



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-28609

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO Neurotoxinas clastidiales para uso en
caracterización de tejidos

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/08 A61P 17/02

71. SOLICITANTE HEIZ PHARMA GMBH & CO. KGAA

DOMICILIO Frankfurt am Main, Alemania

74. APODERADO Dalia Rodríguez D'Aleuain

22. BOGOTÁ, D. C., Mayo 22, 2007

F.N. 27-04-2109

Cesar

(FORMA P-10)



**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: MERZ PHARMA GMBH & CO KGAA Dirección: Eckenheimer Landstrasse 100, 60318 Frankfurt am Main, Alemania Nacionalidad o domicilio: Frankfurt am Main, Alemania Lugar de constitución: Alemania		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☒ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
	Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: MARSDEN, John, Christopher Dirección: Frank B Dehn 6 Co., 179 Queen Victoria Street, London EC4V 4 EL Gran Bretaña Nacionalidad o Domicilio: Gran Bretaña		
5) PCT (86)			
Solicitud Internacional No. PCT/GB20057003728 Fecha: sept. 27, 2005			
Publicación Internacional No. WO 2006/035225 A1 Fecha: Abril 6, 2006			
6) Título (54) NEUROTOXINAS CLOSTRIDIALES PARA USO EN CICATRIZACIÓN DE TEJIDOS.			
7) Clasificación Internacional: A61K 39/08 A61P 17/02			
8) PRIORIDAD	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	Estados Unidos	Sept. 27, 2004	60/613,392
9) Comprobante de pago N° 07-14,199 de Febrero 16, 2007			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina			

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☒ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros:
1. Reporte internacional de búsqueda
 2. Documentos Informe de búsqueda
 3. opinión escrita
 4. PCT solicitud

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta página

P. 919

✓

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-028609-00000-0000
Fec: 2007-03-22 18:44:58 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/II
Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios. 80

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 14,199
FECHA : FEBRERO 16 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	31028896	16/02/2007	10,488,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 April 2006 (06.04.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/035225 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/08 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01)

(74) Agent: MANSDEN, John, Christopher; Frank B. Dohn
& Co., 179 Queen Victoria Street, London EC4V 4EL
(GB).

(21) International Application Number:
PCT/GB2005/003728

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GH, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
27 September 2005 (27.09.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/613,392 27 September 2004 (27.09.2004) US

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): MERZ
PHARMA GMBH & CO. KGaA [DE/DE]; Eckenheimer
Landstrasse 100, 60318 Frankfurt (DE).

(71) Applicant (for GB only): MANSDEN, John, Christo-
pher [GB/GB]; Frank B Dohn & Co., 179 Queen Victoria
Street, London EC4V 4EL (GB).

(72) Inventor: and

(75) Inventor/Applicant (for US only): TAYLOR, Harold,
Victor [US/DE]; An den Drei Hohen 76, D-60534 Frank-
furt (DE).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CLOSTRIDIAL NEUROTOXINS FOR USE IN TISSUE HEALING

(57) Abstract: Naturally occurring and/or modified *Clostridium* neurotoxins, including those neurotoxins free of complexing pro-
teins which naturally form complexes with Clostridial neurotoxins, are used to enhance healing of injured surface or superficial
tissue of a patient by local administration into or in close proximity to the injured tissue. Such neurotoxins may be advantageously
employed in wound healing and preventing scar formation, and find applicability in the area of ophthalmology, e.g. in treatment of
injured corneal tissue, for example by closing inflamed eyes. A further embodiment includes diagnostic usage for the evaluation of
effective toxin administration and medicaments for use therein.

WO 2006/035225 A1

b

CLOSTRIDIAL NEUROTOXINS FOR USE IN TISSUE HEALING

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention is concerned with enhancing healing of injured tissue by administering naturally occurring and/or modified *Clostridium* neurotoxins, and/or those neurotoxins free of complexing proteins. Such neurotoxins can be employed to enhance wound healing (including the prevention of scar formation) and find applicability in the area of ophthalmology, e.g. in treatment of injured corneal tissue, for example by closing inflamed eyes. Their diagnostic usage and medicaments for use therein are also disclosed.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] The present invention is directed to enhancement of healing of injured surface or superficial tissue using naturally occurring and/or modified neurotoxins. *Clostridium botulinum* neurotoxins from serotypes A, B, C₁, D, E, F and G, and Clostridial neurotoxins free of the complexing proteins naturally occurring in Clostridial neurotoxins may be used to facilitate or enhance such healing. Clostridial neurotoxins which exhibit short duration of action, such as type E or F, may be indicated in cases where a relatively brief period of muscle paralysis is desired, such as in the treatment of wounds which heal rapidly. Clostridial neurotoxins with shorter biological persistence may exhibit reduced antibody formation, thereby maintaining the therapeutic efficacy of Clostridial neurotoxins in wound healing.

[0003] Wound healing after injury or surgical intervention may be adversely affected by tension on wound margins. Reflex muscular contractions, which may occur especially with lessening analgesia, can displace any as yet unhealed wound margins. This displacement may facilitate the entry of pathogens and, at worst, secondary healing therapy is required. In the case of secondary healing the operation wound has to be opened again and cleansed several times daily. Necrotic tissue must be removed

regularly (debridement). Secondary healing takes considerably longer than primary healing: it is not only labor intensive and incurs additional cost, but also results in cosmetically unsatisfactory large scars. It can also lead to adhesions in muscles that have not been sutured together, which after healing may lead to painful random contractions of muscles scarred by connective tissue. Usually an attempt is made to counteract this by immobilizing the injured area. This may be done by, for example, applying a splint, special bandages or other devices for fixation and positioning. However, these currently used methods are in many cases inadequate and/or inconvenient and often cannot be used, especially after operation or injury to the abdomen.

[0004] The anaerobic, gram positive bacterium *Clostridium botulinum* produces a potent polypeptide neurotoxin, botulinum toxin, which causes a neuromuscular disease in humans and animals referred to as botulism. The spores of *Clostridium botulinum* are found in soil and can grow in improperly sterilized and sealed food containers of home based canneries, which are the cause of many of the cases of botulism. The effects of botulism typically appear 18 to 36 hours after eating the foodstuffs contaminated with a *Clostridium botulinum*. The botulinum toxin can pass unattenuated through the lining of the gut because it is protected from the attack of pancreatic proteases by complexing proteins such as hemagglutinins and a nontoxic, nonhemagglutinating protein. The pure neurotoxin attacks peripheral motor neurons upon resorption from the gut. Symptoms of botulinum toxin intoxication can progress from difficulty walking, swallowing and speaking to paralysis of the respiratory muscles and death.

[0005] Botulinum toxin is the most lethal natural biological agent known to man. About 5-6 picograms of botulinum toxin (purified neurotoxin) serotype A (BoNT/A) given parenterally is one MLD (minimum lethal dose) in mice. One unit (U) of botulinum toxin is defined as the MLD upon intraperitoneal injection into female Swiss Webster mice weighing 18-20 grams each. Seven immunologically distinct botulinum toxin types have been characterized, these being respectively botulinum neurotoxin serotypes A, B, C₁, D, E, F and G, each of which is distinguished by neutralization with serotypespecific antibodies. The different serotypes of botulinum toxin vary in the animal species that

they affect and in the severity and duration of the paralysis they evoke. For example, it has been determined that BoNT/A is 500 times more potent, as measured by the rate of paralysis produced in the rat, than is botulinum toxin serotype B (BoNT/B).

Additionally, BoNT/B has been determined to be non-toxic in primates at a dose of 480 U/kg which is about 12 times the primate MLD for BoNT/A. In contrast, serotype A has a ten times longer duration of paralysis than type E when injected in mice. BoNT/C₁ acts preferentially in birds.

[0006] Botulinum toxins have been used in clinical settings for the treatment of neuromuscular disorders characterized by hyperactive skeletal muscles due to a pathological overactivity of peripheral nerves. BoNT/A has been approved by the U.S. Food and Drug Administration for the treatment of blepharospasm, strabismus and hemifacial spasm. Non-serotype A botulinum toxin serotypes apparently have a lower potency and/or a shorter duration of activity as compared to BoNT/A. Clinical effects of peripheral intramuscular BoNT/A are usually seen within one week of injection. The typical duration of symptomatic relief from a single intramuscular injection of BoNT/A averages about three months.

[0007] All the botulinum toxin serotypes apparently inhibit release of the neurotransmitter acetylcholine at the neuromuscular junction; however, they do so by affecting different neurosecretory proteins and cleaving these proteins at different sites. For example, both botulinum serotypes A and E cleave the 25 kiloDalton (kD) synaptosomal associated protein (SNAP-25); however, each toxin cleaves at a unique site within this protein. Botulinum toxin serotype C₁ (BoNT/C₁) has been shown to cleave both syntaxin and SNAP-25. BoNT/B, D, F and G act on vesicle-associated protein (VAMP, also called synaptobrevin), with each serotype cleaving the protein at a different site. These mechanistic differences may affect the relative potency and/or duration of action of the various botulinum toxin serotypes.

[0008] Regardless of serotype, the molecular mechanism of toxin intoxication appears to be similar and to involve several steps or stages. The intraneuronal targets of the

828

Clostridial toxins universally participate in the process of neurotransmitter release. In the first step of the process, the toxin binds to the presynaptic membrane of the target neuron through a specific interaction between the H chain and a cell surface receptor; the receptor is thought to be different for each serotype of botulinum toxin. The carboxyl end segment of the H chain, H_C, appears to be important for targeting of the toxin to the cell surface.

[0009] In the second step, the toxin is engulfed by the cell through receptor-mediated endocytosis, and an endosome containing the toxin is formed. In the next step the toxin escapes the endosome into the cytoplasm of the cell. This step is thought to be mediated by the amino end segment of the H chain, H_N, which triggers a conformational change of the toxin in response to a pH of about 5.5 or lower. Endosomes are known to possess a proton pump which decreases intra-endosomal pH. The conformational shift exposes hydrophobic residues in the toxin, which permits the toxin to embed itself in the endosomal membrane. The toxin then translocates through the endosomal membrane into the cytosol.

[0010] The next step of the mechanism of botulinum toxin activity involves reduction of the disulfide bond joining the H and L chains. The entire toxic activity of botulinum toxins is contained in the L chain of the holotoxin which has to be separated from the heavy chain to achieve its full activity; the L chain is a zinc (Zn⁺⁺) endopeptidase which, in the last step, selectively cleaves proteins essential for recognition and docking of neurotransmitter-containing vesicles to the cytoplasmic surface of the plasma membrane, and fusion of the vesicles with the plasma membrane.

[0011] The molecular weight of the botulinum neurotoxin protein molecule, for all seven of the known botulinum toxin serotypes, is about 150 kD. However, the botulinum toxins are released by Clostridial organisms as complexes comprising the 150 kD botulinum toxin protein molecule along with associated haemagglutinins and non-toxin proteins. Thus, the BoNT/A complex can be produced by *Clostridium* bacteria as 900 kD, 500 kD and 300 kD forms. BoNT/B and C₁ are apparently produced as only a 500

kD complex. BoNT/D is produced as both 300 kD and 500 kD complexes. Finally, BoNT/E and F are produced as only approximately 300 kD complexes. The complexes (i.e. molecular weight greater than about 150 kD) are believed to contain non-toxin hemagglutinins and a non-toxin, non-toxic non-hemagglutinin protein.

[0012] Repeated injection of the complex is followed in a considerable number of patients by formation of specific neutralizing antibodies which are also directed against the neurotoxin. The direct consequence is that antibody-positive patients no longer respond to the complex. However, they might be treated with other toxin types, although not all of them are approved for therapy. When the patient has been tested with all the toxin types and has formed antibodies against them, further administration of a botulinum toxin complex (irrespective of the type) no longer provides a remedy. It must be taken into account in this connection that each dose of complex contributes to increasing the antibody titer until further administration of the complex no longer makes sense because no effect is achieved.

[0013] The formation of specific antibodies may be facilitated by the non-toxin constituents of the complex. The neurotoxin, fixed in the complex, remains in the tissue for a long period and may activate immune cells which migrate into the tissue to form antibodies. The long residence time does not result in increased uptake by the target cells, however, since poisoned target cells are no longer able to take up toxin. The neurotoxin which slowly dissociates out of the complex thus now has only immunological activity. Moreover, the non-toxin proteins present in the complex may intensify an immune response. Hemagglutinins are lectins, that is to say proteins which are distinguished by a high affinity for certain sugars. Because of their binding to sugar structures, lectins have immuno-stimulating effects. Thus, it has been possible to show that the lectins concanavalin A, phytohemagglutinin and pokeweed mitogen activate T and B lymphocytes. The hemagglutinins of the botulinum toxin complexes, which likewise bind to membrane-associated sugars, are thus able in a similar way to act as immunoadjuvants and contribute to antibody formation and thus to failure of the therapy.

210

[0014] An object of the present invention was therefore to develop an alternative mode of treatment for wound healing and preventing scar formation. In particular, the inventor proposes a suitable active ingredient with which patients may effectively be treated without the formation of neutralizing antibodies and with which patients who have already formed neutralizing antibodies may be treated.

[0015] *In vitro* studies have indicated that botulinum toxins inhibit potassium cation induced release of both acetylcholine and norepinephrine from primary cell cultures of brainstem tissue. Additionally, it has been reported that botulinum toxins inhibit the evoked release of both glycine and glutamate in primary cultures of spinal cord neurons and that in brain synaptosome preparations botulinum toxin inhibits the release of each of the neurotransmitters acetylcholine, dopamine, norepinephrine, CGRP and glutamate.

[0016] *Clostridium* neurotoxin may be obtained by establishing and growing cultures of *Clostridium botulinum* in a fermenter and then harvesting and purifying the fermented mixture in accordance with known procedures. All the botulinum toxin types are initially synthesized as inactive single chain proteins which must be cleaved or nicked by proteases to become neuroactive. The bacterial strains that produce botulinum toxin serotypes A and G possess endogenous proteases which process the toxin, and therefore, may be recovered from bacterial cultures in predominantly their active form. In contrast, botulinum toxin serotypes C, D, and E are synthesized by nonproteolytic strains of *Clostridium* and are therefore typically inactive when recovered from culture. Subsequent activation can be performed using trypsin as a peptidase. It cleaves the prominent nicking site that is exposed preferentially to the enzyme. Serotypes B and F are produced by both proteolytic and nonproteolytic strains and therefore can be recovered in either the active or inactive form. However, even the proteolytic strains that produce, for example, the BoNT/B serotype, only cleave a portion of the toxin produced. The exact proportion of nicked to unnicked molecules depends on different factors, including the length of incubation and the temperature of the culture. Therefore, any preparation of BoNT/B is likely to contain a certain percentage of inactive toxin, which

11

may be responsible for the known significantly lower potency of BoNT/B as compared to BoNT/A.

[0017] A process for preparing neurotoxin preparations free of the associated complexing proteins is disclosed in International Patent Application No. WO 00/74703. The subject matter of this application is herein incorporated by reference. Pharmaceutical compositions comprising a botulinum neurotoxin from *Clostridium botulinum*, the neurotoxin being free of the complexing proteins naturally present in the botulinum neurotoxin complex, are disclosed in U.S. Patent Application Serial No. 11/184,495 and corresponding PCT/US2005/025408. The subject matter of said applications, herein incorporated by reference, pertains to pharmaceutical compositions which comprise a botulinum neurotoxin from *Clostridium botulinum*, the neurotoxin being free of the complexing proteins naturally present in the botulinum neurotoxin complex, which pharmaceutical compositions have good stability and are advantageously formulated free of human serum albumin.

[0018] Frevert, J (DE103 33 317 and WO 2005/007185) discloses a composition for stabilizing protein active ingredients, such as Clostridial neurotoxins, in pharmaceuticals comprising: a) a surface-active substance, for example a non-ionic detergent (surfactant); and b) a mixture of at least two amino acids, selected from either Glu and Gln or Asp and Asn.

[0019] It has been reported that BoNT/A has been used in clinical settings as follows:

- (1) about 75-125 units of BOTOX® per intramuscular injection (multiple muscles) to treat cervical dystonia;
- (2) 5-10 units of BOTOX® per intramuscular injection to treat glabellar lines (brow furrows) (5 units injected intramuscularly into the procerus muscle and 10 units injected intramuscularly into each corrugator supercilii muscle);

2
12

(3) about 30-80 units of BOTOX® to treat constipation by intrasphincter injection of the puborectalis muscle;

(4) about 1-5 units per muscle of intramuscularly injected BOTOX® to treat blepharospasm by injecting the lateral pre-tarsal orbicularis oculi muscle of the upper lid and the lateral pre-tarsal orbicularis oculi of the lower lid;

(5) to treat strabismus, extraocular muscles have been injected intramuscularly with between about 1-5 units of BOTOX®, the amount injected varying based upon both the size of the muscle to be injected and the extent of muscle paralysis desired (i.e. amount of diopter correction desired); and

(6) to treat upper limb spasticity following stroke by intramuscular injections of BOTOX® into five different upper limb flexor muscles, as follows:

(a) flexor digitorum profundus: 7.5 U to 30 U

(b) flexor digitorum sublimis: 7.5 U to 30 U

(c) flexor carpi ulnaris: 10 U to 40 U

(d) flexor carpi radialis: 15 U to 60 U

(e) biceps brachii: 50 U to 200 U. Each of the five indicated muscles has been injected at the same treatment session, so that the patient receives from 90 U to 360 U of upper limb flexor muscle BOTOX® by intramuscular injection at each treatment session.

2
13

[0020] One of the reasons that BoNT/A has been selected over the other serotypes, for example serotypes B, C₁, D, E, F and G, for clinical use is that botulinum toxin type A has a substantially longer lasting therapeutic effect. In other words, the inhibitory effect of botulinum toxin from serotype A is more persistent.

[0021] Alternatively, there may be a need to use short-lasting neurotoxins such as serotype E or F or modified neurotoxins which exhibit suitable effect duration.

[0022] Presently, the basis for the differences in persistence among the various botulinum toxins is unknown. However, there are two main theories explaining the differences in the persistence of the toxins. Without wishing to be bound by any theory of operation or mechanism of action, these theories will be discussed briefly below. The first theory proposes that the persistence of a toxin depends on which target protein and where on that target protein that toxin attacks - Raciborska, et al., Can. J. Physiol. Pharmacol. 77:679-688 (1999). For example, SNAP-25 and VAMP are proteins required for vesicular docking, a necessary step for vesicular exocytosis. BoNT/A cleaves the target protein SNAP-25 and BoNT/B cleaves the target protein VAMP, respectively. The effect of each is similar in that cleavage of either protein compromises the ability of a neuron to release neurotransmitters via exocytosis. However, damaged VAMP may be more easily replaced with new ones than damaged SNAP-25, for example by replacement synthesis. Therefore, since it takes longer for cells to synthesize new SNAP-25 proteins to replace damaged ones, botulinum toxin type A has longer persistence.

[0023] Additionally, the site of cleavage by a toxin may dictate how quickly the damaged target proteins may be replaced. For example, botulinum toxin type A and E both cleave SNAP-25. However, they cleave at different sites and BoNT/E causes shorter-lasting paralysis in patients, compared with BoNT/A - *id.* at 685-6.

[0024] The second theory proposes that the particular persistence of a toxin depends on its particular intracellular half-life or stability, i.e. the longer the toxin is available in the cell, the longer the effect - Keller, et al., FEBS Letters 456:137-42 (1999). Many factors

14

contribute to the intracellular stability of a toxin, but primarily, the better it is able to resist the metabolic actions of intracellular proteases to break it down, the more stable it is - Erdal, et al., Naunynschmiedeber's Arch. Pharmacol. 351:67-78 (1995).

[0025] In general, the ability of a molecule to resist metabolic actions of intracellular proteases may depend on its structures. For example, the primary structure of a molecule may include a unique primary sequence which may cause the molecule to be easily degraded by proteases or difficult to be degraded. For example, Varshavsky describes polypeptides terminating with certain amino acids as being more susceptible to degrading proteases - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:12142-12149(1996).

[0026] Furthermore, intracellular enzymes are known to modify molecules, for example polypeptides through, for example, N-glycosylation, phosphorylation etc. - this kind of modification will be referred to herein as "secondary modification". "Secondary modification" often refers to the modification of endogenous molecules, for example, polypeptides after they are translated from RNAs. However, as used herein, "secondary modification" may also refer to an enzyme's, for example an intracellular enzyme's, ability to modify exogenous molecules. For example, after a patient is administered with exogenous molecules, e.g. drugs, these molecules may undergo a secondary modification by the action of the patient's enzymes, for example intracellular enzymes.

[0027] Certain secondary modifications of molecules, for example polypeptides, may resist or facilitate the actions of degrading proteases. These secondary modifications may, among other things, (1) affect the ability of a degrading protease to act directly on the molecule and/or (2) affect the ability of the molecules to be sequestered into vesicles to be protected against these degrading proteases.

[0028] The Clostridial neurotoxin may be one of the botulinum toxin serotypes A, B, C₁, D, E, F and G, including a botulinum toxin which is free of the complexing proteins present in natural neurotoxin or a neurotoxin modified chemically or modified by genetic

4
15

manipulation. The chemically or genetically modified neurotoxin is free of the complexing proteins which naturally form complexes with botulinum neurotoxin as well.

[0029] The modification of the neurotoxin derived from botulinum neurotoxin due to chemical modifying or genetic manipulation can occur on each part of the neurotoxin protein, for instance on the heavy chain part and/or on the light chain part of the neurotoxin molecule. There might be one modification or more modifications. In one embodiment, the heavy chain of the neurotoxin protein derived from botulinum neurotoxin comprises one or more modifications which may decrease or increase the affinity of the neurotoxin for binding to nerve cells when compared to the native neurotoxin. Such modified neurotoxin may comprise at least one substitution and/or deletion and/or insertion and/or addition and/or posttranslational modification of amino acids of the neurotoxin and preferably of the heavy chain of the neurotoxin.

[0030] There is a need to have modified neurotoxins which have efficacies of the various botulinum toxin serotypes, but with altered (shorter) biological persistence and which exhibit reduced antibody formation.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0031] The present invention relates to enhancement of healing of injured surface or superficial tissue in a patient using naturally occurring and/or modified *Clostridium* neurotoxins, as well as those neurotoxins free of complexing proteins. Such use embraces applications in wound healing (which includes use in preventing scar formation) as well as use in ophthalmology (e.g. in treatment of injured corneal tissue, for example to close inflamed eyes). Their diagnostic usage is a further indication. *Clostridium botulinum* neurotoxins from serotypes A, B, C, D, E, F and G are contemplated for administration to facilitate wound healing and preventing scar formation according to the desired duration of effect. Moreover, Clostridial neurotoxins which have a short duration of action and which may be free of complexing proteins may be used where a relatively short duration of muscle paralysis is desired.

4
16

[0032] The invention is based on immobilizing the area around injured tissue such as a wound by paralyzing the muscles acting thereon. This can be achieved by injecting a peripherally acting muscle relaxant directly into the appropriate muscles. The peripherally acting muscle relaxant is chosen from a natural or modified neurotoxin, such as a Clostridial neurotoxin, with a short duration of action and which may be free of complexing proteins. Botulinum toxins of type E and type F are embodiments of this invention.

[0033] The present invention also provides for improved healing in keratitis and certain operative interventions of the eye. Closure of the eyelids can be achieved by drug-induced ptosis which is achieved by administering a peripherally and locally acting muscle relaxant. This muscle relaxant is chosen from the natural or modified short-acting neurotoxins, such as a Clostridial neurotoxin, with a short duration of action and which may be free of complexing proteins. This measure serves to immobilize the eye and thus favors healing. Botulinum toxins of type E or type F are embodiments.

[0034] In another aspect of the invention, short-acting botulinum toxins which are free of complexing proteins are used as a diagnostic tool to localize the optimal area of injection for longer-acting botulinum toxins used to treat various conditions. Botulinum toxin type E is an embodiment.

[0035] What we therefore believe to be comprised by our invention may be summarized *inter alia* in the following words:

[0036] Use of a natural or modified *Clostridium* neurotoxin for the manufacture of a medicament for enhancing healing of injured surface or superficial tissue of a patient, wherein said medicament is manufactured for local administration into or in close proximity to said injured tissue, such a

7
17

[0037] use wherein the *Clostridium* neurotoxin is free of complexing proteins which naturally form complexes with Clostridial neurotoxins, such a

[0038] use wherein the natural or modified *Clostridium* neurotoxin is characterized by short-lasting efficacy of about 3 to 4 weeks, such a

[0039] use wherein the *Clostridium* neurotoxin is botulinum toxin type F, such a

[0040] use wherein the natural or modified *Clostridium* neurotoxin is characterized by short-lasting efficacy of about 3 to 10 days, such a

[0041] use wherein the *Clostridium* neurotoxin is botulinum toxin type E, such a

[0042] use wherein the *Clostridium* neurotoxin is a modified neurotoxin with an efficacy duration of about 1 to 4 weeks, such a

[0043] use wherein said injured tissue comprises a wound, such a

[0044] use wherein said injured tissue comprises corneal tissue and said medicament is manufactured for local administration into or in close proximity to the adjacent eyelid, and such a

[0045] use wherein a two component medicament is manufactured, the first component comprising a *Clostridium* neurotoxin having short-lasting efficacy of about 3 to 10 days for use in determining an optimal area for administration, and the second component comprising a *Clostridium* neurotoxin having long-lasting efficacy of about 12 weeks for subsequent therapeutic administration. Furthermore,

[0046] a method of treating a patient having a surface or superficial tissue injury, said method comprising locally administering a natural or modified *Clostridium* neurotoxin

39
18

into or in close proximity to said injured tissue, such that healing of the injury is enhanced, such a

[0047] method wherein the *Clostridium* neurotoxin is free of complexing proteins which naturally form complexes with Clostridial neurotoxins, such a

[0048] method wherein the natural or modified *Clostridium* neurotoxin is characterized by short-lasting efficacy of about 3 to 4 weeks, such a

[0049] method wherein the *Clostridium* neurotoxin is botulinum toxin type F, such a

[0050] method wherein the natural or modified *Clostridium* neurotoxin is characterized by short-lasting efficacy of about 3 to 10 days, such a

[0051] method wherein the *Clostridium* neurotoxin is botulinum toxin type E, such a

[0052] method wherein the *Clostridium* neurotoxin is a modified neurotoxin with an efficacy duration of about 1 to 4 weeks, such a

[0053] method wherein said injured tissue comprises a wound, and such a

[0054] method wherein said injured tissue comprises corneal tissue and said *Clostridium* neurotoxin is administered into or in close proximity to the adjacent eyelid such that the eyelid remains closed and healing of the injured corneal tissue is enhanced. Moreover,

[0055] a method of treating a patient having an ophthalmic condition requiring closure of an eyelid for healing of the ophthalmic condition, comprising local administration of a natural or modified *Clostridium* neurotoxin in or in close proximity to the eyelid such that the eyelid remains closed and healing of the ophthalmic condition is enhanced. Additionally,

[0056] a method of determining an optimal area for injection of a *Clostridium* neurotoxin having long-lasting efficacy of about 12 weeks, comprising one or more initial local administrations of a natural or modified *Clostridium* neurotoxin having short-lasting efficacy of about 3 to 10 days in order to determine the effects of administration at a specific site or sites and thereby optimise the administration site to be used subsequently for said *Clostridium* neurotoxin having long-lasting efficacy, such a

[0057] method wherein the natural or modified *Clostridium* neurotoxin is characterised by short-lasting efficacy of about 3 to 10 days and is free of complexing proteins which naturally form complexes with Clostridial neurotoxins, and such a

[0058] method wherein the natural or modified *Clostridium* neurotoxin is botulinum toxin type E. Also,

[0059] a combined medicament comprising separately administrable first and second components wherein the first component comprises a *Clostridium* neurotoxin having short-lasting efficacy of about 3-10 days and the second comprises a *Clostridium* neurotoxin having long-lasting efficacy of about 12 weeks, and such a

[0060] combined medicament further including instructions for use of said first component in determining the effects of administration to a patient at a specific site or sites so as to permit selection of an optimal site for subsequent administration of said second component.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0061] As described herein, wound healing after injury or surgical intervention is adversely affected by tension on the wound margins. The present invention embraces enhancement of wound healing and prevention of scar formation using naturally occurring and/or modified neurotoxins, including Clostridial neurotoxins, as well as those neurotoxins which are free of complexing proteins. This aspect of the invention is based

20

on a new method to immobilize the area around the wound by paralyzing the muscles acting on the wound. This can be achieved by injecting a peripherally acting muscle relaxant directly into the appropriate muscles. Conventional muscle relaxants are, however, unsuitable for this for two reasons. Firstly, due to their small molecular weights they rapidly diffuse outward from the site of injection, thus producing undesirable effects in other parts of the body. Secondly, they are metabolized locally very rapidly and thus lose their efficacy.

[0062] Botulinum toxin, a peripherally acting muscle relaxant, advantageously remains at the site of injection sufficiently long to be taken up by the nerves where it remains in its active form for a long period of time. Due to the toxin's high molecular weight, the amount not taken up diffuses only slowly out from the injection site. Because of its dilution in the circulating blood, more distant nerves are not affected. The toxin is quickly inactivated by proteases in the serum. The various serotypes of botulinum toxin have different durations of action. While serotypes A and B block nerves for many weeks, serotype F does so for 3-4 weeks and serotype E for only 3-10 days. To achieve a brief period of paralysis the toxin must be injected a few days before the operation at one or several sites around the operation field, depending on the size of the muscle to be paralyzed. Serotype E or F may be selected according to the desired period of paralysis. Since the musculature at the chosen operative site is already paralyzed by the toxin at the time of operation, the anaesthetist requires smaller amounts of postsynaptic acting muscle relaxants. The danger of postoperative respiratory impairment by paralysis of the respiratory muscles is thus reduced. As local paralysis at the site of operation is maintained for up to 4-5 days postoperatively, the wound sutures are subjected to no additional tension during this time. The period of local immobilization should be maintained maximal until the wound is completely healed, typically 1-2 weeks maximum. If wound healing is complicated, for example by secondary healing, paralysis lasting a longer period of time may be indicated. In another embodiment, where an extended duration of muscle paralysis in wound healing is desired, administration of botulinum toxin serotype A or B is warranted. Recovery of nerve function occurs slowly after breakdown of the toxins in the nerve cells and is complete approximately 2 days

7
24

after full proteolytic degradation of the toxin. It is not expected that the brief immobilization leads to any significant atrophy of the muscle.

[0063] In another embodiment, *Clostridium botulinum* neurotoxins from serotypes A or B, C₁, D, E, F, G which are free of complexing proteins, hemagglutinins, and other exogenous proteins may be advantageously used to facilitate wound healing and prevent scar formation. As an alternative to the two commercial type A botulinum toxin complex products, BOTOX® and DYSPORT®, and also as alternative to the complexes described in the prior art of the other types (B, C₁, D, E, F, G), a novel pharmaceutical has been developed which comprises only neurotoxin (type A, B, C₁, D, E, F or G) free of complexing proteins, hemagglutinins and other exogenous proteins. Because of its lower molecular mass, it diffuses more quickly to the target cells in which it is taken up, before immune cells, attracted by hemagglutinins, are activated. Antigenicity studies demonstrate that neurotoxin of any type which is free of complexing proteins, induces no, or at the most very little, formation of antibodies, which is distinct from commercial products of type A and the complexes of types B to G. On therapeutic use of this newly developed pharmaceutical (neurotoxin of types A, B, C₁, D, E, F or G which is free of complexing proteins) there is no failure of therapy due to antibodies even after repeated administration. It has also been possible to show that such neurotoxins are, because of their immediate bioavailability, still suitable for the therapy of patients who have developed, after administration of a botulinum toxin complex, e.g. after treatment with BOTOX® or DYSPORT®, an antibody titer against the appropriate type (so-called secondary non-responders), that is to say are no longer amenable to further treatment with BOTOX® or DYSPORT®, because administration of the commercial toxins no longer provides therapeutic effect.

[0064] This newly developed pharmaceutical can be employed with particular advantage for patients who have never, or not for many years, been treated with botulinum neurotoxin, because their antibody titer is low or zero from the outset. The advantage of its use is then that the increase in the titer in these patients due to the treatment with pure toxin is zero, or at the most very insignificant. In other words, the newly developed

22

therapeutic composition can be administered over long periods without losing its effect. It is also suitable for patients who exhibit an antibody titer against a botulinum toxin.

[0065] The induction of antibodies during therapy with a *Clostridium botulinum* neurotoxin is thus prevented by administering a neurotoxin free of complexing proteins in place of the high molecular weight toxin complexes. The neurotoxin which has been completely separated from the complex proteins is immediately bioavailable and can bind directly to the nerve endings of the motor endplates.

[0066] In keratitis and certain operative interventions on the eye, either a bandage is put over the eye or the upper and lower lids are sutured together to keep the eye closed. This measure serves to immobilize the eye and thus favors healing. Daily assessment of the healing process can be done at the time the bandage is changed. However, it is not possible to inspect the surface of the eye if the lids are sutured together. Closure of the eyelids can also be achieved by drug-induced ptosis, through the injection of a peripherally and locally acting muscle relaxant. Depending on the desired duration of closure, botulinum toxin E or F is injected into the levator palpebrae superioris muscle. The advantage of this procedure is obvious. The eye remains accessible for inspection so that the healing process can be monitored and any necessary further measures can be undertaken without stress to the patient. Transient ptosis is reversible, just like the paralyses described above.

[0067] As has been previously described in detail, botulinum toxin serotypes A and B are used in dystonia or spasticity of different origins. If the disorder is complex or if several muscle groups are involved in the symptoms, it is often not clear which muscle should be paralyzed by the toxin to provide maximal relief for the patient. Test injections of serotype A or B would cause additional stress to the patient if they were to be injected into the wrong muscle. To localize the optimal area of injection for toxin therapy with a long-lasting efficacy toxin, a test may be conducted using a toxin which exhibits a short duration of effect. Botulinum toxin E is suitable for such a diagnostic test. The patient can experience the expected changes before the actual treatment. As its action lasts for

only a few days, the patient finds out what effects will be produced later by treatment with a long-lasting efficacy toxin. Should the injection not be optimal, the disturbing effect will last for only a short time and another injection can be performed to test the effect on another muscle.

28
24**EXAMPLES****Example 1****Enhanced Wound Healing by Botulinum Injection in Humans**

[0068] A patient undergoes scar revision excision surgery. The scar is located on the abdomen. The scar was a result of a trauma, and was closed at a tertiary referral center at the time.

[0069] The patient is placed in a supine position, and 5 ml of 0.5% lidocaine with 1:200,000 epinephrine is locally injected. The scar is excised and bleeding is controlled with monopolar cautery. Botulinum toxin A, which is free of complexing proteins is injected (10 units) into the wound periphery and fanning out from the wound. The wound was closed using 6-0 Vicryl for deep and 6-0 Nylon for superficial sutures.

[0070] Approximately 24 hours after surgery, the patient develops marked paralysis of the injection muscles, and had lost the ability to move the skin in an area of about 4 cm in diameter around the excision. The wound heals well in the early postoperative period. It is apparent that there is decreased movement and tension on the wound edges. The wound of the patient heals without complications. Compared to the preoperative scar, the cosmetic appearance of the resulting scar 12 months postoperatively is excellent and superior to the initial scar.

Example 2**Botulinum Induced Ptosis to Promote Corneal Healing**

[0071] A patient suffers from keratitis or undergoes surgical intervention on the eye.

[0072] Botulinum toxin type E or F which is free of complexing proteins is injected into the levator palpebral superioris to produce a flaccid ptosis on the upper lid and provide

15 of 26

safe and effective protection for the cornea. The eye is inspected to monitor the healing process. Injections are repeated until the underlying disease or condition heals.

OTHER EMBODIMENTS

[0073] It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are within the scope of the following claims.

D
26**CLAIMS****We Claim:**

1. Use of a natural or modified *Clostridium* neurotoxin for the manufacture of a medicament for enhancing healing of injured surface or superficial tissue of a patient, wherein said medicament is manufactured for local administration into or in close proximity to said injured tissue.
2. Use as claimed in claim 1 wherein the *Clostridium* neurotoxin is free of complexing proteins which naturally form complexes with Clostridial neurotoxins.
3. Use as claimed in claim 1 or claim 2 wherein the natural or modified *Clostridium* neurotoxin is characterized by short-lasting efficacy of about 3 to 4 weeks.
4. Use as claimed in claim 3 wherein the *Clostridium* neurotoxin is botulinum toxin type F.
5. Use as claimed in claim 1 or claim 2 wherein the natural or modified *Clostridium* neurotoxin is characterized by short-lasting efficacy of about 3 to 10 days.
6. Use as claimed in claim 5 wherein the *Clostridium* neurotoxin is botulinum toxin type E.
7. Use as claimed in claim 1 or claim 2 wherein the *Clostridium* neurotoxin is a modified neurotoxin with an efficacy duration of about 1 to 4 weeks.
8. Use as claimed in any of claims 1 to 7 wherein said injured tissue comprises a wound.

22
27

9. Use as claimed in any of claims 1 to 6 wherein said injured tissue comprises corneal tissue and said medicament is manufactured for local administration into or in close proximity to the adjacent eyelid.
10. Use as claimed in any of claims 1 to 9 wherein a two component medicament is manufactured, the first component comprising a *Clostridium* neurotoxin having short-lasting efficacy of about 3 to 10 days for use in determining an optimal area for administration, and the second component comprising a *Clostridium* neurotoxin having long-lasting efficacy of about 12 weeks for subsequent therapeutic administration.
11. A method of treating a patient having a surface or superficial tissue injury, said method comprising locally administering a natural or modified *Clostridium* neurotoxin into or in close proximity to said injured tissue, such that healing of the injury is enhanced.
12. The method of claim 11 wherein the *Clostridium* neurotoxin is free of complexing proteins which naturally form complexes with Clostridial neurotoxins.
13. The method of claim 11 or claim 12 wherein the natural or modified *Clostridium* neurotoxin is characterized by short-lasting efficacy of about 3 to 4 weeks.
14. The method of claim 13 wherein the *Clostridium* neurotoxin is botulinum toxin type F.
15. The method of claim 11 or claim 12 wherein the natural or modified *Clostridium* neurotoxin is characterized by short-lasting efficacy of about 3 to 10 days.
16. The method of claim 15 wherein the *Clostridium* neurotoxin is botulinum toxin type E.

28

17. The method of claim 11 or claim 12 wherein the *Clostridium* neurotoxin is a modified neurotoxin with an efficacy duration of about 1 to 4 weeks.
18. The method of any of claims 11 to 17 wherein said injured tissue comprises a wound.
19. The method of any of claims 11 to 16 wherein said injured tissue comprises corneal tissue and said *Clostridium* neurotoxin is administered into or in close proximity to the adjacent eyelid such that the eyelid remains closed and healing of the injured corneal tissue is enhanced.
20. A method of determining an optimal area for injection of a *Clostridium* neurotoxin having long-lasting efficacy of about 12 weeks, comprising one or more initial local administrations of a natural or modified *Clostridium* neurotoxin having short-lasting efficacy of about 3 to 10 days in order to determine the effects of administration at a specific site or sites and thereby optimise the administration site to be used subsequently for said *Clostridium* neurotoxin having long-lasting efficacy.
21. The method of claim 20 wherein the natural or modified *Clostridium* neurotoxin is characterized by short-lasting efficacy of about 3 to 10 days and is free of complexing proteins which naturally form complexes with Clostridial neurotoxins.
22. The method of claim 20 or claim 21 wherein the natural or modified *Clostridium* neurotoxin is botulinum toxin type E.
23. A combined medicament comprising separately administrable first and second components wherein the first component comprises a *Clostridium* neurotoxin having short-lasting efficacy of about 3 to 10 days and the second component comprises a *Clostridium* neurotoxin having long-lasting efficacy of about 12 weeks.

29

24. A combined medicament as claimed in claim 23 further including instructions for use of said first component in determining the effects of administration to a patient at a specific site or sites so as to permit selection of an optimal site for subsequent administration of said second component.

NEUROTOXINAS CLOSTRIDIALES PARA USO EN LA CICATRIZACIÓN DE TEJIDOS

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al mejoramiento de la cicatrización del tejido lesionado mediante la administración de neurotoxinas de *Clostridium* naturales y/o modificadas, y/o de dichas neurotoxinas libres de proteínas complejantes. Estas neurotoxinas se pueden emplear para mejorar la cicatrización de heridas (incluyendo la prevención de la formación de cicatrices) y encuentran aplicación en el área de la oftalmología, p. ej. en el tratamiento del tejido lesionado de la córnea, como por ejemplo para permitir el cierre de los ojos inflamados. También se describe su uso diagnóstico y los medicamentos para su utilización.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La presente invención concierne al mejoramiento de la cicatrización de superficies o tejidos superficiales lesionados usando neurotoxinas naturales y/o modificadas. Las neurotoxinas del *Clostridium botulinum* de los serotipos A, B, C₁, D, E, F y G y las neurotoxinas clostridiales libres de las proteínas complejantes que existen naturalmente en las neurotoxinas clostridiales se pueden usar para facilitar o mejorar dicha cicatrización. Las neurotoxinas clostridiales que exhiben una acción de duración corta, como las del tipo E o F, pueden estar indicadas en casos en los que se desea la parálisis muscular durante un tiempo relativamente breve, tal como en el tratamiento de heridas que cicatrizan rápidamente. Las neurotoxinas clostridiales con persistencia biológica más breve pueden exhibir

menor capacidad de formación de anticuerpos, manteniendo así la eficacia terapéutica de las neurotoxinas clostridiales en la cicatrización de la herida.

[0003] La cicatrización de heridas por lesiones o intervenciones quirúrgicas puede verse afectada adversamente por la tensión en los bordes de la herida. Las contracciones musculares reflejas, que pueden aparecer especialmente cuando va disminuyendo la analgesia, pueden hacer que los bordes aún no cicatrizados de la herida se desplacen. Este desplazamiento puede facilitar el ingreso de patógenos y requerir, en el peor de los casos, una terapia para la cicatrización por segunda intención. En el caso de la cicatrización por segunda intención es necesario volver a abrir la herida quirúrgica y limpiarla varias veces por día. Hay que remover periódicamente el tejido necrótico (desbridamiento). La cicatrización por segunda intención tarda considerablemente más que la cicatrización primaria: no solamente aumenta el trabajo requerido y los costos, sino que además resulta en la formación de grandes cicatrices, no satisfactorias desde el punto de vista cosmético. También puede conducir a la formación de adherencias en músculos no suturados entre sí, lo cual, después de la cicatrización, puede llevar a contracciones dolorosas y erráticas de los músculos que tienen tejido conectivo cicatrizal. Usualmente se busca contrarrestar este efecto inmovilizando el área de la lesión. Esta inmovilización se puede obtener, por ejemplo, aplicando férulas, vendajes especiales u otro tipo de dispositivos para la fijación y el posicionamiento. Sin embargo, en muchos casos los métodos mencionados que se usan actualmente resultan inadecuados y/o inconvenientes, siendo con frecuencia de difícil aplicación, en especial cuando se trata de operaciones o lesiones en el abdomen.

32

[0004] La bacteria anaeróbica gram positiva *Clostridium botulinum* produce una potente neurotoxina polipeptídica, la toxina botulínica, que causa en humanos y animales la enfermedad de parálisis muscular conocida como botulismo. Las esporas del *Clostridium botulinum* se encuentran en la tierra y pueden desarrollarse en envases de conservas caseras que no han sido bien esterilizados y cerrados y que constituyen la causa de muchos de los casos de botulismo. Típicamente, los efectos del botulismo aparecen de 18 a 36 horas después de la ingesta de alimentos contaminados con un *Clostridium botulinum*. La toxina botulínica puede atravesar la mucosa intestinal sin ser atenuada debido a que está protegida del ataque de las proteasas pancreáticas por proteínas complejantes, tales como hemaglutininas y una proteína no hemoaglutinante y no tóxica. Al ser absorbida en el intestino, la neurotoxina pura ataca las neuronas motoras periféricas. Los síntomas de intoxicación por toxina botulínica pueden ir progresando desde dificultades iniciales para caminar, deglutir y hablar hasta la parálisis de los músculos respiratorios y la muerte.

[0005] La toxina botulínica es el agente biológico natural más letal conocido. Aproximadamente 5-8 picogramos de toxina botulínica (neurotoxina purificada) del serotipo A (BoNT/A) administrados por vía parenteral representan una MLD (dosis letal mínima) en ratones. Una unidad (U) de toxina botulínica se define como la MLD mediante inyección intraperitoneal en ratones hembra Swiss Webster con pesos de 18-20 gramos cada uno. Se han caracterizado siete tipos diferentes de toxina botulínica desde el punto de vista inmunitario que son, respectivamente, los serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C₁, D, E, F y G, cada uno de los cuales se distingue por la neutralización

de anticuerpos específicos para el serotipo. Los distintos serotipos de toxina botulínica se diferencian en cuanto a las especies animales que afectan y en la intensidad y duración de la parálisis que provocan. Por ejemplo, se ha determinado que la BoNT/A tiene una potencia 500 veces mayor, medida por el grado de parálisis que provoca en la rata, que la toxina botulínica de serotipo B (BoNT/B). Asimismo, se ha determinado que la BoNT/B no es tóxica en primates en dosis de 480 U/kg, que equivale aproximadamente a 12 veces la MLD de la BoNT/A en primates. En cambio, inyectada en ratones, la parálisis que provoca el serotipo A dura diez veces más que la del tipo E. La BoNT/C₁ actúa preferentemente en las aves.

[0006] Se han utilizado toxinas botulínicas en ámbitos clínicos para el tratamiento de trastornos neuromusculares caracterizados por hiperactividad de músculos esqueléticos debida a un exceso patológico de actividad de nervios periféricos. La BoNT/A ha sido aprobada por la U.S. Food and Drug Administration para el tratamiento del blefaroespasmo, el estrabismo y el espasmo hemifacial. Los serotipos no A de toxina botulínica aparentemente tienen menor potencia y/o acción de menor duración en comparación con la BoNT/A. Los efectos clínicos de la BoNT/A administrada intramuscularmente en la periferia se observan usualmente en el curso de la primera semana de la inyección. Típicamente, el alivio sintomático producido por una inyección intramuscular única de BoNT/A dura, en promedio, alrededor de tres meses.

[0007] Todos los serotipos de toxina botulínica aparentemente inhiben la liberación del neurotransmisor acetilcolina en la placa neuromuscular, pero ejercen este efecto afectando proteínas neurosecretoras diferentes y clivando estas proteínas en sitios diferentes. Por ejemplo, tanto el serotipo A como el E

clivan la proteína de 25 kiloDalton (kD) asociada al sinaptosoma (SNAP-25); sin embargo, cada una de estas toxinas hace el clivaje en un sitio diferente de esta proteína. Se ha demostrado que la toxina botulínica del serotipo C₁ (BoNT/C₁) cliva la sintaxina y la SNAP-25. Las BoNT/B, D, F y G actúan sobre la proteína asociada a vesículas (VAMP, llamada también sinaptobrevina), donde cada serotipo cliva la proteína en un sitio diferente. Estas diferencias de los diversos serotipos de toxina botulínica en su mecanismo de acción pueden incidir sobre su potencia relativa y/o la duración de su efecto.

[0008] Cualquiera sea el serotipo, el mecanismo molecular de la intoxicación con la toxina parece ser similar y consiste en varios pasos o etapas. Los blancos intraneuronales de las toxinas clostridiales participan universalmente en el proceso de liberación del neurotransmisor. En el primer paso del proceso, la toxina se une a la membrana presináptica de la neurona blanco por medio de una interacción específica entre la cadena H (pesada) y un receptor en la superficie celular; se considera que el receptor es diferente para cada serotipo de toxina botulínica. El segmento terminal carboxilo de la cadena H, H_C, parece tener importancia en la selección de la toxina sobre la superficie celular.

[0009] En el segundo paso, la toxina es incorporada por la célula mediante un proceso de endocitosis mediado por el receptor, con la formación de un endosoma que contiene la toxina. En el paso siguiente, la toxina sale del endosoma y pasa al citoplasma de la célula. Se considera que este paso es mediado por el segmento terminal amina de la cadena H, H_N, que desencadena un cambio de la conformación de la toxina en respuesta a un pH de aproximadamente 5,5 o inferior. Se sabe que los endosomas poseen una

4
35

bomba de protones que baja el pH en su interior. El cambio en la conformación expone los residuos hidrófobos de la toxina, lo que permite que la toxina se inserte en la membrana del endosoma. Posteriormente, la toxina se trasloca a través de la membrana endosómica hacia el citosol.

[0010] El siguiente paso del mecanismo de acción de la toxina botulínica involucra la reducción del puente disulfuro que une las cadenas H y L. Toda la actividad tóxica de las toxinas botulínicas está contenida en la cadena L (liviana) de la holotoxina, que para alcanzar su máxima actividad debe separarse de la cadena pesada; la cadena L es una zinc (Zn^{++}) endopeptidasa que, en el paso final, cliva selectivamente proteínas esenciales para el reconocimiento y el depósito de las vesículas que contienen el neurotransmisor en la superficie citoplasmática de la membrana plasmática y la fusión de las vesículas con la membrana plasmática.

[0011] El peso molecular de la molécula de proteína de la neurotoxina botulínica de los siete serotipos conocidos de toxina botulínica es de aproximadamente 150 kD. Pero los organismos clostridiales liberan las toxinas botulínicas en forma de complejos que comprenden la molécula de proteína de toxina botulínica de 150 kD junto con hemaglutininas y proteínas no tóxicas. Por esta razón las bacterias *Clostridium* pueden producir el complejo BoNT/A en formas de 900 kD, 500 kD y 300 kD. Las BoNT/B y C₁ aparentemente se producen únicamente como complejo de 500 kD. La BoNT/D se produce como complejos de 300 kD y de 500 kD. Por último, las BoNT/E y F se producen únicamente como complejos de aproximadamente 300 kD. Se piensa que los complejos (es decir, pesos moleculares de más de alrededor de 150 kD)

contienen hemaglutininas que no son toxinas y una proteína no hemaglutinina que no es toxina ni es tóxica.

[0012] En un número considerable de pacientes la inyección repetida del complejo promueve la formación de anticuerpos neutralizantes específicos que también se dirigen contra la neurotoxina. Como directa consecuencia, los pacientes anticuerpo-positivos dejan de responder al complejo. No obstante, en estos casos podrían ser tratados con toxinas de otros tipos, si bien no todas están aprobadas para uso terapéutico. Cuando se realizan las pruebas con todos los tipos de toxinas y se verifica que el paciente ha formado anticuerpos específicos para todas ellas, la administración ulterior de un complejo de toxina botulínica (cualquiera sea su tipo) ya no ofrece solución alguna. Cabe señalar al respecto que cada dosis de complejo contribuye a aumentar el título de anticuerpos, hasta el momento en que nuevas administraciones carecen de sentido ya que el efecto obtenido es nulo.

[0013] La formación de anticuerpos específicos puede verse facilitada por los constituyentes del complejo que no son toxinas. La neurotoxina, fijada en el complejo, permanece largo tiempo en el tejido y puede activar células inmunitarias que migran hacia el tejido para formar anticuerpos. El prolongado tiempo de residencia, sin embargo, no se acompaña de un aumento de la captación por parte de las células blanco, ya que las células blanco envenenadas han perdido la capacidad de absorber la toxina. En esta situación, la neurotoxina que se disocia lentamente del complejo conserva únicamente actividad inmunológica. Asimismo, las proteínas no toxinas presentes en el complejo pueden intensificar una respuesta inmunitaria. Las hemaglutininas son lectinas, es decir, proteínas que se distinguen por una alta

afinidad por determinados azúcares. Debido a su unión a estructuras sacáridas, las lectinas tienen efectos inmunoestimulantes. De este modo, fue posible demostrar que las lectinas concanavalina A, la fitohemaglutinina y el mitógeno *pokeweed* (hierba carmín) activan linfocitos T y B. Las hemaglutininas de los complejos de toxina botulínica, que se unen también a azúcares asociados a la membrana, pueden entonces actuar de manera similar como inmunoadyuvantes y contribuir así a la formación de anticuerpos y, por ende, al fracaso de la terapia.

[0014] Por esta razón, un objeto de la presente invención fue desarrollar un modo alternativo de tratamiento para la cicatrización de heridas y la prevención de la formación de cicatrices. En particular, el inventor propone un principio activo adecuado con el que se pueden tratar eficazmente pacientes sin que se formen anticuerpos neutralizantes y con el cual también se pueden tratar pacientes que ya han formado anticuerpos neutralizantes.

[0015] Estudios in vitro han indicado que las toxinas botulínicas inhiben la liberación de acetilcolina y noradrenalina inducida por el catión potasio en cultivos primarios de células de tejido del tronco cerebral. Además, se ha reportado que las toxinas botulínicas inhiben la liberación evocada de glicina y glutamato en cultivos primarios de neuronas de médula espinal y que en preparados de sinaptosomas cerebrales la toxina botulínica inhibe la liberación de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina, noradrenalina, CGRP y glutamato.

[0016] La neurotoxina de *Clostridium* se puede obtener preparando y desarrollando cultivos de *Clostridium botulinum* en un fermentador y luego cosechando y purificando la mezcla fermentada mediante técnicas conocidas.

Todos los tipos de toxina botulínica se sintetizan inicialmente como proteínas inactivas de cadena única que para convertirse en neuroactivas tienen que ser clivadas o cortadas por proteasas. Las cepas bacterianas que producen toxina botulínica de los serotipos A y G poseen proteasas endógenas que procesan la toxina y por esta razón se la puede recuperar de los cultivos bacterianos predominantemente en su forma activa. En cambio, la toxina botulínica de los serotipos C₁, D, y E es sintetizada por cepas no proteolíticas de *Clostridium* y, por lo tanto, cuando se la extrae del cultivo típicamente está en forma inactiva. La posterior activación se puede obtener usando como peptidasa la tripsina. Ésta cliva el sitio de corte prominente que queda expuesto en forma preferencial a la enzima. Los serotipos B y F son producidos por cepas tanto proteolíticas como no proteolíticas y, por lo tanto, se pueden recuperar en forma activa o inactiva. Sin embargo, incluso las cepas proteolíticas que producen, por ejemplo, el serotipo BoNT/B solamente clivan una porción de la toxina producida. La proporción exacta entre moléculas cortadas y no cortadas depende de diversos factores, que incluyen el tiempo de incubación y la temperatura del cultivo. En consecuencia, es probable que todo preparado de BoNT/B contenga determinado porcentaje de toxina inactiva y a esto puede responder el hecho conocido de que la la BoNT/B tiene una potencia significativamente menor en comparación con la BoNT/A.

[0017] En la Solicitud de Patente Internacional No. WO 00/74703 se describe un proceso para obtener preparaciones de neurotoxina libre de proteínas complejantes asociadas. El objeto de esa solicitud queda incorporado a la presente mediante referencia. Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden neurotoxina botulínica del *Clostridium botulinum*, donde la

neurotoxina está libre de las proteínas complejantes presentes en forma natural en el complejo de neurotoxina botulínica en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. de Serie 11/184.495 y en la correspondiente PCT/US2005/025408. El objeto de dichas solicitudes, que se incorpora a la presente mediante referencia, concierne a composiciones farmacéuticas que comprende una neurotoxina botulínica del *Clostridium botulinum*, donde la neurotoxina está libre de las proteínas complejantes presentes en forma natural en el complejo de neurotoxina botulínica y donde dichas composiciones farmacéuticas tienen buena estabilidad y se formulan de manera ventajosa libres de seroalbúmina humana.

[0018] Frevert, J (DE103 33 317 y WO 2005/007185) revela una composición para estabilizar principios activos proteicos, como las neurotoxinas clostridiales, en productos farmacéuticos que comprenden: a) una sustancia tensioactiva, por ejemplo un detergente no iónico (surfactante); y b) una mezcla de por lo menos dos aminoácidos, seleccionados entre Glu y Gln o Asp y Asn.

[0019] Se ha reportado que la BoNT/A se utilizó en el ámbito clínico de las siguientes maneras:

- (1) aproximadamente 75-125 unidades de BOTOX® por inyección intramuscular (múltiples músculos) para tratar la distonía cervical;
- (2) 5-10 unidades de BOTOX® por inyección intramuscular para tratar arrugas de la zona glabellar (arrugas del ceño) (5 unidades inyectadas por vía intramuscular en el músculo procerus y 10 unidades inyectadas por vía intramuscular en cada músculo corrugador superciliar);
- (3) aproximadamente 30-80 unidades de BOTOX® para tratar la constipación mediante inyección intraesfinteriana del músculo puborrectal;

(4) aproximadamente 1-5 unidades por músculo de BOTOX® inyectado por vía intramuscular en la porción pretarsal lateral del músculo orbicular del ojo del párpado superior y la región pretarsal lateral del orbicular del ojo del párpado inferior;

(5) para tratar el estrabismo, se han inyectado músculos extraoculares por vía intramuscular con aproximadamente 1-5 unidades de BOTOX®, donde la cantidad inyectada varió de acuerdo con el tamaño del músculo a inyectar y el grado de parálisis muscular buscada (es decir, la corrección de dioptrías buscada); y

(6) para tratar la espasticidad del miembro superior secundaria a un accidente cerebrovascular con inyecciones intramusculares de BOTOX® en cinco músculos flexores diferentes del miembro superior, de acuerdo con el siguiente esquema:

(a) flexor profundo de los dedos: 7,5 U a 30 U

(b) flexor superficial de los dedos: 7,5 U a 30 U

(c) flexor cubital del carpo: 10 U a 40 U

(d) flexor radial del carpo: 15 U a 60 U

(e) bíceps braquial: 50 U a 200 U. Cada uno de los cinco músculos indicados se inyectó en la misma sesión de tratamiento, de modo que el paciente recibe entre 90 U y 360 U de BOTOX® en los músculos flexores del miembro superior mediante inyección intramuscular en cada sesión de tratamiento.

[0020] Una de las razones que llevaron a seleccionar para el uso clínico la BoNT/A por sobre los demás serotipos, por ejemplo los serotipos B, C₁, D, E, F y G, es que el efecto terapéutico de la toxina botulínica tipo A tiene una

duración sustancialmente más prolongada. En otros términos, el efecto inhibitor de la toxina botulínica del serotipo A es más persistente.

[0021] Como alternativa, puede resultar necesario usar neurotoxinas de acción corta, como las del serotipo E o F, o neurotoxinas modificadas que exhiban una adecuada duración del efecto.

[0022] Hasta el presente se desconocen las bases de las diferencias entre las diversas toxinas botulínicas en cuanto a su persistencia. Hay dos teorías principales que buscan explicar las diferencias de persistencia de las toxinas. Sin que signifique adherir a ninguna teoría de la forma de operación o del mecanismo de acción, a continuación se comentan brevemente estas teorías. La primera teoría postula que la persistencia de una toxina depende de la proteína blanco a la que ataca y del lugar de la proteína blanco en que ataca la toxina - Raciborska, et al., Can. J. Physiol. Pharmacol. 77:679-688 (1999). Por ejemplo, la SNAP-25 y la VAMP son proteínas que se requieren para el acoplamiento vesicular, un paso necesario para la exocitosis vesicular. La BoNT/A cliva la proteína blanco SNAP-25 y la BoNT/B cliva la proteína blanco VAMP, respectivamente. El efecto de cada una es similar, ya que el clivaje de cualquiera de las dos proteínas compromete la capacidad de la neurona para liberar neurotransmisores por el mecanismo de la exocitosis. Sin embargo, es más fácil reemplazar con moléculas nuevas la VAMP alterada que la SNAP-25 alterada, por ejemplo mediante la síntesis de nuevas moléculas. Por lo tanto, como las células tardan más en sintetizar nuevas proteínas SNAP-25 en reemplazo de las alteradas, la toxina botulínica tipo A persiste durante más tiempo.

27
42

[0023] Asimismo, el sitio de clivaje por acción de una toxina puede determinar la velocidad con que se pueden reemplazar las proteínas blanco alteradas. Por ejemplo, las toxinas botulínicas tipos A y E clivan la SNAP-25. Sin embargo, lo hacen en sitios diferentes y la parálisis que provoca la BoNT/E en los pacientes es más breve en comparación con la BoNT/A – *ibid.*, 685-6.

[0024] La segunda teoría postula que la persistencia de una toxina en particular depende de su vida media o estabilidad intracelular, es decir, cuanto más tiempo está disponible la toxina en la célula, más prolongado es su efecto - Keller, et al., *FEBS Letters* 456:137-42 (1999). Son muchos los factores que contribuyen a la estabilidad intracelular de una toxina, pero primordialmente, cuanto mayor es la capacidad de resistir las acciones metabólicas de las proteasas intracelulares para degradarla, más estable resulta - Erdal, et al., *Naunynschmiedeber's Arch. Pharmacol.* 351:67-78 (1995).

[0025] En general, la capacidad de una molécula para resistir las acciones metabólicas de las proteasas intracelulares puede depender de su estructura. Por ejemplo, la estructura primaria de una molécula puede incluir una secuencia primaria única que haga que la molécula resulte fácilmente degradada por las proteasas o, por el contrario, que resulte difícil de degradar. Por ejemplo, Varshavsky describe que polipéptidos que terminan en ciertos aminoácidos son más susceptibles a las proteasas que los degradan - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12142-12149 (1996).

[0026] Asimismo, se conoce que hay enzimas intracelulares que modifican moléculas, por ejemplo polipéptidos, por mecanismos tales como la de la N-glicosilación, fosforilación, etc. - y a esta clase de modificación se la denomina en la presente "modificación secundaria". "Modificación secundaria"

denota a menudo la modificación de moléculas endógenas, por ejemplo polipéptidos, después de su traducción a partir del ARN. Sin embargo, como se usa en la presente, "modificación secundaria" puede referirse también a la capacidad de una enzima, por ejemplo de una enzima intracelular, para modificar moléculas exógenas. Por ejemplo, después que un paciente recibe moléculas exógenas, p. ej. drogas, estas moléculas pueden sufrir una modificación secundaria por acción de enzimas del paciente, por ejemplo de enzimas intracelulares.

[0027] Ciertas modificaciones secundarias en las moléculas, por ejemplo de polipéptidos, pueden hacerlas más resistentes o más sensibles a las acciones de las proteasas que las degradan. Estas modificaciones secundarias pueden, entre otras cosas, (1) afectar la capacidad de una proteasa para actuar directamente sobre la molécula y degradarla y/o (2) afectar la capacidad de las moléculas para quedar secuestradas en las vesículas y protegerse así contra la acción de degradación de las proteasas.

[0028] La neurotoxina clostridial puede ser uno de los serotipos A, B, C₁, D, E, F y G de la toxina botulínica, incluyendo una toxina botulínica que está libre de las proteínas complejantes presentes en la neurotoxina natural, o ser una neurotoxina modificada químicamente o modificada por ingeniería genética. La neurotoxina modificada química o genéticamente está libre de las proteínas complejantes que en estado natural forman complejos con la neurotoxina botulínica.

[0029] La modificación de la neurotoxina derivada de la neurotoxina botulínica realizada mediante modificación química o ingeniería genética puede hacerse en cada parte de la proteína de la neurotoxina, por ejemplo, en la parte

de la cadena pesada y/o en la parte de la cadena liviana de la molécula de la neurotoxina. Puede haber una o más modificaciones. En una realización, la cadena pesada de la proteína neurotoxina derivada de la neurotoxina botulínica comprende una o más modificaciones que pueden disminuir o aumentar la afinidad de unión de la neurotoxina a las células nerviosas en comparación con la neurotoxina natural. Dicha neurotoxina modificada puede comprender al menos una sustitución y/o delección y/o inserción y/o adición y/o modificación post-traducción de aminoácidos de la neurotoxina y, preferiblemente, de la cadena pesada de la neurotoxina.

[0030] Existe la necesidad de contar con neurotoxinas modificadas que posean la eficacia de los diversos serotipos de toxina botulínica, pero con persistencia biológica alterada (más corta) y que exhiban reducido potencial de formación de anticuerpos.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0031] La presente invención concierne al mejoramiento de la cicatrización de superficies o tejidos superficiales lesionados en un paciente usando neurotoxinas de *Clostridium* naturales y/o modificadas, así como neurotoxinas libres de proteínas complejantes. Dicho uso abarca aplicaciones en la cicatrización de heridas (que incluye el uso en la prevención de formación de cicatrices). así como el uso en oftalmología (p. ej. en el tratamiento del tejido lesionado de la córnea, por ejemplo para cerrar ojos inflamados). Otra indicación es el uso para fines diagnósticos. Se contempla la administración de las neurotoxinas del *Clostridium botulinum* de los serotipos A, B, C₁, D, E, F y G para facilitar la cicatrización de heridas y prevenir la formación de cicatrices de acuerdo con el tiempo deseado de duración de su efecto. Asimismo, se pueden

usar neurotoxinas clostridiales con acción corta y que pueden estar libres de proteínas complejantes en los casos en que se busque una parálisis muscular de duración relativamente corta.

[0032] La invención se basa en la inmovilización del área que circunda el tejido lesionado, como una herida, mediante la parálisis de los músculos que actúan en la zona. Esto se puede lograr inyectando un relajante muscular de acción periférica directamente en los músculos correspondientes. El relajante muscular de acción periférica se elige entre una neurotoxina natural o modificada, como una neurotoxina clostridial, que tiene acción corta y que puede estar libre de proteínas complejantes. Las toxinas botulínicas de tipo E y de tipo F son realizaciones de esta invención.

[0033] La presente invención contempla también el mejoramiento de la cicatrización en la queratitis, en determinadas intervenciones quirúrgicas en el ojo. El cierre de los párpados se puede obtener mediante ptosis inducida farmacológicamente, lo que se logra mediante la administración de un relajante muscular de acción periférica y local. Este relajante muscular se elige entre neurotoxinas naturales o modificadas de acción corta, como una neurotoxina clostridial que tiene acción corta y puede estar libre de proteínas complejantes. Esta medida sirve para inmovilizar el ojo, favoreciendo así la cicatrización. Las toxinas botulínicas de tipo E o de tipo F constituyen realizaciones.

[0034] En otro aspecto de la invención, se usan toxinas botulínicas de acción corta que están libres de proteínas complejantes como herramienta diagnóstica para localizar la zona óptima de inyección de toxinas botulínicas de acción más prolongada que se usarán para tratar diversas condiciones. La toxina botulínica de tipo E constituye una realización.

[0035] En consecuencia, lo que consideramos comprendido por nuestra invención se puede resumir, entre otras, de la siguiente manera:

[0036] El uso de una neurotoxina de *Clostridium*, natural o modificada, para la fabricación de un medicamento destinado a mejorar la cicatrización de una superficie o de un tejido superficial lesionado de un paciente, donde dicho medicamento se fabrica para ser administrado localmente en dicho tejido lesionado o muy próximo al mismo, así como el

[0037] uso donde la neurotoxina de *Clostridium* está libre de proteínas complejantes que naturalmente forman complejos con las neurotoxinas clostridiales, así como el

[0038] uso donde la neurotoxina de *Clostridium* natural o modificada se caracteriza por tener una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 4 semanas, así como el

[0039] uso donde la neurotoxina de *Clostridium* es toxina botulínica tipo F, así como el

[0040] uso donde la neurotoxina de *Clostridium* natural o modificada se caracteriza por una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 10 días, así como el

[0041] uso donde la neurotoxina de *Clostridium* es toxina botulínica tipo E, así como el

[0042] uso donde la neurotoxina de *Clostridium* es una neurotoxina modificada con una eficacia que dura aproximadamente 1 a 4 semanas, así como el

[0043] uso donde dicho tejido lesionado comprende una herida, así como el

[0044] uso donde dicho tejido lesionado comprende tejido corneal y dicho medicamento se fabrica para ser administrado localmente en el párpado adyacente o muy próximo al mismo, y así como el

[0045] uso para la fabricación de un medicamento con dos componentes, donde el primer componente comprende una neurotoxina de Clostridium que tiene una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 10 días, para usar en la determinación de la zona óptima de administración, y el segundo componente comprende una neurotoxina de Clostridium que tiene una eficacia de acción prolongada, de aproximadamente 12 semanas, para su posterior administración terapéutica. Además,

[0046] un método para tratar a un paciente que tiene una lesión en una superficie o tejido superficial, donde dicho método comprende la administración local de una neurotoxina de Clostridium natural o modificada en dicho tejido lesionado o muy próximo al mismo, de modo de mejorar la cicatrización de la lesión, así como el

[0047] método donde la neurotoxina de Clostridium está libre de proteínas complejantes que naturalmente forman complejos con las neurotoxinas clostridiales, así como el

[0048] método donde la neurotoxina de Clostridium natural o modificada se caracteriza por una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 4 semanas, así como el

[0049] método donde la neurotoxina de Clostridium es toxina botulínica tipo F, así como el

[0050] método donde la neurotoxina de Clostridium natural o modificada se caracteriza por una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 10 días, así como el

[0051] método donde la neurotoxina de Clostridium es toxina botulínica tipo E, así como el

[0052] método donde la neurotoxina de Clostridium es una neurotoxina modificada con una eficacia que dura aproximadamente 1 a 4 semanas, así como el

[0053] método donde dicho tejido lesionado comprende una herida, y así como el

[0054] método donde dicho tejido lesionado comprende tejido corneal y dicha neurotoxina de Clostridium se administra en el párpado adyacente o muy próximo al mismo de modo que el párpado permanece cerrado y se mejora la cicatrización del tejido corneal lesionado. Además,

[0055] un método para tratar a un paciente que tiene una condición oftalmológica que requiere el cierre de un párpado para la cicatrización de la condición oftalmológica, que comprende la administración local de una neurotoxina de Clostridium natural o modificada en el párpado o muy próximo al mismo de modo que el párpado permanece cerrado y se mejora la cicatrización de la condición oftalmológica. Además,

[0056] un método para determinar una zona óptima para la inyección de una neurotoxina de Clostridium que tiene una eficacia de acción prolongada, de aproximadamente 12 semanas, que comprende una o más administraciones locales iniciales de una neurotoxina de Clostridium natural o modificada que tiene una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 10 días, con el

fin de determinar los efectos de la administración en uno o más sitios específicos y optimizar así el sitio de administración a usar posteriormente para dicha neurotoxina de Clostridium que tiene eficacia de duración prolongada, así como el

[0057] método donde la neurotoxina de Clostridium natural o modificada se caracteriza por una eficacia de acción corta, de aproximadamente 3 a 10 días, y está libre de proteínas complejantes que naturalmente forman complejos con las neurotoxinas clostridiales, y así como el

[0058] método donde la neurotoxina de Clostridium natural o modificada es toxina botulínica tipo E. Asimismo,

[0059] un medicamento combinado que comprende un primero y un segundo componente que se pueden administrar por separado, donde el primer componente comprende una neurotoxina de Clostridium que tiene una eficacia de acción corta, de aproximadamente 3 a 10 días, y el segundo componente comprende una neurotoxina de Clostridium que tiene una eficacia de acción prolongada, de aproximadamente 12 semanas, y así como el

[0060] medicamento combinado que incluye además instrucciones para el uso de dicho primer componente para determinar los efectos de la administración a un paciente en uno o más sitios específicos con el fin de permitir la selección de un sitio óptimo para la posterior administración de dicho segundo componente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0061] Como se describió en la presente, la cicatrización de una herida después de una lesión o una intervención quirúrgica se ve adversamente afectada por la tensión en los bordes de la herida. La presente invención

comprende el mejoramiento de la cicatrización de heridas y la prevención de la formación de cicatrices usando neurotoxinas naturales y/o modificadas, incluyendo neurotoxinas clostridiales, así como aquellas neurotoxinas libres de proteínas complejantes. Este aspecto de la invención se basa en un nuevo método para inmovilizar la zona alrededor de la herida mediante la parálisis de los músculos que actúan sobre la herida. Lo indicado se puede lograr inyectando un relajante muscular de acción periférica directamente en los músculos correspondientes. Sin embargo, los relajantes musculares convencionales no resultan adecuados por los dos motivos siguientes. Primero, debido a sus bajo peso molecular tienen una rápida difusión, alejándose del sitio de la inyección y provocando así efectos no deseados en otras partes del cuerpo. Segundo, su metabolismo local es muy rápido, lo que hace que pierdan eficacia.

[0062] La toxina botulínica, un relajante muscular de acción periférica, permanece de manera ventajosa en el sitio de inyección durante el tiempo suficiente para poder ser captada por los nervios, en los cuales se mantiene en su forma activa durante un período prolongado. Gracias al alto peso molecular de la toxina, la cantidad que no es captada se aleja lentamente por difusión desde el sitio de la inyección. Debido al grado en que se diluye en la sangre circulante, no se ven afectados los nervios más distantes. La toxina se inactiva rápidamente por acción de las proteasas del suero. Los diversos serotipos de toxina botulínica tienen tiempos de acción diferentes. Mientras que los serotipos A y B bloquean los nervios durante muchas semanas, el serotipo F mantiene el bloqueo durante 3-4 semanas y el serotipo E durante sólo 3-10 días. Para obtener un período de parálisis breve, hay que inyectar la toxina

algunos días antes de la operación en uno o varios sitios en torno al campo operatorio, de acuerdo con el tamaño del músculo que se busca paralizar. Según sea el tiempo de parálisis deseado, se puede seleccionar el serotipo E o el F. Como la musculatura en el sitio elegido para la operación ya está paralizada en el momento de iniciar el procedimiento, el anestesista necesita menos cantidad de relajantes musculares de acción postsináptica. De este modo se reduce el riesgo de problemas respiratorios ocasionados por la parálisis de los músculos respiratorios en el postoperatorio. Como la parálisis local en el sitio de la operación se mantiene hasta 4-5 días después de la intervención, durante este tiempo las suturas de la herida no quedan sometidas a tensión adicional. El período de inmovilización local deberá mantenerse al máximo, hasta que la herida cicatrice por completo; típicamente el máximo es de 1-2 semanas. Si la cicatrización de la herida se complica, por ejemplo en una cicatrización por segunda intención, puede estar indicada una parálisis de mayor duración. En otra realización, cuando se desea una duración más prolongada de la parálisis muscular para la cicatrización de la herida, se justifica administrar toxina botulínica del serotipo A o B. La recuperación de la función del nervio se produce lentamente tras la degradación de las toxinas en las células nerviosas y se completa aproximadamente 2 días después de la degradación proteolítica total de la toxina. No se prevé que la breve inmovilización pueda producir atrofia significativa del músculo.

[0063] En otra realización, las neurotoxinas de *Clostridium botulinum* de los serotipos A o B, C₁, D, E, F, G que están libres de proteínas complejantes, hemaglutininas y de otras proteínas exógenas se pueden usar ventajosamente para facilitar la cicatrización de la herida y prevenir la formación de cicatrices.

Como alternativa a los dos tipos comerciales de complejos de toxina botulínica tipo A, BOTOX® y DYSPORT®, y también como alternativa a los complejos de los otros tipos descritos en el arte previo (B, C₁, D, E, F, G), se ha desarrollado un nuevo producto farmacéutico que comprende únicamente neurotoxina (tipo A, B, C₁, D, E, F o G) libre de proteínas complejantes, hemaglutininas y de otras proteínas exógenas. Gracias a su menor masa molecular, se difunde más rápidamente hacia las células blanco, donde es captada, antes que se activen las células inmunitarias atraídas por las hemaglutininas. Los estudios de capacidad antigénica demuestran que cualquier tipo de neurotoxina que esté libre de proteínas complejantes no induce la formación de anticuerpos, o lo hace en un grado mínimo, a diferencia de los productos comerciales de la de tipo A y de los complejos de los tipos B a G. En el uso terapéutico de este producto farmacéutico recién desarrollado (neurotoxina de los tipos A, B, C₁, D, E, F o G que está libre de proteínas complejantes) no se observa el fracaso de la terapia por formación de anticuerpos, incluso con la administración repetida. También fue posible demostrar que esta clase de neurotoxinas, por su biodisponibilidad inmediata, siguen siendo aptas para la terapia de pacientes que ya han desarrollado, tras la administración de un complejo de toxina botulínica, p. ej. después del tratamiento con BOTOX® o DYSPORT®, un título de anticuerpos contra el serotipo correspondiente (los denominados no respondedores secundarios), vale decir, que ya no son susceptibles de nuevos tratamientos con BOTOX® o DYSPORT® en razón de que la administración de las toxinas comerciales ha dejado de proporcionar un efecto terapéutico.

[0064] Este producto farmacéutico de reciente desarrollo se puede emplear en forma particularmente ventajosa en pacientes que nunca fueron tratados con neurotoxina botulínica, o que no la ha recibido durante muchos años, ya que desde un principio su título de anticuerpos es muy bajo o igual a cero. La ventaja de su uso resulta entonces de que, en estos pacientes, gracias al tratamiento con toxina pura, el título es igual a cero o, en todo caso, insignificante. En otros términos, la composición terapéutica de reciente desarrollo se puede administrar durante largos períodos sin que haya pérdida de su efecto. También es adecuada para pacientes que tienen títulos positivos de anticuerpos contra una toxina botulínica.

[0065] De este modo, la inducción de la producción de anticuerpos durante la terapia con una neurotoxina de *Clostridium botulinum* se previene mediante la administración de una neurotoxina libre de proteínas complejantes en lugar de los complejos de toxina de alto peso molecular. La neurotoxina que fue completamente separada de las proteínas que forman el complejo tiene biodisponibilidad inmediata y se puede unirse directamente a las terminaciones nerviosas de las placas neuromusculares.

[0066] En las queratitis y en ciertas intervenciones quirúrgicas del ojo, se mantiene el ojo cerrado mediante un vendaje oclusivo o suturando entre el párpado superior con el inferior. Esta medida sirve para inmovilizar el ojo, favoreciendo así la cicatrización. El control diario del proceso de cicatrización se puede hacer en el momento de cambiar el vendaje. En cambio, no es posible examinar la superficie del ojo cuando los párpados están suturados entre sí. El cierre de los párpados también se puede obtener mediante ptosis inducida farmacológicamente, a través de la inyección de un relajante muscular

de acción periférica y local. De acuerdo con el tiempo que se desee mantener el cierre, se inyecta toxina botulínica E o F en el músculo elevador del párpado superior. La ventaja de este procedimiento es evidente. El ojo queda accesible para su examen, de modo que resulta posible controlar el proceso de cicatrización y tomar cualquier medida que resulte necesaria sin estrés para el paciente. La ptosis transitoria es reversible, del mismo modo que las parálisis descritas anteriormente.

[0067] Como ya se describió en detalle más arriba, la toxina botulínica de serotipos A y B se usa en la distonía o la espasticidad de diferentes orígenes. Cuando el trastorno tiene un carácter complejo o cuando los síntomas responden a varios grupos musculares involucrados, a menudo no se puede determinar fácilmente cuál es el músculo que corresponde paralizar para proporcionar el máximo alivio al paciente. Las inyecciones de prueba de los serotipos A o B causarían mayor estrés al paciente si se aplicaran en el músculo incorrecto. Para localizar la zona óptima para la posterior inyección terapéutica con una toxina de eficacia de duración prolongada, se puede realizar una prueba usando una toxina de acción corta. La toxina botulínica E es adecuada para esta clase de prueba diagnóstica. El paciente puede experimentar los cambios esperados antes de recibir el tratamiento completo. Como esta acción dura sólo unos pocos días, el paciente puede percibir cuáles serán los efectos que obtendrá posteriormente a partir del tratamiento con una toxina de acción prolongada. En caso de que la inyección no resultara la óptima, el efecto molesto durará sólo un corto tiempo y podrá aplicarse otra inyección para probar el efecto sobre otro músculo.

EJEMPLOS

48
55**Ejemplo 1**

Mejoramiento de la cicatrización de heridas mediante la inyección de toxina botulínica en humanos

[0068] Un paciente es sometido a cirugía de excisión de la cicatriz para revisión. La cicatriz se encuentra localizada en el abdomen. La cicatriz es el resultado de un traumatismo que fue cerrado en su momento en un centro de atención terciaria.

[0069] Se coloca al paciente en decúbito y se inyectan localmente 5 ml de lidocaína al 0,5% con 1:200.000 de adrenalina. Se hace la excisión de la cicatriz y se controla la hemorragia con electrocauterio monopolar. Se inyecta toxina botulínica A, que está libre de proteínas complejantes (10 unidades), en la periferia de la herida y en dirección distal a los bordes. La herida fue cerrada usando vicryl 6-0 para las suturas profundas y nylon 6-0 para las superficiales.

[0070] Aproximadamente 24 horas después de la cirugía, el paciente desarrolla marcada parálisis de los músculos inyectados y perdió la capacidad de mover la piel en una zona de aproximadamente 4 centímetros de diámetro alrededor de la excisión. La herida cicatriza bien en el período postoperatorio temprano. Se puede ver que hay disminución del movimiento y la tensión en los bordes de la herida. La herida del paciente cierra sin complicaciones. En comparación con la cicatriz previa a la operación, el aspecto cosmético de la cicatriz resultante a los 12 meses de la intervención es excelente y superior al de la cicatriz inicial.

Ejemplo 2

Ptosia inducida por toxina botulínica para promover la cicatrización corneal

b
56

[0071] Un paciente presenta queratitis o es sometido a una intervención quirúrgica del ojo.

[0072] Se inyecta toxina botulínica tipo E o F que está libre de proteínas complejantes en el músculo elevador del párpado superior para provocar una ptosis flácida en el párpado superior y suministrar una protección segura y eficaz de la córnea. Se examina el ojo para controlar el proceso de cicatrización. Se repiten las inyecciones hasta la curación de la enfermedad o condición de base.

OTRAS REALIZACIONES

[0073] Queda entendido que, si bien la invención se describió conjuntamente con su descripción detallada, la descripción precedente tiene solamente fines ilustrativos y no limita el alcance de la invención, el cual queda definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

Se reivindica lo siguiente:

1. El uso de una neurotoxina de Clostridium, natural o modificada, para la fabricación de un medicamento destinado a mejorar la cicatrización de una superficie o de un tejido superficial lesionado de un paciente, en el cual dicho medicamento se fabrica para ser administrado localmente en dicho tejido lesionado o muy próximo al mismo.

2. El uso reivindicado en la reivindicación 1, en el cual la neurotoxina de Clostridium está libre de proteínas complejantes que naturalmente forman complejos con las neurotoxinas clostridiales.

3. El uso reivindicado en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en el cual la neurotoxina de Clostridium natural o modificada se caracteriza por una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 4 semanas.

4. El uso reivindicado en la reivindicación 3 en el cual la neurotoxina de Clostridium es toxina botulínica tipo F.

5. El uso reivindicado en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en el cual la neurotoxina de Clostridium natural o modificada se caracteriza por una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 10 días.

6. El uso reivindicado en la reivindicación 5, en el cual la neurotoxina de Clostridium es toxina botulínica tipo E.

7. El uso reivindicado en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en el cual la neurotoxina de Clostridium es una neurotoxina modificada con una eficacia que dura aproximadamente de 1 a 4 semanas.

8. El uso reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual dicho tejido lesionado comprende una herida.

9. El uso reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual dicho tejido lesionado comprende tejido corneal y dicho medicamento se fabrica para ser administrado localmente en el párpado adyacente o muy próximo al mismo.

10. El uso reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual se fabrica un medicamento con dos componentes, donde el primer componente comprende una neurotoxina de Clostridium que tiene una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 10 días para usar en la determinación de la zona óptima de administración, y el segundo componente comprende una neurotoxina de Clostridium que tiene una eficacia de acción prolongada, de aproximadamente 12 semanas, para su posterior administración terapéutica.

11. Un método para tratar a un paciente que tiene una lesión en una superficie o tejido superficial, en el cual dicho método comprende la administración local de una neurotoxina de Clostridium natural o modificada en dicho tejido lesionado o muy próximo al mismo, de modo de mejorar la cicatrización de la lesión.

12. El método de la reivindicación 11, en el cual la neurotoxina de Clostridium está libre de proteínas complejantes que naturalmente forman complejos con las neurotoxinas clostridiales.

13. El método de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el cual la neurotoxina de Clostridium natural o modificada se caracteriza por una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 4 semanas.

14. El método de la reivindicación 13, en el cual la neurotoxina de Clostridium es toxina botulínica tipo F.

15. El método de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el cual la neurotoxina de Clostridium natural o modificada se caracteriza por una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 10 días.

16. El método de la reivindicación 15, en el cual la neurotoxina de Clostridium es toxina botulínica tipo E.

17. El método de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el cual la neurotoxina de Clostridium es una neurotoxina modificada con una eficacia que dura aproximadamente de 1 a 4 semanas.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en el cual dicho tejido lesionado comprende una herida.

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el cual dicho tejido lesionado comprende tejido corneal y dicha neurotoxina de Clostridium se administra en el párpado adyacente o muy próximo al mismo de modo que el párpado permanece cerrado y se mejora la cicatrización del tejido corneal lesionado.

20. Un método para determinar una zona óptima para la inyección de una neurotoxina de Clostridium que tiene una eficacia de acción prolongada, de aproximadamente 12 semanas, que comprende una o más administraciones locales iniciales de una neurotoxina de Clostridium natural o modificada que tiene una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 10 días, con el fin de determinar los efectos de la administración en uno o más sitios específicos y optimizar así el sitio de administración a usar posteriormente para dicha neurotoxina de Clostridium que tiene eficacia de duración prolongada.

21. El método de la reivindicación 20, en el cual la neurotoxina de Clostridium natural o modificada se caracteriza por una eficacia de corta

duración, de aproximadamente 3 a 10 días y está libre de proteínas complejantes que naturalmente forman complejos con las neurotoxinas clostridiales.

22. El método de la reivindicación 20 o la reivindicación 21, en el cual la neurotoxina de Clostridium natural o modificada es toxina botulínica tipo E.

23. Un medicamento combinado que comprende un primero y un segundo componente que se pueden administrar por separado, en el cual el primer componente comprende una neurotoxina de Clostridium que tiene una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 10 días y el segundo componente comprende una neurotoxina de Clostridium que tiene una eficacia de acción prolongada, de aproximadamente 12 semanas,.

24. Un medicamento combinado como el reivindicado en la reivindicación 23, que incluye además instrucciones para el uso de dicho primer componente para determinar los efectos de la administración a un paciente en uno o más sitios específicos con el fin de permitir la selección de un sitio óptimo para la posterior administración de dicho segundo componente.

RESUMEN

Se usan neurotoxinas de Clostridium naturales y/o modificadas, incluyendo aquellas neurotoxinas libres de proteínas complejantes que naturalmente forman complejos con las neurotoxinas clostridiales, para mejorar la cicatrización de una superficie o tejido superficial lesionado de un paciente mediante la administración local en el tejido lesionado o muy próximo al mismo. Dichas neurotoxinas se pueden emplear ventajosamente en la cicatrización de heridas y la prevención de formación de cicatrices y encuentran aplicación en el campo de la oftalmología, p. ej., en el tratamiento del tejido lesionado de la córnea, por ejemplo mediante el cierre del ojo inflamado. Otra realización incluye el uso diagnóstico para evaluar la administración eficaz de la toxina y medicamentos para emplear en dicho uso.

INTERNATI NAL SEARCH REPORT

International Application No.
/GB2005/003728A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K39/08 A61P17/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 6 447 787 B1 (GASSNER HOLGER G ET AL) 10 September 2002 (2002-09-10) column 1, line 9 - line 28 claims; examples	1,11 2-10, 12-19, 23,24
X	US 2003/036502 A1 (GASSNER HOLGER G ET AL) 20 February 2003 (2003-02-20) paragraph '0007! - paragraph '0009! claims; examples	1,11
X	EP 0 845 267 A (BINDER, WILLIAM J) 3 June 1998 (1998-06-03) page 3, line 29 - line 56 page 5, line 11 - line 32 claims; examples	1,11
	-/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 2005

Date of mailing of the international search report

23/12/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5518 Patentamt 2
AL - 8250 HV Munich
Tel. (+31-70) 340-3040, Tx 31 651 ops nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rankin, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
'GB2005/003728

163

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/74703 A (BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG; BIGALKE, HANS; FRE) 14 December 2000 (2000-12-14) cited in the application page 1, line 8 - line 17 page 2, line 11 - line 26 page 5, line 1 - line 26 claims; examples	2-10, 12-19, 23,24
P,X	WO 2005/056050 A (ALLERGAN, INC; FIRST, ERIC, R) 23 June 2005 (2005-06-23) page 1, line 9 - line 11 page 9, line 11 - line 30 page 32, line 19 - page 33, line 21 claims; examples	1,10,11

5
64

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 11-22 are directed to a method of treatment of the animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
- ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
- ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

- ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
- ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
- ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
.../682005/003728

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6447787 B1	10-09-2002	US 2003036502 A1	20-02-2003
US 2003036502 A1	20-02-2003	US 6447787 B1	10-09-2002
EP 0845267 A	03-06-1998	AT 216589 T	15-05-2002
		DE 69620888 D1	29-05-2002
		DE 69620888 T2	14-08-2002
WO 0074703 A	14-12-2000	AT 258803 T	15-02-2004
		AU 774590 B2	01-07-2004
		AU 5804700 A	28-12-2000
		CA 2376193 A1	14-12-2000
		CN 1354670 A	19-06-2002
		CZ 20014351 A3	12-06-2002
		DE 10081516 D2	13-09-2001
		DE 19925739 A1	21-12-2000
		OK 1185291 T3	05-04-2004
		EA 4202 B1	26-02-2004
		EP 1185291 A2	13-03-2002
		ES 2215056 T3	01-10-2004
		HU 0201530 A2	28-09-2002
		JP 2003505343 T	12-02-2003
		NO 20015964 A	30-01-2002
		PL 352468 A1	25-08-2003
		PT 1185291 T	30-06-2004
		UA 72253 C2	15-03-2002
		ZA 200110074 A	06-03-2003
WO 2005056050 A	23-06-2005	US 2005123567 A1	09-06-2005

65

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP2005/003728

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K39/08 A61P17/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 447 787 B1 (GASSNER HOLGER G ET AL) 10 September 2002 (2002-09-10) column 1, line 9 - line 28	1,11
Y	claims; examples	2-10, 12-19, 23,24
X	US 2003/036502 A1 (GASSNER HOLGER G ET AL) 20 February 2003 (2003-02-20) paragraph '0007! - paragraph '0009! claims; examples	1,11
X	EP 0 845 267 A (BINDER, WILLIAM J) 3 June 1998 (1998-06-03) page 3, line 29 - line 56 page 5, line 11 - line 32 claims; examples	1,11
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 December 2005		Date of mailing of the international search report 23/12/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 6616 Patentamt 2 AL - 2280 HNF Rijnsburg Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Rankin, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

GB2005/003728

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/74703 A (BIOTECON GESELLSCHAFT FUER BIOTECHNOLOGISCHE ENTW; BIGALKE, HANS; FRE) 14 December 2000 (2000-12-14) cited in the application page 1, line 8 - line 17 page 2, line 11 - line 26 page 5, line 1 - line 26 claims; examples	2-10, 12-19, 23,24
P,X	WO 2005/056050 A (ALLERGAN, INC; FIRST, ERIC, R) 23 June 2005 (2005-06-23) page 1, line 9 - line 11 page 9, line 11 - line 30 page 32, line 19 - page 33, line 21 claims; examples	1,10,11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

SP
68

International application No.
PCT/GB2005/003728

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 11-22 are directed to a method of treatment of the animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

.../682005/003728

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6447787 B1	10-09-2002	US 2003036502 A1	20-02-2003
US 2003036502 A1	20-02-2003	US 6447787 B1	10-09-2002
EP 0845267 A	03-06-1998	AT 216589 T	15-05-2002
		DE 69620888 D1	29-05-2002
		DE 69620888 T2	14-08-2002
WO 0074703 A	14-12-2000	AT 258803 T	15-02-2004
		AU 774590 B2	01-07-2004
		AU 5804700 A	28-12-2000
		CA 2376193 A1	14-12-2000
		CN 1354670 A	19-06-2002
		CZ 20014351 A3	12-06-2002
		DE 10081516 D2	13-09-2001
		DE 19925739 A1	21-12-2000
		OK 1185291 T3	05-04-2004
		EA 4202 B1	26-02-2004
		EP 1185291 A2	13-03-2002
		ES 2215056 T3	01-10-2004
		HU 0201530 A2	28-09-2002
		JP 2003505343 T	12-02-2003
		NO 20015964 A	30-01-2002
		PL 352468 A1	25-08-2003
		PT 1185291 T	30-06-2004
		UA 72253 C2	15-03-2002
		ZA 200110074 A	06-03-2003
WO 2005056050 A	23-06-2005	US 2005123567 A1	09-06-2005

69

8/10

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/GB2005/003728

International filing date (day/month/year)
27.09.2005

Priority date (day/month/year)
27.09.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K39/08, A61P17/02

Applicant
MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 56.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523658 epmu d
Fax: +49 89 2369 - 4485

Authorized Officer

Rankin, R
Telephone No. +49 89 2369-2850



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2005/003728

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☐ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☐ in written format
☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☐ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

27
72

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 11-22 (for reasons of industrial applicability)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 11-22 (for reasons of industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (indicate particular elements below) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

27
73

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2005/003728

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	2-9, 12-24
	No: Claims	1, 11
Inventive step (IS)	Yes: Claims	20-22
	No: Claims	1-19, 23, 24
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-10, 23, 24
	No: Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

- 1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)**
and / or
- 2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)**
see form 210

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GB2005/003728

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 11-22 relate to subject matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT)

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

For the assessment of the present claims 11-22 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist within the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as industrially applicable the subject matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Cited Documents

Reference is made to the following documents:

- D1: US-B1-6 447 787 (GASSNER HOLGER G ET AL) 10 September 2002 (2002-09-10)
- D2: US 2003/036502 A1 (GASSNER HOLGER G ET AL) 20 February 2003 (2003-02-20)
- D3: EP-A-0 845 267 (BINDER, WILLIAM J) 3 June 1998 (1998-06-03)
- D4: WO 00/74703 A (BIOTECON GESELLSCHAFT FUER BIOTECHNOLOGISCHE ENTW; BIGALKE, HANS; FRE) 14 December 2000 (2000-12-14)

Article 33(2) PCT

The subject matter of claims 1 and 11 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

D1 discloses the use of a natural, complexed clostridial neurotoxin (BOTOX™, Type A toxin) for the enhancement of wound healing (cf column 1, lines 9-28; examples; claims). The toxin is delivered locally at the site of the lesions and administration thereof leads to the enhancement of healing of the injury. As a consequence, the subject matter of claims 1 and 11 are not new (Article 33(2) PCT).

D2 discloses the use of a natural, complexed clostridial neurotoxin (BOTOX™, Type A toxin) for the enhancement of wound healing, either alone or in combination with lidocaine (cf paragraphs 7-9; examples; claims). The toxin is delivered locally at the site of the lesions and administration thereof leads to the enhancement of healing of the injury. As a consequence, the subject matter of claims 1 and 11 are not new (Article 33(2) PCT).

D3 discloses the use of natural, complexed Botulinium Toxin A as a medicament for the therapy of cutaneous disorders involving cell proliferation such as eczema and psoriasis. The toxin is delivered locally at the site of the lesions and administration thereof leads to the enhancement of healing of the injury (cf page 3, lines 29-56; page 5, lines 11-32; examples; claims). As a consequence, the subject matter of claims 1 and 11 are not new (Article 33(2) PCT).

The subject matter of claims 2-10 and 12-24 are new with regard to D1-D3 (Article 33(2) PCT).

Article 33(3) PCT

For claim 2, the closest prior art is considered to be D1, this document is described above.

The difference between the subject matter of claim 2 and that of D1 is that the neurotoxin used in claim 2 is free of complexing proteins.

The effect of the difference is that the toxin preparation is able to penetrate tissue more efficiently and less antigenic, thereby rendering it more amenable for repeated administration without loss of effect.

The problem to be solved may therefore be considered as providing an alternate botulinium toxin for use in the preparation of a medicament for the enhancement of wound healing.

The subject matter of claim 2 solves this problem but cannot be considered inventive given the disclosure of D4 which shows that uncomplexed botulinium toxins are viable candidates for use in therapy. D4 teaches that such uncomplexed molecules are less immunogenic and are particularly useful for repeated administration even in patient who

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GB2005/003728

are seropositive as a result of previous exposure to complexed botulinium toxin. The botulinium toxins A, B, C, D, E, F and G may all be produced in uncomplexed forms according to D4 and be used in therapy. D4 also teaches that these various toxins may be administered to a patient in a mixture (cf page 1, lines 8-17; page 2, lines 11-26; page 5, lines 1-26; examples; claims). The skilled person would, therefore, view the toxin molecules of D4 as being viable alternatives for use in the therapy of wound healing and as a result, the subject matter of claim 2 cannot be considered to be inventive. The subject matter of claims 3-10, 12-19, 23 and 24 also do not contain subject matter which is considered inventive in light of a combination of the documents D1 and D4 (Article 33(3) PCT).

Claims 20-22 contain subject matter which is considered inventive (Article 33(3) PCT)

The closest prior art is D1, which is described above.

The difference between the subject matter of claim 20 and D1 is that the method of claim 20 involves the administration of a botulinium toxin of short effect to determine the optimal area for subsequent injection with a toxin with a long lasting effect.

The effect of the difference is that wound healing may be more efficiently and empirically attained in a patient.

The problem to be solved may therefore be considered as being to devise a method of enhancing wound healing which takes advantage of the differing activities of botulinium toxins.

The subject matter of claim 20 solves this problem and is considered inventive since the skilled person would not be prompted by the prior art to arrive at such a method either by one document or by a combination of documents. None of the cited art teach in the direction of this solution and hence, the skilled person could not arrive at the subject matter of claim 20 without the exercise of inventive skill. Claim 20 is therefore considered inventive, as are claims 21 and 22 (Article 33(3) PCT).

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GB2005/003728

Re Item VI

Certain documents cited

Rule 70.10 PCT

The following document falls within the meaning of Rule 70.10 PCT. Its content is considered as relevant for the present claims. It should be mentioned that the validity of its claimed priority and that of the present application has not been checked.

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO2005/058050	23.06.2005	08.12.2004	09.12.2003

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 408.89223

Box No. I TITLE OF INVENTION Clostridial neurotoxins for use in tissue healing	
Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor	
Name and address: (Please name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.) Merz Pharma GmbH & Co. KGaA Eckenheimer Landstrasse 100 60318 Frankfurt DE	Telephone No. Facsimile No. Teleprinter No. Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: DE	State (that is, country) of residence: DE
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
Name and address: (Please name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.) MARSDEN, John Christopher Frank B. Dehn & Co. 179 Queen Victoria Street London EC4V 4EL GB	This person is: ☒ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: GB	State (that is, country) of residence: GB
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☒ the States indicated in the Supplemental Box	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative	
Name and address: (Please name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) MARSDEN, John Christopher Frank B. Dehn & Co. 179 Queen Victoria Street London EC4V 4EL GB	Telephone No. +44 20 7206 0600 Facsimile No. +44 20 7206 0700 Teleprinter No. Agent's registration No. with the Office
☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) TAYLOR, Harold Victor An den drei Hohen 76 60534 Frankfurt DE	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: DE
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.	

Supplemental Box
If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.

1. *If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(1) to (4) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the caption of the Box in which the space was insufficient, in particular:*
 - (i) *If more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;*
 - (ii) *If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;*
 - (iii) *If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;*
 - (iv) *If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;*
 - (v) *If, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.*
2. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other parent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a) (iii) and 49bis.1(a) or (b)).*
3. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a) (iv) and 49bis.1(d)).*

Continuation of Box No. III

Applicant Maraden is coapplicant with applicant Merz Pharma GmbH & Co. KGaA for the designation of GB for national and EP(UK) patents

Box No. V DESIGNATIONS				
The filing of this request constitutes under Rule 4.9(e), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents. However, ☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection ☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection ☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection (The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States.)				
Box No. VI PRIORITY CLAIM				
The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:				
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application: regional Office	international application: receiving Office
Item (1) 27 September 2004 (27.09.04)	60/613,392	US		
Item (2)				
Item (3)				
☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.				
The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as: ☐ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box * Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)): 				
Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY				
Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used): ISA / EP..... Request to use results of earlier search: reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority): Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)				
Box No. VIII DECLARATIONS				
The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):				Number of declarations
☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor			:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent			:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application			:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)			:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty			:

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING																																																							
This international application contains: (a) on paper, the following number of sheets: <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%;">request (including declaration sheets) :</td> <td style="width: 20%; text-align: right;">5</td> </tr> <tr> <td>description (including sequence listing and/or tables related thereto) :</td> <td style="text-align: right;">21</td> </tr> <tr> <td>claims :</td> <td style="text-align: right;">4</td> </tr> <tr> <td>abstract :</td> <td style="text-align: right;">1</td> </tr> <tr> <td>drawings :</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sub-total number of sheets :</td> <td style="text-align: right; border-top: 1px solid black;">31</td> </tr> <tr> <td>sequence listing :</td> <td></td> </tr> <tr> <td>tables related thereto :</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2"><i>(for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below)</i></td> </tr> <tr> <td>Total number of sheets :</td> <td style="text-align: right; border-top: 1px solid black;">31</td> </tr> </table> (b) ☐ only in electronic form (Section 801(a)(i)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto (c) ☐ also in electronic form (Section 801(a)(ii)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the ☐ sequence listing: ☐ tables related thereto: <i>(additional copies to be indicated under item 9(ii) under 10(ii), in right column)</i>	request (including declaration sheets) :	5	description (including sequence listing and/or tables related thereto) :	21	claims :	4	abstract :	1	drawings :		Sub-total number of sheets :	31	sequence listing :		tables related thereto :		<i>(for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below)</i>		Total number of sheets :	31	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item): <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%;">1. ☒ fee calculation sheet</td> <td style="width: 20%; text-align: right;">1</td> </tr> <tr> <td>2. ☐ original separate power of attorney</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>3. ☐ original general power of attorney</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>5. ☐ statement explaining lack of signature</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>7. ☐ translation of international application into (language):</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>9. ☐ sequence listing in electronic form (indicate type and number of carriers)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) :</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>10. ☐ tables in electronic form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-querter) only (and not as part of the international application)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-querter)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>11. ☐ other (specify):</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> </table>	1. ☒ fee calculation sheet	1	2. ☐ original separate power of attorney	:	3. ☐ original general power of attorney	:	4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:	5. ☐ statement explaining lack of signature	:	6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:	7. ☐ translation of international application into (language):	:	8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:	9. ☐ sequence listing in electronic form (indicate type and number of carriers)	:	(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) :	:	(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	:	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column	:	10. ☐ tables in electronic form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)	:	(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-querter) only (and not as part of the international application)	:	(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-querter)	:	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:	11. ☐ other (specify):	:
request (including declaration sheets) :	5																																																						
description (including sequence listing and/or tables related thereto) :	21																																																						
claims :	4																																																						
abstract :	1																																																						
drawings :																																																							
Sub-total number of sheets :	31																																																						
sequence listing :																																																							
tables related thereto :																																																							
<i>(for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below)</i>																																																							
Total number of sheets :	31																																																						
1. ☒ fee calculation sheet	1																																																						
2. ☐ original separate power of attorney	:																																																						
3. ☐ original general power of attorney	:																																																						
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:																																																						
5. ☐ statement explaining lack of signature	:																																																						
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:																																																						
7. ☐ translation of international application into (language):	:																																																						
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:																																																						
9. ☐ sequence listing in electronic form (indicate type and number of carriers)	:																																																						
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) :	:																																																						
(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	:																																																						
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column	:																																																						
10. ☐ tables in electronic form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)	:																																																						
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-querter) only (and not as part of the international application)	:																																																						
(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-querter)	:																																																						
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:																																																						
11. ☐ other (specify):	:																																																						
Figure of the drawings which should accompany the abstract:	Language of filing of the international application: English																																																						
Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE <i>Mark in each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</i> > - Agent for the Applicant																																																							

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:



Clarke, Modet & Co

COLOMBIA

Carrera 11 n° 93-43, Of. 404 Bogotá Colombia Tel (57 1) 4350813-Fax: (57 1) 6350824-E-mail:clarke@modet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

por el presente instrumento confiere (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ DALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.634.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y emblemas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Interponer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, apelación, nulidad, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de la obtención o explotación de licencias, acciones de nulidad, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de la obtención o explotación de licencias, acciones de nulidad, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de la obtención o explotación de licencias.
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en arbitraje, aceptar, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar a derechos concedidos o en curso de concesión, además de todos los actos del proceso.
- 7) Representar a la agencia oficiosos.
- 8) Así mismo facultar (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned
Christian PERTSCHY

legal representative(s) of
MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA

an organization existing under the laws of
Germany

and in present execution of its business activity, domiciled at
Eckenheimer Landstrasse 100
D-60318 Frankfurt Main
Germany

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ DALEMAN, identification card No. 41.634.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models, Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this: mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at Frankfurt, Germany

on this 17 day of June of 2004

La presente Escritura Transmisor y Soporte Circular de Bogotá tiene carácter de instrumento legal y es válida en su contenido y forma de acuerdo con la Ley 1712 de 2014 y la Ley 1712 de 2014.

22 MAR 2007

Nummer 191 der Urkundenrolle für das Jahr 2004

Umstehende, vor mir geleistete Namensunterschrift des mir von Person bekannten Herrn Dr. Christian Pertschy, dienstansässig Eckenheimer Landstraße 100-104, 60318 Frankfurt am Main, beglaubige ich hiermit, nachdem ich mich auf Ersuchen in die Geschäftsräume der Merz Pharma GmbH & Co. KGaA begeben hatte. Der Unterzeichnende wurde vor Unterschriftsleistung von mir nach einer Vorbefassung i.S. von § 3 I Nr. 7 BeurkG befragt. Dies wurde von ihm verneint.

Frankfurt am Main, den 17. Juni 2004



Haase
Notar

Kostenrechnung

Wert: € 5.000,00

Gebühr §§ 32, 45 KostO ¼

10,50 €

Gebühr § 58 KostO

10,50 €

Gebühr §§ 137, 152 KostO

0,55 €

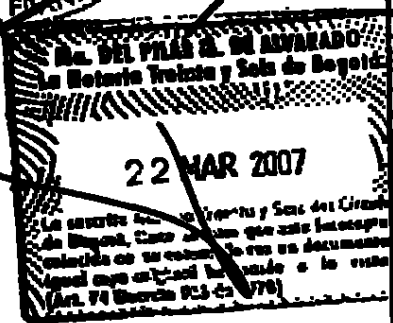
21,55 €

16 % Mwst.

3,45 €

25,00 €

Haase
Notar



APOSTILLE (Convention de la Haye du 5 octobre 1951)	
1. Land: Bundesrepublik Deutschland	
Diese öffentliche Urkunde	
2. ist unterschrieben von	<i>Haase</i>
3. In seiner Eigenschaft als	amtlich beauftragter Notar
4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des(der) Notars	
Bestätigt	
5. in Frankfurt/Main	6. am 17. 06. 2004
7. durch den Herrn Präsidenten des Landgerichts	
8. unter Nr. 91 Ea A	<i>Y.K.B.</i>
9. Siegel/Stempel	10. Unterschrift
	<i>Schlitz</i>





TRADUCCION OFICIAL No. 10416

de un documento escrito en Alemán, efectuada por Luz Arriaga de Herber, resolución del Ministerio de Justicia 599 del 6 de marzo 1978.-

Traducción de la legalización de la firma del señor Christian Pertschy, representante legal de MERZ PHARMA GMBH & CO.KGaA, y de la apostilla en alemán que se encuentran a continuación de un documento de poder conferido a DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, tpa 20824 y a CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tpa 36448, domiciliadas en Bogotá, Colombia.

Protocolo notarial número 191 del año 2004

Certifico la autenticidad de la firma antecedente puesta ante mi por el señor Christian PERTSCHY, con domicilio comercial en Eckenheimer Landstraße 100-104, 69318 Frankfurt am Main, luego de haberme trasladado por solicitud a las oficinas de la Merz Pharma GmbH & Co. KGaA. El mencionado señor fue instruido antes de firmar el documento con respecto a una actuación previa en el sentido del Art. 31 I numeral 7 de la Ley de Legalizaciones, a lo cual respondió negativamente.

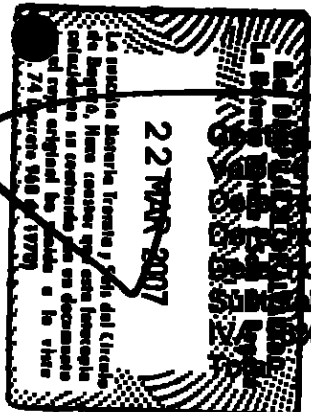
Frankfurt am Main, 17 de junio 2004.

Fdo.: firma ilegible

Notario

(Sello redondo en tinta)

Gerhard Haase - notario de Frankfurt



5.000,00
Gebühren Art. 32, 45 KostO ¼
Gebühren Art. 58 KostO
Gebühren Art. 137, 152 KostO

10,50 €
10,50 €
0,55 €
21,55 €
3,45 €
25,00

Fdo.: firma ilegible
Notario

LUZ ARRIAGA DE HERBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
[Signature]
Resolución No.599 Minjusticia

(Sello redondo en tinta)
Gerhard Haase - notario de Frankfurt

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: República Federal de Alemania

Este documento público

2. Ha sido firmado por Haase

3. Actuando en calidad de notario oficial

4. Lleva el sello del notario

Certificado

5. en Frankfurt/Main

6. el 17 de junio 2004

7. por el Presidente del Tribunal Regional

8 bajo el No. 91 Ea A 4430

9. Sello

10. Firma

El Presidente del Tribunal

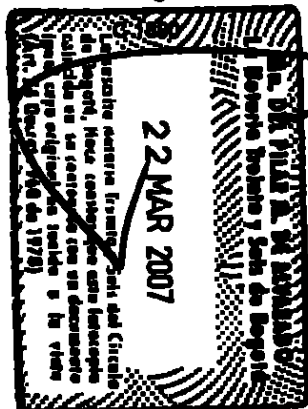
Fdo.: ilegible

Regional de Frankfurt am Main

Schitz

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 5 de octubre 2004



LUZ ARRIAGA DE HERSEZ
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
Luz Arriaga de Hersez
Resolución No. 555 del 1998

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

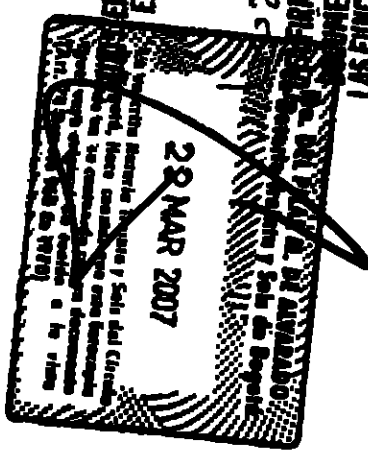
2008 OCT -8 P 1:27

OFICE DE LEGALIZACIONES
SANTIAGO DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

71048
22 MAR 2007

FORMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la Invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha_____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

88



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-028608-00000-0000
Fax: 2007-03-22 18:44:58 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tm. 11 PATENTEIYB
Eve: 378 FASENACIONALI
Ad: 411 PRESENTACION Folios: 68

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención:		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2) SOLICITANTE (71)		IDENTIFICACIÓN	
		C.C. ☐ NIT: ☒	
		C.E. ☐ OTRO ☐	
		Cual _____ NÚMERO _____	
Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____			
3) REPRESENTANTE APODERADO		IDENTIFICACIÓN	
Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 88-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 8181088 Fax: 8350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co		C.C. ☒ NIT: ☐	
		C.E. ☐ OTRO ☐	
		NÚMERO: 41.854.882 TP: 20824 CSJ	
4) INVENTOR (ES) (72)			
Nombre: MARSDEN, John, Christopher Dirección: Frank B Dehn & Co., 179 Queen Victoria Street, London EC4V 4 EL Gran Bretaña Nacionalidad o Domicilio: Gran Bretaña			
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/GB20057003728 Fecha: sept. 27, 2005 Publicación Internacional No. WO 2006/035225 A1 Fecha: Abril 6, 2006			
6) Título (84) NEUROTOXINAS CLOSTRIDIALES PARA USO EN CICATRIZACIÓN DE TEJIDOS.			
7) Clasificación Internacional: A61K 39/08 A61P 17/02			
8) PRIORIDAD		33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ NO ☐		Estados Unidos	Sept. 27, 2004
			(31) Número de Solicitud 60/613,392
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta página			

9

REIVINDICACIONES

Se reivindica lo siguiente:

1. El uso de una neurotoxina de Clostridium, natural o modificada, para la fabricación de un medicamento destinado a mejorar la cicatrización de una superficie o de un tejido superficial lesionado de un paciente, en el cual dicho medicamento se fabrica para ser administrado localmente en dicho tejido lesionado o muy próximo al mismo.
2. El uso reivindicado en la reivindicación 1, en el cual la neurotoxina de Clostridium está libre de proteínas complejantes que naturalmente forman complejos con las neurotoxinas clostridiales.
3. El uso reivindicado en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en el cual la neurotoxina de Clostridium natural o modificada se caracteriza por una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 4 semanas.
4. El uso reivindicado en la reivindicación 3 en el cual la neurotoxina de Clostridium es toxina botulínica tipo F.
5. El uso reivindicado en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en el cual la neurotoxina de Clostridium natural o modificada se caracteriza por una eficacia de corta duración, de aproximadamente 3 a 10 días.
6. El uso reivindicado en la reivindicación 5, en el cual la neurotoxina de Clostridium es toxina botulínica tipo E.
7. El uso reivindicado en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en el cual la neurotoxina de Clostridium es una neurotoxina modificada con una eficacia que dura aproximadamente de 1 a 4 semanas.
8. El uso reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual dicho tejido lesionado comprende una herida.

Gb

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA

919

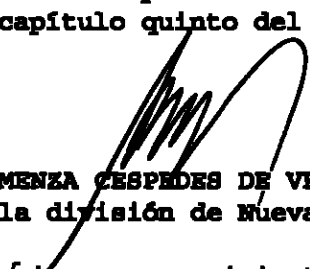
REFERENCIA	Radicación No.	7 28609
	Solicitud internacional	PCT/GFB2005/003728
	Fecha inicio fase nacional	27/04/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	6561

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 05 JUN 2020
adpall