



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-98637

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

COMPOSICIONES Y METODOS PARA APLICACION TOPICA

Y SUMINISTRO TRANSDERMICO DE TOXINAS BOTULINUM

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K51/0 // A61K38/16.

71. SOLICITANTE

ESSENTIA BIOSYSTEMS, INC

DOMICILIO

mountain View, California 94043, Estados Unidos de América

74. APODERADO

emilio Ferrero

c.c. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

29/09/2006.

(FORMA P-10)

(SS)



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 06-088637- -00000-0000

Fec: 2006-09-29 17:49:02 Dep. 2020 NUECREACIONES

Tra. 11 PATENTERYU

Eve: 378 FASENACIONALI

Act 411 PRESENTACION

Folios: 163

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 03-10-06

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

S LICITANTE
(71)

Nombre: **ESSENTIA BIOSYSTEMS, INC.**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de América.

Dirección: 1828B Old Middlefield Way
Mountain View
California 94403
Estados Unidos de América

Domicilio: Mountain View,
California 94043
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 38 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camvp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 438.019 T.P 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. **Michael D. DAKE**
885 Gerona Road
Stanford
California 94305
Estados Unidos de América

2. **Jacob M WAUGH**
4020 El Camino Real #1116
Mountain View
California 94040
Estados Unidos de América

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/007524

Fecha: 3 de marzo 2005

Publicación Internacional No. WO 2005/084410 A2

Fecha: 15 de septiembre de 2005

6

Título (54)

**COMPOSICIONES Y METODOS PARA APLICACIÓN TOPICA Y SUMINISTRO
TRANSDERMICO DE TOXINAS BOTULINUM**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 51/00 // A61K38/16.

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

3 de marzo de 2004

(31) Número de Solicitud

60/550.015

9

Comprobante de pago No.: 06-73.830

Fecha: 25 de septiembre de 2006

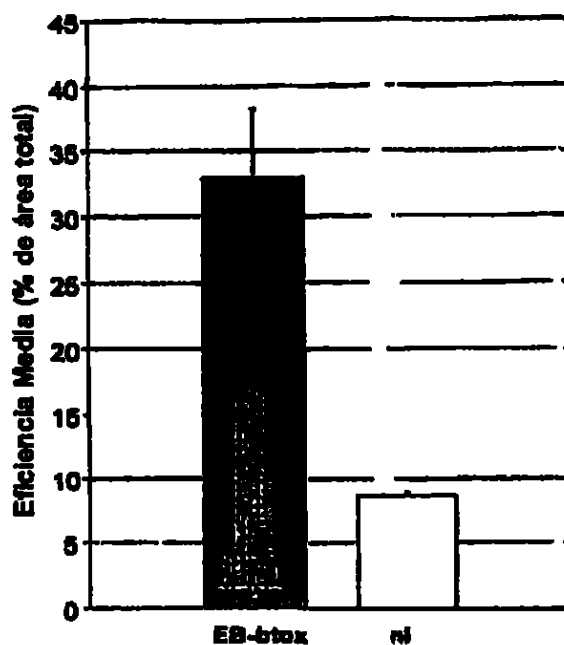
10

An xos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ 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:

EMILIO FERRERO

FIRMA:

Emilio Ferrero

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2005/084410 A2
2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN
FASE INTERNACIONAL**



1. **THE STATE OF TEXAS, COUNTY OF DALLAS, ss. I, _____, a Notary Public in and for said State, do hereby certify that the foregoing is a true and correct copy of the original of the same, as the same appears from the records of said County.**

PCT

WO 2005/084410 A2

AT, AU, AZ, BA, BB, BC, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GU, HD, HE, HF, HS, HU, IG, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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*

(48) Date of publication of this corrected version: 16 March 2016

(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 11/2006 of 16 March 2006, Section II

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

APPLICATION AND TRANSDERMAL DELIVERY OF BO-

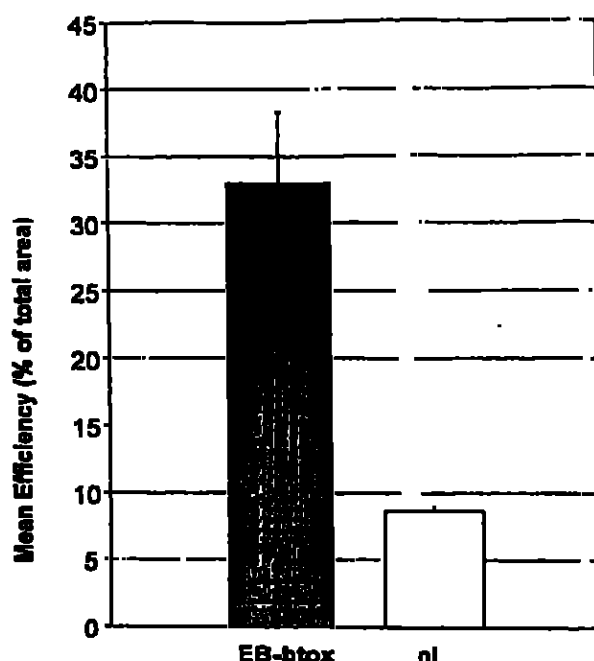
(57) Abstract: A composition for topical application of

a botulinum toxin (including botulinum toxin derivatives) comprises a botulinum toxin and a carrier comprising a polymeric backbone comprising a long-chain polypeptide

or nonpeptidyl polymer having attached positively charged branching or "efficiency" groups. The invention also relates to methods for reducing muscle paralysis and other conditions that may be caused by the use of the compositions.

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

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TOPICAL APPLICATION AND TRANSDERMAL DELIVERY OF BOTULINUM TOXINS



(57) Abstract: A composition for topical application of a botulinum toxin (including botulinum toxin derivatives) comprises a botulinum toxin and a carrier comprising a polymeric backbone comprising a long-chain polypeptide or nonpeptidyl polymer having attached positively charged branching or "efficiency" groups. The invention also relates to methods for reducing muscle paralysis and other conditions that may be treated with a botulinum toxin, particularly paralysis of subcutaneous, and most particularly, facial, muscles, by topically applying an effective amount of the botulinum toxin and carrier, in conjunction, to the subject's skin or epithelium. Kits for administration are also described.

WO 2005/084410 A2

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TOPICAL APPLICATION AND TRANSDERMAL DELIVERY OF BOTULINUM TOXINS

[0001] This application claim the benefit of priority to U.S. Provisional Patent Application No. 60/550,015, filed on March 3, 2004. U.S. Provisional Patent Application No. 60/550,015 is hereby incorporated by reference in its entirety.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Skin protects the body's organs from external environmental threats and acts as a thermostat to maintain body temperature. It consists of several different layers, each with specialized functions. The major layers include the epidermis, the dermis and the hypodermis. The epidermis is a stratifying layer of epithelial cells that overlies the dermis, which consists of connective tissue. Both the epidermis and the dermis are further supported by the hypodermis, an internal layer of adipose tissue.

[0003] The epidermis, the topmost layer of skin, is only 0.1 to 1.5 millimeters thick (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). It consists of keratinocytes and is divided into several layers based on their state of differentiation. The epidermis can be further classified into the stratum corneum and the viable epidermis, which consists of the granular melphigian and basal cells. The stratum corneum is hygroscopic and requires at least 10% moisture by weight to maintain its flexibility and softness. The hygroscopicity is attributable in part to the water-holding capacity of keratin. When the horny layer loses its softness and flexibility it becomes rough and brittle, resulting in dry skin.

[0004] The dermis, which lies just beneath the epidermis, is 1.5 to 4 millimeters thick. It is the thickest of the three layers of the skin. In addition, the dermis is also home to most of the skin's structures, including sweat and oil glands (which secrete substances through openings in the skin called pores, or comedos), hair follicles, nerve endings, and blood and lymph vessels (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). However, the main components of the dermis are collagen and elastin.

[0005] The hypodermis is the deepest layer of the skin. It acts both as an insulator for body heat conservation and as a shock absorber for organ protection (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). In addition,

6

the hypodermis also stores fat for energy reserves. The pH of skin is normally between 5 and 6. This acidity is due to the presence of amphoteric amino acids, lactic acid, and fatty acids from the secretions of the sebaceous glands. The term "acid mantle" refers to the presence of the water-soluble substances on most regions of the skin. The buffering capacity of the skin is due in part to these secretions stored in the skin's horny layer.

[0006] Wrinkles, one of the telltale signs of aging, can be caused by biochemical, histological, and physiologic changes that accumulate from environmental damage (Benedetto, International Journal of Dermatology, 38:641-655 (1999)). In addition, there are other secondary factors that can cause characteristic folds, furrows, and creases of facial wrinkles (Stegman et al., The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)). These secondary factors include the constant pull of gravity, frequent and constant positional pressure on the skin (i.e., during sleep), and repeated facial movements caused by the contraction of facial muscles (Stegman et al., The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)). Different techniques have been utilized in order potentially to mollify some of the signs of aging. These techniques range from facial moisturizers containing alpha hydroxy acids and retinol to surgical procedures and injections of neurotoxins.

[0007] One of the principal functions of skin is to provide a barrier to the transportation of water and substances potentially harmful to normal homeostasis. The body would rapidly dehydrate without a tough, semi-permeable skin. The skin helps to prevent the entry of harmful substances into the body. Although most substances cannot penetrate the barrier, a number of strategies have been developed to selectively increase the permeability of skin with variable success.

[0008] Botulinum toxins (also known as botulin toxins or botulinum neurotoxins) are neurotoxins produced by the gram-positive bacteria *Clostridium botulinum*. They act to produce paralysis of muscles by preventing synaptic transmission or release of acetylcholine across the neuromuscular junction, and are thought to act in other ways as well. Their action essentially blocks signals that normally would cause muscle spasms or contractions, resulting in paralysis.

[0009] Botulinum toxin is classified into eight neurotoxins that are serologically related, but distinct. Of these, seven can cause paralysis, namely botulinum neurotoxin serotypes A, B, C, D, E, F and G. Each of these is distinguished by neutralization with type-specific antibodies. Nonetheless, the molecular weight of the botulinum toxin protein molecule, for all seven of these active botulinum toxin serotypes, is about 150 kD. As released by the bacterium, the botulinum toxins are complexes comprising the 150 kD botulinum toxin protein molecule in question along with associated non-toxin proteins. The botulinum toxin type A complex can be produced by Clostridia bacterium as 900 kD, 500 kD and 300 kD forms. Botulinum toxin types B and C are apparently produced as only a 700 kD or 500 kD complex. Botulinum toxin type D is produced as both 300 kD and 500 kD complexes. Botulinum toxin types E and F are produced as only approximately 300 kD complexes. The complexes (i.e. molecular weight greater than about 150 kD) are believed to contain a non-toxin hemagglutinin protein and a non-toxin and non-toxic nonhemagglutinin protein. These two non-toxin proteins (which along with the botulinum toxin molecule comprise the relevant neurotoxin complex) may act to provide stability against denaturation to the botulinum toxin molecule and protection against digestive acids when toxin is ingested. Additionally, it is possible that the larger (greater than about 150 kD molecular weight) botulinum toxin complexes may result in a slower rate of diffusion of the botulinum toxin away from a site of intramuscular injection of a botulinum toxin complex.

[0010] The different serotypes of botulinum toxin vary in the animal species that they affect and in the severity and duration of the paralysis they evoke. For example, it has been determined that botulinum toxin type A is 500 times more potent, as measured by the rate of paralysis produced in the rat, than is botulinum toxin type B. Additionally, botulinum toxin type B has been determined to be non-toxic in primates at a dose of 480 U/kg, about 12 times the primate LD₅₀ for type A. Due to the molecule size and molecular structure of botulinum toxin, it cannot cross stratum corneum and the multiple layers of the underlying skin architecture.

[0010] Botulism, the characteristic symptom complex from systemic botulinum toxin exposure, has existed in Europe since antiquity. In 1895, Emile P. van Ermengem first isolated the anaerobic spore-forming bacillus from raw salted pork meat obtained from post-mortem tissue of victims who died of botulism in

Belgium. Van Ermengem found the disease to be caused by an extracellular toxin that was produced by what he called *Bacillus botulinus* (Van Ermengem, *Z Hyyg Infektionskr*, 26:1-56; *Rev Infect* (1897)). The name was changed in 1922 to *Clostridium botulinum*. The name *Clostridium* was used to reflect the anaerobic nature of the microorganism and also its morphologic characteristics (Carruthers and Carruthers, *Can J Ophthalmol*, 31:389-400 (1996)). In the 1920's, a crude form of Botulinum toxin type A was isolated after additional outbreaks of food poisoning. Dr. Herman Sommer at the University of California, San Francisco made the first attempts to purify the neurotoxin (Borodic et al., *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*, 7:54-60 (1991)). In 1946, Dr. Edward J. Schantz and his colleagues isolated the neurotoxin in crystalline form (Schantz et al., In: Jankovi J, Hallet M (Eds) *Therapy with Botulinum Toxin*, New York, NY: Marcel Dekker, 41-49 (1994)). By 1949, Burgen and his associates were able to demonstrate that the Botulinum toxin blocks impulses across the neuromuscular junction (Burgen et al., *J Physiol*, 109:10-24 (1949)). Allan B. Scott first used botulinum toxin A (BTX-A) in monkeys in 1973. Scott demonstrated reversible ocular muscle paralysis lasting 3 months (Lamanna, *Science*, 130:763-772 (1959)). Soon afterwards, BTX-A was reported to be a successful treatment in humans for strabismus, blepharospasm, and spasmodic torticollis (Baron et al., In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM (Eds), *Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology*, St. Louis, MO: Mosby Year Book, 504-523 (1994); Carruthers and Carruthers, *Adv Dermatol*, 12:325-348 (1997); Markowitz, In: Strickland GT (Eds) *Hunters Tropical Medicine*, 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 441-444 (1991)). In 1986, Jean and Alastair Carruthers, a husband and wife team consisting of an oculoplastic surgeon and a dermatologist, began to evolve the cosmetic use of BTX-A for treatment of movement-associated wrinkles in the glabella area (Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) *Biomedical Aspects of Botulinum*, New York: Academic Press, 143-150 (1981)). The Carruthers' use of BTX-A for the treatment of wrinkles led to their seminal publication of this approach in 1992 (Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) *Biomedical Aspects of Botulinum*, New York: Academic Press, 143-150 (1981)). By 1994, the same team reported experiences with other movement-associated wrinkles on the face (Scott, *Ophthalmol*, 87:1044-1049 (1980)). This in turn led to the birth of the era of cosmetic BTX-A treatment.

[0011] Botulinum toxin type A is said to be the most lethal natural biological agent known to man. Spores of *C. botulinum* are found in soil and can grow in improperly sterilized and sealed food containers. Ingestion of the bacteria can cause botulism, which can be fatal. At the same time, the muscle-paralyzing effects of botulinum toxin have been used for therapeutic effects. Controlled administration of botulinum toxin has been used to provide muscle paralysis to treat conditions, for example, neuromuscular disorders characterized by hyperactive skeletal muscles. Conditions that have been treated with botulinum toxin include hemifacial spasm, adult onset spasmodic torticollis, anal fissure, blepharospasm, cerebral palsy, cervical dystonia, migraine headaches, strabismus, temporomandibular joint disorder, and various types of muscle cramping and spasms. More recently the muscle-paralyzing effects of botulinum toxin have been taken advantage of in therapeutic and cosmetic facial applications such as treatment of wrinkles, frown lines, and other results of spasms or contractions of facial muscles.

[0012] Topical application of botulinum toxin would provide for a safer and more desirable treatment alternative due to the painless nature of application, the larger treatment surface area that can be covered, the ability to formulate a pure toxin with higher specific activity, the reduced training necessary for applying the botulinum therapeutic, the smaller doses that would be necessary to produce the desired effect, and the lack of a requirement for large wells of toxin to reach a therapeutic clinical result. An effective means for transdermal delivery of botulinum toxin, as well as an effective means for administering botulinum toxin to treat or prevent a number of conditions that does not require injection is thus highly desirable.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0013] This invention relates to new compositions comprising a botulinum toxin, more specifically to such compositions that enable the transport or delivery of a botulinum toxin through the skin or epithelium (also referred to as "transdermal delivery"), and that therefore may be used as topical applications for providing a botulinum toxin to a subject, for various therapeutic, aesthetic and/or cosmetic purposes, as described herein.

[0014] One aspect of this invention is to provide a composition containing a botulinum toxin and a carrier. The carrier has a polymeric backbone with attached

20
10

positively charged branching groups. The association between the carrier and the botulinum toxin is non-covalent.

[0015] Another aspect of this invention is to provide a kit for administration of a botulinum toxin to a subject. The kit includes a botulinum toxin present in an effective amount for transdermal delivery thereof, and a carrier that has a polymeric backbone with attached positively charged branching groups. The association between the carrier and the botulinum toxin is non-covalent.

[0016] Yet another aspect of this invention is to provide a kit for administration of a botulinum toxin to a subject. The kit includes a device for delivering the botulinum toxin to the skin and a composition containing a carrier having a polymeric backbone with attached positively charged branching groups selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD, in which the subscript $n1$ is an integer of from 0 to about 20, and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25.

[0017] This invention also provides a method of administering a botulinum toxin to a subject involving topically applying to the skin or epithelium of the subject the botulinum toxin in conjunction with an effective amount of a carrier. The carrier has a polymeric backbone with attached positively charged branching groups, and associates non-covalently with the botulinum toxin.

[0018] In one aspect, this invention relates to a composition comprising a botulinum toxin (as defined herein) and a carrier comprising a positively charged "backbone" having positively charged branching or "efficiency" groups, as described herein. Most preferably the positively charged carrier is a long-chain positively charged polypeptide or a positively charged nonpeptidyl polymer, for example, a polyalkyleneimine. The invention further relates to a method for producing a biologic effect such as muscle paralysis, reducing hypersecretion or sweating, treating neurologic pain or migraine headache, reducing muscle spasms, preventing or reducing acne, or reducing or enhancing an immune response, by topically applying an effective amount of such a composition, preferably to the skin, of a subject or patient in need of such treatment. The invention also relates to a method for producing an aesthetic or cosmetic effect, for example by topical application of botulinum toxin to the face instead of by injection into facial muscles.

11

[0019] This invention also provides kits for preparing or formulating a composition that comprises the carrier and the botulinum toxin, as well as such additional items that are needed to produce a usable formulation, or a premix that may in turn be used to produce such a formulation. Alternatively the kit comprises means for separately but in conjunction administering the botulinum toxin and the carrier to a subject.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0020] Figure 1 represents the results of an experiment demonstrating efficiency of transdermal delivery of botulinum toxin using a composition of the invention comprising a peptide backbone.

[0021] Figure 2 is a photograph depicting the state of the hind limbs of a mouse in which the area of one limb was treated with a composition of the invention and the area of the other was treated with another botulinum toxin-containing composition that did not contain a carrier according to the invention.

[0022] Figure 3 is a photograph depicting wrinkles on subject's forehead before and after treatment with "Essentia Botox lotion" topically.

[0023] Figure 4 shows a Mikrosil cast of the forehead (A) after topical treatment of wrinkles with "Essentia Botox Lotion", and (b) before treatment. These Mikrosil casts, which are useful because they minimize artifacts that can result from photographing the actual subject, clearly show that the untreated side has deeper wrinkles.

[0024] Figure 5 shows photographs depicting Minor's starch/iodine test performed on subject's forehead five days after application of "Essentia Botox Lotion" (A) and a control lotion (B). The control lotion contained a positively charged polylysine backbone with a molecular weight of about 21,000 and with TAT branching groups. These pictures were taken two minutes after application.

[0025] Figure 6 is the same as Figure 5, but except that they were taken after four minutes had elapsed.

[0026] Figure 7 shows the dose area used in the axillary hyperhidrosis studies. Note that the dose area extends one centimeter beyond the area of the skin covered by axillary hair.

[0027] Figure 8a represents the results of an experiment demonstrating efficiency of botulinum toxin therapeutically delivered across intact skin as a topical agent using a short peptidyl carrier for the treatment of axillary hyperhidrosis on human subjects. Graph depicts significant reduction in amount of sweat (mg per 5 minutes) measured gravimetrically 4 weeks after treatment with Botox plus a short peptidyl carrier or carrier alone. Results are 4 week values as ratio to baseline value for same group, with significance determined by Wilcoxon analysis with $P < 0.05$. $N = 10$ patients. Figure 8b represents the results of an experiment demonstrating efficiency of botulinum toxin therapeutically delivered across intact skin as a topical agent using a short peptidyl carrier for the treatment of axillary hyperhidrosis on human subjects. Graph depicts significant reduction in amount of sweat (mg per 5 minutes) measured gravimetrically 4 weeks after treatment with Botox plus a short peptidyl carrier or carrier alone. Results are treatment values as ratio to control value for both timepoints, with significance determined by Wilcoxon analysis with $P < 0.05$. $N = 10$ patients.

[0028] Figure 9 shows photographs depicting Minor's starch/iodine test before and after treatment with "Essentia Botox lotion" topically for the treatment of axillary hyperhidrosis. Starch/iodine test at Baseline vs. 2 week is shown where right axilla was treated with "Essentia Botox lotion" (a and c) and left axilla was applied with the control (b and d) for subject #12. These photographs illustrate typical benefits observed after treatment with carrier+botox in starch iodine. Although some crossover is observed on the control side (consistent with 25% reduction in gravimetric data), significant reductions are afforded with treatment (consistent with 65% reduction in gravimetric data on treated side).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0029] This invention provides compositions and methods for delivery, particularly transdermal delivery, of a botulinum toxin by topical application of an appropriate formulation.

[0030] According to the present invention, a positively charged carrier molecule having efficiency groups, as described herein, has been found suitable as a transport system for a botulinum toxin, enabling that toxin to be administered

transdermally to muscles and/or other skin-associated structures. The transport occurs without covalent modification of the botulinum toxin.

[0031] By "positively charged" is meant that the carrier has a positive charge under at least some solution-phase conditions, more preferably under at least some physiologically compatible conditions. More specifically, "positively charged" as used herein, means that the group in question contains functionalities that are charged under all pH conditions, for instance, a quaternary amine, or contains a functionality which can acquire positive charge under certain solution-phase conditions, such as pH changes in the case of primary amines. More preferably, "positively charged" as used herein refers to those groups that have the behavior of associating with anions over physiologically compatible conditions. Polymers with a multiplicity of positively-charged moieties need not be homopolymers, as will be apparent to one skilled in the art. Other examples of positively charged moieties are well known in the prior art and can be employed readily, as will be apparent to those skilled in the art.

[0032] Generally, the positively-charged carrier (also referred to as a "positively charged backbone") is typically a linear chain of atoms, either with groups in the chain carrying a positive charge at physiological pH, or with groups carrying a positive charge attached to side chains extending from the backbone. Preferably, the positively charged backbone itself will not have a defined enzymatic or therapeutic biologic activity. The linear backbone is a hydrocarbon backbone which is, in some embodiments, interrupted by heteroatoms selected from nitrogen, oxygen, sulfur, silicon and phosphorus. The majority of backbone chain atoms are usually carbon. Additionally, the backbone will often be a polymer of repeating units (e.g., amino acids, poly(ethyleneoxy), poly(propyleneamine), polyalkyleneimine, and the like) but can be a heteropolymer. In one group of embodiments, the positively charged backbone is a polypropyleneamine wherein a number of the amine nitrogen atoms are present as ammonium groups (tetra-substituted) carrying a positive charge. In another embodiment, the positively charged backbone is a nonpeptidyl polymer, which may be a hetero- or homo-polymer such as a polyalkyleneimine, for example a polyethyleneimine or polypropyleneimine, having a molecular weight of from about 10,000 to about 2,500,000, preferably from about 100,000 to about 1,800,000, and most preferably from about 500,000 to about 1,400,000. In another group of embodiments, the backbone has attached a plurality of side-chain moieties that

18:08

include positively charged groups (e.g., ammonium groups, pyridinium groups, phosphonium groups, sulfonium groups, guanidinium groups, or amidinium groups). The sidechain moieties in this group of embodiments can be placed at spacings along the backbone that are consistent in separations or variable. Additionally, the length of the sidechains can be similar or dissimilar. For example, in one group of embodiments, the sidechains can be linear or branched hydrocarbon chains having from one to twenty carbon atoms and terminating at the distal end (away from the backbone) in one of the above-noted positively charged groups. In all aspects of the present invention, the association between the carrier and the biologically active agent is by non-covalent interaction, non-limiting examples of which include ionic interactions, hydrogen bonding, van der Waals forces, or combinations thereof.

[0033] In one group of embodiments, the positively charged backbone is a polypeptide having multiple positively charged sidechain groups (e.g., lysine, arginine, ornithine, homoarginine, and the like). Preferably, the polypeptide has a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000, more preferably from about 25,000 to about 1,200,000, most preferably from about 100,000 to about 1,000,000. One of skill in the art will appreciate that when amino acids are used in this portion of the invention, the sidechains can have either the D- or L-form (R or S configuration) at the center of attachment. Alternatively, the backbone can be an analog of a polypeptide such as a peptoid. See, for example, Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32:543 (1993); Zuckermann *et al. Chemtracts-Macromol. Chem.* 4:80 (1992); and Simon *et al. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:9367 (1992)). Briefly, a peptoid is a polyglycine in which the sidechain is attached to the backbone nitrogen atoms rather than the α -carbon atoms. As above, a portion of the sidechains will typically terminate in a positively charged group to provide a positively charged backbone component. Synthesis of peptoids is described in, for example, U.S. Patent No. 5,877,278, which is hereby incorporated by reference in its entirety. As the term is used herein, positively charged backbones that have a peptoid backbone construction are considered "non-peptide" as they are not composed of amino acids having naturally occurring sidechains at the α -carbon locations.

[0034] A variety of other backbones can be used employing, for example, steric or electronic mimics of polypeptides wherein the amide linkages of the peptide are replaced with surrogates such as ester linkages, thioamides (-CSNH-), reversed

thioamide (-NHCS-), aminomethylene (-NHCH₂-) or the reversed methyleneamino (-CH₂NH-) groups, keto-methylene (-COCH₂-) groups, phosphinate (-PO₂RCH₂-), phosphoramidate and phosphoramidate ester (-PO₂RNH-), reverse peptide (-NHCO-), trans-alkene (-CR=CH-), fluoroalkene (-CF=CH-), dimethylene (-CH₂CH₂-), thioether (-CH₂S-), hydroxyethylene (-CH(OH)CH₂-), methyleneoxy (-CH₂O-), tetrazole (CN₄), sulfonamido (-SO₂NH-), methylenesulfonamido (-CHRSO₂NH-), reversed sulfonamide (-NHSO₂-), and backbones with malonate and/or gem-diamino-alkyl subunits, for example, as reviewed by Fletcher *et al.* ((1998) *Chem. Rev.* 98:763) and detailed by references cited therein. Many of the foregoing substitutions result in approximately isosteric polymer backbones relative to backbones formed from α -amino acids.

[0035] In each of the backbones provided above, sidechain groups can be appended that carry a positively charged group. For example, the sulfonamide-linked backbones (-SO₂NH- and -NHSO₂-) can have sidechain groups attached to the nitrogen atoms. Similarly, the hydroxyethylene (-CH(OH)CH₂-) linkage can bear a sidechain group attached to the hydroxy substituent. One of skill in the art can readily adapt the other linkage chemistries to provide positively charged sidechain groups using standard synthetic methods.

[0036] In one embodiment, the positively charged backbone is a polypeptide having branching groups (also referred to as efficiency groups). As used herein, an efficiency group or branching group is any agent that has the effect of promoting the translocation of the positively charged backbone through a tissue or cell membrane. Non-limiting examples of branching or efficiency groups include -(gly)_{n1}-(arg)_{n2}, HIV-TAT or fragments thereof, or the protein transduction domain of Antennapedia, or a fragment thereof, in which the subscript n1 is an integer of from 0 to 20, more preferably 0 to 8, still more preferably 2 to 5, and the subscript n2 is independently an odd integer of from about 5 to about 25, more preferably about 7 to about 17, most preferably about 7 to about 13. Still further preferred are those embodiments in which the HIV-TAT fragment has the formula (gly)_p-RGRDDRRQRRR-(gly)_q, (gly)_p-YGRKKRRQRRR-(gly)_q or (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q wherein the subscripts p and q are each independently an integer of from 0 to 20 and the fragment is attached to the backbone via either the C-terminus or the N-terminus of the fragment. Preferred HIV-TAT fragments are those in which the subscripts p and q are

each independently integers of from 0 to 8, more preferably 2 to 5. In another preferred embodiment the positively charged side chain or branching group is the Antennapedia (Antp) protein transduction domain (PTD), or a fragment thereof that retains activity. Preferably the positively charged carrier includes side-chain positively charged branching groups in an amount of at least about 0.05 %, as a percentage of the total carrier weight, preferably from about 0.05 to about 45 weight %, and most preferably from about 0.1 to about 30 weight %. For positively charged branching groups having the formula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, the most preferred amount is from about 0.1 to about 25 %.

[0037] In another embodiment, the backbone portion is a polylysine and positively charged branching groups are attached to the lysine sidechain amino groups. The polylysine may have a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000, preferably from about 25,000 to about 1,200,000, and most preferably from about 100,000 to about 1,000,000. It can be any of the commercially available (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) polylysines such as, for example, polylysine having MW > 70,000, polylysine having MW of 70,000 to 150,000, polylysine having MW 150,000 to 300,000 and polylysine having MW > 300,000. The selection of an appropriate polylysine will depend on the remaining components of the composition and will be sufficient to provide an overall net positive charge to the composition and provide a length that is preferably from one to four times the combined length of the negatively charged components. Preferred positively charged branching groups or efficiency groups include, for example, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg (-Gly₃Arg₇) or HIV-TAT. In another preferred embodiment the positively charged backbone is a long chain polyalkyleneimine such as a polyethyleneimine, for example, one having a molecular weight of about 1,000,000.

[0038] The positively charged backbones or carrier molecules comprising polypeptides or polyalkyleneimines, having the branching groups described above, are novel compounds and form an aspect of this invention.

[0039] In one embodiment of the invention, only a positively charged carrier that has positively charged branching groups is necessary for transdermal delivery of the botulinum toxin. In certain embodiments, the positively charged carrier is a polypeptide (e.g., lysine, arginine, ornithine, homoarginine, and the like) having

multiple positively charged side-chain groups, as described above. Preferably, the polypeptide has a molecular weight of at least about 10,000. In another embodiment, the positively charged carrier is a nonpeptidyl polymer such as a polyalkyleneimine having multiple positively charged side-chain groups having a molecular weight of at least about 100,000. Such polyalkyleneimines include polyethylene- and polypropyleneimines. In either instance, for use as the sole necessary agent for transdermal delivery the positively charged carrier molecule includes positively charged branching or efficiency groups, comprising $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, in which the subscript $n1$ is an integer of from 0 to 20 more preferably 0 to 8, still more preferably 2 to 5, and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25, more preferably from about 7 to about 17, and most preferably from about 7 to about 13, HIV-TAT or fragments thereof, or Antennapedia PTD or a fragment thereof. Preferably the side-chain or branching groups have the general formula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ as described above. Other preferred embodiments are those in which the branching or efficiency groups are HIV-TAT fragments that have the formula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, or $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$, wherein the subscripts p and q are each independently an integer of from 0 to 20 and the fragment is attached to the carrier molecule via either the C-terminus or the N-terminus of the fragment. The side branching groups can have either the D- or L-form (R or S configuration) at the center of attachment. Preferred HIV-TAT fragments are those in which the subscripts p and q are each independently integers of from 0 to 8, more preferably 2 to 5. Other preferred embodiments are those in which the branching groups are Antennapedia PTD groups or fragments thereof that retain the group's activity. These are known in the art, for instance, from Console et al., J. Biol. Chem. 278:35109 (2003). Preferably, the positively charged carrier includes side-chain positively charged branching groups in an amount of at least about 0.05 %, as a percentage of the total carrier weight, preferably from about 0.05 to about 45 weight %, and most preferably from about 0.1 to about 30 weight %. For positively charged branching groups having the formula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, the most preferred amount is from about 0.1 to about 25 %.

[0040] In another embodiment, the carrier is a polylysine with positively charged branching groups attached to the lysine side-chain amino groups. The polylysine used in this particularly embodiment can be any of the commercially

available (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, e.g.) polylysines such as, for example, polylysine having MW > 70,000, polylysine having MW of 70,000 to 150,000, polylysine having MW 150,000 to 300,000 and polylysine having MW > 300,000. However, preferably the polylysine has MW of at least about 10,000. Preferred positively charged branching groups or efficiency groups include, for example, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg (-Gly₃Arg₇), HIV-TAT or fragments of it, and Antennapedia PTD or fragments thereof.

[0041] In other embodiments of this invention, the carrier is a relatively short polylysine or polyethyleneimine (PEI) backbone (which may be linear or branched) and which has positively charged branching groups. Such carriers are useful for minimizing uncontrolled aggregation of the backbones and botulinum toxin in a therapeutic composition, which causes the transport efficiency to decrease dramatically. When the carrier is a relatively short linear polylysine or PEI backbone, the backbone will have a molecular weight of less than 75,000, more preferably less than 30,000, and most preferably, less than 25,000. When the carrier is a relatively short branched polylysine or PEI backbone, however, the backbone will have a molecular weight less than 60,000, more preferably less than 55,000, and most preferably less than 50,000. If, however, partitioning agents as described herein are included in the composition, the molecular weight of the branched polylysine and PEI backbones may be up to 75,000, while the molecular weight of the linear polylysine and PEI backbones may be up to 150,000.

[0042] The term "botulinum toxin" as used herein is meant to refer to any of the known types of botulinum toxin, whether produced by the bacterium or by recombinant techniques, as well as any such types that may be subsequently discovered including engineered variants or fusion proteins. As mentioned above, at the present time, seven immunologically distinct botulinum neurotoxins have been characterized, namely botulinum neurotoxin serotypes A, B, C, D, E, F and G, each of which is distinguished by neutralization with type-specific antibodies. The botulinum toxin serotypes are available from Sigma-Aldrich and from Metabionics, Inc. (Madison, Wisconsin), as well as from other sources. The different serotypes of botulinum toxin vary in the animal species that they affect and in the severity and duration of the paralysis they evoke. At least two types of botulinum toxin, types A and B, are available commercially in formulations for treatment of certain conditions.

Type A, for example, is contained in preparations of Allergan having the trademark BOTOX and of Ipsen having the trademark DYSPORT®, and type B is contained in preparations of Elan having the trademark MYOBLOC®.

[0043] The botulinum toxin used in the compositions of this invention can alternatively be a botulinum toxin derivative, that is, a compound that has botulinum toxin activity but contains one or more chemical or functional alterations on any part or on any chain relative to naturally occurring or recombinant native botulinum toxins. For instance, the botulinum toxin may be a modified neurotoxin (e.g., a neurotoxin which has at least one of its amino acids deleted, modified or replaced, as compared to a native, or a recombinantly produced neurotoxin or a derivative or fragment thereof). For instance, the botulinum toxin may be one that has been modified in a way that, for instance, enhances its properties or decreases undesirable side effects, but that still retains the desired botulinum toxin activity. The botulinum toxin may be any of the botulinum toxin complexes produced by the bacterium, as described above. Alternatively, the botulinum toxin may be a toxin prepared using recombinant or synthetic chemical techniques (e.g. a recombinant peptide, a fusion protein, or a hybrid neurotoxin, as prepared from subunits or domains of different botulinum toxin serotypes (see U.S. patent 6,444,209, for instance)). The botulinum toxin may also be a portion of the overall molecule that has been shown to possess the necessary botulinum toxin activity, and in such case may be used per se or as part of a combination or conjugate molecule, for instance a fusion protein. Additionally, the botulinum toxin may be in the form of a botulinum toxin precursor, which may itself be non-toxic, for instance a nontoxic zinc protease that becomes toxic on proteolytic cleavage.

[0044] This invention also contemplates the general use of combinations and mixtures of botulinum toxins, although due to their differing nature and properties, mixtures of botulinum toxin serotypes are not generally administered at this time in the health-care or cosmetic industries.

[0045] Compositions of this invention are preferably in the form of products to be applied to the skin or epithelium of subjects or patients, i.e. humans or other mammals in need of the particular treatment. The term "in need" is meant to include both pharmaceutical or health-related needs, for example, treating conditions involving undesirable facial muscle spasms, as well as cosmetic and subjective needs,

for example, altering or improving the appearance of facial tissue. In general the compositions are prepared by mixing the botulinum toxin with the carrier, and usually with one or more additional pharmaceutically acceptable carriers or excipients. In their simplest form they may contain a simple aqueous pharmaceutically acceptable carrier or diluent, such as buffered saline. However, the compositions may contain other ingredients typical in topical pharmaceutical or cosmeceutical compositions, including a dermatologically or pharmaceutically acceptable carrier, vehicle or medium, (i.e. a carrier, vehicle or medium that is compatible with the tissues to which they will be applied.) The term "dermatologically or pharmaceutically acceptable," as used herein, means that the compositions or components thereof so described are suitable for use in contact with these tissues or for use in patients in general without undue toxicity, incompatibility, instability, allergic response, and the like. As appropriate, compositions of the invention may comprise any ingredient conventionally used in the fields under consideration, and particularly in cosmetics and dermatology. The compositions also may include a quantity of a small anion, preferably a polyvalent anion, for example, phosphate, aspartate, or citrate.

[0046] In terms of their form, compositions of this invention may include solutions, emulsions (including microemulsions), suspensions, creams, lotions, gels, powders, or other typical solid or liquid compositions used for application to skin and other tissues where the compositions may be used. Such compositions may contain, in addition to the botulinum toxin and carrier, other ingredients typically used in such products, such as antimicrobials, moisturizers and hydration agents, penetration agents, preservatives, emulsifiers, natural or synthetic oils, solvents, surfactants, detergents, , emollients, antioxidants, fragrances, fillers, thickeners, waxes, odor absorbers, dyestuffs, coloring agents, powders, , and optionally including anesthetics, anti-itch additives, botanical extracts, conditioning agents, darkening or lightening agents, glitter, humectants, mica, minerals, polyphenols, silicones or derivatives thereof, sunblocks, vitamins, and phytomedicinals.

[0047] In particularly preferred embodiments, the compositions include gelling agents and/or viscosity-modifying agents. These agents are generally added to increase the viscosity of the composition, so as to make the application of the composition easier and more accurate. Additionally, these agents help to prevent the aqueous botulinum toxin/carrier solution from drying out, which tends to cause a

decrease in the activity of the botulinum toxin. Particularly preferred agents are those that are uncharged and do not interfere with the botulinum toxin activity or the efficiency of the toxin-carrier complexes in crossing skin. The gelling agents may be certain cellulose-based gelling agents, such as hydroxypropylcellulose (HPC) for example. In some embodiments, the botulinum toxin/carrier complex is formulated in a composition having 2-4% HPC. Alternatively, the viscosity of a solution containing a botulinum toxin/carrier complex may be altered by adding polyethylene glycol (PEG). In other embodiments, the botulinum toxin/carrier solution is combined with pre-mixed viscous agents, such as Cetaphil® moisturizer.

[0048] The compositions of this invention may optionally include partitioning agents. As used herein, a "partitioning agent" is any substance or additive that has the property of preventing or minimizing unwanted or uncontrolled aggregation of the botulinum toxin with the carriers of this invention. Partitioning agents may be useful, for example, when a concentrated botulinum toxin solution must be employed due to volume constraints. In these cases, the partitioning agent keeps the botulinum toxin dispersed, thereby preventing aggregation of the toxin that would otherwise occur without the partitioning agent. Generally, a partitioning agent is (1) non-irritating, (2) does not destroy the botulinum toxin, (3) does not confer any increase in permeability, (4) affords reliable and stable particle sizes, (5) is uncharged, and (6) does not interfere with complexes of the toxin and the transdermal carrier. An example of a suitable partitioning agent is ethanol (EtOH). In preferred embodiments, the EtOH is less than 20% of the composition, and most preferably, less than 5% of the composition.

[0049] By way of example, if volume constraints require reconstituting 100 U of botulinum toxin in 0.5 ml of solution, rather than 2.5 ml, one typically observes that the botulinum toxin will exhibit undesirable aggregation, and thus lowered activity. However, by adding 1% EtOH as a dispersing agent, fully activity is maintained even after 24 hours at this concentration. As another example, Botox® at 1.0 ml 0.9% NaCl reconstitution has full activity, while reconstitution at 0.5 ml in 1% and 5% EtOH plus 0.9% NaCl produces solutions with full activity.

[0050] In certain embodiments of this invention, oligo- or polyanion bridges are added to the botulinum toxin compositions to improve the complexation of the toxin with a positively charged backbone carrier. As is well known in the art,

botulinum toxin is actually a complex of different proteins, some of which are positively charged, and some of which are negatively charged. Because the exact distribution of the components of the toxin varies depending on the source of the toxin, it may be that botulinum toxin from certain sources has a lower propensity for complexation with the positively charged backbones described herein. However, one aspect of this invention is the discovery that by adding an oligo- or polyanion bridge to such botulinum toxins, the efficiency and efficacy of topical administration is increased dramatically. Suitable examples of such oligo-/polyanion bridges include sodium phosphate (5%), PBS or 5% poly-L-aspartate (e.g., with a MW of 3000).

[0051] Compositions according to this invention may be in the form of controlled-release or sustained-release compositions, wherein the botulinum toxin and the carrier are encapsulated or otherwise contained within a material such that they are released onto the skin in a controlled manner over time. The botulinum toxin and carrier may be contained within matrixes, liposomes, vesicles, microcapsules, microspheres and the like, or within a solid particulate material, all of which is selected and/or constructed to provide release of the botulinum toxin over time. The botulinum toxin and the carrier may be encapsulated together (e.g., in the same capsule) or separately (in separate capsules).

[0052] Using the compositions described herein, botulinum toxin can be delivered to muscles underlying the skin, or to glandular structures within the skin, in an effective amount to produce paralysis, produce relaxation, alleviate contractions, prevent or alleviate spasms, reduce glandular output, or other desired effects. Local delivery of the botulinum toxin in this manner could afford dosage reductions, reduce toxicity and allow more precise dosage optimization for desired effects relative to injectable or implantable materials.

[0053] The compositions of the invention are applied so as to administer an effective amount of the botulinum toxin. The term "effective amount" as used herein means an amount of a botulinum toxin as defined above that is sufficient to produce the desired muscular paralysis or other biological or aesthetic effect, but that implicitly is a safe amount, i.e. one that is low enough to avoid serious side effects. Desired effects include the relaxation of certain muscles with the aim of, for instance, decreasing the appearance of fine lines and/or wrinkles, especially in the face, or adjusting facial appearance in other ways such as widening the eyes, lifting the

25
23

corners of the mouth, or smoothing lines that fan out from the upper lip, or the general relief of muscular tension. The last-mentioned effect, general relief of muscular tension, can be effected in the face or elsewhere. The compositions of the invention may contain an appropriate effective amount of the botulinum toxin for application as a single-dose treatment, or may be more concentrated, either for dilution at the place of administration or for use in multiple applications. Through the use of the positively charged carriers of this invention, a botulinum toxin can be administered transdermally to a subject for treating conditions such as undesirable facial muscle or other muscular spasms, hyperhidrosis, acne, or conditions elsewhere in the body in which relief of muscular ache or spasms is desired. The botulinum toxin is administered topically for transdermal delivery to muscles or to other skin-associated structures. The administration may be made, for example, to the legs, shoulders, back (including lower back), axilla, palms, feet, neck, groin, dorsa of the hands or feet, elbows, upper arms, knees, upper legs, buttocks, torso, pelvis, or any other part of the body where administration of the botulinum toxin is desired.

[0054] Administration of botulinum toxin may also be carried out to treat other conditions, including treating of neurologic pain, prevention or reduction of migraine headache or other headache pain, prevention or reduction of acne, prevention or reduction of dystonia or dystonic contractions (whether subjective or clinical), prevention or reduction of symptoms associated with subjective or clinical hyperhidrosis, reducing hypersecretion or sweating, reducing or enhancing immune response, or treatment of other conditions for which administration of botulinum toxin by injection has been suggested or performed.

[0055] Administration of botulinum toxin or other therapeutic proteins described herein may also be carried out for immunization-related purposes. Surprisingly, administration of botulinum toxin described herein may be carried out to reduce immune responses. More specifically, this invention allows a botulinum toxin to be delivered by an altered route of administration, thereby changing the complex antigen presentation of the agent. In this way, the invention may be useful to reduce immune response to antigens to botulinum toxin, and to facilitate repeat administration without immune-related reduction in activity. Alternatively, the complex can be prepared and applied topically to enhance an immune response, for example to provide immunizations respecting various proteins, for example, for

childhood immunizations without injections. For use in connection with immune-related activity, an "effective amount" refers to an amount of the botulinum toxin sufficient to allow a subject to mount an immune response to the botulinum toxin after application or a series of applications of it.

[0056] Most preferably, the compositions are administered by or under the direction of a physician or other health care professional. They may be administered in a single treatment or in a series of periodic treatments over time. For transdermal delivery of botulinum toxin for the purposes mentioned above, a composition as described above is applied topically to the skin at a location or locations where the effect is desired. In embodiments where an aqueous botulinum toxin/carrier solution is applied directly to the skin, it is preferable to cover the treated area (e.g., with Cetaphil® moisturizer) or occlude the treated area with a barrier (e.g., Telfa), in order to prevent the solution from drying out, which would lead to a decrease in toxin activity. Because of its nature, most preferably the amount of botulinum toxin applied should be applied with care, at an application rate and frequency of application that will produce the desired result without producing any adverse or undesired results. Accordingly, for instance, topical compositions of the invention should be applied at a rate of from about 1U to about 20,000U, preferably from about 1U to about 10,000U botulinum toxin per cm² of skin surface. Higher dosages within these ranges could preferably be employed in conjunction with controlled release materials, for instance, or allowed a shorter dwell time on the skin prior to removal.

[0057] Proper preparation of the skin surface prior to the application of the botulinum toxin/carrier composition is important for maintaining the efficacy of the solution. For example, the introduction of surfactants on the surface of the skin for the purpose of cleaning off surface oils on the skin prior to application is surprisingly counterproductive, because the surfactants appear to destroy the activity of the botulinum toxin. This occurs even if the skin is subsequently washed with water several times before application of the botulinum toxin/carrier solution. Even extremely gentle surfactants, such as those found in baby wipes, appear to cause this phenomenon. Accordingly, in preferred methods of administering the compositions of this invention, the skin is pre-cleaned using water alone. Washing with only water also appears to improve the transdermal transport of the botulinum toxin moderately.

[0058] Additionally, the skin may be stripped to reduce the stratum corneum layer prior to application of the botulinum toxin/carrier complex. In principle, the process of stripping the skin should lead to enhanced efficiency of transdermal transport of botulinum toxin. However, the method used to strip the skin is important. For example, acetone-mediated reduction of the stratum corneum layer in humans or animals appears to reduce the activity of subsequently applied botulinum toxin. In contrast, tape stripping (i.e., applying tape on the surface of the skin and then removing the tape) appears to allow deeper penetration of the botulinum toxin and dosage reduction in both mouse models and humans. It is presumed that abrasion of the skin surface (e.g., via the use of abrasive pads) would cause a similar effect as tape stripping.

[0059] This invention also comprises devices for transdermal transmission of a composition that contains botulinum toxin and a carrier that has a positively charged backbone with attached branching groups as defined herein. Such devices may be as simple in construction as a skin patch, or may be more complicated devices that include means for dispensing and monitoring the dispensing of the composition, and optionally means for monitoring the condition of the subject (e.g., monitoring the reaction of the subject to the substances being dispensed).

[0060] It should be noted that the choice of materials for the construction of the device is important. Preferred materials for the construction of delivery devices are those that do not lead to a loss of activity of the botulinum toxin/carrier solution, either through degradation or unwanted adsorption of the botulinum toxin on a surface of the device. Such undesired behavior has been observed, for example, when botulinum toxin/carrier in an aqueous solution contacts polypropylene surfaces, but not when the botulinum toxin/carrier solution contacts polyvinyl chloride (PVC) surfaces.

[0061] Generally, the compositions can be pre-formulated and/or pre-installed in a device or can be prepared later, for example using a kit that houses the two ingredients (botulinum toxin and carrier) separately but provides means for combining them at or prior to the time of application. The amount of carrier molecule or the ratio of it to the botulinum toxin will depend on which carrier is chosen for use in the composition in question. The appropriate amount or ratio of carrier molecule in a

given case can readily be determined, for example, by conducting one or more experiments, such as those described below.

[0062] In general, the invention also comprises a method for administering a botulinum toxin to a subject or patient in need thereof. The method includes comprising topically administering an effective amount of the botulinum toxin in conjunction with a carrier having a positively charged backbone with attached positively charged branching groups, as described herein. By "in conjunction with" is meant that the two components (botulinum toxin and carrier) are administered in a combination procedure, which may involve either combining them in a composition, which is subsequently administered to the subject, or administering them separately, but in a manner such that they act together to provide the requisite delivery of an effective amount of the therapeutic protein. For example, a composition containing the carrier may first be applied to the skin of the subject, followed by applying a skin patch or other device containing the botulinum toxin. The botulinum toxin may be incorporated in dry form in a skin patch or other dispensing device, while the positively charged carrier may be applied to the skin surface before application of the patch so that the two act together, resulting in the desired transdermal delivery. Thus, the two substances (carrier and botulinum toxin) act in combination or perhaps interact to form a composition or combination in situ. Accordingly, the invention also comprises a kit that includes both a device for dispensing botulinum toxin via the skin and a liquid, gel, cream or the like that contains the carrier or backbone, and that is suitable for applying to the skin or epithelium of a subject. Kits for administering the compositions of the inventions, either under direction of a health care professional or by the patient or subject, may also include a custom applicator suitable for that purpose.

[0063] The compositions, kits and methods of this invention allow for the delivery of a more pure botulinum toxin with higher specific activity and potentially improved pharmacokinetics. In addition, the carrier can act as a stabilizer, reducing the need for foreign accessory proteins (e.g., human serum albumin ranging from 400-600 mg or recombinant serum albumin ranging from 250-500 mg) and/or polysaccharide stabilizers, and can afford beneficial reductions in immune responses to the botulinum toxin. In addition, the compositions are suitable for use in physiologic environments with pH ranging from about 4.5 to about 6.3, and may thus

have such a pH. The compositions according to this invention may be stored either at room temperature or under refrigerated conditions.

[0064] The following are representative examples of the invention. They demonstrate delivery of functional botulinum neurotoxin complexes across skin without requiring covalent modification of the neurotoxin to be delivered.

EXAMPLES

EXAMPLE 1.

Transport of a botulinum toxin in vivo using a peptidyl carrier.

[0065] This experiment demonstrates the use of a peptidyl carrier to transport a large complex containing an intact labeled protein botulinum toxin across intact skin after a single time administration relative to controls.

Backbone selection:

[0066] The positively charged backbone was assembled by conjugating –Gly₃Arg₇ to polylysine (MW 112,000) via the carboxyl of the terminal glycine to free amines of the lysine side chains at a degree of saturation of 18% (i.e., 18 out of each 100 lysine residues is conjugated to a –Gly₃Arg₇). The modified backbone was designated “KNR”. The control polycation was unmodified polylysine (designated “K”, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) of the same size and from the same lot.

Therapeutic agent:

[0067] Botox® brand of botulinum toxin A (Allergan) was selected for this experiment. It has a molecular weight of approximately 150,000.

Preparation of samples

[0068] The botulinum toxin was reconstituted according to the manufacturer's instructions. An aliquot of the protein was biotinylated with a calculated 12-fold molar excess of sulfo-NHS-LC biotin (Pierce Chemical). The labeled product was designated “Btox-b”.

[0069] In each case, an excess of polycation was employed to assemble a final complex that has an excess of positive charge as in delivery of highly negative large nucleotide complexes. A net neutral or positive charge prevents repulsion of the

protein complex from highly negative cell surface proteoglycans and extracellular matrix. Btox-b dose was standardized across all groups, as was total volume and final pH of the composition to be applied topically. Samples were prepared as follows:

[0070] Group labeled "JMW-7": 2.0 units of Btox-b per aliquot (i.e. 20 U total) and peptidyl carrier KNR at a calculated MW ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 200 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 1.8 ml of Cetaphil® lotion and aliquoted in 200 microliter portions.

[0071] Group labeled "JMW-8": 2.0 units of Btox-b per aliquot (i.e. 20 U total) and K at a MW ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 200 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 1.8 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

Animal experiments to determine transdermal delivery efficiencies after single time treatment with peptidyl carriers and labeled Btox:

[0072] Animals were anesthetized via inhalation of isoflurane during application of treatments. After being anesthetized, C57 black 6 mice (n=4 per group) underwent topical application of a metered 200 microliter dose of the appropriate treatment applied to the cranial portion of dorsal back skin (selected because the mouse cannot reach this region with mouth or limbs). Animals did not undergo depilation. At 30 minutes after the initial treatment, mice were euthanized via inhalation of CO₂, and treated skin segments were harvested at full thickness by blinded observers. Treated segments were divided into three equal portions; the cranial portion was fixed in 10% neutral buffered formalin for 12-16 hours then stored in 70% ethanol until paraffin embedding. The central portion was snap-frozen and employed directly for biotin visualization by blinded observers as summarized below. The treated caudal segment was snap frozen for solubilization studies.

[0073] Biotin visualization was conducted as follows. Briefly, each section was immersed for 1 hour in NeutrAvidin® buffer solution. To visualize alkaline phosphatase activity, cross sections were washed in saline four times then immersed in NBT/BCIP (Pierce Scientific) for 1 hour. Sections were then rinsed in saline and photographed in entirety on a Nikon E600 microscope with plan-apochromat lenses.

Data handling and statistical analysis:

[0074] Total positive staining was determined by blinded observer via batch image analysis using Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) and was normalized to total cross-sectional area to determine percent positive staining for each. Mean and standard error were subsequently determined for each group with analysis of significance at 95% confidence in one way ANOVA repeated measures using Statview software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:

[0075] The mean cross-sectional area that was positive for biotinylated botulinum toxin was reported as percent of total area after single-time topical administration of Btox-b with either KNR ("EB-Btox") or K ("nl"). The results are presented in the following Table 1 and are illustrated in Figure 1. In Figure 1, the area positive for label was determined as percent of total area after three days of once daily treatment with "EB-Btox" which contained Btox-b and the peptidyl carrier KNR and "nl", which contained Btox-b with polycation K as a control. Mean and standard error are depicted for each group.

Table 1. Mean and standard error for labeled botulinum toxin area as percent of total cross-section after single time topical administration of Btox-b with KNR (JMW-7) or K (JMW-8) for 30 minutes.

Group	Mean	Std. Error
JMW-7	33	5.333334
JMW-8	8.666667	0.333334

P=0.0001 (Significant at 99%)

EXAMPLE 2.**Therapeutic efficacy of a topical botulinum toxin preparation with a peptidyl carrier.**

[0076] Example 1 demonstrated that the peptidyl transdermal carrier allowed efficient transfer of botulinum toxin after topical administration in a murine model of intact skin. However, this experiment did not indicate whether the complex protein botulinum toxin was released in a functional form after translocation across skin. The

following experiment was thus constructed to evaluate whether botulinum toxin can be therapeutically delivered across intact skin as a topical agent using this peptidyl carrier (again, without covalent modification of the protein).

[0077] The positively charged backbone was again assembled by conjugating $\text{-Gly}_3\text{Arg}_7$ to polylysine (MW 112,000) via the carboxyl of the terminal glycine to free amines of the lysine side chains at a degree of saturation of 18% (i.e., 18 out of each 100 lysine residues is conjugated to a $\text{-Gly}_3\text{Arg}_7$). The modified backbone was designated "KNR". Control polycation was unmodified polylysine (designated "K", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) of the same size and from the same lot. The same botulinum toxin therapeutic agent was used as in Example 1, and was prepared in the same manner. Samples were prepared as follows:

[0078] Group labeled "JMW-9": 2.0 units of botulinum toxin per aliquot (i.e. 60 U total) and peptidyl carrier KNR at a calculated MW ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

[0079] Group labeled "JMW-10": 2.0 units of botulinum toxin per aliquot (i.e. 60 U total) and K at a MW ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

[0080] Group labeled "JMW-11": 2.0 units of botulinum toxin per aliquot (i.e. 60 U total) without polycation was diluted to 600 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

Animal experiments to determine therapeutic efficacy after single time treatment with peptidyl carriers and botulinum toxin:

[0081] Animals were anesthetized via inhalation of isoflurane during application of treatments. After being anesthetized, C57 black 6 mice (n=4 per group) underwent topical application of metered 400 microliter dose of the appropriate treatment applied uniformly from the toes to the mid-thigh. Both limbs were treated, and treatments were randomized to either side. Animals did not undergo depilation. At 30 minutes after the initial treatment, mice were evaluated for digital abduction

capability according to published digital abduction scores for foot mobility after botulinum toxin administration [Aoki, KR. *A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice*. Toxicon. 2001 Dec; 39(12): 1815-20]. Mouse mobility was also subjectively assessed.

Data handling and statistical analysis:

[0082] Digital abduction scores were tabulated independently by two blinded observers. Mean and standard error were subsequently determined for each group with analysis of significance at 95% confidence in one way ANOVA repeated measures using Statview software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:

[0083] Mean digital abduction scores after single-time topical administration of botulinum toxin with KNR ("JMW-9"), K ("JMW-10") or diluent without polycation ("JMW-11"), are presented in table 2 and illustrated in the representative photomicrograph of figure 2 below. The peptidyl carrier KNR afforded statistically significant functional delivery of the botulinum toxin across skin relative to both controls, which were comparable to one another. Additional independent repetitions (total of three independent experiments all with identical conclusions in statistically significant paralysis from topical botulinum toxin with KNR but not controls) of the present experiment confirmed the present findings and revealed no significant differences between topical botulinum toxin with or without K (i.e. both controls). Interestingly, the mice consistently ambulated toward a paralyzed limb (which occurred in 100% of treated animals and 0% of controls from either control group). As shown in Figure 2, a limb treated with botulinum toxin plus the control polycation polylysine or with botulinum toxin without polycation ("Botox alone") can mobilize digits (as a defense mechanism when picked up), but the limbs treated with botulinum toxin plus the peptidyl carrier KNR ("Essentia Botox lotion") could not be moved.

Table 2 : Digital abduction scores 30 minutes after single-time topical application of botulinum toxin with the peptidyl carrier KNR ("JMW-9"), with a control polycation K ("JMW-10"), or alone ("JMW-11").

Group	Mean	Std. Error
-------	------	------------

JMW-9	3.333	0.333
JMW-10	0.333	0.333
JMW-11	0.793	0.300

P=0.0351 (Significant at 95%)

Conclusions:

[0084] This experiment serves to demonstrate that the peptidyl transdermal carrier can transport a therapeutically effective amount of botulinum therapeutic across skin without covalent modification of the therapeutic. The experiment also confirms that botulinum toxin does not function when applied topically in controls.

EXAMPLE 3.

Therapeutic efficacy of a topical botulinum toxin preparation with a nonpeptidyl carrier.

[0085] This experiment demonstrates the performance of a non-peptidyl carrier in the invention.

Methods:

Backbone selection:

[0086] The positively charged backbone was assembled by conjugating –Gly₃Arg₇ to polyethyleneimine (PEI) MW 1,000,000 via the carboxyl of the terminal glycine to free amines of the PEI side chains at a degree of saturation of 30% (i.e., 30 out of each 100 lysine residues is conjugated to a –Gly₃Arg₇). The modified backbone was designated “PEIR” to denote the large nonpeptidyl carrier. Control polycation was unmodified PEI (designated “PEI”, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) of the same size and from the same lot. The same botulinum toxin therapeutic agent was used as in example 1.

[0087] Botulinum toxin was reconstituted from the Botox product according to the manufacturer's instructions. In each case, an excess of polycation was employed to assemble a final complex that had an excess of positive charge as in delivery of highly negative large nucleotide complexes. A net neutral or positive charge prevents repulsion of the protein complex from highly negative cell surface proteoglycans and extracellular matrix. The botulinum toxin dose was standardized

across all groups as was total volume and final pH of the composition to be applied topically. Samples were prepared as follows:

[0088] Group labeled "AZ": 2.0 units of botulinum toxin per aliquot (i.e. 60 U total) and the nonpeptidyl carrier PEIR in ultrapure form at a calculated MW ratio of 5:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

[0089] Group labeled "BA": 2.0 units of botulinum toxin per aliquot (i.e. 60 U total) and PEI at a charge ratio of 5:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

Animal experiments to determine therapeutic efficacy after single time treatment:

[0090] Animals were anesthetized via inhalation of isoflurane during application of treatments. After being anesthetized, C57 black 6 mice (n=3 per group) underwent topical application of metered 400 microliter dose of the appropriate treatment applied uniformly from the toes to the mid-thigh. Both limbs were treated, and treatments were randomized to either side. Animals did not undergo depilation. At 30 minutes after the initial treatment, mice were evaluated for digital abduction capability according to published digital abduction scores for foot mobility after botulinum toxin administration [Aoki, KR. *A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice*. Toxicon. 2001 Dec; 39(12): 1815-20]. Mouse mobility was also subjectively assessed.

Data handling and statistical analysis:

[0091] Digital abduction scores were tabulated independently by two blinded observers. Mean and standard error were subsequently determined for each group with analysis of significance at 95% confidence in one way ANOVA repeated measures using Statview software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:

[0092] Mean digital abduction scores after single-time topical administration of botulinum toxin with ultrapure PEIR ("AZ"), or control polycation PEI ("BA"), are

presented in table 3 and repetition presented as table 4 (single independent repetition for this experiment). The nonpeptidyl carrier PEIR afforded statistically significant functional delivery of botulinum toxin across skin relative to controls. As before, animals were observed to walk in circles toward the paralyzed limbs.

Table 3. Digital abduction scores 30 minutes after single-time topical administration of Botox with ultrapure PEIR ("AZ"), or control polycation PEI ("BA"). Mean and standard error are presented.

Group	Mean	Std. Error
BA	0.833	0.307
AZ	3.917	0.083

P=0.0002 (Significant at 99%)

Table 4. Digital abduction scores 30 minutes after single-time topical administration of Botox with ultrapure PEIR ("AZ1"), or control polycation PEI ("BA1"). Mean and standard error are presented.

Group	Mean	Std. Error
BA1	0.333	0.211
AZ1	3.833	0.167

P=0.0001 (Significant at 99%)

Conclusions:

[0093] This experiment demonstrated that the nonpeptidyl transdermal carrier can transport therapeutic doses of botulinum toxin across skin without prior covalent modification of the botulinum toxin. These findings complement those with peptidyl transfer agents. The option of using a nonpeptidyl or a peptidyl carrier to achieve the therapeutic effect will allow tailoring to specific circumstances, environments, and methods of application and add to the breadth of the transdermal delivery platform of this invention.

EXAMPLE 4.

Therapeutic efficacy of a topical botulinum toxin preparation with peptidyl carrier for forehead hyperhidrosis and wrinkles.

[0094] This experiment demonstrates that botulinum toxin can be therapeutically delivered across intact skin as a topical agent using this peptidyl carrier for the treatment of forehead hyperhidrosis and wrinkles on human subjects.

Experimental Procedure for Forehead Hyperhidrosis and Wrinkles Study:

[0095] Baseline and post-treatment photographs of the subject's forehead were taken on a blue background using a Nikon D70 camera with Nikon TTL Macro-speedlight SB29s flash (Nikon, Inc. USA).

[0096] Baseline and post-treatment videos of the subject's forehead were taken on a blue background using a Sony Digital Handycam camcorder.

[0097] Minor's starch/iodine test was performed to visualize sweat production using 10% topical povidone iodine solution (Walgreen Co., Deerfield, Illinois) and Kingsford's 100% corn starch (ACH Food Companies, Inc., Memphis, Tennessee). The subject's forehead was painted with an iodine solution using sterile cotton balls (Johnson & Johnson Consumer Product Company, Skillman, New Jersey), and then allowed to dry completely. The area was lightly dusted with starch powder using sterile cotton balls. The sweat was induced with physical activity at ambient room temperature. Dark blue-black spots appeared as the sweat dissolved the iodine and reacted with starch powder. Baseline and post-treatment photographs of iodine-starch test were taken on a blue background using a Nikon D70 camera with Nikon TTL Macro-speedlight SB29s flash. The subject's forehead was cleansed with 70% EtOH and then deionized water.

[0098] The subject's predefined treatment area on the forehead was prepared by non-invasive tape stripping method for stratum corneum prior to treatment application. Precut tape was applied to the treatment area with firm pressure for few seconds. It was removed rapidly by pulling on one corner of the tape. The second tape was carefully applied to the same area immediately after the first tape was removed. Tape-stripping was repeated 3-5 times.

Treatment preparation:

[0099] The Botox reconstituting solution of sterile 0.9% sodium chloride (Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) plus 5% EtOH plus 5% short chained polyaspartate solution solution labeled A-3C (Donlar BioPolymer, Inc. Bedford Park,

Illinois) was prepared (i.e., for every 1.0 milliliter solution, 900 microliters of sterile 0.9% sodium chloride plus 50 microliters of 100% EtOH plus 50 microliters of short chained polyaspartate solution). Kn21T was prepared at 1 milligram/milliliter concentration with 0.9% sodium chloride plus 5% EtOH (i.e., 500 microliters of Kn21T was aliquoted and 25 microliters of 100% EtOH was added). As used herein, Kn21T refers to a positively charged polylysine backbone having a molecular weight of 21,000 and TAT branching groups. 100 units of Botox (Allergan, Irvine, CA) was reconstituted with 1.0 milliliters of reconstituting solution using sterile 3 ml latex free syringe with 18G1 1/2 (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey). The reconstituted Botox was carefully mixed by inversion 8 times. 200 units of Botox were used for each subject. The "Essentia Botox solution" was prepared with 200 units of Botox and Kn21T plus 5% EtOH (ie. 2.0 milliliters of Botox was added to 500 microliters of Kn21T plus 25 microliters of 100% EtOH) and sat at room temperature for 5 minutes for the complexes to form.

[0100] The control solution was prepared with reconstituting solution and Kn21T plus 5% EtOH (ie. 2.0 ml of reconstituting solution was added to 500 microliters of Kn21T plus 25 microliters of 100% EtOH) and kept at room temperature.

Treatment application:

[0101] The subject reclined on a table with protective covering around the eyes, face, and upper body. The treatment was applied evenly to the subject's forehead using a pipette and massaged into the skin in circular motion with fingers while wearing powder-free, nitrile gloves. The treatment area was covered with a thin layer of Cetaphil® moisturizing cream (Galderma, Fort Worth, TX) and incubated for 60 minutes. After 60 minute incubation, the treatment was removed with sterile gauze pads. The gauze pads and gloves were discarded in a biohazard bag.

Results:

[0102] Figure 3 depicts significant reduction in wrinkle length depth and width after topical treatment with Peptidyl carrier and botulinum combination. This experiment confirms that topically applied botulinum toxin, when combined with transdermal carrier, can afford significant muscular paralysis to afford a cosmetic

effect. Figure 4 is a Mikrosil cast of the treated skin (A) versus untreated skin (B). Wrinkles are visible on the cast of the untreated skin.

[0103] Figures 5 and 6 show the results of the Minor's starch/iodine test. Figure 5 shows photos taken two minutes after application, with panel (A) corresponding to the side treated with Essentia Botox Lotion, and panel (B) corresponding to the side treated with a control lotion containing Kn21T carrier alone. Figure 6 is the same as Figure 5, except that it was taken at four minutes. Note the more pronounced coloration on the control lotion side, indicating that the skin on that side is secreting more sweat. Also note that the sweating starts earlier on the untreated side.

Conclusions:

[0104] This example demonstrates that topically applied complexes of botulinum toxin can afford significant aesthetic benefit in reducing fine and coarse wrinkles. This transepithelial effect further confirms that muscle paralysis can be accomplished with appropriate carriers after topical application of botulinum toxin complexes such as those disclosed herein. This example thus indicates that topical application of botulinum toxin can lead to relief from muscle spasms such as blepharospasm or torticollis as well as relief of muscle spasm-related pain such as lower back pain.

EXAMPLE 5

**Therapeutic efficacy of a topical botulinum toxin preparation
with peptidyl carrier for axillary hyperhidrosis.**

[0105] This experiment demonstrates whether botulinum toxin can be therapeutically delivered across intact skin as a topical agent using this peptidyl carrier for the treatment of axillary hyperhidrosis on human subjects (n=10 axillae per group with one axilla treated and one control per patient in a randomized double-blind fashion).

Inclusion criteria for axillary hyperhidrosis study:

[0106]

- Age: 18 years or older
- Healthy volunteers

- Informed consent given and signed by the volunteer
- Subject willing to follow instruction and return for follow-up visits.
- Subject has presence of pre-existing, subjective hyperhidrosis
- Subject is NOT pregnant or planning on becoming pregnant within the next 3 months
- Subject lives and/or work in San Francisco or near study area
- Subject has NOT had treatment for underarm sweating within the past 6 months
- Subject is NOT planning on having treatment for underarm sweating within the next 3 months

Gravimetric measurement procedures:

[0107] As a part of the gravimetric measurement procedure, the subjects were first acclimated to the testing area. Specifically, each subject sat for 15 minutes at a room temperature of 72-77 °F in the resting position.

[0108] **Axillae preparation:** (Powder-free, nitrile gloves were worn for the following procedures.) The subject changed into disposable cape and bra (if a woman) or took off all upper body garments (if a man) so as to expose both of the axillae fully. The dose area was predetermined to be the area covered by hair bearing skin, plus an area extending 1 cm beyond the hair bearing skin at each axilla. The dose area was cleaned with a pre-wet sterile gauze pad from a 50 ml conical tube by wiping with 5 long strokes from top to bottom in the same direction using one side of the gauze. This step was repeated *three more times* with a clean pre-wet gauze pad each time while being careful not to irritate or abrade the skin. The gauze pads were discarded in the trash. The same wash procedure was repeated for the other axilla. The axilla was dried with dry sterile gauze by using firm padding motion from top to bottom of the axilla while being careful not to irritate or abrade the skin. Then, the axilla was further dried by placing a filter paper under the axillary crease and allowing the filter to dwell in the test site for 5 minutes following the procedure for gravimetric assessment. The patient sat with their arms against his/her body in a resting position. The filter papers were discarded in the trash. The subject was allowed to rest for 1 minute without axilla manipulation prior to the first gravimetric assessment.

[0109] **Sweat production measurement (gravimetric measurement):** (A new pair of powder-free, nitrile gloves was donned prior to these measurements). The subject held his or her hands together at the back of head to expose axillae fully, while being partially reclined (about 45 degrees). A pre-weighed filter paper was removed from a conical storage tube and placed under the subject's axilla with the tip of the filter aligning with the center of axillary crease line. The filter paper held in place by using fingers while the subject relaxed arms to the side of the body. The subject sat with both arms held tightly against his/her trunk for five minutes. The timing started when the filter papers were securely placed under both of the axillae. Both axillae were measured simultaneously. After 5 minutes, the filter papers were removed from the axillae and placed back into the same respective conical tubes. The filter paper placed first was removed first. The caps of the conical tubes were screwed tightly to prevent the evaporation of the sweat from the tube. The sweat production was repeated two more times at one-minute intervals.

Minor's starch/iodine test:

[0110] The subject held his/her hands together at the back of head to expose the axillae fully. The iodine solution was painted onto the axilla area predetermined as before with a sterile gauze pad and allowed to air-dry. When the iodine had completely dried, a thin layer of starch was padded onto the area covered by iodine with cotton balls. The iodine was allowed to air-dry before the application of starch in order to reduce false positive and background. The subject then sat with both arms held tightly against his/her trunk. After 5 minutes, the subject raised his/her arms and held hands together at the back of head to expose axillae fully. Photographs of each axilla with left and right axilla and the date clearly labeled were taken. The axillae were cleaned with 70% EtOH and then with sterile deionized water.

Treatment preparation:

[0111] Kn21pr was prepared at 1 milligram/milliliter concentration with saline plus 5% EtOH (i.e., 500 microliters of Kn21pr was aliquoted and 25 microliters of 100% EtOH was added). As used herein, Kn21pr refers to a positively charged polylysine backbone with a molecular weight of 21,000 and branching groups comprising protected oligoarginine. 100 units of Botox® (Allergan, Irvine, CA) was reconstituted with 0.75 milliliters of 0.9% sodium chloride (Abbott Laboratories,

North Chicago, Illinois) using sterile 3 ml latex free syringe with 18G 1 1/2 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey). The reconstituted Botox® was carefully mixed by inversion 8 times. 200 units of Botox® were used for each subject. The treatment solution was prepared with 200 units of Botox® and Kn21pr plus 5% EtOH (i.e., 1.5 milliliters of Botox® was added to 500 microliters of Kn21pr plus 25 microliters of 100% EtOH) and kept at room temperature for 5 minutes to allow the complexes to form. After a 5-minute incubation period, approximately 1.0 milliliters of 4% HPC (hydroxypropylcellulose) (with 1% EtOH) was added and mixed gently and thoroughly with a small metal spatula. The homogenous treatment solution was transferred into a 3 ml syringe and syringe tip cap. (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey).

[0112] The control solution was prepared with 0.9% sodium chloride and Kn21pr plus 5% EtOH (i.e. 1.5 milliliters of 0.9% sodium chloride was added to 500 microliters of Kn21pr plus 25 microliters of 100% EtOH) and sat at room temperature for five minutes. After incubation, approximately 1.0 milliliters of 4% HPC (with 1% EtOH) was added and mixed gently and thoroughly with a small metal spatula. The homogenous control solution was transferred into a 3 ml syringe and syringe tip cap.

Treatment application (wear powder-free, nitrile gloves):

[0113] The subject held his/her hands together with interlocking fingers and placed them on the back of the head to fully exposure the subject's axillae. Then, the subject reclined in a chair to an angle of about 45 degrees. As shown in Figure 7, the dose area was visually mapped out (i.e. 1 cm beyond the hair bearing skin) for application. The dose area were checked for dryness. The syringe tip cap was removed from the labeled syringe marked "L" for left and "R" for right, and prepared for application onto the subject's axilla. The treatment solution was spread evenly around the dose area with a syringe and massaged into the skin with fingers for 1 minute. The subject then placed his/her arms down along the side of the body and incubated for 60 minutes. After 60 minute incubation, the treatment was cleaned with sterile gauze pads. The gauze pads and gloves were discarded in a bio-hazard bag. The subject was discharged.

Results:

[0114] Essentia topical BT reduced sweating by 65% and illustrated in Figure 8a. Sweat production 4 weeks after treatment (randomized by side) with Kn21pr backbone alone (control) or kn21pr backbone plus 200U Botox (ratio to baseline). Statistical analyses by Wilcoxon signed ranks using NPSS with P as noted and significance at $P < 0.05$. [n=10 subjects].

[0115] Second comparison: Baseline vs. 4 weeks (See Figure 8b). Sweat production (mg per 5 minutes) 4 weeks after axillary treatment (randomized by side) with kn21pr backbone alone (control) or kn21pr backbone plus 200U Botox (ratio of treatment to control) presented in Table 6. Statistical analyses by Wilcoxon signed ranks using NPSS with P as noted and significance at $P < 0.05$. (Pr T $p = 0.0217$) [n=10].

[0116] Figure 9 shows photographs depicting Minor's starch/iodine test before and after treatment with "Essentia Botox lotion" topically for the treatment of axillary hyperhidrosis. Starch/iodine test at Baseline vs. 2 week is shown where right axilla was treated with "Essentia Botox lotion" (a and c) and left axilla was applied with the control (b and d) for subject #12. These photographs illustrate typical benefits observed after treatment with carrier+botox in starch iodine. Although some crossover is observed on the control side (consistent with 25% reduction in gravimetric data), significant reductions are afforded with treatment (consistent with 65% reduction in gravimetric data on treated side).

Conclusions:

[0117] This example confirms that topical application of botulinum complexes formed according to the invention disclosed herein readily afford therapeutic benefit in reduction of sweating in a cohort of patients with hyperhidrosis – subjective or quantitative. This effect in reducing sweating has also been afforded in the forehead case presented above and in palmar/plantar application when combined with a glove to limit spread of formulation during dwell time. This transepithelial delivery of botulinum toxin complexes for therapeutic benefit confirms further that the approach can be extended to other cases where SNAP function or acetylcholine signals are crucial such as bladder dysfunction or spasm, gastrointestinal applications, or sebaceous gland secretions for smell reduction or acne prevention/treatment.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition comprising a botulinum toxin and a carrier comprising a polymeric backbone having attached positively charged branching groups, wherein the association between the carrier and the botulinum toxin is non-covalent.
2. A composition according to claim 1 in which the botulinum toxin is a botulinum toxin derivative.
3. A composition according to claim 1 in which the botulinum toxin comprises a recombinant botulinum toxin.
4. A composition according to claim 1 in which the botulinum toxin comprises a modified botulinum toxin.
5. A composition according to claim 1 in which the botulinum toxin is selected from botulinum toxin serotypes A, B, C, D, E, F and G.
6. A composition according to claim 5 in which the botulinum toxin is botulinum toxin A.
7. A composition according to claim 5 in which the botulinum toxin is botulinum toxin B.
8. A composition according to claim 5 in which the botulinum toxin is botulinum toxin C₁.
9. A composition according to claim 5 in which the botulinum toxin is botulinum toxin D.
10. A composition according to claim 5 in which the botulinum toxin is botulinum toxin E.
11. A composition according to claim 1 in which the carrier comprises a polypeptide having attached positively charged branching groups selected from – (gly)_{n1}–(arg)_{n2}, HIV-TAT, Antennapedia PTD, and fragments of HIV-TAT or of Antennapedia PTD, in which the subscript n1 is an integer of from 0 to about 20, and the subscript n2 is independently an odd integer of from about 5 to about 25.

12. A composition according to claim 11 in which the carrier comprises a polypeptide having positively charged branching groups selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ in which the subscript $n1$ is an integer of from about 0 to about 20 and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25.

13. A composition according to claim 12 in which the subscript $n1$ is an integer of from 0 to about 8.

14. A composition according to claim 12 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 2 to about 5.

15. A composition according to claim 12 in which the subscript $n2$ is an odd integer of from about 7 to about 17.

16. A composition according to claim 12 in which the subscript $n2$ is an odd integer from about 7 to about 13.

17. A composition according to claim 11 in which the carrier comprises a polypeptide having attached positively charged branching groups selected from HIV-TAT and fragments thereof.

18. A composition according to claim 17 in which the branching groups are positively charged HIV-TAT fragments that have the formula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, or $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$, wherein the subscripts p and q are each independently an integer of from 0 to 20.

19. A composition according to claim 1 in which the positively charged branching groups comprise at least about 0.05 % by weight of the total carrier weight.

20. A composition according to claim 1 in which the positively charged branching groups comprise from about 0.5% to about 45% by weight of the total carrier weight.

21. A composition according to claim 1 in which the positively charged branching groups comprise from about 0.1 % to about 30% by weight of the total carrier weight.

22. A composition according to claim 1 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide.

23. A composition according to claim 22 in which the backbone comprises a positively charged polylysine.

24. A composition according to claim 23 in which the polylysine has a molecular weight of from about 10,000 to 1,500,000.

25. A composition according to claim 23 in which the polylysine has a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

26. A composition according to claim 23 in which the polylysine has a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

27. A composition according to claim 1 in which the backbone comprises a positively charged nonpeptidyl carrier.

28. A composition according to claim 27 in which the backbone comprises a positively charged polyalkyleneimine.

29. A composition according to claim 28 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

30. A composition according to claim 29 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 10,000 to about 2,500,000.

31. A composition according to claim 29 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 100,000 to about 1,800,000,

32. A composition according to claim 29 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 500,000 to about 1,400,000.

33. A composition according to claim 1 having a pH of from about 4.5 to about 6.3.

34. A composition according to claim 1 that is stable when stored at room temperature or under refrigerated conditions.

~~48~~
45

35. A controlled release composition according to claim 1.
36. A liquid composition according to claim 1.
37. A gel composition according to claim 1.
38. A composition according to claim 1 that is a cream, lotion or ointment.
39. A composition according to claim 1 further comprising saline.
40. A composition according to claim 1 further comprising saline and a pH buffer system.
41. A kit for administration of a botulinum toxin to a subject comprising a botulinum toxin and an effective amount for transdermal delivery thereof, of a carrier comprising a polymeric backbone having attached positively charged branching groups, wherein the association between the carrier and the botulinum toxin is non-covalent.
42. A kit according to claim 41 further comprising a custom applicator.
43. A kit according to claim 42 in which the custom applicator is designed for use by a health care professional.
44. A kit according to claim 42 in which the custom applicator is designed for self-administration by a subject.
45. A kit according to claim 41 comprising a pre-formulated composition comprising the botulinum toxin and the carrier.
46. A kit according to claim 41 in which the botulinum toxin and the carrier are separately formulated for combining prior to administration.
47. A kit according to claim 41 in which the botulinum toxin is contained in a device for administering the botulinum toxin to a subject via the skin.
48. A kit according to claim 47 in which the device is a skin patch.

49. A kit for administration of a botulinum toxin to a subject comprising a device for delivering the botulinum toxin to the skin and a composition comprising a carrier comprising a polymeric backbone having attached positively charged branching groups selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD, in which the subscript $n1$ is an integer of from 0 to about 20, and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25.

50. A kit according to claim 49 in which the device is a skin patch.

51. A method of administering a botulinum toxin to a subject comprising topically applying to the skin or epithelium of the subject the botulinum toxin in conjunction with an effective amount of a carrier comprising a polymeric backbone having attached positively charged branching groups, wherein the association between the carrier and the botulinum toxin is non-covalent.

52. A method according to claim 51 comprising topically applying to the skin or epithelium of the subject an effective amount of a composition according to claim 1.

53. A method according to claim 51 in comprising separately applying the botulinum toxin and the carrier to the skin or epithelium of the subject.

54. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is administered to achieve a desired biologic effect.

55. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is administered to achieve an aesthetic or cosmetic benefit.

56. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied to reduce or prevent an immune response.

57. A method according to claim 56 in which the reduced or prevented immune response improves therapeutic response on later repeat re-administrations of the composition.

58. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is administered for prevention or reduction of symptoms associated with subjective or clinical hyperhidrosis.

59. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of subjective or clinical dystonic contractions or dystonia.

60. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with muscle spasm.

61. A method according to claim 60 in which the botulinum toxin is applied topically to the lower back of the subject.

62. A method according to claim 60 in which the botulinum toxin is topically applied to the neck of the subject.

63. A method according to claim 60 in which the botulinum toxin is topically applied to at least one leg of the subject.

64. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied topically to the face of the subject, or to a portion thereof.

65. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied topically to the axilla of the subject, or to a portion thereof.

66. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied topically to the palms of the hands or to the feet of the subject, or to a portion thereof.

67. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied topically to the back or neck of the subject, or to a portion thereof.

68. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied topically to the groin of the subject, or to a portion thereof.

69. A method according to claim 51 in which the composition is applied topically to the hands or feet of the subject, or to a portion thereof.

70. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied topically to the elbows, upper arms, knees, or upper legs of the subject, or to a portion thereof.

71. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied topically to the buttocks of the subject or to a portion thereof.

72. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied topically to the torso of the subject or to a portion thereof.

73. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied topically to the pelvis of the subject or to a portion thereof.

74. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied to generate or enhance an immune response.

75. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with migraine headache.

76. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of acne.

77. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is a botulinum toxin derivative.

78. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin comprises a recombinant botulinum toxin.

79. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin comprises a modified botulinum toxin.

80. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is selected from botulinum toxin serotypes A, B, C, D, E, F and G.

81. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is botulinum toxin A.

82. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is botulinum toxin B.

83. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is botulinum toxin C.

84. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is botulinum toxin D.

85. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is botulinum toxin E.

86. A method according to claim 51 in which the carrier comprises a polymeric backbone having attached positively charged branching groups selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT, Antennapedia PTD, and fragments of HIV-TAT or of Antennapedia PTD, in which the subscript $n1$ is an integer of from 0 to about 20, and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25.

87. A method according to claim 86 in which the carrier comprises a polypeptide having positively charged branching groups selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ in which the subscript $n1$ is an integer of from about 0 to about 20 and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25.

88. A method according to claim 87 in which the subscript $n1$ is an integer of from 0 to about 8.

89. A method according to claim 87 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 2 to about 5

90. A method according to claim 87 in which the subscript $n2$ is an odd integer of from about 7 to about 17.

91. A method according to claim 87 in which the subscript $n2$ is an odd integer from about 7 to about 13.

92. A method according to claim 86 in which the carrier comprises a polypeptide having attached positively charged branching groups selected from HIV-TAT and fragments thereof.

93. A method according to claim 92 in which the branching groups are positively charged HIV-TAT fragments that have the formula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, or $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$, wherein the subscripts p and q are each independently an integer of from 0 to 20.

94. A method according to claim 51 in which the positively charged branching groups comprise at least about 0.05 % by weight of the total carrier weight.

95. A method according to claim 51 in which the positively charged branching groups comprise from about 0.5% to about 45% by weight of the total carrier weight.

96. A method according to claim 51 in which the positively charged branching groups comprise from about 0.1 % to about 30% by weight of the total carrier weight.

97. A method according to claim 51 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide.

98. A method according to claim 97 in which the backbone comprises a positively charged polylysine.

99. A method according to claim 98 in which the polylysine has a molecular weight of from about 10,000 to 1.5 million.

100. A method according to claim 98 in which the polylysine has a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

101. A method according to claim 98 in which the polylysine has a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

102. A method according to claim 51 in which the backbone comprises a positively charged nonpeptidyl carrier.

103. A method according to claim 102 in which the positively charged nonpeptidyl polymer is polyalkyleneimine.
104. A method according to claim 102 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.
105. A method according to claim 104 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 10,000 to about 2,500,000.
106. A method according to claim 104 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 100,000 to about 1,800,000.
107. A method according to claim 104 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 500,000 to about 1,400,000.
108. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin comprises a recombinant botulinum toxin.
109. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied in a composition having a pH of from about 4.5 to about 6.3.
110. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is applied in a controlled release composition.
111. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is contained in a liquid composition.
112. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is contained in a gel composition.
113. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is contained in a composition that is a cream, lotion or ointment.
114. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is contained in a composition further comprising saline.
115. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is contained in a composition further comprising saline and a pH buffer system.

116. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is contained in a device for dispensing the botulinum toxin, which device is applied topically to the skin or epithelium of the subject.

117. A method according to claim 116 in which the device is a skin patch.

118. A method according to claim 117 in which the device is a cell-encapsulating device.

119. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with mucous secretion.

120. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of obesity or symptoms thereof.

121. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of inflammation or symptoms thereof.

122. A method according to claim 121 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with psoriasis.

123. A method according to claim 122 in which the composition is applied in conjunction with other treatment modalities.

124. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of snoring.

125. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of cutaneous symptoms associated with diabetes.

126. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for improvement of wound healing.

127. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with autonomic nerve dysfunction.

128. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with cerebral palsy.

129. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with Hashimoto's thyroiditis.

130. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with mammary gland disorders.

131. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for alteration of hair growth.

132. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with parathyroid disorders.

133. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with movement disorders.

134. A method according to claim 133 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with parkinson's disease.

135. A method according to claim 133 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with tremors.

136. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with epilepsy.

137. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with inner ear disorders.

138. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with urologic disorders.

139. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of other cholinergic-controlled secretions.

140. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with neuropsychiatric disorders.

141. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with injured muscles.

142. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with ear disorders.

143. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with cancer.

144. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with nerve entrapment disorders.

145. A method according to claim 54 in which the botulinum toxin is applied topically for prevention or reduction of symptoms associated with hypercalcemia.

146. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin comprises a fusion protein.

147. A composition according to claim 5 in which the botulinum toxin is botulinum toxin F.

148. A composition according to claim 5 in which the botulinum toxin is botulinum toxin G.

149. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is botulinum toxin F.

150. A method according to claim 51 in which the botulinum toxin is botulinum toxin G.

1/10

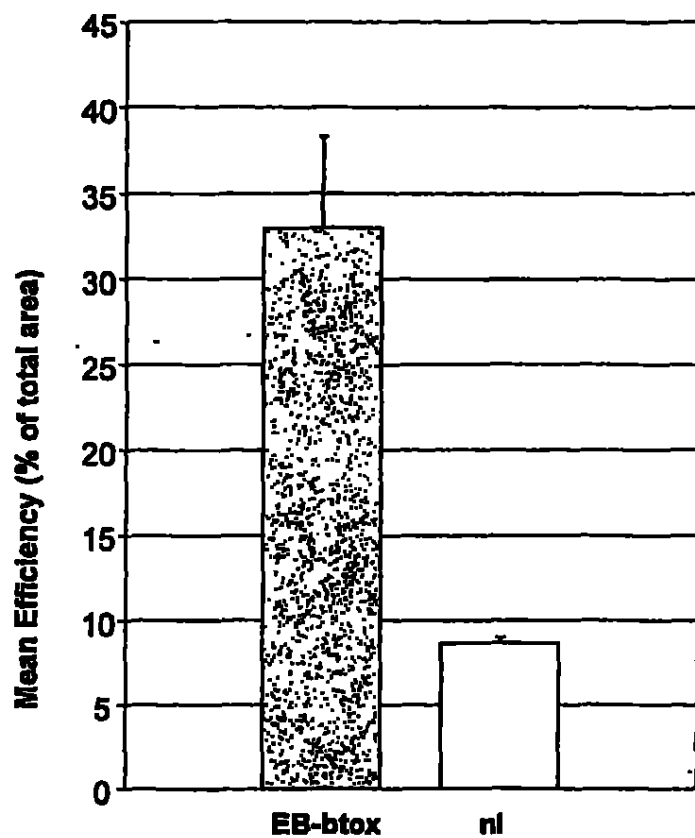
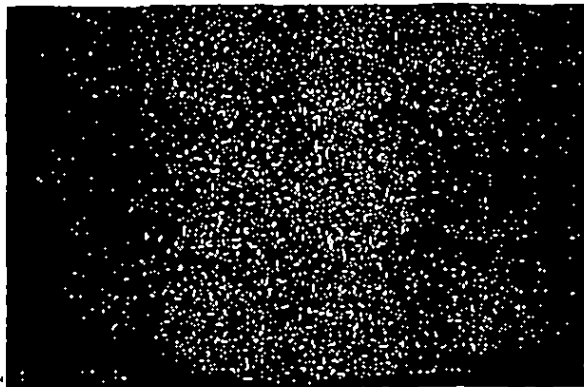


FIGURE 1

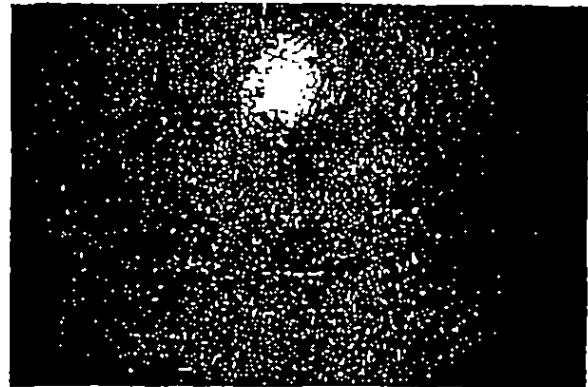
2/10



FIGURE 2



Essentia Botox Lotion



Baseline

FIGURE 3

4/10

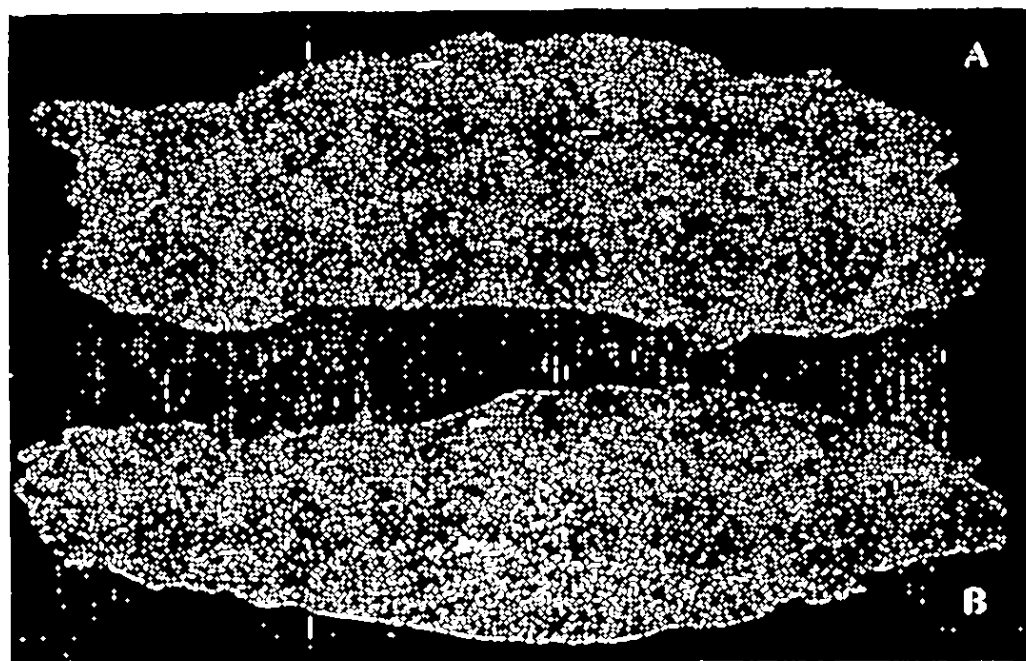


FIGURE 4

5/10

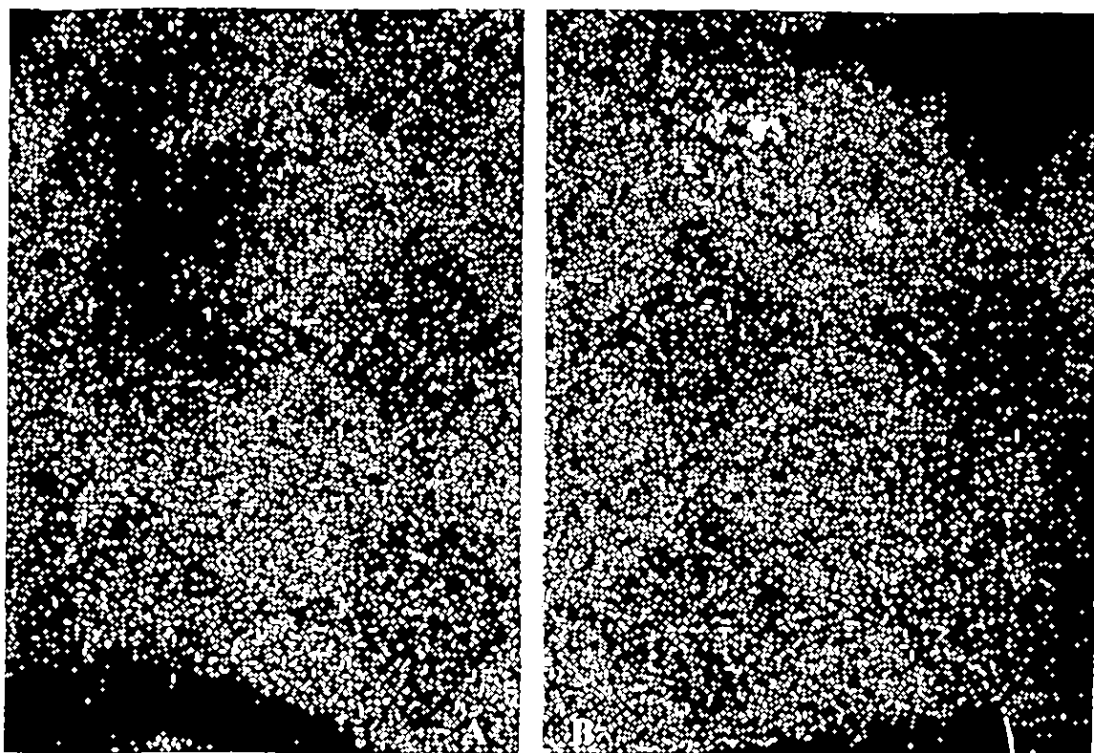


FIGURE 5

6/10

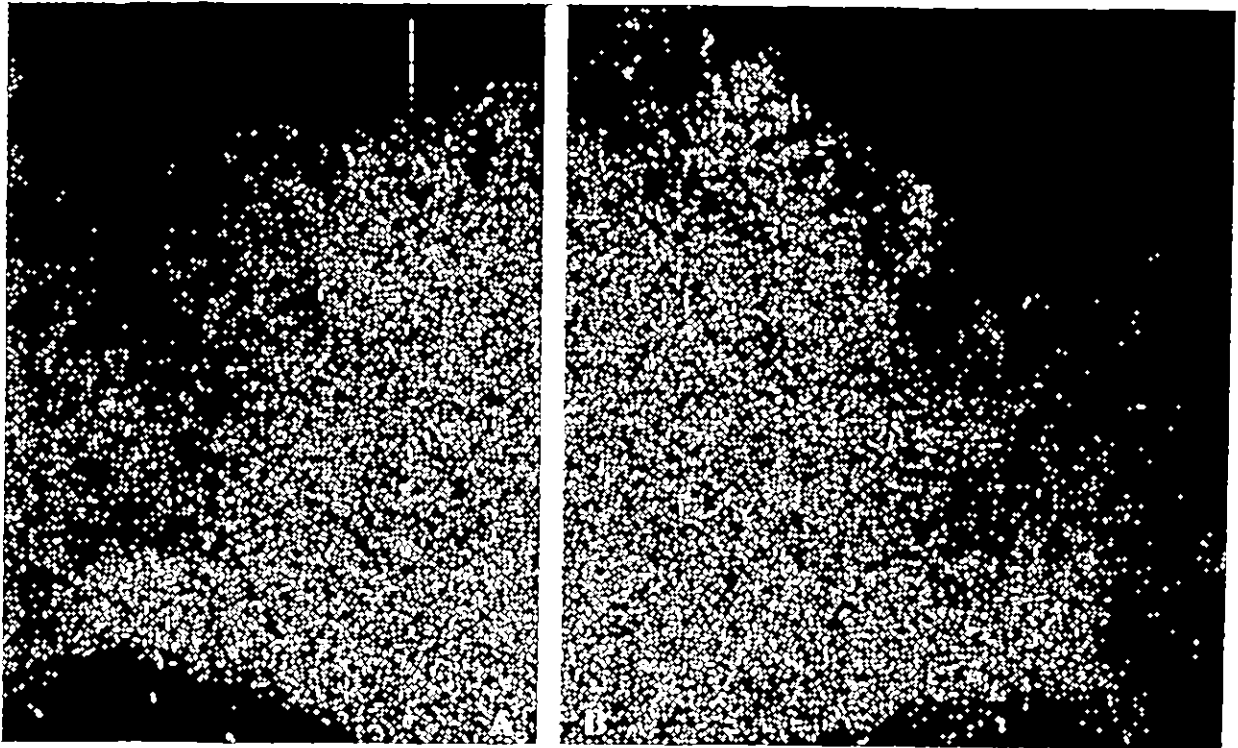


FIGURE 6

7/10



FIGURE 7

8/10

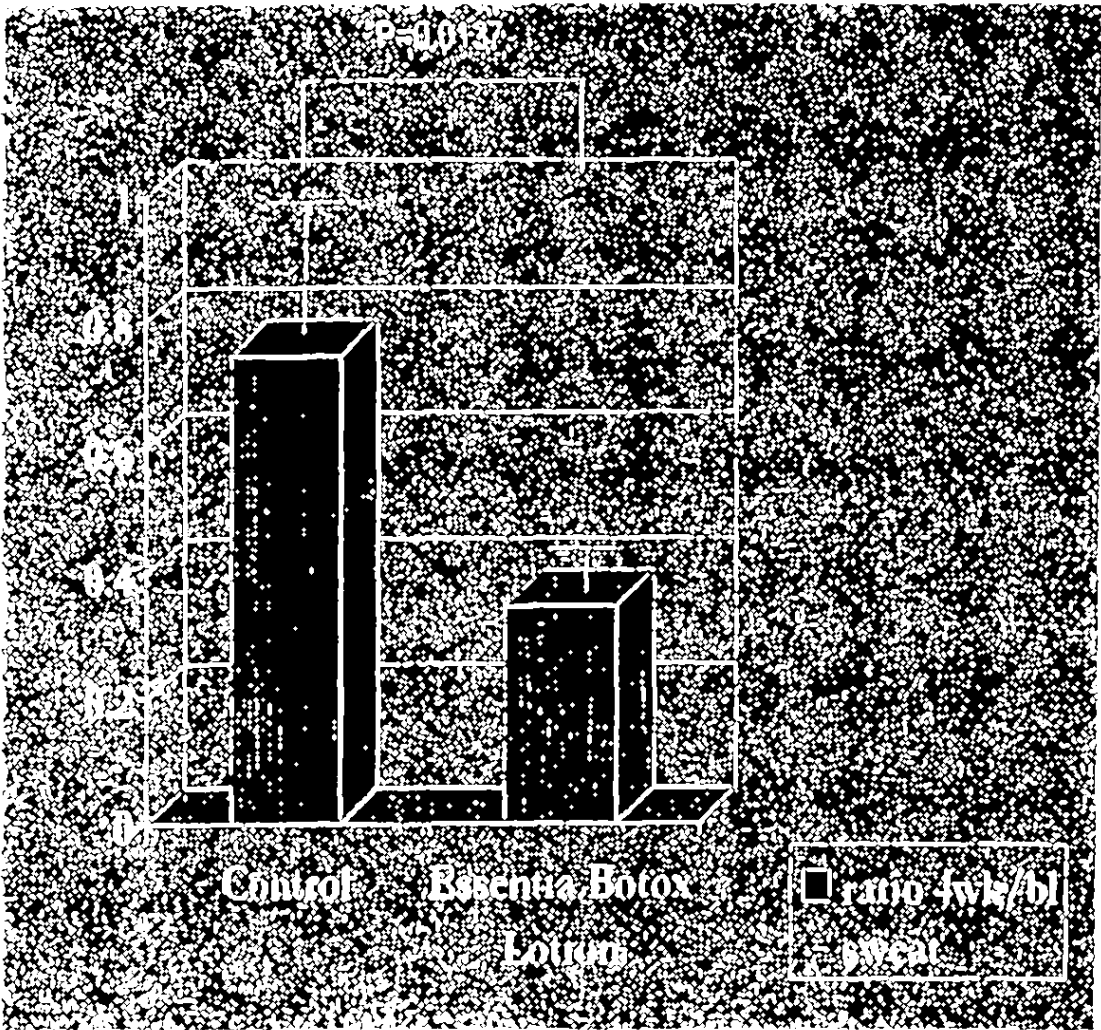


FIGURE 8A

9/10

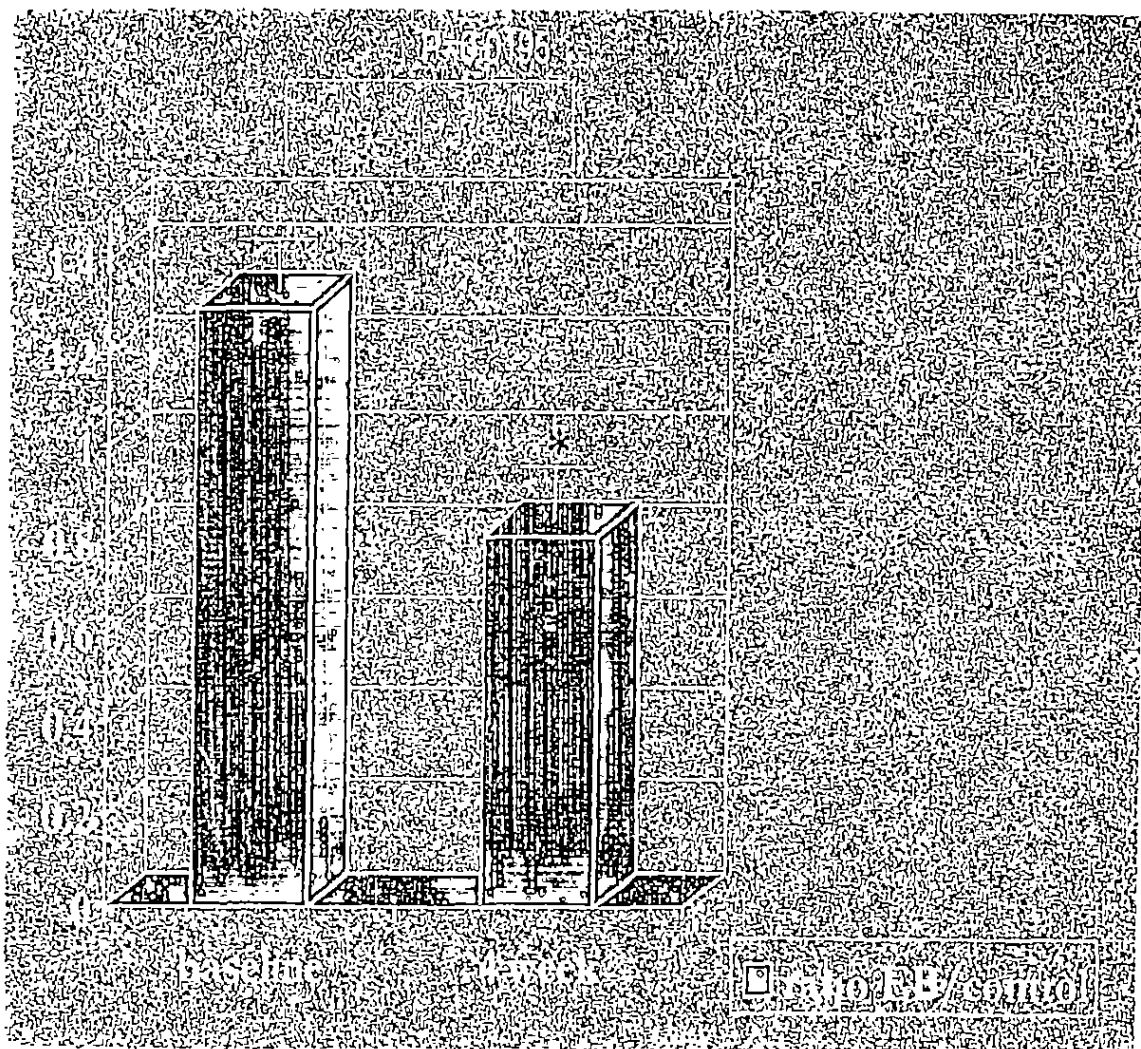
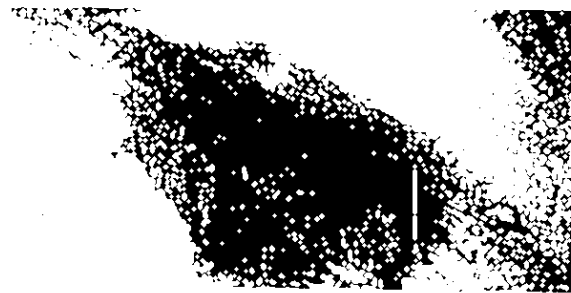


FIGURE 8B

10/10



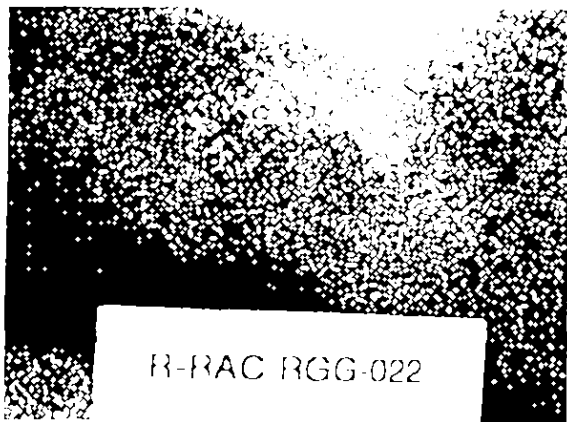
R-RAC-RGG-022

(A)



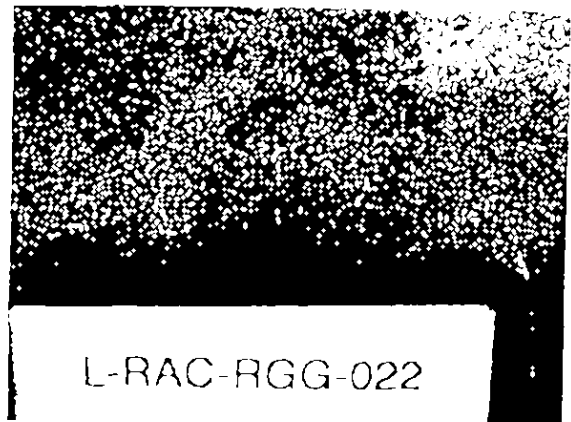
L-RAC-RGG-022

(B)



R-RAC RGG-022

(C)



L-RAC-RGG-022

(D)

FIGURE 9

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA APLICACIÓN TÓPICA Y SUMINISTRO
TRANSDÉRMICO DE TOXINAS BOTULINUM

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional Estadounidense No. 60/550, 015 presentada en marzo 3, 2004. La solicitud de patente provisional Estadounidense No. 60/550, 015 se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

[0002] La piel protege los órganos del cuerpo de amenazas del ambiente externo y actúa como un termostato para mantener la temperatura corporal. Esta consiste de varias capas diferentes, cada una con funciones especializadas. La mayor de las capas incluye la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis es una capa estratificada de células epiteliales que recubre la dermis, que consiste de tejido conector. La epidermis y la dermis se soportan adicionalmente por la hipodermis, una capa interna de tejido adiposo.

[0003] La epidermis, la capa más superior de la piel, solo es de 0.1 a 1.5 milímetros de espesor (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Esta consiste de queratinocitos y se divide en varias capas basado en su estado de diferenciación. La epidermis se puede clasificar adicionalmente en el estrato córneo y la epidermis viable, que consiste de células basales y melphigian granulares. El estrato córneo es higroscópico y requiere al menos 10% de humedad por peso para mantener su flexibilidad y suavidad. La higroscopicidad se atribuye en parte a la capacidad de retener agua de la

queratina. Cuando la capa córnea pierde su suavidad y flexibilidad se arruga y frágil, resultando en piel seca.

[0004] La dermis, que descansa justo por debajo de la epidermis, es de 1.5 a 4 milímetros de espesor, y es la más gruesa de las tres capas de la piel. Adicionalmente, la epidermis también es el hogar de la mayoría de las estructuras de la piel, que incluyen glándulas sudoríparas y de aceite (que secretan sustancias a través de aberturas en la piel llamadas poros, o comedones), folículos pilosos, terminaciones nerviosas, y vasos sanguíneos y linfáticos (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Sin embargo, los componentes principales de la dermis son el colágeno y la elastina.

[0005] La hipodermis es la capa más profunda de la piel. Esta actúa como un aislador para conservar el calor corporal y como un absorbente de golpes para protección de órganos (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Adicionalmente, la hipodermis también almacena grasa para reserva de energía. El pH de la piel está normalmente entre 5 y 6. Esta acidez se debe a la presencia de aminoácidos anfotéricos, ácido láctico y ácidos grasos de las secreciones de las glándulas sebáceas. El término "manto ácido" se refiere a la presencia de sustancias solubles en agua en la mayoría de regiones de la piel. La capacidad de amortiguación de la piel se debe en parte a estas secreciones almacenadas en la capa córnea de la piel.

[0006] Las arrugas, uno de los signos indicadores de envejecimiento, se pueden originar por cambios bioquímicos, histológicos y fisiológicos que acumulan del daño por el medio ambiente (Benedetto, International Journal of Dermatology, 38:641-655 (1999)). Adicionalmente, existen otros factores secundarios que

pueden originar pliegues característicos, surcos, y el aumento de arrugas faciales (Stegman et al., *The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery*, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5- 15 (1990)). Estos factores secundarios incluyen el empuje constante de la gravedad, presión posicional constante y frecuente sobre la piel (es decir, durante el sueño) y movimientos faciales repetidos originados por la contracción de los músculos faciales (Stegman et al., *The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery*, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5- 15 (1990)). Se han utilizado diferentes técnicas con el fin de suavizar potencialmente algunos de los signos de envejecimiento. Estas técnicas varían desde humectantes faciales que contienen ácidos alfa hidroxy y retinol para procedimientos quirúrgicos e inyecciones de neurotoxinas.

[0007] Una de las principales funciones de la piel es suministrar una barrera al transporte de agua y sustancias potencialmente dañinas para la homeostasis normal. El cuerpo podría deshidratarse rápidamente sin una piel coriácea, semipermeable. La piel ayuda a evitar la entrada de sustancias dañinas en el cuerpo. Aunque la mayoría de las sustancias no pueden penetrar la barrera, se ha desarrollado un número de estrategias para incrementar selectivamente la permeabilidad de la piel con éxito variable.

[0008] Las toxinas botulinum (también conocidas como toxinas botulino o neurotoxinas botulinum) son neurotoxinas producidas por la bacteria grampositiva *Clostridium Botulinum*. Ellas actúan para producir parálisis de los músculos al evitar transmisión sináptica o liberación de acetilcolina a través de inyección neuromuscular, y se piensa que actúan también de otras formas. Su acción bloquea esencialmente las señales que normalmente podrían originar espasmos musculares o contracciones, resultando en parálisis.

[0009] La toxina botulinum se clasifica en ocho neurotoxinas que se relacionan serológicamente, pero distintas. De estas, siete pueden originar parálisis, a saber las neurotoxinas botulinum de los serotipos A, B, C, D, E, F y G. Cada una de estas se distingue por la neutralización con anticuerpos de tipo específico. No obstante, el peso molecular de la molécula de proteína de toxina botulinum, para todos los siete serotipos de toxina botulinum activos, es de aproximadamente de 150 kD. Como liberadas por la bacteria, las toxinas botulinum son complejos que comprenden la molécula de proteína de toxina botulinum de 150 kD en cuestión junto con proteínas no toxina asociadas. La toxina botulinum de tipo A compleja se puede producir por clostridia *Bacterium* como formas 900kD, 500kD y 300 kD. Los tipos B y C de toxinas Botulinum se producen aparentemente solo como un complejo de 700kD o 500kD. El tipo de toxina botulinum se produce como de complejos de 300kD y 500 kD. Los tipos E y F de toxinas botulinum se producen solo como complejos de aproximadamente 300kD. Los complejos (es decir peso molecular mayor de aproximadamente 150kD se cree que contienen una proteína hemaglutinina no toxina y una proteína no hemaglutinina no tóxica. Estas dos proteínas no toxinas (que junto con la molécula de toxina botulinum comprende el complejo de neurotoxina relevante) puede actuar para suministrar estabilidad contra la desnaturación de la molécula de toxina botulinum y la protección contra ácidos digestivos cuando se ingiere la toxina. Adicionalmente, es posible que complejos de toxina botulinum más grandes (mayores de aproximadamente 150kD de peso molecular) pueden resultar en una proporción menor de difusión de la toxina botulinum lejos de un sitio de inyección intramuscular de un complejo de toxina botulinum,

[00010] Los diferentes serotipos de toxina botulinum varían en las especies animales que ellas afectan y en la severidad y duración de la parálisis que ellas

evocan. Por ejemplo, se ha determinado que la toxina botulinum tipo A es 500 veces más potente, según se mide por el índice de parálisis producida en las ratas, que la toxina botulinum tipo B. Adicionalmente, la toxina botulinum tipo B se ha determinado no tóxica en primates en una dosis de 480U/kg, aproximadamente 12 veces el LD₅₀ de primate para el tipo A. Debido al tamaño de la molécula y la estructura molecular de la toxina botulinum, esta no puede cruzar el estrato córneo y las múltiples capas de la arquitectura de piel subyacente.

[00010] El botulismo, el complejo síntoma característico de la exposición a la toxina sistémica botulinum, ha existido en Europa desde la antigüedad. En 1895, Emile P. van Ermengem aisló primero el bacilo con forma de espora anaeróbico de carne salada de puerco obtenida de tejido post mortem de víctimas que murieron de botulismo en Bélgica. Van Ermengem encontró que la enfermedad se originaba por una toxina extracelular que se produce por el llamado *Bacillus botulinus* (Van Ermengem, *Z Hyyg Infektionskr*, 26:1-56; *Rev Infect* (1897)). El nombre se cambió en 1922 a *Clostridium botulinum*. El nombre *clostridium* se utiliza para reflejar la naturaleza anaeróbica del microorganismo y también sus características morfológicas (Carruthers and Carruthers, *Can J Ophthalmol*, 31:389-400 (1996)). En la década de 1920, una forma cruda de toxina botulinum tipo A se aisló después de brotes adicionales de envenenamiento con comida. Dr. Herman Sommer en la Universidad de California, San Francisco hizo el primer intento de purificar la neurotoxina (Borodic et al., *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*, 7:54-60 (1991)). En 1946, Edward J Schantz y sus colegas aislaron la neurotoxina en forma cristalina (Schantz et al., In: Jankovi J, Hallet M (Eds) *Therapy with Botulinum Toxin*, New York, NY: Marcel Dekker, 41-49 (1994)). Por 1949, Burgen y sus asociados fueron capaces de demostrar que la toxina botulinum bloquea los impulsos a través de las uniones neuromusculares (Burgen et al., *J Physiol*,

109:10-24 (1949)). Allan B. Scout utilizó primero la toxina botulinum A (BTX-A) en monos en 1973. Scout demostró la parálisis del músculo ocular reversible después de tres meses (Lamanna, Science, 130:763-772 (1959)). Pronto después de eso, el BTX-A se reportó que era un tratamiento exitoso en humanos para estrabismo, blefarospasmos, y torticulis espasmódica (Baron et al., In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM (Eds), Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology, St. Louis, MO: Mosby Year Book, 504-523 (1994); Carruthers and Carruthers, Adv Dermatol, 12:325-348 (1997); Markowitz, In: Strickland GT (Eds) Hunters Tropical Medicine, 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 441-444 (1991)). En 1986, Jean y Alastair Carruthers, un equipo de marido y mujer que consistía de un cirujano oculoplástico y una dermatóloga empezaron a involucrar el uso cosmético del BTX-A para le tratamiento de arrugas asociadas con el movimiento en el área glabella (Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, New York: Academic Press, 143-150 (1981)). El uso de carruthers de BTX-A para el tratamiento de arrugas condujo a su publicación de esta aproximación en 1992 (Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, New York: Academic Press, 143-150 (1981)). Por 1994, el mismo equipo reportó experiencia con otras arrugas asociadas al movimiento en la cara (Scott, Ophthalmol, 87:1044-1049 (1980)). Esta en cambio condujo al nacimiento del área del tratamiento cosmético del BTX-A.

[00011] Se dice que la toxina Botulinum tipo A es el agente biológico natural mas letal conocido para el hombre. Las esporas de *C.Botulinum* se encuentran en el suelo y pueden crecer en contenedores de alimentos esterilizados y sellados inadecuadamente. La ingestión de la bacteria puede originar botulismo, que puede ser fatal. Al mismo tiempo, los efectos paralizantes de los músculos de la toxina botulinum se han utilizado para efectos terapéuticos. La administración controlada

de la toxina botulinum se ha utilizado para suministrar parálisis a los músculos para tratar trastornos, por ejemplo, desórdenes neuromusculares caracterizados por músculos hiperactivos. Los trastornos que se han tratado con la toxina botulinum incluyen espasmos hemifaciales, ataque de tortícolis espasmódica en adultos, fisura anal, blefarospasmo, parálisis cerebral, distonía cervical, dolores de cabeza por migraña, estrabismo, desorden de la articulación temporomandibular, y varios tipos de calambre muscular y espasmos. Más recientemente los efectos paralizantes del músculo de la toxina botulinum han tomado ventaja en aplicaciones faciales terapéuticas y cosméticas tales como tratamiento de arrugas, línea de seño, y otros resultados de espasmos o contracciones de músculos faciales.

[00012] La aplicación tópica de la toxina botulinum suministraría un tratamiento más seguro y deseable alternativo debido a la naturaleza indolora de la aplicación, el área de superficie de tratamiento mayor que se puede cubrir, la capacidad para formular una toxina pura con mayor actividad específica, el entrenamiento necesario reducido para aplicar el botulinum terapéutico, las dosis más pequeñas que se pudieran necesitar para producir el efecto deseado y la falta de un requerimiento para grandes pozos de toxina para alcanzar un resultado clínico terapéutico. Un medio efectivo para el suministro transdérmico de la toxina botulinum, así como también un medio efectivo para administrar la toxina botulinum para tratar o evitar un número de condiciones que no requieren inyección es así altamente deseable.

RESUMEN DE LA INVENCION

[00013] Esta invención se relaciona con composiciones nuevas que comprenden una toxina botulinum, más específicamente para tales composiciones que permiten el transporte o suministro de una toxina botulinum a través de la piel o epitelio (también referido como "administración transdérmica"), y que por lo tanto se puede utilizar como aplicaciones tópicas para suministrar una toxina botulinum a un sujeto, para varios propósitos terapéuticos, estéticos y/o cosméticos, como se describe aquí.

[00014] Un aspecto de esta invención es suministrar una composición que contiene una toxina botulinum y un portador. El portador tiene una estructura polimérica con grupos ramificados cargados positivamente unidos. La asociación entre el portador y la toxina botulinum no es covalente.

[00015] Otro aspecto de esta invención es suministrar un kit para administración de una toxina botulinum a un sujeto. El kit incluye una toxina botulinum presente en una cantidad efectiva para administración transdérmica de esta, y un portador que tiene una estructura polimérica con grupos ramificados cargados positivamente adheridos. La asociación entre el portador y la toxina botulinum no es covalente.

[00016] Aún otro aspecto de esta invención es proveer un kit para la administración de una toxina botulinum a un sujeto.. El kit incluye un dispositivo para suministrar la toxina botulinum a la piel y una composición que contiene un portador que tiene una estructura polimérica con grupos ramificados cargados positivamente adheridos seleccionados de - (gly)n-(arg)n₂, HIV-TAT y fragmentos

de estos, y PTD Antennapedia, en los cuales el subíndice n1 es un entero de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice n2 es independientemente un entero par o de aproximadamente 5 a 25.

[00017] Esta invención también suministra un método para administrar una toxina botulinum a un sujeto que involucra aplicar tópicamente a la piel o epitelio del sujeto la toxina botulinum en conjunto con una cantidad efectiva de un portador. El portador tiene una estructura polimérica con grupos ramificados cargados positivamente adheridos, y asociados no covalentemente con la toxina botulinum,

[00018] En un aspecto, esta invención se relaciona con una composición que comprende una toxina botulinum (como se definió aquí) y un portador que comprende una "estructura" cargada positivamente que tiene grupos de "eficiencia" o ramificados cargados positivamente, como se describió aquí. Más preferiblemente el portador cargado positivamente es un polipéptido de cadena larga cargado positivamente o un polímero no peptídico cargado positivamente, por ejemplo, una polialquilamina. La invención se relaciona además con un método para producir un efecto biológico tal como parálisis muscular, reducir hipersecreción o sudoración, tratar dolor neurológico o migraña por dolor de cabeza, reducir espasmos musculares, evitar o reducir el acné, o reducir o mejorar la respuesta inmune, al aplicar tópicamente una cantidad efectiva de tal una composición, preferiblemente a la piel de un sujeto o paciente en necesidad de tal tratamiento. La invención también se relaciona con un método para producir un efecto estético o cosmético, por ejemplo por aplicación tópica de la toxina botulinum a la cara en cambio de inyectar en los músculos faciales.

[00019] Esta invención también suministra kits para la preparación o para formular una composición que comprende un portador y la toxina botulinum, así como también ítems adicionales que se necesitan para producir una formulación utilizable, o una premezcla que puede en cambio ser utilizada para producir tal una formulación. Alternativamente el kit comprende medios para separadamente pero en conjunción administrar la toxina botulinum y el portador a un sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[00020] La Figura 1 muestra los resultados de un experimento que muestra la eficiencia del suministro transdérmico de la toxina botulinum utilizando una composición de la invención que comprende una estructura de péptido.

[00021] La Figura 2 es una fotografía que describe el estado de las patas traseras de un ratón en la que el área de una pata se trata con una composición de la invención y el área de la otra se trata con otra composición que contiene la toxina botulinum que no contiene un portador de acuerdo con la invención.

[00022] La Figura 3 es una fotografía que describe las arrugas en la frente de un sujeto antes y después del tratamiento con "loción de botox estentia" tópicamente.

[00023] La Figura 4 muestra una impresión Mikrosil de la pata (A) después del tratamiento tópico de arrugas con "esencia botox lotion", y, (b) antes del tratamiento. Estas impresiones Mikrosil que son útiles en razón a que ellas minimizan los artefactos que puedan resultar de la fotografía del sujeto actual, que muestra claramente que el lado no tratado tiene arrugas más profundas.

[00024] La Figura 5 muestra fotografías que describen el ensayo de almidón/yodo de Minor desarrollado en la frente de un sujeto después de cinco días de aplicación de "Essentia Botox Lotion" (A) y una loción de control (B). La loción de control contenía una estructura de policita cargada positivamente con un peso molecular de aproximadamente 21,000 y con grupos ramificados TAT. Estas fotos se tomaron dos minutos después de aplicación.

[00025] La Figura 6 es la misma como la Figura 5, pero excepto que ella se toma después de que ha pasado cuatro minutos.

[00026] La Figura 7 muestra el área de dosis utilizada en los estudios de hiperhidrosis axilar. Note que el área de dosis se extiende un centímetro más allá del área de la piel cubierta por el vello axilar.

[00027] La Figura 8a representa los resultados de un experimento que demuestra la eficiencia de la toxina botulinum terapéuticamente administrada a través de contacto con la piel como un agente tópico que utiliza un portador de peptidilo corto para el tratamiento de hiperhidrosis axilar en sujetos humanos. La gráfica describe la reducción significativa en cantidad de sudor (mg por 5 minutos) medido gravimétricamente 4 semanas después del tratamiento con botox plus un portador de peptidilo corto o solo portador. Los resultados son valores de 4 semanas como proporción para el valor de línea base para el mismo grupo, con significancia determinada por el análisis Wilcoxon $P < 0.05$, $N = 10$ pacientes. La Figura 8b representa los resultados de un experimento que demuestra la eficiencia de la toxina botulinum terapéuticamente administrada a través del contacto con la piel como un agente tópico que utiliza un portador de peptidilo corto para el tratamiento de hiperhidrosis axilar en sujetos humanos. La gráfica

describe la reducción significativa en cantidad de sudor (mg por 5 minutos) medido gravimétricamente 4 semanas después del tratamiento con botox plus un portador de peptidilo corto o solo portador. Los resultados son valores de tratamiento como valor de control para ambos puntos de tiempo, con significancia determinada por análisis Wilcoxon con $P < 0.05$. $N = 10$ pacientes.

[0028] La Figura 9 muestra fotografías que describen el ensayo de almidón/yodo de minor antes y después del tratamiento "Essentia Botox Lotion" tópicamente para el tratamiento de hiperhidrosis axilar. El ensayo de almidón/yodo es una línea base vs. Dos semanas se muestra en donde la axila derecha se trata con "Essentia Botox Lotion" (a y c) y la axila izquierda se aplica con el control (b y d) para el sujeto #12. Estas fotografías ilustran los beneficios típicos observados después del tratamiento con portador más botox en yodo almidón. Aunque se observa algún cruce sobre el lado de control (consistente con 25% de reducción en datos gravimétricos), se dan reducciones significativas con el tratamiento (consistentes con el 65% de reducción en datos gravimétricos en el lado tratado).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[00029] Esta invención suministra composiciones y métodos para administrar, particularmente administración transdérmica de una toxina botulinum mediante aplicación tópica de una formulación apropiada.

[00030] De acuerdo con la presente invención, una molécula portadora cargada positivamente que tiene grupos de eficiencia, como se describe aquí, se ha encontrado adecuada como un sistema de transporte para una toxina botulinum, permitiendo que se administre la toxina transdérmicamente a los

músculos y/o otras estructuras asociadas con la piel. El transporte ocurre sin modificación covalente de la toxina botulinum.

[00031] Por "cargado positivamente" se significa que el portador tiene una carga positiva bajo al menos algunas condiciones de fase de solución, más preferiblemente bajo al menos algunas condiciones fisiológicamente compatibles. Más específicamente, "cargado positivamente" como se utiliza aquí 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 de solución, tal 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 asociar con aniones durante condiciones fisiológicamente compatibles. Los polímeros con una multiplicidad de porciones cargadas positivamente no necesitan ser homopolímeros, como será evidente para un experto en la técnica. Otros ejemplos de porciones cargadas positivamente son bien conocidas en la técnica anterior y se pueden emplear fácilmente, así como también son evidentes para aquellos expertos en la técnica.

[00032] De forma general, el portador cargado positivamente (también llamado como una "estructura cargada positivamente") es típicamente una cadena lineal de átomos, con grupos en la cadena que lleva una carga positiva en pH fisiológico, o con grupos que llevan una carga positiva unida a las cadenas laterales que se extienden desde la estructura. Preferiblemente la estructura cargada positivamente en sí misma no tendrá una actividad biológica enzimática o terapéutica definida. La estructura lineal es una estructura de hidrocarburo que es, en algunas modalidades, interrumpida por heteroátomos seleccionados de

nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio y fósforo. La mayoría de átomos de cadena de la estructura usualmente son carbono. Adicionalmente, la estructura a menudo será un polímero de unidades repetidas (por ejemplo, aminoácidos, poli (etileneoxy) poli (propileneamina), polialquileimina, y similares) pero puede ser un heteropolímero. En un grupo de modalidades, la estructura cargada positivamente es una polipropilenoamina en donde un número de átomos de nitrógeno amina están presente como grupos amonio (tetrasustituidos) que llevan una carga positiva. En otra modalidad, la estructura cargada positivamente es un polímero nopetptidilo, que puede ser un hetero o homopolímero tal como una poliaquileimina, por ejemplo una polietileneimina o polipropileneimina, que tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 2,500,000, preferiblemente de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,800,000, y más preferiblemente de cerca de 500,000 a aproximadamente 1,400,000. En otro grupo de modalidades, la estructura tiene adherida una pluralidad de porciones de cadena lateral que incluyen grupos cargados positivamente (por ejemplo, grupos amonio, grupos piridinio, grupos fosfónio, grupos sulfonio, grupos guanidino, o grupos anidino). Las porciones de cadena lateral en este grupo de modalidades se puede colocar en espacios a lo largo de la estructura que son consistentes en separaciones o variables. Adicionalmente, la longitud de las cadenas laterales puede ser similar o disimilar. Por ejemplo, en un grupo de modalidades, las cadenas laterales pueden ser cadenas de hidrocarburo lineales o ramificadas que tienen de uno a veinte átomos de carbono y que terminan en un extremo distal (lejos de la estructura) en uno de los grupos cargados positivamente anotados anteriormente. En todos los aspectos de la presente invención, la asociación entre el portador y el agente biológicamente activo es mediante interacción no covalente, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen las interacciones iónicas, unión de hidrógeno, fuerzas van der Waals, o combinaciones de estos.

[00033] En un grupo de modalidades, la estructura cargada positivamente es un polipéptido que tiene grupos de cadena laterales cargados positivamente (por ejemplo, lisina, arginina, Ornitina, homoargininas, y similares). Preferiblemente, el polipéptido tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000, más preferiblemente de cerca de 25,000 a aproximadamente 1,200,000, más preferiblemente de cerca de 100,000 a aproximadamente 1,000,000. Un experto en la técnica apreciará que cuando se utilizan aminoácidos en esta porción de la invención, las cadenas laterales pueden tener la forma D- o L (configuración R o S) en el centro de la unión. Alternativamente, la estructura puede ser un análogo o un polipéptido tal como un peptoide. Ver, por ejemplo, Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32:543 (1993); Zuckermann et al. *Chemtracts-Macromol. Chem.* 4:80 (1992); and Simon et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89:9367 (1992)). En resumen, un peptoide es una poliglecina en la que la cadena lateral se une a los átomos de nitrógeno de la estructura a diferencia de los átomos α -carbono. Como se mencionó anteriormente una porción de las cadenas laterales terminará típicamente en un grupo cargado positivamente para suministrar un componente de estructura cargado positivamente. La síntesis de peptoides se describe en, por ejemplo, la patente Estadounidense No. 5,877,278, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Como el término se utiliza aquí, estructuras cargadas positivamente que tienen una construcción de estructura peptoide se considera "no péptido" ellas no están compuestas de aminoácidos que tienen cadenas laterales de ocurrencia natural en las ubicaciones α -carbono.

[00034] Una variedad de otras estructuras pueden ser empleadas, por ejemplo, mimicos estéricos o electrónicos de polipéptidos en donde los enlaces

amida del péptido se reemplazan con subrogados tales como enlaces ester, tioamidas (-CSNH-), tioamida (-NHCS-), aminometileno (-NHCH₂-) o los grupos metileneamino reverso(-CH₂NH-) , grupos ceto-metileno (-COCH₂-), fosfinato (-PO₂RCH₂-), ester de fosnamidato y fosfonamidato (-PO₂RNH-), péptido reverso (-NHCO-), trans-aqueno (-CR=CH-), fluoroaqueno (-CF=CH-), dimetileno (-CH₂CH₂-), tioeter (-CH₂S-), hydroxyetileno (-CH(OH)CH₂-), metileneoxi (-CH₂O-), tetrazol (CN₄), sulfonamido (-SO₂NH-), metilenesulfonamido (-CHRSO₂NH-), sulfonamida reversa (-NHSO₂-), y estructuras con malonato y/o subunidades de gem-diaminoalquil, por ejemplo, como se revisó por Fletcher et al. ((1998) Chem. Rev. 98:763) y detallado por referencias citadas en estas. Muchas de las anteriores sustituciones resultan en estructuras de polímero isostérico aproximadamente relativas a las estructuras formadas de los α-aminoácidos.

[00035] En cada una de las estructuras suministradas anteriormente, los grupos de cadena lateral se pueden añadidos para llevar un grupos cargado positivamente. Por ejemplo, las estructuras ligadas por sulfonamida (-SO₂NH- y -NHSO₂-) pueden tener grupos de cadena laterales unidos a los átomos de nitrógeno. De forma similar, el enlace de hiroxietileno (-CH(OH)CH₂-) puede llevar un grupo de cadena lateral adherido al sustituyente hidroxí. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente las otras químicas de enlace para suministrar grupos de cadena lateral cargados positivamente que utilizan métodos sintéticos estándar.

[00036] En una modalidad, la estructura cargada positivamente son unos grupos ramificados que tienen polipéptido (también referidos como grupos de eficiencia). Como se utiliza aquí, un grupo de eficiencia o un grupo ramificado es cualquier agente que tiene el efecto de promover la translocación de la estructura

cargada positivamente a través de un tejido o membrana celular. Ejemplos no limitantes de ramificación o grupos de eficiencia incluyen $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT o fragmentos de estos, o el dominio de transducción de proteína de Antennapedia, o un fragmento de esta en el que el subíndice $n1$ es un entero de 0 a 2, más preferiblemente de 0 a 8, todavía más preferiblemente 2 a 5, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero par de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, más preferiblemente de cerca de 7 a aproximadamente 17, más preferiblemente cerca de 7 a aproximadamente 13. Todavía se prefiere adicionalmente aquellas modalidades en las que el fragmento HIV-TAT tiene la fórmula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$ o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un entero de 0 a 20 y el fragmento se une a la estructura por vía del C- terminal o el N-terminal del fragmento. Fragmentos de 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. En otra modalidad preferida, la cadena lateral cargada positivamente o grupo ramificado es el dominio de transducción de proteína (PTD) Antennapedia (Antp), o un fragmento de esta que retiene la actividad. Preferiblemente el portador cargado positivamente incluye grupos ramificados de cadena lateral cargados positivamente en una cantidad de al menos aproximadamente 0.05%, como un porcentaje del peso total del portador, preferiblemente de cerca de 0.05 a aproximadamente 45% en peso, y más preferiblemente de cerca de 0.1 a aproximadamente 30% en peso. Para grupos ramificados cargados positivamente que tienen la fórmula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, la cantidad más preferida es de cerca de 0.1 a aproximadamente de 25%.

[0037] En otra modalidad, la porción de estructura es una polilisina y grupos ramificados cargados positivamente se adhieren a los grupos amino lisino de

cadena lateral. La polilisina puede tener un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000 preferiblemente de cerca de 25,000 a aproximadamente 1,200,000, y más preferiblemente de cerca de 100,000 a aproximadamente 1,000,000. Esta puede ser cualquiera de las polilisinas disponibles comercialmente (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) tales como, por ejemplo, polilisina que tiene MW > 70,000, polilisina que tiene MW de 70,000 a 150,000, polilisina que tiene MW 150,000 a 300,000 y polilisina que tiene > 300,000. La selección de una polilisina apropiada dependerá de los componentes restantes de la composición y será suficiente para suministrar una carga positiva neta general a la composición y suministrar una longitud que es preferiblemente de uno a cuatro veces la longitud combinada de los componentes cargados negativamente. Grupos ramificados cargados positivamente preferidos o grupos de eficiencia incluyen, por ejemplo, -gly- gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg (-Gly₃Arg₇) o HIV-TAT. En otra modalidad preferida la estructura cargada positivamente es una polialqueleimina de cadena larga tal como una polietileneimina, por ejemplo, una que tiene un peso molecular de aproximadamente 1,000,000.

[00038] Las estructuras cargadas positivamente o moléculas portadoras que comprenden los polipéptidos o polialquileneiminas, que tienen los grupos ramificados descritos anteriormente, son compuestos novedosos y forman un aspecto de esta invención.

[00039] En una modalidad de la invención, solo un portador cargado positivamente que tiene grupos ramificados cargados positivamente es necesario para el suministro transdérmico de la toxina botulinum. En ciertas modalidades, el portador cargado positivamente es un polipéptido (por ejemplo, lisina, arginina,

ornitina, homoarginina, y similares) que tienen múltiples grupos de cadena lateral cargados positivamente, como se describió anteriormente. Preferiblemente, el polipéptido tiene un peso molecular de al menos 10,000. En otra modalidad, el portador cargado positivamente es un polímero no peptídico tal como un polialquileneimina que tienen múltiples grupos de cadena lateral cargados positivamente que tienen un peso molecular de al menos cerca de 100,000. Tales polialquileneiminas incluyen polietileno y polipropilenoiminas. En cualquier caso, para uso como único agente necesario para el suministro transdérmico la molécula de portador cargada positivamente incluye grupos de eficiencia o ramificados cargados positivamente, que comprenden $-(\text{gly})n_1-(\text{arg})n_2$, en el que subíndice n_1 es un entero que va de 0 a 20 más preferiblemente de 0 a 8, todavía más preferiblemente de 2 a 5, y el subíndice n_2 es independientemente un entero par de aproximadamente 5 y de aproximadamente 25, más preferiblemente de 7 a aproximadamente 17, y más preferiblemente cerca de 7 a aproximadamente 13, HIV_TAT o fragmentos de estos, o Antennapedia (PTD) o un fragmentos de estos, Preferiblemente, la cadena lateral o los grupos ramificados tienen la fórmula general $-(\text{gly})n_1-(\text{arg})n_2$ como se describió anteriormente. Otras modalidades preferidas son aquellas en la que los grupos de eficiencia o ramificados son fragmentos HIV-TAT que tienen la fórmula $(\text{gly})p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}q$, $(\text{gly})p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}q$, o $(\text{gly})p\text{-RKRPvQRKR-(gly)}q$, en donde los subíndices p y q cada uno son independientemente un entero que van de 0 a 20 y el fragmento se une a la molécula portadora por vía del C- terminal o el N-terminal del fragmento. Los grupos ramificados laterales pueden tener la forma D o L (configuración R o S) en el centro de la unión. Los fragmentos HIV-TAT preferidos son aquellos en que los subíndices p y q son cada uno independientemente enteros que van 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 estos que retienen la actividad del grupo. Estos son conocidos en la técnica, por ejemplo, de Console et al, J. Biol. Chem. 278:35109 (2003). Preferiblemente, el portador cargado positivamente incluye grupos ramificados de cadena lateral cargados positivamente en una cantidad de al menos de cerca de 0.05%, como porcentaje del peso total del portador, preferiblemente de cerca de 0.05 a aproximadamente 45% en peso y más preferiblemente de cerca de 0.1 a aproximadamente 30% en peso. Para grupos ramificados cargados positivamente que tienen la fórmula - (gly) n_1 -(arg) n_2 , la cantidad más preferida es de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 25%.

[00040] En otra modalidad, el portador es una polilisina con grupos ramificados cargados positivamente unidos a los grupos aminolisina de cadena lateral. La polilisina utilizada en esta modalidad particular puede ser cualquiera de las disponibles comercialmente (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, por ejemplo.) polilisinas tales como, por ejemplo, polilisina que tiene MW > 70,000, polilisina que tiene MW de 70,000 a 150,000, polilisina que tiene MW 150,000 a 300,000 y polilisina que tiene MW > 300,000. Sin embargo, preferiblemente la polilisina preferiblemente tiene MW de al menos aproximadamente 10,000. Los grupos ramificados cargados positivamente preferidos o grupos de eficiencia incluyen por ejemplo, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg (-Gly₃ATg₇), HIV-TAT o fragmentos de esto, y Antennapedia TPD o fragmentos de esto.

[00041] En otras modalidades de esta invención el portador es una estructura (que puede ser lineal o ramificada) de polietileneima (PEI) o polilisina relativamente corta y que tiene grupos ramificados cargados positivamente. Tales portadores son útiles para minimizar la agregación no controlada de las

estructuras y la toxina botulinum en una composición terapéutica, que origina la eficiencia del transporte se reduzca dramáticamente. Cuando el portador es una estructura PEI o polilisina lineal relativamente corta, la estructura tendrá un peso molecular de menos de 75,000, más preferiblemente menos de 30,000 y más preferiblemente menos de 25,000. Cuando el portador es una estructura PEI o polilisina ramificada relativamente corta, sin embargo, la estructura tendrá un peso molecular menor de 60,000 más preferiblemente menos de 55,000 y más preferiblemente menos de 50,000. Si, sin embargo, los agentes de particionamiento como se describe aquí se incluyen en la composición, el peso molecular de las estructuras PEI y polilisina ramificada puede ser de hasta de 75,000, mientras que el peso molecular de las estructuras PEI y polilisina lineal puede ser de hasta 150,000.

[00042] El término "toxina botulinum" como se utiliza aquí significa que se refiere a cualquiera de los tipos conocidos de toxina botulinum, si se producen por la bacteria o por técnicas recombinantes, así como también cualquiera de tales tipos que se puedan descubrir posteriormente que incluyen variantes de ingeniería o proteínas de fusión. Como se mencionó anteriormente, hoy en día, se han caracterizado siete neurotoxinas botulinum inmunológicamente distintas, a saber los serotipos de neurotoxina botulinum A, B, C, D, E, y G cada una de las cuales se distingue por la neutralización con anticuerpos de tipo específico. Los serotipos de toxina botulinum están disponibles de Sigma-Aldrich y de metabiologics, Inc. (Madison, Wisconsin), así como también de otras fuentes. Los diferentes serotipos de la toxina botulinum varían en las especies animales que ellas afectan y en la severidad y duración en la parálisis que ellas evocan. Al menos dos tipos de toxina botulinum, tipo A y B, están disponibles comercialmente en formulaciones para el tratamiento de ciertas condiciones. El tipo A, por ejemplo, está contenido en las

preparaciones de Allergan que tienen la marca comercial BOTOX® y de Pisen que tiene la marca comercial DYSPORT®, y el tipo B está contenida en preparaciones de Elan teniendo la marca registrada MYOBLOCK®.

[00045] Las composiciones de esta invención están preferiblemente en la forma de productos a ser aplicados a la piel o epitelio de sujetos o pacientes o humanos del tratamiento particular. El término "en necesidad" significa que incluye necesidades relacionadas con la salud o farmacéuticas, por ejemplo, tratamiento de condiciones que involucren espasmos de músculo facial indeseados, así como también necesidades subjetivas, por ejemplo, alterar o mejorar la apariencia del tejido facial. En general las composiciones se preparan al mezclar la toxina botulinum con el portador, y usualmente con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables adicionales o excipientes. En su forma más simple ellas pueden contener un portador farmacéuticamente aceptable acuoso simple o diluyente, tal como salina amortiguada. Sin embargo, las composiciones pueden tener otros ingredientes típicos en las composiciones cosméticas o tópicas farmacéuticas, que incluyen un portador dermatológica o farmacéuticamente aceptable, vehículo o medio (es decir, un portador, vehículo o medio que es compatible con los tejidos a los que ellos se aplicaran). El término "aceptable dermatológica o farmacéuticamente", como se utiliza aquí, significa que las composiciones o componentes de estos así descritos son adecuados para uso en contacto con estos tejidos o para uso en pacientes en general sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, y similares. Como es apropiado, las composiciones de la invención pueden comprender cualquier ingrediente utilizado convencionalmente en los campos bajo consideración, y particularmente en cosmética y dermatología. Las composiciones también pueden

incluir una cantidad de aniones pequeños, preferiblemente un anión polivalente, por ejemplo, fosfato, aspartato, o citrato.

[0046] En términos de su forma, las composiciones de esta invención pueden incluir soluciones, emulsiones (que incluyen microemulsiones), suspensiones, cremas, lociones, geles, polvos, u otras composiciones líquidas o sólidas típicas utilizadas para aplicación a la piel y otros tejidos en donde se puedan usar las composiciones. Tales composiciones pueden contener, en adición a la toxina botulinum y el portador, otros ingredientes típicamente utilizados en tales productos, tales como agentes antimicrobiales, humectantes y de hidratación, agentes de penetración, preservativos, emulsificantes, aceites naturales y sintéticos, solventes, tensoactivos, detergentes, emolientes, antioxidantes, fragancias, llenadores, espesantes, ceras, absorbedores de olor, tintes, agentes colorantes, polvos, y opcionalmente incluyen anestésicos, aditivos antiprurito, extractos botánicos, agentes de acondicionamiento, agentes de oscurecimiento o aclaración, abrillantadores, humectantes, mica, minerales, polifenoles, siliconas o derivados de estos, bloqueadores solares, vitaminas, y fitomedicinas.

[0047] En modalidades particularmente preferidas, la composición incluyen agentes de gelación y/o agentes que modifican la viscosidad. Estos agentes se agregan generalmente para incrementar la viscosidad de la composición, de tal forma que hacen la aplicación de la composición más fácil y más exacta. Adicionalmente, estos agentes ayudan a evitar que se seque la solución de toxina botulinum/portador acuosa que tiende a originar una reducción en la actividad de la toxina botulinum. Agentes particularmente preferidos son aquellos que no se cargan y no interfieren con la actividad de la toxina botulinum o la eficiencia de los complejos portadores de toxina en cruce con la piel. Los agentes de gelación

pueden ser agentes de gelación basados en ciertas celulosas, tal como hidroxipropilcelulosa (HPC) por ejemplo. En algunas modalidades, el complejo de toxina botulinum/portador se formula en una composición que tiene 2-4% HPC. Alternativamente, la viscosidad de una solución que contiene un complejo de toxina botulinum/portador se puede alterar al agregar polietilenglicol (PEG). En otras modalidades, la solución toxina botulinum/portador se combina con agente viscosos premezclados, tal como humectador Cetaphil®.

[0048] La composición de esta invención puede incluir agentes de partición. Como se utiliza aquí, un agente de "partición" es cualquier sustancia o aditivo que tiene la propiedad de evitar o minimizar la agregación no deseada o no controlada de la toxina botulinum con los portadores de esta invención. Los agentes de partición pueden ser útiles, por ejemplo, cuando una solución de toxina botulinum concentrada se debe emplear debido a la restricción de volumen. En estos casos, el agente de partición mantiene la toxina botulinum dispersa, evitando por lo tanto la agregación de la toxina que pudiera de otra forma ocurrir sin el agente de partición. De forma general, un agente de partición es (1) no irritante, (2) no destruye la toxina botulinum (3) no confiere ningún incremento en la permeabilidad, y (4) produce tamaños de partícula estables y confiables, (5) no se carga, y (6) no interfiere con complejos de la toxina y el portador transdérmico. Un ejemplo de un agente de partición adecuado es el etanol (EtOH). En modalidades preferidas, el EtOH es menor del 20% de la composición, y más preferiblemente, menor del 5% de la composición.

[0049] Por vía de ejemplo, si las restricciones de volumen requieren reconstituir 100 U de toxina botulinum en 0.5 ml de solución, a diferencia de 2.5 ml, uno observa típicamente que la toxina botulinum exhibirá agregación indeseada, y así

actividad reducida. Sin embargo, al agregar 1% de EtOH como un agente de dispersión, la actividad completa se mantiene aun después de 24 horas en esta concentración. Como otro ejemplo, el Botox® en 1.0 ml 0.9% de NaCl de reconstitución tiene actividad completa, mientras que la reconstitución a 0.5 ml en 1% y 5% de EtOH más 0.9% de NaCl produce soluciones con actividad completa.

[0050] En ciertas modalidades de esta invención, los puentes de polianión u oligo- se agregan a las composiciones de toxina botulinum para mejorar la complejación de la toxina con un portador de estructura cargado positivamente. Como es bien conocido en la técnica, la toxina botulinum es actualmente un complejo de proteínas diferentes, algunas de las cuales se cargan positivamente, y algunas de las cuales se cargan negativamente. Debido a la distribución del extracto de los componentes de la toxina que varían dependiendo de la fuente de la toxina, esta puede ser toxina botulinum de ciertas fuentes que tiene una propensión reducida para la complejación con las estructuras cargadas positivamente descritas aquí. Sin embargo, un aspecto de esta invención es el descubrimiento de que al agregar un puente de polianión u oligo- tal como las toxinas botulinum, la eficiencia y eficacia de la administración tópica se incrementa dramáticamente. Ejemplos adecuados de tales puentes de polianión/oligo-incluyen fosfato de sodio (5%), PBS o 5% de poli-L-aspartato (por ejemplo, con un PM de 3000).

[0051] Las composiciones de acuerdo con esta invención pueden estar en la forma de composiciones de liberación controlada o liberación sostenida, en donde la toxina botulinum y el portador se encapsulan o están contenidos en otra forma dentro de un material de tal forma que ellos se liberan sobre la piel en una forma controlada durante el tiempo. La toxina botulinum y el portador pueden estar

contenidos dentro de las matrices, liposomas, vesículas, microcápsulas, microesferas y similares, o con un material particulado sólido, todos los cuales se seleccionan y/o se construyen para suministrar la liberación de la toxina botulinum durante el tiempo. La toxina botulinum y el portador se pueden encapsular juntos (por ejemplo, en la misma cápsula) o en forma separada (en cápsulas separadas).

[0052] Utilizando las composiciones descritas aquí, la toxina botulinum se puede administrar a los músculos subyacentes de la piel, o a estructuras glandulares dentro de la piel, en una cantidad efectiva para producir parálisis, para producir relajación, aliviar contracciones, evitar o aliviar espasmos, reducir la salida glandular, u otros efectos deseados. El suministro local de la toxina botulinum de esta forma puede producir reducción de las dosis, reducir la toxicidad y permitir más optimización de dosis precisa para efecto deseado con relación a los materiales inyectables o implantables.

[0053] Las composiciones de la invención se aplica de tal forma que se administra una cantidad efectiva de la toxina botulinum. El término "cantidad efectiva" como se utiliza aquí significa una cantidad de toxina botulinum como se definió anteriormente que es suficiente para producir la parálisis muscular deseada u otro efecto biológico o estético, pero que implícitamente es una cantidad segura, es decir una que es suficientemente baja para evitar serios efectos colaterales. Los efectos deseados incluyen la relajación de ciertos músculos con la ayuda de, por ejemplo, la reducción de la apariencia de líneas finas y/o arrugas, especialmente en la cara, o ajustar la apariencia facial en otras formas tal como ensanchar los ojos, levantar las esquinas de la boca, o suavizar las líneas que salen del labio superior, o el relajación general de la tensión muscular. El último efecto mencionado, la relajación general de la tensión muscular, se puede efectuar en la

cara o en cualquier parte. Las composiciones de la invención pueden contener una cantidad apropiada efectiva de la toxina botulinum para aplicación como un tratamiento de dosis sencilla, o puede ser más concentrada, ya sea para dilución en el lugar de administración o para uso en múltiples aplicaciones. Aunque el uso de los portadores cargados positivamente de esta invención, una toxina botulinum se puede administrar transdérmicamente a un sujeto par tratar condiciones tales como músculos faciales indeseables u otros espasmos musculares, hiperhidrosis, acne, u otras condiciones en cualquier parte en el cuerpo en el que la relajación del dolor muscular o del espasmo se desea. La toxina botulinum se administra tópicamente para administración transdérmica a los músculos u otras estructuras asociadas con la piel. La administración se puede hacer, por ejemplo, a las piernas, hombros, espalda (que incluye la espalda inferior), axila, palmas, pies, cuello, ingle, dorso de las manos o pies, codos, brazos superiores, rodillas, piernas superiores, nalgas, torso, pelvis, o cualquier otra parte del cuerpo en donde se desee la administración de la toxina botulinum.

[0054] La administración de la toxina botulinum también se puede llevar a cabo para tratar otras condiciones, que incluyen el tratamiento de dolor neurológico, prevención o reducción de la migraña por dolor de cabeza u otro dolor de cabeza. Prevención o reducción del acne, prevención o reducción de contracciones de distonia o distónicas (si es subjetivo o clínico) prevención o reducción de síntomas asociados con hiperhidrosis subjetiva o clínica, reducir la hipersecreción o sudor, reducir o mejorar la respuesta inmune, o el tratamiento de otras condiciones para las que la administración de la toxina botulinum por inyección se ha sugerido o desarrollado.

[0055] La administración de la toxina botulinum u otras proteínas terapéuticas descritas aquí también se puede llevar a cabo para propósitos relacionados con inmunización. Sorprendentemente, la administración de la toxina botulinum descrita aquí también se puede llevar a cabo para reducir respuestas inmunes. Más específicamente, esta invención permite que se administre una toxina botulinum mediante una ruta alterada de administración, cambiando por lo tanto la presentación del antígeno complejo del agente. De esta forma, la invención puede ser útil para reducir la respuesta inmune a antígenos para la toxina botulinum y para facilitar la administración repetida sin reducción relacionada con la actividad inmune. Alternativamente, el complejo se puede preparar y aplicar tópicamente para mejorar una respuesta inmune, por ejemplo para suministrar inmunizaciones con respecto a varias proteínas, por ejemplo, para inmunizaciones de niños sin inyecciones. Para uso en relación con actividad inmune, una c se refiere a una cantidad de toxina botulinum suficiente para permitir a un sujeto montar una respuesta inmune a la toxina botulinum después de aplicación o una serie de aplicaciones de esta.

[0056] Más preferiblemente, las composiciones se administran por o bajo la dirección de un médico u otro profesional del cuidado de la salud. Ellas se puede administrar en un tratamiento sencillo o en series de tratamientos periódicos durante el tiempo. Para la administración transdérmica de la toxina botulinum para los propósitos mencionados anteriormente, una composición como se describió anteriormente se aplica tópicamente a la piel en una ubicación o ubicaciones en donde se desea el efecto. En modalidades en donde una solución de toxina botulinum/portador acuosa se aplica directamente a la piel, se prefiere cubrir el área tratada (por ejemplo, con humectante Cetaphil®) o ocluir el área tratada con una barrera (por ejemplo Telfa), con el fin de evitar que la solución se seque, lo

que conduciría a una reducción en la actividad de la toxina. Debido a su naturaleza, más preferiblemente la cantidad de toxina botulina aplicada se debe aplicar con cuidado, en una proporción de aplicación y frecuencia de aplicación que producirá el resultado deseado sin producir ningún resultado adverso o indeseado. De acuerdo con esto, por ejemplo, las composiciones tópicas de la invención se deben aplicar en una proporción de cerca de aproximadamente 1 U a aproximadamente 20,000 U, preferiblemente de aproximadamente 1 U a aproximadamente 10,000 U de toxina botulinum por cm^2 de superficie de piel. Dosis mayores dentro de estos rangos podrían preferiblemente ser empleadas en conjunto con materiales de liberación controlada, por ejemplo, o un acortador de tiempo de detención permitido sobre la piel antes de remoción.

[0057] La preparación apropiada de la superficie de la piel antes de la aplicación de la composición de toxina botulinum/portador es importante para mantener la eficacia de la solución. Por ejemplo, la introducción de tensoactivos sobre la superficie de la piel para el propósito de limpiar los aceites de la superficie sobre la piel antes de la aplicación es sorprendentemente contra productivo, en razón a que aparecen tensoactivos que destruyen la actividad de la toxina botulinum. Esto ocurre aun si la piel se lava posteriormente con agua varias veces antes de la aplicación de la solución toxina botulinum/portador. Aun los tensoactivos extremadamente gentiles, tales como aquellos encontrados en paños para bebés, parecen originar este fenómeno. De acuerdo con esto en modalidades preferidas de administración de las composiciones de esta invención, la piel se prelimpia utilizando solo agua. Lavar con solo agua también parece mejorar el transporte transdérmico moderado de la toxina botulinum.

[0058] Adicionalmente, la piel se puede pelar para reducir el estrato corneo de la capa antes de la aplicación del complejo de toxina botulinum/portador. En principio, el proceso de pelar la piel debe conducir a eficiencia mejorada de transporte transdérmico de la toxina botulinum. Sin embargo, el método utilizado para pelar la piel es importante. Por ejemplo, la reducción mediada por acetona de la capa de estrato corneo en humanos o animales parece reducir la actividad de la toxina botulinum aplicada posteriormente. En contraste, el pelado (es decir aplicar cintas sobre la superficie de la piel y luego remover la cinta) parece permitir la penetración más profunda de la toxina botulinum y la reducción de la dosis en modelos de ratón y humanos. Se presume que la abrasión de la superficie de la piel (por ejemplo por vía del uso de almohadillas abrasivas) podría originar un efecto similar como el pelado con cinta.

[0059] Esta invención también comprende dispositivos para la transmisión transdérmica de una composición que contiene toxina botulinum y un portador que tiene estructura cargada positivamente con grupos ramificados adheridos como se definió aquí. Tales dispositivos pueden ser simples en construcción como un parche para piel, o pueden ser dispositivos más complicados que incluyen medios para dispersar y monitorear la dispersión de la composición, y opcionalmente medios para monitorear la condición del sujeto (por ejemplo monitorear la reacción del sujeto a las sustancias que se dispensan).

[0060] Se debe notar que la elección de los materiales para la construcción del dispositivo es importante. Materiales preferidos para la construcción de dispositivos de suministro son aquellos que no conducen a pérdida de la actividad de la solución de toxina botulinum/portador, o a través de la degradación o adsorción no deseada de la toxina botulinum sobre una superficie del dispositivo.

Tal comportamiento no deseado se ha observado, por ejemplo, cuando la toxina botulinum/portador en una solución acuosa entra en contacto con la superficies de polipropileno, pero no cuando la solución de toxina botulinum/portador entra en contacto con las superficies de cloruro de polivinilo (PVC).

[0061] De forma general, las composiciones se puede preformular y/o preinstalar en un dispositivo o se pueden preparar, después, por ejemplo, utilizando un kit que aloja los dos ingredientes (toxina botulinum y portador) de forma separada pero que suministra medios para combinarlas en o antes del tiempo de aplicación. La cantidad de molécula portadora o la proporción de esta para la toxina botulinum dependerá sobre que portador se escoge para uso en la composición en cuestión. La cantidad apropiada o proporción de molécula portadora en un caso dado se puede determinar fácilmente, por ejemplo, al conducir uno o más experimentos, tales como aquellos descritos adelante.

[0062] En general, la invención también comprende un método para administrar una toxina botulinum a un sujeto o paciente en necesidad de esta, el método incluye administrar tópicamente una cantidad efectiva de la toxina botulinum en conjunto con un portador que tiene una estructura cargada positivamente con grupos ramificados unidos cargados positivamente, como se describe aquí. Por "en conjunción" se significa que los dos componentes (la toxina botulinum y el portador) se administran en un procedimiento de combinación, que puede involucrar combinarlos en una composición, que se administra posteriormente al sujeto o administrarlos en forma separada, pero en una forma tal que ellos actúan juntos para proveer el requisito de administración de una cantidad efectiva de la proteína terapéutica. Por ejemplo, una composición que contiene el portador se puede aplicar primero a la piel del sujeto, seguido por la aplicación de un parche

de piel u otro dispositivo que contiene la toxina botulinum. La toxina botulinum se puede incorporar en forma seca en un parche para piel u otro dispositivo dispensador, mientras que el portador cargado positivamente se puede aplicar a la superficie de la piel antes de la aplicación del parche de tal forma que los dos actúen juntos, resultando en la administración transdérmica deseada. Así, las dos sustancias (portador y toxina botulinum) actúan en combinación o quizás interactúan para formar una composición o combinación in situ. De acuerdo con esto, la invención también comprende un kit que incluye ambos un dispositivo para dispensar la toxina botulinum por vía de la piel y un líquido, gel, crema o similar que contiene el portador o estructura, y que es adecuado para aplicar a la piel o epitelio de un sujeto. Los kit para administrar la composición de la invención, bajo la dirección de un profesional del cuidado de la salud o por el paciente o sujeto, también puede incluir un aplicador habitual adecuado para ese propósito.

[0063] Las composiciones, kits y métodos de esta invención permiten el suministro de una toxina de botulinum más pura con mayor actividad específica y farmacocinéticas potencialmente mejoradas. Adicionalmente, el portador puede actuar como estabilizador, reduciendo la necesidad de proteínas accesorias externas (por ejemplo, seroalbúmina humana que varía de 400-600 mg o seroalbúmina recombinante que varía de 250-500 mg) y/o estabilizador de polisacárido, y puede producir reducciones benéficas en respuestas inmunes a la toxina botulinum. Adicionalmente, las composiciones son adecuadas para uso en ambientes fisiológicos con un pH que varía de aproximadamente 4.5 a aproximadamente 6.3, y puede así tener tal un pH. Las composiciones de acuerdo esta invención se pueden almacenar a temperatura ambiente o bajo condiciones de refrigeración.

[0064] Los siguientes son ejemplos representativos de la invención. Ellos demuestran la administración de complejos de neurotoxina botulinum funcionales a través de la piel sin requerir modificación covalente de la neurotoxina a ser administrada.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Transporte de una toxina botulinum in vivo utilizando un portador de peptídilo

[0065] Este experimento demuestra el uso de un portador de peptídilo para transportar un complejo grande que contiene una toxina botulinum de proteína etiquetada a través de la piel intacta después de un tiempo de administración sencillo con relación a los controles.

Selección de Estructura

[0066] La estructura cargada positivamente se ensambla al conjugador - Gly₃Arg₇ a polilisina (PM 112,000) por vía del carboxilo del terminal glicina de aminas libres de las cadenas laterales lisina en un grado de saturación de 18% (es decir, 18 afuera de cada 100 residuos lisina se conjugan para un -Gly₃Arg₇). La estructura modificada se designa "KNR". El policatión de control fue polilisina no modificada (designada "K", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote.

Agente terapéutico:

[0067] La marca Botox® de toxina botulinum A (Allergan) se selecciona para este experimento. Esta tiene un peso molecular de aproximadamente 150,000.

Preparación de las muestras

[0068] La toxina botulinum se reconstituye de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una alícuota de la proteína se biotiniliza con un exceso de molar de 12 veces de biotina sulfo-NHS-LC (Pierce Chemical). El producto etiquetado se designa "Btox-b".

[0069] En cada caso, un exceso de poliacrilato se emplea para ensamblar un complejo final que tiene un exceso de carga positiva como en la administración de complejos de nucleótido grandes altamente negativos. Una carga de red neutral o positiva evita la repulsión complejo de proteína de proteoglicanos de superficie celular altamente negativa y matriz extracelular. La dosis de Btox-b se estandariza a través de todos los grupos, como fue el volumen total y final de pH de la composición a ser aplicada tópicamente. Las muestras se preparan como sigue:

[0070] Grupos etiquetados "JMW-7": 2.0 unidades de Btox-b por alícuota (es decir 20 U total) y portador peptídico KNR en una proporción PM calculada de 4: 1 se mezclan para homogeneidad y se diluyen en 200 microlitros con salina amortiguada de fosfato. La composición resultante se mezcla para homogeneidad con 1.8 ml de loción Cetaphil® y se divide en porciones de 200 microlitros.

[0071] Grupos etiquetados "JMW-8": 2.0 unidades de Btox-b por alícuota (es decir 20 U total) y K en una proporción PM de 4:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen en 200 microlitros con salina amortiguada de fosfato. La composición resultante se mezcla para homogeneidad con 1.8 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros.

Experimentos animales para determinar la eficiencia de la administración transdérmica después de tratamiento de tiempo sencillo con portadores de peptidilo y Btox marcado:

[0072] Se anestesian animales por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después de ser anestesiados, 6 ratones negros C57 (n= 4 por grupo) experimentaron aplicación tópica de una dosis medida de 200 microlitros del tratamiento aplicado a la porción craneal de la piel de la espalda (seleccionada debido a que el ratón no puede alcanzar esta región con su boca o extremidades) los animales no sufrieron de depilación. A 30 minutos después de tratamiento inicial, se les practicó eutanasia a los ratones por vía de inhalación de CO₂ y los segmentos de piel tratados se cosecharon en espesor completo por observadores cegados. Los segmentos tratados se dividieron en tres porciones iguales; la porción craneal se fija en 10% neutral de formalina amortiguada durante 12-16 horas luego se almacena en 70% de etanol hasta que se embebe en parafina. La porción central se congela y se emplea directamente para visualización de biotina por observadores cegados como se resume adelante. El segmento de caudal tratado se congela para estudios de solubilización.

[0073] La visualización de biotina se conduce como sigue. En resumen, cada sección se sumerge durante 1 hora en solución amortiguadora de NeutrAvidin®.

~~101~~
101

Para visualizar la actividad de fosfatasa alcalina, se lavan secciones cruzadas en salina cuatro veces luego se sumergen en NBT/BCIP (Pierce Scientific) durante 1 hora. Las secciones se enjuagan luego en salina y se fotografian por completo en un microscopio Nikon E600 con lentes plan-apocromat.

Datos de manejo y análisis estadístico

[0074] El tñido positivo se determina por observador cegado por vía de análisis de imagen de tanda utilizando el software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) y se normaliza al área de sección cruzada total para determinar el porcentaje de tñido positivo para cada uno. La media y el error estándar se determinan posteriormente para cada grupo con análisis de significancia en confianza del 95% en una vía ANOVA de mediciones repetidas utilizando el software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados

[0075] El área de sección cruzada media que fue positiva para toxina botulinum biotinilada se reporta como porcentaje del área total después de administración tópica de tiempo sencillo de Btox-b con cada KNR ("EB-Btox") o K ("nl"). Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 1 y se ilustran en la Figura 1. En la Figura 1, el área positiva de la etiqueta se determina como porcentaje del área total después de 3 días de una vez de tratamiento diario con "EB-Btox" que contienen Btox-b y el portador peptidilo KNR y "nl" que contiene Btox-B con policación K como un control. La media y el error estándar se describen para cada grupo.

Tabla 1. La media y el error estándar para cada área de toxina botulinum etiquetada como porcentaje de la sección cruzada después de administración tópica de tiempo sencillo de Btox-b con KNR (JMW-7) o K (JMW-8) durante 30 minutos.

Grupo	Media	Error Estándar
JMW-7	33.000	5.334
JMW-8	8.667	0.334

P= 0.0001 (*significativo en 99%*)

EJEMPLO 2.

Eficacia terapéutica de una preparación de toxina de botulinum tópica con un portador de peptidilo

[0076] El ejemplo 1 demuestra que el portador transdérmico de peptidilo se le permite transferencia eficiente de toxina botulinum después de administración tópica en un modelo de murino de piel intacta. Sin embargo, este experimento no indica si la toxina botulinum de proteína compleja se libera en una forma funcional después de translocación a través de la piel. El siguiente experimento se construye así para evaluar si la toxina botulinum puede ser suministrada terapéuticamente a través de contacto con la piel como un agente tópico utilizando este portador de peptidilo (de nuevo, sin modificación covalente de la proteína).

[0077] La estructura cargada positivamente se ensambla de nuevo al conjugar - Gly₃Arg₇ a polilisina (PM 112,000) por vía del carboxilo de la glicina terminal a aminas libres de las cadenas laterales de lisina en un grado de saturación de 18%

(es decir, 18 fuera de cada 100 residuos de lisina se conjugan para un -Gly₃Arg₇). La estructura modificada se designa "KNR". El control de policación fue polilisina no modificada (designada "K", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote. El mismo agente terapéutico de toxina botulinum se utiliza como en el Ejemplo 1, y se prepara de la misma forma. Las muestras se preparan como sigue:

[0078] El grupo etiquetado "JMW-9": 2.0 unidades de toxina botulinum por alícuota (es decir 60 U total) y portador el peptidilo KNR en una proporción PM calculada de 4:1 se mezclan para homogeneidad y se diluyen a 600 microlitros con salina amortiguada con fosfato. La composición resultante se mezcla para homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros.

[0079] Grupo etiquetado "JMW-10": 2.0 unidades de toxina botulinum por alícuota (es decir 60 U total) y K en una proporción PM de 4:1 se mezclan para homogeneidad y se diluyen a 600 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla para homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se dividen en porciones de 200 microlitros.

[0080] Grupo etiquetado "JMW-11": 2.0 unidades de toxina botulinum por alícuota (es decir 60 U total) sin policación se diluye a 600 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla para homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros.

Experimentos animales para determinar la eficacia terapéutica después tratamiento de tiempo sencillo con portadores peptidilo y toxina botulinum

[0081] Se anestesian animales por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después que se anestesian, 6 ratones negros C57 (n= 4 por grupo) experimentaron aplicación tópica de dosis medida de 400 microlitros del tratamiento apropiado aplicado uniformemente de los dedos a la pierna. Se tratan ambos miembros, y los tratamientos se aleatorizan para cualquier lado. Los animales no experimentan depilación. A 30 minutos después de tratamiento inicial, se evalúan los ratones para capacidad de abducción digital de acuerdo con las calificaciones de abducción digital publicadas para movilidad de pata después de administración de toxina botulinum [Aoki, KR. *A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. Toxicon.* 2001 Dec; 39(12): 1815-20]. También se mide la movilidad de los ratones subjetivamente.

Datos de manejo y análisis estadístico

[0082] La calificación de abducción digital se tabulan independientemente por dos observadores cegados. La media y el error estándar se determinan posteriormente para cada grupo con análisis de significancia en 95% de confianza en una forma de repetición ANOVA utilizan software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados

[0083] Las calificaciones de abducción digital media después de administración tópica en tiempo sencillo de toxina botulinum con KNR ("JMW-9"), K ("JM-10") o diluida sin polimerización ("JMW-H"), se presenta en la tabla 2 y se ilustra en la fotomicrografía representativa de la Figura 2 adelante. El portador peptídico KNR produjo suministro funcional significativo estadísticamente de la toxina botulinum a

LOS

través de la piel con relación a ambos controles, que fueron comparables el uno al otro. Repeticiones independientes adicionales (total de los tres experimentos independientes todos con conclusiones idénticas en parálisis estadísticamente significativa de toxina botulinum tópica con KNR no controles) del presente experimento confirmó los presentes hallazgos y revela diferencias no significativas entre la toxina botulinum con o sin K (es decir ambos controles). De forma interesante, los ratones de ambularon consistentemente con una pata paralizada (que ocurre en el 100% de los animales tratados y el 0% de controles de cualquier grupo de control). Como se muestra en la Figura 2, un miembro tratado con toxina botulinum más la polilisina de policación de control o con la toxina botulinum sin policación ("solo Botox") puede movilizar los dedos como un mecanismo de defensa cuando se pincha, pero los miembros tratados con toxina botulinum más el KNR portador peptidilo ("Essentia Botox lotion") no se puede mover.

Tabla 2. Calificaciones de abducción digital 30 minutos después de aplicación tópica de tiempo sencillo de toxina botulinum con el Portador de peptidilo de KNR ("JMW-9") con un policación de control K ("JMW-10"), o solo ("JMW-11").

Grupo	Media	Error Estándar
JMW-9	3.333	0.333
JMW-10	0.333	0.333
JMW-11	0.793	0.300

P= 0.0351 (*significativo en 95%*)

Conclusiones

[0084] Este experimento sirve para demostrar que el portador transdérmico de peptidilo puede transportar una cantidad terapéuticamente efectiva botulinum

terapéutico a través de la piel sin modificación covalente del terapéutico. El experimento también confirma que la toxina botulinum no funciona cuando se aplica tópicamente en controles.

EJEMPLO 3

Eficacia terapéutica de una preparación de toxina botulinum con un portador no peptídico

[0085] Este experimento demuestra el desempeño de un portador no peptídico en la invención.

Métodos

Selección de estructura

[0086] La estructura cargada positivamente se ensambla al conjugador -Gly₃Arg₇ a polietilenoimina (PEI) PM 1,000,000 por vía del carboxilo de la glicina terminal a aminas libres de las cadenas laterales PEI en un grado de saturación de 30% (es decir 30 de fuera de cada 100 residuos de lisina se conjugan con un Gly₃Arg₇). La estructura modificada se designa "PEIR" para denotar el portador no peptídico grande. El policatión de control fue PEI no modificado (designado "PEI" Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote. El mismo agente terapéutico de toxina botulinum se utiliza como en el Ejemplo 1.

[0087] La toxina botulinum se reconstituye del producto Botox de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cada caso, un exceso de policatión se emplea

para ensamblar un complejo final que tiene un exceso de carga positiva como se suministra de los complejos de nucleótidos grandes altamente negativos. Una carga positiva o neutral neta evita la repulsión del complejo de proteína de proteoglicanos de superficie celular altamente negativa y matriz extracelular. La dosis de toxina botulinum se estandariza a través de todos los grupos como lo fue el volumen total y final de pH de la composición para ser aplicada tópicamente. Las muestras se preparan como sigue:

[0088] Grupo etiquetado "AZ": 2.0 unidades de toxina botulinum por alícuota (es decir 60 U total) y el portador no peptídico PEIR forma ultrapura en una proporción PM calculada de 5:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen a 600 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla para homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros.

[0089] Grupo etiquetado "BA": 2.0 unidades de toxina botulinum por alícuota (es decir 60 U total) y PEI en una proporción de carga de 5:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen a 600 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla para homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros.

Experimentos animales para determinar la eficacia terapéutica después tratamiento de tiempo sencillo

[0090] Se anestesian animales por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después se anestesian, 6 ratones negros C57 (n= 3 por grupo) que sufren aplicación tópica de dosis medida de 400 microlitros del

tratamiento apropiado aplicado uniformemente desde los dedos a la pierna. Se tratan ambos miembros, y los tratamientos se aleatorizan para cualquier lado. Los animales no experimentan depilación. A 30 minutos después del tratamiento inicial, se evalúan los ratones para capacidad de abducción digital de acuerdo con las calificaciones de abducción digital publicadas para movilidad de pata después de administración de toxina botulinum [Aoki, KR. *A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice*. *Toxicon*. 2001 Dec; 39(12): 1815-20]. También se evalúa la movilidad de los ratones subjetivamente.

Manejo de datos y análisis estadístico

[0091] La calificación de abducción digital se tabulan independientemente por dos observadores cegados. La media y el error estándar se determinan posteriormente para cada grupo con análisis de significancia en 95% de confianza en una forma de repetición ANOVA utilizando software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados

[0092] Las calificaciones de abducción digital media después de administración tópica de tiempo sencillo de toxina botulinum con PEIR ultrapuro ("AZ"), o PEI de policación de control ("BA"), se presentan en la tabla 3 y la repetición se presenta como Tabla 4 (repetición independiente sencilla para este experimento). El portador peptídico PEIR produjo suministro funcional estadísticamente significativo de toxina botulinum a través de la piel con relación a los controles. Como se observó anteriormente, los animales caminaron en círculos con los miembros paralizados.

Tabla 3. Las calificaciones de abducción digital 30 minutos después de administración tópica de tiempo sencillo de Botox con PEIR ultrapuro ("AZ"), o policación de control PEI ("BA"). Se presenta la media y el error estándar.

Grupo	Media	Error Estándar
BA	0,833	0,307
AZ	3,917	0,038

P= 0.0002 (significativo en 99%)

Tabla 4. Las calificaciones de abducción digital 30 minutos después de administración tópica de tiempo sencillo de Botox con PEIR ultrapuro ("AZ1"), o policación de control PEI ("BA1"). Se presentan la media y el error estándar.

Grupo	Media	Error Estándar
BA1	0.333	0.211
AZ1	3.833	0.167

P= 0.0001 (significativo en 99%)

Conclusiones

[0093] Este experimento demuestra que el portador transdérmico no peptidilo puede transportar dosis terapéuticas de toxina botulinum a través de la piel sin modificación anterior covalente de la toxina botulinum. Estos hallazgos complementan aquellos con agentes de transferencia de peptidilo. La opción de utilizar un portador no peptidilo o un peptidilo para lograr el efecto terapéutico que permitirá la adaptación a circunstancias específicas, ambientes y métodos de aplicación y agregar al ancho de la plataforma de suministro transdérmico de esta invención.

EJEMPLO 4

Eficacia terapéutica de una preparación de toxina botulinum con portador de peptidilo para estudio de hiperhidrosis de la frente y arrugas

[0094] Este experimento demuestra que la toxina botulinum puede ser suministrada terapéutica a través de de contacto con la piel como un agente tópico que utiliza este portador peptidilo para tratamiento de estudio de hiperhidrosis de la frente y arrugas en sujetos humanos.

Procedimiento experimental para estudio de hiperhidrosis de la frente y arrugas:

[0095] Las fotografías post-tratamiento y línea base de la frente de sujetos se toma en un fondo azul utilizando una cámara Nikon D70 con flash Nikon TTL Macro- speedlight SB29s (Nikon, Inc. USA).

[0096] Los videos postratamiento y de línea base de la frente del sujeto se toma en un fondo azul utilizando una cámara filmadora Sony Digital Handycam.

[0097] Se desarrolla ensayo de almidón/yodo de Minor para visualizar la producción de sudor utilizando 10% de solución de yodo povidona tópica (Walgreen Co., Deerfield, Illinois) y 100% de almidón de maíz Kingsford (ACH Food Companies, Inc., Memphis, Tennessee). Se pinta la frente del sujeto con un solución de yodo utilizando bolas de algodón estéril (Johnson & Johnson Consumer Product Company, Skillman, New Jersey), y luego se le permite secar completamente. El área fue ligeramente empolvada con polvo de almidón utilizando bolas de algodón estéril. Se induce el sudor con actividad física a

temperatura ambiente. Aparecen manchas negro-azul oscuro cuando en la medida en que el sudor disuelve el yodo y reacciona con el polvete almidón. Las fotografías post tratamiento y línea base de el ensayote yodo-almidón se toman en su fondo azul utilizando una cámara Nikon D70 con flash Nikon TTL Macro-speedlight SB28s. la frente del sujeto se limpia con 70% de EtOH y luego agua desionizada.

[0098] El área de tratamiento predefinida del sujeto en la frente se prepara por el método de pelado de cinta no invasivo para el estrato comeo antes de la aplicación del tratamiento. Se aplica cinta precortada al área de tratamiento con presión firme durante pocos segundos. Esta se remueve rápidamente al halar una de las esquinas de la cinta. La segunda cinta se aplica cuidadosamente en la misma área inmediatamente después que se remueve la primera cinta. El pelado con cinta se repite 3-5 veces.

Preparación de tratamiento

[0099] La solución de reconstitución Botox de 0.9% de cloruro de sodio estéril (Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) más 5% de EtOH más 5% de solución de poliaspartato de cadena corta etiquetado A-3C (Donlar BioPolymer, Inc. Bedford Park, Illinois) se prepara (es decir, para cada solución de 1.0 mililitros, 900 microlitros de 0.9% de cloruro de sodio más 50 microlitros de 100% de EtOH más 50 microlitros de solución de poliaspartato de cadena corta). Se prepara Kn21T en concentración de 1 miligramo/mililitro con 0.9% de cloruro de sodio, más 5% EtOH (es decir 500 microlitros de Kn21T se divide en alícuotas y se agrega 25 microlitros de 100% EtOH). Como se utiliza aquí, el Kn21T se refiere a una estructura de polilisina cargada positivamente que tiene un peso molecular de

21,000 y grupos ramificados TAT. 100 unidades de Botox (Allergan, Irvine, CA) se reconstituyen con 1.0 mililitros de solución reconstituyente utilizando jeringa de 3 ml libre látex con 18G 11-1/2 (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey). El Botox reconstituido se mezcla cuidadosamente por 8 veces de inversión. 200 unidades de Botox se utilizan para cada sujeto. La "Essentia Botox solution" se prepara con 200 unidades de Botox y Kn21T más 5% EtOH (es decir 2.0 mililitros de Botox se agrega a 500 microlitros de Kn21T más 25 microlitros de 100% EtOH) y se decanta a temperatura ambiente durante 5 minutos para que se forme el complejo.

[0100] La solución de control se prepara con solución reconstituyente y Kn21T más 5% EtOH (es decir 2.0 ml de solución reconstituyente se agrega a 500 microlitros de Kn21T más 25 microlitros de 100% EtOH) y se mantiene a temperatura ambiente.

Aplicación del tratamiento

[0101] Se reclina al sujeto en una mesa con una cubierta protectora alrededor de los ojos, cara y cuerpo superior. El tratamiento se aplica uniformemente a la frente del sujeto utilizando una pipeta y masajeando la piel en movimiento circular con los dedos mientras que se utilizan guantes de nitrilo libres de polvo. El área de tratamiento se cubre con una capa delgada de crema humectante Cetaphil® (Galderma, Fort Worth, TX) e incubado durante 60 minutos. Después de incubación de 60 minutos se remueve el tratamiento con almohadillas de gasa estéril. Las almohadillas de gasa y los guantes se desechan en una bolsa de bioriesgo.

Resultados:

[0102] La figura 3 describe la reducción significativa en la longitud, profundidad de las arrugas después de tratamiento tópico con portador de peptidilo y combinación de botulinum. Este experimento confirma que la toxina botulinum aplicada tópicamente cuando se combina con el portados transdérmico, puede producir parálisis muscular significativa lo que produce un efecto cosmético. La Figura 4 es un gráfico de Mikrosil de la piel tratada (A) versus piel no tratada (B). las arrugas son visibles en el gráfico de la piel no tratada.

[0103] La Figura 5 y 6 muestran los resultados del ensayo de almidón/yodo de Minor la Figura 5 muestra tomada 2 minutos después de aplicación, con el panel (A) correspondiente al lado tratado con Essentia Botox lotion, y el panel (B) que corresponde con el lado tratado con una loción de control que contiene solo portador Kn21T. la Figura 6 es la misma como la Figura 5, excepto que esta se tomó a los cuatro minutos. Note la coloración más pronunciada en el lado de loción de control, lo que indica que la piel en ese lado está secretando más sudor. Note también que el sudor empieza antes en el lado no tratado.

Conclusiones

[0104] Este ejemplo demuestra que los complejos tópicamente de la toxina botulinum pueden producir beneficio estético significativo en la reducción de arrugas finas y gruesas. Este efecto transepitelial confirma adicionalmente que la parálisis del músculo puede estar acompañada con portadores apropiados después de aplicación tópica de complejos de toxina botulinum tales como aquellos descritos aquí. Este ejemplo indica así que la aplicación tópica de la

toxina botulinum puede conducir a la relajación de los espasmos musculares tales como blafarospasmo o tortícolis así como también el alivio del dolor relacionado con espasmo muscular tal como dolor de la espalda inferior.

EJEMPLO 5

Eficacia terapéutica de una preparación de toxina botulinum tópica con portador peptídico para hiperhidrosis axilar

[0105] Este experimento demuestra si la toxina botulinum se puede suministrar terapéuticamente a través de contacto con la piel como un agente tópico que utiliza este portador peptídico para el tratamiento de hiperhidrosis axilar en sujetos humanos (n= 10 axilas por grupo con una axila tratada y una axila de control por paciente en una forma de ciego doble aleatorizado).

Estudio de control para hiperhidrosis axilar

[0106]

- Edad: 18 años o mayor
- Voluntarios saludables
- Consentimiento informado dado e informado por el voluntario
- El sujeto está dispuesto a seguir las instrucciones y regresar para continuar con las visitas
- El sujeto tiene presencia de hiperhidrosis subjetiva preexistente
- El sujeto no está embarazado o planea llegar a estar embarazada dentro de los siguientes meses

- El sujeto vive y/o trabaja en San Francisco o cerca del área de estudio
- El sujeto no tiene tratamiento para sudor dentro de los pasados 6 meses
- El sujeto no planea tener tratamiento de sudor axilar dentro de los siguientes 3 meses.

Procedimientos de medición gravimétricos

[0107] Como una parte del procedimiento de medición gravimétrico, se aclimatan primero los sujetos al área de ensayo. Específicamente, cada sujeto se sienta durante 15 minutos en una temperatura ambiente de 72-77° F en posición de descanso.

[0108] **Preparación de la axila:** (se usan guantes de nitrilo libres de polvo para los siguientes procedimientos). El sujeto cambia a capa y brasier desechable (si es una mujer) o retira todas las prendas corporales superiores (si es un hombre) de tal forma que expone las axilas completamente. El área de dosis se predetermina para ser el área cubierta por la piel que lleva vello, más un área que se extiende un centímetro más allá del área que lleva vello en cada axila. El área de dosis se limpia con una almohadilla de gasa estéril prehumectada de un tubo cónico de 50 ml para limpiar con 5 recorridos de largo de arriba abajo en la misma dirección utilizando un lado de la gasa. Esta etapa se repite tres veces más con una almohadilla de gasa prehumectada limpia cada vez mientras que no se irrite o raspe la piel. Las almohadillas de gasa se desechan en la basura. El mismo procedimiento de lavado se repite para la otra axila. La axila se seca con gasa estéril seca al utilizar un movimiento firme de arriba hacia debajo de la axila

mientras que no irrite o raspe la piel. Luego, la axila se seca adicionalmente al colocar un papel filtro bajo el pliegue de la axila y permitiendo al filtro secar en el sitio de ensayo durante 5 minutos luego del procedimiento para evaluación gravimétrica. El paciente se sienta con sus brazos contra su cuerpo en una posición de descanso. El papel filtro se desecha en la basura. Se le permite al sujeto descansar durante un minuto sin manipulación de la axila antes de la primer evaluación gravimétrica.

[0109] **Medición de producción de sudor (medición gravimétrica):** (un nuevo par de guantes de nitrilo libres de polvo se utilizan antes de estas mediciones). El sujeto mantiene sus manos juntas en la nuca para exponer completamente las axilas, mientras que se reclina parcialmente (aproximadamente 45 grados). Se remueve el papel filtro prepesado de un tubo de almacenamiento cónico y se colocan bajo la axila del sujeto con la punta de un filtro que se alinea con el centro de la línea de pliegue axilar. El papel de filtro se mantiene en lugar utilizando los dedos mientras que el sujeto relaja los brazos la costado del cuerpo. El sujeto se sienta manteniendo ambos brazos apretados contra su tronco durante 5 minutos. La medición de tiempo inicia cuando el papel de filtro se coloca de forma segura bajo ambas axilas. Ambas axilas se miden simultáneamente. Después de 5 minutos, el papel filtro se remueve de la axila y se coloca de nuevo en los mismos tubos cónicos respectivos. El papel filtro colocado primero se remueve primero. Las tapas de los tubos cónicos se atomillan herméticamente para evitar la evaporación del sudor del tubo. La producción de sudor se repite dos veces más en intervalos de 1 minuto.

Ensayo de almidón/yodo de Minor

[0110] El sujeto mantiene sus manos juntas en la nuca para exponer las axilas completamente. Se pinta solución de yodo en el área de la axila predeterminada como se hizo anteriormente con una almohadilla de gasa estéril y se le permite secar al aire cuando el yodo se ha secado completamente, una capa delgada de almidón se coloca en el área cubierta por el yodo con bolas de algodón. El yodo se le permite secar al aire antes de la aplicación de almidón con el fin de reducir el fondo y positivo falso. El sujeto se sujeta manteniendo ambos brazos apretados contra su tronco. Después de 5 minutos, el sujeto levanta sus brazos y mantiene las manos juntas en la nuca para exponer completamente la axila. Fotografías de cada axila con la axila izquierda y derecha y se toma claramente la fecha. La axila se limpia con 70% de EtOH y luego con agua desionizada estéril.

Preparación del tratamiento

[0111] Se prepara Kn21pr en una concentración de un miligramo/mililitro con salina más 5% EtOH (es decir 500 microlitros de Kn21pr que se divide y se agrega 25 microlitros de 100% EtOH). Como se utiliza aquí, el Kn21pr se refiere a una estructura de polilisina cargada positivamente con un peso molecular de 21,000 y grupos ramificados que comprenden oligoarginina protegida. 100 unidades de Botox® (Allergan, Irvine, CA) se reconstituye con 0.75 mililitros de 0.9% de cloruro de sodio (Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) utilizando una jeringa 3 ml estéril libre de látex con 18G11/2 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey). El Botox® reconstituido se mezcla cuidadosamente por inversión 8 veces. 200 unidades de Botox® se utilizan para cada sujeto. La solución de tratamiento se prepara con 200 unidades de Botox® y Kn21pr más 5% EtOH (es decir, 1.5 microlitro de Botox) se agrega a 500 microlitros de Kn21pr más 25 microlitros de 100% EtOH y se mantiene a temperatura ambiente durante 5

minutos para permitir que se formen los complejos. Después de un periodo de incubación de 5 minutos, aproximadamente 1.0 mililitros de 4% HPLC (hidroxipropilcelulosa) (con 1% de EtOH) se agrega y se mezcla gentilmente y vigorosamente con una espátula de metal pequeña. La solución de tratamiento homogéneo se transfiere dentro de una jeringa de 3 ml y tapa de punta de jeringa Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey).

[0112] La solución de control se prepara con 0.9% de cloruro de sodio y Kn21pr más 5% de EtOH (es decir 1.5 mililitros de 0.9% de cloruro de sodio se agrega a 500 microlitros de Kn21pr más 25 microlitros de 100% EtOH) y se decanta a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de incubación, aproximadamente 1.0 microlitros de 4% HPC (con 1% de EtOH) se agrega y mezcla gentilmente y vigorosamente con una espátula de metal pequeña. La solución de control homogénea se transfiere en una jeringa de 3 ml y se tapa con una punta de jeringa.

Aplicación de tratamiento (uso de guantes de nitrilo libres de polvo)

[0113] El sujeto mantiene sus manos juntas entrelazando los dedos y colocándolas en la nuca para exponer completamente la axila. Luego, el sujeto se reclina en una silla en un ángulo de aproximadamente 45 grados., como se muestra en la figura 7, se mapea el área de dosis visualmente /es decir un centímetro más allá del área que lleva vello) para la aplicación. El área de dosis se revisa para secado. Se remueve la tapa de punta de la jeringa de la jeringa marcada "L" para la izquierda y "R" para la derecha y se prepara para la aplicación a la axila del sujeto. La solución de tratamiento se esparce uniformemente alrededor del área de dosis con una jeringa y se masajea en la piel con los dedos

durante 1 minuto. Se coloca el sujeto con los brazos hacia abajo a lo largo del costado del cuerpo y se incuba durante 60 minutos. Después de incubación durante 60 minutos, el tratamiento se limpia con almohadillas de gasa estéril. La almohadilla de gasa y los guantes se desechan en una bolsa de bioriesgo. El sujeto descarga.

Resultados

[0114] El Essentia topical BT reduce el sudor al 65% y se ilustra en la Figura 8A. La producción de sudor 4 semanas después de tratamiento (aleatorizado por lado) con estructura Kn21pr sola (control) o estructura Kn21pr más 200U Botox (proporción a línea base) análisis estadístico para rangos firmados Wilcoxon que utilizan NPSS con P como se anota y significancia en $P < 0.05$ [$n=10$ sujetos].

[0115] Segunda comparación: línea base versus 4 semanas ver (Figura 8B). producción de sudor (mg x 5 minutos) 4 semanas después de tratamiento axilar (aleatorizado por lado) con estructura Kn21pr sola (control) o estructura Kn21pr sola Botox 200U (Índice de tratamiento para control) presentado en la Tabal 6. Análisis estadístico por Wilcoxon marca rangos utilizando NPSS con P como se anota y significancia en $P < 0.05$ (Pr T $p=0.0217$) [$n=10$].

[0116] La Figura 9 muestra fotografías que describen el ensayo de almidón/yodo de Minor antes y después de tratamiento con "Essentia Botox lotion" tópicamente para el tratamiento de hiperhidrosis axilar. El ensayo de almidón/yodo en línea base versus dos semanas se muestra en donde la axila derecha se trata con "Essentia Botox lotion" (a y c) y la axila izquierda se aplica con el control (b y d) para el sujeto # 12. Estas fotografías ilustran los beneficios típicos observados

después de tratamiento con portador más Botox en almidón yodo. Aunque se observan algunos cruces en el lado de control (consistente con 25% de reducción en datos gravimétricos), las reducciones significativas se producen con tratamiento (consistente en 75% de reducción en datos gravimétricos en el lado tratado).

Conclusiones

[0117] Este ejemplo confirma que la aplicación tópica de los complejos de botulinum formados de acuerdo con la invención descrita aquí producen fácilmente beneficio terapéutico en la reducción del sudor en una cohorte de pacientes con hiperhidrosis- subjetiva o cuantitativa. Este efecto en la reducción del sudor solo se ha producido en el caso de la frente presentado anteriormente y en la aplicación palmar/plantar cuando se combina con un guante para limitar la expansión de la formulación durante el tiempo de detención. Este suministro transepitelial de los complejos de toxina botulinum para beneficio terapéutico confirma adicionalmente que se puede extender la aproximación a otros casos en donde la función SNAP o las señales de acetilcolina son cruciales tales como la disfunción de vejiga o espasmo, aplicaciones gastrointestinales, o secreciones de la glándula sebácea para reducción de olor o prevención/tratamiento de acné.

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES :

1. Una composición que comprende una toxina botulinum y un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente, en donde la asociación entre el portador y la toxina botulinum es no covalente.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la toxina botulinum es un derivado de toxina botulinum.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la toxina botulinum comprende una toxina botulinum recombinante.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la toxina botulinum comprende una toxina botulinum modificada.
5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la toxina botulinum se selecciona de serotipos de toxina botulinum A, B, C, D, E, F y G,
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en la que la toxina botulinum es toxina botulinum A.
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en la que la toxina botulinum es toxina botulinum B.

8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en la que la toxina botulinum es toxina botulinum C₁.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en la que la toxina botulinum es toxina botulinum D.
10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en la que la toxina botulinum es toxina botulinum E.
11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el portador comprende un polipéptido que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente seleccionados de (gly)m-(arg)n₂, HIV-TAT, Antennapedia PTD, y fragmentos de HIV-TAT o de Antennapedia PTD, en el que el subíndice n₁ es un entero de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice n₂ es independientemente un entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25.
12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11 en la que el portador comprende un polipéptido que tiene grupos ramificados cargados positivamente seleccionados de -(gly)n₁-(arg)n₂ en el que el subíndice n₁ es un entero de cerca de 0 a aproximadamente 20 y el subíndice n₂ es independientemente un entero impar de cerca de 5 a aproximadamente 25.
13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 en la que el subíndice n₁ es un entero de 0 a aproximadamente 8.

14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 en la que el subíndice n1 es un entero de cerca de 2 a aproximadamente 5.
15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 en la que el subíndice n2 es un entero impar de cerca de 7 a aproximadamente 17.
16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 en la que el subíndice n2 es un entero impar de cerca de 7 a aproximadamente 13.
17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11 en la que el portador comprende un polipéptido que contiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente seleccionados HIV-TAT y fragmentos de estos.
18. Una composición de acuerdo con la reivindicación 17 en la que los grupos ramificados son fragmentos HIV-TAT son cargados positivamente que tienen la fórmula (gly)p-RGRDDRRQRRR-(gly)q, (gly)p-YGRKKRRQRRR-(gly)q, o (gly)p-RKKRRQRRR-(gly)q, en donde el subíndice p y q cada uno son independientemente un entero de 0 a 20.
19. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que los grupos ramificados cargados positivamente comprenden al menos 0.05% en peso del peso total del portador.

20. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que los grupos ramificados cargados positivamente comprenden de cerca de 0.5% a cerca de 45% en peso del peso total del portador.
21. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que los grupos ramificados cargados positivamente comprenden de cerca de 0.1% a cerca de 30% en peso del peso total del portador.
22. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente.
23. Una composición de acuerdo con la reivindicación 22 en la que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente.
24. Una composición de acuerdo con la reivindicación 23 en la que la polilisina tiene un peso molecular de cerca de aproximadamente de 10,000 a 1,500,000.
25. Una composición de acuerdo con la reivindicación 23 en la que la polilisina tiene un peso molecular de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.
26. Una composición de acuerdo con la reivindicación 23 en la que la polilisina tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000.

27. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la estructura comprende un portador no peptídico cargado positivamente.
28. Una composición de acuerdo con la reivindicación 27 en la que la estructura comprende una polialquileimine cargada positivamente.
29. Una composición de acuerdo con la reivindicación 28 en la que la polialquileimine es una polietileneimine.
30. Una composición de acuerdo con la reivindicación 29 en la que la polietileneimine tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 2,500,000.
31. Una composición de acuerdo con la reivindicación 29 en la que la polietileneimine tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,800,000.
32. Una composición de acuerdo con la reivindicación 29 en la que la polietileneimine tiene un peso molecular de aproximadamente 500, 000 a aproximadamente 1,400,000,
33. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene un pH de aproximadamente 4.5 a aproximadamente de 6.3.
34. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que es estable cuando se almacena a temperatura ambiente o bajo condiciones de refrigeración.

35. Una composición de liberación controlada de acuerdo con la reivindicación 1,
36. Una composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1.
37. Una composición de gel de acuerdo con la reivindicación 1.
38. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que es una crema, loción o ungüento.
39. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente salina.
40. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente salina y un sistema amortiguador de pH.
41. Un kit para la administración de una toxina botulinum a un sujeto que comprende una toxina botulinum y una cantidad efectiva para suministro transdérmico de esta, de un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente, en donde la asociación entre el portador y la toxina botulinum no es covalente.
42. Un kit de acuerdo con la reivindicación 41 que comprende adicionalmente un aplicador habitual.

43. Un kit de acuerdo con la reivindicación 42 en la que el aplicador habitual se diseña para uso por un profesional del cuidado de la salud.
44. Un kit de acuerdo con la reivindicación 42 en la que el aplicador se diseña para autoadministración por un sujeto.
45. Un kit de acuerdo con la reivindicación 41 que comprende una composición reformulada que comprende la toxina botulinum y el portador.
46. Un kit de acuerdo con la reivindicación 41 en la que la toxina botulinum y el portador se formulan separadamente para combinar antes de administración.
47. Un kit de acuerdo con la reivindicación 41 en el que la toxina botulinum está contenida en un dispositivo para administrar la toxina botulinum a un sujeto por vía de la piel.
48. Un kit de acuerdo con la reivindicación 47 en la que el dispositivo es un parche de piel.
49. Un kit para la administración de una toxina botulinum a un sujeto que comprende un dispositivo para suministrar la toxina botulinum a la piel y una composición que comprende un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD, en el que subíndice $n1$ es un entero de 0

a aproximadamente 20, y el subíndice n_2 es independientemente un entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25.

50. Un kit de acuerdo con la reivindicación 49 en el que el dispositivo es un parche de piel.

51. Un método para administrar una toxina botulinum a un sujeto que comprende aplicar tópicamente a la piel o epitelio del sujeto la toxina botulinum en conjunto con una cantidad efectiva de un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente, en donde la asociación entre exportador y la toxina botulinum no es covalente.

52. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 que comprende aplicar tópicamente a la piel o epitelio del sujeto una cantidad efectiva de una composición de acuerdo con la reivindicación 1.

53. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 que comprende aplicar separadamente la toxina botulinum y el portador a la piel o epitelio del sujeto.

54. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se administra para alcanzar un efecto biológico deseado.

55. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se administra para alcanzar un beneficio estético o cosmético.

56. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica para reducir o evitar una respuesta inmune.
57. Un método de acuerdo con la reivindicación 56 en el que la respuesta inmune reducida o prevenida mejora la respuesta terapéutica al repetir posteriormente readministraciones de la composición.
58. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se administra para la prevención o reducción de los síntomas asociados con hiperhidrosis clínica o subjetiva.
59. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de contracciones distónicas subjetivas o clínicas o distonía.
60. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con espasmos musculares.
61. Un método de acuerdo con la reivindicación 60 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente a la espalda inferior del sujeto.
62. Un método de acuerdo con la reivindicación 60 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente al cuello del sujeto.
63. Un método de acuerdo con la reivindicación 60 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente a al menos una pierna del sujeto.

64. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente a la cara del sujeto, o a una porción de esta.
65. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente a la axila del sujeto o a una porción de esta.
66. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente a las palmas de las manos o a los pies del sujeto, o a una porción de estas.
67. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente a la espalda o cuello del sujeto, o a una porción de esta-.
68. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente a la ingle del sujeto, o una porción de esta.
69. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la composición se aplica tópicamente a las manos o pies del sujeto, o a una porción de este.

70. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente a los codos, brazos, rodillas, o piernas del sujeto, o a una porción de estas.
71. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente a las nalgas del sujeto o a una porción de estas.
72. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente al torso del sujeto o a una porción de esta.
73. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente a la pelvis del sujeto o a una porción de esta.
74. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica para generar una respuesta inmune.
75. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con migraña por dolor de cabeza.
76. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de acné.

77. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum es un derivado de toxina botulinum.
78. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum comprende una toxina botulinum recombinante.
79. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum comprende una toxina botulinum modificada.
80. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se selecciona de serotipo de toxina botulinum A, B, C, D, E, F, y G.
81. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum es toxina botulinum A.
82. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum es toxina botulinum B.
83. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum es toxina botulinum C.
84. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum es toxina botulinum D.
85. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum es toxina botulinum E.

86. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que el portador comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT, Antennapedia PTD y fragmentos de HIV-TAT o Antennapedia PTD, en el que el subíndice $n1$ es un entero de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar de cerca de 5 a aproximadamente 25.

87. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que el portador comprende un grupo de polipéptidos que tienen ramificados cargados positivamente seleccionados positivamente de $-(\text{gly})_{n1}(\text{arg})_{n2}$ en el que el subíndice $n1$ es un entero de cerca de 0 a aproximadamente 20 y el subíndice $n2$ se selecciona independientemente un entero impar de cerca de 5 a aproximadamente 25.

88. Un método de acuerdo con la reivindicación 87 en el que el subíndice $n1$ es un entero de 0 a aproximadamente 8.

89. Un método de acuerdo con la reivindicación 87 en el que el subíndice $n1$ es un entero de aproximadamente 2 a aproximadamente 5.

90. Un método de acuerdo con la reivindicación 87 en el que el subíndice $n2$ es un entero impar de cerca de 7 a aproximadamente 17-

91. Un método de acuerdo con la reivindicación 87 en el que el subíndice $n2$ es un entero impar de cerca de 7 a aproximadamente 17.

92. Un método de acuerdo con la reivindicación 86 en el que el portador contiene un polipéptido que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente seleccionados de HIV-TAT y fragmentos de estos.
93. Un método de acuerdo con la reivindicación 92 en el que los grupos ramificados son fragmentos HIV-TAT cargados positivamente que tienen la fórmula (gly)p-RGRDDRRQRRR-(gly)q, (gly)p-YGRKKRRQRRR-(gly)q, o (gly)p-RKKRRQRRR-(gly)q, en donde los subíndices p y q cada uno son independientemente un entero de 0 a 20.
94. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que los grupos ramificados cargados positivamente comprenden al menos cerca de 0.05% en peso del peso del portador total.
95. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que los grupos ramificados cargados positivamente comprenden de cerca de 0.5 a aproximadamente 45% en peso del peso total del portador.
96. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que los grupos ramificados cargados positivamente comprenden de 0.1% a cerca de 30% en peso del peso total del portador.
97. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente.

98. Un método de acuerdo con la reivindicación 97 en el que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente.

99. Un método de acuerdo con la reivindicación 98 en el que la polilisina tiene un peso molecular de cerca de aproximadamente 10,000 a 1.5 millones.

100. Un método de acuerdo con la reivindicación 98 en el que la polilisina tiene un peso molecular de cerca de 25,000 a aproximadamente 1,200,000.

101. Un método de acuerdo con la reivindicación 98 en el que la polilisina tiene un peso molecular de cerca de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000.

102. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la estructura comprende un portador no peptídico cargado positivamente.

103. Un método de acuerdo con la reivindicación 102 en el que el polímero no peptídico cargado positivamente es polialquileimina.

104. Un método de acuerdo con la reivindicación 102 en el que la polialquileimina es polietileneimina.

105. Un método de acuerdo con la reivindicación 104 en el que la polietileneimina tiene un peso molecular de cerca de aproximadamente 10,000 a 2,500,000.

106. Un método de acuerdo con la reivindicación 104 en el que la polietileneimina tiene un peso molecular de cerca de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,800,000.

107. Un método de acuerdo con la reivindicación 104 en el que la polietileneimina tiene un peso molecular de cerca de aproximadamente 500,000 a aproximadamente 1,400,000.

108. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum comprende una toxina botulinum recombinante.

109. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica en una composición que tiene un pH de aproximadamente 4.5 a aproximadamente 6.3.

110. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum se aplica en una composición de liberación controlada.

111. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum está contenida en una composición líquida.

112. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum está contenida en una composición de gel.

113. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum está contenida en una composición que es una crema.

114. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum está contenida en una composición adicional que comprende salina.

115. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum está contenida en una composición que comprende adicionalmente salina y un sistema de amortiguador de pH.

116. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum está contenida en un dispositivo para dispensar la toxina botulinum, tal dispositivo se aplica tópicamente a la piel o epitelio del sujeto.

117. Un método de acuerdo con la reivindicación 116 en el que el dispositivo es un parche para piel.

118. Un método de acuerdo con la reivindicación 117 en el que el dispositivo es un dispositivo de encapsulación de célula.

119. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con secreción de mucosa.

120. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de obesidad o síntomas de estos.

~~CD 8~~
138

121. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de inflamación o síntomas de estos.

122. Un método de acuerdo con la reivindicación 121 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con psoriasis.

123. Un método de acuerdo con la reivindicación 122 en el que la composición se aplica en conjunto con otras modalidades de tratamiento.

124. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de ronquido.

125. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas cutáneos asociados con la diabetes.

126. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente el mejoramiento de cicatrización de herida.

127. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con disfunción de nervio autónomo.

128. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con parálisis cerebral.

129. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con la tiroiditis de Hashimoto.

130. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con desórdenes de la glándula mamaria.

131. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la alteración de crecimiento de cabello.

132. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con trastornos de paratiroides.

133. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con trastornos del movimiento.

134. Un método de acuerdo con la reivindicación 133 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con la enfermedad de parkinson.

135. Un método de acuerdo con la reivindicación 133 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con temblores.

136. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con la epilepsia.

137. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con desórdenes del oído interno.

138. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con trastornos urológicos.

139. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de otras secreciones controladas colinérgicas.

140. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con trastornos neuropsiquiátricos.

141. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con músculos lesionados.

142. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con trastornos del oído.

143. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con cáncer.

144. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con trastornos de entrapamiento de nervios.

145. Un método de acuerdo con la reivindicación 54 en el que la toxina botulinum se aplica tópicamente para la prevención o reducción de síntomas asociados con hipercalcemia.

146. Un método de acuerdo con la reivindicación 55 en el que la toxina botulinum comprende una proteína de fusión.

~~112~~
142

147. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la toxina botulinum es toxina botulinum F.

148. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la toxina botulinum es toxina botulinum G.

149. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum es toxina botulinum F.

150. Un método de acuerdo con la reivindicación 51 en el que la toxina botulinum es toxina botulinum G.

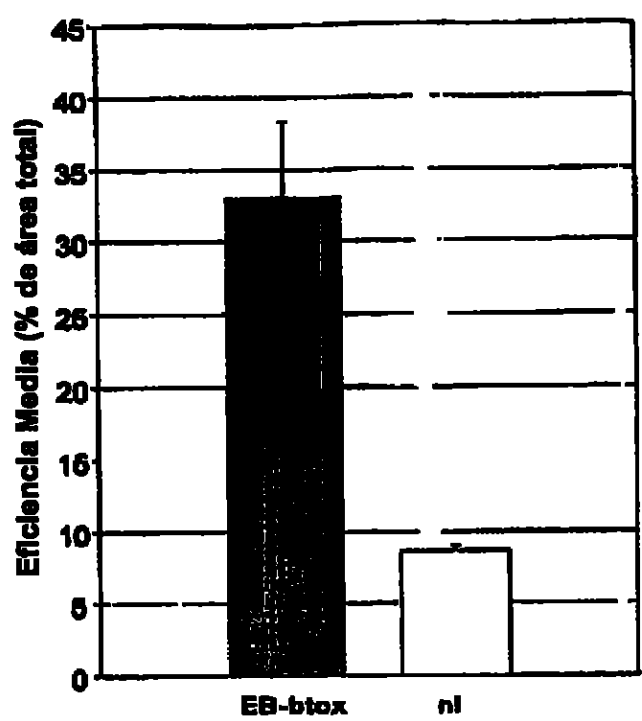


FIGURA 1

144

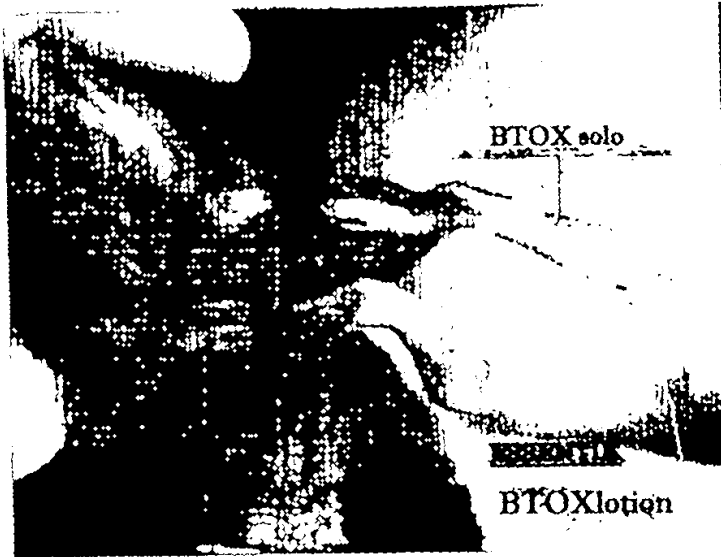
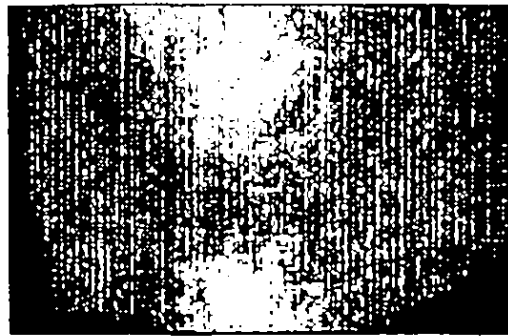


FIGURA 2

145



Essentia Botox Lotion

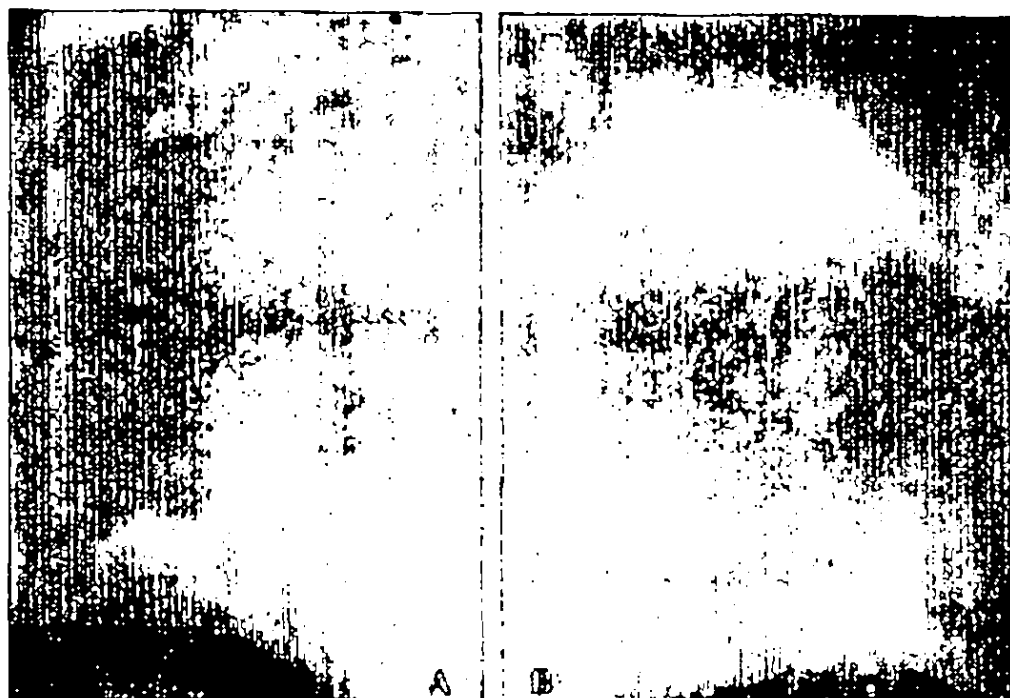


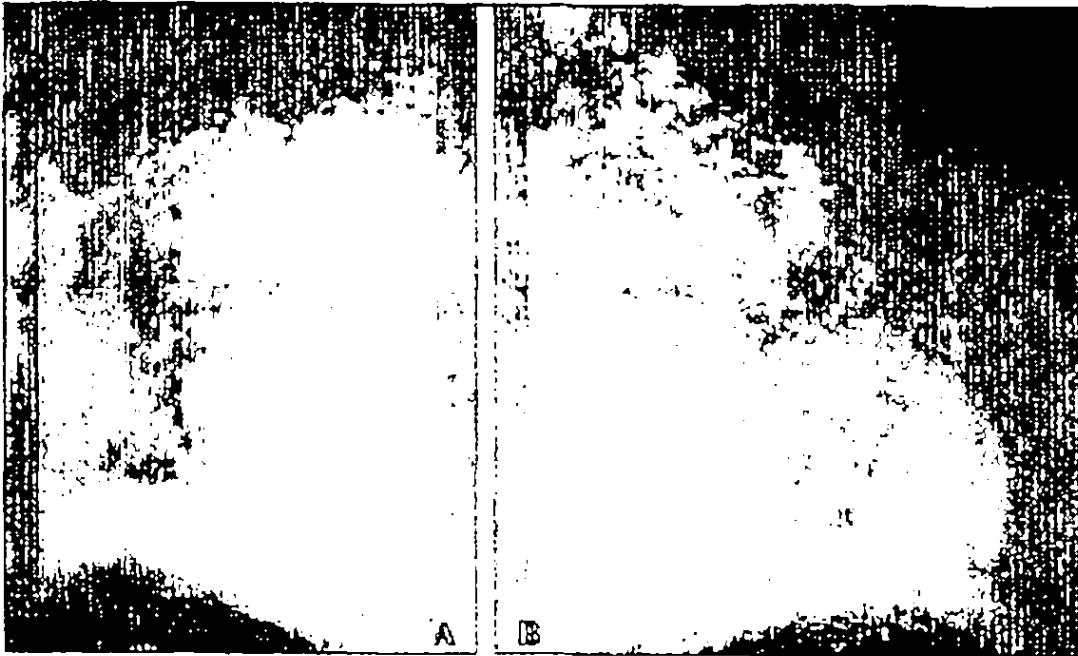
Línea de base

FIGURA 3



FIGURA 4

**FIGURA 5**

**FIGURA 6**

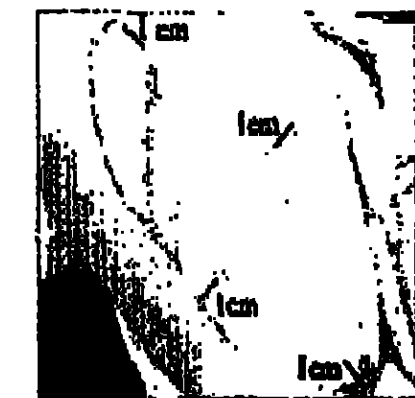


FIGURA 7

150

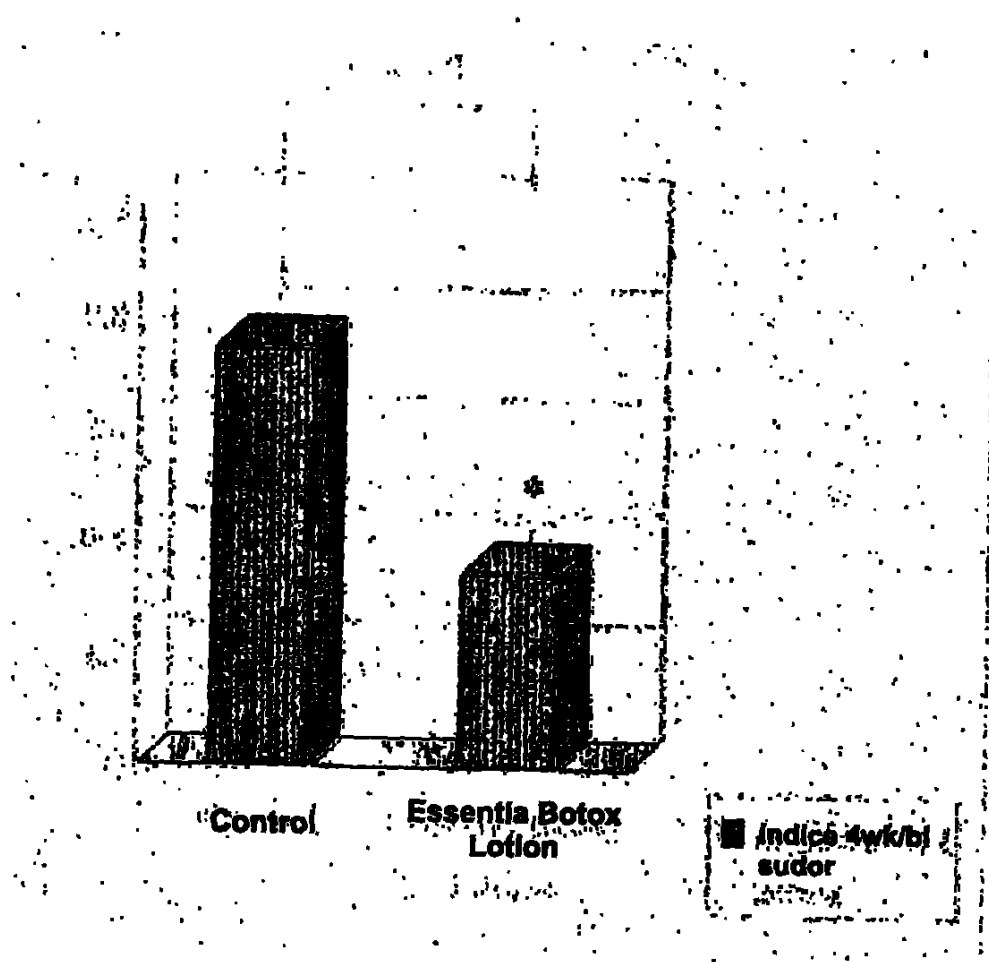


FIGURA 8A

151

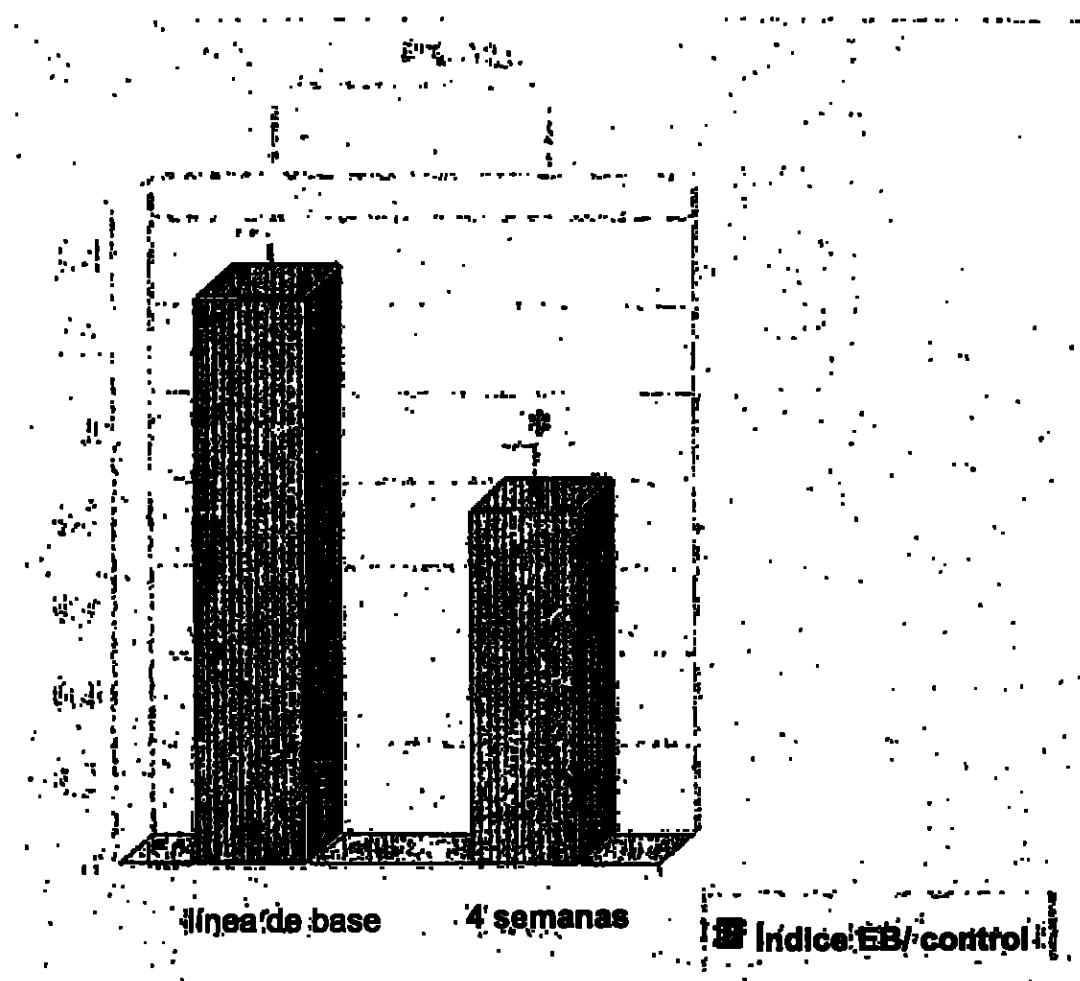


FIGURA 8B

152

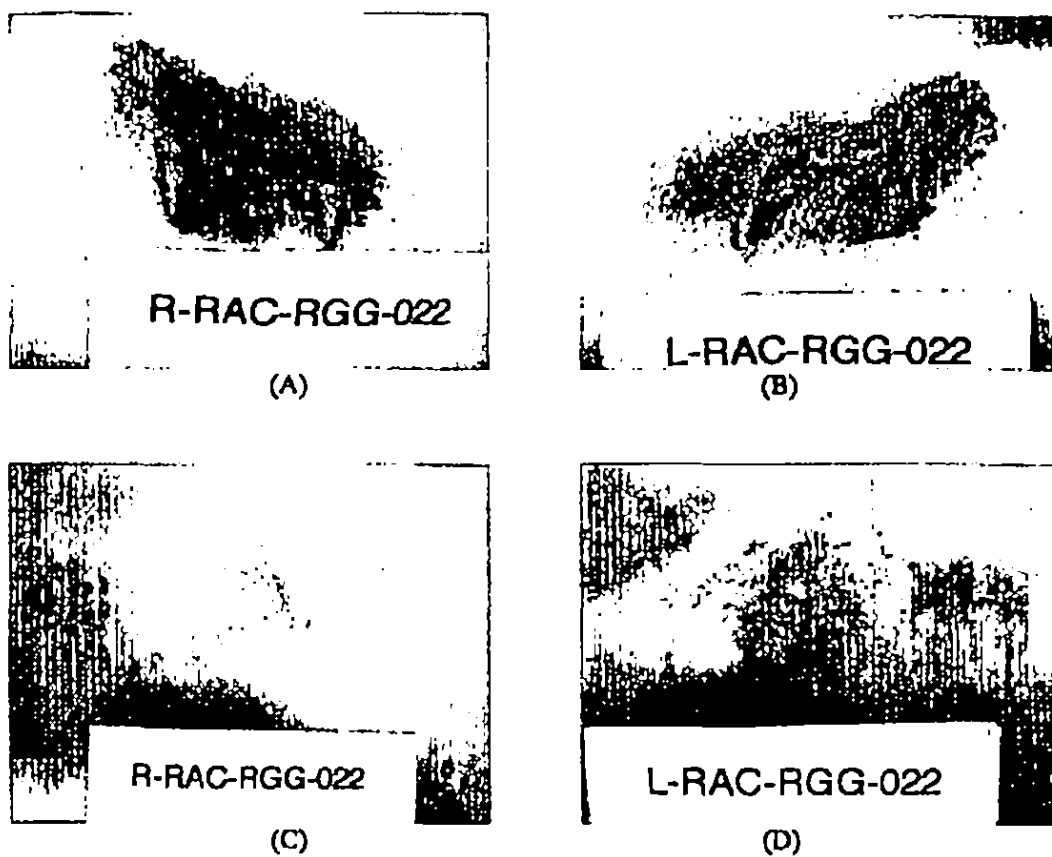


FIGURA 9

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 4649-4002PC	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below	
International application No. PCT/US05/07524	International filing date (day/month/year) 03 March 2005 (03.03.2005)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 03 March 2004 (03.03.2004)
Applicant ESSENTIA BIOSYSTEMS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:



the international application in the language in which it was filed.



a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box No. III)

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.



none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/07524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(B): A61K 51/00(2006.01);A61K 39/40(2006.01);A61K 39/42(2006.01)

USPC: 424/1.21, 1.25, 1.29, 1.33, 1.53, 236.1, 239.1, 247.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/1.21, 1.25, 1.29, 1.33, 1.53, 236.1, 239.1, 247.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SCISEARCH, AGRICOLA, MEDLINE,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHALABY, SW. Polymers for Augmenting R Botulinum Vaccine Efficacy, Crisp Data Base National Institutes of Health, 2002, See the entire document.	1-6, 12-16 and 19-48
X	CROSLAND, R. Detection of Sparse Botulinum Toxin A Binding Sites Using Fluorescent Latex Microspheres, June 1999, Vol 22, No. 2, pages 113-115. See the entire document.	1-10, 12 and 19-48
X	US 6,670,322 B1 (GOODNOUGH et al) 30 December 2003, see the entire document.	1-10, 12 and 19-48
Y	SCHANTZ et al., Properties and Use of Botulinum Toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine, Microbiological Reviews, March 1992, p. 80-99. See the entire document.	1-150
Y	CONSOLF et al. Antennapedia and HIV Transactivator of Transcription (TAT) "Protein Transduction Domains" Promote Endocytosis of Cell Surface Glycosaminoglycans, The Journal of Biological Chemistry, 2003, Vol. 276, No. 37, p. 35109-35224. See the entire document.	1-150

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"R" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 April 2006 (03.04.2006)

Date of mailing of the international search report

10 MAY 2006

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

Vanessa L. Ford

Telephone No. 571.272.1600

155

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

- 1 [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51].
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers, claims 30, 33 and 36 unchanged, new claims 49 to 51 added"
- 2 [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11"
- 3 [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added, all other claims unchanged."
- 4 [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43bis.1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article," "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended ?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When ? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments ?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How ? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments ?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
JOSEPH D. ENG, JR.
MORGAN & FINNEGAN, LLP
3 WORLD FINANCIAL CENTER
NEW YORK, NY 10281-2101

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference 4649-4002PC	Date of mailing (day/month/year) 10 MAY 2006
International application No. PCT/US05/07524	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
Applicant ESSENTIA BIOSYSTEMS, INC.	International filing date (day/month/year) 03 March 2005 (03.03.2005)

- 1 ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70.

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

- 2 ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

- 3 ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4 Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

Vanessa L. Ford

Telephone No. 571 272.1600

Form PCT/ISA/220 (January 2004)

(See notes on accompanying sheet)

CASE 4649-4002PC ATTY JE
DUE August 10, 2006 (U.S. suppl. IDS)
1 mo. call-up July 10, 2006
BY J.M.

REVIEWED BY AUDIT DEPT
DATE 5/18 BY [Signature]

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

158

To:
JOSEPH D. ENG, JR.
MORGAN & FINNIGAN, LLP
3 WORLD FINANCIAL CENTER
NEW YORK, NY 10281-2101

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Applicant's or agent's file reference 4649-4002PC		Date of mailing (day/month/year) 10 MAY 2006
International application No. PCT/US05/07524		FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below
International filing date (day/month/year) 03 March 2005 (03.03.2005)	Priority date (day/month/year) 03 March 2004 (03.03.2004)	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC IPC(8): A61K 51/00(2006.01);A61K 39/40(2006.01);A61K 39/42(2006.01) USPC: 424/1.21.1.25.1.29.1.33.1.53.236.1.239.1.247.1		
Applicant ESSENTIA BIOSYSTEMS, INC.		

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Date of completion of this opinion 03 April 2006 (03.04.2006)	Authorized officer Vance J. Ford Telephone No. 571-272-1600
---	--	---

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (April 2005)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/JS05/07524

159

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

- ☐ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☐ on paper
☐ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☐ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in electronic form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US05/07524

160

Box No. V Reasoned statement under Rule 43 bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims <u>NONE</u>	YES
	Claims <u>1-150</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims <u>NONE</u>	YES
	Claims <u>1-150</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims <u>1-150</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-6, 12-16, and 19-48 lack novelty under PCT Article 33(2) as anticipated by CROSLAND ET AL. (The Journal of Histotechnology, Vol. 22, No. 2, June 1999). CROSLAND ET AL. teach compositions comprising botulinum toxin A and a carrier (latex microspheres). See the entire document. Thus, CROSLAND ET AL. teach the claimed invention.

Claims 1-10, 12 and 19-48 lack novelty under PCT Article 33(2) as anticipated by SHALABY (Crisp Data Base National Institutes of Health, STN database 2002). SHALABY teaches compositions comprising botulinum toxin A-G and polymers. See the Abstract. Thus, SHALABY teaches the claimed invention.

Claims 1-150 lack inventive step under PCT Article 33(3) over SCHANTZ ET AL. (Microbiological Reviews, March 1993, p. 80-99) in view of SHALABY and further in view of CONSOLE ET AL. (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 37, September 12, 2003). SCHANTZ ET AL. teach that botulinum toxins can be used in medical applications (pages 83-84.). SHALABY ET AL. teach the botulinum toxin can be conjugate to polymers. CONSOLE ET AL. teach that botulinum toxin can be used to deliver drugs or compounds to target sites. See the entire document.

 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: 06 - 98637 (22) Fecha de solicitud: 29/09/06 (30) Prioridad (31) 60/550,015 (32) 03/03/04 (33) US		(51) Int Cl: A61K 51/00 (71) Solicitante(s) ESSENTIA BIOSYSTEMS, INC. (72) Inventor(es) MICHAEL D. DAKE JACOB M WAUGH (74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 03/10/2006 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 03/03/2005 No. de solicitud PCT/US2005/007524		(87) Publicación internacional Fecha: 15/09/2005 N° publicación: WO 2005/084410 A2	
(54) Título: COMPOSICIONES Y METODOS PARA APLICACIÓN TOPICA Y SUMINISTRO TRANSDERMICODE TOXINAS BOTULINUM			

Reivindicación(es):

- | | |
|--|---|
| <p>1. Una composición que comprende una toxina botulinum y un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente, en donde la asociación entre el portador y la toxina botulinum es no covalente.</p> <p>2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la toxina botulinum es un derivado de toxina botulinum.</p> <p>3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la toxina botulinum comprende una toxina botulinum recombinante.</p> <p>4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la toxina botulinum comprende una toxina botulinum modificada.</p> | <p>5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la toxina botulinum se selecciona de serotipos de toxina botulinum A, B, C, D, E, F y G,</p> <p>6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en la que la toxina botulinum es toxina botulinum A.</p> <p>7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en la que la toxina botulinum es toxina botulinum B.</p> <p>8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en la que la toxina botulinum es toxina botulinum C₁.</p> <p>9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en la que la toxina botulinum es toxina botulinum D.</p> |
|--|---|



Expediente No		06098637.	No de Folia
Item		No de unidades	✓
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO	1	✓
10	OTROS:		

Observaciones: arte final

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 06-098637- -00000-0000

Fec: 2006-09-29 17:48:02 Dep. 2020 NUECREACIONES

Tm. 11 PATENTEMII

Ere: 376 PASNACIONALJ

Act 411 PRESENTACION

Folios: 153

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 73,830
CHA : SEPTIEMBRE 25 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	48872311	25/09/2006	44,980,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	1
		1	TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

Cdo 14137-841-0049 15550-841-003-9



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (☒) MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	(☒)	()
-Datos de Identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	(☒)	()
-Descripción de la invención.	(☒)	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	(☒)	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	(☒)	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de Identificación del solicitante o de la persona que se 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 ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de Identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:

Sept 29 de 2006.

Fecha:

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	06 98637
	Solicitud internacional	PCT/US2005/007524
	Fecha inicio fase nacional	03/10/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	13590

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CRISPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 24 NOV: 2006 aalvarado