

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 942**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 47/10 (2007.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2015** **PCT/US2015/028647**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015** **WO15168471**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2015** **E 15721519 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020** **EP 3137053**

54 Título: **Formulaciones de productos biológicos para instilación intravesical**

30 Prioridad:

30.04.2014 US 201461986346 P

31.07.2014 US 201462031302 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2021

73 Titular/es:

ALLERGAN, INC. (100.0%)

2525 Dupont Drive

Irvine, CA 92612, US

72 Inventor/es:

FORSSEN, ERIC A.;

HUGHES, PATRICK M.;

RUPP, DAVID C.;

HUNT, TERRENCE;

SHIMIZU, GARY;

FRANCIS, JOSEPH;

BROIDE, RON S. y

FERNANDEZ-SALAS, ESTER

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 822 942 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

Formulaciones de productos biológicos para instilación intravesical

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden un derivado de *Clostridium* y a métodos de uso de las mismas. En particular, la presente divulgación se refiere a formulaciones farmacéuticas que contienen un derivado de *Clostridium* para instilación vesical.

10 **Antecedentes**

Las terapias con neurotoxinas, en particular toxinas botulínicas, se han usado en tratamientos de diversos procesos patológicos, incluyendo estados urológicos tales como vejiga hiperactiva (OAB, por sus siglas en inglés) e hiperactividad del detrusor.

La terapia con toxinas botulínicas para tratar trastornos de la vejiga tales como vejiga hiperactiva (OAB), hiperactividad del detrusor asociada con un estado neurológico, se administra normalmente mediante inyección a través de la pared de la vejiga urinaria y en los tejidos musculares debilitados que rodean la vejiga. Este enfoque requiere la administración de treinta a cuarenta inyecciones a través de la pared de la vejiga, tal como se muestra en la figura 1. La administración farmacéutica mediante inyección puede provocar dolor localizado, y exponer posiblemente a los pacientes a enfermedades de transmisión hemática. Entre las vías de administración alternativas, la instilación intravesical permite que se administre un fármaco directamente en la vejiga cruzando la pared de la vejiga.

La pared de la vejiga es impermeable a la mayoría de las sustancias. Tal como se muestra en la figura 2, el urotelio estratificado consiste en tres capas celulares: células en paraguas, células intermedias y células basales. Las células basales son células germinales que a través de la división celular reemplazan células intermedias que se diferencian parcialmente. Las células en paraguas muy diferenciadas y polarizadas están ubicadas en la luz de la vejiga y son la barrera física principal para el movimiento de sustancias entre la sangre y la orina. La membrana apical de las células en paraguas está cubierta con placas que consisten en proteínas denominadas uroplaquinas y proporcionan a la membrana apical un aspecto grueso. Las células en paraguas también contienen uniones herméticas que restringen el movimiento paracelular de orina y moléculas más grandes a través del epitelio.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de formulaciones farmacéuticas que contengan un derivado de *Clostridium* que puedan mejorar la administración a través de la pared de la vejiga urinaria en lugar de la administración parenteral.

Las terapias con toxinas de *Clostridium* se usan de manera exitosa para muchas indicaciones. Generalmente, la administración de un tratamiento con toxinas de *Clostridium* se tolera bien. Se ha encontrado que las toxinas botulínicas son capaces de afectar a muchos tipos diferentes de neuronas en el cuerpo humano, pero para el tratamiento de algunos procesos patológicos, serán ventajosas moléculas más específicas. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de formulaciones farmacéuticas que contengan derivados de *Clostridium* modificados, tales como moduladores de la exocitosis vesicular dirigidos (TEM, por sus siglas en inglés), dirigidos a tipos específicos de células neuronales.

El documento WO 2013/153550 describe un hidrogel termorreversible mucoadhesivo biocompatible que comprende un agente farmacéuticamente activo tal como toxina botulínica en el tratamiento de trastornos de la vejiga.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización, en la que el al menos un agente de permeabilización comprende una combinación de un tensioactivo y un mucoadhesivo, en la que el mucoadhesivo está presente en una cantidad de 0,005-10 p/v para aumentar sustancial y reversiblemente la permeabilidad de la pared de la vejiga frente al derivado de *Clostridium*, y en la que el derivado de *Clostridium* es toxina botulínica, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico y el mucoadhesivo es un polímero catiónico.

Según otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método para el tratamiento de un paciente con una disfunción neurógena de la vejiga, comprendiendo el método: aplicar por instilación por vía intravesical en la vejiga del paciente la composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización, en la que el al menos un agente de permeabilización comprende un tensioactivo y un mucoadhesivo, en la que el mucoadhesivo está presente en una cantidad del 0,005-10% p/v para aumentar sustancialmente la permeabilidad de la pared de la vejiga frente al derivado de *Clostridium* a una tasa terapéuticamente eficaz, en la que el derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico y el mucoadhesivo es un polímero catiónico.

Otros aspectos y variaciones de la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una inyección intracistinal de la técnica anterior de una toxina botulínica a la pared de la vejiga;
la figura 2 es un diagrama esquemático del urotelio, en el que:

A) el urotelio consiste en tres capas celulares: células basales, intermedias y en paraguas superficiales.

B) Las células en paraguas presentan placas sobre su membrana apical y una red citoplasmática de vesículas que contienen fibrillas unidas a la unión hermética y las desmosomas en la membrana basal lisa.

C) La membrana apical del urotelio vista para la luz muestra la placa y las regiones bisagra.

La figura 3 muestra un diagrama esquemático del modelo de cultivo uroepitelial humano; un diagrama del sistema de soporte permeable Transwell® con un urotelio estratificado;

la figura 4 muestra un gráfico que presenta el efecto diferencial de diversos agentes de permeabilización sobre la permeabilidad de células uroepiteliales humanas frente a un sustituto a modo de ejemplo;

las figuras 5A y 5B muestran los efectos dependientes de la concentración y el tiempo de dos agentes de permeabilización sobre la permeabilidad celular y la actividad de la cadena ligera de un sustituto de TEM a modo de ejemplo;

las figuras 6A y 6B muestran los efectos dependientes de la concentración y el tiempo de dos agentes de permeabilización sobre la permeabilidad celular y la actividad de la cadena ligera de una toxina botulínica de tipo A;

la figura 7 muestra el efecto de un agente de permeabilización sobre la permeabilidad celular y la actividad de la cadena ligera de una toxina botulínica de tipo A a pH 6,0 u 8,0;

las figuras 8-10 presentan datos obtenidos *in vivo*, en las que se cuantificó el efecto de las formulaciones en ratas;

la figura 8A es un diagrama pictórico que establece una base para evaluar la integridad de vejigas de rata, usando un método de puntuación ordinal de 0 - 5; siendo '0' una vejiga normal y '5' una vejiga que muestra patología grave;

la figura 8B es un diagrama pictórico que muestra una base para evaluar la penetración de un sustituto en la pared de la vejiga. La evaluación se basa en el grado de la tinción de SNAP25-197 que corresponde a la tinción de VACHT de fibras nerviosas parasimpáticas en vejiga de rata usando un método de puntuación ordinal de 0 - 5; siendo '0' sin tinción de SNAP25-197 detectada y '4,5' tinción que muestra el solapamiento casi completo de ambos biomarcadores. No se observó nunca una puntuación de '5';

la figura 9A muestra el efecto de una formulación que comprende un sustituto según un aspecto de la presente divulgación tras la instilación en vejigas normales, tal como se mide mediante: (1) el grado de la penetración del sustituto a diversas concentraciones de agentes de permeabilización; y (2) la integridad del tejido vesical. El grado de la penetración se correlacionó con el grado de la tinción de SNAP25-197 (barras azules o primera barra de dos barras contiguas) y el daño del tejido vesical se basó en la tinción de H&E (barras rojas o segunda barra de dos barras contiguas). Las barras sin una barra contigua muestran el grado de la tinción de SNAP25-197.

La figura 9B muestra el efecto de la formulación tras la instilación en vejigas del modelo de cistitis intersticial (IC, por sus siglas en siglas), tal como se mide mediante: (1) el grado de la penetración de un sustituto a diversas concentraciones de agentes de permeabilización a modo de ejemplo; y (2) la integridad del tejido vesical. El grado de la penetración se correlacionó con el grado de la tinción de SNAP25-197 (barras azules o primera barra de dos barras contiguas) y el daño del tejido vesical se basó en la tinción de H&E (barras rojas o segunda barra de dos barras contiguas);

la figura 10 muestra el efecto de una formulación que comprende un complejo de toxinas botulínicas (20 U) tras la instilación en vejigas normales a pH 6,0 u 8,0, tal como se mide mediante: (1) el grado de la penetración del complejo de toxinas botulínicas a diversas concentraciones de un agente de permeabilización; y (2) la integridad del tejido vesical. El grado de la penetración se correlacionó con el grado de la tinción de SNAP25-197 (barras azules o primera barra de dos barras contiguas) y el daño del tejido vesical se basó en la tinción de H&E (barras rojas o segunda barra de dos barras contiguas); y

la figura 11 muestra el efecto de un agente de permeabilización sobre la mucoadhesión de un sustituto.

La figura 12 es un diagrama pictórico que establece una base para evaluar el grado de la penetración en la vejiga de una formulación de prueba. El grado de la penetración se correlacionó con el grado de la tinción de SNAP25-197;

la figura 13 es un diagrama pictórico que muestra los resultados de la inmunohistoquímica de dos vejigas que tenían puntuaciones de IHC de “4” y “0”;

- 5 las figuras 14A-D son microfotografías ilustrativas que muestran diferentes estados del tejido vesical después de la instilación; y

la figura 15 es un gráfico que presenta las puntuaciones de inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) de algunas formulaciones a modo de ejemplo según aspectos de la presente divulgación.

10 Descripción

Las neurotoxinas botulínicas (BoNT), por ejemplo, BoNT/A, BoNT/B, etc., actúan sobre el sistema nervioso bloqueando la liberación de sustancias neurosecretoras incluyendo los neurotransmisores. La acción de la BoNT se inicia por su unión a una molécula receptora sobre la superficie celular. El complejo toxina-receptor resultante experimenta luego endocitosis. Una vez dentro de la célula, la BoNT escinde proteínas específicas exocitóticas responsables del acoplamiento de neurotransmisores y la liberación desde la célula conocidas como proteínas SNARE (receptor de proteínas de fijación soluble del factor sensible a la N-etilmaleimida). La quimiodesnervación transitoria resultante se ha utilizado de manera médica para bloquear la neurotransmisión motora a la unión neuromuscular, lo que conduce a una variedad de aplicaciones terapéuticas.

En un aspecto, la presente invención proporciona en parte una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización, en la que el al menos un agente de permeabilización, en la que el al menos un agente de permeabilización comprende un tensioactivo y un mucoadhesivo, en la que el mucoadhesivo está presente en una cantidad del 0,005-10% p/v para aumentar sustancial y reversiblemente la permeabilidad de la pared de la vejiga frente al derivado de *Clostridium*. El derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico y el mucoadhesivo es un polímero catiónico.

30 Definiciones

Tal como se usan en el presente documento, las palabras o los términos expuestos a continuación tienen las siguientes definiciones:

35 “Principio activo farmacéutico” (API, por sus siglas en inglés) significa un componente que ejerce un efecto al administrarse o tras administrarse a un sujeto o paciente. Los API pueden incluir, por ejemplo, una neurotoxina de *Clostridium* nativa o recombinante, por ejemplo, una toxina botulínica, toxinas modificadas recombinantes, fragmentos de las mismas, TEM, y combinaciones de los mismos.

40 “Administración” o “administrar” significa la etapa de proporcionar (es decir, administrar) una composición farmacéutica a un sujeto, o alternativamente un sujeto que recibe una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden administrarse de manera local mediante diversos métodos. Por ejemplo, administración intramuscular, intradérmica, subcutánea, administración intratecal, administración intraperitoneal, tópica (transdérmica), instilación e implantación (por ejemplo, de un dispositivo de liberación lenta tal como un implante polimérico o bomba miniosmótica) pueden ser todas vías apropiadas de administración.

“Alivio” significa una reducción en la aparición de un dolor, de una cefalea, de un músculo hiperactivo, o de cualquier síntoma o causa de un estado o trastorno. Por tanto, alivio incluye alguna reducción, reducción significativa, reducción casi total y reducción total.

50 “Libre de proteína animal” significa la ausencia de productos o compuestos derivados de sangre, mezcla de sangre y otros derivados de animales. “Animal” significa un mamífero (tal como un humano), ave, réptil, pez, insecto, araña u otra especie animal. “Animal” excluye microorganismos, tales como bacterias. Por tanto, una composición farmacéutica libre de proteína animal puede incluir una neurotoxina botulínica, una toxina modificada recombinante o un TEM. Por ejemplo, una composición farmacéutica “libre de proteína animal” significa una composición farmacéutica que está sustancialmente libre o esencialmente libre o completamente libre de una albúmina derivada de suero, gelatina y otras proteínas derivadas de animales, tales como inmunoglobulinas. Un ejemplo de una composición farmacéutica libre de proteína animal es una composición farmacéutica que comprende o que consiste en una toxina botulínica, un TEM o una toxina modificada recombinante (como el principio activo) y un polisacárido adecuado como estabilizador o excipiente.

“Actividad biológica” describe los efectos beneficiosos o adversos de un fármaco sobre la materia viva. Cuando un fármaco es una mezcla química compleja, esta actividad se ejerce por el principio activo de la sustancia, pero puede modificarse por otros constituyentes. La actividad biológica puede evaluarse como potencia o como toxicidad mediante un ensayo de DL₅₀ o DE₅₀ *in vivo*, o a través de un ensayo *in vitro* tal como, por ejemplo, ensayos de potencia basados en células tal como se describe en las publicaciones estadounidenses 20100203559, 20100233802, 20100233741 y

la patente estadounidense 8.198.034.

“Toxina botulínica” significa una neurotoxina producida por *Clostridium botulinum*, así como una toxina botulínica (o bien la cadena ligera o bien la cadena pesada de la misma) producida de manera no recombinante por una especie no de *Clostridium*. La expresión “toxina botulínica”, tal como se usa en el presente documento, abarca la toxina botulínica de serotipos A, B, C, D, E, F y G, y sus subtipos y cualquier otro tipo de subtipos de la misma, o cualquier proteína vuelta a modificar por ingeniería, análogo, derivado, homólogo, parte, subparte, variante o versión, en cada caso, de cualquiera de los anteriores. “Toxina botulínica”, tal como se usa en el presente documento, también abarca una “toxina botulínica modificada”. Además, “toxina botulínica”, tal como se usa en el presente documento, también abarca un complejo de toxinas botulínicas, (por ejemplo, los complejos de 300, 500 y 900 kDa), así como el componente neurotóxico de la toxina botulínica (150 kDa) que no se asocia con las proteínas del complejo.

“Derivado de *Clostridium*” se refiere a una molécula que contiene cualquier parte de una toxina de *Clostridium*. Tal como se usa en el presente documento, el término “derivado de *Clostridium*” abarca neurotoxinas nativas o recombinantes, toxinas modificadas recombinantes, fragmentos de las mismas, un modulador de la exocitosis vesicular dirigido (TEM), o combinaciones de los mismos.

“Toxina de *Clostridium*” se refiere a cualquier toxina producida por una cepa de toxina de *Clostridium* que puede ejecutar el mecanismo celular global mediante lo cual una toxina de *Clostridium* intoxica una célula y abarca la unión de una toxina de *Clostridium* a un receptor de toxina de *Clostridium* de baja o alta afinidad, la internalización del complejo toxina/receptor, la translocación de la cadena ligera de la toxina de *Clostridium* en el citoplasma y la modificación enzimática de un sustrato de toxina de *Clostridium*. Los ejemplos no limitativos de toxinas de *Clostridium* incluyen una toxina botulínica como BoNT/A, una BoNT/B, una BoNT/C₁, una BoNT/D, una BoNT/E, una BoNT/F, una BoNT/G, una toxina tetánica (TeNT), una toxina de *Clostridium Baratii* (BaNT) y una toxina de *Clostridium Butyricum* (BuNT). La citotoxina BoNT/C₂ y citotoxina BoNT/C₃, que no son neurotoxinas, se excluyen del término “toxina de *Clostridium*”. Una toxina de *Clostridium* divulgada en el presente documento incluye, sin limitación, variantes de toxinas de *Clostridium* que se producen de manera natural, tales como, por ejemplo, isoformas de toxinas de *Clostridium* y subtipos de toxinas de *Clostridium*; variantes de toxinas de *Clostridium* que no se producen de manera natural, tales como, por ejemplo, variantes conservativas de toxinas de *Clostridium*, variantes no conservativas de toxinas de *Clostridium*, variantes quiméricas de toxinas de *Clostridium* y fragmentos activos de toxinas de *Clostridium* de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. Una toxina de *Clostridium* divulgada en el presente documento también incluye un complejo de toxinas de *Clostridium*. Tal como se usa en el presente documento, el término “complejo de toxinas de *Clostridium*” se refiere a un complejo que comprende una toxina de *Clostridium* y proteínas no asociadas a toxinas (NAP), tal como, por ejemplo, un complejo de toxinas botulínicas, un complejo de toxinas tetánicas, un complejo de toxinas de *Clostridium Baratii* y un complejo de toxinas de *Clostridium Butyricum*. Los ejemplos no limitativos de complejos de toxinas de *Clostridium* incluyen los producidos por un *Clostridium botulinum*, tal como, por ejemplo, un complejo de BoNT/A de 900 kDa, un complejo de BoNT/A de 500 kDa, un complejo de BoNT/A de 300 kDa, un complejo de BoNT/B de 500 kDa, un complejo de BoNT/C₁ de 500 kDa, un complejo de BoNT/D de 500 kDa, un complejo de BoNT/D de 300 kDa, un complejo de BoNT/E de 300 kDa y un complejo de BoNT/F de 300 kDa.

“Cantidad eficaz”, tal como se aplica al principio biológicamente activo, significa la cantidad del componente que generalmente es suficiente para inducir un cambio deseado en el sujeto. Por ejemplo, cuando el efecto deseado es una reducción en un síntoma de trastorno autoinmunitario, una cantidad eficaz del componente es la cantidad que provoca al menos una reducción sustancial del síntoma del trastorno autoinmunitario, y sin dar como resultado una toxicidad significativa.

“Cantidad eficaz” aplicada a un constituyente de principio no activo de una composición farmacéutica (tal como un estabilizador usado para mezclar con una toxina botulínica) se refiere a la cantidad del constituyente de principio no activo que es suficiente para influir de manera positiva en la liberación y/o la actividad del principio activo cuando se administra a un individuo. Esta “cantidad eficaz” puede determinarse basándose en la enseñanza de esta memoria descriptiva y el conocimiento general en la técnica.

“Totalmente libre (es decir, terminología de “que consiste en”) significa que dentro del intervalo de detección del instrumento o procedimiento que está usándose, la sustancia no puede detectarse o su presencia no puede confirmarse.

“Esencialmente libre” (o “que consiste esencialmente en”) significa que solo pueden detectarse cantidades mínimas de la sustancia.

“Cadena ligera” significa la cadena ligera de una neurotoxina de *Clostridium*. Tiene un peso molecular de 50 kDa y puede denominarse cadena L, L o dominio proteolítico (secuencia de aminoácidos) de una neurotoxina botulínica.

“Cadena pesada” significa la cadena pesada de una neurotoxina botulínica. Tiene un peso molecular de 100 kDa y puede denominarse cadena H o H.

H_C significa un fragmento (aproximadamente 50 kDa) derivado de la cadena H de una neurotoxina botulínica que es aproximadamente equivalente al segmento del extremo carboxilo de la cadena H, o la porción correspondiente a ese fragmento en la cadena H intacta. Se cree que contiene la porción de neurotoxina botulínica de tipo natural o silvestre implicada en la unión presináptica de alta afinidad a las neuronas motoras.

H_N significa un fragmento (aproximadamente 50 kDa) derivado de la cadena H de una neurotoxina botulínica que es aproximadamente equivalente al segmento del extremo amino de la cadena H, o una porción correspondiente a ese fragmento. Se cree que contiene la parte de la neurotoxina botulínica de tipo natural o silvestre implicada en la translocación de la cadena L a través de una membrana endosómica intracelular.

LH_N o L-H_N significa un fragmento derivado de una neurotoxina de *Clostridium* que contiene la cadena L, o un fragmento funcional de la misma acoplada al dominio de H_N. Puede obtenerse a partir de la neurotoxina de *Clostridium* intacta por proteólisis, para eliminar o modificar el dominio de H_C.

“Implante” significa un sistema de administración de composiciones o fármacos de liberación controlada (por ejemplo, pulsátil o continuo). El implante puede, por ejemplo, inyectarse, insertarse o implantarse en un cuerpo humano.

“Administración intravesical” se refiere a la inyección de una sustancia dada directamente en la vejiga a través de un catéter uretral.

“Administración local” significa la administración directa de un producto farmacéutico en o en las proximidades de un sitio sobre o dentro del cuerpo de un animal, en cuyo sitio se desea un efecto biológico del producto farmacéutico, tal como, por ejemplo, mediante inyección intramuscular, intradérmica o subdérmica o administración tópica. La administración local excluye las vías de administración sistémicas, tal como la administración intravenosa u oral. La administración tópica es un tipo de administración local en la que se aplica un agente farmacéutico a la piel de un paciente.

“Toxina botulínica modificada” significa una toxina botulínica a la que se ha delecionado, modificado o reemplazado al menos uno de sus aminoácidos, en comparación con una toxina botulínica nativa. Además, la toxina botulínica modificada puede ser una neurotoxina producida de manera recombinante, o un derivado o fragmento de una neurotoxina producida de manera recombinante. Una toxina botulínica modificada retiene al menos una actividad biológica de la toxina botulínica nativa, tal como, la capacidad para unirse a un receptor de toxina botulínica o la capacidad para inhibir la liberación de neurotransmisores de una neurona. Un ejemplo de toxina botulínica modificada es una toxina botulínica que tiene una cadena ligera de un serotipo de toxina botulínica (tal como el serotipo A) y una cadena pesada de un serotipo de toxina botulínica diferente (tal como el serotipo B). Otro ejemplo de toxina botulínica modificada es una toxina botulínica acoplada a un neurotransmisor, como la sustancia P.

“Mutación” significa una modificación estructural de una proteína o secuencia de ácido nucleico que se produce de manera natural. Por ejemplo, en el caso de mutaciones de ácidos nucleicos, una mutación puede ser una delección, adición o sustitución de uno o más nucleótidos en la secuencia de ADN. En el caso de una mutación en la secuencia de una proteína, la mutación puede ser una delección, adición o sustitución de uno o más aminoácidos en una secuencia de proteína. Por ejemplo, un aminoácido específico que comprende una secuencia de proteína puede sustituirse por otro aminoácido, por ejemplo, un aminoácido seleccionado de un grupo que incluye los aminoácidos alanina, asparagina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano, tirosina o cualquier otro aminoácido que se produce de manera natural o no natural o aminoácidos modificados químicamente. Las mutaciones en una secuencia de proteína pueden ser el resultado de mutaciones en secuencias de ADN que, cuando se transcriben y se traduce el ARNm resultante, producen la secuencia de proteína mutada. También pueden crearse mutaciones en una secuencia de proteína fusionando una secuencia de péptidos que contiene la mutación deseada con una secuencia de proteína deseada.

“Paciente” significa un sujeto humano o no humano que recibe atención médica o veterinaria. Por consiguiente, tal como se divulga en el presente documento, las composiciones y los métodos pueden usarse para tratar cualquier animal, tal como, por ejemplo, mamíferos.

“Administrar de manera periférica” o “administración periférica” significa administración subdérmica, intradérmica, transdérmica o subcutánea, pero excluye la administración intramuscular. “Periférico” significa en una ubicación subdérmica y excluye los sitios viscerales.

“Agente de permeabilización” se refiere a cualquier compuesto, sustancia o molécula que se produce de manera natural o sintética que tiene la capacidad de mejorar la permeabilidad de una superficie, incluyendo, pero sin limitarse a la piel y la pared de la vejiga, frente a un compuesto seleccionado, tal como un API (principio activo farmacéutico).

“Cantidad eficaz para la permeación” se refiere a una cantidad eficaz para aumentar sustancialmente la permeabilidad de una superficie frente a un agente terapéutico a una tasa terapéuticamente eficaz. Para la administración intravesical a la vejiga, una cantidad eficaz para la permeación se refiere a una cantidad suficiente para aumentar sustancialmente

la permeabilidad de la pared de la vejiga frente un derivado de *Clostridium* durante un intervalo de tiempo deseado sin dañar de manera irreversible la pared de la vejiga, tiempo después del cual puede restaurarse la impermeabilidad selectiva original de la pared de la vejiga.

5 “Composición farmacéutica” significa una composición que comprende un principio activo farmacéutico, tal como, por ejemplo, una toxina botulínica, y al menos un componente adicional, tal como, por ejemplo, un estabilizador o excipiente. Por tanto, una composición farmacéutica es una formulación que es adecuada para la administración diagnóstica o terapéutica a un sujeto, tal como un paciente humano. La composición farmacéutica puede estar, por ejemplo, en un estado liofilizado o secado al vacío, una disolución formada después de la reconstitución de la
10 composición farmacéutica liofilizada o secada al vacío, o como una disolución o un sólido que no requiere reconstitución.

Los componentes constituyentes de una composición farmacéutica pueden incluirse en una única composición (es decir, todos los componentes constituyentes, excepto cualquier líquido de reconstitución requerido, están presentes en el momento de la elaboración inicial de la composición farmacéutica) o como un sistema de dos componentes, por ejemplo, una composición secada al vacío reconstituida con un vehículo de reconstitución que puede contener, por ejemplo, un componente que no está presente en la elaboración inicial de la composición farmacéutica. Un sistema de dos componentes puede proporcionar varios beneficios, incluyendo el de permitir la incorporación de componentes que no son suficientemente compatibles para el almacenamiento a largo plazo con el primer componente del sistema de dos componentes. Por ejemplo, el vehículo de reconstitución puede incluir un conservante que proporcione suficiente protección contra el crecimiento microbiano durante el período de uso, por ejemplo, una semana de almacenamiento refrigerado, pero no está presente durante el período de almacenamiento de dos años en el congelador, tiempo durante el cual podría degradarse la toxina. Pueden incorporarse de esta manera otros componentes que pueden no ser compatibles con una toxina botulínica u otros componentes durante largos períodos de tiempo; es decir, añadirse en un segundo vehículo (por ejemplo, en el vehículo de reconstitución) en el momento aproximado de su uso. Una composición farmacéutica también puede incluir agentes conservantes tales como alcohol bencílico, ácido benzoico, fenol, parabenos y ácido sórbico. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir, por ejemplo, excipientes, tales como agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes de granulación y disgregantes; agentes aglutinantes; agentes lubricantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos y disolventes acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de suspensión; agentes de dispersión o humectantes; agentes emulsionantes, demulcentes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; antioxidantes; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables y otros componentes conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, en Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa..

35 “Toxina modificada recombinante” significa una toxina recombinante que comparte algunos o la mayoría de los dominios con una toxina botulínica pero que puede o no dirigirse a las mismas células que la neurotoxina botulínica nativa.

40 “Estabilizante”, “estabiliza” o “estabilización” significa la retención de al menos el 20% de la actividad biológica de un principio activo farmacéutico (“API”) que se ha reconstituido, en comparación con el API antes de la reconstitución. Por ejemplo, tras (1) preparación de diluciones en serie a partir de una disolución a granel o madre, o (2) tras la reconstitución de una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica liofilizada o secada al vacío que se ha almacenada a o por debajo de -2°C durante entre seis meses y cuatro años, o (3) para una composición farmacéutica en disolución acuosa que contiene toxina botulínica que se ha almacenada entre 2°C y 8°C durante desde seis meses hasta cuatro años, la toxina botulínica presente en la composición farmacéutica en disolución acuosa o reconstituida tiene (en presencia de un compuesto que es estabilizante, estabiliza o que proporciona estabilización al API) más del 20% y hasta el 100% de la potencia o toxicidad que tenía la toxina botulínica biológicamente activa antes de incorporarse en la composición farmacéutica.

50 “Agente estabilizante”, “agente de estabilización” o “estabilizador” significa una sustancia que actúa para estabilizar un API de manera que la potencia de la composición farmacéutica aumenta en relación con una composición no estabilizada.

55 Los “estabilizadores” pueden incluir excipientes y pueden incluir moléculas proteicas y no proteicas.

“Sustancialmente libre” significa presente a un nivel de menos del uno por ciento en peso de la composición farmacéutica.

60 “TEM”, tal como se usa en el presente documento, es sinónimo de “modulador de exocitosis dirigido” o “endopeptidasa redirigida”. Debido a sus numerosas características, “TEM” se divulgará con más detalles al final de la sección “Definición”.

65 “Formulación terapéutica” significa que una formulación puede usar para tratar y aliviar de ese modo un trastorno o una enfermedad, tal como, por ejemplo, un trastorno o una enfermedad caracterizado por hiperactividad (es decir, espasticidad) de un músculo periférico.

“Cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico deseado.

La “administración tópica” excluye la administración sistémica de la neurotoxina. Dicho de otro modo, y a diferencia de los métodos transdérmicos terapéuticos convencionales, la administración tópica de toxina botulínica no da como resultado cantidades significativas, tales como la mayoría de la neurotoxina que pasa al aparato circulatorio del paciente.

“Tratar” significa aliviar (o eliminar) al menos un síntoma de un estado o trastorno, tal como, por ejemplo, arrugas, espasticidad, depresión, dolor (tal como, por ejemplo, dolor de cabeza) o hiperactividad de la vejiga, ya sea temporal o permanentemente.

“Variante” significa una neurotoxina de *Clostridium*, tal como toxina botulínica de tipo natural de serotipo A, B, C, D, E, F o G, que se ha modificado mediante el reemplazo, modificación, adición o delección de al menos un aminoácido en relación con la toxina botulínica de tipo natural, que es reconocida por una célula diana, internalizada por la célula diana, y escinde de manera catalítica una proteína SNARE (receptor de SNAP (proteína de fijación soluble de NSF)) en la célula diana.

Un ejemplo de un componente de neurotoxina variante puede comprender una cadena ligera variante de una toxina botulínica que tiene uno o más aminoácidos sustituidos, modificados, delecionados y/o añadidos. Esta cadena ligera variante puede tener la misma o mejor capacidad para prevenir la exocitosis, por ejemplo, la liberación de vesículas de neurotransmisores. De manera adicional, el efecto biológico de una variante puede disminuir en comparación con la entidad química original. Por ejemplo, una cadena ligera variante de una toxina botulínica de tipo A que tiene una secuencia de aminoácidos eliminada puede tener una persistencia biológica más corta que la de la cadena ligera original (o nativa) de toxina botulínica de tipo A.

“Vehículo” o “vehículo de reconstitución” significa una composición líquida que puede usarse para reconstituir una formulación botulínica sólida para dar una composición farmacéutica botulínica líquida.

“Resto de unión neuronal de tipo natural” significa la porción de una neurotoxina que es nativa para la neurotoxina y que presenta una afinidad de unión específica para un receptor en una neurona. Por tanto, el resto de unión neuronal de tipo natural o nativo excluye un resto de unión que no es nativo para la neurotoxina.

TEM

Generalmente, un TEM comprende un dominio enzimático de una cadena ligera de toxina de *Clostridium*, un dominio de translocación de una cadena pesada de toxina de *Clostridium* y un dominio de direccionamiento. El dominio de direccionamiento de un TEM proporciona una capacidad de direccionamiento celular alterada que dirige la molécula a un receptor distinto del receptor de toxina de *Clostridium* nativo utilizado por una toxina de *Clostridium* que se produce de manera natural. Esta capacidad de redireccionamiento se logra reemplazando el dominio de unión que se produce de manera natural de una toxina de *Clostridium* con un dominio de direccionamiento que tiene una actividad de unión para un receptor de toxina no de *Clostridium*. Aunque se une a un receptor de toxina no de *Clostridium*, un TEM experimenta todas las demás etapas del proceso de intoxicación, incluida la internalización del complejo TEM/receptor en el citoplasma, la formación del poro en la membrana de la vesícula y la molécula bicatenaria, la translocación del dominio enzimático en el citoplasma, y ejerce un efecto proteolítico sobre un componente del complejo SNARE de la célula diana.

Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio enzimático de toxina de *Clostridium*” se refiere a un polipéptido de toxina de *Clostridium* ubicado en la cadena ligera de una toxina de *Clostridium* que ejecuta la etapa de modificación de la diana enzimática del proceso de intoxicación. Un dominio enzimático de toxina de *Clostridium* incluye una región de metaloproteasa que contiene actividad de endopeptidasa dependiente de zinc que selecciona como diana específicamente los componentes del núcleo del aparato de liberación de neurotransmisores. Por tanto, un dominio enzimático de toxina de *Clostridium* selecciona como diana específicamente y escinde de manera proteolítica un sustrato de toxina de *Clostridium*, tal como, por ejemplo, proteínas SNARE como un sustrato de SNAP-25, un sustrato de VAMP y un sustrato de syntaxina.

Un dominio enzimático de toxina de *Clostridium* incluye, sin limitación, variantes de dominios enzimáticos de toxina de *Clostridium* que se producen de manera natural, tales como, por ejemplo, isoformas de dominios enzimáticos de toxina de *Clostridium* y subtipos de dominios enzimáticos de toxina de *Clostridium*; variantes de dominios enzimáticos de toxina de *Clostridium* que no se producen de manera natural, tales como, por ejemplo, variantes de dominios enzimáticos conservativas de toxina de *Clostridium*, variantes de dominios enzimáticos no conservativas de toxina de *Clostridium*, quimeras de dominios enzimáticos de toxina de *Clostridium*, fragmentos activos de dominios enzimáticos de toxina de *Clostridium* de las mismas, o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos no limitativos de un dominio enzimático de toxina de *Clostridium* incluyen, por ejemplo, un dominio enzimático de BoNT/A, un dominio enzimático de BoNT/B, un dominio enzimático de BoNT/C1, un dominio enzimático de BoNT/D, un dominio enzimático de BoNT/E, un dominio enzimático de BoNT/F, un dominio enzimático de BoNT/G, un dominio enzimático de TeNT,

un dominio enzimático de BaNT y un dominio enzimático de BuNT.

Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio de translocación de toxina de *Clostridium*” se refiere a un polipéptido de toxina de *Clostridium* ubicado dentro de la mitad amino-terminal de la cadena pesada de una toxina de *Clostridium* que ejecuta la etapa de translocación del proceso de intoxicación. La etapa de translocación parece implicar un cambio conformacional alostérico del dominio de translocación provocado por una disminución en el pH dentro de la vesícula intracelular. Este cambio conformacional da como resultado la formación de un poro en la membrana vesicular que permite el movimiento de la cadena ligera desde dentro de la vesícula hasta el interior del citoplasma. Por tanto, un dominio de translocación de toxina de *Clostridium* facilita el movimiento de una cadena ligera de la toxina de *Clostridium* a través de una membrana de una vesícula intracelular hasta el interior del citoplasma de una célula.

Un dominio de translocación de toxina de *Clostridium* incluye, sin limitación, variantes de dominios de translocación de toxina de *Clostridium* que se producen de manera natural, tales como, por ejemplo, isoformas de dominios de translocación de toxina de *Clostridium* y subtipos de dominios de translocación de toxina de *Clostridium*; variantes de dominios de translocación de toxina de *Clostridium* que no se producen de manera natural, tales como, por ejemplo, variantes conservativas de dominios de translocación de toxina de *Clostridium*, variantes no conservativas de dominios de translocación de toxina de *Clostridium*, dominios de translocación quiméricos de toxina de *Clostridium*, fragmentos activos de dominios de translocación de toxina de *Clostridium* de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos no limitativos de un dominio de translocación de toxina de *Clostridium* incluyen, por ejemplo, un dominio de translocación de BoNT/A, un dominio de translocación de BoNT/B, un dominio de translocación de BoNT/C1, un dominio de translocación de BoNT/D, un dominio de translocación de BoNT/E, un dominio de translocación de BoNT/F, un dominio de translocación de BoNT/G, un dominio de translocación de TeNT, un dominio de translocación de BaNT y un dominio de translocación de BuNT.

Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio de direccionamiento” es sinónimo de “dominio de unión” o “resto de direccionamiento” y se refiere a un péptido o polipéptido que ejecuta las etapas de unión al receptor y/o internalización del complejo del proceso de intoxicación, con la condición de que el dominio de unión no sea idéntico a un dominio de unión de toxina de *Clostridium* encontrado dentro de la mitad carboxil-terminal de la cadena pesada de una toxina de *Clostridium*. Un dominio de direccionamiento incluye una región de unión al receptor que confiere la actividad y/o especificidad de unión del dominio de direccionamiento para su receptor relacionado. Tal como se usa en el presente documento, el término “receptor relacionado” se refiere a un receptor para el cual el dominio de direccionamiento interactúa de manera preferente en condiciones fisiológicas, o en condiciones *in vitro* que se aproximan sustancialmente a condiciones fisiológicas. Tal como se usa en el presente documento, el término “interactúa de manera preferente” es sinónimo de “que se une de manera preferente” y se refiere a una interacción en un grado estadística y significativamente superior con respecto a un control. Con referencia a un dominio de direccionamiento divulgado en el presente documento, un dominio de direccionamiento se une a su receptor relacionado en un grado estadística y significativamente superior con respecto a un receptor no relacionado. Dicho de otra manera, existe una unión discriminatoria del dominio de direccionamiento a su receptor relacionado con respecto a un receptor no relacionado. Por tanto, un dominio de direccionamiento dirige la unión a un receptor específico de TEM ubicado en la superficie de la membrana plasmática de una célula diana.

Un dominio de direccionamiento divulgado en el presente documento puede ser uno que interactúa de manera preferente con un receptor ubicado en una neurona sensorial. En otra realización, un dominio de direccionamiento divulgado en el presente documento puede ser uno que interactúa de manera preferente con un receptor ubicado en una neurona simpática o una neurona parasimpática.

En otra realización, un dominio de direccionamiento divulgado en el presente documento es un dominio de direccionamiento de péptido opioide, un dominio de direccionamiento de péptido de galanina, un dominio de direccionamiento de péptido de PAR, un dominio de direccionamiento de péptido de somatostatina, un dominio de direccionamiento de péptido de neurotensina, un dominio de direccionamiento de péptido de SLURP, un dominio de direccionamiento de péptido de angiotensina, un dominio de direccionamiento de péptido de taquiquinina, un dominio de direccionamiento de péptido relacionado con el neuropéptido Y, un dominio de direccionamiento de péptido de cinina, un dominio de direccionamiento de péptido de melanocortina o un dominio de direccionamiento de péptido de granina, un dominio de direccionamiento de péptido de hormona similar al glucagón, un dominio de direccionamiento de péptido de secretina, un dominio de direccionamiento del péptido activador de adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), un dominio de direccionamiento del péptido de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), un dominio de direccionamiento del péptido del péptido intestinal vasoactivo (VIP), un dominio de direccionamiento del péptido del péptido inhibidor gástrico (GIP), un dominio de direccionamiento de péptido de calcitonina, un dominio de direccionamiento de péptido intestinal visceral, un dominio de direccionamiento de péptido de neurotrofina, un péptido activador de la cabeza (HA), un dominio de direccionamiento del péptido de la familia de ligandos (GFL) del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), un dominio de direccionamiento del péptido del péptido relacionado con RF-amida (RFRP), un dominio de direccionamiento del péptido de neurohormonas o un dominio de direccionamiento de péptido de citocina neuroregulador, un dominio de direccionamiento de interleucina (IL), un dominio de direccionamiento de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un dominio de direccionamiento de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), un dominio de direccionamiento de factor de crecimiento epidérmico

(EGF), un dominio de direccionamiento del factor de crecimiento transformante β (TGF β), un dominio de direccionamiento de la proteína morfogenética ósea (BMP), un dominio de direccionamiento del factor de crecimiento y diferenciación (GDF), un dominio de direccionamiento de activina o un dominio de direccionamiento del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o un dominio de direccionamiento del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Un dominio de direccionamiento de un péptido opioide puede incluir un péptido de encefalina, un péptido adrenomedular-22 bovino (BAM22), un péptido de endomorfin, un péptido de endorfina, un péptido de dinorfina, un péptido de nociceptina o un péptido de hemorfina.

Por tanto, un TEM puede comprender un dominio de direccionamiento en todas y cada una de las ubicaciones con la condición de que el TEM sea capaz de realizar el proceso de intoxicación. Los ejemplos no limitativos incluyen, localizar un dominio de direccionamiento en el extremo amino terminal de un TEM; localizar un dominio de direccionamiento entre un dominio enzimático de toxina de *Clostridium* y un dominio de translocación de toxina de *Clostridium* de un TEM; y localizar un dominio de direccionamiento en el extremo carboxilo terminal de un TEM. Otros ejemplos no limitativos incluyen localizar un dominio de direccionamiento entre un dominio enzimático de toxina de *Clostridium* y un dominio de translocación de toxina de *Clostridium* de un TEM. El dominio enzimático de las toxinas de *Clostridium* que se producen de manera natural contiene la metionina de iniciación nativa. Por tanto, en organizaciones de dominios en las que el dominio enzimático no se encuentra en la ubicación del extremo amino-terminal, una secuencia de aminoácidos que comprende la metionina de iniciación debe colocarse delante del dominio del extremo amino-terminal. Asimismo, cuando un dominio de direccionamiento está en la posición amino-terminal, una secuencia de aminoácidos que comprende una metionina de iniciación y un sitio de escisión de proteasa puede unirse de manera operativa en situaciones en las que un dominio de direccionamiento requiere un extremo amino-terminal libre, ver, por ejemplo, Shengwen Li *et al.*, *Degradable Clostridial Toxins*, solicitud de patente estadounidense 11/572.512 (23 de enero de 2007). Además, se conoce en la técnica que cuando se añade un polipéptido que se une de manera operativa al extremo amino-terminal de otro polipéptido que comprende la metionina de iniciación, puede delecionarse el residuo de metionina original.

Un TEM divulgado en el presente documento puede comprender opcionalmente un sitio de escisión de proteasa exógena que permite el uso de una proteasa exógena para convertir la forma polipeptídica monocatenaria de un TEM en su forma bicatenaria más activa. Tal como se usa en el presente documento, el término "sitio de escisión de proteasa exógena" es sinónimo de "sitio de escisión de proteasa que no se produce de manera natural" o "sitio de escisión de proteasa no nativo" y significa un sitio de escisión de proteasa que no se encuentra de manera natural en una región de bucle bicatenaria de una toxina de *Clostridium* que se produce de manera natural.

Aunque los TEM varían en su peso molecular general debido al tamaño del dominio de direccionamiento, el proceso de activación y su dependencia de un sitio de escisión exógeno es esencialmente el mismo que el de las toxinas de *Clostridium* producidas de manera recombinante. Véanse, por ejemplo., Steward, *et al.*, *Activatable Clostridial Toxins*, documento US 2009/0081730; Steward, *et al.*, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente estadounidense n.º 11/776.075; Steward, *et al.*, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity for Clostridial Toxin Target Cells*, documento US 2008/0241881; Steward, *et al.*, *Degradable Clostridial Toxins*, documento US 2011/0287517. En general, el proceso de activación que convierte el polipéptido monocatenario en su forma bicatenaria usando proteasas exógenas puede usarse para procesar TEM que tienen un dominio de direccionamiento organizado en una disposición de presentación de amino, presentación central o presentación de carboxilo. Esto se debe a que, para la mayoría de los dominios de direccionamiento, el extremo amino-terminal del resto no participa en la unión al receptor. Como tal, puede usarse una amplia gama de sitios de escisión de proteasa para producir una forma bicatenaria activa de un TEM. Sin embargo, los dominios de direccionamiento que requieren un extremo amino-terminal libre para la unión al receptor requieren un sitio de escisión de proteasa cuyo enlace escindible se ubica en el extremo carboxilo-terminal. El uso del sitio de escisión de proteasa en el diseño de un TEM se describe en, por ejemplo, Steward, *et al.*, *Activatable Clostridial toxins*, documento US 2009/0069238; Ghanshani, *et al.*, *Modified Clostridial Toxins Comprising an Integrated Protease Cleavage Site-Binding Domain*, documento US 2011/0189162; e Ghanshani, *et al.*, *Methods of Intracellular Conversion of Single-Chain Proteins into their Di-chain Form*, solicitud de patente internacional con n.º de serie PCT/US2011/22272.

Composiciones farmacéuticas

Los aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, una composición farmacéutica adecuada para la administración intravesical a la vejiga, que comprende un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización tal como se definió anteriormente.

Derivado de *Clostridium*:

En la presente invención, el derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica nativa o modificada. En una realización, el derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica de tipo A. En algunas realizaciones, el derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica de tipo B, C₁, D, E o F.

La presente composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del derivado de *Clostridium*. Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad total del derivado de *Clostridium* administrada a un individuo en una sesión. Como tal, una cantidad eficaz de un derivado de *Clostridium* y/o TEM no se refiere a la cantidad administrada por sitio. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una toxina de *Clostridium*, tal como una toxina botulínica, administrada a un individuo puede ser de 10 U, mientras que la cantidad de toxina administrada por sitio puede ser de 2 U, es decir, 2 U en cinco sitios diferentes. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de la toxina botulínica oscila desde 10 U hasta 1000 U, más preferiblemente desde 50 U hasta 500 U.

Con referencia a una terapia de combinación que comprende una toxina de *Clostridium* y un TEM, una cantidad eficaz de una toxina de *Clostridium* es una en la que en combinación con un TEM la cantidad de la toxina de *Clostridium* logra el efecto terapéutico deseado, pero una cantidad de este tipo administrada por sí sola podría no ser eficaz. Por ejemplo, normalmente se administran 75-125 U de BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), una BoNT/A, mediante inyección intramuscular por músculo que experimenta espasmos distónicos para tratar distonía cervical. En terapia de combinación, una cantidad eficaz subóptima de BoNT/A podría administrarse para tratar distonía cervical cuando tal toxina se usa en una terapia combinada con un TEM.

Agentes de permeabilización

Los ejemplos de agentes de permeabilización incluyen, por ejemplo, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos no iónicos, glicoles, quelantes, polímeros catiónicos, mucoadhesivos, polipéptidos o mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones, el agente de permeabilización se une de manera selectiva a toxina botulínica para formar un complejo. En realizaciones alternativas, el agente de permeabilización no se une a la toxina botulínica. En realizaciones alternativas, el agente de permeabilización interactúa con el derivado de *Clostridium* a través de interacciones de Van der Waals.

En determinadas realizaciones, el agente de permeabilización puede comprender polietilenglicol (PEG) o poli(óxido de etileno) (PEO). El PEG puede comprender, por ejemplo, PEG con una masa molecular que oscila desde 200 gramos por mol (g/mol) hasta 20.000 gramos por mol (g/mol). En una realización, el agente de permeabilización comprende polietilenglicol 3350.

En determinadas realizaciones el agente de permeabilización puede comprender un poloxámero. El poloxámero puede comprender, por ejemplo, P80, P124, P188, P237, P338 y P407, sus análogos, derivados o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el agente de permeabilización puede comprender una povidona (PVP). La PVP puede comprender, por ejemplo, polímeros de PVP, y análogos o derivados.

En determinadas realizaciones, el agente de permeabilización puede comprender polipéptidos L o D, de peso molecular que oscila desde 1000 hasta 100000 Dalton. En una realización, el agente de permeabilización es poli-L-lisina. En otra realización, el agente de permeabilización incluye péptidos que penetran en las células.

En determinadas realizaciones, el agente de permeabilización puede comprender, por ejemplo, alcohol bencílico, por ejemplo, polihexametileno biguanida (alto y/o bajo peso molecular), proteínas incluyendo, pero sin limitarse a, albúmina sérica humana nativa o recombinante, por ejemplo, polimixina B, o mezclas de los mismos.

El agente de permeabilización comprende un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos adecuados para la presente formulación incluyen, pero no se limitan a, alquil aril poliéteres y análogos, derivados de los mismos (por ejemplo, TX-100, análogos o derivados), poloxámeros, polioxietilén éteres (por ejemplo, familias Brij), Tween, Big CHAPS, Deoxy Big CHAPS, tiloxapol, monooleato de sorbitano (SPAN) 20, 40, 60, Cremophor EL, alfa-tocoferol TPGS, estearato de polioxilo 40, análogos y derivados, o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el agente de permeabilización comprende un alquil aril poliéter, análogos o derivados. En una realización, el agente de permeabilización comprende etoxilato de octilfenol, análogos o derivados. El etoxilato de octilfenol también se conoce como octil fenil éter de polioxietileno, polietoxilato de 4-octilfenol, Mono 30, TX-100, t-octilfenoxipolietoxietanol, octoxinol-9, o el nombre comercial más comúnmente conocido de Triton™ X-100. En realizaciones alternativas, el agente de permeabilización comprende nonoxinol 9, análogos o derivados.

El agente de permeabilización comprende además un polímero catiónico, que es un mucoadhesivo. En algunas realizaciones, el polímero catiónico incluye quitosano, condroitina, o derivados de quitosano.

La presente composición farmacéutica comprende un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización tal como se define en la reivindicación 1. El derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica. En algunas realizaciones, el al menos un agente de permeabilización comprende quitosano o derivado de quitosano y TX-100, análogos de TX-100 o derivados de TX-100. En algunas realizaciones, la presente composición farmacéutica comprende una toxina botulínica, quitosano, o derivado de quitosano y nonoxinol-9, análogos de nonoxinol-9 o

derivados de nonoxinol-9. En realizaciones alternativas, la formulación comprende una toxina botulínica y un TEM.

En determinadas realizaciones, el agente de permeabilización puede comprender quelantes, incluyendo, pero sin limitarse a, EDTA, EGTA (ácido tetraacético de etilenglicol), tetraacetato de ciclohexanodiamina (CDTA), triacetato de hidroxietilendiamina (HEDTA), pentaacetato de dietilentriammina (DTPA), tetraacetato de 1,2-diaminociclohexano y hexametáfosfato. Estos agentes se emplean preferiblemente como sales, normalmente sales de sodio tales como EDTA de disodio, HEDTA de trisodio, hexametáfosfato de sodio o cualquier combinación de los mismos.

Por tanto, en un aspecto, la composición farmacéutica comprende un derivado de *Clostridium*, y al menos un agente de permeabilización, en la que la formulación farmacéutica es adecuada para la administración intravesical a la vejiga. El derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica y el agente de permeabilización comprende un mucoadhesivo y un tensioactivo no iónico. En algunas realizaciones, el mucoadhesivo incluye quitosano, análogos de quitosano, derivados de quitosano, condroitina, análogos de condroitina y derivados de condroitina. En una realización, la presente composición farmacéutica comprende una toxina botulínica de tipo A, quitosano o derivados de quitosano y TX-100, análogos de TX-100 o derivados de TX-100. En algunas realizaciones, el tensioactivo comprende nonoxinol-9, análogos de nonoxinol-9 o derivados de nonoxinol-9.

El agente de permeabilización está presente en una cantidad eficaz para la permeación. En una realización, una cantidad eficaz para la permeación se refiere a una cantidad eficaz para aumentar sustancialmente la permeabilidad de la superficie de la pared de la vejiga con daño limitado a la integridad de la vejiga. En una realización, la cantidad eficaz para la permeación se refiere a una cantidad eficaz para permitir la permeación de una cantidad terapéuticamente eficaz de una neurotoxina botulínica a través de la pared de la vejiga a una tasa terapéuticamente eficaz. En una realización, la cantidad eficaz para la permeación se refiere a una cantidad eficaz para aumentar sustancialmente la permeabilidad de la superficie de la pared de la vejiga frente a una cantidad terapéuticamente eficaz de la toxina a una tasa terapéuticamente eficaz durante un intervalo de tiempo deseado sin dañar de manera irreversible la pared de la vejiga. En algunas realizaciones, la permeabilidad aumentada es reversible después de un intervalo de tiempo deseado, después del cual la pared de la vejiga puede restablecer completa o parcialmente su impermeabilidad original o permeabilidad selectiva. En algunas realizaciones, la pared de la vejiga restablece su impermeabilidad original o permeabilidad selectiva después de un intervalo de tiempo que oscila desde 1 hora hasta 24 horas después de la instilación intravesical. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo oscila desde 3 horas hasta 18 horas. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo oscila desde 4 horas hasta 12 horas. La tasa de recuperación mediante la cual la pared de la vejiga restablece su permeabilidad o impermeabilidad selectiva original puede estar influenciada por las características del agente de permeabilización seleccionado, la cantidad y las características de la superficie de permeación, el tiempo de exposición y el entorno que rodea la superficie de permeación. En una realización, la integridad de la vejiga tras la administración de la presente composición farmacéutica puede evaluarse mediante la magnitud de la respuesta inmunitaria, tal como la presencia de células inmunitarias específicas.

La cantidad eficaz para la permeación varía dependiendo de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a las características del derivado de *Clostridium*, las características de la superficie de permeación (por ejemplo, la pared de la vejiga), el tipo de agente de permeabilización, y el entorno que rodea la superficie de permeación.

En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende una cantidad eficaz para la permeación de Triton™ X-100, análogos o derivados de Triton™ X-100 desde el 0,005% hasta el 10% (p/v), más preferiblemente desde el 0,025% hasta el 5% (p/v), y lo más preferiblemente desde el 0,1% hasta el 0,5% (p/v). En una realización específica, la cantidad eficaz permeativa de Triton™ X-100 es del 0,1% (p/v).

El agente de permeabilización se usa en combinación con un mucoadhesivo que es un polímero catiónico. En algunas realizaciones, el mucoadhesivo incluye quitosano, análogos de quitosano, derivados de quitosano, condroitina, análogos de condroitina o derivados de condroitina. La cantidad eficaz para la permeación del mucoadhesivo oscila desde el 0,005% hasta el 10% (p/v), más preferiblemente desde el 0,02% hasta el 5% (p/v), y lo más preferiblemente desde el 0,05% hasta el 2% (p/v). En una realización, la cantidad eficaz para la permeación de quitosano o derivados de quitosano es del 1% (p/v). En algunas realizaciones, la formulación comprende: (1) una toxina botulínica, (2) Triton™ X-100, análogo de Triton™ X-100, derivados de Triton™ X-100 o mezclas de los mismos; y (3) quitosano, derivados de quitosano o mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, la formulación comprende: (1) una toxina botulínica de tipo A, (2) Triton™ X-100, análogos de Triton™ X-100, derivados de Triton™ X-100 o mezclas de los mismos; y (3) quitosano, derivados de quitosano o mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, la formulación comprende de 20 unidades a 300 unidades de toxina botulínica de tipo A, del 0,5% al 2% (p/v) de quitosano, derivados; o mezclas de los mismos, y del 0,05% al 1% (p/v) de Triton™ X-100, análogos, derivados o mezclas de los mismos. En una realización, la formulación comprende desde 100 ó 200 unidades de toxina botulínica de tipo A, el 1% de quitosano y el 0,1% (p/v) de Triton™ X-100.

En algunas realizaciones, se usa nonoxinol 9 en combinación con el mucoadhesivo. En algunas realizaciones, el mucoadhesivo incluye quitosano, derivados de quitosano, condroitina, análogos de condroitina o derivados de condroitina. La cantidad eficaz para la permeación del mucoadhesivo oscila desde el 0,005% hasta el 10% (p/v), más preferiblemente desde el 0,02% hasta el 5% (p/v), y lo más preferiblemente desde el 0,1% hasta el 2% (p/v). En

algunas realizaciones, la cantidad eficaz para la permeación de quitosano o derivados de quitosano oscila desde el 0,005% hasta el 10% (p/v), más preferiblemente desde el 0,02% hasta el 5% (p/v), y lo más preferiblemente desde el 0,1% hasta el 2% (p/v). En una realización, la cantidad eficaz para la permeación de quitosano o derivados de quitosano es del 1% (p/v).

En algunas realizaciones, el agente de permeabilización puede comprender albúmina sérica humana recombinante o nativa.

En algunas realizaciones, la presente composición no comprende proteína derivada de animales. En una realización, la presente composición comprende una toxina botulínica (como el principio activo) y un polisacárido adecuado, o un excipiente no proteico como estabilizador o excipiente.

Por tanto, los aspectos de la presente divulgación proporcionan una composición farmacéutica que comprende toxina botulínica como un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización, en la que la composición farmacéutica es adecuada para administración intravesical a la vejiga y en la que el uno o más agentes de permeabilización está presente en una cantidad eficaz para la permeación, tal como se divulga en el presente documento. Las realizaciones de la presente composición incluyen excipientes y/o agentes terapéuticos que o bien provocarían o bien mejorarían los efectos farmacológicos de los derivados de *Clostridium*.

También pueden añadirse excipientes para aumentar la estabilidad de la formulación, aumentar la acción de los agentes de permeabilización (por ejemplo EDTA u otros agentes quelantes) o para aumentar la retención de la formulación a través de propiedades viscoelásticas aumentadas que se producirían de manera inmediata (por ejemplo: carboximetilcelulosa (CMC), hidroxipropilcelulosa (HPMC), alginato) o tras un cambio en la temperatura (por ejemplo: poloxámero 407), pH (Carbopol P-934, P940) y/o entornos iónicos (por ejemplo: goma gellan Gelrite, alginato).

También pueden añadirse excipientes para modular la tonicidad y/o el pH de la orina y la piel para aumentar la administración, estabilidad, biodisponibilidad y/o actividad terapéutica de las formulaciones.

La presente divulgación proporciona además un método para elaborar una formulación farmacéutica adecuada para la administración intravesical a la vejiga, comprendiendo el método proporcionar una disolución que comprende el al menos un agente de permeabilización tal como se divulga en el presente documento, añadir la disolución a una composición que comprende un derivado de *Clostridium* tal como se divulga en el presente documento. En algunas realizaciones, el método comprende añadir desde 50 ml hasta 100 ml de la disolución a la composición que comprende el derivado de *Clostridium* que es una toxina botulínica. En una realización, el método comprende añadir de 50 ml a 100 ml de una disolución acuosa que comprende el 1% (p/v) de quitosano o derivados del mismo y el 0,1% (p/v) de Triton™X-100, análogos o derivados, a una toxina botulínica de tipo A. En una realización, el método comprende añadir una disolución acuosa de 50 ml que comprende el 1% (p/v) de quitosano y el 0,1% (p/v) de Triton™X-100 en un vial que contiene 100 unidades o 200 unidades de una toxina botulínica de tipo A liofilizada; y mezclar suavemente para rehidratar la toxina botulínica de tipo A liofilizada.

En algunas realizaciones, también pueden añadirse excipientes para actuar como portadores del derivado de *Clostridium*. En una realización, se añade poli-L-lisina como portador.

Una composición divulgada en el presente documento se administra generalmente como una composición farmacéutica aceptable. Tal como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa cualquier entidad o composición molecular que no produce una reacción adversa, alérgica u otra desfavorable o no deseada cuando se administra a un individuo. Tal como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéuticamente aceptable" es sinónimo de "composición farmacéutica" y significa una concentración terapéuticamente eficaz de un principio activo, tal como, por ejemplo, la toxina de *Clostridium* divulgada en el presente documento. Una composición farmacéutica divulgada en el presente documento es útil para aplicaciones médicas y veterinarias. Una composición farmacéutica puede administrarse a un individuo sola, o en combinación con otros principios activos, agentes, fármacos u hormonas complementarios. Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse usando cualquiera de una variedad de procedimientos, incluyendo, sin limitación, mezclado, disolución, granulación, elaboración de grageas, pulverizado, emulsión, encapsulación, atrapamiento y liofilización convencionales. La composición farmacéutica puede tomar cualquiera de una variedad de formas incluyendo, sin limitación, una disolución, suspensión, emulsión, liofilizado, comprimido, píldora, gránulo, cápsula, polvo, jarabe, elixir estéril o cualquier otra forma de dosificación adecuada para la administración.

La presente composición farmacéutica puede incluir opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable que facilita el procesamiento de un principio activo para dar composiciones farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, el término "portador farmacológicamente aceptable" es sinónimo de "portador farmacológico" y significa cualquier portador que no tiene sustancialmente un efecto perjudicial a largo plazo o permanente cuando se administra y abarca términos tales como "vehículo, estabilizador, diluyente, aditivo, agente auxiliar o excipiente farmacológicamente aceptable". Generalmente, un portador de este tipo se mezcla con un compuesto activo, o se permite que diluya o encierre el compuesto activo y puede ser un agente sólido, semisólido o líquido. Se entiende que los principios activos pueden ser solubles o pueden administrarse como una suspensión en

el portador o diluyente deseado. Puede usarse cualquiera de una variedad de portadores farmacéuticamente aceptables incluyendo, sin limitación, medios acuosos tales como, por ejemplo, agua, solución salina, glicina y ácido hialurónico; portadores sólidos tales como, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio; disolventes; medios de dispersión; recubrimientos; agentes antibacterianos y antifúngicos; agentes isotónicos y retardantes de la absorción; o cualquier otro principio no activo. La selección de un portador farmacológicamente aceptable puede depender del modo de administración. Excepto en la medida en que cualquier portador farmacológicamente aceptable sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en composiciones farmacéuticamente aceptables. Pueden encontrarse ejemplos no limitativos de usos específicos de tales portadores farmacéuticos en PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS (Howard C. Ansel *et al.*, eds., Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 7ª ed. 1999); REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (Alfonso R. Gennaro ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 20ª ed. 2000); GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS (Joel G. Hardman *et al.*, eds., McGraw-Hill Professional, 10ª ed. 2001); y HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS (Raymond C. Rowe *et al.*, APhA Publications, 4ª edición 2003). Estos protocolos son procedimientos de rutina y cualquier modificación está dentro del alcance de un experto en la técnica y de la enseñanza en el presente documento.

Una composición farmacéutica divulgada en el presente documento puede incluir opcionalmente otros componentes farmacéuticamente aceptables (o componentes farmacéuticos), incluyendo, por ejemplo, tampones, conservantes, ajustadores de tonicidad, sales, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolalidad, sustancias fisiológicas, sustancias farmacológicas, agentes de carga, agentes emulsionantes, agentes humectantes, agentes edulcorantes o aromatizantes. Pueden usarse diversos tampones y medios para ajustar el pH para preparar una composición farmacéutica divulgada en el presente documento, siempre que la preparación resultante sea farmacéuticamente aceptable. Tales tampones incluyen tampones acetato, tampones citrato, tampones fosfato, solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y tampones borato. Se entiende que pueden usarse ácidos o bases para ajustar el pH de una composición según sea necesario. Los antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, acetilcisteína, hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado. Los conservantes útiles incluyen, sin limitación, cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, acetato fenilmercurio, nitrato fenilmercurio, una composición de oxícloro estabilizada y quelantes, tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida, DTPA de calcio y CaNaDTPA-bisamida. Los ajustadores de tonicidad útiles en una composición farmacéutica incluyen, sin limitación, sales tales como, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol o glicerina y otro ajustador de tonicidad farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede proporcionarse como una sal y puede formarse con muchos ácidos, incluyendo, pero sin limitarse a, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros protónicos que las correspondientes formas de base libre. Se entiende que estas y otras sustancias conocidas en la técnica de la farmacología pueden incluirse en una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica a modo de ejemplo que comprende una toxina de *Clostridium* y un TEM se describe en Hunt, *et al.*, Animal Protein-Free Pharmaceutical Compositions, documento estadounidense con n.º de serie 12/331.816; y Dasari, *et al.*, Clostridial Toxin Pharmaceutical Compositions, documento WO/2010/090677.

La elección de los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados dependerá de la naturaleza exacta de la formulación particular deseada, por ejemplo, si la presente composición va a formularse en una disolución líquida, un polvo liofilizado que se reconstituirá durante el uso, una disolución en suspensión, nanopartículas, liposomas o microemulsiones.

La elección de un portador farmacéuticamente aceptable adecuado también dependerá de la vía de administración. Preferiblemente, el portador se formula para que sea adecuado para una vía de administración elegida. Los modos de administración de la presente formulación farmacéutica incluyen, pero no se limitan a, inyección, inyecciones sin aguja (por ejemplo, Bioject, JetTouch), administración electromotriz, administración transdérmica o instilación intravesical. En una forma de realización específica, la formulación comprende un portador farmacéutico aceptable para la instilación vesical. En una realización, el portador farmacéutico comprende polilisina.

Composición para su uso en métodos de tratamiento

Los aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de un proceso patológico usando la composición farmacéutica tal como se definió anteriormente, en el que la administración de la presente composición farmacéutica previene o reduce un síntoma asociado con el proceso patológico que se está tratando. La administración es mediante administración intravesical.

En algunas realizaciones, las enfermedades son de una naturaleza neuromuscular, tal como, por ejemplo, las enfermedades que afectan a músculos y al control nervioso de los mismos, tal como vejiga hiperactiva.

Tratamiento de trastornos urológicos

El trastorno médico es la disfunción neurógena de la vejiga, que es una disfunción que resulta de la interferencia con las rutas nerviosas normales asociadas con la micción. Un tipo de disfunción neurógena de la vejiga es la vejiga

hiperactiva (espástica o hiperreflexiva). Una vejiga neurógena hiperactiva se caracteriza por una expulsión frecuente e incontrolada de orina de la vejiga. Puede haber una capacidad de la vejiga reducida y un vaciado incompleto de la orina. La vejiga espástica puede estar provocada por la incapacidad del músculo detrusor de la vejiga para inhibir las contracciones de vaciado hasta que se haya acumulado una cantidad razonable de orina. A menudo, se experimenta una fuerte necesidad de orinar cuando solo hay una pequeña cantidad de orina en la vejiga. El paciente puede informar de síntomas de urgencia, frecuencia, nicturia e incontinencia. Otro tipo de disfunción neurógena de la vejiga se caracteriza por la dificultad para relajar el músculo del esfínter urinario. El esfínter puede estar espástico. Esto provoca dificultad para vaciar la vejiga, lo que puede conducir a retención urinaria e infecciones de las vías urinarias. En otro tipo de disfunción neurógena de la vejiga, tanto el músculo detrusor como el esfínter urinario se contraen simultáneamente, lo que resulta en retención urinaria. Una disfunción asociada con la contracción simultánea tanto del detrusor como del esfínter urinario se denomina disinergia detrusor-esfínter externo (DESD). Las patentes estadounidenses n.ºs 7.449.192; 8.062.807 y 7.968.104, divulgan métodos para tratar a un paciente con una disfunción neurógena de la vejiga inyectando una cantidad terapéuticamente eficaz de una toxina botulínica en la pared de la vejiga del paciente.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse a la vejiga, en las que la administración de la formulación reduce la necesidad imperiosa de orinar asociada con la vejiga hiperactiva. En determinadas realizaciones, la dosis puede oscilar desde 10 unidades hasta 200 U por tratamiento. En algunas realizaciones, las presentes formulaciones farmacéuticas pueden administrarse mediante administración intravesical a la vejiga.

Por tanto, los aspectos de la presente divulgación proporcionan además una composición farmacéutica para su uso en un método para el tratamiento de un estado de la vejiga en un paciente que lo necesita, que comprende: proporcionar una composición farmacéutica tal como se divulga en el presente documento, que comprende un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización, en la que el agente de permeabilización está presente en una cantidad eficaz para mejorar sustancialmente la permeabilidad de la pared de la vejiga frente al derivado de *Clostridium* a una tasa terapéuticamente eficaz y sin dañar de manera irreversible la pared de la vejiga; y aplicar por instilación la composición farmacéutica en la vejiga a través de un catéter; tratando así los estados de la vejiga. En una realización, el método comprende además pretratar la pared de la vejiga con la composición farmacéutica antes de la etapa de instilación.

En otro aspecto, la presente formulación maximiza la biodisponibilidad de un derivado de *Clostridium* previniendo o minimizando la adsorción del derivado de *Clostridium* a catéteres, superficies de dispositivos de administración (jeringa, parche, microaguja, inyector modificado por ingeniería (Bioject, etc.), tubos y envases).

En otro aspecto, la presente formulación maximiza la biodisponibilidad del derivado de *Clostridium* mejorando la retención del derivado de *Clostridium* en la piel o la superficie interna de la pared de la vejiga, a través de interacciones mucoadhesivas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones y aspectos de la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de la presente divulgación.

En los siguientes ejemplos, además de una toxina botulínica de tipo A, BOTOX®, se usó un TEM como principio activo farmacéutico. En varios ejemplos, el TEM usado comprendía un dominio de direccionamiento de péptido opioide, o más específicamente un péptido de nociceptina. Para facilitar la selección de vehículos que potencian la permeabilidad en el modelo urotelial tridimensional *in vitro*, se usó gelatina marcada fluorescentemente (100 kDa) como sustituto (más adelante denominado "sustituto"). El uso de un sustituto fluorescente con peso molecular similar al del API que va administrarse permitió la evaluación de los efectos de agentes de permeabilización a modo de ejemplo sobre los tejidos vesicales mediante el uso de fluorescencia.

Ejemplo 1 (Referencia):

Uso de un modelo de cultivo uroepitelial humano para evaluar el efecto de agentes a modo de ejemplo sobre la permeación de células uroepiteliales humanas frente a una toxina seleccionada, TEM o proteína fluorescente sustituta.

Se evaluó el efecto de agentes de permeabilización a modo de ejemplo en un modelo de cultivo uroepitelial humano tal como se muestra en la figura 3.

Se muestra un modelo de cultivo uroepitelial humano en la figura 3. En resumen, se sembraron en placa células epiteliales vesicales humanas (CELLNTECH n.º de catálogo HBEP.05) a una concentración de aproximadamente 150.000 células viables por pocillo en insertos de membrana de poliéster (PET) o policarbonato. Se colocaron los insertos dentro de los pocillos de placas de cultivo tisular de 24 pocillos. Luego se añadieron medios CELLNTECH CnT-58 (medios de crecimiento) a los pocillos y se incubaron las células durante de 2 a 3 días a 37°C (el 5% de CO₂) hasta que las células eran confluentes. Al final de la incubación, se retiraron los medios de crecimiento y se

reemplazaron con medios CELLNTECH CnT-21 (medios de diferenciación). Luego se permitió que las células se diferenciaron durante de 5 a 7 días después de los cuales se estableció una capa uroepitelial humana de 2 a 3 células. Luego podría formularse BOTOX®, un TEM o un sustituto biológico (por ejemplo, gelatina fluorescente de gelatina marcada con Oregon Green 488 de 100 kDa) en vehículo de prueba y aplicarse a la superficie de la membrana. Se eligió el peso molecular del sustituto fluorescente para representar un peso molecular cercano al del TEM y la toxina botulínica de tipo A. Normalmente se aplicó un volumen de 0,1 ml de disolución de prueba a la superficie de los insertos de membrana en los que se hicieron crecer células. Luego se volvieron a colocar las muestras en la incubadora. En diversos intervalos de tiempo, se recogió el flujo en solución salina (por ejemplo: solución salina equilibrada de Eagle) o medios de cultivo (por ejemplo: medio esencial mínimo de Eagle). Los intervalos de recogida de muestras típicos oscilaron desde 1 hasta 3 horas. Algunas veces se realizó la recogida en otros intervalos (por ejemplo: 24 horas). Se valoraron las muestras después de la recogida midiendo la potencia basada en células (ensayos de actividad basados en células específicos para BoNT/A o TEM), escisión de la cadena ligera de SNAPtide® 520 (ensayo de HPLC de cadena ligera) o fluorescencia de muestras.

El ensayo de CL-HPLC se ha descrito previamente (Terrence Hunt, David Rupp, Gary Shimizu, Karen Tam, Julia Weidler y Jack Xie. Characterization of SNARE Cleavage Products Generated by Formulated Botulinum Neurotoxin Type-A Drug Products. Toxins 2010, 2, 2198-2212. El ensayo basado en células para BoNT/A se ha descrito previamente (Ester Fernández-Salas, Joanne Wang, Yanira Molina, Jeremy B. Nelson, Birgitte P.S. Jacky, K. Roger Aoki. "Botulinum Neurotoxin Serotype A Specific Cell-Based Potency Assay to Replace the Mouse Bioassay". PLoS One (2012) art. N.º e49516 y las patentes estadounidenses n.ºs 8.198.034 y 8.361.789). El ensayo basado en células para TEM se ha descrito previamente en la solicitud de patente estadounidense US 20100233741.

En resumen, el ensayo de cadena ligera se llevó a cabo de la siguiente manera: para cada muestra, se transfirió un volumen de 225 µl a tubos de reacción separados (tubos Microcon) que contenían 225 µl de tampón de digestión 2X (véase la tabla A para la composición del tampón de digestión 2X). Se calentaron las muestras a 37°C durante 30 minutos (etapa de reducción). Después de la finalización de la etapa de reducción, se añadió un volumen de 25 µl de SNAPtide® 520 200 µM a cada tubo (equivalente a SNAPtide® 520 10,5 µM). Luego se incubaron las muestras de reacción a 30°C durante 20 horas (etapa de digestión). Al completarse la etapa de digestión, se añadió un volumen de 25 µl de ácido trifluoroacético al 5% (TFA) a cada tubo para parar la reacción. Luego se transfirió el contenido de cada tubo a viales de HPLC para el análisis.

Tabla A Composición del tampón de digestión 2X

Tampón de digestión 2X	ZnCl ₂ 1 mM, DTT ^a 4 mM, TWEEN 20 al 0,1% en HEPES 100 mM, pH 7,4
Sustrato	SNAPTide® 520 200 µM preparado en SWFI ^b
^a Ditiotreitol, ^b List Biological Laboratories, Inc., suministrado a través de Calbiochem (n.º de catálogo 567333)	

Se analizaron las disoluciones de reacción a través de un método de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) usando un módulo de separaciones Waters 2695 XE y un detector de fluorescencia multi λ Waters 2475 (véase la tabla B para los parámetros de RP-HPLC). Se eluyeron las muestras usando un programa de gradiente (véase la tabla C) con una fase móvil que consistía en TFA al 0,1% en agua (A) y TFA al 0,1% en acetonitrilo (B). Se recogieron los datos y se analizaron mediante el software Waters Empower™ Pro (Waters Corporation). Se compararon las áreas de los picos del producto de escisión marcado fluorescentemente (denominado SNAPtide® 529 por List Biological Laboratories, Inc.) obtenidas para las muestras inyectadas.

Tabla B Parámetros de RP-HPLC

Columna	Waters Symmetry300™ C18, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm (P/N: 186000197)
Temperatura de columna	35°C
Volumen de inyección	25 µl
Flujo	1 ml/min
Detección	Excitación λ = 322 nm
	Emisión λ = 420 nm

Tabla C Programa de gradiente de HPLC

Tiempo (min)	% de A	% de B
--------------	--------	--------

0	90	10
5	90	10
13	85	15
18	5	95
20	5	95
21	90	10
30	90	10

En resumen, para el ensayo de potencia basado en células se utilizaron células BoNT/A SiMa H1 (Allergan, línea celular de neuroblastoma humano). Para el ensayo basado en células de TEM, la línea celular estable SiMa P33 hORL-1 n.º 6 (Allergan, línea celular de neuroblastoma humano (SiMa P33, Allergan) transfectada con plásmido humano ORL-1 (hORL-1) (GeneCopoeia, EX-A1076-M-02, Germantown, MD)). Se cultivaron la línea celular clonal SiMa H1 o la línea celular estable SiMa P33 hORL-1 n.º 6 en matraces con colágeno IV de 175 cm² de la marca BD Biosciences (62405-652, BD Biosciences, San Jose, CA) con tapas ventiladas. Los medios de crecimiento consistían en RPMI 1640, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y suero bovino fetal (SBF) al 10%. Todos los componentes de los medios se obtuvieron de Life Technologies. El medio de diferenciación consistía en medios Neurobasal®, complemento B27 (1X), GlutaMax (1X), penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml.

Para el ensayo de BoNT/A, se sembraron en placa células SiMa H1 en medios de diferenciación a 100.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos durante 3 días. Se trató cada pocillo durante 24 h con 0,1 ml de medios retirados de la cámara inferior del ensayo de permeabilidad. También se trataron las células en 3 filas con BOTOX® resuspendido en SWFI a dosis de desde 0 hasta 300 unidades por ml durante 24 h como referencia usando medios de diferenciación como diluyente. Para el ensayo de TEM, se sembraron en placa células SiMa P33 hORL-1 n.º 6 en medios de diferenciación a 50.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos durante la noche. Se trató cada pocillo durante 24 h con 0,1 ml de medios retirados de la cámara inferior del ensayo de permeabilidad. También se trataron las células en 3 filas con AGN-214868 (PRT-2623) a dosis de desde 0 hasta 100 nM durante 18 h como referencia.

Después del tratamiento, se cultivaron las células en medios de diferenciación durante 3 días adicionales. Se retiraron los medios y se lisaron las células durante 1 hora con 30 µl de tampón de lisis que consistía en cloruro de sodio 0,15 M, Tris 20 mM pH 7,5, cloruro de sodio 0,15 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y Triton X-100 al 1% en agua. Se centrifugaron los lisados a 4000 rpm durante 20 min para eliminar el residuo.

Se colocó de forma personalizada un microlitro del anticuerpo monoclonal de captura purificado 2E2A6 (AGN) a 45 µg/ml en PBS que contenía 750 µg/ml de BSA sobre placas MSD High Bind de Meso Scale Discovery (MSD, Gaithersburg, MD, n.º de catálogo L11XB-3). El anticuerpo monoclonal 2E2A6 desarrollado por NTP reconoce específicamente SNAP25¹⁹⁷. Se bloquearon las placas con 150 µl de tampón de bloqueo que consistía en reactivo de bloqueo Amersham al 2% (GE-Healthcare, Piscataway, NJ, n.º de cat. RPN418V), suero de cabra al 10% (Rockland Inc, n.º de catálogo B304), en PBS-T (TWEEN 20 al 0,05% (BioRad, Hercules, CA, n.º de catálogo 161-0781) en PBS (GIBCO-Invitrogen, n.º de cat. 14040)) a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se descartó el tampón de bloqueo.

Se añadieron veinticinco microlitros de lisado celular a cada pocillo de la placa de MSD manchada y se incubó la placa a 4°C durante la noche. Luego se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Se añadieron en la esquina inferior de los pocillos veinticinco microlitros de anticuerpo anti-SNAP25 AcP de detección marcado con SULFO-TAG NHS-Ester (Ac frente al extremo N-terminal de SNAP25 que reconoce los productos no escindidos y escindidos, Sigma, St. Louis, MO, n.º de cat. S9684) en el 2% de reactivo de bloqueo Amersham en PBS-T a 5 µg/ml. Se sellaron las placas y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 h. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T, y se añadieron 150 µl de tampón de lectura 1x (MSD, n.º de cat. R92TC-1) por pocillo. Se leyeron las placas en el lector de imágenes SI6000 (Meso Scale Discovery).

Para demostrar que el urotelio tridimensional *in vitro* es impermeable, como el urotelio humano *in vivo*, como por tanto es adecuado para la selección de vehículos que potencian la permeabilidad, se incubó la gelatina fluorescente sustituida en solución salina durante 1-3 horas en el compartimento superior. Se recuperaron niveles muy bajos de gelatina fluorescente en el compartimento inferior, lo que demuestra que el urotelio *in vitro* es impermeable a estas proteínas de alto peso molecular. Por el contrario, los vehículos conocidos por mejorar la permeabilidad *in vivo*, como EDTA y Accutase, podrían provocar el mismo efecto en el urotelio *in vitro*. Accutase es una mezcla de proteasas que se usa normalmente para recoger células que son sensibles al tratamiento con tripsina. Accutase digiere las uniones herméticas de células HBEP, pero no afecta a la viabilidad celular. Se completó un experimento para medir la penetración de gelatina fluorescente cuando se trata el urotelio *in vitro* con Accutase o EDTA. Después de 5 minutos de pretratamiento con Accutase, la capa celular del urotelio *in vitro* permitió el 13.000% de las UFR que el control no

tratado; mientras que el urotelio tratado con EDTA aumentó el 300%. Estos datos muestran que el urotelio *in vitro* es una capa celular impermeable y que la permeabilidad de la capa celular puede revertirse.

Ejemplo 2 (Referencia):

Triton X-100 y nonoxinol 9 aumentaron la permeación de vejiga de rata frente a una toxina botulínica de tipo A, un TEM y un sustituto de gelatina fluorescente en un modelo de cultivo uroepitelial humano. En este ejemplo, se evaluaron los efectos de Triton X-100, nonoxinol 9 y bromhidrato de poli-L-lisina en presencia o ausencia de EDTA.

El propósito del estudio era determinar si la permeabilidad de las células uroepiteliales humanas frente a un TEM (100 kDa) podría aumentarse si se pretratan las células durante 30 minutos con disoluciones que contengan diversos agentes que aumentan la permeabilización. Se evaluaron las siguientes disoluciones: solución salina, solución salina que contiene EDTA 50 mM, Triton-X100 al 1% en solución salina, Triton-X100 al 1% en solución salina que contiene EDTA 50 mM, nonoxinol 9 al 1% en solución salina, nonoxinol 9 al 1% en solución salina que contiene EDTA 50 mM, bromhidrato de poli-L-lisina al 1% en solución salina y bromhidrato de poli-L-lisina al 1% en solución salina que contiene EDTA 50 mM. Se aplicó un volumen de 0,1 ml de cada disolución de prueba a la superficie de los insertos de membrana en los que se hicieron crecer las células. Se retiraron las disoluciones después de 30 minutos de incubación a 37°C (el 5% de CO₂). Luego se colocó un volumen de 0,1 ml de solución salina que contiene TEM 0,1 mg/ml en cada inserto de membrana. Luego se incubaron las muestras durante 2 horas adicionales a 37°C (el 5% de CO₂). Se midió el flujo de muestra a las 2 horas mediante el ensayo de potencia basada en células de TEM y mediante el ensayo de HPLC de cadena ligera (escisión de la cadena ligera de SNAPtide® 520), tal como se describió anteriormente.

Tal como se muestra en la figura 4, los resultados indican que la permeabilidad de las células uroepiteliales humanas frente a sustituto de TEM marcado fluorescente podría aumentarse cuando se pretrataron células con Triton-X100, Nonoxinol 9 o bromhidrato de poli-L-lisina. Esta mejora se produjo con o sin EDTA.

Se sometieron a prueba muchos otros vehículos que potencian la permeabilidad con la gelatina fluorescente sustituta y con moléculas de TEM. Los resultados se resumen en la tabla D a continuación:

Tabla D:

Vehículo	Descripción	Resultados típicos
SDS	Tensioactivo aniónico	Inhibido
Sulfato de protamina	Catiónico	Inhibido
Cloruro de benzalconio	Catiónico	Sin efecto
Poloxámero 100	Tensioactivo no iónico	Aumento
Brij 97 (oleil éter de polioxietileno (10))	Tensioactivo no iónico	Aumento (respuesta a la dosis)
Brij 98 (oleil éter de polioxietileno (20))	Tensioactivo no iónico	Aumento (respuesta a la dosis)
Triton X	Tensioactivo no iónico	Aumento (respuesta a la dosis)
Nonoxinol 9	Tensioactivo no iónico	Aumento (respuesta a la dosis)
Tween 20	Tensioactivo no iónico	Aumento (respuesta a la dosis)
Tween 80	Tensioactivo no iónico	Aumento (respuesta a la dosis)
Big Chaps	Tensioactivo no iónico	Aumento (respuesta a la dosis)
Deoxy Big Chaps	Tensioactivo no iónico	Aumento (respuesta a la dosis)
Polietilenglicol 3350	Glicol	Sin efecto
Alcohol bencílico	Conservante	Ligero aumento (el 1% a 2 y 3 horas)
Quitosano	Mucoadhesivo	Inhibido
Monoetil éter de dietilenglicol	Glicol	Sin efecto
Péptido Revance	Péptido celular penetrante	Sin efecto a de 1 a 3 horas
Poli-L-lisina	Péptido	Aumento (respuesta a la dosis)

Poli-L-arginina	Péptido	Inhibido
EDTA	Quelante	Aumento

Ejemplo 3 (Referencia):

5 Transporte dependiente del tiempo y de la concentración del agente del sustituto de gelatina fluorescente a través de las células uroepiteliales humanas. (Figuras 5A y 5B)

En resumen, en este ejemplo, se expusieron células uroepiteliales humanas a diversos vehículos que contienen gelatina marcada con Oregon Green 488 fluorescente a una concentración de 0,1 mg/ml. Los vehículos de prueba consistían en lo siguiente: solución salina, Triton-X100 al 0,00745% en solución salina, Triton-X100 al 0,0149% en solución salina, Triton-X100 al 0,0745% en solución salina, Triton-X100 al 0,149% en solución salina, Triton-X100 al 0,745% en solución salina, nonoxinol 9 al 0,00262% en solución salina, nonoxinol 9 al 0,00524% en solución salina, nonoxinol 9 al 0,0262% en solución salina, nonoxinol 9 al 0,0524% en solución salina, nonoxinol 9 al 0,262% en solución salina y nonoxinol 9 al 0,524% en solución salina. También se expresa cada muestra como un múltiplo de la concentración micelar crítica (CMC) de Triton-X100 o nonoxinol 9. La CMC puede definirse como la concentración de tensioactivo por encima de la cual se forman espontáneamente micelas. Se aplicó un volumen de cien microlitros de cada disolución de prueba a las superficies de los insertos de membrana en los que se hicieron crecer las células. Se incubaron las células a 37°C (el 5% de CO₂). Se tomó una muestra del flujo de muestra a las 1, 2 y 3 horas y se midió la fluorescencia relativa.

20 Tal como se muestra en las figuras 5A y 5B, los resultados demuestran que el transporte depende tanto de la concentración como del tiempo. Se observó transporte aumentado al aumentar la concentración de tensioactivo y al aumentar el tiempo de incubación. Se observó transporte aumentado para cada vehículo de tensioactivo por encima de su CMC.

Ejemplo 4 (Referencia):

Efectos de agentes de permeabilización a modo de ejemplo sobre la permeabilidad de células uroepiteliales humanas frente a un complejo de toxinas botulínicas (figuras 6A y 6B)

30 El propósito del estudio era determinar si la permeabilidad de las células uroepiteliales humanas frente a BOTOX® (complejo de toxinas botulínicas de tipo A) podría aumentarse si se aplica en vehículos que contienen diversas concentraciones de Triton-X100 (figura 6A) o nonoxinol 9 (figura 6B). Se evaluaron los siguientes vehículos de prueba: agua estéril para inyección, Triton-X100 al 0,01% en agua estéril para inyección, Triton-X100 al 0,025% en agua estéril para inyección, Triton-X100 al 0,05% en agua estéril para inyección, nonoxinol 9 al 0,01% en agua estéril para inyección, nonoxinol 9 al 0,025% en agua estéril para inyección y nonoxinol 9 al 0,05% en agua estéril para inyección. Debido a que cada vial de BOTOX® contiene cloruro de sodio al 0,9%, se usó agua estéril para inyección para preparar los vehículos para mantener las disoluciones de cloruro de sodio al 0,9% después de la reconstitución (volumen de reconstitución 0,1 ml). Se reconstituyeron viales de 100 unidades de BOTOX® con volúmenes de 0,1 ml de cada vehículo. Las disoluciones resultantes contienen 1000 unidades de BOTOX® por mililitro. Se aplicó un volumen de 0,1 ml de cada disolución reconstituida a las superficies de los insertos de membrana en los que se hicieron crecer células. Se midió el flujo de muestra a las 1 y 3 horas mediante el ensayo de HPLC de cadena ligera (escisión de la cadena ligera de SNAPtide® 520) y el ensayo basado en células de BoNT/A.

45 Los resultados mostrados en la figura 6A y 6B demuestran que la permeabilidad de las células uroepiteliales humanas frente a BOTOX® (complejo de toxinas botulínicas de tipo A) podría aumentarse cuando se aplica en vehículos que contiene Triton-X100 (figura 6A) y nonoxinol 9 (figura 6B). Los resultados de las pruebas demuestran que la permeabilidad depende tanto de la concentración como del tiempo. Se observó permeabilidad aumentada al aumentar la concentración de Triton-X100 y nonoxinol 9 y al aumentar el tiempo (1 hora frente a 3 horas). La permeabilidad aumentada se refleja en los aumentos observados en los conteos de área de pico (escisión de Snapptide® 520).

50 También se analizó el flujo de muestra a 1 hora en el ensayo basado en células de BoNT/A. Hubo un aumento de 3 veces frente a la solución salina en la cantidad de BoNT/A que permeó el urotelio *in vitro* cuando se administró BOTOX® en presencia de nonoxinol 9 al 0,05%, y un aumento de 3,6 veces frente a la solución salina cuando se usó Triton-X100 al 0,05%.

55 Se ha informado de que a un valor de pH de 6, el complejo de toxinas botulínicas de tipo A de 900 kDa permanecerá intacto mientras que a un valor de pH de 8 el complejo se disociará dando como resultado una toxina botulínica de tipo A de 150 kDa libre (1). Se evaluaron las siguientes disoluciones de prueba: solución salina con fosfato de potasio 5 mM, pH 6,0; solución salina con fosfato de potasio 5 mM, pH 8,0; Triton-X100 al 0,5% en solución salina con fosfato de potasio 5 mM, pH 6,0 y Triton-X100 al 0,5% en solución salina con fosfato de potasio 5 mM, pH 8,0. Se valoró el flujo de muestra en el ensayo basado en células de BoNT/A. No hubo diferencias entre BOTOX® en pH 6 u 8, y en ambos casos, el uso de Triton-X100 al 0,5% aumentó la permeabilidad de la BoNT/A activa a través del urotelio *in vitro* (figura 7).

Ejemplo 5 (Referencia):

Evaluación *in vivo*: se evaluó el efecto de agentes de permeabilización a modo de ejemplo *in vivo* sobre vejiga de rata. En este ejemplo, se evaluaron los efectos de Triton X-100 y nonoxinol 9 (figuras 8A, 8B, 9A y 9B)

Métodos:

Administración de BOTOX® y sustituto de TEM: para la instilación con control de vehículo, se prepararon disoluciones de trabajo de BOTOX® (onabotulinumtoxina A; Allergan) y el sustituto en solución salina al 0,9% o HSA al 0,5%, respectivamente. Para la instilación con tensioactivo, se prepararon disoluciones de trabajo de BOTOX® (onabotulinumtoxina A; Allergan) y sustituto de TEM en solución salina al 0,9%. Se aplicó por instilación a la pared de la vejiga urinaria BOTOX® (20U) o el sustituto (250 µg) durante 1 hora, bajo anestesia. Todos los protocolos y procedimientos *in vivo* se aprobaron por la AACUC institucional.

Preparación de tejidos: se recogió tejido vesical de ratas Sprague Dawley adultas (220-250g, n=2-20) 2 días después de la instilación y se fijó durante la noche a 4°C en fijador de Zamboni. Luego se crioprotegieron los tejidos (sacarosa al 30%), se cortaron longitudinalmente en hemisección, se congelaron en medio de inclusión y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

Inmunofluorescencia: se seccionó con criostato un bloque de tejido por animal (14 µm de espesor) en el plano longitudinal y se montó en un portaobjetos. Se prepararon tres portaobjetos de cada bloque, con tres secciones en cada portaobjetos, separadas aproximadamente 140 µm. Se procesaron dos portaobjetos para la determinación de inmunofluorescencia. En primer lugar, se bloquearon las secciones tisulares frente a la señal no específica en el tampón de bloqueo (1X PBS + TX-100 al 0,1% + suero de burro normal al 10%) y luego se incubaron con combinaciones de anticuerpos primarios a la concentración deseada en tampón de bloqueo, durante la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios usados fueron los siguientes: péptido relacionado con el gen anti-calcitonina de ratón (CGRP; Sigma, C7113, 1:5.000), anticuerpo anti-SNAP25 escindida (SNAP25₁₉₇; Allergan, 1:1.000), anticuerpo de conejo frente a glicoproteína de vesícula sináptica 2C (SV2C; Santa Cruz Biotechnologies, sc-28957, 1:800) y anticuerpo de conejo frente a transportador de acetilcolina vesicular (VACHT; Sigma, V5387, 1:3.000). Después de los lavados, se incubaron las secciones con anticuerpos secundarios (Jackson ImmunoResearch) durante 2 horas a 4°C y luego se lavaron de nuevo. Se cubrieron las secciones montadas en portaobjetos usando Fluoromount-G con 1,5 µg/ml de DAPI. Se tiñó el tercer portaobjetos con hematoxilina y eosina (H&E) para la evaluación anatómica.

Análisis y cuantificación de los datos: se analizaron y capturaron las imágenes en un microscopio de campo claro Leica DMLB, un microscopio de campo amplio fluorescente Nikon E800 o un microscopio confocal Zeiss LSM-710 usando el software Image-Pro® (MediaCybernetics), Metamorph® (Molecular Devices) o ZEN (Carl Zeiss). Se usó el software Imaris® (Bitplane) para el análisis cualitativo tridimensional de alta resolución para establecer las relaciones espaciales de las fibras nerviosas. Se identificaron los tipos de fibras nerviosas basándose en su morfología y neuroquímica. Para el análisis semicuantitativo, para cada portaobjetos, se observaron cuidadosamente las 3 secciones bajo un microscopio y se dio una puntuación (desde 0 hasta 5) para cada animal o bien con respecto al grado de tinción de SNAP25₁₉₇ (tal como se muestra en la figura 8A) o bien con respecto a la integridad de la anatomía de la vejiga (H&E) (tal como se muestra en la figura 8B). Se calculó una puntuación promedio para cada tratamiento/formulación y los resultados se presentan como un gráfico de barras (figuras 9A, 9B).

La figura 8A muestra una evaluación semicuantitativa de la integridad de vejigas de rata usando un método de puntuación ordinal de 0 - 5; siendo '0' una vejiga normal y '5' una vejiga que muestra una patología grave.

La figura 8B muestra una evaluación semicuantitativa del grado de la tinción de SNAP25-197 que corresponde a una tinción de VACHT de fibras nerviosas parasimpáticas en vejiga de rata usando un método de puntuación ordinal de 0 - 5; siendo '0' sin tinción de SNAP25-197 detectada y '4,5' tinción que muestra casi un solapamiento completo de ambos biomarcadores. No se observó nunca una puntuación de '5'.

La figura 9A muestra el grado de la tinción de SNAP25-197 (barras azules) y el daño del tejido vesical basándose en la tinción de H&E (barras rojas) después de la instilación vesical con sustituto (250 µg) junto con concentraciones crecientes de tensioactivo. Los valores son medias ± DE para el número dado de animales. **P*<0,05 significativamente diferente del control de vehículo mediante ANOVA de una vía seguido por análisis de comparaciones múltiples a posteriori de Holm-Sidak.

La figura 9B muestra el grado de la tinción de SNAP25-197 (barras azules) y el daño del tejido vesical basándose en la tinción de H&E (barras rojas) después de la instilación con sustituto (250 µg) o BOTOX® (20 U) junto con concentraciones crecientes de tensioactivo en la vejiga de ratas del modelo de cistitis intersticial. Los valores son medias ± DE para el número dado de animales. **P*<0,05 significativamente diferente del control de vehículo mediante ANOVA de una vía seguido por análisis de comparaciones múltiples a posteriori de Holm-Sidak.

Ejemplo 6 (Referencia):

Efecto de Triton-X100 sobre la permeabilidad de la pared de la vejiga frente a complejo de toxinas botulínicas de tipo A de 900 kDa intacto y toxina botulínica de tipo A de 150 kDa libre. (Figura 10)

Se ha informado de que a un valor de pH de 6, el complejo de toxinas botulínicas de tipo A de 900 kDa permanecerá intacto mientras que a un valor de pH de 8 el complejo se disociará dando como resultado una toxina botulínica de tipo A de 150 kDa libre (1). Se evaluaron las siguientes disoluciones de prueba: solución salina con fosfato de potasio 5 mM, pH 6,0; solución salina con fosfato de potasio 5 mM, pH 8,0; Triton-X100 al 0,1% en solución salina con fosfato de potasio 5 mM, pH 6,0 y Triton-X100 al 0,1% en solución salina con fosfato de potasio 5 mM, pH 8,0. Se usó un volumen de 2,5 ml de cada disolución para reconstituir viales de BOTOX® de 100 unidades. Esto dio como resultado disoluciones de 40 unidades por mililitro. Se aplicó por instilación un volumen de 0,5 ml de cada disolución reconstituida a vejigas de rata dando, como resultado la instilación con 20 unidades.

La figura 10 muestra el grado de la tinción de SNAP25-197 (barras azules) y el daño del tejido vesical basándose en la tinción de H&E (barras rojas) después de la instilación vesical con BOTOX® (20 U) a pH 6,0 o pH 8,0 en solución salina o tensioactivo. Los valores son medias $\pm$ DE para el número dado de animales. * $P < 0,05$ significativamente diferente del control de vehículo a un pH dado mediante la prueba de la t.

Ejemplo 7 (Referencia):

Efecto de un agente de permeabilización a modo de ejemplo sobre la retención de mucoadhesivo de las células de la vejiga humana. En este ejemplo, el agente de permeabilización a modo de ejemplo es el quitosano (figura 11).

El quitosano demuestra retención de mucoadhesivo de las células de la vejiga humana

Se sembraron en placa células de vejiga humana (CELLNTECH n.º de cat. HBEP.05) a 150.000 células por pocillo sobre insertos de membrana de PET (24 pocillos) en medios CELLNTECH CnT-58 (medios de crecimiento) durante 3 días, luego en CELLNTECH CnT-21 (medios de diferenciación) durante 7 días. Se acondicionó previamente la capa celular en solución salina con el 0%, 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4% de quitosano o durante 10 minutos con Accutase (tripsina suave)

Se trató la capa celular con 100 μ l de gelatina marcada con Oregon Green de 0,5 mg/ml.

El medio de flujo fue solución salina equilibrada de Hanks.

Se recogió el medio de flujo y se midió UFR a 30 min, 1 hora, 2 horas y 3 horas.

Tras visualizar y contar la cantidad restante en la membrana, los resultados se muestran en la figura 11. Los resultados muestran que el quitosano aumentó la retención de gelatina dentro del urotelio *in vitro*.

Ejemplo 8 (Referencia):

La permeabilidad aumentada inducida por Triton X-100 de la pared de la vejiga era reversible

Se sembraron en placa células uroepiteliales de vejiga humana (CELLnTEC n.º de catálogo HBEP.05) a una concentración de aproximadamente 150.000 células viables por pocillo en insertos de membrana de policarbonato. Se colocaron los insertos dentro de los pocillos de placas de cultivo tisular de 24 pocillos. Luego se añadieron medios CELLnTEC CnT-58 (medios de crecimiento) a los pocillos y se incubaron las células durante 2 días a 37°C (el 5% de CO₂) hasta que las células eran confluentes. Al final de la incubación, se retiraron los medios de crecimiento y se reemplazaron con medios CELLnTEC CnT-21 (medios de diferenciación). Luego se dejó que las células se diferenciaron durante 7 días, después de lo cual se estableció una capa uroepitelial humana de 2 a 3 células. Se trataron las células durante una hora con los siguientes vehículos: solución salina al 0,9%, Triton X-100 al 0,1% en solución salina al 0,9% y Triton X-100 al 0,5% en solución salina. Se sometió a prueba cada vehículo por triplicado. Se trataron las células aplicando volúmenes de 0,1 ml de cada vehículo a las superficies de los insertos de membrana en los que se hicieron crecer las células. Después de la exposición, se retiraron las disoluciones de vehículo de los insertos y se añadieron medios de diferenciación a cada inserto. Luego, se incubaron las células y se dejaron recuperar durante 0, 24 ó 48 horas. Obsérvese que la solución salina al 0,9% (control negativo) solo se sometió a prueba a las 0 horas. Luego se realizaron ensayos de permeabilidad de la gelatina. Los ensayos de permeabilidad de la gelatina se realizaron retirando los medios de cada inserto seguido por la adición de volúmenes de 0,1 ml de gelatina marcada con Oregon Green 488 de 0,1 mg/ml, formulada en solución salina, a cada inserto. Se colocaron los insertos en pocillos que contenían volúmenes de 0,8 ml de solución salina equilibrada de Earl. Después de 1 hora de exposición, se recogió el flujo y se midió la fluorescencia usando un instrumento Envision. Luego se compararon los resultados de las pruebas de veinticuatro horas y cuarenta y ocho horas con los datos de las 0 horas para determinar si se habían producido disminuciones en la permeabilidad de la gelatina.

Se encontró que la cantidad de gelatina que se difundió a través del urotelio *in vitro* tratado con Triton X-100 al 0,1% era menor después de 24 y 48 horas de recuperación. Estos resultados sugieren la recuperación de la permeabilidad urotelial humana *in vitro* después del tratamiento con Triton X-100 al 0,1%.

5 Ejemplo 9 (Figuras 12, 13, 14A-14D y 15)

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de la toxina botulínica de tipo A, conocida como BOTOX®, en una de las ocho formulaciones de vehículo administradas por instilación en la vejiga urinaria de ratas hembra Sprague Dawley. Se examinó el efecto ocho días después de la administración en el que se evaluaron la eficacia y tolerabilidad mediante inmunohistoquímica (IHC) e histopatología, respectivamente.

Controles positivos: se les administró a cuatro ratas 10 unidades de BOTOX® en solución salina mediante inyección en el músculo detrusor.

15 Controles negativos: formulaciones que contenían el vehículo solo (tal como se muestra en la tabla 1 sin adición de BOTOX®).

Se usó SNAP 25 escindida como biomarcador de la actividad del BOTOX® en los terminales sinápticos y un posible indicador de la funcionalidad del método de administración. En este estudio se usó para confirmar el movimiento exitoso del BOTOX® a través del urotelio. Se usó la expresión de sinaptofisina para identificar terminales sinápticos y para asegurar la especificidad de la ubicación de SNAP 25 escindida. Se realizó histopatología para evaluar el impacto de la formulación sobre el tejido vesical.

25 Se les administró a ratas hembra que pesaban entre 150 y 200 gramos 0,5 ml de formulación de vehículo o formulación de vehículo + 30 U de Botox® según la tabla 1:

Tabla 1:

Números de estudio de UR13002RS	Número de estudio de DP	Formulación de vehículo	
1	DP13104	Triton al 0,1%	*
2	DP13112	Triton al 0,2%	*
3	DP13117	Triton al 0,05%	*
4	DP13121	Nonoxinol-9 ^a al 0,1%	*
5	DP13129	Quitosano al 1% + Triton al 0,1%	
6	DP13130	HMPC al 0,25% + Triton al 0,1%	*
7	DP13139	Tiloxapol al 0,1%	*
8	DP13145	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1%	
^a = sólo 5 vejigas tratadas con vehículo + BOTOX sometidas a evaluación. * Ejemplos de referencia que no son según la presente invención.			

30 La instilación intravesical de la formulación se llevó a cabo de la siguiente manera: se anestesiaron ratas con isoflurano y se vació la vejiga mediante presión con la punta de los dedos aplicada en la parte inferior del abdomen. Mientras estaba bajo anestesia, se introdujo un catéter en la vejiga urinaria a través de la uretra. Posteriormente, se administró lentamente la formulación a lo largo de un transcurso de dos minutos en la vejiga urinaria a un volumen de dosis de 0,5 ml + 0,1 ml (para adaptarse al espacio muerto creado por el catéter). Se dejó reposar la formulación en la vejiga durante 60 minutos antes de la recuperación de la anestesia. Se sacrificaron las ratas una semana después de la instilación.

Se recogieron las vejigas urinarias, se fijaron en formalina al 10% y se procesaron usando técnicas histológicas convencionales. Se prepararon y procesaron secciones adicionales para la determinación de SNAP 25 escindida y sinaptofisina mediante inmunohistoquímica fluorescente.

45 Inmunofluorescencia: se seccionó con criostato un bloque de tejido por animal (14 µm de espesor) en el plano longitudinal y se montó en un portaobjetos. Se prepararon tres portaobjetos de cada bloque, con tres secciones en cada portaobjetos, separadas aproximadamente 140 µm. Se procesaron dos portaobjetos para la determinación de inmunofluorescencia. En primer lugar, se bloquearon las secciones tisulares frente a la señal no específica en el tampón de bloqueo (1X PBS + TX-100 al 0,1% + suero de burro normal al 10%) y luego se incubaron con combinaciones de anticuerpos primarios a la concentración deseada en tampón de bloqueo, durante la noche a 4°C.

Los anticuerpos primarios usados fueron los siguientes: péptido relacionado con el gen anti-calcitonina de ratón (CGRP; Sigma, C7113, 1:5.000), anticuerpo anti-SNAP25 escindida (SNAP25₁₉₇; Allergan, 1:1.000), anticuerpo de conejo frente a glicoproteína de vesícula sináptica 2C (SV2C; Santa Cruz Biotechnologies, sc-28957, 1:800) y anticuerpo de conejo frente a transportador de acetilcolina vesicular (VACHT; Sigma, V5387, 1:3.000). Después de los lavados, se incubaron las secciones con anticuerpos secundarios (Jackson ImmunoResearch) durante 2 horas a 4°C y luego se lavaron de nuevo. Se cubrieron las secciones montadas en portaobjetos usando Fluoromount-G con 1,5 µg/ml de DAPI. Se tiñó el tercer portaobjetos con hematoxilina y eosina (H&E) para la evaluación anatómica.

Análisis y cuantificación de los datos: se analizaron y capturaron las imágenes en un microscopio de campo claro Leica DMLB, un microscopio de campo amplio fluorescente Nikon E800 o un microscopio confocal Zeiss LSM-710 usando el software Image-Pro® (MediaCybernetics), Metamorph® (Molecular Devices) o ZEN (Carl Zeiss). Se usó el software Imaris® (Bitplane) para el análisis cualitativo tridimensional de alta resolución para establecer las relaciones espaciales de las fibras nerviosas. Se identificaron los tipos de fibras nerviosas basándose en su morfología y neuroquímica. Para el análisis semicuantitativo, para cada portaobjetos, se observaron cuidadosamente las 3 secciones bajo un microscopio y se dio una puntuación (desde 0 hasta 4) para cada animal o bien con respecto al grado de tinción de SNAP25₁₉₇ (tal como se muestra en las figuras 12 y 13) o bien con respecto a la integridad de la anatomía de la vejiga (H&E) (tal como se muestra en las figuras 14A-D). Se calculó una puntuación promedio para cada tratamiento/formulación y los resultados se presentan parcialmente en la tabla 2 y la figura 15.

Se evaluaron las formulaciones basándose en lo siguiente:

1. Cambios histológicos en la pared de la vejiga; en el que se realizó un diagnóstico de “infiltrado de células fusiformes” para las vejigas en las que se encontró un mayor número de células fusiformes de origen indeterminado infiltrando la lámina propia (figuras 14B, 14C y 14D); como cambio reactivo, estos se consideraron indeseables como un posible precursor de la fibrosis; y

2. Puntuación de SNAP 25 escindida.

Sumario de los resultados: los resultados se resumen en la tabla 2 a continuación en la que sólo las ratas n.^{os} 35-39, 41, 59-61, 63, 64 y 66 se trataron con composiciones tal como se reivindica:

Tabla 2:

UR13002RS1/ DP13104	n.º de rata	Tratamiento*	NAD	Infiltrados/inflamación: lámina propia	Infiltrados de células fusiformes	edema	otro	SNAP 25 escindida
150	1	Instilación con Triton al 0,1% + BTX (30 U)	x					2
250	2	Instilación con Triton al 0,1% + BTX (30 U)		infiltrados mononucleares mín.				0
350	3	Instilación con Triton al 0,1% + BTX (30 U)		infiltrados de células mixtas mín.	lámina propia mín.			3
450	4	Instilación con Triton al 0,1% + BTX (30 U)	x					1
550	5	Instilación con Triton al 0,1% + BTX (30 U)	x					0
650	6	Instilación con Triton al 0,1% + BTX (30 U)	x					2
750	7	Instilación con Triton al 0,1%		infiltrados mononucleares mín.				0
850	8	Instilación con Triton al 0,1%	x					0
UR13002RS2/ DP13112	n.º de rata	Tratamiento*						
150	10	Instilación con Triton al 0,2%		infiltrado mononuclear mín.				0
250	11	Instilación con Triton al		infiltrados de células mixtas mín.				2

[illegible]

		0,05% + BTX (30 U)							
650	24	Instilación con Triton al 0,05% + BTX (30 U)			inflamación de células mixtas moderada	mod.			1
750	25	Instilación con Triton al 0,05% + BTX (30 U)	x						1
850	26	Instilación con Triton al 0,05% + BTX (30 U)			inflamación de células mixtas moderada	mod.	moderada	ulceración	2

UR13002RS4/ DP13121	n.º de rata	Tratamiento*	NAD	Infiltrados/inflamación: lámina propia	Infiltrados de células fusiformes	edema	otro	SNAP 25 escindida
150	27	Nonoxinol-9 al 0,1%		inflamación de células mixtas mínima	lámina propia mín.			0
250	29	Nonoxinol-9 al 0,1% + Botox 30 U		infiltrados mononucleares mínimos				2
350	30	Nonoxinol-9 al 0,1% + Botox 30 U		infiltrados de células mixtas mínimos				3
450	31	Nonoxinol-9 al 0,1% + Botox 30 U		infiltrados mononucleares mínimos	lámina propia mín.		en placas	2
550	32	Nonoxinol-9 al 0,1% + Botox 30 U	x					2
650	33	Nonoxinol-9 al 0,1% + Botox 30 U	x					3
750	34	Nonoxinol-9 al 0,1%		inflamación de células mixtas leve	lámina propia leve		difuso, hemorragia	0

UR13002RS8/ DP13129	n.º de rata	Tratamiento	NAD	Infiltrados/inflamación: lámina propia	Infiltrados de células fusiformes	edema	otro	SNAP 25 escindida
150	35	Quitosano al 1% + Triton al 0,1% +		infiltrado mononuclear mín.				2

[illegible]

UR13002RS6/ DP13130	n.º de rata	Tratamiento*	NAD	Infiltrados/inflamación: lámina propia	Infiltrados de células fusiformes	edema	otro	SNAP 25 escindida
150	43	Instilación con HPMC al 0,25% + Triton al 0,1% + Botox (30 U)	x					3
250	44	Instilación con HPMC al 0,25% + Triton al 0,1% + Botox (30 U)		inflamación de células mixtas mod.	leve	leve		2
350	45	HPMC al		inflamación de células	leve	leve	hemorragia leve	0

		0,25% + Triton al 0,1%		mixtas mod.					
450	46	Instilación con HPMC al 0,25% + Triton al 0,1% + Botox (30 U)	x					2	
550	47	Instilación con HPMC al 0,25% + Triton al 0,1% + Botox (30 U)		inflamación de células mixtas mod.	leve	leve		1	
650	48	Instilación con HPMC al 0,25% + Triton al 0,1% + Botox (30 U)		inflamación de células mixtas mín.	mín.			2	
750	49	Instilación con HPMC al 0,25% + Triton al 0,1% + Botox (30 U)	x					2	
850	50	HPMC al 0,25% + Triton al 0,1%		inflamación de células mixtas grave	leve	mod.	úlceras grandes; bacterias	0	

UR13002RS8/ DP13145	n.º de rata	Tratamiento	NAD	Infiltrados/inflamación: lámina propia	Infiltrados de células fusiformes	edema	otro	SNAP 25 escindida
150	59	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1% + BTX (30 U)		Infiltrado de células mononucleares mín.				1
250	60	Quitosano al 1% + nonoxinol-9		infiltrado mononuclear leve	mín.			1

		al 0,1% + BTX (30 U)								
350	61	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1% + BTX (30 U)			inflamación mononuclear leve	min.			células desgranuladas	2
450	62	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1%	x							0
550	63	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1% + BTX (30 U)			inflamación de células mixtas leve	leve				1
650	64	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1% + BTX (30 U)			infiltrado de células mononucleares mín.					2
750	65	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1%	x							0
850	66	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1% + BTX (30 U)			inflamación de células mixtas leve	leve				3

UR 13002RS7/ DP13139	n.º de rata	Tratamiento*	NAD	Infiltrados/inflamación: lámina propia	Infiltrados de células fusiformes	edema	otro	SNAP 25 escindida
150	51	Tiloxapol al 0,1% + Botox 30 U	x					1
250	52	Tiloxapol al 0,1% + Botox 30 U	x					0
350	53	Tiloxapol al 0,1% + Botox 30 U	x					0
450	54	Tiloxapol al	x					0

[illegible]

*Ejemplos de referencia

Formulaciones de prueba: se observaron puntuaciones positivas de inmunohistoria en todas las muestras después de la instilación intravesical de BOTOX®, excepto para las formulaciones de tiloxapol al 0,1% (p/v). La figura 15 muestra las puntuaciones de IHC de algunas formulaciones a modo de ejemplo.

5 Ejemplo 10

Composición para su uso en el tratamiento de vejiga hiperactiva

10 Este ejemplo describe el uso de una composición para el tratamiento de pacientes con vejiga hiperrefléxica debido a disfunción neurógena o idiopática de la vejiga.

15 Varios pacientes con síntomas de vejiga hiperrefléxica (infección de la vejiga, incontinencia y necesidad imperiosa de orinar) debido a disfunción neurógena o idiopática de la vejiga se tratan mediante instilación vesical. Una composición farmacéutica que comprende 100 Unidades de BOTOX®, Triton™ X-100 al 0,1% (p/v) y quitosano al 1% (p/v). La composición farmacéutica se aplica por instilación en la vejiga de los pacientes bajo una ligera sedación. Se observa un aumento significativo en la capacidad máxima media de la vejiga y una disminución significativa en la presión máxima media de micción del detrusor 7 días después del tratamiento.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización, en la que el al menos un agente de permeabilización comprende una combinación de un tensioactivo y un mucoadhesivo, en la que el mucoadhesivo está presente en una cantidad del 0,005-10% p/v para aumentar sustancial y reversiblemente la permeabilidad de la pared de la vejiga frente al derivado de *Clostridium*, en la que el derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica, y en la que el tensioactivo es un tensioactivo no iónico y el mucoadhesivo es un polímero catiónico.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el tensioactivo comprende un alquil aril poliéter.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el mucoadhesivo comprende quitosano, derivados de quitosano o combinaciones de los mismos.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el tensioactivo está presente en una cantidad que oscila desde el 0,01% hasta el 0,5% (p/v).
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que el mucoadhesivo está presente en una cantidad que oscila desde el 0,01% hasta el 5% (p/v).
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el mucoadhesivo está presente en una cantidad del 1% (p/v).
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el tensioactivo comprende octoxinol-9 o nonoxinol-9.
8. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 7, en la que el tensioactivo está presente en una cantidad del 0,1% (p/v).
9. Composición farmacéutica para su uso en un método para el tratamiento de un paciente con una disfunción neurógena de la vejiga, en la que el método comprende: aplicar por instilación por vía intravesical la composición farmacéutica según la reivindicación 1 a la pared de la vejiga del paciente.
10. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9, en la que el agente mucoadhesivo comprende quitosano, derivados de quitosano, o combinaciones de los mismos.

Figura 1

Patrón típico de inyecciones de BOTOX® intracistinales para tratamiento de OAB

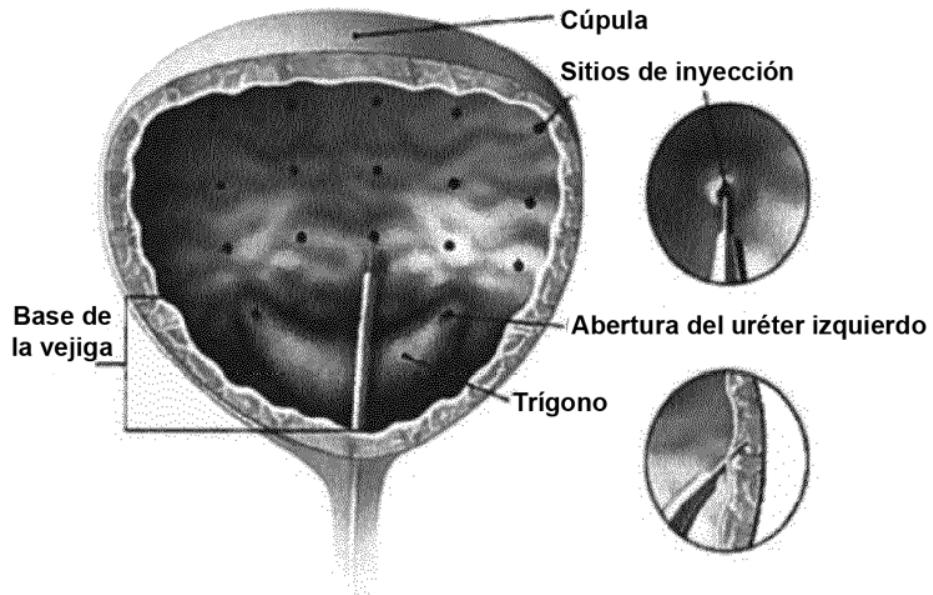


Figura 1

Diagrama esquemático del urotelio

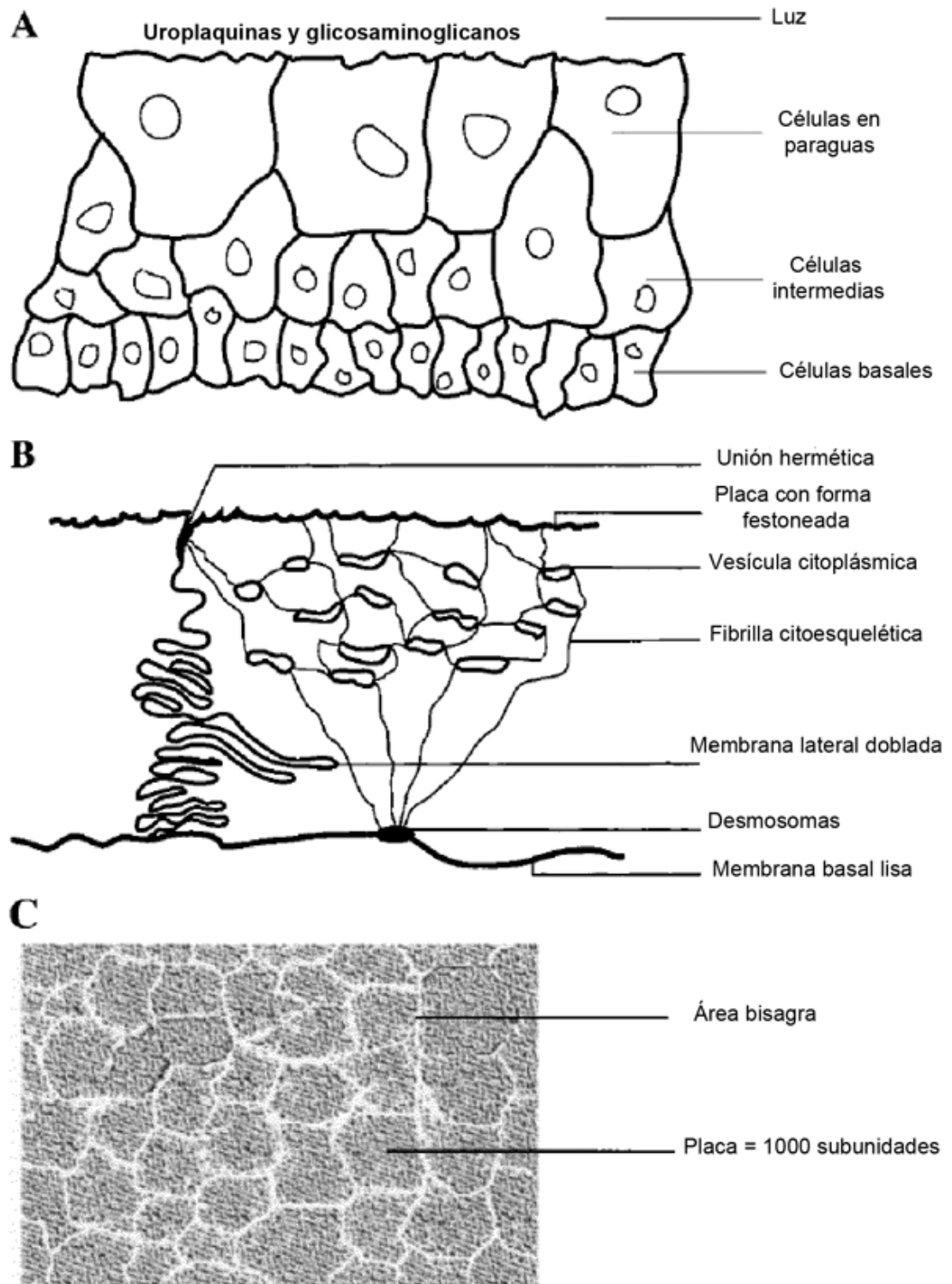


Figura 2

Modelo de cultivo uroepitelial humano

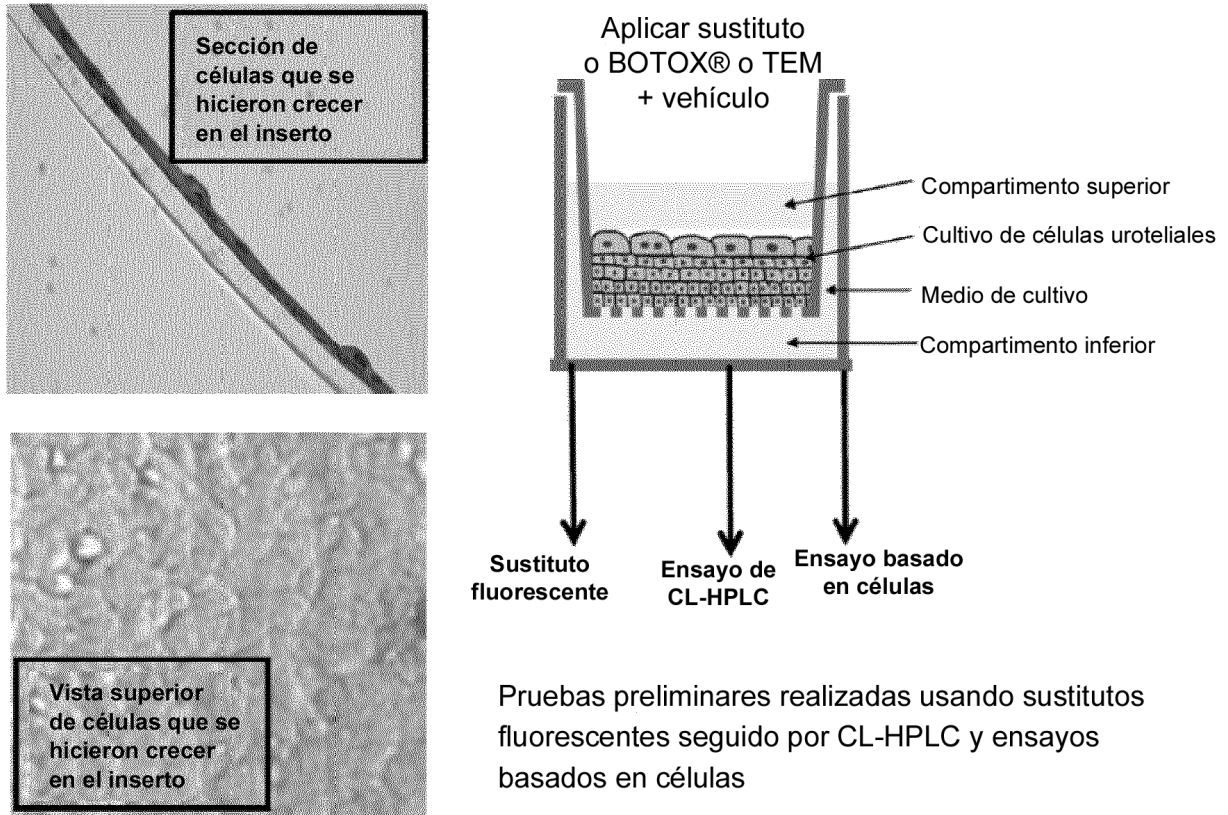


Figura 3

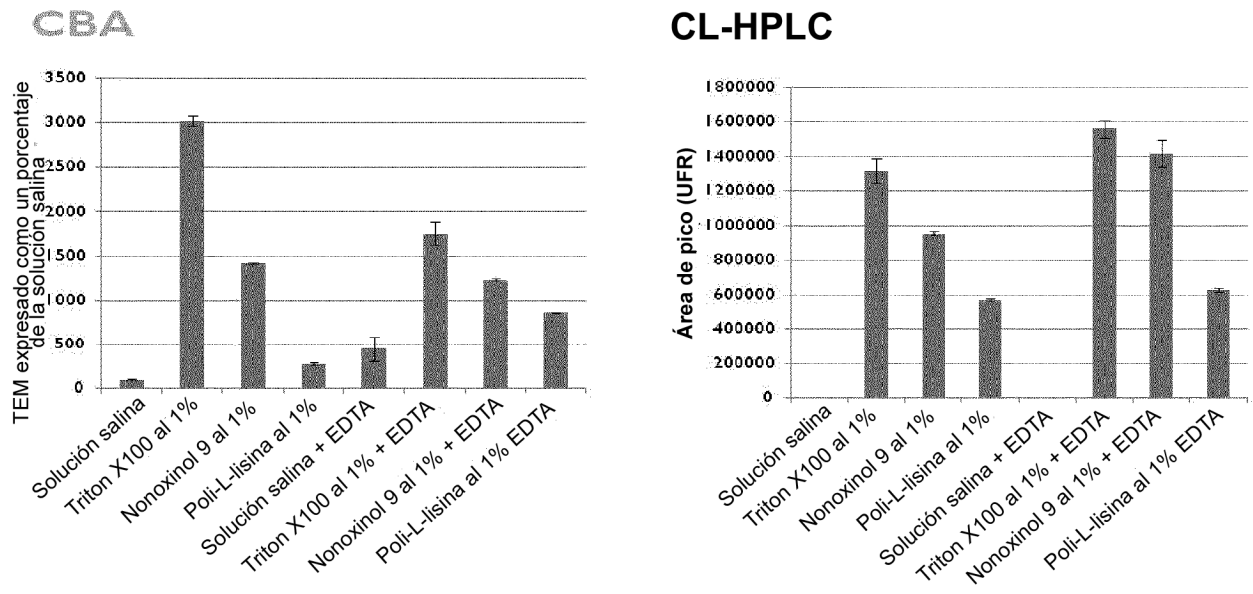


Figura 4

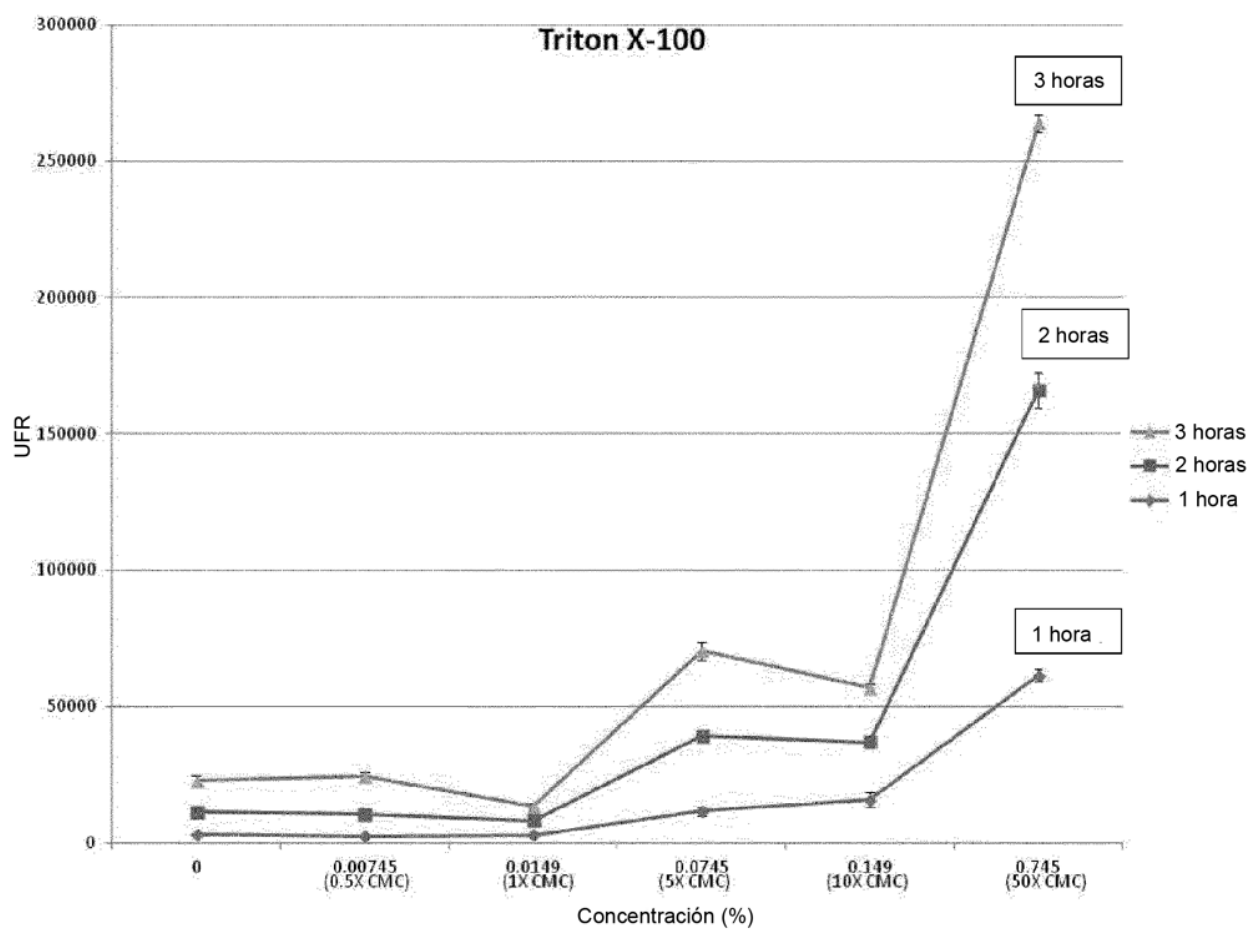


Figura 5A

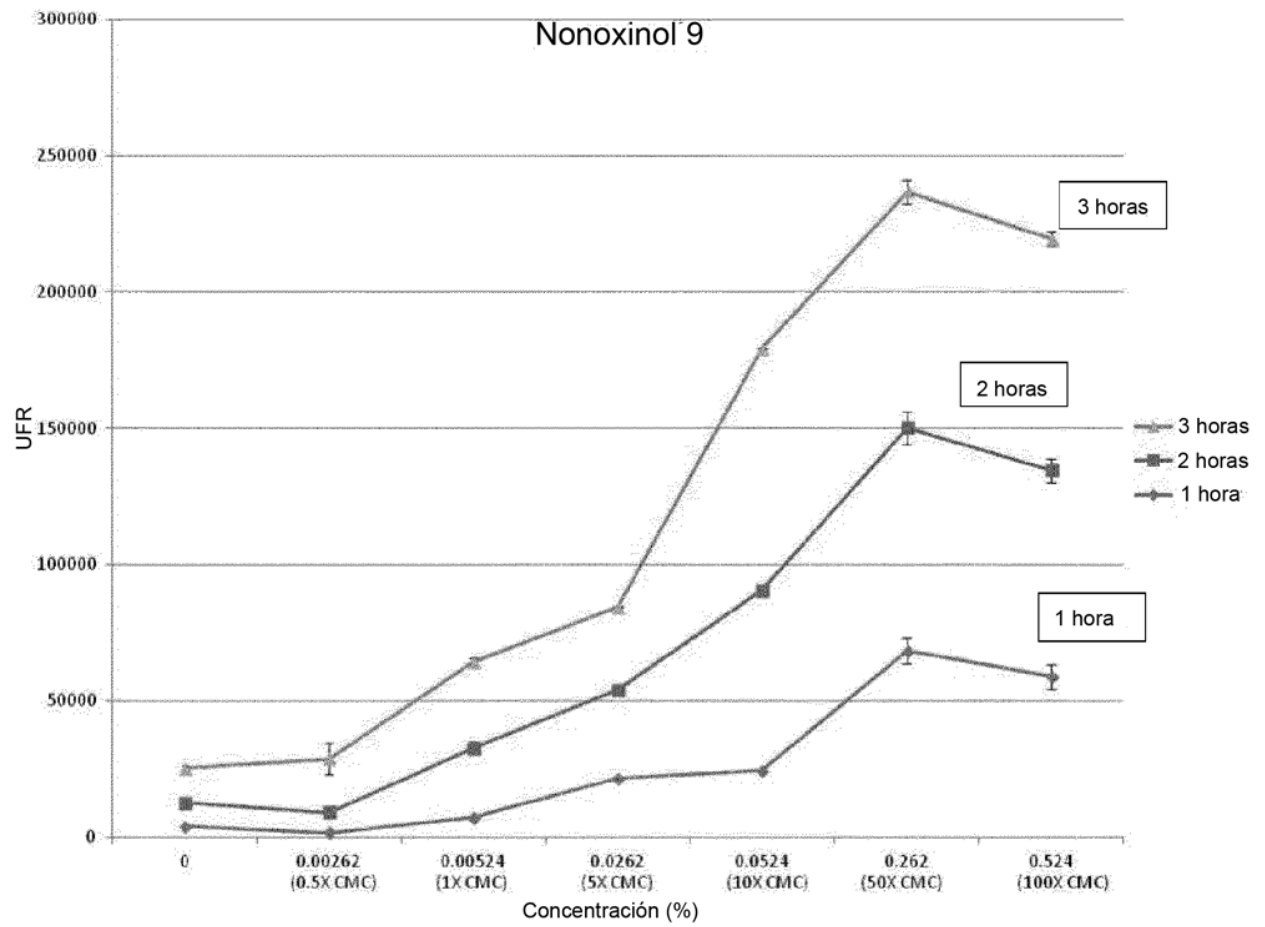


Figura 5B

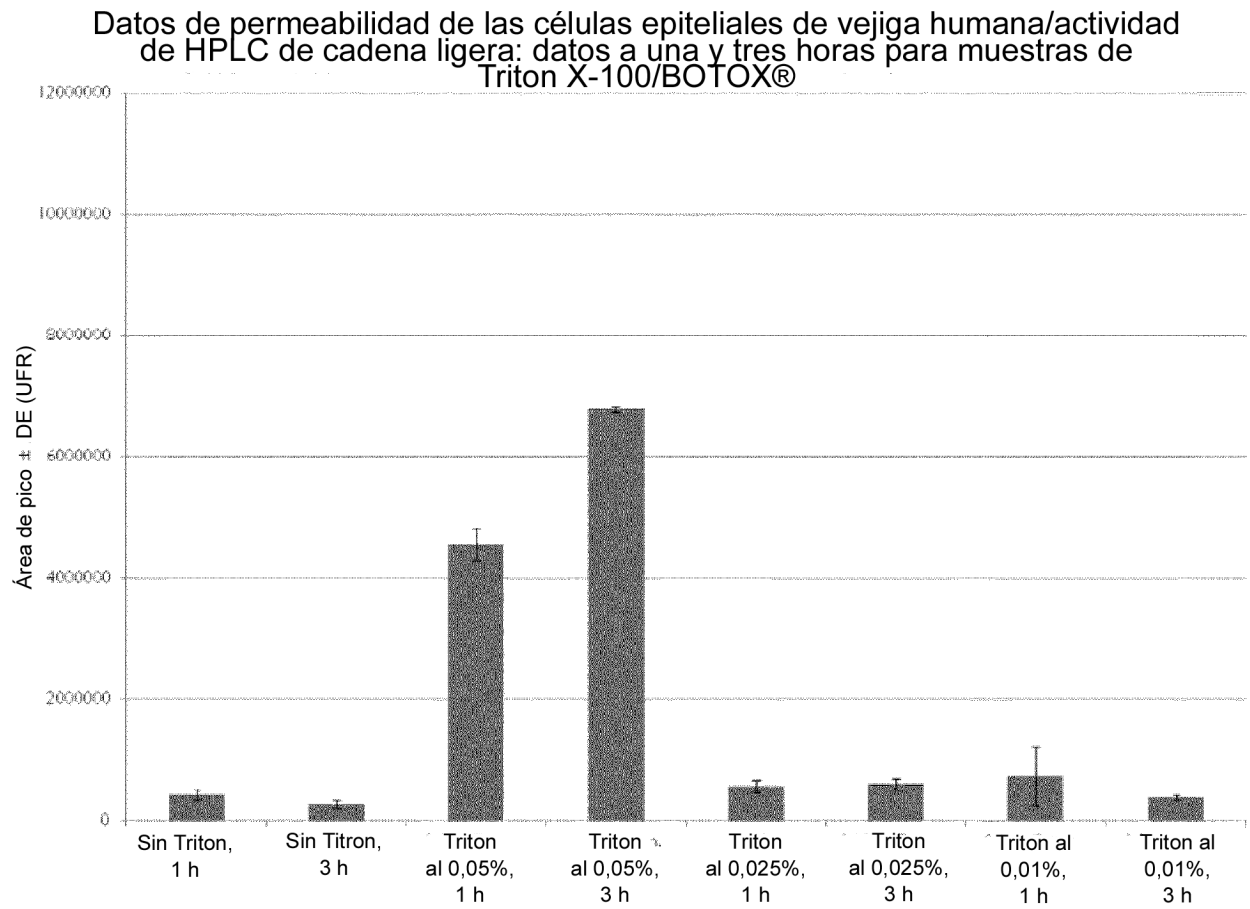


Figura 6A

Datos de permeabilidad de células epiteliales de vejiga humana/actividad de HPLC de cadena ligera: datos a 1 hora y tres horas para muestras de Nonoxinol 9/BOTOX®

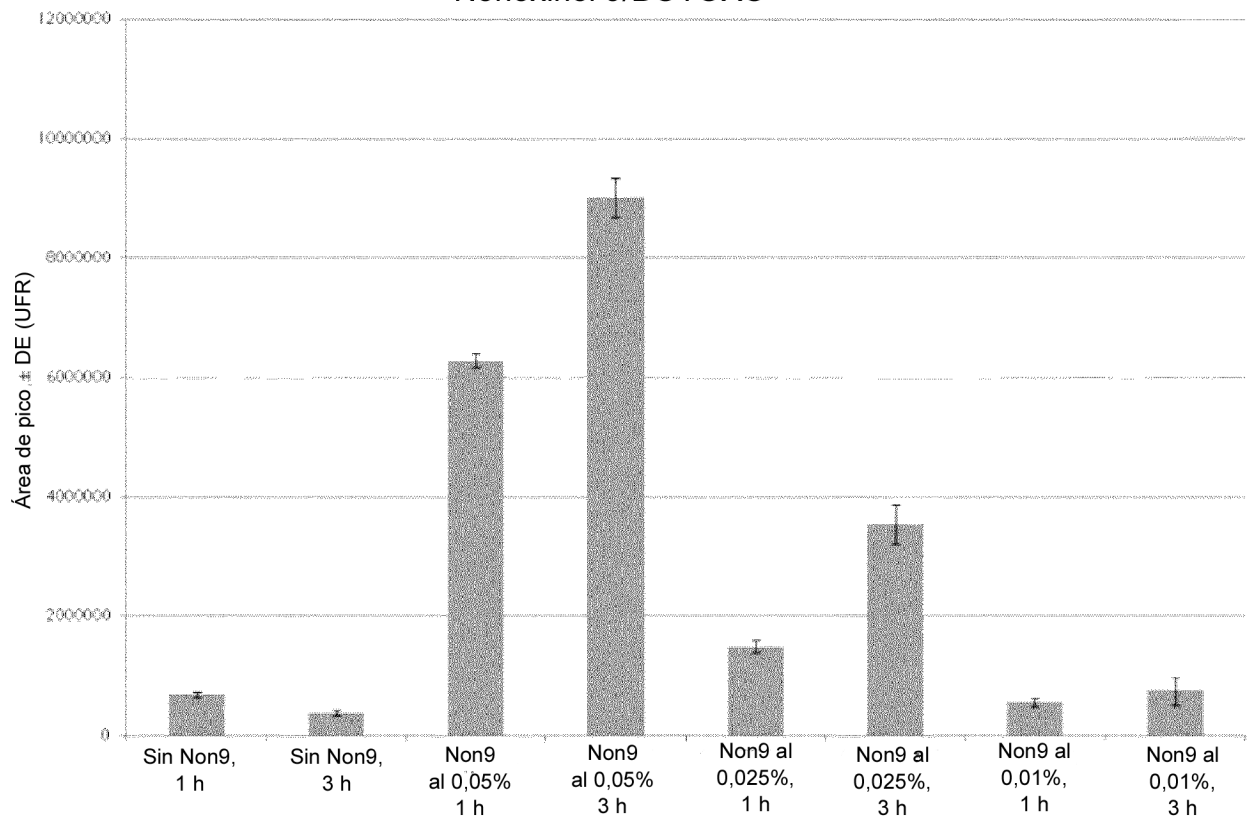
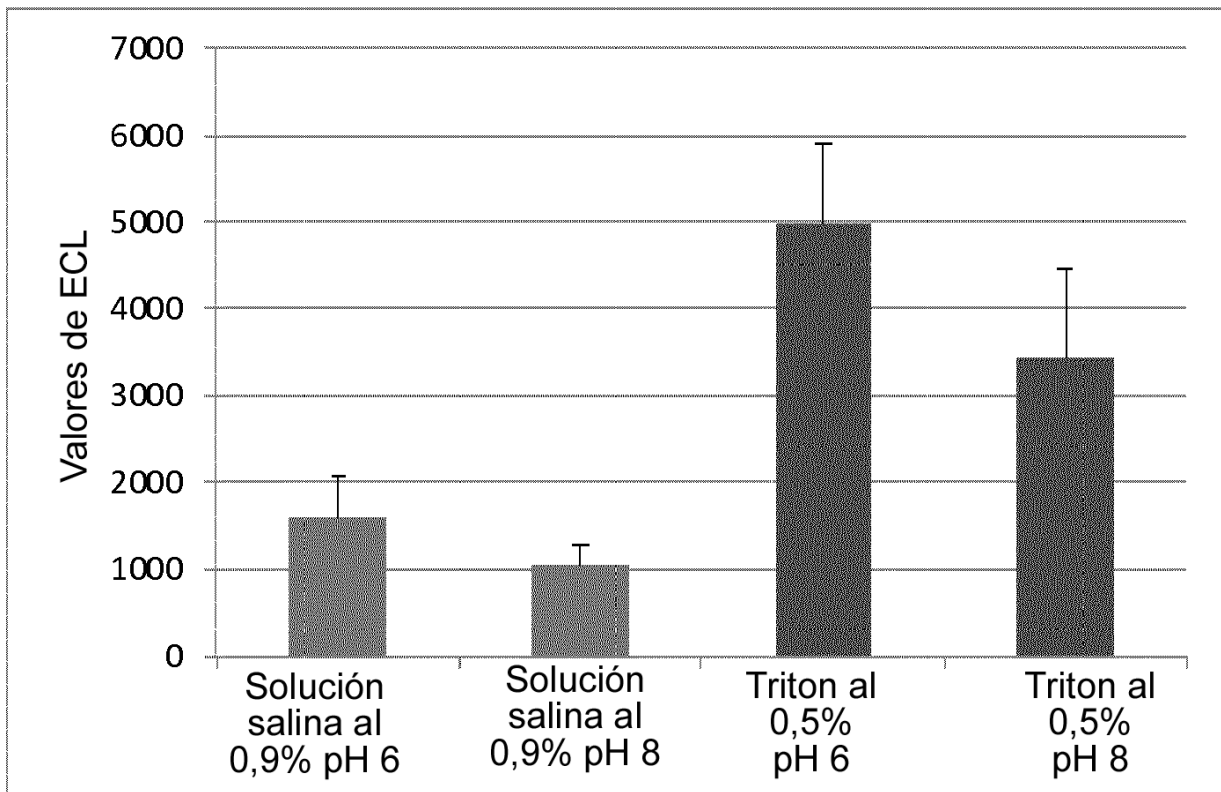


Figura 6B

Figura 7



Puntuaciones de H&E - evaluación semicuantitativa de integridad de vejigas de rata

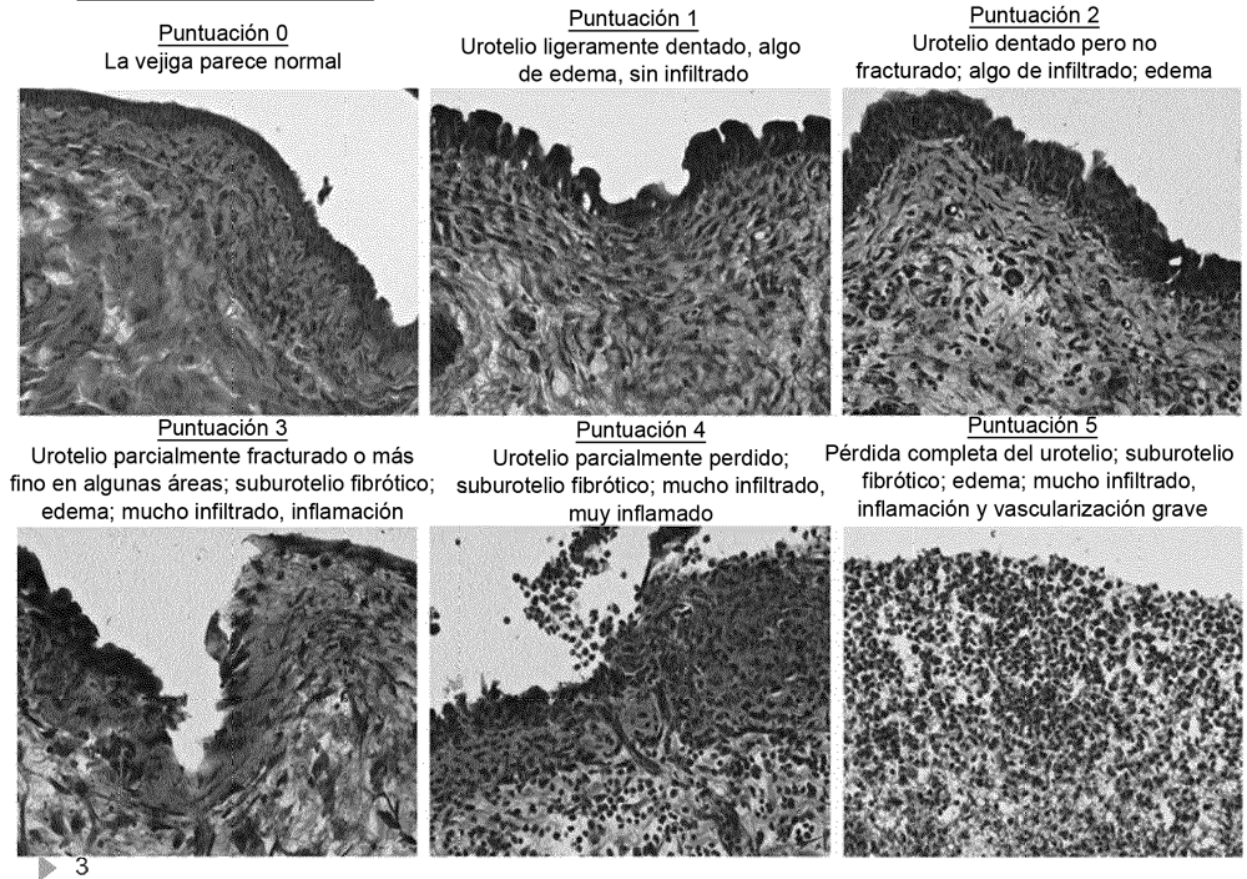


Figura 8A

Puntuaciones de SNAP25₁₉₇ - evaluación semicuantitativa del grado de tinción de SNAP25₁₉₇ que corresponde a la tinción de VACht (fibra nerviosa parasimpática) en la vejiga de ratas

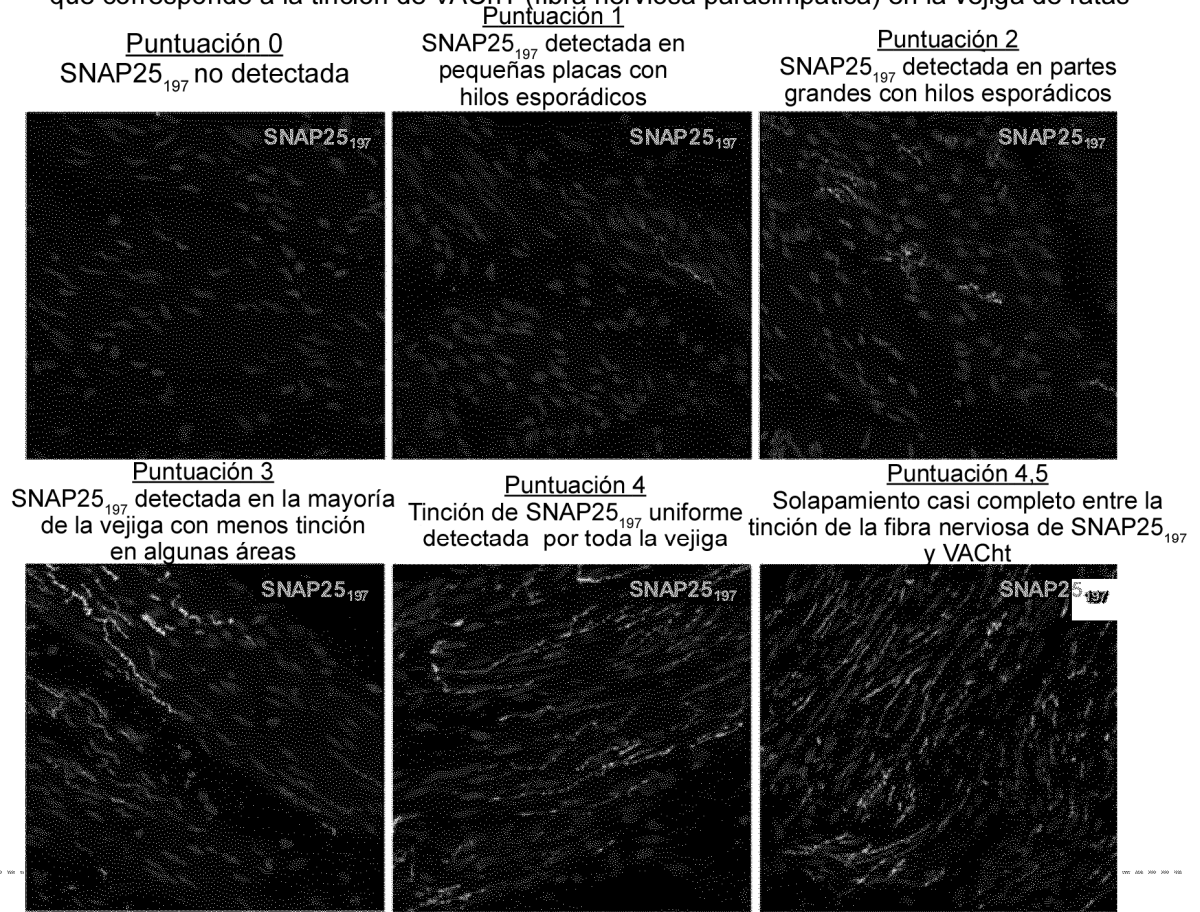
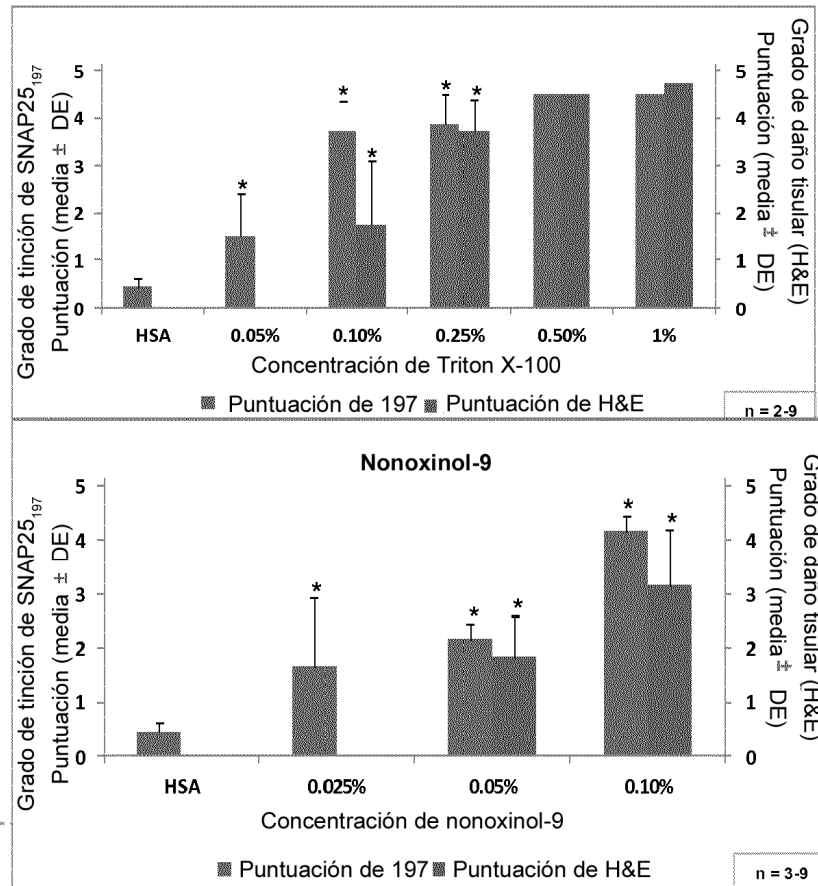


Figura 8B

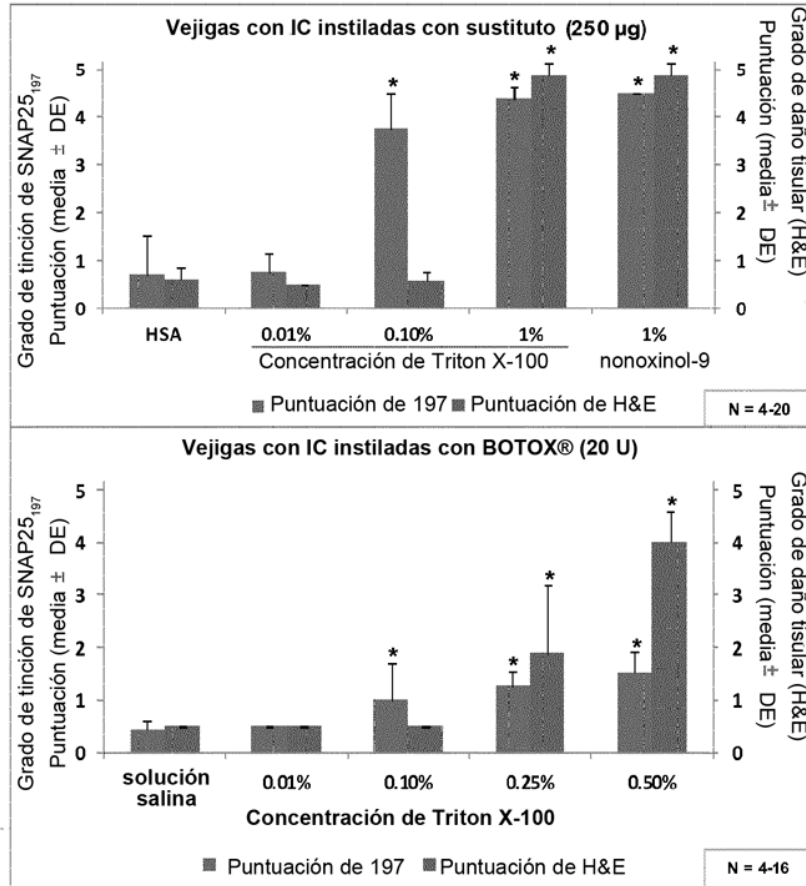
El grado de penetración del sustituto (250 µg) (puntuación de SNAP25₁₉₇) en vejigas normales depende de la concentración de tensioactivo



Cuando hay dos barras contiguas, la primera muestra el grado de tinción de SNAP25-197, la segunda muestra el grado de tinción de H&E.
Las barras sin una barra contigua muestra el grado de tinción de SNAP25-197

Figura 9A

El grado de penetración del sustituto o BOTOX® (puntuación de SNAP25₁₉₇) en vejigas del modelo de cistitis intersticial (IC) depende de la concentración de tensioactivo

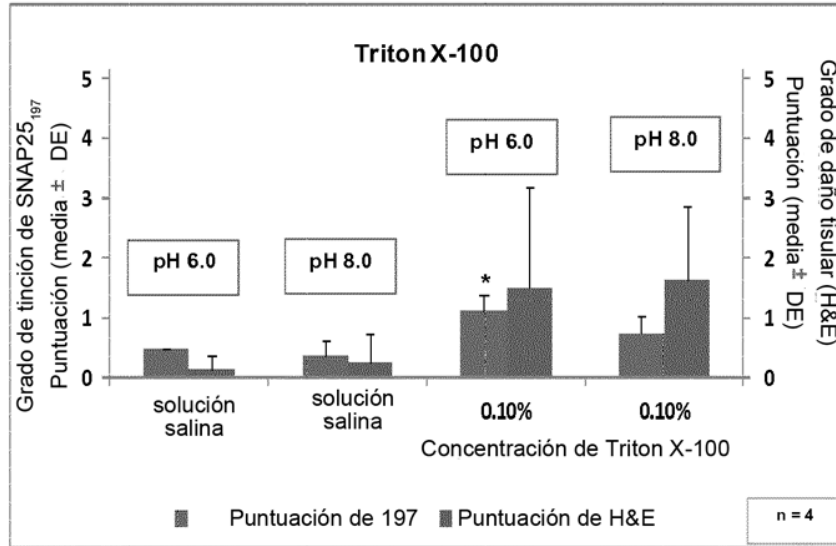


La primera de las dos barras contiguas muestra el grado de tinción de SNAP25-197, la segunda muestra el grado de tinción de H&E.

Figura 9B

BOTOX® (complejo o disociado) en el transporte es equivalente al sustituto basándose en el estudio del pH

Puntuaciones promedio de vejigas normales instiladas con BOTOX® (20 U) a o bien pH 6,0 o bien pH 8,0



- El complejo de BoNT/A 900 se disocia completamente a pH 8 liberando toxina botulínica de 150 kD activa
- El PM del sustituto es de 104 kD
- El tamaño molecular no parece afectar al transporte

La primera de las dos barras contiguas muestra el grado de tinción de SNAP25-197, la segunda muestra el grado de tinción de H&E.

Figura 10

El quitosano aumenta la cantidad de gelatina restante en la capa de células uroteliales sobre poliéster

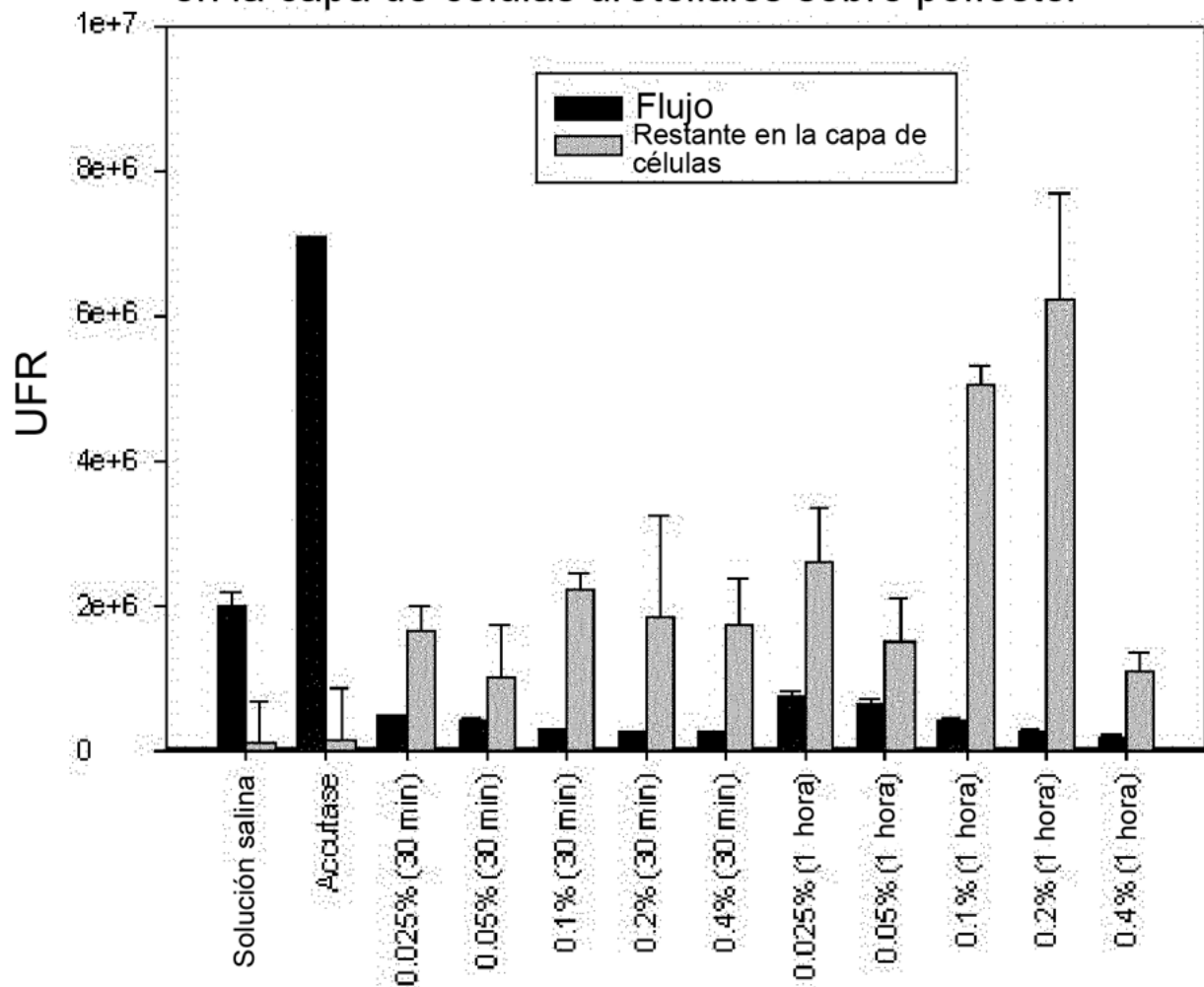
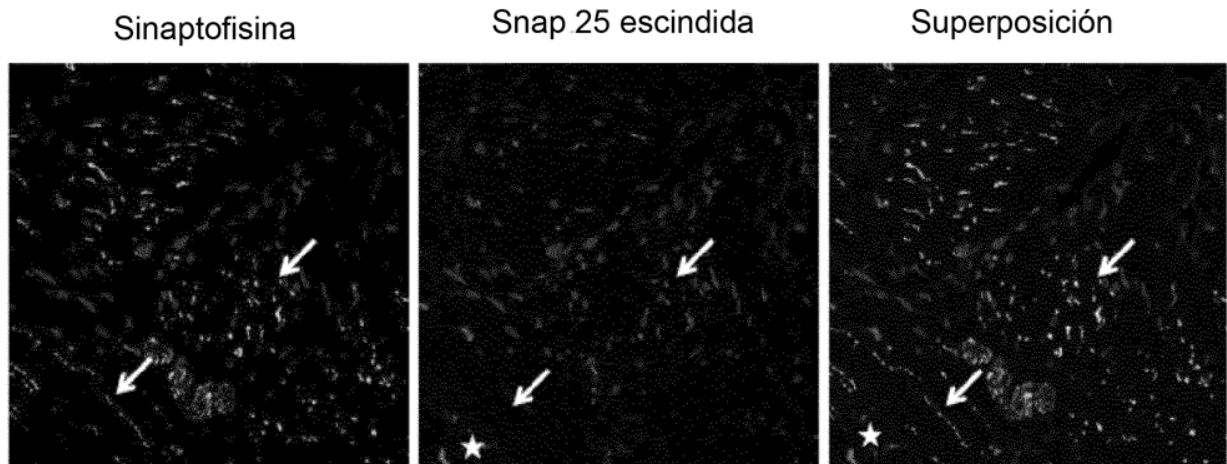


Figura 11

Figura 12

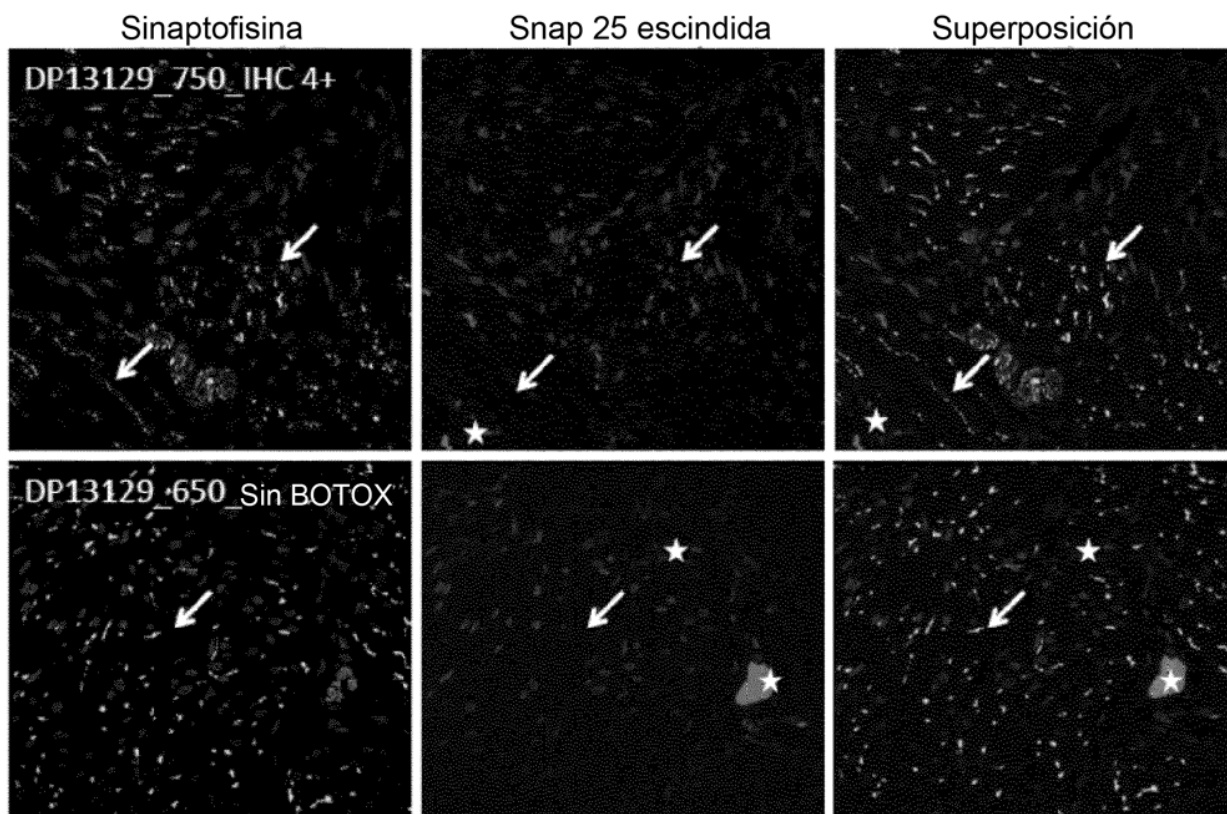


- 0: No se observó SNAP25 escindida
1: Se observó SNAP25 escindida pero sólo un poco
2-3: Se observó SNAP25 escindida y **menos del 50%** de coubicación con sinaptofisina.
4: Se observó SNAP25 escindida y **más del 50%** de coubicación con sinaptofisina.

Estrellas = tinción no específica

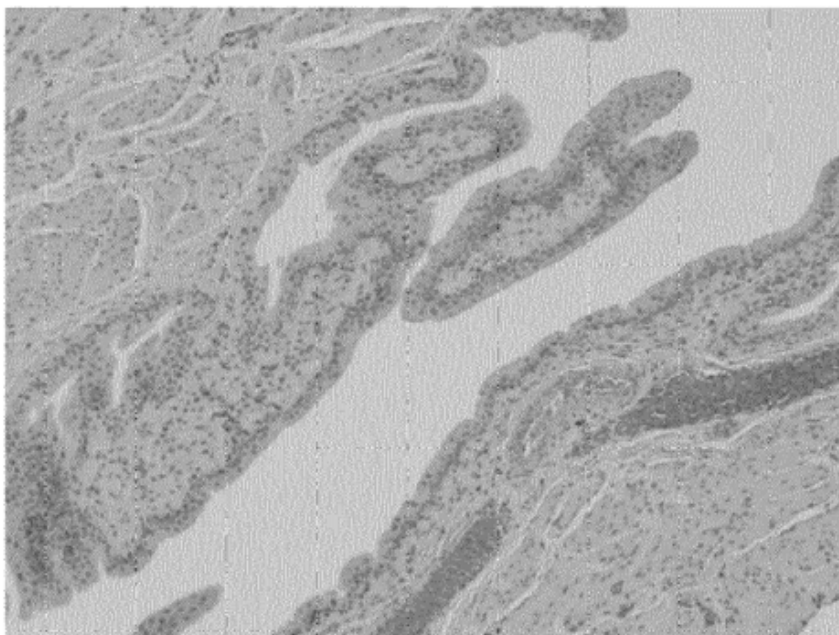
La evaluación se realizó en secciones de vejiga completa explorada en un microscopio de fluorescencia

Figura 13



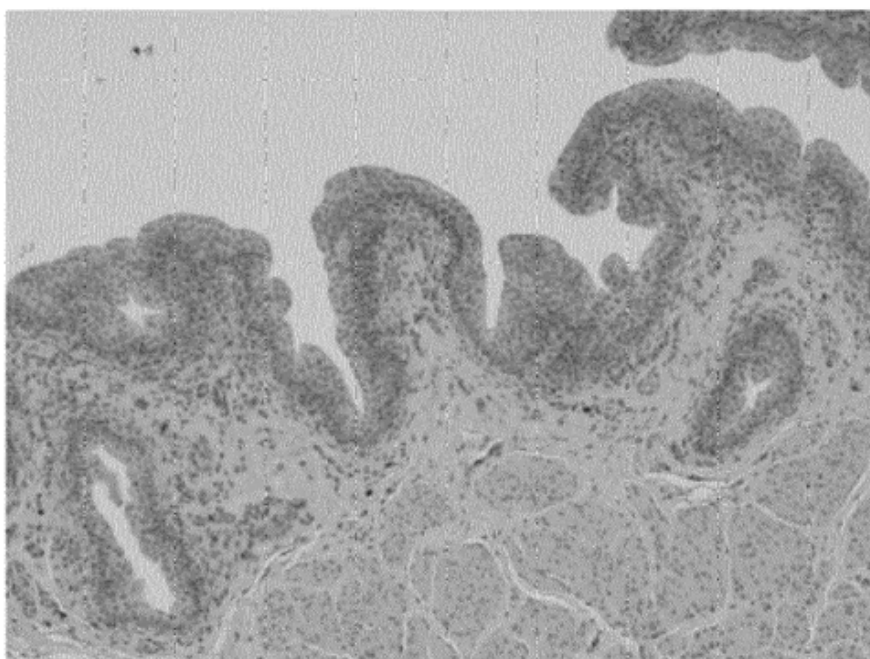
Estrellas: tinción no específica.

Figura 14A



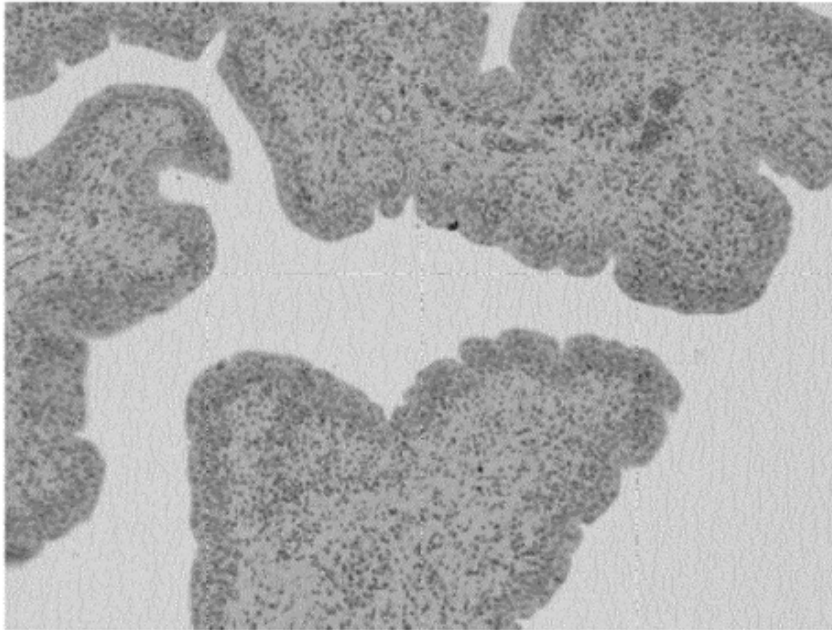
dentro de los límites normales

Figura 14B



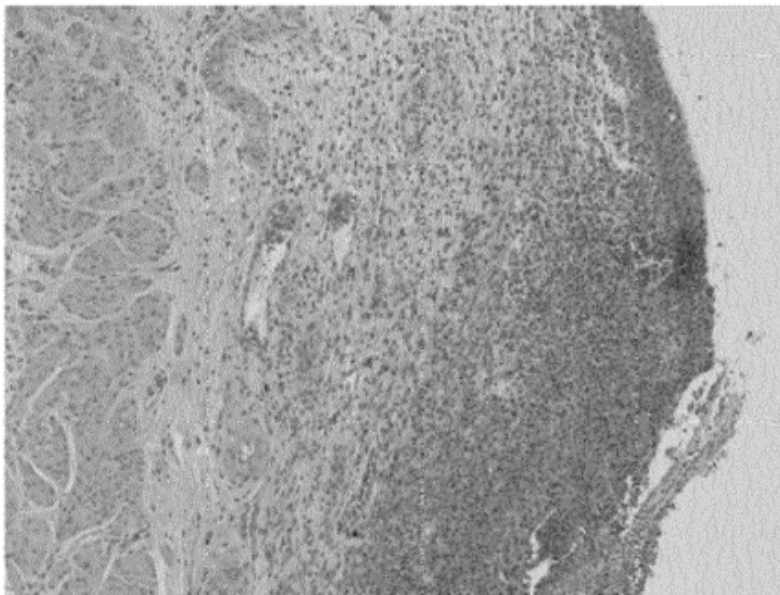
infiltrados de células mixtas mínimos
infiltrados de células fusiformes mínimos

Figura 14C



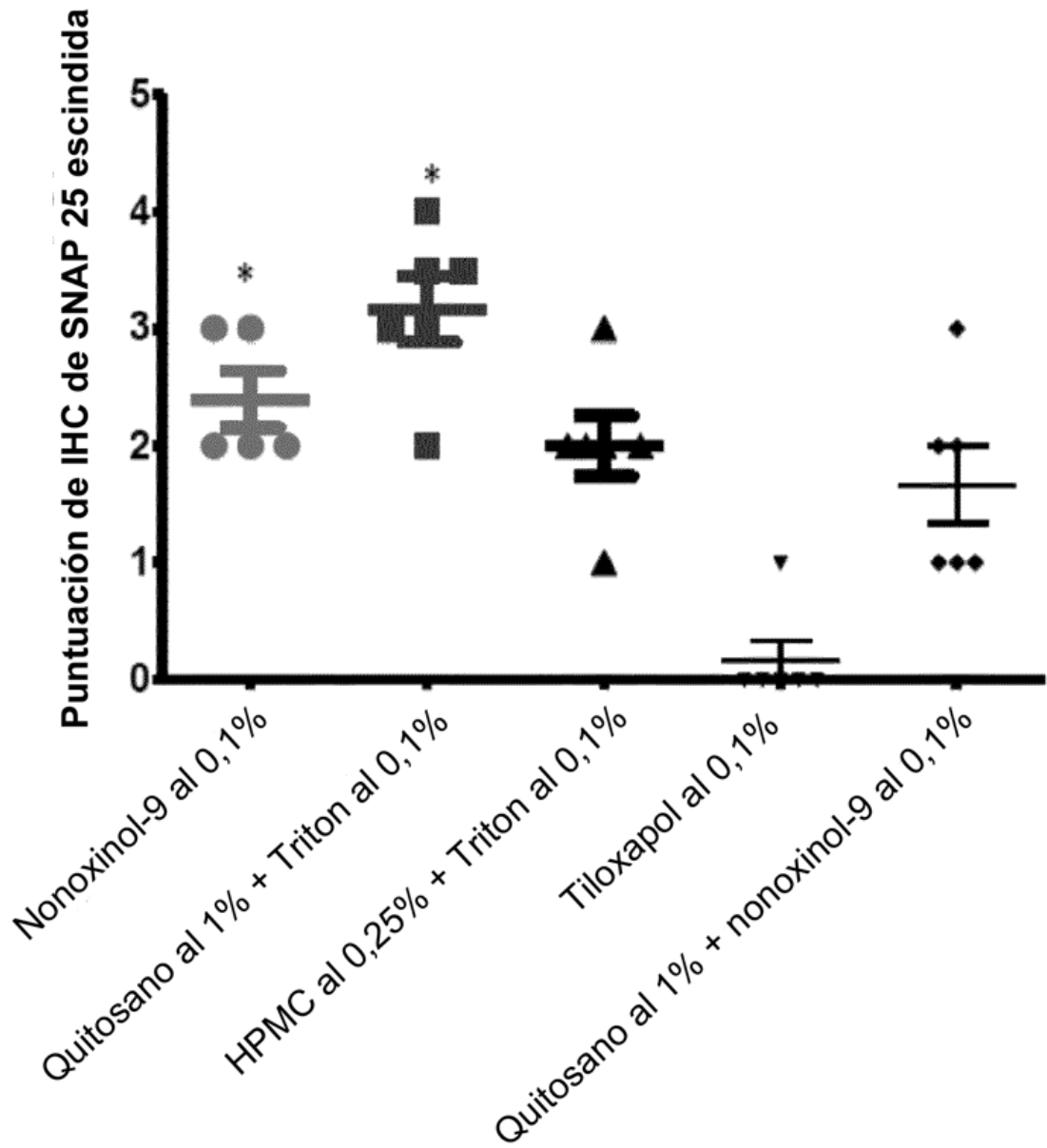
inflamación de células mixtas leve
infiltrados de células fusiformes leves

Figura 14D



Inflamación de células mixtas moderada
Infiltrados de células fusiformes moderados
ulceración

Figura 15



* Diferencia estadísticamente significativa con el grupo de tiloxapol al 0,1%.