



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 965**

51 Int. Cl.:
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02773168 .6**

86 Fecha de presentación : **02.08.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1411991**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2004**

54 Título: **Métodos de determinación de los efectos de toxinas botulínicas.**

30 Prioridad: **03.08.2001 US 309988 P**
29.07.2002 US 208165

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73 Titular/es: **ALLERGAN, Inc.**
2525 Dupont Drive
Irvine, California 92612, US

72 Inventor/es: **Holland, James, M. y**
Chow, Edward

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 278 965 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de determinación de los efectos de toxinas botulínicas.

5 Referencia cruzada

Esta solicitud reivindica prioridad para la solicitud provisional de número de serie 60/309.988, presentada el 3 de agosto de 2001.

10 Antecedentes

La presente invención se refiere a métodos para determinar los efectos de toxinas, por ejemplo toxinas clostridiales. En particular, la presente invención se refiere a métodos histológicos/morfológicos para determinar los efectos de una toxina botulínica.

15 En una realización, la presente invención proporciona un método para cuantificar y definir los efectos de las toxinas en cuanto a "potencia". Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para determinar el alcance de atrofia provocada por las toxinas.

20 En la actualidad, la potencia biológica de preparaciones terapéuticas de una toxina botulínica, tal como una toxina botulínica tipo A, se expresa normalmente en cuanto a unidades de DL₅₀ para ratón. Al contrario de lo que generalmente se cree, la unidad de ratón no es una unidad normalizada. Está bien documentado que el ensayo para determinar la potencia de la toxina botulínica tipo A en unidades de DL₅₀ para ratón tiene tendencia a una variabilidad interlaboratorios significativa (Schantz y Kautter, *J Ass of Anal Chem* 1978, 61:96-99). Un estudio diseñado para normalizar un ensayo de toxina botulínica tipo A implicó 11 laboratorios diferentes (Sesardic *et al*, *Pharmacol Toxicol* 1996, 78: 283-288). En este estudio se encontró que la diferencia en los resultados era hasta 10 veces. Esta variabilidad en la DL₅₀ para ratón no es exclusiva a ensayos que implican la toxina botulínica. De hecho, debido a la variabilidad de este ensayo, varias agencias reguladoras han dejado de requerir el uso rutinario de la DL₅₀ para pruebas de toxicidad para varias sustancias químicas, disolventes, cosméticos y fármacos (Pearce *et al*, *Toxicol App Pharm* 1994, 128:69-77; patente de los EE.UU. número 5.401.243 y patente de los EE.UU. Número 5.183.462).

La importancia médica en expansión de toxinas botulínicas ha aumentado la necesidad de, y ha puesto mucha importancia en, el análisis preciso de la actividad biológica contenida en preparaciones de toxina botulínica tipo A, tanto para uso clínico como para investigación de laboratorio.

35 Toxina botulínica

El género *Clostridium* tiene más de ciento veintisiete especies, agrupadas según su morfología y funciones. La bacteria gram-positiva, anaeróbica *Clostridium botulinum* produce una neurotoxina polipeptídica potente, toxina botulínica, que provoca una enfermedad neuromuscular en seres humanos y animales denominada en lo sucesivo como botulismo. Las esporas de *Clostridium botulinum* se encuentran en la tierra y pueden crecer en recipientes de alimentos sellados y esterilizados de manera inapropiada de conservas caseras, que son la causa de muchos de los casos de botulismo. Los efectos del botulismo normalmente aparecen de 18 a 36 horas después de comer los productos alimenticios infectados con esporas o un cultivo de *Clostridium botulinum*. La toxina botulínica puede pasar aparentemente no atenuada a través de la pared interna del intestino y atacar a las neuronas motoras periféricas. Los síntomas de intoxicación por toxina botulínica pueden progresar desde la dificultad para caminar, tragar y hablar hasta la parálisis de los músculos respiratorios y muerte.

La toxina botulínica tipo A es el agente biológico natural más letal conocido para el hombre. Aproximadamente 50 50 picogramos de una toxina botulínica tipo A comercialmente disponible (complejo de neurotoxina purificado)¹ es una DL₅₀ en ratones (es decir, 1 unidad).

Una unidad de BOTOX[®] contiene aproximadamente 50 picogramos (aproximadamente 56 atomoles) de complejo de toxina botulínica tipo A. De manera interesante, en base molar, la toxina botulínica tipo A es aproximadamente 1,8 55 billones de veces más letal que la difteria, aproximadamente 600 millones de veces más letal que el cianuro de sodio, aproximadamente 30 millones de veces más letal que la toxina del veneno de cobra y aproximadamente 12 millones de veces más letal que el cólera. Singh, *Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins*, páginas 63-84 (capítulo 4) de Natural Toxins II, editado por B.R. Singh *et al.*, Plenum Press, Nueva York (1976) (en el que la DL₅₀ indicada de la toxina botulínica tipo A de 0,3 ng es igual a 1 U se corrige por el hecho de que aproximadamente 0,05 ng de BOTOX[®] es igual a 1 unidad). Una unidad (U) de la toxina botulínica se define como la DL₅₀ por inyección intraperitoneal en ratones Swiss Webster hembra que pesan de 18 a 20 gramos cada uno.

Se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas, siendo éstas, respectivamente serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C₁, D, E, F y G cada uno de los cuales se diferencia mediante la neutralización con anticuerpos de tipo 65 específico. Los diferentes serotipos de toxina botulínica pueden variar en las especies animales a las que afectan y

¹ Disponible de Allergan, Inc. de Irving, California bajo el nombre comercial de BOTOX[®] en viales de 100 unidades.

en la gravedad y duración de la parálisis que provocan. La toxina botulínica se une aparentemente con alta afinidad a neuronas motoras colinérgicas, se transloca en la neurona y bloquea la liberación de acetilcolina.

A pesar del serotipo, el mecanismo molecular de la intoxicación por toxina parece ser similar e implicar al menos tres etapas o fases. En la primera etapa del proceso, la toxina se une a la membrana presináptica de la neurona diana a través de una interacción específica entre la cadena pesada, cadena H, y un receptor de superficie celular, se piensa que el receptor es diferente para cada tipo de toxina botulínica y para la toxina tetánica. El segmento del extremo carboxilo de la cadena H, H_C, parece ser importante para dirigir la toxina hacia la superficie celular.

En la segunda etapa, la toxina atraviesa la membrana plasmática de la célula envenenada. Primero, la toxina se envuelve por la célula a través de endocitosis mediada por receptor, y se forma un endosoma que contiene la toxina. Entonces, la toxina escapa del endosoma en el citoplasma de la célula. Se piensa que esta etapa está mediada por el segmento del extremo amino de la cadena H, H_N, que provoca un cambio conformacional de la toxina en respuesta a un pH de aproximadamente 5,5 o inferior. Se sabe que los endosomas tienen una bomba de protones que disminuye el pH intraendosómico. El desplazamiento conformacional expone los residuos hidrófobos en la toxina, lo que permite que la toxina se inserte por sí misma en la membrana endosómica. Luego la toxina (o como mínimo la cadena ligera) se transloca a través de la membrana endosómica en el citoplasma.

La última etapa del mecanismo de actividad de la toxina botulínica parece implicar la reducción de enlace disulfuro que une la cadena pesada, cadena H, y la cadena ligera, cadena L. Toda la actividad tóxica de las toxinas botulínicas y tetánicas está contenida en la cadena L de la holotoxina; la cadena L es una endopeptidasa de zinc (Zn⁺⁺) que escinde de manera selectiva proteínas esenciales para el reconocimiento y acoplamiento de vesículas que contienen neurotransmisores con la superficie citoplásmica de la membrana plasmática, y fusión de las vesículas con la membrana plasmática. La neurotoxina tetánica, toxina botulínica tipos B, D, F, y G provocan la degradación de sinaptobrevina (también denominada proteína de membrana asociada a vesícula (VAMP)), una proteína de membrana sinaptosómica. La mayoría de las VAMP presentes en la superficie citoplásmica de la vesícula sináptica se elimina como resultado de uno cualquiera de estos casos de escisión. Los serotipos de toxina botulínica A y E escinde la SNAP-25. Originalmente se pensó que la toxina botulínica serotipo C₁ escindía syntaxina, pero se encontró que escindía syntaxina y SNAP-25. Cada una de las toxinas botulínicas escinde de manera específica una unión diferente, excepto la toxina botulínica tipo B (y toxina tetánica) que escinde la misma unión.

Las toxinas botulínicas se han usado en la práctica clínica para el tratamiento de trastornos neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. Se ha aprobado un complejo de toxina botulínica tipo A (BOTOX[®]) por Food and Drug Administration (administración de fármacos y alimentos) de los EE.UU. para el tratamiento de blefaroespasmos, estrabismo y espasmo hemifacial, distonía cervical y tratamiento de arrugas glabellares. También se ha aprobado una toxina botulínica tipo B (MYOBLOC[™]) por la FDA para el tratamiento de distonía cervical. Los serotipos de toxina botulínica que no son de tipo A aparentemente tienen una potencia inferior y/o una duración más corta de actividad en comparación con la toxina botulínica tipo A. Los efectos clínicos de la toxina botulínica tipo A intramuscular periférica se observan normalmente en el plazo de un día o de unas pocas horas tras la inyección. La duración típica del alivio sintomático a partir de una única inyección intramuscular de toxina botulínica tipo A es en promedio aproximadamente de tres a cuatro meses.

Aunque todos los serotipos de toxinas botulínicas inhiben aparentemente la liberación de la acetilcolina neurotransmisora en la unión neuromuscular, lo hacen afectando diferentes proteínas neurosecretoras y/o escindiendo estas proteínas en diferentes sitios. Por ejemplo, tipos botulínicos A y E escinden ambos la proteína asociada al sinaptosoma de 25 kilodalton (kD) (SNAP-25), pero seleccionan como diana diferentes secuencias de aminoácidos dentro de esta proteína. La toxina botulínica tipos B, D, F y G actúan sobre la proteína asociada a vesícula (VAMP, también denominada sinaptobrevina), escindiendo cada serotipo la proteína en un sitio diferente. Finalmente, se ha demostrado que la toxina botulínica tipo C₁ escinde tanto syntaxina como SNAP-25. Estas diferencias en el mecanismo pueden afectar a la duración y/o potencia relativa de la acción de los diversos serotipos de toxina botulínica. Aparentemente, puede encontrarse un sustrato para una toxina botulínica en una variedad de diferentes tipos de células. Véase por ejemplo *Biochem, J* 1; 339 (pt 1): 159-65: 1999, y *Mov Disord*, 10 (3): 376: 1995 (células B del islote pancreático contienen al menos SNAP-25 y sinaptobrevina).

El peso molecular de la molécula de proteína de toxina botulínica, para los siete serotipos de toxina botulínica conocidos, es aproximadamente 150 kD. De manera interesante, las toxinas botulínicas se liberan por la bacteria clostridial como complejos que comprenden la molécula de proteína de toxina botulínica junto con proteínas que nos son toxinas asociadas. Por tanto, el complejo de toxina botulínica tipo A puede producirse por la bacteria clostridial como formas de 900 kD, 500 kD y 300 kD. La toxina botulínica tipos B y C₁ se produce aparentemente sólo como un complejo de 700 kD o 500 kD. La toxina botulínica tipo D se produce tanto como complejos de 300 kD como de 500 kD. Finalmente, la toxina botulínica tipos E y F se producen sólo como complejos aproximadamente de 300 kD. Se cree que los complejos (es decir, peso molecular superior a aproximadamente 150 kD) contienen una proteína hemaglutinina que no es toxina y una proteína que no es hemaglutinina que no es tóxica y que no es toxina. Estas dos proteínas que no son toxina (que junto con la molécula de toxina botulínica comprenden el complejo de neurotoxina relevante) pueden actuar para proporcionar estabilidad frente a la desnaturalización de la molécula de toxina botulínica y protección frente a los ácidos digestivos cuando se ingiere toxina. Adicionalmente, es posible que los complejos de toxina botulínica más grandes (mayores que aproximadamente 150 kD de peso molecular) pueden dar como resultado

una velocidad de difusión más lenta de la toxina botulínica lejos de un sitio de inyección intramuscular de un complejo de toxina botulínica.

Estudios *in vitro* han indicado que la toxina botulínica inhibe la liberación inducida por el catión potasio de tanto acetilcolina como norepinefrina de cultivos de células primarios de tejido del tronco encefálico. Adicionalmente, se ha informado que la toxina botulínica inhibe la liberación provocada tanto de glicina como de glutamato en cultivos primarios de neuronas de médula espinal y que, en preparaciones de sinaptosoma de cerebro la toxina botulínica inhibe la liberación de cada uno de los neurotransmisores 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, sustancia P y glutamato (Sanchez-Priato, J., *et al.*, *Botulinum Toxin A Blocks Glutamate Exocytosis From Guinea Pig Cerebral Cortical Synaptosomes*, Eur J. Biochem 165;675-681:1987. Por tanto, cuando se usan las concentraciones adecuadas, la liberación provocada por estímulo de la mayoría de los neurotransmisores se bloquea mediante la toxina botulínica. Véase por ejemplo, Pearce, L.B., *Pharmacologic Characterization of Botulinum Toxin For Basic Science y Medicine*, Toxicon 35(9);1373-1412 en 1993; 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 y Botulinum A Toxin of the release of [³H] Noradrenaline and [³H] GABA From Rat Brain Homogenate*, experiencia 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, y; Jankovic J. *et al.*, *Therapy With Botulinum Toxin*, Marcel Dekker, Inc., (1994), página 5.

La toxina botulínica tipo A puede obtenerse estableciendo y haciendo crecer cultivos de *Clostridium botulinum* en un fermentador y luego recogiendo y purificando la mezcla fermentada de acuerdo con los procedimientos conocidos. Todos los serotipos de toxina botulínica se sintetizan inicialmente como proteínas de cadena simple inactivas que deben escindir o cortarse por proteasas para convertirse en neuroactivas. Las cepas bacterianas hacen que los serotipos de toxina botulínica A y G tengan proteasas endógenas y que los serotipos A y G puedan por tanto recuperarse de los cultivos bacterianos predominantemente en su forma activa. Por el contrario, los serotipos de toxina botulínica C₁, D y E se sintetizan mediante cepas no proteolíticas y por tanto están normalmente desactivadas cuando se recuperan del cultivo. Los serotipos B y F se producen tanto mediante cepas proteolíticas como no proteolíticas y por tanto pueden recuperarse o bien en la forma activa o bien inactiva. Sin embargo, incluso las cepas proteolíticas que producen, por ejemplo, el serotipo de toxina botulínica tipo B sólo escinde una parte de la toxina producida. La proporción exacta de moléculas cortadas con respecto a las no cortadas depende de la duración de la incubación y de la temperatura del cultivo. Por tanto, un porcentaje determinado de cualquier preparación de, por ejemplo, la toxina botulínica tipo B es probable que sea inactivo, posiblemente explicando la potencia significativamente inferior de la toxina botulínica tipo B comparada con la toxina botulínica tipo A.

Puede producirse toxina botulínica tipo A cristalina de alta calidad a partir de la cepa Hall A de *Clostridium botulinum* con características de $\geq 3 \times 10^7$ U/mg, un A_{260}/A_{278} inferior a 0,60 y un modelo definido de bandeo sobre electroforesis en gel. Puede usarse el proceso conocido de Shantz para obtener toxina botulínica tipo A cristalina, tal como se expone en Shantz, E.J., *et al.*, *Properties and use of Botulinum toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine*, Microbiol Rev. 56;80-99:1992. Generalmente, el complejo de toxina botulínica tipo A puede aislarse y purificarse a partir de una fermentación anaeróbica cultivando *Clostridium botulinum* tipo A en un medio adecuado. El proceso conocido puede usarse también, en la separación a parte de las proteínas que no son toxina, para obtener toxinas botulínicas puras, tales como por ejemplo: toxina botulínica tipo A purificada con un peso molecular de aproximadamente 150 kD con una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ DL₅₀ U/mg o mayor; toxina botulínica tipo B purificada con un peso molecular de aproximadamente 156 kD con una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ DL₅₀ U/mg o mayor, y; toxina botulínica tipo F purificada con un peso molecular de aproximadamente 155 kD con una potencia específica de $1-2 \times 10^7$ DL₅₀ U/mg o mayor.

Las toxinas botulínicas y/o complejos de toxina botulínica pueden obtenerse de Allergan Inc (Irvine, California), Ipsen Beaufour (Francia), Elan Pharmaceuticals (Irlanda), List Biological Laboratories, Inc., Campbell, California; the Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, R.U.; Wako (Osaka, Japón), Metabiologics (Madison, Wisconsin) así como en Sigma Chemicals of St Louis, Missouri.

Aunque de algún modo la toxina botulínica pura, lábil, puede usarse para preparar una composición farmacéutica y como los complejos de toxina botulínica, tales como el complejo de toxina tipo A, es susceptible a la desnaturalización debido a la desnaturalización de superficie, calor, y condiciones alcalinas. La toxina inactivada forma proteínas toxoides que pueden ser inmunógenas. Los anticuerpos resultantes pueden hacer que un paciente sea resistente a la inyección de toxina.

Tal como con las enzimas, generalmente, las actividades biológicas de las toxinas botulínicas (que son peptidasas intracelulares) dependen, al menos en parte, de su conformación tridimensional. Por tanto, la toxina botulínica tipo A se destoxifica mediante calor, secado de la superficie y extensión superficial de diversas sustancias químicas. Adicionalmente, se sabe que la dilución del complejo de toxina obtenido mediante el cultivo, fermentación y purificación conocidos hasta concentraciones de toxina mucho, mucho más inferiores usadas para la formulación de composición farmacéutica da como resultado una destoxificación rápida de la toxina, a menos que esté presente un agente estabilizante adecuado. La dilución de la toxina desde cantidades de miligramo hasta una disolución que contiene nanogramos por mililitro presenta dificultades significativas debido a la pérdida rápida de la toxicidad específica en una gran dilu-

ción de este tipo. Ya que la toxina puede usarse meses o años después de que se formule la composición farmacéutica que contiene la toxina, la toxina puede estabilizarse con un agente estabilizante tal como albúmina y gelatina.

Una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica comercialmente disponible se vende bajo la marca BOTOX® (disponible de Allergan, Inc., de Irvine, California). BOTOX® consiste en un complejo de toxina botulínica tipo A purificado, albúmina y cloruro de sodio empaquetado de forma estéril, secada al vacío. La toxina botulínica tipo A se produce a partir de un cultivo de la cepa Hall de *Clostridium botulinum* que crece en un medio que contiene extracto de levadura y amina N-Z. El complejo de toxina botulínica tipo A se purifica a partir de la disolución de cultivo mediante una serie de precipitaciones ácidas para obtener un complejo cristalino que consiste en la proteína que es toxina de alto peso molecular activa y una proteína hemaglutinina asociada. El complejo cristalino se vuelve a disolver en una disolución que contiene solución salina y albumina y se filtra de manera estéril (0,2 micras) antes del secado a vacío. El producto secado a vacío se almacena en un congelador a, o por debajo de -5°C. BOTOX® puede reconstituirse con solución salina estéril, no conservada antes de la inyección intramuscular. Cada vial de BOTOX® contiene aproximadamente 100 unidades (U) de complejo de neurotoxina purificada de toxina *Clostridium botulinum* tipo A, 0,5 miligramos de albúmina sérica humana y 0,9 miligramos de cloruro de sodio en forma estéril, secada al vacío sin un conservante.

Para reconstituir BOTOX® secado al vacío, se usa solución salina estéril normal sin un conservante; (inyección de cloruro de sodio al 0,9%) preparando la cantidad apropiada de diluyente en la jeringuilla de tamaño apropiado. Ya que BOTOX® puede desnaturalizarse mediante burbujeo o agitación violenta similar, el diluyente se inyecta cuidadosamente en el vial. Por razones de esterilidad, BOTOX® se administra preferiblemente en el plazo de cuatro horas después de que el vial se retira del congelador y se reconstituye. Durante estas cuatro horas, BOTOX® reconstituido puede almacenarse en un refrigerador a de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C. Se ha informado de que BOTOX® refrigerado, reconstituido, conserva su potencia durante al menos cuatro semanas. *Dermatol Surg* enero de 1996; 22(1):39-43.

Se ha informado que la toxina botulínica tipo A se ha usado en prácticas clínicas tal como sigue:

(1) aproximadamente 75-125 unidades de BOTOX® por inyección intramuscular (múltiples músculos) para tratar distonía cervical;

(2) 5-10 unidades de BOTOX® por inyección intramuscular para tratar líneas glabellares (arrugas en la frente) (5 unidades inyectadas por vía intramuscular en el músculo procerus y 10 unidades inyectadas por vía intramuscular en cada músculo superciliar);

(3) aproximadamente 30-80 unidades de BOTOX® para tratar estreñimiento mediante inyección dentro del esfínter del músculo puborectal;

(4) aproximadamente 1-5 unidades por músculo de BOTOX® inyectado por vía intramuscular para tratar blefaroespasma inyectando el músculo orbicularis oculi pretarsal lateral del párpado superior y el orbicularis oculi pretarsal lateral del párpado inferior.

(5) para tratar estrabismo, se han inyectado los músculos extraoculares por vía intramuscular con entre aproximadamente 1-5 unidades de BOTOX®, variando la cantidad inyectada basándose tanto en el tamaño del músculo que ha de inyectarse como en el alcance de la parálisis del músculo deseado (es decir, cantidad de corrección de dioptría deseada);

(6) para tratar la espasticidad de miembro superior tras accidente cerebrovascular mediante inyecciones intramusculares de BOTOX® en cinco músculos flexores diferentes del miembro superior, tal como sigue:

(a) flexor profundo de los dedos: de 7,5 U a 30 U

(b) flexor superficial de los dedos: de 7,5 U a 30 U

(c) flexor cubital del carpo: de 10 U a 40 U

(d) flexor radial del carpo: de 15 U a 60 U

(e) bíceps braquial: de 50 U a 200 U. Cada uno de los cinco músculos indicados se ha inyectado en la misma sesión de tratamiento, de modo que el paciente recibe desde 90 U hasta 360 U de BOTOX® en el músculo flexor de la extremidad superior mediante inyección intramuscular en cada sesión de tratamiento.

(7) para tratar migraña, la inyección de 25 U de BOTOX® inyectadas por vía pericraneal, (inyectadas simétricamente en los músculos glabellar, frontal y temporal) ha mostrado un beneficio significativo como tratamiento profiláctico de migraña comparado con el vehículo tal como se mide mediante medidas disminuidas de frecuencia de migraña, gravedad máxima, vómitos asociados y uso de medicación aguda durante el periodo de tres meses tras la inyección de 25 U.

Adicionalmente, la toxina botulínica intramuscular se ha usado en el tratamiento del temblor en pacientes con la enfermedad del Parkinson, aunque se ha informado que los resultados no han sido excelentes. Marjama-Jyons, J., *et al.*, *Tremor-Predominant Parkinson's Disease*, *Drugs & Aging* 16(4);273-278:2000.

Se conoce que la toxina botulínica tipo A puede tener una eficacia durante hasta 12 meses (*European J. Neurology* 6 (Supp 4): S111-S1150:1999), y en algunas circunstancias durante tanto como 27 meses. *The Laryngoscope* 109:1344-1346:1999. Sin embargo, la duración habitual de una inyección intramuscular de Botox® es normalmente de aproximadamente 3 a 4 meses. El éxito de la toxina botulínica tipo A para tratar una variedad de estados clínicos ha conducido al interés por otros serotipos de toxina botulínica. Véase por ejemplo *Eur J Neurol* 1999 Nov; 6 (Suppl 4): S3-S10.

La neurotoxina tetánica actúa principalmente en el sistema nervioso central, mientras que la neurotoxina botulínica actúa en la unión neuromuscular; ambas actúan inhibiendo la liberación de acetilcolina del axón de la neurona afectada en la sinapsis, dando como resultado parálisis. El efecto de la intoxicación sobre la neurona afectada es de larga duración y hasta recientemente se ha pensado que era irreversible. Se conoce que la neurotoxina tetánica existe en un serotipo inmunológicamente distinto.

Acetilcolina

Normalmente se libera solamente un único tipo de neurotransmisor de molécula pequeña por cada tipo de neurona en el sistema nervioso de los mamíferos. La acetilcolina neurotransmisora se secreta por las neuronas en muchas zonas del cerebro, pero específicamente por las células piramidales grandes de la corteza motora, por diversas neuronas diferentes en los ganglios basales, por las neuronas motoras que inervan a los músculos esqueléticos, por las neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo (tanto simpático como parasimpático), por las neuronas postganglionares del sistema nervioso parasimpático, y por algunas de las neuronas postganglionares del sistema nervioso simpático. Esencialmente, solamente las fibras del nervio simpático postganglionar son colinérgicas para las glándulas sudoríparas, los músculos piloerectores y unos pocos vasos sanguíneos y la mayoría de las neuronas postganglionares del sistema nervioso simpático secretan el neurotransmisor norepinefrina. En la mayoría de los casos la acetilcolina tiene un efecto excitador. Sin embargo, se conoce que la acetilcolina tiene efectos inhibidores en algunos de los extremos de los nervios parasimpáticos periféricos, tales como la inhibición del corazón mediante el nervio vago.

Las señales eferentes del sistema nervioso autónomo se transmiten al organismo a través o bien del sistema nervioso simpático o del sistema nervioso parasimpático. Las neuronas preganglionares del sistema nervioso simpático se extienden a partir de los cuerpos celulares de la neurona simpática preganglionar localizados en el asta intermedio lateral de la médula espinal. Las fibras del nervio simpático preganglionar que se extiende a partir del cuerpo celular, realiza sinapsis con las neuronas simpáticas localizadas o bien en un ganglio simpático paravertebral o bien en un ganglio paravertebral. Ya que las neuronas preganglionares tanto del sistema nervioso simpático como del parasimpático son colinérgicas, la aplicación de acetilcolina a los ganglios excitará a las neuronas postganglionares tanto simpáticas como parasimpáticas.

La acetilcolina activa dos tipos de receptores, receptores muscarínicos y nicotínicos. Los receptores muscarínicos se encuentran en todas las células efectoras estimuladas por neuronas postganglionares del sistema nervioso parasimpático, así como en las estimuladas por las neuronas colinérgicas postganglionares del sistema nervioso simpático. Los receptores nicotínicos se encuentran en las sinapsis entre las neuronas preganglionares y postganglionares tanto del simpático como del parasimpático. Los receptores nicotínicos están presentes también en muchas membranas de fibras del músculo esquelético en la unión neuromuscular.

La acetilcolina se libera de las neuronas colinérgicas cuando las vesículas intracelulares, claras, pequeñas se fusionan con la membrana celular neuronal presináptica. Una amplia variedad de células secretoras no neuronales, tales como las células de la médula suprarrenal (así como la línea celular PC12) y células del islote pancreático, liberan catecolaminas e insulina, respectivamente, de las vesículas grandes de núcleo denso. La línea celular PC12 es un clon de células feocromocitoma de rata usada extensivamente como modelo de cultivo tisular para estudios del desarrollo simpato-suprarrenal. La toxina botulínica inhibe la liberación de ambos tipos de compuesto de ambos tipos de células *in vitro*, permeabilizados (tal como mediante electroporación) o mediante inyección directa de la toxina en la célula desnervada. También se conoce que la toxina botulínica bloquea la liberación del neurotransmisor glutamato de los cultivos celulares de sinaptosomas corticales.

Sería ventajoso proporcionar una medición más precisa de la actividad de la toxina basándose en una exposición no letal de una toxina botulínica, tal como una toxina botulínica tipo A, a un mamífero tal como una rata. Esta invención proporciona un mejor método de determinación de la potencia de una toxina.

Dibujos

La figura 1 ilustra una curva de respuesta a la dosis de muestra construida trazando el índice nuclear frente a la dosis de toxina, por ejemplo toxina botulínica.

ES 2 278 965 T3

La figura 2 muestra que la zona de núcleos (dentro de una zona diferenciada) en un músculo es inversamente proporcional a la masa muscular.

La figura 3 muestra que el número de núcleos (dentro de una zona diferenciada) en un músculo es inversamente proporcional a la masa muscular.

La figura 4 muestra que un aumento en la zona de núcleos corresponde a una masa muscular inferior.

Las figuras 5, 6, 7 y 8 muestran un análisis y reconocimiento por ordenador de los núcleos en cortes microscópicos de músculo. Los músculos de las figuras 5 y 7 no se tratan con toxina botulínica. Los músculos de las figuras 6 y 8 se tratan con toxina botulínica.

La figura 9 muestra la relación entre el peso muscular y la dosis de toxina botulínica inyectada.

La figura 10 muestra la relación del peso muscular y el grado de atrofia.

La figura 11 es un gráfico que muestra el resultado de un experimento en el que se inyectaron en el músculo gemelo izquierdo de diferentes ratas cantidades variantes de una toxina botulínica tipo A. El eje y muestra la razón (como porcentaje) del peso del músculo gemelo izquierdo de la rata al que se le inyecta toxina con respecto al peso del músculo gemelo derecho inyectado de la misma rata. El eje x muestra la cantidad en unidades de la toxina botulínica tipo A que se inyectó en el músculo gemelo izquierdo.

La figura 12 es un gráfico que muestra el resultado de un experimento en el que se inyectaron en el músculo gemelo izquierdo de diferentes ratas cantidades variantes de una toxina botulínica tipo A. El eje y muestra la razón (como porcentaje) del peso del músculo bíceps femoral izquierdo no inyectado (que está adyacente al músculo gemelo izquierdo de la rata al que se le inyecta toxina) con respecto al peso del músculo bíceps femoral derecho no inyectado de la misma rata. El eje x muestra la cantidad en unidades de la toxina botulínica tipo A que se inyectó en el músculo gemelo izquierdo.

La figura 13 es un gráfico que muestra el resultado de un experimento en el que se inyectaron en el músculo gemelo izquierdo de diferentes ratas cantidades variantes de una toxina botulínica tipo A. El eje y muestra la razón (como porcentaje) del peso del músculo sóleo izquierdo no inyectado (que está adyacente al músculo gemelo izquierdo de la rata al que se le inyecta toxina) con respecto al peso del músculo sóleo derecho no inyectado de la misma rata. El eje x muestra la cantidad en unidades de la toxina botulínica tipo A que se inyectó en el músculo gemelo izquierdo.

Definiciones

“Potencia” una medida de una masa de una determinada sustancia química, es decir, una toxina, para inducir un cierto grado de efecto químico o fisiológico. Por ejemplo, potencia de una toxina botulínica indica el alcance o la duración de inhibición de la liberación de acetilcolina de un tejido diana. Alternativamente, una potencia de una toxina botulínica indica el alcance que una dosis determinada de toxina provoca ciertos cambios del índice nuclear.

“Atrofia” es una reducción en la masa muscular. El grado de atrofia muscular puede medirse mediante un cambio en el porcentaje de masa muscular, circunferencia y/o longitud.

“Índice nuclear” indica el número núcleos por zona del músculo (densidad de núcleos), la suma de la zona de los núcleos individuales dentro de un campo (zona de núcleos), y/o el nivel de factores acoplados eléctricamente.

“Factores acoplados eléctricamente” pueden ser proteínas (por ejemplo, factores de transcripción) o secuencias de ácidos nucleicos [por ejemplo ARNm] de MyoD, miogenina, Myr-5, MRF4, sTnI, y/o tTnI.

“Peso muscular” es la masa del músculo.

“Grado de atrofia” es el porcentaje de atrofia de una fibra muscular, en relación con una fibra muscular de control análoga, que puede determinarse mediante inspección visual. Cada “grado” corresponde aproximadamente a la reducción del 25% en masa muscular en relación con el control.

La presente invención abarca un método para determinar un efecto de una toxina clostridial, comprendiendo el método la etapa de administrar la toxina clostridial a un músculo de un mamífero, y determinar un índice nuclear del músculo inyectado. La toxina clostridial puede seleccionarse del grupo que consiste en bacterias *Clostridium beratti*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium tetani* y *Clostridium botulinum*. La toxina clostridial puede seleccionarse del grupo que consiste en toxina botulínica tipos A, B, C₁, D, E, F, G y mezclas de los mismos y es preferiblemente una toxina botulínica tipo A.

El efecto de una toxina clostridial puede determinarse determinando una potencia o difusión de la toxina y esto puede llevarse a cabo determinando el índice nuclear que comprende medir la densidad de núcleos. La etapa de

determinar del índice nuclear puede comprender medir la zona de núcleos. Adicionalmente, la etapa de determinar el índice nuclear comprende medir la densidad de núcleos y la zona de núcleos. La etapa de determinar el índice nuclear puede comprender medir el nivel factores acoplados eléctricamente. La etapa de determinar el índice nuclear puede comprender medir el nivel de los factores acoplados eléctricamente y la densidad de núcleos. La etapa de determinar
5 del índice nuclear puede comprender medir el nivel de factores acoplados eléctricamente y la zona de núcleos.

Adicionalmente, la etapa de determinar el índice nuclear puede comprender medir el nivel de factores acoplados eléctricamente, la densidad de núcleos, y la zona de núcleos. Los factores acoplados eléctricamente pueden comprender proteínas. Los factores acoplados eléctricamente pueden comprender secuencias de ácidos nucleicos.
10 Los factores acoplados eléctricamente pueden comprender los ARNm de MyoD, miogenina, Myr-5, MRF4, sTnl, tTnl.

Una realización adicional de la presente invención es un método para determinar la atrofia muscular inducida por la administración de una toxina Clostridium, el método comprende la etapa de comparar un índice nuclear del músculo
15 al que se le inyecta toxina clostridial con el de un músculo que no se ha inyectado con toxina clostridial. El índice nuclear puede ser la medición del nivel de factores acoplados eléctricamente, la densidad de núcleos, y la zona de núcleos.

La presente invención abarca también un método para determinar un efecto de una toxina clostridial, comprendiendo el método la etapa de administrar la toxina clostridial a un músculo de un mamífero, y determinar una atrofia de un músculo. El efecto de una toxina clostridial puede determinarse determinando una potencia de la toxina. La etapa de determinar la atrofia puede comprender medir una reducción en la masa muscular de o bien el músculo al que se le inyecta la toxina o bien de un músculo adyacente.
20

Una realización detallada de la presente invención incluye un método para determinar un efecto de una toxina clostridial, comprendiendo el método la etapa de administrar la toxina clostridial a un músculo de un mamífero, y determinar una atrofia de un músculo comparando una masa muscular del músculo al que se le inyecta una toxina clostridial con la de un músculo que no se inyecta con una toxina clostridial.
25

30 Descripción

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que un índice nuclear de un músculo puede emplearse para evaluar la potencia de la toxina y la atrofia muscular.

35 I. Métodos de determinación de la potencia de una toxina

En una amplia realización, el método para determinar el efecto de una toxina clostridial comprende la etapa de administrar la toxina a un músculo de un mamífero y determinar el índice nuclear del músculo inyectado. El efecto de una toxina puede definirse mediante su potencia. En una realización, la presente invención proporciona un método de determinación de la potencia de una toxina clostridial sobre un músculo. "Mamíferos" tal como se usan en el presente documento incluyen, por ejemplo, ratas, conejos, ratones y perros.
40

La toxina clostridial pueden ser bacterias *Clostridial beratti*, *Clostridial butyricum*, *Clostridial botulinum*, y *Clostridial tetani*. En una realización preferida, el método mide la potencia de las toxinas botulínicas, por ejemplo toxina botulínica A, B, C₁, D, E, F, G, y mezclas de los mismas.
45

La etapa de determinar el índice nuclear incluye una medida del número de núcleos por zona de tejido, una medida de la suma de la zona individual de los núcleos sobre una zona de tejido, y/o una medida del nivel de factores acoplados eléctricamente. Ejemplos de factores acoplados eléctricamente incluyen ARNm de MyoD, miogenina, Myr-5, MRF4, sTnl y/o tTnl. Véase Voytik *et al.*, Developmental Dynamics 198:214-224 (1993).
50

Se descubre que el número y tamaños de los núcleos, en particular los núcleos del sarcolema, aumentan con un aumento de la dosis de toxina, por ejemplo toxina botulínica tipo A, que se administra a un músculo. Además cambia el nivel de factores acoplados eléctricamente en el músculo, por ejemplo aumenta o disminuye, con un aumento de la dosis de toxina. De este modo, puede construirse una curva de respuesta a la dosis para determinar una potencia de una toxina. La potencia tal como se determina mediante este método se denomina DE₅₀ (dosis efectiva al 50%). Se cree que la potencia tal como se determina mediante este método es más exacta y más fidedigna que la tradicional DL₅₀, tal como se describió anteriormente.
55

La figura 1 muestra una curva de respuesta a la dosis a modo de ejemplo construida trazando la densidad nuclear frente al incremento de dosis de toxina, por ejemplo toxina botulínica. La DE₅₀ es la concentración que corresponde al punto medio entre la densidad de núcleos más inferior y más superior. Por ejemplo, la DE₅₀ de la figura 1 es la dosis de toxina botulínica que corresponde a la zona de 450 núcleos/unidad, que es la mitad de la zona de 1000 y 100 núcleos/unidad.
60

En otra realización, puede trazarse la zona de núcleos frente a la dosis variante de una toxina clostridial, preferiblemente toxina botulínica, para obtener una DE₅₀.
65

ES 2 278 965 T3

En una realización, pueden emplearse técnicas de tinción de núcleos habituales para identificar los núcleos con fines de contar el número de núcleos o determinar la suma de sus zonas. A continuación en el presente documento se enumeran diversos ejemplos no limitativos de técnicas de tinción.

- 5 Tras la tinción de los núcleos, puede obtenerse con ayuda de un ordenador el índice nuclear, por ejemplo, el número de núcleos por zona del tejido muscular o la suma de los núcleos individuales sobre una zona del tejido muscular. Pueden emplearse diversos programas informáticos conocidos en la técnica según esta invención. En una realización, estos programas se usan para ordenarle a un ordenador que reconozca ciertos patrones, preferiblemente el de un núcleo, en un corte microscópico del músculo teñido. Tras identificar los núcleos, el programa además ordenará al ordenador que clasifique núcleos según su tamaño o volumen y que los agrupe en recipientes de volumen o tamaños similares. Un ejemplo de un programa de este tipo que puede usarse según esta invención incluye Image Pro 4.1 (MediaCybematics, Inc.).

- 15 La figura 5B una imagen de reconocimiento por ordenador de los núcleos de un corte microscópico del músculo. La figura 5D muestra que hay diez recipientes. El recipiente nº 1 tiene 54 objetos (o núcleos) que tienen la zona media de 7,5 μm . La figura 5C muestra que hay un total de 106 núcleos. La figura 6 muestra que cuando se trata un músculo análogo con toxina botulínica, los núcleos son más grandes, más hinchados y más numerosos. Por ejemplo, la figura 6D muestra que hay núcleos tan grandes como 58 μm . Además, la figura 6C muestra que el número de núcleos aumenta hasta 192. La figura 7 se refiere a la figura 8 tal como la figura 5 se refiere a la figura 6.

20 Ejemplo 1

Determinación de la potencia de la toxina botulínica con zona de núcleos

- 25 Se prepara un lote de toxina botulínica tipo A mediante una metodología habitual. Se realiza una dilución en serie de la toxina mediante una metodología habitual. Se fija la disolución madre de la toxina a una concentración apropiada de 50 picogramos de toxina botulínica tipo A/microlitro. Se realizan diluciones cinco veces con los factores de dilución en serie finales que oscilan desde 1,0 (disolución madre) hasta $1,0 \times 10^{-4}$. Además, se prepararon ratas, una para cada dilución en serie, para un ensayo de potencia. Se inyecta 1,0 microlitro de cada una de las nueve diluciones en el
- 30 músculo gemelo de cada una de las ratas tal como sigue:

- Rata número 1, factor de dilución = 1,0
- 35 Rata número 2, factor de dilución = $5,0 \times 10^{-1}$
- Rata número 3, factor de dilución = $1,0 \times 10^{-1}$
- Rata número 4, factor de dilución = $5,0 \times 10^{-2}$
- 40 Rata número 5, factor de dilución = $1,0 \times 10^{-2}$
- Rata número 6, factor de dilución = $5,0 \times 10^{-3}$
- Rata número 7, factor de dilución = $1,0 \times 10^{-3}$
- 45 Rata número 8, factor de dilución = $5,0 \times 10^{-4}$
- Rata número 9, factor de dilución = $1,0 \times 10^{-4}$
- 50 Rata número 10 (rata control), solución salina estéril/no toxina.

Tras 14 días, se sacrificaron las ratas. Se elimina el músculo gemelo de cada rata, se prepara y se coloca sobre portaobjetos para su análisis. Se determina la densidad de núcleos (o zona de núcleos) del músculo de la rata.

- 55 Se traza la densidad de núcleos frente a la dosis inyectada en los músculos de las ratas. Se determina la DE_{50} a partir del trazado. Véase la figura 1.

Ejemplo 2

60 *Métodos para teñir el núcleo de células del músculo*

- Se conocen bien las técnicas de tinción para los núcleos de los músculos. Éstas incluyen la hematoxilina y eosina (H&E), yoduro de propidio, DAPI, y Hoechst. Véase Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology (tercera edición). American Registry of Pathology (Luna, Lee G., HT(ASCP) (editor)), McGraw Hill Publishers, Nueva York 1960. Wang and Gerdes, J Mol Cell Cardiol 29, 1553-1565 (1997). Lim and Alvarez-Buylla, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 96, 7526-7531, (1999).

Hematoxilina & eosina

El procedimiento de tinción implica usar secciones desparafinadas, tras las que vuelve a hidratarse. Si las secciones están fijadas en Zenker, se eliminan los cristales de cloruro de mercurio con yodo y se aclara con (hipo) tiosulfato de sodio. A continuación, se añade hematoxilina de Mayer durante 15 minutos. Se lava con agua corriente durante 20 minutos.

Se somete a contratinción con eosina desde 15 segundos hasta 2 minutos dependiendo de la antigüedad de la eosina, y la intensidad de la contratinción deseada. Para resultados de tinción uniformes, se sumergen los portaobjetos varias veces antes de dejarlos reposar en la eosina durante el tiempo deseado. Luego se deshidratan en alcoholes absolutos y al 95%, dos cambios de dos minutos cada uno o hasta que se elimine el exceso de eosina. Se controlan con un microscopio. Se aclaran en xileno, dos cambios de 2 minutos cada uno, y se montan en Permount o Histoclad.

Los tintes aparecen tal como sigue: los núcleos aparecen en azul, con parte del citoplasma con metacromasia y diversas sombras en rosa que identifican los diferentes componentes del tejido.

Los adhesivos que se usan para unir las secciones a los portaobjetos (gelatina, albúmina de huevo) algunas veces se tiñen, en zonas alrededor de la sección, con hematoxilina de Mayor. Esto proporciona a los cortes microscópicos una apariencia ligeramente oscura pero no afecta de ningún modo a la tinción nuclear. Para remediar esto, se usa ácido acético glacial al 10-12% en alcohol al 95%, para "limpiar" los cortes microscópicos tras la hematoxilina de Mayor. Siguiendo con unas pocas inmersiones en carbonato de litio acuoso saturado, los núcleos se vuelven azules inmediatamente. Esto es opcional, el lavado con agua corriente durante 20 minutos es suficiente para teñir de azul los núcleos.

En una realización, puede usarse el tinte Sakura Finetek DRS-60 según la presente invención.

Núcleo teñido con yoduro de propidio (PI)

Pueden fijarse las células del músculo con PFA al 4% durante 30 min a temperatura ambiente. Luego han de lavarse las células 3 veces, 5 min con PBS. A continuación, se incuban las células durante 5 min a temperatura ambiente en yoduro de propidio 1,25 ug/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Núcleo teñido con DAPI

En primer lugar, se repiten las tres etapas de tinción con PI excepto que se realiza la contratinción con DAPI. Se prepara la disolución madre de DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol 2HCl') (Serva) con 0,2 mg/ml de agua destilada. Se preparan las disoluciones de tinción con 0,2 - 0,4 µg/ml de tampón PBS.

Se anega con disolución de DAPI, se cubre con cubreobjeto y se incuba en la oscuridad a temperatura ambiente durante 5-15 minutos. Luego se aclara brevemente con PBS.

Núcleo teñido con Hoechst 33258

Se fijan las células del músculo con PFA al 4% durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavan las células 3 veces durante 5 min con PBS. Luego se incuban las células durante 5 min a temperatura ambiente en Hoechst 33258 0,5 ug/ml. Se lavan brevemente con PBS.

*Ejemplo 3**Aislamiento de ARNm de los factores acoplados eléctricamente*

Se realizaron procedimientos de hibridación de tipo Northern y de aislamiento de ARN habituales para determinar la abundancia relativa de ARNm específicos para troponina I lenta (TNIs), troponina rápida I (fTnl), y cada factor regulador del músculo (MRF). Se aísla el ARN de las muestras de músculo congeladas mediante extracción ácida con isotiocianato de guanidinio/fenol/cloroformo seguida de precipitación con isopropanol (Chomczynski y Sacchi, 1987). Se obtiene el ARN de mamíferos, por ejemplo ratas o seres humanos.

Se reúnen músculos análogos de 4 a 6 sujetos diferentes. Se aísla el ARN del músculo total de una manera similar y sirve como control negativo. Se fraccionan las muestras de ARN (20 ug) mediante electroforesis a través de geles de formaldehído/agarosa al 1% (Lehrach *et al.*, 1977), se transfieren a Nytran (Schleicher y Schuell, Keene, NH) y se inmovilizan mediante entrecruzamiento con UV. Se seleccionan al azar sondas de ADNc cebadas (actividad específica $\geq 1 \times 10^8$ cpm/ug) entonces se hibridan a las membranas a 65 C en 6 x SSC (1 x SSC consiste en Tris-Cl, 15 M, pH 7,5, 5 x disolución de Denhardt, AEDT 2 mM, pH 8,0, SDS al 0,5%) y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 ug/ml. Las sondas de ADNc usadas en este estudio incluyen MRF4 de rata (Davis *et al.*, 1987), miogenina de rata (Wright, *et al.*, 1989), Myf-5 humano (Braun *et al.*, 1989), y troponina I lenta y rápida de ratón (Koppe *et al.*, 1989). Tras la hibridación, se lavan todas las membranas durante 1 h a 65C en 0,1 x SSC, SDS al 0,2%, excepto para las sondas con Myf-5 y MyoD que se lavan en 0,5 x SSC, SDS al 0,2%. En algunos casos, se eliminan las sondas hibridadas de los filtros lavando las membranas en Tris-Cl 5 mM, pH 7,5, EDTA 0,2 mM, pH 8,0, pirofosfato

al 0,05%, y 0,1 x Denhardt a 65°C durante de 1 a 2 h. Luego se aclaran los filtros brevemente en 2 x SSPE (1 x SSPE consiste en NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) tras lo que se realizan hibridaciones adicionales. Para cuantificar los autorradiogramas obtenidos de los análisis de hibridación de tipo Northern, se realizó una evolución densitométrica usando un densitómetro láser Ultrascan XL (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ). Se exploran múltiples exposiciones a autorradiograma para garantizar que las densidades de banda permanecen dentro del intervalo de respuesta lineal de la película.

II. Métodos de utilización del índice nuclear y/o la atrofia muscular para determinar la difusión y la potencia de la toxina

La presente invención proporciona un método más rápido, más sencillo, más sensible y más preciso para evaluar la atrofia muscular como parámetro para determinar la difusión y/o la potencia de la toxina. El método comprende la etapa de comparar un índice nuclear del músculo que se sospecha que está atrofiado con el de un músculo que es normal. Preferiblemente, la presente invención proporciona un método de evaluar la atrofia muscular debida a los efectos de la toxina Clostridium comparando un índice nuclear del músculo al que se le inyecta toxina clostridial con el de un músculo análogo al que no se le inyecta toxina clostridial.

Se descubre actualmente que el índice nuclear varía proporcionalmente con el grado de atrofia muscular. Por ejemplo, la figura 2 (y 3) muestra que la zona de núcleos (y número de núcleos) en un músculo es inversamente proporcional a la masa muscular. La figura 4 muestra que un aumento en la zona de núcleos corresponde a una masa muscular inferior. Por tanto, el alcance de los cambios en el índice nuclear revela el alcance de la atrofia muscular. Por ejemplo, un pequeño aumento en la densidad de núcleos tras una administración de toxina botulínica es indicativo de que el músculo no se ha atrofiado mucho. Mientras que, un gran incremento en núcleos es indicativo de que el músculo se ha atrofiado significativamente.

En una realización, el alcance de los cambios en el índice nuclear, que es el cambio en peso muscular y diámetro de la fibra, de los diversos músculos inyectados, demostrará la actividad inherente de una toxina, por ejemplo toxina botulínica, en un sitio terapéuticamente relevante. Además, puede cuantificarse el potencial de difusión de la proteína toxina en una formulación dada dentro de los mismos mamíferos mediante el alcance de la atrofia muscular de los músculos (de diversos tipos de fibras) periféricos al sitio de inyección.

Ejemplo 4

Ensayo de atrofia muscular

Puede determinarse el alcance de la atrofia muscular en respuesta al tratamiento con toxina botulínica en cuanto a disminuciones en peso muscular y diámetro de la fibra muscular usando los métodos de esta invención.

Se inyectan a ratas adultas por vía intramuscular una dosis única de toxina botulínica en la zona del centro del vientre (ubicación de la lámina terminal motora) de cada músculo gemelo izquierdo de rata. Las dosis están a un nivel bajo de 0 a 2,5 U por rata (hasta ~10 U/kg) para minimizar la toxicidad sistémica que puede ser un factor de confusión para la evaluación de los efectos farmacológicos locales. En un punto de tiempo determinado en el plazo de las dos semanas desde la administración, se recogerán varios músculos de las patas traseras inyectadas para evaluaciones histopatológicas y gravimétricas. La recogida de músculo incluye músculos de diferentes tipos de fibras: el músculo inyectado (gemelo), dos músculos inmediatamente adyacentes al sitio de inyección (bíceps femoral y sóleo), y dos músculos más alejados del sitio de inyección (perineo y tibial).

Los cambios en el peso muscular pueden normalizarse frente al peso corporal de cada rata. El alcance de las disminuciones en peso muscular puede expresarse mediante comparación con los músculos de cada músculo no inyectado de rata, pata contralateral o con controles a los que se inyecta placebo.

La evaluación histopatológica puede implicar la evaluación cualitativa sobre una escala convencional (grado 1 a 5, correspondiente a la reducción mínima hasta máxima en diámetro de la fibra) o medición cuantitativa con evaluación morfométrica asistida por ordenador. Véanse las figuras 9 y 10.

Ejemplo 5

Peso muscular como una medida de la difusión y potencia de la toxina botulínica tipo A

Se inyectó ratas Sprague Dawley hembra (adultas jóvenes, de aproximadamente 250 gramos de peso corporal) una dosis única de un complejo de toxina botulínica tipo A (BOTOX®) solamente en el músculo gemelo izquierdo. Las dosis individuales inyectadas en los músculos gemelos izquierdos de ratas separadas fueron 0,04 unidades, 0,07 unidades, 0,12 unidades, 0,21 unidades, 0,37 unidades, 0,65 unidades y 1,1 unidades. Adyacente al músculo gemelo izquierdo al que se le inyectó toxina estaban los músculos bíceps femoral no inyectado y sóleo izquierdo no inyectado. El músculo gemelo derecho, el músculo bíceps femoral derecho y el músculo sóleo derecho de cada rata no se inyectaron y por tanto se conservaron como controles. Los músculos (músculo gemelo) de las patas traseras tanto izquierda como derecha (inyectada y no inyectada), así como los músculos sóleo y bíceps femoral derecho no inyectado e izquierdo no inyectado, se extrajeron a los 14 días tras la administración en los músculos gemelos izquierdos y luego se pesaron.

La figura 11 muestra el resultado de este experimento en el que se inyectó al músculo gemelo izquierdo de diferentes ratas cantidades variantes de una toxina botulínica tipo A. El eje y muestra la razón (como porcentaje) del peso del músculo gemelo izquierdo al que se inyectó toxina de la rata con respecto al peso del músculo gemelo derecho no inyectado de la misma rata. El eje x muestra la cantidad en unidades de la toxina botulínica tipo A que se inyectó en el músculo gemelo izquierdo.

La figura 12 muestra el resultado de este experimento en el que se inyectaron en el músculo gemelo izquierdo de diferentes ratas cantidades variantes de una toxina botulínica tipo A. El eje y muestra la razón (como porcentaje) del peso del músculo bíceps femoral izquierdo no inyectado (que está adyacente al músculo gemelo izquierdo de la rata al que se le inyectó toxina) con respecto al peso del músculo bíceps femoral derecho no inyectado de la misma rata. El eje x muestra la cantidad en unidades de la toxina botulínica tipo A que se inyectó en el músculo gemelo izquierdo.

La figura 13 muestra el resultado de este experimento en el que se inyectaron en el músculo gemelo izquierdo de diferentes ratas cantidades variantes de una toxina botulínica tipo A. El eje y muestra la razón (como porcentaje) del peso del músculo sóleo izquierdo no inyectado (que está adyacente al músculo gemelo izquierdo de la rata al que se le inyectó toxina) con respecto al peso del músculo sóleo derecho no inyectado de la misma rata. El eje x muestra la cantidad en unidades de la toxina botulínica tipo A que se inyectó en el músculo gemelo izquierdo.

Tal como se muestra en las figuras 11-13, la inyección de BOTOX® provocó atrofia muscular (y disminución del peso muscular) en el músculo de la inyección (músculo gemelo izquierdo) y sitios adyacentes (músculos bíceps femoral izquierdo y sóleo izquierdo). El músculo gemelo izquierdo inyectado mostró una excelente disminución relacionada con la dosis en el peso muscular que se modeló bien con una función estadística (regresión logística de 4 parámetros). Se calculó una DE_{50} (la dosis requerida para alcanzar el 50% del nivel máximo posible de respuesta) para la respuesta del peso muscular (0,47 U/rata) y se asocia con un intervalo de confianza muy bueno (error estándar = 0,03), que muestra, por tanto, que éste es un método *in vivo* preciso y viable para evaluar la potencia farmacológica de una toxina botulínica tal como BOTOX®. La reducción del peso muscular es un criterio de valoración más sensible que la letalidad, ya que la dosis DE_{50} para el peso muscular de rata (0,47 U) es más de 2 veces inferior al ensayo de DL_{50} de ratón basándose en unidades por animal. Los músculos que se inyectaron mostraron una DE_{50} inferior que los músculos adyacentes (0,65 U para bíceps femoral izquierdo y 1,16 U para sóleo izquierdo) en los que la toxina se difundió desde el músculo gemelo inyectado. La razón de DE_{50} de un músculo adyacente con respecto al músculo gemelo puede usarse como medida de la difusión de BOTOX®. Estos datos sostienen el uso del peso muscular para evaluar la difusión y la potencia en un único sistema de prueba.

Una evaluación de la potencia de una toxina botulínica con los ensayos descritos en el presente documento para medir la atrofia muscular y peso muscular posterior a una inyección intramuscular (i.m.) de una toxina botulínica es más clínicamente relevante que el criterio actual. El criterio actual (ensayo de la potencia de DL_{50} i.p. de ratón) implica una inyección intraperitoneal (i.p.) seguida de monitorización de la mortalidad en el ratón. Sin embargo, ya toxina botulínica se usa normalmente de manera i.m. (nunca i.p.), la exposición intramuscular es más clínicamente relevante. Además, el enfoque i.m. permite la evaluación de una dosis eficaz por unidad de masa muscular (dosis por gramo de músculo), que puede permitir a los médicos determinar cuánto de una toxina botulínica han de inyectar en los músculos de diversos tamaños.

Adicionalmente, el ensayo de la atrofia y peso muscular descrito en el presente documento es una herramienta útil para evaluar la difusión de una toxina botulínica, que es una propiedad importante a evaluar en el desarrollo de nuevas formulaciones para toxinas botulínicas. Es necesaria una difusión leve dentro del músculo inyectado para lograr una respuesta terapéutica completa, mientras que siempre es indeseable la difusión extensa a sitios distales debido a que esto puede dar como resultado efectos secundarios adversos graves. Para optimizar la formulación, ha de entenderse el grado de difusión deseable para tratar un estado clínico específico. Una determinación del peso y la atrofia de los músculos adyacentes y distales al sitio de inyección puede proporcionar información crítica sobre si una formulación nueva es potencialmente útil.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar un efecto de una toxina botulínica, comprendiendo el método la etapa de administrar una toxina botulínica a un músculo de un mamífero no humano, y determinar una densidad de núcleos o una zona de núcleos de una muestra del músculo al que se ha administrado la toxina botulínica.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la toxina botulínica es una toxina botulínica tipo A, B, C₁, D, E, F o G.

3. Método según la reivindicación 1, en el que la toxina botulínica es una toxina botulínica tipo A.

4. Método para determinar una atrofia muscular, comprendiendo el método la etapa de administrar una toxina botulínica a un músculo de un mamífero, y determinar una densidad de núcleos o una zona de núcleos de una muestra del músculo al que se ha administrado la toxina botulínica.

5. Método según la reivindicación 4, en el que la toxina botulínica es una toxina botulínica tipos A, B, C₁ D, E, F o G.

6. Método según la reivindicación 4, en el que la toxina botulínica es la toxina botulínica tipo A.

Fig. 1

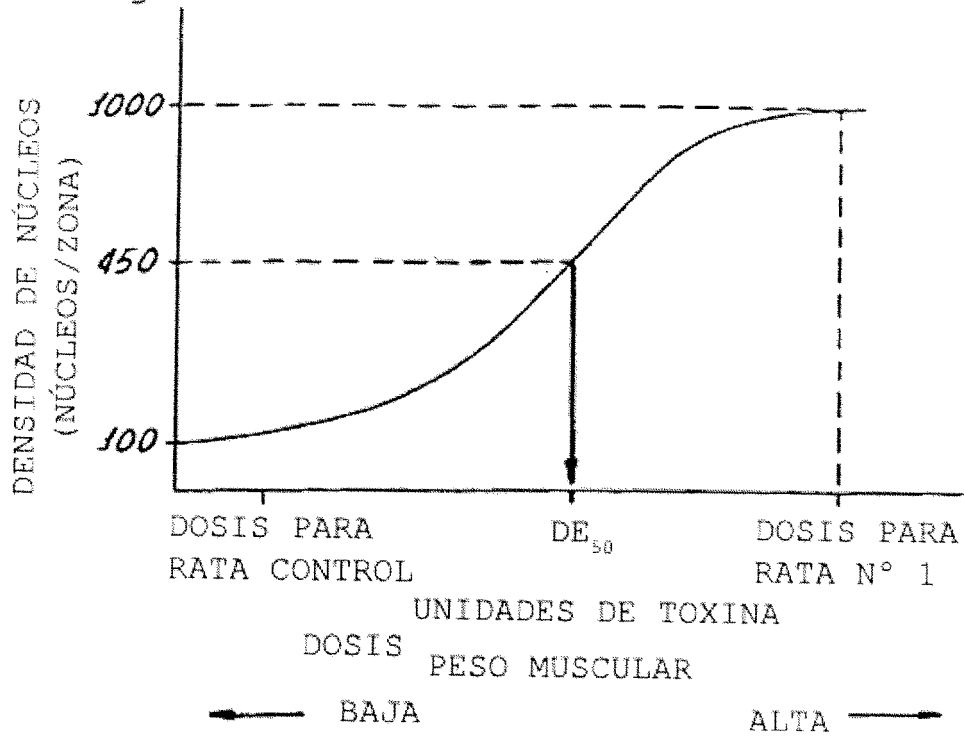


Fig. 2

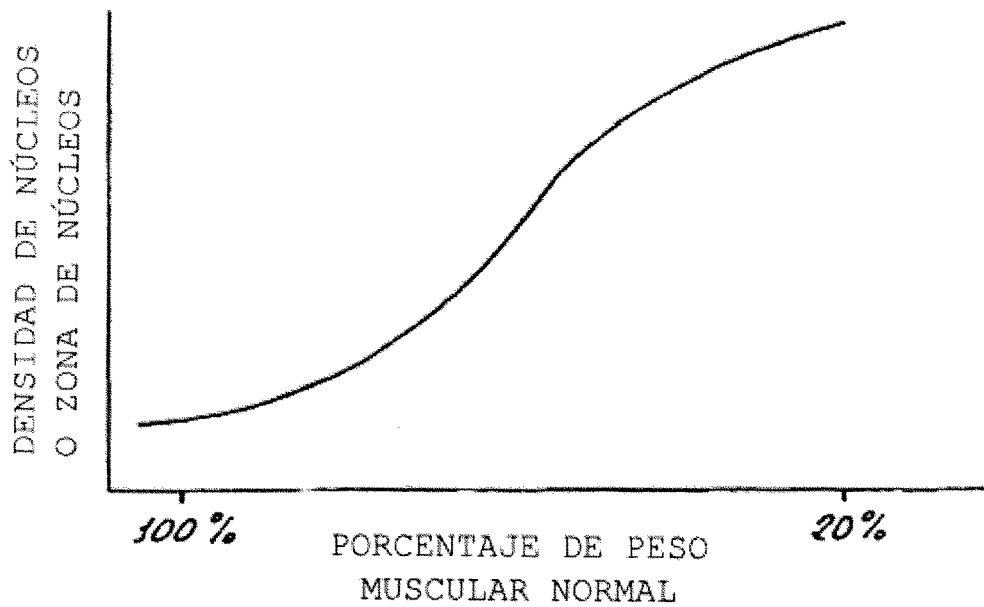
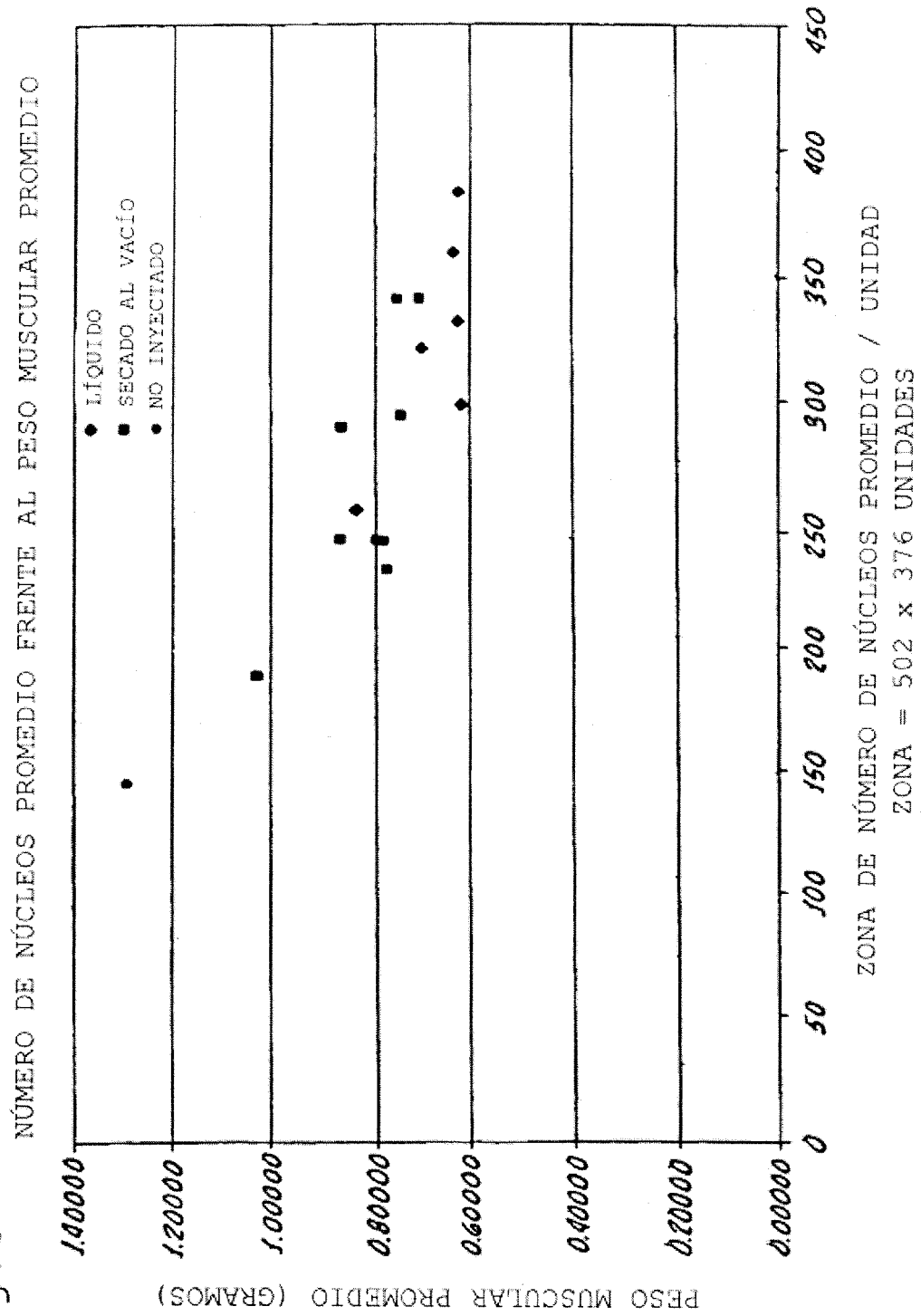


Fig. 3



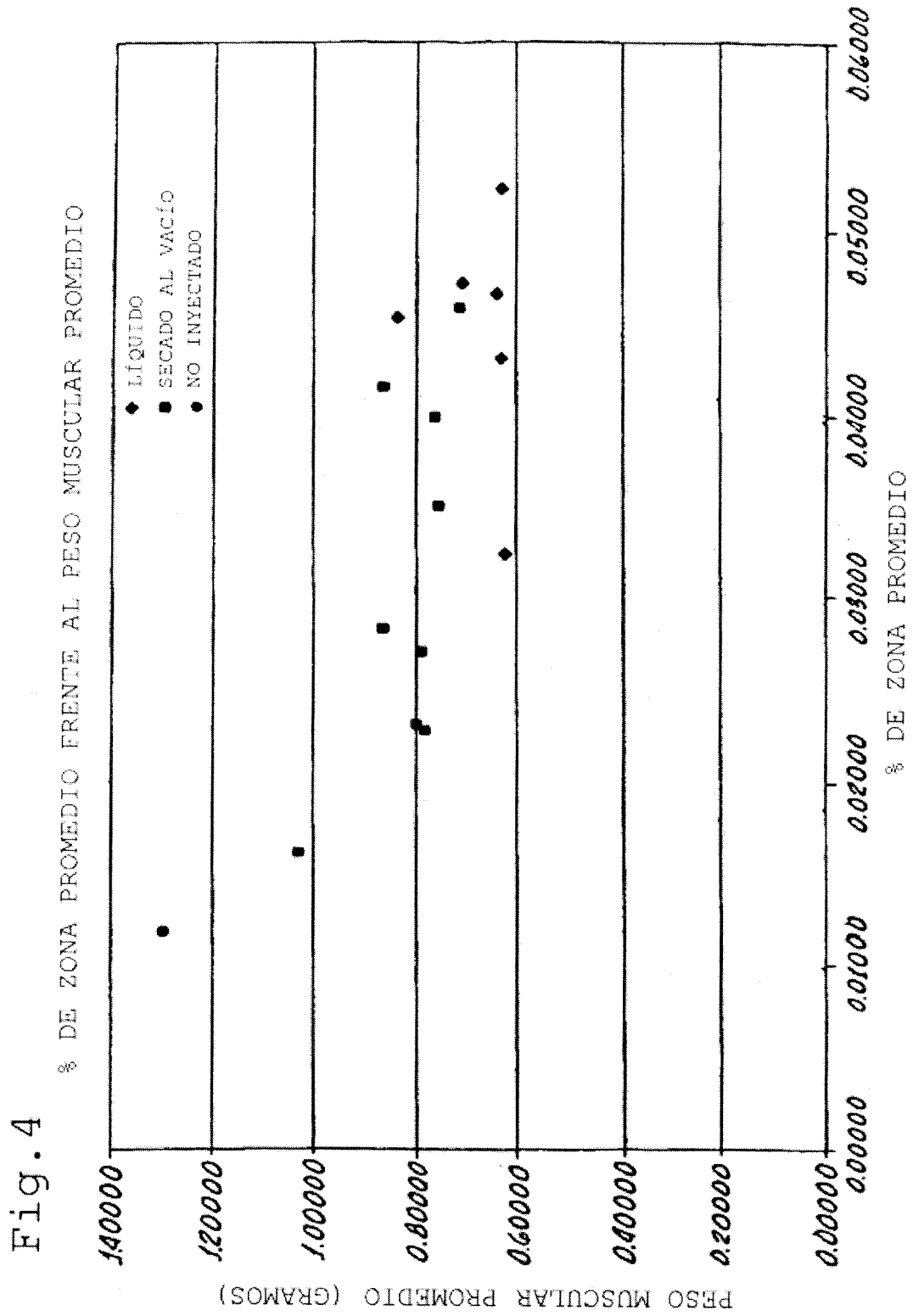


Fig. 5A

2101L EXTERIOR

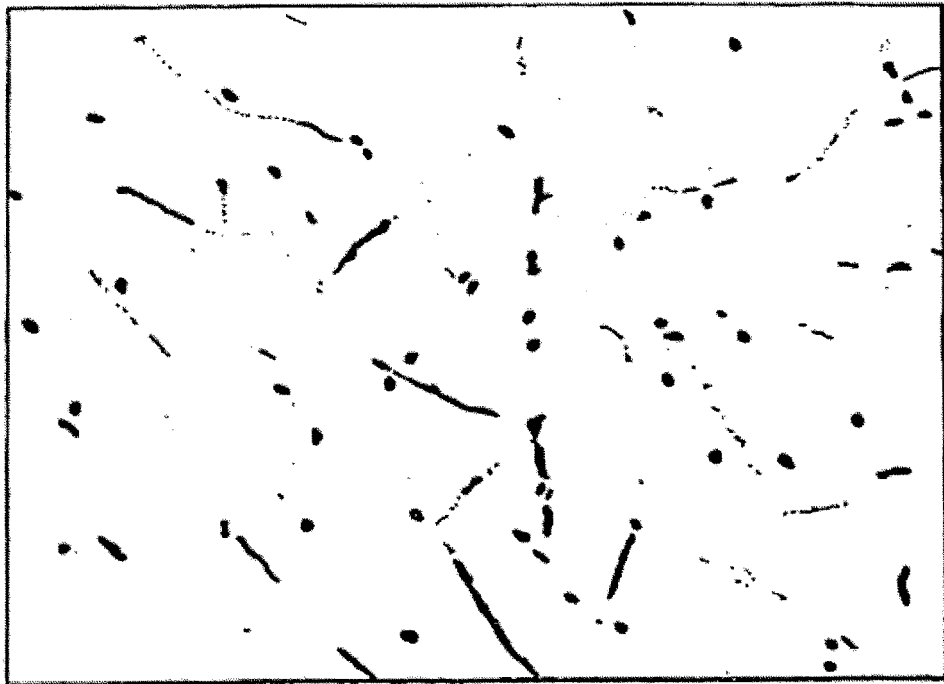
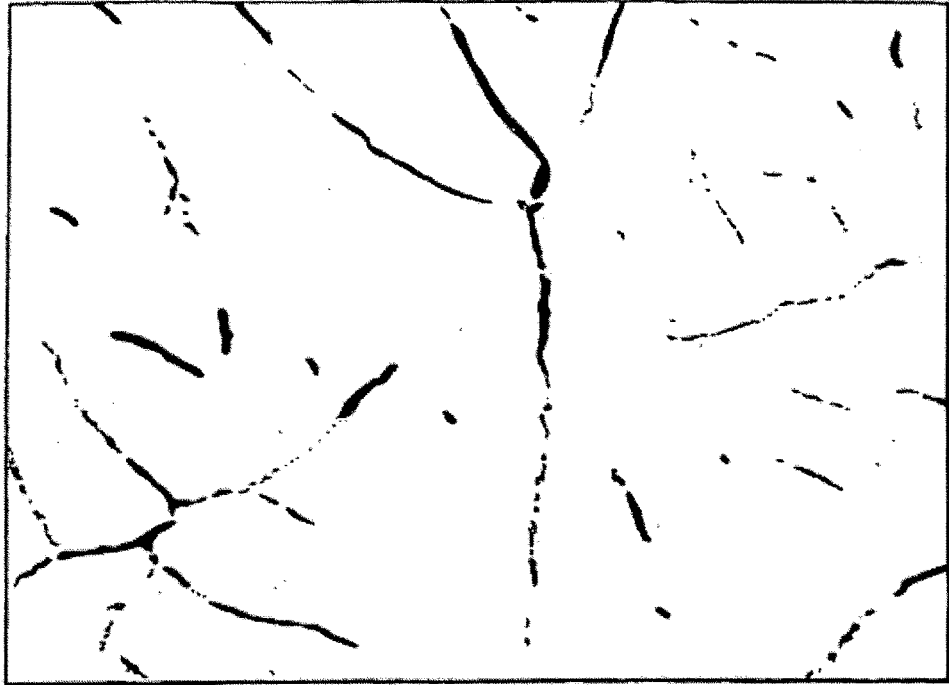


Fig. 5B

21011 EXTERIOR

Fig. 5C

ESTAD.	ZONA	DIAMETRO (MEDIA)	POR ZONA
MÍN	4.3060365	2.4406509	.00002278
(OBJ.N°)	25	25	25
MÁX	45.520958	8.1463652	.00024088
(OBJ.N°)	5	5	5
INTERVALO	41.214920	5.7057142	.00021809
MEDIA	11.391845	3.9377844	.00006028
DES.EST.	5.8512273	.99111760	.00003096
SUMA	1207.5355	417.40515	.00638997
MUESTRAS	106	106	106

CLASIFICACIÓN					☐ ☐ ☐	
ARCHIVO VER						
CLASE	OBJETOS	% DE OBJETOS	ZONA MEDIA	DIÁM.MEDIO (MEDIA)		
1	54	50.943394	7.5298672	3.2515821		
2	36	33.962265	12.678884	4.2547326		
3	11	10.377358	17.895216	5.1142292		
4	3	2.8301888	24.195824	6.1818633		
5	1	.94339621	29.527107	5.7007999		
6	0	0	0	0		
7	0	0	0	0		
8	1	.94339621	45.520958	8.1463652		
9	0	0	0	0		
10	0	0	0	0		

Fig. 5D

Fig. 6A 1400L EXTERIOR

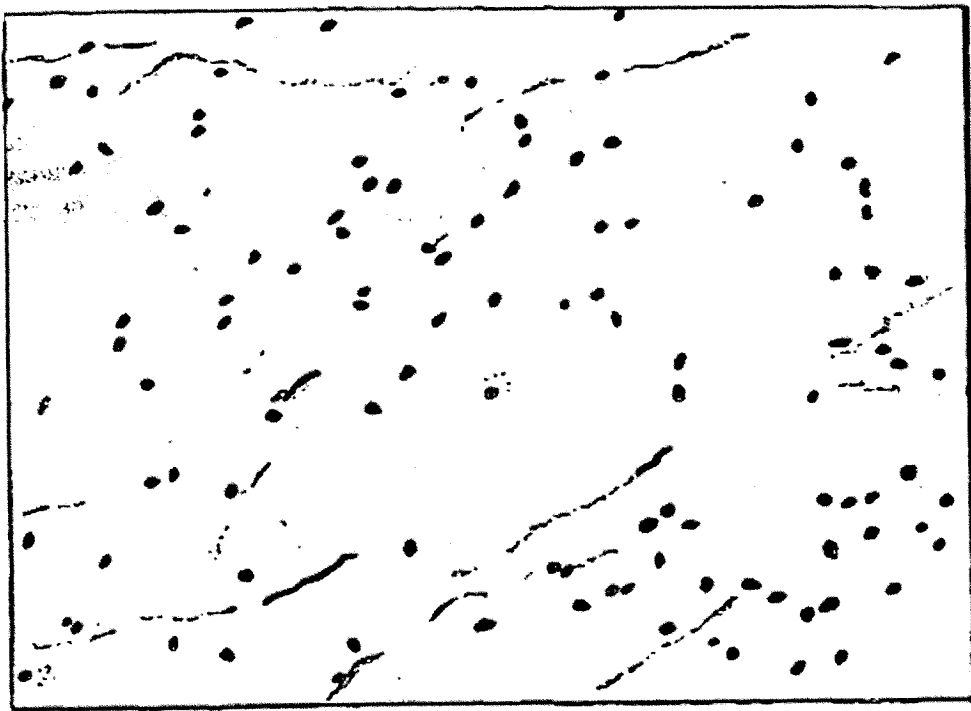


Fig. 6B 1400 EXTERIOR

Fig. 6C

ESTAD.	ZONA	DIAMETRO (MEDIO)	POR ZONA
MÍN	4.3060365	2.3132176	.00002278
(OBJ.N°)	7	7	7
MÁX	65.820847	11.660216	.00034830
(OBJ.N°)	229	114	229
INTERVALO	61.514809	9.3469982	.00032552
MEDIA	19.463675	4.9798832	.00010299
DES.EST.	10.985473	1.4576392	.00005813
SUMA	3737.0254	956.13757	.01977539
MUESTRAS	192	192	192

CLASIFICACIÓN				☐	☐	☐
ARCHIVO VER						
CLASE	OBJETOS	% DE OBJETOS	ZONA MEDIA	DIÁM.MEDIO MEDIA		
1	38	19.791666	7.0580130	3.1523876		
2	39	20.31250	13.186250	4.3244815		
3	51	26.562498	18.550932	5.0418862		
4	32	16.666666	24.183006	5.6668825		
5	11	5.7291665	29.527105	5.9018874		
6	6	3.1250	34.960918	6.6136565		
7	7	3.6458333	40.687653	7.7858882		
8	4	2.0833333	47.058826	8.4272184		
9	2	1.0416666	51.364864	7.6277862		
10	1	.52083331	58.349068	11.660216		
					4	0

Fig. 7A 2101L INTERIOR

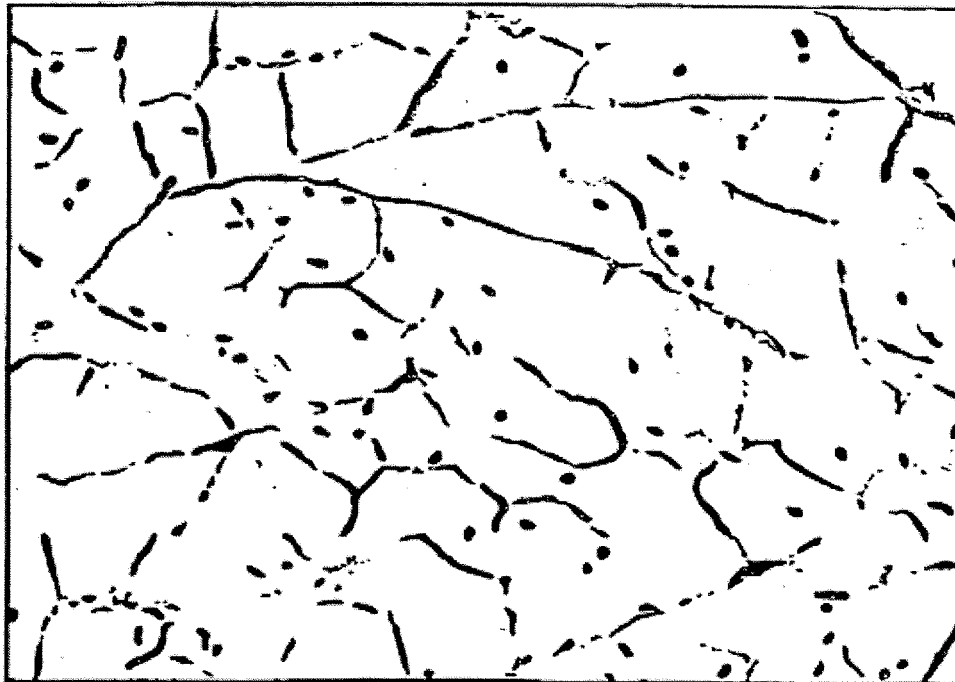


Fig. 7B 21011 INTERIOR

Fig. 7C

ESTAD.	ZONA	DIÁMETRO (MEDIA)	POR ZONA
MÍN	4.3060360	2.3132174	.00002278
(OBJ.Nº)	16	202	239
MÁX	38.754326	9.5076313	.00020507
(OBJ.Nº)	46	46	46
INTERVALO	34.448288	7.1944141	.00018229
MEDIA	12.421543	4.1032901	.00006573
DES. EST.	6.7874541	1.2506217	.00003591
SUMA	2061.9761	681.14618	.01091145
MUESTRAS	166	166	166

CLASIFICACIÓN			
ARCHIVO VER			
CLASE	OBJETOS	% DE OBJETOS	ZONA MEDIA
1	80	48.192772	7.3433294
2	48	28.915663	12.982186
3	21	12.650602	17.868584
4	8	4.8192173	23.606304
5	7	4.2168674	30.318008
6	1	.60240966	36.293732
7	1	.60240966	38.754326
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0

Fig. 7D

Fig. 8A 1400L INTERIOR

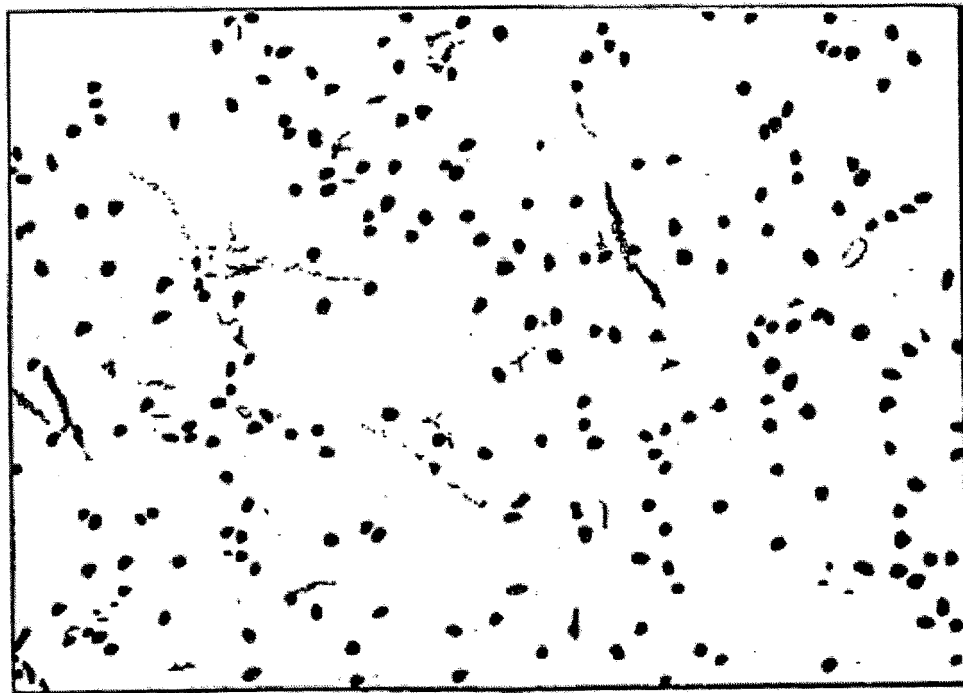
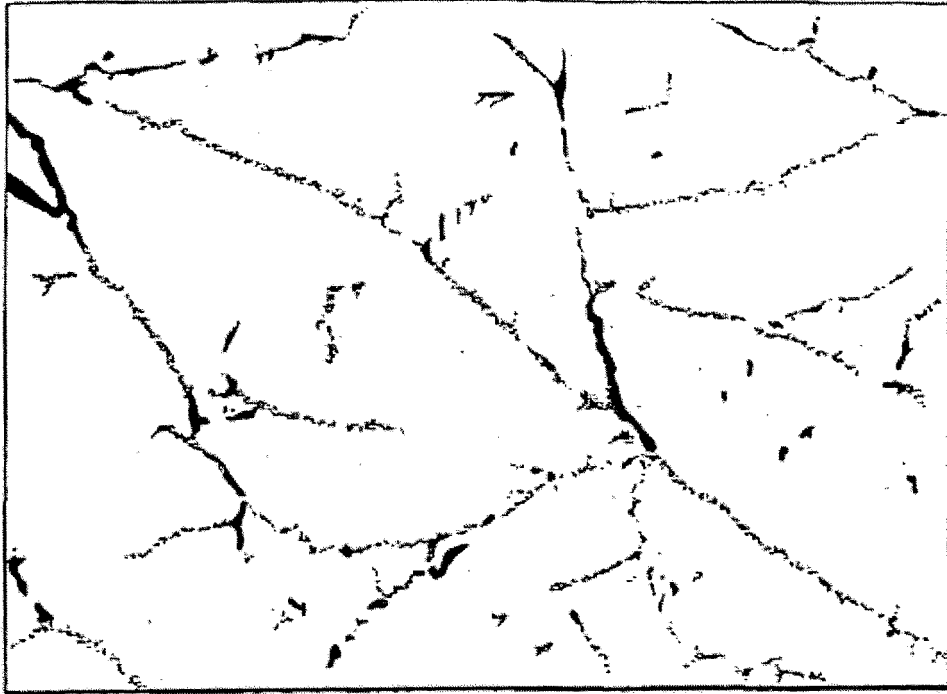


Fig. 8B 1400L INTERIOR

Fig. 8C

ESTAD.	ZONA	DIÁMETRO (MEDIA)	POR ZONA
MÍN	4.3060365	2.3132176	.00002278
(OBJ.Nº)	120	165	120
MÁX	102.72973	13.133185	.00054361
(OBJ.Nº)	145	239	145
INTERVALO	98.423691	10.817967	.00052083
MEDIA	18.054852	4.7163148	.00009554
DES. EST.	18.469315	1.5011599	.00006598
SUMA	6698.3501	1749.7528	.03544595
MUESTRAS	371	371	371

CLASIFICACIÓN					☐ ☐ X	
ARCHIVO VER						
CLASE	OBJETOS	% DE OBJETOS	ZONA MEDIA	DIAM. MEDIO (MEDIA)		
1	93	25.067385	7.0642791	3.1215079		
2	96	25.876011	13.059081	4.2343669		
3	84	22.641508	18.183481	4.9487801		
4	51	13.746631	23.761599	5.5594616		
5	11	2.9649594	29.471184	6.0824142		
6	8	2.1563342	35.909267	6.8700128		
7	11	2.9649594	41.662304	7.2421188		
8	9	2.4258759	46.546204	7.9324665		
9	2	.53908354	53.210308	8.4140301		
10	2	.53908354	57.208771	9.2979317		

Fig. 8D

Fig. 9 TX00045 MÚSCULO GEMELO DE RATA MACHO INYECTADO

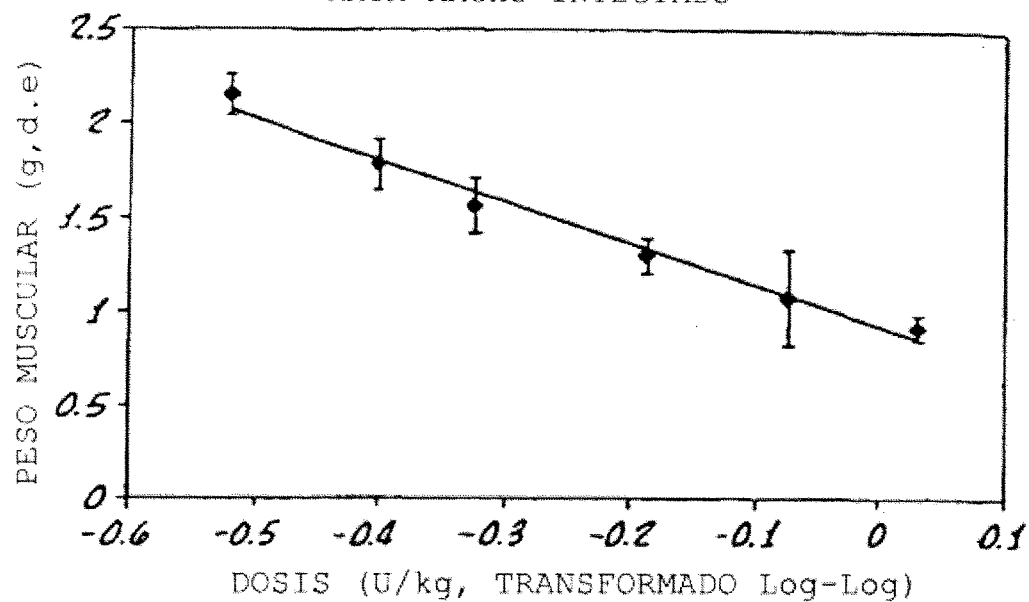
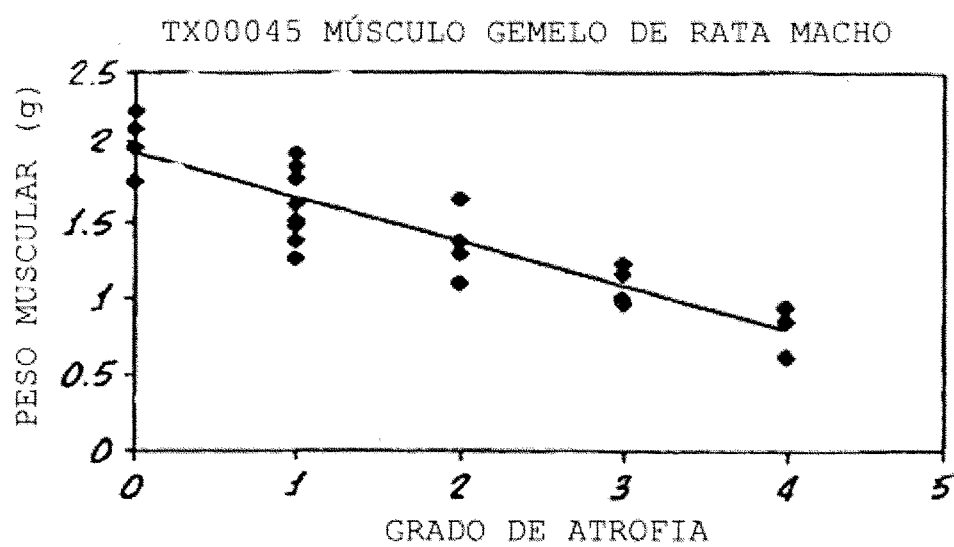


Fig. 10



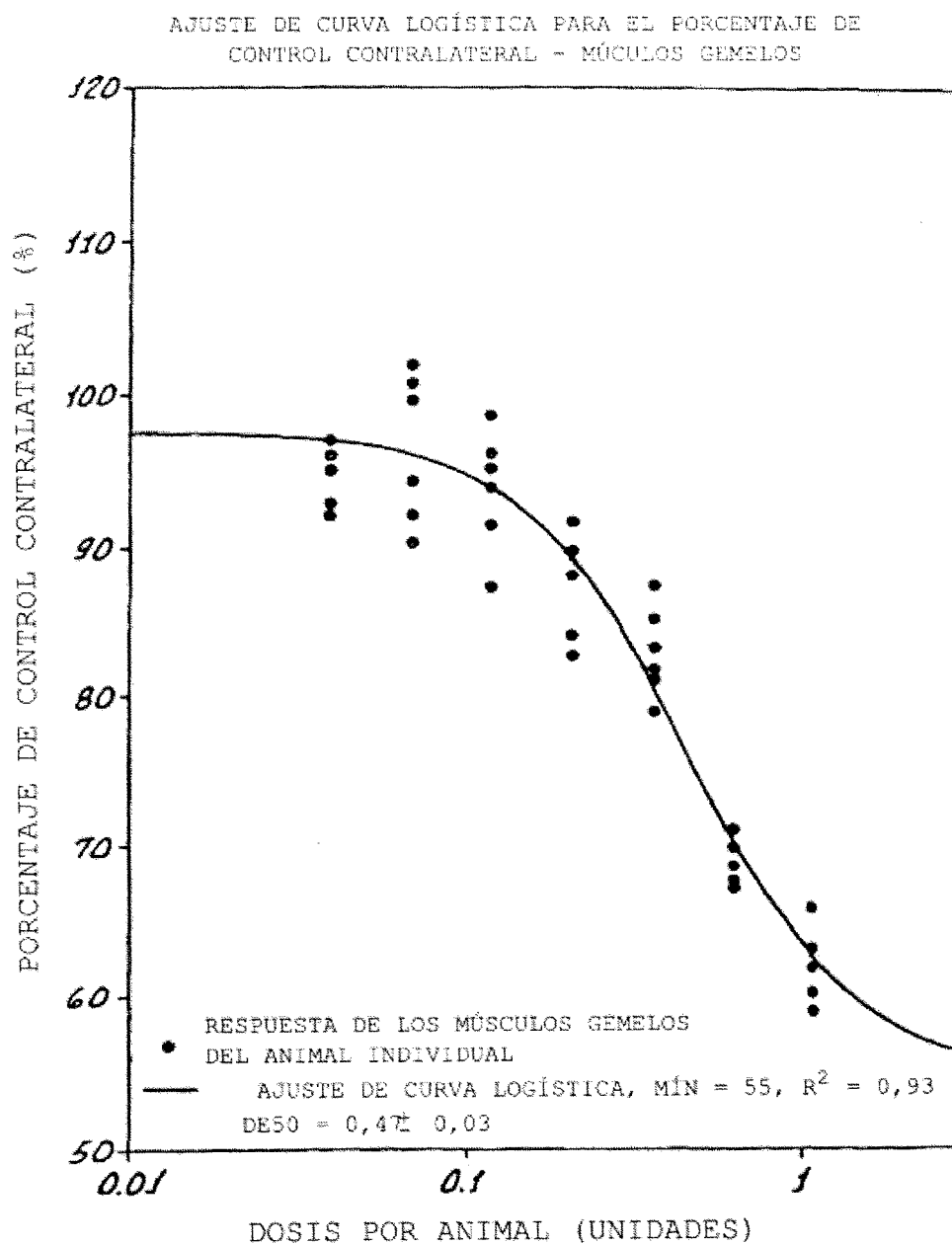


Fig. 11

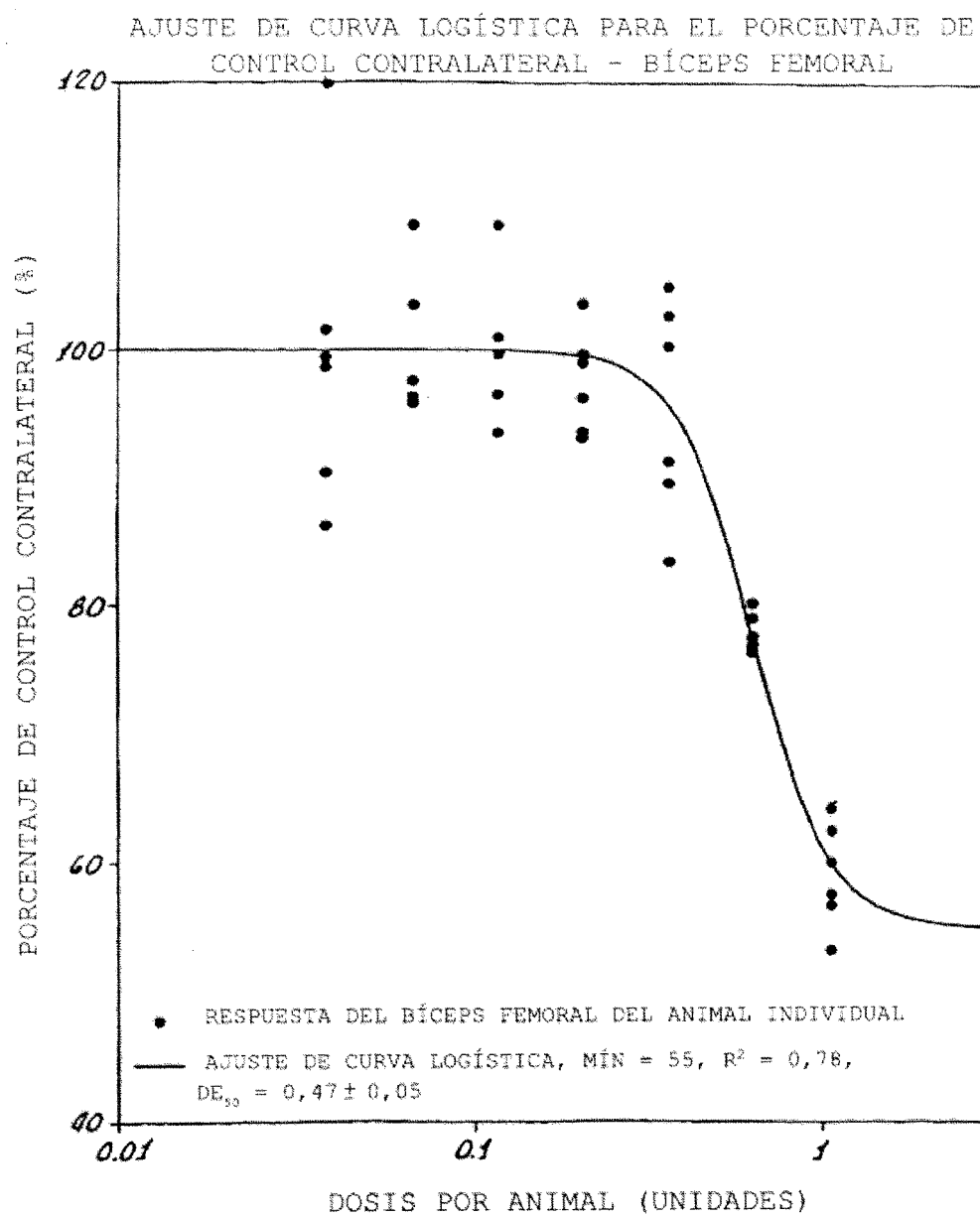


Fig. 12

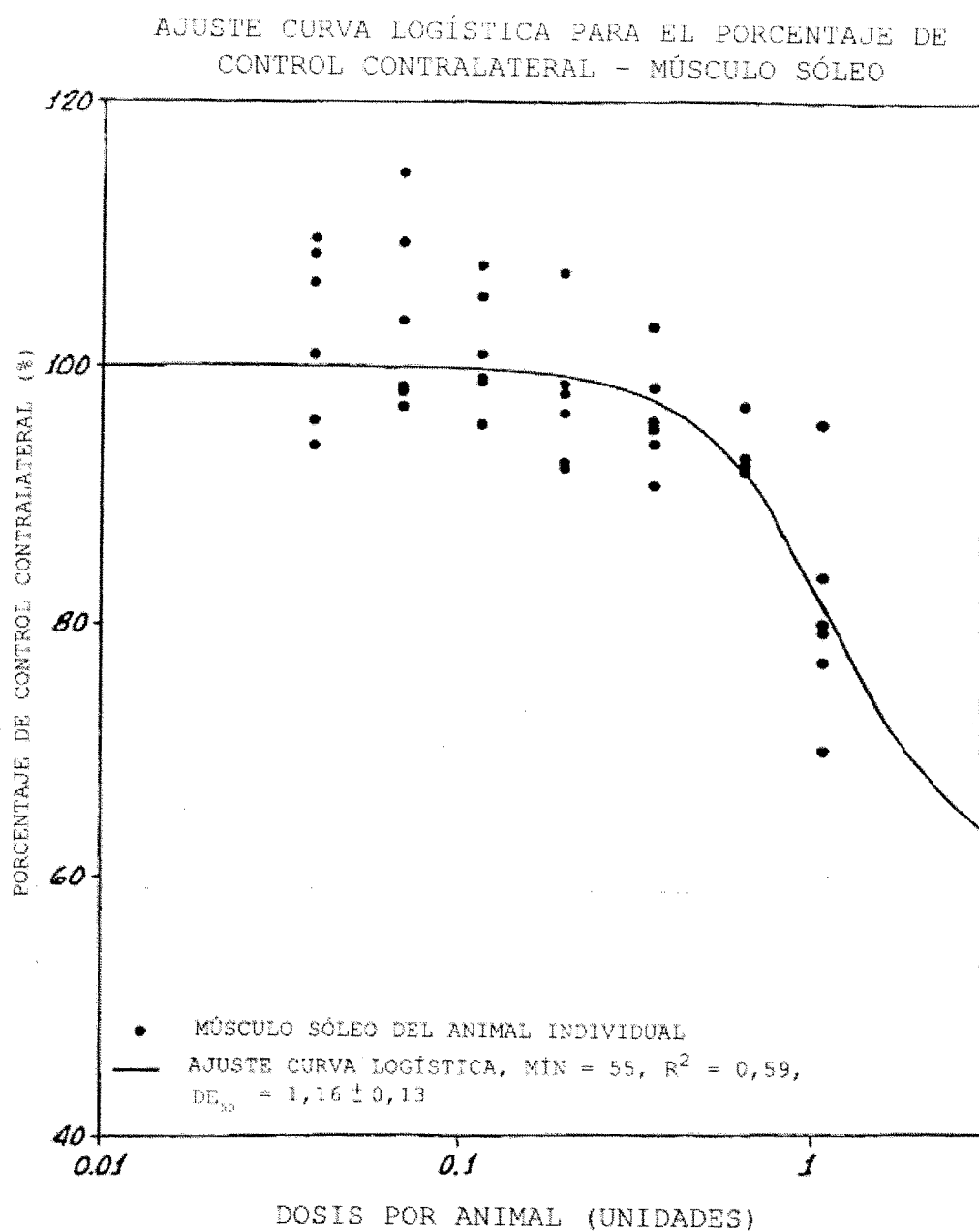


Fig. 13