

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 336 924**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 13/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.1998 E 05024445 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **26.03.2014 EP 1658858**

54 Título: **Uso de toxina botulínica para el tratamiento de disfunción recalcitrante de evacuación**

30 Prioridad:

15.07.1997 US 52580 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
30.04.2014

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
COLORADO (100.0%)
201 Regent Administrative Center
Boulder, CO 80309, US**

72 Inventor/es:

SCHMIDT, RICHARD A.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 336 924 T5

DESCRIPCIÓN

Uso de toxina botulínica para el tratamiento de disfunción recalcitrante de evacuación

5 Campo de la invención

La presente invención estipula el uso de la reivindicación 1.

Antecedentes de la invención

10 Muchas afecciones médicas en urología tienen su origen en una disfunción espástica de los arcos reflejos sacros. Ejemplos de dichas afecciones incluyen el dolor pélvico (por ejemplo, cistitis intersticial, endometriosis, prostatitis, síndromes de inestabilidad uretral), elementos miofasciales pélvicos (por ejemplo, esfínter elevador, dismenorrea, fístula anal, hemorroides), incontinencia urinaria (por ejemplo, vejiga inestable, esfínter inestable), trastornos de la
15 próstata (por ejemplo, BPH, prostatitis, cáncer de próstata), infección recurrente (secundaria a espasticidad del esfínter) y retención urinaria (secundaria a esfínter espástico, cuello de vejiga hipertrofiado) y disfunción neurogénica de la vejiga (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, lesión de la médula espinal, apoplejía, esclerosis múltiple, reflejo espasmódico).

20 La próstata es una glándula parcialmente glandular y parcialmente fibromuscular del sistema reproductor masculino. Durante el envejecimiento, la próstata tiende a agrandarse (hipertrofia). Este agrandamiento prostático puede conducir a la obstrucción uretral y disfunción de la evacuación.

El agrandamiento prostático es un acontecimiento común en hombres de edad avanzada. Lytton y otros (Lytton, B., Emery, J.M. y Harvard, B.M. [1973] 99: 639-645) estimaron que un hombre de 45 años de edad tenía un 10% de riesgo de cirugía de próstata a la edad de 70. Un informe censal de EE.UU. estima que hay 30 millones de personas hoy día con más de 65 años de edad. Este segmento de la población está previsto que se eleve a 50 millones en los próximos 30 años. Por lo tanto, el número de hombres con agrandamiento prostático también aumentará. Según los informes emitidos por el Consejo Asesor Nacional de Enfermedades del Riñón y Urológicas, se realizaron 425.000
30 prostatactomías en los Estados Unidos en 1989. Basándose en el crecimiento de la población se estima que el número de prostatactomías realizadas anualmente se elevará hasta 800.000/año en el año 2020.

La uretra pasa a través de la próstata (uretra prostática) cuando sale hacia el orificio uretral externo. La uretra tiene cinco lóbulos distintos que son evidentes a las 12 semanas en el feto humano (Lowsley, O.S. Am. J. Anat. [1912] 13: 299-349). Aunque la ramificación lobular encontrada en el feto no es visible en la próstata prepubescente, los lóbulos medios anterior y posterior son usados para describir la próstata agrandada.

Un punto de vista más reciente es que la próstata está comprendida también por varias zonas morfológicamente distintas (McNeal, J. Urol. Clin. North. Am. [1990] 17(3): 477-486). La mayoría del volumen glandular está compuesto por la zona periférica (~70-75%). El resto del volumen glandular está dividido en la zona central (~20-25%), la zona de transición (~5-10%) y la zona glandular periuretral (~1%).

McNeal (1990) informó que la BPH se desarrolla en la zona de transición y la zona glandular periuretral. Los nódulos de BPH se desarrollan en el interior o de forma inmediatamente adyacente a la zona esfintérica prostática. La zona de transición es una zona pequeña próxima a la uretra íntimamente relacionada con el esfínter uretral proximal. El estroma de la zona de transición es denso y compacto, y es inusualmente susceptible a perturbaciones neurológicamente inducidas del control del crecimiento. Sus glándulas penetran en el esfínter, mientras que las fibras de los músculos del esfínter penetran en el estroma de transición. La zona glandular periuretral tiene un origen de seno urogénico similar como la zona de transición.

La BPH puede estar asociada con cantidades aumentadas de estroma con relación al epitelio (Bartsch, G. Muller, H. R., Oberholzer, M. Rohr, H., P., J. Urol. [1979] 1222: 487-491). Una parte significativa del estroma es músculo liso (McNeal, 1990) que está bajo control nervioso simpático. Las propiedades contráctiles de este músculo liso podrían suponer el componente dinámico de la obstrucción en la BPH (Bruschini, H. y otros [1978] Invest. Urol. 15(4): 288-90; Lepor H. [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 651-658).

Además del control simpático del estroma prostático, la próstata está altamente enervada. Las fibras nerviosas de la próstata entran en la próstata desde el aspecto lateral posterior con una concentración de ganglios cerca de la conexión entre la próstata y las vesículas seminales (Maggi, C.A., ed. [1993] "Nervous control of the Urogenital System", Harwood Academic Publishers; Higgings, J.R.A. and Gosling, J.A. [1989] Prostate Suppl. 2: 5-16). En esta glándula han sido descritos acetilcolina (ACH), neuropéptido Y (NPY), péptido intestinal vasoactivo (VIP) y fibras de noradrenalina. Un plexo con elevado contenido de estructuras celulares de nervio positivo a ACH está asociado con los acines secretores en todas las partes de la glándula. Algunas de las fibras de ACH contienen también neuronas de NPY. Las neuronas que contienen VIP se ha encontrado que están asociadas con las estructuras celulares de nervios que contienen ACH. Se han encontrado neuronas ocasionales entre las fibras nerviosas manchadas con ACH, sugiriendo que tanto el NPY como las neuronas noradrenérgicas suministran músculo liso (Higgins J.R.A. and

Gosling, J.A. [1989] Prostate Suppl. 2: 5-16).

Los nervios autonómicos están distribuidos uniformemente entre las zonas central y periférica de la próstata (Higgins, J.R.A. y Gosling, J.A. [1989] Prostate Suppl. 2: 5-16). El control neuronal periférico es análogo. Además, no hay ninguna diferencia en el tipo de fibras nerviosas encontradas asociadas con elementos epiteliales o estromales de la glándula.

Los estudios anatómicos de tipos de fibras nerviosas en la próstata, acoplados con otros estudios de innervación de estroma prostático (Brushing H., Schmidt, R.A., Tanagho, E.A. [1978] Invest. Urol. 15(4): 288-290; Watanabe, H., Shima, M., Kojima, M., Ohe, H.L. [1989] Pharmacol. Res. 21 (Suppl 2): 85-94) sugieren que la innervación colinérgica ejerce una influencia sobre el comportamiento epitelial, mientras que la innervación adrenérgica ejerce una influencia sobre el tono estromal (excitabilidad). Estas observaciones han proporcionado un motivo para el uso, por ejemplo, de bloqueadores alfa en el tratamiento de BPH. Los efectos de los bloqueadores alfa (Downie, J.W. y Bialik, G.J. [1988] J. Pharmacol. Exp. Ther. 246(1): 352-358) pueden suponer también mejoras en los síntomas de BPH como consecuencia del humedecimiento del comportamiento del esfínter estriado disfuncional por los bloqueadores alfa.

Los estudios han mostrado también que hay varias taquiquininas (por ejemplo, sustancia P [SP], péptido relacionado con el gen de calcitonina [CGRP], neuroquinina A, bradiquinina y factor de crecimiento nervioso [NGF] que pueden ejercer una influencia sobre el tono del músculo liso (Hakanson y otros, [1987] Neuroscience 21(3): 943-950). Los receptores de neurotransmisores han sido cuantificados en toda la próstata (por ejemplo, NPY, VIP, SP, leu-enkefalina (L-enk), met-enkefalina, 5-HT, somatostatina, fibras positivas a acetilcolinesterasa (AChE) y dopamina beta-hidroxilasa (DBH) (Crowe, R. Chapple, C.R., Burnstock G., "The Human Prostate Gland: A Histochemical and Immunohistochemical Study of Neuropeptides, Serotonins, Dopamine beta-Hydroxylase and Acetylcholinesterase in Autonomic Nerves and Ganglia). Hay alguna variación en la densidad de receptores en diferentes sitios prostáticos en la hiperplasia prostática benigna.

Los cambios en el comportamiento celular electrofisiológicamente registrados y en la concentración de neuropéptidos en la médula espinal se ha mostrado que son una consecuencia secundaria del aplastamiento mecánico de los músculos de la cola de una rata, estimulación por catéter de la uretra posterior y electroestimulación de un nervio periférico. La disineria entre el esfínter detrusor y el uretral es un descubrimiento significativo en pacientes con prostatodinia. La denervación de la próstata se ha mostrado también que produce enormes cambios en el epitelio prostático. Por tanto, hay una evidencia de que las alteraciones experimentalmente inducidas en las influencias neurológicas pueden ser producidas en el sacro, médula espinal, vejiga o uretra a través de métodos mecánicos, eléctricos, químicos o térmicos (microondas, láser) para cambiar el comportamiento irritativo. Sin embargo, no ha habido intentos conocidos de usar neurotoxinas para aplicaciones terapéuticas.

Hay una escasa correlación entre el grado de agrandamiento prostático y la gravedad de los síntomas. Aunque un 80% de los hombres con 70 años de edad muestran BPH tras exploraciones por ultrasonidos transrectales, solamente un 20% buscaron cirugía (Coffey, D.S. y Walsh, P.C. [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 461-475), el tratamiento de elección para BPH (Fowler, F.J. Jr., Wennberg, J.E., Timothy, R.P. [1988] J. Amer. Med. Assoc., 259(20): 3022-3028). Los síntomas de irritación pueden sobrepasar bastante los síntomas esperados basándose en el tamaño de la próstata. Los síntomas pueden mejorar después de un tratamiento quirúrgico de BPH mediante procedimientos como resección transuretral de la próstata (TURP) (Christensen, Aagaard, M. M. J., Madsen P.O. [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 621-629), dilatación de balón (Dowd, J.B. y Smith, J.J. III [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 671-677), o hipertermia prostática (Baert, L. Ameye, F. Willemen, P. y otros [1990] J. Urol. 144: 1383-1386). Sin embargo, los síntomas persisten en tanto como un 15% de pacientes de BPH (Baert, L., Ameye, F., Willemen, P. y otros, [1990] J. Urol. 144: 1383-1386; Wennberg, J.E., Mully, A.G., Hanley, D., Timothy, R.P., Fowler, F.J., Roos, R.P., Barry, M.J. y otros [1988] J. Amer. Med. Assoc. 259: 3027-3030). Hasta un 25% de pacientes de BPH tienen procedimientos secundarios en estudios de seguimiento a largo plazo, sugiriendo que las aproximaciones quirúrgicas no abordan los mecanismos fundamentales que producen la BPH, es decir, la influencia neurológica defectuosa (mecanismo de control) sobre la integridad del tractor urinario inferior.

La necesidad de cirugías repetidas, la morbilidad y la mortalidad asociadas con TURP y el coste de la cirugía han conducido al desarrollo de algunas aproximaciones no quirúrgicas como la ablación de andrógenos (McConnell, J.D., [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 661-670) y el uso de bloqueadores alfa anteriormente expuesto, pero pocos tratamientos médicos o quirúrgicos hasta la fecha han producido una restauración del comportamiento vacío al estado normal (caudal de aproximadamente 25 cm³/s y volumen vacío de aproximadamente 400 cm³).

Es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones seguras, económicas y externas al paciente para uso en métodos para la prevención y el tratamiento de una disfunción recalcitrante de la evacuación, que es incontinencia urinaria.

Otros objetos de la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de toxina botulínica en la preparación de una composición farmacéutica para tratar una disfunción recalcitrante de evacuación, en el que la disfunción recalcitrante

de evacuación es incontinencia urinaria, y en el que la composición es administrada a la pared de la vejiga o al cuello de la vejiga de un paciente mediante inyección. Tal toxina botulínica puede ser, por ejemplo, toxina botulínica tipo A (Botox, Allergen).

- 5 Preferentemente, la toxina botulínica es segura, altamente selectiva y fácil de suministrar, incluso cuando se combina con otras terapias. El suministro de la toxina botulínica es por inyección.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de la toxina botulínica es la dosificación suficiente para inhibir la actividad neuronal durante al menos una semana, más preferentemente un mes, lo más preferentemente durante
10 aproximadamente 6 a 8 meses o más. La dosificación puede ser una dosis única o acumulativa (dosis en serie) y puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica. La toxina botulínica puede ser suministrada en serie (es decir, una vez al mes, una vez cada seis meses) con el fin de que pueda ser optimizado el efecto terapéutico. Este esquema de dosificación es fácilmente determinado por un experto en la técnica basándose, por ejemplo, en el tamaño del paciente y la afección que va a ser tratada, y dependerá de muchos factores, que incluyen la toxina
15 botulínica seleccionada, la afección que va a ser tratada, el grado de irritación y otras variables.

El uso mencionado anteriormente es para el control a largo plazo de la disfunción recalcitrante de evacuación que es la incontinencia urinaria, sin necesidad de intervención quirúrgica. Además de ello, los usos estipulan el control de trastornos expuestos en la reivindicación 1 de una manera altamente selectiva, sin los efectos secundarios
20 potenciales y fallos de tratamiento asociados con las modalidades de tratamiento actuales.

"Afección o trastorno urológico-neurológico" incluye muchas afecciones médicas en urología que tienen su origen en una disfunción espástica y/o degeneración de los arcos reflejos sacros, tales como la incontinencia urinaria (por ejemplo, motora o sensorial, vejiga inestable).
25

Sin estar limitado por la teoría, la base para el tratamiento de las afecciones neurológicas-urológicas es la supresión o modulación de la base neural para la regulación disfuncional del tejido afectado. La toxina A botulínica, más particularmente Botox (Allergen), es una toxina botulínica preferida según la presente invención.

- 30 La toxina botulínica es formulada en una formulación farmacéuticamente aceptable adecuada para inyección.

En una realización preferida de acuerdo con el método de la presente invención, la toxina botulínica es toxina botulínica tipo A. Las cantidades terapéuticamente eficaces de toxina botulínica pueden ser cualesquiera cantidades o dosis que sean menos que una dosis tóxica, por ejemplo, menos de aproximadamente 3000 UI/macho de 70 kg, preferentemente entre 100 UI/macho de 70 kg a 1200 UI/70 kg. Las dosificaciones pueden ser proporcionadas en forma de una dosis única o en forma de dosis divididas, por ejemplo, divididas en el transcurso de cuatro semanas.
35

La toxina botulínica es administrada por inyección.

- 40 Las siguientes técnicas son usadas en esta invención:

Preparación de tejidos para microscopía óptica

Los tejidos son fijados en paraformaldehído al 6% en tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,2, durante 24 horas, deshidratados en alcohol calibrado y xileno, e incluidos en parafina. Las secciones son cortadas y teñidas con tintes apropiados, como hematoxilina/eosina.
45

Preparación de tejidos para microscopía electrónica

Los tejidos son recogidos y fijados en glutaraldehído al 2,5% en tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,2, durante 1 hora a 4°C, y seguidamente son incubados con tetróxido de osmio al 0,1% durante 1 hora e incluidos en EPON. Se preparan secciones de ultratina (80 nm) y se tiñen con citrato de plomo/acetato de uranilo y se examinan con un microscopio electrónico (Philips, modelo 201).
50

Tinción en túnel para apoptosis

El tejido es fijado e incluido como se describió anteriormente. Los tejidos son desparafinizados y se hacen reaccionar con Proteinasa K (Boehringer). Son adicionalmente tratados con peroxidasa y enzima TDT y colocados en un humidificador ajustado a 37°C durante una hora. Las secciones son lavadas y se añade anti-digoxigenina-peroxidasa durante 30 minutos, seguido de tinción con níquel-DAB (diaminobenceno).
60

Estudios de inmunohistoquímica

La presencia de los neuropéptidos VIP, SP, NPY, L-Enk y péptido relacionado con el gen calcitonina (CGRP) así como la expresión del factor beta de crecimiento de transformación (TFG-beta), factor alfa de crecimiento de transformación (TGF-alfa), factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básicos
65

(bFGF) se determinó en tejidos prostáticos usando anticuerpos monoclonales apropiados. El uso de neurotoxinas da lugar a la atrofia prostática, que debe ser evitada por niveles inferiores de factores de crecimiento en el tejido prostático tratado.

- 5 Las secciones son incubadas durante una noche a temperatura ambiente con anticuerpos primarios seguidos de inmunotinción con avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC, Vector Labs, EE.UU.). Se usa en las preparaciones antisuero policlonal de conejo contra los neurotransmisores VIP, CGRP, SP, NPY y L-Enk (Peninsula Labs, EE.UU.), a diluciones de 1:8000 a 1:12.000. Los testigos inmunocitoquímicos consisten en absorber previamente el antisuero primario con antígeno apropiado, o su sustitución con suero normal (Blasi, J., Chapman, E.R., Yamaskai, S., Binz, T., Niemann, H y Jahn, R. [1993], The EMBO Journal 12: 4281-4828; Black, J.D. y Dolly, J.O. [1986] J. Cell Biol. 103: 535-544; Linial, M. [1995] Is. J. Med. Sci. 31: 591-595). Después de disponerse en portaobjetos, las secciones son contrateñidas con eosina, deshidratadas y cubiertas con cubreobjetos.

Análisis por transferencia Western de la expresión del factor de crecimiento

- 15 Los homogenatos de células de próstata tratados y sin tratar son examinados en cuanto a la expresión de factores de crecimiento mediante análisis por transferencia Western. La proteína del homogenato celular es separada por electroforesis sobre SDA-PAGE (7%), seguidamente transferida por electroforesis durante una noche a papel de nitrocelulosa (Towbin, H. y otros, [1979] Proc. Nat. Acad. Sci. 76(9): 4350-4379). El papel de nitrocelulosa es mojado durante una hora a temperatura ambiente en leche seca no grasa al 0,5% disuelta en solución salina tamponada con fosfato, y es adicionalmente mojado a 4°C en solución bloqueante (albúmina de suero bovino al 2% en Tris 10 mM/NaCl 0,15 M/azida de sodio al 0,1%, pH 7,4). Las membranas de nitrocelulosa son incubadas con anticuerpos (fracciones de IgG de anti-TGF-beta, anti-TGF-alfa, anti-EGF y anti-bFGF) purificados por medio de proteína A (1 x 10⁶ cpm/ml) en tampón bloqueante durante 1 hora. La membrana es lavada con PBS que contiene Nonidet P-40 entre incubaciones. Se expone película X-O-mat AR2 (Kodak) a la membrana a -70°C y las películas son reveladas para examinar la expresión de factores de crecimiento.

Determinación de la expresión de c-fos y c-myc

- 30 La expresión de c-fos y c-myc en tejido prostático tratado y sin tratar se determina mediante análisis por transferencia Northern como sigue. El tejido es homogeneizado en tampón de lisis durante 15 segundos o hasta que el tejido se homogeneiza. Se añade acetato de sodio y la solución se mezcla con agitación. Un volumen igual de fenol saturado en agua es añadido y mezclado por inversión, seguido de la adición de cloroformo/alcohol isoamílico. La solución es centrifugada vigorosamente durante 30 segundos y se deja sedimentar en hielo durante 15 minutos. La solución se centrifuga durante 10-20 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, la fase acuosa es cuidadosamente aspirada y colocada en un nuevo tubo de polipropileno. Se añade un volumen de isopropanol y la solución se mezcla por agitación. La solución se coloca en un congelador a -20°C durante al menos 60 minutos para precipitar ARN. Después de la precipitación, el tubo es centrifugado durante 10 minutos, y la materia sobrenadante es sedimentada, dejando un sedimento de ARN. Se añade 1 ml de etanol, y el tubo se centrifuga durante 10 minutos adicionales. La fase acuosa se desecha, y el sedimento se lava con etanol al 100% por centrifugación. El sedimento de ARN se vuelve a disolver en 0,4 ml de tampón de lisis. El ARN es nuevamente precipitado mediante la adición de etanol al 100% e incubación en congelador a -20°C durante al menos 60 minutos. La solución se centrifuga y la materia sobrenadante se desecha. La concentración de ARN se determina diluyendo 5 l de muestra en 995 l de DEPC-agua y midiendo la relación de absorbancia a 260/280 nm.

Los siguientes ejemplos se proporcionan como un modo de describir realizaciones específicas sin limitar el alcance de la invención en modo alguno.

Ejemplo 1

Efecto de la inyección de neurotoxina sobre disfunciones urológicas: datos en seres humanos

Dos pacientes con disfunciones recalcitrantes de evacuación fueron tratados con inyecciones de toxina botulínica (Botox) como sigue. El paciente 1 era un hombre de 47 años de edad que era incontinente secundario a una lesión sostenida en las vértebras cervicales (nivel C6-C7) sostenida 14 meses previamente. Las características urodinámicas pusieron de manifiesto una capacidad de la vejiga de 30 cm³ y un esfínter débil (presión uretral pico de 40 cm de agua). Fracasó con múltiples regímenes farmacológicos y fue intolerante a dispositivos de fijación/condón para el pene.

Recibió cuatro veces a la semana 200 UI de inyecciones de toxina botulínica en el cuello de la vejiga para una dosis total de 800 UI. En una inyección posterior, sus capacidades de la vejiga variaron en el intervalo de 300-400 cm³ con oxibutinina y 150-200 cm³ sin oxibutinina. Las presiones pico de la vejiga previas a la inyección habían sido de 300 cm de agua, en comparación con presiones de la vejiga posteriores a la inyección de 40 cm de agua. El paciente era continente con una fijación del pene después del tratamiento con toxina botulínica. Además, la capacidad de caminar y las erecciones mejoraron debido a la espasticidad reducida de la vejiga.

- El paciente 2 era una mujer parapárética T12 de 55 años de edad secundaria respecto a lesión traumática en los 14 años previos. La paciente presentaba incontinencia imperiosa y había estado en auto-cateterización cada 2 horas durante el día y dos veces en la noche. La paciente recibió inyecciones en la pared lateral de la vejiga en dos inyecciones semanales de 200 UI cada una con un total de 400 UI de toxina botulínica. Los datos diarios de evacuación de la paciente pusieron de manifiesto capacidades previas a las inyecciones entre 150-200 cm³. Después de la inyección, los datos diarios indicaron una capacidad de la vejiga aumentada hasta 300-400 cm³. Además, la paciente ya no tuvo una disfunción de tipo imperioso constante molesta, durmió durante toda la noche y era continente tras una auto-cateterización cada 4 horas.
- 5
- 10 La descripción que antecede de la invención tiene carácter de ejemplo para fines de ilustración y explicación. Será evidente para los expertos en la técnica que son posibles cambios y modificaciones sin salir del alcance de la invención. Está previsto que las reivindicaciones que siguen sean interpretadas para abarcar todos estos cambios y modificaciones.

REIVINDICACIONES

1. El uso de toxina botulínica en la preparación de una composición farmacéutica para tratar una disfunción recalcitrante de evacuación, en el que la disfunción recalcitrante de evacuación es incontinencia urinaria, y en el que
5 la composición es administrada a la pared de la vejiga o al cuello de la vejiga de un paciente mediante inyección.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que la toxina botulínica es una toxina botulínica tipo A.