



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 636**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**C07K 14/33** (2006.01)

**A61L 31/16** (2006.01)

**A61P 9/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03716821 .8**

86 Fecha de presentación : **24.03.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1490097**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2004**

54 Título: **Uso de toxina botulínica para tratar enfermedades cardiovasculares.**

30 Prioridad: **01.04.2002 US 114740**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.10.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.10.2007**

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

72 Inventor/es: **Brooks, Gregory, F. y**  
**Donovan, Stephen**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 281 636 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

Uso de toxina botulínica para tratar enfermedades cardiovasculares.

## 5 Antecedentes

La presente invención se refiere a prevenir o reducir la reestenosis que puede producirse en vasos sanguíneos tras expandir mecánicamente el diámetro de un vaso sanguíneo ocluido.

10 La aterosclerosis es una enfermedad progresiva en la que los depósitos grasos, fibrosos, calcíficos o trombóticos producen placas de ateroma, dentro y debajo de la íntima que es la capa más interna de las arterias. La aterosclerosis tiende a implicar arterias de tamaño grande y medio. Las afectadas más comúnmente son las arterias aorta, ilíaca, femoral, coronaria y cerebral. Los síntomas clínicos se producen porque la masa de placa de ateroma reduce el flujo sanguíneo a través de la arteria afectada, comprometiendo así la función del tejido u órgano distal a la misma.

15 La angioplastia coronaria transluminal percutánea es un procedimiento no quirúrgico para tratar la aterosclerosis coronaria. En este procedimiento, se inserta un balón hinchable en una arteria coronaria en la región del estrechamiento arterial. El hinchado del balón durante 15-30 segundos da como resultado una expansión del paso o luz estrechado. Dado que normalmente está presente un estrechamiento residual tras el primer hinchado del balón, se realizan rutinariamente hinchados múltiples o prolongados para reducir la gravedad del estrechamiento residual del tubo.

20 A menudo se usan endoprótesis en combinación con angioplastia de balón coronaria. Normalmente, se usa una endoprótesis para fijar el vaso sanguíneo abierto tras una expansión inicial del vaso sanguíneo estrechado mediante un balón. También se usan endoprótesis de autoexpansión para expandir y mantener abiertos los vasos sanguíneos ocluidos. Diversas endoprótesis y su uso se describen en las patentes de los EE.UU. números 6.190.404; 6.344.055; 6.306.162; 6.293.959; 6.270.521; 6.264.671; 6.261.318; 6.241.758; 6.217.608; 6.196.230; 6.183.506; 5.989.280.

30 Un problema con la angioplastia es que tras el procedimiento puede producirse la reestenosis, o reaparición de la obstrucción. Los desgarrones en la pared exponen la sangre a proteínas y material extraño, tales como colágeno, que son sumamente trombogénicos. Los coágulos resultantes pueden contener hormonas de crecimiento que pueden liberarse por las plaquetas dentro del coágulo. Adicionalmente, la trombosis puede provocar la liberación de hormonas del crecimiento y citocinas por células de macrófagos. Las hormonas del crecimiento pueden provocar que las células de músculos lisos y fibroblastos se agreguen en la región y se multipliquen. Además, tras la angioplastia a menudo hay una pérdida de la única capa de células que normalmente cubre la superficie interna de los vasos sanguíneos, lo que 35 conduce a la trombosis. La combinación del rasgado de la pared del vaso sanguíneo y la pérdida de la capa endotelial a menudo genera una superficie interna del vaso sanguíneo que es bastante trombogénica. La reestenosis puede resultar de la proliferación de células de músculos lisos, que normalmente residen dentro de la pared arterial, en la zona de la lesión en respuesta a la trombosis.

40 Los procedimientos de angioplastia también producen lesiones en la pared arterial que se asocian con la inflamación. Cualquier clase de respuesta inflamatoria puede producir el crecimiento de nuevo tejido, por ejemplo, tejido cicatricial, que puede contribuir a la reestenosis.

45 Una de las otras causas principales de reestenosis tras la angioplastia puede ser que la pared arterial lesionada puede mostrar una hemocompatibilidad reducida comparada con la asociada con una pared arterial normal. Las respuestas adversas que se asocian con hemocompatibilidad reducida incluyen adhesión de plaquetas, agregación y activación; reacciones celulares inflamatorias tales como adhesión y activación de monocitos o macrófagos; y la infiltración de leucocitos dentro de la pared arterial.

50 La reestenosis es un problema grave que puede producirse en alrededor de un tercio de los pacientes con angioplastia coronaria. Por tanto, existe una necesidad de procedimientos para reducir o eliminar la aparición de reestenosis que puede seguir a procedimientos para expandir mecánicamente un vaso sanguíneo ocluido.

## Toxina botulínica

55 La bacteria gram positiva, anaerobia, *Clostridium botulinum* produce una neurotoxina polipeptídica potente, la toxina botulínica, que provoca una enfermedad neurológica en seres humanos y animales denominada botulismo. Las esporas de *Clostridium botulinum* se encuentran en el suelo y pueden crecer en recipientes de alimentos inapropiadamente esterilizados y sellados de conservas caseras, que son la causa de muchos de los casos de botulismo. Los efectos 60 del botulismo aparecen normalmente de 18 a 36 horas tras comer los productos alimenticios infectados con un cultivo o esporas de *Clostridium botulinum*. Aparentemente la toxina botulínica puede pasar sin que haya sido atenuada a través del recubrimiento del intestino y atacar las neuronas motoras periféricas. Los síntomas de intoxicación por toxina botulínica pueden avanzar desde dificultad para andar, tragar y hablar hasta parálisis de los músculos respiratorios y muerte.

65 La toxina botulínica tipo A ("BoNT/A") es el agente biológico natural más letal conocido por el hombre. Aproximadamente 50 picogramos de toxina botulínica (complejo de neurotoxina purificado) de serotipo A es una DL<sub>50</sub> en ratones. Una unidad (U) de toxina botulínica se define como la DL<sub>50</sub> tras la inyección intraperitoneal en ratones Swiss

Webster hembra de 18-20 gramos de peso cada uno. Se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas inmunológicamente distintas siendo, respectivamente, la neurotoxina botulínica de serotipos A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F y G, cada una de las cuales se distingue mediante neutralización con anticuerpos específicos de serotipo. Los diferentes serotipos de la toxina botulínica varían en las especies animales a las que afectan y en la gravedad y duración de la parálisis que provocan. Por ejemplo, se ha determinado que BoNt/A es 500 veces más potente, según se mide mediante la tasa de parálisis producida en la rata, que la toxina botulínica de serotipo B (BoNt/B). Adicionalmente, se ha determinado que la toxina botulínica tipo B ("BoNt/B") no es tóxica en primates a una dosis de 480 U/kg que es aproximadamente 12 veces la DL<sub>50</sub> de primates para BoNt/A. La toxina botulínica se une aparentemente con alta afinidad a neuronas motoras colinérgicas, se traslada dentro de la neurona y bloquea la liberación de acetilcolina.

Las toxinas botulínicas se han usado en prácticas clínicas para el tratamiento de trastornos neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. La BoNt/A se ha aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para el tratamiento de blefaroespasma, estrabismo, espasmo hemifacial y distonía cervical. Adicionalmente, se ha aprobado una toxina botulínica de tipo B por la FDA para el tratamiento de la distonía cervical. Aparentemente los serotipos de toxina botulínica distintos de serotipo A tienen una potencia inferior y/o una duración de actividad más corta comparados con BoNt/A. Los efectos clínicos de BoNt/A intramuscular periférica se observan habitualmente en el plazo de una semana de inyección. La duración típica del alivio sintomático a partir de una única inyección intramuscular de BoNt/A tiene un promedio de aproximadamente tres meses.

Aunque todos los serotipos de toxinas botulínicas inhiben aparentemente la liberación del neurotransmisor acetilcolina en la unión neuromuscular, lo hacen afectando proteínas neurosecretoras diferentes y/o rompiendo estas proteínas en sitios diferentes. Por ejemplo, los serotipos A y E botulínicos rompen ambos la proteína asociada a sinaptosoma de 25 kiloDalton (kD) (SNAP-25), pero seleccionan como diana secuencias de aminoácidos diferentes dentro de esta proteína. BoNt/B, D, F y G actúan sobre la proteína asociada a vesículas (VAMP, también denominada sinaptobrevina), rompiendo cada serotipo la proteína en un sitio diferente. Finalmente, se ha mostrado que la toxina botulínica de serotipo C<sub>1</sub> (BoNt/C<sub>1</sub>) rompe tanto la syntaxina como la SNAP-25. Estas diferencias en el mecanismo de acción pueden afectar a la potencia relativa y/o duración de la acción de los diversos serotipos de toxina botulínica.

Independientemente del serotipo, el mecanismo molecular de la intoxicación por toxina parece ser similar e implica al menos tres etapas o fases. En la primera etapa del procedimiento, la toxina se une a la membrana presináptica de la neurona diana mediante una interacción específica entre la cadena H y un receptor de la superficie celular; se piensa que el receptor es diferente para cada serotipo de toxina botulínica y para la toxina tetánica. El segmento del extremo carboxilo de la cadena H, H<sub>c</sub>, parece ser importante para dirigir la toxina a la superficie celular.

En la segunda etapa, la toxina atraviesa la membrana plasmática de la célula envenenada. En primer lugar, la célula envuelve la toxina mediante endocitosis mediada por receptor, y se forma un endosoma que contiene la toxina. Entonces la toxina escapa del endosoma dentro del citoplasma de la célula. Se piensa que esta última etapa está mediada por el segmento del extremo amino de la cadena H, H<sub>N</sub>, que desencadena 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 dentro del endosoma. El desplazamiento conformacional expone restos hidrófobos de la toxina, lo que permite a la toxina incrustarse en la membrana endosómica. Entonces la toxina se traslada a través de la membrana endosómica hacia el citosol.

La última etapa del mecanismo de la actividad de la toxina botulínica parece implicar la reducción del enlace disulfuro que une la cadena H y L. Toda la actividad tóxica de las toxinas botulínicas y del tétanos está contenida en la cadena L de la holotoxina; la cadena L es una endopeptidasa de cinc (Zn++) que rompe selectivamente proteínas esenciales para el reconocimiento y acoplamiento de vesículas que contienen neurotransmisores con la superficie citoplasmática de la membrana plasmática, y la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. La neurotoxina tetánica, las toxinas botulínicas B/D/F, y /G provocan la degradación de la sinaptobrevina (también denominada proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP)), una proteína de membrana sinaptosómica. La mayoría de las VAMP presentes en la superficie citosólica de la vesícula sináptica se eliminan como resultado de uno cualquiera de estos acontecimientos de ruptura. Cada toxina rompe específicamente un enlace diferente.

El peso molecular de la molécula de proteína de toxina botulínica, para los siete serotipos de toxina botulínica conocidos, es de aproximadamente 150 kD. De manera interesante, las toxinas botulínicas se liberan por bacterias clostrídicas como complejos que comprenden la molécula de proteína de toxina botulínica de 150 kD junto con proteínas distintas de toxina asociadas. Por tanto, el complejo de BoNt/A puede producirse por bacterias clostrídicas como formas de 900 kD, 500 kD y 300 kD. Aparentemente BoNt/ B y C<sub>1</sub> se producen sólo como un complejo de 500 kD. BoNt/D se produce como complejos tanto de 300 kD como de 500 kD. Finalmente, BoNt/E y F se producen sólo como complejos de aproximadamente 300 kD. Se cree que los complejos (es decir, peso molecular superior a aproximadamente 150 kD) contienen una proteína de hemaglutinina distinta de toxina y una proteína distinta de hemaglutinina no tóxica y distinta de toxina. Estas dos proteínas distintas de toxina (que junto con la molécula de toxina botulínica comprenden el complejo de neurotoxina pertinente) pueden actuar para proporcionar estabilidad frente a la desnaturalización de la molécula de toxina botulínica y protección frente a ácidos digestivos cuando se ingiere la toxina. Adicionalmente, es posible que los complejos de toxina botulínica mayores (mayores de aproximadamente 150 kD de peso molecular) puedan dar como resultado una velocidad de difusión más lenta de la toxina botulínica alejándose del sitio de inyección intramuscular de un complejo de toxina botulínica.

Estudios *in vitro* han indicado que la toxina botulínica inhibe la liberación inducida por catión potasio tanto de acetilcolina como de norepinefrina a partir de cultivos celulares primarios de tejido de tronco encefálico. Adicionalmente, se ha notificado que la toxina botulínica inhibe la liberación provocada tanto de glicina como de glutamato en cultivos primarios de neuronas de la médula espinal, y que en preparaciones de sinaptosomas de cerebro, la toxina botulínica inhibe la liberación de cada uno de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina, norepinefrina, CGRP y glutamato.

La BoNt/A puede obtenerse estableciendo y haciendo crecer cultivos de *Clostridium botulinum* en un fermentador y luego recogiendo y purificando la mezcla fermentada según procedimientos conocidos. Todos los serotipos de la toxina botulínica se sintetizan inicialmente como proteínas de cadena sencilla inactivas que deben romperse o cortarse para volverse neuroactivas. Las cepas bacterianas que producen toxina botulínica de serotipos A y G tienen proteasas endógenas, y los serotipos A y G pueden recuperarse, por tanto, de cultivos bacterianos predominantemente en su forma activa. En cambio, la toxina botulínica de serotipos C<sub>1</sub>, D y E se sintetizan por cepas no proteolíticas y por tanto están normalmente inactivadas cuando se recuperan del cultivo. Los serotipos B y F se producen tanto por cepas proteolíticas como no proteolíticas y, por tanto pueden recuperarse bien en su forma activa o bien inactiva. Sin embargo, incluso las cepas proteolíticas que producen, por ejemplo, el serotipo BoNt/B, sólo rompen una parte de la toxina producida. La proporción exacta de moléculas cortadas con respecto a no cortadas depende de la duración de la incubación y la temperatura del cultivo. Por tanto, es posible que un cierto porcentaje de cualquier preparación de, por ejemplo, la toxina BoNt/B esté inactivo, que representa posiblemente la potencia significativamente inferior conocida de BoNt/B comparado con BoNt/A. La presencia de moléculas de toxina botulínica inactiva en una preparación clínica contribuirá a la carga de proteína global de la preparación, que se ha relacionado con aumento de antigenicidad, sin contribuir a su eficacia clínica. Adicionalmente, se sabe que BoNt/B tiene, tras la inyección intramuscular, una duración de actividad más corta y también es menos potente que BoNt/A en el mismo nivel de dosis.

Se ha notificado (como ejemplos a modo de ejemplo) que BoNt/A se ha usado clínicamente tal como sigue:

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

(2) 5-10 unidades de BOTOX<sup>®</sup> por inyección intramuscular para tratar líneas glabellares (arrugas de la frente) (5 unidades inyectadas por vía intramuscular dentro del músculo procerus y 10 unidades inyectadas por vía intramuscular en cada músculo superciliar corrugador);

(3) aproximadamente 30-80 unidades de BOTOX<sup>®</sup> para tratar el estreñimiento mediante inyección intraesfínter del músculo puborrectal;

(4) aproximadamente 1-5 unidades por músculo de BOTOX<sup>®</sup> inyectado por vía intramuscular para tratar el blefaroespasma inyectando en el músculo orbicular pretarsal lateral del ojo del párpado superior y el orbicular pretarsal lateral del ojo del párpado inferior.

(5) para tratar el estrabismo, se ha inyectado por vía intramuscular en los músculos extraoculares entre aproximadamente 1-5 unidades de BOTOX<sup>®</sup>, variando la cantidad inyectada basándose tanto en el tamaño del músculo en el que va a inyectarse como en el grado de parálisis muscular deseado (es decir, cantidad de corrección de dioptrías deseada).

(6) para tratar la espasticidad de articulaciones superiores tras un accidente cerebrovascular mediante inyecciones intramusculares de BOTOX<sup>®</sup> en cinco músculos flexores diferentes de articulaciones superiores, 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. Se ha inyectado en cada uno de los cinco músculos indicados en la misma sesión de tratamiento, de manera que el paciente recibe desde 90 U hasta 360 U de BOTOX<sup>®</sup> de músculo flexor de articulación superior mediante inyección intramuscular en cada sesión de tratamiento.

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 desde el axón de la neurona afectada hacia la sinapsis, dando como resultado la parálisis. El efecto de la intoxicación sobre la neurona afectada es de larga duración y hasta hace poco se pensaba que era irreversible. Se sabe que la neurotoxina tetánica existe en un serotipo inmunológicamente diferenciado.

<sup>1</sup>[1] Disponible de Allergan, Inc., de Irvine, California, con el nombre comercial BOTOX<sup>®</sup>

*Acetilcolina*

Normalmente sólo se libera un único tipo de neurotransmisor de molécula pequeña por cada tipo de neurona en el sistema nervioso de los mamíferos. El neurotransmisor acetilcolina se secreta por neuronas en muchas zonas del cerebro, pero específicamente por las células piramidales grandes de la corteza motora, por varias neuronas diferentes en los ganglios basales, por las neuronas motoras que inervan los músculos esqueléticos, por las neuronas pregangliónicas del sistema nervioso autónomo (tanto simpático como parasimpático), por las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso parasimpático, y por algunas de las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso simpático. Esencialmente, sólo las fibras del nervio simpático postgangliónico de las glándulas sudoríparas, los músculos piloerectores y algunos vasos sanguíneos son colinérgicos y la mayoría de las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso simpático secretan el neurotransmisor norepinefrina. En la mayoría de los casos, la acetilcolina tiene un efecto excitante. Sin embargo, se sabe que la acetilcolina tiene efectos inhibidores en algunas de las terminaciones de nervios parasimpáticos periféricos, tales como la inhibición del corazón por el nervio vago.

Las señales eferentes del sistema nervioso autónomo se transmiten al cuerpo mediante o bien el sistema nervioso simpático o bien el sistema nervioso parasimpático. Las neuronas pregangliónicas del sistema nervioso simpático se extienden desde los cuerpos celulares de neuronas simpáticas pregangliónicas ubicados en el asta intermediolateral de la médula espinal. Las fibras de nervios simpáticos pregangliónicos, que se extienden desde el cuerpo celular, realizan una sinapsis con neuronas postgangliónicas ubicadas o bien en un ganglio simpático paravertebral o en un ganglio prevertebral. Ya que las neuronas pregangliónicas del sistema nervioso tanto simpático como parasimpático son colinérgicas, la aplicación de acetilcolina a los ganglios excitará las neuronas postgangliónicas 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 las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso parasimpático, así como en las estimuladas por las neuronas colinérgicas postgangliónicas del sistema nervioso simpático. Los receptores nicotínicos se encuentran en la sinapsis entre las neuronas pregangliónicas y postgangliónicas del sistema tanto simpático como parasimpático. Los receptores nicotínicos también están presentes en muchas membranas de fibras de músculos esqueléticos en la unión neuromuscular.

La acetilcolina se libera de neuronas colinérgicas cuando vesículas intracelulares, transparentes, pequeñas, se fusionan con la membrana celular de la neurona presináptica. Una amplia variedad de células secretoras no neuronales, tales como células de la médula suprarrenal (así como la línea celular PC12) y células de islotes pancreáticos, liberan catecolaminas e insulina, respectivamente, a partir de vesículas de núcleo denso grandes. La línea celular PC12 es un clon de células de feocromocitoma de rata ampliamente usadas como modelo de cultivo tisular para estudios de desarrollo simpato-suprarrenal. La toxina botulínica inhibe la liberación de ambos tipos de compuestos a partir de ambos tipos de células *in vitro*, permeabilizadas (tal como mediante electroporación) o mediante inyección directa de la toxina en la célula desnervada. También se sabe que la toxina botulínica bloquea la liberación del neurotransmisor glutamato a partir de cultivos celulares de sinaptosomas corticales.

**Sumario**

La presente invención proporciona medicamentos para tratar enfermedades cardiovasculares en un mamífero, por ejemplo, en un ser humano. El medicamento se formula para administrar una cantidad eficaz de una toxina botulínica directamente a un vaso sanguíneo de un mamífero para tratar una enfermedad cardiovascular. En una realización, el medicamento evita la reestenosis.

En una realización de la invención, el mamífero está sometándose o se ha sometido a un procedimiento cardiovascular. En una realización, el procedimiento cardiovascular es un procedimiento cardiovascular arterial, por ejemplo, un procedimiento cardiovascular arterial coronario.

En una realización, el procedimiento cardiovascular incluye un procedimiento de angioplastia. En una realización, la angioplastia incluye la etapa de insertar una endoprótesis en el vaso sanguíneo del mamífero. En otra realización, la angioplastia no incluye la etapa de insertar una endoprótesis en un vaso sanguíneo. El procedimiento de angioplastia puede ser, por ejemplo, una angioplastia de balón. En una realización, la angioplastia de balón incluye el uso de una endoprótesis. Por ejemplo, una endoprótesis puede insertarse en el vaso sanguíneo durante la angioplastia de balón.

El procedimiento no se limita al uso de un balón. Cualquier dispositivo que puede usarse para abrir mecánicamente un vaso sanguíneo obstruido, por ejemplo, un muelle u otro dispositivo de expansión, puede usarse para realizar una angioplastia.

La etapa de administrar la toxina botulínica puede incluir una etapa de inyectar la toxina botulínica en una pared del vaso sanguíneo. En particular, la toxina puede inyectarse dentro de las capas íntima, media y/o adventicia del vaso sanguíneo. Además, la etapa de administrar puede lograrse usando una endoprótesis que se ha recubierto o impregnado con toxina botulínica.

En una realización de la presente invención, la toxina botulínica reduce o elimina el daño a un vaso sanguíneo. Ejemplos de daño que puede producirse son estiramiento y/o rasgado de un vaso sanguíneo o cualquier otro daño

que pueda producirse al vaso sanguíneo como resultado de expandir mecánicamente el diámetro interno del vaso sanguíneo. En una realización, la toxina botulínica reduce o elimina el daño al vaso sanguíneo, al menos en parte, dilatando el vaso sanguíneo. En otra realización, la toxina botulínica reduce o elimina el daño al vaso sanguíneo, al menos en parte, reduciendo o eliminando la inflamación del vaso sanguíneo.

5 Según la presente invención, la toxina botulínica puede ser cualquier toxina botulínica incluyendo la toxina botulínica de tipos A, B, C, D, E, F, G o mezclas de las mismas o combinaciones de las mismas, incluyendo una toxina botulínica modificada, híbrida o quimérica.

10 Adicionalmente, según la presente invención, se proporcionan procedimientos para evitar la reestenosis en un vaso sanguíneo en un mamífero que puede producirse tras un procedimiento cardiovascular. En una realización, el procedimiento incluye una etapa de administrar al mamífero una cantidad eficaz de toxina botulínica evitando así la reestenosis en un vaso sanguíneo.

15 Todavía adicionalmente, según la presente invención, se proporcionan procedimientos para evitar la reestenosis en un mamífero evitando el daño a un vaso sanguíneo que puede producirse durante o tras un procedimiento cardiovascular. En una realización, el procedimiento incluye la etapa de administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una toxina botulínica evitando así el daño en el vaso sanguíneo y evitando la reestenosis.

20 La presente invención también se refiere a evitar la reestenosis en un mamífero evitando la inflamación en un vaso sanguíneo que puede producirse durante o tras un procedimiento cardiovascular. En una realización, el medicamento se formula para administrar a un mamífero una cantidad eficaz de la toxina botulínica evitando así la inflamación en el vaso sanguíneo y evitando la reestenosis.

25 Adicionalmente, la presente invención provee evitar la reestenosis en un mamífero dilatando un vaso sanguíneo antes, durante o después de un procedimiento cardiovascular. En una realización, el medicamento se formula para administrar a un mamífero una cantidad eficaz de la toxina botulínica dilatando así el vaso sanguíneo y evitando la reestenosis.

30 Todavía adicionalmente, la presente invención provee composiciones para su uso en procedimientos cardiovasculares. En una realización, estas composiciones incluyen una endoprótesis con una toxina botulínica unida a la endoprótesis o incrustada en la endoprótesis. La toxina botulínica puede ser cualquier toxina botulínica incluyendo toxina botulínica de tipo A, B, C, D, E, F, G o combinaciones de las mismas o mezclas de las mismas.

35 Otras ventajas y aspectos de la presente invención resultan evidentes en la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

## Definiciones

40 “Agente” se define como una neurotoxina, por ejemplo, una toxina botulínica, para su uso según la presente invención. Un agente puede ser un fragmento de una neurotoxina, una neurotoxina modificada o una neurotoxina variante que tiene algo o toda la actividad biológica de una neurotoxina sin modificar.

45 “Angioplastia” significa cualquier procedimiento en el que el diámetro interno de un vaso sanguíneo se expande mecánicamente.

Una “toxina botulínica” puede referirse a toxina botulínica nativa o un fragmento funcional de una toxina botulínica o una toxina botulínica modificada. Además, las toxinas botulínicas con delecciones, adiciones, alteraciones o sustituciones de aminoácidos que delecionan, añaden, alteran o sustituyen un único aminoácido, o un porcentaje pequeño de aminoácidos (por ejemplo, menos de aproximadamente el 5%, o por ejemplo, menos de aproximadamente el 1%) son variaciones conservativamente modificadas de toxinas botulínicas. Cuando se realizan una o más sustituciones de un(os) aminoácido(s) por un aminoácido químicamente similar en una toxina botulínica, esto también da como resultado una variación conservativamente modificada de una toxina botulínica. Las tablas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien en la técnica. Los cinco siguientes grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: alifáticos: Glicina (G), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I); aromáticos: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W); que contienen azufre: Metionina (M), Cisteína (C); básicos: Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); ácidos: Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E), Asparagina (N), Glutamina (Q). Véase también, Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company. Las variaciones conservativamente modificadas de toxinas botulínicas nativas se incluyen dentro del alcance del significado de “toxina botulínica.”

“Cardiovascular” significa que pertenece a vasos sanguíneos, por ejemplo, vasos sanguíneos del corazón.

65 “Toxina clostrídica” o “neurotoxina clostrídica” significa una toxina producida de manera natural por el género de bacterias *Clostridium*. Por ejemplo, las toxinas clostrídicas incluyen pero no se limitan a toxinas botulínicas, toxinas tetánicas, toxinas de *C. difficile* y toxinas de *C. butyricum*. Una toxina clostrídica también puede prepararse por medios recombinantes conocidos mediante una bacteria no clostrídica.

## ES 2 281 636 T3

“Combinación” significa una secuencia ordenada de elementos. Por ejemplo, una combinación de toxinas botulínicas puede significar la administración de la toxina botulínica E, seguido de la administración de la toxina botulínica de tipo A, seguido de la administración de la toxina botulínica de tipo B. Esto es contrario a una “mezcla” en la que, por ejemplo, se combinan diferentes tipos de toxinas antes de la administración.

“Daño” significa rasgado, arañazo, estiramiento, raspado, contusión y/o inflamación o lesión provocado por inflamación u otra lesión que puede producirse en un vaso sanguíneo que se somete a un procedimiento, por ejemplo, un procedimiento en el que el diámetro interno del vaso sanguíneo se expande usando fuerza mecánica.

“Fragmento” significa una secuencia de aminoácidos que comprende cinco aminoácidos o más de la secuencia de aminoácidos nativa hasta un tamaño de menos al menos un aminoácido de la secuencia nativa. Por ejemplo, un fragmento de una cadena ligera de toxina botulínica de tipo A comprende cinco o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de toxina botulínica de tipo A nativa hasta un tamaño de menos un aminoácido de la cadena ligera nativa.

“H<sub>C</sub>” significa un fragmento obtenido a partir de la cadena H de una toxina clostrídica que es equivalente, por ejemplo funcionalmente equivalente, al fragmento del extremo carboxilo de la cadena H, o la parte correspondiente a ese fragmento en la cadena H intacta implicada en la unión a una superficie celular o receptor de la superficie celular.

“H<sub>N</sub>” significa un fragmento o variante obtenido a partir de una cadena H de una toxina clostrídica que puede ser funcionalmente equivalente a la parte de una cadena H intacta implicada en la translocación de al menos la cadena L a través de una membrana endosómica intracelular hacia un citoplasma de una célula. Un H<sub>N</sub> puede resultar de eliminar un H<sub>C</sub> de una cadena H. Un H<sub>N</sub> también puede resultar de modificar una cadena H de manera que su H<sub>C</sub> ya no se une a superficies de células colinérgicas.

“Cadena pesada” significa la cadena pesada de una neurotoxina clostrídica o un fragmento o variante de un H<sub>N</sub> de una neurotoxina clostrídica. Una cadena pesada puede tener un peso molecular de aproximadamente 100 kD y puede denominarse cadena H, o H.

“LH<sub>N</sub>” significa un fragmento obtenido a partir de una neurotoxina clostrídica que contiene la cadena L acoplada a un H<sub>N</sub>. LH<sub>N</sub> puede obtenerse a partir de la neurotoxina clostrídica intacta mediante proteólisis, de manera que se elimina o modifica el dominio H<sub>C</sub>.

“Cadena ligera” significa la cadena ligera de una neurotoxina clostrídica o un fragmento o variante de una cadena ligera de una neurotoxina clostrídica. Una cadena ligera puede tener un peso molecular de aproximadamente 50 kD, y puede denominarse cadena L, L, o dominio proteolítico de una neurotoxina clostrídica.

“Conector” significa una molécula que acopla a dos o más moléculas o componentes entre sí.

Una “neurotoxina modificada” significa una neurotoxina que tiene un componente no nativo unido covalentemente a la neurotoxina y/o le falta una parte nativa de la neurotoxina. Por ejemplo, una toxina botulínica modificada puede ser una cadena ligera de una toxina botulínica con una molécula de sustancia P unida covalentemente.

“Neurotoxina” o “toxina” significa una sustancia que inhibe la función neuronal o secreción celular. Las toxinas clostrídicas son ejemplos de neurotoxinas.

“Prevenir” significa evitar que se produzca totalmente o en parte.

“Reducir” significa disminuir en magnitud (por ejemplo tamaño, cantidad o número). La reducción puede ser de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 100%. Por ejemplo, la reducción puede ser de entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 10% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 20% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 30% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 40% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 50% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 60% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 70% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 80% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 90% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 100%.

“Espaciador” significa una molécula o conjunto de moléculas que separa físicamente y/o añade distancia entre componentes de agentes para su uso según la invención.

“Sustancialmente” significa en gran medida pero no totalmente. Por ejemplo, sustancialmente puede significar de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 99,999%, de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99,999%, de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 99,999%, de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 99,999% o de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 99,999%.

“Componente de transporte dirigido” significa una molécula que tiene una afinidad de unión específica por una superficie celular o receptor de la superficie celular.

“Variante” significa una molécula o péptido que es sustancialmente el mismo que una molécula o péptido descrito en su estructura y función. Por ejemplo, una variante de una cadena ligera especificada puede tener diferencias de secuencia de aminoácidos cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera especificada. Las variantes pueden considerarse equivalentes a las moléculas específicamente descritas y como tales están dentro del alcance de la invención.

## Descripción

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que una neurotoxina, por ejemplo, la toxina botulínica, es útil para tratar la enfermedad cardiovascular, por ejemplo, para tratar la enfermedad cardiovascular en un paciente que se ha sometido, o está sometiéndose, a un procedimiento cardiovascular. En una realización, la presente invención provee procedimientos para reducir o eliminar la reestenosis tras un procedimiento cardiovascular.

Un experto en la técnica apreciará que la invención descrita en el presente documento puede encontrar aplicación en cualquier vaso sanguíneo en el cuerpo incluyendo, pero sin limitarse a vasos sanguíneos coronarios (corazón), cerebrales (cerebro), carótidos (cuello), renales (riñón), viscerales (abdominales), ilíacos (cadera), femoropoplíteas (muslo), infrapoplíteas (rodilla).

La invención se refiere a la aplicación de una neurotoxina, por ejemplo, una toxina botulínica, a un vaso sanguíneo de un paciente que está sometiéndose o va a someterse o se ha sometido a un procedimiento que puede conducir, directa o indirectamente, al daño de un vaso sanguíneo, por ejemplo, una arteria coronaria. En una realización, la presente invención provee procedimientos para tratar un paciente que está sometiéndose a un procedimiento de angioplastia de tal manera que se reduce o elimina la reestenosis tras el procedimiento. En una realización, la angioplastia incluye el uso de una endoprótesis, por ejemplo, una endoprótesis de autoexpansión. En otra realización, la angioplastia es angioplastia de balón. En otra realización, la angioplastia es angioplastia de balón que incluye el uso de una endoprótesis. En otra realización, la angioplastia es angioplastia de balón que no incluye el uso de una endoprótesis.

Sin desear limitar la presente invención a ninguna teoría o mecanismo de funcionamiento, se cree que los presentes procedimientos evitan el daño a un vaso sanguíneo que puede producirse relacionado con una expansión mecánica de un vaso sanguíneo de otro modo ocluido o parcialmente ocluido. Por tanto, la presente invención puede prevenir la reestenosis que de otro modo puede producirse como resultado de tal daño. Ejemplos de daño que pueden prevenirse son el rasgado, arañazo, estiramiento, raspado, contusión y/o inflamación o lesión provocado por inflamación u otra lesión que puede producirse en un vaso sanguíneo que se somete a un procedimiento, por ejemplo, un procedimiento en el que se expande el diámetro interno del vaso sanguíneo usando fuerza mecánica.

Aunque el mecanismo de funcionamiento de la toxina botulínica para evitar que se produzca el daño en un vaso sanguíneo no se entiende completamente, sin desear limitar la invención a ninguna teoría o mecanismo de funcionamiento particular, el inventor sugiere al menos dos posibles teorías de funcionamiento.

En un caso, se cree que las toxinas ejercen un efecto dilatador sobre los vasos sanguíneos aumentando así el diámetro de un vaso, incluyendo el diámetro interno del vaso. Puede usarse la topografía de coherencia óptica para proporcionar una medición del efecto dilatador de la toxina. El efecto dilatador de la toxina puede cuantificarse como un factor del tamaño original de la abertura del vaso sanguíneo antes de la administración de la toxina. En una realización, la abertura del vaso sanguíneo puede dilatarse hasta entre aproximadamente 1,5x y aproximadamente 100x el tamaño de la abertura antes de la administración de la toxina. Por ejemplo, la abertura del vaso sanguíneo puede dilatarse hasta entre aproximadamente 2x y aproximadamente 5x el tamaño de la abertura antes de la administración de la toxina. En otro ejemplo la abertura del vaso sanguíneo puede dilatarse hasta entre aproximadamente 2x y aproximadamente 10x el tamaño de la abertura antes de la administración de la toxina. En otro ejemplo, la abertura del vaso sanguíneo puede dilatarse hasta entre aproximadamente 2x y aproximadamente 30x el tamaño de la abertura antes de la administración de la toxina. En otro ejemplo, la abertura del vaso sanguíneo puede dilatarse hasta entre aproximadamente 2x y aproximadamente 50x el tamaño de la abertura antes de la administración de la toxina. En otro ejemplo, la abertura del vaso sanguíneo puede dilatarse hasta entre aproximadamente 50x y aproximadamente 100x el tamaño de la abertura antes de la administración de la toxina.

La dilatación de los vasos sanguíneos puede hacer que los vasos sean más receptivos a los procedimientos de intervención. Por ejemplo, una angioplastia de balón y/o inserción de una endoprótesis u otro procedimiento mecánico puede tener menos posibilidades de dañar el vaso sanguíneo cuando el vaso sanguíneo está en el estado dilatado. Tras la administración de un agente al vaso sanguíneo, puede dejarse dilatar el vaso sanguíneo antes de realizar el procedimiento, por ejemplo, un procedimiento de angioplastia. Puede determinarse si la dilatación ha tenido lugar, y hasta qué grado la dilatación ha tenido lugar por un médico experto. Por ejemplo, puede usarse la topografía de coherencia óptica para realizar estas determinaciones.

En otra teoría no limitante de funcionamiento, se cree que las toxinas descritas en el presente documento actúan sobre células mediadoras de la inflamación, por ejemplo, células endoteliales de vasos sanguíneos. Estas células presentan muchos mediadores de inflamación biológicamente activos que pueden incluir bradiquinina, óxido nítrico y péptido intestinal vasoactivo. La liberación de estos y/u otros mediadores puede contribuir a los acontecimientos que provocan la inflamación del vaso sanguíneo que puede contribuir a la reestenosis.

Durante la secreción o exocitosis, los mediadores pueden incluirse en vesículas que se fusionan con la superficie interna de la membrana celular liberando así el contenido de la vesícula al exterior de la célula. Se presenta la teoría de que la interferencia con el proceso de exocitosis puede ser el modo de acción de las toxinas clostrídicas.

5 Se presenta la teoría de que las toxinas clostrídicas pueden funcionar evitando o reduciendo la secreción de moléculas que producen inflamación en células de vasos sanguíneos u otras células rompiendo o interfiriendo de otro modo con la función de proteínas implicadas en el proceso secretor mediante el uso de un componente de cadena ligera, por ejemplo, un componente de cadena ligera botulínico. Un componente de cadena pesada, por ejemplo H<sub>N</sub>, también puede actuar en ciertas realizaciones de la presente invención, por ejemplo, ayudando en la liberación de un agente de la invención a partir de vesículas intracelulares, por ejemplo, endosomas.

15 Sin desear limitar la invención a ninguna teoría o mecanismo de acción, se conjetura que la inflamación puede contribuir, o bien directa o bien indirectamente, a la reestenosis. Evitando o reduciendo la inflamación del vaso sanguíneo que puede asociarse con procedimientos cardiovasculares, por ejemplo, angioplastia de balón y/o inserción de una endoprótesis, puede reducirse la reestenosis en un paciente que se ha sometido a un procedimiento cardiovascular.

Otro posible mecanismo para la eficacia de la presente invención descrita es un efecto de una toxina botulínica para inhibir la contracción de vasos sanguíneos mediada por neuronas. El tratamiento previo con una toxina botulínica puede inhibir una constricción tras el estiramiento. Dentro del alcance de la presente invención está una toxina botulínica que es una toxina dirigida en la que el resto de unión nativo de la toxina se ha remplazado total o parcialmente por un nuevo resto de unión que dirige la toxina a receptores alfa 2 en neuronas simpáticas que se innervan en el vaso sanguíneo que va a tratarse. Además, puede introducirse NO localmente para provocar la dilatación.

25 La neurotoxina para su uso según la presente invención puede comprender un componente de transporte dirigido, un componente terapéutico y un componente de translocación.

En una realización, el componente de transporte dirigido comprende un fragmento del extremo carboxilo de una cadena pesada de una toxina de *C. butyricum*, una toxina tetánica o una toxina botulínica incluyendo la toxina botulínica tipos A, B, C, D, E, F y G.

30 En otra realización, el componente de transporte dirigido puede ser de origen distinto a toxina botulínica. Ejemplos de componentes de transporte dirigido que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a anticuerpos, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos (Fab, F(ab)<sup>'</sup><sub>2</sub>, Fv, ScFv, y otros fragmentos de anticuerpos similares), lectinas, hormonas, citocinas, factores de crecimiento, péptidos, hidratos de carbono, lípidos, gliconas y ácidos nucleicos. Otros componentes de transporte dirigido que pueden ser útiles según la presente invención se describen en el documento WO 01/21213 que se incorpora en su totalidad en el presente documento como referencia.

40 Un componente de transporte dirigido a modo de ejemplo para su uso según la presente invención es la sustancia P o sustancias similares a la sustancia P. El uso de sustancia P, o sustancias similares a la sustancia P, como componentes de transporte dirigido se describe en las solicitudes de patente de los EE.UU. 09/489.667; 09/922.093 y 09/625.098.

45 El componente terapéutico funciona para romper selectivamente proteínas esenciales para el reconocimiento y acoplamiento de vesículas secretoras con la superficie citoplasmática de la membrana plasmática, y la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. Un efecto del componente terapéutico puede ser interferir sustancialmente con la liberación de neurotransmisores de una célula. Otro efecto del componente terapéutico puede ser provocar la dilatación de vasos sanguíneos. Otro efecto puede ser la parálisis flácida de tejido de músculo liso. Otro efecto puede ser reducir o eliminar la secreción a partir de células, por ejemplo, células que producen inflamación. En una realización, el componente terapéutico comprende una cadena ligera de una toxina de *C. butyricum*, una toxina tetánica, una toxina botulínica, por ejemplo, una toxina botulínica de tipo A, B, C, D, E, F y G.

55 El componente de translocación puede facilitar la transferencia de al menos una parte de la neurotoxina, por ejemplo el componente terapéutico hacia el citoplasma de la célula diana. En una realización, el componente de translocación comprende un fragmento del extremo amino de una cadena pesada de una toxina de *C. butyricum*, una toxina tetánica, una toxina botulínica, por ejemplo, una toxina botulínica de tipo A, B, C, D, E, F y G.

60 Según un amplio aspecto de esta invención, pueden usarse metodologías de ADN recombinante para producir los componentes de agentes útiles según la invención. Estas técnicas pueden incluir etapas de obtener genes clonados a partir de fuentes naturales o a partir de secuencias de oligonucleótidos sintéticas, que pueden codificar componentes de neurotoxina botulínica incluyendo cadenas pesadas, cadenas ligeras o variantes de las mismas de neurotoxina botulínica, cadenas y/o fragmentos de las cadenas de neurotoxina botulínica modificada. Los genes clonados también pueden codificar un componente de transporte dirigido.

65 Los genes pueden clonarse, por ejemplo, dentro de vectores de clonación, tales como fagos o plásmidos o fágmidos. Se transforman los vectores recombinantes dentro de células huésped, por ejemplo, en una célula procariota, por ejemplo, *E.coli*. Pueden expresarse las proteínas y luego aislarse usando técnicas convencionales.

Pueden usarse genes de fusión que codifican más de un componente de un agente. Por ejemplo, pueden producirse un componente de transporte dirigido y una cadena pesada y/o cadena ligera y/o un fragmento de una cadena pesada y/o un fragmento de una cadena ligera de toxina botulínica a partir de un único gen clonado como una proteína de fusión. Como alternativa, pueden acoplarse químicamente componentes individuales obtenidos a partir de técnicas recombinantes con otros componentes obtenidos de fuentes similares o distintas. Por ejemplo, puede acoplarse un componente de transporte dirigido con una cadena L recombinante o con una LH<sub>N</sub> de fusión recombinante. Las uniones entre los componentes botulínicos y los restos de transporte dirigido pueden incluir componentes espaciadores apropiados, que también pueden codificarse por ADN.

En una realización, se expresa recombinantemente un LH<sub>N</sub>, que puede ser un híbrido de una cadena L y un H<sub>N</sub> de distintos tipos de toxina botulínica, como una proteína de fusión. Un híbrido LH<sub>N</sub> de este tipo también puede acoplarse con un componente de transporte dirigido. Pueden incluirse uno o más espaciadores entre L y H<sub>N</sub> y/o entre el LH<sub>N</sub> el compuesto de transporte dirigido.

En otra realización de la invención, se expresa recombinantemente la cadena L de una neurotoxina botulínica, o un fragmento de la cadena L que contiene actividad endopeptidasa, para producir un agente para un uso según la presente invención.

En otra realización de la invención, se expresa recombinantemente la cadena L de una neurotoxina botulínica, o un fragmento de la cadena L que contiene la actividad endopeptidasa, como una proteína de fusión con el H<sub>N</sub> de la cadena H y el componente de transporte dirigido. La proteína de fusión expresada también puede incluir una o más regiones espaciadoras. Por ejemplo, la cadena L puede fusionarse con H<sub>N</sub> que a su vez está fusionada el componente de transporte dirigido. En otro ejemplo, el H<sub>N</sub> puede fusionarse con la cadena L que a su vez está fusionada con el componente de transporte dirigido. Pueden expresarse recombinantemente los componentes espaciadores entre algunos o todos los componentes de un agente de la invención.

En un ejemplo para producir un híbrido de LH<sub>N</sub>, se obtiene la cadena L a partir de una toxina botulínica de tipo B y se obtiene el segmento del extremo amina del fragmento de la cadena H<sub>N</sub> a partir de una toxina botulínica de tipo A. El fragmento H<sub>N</sub> de la toxina botulínica de tipo A se produce según el procedimiento descrito por Shone C. C., Hambleton, P., y Melling, J. (1987, Eur. J. Biochem. 167, 175-180) y la cadena L de la toxina botulínica de tipo B según el procedimiento de Sathyamoorthy, V. y DasGupta, B. R. (1985, J. Biol. Chem. 260, 10461-10466). Luego se derivatiza la cisteína libre en el segmento del extremo amina del fragmento de la cadena H de la toxina botulínica de tipo A mediante la adición de un exceso de diez veces molar de disulfuro de dipiridilo seguido de incubación a 4°C durante la noche. Luego se eliminan el exceso de disulfuro de dipiridilo y el subproducto de tiopiridona mediante desalación de la proteína en una columna PD10 (Pharmacia) hacia PBS.

Luego se concentra el H<sub>N</sub> derivatizado hasta una concentración en exceso de proteína de 1 mg/ml antes de mezclarse con una parte equimolar de cadena L de toxina botulínica de tipo B (>1 mg/ml en PBS). Tras incubación durante la noche a temperatura ambiente se separa la mezcla mediante cromatografía de exclusión molecular sobre Superose 6 (Pharmacia), y se analizan las fracciones mediante SDS-PAGE. Entonces el LH<sub>N</sub> quimérico está disponible para producir un agente conjugado que incluye un componente de transporte dirigido.

El ejemplo descrito anteriormente es meramente ilustrativo de la invención. Al sintetizar los agentes, puede lograrse el acoplamiento de los restos de transporte dirigido con los componentes botulínicos, por ejemplo las neurotoxinas botulínicas modificadas o fragmentos de las mismas, por medio de acoplamiento químico usando reactivos y técnicas conocidos por los expertos en la técnica. Por tanto, cualquier química de acoplamiento que pueda unir covalentemente los restos de transporte dirigido de los agentes con los componentes de neurotoxina botulínica y conocidos por los expertos en la técnica están cubiertos por el alcance de esta solicitud.

Se contemplan las toxinas botulínicas modificadas que tienen una persistencia biológica y/o actividad biológica alteradas para su uso en la presente invención. Las solicitudes de patente de los EE.UU. 09/620.840 y 09/910.346 incluyen ejemplos de composiciones y procedimientos para alterar la persistencia biológica de toxinas botulínicas. Estas dos solicitudes de patente se incorporan en su totalidad al presente documento como referencia.

Puede añadirse un componente que potencia la persistencia biológica y/o un componente que potencia la actividad biológica, por ejemplo, un motivo basado en leucina, a una neurotoxina botulínica aumentando de esta manera la persistencia biológica y/o la actividad biológica de la neurotoxina botulínica. Igualmente, puede eliminarse un componente que potencia la persistencia biológica de una neurotoxina botulínica disminuyendo de esta manera la persistencia biológica y/o la actividad biológica de la neurotoxina.

La neurotoxina botulínica puede ser una neurotoxina híbrida. Por ejemplo, los componentes terapéuticos, de translocación y de transporte dirigido de la neurotoxina pueden derivarse de distintos serotipos de toxina botulínica. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender una primera región de secuencia de aminoácidos derivada del H<sub>C</sub> de una toxina botulínica de tipo A, una segunda región de secuencia de aminoácidos derivada del H<sub>N</sub> de una toxina botulínica de tipo B y una tercera región de secuencia de aminoácidos derivada de la cadena ligera de la toxina botulínica de serotipo E. Esto es meramente un ejemplo y cualquier otra posible combinación está incluida dentro del alcance de la presente invención.

Pueden modificarse los componentes terapéuticos, de translocación y de transporte dirigido de la neurotoxina a partir de la secuencia que se produce de manera natural de la cual se derivan. Por ejemplo, la región de la secuencia de aminoácidos puede tener al menos uno o más aminoácidos añadidos, delecionados o sustituidos si se compara con la secuencia que se produce de manera natural.

Los aminoácidos que pueden sustituirse para aminoácidos contenidos en un componente que potencia la persistencia biológica incluyen alanina, asparagina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptofano, tirosina y otros aminoácidos que se producen de manera natural así como aminoácidos no habituales.

La presente invención provee una reducción de reestenosis que oscila desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 100% en eficacia. Por ejemplo, la reducción puede ser de entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 10% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 20% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 30% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 40% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 50% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 60% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 70% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 80% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 90% o de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 100%.

Generalmente, la dosis de neurotoxina que va a administrarse varía con la edad, el estado presentado y peso del paciente que va a tratarse. También se considerará la potencia de la neurotoxina. La potencia de la toxina se expresa como un múltiplo del valor de la  $DL_{50}$  para un ratón. Puede definirse una "unidad" de toxina como la cantidad de toxina que mata al 50% de un grupo de ratones que estaban libres de enfermedad antes de la inoculación con la toxina. Por ejemplo, la toxina botulínica A disponible comercialmente tiene normalmente una potencia de manera que un nanogramo contiene aproximadamente 40 unidades de ratón. Se cree que la potencia, o  $DL_{50}$  en seres humanos del producto de toxina botulínica A suministrada por Allergan, Inc. con la marca comercial registrada "BOTOX" es de aproximadamente 2.730 unidades de ratón.

Puede administrarse la neurotoxina en una dosis de aproximadamente 0,001 unidades hasta aproximadamente 100 unidades. En una realización, se usan dosificaciones individuales de aproximadamente 0,01 unidades a aproximadamente 5 unidades. En otra realización, se usan dosificaciones individuales de aproximadamente 0,01 unidades a aproximadamente 3 unidades. Todavía en otra realización, se usan dosificaciones individuales de aproximadamente 0,01 unidades a aproximadamente 1 unidad. Todavía en otra realización, se usan dosificaciones individuales de aproximadamente 0,05 unidades a aproximadamente 1 unidad. Los expertos en la técnica sabrán, o pueden determinar fácilmente, cómo ajustar las dosificaciones para neurotoxinas de mayor o menor potencia en una circunstancia dada.

Para toxinas botulínicas modificadas o variantes puede expresarse la potencia como un múltiplo del valor de la  $DL_{50}$  de un agente de la invención para un ratón. Puede definirse una "U" o "unidad" de un agente como la cantidad de toxina que mata al 50% de un grupo de ratones que estaban libres de enfermedad antes de la inoculación con el agente. Como alternativa, puede expresarse la potencia como el valor de la  $DL_{50}$  de un agente que se produciría por una cantidad molar igual de una toxina botulínica nativa, no variante.

Preferiblemente, se administrará al paciente la menor dosificación terapéuticamente eficaz. La menor dosificación terapéuticamente eficaz es la dosificación que da como resultado el efecto deseado en un vaso sanguíneo del paciente al que se le administra la toxina. Pueden determinarse procedimientos para evaluar o cuantificar el efecto de una toxina sobre un vaso sanguíneo por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el uso de topografía de coherencia óptica puede proporcionar una medida del efecto dilatador de la toxina.

En un tratamiento inicial, puede administrarse una dosificación baja para determinar la sensibilidad del paciente, y la tolerancia a la neurotoxina. Otras administraciones de la misma o distintas dosificaciones pueden administrarse al vaso sanguíneo según sea necesario. Por ejemplo, puede administrarse una toxina a un vaso sanguíneo antes de realizar un procedimiento, por ejemplo, un procedimiento de angioplastia coronaria, y/o durante el procedimiento y/o tras el procedimiento. Puede determinarse el número de administraciones y el momento de las administraciones por el médico encargado.

Pueden administrarse las neurotoxinas mediante, por ejemplo, inyección dentro de un vaso sanguíneo usando una aguja o mediante una inyección sin aguja. También puede administrarse la toxina mediante la aplicación de la toxina a la pared del vaso sanguíneo en una pomada, loción, ungüento, crema, emulsión o sustratos de administración similares.

En una realización, se administra un agente de la invención al paciente mediante inyección. Por ejemplo, puede inyectarse un agente en el sistema cardiovascular de un paciente. En particular, la inyección puede realizarse en una arteria, por ejemplo, una arteria coronaria. Normalmente, la inyección se realiza en la región del vaso sanguíneo en la que el vaso va a someterse a un procedimiento, por ejemplo, un procedimiento para expandir mecánicamente el diámetro interno de un vaso sanguíneo ocluido.

Puede inyectarse un agente en la pared de un vaso sanguíneo desde fuera del vaso sanguíneo o puede inyectarse un agente en la pared de un vaso sanguíneo desde el interior del vaso sanguíneo. Los procedimientos para inyectar en una pared de un vaso sanguíneo son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede inyectarse un agente

en la pared de un vaso sanguíneo desde el interior del vaso sanguíneo mediante el uso de un catéter que contiene una o más agujas para inyectar.

En los procedimientos de administración de inyección sin aguja, pueden recubrirse partículas de fármaco microproyectiles con una neurotoxina y luego descargarse en el vaso sanguíneo desde un dispositivo de administración externo. Dependiendo de la velocidad de descarga y la distancia desde el sitio de inyección, las partículas de fármaco penetran a través de las distintas capas de los vasos sanguíneos. A medida que los microproyectiles penetran a través, o se depositan sobre las células del vaso sanguíneo, se libera la neurotoxina. Pueden seleccionarse como diana capas individuales de vasos sanguíneos para los microproyectiles.

También pueden administrarse las neurotoxinas usando una endoprótesis o un balón de angioplastia que está recubierto o impregnado con la toxina, por ejemplo toxina botulínica. Las patentes de los EE.UU. 6.306.423 y 6.312.708 describen un material que puede impregnarse, unirse o incrustarse con la toxina y que puede usarse para recubrir endoprótesis y/o balones de angioplastia. Además, puede usarse el material para formar endoprótesis que incluyen la toxina. La descripción de cada una de estas dos patentes se incorpora en su totalidad al presente documento como referencia. En una realización, se administra en primer lugar una toxina botulínica al vaso sanguíneo que va a tratarse antes de insertar la endoprótesis y/o el balón que comprende toxina. En otra realización, no se administra toxina al vaso sanguíneo que va a tratarse antes de insertar la endoprótesis y/o el balón que comprende toxina.

Pueden repetirse administraciones si es necesario. Como directriz general, la toxina botulínica A administrada en el vaso sanguíneo puede producir un efecto dilatador y/o antiinflamatorio durante, por ejemplo, de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 3 meses, o por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 meses o por ejemplo desde aproximadamente 6 meses hasta aproximadamente 1 año.

Puede dejarse que el agente induzca su efecto sobre un vaso sanguíneo antes de que se realice un procedimiento, por ejemplo, un procedimiento de angioplastia coronaria. Por ejemplo, puede dejarse que el agente dilate el vaso sanguíneo y/o evite la inflamación del vaso sanguíneo antes de empezar un procedimiento. Un médico experto puede determinar cuándo el agente ha ejercido su(s) efecto(s) sobre un vaso sanguíneo.

Habiéndose descrito totalmente la invención, se exponen a continuación ejemplos que ilustran su práctica. Sin embargo, no debe considerarse que estos ejemplos limiten el alcance de la invención, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Uso de la toxina botulínica en angioplastia de balón en la que no se usa una endoprótesis*

Un paciente de 54 años se queja de dolor en el pecho en una exploración en sala de urgencias. El paciente fuma de 2 a 3 paquetes de tabaco al día, tiene un peso promedio y antecedentes familiares de bloqueo arterial coronario. Se diagnostica al paciente como que tiene una oclusión de la arteria coronaria izquierda. Se usa un angiograma coronario para medir el estrechamiento de las arterias. Se estima que el paciente padece una oclusión del 80% de la arteria coronaria izquierda. Se le programa para un procedimiento de angioplastia de balón para la semana siguiente.

El médico comienza el procedimiento inyectando entre aproximadamente 0,05 unidades y aproximadamente 5 unidades de toxina botulínica de tipo A en la pared de la arteria coronaria izquierda del paciente. Tras la inyección, se deja dilatarse la arteria. Entonces se inserta un catéter de balón no elástico de 3 milímetros en la arteria femoral del paciente a través de la zona de la ingle / muslo superior. Entonces se traslada el catéter a través de la arteria hacia arriba hasta el corazón usando una pantalla de video para guiar el procedimiento. Se hace avanzar un cable de guía hasta la ubicación de la arteria bloqueada, y se hace pasar el catéter de balón a lo largo del cable de guía hacia la zona objetivo de bloqueo coronario. Cuando el catéter alcanza la zona objetivo, se hincha el balón durante un periodo de varios segundos a varios minutos. Tras deshinchar el balón, puede tratarse la misma zona con uno o más hinchados adicionales. La exploración revela poco o ningún daño a la arteria tratada.

Un año tras el procedimiento no hay signos de reestenosis y el paciente parece tener buena salud.

### Ejemplo 2

#### *Uso de la toxina botulínica en angioplastia de balón en la que se usa una endoprótesis*

Un paciente de 62 años que tiene un sobrepeso de aproximadamente el 30% y tiene un nivel de colesterol sérico de aproximadamente 260 se queja de dolor de pecho. Se diagnostica al paciente como que tiene bloqueo arterial coronario y se programa para un procedimiento de angioplastia coronaria transluminal percutánea.

Se inyectan entre aproximadamente 0,01 unidades y aproximadamente 1 unidad de toxina botulínica directamente en la pared de la arteria en la zona del bloqueo. Tras la inyección, se deja dilatarse la arteria. Entonces se introducen un catéter de balón elástico de 3 milímetros y una endoprótesis en la arteria interósea del paciente a través de la zona de la

muñeca. Entonces se trasladan el catéter y la endoprótesis a través de la arteria interósea hasta la zona de bloqueo. Se hace avanzar un cable de guía hasta la ubicación de la arteria bloqueada, y se hacen pasar el catéter y la endoprótesis a lo largo del cable de guía hasta la zona objetivo de bloqueo coronario. Cuando el catéter alcanza la zona objetivo, se hincha el balón y se expande correspondientemente la endoprótesis fijando la arteria abierta. Se deshinchas el balón y se retira dejando colocada la endoprótesis expandida. No hay signo de daño a la arteria.

Seis meses tras el procedimiento, no hay signos de reestenosis y el paciente parece estar en buena salud.

#### Ejemplo 3

##### *Uso de la toxina botulínica en angioplastia de balón con una endoprótesis para tratar un caso avanzado de reestenosis*

Se diagnostica a un paciente de 49 años con bloqueo arterial coronario como resultado de reestenosis. El paciente tiene antecedentes de bloqueo arterial coronario y se ha sometido previamente a un procedimiento de angioplastia de balón. Seis meses tras el procedimiento, se diagnostica al paciente un caso avanzado de reestenosis.

Se somete el paciente a un procedimiento de angioplastia coronaria transluminal percutánea en el que se usa toxina botulínica de tipo A, B, C, D, E, F y/o G. Se inyectan entre aproximadamente 0,1 unidades y aproximadamente 4 unidades de toxina botulínica en la pared del vaso sanguíneo en la zona de reestenosis. Tras la inyección, se deja dilatar la arteria. Entonces se insertan un catéter elástico de 4 milímetros y una endoprótesis en la arteria femoral del paciente. Entonces se trasladan el catéter y la endoprótesis a través de la arteria hasta la zona de bloqueo usando una pantalla de video para guiar el procedimiento. Se hace avanzar un cable de guía hasta la ubicación de la arteria bloqueada, y se hacen pasar el catéter y endoprótesis a lo largo del cable de guía hasta la zona objetivo del bloqueo coronario. Cuando el catéter y endoprótesis alcanzan la zona objetivo, se hincha el balón y se expande correspondientemente la endoprótesis sujetando la arteria abierta. Se deshinchas el balón y se retira dejando colocada la endoprótesis expandida. De 3 a 6 meses tras el procedimiento, vuelve a inyectarse en el vaso sanguíneo la toxina botulínica en la zona de la endoprótesis.

Dos años tras el procedimiento no hay signos de reestenosis y el paciente parece tener buena salud.

#### Ejemplo 4

##### *Angioplastia de balón en la que se usa una endoprótesis impregnada con toxina botulínica*

Se diagnostica una paciente de 58 años de edad con bloqueo arterial coronario. Se programa la paciente para un procedimiento de angioplastia coronaria transluminal percutánea en el que se usa una endoprótesis impregnada con toxina botulínica de tipo A, B, C, D, E, F y/o G.

Se inyectan entre aproximadamente 0,1 unidades y aproximadamente 2 unidades de una toxina botulínica en la pared del vaso sanguíneo en la zona de bloqueo. Tras la inyección, se deja dilatar la arteria. Entonces se insertan un catéter de balón elástico de 2 milímetros y una endoprótesis, que está recubierta o impregnada con una toxina botulínica, dentro de la arteria femoral de la paciente. Se hacen pasar el catéter y la endoprótesis a través de la arteria femoral hasta la zona de bloqueo usando una pantalla de video para guiar el procedimiento. Se hace avanzar un cable de guía hasta la ubicación de la arteria bloqueada, y se hacen pasar el catéter y la endoprótesis a lo largo del cable de guía hasta la zona objetivo del bloqueo coronario. Cuando el catéter y endoprótesis alcanzan la zona objetivo, se hincha el balón y se expande correspondientemente la endoprótesis manteniendo abierta la arteria. Se deshinchas el balón y se retira dejando colocada la endoprótesis expandida.

Un año tras el procedimiento no hay signos de reestenosis y la paciente parece tener buena salud.

#### Ejemplo 5

##### *Angioplastia de balón en la que se usa una endoprótesis de autoexpansión impregnada con toxina botulínica*

Se diagnostica un paciente de 50 años con bloqueo arterial coronario de la arteria coronaria izquierda y se le programa para un procedimiento de angioplastia coronaria transluminal percutánea en el que se usa una endoprótesis de autoexpansión impregnada con una toxina botulínica.

El médico comienza el procedimiento inyectando entre aproximadamente 0,1 unidades y aproximadamente 5 unidades de toxina botulínica de tipo A en la pared de la arteria coronaria izquierda del paciente. Tras la inyección, se deja dilatarse la arteria. Entonces se inserta una endoprótesis de autoexpansión impregnada con la toxina botulínica con un catéter en la arteria interósea común del paciente a través de la zona de la muñeca. Se hacen pasar el catéter y la endoprótesis a través de la arteria interósea hasta la zona del bloqueo. Se hace avanzar un cable de guía hasta la ubicación de la arteria bloqueada haciendo avanzar la endoprótesis de autoexpansión, impregnada con toxina botulínica, hasta la zona objetivo de bloqueo coronario. Cuando el catéter alcanza la zona objetivo, se expande la endoprótesis manteniendo abierta la arteria.

Dos años tras el procedimiento no hay signos de reestenosis y el paciente parece tener buena salud.

Ejemplo 6

*Inyección de la toxina botulínica mediante el uso de un sistema de inyección por catéter*

Una paciente de 51 años se queja de dolores de pecho. La paciente tiene sobrepeso y tiene un nivel de colesterol sérico de aproximadamente 270. Se diagnostica a la paciente como que tiene bloqueo arterial coronario. Se usa un angiograma coronario para medir el estrechamiento de las arterias. Se estima que la paciente padece una oclusión de desde el 70% hasta el 90% de una arteria coronaria. Se le programa para un procedimiento de angioplastia coronaria transluminal percutánea.

Se inyectan entre aproximadamente 0,01 unidades y aproximadamente 3 unidades de una toxina botulínica directamente en la pared de la arteria en la zona del bloqueo. Para la inyección, se inserta un catéter que incluye una o más agujas de inyección a través de la arteria femoral de la paciente a través de la zona de la ingle / muslo superior hasta la zona del bloqueo coronario. Allí, se inyecta la toxina botulínica dentro de la pared interna del vaso sanguíneo ocluido.

Tras la inyección de la toxina botulínica, se deja dilatar la arteria. Entonces se insertan un catéter de balón elástico de 3 milímetros y una endoprótesis impregnada con toxina botulínica tipo A dentro de la arteria femoral de la paciente. Se trasladan el catéter y la endoprótesis a través de la arteria femoral hasta la zona de bloqueo usando una pantalla de video para guiar el procedimiento. Se hace avanzar un cable de guía hasta la ubicación de la arteria bloqueada, y se hacen pasar el catéter y la endoprótesis a lo largo del cable guía hasta la zona objetivo de bloqueo coronario. Cuando el catéter alcanza la zona objetivo, se hincha el balón y se expande correspondientemente la endoprótesis manteniendo abierta la arteria. Se deshinchas el balón y se retira dejando colocada la endoprótesis expandida. No hay signos de daño al vaso sanguíneo.

Un año tras el procedimiento no hay signos de reestenosis y el paciente parece tener buena salud.

La invención también incluye dentro de su alcance el uso de una neurotoxina, tal como una toxina botulínica, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

REIVINDICACIONES

1. Un uso de toxina botulínica para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular mediante la administración directa a un vaso sanguíneo de un mamífero.

2. El uso según la reivindicación 1, en el que el mamífero está sometándose o se ha sometido a un procedimiento cardiovascular.

3. El uso según la reivindicación 1, en el que tratar la enfermedad cardiovascular previene la reestenosis.

4. El uso según la reivindicación 2, en el que el procedimiento cardiovascular es un procedimiento cardiovascular arterial.

5. El uso según la reivindicación 2, en el que el procedimiento cardiovascular es un procedimiento cardiovascular arterial coronario.

6. El uso según la reivindicación 2, en el que el procedimiento cardiovascular incluye angioplastia.

7. El uso según la reivindicación 6, en el que la angioplastia no incluye la etapa de insertar una endoprótesis en el vaso sanguíneo.

8. El uso según la reivindicación 1, en el que la administración incluye la etapa de inyectar la toxina botulínica en una pared del vaso sanguíneo.

9. El uso según la reivindicación 1, en el que la etapa de administración se logra usando una endoprótesis recubierta o impregnada con la toxina botulínica.

10. El uso según la reivindicación 1, en el que la toxina botulínica reduce o elimina el daño a un vaso sanguíneo.

11. El uso según la reivindicación 10, en el que la toxina botulínica reduce o elimina el daño a un vaso sanguíneo dilatando el vaso sanguíneo.

12. El uso según la reivindicación 10, en el que la toxina botulínica reduce o elimina el daño a un vaso sanguíneo reduciendo o eliminando la inflamación del vaso sanguíneo.

13. El uso según la reivindicación 1, en el que la toxina botulínica se selecciona del grupo constituido por toxina botulínica de tipos A, B, C, D, E, F, G, mezclas de las mismas y combinaciones de las mismas.

14. El uso según la reivindicación 1, en el que la toxina botulínica es la toxina botulínica de tipo A.

15. El uso de una toxina botulínica para la fabricación de un medicamento para prevenir la reestenosis en un vaso sanguíneo en un mamífero que puede producirse tras un procedimiento cardiovascular.

16. El uso según la reivindicación 15, en el que la reestenosis se previene evitando el daño en un vaso sanguíneo.

17. El uso según la reivindicación 15, en el que la reestenosis se previene evitando la inflamación en un vaso sanguíneo.

18. El uso según la reivindicación 15, en el que la reestenosis se previene dilatando un vaso sanguíneo antes o durante un procedimiento cardiovascular.

19. Una composición para su uso en un procedimiento cardiovascular que comprende una endoprótesis con una toxina botulínica unida o incrustada a la misma.

20. La composición según la reivindicación 19, en la que la toxina botulínica es la toxina botulínica de tipo A.