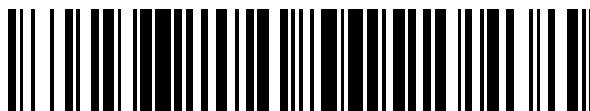


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 820**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2011 PCT/KR2011/003547**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO11152618**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2011 E 11789976 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2578228**

54 Título: **Toxina botulínica no difusiva que provoca una parálisis muscular localizada y procedimiento de purificación de la misma**

30 Prioridad:

**31.05.2010 KR 20100051076**

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

**19.03.2018**

73 Titular/es:

**MEDEXGEN INC. (100.0%)  
2nd Floor, Medical Bldg 1 Hanyang Univ, College  
of Medicine 17 Haengdan-dong, Seongdon-gu  
Seoul 133-791, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, YONG HOON y  
LEE, HYUN SUB**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 659 820 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

Toxina botulínica no difusiva que provoca una parálisis muscular localizada y procedimiento de purificación de la misma

5 **Campo técnico**

10 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de una toxina botulínica sin propagación que provoca parálisis muscular localizada y a una toxina botulínica sin propagación obtenida de este modo.

**Técnica anterior**

15 **[0002]** La Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) advirtió que el Botox® que se utiliza con fines cosméticos, tales como la eliminación de arrugas, puede causar efectos secundarios graves, tales como la muerte, en los casos graves.

20 **[0003]** La FDA de los Estados Unidos dijo que se describió un efecto secundario de la parálisis muscular en zonas distintas de un área inyectada con Botox® y que personas inyectadas con Botox® fueron hospitalizadas o murieron.

**[0004]** Además, la FDA de los Estados Unidos dijo que los pacientes en los que se produjeron efectos secundarios graves por Botox® eran en su mayoría pacientes infantiles cuyos músculos de la pierna fueron inyectados con Botox® con el fin de curar la rigidez muscular causada por la parálisis cerebral.

25 **[0005]** El Botox® se utiliza ampliamente para el tratamiento de los músculos de pacientes con parálisis cerebral, rigidez muscular de cuello, dolor causado por la rigidez muscular y parálisis de las cuerdas vocales. En el campo de la terapia cosmética, el Botox® se utiliza para la eliminación de las arrugas y la prevención o el tratamiento del envejecimiento. Dado que las terapias anti-envejecimiento se han popularizado recientemente, la cantidad de Botox® utilizado ha aumentado cada año.

30 **[0006]** Cuando el Botox® se inyecta en los músculos, los nervios musculares se paralizan. Por lo tanto, el Botox® ha sido inyectado en niños con parálisis cerebral cuyos músculos de las piernas son excesivamente rígidos, con el fin de hacer que caminen de forma más natural.

35 **[0007]** La FDA considera que el Botox® influye en la función muscular respiratoria mientras se propaga a zonas distintas de las piernas, lo que provoca efectos secundarios [FDA NEWS RELEASE FOR IMMEDIATE RELEASE, 30 de abril del 2009, FDA Patient Safety News: Show # 74, April 2008]. En relación con esto, la FDA dijo que los pacientes y los médicos deben prestar atención a si se produce una disminución de la tasa o dificultad para respirar en la deglución después de la inyección con Botox® [etiquetado para pacientes aprobado por la FDA 7/31/09 APPENDIX 1: MEDICATION GUIDE BOTOX, BOTOX cosmetic (Boe-tox®) (on a botulinum toxin A) for Injection)].

40 **[0008]** Sin embargo, la FDA dijo que un efecto secundario grave de Botox® para fines cosméticos, tales como la eliminación de arrugas, aún no ha sido descrito. La FDA no requirió a los médicos detener los tratamientos con Botox® para fines cosméticos.

45 **[0009]** La Unión de Consumidores de Estados Unidos pidió a la FDA reforzar la advertencia de que se describieron 180 casos de efectos secundarios relacionados con el Botox® ante la FDA entre los años 1997 y 2006, y 16 casos de los mismos produjeron la muerte y que el uso de Botox® puede causar anomalías.

50 **[0010]** En la técnica anterior, la toxina botulínica se ha purificado mediante la realización de la precipitación con ácido (USP 7.354.740, titulada "Sistema libre de productos animales y procedimiento para purificar una toxina botulínica", Allergan, Inc.) o la realización de cromatografía después de la precipitación con ácido (USP 7.452.697, titulada "Procedimiento cromatográfico y sistema para la purificación de una toxina botulínica", Allergan, Inc; solicitud de patente coreana nº 10-2008-0016800, titulada "Procedimiento de purificación de la toxina botulínica de *Clostridium botulinum*, Medexgen Inc.; solicitud de patente coreana No. 10-2002-0000685, titulada "Procedimiento para la purificación de la toxina A de tipo *Clostridium botulinum*", Medexgen Inc.).

55 **[0011]** Sin embargo, se sabe que las toxinas botulínicas purificadas por los procedimientos anteriores se propagan de manera significativa a las zonas en el cuerpo que no sean el área inyectada para paralizar los órganos circundantes o los músculos respiratorios, y en casos graves, causan efectos secundarios graves que conducen a la muerte .

60 **[0012]** Ashraf Ahmed S. et al. (Journal of Protein Chemistry, vol. 23, no. 7, 2004, páginas 445-451) describen los efectos de los tampones y sales en la autocatálisis de la cadena ligera de la neurotoxina A botulínica, en presencia y ausencia de cloruro de zinc. Cliff Sandeep H. et al. (Journal of Cosmetic Dermatology, vol. 7, no. 1, 2008, páginas 50-54) dan a conocer que las diferentes formulaciones de toxina botulínica de tipo A presentan diferencias en el

grado de migración del complejo de neurotoxina-proteína desde su sitio de inyección.

- 5 [0013] Pickett et al. (Toxicon, vol. 54, no. 5, 2009, páginas 683-689) proporcionan una revisión de las propiedades farmacológicas de Dysport que influyen en la acción de la toxina, y también una comparación con otros productos de toxina botulínica.
- 10 [0014] Gilsdorf J. et al. (Protein Expression and Purification, vol. 46, no. 2, 2006, páginas 256-267) proporcionan la expresión, purificación y caracterización de cadena ligera de tipo B de *Clostridium botulinum*.
- 15 [0015] Li L. et al. (Protein Expression and Purification, vol. 17, no. 3, 1999, páginas 339-344) proporcionan un alto nivel de expresión, purificación y caracterización de la cadena ligera de neurotoxina botulínica de tipo A recombinante. Brodsky Matthew A. et al. (Tremor and Other Hyperkinetic Movements, vol. 2, 2012) proporcionan una revisión que analiza las variables que afectan a la difusión de la toxina botulínica, incluyendo la composición de la proteína y tamaño molecular, así como factores de inyección. También se analizan datos de difusión a partir de estudios comparativos en modelos animales y ensayos clínicos humanos que ilustran las diferencias entre los productos de toxina botulínica disponibles.
- 20 [0016] Kerscher M. et al. (Archive of Dermatological Research, vol. 304, núm. 2, 2011, páginas 155-161) proporcionan la investigación de la propagación de tres preparaciones aprobadas de toxina botulínica de tipo A, con y sin proteínas complejantes, midiendo y comparando el tamaño de la halos anhidróticos producidos después de la inyección de dosis equivalentes en un volumen idéntico en la frente de los pacientes.
- 25 [0017] Ramírez-Castaneda J et al. (Movement disorders, 2013, XP055074742) proporcionan una revisión de la difusión, difusión, y la migración de la toxina botulínica.
- 30 [0018] Malizio CJ et al. (Methods in Molecular Biology, vol. 145, 2000, páginas 27-39) describen la purificación de la neurotoxina de *C. botulinum* de tipo A.
- [0019] El documento KR-A-20050074806 describe un procedimiento para la producción de toxina botulínica cristalina.
- [0020] El documento KR-A-20030060150 proporciona un procedimiento de purificación de toxina de *Clostridium botulinum* de tipo A.
- 35 [0021] Gessler F et al (Fems Immunology and Medical Microbiology, vol. 24, 1999, pág. 361-367) proporcionan la producción y purificación de neurotoxina de *Clostridium botulinum* de tipo C y D.
- 40 [0022] El documento US-2005238664 da a conocer una formulación farmacéutica de toxina botulínica libre de proteínas de origen animal, que comprende una toxina botulínica y una albúmina recombinante, adecuada para la administración terapéutica a un paciente humano, y procedimientos para tratar pacientes con diversas enfermedades y afecciones con formulación.
- 45 [0023] Walker TJ y Dayan SH (páginas J Clin Aesthet Dermatol, vol. 7, no. 2, 2014, 31-39) proporcionan una revisión de la literatura más reciente sobre todas las toxinas botulínicas disponibles comercialmente en Estados Unidos, sus indicaciones, aprobaciones de la Administración de Alimentos y Fármacos, y la manipulación.
- [0024] Ranoux et al. (J Neurol Neurosurg Psychiatry, vol. 72, no. 4, 2002, páginas 459-462) proporcionan una comparación de la eficacia de Botox con dos proporciones diferentes de Dysport.
- 50 [0025] Sugiyama H et al. (Appl Environm Microbiol, vol. 33, no. 4, 1977, páginas 963-966) describen un procedimiento de purificación para la obtención de cristales de *C. botulinum* de tipo A que se utilizan para muchos propósitos, por ejemplo, purificación de neurotoxinas (página 963, líneas 13-17 de la columna de la izquierda).
- 55 [0026] Schantz EJ y Johnson EA (Micro Rev, vol. 56, no. 1, 1992, páginas 80-99) describen los usos terapéuticos de la toxina de *C. botulinum* de tipo A, y mencionan explícitamente el problema técnico de la difusión (página 85, tres últimos párrafos de la columna izquierda).
- 60 [0027] Chun et al. (Eur J Biochem, vol. 122, 1982, páginas 493-500) describen un cromatograma de un procedimiento convencional de preparación de toxina botulínica, en el que se eluye un primer pico que conduce al producto.

### Descripción detallada de la invención

#### Problema técnico

- 65 [0028] Por lo tanto, la presente invención se ha realizado en vista de los problemas anteriormente mencionados, y

los presentes inventores han encontrado que, cuando se somete una toxina botulínica de tipo A existente purificada mediante cualquiera de precipitación ácida o cromatografía después de la precipitación ácida, cromatografía de intercambio iónica usando cloruro de sodio, se obtienen tres subfracciones heterogéneas, y una subfracción de las mismas tiene actividad paralizante de los músculos, y, al mismo tiempo, no se propaga en el cuerpo.

[0029] Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar una toxina botulínica sin propagación, que no se propaga en el cuerpo y, al mismo tiempo, localiza la actividad paralizante de los músculos, y a un procedimiento para la purificación de la misma.

#### 10 Solución técnica

[0030] Para lograr los objetivos anteriores, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para purificar una toxina botulínica sin propagación, que comprende las etapas de: separar el producto de toxina botulínica de tipo A en subfracciones mediante la realización de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de pH 4,5-5,5 y 0,02-0,2 M de cloruro de sodio (NaCl), y recoger una subfracción toxina botulínica sin propagación, que tiene un valor de A260/A280 de 0,4-0,6, a partir de dichas subfracciones separadas.

[0031] De acuerdo con todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona una preparación de toxina botulínica sin propagación, que se purifica por el procedimiento anterior, que comprende concentraciones de iones de Zn, Fe y Mg de al menos 150, 80, y 140 ppb por 100 U, respectivamente.

[0032] De acuerdo con todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para determinar una toxina botulínica sin propagación, que comprende: inyectar la toxina botulínica sin propagación de la reivindicación 2 en el músculo de la pantorrilla de la extremidad posterior izquierda o derecha de ratón (4-6 semanas de vida, peso de 18-22 g) en una cantidad equivalente a 1,5-3 veces la LD<sub>50</sub> de la toxina; y determinar si los músculos de la extremidad posterior derecha y los músculos respiratorios del ratón se paralizaron y si el ratón murió.

[0033] De acuerdo con todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona dicho procedimiento, en el que la preparación de toxina botulínica sin propagación muestra una tasa de supervivencia de al menos el 80% a las 96 horas después de la inyección de 2 U de preparación de toxina en el volumen 50 µl en el músculo de la pantorrilla de la extremidad posterior izquierda o derecha de ratón (4-6 semanas de vida, peso de 18-22 g).

#### Efectos ventajosos

[0034] Según la presente invención, se puede obtener una toxina botulínica sin propagación que causa parálisis muscular localizada que causa parálisis muscular en un área deseada, no se propaga a otras áreas del sitio de administración y tiene el efecto de paralizar músculos en una de forma rápida y duradera.

[0035] Además, es posible obtener una toxina botulínica sin propagación que tiene un título de toxina elevado en comparación con productos de toxina botulínica convencionales.

[0036] Además, de acuerdo con la presente invención, se puede obtener una toxina botulínica sin propagación que no se mezcla con una toxina de propagación en grandes cantidades mediante el control de las condiciones cromatográficas de aniones.

#### Breve descripción de los dibujos

##### [0037]

La figura 1 muestra los resultados de la separación de la toxina botulínica en subfracciones mediante cromatografía de intercambio iónico en el Ejemplo 1.

La figura 2 es un diagrama gráfico que muestra cambios en los % de área del pico de las subfracciones de acuerdo con los cambios en el pH del tampón.

La figura 3 es un diagrama gráfico que muestra un cambio en el % de área del pico de cada subfracción de acuerdo con el volumen de carga de una muestra.

La figura 4 muestra las tasas de supervivencia de acuerdo con los cambios en la dosis (A) y el tiempo después de la administración (B) de las fracciones activas (pI y pII) entre las subfracciones separadas en el Ejemplo 1 [Ratón: ICR, hembra, 4 semanas de edad, 18-22 g, n = 10, inyección IM en la pata posterior derecha].

La figura 5 es un conjunto de fotografías que muestran una comparación de la difusión en el cuerpo desde el sitio de la administración medida 12 horas después de administrar una fracción activa sin propagación (pII) entre las subfracciones separadas en el Ejemplo 1 y un producto disponible comercialmente en la extremidad posterior derecha de los ratones.

La figura 6 es un conjunto de gráficos que muestran las tasas de supervivencia de acuerdo con la dosis (A) y el tiempo después de la administración (B), medida después de administrar una fracción activa sin propagación (pII) entre las subfracciones separadas en el Ejemplo 1 y un producto disponible comercialmente en la extremidad posterior derecha de los ratones.

La figura 7 muestra una comparación del tiempo de inicio de la parálisis muscular, medida después de administrar 1 U de cada uno de una fracción activa sin propagación (pII) entre las subfracciones separadas en el Ejemplo 1 y un producto disponible comercialmente en la extremidad posterior derecha de ratones.

5 La figura 8 muestra una comparación del tiempo de duración de la parálisis muscular, medido después de administrar 0,5 U de cada uno de una fracción activa sin propagación (pII) entre las subfracciones separadas en el Ejemplo 1 y un producto disponible comercialmente en la extremidad posterior derecha de ratones.

**Mejor modo de llevar a cabo la invención**

10 **[0038]** En lo sucesivo, cada paso de un procedimiento para la purificación de una toxina botulínica sin propagación de acuerdo con la presente invención se describirá con más detalle.

15 **[0039]** Un procedimiento para la purificación de una toxina botulínica sin propagación de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de: separar el producto de toxina botulínica de tipo A en subfracciones mediante la realización de cromatografía de intercambio iónico usando tampón de pH 4,5 a 5,5, utilizando 0,02-0,2 M de cloruro de sodio (NaCl); y recoger una subfracción de toxina botulínica sin propagación, que tiene un valor A260/A280 de aproximadamente 0,4-0,6, a partir de dichas subfracciones separadas.

20 **[0040]** El procedimiento según la invención para la purificación de una toxina botulínica sin propagación es un procedimiento en el que una toxina botulínica existente obtenida por cualquiera de precipitación ácida o cromatografía de intercambio iónico después de la precipitación ácida, se somete a un nuevo procedimiento cromatográfico de intercambio iónico desarrollado por los presentes inventores, obteniendo de este modo una fracción de toxina botulínica sin propagación.

25 **[0041]** Por lo tanto, el procedimiento de la invención para la purificación de una toxina botulínica sin propagación se realiza usando una toxina botulínica de tipo A obtenida por cualquiera de precipitación ácida a partir de un caldo de cultivo de una cepa de *Clostridium botulinum* de tipo A o purificación cromatográfica después de la precipitación ácida.

30 **[0042]** Cuando la toxina botulínica purificada de tipo A se somete a cromatografía de intercambio iónico utilizando cloruro de sodio, se pueden obtener tres subfracciones a partir de la resina de intercambio iónico. Para realizar la cromatografía de intercambio iónico, se usa tampón de acetato de sodio, y la concentración de cloruro de sodio se añade al tampón con el fin de obtener subfracciones incrementadas gradualmente, y se toma cada fracción separada. Se encontró que, cuando no se utilizó cloruro de sodio (0 M de NaCl), la fracción separada era una fracción activa (pico I, pI) que se propaga en el cuerpo, y cuando se utilizó cloruro de sodio a una concentración de 0,02-0,2 M, la fracción separada era una fracción activa (pico II, pII), que no se propaga en el cuerpo, y cuando se utilizó sodio a una concentración de 1 M, la fracción separada fue una fracción inactiva (pico III, pIII) que se propaga en el cuerpo.

40 **[0043]** Específicamente, la concentración de cloruro de sodio que se utiliza para obtener la fracción pII está en el intervalo de 0,02 a 0,2 M, y cuando no se utiliza cloruro de sodio o la concentración de cloruro de sodio está fuera del intervalo anterior, la fracción pII puede contener la fracción pI o pIII, sugiriendo que es difícil obtener una fracción activa sin propagación que tenga un efecto de paralizar los músculos localizados buscada por la presente invención.

45 **[0044]** Mientras tanto, cuando la cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo usando cloruro de sodio en un tampón que tiene un pH que varía de 4,5 a 5,5, la cantidad de fracción pI o pIII en las subfracciones separadas se reduce, y la pureza de la fracción pII aumenta. Esto puede ser confirmado mediante la comparación de los valores de A260/A280 o la medición del grado de parálisis tras la inyección en los músculos de la extremidad posterior derecha de ratones.

50 **[0045]** Además, cuando la cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo usando cloruro de sodio de tal manera que la cantidad de una muestra de toxina botulínica de tipo A purificada es 1/5-1 veces el volumen de la columna de cromatografía de intercambio iónico utilizado, la cantidad de la fracción pII aumenta. Específicamente, cuando el volumen de la columna es de 1 ml y la cantidad de la muestra de toxina botulínica de tipo A purificada es de 0,2-1 ml, la cantidad de la fracción pII obtenida está en el intervalo de 20% a 50%.

60 **[0046]** Mientras tanto, se encontró que la fracción pII obtenida por el procedimiento de la invención para la purificación de la toxina botulínica de tipo A sin propagación tiene una LD<sub>50</sub> total de  $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$  U/ml, tal como se mide usando ratones. Además, se puede observar que la fracción pII no se propaga a otras áreas distintas de un área deseada tras la inyección y se inicia la parálisis muscular en un corto período de tiempo de manera significativa y se mantiene la parálisis muscular durante un largo tiempo en comparación con un producto comercialmente disponible.

65 **[0047]** Además, la fracción pII obtenida por el procedimiento de la invención para la purificación de la toxina botulínica sin propagación comprende, por 100 U, al menos 150 ppb de iones de Zn, al menos 80 ppb de iones de Fe, y al menos 140 ppb de Mg iones.

[0048] El procedimiento según la invención para la purificación de la toxina botulínica sin propagación se caracteriza en que el contenido de Mg, Fe y Zn es significativamente mayor que el de una toxina botulínica de tipo A purificado por un procedimiento convencional.

[0049] Se encontró que, cuando se inyectó la toxina botulínica sin propagación obtenida por el procedimiento de purificación de la presente invención en la extremidad posterior derecha de los ratones en una cantidad equivalente a 1,5-3 veces la LD<sub>50</sub> de la toxina, se paralizaron los músculos de la extremidad posterior derecha, mientras que no se paralizaron los músculos respiratorios y no tenía actividad letal, lo que sugiere que la toxina botulínica sin propagación de la presente invención no se propaga en el cuerpo.

**Modo de llevar a cabo la invención**

[0050] En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los ejemplos y los dibujos adjuntos, pero el alcance de la presente invención no se limita a estos ejemplos y dibujos.

[0051] Un producto disponible en el mercado usado en los ejemplos de la presente invención es un producto Botox (Allergan, Inc) preparado por el procedimiento descrito en USP 7.354.740 [titulada "Sistema libre de productos animales y procedimiento para purificar una toxina botulínica"]. Sin embargo, la presente invención se aplica no sólo al producto disponible comercialmente anterior o productos de toxina botulínica de tipo A purificados por el procedimiento anterior, pero también a cualquier producto de toxina botulínica de tipo A purificado por precipitación con ácido.

Ejemplo 1: Fraccionamiento mediante cromatografía de intercambio iónico

[0052] Una muestra purificada a partir de un medio de cultivo de toxina botulínica por precipitación ácida se sometió a cromatografía de intercambio iónico, separando de este modo la muestra en tres subfracciones. Los resultados de la cromatografía se muestran en la figura 1 [pI, pico I (una fracción activa que se propaga en el cuerpo); pII, pico II (una fracción activa que no se propaga en el cuerpo); pIII, pico III (una fracción inactiva)].

[0053] La cromatografía de intercambio iónico se realizó usando un instrumento AKTA FPLC (GE Healthcare), una columna Hitrap DEAE FF (GE Healthcare), y tampón de acetato de sodio (pH 5,5) como tampón de trabajo (tampón de elución).

[0054] Específicamente, la muestra se eluyó con 0 M de NaCl (pH 5,5) en acetato de sodio para obtener una fracción de lavado no unida (pI, una fracción activa que se propaga en el cuerpo), y después se eluyó con NaCl 0,05 M para obtener una fracción (pII, una fracción activa que no se propaga en el cuerpo), y se eluyó con NaCl 1 M para obtener una fracción (pIII, una fracción inerte). La muestra se sometió a precipitación ácida a una velocidad de flujo de 1 ml/min, seguido de desalación.

Ejemplo 2: Cambios en picos y características en función de los cambios en el pH del tampón

[0055] La figura 2 muestra los % de áreas de pico de las subfracciones de acuerdo con los cambios en el pH del tampón usado en la cromatografía de intercambio iónico. Como puede verse en la figura 2, cuando el pH del tampón estaba en el intervalo de 4,5 a 5,5, aumentó el % de área del pico de la fracción pII. La tabla 1 a continuación muestra los valores de A260/A280 de las subfracciones en función del pH del tampón, y en la Tabla 2 a continuación muestra la LD<sub>50</sub> total (unidad) de las subfracciones.

[Tabla 1]

	A260/A280			
	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0
pI	0,76 ± 0,15	0,69 ± 0,09	0,67 ± 0,05	0,63 ± 0,08
pII	0,50 ± 0,05	0,55 ± 0,04	0,55 ± 0,03	0,81 ± 0,19
pIII	0,76 ± 0,10	0,82 ± 0,13	0,84 ± 0,12	0,79 ± 0,09

[0056] Como puede verse en la Tabla 1 anterior, cuando el pH del tampón estaba en el intervalo de 4,5 a 5,5, el valor de A260/A280 de la fracción pII estaba en el intervalo de 0,45 a 0,6, lo que sugiere que la fracción pII es adecuada para la administración.

[0057] Por lo tanto, es preferible ajustar el pH del tampón a de 4,5 a 5,5 con el fin de obtener una fracción activa purificada (pII) que no se propaga en el cuerpo.

[Tabla 2]

	LD <sub>50</sub> total (unidad)			
	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0
Producto convencional (premuestra) purificado mediante precipitación ácida	5 ± 0,8	5 ± 1	5 ± 0,8	5 ± 1,2
pl	1,5 ± 0,4	3 ± 0,5	2 ± 0,4	2 ± 0,8
pII	0,2 ± 0,2	1 ± 0,2	3 ± 0,4	0,4 ± 0,2
pIII	-	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2 ± 1

(Unidad: 10<sup>5</sup> U)

5 **[0058]** Como puede verse en la Tabla anterior 2, cuando el pH del tampón estaba en el intervalo de 5,0 a 5,5, la LD<sub>50</sub> total de la fracción pII estaba en el intervalo de 0,8 X 10<sup>5</sup>-3,5 X 10<sup>5</sup> U/ml, lo que sugiere que la tasa de retorno de pII es relativamente alta.

10 **[0059]** Por lo tanto, es preferible ajustar el pH del tampón a de 4,5 a 5,5 con el fin de obtener una fracción activa de seguridad (PII) que no se propaga en el cuerpo.

Ejemplo 3: Cambios en picos y características en función de los cambios en el volumen de carga de la muestra

15 **[0060]** Se obtuvieron subfracciones de la misma manera que en el Ejemplo 1. La figura 3 muestra los cambios en el % de área del pico de las subfracciones (pl, pII y pIII) en función de los cambios en el volumen de carga de la muestra utilizada para obtener las subfracciones. También, la Tabla 3 muestra los cambios en los valores de A260/A280 de las subfracciones en función del volumen de carga de la muestra, y la Tabla 4 a continuación muestra los cambios en la LD<sub>50</sub> total (unidad) de las subfracciones en función del volumen de carga de la muestra.

20 [Tabla 3]

	A260/A280			
	0,25 ml	0,5 ml	1 ml	2 ml
pl	0,67 ± 0,08	0,64 ± 0,07	0,68 ± 0,09	0,67 ± 0,13
pII	0,55 ± 0,02	0,56 ± 0,01	0,55 ± 0,04	0,55 ± 0,03
pIII	0,85 ± 0,14	0,84 ± 0,09	0,82 ± 0,18	0,84 ± 0,24

25 **[0061]** Como puede verse en la Tabla anterior 3, cuando el volumen de carga de la muestra estaba en el intervalo de 0,25 a 2 ml, el valor de A260/A280 de la fracción pII era de 0,4-0,6, lo que sugiere que se trata de una muestra ajustable para la administración.

30 **[0062]** Por lo tanto, es preferible controlar el volumen de carga de la muestra en el intervalo de 1/5 a 2 veces el volumen de la columna a fin de obtener una gran cantidad de una fracción activa (pII) que no se propaga en el cuerpo.

[Tabla 4]

	LD <sub>50</sub> total (unidad)			
	0,25 ml	0,5 ml	1 ml	2 ml
Producto convencional (premuestra) purificado mediante precipitación ácida	2,5 ± 0,5	5 ± 1	10 ± 4	20 ± 5
pl	0,8 ± 0,2	1,6 ± 0,4	5 ± 2	15 ± 4,8
pII	1,6 ± 0,2	4 ± 0,6	4 ± 0,9	4 ± 1,5
pIII	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,3

(Unidad: 10<sup>5</sup> U)

35 **[0063]** Como puede verse en la Tabla anterior 4, cuando el volumen de carga de la muestra estaba en el intervalo de 0,25 a 1 ml, la LD<sub>50</sub> total de la fracción pII estaba en el intervalo de 0,8 X 10<sup>5</sup>-3,5 X 10<sup>5</sup> U/ml, lo que sugiere que la tasa de retorno de pII es relativamente alta.

[0064] Por lo tanto, es preferible controlar el volumen de carga de la muestra en el intervalo de 1/5 a 2 veces el volumen de la columna con el fin de obtener una fracción activa de seguridad (pII) que no se propaga en el cuerpo.

5 Ejemplo de ensayo 1: Comparación de los efectos paralizantes de los músculos

1) Inyección en los músculos de la extremidad posterior derecha

10 [0065] Con el fin de examinar los efectos paralizantes de los músculos de las subfracciones obtenidas en el Ejemplo 1, se realizó la inyección en los músculos de la extremidad posterior derecha de los ratones.

15 [0066] Se dividieron ratones ICR (hembras, 4 semanas de vida, 18-22 g) en tres grupos, cada grupo constaba de 10 ratones. El peso de cada ratón se midió y registró con precisión. Cada una de las subfracciones se llenó en una jeringa Hamilton de 50 µl a una concentración de 1 U/20 µl en ausencia de aire, y a continuación la aguja de la jeringa se introdujo en el tobillo de la pata posterior derecha de cada ratón ICR hasta una profundidad de aproximadamente 3 cm, y cada una de las subfracciones se inyectó en los músculos de cada ratón. Después de la inyección en los músculos, se evaluó la puntuación de parálisis de las extremidades para cada ratón en diversos puntos de tiempo de acuerdo con los criterios mostrados en la Tabla 5, y se midió la tasa de supervivencia de los ratones. Los resultados de la medición se muestran en la Figura 4.

20

[Tabla 5]

Puntuación	Criterio
0	Aspecto de las extremidades y andar de ratones normales
1	Los ratones caminan arrastrando pero los dedos no están juntos
2	Junto con el criterio 1, los dedos están juntos
3	Junto con el criterio 2, las articulaciones del pie se doblan hacia dentro
4	Junto con el criterio 3, los pies están en contacto con los músculos de las piernas y las piernas están cojas

[Tabla 6]

Fracciones	Área paralizada tras la inyección en extremidades derechas traseras de ratones
Fracción activa que se propaga en el cuerpo	Varias áreas en el cuerpo, incluyendo la extremidad trasera derecha, el diafragma , etc
Fracción activa que no se propaga en el cuerpo	Extremidad posterior derecha
Fracción inactiva que se propaga en el cuerpo	-

25

[0067] Como puede verse en la figura 4, entre las subfracciones obtenidas en el Ejemplo 1, la fracción activa (pII) que no se propaga en el cuerpo mostró un aumento significativo en la dosis frente a la tasa de supervivencia en comparación con la fracción activa (pI) que se propaga en el cuerpo (Figura 4A), y la tasa de supervivencia a una dosis de 2 U fue del 100% para la fracción pII y 0% para la fracción pI, que difieren extremadamente entre sí (Figura 4B).

30

Ejemplo de ensayo 2: Comparación de la difusión en el cuerpo entre el producto comercial y fracción activa (pII) que no se propaga en el cuerpo

35 [0068] Con el fin de examinar los efectos paralizantes de los músculos de un producto comercial (Botox de Allergan) y la subfracción pII obtenida en el Ejemplo 1, se realizó la inyección en los músculos de la extremidad posterior derecha de ratones.

40 [0069] Se dividieron ratones ICR (hembras, 4 semanas de vida, 18-22 g) en dos grupos, cada grupo constaba de 10 ratones. El peso de cada ratón se midió y registró con precisión. Cada uno del producto comercial y la subfracción pII se llenaron en una jeringa Hamilton de 50 µl a una concentración de 1 U/20 µl en ausencia de aire, y a continuación se introdujo la aguja de la jeringa en el tobillo pata posterior derecha de cada ratón ICR hasta una profundidad de aproximadamente 3 cm, y cada uno del producto comercial y la subfracción se inyectó en los músculos de cada ratón. Después de la inyección en los músculos, se observó visualmente el grado de parálisis de los ratones con el fin de determinar la propagación in vivo del producto comercial y la subfracción. La figura 5 muestra el estado de los ratones fotografiados a las 12 horas después de la inyección, y la figura 6 muestra la tasa de supervivencia de los ratones en función de la dosis y tiempo de administración. Además, la figura 7 muestra el momento de la iniciación del efecto paralizante de los músculos, y la figura 8 muestra el tiempo de duración del efecto paralizante de los músculos.

50

[0070] Como puede verse en la figura 5, la subfracción pII paralizó solamente la extremidad posterior derecha en la que se inyectó por vía intramuscular, pero el producto comercial se propagó y paralizó la cintura y la extremidad



opuesta.

5 **[0071]** Como puede verse en la figura 6, la subfracción pII mostró un aumento significativo en la dosis frente a la tasa de supervivencia en comparación con el producto comercial (figura 6A), y la tasa de supervivencia a una dosis de 2 U fue del 100% para la subfracción pII y del 0% para el producto comercial, que difieren extremadamente entre sí (figura 6B).

10 **[0072]** Como puede verse en la figura 7, la subfracción pII inició el efecto paralizante de los músculos a una dosis de 1 U dentro de un período de tiempo significativamente corto en comparación con el producto comercial.

**[0073]** Como puede verse en la figura 8, el tiempo de duración del efecto paralizante de los músculos de la subfracción pII era más largo que el del producto comercial por 80 días o más a una dosis de 0,5 U.

15 Ejemplo de Ensayo 3: Análisis del contenido de iones de toxinas botulínicas liofilizadas

**[0074]** Un producto comercial (Botox de Allergan) y la subfracción pII obtenida en el Ejemplo 1 se liofilizaron y se analizó el contenido de iones de los mismos.

20 **[0075]** Para la comparación con el producto comercial, la fracción pII diluida y la misma cantidad de toxina botulínica (100 U) se liofilizaron con aditivos, y se utilizó una prueba letal de ratón para confirmar que los productos liofilizados del producto comercial y la subfracción pII tenían la misma actividad, después de lo cual se analizó el contenido de iones de los productos liofilizados. Específicamente, cada uno de los dos productos liofilizados se disolvió en 10 ml de agua destilada, y a continuación se midió el contenido de iones de los mismos usando un espectrómetro de masas de plasma acoplado inductivamente. Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 7 a continuación.

25

[Tabla 7]

	Mg	Fe	Zn
pII	183,0 ± 19,3*	105,4 ± 22,1**	332,6 ± 140,8***
Producto comercial	78,1 ± 7,4*	39,6 ± 3,3	65,6 ± 25,9
*p < 0,0015, ** p < 0,011, ***p < 0,045			

30 **[0076]** Como puede verse en la Tabla 7 anterior, el contenido de Mg, Fe y Zn en el producto liofilizado de la toxina botulínica sin propagación (fracción PII) purificadaa por la presente invención fue significativamente mayor que el del producto comercial.

35 **[0077]** Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han descrito con fines ilustrativos, los expertos en la técnica entenderá que son posibles diversas modificaciones, adiciones y sustituciones, sin apartarse del alcance de la invención, tal como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

**Aplicabilidad industrial**

40 **[0078]** Según la presente invención, se puede obtener en grandes cantidades una toxina botulínica sin propagación que causa parálisis muscular localizada. Esta toxina botulínica sin propagación causa parálisis muscular en un área deseada, no se propaga a áreas distintas del área deseada y tiene el efecto de paralizar los músculos de una manera rápida y duradera.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para purificar una toxina botulínica sin propagación, que comprende las etapas de:  
5 separar el producto de toxina botulínica de tipo A en subfracciones mediante la realización de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de pH 4,5 a 5,5 y 0,02-0,2 M de cloruro de sodio (NaCl); y recoger una subfracción de toxina botulínica sin propagación que tiene un valor de A260/A280 de 0,4-0,6, a partir de dichas subfracciones separadas.
- 10 2. Preparación de toxina botulínica sin propagación, que se purifica mediante el procedimiento anterior, que comprende concentraciones de iones Zn, Fe y Mg de al menos 150, 80, y 140 ppb por 100 U, respectivamente.
- 15 3. Procedimiento para determinar una toxina botulínica sin propagación, que comprende la inyección de la preparación de toxina botulínica sin propagación, según la reivindicación 2, en el músculo de la pantorrilla de la extremidad posterior izquierda o derecha del ratón (4-6 semanas de vida, 18-22 g de peso) en una cantidad equivalente a 1,5-3 veces la LD<sub>50</sub> de la toxina; y determinar si los músculos de la extremidad posterior inyectados y los músculos respiratorios del ratón se paralizaron y si el ratón murió.
- 20 4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que la preparación de toxina botulínica sin propagación muestra una tasa de supervivencia de al menos el 80% a las 96 horas después de la inyección de 2 U de una preparación de toxina en el volumen 50 µl en el músculo de la pantorrilla de la extremidad posterior izquierda o derecha del ratón (4-6 semanas de vida, 18-22 g de peso).

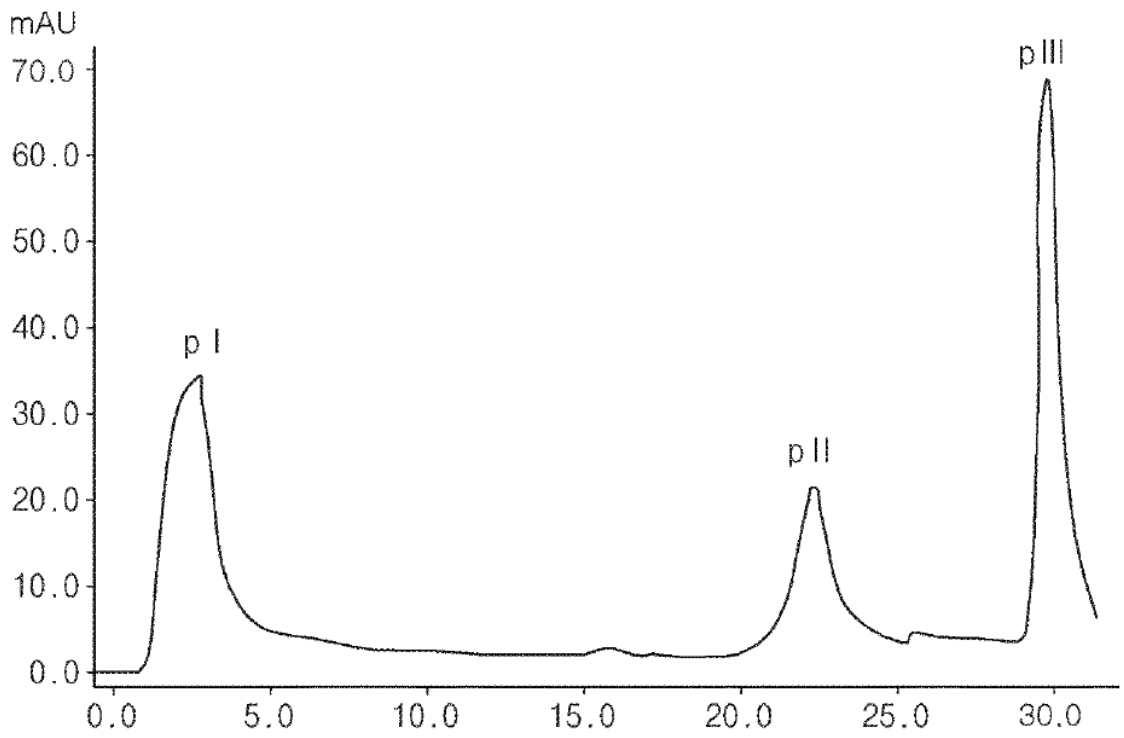


Figura 1

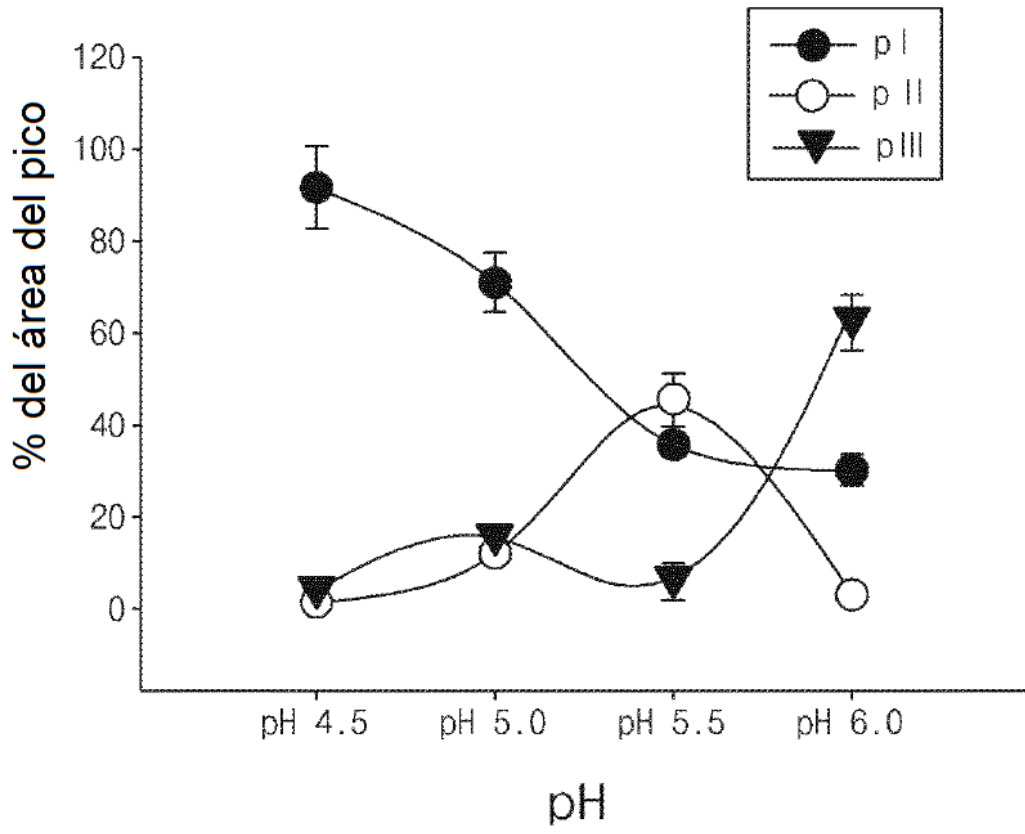


Figura 2

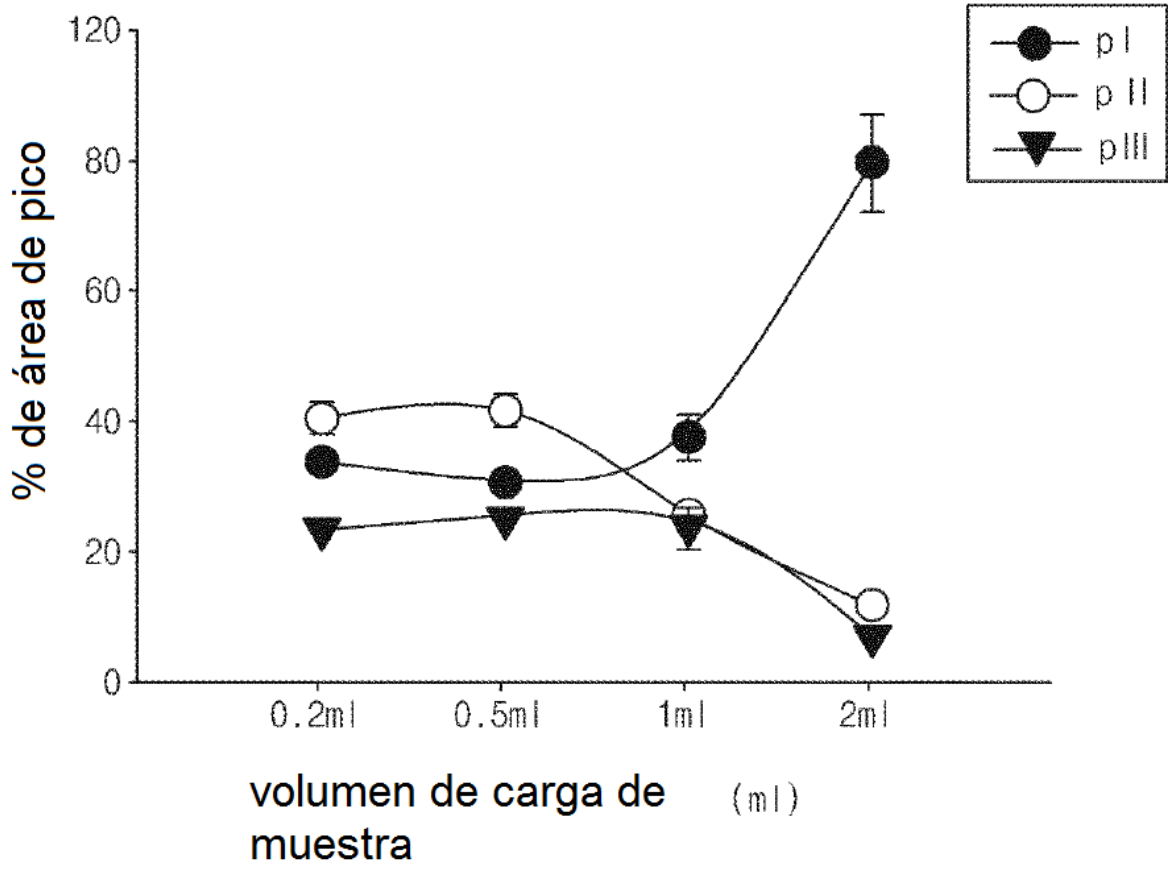
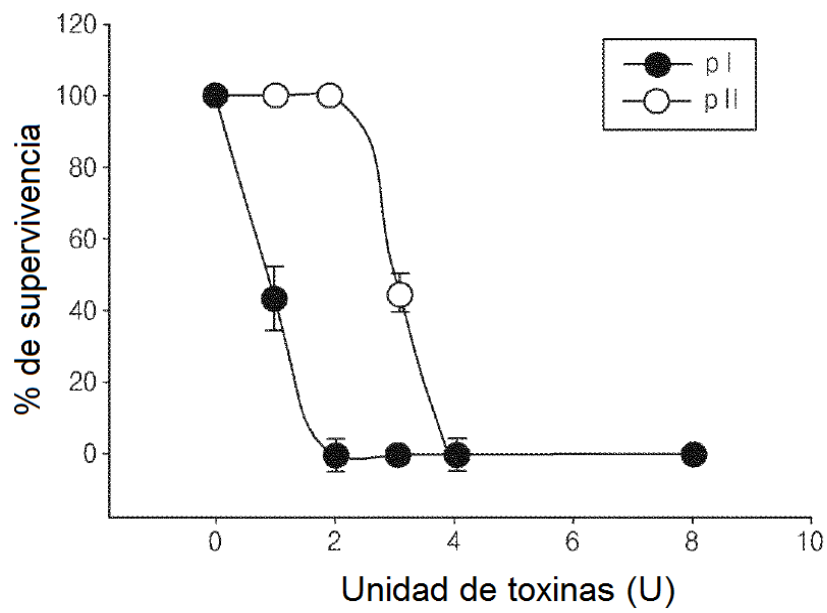


Figura 3

(A)



(B)

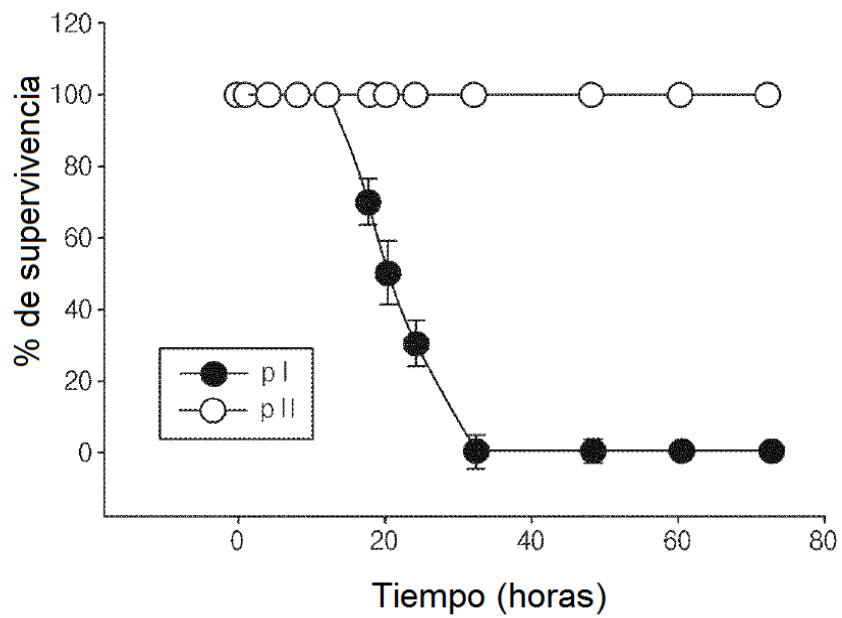
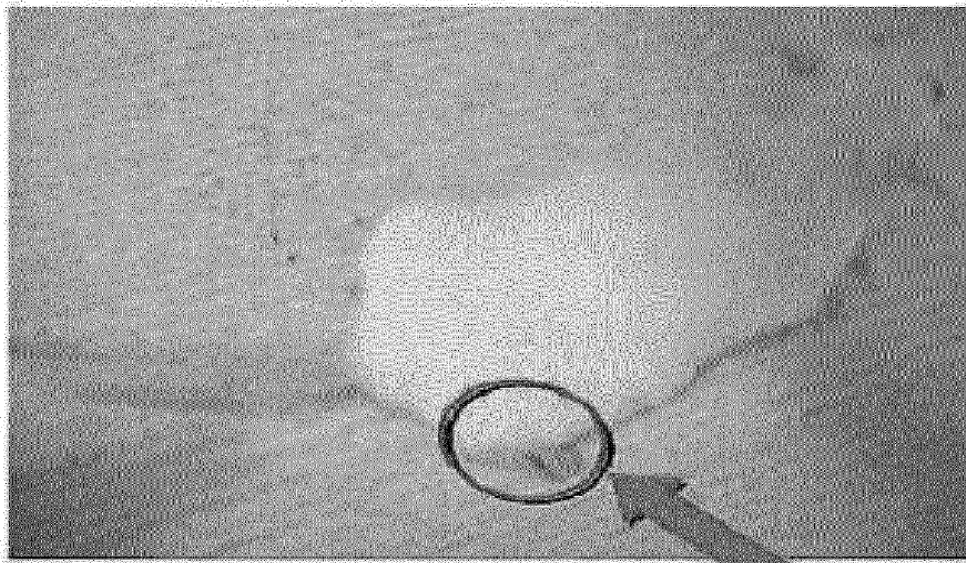
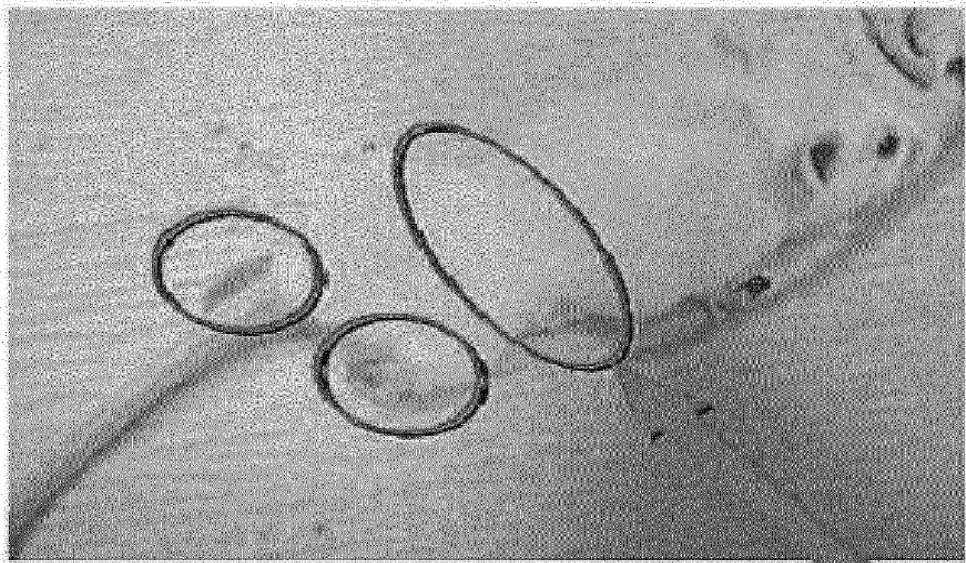


Figura 4



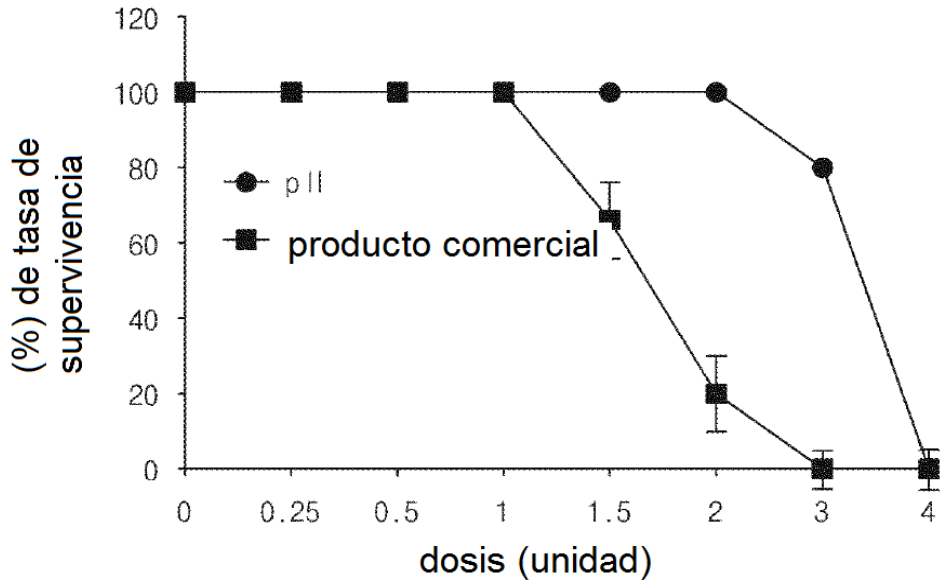
(A)



(B)

Figura 5

(A)



(B)

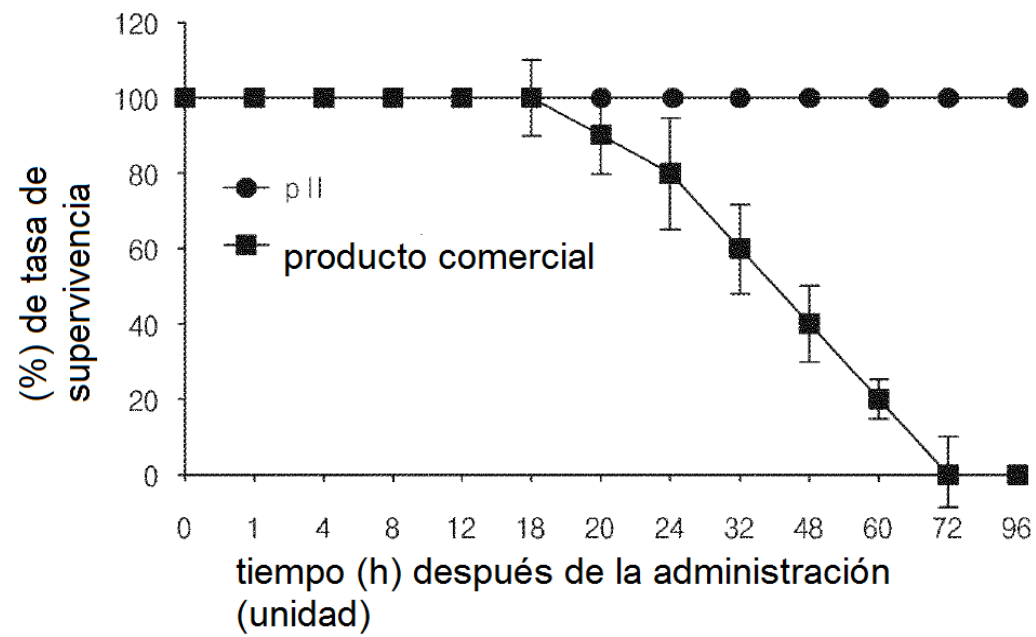


Figura 6



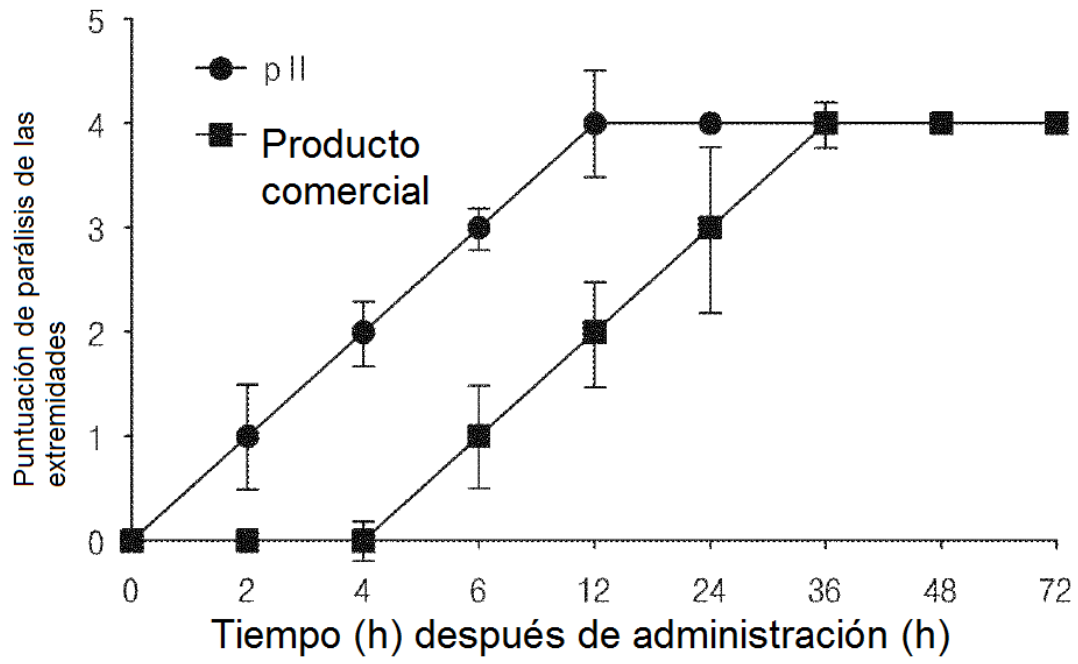


Figura 7

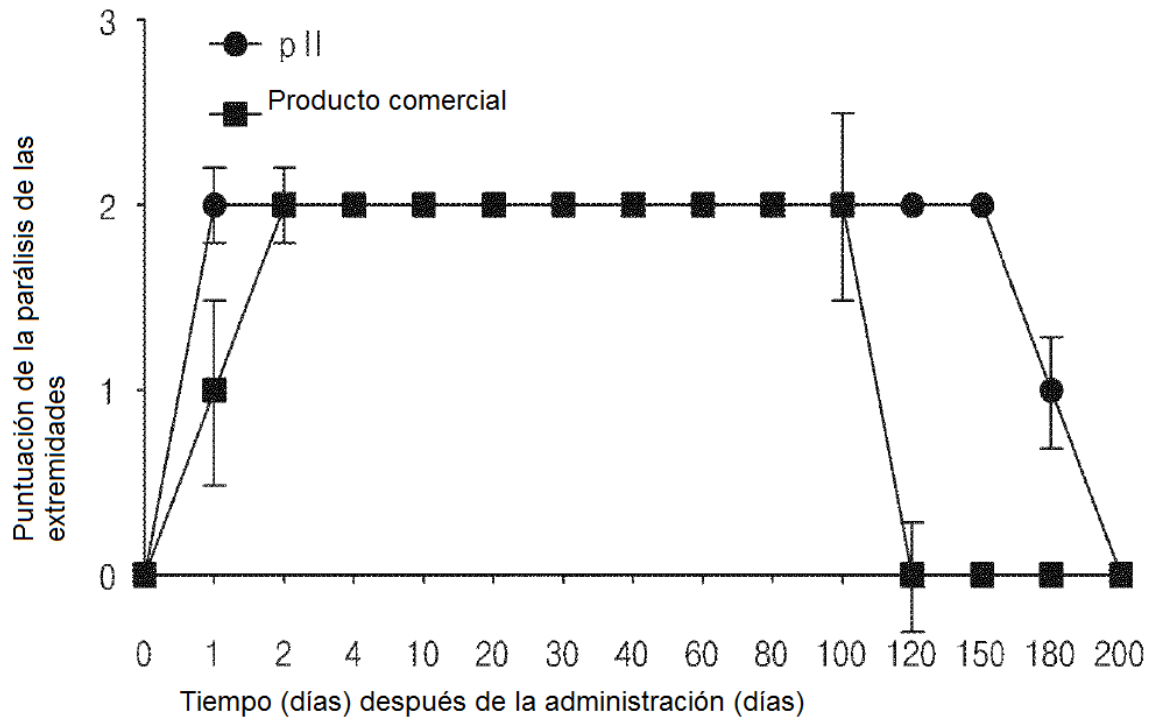


Figura 8