

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 963**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/08** (2006.01)  
**A61P 35/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05814023 .7**  
96 Fecha de presentación: **23.09.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1802339**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **TRATAMIENTO DE NEOPLASMAS CON NEUROTOXINA.**

30 Prioridad:  
**23.09.2004 US 612443 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.02.2012**

73 Titular/es:  
**TOXCURE, INC.  
19 COUNTRY CLUB WAY  
DEMAREST, NJ 07627, US**

72 Inventor/es:  
**SHAARI, Christopher, M, MD**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 373 963 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**

Tratamiento de neoplasmas con neurotoxina

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. número 60/612.443, presentada el 23 de septiembre de 2004.

5 **Antecedentes**

La presente invención se refiere al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una neurotoxina farmacéuticamente aceptable de acuerdo con las reivindicaciones.

10 La presente invención se refiere a procedimientos para tratar diversos neoplasmas benignos o malignos, y describe procedimientos para el tratamiento de infecciones crónicas, enfermedades autoinmunitarias, a inmunodeficiencias. En particular, la presente invención se refiere a procedimientos de tratamiento del crecimiento y metástasis de diversos tumores malignos con una toxina botulínica.

15 NeoplasmasEl crecimiento inicial de neoplasmas depende del suministro adecuado de factores de crecimiento y la eliminación de moléculas tóxicas. La expansión de la masa del tumor más allá de 2 mm de diámetro depende del desarrollo de la angiogénesis para producir un suministro de sangre adecuado. La inducción de la angiogénesis está mediada por varias moléculas que son liberadas tanto por células tumorales como por células huésped, incluidas células endoteliales, célula epiteliales, células mesoteliales, y leucocitos. La angiogénesis consiste en procesos secuenciales que emanan de células endoteliales microvasculares. A medida que se expande, el tumor (primario o secundario) también puede provocar ciertos síntomas, tales como incomodidad (por ejemplo, percepción de una protuberancia), dolor y hemorragia.

20 Tras comenzar la angiogénesis, la invasión de las células tumorales del tejido que rodea al tumor primario y la penetración de vasos sanguíneos y linfáticos es clave para el fenómeno de la metástasis en conjunto.

25 Una vez que las células tumorales se separan del tumor primario, deben invadir el estroma del huésped para penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos. Para hacerlo, las células tumorales deben penetrar las membranas basales que rodean los vasos sanguíneos. Las membranas basales y la matriz extracelular (ECM) de tejido conectivo constan de cuatro grupos de moléculas principales: colágenos, elastinas, glucoproteínas y proteoglicanos. La degradación de los componentes de la ECM y la membrana basal por las células tumorales es un requisito previo esencial para la invasión y la metástasis.

30 En suma, la metástasis cancerosa consta de varias etapas complejas, interactivas e interdependientes, cada una de las cuales es limitante de la velocidad, ya que un fallo en completar cualquiera de las etapas evita que la célula tumoral produzca una metástasis. Las células tumorales que eventualmente dan lugar a metástasis deben sobrevivir a una serie de interacciones potencialmente letales con mecanismos homeostáticos del huésped. El balance de estas interacciones puede variar entre diferentes paciente con diferentes neoplasmas o incluso entre diferentes pacientes con el mismo tipo de neoplasma.

35 Las etapas esenciales de la formación de una metástasis son similares en todos los tumores y consisten en lo siguiente:

1. Alterar la transformación neoplásica, la proliferación progresiva de células neoplásicas es inicialmente soportada con nutrientes suministrados desde el microentorno del órgano por difusión.
2. La neovascularización o angiogénesis debe tener lugar para que una masa tumoral exceda de 1 o 2 mm de diámetro. La síntesis y secreción de diferentes moléculas angiogénicas y la supresión de moléculas inhibitoras son responsables del establecimiento de una red de capilares a partir del tejido circundante del huésped.
3. Algunas células tumorales pueden inhibir la expresión de moléculas cohesivas y tienen una movilidad incrementada y, de este modo, pueden separarse de la lesión primaria. La invasión del estroma del huésped por algunas células tumorales ocurre mediante varios mecanismos paralelos. Los capilares y vénulas de paredes finas, como los canales linfáticos, ofrecen muy poca resistencia a la penetración por las células tumorales y proporcionan las vías más comunes para la entrada de células tumorales en la circulación.
4. La separación y embolización de células sueltas o agregados celulares tumorales tiene lugar después, siendo destruidas rápidamente la gran mayoría de las células tumorales circulantes.
5. Una vez que las células tumorales han sobrevivido a la circulación, deben...
6. Permanecer en los lechos capilares de órganos distantes adhiriéndose a células endoteliales de capilares o a membranas basales subendoteliales.
7. Las células tumorales (especialmente aquellas que forman agregados) pueden proliferar dentro del lumen del vaso sanguíneo, pero la mayoría se extravasan al interior del parénquima del órgano por mecanismos

similares a los operativos durante la invasión.

8. Las células tumorales que portan receptores de superficie adecuados pueden responder a factores de crecimiento paracrinos y así proliferar en el parénquima del órgano.

5 9. Las células metastásicas deben evadir la destrucción por las defensas del huésped que incluyen respuestas inmunitarias específicas y no específicas.

10. Para superar una masa de 1 a 2 mm de diámetro, la metástasis debe desarrollar una red vascular.

### Toxina Botulínica

10 La bacteria gram positiva, anaeróbica, *Clostridium botulinum* produce una potente neurotoxina polipeptídica, la toxina botulínica. Hasta la fecha se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas distintas: los serotipos A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F y G. De éstas, la toxina botulínica de tipo A se reconoce como uno de los agentes naturales más letales conocidos por el hombre.

15 Se postula que las toxinas botulínicas se unen con alta afinidad a neuronas motoras colinérgicas, se transfieren al interior de la neurona y efectúan el bloqueo de la liberación presináptica de acetilcolina. Se supone que todos los serotipos de la toxina botulínica inhiben la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular, lo hacen actuando sobre diferentes proteínas neurosecretoras y/o escindiendo estas proteínas en diferentes sitios. Por ejemplo, la toxina botulínica A es una endopeptidasa dependiente de zinc que puede hidrolizar específicamente un enlace peptídico de la proteína asociada a vesículas, intracelular, SNAP-25. La botulina de tipo E también escinde la proteína asociada a sinaptosomas de 25 kiloDalton (25kDa) (SNAP-25), aunque el tipo E se une a una secuencia de aminoácidos diferente dentro de SNAP-25. Se cree que las diferencias en el sitio de inhibición son responsables de la potencia relativa y/o duración de la acción de los distintos tipos de serotipos de toxina botulínica.

25 Actualmente, las toxinas botulínicas se han usado en ámbitos clínicos para el tratamiento de trastornos neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. La toxina botulínica de tipo A fue aprobada por la Food and Drug Administration de EE. UU. en 1989 para el tratamiento del blefaroespasma esencial, el estrabismo y el espasmo hemifacial en pacientes mayores de doce años. En 2000, la FDA aprobó preparaciones comerciales de serotipos de toxina botulínica de tipo A y tipo B para el tratamiento de la distonía cervical, y en 2002 la FDA aprobó una toxina botulínica de tipo A para el tratamiento cosmético de determinadas arrugas faciales hiperkinéticas (glabellares). En 2004, la FDA aprobó la botulina para el tratamiento de la hiperhidrosis. Usos no aprobados por la FDA, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, distonía oromandibular, disfonía espasmódica y otras distonías, temblores, dolor miofascial, disfunción articular temporomandibular, migraña, espasticidad.

30 Los efectos clínicos de la toxina botulínica de tipo A intramuscular periférica se observan normalmente al cabo de 24-48 horas después de la inyección y, a veces, al cabo de pocas horas. Cuando se usa para inducir parálisis muscular, el alivio sintomático por una única inyección intramuscular de toxina botulínica de tipo A puede durar aproximadamente tres meses, aunque bajo determinadas circunstancias se sabe que los efectos han durado varios años.

35 A pesar de la aparente diferencia en la unión de los serotipos, se cree que el mecanismo de la actividad botulínica es similar e implica al menos tres etapas. Primero, la toxina se une a la membrana presináptica de una célula diana. Segundo, la toxina atraviesa la membrana plasmática de la célula afectada, en la que se forma un endosoma. La toxina se transloca entonces a través de la membrana endosómica hacia el citosol. Tercero, la toxina botulínica parece reducir un enlace disulfuro de SNAP, teniendo como resultado la alteración de la actividad endopeptidasa dependiente de zinc (Zn<sup>++</sup>), que escinde selectivamente proteínas esenciales para el reconocimiento y anclaje de las vesículas que contienen neurotransmisores a la superficie citoplásmica de la membrana plasmática, y la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. La neurotoxina tetánica y las toxinas botulínicas B, D, F y G provocan la degradación de la sinaptobrevina (también llamada proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP)), una proteína de membrana sinaptosómica. La mayoría de la VAMP presente en la superficie citosólica de la vesícula sináptica se elimina como resultado de uno cualquiera de estos fenómenos de escisión. Cada toxina escinde específicamente un enlace diferente.

50 El peso molecular de la molécula de proteína de toxina botulínica, para los siete serotipos de toxina botulínica conocidos, es de aproximadamente 150 kD. Curiosamente, las toxinas botulínicas son liberadas por la bacteria clostridial como complejos que comprenden la molécula de proteína de toxina botulínica de 150 kD junto con proteínas no toxinas asociadas. Por tanto, la toxina botulínica de tipo A puede ser producida por la bacteria clostridial en formas de 900 kD, 500 kD y 300 kD. Aparentemente, las toxinas botulínicas de tipo B y de tipo C<sub>1</sub> se producen sólo como un complejo de 500 kD. La toxina botulínica de tipo D se produce tanto como complejo de 300 kD como de 500 kD. Finalmente, las toxinas botulínicas de tipos E y F se producen sólo como complejos de aproximadamente 300 kD. Se cree que los complejos (es decir, peso molecular de más de aproximadamente 150 kD) contienen una proteína hemaglutinina no toxina y una proteína no hemaglutinina no toxina y no tóxica. Estas dos proteínas no toxinas (que junto con la molécula de toxina botulínica pueden comprender el complejo neurotoxina relevante) pueden actuar para proporcionar estabilidad contra la desnaturalización para la molécula de toxina botulínica y protección contra los ácidos digestivos cuando se ingiere la toxina. Además, es posible que los complejos de toxina

botulínica más grandes (peso molecular mayor de aproximadamente 150 kD) puedan tener como resultado una menor velocidad de difusión de la toxina desde un sitio de inyección intramuscular de un complejo de toxina botulínica. Los complejos de toxina pueden disociarse en proteína toxina y proteínas hemaglutininas tratando el complejo con glóbulos rojos a pH 7,3. La proteína toxina tiene una marcada inestabilidad tras la eliminación de la proteína hemaglutinina.

Todos los serotipos de toxina botulínica son sintetizados por bacterias *Clostridium botulinum* como proteínas de cadena sencilla que deben ser escindidas o melladas por proteasas para hacerse neuroactivas. Las cepas bacterianas que sintetizan los serotipos A y G de toxina botulínica poseen proteasas endógenas y, por lo tanto, los serotipos A y G pueden recuperarse a partir de cultivos bacterianos, principalmente en su forma activa. En cambio, los serotipos C<sub>1</sub>, D y E de toxina botulínica son sintetizados por cepas no proteolíticas y, por lo tanto, normalmente están inactivadas cuando se recuperan del cultivo. Los serotipos B y F son sintetizados tanto por cepas proteolíticas como no proteolíticas y, por lo tanto, pueden recuperarse en forma activa o inactiva. No obstante, incluso las cepas proteolíticas que producen, por ejemplo, el serotipo de toxina botulínica de tipo B, sólo escinden una parte de la toxina producida. La proporción exacta de moléculas melladas y no melladas depende de la duración de la incubación y la temperatura del cultivo. Por lo tanto, es probable que un determinado porcentaje de cualquier preparación de, por ejemplo, la toxina botulínica de tipo B, sea inactiva, contribuyendo posiblemente a una menor potencia de la toxina botulínica de tipo B en comparación con la toxina botulínica de tipo A. La presencia de moléculas de toxina botulínica inactivas en una preparación clínica contribuirá a la carga proteica general de la preparación, que se ha relacionado con una antigenicidad incrementada, sin contribuir a su efecto clínico.

Estudios in vitro han indicado que la toxina botulínica inhibe la liberación inducida por cationes potasio tanto de acetilcolina como de norepinefrina a partir de cultivos celulares primarios de tejido de tronco encefálico. Además, se ha comunicado que la toxina botulínica inhibe la liberación provocada tanto de glicina como de glutamato en cultivos primarios de neuronas de la médula espinal y que en preparaciones de sinaptosomas cerebrales, la toxina botulínica inhibe la liberación de cada uno de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina, norepinefrina, CGRP y glutamato.

La toxina botulínica de tipo A cristalina de alta calidad puede producirse a partir de la cepa Hall A de *Clostridium botulinum* con características de  $3 \times 10^7$  U/mg y  $A_{260}/A_{278}$  de menos de 0,60 y un patrón distinto de bandeo en gel de electroforesis. El conocido proceso de Shantz puede usarse para obtener toxina botulínica de tipo A cristalina, como se establece en Shantz, E. J., y cols, Properties and use of Botulinum toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine, Microbiol Rev. 56: 80-99 (1992). Generalmente, el complejo de toxina botulínica de tipo A puede aislarse a partir de una fermentación anaeróbica cultivando *Clostridium botulinum* de tipo A en un medio adecuado. La toxina en bruto puede recogerse por precipitación con ácido sulfúrico y concentrarse por ultramicrofiltración. La purificación puede llevarse a cabo disolviendo el precipitado ácido en cloruro de calcio. La toxina puede precipitarse después con etanol frío. El precipitado puede disolverse en tampón fosfato de sodio y centrifugarse. Después del secado, pueden obtenerse aproximadamente 900 kD de toxina botulínica de tipo A cristalina con una potencia específica de  $3 \times 10^7$  DL<sub>50</sub> U/mg o superior. Este proceso conocido también puede usarse, tras la separación de las proteínas no toxinas, para obtener toxinas botulínicas puras, tales como por ejemplo: toxina botulínica de tipo A purificada con un peso molecular de aproximadamente 150 kD con una potencia específica de  $1-2 \times 10^8$  DL<sub>50</sub> U/mg o superior; toxina botulínica de tipo B purificada con un peso molecular de aproximadamente 156 kD con una potencia específica de  $1-2 \times 10^8$  DL<sub>50</sub> U/mg o superior, y; toxina botulínica de tipo F purificada con un peso molecular de aproximadamente 155 kD con una potencia específica de  $1-2 \times 10^7$  DL<sub>50</sub> U/mg o superior.

Pueden obtenerse toxinas botulínicas y complejos de toxinas ya preparados y purificados adecuados para preparar formulaciones farmacéuticas de List Biological Laboratories, Inc., Campbell, Calif.; del Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Reino Unido; Wako (Osaka, Japón), así como de Sigma Chemicals de St Louis, Mo.

Se ha demostrado que el patrón de diseminación de la toxina dentro de un músculo está relacionado con la concentración, volumen y localización del sitios de inyección (22).

Childers y cols. 1996 (Am. J. Phys. Med. Rehabil., 1996;75(6):462-9.) describe distintas maneras de inyectar a un músculo espasmódico afectado para maximizar la eficacia de una inyección de toxina botulínica. Los autores describen la inyección de un músculo espasmódico en una localización diferente dentro del mismo músculo para maximizar la parálisis. Childers y cols. 1996 no implica inyectar en un sitio alejado del músculo espasmódico afectado para determinar si hay un efecto sobre el músculo espasmódico o sobre la afección espasmódica.

#### Técnica anterior del uso de una neurotoxina para tratar el cáncer

Varias patentes y solicitudes han enseñado tratamientos para el cáncer con una neurotoxina y, específicamente, una toxina botulínica. De manera uniforme, los procedimientos han enseñado a suministrar toxina botulínica directamente a las células cancerosas o sus proximidades con el objetivo de afectar directamente a las células cancerosas o su inervación. El objetivo ha sido suministrar la toxina en la célula cancerosa para ejercer un efecto, o para enervar localmente una célula cancerosa. Introduciendo la toxina en una célula, la toxina botulínica puede inhibir el proceso de exocitosis desde la célula cancerosa, esto es, la liberación del contenido o vesículas intracelulares de una célula al espacio extracelular. Estas patentes y solicitudes enseñan, en parte, que inhibir la exocitosis de una célula

cancerosa reducirá la actividad de la división de una célula y reducirá la capacidad de moverse de la célula cancerosa. Enervando localmente una célula cancerosa, puede hacerse menos activa. La siguiente revisión de la técnica anterior tratará estos asuntos.

5 La solicitud de patente US2005/0031648 A1, Methods for Treating Diverse Cancers, divulga el tratamiento de tejidos precancerosos o cancerosos, hiperplásicos, con una neurotoxina botulínica administrando localmente la toxina botulínica al tejido precanceroso o canceroso, hiperplásico o a sus proximidades. Sólo se "trata" el tejido enfermo. La administración local se define como la inyección directa de la neurotoxina dentro o en el área local del tejido diana (párrafo 178). Se define el "tratamiento" como causante específico de la reducción del tamaño y/o actividad de un tejido hiperplásico, hipertónico o neoplásico, dirigiéndolo directamente hacia las células cancerosas o las  
10 "proximidades del tejido diana" (párrafo 159). Esta solicitud de patente establece además que una "cantidad terapéuticamente eficaz" no provocará efectos secundarios negativos o adversos significativos en el tejido tratado (párrafo 177). La solicitud de patente reconoce que con el fin de lograr el efecto deseado en una célula no neuronal (tal como una célula de mama), la dosis inyectada puede tener que ser mayor (0187), ya que las células no nerviosas no contienen receptores celulares de superficie para una toxina botulínica. De hecho, las células de este tipo deben permeabilizarse para permitir la entrada in vitro de la toxina botulínica en el citosol de las células (párrafo 191). Además, esta solicitud de patente establece que una toxina botulínica puede bloquear la liberación de cualquier endocitosis mediada por vesículas siempre que la cadena ligera de la toxina botulínica se transloque al medio intracelular (párrafo 191).

20 La solicitud de patente WO 2005/030248 intenta superar la deficiencia significativa de la toxina botulínica cuando se tratan células cancerosas directamente, a saber, que la toxina no tiene una alta afinidad por células no neuronales, y, por lo tanto, se requieren dosis mucho más elevadas para entrar en una célula de este tipo. Una vez que la toxina está dentro de una célula, la toxina interferirá con la maquinaria intracelular. Esta solicitud describe un procedimiento para incrementar la entrada de la toxina botulínica c3 en células cancerosas uniendo la c3 a un proteína de fusión permeable a células. El objetivo del tratamiento es hacer que la célula cancerosa pare de contraerse y diseminarse.  
25 El compuesto descrito se dirige específicamente a una célula cancerosa. Esta solicitud de patente enseña que el compuesto puede inyectarse también alrededor de un cáncer en el 'margen de resección tras una cirugía, pero el objetivo es tratar células cancerosas que puedan estar en ese margen. El procedimiento de inyección en un margen de resección necesariamente implica que se ha realizado cirugía para lograr un 'margen de resección que pueda tratarse.

30 Los documentos US 2002/0094339 A1, US 6.565.870 B1 y 6.139.845 enseñan todos el tratamiento de tumores, cánceres y trastornos con una toxina botulínica. La toxina se inyecta directamente en el tejido enfermo para ejercer su efecto en la inhibición de la exocitosis.

Limitaciones de la técnica anterior

35 La técnica anterior se basa en el suministro de toxina botulínica directamente en las células cancerosas o en sus proximidades locales inmediatas para lograr un efecto sobre las células cancerosas. Existen distintas deficiencias sustanciales de estos procedimientos que, si se emplean, pueden provocar efectos secundarios negativos o adversos significativos en el tejido tratado o sus proximidades.

40 La primera limitación de la técnica anterior se refiere a la inervación colinérgica del cáncer. La bibliografía científica está repleta de informes sobre que los cánceres están inervados colinérgicamente y que bloquear esta inervación colinérgica (con toxina botulínica) puede reducir la capacidad de la célula cancerosa de dividirse, diseminarse o invadir localmente. No obstante, también está claro que algunos cánceres tienen el efecto opuesto por estimulación colinérgica, y que bloquear esta inervación colinérgica (con toxina botulínica) puede potenciar realmente la capacidad de la célula cancerosa de dividirse, diseminarse o invadir localmente. De hecho, hay informes científicos contradictorios sobre que el mismo tipo de cáncer (pulmón) puede ser estimulado o inhibido por estimulación colinérgica. Cuando uno considera el hecho bien conocido de que los cánceres no son una población homogénea de células sino que suelen ser una mezcla heterogénea, o que las células cancerosas son capaces de modificar sus respuestas, resulta evidente que bloquear la inervación colinérgica de un cáncer puede ser bueno para algunas partes de un cáncer, pero malo para otras partes. Alternativamente, un cáncer que se reduce hoy por el bloqueo de la inervación colinérgica, puede adaptarse y convertirse mañana en estimulado por inervación colinérgica.

50 Una segunda limitación significativa de la técnica anterior se refiere al concepto fundamental de hacer entrar la toxina botulínica en una célula cancerosa, donde puede afectarse la capacidad total de la célula para someterse a exocitosis. El documento US 2005/0031648 enseña que el sustrato para una toxina botulínica no está restringido a células neuronales que liberan acetilcolina, sino que los sustratos están "implicados ubicuamente en fenómenos de fusión membrana-membrana" y las pruebas apuntan a "un mecanismo universal para fenómenos de fusión de membranas" (párrafo 0103). Una vez que la toxina se ha internalizado en la célula afectada, actúa de la manera conocida, como una endoproteasa sobre su correspondiente proteína secretora de anclaje vaso-membrana (párrafo 187). Además, "a medida que aumenta la concentración, las neuronas simpáticas no colinérgicas, células cromafines y otros tipos celulares pueden incorporar una toxina botulínica y mostrar exocitosis reducida" (párrafo 191). De nuevo, el objetivo es reducir las secreciones excesiva a partir de células cancerosas interfiriendo con la exocitosis, como también se indica en los documentos US 2002/0094339 A1, 6.139.845 y 6.565.870.  
60

Un problema fundamental de suministrar la toxina en la célula cancerosa o célula del tejido enfermo para interferir con la exocitosis es que la exocitosis en células cancerosas es una necesidad absoluta para ayudar a matar a las células cancerosas. Cualquier intento de eliminar o reducir globalmente la exocitosis podría ser ciertamente arriesgado, ya que todas las células (incluidas las células cancerosas) se someten de forma rutinaria al procesamiento y presentación de moléculas en su superficie a través de la exocitosis, lo cual sirve para indicar al sistema inmunitario del organismo si una célula es cancerosa o normal. Dependiendo del tipo de molécula presentada en su superficie, el sistema inmunitario puede matar una célula si se considera 'cancerosa' o protegerla si se considera normal o 'propia'. El proceso de señalización celular depende de un proceso de exocitosis intacto. Si estos llamados antígenos asociados a tumores se eliminan de la superficie de una célula cancerosa mediante la inhibición global de la exocitosis desde el interior de una célula cancerosa, será menos probable, si es que lo es, que el sistema inmunitario destruya la célula cancerosa exógena. La inyección directa en una célula cancerosa incrementaría adicionalmente los efectos secundarios negativos o adversos significativos en el tejido tratado.

En tercer lugar, se ha enseñado que las células no neuronales son menos sensibles a la toxina botulínica (párrafo 191 del documento US 2005/0031648) y que, "a medida que aumenta la concentración de toxina, las neuronas simpáticas no colinérgicas, células cromafines y otros tipos celulares pueden incorporar una toxina botulínica y mostrar exocitosis reducida". Es bien conocido para un experto en la técnica que las inyecciones de concentraciones más elevadas de toxina se asocian con una mayor incidencia de efectos secundarios locales, debido a la diseminación a los músculos circundantes y a la parálisis muscular accidental. Por lo tanto, una dosis o concentración de toxina elevada necesaria para penetrar en células no neuronales puede provocar una diseminación excesiva desde la zona diana y provocar efectos no sólo en las células cancerosas, sino también en una zona significativa del tejido circundante, provocando efectos secundarios inaceptables.

Cuarto, hay otras limitaciones prácticas en la inyección directa en un cáncer o sus proximidades con cualquier sustancia, incluida la botulina. Para inyectar directamente un cáncer, debe insertarse una aguja directamente en un cáncer e inyectar bajo presión la sustancia deseada. La aguja podría entonces pasar al interior a través del tejido canceroso y posiblemente sembrar células cancerosas en un área que no contenía células cancerosas en un primer momento. Incluso si la aguja no pasa a través del cáncer, el efecto de la presión del inyectable puede forzar o empujar a las células cancerosas hacia el tejido normal circundante o hacia los vasos linfáticos o sanguíneos de paredes finas del interior del cáncer o sus proximidades, provocando una mayor probabilidad de efectos secundarios negativos o adversos significativos, a saber, metástasis regionales o distantes. Por ejemplo, es bien conocido que puede sufrirse una hemorragia temporal cuando se clava una aguja en la piel o la encía tras una visita al dentista. Cuando esta aguja entra en un cáncer, debe considerarse que los vasos sanguíneos se han roto y, a nivel microscópico, las células cancerosas pueden haber entrado en la circulación.

Quinto, la solicitud de patente WO 2005/030248 describe un procedimiento de reducción de la asociación de filamentos de actina introduciendo toxina botulínica en células cancerosas. Aunque se cree que esto puede evitar que las células cancerosas se contraigan y migren, también puede conducir a una pérdida de adhesión de las células malignas y tener como resultado una diseminación distante incrementada.

En consecuencia, existe una necesidad de un procedimiento efectivo para tratar un cáncer usando una neurotoxina.

#### **Objetivos de la invención**

Es un objetivo de la presente invención tratar un cáncer usando una neurotoxina.

Es un objetivo de la presente invención tratar un síntoma de un cáncer usando una neurotoxina.

Es otro objetivo de la presente invención evitar la metástasis de neoplasmas usando una neurotoxina.

Es otro objetivo más de la presente invención aplicar la neurotoxina alrededor del cáncer.

Es aún otro objetivo más de la presente invención aplicar la neurotoxina alrededor del cáncer de forma que la neurotoxina rodee la periferia del cáncer.

Es un objetivo adicional de la presente invención usar la neurotoxina botulínica.

Otro objetivo más de la invención es aplicar la neurotoxina por inyección.

Es un objetivo adicional de la invención modular positivamente el sistema inmunitaria, tanto humoral como celular.

Es un objetivo adicional de la invención tratar una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad fúngica, enfermedad vírica, enfermedad mediada por virus, o inmunodeficiencia o estado inmunodeficiente.

La presente invención se refiere al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una neurotoxina farmacéuticamente aceptable de acuerdo con las reivindicaciones.

### Sumario de la invención

- La presente invención proporciona un procedimiento para tratar un cáncer usando una neurotoxina, preferiblemente toxina botulínica. La aplicación de una neurotoxina alrededor de un cáncer actúa para disminuir el efecto compresor de las células contráctiles sobre la diseminación del cáncer a través del tejido y a través de los túbulos que drenan el
- 5 cáncer. La aplicación también paraliza el músculo linfático que comprime a las células cancerosas y la linfa durante la circulación. La aplicación también modula positivamente el sistema inmunitario para potenciar los mecanismos celulares o humorales contra el cáncer. Tras la administración de toxina botulínica alrededor de un cáncer, se reduce o elimina la diseminación regional y distante. En particular, la neurotoxina se administra de una forma tal que rodea al cáncer.
- 10 La invención logra un procedimiento para inhibir el crecimiento, la invasión o la diseminación de células cancerosas usando una neurotoxina. El procedimiento se adapta fácilmente al tratamiento del cáncer en el momento en el que un cáncer se diagnostica inicialmente y podría mejorar significativamente la evolución de un paciente diagnosticado con cáncer reduciendo la diseminación local, regional o distante. La técnica podría usarse para pacientes sometidos a cirugía, tratamiento con radiación, quimioterapia u otras formas de tratamiento para el cáncer diagnosticado.
- 15 También puede usarse como una modalidad de tratamiento individual.
- La neurotoxina se aplica preferiblemente por inyección. En particular, la neurotoxina se inyecta en el tumor en una cantidad suficiente para rodear la periferia del tumor. Este último procedimiento puede lograrse mediante una sólo inyección o varias inyecciones. Por supuesto, si es accesible, se entiende que la neurotoxina podría aplicarse por
- 20 vía tópica a la periferia del tumor. Asimismo, en el caso, por ejemplo, del cáncer de pulmón, la neurotoxina puede aplicarse mediante aerosol. Además, se entiende que la neurotoxina puede aplicarse alrededor de una metástasis para inducir los efectos deseados.
- La neurotoxina, también puede inyectarse en tejido linfático local, regional o distante, lo cual puede hacerse con guía visual (ocular o con microscopio) o radiográfica, tal como escáner TAC o guía ultrasónica.
- 25 La terapia es aplicable, pero sin limitarse a ellos, a los siguientes sitios. Los músculos regionales, incluso a nivel microscópico, rodean casi cualquier localización en el organismo y, por lo tanto, la mayoría de los sitios del organismo son susceptibles de tratamiento con neurotoxina. En cuanto a los sitios de inyección linfáticos, se inyectarían los tejidos linfáticos regionales circundantes (si el cáncer estuviera presente en una superficie mucosa), y/o las cuencas ganglionares regionales. Pueden realizarse inyecciones distantes en el timo, el bazo, la médula ósea u otros sitios hematopoyéticos también mediante inyección.
- 30 El tratamiento también puede aplicarse a otras enfermedades caracterizadas por una escasa respuesta celular o humoral. La toxina botulínica puede inyectarse localmente en áreas caracterizadas por una respuesta celular o humoral escasa, tal como en el páncreas en el paciente con diabetes dependiente de insulina, en la mucosa de la nariz de un paciente con sinusitis fúngica, en la verruga del paciente con verruca vulgaris o en una herida en el
- 35 paciente con una herida que no se cura, o en el timo, bazo o médula ósea en el caso de un paciente con inmunodeficiencia.

### Descripción detallada de la invención

- La presente invención es distinta en tanto en cuanto trata células no cancerosas, no enfermas, normales, para tratar un cáncer. El tratamiento significa reducir, evitar o eliminar células cancerosas o la diseminación de células cancerosas o los síntomas del cáncer de la circulación local o sistémica. La presente invención trata el cáncer,
- 40 metástasis y afecciones precancerosas, así como crecimientos o trastornos mediados por virus, infecciones crónicas y trastornos mediados por inmunidad inyectado toxina botulínica a distancia. Las inyecciones de toxina botulínica reducirán o eliminarán los síntomas de un cáncer, una o más metástasis, afecciones precancerosas, crecimientos o afecciones mediadas por virus, infecciones crónicas y trastornos mediados por inmunidad. El trastorno preferible es cáncer.
- 45 Para la presente solicitud, los términos neoplasma y cáncer se usan de indistintamente, y ambos términos se entienden que incluyen afecciones precancerosas.
- A diferencia de la técnica anterior que enseña cómo tratar una enfermedad tal como un cáncer con una neurotoxina, el presente procedimiento se basa no en el efecto directo de la toxina botulínica sobre un cáncer o su inervación, sino más bien en la bien conocida afinidad de la toxina botulínica por el músculo, específicamente el músculo que
- 50 rodea al cáncer. Debido a la extremadamente alta afinidad de la toxina por el músculo, este procedimiento supone una ventaja significativa con respecto a la técnica anterior en cuanto que pueden usarse dosis mucho menores para desencadenar un efecto. Las dosis menores tendrán como resultado menos efectos secundarios relacionados con las dosis, tales como la diseminación accidental de toxina a través de los tejidos hacia las estructuras vecinas, y la resistencia a futuras inyecciones de botulina. Habrá una diseminación limitada a las proximidades del cáncer o
- 55 directamente al cáncer, ya que la toxina se une rápidamente a la unión neuromuscular en las proximidades de la inyección. Además, incluso si la toxina se diseminara en el cáncer o sus proximidades, las pequeñas dosis no ejercerían efecto sobre el tejido enfermo, que tiene poca afinidad por el sustrato de la toxina. De hecho, las dosis utilizadas en la realización preferida ya han sido aprobadas por la FDA para su uso en otras afecciones

neuromusculares que se tratan con toxina botulínica.

Otra ventaja distinta de la presente invención es que es un procedimiento "sin contacto" que evita intencionadamente el cáncer o sus proximidades. Puesto que la aplicación no es mediante inyección con aguja en el cáncer o cerca de él, no hay riesgo de sembrar células cancerosas accidentalmente en el tejido circundante, y no hay riesgo de crear un gradiente de presión local que pudiera empujar a las células cancerosas hacia el tejido circundante o hacia vasos sanguíneos o canales linfáticos penetrados.

La invención también es novedosa en cuanto que modula a distancia el sistema inmunitario para potenciar la actividad inmunológica contra el cáncer, metástasis, afecciones precancerosas, crecimientos o trastornos mediados por virus, infecciones crónicas y trastornos mediados por inmunidad. Una inyección distante en un ganglio linfático, tejido linfático regional o estructura inmunológicamente productora o potenciadora (tal como el bazo o el timo) puede potenciar respuestas linfocíticas o humorales contra la afección.

En el tratamiento de afecciones no cancerosas tales como infecciones víricas, crecimientos inducidos por virus, enfermedades autoinmunitarias, esclerosis múltiple, heridas crónicas, infecciones crónicas, infecciones óseas, artritis reumatoide, miastenia grave, VIH, síndrome de fatiga crónica y hepatitis, puede administrarse la neurotoxina de la misma manera, y usando las mismas dosis, en que se administra para tratarneoplasmas. Esto es, la neurotoxina puede aplicarse en la zona que rodea el tejido enfermo o afectado así como, opcionalmente, en ganglios linfáticos próximos y/o distantes, el timo, el bazo y/o la médula ósea. Existen, no obstante, varios procedimientos opcionales distintos para aplicar neurotoxina para tratar estas afecciones no cancerosas.

Por ejemplo, cuando pueda identificarse una zona específica de tejido enfermo o dañado, la neurotoxina puede inyectarse directamente en el tejido enfermo o afectado. Así, si el paciente padece diabetes de tipo 1, la neurotoxina puede inyectarse directamente en el páncreas. Para la esclerosis múltiple, la neurotoxina se inyecta por vía intratecal. Para infecciones crónicas, infecciones víricas, enfermedades víricas y crecimiento inducidos por virus, la neurotoxina puede inyectarse directamente en los tejidos afectados. Para la hepatitis, la neurotoxina puede inyectarse directamente en el hígado. Para el síndrome de Sjogren, la neurotoxina puede inyectarse directamente en las glándulas productoras de humedad.

Para tratar una enfermedad autoinmunitaria que afecta a los vasos sanguíneos, la neurotoxina puede aplicarse a los tejido que rodean a los vasos sanguíneos, permitiendo la difusión de la neurotoxina hacia el interior de los vasos sanguíneos.

Para tratar las afecciones anteriores, la neurotoxina también puede aplicarse a la zona que rodea el tejido afectado. Además, la neurotoxina puede inyectarse adicionalmente en los ganglios linfáticos proximales, los ganglios linfáticos distales, el timo y/o el bazo.

Algunas afecciones, tales como la fatiga crónica, el VIH y el SIDA son sistemáticas y no implican un sólo sistema de órganos o tejido. En ese caso, la afección se trata inyectando el timo, el bazo o la médula ósea. Por supuesto, los ganglios linfáticos también pueden inyectarse.

Para inyectar un órgano o un tejido, especialmente uno que no puede observarse con la vista, puede guiarse la aguja hacia su sitio usando técnicas convencionales. Estas técnicas incluyen, pero sin limitarse a ello, palpación, guía ultrasónica, guía por escáner TAC y guía por rayos X.

La neurotoxina preferida es la toxina botulínica de tipo A. Las dosificaciones usadas son las mismas que las usadas para tratarneoplasmas.

#### Toxina Botulínica

La bacteria gram positiva, anaeróbica, Clostridium botulinum produce una potente neurotoxina polipeptídica, la toxina botulínica, que puede provocar una neuroparálisis en seres humanos. La neuroparálisis se denomina comúnmente botulismo. La bacteria Clostridium botulinum se encuentra comúnmente en el suelo y crecerá en contenedores de alimentos mal esterilizados. Los signos y síntomas del botulismo aparecen normalmente en el ser humano al cabo de 18 a 36 horas después de consumir alimentos que contienen un cultivo de Clostridium botulinum.

Se cree que la toxina botulínica puede pasar a través de las paredes del intestino y afectar a las neuronas motoras periféricas. Los síntomas del botulismo comienzan con dificultad para andar, tragar, y hablar y evolucionan a la parálisis de los músculos respiratorios con resultado de muerte.

#### El uso de toxina botulínica en el tratamiento del cáncer:

##### La influencia colinérgica en el cáncer:

##### 1) Algunas células cancerosas se activan por estimulación colinérgica

Se ha demostrado que varias formas de cáncer tienen receptores colinérgicos muscarínicos que son capaces de inducir la mitogénesis en células capaces de sufrir proliferación celular.



**Próstata:** El carbacol, un análogo de la acetilcolina, estimula la síntesis de ADN en células cancerosas de próstata (Rayfor W. y cols. Muscarinic Cholinergic Receptors Promote Growth of Human Prostate Cancer Cells. The Prostate, 30,1997, resumen) y la estimulación del receptor muscarínico M3 en células cancerosas de próstata estimula la proliferación (Luthin GR, y cols. Role of ml receptor-G protein coupling in cell proliferation in the prostate. Life Sci 60, 1997, resumen).

**Colon:** Los receptores M3 están sobreexpresados en cáncer de colon humano en comparación con tejido de colon normal, y la activación de este receptor puede contribuir a la progresión maligna del carcinoma de colon humano (Yang W, y cols. Cholinergic receptor up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E2 production in colon cancer cells. Carcinogenesis 21,2000, pág. 1789). Ukegawa (Ukegawa J, y cols. Growth-promoting effect of muscarinic acetylcholine receptors in colon cancer cells. J Cancer Res Clin Oncol 129,2003, resumen) demostró recientemente que la activación del receptor colinérgico muscarínico M3 tiene un efecto promotor del crecimiento en líneas celulares cancerosas de colon.

**Pulmón:** La estimulación del receptor de acetilcolina muscarínico expresado en carcinoma de pulmón de células pequeñas estimula el crecimiento celular (Song P, y cols. Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. Cancer Res 63, 2003, resumen). Se ha demostrado que las líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas sintetizan y secretan acetilcolina para que actúe como un factor de crecimiento autocrino (Song, P. y cols. Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. Cancer Res 63, 2003, resumen). El crecimiento de las células de mesotelioma humano está modulado por el sistema nervioso colinérgico, y los agonistas tienen un efecto proliferativo (Trombino S, y cols. Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells: Role of Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. Cancer Res 64, 2004, pág. 135). Curiosamente, Williams encontró que la estimulación de receptores muscarínicos potenciaba la adhesión célula célula en carcinoma de pulmón de células pequeñas.

**Mama:** Las líneas celulares de adenocarcinoma mamario murinas sufren proliferación en respuesta al carbacol que está mediada por la activación de receptores M3 (Espanol A, y cols. Different muscarinic receptors are involved in the proliferation of murine mammary adenocarcinoma cell lines. Int J Mol Med 13, 2004, resumen).

**Cerebro:** La estimulación con carbacol provoca un incremento dependiente de la dosis y el tiempo en la proliferación de células de astrocitoma humanas (Guizetti M, y cols. Acetylcholine as a mitogen: muscarinic receptor-mediated proliferation of rat astrocytes and human astrocytoma cells. Eur J Pharmacol 297, 1996, resumen).

**Melanoma:** Las células de melanoma primario y metastásico reexpresan receptores colinérgicos muscarínicos, que, al ser estimulados, provocan movimientos celulares y contracciones (Sailer M, y cols. Induction of cellular contractions in the human melanoma cell line SK-mel 28 after muscarinic cholinergic stimulation. Anat Embryol 201:27-37, 2000). Se ha propuesto la hipótesis de que tal estimulación puede ser responsable del crecimiento invasivo del melanoma, y también de que puede establecerse un bucle autocrino colinérgico en el melanoma. En un estudio histoquímico, se encontró que los receptores de acetilcolina muscarínicos eran más numerosos en la periferia del melanoma, en su unión con el tejido normal (Lammerding-Koppel M, y cols. Immunohistochemical localization of muscarinic acetylchoine receptors in primary and metastatic malignant melanomas. J Corte Pathol 25,1997, resumen).

**Linfocitos:** Las células T leucémicas humanas tiene el potencial de sintetizar y liberar acetilcolina, lo cual puede jugar un papel en la regulación de respuestas inmunitarias dependientes de células T (Fjuui T, y cols. Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. J. Neurosci Rest 44, 1996, resumen).

**Ovárico:** En el cáncer de ovario, no sólo un gran porcentaje de cánceres ováricos expresan receptores muscarínicos, sino que tal expresión se asoció con una probabilidad reducida de supervivencia (Oppitz M, y cols. Muscarinic receptors in cell lines from ovarian carcinoma: negative correlation with survival of patients. Gynecol Oncol 85, 2002, resumen).

**Cabeza y Cuello:** El tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello con carbacol activa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que juega un papel directo en la regulación del comportamiento migratorio de las células cancerosas de cabeza y cuello (Geschwind A, y cols. Lysophosphatidic Acid-induced Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation and Motility Involves Epidermal Growth Factor Receptor Signal Transduction. Cancer Res 62,2002 pág. 6335). De hecho, la activación del EFGR conduce a la invasión del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Geschwind A, y cols. Lysophosphatidic Acid-induced Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation and Motility Involves Epidermal Growth Factor Receptor Signal Transduction. Cancer Res 62, 2002 pág. 6335). Además, el efecto puede estar mediado por la anfirregulina. En células de carcinoma de células escamosas, el carbacol tiene como resultado específicamente la liberación de anfirregulina (Geschwind A, y cols. La escisión TACE de la proanfirregulina regula la proliferación y movilidad inducidas por GPRC de las células cancerosas. EMBO J 22, 2003, resumen). Se sabe que la anfirregulina libera enzimas metaloproteasas en líneas celulares malignas y dicha liberación puede asociarse con invasividad y metástasis locales (Lui, Z, y cols. Regulation of matrix metalloprotease activity in malignant mesothelioma cell lines by growth factors. Thorax 58:198-203, 2003)). En cáncer de pulmón de células no pequeñas, la anfirregulina puede

inhibir la apoptosis (Hurbin A, y cols. Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. Ann NY Acad Sci 1010, 2003, resumen).

2) Algunas células cancerosas se inhiben por activación colinérgica

5 También se ha demostrado que en carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC), la activación de receptores de acetilcolina muscarínicos M3 provoca una disminución de la proliferación celular, un incremento de la adhesión célula-célula mediada por E-cadherina, y una adhesión incrementada sustrato-células mediada por integrina beta 1 (Williams, muscarinic signaling in carcinoma cells, Life Sciences 72 (2003), 2173-2182). El incremento de la adhesión célula-célula y la adhesión células sustrato produciría una reducción de las metástasis.

10 La estimulación colinérgica de la línea celular preneoplásica (NTH3T3) puede provocar tanto mecanismos de crecimiento inhibidores como estimuladores (Nicke, B. y cols. Muscarinic Cholinergic Receptors activate both inhibitory and stimulatory growth mechanisms in NIH3T3 cells, J. Biol. Chem. 1999, vol. 274, n.º 31, págs. 21701-21706).

3) Algunos cánceres están inervados parasimpáticamente

15 En 2001, se publicó el primer informe que demostraba que el tejido neoplásico está inervado (Seifert P, y cols. Tumors may be innervated. Virchows Arch 438, 2001, resumen). En 2002, Seifert informó de que los carcinomas de vejiga papilares estaban inervados parasimpáticamente (Seifert P, y cols. Nerve fibers in tumors of the human urinary bladder. Virchows Arch 440:291-297,2002).

4) La angiogénesis es estimulada por la acetilcolina

20 La angiogénesis consiste en procesos secuenciales que emanan de células endoteliales microvasculares. Se ha demostrado que el sistema nervioso parasimpático modula positivamente la neovascularización estimulando los receptores M3 y la liberación de prostaglandina E2 (Heeschen C, y cols. A Novel Angiogenesis Pathway Mediated by Non-Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. Journal of Clin Invest 110:527-536, 2002)).

5) Bloquear el "mecanismo universal de anclaje" en células cancerosas

25 Se ha teorizado y demostrado que la toxina botulínica actúa inhibiendo un "mecanismo universal de anclaje" dentro de todas las células interfiriendo con la formación de un complejo SNARE entre dos membranas que se fusionarán y sufrirán exocitosis. Este concepto se ha aplicado al tratamiento del cáncer, teorizando que un efecto de ese tipo ayudará a reducir la actividad de las células cancerosas (documento US 2005/0031648 A1) o reducir la asociación de filamentos de actina y, por lo tanto, reducir el movimiento de una célula cancerosa (documento WO 2005/030248).

30 Existen limitaciones prácticas y de seguridad significativas para este enfoque que se han detallado anteriormente. En primer lugar, la toxina botulínica no entra en células no neuronales a menos que la célula haya sido permeabilizada (sólo in vitro); se haya unido un vehículo de transporte (sólo in vitro), o se haya inyectado una dosis de toxina significativamente más elevada. Dosis más elevadas de inyecciones de botulina pueden provocar la diseminación accidental con la subsiguiente parálisis de las estructuras vecinas, resistencia incrementada a inyecciones futuras.

35 Otras limitaciones prácticas de inyectar un cáncer con toxina botulínica también se han detallado anteriormente, pero incluyen la posible siembra de células cancerosas en el tejido normal vecino, la penetración de vasos linfáticos o vasos sanguíneos del interior del cáncer provocando una mayor probabilidad de diseminación, o producir un efecto de bolo presurizado sobre el cáncer que puede conducir a la diseminación.

40 CONCLUSIÓN: La significativa incertidumbre de una respuesta cancerosa frente a una toxina botulínica prohibiría su uso directo en tejido canceroso. Se ha concluido que debería evitarse la introducción de toxina botulínica en un cáncer.

6) Las inyecciones distantes de toxina botulínica reducirán las metástasis y proporcionarán un tratamiento local del cáncer más seguro

45 Para curar el cáncer, es primordial controlar no sólo la enfermedad local, sino controlar y tratar la diseminación distante llamada metástasis. Las metástasis pueden ser regionales (dentro de las estructuras linfáticas vecinas) o distantes (alejadas del sitio primario). Las metástasis generalmente aparecen por diseminación linfática o hematogénica. La diseminación a través de canales linfáticos está facilitada principalmente a través de la contracción de fibras de músculo esquelético o liso que rodean la red linfática. Es bien conocido que la toxina botulínica tiene la afinidad más alta posible por las fibras de músculo esquelético y las debilita o paraliza tras la exposición.

50 Se necesitan cantidades insignificantes de toxina para lograr esto y el intervalo de dosis que se necesita para lograr esto está bien establecido para otras afecciones no cancerosas. Además, está bien establecido que el sistema inmunitario es de suma importancia en la eliminación de células cancerosas, tanto en el sitio primario como en la circulación.

La presente invención logra, pero no se limita al tratamiento del cáncer tratando el cáncer en el sitio primario

potenciando la respuesta inmunitaria frente a células malignas, evitando la diseminación debilitando las fuerzas contráctiles regionales en y alrededor de las estructuras de vasos linfáticos y sanguíneos, y tratando las células cancerosas en la circulación. La presente invención se distingue de la técnica anterior en que la toxina no se inyecta cerca de las células cancerosas. La presente invención supone varias ventajas sobre la técnica anterior, incluyendo la necesidad de usar dosis más pequeñas, que se evitan inyecciones directas en el cáncer, que se evitan las respuestas inciertas de una célula cancerosa frente a la toxina botulínica.

A continuación se presenta una recapitulación de anatomía relevante:

1) Localización del tejido linfático

Además de los vasos sanguíneos, el cuerpo humano tiene un sistema de canales que recoge fluido de los espacios tisulares y lo devuelve a la sangre. Este fluido se llama linfa y, al contrario que la sangre, circula sólo en una dirección, hacia el corazón.

Los capilares linfáticos se originan como vasos de paredes finas con extremos ciegos. Están hechos de endotelio de paredes finas. Estos vasos de paredes finas convergen y terminan en última instancia en dos ramas principales, el conducto torácico y el conducto linfático derecho. Éstos entran en la unión de la vena yugular interna izquierda y la vena subclavia izquierda, y dentro de la confluencia de la vena subclavia derecha y la vena yugular interna derecha. Interpuestos en el camino de los vasos linfáticos hay ganglios linfáticos. Los vasos linfáticos más grandes tienen una capa de músculo liso que ayuda a propulsar el flujo de linfa a través de los canales y el flujo unidireccional es consecuencia de la presencia de numerosas válvulas de un sólo sentido.

Los conductos linfáticos de gran tamaño (conductos linfáticos torácico y linfático derecho) tienen una capa de músculo liso reforzada en el medio, en la que los músculos están orientados longitudinalmente y circularmente. Contienen vasos vasculares y una red neuronal rica (Junqueira L, Basic Histology, 1986, Lange Medical Publications, pág. 269).

*Tejido linfático*

El bazo, el timo y la médula ósea también se consideran tejido linfático. Estos órganos linfáticos se clasifican como centrales o periféricos y encapsulados (por ejemplo, bazo o ganglios linfáticos) o no encapsulados (por ejemplo, amígdalas, placas de Peyer en el intestino, nódulos linfáticos encontrados a lo largo de la mucosa del tracto alimentario, respiratorio, urinario y reproductivo). (Junqueira L, Basic Histology, 1986, Lange Medical Publications, pág. 269).

En general, las células linfáticas comienzan en un 'órgano linfático 'central' donde los precursores linfáticos sufren una proliferación independiente de antígeno y adquieren antígenos de superficie que los marcan como destinados a la respuesta inmunitaria celular o humoral. El timo es el órgano central en el que los linfocitos adquieren la capacidad de participar en la respuesta inmunitaria celular (células T). Las células migran a través de la sangre desde la médula ósea al timo, donde proliferan, dando lugar a células T. Estos linfocitos son responsable de las reacciones inmunitarias mediadas por células. La médula ósea es donde las células progenitoras se diferencian en células inmunitarias humorales (células B), que en última instancia se convierten en células plasmáticas y segregan inmunoglobulinas y proporcionan la respuesta inmunitaria humoral. Los linfocitos abandonan los órganos linfáticos centrales y pueblan regiones específicas de los órganos ' linfáticos 'periféricos', tales como los ganglios linfáticos, el bazo, las placas de Peyer y tejido linfático difuso no encapsulado de la mucosa de los tractos digestivo, respiratorio, urinario y reproductivo (Junqueira L, Basic Histology, 1986, Lange Medical Publications, pág. 269).

**Bazo:** El bazo es el órgano linfático más grande del sistema circulatorio. El bazo es un sitio de formación de linfocitos activados. Sirve para filtrar y modificar la sangre.

**Timo:** El timo es un órgano linfático central localizado en el mediastino. Existe una intensa proliferación linfocítica que tiene lugar en el timo durante el desarrollo desde el estado embrionario al prepuberal. Es aquí donde las células proliferan y se convierten en linfocitos T, las células responsables de la inmunidad mediada por células. Desde el timo, estas células T salen a través de los vasos sanguíneos para poblar los órganos linfáticos, especialmente los ganglios linfáticos y el bazo.

**Médula Ósea:** La médula ósea también es un órgano central, pero da lugar a células B, que en última instancia se diferencian en células plasmáticas y segregan anticuerpos (el sistema inmunitario humoral). Después de la diferenciación, las células B viajan a los ganglios linfáticos, el bazo y especialmente las placas de Peyer del intestino (Junqueira, supra, página 312).

**Ganglios Linfáticos:** Los ganglios linfáticos son zonas encapsuladas de tejido linfático periférico. Se distribuyen por todo el organismo, siempre a lo largo del curso de los vasos linfáticos, que llevan linfa hacia los conductor torácico y linfático (Junqueira, supra, página 313). Los ganglios linfáticos están agrupados en sitios concretos tales como el cuello, las axilas, las ingles y la región paraaórtica. La ubicación precisa de los ganglios linfáticos es bien conocida. Véase, por ejemplo, el documento UAMS Department of Anatomy - Lymphatics Tables (16 de julio de 2005) (dirección de correo electrónico [http:// anatomy.uams.edu/anatomyhtml/lymph-alpha.html](http://anatomy.uams.edu/anatomyhtml/lymph-alpha.html)), que se incorpora en el

presente documento por referencia en su totalidad.

La linfa entra en los ganglios linfáticos a través del canal linfático aferente y sale a través del canal eferente. El flujo es unidireccional. A medida que la linfa fluye a través de los senos, el 99% o más de los antígenos u otros residuos se eliminan mediante la actividad fagocítica de los macrófagos del interior del ganglio. Parte del material queda atrapado en la superficie de las células dendríticas, y posteriormente se expone en la superficie de las células dendríticas y es reconocido por e interacciona con linfocitos inmunocompetentes. El parénquima de un ganglio linfático tiene tres regiones generales, la corteza, la paracorteza y la médula.

En la corteza, si una célula c reconoce un antígeno (y a veces con la ayuda de células T), la célula B puede activarse y sintetizar anticuerpos que se liberan al fluido linfático y después a la circulación. La células B activadas permanecen dentro del ganglio linfático. Las células B no estimuladas atraviesan el ganglio linfático y vuelven a la circulación general.

Las células T permanecen predominantemente en la región de la paracorteza del ganglio linfático. Las células T activadas pasan a la circulación para alcanzar el sitio periférico. Otros tipos de las células, predominantemente células presentadoras de antígenos, residen en la región paracortical del ganglio linfático.

La médula es rica en células plasmáticas que producen anticuerpos adicionales, y macrófagos.

*Tejido no encapsulado:* El tejido linfático no encapsulado puede encontrarse principalmente en el tejido conectivo laxo de muchos órganos, principalmente en la lamina propia del tracto digestivo, tracto respiratorio superior y conductos urinarios (Junqueira, supra, página 323). Las amígdalas palatinas, linguales y faríngeas son otros sitio principales de tejido linfático encapsulado. Este llamado tejido linfático asociado a mucosas (MALT) incluye tejido linfático asociado al intestino (GALT), tejido linfático asociado a bronquios/tráquea (BALT), tejido linfático asociado a nariz (NALT), y tejido linfático asociado a la vía vulvovaginal (VALT). Existe MALT adicional dentro de los órganos accesorios del tracto digestivo, predominantemente en la glándula parótida.

El MALT puede consistir en una serie de células linfáticas o puede incluir ganglios linfáticos solitarios pequeños. La estimulación de linfocitos B conduce a la producción de inmunoglobulina A (IgA) e IgM dentro de las placas de Peyer. Además, las superficies epiteliales contienen células M que son células especializadas que absorben, transportan y presenta antígenos a la células linfáticas subepiteliales, tales como las células cooperadoras de tipo 1 CD4, las células presentadoras de antígenos y las células de memoria.

A continuación sigue una descripción más específica de linfocitos, pero generalmente, los linfocitos contienen receptores de antígenos que desencadenan la diferenciación. En los órganos periféricos, los linfocitos interactúan con antígenos apropiados, crecen y después se dividen. Algunos se convierten en células efectoras, y otros se convierten en células de memoria que son responsables de la respuesta inmunitaria secundaria. Para generar una respuesta inmunitaria y para que se generen células efectoras, deben suministrárseles antígenos. Este el es trabajo de las células presentadoras de antígenos, que incluyen células dendríticas, macrófagos y células de Langerhans de la epidermis.

Las células efectoras pueden ser células B o células T activadas. Las células efectoras células B son células plasmáticas que segregan inmunoglobulinas a los tejidos conectivos circundantes. Las células efectoras células T son de varios tipos e incluyen células T cooperadores, células T supresoras y células T citotóxicas. Las células atacadas incluyen células tumorales e infectadas por virus. Las células T y los macrófagos segregan linfocinas que regulan la proliferación de células tanto B como T.

#### Flujo Linfático

El sistema linfático se encuentra en casi todos los órganos, excepto el sistema nervioso central y la médula ósea. La circulación linfática es ayudada por la acción de fuerzas externas tales como la contracción del músculo esquelético circundante sobre sus paredes. (Junqueira, supra, página 269): Estas fuerzas hacen posible el transporte a lo largo de los canales linfáticos. La contracción del músculo liso de las paredes de los vasos linfáticos más grandes también ayuda a propulsar la linfa. El transporte de la linfa depende de fuerzas de conducción activas y pasivas. La fuerza de conducción activa que resulta de la actividad de bombeo intrínseca de algunos vasos linfáticos juega un papel importante en la propulsión del flujo de linfa (Hosaka K, y cols. Am J Physiol Heart Circ Physiol 284, 2003, resumen). Hay tono miogénico en los canales linfáticos. Se ha demostrado que la vía de la cinasa Rho (que se inhibe por toxina botulínica) ayuda a regular la actividad de bombeo de la linfa (Hosaka, supra). De hecho, se ha demostrado que los vasos linfáticos son capaces de regular el flujo a través de mecanismos intrínsecos (Ferguson MK, y cols. Lymphology 27(2), 1994 resumen y, Muthuchamy M, y cols. Molecular and Functional analyses of the contractile apparatus in lymphatic muscle. FASEB J 17, 2003, resumen). Los conductos linfáticos más grandes contienen músculo liso y una red neuronal rica (Junqueira, supra, página 269).

Varios factores ayudan al flujo del fluido linfático desde los espacios tisulares hasta los ganglios linfáticos y finalmente al torrente circulatorio venoso: 1) la "presión de filtración" en espacios tisulares, generada por filtración de fluido bajo presión desde los capilares hemáticos; 2) la contracción de los músculos vecinos comprime los vasos linfáticos, moviendo la linfa en la dirección determinada por la disposición de las válvulas; 3) la pulsación de las

arterias adyacentes; 4) los movimientos respiratorios y la baja presión sanguínea en la vena braquiocefálica durante la inspiración; 5) el músculo liso de las paredes de las ramas linfáticas está más marcado en las proximidades de sus válvulas. Se sabe que también se producen contracciones en el conducto torácico.

2) Sistema linfático, cáncer y metástasis

5 Los cánceres se diseminan a través de las circulaciones linfática y hematogénica. Los sistemas linfático y vascular tienen numerosas conexiones, y las células tumorales pueden pasar de un sistema a otro. Durante la invasión, las células tumorales pueden atravesar los vasos linfáticos de paredes finas y transportarse pasivamente a la linfa. Los émbolos tumorales pueden quedar atrapados en el primer ganglio o ganglios linfáticos (ganglios "regionales") que encuentren en su ruta, o pueden superar los ganglios regionales y ser transportados a grupos de ganglios distantes ("metástasis en salto"). Avances recientes en el mapeo de los cánceres de drenaje linfático han permitido a los cirujanos identificar el ganglio linfático que drena el sitio tumoral (el "ganglio linfático centinela").

Cada región del organismo suele drenar en un ganglio linfático o grupo de ganglios seleccionado, que se han detallado con precisión en estudios anatómicos y se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento UAMS Department of Anatomy-Lymphatic Tables, supra, anteriormente incorporado en esta solicitud en su totalidad.

15 Ciertos factores pueden facilitar la entrada de células cancerosas en la circulación y conducir a metástasis. La presión física en el entorno de un cáncer puede conducir a la diseminación de células malignas tanto localmente como en la distancia (Targarona EM, y cols. World J Surg 22, 57-58, 1998, y Lacy AM, y cols. Surg Endosc 1988, 12:1040-1041). Asimismo, se ha abogado por una técnica de escisión quirúrgica "sin contacto" para reducir el efecto de "masajear" las células cancerosas hacia la circulación a través de la manipulación. En esta técnica es importante interrumpir el suministro de sangre del tumor antes de abordar la movilización del tumor. Estas diversas técnicas clínicas hacen hincapié en la necesidad de minimizar la manipulación física directa de un cáncer para reducir la probabilidad de facilitar la diseminación.

20 Clínicamente, se ha demostrado (Hiroto M, y cols. Journal of Pancreas 6(2):143-151, 2005), que todas las muestras de fluido linfático sacadas del tejido pancreático canceroso reseccionado fueron positivas para ARN mensajero de CEA, haciendo patente la necesidad de minimizar la diseminación de fluido linfático de drenaje de un cáncer.

3) La toxina botulínica debilitará el tránsito linfático

El efecto de la toxina botulínica en músculo esquelético es bien conocido. De hecho, es la base del tratamiento para afecciones tales como el estrabismo, las distonias y otras afecciones musculares espásticas. La FDA ha concedido la aprobación de un tratamiento con botulina para el estrabismo, el blefaroespasma, la distonia cervical y otros. El intervalo de dosis requeridas para paralizar diversos músculos del cuerpo está bien establecido.

30 Una inyección regional de toxina botulínica alrededor de un cáncer explotará la bien conocida afinidad de unión de la botulina por el músculo. El músculo esquelético, el músculo liso, el músculo linfático, el músculo de los vasos sanguíneos y el músculo de pericitos serán la diana no limitante de esta invención. La parálisis del músculo esquelético o liso circundante limitará las fuerzas extrínsecas contráctiles sobre las estructuras linfáticas que normalmente facilitan el flujo de la linfa a través de los canales linfáticos. Los músculos intrínsecos del interior de los túbulos linfáticos se paralizarán o debilitarán por el tratamiento con botulina. La pared de los vasos sanguíneos de músculo liso se debilitará también (JERRY-¿añadir esto acerca de los vasos sanguíneos?).

Procedimiento alternativo para tratar el cáncer con inyecciones distantes de toxina botulínica:

40 Un segundo procedimiento para tratar el cáncer con inyecciones de botulina distantes está relacionado con la capacidad para modificar el sistema inmunitario y potenciar la respuesta frente al cáncer usando un tratamiento con toxina botulínica. El fundamento para esto está relacionado con la inervación colinérgica del sistema inmunitario y, por lo tanto, también está relacionado con el tratamiento de otras afecciones no cancerosas que se dan debido a una respuesta inmunitaria escasa. Con respecto al tratamiento del cáncer, de nuevo es importante evitar introducir la toxina en las células cancerosas, ya que la exocitosis dentro de las células cancerosas es primordial para presentar los antígenos adecuados para el reconocimiento inmunitario y la destrucción por el sistema inmunitario. De hecho, se prefieren las inyecciones distantes de toxina en los órganos linfáticos (ganglios linfáticos, tejido linfático).

1) Respuesta inmunitaria normal frente al cáncer

50 Las respuestas inmunitarias antitumorales pueden ser innatas (naturales) o adquiridas (adaptativas). La inmunidad innata está mediada por células o factores solubles que existen de forma natural en los fluidos de los tejidos del organismo y pueden interferir con el crecimiento tumoral (Whiteside TL. J. Allergy Clin Immunol 2003; 111, S677-86). Las células hematopoyéticas incluidas son macrófagos, granulocitos, células asesinas naturales, células T sin restricción por MHC y células T gamma/delta. Asimismo, también están incluidos anticuerpos naturales dirigidos a los componentes de superficie de células tumorales, componentes del complemento, proteína C reactiva, proteína amiloide sérica, proteína de unión a manosa (Whiteside, supra). La inmunidad adaptativa está mediada por células T que reconocen péptidos derivados de tumores unidos a moléculas de MHC propias expresadas en células presentadoras en antígenos (APC). Estas células incluyen células efectoras citolíticas, que son células T CD8+ y con

restricción por MHC de clase I, pero también cooperadoras (Whiteside, supra).

Las respuestas inmunitarias frente a células malignas pueden clasificarse como locales/regionales o sistémicas. Las respuestas locales incluyen leucocitos de infiltración tumoral (TIL). Las respuestas sistémicas existen y se miden mediante la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) de la circulación periférica en pacientes con cáncer.

## 5 2) Células inmunitarias en el microentorno del tumor

Whiteside, supra, revisa el microentorno del tumor. Los TIL se encuentran frecuentemente en tumores. Estas células pueden incluir células que median la inmunidad innata y adaptativa. También pueden liberarse diversidad de productos solubles tales como citocinas y anticuerpos en el microentorno. En teoría, estos productos, combinados con las interacciones directas de las células efectoras de infiltración, deberían tener como resultado la eliminación del cáncer, pero debido a los mecanismos esbozados anteriormente, esto no suele ocurrir.

Las células T se encuentran como los más abundantes de todos los infiltrados tumorales mononucleares. Se ha demostrado que las células T del microentorno del tumor incluyen células CD4+ (cooperadoras) y CD8+ (supresoras). Han demostrado ser disfuncionales en pacientes con cáncer y la magnitud de su disfunción puede estar relacionada con el pronóstico y la supervivencia en pacientes con cáncer. Tradicionalmente, la respuesta de células T protectora frente a tumores se ha atribuido a los linfocitos T CD8 con actividad citotóxica, que están restringidos por moléculas MHC de clase I, pero recientemente se ha considerado que las células CD4 juegan un papel antitumoral (Gerloni M, y cols. Springer Seminars in Immunopathology, Springer-Verlag 2005, 1-15). En general, tanto la respuesta celular como la mediada por anticuerpos se usan para respuestas antitumorales. Las respuestas de anticuerpos son las más adecuadas para patógenos extracelulares y antígenos, y las respuestas mediadas por células son las más adecuadas para patógenos intracelulares y células tumorales (Gerloni, supra). Puesto que los antígenos tumorales son siempre antígenos endógenos, puede ser más adecuada la destrucción de tumores mediante inmunidad mediada por células. Además, puesto que los tumores son negativos para MHC II, la mayoría de los esfuerzos se han centrado en linfocitos T CD8. Se ha demostrado también el papel de los linfocitos CD4, ya que también ayudan a activar y expandir los linfocitos CD8. Existen dos subgrupos de linfocitos CD4, las células T cooperadoras 1 (Th1) y las Th2. Las células Th1 producen interleucina-2 (IL-2), IL-12 e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y las Th2 producen IL-4 e IL-5. Estas citocinas afectan a las células B y ayudan a influir adicionalmente en el tipo de respuesta de anticuerpos frente a la activación antigénica (Gerloni, supra). Las células CD4 pueden ayudar a activar a los macrófagos de los ganglios linfáticos de drenaje o en tejido tumoral.

También puede darse la cooperación célula-célula entre células CD4. Gerloni, supra, ha demostrado que una célula CD4 también puede activar y expandir otras células CD4.

La producción y liberación de antígenos celulares a la membrana celular es de suma importancia en la inmunidad y destrucción tumoral. Los antígenos restringidos tanto por MHC de clase I como de clase II están implicados en la respuesta antitumoral. La mayor parte de la atención en inmunidad de tumores se ha centrado en el papel de los antígenos restringidos por MHC de clase I pero también son importantes los antígenos de clase II. Los antígenos de clase II son específicos de tejido, compartidos entre varios tipos de tumores, los antígenos tumorales habituales y los antígenos víricos que provocan la transformación de tumores (tales como los antígenos del virus del papiloma humano o el virus de Epstein Barr).

Las células asesinas naturales (NK) median la inmunidad innata y están bien equipadas para lisar células tumorales. Se cree que estas células facilitan las interacciones células dendríticas/células T y dirigen la respuesta inmunitaria frente a TAA (antígenos asociados a tumores). En general se piensa que estas células no son abundantes en el microentorno del tumor pero esto puede ser debido a la dificultad para identificarlas de forma fiable. Asimismo, las células NK dependen de la interleucina-2 (IL-2) para su activación, la cual es generalmente deficiente en tumores humanos. (Whiteside, supra). Las células NK también son capaces de responder frente a células infectadas por virus. Las células NK juegan un papel crítico en la limitación de infecciones víricas como se ha establecido mediante estudios con herpesvirus tales como citomegalovirus (CMV), herpesvirus común (VHS) y el virus de Epstein-Barr (VEB), así como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Smyth MJ, y cols. Molec Immunol (42 2005) 501-510). Las funciones efectoras de las células NK incluyen la citotoxicidad y la capacidad para producir diversidad de citocinas (incluido IFN- $\gamma$ ) tras la activación que restringe la angiogénesis tumoral y estimula la inmunidad adaptativa. (Smyth, supra). Clínicamente, la potenciación de la función de las células NK es paralela a la mejora clínica en los pacientes con cáncer (Lechin F, Clin Cane Research 2004, 10:8120).

Las células B también son poco comunes en la mayoría de los tumores excepto en cáncer de mama y melanoma. La función de las B células es la diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos. En general, los anticuerpos contra TAA se encuentran en la circulación de pacientes con cáncer, y se cree que se sintetiza en y se segregan desde ganglios linfáticos de drenaje de tumores, el bazo u otros tejidos linfáticos. Desde ahí, las moléculas de IgG se transportan por el plasma o la linfa a sitios tisulares.

Las células dendríticas (CD) son comunes en cánceres humanos. Estas células procesan y presentan TAA a células T vírgenes o de memoria, jugando de este modo un papel crucial en la generación de células T efectoras específicas de tumor. En pacientes con cáncer, las CD a veces son disfuncionales. Sin embargo, las infiltraciones de CD en

tumores se han asociado con la supervivencia significativamente prolongada del paciente y la incidencia reducida de enfermedad metastásica o recurrente. Por el contrario, los pacientes con lesiones escasamente infiltradas con CD tienen un pronóstico relativamente malo.

5 Los macrófagos también se encuentran en los microentornos de los tumores y se denominan macrófagos asociados a tumores (MAT). En tumores, los MAT inhiben de hecho la función de los linfocitos incluida la proliferación de células T y la citotoxicidad antitumoral mediada por NK.

3) Supresión inmunitaria en el microentorno del tumor

10 Como se mencionó anteriormente, los cánceres pueden evitar al sistema inmunitario y, de ese modo, evitar el reconocimiento. Estos incluyen la expresión por tumores de antígenos inmunogénicamente pobres, defectos en el procesamiento de antígenos, interacciones coestimuladoras inadecuadas, producción de factores inmunosupresores, o a través del hecho de que las células inmunitarias están comprometidas en número y/o función (Hoffman TK, y cols. Cancer Immunol Immunother (2004) 53:1055-1067)

4) Células efectoras inmunitarias en la circulación de pacientes con cáncer

15 Igual que el microentorno local contiene inmunocitos disfuncionales, los linfocitos de la sangre periférica también contienen irregularidades funcionales. Anormalidades en señalización, impedimentos funcionales y apoptosis se ven en células T, células NK, macrófagos y células B de la circulación periférica.

5) Tratamiento inmunitario local y respuesta del cáncer

20 La capacidad para modular el entorno inmunitario local es importante para el tratamiento del cáncer. Cuando se inyectaron dosis bajas de IL-2 natural alrededor de los ganglios linfáticos de drenaje tumoral, el 65% de los pacientes tuvieron una respuesta completa, parcial o mínima (Feinmesser M y cols. Eur Arch Otorhinolaryngol (2004) 261:359-368). Desafortunadamente, el efecto fue de corta duración y se requieren varias inyecciones diarias o semanales (Shibuya TY, y cols. Clin Cane Research 2004, 10:7088-7099). En otros estudios usando infiltración peritumoral de linfocina con o sin infiltración regional en los ganglios linfáticos, se observó una regresión similar (Feinmesser, supra).

25 Se ha demostrado que la administración de sutura bioactiva, recubierta con IFN-gamma, IL-2, genera una respuesta Th1 prolongada y estimula la secreción de IL-12 y prolonga la respuesta inmunitaria (Shibuya TY, y cols. Clin Canc Research 2004, 10: 7088-7099). En este tratamiento la sutura se considera un transportador para los productos bioactivos, y se coloca usando una "técnica de Seldinger", mediante la que una aguja con un trocar se introduce en la localización deseada y se pasa posteriormente la sutura. La colocación de la sutura es invasiva y la sutura se mantiene estirada y pegada a la superficie de la piel, "como un drenaje quirúrgico" lo cual puede conducir potencialmente a una infección.

30 En un esfuerzo para potenciar la función inmunitaria local, se han transducido los genes de citocinas en las células tumorales del paciente. De nuevo, el concepto subyacente es estimular una respuesta inmunitaria potente potenciando la producción de citocinas local. Los escollos de esta técnica incluyen la dependencia de que las células tumorales produzcan una respuesta, y la falta de una cantidad y calidad adecuadas de células tumorales del paciente y la expresión heterogénea de los genes de citocinas. Asimismo, las células tumorales deben irradiarse antes de volver a introducir las en el paciente (Steele TA, y cols. PSEBM 2000, 23:118-127).

6) Estrategias de tratamiento inmunitario

35 En términos generales, existen dos formas de tratamiento inmunitario, activo y pasivo. El tratamiento inmunitario activo se refiere a la inducción de respuestas inmunitarias mediante la aplicación de antígenos tumorales inmunogénicos (tales como péptidos, proteínas, células tumorales o lisados tumorales), mientras que la inmunización pasiva se basa en la transferencia de moléculas efectoras inmunitarias o células inmunitarias (Hoffman TK, y cols. Cancer Immunol Immunother (2004) 53:1055-1067).

40 Los inmunomoduladores activos pueden ser no específicos o específicos. Un inmunomodulador no específico, activo, puede incluir tratamiento local con BCG, extractos tímicos o OK-432, que intentan inducir una respuesta antitumorales. No obstante, un tratamiento de este tipo no ha demostrado beneficios de supervivencia consistentes para un paciente con cáncer. La inmunomodulación específica, activa, puede incluir la administración de vacunas a base de células dendríticas o vacunas a base de ADN. Este tipo de tratamiento está dando sus primeros pasos y suele reservarse para cánceres agresivos en etapas terminales recurrentes.

50 La inmunomodulación pasiva también se divide en tratamientos no específicos y específicos. El tratamiento no específico, pasivo, incluye la administración de citocinas tales como un interferón o interleucina sistémicos, o mecanismos de transferencia adoptiva de células, tales como células asesinas activadas por linfocitos e interleucina-2 administrada localmente. Los resultados de esta terapia fueron inconsistentes y proporcionaron toxicidades clínicas elevadas. Cuando la IL-2 se administra sistémicamente, se observó una tasa de toxicidad sistémica inaceptable incluyendo fiebre, malestar, hipotensión, edema pulmonar y choque. La inmunomodulación específica

55

pasiva incluye la administración de anticuerpos dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico, o mediante transferencia adoptiva celular a través de células T específicas para el tumor.

7) Importancia mantener la exocitosis para el reconocimiento inmunitario

5 Como se indicó anteriormente, para eliminar de forma eficaz las células cancerosas, es crucial que las células cancerosas mantengan su capacidad para sufrir exocitosis. La exocitosis es el proceso específico mediante el que una vesícula celular se funde con la membrana plasmática de la célula. Es el proceso mediante el cual las proteínas y los lípidos que se crean dentro de una célula se transportan al exterior de la célula. (Alberts B, y cols. Molecular Biology of the Cell, Tercera Edición 1994, Garland Publishing pág.. 626)

10 Las proteínas pueden ser segregadas desde las células por exocitosis de forma constitutiva o regulada (Alberts, supra, página 633). En la vía regulada, las moléculas se almacenan en vesículas de secreción que no se funden con la membrana plasmática para liberar su contenido hasta que no se recibe una señal extracelular. Mientras que esta vía opera sólo en células seleccionadas especializadas, una vía de secreción constitutiva opera en todas las células, mediada por un transporte vesicular constante desde la cara trans del aparato de Golgi a la membrana plasmática. (Alberts, supra, pág. 633). Este procedimiento permite la liberación de diversas proteínas de membrana, proteínas de secreción y lípidos a los dominios de la membrana plasmática apropiados (Alberts, supra, p 633).

15 Un antígeno es una macromolécula que incluye prácticamente todas la proteínas y muchos polisacáridos (Alberts, supra, p 1201). Estos llamados determinantes antigénicos estimulan la producción de anticuerpos o respuestas de células T (Alberts, supra, p.1201). Debido a que el sistema inmunitario funciona por expansión clonal, incluso un sólo determinante antigénico activará muchos clones. Por el contrario, la alteración o inhibición de los determinantes antigénicos previsiblemente puede alterar de forma significativa la respuesta inmunitaria del huésped frente a un antígeno tumoral.

20 La mayoría de los TAA son autoantígenos que se sobreexpresan o se alteran después de la transcripción. Para organizar una respuesta adecuada, son necesarias las células T específicas para TAA y la inmunidad inmediata mediada por células T activadas no específicas, las células NK activadas y los macrófagos activados. Teniendo esto en cuenta, hay dos razones principales por las que los tumores no inducen una respuesta inmunitaria potente. La primera, el tumor puede no ser capaz de proporcionar un antígeno adecuado para que lo detecte la respuesta inmunitaria y frente al que pueda reaccionar el sistema inmunitario. La segunda el tumor puede evitar una respuesta inmune al no ser capaz de proporcionar moléculas accesorias esenciales para el desarrollo de una respuesta inmunitaria (Steele, supra).

25 La falta de una presentación de antígeno apropiada puede incluir expresar una proteína tumoral mutante que no es inmunogénica, tener una vía de procesamiento antigénico defectuosa de forma que el antígeno no puede lanzarse a la superficie de la célula o enmascarar el antígeno tumoral de forma que no pueda ser visto por las células inmunitarias (Steele, supra). Sin la expresión por parte del tumor de moléculas de superficie esenciales, no puede generarse ninguna respuesta antitumoral (Steele, supra). Estos descubrimientos hacen hincapié en la necesidad de tener un procedimiento de exocitosis intacto dentro de las células cancerosas para permitir la expresión de los TAA en células cancerosas para desencadenar una respuesta inmunitaria.

30 Se ha demostrado que cuando el cáncer tiene una expresión más elevada de beta-2 macroglobulina, un componente del MHC-1, la evolución clínica mejora (Feinmesser M y cols. Eur Arch Otorhinolaryngol (2004) 261:359-368). Se sugiere que la expresión de antígeno incrementada facilita la presentación tumor-antígeno a los linfocitos CD8.

35 Además de la expresión de los TAA, la exocitosis es importante en las metástasis. Las metástasis cancerosas son un proceso que implica un programa coordinados de sucesos que incluye cambios en la adhesión celular, proteólisis polarizada y migración, intravasación en la circulación, adhesión posterior a células endoteliales seguida de extravasación, invasión e inducción de angiogénesis. Las proteínas y los receptores de la superficie celular están íntimamente implicados en estos procesos. Por ejemplo, la pérdida de E-cadherina puede reducir la adhesión célula-célula y permitir que la células cancerosas salgan más rápidamente de los tumores. Las integrinas regulan la adhesión celular, la movilidad, la invasión, y la angiogénesis, y las metaloproteasas pueden degradar la matriz extracelular sobre las células tumorales. En otras palabras, el proceso de exocitosis, que por un lado puede liberar metaloproteasas y contribuir a la invasión primaria del sitio primario, es importante integralmente en la producción de moléculas de adhesión que ayudan a evitar las metástasis y la expresión de antígenos que puede facilitar el reconocimiento y destrucción por el sistema inmunitario. Cualquier intento de anular por completo el proceso de exocitosis puede, por lo tanto, tener desventajas significativas en la medicina del tratamiento del cáncer.

40 De hecho, el tratamiento del cáncer incluye intentos de potenciar la inmunogenicidad de células tumorales. Por ejemplo, un requisito para que las células T ataquen a células tumorales es que se unan a un fragmento peptídico específico que está presentado sobre la superficie de una célula cancerosa. Se sabe que las células tumorales raramente expresan este antígeno y se han hecho esfuerzos para transducir moléculas coestimuladoras en tumores para promover una respuesta inmunitaria antitumoral potente (Steele, supra).

55



8) Modulación colinérgica de la función inmunitaria

Las células que normalmente son inmunoprotectoras frente al cáncer pueden incluir, pero no se limitan a células asesinas naturales (NK), macrófagos activados y células T (incluidos linfocitos de infiltración tumoral y células T asesinas naturales). La acetilcolina inhibe la función celular de las células asesinas naturales, que se bloqueó por atropina (Qiu YH, Peng YP, y cols. Effect of acetylcholine on in vitro IL-2 production and NK cell cytotoxicity of rats. Lymphology 37(1):31-8, 2004)), lo que sugiere que la botulina puede inhibir la supresión de la actividad de las células NK. Se sabe que las células NK inducen la apoptosis de células malignas (Smyth MJ, y cols. Activation of NK Cell Cytotoxicity. Molec Immunol 42:501-510, 2005) e inhiben las metástasis (Kim, S, y cols. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. Proc Natl Acad Sci 97, 2000, resumen), por lo que la botulina puede potenciar esta actividad. La pilocarpina, un análogo de la acetilcolina, incrementa la relación CD8/CD4 que también se bloqueó con atropina, sugiriendo que la actividad supresora de las células T está influida positivamente por la acetilcolina (Prync AE, Arzt E, y cols. El efecto inhibitorio del agonista muscarínico pilocarpina sobre la activación de linfocitos implica la vía IL-2 y el incremento en la función celular supresora. Int J. Neurosci 62, 1992, resumen). Esto sugeriría que una inversión de la relación CD8/CD4 o un incremento de la actividad T cooperadora influiría positivamente en la citotoxicidad del cáncer (Gerloni M, y cols. Springer Seminars in Immunopathology, Springer-Verlag 2005, 1-15) también. La acetilcolina también reduce la producción de factor de necrosis tumoral (Steinman L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. Nature Immunology 5, 2004, resumen). Finalmente, cuando las glándulas salivales humanas se inyectaron con toxina botulínica, se observó que la cantidad cuantitativa de inmunoglobulina (específicamente IgA) segregada a la saliva, aumentaba. Los descubrimientos anteriores apoyan el uso de botulina para potenciar localmente la citotoxicidad inmunitaria y la inmunidad humoral.

9) La toxina botulínica puede modular el sistema inmunitario

La eventual alteración de la función inmunitaria provocada por la inhibición colinérgica incluye la inmunidad celular y humoral potenciada. La función de las células NK potenciada potencia directamente la eliminación de las células cancerosas. La actividad de las células NK potenciada provoca la potenciación secundaria de la inmunidad celular y humoral mediante la liberación de citocinas e interferón gamma. Esto tiene como consecuencia un incremento de la función de las células T y las células NK, que potencia adicionalmente la destrucción celular del cáncer.

También se ha demostrado que la función de las células NK potenciada reduce las metástasis (Kim, supra).

La función de las células NK potenciada también potencia la evolución de pacientes con infecciones víricas, enfermedades víricas, crecimientos inducidos por virus, enfermedades autoinmunitarias (tales como la enfermedad de Sjogren, diabetes dependiente de insulina), esclerosis múltiple, heridas crónicas, infecciones crónicas tales como la amigdalitis (Ferlazzo G, y cols. Journal Immunol 2004, 172:1455-1462) o infecciones óseas (Miyasaki K, Periodontal Immunology, Homepage, [www.dent.ucla.edu](http://www.dent.ucla.edu)), artritis reumatoide, miastenia grave y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), todas las cuales son afecciones caracterizadas por recuentos, función o actividad de células NK reducidos (Baxter, AG, y cols. Autoimmunity 2002, 35:1-14, y Lee PT, et al., J. Clin Invest 2002, 110:793-800). También se encuentra una baja actividad de células NK en el síndrome de fatiga crónica (Whiteside TL, y cols., AM J Med 105, 1998, resumen), y hepatitis (Chen Y, y cols, J Viral Hepatitis 12, 2005, resumen), de las cuales ambas son susceptibles de tratamiento con botulina.

CONCLUSIÓN: Inyectar toxina botulínica alrededor, pero lejos de células cancerosas mejorará el control local del cáncer en el sitio primario, evitará la diseminación distante de células tumorales en la circulación y tratará las células cancerosas del entorno local y las circulaciones distantes. Los riesgos (como se describieron anteriormente) de inyectar la toxina en o en las proximidades de un cáncer se eliminarán. Análogamente, inyectar toxina botulínica de esta manera potenciará la evolución de los pacientes que padecen infección víricas, enfermedades víricas, crecimientos inducidos por virus, enfermedades autoinmunitarias, esclerosis múltiple, heridas crónicas, infecciones crónicas, artritis reumatoides, miastenia grave y VIH, etc., como se describió anteriormente.

Clasificación de cánceres susceptibles de tratamiento:

Tipo de Cáncer	Ejemplos específicos
Cánceres digestivos/intestinales:	Glándulas salivales, labios, cavidad bucal, orofaríngeo, hipofaríngeo, nasofaríngeo, esofágico, estómago, intestino delgado, intestino grueso, anal
Cánceres del sistema nervioso central:	Cerebro, nervio
Cánceres hepatobiliares:	Hígado, vesícula biliar, páncreas, vías biliares
Cánceres genitourinarios:	Riñón, uréter, vejiga, uretra, próstata, pene, vaginal, vulvar, uterino, de endometrio, ovárico,

cervical, testicular

Cáncer de mama:

Cánceres respiratorios:

nariz, senos, nasofaríngeo, laríngeo, traqueal,

bronquial, pulmón, pleura (mesotelioma)

5 Cánceres del tegumento:  
basales

melanoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células

células de merkel

Musculoesqueléticos:

rabdomiosarcoma, sarcomas

Cánceres hematopoyéticos:

linfoma, leucemia, mielodisplasia

10 Órganos sensoriales:

ojo, oído

Endocrinos:

tiroides, paratiroides

Neuroendocrinos:

cánceres neuroendocrinos excepto aquellos de la  
médula adrenal o tumores glómicos

15 El tratamiento del cáncer requiere el control de las metástasis

Inhibición de la diseminación: La manipulación u opresión física de un cáncer a nivel macroscópico o microscópico mediante células contráctiles puede producir una presión física para que se diseminen las células cancerosas, o puede permitir que las células cancerosas que ya han entrado en un canal eferente sean empujadas hacia una circulación más ancha. Por ejemplo, una premisa bien conocida en cirugía oncológica es minimizar la manipulación del cáncer durante la resección para minimizar las fuerzas físicas que pueden conducir a la entrada y diseminación de las células cancerosas en túbulos tales como los vasos linfáticos o sanguíneos. De hecho, cuando sea quirúrgicamente posible, es deseable interrumpir inicialmente los vasos de un cáncer al cáncer y minimizar la diseminación.

20

La toxina botulínica enervará localmente el tejido muscular

25 La toxina botulínica inhibirá la contracción de las fibras musculares macroscópicas y microscópicas alrededor de un cáncer, inhibiendo así la probabilidad de empujar a las células cancerosas hacia el entorno local o hacia túbulos eferentes que llevan al cáncer lejos. La toxina botulínica paralizará el músculo linfático que se contrae para empujar las células linfáticas y posiblemente las cancerosas a la circulación distante.

El tratamiento del cáncer requiere la capacidad de inmunomodulación positiva

30 La botulina puede potenciar la producción local de inmunoglobulinas cuando se aplica en una superficie de mucosa. Esto puede potenciar las células "asesinas de tumores" o propiedades del tejido local y potenciar el efecto anticanceroso.

35 Se ha demostrado que la botulina potencia y/o provoca la proliferación de una "célula mioepitelial" que es un tipo de célula muy específico. La célula mioepitelial se considera una célula de defensa esencial en el cáncer de mama por mecanismos desconocidos. Potenciando la proliferación de estas células mioepiteliales, la botulina puede potenciar el mecanismo de defensa del huésped en tumores que tengan células mioepiteliales (mama, próstata, pulmón, vías respiratorias, etc.).

40 Otros mecanismos desconocidos también pueden entrar en el juego. Por ejemplo, la señalización célula-célula y el posterior crecimiento/metástasis es una característica de las células cancerosas. Se ha sugerido que alterando estas señales, puede alterarse el crecimiento de un cáncer. En cuanto a la botulina, las señales pueden ser químicas (es decir, sustancias liberadas por exocitosis y bloqueadas por botulina) o físicas (es decir, señales físicas para las células circundantes), pero cualquiera puede ser bloqueada por botulina.

Es más probable que sean beneficiosas las técnicas que se dirigen a varias secuencias de sucesos en la progresión del cáncer que una técnica que se dirige a una sola secuencia.

45 **Ejemplos:**

El siguiente ejemplo demuestra la capacidad de la toxina botulínica para potenciar una respuesta inmunitaria celular:

**Ejemplo N.º 1:** Se inyecta a un paciente con verruca vulgaris (verrugas comunes) en la base de la verruga y su periferia con un total de 25 unidades de toxina botulínica de tipo A. Durante 3-5 semanas, se observa que el tamaño de la lesión se reduce significativamente en todas las dimensiones (en casi el 90%), es suave y apenas perceptible. Después de 3 meses, el tamaño de la lesión vuelve a su tamaño original.

5 Los siguientes ejemplos proféticos demuestran cómo funcionará la invención.

**Ejemplo N.º 2:** Un paciente de 50 años de edad diagnosticado con cáncer de pulmón invasivo se somete a la administración local de 30 unidades de toxina botulínica de tipo A alrededor del cáncer por inyección broncoscópica, aerosolización o inyección transtorácica. El cáncer se visualiza clínicamente o radiográficamente y la zona de alrededor del cáncer se inyecta directamente, y el paciente se somete a radiación, quimioterapia o cirugía según el plan inicial. La aplicación local de botulina también potencia la inmunidad local del paciente, lo cual sirve para minimizar la infección durante el tratamiento, conduciendo a menos episodios de neumonía y menos interrupciones en el tratamiento debidas a infecciones. Después de 2 meses de tratamiento del cáncer estándar, se observa que la invasión local y regional y la diseminación distante se reduce. El paciente experimenta una evolución clínica mejorada.

10 En el ejemplo anterior el ganglio o ganglios linfáticos regionales o distantes, el timo, el bazo o la médula ósea del paciente pueden ser inyectados también cada uno con 1-100 unidades de toxina botulínica de tipo A. Los tejidos se inyectan mediante guía radiográfica o visualización directa durante la mediastinoscopia o la cirugía. Después de la inyección, se observa que hay una respuesta inmunológica mejorada frente al cáncer. El control local y las metástasis locales, regionales y distantes se reducen. La inyección puede repetirse en intervalos de 3-6 meses.

15 **Ejemplo N.º 3:** A un hombre de 50 años con cáncer de próstata invasivo se le inyectan 40 unidades de toxina botulínica de tipo A alrededor del cáncer, lo cual tiene como resultado menos metástasis regionales o distantes. La inyección guía hacia la región alrededor del cáncer mediante guía radiográfica (escáner TAC, ultrasonidos, guía MM u otros). El efecto de la botulina también se da en el mioepitelio local y la incidencia de las metástasis en tránsito, regionales y distantes se reduce. El paciente continúa sometiéndose a tratamiento estándar para el cáncer de próstata. Durante el curso del tratamiento hay menos invasión del tejido circundante y menos diseminación de células cancerosas en la circulación regional o sistémica. El paciente es evaluado de nuevo periódicamente y se observa que el cáncer y la región del cáncer requieren una nueva inyección en 3 meses, ya que el paciente tiene enfermedad persistente que no respondió al tratamiento estándar. Se inyectan 40 unidades más y el paciente continúa con el tratamiento planeado. Tres meses después el tumor se ha eliminado y no se requieren inyecciones adicionales. El paciente experimenta una cura y una supervivencia mejoradas.

20 El ganglio o ganglios linfáticos regionales o distantes, el timo, el bazo o la médula ósea del paciente pueden ser inyectados también cada uno con 1-100 unidades de toxina botulínica de tipo A. Los tejidos se inyectan mediante guía radiográfica, palpación directa o durante la cirugía. El control local y las metástasis locales, regionales y distantes se reducen. La inyección puede repetirse en intervalos de 3-6 meses.

25 **Ejemplo N.º 4:** Se trata a una mujer de 60 años de edad diagnosticada con cáncer de mama con 30 unidades de toxina botulínica de tipo A inyectadas alrededor del cáncer antes de empezar ningún tratamiento. La contracción local del tejido mamario se reduce y la paciente experimenta una incidencia reducida de la diseminación local, regional y distante. Mejora la evolución clínica. El ganglio o ganglios linfáticos regionales o distantes, el timo, el bazo o la médula ósea del paciente pueden ser inyectados también cada uno con 1-100 unidades de toxina botulínica de tipo A. Los ganglios linfáticos se inyectan mediante palpación, guía radiográfica, visualización directa durante la cirugía. Después de la inyección, se observa que hay una respuesta inmunológica mejorada frente al cáncer. El control local y las metástasis locales, regionales y distantes se reducen. La inyección puede repetirse en intervalos de 3-6 meses.

30 Alternativamente, el ganglio linfático centinela del paciente puede identificarse usando la linfoescintigrafía. Puesto que es altamente probable que estos ganglios contengan cáncer metastásico, se evitan durante las inyecciones radiográficas, y sólo se inyecta la cuenca ganglionar circundante.

35 **Ejemplo N.º 5:** A un hombre de 45 años de edad se le diagnostica con cáncer de colon localmente invasivo. En el momento del diagnóstico, se le inyectan 50 unidades de toxina botulínica de tipo A en y/o alrededor del cáncer para debilitar los efectos contráctiles de la musculatura colónica macroscópica y microscópica. El cáncer se "congela" y hay menos invasión de células cancerosas en el tejido o los vasos linfáticos o sanguíneos circundantes. El paciente puede cometerse a tratamiento adicional (quimioterapia, radioterapia y/o cirugía) y la diseminación local, regional y distal se reduce o elimina.

40 El ganglio o ganglios linfáticos regionales o distantes, el timo, el bazo o la médula ósea del paciente pueden ser inyectados también cada uno con 1-100 unidades de toxina botulínica de tipo A. Estos tejidos se inyectan mediante guía radiográfica, inyección endoscópica, palpación directa o durante la cirugía. El control local y las metástasis locales, regionales y distantes se reducen. La inyección puede repetirse en intervalos de 3-6 meses.

45 **Ejemplo N.º 6:** Se observa que un paciente con cáncer de lengua metastásico tiene síntomas de compresión y hemorragia atribuibles a la invasión local de una metástasis regional. La metástasis se considera no operable y no

puede recibir más radioterapia. Alternativamente, puede ser tratado con cirugía, radioterapia o quimioterapia. La zona de alrededor de la lesión metastásica se inyecta con 30 unidades de toxina botulínica de tipo A. Hay menos invasión local y metástasis de la lesión. La metástasis sufre una regresión y se reducen los síntomas de compresión.

5 El ganglio o ganglios linfáticos regionales o distantes, el timo, el bazo o la médula ósea del paciente pueden ser inyectados también cada uno con 1-100 unidades de toxina botulínica de tipo A. Los tejidos se inyectan mediante guía radiográfica, palpación directa o durante la cirugía. El control local y las metástasis locales, regionales y distantes se reducen. La inyección puede repetirse en intervalos de 3-6 meses.

10 **Ejemplo N.º 7:** Un hombre de 35 años de edad tiene cáncer de faringe localmente invasivo. Se inyectan treinta y cinco unidades de toxina botulínica de tipo A alrededor de la lesión. Se observa que el cáncer sufre una regresión y es eliminado con inyecciones locales de botulina sin tratamiento adicional.

El ganglio o ganglios linfáticos regionales o distantes, el timo, el bazo o la médula ósea del paciente pueden ser inyectados también cada uno con 1-100 unidades de toxina botulínica de tipo A. Los tejidos se inyectan mediante guía radiográfica, palpación directa o durante la cirugía. El control local y las metástasis locales, regionales y distantes se reducen. La inyección puede repetirse en intervalos de 3-6 meses.

15 Alternativamente, el ganglio linfático centinela del paciente puede identificarse usando la linfoescintigrafía. Puesto que es altamente probable que estos ganglios contengan cáncer metastásico, se evitan durante las inyecciones radiográficas, y sólo se inyecta la cuenca ganglionar circundante.

20 **Ejemplo comparativo N.º 8:** Un paciente con cáncer tiene sinusitis fúngica invasiva. Su recuento leucocitario es de menos de 1.000 y hay una respuesta inmunológica pobre en la cavidad sinusal. Se lo somete a cirugía para retirar el tejido invadido por el hongo. Antes de la cirugía o preferiblemente, tras la retirada del tejido y durante la cirugía, se inyectan 10 unidades de toxina botulínica de tipo A en varios sitios dentro de la cavidad nasal circundante. Se observa que las respuestas inmunológicas local y sistémica mejoran y que el paciente experimenta una cura de la enfermedad.

25 El ganglio o ganglios linfáticos regionales o distantes, el timo, el bazo o la médula ósea del paciente se inyectan también cada uno con 1-100 unidades de toxina botulínica de tipo A. Estos tejidos se inyectan mediante guía radiográfica, palpación directa o durante la cirugía. El control local y la diseminación distante del hongo se reducen. La inyección puede repetirse en intervalos de 3-6 meses.

30 **Ejemplo comparativo N.º 9:** Un paciente con cáncer, enfermedad autoinmunitaria, diabetes, VIH o SIDA o lupus tiene hongos en las uñas de los pies (onicomicosis). La uña afectada se inyecta con 5 unidades de toxina botulínica de tipo A en varios puntos y hay regresión de los síntomas de la onicomicosis. Alternativamente, pueden inyectarse los tejidos normales o los ganglios linfáticos regionales circundantes.

35 **Ejemplo comparativo N.º 10:** Un paciente de 10 años de edad con diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) depende de inyecciones de insulina. Se inyecta toxina botulínica de tipo a (50 unidades) usando guía radiográfica en su páncreas. Se observa que sus niveles de insulina naturales se elevan y que tiene menos síntomas de diabetes.

**Ejemplo comparativo N.º 11:** A una mujer de 40 años de edad con una enfermedad autoinmunitaria de le inyecta toxina botulínica de tipo A. Se inyectan 100 unidades de toxina en su bazo, médula ósea o cuenca ganglionar regional donde se localicen los síntomas. Tras la inyección, sus síntomas mejoran.

40 **Ejemplo comparativo N.º 12:** Un varón de 35 años de edad con SIDA tiene una población de T cooperadores suprimida y es susceptible a infecciones. Se inyectan 50 de toxina botulínica de tipo A en su timo y bazo. Alternativamente, puede inyectarse su médula ósea. La población de células T del paciente aumenta y su estado mejora significativamente.

45 Como se señaló anteriormente, la toxina botulínica está disponible de varias fuentes. Además, está disponible de Allergan como Botox®, una formulación de BTX-A; DySport®, otra preparación de BTX-A disponible en Europa de Ipsen, Ltd; y Myobloc™ (o NeuroBloc® en Europa), una preparación de BTX-B disponible de Elan Pharmaceuticals.

50 La botulina para su uso en la presente invención también puede fabricarse mediante técnicas farmacéuticas conocidas, por ejemplo, disolviendo toxina botulínica farmacéuticamente aceptable en un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para inyección, de forma que la botulina se disuelva hasta la fuerza o concentración deseadas. Estas preparaciones pueden realizarse en el momento o previamente. Pueden añadirse otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como conservantes. Estas preparaciones se fabrican mediante técnicas bien conocidas en la técnica.

55 La cantidad de toxina botulínica que se utiliza varía, por supuesto, en función del tamaño del tumor que se va a tratar. La dosis máxima de botulina A que se administra no debería exceder las 500 unidades por sesión de inyección. Preferiblemente, deberían usarse 0,01-100 unidades de botulina A. Más preferiblemente, la dosificación de botulina A debería estar en el intervalo de aproximadamente 1 unidad a aproximadamente 50 unidades. Incluso

más preferiblemente, la dosificación de botulina A debería estar en el intervalo de aproximadamente 5 unidades a aproximadamente 40 unidades.

5 Se sabe que una corriente eléctrica puede potenciar la absorción de toxina botulínica en los tejidos. Black, y cols., J:Cell Biol -1986 Ago; 103(2): 53 5-44; Hesse, y cols., 1: Neurosci Lett. 1995 Dic. 1; 201(1) 37-40; Hesse, y cols., 1: Clin. Rehabil. 1998 Oct; 12 (5): 381-8. En consecuencia, una realización de la presente invención sería aplicar una corriente eléctrica a o alrededor de la zona que se va a tratar. Esto debería reducir la cantidad de toxina botulínica necesaria para unos resultados efectivos.

10 Si se usa una neurotoxina diferente, tal como botulina B, C, D, E, F o G, la dosificación debería adaptarse a la dosificación anterior de botulina A. Las conversiones, conocidas en la técnica, pueden usarse para calcular estas dosificaciones.

La descripción anterior establece varias realizaciones de la invención. Sin embargo, esta descripción no pretende ser limitante del alcance de la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una neurotoxina farmacéuticamente aceptable en la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento o metástasis de un neoplasma en un paciente, en el que el medicamento es para su aplicación en la periferia de dicho neoplasma de forma que una parte de la neurotoxina rodea pero no penetra en el neoplasma.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el neoplasma se selecciona del grupo que comprende neoplasmas digestivo/intestinal, del sistema nervioso, hepatobiliar, genitourinario, de mama, respiratorio, del tegumento, musculoesquelético, hematopoyético, de órganos sensoriales, endocrino o neuroendocrino.
3. El uso de la reivindicación 1 o 2, en el que la dosis de neurotoxina no excede las 500 unidades por aplicación.
4. El uso de la reivindicación 3, en el que la dosis de neurotoxina está entre 0,01 y 100 unidades por aplicación.
5. El uso de la reivindicación 4, en el que la dosis de neurotoxina está entre 1 y 50 unidades por aplicación.
6. El uso de la reivindicación 1, en el que la neurotoxina es para aplicación tópica, aplicación por inhalación o mediante inyección.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la neurotoxina es para aplicación mediante inyección.
8. El uso de la reivindicación 1, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de una neurotoxina farmacéuticamente aceptable se proporciona adicionalmente para inyección en un ganglio o ganglios linfáticos regional o distal, tejido ganglionar regional o distal, el timo, el bazo o la médula ósea del paciente.
9. El uso de cualquier reivindicación precedente, en el que la neurotoxina es neurotoxina botulínica.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la neurotoxina es toxina botulínica de tipo A.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la neurotoxina es toxina botulínica de tipo B.