

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(19) **BG**

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) **65555 B1**

(51) Int. Cl.

A 61 K 38/16 (2006.01)
A 61 K 47/02 (2006.01)
A 61 K 47/12 (2006.01)
A 61 K 9/08 (2006.01)
A 61 K 8/64 (2006.01)
A 61 K 9/00 (2006.01)
A 61 K 35/74 (2006.01)
A 61 K 38/00 (2006.01)
A 61 K 38/48 (2006.01)
A 61 K 47/04 (2006.01)
A 61 K 47/42 (2006.01)
A 61 P 1/04 (2006.01)
A 61 P 1/06 (2006.01)
A 61 P 11/02 (2006.01)
A 61 P 11/06 (2006.01)

(21) Заявителски № 105435

(22) Заявено на 10.04.2001

(24) Начало на действие
на патента от: 09.09.1999

Приоритетни данни

(31) 60/099,870 (32) 11.09.1998 (33) US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 12 на 29.12.2001

(45) Отпечатано на 30.12.2008

(46) Публикувано в бюлетин № 12
на 30.12.2008

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от заяв. №

(73) Патентоприитежател(и):

**SOLSTICE NEUROSCIENCES
INC., 19355 MALVERN,
40 GENERAL WARREN BLVD.
SUITE 160, PENNSYLVANIA (US)**

(72) Изобретател(и):

**Elizabeth Moyer,
Mill Valley, California 94941
Pamela Hirtzer
Piedmont, California 94611 (US)**

(74) Представител по индустриална собственост:

**Искра Владимирова Христова,
1000 София, ул. "Любен Каравелов" 20**

(86) № и дата на PCT заявка:

PCT/US1999/020912, 09.09.1999

(87) № и дата на PCT публикация:

WO2000/015245, 23.03.2000

(54) ТЕЧНИ ФОРМИ НА БОТУЛИН ТОКСИН

(57) Изобретението се отнася до течни форми на ботулин токсин, които са стабилни за съхранение в течна форма при стандартни температури за хладилник за поне 1-2 години, както и при по-високи температури за поне 6 месеца. Изобретението се отнася също до използването на такива форми в производството на медикаменти за различни терапевтични и козметични лечения.

30 претенции

BG 65555 B1

(54) ТЕЧНИ ФОРМИ НА БОТУЛИН ТОКСИН**Област на техниката**

Изобретението се отнася до терапевтични форми на ботулинов токсин, които са стабилни при съхранение в течна форма при 0-10°C за периоди от поне една до две години.

Справки:

Consky, E.S., Lang, A.E. (1994) в: *Therapy with Botulinum Toxin*. Jankovic, J and Hallet M, eds. Marcel Dekker, Inc., New York.

Frankel, A.S., and Kamer, F. M. (1998) *Chemical browlift*. Arch. Otolaryngol. Surg. 124(3): 321-323.

Gartlan, M.G., and Hoffman, H.T. (1992) *Crystalline preparation of botulinum toxin type A (Botox): Degradation in potency with storage*. Otolaryngology - Head and Neck Surgery 102(2): 135-140.

Hambleton, P., Capel, B., Bailey, N., Heron, N.I., Crooks, A., Melling, J. (1981) *Production, purification and toxoing of Clostridium botulinum type A toxin*. Biomedical Aspects of Botulism, Academic Press, NY.

Hardman, J.G. and Limbird, L.E., Exec. Eds. (1996) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed. McGraw-Hill, New York.

Hoffman, H.T., and Gartlan, M.G. (1993) *Stability of botulinum toxin in clinical use*. Botulinum and Tetanus Neurotoxins (B.R. DasGupta, Ed.).

Plenum Press, NY. Johnson, E.A., Goodnough, M.C., Borodic, G.E., (1997) US 5 696 077.

Lachman, L., Lieberman, H.A., Kanig, J. L. (1986) *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy* (3rd Ed.), Lea & Febiger, Philadelphia.

Melling, J., Hambleton, P., and Shone, C.C. (1988) *Clostridium botulinum toxins: nature and preparation for clinical use*. Eye 2: 16-23.

Physician's Desk Reference. 51st Edition, 1997. ("PDR") Medical Economics Company, Inc, Montvale, NJ.

Schantz, D. J. and Kautter, D.A. (1978) *Standardized assay for clostridium botulinum toxins*, J Assoc. Off. Anal. Chem 61:1.

Simpson, L.L. (1993) *The actions of clostridial toxins on storage and release of neurotrans-*

mitters. Natural and Synthetic Neurotoxins, A.L. Harvey, Ed., Academic Press Ltd., San Diego, pp. 277-317.

Tsui, J.K.C. (1986), Lancet 2: 245-247.

5

Предшестващо състояние на техниката

Ботулин токсинът е полипептиден продукт на анаеробната бактерия *Clostridium botulinum*.

10 Токсинът причинява мускулна парализа в бозайници чрез блокиране предсинаптичното освобождаване на невротрансмитера ацетилхолин при нервномускулния синапс. Въпреки че токсинът дълго време е бил свързан с фаталния ботулизъм, в последните години той е бил използван терапевтично за лечение на някои неволни мускулни двигателни разстройства, включително фокални дистонии (такива като страбизъм, есенциален блефароспазм и хемифациален спазъм), а така също сегментни дистонии (такива като тортиколия (крива шия), оромандибуларна дистония и спазматична дисфония) и мускулна еластичност. Токсинът е намерил също приложение при разнообразни козметични показания, такива като нехирургично намаляване "линиите на намръщеност" на лицето, а така също при лечението на хиперхидроза (извънредно потене).

30 Понастоящем има два препарата на ботулинов токсин (тип А), които са одобрени за терапевтично използване при хора - "BOTOX®" (Oculinum®; Allergan Inc., Irvine, CA) и "DYSPOORT®" (Spexwood Pharmaceuticals, Ltd., UK). И двете форми се предоставят на лекарите в лиофилизирана (изсушена чрез замразяване) форма за възстановяване преди употреба.

Поради разликите от пациент до пациент в изискванията за дозите, дозата, необходима за всеки индивидуален пациент може да се променя значително. Нещо повече, за някои показания лекарят трябва да приложи само малка част от съдържанието на приготвен флакон в течение на продължителен период от време, който може да бъде няколко часа. Въпреки че едно публикувано изследване показва, че течните форми на ботулинов токсин могат да бъдат повторно замразени и размразени със съществено запазване на активността (Schantz and Kautter, 1978), по-скорошни изследвания оценяващи активността на възстановения токсин са демонстрирали, че

“BOTOX®” губи поне 44 % от активността си, когато е възстановен и съхраняван в стандартен хладилник (приблизително 4°C) за 12 h. Нещо повече, когато възстановената форма е била съхранявана във фризер, който е с температури под нулата, при температура -70°C, тя е загубила около 70 % от активността си след две седмици (Gartlan and Hoffman, 1993). По тези причини се препоръчва такива състави да не бъдат използвани по-късно от 4 h след възстановяването. Това може да доведе до значителна загуба на лекарство и разноси за пациента.

Следователно има необходимост от готова за употреба течна форма на ботулин токсин, която може удобно да бъде превозвана, съхранявана и използвана, както е необходимо от лекарите. Настоящото изобретение се отнася до такава форма.

Кратко описание на изобретението

Настоящото изобретение е насочено към стабилни течни форми на ботулин токсин за използване във фармацевтични препарати. Формите от настоящото изобретение имат предимството, че за разлика от понастоящем достъпните форми, са стабилни в течна форма по време на съхранение за продължителни периоди от време (1 година или повече) при стандартни температури за хладилник (приблизително 4±2°C, или около 2-8°C, или, по-общо, вариращи от около 0-10°C). В един свързан аспект, формите са стабилни в течна форма по време на съхранение при “стайна температура” (около 25°C, или по-общо в диапазона от 10-30°C) за поне шест месеца. Такива форми са особено полезни при условия, в които редукцията или инхибирането на холинергичния нервен принос към една област, особено мускулна или мускулна група, жлеза или орган, е с подобряващо действие. Примери на такива условия са описани тук.

В един аспект изобретението включва стабилна течна фармацевтична форма, която включва изолиран ботулин токсин и буфер, който е способен да осигури буфериран pH диапазон между около pH 5 и pH 6. Съгласно това общо изпълнение, токсинът е смесен в буферирана течност до образуване на течна форма, която има pH от между 5 и 6, особено между около pH 5.4

и pH 5.8, и за предпочитане около pH 5.5-5.6. Получената форма е стабилна за поне една година и достатъчно продължително като поне две години, при температура, варираща от около 0-10°C, или за поне 6 месеца при по-високи температури, както описаните по-горе. Най-общо, в съответствие с изобретението всеки от известните серологични типове ботулин токсин (напр., серотипове A, B, C₁, C₂, D, E, F или G) или други серотипове, имащи еквивалентна биологична активност, могат да бъдат включени във формите от изобретението. В предпочитани изпълнения, използваният във формите ботулин токсин е ботулин токсин серотип A или B, изолиран от *Clostridium botulinum*.

В предпочитани изпълнения, ботулинови-ят токсин Тип B присъства като комплекс със 700 килодалтона молекулно тегло във формата, при концентрация от около 100 - 20000 U/ml и особено между около 1000-5000 U/ml. Когато е използван Тип A, той ще присъства най-общо при концентрация от около 20-2000 U/ml, и особено между около 100-1000 U/ml. Ако във формата са използвани комбинации от различни серотипове, техните полезни граници на доза или концентрация могат да бъдат определени в съотношение към дозите и концентрациите, илюстрирани тук, съгласно техните съответни биологични активности.

Буферите, които могат да бъдат използвани във формата, са физиологични буфери, които се считат безопасни за инжектиране в тъкан на бозайник, особено в човек.

Представителни буфери включват, но не са ограничени до буферни системи базирани на фосфат, фосфат-цитрат, сукцинат, ацетат, цитрат, аконитат, малат и карбонат. За предпочитане формата ще съдържа също протеин като пълнител, такъв като човешки серумен албумин или желатин. Може да се оцени, че специалистите в областта ще признаят и използват еквиваленти на гореспоменатите примерни буфери и ексципиентни протеини. Формата на токсина от изобретението може да бъде опакована в които и да са от множеството контейнери или ампули, известни в областта, като се запазва нейната активност.

Изобретението също включва използването на формите от изобретението при получаването на медикамент за лечение на такива показания.

Примери на терапевтични и козметични показания, които могат да бъдат лекувани с форма на ботулинов токсин включват, но не са ограничени до блефароспазъм, страбизъм, хемифациален спазъм, отит медиа, спастичен колит, анизмус, уринарна детрусорно-сфинктерна дисфункция, челюстно стискане, изкривяване на гръбначния стълб, еластичност, такава като еластичност, дължаща се на един или повече от групата, състояща се от удар, увреждане на гръбначния мозък, закрыта травма на главата, церебрална парализа, мултиплена склероза и болест на Parkinson, и дистония (напр., еластична тортиколия (цервикална дистония), еластична дисфония, дистония на крайник, ларингеална дистония, оромандибуларна (на Meige) дистония). Формата може също да бъде приложена към перинеума (перинеалните мускули) на пациент, който е в процес на раждане на дете, за причиняване на отпускане на такива мускули. Примерни козметични показания за формата включват прилагането към мускули, които продуцират бръчки или набраздени вежди. Други показания за формата включват миофасциална болка, главоболие свързано с мигрена, съдови нарушения, невралгия, невропатия, артритна болка, болка в гърба, хиперхидроза, ринорея, астма, повишено слюноотделяне и повишено секретирание на стомашна киселина.

Отделно специфицирани начини на прилагане на формите от изобретението включват интрамускулно, субкутанно прилагане и прилагане чрез лекарствена електрофореза. Например в изследвания, проведени в подкрепа на настоящото изобретение, ботулин токсинът Тип В бе намерен за ефективен в контролирана цервикална дистония, когато се прилага интрамускулно в разделени или единични дневни дози от между 5000-10000 единици.

Тези и други цели и признаци на изобретението ще станат по-пълно явни, когато се чете следващото подробно описание на изобретението във връзка с придружаващите го чертежи.

Подробно описание на изобретението

Настоящото изобретение се отнася до стабилни течни фармацевтични форми на ботулин токсин и тяхното използване. Понастоящем, докато препаратите на ботулиновия токсин са раз-

пространявани търговски за множество терапевтични и козметични приложения, поради лабилността на активния токсинов ингредиент в разтвора, формулировките трябва да бъдат възстановявани от лиофилизирани компоненти, които имат строги изисквания за съхранение. Например "BOTOX®" се предоставя като лиофилизиран прах, който трябва да бъде превозван и съхраняван във фризер, при температура под -5°C и възстановяван чрез прибавяне на измерено количество солев разтвор точно преди да се използва. След възстановяването се препоръчва формата да бъде прилагана на пациента в рамките на 4 h и всеки възстановен продукт да бъде държан в хладилник през това време (PDR, 1997); замразяването и размразяването на възстановения продукт не се препоръчва (Hoffman, 1993).

Настоящото изобретение се отнася до стабилна течна форма, която съдържа ботулин токсин, и която е стабилна като течност за поне една година при стандартни температури за хладилник, и за поне шест месеца при стайна температура. Тази форма е изгодна, тъй като тя не изисква необичайни условия на съхранение или транспорт, и тъй като тя намалява възможността за грешки в разреждането на токсина, които биха довели до свръхдозироване.

I. Дефиниции

Както е използван тук, терминът "стабилна" се отнася до задържането на биологичната активност или ефективност на биологично активна субстанция, специфично ботулиновия токсин, в продължение на дефиниран или недефиниран период от време.

Терминът "ботулин токсин" се отнася до биологично активен протеин или протеинов комплекс, обикновено получен от бактерията *Clostridium botulinum*. Терминът се отнася до всеки от поне осем известни серологично различни токсини (A, B, C₁, C₂, D, E, F и G), а така също допълнителни ботулинови токсини, имащи същата обща способност да инхибират холинергичното невропредаване, които образуват активната молекула. По избор терминът включва също протеин носител, който също е получен от *C. botulinum*, и който образува комплекс с активната молекула, както е описано в част IIА тук. Серотиповете на ботулиновия токсин са свързани фармакологично, както е обсъдено по-долу, но са имунологично различни. Обикно-

вено активната токсинова молекула има размер на молекулата от между около 145 и 170 килодалтона (kD). В контекста на настоящото изобретение се разбира, че токсиновият протеин включва токсини и протеини носители, които са изолирани от природни източници, а така също съответни токсини и протеини носители, които се продуцират рекомбинантно съгласно методи, известни в областта. Нещо повече, терминът “ботулин токсин” включва протеини имащи аминокиселинни последователности, които включват запазващи аминокиселинни замествания, включително делеции, по отношение на известните секвенции на ботулин токсин, както са описани по-долу.

“Биологичната активност” на ботулин токсина се отнася до неговата способност да блокира невропренасянето при синапсите, имащи ацетилхолинови рецептори, чрез блокиране ацетилхолиновото освобождаване от нервните окончания. Този термин е използван равностойно тук с термините “инхибиране на холинергично предаване”, “инхибиране на холинергичния принос”, “намаляване на холинергичния принос” и негови отклонения. In vitro изследвания за оценяване биологичната активност на токсина включват изследване LD₅₀ на мишки, както е описано тук. “Единица” активност в това изследване е дефинирана като количеството токсинов протеин, необходимо за умъртвяването на 50 % от мишките, тествани при тази доза. Функционална дефиниция на този термин е дадена в пример 2 тук.

Обичайните аминокиселини са споменавани тук с техните едно- и трибуквени съкращения: аланин (A, Ala), цистеин (C, Cys), аспартова киселина (D, Asp), глутаминова киселина (E, Glu), фенилаланин (F, Phe), глицин (G, Gly), хистидин (H, His), изолевцин (I, Ile), лизин (K, Lys), левцин (L, Leu), метионин (M, Met), аспарагин (N, Asn), пролин (P, Pro), глутамин (Q, Gln), аргинин (R, Arg), серин (S, Ser), треонин (T, Thr), валин (V, Val), триптофан (W, Trp), тирозин (Y, Tyr).

Терминът “течна фармацевтична форма” се отнася до фармацевтично активен лекарствен или биологичен препарат, който е способен да бъде съхраняван в течен фармацевтичен ексципиент, такъв като буфериран солев разтвор или физиологичен буфер, за удължен период от

време. Формата може да бъде концентрирана форма, която се разрежда в подобна или различна течност преди употреба.

Терминът “буфер” се отнася до съединение, обикновено сол, което когато се разтваря във водна среда, служи да поддържа концентрацията на свободния водороден йон в рамките на определена pH област, когато се добавят или отстраняват водородни йони от разтвора. За сол или разтвор се казва, че имат “буфериращ капацитет” или “буферират” разтвора в такива граници, когато те осигуряват тази функция. Обикновено, един буфер ще има адекватен буфериращ капацитет за област, която е в рамките на ± 1 pH единица от неговия pK. “Физиологичен буфер” е буфер, който е нетоксичен за бозайници, особено хора, когато се прилага като част от фармацевтичен препарат. Примери на релевантни физиологични буфери в контекста на настоящото изобретение са дадени тук.

“Фармацевтично приемлива течност” е течност, която се счита, че е безопасна за консумация или чрез инжекция на бозайници, особено хора.

Терминът “протеин пълнител”, както е използван тук, се отнася до протеин, който е добавен към фармацевтично активен препарат, но който не дава допълнителна значителна биологична активност на препарата. Примери на протеини пълнители включват, но не са ограничени до серумни албумини, особено човешки серумен албумин, и желатин. Такива протеини за предпочитане ще бъдат относително неимуногенни за млекопитаещите видове, на които ще бъде прилагана фармацевтичната форма.

Терминът “състоящ се от”, както е използван в контекста на настоящото изобретение и особено в контекста на претенциите, е предназначен да има значението на термина “включващ”, “съдържащ” или “характеризиращ се с”. Състав или метод, който се “състои” от елементите A, B и C, може да включва в допълнение към A, B и C, други нецитирани елементи, такива като X или Y.

Терминът “около”, както е използван в контекста на настоящото изобретение и особено в контекста на претенциите, означава “приблизително” или “почти”. В контекста на числените стойности, без да се обвързва с точна числена дефиниция, терминът може да бъде тълкуван за оценяване на стойност, която е $\pm 10\%$ от цити-

раната стойност или област.

Всички други термини използвани тук, би трябвало да бъдат тълкувани като приемащи обичайните си дефиниции, известни на специалистите в областта, или които са цитирани в стандартни медицински или научни речници.

II. Ботулин токсин

Както е споменато по-горе, ботулин токсинът е полипептиден продукт, продуциран от различни щамове на *Clostridium botulinum*. Тези щамове продуцират поне осем известни серологично различни токсина (A, B, C₁, C₂, D, E, F и G). Всеки от *C. baratii* и *C. butyricum* продуцира единичен серотип, който е подобен на серотипове E и F респективно (Simpson, 1993). Обикновено, токсиновата молекула има молекулен размер от между около 145 и 170 килодалтона (kD). В някои случаи, активната токсинова молекула се състои от две дисулфидно свързани вериги, образувани от родоначален полипептид. Например, ботулиновият токсин Тип В е продуциран от единичен прекурсорен полипептид от 150 kD, който е скъсан в едната верига за генериране на два дисулфидно свързани фрагмента - една тежка верига (Н-верига) от 100 kD и една лека верига (L-верига) от 50 kD за максимална активност. Природно срещаният се токсин се свързва нековалентно към нетоксични протеинни носители също продуцирани от *C. botulinum*. Тези протеинни носители се свързват към токсиновите вериги до образуване на комплекси, имащи големина от 900 kD (Тип А), и за предпочитане около 700 kD за Тип В. Протеинните носители съвместно пречистени с токсина и оптимално образуващи част от формите, са описани тук.

Различните серотипове ботулин токсини показват различни свързващи специфичности в клетките. Например, токсините Тип А и Тип Е изглежда се свързват към едни и същи синаптомални свързващи места, докато токсинът Тип В се свързва към различно място и не завършва свързването при свързващото място на Тип А/Е (Melling, 1988). Като не се желае обвързването с определена теория или механизъм на действие се счита, че Н-веригата на токсина обезпечава активностите на невронното клетъчно свързване и клетъчно проникване, докато L-веригата действа за инхибиране ацетилхолиновото освобождаване при синапса. Допълнително се счита, че

ботулин токсинът типове А и В използва леко различни механизми на осъществяване инхибирането на ацетилхолиновото освобождаване: тип А скъсва синаптично асоцииран протеин-25 (SNAP-25 - Synapse Associated Protein-25), а тип В скъсва везикулно асоцииран мембранен протеин (VAMP - Vesicle-Associated Membrane Protein или синаптобrevин), като и двата протеина са компоненти на синаптичното везикулно освобождаване от синапсите.

Всички серотипове *C. botulinum* токсини продуцират общ физиологичен резултат в бозайници. Те всички инхибират или блокират холинергичната синаптична активност, което води до частична или пълна мускулна парализа или блокада, или инхибиране на органна или жлезиста функция в зависимост от мястото на прилагане. Съответно, формата от настоящото изобретение може да бъде използвана с всеки от серотиповете ботулин токсин, получени от *C. botulinum*, които се характеризират с гореописаните биологични активности. Аминокиселинни последователности от повечето от понастоящем известните серотипове, също са известни или могат да бъдат определени по методи, известни в областта. Разбираемо е, че в контекста на настоящото изобретение форма на ботулин токсин би трябвало допълнително да се тълкува, че включва рекомбинантно конструиран ботулин токсин, който има запазващи аминокиселинни замествания по отношение на такива известни последователности. Обикновено такива замествания ще бъдат правени от стандартни субституционни класове от срещани се в природата аминокиселини. Например, стандартни субституционни класове могат да бъдат шестте класа, базирани на свойствата на обща странична верига и най-високата честота на заместване в хомоложните протеини в природата, както е определено например чрез стандартна честотна обменна матрица, известна в областта, такива като честотната обменна матрица на Dayhoff. Според матрицата на Dayhoff например, класовете са Клас I: Cys; Клас II: Ser, Thr, Pro, Hyp, Ala и Gly, представляващи малки алифатни странични вериги и странични вериги с ОН-групи; Клас III: Asn, Asp, Glu и Gln, представляващи неутрални и отрицателно натоварени странични вериги, способни да образуват водородни връзки; Клас IV: His, Arg и Lys, представляващи основни поляри-

ни странични вериги; Клас V: Ile, Val и Leu, представляващи разклонени алифатни странични вериги, и Met; и Клас VI: Phe, Tyr и Trp, представляващи ароматни странични вериги. В допълнение, всяка група може да включва свързани аминокиселинни аналози, такива като орнитин, хомоаргинин, N-метил лизин, диметил лизин или триметил лизин в клас IV, и халогениран тирозин в Група VI. Допълнително, класовете могат да включват, както L-, така и D-стереоизомери, въпреки че L-аминокиселините са предпочитани за замествания. Като пример заместването на Asp с друг остатък от клас III, такъв като Asn, Gln или Glu, е запазващо заместване.

Докато активността на ботулин токсина може да бъде измерена като се използват електрофизиологични изследвания, такива са известни в областта, активността обикновено се измерва чрез инжектиране на токсина в малко животно, такова като мишка, и се определя дозата токсин, необходима за умъртвяване средно на 50 % от изследваните животни. Тази доза се посочва като "леталната доза-50" или LD₅₀ и е дефинирана като единица биологична активност. Дозите за терапевтични приложения по споразумение са стандартизирани към такива единици. Както е обсъдено по-нататък детайлно в Част IIIB по-долу, различните серотипове могат да имат различни за човека терапевтични ефективности, измерени с LD₅₀ единици. Терапевтичните дози могат да бъдат титрувани от тази информация съгласно методите, известни в областта.

III. Получаване на ботулин токсин

Тази част описва методите за получаване на ботулинов токсин за използване във формите в съответствие с настоящото изобретение.

A. Пречистване на ботулин токсин от *C. botulinum*

Тази част се отнася до общите методи за получаване на пречистен ботулин токсин от култивиран *C. botulinum*, както е илюстрирано с ботулин токсина Тип B. В допълнение към методите специфично цитирани тук, алтернативни методи за получаване на ботулин токсин типове A и B, а така също други познати серотипове, са известни в областта.

Както е споменато по-горе, активният ингредиент във формите от настоящото изобретение е протеиноподобният компонент от *C. botu-*

linum-ови екстракти, известен като ботулин токсин, активният компонент от който има молекулно тегло от между около 145-170 kD, и който обикновено присъства в нативния протеинов комплекс, който има значително по-високо молекулно тегло. Тази част предоставя примерни методи за пречистване на различни ботулин токсини, фокусирани върху серотипове A и B на ботулин токсина. Разбираемо е, че общата научна литература предоставя ръководство за алтернативни методи за пречистване на токсини, и че специалистите в областта ще бъдат способни да идентифицират такива методи и да ги приложат към специфичния токсин, желан за използване във формулировките, приготвени в съответствие с настоящото изобретение.

Обикновено, ботулин токсин Тип B се изолира като комплекс от високотитърни ферментационни култури на *C. botulinum*, съгласно методи добре известни в областта. Изходните култури могат да бъдат придобити в САЩ чрез институти, притежаващи лицензия от Центъра за контрол на заболяванията (CDC) и навсякъде другаде, съгласно националните регламенти за разпространение на организмите. За пречистване на ботулин токсин Тип B, *C. botulinum* Okra или Veap B са подходящи изходни материали. Замразени изходни култури се инокулират в тестови епруветки, съдържащи културална среда, такова като тиогликолатна среда или триптиказа пептонова среда, и културите растат и се обработват съгласно методите, описани по-долу и детайлизирани в US 5 696 077, включен тук чрез позоваване, и както е описано по-долу.

Накратко, културите се развиват съгласно методите, известни в областта за произвеждане на достатъчно количество бактериален изходен материал за получаване на желания добив токсин. Обикновено се изискват около 20 l бактериална култура за получаване на 0.5 g токсин. Културата се довежда до стайна температура и pH на културата се нагласява до pH 3.5 със сярна киселина или друга подходяща киселина. Получената утайка се оставя да се утаи и избистрената супернатанта се декантира. Тогава към утайката се прибавя калциев хлорид с разбъркване и обемът се увеличава с дейонизирана вода, така че крайната концентрация на CaCl₂ е около 150 mM. pH се повишава до почти неутрално (pH 6.5) и токсиновият разтвор се избистря чрез

центрофугиране. Токсинът се утаява повторно чрез нагласяване рН до 3.7. Получената утайка се оставя да се утаи и токсиновият преципитат се събира чрез центрофугиране, после се разтваря отново в буфер (рН 5.5) и изчерпателно се диализира в продължение на една нощ срещу същия буфер. Диализираният токсин се центрофугира и получената супернатанта се хроматографира през анионообменна колона (DEAE). Несвързаната фракция се събира и изследва за протеиново съдържание. Токсините комплекси се утаяват от тази фракция чрез прибавяне на амониев сулфат до около 60 % насищане. Пелетата се разтваря във фосфатен буфер и се диализира срещу същия буфер (рН 7.9). Този пречистен токсинов препарат може да бъде използван за получаване на формата.

Методи за получаване на ботулин токсин тип А също са добре известни в областта. Например, Hambleton, et al. (1981) и Melling, et al. (1988), които и двата са включени тук чрез позоваване, описват получаването и пречистването на ботулин токсин тип А от *Clostridium botulinum* тип А NCTC 2916. Културите от тази бактерия се развиват от контролирана посевна биомаса и се инокулират в 30-литров ферментатор, работещ при анаеробни условия, съгласно стандартни условия известни в областта. Добивът на токсин се следи непрекъснато (например чрез определяне на LD₅₀) и когато се постигне максимален добив (грубо 2 x 10⁶ миши LD₅₀/ml), културата се подкислява (нагласявано с 3 N H₂SO₄ до рН 3.5) и токсинът се събира чрез центрофугиране. Този утаен суров токсин се разтваря повторно и се екстрахира с 0.2 М фосфатен буфер (рН 6.0), последван от обработване с рибонуклеаза (100 microg/ml при 34°C) и утаяване като се използва NH₄SO₄ (60 % насищане при 25°C). След това преципитатът се суспендира отново и се подлага на DEAE-Sephacel йонообменна хроматография при рН 5.5 (последваща серия предварителна адсорбция). Фракциите се следят за активност и активните фракции се утаяват отново, като се използва NH₄SO₄ (60 % насищане при 25°C). Преципитатът може да бъде съхраняван и повторно разтворен за приготвяне на форма от изобретението, както е описано по-долу.

Формулировките от настоящото изобретение за предпочитане включват токсиновия свър-

зващ комплекс, такива са получени съгласно методите, описани по отношение на ботулиновия токсин типове А и В, по-горе, или използват еквивалентни форми на ботулин токсин типове C₁, C₂, D, E, F или G, получени съгласно методите, известни в областта. Титърът на токсина се определя чрез серийно разреждане на възстановен токсинов свързващ комплекс в протеин пълнител, такъв като човешки серумен албумин, като се избягват отделянето на мехурчета и силното разбъркване, такова като вихрово смесване. Съгласно конвенцията, титърът се определя в анализ за миша леталност, такъв като анализа на миша LD₅₀, описан в пример 2. Работен изходен разтвор се разрежда, разделя на аликвотни части и лиофилизира за съхранение. Този изходен разтвор се изследва в анализи за определяне на протеинова концентрация, LD₅₀, чистота и фармацевтична пригодност съгласно методи, добре известни в областта и илюстрирани в пример 2 тук.

IV. Стабилни форми на ботулин токсин

Откритието на настоящото изобретение е, че ботулин токсинът може да бъде приготвен и съхраняван в стабилна течна форма, която запазва неговата активност за удължен период от време, напр. поне 1-2 години, при "хладилни" температури (т.е., около 5±3°C или по-специално около 4±2°C, или по-общо, 0-10°C) или поне около 6 месеца при "стайна температура" (т.е., около 25°C, или по-общо 10-30°C). Такава форма може удобно да бъде приготвяна и прилагана на хора или други млекопитаещи видове като фармацевтичен препарат без допълнително възстановяване от лекаря. Формата се характеризира с рН от между около рН 5 и 6, за предпочитане около рН 5.5-5.6, като се поддържа с подходящи буферизиращи условия. Формата може също да включва един или повече протеинни пълнители.

Пример 1 дава подробности за получаването на форма на ботулин токсин (тип В) при концентрация от 5000 U/ml. Разбираемо е, че такива условия на формулиране могат да бъдат приложени към други серотипове на ботулин токсин, такива като ботулин токсин тип А, при концентрациите изисквани за такива серотипове, за да се обезпечат стабилни форми в удобни дозиращи опаковки.

Накратко, концентриран препарат на боту-

лин токсин, такъв като пречистените токсинови препарати описани по-горе във връзка с типове А или В, се смесва с разредител такъв като сукцинатен буфер, имаш рН между рН 5 и рН 6, за предпочитане около рН 5.6. В случая на ботулин токсин тип В, концентрация от около 5000 U/ml, оценени в анализ на миша LD₅₀, е желана; обаче навсякъде в диапазона от 100-20000 U/ml или даже по-високи дози може да са необходими или желани в зависимост от дозата, която трябва да бъде доставена. В случая на ботулин токсин тип А концентрации, вариращи от 20-2000, и за предпочитане около 100-1000 U/ml, могат да бъдат удобни. За целите на фармацевтичното производство, формата е изпитана и анализирана за присъствие на възможни микробиални онечиствания (бионатоварване) и е филтрувана стерилно в стъклени или полипропиленови флакони, за разпространение на пациенти. Крайният продукт може да бъде съхраняван като течност за поне една година и за предпочитане повече от две години при 0-10°C без значителна загуба на биологична активност, както се доказва с < 20 % загуба на активност в миши LD₅₀ тест (Пример 2).

Споменатият по-горе разредител може да бъде всяка фармацевтично приемлива течност, която не повлиява неблагоприятно стабилността на комплекса, и която поддържа стабилна рН област между около рН 5 и рН 6. Примери на особено подходящи буфери включват сукцинатен и фосфатен буфер; обаче тези, които са специалисти в областта ще признаят, че формите от изобретението не ще бъдат ограничени до отделен буфер, доколкото буферът обезпечава приемлива степен на рН стабилност или "буферен капацитет" в отбелязаната област. Обикновено един буфер има адекватен буферен капацитет в рамките около 1 рН единица от неговия рК. (Lachman, et al., 1986). В контекста на настоящото изобретение, това включва буфери, имащи рК в диапазона от около 4.5-6.5. Буферната стабилност може да бъде оценена въз основа на публикувани рК таблични стойности или може да бъде определена емпирично по методи, добре известни в областта. В допълнение към сукцинатния и фосфатен буфер, споменати по-горе, други фармацевтично полезни буфери включват ацетат, цитрат, аконитат, малат и карбонат (Lachman). рН на разтвора може да бъде нагласено към желаната крайна точка в областта, като се използва която и да

е фармацевтично приемлива киселина, например солна киселина или сярна киселина, или основа, например натриев хидроксид.

Протеинът пълнител, прибавен към формата може да бъде всеки от множество фармацевтично приемливи протеини или пептиди. За предпочитане, протеинът пълнител е избран за неговата способност да бъде прилаган на субект бозайник, без да провокира имунен отговор. Например, човешкият серумен албумин е добре подходящ за използване във фармацевтични формулировки, които се прилагат на хора; и обратно, говеждият серумен албумин може да бъде избран за използване при говеда. Други известни фармацевтични протеини пълнители, такива като например желатин могат да бъдат използвани за тази цел. Пълнителят е включен във формата при достатъчна концентрация, за да се предотврати адсорбцията на токсиновия протеинов комплекс към съда, в който се държи или флакона. Концентрацията на пълнителя ще се променя според естеството на пълнителя и концентрацията на токсиновия комплекс във формата. Като пример в изследване, проведено в подкрепа на настоящото изобретение е било определено, че концентрация от 0.5 mg/ml човешки серумен албумин е достатъчна за целите на форми, съдържащи 5000 U/ml ботулинов токсин тип В, като не предизвиква значителна имунологична или алергична реакция в повечето хора; обикновено концентрации от между около 0.05 mg и 1 mg за 1000 U ботулин В би трябвало да обезпечат достатъчна защита.

Подходящи концентрации на пълнители за стабилизиране на ботулин токсин тип А също са били описани. Например, "BOTOX®" се стабилизира при добавянето на 0.5 mg албумин за 100 единици токсинова активност (PDR).

V. Ползност

А. Терапевтични и козметични приложения на формулировки на ботулинов токсин

Фармацевтичните състави от настоящото изобретение могат да бъдат използвани при множество показания, в които се желае инхибиране или блокада на холинергичното невропредаване, особено, но не ограничено до, холинергичното предаване, свързано с контрол на гладки или скелетни мускули. В тази част са дадени примери на разстройства, при които могат да бъдат използвани терапевтично форми от изобретението;

обаче дадените тук примери не би трябвало да се тълкуват като ограничаващи изобретението. Представителни дози и начини на прилагане за някои от тези показания са описани в част В, по-долу.

Било е показано, че ботулин токсин, особено ботулин токсин тип А, е ефективно лечение за еластични мускулни разстройства. Единствен лечебен режим (който може да включва множество мускулни инжекции) може да обезпечи облекчение от неконтролиран мускулен спазъм достатъчно дълго за няколко месеца. Например, "БОТОХ®" (ботулиновият токсин тип А) е одобрен от Агенцията за храни и лекарствени средства на САЩ (US Food and Drug Administration) за локализирана инжекция в очната орбита за лечение на блефароспазъм. Други индикации включват други фокални дистонии, такива като ларингеална дистония, синдром на Meige (оромандибуларна дистония; орофациална дискинезия), спастична крива шия (Hardman, et al., 1996), дистония на крайник, анизмус, уринарна детрусорно-сфинктерна дисфункция, блефароспазъм, страбизъм, хемифациален спазъм, а така също ринорея, отит медия, повишено слюноотделяне, астма, еластичен колит, повишено секретирание на стомашна киселина (виж например, US 5 766 005), главоболие свързано с мигрена, съдови нарушения, невралгия или невропатия (US 5 714 468; WO 1995/003041), артритна болка (WO 1995/017904), разстройство на стомашно-чревния тракт, включващо стрипарен или гладък мускул (US 5 674 205), отпускане на перинеума по време на раждане (US 5 562 899), или облекчаване на челюстно стискане (US 5 298 019). Ботулин токсин тип А е бил също инжектиран локално за постигане на козметично облекчаване на мускулен тонус, който причинява "линиите на намръщеност" на лицето и за постигане на "опъване на челото" (Frankel, 1998) и е било намерено, че е полезен, когато се инжектира вътрекожно за лечение на фокална хиперхидроза (извънредно потене; WO 1995/028171; US 5 766 605), а така също за лечение на юношеско изкривяване на гръбначния стълб (US 5 053 005), церебрална парализа при възрастни и юноши (US 5 298 019; WO 1993/005800) и спазмични и неволеви контракции, причинени от церебрална парализа, мултиплена склероза или болест на Parkinson (US 5 183 462). Всички справки цитирани по-горе, са включени тук из-

цяло чрез позоваване.

В експерименти, проведени в подкрепа на настоящото изобретение, бяха изпитани стабилни течни форми, съдържащи ботулин токсин тип В, и бяха намерени за ефикасни при цервикална дистония, известна също като крива шия, състояние, в което един индивид изпитва неволеви спазми и мускулни контракции в главата, врата и гърба, които водят до движения на обръщане или извеждане на главата. Това състояние също често е придружавано от тремор и мускулно-скелетна болка. Най-общо, етиологията на разстройството е неизвестна; обаче се счита, че е резултат от дисфункция на централната нервна система водеща до свръхактивност на въввлечената мускулатура. Лечебните режими понастоящем, включително антихолинергичните, допаминергични, мускулно-релаксанти, антиспазматични и антиконвулсанти лекарствени средства не предоставят поддържано облекчение. Ботулиновият токсин тип В е ефективен в лечението на това състояние чрез причиняване на локална парализа или пареза, която има типично начално време от около 1 седмица след инжекцията и продължителност на ответната реакция, траеща от около 1 до 4 месеца.

Формулировките на другите серотипове ботулин токсин са полезни в първоначалното лечение на всяко от преди описаните състояния по отношение на тип А. В допълнение, както е споменато по-горе, типове В-Г на ботулиновия токсин са също полезни в лечението на пациенти, които са станали резистентни на лечението с ботулин токсин тип А, поради наличието на имуноен отговор на токсина. Обратно, серотип А може да бъде използван в пациенти, които са станали резистентни на серотип В или всеки от другите серотипове токсин. Могат да бъдат направени и използвани формулировки на един или повече серотипове от ботулиновия токсин, в съответствие с настоящото изобретение.

Обикновено се оценява, че предвид техните подобни биологични ефекти, различни типове ботулин токсин могат да бъдат вътрешно-заменими в лечението на различни нарушения, особено тези, свързани с мускулна еластичност. Независимо от това, както е описано по-долу по отношение на типове А и В, ефективните дози (изразени с термините на LD₅₀ или биологични, единици) могат да варират значително измежду

различните серотипове. Оценките на еквивалентните дози могат да бъдат направени, като се базират на известните дози, описани по отношение на всеки от изпитваните токсини.

В. Дозировки и начини на приложение

Ботулин токсинът е известен като силен и понякога фатален токсин за животните. Независимо от това, както е описано по-долу, когато е обърнато достатъчно внимание в приспособяването начина на приложение и дозите, това лекарство средство може да бъде използвано безопасно при хора.

Дозите за различните форми на ботулин токсин ще варират съгласно използвания серотип токсин. Например, в експерименти проведени в подкрепа на настоящото изобретение е било намерено, че сравнявайки миши LD₅₀ единици, ботулин токсин тип А ("BOTOX®") е около 4-6 пъти по-силен от ботулин токсин тип В в индуцирана парализа в маймуни, както е оценено чрез електрофизиологични измервания на избрани скелетни мускули. Това наблюдение е в съгласие с експерименталните резултати в плъхове, които показват по-големи разлики в количествата на двата токсина, изискващи се за продуциране парализа на крайници на плъх (Sellin; Jackson). Предвид тези наблюдения, еквивалентните дози могат да бъдат изчислени или определени емпирично от практикуващия специалист.

Промените в препоръчителните дози могат също да варират в съответствие с историята на пациента. За пациентите, които са получавали повторно дози на ботулин токсин тип А например, е било докладвано, че стават "резистентни" към допълнително лечение, изискващо по-големи дози за получаване на еквивалентен ефект с течение на времето. Без обвързване към някой отделен механизъм на действие се счита, че този феномен е свързан с развитието в пациента на имунен отговор, специфичен за един серотип. Доклади за инцидентите с антитела в пациентите, подложени на повтаряща се терапия с ботулин токсин тип А засягат от около 3 до 57 %. Съответно се препоръчва в случай на клинични ефекти да се сменят серотиповете по време на режима на лечение, като началната доза от новия серотип трябва да бъде изчислена по-скоро на базата на нетретиран пациент, отколкото на базата историята на дозиране на пациента.

Подходящите методи за приложение включват всички, които ще имат за резултат доставянето на активен токсинов ингредиент към представляващата интерес тъкан, без причиняване на лоши странични ефекти за пациента. Такива методи включват без ограничение, интрамускулна (i.m.) инжекция, локално прилагане, подкожно, периневрално прилагане, приложение с йонофоретичен ток и подобни. Специфични процедури за приложение на ботулин токсини, включително процедури за ограничаване разпространението на активните компоненти, са добре известни в областта. Може да бъде използвана електромиография за идентифициране и по-прецизно локализиране на специфичните мускулни групи, особено за лечения, включващи мускули, които са трудни за идентифициране, такива като тези в орбитата на окото, ларинкса и птеригоидната област, а така също мускули в зълтестели субекти.

Лечението на дистонии обикновено се осъществява чрез прилагане на токсина близо до зоните на инервация на засегнатия мускул, обикновено чрез интрамускулна инжекция, като се използва подкожна игла. Обикновено получената локализирана парализа може да доведе до облекчаване на пациента за до 3 или 4 месеца. Пациентите могат да бъдат тествани при по-ниски дози и индивидуално титрувани до една оптимална доза, за да се постигне достатъчна невромускулна блокада за коригиране на всякаква дисфункция, без да се продуцира изразена парализа. Може да има индикация за промени в дозата, ако пациентът стане резистентен към токсин. Предимство на настоящото изобретение е, че преодолява един проблем с обикновената доза, свързан с нестабилността на токсиновия материал в разтвор, която може да доведе до допълнителна двусмисленост относно подходящата доза.

Препоръчителните дози на ботулин токсин тип А са били определени за множество индикации и са известни в областта. Например, за лечение на страбизъм се препоръчва доза от 1.25-2.5 U ботулин токсин тип А за прилагане към вертикалните мускули и за хоризонтален страбизъм от по-малко от 20 диоптъра; 2.5-5 U се препоръчват за хоризонтален страбизъм от повече от 20 призмени диоптри (Physician's Desk Reference, 51st Edition).

Ботулин токсин тип А е използван също за лечение на блефароспазм при доза от 1.25-2.5 U инжектирана, като се използва игла 27-30 размер, в медиалния и латерален предтарзален очен кръг на горния клепач и в латералния предтарзален очен кръг на долния клепач. Очаква се лечението да трае около 3 месеца; при повтарящо се лечение дозата може да бъде увеличена до двукратна, в зависимост от възприемчивостта на пациента. Препоръчва се една кумулативна доза от не повече от 200 U ботулинов токсин тип А да бъде давана в продължение на 30-дневен период. (Physician's Desk Reference, 51st Edition).

Пример 3 предоставя примери за изследвания на варирането на дозите за използване на ботулин токсин тип В при лечението на цервикална дистония (тортиколия), като се използва форма в съответствие с настоящото изобретение. В тези изследвания също отбелязани по-долу, течната форма на ботулин токсин тип В в съответствие с изобретението бе предоставена на прилагащите клиницисти с инструкции формата да се съхранява в клиничен хладилник с контрол за температурите между 2-8°C. Обикновено формата бе доставяна от партиди, получени и съхранявани при препоръчаната температура за 6-12 месеца. Клиницистите получиха приблизително 6-месечен запас на формата.

Накратко, на пациентите бяха давани различни дози от токсина с интрамускулна (i.m.) инжекция в 2-4 повърхностни мускулни групи на врата и/или плещите, определени в зависимост от оценката на практикуващия лекар за мускулното участие в нарушението. В едно изследване бяха давани индивидуални разделени дози, вариращи от 100-1200 U, с кумулативни дози от между 270-2280 U за период, вариращ до 398 дни. Всички пациенти изпитаха подобрение по време на изследването и не бе наблюдавано намаляване на ефективността на формата в курса на изследването.

Допълнителни изследвания, проведени в подкрепа на настоящото изобретение показваха, че пациенти, които са станали резистентни към ботулин токсин тип А, могат да бъдат лекувани с ботулин токсин тип В. Тук пациенти, които участваха в изследването, показваха понижена чувствителност към ботулин токсин тип А и бяха считани за успешно лекувани, ако след лечението те показваха поне 25 % намаление в общия

резултат (намаление = подобрение), както е оценено по скалата Toronto Western Spasmodic Torticollis Rating Scale (TWSTRS; Consky, 1994), в сравнение с резултата на контролното ниво. Бяха прилагани индивидуални дози между 150-1430 U от форма на ботулин токсин тип В, с кумулативни дози, вариращи от 300-12000 единици в продължение до 117 дни, както е детайлизирано в пример 3. Общо, пациентите изпитаха едно подобрение в това изследване, особено при по-високи дози и нямаше доказателство за развитие на блокиращи антитела към ботулин тип В, нито имаше доказателство за намаляване ефективността на формата. В едно допълнително изследване, индивидуални дози от 0, 400, 1200 и 2400 U от форми на ботулин токсин тип В, бяха прилагани периодично в продължение на 203 дни с успех в лечението на тортиколия, както е описано по-горе.

Следните примери илюстрират, но по никакъв начин не са предназначени да ограничат настоящото изобретение.

Примери за изпълнение на изобретението

Материали

Освен ако не е отбелязано друго, всички реагенти описани тук могат да бъдат придобити от който и да е уважаван търговски продавач, който продава реагенти за използване в химичната, биохимична, биотехнологична или фармацевтична индустрия, както е подходящо.

Пример 1. Получаване на стабилна форма на ботулин токсин

А. Получаване на сукцинатен буфер

Получен бе сукцинатен буфер в партиди от по 3 l с 2.7 mg/ml динатриев сукцинат и 5.8 mg/ml натриев хлорид, допълнен с 0.5 mg/ml човешки серумен албумин (Michigan Biological Products Institute). За нагласяване pH на буфера бе използвана концентрирана солна киселина до pH 5.6. Буферът бе филтруван през 0.2 microm филтър в автоклавиран, херметичен контейнер. Преди употреба от буфера бе вземана проба и бе изследвана за pH, бактериален ендотоксин и бионатоварване.

В. Получаване на форма на ботулин токсин

Аликвотна част от концентриран ботулин токсин тип В бе разреждана приблизително 1000-кратно, с използване на сукцинатен буфер (pH 5.6) до получаване на активност от 5000 ± 1000 U/ml.

65555 B1

Разреденият токсин бе съхраняван в запечатани стъклени контейнери от 2 l и означавани като "Основен разтвор". След това той бе съхраняван при $5 \pm 3^\circ\text{C}$, докато материалът бъде транспортиран за пълнене.

Преди пълненето, от основния разтвор бе взета проба и бе изследвана за присъствието на микробно онечистване (бионатоварване) съгласно стандартни методи, известни в областта. След

това той бе прехвърлен към перисталтична помпа през медицинска марка тръба и филтруван стерилно (0.2 μm) в стерилен основен резервоар, разположен вътре в стаята за пълнене.

- 5 Полученият стерилен филтруван Основен разтвор бе подаден за пълнене в 3.5 cc стъклени ампули на аликвотни части от 0.5 ml (2500 U), 1 ml (5000 U) или 2 ml (10000 U).

Съставът на крайния продукт в контейнера е показан в Таблица 1.

Таблица 1

Състав на форма на Ботулин В

Активен ингредиент	Неактивни ингредиенти	Концентрация
Ботулинов токсин Тип В	--	5000 $\pm$ 1000 LD ₅₀ U/mL
-	Сукцинат, USP	10 mM
-	Натриев хлорид, USP	100 mM
-	Човешки албумин, освободен от FDA	0.5 mg/mL
--	Солна киселина, NF	За регулиране на pH

Пример 2. Изследване стабилността на форма на ботулин токсин

А. Резултати за стабилност

Ботулин токсин тип В бе произведен, разреден както е описано по-горе до концентрация от 2500 единици/ml и съхранен като 1 ml аликвотни части в стъклени ампули от 5 ml при 5°C за до, и включително, 30 месеца. На 0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 и 30-тия месец след първоначалното съхранение, бяха вземани аликвотни части случайно и изследвани за активност в мишия LD₅₀

анализ. Разтворите бяха също наблюдавани за външен вид и бяха изследвани за pH съгласно стандартни методи.

Таблица 2 показва резултатите от изследване на аликвотни части отстранени в различни времеви точки. Тези резултати посочват, че формите, получени в съответствие с настоящото изобретение са стабилни, както се доказва чрез активността, която е в диапазона от активности, докладвани за момента нула за по-не 30 месеца, когато се съхраняват при 5°C .

Таблица 2

Стабилност на формата при 5°C

Време на съхранение (месеци)	Активност (средно; U/ml)	pH	Външност ^a
0	1750-3250	5.5	Преминава

1	1941	ND ^b	ND
3	2541	5.6	ND
6	2020	5.6	Преминава
9	2357	5.6	Преминава
12	2064	5.6	Преминава
18	2318	5.4	Преминава
24	1799	5.6	Преминава
30	2101	5.6	Преминава

^aПреминава = бистър, безцветен до светложълт разтвор; по същество свободен от видими частици

^b Не е осъществен тест

^aПреминава = бистър, безцветен до светложълт разтвор; по същество свободен от видими частици

^b Не е осъществен тест

Таблица 3 показва резултатите от изследването на аликвотни части от форма на ботулин токсин тип В, приготвена и разделена на аликвотни части, както е описано по-горе, но съхранявана при 25°C. Тези резултати посочват, че формата е стабилна за поне 6 месеца при 25°C, както се доказва от средната активност, която се задържа поне около 90 %, и за предпочитане поне 95 % след 6 месеца съхранение, и поне около 75 % от нейната начална активност след 9 месеца съхранение при 25°C.

25

Таблица 3

Стабилност на формата при 25 °C

Време на съхранение (месеца)	Активност (средна; U/ml)	pH	Външност ^a
0	1941	5.5	Преминава
1	2297	5.6	ND ^b
2	1935	5.6	ND
3	2017	5.6	ND
6	1909	ND	Преминава
9	1579	5.6	Преминава

^aПреминава = бистър, безцветен до светложълт разтвор; по същество свободен от видими частици

^b Не е осъществен тест

^a Премахва = бистър, безцветен до светложълт разтвор; по същество свободен от видими частици

^b Не е осъществен тест

В. Тестове за стабилност

1. Определяне pH на формата от ботулин токсин

pH на формата от ботулин токсин тип В бе измерено с pH метър Fisher Scientific Accumet, Model 50, със сонда за автоматично компенсиране на температурата. Електродът бе Orion Ross Combination Electrode със сравнителен електрод от KCl. Определянето на pH бе направено след стандартно еталониране при две точки (pH 4.0, pH 7.0) съгласно указанията на производителя. За всяка проба са правени по три измервания. Стойностите на pH са записвани до 2 значещи числа и бе взета средната стойност.

2. Тест за активност, определена с миша LD₅₀

Здрави, неизползвани CFW или CD-1 мишки от двата пола, тежащи 18 до 22 g бяха използвани за определяне на LD₅₀. За всеки напълнен продукт, мишките бяха тествани при 5 дози на формата от ботулин токсин тип В. Всеки анализ бе проведен в петкратни серии.

От изследваната проба бяха приготвени два изходни разтвора. Основен разтвор А бе получен чрез разреждане на изследваната проба до една приблизителна активност от 750 U/ml с желатин фосфатен буфер, pH 6.2. Основен разтвор В бе получен чрез разреждане на разтвор А 10-кратно до 75 U/ml. Следните изследвани разреждания бяха получени от основен разтвор В: 1:7.5, 1:10, 1:13.5, 1:18 и 1:24.3.

На мишките бяха правени интраперитонеални инжекции от 0.2 ml от съответното разреждане на съединение. Мишките бяха държани по 4 дни след инжекцията и наблюдавани ежедневно. Всяка смърт бе записвана. Наблюденията бяха прекъснати след четири дни.

Кумулативните смъртни случаи (CD) при различните нива на разреждане бяха изчислени чрез събиране броя на смъртните случаи от максималното разреждане нагоре. Кумулативните случаи на оживяване (CS) бяха изчислени чрез събиране броя на оживелите от минималното разреждане надолу. Процентът CD бе изчислен като $CD/(CD+CS) \times 100\%$ при всяко разреждане. Разреждането, представляващо LD₅₀, бе определено по метода на пропорционалното отклоне-

ние (Proportional Distance (PD)) на Reed и Muench, като се използват разрежданията, произвеждащи стойности на % CD, които свързват 50 % кумулативен смъртен случай.

Пропорционалното отклонение

$$(PD) = (\% CD > 50 \%) - 50 \%$$

$$(\% CD > 50 \%) - (\% CD < 50 \%)$$

Получената PD стойност бе умножена с логаритъма от разликата между нивата на разреждане, които свързват 50 % CD. Тази стойност бе прибавена към логаритъма от разреждането със смъртност (CD), по-голяма от 50 за получаване на разреждането, представляващо LD₅₀. Антилогаритъмът на това разреждане бе изчислен за получаване количеството на LD₅₀ единиците токсин на инжекционен обем (0.2 ml). Това количество след това бе умножено по 5 за получаване LD₅₀ единиците на ml токсин от основен разтвор В.

LD₅₀ единиците на ml основен разтвор В бяха умножени с неговия фактор на разреждане (т.е. разреждането, необходимо за получаване на приблизителна активност от 75 U/ml) до получаване на активността на пробата. Средноаритметичната стойност и стандартното отклонение на LD₅₀ единиците на ml бяха изчислени за 5 валидни теста.

3. Външен вид на формата

Външният вид бе оценен чрез визуално преглеждане срещу черен и бял фон под ярка светлина след леко завъртане. Цветът, бистротата и присъствието на видими частици бяха всички оценени.

Пример 3. Лечение на цервикална дистония (CD)

А. Разреждане на лекарството, изчисление, прилагане и режим на дозиране

1. Обработване на лекарственото средство

Ампулите с лекарственото средство бяха напълнени за доставяне на 2.0 ml (10 000 U), 1.0 ml (5 000 U) или 0.5 ml (2 500 U) от неразредено лекарствено средство за изследване. Във всички етапи на обработване бяха избягвани силното разбъркване или отделяне на мехурчета, тъй като ботулиновият токсин може да бъде денатуриран при което и да е от тези състояния. Формата бе отстранена от ампулата като се използва 1 ml туберкулинова спринцовка, като се осигурява отстраняването на точен обем.

2. Изчисляване на лекарственото средство

Ботулин токсин тип В бе прилаган на пациенти с цервикална дистония (CD) чрез прилагане съдържанието на подходящата ампула(и) за получаване на дозите, отбелязани в таблицата по-долу. Мишните единици (U) за увеличена доза са изчислени, както следва, където 1U е количеството токсин, присъстващо в доза, която представлява LD_{50} , определена при мишки, както е описано в пример 2.

За всяка сесия на дозиране, ботулин токсин тип В бе прилаган съгласно стандартни процедури, както са детайлизирани по-долу. Инжекциите със съединението бяха поставяни от лекар невролог, предварително обучен в терапевтичното прилагане на ботулин токсин на пациенти с CD. От пациентите бе изисквано да се отпуснат толкова, колкото е възможно за улесняване наблюдението на положението на главата и врата при покой. Определянето на вратните мускули, въввлечени в продуцирането на CD бе направено и потвърдено чрез палпиране на поразените мускули. По преценка на изследвателя бе осъществявана EMG-оценка за допълнително локализиране на първично увредените мускули. Мускулите, взети под внимание за лечение в този протокол са: мускул повдигач на лопатката (levator scapulae), среден и преден стълбест мускул (scalenus medius и anterior), полубодилен мускул на главата (semispinalis capitis), ремъковиден мускул на главата (splenius capitis), гръдно-ключично-мастоиден мускул (sternocleidomastoid) и трапецовиден (trapezius) мускул. Във всеки от тези мускули бяха правени инжекции в 1 до 5 места. Общият инжектиран обем за място бе по-малък или равен на 1.0 ml за избягване на локална тъканна деформация, но поне 0.1 ml за улесняване на точното измерване на обема със стандартна 1.0 ml спринцовка. Първоначално пациентите получаваха обща доза от 5000 U, с последващи дози от до около 15000 единици при следващи посещения в клиниката.

В. Клинични изследвания на цервикална дистония (CD)

Изследване 1

Осем пациенти (3 мъже, 5 жени), имащи средна възраст от 43.9 години и индивидуални клинични диагнози за идиопатична CD взеха участие в изследване, в което форма на токсин

тип В бе инжектирана в 2-4 повърхностни мускулни групи на врата и/или плещите. Пациентите бяха определени за подлагане на лечение с такава честота като на всеки 4 седмици, при условие, че нямаше сериозни неблагоприятни ефекти или упорито клинично подобрение при явяването. Пациентите участваха в 1 - 5 сесии на дозиране. Индивидуалните сесии на дозиране варираха от 100 до 1200 U с общи кумулативни дози, вариращи от 270 до 2280 U ботулинов токсин тип В, форми на токсин както са описани тук. Ефективността бе оценена чрез използване на скалата Tsui Torticollis Scale (Tsui, J. K. C. (1986), Lancet 2: 245-247). Пациентите участваха в изследването в продължение на 127 до 398 дни, със средно време в изследването от 244.8 дни. Резултатите на тортиколията бяха подобни при контролното ниво и всички пациенти изпитаха скромно намаляване в резултата (намаляване = подобрение) с някаква индикация на обусловена от дозата тенденция, когато се сравняват общите дози. Общо, пациентите изпитаха подобрение в състоянието на тортиколията. Нямаше индикация за развитие на блокиращи антитела в това изследване.

2. Изследване 2

Пациентите, записани в това изследване имаха клинични диагнози за идиопатична CD (тортиколия) и бяха развили резистентност към ботулин токсин тип А. Пациентите получиха интрамускулни инжекции на форми на ботулин токсин тип В в съответствие с настоящото изобретение към 2-4 повърхностни мускули на врата и плещите.

Дванадесет пациенти (средна възраст 52.3 години) започнаха и завършиха изследването. Пациентите участваха в изследването от 37 до 127 дни, със средно време от 65 дни. Пациентите бяха лекувани с 1 до 3 дози от изследваното лекарство средство. Кумулативните дози варираха от 940-2100 U, а индивидуалните дози варираха от 150-1430 U ботулин токсин тип В. Средният период от време между сесиите на дозиране бе 22.3 дни за пациентите, получаващи по-ниски дози (100-899 U общо) и 48.4 дни за тези в по-високия обхват на дозата (900-1500 U).

Клиничната полза бе дефинирана като поне 25 % намаление в резултата по скалата Toronto Western Spasmodic Torticollis Rating Scale (TWSTRS) - Severity Scale (Consy, E.S.,

Lang, A.E. (1994) B: Therapy with Botulinum Toxin. Jankovic, J and Hallet M, eds. Marcel Dekker, Inc., New York) в сравнение с контролното ниво (намаление = подобрене). Средният резултат бе подобен във всички пациенти при контролното ниво. 56 % от пациентите в групата с по-висока доза показаха намаление в TWSTRS-резултата за тежестта на заболяването, в сравнение със 7 % от пациентите в групата с по-ниска доза. Скорно подобрене в TWSTRS-резултата за болка също бе наблюдавано в двете групи, особено в ранните фази на изследването. Нямаше доказателство за развитие на блокиращи анти-тела към ботулин токсин тип В в тези пациенти.

3. Изследване 3

Двадесет и осем пациенти (средна възраст 50.9 години) с потвърдени диагнози на цервикална дистония, получиха инжекции с форма на ботулин токсин тип В в 2-4 повърхностни мускули на врата и плещите с увеличаващи се дози (до 1.5-кратно за успешна сесия) извънредно. Клиничната полза бе оценена при използване на TWSTRS-теста за тежестта на заболяването, както е описано по-горе, с 25 % намаление в резултата считано за подобрене.

Пациентите участваха в изследването от 28-177 дни със средно време в изследването от 71.9 дни. Пациентите бяха лекувани с 1 до 3 дози от форма. Кумулативните дози варираха от 1430 до 12000 U, с индивидуални дози от 300 до 12000 U. За целите на клиничната оценка бяха дефинирани 4 групи дози: 100-800 U (Група А), 900-2399 U (Група В), 2400-5999 U (Група С) и 6000-12000 U (Група D). Периодът от време между сесиите на дозиране варираше както следва: Група А, 13-101 дни, средно 35.7 дни; Група В, 14-113 дни, средно 48.8 дни; Група С, 29-177 дни, средно 62.2 дни; Група D, 28-177 дни, средно 55.1 дни.

Средните контролни резултати бяха подобни във всички пациенти във всички лекувани групи, и всички 4 групи изпитаха средно понижаване в резултата (подобрене) по време на изследването. Общо, средният процент подобрене от контролното ниво и средното отношение на възприемчивост, на резултата за тежестта на заболяването, бяха най-големи в групи С и D по време на изследването. Измерванията на средното максимално подобрене, среден максимален процент подобрене и средното максимално

отношение на възприемчивост бяха по-високи за двете групи с по-високи дози, отколкото за двете групи с по-ниски дози (8.1 и 6.8 срещу 2.1 и 3.6 за максимално подобрене; 43.9 % и 35.5 % срещу 10 % и 16.1 % за средно максимално подобрене; 0.32 и 0.23 срещу 0.05 и 0.09 за средно максимално отношение на възприемчивост). Процентът на пациентите, реагиращи на лечението, бе по-висок за двете групи с по-високи дози (С, 80 % и D, 78 %), отколкото за двете групи с по-ниски дози (А, 0 % и В, 27 %). Средната продължителност на реакцията бе по-дълга за двете групи с по-високи дози (С, 47.6 дни; D, 38.1 дни), отколкото за двете групи с по-ниските дози (А, 0 дни; В, 31 дни). Тези данни показват зависима от дозата възприемчивост към формите на ботулин В токсина в съответствие с настоящото изобретение.

4. Изследване 4

Три дози на форми ботулин токсин тип В бяха тествани на фона на плацебо лечение в изследване, което включи 85 пациенти с CD влизащи в случайно разпределено, двойно-сляпо, с единична доза, 4-ръце, паралелно-групово, многоцентрово изследване. Пациентите бяха разпределени по възраст от 18 до 80 години. Дозите бяха 400, 1200 или 2400 U ботулин токсин Тип В, инжектирани в 2-4 повърхностни мускулни групи на врата и/или плещите. Пациентите бяха оценявани с TWSTRS скалата за резултати при контролно ниво и на седмица 2 и 4 след лечението. Пациентите, които не успяха да покажат 3 или повече точки подобрене (> 20 %) в TWSTRS резултата за тежестта на заболяването след 4 седмици, бяха изтеглени от изследването като не-реагиращи. Възприемчивите бяха връщани за оценка всеки 4 седмици, докато техните нива на чувствителност паднаха с повече от 50 %.

Всички TWSTRS резултати показаха подобрене с увеличение дозата на форма на ботулин токсин тип В. На 4-тата седмица имаше статистически значимо подобрене в пациентите в групата с доза 2400 U в сравнение с плацебо-третираните пациенти по двете оценки: TWSTRS-болка и TWSTRS-обща, и процентът на пациентите показващи подобрене бе най-голям в групата 2400 U. Средните глобални оценки на пациента бяха значително по-високи в групата 2400 U на 2, 4 и 8 седмици, в сравнение с която и да е друга лечебна група; в анализа на изменени-

ето на данните от 4-тата седмица, имаше статистически значителна разлика ($p = 0.0286$) измежду лечебните групи. Имаше също значителни разлики между плацебо и групата с доза 2400 U ($p = 0.0050$) и в анализа доза-отговор ($p = 0.0028$). В анализа на променливите на данните от 4-та седмица, имаше статистически значителна разлика ($p = 0.0073$) измежду лечебните групи, и имаше също значителни разлики между групата плацебо и групата с доза 2400 U ($p = 0.0015$) и в анализа доза-отговор ($p = 0.0008$).

Пациентите участваха в това изследване от 25 до 203 дни, с по-висок среден брой дни за групата с доза 2400 U (61 дни).

5. Изследване 5

Това изследване също бе със случайно разпределение, двойно сляпо, плацебо-контролирано, с единична доза, 4-ръце, паралелно-групово, многоцентрово изследване с амбулаторни пациенти, за изпитване ефектите на еднократно третиране с плацебо (група А) или една или три дози (2500 U, група В; 5000 U, група С; 10000 U, група D) на форма на ботулин токсин тип В, инжектирана в 2 до 4 повърхностни мускулни групи на врата и/или плещите в пациенти с потвърдени диагнози на CD. Пациентите бяха оценявани при посещения 2 и 4 седмици след лечението. Онези с повече от 20 % подобрение на 4-тата седмица, сравнено с контролното ниво (TWSTRS-общ резултат) бяха считани за "възприемчиви" и бяха помолени да се връщат за повторна оценка на 4-седмични интервали за максимум от 4 месеца, или докато тяхното ниво на резултата за възприемчивост падне с повече от 50 %.

Сто двадесет и два пациента, разпределени по възраст от 19-81 години, влязоха в изследването. Времето, през което пациентите продължаваха да бъдат в изследването отразяваше времето, през което те реагираха на изследването лекарствено средство. Лекуваните групи бяха подобни за минималния и максимален брой дни, които пациентите членове оставаха в изследването. Средното време в изследването се увеличаваше с нарастването на дозата, от 45 дни за плацебо група А, до 61 дни (В), 67 дни (С) и 75 дни (D).

За всички TWSTRS резултати, всички лекувани групи показаха подобрение от контролното ниво до седмица 4. Всички TWSTRS резултати имаха тенденция към подобряване с уве-

личаване дозата на формата. В анализа на ковариацията на TWSTRS-общите резултати от седмица 4, общата разлика измежду лекуваните групи бе статистически значителна ($p = 0.0001$).

В допълнение анализът на доза-отговор бе значителен ($p = 0.0001$), и всичките 3 сравнения на плацебо с активните групи бяха значителни ($p = 0.0016$ за плацебо срещу 2500 U; $p = 0.0005$ за плацебо срещу 5000 U; $p = 0.0001$ за плацебо срещу 10000 U). Процентът на пациентите, които реагираха на лечението на седмица 4 бе по-висок в група D (10000 U), отколкото във всяка друга група за резултатите TWSTRS-общ, -инвалидност и -болка. Имаше значителна доза-отговор за всеки от четирите TWSTRS резултати (общ, $p < 0.001$; тежест, $p = 0.035$; инвалидност, $p = 0.002$; болка, $p = 0.001$). Оценката за болка се подобри за всички лекувани групи на седмица 4, до 67.5, 70.2 и 75.1 в групи В, С и D, съответно. Общите разлики измежду лекуваните групи бяха статистически значими ($p = 0.0049$), анализът на доза-отговор бе статистически значителен ($p = 0.0017$) и сравненията на плацебо с всичките три активни лекувани групи бяха значителни ($p = 0.0149, 0.0084$ и 0.0007 за групи В, С и D, сравнени с плацебо съответно).

Пример 4. Физиологична реакция на форма на ботулин токсин тип В в субекти хора

Осемнадесет здрави субекти бяха изследвани за М-вълнова амплитудна чувствителност на мускула къс разгъвач на пръстите (extensor digitorum brevis (EDB)) на ботулин токсин тип В, като се използват стандартни електрофизиологични методи, известни в областта. Субектите бяха разпределени по възраст от 18-22 години. Електрофизиологичните изследвания бяха проведени в дните 2, 4, 6, 9, 11, 13 и 14 след инжекция на дози, вариращи от 1.25 до 480 U (i.m.) на форми на ботулин токсин тип В. Резултатите от анализа на данните показаха обусловено от дозата понижаване в EDB М-вълновата амплитуда и област с увеличаване на дозата. Максималният ефект при 480 U доведе до 75 % намаление в М-вълновата амплитуда от контролното ниво.

В отделно изследване, 10 субекта бяха разпределени случайно, за да бъдат инжектирани с доза на ботулин токсин тип В "В" форма в един EDB и доза от "BOTOX®" (ботулин токсин тип А, "А") в другия EDB, като се използва една от пет различни схеми на дозиране: 1.25 U А/ 20

UB; 2.5 U A/ 80 UB; 5 U A/160 UB; 7.5 U A/ 320 U B; 10 U A/ 480 U B (2 субекта за схема на дозиране). На едно контролно лице бе направена инжекция с физиологичен разтвор във всеки EDB мускул. Скоростта на спадане в М-вълновата амплитуда и област бе подобна и в двата мускула, с максимален ефект, срещащ се приблизително на 6-тия ден след инжекцията. Двата серотипа показаха обусловено от дозата намаляване на значението в М-вълновата амплитуда. Облекчението след упражнение бе най-голямо на 9-тия ден за двата типа токсин.

Докато изобретението е описано с позоваване на специфичните методи и изпълнения, ще бъде оценено, че различни модификации и промени могат да бъдат направени без отделяне от изобретението.

Патентни претенции

1. Течна фармацевтична форма на ботулин токсин за терапевтично използване при хора, съдържаща фармацевтично приемлив буфериран солев разтвор, който осигурява на формата буферирана рН област между рН 5 и рН 6, и терапевтична концентрация на пречистен, изолиран ботулин токсин, подходящ за използване при хора и серумен албумин, при което тази форма е стабилна като течност, когато се съхранява за поне една година при температура между около 0 и 10°C, или за поне шест месеца при температура между около 10 и 30°C.

2. Форма съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че буферираната рН област е около рН 5.4 и рН 5.8.

3. Форма съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че формата е стабилна като течност за поне две години при температура между около 0 и 10°C.

4. Форма съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че формата е стабилна като течност за поне една година при температура между 2 и 8°C, за предпочитане 5°C.

5. Форма съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че формата е стабилна като течност за поне една година при температура между 2 и 6°C, за предпочитане 4°C.

6. Форма съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че формата е стабилна като течност за поне шест месеца при 25°C.

7. Форма съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че ботулин токсинът е ботулин токсин серотип, избран от групата, състояща се от серотипове А, В, C₁, C₂, D, E, F и G.

8. Форма съгласно претенция 7, характеризираща се с това, че ботулин токсинът е ботулин токсин тип В, присъстващ при терапевтична концентрация в диапазона от около 100-20000 U/ml.

9. Форма съгласно претенция 8, характеризираща се с това, че ботулин токсин тип В присъства при терапевтична концентрация в диапазона от 1000-5000 U/ml.

10. Форма съгласно претенция 7, характеризираща се с това, че ботулин токсин тип В присъства в комплекс с високо молекулно тегло от около 700, 000 далтона (D).

11. Форма съгласно претенция 7, характеризираща се с това, че ботулин токсинът е ботулин токсин тип А, присъстващ при терапевтична концентрация в диапазона от около 20-2000 U/ml.

12. Форма съгласно претенция 11, характеризираща се с това, че ботулин токсинът тип А присъства при терапевтична концентрация в диапазона от около 100-1000 U/ml.

13. Форма съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че фармацевтично приемливия буфериран солев разтвор включва буфериращ компонент, избран от групата, състояща се от фосфатен буфер, фосфат-цитратен буфер и сукцинатен буфер.

14. Форма съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че включва 100 mM натриев хлорид; 10 mM сукцинатен буфер при буферирано рН 5.6; 0.5 mg/ml човешки серумен албумин; и ботулин тип В, присъстващ при концентрация от 4000 U/ml до 6000 U/ml, за предпочитане 5000 U/ml.

15. Форма съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че серумният албумин е рекомбинантен човешки серумен албумин.

16. Форма съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че формата съдържа 0.5 mg/ml човешки серумен албумин, ботулин токсин тип В, присъстващ при концентрация от 4000 U/ml до 6000 U/ml, за предпочитане 5000 U/ml и фармацевтично приемлив буфериран солев разтвор, съдържащ 100 mM натриев хлорид и 10 mM сукцинатен буфер, като цитираният буфериран разтвор осигурява буферирано рН от 5.6, при което ботулин токсинът е стабилен в цитираната форма за поне около шест месеца при температура

между около 10 и 30°C.

17. Форма съгласно претенция 16, в която тази температура е около 25°C.

18. Форма съгласно всяка от претенции 16 и 17, в която буфериран солев разтвор има рК в диапазона от рН 4.5-6.5.

19. Форма съгласно всяка от претенции от 16 до 18, в която буферната рН област е около рН 5.6±0.2.

20. Използване на течна форма на ботулин токсин съгласно всяка от претенции от 1 до 19 за производство на медикамент за използване при лечение на пациент, нуждаещ се от инхибиране на холинергичното предаване към избран мускул, мускулна група, жлеза или орган.

21. Използване съгласно претенция 20, в което пациентът страда от разстройство, избрано от групата, състояща се от мускулна еластичност, блефароспазм, страбизъм, хемифациален спазъм, дистония, отит медиа, еластичен колит, анизмус, уринарна детрусорно-сфинктерна дисфункция, челюстно стискане и изкривяване на гръбначния стълб.

22. Използване съгласно претенция 21, в което пациентът страда от мускулна еластичност поради един или повече от групата, състояща се от удар, увреждане на гръбначния мозък, закрыта травма на главата, церебрална парализа, мултиплена склероза и болест на Parkinson.

23. Използване съгласно претенция 21, в което пациентът страда от дистония, избрана от групата, състояща се от спастична тортиколия (цервикална дистония), спастична дисфония,

дистония на крайник, ларингеална дистония и оромандибуларна (на Meige) дистония.

24. Използване съгласно претенция 20, в което посоченият избран мускул или мускулна група продуцира бръчка или набраздена вежда.

25. Използване съгласно претенция 20, в което мускулът е перинеален мускул, и в което пациентът е в процес на раждане на дете.

26. Използване съгласно претенция 20, в което споменатият пациент страда от състояние, избрано от групата, състояща се от миофасциална болка, главоболие, свързано с мигрена, съдови нарушения, невралгия, невропатия, артритна болка, болка в гърба, хиперхидроза, ринорея, астма, повишено слюноотделяне и повишено секретирание на стомашна киселина.

27. Използване съгласно всяка от претенции от 20 до 26, в което споменатият пациент е резистентен към ботулин токсин тип А и ботулин токсинът в споменатата форма е избран от групата, състояща се от ботулин токсин серотипове В, C₁, C₂, D, E, F и G.

28. Метод съгласно претенция 27, в която ботулин токсинът в споменатата форма е ботулин токсин тип В.

29. Използване съгласно всяка от претенции от 20 до 26, в което споменатият пациент е резистентен към ботулин токсин тип В и ботулин токсинът в споменатата форма е избран от групата, състояща се от ботулин токсин серотипове А, C₁, C₂, D, E, F и G.

30. Използване съгласно претенция 29, в което ботулин токсинът в споменатата форма е ботулин токсин тип А.

Издание на Патентното ведомство на Република България
1797 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: О. Димитрова

Пор. № 65354

Тираж: 40 ВК