

60



Registrazione
Eigilazione CSA Ltda

Registrazione
Eigilazione CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

OK

09-79068

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

COMPOSICIONES Y METODOS DE APLICACION TOPICA Y

SUMINISTRO TRANSDERMICO DE TOXINAS BOTULINUM

ESTABILIZADAS CON FRAGMENTOS DE POLIPEPTIDO DERIVADOS
DE HIV-TAT

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

REVANCE THERAPEUTICS, INC.

DOMICILIO

NEWARK, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-079068- -00000-0000

Fecha: 2009-07-29 16:37:55 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 62**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **REVANCE THERAPEUTICS, INC.**
Sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de América.Dirección: 7555 Gateway Blvd,
Newark,
California 94560,
Estados Unidos de AméricaDomicilio: Newark,
California,
Estados Unidos de América**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344T.P 23.555

4

**INVENTOR (ES)
(72)****1. Jacob M. WAUGH**
4020 El Camino #1116,
Mountain View,
California 94040,
Estados Unidos de América**2. Jae Hoon LEE**
34263 Tartarian Way,
Union City,
California 94587
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2007/087263Fecha: 12 de diciembre de 2007Publicación Internacional No. WO 2008/082889 A2Fecha: 10 de julio de 2008

6

Título (54)**COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE APLICACIÓN TÓPICA Y SUMINISTRO
TRANSDÉRMICO DE TOXINAS BOTULINUM ESTABILIZADAS CON FRAGMENTOS
DE POLIPEPTIDO DERIVADOS DE HIV-TAT**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 039/008

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐US29 de diciembre de 200660/882.632

9

Comprobante de pago No.: 09-49.148**Fecha:** 7 de julio de 2009

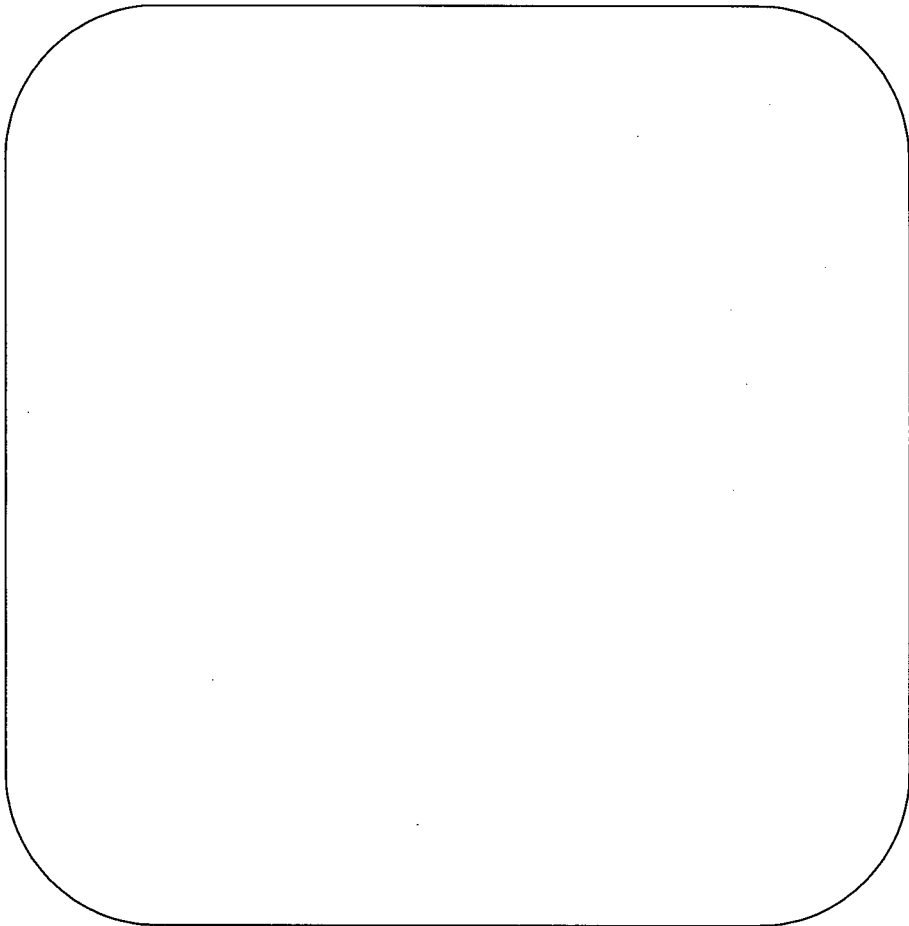
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por.
- ☐ 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: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia De Paez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/082889 A2

Descripción:

Páginas 17 en el idioma original

Páginas 27 en español

Reivindicaciones: Número (s) 13

Figuras: Número (s)

2. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio de dirección del solicitante
REVANCE THERAPEUTICALS, INC.

3. ☒ Extracto de publicación.

4. ☒ Listado de Secuencias.

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

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 July 2008 (10.07.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/082889 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/08 (2006.01)

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

(21) International Application Number:
PCT/US2007/087263

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

(22) International Filing Date:
12 December 2007 (12.12.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/882,632 29 December 2006 (29.12.2006) US

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, 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, LV, MC, MT, 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).

(71) Applicant (for all designated States except US): RE-
VANCE THERAPEUTICS, INC. [US/US]; 2400
Bayshore Parkway, Suite 100, Mountain View, CA 94043
(US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WAUGH, Jacob,
M. [US/US]; 4020 El Camino #1116, Mountain View, CA
94040 (US). LEE, Jae, Hoon [US/US]; 34263 Tartarian
Way, Union City, CA 94587 (US).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS OF TOPICAL APPLICATION AND TRANSDERMAL DELIVERY OF BO-
TULINUM TOXINS STABILIZED WITH POLYPEPTIDE FRAGMENTS DERIVED FROM HIV-TAT

(57) Abstract: This invention relates to novel compositions of botulinum toxin that are stabilized using HTV-TAT fragments or
derivatives of HTV-TAT fragments. The composition can be administered for various therapeutic, aesthetic and/or cosmetic pur-
poses. The invention also provides method for stabilizing botulinum toxin using HIV-TAT fragments or derivatives or HIV-TAT
fragments.

WO 2008/082889 A2

**Compositions And Methods Of Topical Application And Transdermal Delivery Of Botulinum
Toxins Stabilized With Polypeptide Fragments Derived from HIV-TAT**

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to U.S. Provisional Application Serial No. 60/882,632, filed December 29, 2006, the contents of which are incorporated herein by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

[0001] This invention relates to novel compositions of botulinum toxin that can be applied topically for various therapeutic, aesthetic and/or cosmetic purposes and that are stabilized by polypeptide fragments derived from HIV-TAT.

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, 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 to the skin. (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 (e.g., 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)).

[0007] Different techniques have been utilized in order to potentially 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. For example, in 1986, Jean and Alastair Carruthers, a husband and wife team consisting of an oculoplastic surgeon and a dermatologist, developed a method of using the type A form of botulinum toxin 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 the type A form of botulinum toxin for the treatment of wrinkles led to the 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 treatment using the type A form of botulinum toxin.

[0008] Interestingly, the type A form of botulinum toxin 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. Botulinum toxin acts to produce paralysis of muscles by

preventing synaptic transmission or release of acetylcholine across the neuromuscular junction, and is thought to act in other ways as well. Its action essentially blocks signals that normally would cause muscle spasms or contractions, resulting in paralysis. However, 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.

[0009] In addition to the type A form of botulinum toxin, there are seven other serologically distinct forms of botulinum toxin that are also produced by the gram-positive bacteria *Clostridium botulinum*. Of these eight serologically distinct types of botulinum toxin, the seven that can cause paralysis have been designated botulinum toxin serotypes A, B, C (also known as C₁), D, E, F and G. Each of these is distinguished by neutralization with type-specific antibodies. The molecular weight of the botulinum toxin protein molecule, for all seven of these active botulinum toxin serotypes, is about 150 kD. 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 than botulinum toxin type B, as measured by the rate of paralysis produced in rats. 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] As released by *Clostridium botulinum* bacteria, botulinum toxin is a component of a toxin complex containing the approximately 150 kD botulinum toxin protein molecule along with associated non-toxin proteins. These endogenous non-toxin proteins are believed to include a family of hemagglutinin proteins, as well as non-hemagglutinin protein. The non-toxin proteins are believed to stabilize the botulinum toxin molecule in the toxin complex and protect it against denaturation, for example, by digestive acids when toxin

9

complex is ingested. Thus, the non-toxin proteins of the toxin complex protect the activity of the botulinum toxin and enhance systemic penetration, particularly when the toxin complex is administered via the gastrointestinal tract. More specifically, it is believed that some of the non-toxin proteins specifically enhance penetration across the gastrointestinal epithelium while other non-toxin proteins stabilize the botulinum toxin molecule in blood. Additionally, the presence of non-toxin proteins in the toxin complexes typically causes the toxin complexes to have molecular weights that are greater than that of the bare botulinum toxin molecule, which is about 150 kD, as previously noted. For example, *Clostridium botulinum* bacteria can produce botulinum type A toxin complexes that have molecular weights of about 900 kD, 500 kD or 300 kD. Interestingly, botulinum toxin types B and C are apparently produced as only a 700 kD or a 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.

[0011] To provide additional stability to botulinum toxin, the toxin complexes are often stabilized by combining them with exogenous stabilizers, (e.g., gelatin, polysaccharides, or most commonly additional albumin) during manufacturing. The stabilizers serve to bind and to stabilize toxin complexes in disparate environments, including those associated with manufacturing, transportation, storage, and administration.

[0012] Typically, the botulinum toxin is administered to patients by carefully controlled injections of compositions containing the botulinum toxin complex and albumin, but there are several problems associated with this approach. For example, because the injected toxin complexes contain non-toxin proteins and albumin, both of which stabilize the botulinum toxin and increase the molecular weight of the toxin complex, the toxin complexes have a long half-life in the body, are slow to diffuse through tissue, and may cause an undesirable antigenic response in the patient. Also, since the non-toxin proteins and albumin stabilize the botulinum toxin in blood, the injections must be carefully placed so that they do not release a large amount of toxin into the bloodstream of the patient, which could lead to fatal systemic poisoning. Thus, injections typically must be performed precisely by highly trained medical professionals with a deep understanding of human anatomy.

[0013] In view of all of the problems discussed in the foregoing, it would be highly desirable to have a method of stabilizing botulinum toxin that does not use albumin. It would also be highly desirable if such a method were to reduce the antigenicity and blood stability of the botulinum toxin, while increasing the diffusion rate of botulinum toxin complexes

within the body, thereby making it safer to use botulinum toxin for various therapeutic, aesthetic and/or cosmetic purposes. It also would be desirable to have a method of administration that does not critically depend on precise injection of the botulinum toxin by a medical professional in order to achieve safe administration of the toxin.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0014] One aspect of this invention is the recognition that certain polypeptide fragments of HIV-TAT, or polypeptide fragments derived from fragments of HIV-TAT, can be added to botulinum toxin complexes, and in particular reduced botulinum toxin complexes, to stabilize them. In a particularly preferred embodiment, the polypeptide fragment has as a sequence corresponding to amino acid residues 49-57 of HIV-TAT (RKKRRQRRR, SEQ ID NO. 1). In another preferred embodiment, the polypeptide fragment has a sequence corresponding to the reverse sequence of amino acid residues 49-57 of HIV-TAT (RRRQRRKKR, hereafter referred to as SEQ ID NO. 2.) Additionally, this invention also contemplates polypeptide analogs of the sequences of SEQ ID NOS 1 and 2 that are functionally equivalent, such as cases in which the conservative substitutions have been made. As used throughout this application, the reversed HIV-TAT polypeptide defined by SEQ ID NO. 2, as well as any polypeptide analog of SEQ ID NOS 1 or 2 in which conservative substitutions have been made, is encompassed by the term "HIV-TAT fragment derivative."

[0015] Another aspect of this invention is the recognition that the endogenous non-toxin proteins in a botulinum toxin complex obtained from *Clostridium botulinum* bacteria (viz., the non-toxic hemagglutinin and non-hemagglutinin proteins) undesirably increase the stability and toxicity of the toxin complex, while undesirably decreasing the ability of the toxin to diffuse through the skin epithelium. This invention further recognizes that these effects are exacerbated when an exogenous stabilizer, such as albumin, binds to botulinum toxin during conventional manufacturing processes. Thus, one aspect of this invention is to provide botulinum toxin complexes wherein the amounts of hemagglutinin, non-toxin non-hemagglutinin and/or exogenous albumin are selectively and independently reduced compared to conventional commercially available botulinum toxin (e.g., BOTOX® or MYOBLOC®). Such botulinum toxin complexes are hereafter referred to as "reduced botulinum toxin complexes".

[0016] Accordingly, one object of this invention is to provide a composition comprising a botulinum toxin complex (or a reduced botulinum toxin complex) that is stabilized by polypeptides having a sequence corresponding to SEQ ID NO. 1 or 2. The composition optionally may contain added exogenous stabilizers, such as albumin.

[0017] As used herein, the term "stabilize" refers to the ability of the HIV-TAT fragments (e.g., SEQ ID NO. 1) or HIV-TAT fragment derivatives (e.g., SEQ ID NO. 2) to prevent the botulinum toxin from denaturing and to preserve the activity of the toxin, as measured by either a SNAPtide assay, or a Digital Abduction Scoring (DAS) assay. In preferred embodiments, the botulinum toxin compositions of this invention are sufficiently stabilized to retain substantially all of their biological activity during processing and patient administration steps, including, but not limited to, filling, lyophilizing, storing, and reconstituting for delivery.

[0018] The invention further relates to a method for producing a biologic effect by administering the stabilized botulinum complexes or stabilized reduced botulinum toxin complexes of the invention to a patient. In certain preferred embodiments, the stabilized botulinum complexes or stabilized reduced botulinum toxin complexes are topically applied in an effective amount, preferably to the skin, of a subject or patient in need of such treatment. The biologic effect may include, for example, muscle paralysis, reduction of hypersecretion or sweating, treatment of neurologic pain or migraine headache, reduction of muscle spasms, prevention or reduction of acne, reduction or enhancement of an immune response, reduction of wrinkles, or prevention or treatment of various other disorders. In other embodiments, the stabilized botulinum toxin complexes or stabilized reduced botulinum toxin complexes are administered by parenteral injection, such as, for example, subcutaneous injection.

[0019] This invention also provides kits for preparing formulations containing a botulinum toxin complex (or a reduced botulinum toxin complex) and polypeptides having sequences according to SEQ ID NOS. 1 or 2, or a premix that may in turn be used to produce such a formulation. Also provided are kits that contain means for sequentially administering a botulinum toxin complex (or a reduced botulinum toxin complex) and adhesion molecules to a subject.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0020] This invention relates to novel compositions comprising botulinum toxin complexes or reduced botulinum toxin complexes, as described herein, that are stabilized by the addition of polypeptides that are HIV-TAT fragments or HIV-TAT fragment derivatives. In preferred embodiments, the stabilizing polypeptides have a sequence according to SEQ ID NOS 1 or 2, or may be related to those sequences through conservative substitutions. In certain embodiments, the stabilized botulinum toxin compositions according to the invention enable the transport or delivery of a botulinum toxin through the skin epithelium (also referred to as "transdermal delivery") with improved penetration, reduced antigenicity and blood stability. The compositions of the invention 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. The compositions of the invention also have an improved safety profile over other compositions and methods of delivery of botulinum toxin.

[0021] The term "botulinum toxin" as used herein refers to any of the known types of botulinum toxin (i.e., the approximately 150 kD botulinum toxin protein molecule), whether produced by the bacterium or by recombinant techniques, as well as any such types that may be subsequently discovered including newly discovered serotypes, and engineered variants or fusion proteins. As mentioned above, currently 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 commercially available, for example, from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 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®.

[0022] The term "botulinum toxin" used in the compositions of this invention can alternatively refer to 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 that is a neurotoxin that has at

least one of its amino acids deleted, modified or replaced, as compared to a native, or the modified neurotoxin can be a recombinantly produced neurotoxin or a derivative or fragment thereof. In one particularly preferred embodiment of the invention, the botulinum toxin derivative is a polypeptide having the sequence GDSCSVEAETAGK (SEQ ID NO. 3). This sequence corresponds to the portion of the type A botulinum toxin molecule that is responsible for the toxin's biological activity in humans. The botulinum toxin may also 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 from any of the botulinum toxin complexes produced by the bacterium, as described above. Alternatively the botulinum toxin used in this invention may be a toxin prepared using recombinant or synthetic chemical techniques, e.g. a recombinant peptide, a fusion protein, or a hybrid neurotoxin, for example 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. Alternatively, 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.

[0023] The term "botulinum toxin complex" or "toxin complex" as used herein refers to a botulinum toxin (e.g., the approximately 150 kD botulinum toxin protein molecule belonging to any one of botulinum toxin serotypes A-G, or the botulinum toxin fragment of SEQ ID NO. 3), along with associated endogenous non-toxin proteins (i.e., hemagglutinin protein and non-toxin non-hemagglutinin protein produced by *Clostridium botulinum* bacteria). Note, however, that the botulinum toxin complex need not be derived from *Clostridium botulinum* bacteria as one unitary toxin complex. For example, botulinum toxin or modified botulinum toxin may be recombinantly prepared first and then subsequently combined with the non-toxin proteins. Recombinant botulinum toxin can be also be purchased (e.g., from List Biological Laboratories, Campbell, CA) and then combined with non-toxin proteins.

[0024] This invention also contemplates "reduced botulinum toxin complexes", in which the botulinum toxin complexes (including those that contain botulinum toxin derivatives, such as the polypeptide sequence in SEQ ID NO. 3) have reduced amounts of non-toxin protein compared to the amounts naturally found in botulinum toxin complexes

produced by *Clostridium botulinum* bacteria. In one embodiment, reduced botulinum toxin complexes are prepared using any conventional protein separation method to extract a fraction of the hemagglutinin protein or non-toxin non-hemagglutinin protein from botulinum toxin complexes derived from *Clostridium botulinum* bacteria. For example, reduced botulinum toxin complexes may be produced by dissociating botulinum toxin complexes through exposure to red blood cells at a pH of 7.3 (e.g., see EP 1514556 A1, hereby incorporated by reference). HPLC, dialysis, columns, centrifugation, and other methods for extracting proteins from proteins can be used. Alternatively, when the reduced botulinum toxin complexes are to be produced by combining synthetically produced botulinum toxin with non-toxin proteins, one may simply add less hemagglutinin or non-toxin non-hemagglutinin protein to the mixture than what would be present for naturally occurring botulinum toxin complexes. Any of the non-toxin proteins (e.g., hemagglutinin protein or non-toxin non-hemagglutinin protein or both) in the reduced botulinum toxin complexes according to the invention may be reduced independently by any amount. In certain exemplary embodiments, one or more non-toxin proteins are reduced by at least about 0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% or 90% compared to the amounts normally found in botulinum toxin complexes. MYOBLOC has 5000 U of Botulinum toxin type B per ml with 0.05% human serum albumin, 0.01 M sodium succinate, and 0.1 M sodium chloride. DYSPOORT has 500 U of botulinum toxin type A-hemagglutinin complex with 125 mcg albumin and 2.4 mg lactose. In one particularly interesting embodiment, substantially all of the non-toxin protein (e.g., > 95% of the hemagglutinin protein and non-toxin non-hemagglutinin protein) that would normally be found in botulinum toxin complexes derived from *Clostridium botulinum* bacteria is removed from the botulinum toxin complex. Furthermore, although the amount of endogenous non-toxin proteins may be reduced by the same amount in some cases, this invention also contemplates reducing each of the endogenous non-toxin proteins by different amounts, as well as reducing at least one of the endogenous non-toxin proteins, but not the others.

[0025] In addition to (or instead of) reducing the amount of endogenous non-toxin protein to destabilize the botulinum toxin complex, this invention also contemplates reducing the amount of exogenous stabilizers that are normally added during manufacturing. An example of such an exogenous stabilizer is albumin, which is normally added during manufacturing to botulinum toxin complexes in amount equal to 1000 times the amount of albumin found in the endogenous non-toxin, non-hemagglutinin component of a naturally

occurring botulinum toxin complex. According to this invention, the amount of added exogenous albumin can be any amount less than the conventional thousand-fold excess of exogenous albumin. In certain exemplary embodiments of the invention, only about 500x, 400x, 300x, 200x, 100x, 50x, 10x, 5x, 1x, 0.5x, 0.1x, or 0.01x the amount of the albumin in naturally occurring botulinum toxin complexes is added. In one embodiment, no exogenous albumin is added as a stabilizer to the compositions of the invention. In other embodiments, exogenous stabilizers in addition to (or instead of) albumin are added to the therapeutic topical compositions of the invention. For example, other stabilizers contemplated by the invention include lactose, gelatin and polysaccharides.

[0026] While the stabilized botulinum toxin complexes or stabilized reduced botulinum toxin complexes can be obtained or derived from any of the botulinum toxin serotypes (i.e., types A-G), in preferred embodiments of this invention, they are obtained or derived from the type A serotype of botulinum toxin.

[0027] In preferred embodiments, the botulinum toxin compositions of the invention are stabilized by the addition of non-native polypeptides that are either a fragment of HIV-TAT (e.g., SEQ ID NO. 1) or derived from a fragment of HIV-TAT (e.g., SEQ ID NO. 2, which is the reverse sequence of the polypeptide of SEQ ID NO. 1). The HIV-TAT fragment or derivative thereof may be combined with the botulinum toxin molecule either covalently or non-covalently to stabilize the botulinum toxin complex or reduced botulinum toxin complex. In one preferred embodiment, the HIV-TAT fragment or derivative thereof is physically combined with botulinum toxin complexes or reduced botulinum complexes to stabilize them non-covalently. The relative amount of HIV-TAT fragment or derivative thereof will depend on the degree of stability desired. For example, when the stabilizing HIV-TAT fragment or derivative thereof corresponds to the polypeptides of SEQ ID NOs. 1 or 2, a useful concentration range for the stabilizing peptide about 0.1 ng to about 1.0 mg per unit of the botulinum toxin complex or reduced botulinum toxin complex. More preferably, the stabilizing peptides of SEQ ID NOs. 1 or 2 can be in the range of about 0.1 mg to 0.5 mg per unit of botulinum toxin.

[0028] Alternatively, the stabilizing HIV-TAT fragment or derivative thereof can be covalently linked to the botulinum toxin molecule in a botulinum toxin complex or reduced botulinum toxin complex using linking chemistry known in the art. By way of example, coupling of the two constituents can be accomplished via a coupling or conjugating agent. There are several intermolecular cross-linking reagents that can be utilized (see, for example,

Means, G. E. and Feeney, R. E., Chemical Modification of Proteins, Holden-Day, 1974, pp. 39-43). Among these reagents are, for example, J-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) or N, N'-(1,3-phenylene) bismaleimide (both of which are highly specific for sulfhydryl groups and form irreversible linkages); N, N'-ethylene-bis-(iodoacetamide) or other such reagent having 6 to 11 carbon methylene bridges (which are relatively specific for sulfhydryl groups); and 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene (which forms irreversible linkages with amino and tyrosine groups). Other cross-linking reagents useful for this purpose include: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodiphenylsulfone (which forms irreversible cross-linkages with amino and phenolic groups); dimethyl adipimidate (which is specific for amino groups); phenol-1,4-disulfonylchloride (which reacts principally with amino groups); hexamethylenediisocyanate or diisothiocyanate, or azophenyl-p-diisocyanate (which reacts principally with amino groups); glutaraldehyde (which reacts with several different side chains) and disdiazobenzidine (which reacts primarily with tyrosine and histidine).

[0029] Cross-linking reagents may be homobifunctional, i.e., having two functional groups that undergo the same reaction. A preferred homobifunctional cross-linking reagent is bismaleimido-hexane ("BMH"). BMH contains two maleimide functional groups, which react specifically with sulfhydryl-containing compounds under mild conditions (pH 6.5-7.7). The two maleimide groups are connected by a hydrocarbon chain. Therefore, BMH is useful for irreversible cross-linking of polypeptides that contain cysteine residues.

[0030] Cross-linking reagents may also be heterobifunctional. Heterobifunctional cross-linking agents have two different functional groups, for example an amine-reactive group and a thiol-reactive group, that will cross-link two proteins having free amines and thiols, respectively. Examples of heterobifunctional cross-linking agents are succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate ("SMCC"), m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester ("MBS"), and succinimide 4-(p-maleimidophenyl)butyrate ("SMPB"), an extended chain analog of MBS. The succinimidyl group of these cross-linkers reacts with a primary amine, and the thiol-reactive maleimide forms a covalent bond with the thiol of a cysteine residue.

[0031] Cross-linking reagents often have low solubility in water. A hydrophilic moiety, such as a sulfonate group, may be added to the cross-linking reagent to improve its water solubility. Sulfo-MBS and sulfo-SMCC are examples of cross-linking reagents modified for water solubility.

[0032] Many cross-linking reagents yield a conjugate that is essentially non-cleavable under cellular conditions. However, some cross-linking reagents contain a covalent bond, such as a disulfide, that is cleavable under cellular conditions. For example, dithiobis(succinimidylpropionate) ("DSP"), Traut's reagent and N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate ("SPDP") are well-known cleavable cross-linkers. The use of a cleavable cross-linking reagent permits the stabilizing HIV-TAT fragment or derivative thereof to separate from the botulinum toxin molecule after delivery into the target area. Direct disulfide linkage may also be useful.

[0033] Some new cross-linking reagents such as n-γ-maleimidobutyryloxy-succinimide ester ("GMBS") and sulfo-GMBS, have reduced immunogenicity. In some embodiments of the present invention, such reduced immunogenicity may be advantageous.

[0034] Numerous cross-linking reagents, including the ones discussed above, are commercially available. Detailed instructions for their use are readily available from the commercial suppliers. A general reference on protein cross-linking and conjugate preparation is: S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991).

[0035] Chemical cross-linking may include the use of spacer arms. Spacer arms provide intramolecular flexibility or adjust intramolecular distances between conjugated moieties and thereby may help preserve biological activity. A spacer arm may be in the form of a polypeptide moiety comprising spacer amino acids. Alternatively, a spacer arm may be part of the cross-linking reagent, such as in "long-chain SPDP" (Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., cat. No. 21651 H).

[0036] In addition to chemical linking to produce stabilized botulinum toxin complexes or reduced botulinum toxin complexes, this invention also contemplates using genetic fusion techniques to produce these stabilized toxin complexes. For example, using well-known genetic engineering techniques, the nucleic acid sequences that code for a fused botulinum toxin/HIV-TAT fragment or a botulinu toxin/HIV-TAT fragment derivative can be implanted into cells, to cause the cells to express the stabilized toxin complexes.

[0037] In particularly preferred embodiments of this invention, the HIV-TAT fragment or HIV-TAT fragment derivative is covalently attached to the end of the botulinum toxin molecule or derivative thereof to form a linear molecule. In such embodiments, it is often advantageous to use glycine spacers between the botulinum toxin (or derivative thereof) and the HIV-TAT fragment or HIV-TAT fragment derivative. For example, when the

botulinum toxin derivative is the polypeptide according to SEQ ID NO. 3, the stabilized botulinum toxin may have the form RRRQRRKKR-GG-GDSCSVEAETAGK (SEQ ID NO. 4). When it is desired to add more than one stabilizing polypeptide to a toxin molecule, the stabilized botulinum toxin may have the form RRRQRRKKR-GG-toxin amino acids-GG-RRRQRRKKR. Note however, that this invention also contemplates the use of repeating units of HIV-TAT fragments or derivatives thereof (e.g., RRRQRRKKR RRRQRRKKR) for stabilization, either by covalent or non-covalent attachment.

[0038] The number of stabilizing polypeptide chains (whether they are HIV-TAT fragments or derivatives thereof) that are needed to stabilize a botulinum toxin molecule will depend on factors such as the particular serotype in question, and the size and chemical composition of the botulinum toxin or botulinum toxin fragment or derivative under consideration. For example, when a botulinum toxin derivative is being used and it is a relatively small polypeptide (e.g., the polypeptide according to SEQ ID NO. 3), fewer stabilizing polypeptide chains need to be covalently attached, and one covalently attached stabilizing polypeptide chain (e.g., the polypeptide of SEQ ID NOs 1 or 2, or derivatives thereof) may suffice for certain applications.

[0039] 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. Generally, the compositions of this invention can be applied by any means known in the art, non-limiting examples of which include parenteral injection (e.g., subcutaneous injection), topical administration on a skin, or via a patch that can be sub-dermally or supra-dermally located.

[0040] The HIV-TAT fragment of SEQ ID NO. 1 has been previously recognized as promoting intracellular delivery of various "cargo molecules" (see, e.g., U.S. Patent No. 5,804,604). Thus, when botulinum toxin complexes or reduced botulinum toxin complexes have been stabilized with the HIV-TAT fragment of SEQ ID NO. 1 contacts the tissues of a patient (e.g., during topical administration), enhanced cellular penetration of botulinum toxin occurs. In addition, the HIV-TAT derived polypeptide having the sequence of SEQ ID NO. 2 also promotes intracellular penetration, as well as transmembrane penetration. Accordingly, enhanced intracellular and/or transmembrane transport of botulinum toxin occurs when

botulinum toxin complexes or reduced botulinum toxin complexes that have been stabilized with the polypeptide of SEQ ID NO. 2 contacts the tissues of a patient.

[0041] In general, the compositions of the invention are prepared by mixing the stabilized botulinum toxin complexes or stabilized reduced botulinum toxin complexes 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. Such embodiments are particularly preferred when the compositions of the invention are to be administered by injection. However, when the compositions of the invention are to be applied topically, they may contain other ingredients typical in topical pharmaceutical or cosmeceutical compositions, that is, 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.

[0042] 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 HIV-TAT fragments or derivatives thereof, 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, gelling agents, emollients, antioxidants, fragrances, fillers, thickeners, waxes, odor absorbers, dyestuffs, coloring agents, powders, viscosity-controlling agents and water, and optionally including anesthetics, anti-itch actives, botanical extracts, conditioning agents, darkening or lightening agents, glitter, humectants, mica, minerals, polyphenols, silicones or derivatives thereof, sunblocks, vitamins, and phytochemicals.

[0043] Compositions according to this invention may be in the form of controlled-release or sustained-release compositions, wherein the stabilized botulinum toxin complexes or stabilized reduced botulinum toxin complexes are encapsulated or otherwise contained within a material such that they are released onto the skin in a controlled manner over time.

The composition comprising the botulinum toxin and HIV-TAT fragments or derivatives thereof molecules 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 stabilized botulinum toxin over time.

[0044] 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.

[0045] 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 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. The stabilized botulinum toxin complexes or stabilized reduced botulinum toxin complexes 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.

[0046] Administration of botulinum toxin may also be carried out to treat other conditions, including but not limited to treating 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.

[0047] 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. 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 2,000U 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.

[0048] This invention also includes transdermal delivery devices for transmitting botulinum toxin-containing compositions described herein across skin. Such devices may be as simple in construction as a skin patch, or may be a more complicated device that includes means for dispensing and monitoring the dispensing of the composition, and optionally means for monitoring the condition of the subject in one or more aspects, including monitoring the reaction of the subject to the substances being dispensed.

[0049] The compositions of this invention 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.

[0050] It is understood that the following examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents,

22

WO 2008/082889

PCT/US2007/087263

and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes.

23

CLAIMS

We claim:

1. A method for stabilizing botulinum toxin, said method comprising
providing a botulinum toxin complex or a reduced botulinum toxin complex;
providing an polypeptide that is an HIV-TAT fragment or an HIV-TAT
fragment derivative, and
combining said botulinum toxin complex or reduced botulinum toxin complex
with said polypeptide.
2. The method according to claim 1, wherein said botulinum toxin complex or reduced
botulinum toxin complex is covalently attached to said polypeptide.
3. The method of claim 1, wherein said botulinum toxin complex or reduced botulinum
toxin complex is non-covalently stabilized by said polypeptide.
4. The method of claim 1, wherein said HIV-TAT fragment has a sequence according to
SEQ ID NO. 1.
5. The method of claim 1, wherein said HIV-TAT fragment has a sequence according to
SEQ ID NO. 2.
6. The method of claim 1, wherein said botulinum toxin complex or reduced botulinum
toxin complex comprises a polypeptide having a sequence according to SEQ ID NO.
3.
7. The method of claim 1, wherein the reduced botulinum toxin complex contains a
reduced amount of hemagglutinin protein or non-toxin, non-hemagglutinin protein or
both compared to an amount naturally occurring in botulinum toxin complexes
directly extracted from *Clostridium botulinum*.
8. The method according to claim 1, wherein the botulinum toxin complex or reduced
botulinum toxin complex contains albumin as an exogenous stabilizer.

9. The method of claim 6, wherein the albumin is present in an amount equal to about 500, 400, 300, 200, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, or 0.01 times the amount of the albumin in naturally occurring botulinum toxin complexes
10. The method of claim 1, wherein the botulinum toxin complex or reduced botulinum toxin complex contains a botulinum toxin selected from the group consisting of a botulinum toxin derivative, a recombinant botulinum toxin, a modified botulinum toxin, botulinum toxin type A, botulinum toxin type B, botulinum toxin type C, botulinum toxin type D, botulinum toxin type E, botulinum toxin type F, and botulinum toxin type G.
11. A stabilized botulinum toxin composition, wherein said stabilized botulinum toxin comprises
 - a botulinum toxin complex or a reduced botulinum toxin complex; and
 - a polypeptide having a sequence according to SEQ ID NO. 2.
12. The stabilized botulinum toxin composition according to claim 8, wherein said polypeptide is non-covalently associated with said botulinum toxin complex or reduced botulinum toxin complex.
13. The stabilized botulinum toxin composition according to claim 8, wherein said polypeptide is covalently attached to said botulinum toxin complex or reduced botulinum toxin complex.

JS

13720105128_ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Waugh, Jacob M.
Lee, Jae Hoon

<120> Compositions and Methods of Topical Application and Transdermal
Delivery of Botulinum Toxins Stabilized with Polypeptide
Fragments Derived from HIV-TAT

<130> 13720-105128

<140> US 11/955,076

<141> 2007-12-12

<150> US 60/828,632

<151> 2006-12-29

<160> 7

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 1

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 2

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clostridium Botulinum

<400> 3

Gly Asp Ser Cys Ser Val Glu Ala Glu Thr Ala Gly Lys
1 5 10

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 4

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

Val Glu Ala Glu Thr Ala Gly Lys
20

13720105128_ST25

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 5

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

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Human Immunodeficiency Virus

<400> 6

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

Lys Arg

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 7

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

2f

COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE APLICACIÓN TÓPICA Y SUMINISTRO
TRANSDÉRMICO DE TOXINAS BOTULINUM ESTABILIZADAS CON
FRAGMENTOS DE POLIPÉPTIDO DERIVADOS DE HIV-TAT

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS.

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional Estadounidense No de Serie 60/882,632, presentada en Diciembre 29,2006, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

10

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona con composiciones novedosas de toxina botulinum que se pueden aplicar tópicamente para varios propósitos terapéuticos, estéticos
15 y/o cosméticos y que se estabilizan mediante fragmentos de polipéptido derivados de HIV-TAT.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

20 La piel protege los órganos del cuerpo de amenazas ambientales externas 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 estratificante de células epiteliales que descansa sobre la dermis, que consiste de
25 tejido conjuntivo. La epidermis y la dermis están soportadas adicionalmente por la hipodermis, una capa interna de tejido adiposo.

La epidermis, la capa más superior de la piel, es de solo 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 variable, que consiste de células basales y células melfigiana granulares. El estrato córneo es higroscópico y requiere por lo 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 las capas córneas pierden su suavidad y flexibilidad llegan a ser ásperas y quebradizas, resultando en piel seca.

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

La hipodermis es la capa más profunda de la piel. Esta actúa como un aislante para la conservación del calor corporal y como un absorbente de choque para la protección de órganos (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Adicionalmente, la hipodermis también almacena grasas para reserva de energía. El pH de la piel esta normalmente entre 5 y 6. La acidez se debe a la presencia de aminoácidos atmosféricos, ácido láctico, y ácidos grasos de la secreciones de las glándulas sebáceas. El término "manto ácido" se refiere a la

presencia de sustancias solubles en el agua en la mayor para de las regiones. La capacidad de amortiguación de la piel se debe en parte a estas secreciones almacenadas en la capa córnea de la piel.

- 5 Parte de las arrugas, uno de los signos indicadores del envejecimiento, se pueden originar por cambios bioquímicas, histológicos, y fisiológicos que se acumulan del daño ambiental a la piel (Benedetto, International Journal of Dermatology, 38:641-655 (1999)). Adicionalmente, existen otros factores secundarios que pueden originar pliegues característicos, surcos, y pliegues de las arrugas faciales
- 10 (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 la constante atracción de la gravedad, a presión posicional constante y frecuente sobre la piel (por ejemplo, durante el sueño), y los movimientos faciales repetidos originados por la contracción de los músculos faciales (Stegman et al.,
- 15 The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)).

- Se han utilizado diversas técnicas con el fin de modificar potencialmente algunos de los signos del envejecimiento. Estas técnicas varían de humectantes faciales
- 20 que contienen ácidos alfa hidroxí y retinol a procedimientos quirúrgicos e inyecciones de neurotoxinas. Por ejemplo, en 1986, Jean and Alastair Carruthers, un equipo de un matrimonio que consiste de un cirujano oculoplástico y una dermatóloga, desarrollaron un método para utilizar la forma tipo A de la toxina botulinum para el tratamiento de arrugas asociadas con el movimiento en el área
- 25 del entrecejo (Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, New York: Academic Press, 143-150 (1981)). El uso de la toxina botulinum de la forma tipo A de Carruthers para el tratamiento de arrugas conduce

a la publicación original de este método en 1992 (Schantz and Scott, Tn Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, New York: Academic Press, 143-150 (1981)). 1994, el mismo equipo reportó experiencias con otras arrugas asociadas al movimiento (Scott, Ophthalmol, 87: 1044-1049 (1980)). Esto condujo a su vez al nacimiento del área del tratamiento cosmético utilizando la forma tipo A de la toxina botulinum.

De manera interesante, se dice que la forma tipo A de la toxina botulinum es el agente biológico natural más letal conocido por el hombre. Las esporas de C. botulinum se encuentran en el suelo y pueden crecer en recipientes alimenticios sellados y esterilizados de manera inapropiada. La ingestión de la bacteria puede originar botulismo, que puede ser fatal. La toxina Botulinum actúa para producir la parálisis de los músculos al prevenir la transmisión sináptica o la liberación de acetilcolina a través de la unión neuromuscular, y también se considera que actúa en otras formas. Su acción bloquea esencialmente las señales que normalmente originarían espasmos musculares o contracciones, resultando en parálisis. Sin embargo, el efecto de parálisis muscular de la toxina botulinum se ha utilizado para efectos terapéuticos.

La administración controlada de la toxina botulinum se ha utilizado para proporcionar parálisis muscular para tratar afecciones, por ejemplo, trastornos neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. Las afecciones que se han tratado con la toxina botulinum incluye espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica de inicio en adultos, fisura anal, blefaroespasma, parálisis cerebral, distonía cervical, jaquecas de migraña, estrabismo, trastorno de articulación temporomandibular, y varios tipos de espasmos y calambres musculares. Más recientemente los efectos paralizantes musculares de la toxina

botulinum han tomado ventaja en las aplicaciones faciales cosméticas y terapéuticas tal como tratamiento de arrugas, ceño fruncido, y otros resultados de espasmo o contracciones de los músculos faciales.

- 5 Adicionalmente a la forma tipo A de la toxina botulinum, hay otras siete formas serológicamente distintas de la toxina botulinum que también se producen por la bacteria gram positiva *Clostridium botulinum*. De estos ocho tipos serológicamente distintos de toxina botulinum, la siete que pueden originar parálisis se han designados toxina botulinum serotipo A, B, C (también conocida
- 10 como C₁), D, E, F y G. cada una de estas se distingue por la neutralización con anticuerpos específicos de tipo. El peso molecular de la molécula de la proteína de toxina botulinum, para todas las siete de estos serotipos de toxina botulinum activos, es de aproximadamente 150 kD. Los diferentes serotipos de toxina botulinum varían en las especies animales que ellas afectan y en la severidad y
- 15 duración de la parálisis que ellas provocan. Por ejemplo, se ha determinado que la toxina botulinum tipo A es 500 veces más potente que la toxina botulinum tipo B, según se mide por el índice de parálisis producido en ratas. Adicionalmente, la toxina botulinum tipo B se ha determinado que no es toxica en primates en una dosis de 480 U/kg, aproximadamente 12 veces el LD₅₀ de primate para el tipo A.
- 20 Debido al tamaño de molécula y a la estructura molecular de la toxina botulinum, esta no puede cruzar el estrato córneo y las múltiples capas de la arquitectura subyacente de la piel.

- Aunque se libera por la bacteria *Clostridium botulinum*, la toxina botulinum es un
- 25 componente de un complejo de toxinas que contiene la molécula de proteína de toxina botulinum de aproximadamente 150 kD aunque asociada con proteínas no toxinas. Estas proteínas endógenas no toxinas se considera que incluyen una

32

familia de proteínas de hemaglutinina, así como también proteína no hemaglutinina proteína. Las proteínas no toxinas se consideran que estabilizan las moléculas de toxina botulinum en el complejo de toxina y la protegen contra la desnaturalización, por ejemplo, por ácidos digestivos cuando se ingiere el

5 complejo de toxina. Así, las proteínas no toxina del complejo de toxina protegen la actividad de la toxina botulinum y mejoran la penetración sistémica, particularmente cuando el complejo de toxina se administra por vía del trato gastrointestinal. Mas específicamente, se considera que algunas de las proteínas no toxina mejoran específicamente la penetración a través del epitelio

10 gastrointestinal mientras que otras proteínas no toxina estabilizan la molécula toxina botulinum en la sangre. Adicionalmente, el presencia de proteínas no toxina en los complejos de toxina originan típicamente que los complejos de toxina tengan pesos moleculares que sean mayores que aquellos de la molécula de toxina botulinum, que es de aproximadamente 150 kD, como se anoto

15 previamente. Por ejemplo, la bacteria Clostridium botulinum puede producen complejos de toxina botulinum tipo A que tienen pesos moleculares de aproximadamente 900 kD, 500 kD o 300 kD. De manera interesante, los tipos B y C de toxina botulinum se producen aparentemente como solo un complejo de 700 kD o 500 kD. La toxina botulinum tipo D se produce de complejos de 300 kD y 500

20 kD. Los tipos de toxina botulinum tipo E y F se producen solo como complejos de aproximadamente 300 kD.

Para proporcionar estabilidad adicional a la toxina botulinum, los complejos de toxina se estabilizan frecuentemente al combinarlos con estabilizantes exógenos,

25 (por ejemplo, gelatina, polisacáridos, o más comúnmente albúmina adicional) durante la fabricación. Los estabilizantes sirven para unir y estabilizar los

complejos de toxina en ambientes dispares, que incluyen aquellos asociados con fabricación, transporte, almacenamiento, y administración.

Típicamente, la toxina botulinum se administra a pacientes mediante inyecciones controladas cuidadosamente de composiciones que contienen el complejo de toxina botulinum y albúmina, pero existen varios problemas asociados con este método. Por ejemplo, debido a que los complejos de toxina inyectada contienen proteínas no toxina y albúmina, ambas estabilizan la toxina botulinum e incrementan el peso molecular del complejo de toxina, los complejos de toxina tienen una larga vida media en el cuerpo, son lentos para difundirse a través de la piel, y pueden originar una respuesta antigénica indeseable en el paciente. También, en razón a que las proteínas no toxina y la albúmina estabilizan la toxina botulinum en la sangre, las inyecciones se deben colocar cuidadosamente de tal manera que ellas no liberen una gran cantidad de toxina en el torrente sanguíneo del paciente, que pueda conducir a un envenenamiento sistémico fatal. Así, típicamente las inyecciones se deben desarrollar precisamente por profesionales médicos altamente entrenados con un profundo entendimiento de la anatomía humana.

En vista de todos los problemas discutidos anteriormente, sería altamente deseable tener un método para estabilizar la toxina botulinum que no utilice albúmina. También sería altamente deseable si tal método redujera la antigenicidad y estabilidad sanguínea de la toxina botulinum, aunque se incrementa el índice de difusión de los complejos de toxina botulinum dentro del cuerpo, haciendo por lo tanto más seguro utilizar la toxina botulinum para varios propósitos terapéuticos, estéticos y/o cosméticos. También sería deseable tener un método de administración que no dependa críticamente de la inyección precisa de la

toxina botulinum por un profesional medico con el fin de lograr la administración segura de la toxina.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

5

Un aspecto de esta invención es el reconocimiento de que ciertos fragmentos de polipéptido del HIV-TAT, o fragmentos del polipéptido derivados de los fragmentos de HIV-TAT, se pueden agregar a los complejos de toxina botulinum, y en particular complejos de toxina botulinum reducidos, para estabilizarlos. En una

10 modalidad particular preferida, el fragmento de polipéptido tiene una secuencia que corresponde a residuos de aminoácidos 49-57 del HIV-TAT (RKKRRQRRR, SEQ ID NO. 1). En otra modalidad preferida, el fragmento de polipéptido tiene una secuencia que corresponde a la secuencia inversa de los residuos de aminoácidos 49-57 del HIV-TAT (RRRQRRKKR, denominado aquí en adelante como

15 SEQ ID NO. 2.). Adicionalmente, esta invención también contempla análogos del polipéptido de las secuencias de las SEQ DD NOS 1 y 2 que son funcionalmente equivalentes, tal como los casos en los cuales se han hecho sustituciones conservadoras. Como se utiliza a lo largo de esta solicitud, el polipéptido HIV-TAT inverso definido por la SEQ ID NO. 2, así como también cualquier análogo del

20 polipéptido de la SEQ ID NOS 1 o 2 en los que se han hecho sustituciones conservadoras, están abarcados por el término "derivado de fragmento HIV-TAT".

Otro aspecto de esta invención es el reconocimiento de que las proteínas no toxina endógenas en un complejo de toxina botulinum obtenida de la bacteria

25 Clostridium botulinum (viz., las proteínas hemaglutinina no toxica y no hemaglutinina) incrementan de manera indeseable la estabilidad y toxicidad del complejo de toxina, aunque reducen de manera indeseable la capacidad de la

35

toxina para difundirse a través del epitelio de la piel. Esta invención reconoce adicionalmente que estos efectos se exacerban cuando un estabilizantes exógeno, tal como albúmina, se une a la toxina botulinum durante el proceso de fabricación convencional. Así, un aspecto de esta invención es proporcionar complejos de

5 toxina botulinum en donde las cantidades de hemaglutinina, hemaglutinina no toxina y/o albúmina exógena se reducen selectiva e independientemente comparado con la toxina botulinum convencional disponible comercialmente (por ejemplo, BOTOX® o MYOBLOC®). Tales complejos de toxina botulinum se denominan aquí en adelante como "complejos de toxina botulinum".

10

De acuerdo con lo anterior, un objeto de esta invención es proporcionar una composición que comprenda un complejo de toxina botulinum (o un complejo de toxina botulinum reducido) que se estabilice por los polipéptidos que tienen una secuencia que corresponde a la SEQ TD NO. 1 o 2. La composición

15 opcionalmente puede contener estabilizantes exógenos agregados, tal como albúmina.

20

Como se utilice aquí, el término "estabiliza" se refiere a la capacidad de los fragmentos HIV-TAT (por ejemplo, SEQ ID NO. 1) o derivados de fragmentos HIV-TAT para evitar que la toxina botulinum se desnaturalice y conserve la actividad de

20 la toxina, según se mide por un ensayo de SNAPtida, o un ensayo de clasificación de Abducción Digital (DAS). En modalidades preferidas, las composiciones de toxina botulinum de esta invención se estabilizan suficientemente para retener sustancialmente toda su actividad biológica durante las etapas de procesamiento y administración al paciente, que incluyen, pero no se limitan a, llenado,

25 liofilización, almacenamiento y reconstitución para suministro.

La invención se relaciona adicionalmente con un método para producir un efecto biológico al administrar los complejos de botulinum estabilizados o complejos de toxina botulinum estabilizados reducidos de la invención a un paciente. En ciertas modalidades preferidas, los complejos botulinum estabilizados o complejos de toxina botulinum estabilizados reducidos se aplican tópicamente en una cantidad efectiva, preferiblemente a la piel, de un sujeto o paciente en necesidad de tal tratamiento. El efecto biológico puede incluir, por ejemplo, parálisis muscular, reducción de la hipersecreción o sudoración, tratamiento del dolor neurológico o jaqueca de migraña, reducción de espasmos musculares, prevención o reducción del acné, reducción o mejora de una respuesta inmune, reducción de arruga, o prevención o tratamiento de varios otros trastornos. En otras modalidades, los complejos de toxina botulinum estabilizados o complejos de toxina botulinum estabilizados reducidos se administran por inyección parenteral, tal como, por ejemplo inyección subcutánea.

Esta invención también proporciona equipos para preparar formulaciones que contiene un complejo de toxina botulinum (o un complejo de toxina botulinum) y polipéptidos que tienen secuencias de acuerdo con la SEQ ID NOS. 1 o 2, o una premezcla que puede a su vez ser utilizada para producir tal una formulación.

También se proporcionan kits que contienen medios para administrar secuencialmente un complejo de toxina botulinum (o un complejo de toxina botulinum reducido) y moléculas de adhesión a un sujeto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona con composiciones novedosas que comprenden complejos de toxina botulinum o complejos de toxina botulinum reducidos, como

3f

se describe aquí, que se estabilizan mediante la adición de polipéptidos que son fragmentos HIV-TAT o derivados de fragmentos HIV-TAT. En modalidades preferidas, los polipéptidos estabilizantes tienen una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NOS 1 o 2, o se pueden relacionar con aquellas secuencias a través de sustituciones conservadoras. En ciertas modalidades, las composiciones de toxina botulinum estabilizadas de acuerdo con la invención permiten el transporte o el suministro de una toxina botulinum a través del epitelio de la piel (también denominado como "suministro transdérmico") con penetración mejorada, antigenicidad reducida y estabilidad sanguínea. Las composiciones de la invención se pueden utilizar como aplicaciones tópicas para proporcionar una toxina botulinum a un sujeto, para varios propósitos terapéuticos, estéticos y/o cosméticos, como se describe aquí. Las composiciones de la invención también tienen un perfil de seguridad mejorado sobre otras composiciones y métodos de suministro de toxina botulinum.

El término "toxina botulinum" como se utilice aquí se refiere a cualquiera de los tipos de toxina botulinum conocidos (es decir, la molécula de proteína de toxina botulinum de aproximadamente 150 kD), sea producida por la bacteria o por técnicas recombinantes, así como también mediante cualquier tipo que pueda ser descubierto posteriormente que incluye un serotipo nuevos descubiertos, y variantes construidas con ingeniería o proteínas de fusión. Como se menciono anteriormente, actualmente se han caracterizado siete neurotoxinas botulinum inmunológicamente distintas, a saber serotipos de bacteria de neurotoxina A, B, C, D, E, F y G, cada una de las cuales se distingue por la neutralización con anticuerpos específico de tipo. Los serotipos de toxina botulinum están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y de Metabionics, Inc. (Madison, Wisconsin), así como también de otras fuentes. 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 provocan. Por lo menos dos tipos de toxina botulinum, tipo A y B, están disponibles comercialmente en formulaciones para el tratamiento de ciertas afecciones. El tipo A, por ejemplo, esta contenido en las preparaciones de Allergan que tiene la marca registrada BOTOX® y de Ipsen que tiene la marca registrada DYSPORT®, y el tipo B esta contenido en preparaciones de Elan que tiene la marca registrada MYOBLOO®.

El término "toxina botulinum" utilizada en las composiciones de esta invención puede referirse alternativamente a un derivado de toxina botulinum, que es un compuesto que tiene una actividad de toxina botulinum pero contiene una o más alteraciones químicas o funcionales en cualquier parte o cualquier cadena relacionada a ocurrencia natural o toxinas botulinum nativas recombinantes. Por ejemplo, la toxina botulinum puede ser una neurotoxina modificada que es una neurotoxina que tiene por lo menos uno de sus aminoácidos eliminados, modificados o remplazados, según se compara con una neurotoxina nativa, o neurotoxina modificada que puede ser una neurotoxina producida recombinantemente o su fragmento. En una modalidad particularmente preferida de la invención, el derivado de toxina botulinum es un polipéptido que tiene la secuencia GDSCSVEAETAGK (SEQ ID NO. 3). Esta secuencia corresponde a la porción de la molécula de toxina botulinum tipo A que es responsable de la actividad biológica de la toxina en humanos. La toxina botulinum también puede ser una que se ha modificado en una forma que, por ejemplo, mejora sus propiedades o reduce los efectos colaterales indeseables, pero que aún retiene la actividad deseada de la toxina botulinum. La toxina botulinum puede ser de cualquiera de los complejos de toxina botulinum producidos por la bacteria como se describió anteriormente. Alternativamente la toxina botulinum utilizada en esta invención

39.

puede ser una toxina preparada utilizando técnicas químicas sintéticas o recombinante, por ejemplo un péptido recombinante, una proteína de fusión, o una neurotoxina híbrida, por ejemplo preparada de unidades o dominios de diferentes serotipos de toxinas botulinum (ver Patente Estadounidense 6,444,209, por ejemplo). La toxina botulinum también puede ser una porción de la molécula general que ha sido mostrada por poseer la actividad de toxina botulinum necesaria, y en tal caso se puede utilizar per se o como parte de una combinación o molécula conjugada, por ejemplo una proteína de fusión. Alternativamente, la toxina botulinum puede estar en la forma de un precursor de toxina botulinum, que puede en si mismo no ser toxico, por ejemplo una proteasa de zinc no toxica que llega a ser toxica o dividida proteolíticamente.

El término "complejo de toxina botulinum" o "complejo toxinas" como se utiliza aquí se refiere a una toxina botulinum (por ejemplo, la molécula de proteína toxina botulinum de aproximadamente 150 kD que pertenece a una cualquiera de los serotipos de toxina botulinum A-G, o el fragmento de toxina botulinum de la SEQ ID NO. 3), junto con proteínas no toxina asociadas endógenas (es decir, proteína hemaglutinina y proteína no hemaglutinina no toxina producidas por la bacteria *Clostridium botulinum*). Note, sin embargo, que el complejo de toxina botulinum no necesita derivarse de la bacteria *Clostridium* como un complejo de toxina unitario. Por ejemplo, la toxina botulinum o la toxina botulinum modificada se puede preparar primero recombinantemente y luego posteriormente combinar con proteínas no toxina. La toxina botulinum recombinante también se puede comprar (por ejemplo de List Biological Laboratories, Campbell, CA) y luego combinar con proteínas no toxina.

Esta invención también contempla "complejo de toxina botulinum reducidos", en la que los complejos de toxina botulinum (que incluyen aquellas que contienen derivados de la toxina botulinum, tal como la secuencia de polipéptido en la SEQ ID NO. 3) tiene cantidades reducidas de proteína no toxina comparado con las

5 cantidades encontradas naturalmente en los complejos de toxina botulinum producidos por la bacteria *Clostridium botulinum*. En una modalidad, los complejos de toxina botulinum se preparan utilizando cualquier método de separación de proteína convencional para extraer una fracción de la proteína hemaglutinina o proteína no hemaglutinina no toxina de complejos de toxina botulinum derivados

10 de la bacteria *Clostridium botulinum*. Por ejemplo, los complejos de toxina botulinum reducidos se pueden producir al disociar los complejos de toxina botulinum a través de la exposición a los glóbulos rojos en un pH de 7.3 (por ejemplo, ver EP 1514556 A1, incorporada aquí como referencia). Se pueden utilizar

15 El HPLC, la diálisis, columnas, centrifugación, y otros métodos para extraer proteínas de proteínas. Alternativamente, cuando los complejos de toxina botulinum reducidos se producen al combinar toxina botulinum producida sintéticamente con proteínas no toxina, uno puede simplemente agregar menos

hemaglutinina o proteína no hemaglutinina no toxina a la mezcla que estaría presente para los complejos de toxina botulina de ocurrencia natural. Cualquiera

20 de las proteínas no toxina (por ejemplo, proteína hemaglutinina o proteína no hemaglutinina no toxina o ambas) en los complejos de toxina botulinum reducidos de acuerdo con la invención se pueden reducir independientemente mediante cualquier cantidad. En ciertas modalidades de ejemplo, se reducen una o más

25 proteínas no toxina mediante por lo menos aproximadamente el 0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80% o 90% comparado con las cantidades encontradas normalmente en los complejos de toxina botulinum. El MYOBLOC tiene 5000 U de toxina botulinum tipo B por ml con 0.05% de albúmina

de suero humana, 0.01 M de succinato de sodio, y 0.1 M de cloruro de sodio. El DYSPORE tiene 500 U de complejo hemaglutinina -toxina botulinum tipo A con 125 meg de albúmina y 2.4 mg de lactosa. En una modalidad particularmente interesante, sustancialmente todas las proteínas no toxina (por ejemplo, > 95% de la proteína hemaglutinina y la proteína no hemaglutinina no toxina) que pudieran encontrarse normalmente en los complejos de toxina botulinum derivados de la bacteria *Clostridium botulinum* se remueven del complejo de toxina botulinum. Adicionalmente, aunque la cantidad de proteínas no toxina endógenas se pueda reducir mediante la misma cantidad en algunos casos, esta invención también contempla reducir cada una de las proteínas no toxina endógenas mediante diferentes cantidades, así como también reducir por lo menos una de las proteínas no toxina endógena, pero no las otras.

En adición a (o en cambio de) reducir la cantidad de proteína no toxina endógena para desestabilizar el complejo de toxina botulinum, esta invención también contempla reducir la cantidad de estabilizantes exógenos que se agregan normalmente durante la fabricación. Un ejemplo de tal un estabilizante exógeno es la albúmina, que se agrega normalmente durante la fabricación a los complejos de toxina botulinum en una cantidad igual a 1000 veces la cantidad de la albúmina encontrada en el componente no hemaglutinina no toxina endógeno de un complejo de toxina botulinum de ocurrencia natural. De acuerdo con esta invención, la cantidad de albúmina exógena agregada puede ser cualquier cantidad menor que cien veces el exceso de albúmina exógena convencional. Se agregan. En ciertas modalidades de ejemplo de la invención, solo aproximadamente 500x, 400x, 300x, 200x, 100x, 50x, 10, 5x, 1x, 0.5x, 0.1x, o 0.01x la cantidad de albúmina en los complejos de toxina botulinum de ocurrencia natural. En una modalidad, no se agrega albúmina exógena como un estabilizante

42

a las composiciones de la invención. En otras modalidades, los estabilizantes exógenos en adición a (o en cambio de) a la albúmina se agregan a las composiciones tópicas terapéuticas de la invención. Por ejemplo, otros estabilizantes contemplados por la invención incluyen lactosa, gelatina y polisacáridos.

Aunque los complejos de toxina botulinum estabilizados o complejo de toxina botulinum reducidos estabilizados se pueden obtener o derivar a partir de cualquiera de los serotipos de toxina botulinum (es decir, tipos A-G), en las modalidades preferidas de esta invención, ellas se obtienen o se derivan a partir de el serotipo tipo A de toxina botulinum.

En modalidades preferidas, las composiciones de toxina botulinum se estabilizan mediante la adición de polipéptidos no nativos que son un fragmento del HIV- TAT (por ejemplo, SEQ ID NO. 1) o derivados de un fragmente de HIV-TAT (por ejemplo, SEQ ID. NO 2, que es la secuencia inversa del polipéptido de la SEQ ID NO. 1). El fragmento HIV-TAT o su derivado se puede combinar con la molécula de toxina botulinum sea covalentemente o no covalentemente para estabilizar el complejo de toxina botulinum o el complejo de toxina botulinum reducida. En una modalidad preferida, el fragmento HIV-TAT o su derivado se combina físicamente con los complejos de toxina botulinum o complejos de toxina botulinum reducidos para estabilizarlos no covalentemente. La cantidad relativa del fragmento HIV-TAT o su derivado dependerá del grado de estabilidad deseado. Por ejemplo, cuando el fragmento HIV-TAT de estabilización o su derivado corresponde a los polipéptidos de la SEQ ID NOs. 1 o 2, un rango de concentración útil para el péptido de estabilización de alrededor de 0.1 ng a aproximadamente 1.0 mg por unidad de complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducida.

Más preferiblemente, los péptidos de estabilización de la SEQ ID NOs. 1 o 2 pueden estar en el rango de aproximadamente 0.1 mg a 0.5 mg por unidad de toxina botulinum.

- 5 Alternativamente, el fragmento HIV-TAT de estabilización o su derivado se puede ligar covalentemente a la molécula de toxina botulinum en un complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido utilizando química de enlace conocida en la técnica. Por vía de ejemplo, el acoplamiento de los dos
- 10 constituyentes se puede lograr por vía de un acoplamiento o agente de conjugación. Existen varios agentes de reticulación intramolecular que se pueden utilizar (ver, por ejemplo, Means, G. E. and Feeney, R. E., Chemical Modification of Proteins, Holden-Dai, 1974, pp. 39-43). Entre estos reactivos están, por ejemplo, 3-(2-piridiloditio) propionato de J-succinimidilo (SPDP) o N, N'-(1,3-fenileno) bismaleimida (ambos son altamente específicos para grupos sulfhídrico y
- 15 forma enlaces irreversibles); N,N'-etileno-bis-(yodoacetamida) u otros de tales reactivos que tienen 6 a 11 puentes de metileno de carbono (que son relativamente específicos para el grupo sulfhídrico); y 1,5-difloro-2,4-dinitrobenceno (que forma enlaces irreversibles con grupos amino y tirosina). Otro reactivo de reticulación útiles para este propósito incluyen: p,p'-difluoro-m,m'-
- 20 dinitrodifenilosulona (que forman reticulación irreversible con grupos amino y grupos fenolicos); adipimidato dimetilo (que es específico para los grupos aminos); fenol-1,4-disulfonilocloruro (que reacciona principalmente con grupos aminos); hexametilenodisocianato o disotiocianato, o azofenil-p-diisocianato (que reacciona principalmente con grupos aminos); glutaraldehído (que reacciona con varias
- 25 cadenas laterales diferentes) y disdiazobencidina (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

Los agentes de reticulación pueden ser homobifuncionales, es decir, que tienen dos grupos funcionales que experimentan la misma reacción. Un reactivo de reticulación homobifuncional preferido es bismaleimidoheptano ("DMH"). El DMH contiene dos grupos funcionales maleimida, que reaccionan específicamente con grupos que contienen sulfhídrico bajo condiciones suaves (pH 6.5-7.7). Los dos grupos maleimida se conectan mediante una cadena de hidrocarburo. Por lo tanto, el DMH es útil para reticulación irreversible de polipéptido que contienen residuos cisteína.

10 Los reactivos de reticulación también pueden ser heterobifuncionales. Los agentes de reticulación heterobifuncionales tienen dos grupos funcionales diferentes, por ejemplo un grupo amino reactivo y un grupo tiol-reactivo, que reticularán dos proteínas que tienen tioles y aminas libres, respectivamente. Ejemplo de agentes de reticulación heterobifuncionales son 4- (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo ("SMCC"), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida ("MBS"), y 4-(p-maleimidofenilo) butirato de succinimida ("SMPB"), una cadena extendida análoga del MBS. El grupo succinimidilo de estos reticulantes reaccionan con una amina primaria, y la maleimida tiol reactiva forma un enlace covalente con el tiol de un residuo cisteína.

20

Los reactivos de reticulación tienen frecuentemente baja solubilidad en el agua. Un grupo funcional hidrófilo, tal como un grupo sulfonato, se puede agregar al reactivo de reticulación para mejorar su solubilidad al agua. Los Sulfo-MBS y sulfo-SMCC son ejemplos de reactivos de reticulación modificados para la solubilidad al agua.

25

Muchos reactivos de reticulación producen un conjugado que es esencialmente no clivable bajo condiciones celulares. Sin embargo, algunos de los agentes de

4S.

reticulación contienen un enlace covalente tal como un enlace de disulfuro, que se puede clivar bajo condiciones celulares. Ejemplo, ditiobis(succinimidilopropionato) ("DSP"), con reactivo de Traufs y propionatos de 3-(2- piridiloditio) N-succinimidilo ("SPDP") se conocen bien como reticuladores clivables. El uso de un reactivo de reticulación clivable permite la estabilización del fragmento HIV-TAT o su derivado para separarlo de la molécula de toxina botulinum después de suministro en el área objetivo. El enlace de disulfuro directo también puede ser útil.

Algunos reactivos de reticulación nuevos tal como éster de n-γ meleimidobutiriloxisuccinimida ("GMBS") y sulfo-GMBS, tienen inmunogenicidad reducida. En algunas modalidades de la presente invención, tal inmunogenicidad reducida puede ser ventaja.

Numerosos reactivos de reticulación, que incluyen aquellos discutidos anteriormente, están disponibles comercialmente. Instrucciones detalladas para su uso están fácilmente disponibles de proveedores comerciales. Una referencia general sobre la reticulación de proteína y la preparación de conjugado es: S. S. Wong, Cemistri of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991).

La reticulación química puede incluir el uso de brazos espaciadores. Los brazos espaciadores proporcionan flexibilidad intramolecular o ajuste de distancias intramoleculares entre grupos funcionales conjugados y por lo tanto pueden ayudar a conservar la actividad biológica. Un brazo espaciador puede estar en la forma de un grupo funcional polipéptido que comprende aminoácidos espaciadores. Alternativamente, un brazo espaciador puede ser parte de un agente de reticulación, tal como en "cadena larga SPDP" (Pierce Cem. Co., Rockford, 111., cat. No. 21651 H).

En adición a la reticulación química para producir complejos de toxina botulinum estabilizadas o complejos de toxina botulinum reducidas, esta invención también contempla utilizar técnicas de fusión genética para producir estos complejos de toxina estabilizada. Por ejemplo, utilizar técnicas de ingeniería genética bien conocidas, las secuencias de ácido nucleico que codifican un toxina botulinum fusionada /fragmento HIV-TAT o una toxina o botulinum/fragmento HTV-TAT derivada que se pueda implantar en las células, para originar que las células expresen los complejos de toxinas estabilizados.

10

En modalidades particularmente preferida de esta invención, el fragmento HIV-TAT o derivado de fragmento HIV-TAT se une covalentemente al extremo de la molécula de toxina botulinum o derivado de este para formar una molécula lineal. En tales modalidades, es frecuentemente ventajoso utilizar espaciadores de glicina entre la toxina botulinum (o su derivado) y el fragmento HIV-TAT o derivado de fragmento HIV-TAT por ejemplo, cuando el derivado de toxina botulinum es el polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO. 3, la toxina botulinum estabilizada puede tener la forma RRRQRRKKR-GG-GDSCSVEAETAGK (SEQ ID NO. 4). Cuando se desea agregar más de un polipéptido estabilizantes a una molécula de toxina, la toxina botulinum estabilizada puede tener la forma RRRQRRKKR-GG-toxina aminoácidos-GG- RRRQRRKKR. Sin embargo note que, esta invención también contempla el uso de unidades de repetición de fragmentos HIV-TAT o sus derivados (por ejemplo, RRRQRRKKR RRRQRRKKR) para estabilización, ya sea por adhesión covalente o no covalente.

25

El número de cadenas de polipéptido de estabilización (ya sea ellas fragmentos HIV-TAT o sus derivados) que son necesarias para estabilizar una moléculas de

49

toxina botulinum dependerán de factores tales como el serotipo particular en cuestión, y el tamaño y composición química de la toxina botulinum o fragmento de toxina botulinum o fragmento de toxina botulinum o derivado bajo consideración; cuando un derivado de toxina botulinum se está utilizando y es un

5 polipéptido relativamente pequeño (por ejemplo, el polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO. 3), se necesitan menos cadenas de polipéptido de estabilización para ser unidas covalentemente, y una cadena de polipéptido de estabilización unida covalentemente (por ejemplo, el polipéptido de la SEQ ID NOs 1 o 2, o sus derivados) puede ser suficiente para ciertas aplicaciones.

10

Las composiciones de esta invención están preferiblemente en la forma de productos para ser aplicados a la piel o epitelio de los sujetos o pacientes, es decir humanos u otros animales en necesidad del tratamiento particular. El término "en necesidad" significa que incluye necesidades farmacéuticas o relacionadas con la

15 salud, por ejemplo, el tratamiento de afecciones que involucren espasmos musculares faciales indeseables, así como también necesidades subjetivas y cosméticas, por ejemplo, alteración o mejora de la apariencia del tejido facial. De manera general, las composiciones de esta invención se pueden aplicar por medio de cualquier medio conocido en la técnica, ejemplos no limitantes de los cuales

20 incluyen inyección parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea), administración tópica sobre la piel, o por vía de un parche que puede ser ubicado subdérmicamente o supradérmicamente.

25

Los fragmentos HIV-TAT de la SEQ ID NO. 1 se ha reconocido previamente por promover el suministro intracelular de varias "moléculas de carga" (ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,804,604). Así, cuando los complejos de toxina botulinum o los complejos de toxina botulinum reducidos se ha estabilizados

con el fragmento HIV-TAT de SEQ ED NO. 1 entra en contacto con el tejido de un paciente (por ejemplo, durante administración tópica); ocurre la penetración celular mejorada de la toxina botulinum. Adicionalmente, el polipéptido derivado de HIV-TAT que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 2 también promueve la penetración intracelular, así como también la penetración de transmembrana. De acuerdo con lo anterior, ocurre el transporte intracelular y o de transmembrana mejorado de la toxina botulinum cuando los complejos de toxina botulinum o los complejos de toxina botulinum reducidos que se ha estabilizado con el polipéptido y la SEQ ID NO. 2 entra en contacto con el tejido de un paciente.

10

En general, las composiciones de la invención se preparan al mezclar los complejos de toxina botulinum estabilizados o complejo de de toxina botulinum estabilizados reducidos con uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. En su forma más simple ellos pueden contener un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable acuoso simple, tal como salina amortiguada. Tales modalidades son particularmente preferidas cuando las composiciones de la invención se administran por inyección. Sin embargo, cuando las composiciones de la invención se aplican tópicamente, ellas pueden contener otros ingredientes típicos en composiciones farmacéuticas o cosméticas, esto es, un portador farmacéuticamente aceptable, vehículo o medio, es decir un portador, vehículo o medio que es compatible con los tejidos a los cuales ellos se aplicaran. El término "dermatológicamente o farmacéuticamente aceptable", 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 apropiadas, las composiciones de la

15

20

25

invención pueden comprender cualquier ingrediente utilizado convencionalmente en los campos bajo consideración, y particularmente en cosmética y dermatología.

En término de su forma, las composiciones de esta invención pueden incluir

5 soluciones, emulsiones (que incluyen microemulsiones), suspensiones, cremas, lociones, geles, polvo, y otras composiciones típicas sólidas o líquidas utilizadas para aplicación a la piel y otros tejidos en donde se puedan utilizar la composiciones. Tales composiciones pueden contener, en adición a la toxina botulinum y a los fragmentos HIV-TAT o sus derivados, otros ingredientes

10 utilizados típicamente en tales productos, tal como antimicrobianos, humectantes y agentes de hidratación, agentes de penetración, conservantes, emulsificantes, aceites sintéticos o naturales, disolventes, tenso activos, detergente, agentes gelantes, emolientes, antioxidantes, fragancias, rellenos, espesantes, ceras, absorbentes de olor, tintes, agentes colorantes, polvos, agentes controladores de

15 la viscosidad y agua, y opcionalmente incluyen anestésicos, activos antiprurito, estratos botánicos, agentes de acondicionamientos, agentes oscurecedores o iluminadores, abrillantadores, humectantes, mica, minerales, polifenoles, siliconas o sus derivados, bloqueadores solares, vitaminas, y fitomedicamentos.

20 La composiciones de acuerdo con esta invención pueden estar en la forma de composiciones de liberación controlada o liberación sostenida, en donde los complejos de toxina botulinum estabilizados o complejos de toxina botulinum reducidos estabilizados se encapsulan o están contenidos de otra forma dentro de un material de tal manera que se liberan sobre la piel en una forma controlada

25 durante el tiempo. La composición que comprende la toxina botulinum y fragmentos HIV-TAT o su moléculas derivadas pueden estar contenidas dentro de matrices, liposomas, vesículas, microcápsulas, microesferas y similares, o dentro

50

de un material de particular sólido, todos lo cuales se seleccionan y/o se construyen para proporcionar liberación de la toxina botulinum estabilizada durante el tiempo.

- 5 La toxina botulinum se puede suministrar a los músculos que subyacen a la piel, o a estructura glandulares dentro de la piel, en una cantidad efectiva para producir parálisis, para producir relajación, aliviar contracciones, evitar o aliviar espasmos, reducir la secreción glandular, u otros efectos deseados. El suministro local de la toxina botulinum de esta forma puede producir reducciones de dosificación, reducir
- 10 la toxicidad y permitir más optimización de dosificación precisa para efecto deseado relacionados con materiales implantables o inyectables.

- La composición de la invención se aplica de tal manera que administran una cantidad efectiva de la toxina botulinum. El término "cantidad efectiva" como se
- 15 utiliza aquí significa una cantidad de una toxina botulinum como se definió anteriormente que es suficiente para producir la parálisis muscular deseada u otro efecto estético o biológico, pero que implícitamente es una cantidad segura, es decir una que es suficientemente baja para evitar efectos colaterales serios. Los efectos deseados incluyen la relajación de ciertos músculos con la ayuda de; por
- 20 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 ensanchamiento de los ojos, levantamiento de las esquinas de la boca, o alisamiento de líneas que hale del labio superior, o el alivio general de tensión muscular. El efecto final mencionado, alivio general de la tensión muscular, se pueden efectuar en la cara o
- 25 en cualquier parte. Las composiciones de la invención pueden contener una cantidad efectiva apropiada de la toxina botulinum para aplicación como un tratamiento de dosis única, o puede ser más concentrado, ya sea para dilución en

S1

el lugar de administración o para uso en múltiples aplicaciones. Los complejos de toxina botulinum estabilizados o complejos de toxina botulinum estabilizados reducidos se pueden administrar transdérmicamente a un sujeto para tratar afecciones tal como músculos faciales indeseables u otros espasmos musculares, hiperhidrosis, acne, o afecciones en cualquier parte en el cuerpo en el que se desee alivio del dolor muscular o espasmos. La toxina botulinum se administra tópicamente para suministro transdérmico a los músculos u a otras estructuras asociadas con la piel. La administración puede ser hecha, por ejemplo, a las piernas, hombros, espalda, (que incluye la parte baja de la espalda), axila, palmas, pies, nuca, ingle, dorso de las manos o pies, codos, brazo superior, rodillas, parte superior de las piernas, nalgas, torso, pelvis, o cualquier, otra parte del cuerpo en donde se desee la administración de la toxina botulinum.

La estación de la toxina botulinum también se puede llevar a cabo para tratar otras afecciones, que incluyen pero no se limitan al tratamiento del dolor neurológico, prevención, o reducción de jaqueca por migraña u otro dolor de jaqueca. Prevención o reducción del acne, prevención o reducción de la distonía o contracciones diatónicas (sea subjetivas o clínicas), prevención o reducción de síntomas asociados con hiperhidrosis clínica o subjetiva, reducir la hipersecreción o sudoración, reducción o mejora de la respuesta inmune, o tratamiento de otras afecciones para los cuales se ha sugerido o desarrollado la administración de la toxina botulinum mediante inyección.

Más preferiblemente, las composiciones se administran mediante o bajo la dirección de un medico u otro profesional del cuidado de la salud. Ellas se pueden administrar en un tratamiento único o en una serie de tratamientos periódicos durante el tiempo. Para el suministro transdérmico de la toxina botulinum para los

32

propósitos mencionados anteriormente, se aplica una composición como se describió anteriormente tópicamente a la piel en una ubicación o ubicaciones en donde se desee el efecto. Debido a su naturaleza, la cantidad más preferible de la toxina botulinum 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 lo anterior, por ejemplo, las composiciones tópicas de la invención se deben aplicar en una proporción de aproximadamente 1 U a aproximadamente 2,000 U, de toxina botulinum por cm² de superficie corporal. Dosificaciones mayores dentro de estos rangos se pueden emplear preferiblemente en conjunto con materiales de liberación controlada, por ejemplo, o se le permite un tiempo de inactivación más corto sobre la piel antes de remoción.

La invención también incluye dispositivos de suministro transdérmico para transmitir composiciones que contienen toxina botulinum descrita aquí a través de la piel. Tales dispositivos pueden ser tan simples en construcción como un parche para la piel, o pueden ser un dispositivo mas complicado que incluye medios para suministrar y monitorear el suministro de la composición, y opcionalmente medios para monitorear la afección del sujeto en uno más aspectos, que incluyen monitorear la reacción del sujeto a las sustancias que se suministran.

Las composiciones de esta intención son adecuadas para uso en ambientes fisiológicos con pH que varia de aproximadamente 4.5 a aproximadamente 6.3, y pueden así tener tal un pH. Las composiciones de acuerdo con esta invención se pueden almacenar a temperatura ambiente o bajo condiciones refrigeradas.

S3

Se entiende que los siguientes ejemplos y modalidades descritas aquí son solo para propósitos de ilustración y que varias modificaciones o cambios en claridad de estos se sugerirán por las personas expertas en la técnica y se incluyen dentro del espíritu y alcance de esta solicitud y de las reivindicaciones adjuntas. Todas

5 las publicaciones, entes y solicitudes de patente mencionadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

REIVINDICACIONES

Reivindicamos:

1. Un método para estabilizar la toxina botulinum, dicho método comprende

5 Proporcionar un complejo de toxina botulinum o un complejo de toxina botulinum reducido;

Proporcionar un polipéptido que es un fragmento HIV-TAT o un derivado del fragmento HIV-TAT, y

10 Combinar dicho complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido con dicho polipéptido:

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido se une covalentemente a dicho polipéptido

15

3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido de manera no covalente mediante dicho polipéptido.

20 4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho fragmento HIV-TAT tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 1.

5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha fragmento HIV-TAT tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ TD NO. 2.

25

6. El método de la reivindicación 1, en donde dicho complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido comprende un polipéptido que tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ED NO, 3.

5 7. El método de la reivindicación 1, en donde el complejo de toxina botulinum reducido contiene una cantidad reducida de proteína hemaglutinina o proteína no-hemaglutinina, no toxina o ambas comparado con una cantidad de complejos de toxina botulinum de ocurrencia no natural, directamente extraída de *Clostridium botulinum*.

10

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido contiene albúmina como un estabilizante exógeno.

15 9. El método de la reivindicación 6, en donde el albúmina esta presente en una cantidad igual aproximadamente 500, 400, 300, 200, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, o 0.01 veces la cantidad de albúmina en complejos de toxina botulinum de ocurrencia natural.

20 10. El método de la reivindicación 1, en donde el complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido contiene una toxina botulinum seleccionada del grupo que consiste de un derivado de toxina botulinum, una toxina botulinum recombinante, una toxina botulinum modificada, una toxina tipo A, toxina botulinum B, toxina botulinum tipo C, toxina botulinum tipo D, toxina botulinum tipo E, toxina botulinum tipo F, y toxina botulinum tipo G.

25

36

11. Una composición toxina botulinum estabilizada, en donde dicha toxina botulinum estabilizada comprende:

Un complejo de toxina botulinum o un complejo de toxina botulinum reducido; y

Un polipéptido que tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 2.

12. Una composición toxina botulinum estabilizada de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho polipéptido se asocia de manera no covalente con dicho complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido.

13. Una composición toxina botulinum estabilizada de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho polipéptido se une covalentemente a dicho complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido.

Sf

COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE APLICACIÓN TÓPICA Y SUMINISTRO
TRANSDÉRMICO DE TOXINAS BOTULINUM ESTABILIZADAS CON
FRAGMENTOS DE POLIPÉPTIDO DERIVADOS DE HIV-TAT

5

RESUMEN

Esta invención se relaciona con composiciones novedosas de toxina botulinum que se estabilizan utilizando fragmentos HIV-TAT o derivados de fragmentos HIV-TAT. La composición se puede administrar para varios propósitos terapéuticos, 10 estéticos y/o cosméticos. La invención también proporciona un método para estabilizar la toxina botulinum utilizando los fragmentos HIV-TAT o derivados de los fragmentos HIV-TAT.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Waugh, Jacob M.
Lee, Jae Hoon

<120> Composiciones y Métodos de Aplicación Tópica y
Suministro Transdérmico de Toxinas Botulinum
Estabilizadas con Fragmentos de Polipéptido Derivados
de HIV-TAT

<130> 13720-105128

<140> US 11/955,076

<141> 2007-12-12

<150> US 60/828,632

<141> 2006-12-29

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humano

<400> 1

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humano

<400> 2

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

59

<200>
<223> Clostridium Botulinum

<400> 3

Gly Asp Ser Cys Ser Val Glu Ala Glu Thr Ala Gly Lys
1 5 10

<210> 4
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 4

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

Val Glu Ala Glu Thr Ala Gly Lys
20

60

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2007/087263

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

ENG, Joseph, D., Jr.
King & Spalding, LLP
1185 Avenue of the Americas
New York, NY 10036
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 10 September 2008 (10.09.2008)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 13720-105128	
International application No. PCT/US2007/087263	
	International filing date (day/month/year) 12 December 2007 (12.12.2007)

1. The following indications appeared on record concerning: ☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative		
Name and Address REVANCE THERAPEUTICS, INC. 2400 Bayshore Parkway, Suite 100 Mountain View, CA 94043 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: ☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence		
Name and Address REVANCE THERAPEUTICS, INC. 7555 Gateway Blvd Newark, CA 94560 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: ☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned ☒ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned ☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Perez Roberto e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09
---	---

Facsimile No. +41 22 338 71 30

Form PCT/IB/306 (July 2008)

1/DSBZ1JC40

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 60/882,632 29/12/2006 US	(51) Int Cl: A61K 039/008 (71) Solicitante(s) REVANCE THERAPEUTICS, INC. (72) Inventor(es) JACOB M. WAUGH JAE HOON LEE (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 29/07/2009 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 12/12/2007 No. de solicitud PCT/US2007/087263	(87) Publicación internacional Fecha: 10/07/2008 N° publicación: WO 2008/082889 A2
(54) Título: COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE APLICACIÓN TÓPICA Y SUMINISTRO TRANSDÉRMICO DE TOXINAS BOTULINUM ESTABILIZADAS CON FRAGMENTOS DE POLIPÉPTIDO DERIVADOS DE HIV-TAT	

Reivindicación(es):

1. Un método para estabilizar la toxina botulinum, dicho método comprende
Proporcionar un complejo de toxina botulinum o un complejo de toxina botulinum reducido;
Proporcionar un polipéptido que es un fragmento HIV-TAT o un derivado del fragmento HIV-TAT, y
Combinar dicho complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido con dicho polipéptido;

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido se une covalentemente a dicho polipéptido

3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido de manera no covalente mediante dicho polipéptido.

4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho fragmento HIV-TAT tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 1.

5. El método de la reivindicación 1, en donde dicho fragmento HIV-TAT tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 2.

6. El método de la reivindicación 1, en donde dicho complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido comprende un polipéptido que tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ED NO. 3.

7. El método de la reivindicación 1, en donde el complejo de toxina botulinum reducido contiene una cantidad reducida de proteína hemaglutinina o proteína no-hemaglutinina, no toxina o ambas comparado con una cantidad de complejos de toxina botulinum de ocurrencia no natural, directamente extraída de *Clostridium botulinum*.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido contiene albúmina como un estabilizante exógeno.

9. El método de la reivindicación 6, en donde el albúmina está presente en una cantidad igual aproximadamente 500, 400, 300, 200, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, o 0.01 veces la cantidad de albúmina en complejos de toxina botulinum de ocurrencia natural.

10. El método de la reivindicación 1, en donde el complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido contiene una toxina botulinum seleccionada del grupo que consiste de un derivado de toxina botulinum, una toxina botulinum recombinante, una toxina botulinum modificada, una toxina tipo A, toxina botulinum B, toxina botulinum tipo C, toxina botulinum tipo D, toxina botulinum tipo E, toxina botulinum tipo F, y toxina botulinum tipo G.

11. Una composición toxina botulinum estabilizada, en donde dicha toxina botulinum estabilizada comprende:
Un complejo de toxina botulinum o un complejo de toxina botulinum reducido; y
Un polipéptido que tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 2.

12. Una composición toxina botulinum estabilizada de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho polipéptido se asocia de manera no covalente con dicho complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido.

13. Una composición toxina botulinum estabilizada de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho polipéptido se une covalentemente a dicho complejo de toxina botulinum o complejo de toxina botulinum reducido.

62

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NI: 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 49,148
FECHA : JULIO 7 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-079068-00000-0000

Fecha: 2009-07-29 16:37:55 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 62

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	RECIBO DE CAJA		/	49105	07/07/2009	75,380,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

@15861-841-003-8



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PCT

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 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 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 ☐

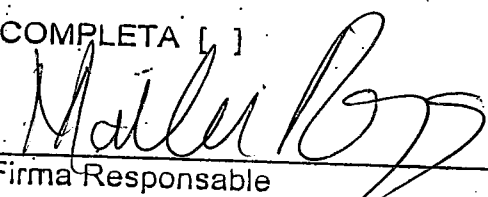
ESQUEMA DE TRAZADO

☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha



No. 09-079068-00000-0000

Fecha: 2009-07-29 16:37:55 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 62

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

REFERENCIA	Radicación No.	9 79068
	Solicitud internacional	PCT/US2007/087263
	Fecha inicio fase nacional	29/07/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	9283

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 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.

2. 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, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

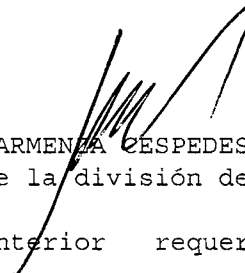
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud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

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 79068



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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha _____
jfernand

14 AGO. 2009