

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 281**

51 Int. Cl.:

A61K 33/30	(2006.01)
A61K 38/46	(2006.01)
A61K 39/08	(2006.01)
A61P 25/00	(2006.01)
A61K 38/48	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2010 PCT/US2010/039674**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO2011005577**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2010 E 10730300 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2445509**

54 Título: **Suplementación con cinc para aumentar la capacidad de respuesta al tratamiento con metaloproteasa**

30 Prioridad:

24.06.2009 US 219932 P
23.06.2010 US 821370

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2017

73 Titular/es:

SOPARKAR, CHARLES N.S. (100.0%)
2620 Pittsburg
Houston, TX 77005, US

72 Inventor/es:

SOPARKAR, CHARLES N.S.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 615 281 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

Suplementación con cinc para aumentar la capacidad de respuesta al tratamiento con metaloproteasa

5 Referencia a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de Estados Unidos número 12/821.370, presentada el 23 de junio de 2010, y sobre la solicitud provisional de Estados Unidos número 61/219 .932, presentada el 24 de junio de 2009, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

10

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a composiciones y métodos utilizados conjuntamente con el ensayo y la administración de ciertos productos farmacéuticos, en particular, toxinas dependientes de cofactores, tales como las neurotoxinas clostridiales.

15

Antecedentes de la invención

Sin limitar el alcance de la invención, sus antecedentes se describen en relación con el desarrollo de toxinas letales, tales como la toxina botulínica, en fármacos útiles. El término de la enfermedad "botulismo" procede de la palabra en latín para salchicha, *botulus*, sobre la base de un brote mortal en Alemania en la década de 1800 causado por salchichas parcialmente cocidas. Posteriormente, se determinó que el botulismo se debía a toxinas producidas por el organismo *Clostridium botulinum*, originalmente aislado en 1895. *C. botulinum* es un bacilo anaeróbico grampositivo formador de esporas que habitualmente se encuentra en las plantas, en el suelo, en el agua y en los tractos intestinales de animales. La toxina botulínica se purificó por primera vez en 1928 y está entre las sustancias más tóxicas conocidas. Las toxinas botulínicas actúan produciendo parálisis en cuatro sitios diferentes del cuerpo: la unión neuromuscular, los ganglios autónomos, las terminaciones nerviosas parasimpáticas posganglionares y las terminaciones nerviosas simpáticas posganglionares que liberan acetilcolina (Ach).

20

25

30

35

Se han identificado varias cepas diferentes de *Clostridium*, incluidas *C. butyricum*, *C. baratii* y *C. argentinense*, que producen formas antigénicamente distintas de neurotoxinas botulínicas farmacológicamente similares (abreviadas como BTX o BoNT). En la actualidad se conocen ocho serotipos principales de neurotoxinas botulínicas elaboradas por bacterias del género *Clostridium*: A, B, C (C1 and C2), D, E, F y G. Los subtipos de los serotipos pueden estar estrechamente relacionados o más distantes. Por ejemplo, BoNT-A1 y A2 son homólogos al 95 % mientras que BoNT-A3 y A4 son, respectivamente, 81 % y 88 % homólogos de BoNT-A1. La toxina botulínica de tipo A (BoNT-A) es la toxina más potente, seguida por los tipos de toxina B y F. Estos tipos son los que se han explotado comercialmente hasta la fecha.

40

45

La FDA aprobó BoNT-A (Oculinum, ahora marca BOTOX®, Allergan, Inc.) en 1989 para el tratamiento médico del blefaroespasma (parpadeo incontrolado), el estrabismo (ojos bizcos), síndrome de Meige (blefaroespasma bilateral con distonía concurrente de la cara inferior) y espasmo hemifacial. En diciembre de 2000 se recibió la aprobación para tratar la distonía cervical, un trastorno del movimiento neurológico causante de contracciones intensas del cuello y el hombro. BOTOX® se aprobó en el Reino Unido para la hiperhidrosis axilar (sudoración excesiva) en 2001 y, el mismo año, BOTOX® se aprobó en Canadá para la hiperhidrosis axilar, la espasticidad muscular focal y el tratamiento cosmético de las arrugas en la línea de la ceja. En 2002, la FDA de Estados Unidos anunció la aprobación de BOTOX® Cosmetic para mejorar temporalmente la aparición de líneas de expresión en el ceño moderadas e intensas entre las cejas (líneas glabellares). En julio de 2004, la FDA aprobó BOTOX® para tratar la hiperhidrosis axilar primaria.

50

BoNT-B también se ha desarrollado para su uso clínico y actualmente hay varios productos disponibles comercialmente (por ejemplo, MyoBloc® en Estados Unidos y NeuroBloc® en Europa, Solstice Neurosciences). La FDA aprobó MyoBloc® en 2000 para el tratamiento de la distonía cervical. Se considera que BOTOX® BoNT-A es 50-100 veces más potente que Myobloc® BoNT-B para cualquier tratamiento específico dado.

55

60

65

Actualmente, una serie de fabricantes diferentes de todo el mundo están produciendo BoNT-A purificado como varias marcas comerciales, incluyendo Xeomin® (Merz Pharma, Germana), Prosigne® (Lanzhou Inst. For Biol. Prod., China) y Neuronox® (Meditoxin® en Corea, Medy-Tox, Inc., Corea). Como con otros productos biológicos, debe determinarse la actividad biológica para nuevos lotes. Esto es particularmente crucial para fármacos, tales como la toxina botulínica, que tienen una toxicidad considerable y para los que se prolonga la restauración de la actividad neuromuscular normal. La toxina botulínica administrada por vía intramuscular actúa en la unión neuromuscular y produce parálisis muscular mediante la inhibición de la liberación de Ach a partir de las neuronas motoras presinápticas. El pico del efecto paralítico se produce 4-7 días después de la inyección. Aproximadamente 2 meses después de la administración de la toxina botulínica, el axón comienza a expandirse y emergen nuevos brotes de terminales nerviosos y se extienden hacia la superficie del músculo. Estos nuevos brotes nerviosos restablecen la unidad motora del nervio y la parálisis muscular se invierte normalmente en un plazo de 2-4 meses. La sobredosis es lo suficientemente crítica y la recuperación suficientemente prolongada que se dispone de un antídoto en caso de

sobredosis accidental.

Las dosis de todas las toxinas botulínicas disponibles comercialmente se expresan en términos de unidades de actividad biológica. Una unidad de toxina botulínica corresponde a la mediana de la dosis letal intraperitoneal calculada (DL50) en ratones. Véase Hoffman R O, Helveston E M. "Botulinum in the treatment of adult motility disorders" *Int Ophthalmol Clin* 26 (1986) 241–50. Aunque ciertamente no es ideal, el ensayo de la DL50 se ha mantenido debido a su alta sensibilidad. La definición de unidad se aplica a todas las formas de toxinas comercialmente disponibles, a pesar del hecho de que no se ha adoptado un enfoque estandarizado de la prueba de potencia y las diferencias entre fabricantes en los protocolos de ensayo de DL50 de ratón han conducido a una considerable variabilidad en la actividad por unidad de diferentes productos. Por ejemplo, mediante diversos estudios en pacientes con blefaroespasma y espasmo hemifacial se ha sugerido que la relación de bioequivalencia de la marca Dysport® de BoNT-A (Ipsen Pharmaceuticals, Francia) y Botox® está entre 2,5:1 y 4:1. Como consecuencia, cuando se comunica la dosis de toxina botulínica recomendada en indicaciones concretas, se ha considerado importante especificar la marca particular de toxina que se utiliza porque las unidades utilizadas en el etiquetado son específicas del producto y no intercambiables. Surgen otras complicaciones debido al hecho de que el BoNT es una molécula grande y relativamente lábil. La reconstitución adecuada del producto es importante y la vida útil es bastante limitada.

El documento US 2003/118598 A1 se refiere a composiciones farmacéuticas de toxina botulínica adecuadas para la administración terapéutica a un paciente y métodos para tratar pacientes con la formulación.

T. Ao et. al., *British Poultry Science* 2007, 690–695 se refiere a los efectos de un suplemento de proteato de cinc quelado y fitasa en una dieta de harina de maíz-soja sobre el rendimiento y el contenido de cinc tisular de pollos de engorde.

El documento WO 1999049740 A1 se refiere a la aplicación de la enzima fitasa en alimentos que tienen un bajo contenido de fitato y se divulgan métodos para administrar una dieta con bajo contenido de fitato suplementada con una fitasa.

Ashraf, A. S. et al, *Journal of Protein Chemistry* 2004, 445–451 divulgan un estudio sobre los efectos del cloruro de cinc sobre la fragmentación catalítica de la toxina botulínica.

La toxina botulínica es capaz de inducir la formación de anticuerpos en seres humanos que conducen a un efecto disminuido de la toxina con el tiempo. Véase, Frueh B R, et al.

"Treatment of Bepharospasm with Botulinum Toxin. A preliminary report" *Arch Ophthalmol* 102 (1984) 1464. Se piensa que la producción de anticuerpos es una función de la dosis acumulada, la carga antigénica por dosis y el intervalo de tiempo entre las inyecciones. Por lo tanto, se ha sugerido que la dosis terapéutica más pequeña debe administrarse con un intervalo de tiempo máximo entre las inyecciones secuenciales. Dada la importancia del uso de BoNT en el tratamiento de ciertas enfermedades, el uso de BoNT-F está en investigación en pacientes que se han convertido en inmunológicamente resistentes a los serotipos A y B.

Aunque las toxinas botulínicas son eficaces para la mayoría de los pacientes, el efecto terapéutico puede variar ampliamente con independencia de la formación de anticuerpos detectables, no solo de un individuo a otro, sino también para un individuo de un tratamiento a otro. Además, se ha identificado que algunas poblaciones son más propensas a mostrar una mala o nula capacidad de respuesta a las toxinas. Por ejemplo, hasta el 30 % de los pacientes mayores de 65 años de edad pueden demostrar una disminución de la eficacia de la toxina botulínica. La base del fracaso de un paciente para responder al tratamiento puede ser difícil de discernir, dado que las explicaciones posibles incluyen las diferencias originales en la potencia del fabricante, la posibilidad de que el paciente haya desarrollado anticuerpos específicos frente a la toxina, así como la posibilidad de que el producto se haya degradado o agitado durante la reconstitución. Sin embargo, el efecto disminuido dentro de una población de pacientes en concreto sugiere la posibilidad de otro factor también.

En los últimos años han aparecido informes de fallecimientos de pacientes por la supuesta diseminación distante dependiente de la dosis de cantidades muy grandes de administración de toxina botulínica, por lo que cualquier método que pueda disminuir la dosis de toxina necesaria para lograr un resultado terapéutico deseado sería beneficioso.

De lo anterior, es evidente que cualquier capacidad para asegurar la máxima capacidad de respuesta del paciente en el tratamiento y proporcionar una estandarización más estrecha de la potencia representaría un importante avance terapéutico y de seguridad.

Breve resumen de la invención

El presente inventor ha encontrado, sorprendentemente, que la administración de cantidades relativamente altas de formas de cinc bien absorbidas antes, simultáneamente o poco después de la administración terapéutica de la toxina

botulínica, permitirá capacidad de respuesta a la toxina en individuos que anteriormente eran poco respondedores y, aparentemente, mejorará la potencia funcional de las toxinas botulínicas en otros individuos también. Aún más notable, el presente inventor ha descubierto que la carga de cinc antes de la administración de la toxina botulínica aumentaba la capacidad de respuesta en casi cada individuo analizado. Por lo tanto, parece claro que los individuos
 5 analizados eran previamente relativamente funcionalmente deficientes en cinc disponible para la unión y activación de la endopeptidasa dependiente de cinc de la cadena ligera (CL) de la toxina botulínica. Debido a que el grupo de individuos que tienen un mayor riesgo de insuficiencia de cinc en relación con la capacidad de respuesta máxima a los efectos de la toxina botulínica incluye potencialmente un gran porcentaje de la población de pacientes (véase la
 10 Tabla 1), el presente hallazgo proporciona varios medios para una posible capacidad de respuesta máxima a la toxina botulínica dependiente de cinc.

Tabla 1. Factores de riesgo para la deficiencia de cinc

1. Dieta
- 15 a. Complementos vitamínicos
- Formas de cinc inorgánico mal absorbidas (baratas)
- 20 ii. Hierro
 iii. Vitamina A
 iv. Calcio
 v. Cobre
- b. Ingesta elevada de fitato
- 25 i. Fibra y panes de harina integral
 ii. Productos de harina integral
 iii. Cereales
 iv. Soja
 30 v. Avenas
 vi. Legumbres (incluidos cacahuetes, manteca de cacahuete, guisantes)
 vii. Judías
 viii. Maíz
 ix. Arroz
 35 x. Muchos alimentos preparados (conservantes)
 xi. La mayoría de las bebidas (incluidos casi todos los refrescos carbonatados)
1. Compuestos que contienen fosfato
 2. Conservante E391
- 40 c. Consumo de alcohol
- 45 i. Disminuye la absorción de cinc
 ii. Aumenta la excreción urinaria
 iii. Muchos vinos contienen fitatos
- d. Productos lácteos que contienen caseína y calcio
 e. Muchos alimentos y suplementos "enriquecidos en fibra"
 f. Vegetarianismo (dietas con niveles bajos de carnes rojas, pollo y pescado, pero ricas en soja)
 50 g. Alimentos que contienen el conservante EDTA
2. Afecciones médicas
- 55 a. Infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas)
 b. Quemaduras
 c. La mayoría de las enfermedades crónicas
 d. Malabsorción
- 60 i. Diarrea frecuente
 ii. Esprú, etc.
 iii. Estreñimiento con uso frecuente de fibra y/o laxante
3. Embarazo
 4. Edad < 25 o > 65 años
 65 5. Uso de diuréticos

En ciertos aspectos divulgados en el presente documento, el hallazgo se extiende a maximizar la efectividad del tratamiento con cualquier compuesto que depende de la actividad sobre la disponibilidad de iones metálicos en el tejido que se está tratando. En una realización, el compuesto es una proteasa terapéutica. En una realización, la proteasa terapéutica es una endopeptidasa de cinc, ejemplos de la cual incluyen la toxina botulínica (BoNT), la neurotoxina tetánica (TeNT) y la toxina de la enfermedad de Lyme (LDT), entre otras.

En un aspecto, se proporciona un método para preparar un sujeto para la administración de un compuesto que incluye instruir sobre la administración (mediante consumo oral o cualquier otro método deseado) de un suplemento de iones metálicos para un período de carga anterior, y, en algunos casos de forma concurrente, a la administración del compuesto, en los que la administración indicada del suplemento de iones metálicos se encuentra a un nivel suficiente para eliminar una deficiencia funcional relativa del ión metálico como causa de una mala respuesta al compuesto administrado. En un aspecto, el compuesto es una endopeptidasa de cinc, tal como una toxina botulínica. El ion metálico puede estar en una forma inorgánica u orgánica pero se selecciona idealmente sobre la base de una biodisponibilidad suficiente de acuerdo con las medidas de biodisponibilidad conocidas en la técnica.

En un aspecto, se proporciona un suplemento de zinc que incluye una forma de cinc orgánico seleccionada de uno o más de un proteinato de cinc, un quelato de cinc y/o una sal con una molécula orgánica, y un complejo de aminoácidos de cinc. El suplemento de cinc está diseñado para administrar de 10 a 400 mg diarios de cinc elemental. En otras realizaciones, el suplemento de cinc proporciona de 30 a 50 mg diarios de cinc elemental.

En aspectos adicionales, la absorción de iones metálicos se estimula instruyendo al paciente para limitar el consumo de fitatos durante el período de carga. En una realización particular, el sujeto es instruido además para administrar, por ejemplo, para consumir por vía oral, al menos una fitasa junto con el suplemento de iones metálicos.

En una realización para maximizar la capacidad de respuesta al botulinum terapéutico, la neurotoxina tetánica o la toxina de Lyme y toxinas quiméricas o sintéticas relacionadas, la carga de reservas de cinc antes, simultáneamente o poco después del tratamiento con la toxina dependiente de iones metálicos terapéuticos se facilita proporcionando un envase de preparación previo al procedimiento que incluye una cantidad de suplementos de cinc en forma de cápsula, polvo, líquido, líquido-gel, suspensión liposomal o comprimido, en los que los suplementos de cinc son suficientes para suministrar de 10 a 400 mg de cinc elemental al día para un período de carga previo al tratamiento de un paciente con una toxina junto con instrucciones que dirigen al paciente a tomar los suplementos de cinc y reducir la ingesta de fitatos. En otros aspectos de esta realización, el envase de preparación previo al procedimiento incluye además una cantidad de suplementos de fitasa en forma de cápsula, polvo, líquido, líquido-gel, suspensión liposomal o comprimido y en cantidad suficiente para la administración junto con los suplementos de cinc a través del período de carga.

En otra realización de la invención, se proporcionan métodos de ensayo de potencia de toxinas que incluyen toxinas botulínicas que permiten una medida de estandarización en toda la industria. Para estas realizaciones, los suplementos de cinc por vía oral o parenteral se administran a los animales de ensayo durante un período de carga antes o simultáneamente con el ensayo de potencia de la toxina, en los que se ha determinado que el suplemento de cinc proporciona suficiente cinc para maximizar la capacidad de respuesta a la toxina administrada. La capacidad de respuesta máxima se determina empíricamente mediante pruebas de dietas o suplementos de cinc para una capacidad de respuesta máxima, incluyendo la modulación del nivel de suplementos de cinc junto con la maximización de la absorción de cinc. La absorción de cinc puede modularse controlando los niveles de fitato en la dieta, así como mediante la adición de fitasa a la dieta.

En otra realización de la invención, el cinc se suministra al tejido mediante crema tópica, o inyección local o sistémica. En otros aspectos, se proporciona reconstitución de toxinas terapéuticas en una solución que contiene cinc para asegurar la presencia adecuada de cinc para la actividad máxima de la toxina en los tejidos diana.

En otra realización de la invención, se usan cinc y fitasa combinadas para aumentar de forma segura y eficaz rápidamente los niveles de cinc en todo el cuerpo en tiempos de necesidad médica, incluyendo, pero sin limitaciones, afecciones tales como cicatrización de heridas, recuperación de quemaduras, compromiso inmunitario e Impotencia masculina.

Los métodos y composiciones de la presente divulgación proporcionan un remedio para la resistencia relativa de la toxina botulínica y la variabilidad terapéutica en muchos individuos con el resultado de un desenlace terapéutico considerablemente mejorado, margen de seguridad y fiabilidad del efecto terapéutico de un tratamiento a otro. La maximización de la eficacia potencial de las metalopeptidasas terapéuticas administradas permite la administración de dosis más bajas y tiempos más largos entre la readministración en algunos pacientes con un posible riesgo menor de desarrollo de resistencia mediada por anticuerpos y una disminución potencial de la diseminación distante de la toxina con efectos no deseados. Los métodos para la normalización de los ensayos de potencia de la toxina botulínica proporcionados en el presente documento resuelven un problema de larga duración en la industria y proporcionan una mayor certeza y márgenes de seguridad en el uso de productos de diferentes fabricantes.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la presente invención, incluyendo características y ventajas, se hace ahora referencia a la descripción detallada de la invención junto con las figuras adjuntas

5 La figura 1 representa los datos brutos de un ensayo de suplementación de cinc y cinc más fitasa durante cuatro días antes de la administración de toxina botulínica terapéutica.

10 La figura 2 representa los resultados gráficos del ensayo de suplementación de cinc y cinc más fitasa durante cuatro días antes de la administración de toxinas botulínicas terapéuticas con respecto a la duración del efecto de la toxina en el paciente.

15 La figura 3 representa los resultados gráficos del ensayo de suplementación de cinc y cinc más fitasa durante cuatro días antes de la administración de toxinas botulínicas terapéuticas con respecto al cambio subjetivo percibido por el paciente en la eficacia de los tratamientos con la toxina.

Descripción detallada de la invención

20 Aunque la puesta en práctica y el uso de varias realizaciones de la presente invención se tratan con detalle más adelante, debe apreciarse que la presente invención proporciona muchos conceptos de la invención aplicables que se pueden utilizar dentro de una amplia variedad de contextos específicos. Las realizaciones específicas tratadas en el presente documento son meramente ilustrativas de modos específicos de poner en práctica y usar la invención y no limitan el alcance de la invención.

25 La variabilidad de la acción de la toxina botulínica en ciertos individuos se ha atribuido hasta ahora a diferentes fuentes o lotes de la toxina, reconstitución o almacenamiento incorrectos, variaciones en la técnica de inyección, el uso de anestésicos tópicos y/o agentes de enfriamiento y la resistencia mediada por anticuerpos. El presente inventor consideró que la resistencia a la toxina botulínica podría tener una base en una insuficiencia de cinc disponible y ha demostrado esta hipótesis notable. Este hallazgo proporciona un remedio para la resistencia a la toxina botulínica en muchos individuos con un desenlace terapéutico y un margen de seguridad muy mejorados. El hallazgo es extensible a la mejora de la capacidad de respuesta de los individuos a otros compuestos administrados que son activos *in vivo* sobre la base de la disponibilidad de iones metálicos, incluyendo otras enzimas tales como toxinas de tétanos y de Lyme, así como otras afecciones en las que un paciente puede beneficiarse de niveles de cinc en todo el cuerpo, tales como cicatrización de heridas, recuperación de quemaduras, compromiso inmunológico e impotencia masculina. También se proporcionan métodos para la normalización de ensayos de potencia de toxina que proporcionan mayor certeza y márgenes de seguridad en el uso de productos de diferentes fabricantes.

40 La expresión "metalopeptidasa terapéutica" como se usa en el presente documento se refiere a una peptidasa administrada con fines terapéuticos que requiere un ion metálico para la actividad parcial o completa. Entre los ejemplos se incluyen las neurotoxinas dependientes de cinc toxina botulínica y toxina del tétanos, en las que ambas inhiben la liberación del neurotransmisor.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "toxina clostridial" se refiere a neurotoxinas aisladas de metaloproteasa de cinc producidas de forma nativa por especies de *Clostridium*, incluyendo, sin limitaciones, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* y *Clostridium beratti*, así como neurotoxinas clostridiales fabricadas de forma recombinante incluidas en otros géneros y especies microbianas. La expresión "toxina botulínica" se refiere a los serotipos de la toxina botulínica A, B, C, E, F y G y subtipos de las mismas, producidos de forma nativa por especies de *Clostridium* o fabricadas de forma recombinante. También se incluyen como "toxinas botulínicas" las cadenas aisladas de toxina botulínica (cadenas pesadas o ligeras), ya sea aisladas de especies de *Clostridium* o generadas de forma recombinante. La expresión "toxina botulínica" también incluye nuevas quimeras recombinantes. Por ejemplo, se han generado nuevas quimeras recombinantes entre BoNT-A y E y algunas de estas formas tienen actividad mejorada sobre formas nativas. Véase, por ejemplo, Wang, J. et al. "Novel chimeras of botulinum neurotoxins A and E unveil contributions from the binding, translocation, and protease domains to their functional characteristics" *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 16993–17002.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "inyección de toxina" se refiere a la introducción de una toxina en un sitio en el que se desea un efecto terapéutico y debería abarcar también los conceptos de otros sistemas de administración de toxinas, incluyendo, pero sin limitaciones a los mismos, la aplicación tópica de la toxina, la liberación dirigida al sitio de la toxina administrada por vía sistémica o vehículos de liberación de nanosistemas.

60 Las toxinas botulínicas se producen de forma nativa en bacterias de *Clostridium* como cadenas de polipéptidos simples relativamente inactivas de aproximadamente 150 kDa de peso con un alto grado de homología de secuencia de aminoácidos entre los tipos de toxinas. El único polipéptido se divide posteriormente en una cadena pesada (CP) de aproximadamente 100 kDa y una cadena ligera (CL) de 50 kDa. Las cadenas CP y CL están unidas finamente entre sí por enlaces disulfuro para formar un heterodímero. La CP de la toxina botulínica es responsable de la unión y la translocación de la toxina a las neuronas implicadas en la actividad neuromuscular. Una vez dentro de la

neurona, el resto de la CL de la toxina inhibe la liberación del neurotransmisor escindiendo proteolíticamente diversas proteínas SNARE (receptor de la proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida soluble) implicadas en la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular, de modo que se inhibe la contracción muscular en respuesta a la estimulación neuronal. La actividad proteolítica de la CL se localiza en el extremo N de la CL y funciona como endopeptidasa dependiente de cinc.

En la unión neuromuscular, el mecanismo de acción de BoNT implica tres etapas, la unión, la internalización y la inhibición de la liberación de neurotransmisores a través de la inactivación de diversos fragmentos de las proteínas SNARE. Tres proteínas SNARE, sintaxina 1, SNAP-25 y sinaptobrevina (también conocida como proteína de membrana asociada a vesículas o VAMP) forman conjuntamente los complejos SNARE "trans" metaestables que actúan anclando la vesícula sináptica a la membrana presináptica.

Los objetivos de la proteína SNARE de la endopeptidasa de la CL difieren entre algunos de los serotipos de BoNT. SNAP-25 es una proteína de membrana presináptica asociada a sinaptosomas necesaria para la fusión de vesículas que contienen neurotransmisores y es la diana para BoNT-A y E. VAMP es la diana de las BoNT B, D, F y G. La diana proteolítica para BoNT-C1 es la proteína de membrana sintaxina.

La neurotoxina tetánica (TeNT) también es producida por bacterias del género *Clostridium* y, al igual que con BoNT, es una proteína de 150 kDa que consisten en tres dominios. Sin embargo, tras su unión a la membrana presináptica de la motoneurona, TeNT se internaliza y se transporta retroaxonalmente a la médula espinal. A continuación, es transportada fuera de los cuerpos celulares de las neuronas motoras e internalizada por los terminales nerviosos pre-sinápticos, donde actúa escindiendo VAMP/sinaptobrevina impidiendo de este modo la liberación de la glicina del transmisor inhibitorio. La transmisión sináptica sobre las neuronas motoras es predominantemente inhibitoria. Como tal, la prevención de esta inhibición da lugar a la hiperactividad de las neuronas motoras afectadas y, por tanto, da como resultado una parálisis espástica por la contracción no regulada (tetania) de los músculos inervados. Aunque no está todavía disponible clínicamente, la TeNT se ha propuesto como potencialmente útil para el tratamiento de afecciones neurológicas del SNC.

Como se ha mencionado anteriormente, las neurotoxinas clostridiales son metaloproteasas dependientes de cinc. Cuando está activa, la BoNT contiene un Zn^{2+} (catión divalente de cinc) por molécula. El cinc puede unirse a la CL de la toxina botulínica antes o después de la entrada en las células, pero es crucial para la actividad de la endopeptidasa. En estudios *in vitro* se ha demostrado que la pérdida espontánea de cinc de los sitios de la toxina es relativamente lenta, pero puede aumentarse con un tiempo más largo en la solución. Si la endopeptidasa se vuelve inactiva por la pérdida del cinc unido, la adición de cinc exógeno puede reactivar la toxina.

Suplementación dietética para proporcionar niveles adecuados de iones metálicos requeridos para la actividad de las metaloproteasas Hasta principios de la década de 1960, se creía que la deficiencia de cinc en los seres humanos no se producía. Desde entonces, se ha determinado que el cinc es un oligoelemento esencial y que la deficiencia de cinc es frecuente. Hace relativamente poco tiempo se ha descubierto que el cinc es necesario para la actividad catalítica de cientos de enzimas y que las células tienen un aparato regulador estrecho para la disponibilidad de Zn^{2+} , lo que es indicativo de su importancia en el metabolismo celular. El cinc intracelular (Zn^{2+}) está en homeostasis con las proteínas de unión al cinc, tales como la familia de las metalotioneínas 1 (MT-1), que actúan controlando la concentración de Zn^{2+} libre secuestrando y liberando Zn^{2+} cuando sea necesario. Sin embargo, la dinámica de unión y liberación de Zn^{2+} , la distribución celular de Zn^{2+} y el control homeostático de Zn^{2+} , no se conocen bien.

La deficiencia de cinc clínicamente relevante produce retraso del crecimiento, pérdida del apetito y deterioro de la función inmunológica, así como pérdida de peso, retraso de la cicatrización de heridas, alteraciones del gusto y letargo mental. En los casos graves, que se encuentran en gran medida en los países subdesarrollados, la deficiencia de cinc causa pérdida de cabello, diarrea, retraso de la maduración sexual, impotencia, hipogonadismo en varones y lesiones oculares y cutáneas. Aunque la deficiencia manifiesta de cinc es rara en los países desarrollados, la deficiencia de cinc es común en los países en desarrollo, donde los cereales constituyen una parte muy importante de la dieta.

Basándose en estudios de pacientes con síntomas manifiestos en países en desarrollo, se encontró que los fitatos en los cereales inhiben marcadamente la absorción de cinc, hierro y otros cationes divalentes. Los fitatos, en su mayor parte hexafosfatos de inositol y pentafofosfatos, se encuentran en abundancia en los panes y fibra de grano entero, productos de trigo integral, cereales, soya, avena, legumbres (incluyendo cacahuets y guisantes), maíz, arroz y muchos productos alimenticios que se consideran ricos en fibra. Los grupos fosfato de estos polioles carbocíclicos forman complejos fuertes e insolubles con cinc e inhiben su absorción.

La deficiencia subclínica de cinc es difícil de detectar. La medición en laboratorio del estado nutricional del cinc es difícil debido a su distribución en todo el cuerpo como un componente de varias metaloproteínas y otras proteínas de unión a cinc, así como ácidos nucleicos. La medición de los niveles de cinc en el cuerpo es difícil y los niveles séricos o plasmáticos de cinc y las tasas de excreción urinaria no se correlacionan bien con los niveles de cinc intracelular o tisular. Véase Maret W, Sandstead HH. "Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation." *J Trance Elem Med Biol* 20 (2006) 3–18. Además, los efectos clínicos de la deficiencia de cinc

pueden estar presentes en ausencia de hallazgos anormales de laboratorio. Por lo tanto, para la evaluación clínica de la deficiencia de cinc, a la hora de determinar la necesidad de suplementos de cinc se consideran factores de riesgo, tales como una ingesta calórica inadecuada, el alcoholismo y las enfermedades digestivas (Tabla 1), junto con síntomas de deficiencia de cinc.

5 Es necesaria una ingesta oral diaria de cinc para mantener un nivel de equilibrio debido a la falta de un sistema especializado de almacenamiento de cinc. El cinc dietético se absorbe principalmente a través del intestino delgado. El aumento del consumo de alimentos con un alto contenido de cinc absorbible puede remediar la deficiencia evidente de cinc. Se han calculado pérdidas diarias de cinc del orden de 0,63 mg/día para varones adultos sanos y
10 de 0,44 mg/día para mujeres adultas sanas. Las investigaciones en Estados Unidos indican que la ingesta promedio de cinc en Estados Unidos es de 14 mg/día en varones adultos y 9 mg/día en mujeres adultas. La cantidad diaria recomendada de cinc oral es de 8 mg/día para mujeres adultas (no embarazadas ni lactantes) y de 11 mg/día en varones adultos. Por el contrario, el valor diario (VD) para el cinc es de 15 mg al día. Los VD fueron desarrollados por la Food and Drug Administration de Estados Unidos para ayudar a los consumidores a comparar los contenidos
15 de nutrientes de los productos en el contexto de una dieta total. El VD para el cinc es de 15 mg para adultos y niños de 4 años o más. La USDA ha fijado el nivel superior de ingesta tolerable (LS) para el cinc en 40 mg/día. Se ha notificado malestar gastrointestinal a dosis de 50 a 150 mg/día durante periodos prolongados. Se estima que una dosis emética de cinc es de 225 a 450 mg de cinc. Es importante destacar que solo 0,26 gramos de fitato pueden inhibir la absorción de hasta 50 mg de cinc oral y, bajo supervisión médica, los pacientes pueden recibir más de 200
20 mg/día de suplementos de cinc.

El cinc está altamente correlacionado con el contenido de proteínas de los alimentos, pero está más disponible en las proteínas animales que en los alimentos ricos en proteínas. Por ejemplo, aunque el pavo (140 gramos contiene 4,34 mg de zinc) y pollo (140 gramos contienen 2,88 mg de cinc) son fuentes razonablemente buenas de cinc, una
25 pieza de 120 gramos de tofu contiene solo 0,77 mg de cinc. El contenido de cinc en las proteínas animales varía ampliamente. Por ejemplo, 6 ostras de tamaño medio proporcionan 77 mg de cinc o más del 500 % de la CDR. En cambio, 3 onzas de carne de vaca proporcionan 8,9 mg de cinc.

Muchas personas presentan riesgo de sufrir una deficiencia subclínica de cinc, incluidas aquellas que toman
30 suplementos de cinc, pero con formas inorgánicas peor absorbidas o en combinación con fitatos que hacen que el cinc no esté disponible. El presente inventor ha encontrado, sorprendentemente, que la administración previa de cantidades relativamente altas de formas de cinc bien absorbidas permitirá capacidad de respuesta a la toxina botulínica en individuos que anteriormente eran poco respondedores. Por tanto, claramente, tales individuos eran, probablemente, previamente deficientes funcionalmente en cinc disponible para la unión y activación de la
35 endopeptidasa dependiente de cinc de la CL de la toxina botulínica. Sin embargo, ninguno de estos individuos exhibió signos manifiestos de insuficiencia de cinc.

Las personas que tienen un mayor riesgo de insuficiencia de cinc en lo que se refiere a la máxima capacidad de
40 respuesta a los efectos de la toxina botulínica incluyen potencialmente un gran porcentaje de la población de pacientes (véase la Tabla 1). Las personas con un riesgo potencialmente aumentado de insuficiencia de cinc en el presente contexto incluyen aquellos que tienen dietas ricas en fitatos (sales de ácido fítico) que se encuentran en panes y fibra de grano entero, productos de trigo integral, cereales, soja, avenas, legumbres (incluyendo cacahuetes y guisantes), judías, maíz y arroz. También están en riesgo las personas que tienen dietas bajas en carne, pavo,
45 pollo u ostras (es decir, vegetarianos) o individuos que consumen estos alimentos ricos en cinc junto con alimentos y compuestos que hacen que el cinc no esté disponible, incluyendo alimentos y otros compuestos ricos en ácido fítico o fosfatos.

Muchos alimentos y bebidas contienen fosfatos o ácido fítico como conservante. El ácido fítico (mioinositol-
50 1,2,3,4,5,6-hexakisfosfato, que tiene la fórmula $C_6H_6(OPO(OH)_2)_6$) es la forma de almacenamiento primario de fósforo en muchos tejidos vegetales, incluyendo salvado y semillas. Los ácidos fíticos son altamente reactivos y forman fácilmente complejos con minerales tales como Ca^{2+} , $Fe^{2+/3+}$, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} , así como con hidratos de carbono y proteínas. Debido a la capacidad para quelar cationes divalentes, los ácidos fíticos se encuentran entre los compuestos utilizados para tratar el agua dura, eliminar el hierro y el cobre de los vinos e inactivar los contaminantes de trazas metálicas en los aceites animales y vegetales. El conservante E391 es ácido fítico.

Como se usa en el presente documento, un "suplemento de cinc" significa una o más formas de cinc inorgánico u
55 orgánico o combinaciones de los mismos para administración oral, incluyendo en las formas sólida, gel, liposómica y líquida. La expresión cinc inorgánico se refiere al catión divalente Zn^{2+} y sales inorgánicas de cinc. Entre los ejemplos no limitantes se incluyen cloruro de cinc ($ZnCl_2$), cloruro de cinc tetrabásico ($Zn_5Cl_2(OH)_8$), óxido de cinc (ZnO), sulfato de cinc ($ZnSO_4$ y cloruro de cinc tetrabásico ($Zn_5Cl_2(OH)_8$). El porcentaje de cinc elemental varía en estas formas. Por ejemplo, aproximadamente el 23 % de sulfato de cinc está constituido por cinc elemental. Por tanto, 220 mg de sulfato de cinc contienen 50 mg de cinc elemental.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cinc orgánico" se refiere a complejos de cinc orgánico, así
65 como proteinatos de cinc, quelatos de cinc y sales con moléculas y compuestos orgánicos, y complejos de aminoácidos de cinc, incluyendo los complejos cinc histidina, cinc metionina (ZnMet), cinc lisina (ZnLys) etc.

Además, entre los ejemplos no limitantes se incluyen acetato de cinc ($\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$), ascorbato de cinc ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ZnO}_{12}$), aspartato de cinc ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_8\text{Zn}_2\text{H}$), butirato de cinc ($\text{Zn}(\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2)$), carbonato de cinc (ZnCO_3), citrato de cinc ($\text{Zn}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$), gluconato de cinc ($\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{14})$), glicinato de cinc ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{Zn}$), histidinato de cinc ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_4\text{Zn}$), cetoglutarato de cinc ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_5\text{Zn}$), lactato de cinc ($\text{Zn}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$), malato de cinc ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5\text{Zn}$), picolinato de cinc ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{Zn}$), propanoato de cinc ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4\text{Zn}$), estearato de cinc ($\text{C}_{36}\text{H}_{70}\text{O}_4\text{Zn}$) y succinato de cinc ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4\text{Zn}$). Al igual que con las sales inorgánicas de cinc, el porcentaje de cinc elemental varía en estas formas. Por ejemplo, con el arginato de cinc, 300 mg suministran 30 mg de cinc elemental.

Ciertas formas de cinc, tales como óxido de cinc y carbonato de cinc, son esencialmente insolubles en solución acuosa y generalmente se ha considerado que se absorben mal. La administración de una dosis única de 50 mg de cinc en las formas fácilmente absorbidas de sulfato de cinc y acetato de cinc induce náuseas y vómitos en adultos humanos, mientras que la misma dosis de óxido de cinc causa estos síntomas solo en un pequeño porcentaje de individuos, posiblemente según las diferencias en la absorción. Véase Allen LH. "Zinc and Micronutrient Supplements For Children" Am J Clin Nutr 68 (Supl.) (1998) 4955. Por lo tanto, la consideración de las dosificaciones adecuadas de cinc dietético para los fines de la presente invención incluye consideraciones de velocidades relativas de absorción.

Tal como se usa en el presente documento, el término "fitasa" hace referencia a las enzimas hidrolasas, que son capaces de catalizar la liberación de fósforo a partir de ácido fítico y sales del mismo (fitatos). Las fitasas están disponibles a partir de muchas fuentes, incluyendo fuentes de plantas, generalmente de semillas en germinación, y microbios. Se han descrito fitasas derivadas de bacterias tales como especies de *Bacillus subtilis* y especies de Pseudomonas, así como de levaduras y hongos filamentosos. Se ha descrito la clonación y la expresión del gen de fitasa de *Aspergillus niger*, entre otros. Véase el documento EP0420358. Hay diferentes tipos de fitasas dependiendo de la especificidad de la posición de sus moléculas de ácido fítico de acción. Por tanto, por ejemplo, una 3-fitasa (mioinositol hexafosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3, 1, 3,8) primero hidroliza el enlace éster en la posición 3. Una 6-fitasa (mioinositol hexafosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3,1.3.26) hidroliza primero el enlace éster en la posición 6. Aunque hay excepciones, las fitasas vegetales son, generalmente, 6-fitasas. Las fitasas microbianas son, principalmente, 3-fitasas.

El consumo frecuente de alcohol a largo plazo se asocia con la alteración de la absorción de cinc y el aumento de la excreción urinaria. Otros potenciales factores de riesgo para la deficiencia funcional de cinc incluyen las personas que toman suplementos que interfieren con la absorción de cinc, incluyendo suplementos de hierro, vitamina A, cobre y calcio; con frecuencia consumen productos lácteos que contienen caseína; tienen infecciones, quemaduras o han sufrido recientemente una cirugía; tienen alguna enfermedad crónica; tienen diarrea frecuente o algún síndrome de malabsorción; están embarazadas y/o tienen menos de 25 años de edad o más de 70 años.

Dado que los factores de riesgo para una deficiencia funcional de cinc en el contexto actual son tan frecuentes, uno de los métodos más convenientes para asegurar que habrá cinc suficiente para la unión y la activación de la toxina botulínica es aumentar las reservas de cinc mediante administración de suplementos orales antes, simultáneamente o poco después de la administración de la toxina botulínica. En un aspecto de la invención, se proporcionan suplementos orales e instrucciones para su uso. En una realización, los suplementos orales incluyen suficiente cinc para proporcionar de 10 a 400 mg diarios de cinc elemental. La cantidad de cinc administrada varía con la absorción relativa de la forma de cinc seleccionada y las formas bien absorbidas se administran a dosis más bajas para evitar efectos eméticos. El cinc a un nivel de 10 mg es esencialmente un nivel de CDR de cinc. Particularmente, en el extremo inferior del intervalo de 10 a 400 mg de cinc elemental, se proporciona, preferentemente, la administración conjunta de una fitasa a un nivel de 0,8 a 10.000 unidades para la ingestión en el momento (es decir, en un par de horas) de ingestión de cinc con el fin de prevenir la quelación de ácido fítico del cinc ingerido. En una realización, se proporciona fitasa para su ingestión junto con cada ingestión de cinc, así como suplementos de fitasa adicionales que se deben tomar con cada comida con el fin de maximizar la disponibilidad de cinc de todas las fuentes dietéticas. En una realización, se proporciona una dosis de carga alta de cinc, que suministra de 30-100 mg de cinc elemental diariamente junto con 0,8-10.000 unidades de fitasa.

Otros métodos de copreparación para aumentar los efectos de las metaloproteasas administradas: El presente inventor ha demostrado que la capacidad de respuesta a la toxina botulínica puede mejorarse espectacularmente mediante un periodo de carga de cinc antes de la administración de la toxina. Este hallazgo indica que incluso en personas que tienen una dieta occidental normal y sin evidencia evidente de insuficiencia de cinc, el cinc disponible está limitado por lo menos en lo que respecta a la actividad de metaloproteasas añadidas exógenamente cuya actividad depende del cinc. En una realización, el cinc se administra localmente en el tejido que se va a tratar con una neurotoxina clostridial. En un aspecto, se inyecta una solución de cinc en los sitios para la inyección de toxina en torno al tiempo de la inyección de la toxina, es decir, antes, durante y/o después de la inyección de toxina o la administración tópica de toxina. En otros aspectos, el cinc se administra en una crema penetrante que se aplica tópicamente en sitios para la inyección de toxina en aproximadamente el momento de la inyección de la toxina, es decir, antes, durante y/o después de la inyección de la toxina. En otros aspectos, el cinc se administra mediante el uso de sistemas de nanoliberación. En otros aspectos, el cinc se administra mediante administración sublingual, pulverización nasal, gotas para los ojos, enemas, "aire forzado", por vía transdérmica o rectal de cualquier forma, incluyendo una suspensión liposomal o un sistema de nanoliberación. En aspectos adicionales, se puede usar una

solución de cinc para reconstituir las toxinas terapéuticas. Cuando se van a tratar áreas mayores o áreas inaccesibles o para dosificar con mayor precisión la terapia de cinc, como alternativa se puede emplear carga de cinc por inyección intravenosa o intramuscular.

- 5 Soluciones de reconstitución de neurotoxinas de clostridiales: La eliminación de Zn^{2+} de la cadena ligera (CL) mediante desplazamiento *in vitro* con quelantes solubles, tales como etilendiaminotetraacetato (EDTA), anula completamente la actividad enzimática en preparaciones de células libres o rotas. Sin embargo, la toxina desprovista de su cinc unido puede retener la actividad contra las uniones neuromusculares intactas, posiblemente porque la toxina internalizada es capaz de unirse al Zn^{2+} citosólico disponible. Véase Simpson LL, et al. "The Role of Zinc Binding in the Biological Activity of Botulinum Toxin" J Biol Chem 276 (29) (2001) 27034–41. Aunque el tejido que se ha pretratado con quelantes pierde su capacidad para restaurar la actividad a la toxina que ha sido desprovista de cinc, la adición de un exceso molar de Zn^{2+} (20 μM) al tejido restaurará rápidamente la actividad de la toxina sin cinc. *Id.*
- 10
- 15 En los estudios se ha demostrado que el cinc no proporciona un crioprotector o un efecto criopermisivo en la liofilización de la toxina botulínica. Véanse las solicitudes de patente de Allergan 10/976.529, publicadas como US 2005/0214326 y PCT/US2006/038913, publicada como WO 2007/041664. En la solicitud de patente de Estados Unidos de Allergan U.10/976.529, publicada como US 2005/0214326, se ha afirmado que la adición de cinc a soluciones de liofilización proporciona una cierta potencia incrementada y una actividad antimicrobiana potenciada.
- 20 Sin embargo, en otros estudios independientes se ha demostrado que la CL de BoNT-A experimenta una fragmentación autocatalítica durante la purificación y el almacenamiento y que esta fragmentación se ve potenciada por el cloruro de cinc, así como por otros cloruros de metales divalentes. Sobre esta base, algunos han recomendado que la toxina se almacene congelada a una concentración baja de pH neutro o más alto que está desprovista de cualquier metal. Ahmed SA, et al. "Factors Affecting Autocatalysis of Botulinum A Neurotoxin Light Chain" Protein J. 23 (7) (2004) 445–51.
- 25

En cualquier caso, las composiciones farmacéuticas de BoNT disponibles comercialmente en la actualidad carecen de Zn^{2+} añadido ya sea antes de la liofilización o como aditivo a una solución de reconstitución. Por ejemplo, la marca BOTOX® de BoNT–A disponible en Allergan, Inc. (Irvine, CA) consiste en BoNT-A purificada que se ha purificado del cultivo mediante una serie de precipitaciones de ácido en un complejo cristalino que consiste en la toxina proteica activa de alto peso molecular y una proteína hemaglutinina asociada. El complejo cristalino se redisuelve en una solución que contiene solución salina y seroalbúmina humana (HSA) y se esteriliza mediante filtración (0,2 micrómetros) antes del secado al vacío. BOTOX® se reconstituye con cloruro sódico (solución salina) al 0,9 % estéril, sin conservantes, antes de la inyección intramuscular. Otras composiciones farmacéuticas de BoNT disponibles comercialmente incluyen el complejo de hemaglutinina BoNT–A de marca Dysport® (Ipsen Ltd., Berkshire, Reino Unido), que se seca en un polvo con HSA y lactosa, para su reconstitución con solución salina antes de su uso. La marca MyoBloc® de BoNT–B se proporciona en viales de un solo uso de una solución inyectable de 5.000 U de toxina botulínica de tipo B en complejo con las proteínas hemaglutinina y no hemaglutininas en HSA al 0,05 %, succinato de sodio 0,01M y cloruro de sodio 0,1M a un pH de aproximadamente 5,6. Por lo tanto, la actividad de la BoNT debe basarse en el cinc que permanece unido a la molécula a lo largo de la purificación y el almacenamiento, así como Zn^{2+} en los tejidos del huésped para su actividad.

30

35

40

Los resultados presentados en el presente documento muestran que, en la mayoría de los individuos analizados, la carga de cinc antes del tratamiento dio como resultado efectos mejorados, en ocasiones mejorados espectacularmente, y la duración de los efectos del tratamiento. Esto demuestra que no hay suficiente Zn^{2+} unido a las moléculas de toxina para la actividad máxima y muestra además que los tejidos de los individuos normales carecen de suficiente Zn^{2+} disponible para compensar la falta de suficiente Zn^{2+} unido a las moléculas. Por tanto, en una realización presentada en el presente documento, se proporciona una solución de reconstitución de BoNT que incluye suficiente Zn^{2+} para permitir la máxima capacidad de respuesta de la toxina inyectada superando cualquier deficiencia en el cinc unido a la toxina o en el cinc disponible residente en el tejido. Dados los hallazgos divulgados en el presente documento se puede determinar empíricamente un nivel ideal de Zn^{2+} para proporcionar en soluciones de reconstitución para su liberación. En una realización, se usan ensayos de potencia de neurotoxina de ratón para determinar niveles y formas de cinc a añadir a las soluciones de liberación. En una realización, se administra a los ratones una dieta deficiente en cinc durante un período de limpieza antes de analizar los niveles deseados de Zn^{2+} para suministrarse en formulaciones de liberación. Colocando a los ratones en un estado de deficiencia relativa de cinc antes de la prueba, se puede aislar la contribución de Zn^{2+} presente en la solución de administración. En una realización de la invención, la BoNT se liofiliza sin Zn^{2+} añadido y se proporciona una solución de reconstitución que contiene suficiente Zn^{2+} añadido para su actividad máxima. En una realización, el Zn^{2+} está presente en la solución de reconstitución a una concentración de 10 – 400 μM .

45

50

55

60

En una realización, se proporciona una solución de reconstitución que incluye solución salina isotónica, es decir, aproximadamente 0,9 % o NaCl 0,155M en solución acuosa estéril (conservada o no conservada) e incluye además Zn^{2+} elemental a una concentración de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 μM o aproximadamente 0,000065 g a aproximadamente 0,00032 g/100 ml de cinc elemental. Esta cantidad de cinc elemental puede proporcionarse, por ejemplo, con $ZnCl_2$ a aproximadamente 0,000136 g a aproximadamente 0,00068 g/100 ml.

65

Ensayos de potencia de la neurotoxina clostridial: El ensayo actualmente aceptado de potencia por vial para la toxina botulínica es un ensayo de dosis letal intraperitoneal en ratones (DLR50). Potencia puede hacer referencia a la potencia recuperada de la toxina botulínica después de la reconstitución o a la potencia de la toxina botulínica antes de la liofilización. Una unidad (U) de una toxina botulínica se define como la cantidad de toxina botulínica que, tras la inyección intraperitoneal, mata al 50 % de un grupo de ratones hembra Weber que pesan 17-22 gramos cada uno al comienzo del ensayo. En el documento PCT/US2006/038913, publicado como WO 2007/041664 e incorporado en el presente documento como referencia se proporcionan más características del ensayo.

La monografía de la Farmacopea Europea (Ph Eur) sobre la toxina botulínica de tipo A (BoNT/A) para la inyección (01/15) ha avalado el uso de métodos no letales y *ex vivo* alternativos para reemplazar el ensayo de la DL50 en ratones, sujeto a su validación. (Secardia, D. y Das, R.G. "Alternatives to the LD50 assay for botulinum toxin potency testing: Strategies and progress towards refinement, reduction and replacement" AATEX 14, número especial, 581–585. Proc. 6º Congreso mundial sobre usos alternativos y de animales en ciencias de la vida. 21–25 de agosto de 2007, Japón). Los ensayos alternativos de potencia propuestos incluyen el ensayo de parálisis flácida de ratón (también conocido como ensayo de ptosis abdominal de ratón), que relaciona la actividad de BoNT/A con el grado de abombamiento abdominal observado después de que inyectar la toxina por vía subcutánea en la región inguinocrural izquierda de un ratón. La magnitud de la parálisis es dependiente de la dosis. Como solo se inyecta una dosis subletal de BoNT, se considera que el ensayo es 10 veces más sensible que el ensayo de DL50. El criterio de valoración de la parálisis es más similar al uso clínico de la toxina porque evalúa los efectos musculares localizados, en lugar de la toxicidad sistémica. El ensayo de parálisis flácida es más rápido que el ensayo de letalidad y proporciona resultados en 24 a 48 horas, en comparación con 72 a 96 horas para un ensayo de DL50 típico.

También se ha propuesto un ensayo *ex vivo* alternativo y mide la amplitud de una respuesta de contracción a la estimulación eléctrica de una preparación nerviosa/muscular escindida. La potencia de la toxina determina la disminución de la amplitud de la respuesta de contracción. El criterio de valoración habitual del ensayo es el tiempo hasta que se observa una disminución del 50 % en la amplitud. El modelo *ex vivo* puede proporcionar resultados en un plazo de dos horas.

Aunque el ensayo de DL₅₀ se ha mantenido debido a su alta sensibilidad, el ensayo no está normalizado y las unidades usadas en el etiquetado son específicas del producto y no intercambiables. La ausencia de pruebas normalizadas es una cuestión de seguridad dada la extrema toxicidad y la lenta recuperación de la sobredosis. El presente inventor ha determinado que la administración oral de cinc da lugar a una mejora considerable de la capacidad de respuesta botulínica en muchos pacientes que, de otro modo, no exhiben indicios de deficiencia de cinc. Este notable hallazgo se ha extendido a ensayos de potencia botulínica y proporciona una capacidad de respuesta máxima en el sistema de prueba. En un aspecto, se proporciona una dieta normalizada a los ratones durante un periodo de tiempo previo a la realización de un ensayo de DL₅₀ intraperitoneal, un ensayo de parálisis flácida de ratón o un ensayo de respuesta de contracción *ex vivo*.

Una dieta típica de roedores de calidad de investigación incluye del 14–20 % de proteína y de 50 a más de 70 % de hidratos de carbono. El porcentaje más alto de ingredientes en la dieta es alto en fitatos o, de lo contrario, inhibe la absorción de cinc. Estos incluyen caseína, almidón de maíz, harina de soja, celulosa y pueden incluir además aceites de maíz y/o soja. Las mezclas de minerales se añaden a la dieta, pero no están normalizadas y pueden variar 10 veces en diferentes dietas estándar.

En varios estudios publicados, las dietas que contienen 25-55 mg de cinc por kg de pienso se consideraron adecuados, mientras que las dietas que contienen < 1–5 mg de cinc por kg se consideraron deficientes. En otros informes, los valores de cinc se han dado en partes por millón (ppm) y las dietas deficientes en cinc y adecuadas contenían 1,5 y 70-75 ppm de cinc, respectivamente. Se ha observado que una dieta que contiene 10 mg/kg de cinc puede ser adecuada en la que la fuente primaria de proteína es clara de huevo o caseína, pero que se necesitarían al menos 20 mg/kg cuando se usa una fuente de proteína rica en fitato, tal como soja. Los ratones son relativamente resistentes a la toxicidad del cinc y se ha indicado que no muestran efectos significativos de 500 mg de Zn/l de agua durante hasta 14 meses.

En una realización de un método para normalizar la prueba de potencia de neurotoxina clostridial en animales y utilizar tejidos animales, a los animales que se van a usar para las pruebas de potencia se administra una dieta definida diseñada para maximizar el cinc disponible durante al menos una semana antes de la prueba. En una realización, la dieta es baja en fitatos y rica en cinc. En una realización en la que se da una dieta baja en fitato, el nivel de cinc es al menos dos veces superior a los niveles de cinc recomendados. En una realización, se añade una fitasa a la dieta además de un nivel de cinc al menos dos veces superior a los niveles recomendados. En una realización, la dieta definida se selecciona por comparación de la potencia del mismo lote de neurotoxina clostridial en grupos de animales alimentados con dietas diferentes durante al menos una semana antes del análisis de potencia. La dieta que proporciona la mayor sensibilidad a los efectos de la toxina se selecciona y normaliza como la dieta definida requerida para todas las pruebas de potencia futuras.

Los siguientes ejemplos se incluyen con el propósito de completar la divulgación e ilustrar los métodos y

composiciones de la presente invención, así como presentar determinadas características de las composiciones. De ningún modo estos ejemplos están destinados a limitar el alcance o las enseñanzas de esta divulgación.

Ejemplo 1: Inversión de la resistencia a la toxina botulínica mediante suplementación con cinc dietético

5 El presente inventor razonó que las diferencias en las reservas intracelulares de cinc disponibles en individuos podrían explicar la falta de capacidad de respuesta a la toxina botulínica en algunos pacientes. En una exploración inicial de la hipótesis, se proporcionó suplementación con cinc a partir de fuentes alimenticias. Se seleccionó el pavo como fuente dietética de Zn^{2+} biodisponible basándose en la seguridad, los bajos costes, el fácil acceso y la aceptación general. Se calculó la cantidad de pavo a la que se dirigió a los pacientes a consumir para proporcionar una dosis diaria de 40 mg, o aproximadamente 2,5 veces el valor diario recomendado. Se consideró que algunos de estos pacientes eran poco respondedores a las toxinas botulínicas, de tal manera que históricamente había sido difícil lograr el control de sus síntomas de blefaroespasma. Los resultados mostraron que la suplementación con cinc daba lugar a un tratamiento notablemente eficaz del blefaroespasma utilizando la misma fuente de toxina botulínica y la dosis que era ineficaz en el mismo paciente en ausencia de suplementación.

20 Sorprendentemente, los resultados sugirieron que la deficiencia de cinc suficiente para reducir la eficacia de la toxina botulínica administrada se produce en un número significativo de pacientes. Incluso en los pacientes sin resistencia evidente, se espera que los niveles crecientes de cinc para administración oral durante un período de tiempo previo a una inyección planificada proporcionen una ventaja normal en todos los pacientes. En particular, mediante la administración de suplementos de cinc para proporcionar cinc intracelular disponible para la unión y activación de la endopeptidasa de la CL de la toxina botulínica se puede obtener la respuesta dependiente de Zn^{2+} más alta posible. En muchos pacientes que han sido previamente resistentes a la toxina botulínica administrada, se pueden administrar dosis más bajas con respuestas fiables. Si bien comer cantidades copiosas de proteína animal que contiene niveles altos de cinc durante un período de tiempo previo a un tratamiento con toxina botulínica puede ser eficaz para normalizar y aumentar la capacidad de respuesta a la toxina botulínica, esta solución es inconveniente, carece de normalización y, a largo plazo, es incompatible con las preferencias dietéticas de la mayoría de los individuos.

30 De este modo, en un aspecto del avance proporcionado en el presente documento, se administran suplementos orales de cinc que proporcionan la normalización y el aumento deseados de las reservas de cinc. En un aspecto de la invención, se formulan una o más formas de cinc inorgánico y/o orgánico en forma de comprimido o cápsula. En un aspecto, la dosificación de cinc para consumo oral está en un intervalo de aproximadamente 10 a 400 mg de cinc elemental diariamente. En otras realizaciones, la dosificación de cinc está en el intervalo de aproximadamente 30 a 50 mg de cinc elemental diariamente. En una realización, la dosificación de cinc es de aproximadamente 50 mg de cinc elemental diariamente. En una realización de la invención, se proporciona un envase de dosis a un paciente antes de un procedimiento planificado que incluye un suplemento de cinc e instrucciones para tomar el suplemento. Como se proporciona en las instrucciones, se indica al paciente que comience la administración de suplementos de cinc varios días antes de la administración de la toxina botulínica. En una realización, se indica al paciente que aumente la administración de suplementos de cinc durante de 3 a 4 días antes del tratamiento con toxinas, así como el día del tratamiento. En un aspecto, las instrucciones dirigen la evitación de alimentos ricos en fitatos durante el período de carga de cinc.

Ejemplo 2: Suplementación de cinc que incluye absorción aumentada de cinc mediante administración de fitasa

45 Dado el papel de los fitatos en la inhibición de la absorción de cinc, en un aspecto de la invención, la absorción de cinc se incrementa mediante la administración oral de fitasas que hidrolizan ácidos fíticos (hexakisfosfato de inositol) y mejoran la absorción oral de cinc. En la actualidad, las fitasas están disponibles en el mercado nutracéutico como suplementos dietéticos diseñados para aumentar la absorción de cationes divalentes, tales como calcio, magnesio, hierro y cinc. Estos cationes divalentes forman complejos insolubles con ácidos fíticos vegetales presentes en alimentos vegetales tales como maíz, subproductos de maíz, legumbres, soja y granos de cereales, haciendo que no estén disponibles. Las fitasas se usan como aditivos en piensos para animales con el fin de obtener fosfatos disponibles a partir de ácido fítico (hexakisfosfato de inositol). Se ha divulgado que la adición de fitasa a piensos para animales es una ventaja, incluso en dietas pobres en fitato. Véase, por ejemplo, el documento WO9949740, en el que se divulga una composición de alimentos pobres en fitato que contiene fitasa de *Aspergillus*. En el documento WO9830681 titulada "Combinaciones de fitasa" se divulga que una combinación de al menos dos fitasas que tienen diferente especificidad de posición es más eficaz en la liberación de fósforo de fitato.

60 Actualmente están disponibles dos tipos de fitasas dietéticas, las de cereales y las de fuentes microbianas. Las fuentes microbianas incluyen la fermentación de hongos tales como *Aspergillus niger* (Finase[®], Alko Ltd., Finlandia), así como la fermentación bacteriana. La actividad fitasa se puede determinar mediante una serie de ensayos diferentes que miden la cantidad de enzima requerida para liberar una cantidad determinada de fosfato inorgánico a partir de ácido fítico por minuto a temperaturas y pH definidos. Las fitasas microbianas tienen una gama más amplia de actividad de pH y se ha demostrado que proporcionan una mayor absorción de hierro en estudios humanos en comparación con la fitasa de trigo. En un estudio de este tipo, la administración de 20.000 unidades de fitasa (UF) aumentó la absorción de hierro en un 14-26 %. Véase, Sandberg A-S, et al. "Dietary *Aspergillus niger* Phytase

Increase Iron Absorption in Humans" The Journal of Nutrition 126 (1996) 476. Por tanto, en un aspecto se proporciona un suplemento dietético que incluye una o más formas de cinc y al menos una fitasa microbiana. La administración del cinc y la fitasa preparan al paciente para una capacidad de respuesta máxima a la toxina botulínica administrada posteriormente.

5 Como se ha mencionado anteriormente, se pueden usar cinc y fitasa combinadas para aumentar rápida y eficazmente de forma segura los niveles de cinc en el cuerpo entero para aplicaciones distintas de la unión y activación mejoradas de la endopeptidasa de la CL de la toxina botulínica. Por ejemplo, puede ser deseable aumentar los niveles de cinc de cuerpo entero en tiempos de necesidad médica, incluyendo, pero sin limitaciones, 10 afecciones tales como: cicatrización de heridas, recuperación de quemaduras, compromiso inmunológico e impotencia masculina.

Con el fin de analizar adicionalmente los resultados aparentemente positivos de la suplementación dietética de cinc proporcionada por la ingestión de un alimento de alto contenido de cinc, así como para analizar si la adición de fitasa conferiría un beneficio en la absorción de cinc, se inició otro ensayo de comparación de la reactividad a la toxina botulínica en pacientes después de un período de cuatro días de análisis de la suplementación con dos suplementos diferentes en comparación con un placebo. Cada una de las sustancias de ensayo y el placebo se proporcionaron de manera variada a los sujetos de ensayo sin identificación. Por lo tanto, los pacientes estaban enmascarados con respecto a la naturaleza del suplemento. El placebo (P) era una forma de cápsula de lactulosa. Las dos 15 preparaciones de ensayo fueron Z₁₀, que era una dosis de CDR normal de 10 mg de cinc en forma de gluconato de cinc, y Z_{50P}, que era una dosis de carga de cinc relativamente alta que proporcionaba 50 mg de cinc en forma de citrato de cinc junto con 3.000 UFI de fitasa (derivada del hongo *Aspergillus niger*). Se registraron dos parámetros diferentes de sensibilidad a la toxina botulínica, duración (D) y efecto (E). La duración se expresó como un porcentaje de aumento o disminución de la duración "habitual" del efecto en el paciente debido a que la experiencia 20 demuestra que diferentes pacientes normalmente experimentan diferentes duraciones del efecto. Para algunos pacientes, los tratamientos con toxinas suelen durar un mes, para otros tres meses, etc. Por lo tanto, un paciente cuya toxina suele durar 90 días y para los que no se observó ningún cambio en la duración se puntuó como 0, es decir, no cambia con respecto a la duración habitual. Se calcula que un paciente que experimenta un efecto de la toxina de 4 semanas adicionales (28 días) tiene una mayor duración de 28/90, cuya relación es igual a +0,31 y 25 representa un efecto que es 31 % más largo de lo usual. Por el contrario, una puntuación negativa, tal como -0,25, es igual a un efecto que es 25 % más corto de lo habitual. El efecto (E) se expresó como la desviación de la percepción habitual del paciente individual de comodidad y efecto deseado. Por ejemplo, 0 = ningún cambio con respecto al efecto habitual, -1 = ligeramente menos eficaz que lo habitual, -2 significativamente menos eficaz que lo habitual, +1 ligeramente más eficaz que lo habitual, +2 = significativamente más eficaz que lo habitual, +3 = mejor 30 efecto nunca logrado para ese paciente. Para asegurar la exactitud, los pacientes mantuvieron registros regulares de la eficacia percibida del tratamiento.

Los resultados de un ensayo de 44 pacientes se presentan en forma de tabla en la Figura 1. Todos estos pacientes habían sido tratados previamente y tenían un historial previo registrado de capacidad de respuesta a la toxina botulínica. Veintitrés de los pacientes se consideraron pacientes con blefaroespasma difícil de tratar (BD), lo que significa que: a.) requerían de forma rutinaria > 50 unidades/sesión de la BoNT-A de marca of Botox® u otra 40 equivalencia de la toxina botulínica; b.) tenían de forma rutinaria resultados subóptimos notificados por el paciente, a pesar de la respuesta maximizada de una dosis y patrón de inyección adaptada; y c.) notificaban un grado de variabilidad del efecto de la toxina de un tratamiento a otro a pesar de la dosis y patrón de la inyección no variable. Otros siete pacientes eran pacientes con blefaroespasma que respondieron de forma consistente al tratamiento con BoNT-A (BC). Cuatro pacientes eran pacientes con espasmo hemifacial (H), mientras que diez pacientes recibieron tratamiento cosmético para las arrugas (C). Los tres tipos de BoNT administrados se muestran en la Figura 1 en las columnas "T" como ("B") BoNT-A (Botox®), ("M") BoNT-B (Myobloc®) y ("D") BoNT -A (Dysport®). Se trató a los 45 pacientes en un estudio piloto aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo y con grupos cruzados.

Un tercero asignó a los participantes del estudio al azar de forma desigual a uno de cuatro grupos de tratamiento y tanto el médico que los trataba como los pacientes estaban enmascarados a los suplementos suministrados antes de la inyección. Veintitrés (52 %, grupo A) se sometieron a una suplementación previa a la inyección con Z_{50P} solo (50 mg de citrato de cinc más 3. 000 unidades de fitasa), seis (14 %, grupo B) se sometieron a una suplementación 50 previa a la inyección con P (lactulosa como placebo) y Z_{50P} a tiempos diferentes en un diseño de grupos cruzados, cuatro (9 %, grupo C) se sometieron a una suplementación previa a la inyección con Z₁₀ (10 mg de gluconato de cinc) y Z_{50P} a tiempos diferentes en un diseño de grupos cruzados y 11 (25 %, grupo D) sometieron a una suplementación previa a la inyección del estudio con P, Z₁₀ y Z_{50P} a tiempos diferentes en un diseño triple de grupos cruzados. 55

En referencia ahora a la figura 2 se muestra un gráfico 200 que ilustra los resultados gráficos del ensayo de suplementación de cinc y cinc más fitasa durante cuatro días antes de la administración de toxinas botulínicas terapéuticas con respecto a la duración (D) del efecto de la toxina en el paciente. El eje vertical 202 en la figura 2 representa el cambio porcentual en la duración de la acción de la toxina en el paciente. El eje horizontal 204 muestra 60 varias barras, cada una representativa de una población de pacientes que recibe: un placebo (P) 206; 10 mg de gluconato de cinc (Z₁₀) 210; o 50 mg de citrato de cinc, además de fitasa (Z_{50P}) 214. Las barras de intervalo de 65

5 confianza 208/212/216 representan intervalos de confianza del 95 % respecto a la media. Como se puede observar en las Figuras 1 y 2, no se observó ningún cambio significativo ($p > 0,05$) respecto a la duración habitual del tratamiento específico del paciente en la duración (D) de los tratamientos con toxina botulínica con suplementación previa a la inyección para pacientes que recibieron placebo (P) 206 o 10 mg de gluconato de cinc (Z_{10}) 210, que se aproxima a la CDR para el cinc.

10 En referencia ahora a la figura 3 se muestra un gráfico 300 que ilustra los resultados gráficos del ensayo de suplementación de cinc y cinc más fitasa durante cuatro días antes de la administración de toxinas botulínicas terapéuticas con respecto al cambio percibido subjetivo de los pacientes en la eficacia ϵ de los tratamientos de la toxina. El eje vertical 302 en la figura 3 representa el cambio percibido en la eficacia (E) de la toxina en el paciente. El eje horizontal 304 muestra varias barras, cada una representativa de una población de pacientes que recibe: un placebo (P) 306; 10 mg de gluconato de cinc (Z_{10}) 310; o 50 mg de citrato de cinc, además de fitasa (Z_{50P}) 314. Las barras de intervalo de confianza 308/312/316 representan intervalos de confianza del 95 % respecto a la media. Como se puede observar en las Figuras 1 y 3, no se observaron cambios significativos ($p > 0,05$) en efecto (E) de la capacidad de respuesta normal específica del paciente en los pacientes que recibieron placebo (P) 306 o 10 mg de gluconato de cinc (Z_{10}) 310, que se aproxima a la CDR para el cinc.

20 Por el contrario, en 41 de los 44 (93 %) pacientes que recibieron Z_{50P} (50 mg de citrato de cinc más 3 000 unidades de suplementos de fitasa) 214 durante cuatro días antes de las inyecciones de botulinum, se observó un incremento promedio específico del paciente en la duración del efecto (D) del 23,6 % ($p < 0,05$, véanse las Figuras 1 y 2). Además, se comprobó que el efecto (E) del tratamiento con toxina botulínica aumentó significativamente ($p < 0,05$, véanse las Figuras 1 y 3), en 38 de 44 pacientes (86 %) que recibieron Z_{50P} (suplementos de 50 mg de citrato de cinc más 3.000 unidades de fitasa) 314 durante cuatro días antes de las inyecciones de botulinum. Prácticamente todos los pacientes mostraron mejoría en la duración (D), el efecto (E) o ambos. En la mayoría de los casos, tanto la duración (D) como el efecto (E) habían mejorado notablemente. De hecho, en tres pacientes con blefaroespasmos que recibieron una carga alta de cinc y fitasa (Z_{50P}) que notificaron un efecto beneficioso disminuido, se observó una sobredosis de toxina obvia, lo que les dificultaba cerrar los ojos. Así, incluso entre estos tres pacientes, hubo un aumento del efecto de la toxina. Entre otras cosas, los resultados sugirieron (y la experiencia posterior ha demostrado) que se puede administrar dosis bajas de BoNT con una capacidad de respuesta razonable en muchos pacientes si los pacientes han recibido cargas de cinc antes del tratamiento. Mediante la carga de cinc antes de la administración, la capacidad de respuesta máxima puede normalizarse a través de la población de pacientes y se puede eliminar una variable importante en la capacidad de respuesta individual. Las dosis eficaces más bajas pueden reducir el desarrollo posterior de anticuerpos que interfieren con el tratamiento. Se cree que estos datos son altamente fiables, ya que los pacientes con blefaroespasmos son muy conscientes diariamente si pueden o no mantener los ojos abiertos para las funciones de leer, conducir, vestirse ellos mismos, ver televisión, trabajar, comprar, etc.

40 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad tal como se han expuesto. Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones ilustrativas, esta descripción no pretende interpretarse en un sentido limitante. Varias modificaciones y combinaciones de realizaciones ilustrativas, así como otras realizaciones de la invención, serán evidentes para los expertos en la técnica con referencia a la descripción. Por lo tanto, se pretende que las reivindicaciones adjuntas incluyan tales modificaciones y mejoras.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Al menos un suplemento que comprende una combinación de cinc y fitasa que asegura la disponibilidad del ion cinc que se requiere para la actividad de la neurotoxina botulínica, para su uso en un método de preparación de un sujeto para la administración de la neurotoxina botulínica, que comprende:
- 10 instruir sobre la administración del al menos un suplemento, en donde la administración indicada del suplemento proporciona una disponibilidad del ion de cinc requerido a un nivel suficiente durante un período de carga del suplemento para eliminar una deficiencia funcional del ion cinc como causa de una capacidad de respuesta pobre o limitada a la neurotoxina botulínica administrada, en donde el suplemento se administra durante el período de carga antes de la administración de la neurotoxina botulínica.
- 15 2. El suplemento de la reivindicación 1 para su uso en el método de preparación de un sujeto para la administración de la neurotoxina botulínica de la reivindicación 1, en donde el suplemento comprende cinc en una forma que proporciona cinc elemental en una cantidad de 10 a 400 mg diarios.
- 20 3. El suplemento de la reivindicación 1 para su uso en el método de preparación de un sujeto para la administración de la neurotoxina botulínica de la reivindicación 1, en donde el suplemento comprende una forma de cinc orgánico seleccionada de uno o más de: proteínatos de cinc, quelatos de cinc y/o sales con moléculas orgánicas, y complejos de aminoácidos de cinc.
- 25 4. El suplemento de la reivindicación 1 para su uso en el método de preparación de un sujeto para la administración de la neurotoxina botulínica de la reivindicación 1, en donde se instruye al sujeto además para limitar el consumo de fitatos durante el periodo de carga.
- 30 5. El suplemento de la reivindicación 1 para su uso en el método de preparación de un sujeto para la administración de la neurotoxina botulínica de la reivindicación 1, en donde se instruye sobre el consumo del suplemento mediante consumo oral a un nivel de 0,8 a 10.000 unidades diarias.
- 35 6. El suplemento de las reivindicaciones 1 o 5 para su uso en el método de preparación de un sujeto para la administración de la neurotoxina botulínica de la reivindicación 1, en donde el periodo de carga es de menos de, o al menos de 4 días antes de la administración de la neurotoxina botulínica.
- 40 7. Un envase de preparación de metaloproteasa terapéutica previo al procedimiento para su uso en un método de preparación de un sujeto para la administración de la neurotoxina botulínica, que comprende:
- una cantidad de suplementos en forma de cápsula o comprimido, en donde el suplemento comprende una combinación de ion cinc y fitasa que asegura la disponibilidad del ion cinc que se ha determinado que es necesario para la actividad de una neurotoxina botulínica y los suplementos se proporcionan en una cantidad suficiente para suministrar el ion cinc diariamente durante un período de carga inmediatamente anterior al tratamiento de un paciente con la neurotoxina botulínica; e
 - instrucciones que instruyen al paciente para que tome los suplementos y reducir la ingesta de fitatos.
- 45 8. El envase de preparación de metaloproteasa terapéutica previo al procedimiento de la reivindicación 7 para su uso en el método de preparación de un sujeto para la administración de la neurotoxina botulínica de acuerdo con 7, en donde el suplemento comprende una forma orgánica o inorgánica de cinc a una dosificación suficiente para suministrar de 10 a 400 mg de cinc elemental diariamente durante un período de carga inmediatamente anterior al tratamiento de un paciente con neurotoxina botulínica.
- 50 9. El envase de preparación de previo al procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 para su uso en el método de preparación de un sujeto para la administración de la neurotoxina botulínica de acuerdo con 7, en donde el periodo de carga es de menos de, o al menos de 4 días inmediatamente antes del tratamiento del paciente con la neurotoxina botulínica.
- 55

ID	SEXO	EDAD	OZ	Placebo			Cinc 10			Cinc 50 + P		
				D _p	E _p	T _p	D ₁₀	E ₁₀	T ₁₀	D _{50+P}	E _{50+P}	T _{50+P}
1	M	39	BH							0	1	B
2	M	56	BH							0,23	2	B
3	M	71	BH	0	0	B				0,15	2	B
4	M	76	BH							0,12	2	B
5	M	78	BH	0,07	1	B	0,07	1	B	0,23	3	B
6	F	68	BH							0,12	0	B
7	F	70	BH				0	0	B	0,23	2	B
8	F	71	BH				-0,15	0	B	0,23	2	B
9	F	73	BH							0,23	2	B
10	F	73	BH	0	-1	B				0,16	2	B
11	F	73	BH	-0,07	0	M	0	1	M	0,23	2	M
12	F	76	BH							0,31	3	B
13	F	76	BH							0,31	2	B
14	F	77	BH	-0,06	0	M	0,07	1	M	0,16	2	M
15	F	77	BH							0,35	-2*	B
16	F	77	BH							0,23	0	B
17	F	80	BH							0,35	3	B
18	F	80	BH	0,06	-1	B	0	0	B	0,16	2	B
19	F	82	BH							0	2	B
20	F	84	BH	0	0	B				0,07	2	B
21	F	84	BH				0,07	1	B	0,23	3	B
22	F	85	BH							0,23	2	B
23	F	88	BH	0,07	1	B	0	0	B	0,23	2	B
24	F	58	8C							0,31	-2*	B
25	F	61	8C							0,15	2	B
26	F	63	8C	0	0	B	0	0	B	0,23	-2*	B
27	M	72	H							0,31	2	B
28	F	65	H				0	0	B	0,47	2	B
29	F	38	C							0,47	2	B
30	F	43	C							0,31	2	B
31	F	54	C	0	0	B	0	0	B	0,23	2	B
32	F	57	C							0,15	1	B
33	M	43	H							0,33	1	B
34	M	47	H							0,5	0	B
35	F	64	8C	0	0	B				0,23	2	B
36	F	69	8C	0	0	B	0,12	1	B	0,31	3	B
37	M	73	8C	0	0	B	0	0	B	0,23	2	B
38	M	74	8C	0	1	B	0	0	B	0,23	2	B
39	F	35	C	0	0	B				0,25	2	B
40	F	39	C	0	0	B	0	1	B	0,25	1	B
41	F	43	C	0	0	B				0	1	B
42	F	44	C							0,25	1	O
43	F	56	C							0,31	2	O
44	M	52	C							0,31	1	O

Figura 1

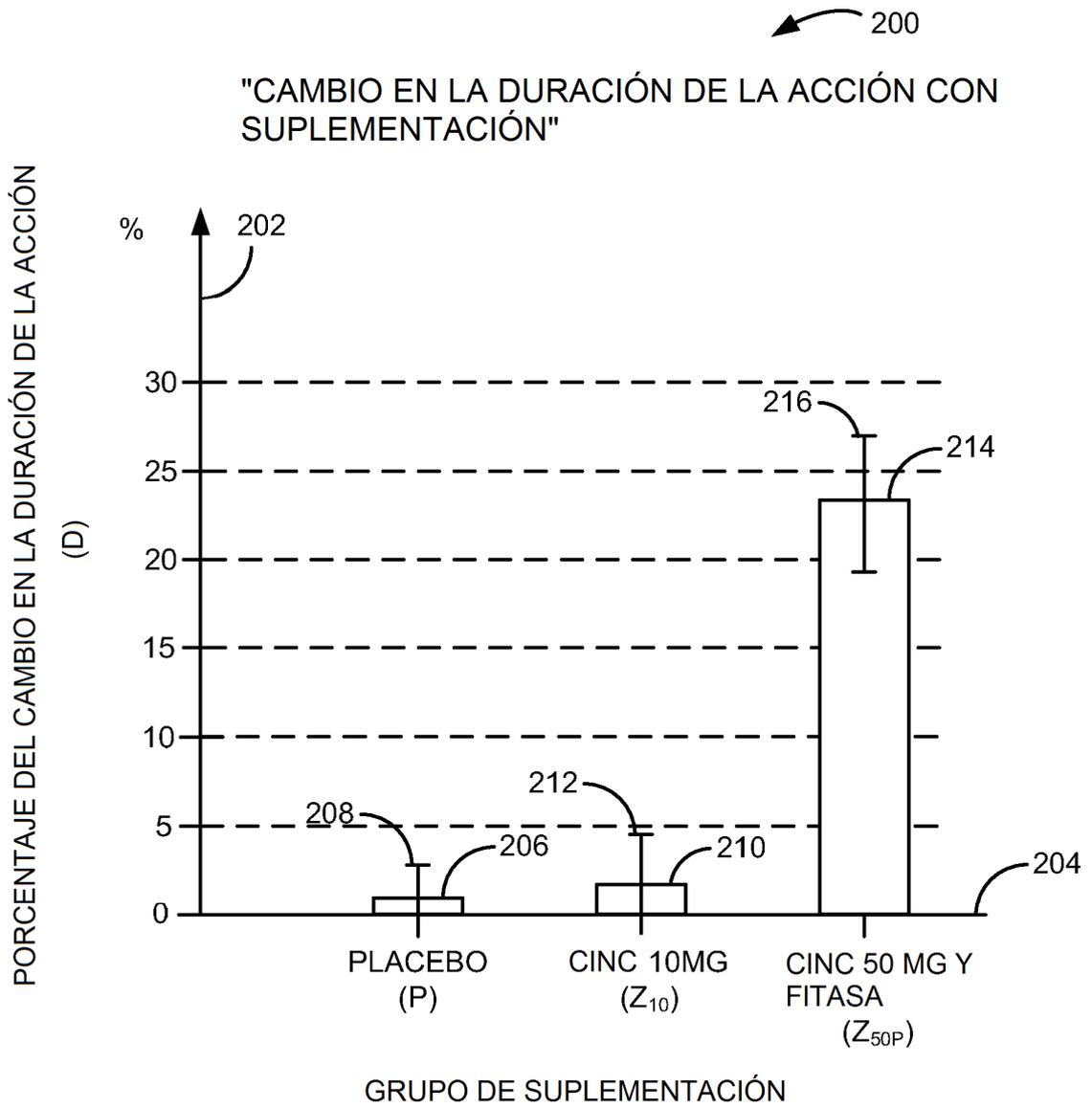


Figura 2

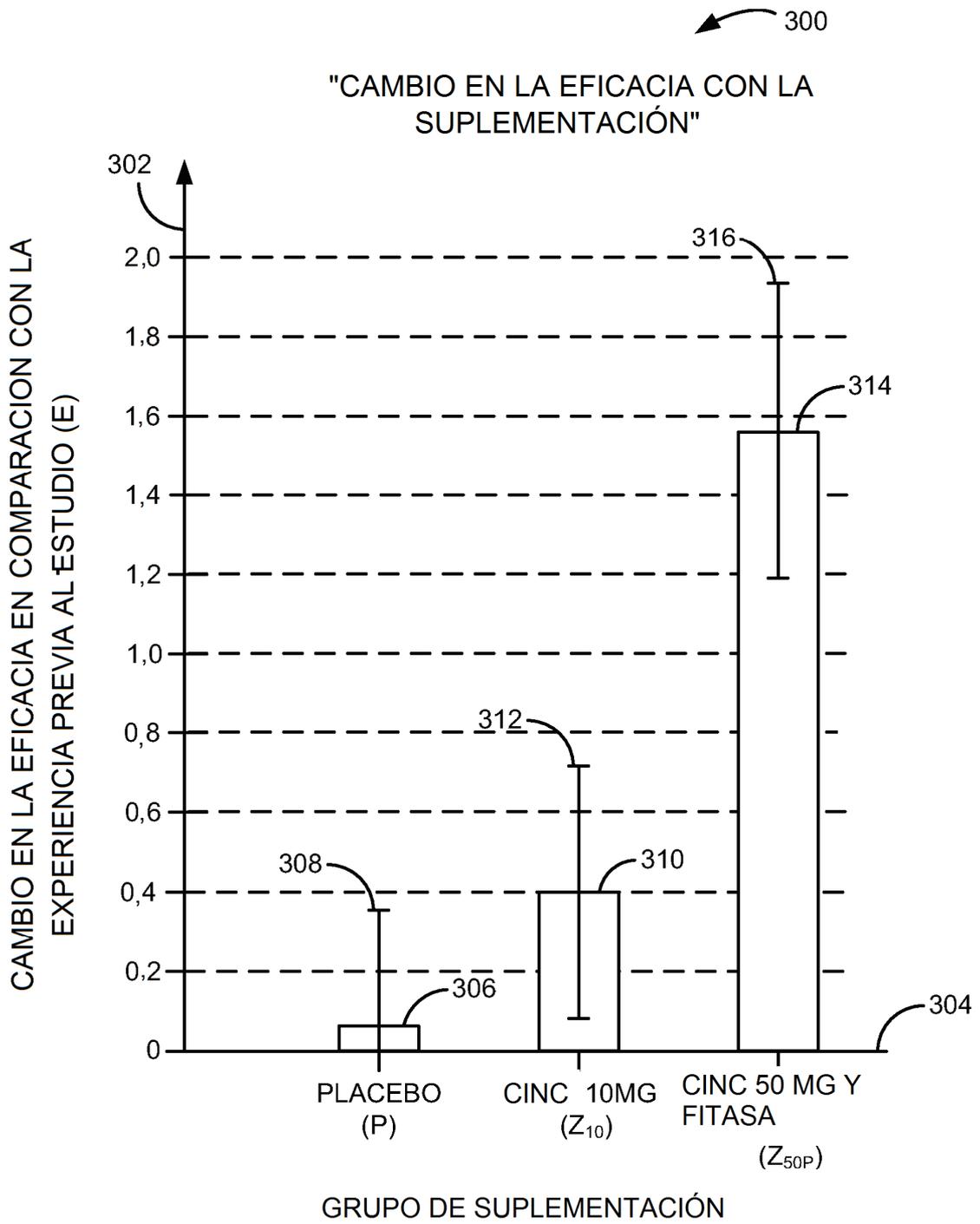


Figura 3