolato del medio que está en uso actual (medio original) (Tabla 1).

Como resultado, como se muestra en la tabla 1 y la figura 1, *Clostridium botulinum* no creció en el medio control negativo, pero empezó a crecer en medio original (medio que está en uso actual) a las 24 horas después de la inoculación de la bacteria y empezó a crecer en el medio que contiene peptonas de origen vegetal a las 30 horas después de la inoculación de la bacteria.

**Ejemplo 2: Cultivo de *Clostridium botulinum* en medio que contiene peptona de origen vegetal, mineral, aminoácido y vitamina**

Puesto que el crecimiento de *Clostridium botulinum* en el medio preparado añadiendo las cuatro peptonas de origen vegetal en el ejemplo 1 era más lento que ese en el medio original, se proporcionaron soluciones al mismo como sigue.

1) Para examinar el efecto del funcionamiento de tioglicolato para hacer condiciones anaerobias, se eliminó el tioglicolato del medio original (medio que está en uso actual), y se analizó un cambio en la velocidad de crecimiento de la bacteria en el medio sin tioglicolato.

2) Puesto que la velocidad de crecimiento más lenta pudiera ser debido a la falta de la fuente de nitrógeno, la concentración de peptona en el medio usado para el cultivo de la bacteria se aumentó dos veces.

3) El crecimiento de *Clostridium botulinum* en un medio obtenido añadiendo mineral, aminoácido y vitamina al medio que contenía peptonas de origen vegetal se comparó con el crecimiento de *Clostridium botulinum* en un medio APF divulgado en la patente en EE UU No. 8.012.716 (Allergan) (Tabla 2).

La tabla 2 muestra los componentes del medio para el cultivo de *Clostridium botulinum*, que contiene peptonas de origen vegetal, minerales, aminoácidos y vitaminas.

Tabla 2

Componentes del medio	g/L	medio que está en uso actual	1 (Candidato a medio APF)	2 (Candidato a medio APF)	3 (Candidato a medio APF)	4 (Candidato a medio APF)	Medio APF de Allergan Company
Glucosa	10	10	10	10	10	10	15
Cloruro de sodio (NaCl)	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	-
Hidrolizado de caseína	20	20	20	-	-	-	-
Extracto de levadura	10	10	10	-	-	-	12
Medio de tioglicolato	5	5	-	-	-	-	-
Hy-Pea™ 7404	20	-	-	20	40	20	-
UltraPep™ Cotton	10	-	-	10	20	10	-
HyPep™ 7504	10	-	-	10	20	10	-
HyPep™ 4601N	10	-	-	10	20	10	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	-	-	-	-	7	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5	-	-	-	-	5.5	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	-	-	-	-	5	-
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10	-	-	-	-	10	-
Kit de vitaminas 100X		-	-	-	-	1X	-
Mezcla de aminoácidos 50X		-	-	-	-	1X	-
Peptona de soja	32.5	-	-	-	-	-	32.5

5 Como resultado, como se muestra en la tabla 2 y la figura 2, cuando la bacteria se cultivó en el medio que está en uso actual sin tioglicolato, la velocidad de crecimiento de la bacteria en el medio era más lenta que esa en el medio que contiene tioglicolato, lo que indica que el tioglicolato influye la velocidad de crecimiento de la bacteria. Cuando la concentración de peptona en el medio se aumentó dos veces, la bacteria no creció en el medio. Cuando en el caso en que se añadieron componentes minerales, aminoácidos y vitaminas al medio que contiene peptona, la velocidad de crecimiento de la bacteria era similar a esa en el medio que está en uso actual, pero se formó un precipitado después de la esterilización del medio. Además, se vio que la velocidad de crecimiento de la bacteria en el medio APF de Allergan era similar a esa en el medio que está en uso actual.

**Ejemplo 3: Producción de precipitado por esterilización de medio que contiene peptonas de origen vegetal, minerales, aminoácidos y vitaminas**

15 En el ejemplo 2, se observó que la velocidad de crecimiento de *Clostridium botulinum* en el medio que contiene peptonas de origen vegetal, minerales, aminoácidos y vitaminas, entre los candidatos a medios APF 2 a 4 mostrados en la tabla 2, era similar a esa en el medio que está en uso actual. Sin embargo, la formación de un precipitado apareció después de la esterilización del medio, y por tanto se examinó la causa del mismo (Tabla 3).

20 La tabla 3 muestra los componentes de un medio para el cultivo de *Clostridium botulinum*, que se usó en esterilización y contiene peptonas de origen vegetal, minerales, aminoácidos y vitaminas.

Tabla 3

Componentes del medio	g/L	medio que está en uso actual	1 (Candidato a medio APF)	2 (Candidato a medio APF)	3 (Candidato a medio APF)	4 (Candidato a medio APF)
Glucosa	10	10	10	10	10	10
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Hidrolizado de caseína	20	20	-	-	-	-
Extracto de levadura	10	10	-	-	-	-
Medio de tioglicolato	5	5	-	-	-	-
Hy-Pea™ 7404	20	-	20	20	20	20
UltraPep™ Cotton	10	-	10	10	10	10
HyPep™ 7504	10	-	10	10	10	10
HyPep™ 4601N	10	-	10	10	10	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	-	7	7	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5	-	5.5	5.5	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	-	5	5	-	-
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10	-	10	10	-	-
Kit de vitaminas 100X		-	1X	-	1X	1X (añadir después de la esterilización)
Mezcla de aminoácidos 50X		-	1X	-	1X	1X (añadir después de la esterilización)

5 Como resultado, como se muestra en la tabla 3 y la figura 3, solo en el caso en que los minerales se añadieron al medio que contiene peptonas de origen vegetal, se formó un precipitado después de la esterilización del medio, lo que indica que la principal causa de la formación del precipitado eran los minerales. Se cree que esto es porque los componentes minerales interactuaban entre sí en las condiciones de alta temperatura y alta presión durante la esterilización del medio.

10 **Ejemplo 4: Formación de precipitado por esterilización de medio que contiene peptonas de origen vegetal y minerales**

Con el fin de identificar los componentes minerales implicados en la formación de precipitado causado por la esterilización como se confirmó en el ejemplo 3, varias combinaciones de diferentes componentes se añadieron a los medios, seguido por esterilización (Tabla 4).

15 La tabla 4 muestra los componentes de medios para el cultivo de *Clostridium botulinum*, que contienen peptonas de origen vegetal y minerales, y los resultados de esterilización de los medios.

Tabla 4

Componentes del medio	g/L	medio que está en uso actual	1 (Candidato a medio APF)	2 (Candidato a medio APF)	3 (Candidato a medio APF)	4 (Candidato a medio APF)	5 (Candidato a medio APF)	6 (Candidato a medio APF)	7 (Candidato a medio APF)	8 (Candidato a medio APF)	9 (Candidato a medio APF)	10 (Candidato a medio APF)	11 (Candidato a medio APF)	12 (Candidato a medio APF)
Glucosa	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Hidrolizado de caseína	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extracto de levadura	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
medio de tioglicolato	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hy-Pea™ 7404	20	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
UltraPep™ Cotton	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
HyPep™ 7504	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
HyPep™ 4601N	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	-	-	7	-	7	7	7	-	7	7	-	-	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5	-	-	5.5	5.5	-	5.5	5.5	-	-	5.5	5.5	5.5	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	-	-	5	5	5	5	5	5	-	-	5	-	5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10	-	-	10	10	10	10	-	10	10	-	-	10	-
precipitación, agregación			x	o	o	o	o	x	o	x	x	x	o	x

Como resultado, como se muestra en la tabla 4 y la figura 4, entre los medios que contienen peptonas de origen vegetal y minerales, el medio que contiene MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y el medio que contiene MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> formaron un precipitado después de la esterilización.

**Ejemplo 5: Cultivo de *Clostridium botulinum* en condiciones en que no se forma precipitado en el medio APF**

Se realizó un experimento para determinar si es posible el cultivo de *Clostridium botulinum* cuando se añaden adicionalmente vitamina y aminoácidos al medio APF del ejemplo 4 que contiene peptonas de origen vegetal y minerales. Además, se realizó un experimento para examinar si es posible el cultivo de la bacteria en un medio que está libre de peptona de origen vegetal y mineral y contiene vitaminas, aminoácidos y/o “BD Recharge™ sin glucosa ni L-glutamina” (No. de catálogo 670002, BD Bioscience) (un componente de medio basado en extracto de levadura sin glucosa ni L-glutamina) (Tabla 5).

La tabla 5 muestra los componentes de medios obtenidos al añadir adicionalmente vitaminas, aminoácidos y “BD Recharge™ sin glucosa ni L-glutamina” al medio para cultivo de *Clostridium botulinum*, que contiene peptonas de origen vegetal y minerales, y las velocidades de crecimiento de la bacteria en los medios.

Tabla 5

Componentes del medio	g/L	medio que está en uso actual	1 (Candidato a medio APF)	2 (Candidato a medio APF)	3 (Candidato a medio APF)	4 (Candidato a medio APF)	5 (Candidato a medio APF)	6 (Candidato a medio APF)	7 (Candidato a medio APF)	8 (Candidato a medio APF)	9 (Candidato a medio APF)	10 (Candidato a medio APF)	11 (Candidato a medio APF)	12 (Candidato a medio APF)
Glucosa	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Hidrolizado de caseína	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extracto de levadura	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medio de tioglicolato	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiglicolato de sodio	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Hy-Pea™ 7404	20	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	-
UltraPep™ Cotton	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
HyPep™ 7504	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
HyPep™ 4601N	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	-	-	7	7	7	-	7	-	-	-	-	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5	-	-	5.5	-	5.5	5.5	-	-	-	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	-	-	5	-	-	5	5	-	-	-	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kit vitaminas 100X		-	-	1X	-	-	1X	-						
Mezcla de aminoácidos 50X		-	-	1X	-	-	1X	-						
Sin glucosa ni L-glutamina	45.42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45.42	-	45.42	45.42
Crecimiento			×	o	×	o	o	o	o	×	×	×	×	o
Detalles				Crece en 24hrs		Crece en 24hrs	Crece en 24hrs	Crece en 24hrs						Crece en 48hr

Como resultado, como se muestra en la tabla 5 y la figura 5, solo en el caso en el que el medio contenía peptonas de origen vegetal y una combinación de dos o más minerales de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y además contenía vitamina y aminoácido, *Clostridium botulinum* creció a las 24 horas después de la inoculación de la bacteria. Además, en el caso en el que el medio estaba libre de peptona de origen vegetal y mineral y contenía vitaminas, aminoácidos y “BD Recharge™ sin glucosa ni L-glutamina”, la bacteria creció a las 48 horas después de la inoculación de la bacteria. En conclusión, la composición de medio más adecuada para el cultivo de *Clostridium botulinum* comprende peptonas de origen vegetal, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, aminoácidos y vitaminas.

**Ejemplo 6: Cultivo de *Clostridium botulinum* en medios que contienen diferentes peptonas de origen vegetal**

Se realizó un experimento para examinar si es posible el cultivo de *Clostridium botulinum* cuando se añaden diferentes combinaciones de peptonas de origen vegetal al medio APF del ejemplo 5.

La tabla 6 muestra los componentes de medios para cultivo de *Clostridium botulinum*, que contienen diferentes peptonas de origen vegetal, y los resultados de examinar si la bacteria creció en los medios.

Tabla 6

Componentes del medio	g/L	medio que está en uso actual	1 (Candidato a medio APF)	2 (Candidato a medio APF)	3 (Candidato a medio APF)	4 (Candidato a medio APF)	5 (Candidato a medio APF)	6 (Candidato a medio APF)	7 (Candidato a medio APF)	8 (Candidato a medio APF)	9 (Candidato a medio APF)	10 (Candidato a medio APF)	11 (Candidato a medio APF)	12 (Candidato a medio APF)	13 (Candidato a medio APF)
Glucosa	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Hidrolizado de caseína	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extracto de levadura	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medio de tioglicolato	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tioglicolato de sodio	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-
Hy-Pea™ 7404	10	-	10	10	-	-	-	-	-	-	10	10	10	-	-
UltraPep™ Cotton	10	-	10	-	10	-	-	-	10	10	-	-	10	-	-
HyPep™ 7504	10	-	10	-	-	10	-	10	-	10	-	10	-	-	-
HyPep™ 4601N	10	-	10	-	-	-	10	10	10	-	10	-	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	-	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5	-	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kit de vitaminas 100X		-	-	1X	1X	1X	1X								
Mezcla de aminoácidos 50X		-	-	1X	1X	1X	1X								
sin glucosa ni L-glutamina	45.42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45.42	45.42
Crecimiento			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	x	x

Como resultado, como se muestra en la tabla 6 y la figura 6, incluso cuando solo o dos de las cuatro peptonas de origen vegetal se añadieron al medio, el cultivo de *Clostridium botulinum* era posible.

5 Considerando los resultados de los ejemplos 5 y 6, se pudo ver que al menos una peptona de origen vegetal debe estar contenida en el medio y que la peptona de origen vegetal no se puede sustituir con “BD Recharge™ sin glucosa ni L-glutamina” (No. de catálogo 670002, BD Bioscience) (un componente de medio basado en extracto de levadura sin glucosa ni L-glutamina).

10 **Ejemplo 7: Experimento para la selección de dos de tres minerales contenidos en el medio**

En los ejemplos 1 a 7 se determinó que la composición de medio APF usada para el cultivo de *Clostridium botulinum* comprende glucosa, cloruro de sodio (NaCl), cuatro peptonas de origen vegetal, tres minerales, aminoácidos, y vitaminas. Entre estos componentes de medio, los componentes del medio que no tenían efecto significativo sobre el crecimiento de la bacteria se eliminaron para reducir el número de componentes de medio. Por tanto, se juzgó que los aminoácidos y vitaminas no tienen efecto significativo sobre el crecimiento de *Clostridium botulinum*, y bajo este juicio, los aminoácidos y vitaminas se eliminaron de los componentes del medio. Además, con el fin de seleccionar dos de tres minerales, la bacteria se cultivó usando las composiciones de medio mostradas en la tabla 7, y los valores de DO (540 nm y 600 nm) a las 24 horas y 48 horas después de la inoculación de la bacteria se midieron y compararon.

La tabla 7 muestra las composiciones de los medios resultantes de la selección de primera fase de minerales y el crecimiento de *Clostridium botulinum* en los medios.

25 Tabla 7

Componentes del medio	g/L	medio que está en uso actual	1 (Candi dato a medio APF)	2 (Candi dato a medio APF)	3 (Candi dato a medio APF)	4 (Candi dato a medio APF)	5 (Candi dato a medio APF)	6 (Candi dato a medio APF)	7 (Candi dato a medio APF)	8 (Candi dato a medio APF)	9 (Candi dato a medio APF)	10 (Candi dato a medio APF)	11 (Candi dato a medio APF)
Glucosa	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Hidrolizado de caseína	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extracto de levadura	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medio de tioglicolato	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hy-Pea™ 7404	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
UltraPep™ Cotton	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
HyPep™ 7504	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
HyPep™ 4601N	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	-	-	7	-	7	-	7	-	7	3.5	3.5	3.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5	-	-	-	5.5	5.5	-	-	5.5	5.5	2.75	2.75	2.75
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	-	-	-	-	-	5	5	5	5	2.5	2.5	2.5
DO de cultivo 24 h	540nm	0.942	-0.017	-0.024	4.396	3.226	4.218	3.214	4.964	3.991	3.951	3.938	3.594
	600nm	0.780	-0.016	-0.020	3.832	2.691	3.593	2.680	4.304	3.351	3.341	3.335	3.036
DO de cultivo 48 h	540nm	2.459	-0.014	-0.019	4.716	5.220	3.502	5.460	2.056	2.603	5.726	5.682	5.434
	600nm	2.057	-0.015	-0.018	3.852	4.288	2.989	4.480	1.587	2.020	4.688	4.647	4.459

5 Como resultado, como se muestra en la tabla 7, a las 24 horas de la inoculación de la bacteria, el medio que está en uso actual mostró un valor de DO (540 nm) de 0,942, y el medio APF que contiene K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mostró el mayor valor de DO (540 nm) de 4,964 entre los medios APF. Además, a las 48 horas después de la inoculación de la bacteria, el medio APF que contiene KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mostró el mayor valor de DO y crecimiento bacteriano activo.

10 Mientras tanto, como se muestra en la figura 7, se dibujaron gráficos de nivel de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> que tienen efectos principales. Como resultado, según aumentaron las concentraciones de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, el valor de DO aumentó. Y *Clostridium botulinum* mostró el mayor crecimiento cuando se añadieron minerales al medio a las concentraciones de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = 5,5 g/l, y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = 5 g/l.

15 Mientras tanto, con el fin de confirmar los resultados de cultivo bacteriano según adición más precisa de minerales, se realizó un experimento de segunda fase usando metodología de superficie de respuesta. Puesto que la composición del medio no puede tener un valor negativo, el experimento se planeó usando un diseño CCF (compuesto central enfrentado) y se realizó cultivando la bacteria en las composiciones de medio mostradas en la tabla 8. A continuación, los resultados experimentales se combinaron con los resultados del FFD previamente realizado y se sometieron a análisis estadístico.

20 La tabla 8 muestra las composiciones de los medios obtenidas por la selección de segunda fase de minerales y el crecimiento de *Clostridium botulinum* en los medios.

Tabla 8

Componentes del medio	g/L	1 (Candi dato a medio APF)	2 (Candi dato a medio APF)	3 (Candi dato a medio APF)	4 (Candi dato a medio APF)	5 (Candi dato a medio APF)	6 (Candi dato a medio APF)	7 (Candi dato a medio APF)	8 (Candi dato a medio APF)	9 (Candi dato a medio APF)	medio que está en uso actual
Glucosa	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-
Hidrolizado de caseína	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Extracto de levadura	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Medio de tioglicolato	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Hy-Pea™ 7404	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
UltraPep™ Cotton	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
HyPep™ 7504	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
HyPep™ 4601N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	-	7	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5	2.75	2.75	-	5.5	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	2.5	2.5	2.5	2.5	-	5	2.5	2.5	2.5	-
DO 24hr	540nm	4.408	3.587	2.233	4.639	1.778	4.332	3.904	3.907	4.046	1.556
	600nm	3.836	3.086	1.896	4.068	1.503	3.777	3.366	3.368	3.505	1.307
DO 48hr	540nm	5.021	5.760	4.359	3.594	4.529	4.054	6.492	5.621	5.473	3.622
	600nm	4.284	4.925	3.695	3.049	3.832	3.457	5.603	4.830	4.677	3.062

5 Se dibujaron gráficos de nivel y se usaron para comparación. Como se muestra en la figura 8, el valor DO aumentó según disminuyó la concentración de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Cuando se compararon las condiciones óptimas, los resultados fueron diferentes de los resultados de FFD debido al efecto curvatura, y el valor de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> fue el mismo, pero el valor de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> cambió de 5 g/l a 3,1313 g/l. Por tanto, se confirmó que las condiciones de minerales óptimas del medio por análisis estadístico eran K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,5 g/l y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g/l.

10 **Ejemplo 8: Experimento para la selección de peptonas de origen vegetal contenidas en el medio**

Como se muestra en las tablas 9 y 10, se combinaron peptonas de origen vegetal según un diseño de mezcla, y se examinó el crecimiento de *Clostridium botulinum* en un medio que contenía las peptonas de origen vegetal combinadas.

15 La tabla 9 muestra las composiciones de los medios obtenidos por la selección de primera fase de peptonas de origen vegetal y el crecimiento de *Clostridium botulinum* usando los medios.

Tabla 9

ES 2 805 726 T3

Componentes del medio	g/L	1 (Candi dato a medio APF)	2 (Candi dato a medio APF)	3 (Candi dato a medio APF)	4 (Candi dato a medio APF)	5 (Candi dato a medio APF)	6 (Candi dato a medio APF)	7 (Candi dato a medio APF)	8 (Candi dato a medio APF)	9 (Candi dato a medio APF)	10 (Candi dato a medio APF)	11 (Candi dato a medio APF)	medio que está en uso actual
Glucosa	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-
Hidrolizado de caseína	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Extracto de levadura	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Medio de tioglicolato	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Hy-Pea™ 7404	10	5	10	5	5	-	-	6.667	6.667	-	-	10	-
UltraPep™ Cotton	10	5	-	5	5	10	-	6.667	6.667	20	-	10	-
HyPep™ 7504	10	5	10	5	5	-	10	-	6.667	-	20	10	-
HyPep™ 4601N	10	5	-	5	5	10	10	6.667	-	-	-	10	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-
DO 24hr	540nm	3.541	2.440	3.345	3.305	3.317	2.852	3.695	2.772	2.353	1.688	4.842	2.239
	600nm	3.058	2.066	2.868	2.831	2.853	2.445	3.183	2.376	2.014	1.419	4.245	1.893
DO 48hr	540nm	0.811	0.935	0.731	0.799	1.400	0.777	1.660	1.090	1.810	1.402	2.093	3.341
	600nm	0.714	0.795	0.647	0.694	1.199	0.680	1.403	0.929	1.548	1.210	1.764	2.812

La tabla 10 muestra las composiciones de los medios obtenidos por la selección de segunda fase de peptonas de origen vegetal y el crecimiento de *Clostridium botulinum* usando los medios.

5

Tabla 10

Componentes del medio	g/L	1 (Candi dato a medio APF)	2 (Candi dato a medio APF)	3 (Candi dato a medio APF)	4 (Candi dato a medio APF)	5 (Candi dato a medio APF)	6 (Candi dato a medio APF)	7 (Candi dato a medio APF)	8 (Candi dato a medio APF)	9 (Candi dato a medio APF)	10 (Candi dato a medio APF)	11 (Candi dato a medio APF)	12 (Candi dato a medio APF)	13 (Candi dato a medio APF)	medio que está en uso actual
Glucosa	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-
Hidrolizado de caseína	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Extracto de levadura	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Medio de tioglicolato	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Hy-Pea™ 7404	10	5	5	-	-	10	10	5	20	-	6.667	10	10	10	-
UltraPep™ Cotton	10	5	5	10	6.667	10	-	5	-	-	-	10	10	10	-
HyPep™ 7504	10	5	5	10	6.667	-	-	5	-	-	6.667	10	10	10	-
HyPep™ 4601N	10	5	5	-	6.667	-	10	5	-	20	6.667	10	10	10	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-
DO 24hr	540nm	3.425	3.640	2.349	2.581	3.272	1.289	3.514	0.776	1.257	3.457	5.376	5.235	4.809	2.208
	600nm	2.969	3.159	2.029	2.244	1.096	1.096	3.032	0.649	1.098	2.950	4.689	4.534	4.246	1.863
DO 48hr	540nm	0.769	0.836	1.633	0.961	1.591	1.148	0.803	0.880	1.278	0.962	1.986	1.994	2.019	3.185
	600nm	0.675	0.732	1.420	0.854	1.270	0.982	0.698	0.744	1.124	0.818	1.708	1.710	1.717	2.708

Como resultado, como se muestra en la figura 9, se dibujaron gráficos de nivel y se usaron para el análisis. Se determinó que HyPep™ 7504 que corresponde al componente C tiene el menor efecto sobre el crecimiento de *Clostridium botulinum*. Basado en esta determinación, HyPep™ 7504 se excluyó de los componentes del medio. En conclusión, se determinó que la composición de las peptonas de origen vegetal finalmente seleccionadas que están contenidas en el medio comprende Hy-Pea™ 7404 5 g/l, UltraPep™ Cotton 10 g/l y HyPep™ 4601N 5 g/l.

**Ejemplo 9: Cultivo de *Clostridium botulinum* en medio que contiene o no contiene NaCl**

Las composiciones de medio usadas en los ejemplos 1 a 8 contenían una pequeña cantidad (0,5 g/l) de NaCl. Con el fin de examinar el crecimiento de *Clostridium botulinum* según el cambio en la concentración de NaCl, el contenido de NaCl en el medio se ajustó a un intervalo desde 0 a 1 g/l, seguido por cultivo de la bacteria en el medio.

La tabla 11 muestra los componentes de los medios que contienen NaCl para el cultivo de *Clostridium botulinum* y el crecimiento de *Clostridium botulinum* en los medios.

Tabla 11

Componentes del medio	g/L	1 (Candidato a medio APF)	2 (Candidato a medio APF)	3 (Candidato a medio APF)	4 (Candidato a medio APF)	5 (Candidato a medio APF)	6 (Candidato a medio APF)	7 (Candidato a medio APF)	8 (Candidato a medio APF)	9 (Candidato a medio APF)
Glucosa	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Cloruro de sodio (NaCl)	0,5	-	-	-	0,5	0,5	0,5	1	1	1
Hy-Pea™ 7404	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
UltraPep™ Cotton	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
HyPep™ 4601N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
DO 24hr	540nm	2.166	2.154	2.151	2.148	2.115	2.120	2.145	2.147	2.140
	600nm	1.940	1.923	1.922	1.922	1.892	1.896	1.919	1.922	1.917

Como resultado, como se muestra en la figura 11, no hubo diferencia en el crecimiento de la bacteria contuviera el medio NaCl o no. Por tanto, se excluyó NaCl de los componentes del medio APF final.

**Ejemplo 10: Medida del patrón de crecimiento de *Clostridium botulinum* en el medio APF finalmente seleccionado y concentración de toxina**

Se inoculó *Clostridium botulinum* en el medio de cultivo de *Clostridium botulinum* finalmente seleccionado (glucosa 10 g/l, Hy-Pea™ 7404 5 g/l, UltraPep™ Cotton 10 g/l, HyPep™ 4601N 5 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,5 g/l y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g/l) determinado basado en los resultados de los ejemplos 1 a 9, y después se midieron el patrón de crecimiento de la bacteria y la concentración de toxina.

La tabla 12 muestra el valor de DO dependiente del tiempo y la concentración de toxina de *Clostridium botulinum* hecha crecer en el medio APF finalmente seleccionado.

Tabla 12

Tiempo de cultivo (h)	DO		Conc. de toxina en el sobrenadante (µg/ml)	Conc. de toxina total después de romper la cepa (µg/ml)
	540nm	600nm		
0	0	0	0	0
6	0.0953	0.0393	0.00	0.00
9	0.0648	0.0525	0.00	0.00
12	0.5003	0.4411	0.00	0.00
14	1.1328	0.9958	2.18	2.04
16	1.6252	1.4484	4.64	10.22
18	2.3435	2.0215	6.77	18.15
20	2.777	2.4015	8.47	29.26
22	3.3485	2.896	9.46	31.86
24	3.5465	3.0695	-	31.73
28	3.452	2.982	-	37.31
36	2.5955	2.242	21.20	38.00
48	0.792	0.7224	31.41	38.39

Como resultado, como se muestra en la tabla 12 y la figura 10, el valor de DO empezó a aumentar después de 12 horas de cultivo de *Clostridium botulinum*, y a las 24 horas de cultivo, el medio de cultivo mostró una DO<sub>540nm</sub> de 3,5465 y una DO<sub>600nm</sub> de 3,0695. A continuación, el valor de DO disminuyó gradualmente, y a las 48 horas de cultivo, el medio de cultivo mostró una DO<sub>540nm</sub> de 0,792 y una DO<sub>600nm</sub> de 0,7224. La concentración de toxina en el sobrenadante de *Clostridium botulinum* empezó a aumentar después de 14 horas de cultivo y mostró un valor final de 31,41 µg/ml. Cuando la concentración de la toxina se midió después de romper la bacteria, la toxina empezó a producirse después de 5 horas de cultivo, y la concentración de toxina siguió aumentando, se mantuvo a un nivel uniforme después de 28 horas de cultivo, y mostró un valor final de 38,39 µg/ml.

En conclusión, la composición APF (medio sin proteína animal) finalmente seleccionada determinada en base a los resultados de los ejemplos 1 a 10 se resume en la tabla 13.

15 Tabla 13

Componentes del medio		g/L
Fuente de carbono	Glucosa	10
Fuente de nitrógeno (peptona vegetal)	Hy-Pea™ 7404	5
	UltraPep™ Cotton	10
	HyPep™ 4601N	5
Mineral	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3

20 **Ejemplo 11: Selección de composición de medio que contiene peptonas de origen vegetal e hidrolizado de caseína**

La composición de medio APF determinada en base a los resultados de los ejemplos 1 a 10 mostró una velocidad de crecimiento aumentada de la bacteria comparada con el medio que está en uso actual (medio original), pero se consideró la adición de un componente de medio que aumente más la velocidad de crecimiento de la bacteria al tiempo que no tiene riesgo de infección con EET o similar. Como resultado, se añadió un hidrolizado de caseína libre de EET

(por ejemplo, hidrolizado de caseína certificado para EET) al medio APF, y el crecimiento de la bacteria en el medio se examinó.

5 Se añadieron uno o dos hidrolizados de caseína sin EET al medio APF determinado en base los resultados de los ejemplos 1 a 10. Específicamente, se cultivó *Clostridium botulinum* en medio A (obtenido añadiendo el hidrolizado de caseína N-Z-Amine A a la composición de medio que contiene las peptonas derivadas de plantas), o medio B (obtenido añadiendo N-Z-Case TT a la composición de medio) o el medio C (obtenido añadiendo casaminoácido a la composición de medio), o medio D (obtenido añadiendo triptona a la composición de medio) durante 24 horas y 48 horas, y el crecimiento de la bacteria se examinó midiendo los valores de DO (540 nm, 600 nm) durante el cultivo (Tabla 14). Además, los resultados de la medida se sometieron a análisis estadístico usando un programa estadístico, seleccionando de esta manera una composición de medio que muestra el mayor crecimiento a las 24 horas de cultivo de la bacteria.

15 La tabla 14 muestra los resultados del crecimiento dependiente del tiempo de *Clostridium botulinum* en las composiciones de medio que contienen hidrolizados de caseína además de peptonas de origen vegetal.

Tabla 14

Orden Estándar	Orden Carrera	A (N-Z-AMINE A)	B (N-Z-CASE TT)	C (Casaminoácido)	D (Triptona)	DO a 24hr		DO a 48hr	
						540nm	600nm	540nm	600nm
1	11	2	0	0	0	4.7040	4.0620	2.3385	2.0715
2	6	0	2	0	0	4.8460	4.1540	1.2785	1.1525
3	2	0	0	2	0	4.7470	4.1140	1.7340	1.5510
4	10	0	0	0	2	4.5240	3.8620	1.1890	1.0710
5	4	1	1	0	0	5.1810	4.4540	1.5360	1.3720
6	3	1	0	1	0	4.9620	4.2900	2.0780	1.8460
7	13	1	0	0	1	4.7280	4.0700	1.2785	1.1475
8	9	0	1	1	0	4.8410	4.1700	1.5390	1.3735
9	7	0	1	0	1	4.8060	4.1370	1.2260	1.1075
10	15	0	0	1	1	4.5690	3.9220	1.3800	1.2375
11	1	0.666666667	0.666666667	0.666666667	0	5.3350	4.5990	1.5385	1.3880
12	14	0.666666667	0.666666667	0	0.666666667	4.9790	4.2880	1.3570	1.2035
13	5	0.666666667	0	0.666666667	0.666666667	4.9020	4.2160	1.7280	1.5575
14	8	0	0.666666667	0.666666667	0.666666667	4.9930	4.2820	1.5305	1.3670
15	12	0.5	0.5	0.5	0.5	4.8500	4.1860	1.4845	1.3250

20 Mientras tanto, como se muestra en la figura 11, con el fin de encontrar condiciones que muestran el mayor crecimiento a las 24 horas de cultivo de la bacteria, se dibujaron gráficos de nivel mixtos para condiciones de ajuste unidas a inferior y ajuste medio. Como resultado, se pudo ver que *Clostridium botulinum* mostró el mayor crecimiento en la región en que el medio A y el medio B existen y el medio C y el medio D muestran un valor de 0. Además, como se muestra en la figura 12, se investigaron las condiciones que muestran el mayor crecimiento de la bacteria, y como resultado, se mostró que la bacteria mostraba el mayor crecimiento en las siguientes condiciones: A = 0,8725, B = 1,1275, C = 0, y D = 0. Basado en tales resultados, el medio A (N-Z-Amine A) y el medio B (N-Z-Case TT) se seleccionaron finalmente de entre los cuatro componentes de medio.

30 **Ejemplo 12: Selección final de la concentración de medio que contiene peptonas de origen vegetal e hidrolizado de caseína**

35 Para determinar la composición de medio óptimo para los dos componentes de medio de hidrolizado de caseína seleccionados en el ejemplo 11, se realizó un experimento de superficie de respuesta con un diseño CCF (compuesto central enfrentado).

40 La tabla 15 muestra los resultados de analizar el crecimiento dependiente del tiempo de *Clostridium botulinum* en la composición de medio que contiene las peptonas de origen vegetal y los hidrolizados de caseína usando la metodología de superficie de respuesta CCF.

Tabla 15

Orden Estándar	Orden Carrera	A (N-Z-AMINE A)	B (N-Z-CASE TT)	DO a 24hr		DO a 48hr	
				540nm	600nm	540nm	600nm
1	3	0	0	3.4850	2.9430	1.4095	1.2110
2	2	2	0	5.1410	4.4030	2.3800	2.0880
3	8	0	2	5.1410	4.4020	1.3590	1.1415
4	7	2	2	5.2690	4.5560	1.7715	1.5420
5	11	0	1	4.2000	3.5680	0.6885	0.6075
6	10	2	1	5.3730	4.6280	1.7055	1.4930
7	5	1	0	3.9240	3.3190	3.2370	2.8775
8	13	1	2	5.1380	4.4140	1.2905	1.1330
9	12	1	1	5.1850	4.4520	1.5585	1.3380
10	6	1	1	5.3810	4.6390	2.9825	2.6300
11	9	1	1	4.9080	4.2150	0.8165	0.7125
12	1	1	1	5.1150	4.3910	1.4515	1.2725
13	4	1	1	5.2110	4.4710	2.6785	2.3405

Como resultado, como se muestra en la tabla 15, se encontró que *Clostridium botulinum* creció.

- 5 Mientras tanto, se dibujó un gráfico de nivel de un ajuste modelo usando un programa estadístico. Como se muestra en la figura 13 (A), el componente de medio A aumentó fuera del intervalo experimental, lo que indica que hay condiciones óptimas. Para confirmarlo, el intervalo del componente de medio A (N-Z-Amine A) se extendió fuera del intervalo experimental usando un programa estadístico, y se dibujó un gráfico de nivel. Como resultado, como se muestra en la figura 13 (B), el crecimiento de la bacteria aumentó según aumentó la concentración del componente de medio A. Sin embargo, puesto que un aumento en el contenido del hidrolizado de caseína puede producir un problema en términos de solubilidad, se seleccionó una condición óptima dentro de los intervalos experimentales.

10 Como resultado, la bacteria mostró el mayor crecimiento a las 24 horas de cultivo en las siguientes condiciones: A = 2,0, y B = 1,1402. Basado en tales resultados, se determinó una composición de medio que contenía el hidrolizado de caseína añadido al medio sin proteína animal (APF), que muestra el mayor crecimiento de *Clostridium botulinum*, como se muestra en la tabla 16.

Tabla 16

Componentes del medio		g/L
Fuente de carbono	Glucosa	10
Fuente de nitrógeno (Peptona vegetal)	Hy-Pea™ 7404	5
	UltraPep™ Cotton	10
	HyPep™ 4601N	5
Mineral	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
Fuente de nitrógeno (hidrolizado de caseína)	N-Z-AMINE A	20
	N-Z-CASE TT	11

**Ejemplo 13: Patrón de crecimiento de *Clostridium botulinum* en el medio que contiene peptonas de origen vegetal e hidrolizados de caseína**

25 Usando la composición de medio que contiene peptonas de origen vegetal y/o hidrolizados de caseína, determinado en base a los resultados de los ejemplos 1 a 10, se cultivó *Clostridium botulinum*, y se examinó el patrón de crecimiento de la bacteria.

30 La tabla 17 muestra los valores de DO dependientes del tiempo del crecimiento de *Clostridium botulinum* entre un medio que está en uso actual, un medio que contiene peptonas de origen vegetal (medio APF), y un medio final que contiene peptonas de origen vegetal e hidrolizados de caseína (medio APF + caseína).

Tabla 17

Tiempo de cultivo (hr)	medio que está en uso actual		Medio APF		Medio APF + caseína	
	540nm	600nm	540nm	600nm	540nm	600nm
0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
15	0.0084	0.0059	0.2064	0.1821	0.7156	0.6551
18	0.073	0.0608	1.0552	0.9296	2.8395	2.5015
21	0.4952	0.4204	1.85	1.5895	4.545	3.92
24	1.2382	0.9954	2.8595	2.472	5.244	4.551
26	2.608	2.215	3.4745	3.009	5.628	4.786
28	2.8335	2.416	3.526	2.994	5.188	4.489
36	3.324	2.838	3.361	2.911	3.838	3.396
39	3.384	2.894	2.9255	2.5185	3.7225	3.2945
44	3.1105	2.6415	1.968	1.712	2.9725	2.778
60	2.1484	1.8164	0.76	0.684	1.9788	1.7564

5 Como resultado, como se muestra en la tabla 17 y la figura 15, el medio que está en uso actual mostró un aumento en la velocidad de crecimiento después de 24 horas de cultivo de *Clostridium botulinum* y mostró el valor pico de DO<sub>540nm</sub> de 3,384 a las 39 horas de cultivo. El medio APF que contiene peptonas de origen vegetal mostró un aumento en la velocidad de crecimiento después de 18 horas de cultivo y mostró el valor pico de DO<sub>540nm</sub> de 3,526 a las 28 horas de cultivo.

10 Además, el medio APF que contiene peptonas de origen vegetal + hidrolizado de caseína mostró un aumento en la velocidad de crecimiento después de 18 horas de cultivo y mostró el valor pico de DO<sub>540nm</sub> de 5,628 a las 26 horas de cultivo. Cuando se comparó el valor de DO<sub>540nm</sub> a las 24 horas de cultivo, el medio que está en uso actual mostró un valor de DO<sub>540nm</sub> de 1,2382, el medio APF que contiene peptonas de origen vegetal mostró un valor de DO<sub>540nm</sub> de 2,8595, y el medio APF que contiene peptonas de origen vegetal + hidrolizado de caseína mostró un valor de DO<sub>540nm</sub> de 5,244. Por tanto, el valor de DO del medio APF que contiene peptonas de origen vegetal + hidrolizado de caseína a las 24 horas era aproximadamente 4,23 veces mayor que el de el medio que está en uso actual y aproximadamente 1,83 veces mayor que el del medio APF que contiene peptonas de origen vegetal. Además, el valor pico de DO del medio APF que contiene peptonas de origen vegetal + hidrolizado de caseína era aproximadamente 1,6 veces mayor que el del medio APF que contiene peptonas de origen vegetal.

20 **Aplicabilidad industrial**

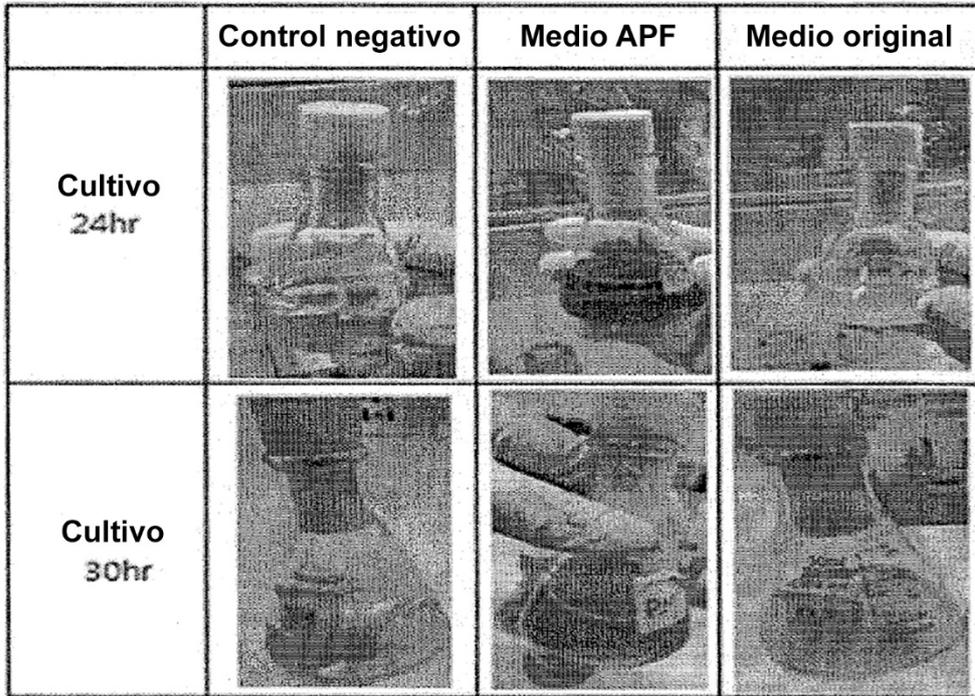
25 Como se ha descrito anteriormente, cuando el medio según la presente invención, que contiene peptona de origen vegetal, hidrolizado de caseína y mineral, se usa para el cultivo de *Clostridium botulinum*, la velocidad de crecimiento de la bacteria en el medio es mayor que esa en cada uno del medio que está en uso actual y el medio que contiene peptona de origen vegetal sola. Además, cuando se usa el medio de la presente invención, se puede producir una alta concentración de toxina botulínica al cultivar la bacteria de una manera segura.

30 Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, será aparente para los expertos en la materia que esta descripción es solo para una forma de realización preferida y no limita el ámbito de la presente invención. Por tanto, el ámbito sustancial de la presente invención se definirá mediante las reivindicaciones adjuntas.

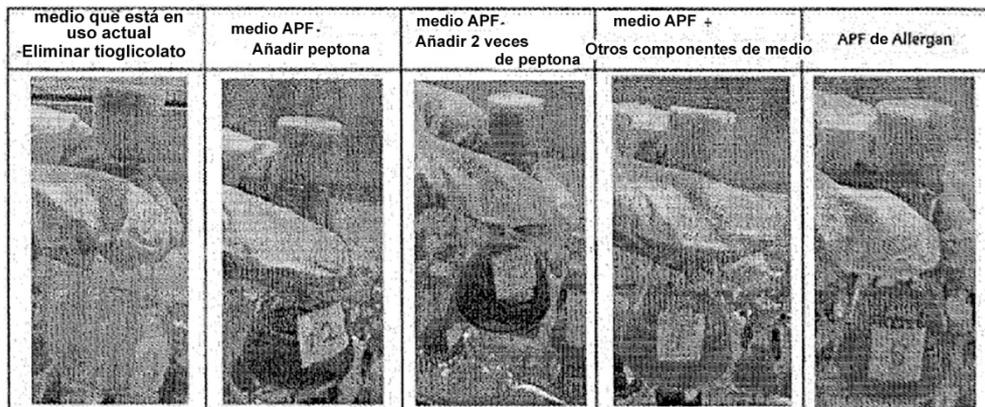
**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de medio libre de EET para su uso en el cultivo de *Clostridium botulinum*, la composición de medio comprende:
  - 5 peptonas de origen vegetal libres de encefalopatía espongiforme transmisible (EET) que comprenden un hidrolizado de guisante de jardín, un hidrolizado de semilla de algodón y un hidrolizado de gluten de trigo con una proporción de 1:0,24-43,62:0,01-50,57 en peso;
  - 10 un hidrolizado de caseína;
  - una fuente de carbono; y al menos un mineral seleccionado del grupo que consiste en  $K_2HPO_4$  (fosfato dipotásico),  $Na_2HPO_4$  (fosfato disódico) y  $KH_2PO_4$  (fosfato monopotásico).
2. La composición de medio de la reivindicación 1, en donde las peptonas de origen vegetal están comprendidas con un contenido del 0,1-10% p/v.
3. La composición de medio de la reivindicación 1, en donde el hidrolizado de caseína está comprendido en la composición de medio con un contenido del 0,22-15,5% p/v.
4. La composición de medio de la reivindicación 1, en donde el hidrolizado de caseína es un hidrolizado que comprende aproximadamente el 85,5-94,5% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos, y/o un hidrolizado que comprende aproximadamente el 63,56-70,25% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos.
5. La composición de medio de la reivindicación 4, en donde el hidrolizado de caseína comprende el hidrolizado que comprende aproximadamente el 85,5-94,5% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos y el hidrolizado que comprende aproximadamente el 63,56-70,25% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos con una proporción de 0,01-40:0,01-22 en peso, siempre que el hidrolizado de caseína comprenda tanto un hidrolizado que comprende aproximadamente el 85,5-94,5% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos como un hidrolizado que comprende aproximadamente el 63,56-70,25% en peso de péptidos que tienen un peso molecular de 500 Da o menos.
6. La composición de medio de la reivindicación 1, en donde la peptona de origen vegetal o el hidrolizado de caseína se somete a un tratamiento enzimático.
7. La composición de medio de la reivindicación 1, en donde el mineral está comprendido en la composición de medio con un contenido del 0,05-3,5% p/v.
8. Un método para producir toxina botulínica, que comprende las etapas de:
  - 40 (a) cultivar *Clostridium botulinum* usando la composición de medio de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para producir toxina botulínica; y
  - (b) recuperar la toxina botulínica producida.
9. El método de la reivindicación 8, en donde el cultivo se realiza en condiciones anaerobias.
10. El método de la reivindicación 8, en donde la toxina botulínica se selecciona del grupo que consiste en toxina botulínica de serotipos A, B, C, D, E, F y G.

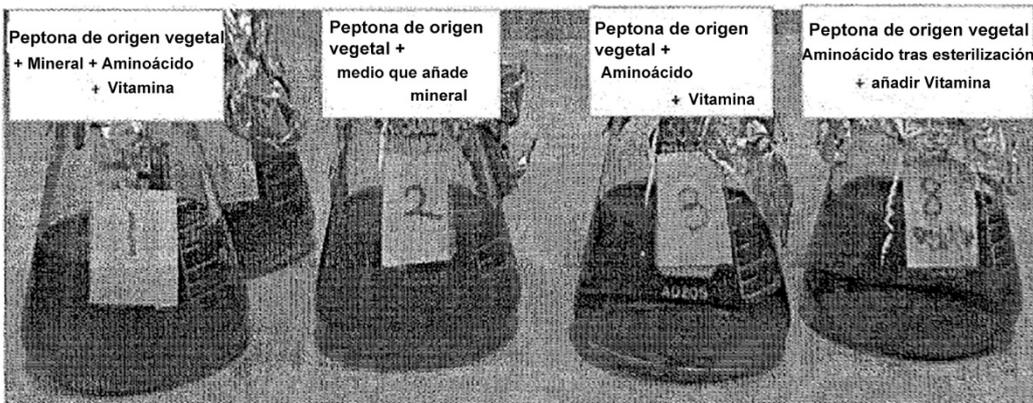
[Fig. 1]



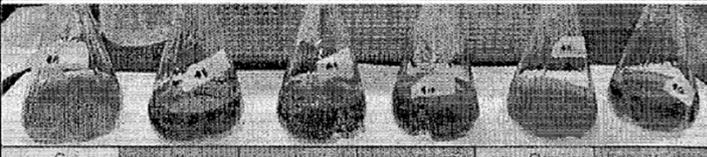
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

Tipos de medio	1 (Candidato a medio APF)	2 (Candidato a medio APF)	3 (Candidato a medio APF)	4 (Candidato a medio APF)	5 (Candidato a medio APF)	6 (Candidato a medio APF)
						
Precipitación	x	o	o	o	o	x
Tipos de medio	7 (Candidato a medio APF)	8 (Candidato a medio APF)	9 (Candidato a medio APF)	10 (Candidato a medio APF)	11 (Candidato a medio APF)	12 (Candidato a medio APF)
						
Precipitación	o	x	x	x	o	x

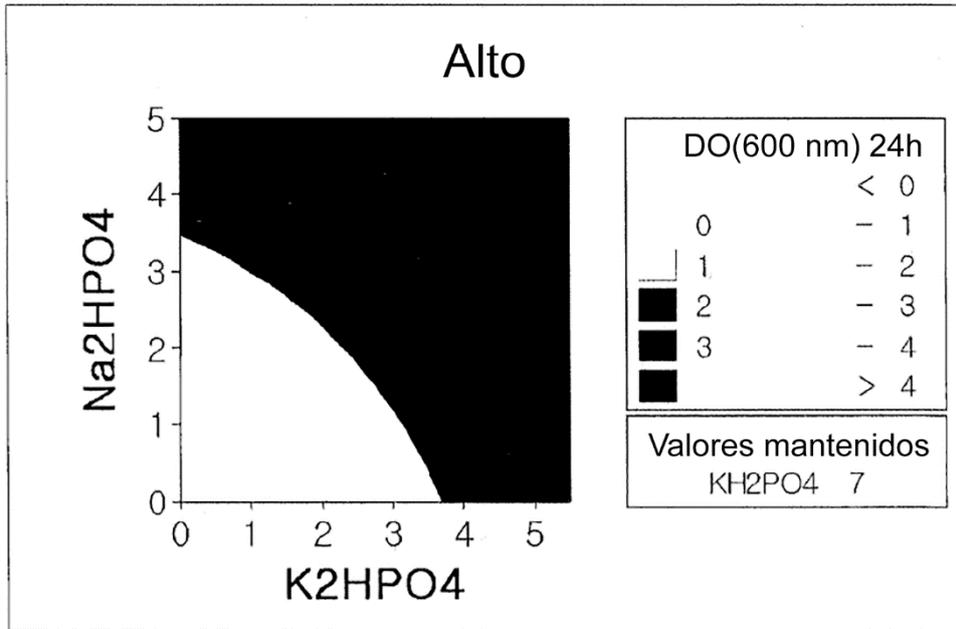
[Fig. 5]

Tipos de medio	1 (Candidato a medio APF)	2 (Candidato a medio APF)	3 (Candidato a medio APF)	4 (Candidato a medio APF)	5 (Candidato a medio APF)	6 (Candidato a medio APF)
						
Crecimiento	x	o	x	o	o	o
Tipos de medio	7 (Candidato a medio APF)	8 (Candidato a medio APF)	9 (Candidato a medio APF)	10 (Candidato a medio APF)	11 (Candidato a medio APF)	12 (Candidato a medio APF)
						
Crecimiento	x	x	x	x	x	o

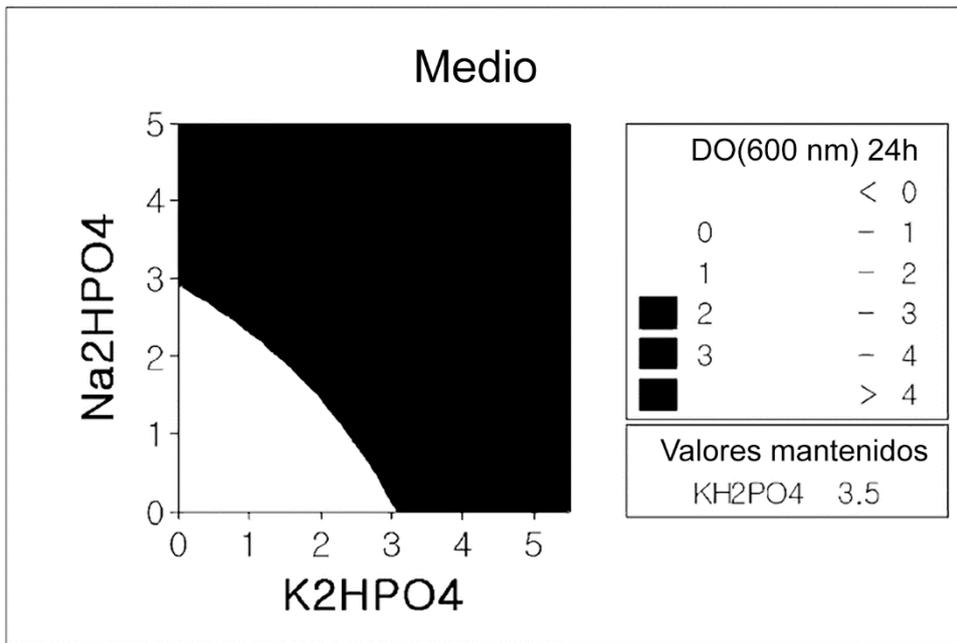
[Fig. 6]

Tipos de medio	1 (Candidato a medio APF)	2 (Candidato a medio APF)	3 (Candidato a medio APF)	4 (Candidato a medio APF)	5 (Candidato a medio APF)	6 (Candidato a medio APF)	7 (Candidato a medio APF)	8 (Candidato a medio APF)	9 (Candidato a medio APF)	10 (Candidato a medio APF)	11 (Candidato a medio APF)	12 (Candidato a medio APF)	13 (Candidato a medio APF)
													
Crecimiento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	X

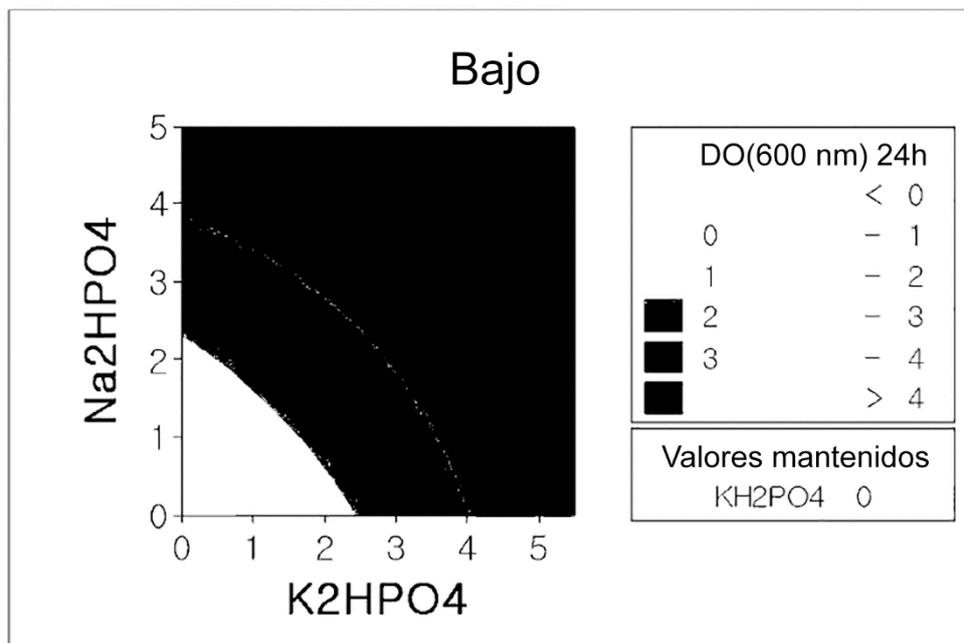
[Fig. 7a]



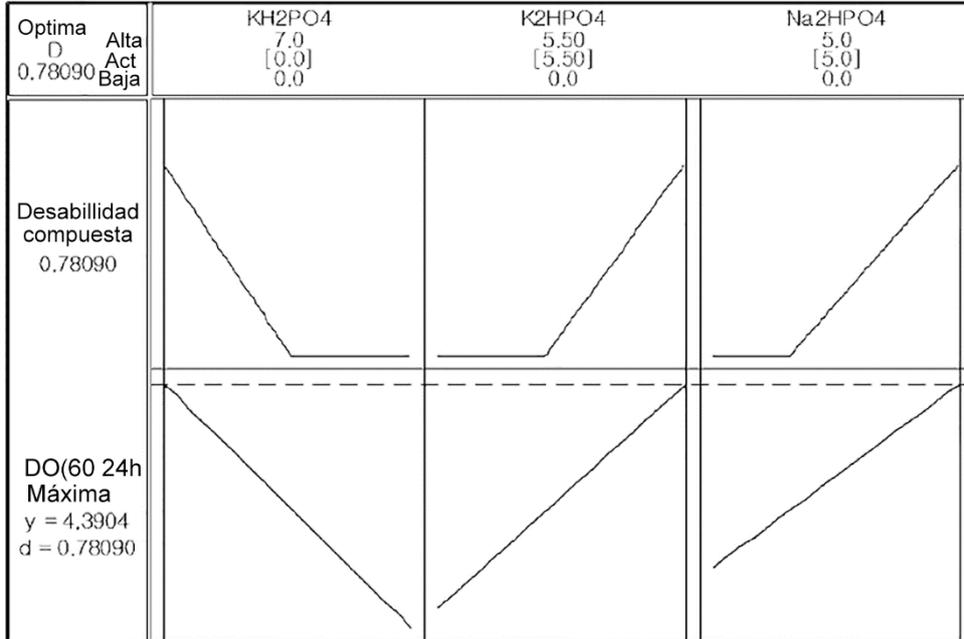
[Fig. 7b]



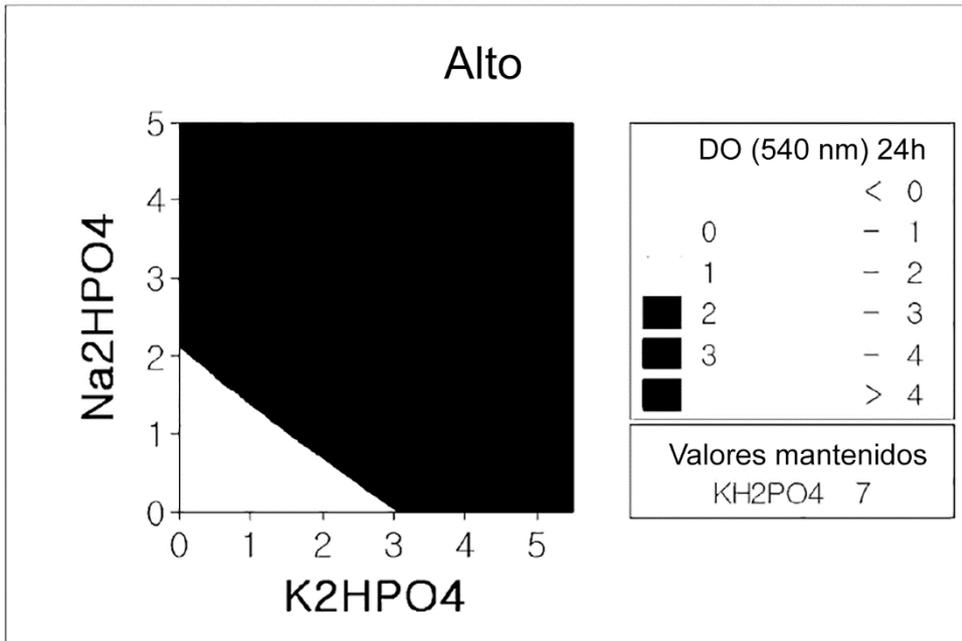
[Fig. 7c]



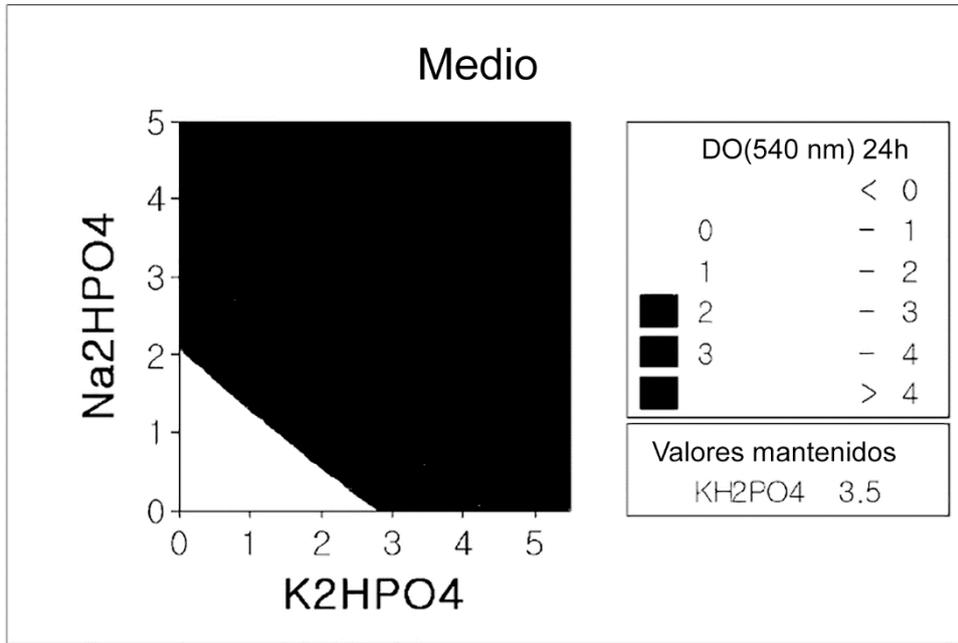
[Fig. 7d]



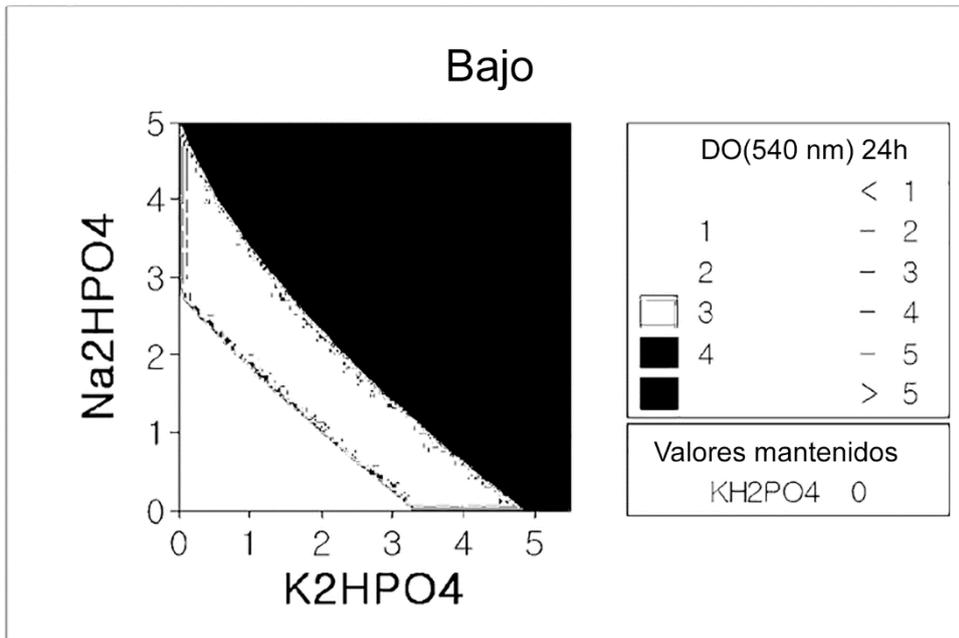
[Fig. 8a]



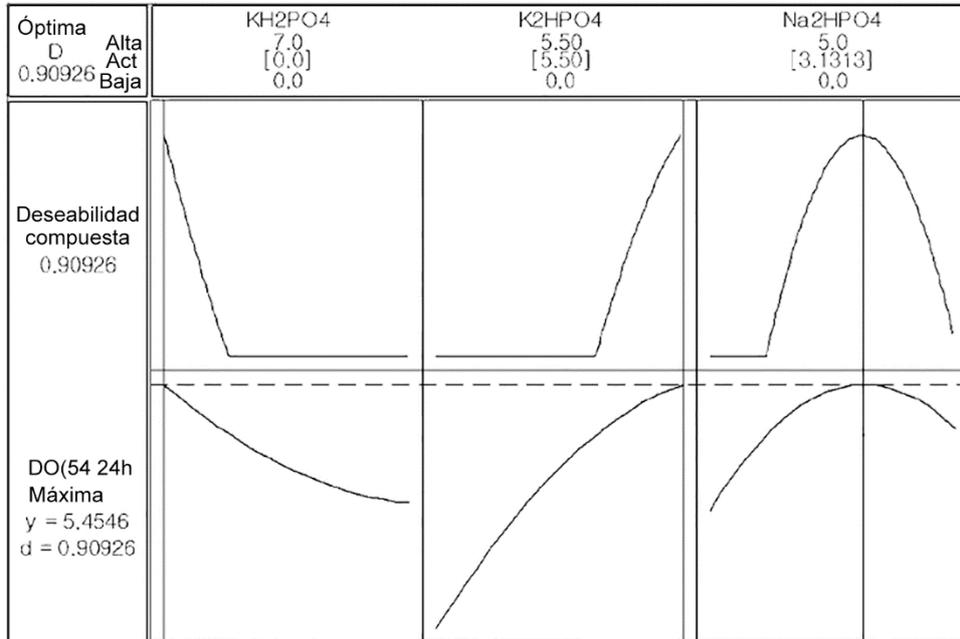
[Fig. 8b]



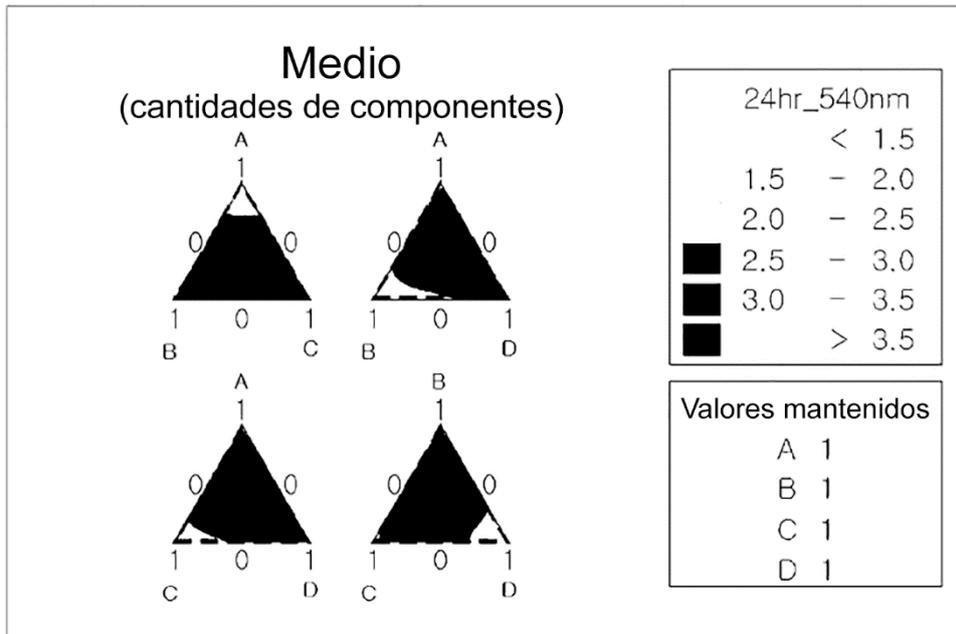
[Fig. 8c]



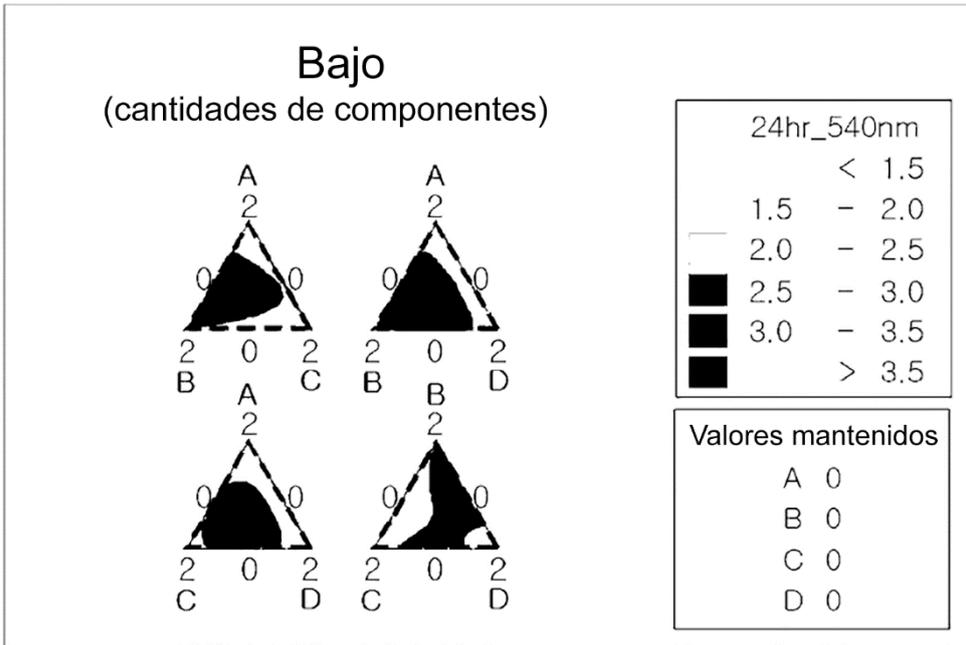
[Fig. 8d]



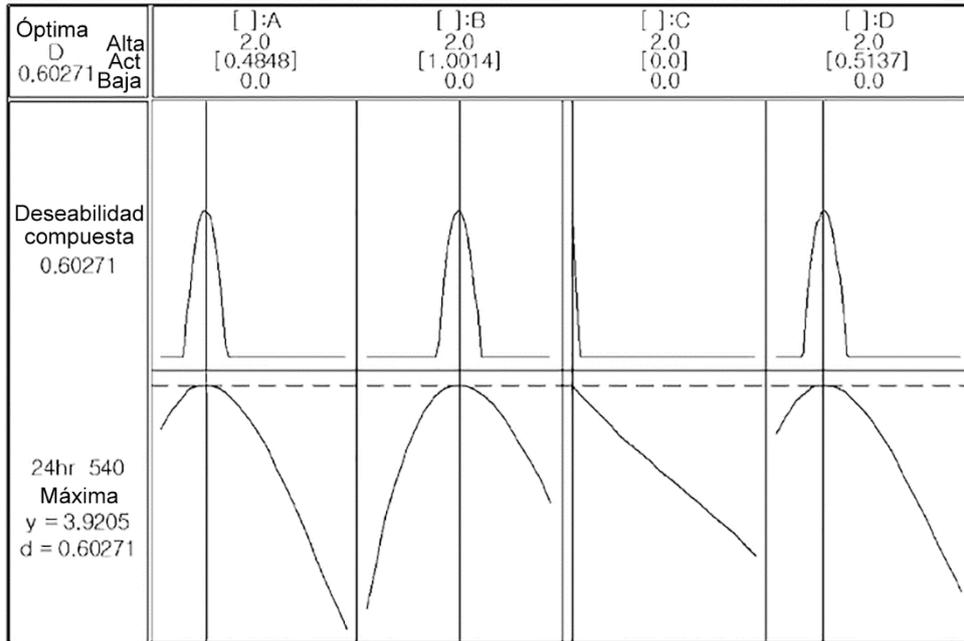
[Fig. 9a]



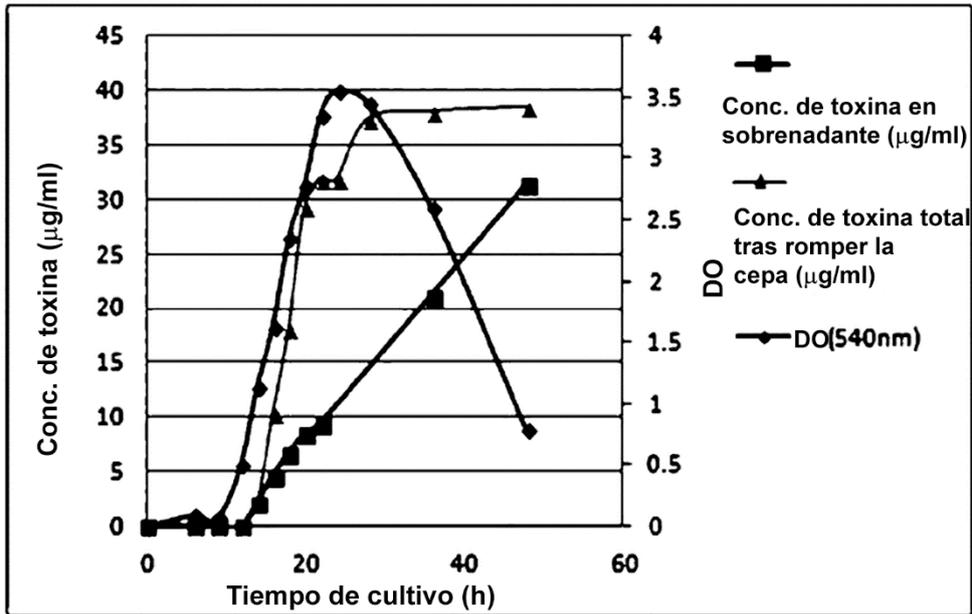
[Fig. 9b]



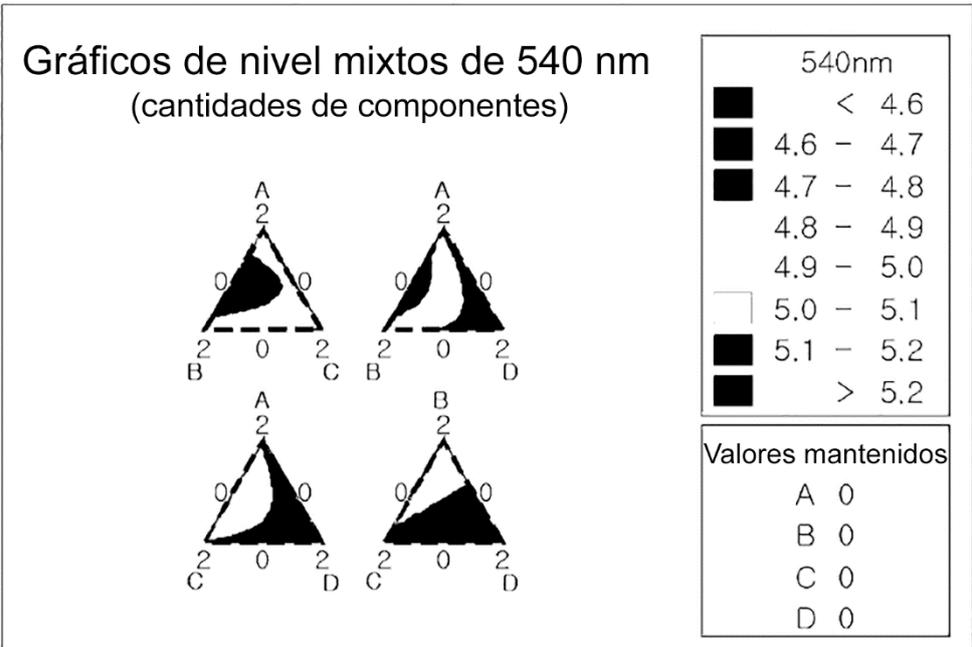
[Fig. 9c]



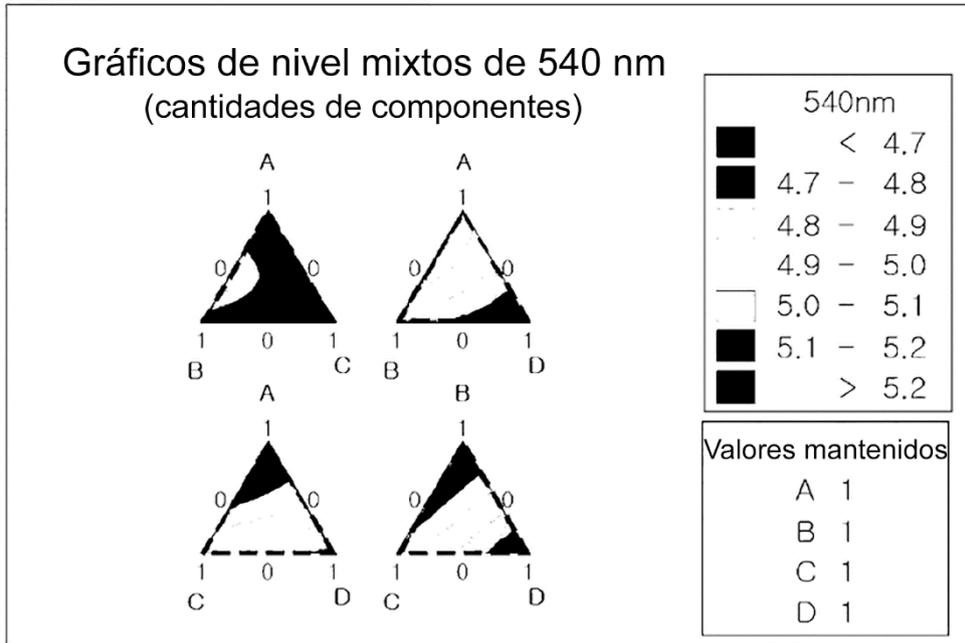
[Fig. 10]



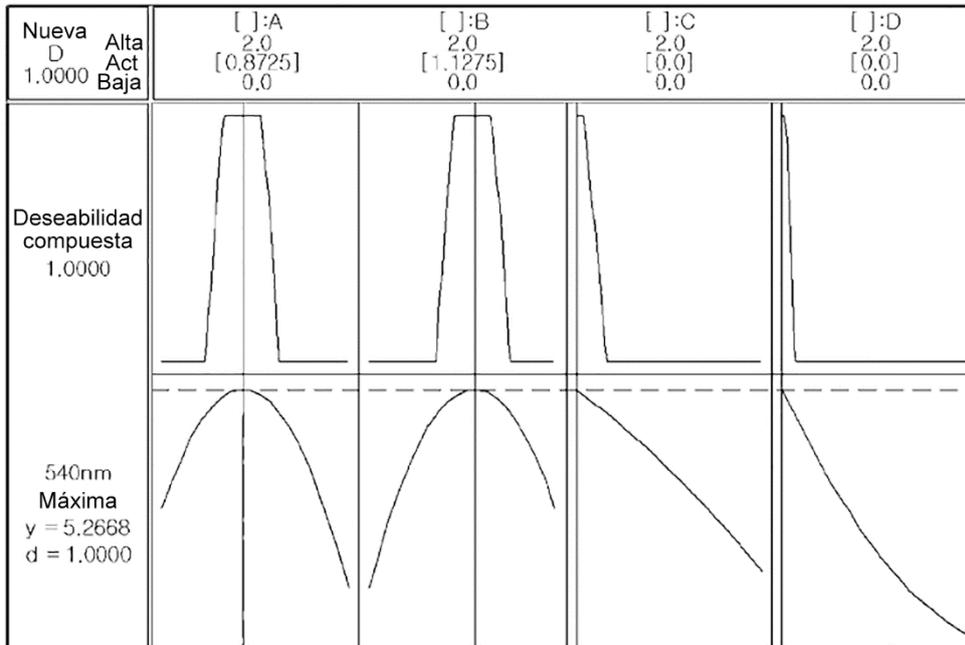
[Fig. 11a]



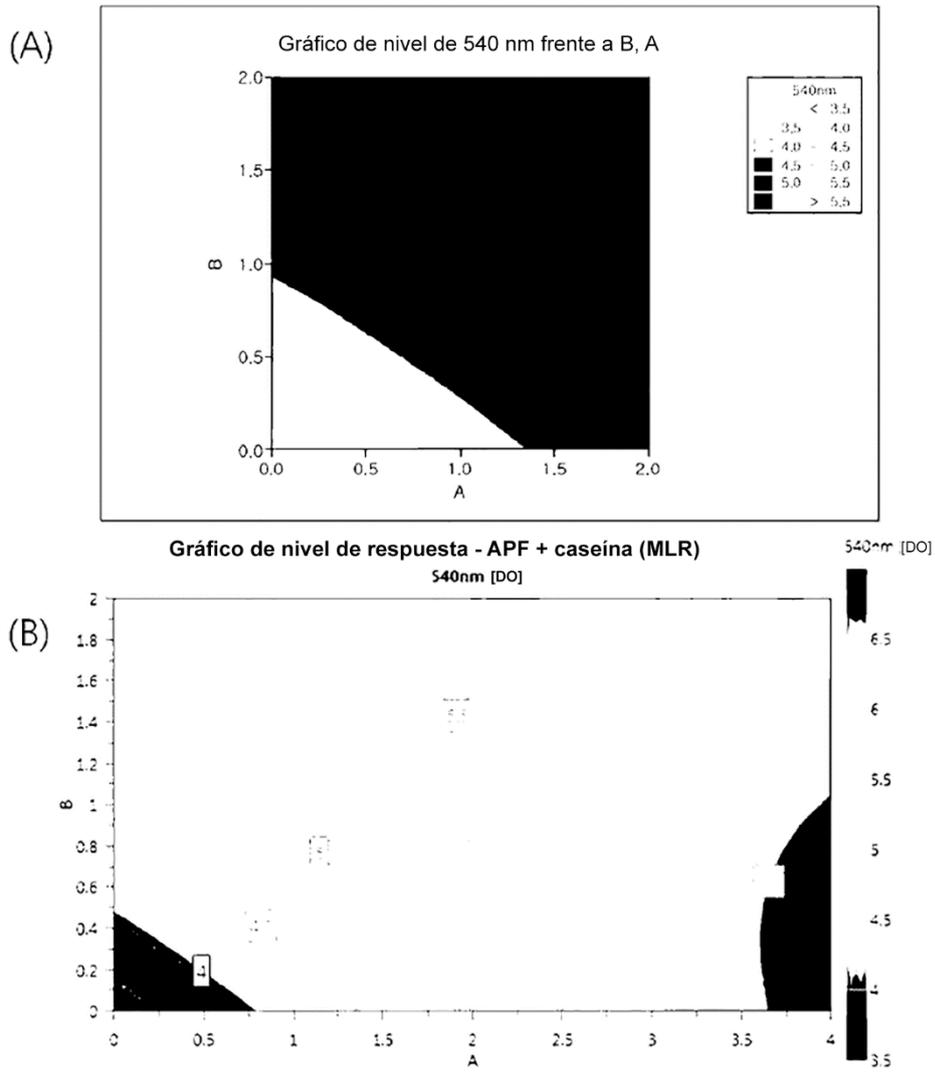
[Fig. 11b]



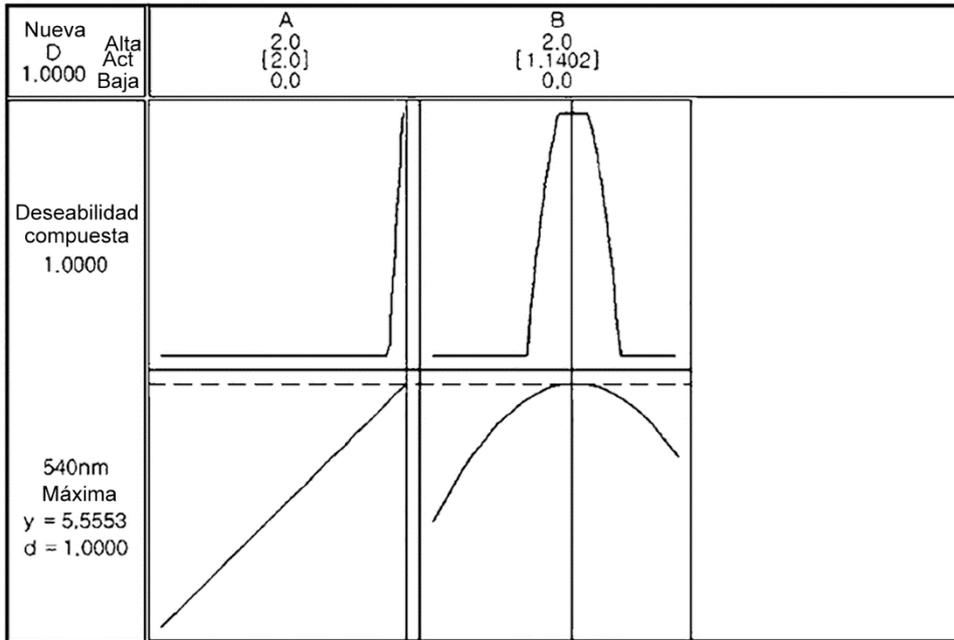
[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]

