(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 710 781**

(51) Int. CI.:

A61K 39/08 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
A61K 8/34 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 8/06 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2006 E 16174750 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 3144013**

(54) Título: **Nanoemulsiones de botulinum**

(30) Prioridad:

01.12.2005 US 741139 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2019

(73) Titular/es:

UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS LOWELL (100.0%)
One Beacon Street, 31st Floor
Boston, MA 02108, US

(72) Inventor/es:

EDELSON, JONATHAN. y
NICOLOSI, ROBERT J.

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Nanoemulsiones de botulinum

Solicitudes relacionadas

La presente solicitud está relacionada con y reivindica prioridad bajo 35 USC 119(e) de la USSN 60/741,139, presentada el 1 de diciembre de 2005.

Antecedente

La toxina de botulinum se ha usado en dermatología cosmética para tratar una variedad de afecciones y trastornos de la piel. Por ejemplo, la toxina de botulinum se ha usado para tratar arrugas (por ejemplo, líneas faciales hipercinéticas), bandas de platisma, bandas de escote, hiperhidrosis y ciertos trastornos neuromusculares. Típicamente, la toxina de botulinum se administra por inyección en el sitio de interés (es decir, en el grupo muscular relevante responsable de la formación de arrugas o bandas, en la piel que contiene glándulas sudoríparas, etc.).

Desafortunadamente, las estrategias actuales para administrar la toxina de botulinum generan numerosos efectos adversos. Por ejemplo, técnicas de inyección inadecuadas pueden dañar el tejido y/o pueden liberar toxina de botulinum en lugares no buscados y/o no deseados. En la región periocular, la ptosis del párpado y la frente tienen efectos adversos importantes. También pueden presentarse dolor, hematoma, equimosis y moretones.

Aunque se han desarrollado técnicas (por ejemplo, enfriamiento de la piel antes de la inyección para reducir el dolor, hematoma, equimosis y moretones) que pueden minimizar ciertos efectos secundarios, sigue existiendo la necesidad del desarrollo de sistemas y/o formulaciones mejorados para administrar toxina de botulinum.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona composiciones de nanopartículas (por ejemplo, nanoemulsiones) que contienen toxina de botulinum, de acuerdo con las reivindicaciones anexas. Tales composiciones son útiles, por ejemplo, en diversas aplicaciones cosméticas y médicas. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones de nanopartículas de botulinum se utilizan para suavizar las arrugas. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones de nanopartículas de botulinum se utilizan para tratar la hiperhidrosis. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones de nanopartículas de botulinum se utilizan para tratar la contractura y/o hiperactividad muscular. Otros usos de las composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención se describen en el presente documento y/o serán evidentes para los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones de la presente invención, las composiciones de nanopartículas de botulinum se preparan por exposición a fuerzas de cizallamiento elevadas; en algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de botulinum se preparan mediante microfluidización; en algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de botulinum se preparan por homogeneización a alta presión.

Las composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención pueden administrarse por cualquier medio disponible que incluye, pero no se limita a, vía transdérmica y por inyección (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular). La presente invención abarca el descubrimiento de que ciertas composiciones de nanopartículas de toxina de botulinum pueden administrarse por vía transdérmica sin cambiar o alterar la estructura de la piel. Por ejemplo, no son necesarios agentes abrasivos o agentes que erosionan o deterioran la capa superficial de la piel para lograr la administración transdérmica de toxina de botulinum de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, en muchas realizaciones, la administración transdérmica de toxina de botulinum se realiza sin irritación significativa en la piel.

De acuerdo con la presente invención, la administración transdérmica puede realizarse en cualquiera de una variedad de formatos. En algunas realizaciones, se incorpora una composición de nanopartículas de botulinum de la invención dentro de una crema de manera que la toxina de botulinum se administre a un sujeto mediante la aplicación de la crema sobre la piel. En algunas realizaciones, se incorpora una composición de nanopartículas de botulinum de la invención dentro de un parche transdérmico de manera que la toxina de botulinum se administra a un sujeto a partir del parche.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención son emulsiones que contienen una población de partículas que tienen diámetros máximo y mínimo, en donde la diferencia entre los diámetros máximo y mínimo no supera aproximadamente 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50 nm o menos.

En algunas realizaciones, las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención tienen diámetros que son menores que aproximadamente 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 130, 120, 115, 110, 100, 90, 80 nm o menos.

En algunas realizaciones, las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención tienen diámetros dentro del intervalo de aproximadamente 10 y aproximadamente 600 nanómetros. En algunas realizaciones, las partículas dentro de las composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención tienen diámetros dentro del intervalo de aproximadamente 10-300, 10-200, 10-150, 10-130, 10-120, 10-115, 10-110, 10-100, o 10-90 nm.

En algunas realizaciones, las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención tienen un tamaño de partícula promedio que está por debajo de aproximadamente 300, 250, 200, 150, 130, 120 o 115, 110, 100, o 90 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula está dentro del intervalo de aproximadamente 10-300, 50-250, 60-200, 65-150, 70-130 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula es aproximadamente 80-110 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula es aproximadamente 90-100 nm.

En algunas realizaciones, la mayoría de las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de las composiciones de la invención tienen diámetros inferiores a un tamaño específico o dentro de un intervalo especificado. En algunas realizaciones, la mayoría es más de 50% 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% o más de las partículas en la composición.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la invención están sustancialmente libres de partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) que tienen diámetros mayores que aproximadamente 120 nanómetros. En algunas realizaciones, las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención tienen diámetros dentro del intervalo de aproximadamente 30 y aproximadamente 115 nanómetros. En algunas realizaciones, la mayoría de las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de la composición tienen diámetros dentro de este intervalo; en algunas realizaciones, tales composiciones están sustancialmente libres de partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) que tienen diámetros mayores que aproximadamente 115 nanómetros. En algunas realizaciones, las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención tienen diámetros dentro del intervalo de aproximadamente 30 a aproximadamente 70 nanómetros. En algunas realizaciones, la mayoría de las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de tales composiciones tienen diámetros dentro de este intervalo; en algunas realizaciones, las composiciones están sustancialmente libres de partículas con diámetros mayores que aproximadamente 70 nanómetros.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la invención tienen al menos dos poblaciones distintas de partículas. Por ejemplo, en algunas de tales realizaciones, la mayoría de las partículas en las composiciones de nanopartículas de la invención tienen diámetros dentro del intervalo de aproximadamente 30-70 nm, mientras que una segunda población de partículas tiene diámetros dentro del intervalo de 70-120 nm. En algunas de tales realizaciones, la composición no está contaminada con partículas mayores de 120 nm de diámetro.

En algunas realizaciones, la toxina de botulinum está presente parcial o completamente dentro de nanopartículas en composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención; en algunas realizaciones, la toxina de botulinum se adsorbe en la superficie de nanopartículas en composiciones de botulinum de la invención; en algunas realizaciones, la toxina de botulinum está asociada con la interfaz entre las nanopartículas y el medio de dispersión. En algunas realizaciones, la toxina de botulinum se encuentra en dos o más de estas ubicaciones dentro de la composición de nanopartículas.

En algunas realizaciones de la invención, la toxina de botulinum se selecciona del grupo que consiste en tipo A, tipo B, tipo C_1, tipo C_2, tipo D, tipo F y tipo G. En algunas realizaciones, la toxina de botulinum está presente como una proteína aislada; en algunas realizaciones, la toxina de botulinum está presente como parte de un complejo de proteína.

Definiciones

Abrasión: el término "abrasión", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier medio para alterar, romper, eliminar o destruir la capa superior de la piel. En algunas realizaciones, la abrasión se refiere a un medio mecánico para alterar, romper, eliminar o destruir la capa superior de la piel. En algunas realizaciones, la abrasión se refiere a un medio químico para alterar, romper, eliminar o destruir la capa superior de la piel. Para dar solo algunos ejemplos, agentes tales como exfoliantes, partículas finas (por ejemplo, partículas de magnesio o aluminio), ácidos (por ejemplo, alfahidroxiácidos o betahidroxiácidos), alcoholes, pueden causar abrasión. En general, potenciadores de la penetración tales como los descritos, por ejemplo, por Donovan (por ejemplo, las Publicaciones de los Estados Unidos 2004/009180 y 2005/175636 y la Publicación PCT WO 04/06954) y Graham (por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 6,939,852 y la Publicación de los Estados Unidos 2006/093624) , etc., se espera que causen abrasión. Por supuesto, los expertos en la técnica apreciarán que un agente particular puede causar abrasión cuando está presente en una concentración, o en asociación con uno o más agentes diferentes, pero puede no provocar abrasión en diferentes circunstancias. Por lo tanto, si un material en particular es o no un "agente abrasivo" depende del contexto. La abrasión puede evaluarse fácilmente por los expertos habituales en la técnica, por ejemplo mediante

observación de enrojecimiento o irritación de la piel y/o examen histológico de la piel que muestra alteración, rotura, eliminación o erosión del estrato córneo.

Administración: El término "administración", como se usa en el presente documento para referirse a la administración de una composición de nanopartículas de la invención a un sujeto, no se limita a ninguna ruta particular, sino que se refiere a cualquier ruta aceptada según sea apropiado por la comunidad médica. Por ejemplo, la presente invención contempla rutas de suministro o administración que incluyen, aunque sin limitación, transdérmica, intramuscular o subcutánea. En ciertas realizaciones de la invención, la administración es transdérmica.

Agente biológicamente activo: Como se usa en el presente documento, la frase "agente biológicamente activo" se refiere a cualquier sustancia que tenga actividad en un sistema biológico y/u organismo. Por ejemplo, una sustancia que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera que es biológicamente activa. En realizaciones particulares, cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una porción de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido se denomina típicamente como una porción "biológicamente activa". La toxina de botulinum es un agente biológicamente activo de acuerdo con la presente invención.

Composición de nanopartículas de botulinum: el término "composición de nanopartículas de botulinum", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier composición de nanopartículas en la que al menos una nanopartícula incluye toxina de botulinum. La toxina de botulinum puede estar presente dentro de la nanopartícula, en la superficie de la nanopartícula y/o dentro de una membrana micelar que define la nanopartícula.

Toxina de botulinum: el término "toxina de botulinum", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier neurotoxina producida por *Clostridium botulinum*. Excepto que se indique lo contrario, el término abarca fragmentos o porciones (por ejemplo, la cadena ligera y/o la cadena pesada) de dicha neurotoxina que retiene actividad apropiada (por ejemplo, actividad relajante muscular). La frase "toxina de botulinum", como se usa en el presente documento, abarca los serotipos de toxina de botulinum A, B, C, D, E, F y G. La toxina de botulinum, como se usa en el presente documento, también abarca un complejo de toxina de botulinum (es decir, por ejemplo, los complejos de 300, 600 y 900 kD) así como la toxina de botulinum purificada (es decir, por ejemplo, aislada) (es decir, por ejemplo, aproximadamente 150 kD). La "toxina de botulinum purificada" se define como una toxina de botulinum que está aislada o sustancialmente aislada de otras proteínas, incluida la proteína que es un complejo de toxina de botulinum. Una toxina purificada puede ser mayor que 95% pura, y preferiblemente es mayor que 99% pura. Los expertos en la técnica apreciarán que la presente invención no está limitada a ninguna fuente particular de toxina de botulinum. Por ejemplo, la toxina de botulinum para uso de acuerdo con la presente invención se puede aislar a partir de *Clostridium botulinum*, se puede sintetizar químicamente, se puede producir de forma recombinante (es decir, en una célula huésped u organismo distinto de *Clostridium botulinum*), etc.

Cosmecéutico: el término "cosmecéutico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente (por ejemplo, peróxido de benzoilo o retinol) que posea propiedades cosméticas y farmacéuticas. Un cosmecéutico generalmente es útil para aplicaciones externas para mejorar el aspecto o la apariencia física general. Los cosmecéuticos se pueden aplicar como composiciones que incluyen, pero no se limitan a, cremas, aceites, espumas, aerosoles, líquidos, etc. Por citar solo algunos ejemplos, los carotenoides, compuestos fenólicos y/o antioxidantes solubles en agua pueden actuar como cosmecéuticos.

Formulación cosmética: el término "formulación cosmética" se usa en el presente documento para referirse a una composición aplicada tópicamente que contiene uno o más agentes que tienen propiedades cosméticas. Para dar algunos ejemplos, una formulación cosmética puede ser un suavizante de la piel, emulsión tipo loción de nutrición, loción limpiadora, crema limpiadora, leche para la piel, loción emoliente, crema de masaje, crema emoliente, base de maquillaje, lápiz labial, paquete facial o facial en gel, limpiadora como champús, enjuagues, limpiadores corporales, tónicos para el cabello o jabones, y/o una composición dermatológica tal como loción, ungüento, gel, crema, parche y/o aerosol.

Crema: El término "crema" se refiere a una composición extensible, formulada típicamente para aplicación a la piel. Las cremas típicamente contienen una matriz basada en aceite y/o ácido graso. Las cremas formuladas según la presente invención pueden contener nanopartículas y pueden ser capaces de una penetración sustancialmente completa (por ejemplo, de tales nanopartículas) a través de la piel tras la administración tópica. Tal crema también podría actuar como un vehículo para materiales incorporados (por ejemplo, para una toxina de botulinum).

Medio de dispersión: el término "medio de dispersión" como se usa en el presente documento, se refiere a un medio líquido en el que se dispersan partículas (por ejemplo, nanopartículas). En general, se forma una dispersión cuando se combinan al menos dos materiales inmiscibles. Una dispersión de "aceite en agua" es una en la que las partículas oleosas se dispersan dentro de un medio de dispersión acuoso. Una dispersión de "agua en aceite" es una en la que las partículas acuosas se dispersan dentro de un medio de dispersión oleosa. Los expertos en la materia apreciarán que se puede formar una dispersión a partir de dos medios inmiscibles y no se limita estrictamente a combinaciones de medios acuosos y aceitosos. El término "medio de dispersión" por lo tanto se aplica ampliamente a cualquier medio de dispersión a pesar de que es común referirse a categorías "acuosas" y "oleosas".

Encapsulado: el término "encapsulado" (también "encapsular" o "que encapsula") se usa en el presente documento para indicar que la entidad encapsulada está completamente rodeada por otro material. Para dar solo un ejemplo, un agente biológicamente activo (por ejemplo, toxina de botulinum) se puede encapsular dentro de una nanopartícula en una emulsión de la invención. Tal encapsulación se puede lograr, por ejemplo, durante la formación de una composición de nanopartículas (por ejemplo, una nanoemulsión), por ejemplo durante la microfluidización.

En conjunción con: Tal como se usa en el presente documento, la frase administrado "en conjunción con" se refiere a la coparticipación de dos o más cosas. En particular, de acuerdo con la presente invención, la frase se usa en el presente documento con referencia a la administración de un agente biológicamente activo con nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas de la invención. Una sustancia o agente se administra junto con nanopartículas cuando la sustancia o agente se combina con nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas; está encapsulado o completamente rodeado de nanopartículas; está asociado con una interfaz de nanopartículas; y/o está adsorbido a la superficie externa de una nanopartícula. Una sustancia o agente para ser administrado junto con nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas puede o no estar unido covalentemente a las nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas. Una sustancia o agente para ser administrado junto con nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas puede o no estar unida a las nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas por fuerzas de adsorción. En muchas realizaciones de la presente invención, el agente biológicamente activo entregado junto con una composición de nanopartículas o nanopartículas es la toxina de botulinum.

Microfluidizado: el término "microfluidizado" se usa en general en este documento para describir composiciones que han sido expuestas a una alta fuerza de cizallamiento. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones se han procesado mediante un instrumento o dispositivo conocido como "microfluidizador". Sin embargo, en su sentido más amplio, el término abarca cualquier composición que haya estado expuesta a alta fuerza de corte por cualquier medio. Por ejemplo, la fuerza de alto cizallamiento puede administrarse por cavitación o por homogeneización a alta presión. Alternativa o adicionalmente, se puede administrar una alta fuerza de cizallamiento por exposición a alta presión, por ejemplo aproximadamente 15,000 psi. En algunas realizaciones, dicha alta presión está dentro del intervalo de aproximadamente 18,000 a aproximadamente 26,000 psi; en algunas realizaciones, está dentro del intervalo de aproximadamente 20,000 a 25,000 psi. Como se ha indicado, se puede administrar una fuerza de cizallamiento elevada mediante el paso a través de un instrumento tal como, por ejemplo, un procesador Microfluidizer® (Microfluidics Corporation/MFIC Corporation) u otro dispositivo similar. Los procesadores Microfluidizer® proporcionan alta presión y una alta velocidad de cizalla resultante al acelerar el producto a través de microcanales a una alta velocidad para reducir el tamaño al rango de nanoescala. El fluido se divide en dos y se empuja a través de microcanales con dimensiones típicas del orden de 75 micras a altas velocidades (en el rango de 50-300 m/s). A medida que el fluido sale de los microcanales, forma chorros que chocan con chorros de microcanales opuestos. En los canales, el fluido experimenta alta cizalladura (hasta 10^7 1/s), que es un orden de magnitud mayor que el de las tecnologías convencionales. Las colisiones de chorro dan como resultado una mezcla en nivel submicrométrico. Por lo tanto, el alto cizallamiento y el impacto son responsables de la reducción del tamaño de partícula y la mezcla de fluidos multifásicos en la tecnología Microfluidizer®. En algunas realizaciones de la presente invención, una muestra se "microfluidiza" a través de la exposición a fuerzas de cizallamiento elevadas durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 10 minutos. En algunas realizaciones, el período de tiempo es menor que aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 minuto(s). En algunas realizaciones, el período de tiempo está dentro del intervalo de aproximadamente 1-2 minutos o menos; en algunas realizaciones, el período de tiempo es aproximadamente 30 segundos. En algunas realizaciones de la invención, una muestra se "microfluidiza" a través de una única exposición a altas fuerzas de cizallamiento; tales realizaciones se denominan aquí microfluidización de "un solo paso".

Nanoemulsión: una emulsión se define tradicionalmente en la técnica "como un sistema ... que consiste en un líquido disperso con o sin un emulsionante en un líquido inmiscible generalmente en gotas de tamaño mayor que el coloidal" Medline Plus Online Medical Dictionary, Merriam Webster (2005)) El término "nanoemulsión", como se usa en el presente documento, se refiere a una emulsión en la que al menos algunas de las gotitas (o partículas) tienen diámetros en el rango de tamaño nanométrico. Como entenderán los expertos normales en la técnica, una nanoemulsión se caracteriza por gotitas o partículas mil veces más pequeñas que las gotitas o partículas de la microemulsión.

Nanopartícula: como se usa en este documento, el término "nanopartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro de menos de 1000 nanómetros (nm). En algunas realizaciones, una nanopartícula tiene un diámetro de menos de 300 nm, como se define por la National Science Foundation. En algunas realizaciones, una nanopartícula tiene un diámetro de menos de 100 nm según lo definido por los National Institutes of Health. Los expertos en la técnica apreciarán que, el término "nanopartícula", como se usa en el presente documento, describe la fase dispersa en una dispersión o emulsión.

Composición de nanopartículas: como se usa en este documento, el término "composición de nanopartículas" se refiere a cualquier composición que incluye al menos una nanopartícula. En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas es una colección uniforme de nanopartículas. Las composiciones de nanopartículas descritas aquí son típicamente emulsiones o dispersiones. En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas es estable. En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas incluye uno o más agentes biológicamente activos para

ser administrados junto con las nanopartículas. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas es una nanoemulsión. Los expertos en la técnica apreciarán que una composición de nanopartículas se puede preparar de acuerdo con cualquier medio disponible que incluya, por ejemplo, medios químicos o mecánicos. En algunas realizaciones de la presente invención, se prepara una composición de nanopartículas sometiendo una muestra a microfluidización. En algunas realizaciones de la invención, se prepara una composición de nanopartículas sin uso de disolventes tóxicos y/o está sustancialmente libre de disolventes tóxicos.

No contaminada con: La frase "no contaminada con", cuando se usa en este documento para referirse a una composición de nanopartículas, es sinónimo de "sustancialmente libre de" y describe una composición de nanopartículas que contiene no más de aproximadamente el 50% del material mencionado. Por ejemplo, si se dice que una composición de nanopartículas está "sustancialmente libre de" partículas cuyo diámetro está fuera de un rango establecido, entonces no más de aproximadamente 50% de las partículas en esa composición tienen diámetros fuera del rango. En algunas realizaciones, no más del 25% de las partículas están fuera del rango. En algunas realizaciones, no más de 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5 %, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% o menos de las partículas tienen diámetros fuera del rango establecido.

Farmacéuticamente aceptable: el término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento, se refiere a agentes que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, alergia respuesta, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

Premezcla: El término "premezcla", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier combinación de componentes que se usa posteriormente para generar una composición de nanopartículas o de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, una premezcla es cualquier colección de ingredientes que, cuando se somete a una alta fuerza de cizallamiento, genera nanopartículas de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, una premezcla es una colección de ingredientes que, cuando se somete a una alta fuerza de cizalla, genera una composición de nanopartículas tal como una composición uniforme de nanopartículas. Una premezcla a menudo contiene un medio de dispersión líquido y otros componentes suficientes para generar nanopartículas dentro del medio de dispersión. De acuerdo con la presente invención, la toxina de botulinum también se puede incluir en la premezcla. La premezcla también puede contener uno o más tensioactivos y/u otros agentes. En algunas realizaciones, la premezcla constituye una solución. En algunas realizaciones particulares en las que la premezcla incluye toxina de botulinum y/u otro agente biológicamente activo, la toxina de botulinum (y/u otro agente biológicamente activo) está en solución antes de aplicar una alta fuerza de cizallamiento a la premezcla.

Refractario: el término "refractario", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sujeto que no responde con una eficacia clínica esperada después de la administración de un agente biológicamente activo o una composición farmacéutica como normalmente observa el personal médico en ejercicio.

Autoadministración: el término "autoadministración", como se usa en el presente documento, se refiere a la situación en la que un sujeto tiene la capacidad de administrar una composición a sí mismo sin requerir supervisión médica. En algunas realizaciones de la invención, la autoadministración puede realizarse fuera de un entorno clínico. Para dar un solo ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, una crema cosmética facial puede ser administrada por un sujeto en su propia casa.

Molécula pequeña: en general, se entiende en la técnica que una "molécula pequeña" es una molécula orgánica que tiene un tamaño menor que aproximadamente 5 kilodalton (Kd). En algunas realizaciones, la molécula pequeña es menor que aproximadamente 3 Kd, 2 Kd o 1 Kd. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es menor que aproximadamente 800 daltons (D), 600D, 500D, 400D, 300D, 200D o 100D. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas no son poliméricas. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas no son proteínas, péptidos o aminoácidos. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas no son ácidos nucleicos o nucleótidos. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas no son sacáridos o polisacáridos.

Estable: el término "estable", cuando se aplica a las composiciones de nanopartículas de esta memoria, significa que las composiciones mantienen uno o más aspectos de su estructura física (por ejemplo, rango de tamaño y/o distribución de partículas) durante un período de tiempo. En algunas realizaciones de la invención, una composición de nanopartícula estable es aquella para el tamaño de partícula promedio, el tamaño de partícula máximo, el rango de tamaños de partícula y/o la distribución de tamaños de partícula (es decir, el porcentaje de partículas por encima de un tamaño designado y/o fuera de un rango designado de tamaños) se mantiene durante un período de tiempo.

En algunas realizaciones, el período de tiempo es al menos aproximadamente una hora; en algunas realizaciones, el período de tiempo es de aproximadamente 5 horas, 10 horas, un (1) día, una (1) semana, dos (2) semanas, un (1) mes, dos (2) meses, tres (3) meses, cuatro (4) meses, cinco (5) meses, seis (6) meses, ocho (8) meses, diez (10) meses, doce (12) meses, veinticuatro (24) meses o más. En algunas realizaciones, el período de tiempo está dentro del intervalo de aproximadamente un (1) día a veinticuatro (24) meses, dos (2) semanas a doce (12) meses, dos (2) meses a cinco (5) meses, etc. Por ejemplo, si una población de partículas de nanoemulsión se somete a un almacenamiento prolongado, cambios de temperatura y/o cambios de pH y la mayoría de las nanopartículas en la

población mantienen un diámetro dentro de un rango establecido (es decir, por ejemplo, entre aproximadamente 10-120 nm), la nanoemulsión es estable. Para algunas de estas poblaciones, la mayoría es más de aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% o más. En algunas realizaciones de la invención, cuando una composición de nanopartículas comprende toxina de botulinum y/o al menos otro agente biológicamente activo, la composición de nanopartículas se considera estable si la concentración de agente biológicamente activo (por ejemplo, toxina de botulinum) se mantiene en la composición durante el período de tiempo designado bajo un conjunto designado de condiciones.

Sujeto: El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal al que se puede suministrar o administrar una composición de nanopartícula de la invención. Por ejemplo, un sujeto puede ser un humano, perro, gato, vaca, cerdo, caballo, ratón, rata, jerbo, hámster, etc. En muchas realizaciones de la presente invención, el sujeto es un ser humano.

Los síntomas se reducen: según la presente invención, los "síntomas se reducen" cuando uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección particular se reducen en magnitud (por ejemplo, intensidad) o frecuencia. Para fines de claridad, un retraso en el inicio de un síntoma particular se considera una forma de reducir la frecuencia de ese síntoma. Para dar solo algunos ejemplos, donde la condición en cuestión son las arrugas faciales, los síntomas de esa condición se reducen cuando se reduce la profundidad y/o gravedad de una o más arrugas en el área seleccionada. Cuando la condición en cuestión es contractura muscular, los síntomas se reducen cuando el músculo se vuelve menos tenso y más flácido. No se pretende que la presente invención se limite solo a los casos en que se eliminan los síntomas. La presente invención contempla específicamente un tratamiento tal que uno o más síntomas se reducen (y la condición del sujeto se "mejora"), aunque no se elimina completamente.

Cantidad terapéuticamente efectiva: como se usa en este documento, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad que es suficiente, cuando se administra a un individuo que padece o es susceptible de una enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar la enfermedad, trastorno y/o condición. Los expertos en la materia apreciarán que la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" no requiere en realidad que se logre un tratamiento exitoso en un individuo particular. Por el contrario, una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser aquella cantidad que proporciona una respuesta farmacológica deseada particular cuando se suministra o administra a un número significativo de sujetos que necesitan dicho tratamiento. Se entiende específicamente que los sujetos particulares pueden, de hecho, ser "refractarios" a una "cantidad terapéuticamente efectiva". Para dar solo un ejemplo, un sujeto refractario puede tener una baja biodisponibilidad de modo que no se puede obtener eficacia clínica. En algunas realizaciones, la referencia a una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser una referencia a una cantidad medida en uno o más tejidos específicos.

Disolvente tóxico: como se usa en el presente documento, el término "disolvente tóxico" se refiere a cualquier sustancia que pueda alterar, romper, eliminar o destruir el tejido de un animal. Como entenderá un experto en la materia, el tejido de un animal puede incluir células vivas, células muertas, matriz extracelular, uniones celulares, moléculas biológicas, etc. Para dar algunos ejemplos, los disolventes tóxicos incluyen dimetilsulfóxido, dimetilacetimida, dimetilforamida, cloroformo, tetrametilformamida, acetona, acetatos y alcanos.

Tratamiento: como se usa en este documento, el término "tratamiento" (también "tratar" o "que trata") se refiere a cualquier administración de un agente biológicamente activo que alivia parcial o completamente, mejora, revive, inhibe, retrasa el inicio de, reduce gravedad y/o reducción de la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno o afección en particular (por ejemplo, arrugas faciales). Tal tratamiento puede ser de un sujeto que no exhibe signos de la enfermedad, trastorno y/o condición relevante y/o de un sujeto que exhibe solamente signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o condición. Alternativa o adicionalmente, dicho tratamiento puede ser de un sujeto que exhibe uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o condición relevante.

Uniforme: el término "uniforme", cuando se usa aquí en referencia a una composición de nanopartículas, se refiere a una composición de nanopartículas en la que las nanopartículas individuales tienen un intervalo específico de tamaños de diámetro de partícula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición uniforme de nanopartículas es aquella en la que la diferencia entre el diámetro mínimo y el diámetro máximo no supera aproximadamente 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50 o menos nm. En algunas realizaciones, las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de las composiciones de nanopartículas de botulinum uniformes de la invención tienen diámetros que son menores que aproximadamente 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 130, 120, 115, 110, 100, 90, 80 nm o menos. En algunas realizaciones, las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de composiciones de nanopartículas de botulinum uniforme de la invención tienen diámetros dentro del intervalo de aproximadamente 10 y aproximadamente 600 nanómetros. En algunas realizaciones, las partículas dentro de las composiciones de nanopartículas de botulinum uniformes de la invención tienen diámetros dentro del intervalo de aproximadamente 10-300, 10-200, 10-150, 10-130, 10-120, 10-115, 10-110, 10-100, o 10-90 nm. En algunas realizaciones, las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención tienen un tamaño de partícula promedio que está por debajo de aproximadamente 300, 250, 200, 150, 130, 120 o 115, 110, 100 o 90 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula está dentro del intervalo de aproximadamente 10-300, 50-250, 60-200, 65-150, 70-130 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula es aproximadamente

80-110 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula es aproximadamente 90-100 nm. . En algunas realizaciones, la mayoría de las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de las composiciones de nanopartículas uniformes de la invención tienen diámetros inferiores a un tamaño específico o dentro de un intervalo especificado. En algunas realizaciones, la mayoría es más de 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6% , 99.7%, 99.8%, 99.9% o más de las partículas en la composición. En algunas realizaciones de la invención, se consigue una composición uniforme de nanopartículas mediante microfluidización de una muestra.

Breve descripción del dibujo

La Figura 1 muestra una realización de una distribución de diámetro de partícula de una nanoemulsión de toxina de botulinum microfluidizada.

La Figura 2 muestra una realización de una distribución de diámetro de partícula de microemulsión de toxina de botulinum homogeneizada.

La Figura 3 muestra un paciente que intenta la elevación máxima de la cepa antes de (Panel A) y dos semanas después de (Panel B) la administración tópica de una composición de la invención que comprende una composición de nanopartículas de botulinum.

Descripción de ciertas formas de realización preferidas

La presente invención se refiere a composiciones de nanoemulsión de toxina de botulinum útiles para tratamientos cosméticos y médicos. Entre otras cosas, la presente invención proporciona sistemas para producir composiciones de nanopartículas que comprenden toxina de botulinum, y proporciona además métodos para usar tales composiciones en diversos contextos. En una realización, un tratamiento médico alivia la contractura y/o hiperactividad muscular; en otra realización, un tratamiento médico alivia la hiperhidrosis. En una realización, un tratamiento cosmético suaviza las arrugas de la piel. En una realización, se prepara una nanoemulsión de toxina de botulinum mediante microfluidización. La administración de nanoemulsiones de toxina de botulinum puede realizarse mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, inyección intramuscular o aplicación tópica transdérmica.

Biología de la toxina de botulinum

La toxina de botulinum (BTX) BTX es producida en la naturaleza por la bacteria gram-positiva anaeróbica *Clostridium botulinum* y es una potente neurotoxina polipeptídica. En particular, la BTX causa una enfermedad neuroparalítica en humanos y animales que se conoce como botulismo. La BTX aparentemente puede pasar sin control a través del revestimiento del intestino y atacar las neuronas motoras periféricas. Los síntomas de la intoxicación por toxina de botulinum pueden progresar desde dificultad para caminar, tragar y hablar hasta la parálisis de los músculos respiratorios y la muerte.

La BTX-A es el agente biológico natural más letal conocido por el hombre. La LD_{50} en ratones hembra Swiss Webster (18-20 g) para BTX-A comercialmente disponible es de aproximadamente 50 picogramos; esta cantidad se define como 1 Unidad de BTX-A. Sobre una base molar, BTX-A es aproximadamente 1.800 millones de veces más letal que la difteria, aproximadamente 600 millones de veces más letal que el cianuro de sodio, aproximadamente 30 millones de veces más letal que la cobra y aproximadamente 12 millones más letal que el cólera (Singh, et al. al., ed., "Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins" Natural Toxins II, págs. 63-84, Plenum Press, Nueva York, 1996).

Los diferentes serotipos de toxina de botulinum varían en las especies animales a las que afectan y en la gravedad y duración de la parálisis que provocan. Por ejemplo, se ha determinado que la BTX-A es 500 veces más potente que la BTX-B, medida por la tasa de parálisis producida en la rata. Además, se ha determinado que la BTX-B no es tóxica en los primates a una dosis de 480 U/kg, que es aproximadamente 12 veces la LD_{50} de los primates para BTX-A. Además, se sabe que la toxina de botulinum tipo B tiene, tras la inyección intramuscular, una duración de actividad más corta y también es menos potente que la BTX-A en el mismo nivel de dosis.

La toxina de botulinum aparentemente se une con alta afinidad a las neuronas motoras colinérgicas, se transloca a la neurona y bloquea la liberación de acetilcolina.

Las toxinas de botulinum se han usado en entornos clínicos para el tratamiento de ciertos trastornos neuromusculares. En particular, la BTX-A ha sido aprobada por la U.S. Food and Drug Administration para el tratamiento del blefaroespasmo, el estrabismo y el espasmo hemifacial. Los serotipos de toxina de botulinum no de tipo A aparentemente tienen una potencia más baja y/o una duración de actividad más corta en comparación con BTX-A. Los efectos clínicos de la BTX-A periféricos intramusculares generalmente se observan dentro de la semana posterior a la inyección. La duración típica del alivio sintomático de una sola inyección intramuscular de BTX-A promedia unos tres meses.

Aunque todos los serotipos de toxinas de botulinum aparentemente inhiben la liberación del neurotransmisor acetilcolina en la unión neuromuscular, lo hacen al afectar diferentes proteínas neurosecretoras y/o dividir estas proteínas en diferentes sitios. Por ejemplo, los tipos A y E de botulinum escinden la proteína sinaptosomal asociada a 25 kilodalton (kD) (SNAP-25), pero se dirigen a diferentes secuencias de aminoácidos dentro de esta proteína. Los tipos de toxina de botulinum B, D, F y G actúan sobre la proteína asociada a vesículas (VAMP, también llamada sinaptobrevina), y cada serotipo escinde la proteína en un sitio diferente. Finalmente, se ha demostrado que la toxina de botulinum tipo C_1 escinde tanto la sintaxina como la SNAP-25. Estas diferencias en el mecanismo de acción pueden afectar la potencia relativa y/o la duración de la acción de los diversos serotipos de toxina de botulinum. Significativamente, se sabe que el citosol de las células B de los islotes pancreáticos contiene al menos SNAP-25 (Biochem J 1; 339 (pt 1): 159-65 (abril de 1999)), y sinaptobrevina (Mov Disord 1995 May; 10(3): 376).

El peso molecular de la molécula de proteína de toxina de botulinum, para los siete serotipos de toxina de botulinum conocidos, es de aproximadamente 150 kD. Curiosamente, las toxinas de botulinum son liberadas por la bacteria de Clostridium como complejos que comprenden la molécula de proteína de la toxina de botulinum de 150 kD junto con proteínas asociadas que no son toxinas. Por lo tanto, el complejo BTX-A puede ser producido por la bacteria De Clostridium como formas de 900 kD, 500 kD y 360 kD. La toxina de botulinum de los tipos B y C_1 aparentemente se produce solo como un complejo de 500 kD. La toxina de botulinum tipo D se produce como complejos de 300 kD y 500 kD. Finalmente, los tipos E y F de toxina de botulinum se producen solo como complejos de aproximadamente 300 kD.

Se cree que los complejos de BTX (es decir, aquellas composiciones que tienen pesos moleculares superiores a aproximadamente 150 kD) contienen una proteína hemaglutinina no toxina y una proteína no hemaglutinina no toxina y no tóxica. Estas dos proteínas que no son toxinas (que junto con la molécula de toxina de botulinum comprenden el complejo de neurotoxina relevante) pueden actuar para proporcionar estabilidad frente a la desnaturalización de la molécula de toxina de botulinum y protección contra ácidos digestivos cuando se ingiere la toxina. Adicionalmente, es posible que los complejos de toxina de botulinum más grandes (más de aproximadamente 150 kD de peso molecular) puedan dar como resultado una velocidad de difusión más lenta de la toxina de botulinum lejos de un sitio de inyección intramuscular de un complejo de toxina de botulinum.

Se pueden utilizar proteínas BTX o complejos BTX de acuerdo con la presente invención. De hecho, los expertos en la técnica apreciarán que cualquier porción o fragmento de una proteína o complejo BTX que retiene la actividad apropiada se puede utilizar como se describe en el presente documento.

Los estudios *in vitro* han indicado que la toxina de botulinum inhibe la liberación inducida por el catión de potasio tanto de la acetilcolina como de la norepinefrina a partir de cultivos de células primarias de tejido de tallo encefálico.

Además, se ha informado que la toxina de botulinum inhibe la liberación evocada de glicina y glutamato en cultivos primarios de neuronas de la médula espinal y que en preparaciones de sinaptosoma cerebral, la toxina de botulinum inhibe la liberación de cada uno de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina, norepinefrina, CGRP y glutamato.

Como se indicó anteriormente, la fuente de la toxina de botulinum no es crítica para la presente invención. Sin embargo, para propósitos de exhaustividad, observamos que están disponibles una variedad de fuentes, incluidas las comerciales, para ciertas preparaciones de toxina de botulinum.

Por ejemplo, la BTX o el complejo BTX se puede obtener estableciendo y haciendo crecer cultivos de *Clostridium botulinum* en un fermentador y luego recolectando y purificando la mezcla fermentada de acuerdo con procedimientos conocidos. Todos los serotipos de toxina de botulinum se sintetizan inicialmente como proteínas inactivas de cadena simple que deben ser escindidas o melladas por las proteasas para convertirse en neuroactivas.

Las cepas bacterianas que producen los serotipos A y G de toxina de botulinum poseen proteasas endógenas y, por lo tanto, los serotipos A y G pueden recuperarse de cultivos bacterianos predominantemente en su forma activa. Por el contrario, los serotipos de toxina de botulinum C_1, D y E se sintetizan mediante cepas no proteolíticas y, por lo tanto, típicamente no se activan cuando se recuperan del cultivo. Los serotipos B y F son producidos por cepas proteolíticas y no proteolíticas y, por lo tanto, pueden recuperarse en forma activa o inactiva. Sin embargo, incluso las cepas proteolíticas que producen, por ejemplo, el serotipo BTX-A típicamente solo escinden una porción de la toxina producida. La proporción exacta de moléculas melladas a no melladas puede depender de la duración de la incubación y la temperatura del cultivo. Por lo tanto, es probable que un cierto porcentaje de cualquier preparación de, por ejemplo, la toxina BTX-A esté inactiva. La presencia de moléculas inactivas de toxina de botulinum en una preparación clínica contribuirá a la carga de proteína total de la preparación, que se ha relacionado en algunas preparaciones de toxina de botulinum comercialmente disponibles con una mayor antigenicidad, sin contribuir a su eficacia clínica.
La toxina de botulinum cristalina de tipo A de alta calidad puede producirse a partir de la cepa Hall A de *Clostridium botulinum* con características de ≥3 x 10^7 U/mg, una A_{260}/A_{278} menor de 0.60 y un patrón distinto de formación de bandas en la electroforesis en gel. El proceso de Schantz conocido se puede usar para obtener toxina de botulinum cristalina que incluye el tipo A (Shantz et al., 1992, Microbiol. Rev., 56:80).

Generalmente, el complejo de toxina de botulinum se puede aislar y purificar a partir de una fermentación anaeróbica cultivando *Clostridium botulinum* (por ejemplo, tipo A) en un medio adecuado. El proceso conocido puede usarse, después de la separación de las proteínas que no son toxinas, para obtener toxinas de botulinum puras, tales como, por ejemplo: toxina de botulinum tipo A con un peso molecular de aproximadamente 150 kD con una potencia específica de 1-2 x 10^8 LD_{50} U/mg o mayor; toxina de botulinum purificada tipo B con un peso molecular de aproximadamente 156 kD con una potencia específica de 1-2 x 10^8 LD_{50} U/mg o mayor, y; toxina de botulinum purificada tipo F con un peso molecular de aproximadamente 155 kD con una potencia específica de 1-2 x 10^7 DL_{50} U/mg o superior.

Alternativamente o adicionalmente, las toxinas de botulinum y los complejos de toxinas ya preparados y purificados se pueden obtener de, por ejemplo, List Biological Laboratories, Inc., Campbell, Calif.; el Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Reino Unido; Wako (Osaka, Japón), así como de Sigma Chemicals de St Louis, Mo.

La toxina de botulinum pura, cuando se administra como una solución libre, es tan lábil que generalmente no se usa para preparar una composición farmacéutica. Además, los complejos de toxina de botulinum, tales como el complejo de toxina de tipo A, también pueden ser susceptibles de desnaturalización debido a la desnaturalización de la superficie, el calor y las condiciones alcalinas. En algunos casos, la toxina inactivada forma proteínas toxoides que pueden ser inmunogénicas. Los anticuerpos resultantes pueden hacer que un paciente sea refractario a la inyección de toxina.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones de nanopartículas de toxina de botulinum (por ejemplo, nanoemulsiones) en las que la toxina de botulinum tiene una estabilidad mejorada en comparación con las soluciones libres administradas actualmente. Es decir, en algunas realizaciones, la toxina de botulinum presente en una composición de nanopartícula de la invención está protegida, al menos en parte, de al menos una afección adversa tal como calor, condiciones alcalinas, condiciones ácidas, enzimas degradantes, anticuerpos de organismo hospedador, etc. Alternativamente o adicionalmente, la toxina de botulinum presente en las composiciones de nanopartículas de la invención puede mostrar menos desnaturalización de la superficie que una preparación de la toxina de botulinum de otro modo comparable en solución libre. Para dar solo un ejemplo específico, 50 picogramos de una toxina de botulinum dentro de una nanoemulsión microfluidizada de acuerdo con la presente invención estarán protegidos de ciertas condiciones adversas, etc., que pueden dar como resultado la desnaturalización de la superficie.

De hecho, un aspecto de la presente invención abarca el reconocimiento de que la toxina de botulinum puede estabilizarse mediante la incorporación en una composición de nanopartículas. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que una composición de nanopartículas de acuerdo con este aspecto de la presente invención se puede preparar por cualquier medio disponible.

La presente invención proporciona además composiciones de nanopartículas de toxina de botulinum (por ejemplo, nanoemulsiones) en las que la toxina de botulinum tiene una capacidad mejorada para impregnar la piel en comparación con las soluciones libres administradas actualmente. Por ejemplo, la toxina de botulinum incorporada dentro de una nanoemulsión microfluidizada de acuerdo con la presente invención tiene propiedades mejoradas de permeabilidad a la membrana cuando se compara con tales soluciones libres. En una realización, el tiempo mínimo entre la administración y la acumulación intracelular da como resultado un método de administración que tiene una eficacia mejorada y efectos secundarios disminuidos.

Además, como se demuestra en el presente documento, la presente invención proporciona composiciones de nanopartículas de toxina de botulinum a partir de las cuales la toxina de botulinum puede atravesar la piel sin requerir alteración o ruptura de las estructuras de la piel. Por ejemplo, las tecnologías comercialmente disponibles para la administración transdérmica de agentes biológicamente activos tradicionalmente requieren una alteración química, física, eléctrica u otra, al menos en la capa externa de la piel. Tal interrupción puede causar irritación, efectos secundarios médicos indeseables y/o resultados estéticos no deseados. La presente invención proporciona composiciones de nanopartículas de toxina de botulinum que, cuando se administran a la piel, no irritan de forma significativa o notable la piel y/o erosionan la capa córnea, y aún permiten que la toxina de botulinum impregne la piel para que tenga sus efectos biológicos.

Como sucede con las proteínas en general, las actividades biológicas de las toxinas de botulinum (que son peptidasas intracelulares) pueden verse afectadas por cambios en la conformación tridimensional. Por lo tanto, la toxina de botulinum tipo A puede desintoxicarse mediante calor, diversos productos químicos, estiramiento superficial y secado superficial. Adicionalmente, se sabe que la dilución del complejo de toxina obtenido por el cultivo, fermentación y purificación conocidas a las concentraciones mucho más bajas de toxina usadas para la formulación de la composición farmacéutica da como resultado la destoxificación rápida de la toxina a menos que esté presente un agente estabilizante adecuado. La dilución de la toxina de cantidades de miligramo a una solución que contiene nanogramos por mililitro presenta dificultades significativas debido a la rápida pérdida de toxicidad específica con una dilución tan grande. Dado que la toxina puede usarse meses o años después de que se formule la composición farmacéutica que contiene la toxina, las preparaciones en solución de la toxina deben formularse con un agente estabilizante, tal como albúmina.

Como se indicó anteriormente, la presente invención proporciona preparaciones estabilizadas de toxina de botulinum. A pesar de la estabilidad adicional que puede ser impartida por la propia formulación de la invención, en algunas realizaciones de la invención, se contempla el uso de estabilizadores adicionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usa al menos una proteína adicional junto con la toxina de botulinum. En algunas realizaciones, esta proteína adicional comprende albúmina. En algunas realizaciones, esta proteína adicional comprende una o más de las proteínas encontradas naturalmente en un complejo de toxina de botulinum. De hecho, en algunas realizaciones de la invención, se emplea un complejo completo de toxina de botulinum. En algunas de tales realizaciones, también se utiliza albúmina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona una nanoemulsión microfluidizada de botulinum que comprende albúmina.

En algunas realizaciones de la presente invención, la toxina de botulinum utilizada es BOTOX®. El BOTOX® consiste en un complejo de toxina de botulinum tipo A purificado, albúmina y cloruro de sodio envasados en forma estéril, secada al vacío.

La toxina de botulinum de tipo A presente en BOTOX® está hecha de un cultivo de la cepa Hall de *Clostridium botulinum* cultivada en un medio que contiene N-Z amina y extracto de levadura. El complejo de toxina de botulinum de tipo A se purifica a partir de la solución de cultivo mediante una serie de precipitaciones ácidas a un complejo cristalino que consiste en la proteína de toxina activa de alto peso molecular y una proteína de hemaglutinina asociada. El complejo cristalino se vuelve a disolver en una solución que contiene solución salina y albúmina y se filtra en condiciones estériles (0.2 micrómetros) antes del secado al vacío. El BOTOX® puede reconstituirse con solución salina estéril no preservada antes de la inyección intramuscular. Cada vial de BOTOX® contiene aproximadamente 100 unidades (U) de complejo de neurotoxina purificada tipo A de toxina de *Clostridium botulinum*, 0.5 miligramos de albúmina de suero humano y 0.9 miligramos de cloruro de sodio en una forma estéril, secada al vacío, sin un conservante.

Actualmente, el BOTOX® normalmente se reconstituye con cloruro sódico al 0.9% para administración por inyección. Dado que el BOTOX® puede desnaturalizarse por burbujeo o agitación violenta similar, el diluyente se inyecta suavemente en el vial. Se recomienda administrar BOTOX®, como solución libre, dentro de las cuatro horas posteriores a la reconstitución. Además, entre la reconstitución y la inyección, se recomienda además que el BOTOX® reconstituido se almacene en un refrigerador (es decir, por ejemplo, entre 2º y 8ºC). El BOTOX® reconstituido es transparente, incoloro y no contiene partículas.

Se informó que BOTOX® se ha utilizado en entornos clínicos de la siguiente manera:

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

(2) 5-10 unidades de BOTOX® por inyección intramuscular para tratar líneas glabelares (surcos de cejas) (5 unidades inyectadas intramuscularmente en el músculo procerus y 10 unidades inyectadas intramuscularmente en cada músculo corrugador superciliar);

(3) aproximadamente 30-80 unidades de BOTOX® para tratar el estreñimiento mediante inyección intraesfinteriana del músculo puborrectal;

(4) aproximadamente 1-5 unidades por músculo de BOTOX® inyectado por vía intramuscular para tratar el blefaroespasmo inyectando el músculo orbicularis oculi pretarsal lateral del párpado superior y el orbicularis oculi pretarsal lateral del párpado inferior.

(5) para tratar el estrabismo, los músculos extraoculares deben inyectarse intramuscularmente con entre 1-5 unidades de BOTOX®, variando la cantidad inyectada según el tamaño del músculo que se va a inyectar y el grado de parálisis muscular deseado (es decir, cantidad de la corrección de dioptrías deseada).

(6) para tratar la espasticidad de las extremidades superiores después del accidente cerebrovascular mediante inyecciones intramusculares de BOTOX® en cinco músculos flexores de los miembros superiores diferentes, de la siguiente manera:

(a) flexor profundo de los dedos: 7.5 a 30 U
(b) flexor digitorum sublimus: de 7.5 U a 30 U
(c) flexor carpi ulnaris: 10 U a 40
(d) flexor radial del carpo: 15 U a 60 U
(e) bíceps braquial: 50 U a 200 U

Cada uno de los cinco músculos indicados se ha inyectado en la misma sesión de tratamiento, de modo que el paciente reciba de 90 U a 360 U de músculo flexor de la extremidad superior BOTOX® por inyección intramuscular en cada sesión de tratamiento.

(7) para tratar la migraña, inyección pericraneal (inyectada simétricamente en los músculos glabelar, frontal y temporal), la inyección de 25 U de BOTOX® ha demostrado beneficios significativos como tratamiento profiláctico de la migraña comparado con el vehículo, medido por la disminución de las medidas de frecuencia de la migraña, máxima severidad, vómito asociado y uso de medicación aguda durante el período de tres meses después de la inyección de 25 U.

La presente invención demuestra (ver, por ejemplo, los Ejemplos 4 y 5) que una composición de nanopartículas de botulinum de la invención que contiene BOTOX®, cuando se incorpora en una crema que se aplica a la piel para la administración transdérmica de la toxina, logra resultados biológicos (es decir, reducción de arrugas) comparables a los históricamente observados con la inyección de una solución de toxina de botulinum que contiene aproximadamente la misma cantidad de BOTOX®.

Las respuestas clínicas positivas de la toxina de botulinum tipo A han despertado el interés en otros serotipos de toxina de botulinum. Se ha llevado a cabo un estudio de dos preparaciones de botulinum de tipo A comercialmente disponibles (BOTOX® y DYSPORT®) y preparaciones de toxinas de botulinum tipo B y F (ambas obtenidas de Wako Chemicals, Japón) para determinar la eficacia, seguridad y potencial antigénico del debilitamiento muscular local.

Se inyectaron preparaciones de toxina de botulinum en la cabeza del músculo gastrocnemio derecho (0.5 a 200.0 unidades/kg) y se evaluó la debilidad muscular usando el ensayo de puntuación de abducción de dedos del ratón (DAS). Los valores ED_{50} se calcularon a partir de las curvas de respuesta a la dosis.

Se administraron inyecciones intramusculares a ratones adicionales para determinar las dosis de LD_{50}. El índice terapéutico se calculó como LD_{50}/ED_{50}. Grupos separados de ratones recibieron inyecciones de BOTOX® en miembros posteriores (5.0 a 10.0 unidades/kg) o toxina de botulinum tipo B (50.0 a 400.0 unidades/kg), y se probaron para detectar debilidad muscular y aumento en el consumo de agua, siendo el último un modelo putativo para boca seca. El potencial antigénico se evaluó mediante inyecciones intramusculares mensuales en conejos (1.5 o 6.5 ng/kg para la toxina de botulinum tipo B o 0.15 ng/kg para BOTOX®). La debilidad muscular pico y la duración se relacionaron con la dosis para todos los serotipos.

Los valores DAS ED_{50} (unidades/kg) fueron los siguientes: BOTOX®: 6.7, DYSPORT®: 24.7, toxina de botulinum tipo B: 27.0 a 244.0, toxina de botulinum tipo F: 4.3. BOTOX® tuvo una duración de acción más prolongada que la toxina de botulinum tipo B o la toxina de botulinum tipo F. Los valores del índice terapéutico fueron los siguientes: BOTOX®: 10.5, DYSPORT®: 6.3, toxina de botulinum tipo B: 3.2. El consumo de agua fue mayor en ratones inyectados con toxina de botulinum tipo B que con BOTOX®, aunque la toxina de botulinum tipo B fue menos efectiva para debilitar los músculos. Después de cuatro meses de inyecciones, 2 de 4 (donde fueron tratados con 1.5 ng/kg) y 4 de 4 (cuando fueron tratados con 6.5 ng/kg), los conejos desarrollaron anticuerpos contra la toxina de botulinum tipo B.

En otro estudio, 0 de 9 tratados con BOTOX® los conejos demostraron anticuerpos contra la toxina de botulinum tipo A. Los resultados del DAS indican potencias máximas relativas de toxina de botulinum tipo A igual a la toxina de botulinum tipo F, y la toxina de botulinum tipo F es mayor que la toxina de botulinum tipo B. Con respecto a la duración del efecto, toxina de botulinum el tipo A fue mayor que la toxina de botulinum tipo B y el tipo de toxina de botulinum. La duración del efecto B fue mayor que la toxina de botulinum tipo F. Como se muestra por los valores del índice terapéutico; las dos preparaciones comerciales de toxina de botulinum tipo A (BOTOX® y DYSPORT®) son diferentes. El mayor comportamiento de consumo de agua observado después de la inyección de la extremidad posterior de la toxina de botulinum tipo B indica que cantidades clínicamente significativas de este serotipo entraron en la circulación sistémica murina. Los resultados también indican que para lograr una eficacia comparable a la toxina de botulinum tipo A, es necesario aumentar las dosis de los otros serotipos examinados. Los resultados también indican que para lograr una eficacia comparable a la toxina de botulinum tipo A, es necesario aumentar las dosis de los otros serotipos examinados. El aumento de la dosificación, sin embargo, puede comprometer la seguridad. Además, en conejos, el tipo B fue más antigénico que BOTOX®, posiblemente debido a la mayor carga de proteína inyectada para lograr una dosis efectiva de toxina de botulinum tipo B. Eur J Neurol 6 (Suppl 4): S3-S10 (1999).

Como se indica aquí, la presente invención contempla el uso de toxina de botulinum de cualquier serotipo. Los expertos en la materia podrán evaluar fácilmente la idoneidad de un serotipo particular para un uso particular y, de acuerdo con las enseñanzas de la presente, podrán preparar composiciones de nanopartículas que contienen dicha toxina de botulinum. Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones de nanopartículas que contienen toxina de botulinum de cualquier serotipo, que incluyen composiciones que contienen solo proteínas de toxina de botulinum y composiciones que contienen una u otras proteínas. En algunas realizaciones, tales otras proteínas comprenden o consisten en albúmina; en algunas realizaciones, se emplean complejos de toxina de botulinum.

Las fuentes de toxina de botulinum comercialmente disponibles que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, BOTOX®, DYSPORT® (complejo de hemaglutinina de toxina *Clostridium botulinum* tipo A con albúmina de suero humano y lactosa; Ispen Limited, Berkshire Reino Unido) y/o MYOBLOC® (una solución inyectable que consiste en toxina de botulinum tipo B, albúmina sérica humana, succinato sódico y cloruro sódico, pH 5.6, Elan Pharmaceuticals, Dublín, Irlanda), etc.

Composiciones de nanopartículas

Como se describe aquí, la presente invención proporciona, entre otras cosas, composiciones que incluyen composiciones de nanopartículas que contienen toxina de botulinum.

En general, una composición de nanopartículas es cualquier composición que incluye al menos una nanopartícula. Las composiciones de nanopartículas de botulinum son composiciones de nanopartículas que contienen toxina de botulinum. La toxina de botulinum puede estar encapsulada o completamente rodeada por una o más nanopartículas; asociada con la interfaz de nanopartículas; y/o adsorbida a la superficie externa de una o más nanopartículas. La toxina de botulinum puede o no estar unida covalentemente a las nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas; la toxina de botulinum puede o no estar unida a las nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas por fuerzas de adsorción.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la invención tienen una colección uniforme de nanopartículas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la diferencia entre el diámetro mínimo y el diámetro máximo de las nanopartículas en una composición de nanopartículas de la invención no supera aproximadamente 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50 o menos nm.

En algunas realizaciones, las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención tienen diámetros que son menores que aproximadamente 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 130, 120, 115, 110, 100, 90, 80 nm o menos.

En algunas realizaciones, las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención tienen diámetros dentro del intervalo de aproximadamente 10 y aproximadamente 600 nanómetros. En algunas realizaciones, las partículas dentro de las composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención tienen diámetros dentro del intervalo de aproximadamente 10-300, 10-200, 10-150, 10-130, 10-120, 10-115, 10-110, 10-100, o 10-90 nm

En algunas realizaciones, las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención tienen un tamaño de partícula promedio que está por debajo de aproximadamente 300, 250, 200, 150, 130, 120 o 115, 110, 100, o 90 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula está dentro del intervalo de aproximadamente 10-300, 50-250, 60-200, 65-150, 70-130 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula es aproximadamente 80-110 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula es aproximadamente 90-100 nm.

En algunas realizaciones, la mayoría de las partículas (por ejemplo, partículas que contienen toxina de botulinum) dentro de las composiciones de la invención tienen diámetros inferiores a un tamaño específico o dentro de un intervalo especificado. En algunas realizaciones, la mayoría es más de 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6% , 99.7%, 99.8%, 99.9% o más de las partículas en la composición.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la invención están sustancialmente libres de partículas que tienen un diámetro en exceso de 120 nm. Específicamente, en algunas realizaciones, menos del 50% de las nanopartículas en las composiciones de nanopartículas de la invención tienen un diámetro en exceso de 120 nm. En algunas realizaciones, menos del 25% de las partículas tienen un diámetro en exceso de 120 nm. En algunas realizaciones, menos de 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% o menos de las partículas tienen un diámetro superior a 120 nm. Además, en algunas realizaciones, las nanopartículas en las composiciones de nanopartículas de la invención tienen diámetros dentro del intervalo de 10-120 nm.

El potencial Zeta es una medida del potencial eléctrico en un plano de cizallamiento. Un plano de cizallamiento es una superficie imaginaria que separa una capa delgada de líquido unido a una superficie sólida (por ejemplo, la superficie de nanopartículas de la invención) y muestra un comportamiento elástico del resto de líquido (por ejemplo, medio de dispersión líquido) que muestra un comportamiento viscoso normal. En algunas realizaciones, las nanopartículas de la invención tienen un potencial zeta que oscila entre -50 mV y +50 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas de la invención tienen un potencial zeta que oscila entre -25 mV y +25 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas de la invención tienen un potencial zeta que varía entre -10 mV a +10 mV.

Las composiciones de nanopartículas de la invención son típicamente emulsiones o dispersiones. En algunas realizaciones, las composiciones son dispersiones de "aceite en agua" (es decir, dispersiones en las que las partículas oleosas se dispersan dentro de un medio de dispersión acuoso); en algunas realizaciones, las composiciones son dispersiones de "agua en aceite" (es decir, dispersiones en las que se dispersan partículas acuosas dentro de un medio de dispersión oleosa).

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la invención no requieren disolventes tóxicos. Por el contrario, muchas estrategias convencionales para inducir la formación de nanopartículas en una composición utilizan disolventes tóxicos (típicamente orgánicos). En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas

de la invención no requieren polímeros. Por el contrario, muchas estrategias convencionales para preparar composiciones que contienen estructuras de nanopartículas requieren polímeros.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la invención tienen una mejor absorción del tejido y/o una mejor biocompatibilidad que otras composiciones de nanopartículas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la invención tienen una mejor absorción del tejido y/o una mejor biocompatibilidad que las composiciones de nanopartículas que no son uniformes, que utilizan uno o más disolventes tóxicos (por ejemplo, orgánicos) y/o que utilizan uno o más polímeros.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la invención (por ejemplo, composiciones de nanopartículas de botulinum) son estables. En algunas realizaciones de la invención, una composición de nanopartícula estable es aquella para el tamaño de partícula promedio, el tamaño de partícula máximo, el rango de tamaños de partícula y/o la distribución de tamaños de partícula (es decir, el porcentaje de partículas por encima de un tamaño designado y/o fuera de un rango designado de tamaños) se mantiene durante un período de tiempo. En algunas realizaciones, el período de tiempo es al menos aproximadamente una hora; en algunas realizaciones, el período de tiempo es de aproximadamente 5 horas, 10 horas, un (1) día, una (1) semana, dos (2) semanas, un (1) mes, dos (2) meses, tres (3) meses , cuatro (4) meses, cinco (5) meses, seis (6) meses, ocho (8) meses, diez (10) meses, doce (12) meses, veinticuatro (24) meses o más. En algunas realizaciones, el período de tiempo está dentro del intervalo de aproximadamente un (1) día a veinticuatro (24) meses, dos (2) semanas a doce (12) meses, dos (2) meses a cinco (5) meses, etc. Por ejemplo, si una población de partículas de nanoemulsión se somete a un almacenamiento prolongado, cambios de temperatura y/o cambios de pH y la mayoría de las nanopartículas en la población mantienen un diámetro dentro de un rango establecido (es decir, por ejemplo, entre aproximadamente 10-120 nm), la composición de nanopartículas es estable. Para algunas de estas poblaciones, la mayoría es más de aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% o más. En algunas realizaciones de la invención, cuando una composición de nanopartículas comprende toxina de botulinum y/o al menos otro agente biológicamente activo, la composición de nanopartículas se considera estable si la concentración de agente biológicamente activo (por ejemplo, toxina de botulinum) se mantiene en la composición el período de tiempo designado bajo un conjunto designado de condiciones.

Como se describe en el presente documento, las composiciones de nanopartículas de la invención son útiles en diversas aplicaciones médicas, cosméticas y nutracéuticas. Tales composiciones pueden administrarse a un sujeto mediante cualquier ruta disponible que incluye, pero sin limitación, inyección, administración oral, administración transdérmica, etc. En ciertas realizaciones, las composiciones se administran por inyección. En ciertas realizaciones, las composiciones se administran por vía transdérmica.

Debe observarse que las composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención son fácilmente distinguibles de otras composiciones que contienen toxina de botulinum que se han descrito. Por ejemplo, Donovan ha descrito una preparación en la que la toxina de botulinum se ha incorporado a una vesícula lipídica para administración transdérmica (Publicación de los Estados Unidos 2004/0009180). Tales vesículas también requieren la incorporación de un agente potenciador, tal como un alcohol, para facilitar la absorción de la toxina de botulinum a través de la piel. Donovan también describe una neurotoxina que se incorpora en un transferoma, que son portadores deformables que contienen lípidos y suavizantes de membrana (Hofer et al., 2000, World J. Surg., 24:1187, y Patente de los Estados Unidos 6,165,500). Donovan describe específicamente la preparación de liposomas de fosfatidil colina + colato de sodio que incorporan toxina de botulinum.

Suvanprakorn et al. también han descrito suspensiones de materiales encapsulados en liposomas en macroperlas discretas; uno de los literalmente cientos de compuestos que se dice que son modificables para la encapsulación es "BOTOX®" (Publicación de los Estados Unidos 2004/0224012). Incluidos en los métodos contemplados para fabricar estos liposomas vesiculares multilaminares se encuentran la liofilización/rehidratación y la deshidratación en solución orgánica/rehidratación acuosa. Se esperaría que estos métodos convencionales para producir liposomas produzcan vesículas del tamaño de micropartículas.

Métodos para hacer composiciones de nanopartículas

En general, las composiciones de nanopartículas de la invención (por ejemplo, composiciones de nanopartículas de botulinum) se pueden preparar mediante cualquier método disponible. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas se preparan por medios químicos. Sin embargo, los medios químicos a menudo requieren solventes tóxicos (típicamente orgánicos); en algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas se preparan de acuerdo con la presente invención sin utilizar tales disolventes.

En ciertas realizaciones de la presente invención, las composiciones de nanopartículas se preparan mediante preparación de una premezcla y sometiendo la premezcla a fuerzas de cizallamiento elevadas. Como se usa en el presente documento, el término "fuerza de cizallamiento" se refiere a una fuerza que es paralela a la cara de un material, en oposición a una fuerza que es perpendicular a la cara de un material.

Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para generar altas fuerzas de cizallamiento. En algunas realizaciones, la cavitación se usa para generar altas fuerzas de cizallamiento. De acuerdo con la presente invención, el uso de energía mecánica (es decir, altas fuerzas de cizallamiento) puede reemplazar o minimizar cualquier requerimiento de usar solventes químicos costosos y/o tóxicos; puede aumentar la velocidad a la que se ensamblan las nanopartículas, puede aumentar el rendimiento de nanopartículas generadas en una mezcla particular de componentes, y/o puede reducir en gran medida el costo global de preparar composiciones de nanoemulsión. Además, en aquellas realizaciones en las que se incorpora un agente tal como un agente biológicamente activo (por ejemplo, toxina de botulinum) en composiciones de nanopartículas de la invención, el uso de una alta fuerza de cizallamiento puede aumentar la capacidad de carga de la nanopartícula en comparación con los métodos tradicionales de formación de nanopartículas. En los métodos tradicionales, la carga de agentes dentro o sobre la superficie de las nanopartículas normalmente depende de la difusión del agente al interior y/o a la superficie de la nanopartícula. Según la presente invención, el uso de una alta fuerza de cizallamiento puede permitir la fabricación de partículas más pequeñas (por ejemplo, en promedio) y/o una distribución más estrecha de tamaños de partícula en una composición de nanopartículas.

En algunas realizaciones, se logran altas fuerzas de cizallamiento por exposición a alta presión, por ejemplo, mediante flujo turbulento continuo a alta presión, por ejemplo aproximadamente 15.000 psi. En algunas realizaciones, dicha alta presión está dentro del intervalo de aproximadamente 18.000 a aproximadamente 26.000 psi; en algunas realizaciones, está dentro del intervalo de aproximadamente 20.000 a 25.000 psi.

En algunas realizaciones, se puede administrar una fuerza de cizallamiento alta o alta presión mediante cavitación u homogeneización a alta presión.

En algunas realizaciones, se puede administrar una fuerza de cizallamiento alta mediante el paso a través de un instrumento tal como, por ejemplo, un procesador Microfluidizer® (Microfluidics Corporation/MFIC Corporation) u otro dispositivo similar. Los procesadores Microfluidizer® proporcionan alta presión y una alta velocidad de cizalla resultante al acelerar el producto a través de microcanales a una alta velocidad para reducir el tamaño al rango de nanoescala. El fluido se divide en dos y se empuja a través de microcanales con dimensiones típicas del orden de 75 micras a altas velocidades (en el rango de 50-300 m/s). A medida que el fluido sale de los microcanales, en forma de chorros que chocan con chorros de microcanales opuestos. En los canales, el fluido experimenta alta cizalladura (hasta 10^7 1/s), que es un orden de magnitud mayor que el de las tecnologías convencionales. Las colisiones de chorro dan como resultado una mezcla en nivel submicrométrico. Por lo tanto, el alto cizallamiento y el impacto son responsables de la reducción del tamaño de partícula y la mezcla de fluidos multifásicos en la tecnología Microfluidizer®.

Más generalmente, un microfluidizador puede ser cualquier dispositivo que accione una bomba intensificadora de acción simple. La bomba intensificadora amplifica la presión hidráulica a un nivel seleccionado que, a su vez, imparte esa presión a la corriente del producto. A medida que la bomba viaja a través de su carrera de presión, impulsa el producto a presión constante a través de la cámara de interacción. Dentro de la cámara de interacción hay microcanales de geometría fija especialmente diseñados a través de los cuales la corriente del producto se acelerará a altas velocidades, creando fuerzas de alto cizallamiento e impacto que pueden generar una composición de nanopartículas uniforme (por ejemplo, nanoemulsión) ya que la corriente de producto de alta velocidad incide sobre sí misma y sobre superficies resistentes al desgaste.

A medida que la bomba intensificadora completa su carrera de presión, invierte la dirección y extrae un nuevo volumen de producto. Al final de la carrera de admisión, nuevamente invierte la dirección e impulsa el producto a presiones constantes, repitiendo así el proceso.

Al salir de la cámara de interacción, el producto fluye a través de un intercambiador de calor a bordo que regula el producto a una temperatura deseada. En este punto, el producto puede recircularse a través del sistema para su posterior procesamiento o dirigirse externamente al siguiente paso en el proceso (Patentes de los Estados Unidos 4,533,254 y 4,908,154).

En algunas realizaciones de la presente invención, una muestra se "microfluidiza" a través de la exposición a fuerzas de cizallamiento elevadas durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 10 minutos. En algunas realizaciones, el período de tiempo es menor que aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 minuto(s). En algunas realizaciones, el período de tiempo está dentro del intervalo de aproximadamente 1-2 minutos o menos; en algunas realizaciones, el período de tiempo es aproximadamente 30 segundos.
En algunas realizaciones de la invención, una muestra se "microfluidiza" a través de una única exposición a fuerzas de alto cizallamiento; tales realizaciones se denominan aquí microfluidización de "un solo paso".

La presente invención abarca el reconocimiento de que someter una premezcla a altas fuerzas de cizallamiento puede generar una composición de nanopartículas, y en particular puede generar una composición de nanopartículas uniforme.

En general, se espera que la premezcla a partir de la cual se preparan las composiciones de nanopartículas de la invención mediante la aplicación de una alta fuerza de cizallamiento contenga al menos dos materiales inmiscibles,

uno de los cuales constituirá el medio de dispersión (es decir, el medio líquido en el que partículas (por ejemplo, nanopartículas) se dispersan en la composición de nanopartículas final). Una dispersión de "aceite en agua" es una en la que las partículas oleosas se dispersan dentro de un medio de dispersión acuoso. Una dispersión de "agua en aceite" es una en la que las partículas acuosas se dispersan dentro de un medio de dispersión oleosa. Los expertos en la materia apreciarán que se puede formar una dispersión a partir de dos medios inmiscibles y no se limita estrictamente a combinaciones de medios acuosos y aceitosos. El término "medio de dispersión" por lo tanto se aplica ampliamente a cualquier medio de dispersión a pesar de que es común referirse a categorías "acuosas" y "oleosas".

Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención, la premezcla contendrá un medio de dispersión acuoso y un medio oleoso que se dispersa en forma de nanopartículas en el medio de dispersión; en algunas realizaciones de la invención, la premezcla contiene un medio de dispersión oleosa y un medio acuoso que se dispersa en forma de nanopartículas en los medios de dispersión oleosa.

Los expertos en la técnica conocerán los medios acuosos adecuados que pueden usarse como medios de dispersión o como medios para dispersar según la presente invención. Representativos tales medios acuosos incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas (incluyendo salina tamponada con fosfato), agua para inyección, alcoholes de cadena corta, 5% de dextrosa, soluciones de Ringer (inyección de Ringer lactato, inyección de Ringer lactato más dextrosa al 5%, inyección de Ringer acilada), Normosol-M, Isolyte E, y similares, y combinaciones de los mismos.

Los expertos en la materia también conocerán los medios oleosos adecuados que pueden usarse como medios de dispersión o como medios para dispersar de acuerdo con la presente invención. Representativos tales medios oleosos incluyen, por ejemplo, almendra saturado e insaturado, hueso de albaricoque, aguacate, babassu, bergamota, semilla de mora, borraja, enebro, manzanilla, canola, alcaravea, carnauba, ricino, canela, manteca de cacao, coco, hígado de bacalao, café, maíz, semilla de algodón, emu, eucalipto, onagra, pescado, semillas de lino, geraniol, calabaza, semillas de uva, avellana, hisopo, jojoba, nuez de kukui, lavandina, lavanda, limón, litsea cubeba, nuez de macadamia, malva, semilla de mango, semilla de hierba de la pradera, mink, nuez moscada, oliva, naranja, naranja amarga, palma, almendra de palma, drupa, cacahuete, semilla de amapola, semilla de calabaza, colza, salvado de arroz, romero, cártamo, sándalo, sasquana, ajedrea, espino amarillo, sésamo, manteca de karité, silicona, soja, girasol, árbol del té, cardo, tsubaki, vetíver, nuez y aceites de germen de trigo; estearato de butilo; triglicérido caprílico; triglicérido cáprico; ciclometicona; sebacato de dietilo; dimeticona 360; miristato de isopropilo; aceite mineral; octildodecanol; alcohol oleico; aceite de silicona; y combinaciones de los mismos.

Además de los dos medios inmiscibles, una premezcla según la presente invención puede incluir, por ejemplo, uno o más agentes biológicamente activos (por ejemplo, toxina de botulinum) y/o uno o más tensioactivos o agentes emulsionantes. Tales tensioactivos o agentes emulsionantes adecuados incluyen, pero sin limitación, fosfoglicéridos; fosfatidilcolinas; dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC); dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE); dioleiloxipropiltrietilamonio (DOTMA); dioleoilfosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; diacilglicerol; diacilglicerolsuccinato; difosfatidil glicerol (DPPG); hexandecanol; alcoholes grasos tales como polietilenglicol (PEG); polioxietileno-9-lauril-éter; un ácido graso tensioactivo, tal como ácido palmítico o ácido oleico; ácidos grasos; monoglicéridos de ácidos grasos; diglicéridos de ácidos grasos; amidas de ácidos grasos; glicocolato de sorbitán trioleato (Span 85); monolaurato de sorbitán (Span 20); polisorbato 20 (Tween-20); polisorbato 60 (Tween-60); polisorbato 65 (Tween-65); polisorbato 80 (Tween-80); polisorbato 85 (Tween-85); monoestearato de polioxietileno; surfactina; un poloxómero; un éster de ácido graso de sorbitano tal como trioleato de sorbitán; lecitina; lisolecitina; fosfatidilserina; fosfatidilinositol; esfingomielina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardiolipina; ácido fosfatídico; cerebrósidos; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecilamina; acetil palmitato; ricinoleato de glicerol; estearato de hexadecilo; miristato de isopropilo; tiloxapol; poli(etilenglicol) 5000-fosfatidiletanolamina; poli(etilenglicol) 400-monoestearato; fosfolípidos; detergentes sintéticos y/o naturales que tienen altas propiedades tensioactivas; desoxicolatos; ciclodextrinas; sales caotrópicas; agentes de apareamiento iónico; y combinaciones de los mismos. El componente tensioactivo puede ser una mezcla de diferentes tensioactivos. Estos tensioactivos pueden extraerse y purificarse de una fuente natural o pueden prepararse sintéticamente en un laboratorio. En una realización preferida, los tensioactivos están disponibles comercialmente.

En algunas realizaciones de la presente invención, todos los componentes presentes en la composición final de nanopartículas están presentes en la premezcla y están sometidos a una alta fuerza de cizallamiento para producir la composición de nanopartículas. En algunas realizaciones de la presente invención, uno o más de los componentes que están presentes en la composición final de nanopartículas están ausentes de la premezcla o están presentes en la premezcla en una cantidad menor que en la composición final de nanopartículas. Es decir, en algunas realizaciones de la presente invención, se añaden uno o más materiales a la composición de nanopartículas después de que la premezcla se somete a una alta fuerza de cizallamiento.

En ciertas realizaciones de la invención, la premezcla se prepara como una solución antes de la aplicación de una alta fuerza de cizallamiento. En particular, para composiciones de nanopartículas que incluyen al menos un agente biológicamente activo (por ejemplo, toxina de botulinum), a menudo es deseable que el agente biológicamente activo se disuelva en la premezcla antes de aplicar la alta fuerza de cizallamiento. Por lo tanto, en muchas realizaciones, el agente biológicamente activo es soluble en al menos uno de los medios (o en una combinación de medios utilizados

en la premezcla). En algunas realizaciones de la invención, dicha disolución requiere calentamiento; en otras realizaciones, no.

En algunas realizaciones de la presente invención, los componentes de premezcla pueden ensamblarse en partículas antes de la aplicación de una fuerza de cizallamiento alta. Al menos algunas de tales partículas pueden ser micropartículas o incluso nanopartículas. En algunas realizaciones, se prepara una composición de nanopartícula de la invención a partir de una premezcla, en donde la premezcla se selecciona del grupo que comprende una suspensión o una microemulsión. Sin embargo, en algunas realizaciones, las estructuras de partículas no se forman en la premezcla antes de la aplicación de una alta fuerza de cizallamiento.

En ciertas realizaciones de la invención, la cantidad relativa de componentes de la premezcla se selecciona o ajusta para generar nanopartículas que tienen las características deseadas. En algunas realizaciones, la premezcla comprende aceite y tensioactivo en una proporción que varía entre 0.5-10. En algunas realizaciones, la relación de aceite a agente tensioactivo es aproximadamente 0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o 10:1. En algunas realizaciones, la relación de tensioactivo a aceite es aproximadamente 0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o 10:1. En algunas realizaciones, la premezcla comprende aceite y tensioactivo en una proporción que varía entre 0.5-2. En algunas realizaciones, la relación de aceite a tensioactivo es aproximadamente 0,5:1, 1:1 o 2:1. En algunas realizaciones, la relación de tensioactivo a aceite es aproximadamente 0.5:1, 1:1 o 2:1. En ciertas realizaciones, la relación de aceite a agente tensioactivo es aproximadamente 1:1.

En algunas realizaciones, el porcentaje de aceite en la premezcla oscila entre 0% - 30%. En algunas realizaciones, el porcentaje de aceite en la premezcla es 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% o 30%. En algunas realizaciones, el porcentaje de aceite es aproximadamente del 8%. En algunas realizaciones, el porcentaje de aceite es aproximadamente del 5%.

En algunas realizaciones, el porcentaje de tensioactivo en la premezcla oscila entre 0%-30%. En algunas realizaciones, el porcentaje de tensioactivo en la premezcla es 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% o 30%. En algunas realizaciones, el porcentaje de tensioactivo es aproximadamente del 8%. En algunas realizaciones, el porcentaje de tensioactivo es aproximadamente del 5%.

En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas no contiene más de un aceite. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas puede comprender dos o más aceites. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas no contiene más de un tensioactivo. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas puede comprender dos o más tensioactivos.

En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas consiste esencialmente en agua, un aceite, un tensioactivo y una toxina de botulinum. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas consiste esencialmente en agua, un aceite, un tensioactivo, al menos una toxina de botulinum y al menos una sustancia utilizada para producir y/o preservar la composición de nanopartículas (por ejemplo, proteínas, sales, etc.).

En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas consiste en agua, un aceite, un tensioactivo y una toxina de botulinum. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas consiste en agua, un aceite, un tensioactivo, al menos una toxina de botulinum y al menos una sustancia usada para producir y/o preservar la composición de nanopartículas (por ejemplo, proteínas, sales, etc.).

Métodos de administración de composiciones de nanopartículas

La presente invención proporciona métodos para suministrar composiciones de nanopartículas (por ejemplo, composiciones de nanopartículas de botulinum) para diversas aplicaciones que incluyen, por ejemplo, aplicaciones cosméticas, nutracéuticas y médicas. Dichas composiciones de nanopartículas pueden incluir uno o más agentes biológicamente activos. En muchas realizaciones, las composiciones de nanopartículas incluyen toxina de botulinum.

En algunas realizaciones, la presente invención contempla métodos para suministrar de composiciones de nanopartículas de la invención que incluyen, pero no se limitan a, rutas de administración transdérmica, intramuscular o subcutánea. Estas rutas de administración son particularmente preferidas para las formulaciones (por ejemplo, ciertas composiciones de nanopartículas de toxina de botulinum) que se pretende que tengan un efecto localizado. La posterior absorción de los ingredientes de la formulación en el tejido, sin embargo, no siempre es predecible.

En algunas realizaciones de la presente invención, las formulaciones de la invención pueden encapsularse, por ejemplo, usando vehículos basados en lípidos, por ejemplo, para facilitar la entrada en las células. Las eficacias del vehículo basadas en lípidos, sin embargo, pueden depender de; i) composición lipídica (es decir, por ejemplo, tamaño molecular y carga); ii) la estructura (por ejemplo, tamaño molecular e ionización por pH) de cualquier agente biológicamente activo u otra entidad incluida en la composición; y iii) la salud general del sujeto. La presente invención contempla composiciones y métodos relacionados con nanoemulsiones microfluidizadas uniformes que comprenden

cualquiera de los portadores basados en lípidos, mejorando de ese modo la biodisponibilidad de cosmecéuticos (es decir, por ejemplo, toxinas de botulinum).

La presente invención proporciona específicamente métodos para administrar toxina de botulinum, y particularmente de administración de composiciones de nanopartículas de toxina de botulinum, para el tratamiento de diversos trastornos, enfermedades o afecciones. Los efectos clínicos de la inyección periférica (es decir, intramuscular o subcutánea), o la administración transdérmica aplicada tópicamente, de toxinas de botulinum se ven generalmente dentro de una semana. La duración típica del alivio sintomático (es decir, por ejemplo, parálisis del músculo flácido) a partir de una sola inyección intramuscular de toxina de botulinum tipo A puede estar presente durante hasta cuatro meses, cuatro meses o más; las duraciones del efecto clínico después de la administración transdérmica de toxinas de botulinum según la presente invención pueden estar presentes durante hasta cuatro meses o más, dependiendo de las características del sujeto individual y/o de la formulación específica de la preparación de nanopartículas de botulinum de la invención.

Los expertos en la técnica apreciarán que la toxina de botulinum se administra actualmente casi exclusivamente mediante inyección, y en particular mediante inyección de una solución salina líquida, habitualmente reconstituida a partir de una preparación liofilizada.

Como ya se discutió aquí, la toxina de botulinum en el contexto de tales preparaciones es especialmente vulnerable a la inestabilidad que da como resultado una pérdida de proteína y/o pérdida de actividad proteica. Se sospecha que dicha inestabilidad es el resultado de desnaturalización, degradación, dimerización y/o polimerización de proteínas. La formulación más común que se sabe que tiene efectos estabilizadores del botulinum es la albúmina humana. Las posibles consecuencias inmunológicas de la albúmina derivada de humanos se han discutido recientemente (Publicación de Estados Unidos 2005/0238667). Esta publicación propone que las albúminas recombinantes, los estabilizadores basados en sacáridos y los aminoácidos antioxidantes pueden dar como resultado toxinas de botulinum que tienen una eficacia mejorada con respecto a las preparaciones de albúmina nativa.

Como también se ha discutido anteriormente, el BOTOX® (un complejo de toxina tipo A de Clostridium botulinum purificado, albúmina de suero humano y cloruro de sodio envasados en una forma estéril secada al vacío) se reconstituye actualmente para inyección usando solución salina normal estéril sin conservante (0.9% cloruro de sodio, grado de inyección). Específicamente, los protocolos de inyección estándar implican extraer la cantidad adecuada de diluyente en la jeringa de tamaño apropiado. Dado que el BOTOX® se desnaturaliza por burbujeo o agitación violenta similar, el diluyente se inyecta suavemente en un vial que contiene una cantidad designada de BOTOX® liofilizado. Por razones de esterilidad, los protocolos de inyección estándar implican la administración de soluciones acuosas de BOTOX® dentro de las cuatro horas posteriores a la reconstitución.

Aunque se conocen bien los problemas con las preparaciones de toxina de botulinum disponibles (que incluyen problemas de estabilidad, problemas de esterilidad, etc.), se han desarrollado pocas formulaciones mejoradas. Además, la inyección sigue siendo el enfoque estándar para administrar la toxina de botulinum, a pesar de la inconveniencia de las técnicas invasivas en general, la incomodidad del paciente, etc.

La presente invención proporciona composiciones mejoradas de toxina de botulinum (por ejemplo, composiciones de nanopartículas de toxina de botulinum) y además proporciona métodos mejorados para administrar toxina de botulinum. En particular, la presente invención proporciona métodos para suministrar composiciones de nanopartículas de botulinum (por cualquier ruta disponible), y además proporciona métodos para suministrar toxina de botulinum por rutas distintas de la inyección.

En general, las composiciones de nanoemulsiones de botulinum de la invención se pueden administrar por cualquier medio disponible que incluye, sin limitación, por vía parenteral, oral, transdérmica, bucal, oftálmica, vaginal, rectal, etc. En ciertas realizaciones, sin embargo, las composiciones se administran por inyección; en algunas realizaciones mediante inyección subcutánea, en algunas realizaciones mediante inyección intramuscular, en algunas realizaciones mediante inyección intravenosa, etc. En ciertas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención se administran por vía transdérmica.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para administrar toxina de botulinum por vía transdérmica. La piel humana comprende la dermis y la epidermis. La epidermis tiene varias capas de tejido, a saber, estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal (identificado en orden desde la superficie exterior de la piel hacia adentro).

El estrato córneo presenta el obstáculo más importante en la administración transdérmica de medicamentos en general, y presumiblemente de la toxina de botulinum en particular. El estrato córneo es típicamente de aproximadamente 10-15 µm de espesor, y consiste en células aplastadas, queratizadas (corneocitos) dispuestas en varias capas. El espacio intercelular entre los corneocitos está lleno de estructuras lipídicas y puede desempeñar un papel importante en la penetración de sustancias a través de la piel (Bauerova et al., 2001, European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 26:85).

El resto de la epidermis debajo del estrato córneo tiene aproximadamente 150 µm de espesor. La dermis es de aproximadamente 1-2 mm de espesor y se encuentra debajo de la epidermis. La dermis está inervada por diversos capilares así como por procesos neuronales.

La administración transdérmica de productos farmacéuticos generalmente ha sido objeto de investigación en un intento de proporcionar una ruta alternativa de administración de medicamentos sin consecuencias indeseables asociadas con inyecciones y administración oral. Por ejemplo, las agujas a menudo causan dolor localizado y potencialmente exponen a los pacientes que reciben inyecciones a enfermedades transmitidas por la sangre. La administración oral a menudo adolece de una baja biodisponibilidad de los medicamentos debido al ambiente extremadamente ácido del estómago del paciente.

Se han realizado esfuerzos para desarrollar técnicas de administración transdérmica para ciertos productos farmacéuticos en un intento de superar estos inconvenientes proporcionando una administración no invasiva. En general, es deseable con la administración transdérmica reducir el daño a la piel de un paciente. Por lo tanto, la administración transdérmica de medicamentos puede reducir o eliminar el dolor asociado con las inyecciones, reducir la probabilidad de contaminación sanguínea y mejorar la biodisponibilidad de los medicamentos una vez que se incorporan sistémicamente.

Tradicionalmente, los intentos de administración transdérmica de medicación se han enfocado en aumentar la permeabilidad del estrato córneo. Algunos intentos han incluido el uso de agentes potenciadores químicos que aumentan la permeabilidad de las moléculas a través de la piel. Algunos intentos han incluido el uso de aparatos mecánicos para derivar o extirpar partes del estrato córneo. Además, los intentos han incluido el uso de ultrasonido o iontoforesis para facilitar la penetración de productos farmacéuticos a través de la piel. En la mayoría de los casos, el objetivo ha sido administrar un agente farmacéutico, típicamente una molécula pequeña, a través de la piel, típicamente para que un agente pueda pasar al lecho capilar en la dermis donde el agente puede incorporarse sistémicamente al sujeto para lograr un efecto terapéutico.

Aunque las moléculas pequeñas han sido un foco principal de las técnicas de administración transdérmica, es importante observar que parece que las moléculas grandes, tales como los polipéptidos y los complejos proteicos, también son susceptibles de administración transdérmica. La eritropoyetina, que tiene aproximadamente 48 kD, también se ha administrado por vía transdérmica con éxito con ayuda de ultrasonidos (Mitragotri et al., 1995, Science, 269: 850 y las Patentes de los Estados Unidos 5,814,599 y 6,002,961).

La presente invención proporciona, entre otras cosas, los métodos de administración de toxina de botulinum por vía transdérmica que no requieren el uso de abrasivos u otros agentes disruptivos (ya sean químicos, mecánicos, eléctricos, magnéticos, etc.). Por el contrario, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la toxina de botulinum incorporada en las composiciones de nanopartículas de la invención se libera eficazmente por vía transdérmica sin etapas adicionales para permeabilizar o romper el estrato córneo. El uso de dichos agentes o etapas con composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención no se excluye necesariamente en todas las realizaciones de la presente invención, pero tampoco se requiere.

Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para administrar toxina de botulinum a través de la aplicación tópica de una composición de nanopartículas de botulinum de la invención. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas de botulinum de la invención se aplica directamente a la piel y para absorción a través de las capas epidérmicas. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas de botulinum puede penetrar en la capa superior de la piel, incluyendo el estrato córneo, los poros dérmicos y/o las glándulas dérmicas, sin el uso de potenciadores químicos o mecánicos de la permeación de la piel u otros agentes que provocan abrasión.

Los expertos en la técnica apreciarán que las composiciones de la invención para administración tópica pueden tener una formulación cosmética tal como suavizante de la piel, emulsión del tipo de loción de nutrición, loción limpiadora, crema limpiadora, leche de la piel, loción emoliente, crema de masaje, crema emoliente, base de maquillaje, barra de labios, paquete facial o gel facial, formulaciones más limpias como champús, enjuagues, limpiadores corporales, tónicos para el cabello o jabones, o composiciones dermatológicas como lociones, ungüentos, geles, cremas, parches o aerosoles.

Una composición de la invención para administración tópica se puede formular y/o administrar de manera que una cantidad de toxina de botulinum entre aproximadamente 10^{-3} U/kg y 10 U/kg pase a través de la piel de un paciente.

En algunas realizaciones, la composición se formula y/o administra de manera que entre aproximadamente 10^{-2} U/kg y aproximadamente 1 U/kg pasan por vía transdérmica a través de la piel del paciente. En algunas realizaciones, la composición se formula y/o administra de manera que entre aproximadamente 10^{-1} U/kg y aproximadamente 1 U/kg pasan a través de la piel del paciente. En algunas realizaciones, la composición se formula y/o administra de manera que entre aproximadamente 0.1 unidades y aproximadamente 5 unidades pasan a través de la piel del paciente a un objetivo subdérmico.

Los expertos en la materia apreciarán que las unidades de la presente invención se refieren a unidades que son biológicamente equivalentes o bioactivamente equivalentes a unidades definidas por fabricantes comerciales de toxina de botulinum.

Los efectos terapéuticos de la toxina de botulinum administrada de acuerdo con la presente invención pueden persistir siempre que lo hagan los efectos de la solución inyectada. Los efectos de dicha solución inyectada pueden persistir durante aproximadamente 4 meses. Además, el uso de un vehículo de polímero sintético que puede retener la toxina de botulinum de modo que se libera lentamente puede prolongar los efectos durante hasta aproximadamente cinco años (Patente de los Estados Unidos 6.312.708).

En una realización, la presente invención proporciona una formulación tópica de toxina de botulinum que evita posibles complicaciones que incluyen, pero no se limitan a, toxicidad sistémica o intoxicación por botulismo. En una realización, las dosificaciones de toxina de botulinum (incluidos los tipos A, B, C, D, E, F o G) pueden oscilar desde tan poco como aproximadamente 1 unidad hasta tan altas como aproximadamente 20000 unidades, con un riesgo mínimo de efectos secundarios adversos. Las dosificaciones particulares pueden variar dependiendo de la condición que se trata y del régimen terapéutico que se utiliza. Por ejemplo, el tratamiento de músculos hiperactivos subdérmicos puede requerir altas dosis transdérmicas (por ejemplo, 1000 unidades a 20000 unidades) de toxina de botulinum. En comparación, el tratamiento de inflamación neurogénica o glándulas sudoríparas hiperactivas puede requerir dosis transdérmicas relativamente pequeñas (por ejemplo, de aproximadamente 1 unidad a aproximadamente 1000 unidades) de toxina de botulinum.

Una realización de la presente invención contempla una composición farmacéutica que comprende una toxina de botulinum estabilizada para administración transdérmica en un paciente humano. La toxina de botulinum puede seleccionarse del grupo que consiste en toxina de botulinum tipos A, B, C_1, D, E, F y G, una toxina de botulinum aislada y/o purificada (es decir, aproximadamente 150 kD), así como una nativa o recombinante hecho de toxina de botulinum. La composición puede comprender entre aproximadamente 1 unidad y aproximadamente 20.000 unidades de la toxina de botulinum, y la composición puede comprender una cantidad de toxina de botulinum suficiente para lograr un efecto terapéutico que dura entre 1 mes y 5 años.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona formulaciones tópicas de toxina de botulinum (por ejemplo, de composiciones de nanopartículas de botulinum) que permiten que la toxina de botulinum permee a través de la piel de un sujeto sin penetrar en una cantidad significativa a través de un vaso sanguíneo. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, menos de aproximadamente el 25%, o incluso menos de aproximadamente el 5% de la toxina de botulinum presente en la composición farmacéutica se infiltra en un vaso sanguíneo tras la aplicación de una preparación tópica y/o transdérmica de la invención.

Los expertos en la materia apreciarán que las composiciones de la invención que consiguen la administración transdérmica de toxina de botulinum se pueden incorporar a un dispositivo tal como, por ejemplo, un parche.

Se conocen en la técnica una variedad de estructuras de parche transdérmicas; los expertos en la materia apreciarán que las composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención pueden incorporarse fácilmente en cualquiera de una variedad de tales estructuras. En algunas realizaciones, un parche transdérmico puede comprender además una pluralidad de agujas que se extienden desde un lado del parche que se aplica a la piel, donde las agujas se extienden desde el parche para proyectarse a través del estrato córneo de la piel. En algunas realizaciones, las agujas no rompen un vaso sanguíneo.

En algunas realizaciones de la presente invención, la toxina de botulinum (por ejemplo, una composición de nanopartículas de botulinum) puede proporcionarse en un depósito en el parche de forma que la presión aplicada al parche haga que la toxina de botulinum se dirija fuera del parche (opcionalmente mediante agujas) y a través del estrato córneo.

En algunas realizaciones de la presente invención, un parche transdérmico incluye un adhesivo. Algunos ejemplos de parches adhesivos son bien conocidos (por ejemplo, véanse las Patentes de los Estados Unidos Des. 296,006; 6,010,715, 5,591,767, 5,008,110, 5,683,712, 5,948,433 y 5,965,154). Los parches adhesivos generalmente se caracterizan por tener una capa adhesiva, que se aplicará a la piel de la persona, un depósito o reservorio para contener un agente farmacéutico, y una superficie exterior que evita la fuga del producto farmacéutico del depósito. La superficie exterior de un parche generalmente no es adhesiva.

De acuerdo con la presente invención, la neurotoxina se incorpora al parche para que la neurotoxina permanezca estable durante largos periodos de tiempo. Por ejemplo, la neurotoxina puede estar presente en una composición de nanopartículas de botulinum de la invención. Alternativa o adicionalmente, la neurotoxina puede incorporarse en una matriz polimérica que estabiliza la neurotoxina, y permite que la neurotoxina se difunda desde la matriz y el parche.

La neurotoxina también se puede incorporar en la capa adhesiva del parche, de modo que una vez que el parche se aplica sobre la piel, la neurotoxina se puede difundir a través de la piel. En una realización, la capa adhesiva puede activarse por calor cuando las temperaturas de aproximadamente 37ºC hacen que el adhesivo se licue lentamente de

modo que la neurotoxina se difunde a través de la piel. El adhesivo puede permanecer pegajoso cuando se almacena a menos de 37°C, y una vez aplicado a la piel, el adhesivo pierde su pegajosidad a medida que se licua. La administración de la toxina se completa una vez que el parche ya no se adhiere a la piel.

Los expertos en la técnica apreciarán que un parche transdérmico no es más que un ejemplo de un dispositivo con el que pueden administrarse composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención. Para dar solo algunos otros ejemplos, se puede emplear un dispositivo que permita que la composición se aplique sin aplicar primero la composición a los dedos, lo que puede conducir a una parálisis indeseable de los dedos. Los dispositivos adecuados incluyen espátulas, hisopos, jeringas sin agujas y parches adhesivos. El uso de espátulas o hisopos, o similares, puede requerir que el dispositivo se inserte en un recipiente que contiene la composición. El uso de jeringas puede lograrse llenando la jeringa con la composición. La composición se puede extender tópicamente mediante espátulas o hisopos, o se puede expulsar de las jeringas sobre la piel de la persona.

En muchas realizaciones de la invención, puede ser deseable limitar el suministro de toxina de botulinum a solo un área de administración prevista. En algunas realizaciones, tal administración limitada se puede llevar a cabo utilizando una composición de nanopartículas de botulinum de la invención en un dispositivo de aplicación que permite la aplicación de la composición a un sitio diana en la piel sin aplicar la composición a áreas del sitio no objetivo de la piel. Claramente, se puede utilizar un parche transdérmico para este fin. Alternativa o adicionalmente, si la toxina de botulinum se va a aplicar tópicamente a solo un área seleccionada, otras áreas pueden estar cubiertas o pretratadas o de otra manera estar protegidas de la exposición.

Aplicaciones de tratamiento de la toxina de botulinum

Como se describe en el presente documento, muchas realizaciones de la presente invención implican la administración de toxina de botulinum a un sujeto en el contexto de una composición de nanopartículas. Tal administración es útil en una variedad de contextos, que incluyen, en particular, ciertas aplicaciones cosméticas y médicas. Algunas de tales aplicaciones se discuten con más detalle a continuación.

Aplicaciones cosméticas

La toxina de botulinum A (BTXA) se ha convertido en un fármaco ampliamente utilizado en dermatología cosmética. Los efectos adversos de la BTXA observados con el uso cosmético tienen un impacto significativo en el cumplimiento del paciente. Actualmente, la BTXA es administrada por personal médico y en un entorno clínico, ya que la BTXA se administra por inyección, lo que requiere personal capacitado, y porque las principales herramientas para prevenir los efectos adversos de la BTXA son el conocimiento y la habilidad. El uso de técnicas correctas de inyección es obligatorio ya que la mayoría de los efectos no deseados son causados por una técnica incorrecta. El conocimiento de la anatomía humana (es decir, por ejemplo, los músculos faciales y extrafaciales) es importante para que los médicos seleccionen la dosis, el tiempo y la técnica óptimos.

Los efectos adversos más comunes de los procedimientos actuales para administrar BTXA son dolor y hematoma. Por ejemplo, cuando la solución de BTXA se administra por inyección a la región periocular, la ptosis de los párpados y las cejas son efectos adversos frecuentes. Los efectos adversos como dolor, hematoma, equimosis y moretones también pueden ocurrir en la parte superior e inferior de la cara y en sitios extrafaciales. Otros posibles efectos adversos incluyen, entre otros, cefalea y posible interacción con medicamentos concomitantes. Se han hecho sugerencias para evitar los efectos adversos más indeseados mediante la implementación de las técnicas adecuadas de dilución, almacenamiento e inyección, así como la exclusión cuidadosa de los pacientes con cualquier contraindicación. El dolor, el hematoma, la equimosis y los moretones se pueden prevenir al enfriar la piel antes y después de la inyección de BTXA. La ptosis del párpado superior puede corregirse parcialmente usando gotas oculares de apraclonidina o fenilefrina (Wollina et al., 2005, Am. J. Clin. Dermatol., 6: 141). Sin embargo, los efectos adversos significativos permanecen con las estrategias actuales.

Por el contrario, la presente invención proporciona métodos y composiciones para administrar de forma segura y efectiva toxinas de botulinum de una manera que minimice los efectos secundarios adversos. En una realización, la presente invención contempla el método de administración de botulinum como una composición administrada tópicamente y/o localmente que comprende una composición de nanopartículas tal como una nanoemulsión microfluidizada. En una realización, la composición se formula como una crema, ungüento, aceite, espuma, aerosol o gel.

Los expertos en la técnica apreciarán que las composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención se pueden formular junto con cualquiera de una variedad de medios cosméticamente aceptables en preparaciones cosméticas tales como líquidos, cremas, emulsiones, geles, lociones espesantes o polvos; pueden contener agua y también cualquier solvente cosméticamente aceptable, en particular, monoalcoholes, tales como alcanoles que tienen de 1 a 8 átomos de carbono (como etanol, isopropanol, alcohol bencílico y alcohol feniletílico), polialcoholes, como alquilen glicoles (como glicerina, etilenglicol) y propilenglicol) y glicoléteres, tales como mono, di y tri-etilenglicolmonoalquiléteres, por ejemplo, etilenglicolmonometiléter y dietilenglicolmonometiléter, utilizados

individualmente o en una mezcla. Tales componentes pueden estar presentes, por ejemplo, en proporciones de hasta tanto como 70% en peso, con relación al peso de la composición total.

Las preparaciones cosméticas que incluyen composiciones de nanopartículas de botulinum de la invención pueden contener al menos una carga, especialmente con el fin de obtener un producto mate, que es especialmente deseado para individuos con piel grasosa. El término "relleno" significa cualquier partícula que sea sólida a temperatura ambiente y presión atmosférica, usada sola o en combinación, que no reaccione químicamente con los diversos ingredientes de la composición y que sea insoluble en estos ingredientes, incluso cuando se introducen estos ingredientes a una temperatura superior a la temperatura ambiente y especialmente a su punto de reblandecimiento o a su punto de fusión. Tales rellenos inertes tienen típicamente puntos de fusión al menos superiores a 170°C, y mejor aún superiores a 200°C.

Los rellenos pueden ser absorbentes o no absorbentes, es decir, capaces en particular de absorber los aceites de la composición y también las sustancias biológicas secretadas por la piel. En algunas realizaciones, los rellenos están en partículas y tienen un diámetro aparente que varía de 0.01 a 150 µm, preferiblemente de 0.5 a 120 µm y aún mejor de 1 a 80 µm. Un diámetro aparente corresponde al diámetro del círculo en el que se inscribe la partícula elemental a lo largo de su dimensión más pequeña (grosor para lamelas).

Tratamiento de arrugas

Las arrugas faciales que involucran las regiones de la frente, glabelar, ritides y/o periorbitales son un problema estético común y se cree que están relacionadas con la hiperactividad de la musculatura facial subyacente. Por ejemplo, el desarrollo de arrugas glabelares se relaciona, al menos en parte, con la dinámica de los músculos procerus subyacente, corrugador superciliar y orbicularis oculi. Las líneas faciales se consideran problemáticas porque producen la apariencia del envejecimiento. En algunos casos, también pueden malinterpretarse como manifestaciones de emociones negativas (por ejemplo, enojo, ansiedad, tristeza), fatiga o estrés.

En los últimos años, las inyecciones de soluciones de toxina de botulinum se han convertido en una de las terapias más populares para el tratamiento de líneas faciales hiperfuncionales. Después de la inyección, la toxina actúa para paralizar o debilitar los músculos miméticos faciales. Esto aparentemente reduce o elimina la aparición de arrugas. Sadick NS., "The cosmetic use of botulinum toxin type B in the upper face" Clin Dermatol. 22(1): 29-33 (2004).

El uso cosmético inicial de una solución de toxina de botulinum fue para el tratamiento de líneas de expresión en la frente (Carruthers et al., 1992, J. Dermatol. Surg Oncol., 18:17). También se ha observado que la inyección de solución de BTX en el platisma produce un levantamiento de la boca (Brandt et al., 1998, Dermatol. Surg., 24: 1232).

La inyección de solución de BTX en el punto del mentón también se ha realizado para el tratamiento del pliegue del mentón prominente (Carruthers et al., "Cosmetic Uses of Botulinum A Exotoxin", págs. 325-48, Advances in Dermatology, James, et al., eds., Mosby-Yearbook, Chicago, 1997).

La presente invención proporciona composiciones de nanopartículas para el tratamiento de arrugas faciales y/o expresiones faciales antiestéticas (por ejemplo debido a hiperactividad de la musculatura facial subyacente). Por supuesto, los principios y/o composiciones relevantes para el tratamiento de arrugas y/o expresiones faciales pueden aplicarse igualmente a líneas o arrugas indeseables causadas por la actividad muscular en otras partes del cuerpo (por ejemplo, líneas del cuello, etc.). En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la invención para uso en el tratamiento de arrugas comprenden una o más toxinas neuroparalíticas; en algunas realizaciones, tales toxinas son capaces de bloquear la actividad del músculo facial; en algunas realizaciones, tales toxinas comprenden toxina de botulinum (BTX). En algunas realizaciones, la presente invención contempla la administración de una nanoemulsión de toxina de botulinum microfluidizada para arrugas faciales.

Recientemente se ha sugerido que la aparición de arrugas y/o líneas de expresión se puede retrasar por el uso a largo plazo de la toxina de botulinum tipo A el tratamiento con toxina a través de inyecciones repetidas (Binder, 2006, Arch Plast facial Surg., 8: 426). Sin embargo, las inyecciones repetidas son dolorosas para el paciente, y existe el riesgo de inyectar grupos musculares involuntarios, que pueden causar efectos secundarios adversos (por ejemplo, ptosis). En algunas realizaciones, se aplica una nanoemulsión de botulinum en la cara y/o el cuello durante un período de tiempo prolongado para retrasar el inicio de líneas o arrugas faciales (o del cuello). En algunas realizaciones, se aplica una nanoemulsión de botulinum a intervalos regulares en la cara y/o el cuello durante un período de tiempo prolongado para retrasar la aparición de arrugas o líneas faciales. En algunas realizaciones, se aplica una toxina de botulinum a intervalos regulares en la cara y/o el cuello durante un período de tiempo superior a 6 meses para retrasar la aparición de arrugas o líneas faciales. En algunas realizaciones, se aplica una toxina de botulinum a intervalos regulares en la cara y/o el cuello durante un período de tiempo superior a 1 año para retrasar el inicio de las arrugas o líneas faciales. En algunas realizaciones, se aplica una toxina de botulinum a intervalos regulares en la cara y/o el cuello durante un período de tiempo superior a 5 años para retrasar la aparición de arrugas o líneas faciales. En algunas realizaciones, se aplica una toxina de botulinum a intervalos regulares en la cara y/o el cuello durante un período de tiempo superior a 10 años para retrasar la aparición de arrugas o líneas faciales.

Líneas faciales hipercinéticas

Se ha evaluado la inyección de toxina de botulinum tipo B (BTX-B) en el tratamiento de líneas faciales hiperfuncionales. Por ejemplo, veinticuatro pacientes fueron tratados con 400 a 800 unidades de BTX-B en el corrugador, orbicularis oculi o músculo frontal. Las mejoras en la línea facial se pueden evaluar utilizando el nivel de mejora de arrugas (WIS) y la Escala de línea cinética numérica nominal (RNKLS). Un estudio informó que el inicio del efecto fue dentro de las 72 horas. WIS y RNKLS para todos los sitios fueron estadísticamente mejores después del tratamiento, con un efecto de 8 semanas. En general, los pacientes notaron una mejora moderada (grado 2) en WIS y una mejora de 2 puntos en RNKLS (Ramirez et al., 2002, Otolaryngol. Head Neck Surg., 126: 459).

En algunas realizaciones, la presente invención contempla la administración de una composición de nanopartículas de botulinum tal como una nanoemulsión de toxina de botulinum microfluidizada a líneas faciales hipercinéticas. En algunas realizaciones, la presente invención contempla la administración de una composición de nanopartículas de botulinum a regiones de la cara que típicamente desarrollan arrugas antes de la formación de arrugas. Se espera que dicha administración repetida pueda retrasar el inicio y/o reducir la intensidad o la gravedad de las arrugas que finalmente pueden desarrollarse (Binder, 2006, Arch. Facila Plast. Surg., 8: 426).

Bandas de platisma

El platisma es una capa ancha y delgada de músculo que se encuentra a cada lado del cuello inmediatamente debajo de la fascia superficial que pertenece al grupo de músculos faciales, que está inervado por el nervio facial, y que dibuja el labio inferior y la esquina de la boca hacia un lado y hacia abajo y cuando se mueve con fuerza expande el cuello y dibuja su piel hacia arriba.

Se ha informado que la inyección de toxina de botulinum Z trata las bandas hipertróficas de músculo platisma (es decir, típicamente denominadas cuello envejecido). Un sistema de clasificación (I a IV) basado en las arrugas del cuello horizontales, las bandas de platisma y la laxitud de la piel puede categorizar el grado de deformidad y servir como una guía para las dosis sugeridas de botulinum. Por ejemplo: Tipo II se refiere a las arrugas del cuello horizontales leves; flacidez delgada y leve del músculo platisma; y laxitud leve de la piel; Tipo III se refiere a las arrugas del cuello horizontales moderadas; flacidez muscular de platisma gruesa y moderada; y la laxitud moderada de la piel (Matarasso et al., 1999, Plast. Reconstr. Surg., 103: 645).

En una realización, la presente invención contempla la administración de una composición de nanopartículas de botulinum tal como una nanoemulsión de toxina de botulinum microfluidizada a las bandas de platisma.

Aplicaciones médicas

Trastornos neuromusculares

La BTX producida por la bacteria *Clostridium botulinum* paraliza de forma reversible el músculo estriado cuando se administra en dosis sub-letales. La BTX se ha utilizado en el tratamiento de varios trastornos neuromusculares y afecciones que involucran espasmos musculares y/o contractura incluyendo diversas formas de parálisis, contractura facial, distonía, espasmo hemifacial, temblor, espasticidad (por ejemplo, resultado de esclerosis múltiple), músculo retroorbital, y varias otras condiciones oftalmológicas (Carruthers et al., 1996, J Am. Acad. Dermatol, 34: 788).

Parálisis facial

Se ha informado que la inyección de BTX en un grupo de músculos en un lado de la cara de un paciente se ha usado para tratar la sinquinesia facial y la asimetría vertical causada por la parálisis del nervio facial (Armstrong et al., 1996, Clin. Otolaryngol., 21:15). En este último procedimiento, los músculos levator anguli oris, zygomaticus major, rizorius y depressor anguli oris asociados con la boca junto con diversos músculos asociados con el ojo en el lado normal de la cara de un paciente fueron tratados como un grupo con el fin de afectar la simetría vertical completa de la cara de un paciente para compensar los efectos de la parálisis nerviosa en el lado no tratado de la cara.

En una realización, la presente invención contempla la administración de una composición de nanopartículas de botulinum tal como una nanoemulsión de toxina de botulinum microfluidizada a músculos faciales espásticos.

Blefaroespasmo

El blefaroespasmo se diagnostica en respuesta a la contracción repetida y rítmica de los músculos del párpado (es decir, también conocido como espasmo del párpado). En algunos casos, el párpado puede cerrarse (o casi cerrarse) varias veces y volver a abrirse. El origen de esta afección generalmente es el resultado de la fatiga, el estrés y/o la cafeína. Sin embargo, una vez que comienzan los espasmos, pueden continuar de manera intermitente durante algunos días.

Son posibles contracciones más severas, cuando el párpado se cierra completamente. Esta condición agravada puede ser causada por irritación de la superficie del ojo (córnea) o las membranas que recubren los párpados (conjuntiva). Esta forma de espasmo de los párpados dura mucho más, a menudo es muy incómodo y también puede hacer que los párpados se cierren por completo.

Los síntomas del blefaroespasmo incluyen, pero no se limitan a, espasmos o espasmos repetitivos e incontrolables de su párpado (generalmente el párpado superior), sensibilidad a la luz o visión borrosa.

En algunas realizaciones, la presente invención contempla la administración de una composición de nanopartículas de botulinum tal como una nanoemulsión de toxina de botulinum microfuidizada al músculo del párpado.

Parálisis cerebral

La parálisis cerebral incluye un grupo de trastornos caracterizados por pérdida de movimiento o pérdida de otras funciones nerviosas. Estos trastornos son causados por lesiones en el cerebro que ocurren durante el desarrollo fetal o cerca del momento del nacimiento. La parálisis cerebral puede ser causada por una lesión en el cerebro (la porción más grande del cerebro, que está involucrada con facultades mentales más altas, sensaciones y actividades musculares voluntarias).

La lesión del cerebro puede provocar la pérdida de las funciones nerviosas en áreas muy diferentes. El hallazgo clásico de PC es la espasticidad (aumento del tono muscular) que puede afectar una sola extremidad, un lado del cuerpo (hemiplejía espástica), ambas piernas (diplejía espástica) o ambos brazos y piernas (tetraplejia espástica). Además, puede haber una pérdida parcial o total de movimiento (parálisis), anomalías sensoriales y defectos de la audición y la visión. Las anormalidades del habla son comunes y pueden ocurrir convulsiones.

La función intelectual en pacientes con CP puede variar desde un retraso mental extremadamente intenso de normal a severo. Los síntomas suelen ser evidentes antes de los 2 años y en casos graves pueden aparecer tan tempranamente como en 3 meses. La parálisis cerebral es un tipo de encefalopatía no progresiva (lesión del cerebro) y los síntomas que resultan directamente de la enfermedad no empeoran.

Las clasificaciones de parálisis cerebral incluyen espástica, discinética, atáxica y mixta. La parálisis cerebral espástica incluye alrededor del 50% de los casos. La parálisis cerebral discinética (atetoide) afecta aproximadamente al 20%. Implica el desarrollo de movimientos anormales (torsiones, sacudidas u otros movimientos). La parálisis cerebral atáxica implica temblores, marcha inestable, pérdida de la coordinación y movimientos anormales. Afecta alrededor del 10%. El 20% restante se clasifica como mixto, con cualquier combinación de los síntomas anteriores.

Los síntomas de la parálisis cerebral incluyen, pero no se limitan a convulsiones, contracciones musculares, dificultad para succionar o alimentar, respiración irregular, retraso en el desarrollo de las habilidades motoras, como alcanzar, sentarse, rodar, gatear, caminar, retraso mental motriz, retraso mental, anomalías del habla (disartria), anomalías visuales, anomalías auditivas, espasticidad, contracturas articulares progresivas, rango de movimiento limitado o clavijas dentadas.

Las toxinas de botulinum son eficaces en el tratamiento del niño con parálisis cerebral y otras hipertonías al disminuir la deformidad, promover la función, mejorar el control motor y el alargamiento de los músculos acortados. Para los niños con hipertonía focal, las toxinas de botulinum ofrecen un cambio dramático pero temporal repetible que afecta la rehabilitación. La investigación ha capturado rápidamente el efecto positivo de las toxinas sobre el deterioro y las limitaciones funcionales. El uso a largo plazo de las toxinas de botulinum y el papel que desempeñan las toxinas a lo largo de la vida de la persona con un trastorno hipertónico infantil todavía no se han determinado (Gaebler-Spira et al., 2003, Phys. Med. Rehabil. Clin. N Am., 14: 703).

En una realización, la presente invención contempla la administración de una composición de nanopartículas de botulinum tal como una nanoemulsión de toxina de botulinum microfluidizada a un paciente que presenta síntomas de hipertonía. En una realización, la hipertonía comprende parálisis cerebral. En una realización, el paciente es un niño.

Estrabismo

El estrabismo implica la desviación de la alineación de un ojo en relación con el otro y también se denomina ojos cruzados, esotropía, exotropía, estrabismo o leucorrea. Se cree que el estrabismo es causado por una falta de coordinación entre los ojos. Como resultado, los ojos miran en diferentes direcciones y no se enfocan simultáneamente en un solo punto.

En la mayoría de los casos de estrabismo en niños, la causa es desconocida. En más de la mitad de estos casos, el problema está presente al momento o poco después del nacimiento (estrabismo congénito). Cuando los dos ojos no se enfocan en la misma imagen, el cerebro puede aprender a ignorar la entrada de un ojo. Si se permite que esto continúe, el ojo que el cerebro ignora nunca verá bien. Esta pérdida de visión se llama ambliopía y con frecuencia se asocia con estrabismo.

El estrabismo adquirido en adultos puede ser causado por lesiones en la órbita del ojo o el cerebro, que incluyen lesiones de cabeza cerradas y accidentes cerebrovasculares. Las personas con diabetes a menudo tienen pérdida de circulación que causa un estrabismo paralítico adquirido. La pérdida de visión en un ojo por cualquier causa generalmente hará que el ojo gire gradualmente hacia afuera (exotropía). Debido a que los cerebros de los adultos ya están desarrollados para la visión, los problemas asociados con la ambliopía, en los cuales el cerebro ignora la entrada de un ojo, no ocurren con el estrabismo de los adultos.

Los síntomas de estrabismo incluyen, pero no se limitan a, ojos que aparecen cruzados, ojos que no se alinean en la misma dirección, movimientos oculares descoordinados, visión doble o visión en un solo ojo con pérdida de percepción de profundidad.

Se han informado resultados a largo plazo de la terapia con botulinum en pacientes que tienen esotropía adquirida. Sesenta y ocho niños (rango de edad, 8-64 meses) con esotropía adquirida se inscribieron en un estudio prospectivo. La toxina de botulinum A se inyectó en los dos rectos medianos. Los estados motores y sensoriales se evaluaron a 1 y 2 semanas; 3, 6 y 12 meses; y cada año después de la última inyección.

Después de un seguimiento promedio de 4.8 años desde la última inyección, se obtuvo el éxito motor en 36 niños con una inyección (52.9%), aumentando a 48 (70.6%) y 60 (88.2%) niños después de dos y tres inyecciones, respectivamente. Cuarenta y ocho (70.6%) pacientes tenían al menos fusión periférica (binocularidad de categoría 1) y 32 (47.1%) tenían estereoacuidad de al menos 400 segundos de arco (binocularidad de categoría 2). La hipermetropía más alta, la ambliopía menos severa y un ángulo más pequeño de esotropía fueron los mejores predictores del éxito motor. La ambliopía mínima y la alineación motora favorable se asociaron con un mejor resultado de binocularidad.

La toxina de botulinum puede ser un tratamiento eficaz a largo plazo de la endotropía adquirida. Es especialmente útil en niños con hipermetropía alta, ambliopía mínima y pequeña desviación esotrópica (Tejedor et al., 2001, Investigative Ophthalmology and Visual Science, 42: 2542).

En una realización, la presente invención contempla la administración de una composición de nanopartículas de botulinum tal como una nanoemulsión de toxina de botulinum microfluidizada a un paciente qaue presenta síntomas de estrabismo. En una realización, el paciente es un niño.

Distonía

La distonía es una afección médica que comprende movimientos involuntarios lentos y retorcidos. Un movimiento incontrolado o lento se define como un deterioro del tono muscular (generalmente en grupos musculares grandes), que provoca contracciones involuntarias lentas de la cabeza, las extremidades, el tronco o el cuello (es decir, distonía cervical). Los movimientos de torsión lentos y sinuosos de los músculos (atetosis) o la contracción muscular sostenida (distonía) pueden ser causados por una serie de afecciones, que incluyen parálisis cerebral, encefalitis, efectos secundarios de los medicamentos, encefalopatía hepática y corea de Huntington. El movimiento anormal puede reducirse o desaparecer durante el sueño, pero se ve agravado por el estrés emocional. Posturas anormales ya veces grotescas pueden ser una manifestación de estos movimientos.

En una realización, la presente invención contempla la administración de una composición de nanopartículas de botulinum tal como una nanoemulsión de toxina de botulinum microfluidizada a un paciente que presenta síntomas de distonía.

Hiperplasia prostática

La inyección de toxina de botulinum puede ser efectiva en hombres con hiperplasia prostática benigna. Treinta hombres con hiperplasia prostática benigna se inscribieron en un estudio aleatorizado, controlado con placebo.

Después de una evaluación inicial, cada participante recibió 4 mL de solución inyectada en la glándula prostática.

Los pacientes del grupo control recibieron solución salina y los pacientes del grupo tratado recibieron 200 U de toxina de botulinum A. El resultado de cada grupo se evaluó comparando las puntuaciones de los síntomas, la concentración sérica de antígeno prostático específico, el volumen prostático, el volumen residual de orina postmiccional, y las tasas pico de flujo urinario.

Después de 2 meses, 13 pacientes en el grupo tratado y 3 en el grupo control tenían alivio sintomático subjetivo (P=0.0007). En pacientes que recibieron toxina de botulinum, la puntuación de los síntomas se redujo en un 65% en comparación con los valores basales y la concentración sérica de antígeno prostático específico en un 51% desde el inicio. En los pacientes que recibieron solución salina, el puntaje de los síntomas y la concentración sérica de antígeno prostático específico no cambiaron significativamente en comparación con los valores iniciales y los valores de 1 mes. El seguimiento promedió 19.6 ± 3.8 meses (Maria et al., 2003, Urology 62: 259).

En una realización, la presente invención contempla la administración de una composición de nanopartículas de botulinum tal como una nanoemulsión de toxina de botulinum microfluidizada a un paciente que presenta síntomas de hiperplasia de próstata.

Hiperhidrosis

La hiperhidrosis es una condición médica en la que una persona suda en exceso e impredeciblemente. Las personas con hiperhidrosis pueden sudar incluso cuando la temperatura es buena y cuando están en reposo. La sudoración ayuda al cuerpo a mantenerse fresco y es perfectamente natural. Las personas sudan más en temperaturas cálidas, cuando hacen ejercicio o en respuesta a situaciones que los ponen nerviosos, enojados, avergonzados o temerosos.

Sin embargo, la sudoración excesiva ocurre sin tales desencadenantes. Las personas con hiperhidrosis parecen tener glándulas sudoríparas hiperactivas. La sudoración incontrolable puede causar incomodidad significativa, tanto física como emocional. Cuando la sudoración excesiva afecta las manos, los pies y las axilas, se denomina hiperhidrosis primaria o focal. La hiperhidrosis primaria afecta al 2%-3% de la población, aunque menos del 40% de los pacientes con esta afección buscan consejo médico. En la mayoría de los casos de hiperhidrosis primaria, no se puede encontrar ninguna causa. Parece funcionar en familias. Si la sudoración ocurre como resultado de otra condición médica, se llama hiperhidrosis secundaria. La sudoración puede estar en todo el cuerpo o puede estar localizada en un área. Las afecciones que causan la segunda hiperhidrosis incluyen, entre otras, acromegalia, hipertiroidismo, trastornos del control de la glucosa, feocromocitoma, síndrome carcinoide, cáncer, tuberculosis, infecciones, menopausia, lesión de la médula espinal, apoplejía, enfermedad de Parkinson, enfermedad cardíaca o pulmonar, medicamentos, sustancias de abuso o condiciones de ansiedad. El síntoma principal de la hiperhidrosis es la humedad.

La toxina de botulinum tipo A (BOTOX®) fue aprobada por la FDA en 2004 para el tratamiento de la sudoración intensa de las axilas, una afección llamada hiperhidrosis axilar primaria. Pequeñas dosis de toxina de botulinum inyectada en la axila bloquean temporalmente los nervios que estimulan la sudoración. Los efectos secundarios incluyen dolor en el lugar de la inyección y síntomas parecidos a la gripe. BOTOX® utilizado para la sudoración de las palmas puede causar debilidad leve pero temporal y dolor intenso.

En una realización, la presente invención contempla la administración de una composición de nanopartículas de botulinum tal como una nanoemulsión de toxina de botulinum microfluidizada a un paciente que presenta síntomas de hiperhidrosis.

Ejemplificación

Los siguientes ejemplos solo pretenden proporcionar ilustraciones de realizaciones específicas contempladas por la presente invención. Los ejemplos no están destinados de ninguna manera a ser limitantes.

Ejemplo 1: Formulación de nanoemulsión de botulinum

Este ejemplo presenta una realización de nanoemulsión preparada por microfluidización que comprende toxina de botulinum (es decir, por ejemplo, BOTOX®).

Se realizó una preparación para microfluidización de la siguiente manera:

1. Se mezclaron 5 g de aceite de soja y 5 g de Tween 80, calentando según sea necesario (típicamente no requerido) para emulsionar la mezcla.

2. 100 unidades de BOTOX®, incorporadas dentro de una matriz de albúmina humana (Allergan, Irvine CA), se añadieron a 100 mL de agua desionizada/destilada y se agitaron hasta que se mezclaron uniformemente.

3. La preparación de la Etapa 1 se añadió a la preparación de la Etapa 2 y se agitó hasta que se mezcló uniformemente.

4. La preparación se homogeneizó durante 1 minuto (ver distribuciones de partículas resultantes en la Tabla 1 y la Figura 1)

5. El procedimiento de microfluidización de paso único a 24.000 psi se realizó usando un procesador Microfluidizer®.

La nanoemulsión resultante se evaluó para el tamaño de partícula usando el clasificador de partículas Malvern Nano S capaz de dimensionar partículas entre aproximadamente 0.6 nm y 6000 nm. La preparación de nanoemulsión BOTOX® tenía dos picos de tamaño de partícula que tenían un tamaño medio de partícula de 95.33 nm (Tabla 2 y Figura 2).

Tabla 1: Distribución del tamaño de partículas de una microemulsión homogenizada de BOTOX®

		Diám. (nm)	% Intensidad	Ancho (nm)
Z-Promedio: 3391	Pico 1	1512	100	76.6
PDI: 0.341	Pico 2	0	0	0
Interceptar: 0.5852	Pico 3	0	0	0

Tabla 2: Distribución del tamaño de partículas de una Nanoemulsión de BOTOX® microfluidizada

		Diám. (nm)	% Intensidad	Ancho (nm)
Z-Promedio: 95.33	Pico 1	134.2	76.49	31.03
PDI: 0.252	Pico 2	44.97	23.51	6.34
Interceptar: 0.9659	Pico 3	0	0	0

Ejemplo 2: Efecto relajante muscular de nanoemulsiones inyectadas de BOTOX®

Este ejemplo presenta una realización de nanoemulsiones BOTOX® que tienen una eficacia comparable a la de la solución libre de inyecciones de BOTOX® como solución salina.

El diseño experimental comparó las siguientes dos preparaciones de BOTOX®:

1) Las nanoemulsiones de BOTOX®, preparadas de acuerdo con el Ejemplo 1, se inyectaron mediante inyección intramuscular (IM) en la pata trasera (músculo gastrocnemio) de ratones Swiss Webster hembra.

2) Las soluciones salinas de BOTOX® se inyectaron mediante inyección intramuscular (IM) en el músculo gastrocnemio de la pata trasera de ratones Swiss Webster hembra.

El ensayo de Calificación de Abducción de Dedos (DAS) se usó para determinar la eficacia local del debilitamiento muscular (Aoki, 1999). Los valores de DAS se asignaron de la siguiente manera: (0) pie plano, distribución de dedos igual que la pata de control; (1) pie plano, una diferencia en el ancho de la abducción de los dedos en comparación con la pierna de control o dos dedos que se tocan y el resto se extiende por completo; (2) pie plano, espacio leve abierto en las puntas de todos los dedos o tres dedos tocando; (3) cinco dedos tocando si el pie es plano, cuatro dedos juntos si el pie está curvado; (4) pie curvo, tocando los cinco dedos.

La inyección IM de la nanoemulsión BOTOX® y la solución salina BOTOX® se evaluaron mediante DAS durante siete días bajo un protocolo ciego simple. Se observaron puntajes DAS de 1-2 tanto para la nanoemulsión de toxina de botulinum (3.96 U/5 µl) como para la solución salina de toxina de botulinum (3.96 U/5 µl). El grupo de control, que es una nanoemulsión blanco, tenía DAS (0). Cada grupo (nanoemulsión de toxina de botulinum, solución salina y control) estaba compuesto por cinco (5) animales.

Esta información demuestra que las técnicas de microfluidización no destruyen las características funcionales de la toxina de botulinum como se demuestra mediante la inyección de solución salina de toxina de botulinum no microfluidizada y que las nanoemulsiones de toxina de botulinum son funcionalmente eficaces.

Ejemplo 3: Efecto relajante muscular de las nanoemulsiones transdérmicas de BOTOX®

Este ejemplo demuestra la eficacia terapéutica de las nanoemulsiones de botulinum aplicadas por vía transdérmica (es decir, por ejemplo, una nanoemulsión BOTOX®).

Una nanoemulsión BOTOX® (9.9 U/100 µl), preparada de acuerdo con el Ejemplo 1, se administró por vía tópica al músculo gastrocnemio de la pata trasera de cinco (5) ratones hembras Swiss Webster. Un grupo de control de cinco (5) ratones hembras Swiss Webster recibió una nanoemulsión preparada de forma idéntica, excepto que se omitió BOTOX®. Durante los siete días después del tratamiento, se observaron puntajes DAS de 1-2, puntuados de acuerdo con el Ejemplo 2, para el grupo tratado con nanoemulsión de toxina de botulinum pero no en el grupo control. La agravación de la piel (por ejemplo, irritación, enrojecimiento, etc.) no se observó en ningún momento después del tratamiento. Los datos muestran que una nanoemulsión de toxina de botulinum es biológicamente activa tras la administración transdérmica de una manera similar a las inyecciones de toxina de botulinum administradas convencionalmente.

Ejemplo 4: Efectos relajantes musculares debidos a la administración de una nanoemulsión de botulinum: comparación controlada de la nanoemulsión de botulinum inyectada estándar frente a la tópica en ratones

Este ejemplo proporcionó un experimento controlado para demostrar que la aplicación de una nanoemulsión de botulinum tópica de la invención podría inducir efectos relajantes musculares equivalentes a una preparación de botulinum inyectada estándar (que no era una nanoemulsión).

Método

Se compraron 35 ratones Swiss Webster hembras de Charles River de aproximadamente 20 gramos de peso. Al llegar, todos los animales se aclimataron a sus jaulas durante una semana (el grupo alojó 5 ratones por jaula por grupo como se define a continuación) y se les proporcionó lecho estándar y Purina 5001 chow. Después de una semana, se usó Calificación de Abducción de Dedos (DAS) para determinar la función muscular local después de la aplicación de una nanoemulsión BOTOX® preparada de acuerdo con el Ejemplo 1. En el ensayo DAS, los ratones se suspendieron brevemente por la cola (10 segundos) para provocar una respuesta de sobresalto característico en la que el animal extendió sus patas traseras y abdujo sus últimos dedos. Este ensayo se realizó una vez a la semana durante 3 semanas.

Se prepararon tres preparaciones de tratamiento para tres grupos de tratamiento de ratones: 1) BOTOX® en una solución salina para inyección, 2) una nanoemulsión que contiene BOTOX® y 3) una nanoemulsión "blanco" que contiene todos los constituyentes de la nanoemulsión BOTOX® excepto el BOTOX® que también se procesó a través del procesador Microfluidizer® de una manera idéntica a la nanoemulsión que contiene BOTOX®.

Paradigmas de tratamiento

Grupo 1 (IM) Se inyectaron 15 ratones con 10U/5uL de BOTOX®/kg de peso corporal que se suspendió en una solución salina y luego se inyectó en el músculo gastrocnemio de la pata trasera de los ratones.

Grupo 2 (tópico) Se trataron 15 ratones tópicamente con 10 U/100 µl de nanoemulsión de BOTOX®/kg de peso corporal que se aplicó a la piel de los ratones que recubre el músculo gastrocnemio de la pata trasera.

Se trataron 15 ratones del Grupo 3 (control) por vía tópica con nanoemulsión blanco que no contenía BOTOX® aplicada a la piel de los ratones que recubre el músculo gastrocnemio de la pata trasera.

Evaluación

Una semana después de la inyección y/o la aplicación transdérmica, el ensayo DAS se usó para determinar los potenciales efectos de debilitamiento muscular local del tratamiento. Este ensayo se realizó una vez a la semana durante las siguientes tres semanas. Después de la inyección y/o aplicación transdérmica de BOTOX® o una preparación de control, los grados variables de abducción de los dedos se calificaron en una escala de cinco puntos (0=normal a 4=reducción máxima en abducción de los dedos y extensión de la pierna) por un observador enmascarado para el tratamiento.

Resultados y conclusión

Una semana después del tratamiento, el grupo de ratones (Grupo # 2) tratado con la preparación tópica de nanoemulsión de botulinum alcanzó una puntuación de 2.8 ± 0,3 en la escala Aoki en comparación con el grupo control de ratones (Grupo # 3) tratado con la nanoemulsión blanco que tenía una puntuación de 0.5 ± 0.3 ($p < 0.001$). En comparación, esos ratones (Grupo # 1) inyectados con botulinum en una solución salina tenían una puntuación de 3.5 ± 0.3. Tres semanas después del tratamiento, tanto el grupo de ratones tratados con la preparación tópica de nanoemulsión de botulinum como los ratones a los que se inyectó botulinum en solución salina tenían puntuaciones de Aoki que estaban en niveles de control, como se esperaba en la literatura publicada sobre la inyección de botulinum. (Esta disminución en la escala de Aoki en ratones se ha observado repetidamente con botulinum, que sin embargo tiene un efecto antiarrugas continuo durante varios meses cuando se usa en dosis terapéuticas en humanos.) Además, agravación de la piel (por ejemplo, irritación, enrojecimiento, etc.) no se observó en ningún momento después del tratamiento.

En resumen, estos datos controlados sugieren fuertemente que la preparación tópica de nanoemulsión de botulinum proporcionó un efecto biológico comparable al de la inyección de botulinum.

Ejemplo 5: Administración de composición de nanopartículas de botulinum a un sujeto humano para aliviar arrugas

Se preparó una nanoemulsión de botulinum tópica de la invención y se aplicó a una persona con arrugas frontales significativas para determinar si podía ser efectiva para relajar los músculos de la frente que generaban esas arrugas (de la misma manera que se esperaría de la administración de botulinum suspendido en una solución salina simple que se inyectó en esos músculos).

Métodos

Se realizó una nanoemulsión de botulinum empleando los siguientes pasos:

1. Agitar 800 mg de aceite de soja y 800 mg de Tween 80 en un vial estéril durante 5 minutos

2. Agregar 8.4 mL de solución salina al 0.9% con 4500 unidades de una toxina de botulinum tipo A aprobada farmacéuticamente. Agitar durante 20 minutos

3. Homogeneizar la muestra durante 1 minuto

4. Mezclar la muestra durante 20 minutos

5. Microfluidizar una vez a 23.000 psi

La nanoemulsión se añadió a un volumen igual de crema para la piel (Base PCCA Vanishing Cream Light) y se agitó en vórtice para dar una crema uniforme.

Se seleccionó para el tratamiento a un paciente que tenía arrugas horizontales significativas sobre su frente, que representaban hiperactividad de sus músculos frontales. Este paciente nunca había sido tratado con un producto botulínico o un producto de relleno dérmico. El paciente fue evaluado antes del tratamiento por un cirujano plástico certificado usando una escala de arrugas de 4 puntos, con una puntuación de "1" igual a "sin arrugas" y una puntuación de "4" igual a arrugas significativas. El paciente fue evaluado usando esta escala cuando su rostro estaba "En reposo" y cuando intentó crear las máximas arrugas contrayendo sus músculos frontales, lo que se logró intentando elevar al máximo sus cejas ("Elevación máxima de cejas").

Este paciente tenía una puntuación de 4 en reposo y de 4 en la elevación máxima de la ceja. Demostró una excelente movilidad para poder contraer los músculos frontales. El paciente fue fotografiado utilizando una cámara digital SLR y video digital, tanto en reposo como cuando se le solicitó realizar una elevación máxima de la ceja (Figura 3A, elevación máxima de la ceja antes del tratamiento).

Se le pidió al paciente que no usara ningún maquillaje facial o pantalla solar el día del tratamiento pero que se lavara la cara antes de ir a la consulta con jabón Ivory. Cuando estaba en la consulta, el cirujano plástico aplicó 0.6 cc de la crema de nanoemulsión (preparada en el Ejemplo 1) a la frente del paciente sobre la distribución de sus músculos frontales. La crema se aplicó a la piel de la frente del paciente con una pipeta y el cirujano la frotó en la piel con su dedo (cubierto con un guante de plástico) hasta que la crema no era visible para el cirujano. El paciente fue observado en la consulta del médico durante tres horas. Se le pidió que no tocara su frente durante 12 horas y luego que se lavara con jabón Ivory y agua. El paciente fue observado en el seguimiento después de 1 día y luego a 1, 2, 4, 8 y 12 semanas. En las visitas de seguimiento, el médico evaluó las arrugas del paciente en reposo y en elevación máxima de cejas. Además, el médico repitió fotografías y videos digitales estandarizados.

Resultados

En la primera semana después del tratamiento, el paciente no pudo contraer los músculos de la frente, como lo demuestra la incapacidad de levantar la ceja en la elevación máxima solicitada de la ceja (Figura 3B). Su puntaje de arrugas fue de 2 en reposo y 2 en elevación máxima de cejas. La evaluación clínica del médico fue que el tratamiento había inducido una parálisis completa de los músculos tratados que era equivalente a los tratamientos que había realizado en el otro paciente que utilizaba inyecciones de toxina de botulinum en un área de tratamiento similar. El paciente tuvo un leve restablecimiento de la movilidad de las cejas en la semana 8, pero continuó teniendo una reducción significativa en la movilidad de sus cejas en la semana 12 de observación.

El paciente pudo mover sus otros músculos faciales debajo de áreas de la piel no tratadas y el cirujano plástico no observó efectos secundarios, que incluyeran cambios en la piel inmediatamente después del tratamiento o en cualquier visita de seguimiento. Del mismo modo, el paciente no informó efectos secundarios, incluidos los cambios en la piel (por ejemplo, irritación, enrojecimiento, etc.) en cualquier momento después del tratamiento.

Conclusión

En resumen, este experimento sugiere fuertemente que la preparación de nanoemulsión de botulinum tópica produjo un efecto biológico y clínico significativo que el cirujano plástico evaluó para que fuera comparable en eficacia clínica a lo que se hubiera esperado para seguir un tratamiento estándar de botulinum inyectado (en una solución salina simple) para este paciente.

Ejemplo 6: Formulaciones adicionales de composiciones de nanopartículas de botulinum

Se preparó una variedad de diferentes composiciones de nanopartículas de botulinum de acuerdo con el Ejemplo 1, excepto que en algunos casos, hubo diferencias en el equipo utilizado, la presión aplicada, la cantidad de botulinum añadido, y el volumen de composición de nanopartículas preparado, que puede explicar la variabilidad de los tamaños observados. Se observaron las siguientes distribuciones y tamaño de partícula promedio (Tabla 3):

Tabla 3: Distribución del tamaño de partícula de las nanoemulsiones de BOTOX® microfluidizadas

	Tamaño medio de partícula (nm)						
	76.8	91.5	94.2	95.3	97.9	112.4	Promedio 95
Umbral de distribución (nm)							
% superior a 120	36.4	48.6	47.6	54.7	50.7	53.8	49
% superior a 130	21.0	37.8	35.5	37.3	40.8	45.2	36
% superior a 150	9.1	27.4	24.8	20.3	31.4	36.8	25
% superior a 200	2.8	16.1	10.3	1.5	15.7	21.7	11
% superior a 300	0.0	0.6	4.5	0.0	3.6	9.6	3

Ejemplo 7: Relación de presión aplicada al tamaño medio de partícula obtenido

Se preparó una formulación de premezcla como se describe en el Ejemplo 1 (excepto por la ausencia de toxina de botulinum) y se dividió en 4 alícuotas de 100 ml, A-D, cada una de las cuales se pasó a través de un Microfluidizer® a una presión diferente, dando como resultado un tamaño de partícula promedio diferente, como se indica a continuación en la Tabla 4:

Tabla 4: Tamaños de partícula de Nanoemulsiones BOTOX® microfluidizadas a diferentes presiones

Preparación	Presión (psi)	Tamaño medio de partícula (nm)
A	3.500	142 nm
B	10.000	107 nm
C	17.000	94 nm
D	24.000	89 nm

Equivalentes y alcance

Lo anterior ha sido una descripción de ciertas realizaciones preferidas no limitantes de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones a esta descripción sin apartarse del alcance de la presente invención, como se define en las siguientes reivindicaciones.

En las reivindicaciones, los artículos tales como "un", "una" y "el" pueden significar uno o más de uno a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, son empleados o son relevantes para un producto o proceso determinado a menos que se indique lo contrario o de otra manera evidente del contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente en, es empleado en, o de otro modo es relevante para un producto o proceso dado. La invención también incluye realizaciones en las que más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, son empleados en, o son relevantes para un producto o proceso dado. Además, debe entenderse que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que uno o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones o de partes relevantes de la descripción es introducido en otra reivindicación. Por ejemplo, cualquier reivindicación que dependa de otra reivindicación puede modificarse para incluir una o más limitaciones encontradas en cualquier otra reivindicación que dependa de la misma reivindicación base. Además, cuando las reivindicaciones citen una composición, debe entenderse que están incluidos los métodos para usar la composición para cualquiera de los fines descritos en el presente documento, y los métodos para preparar la composición de acuerdo con cualquiera de los métodos de divulgación descritos en la presente u otros métodos conocidos en la técnica están incluidos, a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para un experto en la técnica que surgiría una contradicción o incoherencia.

Además, la invención abarca composiciones preparadas de acuerdo con cualquiera de los métodos para preparar composiciones descritas en este documento.

Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en formato de grupo Markush, se debe entender que cada subgrupo de los elementos también se revela, y cualquier elemento se puede eliminar del grupo. También se observa que el término "que comprende" está destinado a ser abierto y permite la inclusión de elementos o etapas adicionales. Debe entenderse que, en general, cuando se hace referencia a la invención, o aspectos de la invención, que comprenden elementos, características, etapas, etc. particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consiste en esencialmente de tales elementos, características, etapas, etc. Por motivos de simplicidad, esas realizaciones no se han expuesto específicamente en el presente documento. Por lo tanto, para cada realización de la invención que comprende uno o más elementos, características, etapas, etc., la invención también proporciona realizaciones que consisten, o consiste esencialmente en esos elementos, características, pasos, etc.

Cuando se proporcionan intervalos, se incluyen los puntos finales. Además, debe entenderse que a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto y/o la comprensión de un experto en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor específico dentro de los intervalos establecidos en diferentes realizaciones de la invención, hasta el décimo de la unidad del límite inferior del rango, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. También debe entenderse que a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto y/o la comprensión de un experto en la técnica, los valores expresados como intervalos pueden asumir cualquier subintervalo dentro del rango dado, donde los puntos finales del subrango son expresados con el mismo grado de precisión que la décima parte de la unidad del límite inferior del rango.

Además, se debe entender que cualquier realización particular de la presente invención se puede excluir explícitamente de una cualquiera o más de las reivindicaciones. Cualquier realización, elemento, característica, aplicación o aspecto de las composiciones y/o métodos de la invención (por ejemplo, cualquier toxina de botulinum, cualquier aceite, cualquier agente tensioactivo, cualquier medio de dispersión, cualquier nanopartícula o composición que comprenda cualquier nanopartícula, cualquier método de fabricación de nanopartículas, cualquier ruta o ubicación de administración, cualquier fin para el que se administra una composición, etc.), pueden excluirse de una o más reivindicaciones. Para fines de brevedad, todas las realizaciones en las que se excluyen uno o más elementos, características, propósitos o aspectos no se establecen explícitamente en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Una nanoemulsión que comprende una población de partículas, en donde más del 50% de las partículas tienen diámetros entre aproximadamente 10 y aproximadamente 300 nanómetros, en la que la nanoemulsión comprende partículas oleosas dispersas dentro de un medio de dispersión acuosa y en la que dicha nanoemulsión comprende al menos una toxina de botulinum, un tensioactivo y un aceite.

2. La nanoemulsión de la reivindicación 1, en la que el medio de dispersión acuosa se selecciona del grupo que consiste en agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, alcoholes de cadena corta, dextrosa al 5%, solución de Ringer, inyección de Ringer lactato, inyección de Ringer lactato más dextrosa al 5%, inyección de Ringer acilada, Normosol-M, Isolyte E, y combinaciones de los mismos.

3. La nanoemulsión de la reivindicación 1, en la que el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en fosfoglicéridos; fosfatidilcolinas; dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC); dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE); dioleiloxipropiltrietilamonio (DOTMA); dioleoilfosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; diacilglicerol; diacilglicerolsuccinato; difosfatidil glicerol (DPPG); hexandecanol; alcoholes grasos tales como polietilenglicol (PEG); polioxietileno-9-lauril-éter; un ácido graso tensioactivo, tal como ácido palmítico o ácido oleico; ácidos grasos; monoglicéridos de ácidos grasos; diglicéridos de ácidos grasos; amidas de ácidos grasos; glicocolato de sorbitán trioleato (Span 85); monolaurato de sorbitán (Span 20); polisorbato 20 (Tween-20); polisorbato 60 (Tween-60); polisorbato 65 (Tween-65); polisorbato 80 (Tween-80); polisorbato 85 (Tween-85); monoestearato de polioxietileno; surfactina; un poloxómero; un éster de ácido graso de sorbitano tal como trioleato de sorbitán; lecitina; lisolecitina; fosfatidilserina; fosfatidilinositol; esfingomielina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardiolipina; ácido fosfatídico; cerebrósidos; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecilamina; acetil palmitato; ricinoleato de glicerol; estearato de hexadecilo; miristato de isopropilo; tiloxapol; poli(etilenglicol)5000-fosfatidiletanolamina; poli(etilenglicol)400-monoestearato; fosfolípidos; detergentes sintéticos y/o naturales que tienen altas propiedades tensioactivas; desoxicolatos; ciclodextrinas; sales caotrópicas; agentes de apareamiento iónico; y combinaciones de los mismos.

4. La nanoemulsión de la reivindicación 1, en la que el aceite y el tensioactivo están presentes en una proporción que varía de 0.5 - 2.0, o en una proporción que varía de 0.5 - 1.5 o en una proporción que varía de 0.5 - 1.0, o en una proporción que varía de 1.0. - 2.0 o en una proporción que varía de 1.5 - 2.0.

5. La nanoemulsión de la reivindicación 1, en la que el porcentaje de aceite en la nanoemulsión varía de 1% - 30%, de 1% - 20%, de 1% - 10% o es aproximadamente 8% o aproximadamente 5%.

6. La nanoemulsión de la reivindicación 1, en la que la toxina de botulinum se selecciona del grupo que comprende tipo A, tipo B, tipo C1, tipo C2, tipo D, tipo F y tipo G.

7. La nanoemulsión de la reivindicación 1, en la que la toxina de botulinum es un complejo de toxina de botulinum, preferiblemente en la que el complejo de toxina de botulinum comprende una proteína hemaglutinina no toxina y una proteína no hemaglutinina no tóxica.

8. La nanoemulsión de la reivindicación 1, en la que la toxina de botulinum se incorpora dentro de una matriz de albúmina, preferiblemente en la que la albúmina es albúmina humana.

9. La nanoemulsión de la reivindicación 1, en la que la toxina de botulinum es una proteína de toxina de botulinum purificada o un fragmento de la misma o en la que la toxina de botulinum está aislada, o sustancialmente aislada, de otras proteínas o en la que la toxina de botulinum está aislada, o sustancialmente aislada, de proteínas no toxinas o en la que la toxina de botulinum se aísla de Clostridium botulinum.

10. La nanoemulsión de la reivindicación 1, en la que la toxina de botulinum se sintetiza químicamente o en la que la toxina de botulinum se produce de forma recombinante.

11. La nanoemulsión de la reivindicación 1, en la que la toxina de botulinum está encapsulada dentro de las partículas o en la que la toxina de botulinum se adsorbe en la superficie de las partículas o en la que la toxina de botulinum está asociada con la interfaz de la partícula.

12. La nanoemulsión de la reivindicación 1, en la que la nanoemulsión puede penetrar en la capa superior de la piel sin el uso de potenciadores o abrasivos de la permeación de la piel, preferiblemente en la que la capa superior de la piel es la superficie del estrato córneo o en la que la capa superior de la piel. piel incluye poros dérmicos o en la que la capa superior de la piel incluye glándulas dérmicas.

13. Una composición que comprende la nanoemulsión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, preferiblemente una composición farmacéutica.

14. La composición de la reivindicación 12, en la que la composición se formula como una crema, una loción, una pomada, un aerosol, un polvo, un emoliente y combinaciones de los mismos.

15. La composición como se reivindica en las reivindicaciones 13 a 14 para uso en administración transdérmica de toxina de botulinum a un sujeto para tratar condiciones o trastornos asociados con la piel de un sujeto.

16. La composición para uso como se reivindica en la reivindicación 15, en la que la condición y el trastorno asociados con la piel incluyen parálisis facial, blefarospasmo, contractura facial, espasmo hemifacial e hiperhidrosis.

17. Un método cosmético para tratar arrugas, líneas faciales y/o líneas del cuello, que comprende los pasos de:

(a) proporcionar un sujeto que presenta síntomas de arrugas, líneas faciales y/o líneas del cuello; y

(b) administrar una composición que comprende la nanoemulsión de las reivindicaciones 1 a 12 a la piel del sujeto de tal manera que se reduzcan los síntomas.

18. Un método cosmético para retrasar la aparición de arrugas, líneas faciales y/o líneas del cuello, que comprende los pasos de:

(a) proporcionar un sujeto que no presenta síntomas de arrugas, líneas faciales y/o líneas del cuello; y

(b) administrar una composición que comprende la nanoemulsión de las reivindicaciones 1 a 12 a la piel del sujeto de tal manera que se retrase la aparición de los síntomas.

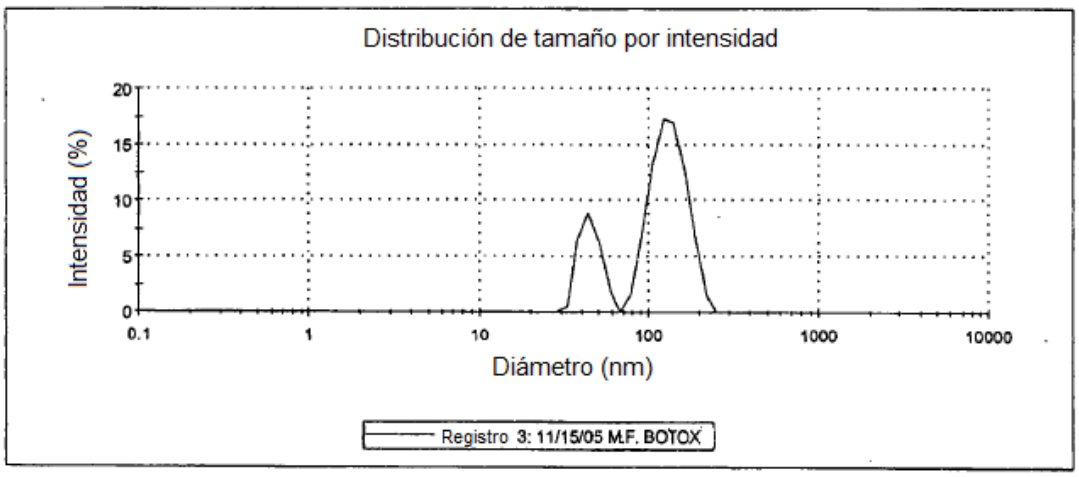
Distribución de tamaño por intensidad
Intensidad (%)
20
15
10
5
0
0.1
1
10
100
1000
10000
Diámetro (nm)
Registro 3: 11/15/05 M.F. BOTOX

Figura 1

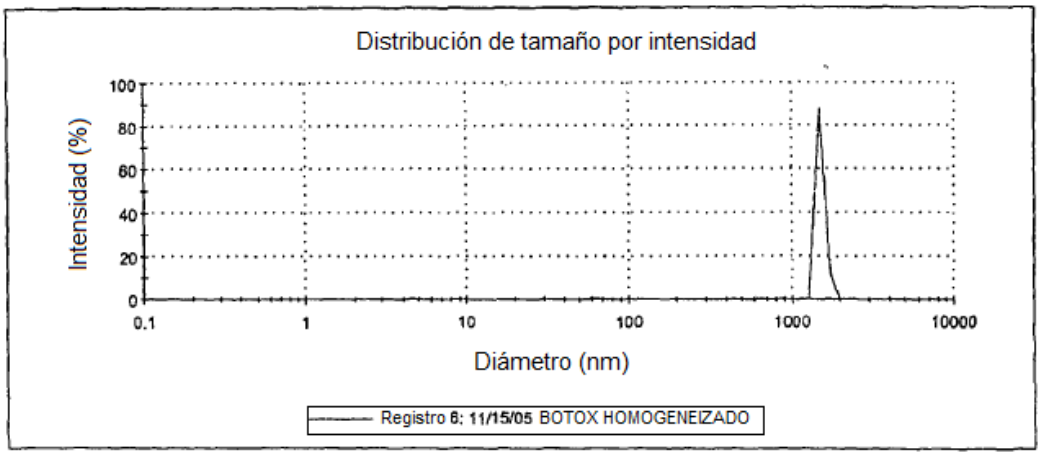
Distribución de tamaño por intensidad
Intensidad (%)
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
1000
10000
Diámetro (nm)
Registro 6: 11/15/05 BOTOX HOMOGENEIZADO

Figura 2

Figura 3A:

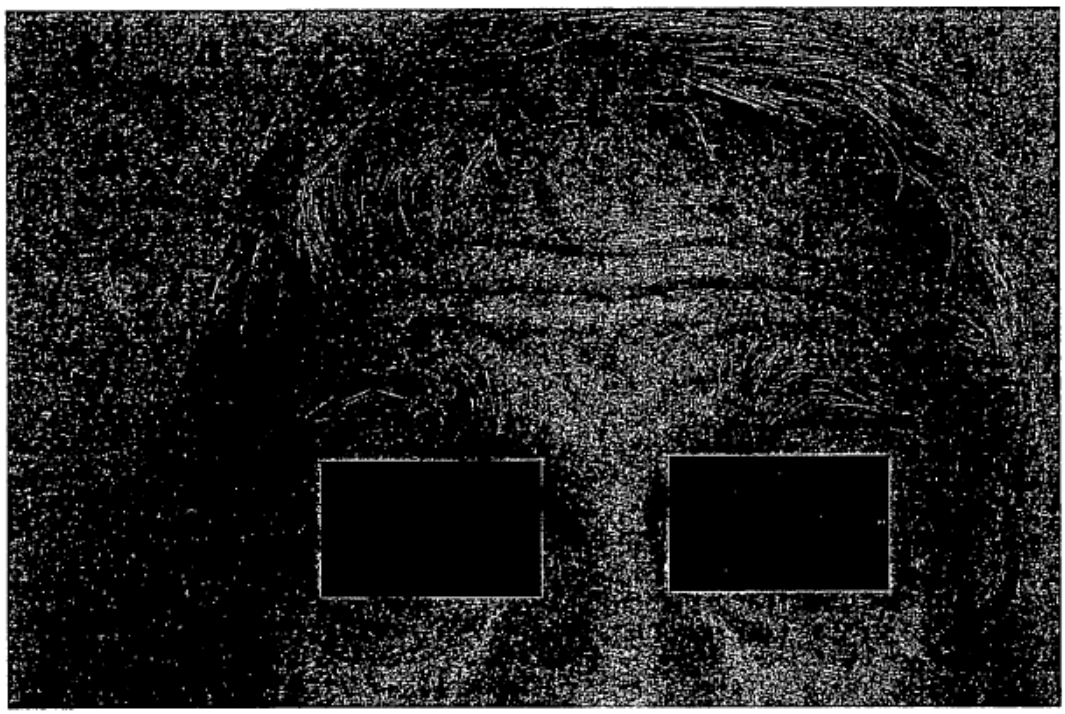

Figura 3B:

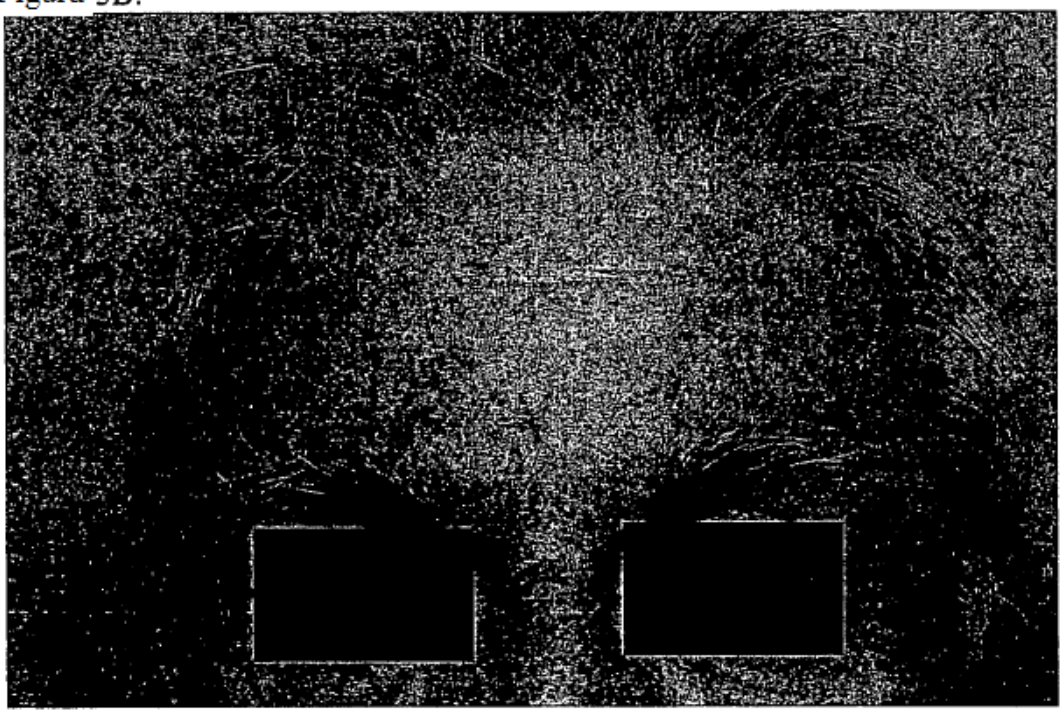

Figura **3**