



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0612119-5 A2**

(22) Data de Depósito: 31/05/2006
(43) Data da Publicação: 19/10/2010
(RPI 2076)



★ B R P I 0 6 1 2 1 1 9 A 2 ★

(51) *Int.Cl.:*
A61K 35/74
A61P 35/00

(54) Título: **TRATAMENTO DE DISTÚRBIO AUTO-IMUNES COM UMA NEUROXOTINA**

(30) Prioridade Unionista: 17/06/2005 US 11/156,502

(73) Titular(es): ALLERGAN INC

(72) Inventor(es): KENNETH L. TONG, PAMELA D. VAN SCHAACK

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006021069 de 31/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/138059 de 28/12/2006

(57) Resumo: TRATAMENTO DE DISTURBIOS AUTO-IMUNES COM UMA NEUROTOXINA. A presente invenção refere-se a métodos de tratamento de um ou mais distúrbios auto-imunes incluindo uma etapa de administrar uma neurotoxina clostrídica, tal como uma toxina botulínica, a um paciente que tenha um distúrbio auto-imune. Em um aspecto, um método inclui uma etapa de administrar a neurotoxina à glândula timo ou próxima da glândula timo do paciente. Em um outro aspecto, um método inclui uma etapa de administrar a neurotoxina em combinação com a administração de um inibidor de citocinas ao paciente. As composições também são descritas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS AUTO-IMUNES COM UMA NEUROTOXINA"**.

Antecedentes da Invenção

A presente invenção refere-se ao tratamento de distúrbios auto-imunes usando uma neurotoxina, e mais particularmente aos métodos e às composições para tratamento de distúrbios auto-imunes usando uma neurotoxina clostrídica.

Sistema Imune

O sistema imune é a primeira linha de defesa do corpo que envolve um complexo dos órgãos, das glândulas, de células altamente especializadas, e de um sistema circulatório que trabalha junto à infecção desobstruída do corpo. O sistema imune inclui duas porções principais. Uma porção pode ser referida como o sistema imune humoral e é envolvida na produção dos anticorpos. A segunda parte pode ser referida como o sistema imune celular e é o componente que inclui linfócitos tímicos (linfócitos T ou células T).

As células T ativadas são formadas das células brancas do sangue que passam através da glândula timo posicionada no tórax de um paciente humano. O timo consiste em dois lobos conectados pelo tecido areolar. Os lobos estão incluídos em uma cápsula fibrosa que divide os lobos em lóbulos que consistem em uma estrutura ramificada irregular de células epiteliais e de linfócitos. O timo contém três populações principais de células: (1) células epiteliais, (2) células hematopoiéticas, e (3) células acessórias.

As células epiteliais parecem ser responsáveis principalmente pela criação dos microambientes necessários e de seus fatores. As células epiteliais promovem etapas diferentes de diferenciação e de maturação intratímica da Célula T. Parece haver pelo menos seis tipos diferentes de células epiteliais: tipo 1 = células perivascular subcapsulares; tipo 2 = células epiteliais opacas, que predominam no córtex exterior; tipo 3 = células tímicas enfermeiras que têm a característica única de emperipolese; tipo 4 = células escuras que são típicas na medula; tipo 5 = células indiferenciadas que são típicas na medula; tipo 6 = células medulares grandes de que são encontra-

dos em torno e dentro dos corpúsculos de Hassall.

As células hematopoiéticas incluem três tipos diferentes de células linfóides: (1) células subcapsulares; (2) células corticais; e (3) células medulares.

- 5 As células acessórias tímicas incluem os macrófagos que secretam um fator de diferenciação do timócito que é mitogênico e induz a maturação funcional do timócito; células de adequação, que têm um papel de determinar que precursores da célula T serão ativados (auxiliares ou destruidores) durante um desafio imunológico; e as células mióides que parecem expressar os receptores da acetilcolina e possuem um possível papel na *myasthenia gravis*, e podem desempenhar o papel de expelir os timócitos da glândula timo.

- 15 As células do timo parecem expressar os receptores da acetilcolina. Por exemplo, os receptores colinérgicos são encontrados limitados às células epiteliais do timo. O timo parece receber também inervação neuronal do hipotálamo, o que pode influenciar os hormônios tímicos e o sistema imune em general.

- 20 Os linfócitos se originam dos hemocitoblastos (células tronco) na medula óssea vermelha. Os linfócitos parecem ser atraídos para o timo por fatores quimiotáticos produzidos pelas células epiteliais. Aqueles linfócitos que entram no timo maduro e se tornam Linfócitos T ativados ou células T ativadas. As células T ativadas podem responder aos antígenos encontrados em qualquer parte no corpo. As células T podem dividir-se em dois grupos: (1) um grupo que se incorpora no sangue, alguns desses permanecem na circulação e outros se alojam em outro tecido linfóide; e (2) um grupo que permanece na glândula timo e é a fonte das gerações futuras das células T.

- 25 30 Acredita-se que as células T são capazes de realizar três funções defensivas: (1) estimular a produção e o crescimento dos anticorpos por outros linfócitos; (2) estimular o crescimento e a ação dos fagócitos, que cercam e envolvem os vírus e os micróbios invasores, e (3) reconhecer e destruir um tecido estranho e anormal. Assim, a glândula timo desempenha um papel criticamente importante na resposta do corpo à invasão da doença.

As funções da glândula timo e da célula T desempenham um papel tão estratégico e importante em gerar e em regular a resposta imune que uma deficiência ou o desequilíbrio em suas funções causará uma disfunção do sistema imune.

5 Os distúrbios auto-imunes são doenças causadas por uma resposta imune contra as próprias células ou os próprios tecidos do corpo. Os distúrbios auto-imunes resultam na destruição de um ou mais tipos de tecido do corpo, no crescimento anormal de um órgão ou de órgãos, ou em alterações na função ou funções de algum órgão. Os distúrbios podem afetar somente um tipo de órgão ou de tecido ou podem afetar múltiplos tipos de órgãos e tecido. Além disso, uma pessoa pode experimentar um ou mais distúrbios auto-imunes ao mesmo tempo. Entre os órgãos e os tecidos afetados por distúrbios auto-imunes geralmente se incluem componentes do sangue tais como células vermelhas do sangue, vasos sanguíneos, tecidos conectivos, glândulas endócrinas tais como a tiróide ou o pâncreas, músculos, articulações e pele.

Os distúrbios auto-imunes podem ser categorizados em dois tipos gerais: (1) doenças auto-imunes sistêmicas (isto é, distúrbios que danificam muitos órgãos ou tecidos), e (2) doenças auto-imunes localizadas (isto é, distúrbios que danificam somente um único órgão ou tecido). Entretanto, o efeito das doenças auto-imunes localizadas, pode ser sistêmico, afetando indiretamente outros órgãos e sistemas do corpo.

As doenças auto-imunes sistêmicas incluem sem limitação: a artrite reumatóide que pode afetar as articulações, e possivelmente o pulmão e a pele; o lúpus, incluindo o lúpus eritematoso sistêmico (SLE), que pode afetar a pele, articulações, rins, coração, cérebro, células vermelhas do sangue, bem como outros tecidos e órgãos; a esclerodermia, que pode afetar a pele, o intestino, e os pulmões; a síndrome de Sjogren, que pode afetar as glândulas salivares, as glândulas lacrimais, e as articulações; a síndrome de Goodpasture, que pode afetar os pulmões e os rins; a granulomatose de Wegener, que pode afetar o sinus, os pulmões, e os rins; a polimialgia reumática, que pode afetar grupos de grandes músculos, e a arterite temporal / arterite

da célula gigante, que podem afetar artérias da cabeça e da garganta.

As doenças auto-imunes localizadas incluem sem limitação: a diabetes melito do tipo 1, que afeta as ilhotas do pâncreas; a tireoidite de Hashimoto e a doença de Graves, que afetam a tiróide; a doença celíaca, as
 5 doenças de Crohn, e a colite ulcerativa, que afetam o trato gastrointestinal; a esclerose múltipla (MS) e a síndrome de Guillain-Barre, que afetam o sistema nervoso central; a doença de Addison, que afeta as glândulas adrenais; a esclerose biliar primária, colangite esclerosante, e a hepatite auto-imune, que afetam o fígado; e fenômeno de Raynaud, que pode afetar os dedos das
 10 mãos, os dedos dos pés, o nariz e as orelhas.

Em seguida estão exemplos adicionais de distúrbios auto-imunes: anemia perniciosa; doença de Addison; dermatomiosite; *Myasthenia gravis* (MG); síndrome de Reiter; *Pemphigus vulgaris*; esclerodermia ou síndrome de CREST; anemia hemolítica auto-imune; púrpura trombocitopênica
 15 auto-imune; espondilite anquilosante; vasculite; e esclerose lateral amiotrófica (doença de Lou Gehrig).

Os sintomas de distúrbios auto-imunes podem variar amplamente dependendo do tipo da doença. Os sintomas geralmente observados incluem a fadiga, a vertigem, a indisposição e a febre. Outros sintomas que
 20 podem ser observados em um ou mais distúrbios auto-imunes incluem calafrios, perda do peso, descamações da pele, vasculite, poliartralgia, perda irregular de cabelo, ulcerações orais e nasais, ampliação do linfonodo, problemas gástricos, dor generalizada, que pode estar localizada nas articulações no caso da artrite, glândulas dilatadas, tal como a tiróide no caso da
 25 doença de Graves, palpitações no coração, bolhas e lesões dérmicas, fraqueza muscular.

O tratamento é específico para a doença, e geralmente se concentra antes em aliviar ou evitar os sintomas do que em melhorar a causa subjacente.

30 Um tratamento usado em determinados distúrbios auto-imunes é a administração de inibidores da colinesterase, que diminuem a hidrólise da acetilcolina neurotransmissora e aumenta desse modo, a quantidade de ace-

tilcolina disponível no alcance sináptico e em fornecer alívio sintomático pelo aumento do estímulo dos receptores colinérgico através de todo o sistema nervoso central e periférico.

Um outro tratamento dos distúrbios auto-imunes envolve o uso dos esteróides, incluindo corticosteróides, controla ou reduz a inflamação. Os corticosteróides são geralmente reservados para os pacientes que não respondem ou que não toleram a terapia da anticolinesterase.

Uma terceira aproximação é a administração de um agente imunossupressor, tal como a azotiprina, para controlar ou reduzir a natureza proliferativa da resposta imune. Esses fármacos trabalham inibindo a divisão celular e, conseqüentemente, suprimindo também as células não imunes, o que conduz a efeitos colaterais tais como a anemia.

Uma quarta aproximação envolve a remoção cirúrgica da glândula timo (isto é, a timectomia).

Um outro tratamento das doenças auto-imunes inclui a administração de inibidores das citocinas.

A sobreexpressão e/ou a infra-expressão das citocinas humanas pode resultar em doenças tais como a doença inflamatória do intestino, a artrite, e o lúpus eritematoso sistêmico (Mackay et al., *N. Engl J Med*, 345(5):340-350, 2001). A artrite é uma artropatia inflamatória comum crônica e destrutiva devido à sobreexpressão do fator alfa da necrose tumoral (TNF-alfa) e/ou devido à infra-expressão do antagonista do receptor da interleucina-1 (IL-1) resultando em uma resposta imune mediada pelas células, causando a inflamação e os danos nas juntas (Mackay et al., *supra*; Choy et al., *N. Engl. J. Med*, 344(12): 907-916, 2001).

Os inibidores da citocina incluem proteínas humanas solúveis do receptor das citocinas (por exemplo, etanercept), anticorpos monoclonais (por exemplo, rituxamab, infliximab, D2E7 e nerelimomab) e bloqueadores do receptor das citocinas (por exemplo, antagonistas do receptor da interleucina 1). Tais inibidores foram relatados por serem eficazes no tratamento da artrite (Choy et al., *supra*), na asma (pacote inserido de Xolair, Genentech, 2003), e na diabetes melito do tipo 1 (Herold et al., *N. Engl. J. Med.*,

346(22):1692-1698, 2002). Os inibidores da citoquina, especificamente anticorpos monoclonais, são únicos já que estes agentes se destinam aos antígenos específicos que crescem na superfície das células (por exemplo, células cancerosas). A radioimunoterapia consiste em uma substância radioativa ligada a um anticorpo. Essa combinação fornece uma liberação de destino específico (anticorpo monoclonal) e o tratamento (substância radioativa) para uma doença específica.

Toxina Botulínica

O gênero *Clostridium* possui mais de cento e vinte sete espécies, agrupadas de acordo com suas morfologias e funções. A bactéria anaeróbica, Gram positivo, *Clostridium botulinum* produz uma potente neurotoxina polipeptídica, a toxina botulínica, que causa uma doença neuromuscular nos seres humanos e nos animais referenciada como botulismo. Os esporos de clostrídio botulínico são encontrados no solo e podem crescer em reservatórios de alimentos imprópriamente esterilizados e selados das conservas de base caseira, que são a causa de muitos dos exemplos do botulismo. Os efeitos do botulismo aparecem tipicamente de 18 a 36 horas após serem ingeridos os gêneros alimentícios infectados com uma cultura botulínica ou os esporos do clostrídio. A toxina botulínica pode aparentemente passar não atenuada através do revestimento intestinal e atacar os neurônios periféricos motores. Os sintomas de intoxicação pela toxina botulínica podem progredir desde a dificuldade em andar, em engolir e falar indo até a paralisia dos músculos respiratórios e à morte.

A toxina botulínica do tipo A é o agente biológico natural mais letal conhecido para o homem. Aproximadamente 50 picogramas de uma toxina botulínica comercialmente disponível do tipo A (complexo de neurotoxina purificada)¹ é uma LD₅₀ em ratos (isto é, 1 unidade). Uma unidade de BOTOX[®] contém aproximadamente 50 picogramas (aproximadamente 56 atomols) complexo de toxina botulínica do tipo A. Um fato de modo interessante, em uma base molar, a toxina botulínica do tipo A é aproximadamente [disponível pela Allergan, Inc., Irvine, Califórnia sob a marca registrada de BOTOX[®] em unidades de 100 frascos]]

1,8 bilhão vezes mais letal do que a difteria, aproximadamente 600 milhões de vezes mais letal do que o cianeto de sódio, aproximadamente 30 milhões de vezes mais letal do que a toxina do veneno de cobra e aproximadamente 12 milhões de vezes mais letal do que o cólera. Singh, *Critical Aspects of Bacterial Proteins Toxinas*, páginas 63-84 (capítulo 4) de *Natural Toxinas II*, editado por B.R. Singh et al., Plenum Press, Nova Iorque (1976) (onde o LD₅₀ indicado da toxina botulínica do tipo A de 0,3 ng igual a 1U é corrigido para o fato que aproximadamente 0,05 ng de BOTOX® ser igual a 1 unidade). Uma unidade (U) de toxina botulínica é definida como o LD₅₀ de uma injeção intraperitoneal nas fêmeas de ratos Swiss Webster pesando de 18 a 20 gramas cada.

Sete neurotoxinas botulínicas geralmente imunologicamente diferentes foram caracterizadas, sendo elas respectivamente as neurotoxinas botulínicas dos sorotipos A, B, C1, D, E, F e G cada uma das quais é distinguida pela neutralização com anticorpos de tipos específicos. Os diferentes sorotipos de toxina botulínica variam pelos tipos de espécies animais que afetam e na severidade e na duração da paralisia que causa. Por exemplo, determinou-se que a toxina botulínica do tipo A é 500 vezes mais potente tal como medido pela taxa de paralisia produzida no rato, do que a toxina botulínica do tipo B. Adicionalmente, a toxina botulínica do tipo B foi determinada como sendo não tóxica em primatas em uma dose de até 480 U/kg o que é aproximadamente 12 vezes o LD₅₀ de primatas para a toxina botulínica do tipo A. Moyer E. et al., *Botulinum Toxin Type B: Experimental and Clinical Experience*, sendo o capítulo 6, páginas 71-85, do "*Therapy With Botulinum Toxin*", editado por Jankovic, J. et al. (1994), Marcel Dekker, Inc. A toxina botulínica que aparentemente se liga com afinidade elevada aos neurônios colinérgicos motores, é deslocada no neurônio e obstrui a liberação da acetilcolina. Uma tomada adicional pode ocorrer através dos receptores de baixa afinidade, bem como por fagocitose e pinocitose.

Não obstante o sorotipo, o mecanismo molecular de intoxicação pela toxina parece ser similar em envolver pelo menos três etapas ou estágios. Na primeira etapa do processo, a toxina se liga à membrana pré-

sináptica do neurônio alvo através de uma interação específica entre a cadeia pesada, cadeia H, e um receptor da superfície da célula; considera-se que o receptor seja diferente para cada tipo de toxina botulínica e para a toxina tetânica. O segmento carboxila, HC, da extremidade da cadeia H parece ser importante para o direcionamento da toxina para a superfície da célula.

Na segunda etapa, a toxina cruza a membrana plasmática da célula envenenada. A toxina é primeiramente envolvida pela célula através de endocitose mediada por receptor, e é formado um endossoma contendo a toxina. A toxina escapa então do endossoma para dentro do citoplasma da célula. Considera-se que essa etapa seja mediada pelo segmento amina, HN, da extremidade da cadeia H que provoca uma mudança de conformação da toxina em resposta a um pH de aproximadamente 5,5 ou menor. Os endossomas são conhecidos por possuírem uma bomba de prótons que diminui o pH intra-endossômico. A alteração de conformação expõe os resíduos hidrofóbicos da toxina, que permitem que a toxina se encaixe na membrana endossômica. A toxina (ou no mínimo a cadeia leve) se desloca então dentro do citoplasma através da membrana endossômica.

A última etapa do mecanismo de atividade da toxina botulínica parece envolver a redução da ponte de dissulfeto que une a cadeia pesada, a cadeia H, e a cadeia leve, cadeia L. A atividade tóxica completa das toxinas botulínicas e tetânica é contida na Cadeia L da holotoxina; a cadeia L é um endopeptidase do zinco (Zn^{++}) que quebra seletivamente as proteínas essenciais para o reconhecimento e o acoplamento das vesículas contendo o neurotransmissor com a superfície citoplasmática da membrana plasmática, e a fusão das vesículas com a membrana plasmática. A neurotoxina tetânica, a toxina botulínica dos tipos B, D, F, e G causam a degradação da sinaptobrevina (chamada também de proteína da membrana associada à vesícula (VAMP)), uma proteína sinaptossômica da membrana. A maioria das VAMP presentes na superfície citoplasmática da vesícula sináptica é removida em consequência de quaisquer desses eventos de clivagem. A toxina botulínica dos sorotipos A e E clivam a SNAP-25. A toxina botulínica

do sorotipo C1 foi originalmente considerada como clivando a sintaxina, mas encontrou-se que ela cliva a sintaxina e a SNAP-25. Cada uma das toxinas botulínicas quebra especificamente uma ligação diferente, exceto a toxina botulínica do tipo B (e a toxina tetânica) que clivam a mesma ligação. Cada
5 uma dessas clivagens obstrui o processo de acoplamento da membrana da vesícula, impedindo desse modo a exocitose do conteúdo da vesícula.

As toxinas botulínicas foram usadas em aplicações clínicas para o tratamento dos distúrbios neuromusculares caracterizados pela hiperatividade da musculatura do esqueleto (isto é, distúrbios motores). Em 1989 um
10 complexo da toxina botulínica do tipo A foi aprovado pela Administração de Alimentos e Fármacos (FDA) dos Estados Unidos para o tratamento do blefarospasmo, do estrabismo e do espasmo hemifacial. Posteriormente, a toxina botulínica do tipo A foi aprovada também pelo FDA para o tratamento da distonia cervical e para o tratamento de linhas glabellares, e a toxina botulíni-
15 ca do tipo B foi aprovada para o tratamento da distonia cervical. Os sorotipos das toxinas botulínicas que não são do tipo A têm aparentemente uma potência mais baixa e/ou uma duração mais curta de atividade em comparação com os efeitos da toxina botulínica do tipo A. Os efeitos clínicos da toxina botulínica do tipo A intramuscular periférica são observados geralmente dentro de uma semana após a injeção. A duração típica de alívio sintomático de
20 uma única injeção intramuscular da toxina botulínica do tipo A é calculada em média como sendo de aproximadamente três meses, embora alguns períodos significativamente mais longos de atividade terapêutica tenham sido relatados.

25 Embora todos os sorotipos das toxinas botulínicas inibam aparentemente a liberação do neurotransmissor acetilcolina na conexão neuromuscular, eles assim agem afetando diferentes proteínas neurosecretórias e/ou clivando essas proteínas em diferentes locais. Por exemplo, ambos os tipos botulínicos A e E clivam a proteína associada sinaptossômica de 25
30 quilodalton (kD) (SNAP-25), mas alvejam seqüências diferentes dos aminoácidos dentro dessa proteína. A toxina botulínica dos tipos B, D, F e G na proteína associada à vesícula (VAMP, também chamado sinaptobrevina), com

cada sorotipo clivando a proteína em um local diferente. Finalmente, a toxina botulínica do tipo C1 foi mostrada clivando a syntaxina e a SNAP-25. Essas diferenças no mecanismo de ação podem afetar a potência e/ou a duração relativas da ação dos vários sorotipos da toxina botulínica. Aparentemente, um substrato para uma toxina botulínica pode ser encontrado em diversos tipos diferentes da célula. Vide, por exemplo, *Biochem J* 1;339 (pt 1):159-65:1999, e *Mov Disord*, 10(3):376:1995 (as células ilhotas B pancreáticas contêm pelo menos a SNAP-25 e sinaptobrevina).

O peso molecular da molécula da proteína da toxina botulínica, para todos os sete sorotipos conhecidos da toxina botulínica, é de aproximadamente 150 kD. De modo interessante, as toxinas botulínicas são liberados pela bactéria clostrídio como complexos compreendendo a molécula da proteína da toxina botulínica de 150 kD junto com as proteínas que não são toxinas associadas. Assim, o complexo da toxina botulínica do tipo A pode ser produzido pela bactéria clostrídio como formas de 900 kD, 500 kD e 300 kD. A toxina botulínica tipo B e C1 é produzida aparentemente como somente um complexo de 700 kD ou de 500 kD. A toxina botulínica do tipo D é produzida como complexos de 300 kD e 500 kD. Finalmente, as toxinas botulínicas dos tipos E e F são produzidas somente como complexos de aproximadamente 300 kD. Acredita-se que os complexos (isto é, moléculas com pesos moleculares maiores do que aproximadamente 150 kD) contenham uma proteína da hemaglutinina que não é toxina e uma proteína que não seja da hemaglutinina e que não é toxina. Essas duas proteínas que não são toxinas (que junto com a molécula da toxina botulínica compreendem o complexo relevante de neurotoxina) podem agir para fornecer a estabilidade contra a desnaturação para a molécula da toxina botulínica e a proteção contra aos ácidos digestivos quando a toxina é ingerida. Adicionalmente, é possível que complexos maiores da toxina botulínica (peso molecular maior do que aproximadamente 150 kD) possam resultar em uma taxa mais lenta de difusão da toxina botulínica para longe do local de injeção intramuscular de um complexo da toxina botulínica.

Estudos *in vitro* indicaram que a toxina botulínica inibe a libera-

ção induzida do cátion do potássio da acetilcolina e da norepinefrina das culturas de célula primária do tecido do tronco encefálico. Adicionalmente, relatou-se que a toxina botulínica inibe a liberação solicitada da glicina e do glutamato em culturas primárias de neurônios da medula espinhal e que em

5 preparações de sinaptossoma cerebral a toxina botulínica inibe a liberação de cada um dos neurotransmissores acetilcolina, dopamina, norepinefrina (Habermann E., et al., *Tetanus Toxin and Botulinum A and C Neurotoxins Inhibit Noradrenaline Release From Cultured Mouse Brain*, *J Neurochem* 51 (2);522- 527:1988), CGRP, da substância P e do glutamato (Sanchez-Prieto,

10 J., et al., *Botulinum Toxin A Blocks Glutamato Exocytosis From Guinea Pig Cerebral Cortical Synaptosomes*, *Eur J. Biochem* 165;675-681:1897). Assim, quando são usadas as concentrações adequadas, a liberação por estímulo evocado da maioria dos neurotransmissores é obstruída pela toxina botulínica. Vide por exemplo Pearce, LB., *Pharmacologic Characterization of Botulinum Toxin For Basic Science and Medicine*, *Toxicon* 35(9); 1373-1412 e

15 1393; Bigalke H., et al., *Botulinum A Neurotoxin Inhibits Non-Cholinergic Synaptic Transmission in Mouse Spinal Cord Neurons in Culture*, *Brain Research* 360;318-324:1985; Habermann E., *Inhibition by Tetanus and Botulinum A Toxin of the release of [3H]Noradrenaline and [3H]GABA From Rat Brain Homogenate*, *Experientia* 44;224-226:1988, Bigalke H., et al., *Tetanus Toxin and Botulinum A Toxin Inhibit Release and Uptake of Various Transmitters, as Studied with Particulate Preparations From Rat Brain and Spinal Cord*, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316;244-251:1981, e; Jankovic J.

20 et al., *Therapy With Botulinum Toxin*, Marcel Dekker, Inc., (1994), página 5.

25 A toxina botulínica do tipo A pode ser obtida cultivando e crescendo culturas de clostrídio botulínico em um fermentador e então colhendo e purificando a mistura fermentada de acordo com procedimentos conhecidos. Todos os sorotipos da toxina botulínica são sintetizados inicialmente como cadeias simples de proteínas inativas que devem ser clivadas ou que-

30 bradas por proteases para se tornarem neuroativas. As cepas bacterianas que fazem os sorotipos A e G da toxina botulínica possuem proteases endógenas e os sorotipos A e G podem desse modo ser recuperados das cultu-

ras bacterianas predominantemente na sua forma ativa. Em contraste, os sorotipos da toxina botulínica C1, D e E sintetizados por cepas não proteolíticas são conseqüentemente tipicamente inativos quando recuperados da cultura. Os sorotipos B e F são produzidos tanto por cepas proteolíticas como não proteolíticas e podem conseqüentemente ser recuperados na forma ativa ou inativa. Entretanto, mesmo as cepas proteolíticas que produzem, por exemplo, o tipo de toxina botulínica do sorotipo B clivam somente uma parte da toxina produzida. A proporção exata da quebra das moléculas não quebradas depende do tempo de incubação e da temperatura da cultura. Conseqüentemente, uma determinada porcentagem de toda a preparação de, por exemplo, toxina botulínica do tipo toxina B deve provavelmente estar inativa, contando possivelmente para a conhecida potência significativamente mais baixa da toxina botulínica do tipo B em comparação com a toxina botulínica do tipo A. A presença de moléculas botulínicas inativas da toxina em uma preparação clínica contribuirá para a carga total de proteínas da preparação, que foi ligada para uma antigenicidade aumentada, sem contribuir para sua eficácia clínica. Adicionalmente, sabe-se que a toxina botulínica do tipo B tem, quando da injeção intramuscular, uma duração mais curta de atividade e é também menos potente do que a toxina botulínica do tipo A no mesmo nível de dose.

A toxina botulínica do tipo A cristalina de qualidade elevada pode ser produzida da cepa Hall A de clostrídio botulínico com características de ter uma concentração $\geq 3 \times 10^7$ U/mg, de um A_{260}/A_{278} menor do que 0,60 e de mostrar um padrão distinto de distribuição da bandas na eletroforese sobre gel. O processo conhecido de Shantz pode ser usado para obter a toxina botulínica cristalina do tipo A, como determinado em Shantz, EJ. et al., *Properties and use of Botulinum toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine*, *Microbiol Rev.* 56;80-99:1992. Geralmente, o complexo da toxina botulínica do tipo A pode ser isolado e purificado de uma fermentação anaeróbica cultivando o clostrídio botulínico do tipo A em um meio apropriado. O processo conhecido pode também ser usado, quando da separação das proteínas que não são toxinas, para obter as toxinas botulínicas puras, tal co-

mo, por exemplo: toxina botulínica purificada do tipo A com um peso molecular de aproximadamente 150 kD com uma potência específica de 1 a 2×10^8 LD₅₀ U/mg ou maior; toxina botulínica purificada do tipo B com um peso molecular de aproximadamente 156 kD com uma potência específico de 1 a 2×10^8 LD₅₀ U/mg ou maior, e; toxina botulínica purificada do tipo F com um peso molecular de aproximadamente 155 kD com uma potência específica de 1 a 2×10^7 LD₅₀ U/mg ou maior.

As toxinas botulínicas e/ou os complexos de toxina botulínica podem ser obtidos de Lista de Laboratórios Biológicos, Inc., Campbell, Califórnia; o Centro para Microbiologia e Pesquisa Aplicadas, Porton Down, U.K.; a Wako (Osaka, Japão), a Metabiologics (Madison, Wisconsin) bem como dos produtos químicos da Sigma Chemicals, de St Louis, Missouri. A toxina botulínica pura pode também ser usada para preparar uma composição farmacêutica.

Como ocorre geralmente com as enzimas, as atividades biológicas das toxinas botulínicas (que são peptidases intracelulares) são dependentes, pelo menos em parte, de sua conformação tridimensional. Assim, a toxina botulínica do tipo A é tornada atóxica pela ação do calor, por estiramento da superfície pela ação de vários produtos químicos e pela secagem da superfície. Adicionalmente, é sabido que a diluição do complexo da toxina obtido pelos meios conhecidos de cultivo, fermentação e purificação ao máximo, e o uso de concentrações muito mais baixas da toxina para a formulação de composições farmacêuticas resulta em rápida perda de toxicidade da toxina a menos que um agente estabilizante adequado esteja presente. A diluição da toxina em quantidades de miligramas para uma solução que contenha nanogramas por mililitro apresenta dificuldades significativas por causa da perda rápida da toxicidade específica devido à tão grande diluição. Como a toxina pode ser usada meses ou anos depois que a composição farmacêutica contendo a toxina foi formulada, a toxina pode ser estabilizada com um agente estabilizante tal como a albumina e a gelatina.

Uma composição farmacêutica contendo a toxina botulínica comercialmente disponível é vendida sob a marca registrada BOTOX® (dispo-

nível pela Allergan, Inc., Irvine, Califórnia). O BOTOX® consiste em um complexo botulínico do tipo A purificado, albumina e cloreto de sódio empacotados em uma forma estéril e liofilizada. A toxina botulínica do tipo A é feita de uma cultura da cepa Hall de clostrídio botulínico crescida em um meio contendo amina N-Z e extrato de levedura. O complexo da toxina botulínica do tipo A é purificado da solução da cultura por uma série de precipitações ácidas até um complexo cristalino que consiste na proteína da toxina ativa de alto peso molecular e uma proteína hemaglutinina associada. O complexo cristalino é redissolvido em uma solução contendo salina e albumina e filtrada estéril (0,2 micron) antes da liofilização. O produto liofilizado é armazenado em um freezer a, ou abaixo de, -5 °C. BOTOX® pode ser reconstituído com solução salina não preservada estéril, antes da injeção intramuscular. Cada frasco de BOTOX® contém aproximadamente 100 unidades (U) da neurotoxina do complexo purificado da toxina do tipo A do clostridium botulínico, 0,5 miligramas de albumina do soro humano e 0,9 miligramas do cloreto de sódio em uma forma estéril liofilizada sem um conservante.

Para reconstituir o BOTOX® liofilizado, é usada uma solução salina normal estéril e sem conservante (injeção do cloreto de sódio a 0,9%) extraíndo acima da quantidade apropriada de diluente em uma seringa de tamanho adequado. Como o BOTOX® pode ser desnaturado por borbulhas ou por agitação violenta, o diluente é injetado delicadamente dentro do frasco. Por razões de esterilidade, BOTOX® é administrado preferivelmente dentro de quatro horas depois que o frasco é removido do freezer e reconstituído. Durante essas quatro horas, o BOTOX® reconstituído pode ser armazenado em um refrigerador de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C. O BOTOX® reconstituído, refrigerado foi relatado como retendo sua potência por pelo menos aproximadamente duas semanas. *Neurology*, 48:249-53:1997.

Foi relatado que a toxina botulínica do tipo A foi usada em aplicações clínicas como se segue:

(1) de aproximadamente 75 a 125 unidades de BOTOX® por injeção intramuscular (múltiplos músculos) para tratar a distonia cervical;

(2) de 5 a 10 unidades de BOTOX® por injeção intramuscular para tratar linhas glabellares (ruga) da testa (5 unidades injetadas intramuscularmente no músculo *procerus* e 10 unidades injetadas intramuscularmente em cada músculo *supercilii* ondulado);

5 (3) de aproximadamente 30 a 80 unidades de BOTOX® para tratar a constipação pela injeção intra-esfíncter do músculo *puborectalis*;

(4) de aproximadamente 1 a 5 unidades de BOTOX® por músculo, intramuscularmente injetado, para tratar o blefaroespasma injetando o músculo lateral *pre-tarsal orbicularis oculi* da tampa superior e o músculo lateral *pre-tarsal orbicularis oculi* da tampa inferior;

10 (5) para tratar o estrabismo, os músculos extra-oculares foram injetados intramuscularmente com entre aproximadamente 1 e aproximadamente 5 unidades de BOTOX®, variando a quantidade injetada com base tanto no tamanho do músculo a ser injetado como na extensão da paralisia desejada do músculo (isto é, uma quantidade de correção desejada do *diop-ter*);

(6) para tratar a espasticidade dos membros superiores após derrame por injeções intramusculares de BOTOX® em cinco músculos flexores diferentes dos membros superiores, tal como segue:

20 (a) flexor do *digitorum profundus*: 7,5 U a 30 U;

(b) flexor do *digitorum sublimis*: 7,5 U a 30;

(c) flexor do *carpi ulnaris*: 10 U a 40 U;

(d) flexor do *carpi radialis*: 15 U a 60 U;

(e) *biceps brachii*: 50 U a 200 U. Cada um dos cinco músculos indicados foi injetado na mesma sessão de tratamento, de modo que o paciente recebeu de 90 U a 360 U de BOTOX® no músculo flexor do membro superior por injeção intramuscular em cada sessão do tratamento;

30 (7) para tratar a enxaqueca, uma injeção injetada pericranialmente (simetricamente nos músculos glabellar, frontal e temporal) de 25 U de BOTOX® mostraram um benefício significativo como um tratamento profilático da enxaqueca em comparação ao veículo tal como medido pelas medidas diminuídas da frequência da enxaqueca, diminuição da severidade máxima,

associada ao vômito e ao uso de medicação aguda por um período de três meses que se seguiu à injeção de 25 U.

Estudos recentes demonstraram que a neurotoxina botulínica pode inibir a secreção da insulina, e assim pode desempenhar algum papel no controle da exocitose da insulina e no controle metabólico (Huang et al.,
5 Mol. Endocrinol. 12(7): 1060-70, 1998).

Sabe-se que a toxina botulínica do tipo A pode ter uma eficácia de até 12 meses (*J. europeu Neurology* 6 (4) supl.: S111-S1150:1999), e em algumas condições pode agir por tanto tempo quanto 27 meses, quando u-
10 sado tratar glândulas, tal como no tratamento da hiperidrose. Vide, por exemplo, Bushara K., *Botulinum toxin and rhinorrhea, Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;114(3):507, e *The Laryngoscope* 109:1344- 1346:1999. Entretanto, a duração usual de uma injeção intramuscular de Botox® é tipicamente de aproximadamente 3 a 4 meses.

15 O sucesso da toxina botulínica do tipo A para tratar diversas condições clínicas conduziu ao interesse em outros sorotipos da toxina botulínica. Duas preparações botulínicas do tipo A comercialmente disponíveis para o uso em seres humanos é o BOTOX® disponível pela Allergan, Inc., Irvine, Califórnia, e o Dysport® disponível pela Beaufour Ipsen, Porton Down,
20 Inglaterra. Uma preparação da toxina botulínica do tipo B (MyoBloc®) está disponível pela Elan Pharmaceuticals, San Francisco, Califórnia.

Além de ter ações farmacológicas em locais periféricos, as toxinas botulínicas também podem ter efeitos inibidores sobre o sistema nervoso central. Os trabalhos de Weigand et al, *Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1976; 292, 161- 165, e Habermann, *Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1974; 281, 47-56 mostraram que a toxina botulínica é capaz
25 de ascender para a área da medula espinhal por transporte retrógrado. Tal como está, uma toxina botulínica injetada em uma posição periférica, por exemplo, intramuscularmente, pode ser retrogradamente transportada até a
30 medula espinhal.

A Patente Americana Nº US 5.989.545 descreve que uma neurotoxina clostrídica modificada ou um fragmento da mesma, preferivelmente

uma toxina botulínica, conjugada quimicamente ou recombinantemente fundida a uma porção particularmente visada, pode ser usada para tratar a dor pela administração do agente na medula espinhal.

Uma toxina botulínica também foi proposta para tratar a otite média do ouvido (Patente Americana Nº US 5.766.605), distúrbios do ouvido interno (Patentes Americanas Nº US 6.265.379, 6.358.926); dor de cabeça por tensão (Patente Americana Nº US 6.458.365), dor de cabeça tipo enxaqueca (Patente Americana Nº US 5.714.468), dor pós-operatória e dor visceral (Patente Americana Nº US 6.464.986), crescimento de cabelo e retenção de cabelo (Patente Americana Nº US 6.299.893), psoríase e dermatite (Patente Americana Nº US 5.670.484), músculos feridos (Patente Americana Nº US 6.423.319), vários tipos de câncer (Patente Americana Nº US 6.139.845), distúrbios do músculo liso (Patente Americana Nº US 5.437.291), e inflamação neurogênica (Patente Americana Nº US 6.063.768). As toxinas implantadas com liberação controlada são conhecidas (vide, por exemplo, as Patentes Americanas Nº US 6.306.423 e US 6.312.708) tal como na administração botulínica transdérmica da toxina (Pedido de Depósito de Patente Americana Nº 10/194805).

Adicionalmente, uma toxina botulínica pode ter um efeito de redução da dor induzida por um processo inflamatório em um modelo de rato em formalina. Aoki K., et al, *Mechanisms Of The Antinociceptive Effect Of Subcutaneous Botox: Inhibition Of Peripheral And Central Nociceptive Processing, Cephalalgia*, Setembro de 2003;23(7):649. Além disso, relatou-se que o bloqueio do nervo pela toxina botulínica pode causar uma redução da espessura epidérmica. Li Y, et al., *Sensory And Motor Denervation Influences Epidermal Thickness In Rat Foot Glabrous Skin, Exp Neurol* 1997; 147:452-462 (vide página 459). Finalmente, sabe-se da administração de uma toxina botulínica no pé para tratar da sudorese excessiva dos pés (Katsambas A., et al., *Cutaneous Diseases Of The Foot: Unapproved Treatments, Clin Dermatol* 2002 Nov-Dez;20(6):689-699; Sevim, S., et al., *Botulinum toxin-A therapy of palmar and plantar hyperhidrosis, Acta Neurol Belg*, Dez 2002; 102(4):167-70), dedos do pé espásticos (Suputtitada, A., *Local*

Botulinum Toxin Type A Injections In The Treatment Of Spastic Toes, Am J Phys Med Rehabil Out 2002; 81(10):770-5), andar idiopático dos dedos dos pés (Tacks L, et al., *Idiopathic Toe Walking: Treatment With Botulinum Toxin A Injection, Dev Med Child Neurol* 2002;44(Suppl 91):6), e distonia do pé
 5 (Rogers J., et al., *Injections Of Botulinum Toxin A In Foot Dystonia, Neurology*, Abr 1993;43(4 Suppl 2)).

A toxina tetânica, bem como seus derivados (isto é, com uma porção de destinação não nativa), os fragmentos, os híbrido e as chimeras da mesma, podem também ter uma utilidade terapêutica. A toxina tetânica
 10 carrega muitas similaridades com as toxinas botulínicas. Assim, a toxina tetânica e as toxinas botulínicas são polipeptídeos produzidos por espécies intimamente relacionadas de *Clostridium* (*Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum*, respectivamente). Adicionalmente, tanto a toxina tetânica como as toxinas botulínicas são proteínas de dupla cadeia compostas de uma ca-
 15 deia leve (peso molecular aproximadamente 50 kD) covalentemente ligada por uma única ponte de dissulfeto a uma cadeia pesada (peso molecular aproximadamente 100 kD). Desse modo, o peso molecular da toxina tetânica e de cada uma das sete toxinas botulínicas (não complexadas) é de aproxi-
 20 madamente 150 kD. Além disso, tanto para a toxina tetânica como para as toxinas botulínicas, a cadeia leve carrega o domínio que exibe a atividade biológica intracelular (protease), enquanto que a cadeia pesada compreende o receptor de ligação (imunogênico) e os domínios translocacionais da membrana celular.

Além disso, a toxina tetânica e as toxinas botulínicas exibem
 25 uma elevada afinidade específica para os receptores gangliocidas na superfície dos neurônios colinérgicos pré-sinápticos. A endocitose mediada por receptor da toxina tetânica por resultados dos neurônios colinérgicos periféricos no transporte axônial retrógrado, na obstrução da liberação de neurotransmissores inibidores das sinapses centrais e na paralisia espástica. Con-
 30 trariamente, a endocitose mediada por receptor da toxina botulínica por neurônios colinérgicos periféricos resulta em pouco, se houver algum, transporte retrógrado, inibição da exocitose da acetilcolina dos neurônios motores peri-

féricos intoxicados e uma paralisia flácida.

Finalmente, a toxina tetânica e as toxinas botulínicas assemelham-se umas às outras tanto na síntese biológica quanto na arquitetura molecular. Assim, há uma identidade total de 34% entre as seqüências da proteína da toxina tetânica e a toxina botulínica do tipo A, e uma identidade da seqüência tão elevada quanto 62% para alguns domínios funcionais. Binz T. et al., *The Complete Sequence of Botulinum Neurotoxin Type A and Comparison with Other Clostridial Neurotoxins*, *J Biological Chemistry* 265(16); 9153-9158:1990.

10 Acetilcolina

Tipicamente somente um único tipo de neurotransmissor de molécula pequena é liberado por cada tipo de neurônio no sistema nervoso de mamíferos, embora haja a evidência que sugiram que diversos neuromoduladores podem ser liberados pelo mesmo neurônio. O neurotransmissor acetilcolina é secretado pelos neurônios em muitas áreas do cérebro, mas especificamente pelas células piramidais grandes do córtex motor, por diversos neurônios diferentes no ganglio basal, pelos neurônios motores que enervam a musculatura do esqueleto, pelos neurônios pré-gangliônicos do sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático), pelas fibras intrafusais com saco nuclear do fuso neuromuscular, pelos neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso parassimpático, e por alguns dos neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso simpático. Essencialmente, somente as fibras nervosas simpáticas pós-gangliônicas das glândulas sudoríparas, aos músculos piloerectores e uns poucos vasos sanguíneos são colinérgico como a maioria dos neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso simpático secretam o neurotransmissor norepinefrina. Na maioria dos exemplos a acetilcolina tem um efeito excitante. Entretanto, a acetilcolina é conhecida por ter efeitos inibitórios em algumas das extremidades periféricas do nervo parassimpático, tais como a inibição da taxa cardíaca pelo nervo vago.

30 Os sinais eferentes do sistema nervoso autônomo são transmitidos ao corpo através do sistema nervoso simpático ou do sistema nervoso parassimpático. Os neurônios pré-gangliônicos do sistema nervoso simpático

co se estendem dos corpos da célula de neurônio simpático pré-gangliônicos situados no chifre intermediolateral da medula espinhal. As fibras nervosas simpáticas pré-gangliônicas, se estendem do corpo da célula, da sinapse com os neurônios pós-gangliônicos posicionados em um gânglio simpático paravertebral ou em um gânglio pré-vertebral. Como os neurônios pré-gangliônicos do sistema nervoso simpático e parassimpático são colinérgicos, a aplicação da acetilcolina aos gânglios excitará os neurônios pós-gangliônicos simpáticos e parassimpáticos.

A acetilcolina ativa dois tipos de receptores, os muscarínicos e os nicotínicos. Os receptores muscarínicos são encontrados em todas as células efectoras estimuladas pelos neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso parassimpático, bem como naqueles estimulados pelos neurônios colinérgicos pós-gangliônicos do sistema nervoso simpático. Os receptores nicotínicos são encontrados na medula adrenal, bem como dentro dos gânglios autônomos, que estão na superfície da célula dos neurônios pós-gangliônicos na sinapse entre os neurônios pré-gangliônicos e pós-gangliônicos dos sistemas simpático e parassimpático. Os receptores nicotínicos também são encontrados em muitas extremidades nervosas não autônomas, por exemplo, nas membranas das fibras da musculatura do esqueleto na junção neuromuscular.

A acetilcolina é liberada dos neurônios colinérgicos quando as pequenas e limpas vesículas intracelulares se fundem com a membrana neuronal pré-sináptica da célula. Uma ampla variedade de células secretoras não neuronais, tais como, a medula adrenal (bem como a linha de células PC12) e as células das ilhotas pancreáticas liberam as catecolaminas e o hormônio paratiroideano, respectivamente, das grandes vesículas de núcleo denso. A linhagem de células PC12 é um clone das células feocromocitomas de rato usadas extensivamente como um modelo para cultura de tecido para estudos de desenvolvimento simpatoadrenal. A toxina botulínica inibe a liberação de ambos os tipos de compostos de ambos os tipos de células *in vitro*, permeabilizadas (tal como por eletroporação) ou por injeção direta da toxina na célula não enervada. A toxina botulínica também é conhecida por obstruir

a liberação do glutamato neurotransmissor das culturas de células corticais de sinaptossomas.

Uma junção neuromuscular é formada na musculatura do esqueleto pela proximidade dos axônios com as células musculares. Um sinal transmitido através do sistema nervoso resulta em uma ação potencial no axônio terminal, com ativação dos canais iônicos e a resultante liberação do neurotransmissor acetilcolina das vesículas sinápticas intraneuronais, por exemplo, na placa terminal motora da junção neuromuscular. A acetilcolina cruza o alcance extracelular para se ligar com as proteínas receptoras da acetilcolina na superfície da placa terminal do músculo. Uma vez que tenham ocorrido suficientes ligações, um potencial de ação da célula muscular causa alterações específicas dos canais iônicos da membrana, resultando na contração da célula muscular. A acetilcolina então é liberada das células musculares e metabolizada pelas colinesterases no alcance extracelular. Os metabólitos são reciclados de volta para o axônio terminal para reprocessamento em acetilcolina adicional.

A Patente Americana Nº US 6.585.993 descreve um sistema controlado de liberação de neurotoxina. A Patente Americana Nº US 6.506.399 descreve um implante biodegradável da toxina botulínica. A Patente Americana Nº US 6.383.509 descreve um implante biodegradável de neurotoxina. A Patente Americana Nº US 6.312.708 descreve um implante da toxina botulínica. A Patente Americana Nº US 6.306.423 descreve um implante de neurotoxina.

Assim, permanece uma necessidade para novas composições e novos métodos que possam ser usados tratar distúrbios auto-imunes.

Sumário

A presente invenção está direcionada a essa necessidade e fornece as novas composições e os novos métodos que proporcionam um alívio eficaz de um ou mais distúrbios auto-imunes.

Em uma modalidade, um método para tratamento de um distúrbio auto-imune compreende uma etapa de administrar uma neurotoxina clostrídica, tal como uma toxina botulínica, em uma posição nas proximidades da

glândula timo de um paciente que tenha um distúrbio auto-imune. Em determinadas modalidades, a neurotoxina clostrídica é a toxina botulínica do tipo A que é injetada diretamente na glândula timo. Nessa modalidade, o método pode também compreender uma etapa de administração de um inibidor de citoquinas ao paciente.

Em uma outra modalidade, um método para tratamento de um distúrbio auto-imune compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma neurotoxina clostrídica, tal como uma toxina botulínica, e uma quantidade terapêuticamente eficaz de um inibidor de citoquinas a um paciente que tenha um distúrbio auto-imune. A administração combinada fornece os efeitos sinérgicos não observados pela administração de um ou outro agente sozinho. Nessa modalidade, o método pode também compreender uma etapa de administrar a neurotoxina à glândula timo do paciente.

As composições para tratamento de um distúrbio auto-imune também são descritas. Tais composições podem ser adequadas para a administração na, ou próximo a, glândula timo de um paciente com um distúrbio auto-imune. As composições podem compreender uma combinação de uma ou mais neurotoxinas clostrídicas com um ou mais inibidores das citoquinas.

Cada característica aqui descrita, e cada combinação de duas ou mais de tais características, são incluídas dentro do alcance de acordo com a presente invenção contanto que as características incluídas em tal combinação não sejam mutuamente inconsistentes. Além disso, qualquer característica, ou combinação de características, podem especificamente ser excluídas de quaisquer modalidades de acordo com a presente invenção.

Os aspectos e as vantagens adicionais de acordo com a presente invenção são determinados na descrição seguinte e nas reivindicações, particularmente quando consideradas conjuntamente com os exemplos que as acompanham.

Definições

As seguintes definições são aqui aplicáveis.

"Aproximadamente" significa mais ou menos dez por cento do valor que estiver sendo qualificado.

"Biocompatível" significa que não há nenhuma resposta inflamatória ou antigênica significativa após a administração da composição.

5 "Composto biologicamente ativo" significa um composto que pode realizar uma alteração benéfica no paciente ao qual é administrado. Por exemplo, os "compostos biologicamente ativos" incluem as neurotoxinas.

10 "Quantidade eficaz" quando aplicada ao composto biologicamente ativo significa aquela quantidade do composto que é geralmente suficiente realizar uma mudança desejada no paciente. Por exemplo, onde o efeito desejado seja uma redução de um sintoma de um distúrbio autoimune, uma quantidade eficaz do composto é essa quantidade que causa pelo menos uma redução substancial do sintoma do distúrbio autoimune, e sem resultar em uma toxicidade significativa.

15 A "quantidade eficaz" quando aplicada a um componente inativo constituinte de uma composição injetável (tal como um veículo usado misturado com uma toxina botulínica) se refere a essa quantidade de componente inativo constituinte que é suficiente para influenciar positivamente a liberação e/ou a atividade do componente ativo, quando administrado a um indivíduo.

20 Essa "quantidade eficaz" pode ser determinada baseada nos ensinamentos do presente relatório descritivo e no conhecimento geral da técnica.

25 "Neurotoxina" significa um agente que possa interromper a transmissão do impulso nervoso através de uma junção neuromuscular ou neuroglandular, obstruir ou reduzir a exocitose neuronal de um neurotransmissor ou alterar o potencial de ação de um portal de voltagem de um canal de sódio de um neurônio. Os exemplos de neurotoxinas incluem toxinas botulínicas, toxina tetânica, saxitoxinas e a tetrodotoxina.

30 "Tratamento" significa todo o tratamento de uma doença em um mamífero, e inclui: (i) prevenção que a doença ocorra ou; (ii) inibição da doença, isto é, impedindo seu desenvolvimento; (iii) alívio da doença, isto é, reduzindo a incidência dos sintomas da, ou causando a regressão da doença.

"Implantes" se referem substancialmente dispositivos não líquidos de liberação do fármaco. Os implantes podem incluir um componente polimérico, tal como um polímero biodegradável ou não biodegradável, associado a uma neurotoxina. Os implantes podem ser sólidos, semi-sólidos, ou viscoelásticos. Os implantes são geralmente maiores do que as microesferas.

"Microesferas" se refere a um polímero ou à combinações de polímeros feitos em corpos ou em elementos de vários tamanhos. As microesferas podem ser de todas as formas, embora estejam freqüentemente em uma forma substancialmente esférica.

"Microesferas biodegradáveis" se refere às microesferas que são capazes de ser absorvidas pelo corpo, química e fisiologicamente, ou por outros meios biológicos, em um período de tempo.

"Agente terapêutico" tal como aqui utilizado se refere a qualquer substância que fornecer efeitos terapêuticos ao processo de tratamento do distúrbio autoimune ou respostas biológicas ou fisiológicas ao tratamento do distúrbio autoimune. Um exemplo de agente terapêutico é uma neurotoxina que seja eficaz no relaxamento dos músculos. Um exemplo de uma neurotoxina adequada é uma neurotoxina produzida pelas bactérias *Clostridium*, tais como a *Clostridium beratti*, a *Clostridium butyricum*, a *Clostridium tetani* e a *Clostridium botulinum*. Tal como aqui descrito, as composições preferidas compreendem um componente da toxina botulínica. Um componente da toxina botulínica é uma parte da composição que inclui um ou mais tipos de toxina botulínica selecionados do grupo consistindo na toxina botulínica dos tipos A, B, C, D, E, F, e G. O componente da toxina botulínica pode compreender uma toxina botulínica produzida por uma bactéria clostrídica, ou produzido pela tecnologia recombinante. A toxina botulínica pode ser uma toxina botulínica recombinantemente produzida ou uma toxina botulínica híbrida. Em composições preferidas, o componente toxina botulínica compreende uma toxina botulínica do tipo A, tal como a toxina botulínica comercialmente disponível vendida sob a marca registrada BOTOX® (Allergan, Inc., CA).

Descrição

Foram inventados novos métodos para tratar distúrbios auto-imunes, bem como composições para o tratamento de distúrbios auto-imunes. Os presentes métodos e composições incluem uma neurotoxina clostrídica que seja administrada a um paciente, tal como um paciente humano ou animal, que esteja sofrendo de um distúrbio auto-imune. Tal como aqui utilizado, um distúrbio auto-imune se refere às doenças causadas por uma resposta imune contra células ou tecidos do próprio corpo. Os presentes métodos e composições fornecem novos modos de tratamento de um distúrbio auto-imune que podem fornecer efeitos colaterais reduzidos e as durações melhoradas do alívio quando comparados às aproximações terapêuticas existentes.

Em uma modalidade, um método para tratamento de um distúrbio auto-imune, compreende a administração de uma quantidade eficaz de uma neurotoxina clostrídica em uma posição nas proximidades da glândula timo de um paciente para aliviar pelo menos um sintoma de um distúrbio auto-imune. Em determinadas situações, a administração da neurotoxina clostrídica é completamente eficaz para tratar o distúrbio auto-imune. Administrando a neurotoxina clostrídica a uma posição nas proximidades da glândula timo, acredita-se que a neurotoxina possa eficazmente reduzir a atividade das células epiteliais do timo, e interferir desse modo com a maturação da célula T, a função imune, e a disfunção imune.

A neurotoxina clostrídica é administrada a uma região próxima da glândula timo. Por exemplo, a neurotoxina pode ser administrada em uma região espaçada afastada do tecido da glândula timo, mas próxima o bastante para causar o alívio desejado pelo menos de um sintoma do distúrbio auto-imune associado à atividade da glândula timo. Enquanto não se desejando estar limitado pela teoria ou por um mecanismo particular da ação, a administração da neurotoxina clostrídica em uma posição próxima da glândula timo pode resultar na neurotoxina inibir a liberação da acetilcolina dos neurônios colinérgicos que enervam a glândula timo. A inibição da liberação da acetilcolina pode assim interferir com o maturação da célula T, tal como des-

crito acima. Assim, em uma modalidade, a neurotoxina clostrídica é administrada em uma posição próxima da glândula timo que contenha os neurônios colinérgicos que enervam a glândula timo. Em uma outra modalidade, a neurotoxina clostrídica é administrada diretamente na glândula timo. Por exemplo, tal como aqui referido a neurotoxina clostrídica, tal como uma toxina botulínica, pode ser injetada diretamente na glândula timo introduzindo uma agulha no paciente de modo que a ponta da agulha contate o tecido da glândula timo. Quando a neurotoxina não é administrada diretamente na glândula timo, a neurotoxina pode ser administrada em uma posição espaçada afastada da glândula timo por uma distância que varie de aproximadamente 5 milímetros a aproximadamente 50 milímetros da superfície da glândula timo. Em determinadas modalidades, pode ser desejável administrar a neurotoxina em uma região não sistêmica, não muscular, do corpo, que seja próxima da glândula timo.

15 A administração local da neurotoxina clostrídica em uma posição próxima da glândula timo pode fornecer uma terapia eficaz para o distúrbio auto-imune com a redução dos efeitos colaterais associados às terapias convencionais. Por exemplo, tal como aqui referido, as terapias que usam inibidores da colinesterase podem estar associadas à atividade da hipertensão muscular aumentada e com a atividade sistema nervoso periférico e central devido às quantidades aumentadas da acetilcolina residente nos alcances sinápticos. A utilização de esteróides por um longo prazo e o uso de agentes imunossuppressores pode resultar em efeitos colaterais indesejáveis já que tais agentes são administrados sistemicamente. Assim, essa modalidade pode fornecer um tratamento eficaz do distúrbio auto-imune fornecendo a inibição local da liberação do neurotransmissor ou do peptídeo próxima da glândula timo.

25 Em determinadas modalidades, o método compreende uma ou mais etapas para facilitar a localização da glândula timo pelo médico que realiza a administração. Por exemplo, uma incisão pode ser feita na região do peito que recobre a glândula timo para fornecer um acesso físico direto à glândula timo por um dispositivo de liberação da neurotoxina, tal como uma agulha ou uma cânula configurada para passar a neurotoxina contendo a

composição através da mesma. Um outro método pode compreender o uso de um dispositivo de visualização do timo, que não possa requerer fazer uma incisão em uma região do peito do paciente. Em determinados métodos, a neurotoxina é administrada sem o uso de um eletrodo, tal como os

5 eletrodos que são usados administrar BOTOX[®] para tratar condições neuromusculares. Outros métodos para identificar um local apropriado de administração ou o local do alvo podem ser praticados usando os métodos rotineiros conhecidos por pessoas com habilidade normal na técnica.

Em uma outra modalidade de acordo com a presente invenção,

10 um método para tratamento de um distúrbio auto-imune compreende a administração de uma quantidade eficaz de uma neurotoxina clostrídica e de uma quantidade eficaz de um inibidor de citocinas a um paciente que sofra de um distúrbio auto-imune. Esse tratamento terapêutico combinado pode aliviar um ou mais sintomas do distúrbio auto-imune ou tratar completamente

15 o distúrbio auto-imune.

Na prática do método anterior a neurotoxina clostrídica e o inibidor de citocinas podem ser administrados em quantidades que proporcionem um maior alívio do sintoma ou dos sintomas em comparação com a administração da neurotoxina clostrídica ou do inibidor de citocinas, mas

20 não de ambos. Assim, a presente terapia de combinação fornece um resultado terapêutico inesperado não atingido pela administração da neurotoxina clostrídica e do inibidor de citocinas separadamente. Em determinadas modalidades, a neurotoxina clostrídica é administrada à glândula timo do paciente, tal como aqui referido. Em outras modalidades, a neurotoxina clostrídica é administrada a uma região eficaz para a inibição da liberação do neuro-

25 peptídeo, tal como a liberação do peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), do glutamato e da substância P, ou para a inibição da dor relacionada com a inflamação. Em modalidades adicionais, a neurotoxina clostrídica é administrada a um paciente em uma quantidade eficaz para inibir a inflamação mediada por um neuropeptídeo e o inibidor de citocinas é

30 administrado em uma quantidade eficaz para inibir a inflamação mediada por citocinas.

O inibidor de citocinas que pode ser administrado aos pacientes inclui, sem limitação, neutralizantes de citocina, bloqueadores do receptor de citocinas e citocinas antiinflamatórias, ou combinações das mesmas.

- 5 Neutralizantes de citocina bloqueiam ou reduzem a atividade da citocina inflamatória impedindo a citocina inflamatória de interagir ou de se ligar a seu receptor da superfície celular. Assim, um neutralizador de citocinas, de acordo com a presente descrição inclui, sem limitação, uma proteína de fusão solúvel receptora que possa ser administrada para se ligar
- 10 com a citocina inflamatória, um antagonista natural das citocinas, ou um anticorpo, tal como um anticorpo monoclonal, ou fragmento do mesmo, que reconheça e se ligue com as citocinas inflamatórias. Exemplos de bloqueadores do receptor de citocinas incluem antagonistas e anticorpos do receptor de citocinas, tais como anticorpos monoclonais, ou fragmentos dos
- 15 mesmos, que reconhecem e se ligam ao receptor de citocinas. As citocinas antiinflamatórias podem ser administradas para inibir a expressão das citocinas inflamatórias nas células expressando as citocinas.

- Alguns exemplos específicos de inibidores das citocinas incluem imidazóis da piridinila, imidazóis bicíclicos, oxipentifilina, talidomida, e
- 20 mesilato de gabexato. Os inibidores adicionais de citocinas podem ser obtidos ou identificados usando os métodos rotineiros conhecidos das pessoas normalmente versadas na técnica. Por exemplo, inibidores potenciais de citocinas podem ser identificados usando ensaios de avaliação e comparando a atividade do inibidor em potencial de citocinas com os inibidores exis-
- 25 tentes de citocinas.

- Para os distúrbios auto-imunes que estão associados a uma resposta inflamatória, tal como a asma, a combinação da neurotoxina clostrídica e anticorpos monoclonais para citocinas ou receptores de citocinas pode fornecer uma redução sinérgica na inflamação associada ao distúrbio auto-imune. Efeitos sinérgicos similares podem ser observados no tra-
- 30 tamento da diabetes. Além disso, nas situações em que o inibidor de citocinas, tal como um anticorpo, esteja ligado ou unido à neurotoxina, a liberação

direcionada da neurotoxina pode ser conseguida de modo a se atingirem efeitos sinérgicos melhorados para tratar um distúrbio auto-imune.

Nas terapias de combinação aqui descritas, o local para administração da neurotoxina e do inibidor de citocinas pode variar. Por exemplo, a neurotoxina e o inibidor de citocinas podem ser administrados no mesmo local, ou em locais diferentes. Além disso, as modalidades de administração podem ser as mesmas ou diferentes. Em determinadas modalidades, a neurotoxina pode ser administrada em um local em que o paciente esteja experimentando a dor da inflamação. Por exemplo, a neurotoxina pode ser injetada próximo ou em uma articulação. Ou, a neurotoxina pode ser administrada em um local eficaz no controle da liberação da insulina. A neurotoxina pode ser administrada tópica, transdérmica, intradérmica, subcutânea, intraglandular ou intramuscularmente. O inibidor de citocinas, quando administrado separado da neurotoxina, pode ser administrado de uma maneira eficaz para fornecer a liberação sistêmica do inibidor. Pode ser desejável administrar intramuscular ou intraperitonealmente o inibidor de citocinas, entretanto, as administrações oral e subcutânea também podem ser eficazes.

Na prática dos métodos anteriores, a neurotoxina clostrídica pode ser qualquer neurotoxina produzida pelas bactérias clostrídicas ou qualquer neurotoxina tenha uma sequência dos aminoácidos substancialmente idêntica ou exatamente idêntica a uma neurotoxina produzida pelas bactérias clostrídicas. Em determinadas modalidades, a neurotoxina clostrídica administrada ao paciente é selecionada do grupo consistindo nas toxinas botulínicas dos tipos A, B, C, D, E, F, e G. Em determinados métodos preferidos, a neurotoxina clostrídica é toxina botulínica do tipo A. A toxina botulínica do tipo A é desejável devido a sua alta potência nos seres humanos, pronta disponibilidade e uso conhecido para inibição da liberação do neurotransmissor.

Embora os presentes métodos e composições sejam descritos com referência particular às toxinas botulínicas, outras neurotoxinas podem ser eficazes nas presentes composições com ou sem as toxinas botulínicas, e tais outras neurotoxinas estão incluídas dentro do alcance de acordo com

a presente invenção. Exemplos de outras neurotoxinas clostrídicas dentro do alcance de acordo com a presente invenção incluem as neurotoxinas produzidas pelas espécies *Clostridium butyricum* e *Clostridium beratti*. A presente invenção também inclui o uso de (a) neurotoxinas clostrídicas obtidas ou processadas de culturas bacterianas, por extração da toxina, por concentração, por preservação, por liofilização e/ou por reconstituição; e/ou (b) neurotoxinas modificadas ou recombinantes, que são as neurotoxinas que tiveram um ou mais aminoácidos ou seqüências de aminoácidos deliberadamente suprimidas, modificadas ou substituídas por procedimentos conhecidos de modificação química/bioquímica dos aminoácidos ou pelo uso de tecnologias recombinantes conhecidas da célula hospedeira/vetor recombinante, bem como dos derivados ou dos fragmentos das neurotoxinas assim produzidas. Essas variantes da neurotoxina retêm a habilidade para inibir o neurotransmissão entre dois ou mais neurônios, e algumas dessas variantes podem fornecer durações aumentadas dos efeitos inibidores em comparação com as neurotoxinas nativas, ou podem fornecer uma especificidade de ligação melhorada aos neurônios expostos às neurotoxinas. Essas variantes da neurotoxina podem ser selecionadas pela avaliação da variantes usando ensaios convencionais para identificar as neurotoxinas possuindo os efeitos fisiológicos desejados para inibir a neurotransmissão.

As neurotoxinas usadas nos presentes métodos podem ser administradas ao paciente em diversas formas. Por exemplo, em determinadas modalidades, as neurotoxinas são administradas em uma composição, tal como uma solução, que compreende um componente com função de veículo, tal como a solução salina e similares. Em outras modalidades, as neurotoxinas podem ser administradas por um dispositivo de implante. O dispositivo de implante é um dispositivo não líquido que compreende tipicamente um componente polimérico. Os implantes contendo neurotoxinas podem ser biodegradáveis ou não biodegradáveis. Ou seja, o implante pode compreender um polímero biodegradável, um polímero não biodegradável, e combinações dos mesmos. Em determinadas modalidades, a neurotoxina é administrada na forma de microesferas poliméricas, tais como microesferas biodegradá-

veis. Os implantes também podem incluir um mecanismo de bombeamento para fornecer a liberação controlada da neurotoxina, ou os implantes podem fornecer uma liberação controlada baseada nas propriedades físicoquímicas dos implantes. Exemplos de implantes em potencial contendo neurotoxinas, incluem aqueles implantes descritos nas patentes identificadas anteriormente.

Os presentes métodos podem assim compreender uma etapa de injetar no paciente uma composição que compreende um componente de toxina botulínica e um componente com função de veículo, colocando um dispositivo de implante compreendendo uma toxina botulínica no paciente, ou uma combinação dos mesmos. Em determinadas modalidades, a neurotoxina clostrídica é administrada em uma única composição com o inibidor de citocinas. Por exemplo, uma composição líquida ou polimérica contendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma neurotoxina botulínica e de um inibidor de citocinas pode ser administrada a um paciente em uma única etapa. Em outras modalidades, a neurotoxina e o inibidor de citocinas são administrados em composições separadas, que podem ser administradas ao paciente ao mesmo tempo ou em horários diferentes. Assim, a presente invenção abrange também as composições farmacêuticas compreendendo uma neurotoxina clostrídica e um ou mais inibidores de citocinas presentes em uma única composição.

As toxinas botulínicas para uso de acordo com a presente invenção podem ser armazenadas na forma liofilizada em reservatórios sob a pressão de vácuo ou como líquidos estáveis. Antes da liofilização a toxina botulínica pode ser combinada com os excipientes, estabilizadores e/ou veículos, farmacêuticamente aceitáveis tais como a albumina. O material liofilizado pode ser reconstituído com a solução salina ou água para criar uma solução ou uma composição contendo a toxina botulínica a ser administrada ao paciente.

A quantidade de neurotoxina clostrídica nas composições ou administrada de acordo com os presentes métodos pode variar de acordo com as características particulares do distúrbio que estiver sendo tratado, incluindo sua severidade e outras diversas variáveis do pacientes incluindo o tamanho, o peso, a idade, e a resposta à terapia. Para guiar o profissional,

tipicamente, não se administra nem menos do que aproximadamente 1 unidade e nem mais do que aproximadamente 50 unidades da toxina botulínica do tipo A (tal como BOTOX[®]) por cada local de injeção (isto é, na glândula timo ou ao outro local de inflamação), por cada sessão de tratamento do paciente. Para a toxina botulínica do tipo A tal como a DYSPORT[®], não são administrados nem menos do que aproximadamente 2 unidades e nem mais do que aproximadamente 200 unidades da toxina botulínica do tipo A por cada local de administração ou de injeção, por cada sessão de tratamento do paciente. Para a toxina botulínica do tipo B tal como a MYOBLOC[®], não são administrados nem menos do que aproximadamente 40 unidades e nem mais do que aproximadamente 2500 unidades da toxina botulínica do tipo B por cada local de injeção, por cada sessão de tratamento do paciente. Menos do que aproximadamente 1, 2 ou 40 unidades (de BOTOX[®], DYSPORT[®] e MYOBLOC[®], respectivamente) podem falhar em conseguir um efeito terapêutico desejado, enquanto que mais do que aproximadamente 50, 200 ou 2500 unidades (de BOTOX[®], DYSPORT[®] e MYOBLOC[®], respectivamente) podem resultar na hipotonicidade muscular, fraqueza e/ou paralisia, indesejáveis e clinicamente observáveis.

Mais preferivelmente: para o BOTOX[®] não menos do que aproximadamente duas unidades e não mais do que aproximadamente 20 unidades de uma toxina botulínica do tipo A; para o DYSPORT[®] não menos do que aproximadamente 4 unidades e não mais do que aproximadamente 100 unidades, e; para o MYOBLOC[®], não menos do que aproximadamente 80 unidades e não mais do que aproximadamente 1.000 unidades, respectivamente, são administradas por local de injeção, por cada sessão de tratamento do paciente.

Mais preferivelmente: para o BOTOX[®] não menos do que aproximadamente 5 unidades e não mais do que aproximadamente 15 unidades de uma toxina botulínica do tipo A; para o DYSPORT[®] não menos do que aproximadamente 20 unidades e não mais do que aproximadamente 75 unidades, e; para o MYOBLOC[®], não menos do que aproximadamente 200 unidades e não mais do que aproximadamente 750 unidades, respectivamente,

são administradas por o local da injeção, por cada sessão de tratamento do paciente. É importante notar que pode haver múltiplos locais de injeção (isto é, um padrão de injeções) para cada sessão de tratamento do paciente.

Assim, os presentes métodos podem compreender a administração de uma quantidade de uma toxina botulínica em uma faixa de aproximadamente 1 unidade a aproximadamente 50.000 unidades. A quantidade de toxina botulínica variará dependendo do tipo de toxina botulínica, tal como o sorotipo ou da cepa da toxina botulínica, e da quantidade da composição a ser administrada a um paciente. Em determinados métodos, a toxina botulínica A é administrada em uma quantidade que varia de aproximadamente 10 unidades a aproximadamente 2.000 unidades. Em outros métodos, a toxina botulínica do tipo B é administrada em uma quantidade que varia de aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 30.000 unidades. Preferivelmente, os presentes métodos compreendem a administração de toxinas botulínicas biologicamente ativas na forma de um agente terapêutica. Por exemplo, os presentes métodos não incluem a administração de um toxóide botulínico ao paciente.

Os presentes métodos podem ser praticados para tratar um ou mais distúrbios auto-imunes. Os distúrbios auto-imunes tratáveis pelos presentes métodos incluem uma ou outra, ou ambas, doenças auto-imunes sistêmicas ou doenças auto-imunes localizadas. Os exemplos de distúrbios auto-imunes tratados pelos presentes métodos incluem um ou mais de alguns dos seguintes: artrite reumatóide que pode afetar articulações, e possivelmente o pulmão e a pele; lúpus, incluindo o lúpus eritematoso sistêmico (SLE), que pode afetar a pele, articulações, rins, coração, cérebro, células vermelhas do sangue, bem como outros tecidos e órgãos; esclerodermia, que pode afetar a pele, o intestino, e os pulmões; síndrome de Sjogren, que pode afetar as glândulas salivares, as glândulas lacrimais, e as articulações; síndrome de Goodpasture, que pode afetar os pulmões e os rins; granulomatose de Wegener, que pode afetar os sinus, pulmões, e rins; polimialgia reumática, que pode afetar grupos de grandes músculos; arterite temporal / arterite da célula gigante, que pode afetar as artérias da cabeça e da gar-

ganta; diabetes melito do tipo 1, que afeta as ilhotas do pâncreas; tireoidite de Hashimoto e doença de Graves, que afetam a tiróide; doença celíaca, doenças de Crohn, e colite ulcerativa, que afetam o trato gastrointestinal; esclerose múltipla (MS) e síndrome de Guillain-Barre, que afetam o sistema nervoso central; Doença de Addison, que afeta as glândulas adrenais; esclerose biliar primária, colangite esclerosante e hepatite auto-imune, que afeta o fígado; fenômeno de Raynaud, que pode afetar os dedos das mãos, dedos dos pés, nariz, orelhas; anemia perniciosa; doença de Addison; dermatomiosite; *myasthenia gravis* (MG); síndrome de Reiter; *Pemphigus vulgaris*; esclerodermia ou síndrome da CREST; anemia hemolítica auto-imune; púrpura trombocitopênica auto-imune; espondilite anquilosante; vasculite; e esclerose lateral amiotrófica (doença de Lou Gehrig).

Em determinadas modalidades, os métodos são praticados pela administração de uma neurotoxina clostrídica nas proximidades da glândula timo para tratar a esclerose múltipla, a *myasthenia gravis* ou o lúpus eritematoso sistêmico.

Os presentes métodos são eficazes no tratamento de pelo menos um sintoma de um distúrbio auto-imune, incluindo pelo menos um sintoma selecionado do grupo consistindo em: fadiga, vertigem, indisposição, febre, calafrios, perda de peso, erupções da pele, vasculite, poliartralgia, perda de cabelo localizada, ulcerações orais e nasais, dilatação do linfonodo, problemas gástricos, dor generalizada, que pode estar situada nas articulações no caso da artrite, dilatação das glândulas, tal como da tiróide como no caso da doença de Graves, palpitações cardíacas, as bolhas e lesões dérmicas, fraqueza muscular e combinações das mesmas.

Além disso, os presentes métodos podem ser eficazes no tratamento da causa do distúrbio auto-imune pelo controle ou pela regulação da maturação das células T, baseado na atividade da glândula timo.

Embora sejam fornecidos exemplos de vias de administração e de dosagens, a via de administração adequada e a dosagem são determinadas geralmente caso a caso com base na anamnese do médico atendente. Tais determinações são rotineiras para uma pessoal normalmente versada

na técnica (vide por exemplo, *Harrison's Principles of Internal Medicine* (1998), editado por Anthony Fauci et al., 14^a edição, publicado por McGraw Hill). Por exemplo, a rota e a dosagem para administração de uma neurotoxina clostrídica de acordo com a presente invenção descrita podem ser selecionadas com base em critérios tais como as características de solubilidade da neurotoxina escolhida, assim como na intensidade e no alcance do distúrbio auto-imune que estiver sendo tratado.

A injeção das composições pode ser realizada por seringas, por catéteres, por agulhas e por outros meios para injetar ou infundir composições que contenham a neurotoxina e/ou o inibidor de citocinas. Tal como aqui tratado, a injeção pode ser realizada em uma ou mais etapas de identificação do local do alvo para a injeção.

A frequência e a quantidade injetadas são determinadas com base na natureza e na posição do distúrbio auto-imune em particular que estiver sendo tratado. Geralmente, devido ao caráter estável e de longa duração da composição injetável da neurotoxina, não são necessárias injeções múltiplas. Em determinados casos, entretanto, uma injeção repetida pode ser desejada para se conseguirem resultados ótimos. A frequência e a quantidade de injeções para cada caso em particular são determinadas pela pessoa normalmente versada na técnica.

A administração da neurotoxina na glândula timo, ou a administração da neurotoxina em combinação com o inibidor de citocinas, proporcionam um alívio inicial ou uma diminuição de pelo menos um sintoma de um distúrbio auto-imune dentro de aproximadamente sete dias após a administração ao paciente. O alívio pode ser obtido por diversos meses ou anos dependendo da modalidade de administração. Por exemplo, uma composição líquida que contém a toxina botulínica do tipo A, tal como o BOTOX®, pode fornecer um alívio por aproximadamente quatro até aproximadamente 6 meses após a administração. Um implante que libere a toxina botulínica do tipo A pode fornecer um alívio terapêutico por pelo menos seis meses, ou mesmo por mais do que um ano, tal como por três ou cinco anos. Os efeitos sinérgicos fornecidos pela terapia da combinação da neurotoxina e dos

inibidores das citocinas podem ser observados por diversos meses, por exemplo, entre aproximadamente um e aproximadamente 12 meses. Em determinadas situações, os efeitos da neurotoxina persistem além dos efeitos mediados pelos inibidores das citocinas.

5 Assim, em uma modalidade específica de acordo com a presente invenção, um método para tratamento de um distúrbio auto-imune, tal como o lúpus eritematoso sistêmico, a *myasthenia gravis* ou a esclerose múltipla, compreende uma etapa de injetar uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma toxina botulínica do tipo A, tal como nas composições disponíveis sob as marcas registradas BOTOX® ou DYSPORT®, na glândula timo
10 de um paciente que esteja sofrendo de um distúrbio auto-imune. A injeção da toxina botulínica na glândula timo é eficaz em reduzir a atividade das células epiteliais do timo, reduzindo a maturação da célula T, a função imune e a disfunção imune.

15 Em uma outra modalidade específica de acordo com a presente invenção, um método para tratamento de um distúrbio auto-imune, tal como o lúpus eritematoso sistêmico, a artrite, a asma e a diabetes, compreende uma etapa de administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma toxina botulínica do tipo A, tal como as composições disponíveis sob as
20 marcas registradas de BOTOX® ou DYSPORT®, e uma quantidade terapêuticamente eficaz de um inibidor de citocinas, a um paciente que tenha um distúrbio auto-imune. A administração da toxina botulínica e do inibidor de citocinas fornece efeitos realçados ou sinérgicos para o tratamento do distúrbio auto-imune.

25 Exemplos

Os seguintes exemplos não limitantes capacitam aquelas pessoas normalmente versadas na técnica com os métodos preferidos específicos para tratar as condições dentro do alcance de acordo com a presente invenção e não possuem a intenção de limitar o alcance da presente invenção. Nos seguintes exemplos vários modos de administração não sistêmica
30 podem ser realizados de uma neurotoxina clostrídica.

Exemplo 1

Tratamento de Lúpus Eritematoso Sistêmico com uma Neurotoxina Botulínica

Um homem de 42 anos diagnosticado com o lúpus eritematoso sistêmico é tratado pela injeção de 10 unidades de BOTOX® na glândula timo (5 unidades são injetadas em cada lóbulo do timo). Após aproximadamente uma semana, o paciente mostra redução da febre, da dor de cabeça, da dor nas articulações e das erupções da pele. No total, o paciente geralmente sente menos fadiga e mostra um aspecto geral positivo. O alívio persiste por aproximadamente 4 meses.

Seis meses após seu tratamento inicial, o paciente se submete à cirurgia para receber um implante biodegradável que contém a toxina botulínica do tipo A. Um implante de 1 mg é colocado a 5 milímetros do timo. O implante contém aproximadamente 200 unidades da toxina botulínica do tipo A e de polímero poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA). O implante libera a toxina botulínica em uma taxa de aproximadamente 2 unidades por dia. O paciente relata uma melhora similar à injeção de BOTOX® no timo após aproximadamente 10 dias. Entretanto, o alívio dos sintomas persiste por 18 meses após o procedimento cirúrgico.

Exemplo 2

Tratamento de *Myasthenia Gravis* com uma Neurotoxina Botulínica

Os procedimentos do Exemplo 1 são seguidos para tratar um paciente do sexo feminino diagnosticado com *Myasthenia Gravis*. O paciente apresenta-se com ptose, visão distorcida, e imobilidade ocular total. Os tratamentos evitam com sucesso o desenvolvimento adicional dos distúrbios e do enfraquecimento muscular associado aos músculos dos braços, das mãos, e do sistema respiratório.

Exemplo 3

Tratamento Da Esclerose Múltipla Com Uma Neurotoxina Botulínica

Os procedimentos do Exemplo 1 são seguidos para tratar um paciente do sexo feminino diagnosticado com esclerose múltipla. O paciente apresenta-se com visão distorcida e dor ocular, bem como espasticidade dos membros. Após ter administrado a toxina botulínica do tipo A ao timo, sem

administração da toxina botulínica a um músculo, os sintomas são aliviados dentro de aproximadamente 14 dias. O alívio dos sintomas persiste por diversos meses.

Exemplos de 4 a 6

- 5 Os procedimentos dos Exemplos de 1 a 3 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando uma quantidade quatro vezes maior de DYSPORT, disponível pela Ipsen Pharmaceuticals, Paris, França.

Exemplos de 7 a 9

- 10 Os procedimentos dos Exemplos de 1 a 3 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando uma quantidade igual da toxina botulínica purificada do tipo A (por exemplo, uma preparação da proteína da toxina botulínica do tipo A sem proteínas complexantes) disponível sob o nome de NT 201 pela Mertz Pharmaceuticals (Frankfurt, Alemanha).
- 15

Exemplos de 10 a 12

- Os procedimentos dos Exemplos de 1 a 3 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando uma quantidade maior do que cinquenta vezes da toxina botulínica do tipo B (ou seja, MyoBloc disponível da Solstice Neuroscience, San Diego, CA).
- 20

Exemplos de 13 a 15

- Os procedimentos dos Exemplos de 1 a 3 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando quantidades terapeuticamente eficazes da toxina botulínica do tipo C em vez da toxina botulínica do tipo A.
- 25

Exemplos de 16 a 18

- Os procedimentos dos exemplos de 1 a 3 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando quantidades terapeuticamente eficazes da toxina botulínica do tipo C em vez da toxina botulínica do tipo A.
- 30

Exemplos de 19 a 21

Os procedimentos dos Exemplos de 1 a 3 são repetidos para di-

ferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando quantidades terapeuticamente eficazes da toxina botulínica do tipo D em vez da toxina botulínica do tipo A.

Exemplos de 22 a 24

- 5 Os procedimentos dos Exemplos de 1 a 3 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando quantidades terapeuticamente eficazes da toxina botulínica do tipo E em vez da toxina botulínica do tipo A.

Exemplos de 25 a 27

- 10 Os procedimentos dos Exemplos de 1 a 3 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando quantidades terapeuticamente eficazes da toxina botulínica do tipo F em vez da toxina botulínica do tipo A.

Exemplos de 28 a 30

- 15 Os procedimentos dos Exemplos de 1 a 3 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando quantidades terapeuticamente eficazes da toxina botulínica do tipo G em vez da toxina botulínica do tipo A.

Exemplo 31

- 20 Tratamento da Asma com uma Neurotoxina Botulínica e um Anticorpo Monoclonal Humanizado

Um homem de 38 anos sofrendo de asma é tratado por uma terapia da combinação baseada na administração de BOTOX® e do anticorpo monoclonal, omalizumab (Xolair®). O homem é tratado injetando-se 5 unidades de BOTOX® nas fibras nervosas responsáveis pela broncoconstrição e injetando 150 mg de Xolair® em uma única injeção subcutânea na forma de bolus. O alívio imediato é proporcionado pelo inalador do paciente. O paciente relata um número reduzido de episódios asmáticos durante os seis meses seguintes.

Exemplo 32

- 30 Tratamento do Diabetes com uma Neurotoxina Botulínica e um Anticorpo Monoclonal Humanizado

Um paciente do sexo masculino com 22 anos com diabetes meli-

- to do tipo 1 é tratado por uma terapia de combinação com a administração de uma neurotoxina botulínica e do anticorpo monoclonal humanized anti-CD3 hOKT3gama1 (Ala-Ala). Ao paciente são administradas aproximadamente 20 unidades de BOTOX® e de injeções do anticorpo uma vez uma
- 5 semana por seis semanas. Após aproximadamente 3 semanas, os sintomas do diabetes são reduzidos. O alívio persiste por aproximadamente 6 meses após o tratamento inicial.

Exemplo 33

- 10 Tratamento da Artrite com uma Neurotoxina Botulínica e um Receptor Bloqueador da Citoquina

- Um paciente do sexo masculino de 62 anos que sofre de artrite reumatóide é tratado por uma terapia de combinação de uma neurotoxina botulínica e de um antagonista do receptor da interleucina 1. Ao paciente são administradas 2 unidades de BOTOX® em cada uma das articulações de
- 15 sua mão esquerda e recebe uma injeção subcutânea do antagonista. O paciente experimenta uma redução total na dor das juntas. A redução da dor em sua mão esquerda persiste por aproximadamente 4 meses enquanto que a redução na dor das juntas em outras regiões de seu corpo dura menos do que 4 meses.

- 20 Exemplos de 34 a 36

Os procedimentos dos Exemplos de 31 a 33 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando uma quantidade quatro vezes maior de DYSPORT, disponível pela Ipsen Pharmaceuticals, Paris, França.

- 25 Exemplos de 37 a 39

- Os procedimentos dos Exemplos de 31 a 33 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando uma quantidade igual da toxina botulínica purificada (por exemplo, uma preparação botulínica da proteína da toxina sem proteínas comple-
- 30 xantes) disponível sob o nome NT 201 pela Merz (Frankfurt, Alemanha).

Exemplos de 40 a 42

Os procedimentos dos Exemplos de 31 a 33 são repetidos para

diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando uma quantidade maior do que cinquenta vezes da toxina botulínica do tipo B (ou seja, MyoBloc disponível da Solstice Neuroscience, San Diego, CA).

5 Exemplos de 43 a 45

Os procedimentos dos Exemplos de 31 a 33 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando quantidades terapeuticamente eficazes da toxina botulínica do tipo C em vez da toxina botulínica do tipo A.

10 Exemplos de 46 a 48

Os procedimentos dos Exemplos de 31 a 33 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando quantidades terapeuticamente eficazes da toxina botulínica do tipo C em vez da toxina botulínica do tipo A.

15 Exemplos de 49 a 51

Os procedimentos dos Exemplos de 31 a 33 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando quantidades terapeuticamente eficazes da toxina botulínica do tipo D em vez da toxina botulínica do tipo A.

20 Exemplos de 52 a 54

Os procedimentos dos Exemplos de 31 a 33 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando quantidades terapeuticamente eficazes da toxina botulínica do tipo E em vez da toxina botulínica do tipo A.

25 Exemplos de 55 a 57

Os procedimentos dos Exemplos de 31 a 33 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas administrando quantidades terapeuticamente eficazes da toxina botulínica do tipo F em vez da toxina botulínica do tipo A.

30 Exemplos de 56 a 60

Os procedimentos dos Exemplos de 1 a 3 são repetidos para diferentes pacientes que estejam sofrendo das mesmas condições, mas admi-

nistrando quantidades terapeuticamente eficazes da toxina botulínica do tipo G em vez da toxina botulínica do tipo A.

Embora a presente invenção tenha sido descrita em detalhes no que diz respeito à determinadas composições e métodos preferidos, são possíveis outras modalidades, versões, e modificações dentro do alcance de acordo com a presente invenção. Por exemplo, uma grande variedade de neurotoxinas pode eficazmente ser usada nos métodos de acordo com a presente invenção. Adicionalmente, a presente invenção inclui métodos de administração local para aliviar um ou mais sintomas de um distúrbio auto-imune em que duas ou mais neurotoxinas, tais como duas ou mais toxinas botulínica, são administradas simultaneamente ou consecutivamente. Por exemplo, a toxina botulínica do tipo A pode ser administrada até uma perda da resposta clínica ou neutralizando o desenvolvimento dos anticorpos, seguida pela administração da toxina botulínica do tipo B. Alternadamente, uma combinação de quaisquer duas ou mais toxinas botulínicas dos sorotipos de A a G pode ser localmente administrada para controlar o início e a duração do resultado desejado. Além disso, os compostos que não são neurotoxinas podem ser administrados antes, simultaneamente com ou subsequente à administração da neurotoxina para fornecer um efeito adjunto tal como a melhoria ou um início mais rápido da deservação antes que a neurotoxina, tal como uma toxina botulínica, comece a exercer seu efeito terapêutico.

Nossa invenção inclui também dentro de seu alcance o uso de uma neurotoxina, tal como uma toxina botulínica, na preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio auto-imune.

Todas as referências, artigos, patentes, aplicações e publicações descritos acima são aqui incorporados pela referência em suas totalidades.

Conseqüentemente, o espírito e o alcance das seguintes reivindicações não devem estar limitados às descrições das modalidades preferidas determinadas acima.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de neurotoxina clostrídica para a fabricação de um medicamento para uso no tratamento de um distúrbio auto-imune pela administração em uma posição contendo neurônios colinérgicos que enervam a glândula timo ou diretamente à glândula timo para aliviar pelo menos um sintoma do distúrbio auto-imune.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, no qual a neurotoxina clostrídica é selecionada do grupo consistindo nas toxinas botulínicas dos tipos A, B, C, D, E, F, e G.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1, no qual a neurotoxina clostrídica é a toxina botulínica do tipo A.

4. Uso de acordo com a reivindicação 1, no qual o medicamento é para a administração de uma quantidade de toxina botulínica em uma faixa de aproximadamente 1 unidade a aproximadamente 50.000 unidades.

5. Uso de acordo com a reivindicação 1, no qual o medicamento é para a administração de uma quantidade da toxina botulínica do tipo A em uma faixa de aproximadamente 10 unidades a aproximadamente 2.000 unidades.

6. Uso de acordo com a reivindicação 1, no qual o medicamento é para a administração de uma quantidade da toxina botulínica do tipo B em uma faixa de aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 30.000 unidades.

7. Uso de acordo com a reivindicação 1, no qual o medicamento é para a administração por (i) injeção de uma composição compreendendo um componente de toxina botulínica e um componente veículo em um paciente ou (ii) inserção de um dispositivo de implante compreendendo uma toxina botulínica no paciente, ou uma combinação de (i) e (ii).

8. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, no qual o medicamento é para a administração de uma neurotoxina clostrídica para co-administração com um inibidor de citocina ao paciente em uma quantidade eficaz para aliviar pelo menos um sintoma do distúrbio auto-imune.

9. Uso de acordo com a reivindicação 1, no qual o distúrbio auto-imune é tratado pela administração da neurotoxina clostrídica e é selecionado do grupo consistindo em esclerose múltipla, *myasthenia gravis*, e lúpus eritematoso sistêmico.

5 10. Uso de acordo com a reivindicação 8, no qual a neurotoxina clostrídica e o inibidor de citocina são para administração em quantidades que fornecem um alívio maior de pelo menos um sintoma do distúrbio auto-imune comparado à administração de somente um de neurotoxina clostrídica e inibidor de citocina a um paciente para tratar o mesmo distúrbio auto-
10 imune.

11. Uso de acordo com a reivindicação 8, no qual a neurotoxina clostrídica e o inibidor de citocina são para administração ao paciente em uma única composição.

12. Uso de acordo com a reivindicação 8, no qual a neurotoxina
15 clostrídica é a toxina botulínica do tipo A e o inibidor de citocina é selecionado do grupo consistindo em neutralizadores de citocina, bloqueadores do receptor de citocina, citocina antiinflamatórias e combinações dos mesmos.

13. Uso de acordo com a reivindicação 8, no qual a neurotoxina clostrídica é para administração em uma quantidade eficaz para a inibição
20 da inflamação mediada por neuropeptídeo, e o inibidor de citocina é para administração em uma quantidade eficaz para inibição da inflamação mediada por citocina.

14. Composição farmacêutica, compreendendo uma neurotoxina clostrídica e pelo menos um inibidor de citocina presentes em quantidades
25 eficazes para tratar um distúrbio auto-imune.

RESUMO

Patente de Invenção: **"TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS AUTO-IMUNES COM UMA NEUROTOXINA".**

A presente invenção refere-se a métodos de tratamento de um
 5 ou mais distúrbios auto-imunes incluindo uma etapa de administrar uma neurotoxina clostrídica, tal como uma toxina botulínica, a um paciente que tenha um distúrbio auto-imune. Em um aspecto, um método inclui uma etapa de administrar a neurotoxina à glândula timo ou próxima da glândula timo do paciente. Em um outro aspecto, um método inclui uma etapa de administrar
 10 a neurotoxina em combinação com a administração de um inibidor de citocinas ao paciente. As composições também são descritas.