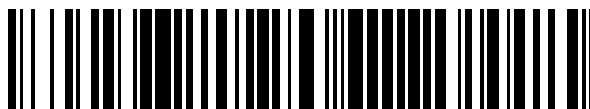


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 627**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48	(2006.01) A61P 17/00	(2006.01)
A61K 8/99	(2007.01) A61P 21/00	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01) A61P 25/14	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01) A61P 27/00	(2006.01)
A61Q 7/00	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
A61Q 19/08	(2006.01) A61P 37/00	(2006.01)
A61P 1/00	(2006.01)	
A61P 5/00	(2006.01)	
A61P 11/00	(2006.01)	
A61P 13/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2005** **E 14180875 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** **EP 2813239**

54 Título: **Composición farmacéutica que contiene neurotoxina botulínica A2**

30 Prioridad:

04.08.2004 GB 0417367
24.09.2004 GB 0421290
24.09.2004 GB 0421288
28.10.2004 GB 0423952
28.10.2004 GB 0423953

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.07.2017

73 Titular/es:

IPSEN BIOPHARM LIMITED (100.0%)
Ash Road Wrexham Industrial Estate
Clwyd LL13 9UF, GB

72 Inventor/es:

PANJWANI, NAVEED;
WEBB, PAUL y
PICKETT, ANDREW

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 627 627 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que contiene neurotoxina botulínica A2

La invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene neurotoxina botulínica.

La neurotoxina botulínica más utilizada actualmente es la neurotoxina botulínica tipo A. Esta neurotoxina se produce durante la fermentación en presencia de cepas de *Clostridium botulinum*. Los complejos de neurotoxina botulínica tipo A (que incluyen neurotoxina botulínica tipo A y al menos otra proteína no tóxica) son principios activos ampliamente utilizados en la medicina moderna. Un ejemplo de una composición farmacéutica basada en un complejo de ese tipo es el producto Dysport® actualmente comercializado por la compañía de los solicitantes. Entre las indicaciones médicas más comunes para las que se podría usar un complejo de neurotoxina botulínica tipo A, se puede mencionar el tratamiento de una serie de trastornos musculares (p. ej. blefarospasmo, espasmo hemifacial, tortícolis, espasticidad, cefalea por tensión, dolor de espalda o arrugas), así como otros trastornos tales como la migraña. Alternativamente, la toxina botulínica de alta pureza (esto es, neurotoxina botulínica exenta de sus proteínas complejantes no tóxicas) puede reemplazar al correspondiente complejo de toxina botulínica como se describe en las solicitudes PCT WO 96/11699 o WO 97/35604.

Actualmente, las composiciones de neurotoxina botulínica comercializadas contienen seroalbúmina humana. Sin embargo, se han expresado algunas reservas acerca de la albúmina (véase p. ej. la solicitud PCT WO 01/58472). Por esta razón, la industria farmacéutica está considerando ahora encontrar agentes estabilizantes alternativos a la albúmina mediante otros agentes estabilizantes en las composiciones farmacéuticas.

Una posible solución está descrita en la solicitud de patente PCT WO 01/58472. En este documento, la albúmina es reemplazada por un polisacárido, esto es, un polímero de más de dos monómeros de moléculas de sacáridos, que desempeña el papel de estabilizador en la composición de neurotoxina botulínica.

Una solución alternativa es la descrita en la solicitud de patente PCT WO 97/35604 o en las patentes de Estados Unidos números 5.512.547 y 5.756.468. En estos documentos, se describe que la neurotoxina botulínica pura (esto es, neurotoxina botulínica exenta de sus proteínas complejantes no tóxicas) se puede estabilizar por trehalosa.

El solicitante ha descubierto inesperadamente que un tensioactivo tiene suficientes efectos estabilizantes para reemplazar a la albúmina, al polisacárido de la solicitud de patente PCT WO 01/58472 o a la trehalosa de la solicitud de patente PCT WO 97/35604 en las composiciones de neurotoxina botulínica.

La invención por lo tanto se refiere al uso de un tensioactivo para estabilizar una composición farmacéutica sólida o líquida que contiene como principio activo una toxina botulínica.

Por toxina botulínica se debe entender una toxina botulínica natural o cualquier toxina botulínica producida por técnicas recombinantes.

Por toxina botulínica natural se debe entender o bien una neurotoxina botulínica de alta pureza derivada de *Clostridium* spp o bien un complejo de neurotoxina botulínica derivada de *Clostridium* spp.

Por neurotoxina botulínica de alta pureza, en la presente solicitud, se quiere decir una neurotoxina botulínica libre de los complejos que incluyen al menos otra proteína. En otras palabras, una neurotoxina botulínica de alta pureza no contiene cantidades significativas de ninguna otra proteína derivada de *Clostridium* spp aparte de la neurotoxina botulínica.

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

La toxina botulínica clásica de tipo A (esto es, el principio activo de los productos comercializados Dysport y Botox) es denominada cada vez más por los expertos en la técnica como toxina botulínica tipo A1. Esto es para distinguirla de la toxina botulínica tipo A2 aislada originalmente de los casos de botulismo en niños en 1990, que es una toxina botulínica inmunológicamente y bioquímicamente distinta. En la presente solicitud de patente, se utilizará por lo tanto esta nomenclatura.

Los organismos *Clostridium botulinum* que producen la toxina tipo A2 fueron identificados por primera vez en 1990 en Japón, a partir de múltiples casos de botulismo infantil (Sakaguchi et al., Int. J. Food Microbiol. (1990), 11, 231-242). El botulismo infantil, o botulismo de colonización intestinal es diferente del botulismo provocado por alimentos en que la toxina se produce después de la infección del paciente, en lugar de pre-formarse en el alimento. Las cepas de aislados clínicos más estrechamente asociadas con la toxina tipo A2 son Kyoto-F, Chiba-H, Y-8036, 7103-H, 7105-H y KZ1828, aunque algunas otras han sido caracterizadas como tipo A2 por métodos moleculares (Cordoba et al., System. Appl. Microbiol. (1995), 18, 13-22; Franciosa et al, resumen presentado en el 40th Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC) Meeting, November 2003).

La toxina botulínica tipo A2 es una neurotoxina única que se ha demostrado que es un tipo de toxina distinto cuando se compara con otras toxinas botulínicas tipos A - G. La toxina botulínica tipo A2 se diferencia de la toxina tipo A1 en

sus características genéticas moleculares, en sus características bioquímicas y en sus características inmunológicas.

A nivel genético molecular, la organización del conjunto de genes de neurotoxina tipo A2 es distinta de todos los otros tipos de toxina botulínica. Muchos tipos de toxina botulínica, incluyendo las toxinas botulínicas tipo A, se encuentran como complejos de neurotoxina con proteínas hemagglutininas (HA) como componentes del complejo. Los genes que codifican estas proteínas HA (HA17, HA34 y HA70) están contenidos en el conjunto de genes de neurotoxinas de organismos tipo A, B, C, D y G, pero están totalmente ausentes en el conjunto de genes de neurotoxina tipo A2. El conjunto de genes de neurotoxina tipo A2 contiene también genes reguladores tales como p47, que están ausentes en los conjuntos de genes de neurotoxina tipo A1. Adicionalmente, la secuencia de la proteína NTN_H del complejo de toxina tipo A2 se ha demostrado que es un mosaico de secuencias de genes NTN_H tipo C y tipo A1 (Kubota et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996), 224(3), 843-848).

La toxina tipo A2 y la toxina tipo A1 también difieren marcadamente en las características bioquímicas del complejo de toxina purificada. Mientras que el complejo de toxina tipo A1 contiene la proteína NTN_H, y al menos tres proteínas HA (HA17, HA34 y HA70), el complejo de toxina tipo A2 solamente contiene una proteína NTN_H y carece de las proteínas HA (Sakaguchi et al., *Int. J. Food Microbiol.* (1990), 11, 231-242). La propia molécula de neurotoxina difiere en peso molecular, siendo la cadena pesada de 101 kDa en la toxina tipo A2 y de 93 kDa en la toxina tipo A1, y presenta diferente sensibilidad para las proteasas (Kozaki et al., *Microbiol. Immunol.* (1995), 39(10), 767-74). La secuencia de aminoácidos de las toxinas tipo A2 y tipo A1 son notablemente diferentes, particularmente en la región de la cadena pesada, donde 109 de los 847 aminoácidos son diferentes entre los dos tipos de toxinas (13 % de diferencia) (Cordoba et al., *System. Appl. Microbiol.* (1995), 18, 13-22). Las secuencias de cadena pesada de aislados de toxinas tipo A1, por contraste, difieren típicamente en menos de un 2 %. Las cadenas pesadas de las neurotoxinas botulínicas son responsables de funciones biológicas clave de la molécula, incluyendo la unión del receptor a las células diana y el tráfico intracelular (Zhang et al., *Gene* (2003), 315, 21-32). En efecto, los estudios de unión de las neurotoxinas A2 y A1 han demostrado diferentes características de unión de las dos toxinas a sinaptosomas purificadas (Kozaki et al., *Microbiol. Immunol.* (1995), 39(10), 767-74).

La toxina botulínica tipo A2 es también inmunológicamente distinta. Se ha demostrado que los anticuerpos creados contra la toxina tipo A no reconocen la toxina botulínica tipo A2 (y viceversa) en experimentos de inmunodifusión, ELISA y transferencias Western (Sakaguchi et al., *Int. J. Food Microbiol.* (1990), 11, 231-242; Kozaki et al., *Microbiol. Immunol.* (1995), 39(10), 767-74). Muy significativamente, sin embargo, los anticuerpos contra las toxinas tipo A1, aunque son capaces de neutralizar la toxicidad de la toxina tipo A1 en ratones, no pueden neutralizar las toxinas tipo A2 en experimentos paralelos de toxicidad en ratones (Kozaki et al., *Microbiol. Immunol.* (1995), 39(10), 767-74).

En resumen, se puede ver a partir de los conocimientos actuales que la toxina botulínica tipo A2 es bioquímicamente e inmunológicamente diferente de otros tipos de toxinas botulínicas, y particularmente de la toxina botulínica tipo A1.

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

La presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica de toxina botulínica tipo A2 como se señala en las reivindicaciones.

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

(a) una toxina botulínica tipo A2, y

(b) un tensioactivo.

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

(a) una toxina botulínica tipo A2,

(b) un tensioactivo, y

(c) agua.

En las composiciones farmacéuticas mencionadas antes, el tensioactivo será de tal modo que estabilice la toxina botulínica.

Una composición farmacéutica sólida según la invención se puede obtener por ejemplo liofilizando una solución en agua estéril que contiene los componentes (a) y (b) como se ha mencionado previamente. Una composición farmacéutica líquida según la invención se obtendrá mezclando la mezcla sólida (p. ej. liofilizada) de los componentes (a) y (b) con agua estéril.

Según la invención, las concentraciones de dichos componentes (a) y (b) en la solución a liofilizar / la composición farmacéutica líquida será preferiblemente como sigue:

- la solución contendrá de 50 a 3.000 unidades de LD50 de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o neurotoxina botulínica de alta pureza tipo A2 por ml de solución, más preferiblemente de 100 a 2.500 unidades de LD50 de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o neurotoxina botulínica de alta pureza tipo A2 por ml of solución y lo más preferiblemente de 100 a 2.000 unidades de LD50 de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o neurotoxina botulínica de alta pureza tipo A2 por ml de solución;

- la concentración de tensioactivo variará desde por encima de la concentración micelar crítica hasta una concentración de 1 % v/v, y especialmente desde aproximadamente 0,005 % hasta 0,02 % v/v en el caso de polisorbato 80.

Preferiblemente, el tensioactivo será un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos incluyen en particular polisorbatos y copolímeros en bloque como los poloxámeros (es decir, los copolímeros de polietileno y propilenglicol). Según una variante preferida de la invención, el tensioactivo será un polisorbato. Más preferiblemente, un polisorbato incluido en una composición según la presente invención tendrá un grado medio de polimerización de 20 a 100 unidades monómeras (preferiblemente alrededor de 80), y puede ser, por ejemplo, polisorbato 80. Preferiblemente también, el polisorbato debería ser de origen vegetal.

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

Por agente cristalino se entiende un agente que, entre otras cosas, podría mantener una estructura mecánicamente fuerte de la torta para el complejo de neurotoxina botulínica liofilizada o neurotoxina botulínica de alta pureza. Cuando se incluyen en formulaciones sólidas, los agentes cristalinos tienen también un efecto de aumento de volumen. Los agentes cristalinos incluyen en particular cloruro de sodio. Contrariamente a lo enseñado en la técnica anterior (véase p. ej. Goodnough, M.C. and Johnson, E. A., Applied and Environmental Microbiology (1992), 58(10), 3426- 3428), el uso de cloruro de sodio para este tipo de composiciones aumenta además la estabilidad de la composición de toxina botulínica.

Según otro modo más de realización preferida de la invención, la composición farmacéutica sólida o líquida contendrá también un tampón para mantener el pH de 5,5 a 7,5.

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

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

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

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

- (a) complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o neurotoxina botulínica de alta pureza tipo A2,
- (b) un tensioactivo,
- (c) un agente cristalino,
- (d) un tampón para mantener el pH entre 5,5 a 7,5.

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

Según esta variante de la invención, se puede obtener una composición farmacéutica sólida liofilizando una solución en agua estéril que contiene los componentes (a) a (d) como se ha mencionado previamente. Se obtendrá una composición farmacéutica líquida según la invención mezclando una mezcla sólida (p. ej. liofilizada) de dichos componentes (a) a (d) con agua estéril.

5 Según la invención, las concentraciones de dichos componentes (a) a (d) en la solución a liofilizar/ la composición farmacéutica líquida, será preferiblemente como sigue:

10 • la solución contendrá de 50 a 3.000 unidades de LD50 de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o neurotoxina botulínica de alta pureza tipo A2 por ml de solución, más preferiblemente de 100 a 2.500 unidades de LD50 de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o neurotoxina botulínica de alta pureza tipo A2 por ml de solución y lo más preferiblemente de 100 a 2.000 unidades de LD50 de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o neurotoxina botulínica de alta pureza tipo A2 por ml de solución;

• la concentración de tensioactivo variará desde por encima de la concentración micelar crítica hasta una concentración de 1 % v/v, y especialmente desde aproximadamente 0,005 % hasta 0,02 % v/v en el caso de polisorbato 80.

15 • la concentración de agente cristalino será de 0,1 a 0,5 M, más preferiblemente de 0,1 a 0,4 M, en particular aproximadamente 0,15 a 0,3 M; y

• la concentración de tampón será de 1 a 50 mM, más preferiblemente de 5 a 20 mM, en particular aproximadamente 10 mM.

20 Como se ha mencionado antes, la formulación farmacéutica sólida o líquida según la invención puede contener un disacárido. En ese caso, la concentración de disacárido en la solución a liofilizar/ la composición farmacéutica líquida, será por ejemplo de 5 a 50 mM, preferiblemente de 5 a 25 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, y en particular aproximadamente 11,7 mM.

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

30 Una composición según la invención se considera estable durante un cierto período de tiempo si al menos 70 % de la toxicidad inicial, evaluada determinando la LD50 en ratones o por cualquier método validado con respecto al ensayo de la LD50 en ratón (esto es, un método que permita la conversión de sus resultados en unidades de LD50), se mantiene durante dicho período de tiempo (véase la parte titulada "ensayo de toxicidad en ratón" en el ensayo de LD50 en ratón).

35 Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden usar para preparar medicamentos destinados a tratar una enfermedad / una afección / un síndrome seleccionado de los siguientes:

40 ❖ trastornos oftalmológicos seleccionados del grupo que consiste en blefarospasmo, estrabismo (incluyendo estrabismo restrictivo o miógeno), ambliopía, oscilopsia, ptosis protectora, ptosis terapéutica para protección córnea, nistagmo, esotropía, diplopía, entropión, retracción de párpados, miopatía orbital, heteroforia, desalineación concomitante, desalineación no concomitante, esotropía o exotropía primaria o secundaria, oftalmoplegia internuclear, desviación oblicua, síndrome de Duane y retracción superior del párpado;

45 ❖ trastornos del movimiento que incluyen espasmo hemifacial, tortícolis, espasticidad del niño o del adulto (p. ej. en pacientes con parálisis cerebral, post-ictus, esclerosis múltiple, lesión traumática cerebral o lesión de la médula espinal), distonías focales idiopáticas, rigidez muscular, calambre del escritor, distonía de la mano, parálisis del nervio VI, distonía oromandibular, temblor de la cabeza, discinesia tardía, distonía tardía, calambres ocupacionales (incluyendo el calambre del músico), parálisis del nervio facial, espasmo de cierre mandibular, espasmo facial, sincinesia, temblor, temblor primario de la escritura, mioclonía, síndrome de persona rígida, distonía del pie, parálisis facial, síndrome de dolor en brazos y movimiento de dedos, trastornos con tics, tics distónicos, síndrome de Tourette, neuromiotonía, barbilla temblante, parálisis lateral del recto, inversión del pie distónico, distonía mandibular, síndrome del conejo, temblor cerebelar, parálisis del nervio III, mioclonía palatina, acastasia, calambres musculares, parálisis del nervio IV, congelación de la marcha, distonía troncal del extensor, sincinesia por parálisis del nervio post-facial, distonía secundaria, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, epilepsia, distonía fuera de período, tétano cefálico, miocimia y síndrome de calambres- fasciculaciones benigno;

50 ❖ trastornos otorrinolaringológicos, que incluyen disfonía espasmódica, hipersalivación, sialorrea, trastornos óticos, deterioro auditivo, clic del oído, acúfenos, vértigo, enfermedad de Meniere, disfunción del nervio coclear, tartamudez, disfagia cricofaríngea, bruxismo, cierre de la laringe en la aspiración crónica, granuloma de las cuerdas

vocales, distonía ventricular, disfonía ventricular, disfonía mutacional, trismo, ronquidos, temblor de voz, aspiración, distonía de protrusión de la lengua, temblor palatino, mordida profunda del labio y distonía laríngea;

- ❖ trastornos gastrointestinales que incluyen acalasia, fisura anal, estreñimiento, disfunción de la articulación temperomandibular, disfunción del esfínter de Oddi, hipertensión sostenida del esfínter de Oddi, trastornos del músculo intestinal, síndrome puborectal, anismo, espasmo del píloro, disfunción de la vesícula biliar, disfunción de la motilidad gastrointestinal o esofágica, espasmo esofágico difuso, diverticulosis esofágica y gastroparesia;
 - ❖ trastornos urogenitales que incluyen disinergia detrusor-esfínter, hiperreflexia del detrusor, disfunción de la vejiga neurogénica (p. ej. en pacientes con enfermedad de Parkinson, lesiones de la médula espinal, ictus o esclerosis múltiple), espasmos de la vejiga, incontinencia urinaria, retención urinaria, cuello de la vejiga hipertrofiado, disfunción miccional, cistitis intersticial, vaginismo, endometriosis, dolor pélvico, agrandamiento de la glándula prostática (hiperplasia prostática benigna), prostatodinia, cáncer de próstata y priapismo;
 - ❖ trastornos dermatológicos que incluyen hiperhidrosis (incluyendo hiperhidrosis axilar, hiperhidrosis palmar y síndrome de Frey), bromhidrosis, trastornos proliferativos de células cutáneas (incluyendo psoriasis), heridas en la piel y acné;
 - ❖ trastornos de dolor, incluyendo dolor de espalda (dorsalgia superior, lumbalgia), dolor miofascial, cefalea tensional, fibromialgia, síndromes dolorosos, mialgia, migraña, latigazo cervical, dolor en las articulaciones, dolor postoperatorio, dolor no asociado con un espasmo muscular y dolor asociado con trastornos del músculo liso;
 - ❖ trastornos inflamatorios que incluyen pancreatitis, trastornos inflamatorios neurogénicos (incluyendo gota, tendinitis, bursitis, dermatomiositis y espondilitis anquilosante);
 - ❖ trastornos secretores tales como secreciones excesivas de glándulas, hipersecreción de moco e hipersecreción lagrimal, disfunción de la glándula holocrina;
 - ❖ trastornos respiratorios que incluyen rinitis (incluyendo rinitis alérgica), EPOC, asma y tuberculosis;
 - ❖ trastornos hipertróficos que incluyen la elongación muscular, hipertrofia maseterina, acromegalia e hipertrofia neurogénica del tibial anterior con mialgia;
 - ❖ trastornos articulares incluyendo el codo de tenista (o epicondilitis del codo), inflamación de las articulaciones, coxartrosis, osteoartritis de la cadera, patología de la cápsula del músculo rotador del hombro, artritis reumatoide y el síndrome del túnel carpiano;
 - ❖ trastornos endocrinos como la diabetes de tipo 2, hiperglucagonismo, hiperinsulinismo, hipoinsulinismo, hipercalcemia, hipocalcemia, trastornos del tiroides (incluyendo la enfermedad de Grave, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, hipertiroidismo e hipotiroidismo), trastornos del paratiroides (incluyendo el hiperparatiroidismo e hipoparatiroidismo), el síndrome de Cushing y la obesidad;
 - ❖ enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico;
 - ❖ enfermedades proliferativas incluyendo tumores de paraganglioma, cáncer de próstata y tumores de huesos;
 - ❖ lesiones traumáticas, incluyendo lesiones deportivas, lesiones musculares, heridas de los tendones y fracturas de huesos; y
 - ❖ trastornos veterinarios (p. ej. la inmovilización de mamíferos, cólico equino, acalasia animal o espasmos musculares de los animales)
- Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden utilizar también para tratamientos cosméticos, incluyendo tratamientos cosméticos de los siguientes trastornos cosméticos:
- ❖ defectos de la piel;
 - ❖ asimetría facial;
 - ❖ arrugas incluyendo líneas de expresión del entrecejo y arrugas faciales;
 - ❖ boca hacia abajo;
 - ❖ pérdida de cabello; y
 - ❖ olores corporales.

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

- ❖ trastornos oftalmológicos seleccionados del grupo que consiste en blefaroespasmó, estrabismo (incluyendo estrabismo restrictivo o miogénico), ambliopía, ptosis protectora, ptosis terapéutica para la protección de la córnea y retracción superior del párpado;
- 5 ❖ trastornos del movimiento seleccionados del grupo que consiste en espasmo hemifacial, torticólis, espasticidad del niño con parálisis cerebral, espasticidad del adulto en pacientes después de ictus, esclerósis múltiple, lesión traumática cerebral o lesión de la médula espinal, distonías focales idiopáticas, rigidez muscular, calambre del escritor, distonía de la mano, parálisis del nervio VI, distonía oromandibular, temblor de la cabeza, discinesia tardía, distonía tardía, calambres ocupacionales (incluyendo el calambre del músico), parálisis del nervio facial, espasmo de cierre mandibular, espasmo facial, sincinesia, temblor, temblor primario de la escritura, mioclonía,
- 10 síndrome de persona rígida, distonía del pié, parálisis facial, síndrome de dolor en brazos y movimiento de dedos, trastornos con tics, tics distónicos, síndrome de Tourette, neuromiotonía, barbilla temblante, parálisis lateral del recto, inversión del pié distónico, distonía mandibular, síndrome del conejo, temblor cerebelar, parálisis del nervio III, mioclonía palatina, acastésia, calambres musculares, parálisis del nervio IV, congelación de la marcha, distonía troncal del extensor, sincinesia por parálisis del nervio post-facial, distonía secundaria, distonía fuera de período,
- 15 tétano cefálico, miocimía y síndrome de calambre- fasciculaciones benigno;
- ❖ trastornos otorrinolaringológicos, seleccionados del grupo que consiste en disfonía espasmódica, hipersalivación, sialorrea, clic del oído, acúfenos, vértigo, enfermedad de Meniere, disfunción del nervio coclear, tartamudez, disfagia cricofaríngea, bruxismo, cierre de la laringe en la aspiración crónica, granuloma de las cuerdas vocales, distonía ventricular, disfonía ventricular, disfonía mutacional, trismo, ronquidos, temblor de voz, aspiración,
- 20 distonía de protrusión de la lengua, temblor palatino y distonía laríngea;
- ❖ trastornos gastrointestinales seleccionados del grupo que consiste en acalasia, fisura anal, estreñimiento, disfunción de la articulación temperomandibular, disfunción del esfínter de Oddi, hipertensión sostenida del esfínter de Oddi, trastornos del músculo intestinal, síndrome puborectal, anismo, espasmo del píloro, disfunción de la vesícula biliar, disfunción de la motilidad gastrointestinal o esofágica, espasmo esofágico difuso, diverticulosis esofágica y gastroparesia;
- 25 ❖ trastornos urogenitales seleccionados del grupo que consiste en disinergia detrusor-esfínter, hiperreflexia del detrusor, disfunción de la vejiga neurogénica en la enfermedad de Parkinson, lesión de la médula espinal, pacientes de ictus o pacientes con esclerósis múltiple, espasmos de la vejiga, incontinencia urinaria, retención urinaria, cuello de la vejiga hipertrofiado, disfunción miccional, cistitis intersticial, vaginismo, endometriosis, dolor pélvico, agrandamiento de la glándula prostática (hiperplasia prostática benigna), prostatodinia, cáncer de próstata y priapismo;
- 30 ❖ trastornos dermatológicos seleccionados del grupo que consiste en hiperhidrosis axilar, hiperhidrosis palmar, síndrome de Frey, bromhidrosis, psoriasis, heridas en la piel y acné;
- ❖ trastornos de dolor seleccionados del grupo que consiste en dorsalgia superior, lumbalgia, dolor miofascial, cefalea tensional, fibromialgia, mialgia, migraña, latigazo cervical, dolor en las articulaciones, dolor postoperatorio y el dolor asociado con trastornos del músculo liso;
- 35 ❖ trastornos inflamatorios seleccionados del grupo que consiste en pancreatitis, gota, tendinitis, bursitis, dermatomiositis y espondilitis anquilosante;
- ❖ trastornos secretorios seleccionados del grupo que consiste en secreciones glandulares excesivas, hipersecreción de moco e hipersecreción lagrimal y disfunción de la glándula holocrina;
- 40 ❖ trastornos respiratorios seleccionados del grupo que consiste en rinitis no alérgica, rinitis alérgica, EPOC y asma;
- ❖ trastornos hipertróficos seleccionados del grupo que consiste en aumento del músculo, hipertrofia maseterina, acromegalia e hipertrofia neurogénica del tibial anterior con mialgia;
- 45 ❖ trastornos articulares seleccionados del grupo que consiste en el codo de tenista (o epicondilitis del codo), inflamación de las articulaciones, coxartrosis, osteoartritis de cadera, patología de la cápsula del músculo rotador del hombro, artritis reumatoide y síndrome del túnel carpiano;
- ❖ trastornos endocrinos seleccionados del grupo que consiste en diabetes de tipo 2, hipercalcemia, hipocalcemia, alteraciones del tiroides, síndrome de Cushing y obesidad;
- 50 ❖ cáncer de próstata; y
- ❖ lesiones traumáticas seleccionadas del grupo que consiste en lesiones deportivas, lesiones musculares, heridas de tendones y fracturas óseas;

o para la realización de tratamientos cosméticos en donde el trastorno cosmético a tratar se selecciona del grupo que consiste en:

- ❖ defectos de la piel;
- ❖ asimetría facial;
- ❖ arrugas seleccionadas de las líneas de expresión del entrecejo y arrugas faciales;
- ❖ boca hacia abajo; y

5 ❖ pérdida de cabello;

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

- ❖ trastornos oftalmológicos seleccionados del grupo que consiste en blefaroespasmos y estrabismo;
 - 10 ❖ trastornos del movimiento seleccionados del grupo que consiste en espasmo hemifacial, tortícolis, espasticidad del niño con parálisis cerebral y espasticidad del brazo o pierna del adulto en pacientes después de un ictus, esclerosis múltiple, lesión cerebral traumática o lesión de la médula ósea;
 - 15 ❖ trastornos otorrinolaringológicos seleccionados del grupo que consiste en disfonía espasmódica, hipersalivación, sialorrea, disfagia cricofaríngea, bruxismo, cierre de la laringe en la aspiración crónica, distonía ventricular, disfonía ventricular, disfonía mutacional, trismo, ronquidos, temblor de voz, distonía de protrusión de la lengua, temblor palatino y distonía de la laringe;
 - 20 ❖ trastornos gastrointestinales seleccionados del grupo que consiste en acalasia, fisura anal, estreñimiento, disfunción de la articulación temporomandibular, disfunción del esfínter de Oddi, hipertensión sostenida del esfínter de Oddi, trastornos del músculo intestinal, anismo, espasmo del píloro, disfunción de la vesícula biliar, disfunción de la motilidad gastrointestinal o esofágica y gastroparesia;
 - 25 ❖ trastornos urogenitales seleccionados del grupo que consiste en disinergia detrusor-esfínter, hiperreflexia del detrusor, disfunción de la vejiga neurogénica en la enfermedad de Parkinson, lesión de la médula espinal, pacientes de ictus o con esclerosis múltiple, espasmos de la vejiga, incontinencia urinaria, retención urinaria, cuello de la vejiga hipertrofiado, disfunción miccional, cistitis intersticial, vaginismo, endometriosis, dolor pélvico, agrandamiento de la glándula prostática (hiperplasia prostática benigna), prostatodinia, cáncer de próstata y priapismo;
 - ❖ trastornos dermatológicos seleccionados del grupo que consiste en hiperhidrosis axilar, hiperhidrosis palmar, síndrome de Frey, bromhidrosis, psoriasis, heridas en la piel y acné;
 - 30 ❖ trastornos de dolor seleccionados del grupo que consiste en dorsalgia superior, lumbalgia, dolor miofascial, cefalea tensional, fibromialgia, mialgia, migraña, latigazo cervical, dolor en las articulaciones, dolor postoperatorio y el dolor asociado con trastornos del músculo liso;
 - ❖ trastornos inflamatorios seleccionados del grupo que consiste en pancreatitis y gota;
 - ❖ hipersecreción lagrimal;
 - ❖ trastornos respiratorios seleccionados del grupo que consiste en rinitis no alérgica, rinitis alérgica, EPOC y asma;
 - 35 ❖ hipertrofia maseterina;
 - ❖ trastornos articulares seleccionados del grupo que consiste en el codo de tenista (o epicondilitis del codo), inflamación de las articulaciones, coxartrosis, osteoartritis de cadera, patología de la cápsula del músculo rotador del hombro, artritis reumatoide y síndrome del túnel carpiano;
 - ❖ obesidad;
 - 40 ❖ lesiones traumáticas seleccionadas del grupo que consiste en lesiones musculares, heridas de tendones y fracturas óseas;
- o para la realización de tratamientos cosméticos en donde el trastorno cosmético a tratar se selecciona del grupo que consiste en:
- ❖ defectos de la piel;
 - 45 ❖ asimetría facial;
 - ❖ arrugas seleccionadas de las líneas de expresión del entrecejo y las arrugas faciales;

- ❖ boca hacia abajo; y
- ❖ pérdida de cabello;

En una forma particularmente preferida se utilizarán composiciones farmacéuticas según la invención para preparar medicamentos destinados al tratamiento de una enfermedad / una afección / un síndrome elegido entre los siguientes: blefaroespasmio, espasmo hemifacial, tortícolis, espasticidad del niño con parálisis cerebral y espasticidad del brazo o la pierna del adulto en pacientes después de un ictus, esclerosis múltiple, lesión cerebral traumática o lesión de la médula espinal, hiperhidrosis axilar, hiperhidrosis palmar, síndrome de Frey, heridas de la piel, acné, dorsalgia superior, lumbalgia, dolor miofascial, migraña, cefalea tensional, dolor en las articulaciones, codo del tenista (o epicondilitis del codo), inflamación de las articulaciones, coxartrosis, osteoartritis de cadera, patología de la cápsula del músculo rotador del hombro, lesiones musculares, heridas de tendones y fracturas óseas; o para la realización de tratamientos cosméticos en donde el trastorno cosmético a tratar se selecciona del grupo que consiste en:

- ❖ defectos de la piel;
- ❖ asimetría facial; y
- ❖ arrugas seleccionadas de las líneas de expresión del entrecejo y las arrugas faciales;

La dosis de complejo de neurotoxina botulínica tipo A2 o neurotoxina botulínica de alta pureza tipo A2 que se necesitará para el tratamiento de las enfermedades / condiciones mencionadas antes varía dependiendo de la enfermedad / afección a tratar, del modo de administración, de la edad y peso corporal del paciente a tratar y del estado de salud de este último, y es el médico o el veterinario responsable de la atención quien eventualmente toma la decisión. Dicha cantidad determinada por el médico o el veterinario responsable de la atención se denomina en la presente memoria "dosis terapéuticamente eficaz".

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

Se refiere también a un método para el tratamiento de trastornos cosméticos seleccionados del grupo que consiste en:

- ❖ defectos de la piel;
- ❖ asimetría facial;
- ❖ arrugas seleccionadas de las líneas de expresión del entrecejo y las arrugas faciales;
- ❖ boca hacia abajo; y
- ❖ pérdida de cabello;

comprendiendo dicho método la administración de toxina botulínica tipo A2 al área afectada por el trastorno cosmético.

Para el complejo de neurotoxina botulínica o neurotoxina botulínica de alta pureza, esta dosis terapéuticamente eficaz se expresa a menudo como una función de la correspondiente LD50. Por LD50 se debe entender en la presente solicitud, la mediana de la dosis intraperitoneal en ratones inyectados con complejo de neurotoxina botulínica o neurotoxina botulínica de alta pureza que causa la muerte de la mitad de dichos ratones antes de 96 horas.

En esta solicitud se ha encontrado ahora sorprendentemente que la toxina botulínica tipo A2 no solamente tiene una actividad biológica similar a la de las otras neurotoxinas botulínicas, sino que también tiene la importante ventaja de una duración de acción mucho más larga que cualquier otra toxina botulínica conocida (como se demuestra por ejemplo por el ensayo de fuerza muscular en la rata descrito en el "Estudio farmacológico, parte I"), haciendo que sea preferida sobre las neurotoxinas botulínicas de otros serotipos para cualquier uso terapéutico conocido para la toxina botulínica tipo A1.

En esta solicitud se ha encontrado ahora sorprendentemente que la toxina botulínica tipo A2 no solamente tiene una actividad biológica similar a la de las otras neurotoxinas botulínicas, sino que también tiene la importante ventaja de una velocidad mucho más rápida de inicio de la parálisis muscular que cualquier otra toxina botulínica conocida (como se demuestra por ejemplo por el ensayo de fuerza muscular en la rata descrito en el "Estudio farmacológico, parte II"), haciendo que sea preferida sobre las neurotoxinas botulínicas de otros serotipos para cualquier uso terapéutico conocido para la toxina botulínica tipo A1.

En esta solicitud se ha encontrado ahora sorprendentemente que la toxina botulínica tipo A2 no solamente tiene una actividad biológica similar a la de las otras neurotoxinas botulínicas, sino que también tiene la importante ventaja de

un margen de seguridad intramuscular significativamente mayor que cualquier otra toxina botulínica conocida (como se demuestra por ejemplo por el ensayo de margen de seguridad intramuscular descrito en el "Estudio farmacológico, parte III"), haciendo que sea preferida sobre las neurotoxinas botulínicas de otros serotipos para cualquier uso terapéutico conocido para la toxina botulínica tipo A1.

5 En esta solicitud se ha encontrado ahora sorprendentemente que la toxina botulínica tipo A2 no solamente tiene una actividad biológica similar a la de las otras neurotoxinas botulínicas, sino que también tiene la importante ventaja de una acción selectiva sobre la inhibición de la contracción del músculo esquelético en comparación con otras toxinas botulínicas conocidas (como se demuestra por ejemplo por los "Criterios para la determinación de selectividad para los músculos esqueléticos" descritos en el "Estudio farmacológico, parte IV"). Puesto que la toxina botulínica tipo A2
10 puede tener menos efectos secundarios con respecto a los músculos lisos vecinos, puede ser preferida sobre las neurotoxinas botulínicas de otros serotipos para cualquier uso terapéutico relacionado con el músculo esquelético, conocido para la toxina botulínica tipo A1.

15 En esta solicitud se ha encontrado ahora sorprendentemente que la toxina botulínica tipo A2 no solamente tiene una actividad biológica similar a la de las otras neurotoxinas botulínicas, sino que también tiene la importante ventaja de una acción selectiva sobre la inhibición de la función de las células nerviosas relacionadas con el dolor (esto es, nociceptivas) en comparación con otras toxinas botulínicas conocidas (como se demuestra por ejemplo por los "Criterios para la determinación de selectividad para la neurotransmisión nociceptiva" descritos en el "Estudio farmacológico, parte V"). Puesto que la toxina botulínica tipo A2 puede tener menos efectos secundarios con respecto a los músculos estriados vecinos, puede ser preferida sobre las neurotoxinas botulínicas de otros serotipos
20 para cualquier uso terapéutico relacionado con el dolor, conocido para la toxina botulínica tipo A1.

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

25 A menos que se definan de forma diferente, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que normalmente entienden los expertos en el campo al que pertenece esta invención. De forma similar, todas las publicaciones, solicitudes de patente, todas las patentes y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan por referencia (cuando esté legalmente permitido).

El término "que comprende" o "que tiene" como se usa en esta memoria, se debe interpretar que tiene estos dos significados "que incluye" y "que consiste en".

30 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar lo anterior, y no se deben considerar en ningún caso limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: (No es conforme a la invención)

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

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

35 La mezcla que contiene nominalmente 2.000 unidades de LD₅₀ de toxina botulínica por ml se liofiliza en un vial esterilizado que después se sella. La composición sólida obtenida es estable durante al menos 12 meses cuando se conserva a una temperatura entre 2 y 8 °C y durante al menos 6 meses de 23 a 27 °C.

Ejemplo 2: (No es conforme a la invención)

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

Complejo de neurotoxina de Clostridium botulinum tipo A1	500 unidades de LD ₅₀ /ml
Sacarosa	11,7 mM
Histidina	10 mM
Cloruro de sodio	0,3 M
Polisorbato 80	0,01 % v/v
pH	6,5

- 5 La composición líquida preparada de este modo se sella en un dispositivo tipo jeringa sin interfase líquida/gaseosa. Almacenada en estas condiciones, es estable durante al menos un mes de 23 a 27 °C y durante al menos seis meses a 2-8 °C.

Ejemplo 3: (No es conforme a la invención)

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

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

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

Ejemplo 4: (Conforme a la invención)

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

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

- 15 La composición líquida preparada de este modo se sella en un dispositivo de tipo jeringa sin interfase líquida/gaseosa.

Ejemplo 5:

- 20 Un paciente de cincuenta y tantos años sufre de distonía cervical. El paciente recibe por inyección intramuscular la composición farmacéutica líquida del ejemplo 4 (1 ml; 500 unidades de LD₅₀) se inyecta, siendo dividida la dosis total en los músculos más activos de su cuello. Se observa el alivio de sus síntomas durante más de 20 semanas

Métodos analíticos

Ensayo de toxicidad en el ratón

- 5 Se puede utilizar un ensayo de toxicidad en el ratón para medir la toxicidad del complejo de neurotoxina botulínica o neurotoxina botulínica de alta pureza. En el ensayo, se utilizará un diluyente estándar para preparar un intervalo de diluciones en el valor o aproximadamente en el valor estimado de la LD₅₀. El intervalo y la escala de diluciones se disponen para establecer un valor exacto de LD₅₀.

Se inyectan los ratones intraperitonealmente con un volumen conocido y estandarizado de la toxina diluida. Después de 96 horas, se registra el número de muertes y de supervivientes en cada grupo de dilución. El valor LD₅₀ es la dosis mediana que mata a la mitad de los animales inyectados antes de 96 horas.

- 10 Una composición según la invención se considera estable durante un cierto período de tiempo si al menos el 70 % de la toxicidad inicial se mantiene durante dicho período de tiempo con respecto a una preparación de referencia.

Estudio farmacológico, parte i

Ensayo de fuerza muscular en la rata

- 15 El ensayo de fuerza muscular en la rata es un método capaz de determinar la duración de la parálisis mediante la medida periódica de la fuerza ejercida por el grupo de músculos del triceps sural (gastrocnemios, plantares y sóleos) en las patas traseras de una rata antes y después de la administración de toxina botulínica.

- 20 Se distribuyen aleatoriamente ratas adultas, machos Sprague-Dawley, en grupos que contienen 8 animales cada uno. Después de anestesia adecuada, se afeitan los cuartos traseros y la parte de atrás de las patas de los animales. Se inyecta el músculo gastrocnemio de la pata izquierda con toxina botulínica formulada en 0,1 ml de tampón fosfato en gelatina. Los grupos reciben cantidades equimolares de toxina botulínica tipo A2 o de toxina botulínica tipo A1. Los animales testigos reciben una inyección de tampón fosfato en gelatina (0,1 ml) cada uno.

- 25 Después de anestesia adecuada, se afeitan los cuartos traseros y la parte de atrás de las patas de los animales. Se inyecta el músculo gastrocnemio de la pata izquierda con una única dosis de Dysport en tampón fosfato en gelatina reconstituido para dar 1,0 U / 0,1 ml o 0,1 U / 0,1 ml). Los animales testigos reciben una inyección de tampón fosfato en gelatina (0,1 ml).

La fuerza de los músculos del grupo de los triceps surales (gastrocnemios, plantares, y sóleos) se mide antes de la inyección y después de la inyección a las 12, 24 y 72 horas. Se hacen medidas adicionales periódicamente a lo largo de varias semanas. Se registran los pesos corporales a los mismos intervalos de tiempo.

- 30 Para medir el desarrollo de la fuerza, se ponen los animales en un decúbito prono en un aparato que permite que los animales estén asegurados en una posición reproducible con movilidad limitada de la parte inferior de la pierna excepto en la articulación tibiotarsiana. Se calibra un ergómetro de fuerza/desplazamiento y se asegura a la pata delantera entre la primera y segunda almohadillas plantares mediante una cadena de peso ligero de tal modo que el ángulo tibiotarsiano sea de 90 grados. La señal de voltaje del transductor de fuerza se procesa por medio de un sistema de adquisición de datos por ordenador.

- 35 Se coloca un electrodo (cátodo) de estimulación, de acero inoxidable, transcutáneamente cerca del nervio ciático a medio camino entre la espina ciática posterior y el trocánter femoral mayor. Otro electrodo (ánodo) de estimulación, de acero inoxidable, se inserta 3 mm subdérmicamente en la línea media de la espalda inferior. Los sitios de los electrodos se tatúan para asegurar la colocación reproducible de los electrodos en todos los puntos de tiempo. El nervio ciático se estimula con 0,5 pulsos por segundo y un tiempo de estímulo de 0,5 ms. El voltaje de estimulación se determina aumentando el voltaje hasta que la fuerza alcance un máximo y aumentando el voltaje en un 10 % adicional.

La medida de la fuerza muscular utilizando este método demuestra que la recuperación de los músculos después de parálisis por la toxina botulínica tipo A2 ocurre con una duración de tiempo significativamente prolongada en comparación con la recuperación de los músculos después de la parálisis por la toxina botulínica tipo A1.

- 45 Estudio farmacológico, parte ii

Ensayo de fuerza muscular en la rata

El ensayo de fuerza muscular en la rata es un método capaz de determinar la duración de la parálisis mediante la medida periódica de la fuerza ejercida por el grupo de músculos del triceps sural (gastrocnemios, plantares y sóleos) en las patas traseras de una rata antes y después de la administración de toxina botulínica.

- 50 Se distribuyen aleatoriamente ratas adultas, machos Sprague-Dawley, en grupos que contienen 8 animales cada uno. Después de anestesia adecuada, se afeitan los cuartos traseros y la parte de atrás de las patas de los animales. Se inyecta el músculo gastrocnemio de la pata izquierda con toxina botulínica formulada en 0,1 ml de

tampón fosfato en gelatina. Los grupos reciben cantidades equimolares de toxina botulínica tipo A2 o de toxina botulínica tipo A1. Los animales testigos reciben una inyección de tampón fosfato en gelatina (0,1 ml) cada uno.

Después de anestesia adecuada, se afeitan los cuartos traseros y la parte de atrás de las patas de los animales. Se inyecta el músculo gastrocnemio de la pata izquierda con una única dosis de Dysport en tampón fosfato en gelatina reconstituido para dar 1,0 U / 0,1 ml o 0,1 U / 0,1 ml). Los animales testigos reciben una inyección de tampón fosfato en gelatina (0,1 ml).

La fuerza de los músculos del grupo de los triceps surales (gastrocnemios, plantares, y sóleos) se mide antes de la inyección y después de la inyección a las 12, 24 y 72 horas. Se hacen medidas adicionales periódicamente a lo largo de varias semanas. Se registran los pesos corporales a los mismos intervalos de tiempo.

Para medir el desarrollo de la fuerza, se ponen los animales en un decúbito prono en un aparato que permite que los animales estén asegurados en una posición reproducible con movilidad limitada de la parte inferior de la pierna excepto en la articulación tibiotarsiana. Se calibra un ergómetro de fuerza/desplazamiento y se asegura a la pata delantera entre la primera y segunda almohadillas plantares mediante una cadena de peso ligero de tal modo que el ángulo tibiotarsiano sea de 90 grados. La señal de voltaje del transductor de fuerza se procesa por medio de un sistema de adquisición de datos por ordenador.

Se coloca un electrodo (cátodo) de estimulación, de acero inoxidable, transcutáneamente cerca del nervio ciático a medio camino entre la espina ciática posterior y el trocánter femoral mayor. Otro electrodo (ánodo) de estimulación, de acero inoxidable, se inserta 3 mm subdérmicamente en la línea media de la espalda inferior. Los sitios de los electrodos se tatúan para asegurar la colocación reproducible de los electrodos en todos los puntos de tiempo. El nervio ciático se estimula con 0,5 pulsos por segundo y un tiempo de estímulo de 0,5 ms. El voltaje de estimulación se determina aumentando el voltaje hasta que la fuerza alcance un máximo y aumentando el voltaje en un 10 % adicional.

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

Estudio farmacológico, parte iii

Ensayo de margen de seguridad intramuscular

Para la determinación de la LD50 intramuscular, se distribuyeron aleatoriamente los ratones CD1 en grupos que contenían 8 animales cada uno. El músculo gastrocnemio de la pata izquierda se inyecta con toxina botulínica formulada en 0,1 ml de tampón fosfato en gelatina. Los grupos reciben cantidades equimolares de toxina botulínica tipo A2 o de toxina tipo A1, recibiendo cada grupo una dosis de un intervalo de dosis. La LD50 i.m. se calcula (análisis de Spearmann-Karber) como la dosis a la cual el 50 % de los ratones murieron después de la inyección i.m.

Para la determinación de la debilidad semimáxima del músculo (ED50), se utiliza el Ensayo de puntuación de la abducción de los dedos (DAS) (Aoki KR, Toxicon (2001), 39, 1815-1820). Se distribuyen aleatoriamente los ratones CD1 en grupos de 10 cada uno. Se inyecta el músculo gastrocnemio de la pata izquierda con toxina botulínica formulada en 0,1 ml de tampón fosfato en gelatina. Los grupos reciben cantidades equimolares de toxina botulínica tipo A2 o de toxina botulínica tipo A1, recibiendo cada grupo una dosis de un intervalo de dosis. Después de un período fijo a partir de la inyección, se suspenden brevemente los ratones por la cola para generar la abducción de los dedos como parte de la respuesta de sobresalto característica en esta posición. La abducción de los dedos de la pata inyectada se puntúa en una escala de 0 a 4, donde 0 es abducción normal y 4 es la reducción máxima en la abducción de los dedos y extensión de la pata. Se calculó la ED50 como la dosis que da como resultado una puntuación de 2 para la abducción de los dedos.

La medida de la relación de la LD50 intramuscular frente a la ED50 intramuscular a partir de los resultados obtenidos utilizando estos dos métodos demuestra que el margen de seguridad intramuscular de la debilitación del músculo producida por la toxina botulínica tipo A2 es mayor en comparación con el inicio de la parálisis de los músculos inducida por la toxina botulínica tipo A1.

Estudio farmacológico, parte iv

A) Ensayo del músculo intercostal:

Para determinación de la inhibición de las uniones neuromusculares (NMJs) del músculo esquelético, se utiliza el ensayo del músculo intercostal (como se describe en la solicitud de patente del Reino Unido N° GB 2 398 636). Se mataron por dislocación cervical ratas Wistar con un peso de aproximadamente 275 g. Se disecó la cavidad torácica de cada animal, y se separó en múltiples secciones por disección cuidadosa a lo largo de la columna vertebral. Para cada preparación (que consiste en dos costillas y el músculo unido) se disecciona cuidadosamente un nervio intercostal para revelar aproximadamente 1 - 2 mm del haz de nervios. La preparación se reanima durante aproximadamente 15-20 minutos antes de ser devuelta a una placa de Petri que contiene 10 ml de tampón oxigenado de Lillies

Ringers. El nervio intercostal diseccionado se conecta mediante un electrodo de succión a un estimulador (Grass Instruments Model S48), con un electrodo de retorno colocado en el medio. La preparación del tejido se conecta a un amplificador y transductor de fuerza (Grass Instruments Model P122 y FT03, respectivamente), de manera que permita la medida de la fuerza muscular generada.

- 5 Se estimula la preparación a un voltaje supramáximo, y se registran las respuestas contráctiles. Después de un período de estabilización, se exponen entonces baños de órganos replicados a una cantidad molar conocida de la toxina botulínica a analizar, y se registra la magnitud del temblor. Las preparaciones control se tratan con diluyente solamente.

B) Ensayo del íleo de cobaya:

- 10 Para determinación de la inhibición de la contracción del músculo liso, se utiliza el ensayo del íleo de cobaya (una modificación del método descrito por Mackenzie IJ et al, Neuroscience 7, 1982, 997-1006). Se matan por dislocación cervical cobayas machos Hartley (Charles River, France) con un peso entre 300-450 g. Se separa la parte distal del íleo y segmentos de 1,5-2 cm de largo se montan sobre soportes dispuestos para tejidos, entre dos electrodos paralelos de alambre de platino. Se coloca este conjunto en un baño de órganos de 20 ml que contiene solución modificada de Krebs bajo una tensión de 1g a 37°C y se gasifica con O₂ al 95 %/ CO₂ al 5 %. Las respuestas contráctiles se miden utilizando transductores de desplazamiento de fuerzas (Statham UC2) acoplados a un polígrafo Gould RS3400.

- 20 Después de un período de equilibrio de 1 h, se estimulan los tejidos eléctricamente entre 0,05 Hz y 0,2 Hz con pulsos de ondas cuadradas de 0,5 ms a 1 ms de duración y se determina entonces el voltaje supramáximo. Después de un período de estabilización, se exponen entonces baños de órganos replicados a una cantidad molar conocida de la toxina botulínica a analizar, y se registra la magnitud del temblor. Las preparaciones control se tratan con diluyente solamente. Baños de órganos replicados adicionales se tratan con tetrodotoxina 0,25 µM o atropina 0,56 µM para confirmar que las contracciones observadas son debidas a la liberación de acetilcolina de las neuronas entéricas.

- 25 C) Criterios para la determinación de selectividad para los músculos esqueléticos:

La relación de selectividad para una cierta toxina botulínica se define como el valor obtenido en el ensayo descrito en A) anteriormente dividido por el valor obtenido en el ensayo descrito en B) anteriormente, a la vez que se utiliza en ambos ensayos la misma cantidad molar de toxina botulínica activa a analizar.

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

Estudio farmacológico, parte v

A) Ensayo de la función de las células nerviosas nociceptivas:

- 35 Para la determinación de la inhibición de la función de las células nerviosas nociceptivas, se utiliza el ensayo de los ganglios embrionarios de la raíz dorsal (como se describe por Welch MJ et al., Toxicon (2000), 38, 245-258). Se preparan células nerviosas disociadas procedentes de ganglios de la raíz dorsal recogidos de ratas Sprague-Dawley fetales de 15 días de edad, y se ponen en placas de 24 pocillos recubiertas con Matrigel. Un día después de la extensión en placas, se tratan las células con citosina β-D-arabinofuranósido durante 48 horas a una concentración 10 micromolar. Se mantienen después las células en medio de cultivo celular durante 2 semanas en condiciones estándar de cultivo celular. Los cultivos celulares replicados se exponen entonces a una cantidad molar conocida de la toxina botulínica a ensayar. Las células control se tratan con diluyente solamente.

- 40 Después de incubación con la toxina botulínica a ensayar, se estimuló la liberación de sustancia P utilizando un tampón alto en potasio, y se midió utilizando un kit de inmunoensayo con enzimas de la sustancia P (EIA) comercialmente disponible.

B) Ensayo del músculo intercostal:

- 45 Para determinación de la inhibición de las uniones neuromusculares (NMJs) del músculo esquelético, se utiliza el ensayo del músculo intercostal (como se describe en la solicitud de patente del Reino Unido N° GB 2 398 636). Se mataron por dislocación cervical ratas Wistar con un peso de aproximadamente 275 g. Se disecó la cavidad torácica de cada animal, y se separó en múltiples secciones por disección cuidadosa a lo largo de la columna vertebral. Para cada preparación (que consiste en dos costillas y el músculo unido) se disecciona cuidadosamente un nervio intercostal para revelar aproximadamente 1-2 mm de haz de nervios. La preparación se reanima durante aproximadamente 15-20 minutos antes de ser devuelta a una placa de Petri que contiene 10 ml de tampón oxigenado de Lillies Ringers. El nervio intercostal diseccionado se conecta mediante un electrodo de succión a un estimulador (Grass Instruments Model S48), con un electrodo de retorno colocado en el medio. La preparación del tejido se conecta a un amplificador y transductor de fuerza (Grass Instruments Model P122 y FT03, respectivamente), de manera que permita la medida de la fuerza muscular generada.
- 55

Se estimula la preparación a un voltaje supramáximo, y se registran las respuestas contráctiles. Después de un período de estabilización, se exponen entonces baños de órganos replicados a una cantidad molar conocida de la toxina botulínica a analizar, y se registra la magnitud del temblor. Las preparaciones control se tratan con diluyente solamente.

5 C) Criterios para la determinación de selectividad para la neurotransmisión nociceptiva:

La relación de selectividad para una cierta toxina botulínica se define como el valor obtenido en el ensayo descrito en A) anteriormente dividido por el valor obtenido en el ensayo descrito en B) anteriormente, a la vez que se utiliza en ambos ensayos la misma cantidad molar de toxina botulínica activa a analizar.

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

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para uso en terapia que comprende toxina botulínica tipo A2 como principio activo, en donde dicha composición farmacéutica no contiene cantidades significativas de cualquier otra proteína derivada de Clostridium spp distinta de la neurotoxina botulínica, y en donde dicha composición farmacéutica no se usa para tratar el hirsutismo o hipertriosis.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicha toxina botulínica tipo A2 es producida por Clostridium spp.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en donde dicha Clostridium spp es una cepa seleccionada de Kyoto-F, Chiba-H, Y-8036, 7103-H, 7105H y KZ1828.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicha toxina botulínica tipo A2 es una toxina botulínica de tipo A2 producida recombinantemente.
5. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha composición farmacéutica es para uso en el tratamiento de una enfermedad, afección o síndrome seleccionado de trastornos oftalmológicos, trastornos del movimiento, trastornos otorrinolaringológicos, trastornos gastrointestinales, trastornos urogenitales, trastornos dermatológicos, trastornos de dolor, trastornos inflamatorios, trastornos secretores, trastornos respiratorios, trastornos hipertróficos, trastornos articulares, trastornos endocrinos, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, lesiones traumáticas y trastornos veterinarios.
6. Uso no terapéutico de una composición que comprende la toxina botulínica tipo A2 para el tratamiento de un trastorno cosmético, en donde dicho trastorno cosmético no es la prevención del crecimiento de pelo en el cuerpo.
7. Uso no terapéutico según la reivindicación 6, en donde dicho trastorno cosmético no terapéutico se selecciona de defectos de la piel, asimetría facial, arrugas incluyendo líneas de expresión del entrecejo y arrugas faciales, boca hacia abajo, pérdida de cabello, y olores corporales.