

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 829 614**

(51) Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 47/36** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2014 PCT/IB2014/061417**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14184746**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2014 E 14727073 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2020 EP 2996674**

---

(54) Título: **Composición farmacéutica que comprende una neurotoxina botulínica y usos de la misma**

(30) Prioridad:

**15.05.2013 RU 2013122509**

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

**01.06.2021**

(73) Titular/es:

**BOSTI TRADING LTD. (100.0%)  
The Business Fórum, 30 Karpenisi Street  
1077 Nicosia, CY**

(72) Inventor/es:

**POKUSHALOV, EVGENY;  
FOMENKO, VLADISLAV y  
SALAKHUDINOV, NARIMAN**

(74) Agente/Representante:

**LÓPEZ CAMBA, María Emilia**

**Observaciones:**

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 829 614 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**

Composición farmacéutica que comprende una neurotoxina botulínica y usos de la misma

5   **Campo de la invención**

La invención se refiere a la medicina, concretamente a la preparación de una composición farmacéutica que comprende una neurotoxina botulínica para su uso en la práctica clínica, preferiblemente en cardiología para el tratamiento de arritmias cardíacas.

10

**Antecedentes de la invención**

Actualmente, la neurotoxina botulínica más utilizada es la neurotoxina botulínica tipo A (toxina botulínica tipo A). Esta neurotoxina se produce durante la fermentación en presencia de cepas de *Clostridium botulinum*.

15

En la práctica clínica, se utilizan pocos fármacos a base de toxina botulínica tipo A como Botox (Botox), Dysport (Dysport), Kseomin (Xeomin) o Lantoks (Lantox). Hay una serie de aplicaciones terapéuticas registradas para estos fármacos en varios países y hay aplicaciones terapéuticas que se encuentran actualmente en desarrollo y aún no están registradas (Sheng-Ghen, 2012, Toxins, -Clinical Uses of Botulinum-Neurotoxins: Current Indications, Limitations and Future Developments, 4, 913-939). Las aplicaciones documentadas por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) incluyen: en oftalmología: tratamiento del estrabismo; en neurología: tratamiento del blefaroespasio, espasmo hemifacial, torticolis espasmódica (distorción cervical), migraña crónica (cranealgie), detrusor hiperactivo, espasmo muscular local en adultos y niños mayores de 2 años (incluyendo parálisis cerebral y espasticidad), hiperhidrosis axilar, hipersalivación; en medicina estética: eliminación de arrugas faciales; en urología: tratamiento de los trastornos del tracto urinario inferior; en gastroenterología: tratamiento de los trastornos del tracto gastrointestinal; en otorrinolaringología: tratamiento de la disfonía espasmódica.

20

Actualmente se encuentran en estudio las siguientes aplicaciones de fármacos basados en la toxina botulínica tipo A: en odontología: tratamiento de la disfunción de la articulación temporomandibular; en neurología: tratamiento del dolor musculoesquelético crónico y neuropatía diabética; en ginecología: tratamiento del vaginismo; en cirugía del trauma y general: mejora de la cicatrización de heridas; en cardiología: tratamiento de arritmias cardíacas.

25

Las arritmias cardíacas son un grupo complejo y extendido de eventos cardíacos. El único tratamiento quirúrgico efectivo y racional de esta enfermedad es la ablación por radiofrecuencia (quema de áreas arritmogénicas del corazón mediante corriente eléctrica de alta frecuencia). Sin embargo, este procedimiento no es suficientemente efectivo (menos del 60 %) y tiene un alto riesgo de complicaciones como hemopericardio, fistula transesofágica, posablación, aleteo auricular, paresia del nervio frénico, trombo mural, etc. en más del 30 % de los casos (Camm y col., 2010, Guidelines for the management of atrial fibrillation European Heart Journal, 31, 2369-2429).

30

Existen publicaciones recientes dedicadas al tratamiento de las arritmias cardíacas con neurotoxina botulínica, pero los efectos sobre la supresión de la fibrilación auricular no duraron más de una semana. (Oh y col., 2011, Botulinum Toxin Injection in Epicardial Autonomic Ganglia Temporarily Suppresses Vagally Mediated Atrial Fibrillation. Circ Arrhythm Electrophysiol., 4, 560-565). La duración de este efecto no es aceptable en la práctica clínica.

35

Actualmente, los fabricantes de fármacos basados en la toxina botulínica están involucrados en el desarrollo del uso de agentes estabilizantes como varias proteínas, aminoácidos, polisacáridos y otros componentes para mejorar la vida útil de la toxina y su administración efectiva al órgano diana.

40

Se han desarrollado composiciones farmacéuticas que comprenden una neurotoxina botulínica, seleccionada entre los diversos serotipos botulínicos A, B, C, D, E, F o G y S, y poliamina ácida, seleccionados del grupo que comprende polilisina, poliarginina, polihistidina o poliornitina (solicitud de patente RU 2011125775A; WO 2010/07842).

45

Se han desarrollado otras composiciones farmacéuticas que comprenden una toxina botulínica tipo A en una cantidad de 6 pg a 30 ng con una actividad biológica de aproximadamente 50-250 Unidades de LD<sub>50</sub> (Dosis Letal, 50 %), y componentes adicionales, como tampón de pH, excipiente, diluyente, un agente crioprotector y/o un estabilizador, seleccionados de entre ácido hialurónico, polivinilpirrolidona o polietilenglicol (patente RU 2453333 C2, WO 2008/000490).

50

Sin embargo, esas composiciones conocidas no tienen una acción prolongada, ni aumentan el efecto terapéutico de la toxina botulínica y no están destinadas a tratar arritmias cardíacas. Esas formulaciones tienen una exposición insuficiente en los tejidos del corazón para un efecto óptimo y pueden tener la rápida eliminación del principio activo en la circulación sistémica.

55

Una composición farmacéutica líquida que comprende: (a) complejo de neurotoxina botulínica (tipo A, B, C, D, E, F o G) o neurotoxina botulínica de alta pureza (tipo A, B, C, D, E, F o G) en concentraciones de 50 a 10.000 unidades LD<sub>50</sub> por 1 ml de solución, (b) un agente estabilizante que comprende un tensioactivo (SAS), preferiblemente polisorbato

80 en una cantidad de 0,005 a 0,02 % en volumen, (c) cloruro de sodio como agente cristalino en una concentración de 0,15 a 0,3 M , (d) un disacárido, preferiblemente sacarosa, a una concentración 10 - 20 mM, (d) un tampón, principalmente histidina, para mantener el pH de 5,5 a 7,5 y agua también se ha desarrollado (patente RU 2407541 C2, WO 2006/005910 ). US 2012/141532 A1 describe el uso de una formulación de toxina botulínica, donde la

5 formulación comprende un vehículo mucopolisacárido tal como ácido hialurónico. Sin embargo, esas composiciones conocidas no están destinadas a tratar trastornos del ritmo cardíaco y se dice que inducen efectos estabilizadores sobre la toxina botulínica sin ninguna indicación o sugerencia de acción prolongadora o reducción de la dosis terapéutica y efectos secundarios. Por tanto, existen importantes necesidades de nuevas estrategias de tratamiento de las arritmias cardíacas, en particular la fibrilación auricular, que conducirían a efectos duraderos y limitarían los posibles efectos secundarios.

#### 10 Resumen de la invención

15 La invención se refiere a composiciones farmacéuticas de neurotoxinas botulínicas útiles para el tratamiento de arritmias cardíacas, que tienen en particular un efecto terapéutico elevado, un efecto duradero aumentado y efectos secundarios reducidos.

20 El Solicitante ha descubierto inesperadamente que las composiciones de la invención alcanzan una actividad farmacológica aumentada de la toxina botulínica tipo A, un efecto terapéutico deseado ya alcanzado con una única dosis, una prolongación del efecto de la toxina botulínica, al tiempo que reduce los efectos secundarios de la toxina botulínica. Además, las composiciones de la invención permiten preparar composiciones con las propiedades deseadas para la medicina personalizada directamente en la clínica y presentan una actividad prolongada cuando se mantienen en la solución lista para la introducción.

25 Un primer aspecto de la invención proporciona una composición que contiene toxina botulínica, en particular toxina botulínica tipo A, y un mucopolisacárido seleccionado del grupo que consiste en quitosano tomado en una relación en peso de 1:(de  $10^3$  a  $10^9$ ), preferiblemente 1:(de  $10^6$  - $10^8$ ) y un excipiente farmacéuticamente aceptable con los siguientes componentes:

30	toxina botulínica	1 - 200 U / ml
	mucopolisacárido	0,1 - 50 mg / ml
	solución salina	0,1 - 50 ml.

35 Un segundo aspecto de la invención se refiere a una formulación farmacéutica según la invención para su uso como medicamento.

40 Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de una composición según la invención para la preparación de una preparación farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de arritmias cardíacas, en particular fibrilación auricular o hipertensión arterial.

45 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para prevenir y/o tratar arritmias cardíacas, en particular fibrilación auricular, o hipertensión arterial en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho procedimiento administrar una formulación farmacéutica según la invención en dicho sujeto.

50 Un quinto aspecto de la invención se refiere a un kit medicinal que comprende en forma compartimental un primer compartimento o serie de compartimentos que comprende una composición según la invención y un segundo compartimento o serie de compartimentos que comprende una jeringa para inyección con instrucciones de uso.

55 Un sexto aspecto de la invención se refiere a un kit medicinal para la preparación de una composición según la invención, que comprende en forma compartimental un primer compartimento o serie de compartimentos que comprende una solución de toxina botulínica y un segundo compartimento o serie de compartimentos que comprende un polvo de quitosano y opcionalmente un vial para la preparación de la formulación con instrucciones de uso.

#### Descripción de las figuras

#### 55 [0020]

60 La **Figura 1** representa el efecto de las composiciones farmacéuticas de la invención representado por el cambio en el umbral de electroestimulación (medido en voltios) de los músculos femorales de rata en comparación con una formulación comercial (Xeomin) y con formulaciones comparativas que comprenden toxina botulínica y otro mucopolisacárido, como se describe en el Ejemplo 9. A: Formulación N° 2 (-Quitosano); B: Formulación N° 6 (-Nadroparina); C: Formulación comparativa N° 11 (- Hialuronato de sodio); D: Formulación comparativa N° 4 (-Heparina); (----) Xeomin

65 La **Figura 2** representa el efecto y su duración de una composición farmacéutica de la invención representada por el cambio en el umbral de electroestimulación (medido en Voltios) de los músculos femorales de rata en comparación con una composición que contiene disacárido y toxina botulínica A, según la descripción de la patente RU 2407541

como se describe en el Ejemplo 11.

**La Figura 3** muestra los efectos comparativos de dos composiciones farmacéuticas de la invención a diferentes concentraciones de quitosano representados por el cambio en el umbral de electroestimulación (medido en Voltios) de los músculos femorales de rata con los de una composición comercial (Xeomin), como se describe en el Ejemplo 13. (- - - Xeomin), (-Formulación N° 1), (.... Formulación N° 2).

**La Figura 4** muestra imágenes de una inyección de contraste [Visipaque™ (iodixanol)] en los panículos adiposos epicárdicos que contienen el PG anterior derecho (A), inferior derecho (B) y superior izquierdo (C) como se describe en el Ejemplo 12. Aguja de salida del catéter en el espacio pericárdico (D).

**La Figura 5** muestra el umbral de estimulación medido por el cambio en el umbral de electroestimulación (medido en Voltios) de los músculos femorales de rata que indujeron FA como se describe en el Ejemplo 11. (· · · referencia), ( Xeomin), ( formulación N° 2).

**La Figura 6** muestra un ejemplo de administración de una composición de la invención en el área visible de los cuatro panículos adiposos epicárdicos principales. A: El primer panículo adiposo epicárdico de la aurícula izquierda se localiza por delante de la vena pulmonar superior derecha (VP) y corresponde al plexo ganglionar (PG) anterior derecho; B: el segundo panículo adiposo epicárdico se localiza inferoposterior a la vena pulmonar inferior derecha y corresponde al PG inferior derecho; C: el tercer panículo adiposo se localiza por delante de la VP superior izquierda y la VP inferior izquierda (entre las VP y la orejuela auricular izquierda (OAI)) y corresponde al PG del tracto de Marshall y al PG superior izquierdo; y D: el cuarto panículo adiposo se localiza por debajo de la VP inferior izquierda y se extiende posteriormente y corresponde al PG inferior izquierdo. La punta de la aguja se coloca manualmente en varios puntos de la superficie epicárdica de los panículos adiposos bajo control visual directo para garantizar una inyección óptima.

#### Descripción detallada

El término «toxina botulínica» se refiere a cualquier tipo de toxina botulínica seleccionada de los tipos A, B, E, F y G. La toxina botulínica (BTX) actúa bloqueando la liberación de acetilcolina desde el terminal presináptico de la unión neuromuscular. Se han descrito siete toxinas botulínicas antigenéticas distintas (BTX-A, B, C, D, E, F y G) producidas por diferentes cepas de *Clostridium botulinum*. El sistema nervioso humano es susceptible a 5 serotipos de toxinas (BTX-A, B, E, F, G) y no se ve afectado por 2 (BTX-C, D). Las neurotoxinas botulínicas se producen como polipéptidos inactivos de 150 kDa, que se escinden mediante proteasa bacteriana similar a la tripsina para generar la forma activa bicanaria de la toxina. La proporción de toxina simple a bicanaria depende del serotipo de la toxina y de si la cepa bacteriana expresa o no la proteasa apropiada. Las cadenas pesadas (H) de 100 kDa y las cadenas ligeras (L) de 50 kDa están unidas por enlaces disulfuro termolábiles y fuerzas no covalentes. Las cadenas H y L se disocian con el calor y la ebullición, lo que inactiva la toxina porque la neurotoxicidad requiere tanto cadenas H como L.

El término «toxina botulínica tipo A» se refiere a cualquier producto disponible comercialmente basado en la toxina botulínica tipo A que se puede usar de acuerdo con la invención, por ejemplo, «BOTOX™», «Dysport™», «Kseomin™», «Lantoks™», etc.

La toxina botulínica de serotipo A tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 150 kDa y es una proteína en forma de polipéptido de doble cadena que consiste en la cadena pesada y en la cadena ligera que están conectadas por un puente disulfuro. En los seres humanos, la cadena pesada provoca la fijación con terminales nerviosas colinérgicas presinápticas y la captación celular de la toxina. Se cree que la cadena ligera es responsable de los efectos tóxicos, actuando como zinc-endopeptidasa y dividiendo proteínas específicas responsables de la fusión de membranas. Al interrumpir el procedimiento de fusión de la membrana dentro de la célula, la toxina botulínica impide la liberación de acetilcolina en la hendidura sináptica. El efecto completo de la toxina botulínica en la transmisión neuromuscular interrumpe la transmisión neuromuscular y, de hecho, desnerva los músculos. La toxina botulínica también tiene actividad en otras sinapsis colinérgicas periféricas, provocando la disminución de la salivación y la sudoración. El serotipo A de la toxina botulínica se puede obtener mediante purificación y aislamiento a partir de un cultivo de la bacteria *Clostridium botulinum* tal como se describe en la patente EE.UU. 7.189.541 (procedimiento de producción de toxina botulínica); patente EE.UU. 6.818.409 (Aislamiento y purificación de toxinas de *Clostridium botulinum*) o producirse de forma recombinante como se describe en la patente EE.UU. 6.967.088 (Proteínas de toxina botulínica recombinante soluble).

El término «quitosano» se refiere a derivados de quitina obtenidos por N-desacetilación parcial o sustancial de la quitina, también denominada polí(N-acetil-D-glucosamina), que es un biopolímero natural que se puede extraer de los caparazones de crustáceos, como camarones, cangrejos y otros crustáceos marinos, incluidos *Pandalus borealis* y paredes celulares de hongos como, por ejemplo, los descritos en Kumar, 2000, Reactive and Functional Polymers, 46(1), 1-27 y Yogeshkumar, 2013, International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 4(1), 312-331; Davis y col., 1984, J. Gen. Microbiol., 130(8):2095-102.

El quitosano, como material natural, ha sido ampliamente investigado en este campo debido a su similitud estructural con los glicosaminoglicanos (GAG), que son los componentes de la matriz extracelular (MEC). El quitosano, el derivado parcialmente desacetilado de la quitina, es un polisacárido lineal, compuesto por conjuntos de glucosamina y N-acetylglucosamina unidas por enlaces  $\beta$  (1-4) glicosídicos. Por sus estructuras, los quitosanos son similares a un polímero que recubre la íntima vascular y tienen una biocompatibilidad total con los tejidos humanos, caracterizados

por una baja toxicidad (Chao Deng y col., 2010, *Macromol. Symp.*, 297, 138-146).

Según una realización particular, los quitosanos de la invención son de origen de caparazón de cangrejo y se obtienen después de un procedimiento de trituración mecánica y desacetilación. Según otra realización particular, los quitosanos de la invención tienen un grado de desacetilación de aproximadamente un 85 % a aproximadamente un 100 %.

Según otra realización particular, los quitosanos de la invención tienen un peso molecular medio (Mw) de aproximadamente 100 kDa a aproximadamente 1.000 kDa.

El término «heparina» se refiere a un mucopolisacárido que tiene acción directa anticoagulante y tiene un peso molecular comparable al peso molecular de la toxina botulínica. Puede extraerse de pulmón bovino triturado o producirse de forma recombinante como se describe en Linhardt y col., 2012, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 12(2): 217-219.

El término «Nadroparina» se refiere a un mucopolisacárido que tiene acción anticoagulante directa y es una heparina de bajo peso molecular con un peso molecular de más de un orden de magnitud menor que el de la toxina botulínica. Puede aislarse de tejido de mamíferos (patente EE.UU. 2.884.358 o sintetizarse a partir de precursores de azúcar UDP como un polímero de residuos alternos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina (Hazardous Substances Data Bank (HSDB®)).

### **Composiciones**

La invención proporciona composiciones farmacéuticas y procedimientos para tratar un sujeto, en particular un sujeto mamífero, y más particularmente un paciente humano que padece arritmias cardíacas, en particular fibrilación auricular o un riesgo de desarrollar arritmias cardíacas, en particular fibrilación auricular.

En una realización particular, la invención proporciona composiciones farmacéuticas de la invención para su uso como medicamento.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales farmacéuticamente aceptables tales como estabilizantes, agentes antimicrobianos, tampones, agentes colorantes, adyuvantes y similares.

Las composiciones según la invención, junto con un adyuvante, vehículo, diluyente o excipiente empleado convencionalmente, pueden colocarse en forma de composiciones farmacéuticas y dosis unitarias de los mismos, y en dicha forma pueden emplearse como sólidos, tales como implantes o cápsulas cargadas o líquidos tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires o cápsulas cargadas con los mismos, en la forma de soluciones inyectables estériles para uso parenteral (incluso subcutáneo) mediante inyección o infusión continua. Las composiciones inyectables se basan típicamente en una solución salina estéril inyectable o una solución salina tamponada con fosfato, u otros vehículos inyectables conocidos en la técnica. Dichas composiciones farmacéuticas y formas de dosificación unitarias de las mismas comprenden ingredientes en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales, y dichas formas de dosificación unitarias pueden contener cualquier cantidad efectiva adecuada del principio activo proporcional al intervalo de dosis prevista que se va a emplear. Según una realización particular, las composiciones según la invención son inyectables.

Materiales adicionales, así como técnicas de procesamiento de la formulación y similares, se exponen en la *Parte 5* de la obra de Remington «*The Science and Practice of Pharmacy*», 22a Edición, 2012, University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, que se incorpora en esta invención como referencia.

Según un aspecto, para el excipiente farmacéuticamente aceptable, se usa preferiblemente solución salina (por ejemplo, cloruro de sodio al 0,9 %). Las composiciones de la invención pueden incluir opcionalmente componentes adicionales, tales como agente tamponador de pH, excipiente, agente crioprotector diluyente y/o estabilizador.

Según un aspecto, las composiciones de la invención comprenden una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la relación en peso de neurotoxina botulínica, en particular toxina botulínica A, a mucopolisacárido es de aproximadamente  $1:1,5 \times 10^7$  a aproximadamente  $1:5 \times 10^7$ , por ejemplo  $1:4,4 \times 10^7$ .

Según otro aspecto, las composiciones de la invención comprenden una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la relación en peso de neurotoxina botulínica, en particular toxina botulínica A, a mucopolisacárido es de aproximadamente  $1:1,5 \times 10^7$  a aproximadamente  $1:5 \times 10^7$ , por ejemplo  $1:76 \times 10^7$ .

Según un aspecto, las composiciones de la invención comprenden una dosis de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 UI de toxina botulínica (típicamente 50 UI), en particular toxina botulínica A, para 1 procedimiento de inyección.

Según otro aspecto, las composiciones de la invención se encuentran en forma de dosificación de volúmenes de

procedimiento de inyección de 2.000 µL.

*Modo de administración*

- 5 Las composiciones de esta invención se pueden administrar de cualquier manera incluyendo, en particular, en el área epicárdica (notablemente en el área visible de los panículos adiposos epicárdicos principales) en caso de tratamiento de la fibrilación auricular. En ciertas realizaciones, también se puede usar una composición de diferentes rutas de administración. Pueden usarse procedimientos tales como la administración intramioocárdica mediante catéteres endovasculares de inyección, infusión intravascular en la arteria que alimenta al órgano diana (corazón, riñón) para la administración de las composiciones de la invención.
- 10

La dosis exacta de las composiciones la determina fácilmente un experto en la técnica dependiendo de una variedad de factores, que incluyen propiedades farmacocinéticas, condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), extensión de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

15 Según una realización, las composiciones de la invención se administran antes o al comienzo de la cirugía de injerto de derivación de arteria coronaria. Según una realización, después de la etapa principal de la cirugía, las composiciones de la invención se inyectan en toda el área visible de los cuatro panículos adiposos epicárdicos principales (como se ilustra en la Figura 6).

20 Según una realización adicional, las composiciones de la invención se administran a una dosis de toxina botulínica de aproximadamente 50 U/1 ml en al menos un panículo adiposo epicárdico, preferiblemente en cada panículo adiposo.

25 **Combinación**

Según la invención, las formulaciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar solas o en combinación con un co-agente útil en la prevención y/o tratamiento de arritmias cardíacas, en particular fibrilación auricular o hipertensión arterial, por ejemplo, un co-agente seleccionado de una sustancia antiarrítmica de clases I, II, III (tal como procainamida, amidaron, sotalol).

30 La invención abarca la administración de una formulación farmacéutica a un individuo antes, simultánea o secuencialmente con otros regímenes terapéuticos/profilácticos o co-agentes en la prevención o tratamiento de arritmias cardíacas, en particular fibrilación auricular o hipertensión arterial (por ejemplo, régimen combinado), en una cantidad terapéuticamente efectiva. Una formulación farmacéutica que se administra simultáneamente con dichos co-agentes se puede administrar en la misma composición o composiciones diferentes y mediante la misma o diferentes vías de administración.

*Pacientes*

40 En una realización, los pacientes según la invención son pacientes que padecen un trastorno seleccionado entre arritmia cardíaca, en particular fibrilación auricular e hipertensión arterial.

45 En otra realización, los pacientes según la invención son pacientes con riesgo de sufrir un trastorno seleccionado entre arritmia cardíaca, en particular fibrilación auricular, por ejemplo pacientes sometidos a cirugía de injerto de derivación de arteria coronaria (CABG), cirugía de válvula cardíaca u otra cirugía a corazón abierto, que se asocian con un riesgo del 30 % de fibrilación auricular en el período postoperatorio temprano (Filardo y col., 2009, Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes, 2:164-169).

50 En una realización particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen arritmia cardíaca.

En una realización particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen de hipertensión arterial.  
*Uso según la invención*

55 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para inducir una disminución de las arritmias cardíacas, en particular de la fibrilación auricular en un sujeto mediante el uso de una formulación o combinación como se describe en esta invención.

60 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para inducir una disminución en la liberación de renina y/o presión sanguínea en un sujeto que lo necesita, mediante el uso de una formulación o combinación como se describe en esta invención.

65 La formulación o combinación según la invención se administra en una cantidad y de acuerdo con un régimen de dosificación que sea efectivo para inducir una disminución de las arritmias cardíacas y/o de la presión arterial.

En otra realización de la invención se proporciona un procedimiento para evitar, reprimir o tratar arritmias cardíacas,

en particular en fibrilación auricular, o hipertensión arterial, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación farmacéutica según la invención. Según otro aspecto, las formulaciones de las invenciones podrían ser utilizadas en diferentes áreas de la medicina, donde solo se usa toxina botulínica, es decir, no solo para el tratamiento de trastornos del ritmo cardíaco, ya que el principal efecto que logran las formulaciones de la invención es un bloqueo de la liberación del neuromediador del terminal presináptico del sistema nervioso y no hay diferencias histológicas y citológicas principales entre estas composiciones sinápticas en otras zonas del cuerpo humano.

Según un aspecto, las formulaciones de la invención deben administrarse en PG intramiocárdicos y panículos adiposos epicárdicos.

#### **Procedimiento de preparación de formulaciones de la invención**

Las composiciones de la invención se pueden preparar mezclando soluciones acuosas de los componentes en proporciones predeterminadas.

La ventaja de una formulación de la invención es que se puede preparar a partir de toxina botulínica pura de tipo A o de un producto disponible comercialmente a base de toxina botulínica de tipo A que permita la preparación de la solución requerida a partir de los componentes disponibles directamente en la práctica clínica.

Las formulaciones de la invención permiten lograr un aumento en el efecto de la toxina botulínica de tipo A, al tiempo que reducen los efectos secundarios del efecto sistémico y producen inmunorresistencia (La sustancia de la invención usa mucopolisacáridos para crear una protección mecánica de la molécula y retrasar la distribución de la molécula de la toxina botulínica a partir del lugar específico). Las moléculas de quitosano son neutrales y cubren mecánicamente los centros inmunorreactivos de la toxina botulínica. (Katherine Bowman y col., 2006, Int. J. Nanomedicine, 1(2): 117-128).

La ventaja de la composición de toxina botulínica de la invención es que permitiría reducir la dosis terapéutica necesaria, al tiempo que aumenta la duración del efecto del fármaco, así como también reduce los efectos secundarios como la desnervación indeseable de los músculos no utilizados y el desarrollo de efectos sistémicos.

Una ventaja adicional es la posibilidad de su preparación en la clínica directamente a partir de productos disponibles comercialmente, lo que permite ajustar las propiedades requeridas, en función de la diana de aplicación. El tratamiento de la fibrilación auricular requiere la administración epicárdica de la composición, donde la propiedad prioritaria del quitosano es la liberación por elongación de la toxina botulínica (toxina botulínica tipo A y quitosano en una proporción de 1 a  $4,4 \times 10^7$  en peso). El tratamiento de la hipertensión arterial requiere la infusión intraarterial renal de la composición, donde la propiedad prioritaria del quitosano es un aumento de las propiedades adhesivas de la toxina botulínica para la membrana yuxtaglomerular (toxina botulínica tipo A y quitosano en una proporción de 1 a  $4 \times 10^5$  en peso). Con una proporción creciente de componentes activos (toxina botulínica tipo A/mucopolisacárido de la invención) por encima de 1:10<sup>9</sup> en peso, existen dificultades para preparar preparaciones inyectables terapéuticamente aceptables. Por ejemplo, en una proporción de toxina botulínica tipo A/quitosano igual a 1:109 y 40 U de actividad de toxina botulínica (equivalente a 1 ng), la cantidad necesaria de quitosano es 1 gramo que conduce a un volumen de inyección de 50 ml para concentraciones clínicamente relevantes de quitosano en inyección al 2 %. Esta cantidad es excesiva para la terapia. Con la disminución de la proporción de componentes activos en la composición (toxina botulínica tipo A/mucopolisacárido) por debajo de 1:103 en peso, la eficiencia de la composición se reduce significativamente y se acerca a la eficiencia de las formulaciones convencionales de toxina botulínica tipo A. En otra realización, se proporciona un kit medicinal que comprende, en forma de compartimentos, un primer compartimento o serie de compartimentos que comprende una composición de la invención y un segundo compartimento o serie de compartimentos que comprende una jeringa para inyección con instrucciones de uso.

Los ejemplos que ilustran la invención se describirán en lo sucesivo de manera más detallada y en referencia a las realizaciones representadas en las Figuras.

#### **EJEMPLOS**

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

#### **Ejemplo 1. Preparación de composición farmacéutica (N° 1) que contiene toxina botulínica tipo A y quitosano en proporción de 1 a $4,4 \times 10^7$ en peso**

Para preparar la solución de toxina botulínica tipo A en todos los experimentos, las preparaciones comerciales de toxina botulínica tipo A «Kseomin™» producidas por MERZ PHARMA GmbH & Co., KGaA (Alemania), número de registro LSR- 004746/08, auxiliares, se utilizaron sacarosa y albúmina de suero humano, o «Lantoxs™» producido por el Instituto Lanzhou de Productos Biológicos, (China), número de registro LSR-001587/08, auxiliares: gelatina, dextrano y sacarosa.

En ambos casos se utilizaron viales que contenían 100 unidades de toxina botulínica. En cada vial se agregaron 1000

ml de solución salina estéril. Las soluciones resultantes se utilizaron para mezclar con la solución de quitosano obtenida como se describe a continuación. Para la preparación de varias soluciones de quitosano, se usó el medicamento «quitosol» producido por «Bioavanta» (Koltsovo, región de Novosibirsk, el grado de desacetilación de este quitosano es de al menos 90 %, su peso molecular promedio de ~ 500 kDa y se prepara a partir de caparazones de cangrejo). Para preparar 100 ml de solución de quitosol al 2,2 %, se disolvieron 1,1 g de ácido succínico y 0,9 g de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada calentando en un horno de microondas. Después de la disolución completa del ácido y la sal, se introdujeron 2,2 g de Quitosol en pequeñas porciones antes de que la disolución completa de cada porción añadida se mezclara y triturara con paleta.

10 El calentamiento se lleva a cabo durante 1 hora en un horno microondas en modo pulsado (1/6 de tiempo a una capacidad de 600 W). Para excluir la formación de aglomerados, la solución se sometió a tratamiento en un limpiador de ultrasonido durante 10 minutos (después de agregar quitosano).

15 La composición farmacéutica se preparó mezclando en una jeringa de 1 ml equipada con un sistema Luer-Lok Tip, 100 ml de solución de toxina botulínica tipo A (conteniendo 10 U o 0,25 ng de toxina botulínica tipo A) y 400 ml de solución de quitosano al 2,75 % (que contiene 11 mg de quitosano). El resultado fue una composición farmacéutica líquida que comprende los siguientes componentes:

toxina botulínica tipo A	20 IU / ml (0,5 ng / ml)
quitosano	22 mg / ml
solución salina	0,5 ml.

20 **Ejemplo 2. Preparación de composición farmacéutica (Nº 2) que contiene toxina botulínica tipo A y quitosano en proporción de 1 a  $1,76 \times 10^7$  en peso**

La composición farmacéutica se preparó mezclando en una jeringa de 2 ml. Se preparó la solución de 100 unidades de toxina botulínica en 400 ml de solución salina y se utilizó (contiene 100 unidades, o 2,5 ng de toxina botulínica tipo A) para mezclar con 1600 ml de solución de quitosano al 2,75 % (conteniendo 44 mg de quitosano).

El resultado fue una composición farmacéutica líquida que comprende los siguientes componentes:

toxina botulínica tipo A	50 IU / ml (1,25 ng / ml)
quitosano	22 mg / ml
solución salina	hasta 2 ml.

30 **Ejemplo 3. Preparación de composición farmacéutica (Nº 3) que contiene toxina botulínica tipo A y heparina en proporción de 1 a  $1,6 \times 10^7$  en peso (formulación comparativa no de la invención)**

35 Se utilizó una solución de heparina con una concentración de 5000 UI/ml (producción de la empresa Synthesis, Kurgan, Rusia, número de registro del fármaco P N000116/01). Una unidad de heparina equivale a 0,0077 mg de heparina estándar internacional, es decir, 1 mg contiene 130 UI (Pershyn GN, Gvozdeva EI Textbook of Pharmacology - Moscú: Medgiz, 1961 - s.405). La composición farmacéutica se preparó mezclando 100 ml de solución de toxina botulínica tipo A (que contiene 10 U o 0,25 ng de toxina botulínica tipo A), 104 ml de solución de heparina que contiene 4 mg de heparina (~ 520 UI) y 500 ml de solución salina. La composición farmacéutica comprende:

toxina botulínica tipo A	20 IU / ml (0,5 ng / ml)
heparina	1040 IU / ml (8 mg / ml)
solución salina	0,5 ml.

40 **Ejemplo 4. Preparación de composición farmacéutica (Nº 4) que contiene toxina botulínica tipo A y heparina en proporción de 1 a  $5,3 \times 10^6$  en peso (formulación comparativa no de la invención)**

45 De manera análoga al Ejemplo 3, para obtener la composición farmacéutica, se mezclaron 300 ml de solución de toxina botulínica tipo A (conteniendo 30 U o 0,75 ng de toxina botulínica tipo A), 104 ml de solución de heparina, conteniendo 4 mg de heparina (~ 520 UI) y 500 ml de solución salina. La composición farmacéutica que comprende:

toxina botulínica tipo A	60 IU / ml (1,5 ng / ml)
heparina	1040 IU / ml (8 mg / ml)
solución salina	hasta 500 µl.

50 **Ejemplo 5. Preparación de composición farmacéutica (Nº 5) que contiene toxina botulínica tipo A y nadroparina en proporción de 1 a  $8 \times 10^6$  en peso (formulación comparativa no de la invención)**

Para el experimento se utilizó una solución de fraxiparina (nadroparina), (Sanofi Winthrop Industry, Francia, número de registro P N012486/01) con una concentración de 9500 UI por ml. Hemos aceptado una unidad de acción de heparina de bajo peso molecular - nadroparina (peso molecular medio - 4000-7000 Da) igual a una unidad de heparina, es decir, 0,0077 mg.

- 5 Para la preparación de la composición farmacéutica, se mezclaron 100 ml de solución de toxina botulínica tipo A (conteniendo 10 unidades o 0,25 ng de toxina botulínica tipo A), 27 ml de solución de nadroparina, conteniendo 2 mg de nadroparina ( $\sim 260$  UI) y solución salina hasta 500 ml. La composición farmacéutica comprende:

toxina botulínica tipo A	20 IU / ml (0,5 ng / ml)
nadroparina	520 IU / ml (4 mg / ml)
solución salina	0,5 ml.

10 **Ejemplo 6. Preparación de composición farmacéutica (N° 6) que contiene toxina botulínica tipo A y nadroparina en proporción de 1 a  $2,67 \times 10^6$  en peso (formulación comparativa no de la invención)**

15 Para preparar una composición farmacéutica se mezclaron 300 ml de solución de toxina botulínica tipo A (que contiene 30 U o 0,75 ng de toxina botulínica tipo A), 27 ml de solución de nadroparina que contiene 2 mg de nadroparina ( $\sim 260$  UI) y 500 ml de solución salina. Una composición farmacéutica que comprende:

toxina botulínica tipo A	60 IU / ml (1,5 ng / ml)
nadroparina	520 IU / ml (4 mg / ml)
solución salina	0,5 ml

20 **Ejemplo 7. Preparación de una composición farmacéutica (N° 10) que contiene toxina botulínica tipo A y quitosano en proporción de 1 a  $2 \times 10^9$  en peso**

25 De manera análoga al Ejemplo 1, se preparó una solución al 5 % de quitosano en solución salina. Se utilizaron 10 ml de esta solución para disolver 100 U de toxina botulínica tipo A (que contenía 100 ng o 2,5 unidades de toxina botulínica tipo A y 500 mg de quitosano). El resultado fue una composición farmacéutica líquida que comprende los siguientes componentes:

toxina botulínica tipo A	10 IU / ml (0,25 ng / ml)
quitosano	50 mg / ml
solución salina	hasta 10ml

30 **Ejemplo 8. Preparación de una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica tipo A e hialuronato de sodio (ejemplo comparativo no de la invención).**

35 La composición farmacéutica se preparó mezclando en jeringa de 1 ml equipada con un sistema Luer-Lok Tip, 100 ml de solución de toxina botulínica tipo A (que contiene 20 U o 0,5 ng de toxina botulínica tipo A) y 400 ml de hialuronato de sodio al 1 % (que contiene 4 mg de hialuronato de sodio, Sigma-aldrich cat#53747). El resultado fue una composición farmacéutica líquida que comprende los siguientes componentes:

toxina botulínica tipo A	20 U/ml (0,5 ng/ml)
hialuronato de sodio	10 mg/ml
solución salina fisiológica	hasta un volumen de 0,5 ml

**Ejemplo 9. Pruebas biológicas de las composiciones farmacéuticas obtenidas.**

40 La eficacia y seguridad de las composiciones farmacéuticas de la invención (N° 1-6) se realizó en comparación con soluciones de preparaciones comerciales de toxina botulínica tipo A en solución salina y con composiciones farmacéuticas que comprenden toxina botulínica tipo A y otro mucopolisacárido distinto del quitosano o la heparina. (N° 3 y 4) a la misma dosis, expresada en unidades.

45 El estudio se realizó en el marco de las «Buenas Prácticas de Laboratorio», de acuerdo con los estándares legales y éticos del tratamiento de los animales, y la aprobación del comité de ética local. Para cada experimento se utilizaron dos grupos de 10 animales experimentales, ratas Wistar. A cada grupo se le inyectó en el muslo derecho toxina botulínica tipo A, diluida en una solución de cloruro de sodio al 0,9 % (solución salina); la composición farmacéutica (N° 1-6) se administró en el muslo izquierdo.

Anestesia: éter

50 Volumen de inyección: 0,5 ml en cada muslo.

Procedimiento de administración: por vía intramuscular, tres puntos de inyección (dorso, medial, superficie lateral del muslo), 0,16 ml en cada uno.

La comparación de las formulaciones se llevó a cabo evaluando la reducción de los músculos del muslo en respuesta a la estimulación eléctrica. Se comparó el cambio mínimo de umbral de electroestimulación intramuscular a lo largo del tiempo. La medición del umbral de electroestimulación se llevó a cabo por vía intramuscular utilizando dos microelectrodos de acero estériles y un dispositivo ERA 300 (Biotronic, EE. UU.). Estos microelectrodos, durante el período de medición, se insertaron temporalmente por vía intramuscular a una profundidad de aproximadamente 4 mm en el área exterior del muslo del ratón, a 10 mm de distancia entre sí. Por ejemplo, si el umbral mínimo de electroestimulación intramuscular fue  $4,0 \pm 0,2$  V para la composición N° 1, y  $2,0 \pm 0,12$  V para el control, el efecto fisiológico de la composición N° 1 en el momento de la medición se incrementa 2 veces en comparación con una preparación comercial de toxina botulínica.

Antes de las inyecciones, se observó una alta actividad general (movimiento hacia la jaula de las ratas) en los animales experimentales de diferentes grupos. Durante el primer día después del procedimiento de inyección, los animales fueron expuestos al fenómeno residual de la sedación por el fármaco. Una semana después de la inyección, se observó parálisis de las extremidades inferiores, pero movimiento debido a las extremidades superiores, en todas las ratas (evidencia clínica de la acción de la toxina botulínica). Los umbrales máximos de estimulación eléctrica intramuscular fueron para las composiciones: N° 1:  $4,0 \pm 0,1$  V (control  $2,5 \pm 0,1$  V, inicialmente  $1,5 \pm 0,1$  V), N° 2:  $10,0 \pm 0,4$  V (control  $3,0 \pm 0,1$  V, inicialmente  $1,0 \pm 0,1$  V).

2 semanas después de la inyección, se observó parálisis de las extremidades inferiores, pero movimiento debido a las extremidades superiores, en todas las ratas. Las ratas perdieron peso y mostraron denegación de comida y agua. Los umbrales máximos de estimulación eléctrica intramuscular fueron para las composiciones: N° 1:  $6,0 \pm 0,3$  V (control  $2,5 \pm 0,2$  V), N° 2:  $10,0 \pm 0,5$  V (control  $2,3 \pm 0,1$ ).

3 semanas después de la inyección, se observó parálisis de las extremidades inferiores, pero movimiento debido a las extremidades superiores, en todas las ratas. Se incrementó la dinámica de la actividad de las ratas. Ellas bebieron activamente y comieron normalmente. Los umbrales máximos de estimulación eléctrica intramuscular fueron para las composiciones: N° 1:  $4,0 \pm 0,1$  V (control  $2,0 \pm 0,1$  V), N° 2:  $5,0 \pm 0,2$  V (control  $1,8 \pm 0,1$ ). 4 semanas después de la inyección, las ratas están objetivamente activas y solo se observó todavía parálisis de las extremidades inferiores.

Los umbrales máximos de estimulación eléctrica intramuscular fueron para las composiciones: N° 1:  $4,0 \pm 0,2$  V (control  $2,0 \pm 0,12$  V), N° 2:  $5,0 \pm 0,3$  V (control  $2,0 \pm 0,2$ ).

Para las composiciones N° 3-6, el efecto máximo no se observó durante la primera semana después de la inyección, pero se encontró durante la segunda semana; pero el valor absoluto de las diferencias con el control no fue tan grande como en el caso del quitosano. Así, para la composición comparativa N° 3, los umbrales máximos de estimulación eléctrica intramuscular durante la segunda semana fueron  $1,8 \pm 0,1$  V (control  $2,3 \pm 0,1$  V, inicialmente  $1,0 \pm 0,1$  V), y para la composición N° 5:  $2,2 \pm 0,1$  V (control  $1,5 \pm 0,1$  V, inicialmente  $1,2 \pm 0,1$  V) y composición comparativa N° 11:  $1,5 \pm 0,1$  V (control  $2,6 \pm 0,2$  V, inicialmente  $1 \pm 0,1$  V). Probablemente la heparina retiene con bastante firmeza la toxina botulínica de tipo A, previniendo sus efectos biológicos en comparación con las preparaciones comerciales, mientras que la nadroparina de bajo peso molecular, en cambio, potencia la acción de la toxina botulínica. Además, esto es respaldado por la ausencia de efectos significativos para la formulación comparativa 4 en comparación con la formulación N° 6.

Se evaluó la toxicidad potencial de las formulaciones de la invención mediante estudio histomorfológico a través de examen histológico de órganos internos de animales experimentales. Tras el análisis microscópico de muestras de tejido de hígado, riñón, bazo, corazón, músculo esquelético y cerebro, fijadas con formalina e incluidas en parafina, no se encontraron signos morfológicos de cambios patológicos. Por tanto, se concluyó la ausencia de influencia dañina de la toxina botulínica tipo A y las formulaciones farmacéuticas de la invención a las dosis de prueba sobre tejidos y órganos de animales experimentales.

#### **Ejemplo 10. Investigación de la supresión de la inducción de la fibrilación auricular mediante la inyección de una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica tipo A en el panículo adiposo epicárdico**

La prueba se realizó en un grupo de 10 perros utilizando una composición farmacéutica N° 2. Los panículos adiposos epicárdicos, que contienen el plexo ganglionar central derecho de la aurícula izquierda, se asignaron a través de la toracotomía lateral derecha.

En el grupo de experiencia (5 perros), en cada uno de los dos panículos adiposos derechos se introdujo 1 ml de solución de 50 U de toxina botulínica tipo A + quitosano (100 unidades de toxina botulínica tipo A-2 ml, composición N° 2). En el grupo control (5 perros), en cada uno de los dos panículos adiposos se introdujo 1 ml de solución de 50 unidades de toxina botulínica tipo A + cloruro sódico al 0,9% (100 UI de toxina botulínica tipo A-2 ml).

Los efectos electrofisiológicos se evaluaron después de 1, 2, 3 y 4 semanas después de la inyección, con y sin estimulación del nervio vago cervical. La fibrilación auricular se logró en ambos grupos de perros mediante la estimulación del nervio vago cervical. Este efecto fue bloqueado por la administración de las soluciones de prueba y control de toxina botulínica en las dosis y áreas descritas anteriormente en ambos grupos. En el grupo de control, el bloqueo del efecto vagal desapareció al 8º día después de la inyección (el período de observación). En el grupo de experiencia, el bloqueo del efecto vagal persistió durante más de 30 días después de la inyección. Por lo tanto, la supresión temporal de la fibrilación auricular inducida por estimulación del nervio vago cervical mediante la inyección de toxina botulínica en los panículos adiposos epicárdicos de la aurícula izquierda se extendió a más de 30 días (no menos de 4 veces) utilizando la composición de la invención N° 2.

Estos resultados indican que el uso de una composición farmacéutica de toxina botulínica tipo A de la invención, aumentará la actividad farmacológica de la toxina y reducirá la dosis única necesaria para lograr el efecto terapéutico deseado que permitirá reducir los efectos secundarios de la toxina botulínica. Se obtuvieron resultados similares para la composición N° 6. Las formulaciones comparativas 4 y 11 no pudieron lograr este efecto (Figura 1).

5                   **Ejemplo 11. Efectos de la composición de la invención en comparación con la composición de disacáridos**

10                  La comparación de la eficacia y duración del efecto de la composición farmacéutica de la invención que comprende toxina botulínica y quitosano (N° 2) y una composición comercial registrada que comprende disacárido (Formulación comparativa N° 11) se realizó como sigue. La formulación comparativa N° 11 contiene:

- a) toxina botulínica tipo A (20 U/ml (0,5 ng / ml))
- b) agente estabilizante polisorbato 80 (0,02 vol. %)
- c) sacarosa, a una concentración de 20 mM
- 15                 d) tampón de histidina para mantener el pH de 5,5 a 7,5
- e) solución salina fisiológica (solución salina de cloruro de sodio al 0,9 %) completar hasta un volumen de 0,5 ml.

Se midieron los umbrales de estimulación eléctrica intramuscular del músculo del muslo de rata después de la inyección como se describió anteriormente.

- 20                  Grupo 1 - Formulación N° 2  
                       Grupo 2 - Formulación comparativa N° 11

25                  Los resultados se representan en la Figura 2: Los umbrales máximos de estimulación eléctrica intramuscular fueron para el Grupo 1: (9,8 ± 0,3 V) vs Grupo 2: (2,6 ± 0,1 V); Inicialmente 1,2 ± 0,1 V vs 1,0 ± 0,1 V, respectivamente. Despues de 2 semanas: Grupo 1: 10,0 ± 0,4 V vs Grupo 2: 2,5 ± 0,1 V.  
                      Despues de 4 semanas: Grupo 1: 5,0 ± 0,2 V vs Grupo 2: 2,0 ± 0,1 V.  
                      Despues de 6 semanas: Grupo 1: 3,3 ± 0,2 V; el umbral de estimulación en el Grupo 2 disminuyó hasta cerca del inicial (1,5 ± 0,1 V).

30                  Estos datos apoyan que las formulaciones de la invención que comprenden quitosano y toxina botulínica mostraron una mejor eficacia y un efecto más duradero que la composición comercial registrada que comprende disacárido y toxina botulínica como se describe en la patente RU 2407541.

35                  **Ejemplo 12. Eficacia y seguridad de la supresión de la inducibilidad de la fibrilación auricular utilizando quitosano + toxina botulínica tipo A composición 1: 1,76X10<sup>7</sup> y formulaciones comerciales de toxina botulínica**

40                  Estudios previos en animales sugieren que la inyección de toxina botulínica en los panículos adiposos epicárdicos puede suprimir la inducibilidad de la fibrilación auricular (FA). El objetivo del presente estudio fue comparar la eficacia y seguridad de la inyección de toxina botulínica endocárdica *en los panículos adiposos epicárdicos y en el plexo ganglionar (PG) de la aurícula izquierda intramiocárdico para prevenir la FA usando quitosano + toxina botulínica tipo A (1:1,76x10<sup>7</sup>) (formulación de la invención (N° 2) y formulaciones comerciales de toxina botulínica.*

45                  En 30 perros, se introdujeron catéteres transvenosos en la aurícula izquierda. Los sitios donde los reflejos vagales fueron evocados por estimulación de alta frecuencia (EAF) se marcaron en un sistema de mapeo electroanatómico y a continuación se designaron para inyección. Se administraron inyecciones intramiocárdicas (10 U/0,2 ml en cada una) de toxina botulínica en 7 sitios por perro. Además, se realizaron 3 inyecciones por perro en los panículos adiposos epicárdicos que contienen el PG anterior derecho, inferior derecho y superior izquierdo (50 U/1 ml en cada una) también por estrategia endocárdica (Figura 4). Los reflejos vagales por HFS y la inducibilidad de la FA se evaluaron antes de las inyecciones y luego cada 2 semanas hasta el regreso de todos los cambios a la línea de base (referencia) mediante la reposición precisa del catéter y la estimulación sobre los sitios de PG marcados en el mapa previamente registrado. A 15 de 30 perros se les inyectó quitosano + composición de toxina botulínica (1:1,76X10<sup>7</sup>), a otros 15 de 30 perros se les inyectó toxina botulínica (Xeomin, Alemania).

55                  A las 2 semanas después del procedimiento, todos los perros demostraron una eliminación completa de la respuesta vagal y a continuación una recuperación completa a los valores de referencia a las 14,7 ± 1,5 semanas en el grupo Xeomin y a las 20,1 ± 1,8 semanas en el grupo quitosano + toxina botulínica ( $p<0,05$ ; (Figura 5)). El umbral de estimulación que indujo FA aumentó de 4,9 ± 0,6 V al inicio del estudio a 12,4 ± 2,5 V a las 2 semanas en el grupo Xeomin y de 5,6 ± 1,2 V al inicio del estudio a 16,3 ± 2,2 V, en el grupo quitosano + toxina botulínica correspondientemente ( $p<0,05$ ). No se produjeron complicaciones relacionadas con el procedimiento.

60                  Estos datos sugieren que la inyección de toxina botulínica en PG intramiocárdicos y panículos adiposos epicárdicos mediante una estrategia endocárdica fue factible y segura, y proporcionó la abolición completa de respuestas vagales cardíacas y una supresión significativa de la FA. La composición de quitosano + toxina botulínica tipo A (1:1,76X10<sup>7</sup>) es más eficaz y tiene una duración de acción prolongada que una formulación comercial de toxina botulínica tipo A (Xeomin, Alemania).

**Ejemplo 13. Eficacia y seguridad de la supresión de la hipertensión arterial utilizando la composición de quitosano + toxina botulínica tipo A (1:4,4X10<sup>7</sup>), composición 1:1,76X10<sup>7</sup>) y formulaciones comerciales de toxina botulínica**

5 Estudios in vitro previos sugieren que la inyección de toxina botulínica en el riñón de rata suprime la liberación de renina activa y conduce a una disminución de la presión arterial. (Mendez y col., 2013, Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 304:F498-F504). El objetivo del presente estudio fue comparar la eficacia y seguridad de la infusión de toxina botulínica en arterias renales para prevenir la hipertensión arterial utilizando formulaciones de la invención, en particular quitosano + toxina botulínica tipo A (formulación de la invención N° 1, 1:4,4X10<sup>7</sup>), quitosano + toxina botulínica tipo A (formulación de la invención N° 2, 1:1,76X10<sup>7</sup>) y formulaciones comerciales de toxina botulínica (Xeomin, Alemania).

10 En 9 cerdos, catéteres transvenosos se pasaron secuencialmente a la arteria renal izquierda y derecha. Se administró infusión intrarrenal (50 U/1 ml) de toxina botulínica al riñón de cada cerdo (para la composición N° 1: 3 cerdos; composición N° 2: 3 cerdos; formulación comercial de toxina botulínica: 3 cerdos). Se incluyeron 3 cerdos en el grupo Placebo con infusión de 1 ml de solución salina fisiológica (solución salina de cloruro de sodio al 0,9 %) en cada arteria renal. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. 1 semana después del procedimiento, se explantaron todos los riñones. Los riñones se descapsularon y homogeneizaron. Las células obtenidas se incubaron en una solución que contenía 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina y suero de ternero fetal al 5 % a 37°C/5 % de CO<sub>2</sub> en placas recubiertas de poli-D-lisina (0,1 mg/ml). Las células se privaron de suero durante 2 h reemplazando el medio con una solución sin suero que contenía 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina. La liberación de renina se estimuló aumentando los niveles intracelulares de AMPc con forskolina (10 mM) más 3-isobutil-1-metilxantina (0,5 mM) durante 1 h. Después del tratamiento, el medio se centrifugó para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes se recogieron en tubos nuevos y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. El análisis del contenido de renina estimulado en el sobrenadante se realizó usando un kit ELISA de reactivo renina (R&D Systems, EE. UU.).

15 Al final de 1 semana después del procedimiento de infusión, se midieron los siguientes valores medios de concentración de Renina (%) en las muestras sobrenadantes: formulación de la invención N° 1, (1:4,4X10<sup>7</sup>) - 2,8±0,5 %; formulación de la invención N° 2, (1:1,76X10<sup>7</sup>) - 1,5±0,2 %; formulaciones comerciales de toxina botulínica (Xeomin, Alemania) - 4,2 ±1,2 %; grupo placebo (solución salina de cloruro de sodio al 0,9 %) - 4,8±1,4 %. No se produjeron complicaciones relacionadas con el procedimiento.

20 Estos datos sugieren que la infusión de toxina botulínica en las arterias renales para prevenir la hipertensión arterial fue factible y segura, y proporcionó una reducción significativa en la liberación de renina, que es una enzima clave en el procedimiento de aumento de la presión arterial. La composición N° 2 de quitosano + toxina botulínica tipo A (1:1,76X10<sup>7</sup>) es más eficaz que la composición N° 1 de quitosano + toxina botulínica tipo A (1:4,4X10<sup>7</sup>) y una formulación comercial de toxina botulínica tipo A (Xeomin, Alemania).

25 **Ejemplo 14. Efectos de la composición de quitosano y toxina botulínica con diferentes proporciones de peso de toxina a quitosano**

30 Las características que permiten mejorar el efecto de la acción de la toxina botulínica según el lugar de la inyección se revelaron mientras se investigaba una proporción óptima de quitosano + toxina botulínica. Para un mayor contenido de quitosano, prevalece la función de liberación de alargamiento de la composición. Contenidos más altos de quitosano son adecuados para la administración de la composición en el tejido adiposo, donde se pueden alcanzar concentraciones terapéuticas de toxina botulínica mediante una liberación lenta.

35 Por el contrario, cuando la composición se administra en áreas diana como la arteria renal y el miocardio ventricular, donde hay contacto directo con el sistema de suministro de sangre, se requiere lograr rápidamente una concentración terapéutica y un aumento de la exposición a la toxina botulínica. Este requisito se satisface reduciendo la proporción quantitativa de quitosano, que a su vez conduce a la función de adhesión predominante de la composición.

40 Como se muestra en la Figura 3, cuando se incrementa la concentración de quitosano en las formulaciones, es decir, cuando la relación en peso de toxina botulínica a quitosano disminuye en la composición (de 1:1,76X10<sup>7</sup> (N° 2) a 1:4,4X10<sup>7</sup> (N° 1) la tasa y el perfil de liberación de la toxina botulínica también se modifican y, correspondientemente, se modifica la eficacia dirigida al lugar, mientras que la duración de la acción varía ligeramente. Sin embargo, la eficacia sigue siendo el doble de la de una formulación comercial de toxina botulínica.

45 Cuando se realiza una inyección endomiocárdica, la toxina botulínica se diluye más en comparación con la inyección de toxina botulínica en los panículas adiposos epicárdicos. Correspondientemente, las inyecciones epicárdicas de quitosano + toxina botulínica necesitan otra relación de concentración (tiende a 1:4,4X10<sup>7</sup>), que permite obtener una buena eficacia y reduce los riesgos de eventos adversos graves, mientras que una inyección endomiocárdica necesita una relación de concentración que tiende a 1:1,76X10<sup>7</sup> obteniendo concentración terapéutica en el lugar diana.

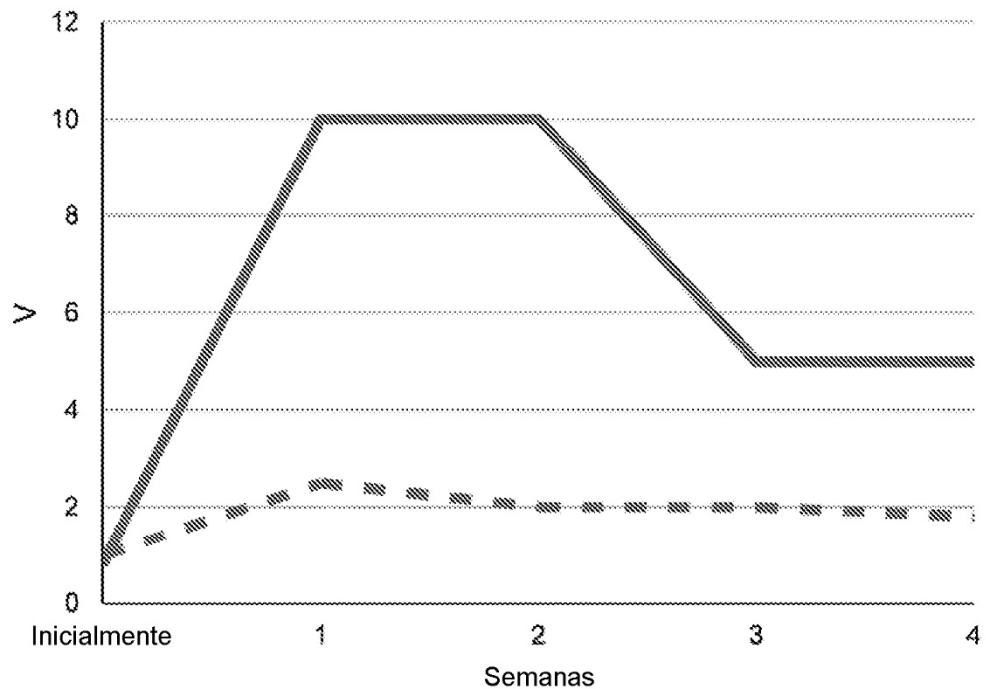
50 Este hecho se confirma comparando la eficacia de la relación de concentración 1:4,4 X10<sup>7</sup> y 1:1,76 X10<sup>7</sup> según el procedimiento descrito en el Ejemplo 12 (solo con inyección intramiocárdica). A las 2 semanas después del procedimiento, todos los perros demostraron una eliminación completa de la respuesta vagal. El umbral de

estimulación que indujo FA aumentó de  $5,1 \pm 0,8$  V en la línea de base (referencia) a  $8,3 \pm 3,1$  V a las 2 semanas en la relación de concentración de grupo 1:4,4  $\times 10^7$  y de  $4,9 \pm 1,1$  V en la referencia a  $15,8 \pm 2,4$  V, en la relación de concentración de grupo correspondientemente 1:1,76  $\times 10^7$  ( $p<0,05$ ).

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición inyectable que comprende una neurotoxina botulínica y un mucopolisacárido, siendo dicho mucopolisacárido quitosano, y un excipiente fisiológicamente aceptable; donde la relación en peso de neurotoxina botulínica a quitosano es de aproximadamente 1:10<sup>3</sup> a aproximadamente 1:10<sup>9</sup>, donde el quitosano tiene un grado de desacetilación de aproximadamente 85 % a aproximadamente 100 % y un peso molecular promedio (Mw) de aproximadamente 100 kg/mol a aproximadamente 1000 kg/mol.
2. Una composición según la reivindicación 1, donde el quitosano tiene un grado de desacetilación de al menos 90 % y un peso molecular promedio (Mw) de aproximadamente 500 kg/mol.
3. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la proporción en peso de neurotoxina botulínica a quitosano es de aproximadamente 1:10<sup>6</sup> a aproximadamente 1:10<sup>8</sup>.
4. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la proporción en peso de neurotoxina botulínica a quitosano es de aproximadamente 1:1,5x10<sup>7</sup> a aproximadamente 1:5x10<sup>7</sup>.
5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la neurotoxina botulínica es neurotoxina botulínica de tipo A.
6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende los siguientes componentes:
- |                          |                |
|--------------------------|----------------|
| toxina botulínica tipo A | 1 - 200 U/ml   |
| quitosano                | 0,1 - 50 mg/ml |
| solución salina          | 0,1 - 50 ml.   |
7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 UI de toxina botulínica.
8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como medicamento.
9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición es una formulación farmacéutica.
10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9, donde la composición comprende además al menos una sustancia antiarrítmica de clase I, II o III.
11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9 para su uso en la prevención y/o tratamiento de arritmias cardíacas o hipertensión arterial.
12. Una composición para su uso según la reivindicación 11 para la prevención o el tratamiento de la fibrilación auricular.
13. Un kit medicinal que comprende en forma compartimental un primer compartimento o serie de compartimentos que comprenden una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9 y un segundo compartimento o serie de compartimentos que comprenden una jeringa para inyección con instrucciones de uso.
14. Un kit medicinal para la preparación de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9, que comprende en forma compartimental un primer compartimento o serie de compartimentos que comprenden una solución de toxina botulínica y un segundo compartimento o serie de compartimentos que comprenden un polvo de quitosano y opcionalmente un vial para la preparación de la formulación con instrucciones de uso.

A



B

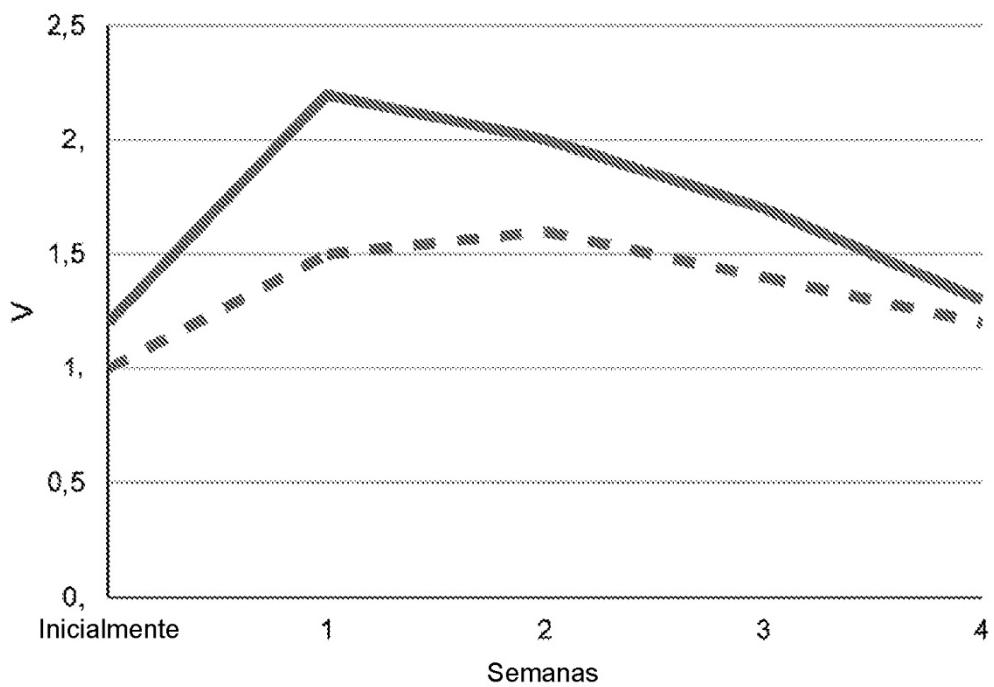
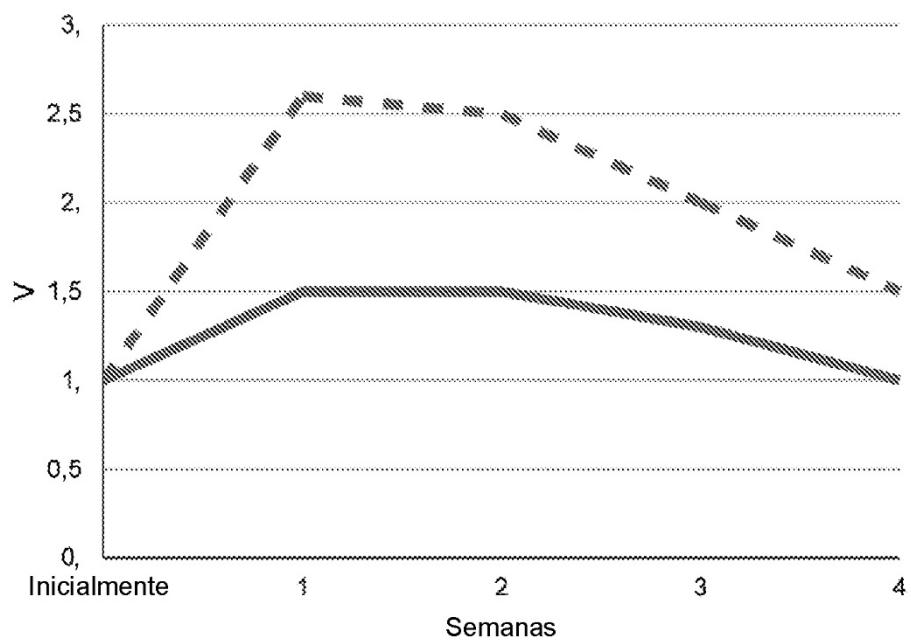


Figura 1

C



D

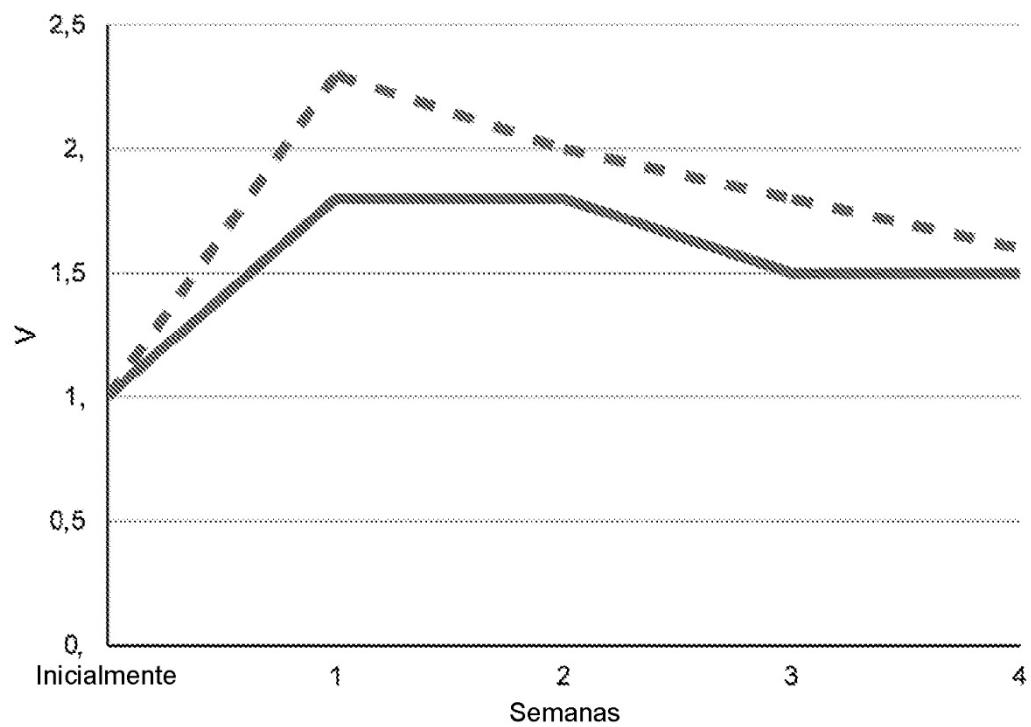


Figura 1

# ES 2 829 614 T3

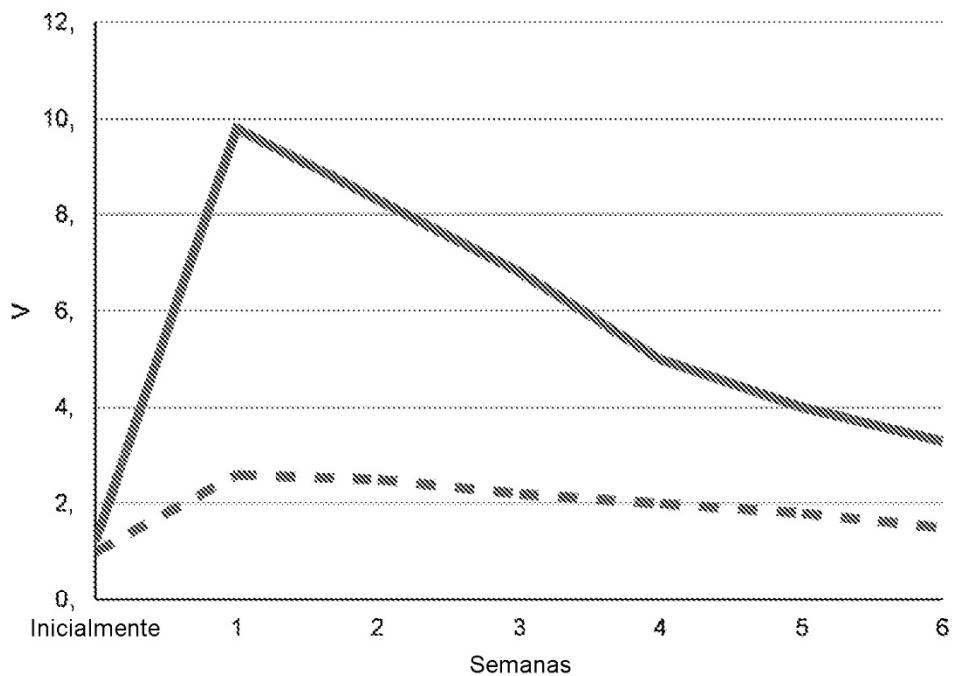


Figura 2

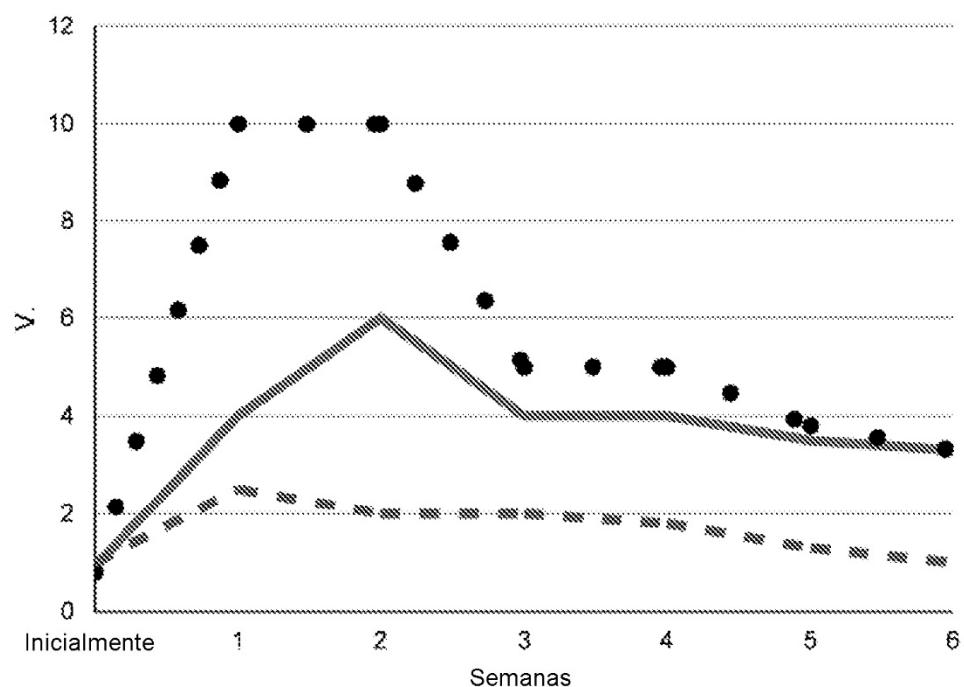


Figura 3

# ES 2 829 614 T3

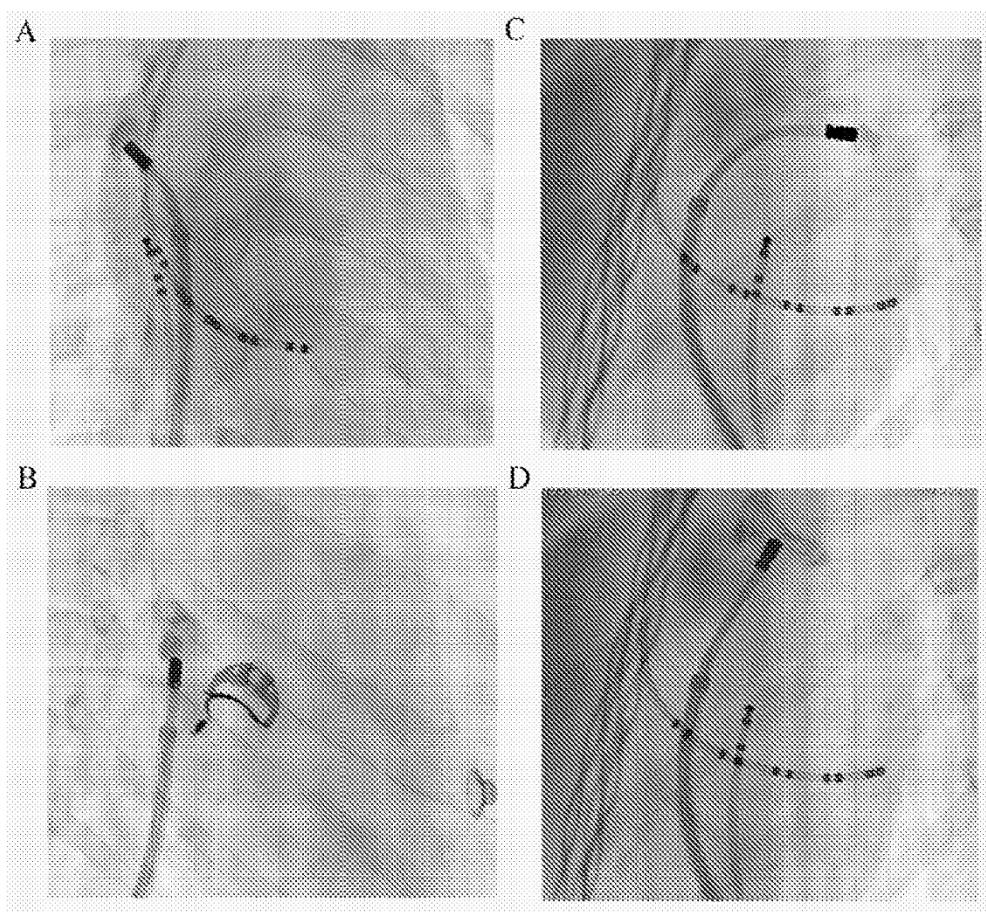


Figura 4

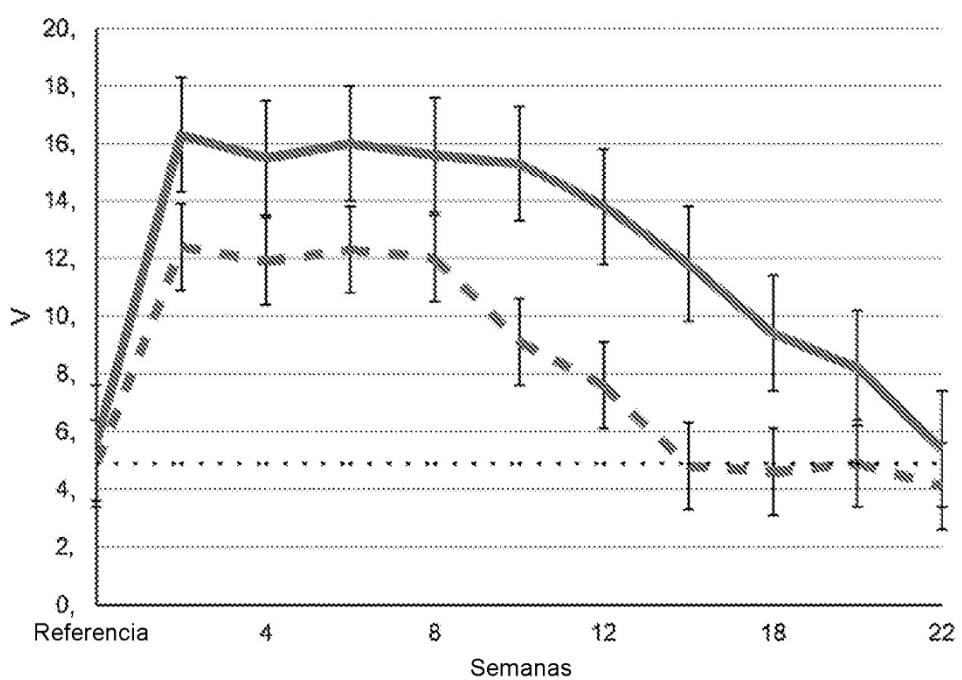


Figura 5

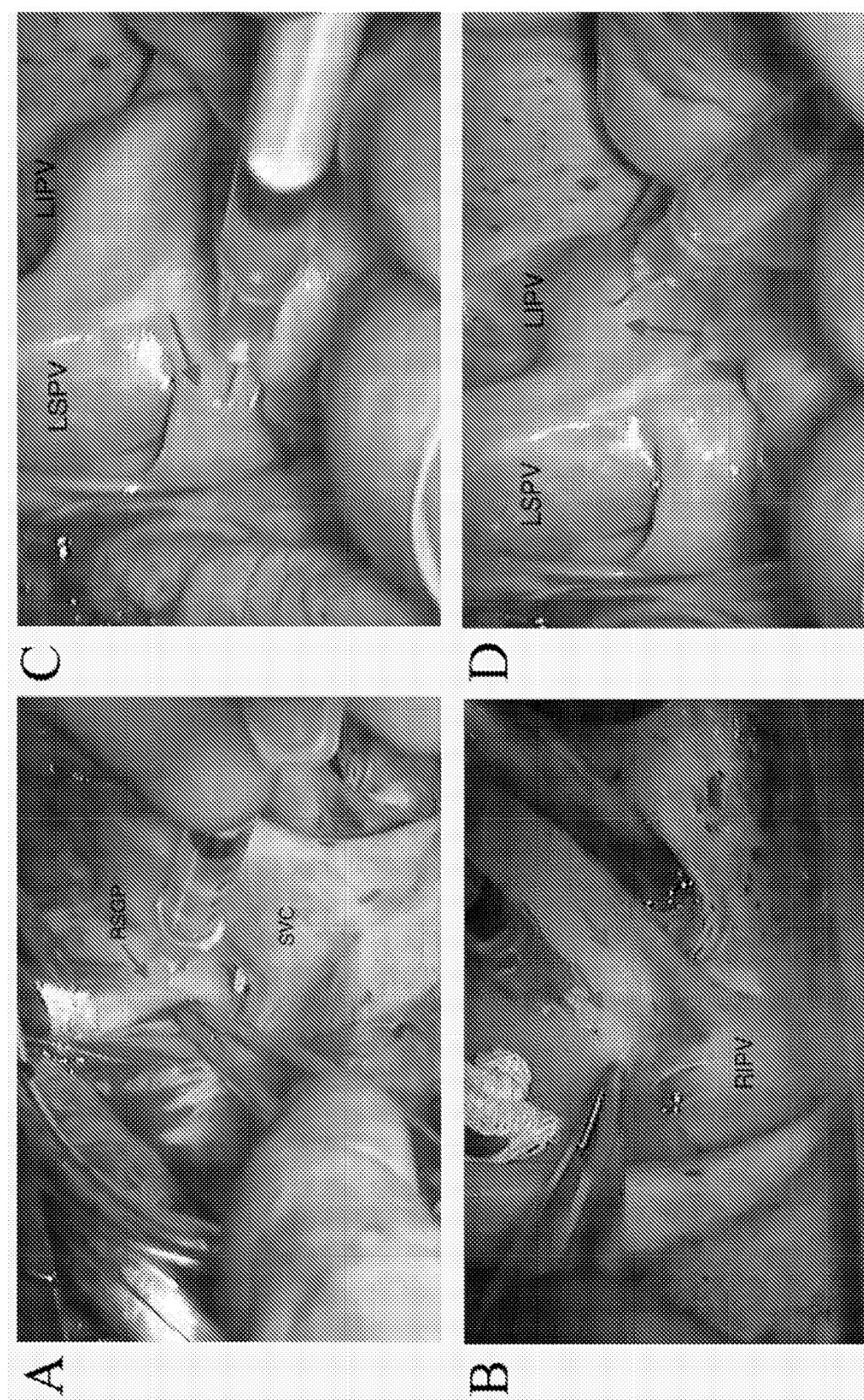


Figura 6