



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 215 056**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 8/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

C07K 14/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **00943666 .8**

96 Fecha de presentación : **26.05.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1185291**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.03.2002**

54 Título: **Agente terapéutico que comprende una neurotoxina botulínica.**

30 Prioridad: **07.06.1999 DE 199 25 739**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.10.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **15.03.2011**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **15.03.2011**

73 Titular/es: **MERZ PHARMA GmbH & Co. KGaA**
Eckenheimer Landstrasse 100
60318 Frankfurt, DE

72 Inventor/es: **Bigalke, Hans y**
Frevert, Jürgen

74 Agente: **Diez de Rivera y Elzaburu, Ignacio**

ES 2 215 056 T5

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere al uso de neurotoxinas botulínicas de "Clostridium botulinum" para la preparación de un medicamento para el tratamiento de afecciones del sistema nervioso, estando la neurotoxina libre de las proteínas formadoras de complejos que están presentes por naturaleza en el complejo. La consecuencia inmediata de ello es el reconocimiento, basado en la presente invención, de que la neurotoxina libre, en contraposición con el complejo, conduce a una inducción nula o sólo significativamente reducida en el paciente de anticuerpos neutralizantes. Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de las neurotoxinas botulínicas de "Clostridium botulinum" para el tratamiento cosmético.

El tipo A de complejo de toxinas de "Clostridium botulinum" (masa molecular 900.000) se emplea desde hace muchos años para la terapia de diferentes distonías. Actualmente están admitidos para el tratamiento del blefaroespasma, espasmos hemifaciales, y de tortícolis espasmódica dos diferentes preparados que contienen este complejo: BOTOX® y DYS-PORT®. La terapia de otras afecciones del sistema nervioso (p. ej., afecciones espásticas, hemicránea, lumbalgia, síndrome cervical, hipersalivación) se ensaya clínicamente en la actualidad. Los preparados se emplean, además, con indicaciones cosméticas tales como hiperhidrosis y formación acentuada de arrugas. También los restantes complejos de toxinas de "Clostridium botulinum" (de los tipos B, C, D, E, F, G) son apropiados para estas terapias. No obstante, todavía no hay actualmente producto admitido en el mercado que contenga toxinas remitentes del tipo B - G.

Los complejos de toxinas botulínicas se componen de una mezcla de proteínas clostridiales. Son éstas hemoaglutininas con diversas masas moleculares, una proteína no tóxica no hemoaglutinante (masa molecular, aproximadamente 120.000) y una neurotoxina (masa molecular, aproximadamente 150.000). Forman un complejo estable a los ácidos, que es el responsable de la toxicidad oral en intoxicaciones alimentarias. En contraposición con la neurotoxina pura, el complejo resiste

al medio agresivo en el tracto gastrointestinal y permite la resorción por vía enteral de la neurotoxina, que alcanza a través de la circulación sanguínea o el sistema linfático las células diana y provoca allí un bloqueo de la liberación del transmisor. A causa de ello se produce una parálisis de la musculatura estriada y lisa, y la extinción de diversas funciones vegetativas. Los pacientes intoxicados fallecen de una insuficiencia de la musculatura respiratoria. Puesto que la neurotoxina pura se degrada en el tracto gastrointestinal y, por tanto, no se resorbe por vía enteral, no es tóxica después de una ingestión. Aplicados por vía parenteral, no se distinguen los efectos terapéuticos de la neurotoxina y del complejo, pues el complejo se descompone en el tejido en sus componentes, y sólo la neurotoxina se absorbe en las células diana.

Para la aplicación terapéutica se inyecta el complejo, según el estado actual de la técnica, directamente al músculo distónico o espástico, en donde la neurotoxina se libera a pH fisiológico del complejo y provoca el efecto farmacológico deseado. Aunque el complejo se aplica sólo en dosis extremadamente pequeñas (1-25 ng, según indicación y tamaño del músculo afectado), se produce, después de repetidas inyecciones en un considerable número de pacientes, la formación de anticuerpos específicos neutralizantes, que están dirigidos también contra la neurotoxina. La consecuencia inmediata es que los pacientes positivos a los anticuerpos ya no reaccionan frente al complejo. Podrían tratarse, sin embargo, con otros tipos de toxinas, de los cuales no obstante ninguno está admitido para la terapia. Si el paciente ha probado uno tras otro todos los tipos de toxina y ha formado contra ellos anticuerpos, ya no es útil la ulterior aplicación de un complejo de toxinas botulínicas (da igual qué tipo). Se ha de considerar en este caso que cada dosis del complejo contribuye a un aumento de la concentración de anticuerpos, hasta el punto de que una ulterior aplicación del complejo ya no tiene sentido, porque ya no se logra efecto alguno. Hasta que el título de anticuerpos se haya reducido

de forma notable, a menudo transcurren años, de modo que estos pacientes durante largos intervalos no se tratan (o pueden tratarse) (con neurotoxina botulínica).

La formación de anticuerpos específicos se favorece por dos factores. Por una parte, la neurotoxina fijada en el complejo permanece en el tejido durante un intervalo más prolongado y puede activar células inmunitarias para la formación de anticuerpos, que proliferan en el tejido. La larga permanencia, sin embargo, no conduce a un aumento de la absorción en las células diana, pues las células diana intoxicadas ya no pueden absorber toxina. La neurotoxina que se disocia lentamente del complejo es activa, por tanto, sólo inmunológicamente. Por otra parte, las proteínas contenidas en el complejo refuerzan una respuesta inmunitaria. Las hemoaglutininas son lectinas, es decir proteínas, que se distinguen por una elevada afinidad a determinados azúcares. En virtud de su unión a estructuras de azúcar, las lectinas actúan como inmunoestimulantes. Así, pudo demostrarse que las lectinas concanavalina A, fitohemoaglutinina y Pokeweed Mitogen activan los linfocitos T y B. Las hemoaglutininas de los complejos de toxinas botulínicas, que igualmente se unen a azúcares de estructura membranosa, pueden funcionar por tanto de manera semejante como inmunoadyuvantes y contribuyen a la formación de anticuerpos y, con ello, al fracaso de la terapia.

Se demostró que la antigenicidad de la neurotoxina botulínica del tipo A decrece con el grado de pureza de la toxina (documento UUS-A-5512547). Puesto que las proteínas formadoras de complejo actúan como coadyuvantes, que estimulan la producción de anticuerpos anti-neurotoxina, se reconoció que la siguiente generación de neurotoxina botulínica debía estar exenta de proteínas formadoras de complejos. Antes del desarrollo de la presente invención existía no obstante una considerable duda acerca de si sería posible un tratamiento de pacientes con inmunidad ya existente frente a la neurotoxina botulínica con tales preparados (Goeschel, H.

Et al.: Experimental Neurology 147, n° 1, 1997, páginas 96 - 102).

Por lo tanto, existía para los autores de la presente invención la misión de desarrollar una vía alternativa de tratamiento para las afecciones y trastornos antes citados. En especial, los inventores querían proponer un principio activo apropiado con el que pudiesen someterse a terapia pacientes que ya hubiesen formado anticuerpos neutralizantes.

Como solución al problema antes propuesto, como alternativa a los dos preparados comerciales a base de complejo de toxina botulínica del tipo A, BOTOX® y DYSPORT®, y también como alternativa a los complejos, descritos en el estado actual de la técnica, de los restantes tipos (B, C, D, E, F, G), se desarrolló un nuevo medicamento que sólo contiene neurotoxina pura (tipo A, o B, C, D, E, F, G) y está exento de hemoaglutininas y otras proteínas extrañas al cuerpo. A causa de su menor masa molecular se difunde más rápidamente hasta las células diana, en las que se absorbe, antes de que se activen las células inmunitarias, atraídas por las hemoaglutininas. En estudios de antigenicidad se encontró que la neurotoxina pura de todos los tipos -en contraposición con los preparados comerciales del tipo A y los complejos de los tipos B a G- no provoca formación de anticuerpos, o en todo caso provoca una formación muy pequeña. Con el empleo terapéutico de estos nuevos medicamentos desarrollados (neurotoxina pura de los tipos A, B, C, D, E, F, G) tampoco se produce, después de repetidas aplicaciones, fallo alguno de la terapia debido a anticuerpos. Además, pudo demostrarse que las neurotoxinas puras, a causa de su inmediata biodisponibilidad, son apropiadas también para la terapia de pacientes que, después de la aplicación de un complejo de toxinas botulínicas, p. ej. después de tratamiento con BOTOX® o DYSPORT®, han desarrollado una concentración de anticuerpos contra el tipo correspondiente (los llamados secondary non-responders -no respondedores secundarios), y por tanto ya no son susceptibles de ulterior tratamiento con BOTOX® o DYS-

PORT[®], ya que la administración de las toxinas comerciales ya no aporta alivio a las molestias.

El medicamento puesto a disposición de acuerdo con la invención es apropiado como agente terapéutico, especialmente en el caso de pacientes que presentan un título de anticuerpos contra una toxina botulínica, en especial contra la del tipo A. El fármaco de acuerdo con la invención (neurotoxina pura o mezcla de varias neurotoxinas puras) es especialmente apropiado en el caso de los pacientes que presentan un título de anticuerpos no superior a 50, preferentemente no superior a 30, de modo más preferente no superior a 20, de modo especialmente preferido no más de 10, y de modo muy especialmente preferido no más de 5 mU/ml. En este caso 1 mU de anticuerpo es la cantidad de anticuerpo que neutraliza 10 U de toxina.

Por otra parte, el medicamento de acuerdo con la invención puede emplearse de modo especialmente ventajoso en aquellas personas que todavía nunca antes, o después de muchos años ya no se han tratado con neurotoxina botulínica, puesto que su título de anticuerpos es desde el principio bajo o igual a cero. Lo ventajoso de la presente invención consiste, pues, en que el título de estos pacientes por el tratamiento con la toxina pura según la presente invención no se aumenta, o en todo caso lo hace de manera absolutamente insignificante. Con otras palabras, el agente terapéutico de acuerdo con la invención puede administrarse durante largos plazos sin que pierda su efecto.

La inducción de anticuerpos en la terapia con una toxina de "C. botulinum" se impide, pues, aplicando en vez de los complejos tóxicos de elevado peso molecular una neurotoxina pura. La neurotoxina separada completamente de las proteínas del complejo está inmediatamente biodisponible y puede unirse inmediatamente a las terminaciones nerviosas de las placas terminales motoras.

Un aspecto de la presente invención es el uso de las neurotoxinas botulínicas de "Clostridium botulinum" de los tipos A, B, C, D, E, F o G, o de una mezcla de dos o más de

estas neurotoxinas caracterizado por estar la neurotoxina o la mezcla de las neurotoxinas exenta de las proteínas formadoras de complejos que de manera natural forman complejos con las neurotoxinas botulínicas, para la preparación de un fármaco para el tratamiento cosmético o para el tratamiento de distonías o de afecciones del sistema nervioso en pacientes animales o humanos, que ya han formado anticuerpos neutralizantes contra complejos de neurotoxinas botulínicas.

Tales fármacos pueden utilizarse ventajosamente para tratar pacientes que ya presentan anticuerpos neutralizantes contra un complejo de "Clostridium botulinum" tipo A o B, o un complejo de "Clostridium botulinum" tipo A y B.

Estos fármacos son especialmente apropiados para el tratamiento cosmético de la hiperhidrosis y/o la formación de arrugas, p.ej., la formación de arrugas en la zona facial.

Entre las afecciones del sistema nervioso y distonías que pueden tratarse con estos fármacos se cuentan tortícolis espasmódica y blefaroespasma, afecciones espásticas tales como el pie equino, espasmos hemifaciales, hemicránea, lumbalgia, síndrome cervical e hipersalivación.

Las neurotoxinas, sus mezclas o los preparados farmacéuticos de acuerdo con la invención pueden presentarse como solución acuosa, en especial como solución acuosa inyectable, pero también como productos liofilizados.

Las neurotoxinas puras, en sí conocidas, de los tipos A - G se prepararon según los protocolos que están contenidos en las publicaciones enumeradas en la lista bibliográfica. A modo de ejemplo se describe la purificación de dos neurotoxinas (tipos A y B) en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Aislamiento de la neurotoxina pura

La neurotoxina pura de "Clostridium botulinum" tipo A se obtiene según un procedimiento que se basa en el procedimiento de DasGupta y Sathyamoorthy. El "Clostridium botulinum" tipo A se cultiva en un fermentador de 20 l en un medio

que consta de 2% de proteosa peptona, 1% de extracto de levaduras, 1% de glucosa y 0,05% de tioglicolato sódico. Después de 72 horas de crecimiento se precipita la toxina mediante adición de H_2O_4 3N (pH final = 3,5). La biomasa precipitada y centrifugada se extrae con tampón fosfato sódico 0,2 M pH 6,0.

Después de la separación de los ácidos nucleicos mediante precipitación con sulfato de protamina se precipita la toxina mediante adición de sulfato amónico. El precipitado solubilizado y dializado frente a fosfato sódico 50 mM pH 6,0 se une a una columna Sephadex DEAE al mismo valor del pH y se desprende con NaCl 150 mM. A continuación, se efectúa una cromatografía a través de una columna Sephadex QAE, que se equilibró con un tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,9. La toxina se eluye a través de un gradiente de NaCl. En la última etapa se cromatografía la toxina a través de SP-Sephadex a pH 7,0. La toxina unida se desprende en este caso de la columna por medio de un gradiente de NaCl (0-300 mM). La toxina purificada se analiza en una electroforesis de SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y presenta una pureza de $95 \pm 5\%$. La actividad biológica se determina en el ensayo DL_{50} en el ratón: a una unidad DL_{50} corresponden 4,8 pg de proteína.

Ejemplo 2: Preparación de un medicamento acabado con contenido en neurotoxina botulínica

Con la neurotoxina purificada del Ejemplo 1 se prepara una solución que contiene 200 unidades DL_{50} de ratón, 10 mg de sacarosa y 2 mg de albúmina de suero humano por ml. 0,5 ml de la solución se envasan en viales y se liofilizan. Los liofilizados se reconstituyen con solución fisiológica de sal de cocina y se determina la actividad biológica. Los viales contienen 100 ± 30 unidades DL_{50} .

Ejemplo 3: Aislamiento de neurotoxina B pura

Se cultiva "Clostridium botulinum" tipo B en el mismo medio y bajo iguales condiciones que el tipo A y se elabora hasta la precipitación con sulfato amónico. A continuación, se efectúa de nuevo una cromatografía Sephadex DEAE a pH 6,0. Las fracciones eluidas de la columna con NaCl 150 mM se reúnen y se dializan frente a fosfato sódico pH 7,0, a lo que sigue una cromatografía a través de Sephadex QAE. Las fracciones con contenido en toxina se continúan cromatografiando a través de una cromatografía Sephadex DEAE a pH 8,5 (Tris/HCl mM pH 8,5).

Finalmente se obtiene la toxina botulínica de elevada pureza tipo B a través de una cromatografía en hidroxilapato equilibrada con fosfato de Na 10 mM pH 8,0. La toxina homogénea unida se eluye con fosfato de Na 80 mM pH 8,0 y, a continuación, se determina la actividad biológica en el ensayo DL_{50} ($2-4 \times 10^7$ unidades DL_{50} /mg de proteína).

Ejemplo 4: Detección de anticuerpos

A 20 conejos se inyectaron por vía intracutánea 25 U de BOTOX® a lo largo de un espacio de tiempo de 12 semanas a intervalos de 14 días (5 inyecciones). Después de 3 semanas y luego a intervalos de 14 días se obtuvo el suero.

Los anticuerpos contra la neurotoxina A de "Clostridium botulinum" se detectaron con un ensayo inmunológico enzimático inmovilizando la neurotoxina homogénea en una placa de microtitulación. Los anticuerpos que se unen a la neurotoxina se cuantificaron por medio de un segundo anticuerpo, marcado enzimáticamente.

El resultado está representado en la tabla 1. Ya 5 semanas después de la primera aplicación podían detectarse anticuerpos en 5 conejos. Después de 11 semanas los sueros de 17 conejos, por tanto el 85% de los animales empleados, contenían anticuerpos contra la neurotoxina. En el ensayo de actividad biológica se demostró que 12 de los 17 sueros contenían anticuerpos neutralizantes (tabla 2).

Tabla 1: Determinación de muestras de suero (dilución 1:100) de conejos, que se trataron con BOTOX®, con un ensayo inmunológico enzimático. Están indicados los valores DO_{490} nm > 0,1. Todos los valores DO están corregidos con los valores DO de los sueros preinmunes (DO aproximadamente 0,150).

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

* Los valores no se corrigieron, puesto que no existía suero preinmune

10 "-" significa densidad óptica (DO_{490}) < 0,1

15 Tabla 2: Neutralización por sueros de conejos que se trataron con BOTOX® (semana 11ª después de la primera inmunización) en el ensayo de hemidiafragma de ratón (límite de detección: 0,35 mU/ml de anticuerpo)

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

n.d. = no determinado

5 **Ejemplo 5:** Ensayo de antigenicidad con producto del
mercado y neurotoxina pura

Después de que se hubo demostrado que el complejo de neurotoxina y hemoaglutininas y la proteína no tóxica, no
10 hemoaglutinante, provoca la formación de anticuerpos neutralizantes, se ensayó el efecto inmunógeno de la neurotoxina pura (tipo A). Para ello se trataron 8 conejos con el complejo de toxina y 12 conejos con la toxina pura. Según el procedimiento antes descrito (véase el Ejemplo 1) se aplicaron
15 25 U del respectivo preparado por vía intracutánea. La

cantidad de neurotoxina, medida como peso, era igual en ambos preparados (200 pg/dosis), tal como se detectó en un ensayo ELISA. BOTOX[®] contenía adicionalmente todavía proteínas de complejo (aproximadamente 800 pg/dosis).

5 Cuatro de los ocho animales tratados con BOTOX[®] presentaron en el ELISA un título de anticuerpos, mientras que en los 12 animales tratados con neurotoxina pura no habían de detectarse anticuerpos contra a neurotoxina pura. El resultado se confirmó en el ensayo de actividad biológica. Los
10 cuatro sueros de conejo contenían títulos de anticuerpos neutralizantes que impedían una acción de la toxina (tabla 3).

Tabla 3: Neutralización por sueros (dilución 1:3) de conejos, que se trataron con BOTOX[®] (semana 11^a después de la
15 primera inmunización) en el ensayo de hemidiafragma de ratón (Límite de detección: 1 mU/ml de anticuerpo)

Conejo	Neutralización mU/ml
1	12 mU
2	> 30 mU
3	4,5 mU
8	> 30 mU

20 **Ejemplo 6:** (Ejemplo Comparativo)

En este experimento se comparó la formación de anticuerpos por BOTOX[®] con la debida a DYSPORT[®]. Para ello se trataron en cada caso diez conejos con BOTOX[®] (grupo 1), con
25 DYSPORT[®] (grupo 2) o con la neurotoxina pura (grupo 3) según el esquema descrito.

Mientras que en los grupos 1 y 2 más del 50% de los animales formaron un título de anticuerpos neutralizantes, los sueros de los animales del grupo 3 estaban exentos de
30 anticuerpos.

Ejemplo 7: Ensayo clínico

Un paciente (edad 45 años) que se trató a lo largo de un espacio de tiempo de 5 años a causa de una tortícolis espasmódica con BOTOX[®] había desarrollado un título de anticuerpos de 3 mU/ml de suero. Ni BOTOX[®] ni DYSPORT[®] eran terapéuticamente activos con este paciente. Un ensayo de terapia con la neurotoxina botulínica pura en una dosis de 145 U, que era equivalente a la dosis de BOTOX[®] últimamente inyectada, condujo en el transcurso de 72 horas a la relajación del músculo, a la normalización de la posición de la cabeza y a la desaparición del dolor muscular. No aparecieron efectos no deseados.

Ejemplo 8: Ensayo clínico

Un paciente (edad 52 años) se trató con BOTOX[®] a causa de paresia cerebral durante 3 años. Había desarrollado un título de anticuerpos de 1 mU/ml de suero, por ello la terapia debía interrumpirse. La inyección de 200 U de neurotoxina pura permitió una terapia con éxito.

Bibliografía

- DasGupta, B.R. & Sathyamoorthy, V. (1984), Purification and Amino Acid Composition of Type A Botulinum Neurotoxin; *Toxicon* **22**(3), p. 415-424.
- De Jongh, K.S., Schwartzkoff, C. L. & Howden, M.E.H. (1989), *Clostridium botulinum* Type D Neurotoxin Purification and Detection; *Toxicon* **27**(2), p. 221-228
- Schmidt, J. J. & Siegel, L. S. (1986), Purification of Type E Botulinum Neurotoxin by High-Performance Ion Exchange Chromatography; *Analyt. Biochemistry* **156**, p. 213-219
- Nukina, M., Mochida, Y., Sakaguchi, S. & Sakaguchi, G. (1988), Purification of *Clostridium botulinum* Type G Progenitor Toxin; *Zbl. Bakt. Hyg. A* **268**, p. 220-227
- Terajima, J., Syuto, B., Ochanda, J. O. & Kubo, S. (1985), Purification and Characterization of Neurotoxin Produced by

Clostridium botulinum Type C 6813; *Infection and Immunity*
48(2), p. 312-317

Wadsworth, J. D. F., Desai, M., Tranter, H. S. et al.
(1990), Botulinum type F neurotoxin: Large-scale Purifica-
5 tion and Characterization of its Binding to Rat Cerebrocor-
tical Synaptosomes; *Biochem. J.* **268**, p. 123-128

REIVINDICACIONES

1. Uso de las neurotoxinas botulínicas de "Clostridium botulinum" de los tipos A, B, C, D, E, F o G o una mezcla de
5 dos o más de dichas neurotoxinas, caracterizado porque dicha neurotoxina o dicha mezcla de dichas neurotoxinas está exenta de las proteínas formadoras de complejos, que forman de manera natural complejos con dichas neurotoxinas botulínicas, para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de distonía o de afecciones del sistema
10 nervioso en pacientes animales o humanos que ya han formado anticuerpos neutralizantes contra complejos de neurotoxinas botulínicas.

2. Uso de una preparación farmacéutica que comprende
15 neurotoxinas botulínicas de "Clostridium botulinum" de los tipos A, B, C, D, E, F o G o una mezcla de dos o más de dichas neurotoxinas, caracterizado porque dicha neurotoxina o dicha mezcla de dichas neurotoxinas está exenta de las proteínas formadoras de complejos, que forman de manera natural
20 complejos con dichas neurotoxinas botulínicas, para el tratamiento cosmético en pacientes animales o humanos que ya han formado anticuerpos neutralizantes contra complejos de neurotoxinas botulínicas.

3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado
25 porque la persona que ha de tratarse ya presenta anticuerpos neutralizantes contra un complejo de "Clostridium botulinum" tipo A o B, o un complejo de "Clostridium botulinum" tipo A y B.

4. Uso según la reivindicación 2 ó 3, caracterizado
30 porque el tratamiento cosmético es para el tratamiento de la hiperhidrosis.

5. Uso según una de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado porque el tratamiento cosmético es para el tratamiento de la formación de arrugas.

35 6. Uso según la reivindicación 5, caracterizado porque el tratamiento cosmético es para el tratamiento de la formación de arrugas en la zona facial.

7. Uso según la reivindicación 1 ó 3, caracterizado porque las afecciones del sistema nervioso o de las distonías, son tortícolis espasmódica, blefaroespasma, afecciones espásticas tales como el pie equino, espasmos hemifaciales, 5 migraña, lumbalgia, síndrome cervical o hipersalivación.