

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 913**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/48</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 5/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 11/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 13/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 21/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 25/14</b>	(2006.01)		
<b>A61P 27/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2005 E 05767945 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 1778279**

54 Título: **Composición farmacéutica que contiene neurotoxina 2 botulínica**

30 Prioridad:

**04.08.2004 GB 0417367**  
**24.09.2004 GB 0421290**  
**24.09.2004 GB 0421288**  
**28.10.2004 GB 0423953**  
**28.10.2004 GB 0423950**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.01.2015**

73 Titular/es:

**IPSEN BIOPHARM LIMITED (100.0%)**  
**ASH ROAD, WREXHAM INDUSTRIAL ESTATE**  
**WREXHAM LL13 9UF, GB**

72 Inventor/es:

**PANJWANI, NAVEED;**  
**WEBB, PAUL y**  
**PICKETT, ANDY**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 526 913 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 farmacéutica que contiene neurotoxina 2 botulínica

La invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene neurotoxina botulínica de tipo A2 para su utilización en el tratamiento de trastornos de músculos lisos.

- 5 La neurotoxina botulínica actualmente más utilizada es la neurotoxina botulínica *tipo A*. Esta neurotoxina se produce durante la fermentación en presencia de cepas de *Clostridium botulinum*. Los complejos de neurotoxina botulínica tipo A (que comprenden la neurotoxina botulínica tipo A y al menos otra proteína atóxica) son principios activos ampliamente utilizados en la medicina moderna. Un ejemplo de una composición farmacéutica a base de un complejo de este tipo es el producto Dysport® actualmente comercializado por la compañía de los solicitantes. Entre  
10 las indicaciones médicas más frecuentes para las que una neurotoxina botulínica *tipo A* se podría utilizar, se puede mencionar el tratamiento de una serie de trastornos musculares (p. ej., blefaroespasmos, espasmo hemifacial, tortícolis, espasticidad, cefalea por tensión, dolor de espalda o las arrugas), así como otros trastornos tales como la migraña. Alternativamente, la toxina botulínica de alta pureza (es decir, la neurotoxina botulínica libre de sus proteínas atóxicas complejantes) puede reemplazar el correspondiente complejo de toxina botulínica como se  
15 describe en las solicitudes PCT WO 96/11699 o WO 97/35604.

Actualmente, las composiciones de la neurotoxina botulínica comercializadas contienen albúmina de suero humano. Sin embargo, algunos han expresado preocupaciones sobre la albúmina (véase, p. ej. en la solicitud de patente PCT WO 01/58472). Por esta razón, la industria farmacéutica está considerando actualmente encontrar agentes estabilizantes alternativos a la albúmina por otros agentes estabilizantes en las composiciones  
20 farmacéuticas.

Una posible solución se describe en la solicitud de patente PCT WO 01/58472. En este documento, la albúmina se sustituye por un polisacárido, es decir, un polímero de más de dos monómeros en la molécula de sacárido, que desempeña la función del estabilizador en la composición de neurotoxina botulínica.

Una solución alternativa es la descrita en la solicitud de patente PCT WO 97/35604 o en las patentes de EE.UU. nº 5.512.547 y nº 5.756.468. En estos documentos, se describe que la trehalosa puede estabilizar la neurotoxina botulínica pura (es decir, la neurotoxina botulínica sin sus proteínas atóxicas complejantes). El solicitante ha descubierto inesperadamente que un agente tensioactivo posee efectos estabilizadores suficientes para reemplazar la albúmina, el polisacárido de la solicitud de patente PCT WO 01/58472 o la trehalosa de la solicitud de patente PCT WO 97/35604 en las composiciones de la neurotoxina botulínica.  
25

30 Por consiguiente, la invención se refiere al empleo de un tensioactivo para estabilizar una composición farmacéutica sólida o líquida que contiene como principio activo una toxina botulínica tipo A2 para su utilización en el tratamiento de trastornos de músculos lisos.

Por toxina botulínica debe entenderse una toxina botulínica de origen natural o cualquier toxina botulínica producida de forma recombinante.

35 Por toxina botulínica de origen natural debe entenderse ya sea una neurotoxina botulínica de alta pureza procedente de *Clostridium* spp o un complejo de neurotoxina botulínica procedente de *Clostridium* spp.

Por neurotoxina botulínica de alta pureza se entiende, en la presente solicitud, neurotoxina botulínica fuera de los complejos incluida al menos otra proteína, en otras palabras, una neurotoxina botulínica de alta pureza no contiene cantidades significativas de ninguna otra proteína procedente de *Clostridium* spp que la neurotoxina botulínica.

40 Además, según la presente invención, los complejos de neurotoxina botulínica y de neurotoxinas botulínicas de alta pureza serán complejos de neurotoxina botulínica y neurotoxina botulínica tipo A2 de alta pureza.

Los expertos en la técnica están haciendo referencia cada vez más a la toxina botulínica tipo A clásica (es decir, el principio activo de los productos comercializados Dysport y Botox) como toxina botulínica tipo A1. Esto es para distinguirla de la toxina botulínica tipo A2 originalmente aislada de casos de botulismo del lactante en 1990, que es una toxina botulínica inmunológica y bioquímicamente distinta. En la presente solicitud de patente, por lo tanto, se va a utilizar esta nomenclatura.  
45

Los organismos productores de la toxina tipo A2 de *Clostridium botulinum* se identificaron por primera vez en 1990 en Japón, a partir de múltiples casos de botulismo del lactante (Sakaguchi *et al.*, *Int. J. Food Microbiol.* (1990), 11, 231-242). El botulismo del lactante, o botulismo por colonización intestinal se diferencia del botulismo por transmisión alimentaria en que la toxina se produce después de la infección del paciente, en lugar de preformarse en los alimentos. Las cepas clínicas más estrechamente relacionadas con la toxina de tipo A2 son Kyoto-F, Chiba-H, Y-8036, 7103-H, 7105-H y KZ 1828, aunque varias otras han sido caracterizadas como tipo A2 por métodos moleculares (Córdoba *et al.*, *System Appl. Microbiol.* (1995), 18, 13-22; Franciosa *et al.*, resumen presentado en el 40<sup>th</sup>. Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC) Meeting, noviembre de 2003).

La toxina botulínica tipo A2 es una neurotoxina única que se ha demostrado que es un tipo distinto de toxina en comparación con otros tipos de toxina botulínica A - G. La toxina botulínica tipo A2 difiere de la toxina tipo A1 en sus características genéticas moleculares, sus características bioquímicas y en sus características inmunológicas.

5 A nivel genético molecular, la organización del grupo de genes de neurotoxina tipo A2 es distinta de los demás tipos de toxina botulínica. Muchos tipos de toxina botulínica, incluidas las toxinas botulínicas tipo A, se encuentran en forma de complejos de neurotoxina con proteínas de hemaglutinina (HA) como componentes del complejo. Los genes que codifican estas proteínas HA (HA17, HA34 y HA70) están contenidos en el grupo de genes de neurotoxina tipo de organismos A, B, C, D y G, pero faltan totalmente en el grupo de genes de neurotoxina tipo A2. El grupo de genes de neurotoxina tipo A2 también contiene genes reguladores tales como p47, que faltan en los  
10 grupos de genes neurotoxina tipo A1. Además, se ha demostrado que la secuencia de la proteína NTNH del complejo de toxina tipo A2 que es un mosaico de secuencias génicas de NTNH tipo C y tipo A1 (Kubota *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996), 224 (3), 843-848).

15 La toxina tipo A2 y la toxina A tipo A1 también difieren notablemente en las características bioquímicas del complejo de toxina purificada. Mientras que el complejo de toxina tipo A1 contiene la proteína NTNH, y al menos tres proteínas HA (HA17, HA34 y HA70), el complejo de toxina tipo A2 contiene sólo una proteína NTNH y carece de las proteínas HA (Sakaguchi *et al.*, *Int. J. Food Microbiol.* (1990), 11, 231-242). La propia molécula de neurotoxina se diferencia en el peso molecular, siendo la cadena pesada de 101 kDa en la toxina de tipo A2 y de 93 kDa en la toxina de tipo A1, y presenta diferente sensibilidad a las proteasas (Kozaki *et al.*, *Microbiol. Immunol.* (1995), 39(10), 161-1 A). La secuencia de aminoácidos de las toxinas de tipo A2 y de tipo A1 son notablemente diferentes,  
20 particularmente en la región de la cadena pesada, donde 109 de los 847 aminoácidos son diferentes entre los dos tipos de toxina (diferencia del 13%) (Córdoba *et al.*, *System Appl. Microbiol.* (1995), 18, 13-22). Las secuencias de cadena pesada de las cepas de toxinas de tipo A1, por el contrario, suelen diferenciarse en menos del 2%. Las cadenas pesadas de las neurotoxinas botulínicas son responsables de las funciones biológicas esenciales de la molécula, incluyendo la unión del receptor en las células diana y el tráfico intracelular (Zhang *et al.*, *Gen* (2003), 315, 21-32). De hecho, los estudios de unión de neurotoxinas A2 y A1 han presentado diferentes características de unión de las dos toxinas a sinaptosomas purificados (Kozaki *et al.*, *Microbiol. Immunol.* (1995), 39(10), 767-74).

25 La toxina botulínica tipo A2 también es inmunológicamente distinta. Los anticuerpos generados contra la toxina tipo A se ha demostrado que no reconocen la toxina botulínica tipo A2 (y viceversa) en experimentos de inmunodifusión, ELISA e inmunotransferencias Western (Sakaguchi *et al.*, *Int. J. Food Microbiol.* (1990), 11, 231- 242; Kozaki *et al.*, *Microbiol. Immunol.* (1995), 39(10), 767-74). Lo más importante, sin embargo, es que los anticuerpos generados contra toxinas de tipo A1, aunque pueden neutralizar la toxicidad de la toxina de tipo A1 en ratones, no podía neutralizar las toxinas de tipo A2 en experimentos de toxicidad de ratón en paralelo (Kozaki *et al.*, *Microbiol. Immunol.* (1995), 39 (10), 767-74).

30 En resumen, puede apreciarse en la situación actual de la técnica que la toxina botulínica tipo A2 es bioquímica e inmunológicamente diferente de otros tipos de toxina botulínica, y particularmente de la toxina botulínica tipo A1.

35 La neurotoxina botulínica tipo A2 de alta pureza utilizada según la invención o contenida en composiciones farmacéuticas se puede obtener fácilmente a partir del correspondiente complejo de neurotoxina botulínica, por ejemplo como se explica en *Current topics in Microbiology and Immunology* (1995), 195, págs. 151-154. La toxina de *Clostridium botulinum* de alta pureza se obtiene, por ejemplo, por purificación de un medio de fermentación adecuado (por ejemplo, un caldo de medio de carne enriquecido que contiene *Clostridium Botulinum* y dejado para fermentación - este caldo pueden ser, por ejemplo, el descrito en *Current topics in Microbiology and Immunology* (1995), 195, pág. 150 y DasGupta, "*Microbial food toxicans. Clostridium botulinum toxins. CRC Handbook of foodborne diseases of biological origin*", CRC Boca Raton, págs. 25-56). Cuando se incluye neurotoxina botulínica de alta pureza en una composición según la presente invención, el grado de pureza de la toxina debe ser  
40 preferiblemente mayor del 80%, más preferiblemente mayor del 90 o 95% y de una manera más particularmente preferida mayor del 98% o 99%. Puede evaluarse, por ejemplo, mediante el ensayo de pureza descrito en la presente solicitud.

La presente invención se refiere a una toxina botulínica tipo A2 para su utilización en el tratamiento de un trastorno de músculos lisos en donde dicha toxina botulínica inhibe la contracción de músculos lisos.

50 Preferiblemente, la toxina botulínica tipo A2 está en una composición farmacéutica sólida o líquida que comprende:

- (a) una toxina botulínica tipo A2, y
- (b) un tensioactivo.

Según una variante concreta de la invención, la composición farmacéutica será una composición farmacéutica sólida y consistirá esencialmente en:

- 55 (a) una toxina botulínica tipo A2, y
- (b) un tensioactivo.

Según otra variante concreta de la invención, la composición farmacéutica será una composición farmacéutica líquida y consistirá esencialmente en:

- (a) una toxina botulínica tipo A2,
- (b) un tensioactivo, y

5 (c) agua.

En las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente, el tensioactivo será tal que estabiliza la toxina botulínica.

Una composición farmacéutica sólida según la invención se puede obtener por ejemplo, por liofilización de una solución acuosa estéril que contiene los componentes (a) y (b) como se mencionó anteriormente. Una composición  
10 farmacéutica líquida según la invención se obtendrá mezclando la mezcla sólida (p. ej. liofilizada) de los componentes (a) y (b) con agua estéril.

Según la invención, las concentraciones de dichos componentes (a) y (b) en la solución que debe liofilizarse o la composición farmacéutica líquida será preferiblemente de la forma siguiente:

- la solución contendrá de 50 a 3.000 unidades de DL<sub>50</sub> de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o de  
15 neurotoxina botulínica tipo A2 de alta pureza por ml de solución y más preferiblemente de 100 a 2500 unidades de LD<sub>50</sub> de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o de neurotoxina botulínica tipo A2 de alta pureza por ml de solución y más preferiblemente de 100 a 2.000 LD<sub>50</sub> unidades de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o de neurotoxina botulínica tipo A2 de alta pureza por ml de solución;

- la concentración de tensioactivo será desde aproximadamente la concentración micelar crítica hasta una  
20 concentración de 1% v/v, y especialmente desde aproximadamente 0,005% a 0,02% v/v en el caso de polisorbato 80. Preferiblemente, el tensioactivo será un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos comprenden especialmente polisorbatos y copolímeros en bloque como poloxámeros (es decir, copolímeros de polietilenglicol y propilenglicol). Según una variante preferida de la invención, el tensioactivo será un polisorbato. Más preferiblemente, un polisorbato incluido en una composición según la presente invención tendrán un grado medio de  
25 polimerización desde 20 a 100 unidades monoméricas (preferiblemente alrededor de 80), y puede ser, por ejemplo, polisorbato 80. Además preferiblemente, el polisorbato debería ser de origen vegetal.

Según un modo de ejecución preferido de la invención, la composición farmacéutica sólida o líquida también contendrá un agente cristalino.

Por agente cristalino se entiende un agente que, entre otras cosas, mantendría una estructura de torta  
30 mecánicamente fuerte a complejo de neurotoxina botulínica liofilizada o neurotoxina botulínica de alta pureza. Cuando están incluidos en formulaciones sólidas, agentes cristalinos también tienen un efecto de aumento de volumen. Agentes cristalinos incluyen principalmente cloruro de sodio. Contrariamente a lo que se enseña en la técnica anterior (véase, p. ej. Goodnough, M.C. y Johnson, E.A., *Applied and Environmental Microbiology* (1992), 58 (10), 3426-3428), el empleo de cloruro de sodio para este tipo de composiciones mejora aún más la estabilidad de la  
35 composición de toxina botulínica.

Según todavía otro modo de ejecución preferido de la invención, la composición farmacéutica sólida o líquida también contendrá un tampón para mantener el pH entre 5,5 y 7,5.

El tampón puede ser cualquier tampón capaz de mantener el pH adecuado. Preferiblemente, el tampón para  
40 composiciones según la invención se seleccionará del grupo que consiste en succinato y un aminoácido como histidina. En concreto, el tampón será histidina. Preferiblemente, el pH será al menos igual a 5,5 o 5,8, y aún más preferiblemente al menos igual a 6,0 o 6,5. Preferiblemente además, el pH será igual o inferior a 7,5 o 7,0, más preferiblemente igual o inferior a 6,8.

Preferiblemente, la composición farmacéutica sólida o líquida de la invención puede contener también un disacárido.

El disacárido utilizado en composiciones según la invención se seleccionará preferiblemente del grupo que consiste  
45 en sacarosa, trehalosa, manitol y lactosa. El disacárido utilizado en las composiciones según la invención se seleccionará más preferiblemente del grupo que consiste en sacarosa y trehalosa. En particular, el disacárido utilizado en las composiciones según la invención será sacarosa. Preferiblemente, el disacárido estará presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, particularmente cuando las composiciones están en forma sólida.

50 La presente invención, por tanto, se refiere principalmente a una composición farmacéutica sólida o líquida que comprende:

- (a) complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o neurotoxina botulínica tipo A2 de alta pureza,

- (b) un tensioactivo,
- (c) un agente cristalino,
- (d) un tampón para mantener el pH entre 5,5 y 7,5.

Preferiblemente, también se incluirá un disacárido en las composiciones farmacéuticas según la presente invención,  
5 especialmente cuando están en forma sólida.

Según esta variante de la invención, una composición farmacéutica sólida puede obtenerse por liofilización de una solución acuosa estéril que contiene los componentes (a) a (d) como se mencionó anteriormente. Una composición farmacéutica líquida según la invención se obtendrá mezclando una mezcla sólida (p. ej. liofilizada) de dichos componentes (a) a (d) con agua estéril.

10 Según la invención, las concentraciones de dichos componentes (a) a (d) en la solución o la composición farmacéutica líquida que debe liofilizarse serán preferiblemente de la forma siguiente:

- la solución contendrá de 50 a 3.000 unidades DL<sub>50</sub> de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o de neurotoxina botulínica tipo A2 de alta pureza por ml de solución, más preferiblemente de 100 a 2500 unidades DL<sub>50</sub> de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o de neurotoxina botulínica tipo A2 de alta pureza por ml de solución y  
15 aún más preferiblemente de 100 a 2000 unidades de DL<sub>50</sub> de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o de neurotoxina botulínica tipo de A2 de alta pureza por ml de solución;
- la concentración de tensioactivo será desde superior a la concentración micelar crítica hasta una concentración de 1% v/v, y principalmente desde aproximadamente 0,005% a 0,02% v/v en el caso de polisorbato 80;
- 20 - la concentración del agente cristalino será de 0,1 a 0,5 M, más preferiblemente de 0,1 a 0,4 M, principalmente alrededor de 0,15 a 0,3 M; y
- la concentración de tampón será de 1 a 50 mM, más preferiblemente de 5 a 20 mM, principalmente alrededor de 10 mM.

Como se mencionó anteriormente, la formulación farmacéutica sólida o líquida según la invención puede contener un disacárido. En ese caso, la concentración de disacárido en la solución que debe liofilizarse o la composición farmacéutica líquida será por ejemplo de 5 a 50 mM, preferiblemente de 5 a 25 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, y en particular alrededor de 11,7 mM.

Según un modo de ejecución preferido de la invención, la mezcla de los diferentes componentes de la composición farmacéutica (es decir, complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o neurotoxina botulínica tipo A2 de alta pureza, el tensioactivo y los excipientes opcionales, tales como el agente cristalino, el tampón o el disacárido) se liofiliza. Las composiciones sólidas obtenidas de este modo, que forman parte también de esta invención, deberían ser preferiblemente estables durante al menos 12 meses, más preferiblemente durante al menos 18 meses, y de una manera más particularmente preferida de al menos 24 o incluso 36 meses.

Una composición según la invención se considera estable durante un determinado período si al menos el 70% de la toxicidad inicial, evaluada valorando la DL<sub>50</sub> en ratones o por cualquier método validado con respecto al ensayo de DL<sub>50</sub> en ratón (es decir, una método que permite una conversión de sus resultados en unidades DL<sub>50</sub>), se mantiene en dicho periodo (véase la parte titulada "ensayo de toxicidad en ratón" en relación con el ensayo de DL<sub>50</sub> en ratón).

Las composiciones farmacéuticas según la presente descripción pueden utilizarse para la preparación de medicamentos destinados al tratamiento de una enfermedad/una afección/un síndrome seleccionado entre los  
40 siguientes:

- trastornos oftalmológicos seleccionados del grupo que consiste en blefaroespasmos, estrabismo (incluyendo estrabismo restrictivo o miógeno), ambliopía, oscilopsia, ptosis protectora, ptosis terapéutica para la protección de la córnea, nistagmo, esotropía, diplopía, entropión, retracción del párpado, miopatía orbital, heteroforia, desalineación concomitante, desalineación no concomitante, esotropía o exotropía primaria o secundaria, oftalmoplejía internuclear, estrabismo con desviación oblicua, síndrome de Duane y retracción del párpado superior;
- trastornos del movimiento incluidos el espasmo hemifacial, tortícolis, espasticidad del niño o del adulto (p. ej., en la parálisis cerebral, después del accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, pacientes con traumatismo cerebral o lesión de la médula espinal), distonías focales idiopáticas, rigidez muscular, calambre del escribiente, distonía de la mano, parálisis del nervio VI, distonía oromandibular, temblor de cabeza, discinesia tardía, distonía tardía, calambres laborales (incluidas la calambre de los músicos), parálisis del nervio facial, espasmo del cierre mandibular, espasmo facial, sincinesia, temblores, temblor primario del escribiente, mioclonía, síndrome de la persona rígida, distonía podal, parálisis facial, síndrome de dolor de brazo y dolor de movimiento de los dedos, trastornos de tics, tics distónicos, síndrome de Tourette, neuromiotonía, temblor de barbilla, parálisis del recto lateral, inversión del pie

- 5 distónico, distonía de la mandíbula, síndrome del conejo, temblor cerebeloso, parálisis del nervio III, mioclonía palatal, acastasia, calambres musculares, parálisis del nervio IV, congelación de la marcha, distonía troncal del extensor, sincinesia tras la parálisis del nervio facial, distonía secundaria, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, epilepsia, distonía fuera de período, tétanos cefálico, mioquimia y síndrome de fasciculaciones benignas con calambres;
- 10 • trastornos otorrinolaringológicos incluidos la disforia espasmódica, hipersalivación, sialorrea, trastornos óticos, deterioro auditivo, chasquido en el oído, acúfenos, vértigo, enfermedad de Ménière, disfunción del nervio coclear, la tartamudez, disfagia cricofaríngea, bruxismo, cierre de la laringe en la aspiración crónica, granuloma de la cuerda vocal inferior, distonía ventricular, disfonía ventricular, disfonía mutacional, trismo, ronquidos, temblor de voz, aspiración, distonía con salida de la lengua, temblor palatino, mordedura profunda de labio y distonía laringea;
- 15 • trastornos gastrointestinales, incluidos la acalasia, fisura anal, estreñimiento, disfunción de la articulación temperomandibular, disfunción del esfínter de Oddi, hipertensión sostenida del esfínter de Oddi, trastornos musculares intestinales, síndrome puborrectal, anismo, espasmo del píloro, disfunción de la vesícula biliar, disfunción de la motilidad gastrointestinal o esofágica, espasmo esofágico difuso, diverticulosis esofágica y gastroparesia;
- 20 • trastornos urogenitales, incluidos disinergia detrusor-esfínter, hiperreflexia del detrusor, disfunción neurógena de la vejiga (p. ej., en pacientes de la enfermedad de Parkinson, de lesiones de la médula espinal, de accidente cerebrovascular o de esclerosis múltiple), espasmos de la vejiga, incontinencia urinaria, retención urinaria, cuello de la vejiga hipertrofiado, disfunción de la micción, la cistitis intersticial, vaginismo, endometriosis, dolor pélvico, hipertrofia de la glándula prostática (hiperplasia prostática benigna), prostatodinia, cáncer de próstata y priapismo;
- trastornos dermatológicos incluidos la hiperhidrosis (incluidas la hiperhidrosis axilar, la hiperhidrosis palmar y el síndrome de Frey), bromhidrosis, trastornos proliferantes celulares cutáneos (incluida la psoriasis), heridas en la piel y el acné;
- 25 • trastornos del dolor, incluido el dolor de espalda (dolor de la parte superior de la espalda, dolor de la parte inferior de la espalda), dolor miofascial, cefalea por tensión, fibromialgia, síndromes dolorosos, mialgia, migraña, latigazo cervical, dolor en las articulaciones, dolor posoperatorio, dolor no relacionado con un espasmo muscular y dolor relacionado con trastornos de los músculos lisos;
- trastornos inflamatorios incluidos la pancreatitis, trastornos neurógenos inflamatorios (incluidas la gota, tendinitis, bursitis, dermatomiositis y espondiloartritis anquilosante);
- 30 • trastornos secretores tales como secreciones excesivas de las glándulas, hipersecreción de mucosidad e hipersecreción lagrimal, disfunción de las glándulas holocrinas;
- trastornos respiratorios, incluidos la rinitis (incluida la rinitis alérgica), EPOC, asma y la tuberculosis;
- trastornos hipertróficos incluídas la hipertrofia muscular, la hipertrofia maseterina, la acromegalia y la hipertrofia neurógena del tibial anterior con mialgia;
- 35 • trastornos articulares, incluidos el codo de tenista (o epicondilitis del codo), la inflamación de las articulaciones, la coxartrosis, la osteoartritis de cadera, la patología de la cápsula del músculo rotador del hombro, la artritis reumatoide y el síndrome del túnel carpiano;
- 40 • trastornos endocrinos como la diabetes tipo 2, hiperglucagonemia, hiperinsulinemia, hipoinsulinemia, hipercalcemia, hipocalcemia, trastornos de la tiroides (incluidos la enfermedad de Grave, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, hipertiroidismo e hipotiroidismo), trastornos de la paratiroides (incluidos el hiperparatiroidismo e hipoparatiroidismo), síndrome de Cushing y la obesidad;
- enfermedades autoinmunitarias como el lupus eritematoso disseminado;
- enfermedades proliferativas incluidos los tumores paragangliomas, cáncer de próstata y tumores óseos;
- 45 • lesiones traumáticas, incluídas las lesiones deportivas, lesiones musculares, heridas tendinosas y fracturas óseas; y
- trastornos veterinarios (p. ej., inmovilización de mamíferos, cólico equino, acalasia en animales o espasmos musculares en animales)
- Las composiciones farmacéuticas según la presente descripción se pueden utilizar también para tratamientos cosméticos, incluidos los tratamientos cosméticos de los siguientes trastornos cosméticos:
- 50 • defectos de la piel;

- asimetría facial;
  - arrugas, incluidas las líneas de expresión del entrecejo y las arrugas faciales;
  - boca hacia abajo;
  - pérdida de cabello; y
- 5 • olores corporales.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas según la invención se utilizarán para preparar medicamentos destinados al tratamiento de una enfermedad / una afección / un síndrome seleccionado entre los siguientes:

- trastornos gastrointestinales seleccionados del grupo que consiste en la acalasia, fisura anal, estreñimiento, disfunción de la articulación temporomandibular, disfunción del esfínter de Oddi, hipertensión sostenida del esfínter de Oddi, trastornos de los músculos intestinales, síndrome puborrectal, anismo, espasmo pilórico, disfunción de la vejiga biliar, disfunción de la motilidad gastrointestinal o esofágica, espasmo esofágico difuso, diverticulosis esofágica y gastroparesia;
- trastornos urogenitales seleccionados del grupo que consiste en disinergia detrusor-esfínter, hiperreflexia del detrusor, disfunción neurógena de la vejiga en pacientes de la enfermedad de Parkinson, de lesiones de la médula espinal, de accidente cerebrovascular o de esclerosis múltiple, espasmos de la vejiga, incontinencia urinaria, retención urinaria, cuello de la vejiga hipertrofiado, disfunción de la micción, cistitis intersticial, vaginismo, endometriosis, dolor pélvico, hipertrofia de la glándula prostática (hiperplasia prostática benigna), prostatodinia, cáncer de próstata y priapismo; y
- dolor asociado a trastornos del músculo liso.

- 20 La dosis de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o de neurotoxina botulínica tipo A2 de alta pureza que será necesaria para el tratamiento de las enfermedades / trastornos mencionados anteriormente varía dependiendo de la enfermedad / trastorno a tratar, modo de administración, edad y peso corporal del paciente a tratar y el estado de salud de este último, y es el médico de cabecera o el veterinario quien finalmente toma la decisión. Dicha cantidad determinada por el médico de cabecera o el veterinario se denomina en la presente memoria "dosis terapéuticamente eficaz".

Además, la invención se refiere al empleo de la toxina botulínica tipo A2 para la preparación de un medicamento destinado a tratar las enfermedades / afecciones / síndromes mencionados anteriormente.

- 30 Para el complejo de neurotoxina botulínica o la neurotoxina botulínica de alta pureza, esta dosis terapéuticamente eficaz se expresa a menudo como una función de la DL<sub>50</sub> correspondiente. Por DL<sub>50</sub> debe entenderse en la presente solicitud la dosis intraperitoneal mediana en ratones inyectados con complejo de neurotoxina botulínica o neurotoxina botulínica de alta pureza que causa la muerte de la mitad de dichos ratones en 96 horas.

- 35 El solicitante ha descubierto ahora sorprendentemente que la toxina botulínica tipo A2 no sólo tiene una actividad biológica similar a la de las demás neurotoxinas botulínicas, sino que además puede tener la gran ventaja de una duración de acción mucho más prolongada que cualquier otra toxina botulínica conocida (como se demuestra por ejemplo por el ensayo de fuerza de músculo de rata descrito en el "Pharmacological study, Part II"), por lo que se prefiere a las neurotoxinas botulínicas de otros serotipos para cualquier uso terapéutico conocido para la toxina botulínica tipo A1.

- 40 El solicitante ha descubierto ahora sorprendentemente que la toxina botulínica tipo A2 no sólo tiene una actividad biológica similar a la de las demás neurotoxinas botulínicas, sino que además puede tener la ventaja principal de un ritmo mucho más rápido de inicio de la parálisis muscular que cualquier otra toxina botulínica conocida (como se demuestra, por ejemplo, por el ensayo de fuerza de músculo de rata descrito en el "Pharmacological study, Part II"), por lo que se prefiere a las neurotoxinas botulínicas de otros serotipos de cualquier uso terapéutico conocido de la toxina botulínica tipo A1.

- 45 El solicitante ha descubierto ahora sorprendentemente que la toxina botulínica tipo A2 no sólo tiene una actividad biológica similar a la de las demás neurotoxinas botulínicas, sino que además puede tener la ventaja principal de un margen de toxicidad intramuscular significativamente mayor que cualquier otra de toxina botulínica conocida (como se demuestra para ejemplo mediante el ensayo de margen de toxicidad intramuscular descrito en el "Pharmacological study, Part III"), por lo que se prefiere a las neurotoxinas botulínicas de otros serotipos para cualquier uso terapéutico conocido de la toxina botulínica tipo A1.

- 50 El solicitante ha descubierto ahora sorprendentemente que la toxina botulínica tipo A2 no sólo tiene una actividad biológica similar a la de las demás neurotoxinas botulínicas, sino que además puede tener la gran ventaja de una acción selectiva sobre la inhibición de la contracción del músculo liso en comparación con otras toxinas botulínicas conocidas (como se demuestra, por ejemplo, por los "Criteria for determination of selectivity for smooth

muscles" descritos en el " Pharmacological study, Part IV"). Dado que la toxina botulínica tipo A2 puede tener menos efectos secundarios que los músculos esqueléticos adyacentes, puede ser preferible a las neurotoxinas botulínicas de otros serotipos para cualquier uso terapéutico relacionado con el músculo liso conocido para la toxina botulínica tipo A1.

- 5 El solicitante ha descubierto ahora sorprendentemente que la toxina botulínica tipo A2 no sólo tiene una actividad biológica similar a la de las demás neurotoxinas botulínicas, sino que además puede tener la gran ventaja de una acción selectiva sobre la inhibición de la función de las células nerviosas (es decir nocisensibles) relacionada con el dolor en comparación con otras toxinas botulínicas conocidas (como se demuestra, por ejemplo, por los "Criteria for determination of selectivity for nociceptive neurotransmission" descritos en el "Pharmacological study, Part V"). Dado que la toxina botulínica tipo A2 puede tener menos efectos secundarios que los músculos estriados adyacentes, puede ser preferible a neurotoxinas botulínicas de otros serotipos para cualquier uso terapéutico relacionado con el dolor conocido para la toxina botulínica tipo A1.

- 10 El término "aproximadamente" se refiere a un intervalo en torno al valor considerado. Tal como se utiliza en esta solicitud de patente, "aproximadamente X" significa un intervalo desde X menos 10% de X hasta X más 10% de X, y preferiblemente un intervalo desde X menos 5% de X hasta X más 5% de X.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que cualquier especialista suele entender en el campo al que pertenece esta invención.

- 20 El término "que comprende" o "que tiene" como se emplea en la presente memoria debe interpretarse en el sentido tanto "que incluye" como "que consiste en".

Los ejemplos siguientes se presentan para ilustrar lo anterior, y no deben en ningún caso considerarse como un límite al alcance de la invención.

### Ejemplos

Ejemplo 1: (No según la invención)

- 25 Se prepara una composición farmacéutica líquida que contiene los siguientes componentes:

Complejo de neurotoxina de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A1	2.000 unidades LD <sub>50</sub> /ml
Sacarosa	11,7 mM
Histidina	10 mM
Cloruro de sodio	0,3 M
Polisorbato 80	0,01% v/v
pH	6,5

La mezcla que contiene nominalmente 2.000 unidades de DL<sub>50</sub> de toxina botulínica por ml se liofiliza en un vial esterilizado que se sella a continuación. La composición sólida obtenida es estable durante al menos 12 meses cuando se almacena a una temperatura entre 2 y 8°C, y al menos 6 meses entre 23 y 27°C.

- 30 Ejemplo 2: (No según la invención)

Se prepara una composición farmacéutica líquida que contiene los siguientes componentes:

Complejo de neurotoxina de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A1	500 unidades LD <sub>50</sub> /ml
Sacarosa	11,7 mM
Histidina	10 mM
Cloruro de sodio	0,3 M

## ES 2 526 913 T3

Complejo de neurotoxina de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A1	500 unidades LD <sub>50</sub> /ml
Sacarosa	11,7 mM
Polisorbato 80	0,01% v/v
pH	6,5

La composición líquida preparada de esta manera se sella en un dispositivo tipo jeringuilla sin interfase líquida/gaseosa. Almacenada en estas condiciones, es estable durante al menos un mes entre 23 y 27°C y al menos seis meses entre 2 y 8°C.

### 5 Ejemplo 3: (No según la invención)

Se prepara una composición farmacéutica líquida que contiene los siguientes componentes:

Complejo de neurotoxina de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A1	500 unidades LD <sub>50</sub> /ml
Sacarosa	11,7 mM
Histidina	10 mM
Cloruro de sodio	0,15 M
Polisorbato 80	0,01% v/v
pH	6,5

10 La composición líquida preparada de esta manera se sella en un dispositivo tipo jeringuilla sin interfase líquida/gaseosa. Almacenada en estas condiciones, es estable durante al menos un mes entre 23 y 27°C y al menos seis meses entre 2 y 8°C.

### Ejemplo 4: (Según la invención)

Se prepara una composición farmacéutica líquida que contiene los siguientes componentes:

Complejo de neurotoxina de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A2	500 unidades LD <sub>50</sub> /ml
Sacarosa	11,7 mM
Histidina	10 mM
Cloruro de sodio	0,15 M
Polisorbato 80	0,01% v/v
pH	6,5

15 La composición líquida preparada de esta manera se sella en un dispositivo tipo jeringuilla sin interfase líquida/gaseosa.

Ejemplo 5: (No según la invención)

Un paciente de unos cincuenta años padece distonía cervical. Recibe por inyección intramuscular la composición farmacéutica líquida del ejemplo 4 (1 ml; 500 unidades de DL<sub>50</sub>), dividiéndose la dosis total en los músculos más activos de su cuello. El alivio de sus síntomas se observa durante más de 20 semanas.

5 Métodos analíticos

Ensayo de toxicidad en ratón

Un ensayo de toxicidad en ratón puede utilizarse para medir la toxicidad del complejo de neurotoxina botulínica o de la neurotoxina botulínica de alta pureza. En el ensayo, puede utilizarse un diluyente convencional para preparar una serie de diluciones en o en torno al valor de DL<sub>50</sub> estimado. El intervalo y la escala de diluciones está dispuesto para establecer un valor de DL<sub>50</sub> exacto.

Se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal con un volumen conocido y normalizado de toxina diluida. Después de 96 horas, se registrará el número de muertos y sobrevivientes en cada grupo de dilución. El valor de DL<sub>50</sub> es la mediana de la dosis que mata a la mitad de los animales inyectados en 96 horas.

Una composición según la invención se considera estable durante un determinado período si se mantiene al menos el 70% de la toxicidad inicial durante dicho periodo en relación con una preparado de referencia.

Parte I del estudio farmacológico

Ensayo de la fuerza muscular de la rata

El ensayo de la fuerza muscular de rata es un método capaz de determinar la duración de la parálisis por medición periódica de la fuerza ejercida por el grupo de de músculos del tríceps sural (gemelo, plantar y sóleo) en las extremidades posteriores de una rata antes y después de la administración de la toxina botulínica.

Ratas macho, adultas Sprague-Dawley se asignan al azar a grupos que contienen 8 animales cada uno. Después de la anestesia adecuada, se rasuran los cuartos traseros y las patas traseras de los animales. Al músculo gemelo de la pata izquierda se le inyecta toxina botulínica formulada en tampón fosfato 0,1 ml en gelatina. Los grupos reciben cantidades equimolares de toxina botulínica tipo A2 o de toxina botulínica tipo A1. Cada uno de los animales de referencia reciben una inyección de tampón fosfato en gelatina (0,1 ml).

La fuerza muscular del grupo tríceps sural (gemelo, plantar y sóleo) se mide antes de la inyección y después de la inyección a las 12, 24 y 72 horas. Se hacen más mediciones periódicamente durante el transcurso de varias semanas. Los pesos corporales se registran a los mismos intervalos de tiempo.

Para medir el desarrollo de la fuerza, los animales se colocan en posición prona en un aparato que permite asegurar el animal en una posición reproducible con movilidad limitada de la pata trasera, excepto en la articulación tibiotarsiana. Un ergómetro de fuerza/desplazamiento se calibra y se fija a la pata delantera del pie entre la primera y segunda almohadillas plantares mediante una cadena ligera de modo que el ángulo tibiotarsiano es de 90 grados. La señal de tensión desde el transductor de fuerza es procesada mediante un sistema de adquisición de datos computarizado.

Un electrodo estimulador de acero inoxidable (cátodo) se coloca cerca bajo la piel cerca del nervio ciático a medio camino entre la espina isquiática posterior y el trocánter mayor femoral. Se inserta otro electrodo estimulador de acero inoxidable (ánodo) 3 mm bajo la dermis en la línea media del lomo inferior.

Los sitios de los electrodos se tatúan para asegurar la colocación reproducible de los electrodos en todos los puntos de tiempo. El nervio ciático se estimula con 0,5 impulsos por segundo y un tiempo de estímulo de 0,5 ms. La tensión de estimulación se determina aumentando la tensión hasta que la fuerza alcanza un máximo y aumentando la tensión un 10% más.

La medición de la fuerza muscular empleando este método demuestra que la recuperación de los músculos de la parálisis por la toxina botulínica tipo A2 se produce durante una duración significativamente prolongada de tiempo cuando se compara con la recuperación de los músculos de la parálisis por la toxina botulínica tipo A1.

45 Parte II del estudio farmacológico

Ensayo de la fuerza muscular de la rata

El ensayo de la fuerza muscular de la rata es un método capaz de determinar la duración de la parálisis por medición periódica de la fuerza ejercida por el grupo de músculos del tríceps sural (gemelos, plantar y sóleo) en las extremidades traseras de una rata antes y después de la administración de la toxina botulínica.

Ratas macho, adultas Sprague-Dawley se asignan al azar a grupos que contienen 8 animales cada uno. Después de la anestesia adecuada, se rasuran los cuartos traseros y las patas traseras de los animales. Al músculo gemelo de la pata izquierda se le inyecta toxina botulínica formulada en tampón fosfato 0,1 ml en gelatina. Los grupos reciben cantidades equimolares de toxina botulínica tipo A2 o de toxina botulínica tipo A1. Cada uno de los animales de referencia reciben una inyección de tampón fosfato en gelatina (0,1 ml).

Después de la anestesia adecuada, se rasuran los cuartos traseros y patas traseras de los animales. Al músculo gemelo de la pata izquierda se le inyecta una dosis única de Dysport en tampón de fosfato de gelatina redisuelta para dar 1,0 U/0,1 ml o 0,1 U/0,1 ml). Los animales de referencia reciben una inyección de tampón de fosfato en gelatina (0,1 ml).

10 La fuerza muscular del grupo del tríceps sural (gemelos, plantar y sóleo) se mide antes de la inyección y después de la inyección a las 12, 24 y 72 horas. Se hacen más mediciones periódicamente durante el transcurso de varias semanas. Los pesos corporales se registran en los mismos intervalos de tiempo.

Para medir el desarrollo de la fuerza, los animales se colocan en posición prona en un aparato que permite asegurar el animal en una posición reproducible con movilidad limitada de la pata trasera, excepto en la articulación tibiotarsiana. Un ergómetro de fuerza/desplazamiento se calibra y se fija a la pata delantera del pie entre la primera y segunda almohadillas plantares mediante una cadena ligera de modo que el ángulo tibiotarsiano es de 90 grados. La señal de tensión desde el transductor de fuerza es procesada mediante un sistema de adquisición de datos computarizado.

20 Un electrodo estimulador de acero inoxidable (cátodo) se coloca cerca bajo la piel cerca del nervio ciático a medio camino entre la espina isquiática posterior y el trocánter mayor femoral. Se inserta otro electrodo estimulador de acero inoxidable (ánodo) 3 mm bajo la dermis en la línea media del lomo inferior.

Los sitios de los electrodos se tatúan para asegurar la colocación reproducible de los electrodos en todos los puntos de tiempo. El nervio ciático se estimula con 0,5 impulsos por segundo y un tiempo de estímulo de 0,5 ms. La tensión de estimulación se determina aumentando la tensión hasta que la fuerza alcanza un máximo y aumentando la tensión un 10% más.

La medición de la fuerza muscular empleando este método demuestra que la velocidad de inicio de la parálisis provocada por la toxina botulínica tipo A2 es significativamente más rápida en comparación con el inicio de la parálisis de los músculos, provocada por la toxina tipo A1.

#### Parte III del estudio farmacológico

30 Ensayo del margen de toxicidad intramuscular

Para la determinación de la DL<sub>50</sub> intramuscular, ratones CD1 se asignan al azar a grupos que contienen 8 animales cada uno. Al músculo gemelo de la pata izquierda se le inyecta toxina botulínica formulada en 0,1 ml de tampón fosfato en gelatina. Los grupos reciben cantidades equimolares de toxina botulínica tipo A2 o toxina tipo A1, recibiendo cada grupo una de una serie de dosis. La DL<sub>50</sub> im. se calcula (análisis de Spearmann-Karber) como la dosis a la que el 50% de los ratones murió después de la inyección im.

Para la determinación de la debilidad muscular máxima media (DE<sub>50</sub>), se utiliza el ensayo de puntuación de abducción digital (DAS) (Aoki KR, *Toxicon* (2001), 39, 1815-1820). Ratones CD1 se asignan al azar en grupos de 10 cada uno. El músculo gemelo de la pata izquierda se inyecta con toxina botulínica formulada en 0,1 ml de tampón fosfato en gelatina. Los grupos reciben cantidades equimolares de toxina botulínica tipo A2 o de toxina botulínica tipo A1, recibiendo cada grupo una de una serie de dosis. Tras un período fijo después de la inyección, se suspendió brevemente a los ratones por la cola para generar abducción digital como parte de la respuesta de sobresalto característica en esta posición. La abducción de los dedos de la extremidad inyectada se califica en una escala de 0 a 4, donde 0 es la abducción normal y 4 es la máxima reducción en la abducción de los dedos y la extensión de la extremidad. La DE<sub>50</sub> se calculó como la dosis que resulta en una puntuación de abducción digital de 2. La medición de la relación de la DL<sub>50</sub> intramuscular a la DE<sub>50</sub> intramuscular de los resultados obtenidos utilizando estos dos métodos demuestra que el margen de toxicidad intramuscular de debilitamiento muscular producido por la toxina botulínica tipo A2 es mayor cuando se compara con la aparición de la parálisis de los músculos provocada por la toxina botulínica tipo A1.

#### Parte IV del estudio farmacológico

50 A) Ensayo en el íleon de cobaya:

Para la determinación de la inhibición de la contracción del músculo liso, se utiliza el ensayo del íleon de cobaya (una modificación del método descrito por Mackenzie I.J. *et al.*, *Neuroscience* 7, 1982, 997 a 1006). Cobayas Hartley macho (Charles River, Francia) con un peso entre 300 y 450 g, se sacrifican por dislocación cervical. La parte distal del íleon se retira y segmentos de 1,5 a 2 cm de longitud se montan sobre soportes equipados con tejido, entre dos electrodos de alambre de platino paralelos. Este conjunto se coloca en un baño orgánico de 20 ml que contiene

solución de Krebs modificada bajo una tensión de 1 g a 37°C y se gasifica con 95% de O<sub>2</sub>/ 5% de CO<sub>2</sub>. Se miden las respuestas contráctiles utilizando transductores de desplazamiento de fuerza (Statham UC2) acoplados a un polígrafo Gould RS3400. Después de un periodo de equilibrado de 1 h, los tejidos se estimulan eléctricamente entre 0,05 Hz y 0,2 Hz con impulsos de onda cuadrada de 0,5 ms a 1 ms de duración y se determina a continuación la tensión supramáxima. Después de un período de estabilización, baños de órganos por duplicado se exponen a continuación a una cantidad molar conocida de la toxina botulínica a ensayar y se registra la magnitud de la contracción nerviosa. Los preparados de referencia se tratan con diluyente solamente. Más baños de órganos por duplicado se tratan con tetrodotoxina 0,25 µM o atropina 0,56 µM para confirmar que las contracciones observadas son debidas a la liberación de acetilcolina de las neuronas entéricas.

10 *B) Ensayo del músculo intercostal:*

Para la determinación de la inhibición de las articulaciones neuromusculares del músculo esquelético (NMJ), se utiliza el ensayo del músculo intercostal (como se describe en la solicitud de patente del Reino Unido n° GB 2 398 636). Ratas Wistar con un peso aproximado de 275 g se sacrificaron por dislocación cervical. Se disecciona la caja torácica de cada animal, y se separa en varias secciones por disección cuidadosa a lo largo de la columna vertebral. Para cada preparado (que consiste en dos costillas y músculos adheridos) se disecciona cuidadosamente un nervio intercostal para mostrar aproximadamente 1-2 mm de haz de nervios. El preparado se recupera durante aproximadamente 15-20 minutos antes de ser devuelto a una placa Petri que contiene 10 ml de tampón de Lillies Ringer oxigenado. El nervio intercostal diseccionado está conectado mediante un electrodo de succión a un estimulador (Grass Instruments Modelo S48), con un electrodo de retorno colocado en el medio. El preparado hístico está conectado a un amplificador y transductor de fuerza (Grass Instruments Modelo P 122 y FT03, respectivamente), para permitir la medición de la fuerza muscular generada.

El preparado se estimula a una tensión supramáxima y se registran las respuestas contráctiles. Después de un período de estabilización, los baños de órganos por duplicado se exponen a continuación a una cantidad molar conocida de la toxina botulínica a ensayar y se registra la magnitud de la contracción nerviosa. Los preparados de referencia se tratan con diluyente solamente.

*C) Criterios para la determinación de la selectividad de los músculos lisos:*

La relación de selectividad para una determinada toxina botulínica se define como el valor obtenido en el ensayo descrito en A) anteriormente dividido por el valor obtenido en el ensayo descrito en B) anteriormente, mientras que la misma cantidad molar de la toxina botulínica activa a ensayar se utiliza en ambas pruebas.

30 La relación de selectividad encontrada de este modo para la toxina botulínica tipo A2 se encuentra significativamente superior a la de la toxina botulínica tipo A1.

Parte V del estudio farmacológico

*A) Ensayo de la función de las células nerviosas nocisensibles:*

Para la determinación de la inhibición de la función de las células nerviosas nocisensibles, se utiliza el ensayo del ganglio embrionario de la raíz dorsal (descrito por Welch M. J. *et al.*, *Toxicon* (2000), 38, 245-258). Se preparan células nerviosas disociadas a partir de ganglios de la raíz dorsal recogidos ratas Sprague-Dawley fetales de 15 días, y se siembran en placas de 24 pocillos recubiertas con Matrigel. Un día después de la siembra, las células se tratan con citosina β-D-arabinofuranósido durante 48 horas a una concentración de 10 micromolar. Las células se mantienen a continuación en medio de cultivo hístico durante 2 semanas en condiciones de cultivo hístico estándar. Los cultivos de células se exponen por duplicado a continuación a una cantidad molar conocida de la toxina botulínica a ensayar. Las células de referencia se tratan con diluyente solamente.

Después de la incubación con la toxina botulínica a ensayar, se estimuló la liberación de la sustancia P utilizando un tampón de alto contenido de potasio, y se determinó mediante la utilización de un kit de sustancia P Enzyme Immunoassay (EIA) disponible en el mercado.

45 *B) Ensayo del músculo intercostal:*

Para la determinación de la inhibición de las articulaciones neuromusculares del músculo esquelético (NMJ), se utiliza el ensayo del músculo intercostal (descrito en la solicitud de patente del Reino Unido n° GB 2 398 636). Ratas Wistar con un peso aproximado de 275 g se sacrifican por dislocación cervical. Se disecciona la caja torácica de cada animal, y se separa en varias secciones por disección cuidadosa a lo largo de la columna vertebral. Para cada preparado (que consiste en dos costillas y los músculos adheridos) un nervio intercostal se disecciona cuidadosamente para mostrar aproximadamente 1-2 mm de haz de nervios. El preparado se recupera durante aproximadamente 15-20 minutos antes de ser devuelto a una placa Petri que contiene 10 ml de tampón de Lillies Ringer oxigenado. El nervio intercostal diseccionado está conectado mediante un electrodo de succión a un estimulador (Grass Instruments Modelo S48), con un electrodo de retorno colocado en el medio. El preparado hístico está conectado a un amplificador y transductor de fuerza (Grass Instruments Modelo P122 y FT03, respectivamente), para permitir la medición de la fuerza muscular generada.

El preparado se estimula a una tensión supramáxima, y se registran las respuestas contráctiles. Después de un período de estabilización, los baños de órganos por duplicado se exponen a continuación a una cantidad molar conocida de la toxina botulínica a ensayar y se registra la magnitud de la contracción nerviosa. Los preparados de referencia se tratan con diluyente solamente.

5 C) *Criterios para la determinación de la selectividad para neurotransmisión nocisensible:*

La relación de selectividad para una determinada toxina botulínica se define como el valor obtenido en el ensayo descrito en A) anteriormente dividido por el valor obtenido en el ensayo descrito en el apartado B) anteriormente, mientras que la misma cantidad molar de la toxina botulínica activa a ensayar se utiliza en ambas pruebas.

10 La relación de selectividad de este modo encontrada para la toxina botulínica tipo A2 se encuentra significativamente superior a la de la toxina botulínica tipo A1.

**REIVINDICACIONES**

1. Toxina botulínica tipo A2 para su utilización en el tratamiento de un trastorno de los músculos lisos en donde dicha toxina botulínica inhibe la contracción de músculos lisos.
- 5 2. Toxina botulínica tipo A2 para su utilización en el tratamiento de un trastorno de los músculos lisos según la reivindicación 1, en donde dicha toxina botulínica tipo A2 es el complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o la neurotoxina botulínica tipo A2 de alta pureza y en donde dicha toxina botulínica tipo A2 forma parte de una composición farmacéutica sólida o líquida que comprende además un tensioactivo, preferiblemente un tensioactivo no iónico.
- 10 3. Toxina botulínica tipo A2 para su utilización en el tratamiento de un trastorno de los músculos lisos según la reivindicación 2, en donde dicha composición farmacéutica sólida o líquida comprende además un agente cristalino, preferiblemente cloruro de sodio.
4. Toxina botulínica tipo A2 para su utilización en el tratamiento de un trastorno de los músculos lisos según la reivindicación 2 o 3, en donde dicha composición farmacéutica sólida o líquida comprende además un tampón para mantener el pH entre 5,5 y 7,5, preferiblemente entre 5,8 y 7,0.
- 15 5. Toxina botulínica tipo A2 para su utilización en el tratamiento de un trastorno de los músculos lisos según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde dicha composición farmacéutica sólida o líquida comprende además un disacárido, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, lactosa y manitol.
- 20 6. Toxina botulínica tipo A2 para su utilización en el tratamiento de un trastorno de los músculos lisos según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde dicho tensioactivo es un tensioactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en polisorbatos y copolímeros en bloque.
7. Toxina botulínica tipo A2 para su utilización en el tratamiento de un trastorno de los músculos lisos según la reivindicación 6, en donde el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en polisorbatos que tienen un grado medio de polimerización que oscila entre 20 a 100 unidades monoméricas y poloxámeros.
- 25 8. Toxina botulínica tipo A2 para su utilización en el tratamiento de un trastorno de los músculos lisos según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde dicho tensioactivo no iónico es polisorbato 80.
9. Toxina botulínica tipo A2 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para el tratamiento de una enfermedad, afección o síndrome seleccionado de entre trastornos gastrointestinales, trastornos urogenitales o dolor asociado a trastornos del músculo liso.