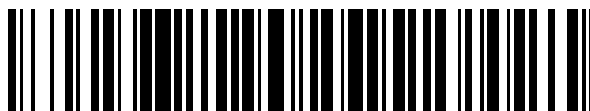


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 130**

51 Int. Cl.:
A61K 35/00 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/335 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09175439 .0**
96 Fecha de presentación: **15.07.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **2145629**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.01.2010**

54 Título: **Uso de terapia con neurotoxinas para el tratamiento de enfermedades urológicas y de enfermedades relacionadas**

30 Prioridad:
15.07.1997 US 52580 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.07.2012

73 Titular/es:
**The Regents of the University of Colorado, a
body corporate
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, CO 80203, US**

72 Inventor/es:
Schmidt, Richard A.

74 Agente/Representante:
Fúster Olaguibel, Gustavo Nicolás

ES 2 385 130 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

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona una toxina botulínica para uso en un método para incrementar la capacidad de la vejiga de un paciente de incontinencia de urgencia mediante la administración de toxina botulínica en la vejiga del paciente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

20 El agrandamiento prostático es un hecho común en hombres de edad avanzada. Lytton *et al.* (Lytton, B., Emery, J.M. y Harvard, B.M. [1973] 99: 639-645) estimaron que un hombre de 45 años tenía un riesgo del 10% de cirugía de próstata a la edad de 70 años. Un informe del censo de EE.UU. estima que actualmente hay 30 millones de personas que superan la edad de 65 años. Está previsto que este segmento de población se eleve a 50 millones en los próximos 30 años. Por lo tanto, también aumentará el número de hombres con agrandamiento prostático. Según los informes previos emitidos por el National Kidney and Urologic Disease Advisory Board, se realizaron 425.000 prostatectomías en los Estados Unidos en 1989. Basándose en las estimaciones de crecimiento de la población, el número de prostatectomías realizadas anualmente se elevará hasta 800.000/año en el año 2020.

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

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

35 McNeal (1990) informó que la HPB se desarrolla en la zona de transición y en la zona glandular periuretral. Los nódulos de HPB se desarrollan en el interior o de manera inmediatamente adyacente a la zona esfintérica pre-prostática. La zona de transición es una región pequeña próxima a la uretra íntimamente relacionada con el esfínter uretral proximal. El estroma de la zona de transición es denso y compacto, y es extraordinariamente susceptible a alteraciones inducidas neurológicamente del control del crecimiento. Sus glándulas penetran en el esfínter, mientras las fibras musculares del esfínter penetran en el estroma de transición. La zona glandular periuretral tiene un origen de seno urogénico similar al de la zona de transición.

40 La HPB puede estar asociada a cantidades incrementadas de estroma respecto del epitelio (Bartsch, G., Muller, H. R., Oberholzer, M., Rohr, H., P., J. Urol. [1979] 122: 487-491). Una porción significativa del estroma es músculo liso (McNeal, 1990) que está bajo control nervioso simpático. Las propiedades contráctiles de este músculo liso podrían explicar el componente dinámico de la obstrucción en la HPB (Bruschini, H. *et al.* [1978] Invest. Urol. 15(4): 288-90; Lepor, H. [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 651-658).

45 Además del control simpático del estroma prostático, la próstata está sumamente inervada. Las fibras nerviosas de la próstata entran en la próstata desde la cara lateral posterior con una concentración de ganglios cerca de la unión entre la próstata y las vesículas seminales (Maggi, C.A., ed. [1993] Nervous control of the Urogenital System, Harwood Academic Publishers; Higgins, J.R.A. y Gosling, J. A. [1989] Prostate Suppl. 2: 5-16). Se ha descrito acetilcolina (ACH), neuropéptido Y (NPY), péptido intestinal vasoactivo (VIP) y fibras de noradrenalina en esta glándula. Un plexo rico en cuerpos de células nerviosas positivas para ACH está asociado a los acinos secretores en toda la glándula. Algunas de las fibras de ACH también contienen neuronas de NPY. Se ha descubierto que las neuronas que contienen VIP están asociadas a los cuerpos de células nerviosas que contienen ACH. Se han descubierto neuronas ocasionales entre las fibras nerviosas que se tiñen para ACH, lo que sugiere que tanto las neuronas de NPY como las neuronas noradrenérgicas inervan el músculo liso (Higgins, J.R.A. y Gosling, J.A. [1989] Prostate Suppl. 2: 5-16).

55 Los nervios autónomos están distribuidos uniformemente entre las zonas central y periférica de la próstata (Higgins,

J.R.A. y Gosling, J.A. [1989] Prostate Suppl. 2: 5-16). El control neuronal periférico es similar. Además, no hay ninguna diferencia en el tipo de fibras nerviosas que se han hallado asociadas a elementos epiteliales o estromales de la glándula.

5 Los estudios anatómicos de los tipos de fibras nerviosas de la próstata, unidos a otros estudios de la inervación del estroma prostático (Brushing H., Schmidt, R.A., Tanagho, E.A., [1978] Invest. Urol. 15(4): 288-290; Watanabe, H., Shima, M., Kojima, M., Ohe, H.L. [1989] Pharmacol. Res. 21(Supl. 2): 85-94) sugieren que la inervación colinérgica influye en el comportamiento epitelial, mientras que la inervación adrenérgica influye en el tono estromal (excitabilidad). Estas observaciones han proporcionado un fundamento para el uso, por ejemplo, de bloqueadores alfa en el tratamiento de HPB. Los efectos de los bloqueadores alfa (Downie, J.W. y Bialik, G.J. [1988] J. Pharmacol. Exp. Ther. 246(1): 352-358) pueden suponer también mejoras de los síntomas de HPB como resultado de la modulación del comportamiento del esfínter estriado disfuncional por parte de los bloqueadores alfa.

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

15 Se ha demostrado que los cambios del comportamiento celular registrado electrofisiológicamente y de la concentración de neuropéptidos en la médula espinal son una consecuencia secundaria del pinzamiento mecánico de los músculos de la cola de una rata, la estimulación mediante catéter de la uretra posterior, y la electroestimulación de un nervio periférico. La disinerxia entre el detrusor y el esfínter uretral es un hallazgo significativo en pacientes con prostatodinia. Se ha demostrado que la denervación de la próstata produce cambios drásticos en el epitelio prostático. Así, hay pruebas de que se pueden producir alteraciones inducidas experimentalmente de las influencias neurológicas en el sacro, médula espinal, vejiga o uretra por medio de métodos mecánicos, eléctricos, químicos o térmicos (microondas, láser) para cambiar el comportamiento irritativo. Sin embargo, no ha habido intentos conocidos de usar neurotoxinas para aplicaciones terapéuticas.

20 Existe una correlación escasa entre el grado de agrandamiento prostático y la gravedad de los síntomas. Aunque un 80% de los hombres de 70 años muestran HPB tras exploraciones mediante ecografía transrectal, solamente un 20% necesitan cirugía (Coffey, D.S. y Walsh, P.C. [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 461-475), el tratamiento de elección para HPB (Fowler, F.J. Jr., Wennberg, J.E., Timothy, R.P. [1988] J. Amer. Med. Assoc., 259(20): 3022-3028). Los síntomas de irritación pueden sobrepasar con mucho los síntomas esperados basándose en el tamaño de la próstata. Los síntomas pueden mejorar tras el tratamiento quirúrgico de HPB mediante procedimientos tales como resección transuretral de la próstata (TURP) (Christensen, Aagaard, M.M. J., Madsen, P.O. [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 621-629), dilatación mediante globo (Dowd, J.B. y Smith, J.J. III [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 671-677), o hipertermia prostática (Baert, L., Ameye, F., Willemsen, P., *et al.*, [1990] J. Urol. 144: 1383-1386). Sin embargo, los síntomas persisten hasta en un 15% de los pacientes de HPB (Baert, L., Ameye, F., Willemsen, P., *et al.*, [1990] J. Urol. 144: 1383-1386; Wennberg, J.E., Mullaly, A.G., Hanley, D., Timothy, R.P., Fowler, F.J., Roos, R.P., Barry, M.J. *et al.*, [1988] J. Amer. Med. Assoc. 259: 3027-3030). Hasta un 25% de los pacientes de HPB se someten a procedimientos secundarios en estudios de seguimiento a largo plazo, lo que sugiere que las aproximaciones quirúrgicas no abordan los mecanismos fundamentales que producen la HPB, es decir, la influencia neurológica defectuosa (mecanismo de control) sobre la integridad del tracto urinario inferior.

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

30 La presente invención usa métodos químicos y no químicos, en particular neurotoxinas, para modular trastornos urológicos mediados neuronalmente y trastornos relacionados. Por ejemplo, tales métodos se pueden usar para tratar HPB y afecciones relacionadas, tales como prostatitis. La presente invención también puede eliminar el desencadenamiento de cambios en el SNC mediante métodos no químicos que incluyen la bio-autoregulación, o mediante métodos químicos que tratan HPB y otras afecciones urológicas mediante la administración de sustancias que bloquean diversas actividades neurológicas, tales como, por ejemplo, neurotoxinas seleccionadas.

OBJETIVOS Y SUMARIO DE LA PRESENTE INVENCION

Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos seguros y económicos para pacientes ambulatorios para incrementar la capacidad de la vejiga de un paciente de incontinencia de urgencia.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar composiciones para este objetivo terapéutico. Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar dosis y métodos de administración para composiciones útiles para la prevención y el tratamiento de esta afección neurológica-urológica.

5 Otros objetivos de la presente invención serán fácilmente evidentes para las personas de experiencia habitual en la técnica.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una toxina botulínica para uso en un método de tratamiento como se define en la reivindicación 1 adjunta. Se prefiere que la toxina botulínica inhiba la función sináptica. Tal inhibición produce una denervación selectiva, y, por ejemplo, la atrofia de la próstata y la inversión de los síntomas irritativos asociados al agrandamiento prostático. En una realización de la presente invención, la toxina botulínica induce la disfunción del terminal neuronal presináptico mediante la unión específica y el bloqueo de la liberación de acetilcolina en las conexiones mioneurales. Tal toxina botulínica puede ser, por ejemplo, toxina botulínica de tipo A (p.ej., Botox, Allergen).

Preferiblemente, la toxina botulínica es segura, muy selectiva y fácil de administrar, también cuando se combina con otras terapias. La administración de la toxina botulínica es mediante inyección.

15 Una cantidad terapéuticamente eficaz de la toxina botulínica es la dosis suficiente para inhibir la actividad neuronal durante al menos una semana, más preferiblemente un mes, lo más preferiblemente durante aproximadamente 6 a 8 meses o más. La dosis puede ser una dosis única o acumulativa (dosis en serie), y un experto en la técnica la puede determinar fácilmente. La toxina botulínica se puede administrar en serie (es decir, una vez al mes, una vez cada seis meses), de manera que se puede optimizar el efecto terapéutico. Tal calendario de dosis puede ser determinado fácilmente por un experto en la técnica basándose, p.ej., en el tamaño del paciente y la afección a tratar, y dependerá de muchos factores, que incluyen la toxina botulínica seleccionada, la afección a tratar, el grado de irritación, y otras variables. Un curso de tratamiento propuesto para HPB es 200 unidades cada tres días hasta la DL50 para Botox o aproximadamente 2500 unidades.

25 Los métodos de tratamiento anteriormente mencionados deberían ser especialmente útiles para el control a largo plazo de los trastornos neurológicos-urológicos definidos sin necesidad de intervención quirúrgica. Además, el método posibilita el control del trastorno neurológico-urológico definido de una manera muy selectiva, sin los efectos secundarios y los fallos de tratamiento potenciales asociados a las modalidades de tratamiento actuales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

30 "Afección o trastorno urológico-neurológico" incluye muchas afecciones médicas en urología originadas por una disfunción y/o degeneración espástica de los arcos reflejos sacros. Los ejemplos de tales afecciones incluyen el dolor pélvico (p.ej., cistitis intersticial, endometriosis, prostatodinia, síndromes de inestabilidad uretral), elementos miofasciales pélvicos (p.ej., esfínter elevador, dismenorrea, fístula anal, hemorroides), incontinencia urinaria (p.ej., motora o sensorial, vejiga inestable, esfínter inestable), trastornos de la próstata (p.ej., HPB, cáncer de próstata), infección recurrente (secundaria a espasticidad del esfínter), y retención urinaria (secundaria a esfínter espástico, cuello de la vejiga hipertrofiado), y disfunción de la vejiga neurogénica (p.ej., enfermedad de Parkinson, lesión de la médula espinal, ictus, esclerosis múltiple, reflejo espasmódico) y otras afecciones urológicas de etiología nerviosa. La presente invención está relacionada con la incontinencia de urgencia.

40 Sin desear limitarse por ninguna teoría, la base del tratamiento de la afección neurológica-urológica según la invención es la eliminación o modulación de la base neurológica de la regulación disfuncional del tejido afectado. Se prefiere que la toxina botulínica provoque una inhibición duradera de la función sináptica, preferiblemente durante más de una semana, más preferiblemente durante más de un mes, lo más preferiblemente seis a ocho meses o más. Se usa toxina botulínica en la presente invención, preferiblemente la toxina botulínica A, más preferiblemente Botox (Allergen).

45 La toxina se puede formular en cualquier formulación farmacéuticamente aceptable en cualquier forma farmacéuticamente aceptable. Tales formas y formulaciones incluyen líquidos, polvos, cremas, emulsiones, píldoras, trociscos, supositorios, suspensiones, soluciones, y similares. La toxina se puede usar también en cualquier forma farmacéuticamente aceptable suministrada por cualquier fabricante.

50 En una realización preferida de acuerdo con el método de la presente invención, la toxina botulínica es toxina botulínica de tipo A. Las cantidades terapéuticamente eficaces de toxina botulínica pueden ser cualquier cantidad o dosis que sean menores de la dosis tóxica, por ejemplo, menos de aproximadamente 3000 UI/70 kg de peso corporal de un hombre, preferiblemente de 100 UI/70 kg de peso corporal de un hombre a 1200 UI/70 kg. Las dosis se pueden administrar en forma de una única dosis, o en forma de dosis divididas, por ejemplo, divididas a lo largo del transcurso de cuatro semanas.

55 La toxina botulínica se puede inyectar mediante uretroscopia con 200 UI con una dosificación única o en serie. Preferiblemente, la toxina botulínica se inyecta cada tres días hasta que se consigue un efecto terapéutico o hasta aproximadamente 2500 unidades.

Se usan las siguientes técnicas en esta invención:

Preparación de Tejidos para Microscopía Óptica

5 Los tejidos se fijan en paraformaldehído al 6% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2, durante 24 horas, se deshidratan en alcohol graduado y xileno, y se incrustan en parafina. Los cortes se cortan y se tiñen con tintes adecuados, tales como hematoxilina/eosina.

Preparación de Tejidos para Microscopía Electrónica

10 Los tejidos se recogen y se fijan en glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2, durante 1 hora a 4 °C, y después se incuban con tetróxido de osmio al 0,1% durante 1 hora y se incrustan en EPON. Se preparan cortes de ultratina (Philips, modelo 201).

Tinción de TUNEL para Apoptosis

15 El tejido se fija y se incrusta como se describió anteriormente. Los tejidos se desparafinan y se hacen reaccionar con Proteinasa K (Boehringer). Se tratan adicionalmente con peroxidasa y enzima TDT y se colocan en un humidificador ajustado a 37 °C durante una hora. Los cortes se lavan y se añade anti-digoxigenina-peroxidasa durante 30 minutos, seguido de tinción con níquel-DAB (diaminobenceno).

Estudios de Inmunohistoquímica

20 La presencia de los neuropéptidos VIP, SP, NPY, L-Enk y péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), así como la expresión del factor beta de crecimiento transformante (TFG-beta), factor alfa de crecimiento transformante (TGF-alfa), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) se determinó en los tejidos prostáticos mediante el uso de anticuerpos monoclonales adecuados. El uso de neurotoxinas da como resultado la atrofia prostática, que se debería evidenciar por los niveles menores de factores de crecimiento en el tejido prostático tratado.

25 Los cortes se incuban durante la noche a temperatura ambiente con anticuerpos primarios, seguido de inmunotinción con avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC, Vector Labs, EE.UU.). En estas preparaciones se usa antisuero policlonal de conejo hacia los neurotransmisores VIP, CGRP, SP, NPY y L-Enk (Peninsula Labs, EE.UU.), a diluciones de 1:8000 a 1:12.000. Los controles inmunocitoquímicos consisten en preabsorber el antisuero primario con el antígeno adecuado, o su sustitución con suero normal (Blasi, J., Chapman, E. R., Yamaskai, S., Binz, T., Niemann, H y Jahn, R. [1993] The EMBO Journal 12: 4821-4828; Black, J.D. y Dolly, J.O. [1986] J. Cell Biol. 103: 535-544; Linial, M. [1995] Is. J. Med. Sci. 31: 591-595). Después de colocarlos en los portaobjetos, se aplica una tinción de contraste a los cortes con eosina, se deshidratan y se cubren con cubreobjetos.

30

Análisis de Transferencia de Western de la Expresión de Factores de Crecimiento

35 Se examina la expresión de factores de crecimiento en los homogeneizados de células de próstata tratados y sin tratar mediante análisis de transferencia de Western. La proteína del homogeneizado celular se separa mediante electroforesis en SDS-PAGE (7%), después se transfiere mediante electroforéticamente durante la noche a papel de nitrocelulosa (Towbin, H., *et al.*, [1979] Proc. Nat. Acad. Sci. 76(9): 4350-4379). El papel de nitrocelulosa se empapa durante una hora a temperatura ambiente en leche en polvo descremada al 0,5% disuelta en solución salina tamponada con fosfato, y se empapa adicionalmente a 4 °C durante la noche en solución bloqueante (albúmina de suero bovino al 2% en Tris 10 mM/NaCl 0,15 M/azida sódica al 0,1%, pH 7,4). Las membranas de nitrocelulosa se incuban con anticuerpos (fracciones de IgG de anti-TGF-beta, anti-TGF-alfa, anti-EGF y anti-bFGF) purificados mediante proteína A (1 x 10⁶ cpm/ml) en tampón bloqueante durante 1 hora. La membrana se lava con PBS que contiene Nonidet P-40 entre incubaciones. Se expone película X-O-mat AR2 (Kodak) a la membrana a -70 °C, y las películas se revelan para examinar la expresión de los factores de crecimiento.

40

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

45 La expresión de c-fos y c-myc en tejido prostático tratado y sin tratar se determina mediante análisis de transferencia de Northern como sigue. El tejido se homogeneiza en tampón de lisis durante 15 segundos o hasta que el tejido se homogeneiza. Se añade acetato sódico, y la disolución se mezcla con agitación. Se añade un volumen igual de fenol saturado en agua y se mezcla mediante inversión, seguido por la adición de cloroformo/alcohol isoamílico. La disolución se agita en vórtex vigorosamente durante 30 segundos y se deja reposar en hielo durante 15 minutos. La disolución se centrifuga durante 10-20 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, la fase acuosa se aspira cuidadosamente y se coloca en un tubo de polipropileno nuevo. Se añade un volumen de isopropanol y la disolución se mezcla mediante agitación. La disolución se coloca en un congelador a -20 °C durante al menos 60 minutos para precipitar el ARN. Tras la precipitación, el tubo se centrifuga durante 10 minutos, y el sobrenadante se decanta, dejando el sedimento de ARN. Se añade un ml de etanol, y el tubo se centrifuga durante otros 10 minutos. La fase acuosa se desecha, y el sedimento se lava con etanol al 100% mediante agitación en vórtex. El sedimento de ARN se redissuelve en 0,4 ml de tampón de lisis. El ARN se vuelve a precipitar mediante la adición de etanol al 100% e

55

incubación en un congelador a -20 °C durante al menos 60 minutos. La disolución se centrifuga, y el sobrenadante se desecha. La concentración de ARN se determina diluyendo 5 µL de muestra en 995 µL de DEPC-agua y midiendo la proporción de absorbancia a 260/280 nm.

5 Los siguientes ejemplos se proporcionan como un modo de describir las realizaciones específicas, sin pretender limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1 (Referencia)

Denervación de la Próstata

10 Se lleva a cabo la denervación unilateral de la próstata mediante la extracción de los ganglios pélvicos, que recubren la próstata de la rata. Esta aproximación preserva la integridad funcional de la vejiga y la uretra posterior, y elimina la posibilidad de que surja un artefacto a partir de perturbaciones importantes en el flujo sanguíneo o la micción. Los animales de control se someten a operaciones simuladas sin denervación concurrente de la próstata. Tras la denervación, se permite que los animales se recuperen, y se mantienen antes de la recogida de la próstata. La próstata se conserva, se prepara para microscopía óptica y se examina histológicamente. Los hallazgos principales son (1) altura reducida de células epiteliales debida principalmente a una disminución de la zona supranuclear clara (debida a una reducción de la cantidad y del tamaño de las cisternas apicales y del retículo endoplásmico); (2) cambios importantes en la expresión de proteínas mediante electroforesis en gel de SDS (el retículo endoplásmico es importante en la síntesis de proteínas) (3) reducción modesta del número de gránulos secretores; (4) un incremento de las vacuolas intracelulares, espacios vacíos intercelulares y reducción de microvellosidades en la superficie celular; y (5) se sabe que un incremento significativo del contenido de factor de crecimiento nervioso (NGF) ipsilateral a la denervación respecto del grupo de control (188 ± 10 frente a 46 ± 20 frente a 29 ± 16 pg/g de tejido húmedo (\pm DE)) de NGF influye solamente en las neuronas simpáticas y sensoriales. N = 15 tanto en el grupo de control como en el experimental.

Ejemplo 2 (Referencia)

Efecto de la Inyección de Neurotoxina sobre la Próstata Normal: Próstata de Rata

25 Las ratas se asignaron aleatoriamente a tres grupos. El primer grupo recibió una única dosis aguda de toxina botulínica de tipo A (Botox, Allergen) de 5, 10 ó 15 UI. Estos animales se sacrificaron una semana después de la inyección. El segundo grupo recibió una serie de 4 inyecciones semanales de 5 UI de toxina botulínica y se sacrificaron a las 5 semanas. Las ratas de control recibieron inyecciones de solución salina. Las inyecciones se llevaron a cabo en forma de inyecciones únicas o en serie en el lóbulo anterior izquierdo y/o derecho de la próstata. Se debe apreciar que una inyección de azul de metileno en un lóbulo de la próstata de rata mostró una difusión inmediata hacia el lóbulo opuesto. Así, había una comunicación entre los lóbulos de la próstata y, por lo tanto, el lóbulo contralateral no se pudo usar como un verdadero control comparativo.

30 El peso de cada lóbulo anterior de próstata recogido de animales sanos fue de aproximadamente 0,50 gramos. Todos los animales tratados con toxina mostraron una contracción del volumen de la próstata, primero en el lóbulo inyectado, y con las inyecciones posteriores, una reducción del volumen global. Después de cuatro inyecciones en serie, el lóbulo izquierdo de la próstata pesó 0,12-0,17 gramos, mientras que el lóbulo derecho pesó 0,10-0,14 gramos. Esto representó una reducción de más de dos tercios del tamaño original.

Ejemplo 3

Efecto de la Inyección de Neurotoxina sobre las Disfunciones Urológicas: Datos en Seres Humanos

40 Parte 1 (Referencia)

Tres pacientes con disfunción recalcitrante de la micción se trataron con inyecciones de toxina botulínica (Botox) como sigue. El paciente 1 fue un hombre de 47 años que era incontinente secundariamente a una lesión mantenida en las vértebras cervicales (nivel C6-C7) mantenida previamente 14 meses. Las características urodinámicas al presentarse revelaron una capacidad de la vejiga de 30 cc y un esfínter débil (presión uretral máxima de 40 cm de agua). Múltiples regímenes farmacológicos fracasaron en él, y fue intolerante a dispositivos de fijación/condón para el pene.

45 Recibió cuatro inyecciones semanales de 200 UI de toxina botulínica a la semana en el cuello de la vejiga, para una dosis total de 800 UI. Tras las inyecciones, la capacidad de la vejiga varió en 300-400 cc con oxibutinina y 150-200 cc sin oxibutinina. Las presiones máximas de la vejiga antes de la inyección habían sido de 200 cm de agua, en comparación con presiones de la vejiga tras la inyección de 40 cm de agua. El paciente era continente con una pinza de pene tras el tratamiento con toxina botulínica. Además, la capacidad de caminar y las erecciones mejoraron debido a la espasticidad reducida de la vejiga.

Parte 2

La paciente 2 fue una mujer de 55 años parapárética en T12 de forma secundaria a una lesión traumática 14 años antes. La paciente presentaba incontinencia de urgencia, y se había sometido a auto-cateterización cada 2 horas durante el día y dos veces por la noche. La paciente recibió inyecciones en la pared lateral de la vejiga en dos inyecciones por semana de 200 UI cada una hasta un total de 400 UI de toxina botulínica. Los datos diarios de micción de la paciente revelaron capacidades antes de la inyección de 150-200 cc. Tras la inyección, los datos diarios indicaron una capacidad incrementada de la vejiga hasta 300-400 cc. Además, la paciente ya no tuvo la molesta disfunción de tipo urgente constante, durmió toda la noche y fue continente con la auto-cateterización cada 4 horas.

10 Parte 3 (Referencia)

El paciente 3 fue un hombre de 65 años con dolor perineal discapacitante tras un tratamiento de radiación para cáncer de próstata. La terapia médica había fracasado en el paciente. Se le trató con una inyección de 200 UI de toxina botulínica en el esfínter uretral externo. El paciente experimentó un alivio drástico del dolor testicular, y tuvo un dolor mucho menos intenso en el eje del pene. Las erecciones no se vieron afectadas.

15 Ejemplo 4 (Referencia)

Determinación de la dosis eficaz más Baja

Se inyecta a las ratas en los lóbulos anteriores de la próstata dosis únicas y en serie de toxina botulínica (Botox). Las próstatas se recogen a intervalos de tiempo diferentes para determinar la dosis eficaz más baja, así como los cambios morfológicos y fisiológicos que tienen lugar con el tiempo. La dosis eficaz más baja se define como la dosis que mostraría una disminución del volumen de la próstata.

Para determinar la respuesta a la estimulación mediante campos eléctricos, las preparaciones se disponen entre dos electrodos de platino colocados en el baño de órganos. Se ajusta la tensión de las preparaciones. La estimulación transparietal de los nervios se lleva a cabo mediante el uso de un estimulador Danted Neuromatic 2000 que suministra impulsos simples de ondas cuadradas a una tensión supramáxima con una duración de 0,8 milisegundos a una frecuencia de 0,5 a 80 hercios. La polaridad de los electrodos se cambia después de cada impulso por medio de una unidad de cambio de la polaridad. La duración de la serie de impulsos es de cinco segundos, y el intervalo de la serie es de 120 segundos. La tensión isométrica se registra mediante el uso de un registrador de 8 canales de termo-matriz Gould. Se llevan a cabo experimentos diferentes para determinar la tensión de precarga que produce respuestas óptimas. Además, se determina el efecto de la estimulación mediante campo eléctrico en presencia de diferentes concentraciones de neuropéptidos individuales. Estos neuropéptidos son adrenalina 10-20 μM , clonidina 10 μM , regitina 5-50 nM, acetilcolina 10 nM - 0,1 μM , atropina 1 - 3 μM , nifedipina 1 nM - 10 μM , VIP 1 - 10 nM y NPY 1 - 250 nM. También se examina en estos tejidos el efecto del nitroprusiato (una sustancia que libera óxido nítrico) y azul de metileno (un inhibidor de la guanilato ciclasa) sobre el tono de la próstata y la contracción resultante de la estimulación mediante el campo.

35 Ejemplo 5 (Referencia)

Efecto de la Toxina Botulínica sobre el Tejido Prostático de Ratas: Comparación de Ratas Hormonalmente Intactas con Ratas Privadas de Hormonas

Para determinar si hay alguna interacción entre la neurotoxina y las hormonas derivadas de testículo, se llevan a cabo estudios que examinarán la interacción de la neurotoxina con los componentes hormonales. Estos estudios compararán el tejido prostático tratado con toxina botulínica recogido de ratas a las que se ha sometido a orquiectomía (ratas con eliminación de hormonas) y tejido prostático de ratas tratadas con toxina botulínica que no se sometieron a orquiectomía. Cincuenta y dos ratas de la misma edad se tratan como se describe en continuación. Cuatro ratas sanas se someterán a una operación simulada que consiste en la inducción de anestesia, exposición de la próstata e inyección de 0,2 cc de solución salina en el lóbulo anterior izquierdo de la próstata. A tres ratas se les somete a una orquiectomía bilateral sin inyección en la próstata (controles con eliminación de hormonas), cinco ratas se someterán a orquiectomía e inyección de 0,2 ml de solución salina en el lóbulo anterior izquierdo (control de eliminación de hormonas + tensión quirúrgica). Cuatro grupos de ratas reciben inyecciones de toxina botulínica de 0,5 UI, 1,0 UI, 1,5 UI y 2,5 UI solamente (ratas experimentales hormonalmente intactas). Dieciséis ratas se someten a una orquiectomía bilateral. Ocho de estas ratas se tratan con una única inyección de 2,5 UI de toxina botulínica en el lóbulo anterior izquierdo 5 semanas tras la cirugía. Todas las ratas se sacrifican después de seis semanas, y la próstata recogida se prepara para su examen como se describió anteriormente. Se espera un efecto atrófico similar en el epitelio glandular.

Ejemplo 6 (Referencia)

Efectos de la Toxina Botulínica en los Pacientes

55 Los pacientes afectados por hiperplasia prostática benigna, prostatitis abacteriana o prostatodinia se estudian tanto

antes como después del tratamiento con toxina botulínica. Los pacientes son elegibles para la inclusión en este estudio si están afectados por HPB entre las edades de 40 y 80 años, o si tienen entre 25 y 60 años y se les ha diagnosticado una prostatitis abacteriana o prostatodinia. Los pacientes preferidos son aquellos que no son buenos candidatos para la cirugía. Los pacientes se estudian antes del tratamiento mediante la determinación de los niveles de antígeno prostático específico (PSA), determinación de los parámetros urodinámicos (cistometrograma, perfil de presión uretral y flujometría), determinación de la puntuación de síntomas de la American Urological Association (AUA) (Barry, M.J., *et al.*, [1992] J. Urol., 148: 1549-1557), mantenimiento de una micción diaria, y examen de la próstata mediante ecografía transrectal con biopsia (para pacientes de HPB solamente). Una semana después de completar el estudio inicial, se inyectan al paciente por vía uretroscópica 200 UI de toxina botulínica en forma de inyecciones unilaterales únicas, inyecciones unilaterales en serie o inyecciones bilaterales. Los pacientes de HPB se tratan mediante TURP, o se someten a TURP-biopsia de control 7 días después de una inyección única o 5 semanas después de inyecciones en serie. Los tejidos prostáticos recogidos se preparan para el examen como se describió en los Ejemplos 1, 2, 3 y 7-10. Los pacientes se vuelven a estudiar después de la inyección mediante el uso de los mismos parámetros examinados durante el estudio inicial.

15

Reivindicaciones

1. Una toxina botulínica para uso en el tratamiento de la incontinencia de urgencia incrementando la capacidad de la vejiga del paciente, siendo la toxina botulínica para la administración mediante inyección en la pared lateral de la vejiga.
- 5
2. Una toxina botulínica para uso según la reivindicación 1, en la que la capacidad de la vejiga se incrementa desde aproximadamente 150 cc antes de la administración hasta aproximadamente 300-400 cc después de la administración.