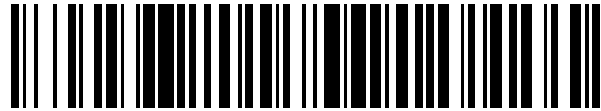


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 821**

51 Int. Cl.:

A61K 51/00 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2005 E 13173674 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2656859**

54 Título: **Aplicación tópica y liberación transdérmica de toxinas botulínicas**

30 Prioridad:

03.03.2004 US 550015 P

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

23.12.2015

73 Titular/es:

**REVANCE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
7555 Gateway Blvd.
Newark, CA 94560, US**

72 Inventor/es:

**DAKE, MICHAEL D. y
WAUGH, JACOB M.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 554 821 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

Aplicación tópica y liberación transdérmica de toxinas botulínicas

5 **Antecedentes de la invención**

10 La piel protege a los órganos corporales de amenazas ambientales externas y actúa como termostato para mantener la temperatura corporal. Consiste en varias capas diferentes, cada una de ellas con funciones especializadas. Las capas principales incluyen la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis es una capa de estratificación de células epiteliales que recubre la dermis, que consiste en tejido conectivo. Tanto la epidermis como la dermis están soportadas adicionalmente por la hipodermis, una capa interna de tejido adiposo.

15 La epidermis, la capa superior de la piel, únicamente tiene de 0,1 a 1,5 milímetros de espesor (Inlander, Skin, Nueva York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Consiste en queratinocitos y está dividida en varias capas basándose en su estado de diferenciación. La epidermis puede clasificarse adicionalmente en el estrato córneo y la epidermis viable, que consiste en la capa de Malpighi y células basales. El estrato córneo es higroscópico y requiere al menos un 10 % en peso de humedad para mantener su flexibilidad y blandura. La higroscopia es atribuible, en parte, a la capacidad de la queratina de mantener agua. Cuando la capa córnea pierde su blandura y flexibilidad se vuelve áspera y frágil, dando como resultado la piel seca.

20 La dermis, que está justo debajo de la epidermis, tiene de 1,5 a 4 milímetros de espesor. Es la más gruesa de las tres capas de la piel. Además, la dermis también alberga la mayoría de las estructuras de la piel, incluyendo las glándulas sudoríparas y sebáceas (que secretan sustancias a través de aperturas de la piel denominadas poros, o comedones), folículos pilosos, terminaciones nerviosas y vasos sanguíneos y linfáticos (Inlander, Skin, Nueva York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Sin embargo, los componentes principales de la dermis son el colágeno y la elastina.

30 La hipodermis es la capa más profunda de la piel. Actúa como aislante para la conservación del calor corporal y como un elemento que absorbe los choques para la protección de los órganos (Inlander, Skin, Nueva York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Además, la hipodermis también almacena grasa para las reservas de energía. El pH de la piel normalmente está comprendido entre 5 y 6. Esta acidez se debe a la presencia de aminoácidos anfóteros, ácido láctico y ácidos grasos de las secreciones de las glándulas sebáceas. La expresión "manto ácido" se refiere a la presencia de sustancias hidrosolubles en la mayor parte de las regiones de la piel. La capacidad tamponante de la piel se debe, en parte, a estas secreciones almacenadas en la capa córnea de la piel.

35 Las arrugas, uno de los signos reveladores del envejecimiento, pueden producirse por cambios bioquímicos, histológicos y fisiológicos que se acumulan por lesiones ambientales (Benedetto, International Journal of Dermatology, 38: 641-655 (1999)). Además, hay otros factores secundarios que pueden producir pliegues, surcos y líneas de expresión características (Stegman et al., The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)). Estos factores secundarios incluyen la presión constante de la gravedad, la presión posicional frecuente y constante sobre la piel (por ejemplo, durante el sueño) y los movimientos faciales repetidos producidos por la contracción de los músculos faciales (Stegman et al., The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)). Se han utilizado diferentes técnicas para modificar potencialmente algunos de los signos del envejecimiento. Estas técnicas van desde hidratantes faciales que contienen alfa hidroxácidos y retinol hasta procedimientos quirúrgicos e inyecciones de neurotoxinas.

50 Una de las funciones principales de la piel es proporcionar una barrera para el transporte de agua y sustancias potencialmente perjudiciales para la homeostasis normal. El cuerpo rápidamente se deshidrataría sin una piel semipermeable resistente. La piel ayuda a impedir la entrada de sustancias perjudiciales en el cuerpo. Aunque la mayoría de las sustancias no pueden atravesar la barrera, se han creado varias estrategias para aumentar selectivamente la permeabilidad de la piel con un éxito variable.

55 Las toxinas de botulinum (también conocidas como toxinas botulínicas o neurotoxinas botulínicas) son neurotoxinas producidas por la bacteria Gram-positiva *Clostridium botulinum*. Actúan produciendo la parálisis de los músculos al impedir la transmisión sináptica o la liberación de acetilcolina a través de la unión neuromuscular y se cree que actúan también de otras formas. Su acción esencialmente bloquea las señales que normalmente producirían espasmos o contracciones musculares, dando como resultado una parálisis.

60 La toxina botulínica se clasifica en ocho neurotoxinas que están relacionadas serológicamente, pero son distintas. De éstas, siete pueden producir parálisis, particularmente los serotipos A, B, C, D, E, F y G de la neurotoxina botulínica. Cada una de éstas se distingue por la neutralización con anticuerpos con especificidad de tipo. Sin embargo, el peso molecular de la molécula de proteína de la toxina botulínica, en los siete de estos serotipos de toxina botulínica activos, es de aproximadamente 150 kD. Cuando se liberan por la bacteria, las toxinas botulínicas son complejos que comprenden la molécula de proteína de la toxina botulínica de 150 kD en cuestión junto con proteínas asociadas que no son toxinas. El complejo de toxina botulínica de tipo A puede producirse por bacterias

del género Clostridia como formas de 900 kD, 500 kD y 300 kD. Los tipos B y C de toxinas botulínicas se producen aparentemente como un solo complejo de 700 kD o 500 kD. El tipo D de toxina botulínica se produce como complejos tanto de 300 kD como de 500 kD. Los tipos E y F de toxinas botulínicas se producen únicamente como complejos de aproximadamente 300 kD. Se cree que los complejos (es decir, peso molecular mayor de aproximadamente 150 kD) contienen una proteína hemaglutinina que no es una toxina y una proteína no hemaglutinina no tóxica. Estas dos proteínas que no son toxinas (que junto con la molécula de la toxina botulínica constituyen el complejo de neurotoxina relevante) pueden actuar proporcionando estabilidad frente a la desnaturalización de la molécula de toxina botulínica y cuando se ingiere la toxina, como protección contra los ácidos digestivos. Además, es posible que cuanto mayores sean (mayor que un peso molecular de aproximadamente 150 kD) los complejos de toxina botulínica, menor será la velocidad de difusión de la toxina botulínica para salir de un sitio de inyección intramuscular de un complejo de toxina botulínica.

Los diferentes serotipos de toxina botulínica varían en las especies animales a las que afectan y en la gravedad y duración de la parálisis que inducen. Por ejemplo, se ha determinado que la toxina botulínica de tipo A es 500 veces más potente, según se mida por la velocidad de parálisis producida en la rata, que la toxina botulínica de tipo B. Además, se ha determinado que la toxina botulínica de tipo B es no tóxica en primates a una dosis de 480 U/kg, aproximadamente 12 veces la DL₅₀ de primates para el tipo A. Debido al tamaño molecular y a la estructura molecular de la toxina botulínica, no puede atravesar el estrato córneo y las múltiples capas de la arquitectura de la piel subyacente.

El botulismo, el complejo de síntomas característicos producidos tras la exposición sistémica a la toxina botulínica, ha existido en Europa desde la antigüedad. En 1895, Emile P. van Ermengem aisló por primera vez el bacilo anaerobio formador de esporas a partir de carne de cerdo salada en bruto obtenida de tejido post-mortem de víctimas que habían muerto de botulismo en Bélgica. Van Ermengem descubrió que la enfermedad se producía por una toxina extracelular, que se producía por lo que él denominó *Bacillus botulinus* (Van Ermengem, Z Hyyg Infektionskr, 26: 1-56; Rev Infect (1897)). El nombre se cambió en 1922 a *Clostridium botulinum*. El nombre *Clostridium* se usó para reflejar la naturaleza anaeróbica del microorganismo y también sus características morfológicas (Carruthers y Carruthers, Can J Ophthalmol, 31: 389-400 (1996)). En 1920, se aisló una forma en bruto de toxina botulínica de tipo A después de brotes adicionales de envenenamiento de alimentos. El Dr. Herman Sommer en la Universidad de California, San Francisco hizo los primeros intentos de purificar la neurotoxina (Borodic et al., Ophthalmic Plast Reconstr Surg, 7: 54-60 (1991)). En 1946, el Dr. Edward J. Schantz y sus colegas aislaron la neurotoxina en forma cristalina (Schantz et al., In: Jankovi J, M Hallet (Eds) Therapy with Botulinum Toxin, Nueva York, NY: Marcel Dekker, 41-49 (1994)). En 1949, Burgen y sus asociados pudieron demostrar que la toxina botulínica bloquea los impulsos a través de la unión neuromuscular (Burgen et al., J Physiol, 109: 10-24 (1949)). Allan B. Scott usó por primera vez la toxina botulínica A (BTX-A) en monos en 1973. Scott, demostró la parálisis reversible del músculo ocular que duraba 3 meses (Lamanna, Science, 130: 763-772 (1959)). Poco después, se notificó que la BTX-A era un tratamiento satisfactorio en seres humanos para el estrabismo, blefaroespasma y tortícolis espasmódica (Baron et al., In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM (Eds), Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology, St. Louis, MO: Mosby Year Book, 504-523 (1994); Carruthers y Carruthers, Adv Dermatol, 12: 325-348 (1997); Markowitz, En: Strickland GT (Eds) Hunters Tropical Medicine, 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 441-444 (1991)). En 1986, Jean y Alastair Carruthers, un equipo compuesto por marido y mujer consistente en un cirujano oculoplástico y un dermatólogo, comenzaron a desarrollar el uso cosmético de BTX-A para el tratamiento de arrugas asociadas con el movimiento en el área del entrecejo (Schantz y Scott, In Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, Nueva York: Academic Press, 143-150 (1981)). El uso por Carruthers de BTX-A para el tratamiento de arrugas condujo a su original publicación de este enfoque en 1992 (Schantz y Scott In Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, Nueva York: Academic Press, 143-150 (1981)). En 1994, el mismo equipo notificó experiencias con otras arrugas asociadas con el movimiento en la cara (Scott, Ophthalmol, 87: 1044-1049 (1980)). Esto, a su vez, condujo al nacimiento de la era del tratamiento cosmético con BTX-A.

Se dice que la toxina botulínica de tipo A es el agente biológico natural más letal conocido para el ser humano. Las esporas de *C. botulinum* se encuentran en el suelo y pueden crecer en recipientes para alimentos sellados y esterilizados de forma inadecuada. La ingestión de la bacteria puede producir botulismo, que puede ser fatal. Al mismo tiempo, los efectos paralizantes musculares de la toxina botulínica se han usado para conseguir efectos terapéuticos. La administración controlada de toxina botulínica se ha usado para proporcionar parálisis muscular para tratar afecciones, por ejemplo, trastornos neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. Las afecciones que se han tratado con toxina botulínica incluyen espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica de inicio en adultos, fisura anal, blefaroespasma, parálisis cerebral, distonía cervical, migrañas, estrabismo, trastorno de la articulación temporomandibular y diversos tipos de calambres y espasmos musculares. Más recientemente, los efectos paralizantes musculares de la toxina botulínica se han aprovechado en aplicaciones faciales terapéuticas y cosméticas tales como el tratamiento de arrugas, líneas de expresión del entrecejo y otros resultados de espasmos o contracciones de músculos faciales.

La Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos número US 2003/0229034 A1 describe composiciones y métodos útiles para la liberación de agentes terapéuticos. La aplicación tópica de toxina botulínica proporcionaría un tratamiento alternativo más seguro y más deseable debido a la naturaleza indolora de la aplicación, la mayor área de superficie de tratamiento que puede cubrirse, la capacidad de formular una toxina pura con mayor actividad

específica, la baja formación necesaria para aplicar la terapia botulínica, las pequeñas dosis que serían necesarias para producir el efecto deseado y la ausencia de necesidad de grandes pocillos de toxinas para alcanzar un resultado clínico terapéutico. Por lo tanto, es muy deseable un medio eficaz para la administración transdérmica de toxina botulínica, así como un medio eficaz para administrar toxina botulínica para tratar o prevenir varias afecciones que no requieren inyección.

Sumario de la invención

Esta divulgación se refiere a composiciones que comprenden una toxina botulínica, más específicamente a dichas composiciones que permiten el transporte o liberación de una toxina botulínica a través de la piel o epitelio (también denominada "liberación transdérmica") y que, por lo tanto, pueden usarse como aplicaciones tópicas para proporcionar una toxina botulínica a un sujeto, para diversos fines terapéuticos, estéticos y/o cosméticos, como se describe en el presente documento.

Un aspecto de la invención es proporcionar una composición tópica que comprende una toxina botulínica y un vehículo cargado positivamente, comprendiendo dicho vehículo un esqueleto polimérico cargado positivamente de peptidilo o distinto de peptidilo que tiene unido al mismo uno o más grupos de eficacia cargados positivamente seleccionados entre $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, donde el subíndice $n1$ es un número entero de 0 a 20 y el subíndice $n2$ es, independientemente, un número entero impar de 5 a 25; PTD de Antennapedia y fragmentos de la misma que retiene actividad de PTD de Antennapedia; VIH-TAT; y fragmentos de VIH-TAT que tienen las secuencias de aminoácidos $(\text{gly})_p\text{-RGRD-DRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$ o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$, en las que los subíndices p y q son cada uno, independientemente, un número entero seleccionado entre un intervalo de 0 a 20, un intervalo de 0 a 8 o un intervalo de 2 a 5; donde el vehículo cargado positivamente y la toxina botulínica entran en contacto directamente para formar un complejo no covalente y donde la toxina botulínica no está modificada covalentemente, para su uso en tratamiento de dolor neurológico; prevención o reducción de dolor de cabeza tipo migraña u otro dolor de cabeza; o aliviar el dolor relacionado con el espasmo muscular.

Otro aspecto de la invención es proporcionar una composición tópica que comprende una toxina botulínica y un vehículo cargado positivamente, que comprende dicho vehículo un esqueleto polimérico cargado positivamente de peptidilo o distinto de peptidilo que tiene unido al mismo uno o más grupos de eficacia cargados positivamente seleccionados entre $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, donde el subíndice $n1$ es un número entero de 0 a 20 y el subíndice $n2$ es, independientemente, un número entero impar de 5 a 25; PTD de Antennapedia y fragmentos de la misma que retienen actividad PTD de Antennapedia; VIH-TAT que tiene las secuencias de aminoácidos $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRR-QRRR-(gly)}_q$ o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$, en las que los subíndices p y q son cada uno, independientemente, un número entero seleccionado entre un intervalo de 0 a 20, un intervalos de 0 a 8 o un intervalo de 0 a 5; donde el vehículo cargado positivamente y la toxina botulínica entran en contacto directamente para formar un complejo no covalente y donde la toxina botulínica no está modificada covalentemente, para su uso en tratamiento, prevención o reducción de síntomas asociados con hiperhidrosis subjetiva o clínica.

Otro aspecto más de esta invención es proporcionar un método cosmético para el tratamiento o la disminución de líneas y/o arrugas finas que comprende la aplicación tópica a la piel o al epitelio del sujeto de la toxina botulínica en combinación con una cantidad eficaz de un vehículo cargado positivamente que comprende un esqueleto polimérico cargado positivamente que tiene unido al mismo uno o más grupos de eficacia cargados positivamente, dichos grupos de eficacia cargados positivamente seleccionados entre $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, donde el subíndice $n1$ es un número entero de 0 a 20 y el subíndice $n2$ es independientemente un número impar de 5 a 25; PTD de Antennapedia y fragmentos de la misma que retienen actividad PTD de Antennapedia; VIH-TAT; y fragmentos de VIH-TAT cargados positivamente que tienen las secuencias de aminoácidos $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRR-QRRR-(gly)}_q$ o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$, en las que los subíndices p y q son cada uno, independientemente, un número entero de 0 a 20; donde el vehículo cargado positivamente y la toxina botulínica entran en contacto directamente para formar un complejo no covalente y donde la toxina botulínica no está modificada covalentemente; para tratar o disminuir la aparición de líneas y/o arrugas finas, opcionalmente donde las líneas y/o arrugas finas son líneas y/o arrugas finas faciales.

Se divulga una composición que contiene una toxina botulínica y un vehículo. El vehículo tiene un esqueleto polimérico con grupos de ramificación cargados positivamente unidos. La asociación entre el vehículo y la toxina botulínica es no covalente.

Se divulga también un kit para la administración de una toxina botulínica a un sujeto. El kit incluye una toxina botulínica presente en una cantidad eficaz para su liberación transdérmica, y un vehículo que tiene un esqueleto polimérico con grupos de ramificación cargados positivamente unidos. La asociación entre el vehículo y la toxina botulínica es no covalente.

Se divulga también un kit para la administración de una toxina botulínica a un sujeto. El kit incluye un dispositivo para liberar la toxina botulínica en la piel y una composición que contiene un vehículo que tiene un esqueleto polimérico con grupos de ramificación cargados positivamente unidos seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, VIH-TAT y fragmentos de los mismos, y PTD de Antennapedia, donde el subíndice $n1$ es un número entero de aproximadamente 20, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar de aproximadamente 5 a

aproximadamente 25.

Se divulga también un método para administrar una toxina botulínica a un sujeto que implica aplicar tópicamente en la piel o epitelio del sujeto la toxina botulínica junto con una cantidad eficaz de un vehículo. El vehículo tiene un esqueleto polimérico con grupos de ramificación cargados positivamente unidos, y está asociado de forma no covalente con la toxina botulínica.

Se divulga también una composición que comprende una toxina botulínica (como se define en el presente documento) y un vehículo que comprende un "esqueleto" cargado positivamente que tiene grupos de ramificación o de "eficacia" cargados positivamente, como se describe en el presente documento. Más preferentemente, el vehículo cargado positivamente es un polipéptido cargado positivamente de cadena larga o un polímero no peptídico cargado positivamente, por ejemplo, una polialquilenimina. Se divulga también un método para producir un efecto biológico tal como parálisis muscular, reducir la hipersecreción o sudoración, tratar un dolor neurológico o migrañas, reducir espasmos musculares, prevenir o reducir el acné o reducir o aumentar una respuesta inmunitaria, mediante la aplicación tópica de una cantidad eficaz de dicha composición, preferentemente en la piel, de un sujeto o paciente que necesita dicho tratamiento. Se divulga también un método para producir un efecto estético o cosmético, por ejemplo, mediante la aplicación tópica de toxina botulínica en la cara en lugar de la inyección en los músculos faciales.

Se divulgan también kits para preparar o formular una composición que comprende el vehículo y la toxina botulínica, así como artículos adicionales que se necesitan para producir una formulación útil, o una premezcla que, a su vez, puede usarse para producir dicha formulación. Como alternativa, el kit comprende medios para administrar, por separado pero conjuntamente, la toxina botulínica y el vehículo a un sujeto.

25 Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** representa los resultados de un experimento que demuestra la eficacia de la liberación transdérmica de la toxina botulínica usando una composición de la invención que comprende un esqueleto peptídico.

La **Figura 2** es una fotografía que representa el estado de las patas traseras de un ratón en el que el área de una pata se trató con una composición de la invención y el área de la otra pata se trató con otra composición que contenía toxina botulínica que no contenía un vehículo de acuerdo con la invención.

La **Figura 3** es una fotografía que representa arrugas en la frente de un sujeto antes y después del tratamiento con "Loción Essentia Botox" tópicamente.

La **Figura 4** muestra un molde de Mikrosil de la frente (A) después del tratamiento tópico de las arrugas con "Loción Essentia Botox" y (b) antes del tratamiento. Estos moldes de Mikrosil, que son útiles porque minimizan los artefactos que pueden producirse como resultado de fotografiar el sujeto real, muestran claramente que el lado no tratado tiene arrugas más profundas.

La **Figura 5** muestra fotografías que representan el ensayo de almidón/yodo de Minor realizado en la frente de sujeto cinco días después de la aplicación de "Loción Essentia Botox" (A) y una loción de control (B). La loción de control contenía un esqueleto de polilisina cargado positivamente con un peso molecular de aproximadamente 21.000 y con grupos de ramificación TAT. Estas fotografías se tomaron dos minutos después de la aplicación.

La **Figura 6** es igual que la Figura 5, con la excepción de que se tomaron después de que hubieran transcurrido cuatro minutos.

La **Figura 7** muestra el área de dosificación usada en los estudios de hiperhidrosis axilar. Obsérvese que el área de dosificación se extiende un centímetro más allá del área de la piel cubierta por el vello axilar.

La **Figura 8** representa los resultados de un experimento que demuestra la eficacia de la toxina botulínica liberada terapéuticamente a través de la piel intacta como agente tópico usando un vehículo peptídico corto para el tratamiento de la hiperhidrosis axilar en sujetos humanos. El gráfico representa una reducción significativa en la cantidad de sudor (mg por 5 minutos) medida gravimétricamente 4 semanas después del tratamiento con Bótox más un vehículo peptídico corto o el vehículo solo. Los resultados son valores en la semana 4 como relación con respecto al valor inicial para el mismo grupo, determinándose el significado por análisis de Wilcoxon con $P < 0,05$. $N = 10$ pacientes. La **Figura 8b** representa los resultados de un experimento que demuestra la eficacia de la toxina botulínica liberada terapéuticamente a través de la piel intacta como agente tópico usando un vehículo peptídico corto para el tratamiento de la hiperhidrosis axilar en sujetos humanos. El gráfico representa una reducción significativa en la cantidad de sudor (mg por 5 minutos) medida gravimétricamente 4 semanas después del tratamiento con Bótox más un vehículo peptídico corto o vehículo solo. Los resultados son valores de tratamiento como una relación con respecto al valor de control para los dos puntos de tiempo, determinándose el significado por análisis de Wilcoxon con $P < 0,05$. $N = 10$ pacientes.

La **Figura 9** muestra fotografías que representan el ensayo de almidón/yodo de Minor antes y después del tratamiento con “Loción Essentia Botox” tópicamente para el tratamiento de la hiperhidrosis axilar. Se muestra el ensayo de almidón/yodo en el punto inicial frente a la semana 2 en la que la axila derecha se trató con “Loción Essentia Botox” (a y c) y a la axila izquierda se le aplicó el control (b y d) en el caso del sujeto N° 12. Estas fotografías ilustran los efectos beneficiosos típicos observados después del tratamiento con vehículo + bótox en almidón yodo. Aunque se observa algún dato cruzado en el lado del control (coherentes con una reducción del 25 % en los datos gravimétricos), se producen reducciones significativas con el tratamiento (coherente con una reducción del 65 % en los datos gravimétricos en el lado tratado).

10 Descripción detallada de la invención

Esta invención se refiere a la liberación, particularmente la liberación transdérmica, de una toxina botulínica por aplicación tópica de una formulación apropiada.

15 De acuerdo con la presente invención, una molécula de vehículo cargada positivamente que tiene grupos de eficacia, como se describe en el presente documento, se ha considerado adecuada como sistema de transporte para una toxina botulínica, que permite que la toxina se administre por vía transdérmica en músculos y/u otras estructuras asociadas con la piel. El transporte se produce sin modificación covalente de la toxina botulínica.

20 Por “cargado positivamente” se entiende que el vehículo tiene una carga positiva de al menos algunas condiciones en fase de solución, más preferentemente en al menos algunas condiciones fisiológicamente compatibles. Más específicamente, “cargado positivamente”, como se usa en el presente documento, significa que el grupo en cuestión contiene funcionalidades que están cargadas en todas las condiciones de pH, por ejemplo, una amina cuaternaria, o contiene una funcionalidad que puede adquirir carga positiva en ciertas condiciones en fase de solución, tales como cambios de pH en el caso de las aminas primarias. Más preferentemente, “cargado positivamente”, como se usa en el presente documento, se refiere a los grupos que tienen el comportamiento de asociarse con aniones en condiciones fisiológicamente compatibles. Como será evidente para un experto en la materia, los polímeros con una multiplicidad de restos cargados positivamente no necesitan ser homopolímeros. Otros ejemplos de restos cargados positivamente son bien conocidos en la técnica anterior y pueden emplearse fácilmente, como será evidente para los expertos en la materia.

Generalmente, el vehículo cargado positivamente (también denominado “esqueleto cargado positivamente”) típicamente es una cadena lineal de átomos, llevando los grupos en la cadena una carga positiva a pH fisiológico, o llevando los grupos una carga positiva unida a cadenas laterales que se extienden desde el esqueleto. Preferentemente, el propio esqueleto cargado positivamente no tendrá una actividad enzimática o biológica terapéutica definida. El esqueleto lineal es un esqueleto de hidrocarburo que, en algunas realizaciones, está interrumpido por heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio y fósforo. La mayoría de los átomos de la cadena del esqueleto normalmente son carbonos. Además, el esqueleto con frecuencia será un polímero de unidades que se repiten (por ejemplo, aminoácidos, poli(etilenoxi), poli(propilenoamina), polialquilenimina y similares) pero puede ser un heteropolímero. Se divulga un esqueleto cargado positivamente que es una polipropilenoamina donde varios de los átomos de nitrógeno de la amina están presentes como grupos amonio (tetra-sustituido) que llevan una carga positiva. En otra realización, el esqueleto cargado positivamente es un polímero no peptídico, que puede ser un hetero- u homo-polímero, tal como una polialquilenimina, por ejemplo, una polietilenoimina o polipropilenoimina, que tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 2.500.000, preferentemente de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 1.800.000, y más preferentemente de aproximadamente 500.000 a aproximadamente 1.400.000. En otro grupo de realizaciones, el esqueleto tiene unida una pluralidad de restos de cadenas laterales que incluyen grupos cargados positivamente (por ejemplo, grupos amonio, grupos piridinio, grupos fosfonio, grupos sulfonio, grupos guanidinio o grupos amidinio). Los restos de cadena lateral en este grupo de realizaciones pueden estar situados en espacios a lo largo del esqueleto que son uniformes o variables en separación. Además, la longitud de las cadenas laterales puede ser similar o distinta. Por ejemplo, en un grupo de realizaciones, las cadenas laterales pueden ser cadenas de hidrocarburo lineales o ramificadas que tienen de uno a veinte átomos de carbono y que terminan en el extremo distal (lejos del esqueleto) en uno de los grupos cargados positivamente indicados anteriormente. En todos los aspectos de la presente invención, la asociación entre el vehículo y el agente biológicamente activo es mediante una interacción no covalente, incluyendo los ejemplos no limitantes de la misma, interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o combinaciones de las mismas.

En un grupo de realizaciones, el esqueleto cargado positivamente es un polipéptido que tiene múltiples grupos de cadena lateral cargados positivamente (por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, homoarginina y similares). Preferentemente, el polipéptido tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1.500.000, más preferentemente de aproximadamente 25.000 a aproximadamente 1.200.000, más preferentemente de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 1.000.000. Un experto en la materia apreciará que cuando se usan aminoácidos en esta parte de la invención, las cadenas laterales pueden tener la forma D o L (configuración R o S) en el centro de la unión. Como alternativa, el esqueleto puede ser un análogo de un polipéptido tal como un peptoide. Véase, por ejemplo, Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32: 543 (1993); Zuckermann *et al.* *Chemtracts-Macromol. Chem.* 4: 80 (1992); y Simon *et al.* *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:9367 (1992)). En resumen, un peptoide

es una poliglicina en la que la cadena lateral está unida a los átomos de nitrógeno del esqueleto en lugar de a los átomos de carbono α . Como anteriormente, una parte de las cadenas laterales típicamente terminará en un grupo cargado positivamente para proporcionar un componente de esqueleto cargado positivamente. Se describe la síntesis de peptoides, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.877.278. Como se usa el término en el presente documento, los esqueletos cargados positivamente que tienen una construcción de esqueleto peptoide se consideran "no peptídicos" ya que no están compuestos de aminoácidos que tienen cadenas laterales naturales en las localizaciones de carbono α .

Puede emplearse una diversidad de esqueletos distintos, por ejemplo, miméticos estéricos o electrónicos de polipéptidos donde los enlaces amida del péptido se reemplazan con sustitutos tales como enlaces éster, tioamidas (-CSNH-), tioamidas invertido (-NHCS-), aminometileno (-NHCH₂-) o el metilnamino invertido (-CH₂NH-), grupos cetometileno (-COCH₂-) fosfinato (-PO₂RCH₂-) fosfonamido y éster de fosfonamido (-PO₂-RNH) péptido inverso (-NHCO-), trans-alqueno (-CR = CH-), fluoroalqueno (-CF = CH-), dimetileno (-CH₂CH₂-), tioéter (-CH₂-S), hidroxietileno (-CH(OH)CH₂-), metilenoxi (-CH₂O-) tetrazol (CN₄), sulfonamido (-SO₂NH-), metilensulfonamido (CHRSO₂-NH) sulfonamida invertida (-NHSO₂-) y esqueletos con subunidades malonato y/o gem-diamino-alquilo, por ejemplo, como se revisa por Fletcher et al. ((1998) Chem. Rev. 98: 763) y se detalla en las referencias citadas en el presente documento. Muchas de las sustituciones anteriores dan como resultado esqueletos poliméricos aproximadamente isostéricos con respecto a los esqueletos formados a partir de α aminoácidos.

En cada uno de los esqueletos proporcionados anteriormente, pueden adjuntarse grupos de cadena lateral que llevan un grupo cargado positivamente. Por ejemplo, los esqueletos unidos a sulfonamida (-SO₂NH y -NHSO₂-) pueden tener grupos de cadena lateral unidos a los átomos de nitrógeno. De forma similar, el enlace hidroetileno (-CH(OH)CH₂-) puede llevar un grupo de cadena lateral unido al sustituyente hidroxilo. Un experto en la materia puede adaptar fácilmente las otras químicas de enlace para proporcionar grupos de cadena lateral cargados positivamente usando métodos sintéticos convencionales.

En una realización, el esqueleto cargado positivamente es un polipéptido que tiene grupos de ramificación (también denominados grupos de eficacia). Como se usa en el presente documento, un grupo de eficacia o grupo de ramificación es cualquier agente que tiene el efecto de promover la translocación del esqueleto cargado positivamente a través de un tejido o membrana celular y son como se definen en las reivindicaciones adjuntas. Los grupos de ramificación o de eficacia incluyen -(gly)_{n1} - (arg)_{n2}, VIH-TAT o fragmentos de los mismos, o el dominio de transducción de proteínas de Antennapedia, o un fragmento del mismo, donde el subíndice n1 es un número entero de 0 a 20, más preferentemente de 0 a 8, aún más preferentemente de 2 a 5, y el subíndice n2 es, independientemente, un número entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 17, y aún más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 13. Todavía más preferidas son las realizaciones en las que el fragmento VIH-TAT tiene la fórmula (gly)_p-RGRDRRQRRR-(gly)_q, (gly)_p-YGRKRRQRRR-(gly)_q o (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q donde los subíndices p y q son cada uno, independientemente, un número entero de 0 a 20 y el fragmento está unido al esqueleto a través del extremo C o el extremo N del fragmento. Son fragmentos VIH-TAT preferidos aquellos en los que los subíndices p y q son cada uno, independientemente, números enteros de 0 a 8, más preferentemente de 2 a 5. En otra realización preferida, la cadena lateral cargada positivamente o grupo de ramificación es el dominio de transducción de la proteína de Antennapedia (Antp) (PTD), o un fragmento del mismo que retiene actividad. Preferentemente, el vehículo cargado positivamente incluye grupos de ramificación cargados positivamente de cadena lateral en una cantidad de al menos aproximadamente un 0,05 %, como porcentaje del peso total del vehículo, preferentemente de aproximadamente un 0,05 a aproximadamente un 45 % en peso, y aún más preferentemente de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 30 % en peso. En el caso de grupos de ramificación cargados positivamente que tienen la fórmula -(gly)_{n1}- (arg)_{n2}, la cantidad más preferida es de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 25 %.

En otra realización, la parte de esqueleto es una polilisina y los grupos de ramificación cargados positivamente están unidos a los grupos amino de la cadena lateral de la lisina. La polilisina puede tener un peso molecular de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1.500.000, preferentemente de aproximadamente 25.000 a aproximadamente 1.200.000, aún más preferentemente de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 1.000.000. Puede ser cualquiera de las polilisinias disponibles en el mercado (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA), tales como, por ejemplo, polilisina que tiene PM > 70.000, polilisina que tiene PM de 70.000 a 150.000, polilisina que tiene PM de 150.000 a 300.000 y polilisina que tiene PM > 300.000. La selección de una polilisina apropiada dependerá de los demás componentes de la composición y será suficiente para proporcionar una carga positiva neta global a la composición y proporcionar una longitud que sea preferentemente de una a cuatro veces la longitud combinada de los componentes cargados negativamente. Los grupos de ramificación cargados positivamente o grupos de eficacia preferidos incluyen, por ejemplo, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg (Gly-₃Arg-₇) o VIH-TAT. En otra realización preferida, el esqueleto cargado positivamente es una polialquilenimina de cadena larga tal como una polietilenimina, por ejemplo, una que tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000.000.

Los esqueletos cargados positivamente o moléculas de vehículo que comprenden polipéptidos o polialquileniminas, que tienen los grupos de ramificación descritos anteriormente, son compuestos que forman un aspecto de esta

divulgación.

En una realización de la invención, sólo se necesita un vehículo cargado positivamente que tiene grupos de ramificación cargados positivamente como se define en las reivindicaciones para la liberación transdérmica de la toxina botulínica. En ciertas realizaciones, el vehículo cargado positivamente es un polipéptido (por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, homoarginina y similares) que tiene múltiples grupos de cadena lateral cargados positivamente, como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, el polipéptido tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 10.000. En otra realización, el vehículo cargado positivamente es un polímero no peptídico tal como una polialquiliminina que tiene múltiples grupos de cadena lateral cargados positivamente que tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 100.000. Dichas polialquilimininas incluyen polietileno y polipropilimininas. En cualquier caso, para uso como único agente necesario para la liberación transdérmica, la molécula de vehículo cargada positivamente incluye grupos de ramificación cargados positivamente o grupos de eficacia que comprenden $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, donde el subíndice $n1$ es un número entero de 0 a 20, más preferentemente de 0 a 8, y aún más preferentemente de 2 a 5, y el subíndice $n2$ es, independientemente, un número entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 17, y aún más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 13, VIH-TAT o fragmentos del mismo, o PTD de Antennapedia o un fragmento del mismo. Preferentemente, la cadena lateral o grupos de ramificación tienen la fórmula general $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ como se ha descrito anteriormente. Otras realizaciones preferidas son aquellas en las que los grupos de ramificación o eficacia son fragmentos de VIH-TAT que tienen la fórmula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-}(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-}(\text{gly})_q$ o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-}(\text{gly})_q$, donde los subíndices p y q son cada uno, independientemente, un número entero de 0 a 20 y el fragmento está unido a la molécula de vehículo a través del extremo C o el extremo N del fragmento. Los grupos de ramificación laterales pueden tener la forma D o L (configuración R o S) en el centro de unión. Son fragmentos de VIH-TAT preferidos aquellos en los que los subíndices p y q son cada uno, independientemente, números enteros de 0 a 8, más preferentemente de 2 a 5. Otras realizaciones preferidas son aquellas en las que los grupos de ramificación son grupos de PTD de Antennapedia o fragmentos de los mismos que conservan la actividad del grupo. Estos se conocen en la técnica, por ejemplo, en Console et al., J. Biol. Chem. 278: 35109 (2003). Preferentemente, el vehículo cargado positivamente incluye grupos de ramificación cargados positivamente de cadena lateral en una cantidad de al menos aproximadamente un 0,05 %, como un porcentaje del peso total del vehículo, preferentemente de aproximadamente un 0,05 a aproximadamente un 45 % en peso, y aún más preferentemente de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 30 % en peso. En el caso de grupos de ramificación cargados positivamente que tienen la fórmula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, la cantidad más preferida es de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 25 %.

En otra realización, el vehículo es una polilisina con grupos de ramificación cargados positivamente unidos a los grupos amino de la cadena lateral de la lisina. La polilisina usada en esta realización particular puede ser cualquiera de las polilisininas disponibles en el mercado (por ejemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA), tales como, por ejemplo, polilisina que tiene PM > 70.000, polilisina que tiene PM de 70.000 a 150.000, polilisina que tiene PM de 150.000 a 300.000 y polilisina que tiene PM > 300.000. Sin embargo, preferentemente, la polilisina tiene un PM de al menos aproximadamente 10.000. Los grupos de ramificación cargados positivamente o grupos de eficacia preferidos incluyen, por ejemplo, $-\text{gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg}$ (Gly_3Arg_7), VIH-TAT o fragmentos del mismo, y PTD de Antennapedia o fragmentos del mismo.

El vehículo divulgado es un esqueleto de polietiliminina (PEI) o polilisina relativamente corto (que puede ser lineal o ramificado) y que tiene grupos de ramificación cargados positivamente. Dichos vehículos son útiles para minimizar la agregación incontrolada de los esqueletos y la toxina botulínica en una composición terapéutica, que hace que la eficacia del transporte disminuya drásticamente. Cuando el vehículo es un esqueleto de PEI o polilisina lineal relativamente corto, el esqueleto tendrá un peso molecular menor de 75.000, más preferentemente menor de 30.000 y más preferentemente menor de 25.000. Cuando el vehículo es un esqueleto de PEI o polilisina ramificado relativamente corto, sin embargo, el esqueleto tendrá un peso molecular menor de 60.000, más preferentemente menor de 55.000, y aún más preferentemente menor de 50.000. Sin embargo, si en la composición se incluyen agentes de división como se describen en el presente documento, el peso molecular de los esqueletos de PEI y polilisina ramificados puede ser de hasta 75.000, mientras que el peso molecular de los esqueletos de PEI y polilisina lineales puede ser de hasta 150.000.

El término "toxina botulínica", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a cualquiera de los tipos conocidos de toxina botulínica, tanto si se produce por la bacteria como si se produce por técnicas recombinantes, así como a cualquier tipo que pueda descubrirse posteriormente incluyendo variantes obtenidas por ingeniería genética o proteínas de fusión. Como se ha mencionado anteriormente, en el momento actual, se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas inmunológicamente distintas, específicamente las neurotoxinas botulínicas de los serotipos de A, B, C, D, E, F y G, de los que cada uno se distingue por neutralización con anticuerpos con especificidad de tipo. Los serotipos de toxina botulínica están disponibles en Sigma-Aldrich y en Metabionics, Inc. (Madison, Wisconsin), así como en otras fuentes. Los diferentes serotipos de toxina botulínica varían en la especie de animal a la que afectan y en la gravedad y duración de la parálisis que inducen. En el mercado están disponibles al menos dos tipos de toxina botulínica, tipos A y B, en formulaciones para el tratamiento de ciertas afecciones. El tipo A, por ejemplo, está contenido en preparaciones de Allergan que tienen la marca comercial BÓTOX® y de Ipsen que tiene la marca comercial DYSPORT® y el tipo B está contenido en

preparaciones de Elan que tiene la marca comercial MYOBLOC®.

La toxina botulínica usada en esta invención, como alternativa, puede ser un derivado de toxina botulínica, es decir, un compuesto que tiene actividad de toxina botulínica pero contiene una o más alteraciones químicas o funcionales en cualquier parte o en cualquier cadena con respecto a las toxinas botulínicas nativas recombinantes o naturales.

5 Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser una neurotoxina modificada (por ejemplo, una neurotoxina que tiene al menos uno de sus aminoácidos delecionado, modificado o reemplazado, en comparación con una neurotoxina nativa o producida de forma recombinante o un derivado o fragmento de la misma). Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser una que se ha modificado de una forma que, por ejemplo, aumente sus propiedades o disminuya los efectos secundarios indeseables, pero que sigue conservando la actividad de toxina botulínica deseada. La toxina botulínica puede ser cualquiera de los complejos de toxina botulínica producidos por la bacteria, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, la toxina botulínica puede ser una toxina preparada usando técnicas químicas sintéticas o recombinantes (por ejemplo, un péptido recombinante, una proteína de fusión o una neurotoxina híbrida, preparada a partir de subunidades o dominios de diferentes serotipos de toxina botulínica (véase la Patente de Estados Unidos 6.444.209, por ejemplo)). La toxina botulínica también puede ser una parte de la molécula total que, según se ha demostrado, posee la actividad de toxina botulínica necesaria, y en tal caso puede usarse por se o como parte de una combinación o molécula conjugada, por ejemplo, una proteína de fusión. Además, la toxina botulínica puede estar en forma de un precursor de toxina botulínica, que puede ser no tóxico por sí mismo, por ejemplo, una proteasa de zinc no tóxica que se convierte en tóxica tras la escisión proteolítica.

20 Se divulga el uso general de combinaciones y mezclas de toxinas botulínicas, aunque debido a sus diferentes propiedades y naturaleza, las mezclas de serotipos de toxina botulínica generalmente no se administran en este momento ni en la industria sanitaria ni en la cosmética.

25 Las composiciones preferentemente están en forma de productos a aplicar a la piel o epitelio de sujetos o pacientes, es decir, seres humanos u otros mamíferos que necesitan el tratamiento particular. La expresión "que necesitan" pretende incluir necesidades tanto farmacéuticas o relacionadas con la salud, por ejemplo, el tratamiento de afecciones en las que están implicados espasmos indeseados de los músculos faciales, como necesidades cosméticas y subjetivas, por ejemplo, la alteración o mejora del aspecto del tejido facial. En general, las composiciones se preparan mezclando la toxina botulínica con el vehículo, y normalmente con uno o más vehículos o excipientes adicionales farmacéuticamente aceptables. En su forma más sencilla, pueden contener un vehículo o diluyente acuoso sencillo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada. Sin embargo, las composiciones pueden contener otros ingredientes típicos en composiciones cosméticas o farmacéuticas tópicas, incluyendo un vehículo, excipiente o medio dermatológica o farmacéuticamente aceptable (es decir, un vehículo, excipiente o medio que es compatible con los tejidos a los que se aplicará). La expresión "dermatológica o farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa que las composiciones o sus componentes descritos de esta manera son adecuados para uso en contacto con esos tejidos o para uso en pacientes en general sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica excesiva y similares. Cuando sea apropiado, las composiciones de la invención pueden comprender cualquier ingrediente usado convencionalmente en los campos en consideración, y particularmente en cosméticos y dermatología. Las composiciones también pueden incluir una cantidad de un anión pequeño, preferentemente un anión polivalente, por ejemplo, fosfato, aspartato o citrato.

45 En términos de su forma, las composiciones pueden incluir soluciones, emulsiones (incluyendo microemulsiones), suspensiones, cremas, lociones, geles, polvos u otras composiciones sólidas o líquidas típicas usadas para la aplicación en la piel y otros tejidos en los que pueden usarse las composiciones. Dichas composiciones pueden contener, además de la toxina botulínica y el vehículo, otros ingredientes usados típicamente en estos productos, tales como agentes antimicrobianos, hidratantes y agentes de hidratación, agentes de penetración, conservantes, emulsionantes, aceites naturales o sintéticos, disolventes, tensioactivos, detergentes, emolientes, antioxidantes, aromas, cargas, espesantes, ceras, absorbentes del olor, tintes, agentes colorantes, polvos y opcionalmente incluyendo anestésicos, aditivos contra el picor, extractos botánicos, agentes de acondicionamiento, agentes para oscurecer o aclarar la piel, agentes de brillo, humectantes, mica, minerales, polifenoles, siliconas o derivados de la misma, filtros solares, vitaminas y agentes fitomedicinales.

55 Las composiciones divulgadas incluyen agentes gelificantes y/o agentes modificadores de la viscosidad. Estos agentes generalmente se añaden para aumentar la viscosidad de la composición, para hacer que la aplicación de la composición sea más fácil y más precisa. Además, estos agentes ayudan a prevenir el secado de la solución acuosa de vehículo/toxina botulínica, que tiende a causar una reducción en la actividad de la toxina botulínica. Son agentes particularmente preferidos los que carecen de carga y no interfieren con la actividad de la toxina botulínica o la eficacia de los complejos de toxina-vehículo al atravesar la piel. Los agentes gelificantes pueden ser ciertos agentes gelificantes basados en celulosa, tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa (HPC). En algunas divulgaciones, el complejo de toxina botulínica/vehículo se formula en una composición que tiene un 2-4 % de HPC. Como alternativa, la viscosidad de una solución que contiene un complejo de toxina botulínica/vehículo puede alterarse añadiendo polietilenglicol (PEG). En otras divulgaciones, la solución de toxina botulínica/vehículo se combina con agentes viscosos premezclados, tal como el hidratante Cetaphil®.

65 La divulgación puede opcionalmente incluir agentes de división. Como se usa en el presente documento, un "agente

de división” es cualquier sustancia o aditivo que tiene la propiedad de prevenir o minimizar la agregación indeseada o incontrolada de la toxina botulínica con los vehículos de esta divulgación. Los agentes de división pueden ser útiles, por ejemplo, cuando tiene que emplearse una solución de toxina botulínica concentrada debido a limitaciones del volumen. En estos casos, el agente de división mantiene la toxina botulínica dispersada, con lo que se impide la agregación de la toxina que en caso contrario se produciría sin el agente de división. En general, un agente de división es (1) no irritante, (2) no destruye la toxina botulínica, (3) no confiere ningún aumento de permeabilidad, (4) produce tamaños de partículas fiables y estables, (5) carece de carga y (6) no interfiere con complejos de la toxina y el vehículo transdérmico. Un ejemplo de un agente de división adecuado es etanol (EtOH). En realizaciones preferidas, el EtOH constituye menos del 20% de la composición, y más preferentemente, menos del 5% de la composición.

A modo de ejemplo, si las limitaciones de volumen requieren reconstituir 100 U de toxina botulínica en 0,5 ml de solución, en lugar de 2,5 ml, típicamente se observa que la toxina botulínica presentará una agregación indeseable, y por lo tanto menor actividad. Sin embargo, al añadir EtOH al 1 % como agente de dispersión, se mantiene la actividad completa incluso después de 24 horas a esta concentración. Como otro ejemplo, el Bótox® a una reconstitución en 1,0 ml de NaCl al 0,9 % tiene actividad completa, mientras que la reconstitución a 0,5 ml en EtOH al 1 % y 5 % más NaCl al 0,9% produce soluciones con actividad completa.

Los puentes de oligo- o polianiones divulgados pueden añadirse a las composiciones de toxina botulínica para mejorar la formación de complejos de la toxina con el vehículo de esqueleto cargado positivamente. Como es bien conocido en este campo, la toxina botulínica realmente es un complejo de diferentes proteínas, de las que algunas están cargadas positivamente, y otras están cargadas negativamente. Debido a que la distribución exacta de los componentes de la toxina varía dependiendo de la fuente de la toxina, es posible que la toxina botulínica de ciertas fuentes tenga menor propensión a formar complejos con los esqueletos cargados positivamente descritos en el presente documento. Sin embargo, se divulga el descubrimiento de que mediante la adición de un puente de oligo o polianión a dichas toxinas botulínicas, aumenta espectacularmente la eficacia y la eficiencia de la administración tópica. Los ejemplos adecuados de dichos puentes de oligo/polianión incluyen fosfato sódico (5 %), PBS o poli-L-aspartato al 5 % (por ejemplo, con un PM de 3000).

Las composiciones de acuerdo con esta divulgación pueden estar en forma de composiciones de liberación controlada o de liberación sostenida, donde la toxina botulínica y el vehículo están encapsulados o contenidos de otra manera dentro de un material de tal forma que se liberan en la piel de una manera controlada a lo largo del tiempo. La toxina botulínica y el vehículo pueden estar contenidos dentro de matrices, liposomas, vesículas, microcápsulas, microesferas y similares, o dentro de un material sólido en forma de partículas, seleccionándose y/o construyéndose todas ellas para proporcionar la liberación de la toxina botulínica a lo largo del tiempo. La toxina botulínica y el vehículo pueden encapsularse conjuntamente (por ejemplo, en la misma cápsula) o por separado (en cápsulas separadas).

Usando las composiciones descritas en el presente documento, la toxina botulínica puede liberarse en músculos subyacentes a la piel, o en estructuras glandulares dentro de la piel, en una cantidad eficaz para producir parálisis, producir relajación, aliviar contracciones, prevenir o aliviar espasmos, reducir la producción glandular u otros efectos deseados. De esta manera, la liberación local de la toxina botulínica podría permitir reducciones de la dosificación, reducir la toxicidad y permitir una optimización de la dosificación más precisa para los efectos deseados con respecto a los materiales inyectables o implantables.

Las composiciones se aplican para administrar una cantidad eficaz de la toxina botulínica. La expresión “cantidad eficaz” como se usa en el presente documento, significa una cantidad de una toxina botulínica como se ha definido anteriormente que es suficiente para producir la parálisis muscular deseada u otro efecto biológico o estético, pero que implícitamente es una cantidad segura, es decir, una que es suficientemente baja como para evitar efectos secundarios graves. Los efectos deseados incluyen la relajación de ciertos músculos con la intención de, por ejemplo, reducir la aparición de líneas y/o arrugas finas, especialmente en la cara, o ajustar el aspecto facial de otras formas tal como aumentando los ojos, elevando las comisuras de la boca o suavizando líneas que se despliegan en abanico desde el labio superior, o el alivio general de la tensión muscular. El efecto mencionado en último lugar, el alivio general de la tensión muscular, puede realizarse en la cara o en otros sitios. Las composiciones pueden contener una cantidad eficaz apropiada de la toxina botulínica para aplicación como un tratamiento de una sola dosis, o pueden estar más concentradas, para diluirse en el sitio de administración o para usarse en múltiples aplicaciones. Mediante el uso de los vehículos cargados positivamente de esta invención, una toxina botulínica puede administrarse transdérmicamente a un sujeto para tratar afecciones tales como espasmos indeseables del músculo facial u otros espasmos musculares, hiperhidrosis, acné o afecciones en cualquier parte del cuerpo en el que se desee el alivio del dolor o de los espasmos musculares. La toxina botulínica se administra tópicamente para la liberación transdérmica en músculos o en otras estructuras asociadas con la piel. La administración puede realizarse, por ejemplo, en las piernas, hombros, espalda (incluyendo zona lumbar), axila, palmas, pies, cuello, ingle, dorso de las manos o pies, tobillos, parte superior del brazo, rodillas, parte superior de las piernas, nalgas, torso, pelvis o cualquier otra parte del cuerpo en la que se desee la administración de la toxina botulínica.

La administración de toxina botulínica también puede realizarse para tratar otras afecciones, incluyendo el

tratamiento del dolor neurológico, prevención o reducción de migrañas u otro dolor de cabeza, prevención o reducción del acné, prevención o reducción de la distonía o contracciones distónicas (subjetivas o clínicas), prevención o reducción de síntomas asociados con la hiperhidrosis subjetiva o clínica, la reducción de la hipersecreción o sudoración, la reducción o potenciación de la respuesta inmunitaria, o el tratamiento de otras afecciones para las que se ha sugerido o realizado la administración de toxina botulínica por inyección.

La administración de toxina botulínica u otras proteínas terapéuticas descritas en el presente documento también puede realizarse con fines relacionados con la inmunización. Sorprendentemente, la administración de toxina botulínica descrita en el presente documento puede realizarse para reducir respuestas inmunitarias. Más específicamente, esta invención permite liberar una toxina botulínica por una vía de administración alterada, cambiando de este modo la presentación del antígeno complejo del agente. De esta forma, la divulgación puede ser útil para reducir una respuesta inmunitaria contra antígenos de la toxina botulínica, y para facilitar la administración repetida sin una reducción de actividad relacionada con el sistema inmunitario. Como alternativa, el complejo puede prepararse y aplicarse tópicamente para aumentar una respuesta inmunitaria, por ejemplo para proporcionar inmunizaciones con respecto a diversas proteínas, por ejemplo, para inmunizaciones de niños sin inyecciones. Para uso en relación con la actividad relacionada con el sistema inmunitario, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de la toxina botulínica suficiente para permitir que un sujeto cree una respuesta inmunitaria a la toxina botulínica después de la aplicación o de una serie de aplicaciones de la misma.

Más preferentemente, las composiciones se administran por o bajo la dirección de un médico u otro profesional sanitario. Pueden administrarse en un único tratamiento o en una serie de tratamientos periódicos a lo largo del tiempo. Para la liberación transdérmica de la toxina botulínica para los fines mencionados anteriormente, una composición como se ha descrito anteriormente se aplica tópicamente en la piel en una localización o localizaciones en las que se desea el efecto. En realizaciones donde se aplica directamente en la piel una solución acuosa de vehículo/toxina botulínica, es preferible cubrir el área tratada (por ejemplo, con hidratante Cetaphil®) para ocluir el área tratada con una barrera (por ejemplo, Telfa) para impedir que se seque la solución, lo cual conduciría a una reducción de la actividad de la toxina. Debido a su naturaleza, más preferentemente, la cantidad de toxina botulínica aplicada debe aplicarse con cuidado, a una proporción y frecuencia de aplicación que produzca el resultado deseado sin producir ningún resultado adverso o indeseado. Por consiguiente, por ejemplo, las composiciones tópicas de la invención deben aplicarse en una proporción de aproximadamente 1 U a aproximadamente 20.000 U, preferentemente de aproximadamente 1 U a aproximadamente 10.000 U de toxina botulínica por cm² de superficie de la piel. Preferentemente podrían emplearse, por ejemplo, dosificaciones superiores dentro de estos intervalos junto con materiales de liberación controlada o permitir un tiempo de permanencia más corto en la piel antes de la eliminación.

La preparación apropiada de la superficie de la piel antes de la aplicación de la composición de toxina botulínica /vehículo es importante para mantener la eficacia de la solución. Por ejemplo, la introducción de tensioactivos en la superficie de la piel con el fin de eliminar los aceites de la superficie presentes en la piel antes de la aplicación, sorprendentemente, es contraproducente, porque los tensioactivos parecen destruir la actividad de la toxina botulínica. Esto tiene lugar incluso si la piel se lava posteriormente con agua varias veces antes de la aplicación de la solución de toxina botulínica/vehículo. Incluso tensioactivos extremadamente suaves, tales como los que se encuentran en las toallitas para los bebés, parecen producir este fenómeno. Por consiguiente, en métodos preferidos de administración de las composiciones de esta invención, la piel se limpia previamente usando únicamente agua. El lavado únicamente con agua también parece mejorar moderadamente el transporte transdérmico de la toxina botulínica.

Además, la piel puede exfoliarse para reducir la capa de estrato córneo antes de la aplicación del complejo de toxina botulínica/vehículo. En principio, el proceso de exfoliación de la piel debe mejorar la eficacia del transporte transdérmico de toxina botulínica. Sin embargo, el método usado para exfoliar la piel es importante. Por ejemplo, la reducción de la capa córnea mediada por acetona en seres humanos o animales parece reducir la actividad de la toxina botulínica aplicada posteriormente. Por el contrario, la exfoliación con cinta adhesiva (es decir, la aplicación de una cinta adhesiva en la superficie de la piel y después retirada de la cinta) parece permitir una penetración más profunda de la toxina botulínica y la reducción de la dosificación tanto en modelos de ratón como en seres humanos. Se supone que la abrasión de la superficie de la piel (por ejemplo, mediante el uso de almohadillas abrasivas) causaría un efecto similar la exfoliación con cinta adhesiva.

Esta divulgación también comprende dispositivos para la transmisión transdérmica de una composición que contiene toxina botulínica y un vehículo que tiene un esqueleto cargado positivamente con grupos de ramificación unidos como se define en el presente documento. Dichos dispositivos pueden ser de construcción sencilla tal como un parche cutáneo, o pueden ser dispositivos más complicados que incluyen medios para distribuir y controlar la distribución de la composición, y opcionalmente medios para controlar el estado del sujeto (por ejemplo, controlar la reacción del sujeto a las sustancias que se están distribuyendo).

Debe indicarse que la elección de materiales para la construcción del dispositivo es importante. Son materiales preferidos para la construcción de dispositivos de liberación los que no conducen a una pérdida de actividad de la solución de toxina botulínica/vehículo mediante degradación o adsorción indeseada de la toxina botulínica en una

superficie del dispositivo. Se ha observado dicho comportamiento indeseado, por ejemplo, cuando la toxina botulínica/vehículo en una solución acuosa entra en contacto con superficies de polipropileno, pero no cuando la solución de toxina botulínica/vehículo entra en contacto con superficies de cloruro de polivinilo (PVC).

- 5 En general, las composiciones pueden preformularse y/o preinstalarse en un dispositivo o pueden prepararse posteriormente, por ejemplo, usando un kit que alberga los dos ingredientes (toxina botulínica y vehículo) por separado pero proporciona medios para combinarlos en o antes del momento de aplicación. La cantidad de molécula de vehículo o la relación entre la misma y la toxina botulínica dependerá del vehículo que se elija para uso en la composición en cuestión. La cantidad o relación apropiada de molécula de vehículo en un caso dado puede determinarse fácilmente, por ejemplo, realizando uno o más experimentos, tales como los descritos más adelante.

15 En general, la administración de una toxina botulínica a un sujeto o paciente que lo necesita, incluye administrar tópicamente una cantidad eficaz de la toxina botulínica junto con un vehículo que tiene un esqueleto cargado positivamente con grupos de ramificación cargados positivamente unidos, como se describe en el presente documento. Por "junto con" se entiende que los dos componentes (toxina botulínica y vehículo) se administran en un procedimiento de combinación, que puede implicar su combinación en una composición que posteriormente se administra al sujeto, o la administración por separado, pero de tal manera que actúan conjuntamente para proporcionar la liberación requerida de una cantidad eficaz de la proteína terapéutica. Por ejemplo, primero puede aplicarse en la piel del sujeto, una composición que contiene el vehículo seguido de la aplicación de un parche cutáneo u otro dispositivo que contiene la toxina botulínica. La toxina botulínica puede incorporarse en forma seca en un parche cutáneo u otro dispositivo de distribución, mientras que el vehículo cargado positivamente puede aplicarse en la superficie de la piel antes de la aplicación del parche de forma que los dos agentes actúen conjuntamente, dando como resultado la liberación transdérmica deseada. De esta manera, las dos sustancias (vehículo y toxina botulínica) actúan en combinación o quizás interaccionan para formar una composición o combinación *in situ*. Por consiguiente, la divulgación también comprende un kit que incluye tanto un dispositivo para distribuir toxina botulínica a través de la piel como un líquido, gel, crema o similar que contiene el vehículo o esqueleto y que es adecuado para la aplicación en la piel o epitelio de un sujeto. Los kits para administrar las composiciones de la invención, o bien bajo la dirección de un profesional sanitario o bien por el paciente o sujeto, también pueden incluir un aplicador habitual adecuado para este fin.

20 Las composiciones para su uso y métodos de esta invención, y kits de esta divulgación permiten la liberación de una toxina botulínica más pura con mayor actividad específica y farmacocinética potencialmente mejorada. Además, el vehículo puede actuar como estabilizador, reduciendo la necesidad de proteínas auxiliares extrañas (por ejemplo, seroalbúmina humana que varía de 400 a 600 mg o seroalbúmina recombinante que varía de 250 a 500 mg) y/o estabilizadores polisacáridos, y puede producir reducciones beneficiosas en las respuestas inmunitarias contra la toxina botulínica. Además, las composiciones son adecuadas para su uso en medios fisiológicos con valores de pH que varían de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,3, y por lo tanto pueden tener dicho pH. Las composiciones pueden almacenarse a temperatura ambiente o en condiciones refrigeradas.

40 A continuación se proporcionan ejemplos representativos de la invención. Éstos demuestran la liberación de complejos funcionales de neurotoxina botulínica a través de la piel sin necesitar la modificación covalente de la neurotoxina a liberar.

45 Ejemplos

Ejemplo 1.

Transporte de una toxina botulínica *in vivo* usando un vehículo peptídico.

50 Este experimento demuestra el uso de un vehículo peptídico para transportar un complejo grande que contiene una toxina botulínica proteica marcada intacta a través de la piel intacta después de una sola administración con respecto a los controles.

Elección del esqueleto:

55 El esqueleto cargado positivamente se ensambló conjugando -Gly₃Arg₇ con poliisina (PM 112.000) a través del carboxilo de la glicina terminal con aminas libres de las cadenas laterales de lisina a un grado de saturación del 18 % (es decir, 18 de cada 100 restos de lisina se conjugan con un -Gly₃Arg₇). El esqueleto modificado se denominó "KNR". El policatión de control era poliisina no modificada (denominada "K", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote.

Agente terapéutico:

65 Para este experimento se seleccionó la marca Bótox® de toxina botulínica A (Allergan). Tiene un peso molecular de aproximadamente 150.000.

Reparación de muestras

5 La toxina botulínica se reconstituyó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una alícuota de la proteína se biotiniló con un exceso molar calculado de 12 veces de sulfo-NHS-LC biotina (Pierce Chemical). El producto marcado se denominó "Btox-b".

10 En todos los casos, se empleó un exceso de polimerización para crear un complejo final que tiene un exceso de carga positiva como en la liberación de complejos nucleotídicos grandes altamente negativos. Una carga neta neutra o positiva impide la repulsión del complejo proteico de los proteoglicanos de la superficie celular altamente negativos y la matriz extracelular. La dosis de Btox-b se estandarizó entre todos los grupos, así como el volumen total y el pH final de la composición a aplicar tópicamente. Las muestras se prepararon como se indica a continuación:

15 Grupo etiquetado como "JMW-7": 2,0 unidades de Btox-b por alícuota (es decir, 20 U en total) y vehículo peptidílico KNR a una relación de PM calculada de 4:1 se mezclaron hasta la homogeneidad y se diluyeron hasta 200 microlitros con solución salina tamponada con fosfato. La composición resultante se mezcló hasta la homogeneidad con 1,8 ml de loción Cetaphil® y se dividió en alícuotas de 200 microlitros.

20 Grupo etiquetado como "JMW-8": se mezclaron 2,0 unidades de Btox-b por alícuota (es decir, 20 U en total) y K a una relación de PM de 4:1 hasta la homogeneidad y se diluyeron hasta 200 microlitros con solución salina tamponada con fosfato. La composición resultante se mezcló hasta la homogeneidad con 1,8 ml de Cetaphil y se dividió en alícuotas de 200 microlitros.

Experimentos en animales para determinar las eficacias de liberación transdérmica después de un único tratamiento con vehículos peptidílicos y Btox marcado:

25 Los animales se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después de anestesiarse, 6 ratones C57 negros (n=4 por grupo) se sometieron a la aplicación tópica de una dosis medida de 200 microlitros del tratamiento apropiado aplicado en la parte craneal de la piel dorsal del lomo (seleccionada porque el ratón no puede alcanzar esta región con la boca o las patas). Los animales no se sometieron a depilación. 30 minutos después del tratamiento inicial, los ratones se sacrificaron por inhalación de CO₂ y se recogieron segmentos cutáneos tratados de espesor completo por observadores con un diseño enmascarado. Los segmentos tratados se dividieron en tres partes iguales; la parte craneal se fijó en formalina tamponada neutra al 10 % durante 12-16 horas y después se almacenaron en etanol al 70 % hasta que se incluyeron en parafina. La parte central se congeló inmediatamente y se empleó directamente para la visualización por biotina por observadores con un diseño enmascarado como se resume más adelante. El segmento caudal tratado se congeló inmediatamente para los estudios de solubilización.

40 La visualización con biotina se realizó como se indica a continuación. En resumen, cada sección se sumergió durante 1 hora en solución tampón NeutrAvidin®. Para visualizar la actividad de la fosfatasa alcalina, se lavaron secciones transversales en solución salina cuatro veces y después se sumergieron en NBT/BCIP (Pierce Scientific) durante 1 hora. Las secciones después se aclararon en solución salina y se fotografiaron en su totalidad en un microscopio Nikon E600 con lentes Plan-Apochromat.

Manejo de los datos y análisis estadístico:

45 La tinción positiva total se determinó por un observador con un diseño enmascarado a través del análisis de imágenes de los lotes usando el software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) y se normalizó con respecto al área de sección transversal total para determinar el porcentaje de tinción positiva para cada uno. Posteriormente se determinaron la media y el error típico para cada grupo con un análisis de significado con un intervalo de confianza del 95 % en medidas repetidas de ANOVA de una vía usando el software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados:

55 Se presentó el área de sección transversal media que era positiva para la toxina botulínica biotinilada como porcentaje del área total después de una única administración tópica de Btox-b con KNR ("EB-Btox") o K ("n1"). Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 1 y se ilustran en la Figura 1. En la Figura 1, el área positiva para el marcador se determinó como el porcentaje de área total después de tres días del único tratamiento diario con "EB-Btox" que contenía Btox-b y el vehículo peptidílico KNR y "n1", que contenía Btox-b con polimerización K como control. Para cada grupo se representan la media y el error típico.

60

Tabla 1. Media y error típico para área de toxina botulínica marcada como porcentaje de la sección transversal total después de una única administración tópica de Btox-b con KNR (JMW-7) o K (JMW-8) durante 30 minutos.

Grupo	Media	Error típico
JMW-7	33	5,333334
JMW-8	8,666667	0,333334
<i>P = 0,0001 (significativo al 99 %)</i>		

5 Ejemplo 2.

Eficacia terapéutica de una preparación tópica de toxina botulínica con un vehículo peptidílico.

El Ejemplo 1 demostró que el vehículo transdérmico peptidílico permitía una transferencia eficaz de toxina botulínica después de la administración tópica en un modelo murino de piel intacta. Sin embargo, este experimento no indicaba si la toxina botulínica proteica compleja se liberaba de una forma funcional después de la translocación a través de la piel. Por lo tanto se construyó el siguiente experimento para evaluar si la toxina botulínica puede liberarse terapéuticamente a través de la piel intacta como un agente tópico usando este vehículo peptidílico (de nuevo sin modificación covalente de la proteína).

El esqueleto cargado positivamente se ensambló de nuevo conjugando $-Gly_3Arg_7$ con polilisina (PM 112.000) a través del carboxilo de la glicina terminal con aminos libres de las cadenas laterales de lisina a un grado de saturación del 18 % (es decir, 18 de cada 100 restos de lisina se conjugan con una $-Gly_3Arg_7$). El esqueleto modificado se denominó "KNR". El policatión de control era polilisina no modificada (denominada "K", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote. Se usó el mismo agente terapéutico de toxina botulínica que en el Ejemplo 1 y se preparó de la misma manera. Las muestras se prepararon como se indica a continuación:

Grupo etiquetado como "JMW-9": se mezclaron 2,0 unidades de toxina botulínica por alícuota (es decir, 60 U en total) y vehículo peptidílico KNR a una relación de PM calculada de 4:1 se mezclaron hasta la homogeneidad y se diluyeron hasta 600 microlitros con solución salina tamponada con fosfato. La composición resultante se mezcló hasta la homogeneidad con 5,4 ml de Cetaphil y se dividió en alícuotas de 200 microlitros.

Grupo etiquetado como "JMW-10": se mezclaron 2,0 unidades de toxina botulínica por alícuota (es decir, 60 U en total) y K a una relación de PM de 4:1 se mezclaron hasta la homogeneidad y se diluyeron hasta 600 microlitros con solución salina tamponada con fosfato. La composición resultante se mezcló hasta la homogeneidad con 5,4 ml de Cetaphil y se dividió en alícuotas de 200 microlitros.

Grupo etiquetado como "JMW-11": se diluyeron 2,0 unidades de toxina botulínica por alícuota (es decir, 60 U en total) sin policatión hasta 600 microlitros con solución salina tamponada con fosfato. La composición resultante se mezcló hasta la homogeneidad con 5,4 ml de Cetaphil y se dividió en alícuotas de 200 microlitros.

Experimento en animales para determinar la eficacia terapéutica después de un único tratamiento con vehículos peptídicos y toxina botulínica:

Los animales se anestesiaron por inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después de anestesiarse, 6 ratones C57 negros (n = 4 por grupo) se sometieron a la aplicación tópica de una dosis medida de 400 microlitros del tratamiento apropiado aplicado uniformemente desde los pies hasta la mitad del muslo. Se trataron las dos patas y los tratamientos se distribuyeron aleatoriamente en ambos lados. Los animales no se sometieron a depilación. 30 minutos después del tratamiento inicial, los ratones se evaluaron con respecto a la capacidad de abducción digital de acuerdo con las puntuaciones de abducción digitales publicadas para la movilidad de los pies después de la administración de toxina botulínica [Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. *Toxicon*. 2001 Dec; 39(12): 1815-20]. La movilidad de los ratones también se evaluó subjetivamente.

Manejo de los datos y análisis estadístico:

Las puntuaciones de abducción digital se presentaron en una tabla independiente por dos observadores con un diseño enmascarado. Posteriormente se determinaron la media y el error típico para cada grupo con un análisis de significado a una confianza del 95 % en medias repetidas de ANOVA de una vía usando el software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados:

Las puntuaciones medias de abducción digital después de la administración tópica una sola vez de toxina botulínica con KNR ("JMW-9"), K ("JMW-10") o diluyente sin policatión ("JMW-11") se presentan en la Tabla 2 y se ilustran en la fotomicrografía representativa de la Figura 2 mostrada más adelante. El vehículo peptidílico KNR produjo la

liberación funcional estadísticamente significativa de la toxina botulínica a través de la piel con respecto a los dos controles, que fueron comparables entre sí. Otras repeticiones independientes adicionales (un total de tres experimentos independientes, todos con conclusiones idénticas en parálisis estadísticamente significativa por toxina botulínica tópica con KNR pero sin controles) del presente experimento confirmaron los presentes hallazgos y no revelaron diferencias significativas entre la toxina botulínica tópica con o sin K (es decir, los dos controles). Es interesante destacar que los ratones ambulaban constantemente hacia un miembro paralizado (lo cual ocurrió en el 100 % de los animales tratados y en el 0 % de los controles de cualquier grupo de control). Como se muestra en la Figura 2, un miembro tratado con toxina botulínica más el polícatión de control polilisina o con toxina botulínica sin polícatión ("Botox solo") puede movilizar los dedos (como un mecanismo de defensa cuando se agarra), pero los miembros tratados con toxina botulínica más el vehículo peptidílico KNR ("Loción Essentia Botox") no podían moverse.

Tabla 2: Puntuaciones de abducción digital 30 minutos después de una única aplicación tópica de toxina botulínica con el vehículo peptidílico KNR ("JMW-9"), con un polícatión de control K ("JMW-10"), o sola ("JMW-11").

Grupo	Media	Error típico
JMW-9	3,333	0,333
JMW-10	0,333	0,333
JMW-11	0,793	0,300
<i>P = 0,0351 (significativo a 95 %)</i>		

Conclusiones:

Este experimento sirve para demostrar que el vehículo transdérmico peptidílico puede transportar una cantidad terapéuticamente eficaz de botulinum terapéutico a través de la piel sin la modificación covalente del agente terapéutico. El experimento también confirma que la toxina botulínica no funciona cuando se aplica tópicamente en los controles.

Ejemplo 3.

Eficacia terapéutica de una preparación tópica de toxina botulínica con un vehículo no peptidílico.

Este experimento demuestra el comportamiento de un vehículo no peptidílico en la invención.

Métodos:

Selección del esqueleto:

El esqueleto cargado positivamente se ensambló conjugando -Gly₃Arg₇ con polietilenimina (PEI) PM 1.000.000 a través del carboxilo de la glicina terminal con aminas libres de las cadenas laterales de PEI a un grado de saturación del 30 % (es decir, 30 de cada 100 restos de lisina se conjugan con un -Gly₃Arg₇). El esqueleto modificado se denominó "PEIR" para indicar el vehículo no peptidílico grande. El polícatión de control era PEI no modificado (denominado "PEI", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote. Se usó el mismo agente terapéutico de toxina botulínica en el Ejemplo 1.

La toxina botulínica se reconstituyó a partir del producto Botox de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los casos se empleó un exceso de polícatión para ensamblar un complejo final que tiene un exceso de carga positiva como en la liberación de complejos nucleotídicos grandes altamente negativos. Una carga neta neutra o positiva impide la repulsión del complejo de los proteoglicanos de la superficie celular altamente negativos y la matriz extracelular. La dosis de toxina botulínica se estandarizó entre todos los grupos así como el volumen total y el pH final de la composición a aplicar tópicamente. Las muestras se prepararon como se indica a continuación:

Grupo etiquetado como "AZ": se mezclaron 2,0 unidades de toxina botulínica por alícuota (es decir, 60 U en total) y el vehículo no peptidílico PEIR en forma ultrapura a una relación de PM calculada de 5:1, se mezclaron hasta la homogeneidad y se diluyeron hasta 600 microlitros con solución salina tamponada con fosfato. La composición resultante se mezcló hasta la homogeneidad con 5,4 ml de Cetaphil y se dividió en alícuotas de 200 microlitros.

Grupo etiquetado como "BA": se mezclaron 2,0 unidades de toxina botulínica por alícuota (es decir, 60 U en total) y PEI a una relación de carga de 5:1, se mezclaron hasta la homogeneidad y se diluyeron hasta 600 microlitros con solución salina tamponada con fosfato. La composición resultante se mezcló hasta la homogeneidad con 5,4 ml de Cetaphil y se dividió en alícuotas de 200 microlitros.

Experimento en animales para determinar la eficacia terapéutica después de un único tratamiento:

Los animales se anestesiaron por inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después de anestesiarse, 6 ratones C57 negros (n = 3 por grupo) se sometieron a la aplicación tópica de una dosis medida de

400 microlitros del tratamiento apropiado aplicado uniformemente desde los pies hasta la mitad del muslo. Se trataron las dos patas y los tratamientos se distribuyeron aleatoriamente en ambos lados. Los animales no se sometieron a depilación. 30 minutos después del tratamiento inicial, los ratones se evaluaron con respecto a la capacidad de abducción digital de acuerdo con las puntuaciones publicadas de abducción digital para la movilidad de los pies después de la administración de toxina botulínica [Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. *Toxicon*. 2001 Dec; 39(12): 1815-20]. La movilidad de los ratones también se evaluó subjetivamente.

Manejo de datos y análisis estadístico:

Las puntuaciones de abducción digital se presentaron en una tabla independiente por dos observadores con un diseño enmascarado. Posteriormente se determinaron la media y el error típico para cada grupo con un análisis de significado a una confianza del 95 % en medidas repetidas de ANOVA de una vía usando el software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados:

Las puntuaciones medias de abducción digital después de una única administración tópica de toxina botulínica con PEIR ultrapuro ("AZ") o policación PEI de control ("BA") se presentan en la Tabla 3 y la repetición se presenta como Tabla 4 (repetición individual independiente para este experimento). El vehículo PEIR no peptidílico produjo una liberación funcional estadísticamente significativa de toxina botulínica a través de la piel con respecto a los controles. Como se ha indicado anteriormente, se observó que los animales caminaban en círculos hacia los miembros paralizados.

Tabla 3. Puntuaciones de abducción digital 30 minutos después de una única administración tópica de Botox con PEIR ultrapuro ("AZ") o policación PEI de control ("BA"). Se presentan la media y el error típico.

Grupo	Media	Error típico
BA	0,833	0,307
AZ	3,917	0,083
<i>P = 0,0002 (significativo al 99 %)</i>		

Tabla 4. Puntuaciones de abducción digital 30 minutos después de la administración tópica una sola vez de Botox con PEIR ultrapuro ("AZ1") o policación PEI de control ("BA1"). Se presentan la media y el error típico.

Grupo	Media	Error típico
BA1	0,333	0,211
AZ1	3,833	0,167
<i>P = 0,0001 (significativo al 99 %)</i>		

Conclusiones:

Este experimento demostró que el vehículo transdérmico no peptidílico puede transportar dosis terapéuticas de toxina botulínica a través de la piel sin la modificación covalente previa de la toxina botulínica. Estos hallazgos complementan los obtenidos con agentes de transferencia peptidílicos. La opción de usar un vehículo no peptidílico o un vehículo peptidílico para conseguir el efecto terapéutico permitirá la adaptación a circunstancias, entornos y métodos de aplicación específicos y aumentar la amplitud de la plataforma de liberación transdérmica de esta invención.

Ejemplo 4.

Eficacia terapéutica de una preparación tópica de toxina botulínica con un vehículo peptidílico para la hiperhidrosis y arrugas de la frente.

Este experimento demuestra que la toxina botulínica puede liberarse terapéuticamente a través de la piel intacta como un agente tópico usando este vehículo peptidílico para el tratamiento de la hiperhidrosis y arrugas de la frente en sujetos humanos.

Procedimiento Experimental para el estudio de hiperhidrosis y arrugas en la frente:

Se tomaron fotografías iniciales y después del tratamiento de la frente de los sujetos en un fondo azul usando una cámara Nikon D70 con un flash Nikon TTL Macro-speed-light SB29s (Nikon, Inc. Estados Unidos).

Se tomaron vídeos iniciales y después del tratamiento de la frente del sujeto en un fondo azul usando una videocámara Sony Digital Handycam.

Se realizó el ensayo de almidón/yodo de Minor para visualizar la producción de sudor usando solución tópica de povidona yodo al 10% (Walgreen Co., Deerfield, Illinois) y almidón de maíz al 100 % de Kingsford (ACH Food

Companies, Inc., Memphis, Tennessee). La frente del sujeto se pintó con una solución de yodo usando bolas de algodón estéril (Johnson & Johnson Consumer Product Company, Skillman, Nueva Jersey) y después se dejó secar completamente. El área se espolvoreó ligeramente con almidón en polvo usando bolas de algodón estériles. El sudor se indujo con actividad física a temperatura ambiente. Aparecieron manchas azul oscuro-negras según el sudor disolvía el yodo y reaccionaba con el polvo de almidón. Se tomaron fotografías iniciales y después del tratamiento del ensayo de yodo-almidón en un fondo azul usando una cámara Nikon D70 con un flash Nikon TTL Macro-speedlight SB29s. La frente del sujeto se limpió con EtOH al 70 % y después con agua desionizada.

El área de tratamiento predefinida del sujeto en la frente se preparó por un método de exfoliación con cinta adhesiva no invasiva para el estrato córneo antes de la aplicación del tratamiento. Se aplicó una cinta precortada en el área del tratamiento con una presión firme durante algunos segundos. Se retiró rápidamente tirando desde una esquina de la cinta. La segunda cinta se aplicó cuidadosamente en la misma área inmediatamente después de retirar la primera cinta. La exfoliación con cinta se repitió 3-5 veces.

15 Preparación de tratamiento:

Se preparó la solución de reconstitución de Botox de cloruro sódico estéril al 0,9 % (Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) más EtOH al 5 % más solución de poliaspartato de cadena corta al 5 % etiquetada como A-3C (Donlar BioPolymer, Inc., Bedford Park, Illinois) (es decir, para cada 1,0 mililitros de solución, 900 microlitros de cloruro sódico estéril al 0,9 % más 50 microlitros de EtOH al 100 % más 50 microlitros de solución de poliaspartato de cadena corta). Kn21T se preparó a una concentración de 1 miligramo/mililitro con cloruro sódico al 0,9 %, más EtOH al 5 % (es decir, se dividieron en alícuotas 500 microlitros de Kn21T y se añadieron 25 microlitros de EtOH al 100%). Como se usa en el presente documento, Kn21T se refiere a un esqueleto de polilisina cargado positivamente que tiene un peso molecular de 21.000 y grupos de ramificación TAT. Se reconstituyeron 100 unidades de Botox (Allergan, Irvine, CA) con 1,0 ml de solución de reconstitución usando una jeringa estéril sin látex de 3 ml con 18G_{1/2} (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, Nueva Jersey). El Botox reconstituido se mezcló cuidadosamente por inversión 8 veces. Se usaron 200 unidades de Botox para cada sujeto. La "solución Essentia Botox" se preparó con 200 unidades de Botox y Kn21T más EtOH al 5 % (es decir, se añadieron 2,0 mililitros de Botox a 500 microlitros de Kn21T más 25 microlitros de EtOH al 100 %) y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos para que se formaran los complejos.

La solución de control se preparó con solución de reconstitución y Kn21T más EtOH al 5 % (es decir, se añadieron 2,0 ml de solución de reconstitución a 500 microlitros de Kn21T más 25 microlitros de EtOH al 100 %) y se mantuvo a temperatura ambiente.

35 Aplicación de tratamiento:

El sujeto se reclinó en una mesa con una cubierta protectora alrededor de los ojos, la cara y la parte superior del cuerpo. El tratamiento se aplicó uniformemente en la frente del sujeto usando una pipeta y se masajeó en la piel con movimientos circulares con los dedos mientras se llevaba puestos guantes de nitrilo sin polvo. El área de tratamiento se cubrió con una capa fina de crema hidratante Cetaphil® (Galderma, Fort Worth, TX) y se incubó durante 60 minutos. Después de la incubación durante 60 minutos, se retiró el tratamiento con gasas estériles. Las gasas y los guantes se desecharon en una bolsa de contaminantes biológicos.

45 Resultados:

La Figura 3 representa una reducción significativa en la profundidad, longitud y anchura de las arrugas después del tratamiento tópico con una combinación de toxina botulínica y vehículo peptídico. Este experimento confirma que la toxina botulínica aplicada tópicamente, cuando se combina con un vehículo transdérmico, puede producir una parálisis muscular significativa para producir un efecto cosmético. La Figura 4 es un molde de Mikrosil de la piel tratada (A) frente a la piel no tratada (B). En el molde de la piel no tratada son visibles las arrugas.

Las Figuras 5 y 6 muestran los resultados del ensayo de almidón/yodo de Minor. La Figura 5 muestra fotos tomadas dos minutos después de la aplicación, correspondiendo el panel (A) al lado tratado con Loción Essentia Botox, y correspondiendo el panel (B) al lado tratado con una loción de control que contiene solo vehículo Kn21T. La Figura 6 es igual que la Figura 5, con la excepción de que se tomó a los cuatro minutos. Obsérvese la coloración más pronunciada en el lado de la loción de control, que indica que la piel en ese lado está secretando más sudor. Obsérvese también que la sudoración empieza antes en el lado no tratado.

60 Conclusiones:

Este ejemplo demuestra que los complejos aplicados tópicamente de toxina botulínica pueden producir un efecto estético beneficioso en la reducción de las arrugas finas y gruesas. El efecto transeptelial confirma además que la parálisis muscular puede conseguirse con vehículos apropiados después de la aplicación tópica de complejos de toxina botulínica tales como los desvelados en el presente documento. En este ejemplo, por lo tanto, indica que la aplicación tópica de toxina botulínica puede conducir al alivio de espasmos musculares tales como blefaroespasma

o tortícolis así como al alivio del dolor relacionado con espasmos musculares tales como el dolor lumbar.

Ejemplo 5

5 Eficacia terapéutica de una preparación de toxina botulínica tópica con vehículo peptídico para la hiperhidrosis axilar.

10 Este experimento demuestra si la toxina botulínica puede liberarse terapéuticamente a través de la piel intacta como un agente tópico usando este vehículo peptídico para el tratamiento de la hiperhidrosis axilar en sujetos humanos (n = 10 axilas por grupo, con una axila tratada y un control por paciente con un diseño de doble enmascaramiento aleatorio).

Criterios de inclusión para el estudio de hiperhidrosis axilar:

- 15
- Edad: 18 años o más
 - Voluntarios sanos
 - Consentimiento informado proporcionado y firmado por el voluntario
 - Intención del sujeto de seguir las instrucciones y volver para las visitas de seguimiento
 - El sujeto tiene hiperhidrosis subjetiva preexistente
- 20
- El sujeto es una mujer no embarazada o que no planea quedarse embarazada en los 3 meses siguientes
 - El sujeto vive y/o trabaja en San Francisco o cerca del área de estudio
 - El sujeto no se ha sometido a un tratamiento para la sudoración axilar en los últimos 6 meses
 - El sujeto no planea someterse a un tratamiento para la sudoración axilar en los 3 meses siguientes

Procedimientos de medición gravimétrica:

Como parte del procedimiento de medición gravimétrica, los sujetos primero se aclimataron al área de ensayo. Específicamente, cada sujeto permaneció durante 15 minutos a una temperatura ambiente de 22,22 - 25 °C en la posición de reposo.

30 **Preparación Axilar:** (Para los siguientes procedimientos se utilizaron guantes de nitrilo sin polvo). El sujeto se puso una capa desechable y un sujetador (si era una mujer) o se quitó todas las prensas corporales superiores (si era un hombre) para exponer las dos axilas completamente. Se predeterminó que el área de dosificación era el área cubierta por piel que tenía vello, más un área que se extendía un 1 cm más allá de la piel con vello en cada axila. El área de dosificación se limpió con una gasa estéril prehumedecida procedente de un tubo cónico de 50 ml limpiando con 5 pases largos desde la parte superior a la parte inferior en la misma dirección usando un lado de la gasa. Esta etapa se repitió tres veces más con una gasa prehumedecida limpia cada vez mientras se tenía cuidado de no irritar o erosionar la piel. Las gasas se tiraron a la basura. Se repitió el mismo procedimiento de lavado para la otra axila. La axila se secó con gasa estéril seca usando un movimiento firme desde la parte superior a la inferior de la axila mientras se tenía cuidado de no irritar o erosionar la piel. Después, la axila se secó adicionalmente poniendo un papel de filtro bajo el pliegue axilar y dejando que el filtro permaneciera en el sitio de ensayo durante 5 minutos después del procedimiento para la evaluación gravimétrica. El paciente permaneció con sus brazos contra su cuerpo en una posición de reposo. Los papeles de filtro se tiraron a la basura. Se dejó que el sujeto permaneciera en reposo durante 1 minuto sin manipulación de la axila antes de la primera evaluación gravimétrica.

45 **Medición de la producción del sudor (medición gravimétrica):** (Antes de estas mediciones la persona encargada se puso un nuevo par de guantes de nitrilo sin polvo). El sujeto mantuvo sus manos juntas en la parte posterior de la cabeza para exponer las axilas completamente, mientras estaba parcialmente reclinado (aproximadamente 45 grados). Se retiró un papel de filtro pesado previamente de un tubo cónico de almacenamiento y se puso bajo la axila del sujeto alineando el borde del filtro con el centro de la línea del pliegue axilar. El papel de filtro se mantuvo en su sitio usando los dedos mientras que el sujeto relajaba los brazos hasta el costado del cuerpo. El sujeto mantuvo ambos brazos firmemente contra su tronco durante cinco minutos. La medición del tiempo se inició cuando los papeles de filtro estaban colocados de forma segura bajo las dos axilas. Las dos axilas se midieron simultáneamente. Después de 5 minutos, se retiraron los papeles de filtro de las axilas y se pusieron de nuevo en los mismos tubos cónicos respectivos. El papel de filtro que se puso primero se retiró primero. Las tapas de los tubos cónicos se pusieron firmemente rosca para prevenir la evaporación del sudor del tubo. La producción de sudor se repitió dos veces más a intervalos de un minuto.

Ensayo de almidón/yodo de Minor:

60 El sujeto permaneció con sus manos juntas en la parte posterior de la cabeza para exponer las axilas completamente. La solución de yodo se pintó sobre el área predeterminada de la axila como se ha indicado anteriormente con una gasa estéril y se dejó secar al aire. Cuando el yodo se hubo secado completamente, se aplicó una capa fina de almidón en el área cubierta por yodo con bolas de algodón. El yodo se dejó secar al aire antes de la aplicación de almidón para reducir los falsos positivos y el efecto de fondo. El sujeto después mantuvo ambos brazos firmemente contra su tronco. Después de 5 minutos, el sujeto elevó sus brazos y mantuvo las manos juntas

en la parte posterior de la cabeza para exponer las axilas completamente. Se tomaron fotografías de cada axila, tanto de la axila izquierda como de la derecha con la fecha claramente etiquetada. Las axilas se limpiaron con EtOH al 70 % y después con agua desionizada estéril.

5 Preparación Tratamiento:

Se preparó Kn21pr a una concentración de 1 mg/ml con solución salina más EtOH al 5 % (es decir, se prepararon alícuotas de 500 microlitros de Kn21pr y se añadieron 25 microlitros de EtOH al 100 %). Como se usa en el presente documento, Kn21pr se refiere a un esqueleto de polilisina cargado positivamente con un peso molecular de 21.000 y grupos de ramificación que comprenden oligoarginina protegida. Se reconstituyeron 100 unidades de Botox® (Allergan, Irvine, CA) con 0,75 mililitros de cloruro sódico al 0,9% (Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) usando una jeringa látex de estéril 3 ml con 18_G 11/2 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey). El Botox® reconstituido se mezcló cuidadosamente por inversión 8 veces. Se usaron 200 unidades de Botox® para cada sujeto. La solución de tratamiento se preparó con 200 unidades de Botox® y Kn21pr más EtOH al 5 % de (es decir, se añadieron 1,5 mililitros de Botox® a 500 microlitros de Kn21pr más 25 microlitros de EtOH al 100 %) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir que se formaran los complejos. Después de un período de incubación de 5 minutos, se añadieron aproximadamente 1,0 mililitros de HPC (hidroxipropilcelulosa) al 4 % (con EtOH al 1 %) y se mezclaron suavemente y minuciosamente con una pequeña espátula metálica. La solución de tratamiento homogénea se transfirió a una jeringa de 3 ml y se tapó la punta de la jeringa. (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey).

La solución de control se preparó con cloruro sódico al 0,9 % y Kn21pr más EtOH al 5% (es decir, se añadieron 1,5 mililitros de cloruro sódico al 0,9 % a 500 microlitros de Kn21pr más 25 microlitros de EtOH al 100 %) y se mantuvo a temperatura ambiente durante cinco minutos. Después de la incubación, se añadieron aproximadamente 1,0 mililitros de HPC al 4% (con EtOH al 1 %) y se mezclaron suavemente y minuciosamente con una pequeña espátula metálica. La solución de control homogénea se transfirió a una jeringa de 3 ml y se tapó la punta de la jeringa.

Aplicación de tratamiento (usando guantes de nitrilo sin polvo):

El sujeto mantuvo sus manos juntas con los dedos entrelazados y puestos en la parte posterior de la cabeza para exponer completamente sus axilas. Después, el sujeto se reclinó en una silla formando un ángulo de aproximadamente 45 grados. Como se muestra en la Figura 7, el área de dosificación se localizó visualmente (es decir, 1 cm más allá de la piel con vello) para la aplicación. Se comprobó que el área de dosificación estaba seca. Se retiró la tapa de la punta de la jeringa de la jeringa etiquetada con la marca "L" en el caso de la axila izquierda y con una "R" en el caso de la axila derecha, y se preparó para la aplicación en la axila del sujeto. La solución de tratamiento se extendió uniformemente alrededor del área de dosificación con una jeringa y se masajeó en la piel con los dedos durante 1 minuto. El sujeto después puso sus brazos a lo largo del costado del cuerpo y permaneció en esta posición durante 60 minutos. Después de la incubación de 60 minutos, el tratamiento se limpió con gasas estériles. Las gasas y los guantes se tiraron en una bolsa de contaminantes biológicos. Se dejó marchar al sujeto.

Resultados:

La BT tópica Essentia redujo la sudoración en un 65 % y se ilustra en la Figura 8a. La producción de sudor 4 semanas después del tratamiento (aleatorizado por costado) con esqueleto Kn21pr solo (control) o esqueleto kn21pr más 200 U de Botox (relación con el punto inicial). Análisis estadísticos por rangos con signos de Wilcoxon usando NPSS siendo P como se ha indicado anteriormente y significación de $p < 0,05$. [n = 10 sujetos].

Segunda comparación: Punto inicial frente a 4 semanas (véase la Figura 8b). La producción de sudor (mg por 5 minutos) 4 semanas después del tratamiento axilar (aleatorizado por costado) con esqueleto kn21pr solo (control) o esqueleto kn21pr más 200 U de Botox (relación de tratamiento con respecto al control) se presenta en la Tabla 6. Análisis estadísticos por rangos con signos de Wilcoxon usando NPSS, siendo P como se ha indicado y significado a $p < 0,05$. (Pr T $p = 0,0217$) [n = 10].

La Figura 9 muestra fotografías que representan el ensayo de almidón/yodo de Minor antes y después del tratamiento con "Loción Essentia Botox" tópicamente para el tratamiento de la hiperhidrosis axilar. Se muestra el ensayo de almidón/yodo en el punto inicial frente a 2 semanas donde la axila derecha se trató con "Loción Essentia Botox" (a y c) y a la axila izquierda se le aplicó el control (b y d) para el sujeto N° 12. Estas fotografías ilustran los efectos beneficiosos típicos observados después del tratamiento con vehículo + bótox en almidón yodo. Aunque se observa algún dato cruzado en el lado de control (coherente con una reducción del 25 % en los datos gravimétricos), se producen reducciones significativas con el tratamiento (coherente con una reducción del 65 % en los datos gravimétricos en el lado tratado).

Conclusiones:

Este ejemplo confirma que la aplicación tópica de complejos de toxina botulínica formados de acuerdo con la invención, desvelados en el presente documento, produce rápidamente un efecto terapéutico beneficioso en la reducción de la sudoración en una cohorte de pacientes con hiperhidrosis - subjetiva o cuantitativa. Este efecto en la

5 reducción de la sudoración también se ha producido en el caso de la frente presentada anteriormente y en la aplicación palmar/plantar cuando se combina con un guante para limitar la extensión de la formulación durante el tiempo de permanencia. Esta liberación transepitelial de complejos de toxina botulínica para obtener efectos terapéuticos beneficiosos confirma adicionalmente que el enfoque puede ampliarse a otros casos en los que la función de SNAP o las señales de acetilcolina son cruciales tales como el espasmo o disfunción de vejiga, aplicaciones gastrointestinales o secreciones de glándulas sebáceas para la reducción del olor o la prevención/tratamiento del acné.

REIVINDICACIONES

1. Una composición tópica que comprende una toxina botulínica y un vehículo cargado positivamente, comprendiendo dicho vehículo un esqueleto polimérico de peptidilo o distinto de peptidilo cargado positivamente que tiene unidos al mismo uno o más grupos de eficacia cargados positivamente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, donde el subíndice $n1$ es un número entero de 0 a 20, y el subíndice $n2$ es, independientemente, un número entero impar de 5 a 25; PTD de Antennapedia y fragmentos de la misma que retienen la actividad de PTD de Antennapedia; VIH-TAT; y fragmentos de VIH-TAT que tienen las secuencias de aminoácidos $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR}-(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$, o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$, donde los subíndices p y q son cada uno, independientemente, un número entero seleccionado de un intervalo de 0 a 20, un intervalo de 0 a 8, o un intervalo de 2 a 5; donde el vehículo cargado positivamente y la toxina botulínica están en contacto directamente para formar un complejo no covalente, y donde la toxina botulínica no está modificada covalentemente, para su uso para tratar el dolor neurológico; prevenir o reducir el dolor de cabeza tipo migraña u otro dolor de cabeza; o aliviar dolor relacionado con espasmos musculares.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso para tratar el dolor neurológico.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en prevenir o reducir el dolor de cabeza tipo migraña.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en prevenir o reducir el dolor de cabeza distinto del dolor de cabeza tipo migraña.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en aliviar dolor relacionado con espasmos musculares.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, donde el dolor relacionado con espasmos musculares es dolor en la parte inferior de la espalda.
7. Una composición tópica que comprende una toxina botulínica y un vehículo cargado positivamente, comprendiendo dicho vehículo un esqueleto polimérico de peptidilo o distinto de peptidilo cargado positivamente que tiene unidos al mismo uno o más grupos de eficacia cargados positivamente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, donde el subíndice $n1$ es un número entero de 0 a 20, y el subíndice $n2$ es, independientemente, un número entero impar de 5 a 25; PTD de Antennapedia y fragmentos de la misma que retienen la actividad de PTD de Antennapedia; VIH-TAT; y fragmentos de VIH-TAT que tienen las secuencias de aminoácidos $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR}-(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRR-QRRR}-(\text{gly})_q$, o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$, donde los subíndices p y q son cada uno, independientemente, un número entero seleccionado de un intervalo de 0 a 20, un intervalo de 0 a 8, o un intervalo de 2 a 5; donde el vehículo cargado positivamente y la toxina botulínica están en contacto directamente para formar un complejo no covalente, y donde la toxina botulínica no está modificada covalentemente, para su uso en el tratamiento de, prevenir o reducir los síntomas asociados con hiperhidrosis subjetiva o clínica.
8. La composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende una cantidad eficaz de toxina botulínica para conseguir un efecto biológico deseado.
9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 u 8, donde la composición se aplica por vía tópica a la cabeza o la parte posterior del cuello para prevenir o reducir el dolor de cabeza tipo migraña u otro dolor de cabeza.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 6 u 8, donde la composición se aplica por vía tópica al torso o a una porción del mismo, la pelvis o una porción de la misma, o la espalda o una porción de la misma para tratar el dolor neurológico, u opcionalmente, tratar el dolor relacionado con el espasmo muscular.
11. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, donde la composición se aplica por vía tópica a un área del cuerpo de un sujeto que lo necesite, seleccionándose dicha área corporal de la cara o una porción de la misma; la axila o una porción de la misma; las manos o pies o una porción de los mismos; las palmas de las manos o una porción de las mismas; la espalda o el cuello o una porción de los mismos; la ingle o una porción de la misma; los codos, parte superior de los brazos, rodillas o parte superior de las piernas o una porción de los mismos; las nalgas o una porción de las mismas; el torso o una porción del mismo; o la pelvis o una porción de la misma.
12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores:
- (a) donde la toxina botulínica se selecciona de toxina botulínica de los serotipos A, B, C, D, E, F o G, opcionalmente donde la toxina botulínica es toxina botulínica del serotipo A; y/o

(b) donde el uno o más grupos de eficacia cargados positivamente es $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ donde el subíndice $n1$ es un número entero de 0 a 20 y el subíndice $n2$ es, independientemente, un número entero impar de 5 a 25, opcionalmente donde el subíndice $n1$ es un número entero de 0 a 8, tal como de 2 a 5; o el subíndice $n2$ es un número entero impar de 7 a 17, tal como de 7 a 13; o

5 (c) donde el uno o más grupos de eficacia cargados positivamente se selecciona de VIH-TAT o fragmentos del mismo que tiene la actividad de VIH-TAT; o PTD de Antennapedia o fragmentos del mismo que tiene la actividad de PTD de Antennapedia, opcionalmente donde el uno o más grupos de eficacia cargados positivamente son fragmentos de VIH-TAT cargados positivamente que tienen una secuencia de aminoácidos $(\text{gly})_p$ -RGRDDRRQRRR- $(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p$ -YGRKKRRQRRR- $(\text{gly})_q$, o $(\text{gly})_p$ -RKKRRQRRR- $(\text{gly})_q$, donde los subíndices p y q son cada uno, independientemente, un número entero de 0 a 20; y/o

10 (d) donde los grupos de eficacia cargados positivamente comprenden una cantidad en peso del peso total del vehículo seleccionado del grupo que consiste en al menos 0,05 % en peso del peso total del vehículo, o del 0,5 % al 45 % en peso del peso total del vehículo.

15 13. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:

(a) los grupos de eficacia cargados positivamente comprenden del 0,1 % al 30 % en peso del peso total del vehículo; y/o

20 (b) donde el esqueleto cargado positivamente comprende un polipéptido cargado positivamente, preferentemente donde el esqueleto cargado positivamente comprende polilisina, y más preferentemente donde la polilisina tiene un peso molecular:

(i) seleccionado de un intervalo de 10.000 a 1.500.000, tal como de 25.000 a 1.200.000, o de 100.000 a 1.000.000;

25 (ii) de 10.000 o un peso molecular de 25.000; o

(iii) de al menos 10.000.

14. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 11 o 12, donde el esqueleto cargado positivamente comprende un vehículo distinto de peptidilo cargado positivamente; preferentemente donde el vehículo distinto de peptidilo cargado positivamente comprende una polialquilenimina; más preferentemente donde la polialquilenimina es polietilenimina; y lo más preferentemente donde la polietilenimina tiene un peso molecular de 10.000 a 2.500.000, o de 100.000 a 1.800.000, o de 500.000 a 1.400.000.

35 15. La composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior:

(a) donde la composición comprende toxina botulínica en forma de una toxina botulínica recombinante, una proteína de fusión de una toxina botulínica, o un complejo de una toxina botulínica; y/o

40 (b) que es una composición de liberación controlada, una composición líquida, una composición de gel o una crema, loción o pomada; o que además comprende solución salina o solución salina y un sistema tamponante del pH; o tiene un pH de 4,5 a 6,3; y/o

(c) donde la composición comprende toxina botulínica del serotipo A con un peso molecular de 150.000.

16. Un método cosmético para tratar o disminuir las líneas y/o arrugas finas que comprende aplicar por vía tópica a la piel del sujeto la toxina botulínica junto con una cantidad eficaz de un vehículo cargado positivamente que comprende un esqueleto polimérico cargado positivamente que tiene unidos al mismo uno o más grupos de eficacia cargados positivamente, seleccionándose dichos grupos de eficacia cargados positivamente de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, donde el subíndice $n1$ es un número entero de 0 a 20, y el subíndice $n2$ es, independientemente, un número entero impar de 5 a 25; PTD de Antennapedia y fragmentos de la misma que retienen la actividad de PTD de Antennapedia; VIH-TAT; y fragmentos de VIH-TAT cargados positivamente que tienen las secuencias de aminoácidos $(\text{gly})_p$ -RGRDDRRQRRR- $(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p$ -YGRKKRRQRRR- $(\text{gly})_q$, o $(\text{gly})_p$ -RKKRRQRRR- $(\text{gly})_q$, donde los subíndices p y q son cada uno, independientemente, un número entero de 0 a 20; donde el vehículo cargado positivamente y la toxina botulínica están en contacto directamente para formar un complejo no covalente, y donde la toxina botulínica no está modificada covalentemente; para tratar o disminuir la aparición de líneas y/o arrugas finas, opcionalmente donde las líneas y/o arrugas finas son líneas y/o arrugas finas faciales.

17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16 donde dicha toxina se administra en una cantidad eficaz para conseguir un beneficio estético o cosmético.

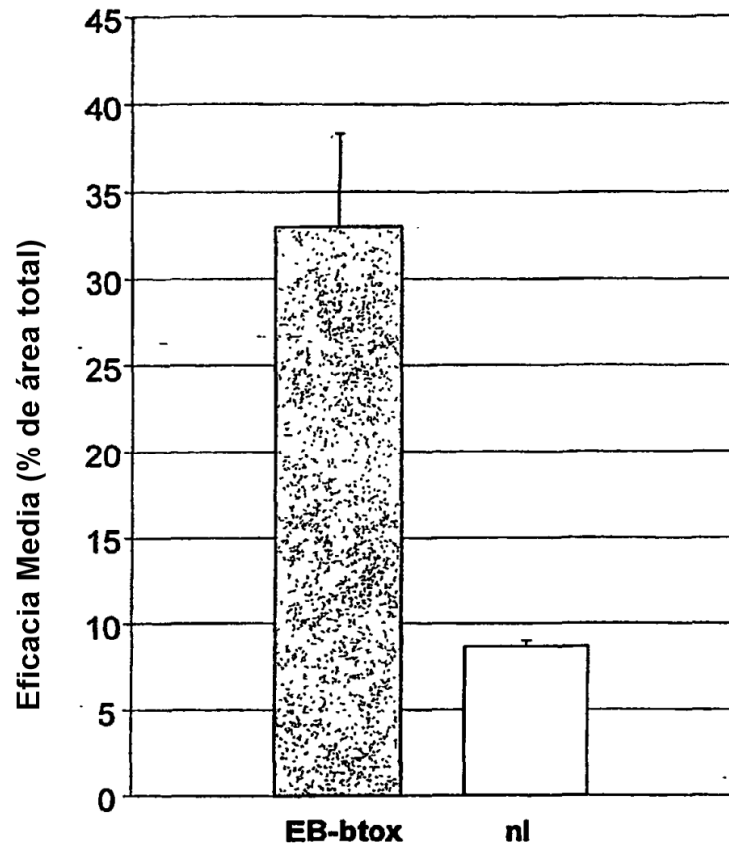


FIGURA 1

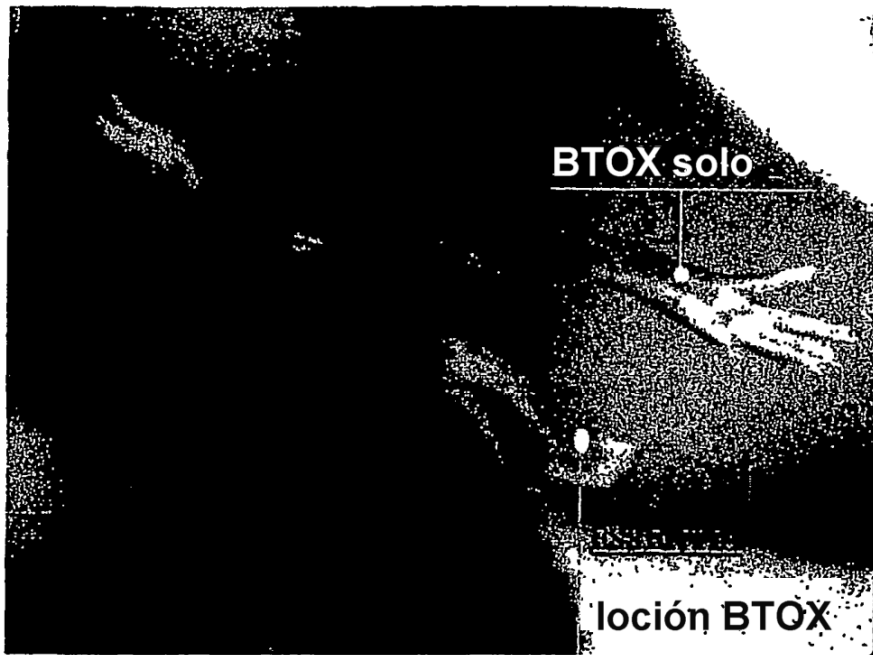
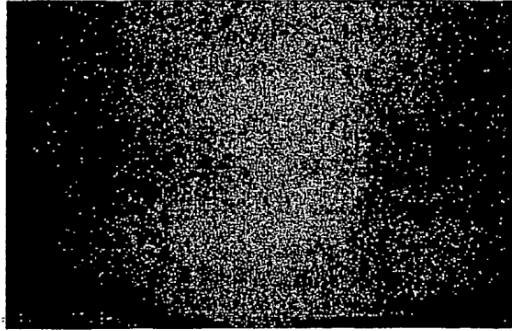
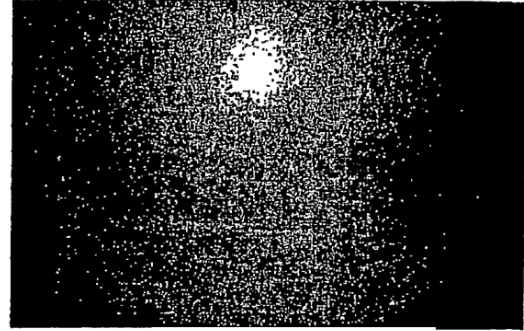


FIGURA 2



Loción Essentia Botox



Punto inicial

FIGURA 3



FIGURA 4

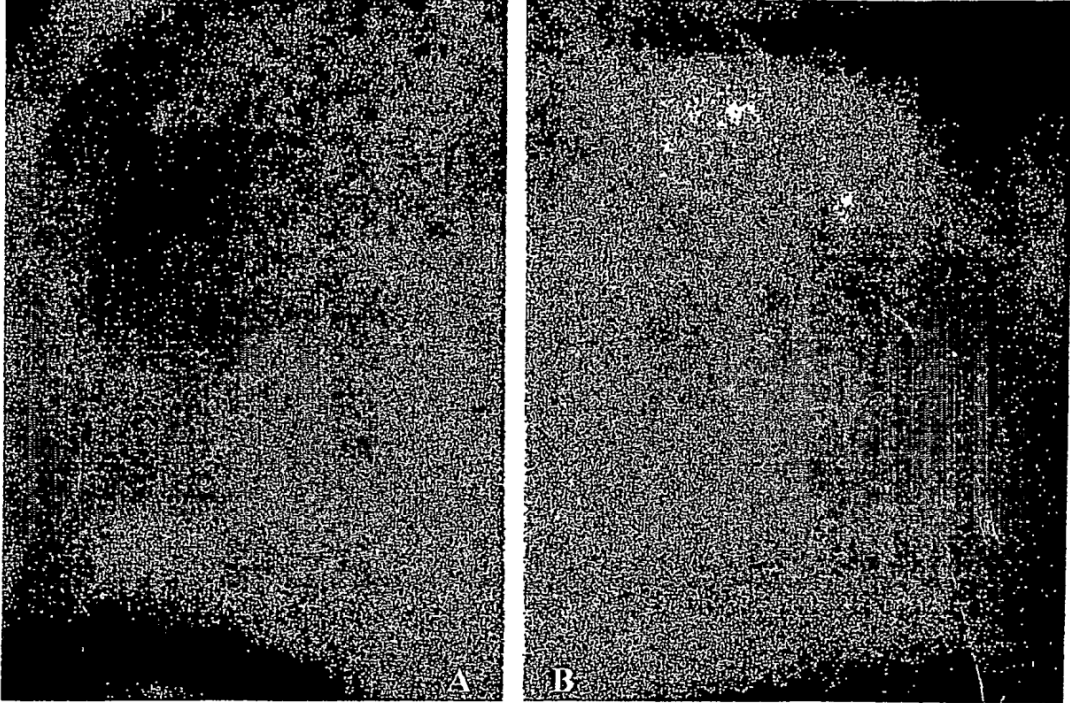


FIGURA 5

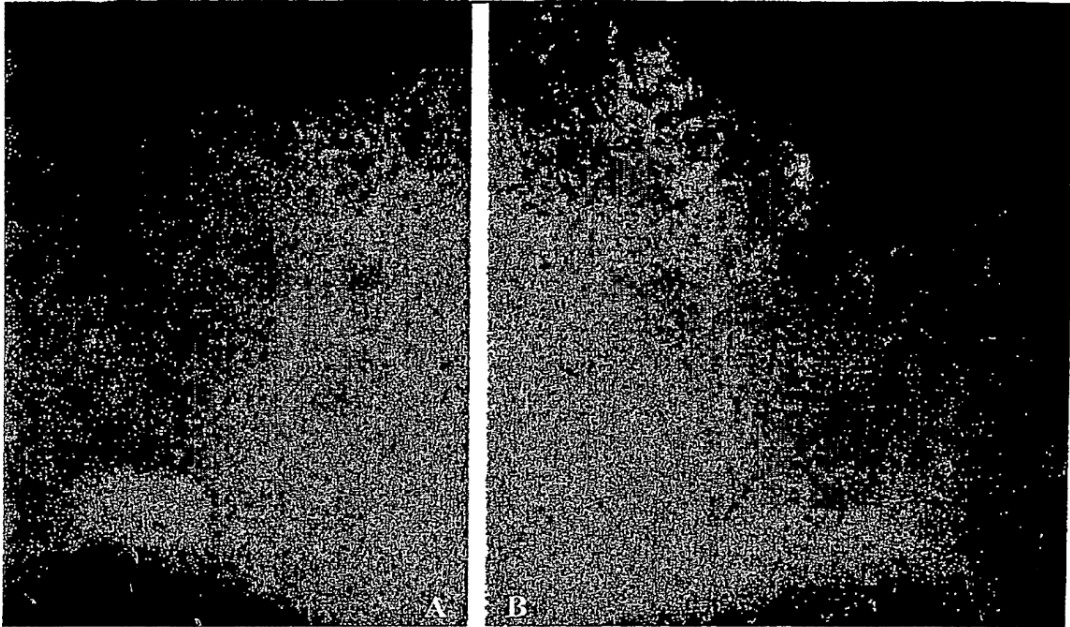


FIGURA 6



FIGURA 7

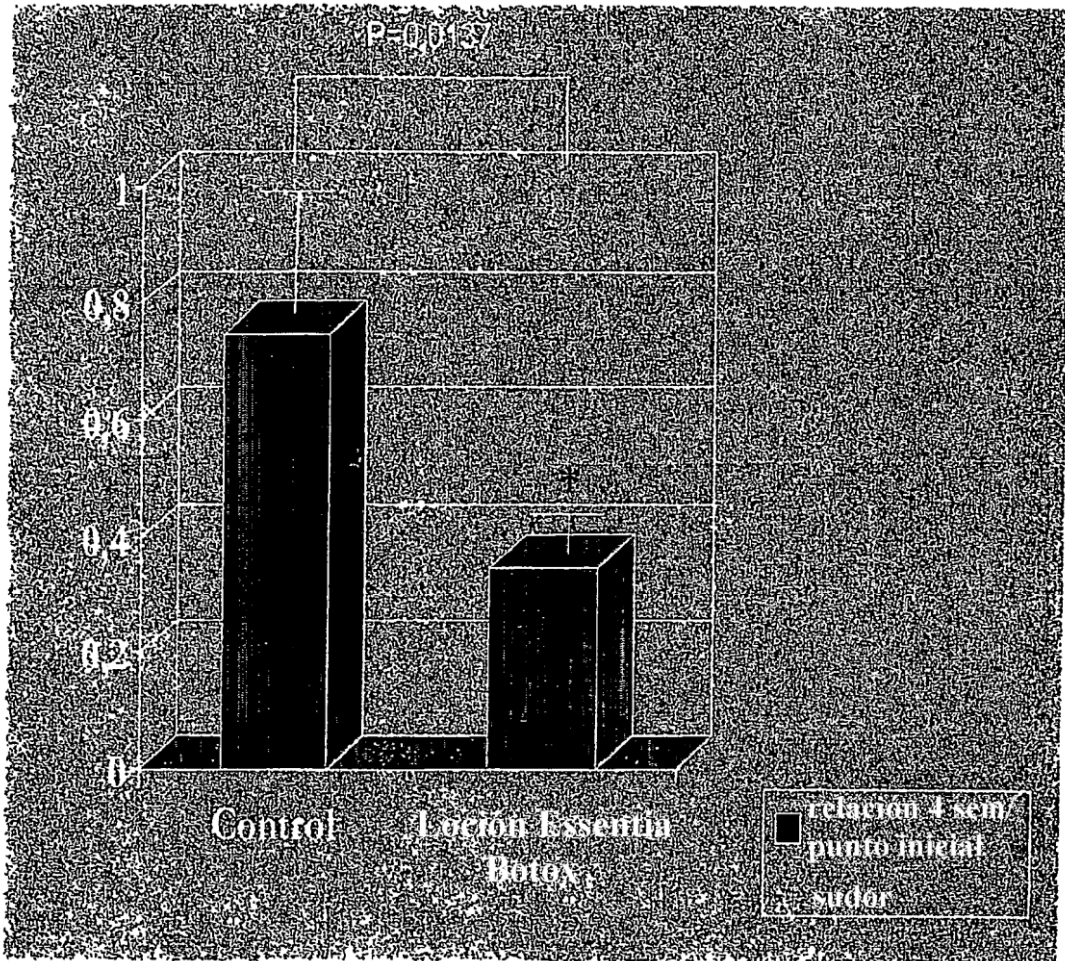


FIGURA 8A

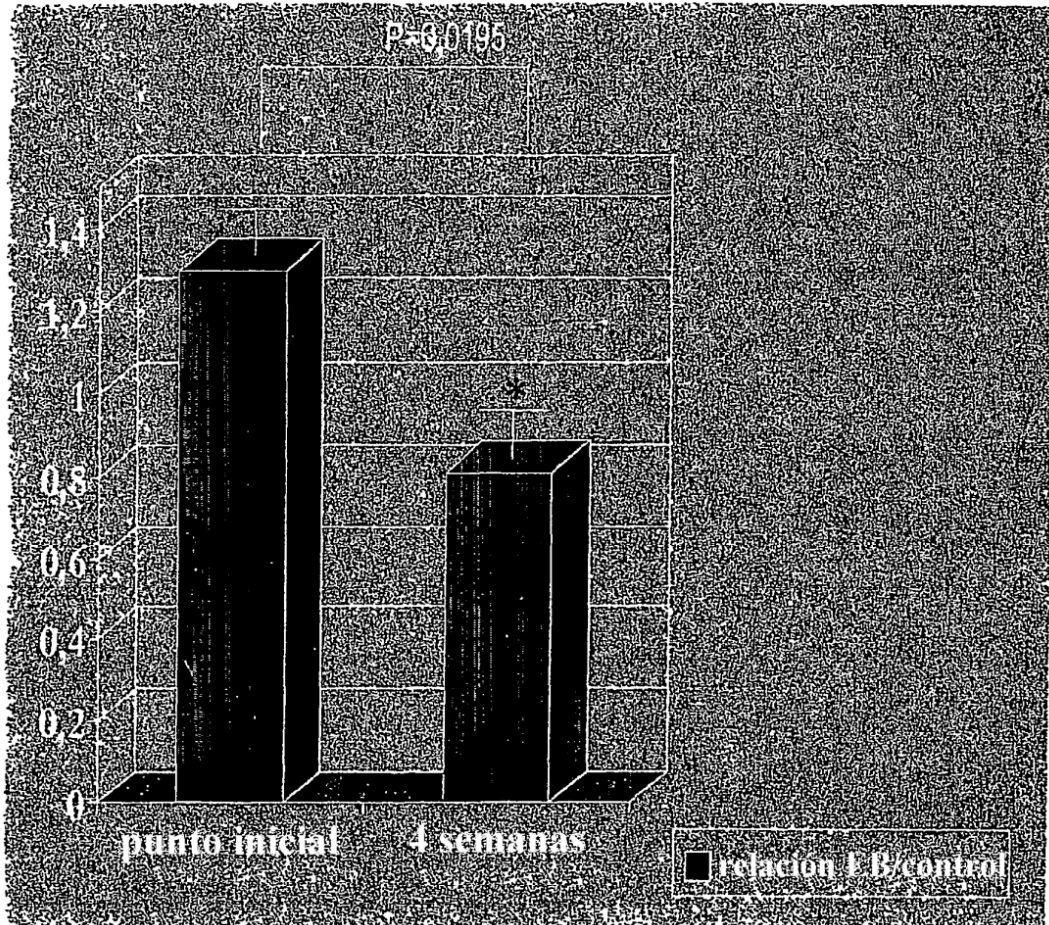


FIGURA 8B

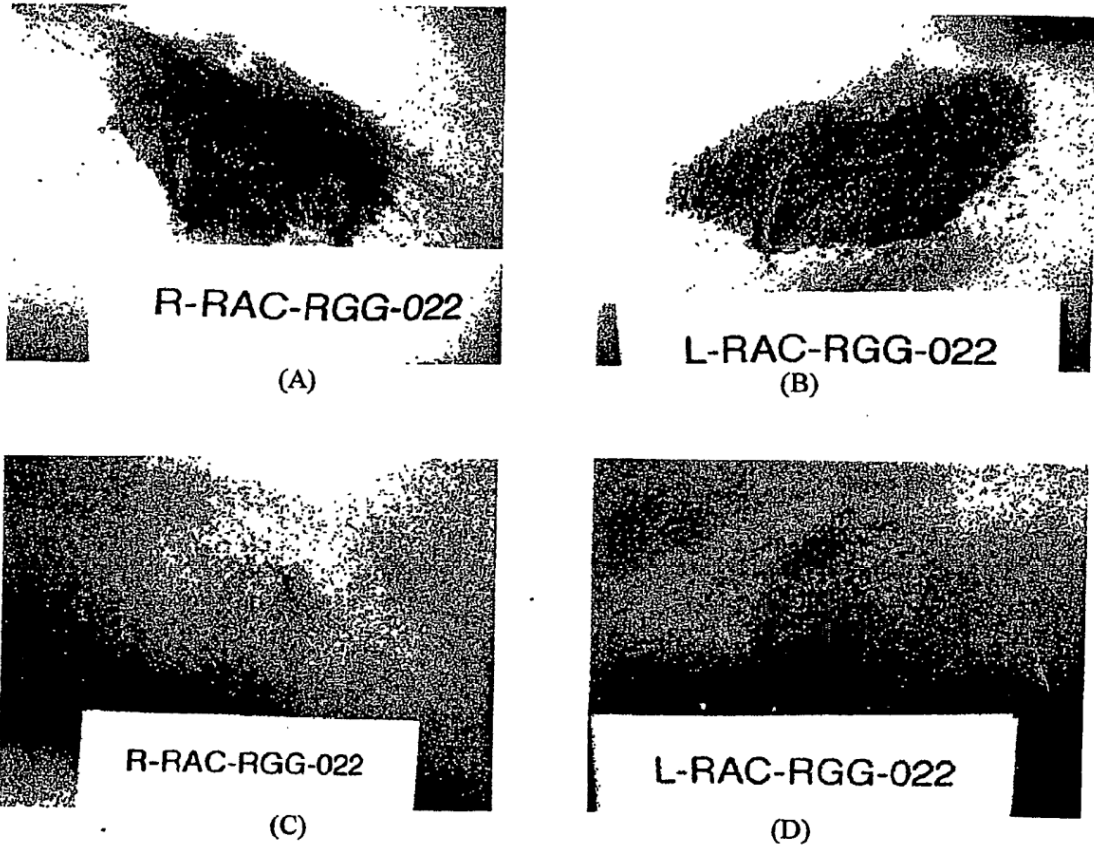


FIGURA 9