

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 365**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2008 E 08827849 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2189790**

54 Título: **Método para la cuantificación del título de un anticuerpo neutralizante de neurotoxinas**

30 Prioridad:

20.08.2007 JP 2007213889

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

05.10.2016

73 Titular/es:

THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE (50.0%)

1-6-1 Okubo, Kita-ku

Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8568, JP y

JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR

GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF

INFECTIOUS DISEASES (50.0%)

72 Inventor/es:

TORII, YASUSHI;

HARAKAWA, TETSUHIRO;

GOTO, YOSHITAKA;

GINNAGA, AKIHIRO;

KAJI, RYUJI;

KOZAKI, SHUNJI y

TAKAHASHI, MOTOHIDE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 585 365 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

Método para la cuantificación del título de un anticuerpo neutralizante de neurotoxinas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para la cuantificación de un título de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina. Específicamente, la presente invención se refiere a un método para la cuantificación de un título de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina que tiene una actividad relajante muscular para un mamífero y se produce por una bacteria de Clostridium. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para la cuantificación de un título de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina caracterizado por que se administra una mezcla de una neurotoxina y un anticuerpo neutralizante a un mamífero y se cuantifica la extensión de la relajación muscular en el mamífero por la neurotoxina no neutralizada usando un electromiograma.

15 **Antecedentes de la técnica**

Se conoce una neurotoxina que incluye una producida por una bacteria de Clostridium o por varios peces o mariscos, normalmente una tetrodotoxina de veneno de marisco, una toxina alfa-bungarotoxina de serpiente y similares. Estas toxinas, aunque diferentes en su punto de acción, normalmente bloquean la neurotransmisión en el extremo del nervio para de este modo exponer una relajación muscular en un mamífero al que se inoculan las toxinas. Entre estas, la toxina de Clostridium es una neurotoxina producida por una bacteria de Clostridium que se divide en más de un centenar de grupos en base a la forma y función. Por bacteria de Clostridium se conocen, Clostridium baratii, Clostridium butyricum, Clostridium botulinum, Clostridium tetani y similares. Una toxina botulínica producida por el Clostridium botulinum, bacteria anaeróbica Gram positiva, es la neurotoxina más letal en la tierra. Se clasifica en siete tipos, A, B, C, D, E, F y G, y se ha dilucidado la propiedad de cada tipo. Los tipos se distinguen unos de otros por los anticuerpos neutralizantes de tipo específico respectivos. Dependiendo de los tipos, una toxina botulínica puede variar en especies animales, puede afectar a la gravedad de la parálisis que induce, la duración del tiempo de su acción, y similares (Referencia 1 de no patente).

Cuando la toxina de Clostridium botulinum o botulínica entra en un ser humano, se produce "botulismo". La mayoría del botulismo se provoca a través de la ingesta de un alimento contaminado con Clostridium botulinum que produce la toxina botulínica (botulismo alimentario). Aunque el Clostridium botulinum, cuando se toma oralmente, no sobrevive debido al ácido gástrico o las enterobacterias, sobrevive en condiciones excepcionales para alcanzar el tracto intestinal donde prolifera para provocar la intoxicación (botulismo del lactante). El botulismo también se produce de una herida sucia donde el botulinum prolifera (botulismo por heridas). También existe "botulismo no clasificado" que no se clasifica en ninguno de los tres botulismos (Referencia 1 de no patente). Para el tratamiento terapéutico del botulismo, se lleva a cabo un manejo respiratorio suficiente y una administración del antisuero. El antisuero botulínico está disponible en el mercado como antisuero equino botulínico seco (tipos A, B, E y F) de la Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute.

Por otro lado, aunque una toxina botulínica es una neurotoxina que puede conducir a un ser humano a la muerte por botulismo a través del bloqueo de la neurotransmisión sistémica, también puede utilizarse como un remedio para el tratamiento de una enfermedad con una tensión muscular acelerada tal como por ejemplo una distonía haciendo uso de su actividad de manera positiva y administrándola directamente en el músculo de los pacientes que sufren de la enfermedad de modo que pueda aliviarse la tensión muscular local. Por ejemplo, el complejo de toxina botulínica de tipo A (BOTOX; marca registrada) se ha aprobado como medicamento para el tratamiento del blefaroespasmio, estrabismo, espasmo hemifacial y distonía cervical, y para el tratamiento de las arrugas en la mitad de la frente por la Food and Drug Administration (FDA). El complejo de toxina botulínica de tipo B (MYOBLOC; marca registrada) también se ha aprobado como medicamento para el tratamiento de la distonía cervical por la FDA. Se supone que la toxina botulínica tipo A tiene una potencia más alta y una duración más larga de acción en comparación con los tipos distintos a la toxina botulínica tipo A. Una toxina botulínica tipo A en los músculos periféricos puede ejercer normalmente una actividad farmacológica en las 24 horas tras la inyección pero la eficacia clínica a menudo puede observarse de dos o tres días después de la inyección. Una duración media de la acción de la toxina botulínica tipo A a partir de su administración muscular única hasta la mejora de los síntomas normalmente es de aproximadamente 3 a 4 meses.

Sin embargo, cuando se usa una toxina botulínica como medicamento, puede surgir un problema de producción de anticuerpos debido a que la toxina botulínica es una proteína exógena para el cuerpo humano. Aquí el más problemático es un anticuerpo neutralizante. Tras la producción de un anticuerpo neutralizante, puede esperarse la eficacia en cierta medida aumentando la dosis cuando su título es bajo pero, cuando el título se vuelve elevado, la eficacia de la toxina botulínica puede perderse (Referencias 2 y 3 de no de patente). Por consiguiente, cuando se usa una toxina botulínica como medicamento, la producción de anticuerpos es un problema grave ya que la eficacia terapéutica de una toxina botulínica puede perderse cuando se eleva el título de un anticuerpo neutralizante. Por consiguiente es muy importante encontrar la producción de un anticuerpo neutralizante en una fase temprana y controlar la pauta de dosis y administración de la toxina botulínica en la terapia.

Existen varios métodos para la cuantificación de un anticuerpo anti-toxina con una sensibilidad variada (Referencia 4 de no patente). Los métodos ejemplares para la cuantificación de un anticuerpo anti-toxina incluyen los siguientes:

(1) Ensayo de neutralización en un ratón (Ensayo de letalidad en un ratón: ELR)

Puede medirse el título de un anticuerpo mediante este enfoque en el que se administra una mezcla de una neurotoxina y un anticuerpo neutralizante de la misma a ratones y se cuenta el número de ratones que murieron a causa de la neurotoxina no neutralizada con una sensibilidad aproximada que es de 10 mUI/ml (Referencia 5 de no patente). Este es el enfoque más antiguo para la medición de un título de un anticuerpo neutralizante.

(2) Ensayo del diafragma de un ratón: EDR

Puede estimarse el título de un anticuerpo mediante este enfoque en el que se prepara un espécimen de nervio frénico/diafragma de ratón y se observa el efecto de una toxina en dicho espécimen. Su sensibilidad de detección de un anticuerpo neutralizante es de alrededor de 0,3 mUI/ml, que es más alta que la del ELR (Referencia 5 de no patente).

(3) Cuantificación *in vitro*

El método *in vitro* para la cuantificación incluye el Western blot que sin embargo es bajo tanto en sensibilidad como en especificidad (Referencia 7 de no patente). Los métodos *in vitro* adicionales incluyen la elución marcada con hapteno, el ensayo de inmunoprecipitación (EIP), ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) y similares (Referencia 4 de no patente) en los que la sensibilidad es tan alta como de 0,3 a 1,0 mUI/ml pero no es posible la discriminación entre los anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes. Otro método *in vitro* para la cuantificación de un anticuerpo neutralizante es un ensayo con endopeptidasa en el que los productos adheridos de SNAP-25 se detectan con un anticuerpo anti-SNAP-25, cuyo ensayo ha demostrado tener una sensibilidad más alta que el ELR (Referencia 8 de no patente). El método de cuantificación *in vitro* más altamente estimado actualmente es el EIP. El EIP o el EDR tienen una sensibilidad más alta entre el ELR, EDR y EIP. La especificidad es la más alta en el ELR. El EIP no muestra una especificidad del 100 % pero tiene las ventajas de no matar animales, y de ser simple, rápido y barato.

El ELR se usa de manera elegible aún hoy en día para la medición de un título de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina tal como la toxina botulínica. Este enfoque, con un índice de actividad letal de la toxina restante no neutralizada en ratones, se informa sin embargo que tiene una sensibilidad que es baja y varía extremadamente entre laboratorios (Referencia 9 de no patente). Además, al usar un gran número de ratones, este enfoque es problemático desde los puntos de vista de la ética y de la protección animal. Por otro lado, entre los pacientes que reciben terapia con una toxina botulínica están los que, aunque en pocos casos, no muestran una eficacia terapéutica y tienen una cantidad traza de anticuerpos en su suero. La sensibilidad de detección del método del ELR sin embargo no puede medir estos anticuerpos y por tanto se desea un sistema de medición con una sensibilidad más alta (Referencia 1 de no patente).

También se informa de un método que usa un electromiógrafo para la detección de la presencia o ausencia de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina. Este es un ensayo del ECD en el que se administra una pequeña cantidad de una toxina botulínica vía intramuscular a dichos músculos en pacientes como a los que cuya parálisis no interferiría con la vida diaria, normalmente el extensor corto de los dedos; ECD, y se mide el PAMC del mismo músculo y se compara antes y 1-2 semanas después de la administración. Su sensibilidad se estima que es de alrededor de 1 mUI/ml. Sin embargo, este método es desventajoso en que una neurotoxina debe administrarse a los músculos innecesarios en pacientes y en que se tarda mucho tiempo hasta que se obtienen los resultados (Referencia 4 de no patente).

Referencia 1 de no patente: Ryuji Kaji et al., "Dystonia and botulinum therapy", Shindan-To-Chiryosha, 2005

Referencia 2 de no patente: Dressler et al., Eur. Neurol., 2002, 47, pág.118-121

Referencia 3 de no patente: Dressler et al., Eur. Neurol., 2002, 48, pág.26-29

Referencia 4 de no patente: Sesaardic et al., Mov. Disord., 2004, 19(Supl 8), pág.S85-S91

Referencia 5 de no patente: Hatheway et al., J. Infect. Dis., 1984, 150, pág.407-412

Referencia 6 de no patente: Goschel et al., Exp. Neurol., 1997, 147, pág.96-102

Referencia 7 de no patente: Duane et al., Neurology, 1997, 48(Supl 2), A399

Referencia 8 de no patente: Hallis et al., J. Clin. Microbiol., 1996, 34, pág.1934-1938

Referencia 9 de no patente: Sheridan et al., J. Appl. Toxicol., 1999, 19(Supl 1), pág.S29-S33

Divulgación de la invención

(Problema técnico a ser resuelto por la invención)

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para la medición de manera cuantitativa de un título de un anticuerpo neutralizante para una toxina de Clostridium con especificidad y una alta sensibilidad.

(Medios para resolver los problemas)

Los presentes inventores han establecido un método para la cuantificación de un título de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina. De acuerdo con el método para la medición de un anticuerpo neutralizante usando un electromiógrafo de la presente invención, se hace reaccionar un anticuerpo neutralizante y una toxina entre ellos y se mide el título del anticuerpo neutralizante en base a un potencial muscular que se disminuye por la cantidad restante de la toxina no neutralizada. El método de la presente invención se refiere de aquí en adelante como "método de neutralización del PAMC". Este método es más sensible que el ELR y puede detectar un anticuerpo neutralizante hasta alrededor de 1 mUI/ml. Mientras que con el ELR, es necesaria la observación durante cuatro días después de la administración, el método de la presente invención permite la cuantificación en un día después de la administración y por tanto los resultados pueden obtenerse rápidamente. Además, el método de la presente invención es simple y altamente reproducible dado que es el mismo que un electromiograma ordinario. Además, el aspecto más ventajoso del método de la presente invención es que ningún animal se mata a diferencia del ELR en el que la medición se basa en la letalidad.

La presente invención incluye lo siguiente de (1) a (4):

(1) Un método para la cuantificación de un título de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina que comprende las siguientes etapas:

(a) mezclar una muestra convencional que contiene una cantidad fija de una neurotoxina y una muestra de ensayo que contiene un anticuerpo neutralizante para dicha neurotoxina;

(b) administrar la mezcla obtenida en la etapa (a) al músculo de un mamífero no humano;

(c) de varias horas a varios días después de la administración, aplicar un estímulo eléctrico al nervio que es dominante en el músculo que recibió la administración;

(d) medir el potencial de acción muscular compuesto (PAMC) debido a la contracción del músculo de dicho mamífero mediante la aplicación de un estímulo eléctrico con un electromiógrafo; y

(e) analizar los datos de la amplitud del PAMC obtenidos en la etapa (d) para un grado de disminución en la amplitud por la neurotoxina no neutralizada, en base a una relación dependiente de la dosis entre el título de un anticuerpo neutralizante y la amplitud del PAMC, para cuantificar de este modo el título del anticuerpo neutralizante contenido en la muestra de ensayo.

(2) El método para la cuantificación de (1) anterior en el que la neurotoxina se selecciona de una neurotoxina producida por una bacteria de Clostridium, una neurotoxina producida por pescado o marisco y una toxina de serpiente.

(3) El método para la cuantificación de (2) anterior en el que la bacteria de Clostridium es Clostridium botulinum.

(4) El método para la cuantificación de (3) anterior en el que dicho Clostridium botulinum se selecciona del tipo A, B, C, D, E, F y G de Clostridium botulinum.

(Efectos más eficaces que en la técnica anterior)

Utilizando el método de la presente invención, se hace posible (1) la cuantificación de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina, (2) la cuantificación de un antisuero para diversos tipos de toxina botulínica, y (3) la medición de un título de un anticuerpo neutralizante en el suero de pacientes que reciben la terapia con una toxina botulínica pero que no muestran una respuesta a la misma.

De acuerdo con la presente invención, no puede hacerse ninguna incisión quirúrgica o sacrificio a un mamífero tal como una rata a la que se administra la toxina botulínica. Sometiendo a mediciones de manera continuada a un solo grupo de mamíferos con un lapso de tiempo, el método de la presente invención permite una evaluación a largo plazo y es un sistema de cuantificación altamente preciso con menos varianza por días cuando se realiza la medición o menos varianza individual. Además, el método de la presente invención requiere un número más pequeño de mamíferos y por tanto es ventajoso desde los puntos de vista de la ética y la protección animal. Además, con una sensibilidad más alta que el ELR convencional, el método de la presente invención hace posible medir un título de un anticuerpo neutralizante en pacientes que no responden a la terapia con una toxina botulínica.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra el lugar de administración de una neurotoxina y los lugares para la medición del PAMC.

La Fig. 2 muestra la comparación entre los títulos de una antitoxina botulínica tipo A convencional y de un antisuero de conejo usando un método de neutralización del PAMC.

La Fig. 3 muestra una línea recta de una respuesta a la dosis de una antitoxina botulínica tipo B convencional mediante un método de neutralización del PAMC.

La Fig. 4 muestra una línea recta de una respuesta a la dosis de una antitoxina botulínica tipo E convencional mediante un método de neutralización del PAMC.

La Fig. 5 muestra una línea recta de una respuesta a la dosis de una antitoxina botulínica tipo F convencional mediante un método de neutralización del PAMC.

La Fig. 6 muestra una línea de calibrado de una respuesta a una dosis de la antitoxina botulínica tipo A convencional mediante un método de neutralización del PAMC.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

5 El método para la medición de manera cuantitativa de un título de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina de acuerdo con la presente invención puede realizarse monitorizando un potencial de acción muscular compuesto del músculo de una pata trasera, preferentemente el músculo gastrocnemio, mediante un estímulo eléctrico usando un electromiógrafo. La presente invención se basa en el descubrimiento de que, teniendo en consideración particular
10 los datos de amplitud entre los parámetros del electromiograma monitorizados con un electromiógrafo, puede cuantificarse con exactitud un título de un anticuerpo neutralizante analizando una disminución en la amplitud por la neurotoxina no neutralizada.

15 En una realización amplia de la presente invención, para la cuantificación de un título de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina, se mezcla una neurotoxina y un anticuerpo neutralizante para la neurotoxina, la mezcla se administra al músculo de un mamífero no humano, y se monitoriza el potencial de acción muscular compuesto en el lugar de administración con un electromiógrafo para la medición de la extensión de la relajación muscular en el mamífero no humano por la neurotoxina no neutralizada. A este respecto, teniendo en consideración particular los datos de amplitud, el análisis de la extensión de la disminución en la amplitud por una neurotoxina no neutralizada
20 permite la cuantificación con una alta precisión de un título de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina.

En una realización, la presente invención proporciona un método para la determinación de un título de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina.

25 La expresión "mamífero no humano" como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, un mono, una rata, un conejo, una cobaya, un hámster, un gato, un ratón y un perro.

Puede seleccionarse una neurotoxina de las derivadas de una bacteria de Clostridium tal como Clostridium baratii, Clostridium butyricum, Clostridium tetani y Clostridium botulinum o una toxina tetánica. Una toxina botulínica puede
30 seleccionarse de los tipos A, B, C, D, E, F y G, y una mezcla de las mismas, y normalmente la toxina botulínica tipo A.

La diferencia entre los potenciales máximos y mínimos obtenidos mediante un estímulo eléctrico aplicado al músculo con un electromiógrafo es la amplitud del PAMC. Esta amplitud del PAMC se disminuye por una neurotoxina de una
35 manera dependiente de la dosis como se describe en el documento WO2007/125604 (PCT/JP2006/309040). Un método de neutralización del PAMC aplica este principio a la medición de un título de un anticuerpo neutralizante. El electromiógrafo puede ser uno disponible en el mercado de Nicolet Biomedical (serie Nicolet Biking Quest) como instrumento médico para la terapia y diagnóstico.

40 De acuerdo con el método de la presente invención, la cantidad restante de una toxina puede variar con una cantidad fija de una toxina y un título variado de un anticuerpo neutralizante en el que cuanto más cantidad restante de una toxina este presente, más se disminuye la amplitud del PAMC, y cuanto más alto es un título de un anticuerpo neutralizante más se neutraliza una toxina para disminuir la cantidad restante de una toxina, dando como resultado un aumento en la amplitud del PAMC. Existe una relación dependiente de la dosis entre el título de un
45 anticuerpo neutralizante y la amplitud del PAMC que puede representarse gráficamente para preparar una línea de calibrado.

Un lugar para la administración y los lugares para la medición en el método de neutralización del PAMC no se limitan particularmente pero, por conveniencia de la medición, son preferentemente las patas, más preferentemente las
50 patas traseras.

El método de neutralización del PAMC puede llevarse a cabo como se resume a continuación. Se aplica una solución de reacción de un anticuerpo neutralizante y una neurotoxina en el músculo. De varias horas a varios días después de la administración, se aplica un estímulo eléctrico al nervio dominante en el músculo que recibió la
55 administración y se registran los potenciales del PAMC para dicho músculo usando un electrodo de registro. Después se calcula la amplitud del PAMC de los potenciales del PAMC obtenidos. Los datos de varios grupos se analizan estadísticamente en cada grupo que se administra con el mismo título de un anticuerpo neutralizante para de este modo obtener una línea de calibrado. Los mismos procedimientos se repiten para una muestra de un título desconocido de un anticuerpo neutralizante y la amplitud obtenida se aplica a un esquema de calibrado para proporcionar un título del anticuerpo neutralizante.
60

La presente invención se explica en más detalle por medio de los siguiente Ejemplos pero sin limitarse a los mismos.

Preparación: Purificación de la neurotoxina botulínica

Los tipos de neurotoxina (NTX) botulínica A, B, E y F se purificaron como se describe en "Sakaguchi, G., Ohishi, I., y Kozaki, S., 1981, BIOCHEMICAL ASPECTS of botulism: Purification and oral toxicities of Clostridium botulinum progenitor toxins, págs. 21-34, Lewis, G. E. (ed.), Academic Press, Nueva York".

La toxina botulínica M se dializó frente a tampón fosfato 10 mM (pH 7,5), se adsorbió a una columna de Sepharose DEAM 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 una proteína no toxina. La neurotoxina (NTX) obtenida se concentró con una membrana YM-10 (Millipore) a 1 mg/ml, se dializó frente a un tampón fosfato 50 mM (pH 7,5) y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Ejemplo comparativo: Cuantificación del anticuerpo neutralizante para la neurotoxina botulínica mediante el método del ELR

La antitoxina botulínica tipo A convencional (proporcionada por el National Institute of Infectious Diseases) se diluyó de manera gradual en tampón fosfato 50 mM (pH 6,0) que contenía gelatina al 0,5 % p/v a 0,078, 0,063, 0,05, 0,04 y 0,032 UI/0,25 ml. Las muestras también se diluyeron de manera gradual para ser de la misma potencia que la antitoxina botulínica tipo A convencional de una potencia estimada. Usando la NTX tipo A preparada en la Preparación como toxina de ensayo, se preparó una solución que contenía 1 dosis de toxina de ensayo (una dosis de una toxina con la que la mitad de los ratones administrados con la toxina tras la reacción con 0,05 UI/0,25 ml mueren) en 0,25 ml. La antitoxina y la toxina de ensayo se mezclaron juntas a una cantidad equivalente para la reacción durante 1 hora. Se administró la mezcla de reacción a los ratones vía intraperitoneal a 0,5 ml por ratón y se observaron los ratones durante 4 días.

El antisuero de conejo obtenido mediante inmunización con la toxina botulínica tipo A se ensayó dos veces por el método del ELR para mostrar un título de 479,6 UI/ml en el primer ensayo y 405,2 UI/ml en el segundo ensayo. Como tal, el método del ELR es un sistema de ensayo con una alta variabilidad.

Ejemplo 1: Cuantificación de un antisuero para la toxina botulínica tipo A mediante el método de neutralización del PAMC

La antitoxina botulínica tipo A convencional y el antisuero de conejo ensayados en el Ejemplo comparativo por el método del ELR se diluyeron a 25, 12,5, 6,3 y 3,1 mUI/ml en suero salino fisiológico que contiene 0,5 % p/v de albumina de suero humano. Usando la NTX tipo A como toxina de ensayo, se estableció una dosis de toxina de ensayo a una dosis con la que la amplitud en el día 1 de administración de una sola toxina se disminuye a 1/3 de esta antes de la administración (10 LD50/ml). La antitoxina botulínica tipo A convencional o el antisuero de conejo se mezclaron con una toxina de ensayo a una cantidad equivalente para la reacción durante 1 hora. Después se administró la mezcla (0,1 ml) vía intramuscular a las ratas en el músculo gastrocnemio izquierdo.

El PAMC se midió anestesiando las ratas y, tras verificar la pérdida del reflejo de cerrar los ojos, colocando los animales boca abajo. La disposición de los electrodos era como sigue: el electrodo estimulante en las bases espinales, el electrodo de registro (+) en el cuerpo del músculo gastrocnemio de la pata trasera, el electrodo de registro (-) en el tendón del músculo gastrocnemio de la pata trasera, y el electrodo de masa en la raíz de la cola. El estímulo eléctrico se aplicó a 25 mA durante 0,2 ms. Se midieron las amplitudes del PAMC después de la administración por duplicado y se usó una media de las amplitudes del PAMC obtenidas para el análisis de los datos. El PAMC se midió antes de la administración y un día después de la administración. La Fig. 1 muestra el lugar de administración y los lugares para la medición del PAMC.

El análisis de regresión se llevó a cabo usando los datos de amplitud para los grupos de la antitoxina convencional y del antisuero de conejo administrados. Las líneas de regresión obtenidas se sometieron a un método de ensayo de líneas paralelas para determinar la cantidad de las antitoxinas. Como resultado, como se muestra en la Fig. 2, ambas líneas exhibieron un paralelismo y linealidad para revelar que son sustancialmente las mismas. Como consecuencia, se demostró que un título obtenido mediante el método de neutralización del PAMC era de conformidad con un título obtenido mediante la neutralización en un ratón del ELR.

Ejemplo 2: Cuantificación de un antisuero para diversos tipos de toxina botulínica mediante el método de neutralización del PAMC

Cada una de las antitoxinas botulínicas tipos B, E y F convencionales (proporcionadas por el National Institute of Infectious Diseases) se diluyeron a 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,1 y 1,5 mUI/ml. Usando los diversos tipos de NTX preparados en la Preparación como toxina de ensayo, se estableció una dosis de toxina de ensayo a una dosis con la que la amplitud en el día 1 de administración de una sola toxina se disminuye a 1/3 de esta antes de la administración (120.000 LD50/ml para el tipo B, 60 LD50/ml para el tipo E y 600 LD50/ml para el tipo F). Cada una de las antitoxinas botulínicas convencionales se mezclaron con una toxina de ensayo a una cantidad equivalente para la reacción durante 1 hora. Después la mezcla (0,1 ml) se administró vía intramuscular a las ratas en el

músculo gastrocnemio izquierdo. Un día después de la administración, se midió el PAMC y se llevó a cabo un análisis de regresión usando los respectivos datos de amplitud. Se obtuvieron las líneas de respuesta a la dosis a 25-200 mUI/ml para el tipo B (Fig. 3), a 1,5-50 mUI/ml para el tipo E (Fig. 4) y a 3,1-50 mUI/ml para el tipo F (Fig. 5).

5 Ejemplo 3: Medición de un título de un anticuerpo neutralizante en suero de pacientes que no responden a la terapia con toxina botulínica mediante el método de neutralización del PAMC

10 La antitoxina botulínica tipo A convencional se diluyó a 25, 12,5, 6,25 y 3,1 mUI/ml. Se usaron los sueros de los pacientes tal como están. Usando la NTX tipo A como toxina de ensayo, se estableció una dosis de toxina de ensayo a 10 LD50/ml. La antitoxina botulínica tipo A convencional se mezcló con una toxina de ensayo a una cantidad equivalente para la reacción durante 1 hora. Después la mezcla (0,1 ml) se administró vía intramuscular a las ratas en el músculo gastrocnemio izquierdo. Un día después de la administración, se midió el PAMC y se llevó a cabo un análisis de regresión usando los datos de amplitud del grupo de la antitoxina botulínica tipo A convencional administrada. La línea de regresión obtenida se usó como línea de calibrado (Fig. 6). Se determinó la cantidad de la antitoxina aplicando los datos de amplitud del grupo del suero de los pacientes a la línea de calibrado. Como resultado, se encontró que el título del suero de los pacientes era de 5,1 mUI/ml (Tabla 1).

Tabla 1

	Título (mUI/ml)	Amplitud del PAMC (mV)
Datos de referencia	25	58,22
	12,5	44,53
	6,25	35,81
	3,13	26,83
Muestra	5,08	30,84

20 **Aplicabilidad industrial**

25 El método para la cuantificación de un título de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina de acuerdo con la presente invención puede utilizarse para (1) la cuantificación de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina, (2) la cuantificación de un antisuero para diversos tipos de toxina botulínica, y (3) la medición de un título de un anticuerpo neutralizante en el suero de pacientes que reciben terapia con una toxina botulínica pero que no muestran una respuesta a la misma. En particular, el método proporciona unos medios para la medición de manera cuantitativa de un título de un anticuerpo neutralizante para una toxina de Clostridium con especificidad y alta sensibilidad.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la cuantificación de un título de un anticuerpo neutralizante para una neurotoxina que comprende las siguientes etapas:
- 5
- (a) mezclar una muestra convencional que contiene una cantidad fija de una neurotoxina y una muestra de ensayo que contiene un anticuerpo neutralizante para dicha neurotoxina;
 - (b) administrar la mezcla obtenida en la etapa (a) en el músculo de un mamífero no humano;
 - (c) de varias horas a varios días después de la administración, aplicar un estímulo eléctrico al nervio que es dominante en el músculo que recibió la administración;
 - (d) medir el potencial de acción muscular compuesto (PAMC) debido a la contracción del músculo de dicho mamífero mediante la aplicación de un estímulo eléctrico con un electromiógrafo; y
 - (e) analizar los datos de la amplitud del PAMC obtenidos en la etapa (d) para un grado de disminución en la amplitud por la neurotoxina no neutralizada, en base a una relación dependiente de la dosis entre un título de un anticuerpo neutralizante y la amplitud del PAMC, para de ese modo cuantificar un título del anticuerpo neutralizante contenido en la muestra de ensayo.
- 10
- 15
2. El método para la cuantificación de la reivindicación 1 en el que la neurotoxina se selecciona de una neurotoxina producida por una bacteria de Clostridium, una neurotoxina producida por pescado o marisco y una toxina de serpiente.
- 20
3. El método para la cuantificación de la reivindicación 2 en el que la bacteria de Clostridium es Clostridium botulinum.
- 25
4. El método para la cuantificación de la reivindicación 3 en el que dicho Clostridium botulinum se selecciona del tipo A, B, C, D, E, F y G de Clostridium botulinum.

Fig. 1

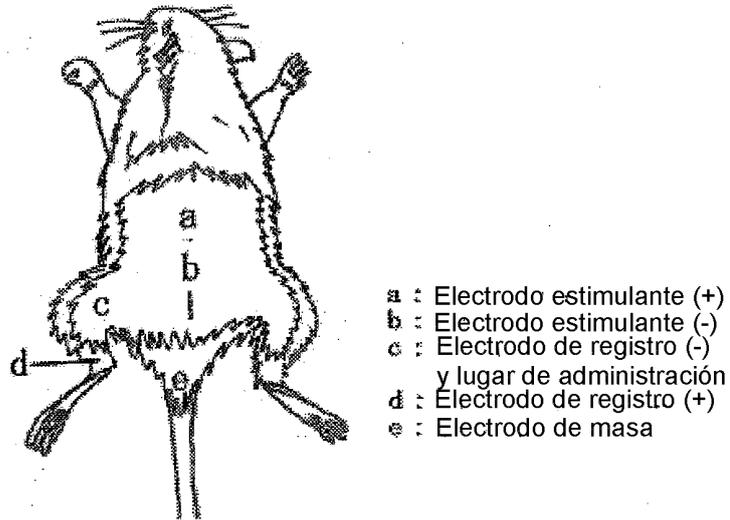


Fig. 2

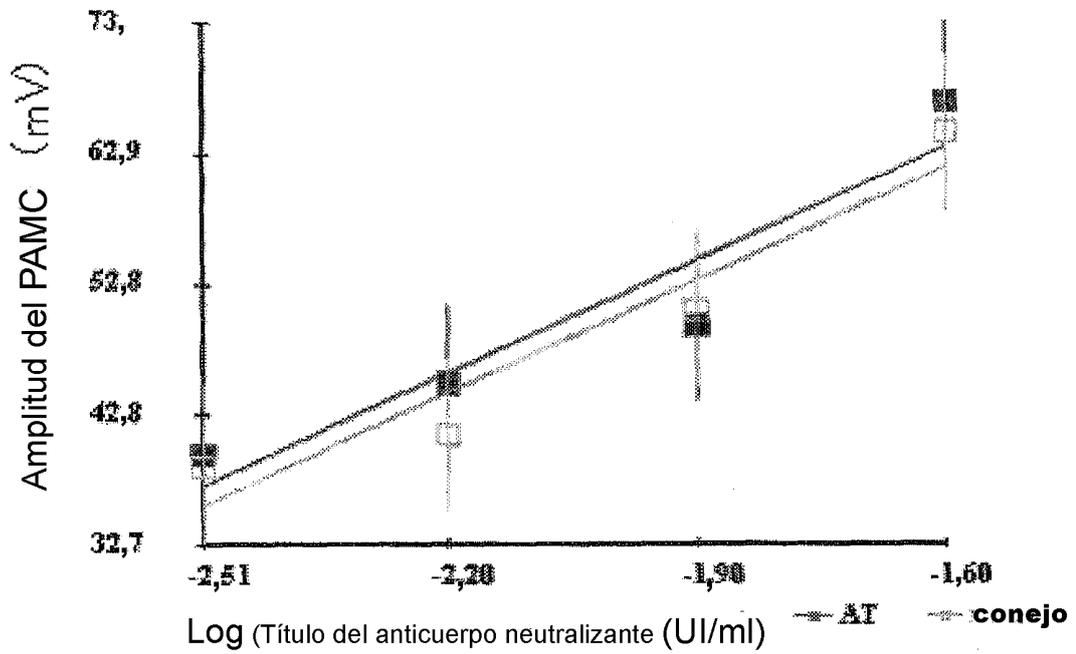


Fig. 3

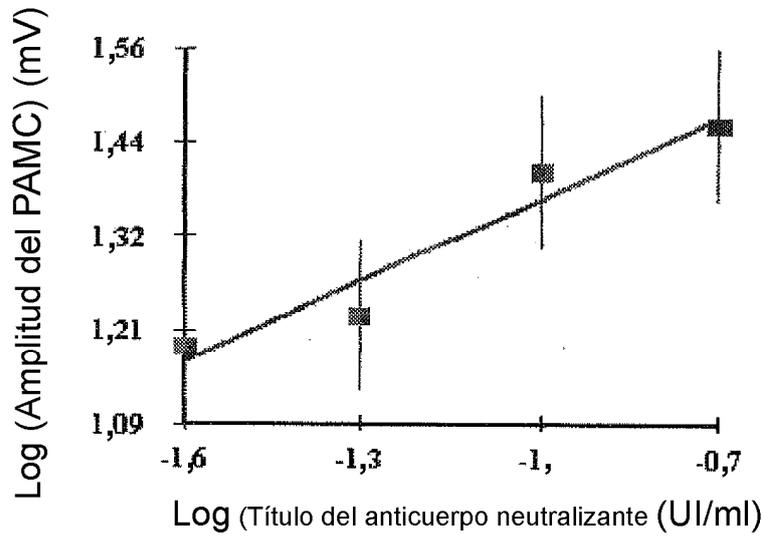


Fig. 4

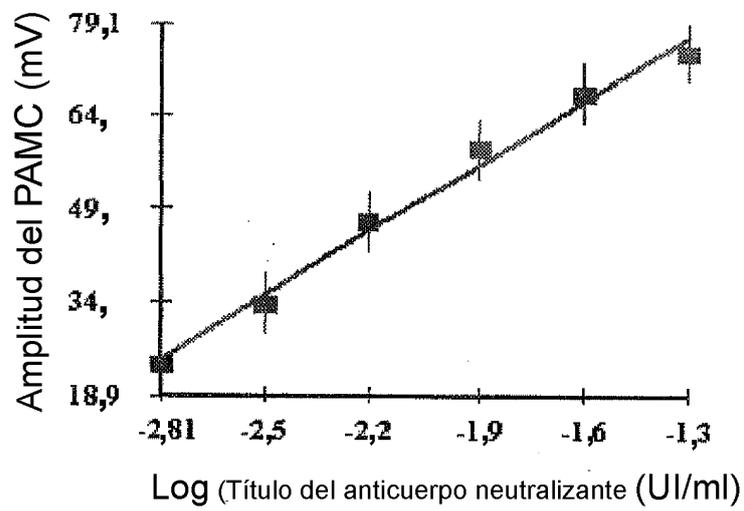


Fig. 5

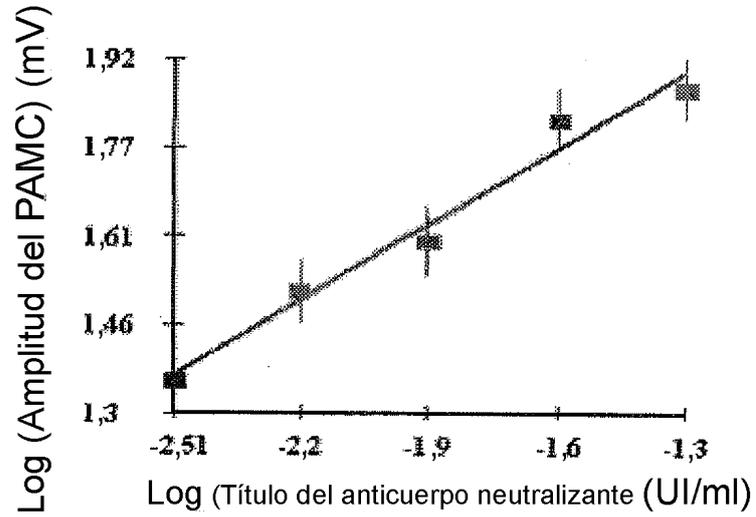


Fig. 6

