

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 579**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/48</b>	(2006.01) <b>A61P 27/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/42</b>	(2006.01) <b>A61P 43/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/00</b>	(2006.01)	
<b>A61P 7/12</b>	(2006.01)	
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)	
<b>A61P 21/02</b>	(2006.01)	
<b>A61P 25/00</b>	(2006.01)	
<b>A61P 25/04</b>	(2006.01)	
<b>A61P 25/06</b>	(2006.01)	
<b>A61P 25/16</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2007 E 07830661 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2085093**

54 Título: **Preparación que contiene toxina botulínica de tipo A muy purificada derivada de patógeno de botulismo del lactante**

30 Prioridad:

**27.10.2006 JP 2006293173**

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

**09.06.2015**

73 Titular/es:

**THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH  
INSTITUTE (50.0%)  
1-6-1 Okubo, Kita-ku, Kumamoto-shi  
Kumamoto 860-8568, JP y  
THE UNIVERSITY OF TOKUSHIMA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HARAKAWA, TETSUHIRO;  
NAKANO, HIROTOSHI;  
TORII, YASUSHI;  
GOTO, YOSHITAKA;  
SHINMURA, MIHO;  
OKUDA, SACHIO;  
KAJI, RYUJI y  
KOSAKI, SHUNJI**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 537 579 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

Preparación que contiene toxina botulínica de tipo A muy purificada derivada de patógeno de botulismo del lactante

## CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un agente bloqueador de la transmisión neuromuscular que comprende como ingrediente activo una neurotoxina de tipo A de 150 kDa obtenida de *Clostridium botulinum* de tipo A, negativa para HA, aislada como patógeno del botulismo del lactante, y a un medicamento para tratar una enfermedad con una sobreactividad muscular, que comprende dicha neurotoxina como ingrediente activo.

## TÉCNICA ANTECEDENTE

10 Una toxina botulínica producida por la bacteria grampositiva anaerobia *Clostridium botulinum* es la neurotoxina más letal en la Tierra. Se clasifica en siete tipos, A, B, C, D, E, F y G, y se ha elucidado la propiedad de cada tipo. Los tipos son distinguibles entre sí por anticuerpos neutralizantes específicos del tipo respectivos. Dependiendo de los tipos, una toxina botulínica puede variar en la especie animal a la que afecta, en la gravedad de la parálisis que induce, en la duración del tiempo de su acción, y similar. Una proteína central activa de una toxina botulínica tiene un peso molecular de alrededor de 150 kDa (NTX), común en los siete tipos conocidos.

15 Cualquier toxina botulínica, cuando se produce a partir de *Clostridium botulinum*, es un complejo compuesto de NTX y proteínas no tóxicas relevantes. Una toxina botulínica de tipo A se produce en una forma molecular de 900 kDa (toxina LL), 500 kDa (toxina L), o 300 kDa (toxina M) (Fig. 1). Estas toxinas botulínicas se separan para liberar NTX y NTNH (una proteína no tóxica) en condiciones alcalinas (pH 7,2 o mayor). Utilizando esta propiedad, es posible aislar NTX de 150 kDa (una proteína central activa que dota de una neurotoxina con la actividad; también denominada "toxina S") sola. Estas toxinas LL, L y M se denominan complejo de toxina botulínica o toxina progenitora. Estas toxinas botulínicas, al absorberlas en el intestino delgado superior, se separan para liberar proteínas no tóxicas y una neurotoxina en un vaso linfático. La neurotoxina liberada se une entonces a un receptor en la terminación nerviosa y en su término C de una cadena pesada, y es llevada a las neuronas vía el receptor. Después, escinde específicamente una proteína en la membrana presináptica a través de una actividad de metaloendopeptidasa de cinc de la cadena ligera e inhibe la liberación dependiente de calcio de acetilcolina para bloquear de ese modo la transmisión neuromuscular en la sinapsis (referencia 1 no de patente).

25 Aunque la toxina botulínica es una neurotoxina que puede conducir al ser humano a la muerte en intoxicación botulínica a través del bloqueo de la transmisión neuromuscular sistémica, también se puede utilizar como remedio para tratar una enfermedad con una sobreactividad muscular tal como, por ejemplo, distonía, haciendo uso de forma positiva de su actividad y administrándola directamente en el músculo de un paciente que sufre la enfermedad, de forma que se puede aliviar la tensión muscular local (referencia 2 no de patente). Por ejemplo, un complejo de toxina botulínica de tipo A (Allergan Inc., BOTOX; marca registrada) ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) como medicamento para tratar blefarospasmo, estrabismo, espasmo hemifacial, y distonía cervical, y para tratar arrugas en la mitad de la frente. Un complejo de toxina botulínica de serotipo B (Elan Pharmaceuticals, MYOBLOC; marca registrada) también ha sido aprobado por la FDA como medicamento para el tratamiento de distonía cervical. Se afirma que una toxina botulínica de tipo A tiene una mayor potencia y una duración de acción más prolongada en comparación con tipos distintos de una toxina botulínica de tipo A. Una duración media de acción de una toxina botulínica de tipo A desde su administración muscular única hasta la mejora de los síntomas es típicamente alrededor de 3 a 4 meses.

30 En años recientes, la acción de la toxina botulínica ha sido aprobada en (1) las conjunciones neuromusculares, (2) los ganglios de los nervios autónomos, (3) la terminación del nervio parasimpático postganglional, (4) la terminación del nervio simpático postganglional, y (5) las fibras receptoras del dolor. Para las conjunciones neuromusculares del músculo esquelético, la terminación de los nervios acetilcolinérgicos muscarínicos es el principal sitio activo. Entre los ganglios de los nervios autónomos, se concibe que una acción directa a los ganglios de los nervios parasimpáticos está relacionada con una acción clínica. También se da a conocer que la acción a los nervios autónomos periféricos provoca la inhibición de la liberación de ATP, VIP (polipéptido intestinal vasoactivo) o sustancia P, o la inhibición de la acción de NO (óxido nítrico) sintetasa. También se ha sabido que la toxina botulínica es útil para aliviar el dolor. En esta acción, se da a conocer que la toxina botulínica inhibe la liberación de ácido glutámico, sustancia P y CGRP (péptido relacionado con el gen de calcitonina) (referencia 2 no de patente).  
35 Como tal, la toxina botulínica es un agente bloqueador de la transmisión neuromuscular útil que inhibe la liberación de diversos neurotransmisores en diversos nervios.

40 Actualmente, un potencial biológico de una preparación terapéutica de una toxina botulínica, tal como una toxina botulínica de tipo A, está indicado como una unidad de LD<sub>50</sub> de ratón. Una LD<sub>50</sub> se define como LD<sub>50</sub> que, en base a la administración intraperitoneal a ratones, se define como una cantidad con la cual muere la mitad del número de ratones estudiados. A saber, un potencial se cuantifica con un nivel o una cantidad de una neurotoxina con la que mueren los ratones como consecuencia de la relajación muscular respiratoria. Una LD<sub>50</sub>, es decir, una unidad, en ratones de complejo de toxina botulínica de tipo A comercialmente disponible (Allergan, Inc., BOTOX; marca registrada; que contiene 100 unidades) es alrededor de 50 pg.  
55

Las preparaciones terapéuticas de toxina botulínica están disponibles de Allergan Inc. (U.S.A.), Ipsen Limited (U.K.) o Elan Pharmaceuticals (Irlanda). Estas preparaciones terapéuticas comercialmente disponibles de toxina botulínica consisten en un complejo de toxina botulínica purificada (toxina LL) solo en una estructura molecular unido con proteínas no tóxicas relevantes. En años recientes, las preparaciones de NTX de tipo A (Merz Pharma, Xeomin (marca registrada), Alemania) que no comprenden proteínas no tóxicas se vendieron en el año 2005; de forma similar, otras preparaciones se sometieron a ensayos clínicos en los Estados Unidos de América, y se ha llevado a cabo de forma activa el desarrollo de preparaciones de nueva generación.

Las preparaciones terapéuticas actualmente disponibles en el comercio de toxina botulínica de tipo A, es decir, BOTOX (marca registrada) de Allergan Inc. y Dysport (marca registrada) de Ipsen Limited, consisten en un complejo de toxina botulínica (toxina LL) que comprende como su componente proteína hemaglutinina (HA) tal como HA17, HA34, y HA70 (positivo para HA).

Por otro lado, una toxina botulínica aislada de pacientes que sufren botulismo de lactante en 1990, aunque pertenece al tipo A, consiste en toxina M sin proteínas HA (negativa para HA). Clostridium botulinum de tipo A que produce la toxina M sin proteína HA se ha identificado por primera vez en Japón en 1986 en pacientes que sufren botulismo de lactante (referencia 3 no de patente). Las cepas aisladas clínicamente incluyen Kyoto-F, Chiba-H, Y-8036, 7103-H, 7105-H y KZ1828. Cuando se compara con los otros tipos A a G de toxinas botulínicas, una toxina botulínica de Clostridium botulinum que provoca botulismo de lactante es una neurotoxina peculiar distinta de cualesquiera tipos de estas moléculas tóxicas.

Desde el punto de vista genético, un mecanismo genético de Clostridium botulinum como patógeno del botulismo del lactante es diferente de los de los otros tipos de toxina botulínica. La mayoría de las toxinas botulínicas convencionales, típicamente toxina botulínica de tipo A, se han observado como un complejo de toxina botulínica que tiene proteína hemaglutinina (HA) como un componente del mismo. Los genes que codifican proteínas HA, tales como HA17, HA34 y HA70, están incluidos en genes de neurotoxinas de Clostridium botulinum de tipos A, B, C, D y G, pero están completamente ausentes en aquellos de Clostridium botulinum como patógeno del botulismo del lactante. También, los genes de Clostridium botulinum como patógeno de botulismo del lactante incluyen un gen regulador tal como p47 (referencia 4 no de patente). Además, se mostró que una secuencia de la proteína NTNH de la toxina botulínica producida por Clostridium botulinum como patógeno del botulismo del lactante es una miscelánea, es decir, un mosaico, de genes de la proteína no HA no tóxica NTNH de tipo C y tipo A (referencia 5 no de patente).

Además, cuando la toxina botulínica producida por Clostridium botulinum como patógeno del botulismo del lactante se compara con la toxina botulínica de tipo A convencional que comprende proteínas HA, las propiedades bioquímicas de las toxinas botulínicas purificadas son notablemente diferentes entre sí. La toxina botulínica de tipo A convencional comprende la proteína NTNH y al menos tres proteínas HA (HA17, HA34 y HA70), mientras que la toxina botulínica producida por Clostridium botulinum como patógeno del botulismo del lactante comprende la proteína NTNH sola pero carece de las proteínas HA (referencia 6 no de patente). En cuanto a las moléculas per se, el peso molecular es distinto entre sí, por cuanto una cadena pesada de la toxina botulínica de tipo A convencional tiene 93 kDa mientras que la toxina botulínica producida por Clostridium botulinum como patógeno del botulismo del lactante tiene 101 kDa. También muestran diferente reactividad de proteasa (referencia 7 no de patente). Las secuencias de aminoácidos de estos dos isotipos de las toxinas botulínicas son diferentes en un 89,9% como un todo, y en particular hay una gran diferencia en las regiones de la cadena pesada, 109 de 847 aminoácidos (diferencia de 13%). Por otro lado, se da a conocer que las cadenas ligeras son diferentes en un 95,1% (referencia 8 no de patente). Por otro lado, un problema que se ha presentado es que la administración repetitiva de toxina botulínica puede disminuir su eficacia. Se piensa que este fenómeno es debido a la producción de anticuerpos frente a la toxina. Se señala que, como una de las causas, la hemaglutinina HA contenida en preparaciones terapéuticas tiene una actividad adyuvante para la producción de anticuerpos (referencia 9 no de patente).

Para una toxina botulínica muy purificada, se dio a conocer con anterioridad por Tse CK., et al. (referencia 10 no de patente) y también en el documento WO1996/11699 (referencia 1 de patente) en cuanto a un procedimiento para la purificación (p. 6, línea 9 a p. 7, línea 2) y composiciones farmacéuticas (p. 11, Tabla 2).

Además, se ha descrito previamente el impacto de la variación de secuencia entre la neurotoxina botulínica de serotipo A, subtipos A1 y A2, sobre la unión al anticuerpo y la neutralización, mientras que se menciona que la neurotoxina de la cepa FRI-H1A2 es idéntica a la de Kyoto-F (referencia 11 no de patente).

Además, se describe que la toxina M negativa para HA de las cepas de C. botulinum 7103-H, 7105-H, Chiba-H, Kyoto-F y 804-1H son adecuadas en el tratamiento de enfermedades causadas por hipermiotonia (referencia 2 de patente).

Referencia 1 de patente: documento WO1996/11699

Referencia 2 de patente: EP 1.640.017 A1

Referencia 1 no de patente: Jankovic J. et al., Curr. Opin. Neurol., (7): p. 358-366, 1994

Referencia 2 no de patente: Ryuji Kaji et al., "Dystonia and botulinum therapy", Shindan-To-Chiryosha, 2005

Referencia 3 no de patente: Sakaguchi G. et al., Int. J. Food Microbiol., 11: p. 231-242, 1990

Referencia 4 no de patente: Kubota T. et al., FEMS Microbiology letters., 158: p. 215-221, 1998

5 Referencia 5 no de patente: Kubota T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 224(3): p. 843-848, 1996

Referencia 6 no de patente: Sakaguchi G. et al., Int. J. Food Microbiol. 11: p. 231-242, 1990

Referencia 7 no de patente: Kozaki S. et al., Microbiol. Immunol. 39(10): p. 767-774, 1995

Referencia 8 no de patente: Cordoba J. et al., System. Appl. Microbiol. 18: p. 13-22, 1995

Referencia 9 no de patente: Arimitsu H. et al., Infect. Immun., 71(3): p. 1599-1603, 2003

10 Referencia 10 no de patente: Tse CK. et al., Eur. J. Biochem., 122(3): p. 493-500, 1982

Referencia 11 no de patente: Smith et al., Infection and Immunity: 73(9); p. 5450-5457, 2005

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

(Problema técnico a resolver por la invención)

15 Se sabe que la toxina botulínica es eficaz para el tratamiento de pacientes que sufren una enfermedad con sobreactividad muscular a través de la relajación de los músculos. Sin embargo, cuando su acción afecta a aquellos sitios distintos de las partes deseadas, la acción se convertirá en tóxica. En consecuencia, existe una necesidad social de preparaciones de la toxina que puedan llevar a la tensión muscular a un estado normal en el caso de contractura o movimiento involuntario sistémico (restringido a parálisis cerebral), y sean seguras, permanezcan tópicamente, y puedan mostrar una pronta eficacia. Además, se ha planteado el problema de que la administración repetida de toxina botulínica puede disminuir su eficacia. Se piensa que este fenómeno es debido a la producción de anticuerpos contra la toxina. Se señala que, como una de las causas, la hemaglutinina (HA) contenida en preparaciones terapéuticas tiene una actividad adyuvante para la producción de anticuerpos. Por lo tanto, se ha deseado un medicamento terapéutico en el que no se induzca la producción de anticuerpos y en el que la administración repetida no disminuya la eficacia. Aunque las preparaciones de toxina botulínica que comprenden 20 toxina LL de toxina botulínica como ingrediente activo principal han estado en el mercado, se desea el desarrollo de preparaciones que sean superiores a las preparaciones convencionales a la luz de la eficacia y efectos adversos.

(Medios para resolver los problemas)

30 Puesto que LD<sub>50</sub> de ratón se ha usado para la unidad de potencial de preparaciones de toxina botulínica, el potencial de la toxina botulínica solo se podría comparar mediante la cuantificación de LD<sub>50</sub> de ratón. "Potencial" se refiere a la expresión numérica de una eficacia deseada de interés. LD<sub>50</sub> de ratón, una medida para calcular una cantidad con la que muere la mitad de ratones sometidos a ensayo en un período fijo de tiempo, es un método para cuantificar una unidad de potencial de una concentración o un nivel de una toxina con la que los ratones mueren como consecuencia de la relajación y parálisis de los músculos respiratorios, y para juzgar la "actividad letal" de una toxina en un período fijo de tiempo. En este caso, es imposible verificar la diferencia en propiedad de las toxinas botulínicas desde el punto de vista del tiempo requerido para generar eficacia en un período fijo de tiempo o efectos adversos. Como tal, no había ningún enfoque per se para estimar la excelencia de la propiedad en comparación con las preparaciones de toxina botulínica comercialmente disponibles.

40 Antes de la presente invención, los actuales inventores construyeron inicialmente un sistema de ensayo. A saber, los actuales inventores desarrollaron un método para comparar la eficacia rápida del potencial de toxinas botulínicas al observar LD<sub>50</sub> de ratón en un lapso de tiempo, pero sin estimar LD<sub>50</sub> de ratón en un período fijo de tiempo.

45 Además, a la vista de que la eficacia deseada de las preparaciones de toxina botulínica actualmente en el mercado es una actividad de relajación para los músculos a tratar, es deseable evaluar una cantidad de toxinas botulínicas no mediante LD<sub>50</sub> sino mediante la cuantificación de la actividad de relajación en un grado tal que no conduzca a letalidad. De este modo, la eficacia de las toxinas botulínicas se refiere preferiblemente como un grado de actividad de relajación que se proporciona mediante una cierta cantidad de toxinas a cierto músculo. Los actuales inventores, usando un electromiógrafo, construyeron un sistema de ensayo que permite la evaluación de la eficacia para los músculos con una escala de tiempo en clínica, es decir, un sistema de ensayo para cuantificar el potencial de acción

sobre el músculo de un compuesto (CMAP), denominado un sistema de ensayo de CMAP.

Usando estos sistemas, es posible seleccionar una estructura molecular más preferible de toxinas botulínicas o cepas bacterianas de las que se obtienen dichas toxinas.

5 Además, a fin de encontrar un medicamento terapéutico que sea superior a las preparaciones de toxina botulínica conocidas, los presentes inventores se enfocaron en toxinas botulínicas producidas por *Clostridium botulinum* de la subespecie de tipo A, que se supone que tienen la actividad letal más elevada. Esta es una toxina botulínica de tipo A que no comprende proteínas HA sino toxina M que se aisló de pacientes que sufren botulismo del lactante en 1990.

10 Los presentes inventores, comparando entre sí las preparaciones de toxina LL y una neurotoxina botulínica (NTX) muy purificada de *Clostridium botulinum* como patógeno del botulismo del lactante, usando el ensayo de LD<sub>50</sub> de ratón con lapso de tiempo y el sistema de ensayo de CMAP como se describe anteriormente, han encontrado que la neurotoxina botulínica (NTX) muy purificada es más excelente en una rápida eficacia y es menos difusiva que la toxina LL. Como consecuencia, se ha encontrado que la neurotoxina botulínica (NTX) muy purificada de *Clostridium botulinum* como patógeno del botulismo del lactante tiene una actividad bloqueadora de la transmisión neuromuscular (un agente bloqueador de la transmisión neuromuscular), y de este modo se puede usar muy adecuadamente como medicamento para tratar una enfermedad con una sobreactividad muscular. Se espera que la neurotoxina botulínica (NTX) muy purificada de *Clostridium botulinum* como patógeno del botulismo del lactante, que tiene una rápida eficacia, ejerza una eficacia más rápidamente en las partes dañadas. También, tiene la ventaja de que se puede usar como una preparación más segura para evitar la propagación (difusibilidad) de toxinas a músculos distintos de las partes dañadas. Además, *Clostridium botulinum* de tipo A aislada de pacientes que sufren botulismo del lactante produce en parte toxina M sola sin proteínas HA, y de este modo tiene la ventaja de que, para la purificación de la neurotoxina, se puede omitir el proceso de purificación para eliminar HA, debido a la ausencia completa de HA que potencia la producción de anticuerpos.

#### EFFECTOS DE LA INVENCION

25 La toxina botulínica (NTX) muy purificada según la presente invención procedente de *Clostridium botulinum* negativa para HA aislada del patógeno del botulismo del lactante tiene actividad bloqueadora de la transmisión neuromuscular con una eficacia más rápida que la toxina M o la toxina LL. Un bloqueo de la transmisión neuromuscular en los músculos lejos de aquellos en los que se administra la toxina botulínica, queriendo decir efectos adversos, es del orden de toxina LL > toxina M > NTX, sugiriendo que NTX es la menos difusiva y tiene los efectos adversos más bajos.

30 Como se describe anteriormente, NTX del patógeno del botulismo del lactante, cuando se aplica al tratamiento de una enfermedad con una sobreactividad muscular, tiene las características más favorables como un agente bloqueador de la transmisión neuromuscular, por cuanto exhibe una "rápida eficacia" en los músculos de interés en los que es necesario relajar la tensión mientras que no relaja la tensión en los músculos distinto de aquellos de interés, debido a su propiedad "menos difusiva". Se supone que esto es debido a una secuencia de aminoácidos peculiar para NTX de patógeno del botulismo del lactante, y a su estructura. La preparación de NTX de la presente invención tiene la gran ventaja de que se puede obtener una eficacia en un tiempo más corto tras la administración que las denominadas preparaciones de toxina LL, tales como BOTOX, usadas convencionalmente para el tratamiento de una enfermedad con una sobreactividad muscular, y de este modo los pacientes "pueden ahorrar varios días antes de que se obtenga la eficacia". Además, en el caso de que los músculos con tensión sean grandes músculos del pie, que se usan cuando el ser humano se pone de pie o camina, se requiere la administración de una gran cantidad, tal como 300 unidades o más, de toxinas. En tal caso, la relajación de los músculos distintos de aquellos de interés perturbaría posiblemente la vida diaria. A la vista de que no hay antídotos apropiados contra las toxinas botulínicas, la característica de la NTX del patógeno del botulismo del lactante de ser "menos difusiva" es extremadamente ventajosa por cuanto es "menos arriesgada en efectos secundarios".

45 Además, la preparación de NTX de la presente invención, puesto que no comprende HA, no induciendo probablemente de ese modo la producción de anticuerpos y no disminuyendo la eficacia tras la administración repetida, es útil como un medicamento para tratar una enfermedad con una sobreactividad muscular tal como estrabismo, blefarospasmo, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódico, apasticidad tras apoplejía, parálisis cerebral, disfonía espasmódica, cefalea tal como migraña, dolor crónico tal como lumbago, rigidez en los hombros, paresia que aparece en el comienzo de la enfermedad del Parkinson o esclerosis múltiple, síndrome de dolor miofascial, espasmo de los músculos masticatorios, fisura anal crónica, vejiga sobreactiva, bruxismo, mioquimia facial, tic, distonía local, o arruga. Además, puesto que la toxina botulínica es eficaz para el alivio de dolores, la preparación de NTX de la presente invención también será útil como medicamento para tratar una variedad de dolores nerviosos centrales o nerviosos periféricos, o dolores postoperatorios.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 ilustra una estructura molecular de un complejo de la proteína de la toxina botulínica.

La Fig. 2 es una gráfica que muestra el tiempo requerido para que la toxina NTX muestre eficacia con el

ensayo de LD<sub>50</sub> con lapso de tiempo usando ratones.

La Fig. 3 es una gráfica que muestra el tiempo requerido para que la toxina M muestre eficacia con el ensayo de LD<sub>50</sub> con lapso de tiempo usando ratones.

5 La Fig. 4 es una gráfica que muestra el tiempo requerido para que la toxina progenitora muestre eficacia con el ensayo de LD<sub>50</sub> con lapso de tiempo usando ratones.

La Fig. 5 muestra sitios en los que se administraron las toxinas botulínicas, y sitios en los que se mide el CMAP.

10 La Fig. 6 es una gráfica que muestra los resultados de CMAP en el músculo de la pata trasera izquierda en el que se administraron diversas toxinas botulínicas. El eje de abscisas representa días tras la administración (día), mientras que el eje de ordenadas representa la amplitud de CMAP ( $\times 10^{-1}$  mA).

La Fig. 7 es una gráfica que muestra los resultados de CMAP en el músculo de la pata posterior derecha en oposición al sitio en el que se administraron diversas toxinas botulínicas. El eje de abscisas representa días tras la administración (día), mientras que el eje de ordenadas representa la amplitud de CMAP ( $\times 10^{-1}$  mA).

15 La Fig. 8 es una gráfica que muestra regresión lineal de la amplitud de CMAP en la pata posterior izquierda en el día 1 tras la administración.

La Fig. 9 es una gráfica que muestra regresión lineal de la amplitud de CMAP en la pata posterior derecha a los 4 días después de la administración.

La Fig. 10 muestra la comparación de las diversas toxinas para CMAP-ED<sub>50</sub>, CMAP-SD<sub>50</sub>, y la ventana terapéutica.

20 La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. De este modo, se refiere a los siguientes apartados:

25 1. Medicamento que comprende un agente bloqueador de la transmisión neuromuscular que comprende, como ingrediente activo, una neurotoxina de tipo A muy purificada que es de una Clostridium botulinum negativa para HA de tipo A aislada como patógeno del botulismo del lactante y que tiene un peso molecular de 150 kDa, para uso en el tratamiento de una enfermedad con una sobreactividad muscular.

2. Uso de un agente bloqueador de la transmisión neuromuscular que comprende como ingrediente activo una neurotoxina de tipo A muy purificada que es de una Clostridium botulinum negativa para HA de tipo A aislada como patógeno del botulismo del lactante y que tiene un peso molecular de 150 kDa, para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad con una sobreactividad muscular.

30 3. Medicamento para uso del apartado 1, o el uso del apartado 2, en el que el agente bloqueador de la transmisión neuromuscular tiene un margen más amplio de seguridad y muestra una eficacia más rápida y una propiedad menos difusiva que las toxinas botulínicas LL, L y M.

35 4. Medicamento para uso del apartado 1 ó 3, o el uso del apartado 2 ó 3, en el que dicha neurotoxina muy purificada es producida por una cepa negativa para HA de Kyoto-F, Chiba-H, Y-8036, 7103-H, 7105-H o KZ1828, derivada del patógeno del botulismo del lactante.

5. Medicamento para uso de los apartados 1, 3 ó 4, o el uso de cualquiera de los apartados 2 a 4, en el que el agente bloqueador de la transmisión neuromuscular comprende además un agente estabilizante para la toxina botulínica.

40 6. Medicamento para uso o el uso del apartado 5, en el que dicho agente estabilizante es una seroalbúmina humana.

45 7. Medicamento para uso de uno cualquiera de los apartados 1, y 3 a 6, o el uso de uno cualquiera de los apartados 2 a 6, en el que dicha enfermedad con una sobreactividad muscular es una enfermedad inducida por sobreactividad local, seleccionándose dicha enfermedad de estrabismo, blefarospasmo, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódico, apasticidad tras apoplejía, parálisis cerebral, disfonía espasmódica, cefalea tal como migraña, dolor crónico tal como lumbago, rigidez en los hombros, paresia que aparece en el comienzo de la enfermedad del Parkinson o esclerosis múltiple, síndrome de dolor miofascial, espasmo de los músculos masticatorios, fisura anal crónica, vejiga sobreactiva, bruxismo, mioquimia facial, tic, distonía local, o arruga.

50 De este modo, el medicamento terapéutico de la toxina botulínica de tipo A muy purificada procedente del patógeno del botulismo del lactante comprende como ingrediente activo una toxina botulínica de tipo A muy purificada que se prepara eliminando la proteína no tóxica NTN<sub>H</sub> de la toxina M obtenida de Clostridium botulinum de tipo A negativa para HA aislada del patógeno del botulismo del lactante, es decir, NTX. Puesto que NTX puede ejercer una eficacia

más rápidamente tras la administración según se compara con la toxina LL o con la toxina M, el medicamento terapéutico se puede usar como uno con eficacia más rápida. También, la toxina botulínica de tipo A muy purificada, aislada como patógeno del botulismo del lactante negativo para HA, es menos difusiva que la toxina botulínica de tipo A muy purificada obtenida de toxina botulínica de tipo A positiva para HA, y de este modo es un excelente agente bloqueador de la transmisión neuromuscular, con un margen más amplio de seguridad, y se puede usar muy adecuadamente como un medicamento terapéutico para disminuir la sobreactividad muscular local en una enfermedad con una sobreactividad muscular.

Tal tipo de toxina botulínica según se aísla de pacientes que sufren botulismo del lactante, aunque es de tipo A, consiste en la toxina M sin las proteínas de HA. *Clostridium botulinum* de tipo A que produce toxina botulínica sin proteínas de HA se selecciona de Kyoto-F, Chiba-H, Y-8036, 7I03-H, 7I05-H y KZ1828.

El medicamento terapéutico de la presente invención es preferiblemente una composición farmacéutica que comprende la toxina botulínica de tipo A muy purificada procedente del patógeno del botulismo del lactante, y un agente estabilizante para la toxina botulínica.

Un agente estabilizante para la toxina botulínica puede estabilizar una toxina botulínica en condiciones en las cuales la composición como se describe anteriormente se almacena y no alterarían la rápida eficacia de la eficacia del tratamiento para una enfermedad con una sobreactividad muscular. Un ejemplo de un agente estabilizante para toxina botulínica incluye seroalbúmina humana.

La composición farmacéutica preferible de la presente invención se puede preparar mediante la etapa de mezclar la toxina botulínica de tipo A muy purificada procedente del patógeno del botulismo del lactante con una seroalbúmina humana. En consecuencia, también se describe un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende una toxina botulínica, que comprende las etapas de: (1) purificar una toxina botulínica, y (2) mezclar la toxina botulínica con una seroalbúmina humana.

La toxina botulínica de tipo A muy purificada se puede purificar mediante una combinación adecuada de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía hidrófila, y similar. Específicamente, la toxina M se concentra a partir de un sobrenadante de cultivo de *Clostridium botulinum*, por ejemplo desalando con sulfato de amonio o mediante tratamiento con protamina. La toxina M se lleva entonces a pH 7 o más para separarla en una neurotoxina y proteínas no tóxicas. Después, la toxina se purifica de forma bruta, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio catiónico, y las fracciones con la actividad tóxica se recogen y se purifican adicionalmente mediante cromatografía de filtración en gel. La actividad tóxica se puede medir, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal en ratones, en los que la actividad tóxica se calcula a partir de LD<sub>50</sub> tras la administración intraperitoneal en ratones, y LD<sub>50</sub> en ratones se define como 1 unidad.

Tras la etapa de purificación, se puede llevar a cabo cualquier procedimiento en tanto que comprenda la etapa de mezclar la toxina botulínica con una seroalbúmina humana. Por ejemplo, la toxina botulínica y un agente estabilizante para toxina botulínica se pueden disolver en un disolvente, y la disolución se puede filtrar de forma estéril y se puede rellenar en una ampolla, un vial, y similar, para preparar la composición farmacéutica de la presente invención. Como alternativa, la toxina botulínica se puede disolver en un disolvente en el que se ha disuelto previamente un agente estabilizante para la toxina botulínica, y la disolución se puede filtrar de forma estéril y se puede rellenar en una ampolla, etc. Un disolvente puede incluir agua destilada para inyección, disolución salina fisiológica, tampón de fosfato 0,01M a 0,1M, etc., que se puede mezclar opcionalmente con etanol, glicerol, etc.

Como alternativa, la toxina botulínica y un agente estabilizante para la toxina botulínica se pueden disolver en un disolvente, y la disolución se puede filtrar de forma estéril y se puede rellenar en un vial, etc., seguido de la liofilización para preparar la composición farmacéutica de la presente invención. Todavía de forma alternativa, la toxina botulínica y un agente estabilizante para la toxina botulínica se pueden mezclar juntos, y la mezcla se puede rellenar entonces de forma estéril en un vial, etc., para preparar la composición farmacéutica de la presente invención.

Específicamente, a la toxina botulínica purificada se puede añadir un agente estabilizante para la toxina botulínica, preferiblemente una seroalbúmina humana, más preferiblemente una seroalbúmina humana para terapia de seguridad probada en seres humanos, a una concentración final de 0,1 a 5 mg/ml, preferiblemente 0,5 a 2 mg/ml, y la mezcla se puede almacenar con enfriamiento, congelación o mediante liofilización.

El medicamento terapéutico de la presente invención, según lo demande la ocasión, se puede suplementar además con aditivos tales como azúcares, por ejemplo manitol, glucosa o lactosa, una disolución salina, fosfato sódico, y similar. La composición farmacéutica de la presente invención puede estar habitualmente a pH de 3 a 8, preferiblemente 4 a 7, más preferiblemente 5 a 7.

La toxina botulínica contenida en el medicamento terapéutico de la presente invención puede estar en una cantidad tal que sea eficaz para uso en la presente invención. En el caso de que un agente estabilizante para la toxina botulínica esté contenido en el medicamento terapéutico de la presente invención, el agente puede estar en una cantidad suficiente para estabilizar la neurotoxina botulínica.

El medicamento terapéutico de la presente invención, en comparación con las preparaciones convencionales conocidas de toxina botulínica, tiene "rápida eficacia" de potencial y un margen más amplio de seguridad debido a que es "menos difusivo", y de este modo se puede usar muy adecuadamente como medicamento terapéutico para disminuir la sobreactividad muscular local en una enfermedad con una sobreactividad muscular. Las enfermedades objetivo para las que está dirigida aquí la terapia para disminuir la sobreactividad muscular local incluyen estrabismo, blefarospasmo, espasmo hemifacial, torticolis espasmódico, apastividad tras apoplejía, parálisis cerebral, disfonía espasmódica, cefalea tal como migraña, dolor crónico tal como lumbago, rigidez en los hombros, paresia que aparece en el comienzo de la enfermedad del Parkinson o esclerosis múltiple, síndrome de dolor miofascial, espasmo de los músculos masticatorios, fisura anal crónica, vejiga sobreactiva, bruxismo, mioquimia facial, tic, distonía local, o arruga. Se sabe que en el síndrome de dolor miofascial, una enfermedad con bandas de tensión de rigidez sólida en los músculos producida debido a daño muscular agudo o a sobrecarga (sobreuso) repetitiva de los músculos y con un fuerte dolor, la tensión muscular en manos y piernas se acelera sumamente postapopléjicamente o en asociación con el comienzo de parálisis cerebral, enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiple. También se sabe que la cefalea, tal como la migraña crónica, aparece debido a sobreactividad muscular anormal en el cuello y los hombros, y que la tensión muscular se puede acelerar anormalmente debido a fatiga en los músculos o a una mala postura sostenida hasta inducir finalmente de ese modo dolores crónicos tales como lumbago, dolores en el cuello o la espalda, o la rigidez en los hombros.

Una enfermedad con una sobreactividad muscular a tratar con el medicamento terapéutico de la presente invención es preferiblemente una enfermedad en la que es necesaria la rápida relajación de una sobreactividad muscular, es decir, una enfermedad que necesita ser tratada con un medicamento terapéutico que tiene eficacia inmediata. Tal enfermedad con una sobreactividad muscular incluye aquella en la que se administra un medicamento ajustando la dosis hasta que se determina la dosis eficaz, y aquella sistémica en la que el tratamiento se realiza con eficacia acumulativa. Una enfermedad sistémica con una sobreactividad muscular incluye distonía sistémica, contractura sistémica, apastividad tras apoplejía, parálisis cerebral, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple.

El medicamento terapéutico de la presente invención se puede administrar en una cantidad eficaz. Cuando se administra a un ser humano, su vía preferible de administración es la administración tópica, más preferiblemente la administración intramuscular. El momento adecuado y la dosis de administración no están particularmente limitados, y pueden variar dependiendo de la gravedad de los síntomas, etc. Una dosis puede variar dependiendo de la gravedad de los síntomas, de la edad, sexo, peso, sitio y día de administración, pero, por ejemplo, se administran intramuscularmente de una sola vez 0,01 a 900 unidades, preferiblemente 5 a 300 unidades, para adultos. Una unidad se define aquí como una cantidad de la toxina con la que muere la mitad de los ratones cuando se administra intraperitonealmente (1 LD<sub>50</sub>). Una dosis total para pacientes está en un intervalo de alrededor de 0,01 a 900 unidades.

Tras la inyección, la terapia se continúa mientras se confirma en todos los pacientes que no hay una disminución amplia en la tensión local en los músculos distintos de aquellos de interés observados, sin efectos secundarios sistémicos o locales, y que se observa alivio funcional en los músculos a tratar usando un electromiógrafo.

También se describe un método para el tratamiento usando el medicamento terapéutico de la toxina botulínica de tipo A muy purificada procedente de Clostridium botulinum de tipo A negativa para HA aislada como patógeno del botulismo del lactante para disminuir la sobreactividad muscular local en una enfermedad con una sobreactividad muscular. La toxina botulínica muy purificada, una enfermedad con una sobreactividad muscular, una vía de administración, y un procedimiento para prepararla, se describen aquí anteriormente.

## EJEMPLO

La presente invención se explica con más detalle por medio de los siguientes Ejemplos, pero no se limita a ellos.

### Ejemplo 1: Purificación de neurotoxina botulínica de tipo A

Usando Clostridium botulinum de tipo A, cepa Chiba-H, aislada de pacientes que sufren una enfermedad con una sobreactividad muscular, la toxina M botulínica de tipo A se purificó como se describió por Sakaguchi G., Biochemical aspects of botulism: Purification and oral toxicities of Clostridium botulinum progenitor toxins, 21-34, Lewis GE., 1981, Academic Press, Nueva York.

La toxina M botulínica se dializó frente a tampón de fosfato 10 mM (pH 7,5), se adsorbió a una columna de DEAE sefarosa equilibrada con el mismo tampón, y se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 0,3 M del mismo tampón para separar la neurotoxina de las proteínas no tóxicas. La neurotoxina (NTX) muy purificada obtenida se concentró con una membrana YM-10 (Amicon) hasta 1 mg/ml, se dializó frente a tampón de fosfato 50 mM (pH 7,5), y se almacenó a -80°C hasta el uso.

### Ejemplo 2: Comparación del tiempo requerido para que diversas toxinas muestren eficacia con el ensayo de LD<sub>50</sub> con lapso de tiempo en ratones

Para la toxina botulínica, se usaron la toxina M de tipo A y NTX, como se prepara en el Ejemplo 1. Para la toxina LL, se usó BOTOX (marca registrada) fabricada por Allergan Inc. Cada una de las toxinas se diluyó con un tampón de



dilución de muestra hasta 2,662, 2,420, 2,200, 2,000, 1,818, 1,653, y 1,503 LD<sub>50</sub>/ml (7 dosis, dilución 1,1 x intervalo). A cada uno de 20 ratones por grupo de dilución se administraron intraperitonealmente 0,5 ml de la toxina. 4 días después de la administración, los ratones se observaron cada día en busca de muertes. Los resultados se muestran en las Figs. 2 a 4.

- 5 Como resultado, se encontró que el tiempo para la muerte estaba en el orden NTX > toxina M > toxina LL, demostrando que NTX exhibió eficacia casi inmediatamente y pudo conducir a los ratones a la muerte en menos días.

### Ejemplo 3: Comparación de CMAP para diversas neurotoxinas

10 Para la toxina botulínica, se usó la toxina M de tipo A y NTX, como se prepara en el Ejemplo 1. Para la toxina LL, se usó BOTOX (marca registrada) fabricada por Allergan Inc. Para la unidad de cada toxina, 1 unidad se define como 1 LD<sub>50</sub> cuando se administra intraperitonealmente a ratones. Cada toxina se preparó a 3 LD<sub>50</sub> de ratón/0,1 ml usando disolución salina fisiológica estéril que contiene 0,5% de seroalbúmina. Se administraron 0,1 ml de cada una de las dos toxinas al músculo gastrocnemio de la pata posterior izquierda de cada rata (SD), y se midió el cambio en el potencial de acción sobre el músculo del compuesto (CMAP) de las patas traseras. Para la medida de CMAP de las patas traseras, se pellizcó la vecindad de la parte lumbar de la rata con un electrodo de clip para aplicar excitación eléctrica, y se registró el CMAP para cada una de las patas posteriores derecha e izquierda con electrodos de registro. La Fig. 5 muestra los sitios en los que se administró la toxina botulínica y los sitios en los que se midió CMAP. Un electromiógrafo usado fue Nicolet Biking Quest series (Nicolet Biomedical). Los resultados se expresaron numéricamente con software analítico. Las Figs. 6 y 7 muestran los resultados de CMAP de cada toxina de las patas posteriores izquierda y derecha, respectivamente.

Los resultados de CMAP de la pata posterior izquierda en la que se administró la toxina botulínica revelaron una rápida eficacia de la relajación muscular en el orden NTX > toxina M = toxina LL, demostrando que NTX exhibió eficacia casi inmediatamente. Además, según los resultados de CMAP de la pata posterior derecha, opuesta al sitio en el que se administró la toxina botulínica, es decir, en la que no se administró la toxina botulínica, la rápida eficacia de la relajación muscular y difusibilidad estaban en el orden toxina LL > toxina M > NTX, demostrando que NTX es la menos difusiva.

### Ejemplo 4: Purificación de NTX a partir de toxina botulínica de tipo A positiva para HA

30 Usando la cepa 62A de Clostridium botulinum de tipo A positiva para HA, se repitieron los procedimientos del Ejemplo 1 para llevar a cabo el cultivo y purificación de las toxinas como se describe por Sakaguchi G., Biochemical aspects of botulism: Purification and oral toxicities of Clostridium botulinum progenitor toxins, 21-34, Lewis GE., 1981, Academic Press, Nueva York. Además, NTX se purificó a partir de toxina M y se denomina como 62A NTX.

### Ejemplo 5: Comparación de la ventana terapéutica en diversas neurotoxinas

35 Para la toxina botulínica, se usó NTX de tipo A, como se prepara en el Ejemplo 1, y 62A NTX, como se prepara en el Ejemplo 4. Para la toxina LL, se usó BOTOX (marca registrada) fabricada por Allergan Inc. Cada toxina se diluyó hasta 136,0, 68,0, 34,0, 17,0, 4,0, 2,0, 1,0, y 0,50 LD<sub>50</sub>/ml usando disolución salina fisiológica estéril que contiene 0,5% de seroalbúmina. Se administró 0,1 ml de cada una de las toxinas diluidas al músculo gastrocnemio de la pata posterior izquierda de cada rata (SD), y se midió CMAP para la pata posterior izquierda 1 día después de la administración, y para la pata posterior derecha 4 días después de la administración. CMAP-ED<sub>50</sub> se definió como una actividad tóxica disminuida en 50% en el día 1 después de la administración en la pata posterior izquierda. CMAP-SD<sub>50</sub> se define como una actividad tóxica disminuida en 50% a los 4 días después de la administración en la pata posterior derecha. También, la ventana terapéutica se definió como CMAP-SD<sub>50</sub> dividido entre CMAP-ED<sub>50</sub>. La Fig. 8 muestra regresión lineal de la amplitud de CMAP en la pata posterior izquierda en el día 1 después de la administración. La Fig. 9 muestra regresión lineal de la amplitud de CMAP en la pata posterior derecha a los 4 días después de la administración. La Fig. 10 muestra la comparación de las diversas toxinas para CMAP-ED<sub>50</sub>, CMAP-SD<sub>50</sub>, y la ventana terapéutica.

45 Como se muestra en la Fig. 10, CMAP-ED<sub>50</sub> fue casi la misma entre cada una de las toxinas, mientras que CMAP-SD<sub>50</sub> reveló que NTX es la menos difusiva ya que requiere la actividad tóxica más elevada para afectar al sitio en el que no se administró la toxina, siendo la relación de NTX a 62A NTX 1,8, y siendo la relación de NTX a BOTOX 1,45. Comparando cada toxina para la ventana terapéutica, NTX tiene un valor de alrededor del doble más amplio, y de este modo se puede afirmar que es la más adecuada para la terapia.

### APLICABILIDAD INDUSTRIAL

55 El medicamento terapéutico de la toxina botulínica de tipo A muy purificada procedente del patógeno del botulismo del lactante según la presente invención comprende como ingrediente activo una toxina botulínica de tipo A muy purificada que se prepara eliminando la proteína no tóxica NTN<sub>H</sub> de la toxina M obtenida de Clostridium botulinum de tipo A negativa para HA aislada del patógeno del botulismo del lactante, es decir, NTX. Puesto que NTX puede ejercer eficacia más rápidamente tras la administración en comparación con la toxina LL o la toxina M, el medicamento terapéutico de la presente invención se puede usar como aquel con eficacia más rápida. También, la

toxina botulínica de tipo A muy purificada aislada como patógeno del botulismo del lactante negativo para HA es menos difusiva que la toxina botulínica de tipo A muy purificada obtenida de la toxina botulínica de tipo A positiva para HA, y de este modo tiene un margen más amplio de seguridad y se puede usar muy adecuadamente como un medicamento terapéutico para disminuir la sobreactividad muscular local en una enfermedad con una sobreactividad muscular.

5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Medicamento que comprende un agente bloqueador de la transmisión neuromuscular que comprende, como ingrediente activo, una neurotoxina de tipo A muy purificada que es de una Clostridium botulinum negativa para HA de tipo A aislada como patógeno del botulismo del lactante y que tiene un peso molecular de 150 kDa, para uso en el tratamiento de una enfermedad con una sobreactividad muscular.
2. Uso de un agente bloqueador de la transmisión neuromuscular que comprende como ingrediente activo una neurotoxina de tipo A muy purificada que es de una Clostridium botulinum negativa para HA de tipo A aislada como patógeno del botulismo del lactante y que tiene un peso molecular de 150 kDa, para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad con una sobreactividad muscular.
- 10 3. Medicamento para uso de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, en el que el agente bloqueador de la transmisión neuromuscular tiene un margen más amplio de seguridad y muestra una eficacia más rápida y una propiedad menos difusiva que las toxinas botulínicas LL, L y M.
- 15 4. Medicamento para uso de la reivindicación 1 ó 3, o el uso de la reivindicación 2 ó 3, en el que dicha neurotoxina muy purificada es producida por una cepa negativa para HA de Kyoto-F, Chiba-H, Y-8036, 7I03-H, 7I05-H o KZ1828, derivada del patógeno del botulismo del lactante.
5. Medicamento para uso de las reivindicaciones 1, 3 ó 4, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el agente bloqueador de la transmisión neuromuscular comprende además un agente estabilizante para la toxina botulínica.
- 20 6. Medicamento para uso o el uso de la reivindicación 5, en el que dicho agente estabilizante es una seroalbúmina humana.
- 25 7. Medicamento para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, y 3 a 6, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicha enfermedad con una sobreactividad muscular es una enfermedad inducida por sobreactividad local, seleccionándose dicha enfermedad de estrabismo, blefarospasmo, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódico, apastividad tras apoplejía, parálisis cerebral, disfonía espasmódica, cefalea tal como migraña, dolor crónico tal como lumbago, rigidez en los hombros, paresia que aparece en el comienzo de la enfermedad del Parkinson o esclerosis múltiple, síndrome de dolor miofascial, espasmo de los músculos masticatorios, fisura anal crónica, vejiga sobreactiva, bruxismo, mioquimia facial, tic, distonía local, o arruga.

Fig. 1

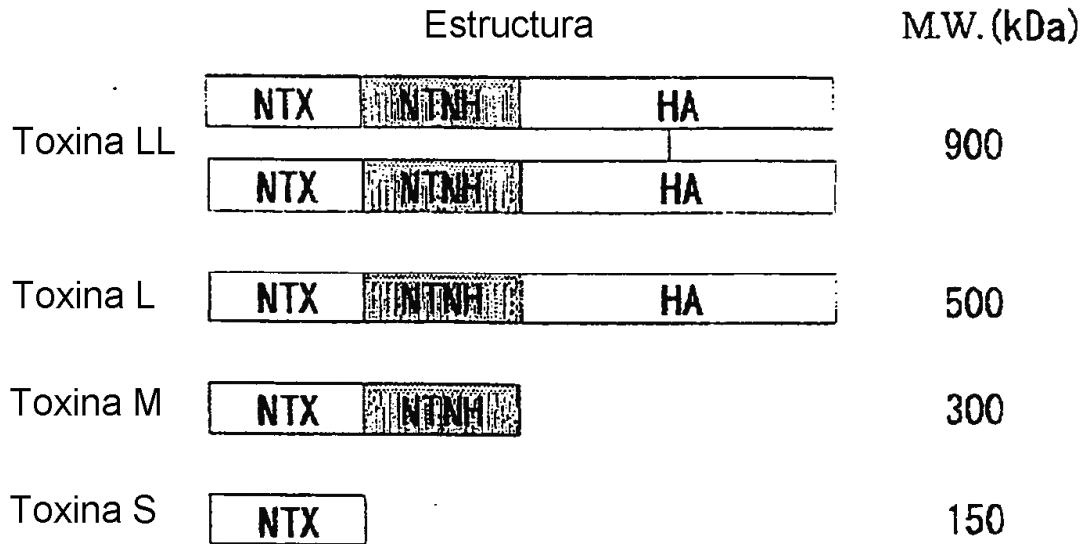


Fig. 2

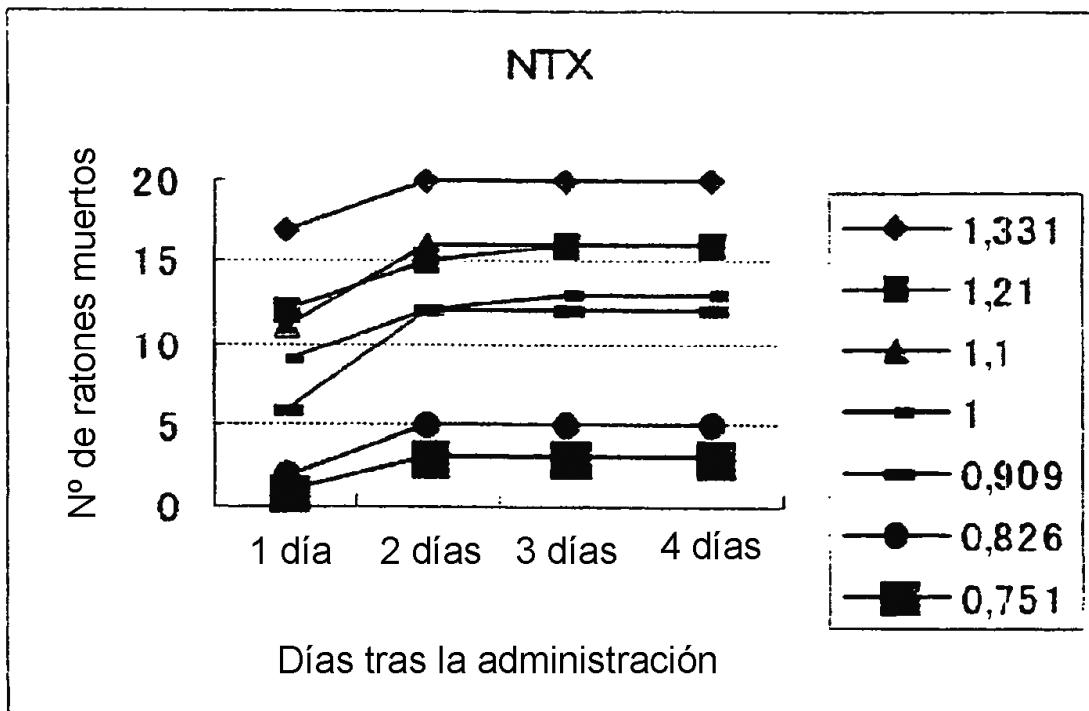


Fig. 3

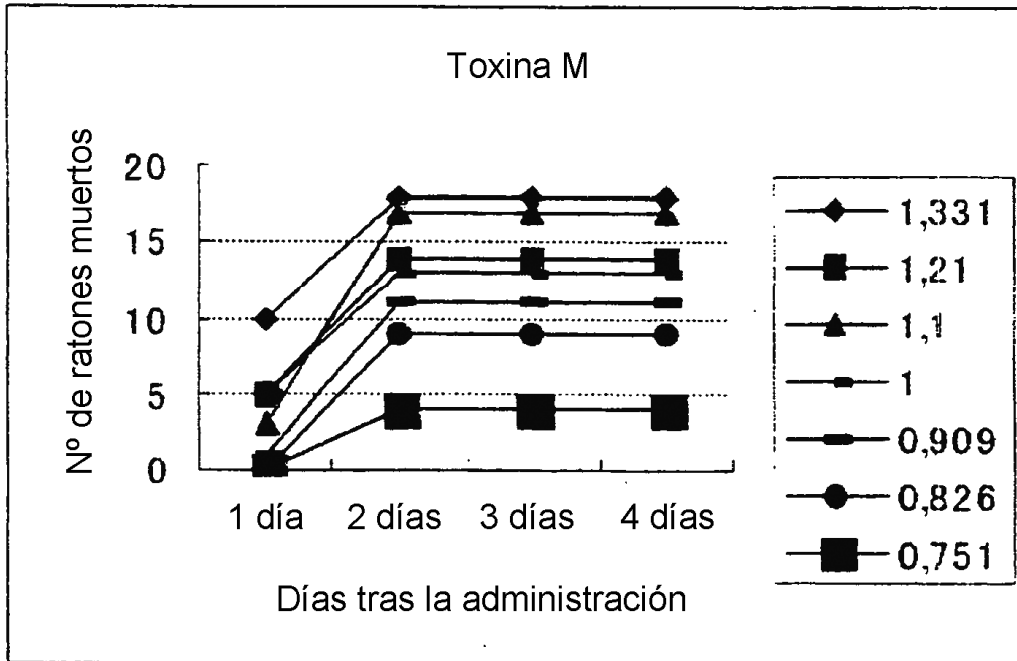


Fig. 4

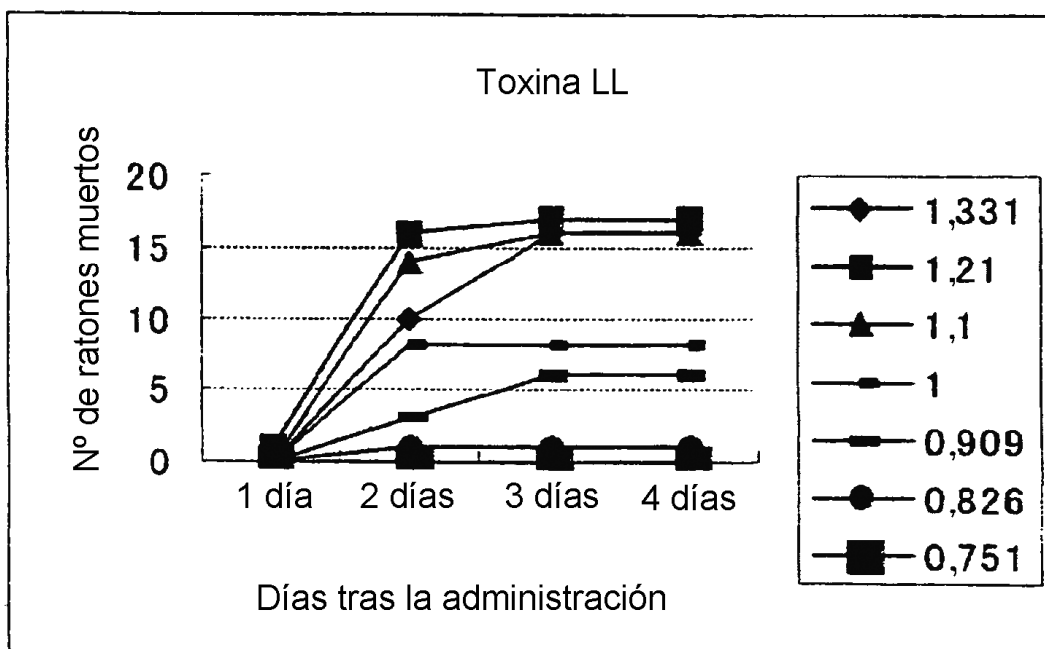
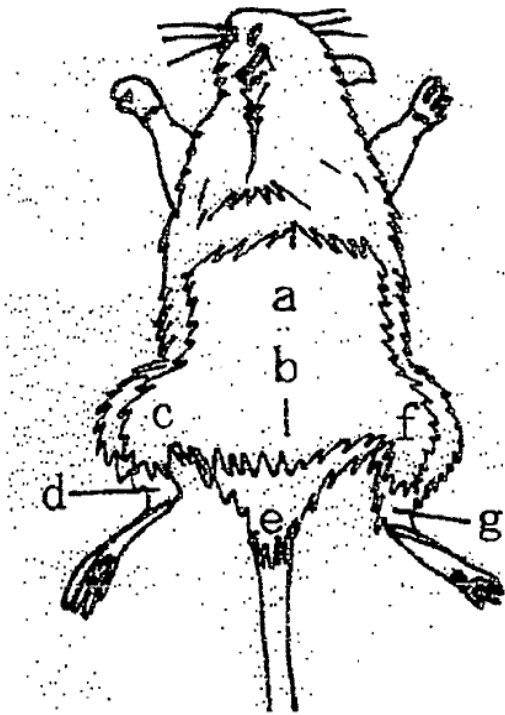


Fig. 5



- a : Electrodo estimulante (+)
- b : Electrodo estimulante (-)
- c : Electrodo de registro (-)  
y sitio de administración
- d : Electrodo de registro
- e : Electro de tierra
- f : Electrodo para registrar la difusión (-)
- g : Electrodo para registrar la difusión (+)

Fig. 6

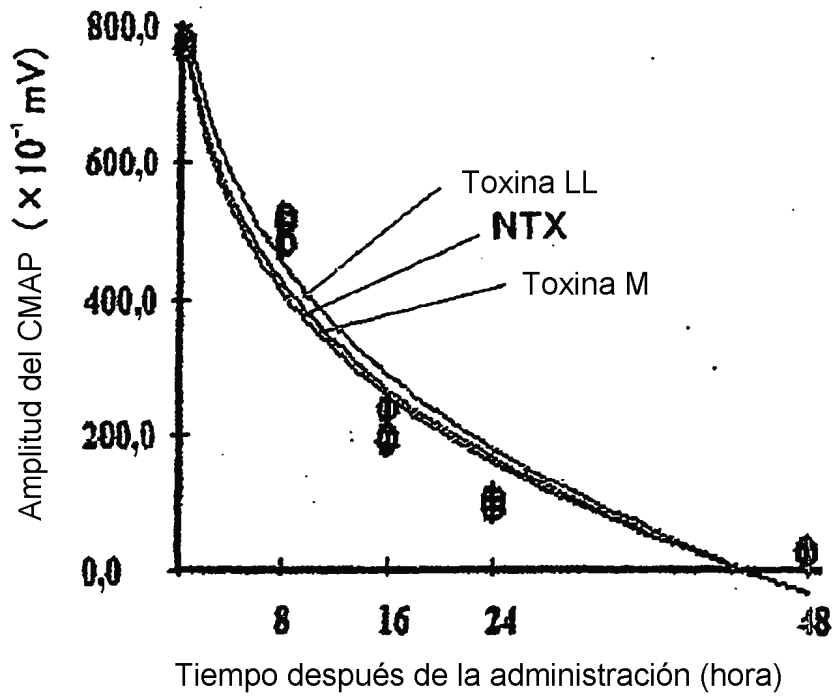


Fig. 7

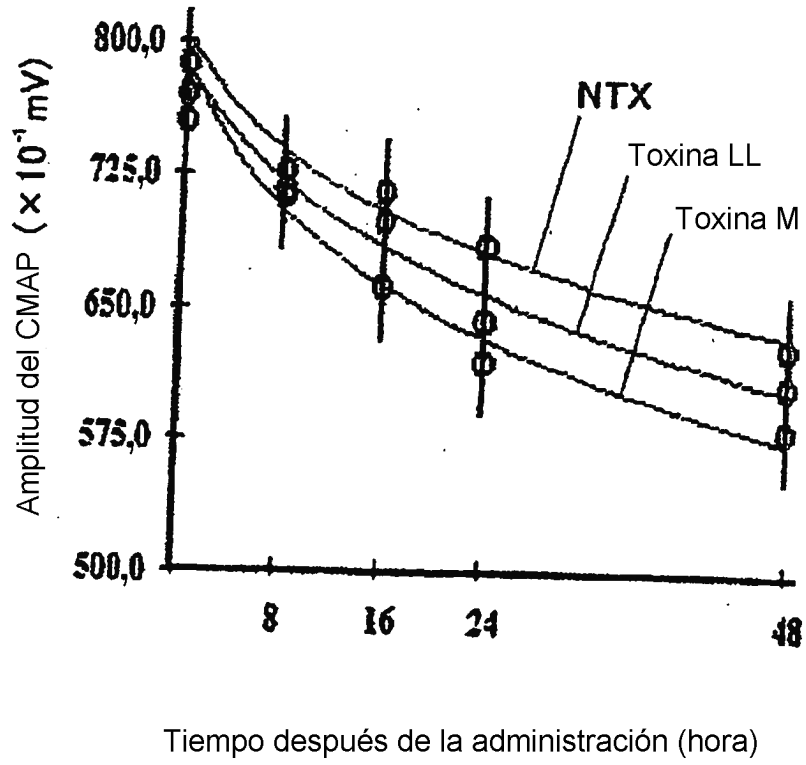




Fig. 8

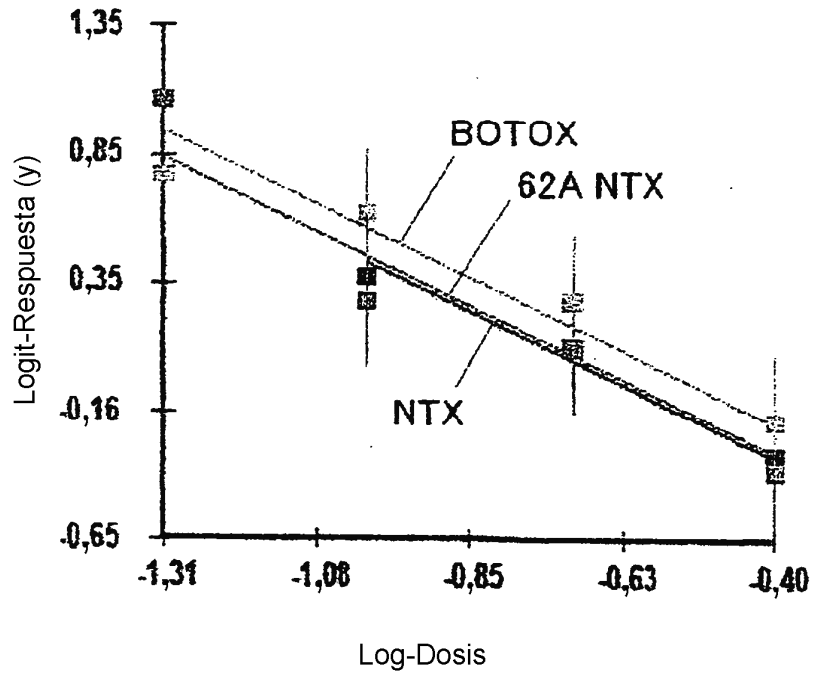


Fig. 9

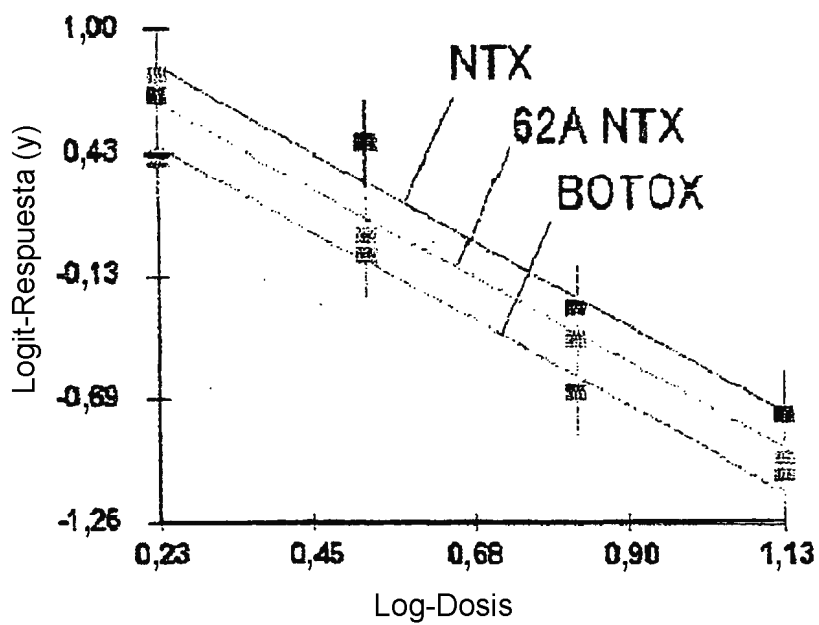


Fig. 10

Toxina ensayada	CMAP-ED <sub>50</sub>	CMAP-SD <sub>50</sub>	Ventana terapéutica
NTX	0,138	4,864	35,25
62A NTX	0,117	2,695	23,03
BOTOX	0,188	3,350	17,82