

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 033**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 39/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2009** **PCT/US2009/065919**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010** **WO10062955**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2009** **E 09765190 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016** **EP 2370090**

54 Título: **Tratamiento de neoplasias con neurotoxina**

30 Prioridad:

26.11.2008 US 118036 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2017

73 Titular/es:

TOXCURE, INC. (100.0%)
20 Prospect Avenue
Hackensack, NJ 07601, US

72 Inventor/es:

SHAARI, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 599 033 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de neoplasias con neurotoxina

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una neurotoxina botulínica farmacéuticamente aceptable para su uso en la potenciación de la eficacia de un fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la invención

Una neoplasia es una masa anormal de tejido resultante de la proliferación anormal de células. El crecimiento de una neoplasia supera y no está coordinado con el de los tejidos normales (es decir, no neoplásicos) a su alrededor. Normalmente, las neoplasias producen un bulto o un tumor y pueden ser benignas, premalignas o malignas. El crecimiento inicial de una neoplasia depende de un suministro adecuado de factores de crecimiento y de la eliminación de moléculas tóxicas. La expansión de la masa tumoral más allá de 2 mm de diámetro depende del desarrollo de la angiogénesis para producir un suministro de sangre adecuado. La inducción de la angiogénesis está mediada por múltiples moléculas que son liberadas por las células tumorales y las células huésped, entre las que se incluyen células endoteliales, células epiteliales, células mesoteliales y leucocitos. La angiogénesis comprende procesos secuenciales que emanan de células endoteliales microvasculares. A medida que se expande, el tumor (primario o secundario) también puede causar ciertos síntomas, tales como molestias (por ejemplo, la sensación de un bulto), dolor y hemorragia. Una vez que ha comenzado la angiogénesis, la invasión por células tumorales del tejido que rodea el tumor primario y la penetración de vasos sanguíneos y linfáticos es crucial para todo el fenómeno de la metástasis.

Una vez que las células tumorales se desprenden del tumor primario, deben invadir el estroma del huésped para penetrar en los vasos linfáticos y los vasos sanguíneos. Para ello, las células tumorales deben atravesar las membranas basales que rodean a los vasos sanguíneos. Las membranas basales y la matriz extracelular del tejido conjuntivo (MEC) están compuestas por cuatro grupos principales de moléculas: colágenos, elastinas, glucoproteínas y proteoglicanos. La degradación de los componentes de la MEC y la membrana basal por las células tumorales es un requisito previo importante para la invasión y la metástasis.

La metástasis del cáncer está comprendida por varias etapas complejas e interdependientes que interaccionan entre sí, cada una de las cuales es limitante de la velocidad, ya que si alguna de las etapas no se completa, la célula tumoral no produce metástasis. Las células tumorales que finalmente dan lugar a metástasis deben sobrevivir a una serie de interacciones potencialmente letales con mecanismos homeostáticos del huésped. El balance de estas interacciones puede variar entre diferentes pacientes con diferentes neoplasias o incluso entre diferentes pacientes con el mismo tipo de neoplasia.

Las etapas importantes en la formación de una metástasis son similares en todos los tumores y comprende lo siguiente:

1. Después de la transformación neoplásica, la proliferación progresiva de las células neoplásicas se soporta inicialmente con nutrientes suministrados por el microambiente de órganos mediante difusión.
2. Para que un tumor supere 1 o 2 mm de diámetro se debe producir neovascularización o angiogénesis. La síntesis y la secreción de diferentes moléculas angiogénicas y la supresión de moléculas inhibitoras son responsables de la creación de una red capilar del tejido huésped circundante.
3. Algunas células tumorales pueden regular a la baja la expresión de moléculas cohesivas y tienen una motilidad incrementada, por lo tanto puede separarse de la lesión primaria. La invasión del estroma del huésped por algunas células tumorales se produce por varios mecanismos paralelos. Los capilares y las vénulas de pared delgada, como los canales linfáticos, ofrecen muy poca resistencia a la penetración por las células tumorales y proporcionan las vías más habituales para la entrada de las células tumorales en la circulación.
4. A continuación se producen el desprendimiento y la embolización de células tumorales individuales o agregados de células, la gran mayoría de las células tumorales circulantes se destruye rápidamente.
5. Una vez que las células tumorales han sobrevivido a la circulación, deben detenerse en los lechos capilares de órganos distantes, ya sea mediante adhesión a las células endoteliales capilares o a las membranas basales subendoteliales expuestas.
6. Las células tumorales (especialmente las de los agregados) pueden proliferar dentro del lumen del vaso sanguíneo, pero la mayoría se mueven hacia el parénquima del órgano por mecanismos similares a los que funcionan durante la invasión.
7. Las células tumorales portadoras de receptores de superficie celular adecuados responden a factores de crecimiento paracrinós y, por lo tanto, proliferan en el parénquima del órgano.
8. Las células metastásicas deben evadir la destrucción por las defensas del huésped que incluyen las respuestas inmunitarias específicas y no específicas.
9. Para que supere una masa de 1 a 2 mm de diámetro, la metástasis debe desarrollar una red vascular.

Actualmente se usan varios fármacos quimioterapéuticos y terapias anticancerosas para tratar diversos tipos de

cáncer, por ejemplo, dañando el ADN en la célula cancerosa para impedir que la célula se reproduzca. Los fármacos quimioterapéuticos se pueden dividir en varios grupos en función de factores tales como la forma en que funcionan, su estructura química y su relación con otro medicamento. Debido a que algunos fármacos actúan en más de una forma, pueden pertenecer a más de un grupo.

- 5 Los agentes alquilantes dañan directamente el ADN para evitar que las células cancerosas se reproduzcan. Como una clase de fármacos, estos agentes no son específicos de fase; en otras palabras, funcionan en todas las fases del ciclo celular. Los agentes alquilantes se utilizan para tratar muchos tipos de cáncer diferentes, entre los que se incluyen leucemia aguda y crónica, linfoma, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, sarcoma, así como los cánceres de pulmón, de mama y de ovarios. Debido a que estos fármacos dañan el ADN, pueden causar daños a largo plazo en la médula ósea. En algunos casos raros, esto puede producir, en última instancia, leucemia aguda. El riesgo de leucemia causada por los agentes alquilantes es "dependiente de la dosis", lo que significa que el riesgo es pequeño, con dosis más bajas, pero aumenta a medida que la cantidad total de fármaco utilizado se incrementa. El riesgo de leucemia causada por agentes alquilantes es más alto de 5 a 10 años después del tratamiento. Existen muchos tipos de agentes alquilantes, entre los que se incluyen: mostazas de nitrógeno, tales como mecloretamina (mostaza nitrogenada), clorambucilo, ciclofosfamida (Cytosan®), ifosfamida y melfalán; nitrosoureas, tales como estreptozocina, carmustina (BCNU) y lomustina; sulfonatos de alquilo, que incluyen busulfán; triazinas, tales como dacarbazina (DTIC) y temozolomida (Temodar®); y etileniminas tales como tiotepa y altretamina (hexametilmelamina). Los fármacos de platino (cisplatino, carboplatino y oxalplatino) a veces se agrupan con agentes de alquilación, ya que matan a las células de una manera similar. Estos fármacos son menos propensos que los agentes alquilantes a causar leucemia.

- Los antimetabolitos son una clase de fármacos que interfieren con el crecimiento del ADN y el ARN mediante la sustitución de los bloques componentes normales del ARN y el ADN. Estos agentes dañan las células durante la fase S. Normalmente se usan para tratar leucemias, tumores de mama, de ovarios y del aparato intestinal, así como otros tipos de cáncer. Entre los ejemplos de antimetabolitos se incluyen 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (Xeloda®), 6-mercaptopurina (6-MP), metotrexato, gemcitabina (Gemzar®), citarabina (Ara-C®), fludarabina y pemetrexed (Alimta®).

- Las antraciclinas son antibióticos antitumorales que interfieren con las enzimas implicadas en la replicación del ADN. Estos agentes funcionan en todas las fases del ciclo celular. Por lo tanto, se utilizan ampliamente para diversos tipos de cáncer. Una consideración importante al administrar estos fármacos es que pueden causar daños permanentes en el corazón si se administran a dosis altas. Por esta razón, a menudo se suelen poner límites de dosis durante la vida con estos fármacos. Entre los ejemplos de antraciclinas se incluyen daunorrubicina, doxorubicina (Adriamycin®), epirubicina e idarrubicina. Otros antibióticos antitumorales incluyen los fármacos actinomicina-D, bleomicina y mitomicina-C.

- La mitoxantrona es un antibiótico antitumoral que es similar a la doxorubicina en muchos aspectos, incluyendo el potencial de dañar el corazón. Este fármaco también actúa como un inhibidor de la topoisomerasa II y puede dar lugar a leucemia relacionada con el tratamiento. La mitoxantrona se utiliza para tratar el cáncer de próstata, el cáncer de mama, linfoma y leucemia.

- Los inhibidores de la topoisomerasa interfieren con las enzimas denominadas topoisomerasas, que ayudan a separar las hebras de ADN para que se puedan copiar. Se utilizan para tratar ciertas leucemias, así como de cánceres de pulmón, de ovarios, gastrointestinales y otros tipos de cáncer. Entre los ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa I se incluyen topotecán e irinotecán (CPT-11). Entre los ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa II se incluyen etopósido (VP-16) y tenipósido. El tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II aumenta el riesgo de un segundo cáncer, leucemia mielógena aguda. La leucemia secundaria se puede ver ya en 2-3 años después de administrar el medicamento.

- Los inhibidores de la mitosis suelen ser alcaloides vegetales y otros compuestos derivados de productos naturales. Pueden detener la mitosis o inhibir las enzimas que fabrican las proteínas necesarias para la reproducción celular. Estos fármacos funcionan durante la fase M del ciclo celular, pero pueden dañar las células en todas las fases. Se utilizan para tratar muchos tipos diferentes de cáncer, entre los que se incluyen de mama, de pulmón, mielomas, linfomas y leucemias. Estos fármacos son conocidos por su potencial para causar daño nervioso periférico, que puede ser un efecto secundario limitante de la dosis. Entre los ejemplos de inhibidores de la mitosis se incluyen: los taxanos, tales como paclitaxel (Taxol®) y docetaxel (Taxotere®); epotilonas, que incluyen ixabepilona (Ixempra®); los alcaloides de la vinca, tales como vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y vinorelbina (Navelbine®); y estramustina (Emcyt®).

- Los esteroides son hormonas naturales y fármacos similares a las hormonas que son útiles en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (linfoma, leucemia y mieloma múltiple), así como otras enfermedades. Cuando estos fármacos se usan para matar las células cancerosas o retardar su crecimiento, se consideran fármacos quimioterapéuticos. Los corticosteroides se utilizan habitualmente como antieméticos para prevenir las náuseas y los vómitos causados por la quimioterapia, también. También se utilizan antes de la quimioterapia para ayudar a prevenir reacciones alérgicas graves (reacciones de hipersensibilidad). Entre los ejemplos se incluyen prednisona, metilprednisolona (Solumedrol®) y dexametasona (Decadron®).

Algunos fármacos quimioterapéuticos actúan de manera ligeramente diferente y no encajan bien en ninguna de las otras categorías. Entre los ejemplos se incluyen fármacos tales como L-asparaginasa, que es una enzima, y el inhibidor del proteosoma bortezomib (Velcade®).

5 Algunos otros fármacos y tratamientos biológicos se utilizan para tratar el cáncer, pero generalmente no se consideran "quimioterapia". Mientras que los fármacos quimioterapéuticos se aprovechan del hecho de que las células cancerosas se dividen rápidamente, estos otros fármacos están dirigidos a diferentes propiedades que separan a las células cancerosas, de las células normales. A menudo tienen efectos secundarios menos graves que los que habitualmente causan los fármacos quimioterapéuticos, ya que están dirigidos a funcionar principalmente en las células cancerosas, no en las células sanas normales. Muchos se usan junto con quimioterapia

10 A medida que los investigadores han conocido más sobre el funcionamiento interno de las células cancerosas, han comenzado a crear nuevos fármacos que atacan a las células cancerosas más específicamente de lo que lo pueden hacer los fármacos quimioterapéuticos tradicionales. La mayoría atacan a las células con versiones mutantes de ciertos genes, o células que expresan demasiadas copias de un gen particular. Estos fármacos se pueden utilizar como parte del tratamiento primario o después del tratamiento para mantener la remisión o reducir la probabilidad de recurrencia. En este momento solo se dispone de un puñado de estos fármacos. Entre los ejemplos se incluyen imatinib (Gleevec®), gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), sunitinib (Sutent®) y bortezomib (Velcade®).

Los agentes de diferenciación actúan sobre las células cancerosas para hacer que maduren en células normales. Entre los ejemplos se incluyen los retinoides, tretinoína (ATRA o Atralin®) y bexaroteno (Targretin®), así como el trióxido de arsénico (Arsenox®).

20 La terapia hormonal incluye el uso de las hormonas sexuales, o fármacos similares a las hormonas, que alteran la acción o producción de hormonas masculinas o femeninas. Se utilizan para retardar el crecimiento del cáncer de mama, de próstata y cánceres endometriales (uterinos) que normalmente crecen en respuesta a las hormonas naturales en el cuerpo. Estas hormonas de tratamiento del cáncer no funcionan de la misma manera que los fármacos quimioterapéuticos estándar, sino más bien mediante la prevención del uso por parte de la célula cancerosa de la hormona que necesita para crecer, o impidiendo que el cuerpo produzca las hormonas. Entre los ejemplos se incluyen: los antiestrógenos, fulvestrant (Faslodex®), tamoxifeno y toremifeno (Fareston®); inhibidores de la aromatasa, anastrozol (Arimidex), exemestano (Aromasin®) y letrozol (Femara); progestinas, acetato de megestrol (Megace®); estrógenos; antiandrógenos, bicalutamida (Casodex®), flutamida (Eulexin®) y nilutamida (Nilandron®); y agonistas de LHRH, leuprolida (Lupron®) y goserelina (Zoladex®).

30 Algunos fármacos se administran a personas con cáncer para estimular su sistema inmunitario natural para reconocer con mayor eficacia las células cancerosas y atacarlas. Estos fármacos ofrecen un procedimiento único de tratamiento y con frecuencia se consideran aparte de la quimioterapia. En comparación con otras formas de tratamiento contra el cáncer tales como cirugía, radioterapia o quimioterapia, la inmunoterapia es todavía relativamente nueva. Existen diferentes tipos de inmunoterapia. Las inmunoterapias activas estimulan el propio sistema inmunológico del cuerpo para combatir la enfermedad. Las inmunoterapias pasivas no dependen del cuerpo para atacar la enfermedad; en cambio, utilizan componentes del sistema inmunológico (tales como los anticuerpos) creados fuera del cuerpo. Los tipos de inmunoterapias incluyen: terapia de anticuerpos monoclonales (inmunoterapias pasivas), rituximab (Rituxan®) y alemtuzumab (Campath®); inmunoterapias no específicas y adyuvantes (otras sustancias o células que aumentan la respuesta inmunitaria), BCG, interleucina-2 (IL-2) e interferón-alfa; fármacos inmunomoduladores, talidomida y lenalidomida (Revlimid®); vacunas contra el cáncer (inmunoterapias activas específicas), aunque se están estudiando varias vacunas, no existen vacunas aprobadas por la FDA para tratar el cáncer (sitio web de la American Cancer Society, Inc., 2009).

45 La administración de la toxina botulínica directamente en las células cancerosas también se está utilizando para tratar el crecimiento de tumores. La bacteria anaerobia grampositiva *Clostridium botulinum* produce una potente neurotoxina polipeptídica, denominada toxina botulínica. Hasta la fecha, se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas inmunológicamente distintas: los serotipos A, B, C₁, D, E, F, y G. De estos, la toxina botulínica de serotipo A se reconoce como uno de los agentes de origen natural más letales.

50 Se cree que las toxinas botulínicas se unen con alta afinidad a las neuronas motoras colinérgicas, se transfieren a la neurona y efectúan el bloqueo de la liberación presináptica de acetilcolina. Se pretende que todos los serotipos de toxina botulínica inhiban la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular. Lo hacen afectando a diferentes proteínas neurosecretoras y/o escindiendo estas proteínas en diferentes sitios. Por ejemplo, la toxina botulínica de serotipo A es una endopeptidasa de cinc que puede hidrolizar específicamente un enlace peptídico de la proteína intracelular asociada a vesículas SNAP-25. La toxina botulínica de serotipo E también escinde la proteína asociada al sinaptosoma de 25 kiloDalton (kDa) (SNAP-25), sin embargo, el serotipo E se une a una secuencia de aminoácidos diferente dentro de SNAP-25. Se cree que las diferencias en el sitio de la inhibición son responsables de la potencia relativa y/o duración de la acción de los diversos serotipos de toxina botulínica.

55 Actualmente, las toxinas botulínicas se han usado en entornos clínicos para el tratamiento de trastornos neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. La Food and Drug Administration de EE.UU. (FDA) aprobó la toxina botulínica de serotipo A en 1989 para el tratamiento del blefaroespasma, el

estrabismo y el espasmo hemifacial en pacientes de más de doce años de edad. En 2000, la FDA aprobó las preparaciones comerciales de toxina botulínica de serotipo A y serotipo B para el tratamiento de la distonía cervical, y en 2002 la FDA aprobó la toxina botulínica de serotipo A para el tratamiento cosmético de ciertas arrugas faciales hiperkinéticas (entrecejo). En 2004, la FDA aprobó la toxina botulínica para el tratamiento de la hiperhidrosis. Los usos no aprobados por la FDA incluyen el tratamiento del espasmo hemifacial, la tortícolis espasmódica, la distonía oromandibular, la disfonía espasmódica y otras distonías, temblor, dolor miofascial, disfunción de la articulación temporomandibular, migraña y la espasticidad.

Los efectos clínicos de la toxina botulínica de serotipo A intramuscular periférica generalmente se observan en un plazo de 24-48 horas desde la inyección y a veces en unas pocas horas. Cuando se utiliza para inducir parálisis muscular, el alivio sintomático con una única inyección intramuscular de toxina botulínica de serotipo A puede durar aproximadamente tres meses, sin embargo, en ciertas circunstancias, se ha descubierto que los efectos duran varios años.

A pesar de la aparente diferencia en la unión del serotipo, se cree que el mecanismo de la actividad botulínica es similar e implica al menos tres etapas. En primer lugar, la toxina se une a la membrana presináptica de una célula diana. En segundo lugar, la toxina entra en la membrana plasmática de la célula afectada en la que se forma un endosoma. A continuación, la toxina se transloca a través de la membrana endosómica en el citosol. En tercer lugar, la toxina botulínica parece reducir un enlace disulfuro SNAP que da lugar a la interrupción de la actividad endopeptidasa de cinc (Zn^{++}), que escinde selectivamente proteínas importantes para el reconocimiento y acoplamiento de vesículas que contienen neurotransmisores con la superficie citoplásmica de la membrana plasmática, y la fusión de la vesículas con la membrana plasmática. La toxina botulínica de los serotipos B, D, F y G causa la degradación de la sinaptobrevina (también llamada proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP)), una proteína de la membrana del sinaptosoma. La mayor parte de las VAMP presentes en la superficie citosólica de la vesícula sináptica se elimina como resultado de uno cualquiera de estos acontecimientos de escisión. Cada toxina escinde específicamente un enlace diferente.

El peso molecular de la molécula de la proteína de la toxina botulínica, para los siete serotipos de toxina botulínica conocidos, es de aproximadamente 150 kDa. Es interesante el hecho de que las toxinas botulínicas son liberadas por la bacteria clostridial como complejos que comprenden la molécula de la proteína de la toxina botulínica de 150 kDa junto con proteínas no toxinas asociadas. Por lo tanto, el complejo de la toxina botulínica de serotipo A puede producirlo la bacteria clostridial como formas de 900 kDa, 500 kDa y 300 kDa. La toxina botulínica de los serotipos B y C₁ se produce, aparentemente, como solo un complejo de 500 kDa. La toxina botulínica de serotipo D se produce como complejos de 300 kDa y de 500 kDa. Finalmente, la toxina botulínica de serotipos E y F se producen como complejos de solo aproximadamente 300 kDa. Se cree que los complejos (por ejemplo, de peso molecular superior a aproximadamente 150 kDa) contienen una proteína de hemaglutinina no toxina y una proteína no hemaglutinina no tóxica. Estas dos proteínas no toxinas (que junto con la molécula de la toxina botulínica pueden comprender el complejo de neurotoxina relevante) pueden actuar proporcionando estabilidad contra la desnaturalización de la molécula de la toxina botulínica y protección contra los ácidos digestivos cuando la toxina se ingiere. Además, es posible que los complejos de toxina botulínica más grandes (de peso molecular superior a aproximadamente 150 kDa) den lugar a una tasa de difusión más lenta de la toxina botulínica desde un sitio en el que se realizó la inyección intramuscular de un complejo de toxina botulínica. Los complejos de toxina se pueden disociar en proteína toxina y proteínas hemaglutinina tratando el complejo con glóbulos rojos de la sangre a un pH de 7,3. La proteína toxina tiene una marcada inestabilidad después de la retirada de la proteína hemaglutinina.

Todos los serotipos de toxina botulínica son sintetizados por bacterias *Clostridium botulinum* como proteínas monocatenarias inactivas que, para ser neuroactivas, deben sufrir escisión o corte por proteasas. Las cepas bacterianas que producen toxina botulínica de los serotipos A y G poseen proteasas endógenas y, por tanto, los serotipos A y G pueden recuperarse de cultivos bacterianos predominantemente en su forma activa. Por el contrario, la toxina botulínica de serotipos C₁, D y E son sintetizadas por cepas no proteolíticas y, por lo tanto, normalmente están inactivas cuando se recuperan del cultivo. Los serotipos B y F de la toxina botulínica los producen cepas tanto proteolíticas como no proteolíticas y, por lo tanto, se pueden recuperar tanto en la forma activa como inactiva. Sin embargo, incluso las cepas proteolíticas que producen, por ejemplo, la toxina botulínica de serotipo B solo escinden una parte de la toxina producida. La proporción exacta de moléculas cortadas y no cortadas depende de la duración de la incubación y de la temperatura del cultivo. Por lo tanto, es probable que un cierto porcentaje de cualquier preparación de, por ejemplo, la toxina botulínica de serotipo B sea inactiva, posiblemente teniendo en cuenta una menor potencia de la toxina botulínica de serotipo B, en comparación con la toxina botulínica de serotipo A. La presencia de moléculas de toxina botulínica inactiva en una preparación clínica contribuirá a la carga global de proteína de la preparación, que se ha relacionado con una mayor antigenicidad, sin contribuir a su eficacia clínica.

Los estudios in vitro han indicado que la toxina botulínica inhibe la liberación inducida por el catión potasio tanto de acetilcolina como de norepinefrina de los cultivos celulares primarios de tejido del tronco cerebral. Además, se ha informado de que la toxina botulínica inhibe la liberación provocada tanto de glicina como de glutamato en cultivos primarios de neuronas de la médula espinal y que en preparaciones de sinaptosomas de cerebro, la toxina botulínica inhibe la liberación de cada uno de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina, norepinefrina, CGRP y glutamato.

La toxina botulínica cristalina de serotipo A de alta calidad puede producirse a partir de la cepa Hall A de *Clostridium*

botulinum con características de 3×10^7 U/mg, una A_{260}/A_{278} de menos de 0,60 y un patrón distinto de bandas en la electroforesis en gel. El conocido como proceso de Shantz puede usarse para obtener toxina botulínica cristalina de serotipo A, como se expone en Shantz, E. J., y col., Properties and use of Botulinum toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine, Microbiol Rev. 56: 80–99 (1992). En general, el complejo de la toxina botulínica de serotipo A se puede aislar y purificar a partir de una fermentación anaeróbica cultivando *Clostridium botulinum* de serotipo A en un medio adecuado. La toxina en bruto se puede cosechar mediante precipitación con ácido sulfúrico y se concentra mediante ultrafiltración. La purificación se puede llevar a cabo disolviendo el precipitado ácido en cloruro de calcio. Después, la toxina puede precipitarse con etanol frío. El precipitado se puede disolver en tampón de fosfato de sodio y centrifugarse. Tras el secado, se puede obtener el complejo de toxina botulínica cristalina de serotipo A de aproximadamente 900 kDa con una potencia específica de 3×10^7 DL₅₀ U/mg o mayor. Este proceso conocido también puede usarse, tras la separación de las proteínas no tóxicas, para obtener toxinas botulínicas puras, tales como, por ejemplo: toxina botulínica purificada de serotipo A con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa con una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ DL₅₀ U/mg o mayor; toxina botulínica purificada de serotipo B con un peso molecular de aproximadamente 156 kDa con una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ DL₅₀ U/mg o mayor, y toxina botulínica purificada de serotipo F con un peso molecular de aproximadamente 155 kDa con una potencia específica de $1-2 \times 10^7$ DL₅₀ U/mg o mayor.

Los complejos de toxinas y toxinas botulínicas purificadas y ya preparadas adecuadas para preparar formulaciones farmacéuticas se pueden obtener en List Biological Laboratories, Inc., Campbell, Calif.; the Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Reino Unido; Wako (Osaka, Japón), así como en Sigma Chemicals of St Louis, Mo.

Se ha demostrado que el patrón de la toxina extendido dentro de un músculo está relacionado con la concentración, el volumen y la ubicación del lugar de la inyección.

Varias patentes y solicitudes hacen referencia al tratamiento de cánceres con una neurotoxina y, específicamente, una toxina botulínica. De manera uniforme, los procedimientos liberan directamente la toxina botulínica a las células cancerosas con el fin de afectar directamente a las células cancerosas o a su innervación. El objetivo ha sido liberar la toxina en la célula cancerosa para ejercer un efecto o para desnervar localmente una célula cancerosa. Al obtener la toxina en una célula, la toxina botulínica puede inhibir el proceso de exocitosis a partir de la célula cancerosa, que es la liberación del contenido intracelular de la célula o las vesículas en el espacio extracelular. Estas patentes y solicitudes se refieren a la inhibición de la exocitosis de una célula cancerosa y su reducida capacidad de dividirse y moverse. Al desnervar localmente una célula cancerosa, puede ser menos activa.

La solicitud de patente US 2005/0031648 A1, Procedimientos para el tratamiento de cánceres diversos (Methods for Treating Diverse Cancers), se refiere al tratamiento de tejidos hiperplásicos precancerosos o cancerosos con una neurotoxina botulínica mediante la administración local de la toxina botulínica en el tejido hiperplásico precanceroso o canceroso o en la proximidad del tejido canceroso.

La solicitud de patente WO 2005/030248 se refiere a un procedimiento para aumentar la entrada de una unidad de C3 exotransferasa de *Clostridium botulinum* en las células cancerosas mediante la unión de C3 a una proteína de fusión permeable a las células. El tratamiento se refiere a la prevención de la contracción y extensión de la célula cancerosa. El compuesto descrito está dirigido específicamente a una célula cancerosa.

El documento US 2002/0094339 A1, la patente de Estados Unidos n.º 6.565.870 B1 y la patente de Estados Unidos n.º 6.139.845 se refieren todas al tratamiento de tumores, cánceres y trastornos con una toxina botulínica. La toxina se inyecta directamente en el tejido enfermo para ejercer su efecto en la inhibición de la exocitosis.

La solicitud de patente WO2006/034404 se refiere a un procedimiento para inhibir el crecimiento o la metástasis de una neoplasia en un paciente, que comprende aplicar a la zona alrededor de dicha neoplasia una neurotoxina farmacéuticamente aceptable de modo que una parte sustancial de la neurotoxina rodea pero no penetra en la neoplasia. Esta solicitud de patente sugiere que la neurotoxina también se puede utilizar en pacientes sometidos a cirugía, radioterapia, quimioterapia u otras formas de tratamiento del cáncer, pero no especifica que hay un efecto potenciador del fármaco anticanceroso.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una neurotoxina botulínica farmacéuticamente aceptable para su uso en la potenciación de la eficacia de un fármaco anticanceroso o tratamiento anticanceroso mediante la inhibición del crecimiento o metástasis de una neoplasia en un paciente en combinación con un fármaco anticanceroso o tratamiento anticanceroso y/o para tratar un síntoma de una neoplasia en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento administrar en la zona no neoplásica alrededor de dicha neoplasia una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha neurotoxina botulínica farmacéuticamente aceptable en combinación con un fármaco anticanceroso o tratamiento anticanceroso, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica no penetra en la neoplasia, en la que la neurotoxina botulínica debilita la contracción de las fibras musculares en el tejido no neoplásico alrededor de la neoplasia. La neurotoxina administrada en el tejido no neoplásico alrededor de una neoplasia (por ejemplo, evitando la neoplasia) actúa disminuyendo el efecto de apretar las células contráctiles sobre

la propagación de células neoplásicas a través del tejido y a través de los túbulos que drenan la neoplasia. En ciertas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento paralizan el músculo linfático que aprieta las células neoplásicas y la linfa a través de la circulación. En ciertas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento también modulan positivamente el sistema inmunológico para mejorar los mecanismos celulares o humorales contra la neoplasia. Después de la administración de la toxina botulínica alrededor de una neoplasia, la extensión regional y distante se reduce o elimina.

Es un objeto de la invención administrar la neurotoxina botulínica de una manera tal que una cantidad terapéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica rodea a una neoplasia pero no penetra en ella. Es otro objeto de la invención administrar la toxina botulínica para inhibir el crecimiento, la invasión o la propagación de las células neoplásicas. Los procedimientos descritos en el presente documento se adaptan fácilmente a, por ejemplo, la terapia del cáncer en el momento en que un cáncer se diagnostica inicialmente y podría mejorar significativamente el resultado de un paciente diagnosticado con cáncer mediante la reducción de la propagación local, regional o distante de las células cancerosas. Los procedimientos descritos en el presente documento se utilizan para pacientes sometidos a cirugía, radioterapia, quimioterapia u otras formas de tratamiento para el cáncer que se ha diagnosticado.

Es otro objeto más de la invención administrar la neurotoxina botulínica, en combinación con un fármaco anticanceroso, por vía tópica o por inyección en el tejido no neoplásico adyacente a una neoplasia. La neurotoxina botulínica puede administrarse a través de una inyección única o varias inyecciones. La neurotoxina botulínica puede administrarse también por aerosol para el tratamiento de, por ejemplo, cáncer de pulmón. Se entiende que la neurotoxina se puede aplicar al tejido no metastásico/no canceroso alrededor de una metástasis para inducir los efectos deseados.

Es otra realización más de la invención que la neurotoxina botulínica, en combinación con un fármaco anticanceroso, se puede inyectar en el tejido linfático local, regional o distante que se puede realizar con guía visual (ojo o lupa) o radiográfica, tal como una TAC o guía de ultrasonidos.

Es otro objeto que la neurotoxina botulínica, en combinación con un fármaco anticanceroso, se puede aplicar a, pero sin limitaciones, los siguientes sitios: área de los músculos regionales (incluso a nivel microscópico) que rodean a los tejidos linfáticos regionales (si el cáncer estaba presente en una superficie de mucosa); las cuencas ganglionares regionales; el timo; el bazo; y la médula ósea u otros sitios hematopoyéticos.

También se divulga un tratamiento con toxina botulínica, sola o en combinación con un fármaco anticanceroso, que puede ser aplicable a otras enfermedades caracterizadas por una mala respuesta celular o humoral. En una realización, la toxina botulínica, sola o en combinación con un fármaco anticanceroso, se puede inyectar localmente en áreas caracterizadas por una baja respuesta celular o humoral, tal como en el páncreas en el paciente con diabetes dependiente de insulina, en la mucosa de la nariz en un paciente con sinusitis fúngica, en la verruga en el paciente con verruga vulgar o en una herida en el paciente con una herida que no cicatriza, o en el timo, el bazo o la médula ósea en el caso de un paciente con inmunodeficiencia.

La presente invención proporciona una neurotoxina botulínica farmacéuticamente aceptable para su uso en la potenciación de la eficacia de un fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa mediante la inhibición del crecimiento o metástasis de una neoplasia en un paciente en combinación con un fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa, que comprende aplicar a la zona no neoplásica alrededor de dicha neoplasia una cantidad terapéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica en combinación con un fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica no penetra en la neoplasia. En una realización, la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en neoplasias digestivas/intestinales, del sistema nervioso, hepatobiliar, genitourinario, de mama, respiratorias, del integumento, musculoesqueléticas, hematopoyéticas, de los órganos sensoriales, endocrinas o neuroendocrinas. En otra realización, la toxina botulínica es toxina botulínica de tipo A. En otra realización más, la toxina botulínica es toxina botulínica de tipo B.

En una realización adicional, la dosis de la toxina botulínica no excede de 500 unidades por aplicación. En una realización, la dosis de la toxina botulínica es de entre 0,01 y 100 unidades por aplicación. En otra realización, la dosis de toxina botulínica está entre aproximadamente 1 unidad a aproximadamente 50 unidades por aplicación, en otra realización más, la toxina botulínica se aplica por vía tópica, mediante inhalación o mediante inyección.

En una realización, la neurotoxina se aplica mediante inyección.

También se divulga un procedimiento para inhibir la metástasis de una neoplasia en un paciente, que comprende la inyección de una cantidad terapéuticamente eficaz de una neurotoxina botulínica en ganglio o ganglios linfáticos regionales o distales o tejido ganglionar regional o distal, timo, bazo o médula ósea del paciente. En una realización, la toxina botulínica es la neurotoxina botulínica de tipo A.

También se divulga un procedimiento de tratamiento de una enfermedad no cancerosa en un ser humano que se caracteriza por la reducción del número de células NK, su función o actividad, que comprende: a) aplicar, aplicar en sus proximidades o aplicar a una zona fuera de las proximidades del tejido afectado por dicha enfermedad, una cantidad terapéuticamente eficaz de la toxina botulínica; b) aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha

toxina botulínica a uno o más ganglios linfáticos que están próximos a dicho tejido afectado; y c) aplicar opcionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha toxina botulínica a uno o más ganglios linfáticos que están distales a dicho tejido afectado. En una realización, la neurotoxina se inyecta en el bazo, el timo o en el bazo y en el timo. En una realización, la toxina botulínica es toxina botulínica de tipo A. En otra realización, la toxina botulínica es toxina botulínica de tipo B. En una realización de la presente invención, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en infecciones víricas, enfermedades víricas, crecimientos inducidos por virus, enfermedad autoinmune, esclerosis múltiple, heridas crónicas, artritis reumatoide, miastenia gravis, VIH, síndrome de fatiga crónica y hepatitis.

En otras realizaciones más, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un síntoma de una neoplasia en un paciente, que comprende aplicar a la zona no neoplásica alrededor de dicha neoplasia una cantidad terapéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica no penetra en la neoplasia.

En una realización, la neurotoxina desnerva el tejido muscular que rodea a la neoplasia y/o reduce al mínimo y/o detiene el flujo linfático en la región fuera de la neoplasia.

En otra realización, la toxina botulínica debilita la contracción de las fibras musculares en el tejido no neoplásico alrededor de la neoplasia.

La presente invención proporciona una neurotoxina botulínica farmacéuticamente aceptable para su uso en la potenciación de la eficacia de un fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa mediante la inhibición del crecimiento o metástasis de una neoplasia en un paciente en combinación con un fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa, que comprende administrar en la zona no neoplásica alrededor de dicha neoplasia una cantidad terapéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica en combinación con un fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica no penetra en la neoplasia de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. En una realización, la neurotoxina botulínica se administra antes de administrar el fármaco anticanceroso o la terapia anticancerosa. En otra realización, la neurotoxina botulínica se administra junto con el fármaco anticanceroso o la terapia anticancerosa. En ciertas realizaciones, el fármaco anticanceroso se selecciona del grupo que consiste en un agente alquilante, un antimetabolito, una antraciclina, mitoxantrona, topoisomerasa, un inhibidor de la mitosis, un esteroide, un agente de diferenciación, una hormona o un agente de inmunoterapia. En otra realización, el inhibidor de la mitosis se selecciona del grupo que consiste en un taxano, una epotilona y un alcaloide de la vinca. En una realización, el taxano es paclitaxel o docetaxel. En otra realización, el taxano es paclitaxel.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplo pero con la que no se pretende limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, se puede entender junto con las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 muestra una representación gráfica de los volúmenes tumorales relativos medios para cada día de medición tratado en el ejemplo 14.

La figura 2 muestra un modelo de crecimiento de los tumores individuales tratados en el ejemplo 14.

Descripción detallada de la invención

La presente invención trata células no neoplásicas (por ejemplo, normales, no enfermas, no cancerosas) con el fin de tratar una neoplasia. Tratamiento significa reducir, prevenir o eliminar las células neoplásicas o la propagación de las células neoplásicas o los síntomas de una neoplasia en la circulación, regional o sistémica. La presente invención trata afecciones no cancerosas (benignas), precancerosas y cancerosas (malignas), así como crecimientos o trastornos mediados por virus, infecciones crónicas y trastornos inmunitarios mediante la inyección de la toxina botulínica lejos del sitio de origen de la neoplasia, afección, crecimiento, infección o trastorno. Las inyecciones de toxina botulínica pueden reducir o eliminar los síntomas de la neoplasia, afección, crecimiento, infección o trastorno.

Como se utiliza en el presente documento, el término "neoplasia" incluye tumores benignos (no cancerosos), precancerosos o cancerosos (malignos). La expresión "células neoplásicas" incluye células benignas (no cancerosas), precancerosas o cancerosas (malignas) procedentes de una neoplasia. La frase "células no neoplásicas" se refiere a las células normales y sanas no procedentes de una neoplasia. Las células no neoplásicas son células no precancerosas, no cancerosas, no enfermas.

Neurotoxina botulínica" puede significar una neurotoxina botulínica ya sea como toxina pura o en complejo. En una realización, la neurotoxina botulínica puede ser neurotoxina botulínica de los serotipos A, B, C₁, D, E, F y G. En otra realización, la neurotoxina botulínica es del serotipo A o el serotipo B. En otra realización más, la neurotoxina botulínica es de serotipo A.

La presente invención se basa en la conocida afinidad de la toxina botulínica por el músculo, específicamente el

músculo que rodea a una neoplasia. Debido a la extremadamente alta afinidad de la toxina por el músculo, este procedimiento plantea una ventaja significativa sobre otros procedimientos que inyectan toxina botulínica directamente en la neoplasia en que se pueden usar dosis mucho más pequeñas de la toxina para provocar un efecto. Las dosis más pequeñas tendrán como resultado menos efectos secundarios relacionados con la dosis, tales como la propagación accidental de la toxina a través de los tejidos a las estructuras vecinas, y la resistencia a futuras inyecciones de toxina botulínica. Habrá una propagación limitada de la toxina a la neoplasia, ya que la toxina se une rápidamente a la unión neuromuscular en el sitio de inyección. De hecho, en estudios previos se ha demostrado que el complejo de la neurotoxina botulínica A, cuando se inyecta en la musculatura, se extiende no más de aproximadamente un 7-8 mm de distancia (Tang-Liu, y col., "Intramuscular injection of 125I-botulinum neurotoxin-complex versus 125I-botulinum-free neurotoxin: time course of tissue distribution," *Toxicon* 42 (2003) 461-469). Además, incluso si la toxina se extendiera a la neoplasia, es poco probable que la pequeña cantidad fuera terapéuticamente eficaz, especialmente teniendo en cuenta que las células neoplásicas tienen poca afinidad por el sustrato de la toxina. En ciertas realizaciones de la invención, las dosis utilizadas están aprobadas por la FDA para su uso en otras afecciones neuromusculares que se tratan con toxina botulínica.

La presente invención evita intencionadamente la neoplasia o su vecindad. Tal como se define en el presente documento, la proximidad de una neoplasia se refiere a una distancia que está típicamente dentro de 7 mm desde el borde o la periferia de la neoplasia. Por lo tanto, si la toxina botulínica se administra fuera o lejos de la proximidad de la neoplasia, la toxina se administra generalmente a una distancia de al menos 7 mm desde la neoplasia. Se sabe en la técnica que incluso cuando se administra a dosis altas (por ejemplo, ~ 70 unidades de complejo de neurotoxina botulínica), la mayor parte de la toxina se mantiene dentro de aproximadamente 7-8 mm del sitio de inyección (Tang-Liu y col.). Dado que la aplicación no se realiza mediante inyección de una aguja en una neoplasia, no hay riesgo de sembrar inadvertidamente células neoplásicas en el tejido circundante y no hay riesgo de crear un gradiente de presión local que podría empujar las células neoplásicas al tejido circundante o en los vasos sanguíneos o canales linfáticos penetrados.

De acuerdo con la invención, se aplica una cantidad terapéutica de neurotoxina botulínica a la zona no neoplásica alrededor de la neoplasia, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica no penetra en la neoplasia. Tal como se usa en el presente documento una "cantidad terapéuticamente eficaz" de la toxina botulínica se refiere a una cantidad que es suficiente para reducir la propagación de las células neoplásicas desde la neoplasia o para reducir el crecimiento de la neoplasia.

La cantidad terapéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica administrada de acuerdo con un procedimiento de la invención divulgada puede variar según la edad, el peso, la altura, el sexo, la masa muscular, el área de la región diana, el número de sitios de aplicación, el espesor de la piel, la capacidad de respuesta a la terapia y otras variables de los pacientes conocidas por el médico a cargo. La cantidad también puede depender de las características de solubilidad de la neurotoxina botulínica elegida. Los procedimientos para determinar la dosis apropiada los determina generalmente caso por caso el médico encargado del tratamiento. Tales determinaciones son rutinarias para un experto habitual en la técnica (véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine (1998), editado por Anthony Fauci y col., 14ª edición, publicado por McGraw Hill).

Las neurotoxinas botulínicas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden almacenarse en forma liofilizada, secada al vacío en recipientes a presión de vacío o como líquidos estables. Antes de la liofilización, la toxina botulínica puede combinarse con excipientes, estabilizantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como albúmina. El material liofilizado puede reconstituirse con solución salina o agua para crear una solución o composición que contenga la toxina botulínica que se va a administrar al paciente.

Otras preparaciones de la toxina botulínica son las siguientes:

- Tipo A (Dysport®): Polvo para solución inyectable. Vial de vidrio de tipo I incoloro que contiene un polvo liofilizado blanco estéril.
- Toxina de tipo B (Myobloc) La toxina botulínica de tipo B (Myobloc) está disponible comercialmente como una solución transparente, de incolora a de color amarillo claro del fármaco en agua estéril para inyección. Cada vial de inyección de Myobloc® contiene 5.000 unidades/ml de la toxina botulínica de tipo B; cada ml de la inyección también contiene 0,5 mg de albúmina humana (para minimizar la adsorción de la toxina en el vial de vidrio), 2,7 mg de succinato de sodio y 5,8 mg de cloruro de sodio. La inyección disponible en el mercado de toxina botulínica de tipo B (Myobloc®) tiene un pH de aproximadamente 5,6.

Aunque la composición puede contener solo un único tipo de neurotoxina, tal como neurotoxina botulínica de serotipo A, como ingrediente activo para suprimir la neurotransmisión, otras composiciones terapéuticas pueden incluir dos o más tipos de neurotoxinas. Por ejemplo, una composición administrada a un paciente puede incluir la neurotoxina botulínica de serotipo A y la neurotoxina botulínica de serotipo B. La administración de una única composición que contiene dos neurotoxinas diferentes puede permitir que la concentración eficaz de cada una de las neurotoxinas sea menor que si una sola neurotoxina se administra al paciente sin dejar de lograr los efectos terapéuticos deseados.

Típicamente, se pueden administrar de aproximadamente 0,1 unidades a aproximadamente 50 unidades de una

neurotoxina botulínica de serotipo A (tal como BOTOX®) por sitio (por ejemplo, mediante inyección o aplicación tópica), por sesión de tratamiento del paciente. Para una neurotoxina botulínica de serotipo A, tal como DYSPORT®, se pueden administrar de aproximadamente 0,2 unidades a aproximadamente 125 unidades de la neurotoxina botulínica de serotipo A por sitio de inyección, por sesión de tratamiento del paciente. Para una neurotoxina botulínica de serotipo B, tal como MYOBLOC®, se pueden administrar de aproximadamente 10 unidades a aproximadamente 1500 unidades de la neurotoxina botulínica de serotipo B por sitio de inyección, por sesión de tratamiento del paciente.

En una realización, para BOTOX®, se pueden administrar de aproximadamente 0,1 unidades a aproximadamente 20 unidades; para DYSPORT®, se pueden administrar de aproximadamente 0,2 unidades a aproximadamente 100 unidades; y, para MYOBLOC®, se pueden administrar de aproximadamente 40 unidades a aproximadamente 1.000 unidades por sitio de inyección, por sesión de tratamiento.

En otra realización, para BOTOX®, se pueden administrar de aproximadamente 0,5 unidades a aproximadamente 15 unidades; para DYSPORT®, se pueden administrar de aproximadamente 1 unidades a aproximadamente 75 unidades; y, para MYOBLOC®, se pueden administrar de aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 750 unidades por sitio de inyección, por sesión de tratamiento.

En una realización, la neurotoxina se puede administrar en dosis múltiples para cada sesión de tratamiento del paciente. En otra realización, la neurotoxina puede administrarse en aproximadamente 1 a aproximadamente 10 dosis, dependiendo de variables del paciente. En otra realización más, la dosis terapéuticamente eficaz total administrada (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 unidades a aproximadamente 50 unidades) se divide uniformemente entre múltiples sitios de inyección.

La concentración de la toxina botulínica dependerá del tipo de neurotoxina botulínica utilizada y de la ubicación diana a la que se aplica la toxina.

La presente invención potencia la terapia anticancerosa. Cuando se administra en combinación con un fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa, la neurotoxina botulínica potencia, o aumenta, la eficacia, del fármaco anticanceroso o la terapia anticancerosa. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el fármaco anticanceroso o la terapia anticancerosa es más eficaz en el tratamiento de una neoplasia cuando la toxina botulínica se administra primero al tejido no neoplásico alrededor de la neoplasia. En una realización de la invención, la toxina botulínica evita la propagación de las células neoplásicas de la neoplasia y previene y/o reduce el crecimiento de la neoplasia antes de la administración del fármaco anticanceroso o la terapia anticancerosa.

En una realización de la invención, el fármaco anticanceroso puede ser, aunque sin limitaciones a los mismos, un agente alquilante, un antimetabolito, una antraciclina, mitoxantrona, topoisomerasa, un inhibidor de la mitosis, un esteroide, un agente de diferenciación, una hormona o un agente de inmunoterapia. En otra realización, el fármaco anticanceroso puede ser un inhibidor de la mitosis, entre los que se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, taxanos, tales como paclitaxel (Taxol®) y docetaxel (Taxotere®); epotilonas, que incluyen ixabepilona (Ixempra®); los alcaloides de la vinca, tales como vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y vinorelbina (Navelbine®); y estramustina (Emcyt®).

La presente invención modula a distancia el sistema inmunológico para mejorar la actividad inmunológica contra cáncer, metástasis, afecciones precancerosas, crecimientos o trastornos mediado por virus, infecciones crónicas y trastornos inmunitarios. Una inyección distante en un ganglio linfático, tejido linfático regional o estructura productora o potenciadora inmunológica (tal como el bazo o el timo) puede potenciar las respuestas linfocíticas o humorales contra la afección.

En el tratamiento de afecciones no cancerosas, tales como infecciones víricas, enfermedades víricas, crecimientos inducidos por virus, enfermedades autoinmunes, esclerosis múltiple, heridas crónicas, infecciones crónicas, infecciones óseas, artritis reumatoide, miastenia gravis, VIH, síndrome de fatiga crónica y hepatitis, la neurotoxina puede administrarse de la misma manera y usando las mismas dosis en que se administra para el tratamiento de neoplasias. Es decir, la neurotoxina se puede aplicar a la zona alrededor del tejido enfermo o afectado, así como opcionalmente a ganglios linfáticos próximos y/o distales, el timo, el bazo y/o la médula ósea. Sin embargo, hay varios otros procedimientos opcionales de aplicación de la neurotoxina para tratar estas afecciones no cancerosas.

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

Para el tratamiento de una enfermedad autoinmune que afecta a los vasos sanguíneos, la neurotoxina puede aplicarse a los tejidos que rodean los vasos sanguíneos, permitiendo la difusión de la neurotoxina en los vasos sanguíneos.

Para el tratamiento de las afecciones anteriores, la neurotoxina también se puede aplicar a la zona que rodea al tejido afectado. Además, la neurotoxina puede además inyectarse en los ganglios linfáticos proximales, los ganglios linfáticos distales, el timo y/o el bazo.

- 5 Algunas enfermedades, tales como fatiga crónica, VIH y SIDA, son sistémicas y no implican a un solo sistema orgánico o tejido. En ese caso, la afección se trata inyectando en el timo, el bazo o la médula ósea. También se pueden inyectar en los ganglios linfáticos.

Para la inyección de un órgano o un tejido, especialmente uno que no pueda visualizarse, la aguja puede guiarse a su lugar usando técnicas convencionales. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a las mismas, palpaciones, guía de ultrasonido, guía de exploración CAT y la guía de rayos X.

- 10 La tabla 1 siguiente muestra varias realizaciones diferentes de la presente invención.

Tipo de neoplasia/cáncer que se va a tratar					
	Gastrointestinal	Mama	Piel	Respiratoria	Próstata
Localización de la administración de toxina botulínica	mucosa submucosa muscular extraserosa	rodeando a la neoplasia en el tejido mamario	Subcutánea intradérmica subdérmica profunda	Parénquima	Parénquima
Momento de la administración	– en la visita inicial –segunda visita después de la confirmación del cáncer	igual	igual	igual	igual
Terapia adicional	–ninguna (por ejemplo, toxina botulínica sola) –cirugía –quimioterapia –radioterapia –inmunoterapia	igual	igual	igual	igual
Dosis de toxina botulínica	Hasta 500 unidades Administración/sitio de inyección	igual	igual	igual	igual
Número de sitios de inyección	Hasta 10 sitios	igual	igual	igual	igual
Procedimiento de localización	Endoscopia, guía de ultrasonidos con endoscopia, visualización directa durante la cirugía, guía TAC/RM	Mamografía, fluoroscopia, guía de ultrasonidos o TAC/RM, visualización directa durante la cirugía	Visualización directa, guía de ultrasonidos	guía TAC/RM, broncoscopia, visualización directa durante la cirugía	Guía DR/RM, visualización transrectal, ultrasonidos transrectales o inyección guiada por citoscopia, inyección endoscópica transuretral

Toxina botulínica

La bacteria anaerobia grampositiva *Clostridium botulinum* produce una potente neurotoxina polipeptídica, la toxina botulínica, que puede causar una neuroparálisis en los seres humanos. La neuroparálisis habitualmente se conoce

como botulismo. La bacteria *Clostridium botulinum* se encuentra habitualmente en el suelo y crecerá en envases de alimentos e esterilizados inadecuadamente. En los seres humanos, los signos y síntomas del botulismo normalmente se producen en un plazo de 18 a 36 horas después de consumir alimentos que contienen un cultivo de *Clostridium botulinum*. Se cree que la toxina botulínica puede pasar a través del revestimiento del intestino y afectar a las neuronas motoras periféricas. Los síntomas de la botulinum comienzan con dificultad para caminar, tragar y hablar, y progresa a la parálisis de los músculos respiratorios que causa la muerte.

El uso de la toxina botulínica para la terapia del cáncer:

La influencia colinérgica sobre el cáncer:

1) Algunas células cancerosas son activadas por estimulación colinérgica

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

Próstata: El carbacol, un análogo de la acetilcolina, estimula la síntesis de ADN en las células de cáncer de próstata (Rayford W. y col., Muscarinic Cholinergic Receptors Promote Growth of Human Prostate Cancer Cells. The Prostate 30, 1997, resumen) y la estimulación del receptor muscarínico M3 sobre las células de cáncer de próstata estimula la proliferación (Luthin G R, y col., Role of m1 receptor–G protein coupling in cell proliferation in the prostate. Life Sci 60, 1997, resumen).

Colon: los receptores M3 se sobreexpresan en el cáncer de colon humano en comparación con el tejido normal del colon y la activación de este receptor puede contribuir a la progresión maligna de carcinoma de colon humano (Yang W, y col., Cholinergic receptor up–regulates COX–2 expression and prostaglandin E2 production in colon cancer cells. Carcinogenesis 21, 2000, pg. 1789). Ukegawa (Ukegawa J, y col., Growth–promoting effect of muscarinic acetylcholine receptors in colon cancer cells. J Cancer Res Clin Oncol 129, 2003, resumen) han demostrado recientemente que la activación del receptor colinérgico muscarínico M3 tiene un efecto estimulante del crecimiento sobre las líneas celulares de cáncer de colon.

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

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

Cerebro: La estimulación con carbacol causó un aumento dependiente del tiempo y de la dosis de la proliferación de células de astrocitoma humano (Guizetti M, y col., Acetylcholine as a mitogen: muscarinic receptor–mediated proliferation of rat astrocytes and human astrocytoma cells. Eur J Pharmacol 297, 1996, resumen).

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

Linfocitos: Los linfocitos T leucémicos humanos tienen el potencial de sintetizar y liberar acetilcolina, que puede desempeñar un papel en la regulación de las respuestas inmunitarias dependientes de los linfocitos T (Fjui T, y col., Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. J. Neurosci Res 44, 1996, resumen).

Ovarios: En el cáncer de ovarios, no solo un gran porcentaje de los cánceres de ovarios expresan receptores muscarínicos, sino que dicha expresión se asoció con una probabilidad reducida de supervivencia (Oppitz M, y col., Muscarinic receptors in cell lines from ovarian carcinoma: negative correlation with survival of patients. Gynecol Oncol 85, 2002, resumen).

Cabeza y cuello: El tratamiento con carbacol del carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas activa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que desempeña un papel directo en la regulación del comportamiento migratorio de las células del cáncer de cabeza y cuello (Geschwind A, y col., Lysophosphatidic Acid-induced Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation and Motility Involves Epidermal Growth Factor Receptor Signal Transduction. Cancer Res 62, 2002 p. 6335). De hecho, la activación de EGFR conduce a la invasión del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Geschwind A, y col., Lysophosphatidic Acid-induced Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation and Motility Involves Epidermal Growth Factor Receptor Signal Transduction. Cancer Res 62, 2002 p. 6335). Además, el efecto puede estar mediado por la anfirregulina. En células de carcinoma de células escamosas, el carbacol da lugar específicamente a la liberación de anfirregulina (Geschwind A, y col., TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced Proliferation and motility of cancer cells. EMBO J 22, 2003, resumen). Se sabe que la anfirregulina libera enzimas metaloproteasas en líneas celulares malignas y dicha liberación puede estar asociada con la invasión local y la metástasis (Lui, Z, y col., Regulation of matrix metalloprotease activity in malignant mesothelioma cell lines by growth factors. Thorax 58:198–203, (2003)). En el cáncer de pulmón no microcítico, la anfirregulina puede inhibir la apoptosis (Hurbin A, y col., Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor–1 receptor–dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. Ann NY Acad Sci 1010, 2003, resumen).

2) Algunas células cancerosas son inhibidas por la activación colinérgica

También se ha demostrado que en el carcinoma de pulmón microcítico (CPM), la activación de los receptores muscarínicos M3 de acetilcolina causa la disminución de la proliferación celular, el aumento de la adhesión célula-célula mediada por la E-cadherina y el aumento de Beta 1 de la adhesión célula-sustrato mediada por la integrina beta 1 (Williams, muscarinic signaling in carcinoma cells, Life Sciences 72 (2003), 2173–2182). El aumento de la adhesión célula-célula y de la adhesión célula-sustrato produciría disminución de la metástasis.

La estimulación colinérgica de la línea celular preneoplásica (NIH3T3) puede causar también mecanismos tanto inhibidores como estimulantes del crecimiento (Nicke, B. y col., Muscarinic Cholinergic Receptors activate both inhibitory and stimulatory growth mechanisms in NIH3T3 cells, J. Biol. Chem. 1999, vol. 274, no. 31, pp. 21701–21706).

3) Algunos cánceres están innervados parasimpáticamente

En 2001, se publicó el primer informe en el que se demostró que el tejido neoplásico está innervado (Seifert P, y col., Tumors may be innervated. Virchows Arch 438, 2001, resumen). En 2002, Seifert informó que los carcinomas de vejiga papilar estaban innervados parasimpáticamente (Seifert P, y col., Nerve fibers in tumors of the human urinary bladder. Virchows Arch 440:291–297, 2002).

4) La angiogénesis es estimulada por la acetilcolina

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

5) Bloqueo del "Mecanismo de acoplamiento universal" en las células cancerosas

Se ha planteado la teoría y se ha demostrado que la toxina botulínica actúa mediante la inhibición de un "mecanismo de acoplamiento universal" dentro de todas las células al interferir con la formación de un complejo SNARE entre dos membranas que se fusionarán y sufrirán exocitosis. Este concepto ha sido aplicado al tratamiento del cáncer mediante la inyección de la toxina botulínica directamente en las células cancerosas. Se ha planteado la teoría de que tal efecto ayudará a reducir la actividad de una célula cancerosa (documento UTS 2005/0031648 A1) o a reducir la asociación de los filamentos de actina y, por lo tanto, a reducir el movimiento de una célula cancerosa (documento WO 2005/030248).

Existen importantes limitaciones prácticas y de seguridad de este enfoque. En primer lugar la toxina botulínica no entra en las células no neuronales a menos que la célula se ha permeabilizado (solo *in vitro*), un vehículo de transporte se ha unido (*in vitro*), o si se ha inyectado una dosis significativamente más alta de toxina. Las dosis más altas de inyecciones de toxina botulínica pueden producir una mayor propagación inadvertida con la consiguiente parálisis de las estructuras vecinas, una mayor resistencia a futuras inyecciones. Otras limitaciones prácticas de la inyección de la toxina botulínica en un cáncer directamente incluyen la posible siembra de las células cancerosas al tejido normal vecino, la penetración de los vasos linfáticos o vasos sanguíneos dentro del cáncer que causan una mayor probabilidad de propagación, o que producen un efecto de bolo a presión en el cáncer que puede dar lugar a la propagación.

6) Las inyecciones distantes de toxina botulínica reducirán las metástasis y proporcionarán una terapia local contra el cáncer más segura

Para tratar el cáncer, es importante controlar no solo la enfermedad local, sino controlar y tratar la propagación a

distancia denominada metástasis. Las metástasis pueden ser regionales (dentro de las estructuras linfáticas vecinas) o distantes (lejos del sitio primario). Generalmente, las metástasis se producen por diseminación hematológica o linfática. La propagación a través de los canales linfáticos se ve facilitada principalmente mediante la contracción de las fibras del músculo esquelético o liso que rodean a la red linfática. Es bien conocido que la toxina botulínica tiene una fuerte afinidad por las fibras musculares esqueléticas y las debilita o paraliza después de la exposición. Se necesitan pequeñas cantidades de toxina para lograr esto y el intervalo de dosis que se necesita para lograr esto está bien establecido para otras afecciones no cancerosas. Adicionalmente, está bien establecido que el sistema inmunológico es importante en la eliminación de células cancerosas, tanto en el sitio primario como dentro de la circulación.

En ciertas realizaciones, los procedimientos de la presente invención logran, pero no se limitan al mismo, el tratamiento de cáncer mediante el tratamiento del cáncer en el sitio primario a través de la mejora de la respuesta inmunitaria a las células malignas, la prevención de la propagación por el debilitamiento de las fuerzas contráctiles regionales en y alrededor de las estructuras de vasos linfáticos y sanguíneos, y el tratamiento de las células cancerosas dentro de la circulación. La presente invención es distinta en que la toxina no se inyecta directamente en las células cancerosas.

A continuación se expone una revisión de la anatomía relevante:

1) La localización de tejido linfático

Además de los vasos sanguíneos, el cuerpo humano tiene un sistema de canales que recoge el líquido de los espacios de los tejidos y lo devuelve a la sangre. Este líquido se llama linfa y, en contraste con la sangre, circula en una sola dirección, hacia el corazón.

Los capilares linfáticos se originan como vasos de paredes finas y extremos ciegos. Están compuestos por un endotelio de pared delgada. Estos vasos de paredes finas en última instancia convergen y terminan como dos troncos principales, el conducto torácico y el conducto linfático derecho. Estos entran en la unión de la vena yugular interna izquierda y la vena subclavia izquierda, y en la confluencia de la vena subclavia derecha y la vena yugular interna derecha. Interpuestos en la trayectoria de los vasos linfáticos están los ganglios linfáticos. Los vasos linfáticos más grandes tienen una capa de músculo liso que ayuda a impulsar el flujo de la linfa a través de los canales y el flujo linfático unidireccional es secundario a la presencia de muchas válvulas de una vía.

Los conductos linfáticos de gran tamaño (conductos linfáticos torácicos y derechos) tienen una capa de músculo liso reforzado en el medio, en la que los músculos están orientados longitudinalmente y circularmente. Contienen vasos vasculares y una rica red neuronal (Junqueira L, Basic Histología de 1986, Lange Medical Publications, página 269).

Tejido linfático

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

En general, las células linfoides comienzan en un órgano linfático "central", en el que los precursores linfoides sufren proliferación independiente de antígeno y adquieren antígenos de superficie que los marcan como comprometidos con la respuesta inmunitaria celular o humoral. El timo es el órgano central en el que los linfocitos adquieren la capacidad de participar en la respuesta inmunitaria celular (linfocitos T). Las células migran a través de la sangre desde la médula ósea al timo, donde proliferan, dando lugar a los linfocitos T. Estos linfocitos son responsables de reacciones inmunitarias mediadas por células. La médula ósea es donde las células progenitoras se diferencian en células inmunitarias humorales (linfocitos B), que, en última instancia, se convierten en células plasmáticas y segregan inmunoglobulinas y proporcionan la respuesta inmunitaria humoral. Los linfocitos dejan los órganos linfoides centrales y pueblan regiones específicas de los órganos linfoides "periféricos", tales como los ganglios linfáticos, el bazo, las placas de Peyer y el tejido linfático no encapsulado difuso en la mucosa de los aparatos digestivo, respiratorio, urinario y reproductivo (Junqueira L, Basic Histology, 1986, Lange Medical Publications, página 269).

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

Timo: El timo es un órgano linfático central situado en el mediastino. Hay una proliferación linfocítica intensa que se produce en el timo durante el desarrollo embrionario hasta el desarrollo prepuberal. Aquí es donde las células proliferan y convierten en linfocitos T, las células responsables de la inmunidad mediada por células. Desde el timo, estos linfocitos T salen a través de los vasos sanguíneos para poblar los órganos linfoides periféricos, especialmente los ganglios linfáticos y el bazo.

Médula ósea: La médula ósea es también un órgano central, pero da lugar a linfocitos B, que en última instancia se

diferencian en células plasmáticas y secretan anticuerpos (el sistema inmunológico humoral). Después de la diferenciación, los linfocitos B viajan a los ganglios linfáticos, el bazo y, especialmente, las placas de Peyer en el intestino (Junqueira, citado anteriormente, página 312).

5 Ganglios linfáticos: Los ganglios linfáticos son áreas de tejido linfóide periférico encapsulado. Se distribuyen por todo el cuerpo, siempre a lo largo del curso de los vasos linfoides, que llevan la linfa a los conductos torácicos y linfáticos (Junqueira, citado anteriormente, página 313). Los ganglios linfáticos se agregan en sitios particulares, tales como el cuello, las axilas, las ingles y la región para-aórtica. La ubicación precisa de los ganglios linfáticos es bien conocida. Véase, por ejemplo, Le, UAMS Department of Anatomy Lymphatics Tables (Jul. 16, 2005).

10 La linfa entra en los ganglios linfáticos a través del canal linfático aferente y sale a través del canal eferente. El flujo es unidireccional. A medida que la linfa fluye a través de los senos, el 99 % o más de los antígenos u otros desechos se eliminan por la actividad fagocítica de los macrófagos en el ganglio. Parte del material está atrapado en la superficie de las células dendríticas, que a continuación se exponen en la superficie de la célula dendrítica y son reconocidas por los linfocitos inmunocompetentes actúan sobre ellos. El parénquima de un ganglio linfático tiene tres regiones generales, la corteza, la paracorteza y la médula.

15 En la corteza, si un linfocito B reconoce un antígeno (y a veces con la ayuda de los linfocitos T), el linfocito B puede activarse y sintetizar anticuerpos que se liberan en el líquido linfático y después en la circulación. Los linfocitos B activados permanecen dentro del ganglio linfático. Los linfocitos B no estimulados salen del ganglio linfático y vuelven a la circulación general.

20 Los linfocitos T permanecen predominantemente en la región paracortical del ganglio linfático. Los linfocitos T activados pasan a la circulación para llegar al sitio periférico. Otros tipos de células, predominantemente las células presentadoras de antígeno, residen en la región paracortical del ganglio linfático.

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

25 Tejido no encapsulado: EL tejido linfóide no encapsulado se puede encontrar sobre todo en el tejido conjuntivo laxo de muchos órganos, principalmente en la lámina propia del aparato digestivo, el aparato respiratorio superior y las vías urinarias (Junqueira, citado anteriormente, página 323). Las amígdalas palatinas, linguales y faríngeas son otro sitio principal del tejido linfóide no encapsulado. Este denominado tejido linfóide asociado a mucosas (MALT) incluye tejido linfóide asociado al intestino (GALT), tejido linfóide asociado a los bronquios/tráquea (BALT), linfóide asociado a la nariz (NALT) y el tejido linfóide asociado a la vía vulvovaginal (VALT). Existe MALT adicional dentro de los órganos accesorios del aparato digestivo, predominantemente en la glándula parótida.

30 El MALT puede comprender una colección de células linfoides o puede incluir pequeños ganglios linfáticos solitarios. La estimulación de los linfocitos B conduce a la producción de inmunoglobulina A (IgA) e IgM dentro de las placas de Peyer. Además, las superficies epiteliales contienen células M que son células especializadas que absorben, transportan y presentan los antígenos a las células linfoides subepiteliales, tales como las células colaboradoras 1 de tipo CD4, las células presentadoras de antígeno y las células de memoria.

35 Una discusión más específica de los linfocitos se expondrá a continuación, pero en general, los linfocitos contienen receptores de antígenos que desencadenan la diferenciación. En los órganos periféricos, los linfocitos interactúan con antígenos apropiados, aumentan de tamaño y luego se dividen. Algunos se convierten en células efectoras y otros se convierten en células de memoria que son responsables de la respuesta inmunitaria secundaria. Para generar una respuesta inmunitaria y para generar las células efectoras, el antígeno debe ser liberado a ellas. Este es el trabajo de las células presentadoras de antígenos, que incluyen células dendríticas, macrófagos y células de Langhans en la epidermis.

45 Las células efectoras se pueden ser linfocitos B o T activados. Los linfocitos B efectoras son células plasmáticas que secretan inmunoglobulinas en los tejidos conjuntivos circundantes. Los linfocitos T efectoras son de varios tipos e incluyen linfocitos T colaboradores, linfocitos T supresores y linfocitos T citotóxicos. Las células atacadas incluyen células infectadas por virus y tumorales. Los linfocitos T y los macrófagos secretan linfocinas que regulan la proliferación tanto de los linfocitos T como B.

Flujo linfático

50 El sistema linfático se encuentra en casi todos los órganos excepto el sistema nervioso central y la médula ósea. La circulación linfática está ayudada por la acción de fuerzas externas, tales como la contracción del músculo esquelético que rodea en sus paredes. (Junqueira, citado anteriormente, página 269). Estas fuerzas producen el transporte a lo largo de los canales linfáticos. La contracción del músculo liso en las paredes de los vasos linfáticos más grandes también ayuda a impulsar la linfa. El transporte de la linfa depende de las fuerzas de conducción activa y pasiva. La fuerza de conducción activa resultante de la actividad de la bomba intrínseca en algunos vasos linfáticos desempeña un papel importante en la propulsión de flujo de la linfa (Hosaka K, y col., Am J Physiol Heart Circ Physiol 284, 2003, resumen) Hay un tono miogénico en los canales linfáticos. Se ha demostrado que la vía de la cinasa Rho (que es inhibida por la toxina botulínica) ayuda a regular la actividad de la bomba de linfa (Hosaka, citado anteriormente). De hecho, se ha demostrado que los vasos linfáticos son capaces de regular el flujo a través

de mecanismos intrínsecos (Ferguson MK, y col., *Lymphology* 27(2), 1994 resumen y Muthuchamy M, y col., *Molecular and Functional analyses of the contractile apparatus in lymphatic muscle*. FASEB J 17, 2003, resumen). Los conductos linfáticos más grandes contienen músculo liso y una rica red neuronal (Junqueira, citado anteriormente, página 269).

- 5 Hay varios factores que ayudan al flujo del líquido linfático desde espacios de los tejidos a los ganglios linfáticos y, finalmente, a la circulación sanguínea venosa: 1) "Presión de filtración" en espacios de tejido, generada por filtración de fluido a presión desde los capilares hemáticos; 2) la contracción de los músculos vecinos comprime los vasos linfáticos, moviendo la linfa en la dirección determinada por la disposición de válvula; 3) la pulsación de las arterias adyacentes; 4) los movimientos respiratorios y la baja presión sanguínea de la vena braquicefálica durante la inspiración; 5) el músculo liso en las paredes de los troncos linfáticos es más marcado más proximal a sus válvulas. También se sabe que se producen contracciones pulsátiles en el conducto torácico.

2) Linfáticos. Cáncer y metástasis

- 15 Los cánceres se propagan por las circulaciones linfáticas y hematógenas. Los sistemas linfáticos y vasculares tienen numerosas conexiones y las células tumorales pueden pasar de un sistema a otro. Durante la invasión, las células cancerosas pueden entrar en los pequeños vasos linfáticos de pared fina y son transportadas pasivamente en la linfa. Los émbolos tumorales pueden quedar atrapados en el primer ganglio o ganglios linfáticos (ganglios "regionales") encontrados en su ruta, o pueden pasar por alto los ganglios regionales y son transportadas a los grupos ganglionares distantes ("salto de metástasis"). Los recientes avances en el mapeo de los vasos linfáticos que drenan los cánceres han permitido a los cirujanos identificar el ganglio linfático de drena el sitio del tumor (el "ganglio linfático centinela").

Cada región del cuerpo generalmente drena en un ganglio linfático o grupo de ganglios determinado, que se han detallado con precisión en estudios anatómicos y es conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, UAMS Department of Anatomy–Lymphatic Tables, citado anteriormente.

- 25 Ciertos factores pueden facilitar la entrada de las células cancerosas en la circulación y provocar metástasis. La presión física dentro de un entorno de cáncer puede conducir a la diseminación de las células malignas, tanto local como remotamente (Targarona E M, y col., *World J Surg* 22, 57–58, 1998 y Lacy A M, y col., *Surg Endosc* 1988, 12:1040–1041). Además, una técnica "sin tocar" de escisión quirúrgica se ha recomendado para reducir el efecto de "masaje" de las células cancerosas en la circulación a través de manipulación. En esta técnica es importante para ligar el suministro de sangre del tumor antes de intentar la movilización del tumor. Estas diversas técnicas clínicas hacen hincapié en la necesidad de minimizar la manipulación física directa de un cáncer para reducir la posibilidad de facilitar la difusión.

Clínicamente, se ha demostrado (Hiroto M, y col., *Journal of Pancreas* 6(2):143–151, 2005), que todas las muestras de fluidos linfáticos exprimidos a partir de tejido pancreático canceroso resecado fueron positivas para el ARN mensajero CEA, lo que urge a la necesidad de minimizar la propagación del drenaje de líquido linfático de un cáncer.

- 35 3) La toxina botulínica debilitará el tránsito linfático

El efecto de la toxina botulínica en el músculo esquelético es bien conocido. De hecho, es la base de la terapia para afecciones tales como estrabismo, distonías y otras afecciones musculares espásticas. La FDA ha concedido la aprobación de la terapia botulínica para el estrabismo, el blefaroespasma, las distonías cervical y otras. El intervalo de dosis necesarias para paralizar diversos músculos en el cuerpo está bien establecido.

- 40 Una inyección regional de la toxina botulínica alrededor de un cáncer explotará la conocida afinidad de unión de la toxina botulínica por el músculo. El músculo esquelético, músculo liso, músculo linfático, músculo de los vasos sanguíneos y el músculo de los pericitos pueden ser el objetivo no limitante de esta invención. La parálisis del músculo esquelético o liso circundante puede limitar las fuerzas extrínsecas contráctiles en estructuras linfáticas que normalmente facilitan el flujo de la linfa a través de los canales linfáticos. Los músculos intrínsecos dentro de los túbulos linfáticos pueden paralizarse o debilitarse por la terapia botulínica. La pared del músculo liso de los vasos sanguíneos puede debilitarse también.

Procedimiento alternativo de tratamiento del cáncer con inyecciones de toxina botulínica distante:

- 50 En algunas realizaciones, un procedimiento para tratar el cáncer con inyecciones botulínicas distantes se refiere a la capacidad para modificar el sistema inmunológico y aumentar la respuesta al cáncer utilizando la terapia de la toxina botulínica. La base para esto se refiere a la inervación colinérgica del sistema inmunitario y, por lo tanto, también se refiere al tratamiento de otras afecciones no cancerosas que existen debido a una respuesta inmunitaria pobre o debilitada. Con respecto a la terapia del cáncer, de nuevo es importante evitar la introducción de la toxina a las células cancerosas, ya que la exocitosis en las células cancerosas es importante para la presentación de los antígenos apropiados para el reconocimiento inmune y la destrucción por el sistema inmunológico. De hecho, se prefieren las inyecciones distantes de toxina en los órganos linfáticos (ganglios linfáticos, tejido linfático).

1) Respuesta inmunitaria normal al cáncer

Las respuestas inmunitarias antitumorales pueden ser innatas (natural) o adquiridas (adaptativa). La inmunidad innata está mediada por las células o factores solubles que existen de forma natural en los tejidos de los fluidos corporales y puede interferir con el crecimiento del tumor (Whiteside T L. J. *Allergy Clin Immunol* 2003; 111, S677–86). Las células hematopoyéticas incluidas son macrófagos, granulocitos, células asesinas naturales, células T no restringidas por MHC y los linfocitos T gamma/delta. Asimismo, los anticuerpos naturales dirigidos a los componentes de la superficie de las células tumorales, componentes del complemento, proteína C reactiva, proteína amiloide A sérico, proteína de unión a manosa también están incluidos (Whiteside, citado anteriormente). La inmunidad adaptativa está mediada por los linfocitos T que reconocen los péptidos derivados del tumor unidos a moléculas auto-MHC expresadas sobre las células presentadoras de antígenos (CPA). Estas células incluyen células citolíticas efectoras, que son CD8 + y restringidas por MHC de clase I, pero también linfocitos T colaboradores CD4 + (Whiteside, citado anteriormente).

Las respuestas inmunitarias a las células malignas se pueden clasificar como locales/regionales o sistémicas. Las respuestas locales incluyen leucocitos infiltrantes de tumor (LIT). Existen respuestas sistémicas y se miden por la hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) en la circulación periférica en pacientes con cáncer.

2) Células inmunitarias en el microambiente tumoral

Whiteside, citado anteriormente, revisa el microambiente tumoral. Los LIT se encuentran frecuentemente en los tumores. Estas células pueden incluir células que median la inmunidad innata y adaptativa. Diversos productos solubles, tales como citocinas y anticuerpos, también pueden liberarse en el microambiente. En teoría estos productos combinados con la interacción directa de las células efectoras infiltrantes deberán producir la muerte de las células cancerosas, pero debido a los mecanismos descritos anteriormente, esto no suele ocurrir.

Los linfocitos T son los más abundantes de todos los infiltrados tumorales mononucleares. Se ha demostrado que los linfocitos T en el microambiente tumoral incluyen células CD4 + (colaboradoras) y CD8 + (supresoras). Se ha demostrado que son disfuncionales en pacientes con cáncer y la magnitud de su disfunción puede estar relacionada con el pronóstico y la supervivencia en pacientes con cáncer. Tradicionalmente, la respuesta protectora de los linfocitos T a los tumores se ha atribuido a los linfocitos T CD8 con actividad citotóxica, que están restringidos por las moléculas de MHC de clase I, pero recientemente se ha considerado que las células CD4 desempeñan un papel antitumoral (Gerloni M, y col., *Springer Seminars in Immunopathology*, Springer–Verlag 2005, 1–15). En general, tanto las respuestas celulares como las mediadas por anticuerpos se utilizan para las respuestas antitumorales. Las respuestas de anticuerpos son las más adecuadas para los patógenos y antígenos extracelulares, y las respuestas mediadas por células son las más adecuadas para los patógenos intracelulares y células tumorales (Gerloni, citado anteriormente). Dado que los antígenos tumorales son siempre antígenos endógenos, los tumores pueden ser más adecuados para su destrucción por la inmunidad mediada por células. Además, ya que los tumores son negativos para MHC II, la mayoría de los esfuerzos se han centrado en los linfocitos T CD8, el papel de los linfocitos CD4 se ha demostrado, así, ya que ayudan a activar y expandir los linfocitos CD8 también. Hay dos subpoblaciones de linfocitos CD4, los linfocitos T colaboradores 1 (Th1) y los linfocitos Th2. Los linfocitos Th1 producen interleucina-2 (IL-2), IL-12 e interferón-gamma (INF-G) y Th2 producen IL-4 e IL-5. Estas citocinas afectan a los linfocitos B y ayudan aún más a la influencia del tipo de respuesta de anticuerpos a la activación por antígeno (Gerloni, citado anteriormente). Las células CD4 pueden ayudar a activar los macrófagos en los ganglios linfáticos drenantes o en el tejido tumoral.

La cooperación célula-célula también puede existir entre las células CD4. Gerloni, citado anteriormente, ha demostrado que una célula CD4 puede activar y expandir otras células CD4 también.

La producción y liberación en la membrana celular de antígenos celulares es importante en la inmunidad y destrucción tumoral. Ambos antígenos restringidos por MHC de clase I y de clase II están involucrados en la respuesta antitumoral. La mayoría de la atención en la inmunidad tumoral se ha centrado en el papel de los antígenos restringidos por el MHC de clase I pero los antígenos de clase II son importantes también. Los antígenos de clase II son específicos de tejido, compartidos entre varios tipos de tumores, antígenos tumorales comunes verdaderos y antígenos virales que causan la transformación tumoral (tales como el virus del papiloma humano o los antígenos del virus de Epstein Barr).

Las células asesinas naturales (NK) median la inmunidad innata y están bien equipados para la lisis de las células tumorales. Se piensa que estas células facilitan las interacciones células dendríticas/linfocitos T y dirigen la respuesta inmunitaria a TAA. En general se piensa que estas células no son abundantes en el microambiente tumoral, pero esto puede ser debido a la dificultad para su identificación fiable. Además, las células NK son dependientes de la interleucina-2 (IL-2) para la activación, que generalmente es deficiente en tumores humanos. (Whiteside, citado anteriormente). Las células NK son también capaces de responder a las células infectadas por virus. Las células NK desempeñan un papel crítico en la limitación de las infecciones virales, como lo han indicado estudios con virus herpes, tales como el citomegalovirus (CMV), el virus herpes simple (VHS) y el virus de Epstein-Barr (EBV), así como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Smyth M J, y col., *Molec Immunol* 42 (2005) 501–510). Las funciones efectoras de las células NK, incluyendo la citotoxicidad y la capacidad para producir diversas citocinas (incluyendo INF-gamma) después de la activación que restringe la angiogénesis tumoral y estimula la inmunidad adaptativa (Smyth, citado anteriormente). Clinically, enhancement of NK cell function parallels

clinical improvement in cancer patients (Lechin F, Clin Canc Research 2004, 10:8120).

Los linfocitos B son también poco frecuentes en la mayoría de los tumores, excepto en el cáncer de mama y el melanoma. La función de los linfocitos B es la diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos. En general, los anticuerpos frente a TAA se encuentran en la circulación de pacientes con cáncer y se cree que son sintetizados y secretados en los ganglios linfáticos que drenan el tumor, el bazo u otros tejidos linfoides. Desde ahí, las moléculas de IgG se transportan por el plasma o la linfa a los sitios de tejido.

Las células dendríticas (CD) son comunes en los cánceres humanos. Estas células procesan y presentan TAA a las células T vírgenes o de memoria, desempeñando un papel importante en la generación de linfocitos T efectores específicos de tumor. En pacientes con cáncer, las CD son a veces disfuncionales. Sin embargo, las infiltraciones de CD en los tumores se han asociado con una supervivencia del paciente significativamente prolongada y una incidencia reducida de la enfermedad recurrente o metastásica. Por el contrario, los pacientes con lesiones apenas infiltradas con CD tienen un pronóstico relativamente malo.

Los macrófagos también se encuentran en el microambiente tumoral y se denominan macrófagos asociados al tumor (MAT). En los tumores, los MAT realmente inhiben la función de los linfocitos, incluyendo la proliferación de linfocitos T y la citotoxicidad antitumoral mediada por NK.

3) Supresión inmunitaria en el microambiente tumoral

Como se ha mencionado anteriormente, los cánceres pueden evadir el sistema inmunitario y, por lo tanto, escapar al reconocimiento. Estos incluyen la expresión por los tumores de antígenos poco inmunogénicos, defectos en el procesamiento de antígenos, interacciones coestimuladoras inadecuadas, producción de factores inmunosupresores, o por el hecho de que las células inmunitarias se ven comprometidos en número y/o función (Hoffman T K, y col., Cancer Immunol Immunother (2004) 53:1055–1067)

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

Al igual que el microambiente local contiene inmunocitos disfuncionales, los linfocitos de sangre periférica contienen irregularidades de función también. Las anomalías de señalización, las alteraciones funcionales y la apoptosis se observan en los linfocitos T, las células NK, los macrófagos y los linfocitos B en la circulación periférica.

5) Inmunoterapia local y respuesta del cáncer

La capacidad de modular el medio ambiente inmunitario local es importante para la terapia del cáncer. Cuando se inyectaron dosis bajas de IL-2 natural alrededor de los ganglios linfáticos que drenan el tumor, el 65 % de los pacientes tuvo una respuesta completa, parcial o mínima (Feinmesser M y col., Eur Arch Otorhinolaryngol (2004) 261:359–368). Por desgracia, el efecto fue de corta duración y múltiples inyecciones diarias o semanales son importantes (Shibuya T Y, y col., Clin Canc Research 2004, 10:7088–7099). En otros estudios que usan infiltración peritumoral de linfocinas con o sin infiltración regional en los ganglios linfáticos, se observó una regresión similar (Feinmesser, citado anteriormente).

La administración de sutura bioactiva, recubierta con INF-gamma, IL-2, se ha demostrado que genera una respuesta Th1 prolongada y estimula la secreción de IL-12 y prolonga la respuesta inmunitaria (Shibuya T Y, y col., Clin Canc Research 2004, 10: 7088–7099). En esta terapia, se considera que la sutura es un vehículo para los productos bioactivos, y se coloca utilizando una "técnica de Seldinger" de modo que una aguja con un trocar se introduce en la ubicación deseada y la sutura se hace pasar posteriormente. La colocación de la sutura es invasiva y la sutura se mantendrá larga y unida a la superficie de la piel, "similar a un drenaje quirúrgico", que puede conducir potencialmente a una infección.

En un esfuerzo para mejorar la función inmunitaria local, se han transducido genes de citocina en las células tumorales del paciente. De nuevo, el concepto subyacente es estimular una respuesta inmunitaria enérgica mediante la mejora de la producción de citocinas locales. Los inconvenientes de esta técnica incluyen la dependencia de las células tumorales para producir un efecto, y la falta de la cantidad y calidad adecuada de las células tumorales del paciente y la expresión heterogénea de los genes de las citocinas. Asimismo, las células tumorales deben ser irradiadas antes de la reintroducción en el paciente (Steele T A, y col., PSEBM 2000, 23:118–127).

6) Estrategias de inmunoterapia

En términos generales, existen dos formas de inmunoterapia, activa y pasiva. La inmunoterapia activa se refiere a la inducción de las respuestas inmunitarias mediante la aplicación de antígenos tumorales inmunogénicos (tales como, péptidos, proteínas, células tumorales o lisados tumorales), mientras que la inmunización pasiva se basa en la transferencia de moléculas inmunitarias efectoras o células inmunitarias (Hoffman T K, y col., Cancer Immunol Immunother (2004) 53:1055–1067).

Los inmunomoduladores activos pueden ser inespecíficos o específicos. Un inmunomodulador activo no específico puede incluir terapia local con BCG, extractos tímicos u OK-432, que tratan de inducir una respuesta antitumoral. Sin

embargo, este tipo de tratamiento no se ha demostrado que tenga beneficios consistentes de la supervivencia para el paciente de cáncer. La inmunomodulación específica activa puede incluir la administración de vacunas basadas en células dendríticas o de vacunas basadas en ADN. Esta terapia está en pañales y por lo general está reservada para las enfermedades recurrentes en estadio terminal de cánceres agresivos.

- 5 La inmunomodulación pasiva también se divide en terapias inespecíficas y específicas. La terapia pasiva, no específica incluye la administración de citocinas, tales como interferón o interleucina sistémicos o mecanismos de transferencia adoptivos celulares, tales como células asesinas activadas por linfocitos e interleucina-2 administrada localmente. Los resultados de este tipo de tratamiento no fueron consistentes y produjeron altas toxicidades clínicas. Cuando la IL-2 se administra por vía sistémica se observó una tasa inaceptable de toxicidad sistémica, incluyendo
- 10 fiebre, malestar general, hipotensión, edema pulmonar y shock. La inmunomodulación pasiva específica incluye la administración de anticuerpos dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico, o por medio de transferencia adoptiva celular a través de los linfocitos T específicos para el tumor.

7) Importancia de mantener la exocitosis para el reconocimiento inmunitario

- 15 Como se ha indicado anteriormente, con el fin de matar con eficacia las células cancerosas, es importante que las células cancerosas mantengan su capacidad para sufrir exocitosis. La exocitosis es el proceso específico por el cual una vesícula celular se fusiona con la membrana plasmática de la célula. Es el proceso por el cual las proteínas y los lípidos que se crean dentro de una célula son transportados al exterior de la célula. (Alberts B, y col., Molecular Biology of the Cell, Tercera edición, 1994, Garland Publishing pg. 626).

- 20 Las proteínas pueden secretarse a partir de las células por exocitosis de forma constitutiva o regulada (Alberts, citada anteriormente, página 633). En la vía regulada, las moléculas se almacenan en vesículas secretoras que no se fusionan con la membrana plasmática para liberar su contenido hasta que se recibe una señal extracelular. Mientras que esta vía solo funciona en células seleccionadas especializadas, una vía secretora constitutiva funciona en todas las células, mediada por el transporte vesicular continuo de la cara trans del aparato de Golgi a la membrana plasmática. (Alberts, citado anteriormente, página 633). Este procedimiento permite liberar varias
- 25 proteínas de membrana, proteínas y lípidos secretados en los dominios de la membrana plasmática apropiados (Alberts, citado anteriormente, página 633).

- Un antígeno es una macromolécula que incluye prácticamente todas las proteínas y muchos polisacáridos (Alberts, citado anteriormente, página 1201). Estos denominados determinantes antigénicos estimulan la producción de anticuerpos o respuestas de linfocitos T (Alberts, citado anteriormente, página 1201). Debido a que el sistema
- 30 inmunológico funciona mediante expansión clonal, incluso un solo determinante antigénico activará muchos clones. Por el contrario, la alteración o regulación por disminución de los determinantes antigénicos puede alterar previsiblemente significativamente la respuesta inmunitaria del huésped a un antígeno tumoral.

- La mayoría de los TAA son autoantígenos que se sobreexpresan o están alterados postranscripcionalmente. Con el fin de montar una respuesta adecuada, los linfocitos T específicos de TAA y la inmunidad innata mediada por
- 35 linfocitos T activados no específicos, células NK activadas y macrófagos activados son necesarios. Con esto en mente, hay dos razones principales por las que los tumores no inducen una respuesta inmunitaria enérgica. En primer lugar, el tumor puede dejar de proporcionar un antígeno apropiado para la respuesta inmunitaria que se desea detectar y al que el sistema inmunológico puede reaccionar. En segundo lugar el tumor puede evitar una respuesta inmunitaria al no proporcionar moléculas accesorias importantes para el desarrollo de una respuesta
- 40 inmunitaria (Steele, citado anteriormente).

- La falta de presentación de antígeno adecuada puede incluir la expresión de una proteína tumoral mutante que no es inmunogénica, que tiene una vía de procesamiento de antígeno defectuosa, de modo que el antígeno no se puede transportar a la superficie celular o enmascarando el antígeno tumoral, por lo que no puede ser visto por las
- 45 células inmunitarias (Steele, citado anteriormente). Sin la expresión tumoral de moléculas de superficie importantes, no se puede generar una respuesta antitumoral (Steele, citado anteriormente). Estos resultados hacen hincapié en la necesidad de tener un procedimiento intacto de exocitosis en las células cancerosas para permitir que los TAA se expresen en las células cancerosas y provoquen una respuesta inmunitaria.

- Se ha demostrado que cuando los cánceres tienen una mayor expresión de beta-2 macroglobulina, un componente del MHC-1, el resultado clínico mejora (Feinmesser M y col., Eur Arch Otorhinolaryngol (2004) 261:359-368). Se
- 50 sugiere que el incremento de la expresión del antígeno facilita la presentación del antígeno tumoral a los linfocitos CD8.

- Además de la expresión de TAA, la exocitosis es importante en la metástasis. La metástasis del cáncer es un proceso que implica un programa coordinado de acontecimientos que incluye cambios en la adhesión celular, la proteólisis polarizada y la migración, la intravasación en la circulación, la posterior adhesión a las células
- 55 endoteliales, seguida de la extravasación, la invasión y la inducción de la angiogénesis. Las proteínas y receptores de la superficie celular están implicados íntimamente en estos procesos. Por ejemplo, la pérdida de E-cadherina puede reducir la adhesión célula-célula y permitir que las células cancerosas escapen más fácilmente de los tumores. Las integrinas regulan la adhesión celular, la motilidad, la invasión y la angiogénesis, y las metaloproteasas

sobre las células tumorales pueden degradar la matriz extracelular. En otras palabras, el proceso de exocitosis, que por un lado puede liberar metaloproteasa y contribuir a la invasión principal del sitio primario, es importante de forma integral en la producción de moléculas de adhesión que ayudan a prevenir las metástasis y la expresión de antígenos que puede facilitar el reconocimiento y la destrucción por el sistema inmunológico. Cualquier intento de

5 apagar globalmente el proceso de la exocitosis, por lo tanto, puede tener desventajas significativas en la terapia de la medicina del cáncer.

De hecho, el tratamiento del cáncer incluye los intentos de mejorar la inmunogenicidad de las células tumorales. Por ejemplo, es importante que para que los linfocitos T ataquen las células cancerosas que se unan a un fragmento peptídico específico que se presenta en una superficie de células cancerosas. Se sabe que los células tumorales

10 rara vez expresan este antígeno y se han hecho esfuerzos para transducir moléculas coestimuladoras en los tumores para estimular una respuesta inmunitaria antitumoral energética (Steele, citado anteriormente).

8) Modulación colinérgica de la función inmunitaria

Las células que son normalmente inmunoprotectoras del cáncer incluyen, pero no se limitan a las mismas, células asesinas naturales (NK), macrófagos y linfocitos T activados (incluyendo linfocitos infiltrantes de tumores y linfocitos

15 T asesinos naturales). La acetilcolina inhibe la función de las células asesinas naturales, que fue bloqueada por la atropina (Qiu Y H, Peng Y P, y col., Effect of acetylcholine on in vitro IL-2 production and NK cell cytotoxicity of rats. Lymphology 37(1):31-8, 2004)), lo que sugiere que la toxina botulínica puede inhibir la supresión de la actividad de las células NK. Se sabe que las células NK inducen la apoptosis de las células malignas (Smyth M J, y col., Activation of NK Cell Cytotoxicity. Molec Immunol 42:501-510, 2005) e inhiben la metástasis (Kim, S, y col., In vivo

20 natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. Proc Natl Acad Sci 97, 2000, resumen), por lo que la toxina botulínica puede potenciar esta actividad. La pilocarpina, un análogo de la acetilcolina, aumenta la relación CD8/CD4 que también fue bloqueada por la atropina, lo que sugiere que la actividad supresora de los linfocitos T se ve influida positivamente por la acetilcolina (Prync A E, Arzt E, y col., The inhibitory effect of the muscarinic agonist pilocarpine on lymphocyte activation involves the IL-2 pathway and the increase in suppressor

25 cell function. Int J. Neurosci 62, 1992, resumen). Esto sugeriría que una inversión de la relación CD8/CD4 o un aumento en la actividad de los linfocitos T colaboradores influiría positivamente sobre la citotoxicidad del cáncer (Gerloni M, y col., Springer Seminars in Immunopathology, Springer-Verlag 2005, 1-15) también. La acetilcolina también reduce la producción de factor de necrosis tumoral (Steinman L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. Nature Immunology 5, 2004, resumen). Finalmente, cuando se inyectó la toxina botulínica en las glándulas salivales humanas se observó que aumentaba la cantidad cuantitativa de inmunoglobulina

30 (específicamente IgA) secretada en la saliva. Los resultados anteriores apoyan el uso de la toxina botulínica para mejorar localmente la citotoxicidad inmunitaria y la inmunidad humoral.

9) La toxina botulínica puede modular el sistema inmunológico

La eventual alteración de la función inmune causada por la inhibición colinérgica incluye mejor inmunidad celular y

35 humoral. La función mejorada de las células NK potencia directamente la destrucción de células cancerosas. La actividad de las células NK mejorada produce una potenciación secundaria de la inmunidad celular y humoral por la liberación de citocinas y gamma interferón. Esto se traduce en un aumento de la función de los linfocitos T y las células NKT, que mejora aún más la destrucción celular del cáncer.

La función mejorada de las células NK también se ha demostrado que reduce la metástasis (Kim, citado

40 anteriormente).

La función mejorada de las células NK también mejora el resultado de los pacientes con infecciones víricas, enfermedades víricas, crecimientos inducidos por virus, enfermedades autoinmunes (tales como la enfermedad de Sjögren, diabetes dependiente de la insulina), esclerosis múltiple, heridas crónicas, infecciones crónicas, tales como la amigdalitis (Ferlazzo G, y col., Journal Immunol 2004, 172:1455-1462) o infecciones óseas (Miyasaki K,

45 Periodontal Immunology, Homepage, www.dent.ucla.edu), artritis reumatoide, miastenia grave y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), todos los cuales son trastornos que se caracterizan por la reducción del número de células NK, su función o actividad (Baxter, A G, y col., Autoimmunity 2002, 35:1-1,4, and Lee PT, y col., J. Clin Invest 2002, 110:793-800). La actividad baja de los linfocitos NK también se encuentra en el síndrome de fatiga crónica (Whiteside T L, y col., AM J Med 105, 1998, abstract), y la hepatitis (Chen Y, y col., J Viral Hepatitis 12,

50 2005, resumen), ambas susceptibles a la terapia con toxina botulínica.

La inyección de toxina botulínica alrededor y fuera de la vecindad de las células cancerosas puede mejorar el control local del cáncer en el sitio primario, impedir la propagación a distancia de las células cancerosas en la circulación y puede tratar las células cancerosas en el entorno local y las circulaciones distantes. Se evitarán los riesgos (como se ha descrito anteriormente) de la inyección de la toxina en o en la proximidad de un cáncer. Del mismo modo, la

55 inyección de la toxina botulínica de esta manera puede mejorar el resultado de pacientes que sufren infecciones víricas, enfermedades víricas, crecimientos inducidos por virus, enfermedades autoinmunes, esclerosis múltiple, heridas crónicas, infecciones crónicas, artritis reumatoide, miastenia grave y VIH, etc., como se ha descrito anteriormente.

Clasificación de los cánceres susceptibles de tratamiento:

Tabla 1: Clasificación de los cánceres susceptibles de tratamiento

<u>Tipo de cáncer</u>	<u>Ejemplos específicos</u>
Cánceres digestivos/intestinales	De glándulas salivales, labios, cavidad oral, orofaringe, hipofaringe, nasofaringe, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, anal
Cánceres del sistema nervioso	Cerebro, nervios
Cánceres hepatobiliares	De hígado, vesícula biliar, páncreas, aparato biliar
Cánceres genitourinarios	De riñón, uréter, vejiga, uretra, próstata, pene, vagina, vulva, útero, endometrio, ovario, cervical, testículos
Cáncer de mama	
Cánceres respiratorios	De nariz, senos paranasales, nasofaringe, laringe, tráquea, bronquios, pulmón, pleura (mesotelioma)
Cánceres del integumento	Melanoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, de células de Merkel
Cánceres musculoesqueléticos	rabdomiosarcoma, sarcomas
Cánceres hematopoyéticos	Linfoma, leucemia, mielodisplasia
Cánceres de órganos sensoriales	ojo, oído
Cánceres endocrinos	de tiroides, paratiroides
Cánceres neuroendocrinos	cánceres neuroendocrinos a excepción de las de la médula suprarrenal o tumores del glomus

El control de la metástasis es importante para el tratamiento del cáncer

- 5 Inhibición de la propagación: la manipulación física o presionar un cáncer a nivel macro o microscópica a través de células contráctiles puede producir una presión física para que las células cancerosas se propaguen o puede permitir que las células cancerosas que ya han entrado en un canal eferente se presione a la circulación más ancha. Por ejemplo, una premisa bien conocida en la cirugía oncológica es reducir al mínimo la manipulación del cáncer durante la resección para reducir al mínimo las fuerzas físicas que pueden conducir a la entrada y la propagación de las células cancerosas en los túbulos, tales como los vasos linfáticos o los sanguíneos. De hecho, cuando sea quirúrgicamente factible, es deseable ligar inicialmente los vasos de un cáncer al cáncer y minimizar la propagación.
- 10

La toxina botulínica desnervará localmente el tejido muscular

- 15 La toxina botulínica inhibirá la contracción de las fibras musculares macro o microscópicas alrededor de un cáncer, inhibiendo de este modo la oportunidad de presionar las células cancerosas en el entorno local o en los túbulos eferentes que transportan al cáncer a distancia. La toxina botulínica paraliza el músculo linfático que se contrae para presionar la linfa y, posiblemente, las células cancerosas en la circulación distante.

La capacidad para inmunomodular positivamente es importante para el tratamiento del cáncer

- 20 La toxina botulínica puede aumentar la producción de inmunoglobulina local cuando se aplica a una superficie mucosa. Esto puede mejorar las células "asesinas de tumores" o las propiedades del tejido local y mejorar el efecto anticanceroso.

- 25 Se ha demostrado que la toxina botulínica mejorar y/o produce la proliferación de una "célula mioepitelial", que es un tipo de célula muy específico. La célula mioepitelial se considera una célula de defensa importante en el cáncer de mama por mecanismos desconocidos. Aumentando la proliferación de estas células mioepiteliales, la toxina botulínica puede mejorar el mecanismo de defensa del huésped en los tumores que tienen células mioepiteliales (mama, próstata, pulmón, vías respiratoria, etc.).

Otros mecanismos desconocidos también pueden participar. Por ejemplo, la señalización célula-célula y el posterior crecimiento/metástasis es una característica de las células cancerosas. Se ha sugerido que mediante la alteración de estas señales, se puede alterar el crecimiento del cáncer. En cuanto a la toxina botulínica, las señales pueden ser químicas (por ejemplo, las sustancias liberadas por exocitosis y bloqueadas por la toxina botulínica) o físicas (por ejemplo, las señales físicas que rodean a las células), pero cualquiera puede ser bloqueada por la toxina botulínica.

Las técnicas que se dirigen a múltiples secuencias de acontecimientos en la progresión del cáncer es más probable que sean beneficiosas que una técnica dirigida a solo una secuencia.

La invención se describirá a continuación mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplos

El siguiente ejemplo demuestra la capacidad de la toxina botulínica para mejorar una respuesta inmunitaria celular.

Ejemplo n.º 1

A un paciente con verruga vulgar (verruga común) se inyecta en la base de la verruga y su periferia un total de 25 unidades de toxina botulínica de tipo A. Durante 3-5 semanas, se advierte que el tamaño de la lesión se reduce significativamente en todas las dimensiones (en casi un 90 %), es blanda y apenas perceptible. Después de 3 meses, el tamaño de la lesión vuelve a su tamaño original.

Los siguientes son ejemplos proféticos.

Ejemplo n.º 2

A un paciente de 50 años de edad con un diagnóstico de cáncer de pulmón invasivo se administran localmente 30 unidades de la toxina botulínica de tipo A alrededor del cáncer mediante inyección broncoscópica, aerosol o inyección transtorácica. El cáncer se visualiza clínica o radiográficamente y se inyecta directamente en la zona alrededor del cáncer y se somete al paciente a radiación, quimioterapia o cirugía como estaba previsto inicialmente. La aplicación local de la toxina botulínica también mejora la inmunidad local del paciente que sirve para minimizar la infección durante el tratamiento, dando lugar a un menor número de episodios de neumonía y a menos interrupciones en el tratamiento a causa de la infección. Después de 2 meses de terapia estándar contra el cáncer, se observa que la invasión local y la propagación regional y distante se reducen. El paciente experimenta un resultado clínico mejorado.

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

Ejemplo n.º 3

A un varón de 50 años de edad con cáncer de próstata invasivo se inyectan 40 unidades de toxina botulínica de tipo A alrededor del cáncer, que se traduce en un menor número de metástasis regionales o distantes. La inyección es guiada a la zona alrededor del cáncer mediante guía radiográfica (exploración por TAC, ecografía, guía de resonancia magnética u otros). El efecto de la toxina botulínica también se produce en el mioepitelio local y la incidencia durante la metástasis regional y distante en tránsito se reduce. El paciente sigue recibiendo terapia estándar para el cáncer de próstata. Durante el curso del tratamiento hay menos invasión de los tejidos circundantes y menos propagación de las células cancerosas en la circulación regional o sistémica. Se vuelve a evaluar al paciente periódicamente y se observa que se debe repetir la inyección en el cáncer y la región del cáncer en 3 meses, ya que el paciente tiene una enfermedad persistente que no respondió a la terapia estándar. Se inyectan 40 unidades más y el paciente continúa con la terapia planificada. Tres meses después, el tumor se elimina y no se requieren más inyecciones. El paciente experimenta cura y supervivencia mejoradas.

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

Ejemplo n.º 4

Una mujer de 60 años diagnosticada con cáncer de mama se trata con 30 unidades de toxina botulínica de tipo A inyectadas alrededor del cáncer antes de que comience cualquier terapia. La contracción local del tejido de mama se reduce y el paciente experimenta una reducción de la incidencia de propagación local, regional y distante. El resultado clínico mejora.

También se pueden inyectar en cada uno de los ganglios linfáticos regionales o distantes del paciente, el timo, el

bazo o la médula ósea 1-100 unidades de toxina botulínica de tipo A. Los ganglios linfáticos se inyectan mediante palpación, guía radiográfica o visualización directa durante la cirugía. Después de la inyección, se observa que hay una respuesta inmunológica mejorada contra el cáncer. El control local y las metástasis locales, regionales y distantes se reducen. La inyección puede repetirse en intervalos de 3-6 meses.

- 5 Como alternativa, el ganglio linfático centinela de los pacientes se puede identificar usando linfoscintigrafía. Dado que es altamente probable que estos ganglios contengan cáncer metastásico, se evitan durante las inyecciones radiográficas y solo se inyecta en la cuenca ganglionar circundante.

Ejemplo n.º 5

- 10 A un varón de 45 años de edad se le diagnostica cáncer de colon localmente invasivo. En el momento del diagnóstico, se inyectan 50 unidades de toxina botulínica de tipo A en y/o alrededor del cáncer para debilitar los efectos contráctiles de la musculatura colónica macroscópica y microscópica. El cáncer se 'congela' y hay menos invasión de las células cancerosas en los tejidos o vasos linfáticos o sanguíneos circundantes. El paciente puede recibir el tratamiento adicional (quimioterapia, radioterapia y/o cirugía) y la propagación local, regional y distal se reduce o elimina.
- 15 También se pueden inyectar en cada uno de los ganglios linfáticos regionales o distantes del paciente, el timo, el bazo o la médula ósea 1-100 unidades de toxina botulínica de tipo A. Estos tejidos se inyectan mediante guía radiográfica, inyección endoscópica, palpación directa o durante la cirugía. El control local y las metástasis locales, regionales y distantes se reducen. La inyección puede repetirse en intervalos de 3-6 meses.

Ejemplo n.º 6

- 20 Se observó que un paciente con cáncer de lengua metastásico tenía síntomas de compresión y hemorragia atribuibles a la invasión local de una metástasis regional. La metástasis se considera inoperable y no puede recibir radioterapia adicional. Alternativamente, puede ser tratado con cirugía, radioterapia o quimioterapia. En la zona alrededor de la lesión metastásica se inyectan 30 unidades de toxina botulínica de tipo A. Hay menos invasión local y metástasis de la lesión. La metástasis sufre regresión y se reducen los síntomas compresivos.
- 25 También se pueden inyectar en cada uno de los ganglios linfáticos regionales o distantes del paciente, el timo, el bazo o la médula ósea 1-100 unidades de toxina botulínica de tipo A. Estos tejidos se inyectan mediante guía radiográfica, palpación directa o durante la cirugía. El control local y las metástasis locales, regionales y distantes se reducen. La inyección puede repetirse en intervalos de 3-6 meses.

Ejemplo n.º 7

- 30 Un varón de 35 años de edad tiene cáncer de faringe localmente invasivo. Se inyectan treinta y cinco unidades de toxina botulínica de tipo A alrededor de la lesión. Se observa que el cáncer sufre regresión y se elimina con inyecciones locales de toxina botulínica sin terapia adicional.

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

Como alternativa, el ganglio linfático centinela del paciente se puede identificar usando linfoscintigrafía. Dado que es altamente probable que estos ganglios contengan cáncer metastásico, se evitan durante las inyecciones radiográficas y solo se inyecta en la cuenca ganglionar circundante.

Ejemplo n.º 8

- 40 Un paciente con cáncer tiene sinusitis fúngica invasiva. Su recuento de glóbulos blancos es inferior a 1.000 y hay una respuesta inmunológica deficiente en la cavidad sinusal. Se le somete a cirugía para eliminar el tejido invadido por el hongo. Antes de la cirugía o, preferentemente, después de la eliminación del tejido y durante la cirugía, se inyectan 10 unidades de toxina botulínica de tipo A en varios sitios en la cavidad nasal circundante. Se observa que
- 45 las respuestas inmunológicas locales e inmunológicas sistémicas mejoran y el paciente experimenta una cura de la enfermedad.

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

Ejemplo n.º 9

Un paciente con cáncer, enfermedad autoinmune, diabetes, VIH o SIDA o lupus tiene hongos en las uñas (onicomicosis). Se inyectan en la uña afectada 5 unidades de toxina botulínica de tipo A en múltiples puntos y hay

regresión de los síntomas de la onicomycosis. Como alternativa, se pueden inyectar los tejidos normales circundantes o los ganglios linfáticos regionales.

Ejemplo n.º 10

- 5 Una paciente de 10 años con diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) depende de las inyecciones de insulina. La toxina botulínica de tipo A (50 unidades) se inyecta utilizando guía radiográfica en el páncreas. Se observa que los niveles de insulina se elevan naturales y que tiene menos síntomas de diabetes.

Ejemplo n.º 11

- 10 En una mujer de 40 años de edad con enfermedad autoinmune se inyecta la toxina botulínica de tipo A. Se inyectan 100 unidades de la toxina en el bazo, la médula ósea o la cuenca ganglionar regional donde se encuentran los síntomas. Después de la inyección, los síntomas mejoraron.

Ejemplo n.º 12

- 15 Un varón de 35 años de edad con SIDA tiene una población de linfocitos T colaboradores suprimida y es susceptible a las infecciones. Se inyectan 50 unidades de toxina botulínica de tipo A en el timo y el bazo. Como alternativa, se puede inyectar en la médula ósea. La población de linfocitos T del paciente aumenta y su afección mejora significativamente.

Ejemplo n.º 3 Resultados del ensayo clínico

- 20 Con el fin de determinar histológicamente si la toxina botulínica de tipo A puede desnervar el tejido muscular que rodea al cáncer, se realizó un ensayo clínico en seres humanos después de obtener la aprobación del Consejo de Revisión Institucional. En el estudio, a los pacientes con diagnóstico precoz de carcinoma de células escamosas de la cavidad oral programados para una extirpación quirúrgica se les ofreció la participación en el estudio. Se inyectaron diez (10) unidades de toxina botulínica de tipo A (BOTOX®, Allergan) antes de la cirugía alrededor de un lado del cáncer, y se inyectó control de solución salina en el lado contralateral. Un total de 10 (diez) unidades de toxina botulínica se inyectaron en dos sitios distintos en el mismo lado del cáncer. Cada una de las dos inyecciones contenía 5 unidades de toxina botulínica de tipo A y cada una se administró a un centímetro de distancia del borde del cáncer. Las dos inyecciones también se administraron separadas por un centímetro. Las inyecciones se administraron 10 a 19 días antes de la cirugía y se administraron lo antes posible después de realizar el diagnóstico de cáncer (de 1 a 4 días). Los pacientes fueron sometidos a cirugía como parte de su plan de tratamiento programado regularmente y el espécimen quirúrgico se examinó adicionalmente para obtener pruebas de la atrofia por desnervación en el lado del espécimen inyectado con toxina botulínica.

- 30 Inicialmente se incluyó a cinco pacientes en el estudio, aunque uno fue posteriormente excluido debido a que recibió tratamiento no quirúrgico. De los cuatro pacientes restantes, tres tenían carcinoma de células escamosas de la lengua móvil, y uno tenía carcinoma escamoso del paladar. Las edades de los pacientes oscilaban entre los 36 y los 83 años de edad, y todos eran varones. Después de obtener el consentimiento informado, las inyecciones se administraron tan pronto como fue posible después del diagnóstico de carcinoma, con el fin de maximizar la duración del efecto de la toxina botulínica antes de la cirugía. Se inyectó a los pacientes de 10 a 19 días antes de la cirugía. No hubo complicaciones de la inyección y las inyecciones fueron bien toleradas. Se planteó la teoría de que el debilitamiento del músculo esquelético y liso en la región alrededor del cáncer minimizaría el flujo linfático y reduciría la probabilidad de metástasis, por lo tanto 'congelando' el cáncer en su lugar tan pronto como se hizo un diagnóstico de cáncer.

- 40 Después de la escisión quirúrgica de las muestras, el análisis histológico reveló efecto de desnervación en el músculo circundante en uno de los cuatro pacientes. Hubo un efecto parcial observado en otro paciente y no se observó una diferencia apreciable en dos de los cuatro pacientes. El análisis patológico de la toxina botulínica inyectada en el músculo en los pacientes n.º 1 y n.º 3 no reveló diferencias estructurales en comparación con el lado control en el que se inyectó solución salina. En el paciente n.º 2, hubo signos de atrofia miofibrilar focal con inflamación crónica focal. En el paciente n.º 4, hubo signos de grupos de fibras atroficas con atrofia de grupo sugerente. Se cree que la dosis baja de la toxina botulínica (10 unidades) era responsable del efecto parcial. Como referencia, no sería inusual inyectar 200 unidades de toxina botulínica en un paciente con sudoración excesiva de las axilas. Dado que este estudio fue el primero en inyectar seres humanos con cáncer con la toxina botulínica, los parámetros de inyección no se habían definido nunca, y, por lo tanto, se usó una dosis conservadora con el fin de minimizar la posibilidad de complicaciones. Es posible que 10 unidades de toxina botulínica de tipo A fuera insuficiente para inducir desnervación de los músculos grandes de la lengua.

- 55 Además, se hizo evidente que evaluar con precisión la atrofia por desnervación de la toxina botulínica es excepcionalmente difícil en la fase aguda, conocida como atrofia por desnervación aguda. Evaluar con precisión el efecto de la toxina botulínica en la fase aguda mediante técnicas histológicas estáticas es difícil porque las fibras musculares no han tenido la oportunidad de demostrar el efecto final de la desnervación. Sin embargo, es de rutina examinar un espécimen para determinar atrofia por desnervación después de varias semanas cuando las fibras musculares han sido sometidas a atrofia, que se pueden evaluar fácilmente visualmente e histológicamente.

Además, sobre la base del presente estudio, y otras evaluaciones de la dosis de rutina, un experto en la técnica será capaz de determinar las dosis apropiadas de la toxina botulínica en función del tipo de toxina, la localización del cáncer y el tamaño de la región que rodea al cáncer que se va a tratar.

El estudio demostró que la parálisis muscular local alrededor del cáncer se puede realizar de forma segura en seres humanos. Dos de los cuatro pacientes demostraron atrofia muscular focal, que son resultados que pueden ser inducidos por la toxina botulínica. Estos resultados son consistentes con el concepto de que el debilitamiento muscular focal selectivo alrededor de un cáncer puede estar inducido por una inyección de toxina botulínica. Las implicaciones de este hallazgo son de largo alcance y algo nuevo en el tratamiento del cáncer. En primer lugar, esta técnica permitirá iniciar el tratamiento del cáncer durante la aparición inmediato del diagnóstico de cáncer. Desafortunadamente, a menudo hay una demora prolongada entre el diagnóstico y el tratamiento del cáncer en la mayoría de las situaciones, a causa de la necesidad de obtener estudios de diagnóstico, el alta médica y la programación del tratamiento real del cáncer, ya sea cirugía, quimioterapia, radiación u otra forma de terapia. Incluso unas pocas semanas pueden ser suficiente margen para que el cáncer se propague desde el sitio primario. Con la terapia de la toxina botulínica, las fibras musculares están paralizadas en un plazo de 24 a 48 horas desde el diagnóstico del cáncer, deteniendo este modo el cáncer en su lugar.

Además, actualmente no existe ningún procedimiento para proporcionar parálisis prolongada de los conductos (linfáticos) que dirigen la propagación del cáncer a sitios distantes. Esta barrera se superaría con la terapia botulínica y sería particularmente útil en pacientes sometidos a quimioterapia, radioterapia u otras formas de terapia gradual en las que el cáncer no se elimina de inmediato. El efecto de una sola inyección botulínica dura de 2-6 meses.

Ejemplo n.º 14 Evaluación in vivo de capacidad de la toxina botulínica A (BTX) para potenciar la eficacia del fármaco anticanceroso paclitaxel (Taxol®) contra el xenoinjerto de cáncer colorrectal humano HCT-116 en ratones desnudos

Sustancia de ensayo: toxina botulínica A (BTX); 0,45 unidades/ratón; vía subcutáneas (4 x 10 µl inyecciones peritumorales).

Vehículo para la sustancia de ensayo: solución salina estéril (0,9 % p/v); subcutánea (4 x 10 µl inyecciones peritumorales).

Sustancia de referencia: Paclitaxel; 5 mg/kg; intravenosa mediante inyección en la vena de cola.

Vehículo para la sustancia de referencia: 50 µl de dimetil sulfoxido (DMSO), seguido de dilución en 5 % de etanol, 10 % de cremafor, 85 % de solución salina estéril (0,9 % p/v)

Sistema del ensayo: Ratones CD-1 atímicos (nu/nu); hembras; intervalo de edad de 6 a 8 semanas; intervalo de peso 22 a 24 g en el parto.

Número por grupo: 6 grupos de tratamiento; 10 ratones por grupo.

Resultados: Durante el período de medición de 42 días, el tiempo de duplicación estimado de los grupos de vehículo fue de 9,7 días, para el grupo BTX el tiempo de duplicación estimado fue de 12,5 días, para el grupo de paclitaxel el tiempo de duplicación estimado fue de 10,5 días y para el grupo de tratamiento de combinación BTX + paclitaxel el tiempo de duplicación estimado fue de 16,3 días. La reducción de la tasa de crecimiento del tumor en comparación con el vehículo en el grupo de tratamiento de combinación BTX + Paclitaxel fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$, análisis de la covarianza). Las diferencias en la tasa de crecimiento entre el vehículo y los grupos que recibieron paclitaxel o BTX como agentes únicos no fueron estadísticamente significativas.

La administración de Paclitaxel + BTX como un tratamiento de combinación causó un retraso del tiempo de duplicación estimado de 6,6 días. La administración de Paclitaxel como agente único causó un retraso del tiempo de duplicación estimado de 0,8 días. La administración de BTX como agente único causó un retraso del tiempo de duplicación estimado de 2,8 días.

Los volúmenes tumorales relativos medios de los ratones que recibieron todos los tratamientos fueron más bajos que los de los ratones tratados con el vehículo a lo largo de la mayor parte del estudio de 42 días.

A partir del análisis histológico, BTX indujo un aumento de la respuesta inflamatoria en el tejido que rodea a los tumores.

En los ratones atímicos desnudos portadores de xenoinjertos subcutáneos de tumor colorrectal humano HCT116, el tratamiento con la sustancia de referencia, paclitaxel, a 5 mg/kg i.v. en combinación con la sustancia de ensayo BTX, 0,45 unidades/ratón, subcutánea (peri-tumoral) dio lugar a una reducción estadísticamente significativa en la tasa de crecimiento del tumor.

El tratamiento con cualquiera de sustancia de ensayo o de referencia como agentes únicos no dio lugar a una reducción estadísticamente significativa del crecimiento tumoral.

A partir de estos datos se puede observar que la toxina botulínica A (BTX) puede potenciar la eficacia de un nivel de dosis submáxima del fármaco anticanceroso paclitaxel contra el xenoinjerto de cáncer colorrectal HCT-116 humano en ratones desnudos.

- 5 El examen histológico de los tumores y el tejido circundante sugirió que la administración subcutánea peritumoral de BTX provoca un aumento de la inflamación del tejido.

CUMPLIMIENTO DE LA NORMATIVA

- 10 BTX se administró según el protocolo de los Grupos 2 y 6 en el día 0. En los días 3 y 4 se observaron los signos clínicos (postura encorvada, columnas y cajas torácicas prominentes, inestabilidad y pérdida de peso de hasta el 18,6 % del peso inicial). Como resultado se sacrificó a seis ratones del Grupo 2 y 5 en el Grupo 6. Estos tumores no se extirparon y así no formó parte del análisis histológico. Como resultado, para el resto del estudio, los grupos 2 y 6 contenían 4 y 5 ratones, respectivamente.

La dosis de paclitaxe debería haber procedido el Día 3, pero se retrasó hasta el día 5 para asegurarse de que la afección de los ratones restantes no empeoraba. Por lo tanto, los días dosificación de paclitaxel cambiaron desde los días 3, 7, 11, 15, 19 y 23 a días 5, 9, 13, 17, 21 y 25.

- 15 El Día 5 dos animales del Grupo 4 (paclitaxel) recibieron aproximadamente la mitad del volumen de la dosis completa debido a la dificultad de inyección en la vena de la cola.

En el Día 20, se retiró a un animal del Grupo 1 (vehículo BTX) debido al estado del tumor y a que el tejido tumoral no se había eliminado. Como resultado se realizó un análisis histológico en sólo 9 tumores para este grupo.

SUSTANCIA DE ENSAYO Y MATERIALES

- 20 **Sustancia de ensayo, sustancia de referencia y vehículo**

Sustancia de ensayo: toxina botulínica A (BTX) (número de lote C2297 C2; fecha de caducidad 30 de abril de 10; sólido; Allergan)

Sustancia de referencia: paclitaxel (número de lote 039K1515; fecha de caducidad 01 de septiembre de 2011; polvo blanco; Sigma)

- 25 Vehículo para la sustancia de ensayo: solución salina estéril (0,9 % p/v) (número de lote 09C24G50; fecha de caducidad 28 de febrero de 2011; líquido transparente; Baxter suministrada por TPS Médica)

- 30 Vehículo para la sustancia de referencia: 50 µl de dimetil sulfóxido (DMSO) (número de lote 1420182, fecha de caducidad 31 de diciembre 2010; líquido claro; Sigma) seguido de dilución en etanol al 5 % (número de lote L687104; fecha de caducidad 30 de noviembre de 2011; líquido; VWR), cremafor EL al 10 % (número de lote 1369469; fecha de caducidad 31 de diciembre de 2009; líquido; Sigma), 85 % de solución salina estéril (0,9 % p/v) (número de lote 09C24G50; fecha de caducidad 28 de febrero de 2011; líquido transparente; Baxter suministrado por TPS médica)

Conservación de la sustancia de ensayo y de referencia

- 35 La sustancia de ensayo se refrigeró (2 °C a 8 °C) y la sustancia de referencia se almacenó congelada (aproximadamente -20 °C).

ANIMALES

Especie: Ratones (Atímicos)

Cepa: CD-1 nu/nu

Sexo: Hembras

- 40 Número de animales: Se asignó a 60 animales al estudio; 9 fueron transferidos a otro estudio y los 31 animales restantes fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

Intervalo de edad: 6 a 8 semanas (basado en el peso corporal promedio)

Intervalo de peso: 22 a 24 g

Aclimatación: Al menos 3 días después del parto, antes de la implantación del tumor

- 45 Fuente: Charles River UK Ltd

DISEÑO EXPERIMENTAL

Formulación de las sustancias de ensayo y de referencia

La sustancia de ensayo, BTX, se obtuvo como un polvo liofilizado (50 unidades por vial) y se reconstituyó antes de la inyección de 4,44 ml de solución salina estéril. Una vez reconstituida, BTX se almacenó en refrigeración a 2 °C y 8 °C hasta inmediatamente antes de la dosis y se utilizó en un plazo de 4 horas. La solución de dosificación resultante era 11,26 unidades/ml y se administró como cuatro inyecciones 10 µl por ratón.

La sustancia de referencia, paclitaxel, se suministró como un polvo. Este polvo se disolvió en un volumen mínimo (50 µl) de DMSO, y se formuló como una solución de 0,5 mg/ml en 5 % de etanol, 10 % de cremafor, 85 % de solución salina estéril (0,9 % p/v). Las soluciones se protegieron de la luz y se usaron en un plazo de aproximadamente 30 minutos de preparación.

Tamaños del grupo, dosis y números de identificación

Hubo 6 grupos de tratamiento con un objetivo de 10 ratones por grupo. Se inyectó a cien ratones por vía subcutánea con 7×10^6 células tumorales HCT-116 para permitir la selección de los tumores óptimos para su inclusión en el estudio. Antes del tratamiento, se clasificó a los animales de acuerdo con el volumen del tumor. Los tumores del tamaño apropiado fueron asignados a los diferentes grupos de tratamiento usando un procedimiento recomendado por un estadístico para dar la mejor distribución de los tamaños de los tumores entre los grupos.

A cada grupo se le asignó un número (1 a 6). Los grupos de tratamiento comprendían lo siguiente:

Grupo 1 Vehículo de BTX 4 x 10 µl

Grupo 2 BTX 4 x 0,112 U por 10 µl

Grupo 3 Vehículo Paclitaxel 10 ml/kg

Grupo 4 Paclitaxel 5 mg/kg

Grupo 5 Vehículo de BTX 4 x 10 µl

Vehículo para Paclitaxel 10 ml/kg

Grupo 6 BTX 4 x 0,112 U por 10 µl

Paclitaxel 5 mg/kg

Para BTX se administró cada tratamiento un volumen de inyección de 10 µl. El vehículo para BTX era solución salina estéril (0,9 % p/v). En el día 0, los ratones recibieron cuatro dosis cuatro peritumorales de la sustancia de ensayo o el vehículo en 1 ocasión, en cuatro sitios distintos. En cada sitio, el borde de la "ampolla" de la inyección fue de aproximadamente 1 a 2 mm desde el borde del tumor para asegurar que BTX no se inyectaba en la masa tumoral.

Para paclitaxel, se administró cada tratamiento en un volumen de inyección de 10 ml/kg. El nivel de dosis fue 5 mg/kg. Este nivel de dosis estableció que 5 mg/kg dieron como resultado una respuesta inhibidora del crecimiento submáximo en un modelo de xenoinjerto de HCT116. El vehículo para paclitaxel era un volumen equivalente (50 µl) de DMSO en 5 % de etanol, 10 % cremafor, 85 % de solución salina estéril (0,9 %p/v). Los ratones recibieron dosis por vía intravenosa (vena de la cola) cada 4 días en los días 5 (cinco días después de la administración BTX), 9, 13, 17, 21 y 25.

Pesos corporales

Los animales se pesaron regularmente durante el período de dosificación y al menos dos veces por semana durante el resto del estudio y los pesos corporales se registraron.

Procedimiento

Las células de tumor colorrectal HCT116 humano (Colección americana de cultivos tipo (ATCC), Maryland, EE.UU.) se recogieron a partir de cultivos subconfluentes que crecen *in vitro* y el número de células viables determinadas. Las células se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato estéril a una concentración de aproximadamente 7×10^7 células/ml. Los ratones (nu/nu) atímicos desnudos se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho con aproximadamente 7×10^6 células en un volumen de 0,1 ml.

Los animales fueron examinados periódicamente para detectar la aparición de tumores.

Los tratamientos comenzaron cuando la mayoría de los tumores se encontraban en el intervalo de 50 a 150 mm³. El excedente de ratones implantados eran o bien "sin" o bien con tumores que eran demasiado grandes, deformes o no aptos para la selección.

Se registraron las dimensiones del tumor (longitud y anchura), y los volúmenes tumorales se calcularon utilizando la

fórmula $(W^2 \times L)/2$, en la que W es la dimensión más ancha del tumor y L es la más larga. Cuando los ratones murieron debido al tamaño del tumor, al estado clínico o en la terminación del estudio, se extrajeron los tumores (incluyendo aproximadamente 2 cm de tejido circundante), a continuación, se diseccionaron en dos partes (con la excepción de los animales tratados en la sección 3.1). La mitad se congeló rápidamente en nitrógeno líquido, la otra mitad se fijó en formalina. Las muestras de tejido se cortaron a un espesor de aproximadamente 5 μm , se tiñeron con hematoxilina y eosina y las analizó un patólogo veterinario. Se evaluó el tejido tumoral para determinar la necrosis central, el índice mitótico, la apoptosis y la vascularización; el tejido circundante se evaluó según los cambios inflamatorios y la vascularización. Se dio un grado desde 1 (más bajo) a 5 (el más alto). Se observaron otros cambios cuando fue adecuado, incluyendo la ulceración de la piel que lo recubría, la disminución del espesor de la pared del tumor, la necrosis y el tamaño total.

ANÁLISIS DE DATOS

Se efectuaron los cálculos de los volúmenes tumorales relativos y los gráficos de las curvas de crecimiento del tumor. El volumen del tumor se calculó mediante la fórmula $(W^2 \times L)/2$, en la que W es la medida del tumor en el punto más ancho y L es la dimensión del tumor en el punto más largo. El volumen tumoral relativo (VTR) se calculó para los tumores utilizando el volumen del tumor el primer día de tratamiento, el día 0, por ejemplo volumen del tumor el día 3/volumen del tumor el día 0 (V/V_0).

MODELIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL TUMOR

Para las comparaciones estadísticas entre los grupos de tratamiento se realizó una modelización del crecimiento tumoral utilizando GraphPad Prism v5.02 y SAS v9.1.

El volumen del tumor esperado (V) se puede expresar en el siguiente modelo:

$$V = V_0 e^{\lambda \text{ día}}$$

En el que V_0 es el volumen del tumor el día 0 y λ es la tasa de crecimiento del tumor.

Este modelo implica que la transformación logarítmica natural del volumen tumoral relativo (V/V_0) se puede expresar en términos de una regresión lineal con intersección de 0 y una pendiente de λ .

es decir, $\log(V/V_0) = \lambda \text{ día}$

Se realizaron transformaciones logarítmicas naturales en volúmenes tumorales relativos de cada animal individual y se llevó a cabo una regresión lineal (forzada a 0) con los datos con el fin de calcular un parámetro de la pendiente de regresión lineal para cada animal. La pendiente de cada animal (λ_i) es equivalente a la tasa de crecimiento del volumen del tumor relativo, en una escala log transformada.

Se efectuó una modelización del análisis de la varianza (ANOVA) en las estimaciones de la pendiente de los animales individuales (λ_i), con tratamiento como el único efecto. Esto proporcionó estimaciones de la pendiente media para cada tratamiento.

A continuación, se calculó el tiempo de duplicación (TD) para cada tratamiento, utilizando la fórmula:

$$TD_{\text{tratar}} = (\log_e 2) / \lambda_{\text{tratar}}$$

En la que λ_{tratar} es la pendiente de regresión lineal media estimada para cada tratamiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el fin de hacer comparaciones estadísticas entre las tasas de crecimiento del tumor, un análisis de la covarianza (ANCOVA) se ajustó a las estimaciones de la pendiente de los animales individuales.

Los tres grupos de vehículos se analizaron para determinar si había alguna diferencia estadística entre ellos. No hubo pruebas de una diferencia estadística entre los vehículos por lo que esto permitió combinar los datos de los grupos de vehículo y el análisis como un solo grupo.

El tiempo de duplicación y los límites de confianza del tiempo de duplicación se calcularon dividiendo el $\log_e 2$ por las estimaciones de la pendiente (y los límites de confianza del 95 %) proporcionados por el ANCOVA para cada tratamiento. También se calcularon los valores de p para la diferencia entre las pendientes estimadas de los tratamientos.

Los supuestos de normalidad de los residuos y la igualdad de la varianza fueron válidos para estos datos.

Se realizaron comparaciones entre cada grupo de tratamiento y el grupo combinado del vehículo.

Los cálculos del retraso de crecimiento se realizaron restando el tiempo de duplicación cada grupo de tratamiento del tiempo de duplicación de los grupos de vehículo combinados. Los cálculos del retraso del crecimiento específico se realizaron dividiendo el retraso del crecimiento obtenido (en días) por el tiempo de duplicación del tumor de los grupos de vehículo combinados.

5 RESULTADOS

El régimen de tratamiento para BTX no fue bien tolerado en aproximadamente la mitad de los animales tratados. Parecería que la tolerancia de BTX varía mucho entre los ratones individuales.

No se observaron signos de toxicidad (postura encorvada, columnas y cajas torácicas prominentes, inestabilidad y pérdida de peso de hasta el 18,6 %) los días 3 y 4 del estudio y se sacrificó a 11 ratones como resultado (6 en el Grupo 2, BTX y 5 en el Grupo 6, BTX + paclitaxel). Se sacrificó a varios ratones a partir del día 28 en adelante debido a un tamaño tumoral de $> 1500 \text{ mm}^3$.

No se observó ninguna diferencia sustancial en el tamaño medio del tumor entre los grupos de tratamiento el día 0, el día de clasificación. Los volúmenes medios de partida para cada grupo se muestran en la Tabla 1. Los volúmenes medios tumorales para cada día de medición se presentan en la Tabla 2, mientras que los volúmenes tumorales relativos medios para cada día de medición se presentan en la Tabla 3 y se muestran gráficamente en la Figura 1. La modelización del crecimiento de los tumores individuales se muestra gráficamente en la Figura 2. Los tiempos de duplicación estimados calculados utilizando los parámetros de la pendiente media del grupo, los límites de confianza del 95 % y los valores de p se presentan en la Tabla 4. El retraso de crecimiento (tiempo de duplicación) y los retrasos de crecimiento específicos debido a la administración de sustancias de ensayo y de referencia se presentan en la Tabla 5.

Tabla 1 Volúmenes tumorales medios tras la asignación aleatoria a los grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral medio ($\pm$ s.e.m.) (mm^3)	n
1	Vehículo para BTX*	101,7 $\pm$ 9,7	10
2	BTX	101,2 $\pm$ 9,4	10
3	Vehículo para paclitaxel #	100,6 $\pm$ 9,7	10
4	Paclitaxel	100,0 $\pm$ 9,9	10
5	Vehículo para BTX * + Vehículo para paclitaxel #	100,7 $\pm$ 10,2	10
6	BTX + Paclitaxel	100,8 $\pm$ 10,3	10

* 0,9 % p/v de solución salina estéril.

DMSO en 5 % de etanol, 10 % de cremafor, 85 % de solución salina estéril (0,9 % p/v)

Tabla 2 Volumen medio del tumor de xenoinjertos de tumores de cáncer colorrectal humano **HCT-116** en ratones desnudos después del tratamiento con la toxina botulínica A, paclitaxel, toxina botulínica A + paclitaxel o los grupos de vehículo correspondientes

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral medio (mm ³) ± s.e.m. el día						
		0	5	7	11	14	18	20
1	Vehículo para BTX*	101,7 ± 9,7	194,5 ± 27,2	250,2 ± 32,9	304,5 ± 43,5	398,4 ± 56,7	483,0 ± 76,7	523,2 ± 121,7 (9)
2	BTX	101,2 ± 9,4	96,7 ± 22,5 (4)	135,3 ± 32,5 (4)	172,0 ± 25,4 (4)	203,9 ± 36,1 (4)	250,8 ± 48,8 (4)	245,1 ± 62,1 (4)
3	Vehículo para paclitaxel #	100,6 ± 9,7	164,7 ± 17,7	206,6 ± 23,2	266,6 ± 35,4	351,7 ± 49,9	406,5 ± 52,3	448,5 ± 65,3
4	Paclitaxel	100,0 ± 9,9	175,1 ± 21,9	218,9 ± 27,4	245,2 ± 38,9	306,1 ± 49,3	407,4 ± 74,3	437,6 ± 79,4
5	Vehículo para BTX * + Vehículo para paclitaxel #	100,7 ± 10,2	140,4 ± 13,0	183,6 ± 28,1	241,1 ± 38,4	294,3 ± 42,3	373,6 ± 54,2	455,8 ± 95,7
6	BTX + Paclitaxel	100,8 ± 10,3	125,3 ± 14,4 (5)	141,0 ± 22,7 (5)	180,6 ± 42,5 (5)	231,1 ± 48,6 (5)	262,0 ± 56,4 (5)	256,1 ± 70,7 (5)
* 0,9 % p/v de solución salina estéril. # DMSO en 5 % de etanol, 10 % de cremafor, 85 % de solución salina estéril (0,9 % p/v) n = 10, a menos que se indique de otro modo entre paréntesis.								

Tabla 3 Volumen tumoral relativo medio de xenoinjertos de tumores de cáncer colorrectal humano HCT-116 en ratones desnudos después del tratamiento con la toxina botulínica A, paclitaxel, toxina botulínica A + paclitaxel o los grupos de vehículo correspondientes

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral relativo medio (mm ³) ± s.e.m. el día:						
		0	5	7	11	14	18	20
1	Vehículo para BTX*	1,0 ± 0,0	2,0 ± 0,3	2,5 ± 0,4	3,1 ± 0,5	4,0 ± 0,6	4,9 ± 0,9	4,9 ± 1,3 (9)
2	BTX	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,2 (4)	1,5 ± 0,3 (4)	2,0 ± 0,2 (4)	2,3 ± 0,2 (4)	2,8 ± 0,3 (4)	2,6 ± 0,6 (4)
3	Vehículo para paclitaxel #	1,0 ± 0,0	1,8 ± 0,3	2,3 ± 0,4	3,0 ± 0,6	3,9 ± 0,9	4,6 ± 1,0	4,9 ± 1,0
4	Paclitaxel	1,0 ± 0,0	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,4 ± 0,2	3,0 ± 0,3	4,1 ± 0,5	4,4 ± 0,6
5	Vehículo para BTX * + Vehículo para paclitaxel #	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,4	2,2 ± 0,7	3,0 ± 1,0	3,6 ± 1,1	4,6 ± 1,5	5,8 ± 2,1
6	BTX + Paclitaxel	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,1 (5)	1,4 ± 0,2 (5)	1,7 ± 0,3 (5)	2,2 ± 0,3 (5)	2,5 ± 0,4 (5)	2,4 ± 0,5 (5)
* 0,9 % p/v de solución salina estéril. # DMSO en 5 % de etanol, 10 % de cremafor, 85 % de solución salina estéril (0,9 % p/v) n = 10, a menos que se indique de otro modo entre paréntesis.								

5

Tabla 4 Tiempos de duplicación estimados de xenoinjerto de tumores colorrectales humanos HCT-116 después del tratamiento con la toxina botulínica A, paclitaxel, toxina botulínica A + paclitaxel o los grupos de vehículo correspondientes

Grupo	Tratamiento	Tiempo de duplicación (Días)	Inferior IC del 95 %	Superior IC del 95 %	Valor p (tratamiento comparado con vehículo)
1, 3, 5	Vehículo	9,7	8,5	11,4	
2	BTX	12,5	8,3	25,8	0,29
4	Paclitaxel	10,5	8,2	14,4	0,63
6	BTX + Paclitaxel	16,3	10,2	40,8	0,04*

* p = < 0,05.

10

Tabla 5 Retraso del crecimiento de xenoinjerto de tumores colorrectales humanos HCT-116 después del tratamiento con la toxina botulínica A, paclitaxel, toxina botulínica A + paclitaxel o los grupos de vehículo correspondientes

Grupo	Tratamiento	Tiempo de duplicación estimado (días)	Retraso del crecimiento (días de retraso por duplicación control)	Retraso del crecimiento específico
1, 3, 5	Vehículo	9,7	–	–
2	BTX	12,5	2,8	0,29
4	Paclitaxel	10,5	0,8	0,08
6	BTX + Paclitaxel	16,3	6,6	0,68

- 5 Durante el periodo de medición de 42 días, el tiempo de duplicación estimado de los grupos control combinados fue de 9,7 días (límite de confianza del 95 % inferior 8,5, límite de confianza del 95 % superior 11,4), para el grupo BTX el tiempo de duplicación fue de 12,5 días (límite de confianza del 95 % inferior 8,3, límite de confianza del 95 % superior 25,8), para el grupo de paclitaxel el tiempo de duplicación fue de 10,5 días (límite de confianza del 95 % inferior 8,2, límite de confianza del 95 % superior 14,4) y para el grupo de tratamiento combinado de BTX + paclitaxel el tiempo de duplicación fue de 16,3 días (límite de confianza del 95 % inferior 10,2, límite de confianza del 95 % superior 40,8). La reducción de la tasa de crecimiento del tumor en comparación con el vehículo en el grupo de tratamiento de combinación BTX + Paclitaxel fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$, ANCOVA). Las diferencias en la tasa de crecimiento entre el vehículo y los grupos que recibieron paclitaxel o BTX como agentes únicos no fueron estadísticamente significativas.
- 10
- 15 En comparación con el grupo de vehículo, la administración de BTX + paclitaxel como tratamiento de combinación causó un retraso del tiempo de duplicación del tumor estimado de 6,6 días, que se tradujo en un retraso de crecimiento específico de 0,68. La administración de paclitaxel como agente único causó un retraso del tiempo de duplicación del tumor estimado de 0,8 días, que se tradujo en un retraso de crecimiento específico de 0,08. La administración de BTX como agente único causó retraso del tiempo de duplicación del tumor estimado de 2,8 días, que se tradujo en un retraso de crecimiento específico de 0,29.
- 20
- Los volúmenes tumorales relativos medios de los ratones que recibieron BTX + Paclitaxel como tratamiento combinado fueron inferiores que los de los ratones tratados con vehículo BTX hasta el día 34. Los volúmenes tumorales relativos medios de los ratones que recibieron BTX como agente único fueron más bajos que los de los ratones tratados con vehículo BTX durante todo el estudio hasta día 34. Los volúmenes tumorales relativos medios de los ratones que recibieron paclitaxel como agente único fueron más bajos que los de los ratones tratados con vehículo paclitaxel en el estudio hasta el día 34 (Figura 1 y Tabla 3).
- 25
- El análisis histológico de los tumores extirpados mostró necrosis central de grado variable con un alto índice mitótico y una apoptosis de grado bajo. Hubo poca variación en la vascularización dentro de los tumores y un grado de inflamación en el tejido que rodea al tumor, por lo general extendido por todo el tejido subcutáneo con un suministro de sangre en este tejido como se esperaba. Cuando se produjo ulceración de la piel, se produjo un aumento en los cambios inflamatorios como sería de esperar.
- 30
- Los grupos que recibieron BTX tenían un menor número de animales para la evaluación, por lo que cualquier interpretación de las tendencias de grupo era difícil.
- 35
- El grupo 2 BTX (4 animales) mostró una reducción en el espesor del tumor en 3/4 animales y generalmente hubo una respuesta inflamatoria mayor en el tejido circundante.
- El grupo 4 Paclitaxel (10 animales) en general, mostró una reducción en el espesor del tumor en 5/10 animales, principalmente de grado 2, con un aumento en la fibrosis del tumor en 3 animales. El grupo 3 (vehículo para paclitaxel) mostró una reducción en el espesor del tumor en 3/10 animales en el grado 1, pero en todos estos animales había ulceración de la piel que recubre el tumor. Por lo demás, este grupo fue similar a los otros 2 grupos de vehículo solo (grupos 1 y 5).
- 40
- En el grupo 6 BTX + Paclitaxel (5 animales) 2/5 tenían pequeños tumores y otro 1/5 mostraba una pequeña reducción en el espesor del tumor. Se observó ulceración de la piel en un animal.
- En ratones atímicos desnudos portadores de xenoinjertos subcutáneos de tumor colorrectal humano HCT116, el tratamiento con paclitaxel a 5 mg/kg i.v. en combinación con BTX, 0,45 unidades/ratón, subcutáneo (peritumoral) dio lugar a una reducción estadísticamente significativa de la tasa de crecimiento del tumor estimada y una reducción
- 45

del volumen tumoral relativo en comparación con el control a lo largo de la duración del estudio.

El tratamiento con una dosis submáxima de la sustancia de referencia como agente único, Paclitaxel (5 mg/kg iv), apenas redujo la tasa de crecimiento del tumor estimado de una manera consistente con su actividad antitumoral reconocida a dosis más altas, aunque estos datos no eran estadísticamente significativos. Una reducción del volumen tumoral relativo en comparación con el control se observó para la mayor parte de la duración del estudio.

El tratamiento con la sustancia de ensayo como agente único, BTX (0,45 unidades/ratón, subcutánea, peritumoral), redujo la tasa de crecimiento del tumor estimada, aunque estos datos no fueron estadísticamente significativos. Una reducción del volumen tumoral relativo en comparación con el control se observó para la mayor parte de la duración del estudio.

Debido a los signos clínicos en los dos grupos tratados con BTX (Grupos 2 y 6) al principio del estudio, los números *n* se redujeron y, por tanto, se redujo la potencia estadística del estudio.

La administración de BTX pareció causar un aumento en la inflamación y una disminución en el espesor del tumor. La administración de paclitaxel mostró una tendencia hacia una disminución en el espesor del tumor y un aumento de la fibrosis. La administración de ambos en combinación produjo una reducción en el tamaño o espesor del tumor en más de la mitad de los animales.

A partir de estos datos se puede observar que la toxina botulínica A (BTX) puede potenciar la eficacia de un nivel de dosis submáxima del fármaco anticanceroso paclitaxel contra el xenoinjerto de cáncer colorrectal HCT-116 humano en ratones desnudos.

Ejemplo n.º 15 - Cáncer que se sospecha en las radiografías

Mediante imágenes de TAC realizadas por dolor abdominal se descubre que un paciente de 47 años de edad tiene una masa de 30 mm en el colon. La sospecha es alta de que la lesión representa un cáncer de la mucosa. Durante la colonoscopia, la biopsia de la sección congelada confirma el cáncer. Se identifican los bordes de la lesión. Se inyecta BOTOX® en la región de la submucosa en 6 inyecciones separadas alrededor del cáncer. Se administra un total de 60 unidades. Las inyecciones se realizan en el tejido no canceroso que rodea al cáncer. Las inyecciones se realizaron a aproximadamente 10 mm de distancia del borde del cáncer. Después, se somete al paciente a quimioterapia.

Ejemplo n.º 16 – Sospecha de cáncer y confirmación durante la colonoscopia

Durante una colonoscopia se descubre que un paciente de 47 años de edad tiene una masa de 30 mm en el colon. La sospecha es alta de que la lesión representa un cáncer de la mucosa. Durante la colonoscopia, la biopsia de la sección congelada confirma el cáncer. Se identifican los bordes de la lesión. Se inyecta BOTOX® en la región de la submucosa en 6 inyecciones separadas alrededor del cáncer. Se administra un total de 60 unidades. Las inyecciones se realizan en el tejido no canceroso que rodea al cáncer. Las inyecciones se realizaron a aproximadamente 10 mm de distancia del borde del cáncer. A continuación, se somete al paciente a radioterapia.

Ejemplo n.º 17 – Sospecha de cáncer y administración de BOTOX® alrededor de la periferia del cáncer (antes de la confirmación de cáncer) durante la colonoscopia

Durante una colonoscopia se descubre que un paciente de 47 años de edad tiene una masa de 30 mm en el colon. La sospecha es alta de que la lesión representa un cáncer de la mucosa. Se envía una biopsia. Se identifican los bordes de la lesión. Se administran seis inyecciones separadas de BOTOX® en la región de la submucosa a distancia del cáncer. Se administra un total de 60 unidades (es decir, 6 inyecciones x 10 unidades por inyección). Las inyecciones se realizan en el tejido no canceroso, a unos 10 mm de distancia desde el borde del cáncer. Después, se somete al paciente a quimioterapia.

Ejemplo n.º 18 – Sospecha de cáncer, confirmación y después se somete al paciente a una nueva colonoscopia

Durante una colonoscopia se descubre que un paciente de 47 años de edad tiene una masa de 30 mm en el colon. La sospecha es alta de que la lesión representa un cáncer de la mucosa. Se envía una biopsia. La biopsia se envía. La biopsia final 3 días más tarde confirma el cáncer. Se prepara al paciente para repetir la colonoscopia. Se identifica la lesión y se identifican sus bordes. Se inyecta BOTOX® en la región de la submucosa en 6 inyecciones separadas alrededor del cáncer. Se administran un total de 60 unidades. Las inyecciones se realizan en el tejido no canceroso que rodea al cáncer. Las inyecciones se realizaron a aproximadamente 10 mm de distancia del borde del cáncer. Después, se somete al paciente a quimioterapia.

Como se ha indicado anteriormente, la toxina botulínica está disponible en múltiples fuentes. Además, está disponible de Allergan como Botox®, un formulación de BTX-A; Dysport®, otra preparación de BTX-A disponible en Europa en Ipsen, Ltd; y Myobloc® (o Neurobloc® en Europa), una preparación de BTX-B disponible en Elan Pharmaceuticals.

5 Toxina botulínica para su uso en la presente invención también se puede preparar mediante técnicas farmacéuticas conocidas, por ejemplo, la disolución de la toxina botulínica farmacéuticamente aceptable en un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para inyección, de tal manera que la toxina botulínica se disuelve a la concentración o potencia deseadas. Estas preparaciones se pueden estar recién preparadas o ya preparadas. Se pueden añadir otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como conservantes. Estas preparaciones se realizan por técnicas conocidas en la materia.

10 La cantidad de toxina botulínica para usar varía, por supuesto, de acuerdo con el tamaño del tumor que se va a tratar. La dosis máxima de la toxina botulínica A que se va a administrar no debe exceder las 500 unidades por sesión de inyección. Preferentemente, deben usarse 0,01-100 unidades de la toxina botulínica A. Más preferentemente, la dosis de la toxina botulínica A debe estar en el intervalo de aproximadamente 1 unidad a aproximadamente 50 unidades. Incluso más preferentemente, la dosis de la toxina botulínica A debe estar en el intervalo de aproximadamente 5 unidades a aproximadamente 40 unidades.

15 Se sabe que una corriente eléctrica puede mejorar la absorción de la toxina botulínica en los tejidos. Black, y col., 1: Cell Biol-1986 August; 103(2): 535-44; Hesse, sub.1 y col., 1: Neurosci Lett. 1995 Dec. 1; 201(1) 37-40; Hesse, y col., 1: Clin. Rehabil. 1998 October; 12(5): 381-8.

Por consiguiente, una realización de la presente invención es aplicar una corriente eléctrica a o alrededor de la zona que se va a tratar. Esto debería reducir la cantidad de toxina botulínica necesaria para obtener resultados eficaces.

Si se utiliza una neurotoxina diferente, tal como toxina botulínica B, C, D, E F o G, la dosis debe ajustarse a la dosis anterior para la toxina botulínica A. Se pueden usar conversiones, conocidas en la técnica, para calcular estas dosis.

20

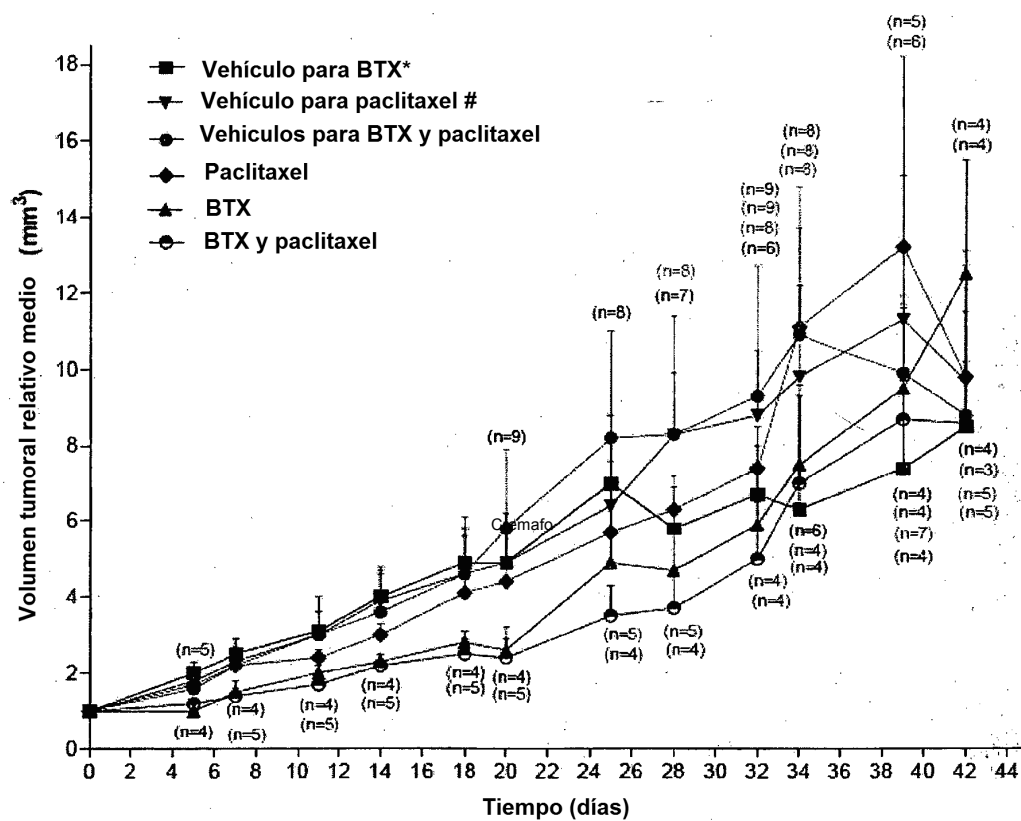
REIVINDICACIONES

1. Una neurotoxina botulínica farmacéuticamente aceptable para su uso en la potenciación de la eficacia de un fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa mediante la inhibición del crecimiento o metástasis de una neoplasia en un paciente en combinación con un fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa y/o para el tratamiento de un síntoma de una neoplasia en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento administrar en la zona no neoplásica alrededor de dicha neoplasia una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha neurotoxina botulínica farmacéuticamente aceptable en combinación con un fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa,
5
- en la que la cantidad terapéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica no penetra en la neoplasia, en la que la neurotoxina botulínica debilita la contracción de las fibras musculares en el tejido no neoplásico alrededor de la neoplasia.
10
2. La neurotoxina botulínica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la neurotoxina botulínica se administra antes de administrar el fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa.
3. La neurotoxina botulínica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la neurotoxina se administra junto con el fármaco anticanceroso o terapia anticancerosa.
- 15 4. La neurotoxina botulínica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el fármaco anticanceroso se selecciona del grupo que consiste en un agente alquilante, un antimetabolito, una antraciclina, mitoxantrona, topoisomerasa, un inhibidor de la mitosis, un esteroide, un agente de diferenciación, una hormona o un agente de inmunoterapia.
- 20 5. La neurotoxina botulínica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el inhibidor de la mitosis se selecciona del grupo que consiste de un taxano, una epotilona individual y un alcaloide de la vinca.
6. La neurotoxina botulínica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el taxano es paclitaxel o docetaxel.
7. La neurotoxina botulínica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el taxano es paclitaxel.
- 25 8. La neurotoxina botulínica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la neurotoxina botulínica desnerva el tejido muscular que rodea a la neoplasia y/o reduce al mínimo y/o detiene el flujo linfático en la región fuera de la neoplasia.
9. La neurotoxina botulínica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en neoplasias digestivas/intestinales, del sistema nervioso, hepatobiliar, genitourinario, de mama, respiratorias, del integumento, musculoesqueléticas, hematopoyéticas, de los órganos sensoriales, endocrinas o neuroendocrinas.
30
10. La neurotoxina botulínica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la dosis de neurotoxina botulínica no excede de 500 unidades por aplicación.
11. La neurotoxina botulínica para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la dosis de la neurotoxina botulínica es de entre 0,01 y 100 unidades por aplicación, entre 1 unidad y 50 unidades por aplicación.
- 35 12. La neurotoxina botulínica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la neurotoxina botulínica es neurotoxina botulínica de tipo A o de tipo B, o en la que la neurotoxina botulínica es neurotoxina botulínica de tipo C₁, D, E, F o G.

FIGURA 1

Figura 1

Crecimiento del xenoinjerto de tumor colorrectal humano, HCT116, tras el tratamiento con toxina botulínica A, paclitaxel, toxina botulínica A + paclitaxel o los correspondientes grupos de vehículo



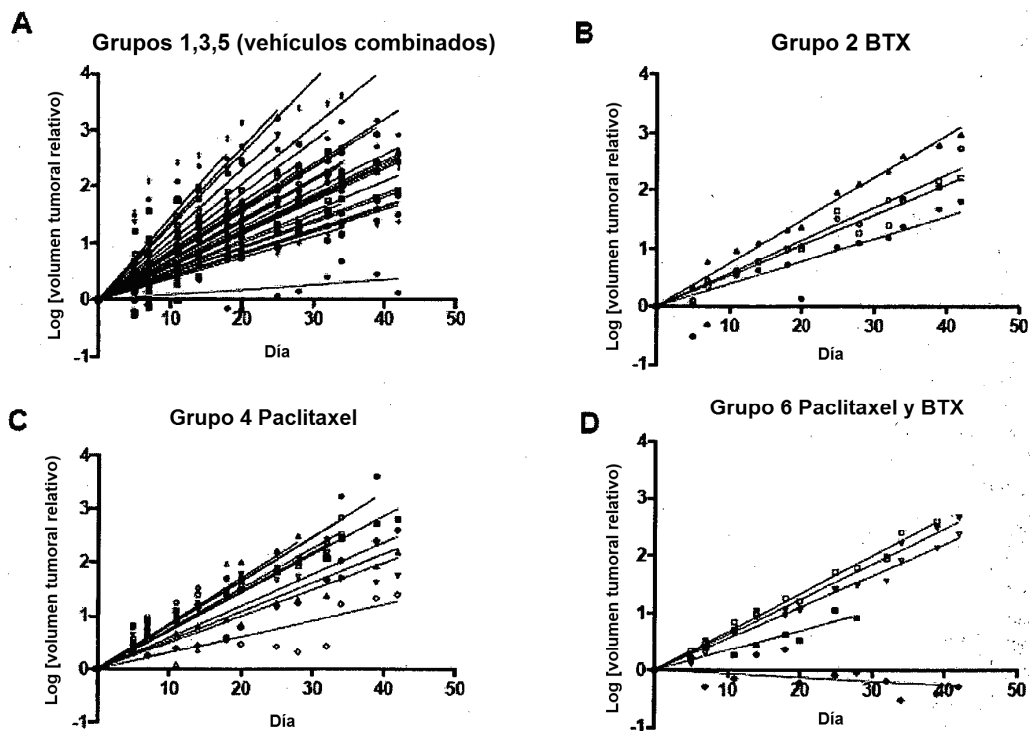
DMSO en 5 % de etanol, 10 % de ~~Cremator~~, 85 % de solución salina estéril (0,9 % p / v)

*0,9 % p/v de solución salina estéril

n= 10 a menos que se indique otra cosa entre paréntesis

FIGURA 2

Figura 2 Modelización del crecimiento tumoral individual del xenoinjerto de tumor colorrectal humano, HCT116, tras tratamiento con la toxina botulínica A, paclitaxel, toxina botulínica A + paclitaxel o los correspondientes grupos de vehículo



Transformación logarítmica natural del volumen tumoral relativo (V/V_0) de animales individuales expresado en términos de una regresión lineal con intersección de 0.