

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 020**

51 Int. Cl.:

A61K 39/08 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2009 PCT/US2009/069576**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.07.2010 WO10078242**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2009 E 09837072 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2379104**

54 Título: **Formulaciones inyectables de toxina botulínica**

30 Prioridad:

31.12.2008 US 142063 P

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

23.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RUEGG, CURTIS, L.;
STONE, HONGRAN, F. y
WAUGH, JACOB, M.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

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

ES 2 669 020 T3

Aviso:En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones inyectables de toxina botulínica

5 **Solicitud de patente relacionada**

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad según la norma 35 U.S.C. § 119 con respecto a la Solicitud de Patente Provisional n.º 61/142.063, presentada el 31 de diciembre de 2008, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

10

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas composiciones inyectables que comprenden toxina botulínica, que pueden administrarse a un sujeto para diversos fines terapéuticos, estéticos y/o cosméticos.

15

Antecedentes de la invención

La piel protege los órganos del cuerpo de las amenazas ambientales externas y actúa como un termostato para mantener la temperatura corporal. Consta de varias capas diferentes, cada una de ellas con funciones especializadas. Las capas principales incluyen la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis es la capa estratificada de células epiteliales que recubre la dermis, que consiste en tejido conjuntivo. Tanto la epidermis como la dermis están sostenidas por la hipodermis, una capa interna de tejido adiposo.

20

La epidermis, la capa superior de la piel, tiene solo de 0,1 a 1,5 milímetros de espesor (Inlander, *Skin*, Nueva York, N. Y.: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Consta de queratinocitos y se divide en varias capas en función de su estado de diferenciación. La epidermis se puede clasificar además en el estrato córneo y la epidermis viable, que consiste en células malpighianas (de la capa de Malpighi) y basales granulares. El estrato córneo es higroscópico y requiere al menos un 10 % de humedad en peso para mantener su flexibilidad y suavidad. La higroscopicidad es atribuible en parte a la capacidad de retención de agua de la queratina. Cuando la capa córnea pierde su suavidad y flexibilidad, se vuelve áspera y quebradiza, dando como resultado una piel seca.

25

30

La dermis, que se encuentra justo debajo de la epidermis, tiene un espesor de 1,5 a 4 milímetros. Es la más gruesa de las tres capas de la piel. La mayoría de las estructuras de la piel, incluyendo las glándulas sudoríparas y sebáceas (que secretan sustancias a través de las aberturas en la piel denominadas poros o comedones), folículos capilares, terminaciones nerviosas y vasos sanguíneos y linfáticos, se encuentran en la dermis (Inlander, *Skin*, Nueva York, N. Y.: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Sin embargo, los componentes principales de la dermis son el colágeno y la elastina.

35

La hipodermis es la capa más profunda de la piel. Actúa como un aislante para la conservación del calor corporal y como un amortiguador para la protección de los órganos (Inlander, *Skin*, Nueva York, N. Y.: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Además, la hipodermis también almacena grasa para las reservas energéticas. El pH de la piel normalmente está 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 de amortiguación de la piel se debe en parte a estas secreciones almacenadas en la capa córnea de la piel.

40

45

Las arrugas, uno de los signos reveladores del envejecimiento, pueden producirse por cambios bioquímicos, histológicos y fisiológicos que se acumulan a partir del daño ambiental a la piel. (Benedetto, "International Journal of Dermatology," 38:641-655 (1999)). Además, hay otros factores secundarios que pueden causar pliegues, surcos y frunces característicos de las arrugas faciales (Stegman *et al.*, *The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery*, 2ª ed., St. Louis, Mo.: Mosby Year Book: 5-15 (1990)). Estos factores secundarios incluyen la atracción constante de la gravedad, la presión posicional frecuente y constante en la piel (por ejemplo, durante el sueño) y movimientos faciales repetidos causados por la contracción de los músculos faciales (Stegman *et al.*, *The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery*, 2ª ed., St. Louis, Mo.: Mosby Year Book: 5-15 (1990)).

50

55

Para mitigar potencialmente algunos de los signos del envejecimiento se han utilizado diferentes técnicas. Estas técnicas van desde humectantes faciales que contienen alfa-hidroxiácidos y retinol a procedimientos quirúrgicos e inyecciones de neurotoxinas. Por ejemplo, en 1986, Jean y Alastair Carruthers, un matrimonio formado por un cirujano oculoplástico y una dermatóloga, desarrollaron un método para utilizar la forma del tipo A de la toxina botulínica para el tratamiento de las arrugas asociadas al movimiento en la zona de la glabella (Schantz y Scott, In Lewis G. E. (Ed) *Biomedical Aspects of Botulinum*, Nueva York: Academic Press, 143-150 (1981)). El uso de los Carruthers de la forma del tipo A de la toxina botulínica para el tratamiento de las arrugas condujo a la publicación seminal de esta estrategia en 1992 (Schantz y Scott, In Lewis G. E. (Ed) *Biomedical Aspects of Botulinum*, Nueva York: Academic Press, 143-150 (1981)). En 1994, el mismo equipo comunicó experiencias con otras arrugas faciales asociadas al movimiento (Scott, *Ophthalmol*, 87: 1044-1049 (1980)). A su vez esto condujo al nacimiento de la era del tratamiento cosmético utilizando la forma del tipo A de la toxina botulínica.

60

65

La forma del tipo A de la toxina botulínica se describe como el agente biológico natural más letal conocido por el hombre. Las esporas de *C. botulinum* se encuentran en el suelo y pueden crecer en envases de alimentos esterilizados y sellados de manera inadecuada. El botulismo, que puede ser mortal, puede producirse por la ingestión de la bacteria. La toxina botulínica actúa produciendo la parálisis de los músculos impidiendo la transmisión sináptica inhibiendo la liberación de acetilcolina a través de la unión neuromuscular, y se cree que actúa de otras maneras también. Su acción bloquea esencialmente las señales que normalmente causarían espasmos o contracciones musculares, lo que provocaría parálisis. Durante la última década, la actividad paralizante muscular de la toxina botulínica se ha aprovechado para obtener una variedad de efectos terapéuticos. La administración controlada de la toxina botulínica se ha utilizado para proporcionar parálisis muscular para tratar una variedad de afecciones médicas, por ejemplo, trastornos neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. Las afecciones que se han tratado con la toxina botulínica incluyen espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica del adulto, fisura anal, blefaroespasma, parálisis cerebral, distonía cervical, cefalea migrañosa, estrabismo, trastorno de la articulación temporomandibular y diversos tipos de calambres y espasmos musculares. Más recientemente, los efectos paralizantes de la toxina botulínica sobre la musculatura se han aplicado en aplicaciones faciales terapéuticas y cosméticas, tales como el tratamiento de arrugas, líneas de expresión y otros resultados de espasmos o contracciones de los músculos faciales.

Además de la forma del tipo A de la toxina botulínica, existen otras siete formas serológicamente distintas de la toxina botulínica que también son producidas por las bacterias gram positivas de *Clostridium botulinum*. De estos ocho tipos serológicamente distintos de toxina botulínica, los siete que pueden causar parálisis se han denominado serotipos A, B, C, D, E, F y G de la toxina botulínica. Cada uno de estos se diferencia por la neutralización con anticuerpos específicos de tipo. El peso molecular de cada una de las proteínas de la toxina botulínica es de aproximadamente 150 kD. Debido al tamaño de la molécula y a la estructura molecular de la toxina botulínica, esta no puede atravesar el estrato córneo y las múltiples capas de la arquitectura subyacente de la piel. Los diferentes serotipos de la toxina botulínica varían en el efecto y en la gravedad y duración de la parálisis que provocan en diferentes especies animales. Por ejemplo, en ratas, se ha determinado que la toxina botulínica del tipo A es 500 veces más potente que la toxina botulínica del tipo B, medida por la tasa de parálisis. Además, se ha determinado que la toxina botulínica del tipo B no es tóxica en los primates a una dosis de 480 U/kg, aproximadamente 12 veces la DL₅₀ (dosis letal para el 50 % de la población) de los primates para el tipo A.

Dado que la toxina botulínica es liberada por las bacterias *Clostridium botulinum*, dicha toxina es un componente de un complejo de toxina que contiene la molécula de la proteína de toxina botulínica de aproximadamente 150 kD junto con proteínas no tóxicas asociadas. Se cree que estas proteínas endógenas no tóxicas incluyen una familia de proteínas hemaglutinínicas, así como de proteínas no hemaglutinínicas. Se ha informado que las proteínas no tóxicas estabilizan la molécula de la toxina botulínica en el complejo de toxina y la protegen contra la desnaturalización por ácidos digestivos cuando se ingiere el complejo de toxina. Por lo tanto, las proteínas no tóxicas del complejo de toxina protegen la actividad de la toxina botulínica y de ese modo mejoran la penetración sistémica cuando el complejo de toxina se administra a través de tubo gastrointestinal. Además, se cree que algunas de las proteínas no tóxicas estabilizan específicamente la molécula de la toxina botulínica en la sangre.

La presencia de proteínas no tóxicas en los complejos de toxina típicamente hace que los complejos de toxina tengan pesos moleculares que son mayores que los de la molécula de la toxina botulínica pura, que es de aproximadamente 150 kD, como se indicó anteriormente. Por ejemplo, la bacteria *Clostridium botulinum* puede producir complejos de toxina botulínica del tipo A que tienen pesos moleculares de aproximadamente 900 kD, 500 kD o 300 kD. La toxina botulínica de los tipos B y C se producen como complejos que tienen un peso molecular de aproximadamente 700 kD o de aproximadamente 500 kD. La toxina botulínica del tipo D se produce como complejos que tienen pesos moleculares de aproximadamente 300 kD o 500 kD. La toxina botulínica de los tipos E y F solo se producen como complejos que tienen un peso molecular de aproximadamente 300 kD.

Para proporcionar estabilidad adicional a la toxina botulínica, los complejos de toxina se estabilizan convencionalmente combinando los complejos con albúmina durante la fabricación. Por ejemplo, BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA) es una formulación que contiene toxina botulínica que contiene 100 U de toxina botulínica del tipo A con proteínas accesorias, 0,5 miligramos de albúmina humana y 0,9 miligramos de cloruro de sodio. La albúmina sirve para unir y estabilizar complejos de toxinas en entornos dispares, incluidos los relacionados con la fabricación, transporte, conservación y administración.

Típicamente, la toxina botulínica se administra a pacientes mediante inyecciones cuidadosamente controladas de composiciones que contienen complejo de toxina botulínica y albúmina. Sin embargo, existen varios problemas asociados con esta estrategia. Las inyecciones no solo son dolorosas, sino que típicamente alrededor de los sitios de inyección se generan localmente grandes cavidades subdérmicas de toxina, para obtener el efecto terapéutico o cosmético deseado. La toxina botulínica puede migrar desde estas cavidades subdérmicas ocasionando parálisis no deseada en las zonas circundantes del cuerpo. Este problema se agrava cuando la zona a tratar es grande y se requieren muchas inyecciones de toxina para tratarla. Además, debido a que los complejos de toxina inyectados contienen proteínas no tóxicas y albúmina que estabilizan la toxina botulínica y aumentan el peso molecular del complejo de toxina, los complejos de toxina tienen una semivida prolongada en el organismo y pueden causar una respuesta antigénica no deseable en el paciente. Por ejemplo, con el tiempo, algunos pacientes desarrollarán una

alergia a la albúmina, que se utiliza como un estabilizante en las formulaciones comerciales actuales. Además, los complejos de toxina pueden inducir al sistema inmunitario del paciente a formar anticuerpos neutralizantes, de modo que, en administraciones posteriores, se requieren mayores cantidades de toxina para obtener el mismo efecto. Cuando esto sucede, las inyecciones posteriores deben cuidarse para que no liberen una gran cantidad de toxina en la corriente sanguínea del paciente, lo que podría provocar una intoxicación sistémica mortal, especialmente dado que las proteínas no tóxicas y la albúmina estabilizan la toxina botulínica en la sangre.

En vista de los inconvenientes asociados a las formulaciones actuales de la toxina botulínica, sería muy deseable disponer de una formulación de toxina botulínica inyectable que fuese eficaz y estable, pero que mostrase una antigenicidad reducida y una menor tendencia a difundirse localmente después de la inyección. También sería deseable usar dicha formulación de toxina botulínica para diversos fines terapéuticos, estéticos y/o cosméticos.

También se conocen los siguientes documentos:

- WO 2006/094193 A2 relacionado con composiciones y métodos para la aplicación tópica y suministro transdérmico de un oligopéptido;
- US 2004/0220100 A1 relacionado con sistemas de transporte biológico multicomponente;
- WO 2008/082889 A2 relacionado con composiciones y métodos de aplicación tópica y suministro transdérmico de las toxinas botulínicas estabilizadas con fragmentos polipeptídicos procedentes de la proteína TAT del VIH; y
- US 2008/0107690 A1 relacionado con composiciones y métodos para la aplicación tópica y suministro transdérmico de un oligopéptido.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona composiciones inyectables que comprenden la toxina botulínica asociada no covalentemente con una molécula transportadora cargada positivamente. La invención se define mediante las reivindicaciones. En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención poseen una o más ventajas sobre las formulaciones convencionales y comerciales de la toxina botulínica, tales como BOTOX® o MYOBLOC®. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las composiciones pueden presentar una o más ventajas sobre las formulaciones botulínicas inyectables convencionales, incluyendo antigenicidad reducida, una tendencia reducida a difundirse en el tejido circundante después de la inyección, duración aumentada de la eficacia clínica o mayor fuerza en relación con formulaciones convencionales de toxina botulínica, mayor rapidez de inicio de la eficacia clínica y/o estabilidad mejorada.

Un aspecto de esta invención es el reconocimiento de que determinadas moléculas no nativas (es decir, moléculas no encontradas en complejos de toxina botulínica obtenidos de la bacteria *Clostridium botulinum*), se pueden añadir a la toxina botulínica, a complejos de toxina botulínica, y en particular, a complejos reducidos de toxina botulínica (como se define en el presente documento), para mejorar la difusión de la toxina a través de los tejidos. Las moléculas no nativas se asocian no covalentemente con la toxina y actúan como potenciadores de penetración que mejoran la capacidad de la toxina para alcanzar estructuras diana después de la inyección. Además, las moléculas no nativas pueden aumentar la estabilidad de la toxina antes y después de la inyección. Como ejemplo, los potenciadores de penetración pueden ser transportadores cargados positivamente, tales como péptidos catiónicos, que no tienen actividad intrínseca similar a la de la toxina botulínica y que también contienen uno o más dominios de transducción de proteínas como se describe en el presente documento.

Otra realización de esta invención es proporcionar una composición que comprende la toxina botulínica, un complejo de toxina botulínica (o un complejo reducido de proteína toxina botulínica que solo incluye la propia neurotoxina de 150 kD o la neurotoxina con algunas, pero no todas, proteínas nativas del complejo) y un transportador cargado positivamente.

La invención también se refiere a un método para la producción de un efecto biológico inyectando una cantidad eficaz de las composiciones de esta invención a un sujeto o a un paciente que necesite dicho tratamiento. El efecto biológico puede incluir, por ejemplo, parálisis muscular, reducción de hipersecreción o sudoración, tratamiento de dolor neurológico o cefalea migrañosa, gestión de la rinitis o sinusitis, tratamiento de vejiga hiperactiva, reducción de espasmos musculares, prevención o reducción del acné, reducción o potenciación de una respuesta inmunitaria, reducción de arrugas, o prevención o tratamiento de diversos otros trastornos.

Esta invención también proporciona kits para la preparación de formulaciones que contienen una toxina botulínica, un complejo de toxina botulínica, o un complejo reducido de proteína toxina botulínica y un transportador cargado positivamente, o una premezcla que a su vez puede utilizarse para producir dicha formulación. También se proporcionan kits que contienen medios para administrar secuencialmente un complejo de toxina botulínica (o un complejo reducido de toxina botulínica que solo incluye la propia neurotoxina de 150 kD o la neurotoxina con algunas proteínas nativas del complejo) y un transportador cargado positivamente.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1:** Gráfico de barras que muestra el tiempo necesario para volver al valor PAD (puntuación de abducción digital) de referencia (0,4) después de la administración repetida de RT003 o BOTOX®
- 5 **Figura 2:** La Figura 2A muestra la pata trasera de un ratón inyectado con un colorante oscuro para indicar la parte del músculo gastrocnemio de un ratón afectada por una inyección lateral a la línea media. La Figura 2B muestra la pata trasera de un ratón inyectado con un colorante oscuro para indicar la parte del músculo gastrocnemio de un ratón afectada por una inyección en la línea media.
- 10 **Figura 3:** Puntuaciones de abducción digital medidas en función del tiempo después de la inyección de RT003, RTT150 o BOTOX® en la parte lateral a la línea media o línea media del músculo gastrocnemio de un ratón.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a nuevas composiciones inyectables que comprenden toxina botulínica, un complejo de toxina botulínica, o un complejo reducido de toxina botulínica. En realizaciones preferidas, las composiciones estabilizan la toxina o permiten el transporte o suministro de la toxina a través de los tejidos después de la inyección, de manera que la toxina tiene antigenicidad reducida, un mejor perfil de seguridad, una fuerza aumentada, mayor rapidez de inicio de la eficacia clínica y/o mayor duración de la eficacia clínica en comparación con los complejos comerciales convencionales de toxina botulínica que están unidos a albúmina exógena (por ejemplo, BOTOX® o MYOBLOC®). Las composiciones de la invención se pueden utilizar como aplicaciones inyectables para proporcionar una toxina botulínica a un sujeto, para diversos fines terapéuticos, estéticos y/o cosméticos, como se describe en el presente documento. Las composiciones de la invención también tienen un perfil de seguridad mejorado sobre otras composiciones y métodos de suministro de toxina botulínica. Además, estas composiciones pueden proporcionar reducciones beneficiosas en las respuestas inmunitarias a la toxina botulínica.

La expresión "toxina botulínica", como se usa en el presente documento, puede referirse a cualquiera de los tipos conocidos de toxina botulínica (por ejemplo, moléculas de proteína de toxina botulínica de 150 kD asociadas a los diferentes serotipos de *C. botulinum*), ya sea producidos por la bacteria o por técnicas recombinantes, así como cualquiera de dichos tipos que puedan descubrirse posteriormente incluyendo serotipos recién descubiertos y variantes o proteínas de fusión modificadas por ingeniería genética. Como se ha mencionado anteriormente, actualmente se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas inmunológicamente distintas, en concreto los serotipos A, B, C, D, E, F y G de neurotoxina botulínica, cada uno de los cuales se diferencia por la neutralización con anticuerpos específicos de tipo. Los serotipos de la toxina botulínica están disponibles en el comercio, por ejemplo, en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y en MetabioLogics, Inc. (Madison, WI), así como en otras fuentes. Los diferentes serotipos de la toxina botulínica varían en las especies animales a las que afectan y en la gravedad y duración de la parálisis que provocan. En el comercio se dispone al menos de dos tipos de toxina botulínica, los tipos A y B, en formulaciones para el tratamiento de determinadas afecciones. El tipo A, por ejemplo, está incluido en preparaciones de Allergan que tiene la marca comercial BOTOX®^M y de Ipsen que tiene la marca comercial DYSPOUR®, y el tipo B está incluido en preparaciones de Elan que tiene la marca comercial MYOBLOC®.

La expresión "toxina botulínica", utilizada en las composiciones de esta invención, puede referirse alternativamente a un derivado de toxina botulínica, es decir, un compuesto que tiene actividad de toxina botulínica pero que contiene una o más alteraciones químicas o funcionales en cualquier parte o en cualquier cadena de aminoácidos en relación con las toxinas botulínicas nativas recombinantes o de origen natural. Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser una neurotoxina modificada que es una neurotoxina que tiene al menos uno de sus aminoácidos delecionado, modificado o reemplazado, en comparación con una forma nativa, o la neurotoxina modificada puede ser una neurotoxina 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 tal manera que, por ejemplo, potencie sus propiedades o disminuya los efectos secundarios no deseables, pero que aún conserve la actividad de toxina botulínica deseada. Como alternativa, la toxina botulínica que se utiliza en esta invención puede ser una toxina preparada utilizando técnicas químicas recombinantes o sintéticas, por ejemplo, un péptido recombinante, una proteína de fusión o una neurotoxina híbrida, por ejemplo, preparada a partir de subunidades o dominios de diferentes serotipos de toxina botulínica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.444.209). La toxina botulínica también puede ser una parte de la molécula completa que se ha demostrado que posee la actividad de toxina botulínica necesaria y, en dicho caso, puede utilizarse por sí misma o como parte de una combinación o molécula conjugada, por ejemplo, una proteína de fusión. Como alternativa, la toxina botulínica puede estar en forma de un precursor de toxina botulínica, que en sí mismo puede ser no tóxico, por ejemplo, una proteasa de cinc no tóxica que se vuelve tóxica en la escisión proteolítica.

La expresión "complejo de toxina botulínica" o "complejo de toxina", como se usa en el presente documento, se refiere a la molécula de proteína de toxina botulínica de aproximadamente 150 kD (que pertenece a uno cualquiera de los serotipos A-G de toxina botulínica), junto con proteínas no tóxicas endógenas asociadas (es decir, proteína hemaglutinínica y proteína no hemaglutinínica no tóxica producida por la bacteria *Clostridium botulinum*). Sin embargo, obsérvese que no es necesario que el complejo de toxina botulínica provenga de la bacteria *Clostridium botulinum* como un complejo de toxina unitario. Por ejemplo, la toxina botulínica o la toxina botulínica modificada

pueden prepararse de forma recombinante primero y después combinarse posteriormente con las proteínas no tóxicas. La toxina botulínica recombinante también puede adquirirse (por ejemplo, en List Biological Laboratories, Campbell, CA) y después combinarse con proteínas no tóxicas.

5 Esta invención también contempla la modulación de la estabilidad de moléculas de toxina botulínica mediante la adición de uno o más estabilizadores exógenos, la eliminación de estabilizadores endógenos, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, esta invención contempla el uso de "complejos reducidos de toxina botulínica", en los que los complejos de toxina botulínica tienen cantidades reducidas de proteína no tóxica en comparación con las cantidades encontradas de manera natural en complejos de toxina botulínica producidos por la bacteria *Clostridium botulinum*. En una realización, los complejos reducidos de toxina botulínica se preparan usando cualquier método convencional de separación de proteínas para extraer una fracción de la proteína hemaglutinínica o proteína no hemaglutinínica no tóxica de los complejos de toxina botulínica procedentes de la bacteria *Clostridium botulinum*. Por ejemplo, se pueden producir complejos reducidos de toxina botulínica disociando complejos de toxina botulínica a través de la exposición a glóbulos rojos a un pH de 7,3 (véase, por ejemplo, el documento EP 1514556 A1). Se puede usar HPLC, diálisis, columnas, centrifugación y otros métodos para la extracción de proteínas a partir de proteínas. Como alternativa, cuando los complejos reducidos de toxina botulínica se van a producir combinando toxina botulínica producida sintéticamente con proteínas no tóxicas, se puede simplemente añadir a la mezcla menos proteína hemaglutinínica o proteína no hemaglutinínica no tóxica, de lo que estaría presente en los complejos de toxina botulínica de origen natural. Cualquiera de las proteínas no tóxicas (por ejemplo, proteína hemaglutinínica o proteína no hemaglutinínica no tóxica o ambas) en los complejos reducidos de toxina botulínica según la invención, se pueden reducir independientemente en cualquier cantidad. En determinadas realizaciones ejemplares, una o más proteínas no tóxicas se reducen en al menos aproximadamente 0,5 %, 1 %, 3 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con las cantidades normalmente encontradas en los complejos de toxina botulínica. Como se indicó anteriormente, la bacteria *Clostridium botulinum* produce siete serotipos diferentes de toxina y las preparaciones comerciales se fabrican con diferentes cantidades relativas de proteínas no tóxicas (es decir, una cantidad diferente de complejos de toxina). Por ejemplo, MYOBLOC™ tiene 5000 U de toxina botulínica del tipo B por ml con albúmina de suero humano al 0,05 %, succinato sódico 0,01 M y cloruro sódico 0,1 M. DYSPORT™ tiene 500 U de complejo de toxina botulínica del tipo A - hemaglutinina con 125 mcg de albúmina y 2,4 mg de lactosa. En determinadas realizaciones, sustancialmente toda la proteína no tóxica (por ejemplo, más del 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la proteína hemaglutinínica y proteína no hemaglutinínica no tóxica) que normalmente se encontraría en los complejos de toxina botulínica procedentes de la bacteria *Clostridium botulinum*, se elimina del complejo de toxina botulínica. Además, aunque en algunos casos la cantidad de proteínas no tóxicas endógenas puede reducirse en la misma cantidad, esta invención también contempla la reducción de cada una de las proteínas no tóxicas endógenas en diferentes cantidades, así como la reducción de al menos una de las proteínas no tóxicas endógenas, pero no las restantes.

Como se ha indicado anteriormente, para estabilizar las formulaciones de toxina botulínica, típicamente se añade un estabilizador exógeno (por ejemplo, albúmina). Por ejemplo, en el caso de BOTOX®, 0,5 mg de albúmina humana por 100 U de complejo de toxina botulínica del tipo A, estabilizan el complejo. Generalmente, la cantidad de estabilizador exógeno que se puede añadir para estabilizar las composiciones de acuerdo con la invención, no está particularmente limitada. En algunas realizaciones, la cantidad de estabilizador añadido puede ser menor que la cantidad añadida convencionalmente, debido a la capacidad que tienen los transportadores cargados positivamente de la invención para actuar en sí mismos como estabilizador. Por ejemplo, la cantidad de albúmina exógena añadida puede ser cualquier cantidad menor que el exceso de mil veces convencional de albúmina exógena y, en determinadas realizaciones ejemplares de la invención, es solo de aproximadamente 0,25, 0,20, 0,15, 0,10, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,00001, 0,000005, 0,000001 o 0,0000001 mg por 100 U de toxina botulínica. En una realización, no se añade albúmina exógena como estabilizante a las composiciones de la invención.

De acuerdo con la presente invención, una molécula transportadora cargada positivamente que tiene dominios de transducción de proteínas o grupos de eficacia, como se describe en el presente documento, se ha encontrado adecuada como un sistema de transporte para una toxina botulínica, permitiendo que la toxina se inyecte con una penetración mejorada en estructuras diana, tales como músculos y/u otras estructuras asociadas a la piel. El transporte se produce sin modificación covalente de la toxina botulínica. Además de potenciar la penetración de la toxina botulínica, los transportadores cargados positivamente de la invención pueden, en determinadas realizaciones preferidas, estabilizar la toxina botulínica contra la degradación. En dichas realizaciones, la proteína hemaglutinínica y la proteína no hemaglutinínica no tóxica, que están normalmente presentes para estabilizar la toxina botulínica, se pueden reducir u omitir por completo. De manera similar, la albúmina exógena que normalmente se añade durante la fabricación puede omitirse.

Con el uso de las expresiones "cargado positivamente" o "catiónico", en relación con el término "transportador", se entiende que el transportador tiene una carga positiva en al menos algunas condiciones de fase en solución, más preferentemente, en al menos algunas condiciones fisiológicamente compatibles. Más específicamente, "cargado positivamente" y "catiónico", 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 que contiene una funcionalidad que puede adquirir carga positiva en determinadas condiciones fase en solución, tales como cambios de pH en el caso de aminas primarias. Más preferentemente, "cargado positivamente" o "catiónico",

como se usa en el presente documento, se refiere a aquellos grupos que tienen el comportamiento de asociarse con aniones en condiciones fisiológicamente compatibles. Como será obvio para un experto en la materia, no es necesario que los polímeros con una multiplicidad de restos cargados positivamente sean homopolímeros. En la técnica anterior se conocen bien otros ejemplos de restos cargados positivamente y pueden emplearse fácilmente, como será obvio para los expertos en la materia.

Generalmente, el transportador cargado positivamente (también denominado "esqueleto cargado positivamente") es típicamente una cadena de átomos, con grupos en la cadena que llevan una carga positiva a pH fisiológico, o con grupos que llevan una carga positiva unida a cadenas laterales que se extienden desde el esqueleto. En determinadas realizaciones preferidas, el esqueleto cargado positivamente es un péptido catiónico. Como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a una secuencia de aminoácidos, pero no lleva ninguna connotación con respecto al número de restos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos. Por consiguiente, el término "péptido" también puede incluir polipéptidos y proteínas. En determinadas realizaciones preferidas, el propio esqueleto cargado positivamente no tendrá una actividad biológica enzimática o terapéutica definida. En determinadas realizaciones, el esqueleto es un esqueleto hidrocarbonado lineal que, en algunas realizaciones, está interrumpido por heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio y fósforo. La mayor parte de los átomos de la cadena del esqueleto son normalmente carbonos. Adicionalmente, el esqueleto será a menudo un polímero de unidades repetitivas (por ejemplo, aminoácidos, poli(etilenoxi), poli(propilenoamina), polialquilenoimina y similares) pero puede ser un heteropolímero. En un grupo de realizaciones, el esqueleto cargado positivamente es una polipropilenoamina en la que diversos átomos de nitrógeno de amina están presentes como grupos amonio (tetrasustituidos) que llevan una carga positiva. En otra realización, el esqueleto cargado positivamente es un polímero no peptídico, que puede ser un hetero u homopolímero tal como una polialquilenoimina, 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 está unido a una pluralidad de restos de cadena lateral que incluyen grupos cargados positivamente (por ejemplo, grupos amonio, grupos piridinio, grupos fosfonio, grupos sulfonio, grupos guanidinio o grupos amidinio). En este grupo de realizaciones, los restos de cadena lateral pueden colocarse en espaciamientos a lo largo del esqueleto con separaciones constantes o variables. Adicionalmente, la longitud de las cadenas laterales puede ser similar o diferente. Por ejemplo, en un grupo de realizaciones, las cadenas laterales pueden ser cadenas hidrocarbonadas 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 mencionados anteriormente. La asociación entre el transportador cargado positivamente y la toxina botulínica, bo reducida, es por interacción no covalente, cuyos ejemplos no limitantes incluyen interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o combinaciones de los mismos.

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 100 a aproximadamente 1.500.000, más preferentemente de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.200.000, lo más preferentemente de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1.000.000. Un experto en la materia apreciará que, cuando en esta parte de la invención se usan aminoácidos, las cadenas laterales pueden tener la forma D o la forma L (configuración R o S) en el centro de unión. En determinadas realizaciones preferidas, el polipéptido tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000, más preferentemente de 1000 a aproximadamente 4000, más preferentemente de 2000 a aproximadamente 3000.

Como alternativa, el esqueleto puede comprender análogos de aminoácidos y/o aminoácidos sintéticos. El esqueleto también 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)). Resumiendo, 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 se ha indicado anteriormente, una parte de las cadenas laterales terminará típicamente en un grupo cargado positivamente para proporcionar al esqueleto un componente cargado positivamente. La síntesis de peptoides se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n. ° 5.877.278. De la manera en la que en el presente documento se usa el término, los esqueletos cargados positivamente, que tienen una construcción de esqueleto peptoide, se consideran "no péptidos" y están compuestos por aminoácidos que tienen cadenas laterales de origen natural en las localizaciones del carbono alfa.

Puede utilizarse una variedad de esqueletos distintos empleando, por ejemplo, miméticos estéricos o electrónicos de polipéptidos donde los enlaces amida del péptido se reemplazan con sustitutos tales como enlaces éster, tioamidas (--CSNH--), tioamida invertida (--NHCS--), aminometileno (--NHCH₂--) o los grupos metileno invertidos (--CH₂NH--), grupos ceto-metileno (--COCH₂--), fosfinato (--PO₂RCH₂--), fosfonamido y éster de fosfonamido (--PO₂RNH--), péptido inverso (--NHCO--), trans-alqueno (--CR=CH--), fluoroalqueno (--CF=CH--), dimetileno (--CH₂CH₂--), tioéter (--CH₂S--), hidroxietileno (--CH(OH)CH₂--), metilenoxi (--CH₂O--), tetrazol (CN₄), sulfonamida (--SO₂NH--), metilensulfonamida (--CHRSO₂NH--), sulfonamida invertida (--NHSO₂--), y esqueletos con subunidades malonato y/o gem-diamino-alquilo, por ejemplo, como revisan Fletcher *et al.* ((1998) *Chem. Rev.* 98: 763) y se

detalla en las referencias citadas en este documento. Muchas de las sustituciones anteriores dan como resultado esqueletos poliméricos aproximadamente isostéricos con respecto a los esqueletos formados a partir de α aminoácidos.

5 En cada uno de los esqueletos proporcionados anteriormente, se pueden adjuntar grupos de cadena lateral que llevan un grupo cargado positivamente. Por ejemplo, los esqueletos unidos a sulfonamida ($--SO_2NH--$ y $--NHSO_2--$) pueden tener grupos de cadena lateral unidos a los átomos de nitrógeno. Del mismo modo, el enlace hidroxietileno ($-CH(OH)CH_2-$) 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 utilizando métodos sintéticos convencionales.

10 En una realización, el esqueleto cargado positivamente es un polipéptido que tiene dominios de transducción de proteínas (también denominados grupos de eficacia). Como se usa en el presente documento, un grupo de eficacia o un dominio de transducción es cualquier agente que tiene el efecto de promover la translocación del esqueleto cargado positivamente a través de un tejido o membrana celular. Como ejemplos no limitantes de dominios de transducción de proteínas o grupos de eficacia se incluyen $-(gli)_{n1}-(arg)_{n2}$, la proteína TAT del VIH 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, lo más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 13. En algunas realizaciones, el fragmento de la proteína TAT del VIH no contiene la región rica en cisteína de la molécula de la proteína TAT del VIH, con el fin de minimizar los problemas asociados a la agregación de disulfuro. Aún más preferidas son aquellas realizaciones en las que el fragmento de la proteína TAT del VIH tiene la fórmula $(gli)_p-RGRDDRRQRRR-(gli)_q$, $(gli)_p-YGRKKRRQRRR-(gli)_q$ o $(gli)_p-RKKRRQRRR-(gli)_q$ 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 del extremo N del fragmento. En determinadas realizaciones preferidas, p es uno y q es cero o p es cero y q es uno. Son fragmentos preferidos de la proteína TAT del VIH aquellos en los que los subíndices p y q son cada uno, independientemente, números enteros de 0 a 8, más preferentemente de 0 a 5. En otra realización preferida, la cadena lateral cargada positivamente o grupo de ramificación es el dominio de transducción de la proteína (DTP) de Antennapedia (Antp), o un fragmento del mismo que conserva actividad. Estos son conocidos en la técnica, por ejemplo, de Console *et al.*, J. Biol. Chem. 278: 35109 (2003) y un ejemplo no limitante de un DTP de Antp contemplado en esta invención es SGRQIKIWFQNRMMKWKCC.

35 Preferentemente, el transportador cargado positivamente incluye dominios de transducción de proteínas cargados positivamente de cadena lateral en una cantidad de al menos aproximadamente 0,01 %, como porcentaje del peso total del transportador, preferentemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 por ciento en peso, más preferentemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 45 por ciento en peso y lo más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30 por ciento en peso. Para dominios de transducción de proteínas cargados positivamente que tienen la fórmula $-(gli)_{n1}-(arg)_{n2}$, un intervalo preferido es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 %.

40 En otra realización, la parte de esqueleto es una polilisina y los dominios de transducción de proteínas cargados positivamente están unidos a los grupos amino de la cadena lateral de la lisina o a los extremos C o N. En algunas realizaciones preferidas, la polilisina puede tener un peso molecular que es de al menos 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500 o 6000 D, y menos de aproximadamente 2.000.000, 1.000.000, 500.000, 250.000, 100.000, 75.000, 50.000 y 25.000 D. Dentro del intervalo de 100 a 2.000.000 D, se contempla que el intervalo inferior y/o superior se puede aumentar o disminuir, respectivamente, en 100, siendo cada subintervalo resultante una realización específicamente contemplada de la invención. En algunas realizaciones ejemplares, la polilisina tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1.500.000 D, de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 800.000 D, o de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 200.000 D. En otras realizaciones ejemplares, la polilisina tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 10.000 D, de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 D, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 4.000 D, de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 3.500 D o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 3.000 D. En algunas realizaciones, la polilisina contemplada en esta invención puede ser cualquiera de las polilisinias disponibles en el comercio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.) tales como, por ejemplo, polilisina que tiene un $PM > 70.000$, polilisina que tiene un PM de 70.000 a 150.000, polilisina que tiene un PM de 150.000 a 300.000 y polilisina que tiene un $PM > 300.000$. 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 dominios de transducción de proteínas o cargados positivamente o grupos de eficacia preferidos incluyen, por ejemplo, $-gli-gli-gli-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg$ ($-Gly_3Arg_7$) o la proteína TAT del VIH.

65 En otra realización preferida, el esqueleto cargado positivamente es una polialquilenimina, cuyos ejemplos no limitantes incluyen polietilenimina, polipropilenimina y polibutilenimina. En determinadas realizaciones, la polialquilenimina tiene un peso molecular de al menos 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500,

2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500 o 6000 D, y menos de aproximadamente 2.000.000, 1.000.000, 500.000, 250.000, 100.000, 75.000, 50.000 y 25.000 D. Dentro del intervalo de 100 a 2.000.000 D, se contempla que el intervalo inferior y/o superior se puede aumentar o disminuir, respectivamente, en 100, siendo cada subintervalo resultante una realización específicamente contemplada de la invención.

5 En otras realizaciones de esta invención el transportador es un esqueleto de polilisina o polietilenimina (PEI) relativamente corto (que puede ser lineal o ramificado) y que tiene grupos de ramificación cargados positivamente. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que dichos transportadores son útiles para minimizar la agregación incontrolada de los esqueletos y la toxina botulínica en una composición terapéutica, lo que hace que la eficacia del transporte disminuya drásticamente. Cuando el transportador es un esqueleto lineal de polilisina o PEI relativamente corto, el esqueleto tendrá un peso molecular menor de 75.000 D, más preferentemente menor de 30.000 D, y lo más preferentemente menor de 25.000 D. Sin embargo, cuando el transportador es un esqueleto ramificado de polilisina o PEI relativamente corto, el esqueleto tendrá un peso molecular menor de 60.000 D, más preferentemente menor de 55.000 D y lo más preferentemente menor de 50.000 D.

10 En una realización particularmente interesante, las moléculas no nativas son péptidos catiónicos que no tienen actividad intrínseca similar a la de la toxina botulínica y que también contienen uno o más dominios de transducción de proteínas como se describe en este documento. Sin desear estar ligado a ninguna teoría científica particular, se cree que los péptidos aumentan la penetración tisular de las moléculas asociadas en el complejo después de la inyección, a la vez que mejoran la estabilización de la toxina botulínica en la piel e *in vitro*. Se cree que la penetración tisular mejorada proporcionada por estos péptidos en particular proporciona antigenicidad reducida, un mejor perfil de seguridad, fuerza aumentada, mayor rapidez de inicio de la eficacia clínica o mayor duración de la eficacia clínica, en comparación con los complejos de toxina botulínica comerciales convencionales que están unidos a albúmina exógena (por ejemplo BOTOX® o MYOBLOC®).

15 En realizaciones preferidas, la concentración de transportadores cargados positivamente en las composiciones de acuerdo con la invención, es suficiente para potenciar el suministro de la toxina botulínica a dianas moleculares, tales como, por ejemplo, placas nerviosas motoras. Además, sin desear ligarse a ninguna teoría, se cree que la velocidad de penetración sigue la cinética mediada por receptores, de modo que la penetración tisular aumenta aumentando las cantidades de moléculas potenciadoras de penetración hasta un punto de saturación, después del cual la velocidad de transporte se vuelve constante. Por lo tanto, en una realización preferida, la cantidad añadida de moléculas potenciadoras de penetración es igual a la cantidad que maximiza la velocidad de penetración justo antes de la saturación. Un intervalo de concentración útil para el transportador cargado positivamente en las composiciones inyectables de la presente invención es de aproximadamente 0,1 pg a aproximadamente 1,0 mg por unidad de la composición de toxina botulínica como se describe en el presente documento. Más preferentemente, el transportador cargado positivamente en las composiciones tóxicas de la invención está presente en el intervalo de aproximadamente 1,0 pg a 0,5 mg por unidad de toxina botulínica.

20 Las composiciones de esta invención están preferentemente en una forma que permite la inyección en la piel o el epitelio de sujetos o pacientes (es decir, seres humanos u otros mamíferos que necesiten el tratamiento particular). La expresión "que necesiten" pretende incluir necesidades tanto farmacéuticas como relacionadas con la salud (por ejemplo, condiciones de tratamiento que implican espasmos musculares faciales no deseables), así como necesidades cosméticas y subjetivas (por ejemplo, alterar o mejorar el aspecto del tejido facial). En realizaciones preferidas, las composiciones se preparan mezclando la toxina botulínica (que contiene las proteínas no tóxicas asociadas o proteínas no tóxicas asociadas reducidas) con el transportador cargado positivamente, y normalmente con uno o más transportadores o excipientes adicionales farmacéuticamente aceptables. En su forma más sencilla, estos pueden contener un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). Sin embargo, las composiciones pueden contener otros ingredientes que se encuentran típicamente en las composiciones farmacéuticas o cosmecéuticas inyectables, que incluyen un transportador, un vehículo o un medio dermatológica o farmacéuticamente aceptable, 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 los componentes de la misma así descritos son adecuados para su uso en contacto con estos tejidos o para su uso en pacientes en general, sin indebida toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica y similares. Según sea apropiado, las composiciones de la invención pueden comprender cualquier ingrediente utilizado convencionalmente en los campos en cuestión y particularmente en cosmética y dermatología.

25 En cuanto a su forma, las composiciones de esta invención pueden incluir soluciones, emulsiones (incluyendo microemulsiones), suspensiones, geles, polvos, u otras composiciones sólidas o líquidas típicas usadas para la inyección en músculos y otros tejidos donde pueden utilizarse las composiciones. En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención están presentes en formulaciones estériles, de baja viscosidad, adecuadas su para inyección con una jeringa. Las composiciones de la invención pueden estar en forma de un polvo liofilizado que se reconstituye utilizando un diluyente líquido farmacéuticamente aceptable antes de la inyección. En determinadas realizaciones, el polvo liofilizado se reconstituye con un diluyente líquido para formar una formulación inyectable con una viscosidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2000 cP, más preferentemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 500 cP, incluso más preferentemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 50 cP, e

incluso más preferentemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 2,0 cP. Las composiciones de la invención pueden contener, además de la toxina botulínica y el transportador cargado positivamente, otros ingredientes típicamente utilizados en dichos productos, tales como agentes antimicrobianos, agentes hidratantes, agentes formadores de tejido o materiales de relleno tisular, conservantes, emulsionantes, aceites naturales o sintéticos, disolventes, tensioactivos, detergentes, agentes gelificantes, antioxidantes, cargas, espesantes, polvos, agentes controladores de la viscosidad y agua, y opcionalmente incluyendo anestésicos, principios activos contra prurito, extractos botánicos, agentes acondicionadores, minerales, polifenoles, siliconas o sus derivados, vitaminas y fitomedicamentos.

Las composiciones inyectables de acuerdo con esta invención pueden estar en forma de composiciones de liberación controlada o de liberación sostenida que comprenden toxina botulínica y transportador cargado positivamente encapsulado o introducido de otro modo en un material de tal manera que se libera dentro del tejido de una manera controlada con el tiempo. La composición que comprende la toxina botulínica y el transportador cargado positivamente puede introducirse en matrices, liposomas, vesículas, microcápsulas, microesferas y similares, o en un material particulado sólido, todo lo cual se selecciona y/o se construye para proporcionar la liberación de la toxina botulínica con el tiempo. La toxina botulínica y el transportador cargado positivamente pueden encapsularse conjuntamente (es decir, en la misma cápsula) o individualmente (es decir, en cápsulas individuales).

Las formulaciones de toxina botulínica de acuerdo con la invención pueden suministrarse por inyección (típicamente usando una jeringa) a los músculos subyacentes a la piel, o a estructuras glandulares dentro de la piel, en una cantidad eficaz para producir parálisis, relajación, aliviar contracciones, prevenir o aliviar espasmos, reducir la producción glandular u otros efectos deseados. El suministro local de la toxina botulínica de esta manera proporcionaría reducciones en cuanto a la dosificación, reduciría la toxicidad y permitiría optimizar la dosificación de una manera más precisa para obtener los efectos deseados con respecto a los materiales inyectables o implantables.

Las composiciones de la invención se administran para suministrar 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 tal 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 cantidad que es suficientemente baja para impedir que aparezcan efectos secundarios graves. Los efectos deseados incluyen la relajación de determinados músculos con el objetivo de, por ejemplo, disminuir la aparición de líneas finas y/o arrugas, especialmente en el rostro, o rectificar el aspecto facial de otras maneras, tal como agrandar los ojos, levantar las comisuras de la boca, o suavizar líneas que se abren en abanico desde el labio superior, o el alivio general de la tensión muscular. El último efecto mencionado, alivio general de la tensión muscular, puede efectuarse en el rostro o en cualquier otra parte. Las composiciones de la invención pueden contener una cantidad eficaz apropiada de la toxina botulínica para su aplicación como un tratamiento de dosis única, o pueden estar más concentradas, ya sea para su dilución en el lugar de administración o para su uso en múltiples aplicaciones. Utilizando el transportador cargado positivamente de esta invención, se puede administrar una toxina botulínica por inyección a un sujeto para el tratamiento de afecciones tales como arrugas, espasmos musculares faciales no deseables u otros espasmos musculares, hiperhidrosis, acné, o afecciones en cualquier otra parte del cuerpo en la que se desee obtener un alivio del dolor muscular o de los espasmos musculares. La toxina botulínica se administra por inyección a los músculos o a otras estructuras tisulares asociadas a la piel u otras estructuras diana. La administración puede realizarse por ejemplo, en piernas, hombros, espalda (incluyendo la región lumbar), axila, palmas, pies, cuello, cara, ingle, dorso de las manos o de los pies, codos, brazos, rodillas, muslos, nalgas, tronco, pelvis y cualquier otra parte del cuerpo en el que se desee realizar la administración de la toxina botulínica.

La administración de las composiciones inyectables que contienen la toxina botulínica de esta invención, también puede llevarse a cabo para tratar otras afecciones, incluyendo cualquier afección para la cual la prevención de la transmisión sináptica, o la liberación, de acetilcolina otorgaría un efecto terapéutico. Por ejemplo, las afecciones que pueden tratarse con las composiciones según la invención incluyen, sin limitación, dolor neurológico, cefalea migrañosa u otra cefalea, vejiga hiperactiva, rinitis, sinusitis, acné, distonía, contracciones distónicas (ya sean subjetivas o clínicas), hiperhidrosis (ya sea subjetiva o clínica) e hipersecreción de una o más glándulas controladas por el sistema nervioso colinérgico. Las composiciones de esta invención también pueden usarse para reducir o potenciar la respuesta inmunitaria, o para el tratamiento de otras afecciones en las que se ha sugerido o realizado la administración de la toxina botulínica por inyección.

Más preferentemente, las composiciones las administra un médico u otro profesional sanitario, o bajo su supervisión. Se pueden administrar en un solo tratamiento o en una serie de tratamientos a lo largo del tiempo. En realizaciones preferidas, una composición según la invención se inyecta en un lugar, o lugares, donde se desea obtener un efecto asociado a la toxina botulínica. Debido a su naturaleza, la toxina botulínica se administra preferentemente en una cantidad, tasa de aplicación y frecuencia, que producirá el resultado deseado sin causar ningún resultado adverso o no deseado. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las composiciones de la invención se aplican a una tasa de aproximadamente 1 U a aproximadamente 20.000 U y más preferentemente de aproximadamente 1 U a aproximadamente 10.000 U de toxina botulínica por cm² de superficie de la piel. Se pueden emplear dosis más

elevadas dentro de estos intervalos, por ejemplo, en situaciones en las que la toxina botulínica se administra junto con materiales de liberación controlada, como se describe en este documento. En determinadas realizaciones, las formulaciones de toxina botulínica de la invención se administran para proporcionar de 1 a 400 U, más preferentemente 10 a 350 U, incluso más preferentemente 30 a 250 U y lo más preferentemente de 50 a 200 U de toxina botulínica por inyección.

Esta invención también contempla el uso de una variedad de dispositivos de suministro para inyectar a través de la piel las composiciones que contienen la toxina botulínica descritas en este documento. Dichos dispositivos pueden incluir, sin limitación, una aguja y una jeringa, o pueden implicar dispositivos más sofisticados capaces de dispensar y controlar la dispensación de la composición, y opcionalmente controlar la afección del sujeto en uno o más aspectos (por ejemplo, controlar la reacción del sujeto con respecto a las sustancias que se dispensan).

En algunas realizaciones, las composiciones pueden preformularse y/o preinstalarse en un dispositivo de suministro como tal. Esta invención también contempla realizaciones en las que las composiciones se proporcionan en un kit que conserva uno o más componentes separados de los restantes componentes. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la invención proporciona un kit que conserva por separado la toxina botulínica y el transportador cargado positivamente, para combinarse antes, o en el momento, de la aplicación. La cantidad de transportador cargado positivamente o la proporción de la concentración de estas moléculas con respecto a la toxina botulínica, dependerá del transportador seleccionado para su uso en la composición en cuestión. La cantidad o proporción apropiada de molécula transportadora en un caso dado, se puede determinar fácilmente, por ejemplo, realizando uno o más experimentos tales como los descritos más adelante.

En general, la invención también contempla un método para administrar a un sujeto o a un paciente que lo necesite, la toxina botulínica (de manera alternativa como complejos de toxina botulínica o complejos reducidos de toxina botulínica), en el que se administra una cantidad eficaz de toxina botulínica junto con un transportador cargado positivamente, como se describe en el presente documento. La expresión "junto con" significa que los dos componentes (toxina botulínica y transportador cargado positivamente) se administran en un procedimiento de combinación, que puede implicar combinarlos antes de su administración a un sujeto, o administrarlos por separado, pero de una manera tal que actúen a la vez para proporcionar el suministro requerido de una cantidad eficaz de la proteína terapéutica. Por ejemplo, una composición que contiene el transportador cargado positivamente se puede administrar primero a la piel del sujeto, seguido de la aplicación de una jeringa, u otro dispositivo que contenga la toxina botulínica. La toxina botulínica puede conservarse deshidratada en una jeringa u otro dispositivo dispensador y el transportador cargado positivamente puede inyectarse antes de la aplicación de la toxina de modo que los dos actúen a la vez dando como resultado la potenciación deseada de penetración tisular. Por tanto, en ese sentido, las dos sustancias (transportador cargado positivamente y toxina botulínica) actúan en combinación o quizá interaccionan para formar una composición o combinación *in situ*. Por consiguiente, la invención también incluye un kit con un dispositivo para dispensar la toxina botulínica y un líquido, gel o similar que contiene el transportador cargado positivamente, y que es adecuado para la inyección en la piel o en tejido diana de un sujeto. Los kits para administrar las composiciones de las invenciones, ya sea bajo la supervisión de un profesional sanitario o del paciente o sujeto, también pueden incluir un aplicador personalizado adecuado para esta finalidad.

Las composiciones de la presente invención son adecuadas para su uso en entornos fisiológicos con un pH que varía de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,3, y por lo tanto pueden tener dicho pH. Las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden conservar a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración.

Ejemplo 1

Duración de la parálisis muscular local en un modelo murino.

Este ejemplo compara la duración de la parálisis muscular local en ratones inyectados con RT003 o BOTOX®. RT003 es una formulación inyectable ejemplar según la invención que contiene toxina botulínica del tipo A (purificada para eliminar todas las proteínas no tóxicas endógenas) y un transportador cargado positivamente con la secuencia RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR. BOTOX® también contiene toxina botulínica del tipo A, pero se añade albúmina exógena para estabilizar la molécula de toxina botulínica del tipo A.

La parálisis muscular se midió utilizando el ensayo de puntuación de abducción digital (PAD) según lo comunicado por Aoki, K. R. en "A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice", *Toxicon* 2001; 39(12): 1815-1820. En el ensayo PAD, un ratón se suspende durante algún tiempo por su cola para provocar una respuesta de sobresalto característica en la que el ratón extiende sus patas traseras y abduce sus dedos traseros. El grado al cual el ratón puede mostrar esta respuesta de sobresalto se puntúa en una escala de cinco puntos (de 0 a 4), donde cero representa una respuesta de sobresalto normal y cuatro representa reducción máxima en la abducción de los dedos y extensión de la pata. La puntuación la realiza un observador sin conocer el grado al cual el ratón en cuestión ha sido tratado con neurotoxina. Utilizando el ensayo PAD, se determinó que la puntuación de referencia era de 0,4 para una población de animales no tratados.

En el estudio presentado en este ejemplo participaron diez animales (5 ratones en el grupo tratado con RT003 y

otros 5 en el grupo tratado con BOTOX®). Cada uno de los animales se inyectó tres veces con la formulación de toxina botulínica respectiva (es decir, RT003 o BOTOX®), con un período de 40 días entre cada dosificación. Después de la inyección, se contó el número de días en que todos los animales en cada grupo de ensayo estaban por encima del valor de referencia de 0,4 del ensayo PAD. Los resultados, mostrados en la FIG. 1, indican que la

5 puntuación del ensayo PAD para el grupo tratado con RT003 se mantuvo por encima del valor de referencia de 0,4 durante 25, 22 y 21 días, después del primer, segundo y tercer tratamiento, respectivamente. Por el contrario, la puntuación del ensayo PAD para el grupo tratado con BOTOX® se mantuvo por encima del valor de referencia de 0,4 durante 11,8 y 11 días, después del primer, segundo y tercer tratamiento, respectivamente.

10 Estos datos del ensayo PAD indican que la parálisis muscular local causada por la formulación de RT003 dura aproximadamente el doble que la parálisis muscular local causada por BOTOX®. Este resultado tiene implicaciones importantes para los usos terapéuticos de RT003 y otros compuestos inyectables que contienen toxina botulínica de acuerdo con la invención. En particular, usando composiciones inyectables de acuerdo con la invención, se puede

15 reducir significativamente la frecuencia de las inyecciones de seguimiento necesarias para mantener un efecto cosmético o terapéutico particular causado por la toxina botulínica. A su vez, la frecuencia de aplicación reducida puede dar como resultado una mejor eficacia a largo plazo, ya que el sujeto es menos propenso a desarrollar anticuerpos contra la toxina botulínica.

20 Ejemplo 2

Formulaciones inyectables de toxina botulínica con un perfil de seguridad mejorado

En las últimas décadas, la toxina botulínica ha encontrado uso como agente terapéutico para tratar una variedad de afecciones entre las que se incluyen arrugas, hiperhidrosis y espasmos musculares. Sin embargo, como la toxina

25 botulínica es la toxina natural más fuerte conocida por los seres humanos, la administración inadecuada de la toxina puede ser extremadamente peligrosa. Por ejemplo, el suministro sistémico accidental de la toxina botulínica puede provocar parálisis, dificultad respiratoria e incluso la muerte. Además, incluso si la toxina botulínica se suministra adecuadamente a una zona localizada del cuerpo como parte de un tratamiento terapéutico, la toxina tiene una

30 tendencia natural a difundirse con el tiempo, aumentando así el riesgo de parálisis no deseada en otras partes del cuerpo. Por ejemplo, cuando se inyecta toxina botulínica alrededor de los ojos para tratar las arrugas, esta se puede difundir a los músculos que controlan el movimiento de los párpados. Si esto sucede, los músculos del párpado pueden paralizarse parcialmente lo que lleva a una afección muy conocida denominada "ptosis palpebral", en la que el párpado está parcialmente cerrado e interfiere con la visión normal.

35 Un aspecto de esta invención es proporcionar formulaciones inyectables de toxina botulínica con un perfil de seguridad mejorado en comparación con las formulaciones de toxina botulínica comerciales actualmente disponibles. En realizaciones preferidas, las formulaciones inyectables de toxina botulínica tienen una tendencia reducida a difundirse después de la inyección. De esta forma, determinadas formulaciones preferidas de la invención permiten un suministro más preciso de la toxina botulínica, reduciendo drásticamente los efectos secundarios no

40 deseados asociados a la difusión local no controlada de la toxina botulínica.

Este ejemplo informa sobre un estudio comparativo de la tendencia de la toxina botulínica en diversas formulaciones a difundirse después de la inyección. El estudio incluyó tres formulaciones de toxina botulínica: (1) BOTOX®; (2) RT003, una solución tamponada y estabilizada que contenía la molécula de la toxina botulínica del tipo A de 150 kD

45 asociada no covalentemente a un transportador cargado positivamente que tenía la fórmula RKKRRQRRR-(K)₁₅-GRKKRRQRRR; y (3) RTT150, que es idéntica a la formulación de RT003, excepto que no contenía el transportador cargado positivamente presente en RT003.

El músculo gastrocnemio de cada uno de los ratones utilizados en el estudio se inyectó con una de las formulaciones de toxina botulínica mencionadas anteriormente, ya sea en la parte lateral a la línea media del

50 músculo (Figura 2A), o en la parte de la línea media del músculo (Figura 2B). Para determinar si la toxina botulínica de la formulación respectiva presentaba alguna tendencia a difundirse desde el músculo gastrocnemio hacia las patas traseras del ratón, se realizaron ensayos PAD en cada uno de los ratones durante cuatro días después de la inyección con la toxina botulínica. A partir de los ensayos PAD, cualquier capacidad disminuida de los animales de

55 ensayo para abducir sus dedos traseros, se interpretó como un signo de difusión de la toxina botulínica.

La Figura 3 muestra los resultados de los ensayos PAD realizados después de inyectar a los animales de ensayo las diferentes formulaciones de toxina botulínica como se describió anteriormente. Hay que tener en cuenta que las puntuaciones de abducción digital se agrupan en dos grupos, que corresponden a si la inyección fue en la línea

60 media o en la parte lateral a la línea media del músculo gastrocnemio. Las puntuaciones PAD generalmente más bajas para las inyecciones en la línea media, en comparación con las puntuaciones PAD para las inyecciones laterales a la línea media, indican que el grado de parálisis en las patas traseras de los animales de ensayo generalmente es menor después de la inyección en la línea media. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que este comportamiento es resultado de la mayor distancia que la toxina botulínica tiene que recorrer para llegar a los dedos

65 traseros de un animal de ensayo después de la inyección en la línea media, en comparación con la inyección lateral a la línea media. Se cree que esta mayor distancia de recorrido requerida por la toxina botulínica disminuye la

probabilidad de parálisis de los dedos traseros.

La Figura 3 muestra una puntuación de abducción digital de cero durante los cuatro días siguientes a la inyección en la línea media de la formulación RT003. Este resultado indica que la toxina botulínica en la formulación RT003 permanece localizada en la parte de la línea media del músculo gastrocnemio después de la inyección y que no produce difusión que cause parálisis durante el periodo de tiempo del experimento. Por el contrario, se observaron puntuaciones de abducción digital por encima del valor de referencia PAD de 0,4 después de la inyección de las formulaciones RTT150 y BOTOX®, siendo la puntuación PAD promedio más alta para la formulación BOTOX®. Los resultados del ensayo PAD para las formulaciones RTT150 y BOTOX® indican que se observó parálisis de los dedos traseros de los animales de ensayo después de la inyección de estas formulaciones en la línea media, observándose un mayor grado de parálisis después de la inyección de la formulación BOTOX®. Estos datos sugieren que las moléculas de toxina botulínica en las formulaciones RTT150 y BOTOX® son capaces de difundirse localmente después de la inyección, con un mayor grado de difusión local para las moléculas de toxina botulínica en la formulación BOTOX®.

La Figura 3 también muestra que en todos los animales de ensayo se observa parálisis de los dedos traseros después de inyección lateral a la línea media, independientemente de la formulación de toxina botulínica específica. Como se indicó anteriormente, se cree que este mayor grado de parálisis después de inyección lateral a la línea media, en comparación con la inyección en la línea media, se relaciona con una distancia de recorrido más corta para la toxina botulínica a las patas traseras de los animales de ensayo. Sin embargo, aunque las tres formulaciones de toxina botulínica presentan difusión causante de parálisis después de inyección lateral a la línea media, el grado de parálisis en los animales de ensayo inyectados con RT003 es, en promedio, menor que el grado de parálisis observado para las formulaciones RTT150 y BOTOX® durante el periodo de tiempo del experimento. Por tanto, los datos del ensayo PAD que corresponden a la inyección lateral a la línea media son cualitativamente similares a los de la inyección en la línea media porque muestran una tendencia disminuida a la difusión local de la toxina botulínica para la formulación RT003, en comparación con RTT150 y BOTOX®.

Teniendo en cuenta un parámetro denominado “índice de difusión”, que se define de acuerdo con la ecuación (1), se puede hacer una comparación de la velocidad de difusión local después de inyección en la línea media e inyección lateral a la línea media:

$$\text{índice de difusión} = \frac{\text{puntuación de abducción digital en la línea media}}{\text{puntuación de abducción digital lateral a la línea media}} \times 100. \quad (1)$$

Dado que las puntuaciones de abducción digital pueden variar de 0 a 4, y que se espera que las puntuaciones de abducción digital lateral a la línea media sean más altas que las puntuaciones de abducción digital en la línea media (como se indicó anteriormente), los valores del índice de difusión típicamente varían de 0 a 100. Un valor del índice de difusión que se aproxima a 100 indica que la relación entre las puntuaciones de abducción digital en la línea media y lateral a la línea media se aproxima a la unidad. Esto puede ocurrir si después de la inyección las velocidades de difusión son lo suficientemente altas como para que los tiempos de difusión para que la toxina botulínica alcance y paralice los dedos traseros del animal de ensayo después de inyección en la línea media y lateral a la línea media, sean comparables o casi iguales. En el otro extremo, los valores del índice de difusión que se aproximan a cero indican que la relación entre las puntuaciones de abducción digital en la línea media y lateral a la línea media se aproxima a cero. Esto puede ocurrir si la difusión de la toxina botulínica después de la inyección en la línea media es tan baja que es insuficiente para causar parálisis en los dedos traseros de los animales de ensayo, incluso aunque se observe parálisis después de la inyección lateral a la línea media.

La Tabla 1 muestra valores del índice de difusión calculados utilizando puntuaciones de abducción digital después de inyección en la línea media o lateral a la línea media de BOTOX®, RT003 y RTT150, según se informa en el experimento correspondiente a la Figura 3. En el periodo de tiempo del experimento, los valores del índice de difusión correspondientes a la inyección de la formulación BOTOX® son superiores a los valores observados para las formulaciones RTT150 y RT003. Esto indica que, para la inyección de la formulación BOTOX®, la relación de las puntuaciones de abducción digital en la línea media y lateral a la línea media está más próxima a la unidad, en comparación con las relaciones observadas para las formulaciones RTT150 y RT003. Dado que la toxina botulínica se debe difundir adicionalmente para causar la parálisis de los dedos traseros de un animal de ensayo después de inyección en la línea media, la observación de que la relación de las puntuaciones de abducción digital en la línea media y lateral a la línea media después de la inyección de BOTOX® está más próxima a la unidad, sugiere que la velocidad de difusión de la toxina botulínica después de la inyección en la línea media de BOTOX® es bastante sustancial en relación con la velocidad después de inyección lateral a la línea media. En otras palabras, la mayor longitud de trayectoria de difusión asociada a la inyección en la línea media es una barrera menor para causar la parálisis de los dedos traseros.

En cambio, los valores del índice de difusión para RT003 son todos cero en el periodo de tiempo de cuatro días del experimento. Este resultado indica que no se observa difusión que induzca parálisis después de la inyección en la línea media de RT003. En otras palabras, la formulación RT003, que contiene la molécula de toxina botulínica del

tipo A asociada no covalentemente con un transportador cargado positivamente, permite potenciar la localización de la toxina botulínica del tipo A inyectada. De esta manera, la formulación RT003 proporciona un perfil de seguridad mejorado en comparación con el de la formulación BOTOX® y minimiza la parálisis no deseada.

5 Los valores del índice de difusión observados para RTT150, aunque no son cero como ocurre en el caso de RT003, son todavía menores que los observados para la formulación BOTOX® [véase la Tabla 1]. Este resultado indica que se produce suficiente difusión de la toxina botulínica para producir parálisis de los dedos traseros observable en el período de tiempo de cuatro días del experimento, pero que el tiempo necesario para la difusión de la toxina botulínica causante de la parálisis es relativamente más prolongado después de la inyección en la línea media.

10

Tabla 1: mediciones del índice de difusión de la toxina botulínica para RTT150, BOTOX® y RT003.

	Días Después del Tratamiento				
	0	1	2	3	4
BOTOX®	NA	42	38	38	9
RT003	NA	0	0	0	0
RTT150	NA	20	20	27	17

Ejemplo 3

15 Formulaciones inyectables de toxina botulínica con tendencia reducida a generar anticuerpos

Cuando la toxina botulínica se inyecta periódicamente a un paciente para tratar una afección no deseada, tal como arrugas, a menudo se observa que la eficacia de la toxina botulínica disminuye con inyecciones sucesivas, incluso aunque la duración de los efectos de la toxina botulínica pueda seguir siendo la misma. Se cree que este fenómeno es el resultado de la formación de anticuerpos contra la toxina botulínica por parte del sistema inmunitario del paciente. Desde una perspectiva de tratamiento, la formación de anticuerpos contra la toxina botulínica por el paciente no es deseable, ya que después se requieren dosis cada vez mayores de toxina botulínica para lograr el mismo efecto, lo que presenta problemas graves relacionados con la seguridad y costes.

20

25 En determinadas realizaciones, esta invención proporciona formulaciones inyectables de toxina botulínica que tienen una tendencia disminuida a inducir la formación de anticuerpos, en comparación con las formulaciones inyectables comerciales de toxina botulínica actualmente disponibles. Por lo tanto, en estas realizaciones, las formulaciones de toxina botulínica ayudan a minimizar el riesgo asociado a la inyección de la toxina botulínica al permitir que, con el tiempo, se use menos toxina para lograr el mismo efecto.

30

En este ejemplo, los datos del ensayo PAD obtenidos después de inyecciones repetidas de RT003 y BOTOX®, como se describe en el Ejemplo 2, se analizaron en función del tiempo para determinar cómo la eficacia de estas dos formulaciones cambia después la administración repetida a los mismos animales de ensayo. Generalmente, después de la administración repetida de cualquier formulación, la duración de los efectos asociados a la toxina botulínica fue la misma. Sin embargo, el grado de parálisis muscular después de la administración repetida varió dependiendo de la formulación. Para cuantificar el cambio en el grado de parálisis muscular, el porcentaje de cambio en las puntuaciones de abducción digital después de la inyección de RT003 o BOTOX® se determinó de acuerdo con la ecuación (2).

35

$$\% \text{ de cambio en PAD} = \frac{\text{PAD para enésimo tratamiento} - \text{PAD para primer tratamiento}}{\text{PAD para primer tratamiento}} \times 100 \% \quad (2)$$

40

Dado que el numerador de la ecuación (2) es la diferencia entre las puntuaciones de abducción digital medidas para el enésimo y el primer tratamiento, el cambio porcentual en DAS será negativo si la puntuación de abducción digital medida para el enésimo tratamiento es menor que la puntuación de abducción digital medida para el primer tratamiento. En otras palabras, el cambio porcentual en PAD es negativo cuando se observa menos parálisis después del enésimo tratamiento, en comparación con el primer tratamiento. La Tabla 2 muestra el cambio porcentual en los valores PAD medidos después de la administración repetida de las formulaciones RT003 y BOTOX® según el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

45

Tabla 2: Cambio porcentual en el valor PAD después de la administración repetida de RT003 y BOTOX®

	1er tratamiento	1er retratamiento	2º retratamiento
RT003	0 %	0 %	-30 %

BOTOX®	0 %	-44 %	-67 %
--------	-----	-------	-------

Como se indica en la Tabla 2, después del primer retratamiento, el cambio porcentual en la puntuación de abducción digital fue de -44 % para la formulación BOTOX®, lo que sugiere una disminución sustancial en la eficacia. Por el contrario, el cambio porcentual en la puntuación de abducción digital para la formulación de RT003 fue cero, lo que indica que la puntuación PAD después del segundo retratamiento fue la misma que la de después de la administración inicial y primer retratamiento. Este resultado indica que el grado de parálisis observado después del primer retratamiento con RT003 es el mismo que el grado de parálisis después del primer tratamiento y que se produjo una formación insignificativa de anticuerpos neutralizantes en los animales de ensayo incluso después del primer retratamiento. Después del segundo retratamiento de RT003 y BOTOX®, los cambios porcentuales calculados en los valores PAD fueron negativos para ambas formulaciones, aunque la magnitud del cambio porcentual en los valores PAD para la formulación RT003 fue la mitad del valor determinado para BOTOX®. El cambio porcentual mayor y negativo en los valores PAD observados para BOTOX® sugiere que los animales de ensayo tuvieron una mayor tasa de generación de anticuerpos contra BOTOX®, en comparación con RT003. Por lo tanto, estos datos indican que las formulaciones contempladas en esta invención, tales como RT003, pueden tener una menor tendencia a inducir la formación de anticuerpos que neutralizan el efecto de la toxina botulínica. De acuerdo con esto, este resultado sugiere que utilizando las formulaciones contempladas en la presente invención, con el tiempo se puede utilizar menos toxina botulínica para lograr el mismo efecto terapéutico.

Ejemplo 4

Formulaciones inyectables de toxina botulínica con estabilidad mejorada

Este ejemplo demuestra que las moléculas transportadoras cargadas positivamente utilizadas en las formulaciones inyectables de toxina botulínica de la invención, no solo potencian el perfil de seguridad de las formulaciones (Ejemplo 2), sino que también mejoran su estabilidad. La Tabla 3 muestra los resultados de experimentos de envejecimiento en los que las formulaciones RT003 y RTT150 se envejecieron a 4 °C (solo RT003) y a 40 °C (tanto RT003 como RTT150) durante diversos intervalos de tiempo. Después de envejecer a las temperaturas especificadas durante los tiempos especificados, se midió la fuerza de las formulaciones RT003 y RTT150 mediante una serie de ensayos de DL50 IP en ratón. Los resultados, resumidos en la Tabla 3, indican que la fuerza de RT003 permanece esencialmente sin cambios tras el envejecimiento a 4 °C, incluso después de seis meses. Además, la fuerza de la formulación RT003, medida por la capacidad de la formulación para destruir a los animales diana en un ensayo de DL50 IP en ratón, disminuye solo ligeramente incluso si la formulación RT003 se envejece a temperatura elevada (40 °C) durante seis meses. Por el contrario, la formulación RTT150 mostró una disminución significativa en la fuerza después de solo un mes de envejecimiento a 40 °C. Dado que las formulaciones RT003 y RTT150 son idénticas, salvo que la formulación RT003 también contiene una molécula transportadora cargada positivamente que tiene la fórmula RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR, estos datos indican que la molécula transportadora cargada positivamente mejora la estabilidad de la toxina botulínica en la formulación RT003.

Tabla 3: Resultados de ensayos de DL50 de IP en ratón después del envejecimiento de RT003 y RTT150 a diversas condiciones

	Condición (°C)	Tiempo (meses)	% Diana
RT003	4	0	100 %
	4	6	118 %
	40	6	93 %
RTT150	40	1	<50 %

40

REIVINDICACIONES

1. Un método no terapéutico de administración de toxina botulínica para obtener un efecto cosmético en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método
- 5 inyectar al individuo una cantidad eficaz de una formulación inyectable estéril que comprende una composición de toxina botulínica para obtener un efecto cosmético, donde la composición de toxina botulínica comprende
- 10 un transportador cargado positivamente que comprende la secuencia de aminoácidos RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 7),
un componente de toxina botulínica presente en una cantidad adecuada para inyección, seleccionándose el componente de toxina botulínica del grupo que consiste en un complejo de toxina botulínica, un complejo reducido de toxina botulínica y toxina botulínica, y
- 15 un diluyente farmacéuticamente aceptable adecuado para inyección, donde el transportador cargado positivamente está asociado de manera no covalente con el componente de toxina botulínica.
2. Un método de preparación de una formulación de toxina botulínica inyectable estéril, comprendiendo el método:
- 20 proporcionar un componente de toxina botulínica presente en una cantidad adecuada para inyección, seleccionándose el componente de toxina botulínica del grupo que consiste en un complejo de toxina botulínica, un complejo reducido de toxina botulínica y una toxina botulínica;
proporcionar un transportador cargado positivamente que comprende la secuencia de aminoácidos
- 25 RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 7);
combinar el componente de toxina botulínica con el transportador cargado positivamente y un diluyente farmacéuticamente aceptable para formar la formulación de toxina botulínica inyectable estéril;
donde el diluyente farmacéuticamente aceptable es adecuado para su uso en composiciones farmacéuticas inyectables o composiciones cosmecéuticas inyectables; y
- 30 donde el transportador cargado positivamente está asociado de manera no covalente con el componente de toxina botulínica;
opcionalmente comprendiendo además la etapa de conservar la formulación inyectable en una jeringa adecuada para inyectar la formulación.
- 35 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el efecto cosmético es el tratamiento de arrugas.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el componente de toxina botulínica se obtiene de los serotipos A, B, C, D, E, F o G de *C. botulinum*.
- 40 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el transportador cargado positivamente:
- (a) estabiliza la toxina botulínica contra la degradación, opcionalmente conservando su fuerza después de envejecimiento durante 6 meses a 4 °C; o
- 45 (b) reduce la difusión local de la toxina botulínica después de la inyección.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la generación de anticuerpos después de la inyección de la formulación en el cuerpo del sujeto, se reduce en comparación con la generación de anticuerpos después de la inyección de BOTOX®.
- 50 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el componente de toxina botulínica está presente en dicha composición en el intervalo de 1 a 400 U por inyección.
8. Una composición inyectable estéril para su uso en un método de administración de toxina botulínica para obtener un efecto terapéutico en un individuo que lo necesite, donde la composición comprende
- 55 un transportador cargado positivamente que comprende la secuencia de aminoácidos RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 7),
un componente de toxina botulínica presente en una cantidad adecuada para inyección, seleccionándose el componente de toxina botulínica del grupo que consiste en un complejo de toxina botulínica, un complejo reducido de toxina botulínica y toxina botulínica, y
- 60 un diluyente farmacéuticamente aceptable adecuado para inyección,
donde el transportador cargado positivamente está asociado de manera no covalente con el componente de toxina botulínica, y
el método comprende inyectar al individuo una cantidad eficaz de la composición inyectable estéril para obtener un efecto terapéutico;
- 65 donde el efecto terapéutico es la reducción de un síntoma asociado a un trastorno seleccionado del grupo que

consiste en espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica de aparición en adultos, fisura anal, blefaroespasma, parálisis cerebral, migraña, estrabismo, trastorno de la articulación temporomandibular, dolor neurológico, vejiga hiperactiva, rinitis, sinusitis, acné, distonía, contracciones distónicas, hiperhidrosis e hipersecreción de una glándula controlada por el sistema nervioso colinérgico.

- 5
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, donde el componente de toxina botulínica se obtiene de los serotipos A, B, C, D, E, F o G de *C. botulinum*.
- 10
10. Una composición como se reivindica en la reivindicación 8, donde el transportador cargado positivamente:
- (a) estabiliza la toxina botulínica contra la degradación, opcionalmente conservando su fuerza después de envejecimiento durante 6 meses a 4 °C; o
 - (b) reduce la difusión local de la toxina botulínica después de la inyección.
- 15
11. Una composición como se reivindica en la reivindicación 8, para la cual la generación de anticuerpos después de la inyección de la composición en el cuerpo del sujeto se reduce en comparación con la generación de anticuerpos después de la inyección de BOTOX®.
- 20
12. Una composición inyectable estéril para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal, donde la composición es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.
- 25
13. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde el componente de toxina botulínica está presente en dicha composición en el intervalo de 10 a 350 U por inyección.
- 30
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, donde el componente de toxina botulínica está presente en dicha composición en el intervalo de 30 a 250 U por inyección.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde el componente de toxina botulínica está presente en dicha composición en el intervalo de 50 a 200 U por inyección.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, donde el componente de toxina botulínica está presente en dicha composición en el intervalo de 10 a 200 U por inyección.

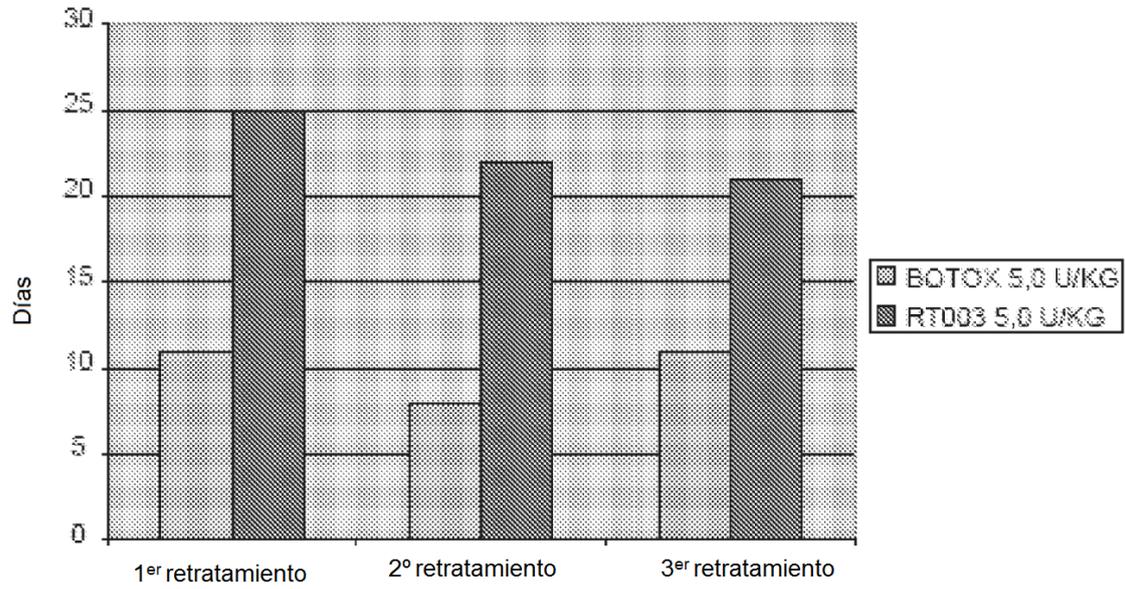
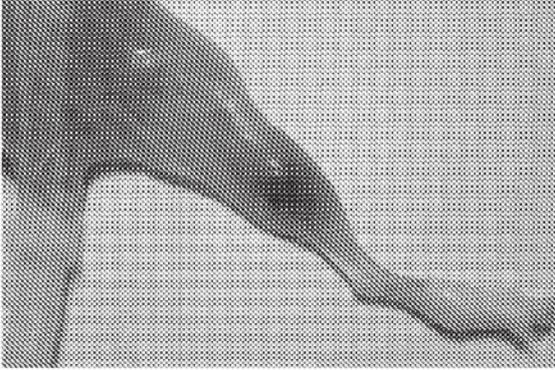
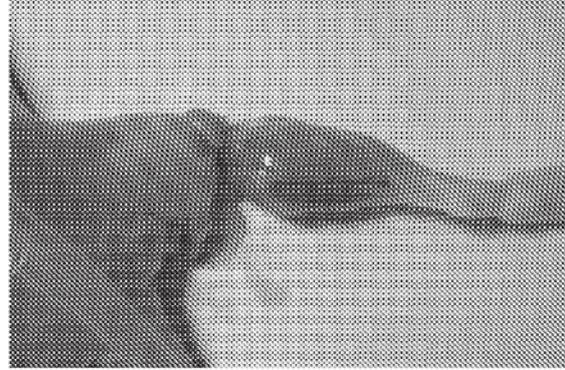


FIGURA 1



Inyección lateral a la línea media

(A)



Inyección en la línea media

(B)

FIGURA 2

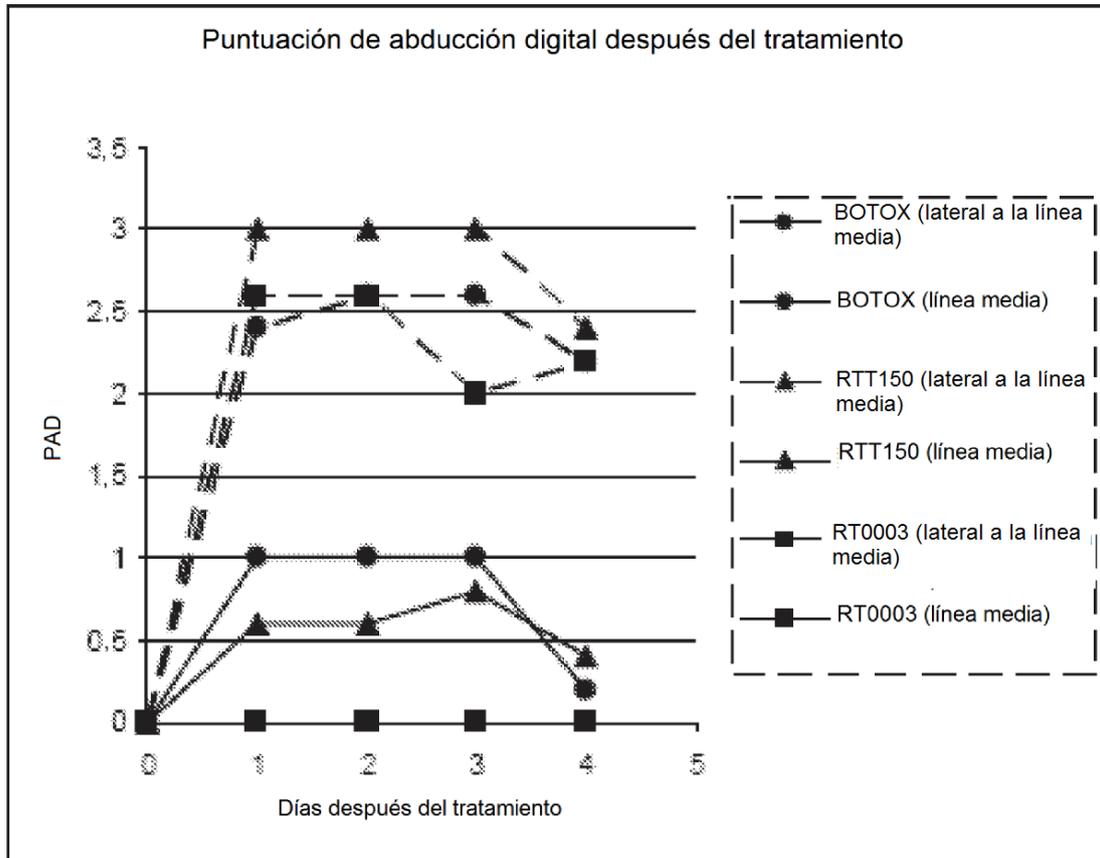


FIGURA 3