



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 255 025**

⑤① Int. Cl.⁷: **A61K 38/48**
A61P 13/02

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **04019371 .6**

⑧⑥ Fecha de presentación : **15.07.1998**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1475099**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2004**

⑤④ Título: **Uso de toxina de botulino para tratar incontinencia urinaria.**

③⑩ Prioridad: **15.07.1997 US 52580 P**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2006

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2006

⑦③ Titular/es:
The Regents of the University of Colorado
201 Regents Administrative Center
Boulder, Colorado 80309, US

⑦② Inventor/es: **Schmidt, Richard A.**

⑦④ Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

ES 2 255 025 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de toxina de botulino para tratar incontinencia urinaria.

Campo de la invención

La presente invención proporciona composiciones para tratar la incontinencia urinaria. Esto se realiza administrando una composición que incluye al menos un compuesto neurotóxico o por terapias convencionales.

Antecedentes de la invención

Muchas afecciones médicas en urología tienen su origen en una disfunción espástica de los arcos reflejos sacros. Ejemplos de dichas afecciones incluyen el dolor pélvico (por ejemplo, cistitis intersticial, endometriosis, prostatidina, síndromes de inestabilidad uretral), elementos miofasciales pélvicos (por ejemplo, esfínter elevador, dismenorrea, fístula anal, hemorroides), incontinencia urinaria (por ejemplo, vejiga inestable, esfínter inestable), trastornos de la próstata (por ejemplo, BPH, prostatitis, cáncer de próstata), infección recurrente (secundaria a espasticidad del esfínter) y retención urinaria (secundaria a esfínter espástico, cuello de vejiga hipertrofiado) y disfunción neurogénica de la vejiga (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, lesión de la médula espinal, apoplejía, esclerosis múltiple, reflejo espasmódico).

La próstata es una glándula parcialmente glandular y parcialmente fibromuscular del sistema reproductor masculino. Durante el envejecimiento, la próstata tiende a agrandarse (hipertrofia). Este agrandamiento prostático puede conducir a la obstrucción uretral y disfunción de la evacuación.

El agrandamiento prostático es un acontecimiento común en hombres de edad avanzada. Lytton *et al.* (Lytton, B., Emery, J.M. y Harvard, B.M. [1973] 99: 639-645) estimaron que un hombre de 45 años de edad tenía un 10% de riesgo de cirugía de próstata a la edad de 70. Un informe censal de EE.UU. estima que hay 30 millones de personas hoy día con más de 65 años de edad. Este segmento de la población está previsto que se eleve a 50 millones en los próximos 30 años. Por lo tanto, el número de hombres con agrandamiento prostático también aumentará. Según los informes emitidos por el Consejo Asesor Nacional de Enfermedades del Riñón y Urológicas, se realizaron 425.000 prostatactomías en los Estados Unidos en 1989. Basándose en el crecimiento de la población se estima que el número de prostatactomías realizadas anualmente se elevará hasta 800.000/año en el año 2020.

La uretra pasa a través de la próstata (uretra prostática) cuando sale hacia el orificio uretral externo. La uretra tiene cinco lóbulos distintos que son evidentes a las 12 semanas en el feto humano (Lowsley, O.S. Am. J. Anat. [1912] 13: 299-349). Aunque la ramificación lobular encontrada en el feto no es visible en la próstata prepubescente, los lóbulos medios anterior y posterior son usados para describir la próstata agrandada.

Un punto de vista más reciente es que la próstata está comprendida también por varias zonas morfológicamente distintas (McNeal, J. Urol. Clin. North Am. [1990] 17(3): 477-486). La mayoría del volumen glandular está compuesto por la zona periférica (~70-75%). El resto del volumen glandular está dividido en la zona central (~20-25%), la zona de transición (~5-10%) y la zona glandular periuretral (~1%).

McNeal (1990) informó que la BPH se desarrolla en la zona de transición y la zona glandular periuretral. Los nódulos de BPH se desarrollan en el interior o de forma inmediatamente adyacente a la zona esfínterica prostática. La zona de transición es una zona pequeña próxima a la uretra íntimamente relacionada con el esfínter uretral proximal. El estroma de la zona de transición es denso y compacto, y es inusualmente susceptible a perturbaciones neurológicamente inducidas del control del crecimiento. Sus glándulas penetran en el esfínter, mientras que las fibras de los músculos del esfínter penetran en el estroma de transición. La zona glandular periuretral tiene un origen de seno urogénico similar como la zona de transición.

La BPH puede estar asociada con cantidades aumentadas de estroma con relación al epitelio (Bartsch, G. Muller, H. R., Oberholzer, M. Rohr, H., P., J. Urol. [1979] 1222: 487-491). Una parte significativa del estroma es músculo liso (McNeal, 1990) que está bajo control nervioso simpático. Las propiedades contráctiles de este músculo liso podrían suponer el componente dinámico de la obstrucción en la BPH (Bruschini, H. *et al.* [1978] Invest. Urol. 15 (4): 288-90; Lepor H. [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 651-658).

Además del control simpático del estroma prostático, la próstata está altamente enervada. Las fibras nerviosas de la próstata entran en la próstata desde el aspecto lateral posterior con una concentración de ganglios cerca de la conexión entre la próstata y las vesículas seminales (Maggi, C.A., ed. [1993] "Nervous control of the Urogenital System", Harwood Academic Publishers; Higgins, J.R.A. and Gosling, J.A. [1989] Prostate Suppl. 2: 5-16). En esta glándula han sido descritos acetilcolina (ACH), neuropéptido Y (NPY), péptido intestinal vasoactivo (VIP) y fibras de noradrenalina. Un plexo con elevado contenido de estructuras celulares de nervio positivo a ACH está asociado con los acines secretores en todas las partes de la glándula. Algunas de las fibras de ACH contienen también neuronas de NPY. Las neuronas que contienen VIP se ha encontrado que están asociadas con las estructuras celulares de nervios que contienen ACH. Se han encontrado neuronas ocasionales entre las fibras nerviosas manchadas con ACH, sugiriendo que tanto el NPY como las neuronas noradrenérgicas suministran músculo liso (Higgins J.R.A. and Gosling, J.A. [1989] Prostate Suppl. 2: 5-16).

Los nervios autonómicos están distribuidos uniformemente entre las zonas central y periférica de la próstata (Higgins, J.R.A. y Gosling, J.A. [1989] Prostate Suppl. 2: 5-16). El control neuronal periférico es análogo. Además, no hay ninguna diferencia en el tipo de fibras nerviosas encontradas asociadas con elementos epiteliales o estromales de la glándula.

Los estudios anatómicos de tipos de fibras nerviosas en la próstata, acoplados con otros estudios de inervación de estroma prostático (Brushing H., Schmidt, R.A., Tanagho, E.A. [1978] Invest. Urol. 15(4): 288-290; Watanabe, H., Shima, M., Kojima, M., Ohe, H.L. [1989] Pharmacol. Res. 21 (Suppl 2): 85-94) sugieren que la inervación colinérgica ejerce una influencia sobre el comportamiento epitelial, mientras que la inervación adrenérgica ejerce una influencia sobre el tono estromal (excitabilidad). Estas observaciones han proporcionado un motivo para el uso, por ejemplo, de bloqueadores alfa en el tratamiento de BPH. Los efectos de los bloqueado-

res alfa (Downie, J.W. y Bialik, G.J. [1988] *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246(1): 352-358) pueden suponer también mejoras en los síntomas de BPH como consecuencia del humedecimiento del comportamiento del esfínter estriado disfuncional por los bloqueadores alfa.

Los estudios han mostrado también que hay varias taquiquininas (por ejemplo, sustancia P [SP], péptido relacionado con el gen de calcitonina [CGRP], neuroquinina A, bradiquinina y factor de crecimiento nervioso [NGF] que pueden ejercer una influencia sobre el tono del músculo liso (Hakanson *et al.*, [1987] *Neuroscience* 21(3): 943-950). Los receptores de neurotransmisores han sido cuantificados en toda la próstata (por ejemplo, NPY, VIP, SP, leu-enkefalina (L-enk), met-enkefalina, 5-HT, somatostatina, fibras positivas a acetilcolinesterasa (ACTH) y dopamina beta-hidroxilasa (DBH) (Crowe, R. Chapple, C.R., Burnstock G., "The Human Prostate Gland: A Histological and Immunohistochemical Study of Neuropeptides, Serotonins, Dopamine beta-Hydroxylase and Acetylcholinesterase in Autonomic Nerves and Ganglia). Hay alguna variación en la densidad de receptores en diferentes sitios prostáticos en la hiperplasia prostática benigna.

Los cambios en el comportamiento celular electrofisiológicamente registrados y en la concentración de neuropéptidos en la médula espinal se ha mostrado que son una consecuencia secundaria del aplastamiento mecánico de los músculos de la cola de una rata, estimulación por catéter de la uretra posterior y electroestimulación de un nervio periférico. La disiner-gia entre el esfínter detrusor y el uretral es un descubrimiento significativo en pacientes con prostatodinia. La denervación de la próstata se ha mostrado también que produce enormes cambios en el epitelio prostático. Por tanto, hay una evidencia de que las alteraciones experimentalmente inducidas en las influencias neurológicas pueden ser producidas en el sacro, médula espinal, vejiga o uretra a través de métodos mecánicos, eléctricos, químicos o térmicos (microondas, láser) para cambiar el comportamiento irritativo. Sin embargo, no ha habido intentos conocidos de usar neurotoxinas para aplicaciones terapéuticas.

Hay una escasa correlación entre el grado de agrandamiento prostático y la gravedad de los síntomas. Aunque un 80% de los hombres con 70 años de edad muestran BPH tras exploraciones por ultrasonidos transrectales, solamente un 20% buscaron cirugía (Coffey, D.S. y Walsh, P.C. [1990] *Urol. Clin. North Am.* 17(3): 461-475), el tratamiento de elección para BPH (Fowler, F.J. Jr., Wennberg, J.E., Timothy, R.P. [1988] *J. Amer. Med. Assoc.*, 259(20): 3022-3028). Los síntomas de irritación pueden sobrepasar bastante los síntomas esperados basándose en el tamaño de la próstata. Los síntomas pueden mejorar después de un tratamiento quirúrgico de BPH mediante procedimientos como resección transuretral de la próstata (TURP) (Christensen, Aagaard, M. M. J., Madsen P.O. [1990] *Urol. Clin. North Am.* 17(3): 621-629), dilatación de balón (Dowd, J.B. y Smith, J.J. III [1990] *Urol. Clin. North Am.* 17(3): 671-677), o hipertermia prostática (Baert, L. Ameye, F. Willemens, P., *et al* [1990] *J. Urol.* 144: 1383-1386). Sin embargo, los síntomas persisten en tanto como un 15% de pacientes de BPH (Baert, L., Ameye, F., Willemens, P., *et al.*, [1990] *J. Urol.* 144: 1383-1386; Wennberg, J.E., Mully, A.G., Hanley, D., Timothy, R.P., Fowler,

F.J., Roos, R.P., Barry, M.J. *et al* [1988] *J. Amer. Med. Assoc.* 259: 3027-3030). Hasta un 25% de pacientes de BPH tienen procedimientos secundarios en estudios de seguimiento a largo plazo, sugiriendo que las aproximaciones quirúrgicas no abordan los mecanismos fundamentales que producen la BPH, es decir, la influencia neurológica defectuosa (mecanismo de control) sobre la integridad del tractor urinario inferior.

La necesidad de cirugías repetidas, la morbilidad y la mortalidad asociadas con TURP y el coste de la cirugía han conducido al desarrollo de algunas aproximaciones no quirúrgicas como la ablación de andrógenos (McConnell, J.D., [1990] *Urol. Clin. North Am.* 17(3): 661-670) y el uso de bloqueadores alfa anteriormente expuesto, pero pocos tratamientos médicos o quirúrgicos hasta la fecha han producido una restauración del comportamiento vacío al estado normal (caudal de aproximadamente 25 cm³/s y volumen vacío de aproximadamente 400 cm³).

La presente invención usa neurotoxina, que es una toxina botulino, para modular los trastornos de la próstata. Por ejemplo, estos métodos pueden ser usados para tratar BPH y estados relacionados como prostatitis. La presente invención puede suprimir también la activación de cambios en el CNS por métodos no químicos que incluyen bio-retrocontrol, o mediante métodos químicos que tratan BPH y otros estados urológicos mediante la administración de sustancias que bloquean diversas actividades neurológicas como, por ejemplo, neurotoxinas seleccionadas.

Objetos y sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones para uso en métodos para la prevención y tratamiento de la incontinencia urinaria.

Es un objeto adicional proporcionar composiciones para este logro terapéutico. Es un objeto más adicional proporcionar dosis y métodos de administración para composiciones útiles para la prevención y tratamiento de afecciones neurológicas-urológicas.

Otros objetos de la invención serán fácilmente aparentes para los expertos en la técnica.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones para el tratamiento de la incontinencia urinaria, dichas composiciones se usan en métodos que comprenden la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una toxina de botulino a dicho mamífero. Es preferido que el botulino inhiba la función sináptica. Esta inhibición produce una denervación selectiva y, por ejemplo, atrofia de la próstata e inversión de los síntomas irritativos asociados con el agrandamiento prostático. La neurotoxina induce una disfunción del terminal neuronal presináptico mediante la unión específica y bloqueo de la liberación de acetilcolina en las conexiones mioneurales. Esta neurotoxina es tipo A de toxina botulino (Botox, Allergen).

Preferentemente, la neurotoxina es segura, altamente selectiva y fácil de suministrar, incluso cuando se combina con otras terapias. Es también barata y puede ser usada sobre una base del paciente. El suministro de la neurotoxina puede ser por cualquiera de los medios adecuados. En método conveniente y localizado de suministro es por inyección.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de la neurotoxina es la dosificación suficiente para inhibir la actividad neuronal durante al menos una semana, más preferentemente un mes, lo más preferentemente du-

rante aproximadamente 6 a 8 meses o más. La dosificación puede ser una dosis única o acumulativa (dosis en serie) y puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica. La neurotoxina puede ser suministrada en serie (es decir, una vez al mes, una vez cada seis meses) con el fin de que pueda ser optimizado el efecto terapéutico. Este esquema de dosificación es fácilmente determinado por un experto en la técnica basándose, por ejemplo, en el tamaño del paciente y el estado que va a ser tratado, y dependerá de muchos factores, que incluyen la neurotoxina seleccionada, el estado que va a ser tratado, el grado de irritación y otras variables. Una vía sugerida de tratamiento para BPH es 200 unidades cada tres días hasta la LD50 para Botox de aproximadamente 2500 unidades.

El tratamiento anteriormente mencionado debe ser particularmente útil para el control a largo plazo de trastornos de la próstata, por ejemplo, los síntomas de agrandamiento prostático, sin necesidad de intervención quirúrgica. Además de ello, los métodos de la presente invención proporcionan el control de trastornos neurológicos-urológicos, por ejemplo, BPH y estados relacionados, de una manera altamente selectiva, sin los efectos secundarios potenciales y fallos de tratamiento asociados con las modalidades de tratamiento actuales.

Descripción detallada de la realización preferida

“La afección o trastorno urológico-neurológico” incluye muchas afecciones médicas en urología originadas en una disfunción y/o degeneración espástica de los arcos reflejos sacros. Ejemplos de dichas afecciones incluyen el dolor pélvico (por ejemplo, cistitis intersticial, endometriosis, prostatinía, síndromes de inestabilidad uretral), elementos miofasciales pélvicos (por ejemplo, esfínter elevador, dismenorrea, fístula anal, hemorroides), incontinencia urinaria (por ejemplo, vejiga inestable, esfínter inestable, motora o sensorial), trastornos de la próstata (por ejemplo, BPH, cáncer de próstata), infección recurrente (secundaria a espasticidad del esfínter) y retención urinaria (secundaria a esfínter espástico, cuello de vejiga hipertrofiado) y disfunción neurogénica de la vejiga (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, lesión de la médula espinal, apoplejía, esclerosis múltiple, reflejo espasmódico) y otras afecciones urológicas de una etiología nerviosa.

Aunque no se desean vinculaciones de carácter teórico, la base para el tratamiento de las afecciones neurológicas-urológicas es la supresión o modulación de la base neural para la regulación disfuncional del tejido afectado. Por ejemplo, la modulación de la base neural de la disfunción glandular de próstata puede ser realizada mediante cualquiera de los medios no quirúrgicos conocidos en la técnica. Estos medios pueden incluir, por ejemplo, bio-retrocontrol, bloqueadores α , métodos farmacológicos y el uso de una o más neurotoxinas para inhibir la función sináptica en la glándula afectada. Es preferido que la neurotoxina provoque una inhibición de larga duración de la función sináptica, preferentemente mayor que una semana, más preferentemente mayor que un mes, lo más preferentemente de seis a ocho meses o más. La toxina botulino es una neurotoxina necesaria según la presente invención, particularmente la toxina botulino A, más particularmente Botox (Allergen).

La toxina puede ser formulada en cualquier formulación farmacéuticamente aceptable en cualquier forma farmacéuticamente aceptable. Estas formas

y formulaciones incluyen líquidos, polvos, cremas, emulsiones, píldoras, pastillas, supositorios, suspensiones, soluciones y similares. La toxina puede ser usada también en cualquier forma farmacéuticamente aceptable suministrada por cualquier fabricante.

En una realización preferida de acuerdo con el método de la presente invención, la neurotoxina es tipo A de toxina botulino. Las cantidades terapéuticamente eficaces de toxina botulino pueden ser cualesquiera cantidades o dosis que sean menos que una dosis tóxica, por ejemplo, menos de aproximadamente 3000 UI/macho de 70 kg, preferentemente entre 100 UI/macho de 70 kg a 1200 UI/70 kg. Las dosificaciones pueden ser proporcionadas en forma de una dosis única o en forma de dosis divididas, por ejemplo, divididas en el transcurso de cuatro semanas.

Las neurotoxinas pueden ser administradas por cualesquiera medios adecuados. En la realización preferida de la invención, la toxina botulino es administrada por inyección. Por ejemplo, la neurotoxina puede ser inyectada uretroscópicamente en la próstata con 200 UI con dosis únicas o en serie. Preferentemente, la neurotoxina es inyectada cada tres días hasta que se consigue un efecto terapéutico o hasta aproximadamente 2500 unidades.

Las siguientes técnicas son usadas:

Preparación de tejidos para microscopía óptica

Los tejidos son fijados en paraformaldehído al 6% en tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,2, durante 24 horas, deshidratados en alcohol calibrado y xileno, e incluidos en parafina. Las secciones son cortadas y teñidas con tintes apropiados, como hematoxilina/eosina.

Preparación de tejidos para microscopía electrónica

Los tejidos son recogidos y fijados en glutaraldehído al 2,5% en tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,2, durante 1 hora a 4°C, y seguidamente son incubados con tetróxido de osmio al 0,1% durante 1 hora e incluidos en EPON. Se preparan secciones de ultratrina (80 nm) y se tiñen con citrato de plomo/acetato de uranilo y se examinan con un microscopio electrónico (Philips, modelo 201).

Tinción en túnel para apoptosis

El tejido es fijado e incluido como se describió anteriormente. Los tejidos son desparafinizados y se hacen reaccionar con Proteínasa K (Boehringer). Son adicionalmente tratados con peroxidasa y enzima TDT y colocados en un humidificador ajustado a 37°C durante una hora. Las secciones son lavadas y se añade anti-digoxigenina-peroxidasa durante 30 minutos, seguido de tinción con níquel-DAB (diaminobenceno).

Estudios de inmunohistoquímica

La presencia de los neuropéptidos VIP, SP, NPY, L-Enk y péptido relacionado con el gen calcitonina (CGRP) así como la expresión del factor beta de crecimiento de transformación (TFG-beta), factor alfa de crecimiento de transformación (TGF-alfa), factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF) se determinó en tejidos prostáticos usando anticuerpos monoclonales apropiados. El uso de neurotoxinas da lugar a la atrofia prostática, que debe ser evitada por niveles inferiores de factores de crecimiento en el tejido prostático tratado.

Las secciones son incubadas durante una noche a temperatura ambiente con anticuerpos primarios seguidos de inmunotinción con avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC, Vector Labs, EE.UU.). Se

usa en las preparaciones antisuero policlonal de conejo contra los neurotransmisores VIP, CGRP, SP, NPY y L-Enk (Península Labs, EE.UU.), a diluciones de 1:8000 a 1:12.000. Los testigos inmunocitoquímicos consisten en absorber previamente el antisuero primario con antígeno apropiado, o su sustitución con suero normal (Blasi, J., Chapman, E.R., Yamaskai, S., Binz, T., Niemann, H y Jahn, R. [1993], *The EMBO Journal* 12: 4281-4828; Black, J.D. y Dolly, J.O. [1986] *J. Cell Biol.* 103; 535-544; Linial, M. [1995] *Is. J. Med. Sci.* 31: 591-595). Después de disponerse en portaobjetos, las secciones son contrateñidas con eosina, deshidratadas y cubiertas con cubreobjetos.

Análisis por transferencia Western de la expresión del factor de crecimiento

Los homogenatos de células de próstata tratados y sin tratar son examinados en cuanto a la expresión de factores de crecimiento mediante análisis por transferencia Western. La proteína del homogenato celular es separada por electroforesis sobre SDA-PAGE (7%), seguidamente transferida por electroforesis durante una noche a papel de nitrocelulosa (Towbin, H., *et al.*, [1979] *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76(9): 4350-4379). El papel de nitrocelulosa es mojado durante una hora a temperatura ambiente en leche seca no grasa al 0,5% disuelta en solución salina tamponada con fosfato, y es adicionalmente mojado a 4°C en solución bloqueante (albúmina de suero bovino al 2% en Tris 10 mM/NaCl 0,15 M/azida de sodio al 0,1%, pH 7,4). Las membranas de nitrocelulosa son incubadas con anticuerpos (fracciones de IgG de anti-TGF-beta, anti-TGF-alfa, anti-EGF y anti-bFGF) purificados por medio de proteína A (1×10^6 cpm/ml) en tampón bloqueante durante 1 hora. La membrana es lavada con PBS que contiene Nonidet P-40 entre incubaciones. Se expone película X-O-mat AR2 (Kodak) a la membrana a -70°C y las películas son reveladas para examinar la expresión de factores de crecimiento.

Determinación de la expresión de c-fos y c-myc

La expresión de c-fos y c-myc en tejido prostático tratado y sin tratar se determina mediante análisis por transferencia Northern como sigue. El tejido es homogeneizado en tampón de lisis durante 15 segundos o hasta que el tejido se homogeneiza. Se añade acetato de sodio y la solución se mezcla con agitación. Un volumen igual de fenol saturado en agua es añadido y mezclado por inversión, seguido de la adición de cloroformo/alcohol isoamílico. La solución es centrifugada vigorosamente durante 30 segundos y se deja sedimentar en hielo durante 15 minutos. La solución se centrifuga durante 10-20 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, la fase acuosa es cuidadosamente aspirada y colocada en un nuevo tubo de polipropileno. Se añade un volumen de isopropanol y la solución se mezcla por agitación. La solución se coloca en un congelador a -20°C durante al menos 60 minutos para precipitar RNA. Después de la precipitación, el tubo es centrifugado durante 10 minutos, y la materia sobrenadante es sedimentada, dejando un sedimento de RNA. Se añade 1 ml de etanol, y el tubo se centrifuga durante 10 minutos adicionales. La fase acuosa se desecha, y el sedimento se lava con etanol al 100% por centrifugación. El sedimento de RNA se vuelve a disolver en 0,4 ml de tampón de lisis. El RNA es nuevamente precipitado mediante la adición de etanol al 100% e incubación en congelador a -20°C durante al menos 60 minutos. La solución se centrifuga y la materia sobrenadante se desecha. La concentración

de RNA se determina diluyendo 5 μ l de muestra en 995 μ l de DEPC-agua y midiendo la relación de absorbancia a 260/280 nm.

Los siguientes ejemplos se proporcionan como un modo de describir realizaciones específicas sin limitar el alcance de la invención en modo alguno.

Ejemplo Ilustrativo 1

Denervación de la próstata

Se lleva a cabo una denervación unilateral de la próstata mediante la extirpación de los ganglios pélvicos, que recubren la próstata de la rata. Esta aproximación conserva la integridad funcional de la vejiga y la uretra posterior y suprime la posibilidad de que surja un artefacto a partir de perturbaciones principales en el flujo sanguíneo o micturación. Los animales testigos experimentan operaciones simuladas sin denervación concurrente de la próstata. Después de la denervación, se permite que los animales se recuperen y mantengan antes de la recogida de la próstata. La próstata es conservada, preparada para microscopía óptica y examinada histológicamente. Los descubrimientos principales son (1) altura reducida de células epiteliales debida principalmente a una disminución de la zona supranuclear transparente (debida a una reducción en la cantidad y tamaño de las cisternas apicales y el retículo endoplásmico); (2) cambios principales en la expresión de proteínas por electroforesis sobre gel de SDS (el retículo endoplásmico es importante en la síntesis de proteínas) (3) reducción modesta del número de gránulos secretores; (4) un aumento de los vacuolos intracelulares, espacios vacíos intracelulares y reducción de micrópilos en la superficie celular; y (5) un aumento significativo del contenido factor de crecimiento nervioso (NGF) ipsilateral a la denervación con relación al grupo testigo (188 ± 10 frente a 46 ± 20 frente a 29 ± 16 pg/g de tejido húmedo (\pm SD) de NGF se conoce que ejerce una influencia solamente sobre las neuronas simpáticas y sensoriales. N = 15 en los grupos tanto testigo como experimental.

Ejemplo Ilustrativo 2

Efecto de la inyección de neurotoxina sobre próstata normal: próstata de rata

Las ratas fueron asignadas al azar en tres grupos. El primer grupo recibió una única dosis aguda de tipo A de toxina botulino (Botox, Allergan) de 5, 10 ó 15 UI. Estos animales fueron sacrificados una semana después de la inyección. El segundo grupo recibió una serie de 4 inyecciones semanales de 5 UI de toxina botulino y fueron sacrificados a las 5 semanas. Las ratas testigos recibieron inyecciones de soluciones salinas. Las inyecciones se realizaron en forma de inyecciones únicas o en serie en el lóbulo ventral izquierdo y/o derecho de la próstata. Debe apreciarse que una inyección de azul de metileno en un lóbulo de la próstata de la rata mostró una difusión inmediata en el lóbulo opuesto. Por tanto, había una comunicación entre los lóbulos de la próstata y, por lo tanto, el lóbulo contralateral no puede ser usado como un verdadero testigo comparativo.

El peso de cada lóbulo ventral de próstata recogido de animales sanos era de aproximadamente 0,50 gramos. Todos los animales tratados con toxina mostraron contracción del volumen de la próstata, primero en el lóbulo inyectado, y con las inyecciones posteriores, reducción en el volumen global. Después de cuatro inyecciones en serie, el lóbulo izquierdo de la próstata pesaba 0,12-0,17 gramos, mientras que el ló-

bulo derecho pesaba 0,10-0,14 gramos. Esto representaba un reducción por encima de dos tercios del tamaño original.

Ejemplo 3

Efecto de la inyección de neurotoxina sobre disfunciones urológicas: datos en seres humanos

Tres pacientes con disfunciones recalcitrantes de evacuación fueron tratados con inyecciones de toxina botulino (Botox) como sigue. El paciente 1 era un hombre de 47 años de edad que era incontinente secundario a una lesión sostenida en las vértebras cervicales (nivel C6-C7) sostenida 14 meses previamente. Las características urodinámicas pusieron de manifiesto una capacidad de la vejiga de 30 cm³ y un esfínter débil (presión uretral pico de 40 cm de agua). Fracasó con múltiples regímenes farmacológicos y fue intolerante a dispositivos de fijación/condón para el pene.

Recibió cuatro veces a la semana 200 UI de inyecciones de toxina botulino en el cuello de la vejiga para una dosis total de 800 UI. En una inyección posterior, sus capacidades de la vejiga variaron en el intervalo de 300-400 cm³ con oxibutinina y 150-200 cm³ sin oxibutinina. Las presiones pico de la vejiga previas a la inyección habían sido de 300 cm de agua, en comparación con presiones de la vejiga posteriores a la inyección de 40 cm de agua. El paciente era continente con una fijación del pene después del tratamiento con toxina botulino. Además, la capacidad de caminar y las erecciones mejoraron debido a la espasticidad reducida de la vejiga.

El paciente 2 era una mujer de 55 años de edad, parapárética T12 secundaria a daño traumático 14 años antes. La paciente presentaba incontinencia urinaria de esfuerzo, y se había sometido a auto-cateterización cada dos horas durante el día y dos veces por la noche. La paciente recibió inyecciones en la pared lateral de la vejiga a dos inyecciones semanales de 200 UI cada una por un total de 400 UI de toxina botulino. Los datos diarios que evacuaba la paciente revelaron capacidades de preinyección de entre 150-200 cm³. Los datos diarios de post-inyección indicaron que la capacidad de la vejiga aumentó a 300-400 cm³. Además, la paciente no sufrió más de disfunción de tipo de esfuerzo constante, dormida toda la noche y fue continente sometida a auto-cateterización cada 4 horas.

El paciente 3 era un hombre de 65 años de edad con dolor perineal discapacitante tras un tratamiento de radiación para cáncer de próstata. El paciente había fracasado con terapia médica. Fue tratado con una inyección de 200 UI de toxina botulino en el esfínter uretral externo. El paciente experimentó un alivio enorme del dolor de testículos y tuvo un dolor mucho menos grave en el eje del pene. Las erecciones no se vieron afectadas.

Ejemplo Ilustrativo 4

Determinación de la dosis eficaz más pequeña

Las ratas son inyectadas en los lóbulos ventrales de la próstata con dosis únicas y en serie de toxina botulino (Botox). Las próstatas son recolectadas a diferentes intervalos de tiempo para determinar la dosis eficaz más pequeña, así como los cambios morfológicos y fisiológicos que tienen lugar con el tiempo. La dosis eficaz más pequeña es definida como la dosis que demostraría una disminución del volumen de la próstata.

Para valorar la respuesta a estímulos de campos

eléctricos, las preparaciones se disponen entre dos electrodos de platino colocados en el baño de órganos. La tensión de las preparaciones es ajustada. La estimulación transmural de los nervios se realiza usando un estimulador Danted Neuromatic 2000 que suministra impulsos únicos de ondas cuadradas a un voltaje supramáximo con una duración de 0,8 milisegundos a una frecuencia de 0,5 a 80 hertzios. La polaridad de los electrodos es cambiada después de cada impulso por medio de una unidad de cambio de la polaridad. La duración del tren de impulsos es de cinco segundos y el intervalo del tren de impulsos de 120 segundos. La tensión isométrica es registrada usando un registrador de 8 canales de termo-matriz Gould. Se realizan experimentos separados para determinar la tensión de precarga que produce respuestas óptimas. Además, se determina el efecto de la estimulación del campo eléctrico en presencia de diferentes concentraciones de neuropéptidos individuales. Estos neuropéptidos son adrenalina 10-20 μm, clonidina 10 μM, regitina 5-50 mM, acetilcolina 10 nM-0,1 μM, atropina 1-3 μM, nifedipina 1 nM-010 μM, VIP 1-10 nM y NPY 1-250 nM. El efecto de nitroprusiato (una sustancia que libera óxido nítrico) y azul de metileno (un inhibidor de guanilato ciclasa) sobre el tono de la próstata y la contracción resultante de la estimulación de campos es también examinado en estos tejidos.

Ejemplo Ilustrativo 5

Efecto de toxina botulino sobre tejido prostático de ratas: comparación de ratas hormonalmente intactas con ratas desprovistas de hormonas

Para determinar si hay alguna interacción entre las hormonas neurotoxinas y derivadas de testículos, se realizan estudios que examinan la interacción de la neurotoxina con los componentes hormonales. Estos estudios compararán tejido prostático tratado con toxina botulino recolectada de ratas que han experimentado orquidectomía (ratas con agotamiento hormonal) y tejido prostático de ratas tratadas con toxina botulino que no experimentaron orquidectomía. Cincuenta y dos ratas de edad coincidente son tratadas como se describe a continuación. Cuatro ratas sanas experimentarán una operación simulada que consiste en inducción de anestesia, exposición de la próstata e inyección de 0,2 cm³ de solución salina en el lóbulo ventral izquierdo de la próstata. A tres ratas se les proporciona una orquidectomía bilateral sin inyección en la próstata (normalmente testigos agotados), cinco ratas tendrá una orquidectomía e inyección de 0,2 ml de solución salina en el lóbulo ventral izquierdo (agotamiento hormonal + testigo de tensión quirúrgica). Los cuatro grupos de ratas reciben inyecciones de botulino de 0,5 UI, 1,0 UI, 1,5 UI y 2,5 UI solamente (ratas experimentales hormonalmente intactas). Dieciséis ratas experimentan una orquidectomía bilateral. Ocho de estas ratas son tratadas con una única inyección de 2,5 UI de toxina botulino en el lóbulo ventral izquierdo 5 semanas después de la cirugía. Todas las ratas son sacrificadas después de seis semanas, y la próstata recolectada es preparada para un examen como se describió anteriormente. Es esperado un efecto atrófico similar sobre el epitelio glandular.

Ejemplo Ilustrativo 6

Efectos de la toxina botulino sobre los pacientes

Los pacientes afectados por hiperplasia prostática benigna, prostatitis abacteriana o prostatodinia son estudiados tanto antes como después del tratamiento con toxina botulino. Los pacientes son elegibles pa-

ra ser incluidos en este estudio si están afectados por BPH ente las edades de 40 y 80, o si tienen entre 25 y 60 y han sido diagnosticados con prostatitis abacteriana o prostatodinia. Los pacientes preferidos son los que no son buenos candidatos quirúrgicos. Los pacientes son evaluados antes del tratamiento mediante la determinación de los niveles de antígeno específico de próstata (PSA), evaluación de parámetros urodinámicos (cistometrograma, perfil de presión uretral y flujometría), determinación de la puntuación de síntomas de la institución American Urological Association (AUA) (Barry, M.J. *et al.*, [1992] J. Urol., 148: [1549-1557], mantenimiento de la evacuación diaria y examen de la próstata por ultrasonidos transrectales con biopsia (para pacientes de BPH solamente). Una semana después de completar la evaluación inicial, el paciente es inyectado por vía uretroscópica con 200 UI de toxina botulino en forma de inyecciones unila-

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

terales únicas, inyecciones unilaterales en serie o inyecciones bilaterales. Los pacientes de BPH son tratados por TURP o experimentan 7 días de biopsia de TURP testigo después de una inyección única o 5 semanas después de inyecciones en serie. Los tejidos prostáticos recolectados son preparados para un examen como se describió en los Ejemplos 1, 2, 3 y 7-10. Los pacientes son nuevamente evaluados después de la inyección usando los mismos parámetros examinados durante la evaluación inicial.

La descripción que antecede de la invención tiene carácter de ejemplo para fines de ilustración y explicación. Debe ser evidente para los expertos en la técnica que son posibles cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención. Está previsto que las siguientes reivindicaciones sean interpretadas para abarcar todos estos cambios y modificaciones.

REIVINDICACIONES

1. El uso de una toxina botulino, en la preparación de una composición farmacéutica para tratar incontinencia urinaria.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que la incontinencia urinaria es vejiga inestable o esfínter inestable.

3. El uso de la reivindicación 1, en el que la incontinencia urinaria es incontinencia de esfuerzo.

4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la toxina de botulino es formulada en una formulación farmacéuticamente aceptable seleccionada de un líquido, un polvo, una crema, una emulsión, una píldora, una pastilla, un supositorio, una suspensión y una solución.

5. El uso de la reivindicación 4, en el que la toxina de botulino es formulada en una formulación farma-

céuticamente aceptable seleccionada de una crema, una suspensión y una emulsión.

6. El uso de la reivindicación 4, en el que la toxina de botulino es formulada en una formulación inyectable farmacéuticamente aceptable seleccionada de un líquido, una crema, una emulsión, una suspensión y una solución.

7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición es una composición inyectable.

8. El uso de la reivindicación 7, en el que la composición es adecuada para inyección en el cuello de la vejiga, la pared lateral de la vejiga, o el esfínter externo de la uretra de un paciente humano.

9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la toxina botulino es tipo A de toxina botulino.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65