

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 648**

51 Int. Cl.:

C07K 14/46

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2009** **PCT/US2009/034578**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2009** **WO09105585**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2009** **E 09713319 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019** **EP 2250193**

54 Título: **Agentes de quimiodenervación dirigida postsinápticamente y sus procedimientos de uso**

30 Prioridad:

19.02.2008 US 66347 P

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

29.04.2020

73 Titular/es:

**MYOCEPT INC. (100.0%)
1370 Miners Drive Suite 106
Lafayette, CO 80026, US**

72 Inventor/es:

**PETERS, LARS ERIK y
LORENZ, TODD**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 757 648 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes de quimiodenervación dirigida postsinápticamente y sus procedimientos de uso

5 ANTECEDENTES

Hasta la fecha, el tratamiento de los trastornos neuromusculares se ha centrado de manera casi absoluta en el desarrollo y la administración de agentes terapéuticos dirigidos al lado presináptico (es decir, neuronal) de la unión neuromuscular. En particular, se han investigado ampliamente las diversas toxinas de Clostridium en sus formas
 10 nativas como agentes de quimiodenervación. Desafortunadamente, debido al carácter pleiotrópico de la función neuronal, la estrategia terapéutica presináptica adoptada en la técnica, aparte de ejercer el efecto deseado sobre el músculo esquelético, puede afectar negativamente a la señalización del músculo liso y a la señalización interneuronal, con lo cual se producen efectos secundarios y toxicidades no deseados.

15 Las toxinas botulínicas, en particular, ponen de manifiesto los problemas inherentes al direccionamiento presináptico para el tratamiento de trastornos neuromusculares. En los últimos diez años, se ha generalizado la utilización de preparaciones comerciales de toxinas de Clostridium botulinum, incluido BoTox®, como agentes de quimiodenervación con fines tanto estéticos como clínicos. En particular, su uso en el tratamiento de los síntomas de trastornos neuromusculares clínicos ha sido objeto de un escrutinio más intenso por parte de la FDA, debido a la
 20 toxicidad por diseminación que da lugar a la pérdida de la función de células de músculo liso críticas. De hecho, incluso algunas de las toxicidades más frecuentes asociadas con la utilización estética de estas moléculas, como la sequedad bucal persistente, se deben también a la diseminación de la toxina desde el punto de administración y a la inhibición de la función de células de músculo liso más distantes. Además, muchos pacientes que al principio responden a la terapia con toxina botulínica se vuelven refractarios al tratamiento. En consecuencia, para muchos pacientes, las
 25 inyecciones de botulina no proporcionan un tratamiento satisfactorio a largo plazo de la afección. Sin embargo, a pesar de estas aparentes desventajas, hasta la fecha no se han desarrollado estrategias terapéuticas alternativas.

Se conocen otras neurotoxinas aisladas a partir de venenos de origen animal que presentan mecanismos de acción postsinápticos. Por ejemplo, es sabido que los α -conopéptidos del veneno de los caracoles marinos del género Conus
 30 actúan de manera postsináptica en los nAChR. También se sabe que la clase de proteínas de veneno de serpiente conocidas como α -neurotoxinas son antagonistas competitivos de los nAChR. Las α -neurotoxinas presentan un pliegue altamente conservado, debido principalmente a cuatro puentes disulfuro invariantes, y se clasifican como «cortas», con entre 60 y 62 residuos de aminoácidos y cuatro puentes disulfuro, o «largas», con entre 63 y 80 residuos y un quinto disulfuro. Ver Walkinshaw, MD y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2400-04 (1980). Todas estas toxinas
 35 se unen con alta afinidad al nAChR de tipo muscular, y las toxinas de cadena larga reconocen además el receptor alfa-7 del nAChR de tipo neuronal con alta afinidad (Servent D. y col.; Eur J Pharmacol, 393(1-3): 197-204 (2000).

En particular, se han propuesto como agentes terapéuticos óptimos para la inhibición específica de la neurotransmisión las α -neurotoxinas de cadena larga modificadas para una mejor unión a la subunidad $\alpha 7$ que contiene nAChR neuronal.
 40 Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.753.315. Sin embargo, desafortunadamente, esta propuesta obedece una vez más a la convención del direccionamiento presináptico y pasa por alto las consecuencias negativas de dichos antagonistas para la señalización interneuronal y la actividad del músculo liso. Además, dichos antagonistas pueden tener un efecto perjudicial sobre el sistema inmunitario debido a la distribución del nAChR α -7. Véase, por ejemplo, Wang y col., «Nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 subunit is an essential regulator of inflammation», Nature 421:
 45 384-8 (2003).

Se han propuesto α -conopéptidos del veneno de los caracoles marinos Conus para su utilización en la denervación y la parálisis muscular (Olivera y col., patente de EE. UU. n.º 4.447.356). Sin embargo, la parálisis muscular lograda por los α -conopéptidos dura solo de quince a veinte minutos, debido a las altas tasas de disociación y la baja bioestabilidad.
 50 Para un tratamiento eficaz de denervación muscular es conveniente lograr un efecto paralizante a largo plazo que dure varias horas o días. Por consiguiente, los α -conopéptidos no se han desarrollado como alternativa viable a la quimiodenervación convencional con toxina botulínica, y sigue existiendo la necesidad de disponer de una estrategia terapéutica alternativa para tratar trastornos neuromusculares que sea capaz lograr de manera eficaz la parálisis del músculo esquelético y que al mismo tiempo reduzca los efectos adversos sobre la función neuronal y del músculo liso
 55 que se observan con las neurotoxinas terapéuticas convencionales.

Meng y col., en Comparative Biochem & Phys Part C: Toxicology & Pharmacology (2002) 132C 113-121, describen una nueva neurotoxina corta, la cobrotoxina-c procedente de la cobra monocelada (*Naja kaouthia*), determinan un dominio funcionalmente importante en el exterior del asa III y postulan que los residuos básicos funcionalmente
 60 importantes en el exterior del asa III podrían tener una interacción por pares con la subunidad α , en lugar de las subunidades γ o δ del nAChR.

Golovanov y col., en *European J. Biochem* (1993) 213 (3): 1213-1223, describen la estructura espacial de la neurotoxina II procedente del veneno de la cobra de Asia Central, *Naja oxiana*, caracterizada por sus hojas beta antiparalelas cortas de doble cadena y triple cadena.

- 5 He y col., en *Toxicon* (2004) 44 (3): 295-303, describen procedimientos para la clonación y purificación de α -neurotoxinas de la cobra real *Ophiophagus hannah*.

- Servent y col., en *J. Biol. Chem* 1997) 272 (39) 24279-24286, describen toxinas curaremiméticas de cadena larga y corta procedentes de serpientes, con cuatro o cinco puentes disulfuro, que se unen con alta afinidad a AChR. Una
10 toxina curaremimética de cadena larga con un quinto puente disulfuro reducido se comporta como una toxina de cadena corta ante el AChR periférico y el neuronal.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 15 Contrariamente a la convención establecida en la técnica, los presentes inventores han desarrollado agentes que actúan de manera postsináptica para provocar parálisis inmediata, temporal y opcionalmente parcial del músculo esquelético. Esta estrategia postsináptica de quimiodenervación ofrece muchas ventajas frente a las estrategias presinápticas de la técnica anterior (por ejemplo, la utilización de toxina botulínica). En primer lugar, las composiciones objeto de la invención presentan una toxicidad reducida en comparación con las neurotoxinas que actúan de manera
20 presináptica. Los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente que se describen en esta invención actúan de manera selectiva sobre las membranas postsinápticas en la unión neuromuscular esquelética. Gracias a su selectividad por el componente muscular de la unión neuromuscular y a que se limitan al músculo esquelético, la toxicidad de las composiciones objeto de la invención se reduce en gran medida en comparación con las neurotoxinas de acción presináptica, como la toxina botulínica. En segundo lugar, a diferencia de las estrategias presinápticas, la
25 quimiodenervación postsináptica tal como se describe en esta invención no implica un período de latencia entre la administración y el efecto. La quimiodenervación postsináptica tal como se describe en esta invención es inmediata. En tercer lugar, y de manera relacionada, se puede determinar inmediatamente una dosis eficaz de polipéptido de quimiodenervación postsináptica. En cambio, el efecto retardado de la quimiodenervación presináptica hace que sea imposible medir la dosis eficaz en tiempo real. En cuarto lugar, la quimiodenervación postsináptica produce una
30 parálisis duradera pero temporal. La duración del efecto de la quimiodenervación postsináptica se sitúa entre la de las α -conotoxinas de corta duración, y la de las neurotoxinas paralizantes esencialmente permanentes, como la toxina botulínica. Esta duración del efecto resulta muy conveniente, ya que se puede lograr una parálisis prolongada sin una readministración frecuente y permite obtener parálisis temporales y parciales. Además, la presente descripción proporciona diversos agentes de quimiodenervación postsinápticos con un intervalo de potencias que amplía el
35 intervalo de duración de la parálisis que puede alcanzarse con esta clase de agentes.

- Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones que comprenden polipéptidos de quimiodenervación postsináptica y procedimientos para utilizarlos tal como se definen en las reivindicaciones. Los polipéptidos de quimiodenervación postsináptica objeto de la presente invención incluyen α -neurotoxinas de cadena
40 corta, así como α -neurotoxinas de cadena larga que se unen preferentemente al nAChR muscular humano en lugar de al nAChR neuronal humano que contiene $\alpha 7/4/3/2$. Los polipéptidos objeto de la invención muestran una afinidad al menos 100 veces mayor por los nAChR musculares que contienen subunidades $\alpha 1$ humanas que por cualquiera de los nAChR neuronales que contienen subunidades $\alpha 7$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 2$, más preferentemente una afinidad al menos 500 veces mayor y, aún más preferentemente, una afinidad al menos 1000 veces mayor. Como se describe en esta
45 invención, la afinidad de una α -neurotoxina por un receptor humano concreto se puede expresar como la inversa de la constante de disociación en equilibrio ($1/K_D$) medida en ensayos de unión al receptor con moléculas de toxina marcadas.

- Las moléculas de neurotoxina preferidas para su utilización en las composiciones y procedimientos objeto de la
50 presente invención se caracterizan además por su baja velocidad de disociación en equilibrio del nAChR de subtipo muscular humano. Tal como se describe en esta invención, la constante de disociación representa la concentración molar a la cual el 50% de la neurotoxina existe como moléculas libres disociadas y el 50% permanece unido al receptor.

- Los polipéptidos postsinápticos de quimiodenervación objeto de la invención encuentran un uso ventajoso en
55 composiciones y procedimientos para la inhibición no permanente y localizada de la función de las células musculares, y para reducir los efectos de los neurotransmisores en las uniones neuromusculares y, por lo tanto, inducir la parálisis temporal de los músculos esqueléticos. Estos efectos son útiles para el tratamiento de contracciones musculares aberrantes o no deseadas, entre otros el tratamiento cosmético de arrugas faciales, en el estrabismo, el blefaroespasma, diversas distonías y otras afecciones con componentes neuromusculares, así como en la parálisis
60 muscular transitoria en entornos quirúrgicos que requieren la inmovilización parcial del paciente, como por ejemplo diversas intervenciones ortopédicas.

En algunas realizaciones, una composición de la invención consiste esencialmente en un polipéptido de α -neurotoxina de quimiodenervación postsináptica que tiene las características de constante de unión que se estipulan en esta invención. Tal como se usa en esta invención, la expresión «constituido esencialmente por» y sus equivalentes gramaticales limitan el alcance de una reivindicación a los materiales especificados y a aquellos que no afectan materialmente a la característica o características básicas y novedosas de la invención reivindicada. Por ejemplo, una composición constituida esencialmente por un polipéptido puede carecer de elementos que afecten materialmente la actividad deseada de la composición como un todo.

En un caso, los polipéptidos de quimiodenervación postsinápticos objeto de la invención son α -neurotoxinas de cadena larga. Las α -neurotoxinas de cadena larga comprenden generalmente cinco puentes disulfuro e, invariablemente, comprenden 10 residuos de cisteína. (véase Walkinshaw, *supra*, como referencia). En la Tabla 1 del presente documento, se proporcionan ejemplos de secuencias de α -neurotoxina de cadena larga nativas. En cambio, las moléculas de α -neurotoxina de cadena larga empleadas en la presente invención tienen solo cuatro puentes disulfuro y les falta el puente disulfuro típico de la punta del asa II (dedo II). En una realización, las moléculas de α -neurotoxina de cadena larga nativas aisladas que carecen naturalmente de un quinto disulfuro se emplean como agentes de quimiodenervación según las presentes enseñanzas, de los cuales se proporcionan ejemplos en la Tabla 2 del presente documento. En realizaciones alternativas, las α -neurotoxinas de cadena larga nativas que poseen un quinto puente disulfuro entre el cuarto y el quinto residuo de cisteína del extremo N se modifican para eliminar el puente. Tal como se muestra en la Figura 1, los cuatro puentes disulfuro invariables en las α -neurotoxinas de cadena larga producen un pliegue de cadena beta de tres dedos con un quinto puente disulfuro formado en la punta de la segunda asa, que falta o se elimina según las enseñanzas del presente documento.

En una realización, los polipéptidos de quimiodenervación postsináptica objeto de la presente invención son α -neurotoxinas de cadena larga en las que al menos uno de entre los residuos de cisteína cuarto y/o quinto contados desde el extremo N se reemplaza con un aminoácido distinto de la cisteína, preferentemente con un aminoácido seleccionado entre el grupo formado por metionina, valina, leucina, isoleucina, arginina, lisina, asparagina, glutamina, fenilalanina, tirosina, triptófano, más preferentemente con un aminoácido seleccionado del grupo que comprende serina, alanina, treonina y glicina.

En una realización, los polipéptidos de quimiodenervación postsináptica objeto de la presente invención son α -neurotoxinas de cadena corta y, más preferentemente, α -neurotoxinas de cadena corta recombinantes expresadas a partir de sistemas huésped/vector adecuados y purificadas como una composición de toxina única y homogénea. Las α -neurotoxinas de cadena corta comprenden cuatro cinco puentes disulfuro e, invariablemente, comprenden 8 residuos de cisteína. (véase Walkinshaw, *supra*, como referencia). En la Tabla 3 del presente documento, se proporcionan ejemplos de secuencias de α -neurotoxina de cadena larga nativas.

Las moléculas de α -neurotoxina de cadena larga y cadena corta preferidas que pueden aislarse y/o modificarse según las presentes enseñanzas incluyen α -neurotoxinas procedentes de serpientes del orden elapidae, preferentemente de serpientes elapidae pertenecientes a los géneros Naja, Dendroaspis, Pseudonaja, Ophiophagus, Bungarus, Laticauda, Austrelaps, Lapemis, Pseudechis, Notechis, Oxyuranus, Tropidechis, Acanthophis, Aspidelaps, Astrotia y Demansia, más preferentemente de Naja kaouthia, Naja, Naja sputatrix, Naja haje, Naja oxiana, Naja nivea, Naja melanoleuca, Ophiophagus hannah, Pseudonaja textiles, Dendroaspis viridis, Dendroaspis jamesoni, Dendroaspis viridis, Dendroaspis polylepis, Acanthophis antarcticus, Aspidelaps scutatus, Astrotia stokesii, Austrelaps superbus, Bungarus candidus, Boulengerina annulata, Bungarus flaviceps, Bungarus multicinctus, Bungarus multicinctus, Demansia vestigiata, Laticauda laticaudata, Laticauda colubrine, Lapemis hardwickii, Laticauda semifasciata, Notechis scutatus, Oxyuranus scutellatus, Oxyuranus microlepidotus, Pseudechis australis y Tropidechis carinatus.

Las α -neurotoxinas descritas en esta invención se pueden producir mediante varias técnicas bien conocidas que incluyen, *p.ej.*, la reducción de cisteína limitada postraduccion de las α -neurotoxinas nativas aisladas, seguida de la modificación química estable de los residuos de cisteína reducidos; o la manipulación genética de secuencias de ácidos nucleicos nativas acompañada de la producción recombinante, y/o la síntesis química de las correspondientes secuencias de aminoácidos de α -neurotoxinas modificadas.

En realizaciones preferidas, los polipéptidos de quimiodenervación postsináptica objeto de la invención se proporcionan como composiciones homogéneas de una sola especie de α -neurotoxina, o como una mezcla definida de dos o más especies de α -neurotoxina cuyas secuencias y actividades son conocidas. Las α -neurotoxinas recombinantes, particularmente preferidas, son producidas por expresión recombinante en un sistema huésped/vector adecuado y purificadas hasta la homogeneidad. Las α -neurotoxinas recombinantes pueden expresarse a partir de ADNc clonado en un vector plasmídico de expresión y los ADNc de moléculas de α -neurotoxina individuales se pueden clonar a partir de preparaciones de ARN total o ARNm de la glándula venenosa, mediante técnicas estándar que son bien conocidas en la técnica.

En un aspecto, la descripción proporciona procedimientos para utilizar los polipéptidos de quimiodenervación postsináptica objeto de la presente invención para la inhibición localizada de la función del músculo esquelético y para reducir los efectos de los neurotransmisores en las uniones neuromusculares. En un caso, se proporcionan procedimientos para paralizar transitoriamente un músculo o grupo de músculos deseados junto con procedimientos quirúrgicos. Los procedimientos incluyen la administración, a un músculo o grupo de músculos involucrados en un procedimiento quirúrgico, de un polipéptido de quimiodenervación postsináptica en una cantidad eficaz para inmovilizar el músculo o grupo de músculos durante el período de tiempo deseado, por ejemplo, la duración del procedimiento quirúrgico, de una parte del mismo o un intervalo que se prolongue más allá del procedimiento quirúrgico. Los polipéptidos amplían considerablemente las capacidades del cirujano para efectuar la reparación de tejidos y huesos sin necesidad de anestesia prolongada y/o general.

Según un aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos para aumentar la relajación o el debilitamiento del tejido cutáneo. Los procedimientos incluyen la administración tópica a un tejido cutáneo de un polipéptido de quimiodenervación postsináptica en una cantidad eficaz para aumentar la denervación del músculo esquelético o grupo de músculos esqueléticos presentes bajo el tejido cutáneo para aumentar la relajación o el debilitamiento del tejido cutáneo. En algunos casos, el polipéptido se administra por vía subcutánea. En otros casos, el polipéptido se administra por vía intramuscular o transdérmica. Preferentemente, la relajación o el debilitamiento del tejido cutáneo da lugar a una disminución de las arrugas o líneas finas de la piel.

En algunas realizaciones, los procedimientos también incluyen la administración conjunta de un agente antiarrugas escogido entre el grupo formado por hidroxiácidos y retinoides. En realizaciones preferidas de la invención, el hidroxiácido se escoge entre el grupo formado por α -hidroxiácidos y β -hidroxiácidos, que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos y saturados o insaturados, y el retinoide se escoge entre el grupo formado por ácido retinoico, retinol, ésteres de retinol, ácido hialurónico y/o colágeno.

Según otro aspecto de la descripción, se proporcionan procedimientos para tratar el espasmo o la contracción involuntaria en un músculo o un grupo de músculos de un sujeto. Los procedimientos incluyen la administración, a un músculo o un grupo de músculos de un sujeto que precisa dicho tratamiento, de un polipéptido de quimiodenervación postsináptica en una cantidad eficaz para inhibir el espasmo o la contracción involuntaria en el músculo o grupo de músculos del sujeto.

En algunos casos, el sujeto que precisa dicho tratamiento padece blefaroespasma, estrabismo, tortícolis espasmódica, distonía focal, distonía mandibular, distonía ocupacional, ulceración corneal (ptosis protectora), disfonía espasmódica (distonía laríngea) o discinesias faciales como el síndrome de Meige, espasmo hemifacial, regeneración aberrante del nervio facial o blefarocolisis (o apraxia de la apertura palpebral).

En un aspecto, la descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se proporcionan procedimientos para producir un medicamento útil para el tratamiento de un trastorno neuromuscular.

Estos y otros aspectos de la invención, así como diversas ventajas y utilidades, resultarán más evidentes haciendo referencia a la descripción detallada de las realizaciones preferidas.

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra el pliegue de cadena beta de tres dedos y cinco puentes disulfuro que se encuentran comúnmente en las α -neurotoxinas de cadena larga, con el quinto disulfuro en la punta del segundo dedo y asa.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Tal como se detalla en esta invención, los presentes inventores han determinado que los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente son agentes de quimiodenervación superiores en comparación con las neurotoxinas de acción presináptica de la técnica anterior. Los polipéptidos postsinápticos de quimiodenervación objeto de la invención encuentran un uso ventajoso en composiciones y procedimientos para la inhibición localizada de la función de las células musculares, y para reducir los efectos de los neurotransmisores en las uniones neuromusculares y, por lo tanto, inducir la parálisis de los músculos esqueléticos. Estos efectos, que en esta invención se denominan «quimiodenervación», son útiles para el tratamiento de contracciones musculares aberrantes o no deseadas, entre otros el tratamiento cosmético de arrugas faciales, en el estrabismo, el blefaroespasma, diversas distonías y otras afecciones con componentes neuromusculares, así como en la parálisis muscular transitoria en entornos quirúrgicos que requieren la inmovilización parcial del paciente, como por ejemplo diversas intervenciones ortopédicas.

Polipéptidos de quimiodenervación postsináptica

Los polipéptidos de quimiodenervación postsináptica objeto de la invención tienen una afinidad al menos 100 veces mayor por los nAChR que contienen la subunidad $\alpha 1$ que por los nAChR con la subunidad $\alpha 7$, más preferentemente al menos una afinidad 500 veces mayor, y aún más preferentemente al menos una afinidad 1000 veces mayor.

Los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención tienen preferentemente una constante de disociación en equilibrio (K_D) inferior a 1×10^{-8} M, más preferentemente inferior a 1×10^{-9} M, más preferentemente inferior a 1×10^{-10} M y, en algunas realizaciones, inferior a 1×10^{-11} M.

En una realización, los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención tienen preferentemente una velocidad de disociación en equilibrio (k_{off}) inferior a $1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, más preferentemente inferior a $1 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, más preferentemente inferior a $1 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ y, en algunas realizaciones, inferior a $1 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$.

En una realización, los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención tienen preferentemente una constante de velocidad de asociación en equilibrio (k_{on}) superior a $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, más preferentemente superior a $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

En una realización, se proporcionan α -neurotoxinas de cadena corta aisladas como polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente. En otra realización, se proporcionan α -neurotoxinas de cadena larga nativas aisladas que carecen del típico puente disulfuro en la porción de la punta del dedo del asa 2 como polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente. En otra realización, se proporcionan α -neurotoxinas de cadena larga nativas aisladas que carecen del típico puente disulfuro en la porción de la punta del dedo del asa 2 como polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente.

Por lo tanto, la invención engloba las α -neurotoxinas de cadena corta aisladas, las α -neurotoxinas nativas aisladas de cadena larga desprovistas del típico puente disulfuro en la porción de la punta del dedo del asa 2 (es decir, el puente disulfuro que se forma normalmente entre el cuarto y el quinto residuo de cisteína del extremo N del polipéptido) y α -neurotoxinas modificadas de cadena larga desprovistas del típico puente disulfuro en la porción de la punta del dedo del asa 2. En realizaciones preferidas, las α -neurotoxinas del sujeto son recombinantes.

Tal como se usa en esta invención, una «variante funcional», «variante» o «modificación» de una molécula nativa de α -neurotoxina de cadena larga (es decir, una « α -neurotoxina de cadena larga modificada») es una molécula que contiene al menos 63 residuos de aminoácidos y que presenta solo cuatro puentes disulfuro en comparación con los cinco puentes disulfuro del correspondiente polipéptido nativo. Tal como se usa en esta invención, las moléculas de α -neurotoxina de cadena larga «nativas» son moléculas de tipo salvaje que se encuentran en el veneno de diversas especies de serpientes, incluidas las descritas en la Tabla 2, de las cuales se muestran las secuencias de aminoácidos completas. Las α -neurotoxinas de cadena corta, por su naturaleza, carecen de un quinto puente disulfuro. Las α -neurotoxinas de cadena corta modificadas (p. ej., variantes que comprenden sustituciones conservadoras de aminoácidos) en las que la variante mantiene su capacidad de unirse selectivamente al $\alpha 1$ nAChR, preferentemente con una afinidad comparable a la α -neurotoxina de cadena corta nativa, también se engloban en la invención.

Los clones de ADN que codifican neurotoxinas α de cadena larga y neurotoxinas α de cadena corta nativas pueden ser obtenidos fácilmente por un experto en la materia utilizando información publicada acerca de las secuencias y empleando técnicas convencionales de ADN recombinante, como la síntesis de genes, el aislamiento de ARN, la transcripción inversa a ADNc a partir de ARN total o ARNm aislados acompañada de la amplificación de secuencias de codificación de α -neurotoxinas individuales del conjunto de ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos de neurotoxinas diseñados atendiendo a la información publicada relativa a las secuencias.

La presente invención reconoce por primera vez que las neurotoxinas con mecanismos de acción postsinápticos proporcionan agentes de quimiodenervación superiores para su utilización en la parálisis de los músculos esqueléticos. Los agentes objeto de la invención ofrecen varias ventajas respecto a los agentes de acción presináptica de la técnica anterior. Entre ellas se incluyen una menor toxicidad y menos efectos secundarios, falta de latencia para el efecto de parálisis, dosificación eficaz determinable inmediatamente y una parálisis temporal pero duradera. Además, se proporciona una serie de polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente con diversas potencias, lo que amplía el intervalo de duración de la parálisis que puede alcanzarse con esta clase de agentes.

La «afinidad», tal como se usa en esta invención, se expresa como el inverso de la constante de disociación en equilibrio de la α -neurotoxina individual con el nAChR escogido como objetivo. En una realización, una α -neurotoxina de cadena larga empleada en las composiciones y procedimientos objeto de la invención presenta una constante de

disociación en equilibrio con respecto a la nAChR muscular humana al menos 10 veces menor que la de las típicas α -neurotoxinas de cadena corta, como la erabutoxina b o las α -conotoxinas, preferentemente una constante de disociación en equilibrio al menos 100 veces inferior y, más preferentemente, una constante de disociación en equilibrio al menos 500 veces inferior.

5

En una realización, los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente que se emplean en las composiciones y procedimientos objeto de la invención presentan *in vivo* un efecto de denervación muscular que dura al menos 2, 4 o 6 horas, más preferentemente al menos 8, 12 o 24 horas, preferentemente al menos 48 horas y más preferentemente al menos de 3 a 7 días.

10

Las composiciones objeto de la invención comprenden polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención aislados. Tal como se usa en esta invención con respecto a los polipéptidos, «aislado» significa separado de su entorno nativo y presente en cantidad suficiente para permitir su identificación o utilización. El término «aislado», cuando se refiere a una proteína o polipéptido, significa, por ejemplo: 1) producido selectivamente por clonación de expresión o 2) purificado mediante cromatografía o electroforesis. Las proteínas o polipéptidos aislados pueden ser sustancialmente puros, aunque no necesariamente. La expresión «sustancialmente puro» significa que las proteínas o polipéptidos no contienen básicamente ninguna otra sustancia junto a la cual pueden encontrarse en la naturaleza o en sistemas *in vivo* en la medida que pueda resultar práctica y apropiada para su utilización prevista. Los polipéptidos sustancialmente puros se pueden producir mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Debido a que una proteína aislada puede mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, la proteína puede comprender solo un pequeño porcentaje en peso de la preparación. Sin embargo, la proteína está aislada porque se ha separado de las sustancias con las que puede estar asociada en los sistemas vivos, es decir, está aislada de otras proteínas.

25 α -Neurotoxinas modificadas

En una realización, el polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente es una molécula de α -neurotoxina modificada.

Las modificaciones en las moléculas de α -neurotoxina se pueden llevar a cabo en un ácido nucleico que codifica el polipéptido y pueden incluir delecciones, mutaciones puntuales, truncamientos, sustituciones de aminoácidos y adiciones de aminoácidos. Otra posibilidad consiste en realizar modificaciones directamente en el polipéptido en sí, por ejemplo, mediante una reducción química irreversible de las cisteínas en un puente disulfuro, escisión, adición de una molécula de enlace, adición de una fracción detectable, por ejemplo, biotina, adición de un ácido graso, pegilación, sustitución de un aminoácido por otro y similares. Las α -neurotoxinas pueden estar compuestas por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados genéticamente. Las α -neurotoxinas pueden modificarse mediante procesos naturales, como el procesamiento postraduccion, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Dichas modificaciones se han descrito suficientemente en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación.

Las modificaciones pueden tener lugar en cualquier lugar del polipéptido, incluido el esqueleto del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en igual o distinto grado en diversas ubicaciones de un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados, por ejemplo, debido a una ubicuitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificaciones. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden producirse como resultado de procesos naturales de postraduccion o pueden obtenerse mediante procedimientos sintéticos. Las modificaciones pueden incluir acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de una fracción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes de disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclas de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia tal como arginilación y ubicuitinación; (véase, por ejemplo, *Proteínas - Estructura y propiedades moleculares*, 2ª ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter y col., *Meth Enzymol* 182: 626-646 (1990); Rattan y col., *Ann NY Acad Sci* 663: 48-62 (1992).)

Las variantes funcionales de las moléculas de α -neurotoxina nativas y modificadas incluyen fragmentos de las moléculas de polipéptido. Un fragmento, tal como se usa en esta invención, es una molécula de α -neurotoxina que carece de uno o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de α -neurotoxina nativa. Los fragmentos pueden

tener uno o más aminoácidos eliminados de uno o ambos extremos de la molécula de α -neurotoxina, o en la secuencia interna de la molécula, y combinaciones de los mismos. Los fragmentos empleados en la presente invención deben retener al menos una parte sustancial de la actividad de unión al nAChR muscular de la molécula de α -neurotoxina de longitud completa de la que se derivaron los fragmentos (moléculas de α -neurotoxina de cadena larga nativas o modificadas). Cualquier experto en la materia está capacitado para analizar los fragmentos con el fin de determinar la actividad de unión del fragmento. En el apartado de Ejemplos se proporcionan procedimientos ejemplares para determinar la unión al nAChR, junto con líneas celulares preferidas para su utilización en dichos procedimientos.

10 Cuando la secuencia nativa de la α -neurotoxina de cadena larga incluye un quinto puente disulfuro formado entre el cuarto y el quinto residuo de cisteína del extremo N del polipéptido, las modificaciones preferidas darán como resultado la eliminación permanente de dicho puente para mejorar la selectividad por el nAChR muscular humano. En una realización, se emplea la reducción química con reactivos de acilación que reaccionan al tiol para eliminar permanentemente el quinto puente disulfuro en una α -neurotoxina de cadena larga nativa aislada. En una realización alternativa y preferida, se emplean técnicas de manipulación genética para alterar la secuencia de codificación de al menos una de las cisteínas cuarta o quinta posteriores al extremo N de la secuencia nativa, de modo que el polipéptido resultante solo forme cuatro puentes disulfuro. Las variantes particularmente preferidas tendrán al menos una de las cisteínas cuarta o quinta sustituidas por un aminoácido distinto a la cisteína, preferentemente por un aminoácido escogido entre el grupo formado por valina, leucina, isoleucina, arginina, lisina, asparagina, glutamina, fenilalanina, tirosina, triptófano, más preferentemente con un aminoácido escogido entre el grupo que comprende serina, alanina, 20 treonina, metionina y glicina.

Si las moléculas modificadas de α -neurotoxina incluyen sustituciones de aminoácidos adicionales sin un cambio en la especificidad de la unión, se preferirán las sustituciones conservadoras de aminoácidos, es decir, las sustituciones que conserven una propiedad del aminoácido original, como la carga, hidrofobia, polaridad, conformación, etc. Los 25 ejemplos de sustituciones conservadoras de aminoácidos comprenden sustituciones realizadas entre aminoácidos incluidos en los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D. Dichas sustituciones conservadoras también se pueden realizar en la derivación de variantes de α -neurotoxina de cadena corta.

30 La descripción también incluye la utilización de secuencias de ácido nucleico que incluyen codones alternativos que codifican los mismos residuos de aminoácidos de las moléculas de α -neurotoxina. Los residuos de leucina, por ejemplo, pueden ser codificados por los codones CUA, CUC, CUG, CUU, UUA y UUG. Cada uno de los seis codones es equivalente para codificar un residuo de leucina. Por lo tanto, será evidente para un experto en la materia que puede emplearse cualquiera de los tripletes de nucleótidos que codifican leucina para dirigir el aparato de síntesis de 35 proteínas, in vitro o in vivo, para incorporar un residuo de leucina. De manera similar, los tripletes de la secuencia de nucleótidos que codifican otros residuos de aminoácidos incluyen: GUA, GUC, GUG y GUU (codones de valina); GGU, GGA, GGG, GGC (codones de glicina); UAC y UAU (codones de tirosina). Otros residuos de aminoácidos pueden estar codificados de manera similar por múltiples secuencias de nucleótidos. Por lo tanto, la descripción abarca los ácidos nucleicos degenerados que difieren de los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de α -neurotoxina 40 nativas en la secuencia del codón debido a la degeneración del código genético.

También se entenderá que la descripción abarca la utilización de las secuencias en vectores de expresión, así como para transfectar células huésped y líneas celulares, ya sean estas procariotas (p. ej., *Escherichia coli*) o eucariotas (p. ej., Sistemas de expresión de levadura como *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*, células CHO, células COS 45 y expresión del baculovirus recombinante en células de insecto). Los vectores de expresión requieren que la secuencia pertinente, es decir, las descritas anteriormente, esté unida operativamente a un promotor.

Tal como se usa en esta invención, un «vector» puede ser cualquiera de una serie de ácidos nucleicos en los que se puede insertar una secuencia deseada mediante restricción y ligadura para el transporte entre diferentes entornos 50 genéticos o para la expresión en una célula huésped. Los vectores suelen estar formados por ADN, aunque también hay disponibles vectores de ARN. Los vectores incluyen, no exclusivamente, plásmidos, fagémidos, genomas de bacterias y genomas de virus. Un vector de clonación es aquel que puede replicarse en una célula huésped o replicarse después de su integración en el genoma de una célula huésped, y que se caracteriza además por uno o más sitios de restricción de endonucleasa en los que el vector puede cortarse de una manera determinada y en la que se puede 55 ligar una secuencia de ADN deseada de modo que el nuevo vector recombinante conserve su capacidad de replicarse en la célula huésped. En el caso de los plásmidos, la replicación de la secuencia deseada puede ocurrir muchas veces a medida que el plásmido aumenta en número de copias dentro de la bacteria huésped o solo una vez por huésped antes de que el huésped se reproduzca por mitosis. En el caso del fago, la replicación puede ocurrir activamente durante una fase lítica o pasivamente durante una fase lisogénica. Un vector de expresión es aquel en el que se puede 60 insertar una secuencia de ADN deseada por restricción y ligadura de modo que se una operativamente a secuencias reguladoras y que se pueda expresar como un transcrito de ARN. Los vectores pueden contener además una o más secuencias marcadoras adecuadas para su utilización en la identificación de células que han sido o no transformadas

o transfectadas con el vector. Los marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican proteínas que aumentan o disminuyen la resistencia o la sensibilidad a los antibióticos u otros compuestos, genes que codifican enzimas cuyas actividades son detectables por ensayos estándar conocidos en la técnica (por ejemplo, β -galactosidasa, luciferasa o fosfatasa alcalina) y genes que afectan visiblemente al fenotipo de células, huéspedes, colonias o placas transformadas o transfectadas (p. ej., proteína verde fluorescente). Los vectores preferidos son aquellos capaces de llevar a cabo la replicación autónoma y la expresión de los productos genéticos estructurales presentes en los segmentos de ADN a los que están unidos operativamente.

Tal como se usa en esta invención, se dice que una secuencia de codificación y unas secuencias reguladoras están unidas «operativamente» cuando se unen covalentemente de manera que la expresión o transcripción de la secuencia de codificación se sitúe bajo la influencia o control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias de codificación se traduzcan en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están unidas operativamente si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras 5' da como resultado la transcripción de la secuencia de codificación y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) da lugar a la introducción de una mutación de cambio de marco, (2) ni interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de las secuencias de codificación, ni (3) interfiere con la capacidad de la correspondiente transcripción de ARN para traducirse en una proteína. Por lo tanto, una región promotora estaría unida operativamente a una secuencia codificadora si la región promotora fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de modo que el transcrito resultante pudiera traducirse en la proteína o polipéptido deseado.

La naturaleza concreta de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre especies o tipos de células, pero en general deben incluir, en la medida en que sea necesario, secuencias 5' no transcritas y 5' no traducidas involucradas en el inicio de la transcripción y traducción respectivamente, tales como una caja TATA, secuencia de límite, secuencia CAAT y similares. Preferentemente, dichas secuencias reguladoras 5' no transcritas incluirán una región promotora que incluya una secuencia promotora para el control transcripcional del gen unido operativamente. Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras previas según se desee. Los vectores de la invención pueden incluir opcionalmente secuencias líder o señal 5'. La elección y el diseño de un vector apropiado son asequibles para las capacidades y el criterio de cualquier experto en la materia.

Los vectores de expresión que contienen todos los elementos necesarios para la expresión están disponibles comercialmente y son conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Laboratory Press, 1989. Las células se modifican genéticamente mediante la introducción en las células de ADN heterólogo (ARN) que codifica una molécula de polipéptido de quimiodenervación postsináptica. Ese ADN heterólogo (ARN) se pone bajo el control operativo de elementos transcripcionales para permitir la expresión del ADN heterólogo en la célula huésped.

Los sistemas preferidos para la expresión de ARNm en células de mamíferos son aquellos que, como pcDNA3.1 (disponible en Invitrogen, Carlsbad (California)), contienen un marcador seleccionable como, por ejemplo, un gen que confiere resistencia a G418 (lo que facilita la selección de líneas celulares transfectadas de forma estable) y las secuencias potenciadoras-promotoras del citomegalovirus humano (CMV).

El vector de expresión se selecciona para que sea compatible con el organismo huésped. Se puede emplear una gran variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión para expresar el ADN que codifica el polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente. Existen numerosas líneas de células huésped, vectores de expresión y componentes del vector de expresión disponibles comercialmente. Los expertos en la materia pueden seleccionar con facilidad combinaciones de vectores de expresión/huésped compatibles. En una realización preferida de la invención, el organismo huésped es *Pichia pastoris* y el vector de expresión es uno de los vectores de la serie pPIC (Invitrogen, Carlsbad (California); véase también la sección de Ejemplos). En otra realización de la invención, el organismo huésped es *Escherichia coli* y el vector de expresión es uno de los vectores de la serie pET (Novagen, Madison (Wisconsin); véase también la sección de Ejemplos), en particular, vectores pET que proporcionan presecuencias de señal de secreción para la exportación de la α -neurotoxina recombinante al espacio periplásmico.

El procedimiento preferido para obtener los polipéptidos de quimiodenervación postsináptica es la producción recombinante, que conlleva la transformación genética de una célula huésped con un vector de ADN recombinante que codifica un polipéptido de quimiodenervación postsináptica según las presentes enseñanzas, la expresión del ADN recombinante en la célula huésped transformada y la recogida y purificación del polipéptido. Preferentemente, el organismo huésped es unicelular. Más preferentemente, el organismo huésped es una levadura, en particular *Pichia pastoris*, o una bacteria, en particular *E. coli*.

Aunque las α -neurotoxinas nativas se pueden obtener directamente a partir de venenos de serpiente mediante purificación, la cantidad de una α -neurotoxina individual que puede obtenerse a partir de una sola muestra es bastante

pequeña. Además, la purificación de las α -neurotoxinas individuales hasta la homogeneidad a partir de venenos es muy costosa y laboriosa. Los intentos de purificar cantidades significativas de neurotoxinas individuales a partir de venenos de serpiente también se ven obstaculizados por el hecho de que cualquier veneno de serpiente contiene un gran número de polipéptidos de toxina de tres dedos con propiedades fisicoquímicas similares, que son difíciles de separar entre sí. Esto conlleva la propensión a la contaminación cruzada por neurotoxinas similares de tres dedos. Debido al amplio espectro de los efectos tóxicos causados por diferentes toxinas de tres dedos, dicha contaminación cruzada puede dar lugar a efectos secundarios impredecibles y potencialmente graves. Por consiguiente, los polipéptidos de quimiodenervación postsináptica objeto de la invención se proporcionan preferentemente como una composición homogénea de un solo tipo de molécula de α -neurotoxina, o como una mezcla definida de dos o más especies de α -neurotoxina cuyas secuencias y actividades son conocidas y han sido caracterizadas.

Otra alternativa para obtener polipéptidos de quimiodenervación dirigida de manera postsináptica sustancialmente puros es una síntesis química que emplea una estrategia de fase sólida, demostrada por Mourier G. y col. (Protein Eng. 2000 Mar; 13 (3): 217-25). Sin embargo, debido al tamaño de los polipéptidos de la invención, que varían de 60 a 80 aminoácidos, este procedimiento es menos preferible para la producción a escala comercial.

Los deseados polipéptidos de quimiodenervación sustancialmente puros se obtienen prácticamente en cantidades comercialmente valiosas mediante la expresión recombinante en un organismo huésped adecuado, seguida de la purificación cromatográfica. Los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Dichas técnicas fueron descritas por Sambrook y col. (1989). Las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de α -neurotoxina se pueden aislar y clonar mediante técnicas convencionales. Otra posibilidad consiste en sintetizar las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de α -neurotoxina en función de las secuencias de aminoácidos del polipéptido y la degeneración conocida del código genético. Los ácidos nucleicos para los polipéptidos se pueden diseñar para conseguir la máxima expresión en un sistema huésped dado. Los polipéptidos producidos de esta manera se aíslan, se reducen si es necesario y se oxidan para formar los cuatro puentes disulfuro deseados, tal como se detalla en esta invención. Para lograrlo, se pueden emplear diversos sistemas huésped-vector optimizados para un plegado correcto y la formación de disulfuro in vivo, disponibles comercialmente y muy conocidos para cualquier experto en la materia. Lyukmanova E. N., y col. (J Biol Chem. 24 de agosto de 2007; 282 (34): 24784-91) y Peng LS y col. (Toxicol., diciembre de 2003; 42 (7): 753-61) y Wang Y. y col. (J Biotechnol. 11 de abril de 2002; 94 (3): 235-44), incluidos en esta invención a modo de referencia, han logrado demostrar la expresión de alto rendimiento de moléculas de α -neurotoxinas de cadena larga y corta biológicamente activas en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*.

Un procedimiento para formar puentes disulfuro en las neurotoxinas α consiste en la oxidación al aire de los péptidos lineales durante períodos prolongados a temperaturas frías o a temperatura ambiente. Este procedimiento da lugar a la creación de una cantidad sustancial de péptidos bioactivos unidos por disulfuros. Los péptidos oxidados se fraccionan mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa o similar, para separar los péptidos que tienen diferentes configuraciones de unión. Posteriormente, ya sea comparando estas fracciones con la elución del material nativo o mediante un ensayo simple, se determina con facilidad la fracción concreta que posee la unión correcta para lograr la máxima potencia biológica. También se observa que en ocasiones se puede emplear el péptido lineal, o el producto oxidado con más de una fracción, para su administración in vivo, ya que se ha descubierto que la reticulación y/o reordenamiento que se produce in vivo crea la molécula de α -neurotoxina biológicamente potente. Sin embargo, debido a la dilución ocasionada por la presencia de otras fracciones de menor potencia biológica, puede ser necesaria una dosis algo mayor.

También se pueden preparar análogos de péptidos y peptidomiméticos que sean específicos para el nAChR muscular basándose en las enseñanzas descritas en esta invención, mediante el modelado de fármacos, diseño de fármacos y química combinatoria convencionales. Las técnicas adecuadas incluyen, no exclusivamente, las descritas en la patente de EE. UU. n.º 5.571.698, el documento WO 95/21193, Ecker y Cook (Bio/Technology 13: 351-360 (1995)), Persidis y Persidis (Bio/Technology 15: 1035-1036 (1997)), Johnson y col. («Peptide Turn Mimetics» en Biotechnology and Pharmacy, Pezzato y col., eds., Chapman and Hall, Nueva York (1993)), Sun y Cohen (Gene 137: 127-132 (1993)) y las referencias allí citadas. El desarrollo de análogos de péptidos y peptidomiméticos se lleva cabo utilizando un software de diseño de fármacos disponible comercialmente, incluidos los expuestos en la referencia de Persidis y Persidis. Estos análogos de péptidos y peptidomiméticos tienen las mismas actividades que las α -neurotoxinas descritas en esta invención y en la bibliografía publicada. Los análogos y derivados de péptidos se pueden preparar siguiendo técnicas convencionales. Las técnicas adecuadas para la síntesis de péptidos se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.514.774, así como en las referencias citadas en dicho documento. Los peptidomiméticos se sintetizan de manera similar mediante técnicas convencionales.

Tal como se usa en esta invención con respecto a los ácidos nucleicos, el término «aislado» significa: 1) amplificado in vitro mediante, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (RCP); 2) producido de manera recombinante por clonación; 3) purificado, por ejemplo, mediante escisión y separación en gel; o 4) sintetizado, por ejemplo, mediante

síntesis química. Un ácido nucleico aislado es aquel que puede manipularse con facilidad mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos contenida en un vector del que se conocen los sitios de restricción 5' y 3' o para el que se han desvelado secuencias cebadoras de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se considera aislada, pero no así una secuencia de ácidos nucleicos existente en su estado nativo en su huésped natural. Un ácido nucleico aislado puede estar sustancialmente purificado, pero no es necesario. Por ejemplo, un ácido nucleico que está aislado dentro de un vector de clonación o expresión no es puro, ya que puede comprender solo un pequeño porcentaje del material existente en la célula en la que reside. Sin embargo, dicho ácido nucleico está aislado, ya que en esta invención se le aplica dicho término debido a que se puede manipular fácilmente mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia. Un ácido nucleico aislado, tal como se emplea en esta invención, no es un cromosoma que exista de manera natural.

La invención también engloba α -neurotoxinas de cadena corta modificadas en las que la variante mantiene su capacidad de unirse selectivamente al α -1 nAChR, preferentemente con una afinidad comparable a la de la α -neurotoxina de cadena corta nativa. Se prefieren dichas variantes que comprenden sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Procedimientos de uso

Los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención encuentran un uso ventajoso en composiciones y procedimientos para la inhibición localizada de la función de las células musculares, y para reducir los efectos de los neurotransmisores en las uniones neuromusculares y, por lo tanto, inducir la parálisis de los músculos esqueléticos. Estos efectos, que en esta invención se denominan «quimiodenervación», son útiles para el tratamiento de contracciones musculares aberrantes o no deseadas, entre otros el tratamiento cosmético de arrugas faciales, en el estrabismo, el blefaroespasma, diversas distonías y otras afecciones con componentes neuromusculares, así como en la parálisis muscular transitoria en entornos quirúrgicos que requieren la inmovilización parcial del paciente, como por ejemplo diversas intervenciones ortopédicas.

En un caso, se proporcionan procedimientos para tratar el espasmo o la contracción involuntaria en un músculo o un grupo de músculos de un sujeto. Los procedimientos incluyen la administración, a un músculo o un grupo de músculos de un sujeto que precisa dicho tratamiento, de un polipéptido de quimiodenervación postsináptica en una cantidad eficaz para inhibir el espasmo o la contracción involuntaria en el músculo o grupo de músculos del sujeto.

La administración tópica de los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención es muy deseable. Los ejemplos de trastornos susceptibles de ser tratados mediante la administración tópica de las composiciones expuestas en esta invención incluyen, no exclusivamente, arrugas, por ejemplo los surcos del entrecejo, dolores de cabeza, como cefaleas o migrañas, distonía cervical, distonía focal de la mano, inflamación neurogénica, blefaroespasma, estrabismo, espasmo hemifacial, trastorno palpebral, parálisis cerebral, espasticidad focal, espasticidad de las extremidades, tics, temblores, bruxismo, fisura anal, fibromialgia, disfagia, lagrimeo y dolor por espasmos musculares. La administración tópica de los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención reduce el dolor experimentado por el paciente cuando se administra el polipéptido, ya que no es necesario pinchar al paciente con una aguja que activa las neuronas sensoriales nociceptivas que se hallan bajo la piel. Las composiciones descritas en esta invención proporcionan un alivio localizado con los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente, sin incurrir en el riesgo que supone su administración sistémica.

Otros trastornos en los que es conveniente inducir la parálisis muscular incluyen los estados patológicos en los que actualmente se está utilizando la administración de toxina botulínica. Se describen ejemplos de tales estados patológicos y procedimientos de administración se describen en detalle en las patentes de EE. UU. N.º: 5.298.019 de Borodic (disminución del espasmo o contracción involuntaria en un músculo o grupo de músculos de un paciente inducidos por estimulación neural patológica causada por lesión cerebroespinal o accidente cerebrovascular); 5.721.215 de Aoki y col. (tratamiento de trastornos neuromusculares); 5.714.468 de Binder (reducción del dolor migrañoso); 5.670.484 de Binder (tratamiento de lesiones cutáneas asociadas con un trastorno cutáneo proliferativo celular); y otras patentes de las familias de las citadas.

Los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención también se pueden utilizar para el tratamiento de la espasticidad de las extremidades inferiores relacionada con la parálisis cerebral (Koman y col., J. Pediatr. Orthop. 20 (1): 108-115, 2000), acalasia (Kolbasnik y col., Am. J. Gastroenterol. 94 (12): 3434-3439, 1999), lagrimeo patológico (Riemann y col., Ophthalmology 106 (12): 2322-2324, 1999), granulomas de las cuerdas vocales (Orloff y col., Otolaryngol. Head Neck Surg. 121 (4): 410-413, 1999), páncreas divisum y pancreatitis aguda recurrente, (Wehrmann y col., Gastrointest. Endosc. 50 (4): 545-548, 1999), esotropía de aparición aguda (Dawson y col., Ophthalmology 106 (9): 1727-1730, 1999) y otros trastornos, especialmente aquellos que se benefician de la mejora del control muscular aberrante.

Los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención también se pueden utilizar para tratamientos cosméticos, por ejemplo, solos (Carruthers y col., J. Am. Acad. Dermatol 34 (5 pt 1): 788-977, 1996; Frankel y col., Arch. Otolaryngol Head Neck Surg. 124 (3): 321-323, 1998), en combinación con otros agentes antiarrugas útiles en el tratamiento cosmético de la piel que incluyen, por ejemplo, toxinas botulínicas, o en terapia combinada con rejuvenecimiento por láser y procedimiento quirúrgico (Carruthers y col., Dermatol. Surg. 24 (11): 1244-7, 1998), y similares. Como es sabido por cualquier experto en la materia, los agentes antiarrugas también pueden incluir α -hidroxiácidos y β -hidroxiácidos, que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos y saturados o insaturados, retinoides, incluidos ácido retinoico, retinol y retinol ésteres; colágeno y ácido hialurónico, además del agente descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.869.068.

Otras indicaciones pueden incluir la escoliosis, para la cual se ha sugerido la toxina botulínica A. Véase la patente de EE. UU. n.º 5.053.005 de Borodic. De manera más general, todas las indicaciones para las cuales se ha sugerido la toxina botulínica A como tratamiento para relajar el músculo esquelético se incluyen entre las presentes indicaciones que pueden tratarse mediante los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente.

Para el tratamiento del estrabismo con toxina botulínica de tipo A, véase Elston, J. S., y col., British Journal of Ophthalmology, 1985, 69, 718-724 y 891-896. Para el tratamiento del blefaroespasma con toxina botulínica de tipo A, véase Adenis, J. P., y col., J. Fr. Ophthalmol., 1990, 13 (5) en las páginas 259-264. Para tratar la bizquera, véase Elston, J. S., Eye, 1990, 4 (4): VII. Para tratar la tortícolis espasmódica y distonía oromandibular, véase Jankovic y col., Neurology, 1987, 37, 616-623.

La disfonía espasmódica se ha tratado con toxina botulínica de tipo A. Véase Blitzer y col., Ann. Otol. Rhino. Laryngol, 1985, 94, 591-594. La distonía lingual se ha tratado con toxina botulínica de tipo A, según Brin y col., Adv. Neurol. (1987) 50, 599-608. Por último, Cohen y col., Neurology (1987) 37 (supl. 1), 123-4, describen el tratamiento del calambre del escribiente con toxina botulínica de tipo A.

Los procedimientos de tratamiento según la presente descripción comprenden la administración de polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención para provocar de manera eficaz quimiodenervación y parálisis muscular temporal.

Los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención se administran en cantidades eficaces. Una cantidad eficaz es una dosis del polipéptido objeto de la invención suficiente para proporcionar un resultado deseable desde el punto de vista médico o cosmético. La cantidad eficaz variará con el trastorno concreto que se esté tratando, la edad y la condición física del sujeto que se está tratando, la gravedad del trastorno, la duración del tratamiento, las características de la terapia concurrente (si la hay), la vía específica de administración y factores similares que están al alcance del conocimiento y la pericia del profesional de la salud. Por ejemplo, en relación con el tratamiento del espasmo o la contracción involuntaria de un músculo o un grupo de músculos de un sujeto, una cantidad eficaz es la cantidad que inhibe o reduce el espasmo o la contracción involuntaria. Del mismo modo, una cantidad eficaz para reducir la aparición de arrugas o líneas finas en la piel sería una cantidad suficiente para disminuir o inhibir el tono contráctil muscular del grupo de músculos presentes subcutáneamente bajo de la superficie cutánea arrugada, para permitir la relajación de la superficie cutánea y mejorar su suavidad. Por lo tanto, se entenderá que los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención se pueden utilizar para tratar los trastornos indicados anteriormente según los modos de administración preferidos que se describen a continuación. En general, se prefiere usar una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta según el buen criterio médico. Pueden preferirse administraciones repetidas de pequeñas dosis para reducir el «derramamiento» y, por tanto, efectos innecesarios en tejidos a los que no vaya dirigido el tratamiento.

Ventajosamente, los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención carecen de un período de latencia entre la administración y la parálisis. Por consiguiente, se puede determinar inmediatamente una dosis eficaz. El administrador puede iniciar el tratamiento con una primera dosis y, si observa que la parálisis está por debajo del nivel deseado, puede aumentar la dosis de manera escalonada para lograr el nivel o el alcance deseado de la parálisis.

El término sujeto, tal como se usa en esta invención, hace referencia a cualquier mamífero (preferentemente un ser humano, pero se incluyen primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores) con un trastorno que requiera la inhibición de la actividad neuronal, que dé lugar a períodos prolongados de parálisis (como las condiciones descritas anteriormente).

60 Reducción cosmética de arrugas

Las líneas de expresión facial, como las líneas transversales de la frente o el pliegue nasolabial, son creadas por

conexiones de los músculos faciales que penetran en la dermis. Es bien sabido que en general la contracción de los músculos faciales produce las diversas formas características de las expresiones faciales, como la sonrisa, muecas, etc. Además, la exageración de las líneas faciales también se asocia con el proceso de envejecimiento. El principio general de la aplicación de los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención es el de limitar el estado contráctil tónico de los músculos faciales a fin de reducir el tono muscular y mejorar o cambiar la calidad y las características de la expresión facial.

En una descripción preferida, se puede reducir la intensidad de las líneas transversales de la frente inyectando una cantidad de polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención con un campo de difusión de aproximadamente 5 a 10 mm en cuatro puntos de inyección en el borde superior de la frente y en un punto situado aproximadamente 15 mm por encima del entrecejo. Esto se hace de manera simétrica en ambos lados de la frente. Se puede actuar sobre las líneas glabellares (las líneas del ceño fruncido en la posición central de la frente) tratando los músculos glabellares con una cantidad que produzca un campo de denervación de 5 a 10 mm. El polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención se inyecta 15 mm por encima de la línea de las cejas en la posición central de la frente. Se puede disminuir la intensidad de las líneas del pliegue nasolabial tratando los músculos cigomáticos mayores y menores que parten desde el arco cigomático y se extienden diagonalmente hasta la posición del pliegue nasolabial. Una inyección de polipéptido objeto de la invención que se difunda a una distancia de 5 a 10 mm por encima del borde superior de estos músculos disminuirá esta línea de manera eficaz. Además, la posición de los labios se puede controlar inyectando en los músculos cigomáticos mayores y menores. La protuberancia del labio superior se puede reducir e incluso invertir mediante la inyección en estos músculos. Además, la protuberancia del labio inferior se puede reducir inyectando en el músculo mentoniano en dosis que producen un campo denervante de 5 a 10 mm a la altura de la barbilla, aproximadamente 15 mm por debajo de los labios inferiores en un punto a aproximadamente 5 mm de la línea media.

Otra posibilidad ventajosa en comparación con las toxinas botulínicas, consiste en emplear sistemas transdérmicos para administrar los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención para lograr campos de denervación similares a los obtenidos mediante inyección.

Los procedimientos también pueden incluir la administración conjunta de un agente antiarrugas escogido entre el grupo formado por hidroxiácidos y retinoides. En realizaciones preferidas, el hidroxiácido se escoge entre el grupo formado por α -hidroxiácidos y β -hidroxiácidos, que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos y saturados o insaturados, y el retinoide se escoge entre el grupo formado por ácido retinoico, retinol, ésteres de retinol, ácido hialurónico y/o colágeno.

Inhibición del desgaste dental

El rechinar involuntario de los dientes característico del auténtico bruxismo es causado por contracciones involuntarias de los músculos masetero, temporal y pterigoideo. Generalmente, se suelen escoger los músculos masetero y temporal para someterlos a la quimiodenervación. Se les aplican inyecciones de manera que se limite la penetración de los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención en el volumen y el cuerpo de los músculos. La difusión debe limitarse preferentemente a una distancia de no más de 25 a 35 mm. Preferentemente, se administra una inyección con una dosis unitaria en la superficie de cada uno de estos músculos, en múltiples puntos, de manera percutánea o permucosa. Como es obvio, se debe realizar una evaluación dental adecuada para evaluar el grado de daño o daño potencial en los dientes antes de la aplicación de los polipéptidos objeto de la invención.

Accidente cerebrovascular y lesión cerebroespinal

Las lesiones cerebrovasculares (accidente cerebrovascular y lesión cerebroespinal) pueden provocar espasticidad y contracciones como resultado de la parálisis y la espasticidad. Aunque los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención producen una parálisis, pueden ser útiles para reducir la masa muscular y ayudar en la espasticidad. La espasticidad sintomática puede ocasionar movimientos involuntarios crónicos, así como dificultades con posturas contraídas o contracciones de las extremidades. La aplicación de los polipéptidos objeto de la invención en estos estados espásticos implica el conocimiento de las zonas de inervación de los músculos de las extremidades. El músculo involucrado en la postura anormal o el movimiento anormal se puede identificar con una aguja electromiográfica. Dichos músculos también pueden ser identificados como los causantes de las deformidades posturales basándose en la experiencia y la comprensión de los estados contráctiles del músculo en la posición de las extremidades y su capacidad de movimiento. Estos músculos se atraviesan con una aguja en un sitio cercano a la zona de inervación. En ciertas situaciones, puede ser necesario estimular el músculo con una corriente estimulante a través de una aguja electromiográfica recubierta de teflón para asegurar la ubicación correcta de las inyecciones. El

polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención se inyecta con una dosis apropiada para crear un campo de denervación que abarque la zona de inervación del músculo o todo el músculo. Pueden ser necesarias múltiples inyecciones sobre músculos largos para aislar el efecto sobre ese músculo.

5 *Parálisis cerebral*

La parálisis cerebral se produce a causa de diversas formas de daño cerebral relacionadas con la anoxia o insuficiencia vascular, normalmente en el momento del nacimiento. La destrucción de la corteza central del sistema motor central produce espasticidad involuntaria del movimiento, posturas anormales y contracturas musculares no deseadas. Para 10 tratar la parálisis cerebral, se emplea la fisioterapia y ocasionalmente fármacos antiespasmódicos. En situaciones en las que la espasticidad está relacionada con dolor, deformidad, o limitaciones en las capacidades funcionales de un paciente, puede estar indicada la utilización de los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención. La aplicación conlleva escoger como objetivo grupos musculares vitales para la discapacidad del paciente, como, por ejemplo, los músculos que producen deformaciones de las extremidades o impedimentos en 15 los movimientos volitivos, o en situaciones en las que las contracturas parecen estar evolucionando hacia posturas anormales.

La dosificación para el tratamiento de esta enfermedad conllevará escoger estos músculos como objetivo y emplear una formulación similar a la utilizada para tratar la enfermedad cerebrovascular. El prototipo para aplicaciones en 20 músculos grandes es el de la tortícolis espasmódica. Al músculo escogido como objetivo se le inyecta una dosis suficiente para abarcar la zona de inervación del músculo.

Esclerosis múltiple

25 La esclerosis múltiple es una enfermedad de la sustancia blanca del sistema nervioso central. Está relacionada con un proceso de desmielinización que conduce al deterioro de la vía corticoespinal y las vías asociativas en el tronco encefálico. Esto da lugar a lesiones en la columna y espasticidad. La espasticidad en la esclerosis múltiple puede ser debilitante debido al movimiento involuntario, la contractura, las deformidades posturales y, en ciertas situaciones, el dolor. Dicha espasticidad muscular se puede tratar con los polipéptidos de quimiodenervación dirigida 30 postsinápticamente objeto de la invención.

De nuevo, el polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención se dirige a los músculos que el médico, neurólogo, podólogo o cirujano ortopédico determine que parecen ser hiperactivos. Se inyecta en los músculos una cantidad suficiente para abarcar volumétricamente el músculo o su zona de inervación, o 35 ambos. El profesional deberá tener un conocimiento práctico de la anatomía muscular, la inervación y la anatomía funcional para lograr resultados óptimos.

Enfermedad de Parkinson

40 La enfermedad de Parkinson se caracteriza por tres alteraciones básicas: acinesia (falta de movimiento); temblor (movimiento involuntario); y rigidez (aumento del tono muscular en grupos musculares). Los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención se pueden utilizar para mejorar el grado de temblor y rigidez presente en la enfermedad de Parkinson, aunque la utilización de los polipéptidos objeto de la invención puede estar contraindicado para la acinesia.

45 En ciertas situaciones en la enfermedad de Parkinson, se desarrollan distonías graves en las extremidades del paciente. En estas situaciones, los movimientos involuntarios son exagerados, espásticos y a menudo dolorosos. El polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención se inyecta en el músculo en una dosis suficiente para abarcar el volumen del músculo o su zona de inervación o ambos. Se realiza preferentemente 50 con una aguja de electrodo de estimulación en una máquina de EMG o en combinación con una máquina de EMG para asegurar la colocación correcta de la aguja en el músculo. El polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención se administra preferentemente en múltiples puntos de inyección para músculos grandes con el fin de asegurar que se abarque un porcentaje adecuado de la zona de inervación.

55 *Cefaleas*

Las cefaleas tensionales pueden tener su origen en el estrés musculoesquelético, tal como se describe en la patente de EE. UU. N.º 5.714.468. Los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención se pueden emplear para ayudar a aliviar los síntomas de la cefalea seleccionando dirigiendo la quimiodenervación a 60 los músculos implicados.

Cirugía

Parálisis Temporal

Tal como se usa en esta invención, las expresiones «parálisis temporal» o «parálisis transitoria» se refieren a muchos
 5 períodos de tiempo diferentes posibles durante los cuales un músculo escogido como objetivo presenta una parálisis
 como respuesta al contacto con un polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente de la invención. La
 descripción proporciona una serie de dichos polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente con un
 intervalo de potencias. Sin limitarse a ninguna teoría, la duración de la parálisis depende de la cinética de unión del
 10 polipéptido concreto, el número de nAChR musculares disponibles, la dinámica del recambio del receptor y la nueva
 presentación del receptor, y la señal umbral para la actividad muscular. Por consiguiente, se puede lograr una duración
 más corta de la parálisis, por ejemplo, mediante un polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente de
 potencia relativamente baja, administrando una pequeña cantidad del polipéptido para reducir la ocupación del
 receptor a lo largo de una zona del músculo hasta el mínimo requerido para producir efecto, administrando el
 polipéptido durante un corto período de tiempo para reducir con el transcurso del tiempo la ocupación del receptor a
 15 lo largo de una zona del músculo hasta el mínimo requerido para producir efecto, o llevando a cabo una administración
 única o administraciones poco frecuentes del polipéptido, o mediante una combinación de estas estrategias. Por
 ejemplo, se puede seleccionar una α -neurotoxina de cadena corta para su utilización, en lugar de una α -neurotoxina
 de cadena larga modificada que presente una mayor afinidad por el α -1 nAChR y/o presente una unión irreversible al
 α -1 nAChR. Dentro del grupo de potenciales α -neurotoxinas de cadena corta, también se puede seleccionar una
 20 especie con una afinidad relativamente baja por el α -1 nAChR. Por el contrario, para lograr una mayor duración de la
 parálisis, se puede utilizar una α -neurotoxina de cadena larga modificada relativamente potente, se puede emplear
 una mayor cantidad de toxina para aumentar la ocupación del receptor a lo largo de una zona del músculo, se puede
 aumentar el período de administración (por ejemplo, administración continuada) para aumentar con el transcurso del
 tiempo la ocupación del receptor a lo largo de una zona muscular, o se pueden realizar administraciones repetidas, o
 25 se puede utilizar una combinación de estas estrategias.

Formulación y administración

Existen diversas vías de administración disponibles. El modo concreto que se seleccione dependerá, como es obvio,
 30 de las características del trastorno que se vaya a tratar y la dosis requerida para la eficacia terapéutica. Los
 procedimientos de la invención, en general, se pueden poner en práctica utilizando cualquier modo de administración
 que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de los compuestos
 activos sin causar efectos adversos inaceptables desde el punto de vista clínico. Normalmente, dichos modos de
 administración incluyen vías parenterales. El término «parenteral» incluye infusión subcutánea, intramuscular,
 35 intradérmica, transdérmica o tópica. Las rutas transdérmica, subcutánea e intramuscular son las preferidas. Se debe
 evitar la administración oral e intravenosa debido a la toxicidad asociada con los agentes.

Por consiguiente, el polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente puede administrarse mediante
 inyección intramuscular directamente en una zona local como, por ejemplo, un músculo espástico, preferentemente
 40 en la región de la unión neuromuscular. Otra posibilidad consiste en emplear la administración subcutánea para liberar
 el polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente directamente en la región afectada, cuando proceda.
 Ventajosamente, se pueden emplear técnicas de administración transdérmica y/o microinyección convencional para
 afectar a los músculos esqueléticos en las proximidades inmediatas de la piel, tal como se describe en esta invención.
 El polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente puede presentarse como una solución o dispersión
 45 acuosa estéril apirógena y como un polvo estéril para su reconstitución en una solución o dispersión estéril.

Si se desea, se pueden agregar agentes de ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio, glicerol y diversos
 azúcares; también se pueden incluir estabilizantes como la albúmina sérica humana. La formulación se puede
 conservar por medio de un conservante farmacéuticamente aceptable adecuado, como, por ejemplo, un parabeno,
 50 aunque preferentemente no contiene conservantes.

Se prefiere que el polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente se formule en forma de dosificación
 unitaria; por ejemplo, se puede proporcionar como una solución estéril en un vial, o como un vial o sobre que contenga
 un polvo liofilizado para reconstituir en un vehículo adecuado como, por ejemplo, una solución salina para inyección.
 55

La dosis del polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente administrada al paciente dependerá de la
 gravedad del trastorno; por ejemplo, el número de grupos musculares que requieren tratamiento, la edad y el tamaño
 del paciente y la potencia de la toxina. La potencia de la toxina se expresa como un múltiplo del valor LD₅₀ para el
 ratón, una unidad (U) de polipéptido se define como el equivalente a esa cantidad, por ratón, que mata al 50% de un
 60 grupo de ratones Swiss-Webster que pesan entre 17 y 22 gramos.

Las dosis utilizadas en aplicaciones terapéuticas humanas son aproximadamente proporcionales a la masa del

músculo que recibe la inyección. Normalmente, la dosis administrada al paciente puede aumentar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1.000 unidades; por ejemplo, hasta aproximadamente 500 unidades, y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 80 a aproximadamente 460 unidades por paciente por tratamiento, aunque se pueden administrar dosis más pequeñas o más grandes en las circunstancias apropiadas.

5 A medida que los médicos se familiaricen con la utilización de este producto, se puede cambiar la dosis. Tanto la cantidad del polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención administrado como la frecuencia de su administración quedarán a criterio del médico responsable del tratamiento y estarán en consonancia con las cuestiones de seguridad y los efectos producidos por el polipéptido concreto y el modo de
10 administración.

Ventajosamente, los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención carecen de un período de latencia entre la administración y la parálisis. Por consiguiente, se puede determinar inmediatamente una dosis eficaz. El administrador puede iniciar el tratamiento con una primera dosis y, si observa que la parálisis está
15 por debajo del nivel deseado, puede aumentar la dosis de manera escalonada para lograr el nivel o el alcance deseado de la parálisis.

Composiciones farmacéuticas

20 Un polipéptido de quimiodenervación postsináptica de la descripción se puede administrar solo o como parte de una composición farmacéutica. Dicha composición farmacéutica puede incluir el polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención en combinación con cualquier vehículo estándar fisiológicamente y/o farmacéuticamente aceptable conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton (Pensilvania)). El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas,
25 dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, intramuscular, subcutánea o parenteral. Las composiciones pueden contener además agentes antioxidantes, agentes estabilizantes, conservantes y similares. Las composiciones deben ser estériles y contener una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un paciente.

30 La expresión «vehículo farmacéuticamente aceptable», tal como se usa en esta invención, significa uno o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidas o líquidas compatibles y adecuadas para la administración a un ser humano u otro animal. El término «vehículo» denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas
35 también se pueden mezclar con las moléculas de la presente descripción, y entre sí, de manera que no haya ninguna interacción que afecte sustancialmente a la eficacia farmacéutica deseada. Farmacéuticamente aceptable hace referencia además a un material no tóxico, que es compatible con un sistema biológico como, por ejemplo, una célula, cultivo celular, tejido u organismo. Las características del vehículo pueden depender de la vía de administración. Los vehículos fisiológica y farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes,
40 solubilizantes y otros materiales muy conocidos en la técnica.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente preparaciones estériles acuosas y no acuosas de los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente. Esta preparación acuosa se puede formular según procedimientos conocidos en los que se emplean agentes dispersantes
45 o humectantes y agentes de suspensión adecuados. Los vehículos acuosos incluyen agua y soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, entre ellas, solución salina y medios tamponados. Entre los ejemplos de disolventes no acuosos, se incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo, incluidos los mono- o diglicéridos. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente
50 aceptable, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol. Además, en la preparación de inyectables también se pueden utilizar ácidos grasos como el ácido oleico. Los vehículos parenterales preferidos incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa Ringer, cloruro de sodio y dextrosa, Ringer lactada o aceites fijos. Las formulaciones de vehículos adecuadas para administraciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, etc. se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton (Pensilvania). También pueden estar presentes conservantes
55 y otros aditivos como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes y similares.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria en paquetes, kits y similares junto con instrucciones de uso y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Todos los procedimientos incluyen la etapa de asociar los
60 polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención con un vehículo que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las composiciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención con un vehículo líquido, un

vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y, si fuera necesario, moldeando después el producto.

Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de liberación gradual, liberación retardada o liberación continuada. Dichos sistemas pueden evitar la administración repetida de los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención, lo cual resulta más conveniente para el sujeto y el médico. Existen muchos tipos de sistemas de liberación disponibles conocidos por los expertos en la materia. Incluyen sistemas de base polimérica tales como poli(láctido-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. En, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.075.109, se describen microcápsulas de los anteriores polímeros que contienen fármacos. Los sistemas de suministro también incluyen sistemas no poliméricos que consisten en: lípidos, incluidos esteroides como el colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; comprimidos en los que se utilizan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos incluyen, no exclusivamente: a) sistemas erosivos en los que la molécula de α -neurotoxina está contenida en una forma dentro de una matriz como las descritas en las patentes de EE. UU. n.º 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152 y b) sistemas de difusión en los que un componente activo impregna a una velocidad controlada a partir de un polímero tal como se describe en las patentes de EE. UU. n.º 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, se pueden utilizar sistemas de suministro basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

la utilización de un implante de liberación continuada a largo plazo puede resultar particularmente adecuada para el tratamiento de trastornos crónicos. Liberación a largo plazo, tal como se usa en esta invención, significa que el implante está construido y dispuesto para suministrar niveles terapéuticos del ingrediente activo durante al menos 30 días, y preferentemente 60 días. Los implantes de liberación continuada a largo plazo son muy conocidos por los expertos en la materia e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

La descripción también proporciona derivados químicamente modificados de los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención que pueden proporcionar ventajas adicionales como una mayor solubilidad, estabilidad y tiempo de circulación del polipéptido, o una disminución de la inmunogenicidad (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.179.337). Por consiguiente, la divulgación abarca la derivatización de los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente, por ejemplo, con compuestos que pueden cumplir una función estabilizante (por ejemplo, para aumentar la vida media de los polipéptidos en solución, para hacer que los polipéptidos sean más solubles en agua, para aumentar el carácter hidrófilo o hidrófobo de los polipéptidos, etc.). Los polímeros útiles como materiales estabilizantes pueden ser de origen natural, semisintético (natural modificado) o sintético. Los polímeros naturales ejemplares incluyen polisacáridos de origen natural, tales como, por ejemplo, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos (como, por ejemplo, inulina), levana, fucoidano, carragenano, galatocarolosa, ácido péctico, pectinas, que incluyen amilosa, pululano, glucógeno, amilopectina, celulosa, dextrano, dextrina, dextrosa, glucosa, poliglucosa, polidextrosa, pustulano, quitina, agarosa, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido alginico, goma xantana, almidón y otros homopolímeros o heteropolímeros naturales, como los que contienen una o más de las siguientes aldosas, cetosas, ácidos o aminos: eritosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lisosa, alosa, altrosa, glucosa, dextrosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, eritrola, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa, manitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, trehalosa, maltosa, celobiosa, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina y ácido neuramínico, y sus derivados naturales. Por consiguiente, los polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, proteínas tales como la albúmina, polialginatos y polímeros de polilactida-co-glicólido. Los ejemplos de polímeros semisintéticos incluyen carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa y metoxicelulosa. Los ejemplos de polímeros sintéticos incluyen polifosfocenos, hidroxiapatitas, polímeros de fluoroapatita, polietilenos (como, por ejemplo, polietilenglicol (que incluyen, por ejemplo, la clase de compuestos denominada PluronicTM, disponible comercialmente en BASF, Parsippany, (Nueva Jersey)), polioxietileno y tereftalato de polietileno), polipropilenos (como, por ejemplo, polipropilenglicol), poliuretanos (como, por ejemplo, alcohol polivinílico (PVA), cloruro de polivinilo y polivinilpirrolidona), poliamidas que incluyen nylon, poliestireno, ácidos polilácticos, polímeros de hidrocarburos fluorados, carbono fluorado polímeros (tales como, por ejemplo, politetrafluoroetileno), acrilato, metacrilato y polimetilmetacrilato, y sus derivados. Los procedimientos para la preparación de α -neurotoxinas de cadena larga derivatizadas de la invención que emplean polímeros como compuestos estabilizantes serán inmediatamente evidentes para cualquier experto en la materia, en vista de la presente descripción, cuando se combina con información conocida en la técnica, como la que se describe y se menciona en Unger, patente de EE. UU. n.º 5.205.290.

Las fracciones químicas para la derivatización se pueden seleccionar entre polímeros solubles en agua como el polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico y similares. Los polipéptidos se pueden modificar en posiciones aleatorias dentro de la molécula, o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y pueden incluir uno, dos, tres o más fracciones químicas unidas.

En algunos casos, la derivatización química de los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente de la presente descripción se lleva a cabo usando un residuo de polímero hidrófilo. Los polímeros hidrófilos ejemplares, incluidos los derivados, pueden ser aquellos que incluyen polímeros en los que las unidades repetidas contienen uno o más grupos hidroxilo (polímeros polihidroxílicos), que incluyen, por ejemplo, poli(alcohol vinílico); polímeros en los que las unidades repetidas contienen uno o más grupos amino (polímeros de poliamina), que incluyen, por ejemplo, péptidos, polipéptidos, proteínas y lipoproteínas, tales como albúmina y lipoproteínas naturales; polímeros en los que las unidades repetidas contienen uno o más grupos carboxilo (polímeros policarboxílicos), que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa, ácido alginico y sus sales, como alginato de sodio y calcio, glucosaminoglucanos y sus sales, incluidas sales de ácido hialurónico, derivados fosforilados y sulfonados de carbohidratos y oligómeros de fosforotioato; y polímeros en los que las unidades repetidas contienen una o más fracciones de sacáridos (polímeros de polisacáridos), que incluyen, por ejemplo, carbohidratos.

El peso molecular de los polímeros hidrófilos puede variar, y, por lo general, es de aproximadamente 50 a aproximadamente 5.000.000, prefiriéndose los polímeros con un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 50.000. Los polímeros pueden ser ramificados o no ramificados. Los polímeros preferidos tienen un peso molecular de aproximadamente 150 a aproximadamente 10.000, siendo aún más preferidos pesos moleculares de 200 a aproximadamente 8.000.

Para el polietilenglicol, el peso molecular preferido está entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa (el término «aproximadamente» indica que en las preparaciones de polietilenglicol, unas moléculas pesarán más y otras menos que el peso molecular establecido) para facilitar el manejo y fabricación. Se pueden utilizar otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado (por ejemplo, la duración deseada de la liberación continuada, los efectos, si los hubiera, sobre la actividad biológica, la facilidad de manejo, el grado o la falta de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol sobre una proteína terapéutica o análogo).

Entre los polímeros preferidos adicionales que se pueden utilizar para derivatizar los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención, se incluyen, por ejemplo, poli(etilenglicol) (PEG), poli(vinilpirrolidina), polioxómeros, polisorbato y poli(alcohol vinílico), siendo los polímeros PEG particularmente preferidos. Los polímeros PEG preferidos son los polímeros PEG que tienen un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 10.000. Más preferiblemente, los polímeros PEG tienen un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 8.000, siendo aún más preferidos PEG 2.000, PEG 5.000 y PEG 8.000, que tienen pesos moleculares de 2.000, 5.000 y 8.000, respectivamente. Otros polímeros hidrófilos adecuados, además de los ejemplificados anteriormente, resultarán inmediatamente evidentes para cualquier experto en la materia basándose en la presente descripción. En general, los polímeros utilizados pueden incluir polímeros que se pueden unir a los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención mediante reacciones de alquilación o acilación.

Las moléculas de polietilenglicol (u otras fracciones químicas) se deben unir a los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente teniendo en cuenta los efectos sobre los dominios funcionales o antigénicos de la proteína. Existen diversos procedimientos de unión disponibles para los expertos en la materia, por ejemplo, el documento EP 0 401 384, incorporado en esta invención a modo de referencia (acoplamiento de PEG a G-CSF), véase también Malik y col., Exp. Hematol. 20:1028-1035 (1992) (informando sobre pegilación de GM-CSF utilizando cloruro de tresilo). Por ejemplo, el polietilenglicol se puede unir covalentemente a través de residuos de aminoácidos mediante un grupo reactivo como, por ejemplo, un grupo carboxilo o amino libre. Los grupos reactivos son aquellos a los que puede unirse una molécula de polietilenglicol activada. Los residuos de aminoácidos con un grupo amino libre pueden incluir residuos de lisina y los residuos de aminoácidos N-terminales; los que tienen un grupo carboxilo libre pueden incluir residuos de ácido aspártico, residuos de ácido glutámico y el residuo de aminoácido C-terminal. Los grupos sulfhidrido también se pueden utilizar como grupo reactivo para unir las moléculas de polietilenglicol. Se prefiere para fines terapéuticos la unión en un grupo amino, como, por ejemplo, la unión en el grupo N-terminal o de lisina.

Se pueden desear específicamente proteínas químicamente modificadas en el extremo N-terminal. Utilizando polietilenglicol como ilustración de la presente composición, se puede seleccionar entre una variedad de moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de polietilenglicol a moléculas de proteína (polipéptido) en la mezcla de reacción, la tipo de reacción de pegilación a realizar, y el procedimiento para obtener la proteína pegilada N-terminal seleccionada. El procedimiento para obtener la preparación pegilada en el extremo N (es decir, separando esta fracción de otras fracciones monopegiladas si fuera necesario) puede realizarse mediante la purificación del material pegilado en el extremo N-terminal a partir de una población de moléculas de proteínas pegiladas. La modificación de las proteínas selectivas modificadas químicamente en el extremo N se puede lograr mediante una alquilación reductora que aproveche la reactividad diferencial de distintos tipos de grupos amino primarios (lisina frente a extremo N-terminal) disponibles para la derivatización para obtener una proteína concreta. En las condiciones de selección apropiadas, se consigue una derivatización sustancialmente selectiva de la proteína

en el extremo N-terminal con un polímero que contiene un grupo carbonilo.

Al igual que con los diversos polímeros ejemplificados anteriormente, se contempla que los residuos poliméricos puedan contener grupos funcionales además, por ejemplo, de aquellos que suelen participar en la unión de los
 5 residuos poliméricos a los polipéptidos de la presente invención. Dichas funcionalidades incluyen, por ejemplo, grupos carboxilo, amino, hidroxilo y tiol. Estos grupos funcionales en los residuos poliméricos se pueden hacer reaccionar también, si se desea, con materiales que por lo general son reactivos con dichos grupos funcionales y que pueden
 10 ayudar a dirigir el tratamiento hacia tejidos específicos en el cuerpo, incluido, por ejemplo, tejido enfermo. Los materiales ejemplares que se pueden hacer reaccionar con los grupos funcionales adicionales incluyen, por ejemplo, proteínas, que incluyen anticuerpos, carbohidratos, péptidos, glucopéptidos, glucolípidos, lectinas y nucleósidos.

Además de los residuos de polímeros hidrófilos, el producto químico utilizado para derivatizar los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente puede ser un residuo de sacárido. Los ejemplos de sacáridos que
 15 pueden derivarse incluyen, por ejemplo, monosacáridos o alcoholes de azúcar, tales como eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, liposa, fructosa, sorbitol, manitol y sedoheptulosa, siendo los monosacáridos preferidos fructosa, manosa, xilosa, arabinosa, manitol y sorbitol; y disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, maltosa y celobiosa. Otros sacáridos incluyen, por ejemplo, grupos de cabeza de inositol y gangliósido. Otros sacáridos adecuados, además de los ejemplificados anteriormente, resultarán inmediatamente evidentes para cualquier experto en la materia basándose
 20 en la presente descripción. En general, los sacáridos que se pueden utilizar para la derivatización incluyen sacáridos que se pueden unir a los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención mediante reacciones de alquilación o acilación. También se incluye la derivatización con polisacáridos, por ejemplo, quitosano.

Además, la descripción también abarca la derivatización de los polipéptidos de quimiodenervación dirigida
 25 postsinápticamente objeto de la invención, por ejemplo, con lípidos (incluidos catiónicos, aniónicos, polimerizados, cargados, sintéticos, saturados, insaturados y cualquier combinación de los anteriores, etc.). agentes estabilizantes

Además, la descripción abarca modificaciones adicionales de los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención. Dichas modificaciones adicionales son conocidas en la técnica, y se
 30 proporcionan específicamente, junto con procedimientos de derivatización, etc., en la patente de EE. UU. n.º 6.028.066.

Significativamente, y a diferencia de las toxinas botulínicas empleadas convencionalmente en la técnica, los polipéptidos de quimiodenervación postsináptica objeto de la invención también se pueden administrar
 35 ventajosamente por vía transdérmica en vista de la considerable reducción de tamaño y las mejoras en la estabilidad obtenidas con los presentes polipéptidos. Implantes biocompatibles como los descritos en las patentes de EE. UU. n.º 6.306.423 y 6.312.708 pueden encontrar un uso ventajoso, así como sistemas de parches transdérmicos (como, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. 2004/0009180) y perforadores de solución sólida (como por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. 2006/0074376), y similares. También se pueden utilizar técnicas de microinyección
 40 convencionales como las descritas por Martanto y col., Pharm. Res. 21:947 (2004); Hoffmann y col., J. Neurol. Derm. 126: 1080-87 (2006) y Xie y col., Nanomedicine, Biotechnology and Medicine, 1: 1-190 (200) junto con las composiciones de α -neurotoxina y los procedimientos proporcionados en esta invención. También se pueden emplear técnicas de ultrasonido como las descritas por Mitragotri y col., Science 5225: 850-853 (1995) con las composiciones y procedimientos descritos en esta invención.

Además, o como otra posibilidad, la administración conjunta de chaperonas de péptidos como las descritas por Chen y col. Nature Biotechnology, 24: 455-60 (2006) y/o Prausnitz, Nature Biotechnology 24: 416-17 (2006) también puede
 45 encontrar un uso ventajoso. En una realización, se contempla específicamente la coadministración con la secuencia de péptidos transdérmicos ACSSSPSKHCG, ya que se ha demostrado que facilita la administración transdérmica eficaz de fármacos proteínicos, a través de la piel intacta, de una molécula de proteína de tamaño similar. Véase Chen y col. *supra*.

Los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención se pueden administrar solos o en combinación (coadministrados) con las terapias farmacológicas descritas anteriormente por cualquier vía
 55 convencional, incluida inyección, inyección repetida, aplicación tópica, etc., con el transcurso del tiempo. La administración puede ser, por ejemplo, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, subcutánea o transdérmica. Cuando se utilizan los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención, se prefiere la administración directa al sitio afectado (p. ej., músculos con espasmo involuntario, arrugas, etc.) como, por ejemplo, la administración mediante inyección.

60 El término «coadministrado» significa administrado de manera sustancialmente simultánea con otro agente. Por sustancialmente simultáneo, se entiende que un polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente se

administra al sujeto lo suficientemente cerca en el tiempo a la administración del otro agente (por ejemplo, un agente antiarrugas, etc.). El otro agente puede estar presente en una formulación distinta a la del polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente, o puede formar parte de la misma formulación.

- 5 El agente coadministrado puede actuar de manera cooperativa, aditiva o sinérgica con el polipéptido de quimiodenervación dirigida postsinápticamente para producir un efecto deseado, por ejemplo, la disminución de arrugas. El otro agente se administra en cantidades eficaces. Dichas cantidades pueden ser inferiores a las suficientes para proporcionar un beneficio terapéutico cuando el agente se administra solo y no en combinación con los polipéptidos de quimiodenervación dirigida postsinápticamente objeto de la invención. Cualquier experto en la materia
- 10 sería capaz de determinar las cantidades eficaces necesarias.

La invención se entenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, la finalidad de estos ejemplos es simplemente la de ilustrar las realizaciones de la invención y no deben interpretarse como una limitación del alcance de la invención.

- 15 TABLA 1 - A continuación, se describen polipéptidos de α -neurotoxina de cadena larga. Las formas aisladas y/o modificadas de estos polipéptidos pueden emplearse junto con las composiciones y procedimientos descritos en esta invención.

Especies	Seq ID	Secuencia
Naja kaouthia	1	IRCFITPDITSKDCPNGHVCYKTKWCDAFCSIRGKRVDLGCAATCPTV KTGVDIQCCSTDNCNPFPTRKRP
Naja kaouthia	2	IRCFITPDITSKDCPNGHVCYKTKWCDAFCSIRGKGVDLGCAATCPTV KTGVDIQCCSTDNCNPFPTRKRP
Naja kaouthia	3	IRCFITPDITSKDCPNGHVCYKTKWCDAFCSIRGKRVDLGCAATCPTV KTGVDIQCCSTDNCT
Naja kaouthia	4	IRCFITPDITSKDCPNGRVCYKTKWCDAFRSIRGKRVDLGCAATCPTV KTGVDIQCCSTDNCNPFPTRKRP
Naja naja	5	IRCFITPDITSKDCPNGHVCYKTKWCDAFCSIRGKRVDLGCAATCPTV KTGVDIQCCSTDDCDPFPTRKRP
Naja naja	6	IRCFITPDITSKDCPNGHVCYKTKWCDGFCIRGKRVDLGCAATCPTV RTGVDIQCCSTDDCDPFPTRKRP
Naja naja	7	IRCFITPDITSKDCPNGHVCYKTKWCDGFCRIRGERVDLGCAATCPTV KTGVDIQCCSTDDCDPFPTRKRP
Naja naja	8	IRCFITPDITSKDCPNGHVCYKTKWCDGFCSSRRGERVDLGCAATCPT VKTGVDIQCCSTDDCDPFPTRKRP
Naja naja	9	IRCFITPDITSKDCPNGHVCYKTKWCDGFCSSRGKRVDLGCAATCPT VRTGVDIQCCSTDDCDPFPTRKRP
Naja sputatrix	10	IRCFITPDVTSTDCPNGHVCYKTKWCDGFCSSRGRRVELGCAATCPT VKPGVDIQCCSTDNCNPFPTRP

Especies	Seq ID	Secuencia
Naja haje haje	11	IRCFITPDVTSQACPDGQNICYTKTWCDNFCGMRGKRVDLGCAATCP TVKPGVDIKCCSTDNCNPFPTREERS
Naja haje haje	12	IRCFITPDVTSQACPDGHVCYTKMWCDNFCGMRGKRVDLGCAATCP TVKPGVDIKCCSTDNCNPFPTRKRS
Naja oxiana	13	ITCYKTIPIITSETCAPGQNLCTYTKTWCDAWCGSRGKVIELGCAATCP TVESYQDIKCCSTDNCNPHPKQKRP
Naja nivea	14	IRCFITPDVTSQACPDGHVCYTKMWCDNFCGMRGKRVDLGCAATCP KVKPGVNIKCCSRDNCNPFPTRKRS
Naja melanoleuca	15	IRCFITPDVTSQICADGHVCYTKTWCDNFCASRGKRVDLGCAATCPT VKPGVNIKCCSTDNCNPFPTRNRP
Naja melanoleuca	16	KRCYRTPDLKSQTCPPGEDLCYTKKWCADWCTSRGKVIELGCVATC PKVKPYEQITCCSTDNCNPHPKMKP
Ophiophagus hannah	17	TKCYVTPDVKSETCPAGQDICYTETWCDAWCTSRGKRVDLGCAATC PIVKPGVEIKCCSTDNCNPFPTWRKRP
Ophiophagus hannah	18	TKCYVTPDATSQTCPDGQDICYTKTWCDGFCSSRGKRIDLGAATCP KVKPGVDIKCCSTDNCNPFPTWKRKH
Ophiophagus hannah	19	TKCYVTPDVKSETCPAGQDLCYTETWCVAWCTVRGKRVSILTCAAICP IVPPKVSIIKCCSTDACGPFPTWPNVR
Ophiophagus hannah	20	TKCYKTGDRIISEACPPGQDLCYMKTWCDVFCGTRGRVIELGCTATC PTVKPHEQITCCSTDNCNPHPKMKQ
Ophiophagus hannah	21	TKCYKTGDRIISEACPPGQDLCYMKTWCDVFCGTRGRVIELGCTATC PTVKPHEQITCCSTDNCNPHPKMLQ
Ophiophagus hannah	22	LICFISSHDSVTCAPGENVCFLKSWCDAWCGSRGKKLSFGCAATCPK VNPGLDIECCSTDNCNPHPKLRP
Ophiophagus hannah	23	TKCYVTPDVKSETCPAGQDICYTETWCDAWCTSRGKRVDNLGCAATC PIVKPGVEIKCCSTDNCNPFPTRKRP
Ophiophagus hannah	24	TKCYVTPDATSQTCPDGENICYTKSWCDVFCSSRGKRIDLGAATCP KVKPGVDIKCCSTDNCNPFPTWKRH
Ophiophagus hannah	25	TKCYITPDVKSETCPDGENICYTKTWCDVWCGSRGRRVDLGCAATC PIVKPGVNINCCSTDNCNPFPKRS
Ophiophagus hannah	26	TKCYVTPDVTSQTCPDGQNICYTETWCDAWCGSRGKRVDNLGCAATC PKVNPGLDIECCSTDNCNPFPKRS

Especies	Seq ID	Secuencia
Ophiophagus hannah	27	TKCYVTPDVKSETCPDGENICYTKSWCEVFCTSRGKRIDLGRAATCP KVKPGVDIKCCSTDNCNPFTPWKRH
Ophiophagus hannah	28	TKCYITPDVKSETCPDGENICYTKSWCDVFCTSRGKRIDLGCAATCPK VKPGVDIKCCSTDNCNPFTPWKRH
Ophiophagus hannah	29	LICFISPHDSVTCAPGENVCFLKSWCDAWCGSRGKKLSFGCAATCPK VNPGIDIECCSTDNCNPHPKLRP
Ophiophagus hannah	30	LICFISSHDSVTCAPGENVCFLKSWCDAWCGSRGKKLSFGCAATCPK VNPGIDIECCSTDNCNPHPKLRP
Ophiophagus hannah	31	RICHKSSFISETCPDGQNLCLYKSWCDIFCGSRGERLEFGCAATCPEV KPGVNIIECCSTDNCNPHPKLRP
Ophiophagus hannah	32	TKCYKTGERISETCPPGQDLCYMKTWCDVFCGSRGRVIELGCTATC PTVKPHEQITCCSTDNCNPHPKMKQR
Ophiophagus hannah	33	TKCYKTGERISETCPPGQDLCYMKTWCDVFCGSRGRVIELGCTATC PTVKHHEQITCCSTDNCNPHPKMKQR
Ophiophagus hannah	34	TKCYKTGERISETCPPGQDLCYMKTWCDVFCGSRGRVIELGCTATC PTVKPHEQITCCSTDNCNPHPKMKQR
Ophiophagus hannah	35	LTNAPDSWSSRRCLCPAWVPLRSRPVAGHSKQCGSRGRRVDLGC AATCPIVKPGVNINCCSTDNCNPFPKRS
Pseudonaja textilis	36	RTCFITPDVKSKPCPPGQEVCTETWCDGFCGIRGKRVELGCAATCP TPKKTGIDIQCCSTDNCNPFPLRP
Pseudonaja textilis	37	RTCFITPDVKSKPCPPGQEVCTETWCDGFCGIRGKRVDLGAATCP TPKKTGIDIICCCSTDNCNPFPLRPRGRLLSSIKDHP
Dendroaspis viridis	38	RTCYKTSPVKPETCPHGENICYTETWCDAWCSQRGKRVELGCAATC PKVKAGVGIIKCCSTDNCNPFVWNPRG
Dendroaspis jamesoni	39	RTCYKTYSDKSKTCPRGEDICYTKTWCDGFCGSRGKRVELGCAATC PKVKTGVEIKCCSTDNCNPFVWNPR
Dendroaspis viridis	40	RTCYKTSPVKPETCPHGENICYTETWCDAWCSQRGKREELGCAATC PKVKAGVGIIKCCSTDNCNPFVKNPR
Dendroaspis viridis	41	RTCYKTSPVKPETCPHGENICYTETWCDAWCSQRGKRVELGCAATC PKVKAGVGIIKCCSTDNCNPFVWNPR
Dendroaspis polylepis	42	RTCNKTFSQSKICPPGENICYTKTWCDAWCSQRGKRVELGCAATC PKVKAGVEIKCCSTDNCNPFQFGKPR

Especies	Seq ID	Secuencia
Dendroaspis polylepis	43	RTCNKTPSDQSKICPPGENICYTKTWCDAWCSQRGKIVELGCAATCP KVKAGVEIKCCSTDNCNKFVKFGKPR
Dendroaspis polylepis	44	RTCNKTFSDQSKICPPGENICYTKTWCDAWCSRRGKIVELGCAATCP KVKAGVGIKCCSTDNCNLFKFGKPR
Acanthophis antarcticus	45	VICYRGYNNPQTCPGENVCFTRTWCDAFCSRGKVVELGCAATCPI VKSYNEVKCCSTDKNPFPVRRPP
Acanthophis antarcticus	46	VICYRKYTNVKTCPDGENVCYTKMWCDGFCSTRGKVVELGCAATC PIRKPGNEVKCCSTNKNHPPKRKKRRP
Aspidelaps scutatus	47	RICYIAPYDHKTCAAGENICYLKAWCDAWCSSRGKKLEFGCAATCPT VKPGVDISCCDNDNCNPHPKL
Astrotia stokesii	48	LSCYLGYKHSQTCPGENVCFVKTWCDGFCNTRGERIIMGCAATCPT AKSGVHIACCSTDNCNIYAKWGS
Astrotia stokesii	49	LSCYLGYKHSQTCPGENVCFVKTWCDAFCSSTRGERIVMGCAATCP TAKSGVHIACCSTDNCNIYTKWGSGR
Austrelaps superbus	50	LICYVDSKTSRTCPGENVCFTEWCDARCSLLGKRVDLGCAATCPT AKPGVDITCCSTDKNPFPQTQHR
Austrelaps superbus	51	FSCYKTPDVKSEPCAPGENLCYTKTWCDRFCISIRGKVIELGCAATCP PAEPRKDITCCSTDNCNPHPAH
Bungarus candidus	52	LLCYKTPSPINAETCPPGENLCYTKMWCDAWCSSRGKVVELGCAAT CPSKKPYEEVTCCSTDKNPHPKQRPD
Bungarus candidus	53	LLCYKTPSPINAETCPPGENLCYTKMWCDAWCSSRGKVIELGCAATC PSKKPYEEVTCCSTDKNPHPKQRPG
Bungarus candidus	54	LLCYKTPIPIAETCPPGENLCYTKMWCDIWCSSRGKVVELGCAATCP SKKPYYEVTCCSTDKNPHPKQRPD
Bungarus candidus	55	IVCHTTATSPISAVTCPPGENLCYRKMFCDACSSRGKVVELGCAATC PSKKPYEEVTCCSNDKNPHPKQRPG
Boulengerina annulata	56	IRCFITPRVSSQACPDGHVCYTKTWCDNFCGINGKRVDLGCAATCPT VKPGVDIKCCSTDNCNPFPTKRKP
Bungarus flaviceps	57	RTCLISPSSTSQTCPKGQDICFTKAFCDRWCSSRGPVIEQGCAATCP EFTSRYKSLLCCTDNCNH
Bungarus multicinctus	58	IVCHTTATSPISAVTCPPGENLCYRKMWCDAFCSKKGKVVELGCAAT CPSKKPYEEVTCCSTDKNPHPKQRPG

Especies	Seq ID	Secuencia
Bungarus multicinctus	59	IVCHTTATSPISAVTCPPGENLCYRKMWCDAFCSSRGKVVELGCAAT CPSKKPYEEVTCCSTDKNPHPKQRPG
Bungarus multicinctus	60	IVCHTTATSPISAVTCPPGENLCYRKMWCDAFCSSRGKVVELGCAAT CPSKKPYEEVTCCSTDQCHPHPKQRPG
Bungarus multicinctus	61	IVCHTTATSPISAVTCPPGENLCYRKMWCDFCSSRGKVVELGCAAT CPSKKPYEEVTCCSTDKNPHPKQRPG
Demansia vestigiata	62	RTCLKTPEVKSEPCPPGQEVCTKAWCDRMCSFRGKVIELGCAATC PRQEPGKEITCCSTDDCNTHP
Demansia vestigiata	63	RTCLKTPEVKSEPCPPGQEVCTKAWRDRMCSFRGKVIELGCAATC PRQEPGKEITCCSTDDCNTHP
Laticauda laticaudata	64	RICFKTPYVKSETCPPGQELCYTKTWCDRFCsirgkvIELGCTATCPR AEPKEDTTCCSKDNCNPHP
Laticauda colubrina	65	RICYLAPRDTQICAPGQEICYLKSWDDGTGSIRGNRLEFGCAATCPTV KRGIIHKCCSTDKNPHPKLA
Laticauda colubrina	66	RICYLAPRDTQICAPGQEICYLKSWDDGTGFLKGNRLEFGCAATCPTV KPGIDIKCCSTDKNPHPKLA
Lapemis hardwickii	67	LSCYLGYSRSQTCPGGEKVCVKS WCDAFCSSRGKRIEMGCAATCP TVKDGIDITCCATDNCNTYANWGS
Lapemis hardwickii	68	RTCYRTHPYKPETCPPGQNL CYKKS WCDAFCSSRGKVIELGCTAKC PTVKHKGKDINCCATDNCNTVANWKS
Laticauda semifasciata	69	RECYLNPHDTQTCPSGQEICYVKS WCNAWCSSRGKVLEFGCAATCP SVNTGTEIKCCSADKCNTP
Laticauda semifasciata	70	RECYLNPHDTQTCPSGQEICYVKS WCNAWCSSRGKVLEFGCAATCP SVNTGTEIKCCSADKCNTP
Notechis scutatus	71	LICYMGPKTPRTCPRGQNL CYTKTWCDAFCSRGKVVELGCAATCPI AKSYEDVTCCSTDNCNPFVRPRHPP
Oxyuranus scutellatus	72	RRCFTTPSVRSERCPPGQEVCTKWTWDGHGGSRGKRVDLGCAAT CPTPKKKDIKCCSTDNCNTFPKWP
Oxyuranus microlepidotus	73	RRCFITPDVRSERCPPGQEVCTKWTWCDGFCSSRGKRVDLGCAATC PTPKKKGIDIICCSKDNCNTFPKWP
Oxyuranus microlepidotus	74	RRCFITPDVRSERCPPGQEVCTKWTWCDGFCSSRGKRVDLGCAATC PTPKKKGIDIICCSKDNCNTFPKWP

Especies	Seq ID	Secuencia
Oxyuranus microlepidotus	75	RRCFTTPSVRSERCPPGQEVCTKTWTDGHGGSRGKRVDLGCAAT CPTPKKKDIKTICCSKDNCNTFPKWP
Oxyuranus microlepidotus	76	RRCFITPDVRSERCPPGQEVCTKTWCDGFCGSRGKRVDLGCAATC PTPKKKDIKIICCSKDNCNTFPKWP
Pseudechis australis	77	LTCYKGRDRSSETCRSEQELCCTKTWCDQWCQDRGPRLEMGCTAT CPRRMPGLDFTCCTTDNCNPVPT
Pseudechis australis	78	LTCYKGRDRSSETCRSEQELCCTKTWCDQWCQDRGPRLEMGCTAT CPRRMPGLDFTCCTTDNCNPVPT
Tropidechis carinatus	79	FSCYKTPHVKSEPCAPGQNLCTKTWCDAFCFSRGRVIELGCAATCP PAEPKKDISCCSTDNCNPHPAHQSR

TABLA 2 - Se describen polipéptidos nativos de α -neurotoxina de cadena larga, que carecen del quinto puente disulfuro en la región de la punta del bucle II, que pueden emplearse junto con las composiciones y procedimientos descritos en esta invención.

5

Especies	Seq ID	Secuencia
Naja kaouthia	4	IRCFITPDITSKDCPNGRVCYTKTWCDAFRSIRGKRVDLGCAATCPTV KTGVDIQCCSTDNCNPFTRKRP
Ophiophagus hannah	35	LTNAPDSWSSRRTCLCPAWVPLRSRPVAGHSKQCGSRGRRVDLGC AATCPIVKPGVNINCCSTDNCNPFPKRS
Demansia vestigiata	63	RTCLKTPEVKSEPCPPGQEVCTKAWRDRMCSFRGKVIELGCAATC PRQEPGKEITCCSTDNCNTHP
Laticauda colubrina	65	RICYLAPRDTQICAPGQEICYLKS WDDGTGSIRGNRLEFGCAATCPTV KRGIIHKCCSTDKNPHPKLA
Laticauda colubrina	66	RICYLAPRDTQICAPGQEICYLKS WDDGTGFLKGNRLEFGCAATCPTV KPGIDIKCCSTDKNPHPKLA
Oxyuranus scutellatus	72	RRCFTTPSVRSERCPPGQEVCTKTWTDGHGGSRGKRVDLGCAAT CPTPKKKDIKIICSTDNCNTFPKWP
Oxyuranus microlepidotus	75	RRCFTTPSVRSERCPPGQEVCTKTWTDGHGGSRGKRVDLGCAAT CPTPKKKDIKTICCSKDNCNTFPKWP

TABLA 3 - A continuación, se describen polipéptidos de α -neurotoxina de cadena corta. Las formas aisladas y/o modificadas de estos polipéptidos pueden emplearse junto con las composiciones y procedimientos descritos en esta invención.

10

Especies	Seq ID	Secuencia
Naja kaouthia	80	LECHNQSSQPTTTGCSGGETNCYKKRWRDHRGYRTERGCGCPS VRNGIEINCCTTDRCNN
Naja kaouthia	81	LECHNQSSQAPTTKTCSGGETNCYKKRWRDHRGYRTERGCGCPS VRNGIEINCCTTDRCNN
Naja kaouthia	82	LECHNQSSQAPTTKTCSGETNCYKKWWSDHRTIIERGCGCPVK PGVNLNCCRTDRCNN
Naja kaouthia	83	LECHNQSSQPTTKTCSGETNCYKKWWSDHRTIIERGCGCPVK PGVNLNCCRRDRCNN
Naja oxiana	84	LECHNQSSQPPTTKTCSGETNCYKKWWSDHRTIIERGCGCPVK PGVNLNCCRTDRCNN
Micrurus nigrocinctus	85	MICHNQSSQPPTIKTCSGQCYKKTWRDHRGTISERGCGCPTVKP GIHISCCASDKCNA
Pseudonaja textilis	86	LTCYKSLSGTVVCKPHETICYRRLIPATHGNAIDRGCTSCPGGNRPV CCSTDLCNK
Pseudonaja textilis	87	LTCYKRYFDTVVCKPQETICYRYIIPATHGNAITTRGCTSCPSGIRLV CCSTDLCNK
Pseudonaja textilis	88	LTCYKGYHDTVVCKPHETICYRYLVPATHGNAIPARGCGTSCPGGNH PVCCSTDLCNK
Naja pallida	89	LECHNQSSQPPTTKTCPGETNCYKKVWRDHRGTIIERGCGCPTVK PGIKLNCCTTDKCNN
Naja haje anulifera	90	LECHNQSSQPPTTKTCPGETNCYKKRWRDHRGSITERGCGCPSVK KGIEINCCTTDKCNN
Acalyptophis peroni	91	MTCCNQSSQPKTTTNCAGNSCYKKTWSDHRGTIIERGCGCPQVKS GIKLECCHTNECNN
Dendroaspis polylepis	92	RICYNHQSTTRATTKSCEENSCYKKYWRDHRGTIIERGCGCPVKPG VGIHCCQSDKCN
Pseudechis australis	93	MTCCNQSSQPKTTTICAGGESSCYKKTWSDHRGSRTERGCGCPH VKPGIKLTCKTDECNN

EXPERIMENTACIÓN

5 EJEMPLO 1: CLONACIÓN MOLECULAR DE ADNc QUE CODIFICA α -NEUROTOXINAS A PARTIR DE GLÁNDULAS DE VENENO DE SERPIENTE

El siguiente procedimiento experimental ejemplifica la clonación molecular del conjunto de ADNc que codifica la

neurotoxina alfa de cadena larga utilizando la cobra asiática *Naja kaouthia* como fuente biológica. Cualquier experto en la materia entiende que este procedimiento con las secuencias cebadoras de neurotoxinas universales proporcionadas se puede utilizar para clonar secuencias análogas de cualquier especie de los taxones *Elapidae* y *Hydrophilidae*.

- 5 Las glándulas de veneno de un solo espécimen de *N. kaouthia* se extirparon quirúrgicamente del cráneo justo después de la decapitación del animal. Las glándulas extraídas se diseccionaron rápidamente con una cuchilla sobre una placa de Petri colocada en hielo. El tejido de la glándula disecada se trasladó a unos tubos Eppendorf de 2 ml que contenían tampón de lisis (10 µl de tampón por 1 mg de tejido). La lisis del tejido de la glándula se completó agitando la
- 10 suspensión de lisis en un termomezclador (Eppendorf AG, Hamburgo (Alemania)) a máxima velocidad, a 4 °C y durante 30 minutos. El ARN total se extrajo siguiendo el método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159), pero sin adición de ARNt. Después de la precipitación con etanol, el sedimento de ARN se disolvió en 50 µl de agua estéril sin RNasa. La integridad del ARN total se verificó por electroforesis en gel
- 15 desnaturalizante. El ARN se almacenó hasta su utilización en citrato de sodio 5 mM, pH 5,5 a -80 °C.

- El conjunto de ADNc que codifica las α -neurotoxinas de cadena larga se clonó a partir de ARN de veneno total de *N. kaouthia* mediante un protocolo de RT-PCR anidada de dos pasos. Se desnaturalizaron aproximadamente 2 µg de ARN de veneno total a 65 °C durante 5 minutos en presencia de dNTP 1 mM y cebador Oligo(d)T₂₀ (0,5 µg; Invitrogen)
- 20 y después se colocaron en hielo. La reacción de transcripción inversa (RT) se preparó en 20 µl con agua libre de RNasa, 15 U de enzima cMaster™ RT (AMV RT, Eppendorf), 2 U de inhibidor de RNasa Prime™ (Eppendorf) y 4 µl de tampón 5X RTplusPCR™. La reacción de RT se incubó a 42 °C durante 1 hora. La primera PCR posterior se llevó a cabo agregando 2 µl de la mezcla de reacción RT a 50 µl de una mezcla de reacción de PRC que contiene 1,25 U de ADN polimerasa Taq (Eppendorf), dNTP 200 µM (Eppendorf), tampón 1x Tuning™ (Eppendorf), acetato de
- 25 magnesio 2,5 mM, 0,2 µM del cebador directo universal de toxina de tres dedos (ATGAAACTCTGCTGCTGACC) y 0,2 µM del cebador inverso universal de toxina de tres dedos (CTCAAACCTACAGAACTAGCAG). Después de 2 minutos de desnaturalización inicial del molde a 94 °C, se llevaron a cabo 35 ciclos del siguiente programa de ciclos de temperatura en un Eppendorf™ Mastercycler: 94 °C - 15 s, 59 °C - 30 s y 68 °C - 60 s. Para el segundo paso de la PCR anidada, la reacción del primer paso de la PCR se diluyó 1:100 con H₂O una vez concluida. A continuación, se
- 30 usaron 0,5 µl de la mezcla de reacción diluida como molde en la segunda reacción PCR.

- La segunda PCR se llevó a cabo en las mismas condiciones que la primera PCR, pero utilizando 0,2 µM del cebador directo específico de α -neurotoxina de cadena larga (GACTTAGGATACACCATAAG) y 0,2 µM del cebador inverso específico de α -neurotoxina de cadena larga (TTGAGTT TGTCTCTCATCCATC). El producto final de la PCR de 300
- 35 pb de tamaño se purificó en gel para su posterior clonación mediante el kit de limpieza de gel PerfectPrep™ (Eppendorf AG, Alemania). El producto purificado de la PCR se clonó directamente en el vector plasmídico pGEM-T (Promega, Madison (Wisconsin)) mediante procedimientos estándar para la ligadura de fragmentos de ADN, transformación de *E. coli*, cribado de colonias y aislamiento de ADN plasmídico conocido por los especialistas en la materia. Se seleccionaron un total de 192 clones recombinantes para la secuenciación del ADN a fin de determinar
- 40 las secuencias de codificación exactas de las neurotoxinas alfa de cadena larga a partir de *N. kaouthia*. En la Tabla 3 se enumeran todas las secuencias únicas identificadas de alfa neurotoxina de cadena larga clonadas a partir de las glándulas de veneno de *N. kaouthia*.

- TABLA 4: Secuencias de aminoácidos de los ARNm únicos de α -neurotoxina de cadena corta y larga clonados a partir
- 45 de las glándulas venenosas de *N. kaouthia*. Obsérvese que en la cuarta secuencia que se indica a continuación, el 5º residuo de cisteína altamente conservado se sustituye por una arginina, que suprime la formación del puente disulfuro en la punta del bucle II, crítico para unir la subunidad $\alpha 7$ en la nAChR neuronal.

Secuencias únicas de α -neurotoxina de cadena larga de <i>N. kaouthia</i>	
IRCFITPDITSKDCPNGHVCYKTKWCDAFCSIRGKRVDLGCAATCPTVKTGVDIQCCSTDNCNPFPTKRKP (SEQ ID NO: 1)	
IRCFITPDITSKDCPNGHVCYKTKWCDAFCSIRGKGVDLGCAATCPTVKTGVDIQCCSTDNCNPFPTKRKP (SEQ ID NO: 2)	
IRCFITPDITSKDCPNGHVCYKTKWCDAFCSIRGKRVDLGCAATCPTVKTGVDIQCCSTDNCN (SEQ ID NO: 3)	
IRCFITPDITSKDCPNGRVCYKTKWCDAFRSIRGKRVDLGCAATCPTVKTGVDIQCCSTDNCNPFPTKRKP (SEQ ID NO: 4)	
Secuencias únicas de α -neurotoxina de cadena corta de <i>N. kaouthia</i>	
LECH NQSSQTPTTTGCSGG ETNCYKKRWRDH RGYRTERGCGCPSVRNGIEINCCTTD RCNN (SEQ ID NO: 80)	

Secuencias únicas de α -neurotoxina de cadena larga de <i>N. kaouthia</i>
LECH NQQSSQAPTTKTCSETNCKYKKRWRDHRGRTGCGCPSVRNGIEINCCTD RCNN SEQ ID NO: 81)
LECHNQQSSQAPTTKTCSETNCKYKKWWSDRGTIERGCGCPKVKPGVNLNCCRTDRCNN (SEQ ID NO: 82)
LECHNQQSSQPTTKTCSETNCKYKKWWSDRGTIERGCGCPKVKPGVNLNCCRRDRCNN (SEQ ID NO: 83)

Ejemplo 2: CULTIVO DE CÉLULAS DE CÉLULAS FETALES DE MÚSCULO ESQUELÉTICO HUMANO (HskMC) QUE EXPRESAN EL nAChR MUSCULAR HUMANO ($\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ)

5

Se puede emplear cualquier técnica conocida en la técnica para el cultivo de células de mamíferos para cultivar HSkMC fetales humanas (HSkMC precibadas, Cell Applications Inc., San Diego, Cat# S150-05f).

La técnica preferida para el cultivo de células HSkMC emplea el «medio de crecimiento de células musculares esqueléticas» (Cell Applications Inc., San Diego, Cat # 151-500) en una atmósfera con un 90% de aire y un 5% de CO₂ a 37 °C, siguiendo la recomendación del proveedor de la célula.

Se cultivan pequeños volúmenes en placas de 35 mm utilizando un inóculo de 3x10⁵ células en 1,5 ml de medio. Después de tres días, se cambia el medio y se obtiene un rendimiento óptimo de AChR en el sexto o séptimo día.

15

Para grandes volúmenes, se utilizan botellas rotatorias de plástico (Falcon Labware, Becton-Dickinson, Inc., Oxnard (California, EE. UU.)). En el caso de las botellas de 850 cm², se inoculan 3x10⁷ células en 150 ml de medio; mientras que para las botellas de 1750 cm² botellas, se inoculan 6x10⁷ células en 300 ml de medio. El medio se cambia al quinto día y el rendimiento de AChR es óptimo entre el noveno y el décimo día.

20

Ejemplo 3: REDUCCIÓN SELECTIVA Y ALQUILACIÓN DEL 5º PUENTE DE DISULFURO EN LA α -COBRATOXINA 1 DE CADENA LARGA A PARTIR DE N. KAOUTHIA

Para la reducción selectiva del 5º puente disulfuro en el bucle II, se incuban 1,2 mM de la toxina con 2,5 mM de ditiotreitól en un tampón Tris 0,2 M, pH 8,5, 1 mg/ml de EDTA durante 90 minutos a 4 °C. Posteriormente, se agrega 2,2'-ditiopiridina disuelta en metanol a una concentración final de 15 mM y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. La cobratoxina-ditiopiridina alquilada obtenida se purifica por filtración en gel (Bio-Gel P-2) y cromatografía HPLC (Vydac C8). Cualquier experto en la materia entiende que este procedimiento se puede aplicar para la reducción selectiva de cualquier α -neurotoxina de cadena larga que comparta el pliegue común de tres dedos con la α -bungarotoxina y la α -cobratoxina. Las toxinas ejemplificadas se eligieron únicamente en función de su disponibilidad comercial en forma purificada.

Ejemplo 4: AISLAMIENTO DE COMPLEJOS RECEPTORES DE ACETILOLINA A PARTIR DE CÉLULAS PARA ENSAYOS DE UNIÓN

35

Los AChR se suelen aislar a partir de los cultivos de seis o siete botellas rotatorias de 850 cm² al mismo tiempo, aunque se pueden procesar con facilidad volúmenes mucho mayores de cultivo simultáneamente. El siguiente procedimiento se utiliza de manera rutinaria para el aislamiento de AChR a partir de cultivos de HSkMC fetales humanas, cuyas muestras están disponibles en Cell Applications Inc., San Diego, con el n.º de catálogo 151-500.

40

A cada botella de cultivo de 850 cm² en el noveno o décimo día, después del cultivo descrito en el Ejemplo II, se le agregan 25 ml de tampón de recogida (NaCl 100 mM, tampón de fosfato de Na 10 mM, NaN₃ 10 mM, EDTA 15 mM, PMSF 2 mM (fluoruro de fenilmetanosulfonilo), IAA 15 mM (ácido yodoacético) y benzamidina 5 mM, pH 7,5). Después se agitan las botellas vigorosamente hasta que las células se desprenden del plástico. Las células que permanecen adheridas a la superficie de la botella se raspan cuidadosamente con un raspador de células de plástico estéril. El tampón y las células se recogen en una botella sobre hielo, y las botellas rotatorias se enjuagan de botella a botella con 100 ml adicionales de tampón de recogida, que luego se combina con el resto. Después se utiliza un homogeneizador Polytron para romper las células durante 15 segundos a una velocidad justo por debajo de aquella a la que se forma espuma. Las membranas y otras partículas se recogen centrifugando el homogenato durante 30 minutos a 300.000 g a 4 °C. Se suelen recuperar aproximadamente 1,5 g de sedimento por botella de 850 cm². El sedimento se añade a cuatro volúmenes de tampón de extracción (fosfato de Na 10 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, IAA 5 mM, benzamidina 5 mM, PMSF 2 mM, Triton X-100 al 2%, pH 7,5) y se suspenden suavemente con el Polytron durante 15 segundos. Después de 30 minutos de extracción con agitación suave a 4 °C, la preparación se centrifuga como antes. El sobrenadante que contiene el nAChR extraído se aspira, se divide en alícuotas y se somete a congelación de choque en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento a -80 °C. Se puede determinar la

55

concentración de proteína del extracto de nAChR mediante el agente reductor del kit de ensayo de proteínas BCA TM compatible (Pierce, Cat # 3250).

EJEMPLO 5: ENSAYOS DE UNIÓN PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DE LA UNIÓN A α -NEUROTOXINA

- 5 El ensayo de unión es básicamente un ELISA que emplea extractos celulares enriquecidos en nAChR humano (ya sea neuronal o muscular) para recubrir los pocillos de la placa de microtitulación y la α -bungarotoxina marcada con FITC (Sigma-Aldrich, Cat # T9641) como trazador marcado. La señal cuantitativa detectada es la fluorescencia del trazador marcado medida en unidades de RF a 525 nm en un escáner de placa de microtitulación de fluorescencia.
- 10 Otra posibilidad para lograr una mayor sensibilidad consiste en detectar colorimétricamente el trazador marcado con FITC con un sándwich de un anticuerpo monoclonal anti-FITC (Sigma-Aldrich, Cat # F5636), anticuerpo anti-IgG de ratón (molécula completa)-Biotina (Sigma-Aldrich, Cat # B7264) y conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina y un sustrato de fosfatasa quimioluminiscente (Sigma-Aldrich, Cat # S2890; Cat #). Para la cuantificación, las unidades de RF de fluorescencia se correlacionan con las concentraciones molares de la toxina trazadora marcada mediante el registro de la fluorescencia (o quimioluminiscencia) de una serie de diluciones de α -bungarotoxina marcadas con FITC que varían de 0,1 a 20 nM preparadas a partir de un stock formulado gravimétricamente con una concentración molar exacta. La curva de calibración de la fluorescencia resultante permite desviar la concentración molar del trazador marcado de la señal fluorescente medida. También se utiliza para determinar el umbral de sensibilidad del ensayo. Para preparar las placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos para el ensayo ELISA, cada pocillo se recubre con un extracto de nAChR diluido en PBS (α 1 2-5 nM). Por lo tanto, se incuban 50-150 μ l del extracto diluido por pocillo durante toda la noche a 4 °C. Los sitios de unión no específicos contenidos en los pocillos se bloquean mediante una incubación posterior con 100-150 μ l por pocillo de PBS que contiene BSA al 3% a 4 °C durante 2 horas con agitación. Para cada lote del extracto de nAChR, se debe determinar de forma empírica la concentración del trazador de saturación, a la cual todos los sitios de unión a toxinas específicos por pocillo están ocupados. Por lo tanto, para cada lote se incuban una placa con una serie de diluciones de la toxina trazadora marcada que varía entre 1 y 10 nM y se determina la concentración del trazador a la cual se alcanza la saturación de la señal fluorescente (generalmente entre 2 y 5 nM). En todos los pocillos que compartan el mismo lote del extracto nAChR, se utilizará la concentración más baja del trazador a la que se alcanza la saturación de la señal de fluorescencia.
- 30 En el primer paso del ensayo, las diluciones en serie (100-150 μ l) que varían de 1 pM a 2 nM de los competidores de las neurotoxinas de cadena larga alquiladas y no modificadas (Sigma-Aldrich; α -cobratoxina, Cat # C6903, y α -bungarotoxina, Cat # T3019) se incuban en tampón PBS a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Después de la incubación con las toxinas competidoras, se agrega la α -bungarotoxina (trazador) marcada con FITC hasta una concentración de saturación (igual en todos los pocillos) y se incuban durante 30 minutos más. Cada pocillo se enjuaga 3 veces con 150 μ l de PBS antes de medir la fluorescencia restante a 525 nm. La constante de protección calculada ajustando los datos de competencia mediante la ecuación de Hill corresponde al valor de Kd, como se ha mostrado en la técnica anterior (6).

EJEMPLO 6: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUIMIODENERVACIÓN

- 40 a) Ensayo de quimiodenervación local de las extremidades posteriores:

La inyección de polipéptidos de quimiodenervación postsináptica objeto de la invención en el músculo gastrocnemio de ratón produce una serie de efectos sobre la función de las extremidades posteriores. A dosis más bajas se observa parálisis de las patas que, por otra parte, constituye una respuesta parcial incipiente a la inyección de dosis más altas de α -neurotoxina. Tal como se usa en esta invención, la «parálisis completa de la pata» se define como la incapacidad del ratón para agarrar con la pata. A dosis más altas, se observa una merma aún más generalizada de la función de la extremidad que recibió la inyección y, en última instancia, la parálisis total de la extremidad posterior. La «parálisis total de la extremidad posterior» se define como la ausencia total de movimientos voluntarios de la extremidad inyectada.

Por consiguiente, se utilizan dos medidas del grado de denervación, una es la parálisis total de la extremidad posterior y la otra es la parálisis total de la pata. Tal como se usa en esta invención, parálisis parcial también significa parálisis de la pata, y parálisis total también significa parálisis de las extremidades posteriores.

55 La cantidad de polipéptido de quimiodenervación postsináptica en una preparación dada se calibra empleando dos unidades diferentes de actividad biológica. La unidad de actividad estándar para la calibración convencional de las neurotoxinas es la LD₅₀ en ratones; 1,0 LD₅₀ es equivalente a 1,0 unidades de actividad. Una unidad de calibración alternativa es la unidad de parálisis media (MPU); tal como se usa en esta invención, 1,0 MPU es la cantidad de α -neurotoxina que produce la parálisis total de la extremidad posterior en el 50% de una población de ratones. A continuación, se describen en detalle los procedimientos para determinar estas unidades de actividad.

b) Determinación de la unidad de parálisis mediana:

La parálisis de la extremidad posterior del ratón se produce por una inyección IM de los polipéptidos objeto de la invención mediante un procedimiento reconocido en la técnica y similar al descrito previamente por Pearce y col. (1994) 128 Toxicol. App. Pharmacology 69. En pocas palabras, se inyecta una α -neurotoxina de la presente invención en el músculo gastrocnemio de la extremidad posterior de ratones de 18-22 g. La actividad neurotóxica se evalúa determinando la fracción de ratones que muestran parálisis completa de la extremidad posterior derecha. La parálisis total se manifiesta como una incapacidad del ratón para usar la extremidad posterior derecha para sostener pesos o para escapar. Una vez que se produce la parálisis total, por lo general, la extremidad posterior se sostiene contra el cuerpo o se arrastra. Estas posturas se consideran signos fundamentales de la parálisis total.

Se inyectan de cinco a seis diluciones de α -neurotoxina en 10 ratones por dilución. Las dosis de α -neurotoxina se incrementan en progresión geométrica con un factor de 1,25. Aplicando consideraciones estadísticas bien conocidas, las dosis se mantienen en torno a la ED_{50} (dosis eficaz mediana) para proporcionar un diseño simétrico (Finney, D. J. (1978) Statistical Method in Biological Assay, Charles Griffin & Co., Londres). Para evitar el sesgo, solo se utilizan dosis de neurotoxina que no producen ninguna muerte antes de determinar la ED_{50} en el análisis probit. Se determina el porcentaje de sujetos paralizados con cada dosis de α -neurotoxina y se realiza un análisis probit estándar con los datos (Bliss, C. I. (1938) 11 Q. J. Pharm. Pharmac. 192-216) utilizando el programa probit proporcionado con el paquete estadístico SPSS-X (SPSS, Inc., Chicago, Illinois). Este programa estima la mejor línea mediante análisis de regresión y los valores para la intersección y la pendiente se estiman mediante el procedimiento de máxima verosimilitud. Se usa una prueba estándar de bondad de ajuste chi-cuadrado de Pearson y, si esta estimación resulta significativa, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza. La ED_{50} obtenida con este tipo de experimento se denomina específicamente en esta invención unidad de parálisis media (UPM).

c) Determinación de la LD_{50} :

Se diluyen muestras de α -neurotoxina. Generalmente, se utilizan 5 diluciones de α -neurotoxina y 5 o 10 ratones por dilución. Se utilizan varias series diferentes de diluciones y se determina la relación entre dosis sucesivas. Las diluciones se incrementan siguiendo, aproximadamente, una progresión geométrica para lograr un diseño simétrico mediante procedimientos estadísticos bien conocidos y similares a los descritos por Finney, D. J. (1978) Statistical Method in Biological Assay (Charles Griffin & Co., Londres). Las muestras diluidas de α -neurotoxina se administran mediante inyección IP a ratones de 18-22 g. Después de la inyección, se observan los ratones durante 4 días.

Se determina el porcentaje de muerte para cada dosis de neurotoxina y se realiza el análisis probit con los datos mediante el programa probit descrito anteriormente. Según las prácticas estadísticas convencionales, se determinaron los intervalos de confianza del 95% para las estimaciones de la LD_{50} mediante procedimientos reconocidos en la técnica similares a los descritos por Finney, D. J., (1971) Probit Analysis (3ª ed.), University Press, Cambridge. De nuevo, se utiliza una prueba estándar de bondad de ajuste chi cuadrado de Pearson y, si esta estimación resulta significativa, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

EJEMPLO 7: ESTUDIO Y COMPARACIÓN DE DOSIS-EFECTO

Se estudian un total de 50 ratas (en 5 grupos de 10). Todos los animales se anestesian con pentobarbital (60 mg/kg) administrado por vía intraperitoneal y mantenido con dosis complementarias según lo determinen las variables de monitorización fisiológica. Se les practica una traqueotomía a las ratas y se ventilan con aire ambiente manteniendo P_{CO_2} cerca de los 35 torr. La arteria carótida se encanula para medir la presión arterial y los gases en sangre arterial. La vena yugular derecha se encanula para la infusión intravenosa y la administración adicional de fármacos. La temperatura corporal se mantiene a 36-38 °C durante todo el experimento. El nervio ciático se expone en el hueco poplíteo y se estimula con una estimulación de tren de cuatro mediante un estimulador neural Digistim. La contracción del músculo tibial anterior se mide uniéndolo a la extremidad posterior de la rata a un transductor de fuerza isométrica para registrar la respuesta provocada. Antes de la administración del polipéptido de quimiodenervación postsináptica, se realizan mediciones basales de la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción muscular durante un periodo de cinco minutos y a intervalos de cinco minutos a lo largo de todo el estudio.

La dosis inicial para el análisis se basa en dosis biológicamente eficaces determinadas en ratones, tal como se describe en el anterior Ejemplo 6. En función de la aparición, el efecto máximo y la duración del efecto en el primer animal estudiado, la dosis para el siguiente animal se duplica o se reduce a la mitad. Si el nivel de relajación se mantiene en un nivel máximo durante más de 20 minutos partiendo de esta dosis inicial, se duplicará la dosis posterior estudiada. Esta progresión continúa hasta que se encuentra la dosis que produjo una relajación muscular casi máxima.

En el estudio inicial se estudian dos polipéptidos de quimiodenervación postsináptica y se comparan con agentes de direccionamiento presináptico convencionales. Para cada compuesto estudiado, se determina el inicio de la relajación

muscular, la duración de la relajación y se hace una estimación de la ED₅₀ a partir de la respuesta del transductor a la fuerza provocada. El inicio de la relajación se define como el tiempo para que la respuesta provocada disminuya al 5% del valor basal previo a la administración del fármaco. Además, se determina la duración clínica, definida como el tiempo transcurrido desde la administración del fármaco hasta que la respuesta muscular provocada vuelve al 25% de su valor inicial previo al fármaco, y el tiempo de recuperación, definido como el tiempo transcurrido hasta que la respuesta suscitada vuelve al 75% del valor inicial. Los datos se resumen para cada compuesto. Estos resultados mostrarán que los polipéptidos son biológicamente activos en la unión neuromuscular y producen una parálisis del músculo esquelético que imita la respuesta observada con los agentes bloqueadores neuromusculares no despolarizantes convencionales administrados durante la anestesia.

10

Ejemplo 8: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUIMIODENERVACIÓN DE LA α -NEUROTOXINA IN VIVO

- Se realizan experimentos con gatos de cualquier sexo anestesiados con una mezcla de α -cloralosa (80 mg kg⁻¹, sup. 1) y pentobarbitona sódica (5 mg kg, sup. 1) inyectada por vía intraperitoneal. Los animales reciben ventilación con aire ambiente a una velocidad de 26 respiraciones por minuto empleando un volumen corriente de 13 ml kg, sup. 1.
- 15 Las extremidades posteriores izquierda y derecha se inmovilizan mediante taladros insertados en las articulaciones del tobillo y la rodilla. Se registran las respuestas contráctiles de los músculos tibial anterior y sóleo ante la estimulación del nervio ciático. El nervio ciático se estimula a frecuencias de 0,1 Hz a 200 Hz utilizando pulsos rectangulares de 0,2 ms de duración y con una fuerza superior a la requerida para producir un temblor máximo. Se registra la presión arterial
- 20 desde la arteria carótida mediante un transductor de presión Statham PC45. Se utiliza el pulso de la presión arterial con el fin de activar un cardiotacógrafo para mostrar la frecuencia cardíaca. En algunos experimentos, ambos nervios vagos están ligados y, a intervalos de 100 s, se estimula el nervio vago derecho con trenes de 10 segundos de duración a una frecuencia de 2-5 Hz y con impulsos de 0,5 ms de duración y una fuerza mayor que la requerida para producir una reducción máxima en la frecuencia cardíaca. Se provocan contracciones de la membrana nictitante cada 100 s
- 25 mediante estimulación preganglionar del nervio simpático cervical con trenes de 10 s de duración a una frecuencia de 5 Hz y con la fuerza necesaria para producir contracciones máximas de la membrana nictitante. Se registran las respuestas contráctiles de los músculos mediante transductores de desplazamiento de fuerza Grass FT03C y FT10C. Todas las respuestas se muestran en un oscilógrafo de escritura en tinta modelo Grass 5.
- 30 Al evaluar la eficacia de los polipéptidos dirigida postsinápticamente objeto de la invención, se registran las respuestas de ambos músculos tibiales anteriores; el músculo que recibe la inyección y el músculo contralateral que sirve como control para la evaluación del derrame. Los polipéptidos dirigidos postsinápticamente objeto de la invención son altamente específicos para los receptores musculares de acetilcolina en la unión neuromuscular. Por lo tanto, se espera que no se observen efectos atribuibles a las toxinas en las respuestas de los tejidos a la estimulación autónoma.
- 35 También se espera que la falta de «derrames» hacia la circulación general sea un factor que contribuya a la falta de acciones autónomas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición cosmética que comprende una α -neurotoxina recombinante que carece de un quinto puente disulfuro en el bucle II del pliegue de tres dedos y un sistema transdérmico, en el que dicha α -neurotoxina
5 presenta una K_D para el nAChR muscular humano que contiene alfa-1 que es al menos 100 veces menor que su K_D para cualquiera de los nAChR neuronales que comprenden $\alpha 7$ nAChR, $\alpha 3$ nAChR, $\alpha 4$ nAChR y $\alpha 2$ nAChR.
2. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende una sola especie de α -neurotoxina.
10
3. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende una mezcla definida de dos o más especies de α -neurotoxina.
4. La composición según la reivindicación 1, en la que dicho sistema transdérmico comprende una
15 chaperona de péptidos.
5. La composición según la reivindicación 4, en la que dicha chaperona de péptidos comprende la secuencia ACSSSPSKHCG (SEQ ID NO: 94).
- 20 6. La utilización de una composición cosmética según la reivindicación 1 en un procedimiento para relajar tejido cutáneo en un paciente, en el que el procedimiento comprende la administración tópica de la composición cosmética a un tejido cutáneo de un paciente en una cantidad eficaz para mejorar la denervación del músculo esquelético o grupo de músculos esqueléticos presentes bajo el tejido cutáneo para mejorar la relajación o el debilitamiento del tejido cutáneo.
- 25 7. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha α -neurotoxina es una α -neurotoxina de cadena corta nativa.
8. Composición según la reivindicación 1, en la que dicha α -neurotoxina comprende una α -neurotoxina de
30 cadena larga nativa con el quinto puente disulfuro entre el cuarto y el quinto residuo de cisteína del extremo N eliminado por sustitución conservadora de aminoácidos.

Figura 1

Alfa-cobratoxina
(Neurotoxina de cadena larga)

