

ESCOBAR - URIBE ASOCIADOS

A B O G A D O S

Carrera 11A No. 94-76 Of. 305 - P.O. Box 94948, Santafé de Bogotá, Colombia, S.A.

Tels.: (571) 6162051 - 616

Fax: (57)

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00042305 00000001

Folios: 35

Fecha (AMD): 2000-09-05 15:55:46

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 325 COMPLETEN

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

2346/P

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. [REDACTED]

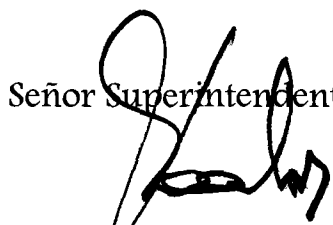
Solicitud de Patente en nombre de

BioteCon Gesellschaft für Biotechnologische Entwicklung und Consulting mbH

Yo, IGNACIO ESCOBAR URIBE, identificado como aparece al pie de mi firma, domiciliado en Santafé de Bogotá, en la carrera 11 A No. 94-76 Of. 305, obrando como apoderado de la sociedad BioteCon Gesellschaft für Biotechnologische Entwicklung und Consulting mbH solicitante de la patente de la referencia, anexo al presente memorial el siguiente documento:

Copia certificada de la solicitud de Patente Número 199 25 739.6 presentada en Alemania el día 7 de junio de 1999, con la debida traducción de lo pertinente, incluyendo el capítulo reivindicatorio.

Señor Superintendente,



IGNACIO ESCOBAR URIBE
C.C. 2.886.770 de Bogotá
T.P. 12.772

35

32

REPUBLICA FEDERAL DE ALEMANIA

[Emblemal

Certificado de Prioridad para la presentación
de una Solicitud de Patente

Solicitud No.: 199 25 739.6

Fecha de presentación: 7 de Junio 1999

Solicitante/Proprietario: BioteCon Gesellschaft für Biotechnologische Entwicklung und
Consulting mbH,
Berlin/DE

Título: Agente terapéutico con una Neurotoxina-Botulínica

CIP: A 61 K 35/74

Los documentos adjuntos son una reproducción correcta y exacta de la documentación
original presentada para esta Solicitud de Patente.

Munich, 06 de Julio 2000
Oficina alemana de Patentes y Marcas
El Presidente

(Sello de la Oficina alemana
de Patentes y Marcas]

[Firma]

3

7 de junio de 1999/h1

N/Ref.: 10033

Nueva solicitud de patente alemana

BioteCon Gesellschaft für

Biotechnologische Entwicklung und Consulting mbH

Campo técnico de la invención

El complejo de toxinas de Clostridium botulinum del tipo A (M_r 900.000) es empleado desde hace varios años para el tratamiento de diversas distonías. Actualmente están autorizados dos preparados distintos para el tratamiento del blefarospasmo (espasmo de los párpados), de los espasmos hemifaciales y del espasmo rotatorio (Torticollis spasmodicus), se trata de BOTOX® y DYSPORT®. La terapia de otras enfermedades del sistema nervioso (espasticidades, migraña, lumbalgia, síndrome cervical, hipersalivación) está siendo examinada clínicamente en la actualidad. Los preparados se emplean además en indicaciones cosméticas tales como la hiperhidrosis y la formación pronunciada de arrugas en el ámbito de la cara.

Los complejos de toxina botulínica se componen de una mezcla de proteínas clostridiales. Estas son hemaglutininas con masas moleculares diferentes, una proteína no tóxica no hemaglutinante (M_r 120.000) y dos moléculas de neurotoxina

(Mr 150.000). Las mismas conforman un complejo suelto que es responsable de la toxicidad oral en intoxicaciones por alimentos. Contrariamente a lo que ocurre con la neurotoxina pura, el complejo resiste el medio ambiente agresivo del tracto gastrointestinal y posibilita la resorción enteral de la neurotoxina, la que alcanza las células de destino a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático y desencadena allí un bloqueo de la liberación de transmisores. Se llega así a la parálisis de la musculatura estriada y lisa y a la extinción de diversas funciones vegetativas. Los pacientes intoxicados mueren de una insuficiencia de la musculatura respiratoria. Debido a que la neurotoxina pura se descompone en el tracto gastrointestinal y por lo tanto no se resorve enteralmente, no es venenosa después de su ingestión. Aplicados parenteralmente, no se diferencian los efectos del complejo de los efectos de la neurotoxina debido a que el complejo se desintegra en el tejido en sus partes componentes y solo la neurotoxina es absorbida en las células de destino.

Para la aplicación terapéutica, el complejo se inyecta directamente en los músculos distónicos o espásticos, donde la neurotoxina es liberada del complejo y provoca la acción farmacológica deseada. A pesar de que el complejo es aplicado solo en dosis sumamente reducidas (1-25 ng, según la indicación y el tamaño del músculo) después de inyecciones

reiteradas, se llega en un número considerable de pacientes a la formación de anticuerpos específicos neutralizadores que también están dirigidos contra la neurotoxina. Estos pacientes ya no reaccionan a ninguno de los dos preparados. Ellos podrían ser tratados con otros subtipos de toxina, de los cuales sin embargo ninguno está autorizado para ser empleado terapéuticamente.

La formación de anticuerpos específicos se ve beneficiada por dos factores. Por un lado, la neurotoxina, fijada en el complejo, queda depositada por un largo lapso de tiempo en el tejido y puede activar las células inmunizantes que migran hacia el tejido, a fin de que formen anticuerpos. El largo tiempo de residencia no lleva a una absorción incrementada en las células de destino debido a que células intoxicadas ya no pueden absorber la toxina. La toxina que se disocia lentamente del complejo es por lo tanto ya solo efectiva inmunológicamente. Por el otro lado, las proteínas contenidas en el complejo refuerzan una respuesta inmunológica. Las hemaglutininas son lectinas, proteínas que se destacan por una alta afinidad a ciertos azúcares. A raíz de su enlace a estructuras sacáricas, las lectinas actúan de manera inmunoestimulante. Así pudo ser demostrado que la lectina concanavalina A, la fitohemaglutinina y los mitógenos de *Phytolacca* activan los linfocitos T y B. Las hemaglutininas del complejo de toxina botulínica, que igualmente se enlazan

a azúcares presentes en las membranas, pueden funcionar por lo tanto de manera similar como adyuvantes inmunológicos y contribuir a la formación de anticuerpos y con ello al fracaso de la terapia.

Como alternativa a los dos preparados comerciales de complejos de toxina botulínica, BOTOX® y DYSPORT®, se desarrolló un nuevo medicamento que contiene solo neurotoxina pura y que está libre de hemaglutininas y otras proteínas ajenas al cuerpo. Debido a su masa molecular reducida, se difunde más rápidamente hacia las células de destino, en las que es absorbido antes de que se activen células inmunológicas atraídas por hemaglutininas. En estudios de antigenidad encontramos que este preparado, a diferencia de los preparados comerciales, no desencadena la formación de anticuerpos. En la aplicación terapéutica de este nuevo medicamento desarrollado, aún después de repetidas aplicaciones, no se debería llegar a un fracaso de la terapia condicionado por la formación de anticuerpos. Por otro lado pudo ser demostrado que la neurotoxina pura, debido a su inmediata biodisponibilidad, es apropiada también para la terapia de pacientes que bajo el tratamiento con BOTOX® o DYSPORT®, han desarrollado un índice de anticuerpos.

Descripción del invento

De acuerdo con otra forma de realización, el invento se refiere a un agente terapéutico caracterizado por una neuro-

toxina botulínica de *Clostridium botulinum* del Tipo A, libre de otras proteínas del complejo de toxinas botulínicas, en particular libre de hemaglutinas y de proteínas no-tóxicas no-hemaglutinantes.

De acuerdo con otra forma de realización, el invento se refiere a un agente terapéutico, caracterizado por una neurotoxina botulínica de *Clostridium botulinum* del Tipo B, C, en particular C1, D, e, F y/o G, libre de otras proteínas del complejo botulínico, en particular libre de hemaglutinas y proteínas no-tóxicas no-metaglutinantes.

Este agente terapéutico puede ser caracterizado por una neurotoxina botulínica de *Clostridium botulinum* Tipo B.

Un agente terapéutico de acuerdo con el invento puede estar caracterizado por una neurotoxina botulínica obtenida de manera en sí conocida o por una neurotoxina botulínica recombinante.

Un agente terapéutico de acuerdo con el invento puede estar caracterizado por una neurotoxina botulínica de un grado de pureza (neurotoxina botulínica altamente pura) que en comparación con su complejo de toxina botulinica, no produce o lo hace de manera muy reducida, una inducción de anticuerpos neutralizadores.

Además, puede presentarse un agente terapéutico como preparado liofilizado con un contenido facultativo de una

sustancia terapéutica habitual de soporte, de un diluyente y/o sustancia auxiliar.

Un agente terapéutico de acuerdo con el invento puede también presentarse en forma de preparado líquido, en particular como preparado para infusión, preferentemente en base acuosa, dado el caso obtenible por incorporación de un preparado de acuerdo con el invento liofilizado en agua o en sustancia salina.

Un agente terapéutico de acuerdo con el invento puede estar previsto para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso.

Un agente terapéutico de acuerdo con el invento puede además estar previsto para el tratamiento de "Secondary Non-Responders".

Un agente terapéutico de acuerdo con el invento puede además estar previsto para el tratamiento de

- distonias, en particular Torticollis spasmodicus o Blepharospasmus,
- espasmocidades, en particular el pie equino,
- espasmos hemifaciales,
- migraña,
- lumbalgia,
- síndrome cervical o
- hipersalivación.

El agente terapéutico de acuerdo con el invento puede estar previsto para indicaciones cosméticas, en particular para la hiperhidrosis o la formación de arrugas, en particular en el ámbito de la cara.

El agente terapéutico de acuerdo con el invento puede estar previsto para la terapia de pacientes con han desarrollado anticuerpos neutralizadores contra un complejo botulínico.

Un agente terapéutico con una neurotoxina botulínica de Clostridium botulinum Tipo B de acuerdo con el invento puede estar previsto para el tratamiento de pacientes con anticuerpos neutralizadores contra un complejo de toxina botulínica de Clostridium botulinum Tipo B.

Ejemplo 1:

A 20 conejos les fueron inyectados intracutáneamente 25 U de BOTOX® durante un lapso de 12 semanas, a intervalos de 14 días (5 inyecciones). Después de 3 semanas y luego a intervalos de 14 días se les extrajo suero.

Los anticuerpos contra Clostridium botulinum neurotoxina A fueron determinados con un inmunoensayo enzimático, estando la neurotoxina homogénea inmovilizada sobre una placa de microíndice. Los anticuerpos enlazados a la neurotoxina fueron cuantificados mediante un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente.

El resultado está volcado en la Tabla 1. En los sueros de 17 conejos pudieron ser determinados anticuerpos después de 11 semanas. En el test de actividad biológica se demostró que 12 de los 17 sueros contenían anticuerpos neutralizadores (Tabla 2).

Tabla 1 Determinación de muestras de suero (diluidas 1:100) de conejos que fueron tratados con BOTOX® Están indicados $DO_{490nm} > 0.1$. Todos los valores DO están corregidos con los valores DO de los sueros preinmunes (DO alrededor de 0,150).

Conejo N°	3° semana	5° semana	7° semana	9° semana	11° semana
1	-	-	-	0,11	0,36
2	-	-	-	2,36	2,23
3	-	-	0,57	1,43	1,44
4	-	-	0,68	1,68	0,93
5	-	0,97	3,52	3,49	3,44
6	-	-	1,34	2,32	2,70
7	-	-	2,13	3,09	3,00
8*	-	0,53	1,47	2,75	2,75
9	-	-	0,43	2,44	2,85
10	-	-	2,99	3,15	2,73
11	-	0,10	2,42	2,45	1,93
12	-	-	-	1,13	1,95

44
 8
 41

13	-	-	-	-	1,89
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	2,93	3,62	3,72	3,44
18	-	-	1,18	2,28	2,62
19	-	-	0,43	0,43	0,81
20	-	1,65	3,20	2,97	2,88

* Los valores no fueron corregidos debido a que no estaba disponible el suero preinmune

Tabla 2 Neutralización mediante sueros de conejos que fueron tratados con BOTOX® (semana 11 después de la primera inmunización) en el ensayo de hemidiafragma de ratones (Límite de detección: 0,35 mU de anticuerpo)

Conejo	Neutralización mU/ml
1	2,0 mU
2	n.d.
3	n.d.
4	> 10 mU
5	> 100 mU
6	n.d.

7	> 10 mU
8	> 10 mU
9	n.d.
10	n.d.
11	n.d.
12	> 10 mU
13	n.d.
14	n.d.
15	< 0,35 mU
16	0,4 mU
17	> 10 mU
18	> 10 mU
19	2,0 mU
20	> 10 mU

n.d. = no determinado

Ejemplo 2:

Después de que fuera demostrado que el complejo consistente de neurotoxina y hemaglutinina y la proteína no tóxica, no hemaglutinante desencadena la formación de anticuerpos neutralizadores, se examinó la acción inmunogénica de la neurotoxina pura. Para ello se trataron 8 conejos con el complejo de toxina y 12 conejos con la toxina pura. Después del procedimiento descrito anteriormente (véase el Ejemplo 1)

fueron aplicados intracutáneamente 25 U de cada preparado. La cantidad de neurotoxina, medida como peso, fue igual en ambos preparados (200 pg/dosis), como se demostró en un ELISA (inmunoensayo enzimático). El producto BOTOX® contenía adicionalmente proteínas de complejo (alrededor de 800 pg/dosis).

Cuatro de los ocho conejos tratados con BOTOX® mostraron en el ELISA un índice de anticuerpos, mientras que en los 12 animales tratados con neurotoxina pura no pudieron ser detectados anticuerpos contra la neurotoxina pura. El resultado fue confirmado en el test de actividad biológica. Todos los sueros de los cuatro conejos contenían índices de anticuerpos neutralizadores que impedían el efecto de la toxina (Tabla 3).

Tabla 3 Neutralización por sueros (diluidos 1:3) de conejos, que fueron tratados con BOTOX® (11 semanas después de la primera inmunización) en el ensayo de hemidiafragma de ratones (Límite de detección: 1 mU de anticuerpo)

Conejo	Neutralización
1	12 mU
2	> 30 mU
3	4.5 mU
8	> 30 mU

47

41

44

Ejemplo 3:

En este experimento se comparó la formación de anticuerpos por BOTOX® con la formación por DYSPORT®. Para ello se trataron cada vez diez conejos con BOTOX® (grupo 1), con DYSPORT® (grupo 2) o con una neurotoxina pura (grupo 3) de acuerdo con el esquema descripto.

Mientras que en los grupos 1 y 2 más del 50% de los animales formaron un índice de anticuerpos neutralizadores, los sueros de los animales del grupo 3 estaban libres de anticuerpos.

Ejemplo 4:

Un paciente (edad 45 años) que fue tratado durante un período de 5 años con BOTOX® por un cuadro de Torticollis spasmodicus, había desarrollado un índice de anticuerpos de 3 mU/ml de suero. En este paciente, ni BOTOX® ni DYSPORT® eran efectivos desde el punto de vista terapéutico. Un ensayo terapéutico con neurotoxina botulínica pura en una dosis de 145 unidades, que era equivalente a la última dosis inyectada de BOTOX®, produjo, dentro de las 72 horas, el aflojamiento del músculo, la normalización de la postura de la cabeza y la desaparición del dolor muscular. No se presentaron efectos indeseados.

Ejemplo 5:

45

42

45

Un paciente (edad 52 años) fue tratado durante 3 años por paresia cerebral con BOTOX®. Había desarrollado un índice de anticuerpos de 10 mU/ml de suero, la terapia tuvo por ello que ser interrumpida. La inyección de 200 unidades de neurotoxina pura posibilitó una terapia exitosa.

Bibliografía

- Ahner-Hilger G., Bigalke H (1995)
Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning.
Progress in Neurobiology 46: 83-96
Benecke R., Kessler K.R. (1995)
Botulinumtoxin A
Akt. Neurol. 22: 209-213
Binscheck T., Wellhöner H.H. (1997)
Tetanus und botulinum toxins - zinc proteases -
synaptotagmin - exocytosis.
Ing. Toxins and signal transduction
(Eds.: Butman Y., Lazarovici P.) 1: 457-487
Binz, T., Kurazono, H., M., Frevert, J., Wernars, K. &
Niemann, H. (1990)
The complete sequence of botulinum toxin A and comparison
with other clostridial neurotoxins
J. Biol. Chem. 265: 9153-9158
Cardoso, F. & Jancovic, J. (1995)
Clinical use of botulinum neurotoxins

Current Topics Microbiol. Immunol. 195: 123-141

Marxen P., Fuhrmann U., Bigalke H. (1989)

Gangliosides mediate inhibitory effects of tetanus and
botulinum A neurotoxins on exocytosis in chromaffin cells.

Toxicon 27: 849-859

~~50~~

~~14~~

47

Resumen

El invento se refiere a un agente terapéutico con una neurotoxina botulínica.

51

48

7 de junio de 1999/hl

N/Ref.: 10033

Nueva solicitud de patente alemana

BioteCon Gesellschaft für

Biotechnologische Entwicklung und Consulting mbH

Reivindicaciones

1. Agente terapéutico caracterizado por una neurotoxina botulínica de *Clostridium botulinum* del Tipo A, libre de proteínas del complejo de toxina botulínica, en particular libre de hemaglutininas y de proteínas no-tóxicas, no-hemaglutinantes.

2.- Agente terapéutico, caracterizado por una neurotoxina botulínica de *Clostridium botulinum* del Tipo B, C, en particular C1, D, e, F y/o G, libre de proteínas del complejo botulínico, en particular libre de hemaglutinas y de proteínas no-tóxicas, n-hemaglutinantes.

3. Agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por una neurotoxina botulínica de *Clostridium botulinum* del Tipo B.

4.- Agente terapéutico de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por la neurotoxina botulínica es una neurotoxina natural o recombinante.

5.- Agente terapéutico de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por una neurotoxina

botulínica de un grado de pureza (neurotoxina botulínica áltamente pura) que no producen o, en comparación con su complejo de neurotoxina botulínica, producen solo una inducción disminuída de anticuerpos neutralizadores.

6.- Agente terapéutico de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes como preparado liofilizado con un contenido facultativo de sustancia habitual terapéutica de soporte, diluyente y/o auxiliar.

7.- Agente terapéutico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 á 5, como preparado líquido, en particular como preparado para infusión, preferentemente sobre base acuosa, dado el caso obtenible por introducción del agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 6 en agua o sustancia salina.

8.- Agente terapéutico de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso.

9.- Agente terapéutico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 á 7 para el tratamiento de "Secondary Non-Responders".

10.- Agente terapéutico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 á 6 para el tratamiento de

- distonías, en particular Torticollis spasmodicus o Blepharospasmus
- espasmocidades, en particular el pie equino

- 53
✓
SD
- espasmos hemifaciales,
 - migraña,
 - lumbalgia,
 - síndrome cervical o
 - hipersalivación.

11.- Agente terapéutico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 á 7 para el tratamiento cosmético, en particular la hiperhidrosis o la marcada formación de arrugas en el ámbito del rostro.

12.- Agente terapéutico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 á 7 para el tratamiento de pacientes con anticuerpos neutralizadores frente a un complejo botulínico.

13.- Agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1 para el tratamiento de pacientes con anticuerpos neutralizadores frente a un complejo de toxina botulínica de *Clostridium botulinum* del Tipo A.

14.- Agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 3 para el tratamiento de pacientes con anticuerpos neutralizadores frente a un complejo de toxina botulínica de *Clostridium botulinum* del Tipo B.



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 25 739.6

Anmeldetag: 07. Juni 1999

Anmelder/Inhaber: BioteCon Gesellschaft für Biotechnologische
Entwicklung und Consulting mbH,
Berlin/DE

Bezeichnung: Therapeutikum mit einem Botulinum-
Neurotoxin

IPC: A 61 K 35/74

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.**

München, den 06. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurko



52

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Therapeutikum mit einem Botulinum-Neurotoxin.

53

7. Juni 1999/hl

✓
Unser Zeichen: 10033
Neue deutsche Patentanmeldung
BioteCon Gesellschaft für
Biotechnologische Entwicklung und Consulting mbH

Hintergrund der Erfindung

15
Clostridium botulinum Toxinkomplex Typ A (M, 900.000) wird seit mehreren Jahren zur Therapie verschiedener Dystonien eingesetzt. Derzeit sind zwei verschiedene Präparate für die Behandlung des *Blepharospasmus*, hämifacialer Spasmen und des *Torticollis spasmodicus* zugelassen, und zwar BOTOX® und DYSPORT®. Die Therapie weiterer Erkrankungen des Nervensystems (z. B. Spastizitäten, Migräne, Lumbalgie, Cervicalsyndrom, Hypersalivation) wird derzeit klinisch geprüft. Die Präparate werden außerdem bei kosmetischen Indikationen wie z. B. Hyperhydrose und ausgeprägter Faltenbildung im Gesichtsbereich eingesetzt.

Botullinumtoxin-Komplexe setzen sich aus einem Gemisch clostridieller Proteine zusammen. Dies sind Hämagglutinine mit unterschiedlichen Molekularmassen, ein nicht-toxisches, nicht-hämagglutinierendes Protein (M, 120.000) und zwei Neurotoxinmoleküle (M, 150.000). Sie bilden einen losen Komplex, der für die orale Toxizität bei Lebensmittelintoxikationen verantwortlich ist. Im Gegensatz zum reinen Neurotoxin widersteht der Komplex dem aggressiven Milieu im Magen-Darm-Trakt und ermöglicht die enterale Resorption des Neurotoxins, welches über den Blutkreislauf oder das Lymphsystem die Zielzellen erreicht und dort eine Blockade der Transmitterfreisetzung auslöst. Daraufhin kommt es zur Paralyse der quergestreiften und glatten Muskulatur und zum Versiegen verschiedener vegetativer Funktionen. Vergiftete Patienten sterben an einer Insuffizienz der respiratorischen Muskulatur. Da das reine Neurotoxin im Ma-

54

2

gen-Darm-Trakt abgebaut und somit nicht enteral resorbiert wird, ist es nach einer Ingestion nicht giftig. Parenteral appliziert unterscheiden sich die Wirkungen des Komplexes nicht von den Wirkungen des Neurotoxins, denn der Komplex zerfällt im Gewebe in seine Bestandteile, und nur das Neurotoxin wird in die Zielzellen aufgenommen.

Zur therapeutischen Anwendung wird der Komplex direkt in dystone oder spastische Muskel injiziert, wo das Neurotoxin aus dem Komplex freigesetzt wird und die erwünschte pharmakologische Wirkung hervorruft. Obwohl der Komplex nur in äußerst geringen Dosen appliziert wird (1-25ng, je nach Indikation und Größe des betroffenen Muskels), kommt es nach wiederholten Injektionen bei einer beträchtlichen Anzahl der Patienten zur Bildung von spezifischen, neutralisierenden Antikörpern, die auch gegen das Neurotoxin gerichtet sind. Diese Patienten sprechen auf keines der beiden Präparate mehr an. Sie könnten aber mit anderen Toxinsubtypen behandelt werden, von denen allerdings keiner zur Therapie zugelassen ist.

Die Bildung von spezifischen Antikörpern wird durch zwei Faktoren begünstigt. Zum einen bleibt das Neurotoxin, fixiert im Komplex, über einen langen Zeitraum im Gewebe liegen und kann ins Gewebe hineinwandernde Immunzellen zur Antikörperbildung aktivieren. Die lange Verweildauer führt nicht zu einer gesteigerten Aufnahme in die Zielzellen, denn vergiftete Zellen können kein Toxin mehr aufnehmen. Das langsam aus dem Komplex herausdissoziierende Toxin ist also nur noch immunologisch wirksam. Zum anderen verstärken die im Komplex enthaltenden Proteine eine Immunantwort. Hämagglutine sind Lektine, Proteine, die sich durch eine hohe Affinität zu bestimmten Zuckern auszeichnen. Aufgrund ihrer Bindung an Zuckerstrukturen wirken Lektine immunstimulierend. So konnte gezeigt werden, daß die Lektine Concanavalin A, Phytohämagglutinin und Pokeweed Mitogen T- und B-Lymphozyten aktivieren. Die Hämagglutine des Botulinumtoxin-Komplexes, die ebenfalls an membranständige Zucker binden, können also in ähnlicher Weise als Immunadjuvantien fungieren und zur Antikörperbildung und damit zum Therapieversagen beitragen.

Als Alternative zu den beiden kommerziellen Präparaten aus Botulinumtoxinkomplex, BOTOX® und DYSPORT®, wurde ein neues Arzneimittel entwickelt, welches nur reines

Beschreibung der Erfindung

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Therapeutikum, **gekennzeichnet** durch ein Botulinum-Neurotoxin von Clostridium botulinum Typ A, frei von sonstigen Proteinen des Botulinumtoxin-Komplexes, insbesondere frei von Hämagglutininen und nicht-toxischen nicht-hämagglutinierenden Proteinen.

Dieses Therapeutikum kann durch ein Botulinum-Neurotoxin von *Clostridium botulinum* Typ B gekennzeichnet sein.

Ein Therapeutikum gemäß der Erfindung kann durch ein in an sich bekannter Weise gewonnenes Botulinum-Neurotoxin oder durch ein rekombinantes Botulinum-Neurotoxin gekennzeichnet sein.

56

Therapeutikum gemäß der Erfindung kann durch ein Botulinum-Neurotoxin eines Reinheitsgrades (hochreines Botulinum-Neurotoxin) gekennzeichnet sein, der zu keiner oder zu einer verminderten Induktion neutralisierender Antikörper führt, verglichen mit seinem Botulinumtoxin-Komplex.

Ferner kann ein Therapeutikum gemäß als lyophilisiertes Präparat mit einem fakultativen Gehalt an einem therapeutisch üblichen Träger, Verdünnungsmittel und/oder Hilfsstoff vorliegen.

Auch kann ein Therapeutikum gemäß der Erfindung als flüssiges Präparat vorliegen, insbesondere als Infusionspräparat, vorzugsweise auf wäßriger Basis, gegebenenfalls erhältlich durch Aufnahme eines erfindungsgemäßen lyophilisierten Präparats in Wasser oder Saline.

Ein erfindungsgemäßes Therapeutikum kann zur Therapie von Erkrankungen des Nervensystems vorgesehen sein.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Therapeutikum zur Therapie von Secondary Non-Responders vorgesehen sein.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Therapeutikum zur Therapie von

- Dystonien, insbesondere Torticollis spasmodicus oder Blepharospasmus,
 - Spastizitäten, insbesondere Spitzfuß,
 - hämifascialen Spasmen,
 - Migräne,
 - Lumbalgie,
 - Cervicalsyndrom oder
 - Hypersalivation
- vorgesehen sein.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Therapeutikum für kosmetische Indikation, insbesondere Hyperhydrose oder ausgeprägte Faltenbildung im Gesichtsbereich vorgesehen sein.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Therapeutikum zur Therapie von Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen einen Botulinum-Komplex vorgesehen sein.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Therapeutikum mit einem Botulinum-Neurotoxin von *Clostridium botulinum* Typ A zur Therapie von Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen einen Botulinumtoxin-Komplex von *Clostridium botulinum* Typ A vorgesehen sein.

Schließlich kann ein erfindungsgemäßes Therapeutikum mit einem Botulinum-Neurotoxin von *Clostridium botulinum* Typ B zur Therapie von Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen einen Botulinumtoxin-Komplex von *Clostridium botulinum* Typ B vorgesehen sein.

Beispiel 1

20 Kaninchen wurden 25 U BOTOX®, über einen Zeitraum von 12 Wochen im Abstand von 14 Tagen (5 Injektionen) intracutan injiziert. Nach 3 Wochen und im weiteren im Abstand von 14 Tagen wurde Serum gewonnen.

Antikörper gegen *Clostridium botulinum* Toxin A wurden mit einem Enzymimmunoassay nachgewiesen, in dem das homogene Neurotoxin auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert war. An das Neurotoxin bindende Antikörper wurden mittels eines zweiten, enzymmarkierten Antikörpers quantifiziert.

Das Ergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt. In Seren von 17 Tiere konnten nach 11 Wochen Antikörper nachgewiesen werden. Im biologischen Aktivitätstest wurde gezeigt, daß 12 der 17 Seren neutralisierende Antikörper enthielten (Tab. 2).

58

6

Tab. 1 Bestimmung von Serumproben (1:100 verdünnt) aus Kaninchen, die mit BOTOX® behandelt wurden. O. D._{490nm} > 0.1 sind angegeben. Alle O. D. Werte sind korrigiert mit den O. D. Werten der Präimmunseren (O.D. ca. 0,150).

Kanin. Nr.	3. Woche	5. Woche	7. Woche	9. Woche	11. Woche
1	-	-	-	0,11	0,36
2	-	-	-	2,36	2,23
3	-	-	0,57	1,43	1,44
4	-	-	0,68	1,68	0,93
5	-	0,97	3,52	3,49	3,44
6	-	-	1,34	2,32	2,70
7	-	-	2,13	3,09	3,00
8 *	-	0,53	1,47	2,75	2,75
9	-	-	0,43	2,44	2,85
10	-	-	2,99	3,15	2,73
11	-	0,10	2,42	2,45	1,93
12	-	-	-	1,13	1,95
13	-	-	-	-	1,89
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	2,93	3,62	3,72	3,44
18	-	-	1,18	2,28	2,62
19	-	-	0,43	0,43	0,81
20	-	1,65	3,20	2,97	2,88

*Werte wurden nicht korrigiert, da kein Präimmunserum vorhanden war.

59

7

Tab. 2 Neutralisierung durch Seren von Kaninchen, die mit BOTOX® (Woche 11 nach der ersten Immunisierung) im Maus-Hemidiaphragma-Assay (Nachweisgrenze: 0,35 mU Antikörper)

Kaninchen	Neutralisation
1	2,0 mU
2	n. d.
3	n. d.
4	> 10 mU
5	> 100 mU
6	n. d.
7	> 10 mU
8	> 10 mU
9	n. d.
10	n. d.
11	n. d.
12	> 10 mU
13	n. d.
14	n. d.
15	< 0,35 mU
16	0,4 mU
17	> 10 mU
18	> 10 mU
19	2,0 mU
20	> 10 mU

n. d. = nicht bestimmt

60

8

Beispiel 2

Nachdem gezeigt wurde, daß der Komplex aus Neurotoxin und Hämagglutininen und dem nicht-toxischen, nicht-hämagglutinierenden Proteinen die Bildung neutralisierende Antikörper auslöst, wurde die immunogene Wirkung des reinen Neurotoxins geprüft. Dazu wurden 8 Kaninchen mit dem Toxinkomplex und 12 Kaninchen mit dem reinen Toxin behandelt. Nach dem oben beschriebenen Verfahren (s. Beispiel 1) wurden 25U des jeweiligen Präparates intracutan appliziert. Die Menge an Neurotoxin, gemessen als Gewicht, war in beiden Präparaten gleich (200pg/Dosis), wie in einem ELISA nachgewiesen wurde. BOTOX® enthielt zusätzlich noch Komplexproteine (ca. 800 pg/Dosis).

Vier der acht mit BOTOX® behandelten Tiere zeigten im ELISA einen Antikörpertiter, während bei den 12 mit reinem Neurotoxin behandelten Tieren keine Antikörper gegen das reine Neurotoxin nachzuweisen waren. Das Ergebnis wurde im biologischen Aktivitätstest bestätigt. Alle vier Kaninchenserum enthielten neutralisierende Antikörper, die eine Toxinwirkung verhinderten (Tab. 3).

Tab. 3 Neutralisation durch Seren (1:3 verdünnt) von Kaninchen, die mit BOTOX® (Woche 11 nach der ersten Immunisierung) im Maus-Hemidiaphragma-Assay (Nachweisgrenze: 1 mU Antikörper)

Kaninchen	Neutralisation
1	12 mU
2	> 30 mU
3	4,5 mU
8	> 30 mU

61

Beispiel 3

In diesem Experiment wurde die Antikörperbildung durch BOTOX® mit der durch DYSPORT® verglichen. Hierzu wurden jeweils zehn Kaninchen entweder mit BOTOX® (Gruppe 1), mit DYSPORT® (Gruppe 2) oder mit dem reinen Neurotoxin (Gruppe 3) nach beschriebenem Schema behandelt.

Während in Gruppe 1, 2 mehr als 50 % der Tiere einen neutralisierende Antikörpertiter bildeten, waren die Seren aus den Tieren der Gruppe 3 frei von Antikörpern.

Beispiel 4

Ein Patient (Alter 45 Jahre) der über einen Zeitraum von 5 Jahren wegen eines *Torticollis spasmodicus* mit BOTOX® behandelt wurde, hatte einen Antikörpertiter von 3 mU/mL Serum entwickelt. Weder BOTOX® noch DYSPORT® waren bei diesem Patienten therapeutisch wirksam. Ein Therapieversuch mit dem reinen Botulinum Neurotoxins in einer Dosis von 145 Units, welche äquivalent der zuletzt injizierten Dosis von BOTOX® war, führte innerhalb von 72 Stunden zur Lockerung des Muskels, zur Normalisierung der Kopfhaltung und zum Verschwinden des Muskelschmerzes. Unerwünschte Wirkungen traten nicht auf.

Beispiel 5

Ein Patient (Alter 52 Jahre) wurde 3 Jahre wegen Cerebralparese mit BOTOX behandelt. Er hatte einen Antikörpertiter von 10 mU/mL Serum entwickelt, die Therapie mußte deshalb abgebrochen werden. Die Injektion von 200 Units reinen Neurotoxin ermöglichte eine erfolgreiche Therapie.

62

Literatur:

Ahnert-Hilger G., Bigalke H. (1995)
Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning.
Progress in Neurobiology 46: 83-96

Benecke R., Kessler K.R. (1995)
Botulinumtoxin A
Akt. Neurol. 22: 209-213

Binscheck T., Wellhöner H.H. (1997)
Tetanus and botulinum toxins - zinc proteases - synaptotagmin -
exocytosis.
In: Toxins and signal transduction
(Eds.: Gutman Y., Lazarovici P.) 1: 457-487

Binz, T. , Kurazono, H., M., Frevert, J. , Wernars, K. & Nie-
mann, H. (1990)
The complete sequence of botulinum toxin A and comparison with
other clostridial neurotoxins
J.Biol.Chem. 265: 9153-9158

Cardoso, F. & Jancovic, J. (1995)
Clinical use of botulinum neurotoxins
Current Topics Microbiol.Imunol. 195: 123-141

Marxen P., Fuhrmann U., Bigalke H. (1989)
Gangliosides mediate inhibitory effects of tetanus and botulinum
A neurotoxins on exocytosis in chromaffin
cells.
Toxicon 27: 849-859

63

7. Juni 1999/h1

Unser Zeichen: 10033
Neue deutsche Patentanmeldung
BioteCon Gesellschaft für
Biochnologische Entwicklung und Consulting mbH

Patentansprüche

1. Therapeutikum, gekennzeichnet durch ein Botulinum-Neurotoxin von Clostridium botulinum Typ A, frei von sonstigen Proteinen des Botulinumtoxin-Komplexes, insbesondere frei von Hämagglutinen und nicht-toxischen nicht-hämagglutinierenden Proteinen.
2. Therapeutikum, gekennzeichnet durch ein Botulinum-Neurotoxin von Clostridium botulinum Typ B, C, insbesondere C1, D, E, F und/oder G, frei von sonstigen Proteinen des Botulinum-Komplexes, insbesondere frei von Hämagglutinen und nicht-toxischen nicht-hämagglutinierenden Proteinen.
3. Therapeutikum nach Anspruch 2, gekennzeichnet durch ein Botulinum-Neurotoxin von Clostridium botulinum Typ B.

64

2

4. Therapeutikum nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß des Botulinum-Neurotoxin ein natürliches oder rekombinantes Neurotoxin ist.
5. Therapeutikum nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **ge-**
kennzeichnet durch ein Botulinum-Neurotoxin eines Reinheits-
grades (hochreines Botulinum-Neurotoxin), der zu keiner oder
zu einer verminderten Induktion neutralisierender Antikörper
führt, verglichen mit seinem Botulinumtoxin-Komplex.
6. Therapeutikum nach einem der vorhergehenden Ansprüche als
lyophilisiertes Präparat mit einem fakultativen Gehalt an
einem therapeutisch üblichen Träger, Verdünnungsmittel
und/oder Hilfsstoff.
7. Therapeutikum nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als flüssiges
Präparat, insbesondere als Infusionspräparat, vorzugsweise
auf wäßriger Basis, gegebenenfalls erhältlich durch Aufnahme
des Therapeutikums gemäß Anspruch 6 in Wasser oder Saline.
8. Therapeutikum nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur
Therapie von Erkrankungen des Nervensystems.
9. Therapeutikum nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Therapie
von Secondary Non-Responders.
10. Therapeutikum nach einem der Ansprüche 1 bis ⁷/₇ zur Therapie
von
 - Dystonien, insbesondere Torticollis spasmodicus oder
Blepharospasmus,
 - Spastizitäten, insbesondere Spitzfuß,
 - Hämifascialen Spasmen,

65

3

- Migräne,
 - Lumbalgie,
 - Cervicalsyndrom oder
 - Hypersalivation.
11. Therapeutikum nach einem der Ansprüche 1 bis 7 für kosmetische Indikation, insbesondere Hyperhydrose oder ausgeprägte Faltenbildung im Gesichtsbereich.
 12. Therapeutikum nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Therapie von Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen einen Botulinum-Komplex.
 13. Therapeutikum nach Anspruch 1 zur Therapie von Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen einen Botulinumtoxin-Komplex von Clostridium botulinum Typ A.
 14. Therapeutikum nach Anspruch 3 zur Therapie von Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen einen Botulinumtoxin-Komplex von Clostridium botulinum Typ B.