



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1502601 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 38/48 (2006.01) **A61P 13/10** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 1998.07.15	(73) Titular(es): THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO 201 REGENTS ADMINISTRATIVE CENTER BOULDER, CO 80309	US
(30) Prioridade(s): 1997.07.15 US 52580 P		
(43) Data de publicação do pedido: 2005.02.02		
(45) Data e BPI da concessão: 2006.09.25 012/2006	(72) Inventor(es): RICHARD A.SCHMIDT	US
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE TERAPIA COM NEUROTOXINA PARA TRATAMENTO DA
RETENÇÃO URINÁRIA**

(57) Resumo:

RESUMO**"UTILIZAÇÃO DE TERAPIA COM NEUROTOXINA PARA
TRATAMENTO DA RETENÇÃO URINÁRIA"**

O presente invento refere-se à utilização de uma toxina botulínica, em particular toxina tipo A, na preparação de uma composição farmacêutica para a retenção urinária que é secundária em relação quer a um colo da bexiga hipertrofiado quer a um esfíncter espasmódico. A toxina botulínica pode ser formulada numa formulação farmacêuticamente aceitável tal como um líquido, um pó, um creme, uma emulsão, uma pílula, um trocisco, supositórios, uma suspensão ou uma solução, e administrada no tracto urinário de um macho humano ou de uma fêmea humana.

DESCRIÇÃO

"UTILIZAÇÃO DE TERAPIA COM NEUROTOXINA PARA TRATAMENTO DA RETENÇÃO URINÁRIA"

Muitas condições médicas em urologia são originadas por uma disfunção espasmódica dos arcos reflexos do sacro. Exemplos de tais condições incluem a dor pélvica (e.g. cistite intersticial, endometriose, prostatodinia, síndromas de instabilidade uretral), elemento miofascial pélvico (e.g. esfíncter elevador, dismenorreia, fístulas anais, hemorróidas), incontinência urinária (e.g. bexiga instável, esfíncter instável), doenças da próstata (e.g. BPH, prostatite, cancro da próstata), infecção recorrente (secundária em relação aos espasmos do esfíncter) e retenção urinária (secundária em relação a um esfíncter espasmódico, canal de saída da bexiga hipertrofiada) e disfunção neurogénica da bexiga (e.g. doença de Parkinson, danos na espinal medula, trombose, esclerose múltipla, reflexos espasmódicos).

A próstata é uma glândula parcialmente glandular e parcialmente fibromuscular do sistema reprodutivo dos machos. Durante o envelhecimento, a próstata tende a aumentar (hipertrofia). Este aumento prostático pode conduzir a uma obstrução da uretra e a disfunção no esvaziamento da bexiga.

A dilatação prostática é uma ocorrência comum nos homens idosos. Lytton *et al.* (Lytton, B. Emery, J. M. e Harvard, B. M. [1973] 99: 639-645) estimou que um homem de 45 anos tem 10% de risco de vir a ter cirurgia da próstata aos 70 anos. O U.S. Census Report estima que há actualmente 30 milhões de pessoas com mais de 65 anos. Prevê-se que este segmento da população atinja 50 milhões nos próximos 30 anos. Por isso, o número de homens com dilatação prostática também aumentará. De acordo com os relatórios prévios do National Kidney and Urologic Disease Advisory Board, foram realizadas 425.000 prostatectomias nos Estados Unidos em 1989. Com base nas estimativas de crescimento populacional, estima-se que o número de prostactomias realizadas anualmente elevar-se-á a 800.000/ano no ano 2020.

A uretra passa através da próstata (uretra prostática) à medida que se dirige para o orifício uretal externo. A próstata possui cinco lóbulos distintos que se tornam evidentes às 12 semanas nos fetos humanos (Lowsley, O.S. Am. J. Anat. [1912] 13: 299-349). Embora a ramificação lobular encontrada no feto não seja visível na próstata pré-pubescente, os lóbulos anterior e posterior laterais médios são utilizados para descrever a próstata dilatada.

Um ponto de vista mais recente é o de que a próstata é também compreendida por várias zonas distintas morfológicas (McNeal, J. Urol. Clin. North Am. [1990] 17(3): 477-486). A maioria do volume glandular é composto

por zona periférica (~70-75%). O volume glandular remanescente está dividido na zona central (~20-25%), na zona de transição (~5-10%) e na zona glandular periuretral (~1%).

McNeal (1990) relatou que a BPH se desenvolve na zona de transição e na zona glandular periuretral. Os nódulos de BPH desenvolvem-se quer dentro quer de forma imediatamente adjacente à zona esfínctérica pré-prostática. A zona de transição é uma pequena região próxima da uretra intimamente relacionada com o esfíncter uretral proximal. O estroma da zona de transição é denso e compacto, e não é usualmente susceptível de perturbações de controlo do crescimento induzidas neurologicamente. As suas glândulas penetram no esfíncter, enquanto que as fibras do músculo do esfíncter penetra no estroma de transição. A zona glandular periuretral possui uma origem de sino urogénico semelhante à da zona de transição.

A BPH pode ser associada quantidades crescentes de estroma em relação ao epitélio (Bartsch, G., Muller, H. R., Oberholzer, M., Rohr, H., P., J. Urol. [1979] 122: 487-491). Uma porção significativa de estroma é de músculo liso (McNeal, 1990) que está sob controlo nervoso simpático. As propriedades contrácteis deste músculo liso podem ser responsáveis pela componente dinâmica de obstrução no BPH (Bruschini, H. et al. [1978] Invest. Urol. 15(4): 288-90; Lepor, H. [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 651-658).

Adicionalmente ao controlo simpático do estroma prostático, a próstata é altamente enervada. As fibras dos nervos da próstata entram na próstata a partir da parte lateral posterior, com uma concentração de gânglios próximos da junção entre a próstata e as vesículas seminais (Maggi, C.A., ed. [1993] *Nervous Control of the Urogenital System*, Harwood Academic Publishers; Higgins, J.R.A. e Gosling, J.A. [1989] *Prostate Suppl.* 2: 5-16]. A acetilcolina (ACH), neuropéptido Y (NPY), péptido intestinal vasoactivo (VIP) e fibras de noradrelanina foram descritos nesta glândula. Um plexo rico em células nervosas positivas ao ACH está associado a ácinos excretórios em todas as partes da glândula. Algumas fibras de ACH também contém neurónios NPY. Verificou-se que os neurónios contendo VIP estavam associados às células nervosas contendo ACH. Neurónios ocasionais têm sido encontrados entre as fibras nervosas que formam mancha com ACH, sugerindo que quer os neurónios NPY quer noradrenérgicos fornecem músculo liso (Higgins, J. R. A. E Gosling, J.A. [1989] *Prostate Suppl.* 2: 5.-16).

Os nervos autonómicos estão distribuídos uniformemente entre as zonas central e periférica da próstata (Higgins, J. R. A. E Gosling, J.A. [1989] *Prostate Suppl.* 2: 5-16). O controlo neuronal periférico é semelhante. Adicionalmente, não existe diferença no tipo de fibras nervosas que se verificou estarem associadas quer aos elementos epiteliais quer estromais da glândula.

Os estudos anatómicos dos tipos de fibras nervosas na próstata, associados a outros estudos da inervação do estroma prostático (Brushing H., Schmidt, R.A., Tanagho, E.A., [1978] Invest. Urol. 15(4): 288-290; Watanabe, H., Shima, M., Kojima, M., Ohe, H.L. [1989] Pharmacol. Res. 21 (Suppl 2): 85-94) sugerem que a inervação colinérgica influencia o comportamento epitelial, enquanto que a inervação adrenérgica influencia o tónus estromal (excitabilidade). Estas observações proporcionaram o fundamento para a utilização de, por exemplo, bloqueadores alfa no tratamento da BPH. Os efeitos dos bloqueadores alfa (Downie, J. W. e Bialik, G. J. [1988] J. Pharmacol. Exp. Ther. 246 (1): 352-358) podem também ajudar na melhoria dos sintomas da BPH como resultado da diminuição do comportamento do esfíncter estriado disfuncional pelos bloqueadores alfa.

Os estudos demonstraram também que há várias taquicinininas (por exemplo, a substância P [SP], o péptido relacionado com o gene de calcitonina [CGPR], neurocinina A, bradicinina e o factor de crescimento dos nervos [NGF] que podem influenciar o tónus do músculo liso (Hakanson, *et al.*, [1987] Neuroscience 21(3): 943-950). Os receptores do neurotransmissor foram quantificados ao longo da próstata (e.g. NPY, VIP, SP, leu-encefalina (L-enk), met-encefalina, 5-HT, somatostatina, fibras positivas de acetilcolinesterase (AChE), e beta-hidroxilase de dopamina (DBH) (Crowe, R., Chapple, C.R., Burnstock, G., The Human Prostate Gland: A Histochemical and Immunohistochemical Study of Neuropeptides, Serotonins, Dopamine beta-Hydroxylase and

Acetylcholinesterase in Autonomic Nerves and Ganglia). Existe alguma variação na densidade de receptores em diferentes locais prostáticos na hiperplasia prostática benigna.

Mostrou-se que as alterações no comportamento celular registado electrofisiologicamente e na concentração dos neuropeptídeos dentro da espinal medula são uma consequência secundária do beliscão mecânico nos músculos da cauda de uma ratazana, estimulação por cateter da uretra posterior e electroestimulação de um nervo periférico. A ataxia entre o músculo vesical e o esfíncter uretral é uma descoberta significativa para pacientes de prostatodinia. Mostrou-se que a desnervação da próstata produzia alterações dramáticas dentro do epitélio prostático. Deste modo, existe evidência de que as alterações experimentalmente induzidas em influências neurológicas podem ser produzidas no sacro, espinal medula, bexiga ou uretra através de métodos mecânicos, eléctricos, químicos ou térmicos (microondas, laser) para alterar o comportamento irritante. Contudo, não têm havido tentativas de utilizar neurotoxinas para aplicações terapêuticas.

Existe uma correlação pobre entre o grau de aumento prostático e a severidade dos sintomas. Embora 80% dos homens com 70 anos de idade apresentem BPH ou sinais em exames transrectais por ultrassons, apenas 20% necessitam de cirurgia (Coffrey, D.S. e Walsh, P.C. [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 461-475), o tratamento escolhido para a

BPH (Fowler, F.J. Jr., Wennberg, J.E., Timothy, R.P. [1988] J. Amer. Med. Assoc., 259(20): 3022-3028). Os sintomas de irritação podem exceder, de longe, os sintomas esperados com base na dimensão da próstata. Os sintomas podem melhorar após tratamento cirúrgico da BPH através de procedimentos, tais como ressecção transuretral da próstata (TURP) (Christensen, Aagaard, M.M.J., Madsen, P.O. [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 621-628), dilatação por balão (Doed, J.B. e Smith, J.J. III [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 671-677), ou hipertermia prostática (Baert, L., Ameye, F., Willemen, P., et al. [1990] J. Urol. 144: 1383-1386). Contudo, os sintomas persistem em 15% dos pacientes de BPH (Baert, L., Ameye, F., Willemen, P., et al. [1990] J. Urol. 144: 1383-1386; Wennberg, J.E., Mully, A.G., Hanley, D., Timothy, R.P., Fowler, F.J., Roos, R.P., Barry, M.J. et al., [1988] J. Amer. Med. Assoc. 259: 3027-3030). Até 25% dos pacientes de BPH têm procedimentos secundários em estudos de seguimento de longo prazo, sugerindo que as aproximações cirúrgicas não se dirigem aos mecanismos fundamentais que produzem a BPH, i.e. a influência neurológica defeituosa (mecanismo de controlo) na integridade do tracto urinário inferior.

A necessidade de repetidas cirurgias, a morbidez e mortalidade associadas à TURP e o custo da cirurgia conduziram ao desenvolvimento de algumas aproximações não cirúrgicas, tais como a ablação andrógena (McConnell, J.D., [1990] Urol. Clin. North Am. 17(3): 661-670) e a utilização de bloqueadores alfa discutidos atrás mas, até à data,

poucos tratamentos médicos ou cirúrgicos produziram uma restauração no comportamento do esvaziamento da bexiga a um estado normal (um caudal de cerca de 25 cc/seg e um volume de esvaziamento de cerca de 400 cc).

OBJECTIVOS E SUMÁRIO DO PRESENTE INVENTO

O invento proporciona a utilização da toxina botulínica, na preparação de uma composição farmacêutica para tratamento da retenção urinária que é secundária em relação quer a uma bexiga hipertrofiada quer a um esfíncter espasmódico.

A toxina botulínica inibe a função sináptica. Tal inibição produz uma desnervação selectiva e, por exemplo, atrofia da próstata e inversão dos sintomas irritativos associados ao aumento prostático. Numa forma de concretização do presente invento, a neurotoxina induz disfunção do terminal neuronal pré-sináptico através de ligação específica e blocagem da libertação da acetilcolina nas junções mioneuronais. Uma tal neurotoxina pode ser, por exemplo, a toxina botulínica do tipo A (Botox, Allergen).

Preferencialmente, a neurotoxina é segura, altamente selectiva e fácil de administrar, mesmo quando combinada com outras terapias. A administração da neurotoxina pode ser feita através de quaisquer meios adequados. Um método conveniente e localizado de administração é por injeção.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz da neurotoxina é a dosagem suficiente para inibir a actividade neuronal durante, pelo menos, uma semana, mais preferencialmente um mês, muito preferencialmente durante aproximadamente 6 a 8 meses ou mais. O doseamento pode ser numa dosagem simples ou cumulativa (dosagem em série) e pode ser rapidamente determinada por um especialista na matéria. A neurotoxina pode ser administrada em série (*i.e.* uma vez por mês, uma vez a cada seis meses) de modo a que o efeito terapêutico possa ser optimizado. Tal esquema de dosagem é rapidamente determinado por um especialista na matéria com base em *e.g.* tamanho do paciente e condição a ser tratada, e dependerá de muitos factores, incluindo a neurotoxina seleccionada, a condição a ser tratada, o grau de irritação e outras variáveis. Um tratamento sugerido para a BPH é o de 200 unidades a cada três dias até ao LD50 do Botox ou cerca de 2500 unidades.

Os métodos de tratamento atrás mencionados devem ser particularmente úteis para o controlo a longo prazo de doenças da retenção urinária, sem a necessidade de intervenção cirúrgica. Além disso, os métodos do presente invento proporcionam o controlo da retenção urinária, de maneira altamente selectiva, sem os potenciais efeitos secundários e as falhas de tratamento associadas às modalidades de tratamento correntes.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA FORMA DE CONCRETIZAÇÃO
PREFERIDA

Sem se ficar ligado a qualquer teoria, a base para o tratamento de condições neurológicas-urológicas, de acordo com o presente invento, é a remoção ou modulação da base neuronal da regulação da disfunção do tecido afectado. É preferido que a neurotoxina provoque uma inibição de longa duração da função sináptica, preferencialmente superior a uma semana, mais preferencialmente superior a um mês, muito preferencialmente seis a oito meses ou mais. A toxina botulínica é uma neurotoxina preferida de acordo com o presente invento, particularmente a toxina botulínica A, mais particularmente o Botox (Allergan).

A toxina pode ser formulada sob a forma de qualquer formulação farmacêuticamente aceitável com qualquer forma farmacêuticamente aceitável. Tais formas e formulações incluem, líquidos, pós, cremes, emulsões, pílulas, trociscos, supositórios, suspensões, soluções e outros do género. A toxina pode ser também utilizada sob qualquer forma farmacêuticamente aceitável fornecida por qualquer fabricante.

Numa forma de concretização preferida de acordo com o método do presente invento, a neurotoxina é a toxina botulínica tipo A. As quantidades terapêuticamente eficazes da toxina botulínica podem ser quaisquer quantidades ou

doses que sejam inferiores a uma dose tóxica, por exemplo, inferior a cerca de 3000 IU/macho de 70 kg, preferencialmente entre 100 IU/macho de 70 kg a 1200 IU/70 kg. As dosagens podem ser administradas como dose única, ou em doses divididas, por exemplo, divididas ao longo de quatro semanas.

As neurotoxinas do presente invento podem ser administradas através de quaisquer meios adequados. Na forma de concretização preferida do invento, a toxina botulínica é administrada por injeção. Tal injeção pode ser administrada a qualquer área afectada. Por exemplo, a neurotoxina pode ser injectada uretroscopicamente na próstata com 200 IU, com dosagem única ou em série. Preferencialmente, a neurotoxina é injectada a cada três dias até se conseguir um efeito terapêutico ou até cerca de 2500 unidades.

São utilizadas as técnicas seguintes:

Preparação de Tecidos para Microscopia Óptica

Os tecidos são fixados em paraformaldeído a 6% num tampão de fosfato a 0,1 M, pH 7,2, durante 24 horas, desidratados em álcool graduado e xileno, e encerrados em parafina. São cortadas secções e coradas com corantes apropriados, tais como hematoxilina/eosina.

Preparação de Tecidos para Microscopia Electrónica

Os tecidos são recolhidos e fixados em glutaraldeído a 2,5% num tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, durante 1 hora a 4°C, e então incubados com tetróxido de ósmio 0,1% durante 1 hora e encerrados em EPON. Secções ultrafinas (80 nm) são preparadas e coradas com citrato de chumbo/acetato de uranilo e examinadas com um microscópio electrónico (Philips, modelo 201).

Coloração de TUNEL para Apoptose

O tecido é fixado e encerrado, tal como descrito atrás. Os tecidos são desparafinados e feitos reagir com Proteinase K (Boehringer). Estes são ainda tratados com peroxidase e enzima TDT e colocados num humidificador ajustado para 37°C, durante uma hora. As secções são lavadas e adiciona-se anti-digoxigenina-peroxidase durante 30 minutos, seguido por coloração com níquel-DAB (diaminobenzeno).

Estudos de Imuno-Histoquímica

A presença dos neuropeptídeos VIP, SP, NPY, L-Enk e o péptido relacionado com o gene de calcitonina (CGRP) assim como a expressão da transformação do factor beta de crescimento (TGF-beta), transformação do factor alfa de crescimento (TGF-alfa), factor de crescimento epidérmico (EGF) e factor de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) são determinados em tecidos prostáticos utilizando anti-

corpos monoclonais adequados. A utilização de neurotoxinas resulta em atrofia prostática, que deve ser reflectida pelos baixos níveis de factores de crescimento em tecido prostático tratado.

As secções são incubadas, durante a noite, à temperatura ambiente, com anticorpos primários seguido de imunocoloração com avidina-biotina-peroxidase (Vectastain Elite ABC, Vector labs, EUA). É utilizado anti-soro policlonal de coelho contra os neurotransmissores VIP, CGRP, SP, NPY e L-Enk (Peninsula Labs, EUA) nestas preparações, com diluições de 1:8000 a 1:12.000. Os controlos imunocitoquímicos consistem numa pré-absorção do anti-soro primário com um antigénio adequado, ou a sua substituição com soro normal (Blasi, J., Chapman, E.R., Yamaski, S., Binz, T.a, Niemann, H. e Jahn, R. [1993] The EMBO Journal 12: 4821-4828; Black, J.D. e Dolly, J.O. [1986] J. Cell Biol. 103: 535-544; Linial, M. [1995] Is. J. Med. Sci. 31: 591-595). Após montagem nas lâminas, as secções são contrastadas com eosina, desidratadas e cobertas com as lamelas.

Análise da Expressão do Factor de Crescimento por Coloração WESTERN

Homogenatos de células da próstata tratada e não tratada são examinados no que se refere à expressão de factores de crescimento por análise de coloração WESTERN. As proteínas do homogenato de células são separadas por

electroforese em SDS-PAGE (7%), e então transferidas electroforeticamente durante a noite para papel de nitrocelulose (Towbin, H., et al. [1979] Proc. Nat.Acad. Sci. 76(9): 4350-4379). O papel de nitrocelulose é embebido durante uma hora à temperatura ambiente em leite seco magro a 0,5% dissolvido numa solução salina tamponada de fosfato, e ainda mais embebidas durante a noite a 40°C numa solução bloqueante (albumina de soro bovino a 2% em Tris 10 mM/NaCl 0,15 M/ azida de sódio a 0,1%, pH 7,4). As membranas de nitrocelulose são incubadas com anticorpos (fracções IgG de anti-TGF-beta, anti-TGF-alfa, anti-EGF e anti-bFGF) purificados com proteína A (1×10^6 cpm/ml) em tampão bloqueante durante 1 hora. A membrana é lavada com PBS contendo Nonidet P-40 entre incubações. Um filme X-O-mat AR2 (Kodak) é exposto à membrana, a -70°C e os filmes são revelados para examinar a expressão de factores de crescimento.

Determinação da Expressão de c-fos e c-myc

A expressão de c-fos e c-myc em tecido prostático tratado e não tratado é determinada por análise de coloração NORTHERN como se segue. O tecido é homogeneizado em tampão de lise durante 15 segundos ou até o tecido homogeneizar. É adicionado acetato de sódio e a solução é misturada por agitação. É adicionado um volume igual de fenol saturado com água e misturado por inversão, seguido de adição de clorofórmio/álcool isoamílico. A solução é agitada vigorosamente durante 30 segundos e deixada em repouso sobre gel durante 15 minutos. A solução é centrifugada durante 10-20 minutos a 4°C. Após centrifugação, a

fase aquosa é cuidadosamente aspirada e colocada num tubo de polipropileno novo. É adicionado um volume de isopropanol e a solução é misturada por agitação. A solução é colocada num frigorífico, a -20°C , durante pelo menos 60 minutos para precipitar RNA. Após a precipitação, o tubo é centrifugado, durante 10 minutos, e o sobrenadante é decantado deixando um pelete de RNA. É adicionado um ml de etanol, e o tubo é centrifugado, durante 10 minutos adicionais. A fase aquosa é deitada fora, e o pelete é lavado com etanol a 100% por agitação. O pelete de RNA é redissolvido em 0,4 ml de tampão de lise. O RNA é reprecipitado por adição de etanol a 100% e incubação, a -20°C , durante pelo menos 60 minutos. A solução é centrifugada e o sobrenadante é deitado fora. A concentração de RNA é determinada por diluição de 5 μl de amostra em 995 μl de água com DEPC e medindo-se a absorvância a 260/280 nm.

São proporcionados os exemplos seguintes por descrição de formas de concretização específicas sem se pretender limitar de qualquer maneira o domínio do invento.

Exemplo 1

Efeito da Injecção de Neurotoxina em Disfunções Urológicas:
Dados Humanos

Três pacientes com disfunção de esvaziamento da bexiga recalcitrante foram tratados com injeções de toxina botulínica (Botox) como se segue. O paciente 1 era um homem de 47 anos que ficou incontinente a seguir a danos nas

vértebras cervicais (nível C6-C7) 14 meses antes. A urodinâmica apresentada revelou uma capacidade da bexiga de 30 cc e um fraco esfíncter (pico da pressão uretral de 40 cm de água). Tinha falhado vários regimes farmacológicos e era intolerante a dispositivos de retenção presos no pénis.

Recebeu injeções de toxina botulínica de 200 IU durante quatro semanas no canal de saída da bexiga numa dose total de 800 IU. Após a injeção as capacidades da sua bexiga variaram de 300-400 cc com oxibutinina e 150-200 cc sem oxibutinina. Os picos das pressões da bexiga pré-injeção tinham sido de 200 cm de água, em comparação com as pressões da bexiga pós-injeção de 40 cm de água. O paciente ficou continente com um sistema de retenção peniano após o tratamento com a toxina botulínica. Adicionalmente, o caminhar e as ereções melhoraram devido à reduzida espasmocidade da bexiga.

O paciente 2 era mulher paraparética T12 de 55 anos secundária em relação a lesão traumática 14 anos antes. A paciente apresentava-se com incontinência de urgência, e tinha estado em auto-cateterização de duas em duas horas durante o dia e duas vezes à noite. A paciente recebeu injeções na parede lateral da bexiga em duas injeções semanais de 200 IU cada, para um total de 400 IU de toxina botulínica. Os dados diários de eliminação de urina da paciente revelaram capacidades de pré-injeção de entre 150-200 cc. Os dados diários pós-injeção indicaram que a capacidade da bexiga aumentou até 300-400 cc. Para além disso, a paciente não mais teve incómodos de disfunção

do tipo urgência constante, dormiu toda a noite e e foi continente por auto-cateterização de 4 em 4 horas.

O paciente 3 era um homem de 65 anos com uma dor perineal incapacitante a seguir a um tratamento por radiação de cancro da próstata. O paciente falhou a terapia médica. Este foi tratado com uma injeção de 200 IU de toxina botulínica no esfíncter uretral externo. O paciente experimentou um alívio dramático da dor nos testículos e tinha uma dor muito menos severa no corpo do pénis. As erecções não foram afectadas.

Exemplo 4

Determinação da Mais Pequena Dose Eficaz

As ratazanas macho foram injectadas nos lóbulos ventrais da próstata com doses únicas, e em série, de toxina botulínica (Botox). As próstatas foram recolhidas em diferentes intervalos de tempo para determinar a dose eficaz mais pequena, assim como as alterações morfológicas e fisiológicas que aconteceram ao longo do tempo. A dose eficaz mais pequena é definida como a dose que demonstra uma diminuição do volume da próstata.

Para avaliar a resposta à estimulação do campo eléctrico, foram montadas preparações entre dois eléctrodos de platina colocados no banho do órgão. A tensão das preparações é ajustada. A estimulação transmural dos nervos

é realizada utilizando um Danted Neuromatic 200 Stimulator aplicando pulsos únicos de onda quadrada de voltagem supramaximal com uma duração de 0,8 milissegundos com uma frequência de 0,5 a 80 hertz. A polaridade dos eléctrodos é alterada após cada pulso por meio de uma unidade de alteração da polaridade. A duração da série é de cinco segundos e o intervalo da série é de 120 segundos. A tensão isométrica é registada num registador térmico Gould de 8 canais. Foram realizadas experiências separadas para determinar a tensão de pré-carga que produz respostas óptimas. Adicionalmente, é determinado o efeito da estimulação do campo eléctrico na presença de concentrações diferentes de neuropéptidos individuais. Estes neuropéptidos são adrenalina 10-20 μM , clonidina 10 μM , regitina 5-50 nM, acetilcolina 10 nM-0,1 μM , atropina 1-3 μM , nifedipina 1 nm-10 μM , VIP 1-10 nM e NPY 1-250 nM. O efeito do nitroprusside (uma substância que liberta óxido nítrico) e azul de metileno (um inibidor de ciclase de guanilato) na tonicidade e contracção da próstata que resulta da estimulação do campo é também examinado nestes tecidos.

Exemplo 5

Efeito da Toxina Botulínica no Tecido Prostático da Ratazana: Comparação de Ratazanas Hormonalmente Intactas com Ratazanas Hormonalmente Desprovidas

Para determinar se existe qualquer interacção entre a neurotoxina e as hormonas testicularmente deriva-

das, foram realizados estudos que examinarão a interacção da neurotoxina com componentes hormonais. Estes estudos compararão o tecido prostático tratado com toxina botulínica recolhido em ratazanas que sofreram orquiectomia (ratazanas hormonalmente desprovidas) e tecido prostático de ratazanas tratadas com toxina botulínica que não sofreram orquiectomia. Cinquenta e dois ratos com a mesma idade são tratados, tal como descrito abaixo. Quatro ratos saudáveis sofrerão uma operação falsa que consiste em indução de anestesia, exposição da próstata e injeção de 0,2 cc de solução salina no lóbulo ventral esquerdo da próstata. A três ratazanas foi efectuada uma orquiectomia bilateral sem injeção na próstata (controles hormonalmente desprovidos), cinco ratazanas sofrerão orquiectomia e injeção de 0,2 ml de solução salina no lóbulo ventral esquerdo (desprovemento hormonal + controlo de estresse cirúrgico). Quatro grupos de ratazanas receberam injeções de toxina botulínica de apenas 0,5 IU, 1,0 IU, 1,5 IU e 2,5 IU (ratazanas experimentais hormonalmente intactas). Dezasseis ratazanas sofreram orquiectomia bilateral. Oito destas ratazanas são tratadas com uma única injeção de 2,5 IU de toxina botulínica no lóbulo ventral esquerdo 5 semanas após a cirurgia. Todas as ratazanas foram sacrificadas após seis semanas, e a próstata recolhida é preparada para exame, tal como descrito acima. Espera-se um efeito atrófico semelhante no epitélio glandular.

A descrição precedente do invento é um exemplo para fins de ilustração e explicação. Será evidente para os

peritos na matéria que são possíveis alterações e modificações sem se sair do espírito e âmbito do invento. Todos os documentos aqui citados são deste modo aqui incorporados por referência. Pretende-se que as reivindicações que se seguem sejam interpretadas como englobando todas estas alterações e modificações.

Lisboa, 9 de Outubro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. A utilização de uma toxina botulínica na preparação de uma composição farmacêutica para tratar a retenção urinária que é secundária em relação quer a um colo da bexiga hipertrofiado quer a um esfíncter espasmódico.

2. A utilização da reivindicação 1, em que a retenção urinária é secundária em relação a um esfíncter espasmódico.

3. A utilização da reivindicação 1, em que a retenção urinária é secundária em relação a um colo da bexiga hipertrofiado.

4. A utilização da reivindicação 3, em que a composição é proporcionada numa forma que é adequada para injeção no esfíncter urinário, parede da bexiga ou colo da bexiga de um paciente.

5. A utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a toxina botulínica é formulada sob a forma de uma formulação farmacêuticamente aceitável selecionada a partir do grupo constituído por: um líquido, um pó, um creme, uma emulsão, uma pílula, um trocisco, um supositório, uma suspensão e uma solução.

6. A utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a toxina botulínica é formulada sob a forma de uma formulação farmacêuticamente aceitável seleccionada a partir de um creme, uma suspensão ou uma emulsão.

7. A utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a toxina botulínica é formulada sob a forma de uma formulação injectável, farmacêuticamente aceitável, seleccionada a partir de um líquido, um creme, uma emulsão, uma suspensão ou uma solução.

8. A utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a composição é uma composição injectável.

9. A utilização de qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a toxina botulínica é uma toxina botulínica do tipo A.

Lisboa, 9 de Outubro de 2006