

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 314**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 29/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2001 E 05006626 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **06.07.2005 EP 1550456**

54 Título: **Uso de la toxina botulínica en el tratamiento del dolor de la quemadura**

30 Prioridad:

14.04.2000 US 550371

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.01.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AOKI, KEI ROGER;
CUI, MINGLEI y
JENKINS, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 394 314 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de la toxina botulínica en el tratamiento del dolor de la quemadura

Fundamento

5 La presente invención se refiere a una toxina botulínica tipo A para el uso en un método para aliviar el dolor por quemadura en un paciente humano mediante administración periférica de la toxina botulínica tipo A.

10 Muchos, si no la mayoría de los achaques del cuerpo producen dolor. Generalmente, el dolor se experimenta cuando las terminaciones nerviosas libres que constituyen los receptores del dolor en la piel además de en ciertos tejidos internos, se someten a estímulos mecánicos, térmicos, químicos u otros estímulos nocivos. Los receptores del dolor pueden transmitir señales a lo largo de neuronas aferentes en el sistema nervioso central y de ahí al cerebro.

Las causas del dolor pueden incluir inflamación, herida, enfermedad, espasmo muscular y el comienzo de un suceso o síndrome neuropático. El dolor tratado de forma ineficaz puede ser devastador para la persona que lo experimenta limitando la función, reduciendo la movilidad, complicando el sueño e interfiriendo dramáticamente con la calidad de vida.

15 Un espasmo muscular puede llevar a la estimulación de receptores del dolor mecanosensibles provocando así una sensación de dolor. Así, el dolor puede surgir de o deberse a un espasmo muscular. Adicionalmente, el espasmo puede estimular indirectamente los receptores del dolor por compresión sobre los vasos sanguíneos, provocando isquemia en el tejido, que a su vez libera sustancias inductoras del dolor que estimulan los receptores del dolor para provocar sensaciones de dolor. Además, un espasmo muscular puede provocar una reducción localizada de pH que
20 puede percibirse como o que puede engendrar señales dolorosas. Por tanto, el dolor puede ser un efecto secundario de un espasmo muscular o hipertonicidad muscular.

25 El dolor inflamatorio puede darse cuando el tejido está dañado, como puede resultar de cirugía o debido a un suceso físico, químico o térmico adverso o a infección por un agente biológico. Cuando un tejido está dañado, una gran cantidad de sustancias endógenas inductoras del dolor, por ejemplo bradiquinina e histamina, pueden liberarse desde el tejido dañado. Las sustancias inductoras del dolor pueden unirse a receptores en las terminaciones nerviosas sensoriales e iniciar así señales aferentes de dolor.

30 De forma adicional, las sustancias inductoras del dolor pueden liberarse desde terminaciones aferentes nociceptivas, y los neuropéptidos liberados desde las terminaciones sensoriales pueden acentuar una respuesta inflamatoria. Así, durante la inflamación puede haber un brote de fibras periféricas peptidérgicas y un contenido aumentado de péptido, con muchas fibras que muestran una coexistencia de sustancia P (SP) y péptido relacionado con el gen calcitonina (CGRP). La sustancia P puede inducir a la contracción de células endoteliales, que a su vez provoca la extravasación de plasma para permitir a otras sustancias (bradiquinina, ATP, histamina) acceder a la cita de la herida y las terminaciones nerviosas aferentes. La liberación de sustancia P por la terminación nerviosa sensorial puede además desgranular mastocitos. Este proceso se ha considerado que es un factor importante en la
35 inflamación neurogénica debido a la liberación de mediadores inflamatorios tales como histamina y serotonina y la liberación de enzimas proteolíticas que catalizan la producción de bradiquinina. El CGRP aparentemente no produce extravasación de plasma aunque es un potente vasodilatador y además actúa de forma sinérgica con SP y otros mediadores inflamatorios para mejorar la extravasación de plasma. Todos los mediadores inflamatorios enumerados anteriormente pueden, o bien sintetizar nociceptores o producir dolor.

40 Después de la activación de las neuronas aferentes sensoriales primarias, la siguiente etapa en la transducción de señales sensoriales puede ser la activación de las neuronas de proyección, que llevan la señal, por medio del tracto espinotalámico, a partes superiores del sistema nervioso central tal como el núcleo talámico. Los cuerpos celulares de estas neuronas (distintas de las relacionadas con los nervios craneales) están localizados en el asta dorsal de la médula espinal. Aquí además, se puede encontrar las sinapsis entre las neuronas aferentes primarias y las de proyección. El asta dorsal está organizada en una serie de láminas que están apiladas, siendo la lámina I la más
45 dorsal seguida por la lámina II, etc. Las diferentes clases de aferentes primarias crean sinapsis en diferentes láminas. Para las aferentes primarias cutáneas, las fibras C crean sinapsis en las láminas I y II, las fibras delta A en las láminas I, II y V, y las fibras beta A en las láminas III, IV y V. Las láminas más profundas (V-VII, X) se cree que están implicadas en las rutas sensoriales que llegan desde tejidos más profundos tales como músculos y las
50 vísceras.

Los neurotransmisores predominantes en las sinapsis entre las neuronas aferentes primarias y las neuronas de proyección son sustancia P, glutamato, CGRP y neuropéptido Y. La eficacia de transmisión de estas sinapsis puede alterarse por medio de rutas descendentes y mediante interneuronas locales en la médula espinal. Estas neuronas moduladoras pueden liberar un número de mediadores que son o inhibidores (por ejemplo, péptidos opiáceos, glicina) o excitantes (por ejemplo, óxido nítrico, colecistoquinina), para proporcionar un mecanismo para elevar o
55 reducir la conciencia de las sensaciones.

Aunque el dolor inflamatorio es generalmente reversible y disminuye cuando el tejido dañado se ha reparado o el estímulo inductor del dolor se ha eliminado, los métodos actuales para tratar el dolor inflamatorio tienen muchos inconvenientes y deficiencias. Así, la típica administración oral, parenteral o tópica de un fármaco analgésico para tratar los síntomas del dolor o de, por ejemplo, un antibiótico para tratar los factores causantes del dolor inflamatorio, pueden dar por resultado una distribución sistémica extensa del fármaco y efectos secundarios indeseados. Adicionalmente, la terapia habitual para el dolor inflamatorio sufre de duraciones cortas de eficacia del fármaco que necesitan de frecuentes nuevas administraciones de fármaco con posible resistencia al fármaco resultante, desarrollo de anticuerpos y/o dependencia y adición al fármaco, todo lo cual es insatisfactorio. Además, la administración frecuente de fármaco aumenta el gasto del régimen al paciente y para acordarse el paciente puede necesitar el seguir un calendario de dosificación.

Ejemplos de tratamientos para la inflamación y dolor muscular incluyen fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDS), que incluyen aspirina e ibuprofeno; y opiáceos, tales como morfina.

Los NSAIDs alivian el dolor inhibiendo la producción de prostaglandinas liberadas por los tejidos dañados. Las prostaglandinas se han mostrados por ser mediadores periféricos del dolor y la inflamación, como en enfermedades artríticas, y una reducción en su concentración proporciona alivio a los pacientes. Se ha sugerido que las prostaglandinas están implicadas en la mediación del dolor en la médula espinal y el cerebro, lo que puede explicar los efectos analgésicos de los NSAIDs en algunos estados del dolor que no implican la inflamación o daño del tejido periférico. Sin embargo, las prostaglandinas son solo uno de varios mediadores del dolor. Como tal, los NSAIDs tienen un límite de actividad por encima del que dosis aumentadas no dan más alivio del dolor. Además, tienen efectos secundarios que limitan su utilidad. Por ejemplo, los NSAIDs pueden provocar irritación del tracto gastrointestinal y el uso prolongado puede llevar al desarrollo de ulceración extensiva del intestino. Esto es particularmente cierto en pacientes mayores que usan de forma frecuente NSAIDs para sus afecciones de artritis.

Las acciones terapéuticas de opiáceos son en la médula espinal. Los opiáceos inhiben la eficacia de la neurotransmisión entre las neuronas aferentes sensoriales primarias (principalmente fibras C) y las de proyección. Consiguen esto provocando una prolongada hiperpolarización de ambos elementos de estas sinapsis: el uso de opiáceos es eficaz aliviando la mayoría de los tipos de dolor agudo y dolor maligno crónico. Hay, sin embargo, un número de procesos dolorosos malignos crónicos que son parcial o completamente refractarios a la analgesia de opiáceos, particularmente aquellos que implican compresión del nervio, por ejemplo, por formación tumoral. Desafortunadamente, los opiáceos también tienen efectos secundarios indeseados que incluyen: (1) depresión del sistema respiratorio, (2) estreñimiento y (3) efectos psicoactivos que incluyen sedación y euforia. Estos efectos secundarios se dan a dosis similares a aquellas que producen analgesia y por lo tanto, limitan las dosis que pueden darse a los pacientes. De forma adicional, los opiáceos tales como morfina y heroína son drogas de abuso bien conocidas que llevan a la dependencia física, lo que también implica el desarrollo de tolerancia. Con el desarrollo de la tolerancia, la dosis de un fármaco necesaria para producir el mismo efecto analgésico aumenta con el tiempo. Esto puede llevar a un proceso en que las dosis necesarias para aliviar el dolor son peligrosas para la vida debido a los efectos secundarios mencionados previamente.

Aunque el dolor que surge de la inflamación y el espasmo muscular puede iniciarse por estimulación mecánica o química de la terminación libre de la neurona sensorial primaria, el dolor neuropático no necesita un estímulo inicial a la terminación nerviosa libre periférica. El dolor neuropático es un síndrome de dolor persistente o crónico que puede resultar del daño al sistema nervioso, los nervios periféricos, el ganglio espinal, raíz dorsal o al sistema nervioso central.

Los síndromes de dolor neuropático incluyen alodinia, diversas neuralgias tales como neuralgia post-herpética y neuralgia trigeminal, dolor fantasma, y síndromes de dolor regional complejos, tales como distrofia simpática del reflejo y causalgia. La causalgia se caracteriza a menudo por dolor con ardor espontáneo combinado con hiperalgesia y alodinia.

Trágicamente, no existe un método para tratar adecuada, predecible y específicamente el dolor neuropático establecido (Woolf C. et al., *Neuropathic Pain: Aetiology, Symptoms, Mechanisms, and Management*, Lancet 1999; 353: 1959-64), ya que los métodos actuales de tratamiento para el dolor neuropático consiste meramente en intentar ayudar a paciente a arreglárselas a través de terapia psicológica u ocupacional, más que reduciendo o eliminando el dolor experimentado.

Por ejemplo, métodos habituales para tratar el dolor neuropático incluyen la administración de bloques anestésicos locales dirigidos a puntos desencadenantes, nervios periféricos, plexos, raíces dorsales y al sistema nervioso simpático. Sin embargo, estos tratamientos solo tienen efectos antinociceptivos de vida corta. Adicionalmente, métodos de tratamiento analgésico de mayor duración, tales como bloques mediante inyección de fenol o crioterapia aumentan un riesgo considerable de discapacidad funcional irreversible. Además, la administración epidural o intratecal (colectivamente "intraespinal") crónica de fármacos tales como clonidina, esteroides, opiáceos o midazolam, tienen efectos secundarios significativos y eficacia cuestionable.

Toxina botulínica

La bacteria gram positiva, anaeróbica, *Clostridium botulinum*, produce una potente neurotoxina polipeptídica, toxina botulínica, que provoca una dolencia neuroparalítica en seres humanos y animales denominada como botulismo. Las esporas de *Clostridium botulinum* se encuentran en la tierra y pueden crecer en envases de comida esterilizados y sellados de forma inapropiada de fábricas de conserva en casa, que son la causa de muchos de los casos de botulismo. Los efectos del botulismo aparecen típicamente 18 a 36 horas después de comer los alimentos infectados con un cultivo o esporas de *Clostridium botulinum*. La toxina botulínica puede pasar aparentemente no atenuada a través del recubrimiento del intestino y atacar a las neuronas motoras periféricas. Los síntomas de intoxicación por toxina botulínica pueden progresar desde dificultad para andar, tragar y hablar hasta parálisis de los músculos respiratorios y muerte.

La toxina botulínica tipo A es el agente biológico natural más letal conocido por el hombre. Aproximadamente 50 picogramos de una toxina botulínica tipo A disponible comercialmente (complejo de neurotoxina purificada)¹ es una LD₅₀ en ratones (es decir, 1 unidad). Una unidad de BOTOX® contiene aproximadamente 50 picogramos de complejo de toxina botulínica tipo A. De forma interesante, en una base molar, la toxina botulínica tipo A es aproximadamente 1,8 billones de veces más letal que la difteria, aproximadamente 600 millones de veces más letal que el cianuro sódico, aproximadamente 30 millones de veces más letal que la toxina de cobra y aproximadamente 12 millones de veces más letal que el cólera. Singh, *Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins*, páginas 63-84 (capítulo 4) de *Natural Toxins II*, editado por B.R. Singh et al., Plenum Press, Nueva York (1976) (donde la LD₅₀ afirmada de toxina botulínica tipo A de 0,3 ng es igual a 1 U se corrige por el hecho de que aproximadamente 0,05 ng de BOTOX® es igual a 1 unidad). Una unidad (U) de toxina botulínica se define como la LD₅₀ sobre inyección intraperitoneal en ratones hembra Swiss Webster que pesan 18 a 20 gramos cada uno.

Se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas inmunológicamente distintas, siendo éstas respectivamente los serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C₁, D, E, F y G, cada una de las cuales se distingue por neutralización con anticuerpos específicos del tipo. Los diferentes serotipos de toxina botulínica varían en las especies animales a que afectan y en la gravedad y duración de la parálisis que evocan. Por ejemplo, se ha determinado que la toxina botulínica tipo A es 500 veces más potente, como se mide por el índice de parálisis producido en la rata, que lo que es la toxina botulínica tipo B. Adicionalmente, la toxina botulínica tipo B se ha determinado que no es tóxica en primates a una dosis de 480 U/kg que es aproximadamente 12 veces la LD₅₀ del primate para la toxina botulínica tipo A. La toxina botulínica aparentemente se enlaza con alta afinidad a neuronas motoras colinérgicas, se transloca en la neurona y bloquea la liberación de acetilcolina.

A pesar del serotipo, el mecanismo molecular de la intoxicación por toxina parece ser similar e implicar al menos tres pasos o etapas. En la primera etapa del proceso, la toxina se une a la membrana presináptica de la neurona diana a través de una interacción específica entre la cadena pesada, cadena H, y un receptor de superficie celular; se cree que el receptor es diferente para cada tipo de toxina botulínica y para la toxina tetánica. El segmento carboxilo terminal de la cadena H, H_C, parece ser importante para la focalización de la toxina a la superficie celular.

En la segunda etapa, la toxina cruza la membrana plasmática de la célula envenenada. La toxina se envuelve primero por la célula a través de endocitosis mediada por el receptor, y se forma un endosoma que contiene la toxina. La toxina escapa entonces del endosoma en el citoplasma de la célula. Se piensa que esta etapa está mediada por el segmento amino terminal de la cadena H, H_N, que desencadena un cambio conformacional de la toxina en respuesta a un pH de aproximadamente 5,5 o menor. Los endosomas se conocen por poseer una bomba de protones que disminuye el pH intra-endosomal. El cambio conformacional expone residuos hidrofóbicos en la toxina, lo que permite a la toxina incrustarse en la membrana endosómica. La toxina (o al menos la cadena ligera) se transloca entonces a través de la membrana endosomal en el citoplasma.

La última etapa del mecanismo de la actividad de la toxina botulínica parece implicar la reducción del enlace disulfuro que une la cadena pesada, cadena H, y la cadena ligera, cadena L. La actividad tóxica total de las toxinas botulínica y tetánica está contenida en la cadena L de la holotoxina; la cadena L es una zinc (Zn⁺⁺) endopeptidasa que rompe de forma selectiva proteínas esenciales para el reconocimiento y acoplamiento de vesículas que contienen neurotransmisores con la superficie citoplasmática de la membrana plasmática, y la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. La neurotoxina tetánica, toxina botulínica/B/D/F y/G, provocan la degradación de la sinaptobrevina (también denominada proteína de membrana asociada a la vesícula (VAMP)), una proteína de membrana sinaptosomal. La mayoría de la VAMP presente en la superficie citoplasmática de la vesícula sináptica se elimina como resultado de cualquiera de estos sucesos de ruptura. El serotipo A y E rompen SNAP-25. El serotipo C₁ se pensó originalmente que rompía la sintaxina, pero se encontró que rompía la sintaxina y SNAP-25. Cada toxina rompe específicamente un enlace diferente (excepto el tétanos y el tipo B que rompen el mismo enlace).

Las toxinas botulínicas se han usado en entornos clínicos para el tratamiento de trastornos neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. La toxina botulínica tipo A se ha aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. para el tratamiento de blefaroespasmos, estrabismo y espasmos hemifaciales. Los serotipos de toxina botulínica que no son tipo A aparentemente tienen una menor

¹ Disponible por Allergan, Inc., de Irvine, California, bajo la marca comercial BOTOX® en viales de 100 unidades).

potencia y/o una menor duración de actividad en comparación con la toxina botulínica tipo A. Los efectos clínicos de la toxina botulínica tipo A intramuscular periférica se ven normalmente en una semana de la inyección. La duración típica del alivio sintomático de una única inyección intramuscular de toxina botulínica tipo A se promedia en aproximadamente de tres meses.

- 5 Aunque todos los serotipos de toxinas botulínicas aparentemente inhiben la liberación del neurotransmisor acetilcolina en la unión neuromuscular, lo hacen afectando a diferentes proteínas neurosecretoras y/o rompiendo estas proteínas en diferentes sitios. Por ejemplo, los tipos botulínicos A y E rompen ambos la proteína asociada sinaptosomal de 25 kiloDalton (kD) (SNAP-25), aunque apuntan a diferentes secuencias de aminoácidos en esta proteína. Los tipos de toxina botulínica B, D, F y G actúan en la proteína asociada a la vesícula (VAMP, también denominada sinaptobrevina), con cada serotipo rompiendo la proteína en distinto sitio. Finalmente, la toxina botulínica tipo C₁ se ha mostrado que rompe tanto la sintaxina como la SNAP-25. Estas diferencias en el mecanismo de acción pueden afectar a la potencia relativa y/o duración de acción de los diversos serotipos de toxina botulínica. De forma significativa, se sabe que el citosol de las células B de la isleta pancreática contiene al menos SNAP-25 (*Biochem J* 1; 339 (pt 1): 159-65 (Abril de 1999)), y sinaptobrevina (*Mov Disord, Mayo 1995; 10(3): 376*).
- 10
- 15 El peso molecular de la molécula de proteína de toxina botulínica, para los siete serotipos de toxina botulínica conocidos, es aproximadamente 150 kD. De forma interesante, las toxinas botulínicas se liberan por la bacteria Clostridial como complejos que comprenden la molécula de proteína de toxina botulínica de 150 kDa junto con proteínas asociadas que no son toxina. Así, el complejo de toxina botulínica tipo A puede producirse por la bacteria Clostridial como formas de 900 kD, 500 kD y 300 kD. La toxina botulínica de tipos B y C₁ se produce aparentemente solo como un complejo de 500 kD. La toxina botulínica tipo D se produce como complejo tanto de 300 kD como de 500 kD. Finalmente, la toxina botulínica tipos E y F se producen solo como complejos de aproximadamente 300 kD. Se cree que los complejos (es decir, peso molecular mayor que aproximadamente 150 kD) contienen una proteína hemaglutinina que no es toxina y una proteína no hematoglutinina que no es toxina y no es tóxica. Estas dos proteínas que no son toxina (que junto con la molécula de toxina botulínica comprenden el complejo de neurotoxina relevante) pueden actuar para proporcionar estabilidad frente a la desnaturalización a la molécula de toxina botulínica y protección contra los ácidos digestivos cuando la toxina se ingiere. Adicionalmente, es posible que los mayores complejos de toxina botulínica (mayores que aproximadamente 150 kD de peso molecular) puedan dar por resultado una velocidad de difusión más lenta de la toxina botulínica desde el sitio de la inyección intramuscular de un complejo de toxina botulínica.
- 20
- 25
- 30 Estudios *in vitro* han indicado que la toxina botulínica inhibe la liberación inducida del catión potasio tanto de la acetilcolina como la norepinefrina a partir de cultivos celulares primarios de tejido del tallo encefálico. Adicionalmente, se ha presentado que la toxina botulínica inhibe la liberación evocada tanto de la glicina como del glutamato en cultivos primarios de neuronas de médula espinal y que en los preparados de sinaptosoma cerebral la toxina botulínica inhibe la liberación de cada uno de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina, norepinefrina, CGRP y glutamato.
- 35

La toxina botulínica tipo A puede obtenerse estableciendo y haciendo crecer cultivos de *Clostridium botulinum* en un fermentador y después cosechando y purificando la mezcla fermentada de acuerdo con procedimientos conocidos. Todos los serotipos de toxina botulínica se sintetizan inicialmente como proteínas de cadena sencilla inactivas que deben romperse o cortarse mediante proteasas para volverse neuroactivas. Las cepas bacterianas que hacen los serotipos A y G de toxina botulínica poseen proteasas endógenas, y los serotipos A y G pueden recuperarse por lo tanto a partir de cultivos bacterianos predominantemente en su forma activa. En contraste, los serotipos C₁, D y E de la toxina botulínica se sintetizan por cepas no proteolíticas y están, por tanto, típicamente inactivas cuando se recuperan del cultivo. Los serotipos B y F se producen tanto por cepas proteolíticas como no proteolíticas y por lo tanto, pueden recuperarse en la forma tanto activa como inactiva. Sin embargo, incluso las cepas proteolíticas que producen, por ejemplo, el serotipo de la toxina botulínica tipo B, solo rompe una parte de la toxina producida. La proporción exacta de moléculas de moléculas cortadas a no cortadas depende de la longitud de la incubación y la temperatura del cultivo. Por lo tanto, un cierto porcentaje de cualquier preparado de, por ejemplo, la toxina botulínica tipo B, es probable que esté inactiva, posiblemente contando para la potencia significativamente menor conocida de la toxina botulínica tipo B en comparación con la toxina botulínica tipo A. La presencia de moléculas de toxina botulínica inactivas en un preparado clínico contribuirá a la carga de proteína total del preparado, que se ha unido a antigenicidad aumentada, sin contribuir a su eficacia clínica. Adicionalmente, se sabe que la toxina botulínica tipo B tiene, en inyección intramuscular, una duración de actividad menor y es además menos potente que la toxina botulínica tipo A al mismo nivel de dosis.

40

45

50

- 55 La toxina botulínica tipo A, cristalina, de alta calidad, puede producirse a partir de la cepa A Hall de *Clostridium botulinum* con características de $\geq 3 \times 10^7$ U/mg, un A_{250}/A_{278} de menos que 0,60 y un patrón de bandas definido en electroforesis en gel. El conocido proceso de Shantz puede usarse para obtener toxina botulínica tipo A cristalina, como se describe en Shantz, E.J., et al, *Properties and use of Botulinum toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine*, Microbiol Rev. 56:80-99 (1992). Generalmente, el complejo de toxina botulínica tipo A puede aislarse y purificarse a partir de una fermentación anaeróbica cultivando *Clostridium botulinum* tipo A en un medio adecuado.
- 60 El proceso conocido puede usarse también, en la separación fuera de las proteínas que no son toxina, para obtener toxinas botulínicas puras, tal como por ejemplo: toxina botulínica tipo A purificada con un peso molecular de aproximadamente 150 kD con una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ LD₅₀ U/mg o mayor; toxina botulínica tipo B

purificada con un peso molecular de aproximadamente 156 kD con una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ LD₅₀ U/mg o mayor, y; toxina botulínica tipo F purificada con un peso molecular de aproximadamente 155 kD con una potencia específica de $1-2 \times 10^7$ LD₅₀ U/mg o mayor.

5 Las toxinas botulínicas y/o complejos de toxina botulínica pueden obtenerse a partir de List Biological Laboratories, Inc., Campbell, California; el Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, U.K.; Wako (Osaka, Japón), Metabiologics (Madison, Winconsin) además de Sigma Chemicals of St Louis, Missouri.

10 La toxina botulínica pura es tan lábil que generalmente no se usa para preparar una composición farmacéutica. Además, los complejos de toxina botulínica, tal como el complejo de toxina tipo A son además extremadamente susceptibles a la desnaturalización debida a la desnaturalización de superficie, calor y condiciones alcalinas. La toxina inactivada forma proteínas toxoides que pueden ser inmunogénicas. Los antibióticos resultantes pueden dar un paciente refractario a la inyección de toxina.

15 Como con enzimas generalmente, las actividades biológicas de las toxinas botulínicas (que son peptidasas intracelulares) es dependiente, al menos en parte, de su conformación tridimensional. Así, la toxina botulínica tipo A se destoxifica por calor, diversos compuestos químicos que estiran la superficie y secan la superficie. Adicionalmente, se sabe que la dilución del complejo de toxina obtenido por el cultivo conocido, fermentación y purificación a las concentraciones de toxina mucho, mucho menores, usadas para la formulación de la composición farmacéutica da por resultado la rápida destoxificación de la toxina a menos que esté presente un agente estabilizador adecuado. La dilución de la toxina a partir de cantidades de miligramos a una disolución que contiene nanogramos por milímetro presenta dificultades significativas por la rápida pérdida de toxicidad específica sobre dicha gran dilución. Como la toxina puede usarse meses o años después de que la composición farmacéutica que contiene toxina se formula, la toxina debe estabilizarse con un agente de estabilización. El único agente de estabilización con éxito para este propósito ha sido las proteínas derivadas de animal albúmina y gelatina. Y como se indica, la presencia de proteínas derivadas de animales en la formulación final presenta problemas potenciales en esos ciertos virus estables, priones u otros compuestos infecciosos o patogénicos llevados a partir de donantes pueden contaminar la toxina.

25 Además, cualquiera de las duras condiciones de pH, temperatura e intervalo de concentración necesarias para liofilizar (secar por congelación) o secar al vacío una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica en un formato de transporte y almacenaje de toxina (listo para el uso o reconstitución por un médico), puede destoxificar algo de la toxina. Así, las proteínas derivadas de animales o donantes tales como gelatina y albúmina de suero se han usado con algún éxito para estabilizar toxina botulínica.

30 Una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica comercialmente disponible se vende bajo la marca registrada BOTOX® (disponible a partir de Allergan, Inc., de Irvine, California). El BOTOX® consiste en un complejo purificado de toxina botulínica tipo A, albúmina y cloruro sódico empaquetado en forma estéril, seca al vacío. La toxina botulínica tipo A está hecha a partir de un cultivo de la cepa Hall de Clostridium botulinum crecido en un medio que contiene amina N-Z y extracto de levadura. El complejo de toxina botulínica tipo A se purifica a partir de la disolución de cultivo mediante una serie de precipitaciones ácidas a un complejo cristalino que consiste en la proteína de toxina activa de alto peso molecular y una proteína hemaglutinina asociada. El complejo cristalino se disuelve de nuevo en una disolución que contiene solución salina y albúmina y se filtró estéril (0,2 micras) antes del secado al vacío. El BOTOX® puede reconstituirse con solución salina estéril, no conservada, antes de la inyección intramuscular. Cada vial de BOTOX® contiene aproximadamente 100 unidades (U) de complejo de neurotoxina purificada de toxina tipo A de Clostridium botulinum, 0,5 miligramos de albúmina de suero humano y 0,9 miligramos de cloruro sódico en una forma estéril, seca al vacío, sin un conservante.

35 Para reconstituir una solución salina normal estéril de BOTOX® seco al vacío sin un conservante, se usó Inyección de Cloruro Sódico al 0,9% diseñando la cantidad apropiada de diluyente en la jeringa de tamaño apropiado. Como se cree que el BOTOX® se desnaturaliza mediante burbujeo o agitación violenta similar, el diluyente se inyecta suavemente en el vial. El BOTOX® se administraría en las cuatro horas después de la reconstitución. Durante este periodo de tiempo, el BOTOX® reconstituido se almacena en un refrigerador (2° a 8°C). El BOTOX® reconstituido es claro, incoloro y libre de materia particulada. El producto seco al vacío se almacena en un congelador a o por debajo de -5°C. El BOTOX® se administra en las cuatro horas después de que el vial se sacara del congelador y se reconstituyera. Durante estas cuatro horas, el BOTOX® reconstituido puede almacenarse en un refrigerador (2° a 8°C). El BOTOX® reconstituido es claro, incoloro y libre de materia particulada.

Se ha presentado que la toxina botulínica tipo A se ha usado en el ámbito clínico como sigue:

- (1) aproximadamente 75-125 unidades de BOTOX® por inyección intramuscular (músculos múltiples) para tratar la distonía cervical;
- 55 (2) 5-10 unidades de BOTOX® por inyección intramuscular para tratar líneas glabellares (surcos de la frente) (5 unidades inyectadas de forma intramuscular en el músculo prócer y 10 unidades inyectadas de forma intramuscular en cada músculo superciliar corrugador);

(3) aproximadamente 30-80 unidades de BOTOX® para tratar el estreñimiento mediante inyección intraesfínter del músculo puborrectal;

5 (4) aproximadamente 1-5 unidades por músculo de BOTOX® inyectado de forma intramuscular para tratar el blefaroespasma inyectando el músculo ocular orbicular pre-tarsal lateral del párpado superior y el músculo ocular orbicular pre-tarsal lateral del párpado inferior.

(5) para tratar estrabismo, los músculos extraoculares se han inyectado de forma intramuscular con entre aproximadamente 1-5 unidades de BOTOX®, variando la cantidad inyectada en base tanto al tamaño del músculo a inyectar como la extensión de parálisis muscular deseado (es decir, cantidad de corrección de dioptrías deseada).

10 (6) para tratar la espasticidad de la extremidad superior después de ictus mediante inyecciones intramusculares de BOTOX® en cinco diferentes músculos flexores de la extremidad superior, como sigue:

(a) flexor digitorum profundus (flexor profundo): 7,5 U a 30 U

(b) flexor digitorum sublimus (flexor superficial): 7,5 U a 30 U

(c) flexor carpi ulnaris (extensor lunar del carpo): 10 U a 40 U

(d) flexor carpi radialis (flexor radial del carpo): 15 U a 60 U

15 (e) biceps brachii (bíceps braquial): 50 U a 200 U. Cada uno de los cinco músculos indicados se han inyectado en la misma sesión del tratamiento, de manera que el paciente recibe de 90 U a 360 U de BOTOX® en el músculo flexor superior del limbo por inyección intramuscular en cada sesión de tratamiento.

20 (7) para tratar migraña, la inyección de 25 U de BOTOX® inyectada de forma pericraneal (inyectada de forma simétrica en los músculos glabellar, frontal y temporal) ha mostrado un beneficio significativo como un tratamiento profiláctico de la migraña en comparación con el vehículo como se mide mediante medidas decrecientes de la frecuencia de migraña, gravedad máxima, vómito asociado y uso agudo de medicación durante el periodo de tres meses después de la inyección de 25 U.

25 Se sabe que la toxina botulínica tipo A puede tener una eficacia de hasta 12 meses (*European J. Neurology* 6 (Supl. 4): S111-S1150:1999, y en algunas circunstancias durante tanto como 27 meses, (*The Laryngoscope* 109: 1344-1346:1999)). Sin embargo, la duración normal de una inyección intramuscular de Botox® es típicamente de aproximadamente 3 a 4 meses.

30 Como se describe, ciertas toxinas botulínicas se han usado para tratar diversos trastornos de movimiento, tal como enfermedades de músculo espasmódico con un alivio del dolor resultante. Por ejemplo, se conoce el uso de una toxina botulínica para tratar los espasmos musculares con alivio resultante tanto de la hiperactividad espasmódica del músculo como del dolor que surge de forma secundaria como resultado de o debido a la actividad espasmódica del músculo. Por ejemplo, Cheshire et al *Pain* 1994; 59(1):65-69 presentó que los paciente con síndrome de dolor miofascial experimentaron una reducción de dolor después de inyecciones de toxina botulínica tipo A en puntos desencadenantes. Véase además el documento WO 94/15629. Se cree que la toxina botulínica A puede reducir el dolor reduciendo la contracción sostenida del músculo que provocó o que provocó esencialmente el dolor en primer lugar. Así, el dolor que puede resultar o que puede acompañar un espasmo muscular puede deberse al pH local menor provocado por el espasmo. Un efecto indirecto de la parálisis del músculo flácido inducido por una toxina botulínica es permitir que el pH vuelva a un nivel fisiológico, provocando así la reducción del dolor como un efecto secundario de la denervación colinérgica de la placa motora terminal que puede darse debido a la administración de toxina botulínica periférica.

40 La toxina botulínica puede usarse para tratar dolor de cabeza por migraña que está asociado con espasmo muscular, trastornos vasculares, neuralgia y neuropatía (Binder Patente de EE.UU. núm. 5.714.468). De forma notable, el dolor por espasmo muscular, dolor de músculo hipertónico, dolor miofascial y dolor de cabeza por migraña pueden deberse todos, al menos en parte, a la producción y liberación de una o más sustancias nociceptivas de los músculos en sí mismos, durante periodos de tensión o contracción muscular aumentada.

45 El éxito de la toxina botulínica tipo A para tratar una variedad de trastornos clínicos ha llevado al interés en otros serotipos de toxina botulínica. Un estudio de dos preparados de botulina tipo A disponible comercialmente (BOTOX® y Dysport®) y preparados de toxinas botulínicas tipo B y F (ambos obtenidos de Wako Chemicals, Japón) se han llevado a cabo para determinar la eficacia del debilitamiento local del músculo, la seguridad y el potencial antigénico. Los preparados de toxina botulínica se inyectaron en la cabeza del músculo gemelo derecho (0,5 a 200,0 unidades/kg) y la debilidad muscular se evaluó usando el ensayo de puntuación de abducción digital del ratón (DAS). Los valores de ED₅₀ se calcularon a partir de las curvas de respuesta a la dosis. Se dieron a ratones adicionales inyecciones intramusculares para determinar las dosis de LD₅₀. El índice terapéutico se calculó como LD₅₀/ED₅₀. Grupos separados de ratones recibieron inyecciones de BOTOX® en la extremidad posterior (5,0 a 10,0 unidades/kg) o toxina botulínica tipo B (50,0 a 400,0 unidades/kg), y se ensayaron para la debilidad muscular y el consumo aumentado de agua, siendo lo último un modelo putativo para la boca seca. El potencial antigénico se

5 evaluó mediante inyecciones intramusculares mensuales en conejos (1,5 o 6,5 ng/kg para la toxina botulínica tipo B o 0,15 ng/kg para BOTOX[®]). La debilidad pico del músculo y la duración se relacionó con la dosis para todos los serotipos. Los valores ED₅₀ de DAS (unidades/kg) fueron como sigue: BOTOX[®]: 6,7, Dysport[®]: 24,7, toxina botulínica tipo B: 27,0 a 244,0, toxina botulínica tipo F: 4,3. El BOTOX[®] tenía una mayor duración de acción que la
 10 toxina botulínica tipo B o la toxina botulínica tipo F. Los valores del índice terapéutico fueron como sigue: BOTOX[®]: 10,5, Dysport[®]: 6,3, toxina botulínica tipo B: 3,2. El consumo de agua fue mayor en ratones inyectados con toxina botulínica tipo B que con BOTOX[®], aunque la toxina botulínica tipo B fue menos eficaz en el debilitamiento muscular. Después de cuatro meses de inyecciones 2 de 4 (donde se trató con 1,5 ng/kg) y 4 de 4 (donde se trató con 6,5 ng/kg) conejos desarrollaron anticuerpos contra la toxina botulínica tipo B. En un estudio separado, 0 de 9 conejos
 15 tratados con BOTOX[®] demostraron anticuerpos contra la toxina botulínica tipo A. Los resultados de DAS indican potencias pico relativas de toxina botulínica tipo A que son iguales a la toxina botulínica tipo F, y la toxina botulínica tipo F que son mayores que la toxina botulínica tipo B. Con respecto a la duración del efecto, la toxina botulínica tipo A fue mayor que la toxina botulínica tipo B, y la duración del efecto de la toxina botulínica tipo B fue mayor que la de la toxina botulínica tipo F. Como se muestra por los valores del índice terapéutico, los dos preparados comerciales de toxina botulínica tipo A (BOTOX[®] y Dysport[®]) son diferentes. El comportamiento de consumo de agua aumentado observado después de la inyección en la extremidad posterior de toxina botulínica tipo B indica que cantidades clínicamente significativas de este serotipo entraron en la circulación sistémica murina. Los resultados indican además que para alcanzar la eficacia comparable a la toxina botulínica tipo A, es necesario aumentar las dosis de los demás serotipos examinados. La dosis aumentada puede comprender seguridad. Además, en conejos, el tipo B fue más antigénico que el BOTOX[®], posiblemente por la mayor carga de proteína inyectada para alcanzar una dosis eficaz de toxina botulínica tipo B. *Eur J Neurol 1999 Nov; 6(Supl. 4): S3-S10.*

25 Además de tener acciones farmacológicas en la posición periférica, las toxinas botulínicas pueden tener además efectos inhibidores en el sistema nervioso central. Trabajo por Weigand et al, *Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1976; 292, 161-165, y Habermann, *Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1974; 281, 47-56, mostraron que la toxina botulínica es capaz de ascender al área espinal por transporte retrógrado. Como tal, una toxina botulínica inyectada en una posición periférica, por ejemplo, de forma intramuscular, puede transportarse de forma retrógrada a la médula espinal. Sin embargo, los autores de los citados artículos fueron incapaces de demostrar que el material radiomarcado era toxina botulínica intacta.

30 Como se trata anteriormente, el dolor asociado con el trastorno muscular, por ejemplo, dolor por espasmo muscular, y dolor de cabeza asociado con alteraciones vasculares, neuralgia y neuropatía, pueden tratarse de forma eficaz mediante el uso de toxina botulínica. Sin embargo, hay una clara deficiencia en medios disponibles para el tratamiento de una variedad de otros tipos de dolor. Dicho dolor incluye, por ejemplo, dolor no asociado con trastorno muscular, neuralgia que no es dolor de cabeza y dolor por neuropatía, dolor por inflamación tisular, dolor por inflamación de la articulación, dolor por inflamación tisular, dolor por cáncer, dolor post-operatorio, dolor por laceración, dolor isquémico, etc.

35 Se han hecho intentos para tratar estos otros tipos de dolor, aunque su éxito potencial y posible uso clínico es incierto en este momento. Por ejemplo, Foster et al. en la Patente de EE.UU. núm. 5.989.545, describe que una neurotoxina Clostridial, preferiblemente una toxina botulínica, conjugada químicamente o condensada de forma recombinante a un resto de localización particular, puede usarse para tratar el dolor.

40 Acetilcolina

Típicamente, solo un único tipo de neurotransmisor de molécula pequeña se libera por cada tipo de neurona en el sistema nervioso del mamífero. El neurotransmisor acetilcolina se secreta por las neuronas en muchas áreas del cerebro, pero específicamente por las células piramidales grandes de la corteza motora, por varias neuronas diferentes en el ganglio basal, por las neuronas motoras que inervan los músculos esqueléticos, por las neuronas pregangliónicas del sistema nervioso autónomo (tanto simpático como parasimpático), por las neuronas post-gangliónicas del sistema nervioso parasimpático, y por algunas de las neuronas post-gangliónicas del sistema nervioso simpático. Esencialmente, solo las fibras nerviosas simpáticas post-gangliónicas a las glándulas sudoríparas, los músculos piloerectores y unos pocos vasos sanguíneos son colinérgicos, ya que la mayoría de las neuronas post-gangliónicas del sistema nervioso simpático secretan el neurotransmisor norepinefrina. En la mayoría de los ejemplos, la acetilcolina tiene un efecto excitante. Sin embargo, la acetilcolina se conoce por tener efectos inhibidores en algunas de las terminaciones nerviosas parasimpáticas periféricas, tal como la inhibición del ritmo cardíaco por el nervio vago.

55 Las señales eferentes del sistema nervioso autónomo se transmiten al cuerpo a través o bien del sistema nervioso simpático o del sistema nervioso parasimpático. Las neuronas pregangliónicas del sistema nervioso simpático se extienden de los cuerpos celulares de neuronas simpáticas pregangliónicas situadas en el asta intermediolateral de la médula espinal. Las fibras nerviosas simpáticas pregangliónicas, que se extienden del cuerpo celular, tienen sinapsis con neuronas post-gangliónicas situadas o bien en un ganglio simpático paravertebral o en un ganglio prevertebral. Ya que, las neuronas pregangliónicas tanto del sistema nervioso simpático como del parasimpático son colinérgicas, la aplicación de acetilcolina a los ganglios excitará las neuronas post-gangliónicas tanto simpáticas como parasimpáticas.

5 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 post-gangliónicas del sistema nervioso parasimpático, además de las estimuladas por las neuronas colinérgicas post-gangliónicas del sistema nervioso simpático. Los receptores nicotínicos se encuentran en las sinapsis entre las neuronas pregangliónicas y post-gangliónicas tanto del sistema simpático como parasimpático. Los receptores nicotínicos están presentes además en muchas membranas de fibras del músculo esquelético en la unión neuromuscular.

10 La acetilcolina se libera a partir de neuronas colinérgicas cuando vesículas pequeñas, claras, intracelulares, se funden con la membrana celular neuronal presináptica. Una amplia variedad de células secretoras no neuronales, tales como células de médula adrenal (además de la línea celular PC12) y de la isleta pancreática, liberan catecolaminas y hormona paratiroidea, respectivamente, a partir de vesículas grandes con núcleo denso. La línea celular PC12 es un clon de células de feocromocitoma de rata usadas de forma extensiva como un modelo de cultivo tisular para estudios de desarrollo simpatoadrenal. La toxina botulínica inhibe la liberación de ambos tipos de compuestos a partir de ambos tipos de células *in vitro*, permeabilizadas (como por electroporación) o por inyección directa de la toxina en la célula denervada. La toxina botulínica se conoce también por bloquear la liberación del neurotransmisor glutamato de los cultivos celulares de sinaptosomas corticales.

15 Una unión neuromuscular se forma en el músculo esquelético por la proximidad de axones a células musculares. Una señal transmitida a través del sistema nervioso da por resultado una acción potencial en el axón terminal, con activación de canales de iones y liberación resultante del neurotransmisor acetilcolina desde vesículas sinápticas intraneuronales, por ejemplo, en la placa motora terminal de la unión neuromuscular. La acetilcolina cruza el espacio extracelular para unirse con las proteínas del receptor de acetilcolina en la superficie de la placa terminal muscular. Una vez que se ha dado suficiente unión, una acción potencial de la célula muscular provoca cambios específicos en el canal de iones de la membrana, dando por resultado la contracción de la célula muscular. La acetilcolina se libera entonces de las células musculares y se metaboliza por colinesterasas en el espacio extracelular. Los metabolitos se reciclan de vuelta en el axón terminal para volver a procesarse en más acetilcolina.

20 Lo que se necesita por lo tanto, es un método eficaz, de larga duración, no quirúrgico, para tratar el dolor, particularmente el dolor por quemadura.

Resumen

La presente invención encuentra esta necesidad y proporciona un método eficaz, de larga duración, no quirúrgico, para tratar el dolor por quemadura.

30 La presente invención proporciona una toxina botulínica tipo A para el uso en un método para tratar dolor, como se define en las reivindicaciones. El dolor tratado no está asociado con un trastorno muscular, tal como un espasmo muscular, porque se cree que un mecanismo por el que la presente invención trabaja es por un efecto antinociceptivo sobre neuronas del dolor aferentes, sensoriales, periféricas, en oposición a tener un efecto sobre las neuronas motoras.

35 La toxina botulínica es toxina botulínica tipo A, denominada en adelante como "la toxina botulínica".

La toxina botulínica puede ser una toxina botulínica modificada que tiene al menos un aminoácido eliminado, modificado o sustituido. Adicionalmente, la toxina botulínica puede hacerse al menos en parte, mediante un proceso recombinante.

40 La toxina botulínica puede administrarse en una cantidad entre aproximadamente 0,01 U/kg y aproximadamente 35 U/kg y el dolor tratado puede aliviarse sustancialmente para entre aproximadamente 1 mes y aproximadamente 27 meses, por ejemplo para de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 6 meses.

45 La administración periférica de la toxina botulínica puede llevarse a cabo antes de un comienzo de un suceso nociceptivo o síndrome experimentado por un paciente. Adicionalmente, la administración periférica de la toxina botulínica puede llevarse a cabo posteriormente a un comienzo de un suceso nociceptivo experimentado por un paciente.

50 resto, esencialmente completamente derivado de una neurotoxina seleccionada de un grupo que consiste en toxina botulínica tipos A, B, C₁, D, E, F, G y mezclas de los mismos; (b) una segunda región secuencial de aminoácidos eficaz para translocar el polipéptido o una parte del mismo a través de una membrana de endosoma, y; (c) una tercera región secuencial de aminoácidos que tiene actividad terapéutica cuando se libera en un citoplasma de una célula diana, en donde el dolor no está asociado con un espasmo muscular.

La primera región secuencial de aminoácidos del polipéptido puede comprender un carboxilo terminal de una cadena pesada derivada de la neurotoxina y la neurotoxina puede ser una toxina botulínica, tal como toxina botulínica tipo A.

La segunda región secuencial de aminoácidos del polipéptido puede tener un amino terminal de una cadena pesada derivada de una neurotoxina seleccionada de un grupo que consiste en toxina botulínica tipos A, B, C₁, D, E, F, G y

mezclas de las mismas. De forma notable, la segunda región secuencial de aminoácidos del polipéptido puede incluir un amino terminal de una cadena pesada de toxina derivada de la toxina botulínica tipo A.

Finalmente, la tercera región secuencial de aminoácidos del polipéptido puede comprender una cadena ligera de toxina derivada de una neurotoxina seleccionada de un grupo que consiste en toxina de *Clostridium beratti*, toxina butyricum; toxina tetánica, toxina botulínica tipos A, B, C₁, D, E, F, G y mezclas de las mismas. La tercera región secuencial de aminoácidos del polipéptido puede incluir una cadena ligera de toxina derivada de la toxina botulínica tipo A.

La presente invención incluye además un método para mejorar la función del paciente, comprendiendo el método la etapa de administración periférica de una toxina botulínica a un paciente que experimenta dolor por quemadura, mejorando así la función del paciente.

De forma significativa, las neurotoxinas dentro del alcance de la presente invención comprenden un resto de unión tipo nativo o salvaje con una afinidad específica por un receptor de superficie celular neuronal. Las neurotoxinas dentro del alcance de la presente invención excluyen los restos de localización neuronal que no son nativos a la neurotoxina porque se ha encontrado que la presente invención puede practicarse de forma eficaz sin la necesidad de hacer ninguna modificación o supresiones del resto de unión tipo nativo o salvaje de las neurotoxinas usadas.

Así, el uso de una neurotoxina con uno o más artefactos o construcciones de resto de localización no nativos se excluye del alcance de la presente invención como innecesario ya que, como se afirma, se ha descubierto sorprendentemente que la administración periférica de una neurotoxina según la presente invención proporciona alivio significativo del dolor incluso aunque la neurotoxina no comprenda un resto de localización neuronal no nativo. Así, se ha descubierto que una neurotoxina tal como toxina botulínica tipo A, en administración periférica, puede proporcionar alivio del dolor incluso aunque no se haya concedido a la neurotoxina de forma artificial o manipulativa ninguna unión de un resto de localización neuronal no nativo.

Sorprendentemente, se ha descubierto que una neurotoxina, por ejemplo una neurotoxina Clostridial, que tiene un resto de unión neuronal tipo salvaje, puede administrarse periféricamente en un mamífero para tratar el dolor. El resto de unión neuronal tipo salvaje es originalmente parte de la neurotoxina. Por ejemplo, la toxina botulínica tipo A, con su resto de unión neuronal tipo salvaje original, puede administrarse periféricamente en cantidades entre aproximadamente 0,01 U/kg a aproximadamente 35 U/kg para aliviar el dolor experimentado por un mamífero, tal como un paciente humano. Preferiblemente, la toxina botulínica usada se administra periféricamente en una cantidad entre aproximadamente 0,1 U/kg a aproximadamente 3 U/kg. De forma significativa, el efecto aliviante del dolor de los actuales métodos descritos puede persistir durante un promedio de 1-6 meses y más tiempo en algunas circunstancias. Se ha presentado que un efecto de una toxina botulínica puede persistir durante hasta 27 meses después de la administración.

La toxina botulínica puede diferir de una toxina botulínica que se da de forma natural por al menos un aminoácido. La toxina botulínica tiene además un resto de unión neuronal tipo salvaje.

La toxina botulínica puede tener un resto de unión neuronal tipo salvaje de otro subtipo de toxina botulínica.

Un método para tratar el dolor por quemadura comprende la etapa de administración periférica de una toxina botulínica a un mamífero. El dolor tratado no es esencialmente debido a un espasmo muscular porque se ha descubierto sorprendentemente que una toxina botulínica dentro del alcance de la presente invención puede usarse para tratar dolor que no es secundario a un espasmo muscular. Así, la presente invención es aplicable al tratamiento de dolor que surge independientemente de la presencia o ausencia de un trastorno muscular, tal como un espasmo muscular.

Definiciones

Las siguientes definiciones se proporcionan y se aplican en este documento:

“Cadena ligera” significa la cadena ligera de una neurotoxina clostridial. Puede tener un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, y puede denominarse como cadena L, L o como el dominio proteolítico (secuencia de aminoácidos) de una neurotoxina clostridial.

“Cadena pesada” significa la cadena pesada de una neurotoxina clostridial. Puede tener un peso molecular de aproximadamente 100 kDa y puede denominarse en este documento como cadena H o como H.

“H_N” significa un fragmento que puede tener un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, se deriva a partir de la cadena H de una neurotoxina Clostridial y es aproximadamente equivalente al segmento amino terminal de la cadena H, o la parte correspondiente a ese fragmento en la cadena H intacta. Se cree que contiene la parte de la neurotoxina clostridial tipo natural o salvaje implicada en la translocación de la cadena L a través de una membrana endosomal intracelular.

“H_C” significa un fragmento (aproximadamente 50 kDa) derivado de la cadena H de una neurotoxina clostridial que es aproximadamente equivalente al segmento carboxilo terminal de la cadena H, o la parte correspondiente a ese fragmento en la cadena H intacta. Se cree que es inmunogénico y que contiene la parte de la neurotoxina Clostridial tipo natural o salvaje implicada en enlace presináptico de alta afinidad a las neuronas motoras.

5 “Resto de unión neuronal tipo salvaje” significa que la parte de una neurotoxina que es nativa a la neurotoxina y que muestra una afinidad de enlace específica para un receptor en una neurona. Así, el resto de unión neuronal tipo salvaje o nativo excluye un resto de unión que no es nativo a la neurotoxina.

10 “Resto de localización” significa una molécula que tiene una afinidad de enlace específica por un receptor de superficie celular. El resto de localización no es una neurotoxina Clostridial H_C, o péptidos derivados de H_C con al menos uno de sus aminoácidos eliminados, modificados o sustituidos. El resto de localización es una molécula que no es una neurotoxina Clostridial, por ejemplo puede ser una bradiquinina.

“Administración local” significa administración por una ruta no sistémica a o en la vecindad del sitio de un mal, trastorno o dolor percibido.

15 “Administración periférica” significa la administración por medio de una ruta no sistémica a una posición periférica en un mamífero. Una posición periférica generalmente significa bajo la piel o en un músculo esquelético. La administración periférica incluye rutas de administración intramuscular periférica, intraglandular y subcutánea, pero excluye la administración intravenosa u oral y excluye además cualquier administración directa al sistema nervioso central.

Dibujos

20 Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención pueden entenderse mejor a partir de la siguiente descripción, reivindicaciones y los dibujos que la acompañan, donde en las Figuras 1 y 2 posteriores, “inyección” significa inyección o administración periférica.

25 La Figura 1 es un gráfico de respuesta con la dosis que muestra que un método alivia el dolor inflamatorio inducido bajo el modelo de formalina de rata durante al menos cinco días. El eje X describe el tiempo en minutos después del comienzo del modelo de formalina en ratas. El eje Y describe el tiempo gastado levantando y lamiendo la pata inyectada con formalina bajo el uso de inyecciones de control (solución salina, n=7) y BOTOX® (complejo de neurotoxina purificada de toxina botulínica tipo A) a concentraciones de 7 U/kg (n=8), 15 U/kg (n=5) y 30 U/kg (n=4). El BOTOX® se inyectó 5 días antes del comienzo de la prueba de formalina.

30 La Figura 2 es un gráfico de respuesta con la dosis que muestra que un método alivia el dolor inflamatorio inducido bajo el modelo de formalina en rata durante al menos doce días. El eje X describe el tiempo en minutos después del comienzo del modelo de formalina en ratas. El eje Y describe el tiempo gastado levantando y lamiendo la pata inyectada con formalina bajo el uso de inyecciones de control (solución salina, n=3) y BOTOX® (complejo de neurotoxina purificada de toxina botulínica tipo A) a concentraciones de 3,5 U/kg (n=7) y 7 U/kg (n=8). El BOTOX® se inyectó 12 días antes del comienzo de la prueba de formalina.

Descripción

35 La presente invención se basa en el descubrimiento de que la administración periférica de una toxina botulínica puede proporcionar tratamiento eficaz de dolor por quemadura. Notablemente, la toxina botulínica tiene un resto de unión neuronal nativo o tipo salvaje. El dolor tratado no se debe a un espasmo muscular, ni es el dolor del dolor de cabeza. El dolor por quemadura se trata por el efecto antinociceptivo a largo plazo de las toxinas botulínicas usadas. El componente resto de unión neuronal de la toxina botulínica es un resto de unión neuronal que es nativo a la toxina botulínica seleccionada porque se ha descubierto que la presente invención puede practicarse sin sustitución del resto de unión neuronal tipo salvaje con un resto de localización no nativo o tipo no salvaje. El tratamiento del dolor de cabeza no está dentro del alcance de la presente invención porque los sitios preferidos de administración periférica de una toxina botulínica según la presente invención excluyen la cabeza y el cuello.

45 Antes del descubrimiento, se ha usado una toxina botulínica para tratar el dolor asociado con diversos trastornos musculares. Así, se sabe que un trastorno muscular, tal como un músculo espasmódico, puede provocar dolor y que tratando el espasmo puede también aliviarse el dolor. Foster et al. describe que la neurotoxina está unida a un resto de localización para el uso en el tratamiento del dolor, que es que el resto de unión tipo salvaje de una neurotoxina Clostridial se elimina completamente y se sustituye por un resto de localización.

50 Sorprendentemente, se ha descubierto que una toxina botulínica que no se ha conjugado, unido, adherido o condensado con un resto de localización neuronal, puede administrarse de forma periférica para tratar el dolor por quemadura. Preferiblemente, el dolor tratado no es debido, que es que el dolor no surge directamente de o como unos resultados secundarios de un espasmo muscular.

55 Antes de la invención no se sabía que una toxina botulínica pudiera usarse para tratar dolor de forma eficaz, donde el dolor no es debido a un espasmo muscular o trastorno muscular hipertónico. El mecanismo fisiológico por el que

la administración periférica de neurotoxina puede dar por resultado el alivio a largo plazo del dolor no está claro. Se nota que mientras el dolor debido a un espasmo muscular o trastorno muscular hipertónico puede producir un pH local reducido, la invención no se apoya y no necesita la elevación de un nivel de pH bajo, local. Adicionalmente, mientras un espasmo muscular o trastorno muscular hipertónico puede aliviarse por un efecto anticolinérgico de una toxina botulínica, sobre neuronas motoras, la invención no se basa en un efecto sobre neuronas motoras. Sin desear estar atado por la teoría, se hipotetiza que un efecto de la administración periférica de una toxina botulínica, según la presente invención puede ser un efecto antinociceptivo sobre una neurona aferente sensorial periférica. De forma significativa, en la invención, el alivio del dolor es un efecto primario, en oposición a ser uno secundario, sobre la administración periférica de una toxina botulínica.

Así, la presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que una toxina botulínica que tiene un resto de unión neuronal tipo salvaje puede administrarse de forma periférica a un mamífero para aliviar el dolor por quemadura. La toxina botulínica según esta invención no está acoplada a un resto de localización no nativo. Un resto de unión tipo salvaje según la presente invención, puede ser un segmento H_C que existe de forma natural de una toxina botulínica o una secuencia de aminoácidos esencialmente derivada completamente a partir del segmento H_C de la toxina botulínica.

Como se usa en adelante, una secuencia de aminoácidos, por ejemplo un resto de unión de tipo salvaje, "derivado de" otra secuencia de aminoácidos, por ejemplo el segmento H_C, significa que la secuencia de aminoácidos resultante está duplicada exactamente como la secuencia de aminoácidos de la que se deriva; o la secuencia de aminoácidos resultante tiene al menos un aminoácido eliminado, modificado o sustituido cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de la que se deriva.

La toxina botulínica puede usarse en un método para el tratamiento de dolor por quemadura que comprende administrar a un mamífero dosis eficaces de una toxina botulínica que tiene un resto de unión neuronal tipo salvaje. En una realización, los métodos incluyen administrar a un mamífero una toxina botulínica que tiene un resto de unión neuronal tipo salvaje que es ya originalmente una parte de la toxina botulínica. Preferiblemente, la botulina tipo A usada tiene su resto de unión neuronal tipo salvaje original.

En otra realización, los métodos comprenden la administración de una toxina botulínica a un mamífero en donde la toxina botulínica difiere de una toxina botulínica que se da de forma natural por al menos un aminoácido. Por ejemplo, variantes de la toxina botulínica tipo A como se describen en *Biochemistry* 1995, 34, páginas 15175-15181 y *Eur. J. Biochem.*, 1989, 185, páginas 197-203, pueden administrarse a un mamífero para tratar dolor no relacionado con espasmos. Estas variantes tienen además restos de unión neuronal tipo salvaje.

En otra realización, la toxina botulínica tiene un resto de unión neuronal tipo salvaje de otra toxina botulínica. Por ejemplo, puede usarse la toxina botulínica tipo A que tiene un resto de unión neuronal tipo salvaje de toxina botulínica tipo B. Todas las demás combinaciones se incluyen en el alcance de la presente invención.

La administración periférica de la toxina botulínica puede ser en una posición de dolor real o percibido en el mamífero. En una realización, la toxina botulínica se administra de forma subcutánea a o cerca de la posición del dolor percibido. En otra realización, la toxina botulínica se administra de forma intramuscular a o cerca de la posición del dolor, por ejemplo a o cerca de un neoplasma en el mamífero. Además, inyecciones repetidas, frecuentes, o infusión de la toxina botulínica a una posición de dolor periférica está dentro del alcance de la presente invención. Sin embargo, dados los efectos terapéuticos de larga duración de la presente invención, las inyecciones frecuentes o infusión de la toxina botulínica pueden no ser necesarias. Por ejemplo, la práctica de la presente invención puede proporcionar un efecto analgésico, por inyección, durante 2 meses o más, por ejemplo 7 meses, en seres humanos.

Sin desear limitar la invención a cualquier mecanismo o teoría de operación, se cree que cuando se administra la toxina botulínica de forma local a una posición periférica, inhibe la liberación de neuro-sustancias, por ejemplo, sustancia P, desde la terminación sensorial primaria periférica. Como se trata anteriormente, una liberación de sustancia P por la terminación sensorial primaria periférica puede provocar o al menos amplificar el proceso de transmisión del dolor. Por lo tanto, la inhibición de su liberación en la terminación sensorial primaria periférica disminuirá el proceso de transmisión del dolor.

Además de tener acciones farmacológicas a una posición periférica de administración, un método dentro del alcance de la presente invención puede tener además un efecto antinociceptivo debido al transporte retrógrado a la neurotoxina desde el sitio de inyección periférica (es decir, subcutánea) al sistema nervioso central. Se ha determinado que la botulina tipo A puede transportarse de forma retrógrada a partir del sitio periférico de administración de vuelta al asta dorsal de la médula espinal. Presumiblemente, el transporte retrógrado es por medio del aferente primario. Este descubrimiento es consistente con el trabajo de Weigand et al, *Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1976; 292, 161-165, y Habermann, *Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1974; 281, 47-56, que mostraron que la toxina botulínica es capaz de ascender al área espinal por transporte retrógrado. Así, se presentó que la toxina botulínica tipo A inyectada de forma intramuscular puede transportarse de forma retrógrada a partir de la terminación sensorial primaria periférica a la terminación sensorial primaria central.

El descubrimiento difiere de forma significativa de la discusión en los artículos citados en el párrafo anterior. Se ha descubierto que, en la rata, después de la administración subcutánea periférica, la toxina botulínica se encontró localizada en el asta dorsal del animal, que está en la posición donde las fibras C tienen la sinapsis. Una inyección *subcutánea* es una inyección en una posición donde están situadas muchas fibras nerviosas nociceptivas bipolares. Estas fibras sensoriales van desde la periferia al asta dorsal de la médula espinal. Por el contrario, en uno o más de los artículos citados en el párrafo anterior, después de que se llevara a cabo la inyección de toxina *intramuscular*, algo de toxina botulínica radiomarcada se encontró situada en las raíces ventrales. La raíz ventral de la médula espinal es donde están situadas las neuronas motoras eferentes (fuera de tráfico) monopolares. Así, la técnica lleva a una expectativa de que la espasticidad muscular periférica puede esperarse como un resultado del transporte retrógrado de una toxina botulínica desde la periferia a una posición de la médula espinal.

Así, se ha creído por los expertos en la técnica que la aparición de una neurotoxina, tal como una toxina botulínica en la médula espinal de un mamífero: (1) induciría la espasticidad significativa en el receptor, y; (2) promovería los efectos perjudiciales sobre la médula espinal y las funciones cerebrales. Así, con respecto al citado efecto nocivo (1): se presentó, como ejemplos, en Williamson et al., en *Clostridial Neurotoxins and Substrate Proteolysis in Intact Neurons*, J. of Biological Chemistry 271:13; 7694-7699 (1996), que tanto la toxina tetánica como la toxina botulínica tipo A inhiben la liberación evocada de los neurotransmisores glicina y glutamato de los cultivos celulares de médula espinal de ratones fetales, mientras que se presentó por Hagenah et al., en *Effects of Type A Botulinum Toxin on the Cholinergic Transmission at Spinal Renshaw Cells and on the Inhibitory Action at the Inhibitory Interneurons*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 299, 267-272 (1977), que la inyección intraespinal directa de toxina botulínica tipo A en gatos preparados de forma experimental, anestesiados, inhibe la actividad de células Renshaw de SNC. La inhibición de la liberación central de neurotransmisor glicina y glutamato, además de la regulación hacia abajo de la actividad de células Renshaw, presumiblemente puede dar por resultado *in vivo* tanto la promoción de hiperactividad significativa de neuronas motoras con la consiguiente espasticidad muscular periférica.

Con respecto al efecto nocivo (2): se cree que la presencia central (médula espinal) de una neurotoxina tetánica ejerce, por movimiento retrógrado de la toxina tetánica a lo largo de neuronas del SNC, efectos negativos significativos sobre la médula espinal y las funciones cerebrales, contraindicando así cualquier deseo de tener una neurotoxina relacionada, tal como aparece la toxina botulínica (como por transporte retrógrado) en la médula espinal. Notablemente, la toxina botulínica y la toxina tetánica están ambas hechas por bacterias Clostridial, aunque por diferentes especies de Clostridium. De forma significativa, algunos investigadores han presentado que la toxina botulínica comparte, al menos en alguna extensión, la característica de subida neuronal anotada de la toxina tetánica. Véase, por ejemplo, Habermann E., *¹²⁵I-Labeled Neurotoxin from Clostridium Botulinum A: Preparation, Binding to Synaptosomes and Ascent in the Spinal Cord*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 281, 47-56 (1974).

La invención no encuentra sorprendentemente los efectos nocivos (1) o (2), y los métodos de administración periférica (subcutánea) descritos de la presente invención pueden practicarse para proporcionar un alivio eficaz y de larga duración a partir del dolor que no es debido a un espasmo muscular y para proporcionar una mejora general en la calidad de vida experimentada por el paciente tratado. El dolor experimentado por el paciente puede deberse, por ejemplo, a herida, cirugía, infección, accidente o enfermedad (que incluye cáncer y diabetes), que incluyen enfermedades y trastornos neuropáticos, donde el dolor no es debido principalmente a un espasmo muscular o proceso de músculo hipertónico.

Una vez en la terminación sensorial primaria central situada en el asta dorsal de la médula espinal, la neurotoxina puede inhibir además la liberación del neurotransmisor responsable de la transmisión de señales de dolor, por ejemplo sustancia P. Esta inhibición previene la activación de las neuronas de proyección en el tracto espinotalámico y aliviando así el dolor. Por lo tanto, la administración periférica de la neurotoxina, debido a su efecto antinociceptivo central ahora descubierto, sirve como un método alternativo para la administración central (es decir, intraespinal) de un analgésico, eliminando así las complicaciones asociadas con la administración central de un fármaco analgésico.

Además, se ha mostrado por Habermann *Experientia* 1988; 44:224-226, que la toxina botulínica puede inhibir la liberación de noradrenalina y GABA desde los homogeneizados cerebrales. Este descubrimiento sugiere que la toxina botulínica puede entrar en las terminaciones nerviosas simpáticas adrenérgicas y terminaciones nerviosas GABA. Como tal, la toxina botulínica puede administrarse al sistema simpático para proporcionar bloqueo a largo plazo y aliviar el dolor, por ejemplo, dolor neuropático. La administración de una neurotoxina, preferiblemente toxina botulínica tipo A, proporciona un beneficio de bloqueo a largo plazo sin el riesgo de deficiencia funcional permanente, que no es posible con compuestos farmacéuticos actualmente en uso.

La cantidad de la neurotoxina administrada puede variar ampliamente según el trastorno particular a tratar, su gravedad y otras diversas variables del paciente que incluyen tamaño, peso, edad y respuesta a la terapia. Por ejemplo, la extensión del área de dolor periférico se cree que es proporcional al volumen de neurotoxina inyectada, mientras la cantidad de la analgesia, para la mayoría de los intervalos de dosis, se cree que es proporcional a la concentración de la neurotoxina inyectada. Además, la posición particular para la administración de neurotoxina puede depender de la posición del dolor a tratar.

Generalmente, la dosis de neurotoxina a administrar variará con la edad, enfermedad que se presenta y peso del mamífero a tratar. La potencia de la neurotoxina se considerará también.

En una realización según esta invención, las dosis terapéuticamente eficaces de una neurotoxina, por ejemplo, toxina botulínica tipo A, en una posición periférica, puede estar en cantidades entre aproximadamente 0,01 U/kg y aproximadamente 35 U/kg. Un intervalo preferido para la administración de una neurotoxina que tiene un resto de unión neuronal tipo salvaje, tal como la toxina botulínica tipo A, para así alcanzar un efecto antinociceptivo en el paciente tratado, es de aproximadamente 0,01 U/kg a aproximadamente 35 U/kg. Un intervalo más preferido para la administración periférica de una neurotoxina, tal como toxina botulínica tipo A, para así alcanzar un efecto antinociceptivo en el paciente tratado, es de aproximadamente 1 U/kg a aproximadamente 15 U/kg. Menos de aproximadamente 0,1 U/Kg puede dar por resultado el efecto terapéutico deseado siendo de menos que la duración posible óptima o más larga, mientras que más de aproximadamente 2 U/kg puede aún dar por resultado algunos síntomas de flacidez muscular. Un intervalo más preferido para la administración periférica de una neurotoxina, tal como la toxina botulínica tipo A, para así alcanzar un efecto antinociceptivo en el paciente tratado, es de aproximadamente 0,1 U/kg a aproximadamente 1 U/kg.

Aunque se proporcionan ejemplos de rutas de administración y dosificaciones, la ruta apropiada de administración y dosificación se determina generalmente en una base de caso por caso por el médico que atiende. Dichas determinaciones son rutinarias para un experto en la técnica (véase por ejemplo, *Harrison's Principles of Internal Medicine* (1998), editado por Anthony Fauci et al., 14ª edición, publicada por McGraw Hill). Por ejemplo, la ruta y dosificación para la administración de una neurotoxina según la presente invención descrita puede seleccionarse en base a criterios tales como las características de solubilidad de la neurotoxina elegida además de la intensidad del dolor percibido.

En otra amplia realización de la invención, se proporcionan métodos para tratar dolor no relacionado con espasmos que comprende administrar dosis eficaces de una neurotoxina, en donde la neurotoxina es un polipéptido sencillo en oposición al di-polipéptido como se describe anteriormente.

En una realización, la neurotoxina es un polipéptido sencillo que tiene tres regiones secuenciales de aminoácidos. La primera región secuencial de aminoácidos incluye un resto de unión neuronal que está esencialmente derivado completamente de una neurotoxina seleccionada de un grupo que consiste en toxina beratti; toxina butyricum; toxina tetánica; toxina botulínica tipos A, B, C₁, D, E, F y G. Preferiblemente, la primera región secuencial de aminoácidos se deriva del extremo carboxilo de una cadena pesada de toxina, H_C. Más preferiblemente, la primera región secuencial de aminoácidos se deriva de la H_C de la toxina botulínica tipo A.

La segunda región secuencial de aminoácidos es eficaz para translocar el polipéptido o una parte del mismo a través de una membrana de endosoma en el citoplasma de una neurona. En una realización, la segunda región secuencial de aminoácidos del polipéptido comprende un extremo terminal de una cadena pesada, H_N, derivada de una neurotoxina seleccionada de un grupo que consiste en toxina beratti; toxina butyricum; toxina tetánica; toxina botulínica tipos A, B, C₁, D, E, F y G. Preferiblemente, la segunda región secuencial de aminoácidos del polipéptido comprende un extremo terminal de una cadena pesada de toxina, H_N, derivada de la toxina botulínica tipo A.

La tercera región secuencial de aminoácidos tiene actividad terapéutica cuando se libera en el citoplasma de una célula diana o neurona. En una realización, la tercera región secuencial de aminoácidos del polipéptido comprende una cadena ligera de toxina, L, derivada de una neurotoxina seleccionada de un grupo que consiste en toxina beratti; toxina butyricum; toxina tetánica; toxina botulínica tipos A, B, C₁, D, E, F y G. Preferiblemente, la tercera región secuencial de aminoácidos del polipéptido comprende una cadena ligera de toxina, L, derivada de la toxina botulínica tipo A.

En una realización, el polipéptido comprende una primera región secuencial de aminoácidos derivada del H_C de la toxina tetánica, una segunda región secuencial de aminoácidos derivada del H_N de la toxina botulínica tipo B, y una tercera región secuencial de aminoácidos derivada de la cadena L de botulina tipo A. En una realización preferida, el polipéptido comprende una primera región secuencial de aminoácidos derivada de la H_C de la toxina botulínica tipo B, una segunda región secuencial de aminoácidos derivada de la H_N de la toxina botulínica tipo A, y una tercera región secuencial de aminoácidos derivada de la cadena L de la botulina tipo A. Todas las demás combinaciones se incluyen en el alcance de la presente invención.

En otra realización, el polipéptido comprende una primera región secuencial de aminoácidos derivada de la H_C de la toxina botulínica tipo A, en donde la secuencia de aminoácidos tiene al menos un aminoácido eliminado, modificado o sustituido; una segunda región secuencial de aminoácidos derivada de la H_N de la toxina botulínica tipo A, y una tercera región secuencial de aminoácidos derivada de la cadena L de botulina tipo A. Todas la demás combinaciones se incluyen en el alcance de la presente invención.

Como se indica anteriormente, estos polipéptidos son cadenas sencillas y pueden no ser tan potentes como se desea. Para aumentar su potencia, la tercera

Si una toxina botulínica no modificada se va a usar para tratar dolor por quemadura como se describe en este documento, la toxina botulínica puede obtenerse cultivando una especie bacteriana apropiada. Por ejemplo, la toxina

botulínica tipo A puede obtenerse estableciendo y haciendo crecer cultivos de *Clostridium botulinum* en un fermentador y después cosechando y purificando la mezcla fermentada de acuerdo con procedimientos conocidos. Todos los serotipos de toxina botulínica se sintetizan inicialmente como proteínas inactivas de cadena sencilla que deben romperse o cortarse con proteasas para volverse neuroactivas. Las cepas bacterianas que hacen los serotipos A de la toxina botulínica poseen proteasas endógenas y los serotipos A pueden por lo tanto, recuperarse de los cultivos bacterianos predominantemente en su forma activa.

Si una toxina botulínica modificada se va a usar según esta invención, pueden usarse técnicas recombinantes para producir las toxinas botulínicas deseadas. La técnica incluye las etapas de obtención de materiales genéticos a partir de fuentes naturales, o fuentes sintéticas, que tienen códigos para un resto de unión neuronal, una secuencia de aminoácidos eficaz para translocar la toxina botulínica o una parte de la misma, y una secuencia de aminoácidos que tiene actividad terapéutica cuando se libera en un citoplasma de una célula diana, preferiblemente una neurona. En una realización preferida, los materiales genéticos tienen códigos para H_C, H_N y la cadena L de las toxinas botulínicas, toxinas botulínicas modificadas y fragmentos de las mismas. Las construcciones genéticas se incorporan en células huésped para la amplificación fusionando primero las construcciones genéticas con vectores de clonación, tales como fagos o plásmidos. Después los vectores de clonación se insertan en huéspedes, preferiblemente *E. Coli*. Después de las expresiones de los genes recombinantes en células huésped, las proteínas resultantes pueden aislarse usando técnicas convencionales.

Aunque las técnicas recombinantes se proporcionan para la producción de toxinas botulínicas modificadas, las técnicas recombinantes pueden también emplearse para producir toxinas botulínicas no modificadas, por ejemplo, toxina botulínica A como existe de forma natural, ya que la secuencia genética de la toxina botulínica tipo A se conoce.

Hay muchas ventajas para producir estas toxinas botulínicas de forma recombinante. Por ejemplo, la producción de toxina botulínica a partir de cultivos anaeróbicos de *Clostridium* es un proceso engorroso y consumidor de tiempo que incluye un protocolo de purificación multi-etapa que implica varias etapas de precipitación de proteína y cristalización tanto prolongada como repetida de la toxina o varias etapas de cromatografía en columna. De forma significativa, la alta toxicidad del producto dicta que el procedimiento debe llevarse a cabo bajo contención estricta (BL-3). Durante el proceso de fermentación, las toxinas botulínicas de cadena sencilla plegadas se activan mediante proteasas clostridiales endógenas a través de un proceso denominado de corte. Esto implica la eliminación de aproximadamente 10 residuos de aminoácido de la cadena sencilla para crear la forma di-cadena en que las dos cadenas permanecen unidas de forma covalente a través del enlace disulfuro intracatenal.

La toxina botulínica cortada es mucho más activa que la forma no cortada. La cantidad y posición precisa del corte varía con los serotipos de la bacteria que produce la toxina. Las diferencias en la activación de la toxina botulínica de cadena sencilla y, por tanto, el rendimiento de la toxina cortada, son debidas a variaciones en el tipo y cantidades de actividad proteolítica producida por una cepa dada. Por ejemplo, más del 99% de la toxina botulínica de cadena sencilla tipo A de *Clostridium botulinum* se activa mediante la cepa Hall A de *Clostridium botulinum*. Así, la alta toxicidad de la toxina botulínica madura tiene una parte principal en la fabricación comercial de neurotoxinas como agentes terapéuticos.

El grado de activación de toxinas clostridiales generadas por ingeniería es, por tanto, una importante consideración para la fabricación de estos materiales. Sería una ventaja principal si neurotoxinas tales como toxina botulínica y toxina tetánica pudieran expresarse, de forma recombinante, en alto rendimiento, en bacterias de crecimiento rápido (tal como células *E. coli* heterólogas) como cadenas sencillas relativamente no tóxicas (o cadenas sencillas que tienen actividad tóxica reducida) que son seguras, fáciles de aislar y sencillas de convertir a la forma totalmente activa.

Con la seguridad siendo un asunto principal, el trabajo previo se ha concentrado en la expresión en *E. coli* y la purificación de cadenas H y L individuales de toxinas tetánica y botulínica; estas cadenas aisladas son, por si mismas, no tóxicas; véase Li et al., *Biochemistry* 33:7014-7020 (1994); Zhou et al., *Biochemistry* 34:15175-15181 (1995). Después de la producción separada de estas cadenas peptídicas y bajo condiciones estrictamente controladas, las cadenas H y L pueden combinarse por unión disulfuro oxidativo para formar las di-cadenas neuromoduladoras.

Se sabe que el dolor post-operatorio resultante de (es decir, secundario a) un espasmo muscular, puede aliviarse mediante la inyección pre-operatoria de toxina botulínica tipo A. *Developmental Medicine & Child Neurology* 42; 116-121:2000. Contrariamente, esta invención abarca un método para tratar el dolor post-operatorio por administración periférica, pre- o peri-operatoria, de una toxina botulínica donde el dolor no es debido a un músculo espasmódico.

Así, un paciente puede o bien durante la cirugía o hasta aproximadamente diez días antes de la cirugía (donde la cirugía no está relacionada con la corrección de o el tratamiento de un proceso por músculo espasmódico) ser administrado local y periféricamente por inyección en bolo con de aproximadamente 20 unidades a aproximadamente 300 unidades de una toxina botulínica, tal como toxina botulínica tipo A, a o en la cercanía del sitio de una incisión de prospección en la dermis del paciente. La inyección de toxina botulínica puede ser subcutánea o intramuscular. La cirugía no se lleva a cabo para tratar o aliviar dolor que resulta de un músculo

hiperactivo o hipertónico porque se ha descubierto sorprendentemente que muchos tipos de dolor que no surgen de o que no resultan de un espasmo muscular, pueden aliviarse significativamente mediante la práctica de esta invención descrita.

5 Según la invención, para el alivio de dolor post-operatorio, un paciente que está previsto operar con el propósito de eliminación tumoral, injerto de hueso, sustitución ósea, cirugía de exploración, cierre de heridas, una cirugía estética tal como liposucción, o cualquiera de una miríada de otros tipos de posibles procedimientos quirúrgicos (tratamiento de trastorno no muscular) que necesita una o más incisiones en y/o a través de la dermis del paciente, puede tratarse, según esta invención, por administración periférica de aproximadamente 0,01 U/kg a aproximadamente 60 U/kg de una toxina botulínica, tal como toxina botulínica tipo A o B. La duración del alivio del dolor post-operatorio significativo puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 meses, o más.

10 Un método dentro del alcance de la presente invención puede proporcionar función mejorada al paciente. "Función mejorada al paciente" puede definirse como una mejora medida por factores tales como un dolor reducido, tiempo reducido pasado en cama, movilización aumentada, actitud más sana, estilo de vida más variado y/o salud permitida por tono muscular normal. La función mejorada al paciente es sinónimo con una calidad de vida mejorada (QOL). QOL puede valorarse usando, por ejemplo, los procedimientos conocidos de puntuación de supervivencia de salud SF-12 o SF-36. SF-36 valora la salud física y mental de un paciente en los ocho dominios de funcionamiento físico, limitaciones de función debido a problemas físicos, funcionamiento social, dolor corporal, salud mental general, limitaciones de función debido a problemas emocionales, vitalidad y percepciones de salud general. Las puntuaciones obtenidas pueden compararse con valores publicados disponibles para diversas poblaciones generales y de pacientes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes proveen a los expertos en la técnica con métodos preferidos específicos para tratar dolor no relacionado con espasmos en el alcance de la presente invención y no se pretende limitar el alcance de la invención. En los siguientes ejemplos pueden llevarse a cabo diversos modos de administración no sistémica de una neurotoxina. Por ejemplo, por inyección de bolo intramuscular, por inyecciones subcutáneas múltiples en zonas dérmicas a y en la región de dolor o por implantación de un implante de liberación controlada.

Ejemplo 1

Alivio del Dolor por Administración Periférica de la Toxina Botulínica Tipo A

30 Se llevaron a cabo dos experimentos. Se usaron ratas Sprague-Dawley (aproximadamente 300 a aproximadamente 350 gramos) en ambos experimentos. La neurotoxina usada en ambos experimentos fue BOTOX[®] (complejo de neurotoxina purificada de toxina botulínica tipo A). En el primer experimento hubo 4 grupos de tratamiento (dosis): ratas de control (solución salina inyectada) (n=4), ratas de 7 U BOTOX[®]/kg (n=8), ratas de 15 U BOTOX[®]/kg (n=5) y ratas de 30 U BOTOX[®]/kg (n=4). Para las ratas de control, se inyectaron 25 microlitros de solución salina al 0,9% de forma subcutánea en la superficie plantar de la extremidad trasera del animal. El sitio y ruta de administración de BOTOX[®] fue igual que para la inyección salina del grupo de control.

35 Cinco días después de la inyección de o bien la solución salina o el BOTOX[®], se inyectaron 50 microlitros de formalina al 5% en el sitio en cada una de las ratas en todos los cuatro grupos donde o bien la solución salina o el BOTOX[®] se han inyectado previamente. El levantamiento/lamido de la extremidad por los animales sujeto se grabó entonces a intervalos de 5 minutos durante una hora.

40 El segundo conjunto de experimentos implicaron el mismo protocolo que se hizo en el primer experimento. En el segundo experimento hubo tres grupos de tratamiento (dosis): ratas de control (solución salina inyectada) (n=3), ratas de 3,5 U/kg (n=7) y ratas de 7 U/kg (n=8); y el ensayo de formalina se llevó a cabo en el duodécimo día después de la inyección de BOTOX[®] o solución salina original.

45 Los resultados de estos dos experimentos se muestran en las Figuras 1 y 2, respectivamente. Los primeros 5 a 10 minutos pueden denominarse como fase 1 que va seguida por la fase 2. Como se muestra por las Figuras 1 y 2, tanto en 5 días como en 12 días después de la inyección, hubo un alivio del dolor dependiente de la dosis significativo en los animales tratados con BOTOX[®].

Ejemplo 2

Administración Periférica de una Toxina Botulínica para Aliviar el Dolor que No es por Espasmos

50 Una mujer de 46 años de edad se presenta con dolor localizado en la región deltoidea debido a un trastorno artrítico. El músculo no está en espasmos, ni muestra un trastorno hipertónico. La paciente se trata mediante una inyección en bolo de entre aproximadamente 50 Unidades y 200 unidades de toxina botulínica tipo A intramuscular. En los días 1-7 después de la administración de neurotoxinas, el dolor del paciente se alivia sustancialmente. La duración de alivio de dolor significativo es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 meses. Un dolor en el hombro, brazo

y mano debido a la osteoporosis, fijación de articulaciones, insuficiencia coronaria, osteoartritis cervical, enfermedad del hombro localizada, o debido a un periodo prolongado de descanso en cama puede tratarse de forma similar.

Ejemplo 3

Administración Periférica de una Neurotoxina para Tratar Neuralgia Post-terapéutica.

- 5 La neuralgia post-terapéutica es uno de los más intratables de los problemas de dolor crónico. Los pacientes que sufren este proceso atrozmente doloroso son a menudo mayores, tienen enfermedad debilitante, y no son adecuados para procedimientos intervencionistas principales. La diagnosis se hace fácilmente por la aparición de las lesiones curadas de herpes y por la historia del paciente. El dolor es intenso y emocionalmente estresante. La neuralgia post-terapéutica puede darse en cualquier sitio, aunque es más a menudo en el tórax.
- 10 Un hombre de 76 años de edad presenta un dolor tipo post-terapéutico. El dolor se localiza en la región abdominal. El paciente se trata con una inyección de bolo de entre aproximadamente 50 Unidades y 200 unidades de toxina botulínica tipo A de forma subcutánea a la región abdominal. Dentro de los días 1-7 después de la administración de neurotoxina, el dolor del paciente se alivia sustancialmente. La duración del alivio del dolor significativa es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 meses.

15 Ejemplo 4

Administración Periférica de una Neurotoxina para Tratar Dolor por Tumor Nasofaríngeo.

Estos tumores, lo más a menudo carcinomas de células escamosas, están normalmente en la fosa de Rosenmuller y pueden invadir la base del cráneo. El dolor en la cara es común. Es dolor sordo, constante, por naturaleza.

- 20 Un hombre de 35 años de edad presenta un dolor tipo tumor nasofaríngeo. El dolor se presenta en la mejilla izquierda inferior. El paciente se trata mediante una inyección en bolo de entre aproximadamente 10 unidades y aproximadamente 35 unidades de toxina botulínica tipo A de forma intramuscular en la mejilla. En 1-7 días después de la administración de neurotoxina, el dolor del paciente se alivia sustancialmente. La duración del alivio significativo del dolor es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 meses.

Ejemplo 5

- 25 Administración Periférica de una Neurotoxina para Tratar Dolor Inflamatorio Crónico

Un paciente, 45 años de edad, se presenta con dolor inflamatorio crónico en la región del pecho. El paciente se trata mediante una inyección en bolo de entre aproximadamente 50 Unidades y 200 Unidades de toxina botulínica tipo A intramuscular. En 1-7 días después de la administración de la neurotoxina, el dolor del paciente se alivia sustancialmente. La duración del alivio significativo del dolor es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 meses.

30

Ejemplo 6

Administración Periférica de una Neurotoxina para Tratar Dolor Provocado por Quemaduras

- 35 Un paciente, 51 años de edad, que experimenta dolor posterior a unas quemaduras de primer o segundo grado, graves y extensas, en el brazo. El paciente se trata mediante una inyección en bolo de entre aproximadamente 30 unidades a aproximadamente 200 unidades de toxina botulínica tipo A, de forma subcutánea en el brazo. En 1-7 días después de la administración de neurotoxina, el dolor del paciente se alivia sustancialmente. La duración del alivio significativo del dolor es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 meses.

Ejemplo 7

Administración Periférica de una Neurotoxina para Tratar Dolor de Articulaciones

- 40 Un paciente, 63 años de edad, que sufre de dolor de articulaciones resultante de artritis. El paciente se trata mediante una inyección en bolo de entre aproximadamente 30 Unidades y 150 Unidades de toxina botulínica tipo A intramuscular en la región de la articulación dolorida. En 1-7 días después de la administración de neurotoxina, el dolor del paciente se alivia sustancialmente. La duración del alivio significativo del dolor es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 meses.

45 Ejemplo 8

Administración Periférica de una Neurotoxina para Tratar Dolor Post-Operatorio

- 50 Un paciente, 39 años de edad, de 1 hora a diez días antes de la cirugía, se administra local y periféricamente mediante inyección de bolo o inyección subcutánea con de aproximadamente 20 unidades a aproximadamente 300 unidades de una toxina botulínica, tal como toxina botulínica tipo A, a o en cercanía del sitio de una incisión de proyección en la dermis del paciente. La inyección de toxina botulínica puede ser subcutánea o intramuscular. La

cirugía no se lleva a cabo para tratar o aliviar un trastorno muscular, tal como un músculo hiperactivo o hipertónico. La duración del alivio del dolor post-operatorio significativo es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 meses.

Ejemplo 9

Tratamiento de Dolor Visceral por Administración de una Neurotoxina

5 Un paciente varón de 46 años de edad se presenta con dolor abdominal crónico de origen visceral pero de etiología desconocida. Se hipotetiza tumor o constricción del conducto. La toxina botulínica subcutánea o intra-orgánica, tal como de aproximadamente 20 unidades a aproximadamente 300 unidades de una toxina botulínica tipo A, se administra de forma subcutánea o intra-orgánica (en el sitio del dolor percibido). En uno a siete días, el dolor se alivia sustancialmente. La duración del alivio significativo del dolor es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6
10 meses.

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con respecto a ciertos métodos preferidos, son posibles otras realizaciones, versiones y modificaciones dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, una amplia variedad de neurotoxinas pueden usarse de forma eficaz en los métodos de la presente invención. Adicionalmente, la presente invención incluye métodos de administración periférica para aliviar dolor relacionado con trastornos no
15 musculares, en donde dos o más neurotoxinas, tales como dos o más toxinas botulínicas, se administran al mismo tiempo o de forma consecutiva. Por ejemplo, la toxina botulínica tipo A puede administrarse hasta una pérdida de respuesta clínica o desarrollo de anticuerpos de neutralización, seguido por la administración de toxina botulínica tipo E. De forma alternativa, una combinación de cualquiera de dos o más de los serotipos A-G de botulina, pueden administrarse de forma local para controlar el comienzo y duración del resultado terapéutico deseado. Además, los
20 compuestos que no son neurotoxina pueden administrarse antes de, al mismo tiempo o posteriormente a la administración de la neurotoxina para efecto adjunto probado tal como comienzo mejorado o más rápido de denervación antes de que la neurotoxina, tal como una toxina botulínica, comience a ejercer su efecto terapéutico.

REIVINDICACIONES

1. Una toxina botulínica tipo A para uso en un método para aliviar un dolor por quemadura en un paciente humano, en donde el método comprende la administración subcutánea de la toxina botulínica tipo A.

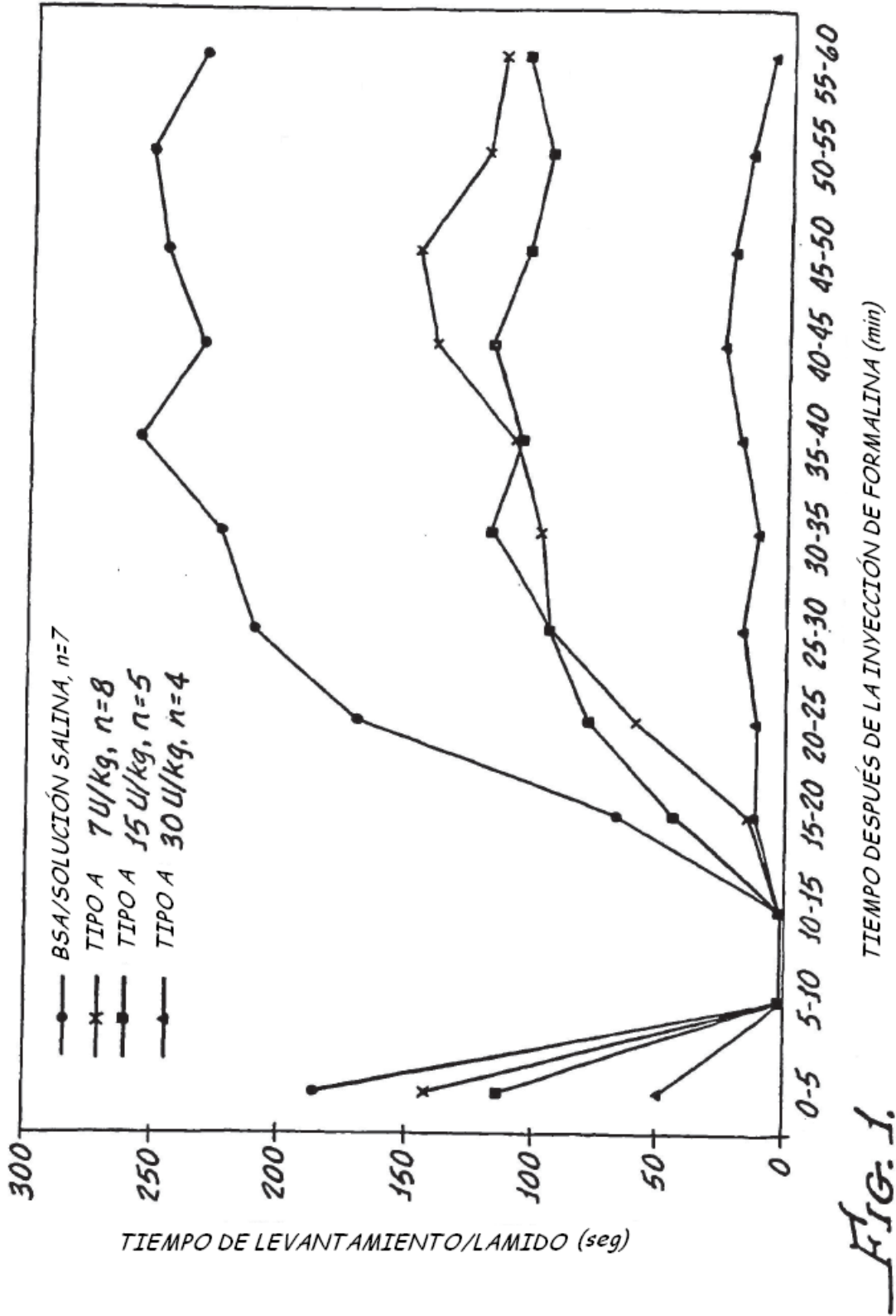


FIG. 1.

