



No. 12-010852- -00000-0000

Fecha: 2012-01-25 11:22:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132

Act. 411 PRESENTACION Folios: 133



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ FORMULACIONES DE TOXINA BOTULÍNICA LIBRE DE ALBÚMINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ REVANCE THERAPEUTICS , INC.

DOMICILIO _____ NEWARK, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____



DETALLE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-010852- -00000-0000

Fecha: 2012-01-25 11:22:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132

Act. 411 PRESENTACION Folios: 133

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.			
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: REVANCE THERAPEUTICS, INC. Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América. Dirección: 7555 Gateway Blvd., Newark, California 94560, Estados Unidos de América Domicilio: Newark, California, Estados Unidos de América		
	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____		
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia.		
	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 35.456.344 T.P 23.555		
4 INVENTOR (ES) (72)	1. Stewart A. THOMPSON 229 Bloomfield Road, Burlingame, California 94010, Estados Unidos de América 3. Jacob M. WAUGH 425 First Street, #1805, San Francisco, California 94105, Estados Unidos de América 2. Curtis L. RUEGG 826 Shepard Way, Redwood City, California 94062, Estados Unidos de América		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US2010/040104 Fecha: 25 de junio de 2010 Publicación Internacional No. WO 2010/151840 A2 Fecha: 29 de diciembre de 2010			
6 Título (54) FORMULACIONES DE TOXINA BOTULÍNICA LIBRE DE ALBÚMINA			
7 Clasificación Internacional (51) A61K 039/008			
8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	US	25 de junio de 2009	61/220.433

9

Comprobante de pago No.: 12-005064Fecha: 19 de enero de 2012Comprobante de pago No.: 12-001878Fecha: 06 de enero de 2012Comprobante de pago No.: 12-006198Fecha: 23 de enero de 2012

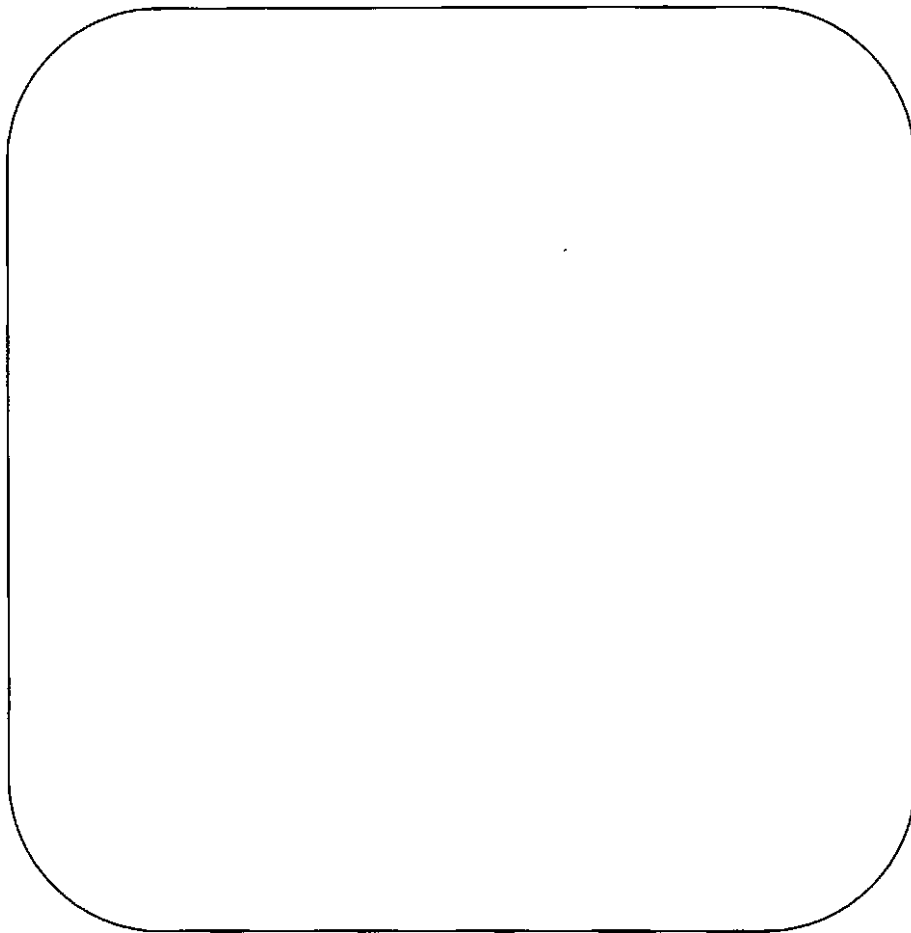
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.00.
- ☒ Comprobante de pago por 42 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$1.260.000.00.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poder de **REVANCE THERAPEUTICS, INC.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2010/151840 A2.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

Luz Clemencia de Paez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/151840 A2

Descripción:

Páginas 39 en español

Reivindicaciones: Número (s) 52

Figuras: Número (s) 3

2. ☒ Listado de Secuencias.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

State of California

SECRETARY OF STATE

Requested for use in Colombia.

Not for use within the United States of America.

The purpose of the Apostille is to certify the authenticity of the signature of the official signing the document, the capacity in which the official signing the document has acted, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp.

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

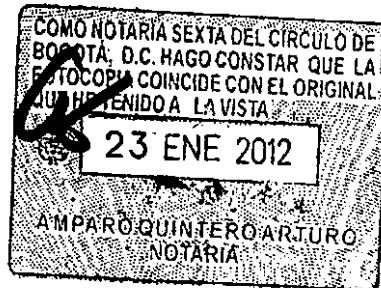
1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by Heidi Butler*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Heidi Butler, Notary Public,*
State of California

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 4th day of February 2010*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 778289*
9. *Seal/Stamp:*



10. Signature



Jana Bowen
Secretary of State

BY *[Signature]*

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

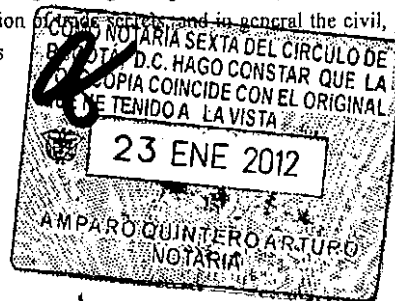
Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned **REVANCE THERAPEUTICS, INC.**
domiciliado (s) en/of 7555 Gateway Blvd., Newark, CA, 94560, United States of America

por el presente nombramos a Luz Clemencia de Páez TPA.23.555, Nidia Osorio TPA. 73.366, Oscar Correa TPA. 71.027, Edna Sarmiento TPA. 65.794, Jorge Chávarro TPA. 40.119, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint Luz Clemencia de Páez TPA.23.555, Nidia Osorio TPA. 73.366, Oscar Correa TPA. 71.027, Edna Sarmiento TPA. 65.794, Jorge Chávarro TPA. 40.119, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits



administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistirse, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy / Given and signed this _____

February 1, 2010

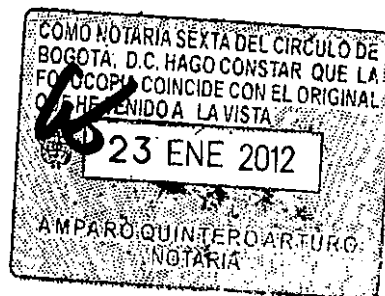
en/in Newark, CA

por/by L. Daniel Browne

Firma President, CEO - Revance Therapeutics Inc.

Signature [Signature]

(Please see attached CA
Notary Acknowledgment)



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

Alameda

On

February 1, 2010

before me,

Heidi Butler, Notary Public

personally appeared

L. Daniel Browne



who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature

Heidi Butler

Signature of Notary Public

Place Notary Seal Above

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document:

Representation and Power of Attorney

Document Date:

Number of Pages:

Signer(s) Other Than Named Above:

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name:

L. Daniel Browne

☐ Individual

☒ Corporate Officer — Title(s):

CFO, President

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other:

Signer Is Representing:

Signer's Name:

☐ Individual

☐ Corporate Officer — Title(s):

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

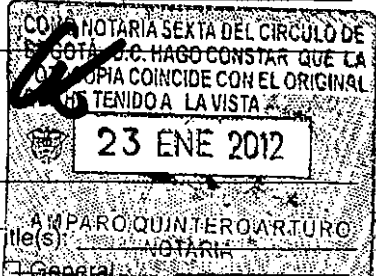
☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other:

Signer Is Representing:



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Jeffrey W. Bullock

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the twenty-second day of April, A.D. 2010

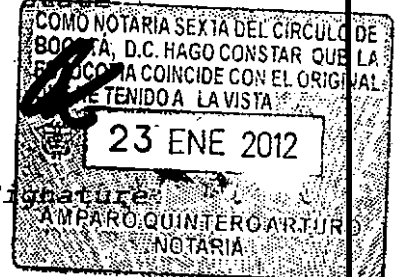
7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0412740

9. Seal/Stamp:



10. Signature:




Secretary of State

Delaware

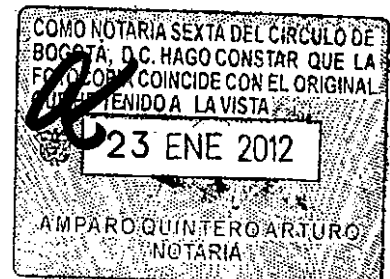
PAGE 1

The First State

I, JEFFREY W. BULLOCK, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "REVANCE THERAPEUTICS, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE TWENTY-SECOND DAY OF APRIL, A.D. 2010.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.



3074007 8306

100413396

You may verify this certificate online
at corp.delaware.gov/authver.shtml

Jeffrey W. Bullock, Secretary of State
AUTHENTICATION: 7948992

DATE: 04-22-10

11

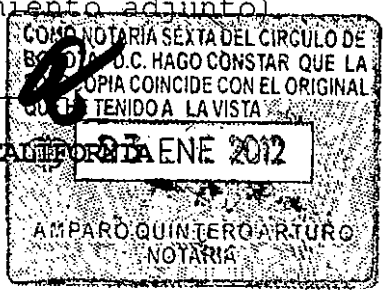
TRADUCCIÓN OFICIAL No. 05.20/10a realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia, registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **REVANCE THERAPEUTICS, INC.**, domiciliado en 7555 Gateway Blvd., Newark, CA 94560, Estados Unidos de América, otorga derechos de representación y poder a los Doctores Luz Clemencia de Páez, tpa. 23.555; Nidia Osorio, tpa. 73.366; Oscar Correa tpa. 71.027; Edna Sarmiento, tpa. 65.794 y Jorge Chávarro, tpa. 40.119, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 1 de febrero de 2010 en Newark, California, Estados Unidos de América por L. Daniel Browne, Presidente y Director Ejecutivo.

Firma Firma Ilegible

(Por favor ver el acto notarial de reconocimiento adjunto)



ACTA NOTARIAL DE RECONOCIMIENTO MULTIPROPÓSITOS DE CALIFORNIA

Estado de California
Condado de Alameda }

El 1 de febrero de 2010 ante mí, Heidi Butler, Notario Público,
Fecha Indique aquí el Nombre y Cargo del Funcionario
compareció personalmente L. Daniel Browne
Nombre(s) del Signatario(s)

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

HEIDI BUTLER
Comisión # 1727224
Notario Público - California
Condado de Santa Clara

quien comprobó con fundamento en evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito en el instrumento anexo y reconoció ante mí que él suscribió el mismo en su calidad autorizada y que por medio de su firma en el instrumento la persona o la

12

Comisión Vence Mar. 23 de 2011

entidad a nombre de la cual dicha persona actuó, ejecutó el documento.

Certifico SO PENA DE PERJURIO según las leyes del Estado de California que el párrafo anterior es verdadero y correcto.

Fijar Sello Notarial Arriba

TESTIFICA mi firma y sello oficial.

Firma Ilegible
Firma del Notario Público

OPCIONAL

Aunque la siguiente información no es obligatoria por ley, esta podría tener valor para aquellas personas que admitan el documento y podría prevenir la remoción fraudulenta y anexión de este formato a otro documento.

DESCRIPCIÓN DEL DOCUMENTO ANEXO

Título o clase del documento: Representación y Poder

Fecha del Documento: _____ Número de Páginas: _____

Otros Signatarios distintos a los anteriores: _____

CALIDAD(ES) REIVINDICADA(S) POR SIGNATARIO(S)

Nombre del signatario: L. Daniel Browne Nombre del signatario: _____

☐ Individuo
Funcionario Director Ejecutivo
☒ Corporativo Cargo(s): y Presidente

☐ Socio ☐ Comanditario ☐ General

☐ Apoderado

☐ Fiduciario

☐ Guardián o Curador

☐ Otro: _____

El Signatario representa a:
Revance Therapeutics, Inc.

☐ Individuo
Funcionario _____
☐ Corporativo Cargo(s): _____

☐ Socio ☐ Comanditario ☐ General

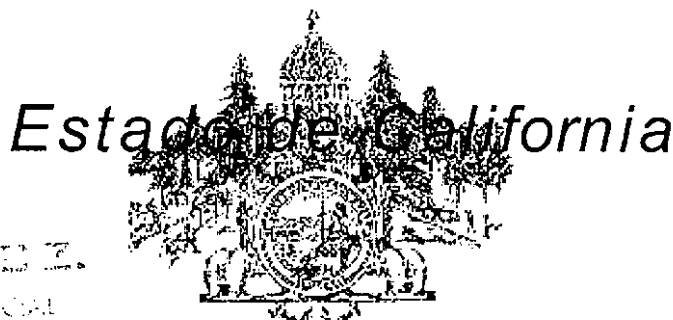
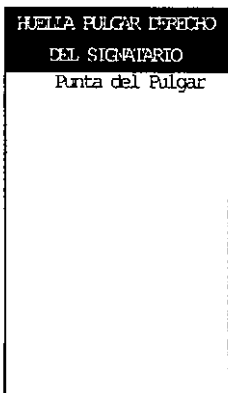
☐ Apoderado

☐ Fiduciario

☐ Guardián o Curador

☐ Otro: _____

El Signatario representa a:
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA



Notario Público
AMPARO QUINTERO ARTURO
TITULO DE NOTARIO PUBLICO
ESPANOL-INGLES - INGLES-ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

SECRETARIO DE ESTADO

Solicitado para uso en Colombia

No puede ser usado dentro de los Estados Unidos de América

El objeto de esta Apostilla es certificar la autenticidad de la firma del funcionario que suscribe el documento, la calidad en la cual dicho funcionario ha actuado y en caso de ser indicado, la identidad del sello o timbre.

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

- 1. País: Estados Unidos de América
- Este documento público
- 2. ha sido firmado por Heidi Butler
- 3. actuando en calidad de Notario Público, Estado de California
- 4. lleva el sello/estampilla de Heidi Butler, Notario Público, Estado de California

CERTIFICADO

- 5. En Sacramento, California
- 6. El 4 de febrero de 2010
- 7. por el Suplente del Secretario de Estado de California
- 8. No. 778289
- 9. Sello/estampilla:



10. Firma
Firma Ilegible
Secretario de Estado

Por Firma ilegible

EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

Delaware
El Primer Estado

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

019483

Deo Vinas
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

200 MAY 21 A 1:04

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTÁ, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

23 ENE 2012

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

14

YO, JEFFREY W. BULLOCK, SECRETARIO DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE LA SOCIEDAD "REVANCE THERAPEUTICS, INC." ESTÁ DEBIDAMENTE CONSTITUIDA DE CONFORMIDAD CON LAS LEYES DEL ESTADO DE DELAWARE Y CUMPLE CON SU OBJETO SOCIAL Y TIENE UNA EXISTENCIA LEGAL CORPORATIVA DE ACUERDO CON LO QUE MUESTRAN LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA A VEINTIDÓS DE ABRIL DE 2010.

Y ADICIONALMENTE CERTIFICO QUE LOS DERECHOS DE LICENCIA HAN SIDO PAGADOS A LA FECHA.

Y ADICIONALMENTE CERTIFICO QUE LOS INFORMES ANUALES HAN SIDO PRESENTADOS HASTA LA FECHA.

3074007 8300

100413396



Firma ilegible

Jeffrey W. Bullock, Secretario de Estado

AUTENTICACIÓN: 7948992

FECHA: 04-22-10

Apostilla

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

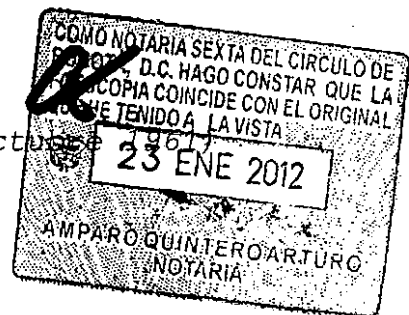
1. País: Estados Unidos de América

Este documento público:

2. ha sido firmado por Jeffery W. Bullock
3. actuando en calidad de Secretario de Estado de Delaware
4. lleva el sello/estampilla de Secretario de Estado

Certificado

5. En Dover, Delaware
6. El veintidós de abril de 2010



Diego F. Vazquez
DIEGO F. VAZQUEZ
TRANSLADOR JURMENTADO OFICIAL
ESPAÑOL-INGLÉS - INGLÉS-ESPAÑOL
RES. UDDI DEL ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

15

7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware

8. No. 0412740

9. Sello/estampilla:



10. Firma:

Secretario de Estado

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-171339\WPCL002H\COLO 17580-841-001-3

Díaz F. Vargas
DÍAZ F. VARGAS Z.

TRADUCCION E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL

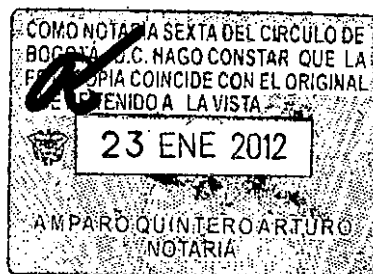
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA

SECRETARÍA DE JUSTICIA
CALLE DE LA PAZ 100

BOGOTÁ D.C. 15 JAN 2005

RECEIVED
SECRETARÍA DE JUSTICIA



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

019482

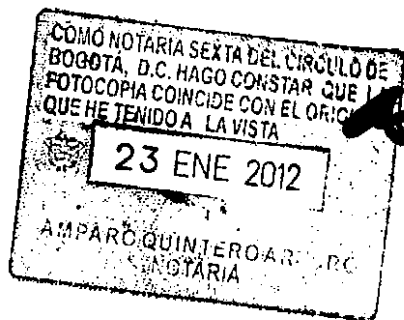
Diego Vargas

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2008 MAY 21 A 1:03

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 December 2010 (29.12.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/151840 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 39/08 (2006.01) A61P 21/02 (2006.01)
A61K 8/99 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2010/040104

(22) International Filing Date:

25 June 2010 (25.06.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/220,433 25 June 2009 (25.06.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **RE-VANCE THERAPEUTICS, INC.** [US/US]; 7555 Gateway Boulevard, Newark, California 94560 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **THOMPSON, Stewart A.** [US/US]; 229 Bloomfield Road, Burlingame, California 94010 (US). **RUEGG, Curtis L.** [US/US]; 826 Shepard Way, Redwood City, California 94062 (US). **WAUGH, Jacob M.** [US/US]; 425 First Street, #1805, San Francisco, California 94105 (US).

(74) Agent: **ENG, Joseph D., Jr.**; King & Spalding LLP, 1185 Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available):

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

(54) Title: **ALBUMIN-FREE BOTULINUM TOXIN FORMULATIONS**

(57) Abstract: This invention relates to botulinum toxin formulations that are stabilized without the use of any proteinaceous excipients. The invention also relates to methods of preparing and using such botulinum toxin formulations.



WO 2010/151840 A2

FORMULACIONES DE TOXINA BOTULÍNICA LIBRE DE ALBÚMINA

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud de Patente Provisional No. 61/220,433, presentada el 25 de junio, 2009, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0002] Esta invención se relaciona con formulaciones farmacéuticas que contienen toxina botulínica. En particular, esta invención se relaciona con formulaciones de toxina botulínica que se estabilizan mediante excipientes no proteicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0003] Las toxinas botulínicas (también conocidas como toxinas botulina o neurotoxinas botulínicas) son neurotoxinas producidas por bacterias *Clostridium botulinum*. Las toxinas botulínicas producen parálisis muscular al evitar la transmisión sináptica o liberación de acetilcolina a través de la unión neuromuscular. La acción de las toxinas botulínicas bloquea esencialmente las señales que normalmente provocarían espasmos musculares o contracciones, lo que resulta en parálisis.

[0004] Existen ocho toxinas botulínicas relacionadas serológicamente de ocurrencia natural, siete de las cuales se sabe que provocan parálisis (a saber, serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C, D, E, F y G). Cada uno de estos serotipos se distingue por neutralización con anticuerpos de tipo específico. Sin embargo, el peso molecular de la molécula de proteína de toxina botulínica es aproximadamente 150 kD para todas las siete de estas toxinas botulínicas activas. Aunque se libere por las bacterias *Clostridium botulinum*, la toxina botulínica está

presente en un complejo que comprende la molécula de proteína de toxina botulínica de 150 kD junto con proteínas no tóxicas asociadas. El tamaño total del complejo puede variar. Por ejemplo, el complejo de toxina botulínica tipo A se puede producir mediante las bacterias *Clostridium botulinum* como complejos 900 kD, 500 kD y 300 kD. Los complejos de toxina botulínica tipos B y C solo se producen como complejos 700 kD o 500 kD. Los complejos de toxina botulínica tipo D se producen como complejos 300 kD y 500 kD. Los complejos toxina botulínica tipos E y F solo se producen como complejos 300 kD. Se considera que los complejos contienen proteína de hemaglutinina no tóxica y proteína sin hemaglutinina no tóxica y sin toxina. Se consideran que estas dos proteínas sin toxina (que junto con la molécula de toxina botulínica comprenden el complejo de neurotoxina importante) proporcionan estabilidad contra la desnaturalización de la molécula de toxina botulínica y protección contra los ácidos digestivos cuando se ingiere toxina.

[0005] Aunque la toxina botulínica es la toxina de ocurrencia natural más letal conocida por el hombre, se ha encontrado un uso amplio como un agente terapéutico y cosmético. Por ejemplo, en 1986, la posibilidad de utilizar toxina botulínica tipo A para el tratamiento de arrugas asociadas con el movimiento en el área de la glabella se demostró primero por Schantz and Scott, in Lewis G E (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, N. Y.: Academic Press, 143-150 (1981). El uso de botulina tipo A para el tratamiento de arrugas se publicó en 1992 (Schantz and Scott, in Lewis G. E. (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, N.Y.: Academic Press, 143-150 (1981)), y en 1994, se trataron otras arrugas asociadas al movimiento en la cara con toxina botulínica tipo A (Scott, Ophthalmol, 87:1044-1049 (1980)). La demanda de tratamientos cosméticos con toxina botulínica ha aumentado de

manera constante durante los años, con ventas anuales reales de toxina botulínica en los Estados Unidos que exceden mil millones de dólares por año.

[0006] Un aspecto desafiante de la fabricación de formulaciones comerciales de toxina botulínica es estabilizar la toxina botulínica. Al igual que muchas proteínas, la toxina botulínica se puede degradar o desnaturalizar mediante factores ambientales, tales como calor, condiciones alcalinas, fuerzas de corte mecánicas, o contacto con superficies o sustancias reactivas. Adicionalmente, la dificultad en estabilizar la toxina botulínica en las formulaciones comerciales se agrava por la extrema toxicidad de la toxina, que solo permite cantidades mínimas de toxina que se van a utilizar para propósitos terapéuticos. Si la formulación de toxina botulínica no se estabiliza apropiadamente, las cantidades mínimas de toxina botulínica pueden experimentar reacciones no deseadas y/o adherirse a las superficies internas de sus contenedores de almacenamiento, conduciendo a la pérdida inaceptable de actividad o de la toxina botulínica.

[0007] Las formulaciones comerciales de toxina botulínica se distribuyen a menudo como polvo liofilizado (es decir secado por congelamiento) o secado al vacío, con el fin de evitar la degradación y hacer más fácil de manejar la formulación de toxina botulínica y menos costosa para transportar. Antes de uso, las formulaciones en polvo de toxina botulínica se reconstituyen con un portador líquido, tal como agua o una solución salina. Por ejemplo, una formulación de toxina botulínica comercialmente disponible se vende bajo la marca BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, Calif.). La formulación de BOTOX® se distribuye como un polvo secado al vacío almacenado en frascos individuales, cada uno de los cuales contiene aproximadamente 100 unidades (U) de complejo de toxina botulínica de Clostridium tipo A, 0.5 miligramos de albúmina de suero humana y 0.9 miligramos

de cloruro de sodio. Se ha reportado que la formulación de toxina botulínica comercial se debe almacenar a una temperatura de -10°C o menos para mantener la potencia que aparece en la etiqueta durante un año de vida útil.

[0008] En las formulaciones comerciales de toxina botulínica, la albúmina de suero humana a menudo se agrega como un portador de masa y estabilizante. De forma general, la albúmina puede estabilizar una proteína terapéutica (por ejemplo, toxina botulínica) mediante uno o más de los siguientes mecanismos: (1) reducir la adhesión de la proteína terapéutica a las superficies internas de los contenedores de almacenamiento o suministro, que incluyen cristalería, frascos de almacenamiento, y la jeringa utilizada para inyectar la composición farmacéutica; y (2) reducir la desnaturalización de la proteína terapéutica, especialmente después de reconstitución para preparar una solución de la proteína terapéutica. La albúmina de suero humana tiene la ventaja agregada de ser mínimamente inmunogénica, lo cual disminuye la probabilidad de que un paciente humano desarrolle anticuerpos contra la formulación de toxina botulínica.

[0009] Aunque se ha adoptado la albúmina de suero humana como un estabilizante en las formulaciones comerciales de toxina botulínica, aún existen problemas asociados con este método. Un serio problema es que la albúmina se deriva de sangre y es por lo tanto susceptible para llevar los patógenos o agentes infecciosos de transmisión sanguínea. Por ejemplo, la albúmina de suero humana puede llevar el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). La albúmina también puede llevar priones, que son agentes de infección proteicos que son responsables por provocar un trastorno neurodegenerativo conocido como enfermedad de Creutzfeldt- Jacob. Los priones provocan plegamiento erróneo de las proteínas en el cerebro, lo que resulta en la demencia, pérdida de la memoria,

deterioro del lenguaje, pérdida de coordinación motora, y muerte, a menudo dentro del lapso de meses después del inicio de los síntomas.

[0010] Los intentos para reemplazar la albúmina de suero humana con estabilizantes no proteicos de forma general se ha encontrado con dificultades. Un polímero no proteico puede ser reactivo hacia la toxina botulínica o puede contener impurezas reactivas que degradan y/o desnaturalizan la toxina botulínica. Por ejemplo, algunos estudios han utilizado un poloxámero como un compuesto estabilizante no proteico para la toxina botulínica. Sin embargo, estos estudios reportan que las formulaciones de toxina botulínica estabilizadas con poloxámero reconstituido demuestran baja actividad de la toxina botulínica, lo que sugiere que el excipiente de poloxámero falla en estabilizar de manera apropiada la toxina botulínica y/o provoca reacciones de degradación indeseadas.

[0011] De acuerdo con lo anterior, sería muy conveniente tener una formulación de toxina botulínica que se estabiliza, pero sin un excipiente proteico, especialmente sin ningún excipiente basado en proteína animal. Adicionalmente, sería muy conveniente tener un excipiente estabilizante no proteico que no reacciona en sí mismo con la toxina botulínica.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0012] En un aspecto, esta invención se relaciona con formulaciones botulínicas que se estabilizan mediante excipientes no proteicos. En particular, en las modalidades preferidas, esta invención se relaciona con formulaciones de toxina botulínica que se estabilizan sin albúmina u otros excipientes derivados de proteína animal.

[0013] Un aspecto de la invención es proporcionar una composición líquida que comprende una toxina botulínica, un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción, un tensoactivo no iónico, y un regulador fisiológicamente compatible capaz de mantener el pH entre 4.5 y 6.5. La concentración del azúcar sin reducción en la composición líquida está en el rango de 10% a 40% (p/v) y la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v).

[0014] Otro aspecto de la invención es proporcionar una composición en polvo al secar la composición líquida descrita anteriormente.

[0015] Esta invención también proporciona un método para estabilizar una formulación de toxina botulínica. El método comprende combinar una toxina botulínica, un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción, un tensoactivo no iónico, y componentes de regulador fisiológicamente compatible capaces de mantener el pH entre 4.5 y 6.5 para formar una composición líquida. La concentración del azúcar sin reducción en la composición líquida está en el rango de 10% a 40% (p/v) y la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v). Opcionalmente, el método comprende adicionalmente secar la composición líquida para producir una composición en polvo estabilizada.

[0016] Otro aspecto de la invención es proporcionar una composición líquida que comprende una toxina botulínica, un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción, un tensoactivo no iónico, un agente de masa y un regulador fisiológicamente compatible. En estas modalidades, la concentración de las composiciones de disacárido sin reducción está en el rango de 0.50 a 3.0% (p/v), la concentración del agente de masa está en el rango de 1.5% a 7.5%, la

concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v); y el pH de la composición está en el rango de 4.5 a 6.5. También, la cantidad de disacárido sin reducción o trisacárido sin reducción relativa a la cantidad de agente de masa se selecciona de tal manera que el agente de masa no se cristaliza cuando se seca la composición líquida. La invención también contempla de forma expresa formulaciones en polvo preparadas al secar tales composiciones líquidas.

[0017] La invención también proporciona un método para estabilizar una formulación de toxina botulínica que comprende combinar una toxina botulínica, un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción, un tensoactivo no iónico, un agente de masa y un regulador fisiológicamente compatible para formar una composición líquida. La concentración de las composiciones de disacárido sin reducción está en el rango de 0.50 a 3.0% (p/v), la concentración del agente de masa está en el rango de 1.5% a 7.5%, la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v); y el pH de la composición está en el rango de 4.5 a 6.5. Opcionalmente, el método comprende adicionalmente secar la composición líquida para producir una composición en polvo estabilizada. También, la cantidad de disacárido sin reducción o trisacárido sin reducción relativa a la cantidad de agente de masa se selecciona de tal manera que el agente de masa no se cristaliza cuando se seca la composición líquida.

[0018] Esta invención también proporciona una composición líquida que comprende una toxina botulínica, un azúcar sin reducción, un tensoactivo no iónico, un regulador fisiológicamente compatible, un péptido cargado positivamente y un agente de masa opcional. El péptido cargado positivamente tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-

RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR. El pH de la composición líquida está en el rango de 4.5 a 6.5. La invención también contempla de forma expresa formulaciones en polvo preparadas al secar tales composiciones líquidas.

[0019] Aún otro aspecto de la invención es proporcionar un método para estabilizar una formulación de toxina botulínica que comprende combinar una toxina botulínica, un azúcar sin reducción, un tensoactivo no iónico, un regulador fisiológicamente compatible, un péptido cargado positivamente y un agente de masa opcional. El péptido cargado positivamente tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G- RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR. El pH de la composición líquida está en el rango de 4.5 a 6.5. Opcionalmente, el método comprende adicionalmente secar la composición líquida para producir una composición en polvo estabilizada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0020] La **FIGURA 1**: Actividad de toxina botulínica recuperada como una función de tiempo después de almacenamiento de una toxina botulínica liofilizada a 40° C.

[0021] La **FIGURA 2**: Actividad de toxina botulínica recuperada como una función de tiempo después de almacenamiento de una toxina botulínica liofilizada a diferentes temperaturas.

[0022] La **FIGURA 3**: Actividad de toxina botulínica recuperada como una función de tiempo después de almacenamiento de una toxina botulínica liofilizada a diferentes temperaturas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0023] Esta invención se relaciona con formulaciones de toxina botulínica que se estabilizan sin la adición de excipientes proteicos derivados (es decir, purificados) a partir de fuentes animales, tales como albúmina. Como tal, las formulaciones botulínicas de la invención no sufren de los problemas potenciales asociados a los patógenos de transmisión sanguínea u otros tipos de agentes infecciosos. Esta invención también proporciona métodos para preparar formulaciones de toxina botulínica sin la adición de excipientes proteicos derivados de animal. En las modalidades preferidas, las formulaciones no contienen ningún excipiente proteico en lo absoluto. Sin embargo, en ciertas modalidades, los excipiente proteicos no derivados de fuentes animales (por ejemplo, albúmina recombinante o gelatina recombinante) pueden estar presentes en las formulaciones de la invención.

[0024] Como se utiliza aquí en relación con las formulaciones de toxina botulínica de la invención, el término “estabiliza” y variaciones del mismo (por ejemplo, “estabilización”, “estabilizar” “estabilizado” etc.) se refiere a la retención de actividad biológica de la toxina botulínica en la formulación durante un periodo de tiempo específico según se mide por un ensayo LD₅₀ de 20 ratones (Ver LB Pearce, RE Borodic, Tox. Appl. Pharmacol., v128, p69, 1994 y ICCVAM/NICEATM/ECVAM, Scientific Workshop on Alternate Methods to Refine, Reduce and Replace the Mouse LD50 Assay for Toxina botulínica Testing, 14 November 2006). En las modalidades preferidas, hay una retención del 100% de la actividad biológica de la toxina botulínica durante el periodo de tiempo

específico. Sin embargo, en otras modalidades, hay por lo menos una retención del 10%, 20%, 30 %, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la actividad biológica de la toxina botulínica durante el periodo de tiempo específico. En ciertas modalidades, la duración del periodo de tiempo específico se puede seleccionar para que sea consistente con la duración de los procesos para fabricar el producto de toxina botulínica. Por ejemplo, la duración del periodo de tiempo específico se puede seleccionar para que sea suficiente para estabilizar la toxina botulínica ya que esta se somete a una o más etapas de procesamiento. En otras modalidades, el tiempo específico será del orden de semanas, meses o aún años, tal como el caso cuando los componentes de formulación sin toxina se seleccionan para permitir estabilización a largo plazo de la formulación de toxina botulínica para almacenamiento. En ciertas modalidades, el tiempo específico es por lo menos dos semanas, por lo menos un mes, por lo menos tres meses, por lo menos seis meses, por lo menos nueve meses, por lo menos un año, por lo menos 18 meses o por lo menos dos años. En otras modalidades, el tiempo específico es coincidente con el tiempo de la toxina botulínica para retener una cantidad deseada de bioactividad utilizando las formulaciones de la invención, cuyo tiempo incluye, por ejemplo, la duración de las actividades establecidas anteriormente. Los componentes utilizados para estabilizar la formulación se pueden seleccionar para permitir la estabilización a bajas temperaturas (por ejemplo, -5 a -10° C) o a temperatura ambiente, como se describe aquí.

[0025] En algunas modalidades, las formulaciones de toxina botulínica de la invención se proporcionan en forma sólida. Solo por vía de ejemplo, las formulaciones se pueden liofilizar o secar al vacío para producir una formulación sólida. Cuando una formulación de toxina botulínica de la invención se proporciona en forma sólida, y el periodo de tiempo específico durante el cual se mide la

estabilidad de la formulación botulínica es una semana o menos, la actividad que se observa luego de reconstitución se dice que es la actividad tras la recuperación inicial. En ciertas modalidades preferidas de la invención, hay por lo menos una retención del 70%, 80%, o 90% en la actividad tras la recuperación inicial. En otras modalidades, hay por lo menos una retención del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de la actividad tras la recuperación inicial. En una modalidad particularmente preferida, la actividad tras la recuperación inicial es mayor de 99% y puede aún ser el 100%.

[0026] En otras modalidades, el tiempo específico durante el cual se mide la estabilidad es mayor de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses a temperatura de almacenamiento dada. Cuando una formulación de toxina botulínica de la invención se proporciona en forma sólida, y el periodo de tiempo específico durante el cual la estabilidad de la formulación botulínica se mide es doce meses o más, la actividad que se observa luego de reconstitución se dice que es la actividad luego de almacenamiento a largo plazo. En ciertas modalidades preferidas, hay por lo menos una retención del 70%, 80%, o 90% de la actividad de toxina botulínica luego de almacenamiento a largo plazo. En ciertas modalidades hay una retención del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de la actividad de toxina botulínica luego de almacenamiento a largo plazo. En ciertas modalidades, hay por lo menos una retención del 90% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 91% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 92% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una

retención del 93% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 94% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 95% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 96% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 97% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 98% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; o por lo menos una retención del 99% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C.

[0027] En algunas modalidades de la invención, las formulaciones de toxina botulínica se almacenan en forma líquida, a diferencia de la forma sólida. En ciertas modalidades preferidas, las formulaciones líquidas de toxina botulínica de acuerdo con la invención retienen por lo menos 60%, 70%, 80%, o 90% de la actividad de toxina botulínica durante hasta 8 horas a temperatura ambiente. En una modalidad particularmente preferida, las formulaciones líquidas de toxina botulínica de acuerdo con la invención retienen 100% de la actividad de toxina botulínica durante hasta 8 horas a temperatura ambiente.

[0028] Los excipientes en las formulaciones botulínicas de la invención reducen o eliminan de forma ventajosa los mecanismos mediante los cuales la toxina

botulínica se pierde durante la fabricación y almacenamiento. Sin desear estar limitado por la teoría, se considera que los excipientes no proteicos de la invención reducen o eliminan la adhesión no deseada de la toxina botulínica en los recipientes utilizados para fabricación, almacenamiento o suministro de la formulación. Ejemplos no limitantes de tales recipientes incluyen aquellos hechos con vidrio, poliestireno, polipropileno, y otros polímeros. Adicionalmente, y de nuevo sin desear estar limitado por la teoría, se considera que los excipientes no proteicos de la invención reducen o evitan reacciones no deseadas entre la toxina botulínica y objetos o sustancias encontradas por la toxina botulínica durante la fabricación, almacenamiento, o suministro. En las modalidades preferidas, los excipientes no proteicos son inertes a los otros componentes de la formulación.

[0029] En algunas modalidades, las formulaciones de toxina botulínica se preparan en una forma de polvo para facilitar el manejo, transporte, o almacenamiento. La forma en polvo se puede preparar mediante cualquier método conocido en la técnica. Ejemplos no limitantes de tales incluyen liofilización, secado al vacío, secado por tambor y secado por aspersión, siendo la liofilización y el secado al vacío particularmente preferidos.

[0030] El término "toxina botulínica" como se utiliza aquí significa que se refiere a cualquiera de los tipos de toxina botulínica conocidos, ya sea producidos por la bacteria o mediante técnicas recombinantes, así como también cualesquier tales tipos que se pueden descubrir posteriormente que incluyen las variantes diseñadas por ingeniería o proteínas de fusión. Como se mencionó anteriormente, actualmente, se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas inmunológicamente distintas, a saber serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C, D, E, F y G, cada una de las cuales se distingue por neutralización con

anticuerpos tipo específicos. Los serotipos de toxina botulínica están disponibles de Sigma-Aldrich y de Metabiologics, Inc. (Madison, Wis.), así como también de otras fuentes. Los diferentes serotipos de toxina botulínica varían en las especies animales que ellas afectan y en la severidad y duración de la parálisis que provocan.

[0031] La toxina botulínica utilizada en las composiciones de esta invención puede ser alternativamente un derivado de toxina botulínica, es decir, un compuesto que tiene actividad de toxina botulínica pero contiene una o más alteraciones químicas o funcionales en cualquier parte o en cualquier cadena relativa a las toxinas botulínicas naturales recombinantes o de ocurrencia natural. Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser una neurotoxina modificada (por ejemplo, una neurotoxina que tiene por lo menos uno de sus aminoácidos eliminado, modificado o reemplazado, cuando se compara con una neurotoxina natural o producida recombinantemente o un derivado o fragmento del mismo). Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser una que se ha modificado en una forma que, mejora sus propiedades o reduce los efectos colaterales indeseados, pero que todavía retiene la actividad de toxina botulínica deseada. La toxina botulínica puede ser cualesquier complejos de toxina botulínica producidos por la bacteria, como se describió anteriormente. Alternativamente, la toxina botulínica puede ser una toxina preparada utilizando técnicas químicas recombinantes o sintéticas (por ejemplo un péptido recombinante, una proteína de fusión, o una neurotoxina híbrida, cuando se prepara a partir de subunidades o dominios de diferentes serotipos de toxina botulínica (ver Pat. EE.UU. No. 6,444,209, por ejemplo)). La toxina botulínica también puede ser una porción de la molécula completa que se ha mostrado por poseer la actividad de toxina botulínica necesaria, y en tal caso se puede utilizar per se o como parte de una molécula de combinación o

conjugada, por ejemplo una proteína de fusión. Adicionalmente, la toxina botulínica puede estar en la forma de un precursor de toxina botulínica, que puede ser en sí misma no tóxica, por ejemplo una proteasa se zinc no tóxica que se convierte en tóxica luego de la división proteolítica.

[0032] El término "complejo de toxina botulínica" o "complejo de toxina" como se utiliza aquí se refiere a la molécula de proteína de toxina botulínica de aproximadamente 150 kD (que pertenece a uno cualquiera de los serotipos de toxina botulínica A-G), junto con las proteínas sin toxina endógenas asociadas (es decir, proteína hemaglutinina y proteína no hemaglutinina sin toxina producida por las bacterias *Clostridium botulinum*). Observe, sin embargo, que el complejo de toxina botulínica no necesita derivarse de bacterias *Clostridium botulinum* como un complejo de toxina unitario. Por ejemplo, la toxina botulínica o toxina botulínica modificada primero se puede preparar de forma recombinante y luego combinar posteriormente con las proteínas no tóxicas. También se puede comprar la toxina botulínica recombinante (por ejemplo, de List Biological Laboratories, Campbell, CA) y luego combinar con proteínas no tóxicas.

[0033] Esta invención también contempla los "complejos de toxina botulínica reducidos," en el que los complejos de toxina botulínica han reducido las cantidades de proteína sin toxina comparadas con las cantidades encontradas naturalmente en los complejos de toxina botulínica producidos por bacterias *Clostridium botulinum*. En una modalidad, los complejos de toxina botulínica reducidos se preparan utilizando cualquier método de separación de proteína convencional para extraer una fracción de la proteína hemaglutinina o proteína no hemaglutinina sin toxina de los complejos de toxina botulínica derivados de bacterias *Clostridium botulinum*. Por ejemplo, los complejos de toxina botulínica

reducidos se pueden producir al disociar los complejos de toxina botulínica a través de la exposición a los glóbulos rojos a un pH de 7.3 (por ejemplo, ver EP 1514556 A1, incorporada aquí como referencia). Se pueden utilizar HPLC, diálisis, columnas, centrifugación, y otros métodos para extraer proteínas de proteínas. Alternativamente, cuando se producen los complejos de toxina botulínica reducidos al combinar la toxina botulínica producida sintéticamente con proteínas no tóxicas, uno puede agregar simplemente menos hemaglutinina o proteína no hemaglutinina sin toxina a la mezcla que la que estaría presente para los complejos de toxina botulínica de ocurrencia natural. Cualquiera de las proteínas no tóxicas (por ejemplo, proteína hemaglutinina o proteína no hemaglutinina sin toxina o ambas) en los complejos de toxina botulínica reducidos de acuerdo con la invención se puede reducir de forma independiente mediante cualquier cantidad. En ciertas modalidades de ejemplo, se reducen una o más proteínas no tóxicas mediante por lo menos aproximadamente 0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% en comparación con las cantidades normalmente encontradas en los complejos de toxina botulínica. En una modalidad, sustancialmente toda la proteína sin toxina (por ejemplo, >95% de la proteína hemaglutinina y proteína no hemaglutinina sin toxina) que normalmente se encontraría en los complejos de toxina botulínica derivados de bacterias *Clostridium botulinum* se elimina del complejo de toxina botulínica. En otra modalidad, solo se utiliza la molécula de toxina botulínica pura, sin ninguna proteína hemaglutinina y proteína no hemaglutinina sin toxina. Adicionalmente, aunque se puede reducir la cantidad de proteínas no tóxicas endógenas por la misma cantidad en algunos casos, esta invención también contempla reducir cada una de las proteínas no tóxicas endógenas mediante diferentes cantidades, así como también reducir por lo menos una de las proteínas no tóxicas endógenas, pero no las otras.

[0034] Esta invención también contempla el uso general de combinaciones y mezclas de toxinas botulínicas, aunque debido a su naturaleza y propiedades diferentes, las mezclas de serotipos de toxina botulínica no se administran de forma general en este momento en las industrias del cuidado de la salud y cosmética.

[0035] Las formulaciones de toxina botulínica de la invención comprenden un tensoactivo no iónico. De forma general, esta invención contempla el uso de cualquier tensoactivo no iónico que tenga la capacidad de estabilizar la toxina botulínica y que sea adecuado para uso farmacéutico. En ciertas modalidades, el tensoactivo no iónico es un polisorbato, ejemplos no limitantes del cual incluyen polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, y polisorbato 80. En otras modalidades, el tensoactivo no iónico es un éster de sorbitán, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen Span 20, Span 60, Span 65, y Span 80. La invención también contempla el uso de poloxámeros, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen poloxámero 181, poloxámero 188, y poloxámero 407. La invención también contempla utilizar Triton X-100 o NP -40 como los tensoactivos no iónicos. Adicionalmente, la invención contempla modalidades en las que se utilizan las combinaciones de diferentes tensoactivos no iónicos en conjunto. En ciertas modalidades preferidas, el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbatos, poloxámeros, y sorbitanes, siendo particularmente preferidos los polisorbatos y sorbitanes. En las modalidades preferidas, la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5%, o en el rango de 0.01% a 0.2%, o en el rango de 0.02% a 0.1% o en el rango de 0.05 a 0.08%. Esta invención también contempla formulaciones donde la concentración

del tensoactivo no iónico es 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%, 0.08%, 0.09%, 0.10%, 0.11%, 0.12%, 0.13%, 0.14%, o 0.15%.

[0036] Las formulaciones de toxina botulínica de la invención comprenden un azúcar sin reducción. En las modalidades preferidas, el azúcar sin reducción tiene temperatura de transición vítrea por encima de 55° C, 57° C o 60° C. Sin desear estar limitado por la teoría, se considera que tales temperaturas de transición vítreas son suficientemente altas para suprimir movimientos moleculares indeseables que provocan la desnaturalización de la toxina botulínica. En ciertas modalidades particularmente preferidas, el azúcar sin reducción es un disacárido, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen trehalosa y sacarosa. En otras modalidades, el azúcar sin reducción es un trisacárido, un ejemplo no limitante del cual es rafinosa. De forma general, la concentración del azúcar sin reducción en las formulaciones de toxina botulínica de la invención están en el rango de 10% a 40% (p/v), preferiblemente 10% a 25% (p/v), más preferiblemente 15% a 20% (p/v). En algunas modalidades preferidas, la concentración del azúcar sin reducción es 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20% (p/v). Cuando el azúcar sin reducción es trehalosa, preferiblemente la forma hidratada de la trehalosa (es decir, dihidrato de trehalosa) se utiliza para preparar la formulación, aunque también se contempla el uso de la forma anhidra de la trehalosa.

[0037] Adicionalmente, un aspecto de esta invención es el reconocimiento de que se puede utilizar la selección del azúcar sin reducción para adaptar la estabilidad de la formulación de toxina botulínica como una función de temperatura. Por ejemplo, cuando la formulación de toxina botulínica se somete a condiciones sin refrigeración es ventajoso utilizar trehalosa como el azúcar sin reducción, ya que

la trehalosa confiere estabilidad a la toxina botulínica a temperaturas ambiente. Así, las formulaciones que contienen trehalosa de la invención se pueden procesar de forma ventajosa a temperaturas ambiente durante varios procesos de fabricación sin pérdida de la actividad de toxina botulínica apreciable. En situaciones donde se refrigerará la formulación de toxina botulínica (por ejemplo, durante almacenamiento a largo plazo los últimos meses o aún años), se puede seleccionar la sacarosa como el azúcar sin reducción. También se contemplan las mezclas de azúcares por la invención. Por ejemplo, en ciertas modalidades, se agregan sacarosa y trehalosa a la formulación de toxina botulínica. La relación específica de los componentes de la mezcla de azúcar dependerá del efecto que se vaya a alcanzar y se puede determinar mediante experimentación de rutina. También dentro del alcance de esta invención está el uso de diferentes azúcares sin reducción, tales como disacáridos, solos o en combinación durante diferentes etapas de purificación, fabricación, o almacenamiento. Así, por ejemplo, se puede utilizar trehalosa durante el procesamiento y/o purificación inicial a altas temperaturas (por ejemplo, temperatura ambiente), seguido por eliminación y reemplazo de la trehalosa con sacarosa. La eliminación y sustitución de un azúcar sin reducción, tal como un disacárido, por otro se puede lograr mediante, por ejemplo, diálisis, cromatografía, u otros métodos conocidos en la técnica.

[0038] Otro aspecto de la invención es el reconocimiento de que el azúcar sin reducción (o azúcares) especificado aquí, para ciertas modalidades, puede actuar como el agente de masa principal para formulaciones sólidas de toxina botulínica. En particular, se ha descubierto que los azúcares sin reducción, cuando se agregan en las cantidades especificadas aquí, pueden formar una torta estable y mecánicamente robusta luego de liofilización o secado al vacío de la formulación de toxina botulínica. Sin desear estar limitado por la teoría, se considera que los

azúcares sin reducción en tales formulaciones forman un sólido amorfo en el que los grupos hidroxilo en el azúcar sin reducción orientado de forma aleatoria el azúcar sin reducción para maximizar en enlace de hidrógeno, que estabiliza la toxina botulínica e imparte robustez mecánica a la torta sólida. En algunas modalidades preferidas, los azúcares sin reducción descritos aquí se utilizan como el único agente de masa para las formulaciones de toxina botulínica. En otras modalidades preferidas, un azúcar sin reducción actúa como el agente de masa principal, pero se agregan pequeñas cantidades de los agentes volumétricos secundarios a la formulación de toxina botulínica. Los agentes volumétricos secundarios no se pueden limitar particularmente, y puede ser cualquier agente de masa que no tiene un efecto inaceptablemente adverso sobre la estabilidad de la formulación de toxina botulínica. Cuando se utiliza agentes volumétricos secundarios que tienen una tendencia para cristalizar, es preferible agregarlos en concentraciones suficientemente bajas, de tal modo que no son capaces de cristalizarse. Sin desear estar limitado por la teoría, se considera que la cristalización de tales agentes volumétricos secundarios tendrán un efecto adverso sobre la estabilidad de la torta sólida obtenida después de la liofilización o secado al vacío.

[0039] Un aspecto adicional de la invención es el resultado inesperado de que los azúcares sin reducción, en las concentraciones descritas aquí, se pueden utilizar no solo para estabilizar formulaciones liofilizadas de toxina botulínica, sino también formulaciones de toxina botulínica en la fase de solución.

[0040] En las modalidades preferidas, la formulación de toxina botulínica comprende un regulador. De forma general, cualquier regulador fisiológicamente compatible capaz de mantener el pH en el rango de 4.5 a 6.5, más preferiblemente

en el rango de 5 a 6, y más preferiblemente aproximadamente 5.5, es adecuado para las formulaciones de toxina botulínica de la invención. Ejemplos no limitantes de tales reguladores incluyen aquellos que involucran sales de ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico, y histidina. Ejemplos no limitantes de concentraciones reguladoras adecuadas incluyen concentraciones reguladoras en el rango de 0.400% a 0.600%; 0.450% a 0.575%, o 0.500% a 0.565%. La invención también contempla formulaciones de toxina botulínica que comprenden una mezcla de sales reguladoras, ejemplos no limitantes de las cuales incluyen citrato/acetato, citrato/histidina, citrato/tartrato, maleato/histidina, o succinato/histidina. En ciertas modalidades preferidas, el regulador es regulador de fosfato.

[0041] En ciertas modalidades, las formulaciones de toxina botulínica comprenden un agente de masa (adicionalmente al azúcar sin reducción(s)) que hace más fácil manejar las formas liofilizadas de las formulaciones de toxina botulínica. En ciertas modalidades preferidas, los agentes volumétricos se cristalizan bajo condiciones de liofilización y no se mezclan bien con los otros excipientes cuando están en el estado sólido. Sin embargo, en otras modalidades preferidas, el agente de masa permanece amorfo bajo condiciones de liofilización, aún si se conoce por tener una tendencia para cristalizar durante el congelamiento (por ejemplo, manitol o glicina). Como lo entenderá una persona medianamente versada en la técnica, si un agente de masa cristallizará o permanecerá amorfo durante la liofilización se rige por varios factores, que incluye el tipo de agente de masa, la cantidad de agente de masa relativa a los otros componentes de la formulación, y el índice en el que se liofiliza la formulación. En ciertas modalidades preferidas, la cantidad de azúcar sin reducción relativa al agente de masa se ajusta para suprimir la cristalización del agente de masa. Cuando este es el caso, la relación de azúcar

sin reducción con el agente de masa, sobre una base de porcentaje en peso, puede ser mayor de 0.33 a 1; 0.5 a 1, 0.75 a 1; 1:1; 2:1, 3:1, o 4:1. Ejemplos no limitantes de agentes volumétricos contemplados por la invención incluyen sorbitol, manitol, glicina, arginina, e histidina. En algunas modalidades, la concentración del agente de masa puede estar en el rango de 1% a 10%, 2% a 6%, 3% a 5% o 4% a 4.5% (p/v). En ciertas modalidades preferidas, cuando se utiliza un agente de masa, la concentración del azúcar sin reducción se puede reducir del rango de 10% a 40% (p/v) a un rango de 0.5% a 3.0% (p/v). Adicionalmente, en ciertas modalidades preferidas, la relación del azúcar sin reducción con el agente de masa está en el rango de 0.07 a 2.0, preferiblemente en el rango de 0.4 a 0.6. Así, solo por vía de ejemplo, la formulación puede comprender manitol como el agente de masa y dihidrato de trehalosa como el azúcar sin reducción, con manitol presente en un rango de concentración de 1.5% a 7.5% (p/v) y dihidrato de trehalosa presente en un rango de concentración de 0.5% a 3.0% (p/v). Preferiblemente, el agente de masa no es cloruro de sodio.

[0042] Las formulaciones de toxina botulínica de la invención se pueden administrar a través de una ruta de administración convencional. En algunas modalidades de la invención, las formulaciones de toxina botulínica se administran mediante inyección intramuscular o subcutánea en el sujeto. En otras modalidades, las formulaciones de toxina botulínica se administran tópicamente. Independientemente de si se administran las formulaciones de toxina botulínica tópicamente o mediante inyección, las formulaciones pueden incluir un portador cargado positivamente que tiene grupos de eficiencia cargados positivamente, como se describe aquí, con el fin de facilitar la penetración de la toxina botulínica en los tejidos de interés. Sin embargo, cabe notar que si no se requiere el portador cargado positivamente para la estabilización y que la invención contempla

modalidades en las que las formulaciones no comprenden tal un portador cargado positivamente. Las formulaciones de toxina botulínica de la invención también se pueden administrar a través de un dispositivo de suministro de fármaco, un ejemplo no limitante del cual es un parche para la piel.

[0043] Cuando las formulaciones de toxina botulínica son para ser administradas tópicamente, es ventajoso incluir en las formulaciones un portador cargado positivamente con grupos ramificados cargados positivamente, como se describe aquí, para promover la penetración transdérmica de la toxina botulínica (ver también Solicitud de Patente EE.UU. Nos. 09/910,432; 11/073,307; 11/072,026; y 10/793,138, cada una las cuales se incorpora como referencia en su totalidad). Sin el uso del portador cargado positivamente o algunos otros medios para mejorar el transporte transdérmico, el flujo transdérmico de la toxina botulínica aplicada tópicamente se espera que sea bastante bajo. Cabe notar que la invención también contempla el uso de otros métodos para mejorar el transporte transdérmico, además del uso de un portador cargado positivamente como se describe aquí, con las formulaciones de toxina botulínica de la invención. Ejemplos no limitantes de tales métodos incluyen el suministro transdérmico de las formulaciones de toxina botulínica que utilizan liposomas, iontoforesis, micelas, y similares.

[0044] Adicionalmente, cuando las formulaciones de toxina botulínica se van a administrar tópicamente, es a menudo ventajoso para mezclarlos con agentes de gelificación y/o agentes que modifican la viscosidad para incrementar la viscosidad para incrementar la viscosidad de la formulación, para hacer la aplicación de la toxina botulínica más fácil y más exacta. Adicionalmente, si se utiliza un portador cargado positivamente, estos agentes ayudan a prevenir la formulación de toxina botulínica/ portador acuosa a partir del secado, que tiende a provocar una

disminución en la actividad de la toxina botulínica. Los agentes particularmente preferidos son aquellos que son no cargados y que no interfieren con la actividad de toxina botulínica o la eficiencia de los complejos de portador en el cruzamiento de la piel. Los agentes de gelificación pueden ser ciertos agentes de gelificación con base en celulosa, tales como hidroxipropilcelulosa (HPC) por ejemplo. En algunas modalidades, el complejo de toxina botulínica/portador se formula en una composición que tiene 2-4% de HPC. Alternativamente, la viscosidad de una solución que contiene un complejo de toxina botulínica/ portador se puede alterar al agregar polietilenglicol (PEG). En otras modalidades, la solución de toxina botulínica/ portador se combina con agentes viscosos premezclados, tales como humectante Cetaphil®. En otras modalidades, el agente que modifica la viscosidad es un poloxámero, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen poloxámero 188 y poloxámero 407. El agente que modifica la viscosidad también puede ser un ácido poliacrílico, una poliamida, o una goma vegetal (por ejemplo, goma guar). Adicionalmente, se pueden mezclar formulaciones de toxina botulínica como se describe aquí con excipientes para formar emulsiones (que incluyen microemulsiones), suspensiones, cremas, lociones, geles, polvos, u otras composiciones sólidas o líquidas típicas utilizadas para aplicación a la piel y otros tejidos donde se pueden utilizar las composiciones. Tales composiciones también pueden contener otros ingrediente típicamente utilizados en tales productos, tales como agentes antimicrobianos, humectantes y agentes de hidratación, agentes de penetración, conservantes, emulsificantes, aceites naturales o sintéticos, disolventes, tensoactivos, detergentes, emolientes, antioxidantes, perfumes, rellenos, espesantes, ceras, absorbentes de olores, tintes, agentes colorantes, polvos, y opcionalmente anestésicos, aditivos contra el prurito, extractos botánicos, agentes de acondicionamiento, agentes de oscuridad o luminosidad,

agentes de brillo, humectantes, mica, minerales, polifenoles, siliconas o derivados de las mismas, bloqueadores solares, vitaminas y fitomedicinales.

[0045] Esta invención también proporciona equipos para preparar y/o administrar las formulaciones de toxina botulínica de la invención. En algunas modalidades, el equipo comprende la toxina botulínica, así como también tales excipientes adicionales que son necesarios para producir una formulación estabilizada de acuerdo con la invención. El equipo también comprende una premezcla que puede a su vez ser utilizada para producir tal una formulación. En otras modalidades, el equipo comprende una formulación de toxina botulínica de acuerdo con la invención que se ha liofilizado y un dispositivo para suministrar la formulación, un ejemplo no limitante de la cual una jeringa.

[0046] La invención proporcionan formulaciones que suministran una "cantidad terapéutica" de botulina al sujeto durante el tratamiento. Como se utiliza aquí, el término "cantidad terapéutica" se refiere a una cantidad de toxina botulínica que es suficiente para producir el efecto deseado (por ejemplo, relajación de los músculos, tratamiento de arrugas, tratamiento de dolor, o reducción de la actividad de una glándula hiperactiva, tal como una glándula sudorífera). La "cantidad terapéutica" de la toxina botulínica se entiende implícitamente que es una cantidad segura que no provoca parálisis indeseada u otros efectos colaterales no deseados o perjudiciales. La cantidad específica de toxina botulínica que se administra dependerá de varios factores, que incluyen la ruta de administración, el sitio de administración, la indicación a ser tratada, y el serotipo (o serotipos) de toxina botulínica en la formulación específica. Por ejemplo, cuando se selecciona el serotipo de toxina botulínica tipo A, una cantidad terapéutica puede estar en el rango de 10 U a 150 U o 1,000 U a 2,500 U. En otras modalidades preferidas, the

cantidad terapéutica varía de 400 U a 800 U y 1,000 U a 50,000 U, preferiblemente de 2,000 - 35,000 U, más preferiblemente de 3,000 U - 30,000 U, y aún más preferiblemente de 4,000 U a 25,000 U. En ciertas modalidades, la cantidad terapéutica varía de 4,000 U a 8,000 U, 9,000 U a 19,000 U, o 20,000 U a 40,000 U.

[0047] Las composiciones de la invención se aplican de tal manera que provoquen un efecto deseado, que puede ser un efecto cosmético o terapéutico. Los efectos deseados incluyen la relajación de ciertos músculos con la ayuda de, por ejemplo, disminución de la apariencia de líneas finas y/o arrugas, especialmente en la cara, o ajustar la apariencia facial en otras formas tales como el agrandamiento de los ojos, levantamiento de los bordes de la boca, o suavizar las líneas que se extienden desde el labio superior, o el alivio general de la tensión muscular. El efecto mencionado anteriormente, el general de la tensión muscular, se puede efectuar en la cara o cualquier parte. Las composiciones de la invención pueden contener una cantidad efectiva apropiada de la toxina botulínica para aplicación como un tratamiento de dosis única, o puede ser más concentrada, ya sea para dilución en el lugar de la administración o para uso en múltiples aplicaciones. Los complejos de toxina botulínica estabilizados o complejos de toxina botulínica reducidos estabilizados se pueden administrar a un sujeto para tratar afecciones tales como espasmos musculares faciales no deseados u otros espasmos musculares, hiperhidrosis, acné, o afecciones en cualquier parte del cuerpo en la que se desea un alivio de dolor o espasmos musculares. La toxina botulínica se suministra a los músculos o a otras estructuras asociadas con la piel. Se puede hacer la administración, por ejemplo, a la cara, piernas, hombros, espalda (que incluyen la parte baja de la espalda), axilas, palmas, pies, cuello, ingle, dorso de las manos o los pies, codos, brazos, rodillas, parte superior de las piernas, nalgas,

torso, pelvis, o cualquier otra parte del cuerpo donde se desea la administración de la toxina botulínica.

[0048] En ciertas modalidades preferidas, las formulaciones de toxina botulínica de la invención comprenden un portador cargado positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente. Cuando este es el caso, el portador cargado positivamente está presente en una cantidad suficiente para facilitar la penetración de la toxina botulínica en los tejidos de interés. Como se utiliza aquí, el término "cargado positivamente" significa que el portador tiene una carga positiva bajo por lo menos algunas condiciones de fase en solución, más preferiblemente bajo por lo menos algunas condiciones fisiológicamente compatibles. Más específicamente, "cargado positivamente" significa que el grupo en cuestión contiene funcionalidades que se cargan bajo todas las condiciones de pH, por ejemplo, una amina cuaternaria, o contiene una funcionalidad que puede adquirir carga positiva bajo ciertas condiciones de fase en solución, tales como cambios de pH en el caso de aminas primarias. Más preferiblemente, "cargado positivamente" como se utiliza aquí se refiere a aquellos grupos que tienen el comportamiento de asociación con aniones para condiciones fisiológicamente compatibles. Los polímeros con una multiplicidad de grupos funcionales cargados positivamente no necesitan ser homopolímeros, como será evidente para un experto en la técnica. Otros ejemplos de grupos funcionales cargados positivamente son bien conocidos en la técnica anterior y se pueden emplear fácilmente, como será evidente para aquellos expertos en la técnica.

[0049] De forma general, el portador cargado positivamente comprende una estructura principal cargada positivamente, que es típicamente una cadena de átomos, ya sea con grupos en la cadena que lleva una carga positiva a pH

fisiológico, o con grupos que llevan una carga positiva adherida a las cadenas laterales que se extienden desde la estructura principal. Preferiblemente, la estructura principal cargada positivamente en sí misma no tendrá una actividad enzimática o biológica terapéutica. La estructura principal lineal es un hidrocarburo que, en algunas modalidades, se interrumpe por heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio y fósforo. La mayoría de los átomos de la cadena de estructura principal son usualmente carbono. Adicionalmente, la estructura principal a menudo será un polímero de unidades de repetición (por ejemplo, aminoácidos, poli(etilenooxi), poli(propilenoamina), polialquilenimina, y similares) pero puede ser un heteropolímero. En un grupo de modalidades, la estructura principal cargada positivamente es una polipropilenoamina en donde un número de los átomos de nitrógeno de amina están presentes como grupos amonio (tetra-sustituídos) que llevan una carga positiva. En otra modalidad, la estructura principal cargada positivamente es un polímero no peptídico, que puede ser un hetero- o homo-polímero tal como una polialquilenimina, por ejemplo una polietilenimina o polipropilenimina, que tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 2,500,000 D, preferiblemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 1,800,000 D, y más preferiblemente de aproximadamente 1000 a aproximadamente 1,400,000 D. En otro grupo de modalidades, la estructura principal tiene adherido una pluralidad de grupos funcionales de cadena lateral que incluyen grupos cargados positivamente (por ejemplo, grupos de amonio, grupos piridinio, grupos fosfonio, grupos sulfonio, grupos guanidinio, o grupos amidinio). Estos grupos funcionales de cadena lateral en este grupo de modalidades se pueden colocar en espacios a lo largo de la estructura principal que son consistentes en separaciones o variables. Adicionalmente, la longitud de las cadenas laterales puede ser similar o diferente. Por ejemplo, en un grupo de modalidades, las cadenas laterales pueden ser

cadenas de hidrocarburos lineales o ramificadas que tienen de uno a veinte átomos de carbono y terminación en el extremo distal (lejos de la estructura principal) en uno de los grupos cargados positivamente anotados anteriormente. En todos los aspectos de la presente invención, la asociación entre el portador y la toxina botulínica es mediante interacción no covalente, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o combinaciones de los mismos.

[0050] En un grupo de modalidades, la estructura principal cargada positivamente es un polipéptido que tiene múltiples grupos de cadena lateral cargados (por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, homoarginina, y similares). Preferiblemente, el polipéptido tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 1,500,000 D, más preferiblemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 1,200,000 D, más preferiblemente de aproximadamente 1000 a aproximadamente 1,000,000 D. Un experto en la técnica apreciará que cuando se utilizan aminoácidos en esta porción de la invención, las cadenas laterales pueden tener ya sea la forma D o L (configuración R o S) e el centro de la adhesión. En ciertas modalidades preferidas, el polipéptido tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 D, más preferiblemente de 1000 a aproximadamente 4000 D, más preferiblemente de 2000 a aproximadamente 3000 D. En otras modalidades, el polipéptido tiene un peso molecular de por lo menos aproximadamente 10,000.

[0051] En otra modalidad, la porción de la estructura principal es una polilisina y los grupos de eficiencia como se discute aquí, se adhieren a la polilisina. La polilisina puede tener un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 1,500,000 D, preferiblemente de aproximadamente 250 a

aproximadamente 1,200,000 D, y más preferiblemente de aproximadamente 1000 a aproximadamente 3000 D. En una modalidad de ejemplo, el portador cargado positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente es un péptido con la secuencia de aminoácido RKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RGRDDRRQRRR, o YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR. También puede ser cualquiera de las polilisinas disponibles comercialmente (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., EE.UU.) tal como, por ejemplo, polilisina que tiene MW>70,000 D, polilisina que tiene MW de 70,000 a 150,000 D, polilisina que tiene MW 150,000 a 300,000 D y polilisina que tiene MW>300,000 D. La selección de una polilisina apropiada dependerá de los componentes restantes de la composición y será suficiente para proporcionar una carga positiva neta general a la composición y proporcionar una longitud que es preferiblemente de uno a cuatro veces la longitud combinada de los componentes cargados positivamente.

[0052] Alternativamente, la estructura principal puede ser un análogo de un polipéptido tal como a peptoide. Ver, por ejemplo, Kessler, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32:543 (1993); Zuckermann et al. Chemtracts- Macromol. Chem. 4:80 (1992); y Simon et al. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:9367 (1992)). En resumen, un peptoide es una poliglicina en la cual la cadena lateral está adherida a los átomos de nitrógeno de la estructura principal en lugar de los átomos de carbono alfa. Como anteriormente, una porción de las cadenas laterales típicamente terminará en un grupo cargado positivamente para proporcionar un componente de estructura principal cargado positivamente. Se describe la síntesis de los peptoides en, por ejemplo, Pat. U.S. No. 5,877,278, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Ya que el término se utiliza aquí, las estructuras principales cargadas positivamente que tienen una construcción de estructura

principal de peptóide se consideran "no péptido" ya que ellas no se componen de aminoácidos que tienen cadenas laterales de aminoácidos de ocurrencia natural en las ubicaciones del carbono α .

[0053] Se puede utilizar una variedad de otras estructuras principales empleando, por ejemplo, imitadores estéricos o electrónicos de los polipéptidos en donde los enlaces de amida del péptido se reemplazan con sustitutos tales como enlaces éster, grupos tioamidas ($--CSNH-$), tioamida inversa ($--NHCS--$), aminometileno ($--NHC_2H-$) o el metilenoamino inverso ($-C_2HNH-$), grupos ceto-metileno ($-COC_2H-$), fosfinato ($-PO_2RC_2H-$), fosfonamidato y éster de fosfonamidato ($-PO_2RNH-$), péptido inverso ($--NHCO-$), trans-alqueno ($-CR=CH-$), fluoroalqueno ($-CF=CH-$), dimetileno ($--C_2HC_2H-$), tioéter ($-C_2HS-$), hidroxietileno ($-CH(OH)C_2H-$), metilenooxi ($-C_2HO-$), tetrazole (CN_4), sulfonamido ($-SO_2NH-$), metilenosulfonamido ($--CHRSO_2NH-$), sulfonamida inversa ($-NHSO_2-$), y estructuras principales con malonato y/o subunidades de gem-diamino-alquilo, por ejemplo, como se revisa por Fletcher et al. ((1998) Chem. Rev. 98:763) y detallado mediante las referencias citadas allí. Muchas de las anteriores sustituciones resultan en aproximadamente estructuras de polímero isostérico relativas a las estructuras principales formadas a partir de α -aminoácidos.

[0054] En cada una de las estructuras principales proporcionadas anteriormente, los grupos de cadena lateral se pueden añadir para llevar un grupo cargado positivamente. Por ejemplo, las estructuras ligadas a sulfonamida ($-SO_2NH-$ y $-NHSO_2-$) pueden tener grupos de cadena lateral adheridos a los átomos de nitrógeno. De forma similar, el enlace hidroxietileno ($-CH(OH)C_2H-$) puede llevar un grupo de cadena lateral adherido al sustituyente hidroxilo. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente las otras químicas de enlace para proporcionar

grupos de cadena lateral cargados positivamente utilizando métodos sintéticos estándar.

[0055] En algunas modalidades de la invención, el portador cargado positivamente comprende grupos de eficiencia cargados positivamente. Ejemplos no limitantes de los grupos de eficiencia incluyen $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, en el que el subíndice $n1$ es un entero de 0 a 20 más preferiblemente 0 a 8, aún más preferiblemente 2 a 5, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 17, y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 13, HIV-TAT o fragmentos del mismo, o Antennapedia PTD o un fragmento del mismo. Preferiblemente los grupos de cadena lateral o ramificados tienen la fórmula geneal $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ como se describió anteriormente. Otras modalidades preferidas son aquellas en las que los grupos ramificados o de eficiencia son fragmentos HIV-TAT que tienen la fórmula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR}-(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$, o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$, en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un entero de 0 a 20 y el fragmento se adhiere a la molécula portadora a través de ya sea el terminal C o el terminal N del fragmento. Los grupos ramificados laterales pueden tener ya sea la forma D o L (configuración R o S) en el centro de la adhesión. Los fragmentos HIV-TAT preferidos son aquellos en los que los subíndices p y q son cada uno independientemente enteros de 0 a 8, más preferiblemente 2 a 5. Otras modalidades preferidas son aquellas en las que los grupos ramificados son grupos Antennapedia PTD o fragmentos de los mismos que retienen la actividad del grupo. Esto se conoce en la técnica, por ejemplo, de Console et al., J. Biol. Chem. 278:35109 (2003). Preferiblemente, el portador cargado positivamente incluye grupos ramificados cargados positivamente de cadena lateral en una cantidad de

por lo menos aproximadamente 0.05%, como un porcentaje del peso del portador total, preferiblemente de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 45% en peso, y más preferiblemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 30% en peso. Para los grupos ramificados cargados positivamente que tiene la fórmula $-(\text{gly})_{n1}-$ $(\text{arg})_{n2}$, la cantidad más preferida es de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 25%.

[0056] Los siguiente ejemplos proporcionan ilustraciones no limitantes de varias modalidades de la invención. Donde una persona medianamente versada en la técnica reconocerá, que se pueden hacer modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de una formulación de toxina botulínica

[0057] Una formulación de ejemplo de toxina botulínica de la invención se prepara al combinar cantidades apropiadas de dihidrato de trehalosa, polisorbato-20, histidina, y histidina HCl para producir una solución madre de formulación 2x que contiene 36% de dihidrato de trehalosa, 0.05% de polisorbato-20, y 1.126% de histidina a un pH de 5.5. La solución se enfría a 4° C. La toxina botulínica API se sedimenta mediante centrifugación de una suspensión madre de sulfato de amonio. El sedimento de toxina se disuelve en 0.56% de regulador de histidina pH 5.5 con 0.05% de polisorbato-20. Esta solución se diluye adicionalmente con la solución de histidina/polisorbato-20 para dar una solución madre de toxina de solución 1.074 µg/mL.

[0058] Una solución madre del péptido portador RKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RKKRRQRRR se prepara al disolver suficiente péptido en agua para producir una solución de 6.0 mg/mL de péptido. La solución madre de toxina, solución madre de péptido, 0.56% de regulador de histidina, y solución madre de formulación 2x se combinan para producir un producto de fármaco de masa de formulación que consiste de 18% de dihidrato de trehalosa, 0.025% de polisorbato-20, 0.56% de regulador de histidina, 55 ng/mL de toxina y 150 µg/mL de péptido portador.

Ejemplo 2: Liofilización de una formulación de toxina botulínica

[0059] Este ejemplo proporciona un procedimiento de liofilización para una formulación de toxina botulínica de acuerdo con la invención. 200 µL de alícuotas del producto de fármaco de masa de formulación descrito en el Ejemplo 1 se transfiere para cada uno de cincuenta y cinco frascos de vidrio de 2 mL. Tapones para liofilización de caucho de butilo grises se colocan libremente sobre la parte superior de los frascos de vidrio. Los frascos se colocan en el liofilizador y se inicia la liofilización.

[0060] El proceso de liofilización comprende tres etapas principales: (1) una etapa de congelamiento; (2) una etapa de secado principal; y (3) una etapa de secado secundario. Cada una de estas tres etapas principales contienen una o más etapas de proceso individuales, que se realizan a las temperaturas y presiones como se indica adelante. El tiempo de secado principal requerido para completar el secado principal varía dependiendo del número de frascos y el volumen de relleno en los frascos.

Congelamiento

Etap	Índice/Mantenimiento	Grados C	Minutos
1	H	5	50
2	R	-45	60
3	H	-45	120

Congelamiento, Condensación y Evacuación:

Temperatura de congelamiento: -40 grados C de Estante o Promedio de Producto

Tiempo de congelamiento extra: 0 minutos

Permite inicio de vacío: -45 Cond. Avg. grados C

Permite inicio de calentamiento: 200 mTorr

Secado principal

Etap	Índice/ Mantenimiento	Grados C	Minutos	mTorr
1	H	-45	150	150
2	H	-33	2520	150
3	R	-25	990	150
4	H	-25	275	150
5	H	-15	240	150
6	H	0	300	150
7	R	25	180	150
8	H	25	120	150

Secado secundario

Etap	Índice/Mantenimiento	Grados C	Minutos	mTorr
1	H	27	150	100

Ejemplo 3: Estabilidad de la formulación de toxina botulínica con dihidrato de trehalosa

[0061] La **FIGURA 1** y **2** muestran los resultados de los estudios de estabilidad en los cuales los frascos de la formulación de toxina botulínica preparados en dos diferentes concentraciones de toxina con dihidrato de trehalosa (11 ng/frasco y 1.1 ng/frasco) se preparan como se describió anteriormente, se almacenan a 4° C, 25° C y 40° C y se prueban en los puntos de tiempo indicados para determinar la actividad biológica de la toxina botulínica para una duración de hasta 18 meses. La actividad se mide utilizando el ensayo de ratón LD₅₀ y las actividades se reportan en la **FIGURA 1** y **2** como unidades equivalentes de toxina botulínica por frasco. Al inicio del experimento (t=0), la actividad observada es 1802 unidades de toxina botulínica por frasco para la formulación en la **FIGURA 1** y 192 unidades de toxina botulínica por frasco para la formulación en la **FIGURA 2**. La variabilidad observada en la actividad de toxina botulínica en la **FIGURA 1** y **2** se considera que resulta del ruido inherente en los datos obtenidos utilizando el ensayo de ratón LD₅₀ y el pequeño número de muestra (n=1 frasco/ temperatura –punto de tiempo). A pesar de la variabilidad, los datos indican que no hay tendencia a la pérdida de actividad recuperada durante este estudio de dieciocho meses, aún a una temperatura de almacenamiento de 40° C. Estos datos proporcionan un ejemplo de la estabilización de una formulación de ejemplo de toxina botulínica de la invención.

Ejemplo 4: Estabilidad de la formulación de toxina botulínica con sacarosa

[0062] La **FIGURA 3** muestra los resultados de los estudios de estabilidad en los que los frascos de la formulación de toxina botulínica con sacarosa a 11 ng/frasco se preparan utilizando el protocolo descrito anteriormente para las formulaciones que contienen trehalosa, se almacenan a 4° C y 25° C y se prueban en los puntos de tiempo indicados para determinar la actividad biológica de la toxina botulínica

para una duración de hasta 18 meses. La actividad se mide utilizando el ensayo de ratón LD₅₀ como se describió anteriormente y las actividades se reportan en la **FIGURA 3** como unidades equivalentes de toxina botulínica por frasco. Al inicio del experimento (t=0), la actividad observada es 2299 unidades de toxina botulínica por frasco. La variabilidad observada en la actividad de toxina botulínica en la **FIGURA 3** se considera que resulta del ruido inherente en los datos obtenidos utilizando el ensayo de ratón LD50 y el pequeño número de muestra (n=1 frasco/ temperatura- punto de tiempo). A pesar de la variabilidad, los datos indican que no hay tendencia a la pérdida de actividad recuperada durante este estudio de dieciocho meses, aún a una temperatura de almacenamiento de 25° C. Estos datos proporcionan un ejemplo de la estabilización de una formulación de ejemplo de toxina botulínica de la invención.

Ejemplo 5: Liofilización de una formulación de toxina botulínica con agentes volumétricos

[0063] En este ejemplo, la formulación de toxina botulínica se prepara al combinar cantidades apropiadas de dihidrato de trehalosa, manitol, polisorbato-20, histidina, e histidina HCl para producir una solución madre de formulación que contiene 3% de dihidrato de trehalosa, 7.5% de manitol, 0.05% de polisorbato-20, y 0.563% de histidina a un pH de 5.5. La solución se enfría a 4° C. La toxina botulínica API se sedimenta mediante centrifugación de una suspensión madre de sulfato de amonio. El sedimento de toxina se disuelve en la solución madre de formulación. La concentración de esta solución es 117 µg/mL. Esta solución se diluye adicionalmente con la misma solución a una concentración final de solución madre de toxina de 11.7 µg/mL. Una cantidad suficiente de un péptido portador que tiene la secuencia de aminoácido RKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RKKRRQRRR se disuelve

en agua para preparar una solución madre de péptido portadora 20 mg/mL. Estas soluciones se combinan para crear un producto de fármaco de masa de formulación con una composición final de 3% de dihidrato de trehalosa, 7.5% de manitol, 0.05% de polisorbato-20, y 0.563% de histidina pH de 5.5, 75 µg/mL de péptido portador, y 5.5 ng/mL de toxina,

[0064] Las alícuotas de 200 µL del producto de fármaco de masa de formulación se agregan a cada uno de los frascos de liofilización de vidrio de 192 2-mL. Se colocan tapones de caucho de butilo gris libremente en la parte superior de los frascos. Los frascos luego se colocan en el liofilizador y se inicia la liofilización.

[0065] Como en el ejemplo previo, el proceso de liofilización comprende tres etapas principales: (1) una etapa de congelamiento; (2) una etapa de secado principal; y (3) una etapa de secado secundario. Cada una de estas tres etapas principales contienen una o más etapas de proceso individuales, que se realizan a las temperaturas y presiones como se indica adelante.

Congelamiento

Etapas	Índice/Mantenimiento	grados C	Minutos
1	H	5	30
2	R	-45	50
3	H	-45	60
4	R	-20	25
5	H	-20	240
6	R	-45	25
7	H	-45	60

Congelamiento, Condensación y Evacuación:

Temperatura de congelamiento: -40 grados C de Estante o Promedio de Producto

Tiempo de congelamiento extra: 1 minutos

Permite inicio de vacío: -45 Cond. Avg. grados C

Permite inicio de calentamiento: 300 mTorr

Secado principal

Etapas	Índice/ Mantenimiento	Grados C	Minutos	mTorr
1	H	-45	30	150
2	R	-28	80	150
3	H	-28	900	150
4	R	-15	20	150
5	H	-15	180	150
6	R	-5	20	150
7	H	-5	180	150
8	R	27	100	150

Secado secundario

Etapas				
1	H	27	540	100

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Una composición líquida que comprende
una toxina botulínica,
un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción,
un tensoactivo no iónico, y
un regulador fisiológicamente compatible;
en donde la concentración del disacárido sin reducción o trisacáridos sin reducción está en el rango de 10% a 40% (p/v),
en donde la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v), y en donde el pH de la composición líquida está en el rango de 4.5 a 6.5.
2. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el disacárido sin reducción se selecciona del grupo que consiste de dihidrato de trehalosa, sacarosa, y combinaciones de los mismos.
3. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbatos, ésteres de sorbitán, Triton X-100, NP -40, poloxámeros y combinaciones de los mismos.
4. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el regulador se prepara utilizando una sal seleccionada del grupo que consiste de una sal de ácido cítrico, una sal de ácido acético, una sal de ácido

succínico, una sal de ácido tartárico, una sal de ácido maleico, y una sal de histidina.

5. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, comprende adicionalmente una estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente adjuntos a esta.
6. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente es un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR-G- (K)₁₅ -G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR.
7. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica está presente en una cantidad terapéutica.
8. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica se obtiene del serotipo de las bacterias *Clostridium botulinum* seleccionadas del grupo que consiste de los tipos A, B, C, D, E, F, y G.
9. Una composición en polvo preparada al secar la composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1.

10. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el disacárido sin reducción se selecciona del grupo que consiste de dihidrato de trehalosa, sacarosa, y combinaciones de los mismos.
11. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbatos, ésteres de sorbitán, Triton X-100, NP-40, poloxámeros y combinaciones de los mismos.
12. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el regulador se prepara utilizando una sal seleccionada del grupo que consiste de una sal de ácido cítrico, una sal de ácido acético, una sal de ácido succínico, una sal de ácido tartárico, una sal de ácido maleico, y una sal de histidina.
13. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 9, comprende adicionalmente una estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente adjuntos a esta.
14. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente es un péptido con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-YGRKKRRQRRR.

15. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición liofilizada comprende una cantidad terapéutica de una toxina botulínica.
16. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la toxina botulínica se obtiene del serotipo de las bacterias *Clostridium botulinum* seleccionadas del grupo que consiste de los tipos A, B, C, D, E, F, y G.
17. Una composición líquida que comprende
 - una toxina botulínica,
 - un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción,
 - un tensoactivo no iónico,
 - un agente de masa y
 - un regulador fisiológicamente compatible;
 - en donde la concentración del disacárido sin reducción está en el rango de 0.50 a 3.0% (p/v),
 - en donde la concentración del agente de masa está en el rango de 1.5% a 7.5%,
 - en donde la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v);
 - en donde la cantidad de disacárido sin reducción o trisacárido sin reducción relativa a la cantidad de agente de masa se selecciona de tal manera que el agente de masa no se cristaliza cuando se seca la composición líquida;
 - y en donde el pH de la composición está en el rango de 4.5 a 6.5.

18. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el disacárido sin reducción se selecciona del grupo que consiste de dihidrato de trehalosa, sacarosa, y combinaciones de los mismos.
19. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbatos, ésteres de sorbitán, Triton X-100, NP-40, poloxámeros y combinaciones de los mismos.
20. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el regulador se prepara utilizando una sal seleccionada del grupo que consiste de una sal de ácido cítrico, una sal de ácido acético, una sal de ácido succínico, una sal de ácido tartárico, una sal de ácido maleico, y una sal de histidina.
21. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17, comprende adicionalmente una estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente adjuntos a esta.
22. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente es un péptido con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR-G-(K)₁₅ - G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR.

23. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la toxina botulínica está presente en una cantidad terapéutica.
24. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la toxina botulínica se obtiene del serotipo de las bacterias *Clostridium botulinum* seleccionadas del grupo que consiste de los tipos A, B, C, D, E, F, y G.
25. Una composición en polvo preparada al secar la composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17.
26. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el disacárido sin reducción se selecciona del grupo que consiste de dihidrato de trehalosa, sacarosa, y combinaciones de los mismos.
27. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbatos, ésteres de sorbitán, Triton X-100, NP-40, poloxámeros y combinaciones de los mismos.
28. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el regulador se prepara utilizando una sal seleccionada del grupo que consiste de una sal de ácido cítrico, una sal de ácido acético, una sal de ácido succínico, una sal de ácido tartárico, una sal de ácido maleico, y una sal de histidina.

29. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 25, comprende adicionalmente una estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente adjuntos a esta.
30. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente es un péptido con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR- G-(K)₁₅ -G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR.
31. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 30, en donde la composición liofilizada comprende una cantidad terapéutica de una toxina botulínica.
32. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la toxina botulínica se obtiene del serotipo de las bacterias *Clostridium botulinum* seleccionadas del grupo que consiste de los tipos A, B, C, D, E, F, y G.
33. Un equipo que comprende
una composición en polvo de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 25, y una jeringa.
34. Un método para estabilizar una formulación de toxina botulínica, el método comprende

combinar una toxina botulínica, un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción, un tensoactivo no iónico, y un regulador fisiológicamente compatible para formar una composición líquida,

en donde la concentración del disacárido sin reducción está en el rango de 10% a 40% (p/v),

en donde la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v), y

en donde el pH de la composición líquida está en el rango de 4.5 a 6.5.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, comprende adicionalmente la etapa de secar la composición líquida.
36. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde la etapa de secar comprende liofilizar o secar al vacío la composición líquida.
37. Una composición líquida que comprende
 - una toxina botulínica,
 - un azúcar sin reducción,
 - un tensoactivo no iónico, un péptido cargado positivamente con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR;
 - un regulador fisiológicamente compatible, y
 - opcionalmente un agente de masa;
 - en donde el pH de la composición está en el rango de 4.5 a 6.5.

38. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 37, en donde la secuencia de aminoácido del péptido cargado positivamente es RKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RKKRRQRRR.
39. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 38, en donde el azúcar sin reducción se selecciona del grupo que consiste de trehalosa, sacarosa, o rafinosa.
40. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, Span 20, Span 60, Span 65, y Span 80.
41. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 40, en donde el regulador fisiológicamente compatible se selecciona del grupo que consiste de ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico, histidina, citrato/acetato, citrato/histidina, citrato/tartrato, maleato/histidina, succinato/histidina y regulador de fosfato.
42. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 41, en donde la toxina botulínica es una proteína de toxina botulínica de 150 kD del serotipo *Clostridium botulinum* A, B, C, D, E, F, o G.
43. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 37, en donde la secuencia de aminoácido del péptido cargado positivamente es RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RGRDDRRQRRR.

44. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 43, en donde el azúcar sin reducción se selecciona del grupo que consiste de trehalosa, sacarosa, o rafinosa.
45. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, Span 20, Span 60, Span 65, y Span 80.
46. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 45, en donde el regulador fisiológicamente compatible se selecciona del grupo que consiste de ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico, histidina, citrato/acetato, citrato/histidina, citrato/tartrato, maleato/histidina, succinato/histidina y regulador de fosfato.
47. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 46, en donde la toxina botulínica es una proteína de toxina botulínica de 150 kD del serotipo *Clostridium botulinum* A, B, C, D, E, F, o G.
48. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 37, en donde la secuencia de aminoácido del péptido cargado positivamente es YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G- YGRKKRRQRRR.
49. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 48, en donde el azúcar sin reducción se selecciona del grupo que consiste de trehalosa, sacarosa, o rafinosa.

50. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 49, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, Span 20, Span 60, Span 65, y Span 80.
51. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 50, en donde el regulador fisiológicamente compatible se selecciona del grupo que consiste de ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico, histidina, citrato/acetato, citrato/histidina, citrato/tartrato, maleato/histidina, succinato/histidina y regulador de fosfato.
52. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 51, en donde la toxina botulínica es una proteína de toxina botulínica de 150 kD del serotipo *Clostridium botulinum* A, B, C, D, E, F, o G.

FORMULACIONES DE TOXINA BOTULÍNICA LIBRE DE ALBÚMINA**Resumen**

Esta invención se relaciona con formulaciones de toxina botulínica que se estabilizan sin el uso de ningún excipiente proteico. La invención también se relaciona con métodos para preparar y utilizar dichas formulaciones de toxina botulínica.

1/3

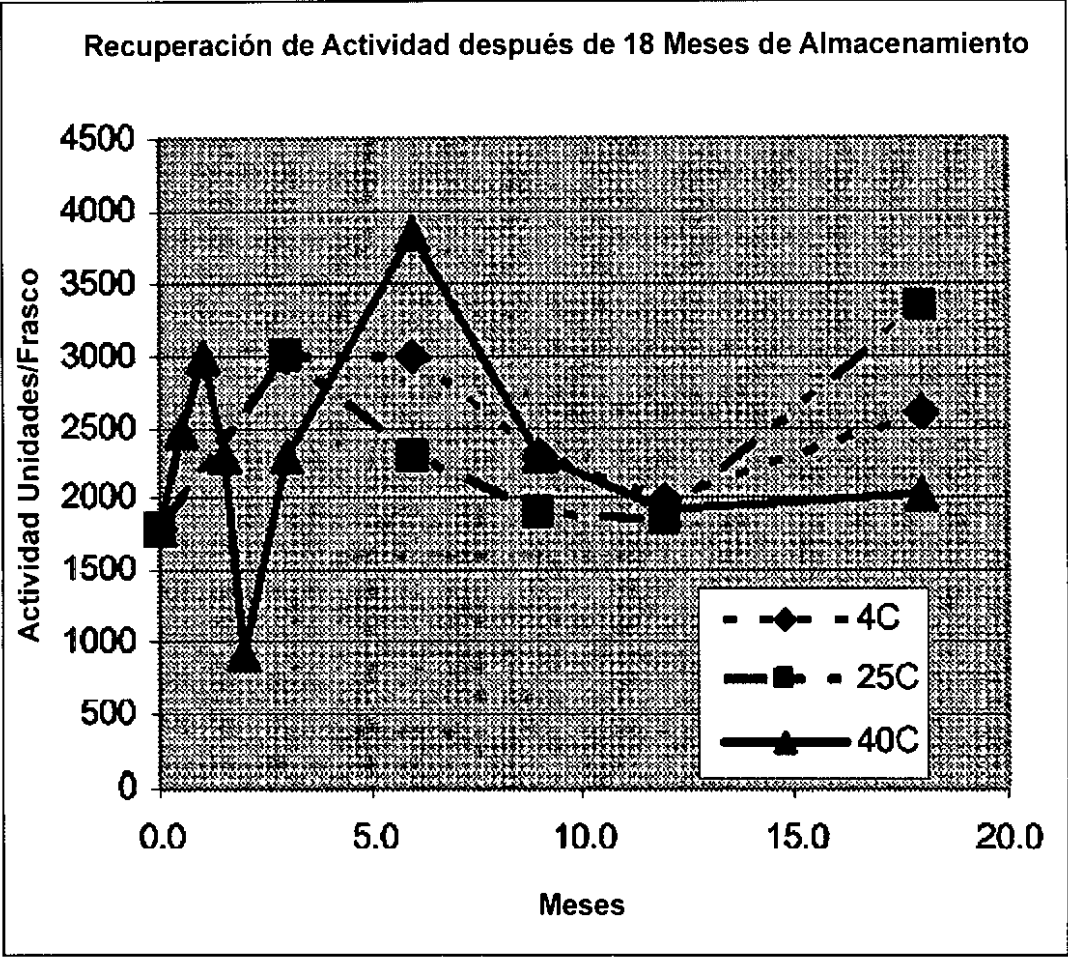


FIGURA 1

2/3

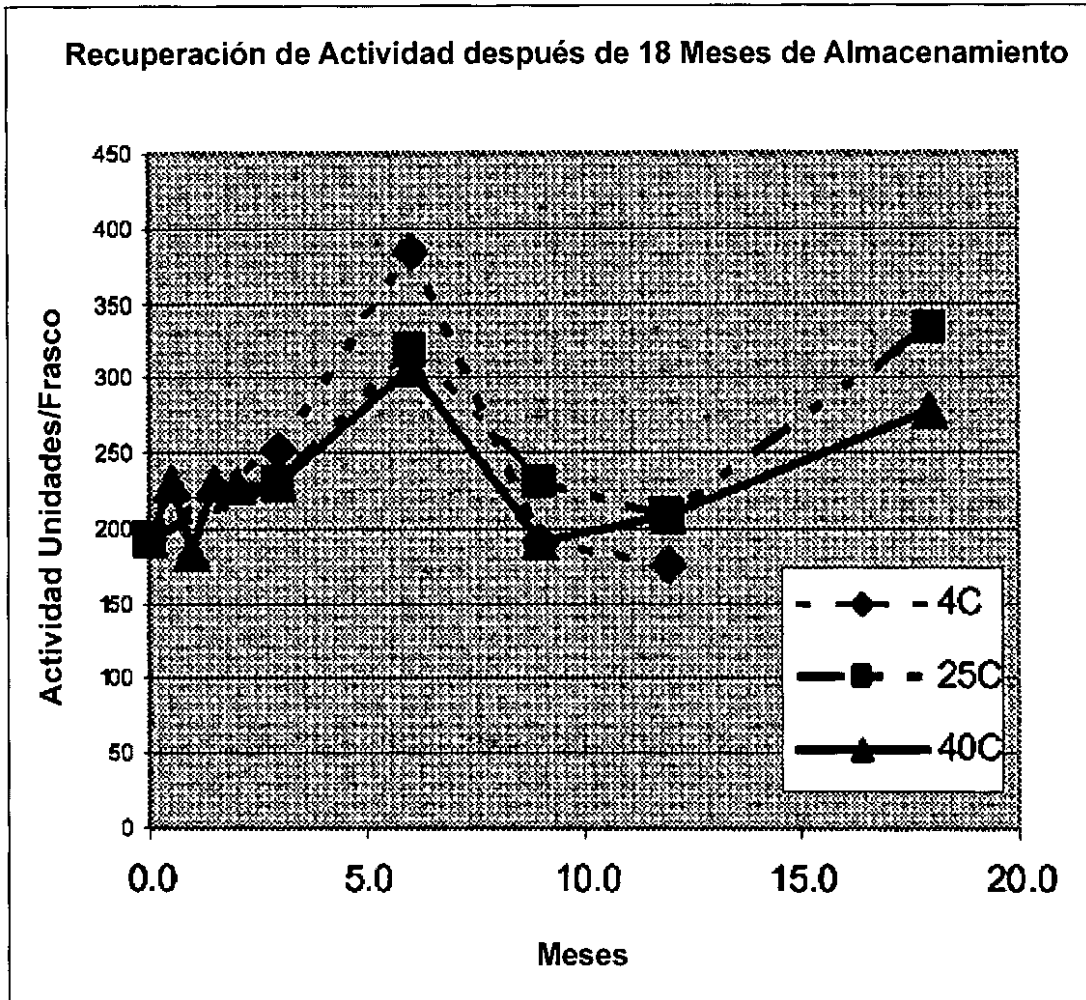


FIGURA 2

3/3

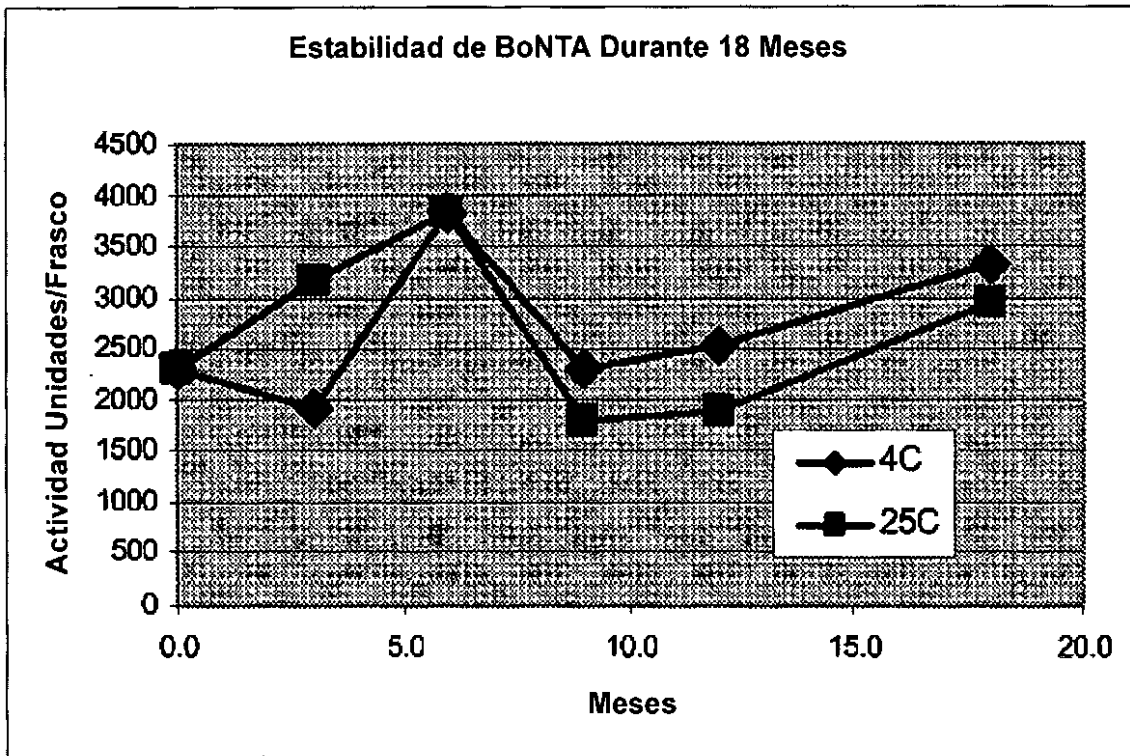


FIGURA 3

FORMULACIONES DE TOXINA BOTULÍNICA LIBRE DE ALBÚMINA

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud de Patente Provisional No. 61/220,433, presentada el 25 de junio, 2009, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] Esta invención se relaciona con formulaciones farmacéuticas que contienen toxina botulínica. En particular, esta invención se relaciona con formulaciones de toxina botulínica que se estabilizan mediante excipientes no proteicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] Las toxinas botulínicas (también conocidas como toxinas botulina o neurotoxinas botulínicas) son neurotoxinas producidas por bacterias *Clostridium botulinum*. Las toxinas botulínicas producen parálisis muscular al evitar la transmisión sináptica o liberación de acetilcolina a través de la unión neuromuscular. La acción de las toxinas botulínicas bloquea esencialmente las señales que normalmente provocarían espasmos musculares o contracciones, lo que resulta en parálisis.

[0004] Existen ocho toxinas botulínicas relacionadas serológicamente de ocurrencia natural, siete de las cuales se sabe que provocan parálisis (a saber, serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C, D, E, F y G). Cada uno de estos serotipos se distingue por neutralización con anticuerpos de tipo específico. Sin embargo, el peso molecular de la molécula de proteína de toxina botulínica es aproximadamente 150 kD para todas las siete de estas toxinas botulínicas activas. Aunque se libere por las bacterias *Clostridium botulinum*, la toxina botulínica está

presente en un complejo que comprende la molécula de proteína de toxina botulínica de 150 kD junto con proteínas no tóxicas asociadas. El tamaño total del complejo puede variar. Por ejemplo, el complejo de toxina botulínica tipo A se puede producir mediante las bacterias *Clostridium botulinum* como complejos 900 kD, 500 kD y 300 kD. Los complejos de toxina botulínica tipos B y C solo se producen como complejos 700 kD o 500 kD. Los complejos de toxina botulínica tipo D se producen como complejos 300 kD y 500 kD. Los complejos toxina botulínica tipos E y F solo se producen como complejos 300 kD. Se considera que los complejos contienen proteína de hemaglutinina no tóxica y proteína sin hemaglutinina no tóxica y sin toxina. Se consideran que estas dos proteínas sin toxina (que junto con la molécula de toxina botulínica comprenden el complejo de neurotoxina importante) proporcionan estabilidad contra la desnaturalización de la molécula de toxina botulínica y protección contra los ácidos digestivos cuando se ingiere toxina.

[0005] Aunque la toxina botulínica es la toxina de ocurrencia natural más letal conocida por el hombre, se ha encontrado un uso amplio como un agente terapéutico y cosmético. Por ejemplo, en 1986, la posibilidad de utilizar toxina botulínica tipo A para el tratamiento de arrugas asociadas con el movimiento en el área de la glabella se demostró primero por Schantz and Scott, in Lewis G E (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, N. Y.: Academic Press, 143-150 (1981). El uso de botulina tipo A para el tratamiento de arrugas se publicó en 1992 (Schantz and Scott, in Lewis G. E. (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, N.Y.: Academic Press, 143-150 (1981)), y en 1994, se trataron otras arrugas asociadas al movimiento en la cara con toxina botulínica tipo A (Scott, Ophthalmol, 87:1044-1049 (1980)). La demanda de tratamientos cosméticos con toxina botulínica ha aumentado de

manera constante durante los años, con ventas anuales reales de toxina botulínica en los Estados Unidos que exceden mil millones de dólares por año.

[0006] Un aspecto desafiante de la fabricación de formulaciones comerciales de toxina botulínica es estabilizar la toxina botulínica. Al igual que muchas proteínas, la toxina botulínica se puede degradar o desnaturalizar mediante factores ambientales, tales como calor, condiciones alcalinas, fuerzas de corte mecánicas, o contacto con superficies o sustancias reactivas. Adicionalmente, la dificultad en estabilizar la toxina botulínica en las formulaciones comerciales se agrava por la extrema toxicidad de la toxina, que solo permite cantidades mínimas de toxina que se van a utilizar para propósitos terapéuticos. Si la formulación de toxina botulínica no se estabiliza apropiadamente, las cantidades mínimas de toxina botulínica pueden experimentar reacciones no deseadas y/o adherirse a las superficies internas de sus contenedores de almacenamiento, conduciendo a la pérdida inaceptable de actividad o de la toxina botulínica.

[0007] Las formulaciones comerciales de toxina botulínica se distribuyen a menudo como polvo liofilizado (es decir secado por congelamiento) o secado al vacío, con el fin de evitar la degradación y hacer más fácil de manejar la formulación de toxina botulínica y menos costosa para transportar. Antes de uso, las formulaciones en polvo de toxina botulínica se reconstituyen con un portador líquido, tal como agua o una solución salina. Por ejemplo, una formulación de toxina botulínica comercialmente disponible se vende bajo la marca BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, Calif.). La formulación de BOTOX® se distribuye como un polvo secado al vacío almacenado en frascos individuales, cada uno de los cuales contiene aproximadamente 100 unidades (U) de complejo de toxina botulínica de Clostridium tipo A, 0.5 miligramos de albúmina de suero humana y 0.9 miligramos

de cloruro de sodio. Se ha reportado que la formulación de toxina botulínica comercial se debe almacenar a una temperatura de -10°C o menos para mantener la potencia que aparece en la etiqueta durante un año de vida útil.

[0008] En las formulaciones comerciales de toxina botulínica, la albúmina de suero humana a menudo se agrega como un portador de masa y estabilizante. De forma general, la albúmina puede estabilizar una proteína terapéutica (por ejemplo, toxina botulínica) mediante uno o más de los siguientes mecanismos: (1) reducir la adhesión de la proteína terapéutica a las superficies internas de los contenedores de almacenamiento o suministro, que incluyen cristalería, frascos de almacenamiento, y la jeringa utilizada para inyectar la composición farmacéutica; y (2) reducir la desnaturalización de la proteína terapéutica, especialmente después de reconstitución para preparar una solución de la proteína terapéutica. La albúmina de suero humana tiene la ventaja agregada de ser mínimamente inmunogénica, lo cual disminuye la probabilidad de que un paciente humano desarrolle anticuerpos contra la formulación de toxina botulínica.

[0009] Aunque se ha adoptado la albúmina de suero humana como un estabilizante en las formulaciones comerciales de toxina botulínica, aún existen problemas asociados con este método. Un serio problema es que la albúmina se deriva de sangre y es por lo tanto susceptible para llevar los patógenos o agentes infecciosos de transmisión sanguínea. Por ejemplo, la albúmina de suero humana puede llevar el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). La albúmina también puede llevar priones, que son agentes de infección proteicos que son responsables por provocar un trastorno neurodegenerativo conocido como enfermedad de Creutzfeldt- Jacob. Los priones provocan plegamiento erróneo de las proteínas en el cerebro, lo que resulta en la demencia, pérdida de la memoria,

deterioro del lenguaje, pérdida de coordinación motora, y muerte, a menudo dentro del lapso de meses después del inicio de los síntomas.

[0010] Los intentos para reemplazar la albúmina de suero humana con estabilizantes no proteicos de forma general se ha encontrado con dificultades. Un polímero no proteico puede ser reactivo hacia la toxina botulínica o puede contener impurezas reactivas que degradan y/o desnaturalizan la toxina botulínica. Por ejemplo, algunos estudios han utilizado un poloxámero como un compuesto estabilizante no proteico para la toxina botulínica. Sin embargo, estos estudios reportan que las formulaciones de toxina botulínica estabilizadas con poloxámero reconstituido demuestran baja actividad de la toxina botulínica, lo que sugiere que el excipiente de poloxámero falla en estabilizar de manera apropiada la toxina botulínica y/o provoca reacciones de degradación indeseadas.

[0011] De acuerdo con lo anterior, sería muy conveniente tener una formulación de toxina botulínica que se estabiliza, pero sin un excipiente proteico, especialmente sin ningún excipiente basado en proteína animal. Adicionalmente, sería muy conveniente tener un excipiente estabilizante no proteico que no reacciona en sí mismo con la toxina botulínica.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0012] En un aspecto, esta invención se relaciona con formulaciones botulínicas que se estabilizan mediante excipientes no proteicos. En particular, en las modalidades preferidas, esta invención se relaciona con formulaciones de toxina botulínica que se estabilizan sin albúmina u otros excipientes derivados de proteína animal.

[0013] Un aspecto de la invención es proporcionar una composición líquida que comprende una toxina botulínica, un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción, un tensoactivo no iónico, y un regulador fisiológicamente compatible capaz de mantener el pH entre 4.5. y 6.5. La concentración del azúcar sin reducción en la composición líquida está en el rango de 10% a 40% (p/v) y la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v).

[0014] Otro aspecto de la invención es proporcionar una composición en polvo al secar la composición líquida descrita anteriormente.

[0015] Esta invención también proporciona un método para estabilizar una formulación de toxina botulínica. El método comprende combinar una toxina botulínica, un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción, un tensoactivo no iónico, y componentes de regulador fisiológicamente compatible capaces de mantener el pH entre 4.5 y 6.5 para formar una composición líquida. La concentración del azúcar sin reducción en la composición líquida está en el rango de 10% a 40% (p/v) y la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v). Opcionalmente, el método comprende adicionalmente secar la composición líquida para producir una composición en polvo estabilizada.

[0016] Otro aspecto de la invención es proporcionar una composición líquida que comprende una toxina botulínica, un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción, un tensoactivo no iónico, un agente de masa y un regulador fisiológicamente compatible. En estas modalidades, la concentración de las composiciones de disacárido sin reducción está en el rango de 0.50 a 3.0% (p/v), la concentración del agente de masa está en el rango de 1.5% a 7.5%, la

concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v); y el pH de la composición está en el rango de 4.5 a 6.5. También, la cantidad de disacárido sin reducción o trisacárido sin reducción relativa a la cantidad de agente de masa se selecciona de tal manera que el agente de masa no se cristaliza cuando se seca la composición líquida. La invención también contempla de forma expresa formulaciones en polvo preparadas al secar tales composiciones líquidas.

[0017] La invención también proporciona un método para estabilizar una formulación de toxina botulínica que comprende combinar una toxina botulínica, un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción, un tensoactivo no iónico, un agente de masa y un regulador fisiológicamente compatible para formar una composición líquida. La concentración de las composiciones de disacárido sin reducción está en el rango de 0.50 a 3.0% (p/v), la concentración del agente de masa está en el rango de 1.5% a 7.5%, la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v); y el pH de la composición está en el rango de 4.5 a 6.5. Opcionalmente, el método comprende adicionalmente secar la composición líquida para producir una composición en polvo estabilizada. También, la cantidad de disacárido sin reducción o trisacárido sin reducción relativa a la cantidad de agente de masa se selecciona de tal manera que el agente de masa no se cristaliza cuando se seca la composición líquida.

[0018] Esta invención también proporciona una composición líquida que comprende una toxina botulínica, un azúcar sin reducción, un tensoactivo no iónico, un regulador fisiológicamente compatible, un péptido cargado positivamente y un agente de masa opcional. El péptido cargado positivamente tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-

RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-YGRKKRRQRRR. El pH de la composición líquida está en el rango de 4.5 a 6.5. La invención también contempla de forma expresa formulaciones en polvo preparadas al secar tales composiciones líquidas.

[0019] Aún otro aspecto de la invención es proporcionar un método para estabilizar una formulación de toxina botulínica que comprende combinar una toxina botulínica, un azúcar sin reducción, un tensoactivo no iónico, un regulador fisiológicamente compatible, un péptido cargado positivamente y un agente de masa opcional. El péptido cargado positivamente tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-YGRKKRRQRRR. El pH de la composición líquida está en el rango de 4.5 a 6.5. Opcionalmente, el método comprende adicionalmente secar la composición líquida para producir una composición en polvo estabilizada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0020] La **FIGURA 1**: Actividad de toxina botulínica recuperada como una función de tiempo después de almacenamiento de una toxina botulínica liofilizada a 40° C.

[0021] La **FIGURA 2**: Actividad de toxina botulínica recuperada como una función de tiempo después de almacenamiento de una toxina botulínica liofilizada a diferentes temperaturas.

[0022] La **FIGURA 3**: Actividad de toxina botulínica recuperada como una función de tiempo después de almacenamiento de una toxina botulínica liofilizada a diferentes temperaturas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0023] Esta invención se relaciona con formulaciones de toxina botulínica que se estabilizan sin la adición de excipientes proteicos derivados (es decir, purificados) a partir de fuentes animales, tales como albúmina. Como tal, las formulaciones botulínicas de la invención no sufren de los problemas potenciales asociados a los patógenos de transmisión sanguínea u otros tipos de agentes infecciosos. Esta invención también proporciona métodos para preparar formulaciones de toxina botulínica sin la adición de excipientes proteicos derivados de animal. En las modalidades preferidas, las formulaciones no contienen ningún excipiente proteico en lo absoluto. Sin embargo, en ciertas modalidades, los excipiente proteicos no derivados de fuentes animales (por ejemplo, albúmina recombinante o gelatina recombinante) pueden estar presentes en las formulaciones de la invención.

[0024] Como se utiliza aquí en relación con las formulaciones de toxina botulínica de la invención, el término “estabiliza” y variaciones del mismo (por ejemplo, “estabilización”, “estabilizar” “estabilizado” etc.) se refiere a la retención de actividad biológica de la toxina botulínica en la formulación durante un periodo de tiempo específico según se mide por un ensayo LD₅₀ de 20 ratones (Ver LB Pearce, RE Borodic, Tox. Appl. Pharmacol., v128, p69, 1994 y ICCVAM/NICEATM/ECVAM, Scientific Workshop on Alternate Methods to Refine, Reduce and Replace the Mouse LD50 Assay for Toxina botulínica Testing, 14 November 2006). En las modalidades preferidas, hay una retención del 100% de la actividad biológica de la toxina botulínica durante el periodo de tiempo

específico. Sin embargo, en otras modalidades, hay por lo menos una retención del 10%, 20%, 30 %, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la actividad biológica de la toxina botulínica durante el periodo de tiempo específico. En ciertas modalidades, la duración del periodo de tiempo específico se puede seleccionar para que sea consistente con la duración de los procesos para fabricar el producto de toxina botulínica. Por ejemplo, la duración del periodo de tiempo específico se puede seleccionar para que sea suficiente para estabilizar la toxina botulínica ya que esta se somete a una o más etapas de procesamiento. En otras modalidades, el tiempo específico será del orden de semanas, meses o aún años, tal como el caso cuando los componentes de formulación sin toxina se seleccionan para permitir estabilización a largo plazo de la formulación de toxina botulínica para almacenamiento. En ciertas modalidades, el tiempo específico es por lo menos dos semanas, por lo menos un mes, por lo menos tres meses, por lo menos seis meses, por lo menos nueve meses, por lo menos un año, por lo menos 18 meses o por lo menos dos años. En otras modalidades, el tiempo específico es coincidente con el tiempo de la toxina botulínica para retener una cantidad deseada de bioactividad utilizando las formulaciones de la invención, cuyo tiempo incluye, por ejemplo, la duración de las actividades establecidas anteriormente. Los componentes utilizados para estabilizar la formulación se pueden seleccionar para permitir la estabilización a bajas temperaturas (por ejemplo, -5 a - 10° C) o a temperatura ambiente, como se describe aquí.

[0025] En algunas modalidades, las formulaciones de toxina botulínica de la invención se proporcionan en forma sólida. Solo por vía de ejemplo, las formulaciones se pueden liofilizar o secar al vacío para producir una formulación sólida. Cuando una formulación de toxina botulínica de la invención se proporciona en forma sólida, y el periodo de tiempo específico durante el cual se mide la

estabilidad de la formulación botulínica es una semana o menos, la actividad que se observa luego de reconstitución se dice que es la actividad tras la recuperación inicial. En ciertas modalidades preferidas de la invención, hay por lo menos una retención del 70%, 80%, o 90% en la actividad tras la recuperación inicial. En otras modalidades, hay por lo menos una retención del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de la actividad tras la recuperación inicial. En una modalidad particularmente preferida, la actividad tras la recuperación inicial es mayor de 99% y puede aún ser el 100%.

[0026] En otras modalidades, el tiempo específico durante el cual se mide la estabilidad es mayor de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses a temperatura de almacenamiento dada. Cuando una formulación de toxina botulínica de la invención se proporciona en forma sólida, y el periodo de tiempo específico durante el cual la estabilidad de la formulación botulínica se mide es doce meses o más, la actividad que se observa luego de reconstitución se dice que es la actividad luego de almacenamiento a largo plazo. En ciertas modalidades preferidas, hay por lo menos una retención del 70%, 80%, o 90% de la actividad de toxina botulínica luego de almacenamiento a largo plazo. En ciertas modalidades hay una retención del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de la actividad de toxina botulínica luego de almacenamiento a largo plazo. En ciertas modalidades, hay por lo menos una retención del 90% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 91% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 92% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una

retención del 93% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 94% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 95% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 96% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 97% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; por lo menos una retención del 98% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C; o por lo menos una retención del 99% de la actividad de toxina botulínica después de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses de almacenamiento a 25° C.

[0027] En algunas modalidades de la invención, las formulaciones de toxina botulínica se almacenan en forma líquida, a diferencia de la forma sólida. En ciertas modalidades preferidas, las formulaciones líquidas de toxina botulínica de acuerdo con la invención retienen por lo menos 60%, 70%, 80%, o 90% de la actividad de toxina botulínica durante hasta 8 horas a temperatura ambiente. En una modalidad particularmente preferida, las formulaciones líquidas de toxina botulínica de acuerdo con la invención retienen 100% de la actividad de toxina botulínica durante hasta 8 horas a temperatura ambiente.

[0028] Los excipientes en las formulaciones botulínicas de la invención reducen o eliminan de forma ventajosa los mecanismos mediante los cuales la toxina

botulínica se pierde durante la fabricación y almacenamiento. Sin desear estar limitado por la teoría, se considera que los excipientes no proteicos de la invención reducen o eliminan la adhesión no deseada de la toxina botulínica en los recipientes utilizados para fabricación, almacenamiento o suministro de la formulación. Ejemplos no limitantes de tales recipientes incluyen aquellos hechos con vidrio, poliestireno, polipropileno, y otros polímeros. Adicionalmente, y de nuevo sin desear estar limitado por la teoría, se considera que los excipientes no proteicos de la invención reducen o evitan reacciones no deseadas entre la toxina botulínica y objetos o sustancias encontradas por la toxina botulínica durante la fabricación, almacenamiento, o suministro. En las modalidades preferidas, los excipientes no proteicos son inertes a los otros componentes de la formulación.

[0029] En algunas modalidades, las formulaciones de toxina botulínica se preparan en una forma de polvo para facilitar el manejo, transporte, o almacenamiento. La forma en polvo se puede preparar mediante cualquier método conocido en la técnica. Ejemplos no limitantes de tales incluyen liofilización, secado al vacío, secado por tambor y secado por aspersión, siendo la liofilización y el secado al vacío particularmente preferidos.

[0030] El término "toxina botulínica" como se utiliza aquí significa que se refiere a cualquiera de los tipos de toxina botulínica conocidos, ya sea producidos por la bacteria o mediante técnicas recombinantes, así como también cualesquier tales tipos que se pueden descubrir posteriormente que incluyen las variantes diseñadas por ingeniería o proteínas de fusión. Como se mencionó anteriormente, actualmente, se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas inmunológicamente distintas, a saber serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C, D, E, F y G, cada una de las cuales se distingue por neutralización con

anticuerpos tipo específicos. Los serotipos de toxina botulínica están disponibles de Sigma-Aldrich y de Metabionics, Inc. (Madison, Wis.), así como también de otras fuentes. Los diferentes serotipos de toxina botulínica varían en las especies animales que ellas afectan y en la severidad y duración de la parálisis que provocan.

[0031] La toxina botulínica utilizada en las composiciones de esta invención puede ser alternativamente un derivado de toxina botulínica, es decir, un compuesto que tiene actividad de toxina botulínica pero contiene una o más alteraciones químicas o funcionales en cualquier parte o en cualquier cadena relativa a las toxinas botulínicas naturales recombinantes o de ocurrencia natural. Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser una neurotoxina modificada (por ejemplo, una neurotoxina que tiene por lo menos uno de sus aminoácidos eliminado, modificado o reemplazado, cuando se compara con una neurotoxina natural o producida recombinantemente o un derivado o fragmento del mismo). Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser una que se ha modificado en una forma que, mejora sus propiedades o reduce los efectos colaterales indeseados, pero que todavía retiene la actividad de toxina botulínica deseada. La toxina botulínica puede ser cualesquier complejos de toxina botulínica producidos por la bacteria, como se describió anteriormente. Alternativamente, la toxina botulínica puede ser una toxina preparada utilizando técnicas químicas recombinantes o sintéticas (por ejemplo un péptido recombinante, una proteína de fusión, o una neurotoxina híbrida, cuando se prepara a partir de subunidades o dominios de diferentes serotipos de toxina botulínica (ver Pat. EE.UU. No. 6,444,209, por ejemplo)). La toxina botulínica también puede ser una porción de la molécula completa que se ha mostrado por poseer la actividad de toxina botulínica necesaria, y en tal caso se puede utilizar per se o como parte de una molécula de combinación o

conjugada, por ejemplo una proteína de fusión. Adicionalmente, la toxina botulínica puede estar en la forma de un precursor de toxina botulínica, que puede ser en sí misma no tóxica, por ejemplo una proteasa se zinc no tóxica que se convierte en tóxica luego de la división proteolítica.

[0032] El término "complejo de toxina botulínica" o "complejo de toxina" como se utiliza aquí se refiere a la molécula de proteína de toxina botulínica de aproximadamente 150 kD (que pertenece a uno cualquiera de los serotipos de toxina botulínica A-G), junto con las proteínas sin toxina endógenas asociadas (es decir, proteína hemaglutinina y proteína no hemaglutinina sin toxina producida por las bacterias *Clostridium botulinum*). Observe, sin embargo, que el complejo de toxina botulínica no necesita derivarse de bacterias *Clostridium botulinum* como un complejo de toxina unitario. Por ejemplo, la toxina botulínica o toxina botulínica modificada primero se puede preparar de forma recombinante y luego combinar posteriormente con las proteínas no tóxicas. También se puede comprar la toxina botulínica recombinante (por ejemplo, de List Biological Laboratories, Campbell, CA) y luego combinar con proteínas no tóxicas.

[0033] Esta invención también contempla los "complejos de toxina botulínica reducidos," en el que los complejos de toxina botulínica han reducido las cantidades de proteína sin toxina comparadas con las cantidades encontradas naturalmente en los complejos de toxina botulínica producidos por bacterias *Clostridium botulinum*. En una modalidad, los complejos de toxina botulínica reducidos se preparan utilizando cualquier método de separación de proteína convencional para extraer una fracción de la proteína hemaglutinina o proteína no hemaglutinina sin toxina de los complejos de toxina botulínica derivados de bacterias *Clostridium botulinum*. Por ejemplo, los complejos de toxina botulínica

reducidos se pueden producir al disociar los complejos de toxina botulínica a través de la exposición a los glóbulos rojos a un pH de 7.3 (por ejemplo, ver EP 1514556 A1, incorporada aquí como referencia). Se pueden utilizar HPLC, diálisis, columnas, centrifugación, y otros métodos para extraer proteínas de proteínas. Alternativamente, cuando se producen los complejos de toxina botulínica reducidos al combinar la toxina botulínica producida sintéticamente con proteínas no tóxicas, uno puede agregar simplemente menos hemaglutinina o proteína no hemaglutinina sin toxina a la mezcla que la que estaría presente para los complejos de toxina botulínica de ocurrencia natural. Cualquiera de las proteínas no tóxicas (por ejemplo, proteína hemaglutinina o proteína no hemaglutinina sin toxina o ambas) en los complejos de toxina botulínica reducidos de acuerdo con la invención se puede reducir de forma independiente mediante cualquier cantidad. En ciertas modalidades de ejemplo, se reducen una o más proteínas no tóxicas mediante por lo menos aproximadamente 0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% en comparación con las cantidades normalmente encontradas en los complejos de toxina botulínica. En una modalidad, sustancialmente toda la proteína sin toxina (por ejemplo, >95% de la proteína hemaglutinina y proteína no hemaglutinina sin toxina) que normalmente se encontraría en los complejos de toxina botulínica derivados de bacterias *Clostridium botulinum* se elimina del complejo de toxina botulínica. En otra modalidad, solo se utiliza la molécula de toxina botulínica pura, sin ninguna proteína hemaglutinina y proteína no hemaglutinina sin toxina. Adicionalmente, aunque se puede reducir la cantidad de proteínas no tóxicas endógenas por la misma cantidad en algunos casos, esta invención también contempla reducir cada una de las proteínas no tóxicas endógenas mediante diferentes cantidades, así como también reducir por lo menos una de las proteínas no tóxicas endógenas, pero no las otras.

[0034] Esta invención también contempla el uso general de combinaciones y mezclas de toxinas botulínicas, aunque debido a su naturaleza y propiedades diferentes, las mezclas de serotipos de toxina botulínica no se administran de forma general en este momento en las industrias del cuidado de la salud y cosmética.

[0035] Las formulaciones de toxina botulínica de la invención comprenden un tensoactivo no iónico. De forma general, esta invención contempla el uso de cualquier tensoactivo no iónico que tenga la capacidad de estabilizar la toxina botulínica y que sea adecuado para uso farmacéutico. En ciertas modalidades, el tensoactivo no iónico es un polisorbato, ejemplos no limitantes del cual incluyen polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, y polisorbato 80. En otras modalidades, el tensoactivo no iónico es un éster de sorbitán, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen Span 20, Span 60, Span 65, y Span 80. La invención también contempla el uso de poloxámeros, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen poloxámero 181, poloxámero 188, y poloxámero 407. La invención también contempla utilizar Triton X-100 o NP -40 como los tensoactivos no iónicos. Adicionalmente, la invención contempla modalidades en las que se utilizan las combinaciones de diferentes tensoactivos no iónicos en conjunto. En ciertas modalidades preferidas, el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbatos, poloxámeros, y sorbitanes, siendo particularmente preferidos los polisorbatos y sorbitanes. En las modalidades preferidas, la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5%, o en el rango de 0.01% a 0.2%, o en el rango de 0.02% a 0.1% o en el rango de 0.05 a 0.08%. Esta invención también contempla formulaciones donde la concentración

del tensoactivo no iónico es 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%, 0.08%, 0.09%, 0.10%, 0.11%, 0.12%, 0.13%, 0.14%, o 0.15%.

[0036] Las formulaciones de toxina botulínica de la invención comprenden un azúcar sin reducción. En las modalidades preferidas, el azúcar sin reducción tiene temperatura de transición vítrea por encima de 55° C, 57° C o 60° C. Sin desear estar limitado por la teoría, se considera que tales temperaturas de transición vítreas son suficientemente altas para suprimir movimientos moleculares indeseables que provocan la desnaturalización de la toxina botulínica. En ciertas modalidades particularmente preferidas, el azúcar sin reducción es un disacárido, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen trehalosa y sacarosa. En otras modalidades, el azúcar sin reducción es un trisacárido, un ejemplo no limitante del cual es rafinosa. De forma general, la concentración del azúcar sin reducción en las formulaciones de toxina botulínica de la invención están en el rango de 10% a 40% (p/v), preferiblemente 10% a 25% (p/v), más preferiblemente 15% a 20% (p/v). En algunas modalidades preferidas, la concentración del azúcar sin reducción es 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20% (p/v). Cuando el azúcar sin reducción es trehalosa, preferiblemente la forma hidratada de la trehalosa (es decir, dihidrato de trehalosa) se utiliza para preparar la formulación, aunque también se contempla el uso de la forma anhidra de la trehalosa.

[0037] Adicionalmente, un aspecto de esta invención es el reconocimiento de que se puede utilizar la selección del azúcar sin reducción para adaptar la estabilidad de la formulación de toxina botulínica como una función de temperatura. Por ejemplo, cuando la formulación de toxina botulínica se somete a condiciones sin refrigeración es ventajoso utilizar trehalosa como el azúcar sin reducción, ya que

la trehalosa confiere estabilidad a la toxina botulínica a temperaturas ambiente. Así, las formulaciones que contienen trehalosa de la invención se pueden procesar de forma ventajosa a temperaturas ambiente durante varios procesos de fabricación sin pérdida de la actividad de toxina botulínica apreciable. En situaciones donde se refrigerará la formulación de toxina botulínica (por ejemplo, durante almacenamiento a largo plazo los últimos meses o aún años), se puede seleccionar la sacarosa como el azúcar sin reducción. También se contemplan las mezclas de azúcares por la invención. Por ejemplo, en ciertas modalidades, se agregan sacarosa y trehalosa a la formulación de toxina botulínica. La relación específica de los componentes de la mezcla de azúcar dependerá del efecto que se vaya a alcanzar y se puede determinar mediante experimentación de rutina. También dentro del alcance de esta invención está el uso de diferentes azúcares sin reducción, tales como disacáridos, solos o en combinación durante diferentes etapas de purificación, fabricación, o almacenamiento. Así, por ejemplo, se puede utilizar trehalosa durante el procesamiento y/o purificación inicial a altas temperaturas (por ejemplo, temperatura ambiente), seguido por eliminación y reemplazo de la trehalosa con sacarosa. La eliminación y sustitución de un azúcar sin reducción, tal como un disacárido, por otro se puede lograr mediante, por ejemplo, diálisis, cromatografía, u otros métodos conocidos en la técnica.

[0038] Otro aspecto de la invención es el reconocimiento de que el azúcar sin reducción (o azúcares) especificado aquí, para ciertas modalidades, puede actuar como el agente de masa principal para formulaciones sólidas de toxina botulínica. En particular, se ha descubierto que los azúcares sin reducción, cuando se agregan en las cantidades especificadas aquí, pueden formar una torta estable y mecánicamente robusta luego de liofilización o secado al vacío de la formulación de toxina botulínica. Sin desear estar limitado por la teoría, se considera que los

azúcares sin reducción en tales formulaciones forman un sólido amorfo en el que los grupos hidroxilo en el azúcar sin reducción orientado de forma aleatoria el azúcar sin reducción para maximizar en enlace de hidrógeno, que estabiliza la toxina botulínica e imparte robustez mecánica a la torta sólida. En algunas modalidades preferidas, los azúcares sin reducción descritos aquí se utilizan como el único agente de masa para las formulaciones de toxina botulínica. En otras modalidades preferidas, un azúcar sin reducción actúa como el agente de masa principal, pero se agregan pequeñas cantidades de los agentes volumétricos secundarios a la formulación de toxina botulínica. Los agentes volumétricos secundarios no se pueden limitar particularmente, y puede ser cualquier agente de masa que no tiene un efecto inaceptablemente adverso sobre la estabilidad de la formulación de toxina botulínica. Cuando se utiliza agentes volumétricos secundarios que tienen una tendencia para cristalizar, es preferible agregarlos en concentraciones suficientemente bajas, de tal modo que no son capaces de cristalizarse. Sin desear estar limitado por la teoría, se considera que la cristalización de tales agentes volumétricos secundarios tendrán un efecto adverso sobre la estabilidad de la torta sólida obtenida después de la liofilización o secado al vacío.

[0039] Un aspecto adicional de la invención es el resultado inesperado de que los azúcares sin reducción, en las concentraciones descritas aquí, se pueden utilizar no solo para estabilizar formulaciones liofilizadas de toxina botulínica, sino también formulaciones de toxina botulínica en la fase de solución.

[0040] En las modalidades preferidas, la formulación de toxina botulínica comprende un regulador. De forma general, cualquier regulador fisiológicamente compatible capaz de mantener el pH en el rango de 4.5 a 6.5, más preferiblemente

en el rango de 5 a 6, y más preferiblemente aproximadamente 5.5, es adecuado para las formulaciones de toxina botulínica de la invención. Ejemplos no limitantes de tales reguladores incluyen aquellos que involucran sales de ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico, y histidina. Ejemplos no limitantes de concentraciones reguladoras adecuadas incluyen concentraciones reguladoras en el rango de 0.400% a 0.600%; 0.450% a 0.575%, o 0.500% a 0.565%. La invención también contempla formulaciones de toxina botulínica que comprenden una mezcla de sales reguladoras, ejemplos no limitantes de las cuales incluyen citrato/acetato, citrato/histidina, citrato/tartrato, maleato/histidina, o succinato/histidina. En ciertas modalidades preferidas, el regulador es regulador de fosfato.

[0041] En ciertas modalidades, las formulaciones de toxina botulínica comprenden un agente de masa (adicionalmente al azúcar sin reducción(s)) que hace más fácil manejar las formas liofilizadas de las formulaciones de toxina botulínica. En ciertas modalidades preferidas, los agentes volumétricos se cristalizan bajo condiciones de liofilización y no se mezclan bien con los otros excipientes cuando están en el estado sólido. Sin embargo, en otras modalidades preferidas, el agente de masa permanece amorfo bajo condiciones de liofilización, aún si se conoce por tener una tendencia para cristalizar durante el congelamiento (por ejemplo, manitol o glicina). Como lo entenderá una persona medianamente versada en la técnica, si un agente de masa cristallizará o permanecerá amorfo durante la liofilización se rige por varios factores, que incluye el tipo de agente de masa, la cantidad de agente de masa relativa a los otros componentes de la formulación, y el índice en el que se liofiliza la formulación. En ciertas modalidades preferidas, la cantidad de azúcar sin reducción relativa al agente de masa se ajusta para suprimir la cristalización del agente de masa. Cuando este es el caso, la relación de azúcar

sin reducción con el agente de masa, sobre una base de porcentaje en peso, puede ser mayor de 0.33 a 1; 0.5 a 1, 0.75 a 1; 1:1; 2:1, 3:1, o 4:1. Ejemplos no limitantes de agentes volumétricos contemplados por la invención incluyen sorbitol, manitol, glicina, arginina, e histidina. En algunas modalidades, la concentración del agente de masa puede estar en el rango de 1% a 10%, 2% a 6%, 3% a 5% o 4% a 4.5% (p/v). En ciertas modalidades preferidas, cuando se utiliza un agente de masa, la concentración del azúcar sin reducción se puede reducir del rango de 10% a 40% (p/v) a un rango de 0.5% a 3.0% (p/v). Adicionalmente, en ciertas modalidades preferidas, la relación del azúcar sin reducción con el agente de masa está en el rango de 0.07 a 2.0, preferiblemente en el rango de 0.4 a 0.6. Así, solo por vía de ejemplo, la formulación puede comprender manitol como el agente de masa y dihidrato de trehalosa como el azúcar sin reducción, con manitol presente en un rango de concentración de 1.5% a 7.5% (p/v) y dihidrato de trehalosa presente en un rango de concentración de 0.5% a 3.0% (p/v). Preferiblemente, el agente de masa no es cloruro de sodio.

[0042] Las formulaciones de toxina botulínica de la invención se pueden administrar a través de una ruta de administración convencional. En algunas modalidades de la invención, las formulaciones de toxina botulínica se administran mediante inyección intramuscular o subcutánea en el sujeto. En otras modalidades, las formulaciones de toxina botulínica se administran tópicamente. Independientemente de si se administran las formulaciones de toxina botulínica tópicamente o mediante inyección, las formulaciones pueden incluir un portador cargado positivamente que tiene grupos de eficiencia cargados positivamente, como se describe aquí, con el fin de facilitar la penetración de la toxina botulínica en los tejidos de interés. Sin embargo, cabe notar que si no se requiere el portador cargado positivamente para la estabilización y que la invención contempla

modalidades en las que las formulaciones no comprenden tal un portador cargado positivamente. Las formulaciones de toxina botulínica de la invención también se pueden administrar a través de un dispositivo de suministro de fármaco, un ejemplo no limitante del cual es un parche para la piel.

[0043] Cuando las formulaciones de toxina botulínica son para ser administradas tópicamente, es ventajoso incluir en las formulaciones un portador cargado positivamente con grupos ramificados cargados positivamente, como se describe aquí, para promover la penetración transdérmica de la toxina botulínica (ver también Solicitud de Patente EE.UU. Nos. 09/910,432; 11/073,307; 11/072,026; y 10/793,138, cada una las cuales se incorpora como referencia en su totalidad). Sin el uso del portador cargado positivamente o algunos otros medios para mejorar el transporte transdérmico, el flujo transdérmico de la toxina botulínica aplicada tópicamente se espera que se bastante bajo. Cabe notar que la invención también contempla el uso de otros métodos para mejorar el transporte transdérmico, además del uso de un portador cargado positivamente como se describe aquí, con las formulaciones de toxina botulínica de la invención. Ejemplos no limitantes de tales métodos incluyen el suministro transdérmico de las formulaciones de toxina botulínica que utilizan liposomas, iontoforesis, micelas, y similares.

[0044] Adicionalmente, cuando las formulaciones de toxina botulínica se van a administrar tópicamente, es a menudo ventajoso para mezclarlos con agentes de gelificación y/o agentes que modifican la viscosidad para incrementar la viscosidad para incrementar la viscosidad de la formulación, para hacer la aplicación de la toxina botulínica más fácil y más exacta. Adicionalmente, si se utiliza un portador cargado positivamente, estos agentes ayudan a prevenir la formulación de toxina botulínica/ portador acuosa a partir del secado, que tiende a provocar una

disminución en la actividad de la toxina botulínica. Los agentes particularmente preferidos son aquellos que son no cargados y que no interfieren con la actividad de toxina botulínica o la eficiencia de los complejos de portador en el cruzamiento de la piel. Los agentes de gelificación pueden ser ciertos agentes de gelificación con base en celulosa, tales como hidroxipropilcelulosa (HPC) por ejemplo. En algunas modalidades, el complejo de toxina botulínica/portador se formula en una composición que tiene 2-4% de HPC. Alternativamente, la viscosidad de una solución que contiene un complejo de toxina botulínica/ portador se puede alterar al agregar polietilenglicol (PEG). En otras modalidades, la solución de toxina botulínica/ portador se combina con agentes viscosos premezclados, tales como humectante Cetaphil®. En otras modalidades, el agente que modifica la viscosidad es un poloxámero, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen poloxámero 188 y poloxámero 407. El agente que modifica la viscosidad también puede ser un ácido poliacrílico, una poliamida, o una goma vegetal (por ejemplo, goma guar). Adicionalmente, se pueden mezclar formulaciones de toxina botulínica como se describe aquí con excipientes para formar emulsiones (que incluyen microemulsiones), suspensiones, cremas, lociones, geles, polvos, u otras composiciones sólidas o líquidas típicas utilizadas para aplicación a la piel y otros tejidos donde se pueden utilizar las composiciones. Tales composiciones también pueden contener otros ingrediente típicamente utilizados en tales productos, tales como agentes antimicrobianos, humectantes y agentes de hidratación, agentes de penetración, conservantes, emulsificantes, aceites naturales o sintéticos, disolventes, tensoactivos, detergentes, emolientes, antioxidantes, perfumes, rellenos, espesantes, ceras, absorbentes de olores, tintes, agentes colorantes, polvos, y opcionalmente anestésicos, aditivos contra el prurito, extractos botánicos, agentes de acondicionamiento, agentes de oscuridad o luminosidad,

agentes de brillo, humectantes, mica, minerales, polifenoles, siliconas o derivados de las mismas, bloqueadores solares, vitaminas y fitomedicinales.

[0045] Esta invención también proporciona equipos para preparar y/o administrar las formulaciones de toxina botulínica de la invención. En algunas modalidades, el equipo comprende la toxina botulínica, así como también tales excipientes adicionales que son necesarios para producir una formulación estabilizada de acuerdo con la invención. El equipo también comprende una premezcla que puede a su vez ser utilizada para producir tal una formulación. En otras modalidades, el equipo comprende una formulación de toxina botulínica de acuerdo con la invención que se ha liofilizado y un dispositivo para suministrar la formulación, un ejemplo no limitante de la cual una jeringa.

[0046] La invención proporcionan formulaciones que suministran una "cantidad terapéutica" de botulina al sujeto durante el tratamiento. Como se utiliza aquí, el término "cantidad terapéutica" se refiere a una cantidad de toxina botulínica que es suficiente para producir el efecto deseado (por ejemplo, relajación de los músculos, tratamiento de arrugas, tratamiento de dolor, o reducción de la actividad de una glándula hiperactiva, tal como una glándula sudorífera). La "cantidad terapéutica" de la toxina botulínica se entiende implícitamente que es una cantidad segura que no provoca parálisis indeseada u otros efectos colaterales no deseados o perjudiciales. La cantidad específica de toxina botulínica que se administra dependerá de varios factores, que incluyen la ruta de administración, el sitio de administración, la indicación a ser tratada, y el serotipo (o serotipos) de toxina botulínica en la formulación específica. Por ejemplo, cuando se selecciona el serotipo de toxina botulínica tipo A, una cantidad terapéutica puede estar en el rango de 10 U a 150 U o 1,000 U a 2,500 U. En otras modalidades preferidas, the

cantidad terapéutica varía de 400 U a 800 U y 1,000 U a 50,000 U, preferiblemente de 2,000 - 35,000 U, más preferiblemente de 3,000 U - 30,000 U, y aún más preferiblemente de 4,000 U a 25,000 U. En ciertas modalidades, la cantidad terapéutica varía de 4,000 U a 8,000 U, 9,000 U a 19,000 U, o 20,000 U a 40,000 U.

[0047] Las composiciones de la invención se aplican de tal manera que provoquen un efecto deseado, que puede ser un efecto cosmético o terapéutico. Los efectos deseados incluyen la relajación de ciertos músculos con la ayuda de, por ejemplo, disminución de la apariencia de líneas finas y/o arrugas, especialmente en la cara, o ajustar la apariencia facial en otras formas tales como el agrandamiento de los ojos, levantamiento de los bordes de la boca, o suavizar las líneas que se extienden desde el labio superior, o el alivio general de la tensión muscular. El efecto mencionado anteriormente, el general de la tensión muscular, se puede efectuar en la cara o cualquier parte. Las composiciones de la invención pueden contener una cantidad efectiva apropiada de la toxina botulínica para aplicación como un tratamiento de dosis única, o puede ser más concentrada, ya sea para dilución en el lugar de la administración o para uso en múltiples aplicaciones. Los complejos de toxina botulínica estabilizados o complejos de toxina botulínica reducidos estabilizados se pueden administrar a un sujeto para tratar afecciones tales como espasmos musculares faciales no deseados u otros espasmos musculares, hiperhidrosis, acné, o afecciones en cualquier parte del cuerpo en la que se desea un alivio de dolor o espasmos musculares. La toxina botulínica se suministra a los músculos o a otras estructuras asociadas con la piel. Se puede hacer la administración, por ejemplo, a la cara, piernas, hombros, espalda (que incluyen la parte baja de la espalda), axilas, palmas, pies, cuello, ingle, dorso de las manos o los pies, codos, brazos, rodillas, parte superior de las piernas, nalgas,

torso, pelvis, o cualquier otra parte del cuerpo donde se desea la administración de la toxina botulínica.

[0048] En ciertas modalidades preferidas, las formulaciones de toxina botulínica de la invención comprenden un portador cargado positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente. Cuando este es el caso, el portador cargado positivamente está presente en una cantidad suficiente para facilitar la penetración de la toxina botulínica en los tejidos de interés. Como se utiliza aquí, el término "cargado positivamente" significa que el portador tiene una carga positiva bajo por lo menos algunas condiciones de fase en solución, más preferiblemente bajo por lo menos algunas condiciones fisiológicamente compatibles. Más específicamente, "cargado positivamente" significa que el grupo en cuestión contiene funcionalidades que se cargan bajo todas las condiciones de pH, por ejemplo, una amina cuaternaria, o contiene una funcionalidad que puede adquirir carga positiva bajo ciertas condiciones de fase en solución, tales como cambios de pH en el caso de aminas primarias. Más preferiblemente, "cargado positivamente" como se utiliza aquí se refiere a aquellos grupos que tienen el comportamiento de asociación con aniones para condiciones fisiológicamente compatibles. Los polímeros con una multiplicidad de grupos funcionales cargados positivamente no necesitan ser homopolímeros, como será evidente para un experto en la técnica. Otros ejemplos de grupos funcionales cargados positivamente son bien conocidos en la técnica anterior y se pueden emplear fácilmente, como será evidente para aquellos expertos en la técnica.

[0049] De forma general, el portador cargado positivamente comprende una estructura principal cargada positivamente, que es típicamente una cadena de átomos, ya sea con grupos en la cadena que lleva una carga positiva a pH

fisiológico, o con grupos que llevan una carga positiva adherida a las cadenas laterales que se extienden desde la estructura principal. Preferiblemente, la estructura principal cargada positivamente en sí misma no tendrá una actividad enzimática o biológica terapéutica. La estructura principal lineal es un hidrocarburo que, en algunas modalidades, se interrumpe por heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio y fósforo. La mayoría de los átomos de la cadena de estructura principal son usualmente carbono. Adicionalmente, la estructura principal a menudo será un polímero de unidades de repetición (por ejemplo, aminoácidos, poli(etilenooxi), poli(propilenoamina), polialquilenoimina, y similares) pero puede ser un heteropolímero. En un grupo de modalidades, la estructura principal cargada positivamente es una polipropilenoamina en donde un número de los átomos de nitrógeno de amina están presentes como grupos amonio (tetra-sustituídos) que llevan una carga positiva. En otra modalidad, la estructura principal cargada positivamente es un polímero no peptídico, que puede ser un hetero- o homo-polímero tal como una polialquilenoimina, por ejemplo una polietilenoimina o polipropilenoimina, que tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 2,500,000 D, preferiblemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 1,800,000 D, y más preferiblemente de aproximadamente 1000 a aproximadamente 1,400,000 D. En otro grupo de modalidades, la estructura principal tiene adherido una pluralidad de grupos funcionales de cadena lateral que incluyen grupos cargados positivamente (por ejemplo, grupos de amonio, grupos piridinio, grupos fosfonio, grupos sulfonio, grupos guanidinio, o grupos amidinio). Estos grupos funcionales de cadena lateral en este grupo de modalidades se pueden colocar en espacios a lo largo de la estructura principal que son consistentes en separaciones o variables. Adicionalmente, la longitud de las cadenas laterales puede ser similar o diferente. Por ejemplo, en un grupo de modalidades, las cadenas laterales pueden ser

cadenas de hidrocarburos lineales o ramificadas que tienen de uno a veinte átomos de carbono y terminación en el extremo distal (lejos de la estructura principal) en uno de los grupos cargados positivamente anotados anteriormente. En todos los aspectos de la presente invención, la asociación entre el portador y la toxina botulínica es mediante interacción no covalente, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o combinaciones de los mismos.

[0050] En un grupo de modalidades, la estructura principal cargada positivamente es un polipéptido que tiene múltiples grupos de cadena lateral cargados (por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, homoarginina, y similares). Preferiblemente, el polipéptido tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 1,500,000 D, más preferiblemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 1,200,000 D, más preferiblemente de aproximadamente 1000 a aproximadamente 1,000,000 D. Un experto en la técnica apreciará que cuando se utilizan aminoácidos en esta porción de la invención, las cadenas laterales pueden tener ya sea la forma D o L (configuración R o S) e el centro de la adhesión. En ciertas modalidades preferidas, el polipéptido tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 D, más preferiblemente de 1000 a aproximadamente 4000 D, más preferiblemente de 2000 a aproximadamente 3000 D. En otras modalidades, el polipéptido tiene un peso molecular de por lo menos aproximadamente 10,000.

[0051] En otra modalidad, la porción de la estructura principal es una polilisina y los grupos de eficiencia como se discute aquí, se adhieren a la polilisina. La polilisina puede tener un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 1,500,000 D, preferiblemente de aproximadamente 250 a

aproximadamente 1,200,000 D, y más preferiblemente de aproximadamente 1000 a aproximadamente 3000 D. En una modalidad de ejemplo, el portador cargado positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente es un péptido con la secuencia de aminoácido RKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RGRDDRRQRRR, o YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR. También puede ser cualquiera de las polilisinas disponibles comercialmente (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., EE.UU.) tal como, por ejemplo, polilisina que tiene MW>70,000 D, polilisina que tiene MW de 70,000 a 150,000 D, polilisina que tiene MW 150,000 a 300,000 D y polilisina que tiene MW>300,000 D. La selección de una polilisina apropiada dependerá de los componentes restantes de la composición y será suficiente para proporcionar una carga positiva neta general a la composición y proporcionar una longitud que es preferiblemente de uno a cuatro veces la longitud combinada de los componentes cargados positivamente.

[0052] Alternativamente, la estructura principal puede ser un análogo de un polipéptido tal como a peptoide. Ver, por ejemplo, Kessler, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32:543 (1993); Zuckermann et al. Chemtracts- Macromol. Chem. 4:80 (1992); y Simon et al. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:9367 (1992)). En resumen, un peptoide es una poliglicina en la cual la cadena lateral está adherida a los átomos de nitrógeno de la estructura principal en lugar de los átomos de carbono alfa. Como anteriormente, una porción de las cadenas laterales típicamente terminará en un grupo cargado positivamente para proporcionar un componente de estructura principal cargado positivamente. Se describe la síntesis de los peptoides en, por ejemplo, Pat. U.S. No. 5,877,278, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Ya que el término se utiliza aquí, las estructuras principales cargadas positivamente que tienen una construcción de estructura

principal de peptoides se consideran "no péptido" ya que ellas no se componen de aminoácidos que tienen cadenas laterales de aminoácidos de ocurrencia natural en las ubicaciones del carbono α .

[0053] Se puede utilizar una variedad de otras estructuras principales empleando, por ejemplo, imitadores estéricos o electrónicos de los polipéptidos en donde los enlaces de amida del péptido se reemplazan con sustitutos tales como enlaces éster, grupos tioamidas ($--CSNH-$), tioamida inversa ($--NHCS--$), aminometileno ($--NHC_2H-$) o el metilenoamino inverso ($-C_2HNH-$), grupos ceto-metileno ($-COC_2H-$), fosfinato ($-PO_2RC_2H-$), fosfonamidato y éster de fosfonamidato ($-PO_2RNH-$), péptido inverso ($--NHCO-$), trans-alqueno ($-CR=CH-$), fluoroalqueno ($-CF=CH-$), dimetileno ($--C_2HC_2H-$), tioéter ($-C_2HS-$), hidroxietileno ($-CH(OH)C_2H-$), metilenooxi ($-C_2HO-$), tetrazole (CN_4), sulfonamido ($-SO_2NH-$), metilenosulfonamido ($--CHRSO_2NH-$), sulfonamida inversa ($-NHSO_2-$), y estructuras principales con malonato y/o subunidades de gem-diamino-alquilo, por ejemplo, como se revisa por Fletcher et al. ((1998) Chem. Rev. 98:763) y detallado mediante las referencias citadas allí. Muchas de las anteriores sustituciones resultan en aproximadamente estructuras de polímero isostérico relativas a las estructuras principales formadas a partir de α -aminoácidos.

[0054] En cada una de las estructuras principales proporcionadas anteriormente, los grupos de cadena lateral se pueden añadir para llevar un grupo cargado positivamente. Por ejemplo, las estructuras ligadas a sulfonamida ($-SO_2NH-$ y $-NHSO_2-$) pueden tener grupos de cadena lateral adheridos a los átomos de nitrógeno. De forma similar, el enlace hidroxietileno ($-CH(OH)C_2H-$) puede llevar un grupo de cadena lateral adherido al sustituyente hidroxilo. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente las otras químicas de enlace para proporcionar

grupos de cadena lateral cargados positivamente utilizando métodos sintéticos estándar.

[0055] En algunas modalidades de la invención, el portador cargado positivamente comprende grupos de eficiencia cargados positivamente. Ejemplos no limitantes de los grupos de eficiencia incluyen $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, en el que el subíndice $n1$ es un entero de 0 a 20 más preferiblemente 0 a 8, aún más preferiblemente 2 a 5, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 17, y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 13, HIV-TAT o fragmentos del mismo, o Antennapedia PTD o un fragmento del mismo. Preferiblemente los grupos de cadena lateral o ramificados tienen la fórmula general $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ como se describió anteriormente. Otras modalidades preferidas son aquellas en las que los grupos ramificados o de eficiencia son fragmentos HIV-TAT que tienen la fórmula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR}-(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$, o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$, en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un entero de 0 a 20 y el fragmento se adhiere a la molécula portadora a través de ya sea el terminal C o el terminal N del fragmento. Los grupos ramificados laterales pueden tener ya sea la forma D o L (configuración R o S) en el centro de la adhesión. Los fragmentos HIV-TAT preferidos son aquellos en los que los subíndices p y q son cada uno independientemente enteros de 0 a 8, más preferiblemente 2 a 5. Otras modalidades preferidas son aquellas en las que los grupos ramificados son grupos Antennapedia PTD o fragmentos de los mismos que retienen la actividad del grupo. Esto se conoce en la técnica, por ejemplo, de Console et al., J. Biol. Chem. 278:35109 (2003). Preferiblemente, el portador cargado positivamente incluye grupos ramificados cargados positivamente de cadena lateral en una cantidad de

por lo menos aproximadamente 0.05%, como un porcentaje del peso del portador total, preferiblemente de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 45% en peso, y más preferiblemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 30% en peso. Para los grupos ramificados cargados positivamente que tiene la fórmula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, la cantidad más preferida es de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 25%.

[0056] Los siguiente ejemplos proporcionan ilustraciones no limitantes de varias modalidades de la invención. Donde una persona medianamente versada en la técnica reconocerá, que se pueden hacer modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de una formulación de toxina botulínica

[0057] Una formulación de ejemplo de toxina botulínica de la invención se prepara al combinar cantidades apropiadas de dihidrato de trehalosa, polisorbato-20, histidina, y histidina HCl para producir una solución madre de formulación 2x que contiene 36% de dihidrato de trehalosa, 0.05% de polisorbato-20, y 1.126% de histidina a un pH de 5.5. La solución se enfría a 4° C. La toxina botulínica API se sedimenta mediante centrifugación de una suspensión madre de sulfato de amonio. El sedimento de toxina se disuelve en 0.56% de regulador de histidina pH 5.5 con 0.05% de polisorbato-20. Esta solución se diluye adicionalmente con la solución de histidina/polisorbato-20 para dar una solución madre de toxina de solución 1.074 µg/mL.

[0058] Una solución madre del péptido portador RKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RKKRRQRRR se prepara al disolver suficiente péptido en agua para producir una solución de 6.0 mg/mL de péptido. La solución madre de toxina, solución madre de péptido, 0.56% de regulador de histidina, y solución madre de formulación 2x se combinan para producir un producto de fármaco de masa de formulación que consiste de 18% de dihidrato de trehalosa, 0.025% de polisorbato-20, 0.56% de regulador de histidina, 55 ng/mL de toxina y 150 µg/mL de péptido portador.

Ejemplo 2: Liofilización de una formulación de toxina botulínica

[0059] Este ejemplo proporciona un procedimiento de liofilización para una formulación de toxina botulínica de acuerdo con la invención. 200 µL de alícuotas del producto de fármaco de masa de formulación descrito en el Ejemplo 1 se transfiere para cada uno de cincuenta y cinco frascos de vidrio de 2 mL. Tapones para liofilización de caucho de butilo grises se colocan libremente sobre la parte superior de los frascos de vidrio. Los frascos se colocan en el liofilizador y se inicia la liofilización.

[0060] El proceso de liofilización comprende tres etapas principales: (1) una etapa de congelamiento; (2) una etapa de secado principal; y (3) una etapa de secado secundario. Cada una de estas tres etapas principales contienen una o más etapas de proceso individuales, que se realizan a las temperaturas y presiones como se indica adelante. El tiempo de secado principal requerido para completar el secado principal varía dependiendo del número de frascos y el volumen de relleno en los frascos.

Congelamiento

Etap	Índice/Mantenimiento	Grados C	Minutos
1	H	5	50
2	R	-45	60
3	H	-45	120

Congelamiento, Condensación y Evacuación:

Temperatura de congelamiento: -40 grados C de Estante o Promedio de Producto

Tiempo de congelamiento extra: 0 minutos

Permite inicio de vacío: -45 Cond. Avg. grados C

Permite inicio de calentamiento: 200 mTorr

Secado principal

Etap	Índice/ Mantenimiento	Grados C	Minutos	mTorr
1	H	-45	150	150
2	H	-33	2520	150
3	R	-25	990	150
4	H	-25	275	150
5	H	-15	240	150
6	H	o	300	150
7	R	25	180	150
8	H	25	120	150

Secado secundario

Etap				
1	H	27	150	100

Ejemplo 3: Estabilidad de la formulación de toxina botulínica con dihidrato de trehalosa

[0061] La **FIGURA 1** y **2** muestran los resultados de los estudios de estabilidad en los cuales los frascos de la formulación de toxina botulínica preparados en dos diferentes concentraciones de toxina con dihidrato de trehalosa (11 ng/frasco y 1.1 ng/frasco) se preparan como se describió anteriormente, se almacenan a 4° C, 25° C y 40° C y se prueban en los puntos de tiempo indicados para determinar la actividad biológica de la toxina botulínica para una duración de hasta 18 meses. La actividad se mide utilizando el ensayo de ratón LD₅₀ y las actividades se reportan en la **FIGURA 1** y **2** como unidades equivalentes de toxina botulínica por frasco. Al inicio del experimento (t=0), la actividad observada es 1802 unidades de toxina botulínica por frasco para la formulación en la **FIGURA 1** y 192 unidades de toxina botulínica por frasco para la formulación en la **FIGURA 2**. La variabilidad observada en la actividad de toxina botulínica en la **FIGURA 1** y **2** se considera que resulta del ruido inherente en los datos obtenidos utilizando el ensayo de ratón LD₅₀ y el pequeño número de muestra (n=1 frasco/ temperatura –punto de tiempo). A pesar de la variabilidad, los datos indican que no hay tendencia a la pérdida de actividad recuperada durante este estudio de dieciocho meses, aún a una temperatura de almacenamiento de 40° C. Estos datos proporcionan un ejemplo de la estabilización de una formulación de ejemplo de toxina botulínica de la invención.

Ejemplo 4: Estabilidad de la formulación de toxina botulínica con sacarosa

[0062] La **FIGURA 3** muestra los resultados de los estudios de estabilidad en los que los frascos de la formulación de toxina botulínica con sacarosa a 11 ng/frasco se preparan utilizando el protocolo descrito anteriormente para las formulaciones que contienen trehalosa, se almacenan a 4° C y 25° C y se prueban en los puntos de tiempo indicados para determinar la actividad biológica de la toxina botulínica

para una duración de hasta 18 meses. La actividad se mide utilizando el ensayo de ratón LD₅₀ como se describió anteriormente y las actividades se reportan en la **FIGURA 3** como unidades equivalentes de toxina botulínica por frasco. Al inicio del experimento (t=0), la actividad observada es 2299 unidades de toxina botulínica por frasco. La variabilidad observada en la actividad de toxina botulínica en la **FIGURA 3** se considera que resulta del ruido inherente en los datos obtenidos utilizando el ensayo de ratón LD50 y el pequeño número de muestra (n=1 frasco/ temperatura- punto de tiempo). A pesar de la variabilidad, los datos indican que no hay tendencia a la pérdida de actividad recuperada durante este estudio de dieciocho meses, aún a una temperatura de almacenamiento de 25° C. Estos datos proporcionan un ejemplo de la estabilización de una formulación de ejemplo de toxina botulínica de la invención.

Ejemplo 5: Liofilización de una formulación de toxina botulínica con agentes volumétricos

[0063] En este ejemplo, la formulación de toxina botulínica se prepara al combinar cantidades apropiadas de dihidrato de trehalosa, manitol, polisorbato-20, histidina, e histidina HCl para producir una solución madre de formulación que contiene 3% de dihidrato de trehalosa, 7.5% de manitol, 0.05% de polisorbato-20, y 0.563% de histidina a un pH de 5.5. La solución se enfría a 4° C. La toxina botulínica API se sedimenta mediante centrifugación de una suspensión madre de sulfato de amonio. El sedimento de toxina se disuelve en la solución madre de formulación. La concentración de esta solución es 117 µg/mL. Esta solución se diluye adicionalmente con la misma solución a una concentración final de solución madre de toxina de 11.7 µg/mL. Una cantidad suficiente de un péptido portador que tiene la secuencia de aminoácido RKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RKKRRQRRR se disuelve

en agua para preparar una solución madre de péptido portadora 20 mg/mL. Estas soluciones se combinan para crear un producto de fármaco de masa de formulación con una composición final de 3% de dihidrato de trehalosa, 7.5% de manitol, 0.05% de polisorbato-20, y 0.563% de histidina pH de 5.5, 75 µg/mL de péptido portador, y 5.5 ng/mL de toxina,

[0064] Las alícuotas de 200 µL del producto de fármaco de masa de formulación se agregan a cada uno de los frascos de liofilización de vidrio de 192 2-mL. Se colocan tapones de caucho de butilo gris libremente en la parte superior de los frascos. Los frascos luego se colocan en el liofilizador y se inicia la liofilización.

[0065] Como en el ejemplo previo, el proceso de liofilización comprende tres etapas principales: (1) una etapa de congelamiento; (2) una etapa de secado principal; y (3) una etapa de secado secundario. Cada una de estas tres etapas principales contienen una o más etapas de proceso individuales, que se realizan a las temperaturas y presiones como se indica adelante.

Congelamiento

Etapas	Índice/Mantenimiento	grados C	Minutos
1	H	5	30
2	R	-45	50
3	H	-45	60
4	R	-20	25
5	H	-20	240
6	R	-45	25
7	H	-45	60

Congelamiento, Condensación y Evacuación:

Temperatura de congelamiento: -40 grados C de Estante o Promedio de Producto

Tiempo de congelamiento extra: 1 minutos

Permite inicio de vacio: -45 Cond. Avg. grados C

Permite inicio de calentamiento: 300 mTorr

Secado principal

Etap	Índice/ Mantenimiento	Grados C	Minutos	mTorr
1	H	-45	30	150
2	R	-28	80	150
3	H	-28	900	150
4	R	-15	20	150
5	H	-15	180	150
6	R	-5	20	150
7	H	-5	180	150
8	R	27	100	150

Secado secundario

Etap				
1	H	27	540	100

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Una composición líquida que comprende
una toxina botulínica,
un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción,
un tensoactivo no iónico, y
un regulador fisiológicamente compatible;
en donde la concentración del disacárido sin reducción o trisacáridos sin reducción está en el rango de 10% a 40% (p/v),
en donde la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v), y en donde el pH de la composición líquida está en el rango de 4.5 a 6.5.
2. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el disacárido sin reducción se selecciona del grupo que consiste de dihidrato de trehalosa, sacarosa, y combinaciones de los mismos.
3. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbatos, ésteres de sorbitán, Triton X-100, NP -40, poloxámeros y combinaciones de los mismos.
4. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el regulador se prepara utilizando una sal seleccionada del grupo que consiste de una sal de ácido cítrico, una sal de ácido acético, una sal de ácido

succínico, una sal de ácido tartárico, una sal de ácido maleico, y una sal de histidina.

5. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, comprende adicionalmente una estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente adjuntos a esta.
6. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente es un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR-G- (K)₁₅ -G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR.
7. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica está presente en una cantidad terapéutica.
8. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica se obtiene del serotipo de las bacterias *Clostridium botulinum* seleccionadas del grupo que consiste de los tipos A, B, C, D, E, F, y G.
9. Una composición en polvo preparada al secar la composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1.

10. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el disacárido sin reducción se selecciona del grupo que consiste de dihidrato de trehalosa, sacarosa, y combinaciones de los mismos.
11. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbatos, ésteres de sorbitán, Triton X-100, NP-40, poloxámeros y combinaciones de los mismos.
12. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el regulador se prepara utilizando una sal seleccionada del grupo que consiste de una sal de ácido cítrico, una sal de ácido acético, una sal de ácido succínico, una sal de ácido tartárico, una sal de ácido maleico, y una sal de histidina.
13. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 9, comprende adicionalmente una estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente adjuntos a esta.
14. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente es un péptido con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR- G-(K)₁₅ -G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR.

15. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición liofilizada comprende una cantidad terapéutica de una toxina botulínica.
16. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la toxina botulínica se obtiene del serotipo de las bacterias *Clostridium botulinum* seleccionadas del grupo que consiste de los tipos A, B, C, D, E, F, y G.
17. Una composición líquida que comprende
 - una toxina botulínica,
 - un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción,
 - un tensoactivo no iónico,
 - un agente de masa y
 - un regulador fisiológicamente compatible;

en donde la concentración del disacárido sin reducción está en el rango de 0.50 a 3.0% (p/v),

en donde la concentración del agente de masa está en el rango de 1.5% a 7.5%,

en donde la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v);

en donde la cantidad de disacárido sin reducción o trisacárido sin reducción relativa a la cantidad de agente de masa se selecciona de tal manera que el agente de masa no se cristaliza cuando se seca la composición líquida;

y en donde el pH de la composición está en el rango de 4.5 a 6.5.

18. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el disacárido sin reducción se selecciona del grupo que consiste de dihidrato de trehalosa, sacarosa, y combinaciones de los mismos.
19. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbatos, ésteres de sorbitán, Triton X-100, NP-40, poloxámeros y combinaciones de los mismos.
20. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el regulador se prepara utilizando una sal seleccionada del grupo que consiste de una sal de ácido cítrico, una sal de ácido acético, una sal de ácido succínico, una sal de ácido tartárico, una sal de ácido maleico, y una sal de histidina.
21. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17, comprende adicionalmente una estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente adjuntos a esta.
22. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente es un péptido con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR-G-(K)₁₅ - G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR.

23. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la toxina botulínica está presente en una cantidad terapéutica.
24. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la toxina botulínica se obtiene del serotipo de las bacterias *Clostridium botulinum* seleccionadas del grupo que consiste de los tipos A, B, C, D, E, F, y G.
25. Una composición en polvo preparada al secar la composición líquida de acuerdo con la reivindicación 17.
26. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el disacárido sin reducción se selecciona del grupo que consiste de dihidrato de trehalosa, sacarosa, y combinaciones de los mismos.
27. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbatos, ésteres de sorbitán, Triton X-100, NP-40, poloxámeros y combinaciones de los mismos.
28. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el regulador se prepara utilizando una sal seleccionada del grupo que consiste de una sal de ácido cítrico, una sal de ácido acético, una sal de ácido succínico, una sal de ácido tartárico, una sal de ácido maleico, y una sal de histidina.

29. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 25, comprende adicionalmente una estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente adjuntos a esta.
30. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la estructura principal cargada positivamente con grupos de eficiencia cargados positivamente es un péptido con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR- G-(K)₁₅ -G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR.
31. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 30, en donde la composición liofilizada comprende una cantidad terapéutica de una toxina botulínica.
32. La composición en polvo de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la toxina botulínica se obtiene del serotipo de las bacterias *Clostridium botulinum* seleccionadas del grupo que consiste de los tipos A, B, C, D, E, F, y G.
33. Un equipo que comprende
una composición en polvo de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 25, y una jeringa.
34. Un método para estabilizar una formulación de toxina botulínica, el método comprende

combinar una toxina botulínica, un disacárido sin reducción o un trisacárido sin reducción, un tensoactivo no iónico, y un regulador fisiológicamente compatible para formar una composición líquida,

en donde la concentración del disacárido sin reducción está en el rango de 10% a 40% (p/v),

en donde la concentración del tensoactivo no iónico está en el rango de 0.005% a 0.5% (p/v), y

en donde el pH de la composición líquida está en el rango de 4.5 a 6.5.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, comprende adicionalmente la etapa de secar la composición líquida.
36. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde la etapa de secar comprende liofilizar o secar al vacío la composición líquida.
37. Una composición líquida que comprende
 - una toxina botulínica,
 - un azúcar sin reducción,
 - un tensoactivo no iónico, un péptido cargado positivamente con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de RKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RKKRRQRRR, RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-RGRDDRRQRRR, y YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅ -G-YGRKKRRQRRR;
 - un regulador fisiológicamente compatible, y
 - opcionalmente un agente de masa;
 - en donde el pH de la composición está en el rango de 4.5 a 6.5.

38. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 37, en donde la secuencia de aminoácido del péptido cargado positivamente es RKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G- RKKRRQRRR.
39. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 38, en donde el azúcar sin reducción se selecciona del grupo que consiste de trehalosa, sacarosa, o rafinosa.
40. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, Span 20, Span 60, Span 65, y Span 80.
41. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 40, en donde el regulador fisiológicamente compatible se selecciona del grupo que consiste de ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico, histidina, citrato/acetato, citrato/histidina, citrato/tartrato, maleato/histidina, succinato/histidina y regulador de fosfato.
42. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 41, en donde la toxina botulínica es una proteína de toxina botulínica de 150 kD del serotipo *Clostridium botulinum* A, B, C, D, E, F, o G.
43. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 37, en donde la secuencia de aminoácido del péptido cargado positivamente es RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅-G- RGRDDRRQRRR.

44. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 43, en donde el azúcar sin reducción se selecciona del grupo que consiste de trehalosa, sacarosa, o rafinosa.
45. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, Span 20, Span 60, Span 65, y Span 80.
46. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 45, en donde el regulador fisiológicamente compatible se selecciona del grupo que consiste de ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico, histidina, citrato/acetato, citrato/histidina, citrato/tartrato, maleato/histidina, succinato/histidina y regulador de fosfato.
47. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 46, en donde la toxina botulínica es una proteína de toxina botulínica de 150 kD del serotipo *Clostridium botulinum* A, B, C, D, E, F, o G.
48. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 37, en donde la secuencia de aminoácido del péptido cargado positivamente es YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G- YGRKKRRQRRR.
49. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 48, en donde el azúcar sin reducción se selecciona del grupo que consiste de trehalosa, sacarosa, o rafinosa.

50. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 49, en donde el tensoactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, Span 20, Span 60, Span 65, y Span 80.
51. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 50, en donde el regulador fisiológicamente compatible se selecciona del grupo que consiste de ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico, histidina, citrato/acetato, citrato/histidina, citrato/tartrato, maleato/histidina, succinato/histidina y regulador de fosfato.
52. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 51, en donde la toxina botulínica es una proteína de toxina botulínica de 150 kD del serotipo *Clostridium botulinum* A, B, C, D, E, F, o G.

FORMULACIONES DE TOXINA BOTULÍNICA LIBRE DE ALBÚMINA**Resumen**

Esta invención se relaciona con formulaciones de toxina botulínica que se estabilizan sin el uso de ningún excipiente proteico. La invención también se relaciona con métodos para preparar y utilizar dichas formulaciones de toxina botulínica.

1/3

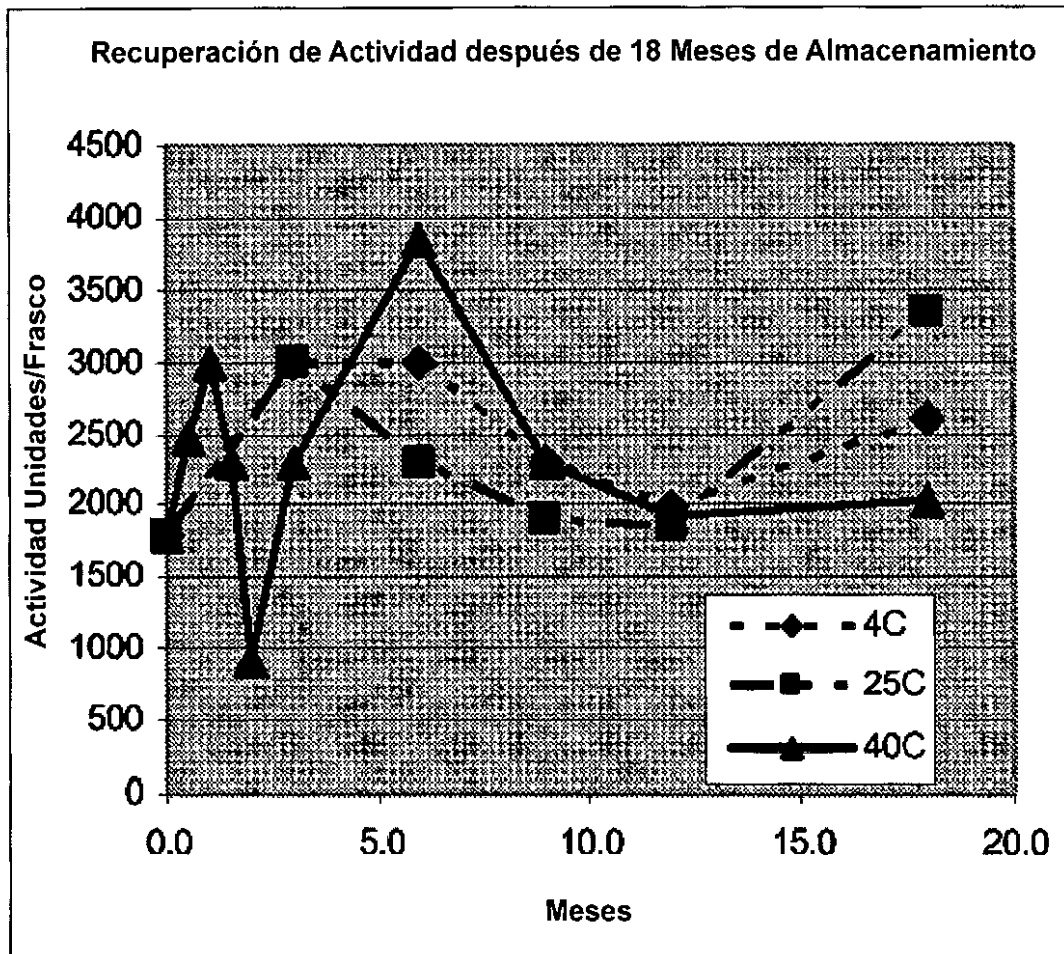


FIGURA 1

2/3

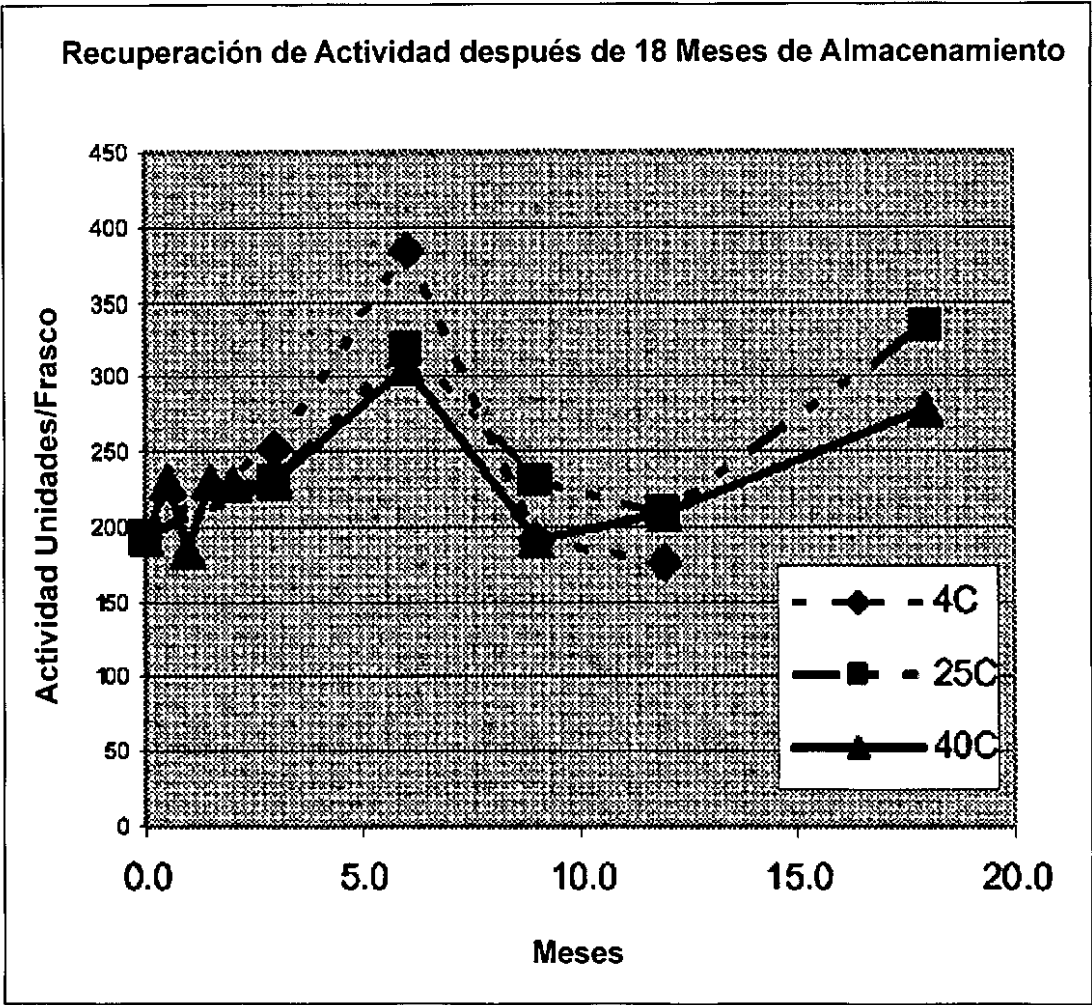


FIGURA 2

3/3

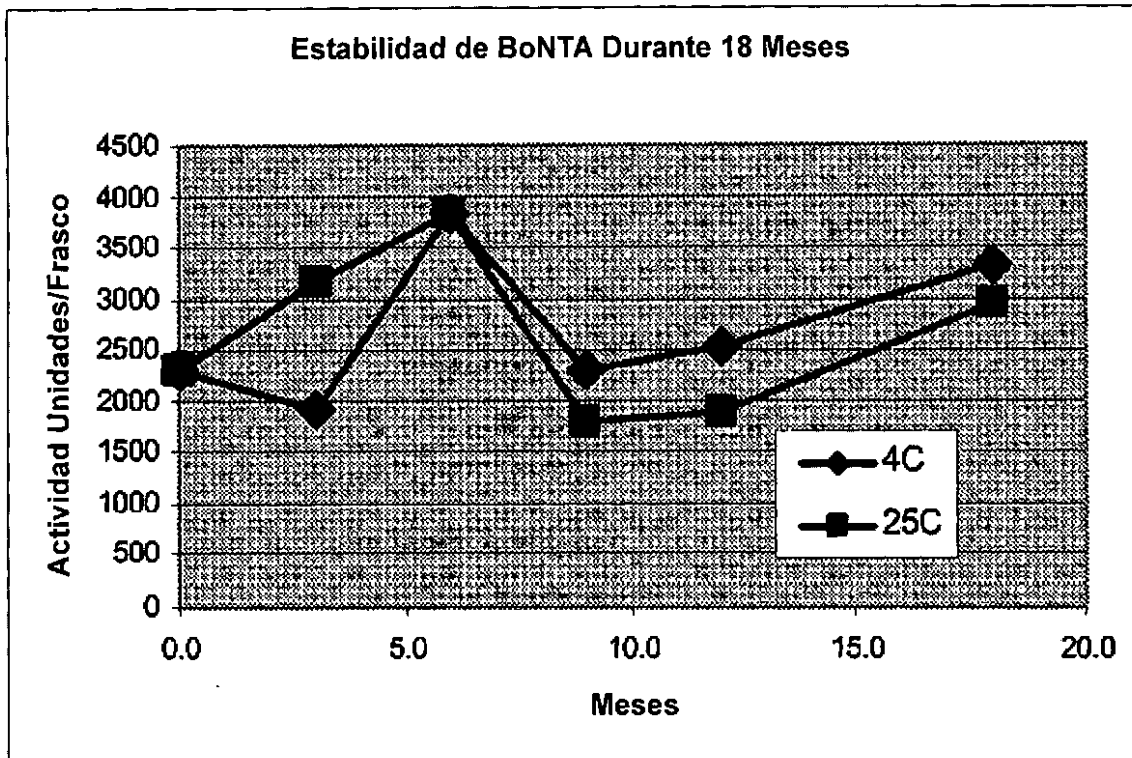


FIGURA 3

Lista de Secuencias
LISTA DE SECUENCIAS

|

<110> THOMPSON, STEWART A.
RUEGG, CURTIS L.
WAUGH, JACOB M.

<120> FORMULACIONES DE TOXINA BOTULÍNICA LIBRE DE ALBÚMINA

<130> 13720-105135PC

<140> PCT/US2010/040104

<141> 2010-06-25

<150> 61/220,433

<151> 2009-06-25

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 1

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln
20 25 30

Arg Arg Arg
35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 2

Arg Gly Arg Asp Asp Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Arg Gly Arg Asp
20 25 30

Asp Arg Arg Gln Arg Arg Arg
35

<210> 3

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 3

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lista de Secuencias
Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Tyr Gly Arg Lys
20 25 30

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
35

<210> 4
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> esta región puede abarcar 0-20 residuos "Gly"

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(45)
<223> esta región puede abarcar 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, o 25 residuos "Arg"

<220>
<223> ver la especificación como se presentó para la descripción detallada de sustituciones y modalidades preferidas

<400> 4
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
35 40 45

<210> 5
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> esta región puede abarcar 0-20 residuos "Gly"
<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(51)
<223> esta región puede abarcar 0-20 residuos "Gly"
<220>
<223> ver la especificación como se presentó para la descripción detallada de sustituciones y modalidades preferidas

<400> 5
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Arg Gly Arg Asp Asp Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly **Lista de Secuencias** Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Gly Gly
50

```
<210> 6
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético
```

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> esta región puede abarcar 0-20 residuos "Gly"
<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(51)
<223> esta región puede abarcar 0-20 residuos "Gly"
```

<220>
<223> ver la especificación como se presentó para la descripción detallada de sustituciones y modalidades preferidas

<400> 6
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

Gly Gly Gly
50

```
<210> 7
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético

```
<220>  
<221> misc_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> esta región puede abarcar 0-20 residuos "Gly"  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> (30)..(49)  
<223> esta región puede abarcar 0-20 residuos "Gly"
```

<220>
<223> ver la especificación como se presentó para la descripción detallada de sustituciones y modalidades preferidas

<400> 7
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Lista de Secuencias
Gly Gly Gly Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45
Gly

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 61/220,433 25/06/2009 US		(51) Int Cl: A61K 039/008 (71) Solicitante(s) REVANCE THERAPEUTICS, INC. (72) Inventor(es) STEWART A. THOMPSON Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 25/01/2012 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 25/06/2010 No. de solicitud PCT/US2010/040104		(87) Publicación internacional Fecha: 29/12/2010 N° publicación: WO 2010/151840 A2	
(54) Título: FORMULACIONES DE TOXINA BOTULÍNICA LIBRE DE ALBÚMINA			

Resumen:

Esta invención se relaciona con formulaciones de toxina botulinica que se estabilizan sin el uso de ningún excipiente proteico. La invención también se relaciona con métodos para preparar y utilizar dichas formulaciones de toxina botulinica.

131

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 005064
		Bogotá D.C., Enero 19 de 2012 - 12:03:23

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

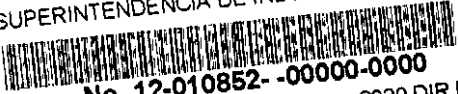
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157712236	19/01/2012	22.810.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00 590.000.00
			\$590.000.00
=====			

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-010852- -00000-0000

Fecha: 2012-01-25 11:22:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132
Act. 411 PRESENTACION Folios: 133

Cc/p: 15861-841-007-6.

132

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

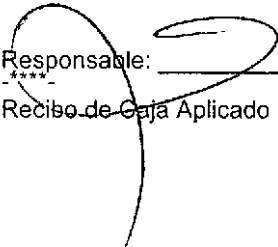
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 001878
		Bogotá D.C., Enero 06 de 2012 - 17:11:42

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470923	06/01/2012	22.030.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL)	300.000.00	300.000.00
			<u>\$300.000.00</u>
=====			

SON: **TRESCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-010852- -00000-0000
Fecha: 2012-01-25 11:22:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132
Act. 411 PRESENTACION Folios: 133

Colo: 15861- 841- 007-6.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

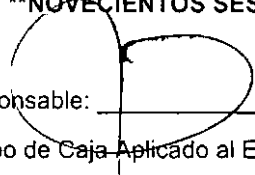
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 006198
		Bogotá D.C., Enero 23 de 2012 - 07:49:39

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	127712240	20/01/2012	45.250.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1614 TASA ANUAL A#OS 17 a 20 PARA MANTENIMINETO DE PATENTE D	960.000.00 960.000.00
			\$960.000.00

SON: **NOVECIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-010852- -00000-0000

Fecha: 2012-01-25 11:22:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 132

Act. 411 PRESENTACION Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 133

Colo: 15861-841-007-6.

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☒

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐