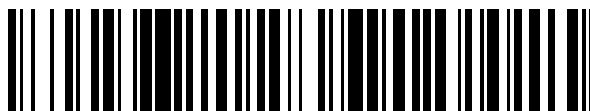


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 731**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 47/10 (2007.01)

A61K 47/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2015 PCT/US2015/042988**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16019180**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2015 E 15748420 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3174523**

54 Título: **Formulaciones de productos biológicos para instilación intravesical**

30 Prioridad:

31.07.2014 US 201462031302 P

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

27.04.2021

73 Titular/es:

**ALLERGAN, INC. (100.0%)
2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US**

72 Inventor/es:

**FORSSEN, ERIC A.;
HUGHES, PATRICK M. y
RUPP, DAVID C.**

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 821 731 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

Formulaciones de productos biológicos para instilación intravesical

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden un derivado de *Clostridium* y a métodos de uso de las mismas. En particular, la presente divulgación se refiere a formulaciones farmacéuticas que contienen un derivado de *Clostridium* para instilación vesical.

10

Antecedentes

Las terapias con neurotoxinas, en particular toxinas botulínicas, se han usado en tratamientos de diversos procesos patológicos, incluyendo estados urológicos tales como vejiga hiperactiva (OAB, por sus siglas en inglés) e hiperactividad del detrusor.

15

La terapia con toxinas botulínicas para tratar trastornos de la vejiga tales como vejiga hiperactiva (OAB), hiperactividad del detrusor asociada con un estado neurológico, se administra normalmente mediante inyección a través de la pared de la vejiga urinaria y en los tejidos musculares debilitados que rodean la vejiga. Este enfoque requiere la administración de aproximadamente treinta a cuarenta inyecciones a través de la pared de la vejiga, tal como se muestra en la figura 1. La administración farmacéutica mediante inyección puede provocar dolor localizado, y exponer posiblemente a los pacientes a enfermedades de transmisión hemática. Entre las vías de administración alternativas, la instilación intravesical permite que se administre un fármaco directamente en la vejiga cruzando la pared de la vejiga.

20

25

La pared de la vejiga es impermeable a la mayoría de las sustancias. Tal como se muestra en la figura 2, el urotelio estratificado consiste en tres capas celulares: células en paraguas, células intermedias y células basales. Las células basales son células germinales que a través de la división celular reemplazan células intermedias que se diferencian parcialmente. Las células en paraguas muy diferenciadas y polarizadas están ubicadas en la luz de la vejiga y son la barrera física principal para el movimiento de sustancias entre la sangre y la orina. La membrana apical de las células en paraguas está cubierta con placas que consisten en proteínas denominadas uroplaquinas y proporcionan a la membrana apical un aspecto grueso. Las células en paraguas también contienen uniones herméticas que restringen el movimiento paracelular de orina y moléculas más grandes a través del epitelio.

30

35

El documento WO2013/153550 divulga composiciones que comprenden un polímero mucoadhesivo y opcionalmente un potenciador de la penetración para tratar trastornos de la vejiga.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de formulaciones farmacéuticas que puedan mejorar la administración a través de la pared de la vejiga urinaria en lugar de la administración parenteral.

40

Sumario de la invención

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas para administración intravesical (a la vejiga urinaria), que comprende un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización, que puede permear la pared de la vejiga de un paciente y retener la bioactividad del derivado de *Clostridium* para provocar un efecto terapéutico deseado. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

45

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización, en la que el derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica, y en la que el al menos un agente de permeabilización comprende un tensioactivo no iónico y un mucoadhesivo, que es un polímero catiónico, y en la que el al menos un agente de permeabilización está presente en una cantidad eficaz para aumentar sustancial y reversiblemente la permeabilidad de la pared de la vejiga frente al derivado de *Clostridium*.

50

Según otro aspecto, la presente divulgación también proporciona composiciones para su uso para tratar trastornos médicos en un paciente, tal como se define en la reivindicación 10. En una realización, los presentes métodos alivian uno o más síntomas de los trastornos médicos. En una realización, los trastornos médicos incluyen disfunción de vejiga idiopática neurógena o dolor de vejiga. En algunos aspectos, se proporciona una composición para su uso para tratar un paciente con una disfunción neurógena de la vejiga o idiopática, dolor de vejiga, que comprende: aplicar por instilación por vía intravesical en la vejiga del paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de *Clostridium* que es una toxina botulínica y al menos un agente de permeabilización que comprende un tensioactivo no iónico y un mucoadhesivo, que es un polímero catiónico, y en la que el al menos un agente de permeabilización está presente en una cantidad eficaz para aumentar sustancial y reversiblemente la permeabilidad de la pared de la vejiga frente al derivado de *Clostridium* a una tasa terapéuticamente eficaz. Las composiciones para su uso según la reivindicación 10 son para su uso en el tratamiento de un paciente con una disfunción neurógena de la vejiga.

60

65

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una inyección intracistinal de la técnica anterior de una toxina botulínica a la pared de la vejiga;

las figuras 2A-2C son diagramas esquemáticos del urotelio, en los que:

A) el urotelio consiste en tres capas celulares: células basales, intermedias y en paraguas superficiales.

B) Las células en paraguas presentan placas sobre su membrana apical y una red citoplasmática de vesículas que contienen fibrillas unidas a la unión hermética y las desmosomas en la membrana basal lisa.

C) La membrana apical del urotelio vista para la luz muestra la placa y las regiones bisagra.

La figura 3 es un diagrama pictórico que establece una base para evaluar la extensión de la penetración en la vejiga de una formulación de prueba; en el que se usó SNAP 25 escindida como biomarcador de la actividad del BOTOX® en los terminales sinápticos, y se usó la expresión de sinaptofisina para identificar terminales sinápticos y para asegurar la especificidad de la ubicación de SNAP 25 escindida. La extensión de la penetración se correlacionó con la extensión de la tinción de SNAP25-197;

la figura 4 es un diagrama pictórico que muestra los resultados de la inmunohistoquímica a modo de ejemplo de dos vejigas que tenían puntuaciones de IHC de "4" y "0"; en el que se usó SNAP 25 escindida como biomarcador de la actividad del BOTOX® en los terminales sinápticos, y se usó la expresión de sinaptofisina para identificar terminales sinápticos y para asegurar la especificidad de la ubicación de SNAP 25 escindida;

las figuras 5A-5D son microfotografías ilustrativas que muestran diferentes estados del tejido vesical después de la instilación; y

la figura 6 es un gráfico que presenta las puntuaciones de inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) de algunas formulaciones a modo de ejemplo según aspectos de la presente divulgación.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Las neurotoxinas botulínicas (BoNT), por ejemplo, BoNT/A, BoNT/B, etc., actúan sobre el sistema nervioso bloqueando la liberación de sustancias neurosecretoras incluyendo los neurotransmisores. La acción de la BoNT se inicia por su unión a una molécula receptora sobre la superficie celular. El complejo toxina-receptor resultante experimenta luego endocitosis. Una vez dentro de la célula, la BoNT escinde proteínas específicas exocitóticas responsables del acoplamiento de neurotransmisores y la liberación desde la célula conocidas como proteínas SNARE (receptor de proteínas de fijación soluble del factor sensible a la N-etilmaleimida). La quimiodesnervación transitoria resultante se ha utilizado de manera médica para bloquear la neurotransmisión motora a la unión neuromuscular, lo que conduce a una variedad de aplicaciones terapéuticas.

(A) Una realización de la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización, en la que el derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica, y en la que el al menos un agente de permeabilización comprende un tensioactivo no iónico y un mucoadhesivo, que es un polímero catiónico, y en la que el al menos un agente de permeabilización está presente en una cantidad eficaz para aumentar sustancial y reversiblemente la permeabilidad de la pared de la vejiga frente al derivado de *Clostridium*.

(B) La composición farmacéutica de la realización (A), en la que el tensioactivo comprende un alquil aril poliéter.

(C) La composición farmacéutica de la realización (A), en la que el mucoadhesivo comprende quitosano.

(D) La composición farmacéutica de la realización (A), en la que el tensioactivo está presente en una cantidad que oscila desde el 0,01% hasta el 0,5% (p/v).

(E) La composición farmacéutica de la realización (B), en la que el mucoadhesivo está presente en una cantidad que oscila desde el 0,01% hasta el 5% (p/v).

(F) La composición farmacéutica de la realización (B), en la que el tensioactivo comprende octoxinol-9.

(G) La composición farmacéutica de la realización (B), en la que el tensioactivo comprende nonoxinol-9.

(H) La composición farmacéutica de la realización (F), en la que el tensioactivo está presente en una cantidad del 0,1% (p/v).

(I) La composición farmacéutica de la realización (J), en la que el tensioactivo está presente en una cantidad del 0,1% (p/v).

5 (J) La composición farmacéutica según la realización (A) para su uso en el tratamiento de un paciente con una disfunción neurógena de la vejiga, que comprende: aplicar por instilación por vía intravesical a la pared de la vejiga del paciente la composición farmacéutica anterior.

10 (K) La composición farmacéutica para su uso según la realización (A), en la que el tensioactivo comprende un alquil aril poliéter.

(L) La composición farmacéutica para su uso según la realización (A), en la que el mucoadhesivo comprende quitosano.

15 (M) La composición farmacéutica para su uso según la realización (J), en la que el tensioactivo está presente en una cantidad que oscila desde el 0,01% hasta el 0,5% (p/v).

(N) La composición farmacéutica para su uso según la realización (L), en la que el mucoadhesivo está presente en una cantidad que oscila desde el 0,01% hasta el 5% (p/v).

20 (O) La composición farmacéutica para su uso según la realización (K), en la que el tensioactivo comprende octoxinol-9.

Definiciones

25 Tal como se usan en el presente documento, las palabras o los términos expuestos a continuación tienen las siguientes definiciones:

30 “Principio activo farmacéutico” (API, por sus siglas en inglés) significa un componente que ejerce un efecto al administrarse o tras administrarse a un sujeto o paciente. Los API pueden incluir una toxina botulínica nativa o recombinante.

35 “Administración” o “administrar” significa la etapa de proporcionar (es decir, administrar) una composición farmacéutica a un sujeto, o alternativamente un sujeto que recibe una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden administrarse de manera local mediante diversos métodos. Por ejemplo, administración intramuscular, intradérmica, subcutánea, administración intratecal, administración intraperitoneal, tópica (transdérmica), instilación e implantación (por ejemplo, de un dispositivo de liberación lenta tal como un implante polimérico o bomba miniosmótica) pueden ser todas vías apropiadas de administración.

40 “Alivio” significa una reducción en la aparición de un dolor, de una cefalea, de un músculo hiperactivo, o de cualquier síntoma o causa de un estado o trastorno. Por tanto, alivio incluye alguna reducción, reducción significativa, reducción casi total y reducción total.

45 “Libre de proteína animal” significa la ausencia de productos o compuestos derivados de sangre, mezcla de sangre y otros derivados de animales. “Animal” significa un mamífero (tal como un humano), ave, réptil, pez, insecto, araña u otra especie animal. “Animal” excluye microorganismos, tales como bacterias. Por tanto, una composición farmacéutica libre de proteína animal puede incluir una neurotoxina botulínica. Por ejemplo, una composición farmacéutica “libre de proteína animal” significa una composición farmacéutica que está sustancialmente libre o esencialmente libre o completamente libre de una albúmina derivada de suero, gelatina y otras proteínas derivadas de animales, tales como inmunoglobulinas. Un ejemplo de una composición farmacéutica libre de proteína animal es una composición farmacéutica que comprende o que consiste en una toxina botulínica y un polisacárido adecuado como estabilizador o excipiente.

50 “Actividad biológica” describe los efectos beneficiosos o adversos de un fármaco sobre la materia viva. Cuando un fármaco es una mezcla química compleja, esta actividad se ejerce por el principio activo de la sustancia, pero puede modificarse por otros constituyentes. La actividad biológica puede evaluarse como potencia o como toxicidad mediante un ensayo de DL₅₀ o DE₅₀ *in vivo*, o a través de un ensayo *in vitro* tal como ensayos de potencia basados en células tal como se describe en las publicaciones estadounidenses 20100203559, 20100233802, 20100233741 y la patente estadounidense 8.198.034.

60 “Toxina botulínica” significa una neurotoxina producida por *Clostridium botulinum*, así como una toxina botulínica (o bien la cadena ligera o bien la cadena pesada de la misma) producida de manera no recombinante por una especie no de *Clostridium*. La expresión “toxina botulínica”, tal como se usa en el presente documento, abarca la toxina botulínica de serotipos A, B, C, D, E, F y G, y sus subtipos y cualquier otro tipo de subtipos de la misma, o cualquier proteína vuelta a modificar por ingeniería, análogo, derivado, homólogo, parte, subparte, variante o versión, en cada caso, de cualquiera de los anteriores. “Toxina botulínica”, tal como se usa en el presente documento, también abarca una “toxina botulínica modificada”. Además, “toxina botulínica”, tal como se usa en el presente documento, también

abarca un complejo de toxinas botulínicas, (por ejemplo, los complejos de 300, 500 y 900 kDa), así como el componente neurotóxico de la toxina botulínica (150 kDa) que no se asocia con las proteínas del complejo.

“Derivado de *Clostridium*” se refiere a una molécula que contiene cualquier parte de una toxina de *Clostridium*. Tal como se usa en el presente documento, el término “derivado de *Clostridium*” abarca neurotoxinas nativas o recombinantes, toxinas modificadas recombinantes, fragmentos de las mismas.

“Toxina de *Clostridium*” se refiere a cualquier toxina producida por una cepa de toxina de *Clostridium* que puede ejecutar el mecanismo celular global mediante lo cual una toxina de *Clostridium* intoxica una célula y abarca la unión de una toxina de *Clostridium* a un receptor de toxina de *Clostridium* de baja o alta afinidad, la internalización del complejo toxina/receptor, la translocación de la cadena ligera de la toxina de *Clostridium* en el citoplasma y la modificación enzimática de un sustrato de toxina de *Clostridium*. Los ejemplos no limitativos de toxinas de *Clostridium* incluyen una toxina botulínica como BoNT/A, una BoNT/B, una BoNT/C₁, una BoNT/D, una BoNT/E, una BoNT/F, una BoNT/G. La citotoxina BoNT/C₂ y citotoxina BoNT/C₃, que no son neurotoxinas, se excluyen del término “toxina de *Clostridium*”. Una toxina de *Clostridium* divulgada en el presente documento incluye, sin limitación, variantes de toxinas de *Clostridium* que se producen de manera natural, tales como, por ejemplo, isoformas de toxinas de *Clostridium* y subtipos de toxinas de *Clostridium*; variantes de toxinas de *Clostridium* que no se producen de manera natural, tales como, por ejemplo, variantes conservativas de toxinas de *Clostridium*, variantes no conservativas de toxinas de *Clostridium*, variantes quiméricas de toxinas de *Clostridium* y fragmentos activos de toxinas de *Clostridium* de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. Una toxina de *Clostridium* divulgada en el presente documento también incluye un complejo de toxinas de *Clostridium*. Tal como se usa en el presente documento, el término “complejo de toxinas de *Clostridium*” se refiere a un complejo que comprende una toxina de *Clostridium* y proteínas no asociadas a toxinas (NAP), tal como, por ejemplo, un complejo de toxinas botulínicas. Los ejemplos no limitativos de complejos de toxinas de *Clostridium* incluyen los producidos por un *Clostridium botulinum*, tal como, por ejemplo, un complejo de BoNT/A de 900 kDa, un complejo de BoNT/A de 500 kDa, un complejo de BoNT/A de 300 kDa, un complejo de BoNT/B de 500 kDa, un complejo de BoNT/C₁ de 500 kDa, un complejo de BoNT/D de 500 kDa, un complejo de BoNT/D de 300 kDa, un complejo de BoNT/E de 300 kDa y un complejo de BoNT/F de 300 kDa.

“Cantidad eficaz”, tal como se aplica al principio biológicamente activo, significa la cantidad del componente que generalmente es suficiente para inducir un cambio deseado en el sujeto. Por ejemplo, cuando el efecto deseado es una reducción en un síntoma de trastorno autoinmunitario, una cantidad eficaz del componente es la cantidad que provoca al menos una reducción sustancial del síntoma del trastorno autoinmunitario, y sin dar como resultado una toxicidad significativa.

“Cantidad eficaz” aplicada a un constituyente de principio no activo de una composición farmacéutica (tal como un estabilizador usado para mezclar con una toxina botulínica) se refiere a la cantidad del constituyente de principio no activo que es suficiente para influir de manera positiva en la liberación y/o la actividad del principio activo cuando se administra a un individuo. Esta “cantidad eficaz” puede determinarse basándose en la enseñanza de esta memoria descriptiva y el conocimiento general en la técnica.

“Totalmente libre (es decir, terminología de “que consiste en”) significa que dentro del intervalo de detección del instrumento o procedimiento que está usándose, la sustancia no puede detectarse o su presencia no puede confirmarse.

“Esencialmente libre” (o “que consiste esencialmente en”) significa que solo pueden detectarse cantidades mínimas de la sustancia.

“Cadena ligera” significa la cadena ligera de una neurotoxina de *Clostridium*. Tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa y puede denominarse cadena L, L o dominio proteolítico (secuencia de aminoácidos) de una neurotoxina botulínica.

“Cadena pesada” significa la cadena pesada de una neurotoxina botulínica. Tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kDa y puede denominarse cadena H o H.

H_C significa un fragmento (aproximadamente 50 kDa) derivado de la cadena H de una neurotoxina botulínica que es aproximadamente equivalente al segmento del extremo carboxilo de la cadena H, o la porción correspondiente a ese fragmento en la cadena H intacta. Se cree que contiene la porción de neurotoxina botulínica de tipo natural o silvestre implicada en la unión presináptica de alta afinidad a las neuronas motoras.

H_N significa un fragmento (aproximadamente 50 kDa) derivado de la cadena H de una neurotoxina botulínica que es aproximadamente equivalente al segmento del extremo amino de la cadena H, o una porción correspondiente a ese fragmento. Se cree que contiene la parte de la neurotoxina botulínica de tipo natural o silvestre implicada en la translocación de la cadena L a través de una membrana endosómica intracelular.

LH_N o L-H_N significa un fragmento derivado de una neurotoxina de *Clostridium* que contiene la cadena L, o un

fragmento funcional de la misma acoplada al dominio de H_N. Puede obtenerse a partir de la neurotoxina de *Clostridium* intacta por proteólisis, para eliminar o modificar el dominio de H_C.

“Administración intravesical” se refiere a la inyección de una sustancia dada directamente en la vejiga a través de un catéter uretral.

“Toxina botulínica modificada” significa una toxina botulínica a la que se ha delecionado, modificado o reemplazado al menos uno de sus aminoácidos, en comparación con una toxina botulínica nativa. Además, la toxina botulínica modificada puede ser una neurotoxina producida de manera recombinante, o un derivado o fragmento de una neurotoxina producida de manera recombinante. Una toxina botulínica modificada retiene al menos una actividad biológica de la toxina botulínica nativa, tal como, la capacidad para unirse a un receptor de toxina botulínica o la capacidad para inhibir la liberación de neurotransmisores de una neurona. Un ejemplo de toxina botulínica modificada es una toxina botulínica que tiene una cadena ligera de un serotipo de toxina botulínica (tal como el serotipo A) y una cadena pesada de un serotipo de toxina botulínica diferente (tal como el serotipo B). Otro ejemplo de toxina botulínica modificada es una toxina botulínica acoplada a un neurotransmisor, como la sustancia P.

“Mutación” significa una modificación estructural de una proteína o secuencia de ácido nucleico que se produce de manera natural. Por ejemplo, en el caso de mutaciones de ácidos nucleicos, una mutación puede ser una delección, adición o sustitución de uno o más nucleótidos en la secuencia de ADN. En el caso de una mutación en la secuencia de una proteína, la mutación puede ser una delección, adición o sustitución de uno o más aminoácidos en una secuencia de proteína. Por ejemplo, un aminoácido específico que comprende una secuencia de proteína puede sustituirse por otro aminoácido, por ejemplo, un aminoácido seleccionado de un grupo que incluye los aminoácidos alanina, asparagina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano, tirosina o cualquier otro aminoácido que se produce de manera natural o no natural o aminoácidos modificados químicamente. Las mutaciones en una secuencia de proteína pueden ser el resultado de mutaciones en secuencias de ADN que, cuando se transcriben y se traduce el ARNm resultante, producen la secuencia de proteína mutada. También pueden crearse mutaciones en una secuencia de proteína fusionando una secuencia de péptidos que contiene la mutación deseada con una secuencia de proteína deseada.

“Paciente” significa un sujeto humano o no humano que recibe atención médica o veterinaria. Por consiguiente, tal como se divulga en el presente documento, las composiciones y los métodos pueden usarse para tratar cualquier animal, tal como, por ejemplo, mamíferos, o similares.

“Cantidad eficaz para la permeación” se refiere a una cantidad eficaz para aumentar sustancialmente la permeabilidad de una superficie frente a un agente terapéutico a una tasa terapéuticamente eficaz. Para la administración intravesical a la vejiga, una cantidad eficaz para la permeación se refiere a una cantidad suficiente para aumentar sustancialmente la permeabilidad de la pared de la vejiga frente un derivado de *Clostridium* durante un intervalo de tiempo deseado sin dañar de manera irreversible la pared de la vejiga, tiempo después del cual puede restaurarse la impermeabilidad selectiva original de la pared de la vejiga.

“Composición farmacéutica” significa una composición que comprende un principio activo farmacéutico, tal como, por ejemplo, una toxina botulínica, y al menos un componente adicional, tal como un agente de permeabilización. Por tanto, una composición farmacéutica es una formulación que es adecuada para la administración diagnóstica o terapéutica a un sujeto, tal como un paciente humano. La composición farmacéutica puede estar, por ejemplo, en un estado liofilizado o secado al vacío, una disolución formada después de la reconstitución de la composición farmacéutica liofilizada o secada al vacío, o como una disolución o un sólido que no requiere reconstitución.

Los componentes constituyentes de una composición farmacéutica pueden incluirse en una única composición (es decir, todos los componentes constituyentes, excepto cualquier líquido de reconstitución requerido, están presentes en el momento de la elaboración inicial de la composición farmacéutica) o como un sistema de dos componentes, por ejemplo, una composición secada al vacío reconstituida con un vehículo de reconstitución que puede contener, por ejemplo, un componente que no está presente en la elaboración inicial de la composición farmacéutica. Un sistema de dos componentes puede proporcionar varios beneficios, incluyendo el de permitir la incorporación de componentes que no son suficientemente compatibles para el almacenamiento a largo plazo con el primer componente del sistema de dos componentes. Por ejemplo, el vehículo de reconstitución puede incluir un conservante que proporcione suficiente protección contra el crecimiento microbiano durante el período de uso, por ejemplo, una semana de almacenamiento refrigerado, pero no está presente durante el período de almacenamiento de dos años en el congelador, tiempo durante el cual podría degradarse la toxina. Pueden incorporarse de esta manera otros componentes que pueden no ser compatibles con una toxina botulínica u otros componentes durante largos períodos de tiempo; es decir, añadirse en un segundo vehículo (por ejemplo, en el vehículo de reconstitución) en el momento aproximado de su uso. Una composición farmacéutica también puede incluir agentes conservantes tales como alcohol bencílico, ácido benzoico, fenol, parabenos y ácido sórbico. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir, por ejemplo, excipientes, tales como agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes de granulación y disgregantes; agentes aglutinantes; agentes lubricantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos y disolventes acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de

suspensión; agentes de dispersión o humectantes; agentes emulsionantes, demulcentes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; antioxidantes; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables y otros componentes conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, en Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa..

"Toxina modificada recombinante" significa una toxina recombinante que comparte algunos o la mayoría de los dominios con una toxina botulínica pero que puede o no dirigirse a las mismas células que la neurotoxina botulínica nativa.

"Estabilizante", "estabiliza" o "estabilización" significa la retención de al menos aproximadamente el 20% de la actividad biológica de un principio activo farmacéutico ("API") que se ha reconstituido, en comparación con el API antes de la reconstitución. Por ejemplo, tras (1) preparación de diluciones en serie a partir de una disolución a granel o madre, o (2) tras la reconstitución de una composición farmacéutica que contiene toxina botulínica liofilizada o secada al vacío que se ha almacenada a o por debajo de aproximadamente -2°C durante entre seis meses y cuatro años, o (3) para una composición farmacéutica en disolución acuosa que contiene toxina botulínica que se ha almacenada entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C durante desde seis meses hasta cuatro años, la toxina botulínica presente en la composición farmacéutica en disolución acuosa o reconstituida tiene (en presencia de un compuesto que es estabilizante, estabiliza o que proporciona estabilización al API) más de aproximadamente el 20% y hasta aproximadamente el 100% de la potencia o toxicidad que tenía la toxina botulínica biológicamente activa antes de incorporarse en la composición farmacéutica.

"Agente estabilizante", "agente de estabilización" o "estabilizador" significa una sustancia que actúa para estabilizar un API de manera que la potencia de la composición farmacéutica aumenta en relación con una composición no estabilizada.

Los "estabilizadores" pueden incluir excipientes y pueden incluir moléculas proteicas y no proteicas.

"Sustancialmente libre" significa presente a un nivel de menos del uno por ciento en peso de la composición farmacéutica.

"Formulación terapéutica" significa que una formulación puede usar para tratar y aliviar de ese modo un trastorno o una enfermedad, tal como, por ejemplo, un trastorno o una enfermedad caracterizado por hiperactividad (es decir, espasticidad) de un músculo periférico.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico deseado.

"Tratar" significa aliviar (o eliminar) al menos un síntoma de un estado o trastorno, tal como, por ejemplo, disfunción neurógena de la vejiga, ya sea temporal o permanentemente.

"Variante" significa una toxina botulínica de tipo natural de serotipo A, B, C, D, E, F o G, que se ha modificado mediante el reemplazo, modificación, adición o delección de al menos un aminoácido en relación con la toxina botulínica de tipo natural, que es reconocida por una célula diana, internalizada por la célula diana, y escinde de manera catalítica una proteína SNARE (receptor de SNAP (proteína de fijación soluble de NSF)) en la célula diana.

Un ejemplo de un componente de neurotoxina variante puede comprender una cadena ligera variante de una toxina botulínica que tiene uno o más aminoácidos sustituidos, modificados, delecionados y/o añadidos. Esta cadena ligera variante puede tener la misma o mejor capacidad para prevenir la exocitosis, por ejemplo, la liberación de vesículas de neurotransmisores. De manera adicional, el efecto biológico de una variante puede disminuir en comparación con la entidad química original. Por ejemplo, una cadena ligera variante de una toxina botulínica de tipo A que tiene una secuencia de aminoácidos eliminada puede tener una persistencia biológica más corta que la de la cadena ligera original (o nativa) de toxina botulínica de tipo A.

"Vehículo" o "vehículo de reconstitución" significa una composición líquida que puede usarse para reconstituir una formulación botulínica sólida para dar una composición farmacéutica botulínica líquida.

"Resto de unión neuronal de tipo natural" significa la porción de una neurotoxina que es nativa para la neurotoxina y que presenta una afinidad de unión específica para un receptor en una neurona. Por tanto, el resto de unión neuronal de tipo natural o nativo excluye un resto de unión que no es nativo para la neurotoxina.

Composiciones farmacéuticas

Los aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, una composición farmacéutica adecuada para la administración intravesical a la vejiga, que comprende un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización tal como se divulga en el presente documento.

Derivado de *Clostridium*:

Un derivado de *Clostridium* tal como se define en el presente documento es una toxina botulínica nativa o modificada tal como se define en el presente documento. En una realización, el derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica de tipo A. En algunas realizaciones, el derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica de tipo B, C₁, D, E o F.

En algunas realizaciones, la presente composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del derivado de *Clostridium*. Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad total del derivado de *Clostridium* administrada a un individuo en una sesión. Como tal, una cantidad eficaz de un derivado de *Clostridium* no se refiere a la cantidad administrada por sitio. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una toxina botulínica administrada a un individuo puede ser de 10 U, mientras que la cantidad de toxina administrada por sitio puede ser de 2U, es decir, 2 U en cinco sitios diferentes. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de la toxina botulínica oscila desde 10 U hasta 1000 U, más preferiblemente desde aproximadamente 50 U hasta aproximadamente 500 U.

Con referencia a una terapia de combinación que comprende una toxina de *Clostridium* y un TEM, una cantidad eficaz de una toxina de *Clostridium* es una en la que en combinación con un TEM la cantidad de la toxina de *Clostridium* logra el efecto terapéutico deseado, pero una cantidad de este tipo administrada por sí sola podría no ser eficaz. Por ejemplo, normalmente se administra aproximadamente 75-125 U de BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), una BoNT/A, mediante inyección intramuscular por músculo que experimenta espasmos distónicos para tratar distonía cervical. En terapia de combinación, una cantidad eficaz subóptima de BoNT/A podría administrarse para tratar distonía cervical cuando tal toxina se usa en una terapia combinada con un TEM.

Agentes de permeabilización

El al menos un agente de permeabilización comprende un tensioactivo no iónico y un mucoadhesivo, que es un polímero catiónico.

En algunas realizaciones, el agente de permeabilización se une de manera selectiva a la toxina botulínica para formar un complejo. En realizaciones alternativas, el agente de permeabilización no se une a la toxina botulínica. En realizaciones alternativas, el agente de permeabilización interactúa con la toxina botulínica a través de interacciones de Van der Waals.

En determinadas realizaciones, el agente de permeabilización puede comprender polietilenglicol (PEG) o poli(óxido de etileno) (PEO). El PEG puede comprender, por ejemplo, PEG con una masa molecular que oscila desde aproximadamente 200 gramos por mol (g/m) hasta aproximadamente 20.000 gramos por mol (g/m). En una realización, el agente de permeabilización comprende polietilenglicol 3350.

En determinadas realizaciones el agente de permeabilización puede comprender un poloxámero. El poloxámero puede comprender, por ejemplo, P80, P124, P188, P237, P338 y P407, sus análogos, derivados o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el agente de permeabilización puede comprender una povidona (PVP). La PVP puede comprender, por ejemplo, polímeros de PVP, y análogos o derivados.

El agente de permeabilización comprende un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos adecuados para la presente formulación, incluyen pero no se limitan a, alquil aril poliéteres y análogos, derivados de los mismos (por ejemplo, TX-100, análogos o derivados), poloxámeros, polioxietilén éteres (por ejemplo, familias Brij), Tween, Big CHAPS, Deoxy Big CHAPS, monooleato de sorbitano (SPAN) 20, 40, 60, Cremophor EL, alfa-tocoferol TPGS, estearato de polioxilo 40, análogos y derivados, o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el agente de permeabilización comprende un alquil aril poliéter, análogos o derivados. En una realización, el agente de permeabilización comprende etoxilato de octilfenol, análogos o derivados. El etoxilato de octilfenol también se conoce como octil fenil éter de polioxietileno, polietoxilato de 4-octilfenol, Mono 30, TX-100, t-octilfenoxipolietoxietanol, octoxinol-9, o el nombre comercial más comúnmente conocido de Triton™ X-100. En realizaciones alternativas, el agente de permeabilización comprende nonoxinol 9, análogos, o derivados.

El agente de permeabilización comprende además un polímero catiónico. El polímero catiónico es un mucoadhesivo. En algunas realizaciones, el polímero catiónico incluye quitosano.

En algunas realizaciones, el al menos un agente de permeabilización comprende quitosano y TX-100, análogos de TX-100 o derivados de TX-100. En algunas realizaciones, la presente composición farmacéutica comprende una toxina botulínica, quitosano y nonoxinol-9, análogos de nonoxinol-9 o derivados de nonoxinol-9.

En determinadas realizaciones, el agente de permeabilización puede comprender agentes quelantes, incluyendo, pero sin limitarse a, EDTA, EGTA (ácido tetraacético de etilenglicol), tetraacetato de ciclohexanodiamina (CDTA), triacetato de hidroxietilendiamina (HEDTA), pentaacetato de dietilentriamina (DTPA), tetraacetato de 1,2-diaminociclohexano y hexametáfosfato. Estos agentes se emplean preferiblemente como sales, normalmente sales de sodio tales como EDTA de disodio, HEDTA de trisodio, hexametáfosfato de sodio o cualquier combinación de los mismos.

Por tanto, en un aspecto, la presente composición farmacéutica comprende un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización, en la que la formulación farmacéutica es adecuada para la administración intravesical a la vejiga, en la que el derivado de *Clostridium* comprende una toxina botulínica y el agente de permeabilización comprende un mucoadhesivo y un tensioactivo no iónico. En algunas realizaciones, el mucoadhesivo incluye quitosano. En una realización, la presente composición farmacéutica comprende una toxina botulínica de tipo A, quitosano y TX-100, análogos de TX-100 o derivados de TX-100. En algunas realizaciones, el tensioactivo comprende nonoxinol-9, análogos de nonoxinol-9 o derivados de nonoxinol-9.

El al menos un agente de permeabilización está presente en una cantidad eficaz para la permeación. Una cantidad eficaz para la permeación se refiere a una cantidad eficaz para aumentar sustancialmente la permeabilidad de la superficie de la pared de la vejiga con daño limitado a la integridad de la vejiga. En una realización, la cantidad eficaz para la permeación se refiere a una cantidad eficaz para permitir la permeación de una cantidad terapéuticamente eficaz de una neurotoxina botulínica a través de la pared de la vejiga a una tasa terapéuticamente eficaz. En una realización, la cantidad eficaz para la permeación se refiere a una cantidad eficaz para aumentar sustancialmente la permeabilidad de la superficie de la pared de la vejiga frente a una cantidad terapéuticamente eficaz de la toxina a una tasa terapéuticamente eficaz durante un intervalo de tiempo deseado sin dañar de manera irreversible la pared de la vejiga. La permeabilidad aumentada es reversible después de un intervalo de tiempo deseado, después del cual la pared de la vejiga puede restablecer completa o parcialmente su impermeabilidad original o permeabilidad selectiva. En algunas realizaciones, la pared de la vejiga restablece su impermeabilidad original o permeabilidad selectiva después de un intervalo de tiempo que oscila desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 24 horas después de la instilación intravesical. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo oscila desde aproximadamente 3 horas hasta aproximadamente 18 horas. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo oscila desde aproximadamente 4 horas hasta aproximadamente 12 horas. La tasa de recuperación mediante la cual la pared de la vejiga restablece su permeabilidad o impermeabilidad selectiva original puede estar influenciada por las características del agente de permeabilización seleccionado, la cantidad y las características de la superficie de permeación, el tiempo de exposición y el entorno que rodea la superficie de permeación. En una realización, la integridad de la vejiga tras la administración de la presente composición farmacéutica puede evaluarse mediante la magnitud de la respuesta inmunitaria, tal como la presencia de células inmunitarias específicas.

La cantidad eficaz para la permeación varía dependiendo de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, las características del derivado de *Clostridium*, las características de la superficie de permeación (por ejemplo, la pared de la vejiga), el tipo de agente de permeabilización y el entorno que rodea la superficie de permeación.

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz para la permeación del agente de permeabilización oscila desde aproximadamente el 0,005% hasta aproximadamente el 10% (p/v), más preferiblemente desde aproximadamente el 0,025% hasta aproximadamente el 5% (p/v), y lo más preferiblemente desde aproximadamente el 0,05% hasta aproximadamente el 0,5% (p/v). En algunas realizaciones, la presente formulación farmacéutica comprende una cantidad eficaz para la permeación de Triton™ X-100, análogos o derivados de Triton™ X-100 desde el 0,005% hasta aproximadamente el 10% (p/v), más preferiblemente desde aproximadamente el 0,025% hasta aproximadamente el 5% (p/v), y lo más preferiblemente desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 0,5% (p/v). En una realización específica, la cantidad eficaz permeativa de Triton™ X-100 es de aproximadamente el 0,1% (p/v).

El agente de permeabilización se usa en combinación con un mucoadhesivo. El mucoadhesivo es un polímero catiónico. En algunas realizaciones, el mucoadhesivo incluye quitosano. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz para la permeación del mucoadhesivo oscila desde aproximadamente el 0,005% hasta el 10% (p/v), más preferiblemente desde aproximadamente el 0,02% hasta aproximadamente el 5% (p/v), y lo más preferiblemente desde aproximadamente el 0,05% hasta aproximadamente el 2% (p/v). En una realización, la cantidad eficaz para la permeación de quitosano es de aproximadamente el 1% (p/v). En algunas realizaciones, la formulación comprende: (1) una toxina botulínica, (2) Triton™ X-100, análogo de Triton™ X-100, derivados de Triton™ X-100 o mezclas de los mismos; y (3) quitosano, o mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, la formulación comprende: (1) una toxina botulínica de tipo A, (2) Triton™ X-100, análogos de Triton™ X-100, derivados de Triton™ X-100, o mezclas de los mismos; y (3) quitosano, o mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, la formulación comprende de aproximadamente 20 unidades a aproximadamente 300 unidades de toxina botulínica de tipo A, de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 2% (p/v) de quitosano; o mezclas de los mismos, y de aproximadamente el 0,05% a aproximadamente el 1% (p/v) de Triton™ X-100, análogos, derivados o mezclas de los mismos. En una realización, la formulación comprende desde aproximadamente 100 o 200 unidades de toxina botulínica de tipo A, aproximadamente el 1% de quitosano y aproximadamente el 0,1% (p/v) de Triton™ X-100.

En algunas realizaciones, el agente de permeabilización comprende nonoxinol 9. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz para la permeación de nonoxinol 9 oscila desde aproximadamente el 0,005% hasta aproximadamente el 10% (p/v), más preferiblemente desde aproximadamente el 0,025% hasta aproximadamente el 5% (p/v), y lo más preferiblemente desde aproximadamente el 0,05% hasta aproximadamente el 0,5% (p/v). En una realización específica, la presente formulación farmacéutica comprende una cantidad eficaz para la permeación de nonoxinol 9 de aproximadamente el 0,1% (p/v). En una realización específica, la presente formulación farmacéutica comprende una cantidad eficaz para la permeación de nonoxinol 9 de aproximadamente el 0,5% (p/v). En algunas realizaciones, se usa nonoxinol 9 en combinación con un mucoadhesivo. En algunas realizaciones, el mucoadhesivo incluye

quitosano. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz para la permeación del mucoadhesivo oscila desde aproximadamente el 0,005% hasta el 10% (p/v), más preferiblemente desde aproximadamente el 0,02% hasta aproximadamente el 5% (p/v), y lo más preferiblemente desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 2% (p/v). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz para la permeación de quitosano oscila desde aproximadamente el 0,005% hasta el 10% (p/v), más preferiblemente desde aproximadamente el 0,02% hasta aproximadamente el 5% (p/v), y lo más preferiblemente desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 2% (p/v). En una realización, la cantidad eficaz para la permeación de quitosano es de aproximadamente el 1% (p/v).

Por tanto, los aspectos de la presente divulgación proporcionan una composición farmacéutica que comprende un derivado de *Clostridium* y uno o más agentes de permeabilización tal como se divulgó anteriormente, en la que la composición farmacéutica es adecuada para administración intravesical a la vejiga y en la que el uno o más agentes de permeabilización está presente en una cantidad eficaz para la permeación, tal como se divulga en el presente documento. Las realizaciones de la presente composición incluyen excipientes y/o agentes terapéuticos que o bien provocarán o bien mejorarán los efectos farmacológicos de las toxinas botulínicas.

También pueden añadirse excipientes para aumentar la estabilidad de la formulación, aumentar la acción de los agentes de permeabilización (por ejemplo EDTA u otros agentes quelantes) o para aumentar la retención de la formulación a través de propiedades viscoelásticas aumentadas que se producirán de manera inmediata (por ejemplo: carboximetilcelulosa (CMC), alginato) o tras un cambio en la temperatura (por ejemplo: poloxámero 407), pH (Carbopol P-934, P940) y/o entornos iónicos (ejemplo: goma gellan Gelrite, alginato).

También pueden añadirse excipientes para modular la tonicidad y/o el pH de la orina y la piel para aumentar la administración, estabilidad, biodisponibilidad y/o actividad terapéutica de las formulaciones.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para elaborar una formulación farmacéutica adecuada para la administración intravesical a la vejiga, comprendiendo el método proporcionar una disolución que comprende al menos un agente de permeabilización tal como se divulga en el presente documento, añadir la disolución a una composición que comprende un derivado de *Clostridium* tal como se divulga en el presente documento. En algunas realizaciones, el método comprende añadir desde aproximadamente 50 ml hasta aproximadamente 100ml de la disolución a la composición que comprende la toxina botulínica. En una realización, el método comprende añadir desde aproximadamente 50 ml hasta aproximadamente 100 ml de una disolución acuosa que comprende el 1% (p/v) de quitosano o y el 0,1% (p/v) de Triton™X-100, análogos o derivados, a una toxina botulínica de tipo A. En una realización, el método comprende añadir una disolución acuosa de 50 ml que comprende aproximadamente el 1% (p/v) de quitosano y aproximadamente el 0,1% (p/v) de Triton™X-100 en un vial que contiene aproximadamente 100 unidades o 200 unidades de una toxina botulínica de tipo A liofilizada; y mezclar suavemente para rehidratar la toxina botulínica de tipo A liofilizada.

En algunas realizaciones, también pueden añadirse excipientes para actuar como portadores del derivado de *Clostridium*. En una realización, se añade poli-L-lisina como portador.

Una composición divulgada en el presente documento se administra generalmente como una composición farmacéutica aceptable. Tal como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa cualquier entidad o composición molecular que no produce una reacción adversa, alérgica u otra desfavorable o no deseada cuando se administra a un individuo. Tal como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéuticamente aceptable" es sinónimo de "composición farmacéutica" y significa una concentración terapéuticamente eficaz de un principio activo, tal como, por ejemplo, la toxina botulínica. Una composición farmacéutica divulgada en el presente documento es útil para aplicaciones médicas y veterinarias. Una composición farmacéutica puede administrarse a un individuo sola, o en combinación con otros principios activos, agentes, fármacos u hormonas complementarios. Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse usando cualquiera de una variedad de procedimientos, incluyendo, sin limitación, mezclado, disolución, granulación, elaboración de grageas, pulverizado, emulsión, encapsulación, atrapamiento y liofilización convencionales. La composición farmacéutica puede tomar cualquiera de una variedad de formas incluyendo, sin limitación, una disolución, suspensión, emulsión, liofilizado, comprimido, píldora, gránulo, cápsula, polvo, jarabe, elixir estéril o cualquier otra forma de dosificación adecuada para la administración.

La presente composición farmacéutica puede incluir opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable que facilita el procesamiento de un principio activo para dar composiciones farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, el término "portador farmacológicamente aceptable" es sinónimo de "portador farmacológico" y significa cualquier portador que no tiene sustancialmente un efecto perjudicial a largo plazo o permanente cuando se administra y abarca términos tales como "vehículo, estabilizador, diluyente, aditivo, agente auxiliar o excipiente farmacológicamente aceptable". Generalmente, un portador de este tipo se mezcla con un compuesto activo, o se permite que diluya o encierre el compuesto activo y puede ser un agente sólido, semisólido o líquido. Se entiende que los principios activos pueden ser solubles o pueden administrarse como una suspensión en el portador o diluyente deseado. Puede usarse cualquiera de una variedad de portadores farmacéuticamente aceptables incluyendo, sin limitación, medios acuosos tales como, por ejemplo, agua, solución salina, glicina, ácido hialurónico; portadores sólidos tales como, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina

de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio; disolventes; medios de dispersión; recubrimientos; agentes antibacterianos y antifúngicos; agentes isotónicos y retardantes de la absorción; o cualquier otro principio no activo. La selección de un portador farmacológicamente aceptable puede depender del modo de administración. Excepto en la medida en que cualquier portador farmacológicamente aceptable sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en composiciones farmacéuticamente aceptables. Pueden encontrarse ejemplos no limitativos de usos específicos de tales portadores farmacéuticos en PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS (Howard C. Ansel *et al.*, eds., Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 7ª ed. 1999); REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (Alfonso R. Gennaro ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 20ª ed. 2000); GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS (Joel G. Hardman *et al.*, eds., McGraw-Hill Professional, 10ª ed. 2001); y HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS (Raymond C. Rowe *et al.*, APhA Publications, 4ª edición 2003). Estos protocolos son procedimientos de rutina y cualquier modificación está dentro del alcance de un experto en la técnica y de la enseñanza en el presente documento.

Una composición farmacéutica divulgada en el presente documento puede incluir opcionalmente otros componentes farmacéuticamente aceptables (o componentes farmacéuticos), incluyendo tampones, conservantes, ajustadores de tonicidad, sales, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolalidad, sustancias fisiológicas, sustancias farmacológicas, agentes de carga, agentes emulsionantes, agentes humectantes, agentes edulcorantes o aromatizantes. Pueden usarse diversos tampones y medios para ajustar el pH para preparar una composición farmacéutica divulgada en el presente documento, siempre que la preparación resultante sea farmacéuticamente aceptable. Tales tampones incluyen tampones acetato, tampones citrato, tampones fosfato, solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y tampones borato. Se entiende que pueden usarse ácidos o bases para ajustar el pH de una composición según sea necesario. Los antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, acetilcisteína, hidroxianisobutilado e hidroxitolueno butilado. Los conservantes útiles incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, acetato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, una composición de oxícloro estabilizada y quelantes, tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida, DTPA de calcio y CaNaDTPA-bisamida. Los ajustadores de tonicidad útiles en una composición farmacéutica incluyen, sin limitación, sales tales como, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol o glicerina y otro ajustador de tonicidad farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede proporcionarse como una sal y puede formarse con muchos ácidos, incluyendo, pero sin limitarse a, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros protónicos que las correspondientes formas de base libre. Se entiende que estas y otras sustancias conocidas en la técnica de la farmacología pueden incluirse en una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica a modo de ejemplo que comprende una toxina de *Clostridium* y un TEM se describe en Hunt, *et al.*, Animal Protein-Free Pharmaceutical Compositions, documento estadounidense con n.º de serie 12/331.816; y Dasari, *et al.*, Clostridial Toxin Pharmaceutical Compositions, documento WO/2010/090677.

La elección de los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados dependerá de la naturaleza exacta de la formulación particular deseada, por ejemplo, si la presente composición va a formularse en una disolución líquida, un polvo liofilizado que se reconstituirá durante el uso, una disolución en suspensión, nanopartículas, liposomas, o microemulsiones.

La elección de un portador farmacéuticamente aceptable adecuado también dependerá de la vía de administración. Preferiblemente, el portador se formula para que sea adecuado para una vía de administración elegida. Los modos de administración de la presente formulación farmacéutica incluyen, pero no se limitan a, inyección, inyecciones sin aguja (por ejemplo, Bioject, JetTouch), administración electromotriz, administración transdérmica o instilación intravesícula. En una forma de realización específica, la formulación comprende un portador farmacéutico aceptable para la instilación vesical. En una realización, el portador farmacéutico comprende polilisina.

Composiciones para su uso en el tratamiento de disfunción neurógena de la vejiga. Los aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, una composición farmacéutica que comprende un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización tal como se describió anteriormente para su uso en el tratamiento de un proceso patológico, en la que la administración de la presente composición farmacéutica previene o reduce un síntoma asociado con el proceso patológico que se está tratando. En una realización, la administración es mediante administración intravesical.

Tratamiento de trastornos urológicos

En algunas realizaciones, el trastorno médico comprende enfermedades y condiciones de la vejiga urológicas, incluyendo vejiga hiperactiva (OAB), cistitis, cáncer de vejiga, hiperactividad del detrusor neurógena (NDO). En una realización, la presente divulgación también proporciona composiciones para su uso para tratar un paciente que padece vejiga hiperactiva (OAB), tal como, por ejemplo, que se debe a un estado neurológico (NOAB), o OAB idiopática (IOAB).

La disfunción neurógena de la vejiga es una disfunción que resulta de la interferencia de las rutas nerviosas normales asociadas con la micción. Un tipo de disfunción neurógena de la vejiga es la vejiga hiperactiva (espástica o

hiperreflexiva). Una vejiga neurógena hiperactiva se caracteriza por una expulsión frecuente e incontrolada de orina de la vejiga. Puede haber una capacidad de la vejiga reducida y un vaciado incompleto de la orina. La vejiga espástica puede estar provocada por la incapacidad del músculo detrusor de la vejiga para inhibir las contracciones de vaciado hasta que se haya acumulado una cantidad razonable de orina. A menudo, se experimenta una fuerte necesidad de orinar cuando solo hay una pequeña cantidad de orina en la vejiga. El paciente puede informar de síntomas de urgencia, frecuencia, nicturia e incontinencia. Otro tipo de disfunción neurógena de la vejiga se caracteriza por la dificultad para relajar el músculo del esfínter urinario. El esfínter puede estar espástico. Esto provoca dificultad para vaciar la vejiga, lo que puede conducir a retención urinaria e infecciones de las vías urinarias. En otro tipo de disfunción neurógena de la vejiga, tanto el músculo detrusor como el esfínter urinario se contraen simultáneamente, lo que resulta en retención urinaria. Una disfunción asociada con la contracción simultánea tanto del detrusor como del esfínter urinario se denomina disinergia detrusor-esfínter externo (DESD). Las patentes estadounidenses n.ºs 7.449.192, 8.062.807 y 7.968.104 divulgan composiciones para su uso para tratar a un paciente con una disfunción neurógena de la vejiga inyectando una cantidad terapéuticamente eficaz de una toxina botulínica en la pared de la vejiga del paciente.

La cistitis intersticial (IC, por sus siglas en inglés) es una enfermedad incurable, crónica y debilitante de la vejiga urinaria que se caracteriza por dolor de vejiga, dolor pélvico crónicos, síntomas de micción irritativa y orina estéril. En la IC, la pared de la vejiga muestra normalmente infiltración inflamatoria con ulceración mucosa y cicatrización que provoca la contracción del músculo liso, capacidad urinaria disminuida, hematuria y polaquiuria dolorosa.

En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse a la vejiga o su proximidad, por ejemplo, el detrusor, en las que la administración de la formulación reduce la necesidad imperiosa de orinar asociada con la vejiga hiperactiva. En determinadas realizaciones, la dosis puede oscilar desde aproximadamente 10 unidades hasta aproximadamente 200 U por tratamiento. En algunas realizaciones, las presentes formulaciones farmacéuticas pueden administrarse mediante administración intravesical a la vejiga.

Por tanto, los aspectos de la presente divulgación proporcionan además una composición para su uso para tratar un estado de la vejiga en un paciente que lo necesita, que comprende: proporcionar una composición farmacéutica tal como se divulga en el presente documento, que comprende un derivado de *Clostridium* que es una toxina botulínica y al menos un agente de permeabilización que comprende un tensioactivo no iónico y un mucoadhesivo, que es un polímero catiónico, en la que el agente de permeabilización está presente en una cantidad eficaz para mejorar sustancialmente la permeabilidad de la pared de la vejiga frente al derivado de *Clostridium* a una tasa terapéuticamente eficaz y sin dañar de manera irreversible la pared de la vejiga; y aplicar por instilación la composición farmacéutica en la vejiga a través de un catéter; tratando así los estados de la vejiga. En una realización, la composición para su uso comprende además pretratar la pared de la vejiga con la composición farmacéutica antes de la etapa de instilación.

En algunas realizaciones, la composición para su uso para tratar un estado de la vejiga en un paciente que comprende proporcionar una disolución que comprende un agente de permeabilización; añadir la disolución a un derivado de *Clostridium* para formar una formulación terapéutica, aplicar por instilación la formulación terapéutica a través de un catéter en la vejiga de un paciente. El derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica. En una realización, el derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica de tipo A. El agente de permeabilización comprende un tensioactivo no iónico y un mucoadhesivo, que es un polímero catiónico. En algunas realizaciones, el mucoadhesivo comprende quitosano.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aliviar los síntomas de cistitis intersticial (IC) en un paciente, comprendiendo el método: proporcionar una composición farmacéutica para su uso, que comprende un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización, en el que el agente de permeabilización está presente en una cantidad eficaz para mejorar de manera sustancial la permeabilidad de la pared de la vejiga frente al derivado de *Clostridium* a una tasa terapéuticamente eficaz y sin dañar de manera irreversible la pared de la vejiga; y aplicar por instilación la composición farmacéutica a la vejiga a través de un catéter; aliviando de ese modo los síntomas de la IC.

En otro aspecto, la presente formulación maximiza la biodisponibilidad de un derivado de *Clostridium* previniendo o minimizando la adsorción del derivado de *Clostridium* a catéteres, superficies de dispositivos de administración (jeringa, parche, microaguja, inyector modificado por ingeniería (Bioject, etc.), tubos y envases.

En otro aspecto, la presente formulación maximiza la biodisponibilidad del derivado de *Clostridium* mejorando la retención del derivado de *Clostridium* en la piel o la superficie interna de la pared de la vejiga, a través de interacciones mucoadhesivas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones y aspectos de la presente invención.

Ejemplo 1

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de la toxina botulínica de tipo A, conocida como BOTOX®, en una

de las ocho formulaciones de vehículo administradas por instilación en la vejiga urinaria de ratas hembra Sprague Dawley. Se examinó el efecto ocho días después de la administración en el que se evaluaron la eficacia y tolerabilidad mediante inmunohistoquímica (IHC) e histopatología, respectivamente.

- 5 Controles positivos: se les administró a cuatro ratas 10 unidades de BOTOX® en solución salina mediante inyección en el músculo detrusor.

Controles negativos: formulaciones que contenían el vehículo solo (tal como se muestra en la tabla 1 sin adición de BOTOX®).

10 Se usó SNAP 25 escindida como biomarcador de la actividad del BOTOX® en los terminales sinápticos y un posible indicador de la funcionalidad del método de administración. En este estudio se usó para confirmar el movimiento exitoso del BOTOX® a través del urotelio. Se usó la expresión de sinaptofisina para identificar terminales sinápticos y para asegurar la especificidad de la ubicación de SNAP 25 escindida. Se realizó histopatología para evaluar el impacto de la formulación sobre el tejido vesical.

15 Se les administró a ratas hembra que pesaban entre 150 y 200 gramos 0,5 ml de formulación de vehículo o formulación de vehículo + 30 U de Botox® según la tabla 1, mediante lo cual sólo los vehículos descritos en los números de estudio de DP 5 y 8 son según las presentes reivindicaciones:

20 Tabla 1:

Número de estudio de UR13002RS	Número de estudio de DP	Formulación de vehículo
1	DP13104	Triton al 0,1%
2	DP13112	Triton al 0,2%
3	DP13117	Triton al 0,05%
4	DP13121	Nonoxinol-9 ^a al 0,1%
5	DP13129	Quitosano al 1% + Triton al 0,1%
6	DP13130	HPMC al 0,25% + Triton al 0,1%
7	DP13139	Tiloxapol al 0,1%
8	DP13145	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1%
^a = sólo 5 vejigas tratadas con vehículo + BOTOX sometidas a evaluación.		

25 La instilación intravesical de la formulación se llevó a cabo de la siguiente manera: se anestesiaron ratas con isoflurano y se vació la vejiga mediante presión con la punta de los dedos aplicada en la parte inferior del abdomen. Mientras estaba bajo anestesia, se introdujo un catéter en la vejiga urinaria a través de la uretra. Posteriormente, se administró lentamente la formulación a lo largo de un transcurso de dos minutos en la vejiga urinaria a un volumen de dosis de 0,5 ml + 0,1 ml (para adaptarse al espacio muerto creado por el catéter). Se dejó reposar la formulación en la vejiga durante 60 minutos antes de la recuperación de la anestesia. Se sacrificaron las ratas una semana después de la instilación.

30 Se recogieron las vejigas urinarias, se fijaron en formalina al 10% y se procesaron usando técnicas histológicas convencionales. Se prepararon y procesaron secciones adicionales para la determinación de SNAP 25 escindida y sinaptofisina mediante inmunohistoquímica fluorescente.

35 Inmunofluorescencia: se seccionó con criostato un bloque de tejido por animal (14 µm de espesor) en el plano longitudinal y se montó en un portaobjetos. Se prepararon tres portaobjetos de cada bloque, con tres secciones en cada portaobjetos, separadas aproximadamente 140 µm. Se procesaron dos portaobjetos para la determinación de inmunofluorescencia. En primer lugar, se bloquearon las secciones tisulares frente a la señal no específica en el tampón de bloqueo (1X PBS + TX-100 al 0,1% + 10% de suero de burro normal) y luego se incubaron con combinaciones de anticuerpos primarios, incluyendo anti-SNAP25 escindida y anti-sinaptofisina, a la concentración deseada en tampón de bloqueo, durante la noche a 4°C. Después de los lavados, se incubaron las secciones con anticuerpos secundarios (Jackson ImmunoResearch) durante 2 horas a 4°C y luego se lavaron de nuevo. Se cubrieron las secciones montadas en portaobjetos usando Fluoromount-G con 1,5 µg/ml de DAPI. Se tiñó el tercer portaobjetos con hematoxilina y eosina (H&E) para la evaluación anatómica.

Análisis y cuantificación de los datos: se analizaron y capturaron las imágenes en un microscopio de campo claro Leica DMLB, un microscopio de campo amplio fluorescente Nikon E800 o un microscopio confocal Zeiss LSM-710

usando el software Image-Pro® (MediaCybernetics), Metamorph® (Molecular Devices) o ZEN (Carl Zeiss). Se usó el software Imaris® (Bitplane) para el análisis cualitativo tridimensional de alta resolución para establecer las relaciones espaciales de las fibras nerviosas. Se identificaron los tipos de fibras nerviosas basándose en su morfología y neuroquímica. Para el análisis semicuantitativo, para cada portaobjetos, se observaron cuidadosamente las 3 secciones bajo un microscopio y se dio una puntuación (desde 0 hasta 4) para cada animal o bien con respecto al grado de tinción de SNAP25¹⁹⁷ (tal como se muestra en las figuras 3 y 4) o bien con respecto a la integridad de la anatomía de la vejiga (H&E) (tal como se muestra en las figuras 5A-D). Se calculó una puntuación promedio para cada tratamiento/formulación y los resultados se presentan parcialmente en la tabla 2 y la figura 6.

Se evaluaron las formulaciones basándose en lo siguiente:

1. Cambios histológicos en la pared de la vejiga; en el que se realizó un diagnóstico de “infiltrado de células fusiformes” para las vejigas en las que se encontró un mayor número de células fusiformes de origen indeterminado infiltrando la lámina propia (figura 5); como cambio reactivo, estos se consideraron indeseables como un posible precursor de la fibrosis; y

2. Puntuación de SNAP 25 escindida.

Sumario de los resultados: los resultados se resumen en la tabla 2 en la que sólo las ratas n.ºs 35-39, 41, 59-61, 63, 64 y 66 recibieron tratamientos tal como se reivindica:

Tabla 2:

UR13002RS1/ DP13104	n.º de rata	Tratamiento	NAD	Infiltrados/inflamación: lámina propia	Infiltrados de células fusiformes	edema	otro	SNAP 25 escindi da
150	1	Instilación con Triton al 0,1% + BTX (30 U)	x					2
250	2	Instilación con Triton al 0,1% + BTX (30 U)		infiltrados mononucleares mín.				0
350	3	Instilación con Triton al 0,1% + BTX (30 U)		infiltrados de células mixtas mín.	lámina propia mín.			3
450	4	Instilación con Triton al 0,1% + BTX (30 U)	x					1
550	5	Instilación con Triton al 0,1% + BTX (30 U)	x					0
650	6	Instilación con Triton al 0,1% + BTX (30 U)	x					2
750	7	Instilación con Triton al 0,1%		infiltrados mononucleares mín.				0
850	8	Instilación con Triton al 0,1%	x					0
UR13002RS2/ DP13112	n.º de rata	Tratamiento						
150	10	Instilación con Triton al 0,2%		infiltrado mononuclear mín.				0
250	11	Instilación con Triton al		infiltrados de células mixtas mín.				2

ES 2 821 731 T3

		0,2% + BTX (30 U)						
350	12	Instilación con Triton al 0,2% + BTX (30 U)		infiltrados de células mononucleares mín.	lámina propia mín.			3
450	13	Instilación con Triton al 0,2% + BTX (30 U)		inflamación de células mixtas leve	lámina propia leve.			2
550	15	Instilación con Triton al 0,2% + BTX (30 U)		inflamación de células mixtas leve	lámina propia leve.			3
650	16	Instilación con Triton al 0,2% + BTX (30 U)		infiltrados de células mixtas mín.	lámina propia mín.			2
750	17	Instilación con Triton al 0,2% + BTX (30 U)	x					2
850	18	Instilación con Triton al 0,2%		infiltrados de células mononucleares mín.	lámina propia mín.			0
UR13002RS3/DP13117	n.º de rata	Tratamiento						
150	19	Instilación con Triton al 0,05% + BTX (30 U)	x					0
250	20	Instilación con Triton al 0,05%		inflamación de células mixtas mínima	leve		lesión focal	0
350	21	Instilación con Triton al 0,05%	X					0
450	22	Instilación con Triton al 0,05% + BTX (30 U)		inflamación de células mixtas mínima	leve			1
550	23	Instilación con Triton al 0,05% + BTX (30 U)		inflamación de células mixtas moderada	mod.	leve		1
650	24	Instilación con Triton al 0,05% + BTX (30 U)		inflamación de células mixtas moderada	mod.			1
750	25	Instilación con Triton al 0,05% + BTX (30 U)	x					1
850	26	Instilación con Triton al 0,05% + BTX (30 U)		inflamación de células mixtas moderada	mod.	moderada	ulceración	2

UR13002RS4/DP13121	n.º de rata	Tratamiento	NAD	Infiltrados/inflamación: lámina propia	Infiltrados de células fusiformes	edema	otro	SNAP 25 escindida
150	27	Nonoxinol-9 al 0,1%		inflamación de células mixtas mínima	lámina propia mín.			0

250	29	Nonoxinol-9 al 0,1% + Botox 30 U		infiltrados mononucleares mínimos				2
350	30	Nonoxinol-9 al 0,1% + Botox 30 U		infiltrados de células mixtas mínimos				3
450	31	Nonoxinol-9 al 0,1% + Botox 30 U		infiltrados mononucleares mínimos	lámina propia mín.		en placas	2
550	32	Nonoxinol-9 al 0,1% + Botox 30 U	x					2
650	33	Nonoxinol-9 al 0,1% + Botox 30 U	x					3
750	34	Nonoxinol-9 al 0,1%		inflamación de células mixtas leve	lámina propia leve		difuso, hemorragia	0

UR13002RS8/DP13129	n.º de rata	Tratamiento	NAD	Infiltrados/inflamación: lámina propia	Infiltrados de células fusiformes	edema	otro	SNAP 25 escindi da
150	35	Quitosano al 1% + Triton al 0,1% + Botox 30 U		infiltrado mononuclear mín.				2
250	36	Quitosano al 1% + Triton al 0,1% + Botox 30 U		infiltrado mononuclear mín.				3,5
350	37	Quitosano al 1% + Triton al 0,1% + Botox 30 U		inflamación de células mixtas mínima			. focal	3,5
450	38	Quitosano al 1% + Triton al 0,1% + Botox 30 U		infiltrado mononuclear mín.			hiperplasia del epitelio, mín	3
550	39	Quitosano al 1% + Triton al 0,1% + Botox 30 U		infiltrados mononucleares leves				3
650	40	Quitosano al 1% + Triton al 0,1%	x					0
750	41	Quitosano al 1% + Triton al 0,1% + Botox 30 U		inflamación mononuclear leve				4
850	42	Quitosano al 1% + Triton al 0,1%		inflamación de células mixtas/infiltrado mononuclear mínimos				0

UR13002RS6/DP13130	n.º de rata	Tratamiento	NAD	Infiltrados/inflamación: lámina propia	Infiltrados de células fusiformes	edema	otro	SNAP 25 escindi da
150	43	Instilación con HPMC al 0,25% + Triton al 0,1% + Botox (30 U)	x					3
250	44	Instilación		inflamación de células	leve	leve		2

		con HPMC al 0,25% + Triton al 0,1% + Botox (30 U)		mixtas mod.				
350	45	HPMC al 0,25% + Triton al 0,1%		inflamación de células mixtas mod.	leve	leve	hemorragia leve	0
450	46	Instilación con HPMC al 0,25% + Triton al 0,1% + Botox (30 U)	x					2
550	47	Instilación con HPMC al 0,25% + Triton al 0,1% + Botox (30 U)		inflamación de células mixtas mod.	leve	leve		1
650	48	Instilación con HPMC al 0,25% + Triton al 0,1% + Botox (30 U)		inflamación de células mixtas mín.	mín.			2
750	49	Instilación con HPMC al 0,25% + Triton al 0,1% + Botox (30 U)	x					2
850	50	HPMC al 0,25% + Triton al 0,1%		inflamación de células mixtas grave	leve	mod.	úlceras grandes; bacterias	0

UR13002RS8/DP13145	n.º de rata	Tratamiento	NAD	Infiltrados/inflamación: lámina propia	Infiltrados de células fusiformes	edema	otro	SNAP 25 escindida
150	59	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1% + BTX (30 U)		Infiltrado de células mononucleares mín.				1
250	60	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1% + BTX (30 U)		infiltrado mononuclear leve	mín.			1
350	61	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1% + BTX (30 U)		inflamación mononuclear leve	mín.		células desgranuladas	2
450	62	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1%	x					0
550	63	Quitosano al 1% + nonoxinol-9		inflamación de células mixtas leve	leve			1

		al 0,1% + BTX (30 U)						
650	64	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1% + BTX (30 U)		infiltrado de células mononucleares mín.				2
750	65	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1%	x					0
850	66	Quitosano al 1% + nonoxinol-9 al 0,1% + BTX (30 U)		inflamación de células mixtas leve	leve			3

UR13002RS7/ DP13139	n.º de rata	Tratamiento	NAD	Infiltrados/inflamación: lámina propia	Infiltrados de células fusiformes	edema	otro	SNAP 25 escindi da
150	51	Tiloxapol al 0,1% + Botox 30 U	x					1
250	52	Tiloxapol al 0,1% + Botox 30 U	x					0
350	53	Tiloxapol al 0,1% + Botox 30 U	x					0
450	54	Tiloxapol al 0,1% + Botox 30 U	x					0
550	55	Tiloxapol al 0,1% + Botox 30 U	x					0
650	56	Tiloxapol al 0,1% + Botox 30 U	x					0
750	57	Tiloxapol al 0,1%	x					0
850	58	Tiloxapol al 0,1%		célula mixta mod.		mod.	úlceras	0
950	1	solución salina al 0,9% + Botox 10 U					inflamaci ón mixta mín.	4
951	2	solución salina al 0,9% + Botox 10 U					inflamaci ón mixta mín.	2
952	3	solución salina al 0,9% + Botox 10 U	x				.	3
953	4	solución salina al 0,9% + Botox 10 U					granulom atoso mod	1

Formulaciones de prueba: se observaron puntuaciones positivas de inmunohistoria en todas las muestras después de la instilación intravesical de BOTOX®, excepto para las formulaciones de tiloxapol al 0,1% (p/v). La figura 6 muestra las puntuaciones de IHC de algunas formulaciones a modo de ejemplo.

Tratamiento de vejiga hiperactiva

Este ejemplo describe el tratamiento de pacientes con vejiga hiperrefléxica debido a disfunción neurógena o idiopática de la vejiga.

Varios pacientes con síntomas de vejiga hiperrefléxica (infección de la vejiga, incontinencia y necesidad imperiosa de orinar) debido a disfunción neurógena o idiopática de la vejiga se tratan mediante instilación vesical. Una composición farmacéutica que comprende aproximadamente 100 Unidades de BOTOX®, Triton™ X-100 al 0,1% (p/v) y quitosano al 1% (p/v). La composición farmacéutica se aplica por instilación en la vejiga de los pacientes bajo una ligera sedación. Se observa un aumento significativo en la capacidad máxima media de la vejiga y una disminución significativa en la presión máxima media de micción del detrusor 7 días después del tratamiento.

Ejemplo de referencia 3: el aumento de permeabilidad de la pared de la vejiga inducido por Triton X-100 fue reversible

Se sembraron en placa células uroepiteliales de vejiga humana (CELLnTEC n.º de catálogo HBEP.05) a una concentración de aproximadamente 150.000 células viables por pocillo en insertos de membrana de policarbonato. Se colocaron los insertos dentro de los pocillos de placas de cultivo tisular de 24 pocillos. Luego se añadieron medios CELLnTEC CnT-58 (medios de crecimiento) a los pocillos y se incubaron las células durante 2 días a 37°C (el 5% de CO₂) hasta que las células eran confluentes. Al final de la incubación, se retiró los medios de crecimiento y se reemplazaron con medios CELLnTEC CnT-21 (medios de diferenciación). Luego se dejó que las células se diferenciaron durante 7 días, después de lo cual se estableció una capa uroepitelial humana de 2 a 3 células. Se trataron las células durante una hora con los siguientes vehículos: solución salina al 0,9%, Triton X-100 al 0,1% en solución salina al 0,9% y Triton X-100 al 0,5% en solución salina. Se sometió a prueba cada vehículo por triplicado. Se trataron las células aplicando volúmenes de 0,1 ml de cada vehículo a las superficies de los insertos de membrana en los que se hicieron crecer las células. Después de la exposición, se retiraron las disoluciones de vehículo de los insertos y se añadieron medios de diferenciación a cada inserto. Luego, se incubaron las células y se dejaron recuperar durante 0, 24 ó 48 horas. Obsérvese que la solución salina al 0,9% (control negativo) solo se sometió a prueba a las 0 horas. Luego se realizaron ensayos de permeabilidad de la gelatina. Los ensayos de permeabilidad de la gelatina se realizaron retirando los medios de cada inserto seguido por la adición de volúmenes de 0,1 ml de gelatina marcada con Oregon Green 488 de 0,1 mg/ml, formulada en solución salina, a cada inserto. Se colocaron los insertos en pocillos que contenían volúmenes de 0,8 ml de solución salina equilibrada de Earl. Después de 1 hora de exposición, se recogió el flujo y se midió la fluorescencia usando un instrumento Envision. Luego se compararon los resultados de las pruebas de veinticuatro horas y cuarenta y ocho horas con los datos de las 0 horas para determinar si se habían producido disminuciones en la permeabilidad de la gelatina.

Se encontró que la cantidad de gelatina que se difundió a través del urotelio *in vitro* tratado con Triton X-100 al 0,1% era menor después de 24 y 48 horas de recuperación. Estos resultados sugieren la recuperación de la permeabilidad urotelial humana *in vitro* después del tratamiento con Triton X-100 al 0,1%.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de *Clostridium* y al menos un agente de permeabilización,
5 en la que el derivado de *Clostridium* es una toxina botulínica, y en la que el al menos un agente de permeabilización comprende un tensioactivo no iónico y un mucoadhesivo, que es un polímero catiónico, y
10 en la que el al menos un agente de permeabilización está presente en una cantidad eficaz para aumentar sustancial y reversiblemente la permeabilidad de la pared de la vejiga frente al derivado de *Clostridium*.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el tensioactivo comprende un alquil aril poliéter.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el mucoadhesivo comprende quitosano.
- 15 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el tensioactivo está presente en una cantidad que oscila desde el 0,01% hasta el 0,5% (p/v).
- 20 5. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que el mucoadhesivo está presente en una cantidad que oscila desde el 0,01% hasta el 5% (p/v).
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que el tensioactivo comprende octoxinol-9.
- 25 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que el tensioactivo comprende nonoxinol-9.
8. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que el tensioactivo está presente en una cantidad del 0,1% (p/v).
- 30 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que el tensioactivo está presente en una cantidad del 0,1% (p/v).
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de un paciente con una disfunción neurógena de la vejiga, que comprende: aplicar por instilación por vía intravesical a la pared de la vejiga del paciente la composición farmacéutica anterior.
35
11. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en la que el tensioactivo comprende un alquil aril poliéter.
- 40 12. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en la que el mucoadhesivo comprende quitosano.
13. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en la que el tensioactivo está presente en una cantidad que oscila desde el 0,01% hasta el 0,5% (p/v).
- 45 14. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que el mucoadhesivo está presente en una cantidad que oscila desde el 0,01% hasta el 5% (p/v).
- 50 15. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en la que el tensioactivo comprende octoxinol-9.

Patrón típico de inyecciones de BOTOX intracistinales para tratamiento de OAB

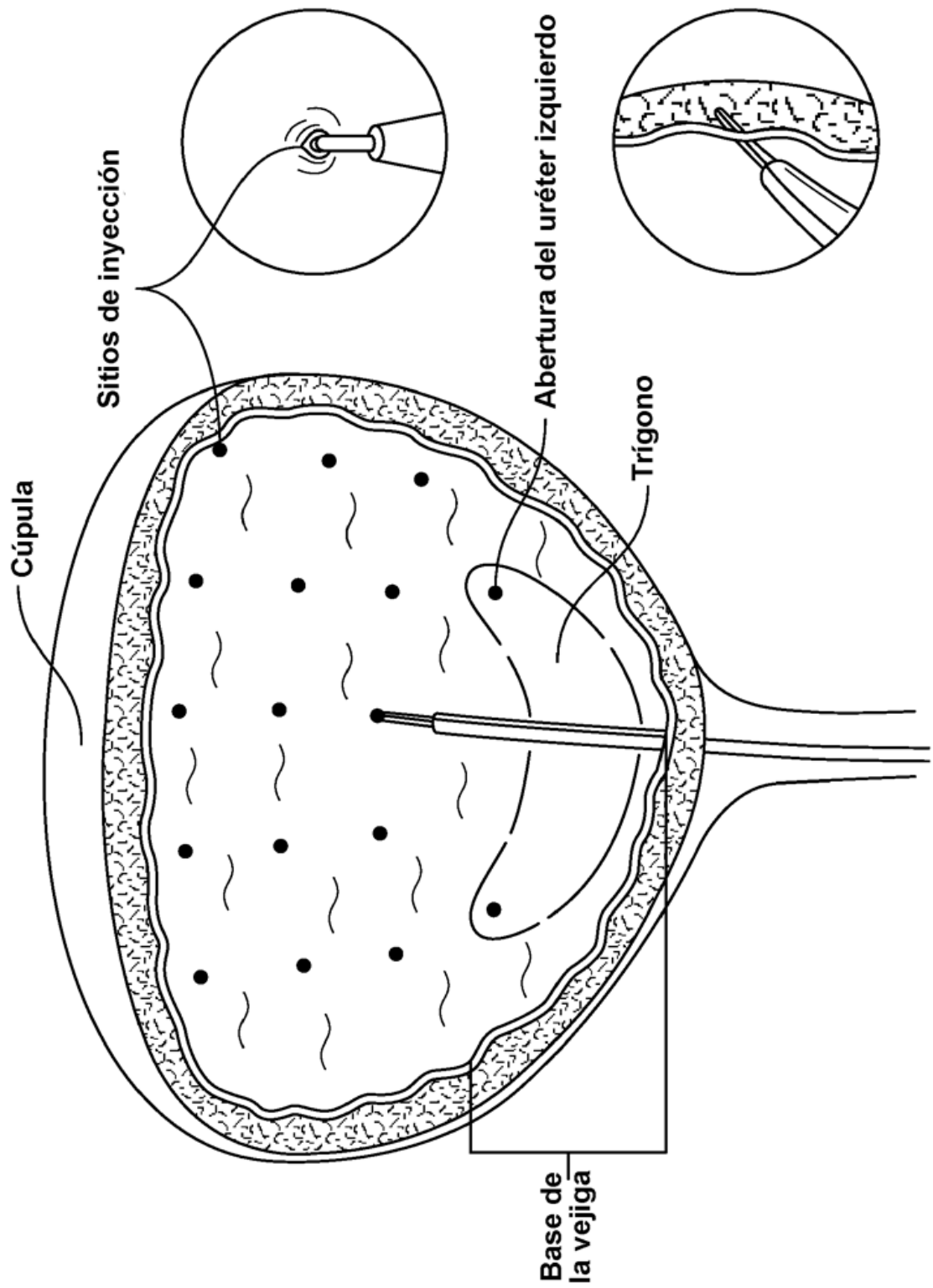


FIG. 1



FIG. 2A

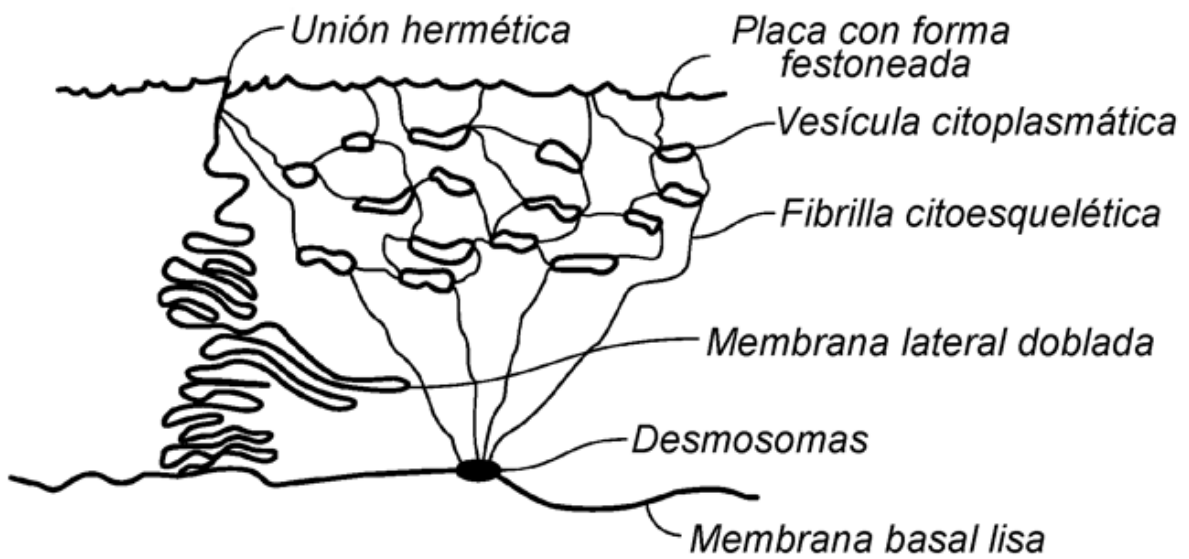


FIG. 2B

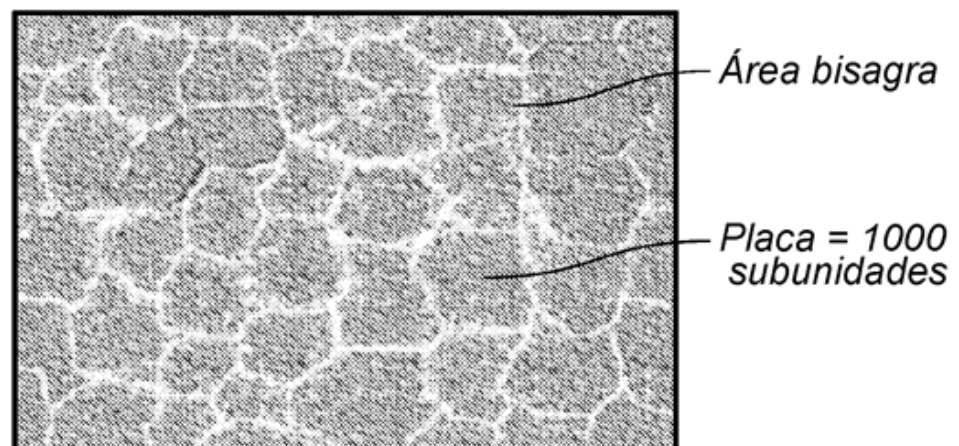


FIG. 2C

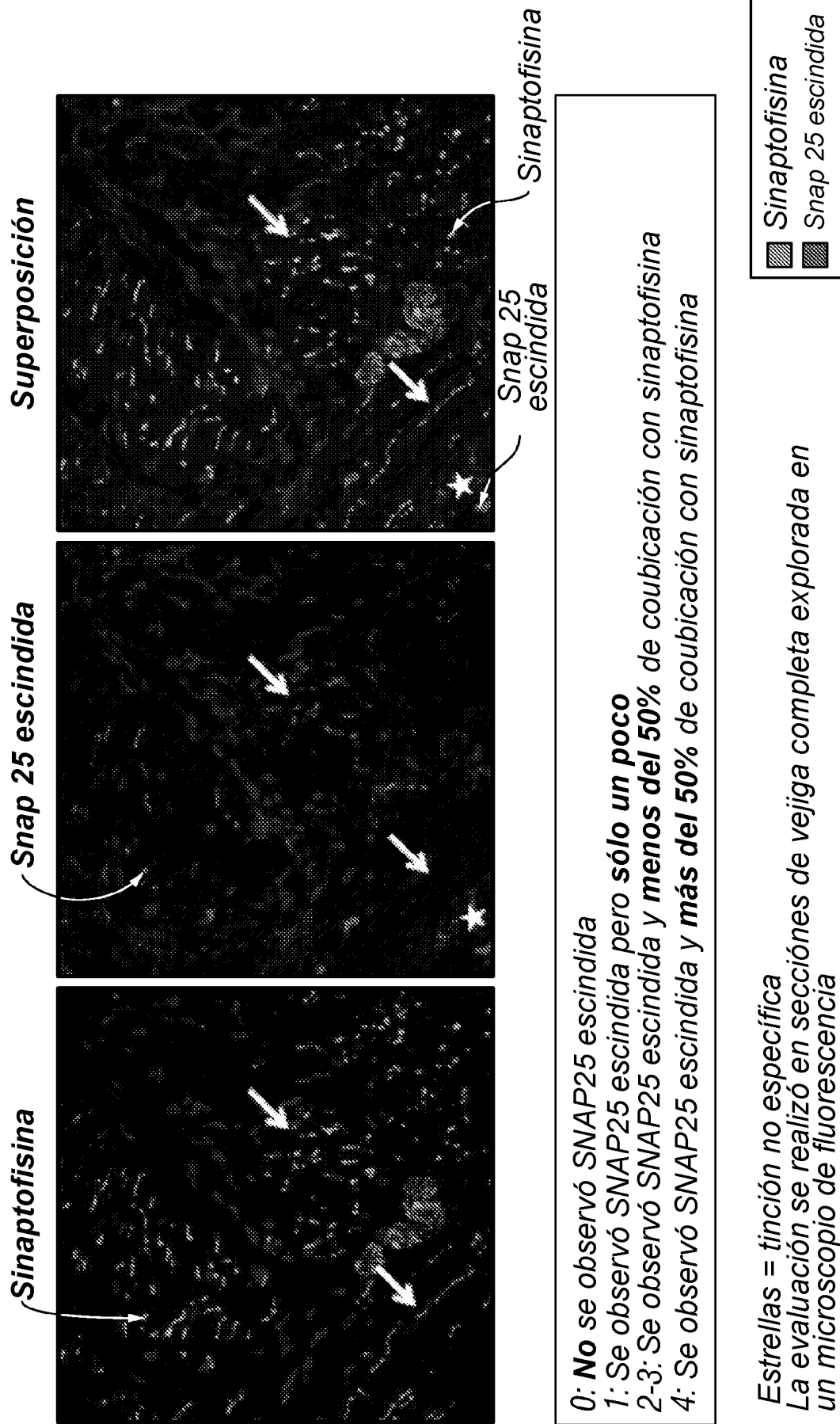
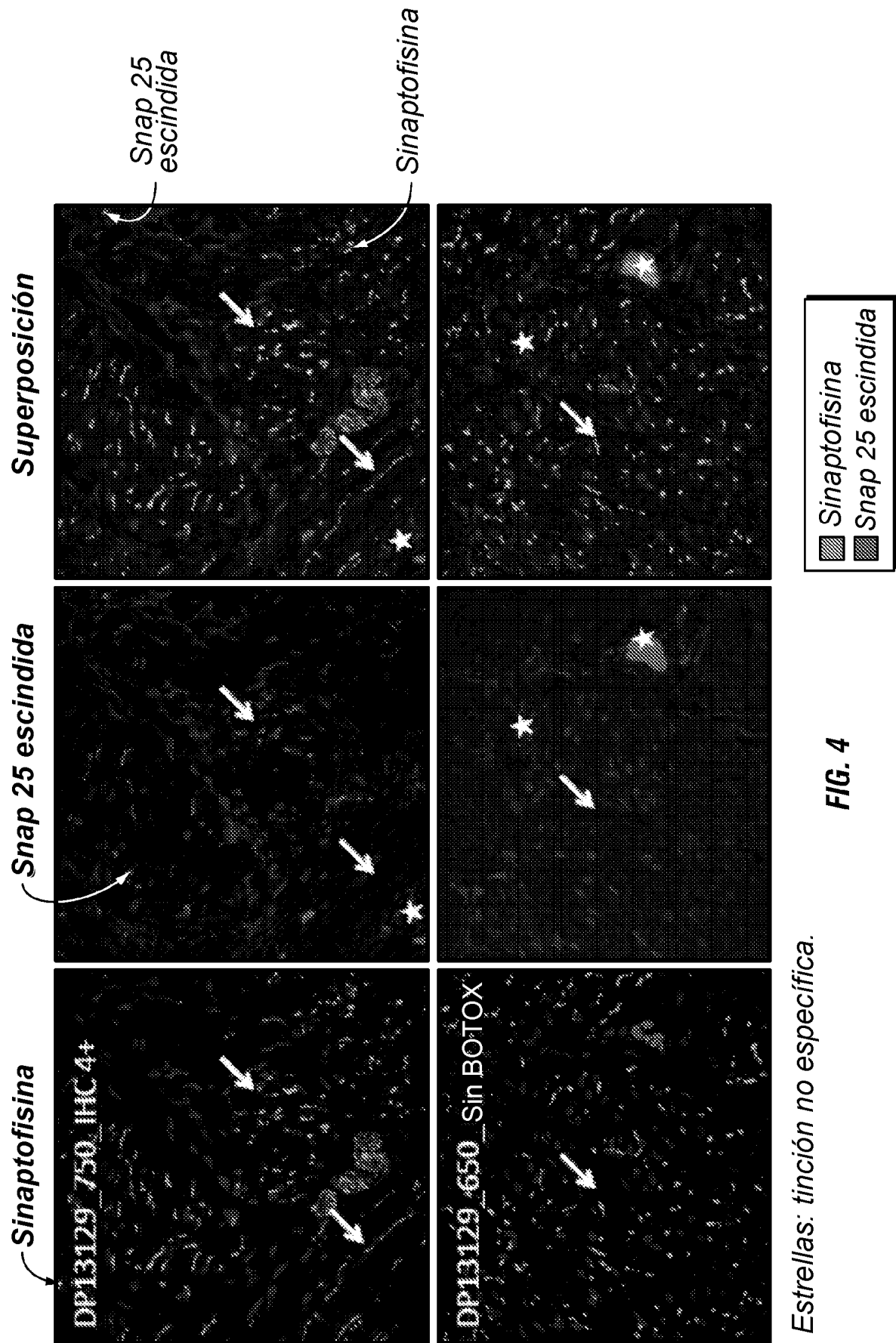
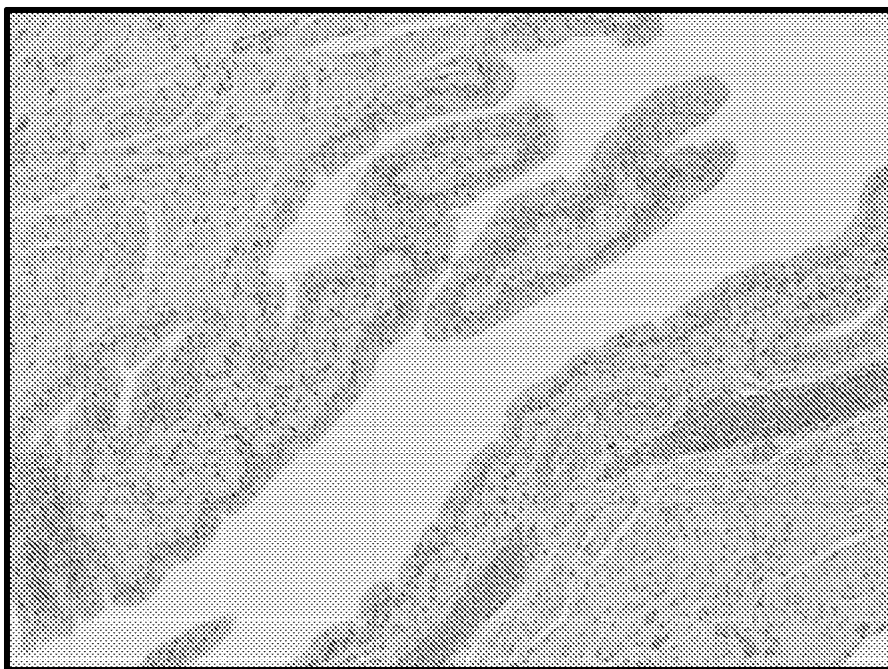


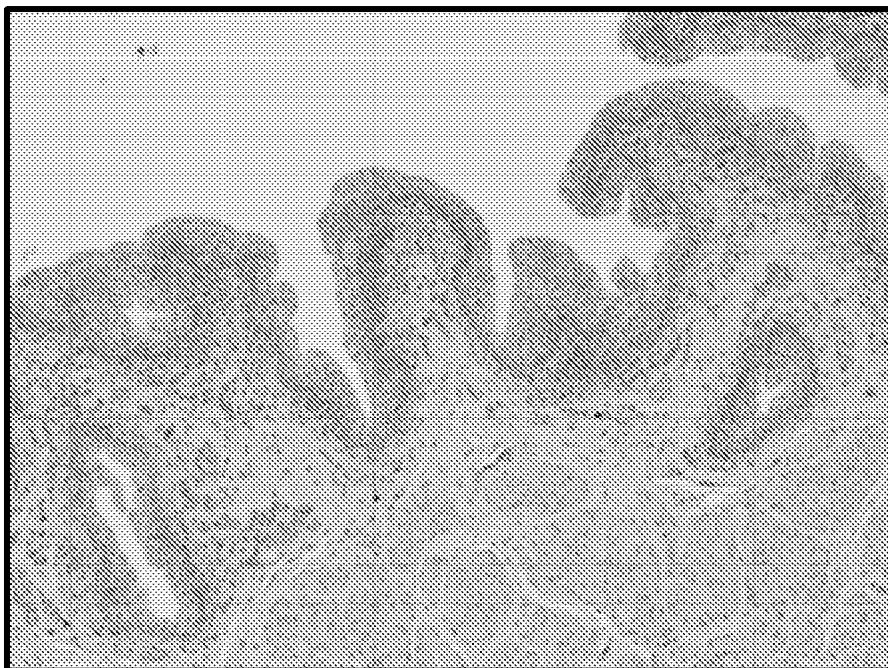
FIG. 3





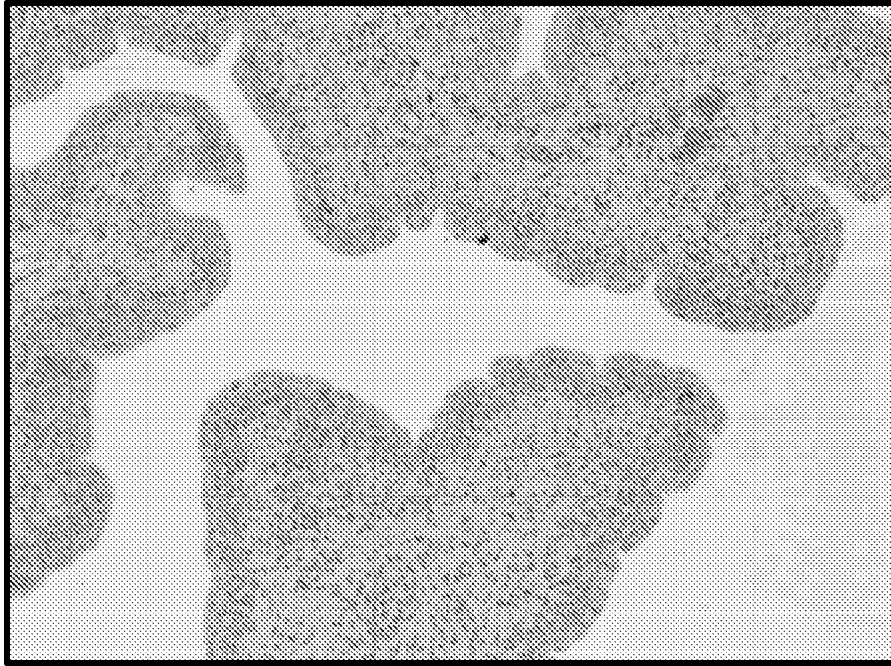
dentro de los límites normales

FIG. 5A



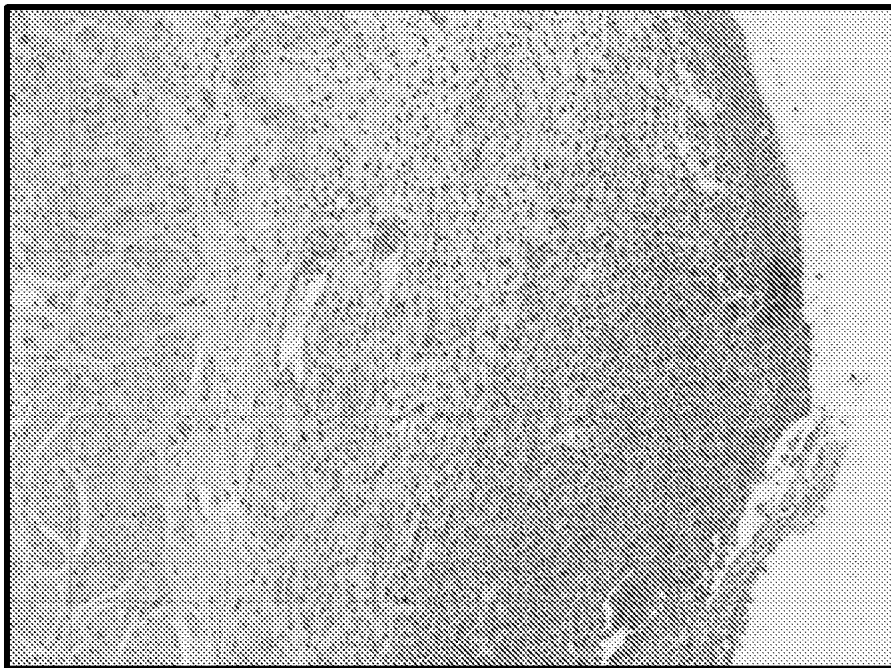
infiltrados de células mixtas mínimos
infiltrados de células fusiformes mínimos

FIG. 5B



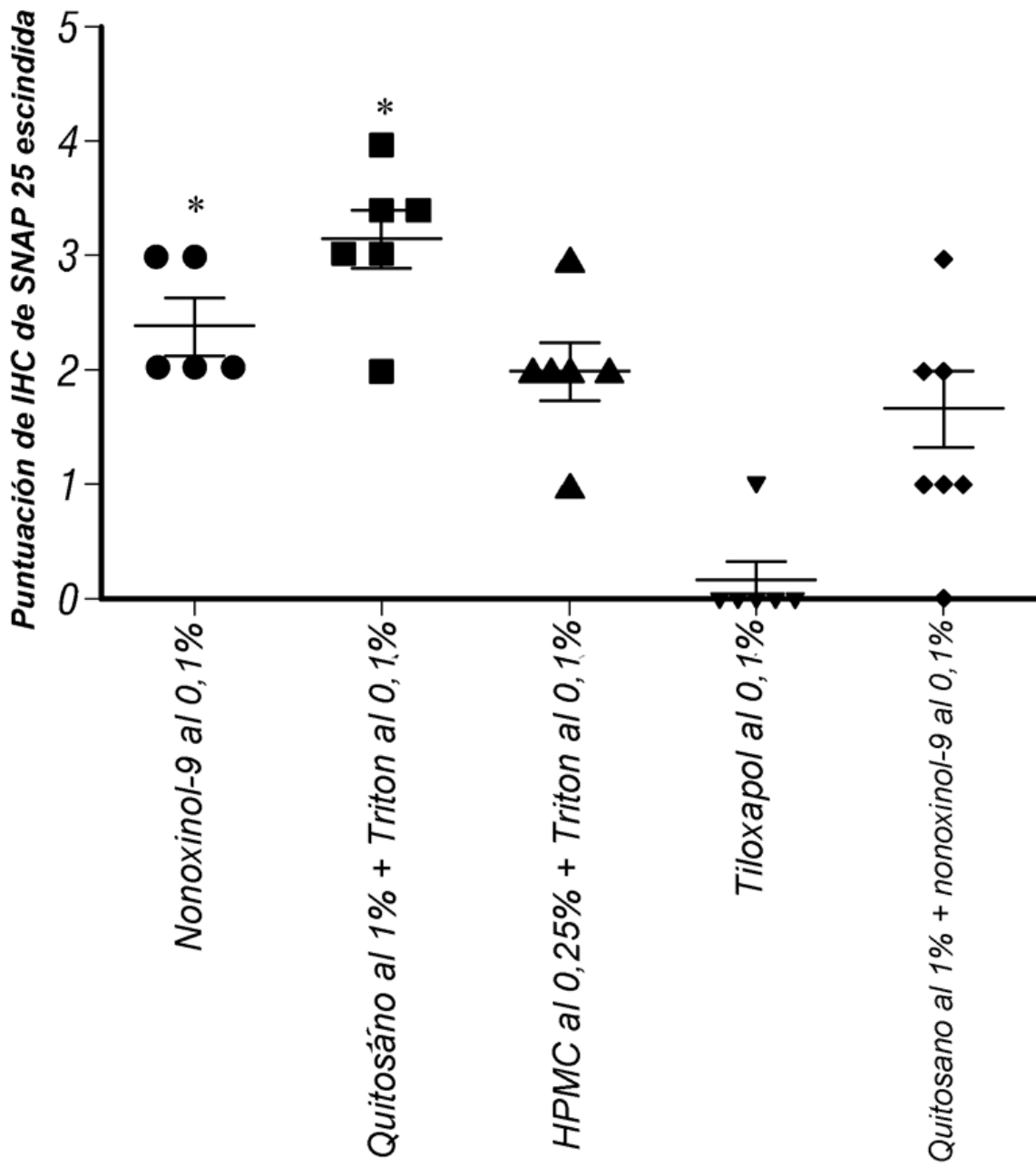
inflamación de células mixtas leve
infiltrados de células fusiformes leves

FIG. 5C



inflamación celular mixta moderada
infiltrados de células fusiformes moderados
ulceración

FIG. 5D



* Diferencia estadísticamente significativa con el grupo de tiloxapol al 0,1%.

FIG. 6