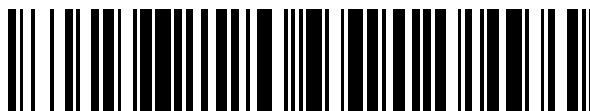


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 951**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2016** **PCT/IB2016/052280**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016** **WO16170501**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2016** **E 16725920 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019** **EP 3285800**

54 Título: **Nuevo uso terapéutico de la neurotoxina botulínica serotipo A**

30 Prioridad:

24.04.2015 IT UB20150271

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

26.05.2020

73 Titular/es:

**CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
(100.0%)**

**Piazzale Aldo Moro 7
00185 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**MARINELLI, SARA;
PAVONE, FLAMINIA;
LUVISETTO, SIRO y
VACCA, VALENTINA**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 762 951 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

Nuevo uso terapéutico de la neurotoxina botulínica serotipo A

5 La presente invención se refiere a un nuevo uso terapéutico de la neurotoxina botulínica serotipo A.

La neurotoxina botulínica (BoNT), producida por la bacteria anaeróbica *Clostridium botulinum*, consiste en una cadena pesada de aminoácidos (HC = cadena pesada) de 100 kDa y una cadena ligera (LC = cadena ligera) de 50 kDa unidas entre sí mediante un puente disulfuro. La integridad de este enlace es esencial para la actividad del complejo, haciendo que sea extremadamente sensible a factores ambientales.

La neurotoxina botulínica, en sus diferentes serotipos (A-G), se ha usado en la práctica clínica desde hace varios años para los síndromes y las patologías más variados: en el tratamiento de patologías musculares, síndromes de dolor y para el tratamiento de síntomas de enfermedades neurodegenerativas. Además, su uso en cosmética ya está ampliamente extendido.

Actualmente no se entiende completamente el mecanismo general mediante el cual BoNT puede actuar sobre tal amplia gama de enfermedades, pero se sabe que esta neurotoxina puede bloquear de manera reversible la liberación de muchos neurotransmisores/neuromoduladores a partir de las terminaciones nerviosas. De hecho, actúa cortando diversos componentes del complejo de proteína denominado SNARE. Este último, presente en todas las células, es esencial en el proceso de exocitosis cuando deben anclarse las vesículas sinápticas a la membrana sináptica desde la cual se liberarán los neurotransmisores. El bloqueo de la formación del complejo SNARE impide la exocitosis y de ese modo se inhibe la transmisión.

25 Recientemente, se ha centrado la atención en la capacidad de las neurotoxinas botulínicas no solo para bloquear la acetilcolina sino también diversos otros neurotransmisores, tales como glutamato, GABA y neuropéptidos, tales como SP y CGRP.

La cadena pesada de la neurotoxina botulínica es particularmente importante para la penetración de la misma al interior de las terminaciones axonales. Tras la unión de la cadena pesada con las proteínas de axón terminal, la neurotoxina puede entrar en las neuronas mediante endocitosis. La unión de la cadena pesada se produce con el receptor de proteína SV2, cuya expresión se aumenta cuando la sinapsis es más activa. La cadena ligera puede salir de las vesículas endocíticas y alcanzar el citoplasma. La cadena ligera de neurotoxina tiene actividad proteasa.

La neurotoxina botulínica serotipo A (BoNT/A) degrada de manera proteolítica la proteína SNAP-25, un tipo de proteína de SNARE. La proteína SNAP-25 se requiere para la liberación de los neurotransmisores a partir de los axones terminales. En particular, la neurotoxina botulínica degrada SNARE impidiendo la liberación de los neurotransmisores en las sinapsis.

La neurotoxina botulínica (BoNT) es una potente toxina biológica que se usa ampliamente en la práctica clínica para el tratamiento de las enfermedades más variadas, incluyendo distonías, tales como espasticidad debido a lesión de la médula espinal, cefaleas y trastornos de hiperactividad de la vejiga.

45 Más recientemente, BoNT ha provocado interés en el tratamiento de síndromes de dolor.

Los presentes inventores mostraron anteriormente que la neurotoxina botulínica serotipo A (BoNT/A) contrarresta eficazmente el dolor neuropático provocado por lesión nerviosa. De hecho, BoNT/A tiene propiedades analgésicas y antiinflamatorias debido a su capacidad para bloquear la liberación de factores proinflamatorios, tales como sustancia P y glutamato. También puede transportarse de manera retrógrada y actuar sobre células de la glía (células de Schwann, astrocitos y microglía), así como sobre neuronas (Marinelli S, Vacca V, Ricordy R, Ugenti C, Tata AM, *et al.* (2012) The Analgesic Effect on Neuropathic Pain of Retrogradely Transported botulinum Neurotoxin A Involves Schwann Cells and Astrocytes. PLoS ONE 7(10): e47977).

55 Se encuentra una revisión de los usos clínicos de neurotoxinas botulínicas y sus mecanismos de acción en Sheng Chen, Toxins 2012, 4, 913-939.

En cuanto a la bibliografía de patentes relacionada con neurotoxinas botulínicas y sus usos terapéuticos, se destaca la siguiente técnica anterior.

La patente estadounidense US 7.964.199 describe una composición farmacéutica que comprende una neurotoxina botulínica seleccionada de serotipos A, B, C, D, E, F o G o una mezcla de dos de las neurotoxinas botulínicas anteriores, para su uso en el tratamiento terapéutico de un trastorno neurológico seleccionado de distonía, tortícolis espasmódica, blefaroespasmó, espasticidad, migrañas, lumbociática, trastornos de la médula espinal e hipersalivación.

A Catz *ET AL*, "M I N E R V A Repeated botulinum toxin injections can improve mobility in patients with spinal cord lesions", (20070101) y el documento EP2072057 muestran que la neurotoxina botulínica puede mejorar la movilidad en pacientes que padecen espasticidad provocada por lesión de la médula espinal. La solicitud de patente internacional WO 2006/013357 describe una composición o medicamento que comprende la neurotoxina botulínica serotipo A2 y un tensioactivo, para su uso en el tratamiento de trastornos oftalmológicos, trastornos del movimiento, trastornos de ORL, trastornos gastrointestinales, trastornos urogenitales, trastornos dermatológicos, dolor, trastornos inflamatorios, trastornos secretores, trastornos respiratorios, trastornos hipertróficos, trastornos articulares, trastornos endocrinos, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades proliferativas, lesiones por traumatismo y trastornos veterinarios.

La solicitud de patente internacional WO 2009/80313 describe el uso de BoNT/A en la terapia para espasticidad debida a traumatismo de la médula espinal y cerebrovascular. El uso de la neurotoxina botulínica serotipo A para el tratamiento de espasticidad también se describe en la solicitud de patente estadounidense US 2010/0124559.

Una de las características destacadas de las neurotoxinas botulínicas, en particular de la neurotoxina botulínica serotipo A, es la duración de acción en pacientes (desde 2 hasta 6 meses) a concentraciones muy bajas, en el intervalo de fM o pM. Aunque los mecanismos de la persistencia del efecto no quedan claros, se mostró que la duración de la actividad enzimática intracelular de la neurotoxina botulínica serotipo A en neuronas de médula espinal de rata era de al menos 10 meses. Esta característica da a la neurotoxina botulínica serotipo A una ventaja considerable en comparación con fármacos comunes, que necesitan administrarse de manera continua para que se mantenga el efecto terapéutico.

Solo están disponibles actualmente en el mercado cinco preparaciones farmacéuticas que contienen la neurotoxina botulínica, cuatro de las cuales contienen BoNT serotipo A (Botox®, Dysport®, Xeomin® y CBTXA), y una que contiene BoNT serotipo B (Myobloc®/NeuroBloc®). El proceso de aprobación es extremadamente complejo y varía de una preparación a otra y de un país a otro. Actualmente, CBTXA solo se comercializa en China y hay poca información disponible sobre este producto. Xeomin® se aprobó recientemente en Alemania. La única preparación comercializada de BoNT/B (Myobloc®/NeuroBloc®) acaba de aprobarse para distonía cervical (CD) y solo en unos pocos países. Su uso se limita a pacientes que han desarrollado anticuerpos neutralizantes contra preparaciones de BoNT/A.

Botox® es la preparación más ampliamente aceptada y extendida en el mundo, seguida por Dysport® que, sin embargo, aún no se ha aprobado en los Estados Unidos de América.

Tal como se describe en mayor detalle a continuación, los presentes inventores han encontrado ahora sorprendentemente que la neurotoxina botulínica serotipo A es eficaz en el tratamiento terapéutico de parálisis provocada por lesión de la médula espinal.

Esta observación es bastante sorprendente a la luz de las actividades terapéuticas conocidas hasta ahora de la neurotoxina botulínica, tales como en particular el tratamiento de espasticidad.

Por tanto, un objeto de la presente invención es la neurotoxina botulínica serotipo A para su uso en el tratamiento terapéutico de parálisis provocada por lesión de la médula espinal tal como se define en la reivindicación 1 adjunta. En una realización preferida, la parálisis provocada por lesión de la médula espinal es paraplejia o tetraplejia.

También está dentro del alcance de la presente invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica serotipo A y al menos un portador, excipiente o diluyente, farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento terapéutico de parálisis provocada por lesión de la médula espinal tal como se define en la reivindicación 8 adjunta. En una realización preferida, la parálisis provocada por lesión de la médula espinal es paraplejia o tetraplejia.

Características adicionales de la invención se identifican en las reivindicaciones dependientes adjuntas, que forman una parte integrante de la presente descripción.

En una realización preferida de la presente invención, la neurotoxina botulínica serotipo A se selecciona del grupo que consiste en neurotoxina botulínica serotipo A1 y neurotoxina botulínica serotipo A2.

En otra realización preferida, el tratamiento terapéutico comprende administrar a un paciente humano una cantidad farmacéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica serotipo A. Según esta realización, una cantidad farmacéuticamente eficaz de neurotoxina botulínica serotipo A está en el intervalo de 75 U - 360 U.

Debe entenderse que las dosis terapéuticamente eficaces de neurotoxina botulínica varían dependiendo de la preparación particular de la neurotoxina usada. Aunque ambos de los dos productos comerciales más ampliamente extendidos contienen serotipo A (Botox® y Dysport®), una unidad de Botox® no es equivalente a una unidad de Dysport®. Basándose en estudios disponibles, se estableció que la razón de dosis de

Botox®:Dysport® está en el intervalo de 1:3 a 1:5. Se estima que la razón de dosis para Botox®:Xeomin® es de 1:1.

Por tanto, resulta útil recordar que la dosis de neurotoxina indicada para cada preparación se refiere exclusivamente a esa preparación específica.

Con frecuencia se usa la dosis de neurotoxina relacionada con Botox® como valor de referencia.

Por tanto, en la presente memoria descriptiva, la dosis farmacéuticamente eficaz de BoNT/A se expresa como unidades (U) relacionadas con Botox®.

La neurotoxina botulínica serotipo A puede administrarse como una única dosis o como una dosis acumulativa, dividida a lo largo de un periodo de tiempo predeterminado para optimizar el efecto terapéutico. La determinación del régimen administración se encuentra dentro de las habilidades de un experto en la técnica.

La neurotoxina botulínica serotipo A puede administrarse de cualquier manera adecuada, pero el modo de administración preferido es mediante inyección. En una realización particularmente preferida, la neurotoxina botulínica serotipo A se administra por vía intratecal, más preferiblemente mediante inyección en la zona vertebral inmediatamente caudal con respecto a la zona afectada por la lesión de la médula espinal.

La siguiente sección experimental se proporciona únicamente con fines de ilustración y no limita el alcance de las reivindicaciones tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Sección experimental

En la presente invención se usó un modelo murino de lesión de la médula espinal, que imita con precisión el daño tisular resultante de un traumatismo mecánico directo y permite reproducir las características de diversas enfermedades humanas provocadas mediante lesión de la médula espinal ("lesión de la médula espinal", SCI), incluyendo la ausencia total de recuperación motora.

En primer lugar, se llevaron a cabo experimentos preliminares con ratones CD1 machos y hembras, con el fin de identificar los parámetros correctos que podían inducir una SCI grave, según se clasifica en la escala BMS ("escala de ratón de Basso", descrita en detalle a continuación) e identificar los sujetos más adecuados. Los resultados de estos experimentos se notifican en la tabla 1.

Tabla 1

	PUNTAS	TIEMPO DE RESIDENCIA	VELOCIDAD	PROFUNDIDAD
LEVE	Redondeada 1-2	300/500 ms	3 m/seg	2,5-3 mm
MODERADO	Redondeada 3	500/600 ms	3 m/seg	3,5-5 mm
GRAVE	Redondeada 4	600/1000 ms	3 m/seg	5 mm

Los presentes inventores demostraron que la neurotoxina botulínica serotipo A representa un tratamiento eficaz para parálisis provocada por lesión de la médula espinal (SCI).

Aunque el daño inicial producido por SCI puede atribuirse directamente al traumatismo (hemorragia, rotura de membrana, daño vascular), la lesión fisiopatológica final es mucho mayor que la detectable en las primeras horas tras el traumatismo. Se cree que la extensión del daño se debe a la activación de una serie de acontecimientos adversos que conducen a disfunción y muerte celular. Esta cascada de acontecimientos destructivos inducidos por lesión se define como lesión secundaria. Estos acontecimientos implican a astrocitos, que desempeñan un papel en todas las aflicciones del sistema nervioso central y están implicados en la neuroinflamación.

Tras la SCI, los astrocitos contribuyen al entorno inhibitor dentro de la médula espinal lesionada: se producen proliferación e hipertrofia de la misma posteriores alrededor del sitio de la lesión. Los astrocitos reactivos forman cicatrización de la astrogliá que actúa como barrera frente a la regeneración de axones. Según observaciones opuestas, la formación de cicatrización mediante astrocitos es esencial para proporcionar protección a las neuronas tras una lesión del sistema nervioso central, de modo que debe de haber una reacción equilibrada, posiblemente modulada de manera farmacológica, para fomentar la regeneración de axones.

Además, la SCI inicia cascadas bioquímicas que conducen a un aumento en la concentración extracelular de glutamato, dando como resultado acontecimientos excitotóxicos mediados por el receptor de glutamato. Tras esta liberación, proteínas de transporte específicas retiran rápidamente el glutamato extracelular de la hendidura sináptica. La retirada de glutamato en exceso evita la acumulación en condiciones normales. Sin embargo, con SCI, la concentración de glutamato extracelular aumenta hasta niveles neurotóxicos. La excitotoxicidad se refiere a la capacidad del glutamato para destruir neuronas debido a una transmisión sináptica excitante prolongada.

En el sistema nervioso central, la apoptosis implica principalmente a células no neuronales tales como oligodendrocitos (OD). Las células apoptóticas están en un número mayor y más cerca del epicentro de la lesión. La apoptosis de OD conduce a desmielinización crónica, provocando por tanto neurodegeneración anterógrada. Además, la SCI induce expresión reducida de varias proteínas de mielina. Se espera que la recuperación de OD y la conservación de mielina tengan un gran efecto sobre el desenlace funcional tras la SCI.

La evidencia obtenida por los presentes inventores, descrita en detalle a continuación, indica que BoNT/A puede ser un tratamiento eficaz de parálisis provocada por SCI ya que: (i) puede proteger a las células neuronales frente a la excitotoxicidad tras la lesión, gracias a su capacidad para bloquear la liberación de glutamato; ii) puede reducir los astrocitos reactivos con el fin de equilibrar la cicatrización de la astrogliosis, dada su capacidad para reducir la inflamación y actuar directamente sobre los astrocitos; iii) puede estimular la proliferación de OD con el fin de reemplazar los OD apoptóticos.

Efectos de BoNT/A sobre la regeneración de la médula espinal y la recuperación locomotora (experimentos)

El procedimiento experimental considera la observación de comportamiento y evaluación de recuperación motora con la escala BMS (Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG (2006) Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma* 23, 635-659) y la restauración de la sensibilidad (prueba de sacudida de la cola) en el modelo murino de SCI en ratones a los que se les inyectaron por vía intratecal BoNT/A o solución salina (i.t. - espinal) dentro del plazo de 1 hora desde la lesión. Se realizó un análisis inmunohistoquímico 7, 30 y 60 días tras la SCI para evaluar:

- el efecto a largo plazo de BoNT/A;
- la reducción de la cicatrización de la astrogliosis mediante BoNT/A;
- la reducción de la apoptosis mediante BoNT/A;
- la reducción de los acontecimientos inflamatorios mediante BoNT/A;
- el fomento de la remielinización y la regeneración mediante BoNT/A.

A continuación se describen en detalle los experimentos realizados con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra la recuperación locomotora tras la inyección intratecal de BoNT/A (A). Se administró BoNT/A (15 pg / 5 microlitros) dentro del plazo de 1 hora tras la cirugía y se realizó la primera observación de comportamiento 24 horas después (D1). Aunque los ratones a los que se les inyectó solución salina nunca se recuperaron, los animales tratados con BoNT/A mostraron una mejora significativa en la paraplejia ($p < 0,0001$) tan solo dos días (D2) tras la SCI y alcanzaron una recuperación motora total (puntuación de BMS de 9) 30 días tras la lesión espinal. Recuperación de la sensibilidad tras la inyección intratecal de BoNT/A (B). La administración de BoNT/A dio como resultado una restauración gradual y significativa (D2-D3 $p < 0,05$; D4-D7 $p < 0,001$; ratones tratados con BoNT/A frente a solución salina y frente a nivel inicial - BL) del umbral térmico hasta la recuperación completa (D10 $p < 0,0001$) que persiste hasta la observación de comportamiento final (D30). En cambio, los ratones tratados con solución salina tras la cirugía alcanzaron el límite de umbral de latencia (10 s) y nunca mostraron una mejora de la sensibilidad térmica.

La figura 2 muestra imágenes confocales de muestras tisulares proximales (prox) y distales (dist) con respecto a la lesión, extraídas 30 (D30, panel A) y 60 (D60, panel B) días tras la lesión. La expresión de GFAP reveló una gran astrogliosis tanto proximal como distal a la lesión en ratones tratados con solución salina, mientras que en ratones tratados con BoNT/A solo podía detectarse en la zona proximal. La expresión de cl-SNAP25 destacó la acción a largo plazo de BoNT/A al D30 y D60 tanto en el sitio proximal como en el distal y la localización conjunta con GFAP confirmó que los astrocitos eran una diana de BoNT/A.

La figura 3 muestra imágenes confocales de muestras tisulares proximales (prox) y distales (dist) con respecto a la lesión, extraídas 30 (D30, panel A) y 60 (D60, panel B) días tras la lesión. La expresión de NeuN mostró neuronas intactas en la zona proximal a la lesión en ratones tratados con BoNT/A, mientras que en ratones tratados con solución salina los cuerpos celulares intactos no eran visibles (datos no mostrados). La expresión de cl-SNAP25 destacó la acción a largo plazo de BoNT/A al D30 y D60 tanto en el sitio proximal como en el distal y la localización conjunta con NeuN confirmó que las neuronas son una diana de BoNT/A.

La figura 4 muestra el análisis de fluorescencia de la expresión de GFAP y OLIG-1 30 días tras la lesión espinal. El gráfico muestra una reducción significativa ($p < 0,0001$) de la expresión de GFAP tanto en el asta dorsal (DH) como en el asta ventral (VH) proximales y distales al sitio de la lesión en comparación con ratones tratados con solución salina. La evaluación de la fluorescencia de OLIG-1 muestra un aumento significativo ($p < 0,05$) de la

expresión de OLIG-1 en la parte distal de la médula tanto en el DH como en el VH en animales tratados con BoNT/A.

La figura 5 muestra la expresión de OLIG-1 y cl-caspasa en ratones tratados con solución salina y con BoNT/A 30 días tras la SCI proximal (A) y distal (B) al sitio de la lesión. La cl-caspasa es un marcador de la apoptosis que se expresa particularmente en ratones tratados con solución salina y se reduce fuertemente mediante la administración de BoNT/A tanto a nivel distal como proximal en ratones con SCI. La tinción de cl-caspasa en oligodendrocitos es particularmente evidente en ratones tratados con solución salina, mientras que ratones con SCI tratados con BoNT/A mostraron oligodendrocitos intactos con poca cl-caspasa.

La figura 6 muestra la expresión de NeuN y cl-caspasa en ratones tratados con solución salina y con BoNT/A 30 días tras la SCI proximal (A) y distal (B) al sitio de la lesión. NeuN es un marcador de neuronas que permite observar la presencia de neuronas intactas en la zona tanto proximal (figura 6a) como distal (figura 6b) en ratones tratados con BoNT/A, mientras que en ratones tratados con solución salina los cuerpos celulares intactos no eran detectables en ninguna de las zonas (figuras 6a y 6b).

El gráfico en la figura 6c muestra una reducción significativa ($p < 0,0001$) de la expresión de cl-caspasa tanto en el asta dorsal (DH) como en el asta ventral (VH) proximales y distales al sitio de la lesión en comparación con ratones tratados con solución salina.

Ejemplo 1

ANIMALES: Se usaron ratones hembra CD1 (Charles River Labs, Como, Italia) con un peso inicial de aproximadamente 30-35 g. Tras su llegada al laboratorio (al menos 2 semanas antes de los experimentos), se alojaron los ratones en jaulas de plástico transparentes convencionales, en grupos de 4 por jaula, en condiciones estándar para animales (acceso libre a comida y agua, ciclo de luz/oscuridad de 12:12, a una temperatura ambiente de 23°C). Los experimentos se llevaron a cabo entre las 11:00 am y la 1:00 pm. Los animales se trataron y se manipularon según las directrices del Comité para Investigación y Asuntos Éticos de IASP (PAIN® 1983, 16, 109-110) y las leyes italianas y europeas (DLG n.º 26 del 04/03/2014, directiva europea 2010/63/EU) sobre la protección de animales usados para investigación científica.

CIRUGÍA: con el fin de provocar la lesión de la médula espinal, se sometieron los animales a anestesia profunda con una mezcla 1:1 de Rompun (Bayer 20 mg/ml; 0,5 ml/kg) y Zoletil (100 mg/ml; 0,5 ml/kg), se afeitó el pelo del lomo, se desinfectó el lomo con Betadine y se realizó una incisión para exponer la columna vertebral. Se montaron los animales en un aparato estereotáctico con adaptadores espinales conectados a un dispositivo de impacto cortical electrónico denominado "PinPoint" (Stoelting), que permite la aplicación, con precisión exacta, de una fuerza puntual en la zona que va a lesionarse, y se mantuvieron a 37°C a lo largo de toda la cirugía.

Con el fin de obtener un traumatismo espinal grave, se establecieron los siguientes parámetros: - punta media, redondeada y plana (n.º 4); - velocidad de 3 m/s; - profundidad de 5 mm; - tiempo de residencia de 800 ms. Se lesionó la médula espinal a nivel torácico 10 (T10) y no se realizó laminectomía.

Para identificar posibles casos anómalos, se usó el análisis de parámetros de impacto gráficos, realizado con el software PinPoint. También se llevaron a cabo análisis de comportamiento para corroborar las diferencias en la gravedad de las lesiones dentro de los grupos. Las lesiones leves se excluyeron del estudio basándose en estos criterios.

Como tratamiento posoperatorio, se vació la vejiga mediante presión abdominal manual dos veces al día hasta la restauración de la función de la vejiga, y se mantuvo el tratamiento con antibiótico profiláctico (Baytril 2,5 mg/kg) durante 1 semana. En las primeras 24 horas se mantuvieron los animales a 37°C con una placa de calentamiento, se rehidrataron con 1 ml de solución de lactato de Ringer. Para garantizar la alimentación, se colocó comida húmeda en la jaula.

TRATAMIENTOS: para la inyección intratecal, se inyectó un volumen de 5 µl de solución salina (NaCl al 0,9%) o de disolución de BoNT/A (0,937-15 pgtox/ratón) en los ratones a nivel espinal L1/L2 usando una microjeringa dentro del plazo de 1 hora desde la SCI.

PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO:

La escala de ratón de Basso (BMS). Se evaluó la función locomotora de las patas traseras en el campo abierto para todos los grupos de tratamiento. Se evaluaron los ratones por dos evaluadores ciegos. La puntuación de BMS (Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG (2006) Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. J Neurotrauma 23, 635-659) va de 0-9, donde 0 indica parálisis completa y 9 indica movimiento normal de las patas traseras. Se calculó el promedio del rendimiento de la pata derecha y del de la izquierda para obtener la puntuación de BMS. Se sometieron los ratones a prueba para determinar deficiencias funcionales de las patas

traseras a 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 17, 20, 30 (n = 8/11 por grupo) tras la SCI. Solo los ratones con puntuaciones de BMS entre 0-3, tras la cirugía, se asignaron al grupo de experimentación clasificado como "grave" y se usaron para los siguientes análisis.

- 5 Prueba de sacudida de la cola. Se sometieron los ratones a prueba en las mismas condiciones, es decir, a las 7:00 a.m. - 9:00 a.m. tras 15 minutos de aclimatación. El entorno en el que se llevó a cabo la prueba se lavó exhaustivamente entre un animal y otro para eliminar cualquier olor relacionado con señales de estrés. Se colocó una fuente de calor radiante con una luz de localización (Ugo Basile) en la cola y se determinó la latencia hasta la retirada. Se usó un tiempo de corte de 10 segundos para evitar daño tisular. Se registró la latencia hasta la retirada o hasta una sacudida de la cola alejándola de la fuente de calor con un temporizador incorporado, que
- 10 mostró el tiempo de reacción en incrementos de 0,01 segundos. Se llevaron a cabo las pruebas tres veces con un descanso de 5 minutos entre secuencias, y se registró la latencia promedio. Todas las pruebas se llevaron a cabo por investigadores ciegos en cuanto al tratamiento.

15 Efectos de BoNT/A sobre la paraplejia

El primer día tras la cirugía, los animales a los que se les había administrado BoNT/A y aquellos a los que se les había administrado solución salina no tenían puntuaciones de BMS significativamente diferentes (figura 1A). Ninguno de los animales en ambos grupos mostró movimiento de las patas traseras. Tras 4 días desde la

20 cirugía, solo los animales tratados con BoNT/A mostraron una mejora en la función locomotora de las patas traseras, con puntuaciones en campo abierto significativamente superiores (>3 puntos en la escala BMS) en comparación con los tratados con solución salina ($p < 0,0001$). Tras 4 semanas desde la cirugía, los ratones tratados con BoNT/A habían recuperado completamente la función motora normal, mientras que los animales tratados con solución salina todavía estaban totalmente paralizados ($p < 0,0001$).

25 Los animales tratados con solución salina mostraron una ausencia total de sensibilidad térmica tras la SCI. Siempre alcanzaron el límite de umbral de latencia (10 s) y nunca se recuperaron durante el periodo de prueba TF (figura 1B). Por otro lado, los ratones tratados con BoNT/A ya comenzaron a restaurar el umbral térmico dos días tras la lesión y lo restauraron completamente en el día 20 ($p < 0,0001$).

30 Ejemplo 2

INMUNOHISTOQUÍMICA

35 Siete o 30 días tras la SCI, se sacrificaron tres ratones para cada grupo de experimentación para análisis inmunohistoquímico y se sometieron a perfusión con solución salina seguido por paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). Se extirpó la médula espinal torácica (T1-T13) de los ratones y se mantuvo en inmersión durante 48 horas en paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) tras la crioprotección con disolución de sacarosa al 30% (p/v) en PBS y se mantuvo a

40 -80°C . Se obtuvieron secciones de criostato de 40 μm . Para la tinción de SI doble, se incubaron diferentes secciones durante 48 horas a temperatura ambiente con anticuerpos primarios (véase la tabla 2) en Triton al 0,3%. Después se lavaron las secciones en PBS y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (véase la tabla). Se lavaron de nuevo las secciones en PBS y se incubaron durante 10 minutos con bisbencimida (Hoechst 33258, 1:1000, Jackson ImmunoResearch) para teñir los núcleos. Tras

45 lavar en PBS, se montaron las secciones en portaobjetos.

Tabla 2

ANTICUERPOS				
PRIMARIO	ESPECIE		PRODUCTO	MARCADOR
NeuN	Ratón, monoclonal	1:100	Millipore	Neuronas
Cd11b	Rata, monoclonal	1:100	AbDSerotec	Microglía/macrófagos
GFAP	Ratón, monoclonal	1:100	Sigma-Aldrich	Astrocitos
OLIG-1	Ratón, monoclonal	1:100	Santa-Cruz	Oligodendrocitos
clSNAP-25	Conejo, policlonal	1:100	Obsequio de Prof. C. Montecucco y Dr. O. Rossetto	Corte de SNAP-25
Casp-cl	Conejo, policlonal	1:100	Cell signaling	Apoptosis
MBP	Conejo, policlonal	1:100	Sigma-Aldrich	Mielina de SNC
SECUNDARIO				
Alexa Fluor 488	Burro, anti-ratón	1:100	Jackson ImmunoResearch	Verde
Cy2	Burro, anti-rata	1:100	Jackson ImmunoResearch	Verde
Rodamina	Cabra, anti-conejo	1:100	Jackson ImmunoResearch	Rojo

50 MICROSCOPIA CONFOCAL Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNOSENSIBLES

Se captaron imágenes de SI a bajo aumento (objetivo de 10X) y a alto aumento (objetivo de 63X) de secciones de médula espinal inmunoteñidas mediante microscopía de exploración con láser confocal usando un microscopio TCS SP5 (Leica Microsystems, Milán, Italia) conectado a instrumentos de diagnóstico con una cámara digital controlada mediante el software LAS AF lite de Leica Microsystems (descarga gratuita disponible en www.leica-microsystems.com).

Todos los análisis se realizaron en el modo de exploración secuencial para excluir solapamiento entre canales. Se realizaron cuantificaciones usando el software ImageJ (versión 1.41; National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos de América). Se contó automáticamente el número de células positivas para SI (núcleos) con la máquina de recuento de marcador, y después se calculó el promedio para cada grupo de ratones (n = 3/grupo). Se calculó la fluorescencia con el método de RGB (rojo, verde, azul), que convierte píxeles de RGB en valores de luminancia. Se consideraron 3 animales por grupo y para cada animal se seleccionaron aleatoriamente tres secciones y se analizaron por investigadores ciegos en cuanto al tratamiento.

Para todos los grupos, se analizaron por separado las secciones distal (2-3 mm rostrocaudal con respecto al epicentro de la lesión) y proximal (zona de impacto T9-T11) con respecto al sitio de la lesión y las astas dorsal (DH) y ventral (VH).

Ejemplo 2 A

Efecto a largo plazo de BoNT/A

Tras transportarse en el citosol de células neuronales, la cadena ligera (LC) de BoNT/A corta las proteínas de receptor SNAP (proteína de unión a NSF soluble) (SNARE) en el citosol conduciendo a la inhibición de la exocitosis de vesículas portadoras de neurotransmisores. Se mostró que LC/BoNTA estaba ubicada en las membranas de células neuronales. Estudios adicionales mostraron que la ubicación de LC/BoNTA en las membranas se debía a la unión de alta afinidad con su sustrato SNAP25 que está ubicado en las membranas. La cadena pesada es esencial para entrar en las terminaciones axonales, uniéndose al receptor de SV2, y para permitir la entrada de BoNT/A en neuronas a través del proceso de endocitosis. La cadena ligera, dentro de la célula, tiene actividad proteasa y degrada SNAP-25, lo cual se requiere para la formación del complejo SNARE y la posterior liberación vesicular de neurotransmisores a nivel sináptico.

Una de las características de las BoNT, particularmente de serotipo A, es la duración de acción, de 2-6 meses, en pacientes, a concentraciones en el intervalo de fM o pM. Los mecanismos de esta persistencia de los efectos aún no quedan claros. De cualquier modo, se mostró que la duración de la actividad enzimática intracelular de BoNT/A en neuronas de médula espinal de rata era de al menos 10 meses (Whitemarsh RC, Tepp WH, Johnson EA, Pellett S. (2014) Persistence of botulinum neurotoxin a subtypes 1-5 in primary rat spinal cord cells. PLoS One. 9(2):e90252). Esta característica da a la BoNT/A una ventaja en comparación con fármacos habituales, que necesitan administrarse de manera continua para que se mantengan sus efectos terapéuticos.

Gracias a este mecanismo de acción, BoNT/A, que corta SNAP-25, es extremadamente prometedora como tratamiento terapéutico para lesiones provocadas por SCI.

Evaluación de la presencia de SNAP25 cortada en la médula 30 y 60 días tras la SCI

Los inventores marcaron cl-SNAP25 en la médula espinal de ratones lesionados tratados con BoNT/A o solución salina, para comprobar si BoNT/A todavía estaba activa 30 y 60 días tras la administración i.t., qué células padecían envenenamiento por BoNT/A, y si la BoNT/A alcanzaba sitios distales al punto de inyección. Solo se detectó cl-SNAP25 en el tejido de ratones tratados con BoNT/A y estaba totalmente ausente de la médula espinal de ratones tratados con solución salina (figura 2A, B); los astrocitos y neuronas activados (figura 3A, B) eran ricos en cl-SNAP25 y la BoNT/A reducía la astrogliosis en la zona distal a la lesión.

Ejemplo II B

BoNT/A reduce la astrogliosis

El día treinta tras la SCI, en ratones, puede considerarse como el final de la fase subaguda/intermedia y el comienzo de la fase crónica. Tal como resulta evidente en ratones tratados con solución salina (figura 2 y figura 4), este periodo de transición presenta maduración/estabilización de la lesión, incluyendo formación continua de una cicatriz y desarrollo de quistes y/o siringomielia (cavidades tubulares patológicas en el organismo), y va acompañado por alteraciones en circuitos neuronales. Una respuesta astrocítica algo retrasada comienza en la fase subaguda (dentro del plazo de los primeros 7 días), durante la cual los astrocitos en la periferia de la lesión se vuelven hipertróficos y proliferan, lo cual se correlaciona con un aumento drástico en la expresión del filamento intermedio de astrocitos, GFAP. Estos astrocitos reactivos provocan el crecimiento de múltiples procesos citoplasmáticos grandes que se interconectan formando la cicatriz astrocítica (gliótica), particularmente

evidente en ratones tratados con solución salina (figura 2A), pero fuertemente reducida mediante tratamiento con BoNT/A (figura 2B). También la expresión de GFAP reveló esta diferencia significativa tanto en la parte proximal como en la distal del sitio de la lesión ($p < 0,001$; figura 3), demostrando la potente acción anti-astroglisis de BoNT/A tanto proximal como distal a la lesión.

5

Ejemplo II C

BoNT/A protege los oligodendrocitos y fomenta la remielinización (OLIG - MBP)

- 10 La tinción conjunta con OLIG-1 (30 días tras la SCI) mostró un drástico aumento de oligodendrocitos distróficos, a lo largo del epicentro de la lesión, en particular el marcador de oligodendrocitos estaba altamente ubicado conjuntamente con cl-caspasa 3, que es un indicador de muerte celular (figura 5). En ratones con SCI tratados con BoNT/A, eran evidentes unos pocos cambios morfológicos importantes. En particular, la tinción con OLIG-1 reveló cuerpos celulares intactos en la zona de epicentro, de manera diferente de la zona devastada observada
- 15 en ratones tratados con solución salina. Además, una alta expresión de OLIG-1, en comparación con animales no tratados (gráfico mostrado en la figura 4, supuestamente células precursoras de oligodendrocitos, OPC, y glía NG2) era evidente en el perímetro de la cavidad, que contiene residuos positivos para cl-caspasa 3 y tejido necrótico que forma una red densa alrededor de la misma.
- 20 Treinta días tras la SCI, la expresión de cl-caspasa 3 era drásticamente alta en ratones tratados con solución salina (figura 6C) tanto en la zona distal como en la proximal, mientras que el tratamiento con BoNT/A contrarrestó la apoptosis que, en la parte distal, era próxima al nivel encontrado en ratones no tratados ($p < 0,01$).
- 25 En esta fase, se produce un daño grave e irreversible en ratones tratados con solución salina: las neuronas proximales al epicentro de la lesión se colapsan (figura 6a) y los cuerpos neuronales están prácticamente ausentes de, o apenas pueden detectarse en, las zonas distales (figura 6b). En vez de eso, el tratamiento con BoNT/A permitió la protección de unas pocas neuronas frente a la muerte (figura 6a) en las inmediaciones de la zona de impacto y la protección de un gran número de las mismas en las distales (figura 6b).

REIVINDICACIONES

1. Neurotoxina botulínica serotipo A para su uso en el tratamiento terapéutico de parálisis provocada por lesión por traumatismo de la médula espinal resultante de traumatismo mecánico directo, en la que la lesión por traumatismo de la médula espinal da como resultado daño tisular **caracterizado por** (i) cicatrización de la astroglia, (ii) destrucción de neuronas provocada por excitotoxicidad, (iii) apoptosis de oligodendrocitos y desmielinización crónica, y en la que la parálisis incluye ausencia total de recuperación motora.
2. Neurotoxina botulínica serotipo A para su uso según la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en neurotoxina botulínica serotipo A1 y neurotoxina botulínica serotipo A2.
3. Neurotoxina botulínica serotipo A para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en la que la parálisis que incluye ausencia total de recuperación motora es paraplejia o tetraplejia.
4. Neurotoxina botulínica serotipo A para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el tratamiento terapéutico comprende administración intratecal de neurotoxina botulínica serotipo A.
5. Neurotoxina botulínica serotipo A para su uso según la reivindicación 4, en la que la administración intratecal se lleva a cabo mediante inyección en la zona vertebral inmediatamente caudal con respecto a la zona afectada por dicha lesión de la médula espinal.
6. Neurotoxina botulínica serotipo A para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el tratamiento terapéutico comprende administrar a un paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de la neurotoxina botulínica serotipo A, en la que el paciente es un ser humano.
7. Neurotoxina botulínica serotipo A para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la cantidad farmacéuticamente eficaz de neurotoxina botulínica serotipo A está en el intervalo de desde 75 unidades hasta 360 unidades.
8. Composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de neurotoxina botulínica serotipo A y al menos un vehículo, excipiente o diluyente, farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento terapéutico de parálisis provocada por lesión por traumatismo de la médula espinal resultante de traumatismo mecánico directo, en la que la lesión por traumatismo de la médula espinal da como resultado daño tisular **caracterizado por** (i) cicatrización de la astroglia, (ii) destrucción de neuronas provocada por excitotoxicidad, (iii) apoptosis de oligodendrocitos y desmielinización crónica, y en la que la parálisis incluye ausencia total de recuperación motora, en la que la parálisis incluye ausencia total de recuperación motora.
9. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en la que la neurotoxina botulínica serotipo A se selecciona del grupo que consiste en neurotoxina botulínica serotipo A1 y neurotoxina botulínica serotipo A2.
10. Composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 8 o 9, en la que la parálisis que incluye ausencia total de recuperación motora es paraplejia o tetraplejia.
11. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que la cantidad farmacéuticamente eficaz de neurotoxina botulínica serotipo A está en el intervalo de desde 75 unidades hasta 360 unidades.
12. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que se formula para su administración mediante inyección.
13. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, que se formula para su administración mediante inyección intratecal.

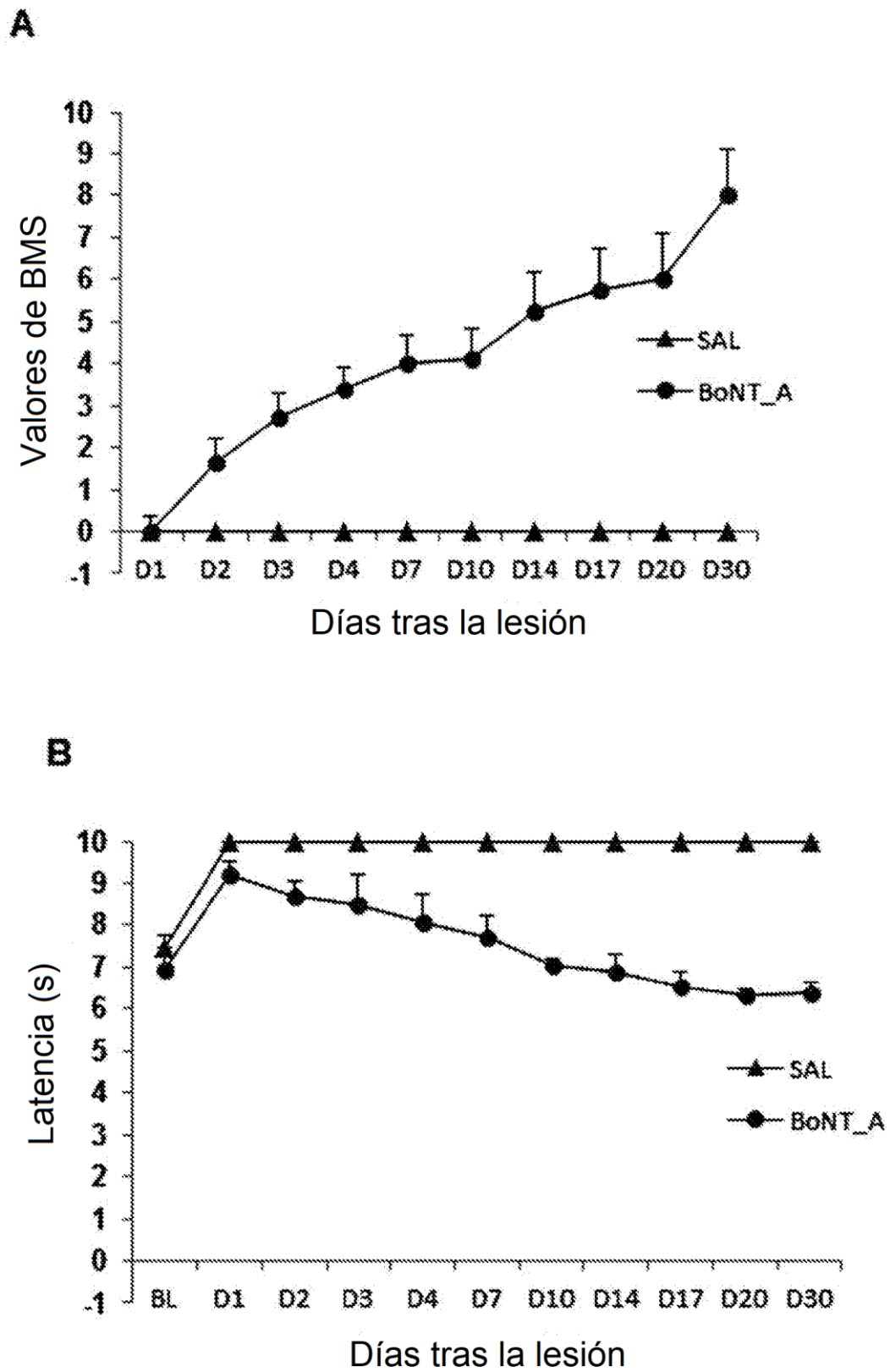


FIG.1

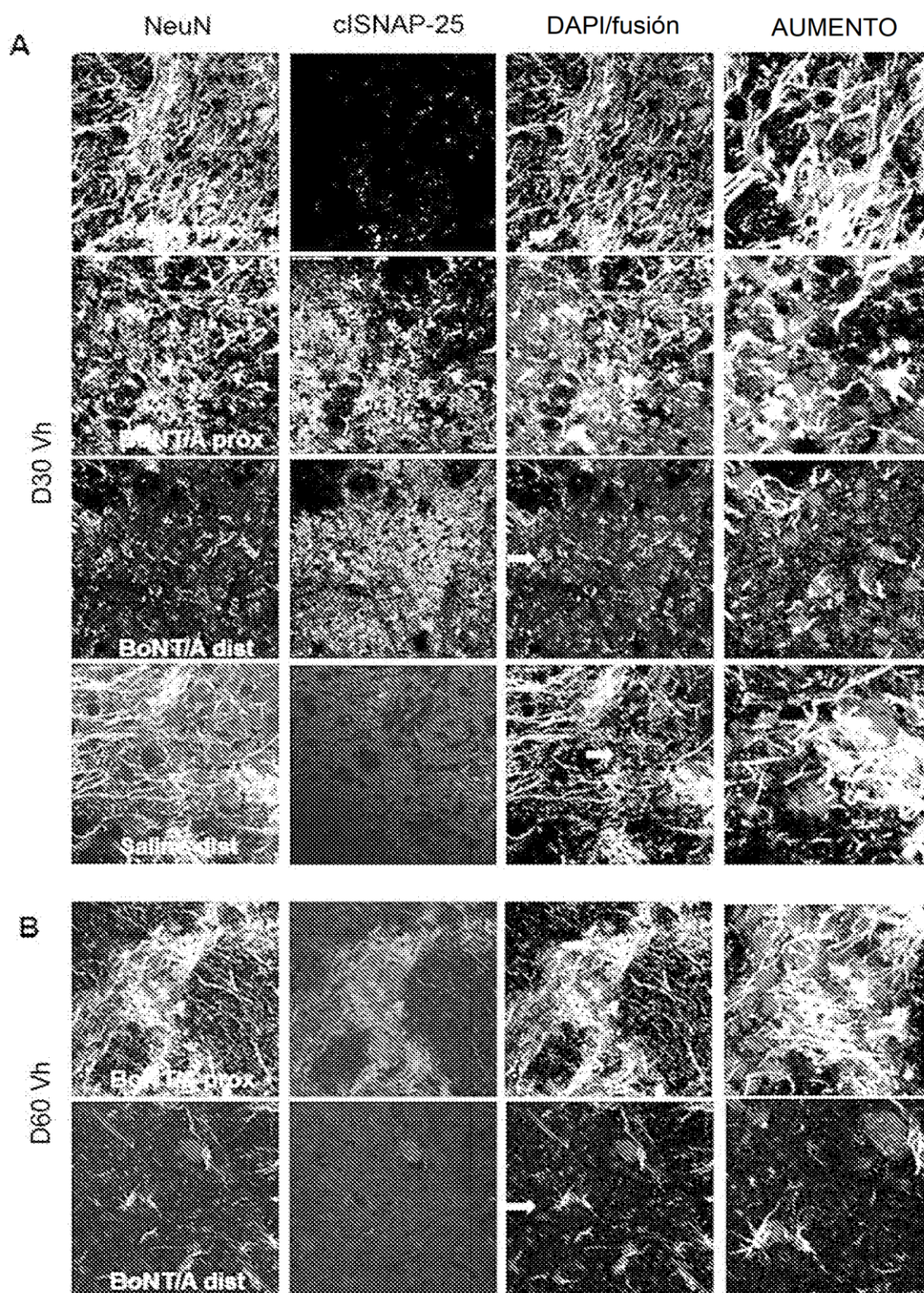


FIG. 2

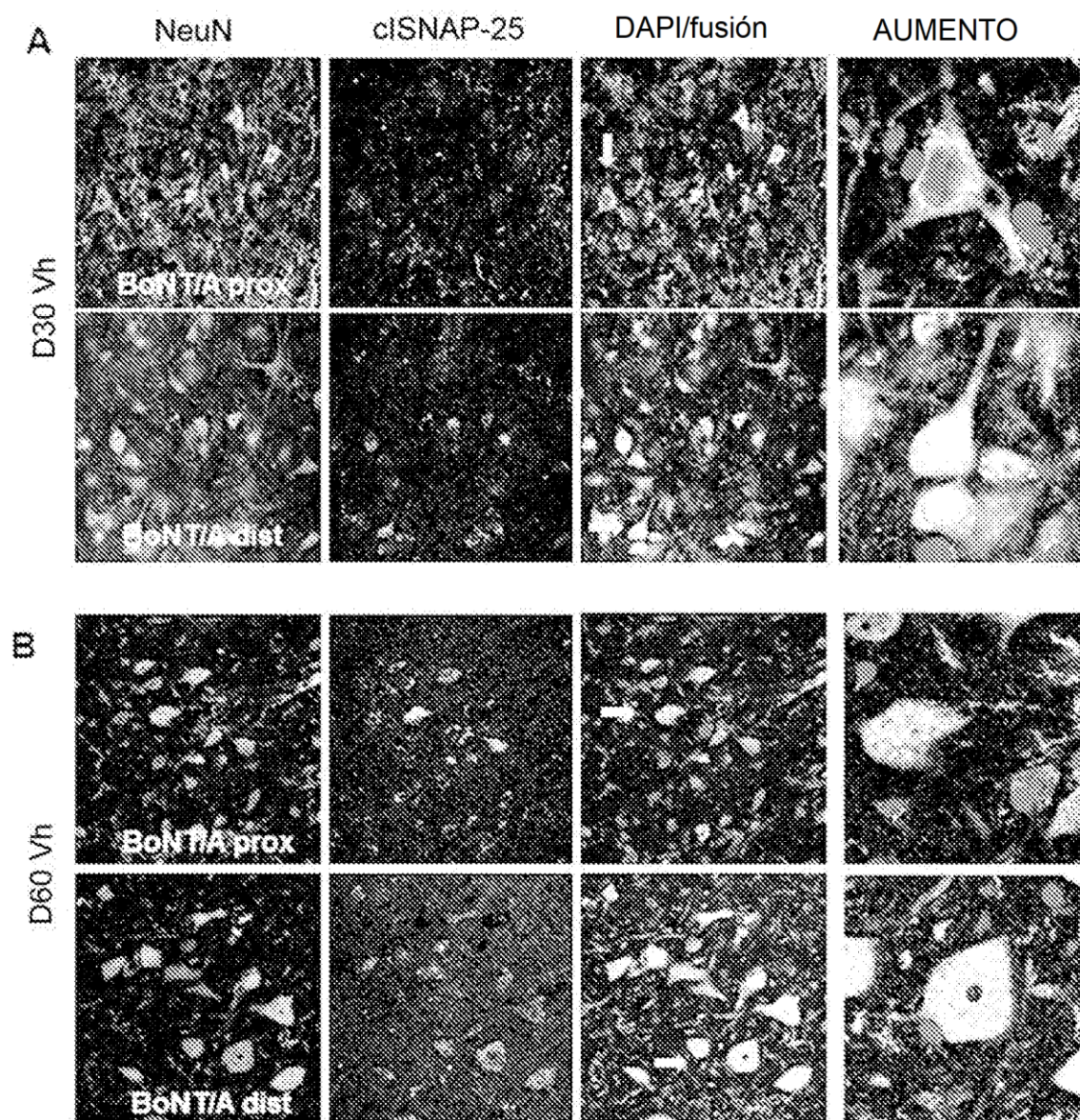


FIG.3

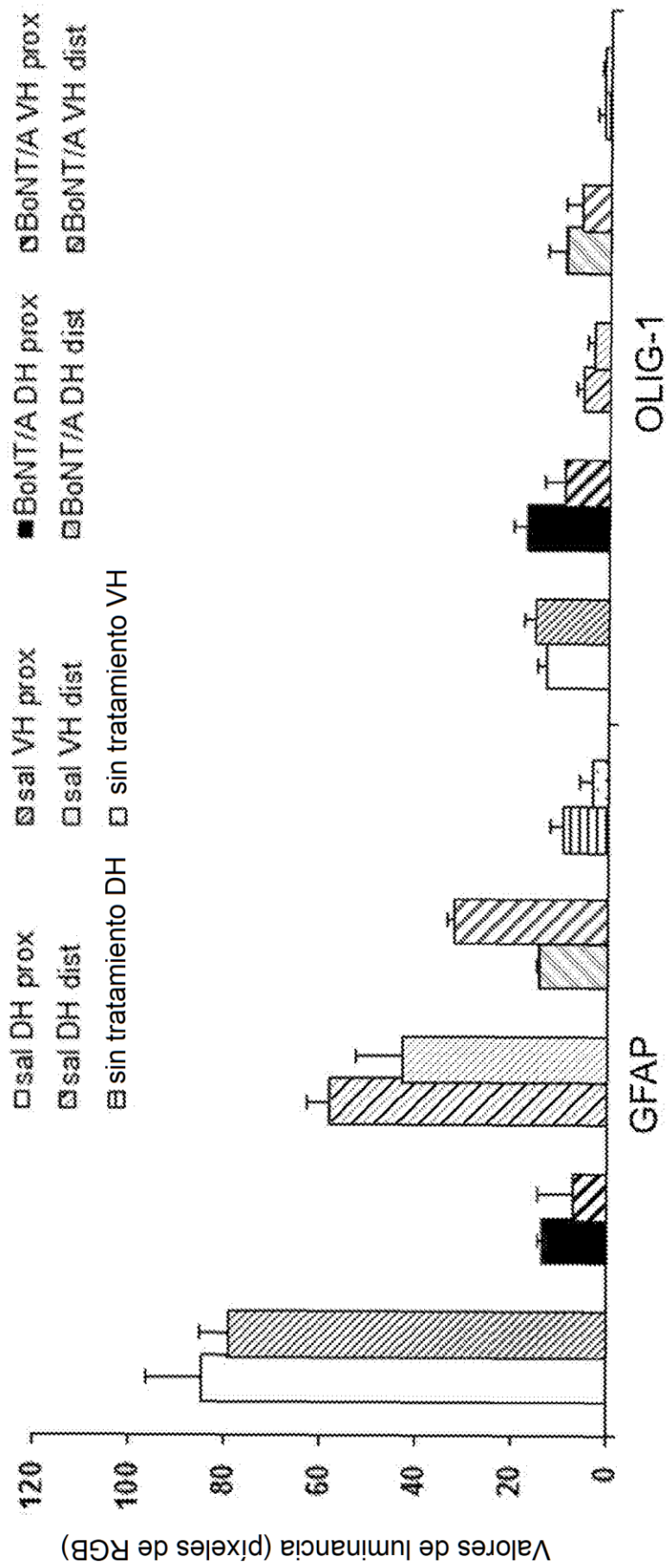


FIG.4

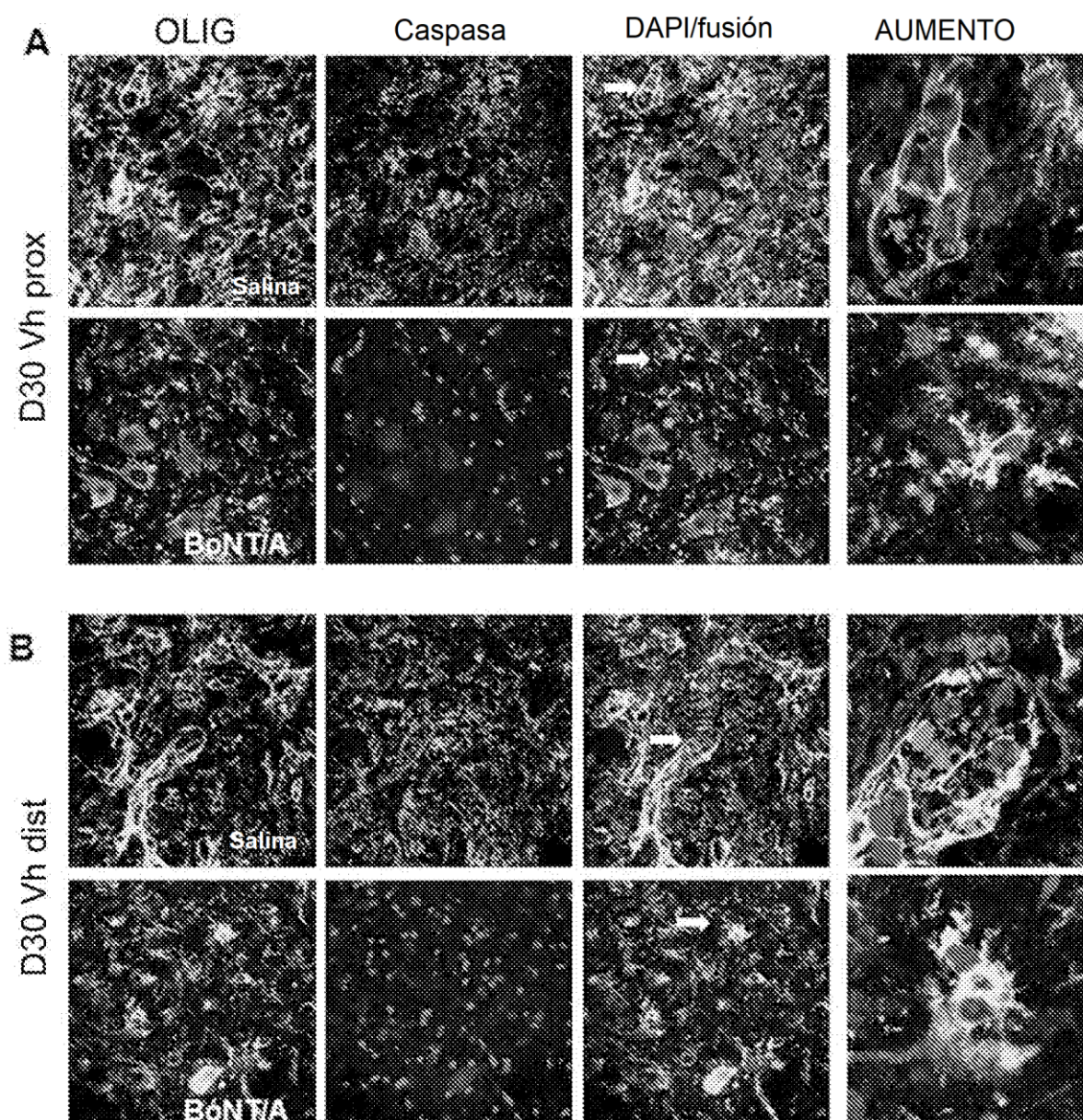


FIG.5

