

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 792**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2009 E 09726893 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2283849**

54 Título: **Neurotoxina botulínica A2 para su uso en el tratamiento de la hiperactividad muscular en presencia de anticuerpos neutralizantes de tipo A1**

30 Prioridad:

31.03.2008 JP 2008092145

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

26.05.2016

73 Titular/es:

**THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH
INSTITUTE (100.0%)**

1-6-1 Okubo

Kita-ku, Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8568, JP

72 Inventor/es:

NAKAHIRA, SHINJI;

TORII, YASUSHI;

GOTO, YOSHITAKA;

SHINMURA, MIHO;

MUNECHIKA, SATOMI;

OKUDA, SACHIO y

KOZAKI, SHUNJI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 571 792 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

Neurotoxina botulínica A2 para su uso en el tratamiento de la hiperactividad muscular en presencia de anticuerpos neutralizantes de tipo A1

5

Campo de la técnica

La presente invención, para abordar la disminución de la respuesta clínica debido a un anticuerpo neutralizante frente a una toxina botulínica de Clostridium botulinum de tipo A1 (toxina botulínica de tipo A1), como se produce cuando se trata a un paciente con una preparación farmacéutica que contiene la toxina botulínica de tipo A1, se refiere a un medicamento que comprende como ingrediente activo la neurotoxina de tipo A de 150 kDa de Clostridium botulinum de tipo A2 (NTX A2) para su uso en el tratamiento de una enfermedad con hiperactividad muscular para su uso en un paciente que tiene anticuerpos neutralizantes frente a una toxina botulínica de tipo A1.

10

Técnica anterior

Una toxina botulínica producida por Clostridium botulinum, bacteria Grampositiva anaerobia, es la neurotoxina más letal en la tierra. Se clasifican en siete tipos, A, B, C, D, E, F y G, y se ha dilucidado la propiedad de cada tipo. Los tipos son distinguibles entre sí por los respectivos anticuerpos neutralizantes específicos del tipo. Dependiendo de los tipos, una toxina botulínica puede variar en las especies animales a las que puede afectar, la gravedad de la parálisis que induce, la duración del tiempo de su acción, y similares. Una proteína centro activo de una toxina botulínica tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kDa (NTX) tan habitual en los siete tipos conocidos.

20

Cualquier toxina botulínica, cuando se produce a partir de Clostridium botulinum, está en una forma molecular de un complejo compuesto por 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 LL, L y M se denominan complejo de toxina botulínica o toxina progenitora. Las toxinas botulínicas se separan para liberar NTX y NTNH (una proteína no-HA no tóxica) en condiciones alcalinas (pH 7,2 o superior). Mediante la utilización de esta propiedad, es posible aislar la NTX de 150 kDa (una proteína centro activo que dota a una neurotoxina de la actividad; también denominada "toxina S") individualmente.

25

30

Las toxinas botulínicas, después de la absorción en la parte superior del intestino delgado, se separan para liberar proteínas no tóxicas y una neurotoxina en un vaso linfático. A continuación, la neurotoxina liberada se une a un receptor en el terminal nervioso y en su extremo C-terminal de una cadena pesada y es captada por neuronas a través del receptor. A continuación, escinde específicamente una proteína en la membrana presináptica a través de una actividad metaloendopeptidasa de cinc de la cadena ligera e inhibe una liberación dependiente de calcio de acetilcolina para bloquear de este modo la transmisión neuromuscular en la sinapsis (referencia no de patente 1).

35

Aunque una toxina botulínica es una neurotoxina que puede producir la muerte a un ser humano en la intoxicación botulínica a través del bloqueo de la transmisión neuromuscular sistémica, también puede usarse como remedio para el tratamiento de una enfermedad con hiperactividad muscular, tal como por ejemplo, distonía, haciendo uso positivamente de su actividad y mediante la administración directamente en el músculo de un paciente que sufre la enfermedad de modo que se puede aliviar una tensión muscular local (referencia no de patente 2). Por ejemplo, la Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado un complejo de toxina botulínica de tipo A (Allergan Inc., BOTOX; marca registrada) como medicamento para el tratamiento de blefaroespasma, estrabismo, espasmo hemifacial y distonía cervical, y para el tratamiento de arrugas en el medio de la frente. Asimismo, la FDA ha aprobado un complejo de toxina botulínica de tipo B (Elan Pharmaceuticals, MYOBLOC; marca registrada) como medicamento para tratar la distonía cervical. Se dice que una toxina botulínica de tipo A tiene una potencia mayor y una mayor duración de acción en comparación con otros tipos distintos de la toxina botulínica de tipo A. Una duración promedio de la acción de una toxina botulínica de tipo A desde su única administración intramuscular hasta la mejora de los síntomas normalmente es de aproximadamente 2 a 4 meses.

40

45

50

Las preparaciones terapéuticas de la toxina botulínica están disponibles en Allergan Inc. (EE.UU.) Ipsen Limited (Reino Unido) o Elan Pharmaceuticals (Irlanda). Estas preparaciones terapéuticas disponibles comercialmente de la toxina botulínica consisten en un complejo de toxina botulínica purificada (toxina LL) solo en una estructura molecular con proteínas no tóxicas relevantes unidas. Por ejemplo, las preparaciones terapéuticas disponibles comercialmente en la actualidad de la toxina botulínica de tipo A, es decir BOTOX (marca registrada) de Allergan Inc. y Dysport (marca registrada) de Ipsen Limited, consisten en una toxina LL de un complejo de toxina botulínica, que comprende, como componente principal, una proteína HA tal como HA17, HA34, o HA70.

55

60

En los últimos años, las preparaciones de NTX de tipo A (Merz Pharma, Xeomin (marca registrada), Alemania), que no comprende proteínas no tóxicas se comercializaron en 2005, similar a otras preparaciones fueron sometidas a ensayos clínicos en EE.UU. y se ha efectuado un desarrollo activo de preparaciones de la siguiente generación.

65

Por otro lado, una toxina botulínica aislada de pacientes que sufren botulismo infantil en 1990, aunque perteneciente al tipo A, consiste en la toxina M sin proteínas HA (negativa para HA). El Clostridium botulinum de tipo A que

produce toxina M sin proteína HA se identificó por primera vez en Japón en 1986 en pacientes que sufren botulismo infantil (referencia no de patente 3). Las cepas aisladas clínicamente incluyen Kyoto-F, Chiba-H, Y-8036, 7I03-H, 7I05-H y KZ1828. En comparación con los otros tipos A a G de toxinas botulínicas, una toxina botulínica de Clostridium botulinum que produce botulismo infantil es una neurotoxina peculiar distinta de cualquier tipo de estas moléculas de toxina.

Desde el punto de vista genético, un mecanismo genético de Clostridium botulinum como patógeno del botulismo infantil es diferente de los de otros tipos de toxina botulínica. La mayoría de las toxinas botulínicas convencionales, normalmente la toxina botulínica de tipo A, se ha visto como complejo de toxina botulínica que tiene proteína hemaglutinina (HA) como componente del mismo. Los genes que codifican las proteínas HA, tales como HA17, HA34 y HA70, están contenidos en los genes de neurotoxina de Clostridium botulinum de los tipos A, B, C, D y G, pero están completamente ausentes en los de Clostridium botulinum como patógeno del botulismo infantil. Asimismo, los genes de Clostridium botulinum como patógeno del botulismo infantil contienen un gen regulador, tal como p47 (referencia no de patente 4). Además, se ha demostrado que una secuencia de la proteína NTNG de la toxina botulínica producida por Clostridium botulinum como patógeno de botulismo infantil es una diversidad, es decir, un mosaico, de genes de NTNH sin proteína HA no tóxica de tipo C y de tipo A (referencia no de patente 5 y referencia no de patente 6).

Como para las moléculas de NTZ per se, un peso molecular es distinto del otro en que una cadena pesada de la toxina botulínica de tipo A convencional es de 93 kDa, mientras que la toxina botulínica producida por Clostridium botulinum como patógeno del botulismo infantil es de 101 kDa. También muestran diferentes reactividades de proteasa (referencia no de patente 7). Las secuencias de aminoácidos de estos dos isotipos de las toxinas botulínicas son diferentes en un 10,2 % como un todo y en un 13 % en la región de la cadena pesada y en tan solo un 4,9 % en la región de la cadena ligera (referencia no de patente 8).

Se ha notificado que las cepas celulares usadas para la fabricación de preparaciones disponibles comercialmente de toxina botulínica de tipo A son la cepa HALL para BOTOX (marca registrada) y Xeomin (marca registrada) y la cepa NCTC2916 para Dysport (marca registrada) (referencia no de patente 9 y referencia no de patente 10), que se puede clasificar en toxina botulínica de tipo A que comprende proteína HA, es decir toxina botulínica de tipo A1. Por otro lado, la toxina botulínica producida por Clostridium botulinum como patógeno del botulismo infantil se puede clasificar en toxina botulínica de tipo A2.

En los últimos años se ha presentado un problema de que la administración repetida de toxina botulínica puede inducir la producción de un anticuerpo anti-toxina botulínica para disminuir la eficacia de la toxina botulínica. Por ejemplo, se ha notificado que una inducción de anticuerpos en BOTOX (marca registrada) es de 3 a 10 % (referencia no de patente 11). Se destaca que, como una de las causas, la HA contenida en las preparaciones terapéuticas tiene actividad adyuvante para la producción de anticuerpos (referencia no de patente 12), cuya actividad adyuvante se piensa que facilita la producción de un anticuerpo neutralizante frente a la NTX.

Brin et al. (Neurology, 53: p. 1431-1438, 1999) divulgan el uso de la toxina botulínica de tipo B en pacientes con distonía cervical resistente al tipo A. El documento DE 199 25 739 A1 propone el uso de una neurotoxina purificada (NTX) en la terapia de pacientes con anticuerpos neutralizantes frente a la toxina botulínica de tipo A1. Ni Brin et al. (loc. cit.) ni el documento DE 199 25 739 A1 proponen el uso de una neurotoxina de tipo A de 150 kDa de Clostridium botulinum de tipo A2 (NTX A2) en el tratamiento de una enfermedad con hiperactividad muscular para su uso en pacientes que tienen un anticuerpo neutralizante contra una toxina botulínica de tipo A1.

Para una toxina botulínica altamente purificada, anteriormente Tse CK., et al. (referencia no de patente 13) y también en el documento WO1996/11699 (referencia de patente 1) notificaron anteriormente un proceso para purificación (pág. 6, línea 9 a página 7, línea 2) y composiciones farmacéuticas (página 11, Tabla 2).

Referencia patente 1: WO1996/11699

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

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

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

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

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

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

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

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

Referencia no de patente 9: Ryuji Kaji et al., "Dystonia and botulinum therapy", Shindan-To-Chiryosha, 23, 1996

Referencia no de patente 10: Dressler D. et al., Disabil Rehabil. 29(23): p.1761-1768, 2007

Referencia no de patente 11: Brin MF., Muscle Nerve Suppl., 6: p.146-168, 1997

Referencia no de patente 12: Arimitsu H. et al., Infect. Immun., 71(3): p.1599-1603, 2003

Referencia no de patente 13: Tse CK. et al., Eur. J. Biochem., 122(3): p.493-500, 1982

Divulgación de la invención

Problema técnico que ha de resolver la invención

5 Se sabe que la toxina botulínica es eficaz para el tratamiento de pacientes que sufren una enfermedad con hiperactividad muscular mediante relajación de los músculos. No obstante, se ha presentado el problema de que la administración repetida de toxina botulínica puede disminuir su eficacia en los pacientes. Se piensa que este fenómeno se debe a la producción de anticuerpos contra la toxina. Se destaca que, como una de las causas, la hemaglutinina (HA) contenida en preparaciones terapéuticas tiene actividad adyuvante para la producción de anticuerpos. Por tanto, es necesario abordar la disminución de la respuesta clínica debido a un anticuerpo neutralizante producido por la administración repetida de toxina botulínica.

Medios para resolver los problemas

15 Las preparaciones terapéuticas disponibles comercialmente de la toxina botulínica de tipo A consisten en una toxina botulínica LL purificada sola en una estructura molecular con proteínas no tóxicas relevantes unidas. Se ha notificado que las cepas celulares usadas para la fabricación de preparaciones disponibles comercialmente de toxina botulínica de tipo A son la cepa HALL para BOTOX (marca registrada) y Xeomin (marca registrada) y la cepa NCTC2916 para Dysport (marca registrada) (referencia no de patente 9), que se puede clasificar en toxina botulínica de tipo A que comprende proteína HA, es decir toxina botulínica de tipo A1.

20 Antes de la presente invención, los presentes inventores se han centrado, de entre las toxinas botulínicas de tipo A, en las toxinas botulínicas producidas por la subespecie A de Clostridium botulinum distintas de las toxinas botulínicas de tipo A1 disponibles comercialmente. Esta es una toxina botulínica de tipo A aislada de pacientes que sufren botulismo infantil en 1990 que no comprende proteínas HA pero sí la toxina M y se clasifica en toxina botulínica de tipo A2. Las secuencias de aminoácidos de estos dos isotipos de toxinas botulínicas, es decir A1 y A2, son diferentes en un 10,2 % como un todo y en un 13 % en la región de la cadena pesada y en tan solo un 4,9 % en la región de la cadena ligera. Como tales, dado que las secuencias de aminoácidos de estos dos isotipos de toxinas botulínicas son bastante similares entre sí, la idea de terapia para usar la toxina botulínica de tipo A2 no se ha concebido para resolver el problema terapéutico de que la administración repetida de la toxina botulínica de tipo A1 convencional puede disminuir su eficacia en pacientes que han desarrollado anticuerpos neutralizantes.

25 Adicionalmente, los presentes inventores han tenido éxito en la purificación exhaustiva de la toxina botulínica de tipo A2, que es una toxina botulínica de tipo A aislada de pacientes que sufren botulismo infantil en 1990 y se prepara eliminando un componente no tóxico de la toxina M, que no comprende proteínas HA, y purificando considerablemente la NTX.

30 Los presentes inventores han construido un "Modelo de rata con respuesta disminuida a la toxina botulínica" que tiene anticuerpos neutralizantes contra la toxina botulínica de tipo A1 conocida hasta ahora y, por tanto, presenta menor eficacia para la toxina inmunizada, administrando a una rata por vía subcutánea una pluralidad de la toxina para inmunización. Adicionalmente, los presentes inventores han administrado una toxina botulínica de tipo A2 altamente purificada (NTX A2) para este modelo de rata para confirmar su efecto de bloqueo de la transmisión neuromuscular usando un sistema de prueba con un electromiógrafo, es decir, una prueba de CMAP en rata, donde se mide un potencial de acción muscular compuesto (CMAP) en el músculo gastrocnemio de ratas. Además, los presentes inventores han hecho reaccionar suero humano que contiene anticuerpos frente a la toxina botulínica de tipo A1 con NTX A2 y han confirmado el efecto de bloqueo de la transmisión neuromuscular de la mezcla de reacción usando la prueba de CMAP de rata. Los presentes inventores han demostrado de este modo la posibilidad de un nuevo método terapéutico con una toxina botulínica de tipo A2 altamente purificada. Por tanto, la presente invención se refiere a los aspectos siguientes:

35 (1) Un medicamento que comprende como ingrediente activo la neurotoxina de tipo A de 150 kDa de Clostridium botulinum de tipo A2 (NTX A2) para su uso en el tratamiento de una enfermedad con hiperactividad muscular para su uso en un paciente que tiene un anticuerpo neutralizante frente a una toxina botulínica de tipo A1.

40 (2) El medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad de acuerdo con (1), donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en estrabismo, blefaroespasma, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, espasticidad posterior al derrame cerebral, parálisis cerebral, disfonía espasmódica, dolor de cabeza, dolor crónico, rigidez en los hombros, paresia que ocurre en el inicio de la enfermedad de Parkinson o la esclerosis múltiple, síndrome de dolor miofascial, espasmo de los músculos de la masticación, fisura anal crónica, vejiga hiperactiva, bruxismo, mioquimia facial, tic, distonía local y arrugas.

45 (3) El medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad de acuerdo con (2), donde dicho dolor de cabeza es migraña.

50 (4) El medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad de acuerdo con (2), donde dicho dolor crónico y lumbago.

65

Efectos de la invención

La toxina botulínica altamente purificada (NTX A2) de acuerdo con la presente invención de Clostridium botulinum negativo para HA aislado del patógeno botulismo infantil tiene un efecto terapéutico sobre un paciente que tiene anticuerpos neutralizantes frente a una toxina botulínica de tipo A1. Además, dado que no comprende HA, es menos probable que la NTX A2 induzca producción de anticuerpos.

Además, la NTX A2 es útil para su uso como preparación farmacéutica para abordar la disminución de la respuesta clínica causada por un anticuerpo neutralizante frente a una toxina botulínica de tipo A1 producida cuando se trata a un paciente con una preparación farmacéutica que comprende una toxina botulínica de tipo A1. Por lo tanto, la NTX A2 es útil para su uso como medicamento para tratar una enfermedad con hiperactividad muscular, tales como estrabismo, blefaroespasmos, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, espasticidad posterior al derrame cerebral, parálisis cerebral, disfonía espasmódica, dolor de cabeza, tal como migraña, dolor crónico, tal como lumbago, rigidez en los hombros, parestesia que se produce al inicio de la enfermedad de Parkinson o la esclerosis múltiple, síndrome de dolor miofascial, espasmo de los músculos de la masticación, fisura anal crónica, vejiga hiperactiva, bruxismo, mioquimia facial, tic, distonía local o arrugas.

Breve descripción de los dibujos

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

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados de CMAP en el músculo de la pata trasera usando el modelo de rata con disminución de la respuesta a la toxina botulínica. El eje de abscisas representa el tipo de toxinas administradas (NTX), mientras el eje de ordenadas es la amplitud del CMAP (mV).

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la reacción del suero humano que contiene un anticuerpo anti-toxina botulínica de tipo A1 con NTX A1 o NTX A2. El eje de abscisas representa los números de suero de paciente que han reaccionado con NTX A1 y NTX A2, mientras que el eje de ordenadas ES una dosis de toxinas reactivas (U).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Los diversos aspectos de la presente invención se explican con detalle a continuación en el presente documento.

La NTX A2 de acuerdo con la presente invención comprende como ingrediente activo una toxina botulínica de tipo A altamente purificada que se prepara mediante la eliminación del componente no tóxico de la toxina M obtenida de Clostridium botulinum de tipo A1 negativo para HA aislado de patógeno de botulismo infantil, es decir, NTX. Dado que la NTX puede ejercer eficacia más rápidamente después de la administración en comparación con la toxina LL o la toxina M, el medicamento terapéutico de la presente invención se puede usar como uno con una eficacia más rápida. Asimismo, la NTX A2 se difunde menos y tiene un margen de seguridad más amplio y, por tanto, se puede usar más adecuadamente como medicamento terapéutico para disminuir la hiperactividad muscular local en una enfermedad con hiperactividad muscular. Además, la NTX A2 es útil para su uso como preparación farmacéutica para abordar la disminución de la respuesta clínica causada por un anticuerpo neutralizante frente a una toxina botulínica de tipo A1 producida cuando se trata a un paciente con una preparación farmacéutica que comprende una toxina botulínica de tipo A1.

Dicho tipo de toxina botulínica tal como se ha aislado de pacientes que sufren botulismo infantil, aunque es de tipo A, consiste en toxina M sin proteínas HA. El Clostridium botulinum de tipo A que produce la toxina botulínica sin proteínas HA se selecciona de Kyoto-F, Chiba-H, Y-8036, 7103-H, 7105-H y KZ1828.

El medicamento terapéutico de la presente invención es, preferentemente, una composición farmacéutica que comprende la toxina botulínica de tipo A altamente purificada de patógeno del botulismo infantil y un agente estabilizante de la toxina botulínica.

Un agente estabilizante para la toxina botulínica puede estabilizar una toxina botulínica en condiciones donde la composición tal como se ha descrito anteriormente se almacena y no perjudica la rápida eficacia del de la eficacia de tratamiento de una enfermedad con hiperactividad muscular. Un ejemplo de un agente estabilizante para la toxina botulínica incluye una seroalbúmina humana.

La composición farmacéutica preferida de la presente invención se puede preparar mediante la etapa de mezclar la toxina botulínica de tipo A altamente purificada del patógeno del botulismo infantil con una seroalbúmina humana.

La toxina botulínica de tipo A altamente purificada puede purificarse mediante una combinación adecuada de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía hidrófila y similares. Específicamente, las células de Clostridium botulinum se retiran del sobrenadante del cultivo mediante filtración y la toxina M obtenida se concentra mediante, por ejemplo, el procedimiento usando membrana de UF. Después, la toxina M se coloca a pH 7 o más para separar en una neurotoxina (NTX) y proteínas no tóxicas (NTNH). Después, la neurotoxina se purifica en bruto mediante, por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico y se recogen las fracciones con actividad tóxica se purifican adicionalmente mediante cromatografía de filtración en gel. La actividad

tóxica se puede medir, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal en ratones, donde se calcula la actividad tóxica de la DL₅₀ después de la administración intraperitoneal en ratones, y la DL₅₀ en ratones se define como 1 unidad.

5 Después de la etapa de purificación, se puede usar cualquier procedimiento en la medida en que comprenda la etapa de mezclar la toxina botulínica con una seroalbúmina humana. Por ejemplo, la toxina botulínica y un agente estabilizante para la toxina botulínica se pueden disolver en un disolvente y la solución puede filtrarse en esterilidad y cargarse en una ampolla, un vial, y similares, para preparar la composición farmacéutica de la presente invención. Como alternativa, la toxina botulínica se puede disolver en un disolvente donde previamente se ha disuelto un agente estabilizante para la toxina botulínica y la solución puede filtrarse en esterilidad y cargarse en una ampolla etc. Un disolvente puede incluir agua destilada para inyección, solución salina fisiológica, tampón de fosfato 0,01 M a 0,1 M, etc., que puede mezclarse opcionalmente con etanol, glicerol, etc.

15 Como alternativa, la toxina botulínica y un agente estabilizante para la toxina botulínica se pueden disolver en un disolvente y la solución puede filtrarse en esterilidad y cargarse en un vial, etc., seguido de liofilización para preparar la composición farmacéutica de la presente invención. También como alternativa, la toxina botulínica y un agente estabilizante para la toxina botulínica pueden mezclarse y, después, la mezcla puede cargarse en esterilidad en un vial etc. para preparar la composición farmacéutica de la presente invención.

20 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 que ha demostrado seguridad en los seres humanos, a una concentración final de 0,1 a 5 mg/ml, preferiblemente de 0,5 a 2 mg/ml, y la mezcla se puede almacenar con refrigeración, congelación o mediante liofilización.

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

30 La toxina botulínica contenida en el medicamento terapéutico de la presente invención puede estar en una cantidad tal que sea eficaz para su uso en la presente invención. En 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.

35 El medicamento terapéutico de la presente invención puede usarse más adecuadamente como medicamento terapéutico para el tratamiento de un paciente que sufre una enfermedad con hiperactividad muscular que tiene anticuerpos neutralizantes frente a una toxina botulínica de tipo A1. Las enfermedades objetivo para las cuales está dirigida la terapia de disminución de la hiperactividad muscular local en el presente documento incluyen estrabismo, blefaroespasmus, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, espasticidad posterior al derrame cerebral, parálisis cerebral, disfonía espasmódica, dolor de cabeza, tal como migraña, dolor crónico, tal como lumbago, rigidez en los hombros, paresia que se produce al inicio de la enfermedad de Parkinson o la esclerosis múltiple, síndrome de dolor miofascial, espasmo de los músculos de la masticación, fisura anal crónica, vejiga hiperactiva, bruxismo, mioquimia facial, tic, distonía local o arrugas. El síndrome de dolor miofascial, una enfermedad con bandas de tensión de rigidez sólida en los músculos producidas debido a daños musculares aguda o sobrecarga repetitiva (uso excesivo) de los músculos y con un dolor fuerte, se sabe que la tensión muscular en las manos y las piernas está excesivamente acelerada tras una apoplejía o en asociación con el inicio de parálisis cerebral, enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiple. También se sabe que el dolor de cabeza, tal como migraña crónica, se produce debido a hiperactividad muscular anormal en el cuello y en los hombros y que la tensión muscular se puede acelerar anormalmente debido a la fatiga de los músculos o a una mala postura sostenida para, de este modo, inducir en última instancia dolores crónicos, tales como lumbago, dolores en el cuello o en la espalda o rigidez en los hombros.

50 Una enfermedad con una hiperactividad muscular que se va a tratar con el medicamento terapéutico de la presente invención es, preferentemente, una enfermedad donde se necesita la relajación rápida de una hiperactividad muscular, es decir, una enfermedad que tiene que tratarse con un medicamento terapéutico que tenga eficacia inmediata. Dicha enfermedad con hiperactividad muscular incluye una donde un medicamento se administra mediante el ajuste de una dosis hasta que se determina una dosis eficaz y uno sistémico donde el tratamiento se realiza con eficacia acumulada. Una enfermedad sistémica con hiperactividad muscular incluye distonía sistémica, contractura sistémica, espasticidad posterior a accidente cerebrovascular, parálisis cerebral, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple.

60 El medicamento terapéutico de la presente invención se puede administrar en una cantidad eficaz. Cuando se administra a un ser humano, su vía de administración preferida es la administración tópica, más preferiblemente, administración intramuscular. La sincronización y una dosis de administración no están particularmente limitados y pueden variar dependiendo de la gravedad de los síntomas, etc. Una dosis puede variar en función de la gravedad de los síntomas, la edad, el sexo, el peso, el sitio y la vía de administración, pero, por ejemplo, de 0,01 a 2.000 unidades, preferiblemente de 0,5 a 600 unidades se administran una vez por vía intramuscular en adultos. En el

presente documento, una unidad se define como una cantidad de la toxina con la que la mitad de los ratones mueren cuando se les administra por vía intraperitoneal (1 DL₅₀). Una dosis total para pacientes está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,01 a 2.000 unidades.

- 5 Tras la inyección, la terapia progresa mientras se confirma en todos los pacientes que no hay una disminución extensa en la tensión local en los músculos distintos a los de interés observados sin efectos adversos locales o sistémicos y que se ve un alivio funcional en los músculos que se van a tratar usando un electromiograma.

Ejemplo

- 10 La presente invención se explica con más detalle por medio de los ejemplos siguientes, pero no deben interpretarse como limitantes de la misma.

Ejemplo 1: Purificación de NTX de Clostridium botulinum de tipo 2

- 15 Usando la cepa Chiba-H, el Clostridium botulinum de tipo A aislado de pacientes que sufren una enfermedad con hiperactividad muscular, la toxina botulínica de tipo A, toxina M, se purificó como se describe en Sakaguchi G., Biochemical aspects of botulism: Purification and oral toxicities of Clostridium botulinum progenitor toxins, 21-34, Lewis GE., 1981, Academic Press, New York.

- 20 La toxina botulínica M se dializó frente a tampón fosfato 10 mM (pH 7,5), se adsorbió en una columna de DEAE Sepharose equilibrada con el mismo tampón, y se eluyó con un gradiente de 0 a 0,3 mol/l de NaCl del mismo tampón para separar la neurotoxina (NTX) de las proteínas no toxinas (NTNH). La NTX altamente purificada obtenida (NTX A2) se concentró con la membrana YM-10 (Amicon) a 1 mg/ml, se dializó frente a tampón fosfato 50 mM (pH 7,5) y se almacenó a -80 °C hasta su uso, que se usó como NTX A2.

Ejemplo 2: Purificación de la toxina LL y NTX de Clostridium botulinum de tipo A1

- 30 Usando la cepa 62A, Clostridium botulinum de tipo A1 negativo para HA, se realizaron el cultivo y la purificación de las toxinas como describe G. Sakaguchi como en el Ejemplo 1 para dar la toxina LL y la toxina M. Adicionalmente, la NTX se purificó a partir de la toxina M y se usó como NTX A1.

Ejemplo 3: Construcción del modelo de rata con respuesta disminuida a la toxina botulínica

- 35 La toxina LL de la cepa 62A se diluyó con tampón fosfato 0,1 mol/L (pH 6,4) a 0,3 mg/ml y se introdujo en un aparato de diálisis. La diálisis se realizó a 30 °C durante 7 días con un tampón para la conversión en toxoide en una cantidad 100 veces mayor que la de la toxina diluida. Después de la diálisis, el toxoide se almacenó a 4 °C y se demostró que no era tóxico mediante la administración a ratones.

- 40 El toxoide a 10 µg/cabeza se administró por vía subcutánea a ratas (S/D, 6 semanas de edad, hembra) tres veces en un intervalo de 2 semanas. Se extrajo sangre a las ratas 6 y 10 semanas después de la 1ª administración. Se confirmó la elevación en el título de anticuerpos neutralizantes debido a NTX A1. La NTX A1, el mismo tipo que el toxoide, a 2×10^6 U/cabeza se administró en el músculo gastrocnemio de la pata trasera izquierda para confirmar que la amplitud del CMAP no había disminuido y los síntomas no se alteraron un día después de la administración.
- 45 La medición del CMAP se realizó como se describe en el documento WO2007/125604. En la tabla 1 se muestra un título de anticuerpos neutralizantes en sueros de rata 10 semanas después de la inmunización.

Tabla 1

N.º de rata	Título de anticuerpos neutralizantes (UI/ml)	N.º de rata	Título de anticuerpos neutralizantes (UI/ml)
1	11,1	16	5,4
2	9,9	17	2,8
3	5,5	18	55,7
4	14,5	19	12,5
5	1,7	20	0,8
6	20,5	21	10,2
7	17,6	22	4,4
8	2,8	23	4,3
9	17,7	24	8,9
10	10,9	25	3,7
11	1,6	26	6,3

N.º de rata	Título de anticuerpos neutralizantes (UI/ml)	N.º de rata	Título de anticuerpos neutralizantes (UI/ml)
12	4,6	27	6,4
13	10,7	28	4,8
14	6,8	29	3,2
15	5,6	30	2,3

Ejemplo 4: Administración de NTX al modelo de rata con respuesta disminuida a la toxina botulínica

5 Como se muestra en la Tabla 2, las ratas del modelo con respuesta disminuida a la toxina botulínica se dividieron en dos grupos de manera que las ratas en cada grupo pueden tener aproximadamente la misma media del título de anticuerpos neutralizantes cuando se administra con el toxoide de la toxina LL de la cepa 62A. A cada grupo se le administró NTX A1 o NTX A2 x 10⁶ U/cabeza en el músculo gastrocnemio de la pata trasera izquierda y la amplitud del CMAP se midió un día después de la administración.

10 Tabla 2

Toxina administrada	N.º de rata	Título de anticuerpos neutralizantes (UI/ml)
NTX A2	1	11.1
	3	5.5
	5	1.7
	10	10,9
	12	4,6
	15	5,6
	16	5,4
	17	2,8
	19	12,5
	20	0,8
NTX A1	21	10,2
	2	9,9
	4	14,5
	6	20,5
	7	17,6
	8	2,8
	9	17,7
	11	1,6
	13	10,7
	14	6,8
	18	55,7
	22	4,4

15 Como resultado, se demostró que no se observó ningún cambio en la amplitud del CMAP en el grupo de NTX A1 debido a la neutralización por anticuerpos presentes en el cuerpo de las ratas, mientras que en el grupo de NTX A2, la amplitud del CMAP se redujo para indicar un efecto de bloqueo de la transmisión neuromuscular (Fig. 2).

Ejemplo 5: Reacción de suero humano que contiene anticuerpos anti-toxina botulínica de tipo A1 con NTX

20 Se extrajo sangre de seis seres humanos a los que se había inoculado el toxoide botulínico para uso en laboratorio y se midió el título de anticuerpos frente a la toxina botulínica de tipo A1. Un toxoide de tipo A contenido en el toxoide como se usa es uno de la cepa 97A y la cepa 62A similar, se clasifica en el tipo A1. Estos sueros se diluyeron a 10 mUI/ml, que es un título de anticuerpos supuesto en el suero de un paciente con respuesta disminuida a la toxina botulínica. Cada una de las toxinas de prueba, NTX A1 y NTX A2, se diluyeron a 10 U/ml. Cada uno de los sueros diluidos y cada una de las toxinas de prueba se mezclaron en cantidades iguales para la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción a 0,1 ml se administró a las ratas en el músculo del gastrocnemio de la pata trasera izquierda y la amplitud del CMAP se midió un día después de la administración. Como control, 25 cada una de las toxinas se administró a las ratas a 0,5 U/cabeza y se realizó la misma medición.

5 Como resultado, como se muestra en la Fig. 3, en los grupos donde se utiliza NTX A1 como toxina de prueba, una cantidad restante de la toxina fue de 0,13 a 0,21 U, lo que indica que el 60 % o más de la toxina se había neutralizado. Por otro lado, en los grupos de los que se usó NTX A2 como toxina de prueba, una cantidad restante de la toxina fue de 0,26 a 0,43 U, lo que indica que quedaba más de la mitad de la toxina. Los grupos con NTX A1 y los grupos con NTX A2 fueron objeto de comparación múltiple de Tukey para demostrar la significación de la diferencia entre los grupos de NTX A1 y NTX A2.

Aplicabilidad industrial

10 La toxina botulínica altamente purificada (NTX A2) de acuerdo con la presente invención a partir de Clostridium botulinum negativo para HA aislado del patógeno del botulismo infantil, ya que no comprende HA, es menos probable que induzca la producción de anticuerpos y es menos probable que se atenúe su eficacia después de la administración repetitiva. Además, la NTX A2 no causa el problema la de disminución de la respuesta clínica causada por un anticuerpo neutralizante frente a una toxina botulínica de tipo A1 producida cuando se trata a un
15 paciente con una preparación farmacéutica que comprende una toxina botulínica de tipo A1. Por tanto, la NTX A2 es particularmente útil para su uso como medicamento para tratar varias enfermedades con hiperactividad muscular.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un medicamento que comprende como ingrediente activo la neurotoxina de tipo A de 150 kDa de Clostridium botulinum de tipo A2 (NTX A2) para su uso en el tratamiento de una enfermedad con hiperactividad muscular para su uso en un paciente que tiene un anticuerpo neutralizante frente a una toxina botulínica de tipo A1.
- 10 2. El medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en estrabismo, blefaroespasma, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, espasticidad posterior al derrame cerebral, parálisis cerebral, disfonía espasmódica, dolor de cabeza, dolor crónico, rigidez en los hombros, paresia que ocurre en el inicio de la enfermedad de Parkinson o la esclerosis múltiple, síndrome de dolor miofascial, espasmo de los músculos de la masticación, fisura anal crónica, vejiga hiperactiva, bruxismo, mioquimia facial, tic, distonía local y arrugas.
- 15 3. El medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho dolor de cabeza es migraña.
4. El medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho dolor crónico y lumbago.

Fig. 1

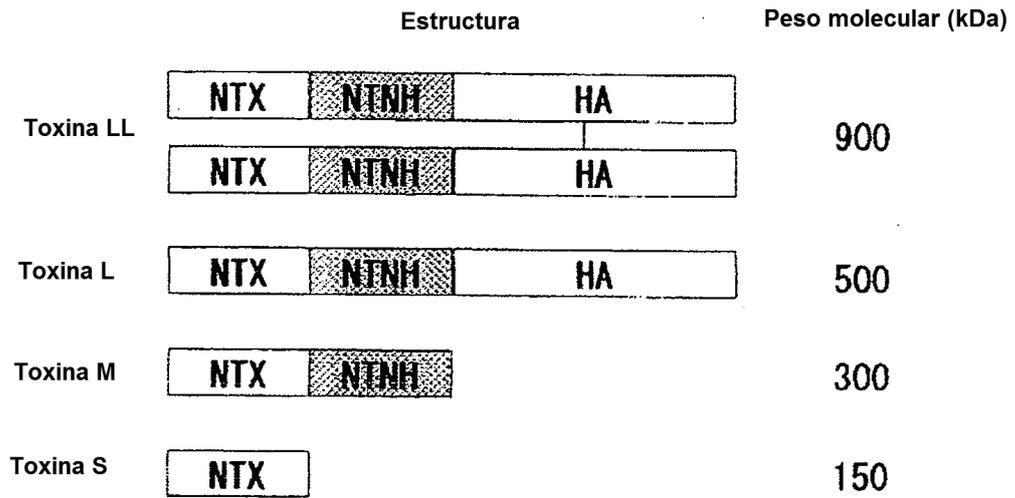


Fig. 2

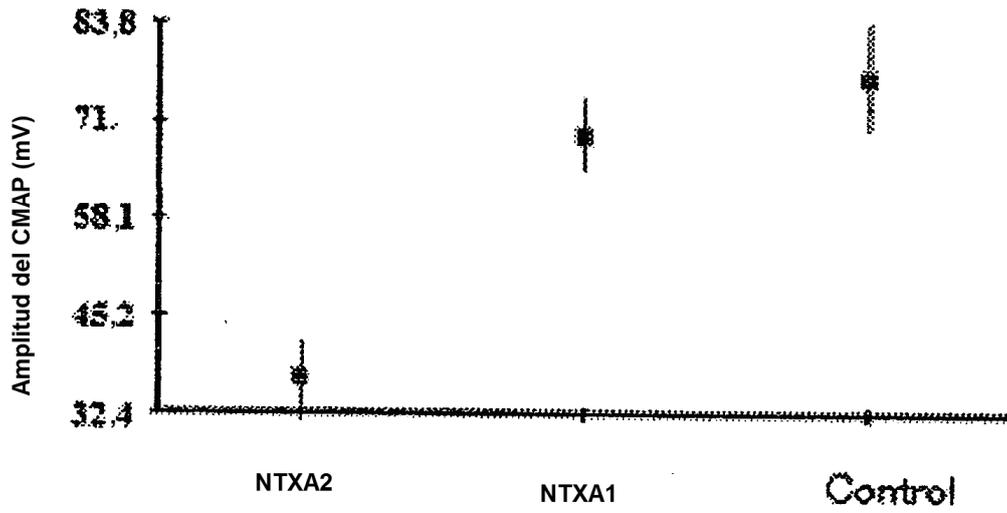


Fig. 3

