

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 217**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61L 31/00** (2006.01)

**A61P 13/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07797720 .5**

96 Fecha de presentación: **24.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2056866**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.2009**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de una estenosis de uretra con una toxina botulínica**

30 Prioridad:

**02.06.2006 US 446403**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**19.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**19.12.2012**

73 Titular/es:

**ALLERGAN, INC. (100.0%)  
2525 DUPONT DRIVE  
IRVINE CA 92612, US**

72 Inventor/es:

**BROOKS, GREGORY F. y  
DONOVAN, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 393 217 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

Métodos para el tratamiento de una estenosis de uretra con una toxina botulínica

**Antecedentes**

5 La presente invención está relacionada con métodos para tratar una estenosis uretral en un mamífero, tal como un paciente humano. En particular, la presente invención está dirigida a usos en métodos para tratar una estenosis uretral utilizando un stent al que se ha asociado una toxina botulínica, tal como por revestimiento o incrustación del stent con la toxina botulínica.

10 Una uretra es un tubo o vaso que lleva orina desde la vesícula al exterior del cuerpo (Figura 1). El tubo de la uretra típicamente es más largo en los hombres que el tubo de uretra en las mujeres (véanse las Figuras 2a y 2b, respectivamente).

15 Una estenosis uretral es una estrechez anormal del tejido no muscular de la uretra (véase la Figura 1). Una estenosis uretral puede ser causada por una inflamación, isquemia o trauma en el lugar de la uretra. Por ejemplo, una inflamación, isquemia o trauma en el lugar de la uretra pueden provocar un tejido cicatrizado en la misma. Una vez formado, el tejido de cicatriz se contrae y provoca la estenosis uretral. Una estenosis uretral no es debido a un espasmo de un músculo uretral, tal como en el caso del espasmo muscular en un esfínter detrusor. La estenosis uretral adquirida es un problema común en pacientes masculinos en los que la uretra se estrecha, generalmente por una infección o trauma. Patológicamente, la abertura uretral se estrecha por una acumulación de tejido fibroso. La estenosis resultante de abertura uretral dificulta la excreción de orina.

20 El término estenosis uretral se refiere generalmente a la uretra anterior y es derivada de la cicatrización en el tejido eréctil esponjoso del cuerpo esponjoso. Una estenosis uretral posterior se debe a un proceso fibroso que estrecha el cuello de la vejiga y generalmente es el resultado de una herida por separación derivada de un trauma o una cirugía, tal como prostatectomía radical.

25 Una técnica común para tratar una estenosis uretral es la dilatación de la uretra, por ejemplo por inserción de un stent uretral. La colocación de un stent es un procedimiento en el que una estructura cilíndrica (stent) es colocada en un órgano tubular hueco, p. ej. la uretra, para proporcionar un apoyo artificial y mantener bien abierta la abertura. Sin embargo, uno de los problemas asociados con esta técnica es que el proceso de dilatación puede provocar una cicatrización adicional, que finalmente puede empeorar la estenosis.

30 Una técnica alternativa para tratar una estenosis uretral es una uretrotomía interna, que implica la incisión de la estenosis de manera transversal a la uretra. La incisión permite la liberación del tejido de cicatriz. Sin embargo, hay complicaciones frecuentes con esta técnica. Por ejemplo, las complicaciones incluyen la reaparición de la estenosis, sangrado, extravasación de fluido de irrigación en tejidos peri-esponjosos y un aumento de la respuesta fibrótica.

La tasa de éxito para el tratamiento de una estenosis uretral con las técnicas tradicionales no es muy buena, debido a las complicaciones ya mencionadas. Por lo tanto, existe la necesidad de un método mejorado para tratar una estenosis uretral.

35 **Toxina botulínica**

40 La toxina botulínica Clostridium, bacteria Gram positiva anaerobia, produce una neurotoxina poderosa de polipéptido, toxina botulínica, que causa una enfermedad neuroparalítica en humanos y animales denominada como botulismo. Las esporas de la toxina botulínica Clostridium se encuentran en la tierra y pueden crecer en recipientes de alimentos sellados y esterilizados de manera inapropiada de fábricas de conservas con base en hogares, que es la causa de muchos de los casos del botulismo. Los efectos del botulismo aparecen típicamente de 18 a 36 horas después de comer los comestibles infectados con un cultivo o esporas de toxina botulínica Clostridium. La toxina botulínica puede pasar aparentemente sin atenuación por el forro del intestino y atacar a las neuronas motrices periféricas. Los síntomas por intoxicación de toxina botulínica pueden progresar desde dificultad para andar, tragar y hablar hasta parálisis de los músculos respiratorios y la muerte.

45 La toxina botulínica de tipo A ("BoNT/A") es el agente biológico natural más mortal conocido por el hombre. Aproximadamente 50 picogramos de toxina botulínica (complejo de neurotoxina purificada) serotipo A es un LD<sub>50</sub> en ratones. Una unidad (U) de toxina botulínica se define como el LD<sub>50</sub> tras la inyección intraperitoneal en ratones hembra Swiss-Webster con un peso de 18-20 gramos cada uno. Se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas inmunológicamente distintas, estas son respectivamente los serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F y G, cada uno de los cuales se distingue por la neutralización con anticuerpos específicos del serotipo. Los diferentes serotipos de toxina botulínica varían en la especie animal a la que afectan y en la gravedad y la duración de la parálisis que provocan. Por ejemplo, se ha determinado que el BoNT/A es 500 veces más potente, medido por la tasa de parálisis producida en la rata, que el serotipo B de toxina botulínica (BoNT/B) Adicionalmente, se ha determinado que la toxina botulínica de tipo B ("BoNT/B") no es tóxica en primates en una dosis de 480 U/kg que es  
55 aproximadamente 12 veces el LD<sub>50</sub> de primate para el BoNT/A. La toxina botulínica se enlaza con gran afinidad a las neuronas motrices colinérgicas, es trasladada a la neurona y bloquea la liberación de acetilcolina.

Las toxinas botulínicas han sido utilizadas en ámbitos clínicos para el tratamiento de desórdenes neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. El BoNt/A ha sido aprobado por U.S. Food and Drug Administration (Administración de Fármacos y Alimentos de EE.UU.) para el tratamiento de blefaroespasmos, estrabismo, espasmo hemifacial y distonía cervical. Adicionalmente, la FDA ha aprobado una toxina botulínica de tipo B para el tratamiento de la distonía cervical. Los serotipos A de toxina botulínica tienen aparentemente una menor potencia y/o una duración más corta de actividad en comparación con BoNt/A. Los efectos clínicos de BoNt/A intramuscular periférico se ven generalmente en menos de una semana tras la inyección. La duración típica de alivio sintomático por una sola inyección intramuscular de BoNt/A promedia aproximadamente tres meses.

Aunque todos los serotipos de toxina botulínica inhiben aparentemente la liberación de acetilcolina neurotransmisora en la unión neuromuscular, lo hacen afectando a diferentes proteínas neurosecretoras y/o dividiendo estas proteínas en sitios diferentes. Por ejemplo, los serotipos A y E de toxina botulínica escinden la proteína sinaptosomal asociada de 25 kiloDalton (kD) (SNAP-25), pero se dirigen a diferentes secuencias de aminoácidos dentro de esta proteína. BoNT/B, D, F y G actúan en la proteína asociada a la vesícula (VAMP, también denominada sinaptobrevina), con cada serotipo que escinde la proteína por un sitio diferente. Por último, el serotipo C<sub>1</sub> de toxina botulínica (BoNT/C<sub>1</sub>) ha demostrado que escinde tanto la sintaxina como la SNAP-25. Estas diferencias en el mecanismo de acción pueden afectar a la potencia y/o la duración relativas de acción de los diversos serotipos de toxina botulínica.

Independientemente del serotipo, el mecanismo molecular de intoxicación de toxina parece ser similar e implicar por lo menos tres etapas o fases. En la primera etapa del proceso, la toxina se une a la membrana presináptica de la neurona de destino mediante una interacción específica entre la cadena H y un receptor de superficie de célula; el receptor está pensado para ser diferente para cada serotipo de toxina botulínica y para la toxina de tétanos. El segmento final carboxilo de la cadena H, H<sub>C</sub>, parece ser importante para dirigir la toxina a la superficie de la célula.

En la segunda etapa, la toxina cruza la membrana de plasma de la célula envenenada. La toxina es tragada primero por la célula a través de endocitosis con la medicación del receptor, y se forma un endosoma que contiene la toxina. La toxina entonces se escapa del endosoma al citoplasma de la célula. Esta última etapa está pensada para tener la medicación del segmento final de amino de la cadena H, H<sub>N</sub>, que provoca un cambio de conformación de la toxina en respuesta a un pH de aproximadamente 5,5 o más bajo. Se sabe que las endosomas poseen una bomba de protones que disminuye el pH intra-endosomal. El cambio de conformación expone residuos hidrófobos en la toxina, lo que permite que la toxina se incruste por sí misma en la membrana endosomal. La toxina entonces es transferida a través de la membrana endosomal al citosol.

La última etapa del mecanismo de actividad de la toxina botulínica parece implicar la reducción del enlace disulfuro que une la cadena H y la L. Toda la actividad tóxica de las toxinas botulínicas y del tétano está contenida en la cadena L de la holotoxina; la cadena L es una endopeptidasa de zinc (Zn<sup>++</sup>) que escinde selectivamente las proteínas esenciales para el reconocimiento y el acoplamiento de vesículas que contienen neurotransmisores con la superficie citoplásmica de la membrana de plasma, y la fusión de las vesículas con la membrana de plasma. La neurotoxina del tétano, toxina botulínica/B/D, /F y /G causa degradación de sinaptobrevina (también denominada proteína de membrana asociada a vesícula (VAMP)), una proteína de membrana sinaptosomal. La mayor parte de la VAMP presente en la superficie citosólica de la vesícula sináptica es eliminada como resultado de cualquiera de estos eventos de escisión. Cada toxina escinde específicamente un enlace diferente.

El peso molecular de la molécula de proteína de toxina botulínica, para los siete serotipos conocidos de toxina botulínica, es aproximadamente 150 kD. De manera interesante, 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 asociadas que no son toxinas. De este modo, el complejo de BoNt/A puede ser producido por la bacteria Clostridial como formas de 900 kD, 500 kD y 300 kD. BoNT/B y C<sub>1</sub> son producidos aparentemente sólo como un complejo de 500 kD. BoNT/D es producido como complejos tanto de 300 kD como de 500 kD. Por último, BoNT/E y F son producidos sólo como complejos de aproximadamente 300 kD.

Se cree que los complejos (es decir, con peso molecular mayor de aproximadamente 150 kD) contienen una proteína de hemaglutinina sin toxina y una proteína de hemaglutinina sin toxina y no tóxica. Estas dos proteínas sin toxina (que junto con la molécula de toxina botulínica comprenden el complejo pertinente de neurotoxina) pueden actuar para proporcionar estabilidad frente a la desnaturalización a la molécula de toxina botulínica y protección contra ácidos digestivos cuando se ingiere la toxina. Adicionalmente, es posible que los complejos más grandes (de peso molecular de más de aproximadamente 150 kD) de toxina botulínica puedan tener como resultado una tasa más lenta de difusión de la toxina botulínica lejos de un lugar de inyección intramuscular de un complejo de toxina botulínica.

Estudios *in-vitro* han indicado que la toxina botulínica inhibe la liberación inducida por catión de potasio de acetilcolina y norepinefrina de cultivos primarios de células de tejido de tronco encefálico. Adicionalmente, se ha informado de que la toxina botulínica inhibe la liberación evocada de glicina y glutamato en cultivos primarios de neuronas de médula espinal y que la toxina botulínica de preparativos de sinaptosoma de cerebro inhibe la liberación de acetilcolina de neurotransmisores, dopamina, norepinefrina, CGRP y glutamato.

BoNt/A puede obtenerse estableciendo y criando cultivos de toxina botulínica Clostridium en un fermentador y luego cosechando y purificando la mezcla fermentada según procedimientos conocidos. Todos los serotipos de toxina botulínica son sintetizados inicialmente como proteínas inactivas de una cadena que deben ser escindidas o melladas mediante proteasas para llegar a ser neuroactivas. Las cepas bacterianas que hacen los serotipos A y G de toxina botulínica poseen proteasas endógenas y los serotipos A y G por lo tanto pueden ser recuperados de cultivos bacterianos en predominantemente su forma activa. Por contra, los serotipos C<sub>1</sub>, D y E de toxina botulínica son sintetizados por cepas no proteolíticas y por lo tanto típicamente no están activos cuando son recuperados del cultivo. Los serotipos B y F son producidos por cepas proteolíticas o no proteolíticas y por lo tanto pueden ser recuperados tanto en la forma activa como inactiva. Sin embargo, incluso las cepas proteolíticas que producen, por ejemplo, el serotipo BoNt/B sólo escinden una parte de la toxina producida. La proporción exacta de moléculas con níquel y sin níquel depende del tiempo de incubación y la temperatura del cultivo. Por lo tanto, un determinado porcentaje de cualquier preparación de, por ejemplo, la toxina BoNt/B es probable de sea inactiva, justificando posiblemente la potencia significativamente más baja conocida de BoNt/B en comparación con BoNt/A. La presencia de moléculas inactivas de toxina botulínica en una preparación clínica contribuirá a la carga total de proteína de la preparación, que ha sido vinculada para aumentar la capacidad de antigenicidad, sin contribuir a su eficacia clínica. Adicionalmente, es sabido que BoNt/B tiene, tras la inyección intramuscular, una duración más corta de actividad y también es menos potente que el BoNt/A con el mismo nivel de dosis.

Se ha informado (como ejemplo) que el BoNt/A ha sido utilizado clínicamente de la siguiente manera:

- (1) aproximadamente 75-125 unidades de BOTOX®<sup>1</sup> por inyección intramuscular (múltiples músculos) para tratar la distonía cervical;
- (2) 5-10 unidades de BOTOX® por inyección intramuscular para tratar arrugas del entrecejo (surcos en la frente) (5 unidades inyectadas intramuscularmente en el músculo prócer y 10 unidades inyectadas intramuscularmente en cada músculo corrugador superciliar);
- (3) aproximadamente 30-80 unidades de BOTOX® para tratar estreñimiento mediante inyección de intraesfínter del músculo puborrectal;
- (4) aproximadamente 1-5 unidades por músculo de BOTOX® inyectado intramuscularmente para tratar blefaroespasma inyectando el músculo orbicular de los ojos pre-tarsal lateral del párpado superior y el orbicular de los ojos pre-tarsal lateral del párpado inferior.
- (5) para tratar estrabismo, los músculos extraoculares han sido inyectados intramuscularmente con entre aproximadamente 1-5 unidades de BOTOX®, la cantidad inyectada varía basándose en el tamaño del músculo en el que se va a inyectar y la magnitud de parálisis de músculo deseada (es decir, cantidad de corrección de dioptrías deseada).
- (6) para tratar espasticidad de miembro superior tras un golpe por inyecciones intramusculares de BOTOX® en cinco músculos flexores diferentes de miembros superiores, de la siguiente manera:
  - (a) flexor profundo de los dedos de las manos: 7,5 U a 30 U
  - (b) flexor superficial de los dedos de las manos: 7,5 U a 30 U
  - (c) flexor ulnar del carpo: 10 U a 40 U
  - (d) flexor radial del carpo: 15 U a 60 U
  - (e) bíceps braquial: 50 U a 200 U. Cada uno de los cinco músculos indicados ha sido inyectado en la misma sesión de tratamiento, de modo que el paciente reciba de 90 U a 360 U de BOTOX® de músculo de miembro superior mediante inyección intramuscular en cada sesión de tratamiento.

Adicionalmente, se conoce la inyección de una toxina botulínica en un esfínter uretral para tratar la incontinencia urinaria o la retención urinaria. Véase p. ej. el documento de Wein AJ., et. al., Toxina botulínica para el Tratamiento de Síntomas del Tracto Urinario Inferior: Una Revisión y Comentario, J Urol, Agosto de 2005; 174(2):610- 2, y la patente de EE.UU. 4.932.936.

La neurotoxina del tétano actúa principalmente en el sistema nervioso central, mientras que la neurotoxina botulínica actúa en la unión neuromuscular; ambas actúan inhibiendo la liberación de acetilcolina del axón de la neurona afectada en la sinapsis, teniendo como resultado la parálisis. El efecto de intoxicación en la neurona afectada es duradero y hasta hace poco se consideraba irreversible. Se sabe que la neurotoxina del tétano existe en un serotipo inmunológicamente distinto.

<sup>1</sup> Disponible de Allergan, Inc., de Irvine, California bajo el nombre comercial BOTOX®.

## Acetilcolina

Típicamente solo se libera un único tipo de neurotransmisor de molécula pequeña por cada tipo de neurona en el sistema nervioso mamífero. La acetilcolina de neurotransmisor es secretada por las neuronas en muchas zonas del cerebro, pero específicamente por las células piramidales grandes de la corteza motriz, por varias neuronas diferentes en los ganglios basales, por las neuronas motrices que inervan los músculos esqueléticos, por las neuronas pregangliónicas del sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático), por las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso parasimpático, y por algunas de las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso simpático. En esencia, sólo las fibras nerviosas simpáticas postgangliónicas a las glándulas sudoríparas, los músculos piloerector y unos pocos vasos sanguíneos son colinérgicos y la mayor parte de las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso simpático secretan la norepinefina de neurotransmisor. En la mayoría de casos la acetilcolina tiene un efecto excitante. Sin embargo, la acetilcolina es conocida por tener efectos inhibitorios en parte de las terminaciones nerviosas parasimpáticas periféricas, tal como inhibición del corazón por el nervio vago.

Las señales eferentes del sistema nervioso autónomo son transmitidas al cuerpo a través del sistema nervioso simpático o el sistema nervioso parasimpático. Las neuronas pregangliónicas del sistema nervioso simpático se extienden desde los cuerpos celulares neuronales simpáticos pregangliónicos situados en el cuerno intermediolateral de la médula espinal. Las fibras simpáticas nerviosas pregangliónicas, que se extienden desde el cuerpo celular, realizan sinapsis con las neuronas postgangliónicas situadas en un ganglio simpático paravertebral o en un ganglio prevertebral. Dado que las neuronas pregangliónicas del sistema nervioso simpático y del parasimpático son colinérgicas, la aplicación de acetilcolina a los ganglios excitará ambas neuronas simpáticas y parasimpáticas postgangliónicas.

La acetilcolina activa dos tipos de receptores, receptores muscarínicos y nicotínicos. Los receptores muscarínicos se encuentran en todas las células efectoras estimuladas por las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso parasimpático, así como en las estimuladas por las neuronas colinérgicas postgangliónicas del sistema nervioso simpático. Los receptores nicotínicos se encuentran en las sinapsis entre las neuronas pregangliónicas y postgangliónicas del simpático y del parasimpático. Los receptores nicotínicos están también presentes en muchas membranas de fibras de músculos esqueléticos en la unión neuromuscular.

La acetilcolina es liberada desde neuronas colinérgicas cuando vesículas pequeñas, claras e intracelulares se funden con la membrana de célula neuronal presináptica. Una gran variedad de células secretoras no neuronales, tal como la médula adrenal (así como la línea celular PC12) y las células pancreáticas islote liberan catecolaminas e insulina, respectivamente, de vesículas grandes de núcleo denso. La línea celular PC12 es un clon de células de feocromocitomas de rata utilizada extensamente como un modelo de cultivo de tejido para estudios del desarrollo simpatoadrenal. La toxina botulínica inhibe la liberación de ambos tipos de compuestos desde ambos tipos de células in vitro, permeabilizadas (como por electroporación) o por inyección directa de la toxina en la célula denervada. También se sabe que la toxina botulínica bloquea la liberación del glutamato de neurotransmisor de cultivos corticales de células de sinaptosomas.

Como se ha explicado antes, la tasa de éxito para el tratamiento de una estenosis uretral con las técnicas tradicionales no es muy buena, debido a diversas complicaciones. Por lo tanto, existe la necesidad de un método mejorado para tratar una estenosis uretral.

## Sumario

La presente invención proporciona compuestos terapéuticos para el uso en métodos para el tratamiento de estenosis uretrales en un mamífero, por ejemplo, en un humano. En algunas realizaciones, los métodos comprenden una etapa de administración de una cantidad efectiva de una toxina botulínica directamente a una uretra del mamífero, tratando con ello la estenosis uretral. Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser administrada en o cerca de la posición de la estenosis. En algunas realizaciones, la toxina botulínica es administrada a la pared de la uretra.

En algunas realizaciones, la toxina botulínica es utilizada junto con un procedimiento para tratar una estenosis de uretra. Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser administrada junto con un procedimiento de colocación de stent. En algunas realizaciones, la administración de la toxina botulínica a la uretra es efectiva para reducir o eliminar daños en la uretra debido al procedimiento de colocación de stent. En algunas realizaciones, la administración es efectiva para reducir o eliminar daños a la uretra al evitar que el epitelio uretral cubra el stent. En algunas realizaciones, la administración es efectiva para reducir o eliminar daños a la uretra al evitar que el stent se incorpore a la pared de la uretra.

La toxina botulínica también puede ser utilizada junto con un procedimiento quirúrgico (p. ej., injertar). La administración de una toxina botulínica junto con estos procedimientos puede ser efectiva para reducir o eliminar daños a la uretra debido a estos procedimientos. En algunas realizaciones, la administración de la toxina botulínica es efectiva para reducir o eliminar la reaparición de la estenosis, sangrando en la uretra, extravasación de fluido de irrigación a tejidos peri-esponjosos y/o un aumento en la respuesta fibrótica.

La toxina botulínica puede ser cualquier toxina botulínica incluyendo toxina botulínica tipo A, B, C, D, E, F, G o las combinaciones de las mismas o las mezclas de las mismas.

Las ventajas y los aspectos adicionales de la presente invención son evidentes en la siguiente descripción y reivindicaciones detallados.

## 5 Definiciones

"Agente" significa una neurotoxina, por ejemplo, una toxina botulínica, para el uso según la presente invención. Un agente puede ser un fragmento de una neurotoxina, una neurotoxina modificada o una neurotoxina variante que posee algo o toda la actividad biológica de una neurotoxina sin modificar.

10 Una "toxina botulínica" puede ser una toxina botulínica nativa o un fragmento funcional de una toxina botulínica o una toxina botulínica modificada. Además, las toxinas botulínicas con supresiones, adiciones, modificaciones o sustituciones de aminoácidos que borran, agregan, alteran o sustituyen un aminoácido individual o un pequeño porcentaje de aminoácidos (por ejemplo, menos de aproximadamente el 5%, o por ejemplo, menos de aproximadamente el 1%) son variaciones modificadas conservadoramente de toxinas botulínicas. Cuando se hacen una o más sustituciones de un aminoácido o aminoácidos con un aminoácido químicamente similar en una toxina botulínica, esto también tiene como resultado una variación conservadoramente modificada de una toxina botulínica. Las tablas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Cada uno de los siguientes cinco grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: Alifáticos: Glicina (G), Alanina (UN), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I); Aromático: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofan (W); Con contenido en azufre: Metionina (M), Cisteína (C); Básicos: Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); Ácidos: Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E), Asparagina (N), Glutamina (Q). Vea también, el documento de Creighton (1984)

20 Proteínas, W. H. Freeman and Company. Las variaciones conservadoramente modificadas de toxinas botulínicas nativas están incluidas dentro del alcance del significado de "toxina botulínica". "

25 "Toxina Clostridial" o "Neurotoxina Costridial" significa una toxina producida naturalmente por el género de bacterias Clostridium. Por ejemplo, las toxinas Clostridial incluyen, pero no están limitadas a, toxinas de toxina botulínica, toxinas de tétano, toxinas difficile y toxinas butyricum. Una toxina Clostridial también puede hacerse por medios conocidos de recombinación mediante una bacteria no Clostridial.

30 "Combinación" significa una secuencia ordenada de elementos. Por ejemplo, una combinación de toxinas botulínicas puede significar la administración de toxina botulínica E, seguido por la administración de toxina botulínica tipo A, seguido por la administración de toxina botulínica de tipo B. Esto es opuesto a una "mezcla", en la que, por ejemplo, tipos diferentes de toxina son combinados antes de la administración.

"Daño" significa romper, rasguñar, estirar, raspar, magullar y/o inflamación o herida causados por inflamación u otra herida que puede ocurrir en una uretra que experimenta un procedimiento, por ejemplo, un procedimiento en el que el diámetro interior de la uretra es expandido utilizando fuerza mecánica.

35 "Fragmento" significa una secuencia de aminoácidos que comprende cinco aminoácidos o más de la secuencia nativa de aminoácido hasta un tamaño de menos de por lo menos un aminoácido de la secuencia nativa. Por ejemplo, un fragmento de una cadena ligera de toxina botulínica tipo A comprende cinco o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera nativa de toxina botulínica tipo A hasta un tamaño de menos de un aminoácido de la cadena ligera nativa.

40 "H<sub>C</sub>" significa un fragmento obtenido de la cadena H de una toxina Clostridial que equivale, por ejemplo es equivalente funcionalmente, al fragmento final carboxilo de la cadena H, o la porción que corresponde a ese fragmento en la cadena H intacta implicado en el enlace a una superficie de la célula o receptor de superficie de célula.

45 "H<sub>N</sub>" significa un fragmento o variante obtenido de una cadena H de una toxina Clostridial que puede ser funcionalmente equivalente a la porción de una cadena H intacta implicada en la transferencia de por lo menos la cadena L a través de una membrana endosomal intracelular a un citoplasma de una célula. Una H<sub>N</sub>, puede resultar de una H<sub>C</sub> que es quitada de una cadena H. Una H<sub>N</sub> también puede resultar de una cadena H que es modificada de tal manera que su H<sub>C</sub> ya no se enlaza a superficies de células colinérgicas.

50 "Cadena pesada" significa la cadena pesada de una neurotoxina Clostridial o un fragmento o variante de una H<sub>N</sub> de una neurotoxina Clostridial. Una cadena pesada puede tener un peso molecular de aproximadamente 100 kD y puede denominarse como cadena H, o como H.

"LH<sub>N</sub>" significa un fragmento obtenido de una neurotoxina Clostridial que contiene la cadena L acoplada a una H<sub>N</sub>. LH<sub>N</sub> puede ser obtenido de la neurotoxina Clostridial intacta por proteólisis, para quitar o modificar el dominio H<sub>C</sub>.

"Cadena ligera" significa la cadena ligera de una neurotoxina Clostridial o un fragmento o variante de una cadena ligera de una neurotoxina Clostridial. Una cadena ligera puede tener un peso molecular de aproximadamente 50 kD y puede denominarse como cadena L, como L o como el dominio protelítico de una neurotoxina Clostridial.

"Enlazador" significa una molécula que acopla juntas dos o más otras moléculas o componentes.

5 Una "neurotoxina modificada" significa una neurotoxina que tiene un componente no nativo conectado covalentemente a la neurotoxina y/o una porción nativa de la neurotoxina perdida. Por ejemplo, una toxina botulínica modificada puede ser una cadena ligera de una toxina botulínica con una molécula de sustancia P conectada covalentemente.

10 "Neurotoxina" o "toxina" significa una sustancia que inhibe una función neuronal o secreción celular. Las toxinas Clostridial son ejemplos de neurotoxina.

"Impedir" significa evitar que se produzca en su totalidad o en parte.

15 "Reducir" significa hacer de magnitud más pequeña (p. ej. tamaño, cantidad o número). La reducción puede ser aproximadamente del 1% a aproximadamente el 100%. Por ejemplo, la reducción puede ser entre aproximadamente 1% y aproximadamente 10% o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 20% o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30% o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 40% o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 50% o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 60% o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 70% o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 80% o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 90% o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 100%.

20 "Espaciadora" significa una molécula o conjunto de moléculas que separan físicamente y/o añaden distancia entre componentes de agentes para el uso según la invención.

"Substancialmente" significa en gran parte pero no enteramente. Por ejemplo, puede significar substancialmente de aproximadamente 10% a aproximadamente 99,999%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 99,999%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 99,999%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 99,999% o de aproximadamente 50% a aproximadamente 99,999%.

25 "Componente de destino" significa una molécula que tiene una afinidad específica de enlace para una superficie de célula o receptor de superficie de célula.

30 "Variante" significa una molécula o péptido que tiene estructura y función substancialmente iguales que la molécula o péptido descritos. Por ejemplo, una variante de una cadena ligera especificada puede tener diferencias de secuencia de aminoácidos cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera especificada. Las variantes pueden ser consideradas equivalentes a las moléculas específicamente descritas y como tal están dentro del alcance de la invención.

### Dibujos

La Figura 1 es un esquema que muestra el sistema urinario, incluyendo la uretra.

Las Figuras 2a y 2b son esquemas que muestran la uretra en un macho y en una hembra, respectivamente.

35 La Figura 3 es un diagrama esquemático que muestra una estenosis uretral en un paciente masculino.

La Figura 4 es un esquema que muestra un stent Urolume® insertado en una uretra.

### Descripción

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que una neurotoxina, por ejemplo, toxina botulínica, es útil para tratar la estenosis uretral.

40 En algunas realizaciones, los métodos comprenden una etapa de administración de una cantidad efectiva de una neurotoxina, p. ej. toxina botulínica, directamente a una uretra del mamífero, tratando con ello la estenosis uretral. La toxina botulínica puede ser administrada en o cerca de la ubicación de la estenosis. En algunas realizaciones, la neurotoxina es administrada a la pared de la uretra. En algunas realizaciones, la neurotoxina es efectiva para reducir la estenosis más del 25%, preferiblemente más del 50%, aún más preferiblemente más del 75%. En algunas realizaciones, la administración de la neurotoxina, p. ej., la toxina botulínica, es efectiva para reducir la estenosis más del 50% durante más de 6 meses, preferiblemente más de 12 meses, aún más preferiblemente más de dos años después de la administración de la neurotoxina.

50 Como se ha indicado antes, se conoce la inyección de una toxina botulínica en un esfínter uretral para tratar la incontinencia urinaria o la retención urinaria. Véase p. ej. el documento de Wein AJ., et. al., Toxina botulínica para el Tratamiento de Síntomas del Tracto Urinario Inferior: Una Revisión y Comentario, J Urol Agosto de 2005; 174(2):610- 2, y la patente de EE.UU. 4.932.936. La incontinencia urinaria y la retención urinaria descritas por Wein

et al. se deben aparentemente a espasmos del esfínter uretral. La administración de la toxina botulínica en el esfínter uretral como describe Wein et al. provoca que el tejido de músculo espástico en el esfínter se relaje, permitiendo con ello vaciar la orina. Significativamente, una estenosis uretral tratable mediante la presente invención no está causada por un espasmo muscular sino que en cambio está causada por una estrechez anormal del tejido muscular debido a una acumulación de tejido fibrótico, en la uretra. Una acumulación de tejido fibrótico puede resultar de una inflamación, isquemia o trauma en el lugar de la estenosis de uretra. Por consiguiente, es sorprendente que una toxina botulínica pueda ser administrada a un tejido uretral en el lugar de una estenosis uretral, con el fin de tratar la estenosis, dicha estenosis no está causada por una contracción muscular ni por un espasmo de tejido muscular. Además, la presente invención excluye la administración de una toxina botulínica a un esfínter uretral ya que no es la intención de los métodos descritos en esta memoria tratar un esfínter uretral.

En algunas realizaciones, la neurotoxina, p. ej. la toxina botulínica, es utilizada junto con un procedimiento para tratar una estenosis de uretra. Por ejemplo, se ha descubierto sorprendentemente que un stent revestido o impregnado con una toxina botulínica puede ser utilizado para tratar con eficacia una estenosis uretral. Varios stents de uretra están disponibles comercialmente y pueden ser utilizados según la presente invención. Por ejemplo, Urolume® (vendido por AMS, Minnetonka, Minnesota) es un stent uretral que puede ser utilizado según la presente invención. Además, estos stents puede ser revestidos o puede ser impregnados con una neurotoxina, p. ej. una toxina botulínica, con técnicas bien conocidas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.579.847 de Unger et al., cuya descripción se incorpora en su totalidad en esta memoria como referencia).

Cabe señalar que la patente de EE.UU. 6.579.847 de Unger et al. (presentada el 1 de mayo de 2000) describe que un stent revestido con una toxina botulínica puede ser utilizado para reducir una restenosis de vaso sanguíneo. Sin embargo, es importante comprender que un vaso sanguíneo es diferente de una uretra. Por lo tanto, sorprende que una toxina botulínica sea efectiva para tratar una estenosis en una uretra.

Por ejemplo, un vaso sanguíneo está forrado por un epitelio escamoso sencillo denominado endotelio. Una uretra es más compleja. En vez de estar forrada por un epitelio escamoso sencillo, la uretra está forrada por un urotelio. Un urotelio es una capa de tejido de aproximadamente 3-5 capas de células y se clasificada como epitelio de transición. Aún más, el urotelio actúa como una barrera de permeabilidad y protege los tejidos subyacentes contra los componentes nocivos de la orina. Como tal, un experto esperaría que la uretra fuera muy resistente a los efectos de agentes extraños, p. ej. una toxina botulínica. Sin embargo, la invención de esta memoria descubrió sorprendentemente que una toxina botulínica puede actuar ventajosamente en la uretra para tratar una estenosis.

También, unos stents revestidos de fármacos son fabricados actualmente por Johnson & Johnson, Inc., Medtronic, Inc., Boston Scientific, Inc., y Guidant, Inc., en los que los stents son revestidos con agentes antineoplásicos como Sirolimus, análogo de Sirolimus ABT -578, paclitaxel o Everolimus. En particular, estos stents revestidos con fármacos no están revestidos con una toxina botulínica. Además, la mayor parte de estos stents revestidos con fármacos se utilizan para tratar una restenosis de vaso sanguíneo, no una estenosis uretral.

Un estudio informa de que un stent revestido de paclitaxel puede ser efectivo para tratar una estenosis uretral (Shin et. al., Radiology 2005; 234:438-444). Sin embargo, un paclitaxel es muy diferente de una toxina botulínica. Por ejemplo, un paclitaxel es una molécula pequeña y ejerce sus efectos terapéuticos interfiriendo con la mitosis celular; mientras que una toxina botulínica es una proteína grande y se conoce por inhibir la mitosis celular. Dado que un paclitaxel es muy diferente de una toxina botulínica, sorprende descubrir que una toxina botulínica sea efectiva para tratar una estenosis uretral.

En algunas realizaciones, una neurotoxina, p. ej., una toxina botulínica, puede ser administrada antes del procedimiento de colocación de stent en una cantidad de tiempo que permitiría a la uretra dilatarse. En algunas realizaciones, la neurotoxina es administrada en aproximadamente una semana antes del procedimiento de colocación de stent. Sin desear limitar la invención a cualquier teoría o mecanismo de operación, se cree que una administración de una neurotoxina, p. ej., una toxina botulínica, en la pared de la uretra ayudaría a dilatar la uretra, proporcionar una reducción del dolor y/o ayudar a estirar el tejido de cicatriz sin producir cicatrices adicionales.

En algunas realizaciones, la neurotoxina, p. ej., una toxina botulínica, puede ser administrada antes, durante y/o después del procedimiento de colocación de stent. En algunas realizaciones, una neurotoxina tipo A puede ser administrada antes, durante y/o después del procedimiento de colocación de stent.

En algunas realizaciones, la administración de la neurotoxina, p. ej. la toxina botulínica, a la uretra es efectiva para reducir o eliminar daños en la uretra debido al procedimiento de colocación de stent. En algunas realizaciones, la administración es efectiva para reducir o eliminar daños a la uretra al evitar que el epitelio uretral cubra el stent. En algunas realizaciones, la administración es efectiva para reducir o eliminar daños a la uretra al evitar que el stent se incorpore a la pared de la uretra. Es ventajoso que el epitelio uretral no cubra el stent y/o el stent no se incorpore en la pared uretral porque tal acontecimiento reduciría el tamaño de la abertura de la uretra que puede llevar de ese modo a una estenosis uretral recurrente.

Se sabe cómo administrar una toxina botulínica combinada con una uretrotomía para tratar una estenosis uretral recurrente. Véase p.e. el documento de Khera et al., El Diario de la Urología, 2004, 172:574-575. Una uretrotomía



requiere una incisión de la uretra, que deja orillas de herida. Las contracciones de músculos uretrales pueden actuar sobre estas orillas de heridas para causar cicatrización y estenosis recurrentes. Por consiguiente, Khera et al. propone que una toxina botulínica pueda ser administrada a la uretra en combinación con una uretrotomía para reducir las contracciones de músculos uretrales y evitar la cicatrización y estenosis recurrentes.

5 Los métodos descritos en esta memoria no implican ni requieren ninguna incisión de la uretra. Verdaderamente, puede esperarse que hacer incisiones en la uretra o una parte de la misma puede ser significativamente contraproducente con respecto a la presente invención. Además, en una realización preferida de los métodos descritos en esta memoria, se realiza un procedimiento de colocación de stent junto con una administración de una toxina botulínica. Un procedimiento de colocación de stent implica una inserción de stent (que puede estar revestido o tener incrustada una toxina botulínica) en la uretra (véase por ejemplo la Figura 4), y no implica una incisión de la uretra.

En algunas realizaciones, una neurotoxina, p. ej., una toxina botulínica, es administrada para tratar una estenosis de uretra en un paciente, en el que el paciente no experimenta una uretrotomía.

15 Sin desear limitar la invención a alguna teoría o mecanismo de operación, se cree que las toxinas descritas en esta memoria pueden actuar sobre células mediadoras de inflamación en el urotelio. Estas células presentan muchos mediadores biológicamente activos de inflamación que pueden incluir bradiquinina y óxido nítrico. La liberación de estos y/u otros mediadores puede contribuir a los acontecimientos que causan inflamación uretral que puede contribuir a la estenosis.

20 Durante la secreción o exocitosis, los mediadores pueden ser incluidos en vesículas que se funden a la superficie interior de la membrana de célula liberando con ello el contenido de vesícula al exterior de la célula. Es una teoría que la interferencia con el proceso de exocitosis puede ser el modo de acción de las toxinas Clostridial.

25 Es una teoría que las toxinas Clostridial pueden funcionar mediante la prevención o reducción de la secreción de moléculas que producen inflamación en las paredes de células de la uretra u otras células mediante escisión o interferencia de otro modo con la función de las proteínas implicadas en el proceso de secreción por el uso de un componente de cadena ligera, por ejemplo, un componente de cadena ligera de toxina botulínica. Un componente de cadena pesada, por ejemplo H<sub>N</sub>, también puede funcionar en determinadas realizaciones de la presente invención, por ejemplo, mediante la participación en la liberación de un agente de la invención desde vesículas intracelulares, por ejemplo, endosomas.

30 Sin desear limitar la invención a alguna teoría o mecanismo de operación, también se cree que la inflamación pueda directa o indirectamente contribuir a la estenosis. Evitando o reduciendo la inflamación uretral que puede estar asociada con procedimientos uretrales, por ejemplo, la cirugía y/o la inserción de un stent, las estenosis pueden ser reducidas en un paciente que ha experimentado un procedimiento uretral.

35 Otro posible mecanismo para la eficacia de la presente invención descrita es un efecto de una toxina botulínica para inhibir la contracción uretral neuronalmente mediada. El tratamiento previo con una toxina botulínica puede inhibir una estenosis posterior a un estiramiento. Dentro del alcance de la presente invención hay una toxina botulínica que es una toxina de destino en la que la fracción nativa de enlace de la toxina ha sido reemplazada en su totalidad o en parte por una nueva fracción de enlace que tiene como destino receptores alpha2 en neuronas simpáticas que inervan la uretra que va a ser tratada. Además, NO puede ser inducido localmente para provocar dilatación.

40 La neurotoxina para el uso según la presente invención puede comprender un componente de destino, un componente terapéutico y un componente de transferencia.

En una realización, el componente de destino comprende un fragmento final carboxilo de una cadena pesada de una toxina de butyricum, una toxina de tétanos o una toxina botulínica incluyendo toxina botulínica de tipo A, B, C, D, E, F y G.

45 La neurotoxina, p. ej. toxina botulínica, también puede ser utilizada junto con un procedimiento quirúrgico (p. ej., injertar). Por ejemplo, la administración de una toxina botulínica junto con estos procedimientos puede ser efectiva para reducir o eliminar daños a la uretra debido a estos procedimientos. En algunas realizaciones, la administración de la toxina botulínica es efectiva para reducir o eliminar la reaparición de la estenosis, sangrando en la uretra, extravasación de fluido de irrigación a tejidos peri-esponjosos y/o un aumento en la respuesta fibrótica. En algunas realizaciones, un procedimiento realizado junto con una administración de la neurotoxina, p. ej. toxina botulínica, tiene una tasa de disminución de daño de más del 25%, preferiblemente más del 50%, aún más preferiblemente más del 75% en comparación con un procedimiento idéntico que es realizado sin la administración de una neurotoxina, p. ej., una toxina botulínica. En algunas realizaciones, el procedimiento realizado junto con la administración de una neurotoxina, p. ej., la toxina botulínica, es efectivo para reducir la estenosis más del 50% durante más de 6 meses, preferiblemente más de 12 meses, aún más preferiblemente más de dos años después de la administración de la neurotoxina.

En otra realización el componente de destino puede ser de origen distinto a toxina botulínica. Ejemplos de componentes de destino que pueden ser utilizados en la presente invención incluyen, pero no están limitados a,

anticuerpos, anticuerpos monoclonal, fragmentos de anticuerpos (Fab, F(ab)'2, Fv, ScFv, y otros fragmentos de anticuerpos o algo similar), lectinas, hormonas, citoquinas, factores del crecimiento, péptidos, carbohidratos, lípidos, gliconas y ácidos nucleicos. Otros componentes de destino que pueden ser útiles según la presente invención se describen en el documento WO 01/21213.

- 5 Un ejemplo de componente de destino para el uso según la presente invención es la sustancia P o sustancias similares a la sustancia P. El uso de sustancia P, o de las sustancias similares a la sustancia P, como componentes de destino se describe en las solicitudes de patente de EE.UU. 09/489.667; 09/922.093 y 09/625.098.

10 El componente terapéutico funciona para escindir selectivamente proteínas esenciales para el reconocimiento y el acoplamiento de vesículas secretorias con la superficie citoplásmica de la membrana de plasma, y la fusión de las vesículas con la membrana de plasma. Un efecto del componente terapéutico puede ser interferir substancialmente con la liberación de neurotransmisores desde una célula. Otro efecto del componente terapéutico puede ser causar dilatación de la uretra. Otro efecto puede ser de causar parálisis flácida de tejido muscular liso. Otro efecto puede ser reducir o eliminar la secreción de células, por ejemplo, las células que producen inflamación. En una realización, el componente terapéutico comprende una cadena ligera de una toxina butyricum, una toxina de tétanos o una  
15 toxina botulínica p. ej. toxina botulínica de tipo A, B, C, D, E, F y G.

El componente de transferencia puede facilitar la transferencia de por lo menos una parte de la neurotoxina, por ejemplo el componente terapéutico en el citoplasma de la célula de objetivo. En una realización, el componente de transferencia comprende un fragmento final de amino de una cadena pesada de una toxina butyricum, una toxina de tétanos o una toxina botulínica, por ejemplo toxina botulínica de tipo A, B, C, D, E, F y G.

20 Según un aspecto amplio de esta invención, se pueden utilizar metodologías recombinantes de ADN para producir los componentes de agentes útiles según la invención. Estas técnicas pueden incluir etapas para obtener genes clonados de fuentes naturales, o de secuencias sintéticas oligonucleotides, que pueden codificar componentes de neurotoxina botulínica incluyendo cadenas ligeras, cadenas pesadas de neurotoxina botulínica o variantes de las mismas, cadenas modificadas de neurotoxina botulínica y/o fragmentos de las cadenas. Los genes clonados  
25 también pueden codificar un componente de destino.

Los genes pueden ser clonados en, por ejemplo, vectores de clonación, como fagos o plásmidos o como fagémidos. Los vectores recombinantes son transformados en células anfitrión, por ejemplo, en una célula procariótica, por ejemplo, *E. coli*. Las proteínas pueden ser expresadas y luego pueden ser aisladas utilizando técnicas convencionales.

30 Pueden utilizarse genes de fusión que codifican más de un componente de un agente. Por ejemplo, puede producirse un componente de destino y una cadena pesada y/o cadena ligera y/o un fragmento de cadena pesada y/o fragmento de cadena ligera de toxina botulínica, a partir de un solo gen clonado como una proteína de fusión. Alternativamente, componentes individuales obtenidos de técnicas recombinantes pueden acoplarse químicamente a otros componentes obtenidos de fuentes similares u otras. Por ejemplo, un componente de destino puede  
35 acoplarse a una cadena L de recombinante o a una LH<sub>N</sub> de fusión recombinante. Los enlaces entre los componentes de toxina botulínica y las fracciones de destino pueden incluir componentes espaciadores apropiados, que también pueden ser ADN codificado.

40 En una realización, una LH<sub>N</sub>, que puede ser un híbrido de una cadena L y una H<sub>N</sub> de tipos diferentes de toxina botulínica, es expresada de manera recombinante como una proteína de fusión. Tal híbrido de LH<sub>N</sub> también puede acoplarse a un componente de destino. Puede incluirse uno o más espaciadores entre L y H<sub>N</sub> y/o entre el LH<sub>N</sub> y el componente de destino.

En otra realización de la invención, la cadena L de una neurotoxina botulínica, o de un fragmento de la cadena L que contiene la actividad de endopeptidasa, es expresado de manera recombinante para producir un agente para el uso según la presente invención.

45 En otra realización de la invención, la cadena L de una neurotoxina botulínica, o un fragmento de la cadena L que contiene la actividad de endopeptidasa, es expresada de manera recombinante como una proteína de fusión, con el H<sub>N</sub> de la cadena H y el componente de destino. La proteína de fusión expresada también puede incluir una o más regiones de espaciador. Por ejemplo, la cadena L puede ser fundida a H<sub>N</sub> que a su vez es fundida al componente de destino. En otro ejemplo, la H<sub>N</sub> puede ser fundida a la cadena L que a su vez es fundida al componente de destino.  
50 Los componentes de espaciador pueden ser expresados de manera recombinante entre algunos o todos los componentes de un agente de la invención.

55 En un ejemplo para producir un híbrido de LH<sub>N</sub>, la cadena L es obtenida de la toxina botulínica de tipo B y el segmento final de amino del fragmento de cadena H<sub>N</sub> es obtenido de la toxina botulínica de tipo A. El fragmento H<sub>N</sub> de la toxina botulínica tipo A es producido según el método descrito por Shone C. C., Hambleton, P., y Melling, J. (1987, Eur. J. Biochem. 167, 175-180) y la cadena L de toxina botulínica de tipo B según el método de Sathyamoorthy, V. y DasGupta, B. R. (1985, J. Biol. Chem. 260, 10461-10466). La cisteína libre en el segmento final de amino del fragmento de cadena H de toxina botulínica tipo A es entonces convertido en derivado por la adición de

un exceso de moles de diez dobles de disulfuro de dipiridilo seguido por incubación a 4°C por la noche. El exceso de disulfuro de dipiridilo y la tiopiridona por producto son eliminados entonces por desalación de la proteína sobre una columna PD10 (Pharmacia) en PBS.

5 El H<sub>N</sub> convertido en derivado es concentrado entonces a una concentración de proteína con exceso de 1 mg/ml antes de ser mezclado con una porción de con igualdad de moles de cadena L de la toxina botulínica de tipo B (> 1 mg/ml en PBS). Después de la incubación por la noche a temperatura ambiente la mezcla es separada por cromatografía de exclusión de tamaño sobre Superose 6 (Pharmacia), y las fracciones son analizadas por SDS-PAGINA. El LH<sub>N</sub> quimérico está entonces disponible para producir un agente conjugado que incluye un componente de destino.

10 El ejemplo descrito antes es estrictamente ilustrativo de la invención. Al sintetizar los agentes, el acoplamiento de las fracciones de destino a los componentes de la toxina botulínica, por ejemplo las neurotoxinas botulínicas modificadas o fragmentos de las mismas, puede lograrse a través de acoplamiento químico utilizando reactivos y técnicas conocidas por los expertos en la técnica. De este modo, cualquier química de acoplamiento capaz de conectarse de manera covalente a las fracciones de destino de los agentes a componentes de neurotoxina botulínica y conocida por los expertos en la técnica está cubierta por el alcance de esta solicitud.

15 Las toxinas botulínicas modificadas que tienen una persistencia biológica y/o actividad biológica alteradas se contemplan para el uso en la presente invención. Las solicitudes de patente de EE.UU. 09/620.840 y 09/910.346 incluyen ejemplos de composiciones y métodos para alterar la persistencia biológica de toxinas botulínicas.

20 Una persistencia biológica que mejora un componente y/o actividad biológica que mejora un componente, por ejemplo, unidades basadas en leucina, puede añadirse a una neurotoxina botulínica aumentando con ello la persistencia biológica y/o actividad biológica de la neurotoxina botulínica. Similarmente, una persistencia biológica que mejora un componente puede eliminarse de una neurotoxina botulínica disminuyendo con ello la persistencia biológica y/o actividad biológica de la neurotoxina.

25 La neurotoxina botulínica puede ser una neurotoxina híbrida. Por ejemplo, los componentes de destino, transferencia y terapéuticos de la neurotoxina pueden ser derivados de diferentes serotipos de toxina botulínica. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender una primera región de secuencia de aminoácidos derivada de la H<sub>C</sub> de una toxina botulínica tipo A, una segunda región de secuencia de aminoácidos derivada del HN de la toxina botulínica tipo B, y una tercera región de secuencia de aminoácidos derivada de la cadena ligera de toxina botulínica serotipo E. Esto es solamente un ejemplo y todas las otras combinaciones posibles están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

Los componentes de destino, transferencia y terapéuticos de la neurotoxina pueden ser modificados desde la secuencia que se produce naturalmente de la que son derivados. Por ejemplo, la región de secuencia de aminoácidos puede tener por lo menos uno o más aminoácidos agregados, eliminados o sustituidos en comparación con la secuencia que se produce naturalmente.

35 Los aminoácidos que pueden ser sustituidos por aminoácidos contenidos en una persistencia biológica que mejora el componente incluyen alanina, aspargina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptofan, tirosina y otros aminoácidos que se producen naturalmente así como aminoácidos no estándar.

40 Generalmente, la dosis de neurotoxina que va a ser administrada puede variar con la edad, condición actual y peso del paciente que va a ser tratado. La potencia de la neurotoxina también será considerada. La potencia de la toxina es expresada como un múltiplo del valor LD<sub>50</sub> para un ratón. Una "unidad" de toxina puede ser definida como la cantidad de toxina que mata al 50% de un grupo de ratones que estuvo sin enfermedad antes de inoculación con la toxina. Por ejemplo, una toxina botulínica tipo A disponible comercialmente tiene típicamente una potencia de tal manera que un nanogramo contiene aproximadamente 40 unidades de ratón. La potencia, o LD<sub>50</sub> en humanos del producto de Toxina botulínica A suministrado por Allergan, Inc. bajo la marca registrada "BOTOX" se cree que es aproximadamente 2.730 unidades de ratón.

45 La neurotoxina puede ser administrada en una dosis de aproximadamente 0,001 unidades hasta aproximadamente 100 unidades. En una realización, se utilizan dosis individuales de aproximadamente 0,01 unidades a aproximadamente 5 unidades. En otra realización, se utilizan dosis individuales de aproximadamente 0,01 unidades a aproximadamente 3 unidades. En todavía otra realización, se utilizan dosis individuales de aproximadamente 0,01 unidades a aproximadamente 1 unidad. En todavía otra realización, se utilizan dosis individuales de aproximadamente 0,05 unidades a aproximadamente 1 unidad. Los expertos habituales en la técnica sabrán, o pueden acertar fácilmente, cómo ajustar las dosis para una neurotoxina mayor o menor potencia en una determinada circunstancia.

55 Para toxinas botulínicas modificadas variantes la potencia puede expresarse como un múltiplo del valor LD<sub>50</sub> de un agente de la invención para un ratón. Una "U" o "unidad" de un agente puede definirse como la cantidad de toxina que mata al 50% de un grupo de ratones que estuvo sin enfermedad antes de inoculación del agente. Como

alternativa, la potencia puede expresarse como el valor LD<sub>50</sub> de un agente que sería producido por una cantidad igual de moles de una toxina botulínica nativa no variante.

5 En un tratamiento inicial, puede ser administrada una dosis baja para determinar la sensibilidad del paciente, y la tolerancia, a la neurotoxina. Administraciones adicionales de dosis iguales o diferentes pueden ser administradas a la uretra según sea necesario. Por ejemplo, una toxina puede ser administrada a una uretra antes de que sea realizado un procedimiento, por ejemplo, un procedimiento de colocación de stent, y/o durante el procedimiento y/o después del procedimiento. El número de administraciones y la secuencia temporal de las administraciones puede ser determinado por el médico que realiza el tratamiento.

10 Las neurotoxinas pueden ser administradas, por ejemplo, mediante inyección en una uretra utilizando una aguja o por inyección sin aguja. La toxina también puede ser administrada por aplicación de la toxina a la pared de la uretra en un bálsamo, loción, ungüento, crema, emulsión o sustratos de administración parecidos.

15 Un agente puede ser inyectado en la pared de una uretra desde fuera de la uretra o un agente puede ser inyectado en la pared de una uretra desde dentro de la uretra. Los métodos para inyectar en una pared de una uretra son bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, un agente puede ser inyectado en la pared de una uretra desde dentro de la uretra mediante el uso de un catéter que contiene una o más agujas para inyectar.

20 En métodos de administración de inyección sin aguja, las partículas de fármacos en microproyectiles pueden ser revestidas con una neurotoxina y entonces ser descargadas en la uretra desde un dispositivo externo de administración. Dependiendo de la velocidad de descarga y la distancia del lugar de inyección, las partículas de fármacos penetran a través de las diferentes capas de la uretra. A medida que los microproyectiles penetran a través de, o son depositados en, las células de la uretra, la neurotoxina es liberada. Las capas individuales de uretra pueden ser el destino de los microproyectiles.

25 Las neurotoxinas también pueden ser administradas utilizando un stent que está revestido o impregnado con la toxina, por ejemplo toxina botulínica. Las patentes de EE.UU. 6.306.423 y 6.312.708 describen un material que puede ser impregnado, conectado o empotrado con la toxina y que puede ser utilizado para revestir stents. Además, el material puede ser utilizado para formar stents que incluyen la toxina. En una realización, la uretra que va a ser tratada es administrada primero con toxina botulínica antes de insertar el stent que comprende toxina. En otra realización, la uretra que va a ser tratada no es administrada primero con toxina antes de insertar el stent que comprende toxina botulínica.

30 Las administraciones pueden ser repetidas si fuera necesario. Como pauta general, la toxina botulínica A administrada en una uretra puede producir un efecto dilatador y/o antiinflamatorio durante, por ejemplo, de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 3 meses, o por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 meses o por ejemplo de aproximadamente 6 meses a aproximadamente 1 año.

35 El agente puede tener permitido inducir su efecto en una uretra antes de que se realice un procedimiento, por ejemplo, un procedimiento de colocación de stent. Por ejemplo, el agente puede tener permitido dilatar la uretra y/o impedir la inflamación de la uretra antes de empezar un procedimiento. Un médico de habilidad ordinaria puede determinar cuando el agente ha ejercido sus efectos en una uretra.

Una vez descrita completamente la invención, se exponen unos ejemplos que ilustran su práctica. Estos ejemplos no deben considerarse, sin embargo, para limitar el alcance de la invención, que está definido por las reivindicaciones adjuntas.

## 40 EJEMPLOS

### Ejemplo 1

Tratamiento de una Estenosis Uretral por Dilatación de la estenosis Sin el Uso de un Stent

45 La dilatación es el procedimiento tradicional para tratar una estenosis uretral. La dilatación es realizada habitualmente pasando una barra plástica delgada (boogie) adentro de la uretra. Se insertan suavemente barras de espesor creciente para ampliar gradualmente la estenosis estrechada. El objetivo es estirar la estenosis sin una cicatrización adicional. Sin embargo, una estenosis a menudo tiende a estrecharse gradualmente otra vez después de cada dilatación. Por lo tanto, comúnmente se necesita una dilatación repetida.

50 Un paciente masculino de 35 años de edad que presenta un flujo reducido de orina, y se ha diagnosticado que tiene una estenosis uretral. El paciente elige experimentar un procedimiento de dilatación uretral para tratar la estenosis uretral. El procedimiento de dilatación es realizado junto con una administración de aproximadamente 0,05 unidades y aproximadamente 5 unidades de toxina botulínica tipo A (o un equivalente de los otros tipos) al lugar de la estenosis en la uretra, p. ej., la pared de la uretra. La administración de la toxina botulínica puede ser antes, durante y/o después del procedimiento de dilatación.

La dilatación de la uretra realizada junto con una administración de la toxina botulínica ha mejorado los resultados clínicos sobre el procedimiento de dilatación de uretra realizado sin la administración de la toxina botulínica. Por ejemplo, con la administración de la toxina botulínica, la dilatación de estenosis permanece dilatada durante un periodo de tiempo más largo en comparación con una dilatación que no es realizada junto con una administración de una toxina botulínica, p. ej., más del 20%, preferiblemente más del 50%, más preferiblemente más del 100%.

**Ejemplo 2A**

Tratamiento de una Estenosis Uretral Con un Stent Uretral

Un stent es como un tubo de malla de alambre que da apoyo a la uretra y ayuda a mantener ensanchada la uretra. Un stent puede colocarse en la uretra mediante un instrumento delgado que se hace pasar adentro de la uretra. La Figura 4 muestra un stent Urolume® (vendido por AMS, Minnetonka, Minnesota) que es insertado en una uretra.

Un paciente masculino de 50 años de edad presenta un dolor durante la micción. El paciente es diagnosticado como que tiene una estenosis uretral de 5 a 60 mm, y elige experimentar un procedimiento de colocación de stent. El stent es introducido bajo guía fluoroscópica después de la uretrotomía interna o dilatación sencilla. El stent mantiene abierta la zona estrechada de la uretra durante intervalos largos permitiendo la curación completa (véase la Figura 4).

Después de seis meses, una toma de imágenes radiológicas muestra que el stent está cubierto con epitelio uretral y se ha incorporado en la pared uretral. La toma de imágenes también muestra la uretra estrechándose otra vez en el lugar de la estenosis original.

El paciente experimenta un segundo procedimiento de colocación de stent. El segundo procedimiento de colocación de stent es realizado junto con una administración de aproximadamente 0,05 unidades y aproximadamente 5 unidades de toxina botulínica tipo A (o un equivalente de los otros tipos) al lugar de la estenosis en la uretra, p. ej., la pared de la uretra. La administración de la toxina botulínica puede ser antes, durante y/o después del procedimiento de colocación de stent.

Después de seis meses, una toma de imágenes radiológicas muestra que el stent no está cubierto con epitelio uretral y no se ha incorporado en la pared uretral. La toma de imágenes también muestra que la uretra permanece adecuadamente abierta en el lugar de la estenosis original, y el paciente orina normalmente. Después de un año, la toma de imágenes radiológicas muestra que la uretra permanece adecuadamente abierta en el lugar de la estenosis original, y el paciente continúa orinando normalmente.

**Ejemplo 2B**

Tratamiento de una estenosis Uretral Con un Stent Uretral que es Impregnado Con una Toxina botulínica

Un paciente masculino de 50 años de edad presenta un dolor durante la micción. El paciente es diagnosticado como que tiene una estenosis uretral de 5 a 60 mm, y elige experimentar un procedimiento de colocación de stent.

El médico empieza el procedimiento inyectando entre aproximadamente 0,1 unidades y aproximadamente 5 unidades de toxina botulínica tipo A en la pared de la uretra del paciente. Tras la inyección, la uretra tiene permitido dilatarse. Un stent auto-expansible impregnado con la toxina botulínica es insertado entonces con un catéter en la uretra. El catéter y stent son pasados a través de la uretra a la zona de la estenosis. Un alambre de guía es avanzado a la ubicación de la arteria bloqueada haciendo avanzar el stent auto-expansible impregnado de toxina botulínica a la zona de destino de estenosis de uretra. Cuando el catéter alcanza la zona de destino, el stent es expandido reforzando abierta la uretra.

Después de seis meses, una toma de imágenes radiológicas muestra que el stent no está cubierto con epitelio uretral y no se ha incorporado en la pared uretral. La toma de imágenes también muestra que la uretra permanece adecuadamente abierta en el lugar de la estenosis original, y el paciente orina normalmente. Después de un año, la toma de imágenes radiológicas muestra que la uretra permanece adecuadamente abierta en el lugar de la estenosis original, y el paciente continúa orinando normalmente.

**Ejemplo 3**

Tratamiento de una Estenosis Uretral Con Cirugía

Pueden utilizarse diversas técnicas quirúrgicas para tratar una estenosis uretral. Por ejemplo, una estenosis corta puede ser recortada y los dos extremos de la uretra sana ser cosidos juntos. Si la estenosis es más larga, entonces una clase de operación es similar a un injerto de piel del interior de la uretra. Véase el documento de Peterson et al., BJU Internacional 2004, 94: 971-976, y Barbagli et al., Braz J Urol Internacional 2003, 29(2):155-161.

Un paciente de 50 años de edad con una estenosis uretral recurrente elige experimentar un procedimiento de uretroplastia bulbular. Peterson et al., Ltd. El procedimiento quirúrgico es realizado junto con una administración de

aproximadamente 0,05 unidades y aproximadamente 5 unidades de toxina botulínica tipo A (o un equivalente de los otros tipos) en el lugar de la estenosis en la uretra, p. ej., la pared de la uretra sana y/o el tejido de injerto. La toxina botulínica puede ser administrada antes, durante y/o después del procedimiento quirúrgico.

- 5 Dos años después del procedimiento, no hay signos de una nueva formación de estenosis, y el paciente parecen estar bien de salud.

#### **Ejemplo 4**

Tratamiento de una estenosis Uretral Con un Stent Uretral que es Impregnado Con una Toxina botulínica

Un paciente masculino de 34 años de edad presenta dificultades de micción. El paciente es diagnosticado como que tiene una estenosis uretral y acepta la colocación de un stent revestido (o impregnado) de toxina botulínica.

- 10 Un stent auto-expansible revestido impregnado con la toxina botulínica es insertado con un catéter en la uretra. El catéter y stent son pasados a través de la uretra a la zona de la estenosis. Un alambre de guía es avanzado a la ubicación de la arteria bloqueada haciendo avanzar el stent auto-expansible impregnado de toxina botulínica a la zona de destino de estenosis de uretra. Cuando el catéter alcanza la zona de destino, el stent es expandido reforzando abierta la uretra. El stent puede ser extraíble o puede quedarse en el lugar.

- 15 El stent puede estar hecho de un material no biodegradable (como un polímero de polivinilo) o el stent puede estar hecho de un polímero biodegradable tal como un ácido de copolímero poliglicólico polilactico (PLGA). Véase las patentes de EE.UU. 6.306.423, 6.312.708, 6.506.399, 6.383.509 y 6.585.993.

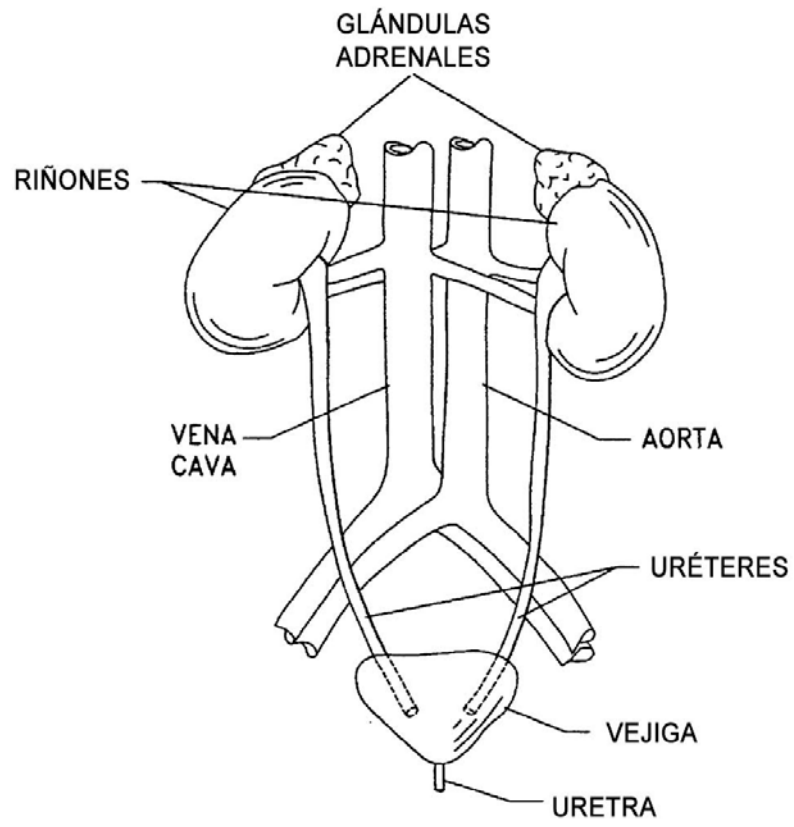
- 20 Después de seis meses, una toma de imágenes radiológicas muestra que el stent no está cubierto con epitelio uretral y no se ha incorporado en la pared uretral. La toma de imágenes también muestra que la uretra permanece adecuadamente abierta en el lugar de la estenosis original, y el paciente orina normalmente. Después de un año, la toma de imágenes radiológicas muestra que la uretra permanece adecuadamente abierta en el lugar de la estenosis original, y el paciente continúa orinando normalmente.

Esta invención también incluye dentro de su alcance el uso de una toxina botulínica en la preparación de un medicamento (es decir un stent revestido de una toxina botulínica) para el tratamiento de una estenosis uretral.

- 25 Por consiguiente, el espíritu y el alcance de las siguientes reivindicaciones no deben limitarse a las descripciones de las realizaciones preferidas expuestas anteriormente.

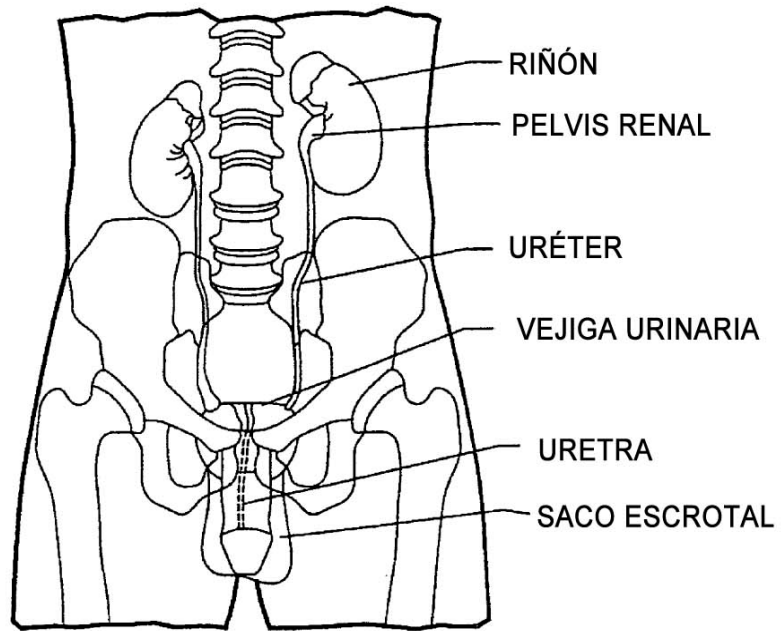
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una toxina botulínica para uso en un método de tratamiento de una estenosis uretral en un paciente, en un método que comprende la etapa de administrar una cantidad efectiva de una toxina botulínica directamente en la uretra del paciente, en donde el paciente tiene o ha tenido un procedimiento de colocación de stent, tratando con ello la estenosis uretral, en donde la etapa de administración se consigue utilizando un stent revestido o impregnado con la toxina botulínica.
2. La toxina botulínica para el uso de la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica reduce o elimina un daño a la uretra que es debido al procedimiento de colocación de stent.
- 10 3. La toxina botulínica para el uso de la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica reduce o elimina un daño en la uretra al reducir la recurrencia de la estenosis, o al impedir que el epitelio uretral cubra el stent, o al evitar que el stent se incorpore a la pared uretral, o al reducir o eliminar el sangrado en la uretra, o al reducir o eliminar la extravasación de fluido de irrigación en tejidos peri-esponjosos.
- 15 4. La toxina botulínica para el uso de la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica reduce o elimina daño en la uretra al evitar un aumento de la respuesta fibrótica.
5. La toxina botulínica para el uso de la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica es seleccionada del grupo que consiste en toxina botulínica de tipo A, B, C, D, E, F, G y las combinaciones de los mismos.
6. La toxina botulínica para el uso de la reivindicación 5, en donde la toxina botulínica es una toxina botulínica de tipo A.
- 20 7. Una toxina botulínica para uso en el tratamiento de una estenosis uretral en un mamífero, en un método que comprende las etapas de
  - (a) administrar una cantidad efectiva de una toxina botulínica directamente a una uretra del mamífero; y
  - (b) colocar un stent en la uretra.
- 25 8. La toxina botulínica para el uso de la reivindicación 7, en donde la administración incluye la etapa de inyectar la toxina botulínica en una pared de la uretra.
9. La toxina botulínica para el uso de la reivindicación 7, en donde la etapa de administración es lograda utilizando un stent revestido o impregnado con la toxina botulínica.
10. La toxina botulínica para el uso de la reivindicación 7, en donde la toxina botulínica es seleccionada del grupo que consiste en toxina botulínica de tipo A, B, C, D, E, F, G y las combinaciones de los mismos.
- 30 11. La toxina botulínica para el uso de la reivindicación 7, en la que la toxina botulínica es una toxina botulínica de tipo A.
12. Una toxina botulínica para uso en el tratamiento de una estenosis uretral en un paciente, en un método que comprende la etapa de administrar una cantidad efectiva de una toxina botulínica directamente en la uretra del paciente, en el que el paciente no está teniendo una uretrotomía, tratando con ello la estenosis de uretra.
- 35 13. La toxina botulínica para el uso de la reivindicación 12, en la que la toxina botulínica es seleccionada del grupo que consiste en toxina botulínica de tipo A, B, C, D, E, F, G y las combinaciones de los mismos.
14. La toxina botulínica para el uso de la reivindicación 12, en la que la toxina botulínica es una toxina botulínica de tipo A.
- 40 15. Una toxina botulínica para el uso en el tratamiento de una estenosis uretral, en un método que comprende la etapa de insertar en una estenosis uretral de un paciente un stent biodegradable revestido o embebido con una cantidad terapéuticamente efectiva de una toxina botulínica, tratando con ello la estenosis uretral.

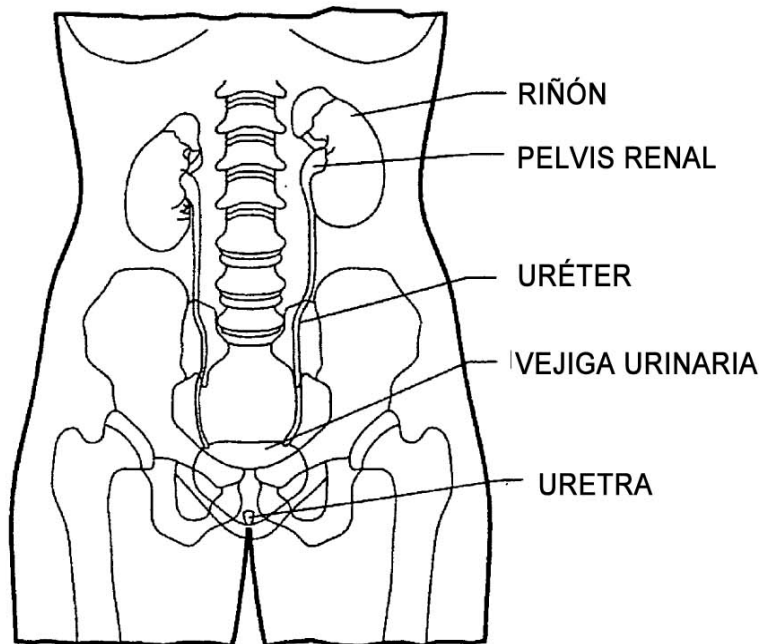


**FIG. 1**

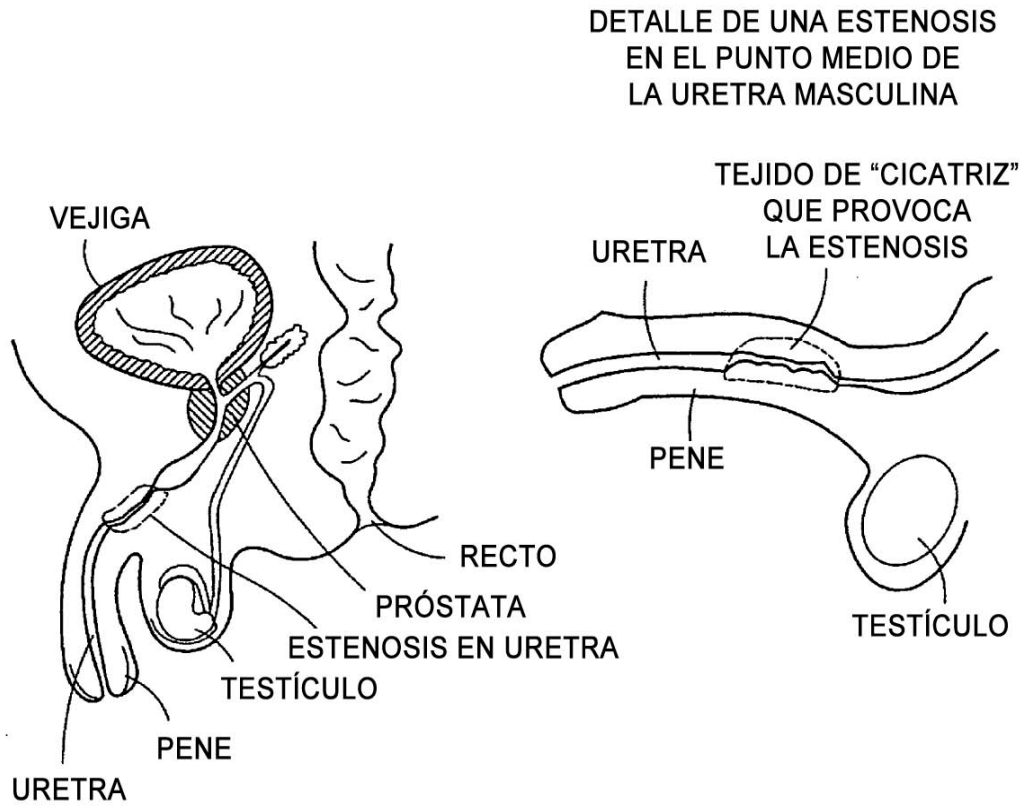




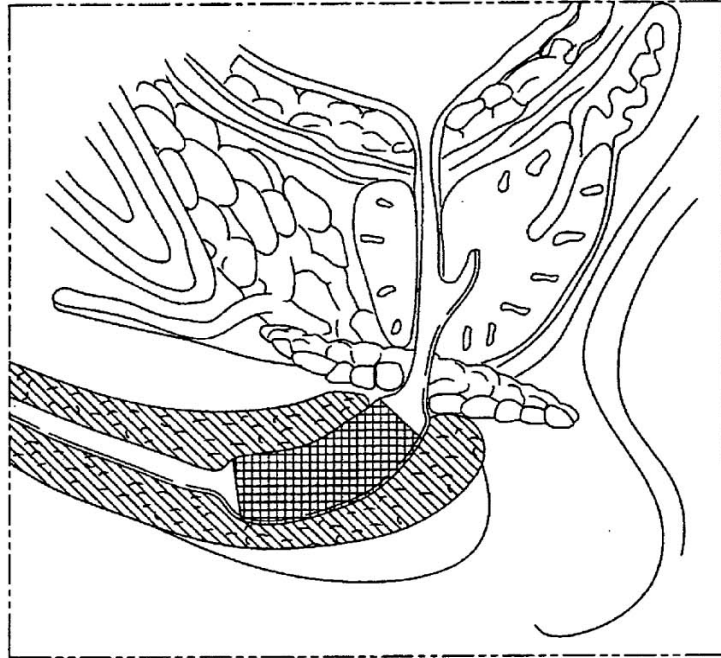
**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



**FIG. 3**



**FIG. 4**