

MÉTODOS DE TRATAMIENTO PARA LA DISTONÍA CERVICAL

LISTADO DE SECUENCIAS

[0000] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias, el cual fue presentado de manera electrónica en formato ASCII y se incorpora aquí por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 13 de diciembre de 2016, lleva como nombre CD.txt y tiene un tamaño de 6.809 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención hace referencia a métodos para el tratamiento o la prevención de distonía cervical, un trastorno relacionado con la misma, o un síntoma de la misma, con nuevas composiciones inyectables que comprenden toxina botulínica que puede administrarse a un sujeto que padece dicha enfermedad. Las composiciones inyectables y los métodos en los cuales se usan estas composiciones, suministran tratamientos novedosos y ventajosos que resultan en tasas de respuesta altas y en efectos de larga duración, por ejemplo, una duración del efecto de alrededor de 24 semanas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La distonía cervical es un trastorno de movimiento neurológico crónico extremadamente doloroso en el que los músculos del cuello y los hombros se contraen involuntariamente y se contorsionan, causando movimientos anormales y una postura incómoda de la cabeza y el cuello, como cuando la cabeza se tuerce o gira hacia la izquierda o derecha (tortícolis), hacia arriba (retrocolis), hacia abajo (anterocolis) o hacia los lados (laterocolis). Los movimientos pueden ser sostenidos (tónicos), espasmódicos (clónicos) o una combinación. La distonía cervical (también conocida como distonía del cuello o tortícolis espasmódica) afecta la capacidad de una persona para controlar la actividad muscular. La distonía cervical puede ser primaria (lo que significa que es el único trastorno neurológico aparente, con o sin antecedentes familiares) o puede ser causada por causas secundarias (como un trauma físico) y a menudo se atribuye al daño del sistema nervioso causado por un derrame cerebral, enfermedad o trauma. Un trastorno raro que puede ocurrir a cualquier edad, incluso durante la infancia, la distonía cervical ocurre con mayor frecuencia en personas de mediana edad y es más frecuente en mujeres que en hombres. Las personas con antecedentes familiares de distonía cervical o algún otro tipo de distonía tienen un mayor riesgo de desarrollar el trastorno.

[0003] La distonía cervical es el tercer trastorno del movimiento más común después del temblor esencial y la enfermedad de Parkinson. Se estima que 3 de cada 10,000 personas sufren de distonía cervical. El número de casos reportados solo en Norteamérica es de aproximadamente 300,000.

[0004] Los síntomas generalmente comienzan gradualmente y luego alcanzan una meseta donde los síntomas no empeoran sustancialmente. Desafortunadamente, no existe una cura para la distonía cervical y la afección afecta en gran medida la calidad de vida de un individuo. En algunos casos, el trastorno se resuelve sin tratamiento, pero las remisiones sostenidas son poco frecuentes.

[0005] Se ha reportado que la forma de la toxina botulínica del tipo A es el agente biológico natural más letal que el hombre conoce. Las esporas de *C. botulinum* se encuentran en el suelo y pueden crecer en contenedores de comida que no se sellan ni se esterilizan apropiadamente. El botulismo, que puede ser fatal, puede ser causado por la ingestión de la bacteria. La toxina botulínica actúa para producir parálisis de los músculos al evitar la transmisión sináptica mediante la inhibición de la liberación de acetilcolina a través de la unión neuromuscular, y se considera que también actúa de otras maneras. Su acción bloquea esencialmente las señales que normalmente ocasionarían los espasmos o contracciones musculares, resultando en la parálisis. Durante la última década, la actividad de paralización muscular de las toxinas botulínicas ha sido aprovechada para alcanzar una variedad de efectos terapéuticos. La administración controlada de la toxina botulínica se ha utilizado para proporcionar parálisis muscular con el fin de tratar una variedad de afecciones médicas, por ejemplo, las enfermedades neuromusculares caracterizadas por músculos esqueléticos hiperactivos. Las afecciones que se han tratado con la toxina botulínica incluyen, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica presentada en adultos, fisura anal, blefaroespasma, parálisis cerebral, distonía cervical, dolores de cabeza por migraña, estrabismo, trastorno de la articulación tempomandibular y varios tipos de calambres y espasmos. Más recientemente, los efectos de paralización muscular de la toxina botulínica se han usado para las aplicaciones faciales terapéuticas y cosméticas tales como el tratamiento de arrugas, líneas de expresión y otros resultados de espasmos y contracciones de los músculos faciales.

[0006] Además de la forma de tipo A de la toxina botulínica, existen otras siete formas serológicamente distintas de la toxina botulínica que también producen la bacteria gram-positiva de *Clostridium botulinum*. De estos ocho tipos serológicamente diferentes de la toxina botulínica, los siete que pueden ocasionar parálisis han sido designados como serotipos A, B, C, D, E, F y G de toxina botulínica. Cada una de estos se distingue por la neutralización con anticuerpos específicos de tipo. El peso molecular de cada una de las proteínas de la toxina botulínica es de aproximadamente 150 kD. Debido al tamaño de la molécula y a la estructura molecular de la toxina botulínica, esta no puede cruzar la capa córnea y las múltiples capas de la arquitectura de la piel subyacente. Los diferentes serotipos de la toxina botulínica varían en el efecto y en la severidad y duración de la parálisis que ellas evocan en diferentes especies de animales. Por ejemplo, en las ratas, se ha determinado que la toxina botulínica del tipo A es 500 veces más potente que la toxina botulínica del tipo B, que se mide por la tasa de parálisis. Adicionalmente, se ha determinado que la toxina botulínica del tipo B no es tóxica en primates en una dosis de 480 U/kg, aproximadamente 12 veces la DL₅₀ de primates para el tipo A.

[0007] Dado que es liberada por la bacteria *Clostridium botulinum*, la toxina botulínica es un componente de un complejo de toxina que contiene la molécula de proteína de toxina botulínica de aproximadamente 150 kD junto con las proteínas asociadas que no son toxinas. Se cree que estas proteínas endógenas que no son toxinas incluyen una familia de proteínas de hemaglutinina, así como proteínas que no son de hemaglutinina. Se ha reportado que las proteínas que no son toxina estabilizan la molécula de toxina botulínica en el complejo de toxina y la protegen contra la desnaturalización de los ácidos digestivos cuando el complejo de toxina es ingerido. Por lo tanto, las proteínas que no son toxinas del complejo de toxina protegen la actividad de la toxina botulínica y mejoran así la penetración sistémica cuando el complejo de toxina se administra a través del aparato gastrointestinal. Adicionalmente, se cree que algunas de las proteínas que no son toxina estabilizan específicamente la molécula de toxina botulínica en la sangre.

[0008] La presencia de las proteínas que no son toxina en los complejos de toxinas generalmente ocasionan que los complejos de toxina tengan pesos moleculares que son mayores que los de la molécula de toxina botulínica simple, la cual es de aproximadamente 150 kD, tal como se mencionó con anterioridad. Por ejemplo, la bacteria *Clostridium botulinum* puede producir complejos de toxina botulínica del tipo A que tienen pesos moleculares de

aproximadamente 900 kD, 500 kD o 300 kD. Las toxinas botulínicas de los tipos B y C son producidas como complejos que tienen un peso molecular de aproximadamente 700 kD o aproximadamente 500 kD. La toxina botulínica del tipo D es producida como complejos que tienen pesos moleculares de aproximadamente 300 kD o 500 kD. Las toxinas botulínicas de los tipos E y F son producidas únicamente como complejos que tienen un peso molecular de aproximadamente 300 kD.

[0009] Para proporcionar una estabilidad adicional a la toxina botulínica, los complejos de toxinas se estabilizan de manera convencional al combinar los complejos con albúmina durante la fabricación. Por ejemplo, BOTOX[®] (Allergan, Inc., Irvine, CA) es una formulación que contiene toxina botulínica que contiene 100 U de la toxina botulínica del tipo A con proteínas accesorias, 0,5 miligramos de albúmina humana y 0,9 miligramos de cloruro de sodio. La albúmina sirve para enlazarse y estabilizar complejos de toxina en ambientes dispares, incluyendo aquellos asociados con la fabricación, transporte, almacenamiento y administración.

[0010] Generalmente, las toxinas botulínicas se administran a los pacientes por medio de inyecciones controladas de manera cuidadosa de composiciones que contienen complejo de toxina botulínica y albúmina. Sin embargo, existen varios problemas asociados a este método. Las inyecciones no solo son dolorosas, sino que se generan localmente grandes pozos subdérmicos de toxina alrededor de los sitios de inyección, para lograr el efecto terapéutico o cosmético deseado. La toxina botulínica puede migrar de estos pozos subdérmicos para ocasionar parálisis no deseada en áreas circundantes del cuerpo. Este problema es exacerbado cuando el área que se va a tratar es amplia y se requieren muchas inyecciones de toxina para tratar la misma. Además, debido a que los complejos de toxina inyectados contienen albúmina y proteínas que no son toxinas que estabilizan la toxina botulínica y aumentan el peso molecular del complejo de toxina, los complejos de toxina tienen una vida media larga en el cuerpo y pueden ocasionar una respuesta antigénica no deseada en el paciente. Por ejemplo, algunos pacientes desarrollarán, con el paso del tiempo, una alergia a la albúmina que se usa como estabilizador en las formulaciones comerciales actuales. También, los complejos de toxina pueden inducir el sistema inmunitario del paciente para formar anticuerpos neutralizantes, de modo que se requieren cantidades más grandes de toxina en administraciones posteriores para lograr el mismo efecto. Cuando esto sucede, las inyecciones posteriores deben ser colocadas cuidadosamente de modo que no liberen una cantidad grande de toxina en la corriente sanguínea

del paciente, lo cual puede llevar a un envenenamiento sistemático fatal, debido especialmente a que la albúmina y las proteínas que no son toxina estabilizan la toxina botulínica en la sangre.

[0011] En vista de las desventajas asociadas con las formulaciones actuales de toxina botulínica, sería altamente deseable tener una formulación de toxina botulínica inyectable que sea eficaz y estable, pero que muestre una antigenicidad reducida y una tendencia menor a esparcirse localmente después de la inyección. También sería deseable utilizar dicha formulación de toxina botulínica con fines terapéuticos para tratar la distonía cervical.

[0012] Los tratamientos para la distonía cervical incluyen medicamentos orales, inyecciones de toxina botulínica, cirugía y terapias complementarias. El tratamiento que se prescribe con mayor frecuencia para la distonía cervical es el uso de toxina botulínica, típicamente de tipo A (aunque también se ha usado de tipo B), que puede reducir sus signos y síntomas. La toxina botulínica puede ayudar a bloquear la comunicación entre el nervio y el músculo y puede aliviar movimientos y posturas anormales. El número de inyecciones generalmente se basa en la gravedad de la distonía. Los médicos que inyectan la toxina pueden seleccionar los músculos a inyectar al observar posturas o movimientos anormales y sentir el espasmo muscular o usar una máquina de electromiografía para medir la actividad muscular. Cada músculo afectado por distonía debe inyectarse generalmente por separado. Como tal, según las características de dispersión de formulaciones de toxinas disponibles actualmente, existe un límite para la cantidad total de toxinas que pueden inyectarse en el cuerpo al mismo tiempo. Si bien el tratamiento para la distonía cervical implica una intervención neurológica regular, que tiene efecto durante un período de 4 a 7 días o mayor después de la inyección, la respuesta al tratamiento con toxina botulínica desaparece generalmente después de un período de 12 semanas, a menudo a las 10 semanas, lo que requiere que la persona que sufre de distonía cervical se inyecte nuevamente. Por lo tanto, sería deseable un tratamiento duradero y de acción prolongada que requiera menos intervenciones neurológicas.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] En uno de sus aspectos, la invención se refiere a un método para producir un efecto biológico en el tratamiento de la distonía cervical al inyectar una cantidad efectiva, preferiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva, de las composiciones de esta invención a un sujeto o paciente que necesita tal tratamiento.

[0014] En otro de sus aspectos, esta invención proporciona un método para tratar la distonía cervical en un individuo que lo necesita, en donde el método comprende administrar al individuo una inyección de una composición que comprende: una toxina botulínica, un complejo de toxina botulínica o un complejo reducido de toxina botulínica y un portador cargado positivamente que comprende una cadena principal de polilisina cargada positivamente que tiene unido covalentemente uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente que tienen una secuencia de aminoácidos de (gly)p-RGRDDRRQRRR-(gly)q (SEC ID NO: 1), (gly)p-YGRKKRRQRRR-(gly)q (SEC ID NO: 2) o (gly)p-RKKRRQRRR-(gly)q (SEC ID NO: 3), en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de 0 a 20; y un diluyente farmacéuticamente aceptable para inyección; en donde la toxina botulínica se administra al individuo en una cantidad de aproximadamente 100 U a aproximadamente 450 U; en donde el portador cargado positivamente no está asociado de forma covalente con la toxina botulínica, el complejo de toxina botulínica o el componente del complejo reducido de toxina botulínica; y en donde la inyección de la composición proporciona un tratamiento que tiene una duración del efecto de al menos aproximadamente seis meses a aproximadamente 10 meses para reducir los síntomas de la distonía cervical, extendiendo así la duración del intervalo del tratamiento para el individuo.

[0015] En otro de sus aspectos, la presente invención proporciona composiciones inyectables que comprenden toxina botulínica que no está asociada de forma covalente con una molécula portadora cargada positivamente que se usa para tratar la distonía cervical. En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención poseen una o más ventajas sobre las formulaciones convencionales de toxina botulínica, tales como el BOTOX® o MYOBLOC®. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones pueden exhibir una o más ventajas sobre las formulaciones botulínicas inyectables convencionales, incluida una antigenicidad reducida, una tendencia reducida a la dispersión en el tejido circundante después de la inyección, una mayor duración de la eficacia clínica o una potencia mejorada en relación con formulaciones de toxina botulínica convencionales, un inicio más rápido de eficacia clínica y/o estabilidad mejorada.

[0016] Otro aspecto de la presente invención es el reconocimiento de que ciertas moléculas no nativas (es decir, moléculas que no se encuentran en complejos de toxinas botulínicas obtenidos de la bacteria *Clostridium botulinum*) se pueden agregar a la toxina botulínica, a los complejos de toxinas botulínicas y, particularmente, a complejos reducidos de

toxinas botulínicas (tal como se define en este documento), para mejorar la dispersión de toxina a través de tejidos en el tratamiento de la distonía cervical. Las moléculas no nativas se asocian de forma no covalente con la toxina y actúan como mejoradores de penetración que mejora la habilidad de la toxina para alcanzar las estructuras objetivo después de la inyección. Además, las moléculas no nativas pueden aumentar la estabilidad de la toxina antes y después de la inyección. A modo de ejemplo, los mejoradores de penetración pueden ser portadores cargados positivamente, tales como péptidos catiónicos, los cuales no tienen una actividad inherente similar a la toxina botulínica y los cuales también contienen uno o más dominios de transducción de proteínas tal como se describe en el presente documento.

[0017] Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición que comprende toxina botulínica, un complejo de toxina botulínica (o un complejo reducido de la proteína de toxina botulínica que incluye justamente la neurotoxina de 150 kD en sí misma, o la neurotoxina con alguna, pero no todas, las proteínas de complejo nativo) y un portador cargado positivamente para su uso en un método de tratamiento para la distonía cervical.

[0018] En otro aspecto, la invención proporciona dosis y cantidades efectivas de las composiciones de la presente invención en el tratamiento de la distonía cervical que proporcionan una eficacia sostenida y prolongada, por ejemplo, una tasa de respuesta de larga duración, después de la administración por inyección a un sujeto o paciente que necesita el tratamiento. Tales dosis y cantidades son preferiblemente dosis y cantidades terapéuticamente efectivas que producen o dan como resultado un efecto terapéutico deseado en un sujeto a quien se le administran las dosis y cantidades. En realizaciones particulares, un único tratamiento de un sujeto o paciente con una composición de la invención que comprende una toxina botulínica, tal como la toxina botulínica A, y un portador cargado positivamente, como se describe en este documento, en cantidades de dosis terapéuticamente efectivas de aproximadamente 100 U a aproximadamente 450 U por sujeto, proporcionó una tasa de respuesta en la reducción de los síntomas de distonía cervical durante al menos 16 semanas, al menos 20 semanas, al menos 24 semanas, o aproximadamente 6 a 10 meses, o incluso más. Además, las composiciones de la invención proporcionan un atributo de dispersión o propagación reducida desde el sitio de inyección después de la inyección, de este modo localizando la toxina y su efecto donde se desea y disminuyendo los efectos no específicos o indeseados de la toxina en lugares o sitios distantes del sitio de inyección para el tratamiento.

[0019] La duración del efecto proporcionado por las composiciones de la invención, por ejemplo, RT002, así como por los métodos de tratamiento y usos descritos, proporcionan ventajas significativas en comparación con el arte. A modo de ejemplo, los sujetos que se someten a tratamiento con composiciones que contienen toxina botulínica consideran que la duración del efecto después del tratamiento es de gran importancia para ellos. Tal duración prolongada y sostenida del efecto que se logra incluso mediante un solo tratamiento con una dosis efectiva y un régimen de tratamiento de un producto de la invención, por ejemplo, el RT002, permite menos inyecciones por tratamiento para un sujeto, lo cual es extremadamente importante para el sujeto. Un efecto de duración prolongada de un único tratamiento con un producto que tiene una eficacia y seguridad claras, como se proporciona mediante las composiciones y métodos de la invención descritos en el presente documento, ofrece menos molestias, menos costos y más comodidad a los sujetos que se someten a tratamiento. Además, un producto que proporciona efectos significativos y sostenidos, que se mantienen durante al menos un período de 16 o 24 semanas, o durante al menos un período de 6 meses, o durante un período superior a 6 meses, después del único tratamiento inyectable del producto a un sujeto, proporciona una solución a una necesidad que no se satisface en el arte tanto para médicos como para pacientes. Por lo tanto, las composiciones y los métodos de la invención proporcionan una solución al problema de tratamientos demasiado frecuentes y mejoran el bienestar general de los pacientes. Tal duración prolongada de acción proporciona menos tratamientos en todo un proceso de tratamiento.

[0020] En otro aspecto, la invención proporciona un método para la administración de toxina botulínica para lograr un efecto terapéutico de duración prolongada en un individuo que padece distonía cervical, en el que el método comprende administrar por inyección una dosis de una composición estéril inyectable en un área del individuo que necesita de tratamiento para lograr el efecto terapéutico después de un primer tratamiento con la composición; en donde la composición comprende una toxina botulínica, un complejo de toxina botulínica o un componente del complejo reducido de toxina botulínica y un componente portador cargado positivamente que comprende una cadena principal de polilisina cargada positivamente que tiene unido covalentemente uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente que tienen una secuencia de aminoácidos de (gly)p-RGRDDRRQRRR-(gly)q (SEC ID NO: 1), (gly)p-YGRKKRRQRRR-(gly)q (SEC ID NO: 2) o (gly)p-RKKRRQRRR-(gly)q (SEC ID NO: 3), en

donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de 0 a 20; en donde la toxina botulínica, el complejo de toxina botulínica o el componente del complejo reducido de toxina botulínica se administran al individuo en una dosis del tratamiento de aproximadamente 100 U a 450 U; o más específicamente, de aproximadamente 100 U a 200 U o de aproximadamente 200 U a 300 U o de aproximadamente 300 U a 450 U, en donde el portador cargado positivamente no está asociado de forma covalente con la toxina botulínica, el complejo de toxina botulínica o el componente del complejo reducido de toxina botulínica; y un diluyente farmacéuticamente aceptable adecuado para inyección; y en donde la primera dosis del tratamiento de la composición administrada por inyección al individuo logra el efecto terapéutico de duración prolongada que tiene al menos una duración del efecto de aproximadamente 6 meses a aproximadamente 10 meses, opcionalmente, antes de que se administre una segunda o la siguiente dosis del tratamiento.

[0021] En otro aspecto, la invención proporciona para el tratamiento de la distonía cervical, una composición estéril inyectable que comprende una toxina botulínica, un complejo de toxina botulínica o un complejo reducido de toxina botulínica en una cantidad de dosis seleccionada de más de 100 U, de 100 U a 200 U, 200-300 U o 300-450 U; y un portador cargado positivamente que comprende una cadena principal de polilisina cargada positivamente que tiene unido covalentemente uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente que tienen una secuencia de aminoácidos de (gly)p-RGRDDRRQRRR-(gly)q (SEC ID NO: 1), (gly)p-YGRKKRRQRRR-(gly)q (SEC ID NO: 2) o (gly)p-RKKRRQRRR-(gly)q (SEC ID NO: 3), en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de 0 a 20; y un diluyente farmacéuticamente aceptable para inyección; en donde el portador cargado positivamente no está asociado de forma covalente con la toxina botulínica, el complejo de toxina botulínica o el componente del complejo reducido de toxina botulínica; y en donde la composición proporciona un efecto terapéutico que dura por lo menos 20 a 24 semanas, o por al menos 6 meses, o más de 6 meses, por ejemplo, aproximadamente 6 meses a aproximadamente 10 meses, después de un tratamiento de un individuo con una dosis efectiva de la composición inyectable.

[0022] En algunas realizaciones de estos métodos y composición anteriores, la composición comprende toxina botulínica del serotipo A, preferiblemente una toxina botulínica del serotipo A que tiene un peso molecular de 150 kDa. En una realización, el portador cargado

positivamente tiene la secuencia de aminoácidos RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEC ID NO: 4). En una realización, la toxina botulínica está presente en la composición en una cantidad de dosificación de más de 100 U, 100-200 U, o 200-300 U o 300-450 U. En una realización, la toxina botulínica está presente en la composición en una cantidad de dosificación seleccionada del grupo que consiste en 100 U, 200U, 300U y 450U. En una realización, la composición reduce los síntomas de distonía cervical en un individuo que se ha sometido a un único tratamiento por inyección de la composición. En ciertas realizaciones, la duración del efecto del tratamiento comprende más de 6 meses; más de 7 meses; más de 8 meses; más de 9 meses; o al menos de 6 a 10 meses.

[0023] En otro de sus aspectos, la invención proporciona un método para tratar un individuo que padece de distonía cervical que necesita un tratamiento con toxina botulínica inyectable, en el cual el método de tratamiento comprende un tratamiento que tiene múltiples intervalos de tratamiento con duración prolongada del efecto y un tiempo de duración entre cada intervalo del tratamiento, el tratamiento que comprende: administrar por inyección una dosis del tratamiento inicial de una composición estéril inyectable en un área del individuo que necesita tratamiento para lograr el efecto terapéutico después del tratamiento inicial con la composición; en donde la composición comprende una toxina botulínica, un complejo de toxina botulínica o un componente del complejo reducido de toxina botulínica y un componente portador cargado positivamente que comprende una cadena principal de polilisina cargada positivamente que tiene unido covalentemente uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente que tienen una secuencia de aminoácidos de (gly)p-RGRDDRRQRRR-(gly)q (SEC ID NO: 1), (gly)p-YGRKKRRQRRR-(gly)q (SEC ID NO: 2) o (gly)p-RKKRRQRRR-(gly)q (SEC ID NO: 3), en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de 0 a 20; y un diluyente farmacéuticamente aceptable adecuado para inyección; en donde la toxina botulínica, el complejo de toxina botulínica o el componente del complejo reducido de toxina botulínica se administran al individuo en una dosis del tratamiento de más de 100 U, 100-200 U, 200-300 U, o 300-450 U; en donde el portador cargado positivamente no está asociado de forma covalente con la toxina botulínica, el complejo de toxina botulínica o el componente del complejo reducido de toxina botulínica; en donde la dosis del tratamiento inicial de la composición administrada por inyección al individuo proporciona una duración terapéutica del efecto que dura al menos aproximadamente 10 meses; y administrar la siguiente dosis del tratamiento de la composición

por inyección al individuo en intervalos de tratamiento que comprenden una duración de más de o igual a 3 meses a al menos aproximadamente 10 meses después de la dosis del tratamiento inicial y entre cada dosis siguiente del tratamiento.

[0024] En realizaciones del método de tratamiento descrito anteriormente, el efecto terapéutico es el tratamiento de los síntomas de la distonía cervical. En una realización, la composición comprende toxina botulínica del serotipo A, preferiblemente, toxina botulínica del serotipo A que tiene un peso molecular de 150 kDa. En una realización, el portador cargado positivamente es un péptido cargado positivamente que tiene la secuencia de aminoácidos RKKRRQRRRG-(K)15-GRKKRRQRRR (SEC ID NO: 4). En una realización, la composición no se dispersa localmente desde el sitio de inyección después de la inyección. En realizaciones específicas, la toxina botulínica se administra al individuo en una cantidad de más de 100 U, 100-200 U, 200-300 U o 300-450 U. En ciertas realizaciones, la duración del intervalo del tratamiento comprende más de 3 meses; más de 4 meses; más de 5 meses; más de 6 meses; más de 7 meses; más de 8 meses; más de 9 meses; o al menos 6 meses a 10 meses.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0025] **La Figura 1** muestra el diseño de estudio de fase 2 de distonía cervical como se describe en el ejemplo del presente documento.

[0026] **La Figura 2** muestra la demografía por cohorte en el estudio que se describe en el ejemplo del presente documento.

[0027] **La Figura 3** muestra el número (%) de sujetos con eventos adversos relacionados con el tratamiento por cohorte por término preferido en el estudio que se describe en el ejemplo del presente documento.

[0028] **La Figura 4** muestra el criterio de valoración principal por cohorte: reducción en la calificación total de TWSTRS en la semana 4 en el estudio, como se describe en el ejemplo del presente documento.

[0029] **La Figura 5** muestra el criterio de valoración secundario por cohorte: cambio con respecto al valor inicial en la calificación total de TWSTRS a lo largo del tiempo en el estudio como se describe en el ejemplo del presente documento.

[0030] **La Figura 6** muestra el criterio de valoración secundario por cohorte: duración de respuesta definida por el sujeto que alcanza la calificación objetivo de TWSTRS (de sujetos con mejoría en la semana 4. Desistimientos debido a la necesidad de retratamiento se consideran eventos) en el estudio que se describe en el ejemplo del presente documento.

[0031] **La Figura 7** muestra la distribución de sujetos por dosis: la dosis de estudio administró un clúster en dos grupos de dosis separadas en el estudio que se describe en el ejemplo de este documento.

[0032] **La Figura 8** muestra el criterio de valoración secundario por grupo de dosis: cambio con respecto al valor inicial en la calificación total de TWSTRS a lo largo del tiempo que se describe en el ejemplo del presente documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0033] La presente invención se refiere a composiciones inyectables novedosas que comprenden una toxina botulínica, un complejo de toxina botulínica o un complejo reducido de toxina botulínica que se utiliza en un método para el tratamiento de la distonía cervical. En las realizaciones preferidas, las composiciones estabilizan la toxina o permiten el transporte o la administración de la toxina a través de los tejidos después de la inyección de modo que la toxina tenga una antigenicidad reducida, un mejor perfil de seguridad, una potencia mejorada, un inicio más rápido de la eficiencia clínica y/o una duración más larga de la eficiencia clínica en comparación con los complejos comerciales convencionales de toxina botulínica que están enlazados a la albúmina exógena (por ejemplo, BOTOX[®] o MYOBLOC[®]). Las composiciones de la invención se pueden utilizar como aplicaciones inyectables para proporcionar una toxina botulínica a un sujeto para diferentes fines terapéuticos, tal como se describe en el presente documento. Las composiciones de la invención también tienen un perfil de seguridad mejorado sobre otras composiciones y métodos de administración de la toxina botulínica. Adicionalmente, estas composiciones pueden proporcionar reducciones beneficiosas en respuestas inmunes hacia la toxina botulínica. En realizaciones, las composiciones inyectables de la invención proporcionan eficiencia a largo plazo, por ejemplo, un efecto que dura al menos 20 semanas, al menos 24 semanas, al menos 6 meses, o más de 6 meses, por ejemplo, hasta aproximadamente 10 meses, en sujetos a los que tales composiciones, particularmente las que comprenden la toxina

botulínica en cantidades de 100 U o más, se administran por inyección para el tratamiento de la distonía cervical.

[0034] El término “toxina botulínica” tal como se emplea en este documento, se puede referir a cualquiera de los tipos conocidos de la toxina botulínica (por ejemplo, moléculas de proteína de toxina botulínica de 150 kD asociada con los diferentes serotipos de la *C. botulinum*), ya sea producida por la bacteria o por técnicas recombinantes, así como cualquiera de dichos tipos que puedan ser descubiertos posteriormente, incluidos los serotipos descubiertos recientemente y variantes diseñadas o proteínas de fusión. Como se mencionó con anterioridad, actualmente se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas inmunológicamente distintas, es decir, los serotipos A, B, C, D, E, F y G de la neurotoxina botulínica, cada uno de los cuales se distingue por la neutralización con anticuerpos específicos de tipo. Los serotipos de la toxina botulínica están disponibles en el mercado, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y de Metabionics, Inc. (Madison, WI), así como de otras fuentes. Los diferentes serotipos de la toxina botulínica varían en las especies de animales que estos afectan y en la gravedad y duración de la parálisis que evocan. Al menos dos tipos de toxina botulínica, los tipos A y B, se encuentran disponibles en el mercado en formulaciones para el tratamiento de ciertas afecciones. Por ejemplo, el tipo A está contenido en preparaciones de Allergan, que tienen la marca registrada BOTOX[®], y de Ipsen, que tienen la marca registrada DYSPORT[®], y el tipo B está contenido en preparaciones de Elan, que tienen la marca registrada MYOBLOC[®].

[0035] El término “toxina botulínica” que se emplea en las composiciones de esta invención se puede referir de forma alternativa a un derivado de la toxina botulínica, es decir, un compuesto que tiene una actividad de toxina botulínica pero que contiene una o más alteraciones químicas o funcionales en cualquier parte o en cualquier cadena de aminoácidos en relación con las toxinas botulínicas nativas recombinantes o de origen natural. Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser una neurotoxina modificada que es una neurotoxina que tiene al menos uno de sus aminoácidos eliminado, modificado o comparado, en comparación con una forma nativa, o la neurotoxina modificada puede ser una neurotoxina producida de manera recombinante o uno de sus derivados o fragmentos. Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser una que haya sido modificada de un modo que, por ejemplo, mejore sus propiedades o disminuya los efectos secundarios no deseados, pero que aún retenga la actividad deseada de la toxina botulínica. De forma alternativa, la toxina botulínica empleada en esta invención puede ser una toxina

preparada con el uso de técnicas químicas recombinantes o sintéticas, por ejemplo, un péptido recombinante, una proteína de fusión o una neurotoxina híbrida, por ejemplo, preparada a partir de subunidades o dominios diferentes de serotipos de toxinas botulínicas (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 6.444.209). La toxina botulínica también puede ser una porción de una molécula general que se ha mostrado que posee la actividad necesaria de la toxina botulínica, y en dicho caso se puede utilizar per se o como parte de una combinación o molécula conjugada, por ejemplo, una proteína de fusión. De forma alternativa, la toxina botulínica puede estar en forma de un precursor de toxina botulínica, que puede en sí no tóxico, por ejemplo, una proteasa de zinc no tóxica que se convierte en tóxica en la escisión proteolítica.

[0036] El término “complejo de toxina botulínica” o “complejo de toxina” tal como se emplea en este documento, se refieren a una molécula de proteína de toxina botulínica de aproximadamente 150 kD (que pertenece a cualquiera de los serotipos A al G de la toxina botulínica), junto con proteínas endógenas asociadas que no son toxina (por ejemplo, la proteína hemaglutinina y la proteína que no es toxina y que no es hemaglutinina de la bacteria *Clostridium botulinum*). Nótese, sin embargo, que el complejo de toxina botulínica no necesita derivarse de la bacteria *Clostridium botulinum* como un complejo unitario de toxina. Por ejemplo, la toxina botulínica o la toxina botulínica modificada puede prepararse primero de forma recombinante y luego combinarse con las proteínas que no son toxinas. La toxina botulínica recombinante también se puede comprar (por ejemplo, en List Biological Laboratories, Campbell, CA) y posteriormente combinarse con proteínas que no son toxinas.

[0037] La presente invención también contempla la modulación de la estabilidad de las moléculas de toxina botulínica a través de la adición de uno o más estabilizadores exógenos, la eliminación de los estabilizadores endógenos o una de sus combinaciones. Por ejemplo, la presente invención contempla el uso de “complejos reducidos de toxina botulínica” en los que los complejos de toxina botulínica tienen cantidades reducidas de proteínas que no son toxinas en comparación con las cantidades naturalmente encontradas en los complejos de toxina botulínica producidos por la bacteria *Clostridium botulinum*. En una realización, los complejos reducidos de toxina botulínica se preparan con el uso de cualquier método convencional de separación de proteína para extraer una fracción de la proteína hemaglutinina o de la proteína que no es toxina y que no es hemaglutinina de los complejos de toxina botulínica derivados de la bacteria *Clostridium botulinum*. Por ejemplo, los complejos reducidos de toxina botulínica se pueden

producir al disociar los complejos de toxina botulínica a través de la exposición a los glóbulos rojos a un pH de 7,3 (por ejemplo, véase el documento EP 1514556 A1, incorporado a el presente documento por referencia). La HPLC, la diálisis, las columnas, la centrifugación y otros métodos se pueden utilizar para la extracción de proteínas de las proteínas. De forma alternativa, cuando se deban producir los complejos reducidos de toxina botulínica mediante la combinación de la toxina botulínica producida sintéticamente con proteínas que no son toxinas, simplemente se puede agregar menos hemaglutinina o proteína que no es toxina y que no es hemaglutinina a la mezcla que estaría presente para los complejos de toxina botulínica de origen natural. Cualquiera de las proteínas que no son toxinas (por ejemplo, la proteína de hemaglutinina o la proteína que no es toxina y que no es hemaglutinina o ambas) en los complejos reducidos de toxina botulínica de acuerdo con la invención puede reducirse independientemente en cualquier cantidad. En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, una o más proteínas que no son toxinas se reducen al menos aproximadamente en 0,5 %, 1 %, 3 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con las cantidades generalmente encontradas en los complejos de toxina botulínica. Como se observó con anterioridad, la bacteria *Clostridium botulinum* produce siete serotipos diferentes de toxinas y las preparaciones comerciales se fabrican con diferentes cantidades relativas de proteínas que no son toxinas (por ejemplo, diferentes cantidades de complejos de toxina). Por ejemplo, MYOBLOCTM tiene 5000 U de la toxina botulínica del tipo B por ml con albúmina sérica humana al 0,05 %, 0,01 M de succinato de sodio y 0,1 M de cloruro de sodio. La DYSPORTTM tiene 500 U del complejo de toxina botulínica del tipo A-hemaglutinina con 125 mcg de albúmina y 2,4 mg de lactosa. En ciertas realizaciones, sustancialmente todas las proteínas que no son toxinas (por ejemplo, más del 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99% de la proteína de hemaglutinina y la proteína que no es toxina y que no es hemaglutinina) que normalmente se encontrarían en los complejos de toxina botulínica derivados de la bacteria *Clostridium botulinum* se elimina del complejo de toxina botulínica. Además, aunque la cantidad de las proteínas endógenas que no son toxina pueden reducirse en la misma cantidad en algunos casos, esta invención también contempla la reducción de cada una de las proteínas endógenas que no son toxina en cantidades diferentes, así como la reducción de al menos una de las proteínas endógenas que no son toxina, pero no de las otras.

[0038] Como se observó con anterioridad, un estabilizador exógeno (por ejemplo, la albúmina) por lo general se agrega para estabilizar las formulaciones de toxina botulínica. Por ejemplo, en el caso del BOTOX[®], 0,5 mg de albúmina humana por 100 U del complejo de toxina botulínica del tipo A para estabilizar el complejo. Generalmente, la cantidad del estabilizador exógeno que puede agregarse para estabilizar las composiciones de acuerdo con la invención no está particularmente limitada. En algunas realizaciones, la cantidad del estabilizador agregado puede ser menor que la cantidad agregada convencionalmente, debido a la capacidad de los portadores cargados positivamente de la invención para actuar como estabilizadores por su propias características. Por ejemplo, la cantidad de la albúmina exógena agregada puede ser cualquier cantidad menor que el exceso convencional de mil veces de la albúmina exógena y, en ciertas realizaciones a modo de ejemplo de la invención, es solamente aproximadamente 0,25, 0,20, 0,15, 0,10, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,00001, 0,000005, 0,000001 o 0,0000001 mg por 100 U de toxina botulínica. En una realización, no se agrega la albúmina exógena como estabilizador a las composiciones de la invención, produciendo así composiciones de toxina de botulínica libres de albúmina.

[0039] Una composición preferida de la invención es una composición líquida que contiene toxina botulínica que se estabiliza sin un excipiente proteínico, especialmente sin ningún excipiente animal derivado de proteína. Tal composición líquida comprende una toxina botulínica, preferiblemente toxina botulínica del serotipo A, un portador cargado positivamente, (por ejemplo, un péptido), un disacárido no reductor o un trisacárido no reductor, un tensioactivo no iónico y un tampón fisiológicamente compatible para mantener el pH entre 4,5 y 7,5. La concentración del azúcar no reductora en la composición líquida se encuentra en un rango del 10 % al 40 % (p/v) y la concentración del tensioactivo no iónico se encuentra en un rango del 0,005 % al 0,5 % (p/v). La composición preferida proporciona un efecto de larga duración después del tratamiento mediante una sola inyección. En una realización preferida, la toxina botulínica A tiene un peso molecular (PM) de 150 kDa. La composición preferida comprende una toxina botulínica, preferiblemente toxina botulínica A, más preferiblemente, de 150 kDa de PM, un portador cargado positivamente (por ejemplo, un péptido) tal como se describe en el presente documento, un disacárido no reductor, tal como la sacarosa, un tensioactivo no iónico, tal como como el polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, o un éster de sorbitano, y un tampón fisiológicamente compatible, tal como el ácido cítrico, el ácido acético, el ácido

succínico, el ácido tartárico, el ácido maleico e la histidina; y tiene un pH en el rango de pH 4,5 a pH 7,5.

[0040] De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que una molécula del portador cargado positivamente que tiene dominios de transducción de proteínas o grupos de eficiencia, tal como se describe en el presente documento, es adecuada como sistema de transporte para la toxina botulínica, haciendo posible que la toxina sea inyectada con una penetración mejorada para las estructuras objetivo tales como los músculos. El transporte ocurre sin la modificación covalente de la toxina botulínica. Además de mejorar la penetración de la toxina botulínica, los portadores cargados positivamente de la invención pueden, en ciertas realizaciones preferidas, estabilizar la toxina botulínica contra la degradación. En dichas realizaciones, la proteína hemaglutinina y la proteína que no es toxina y que no es hemaglutinina que están por lo general presentes para estabilizar la toxina botulínica pueden reducirse u omitirse por completo. De modo similar, se puede omitir la albúmina exógena que generalmente se agrega durante la fabricación.

[0041] Por medio del uso de los términos “cargados positivamente” o “catiónico” en relación con el término “portador”, esto significa que el portador tiene una carga positiva bajo al menos algunas condiciones de la fase de solución, más preferiblemente, bajo al menos algunas condiciones fisiológicamente compatibles. Más específicamente, “cargado positivamente” y “catiónico” tal como se emplea en el presente documento, significa que el grupo en cuestión contiene funcionalidades que se encuentran cargadas bajo todas las condiciones de pH, por ejemplo, una amina cuaternaria, o que contiene una funcionalidad que puede adquirir la carga positiva bajo ciertas condiciones de la fase de solución tales como cambios en el pH en el caso de las aminas primarias. Más preferiblemente, “cargado positivamente” o “catiónico” tal como se emplean en el presente documento, se refieren a aquellos grupos que tienen el comportamiento de asociarse con aniones en condiciones fisiológicamente compatibles. Los polímeros con una multiplicidad de porciones cargadas positivamente no necesitan ser homopolímeros, como lo podrá apreciar un experto en el arte. Otros ejemplos de las porciones cargadas positivamente son bien conocidos en el arte previo y pueden emplearse de manera fácil como podrán apreciarlo aquellos expertos en el arte.

[0042] Por lo general, el portador cargado positivamente (también denominado como una “cadena principal cargada positivamente”) por lo general es una cadena de átomos, ya sea con grupos en la cadena de portadores de una carga positiva en un pH fisiológico o con grupos portadores de una carga positiva enlazada a las cadenas laterales que se extienden desde la cadena principal. En ciertas realizaciones preferidas, la cadena principal cargada positivamente es un péptido catiónico. Tal como se emplea en el presente documento, el término “péptido” se refiere a una secuencia de aminoácidos, pero no lleva ninguna connotación con respecto al número de residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, el término “péptido” también puede comprender polipéptidos y proteínas. En ciertas realizaciones preferidas, la cadena principal cargada positivamente, por sí sola, no tendrá una actividad biológica enzimática o terapéutica definida. En ciertas realizaciones, la cadena principal es una cadena principal de hidrocarburo lineal que es, en algunas realizaciones, interrumpida por heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio y fósforo. La mayoría de los átomos de la cadena principal por lo general son de carbono. Adicionalmente, la cadena principal con frecuencia será un polímero de unidades repetidas (por ejemplo, aminoácidos, poli(etilenoxi), poli(propilenamina), polialquilenimina y similares) pero pueden ser un heteropolímero. En un grupo de realizaciones, la cadena principal cargada positivamente es una polipropilenamina en la que el número de átomos de nitrógeno de la amina están presentes como grupos de amonio (tetra-substituidos) que portan una carga positiva. En otra realización, la cadena principal cargada positivamente es un polímero no peptídico, el cual puede ser un hetero- u homo-polímero tal como una polialquilenimina, por ejemplo, una polietilenimina o polipropilenimina, que tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 2’500.000, preferiblemente de aproximadamente 100.000 hasta aproximadamente 1’800.000 y aún de mayor preferencia de aproximadamente 500.000 hasta aproximadamente 1’400.000. En otro grupo de realizaciones, la cadena principal tiene unida una pluralidad de porciones de cadena lateral que incluyen los grupos cargados positivamente (por ejemplo, grupos de amonio, grupos de piridino, grupos de fosfonio, grupos de sulfonio, grupos de guanidina o grupos de amidinio). Las porciones de cadena lateral en este grupo de realizaciones pueden colocarse en espacios a lo largo de la cadena principal que son consistentes en separaciones o variables. Adicionalmente, la longitud de las cadenas laterales puede ser similar o diferente. Por ejemplo, en un grupo de realizaciones, las cadenas laterales pueden ser

lineales o cadenas ramificadas de hidrocarburos que tienen de uno a veinte átomos de carbono y que terminan en el extremo distante (lejos de la cadena principal) en uno de los grupos cargados positivamente mencionados anteriormente. La asociación entre el portador cargado positivamente y la toxina botulínica es por los ejemplos no limitantes de interacción no covalente, de los cuales se incluyen interacciones iónicas, enlaces de hidrogeno, fuerzas de van der Waals o sus combinaciones.

[0043] En un grupo de realizaciones, la cadena principal cargada positivamente es un polipéptido que tiene múltiples grupos de cadena lateral cargados positivamente (por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, homoarginina y similares). Preferiblemente, el polipéptido tiene un peso molecular de aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1'500.000, más preferiblemente de aproximadamente 500 hasta 1'200.000 y aún de mayor preferencia de aproximadamente 1000 hasta aproximadamente 1'000.000. Un experto en la materia apreciará que cuando los aminoácidos se utilizan en esta parte de la invención, las cadenas laterales pueden tener ya sea una forma D- o L- (configuración R o S) en el centro de la unión. En ciertas realizaciones preferidas, el polipéptido tiene un peso molecular de aproximadamente 500 hasta aproximadamente 5000, más preferiblemente de 1000 hasta aproximadamente 4000, más preferiblemente de 2000 hasta 3000. En otras realizaciones preferidas, el polipéptido comprende de 10 a 20 aminoácidos o 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos, preferiblemente polilisina.

[0044] De manera alternativa, la cadena principal puede comprender análogos de aminoácidos y/o aminoácidos sintéticos. La cadena principal también puede ser un análogo de un polipéptido tal como un peptoide. Ver, por ejemplo, Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32:543 (1993); Zuckermann et al. *Chemtracts-Macromol. Chem.* 4:80 (1992); y Simon et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU.* 89:9367 (1992)). En pocas palabras, un peptoide es una poliglicina en la que la cadena lateral está unida a los átomos de nitrógeno de la cadena principal en vez de a los átomos de α -carbono. Como en lo anterior, una porción de las cadenas laterales por lo general terminará en un grupo cargado positivamente para proporcionar un componente de la cadena principal cargada positivamente. La síntesis de los peptoides se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. No. 5.877.278, la cual se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Tal como se emplea el término en el presente documento, las cadenas

principales cargadas positivamente que tienen una construcción de cadena principal peptoide se consideran “no péptidas” ya que ellas no están compuestas de aminoácidos con cadenas laterales de origen natural en las ubicaciones de alfa-carbono.

[0045] Se puede usar una variedad de otras cadenas principales que emplean, por ejemplo, imitadores estéricos o electrónicos de polipéptidos en los que los enlaces amida del péptido se reemplazan por sustituciones tales como enlaces éster, tioamidas ($--CSNH--$), tioamida inversa ($--NHCS--$), aminometileno ($-NHCH_2--$) o los grupos invertidos de metilenamino ($--CH_2NH--$), grupos ceto-metileno ($--COCH_2--$), fosfinato ($--PO_2RCH_2--$), fosfonamidato y éster de fosfonamidato ($--PO_2RNH--$), péptido inverso ($--NHCO--$), trans-alqueno ($--CR=CH--$), fluoroalqueno ($--CF=CH--$), dimetileno ($--CH_2CH_2--$), tioéter ($--CH_2S--$), hidroxietileno ($--CH(OH)CH_2--$), metilenoxi ($--CH_2O--$), tetrazol (CN_4), sulfonamido ($--SO_2NH--$), metilenosulfonamido ($--CHRSO_2NH--$), sulfonamida inversa ($--NHSO_2--$), y cadenas principales con subunidades de malonato y/o gem-diamino-alquilo, por ejemplo, según lo revisado por Fletcher et al. ((1998) Chem. Rev. 98:763) y detallado por las referencias citadas en el presente documento. Muchas de las sustituciones anteriores resultan en cadenas principales de polímero aproximadamente isotéricas en relación a las cadenas principales formadas a partir de α -aminoácidos.

[0046] En cada una de las cadenas principales proporcionadas anteriormente, los grupos de cadenas laterales pueden estar enlazados para transportar un grupo cargado positivamente. Por ejemplo, la cadena principal enlazada a la sulfonimida ($--SO_2NH--$ y $--NHSO_2--$) puede tener grupos de cadena lateral unidos a los átomos de carbono. De forma similar, los enlaces de hidroxietileno ($--CH(OH)CH_2--$) pueden ser portadores de un grupo de cadena lateral unido a un sustituyente hidroxilo. Un experto en la materia puede adaptar fácilmente las otras químicas de enlace para producir grupos de cadena lateral cargados positivamente utilizando métodos sintéticos estándar.

[0047] En una realización, la cadena principal cargada positivamente es un polipéptido que tiene dominios de transducción de proteínas (también denominados grupos de eficiencia). Tal como se utiliza en el presente documento, un grupo de eficiencia o un dominio de transducción de proteínas es cualquier agente que tiene el efecto de promover la transubicación de la cadena principal cargada positivamente a través de un tejido o membrana celular. Los

ejemplos no limitantes de dominios de transducción de proteínas o grupos de eficiencia incluyen $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ (SEC ID NO: 5), VIH-TAT o sus fragmentos, o el dominio de transducción de proteínas (PTD) de Antennapedia o uno de sus fragmentos, en el que el subíndice $n1$ es un número entero de 0 a 20, más preferiblemente de 0 a 8, aún más preferiblemente de 2 a 5 y el subíndice $n2$ es independientemente un número impar de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 25, preferiblemente de aproximadamente 7 hasta aproximadamente 17, más preferiblemente de aproximadamente 7 hasta aproximadamente 13. En algunas realizaciones, el fragmento de VIH-TAT no contiene la región rica en cisteína de la molécula de VIH-TAT, con el fin de minimizar los problemas asociados con la adición del disulfuro. Preferiblemente, los fragmentos de VIH-TAT y los dominios de transducción de proteínas de Antennapedia retienen la actividad de transducción de proteínas de la proteína completa. Aún más preferidas son aquellas realizaciones en las que el fragmento de VIH-TAT tiene la secuencia de aminoácidos $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$ (SEC ID NO: 1), $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$ (SEC ID NO: 2) o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ (SEC ID NO: 3) en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de 0 a 20, o en donde p y q son cada uno independientemente el número entero 1. En otra realización, el fragmento o grupo de eficiencia está unido a la cadena principal a través ya sea del C-Terminal o N-terminal del fragmento o la secuencia de aminoácidos del grupo de eficiencia. En ciertas realizaciones preferidas, p es uno y q es cero o, p es cero y q es uno. Los fragmentos de VIH-TAT preferidos son aquellos en los cuales los subíndices p y q son cada uno independientemente números enteros de 0 a 8, más preferiblemente de 0 a 5. En otra realización preferida, la cadena lateral cargada positivamente o el grupo ramificado es el dominio de transducción de proteínas (PTD) de la Antennapedia (Antp), o uno de sus fragmentos que retiene actividad. Estas son conocidas en el arte, por ejemplo, en Console et al., *J. Biol. Chem.* 278:35109 (2003) y un ejemplo no limitante de un PTD de Antennapedia contemplado por esta invención es el PTD que tiene la secuencia de aminoácidos SGRQIKIWFQNRRMKWKKC (SEC ID NO: 6). En una realización, el portador cargado positivamente es un péptido cargado positivamente que tiene la secuencia de aminoácidos $\text{RKKRRQRRR-G-(K)}_{15}\text{-G-RKKRRQRRR}$ (SEC ID NO: 4); o un péptido cargado positivamente que tiene la secuencia de aminoácidos $\text{YGRKKRRQRRR-G-(K)}_{15}\text{-G-YGRKKRRQRRR}$ (SEC ID NO: 7); o un péptido cargado positivamente que tiene las secuencias

de aminoácidos RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RGRDDRRQRRR (SEC ID NO 8) para uso en las composiciones y métodos de la invención.

[0048] Preferiblemente, el portador cargado positivamente incluye dominios de transducción de proteínas cargados positivamente de cadena lateral o grupos de eficiencia cargados positivamente en una cantidad de al menos aproximadamente 0,01 %, como porcentaje del peso total del portador, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 por ciento en peso, más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 45 por ciento en peso, y de mayor preferencia de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30 por ciento en peso. Para dominios de transducción de proteínas cargados positivamente que tienen la fórmula - (gly)_{n1}-(arg)_{n2} (SEC ID NO: 5), un intervalo preferido es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25%.

[0049] En otra realización, la porción de la cadena principal es una polilisina y los dominios de transducción de proteínas cargados positivamente están unidos a los grupos amino de cadena lateral de lisina o a los terminales C o N. En algunas realizaciones preferidas, la polilisina puede tener un peso molecular que es al menos 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500 o 6000 D, y menos de aproximadamente 2'000.000, 1'000.000, 500.000, 250.000, 100.000, 75.000, 50.000, y 25.000 D. Dentro del rango de 100 a 2'000.000 D, se contempla que el rango menor y/o superior pueda aumentar o disminuir, respectivamente, en 100, con cada subrango resultante que es una realización específicamente contemplada de la invención. En algunas realizaciones de ejemplo, la polilisina tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1'500.000 D, de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 800.000 D, o de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 200.000 D. En otras realizaciones de ejemplo, la polilisina tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 10.000 D, de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 D, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 4.000 D, de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 3.500 D o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 3.000 D. Se prefiere un polipéptido de polilisina que tiene de 10 a 20 lisinas (SEC ID NO : 9), más preferiblemente, 15 lisinas. En algunas realizaciones, la polilisina contemplada por esta invención puede ser cualquiera de las polilisinas disponibles en el mercado (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE. UU.) tales como, por ejemplo, polilisina que tiene un PM > 70.000, polilisina que tiene un PM de 70.000 a 150.000, polilisina que tiene PM

150.000 a 300.000 y polilisina que tiene $PM > 300.000$. La selección de una polilisina apropiada dependerá de los componentes restantes de la composición y será suficiente para proporcionar una carga positiva neta y general a la composición y proporcionar una longitud que es preferiblemente de una a cuatro veces la longitud combinada de los componentes cargados negativamente. Los dominios de transducción de proteínas o los grupos de eficiencia cargados positivamente preferidos incluyen, por ejemplo, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg (-Gly₃Arg₇ (SEC ID NO: 10)) o VIH-TAT.

[0050] En otra realización preferida, la cadena principal cargado positivamente es una polialquilenimina, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen polietilenimina, polipropilenimina y polibutilenimina. En ciertas realizaciones, la polialquilenimina tiene un peso molecular de al menos 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, o 6000 D, y menos de aproximadamente 2'000.000, 1'000.000, 500.000, 250.000, 100.000, 75.000, 50.000, y 25.000 D. Dentro del rango de 100 a 2'000.000 D se contempla que el rango menor y/o superior pueda aumentar o disminuir, respectivamente, en 100, con cada subrango resultante que es una realización específicamente contemplada de la invención.

[0051] En otras realizaciones de esta invención, el portador es una cadena principal de polilisina o de polietilenimina (PEI) relativamente corta (que puede ser lineal o ramificada) y que tiene grupos ramificados cargados positivamente. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que tales portadores son útiles para minimizar la adición descontrolada de las cadenas principales y la toxina botulínica en una composición terapéutica, la cual hace que la eficiencia del transporte disminuya drásticamente. Cuando el portador es una cadena principal de polilisina lineal o de PEI relativamente corta, la cadena principal tendrá un peso molecular de menos de 75.000 D, más preferiblemente menos de 30.000 D, y más preferiblemente, menos de 25.000 D. Cuando el portador es una cadena principal ramificada de polilisina o de PEI relativamente corta, sin embargo, la cadena principal tendrá un peso molecular inferior a 60.000 D, más preferiblemente inferior a 55.000 D, y de mayor preferencia inferior a 50.000 D.

[0052] En una realización particularmente interesante, las moléculas no nativas son péptidos catiónicos que no tienen actividad inherente similar a la toxina botulínica y que también contienen uno o más dominios de transducción de proteínas como se describe en el presente

documento. Sin desear estar ligado a ninguna teoría científica particular, se cree que los péptidos mejoran la penetración tisular de moléculas asociadas en el complejo después de la inyección, a la vez que mejoran la estabilización de la toxina botulínica en la piel e *in vitro*. Se cree que la penetración tisular mejorada proporcionada por estos péptidos en particular proporciona antigenicidad reducida, un mejor perfil de seguridad, potencia mejorada, inicio más rápido de la eficiencia clínica o mayor duración de la eficiencia clínica en comparación con los complejos de toxina botulínica comerciales y convencionales que se unen a la albúmina exógena (por ejemplo, BOTOX® o MYOBLOC®).

[0053] En realizaciones preferidas, la concentración de portadores cargados positivamente en las composiciones de acuerdo con la invención es suficiente para mejorar la administración de la toxina botulínica a objetivos moleculares tales como, por ejemplo, placas nerviosas motoras. Además, sin querer limitarse a la teoría, se cree que la velocidad de penetración sigue a la cinética mediada por los receptores, de modo que la penetración tisular aumenta con cantidades crecientes de moléculas potenciadoras de penetración hasta un punto de saturación, en el que la velocidad de transporte se vuelve constante. Por lo tanto, en una realización preferida, la cantidad de moléculas potenciadoras de penetración añadidas es igual a la cantidad que maximiza la velocidad de penetración justo antes de la saturación. Un rango de concentración útil para el portador cargado positivamente (o péptido portador) en las composiciones inyectables de esta invención es aproximadamente 0,1 pg de portador por Unidad (U) de toxina botulínica (0,1 pg/U) a aproximadamente 1,0 mg por Unidad (mg/U) de la toxina botulínica como se describe en este documento. Un rango de concentración útil para el portador cargado positivamente (o péptido transportador) en las composiciones tópicas de la invención es de aproximadamente 1,0 pg/U a 0,5 mg/U de toxina botulínica (cantidad de portador/U de toxina botulínica). En otras realizaciones, el portador cargado positivamente (o péptido portador) está presente en las composiciones inyectables de la invención en el rango de, por ejemplo, 10 ng/U a 200 ng/U de toxina botulínica, o en el intervalo de 1 ng/U a 1000 ng/U de toxina botulínica; o en el rango de 0,1 ng/U a 10.000 ng/U de toxina botulínica. En algunas realizaciones, la cantidad del portador (o péptido portador) cargado positivamente a las Unidades de toxina botulínica presentes en las composiciones de la invención es, a modo de ejemplo no limitante, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, etc. ng de

portador por Unidad de toxina botulínica (ng/U). Preferiblemente, la toxina botulínica es del serotipo A y, particularmente, la forma de 150 kD de la toxina botulínica de serotipo A.

[0054] En general, los expertos en la materia conocen y practican métodos y procedimientos para medir la actividad de la toxina botulínica, es decir, unidades (U) de la actividad de la toxina botulínica. Brevemente, los ensayos de letalidad media (ensayos DL_{50}) en ratones se usan convencionalmente para estimar el número de unidades de toxina botulínica con un alto grado de precisión. Las dosis de todas las toxinas botulínicas disponibles en el mercado se expresan en términos de unidades de actividad biológica. A modo de ejemplo, una unidad de toxina botulínica corresponde a la dosis letal intraperitoneal media (DL_{50}) calculada en ratones hembra Swiss-Webster. Ver, Hoffman, R.O. et al., 1986, *Int. Ophthalmol. Clin.*, 26:241-50, como también DePass, L.R., 1989, *Toxicol. Letters*, 49:159-170; y Pearce, L.B. et al., 1994, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 128:69-77, que también describe ensayos de letalidad en el arte. Más particularmente, un método adecuado para determinar las unidades de toxina botulínica para un componente de toxina botulínica de las composiciones de la invención es el siguiente: se asignan de forma aleatoria cuarenta y ocho (48) ratones hembra DC-1 que pesan 17-23 gramos a seis dosis del artículo de prueba (1,54, 1.31, 1,11, 0,95, 0,80 y 0,68 U/0,5 mL), ocho (8) animales por grupo de dosis. El artículo de prueba se refiere a la preparación de la toxina botulínica o muestra que se ensaya o se prueba. Los animales se colocan de a ocho por jaula y se pesan dentro de las 24 horas de dosificación con el artículo de prueba. El día de la dosificación, el artículo de prueba se diluye a las concentraciones apropiadas en solución salina isotónica (NaCl al 0,9 %). A cada animal se le administran 0,5 ml de artículo de prueba diluido por inyección intraperitoneal. Después de la inyección, los ratones son devueltos a la jaula y las muertes se registran diariamente durante tres días. La letalidad se califica 72 horas después de la inyección y los resultados se analizan por análisis probit o logístico para derivar el valor de DL_{50} en relación con un estándar de referencia que se evalúa con el uso del mismo régimen de dosificación. A modo de ejemplo, el estándar de referencia es un lote específicamente calificado y calibrado de la misma composición de la invención que se usa como comparación para derivar la potencia relativa del artículo de prueba. El valor de DL_{50} determinado es posteriormente corregido para las diluciones acumulativas realizadas para asignar un valor de potencia relativo para el artículo de prueba limpio (no diluido).

[0055] Las composiciones de esta invención están preferiblemente en una forma que permite la inyección en la piel o el epitelio de sujetos o pacientes. El término “que necesita” tiene la intención de incluir tanto las necesidades farmacéuticas como las relacionadas con la salud (por ejemplo, tratar afecciones que involucren contracciones distónicas indeseables o espasmos musculares). En realizaciones preferidas, las composiciones se preparan al mezclar la toxina botulínica (ya sea que contenga las proteínas asociadas que no son toxinas o proteínas asociadas y reducidas que no son toxinas) con el portador cargado positivamente y, usualmente, con uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. En su forma más simple, pueden contener un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). Sin embargo, las composiciones pueden contener otros ingredientes que se encuentran generalmente en composiciones farmacéuticas o cosmeceúticas inyectables, incluyendo un portador, vehículo o medio dermatológica o farmacéuticamente aceptable que es compatible con los tejidos a los que se aplicará. El término “farmacéuticamente aceptable”, tal como se emplea en el presente documento, significa que las composiciones o sus componentes así descritos son adecuados para usar en contacto con estos tejidos o para su uso en pacientes en general sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica indebidas y similares. Según sea apropiado, las composiciones de la invención pueden comprender cualquier ingrediente utilizado convencionalmente en los campos considerados.

[0056] En cuanto a su forma, las composiciones de esta invención pueden incluir soluciones, emulsiones (incluidos microemulsiones), suspensiones, geles, polvos u otras composiciones sólidas o líquidas comunes usadas para inyectar al músculo y otros tejidos donde se pueden usar las composiciones. En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención están presentes en formulaciones estériles de baja viscosidad adecuadas para inyección con una jeringa. Como se emplea en el presente documento, los términos composiciones y formulaciones son esencialmente intercambiables cuando se hace referencia a las composiciones y formulaciones de acuerdo con la presente invención. Las composiciones de la invención pueden estar en forma de un polvo liofilizado que se reconstituye utilizando un diluyente líquido farmacéuticamente aceptable antes de la inyección. En ciertas realizaciones, el polvo liofilizado se reconstituye con un diluyente líquido para formar una formulación inyectable con una viscosidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2000 cP, más preferiblemente de

aproximadamente 0,2 a aproximadamente 500 cP, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 50 cP, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 2,0 cP. Las composiciones de la invención pueden contener, además de la toxina botulínica y del portador cargado positivamente, otros ingredientes por lo general utilizados en tales productos, tales como antimicrobianos, agentes de hidratación, agentes de volumen de tejido o rellenos de tejidos, conservantes, emulsionantes, aceites naturales o sintéticos, disolventes, tensioactivos, detergentes, agentes gelificantes, antioxidantes, rellenos, espesantes, polvos, agentes controladores de viscosidad y agua, y opcionalmente incluidos anestésicos, activos contra la picazón, extractos botánicos, agentes de acondicionamiento, minerales, polifenoles, siliconas o sus derivados, vitaminas y fitomedicinales.

[0057] Las composiciones inyectables de acuerdo con esta invención pueden encontrarse en forma de composiciones de liberación controlada o de liberación sostenida las cuales comprenden toxina botulínica y portadores cargados positivamente encapsulados o contenidos de otro modo dentro de un material de manera que sean liberados dentro del tejido de forma controlada a lo largo del tiempo. La composición que comprende la toxina botulínica y el portador cargado positivamente pueden estar contenidos dentro de matrices, liposomas, vesículas, microcápsulas, microesferas y similares, o dentro de un material particulado sólido, todo lo cual se selecciona y/o construye para proporcionar la liberación de la toxina botulínica a lo largo del tiempo. La toxina botulínica y el portador cargado positivamente pueden encapsularse juntos (es decir, en la misma cápsula) o por separado (es decir, en cápsulas separadas).

[0058] En realizaciones, las composiciones de la invención comprenden composiciones (o formulaciones) líquidas (acuosas) que comprenden una toxina botulínica tal como se describe en el presente documento, un portador (o péptido) cargado positivamente como se describe aquí, un disacárido no reductor o un trisacárido no reductor, un tensioactivo no iónico y un tampón fisiológicamente compatible, el cual es capaz de mantener un pH adecuado, tal como un pH en el rango de un pH de 4,5 a un pH de 7,5, o un pH de 4,5 a un pH de 6,8, o un pH de 4,5 a un pH de 6,5. Debe entenderse que un pH adecuado también incluye los valores de pH superior e inferior en el intervalo de, por ejemplo, un pH de 6,5 o un pH de 7,5. La concentración del azúcar no reductor en la composición líquida se encuentra en un rango del 10 % al 40 % (p/v) y la

concentración del tensioactivo no iónico se encuentra en un rango del 0,005 % al 0,5 % (p/v). Las composiciones líquidas pueden secarse, preferiblemente mediante liofilización, para producir composiciones sólidas estabilizadas, que pueden reconstituirse después para su uso, por ejemplo, usando solución salina estéril u otros diluyentes, excipientes o portadores conocidos, fisiológica y farmacéuticamente aceptables, especialmente los conocidos para su uso en formulaciones inyectables. Preferiblemente, las composiciones sólidas secas, por ejemplo, liofilizadas, son composiciones sólidas no cristalinas y amorfas, y pueden, por ejemplo, estar en forma de polvos. Además, preferiblemente, las composiciones de la invención no incluyen productos de origen animal derivados de proteínas, tales como albúmina. Las composiciones que son adecuadas para la invención también se describen en la publicación de la solicitud de los Estados Unidos No. US 2010/0330123, cuyos contenidos completos se incorporan aquí por referencia. En realizaciones particulares, las composiciones comprenden toxina botulínica del serotipo A. En otras realizaciones particulares, las composiciones comprenden toxina botulínica del serotipo A que tiene un peso molecular de 150 kDa.

[0059] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención contienen un azúcar no reductor, que es preferiblemente un disacárido, ejemplos no limitantes que incluyen trehalosa, incluidas sus formas anhidra e hidratada, o sacarosa, así como sus combinaciones. En algunas realizaciones, es preferible la forma hidratada de trehalosa, trehalosa-dihidrato. En otras realizaciones, las composiciones contienen un trisacárido, cuyo ejemplo no limitante es la rafinosa. En general, la concentración del azúcar no reductor, preferiblemente un disacárido, por ejemplo, sacarosa, en las composiciones de la invención está en el rango de 10 % a 40 % (p/v), preferiblemente 10 % a 25 % (p/v), más preferiblemente del 15 % al 20 % (p/v). En algunas realizaciones preferidas, la concentración del azúcar no reductor, preferiblemente un disacárido, por ejemplo, sacarosa, es 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 % (p/v).

[0060] En general, las composiciones de la invención pueden incluir cualquier tensioactivo no iónico que tenga la capacidad de estabilizar la toxina botulínica y que sea adecuado para uso farmacéutico. En algunas realizaciones, el tensioactivo no iónico es un polisorbato, tal como, a modo de ejemplo no limitante, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y polisorbato 80. En otras realizaciones, el tensioactivo no iónico es un éster de sorbitano, cuyos ejemplos no limitantes incluyen SPAN[®] 20, SPAN[®] 60, SPAN[®] 65 y SPAN[®] 80.

También se pueden utilizar los tensioactivos no iónicos Triton® X-100 o NP-40. Además, se puede utilizar una combinación de los diferentes tensioactivos no iónicos. En ciertas realizaciones preferidas, el tensioactivo no iónico es un polisorbato, un poloxámero y/o un sorbitano; los polisorbatos y sorbitanos son particularmente preferidos. En realizaciones, el tensioactivo no iónico ese encuentra en las composiciones de la invención en el rango de 0,005 % a 0,5 %, o en el rango de 0,01 % a 0,2 %, o en el rango de 0,02 % a 0,1 % o en el rango de 0,05 a 0,08%, incluidos los valores superiores e inferiores. Además, las composiciones de la invención pueden contener un tensioactivo no iónico en la cantidad de 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,10 %, 0,11 %, 0,12 %, 0,13 %, 0,14 % o 0,15 %.

[0061] En general, para las composiciones de la invención, cualquier tampón fisiológicamente compatible capaz de mantener el pH en los rangos anteriores es adecuado para su uso. Los ejemplos no limitantes de tales tampones incluyen sales de ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico e histidina. Los ejemplos no limitantes de las concentraciones adecuadas de tampón incluyen concentraciones de tampón en el rango de 0,400 % a 0,600 %; 0,450 % a 0,575 %, o 0,500 % a 0,565 %. Las composiciones de la invención también pueden comprender una mezcla de sales tampón, cuyos ejemplos no limitantes incluyen citrato/acetato, citrato/histidina, citrato/tartrato, maleato/histidina o succinato/histidina. Por consiguiente, una composición de la invención que proporciona un efecto de larga duración después del tratamiento mediante una única inyección incluye una toxina botulínica, tal como la toxina botulínica A o la toxina botulínica A de 150 kDa de PM, tal como se describe en el presente documento, un portador cargado positivamente (o péptido) tal como se describe en el presente documento, un disacárido no reductor, tal como la sacarosa, un tensioactivo no iónico, tal como el polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, o un éster de sorbitano, y un tampón fisiológicamente compatible, tal como el ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico e histidina, el cual es capaz de mantener un pH adecuado, tal como un pH en el rango de un pH de 4,5 a un pH de 6,5 o en el rango de un pH de 4,5 a un pH de 7,5, en cantidades p/v tal como se describe en este documento.

[0062] Una composición particular de la invención es una composición líquida (acuosa) libre de albúmina que comprende una toxina botulínica, preferiblemente toxina botulínica del serotipo A, o una toxina botulínica A que tiene un peso molecular de 150 kDa; un portador

cargado positivamente (por ejemplo, péptido); un disacárido no reductor o un trisacárido no reductor, preferiblemente un disacárido, presente en un rango de 10 % a 40 % (p/v); un tensioactivo no iónico, preferiblemente, un polisorbato o éster de sorbitano, presente en el rango de 0,005 % a 0,5 % (p/v); y un tampón fisiológicamente compatible, tal como el ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico o histidina, presente en el rango de 0,400 % a 0,600 %; 0,450 % a 0,575 %, o 0,500 % a 0,565 %, para mantener el pH entre 4,5 y 7,5.

[0063] Las formulaciones de toxina botulínica según la invención pueden administrarse por inyección (por lo general utilizando una jeringa) a los músculos subyacentes a la piel o a estructuras glandulares dentro de la piel, en una cantidad efectiva para producir parálisis, producir relajación, aliviar contracciones, prevenir o aliviar espasmos, reducir la producción glandular u otros efectos deseados. La administración local de la toxina botulínica de esta manera podría proporcionar reducciones de la dosificación, reducir la toxicidad y permitir una optimización más precisa de la dosificación para los efectos deseados con respecto a los materiales inyectables o implantables.

[0064] Las composiciones de la invención se administran para administrar una cantidad efectiva, preferiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva, de la toxina botulínica. El término “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” tal como se emplea en el presente documento significa una cantidad de toxina botulínica como se definió anteriormente que es suficiente para producir la parálisis muscular deseada u otro efecto biológico o estético, pero que implícitamente es una cantidad segura, es decir, una que es lo suficientemente baja como para evitar efectos secundarios graves.

[0065] Las composiciones de la invención pueden contener una cantidad efectiva apropiada de la toxina botulínica para su aplicación como un tratamiento de una sola dosis o pueden estar más concentradas, ya sea para dilución en el lugar de administración o para uso en múltiples aplicaciones y/o aplicaciones secuenciales durante períodos de tiempo. Mediante el uso del portador cargado positivamente de esta invención, se puede administrar una toxina botulínica por inyección a un sujeto para tratar afecciones tales como distonía cervical. La toxina botulínica se administra por inyección a los músculos u otras estructuras asociadas a la piel u otras estructuras tisulares objetivo.

[0066] Más preferiblemente, las composiciones son administradas por o bajo la dirección de un médico u otro profesional de la salud. Se pueden administrar en un solo tratamiento o en una serie de tratamientos a lo largo del tiempo. En realizaciones preferidas, una composición de acuerdo con la invención se inyecta en una ubicación o ubicaciones en las que se desea un efecto asociado con la toxina botulínica. En el tratamiento de la distonía cervical, la siguiente Tabla 1 proporciona orientación sobre la dosis adecuada de RTT150 (el producto RT002 está compuesto de neurotoxina botulínica purificada de 150 kDa, denominada RTT150) por rangos de dosis de 1, 2 y 3 para grupos musculares específicos:

[La tabla 1 se creó con el uso de la perspectiva de los rangos de dosificación recomendados para BOTOX® por el músculo involucrado (Allergan, Inc. BOTOX® US Prescribing Information, 2015 & BOTOX® medical website, Flexible dosing in cervical dystonia.

<https://www.botoxmedical.com/CervicalDystonia/DosingAndAdministration>)]

Tabla 1: Directriz general sobre rangos de dosificación por músculo para distonía cervical, RTT150 para inyección -	Rango de dosis 1	Rango de dosis 2	Rango de dosis 3
Dosis máxima total	Por sujeto: hasta 200 U RTT150	Por sujeto: 200 a 300 U RTT150	Por sujeto: 300 a 450 U RTT150
Por músculo	Rango de dosis recomendada RTT150 Unidades	Rango de dosis recomendada RTT150 Unidades	Rango de dosis recomendada RTT150 Unidades
Splenius capitis	15–100a	15-100	22,5-150
Esternocleidomastoideo	15–100a	15–100a	22,5–100a
Escápulas elevadoras	20–100a	20–100a	30-150
Complejo de escaleno	15–50a	15–50a	22,5-75
Semispinalis capitis	30–100a	30–100a	45-150
Longísimo	30–100a	30–100a	45-150
Trapezio	20–100a	20–100a	30-150
Esplenio capitis	20–60a	20–60a	30-90

[0067] Debido a su naturaleza, la toxina botulínica se administra preferiblemente a una cantidad, velocidad de aplicación y frecuencia que producirán el resultado deseado sin producir ningún resultado adverso o indeseado. En realizaciones, un único tratamiento con una dosis efectiva de las composiciones de la invención proporciona un efecto de larga duración tal como la que se da durante un curso de tratamiento para una indicación tratable por toxina botulínica, o

una serie de inyecciones durante una única sesión múltiple de tratamiento, con un efecto concomitante que perdura durante períodos prolongados de tiempo, por ejemplo, al menos 6 meses o más de 6 meses, es decir, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses o más, incluidos 10 meses. La mayor duración de la acción proporciona rangos o períodos de tiempo más largos entre los tratamientos en los que se usan múltiples tratamientos para mantener un objetivo o efecto del tratamiento. En una realización, la mayor duración del efecto de la composición después de la administración o dosificación a un individuo con una composición de la invención que proporciona aproximadamente 100 U a 450 U; o más específicamente, de aproximadamente 100 U a 200 U o de aproximadamente 200 U a 300 U o de aproximadamente 300 U a 450 U, de toxina botulínica, por ejemplo, al menos 6 meses o más de 6 meses, como 7, 8, 9 o 10 meses, incluso en medio, es relativo a la duración del efecto de una composición o un producto que contiene toxina botulínica que no contiene un portador (o péptido) cargado positivamente de acuerdo con la presente invención. En algunos casos, una composición o un producto que contiene toxina botulínica sin un portador (o péptido) cargado positivamente de la invención es efectivo durante menos de 6 meses, tal como 3 o 4 meses.

[0068] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención, que comprenden una toxina botulínica y un portador cargado positivamente que comprende una cadena principal polimérica cargada positivamente con uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente unidos covalentemente como se describe en el presente documento, se administran como una única inyección a un sujeto o paciente que lo necesita en una cantidad o en una dosis que proporciona aproximadamente 100 U a 450 U; o más específicamente, de aproximadamente 100 U a 200 U o de aproximadamente 200 U a 300 U o de aproximadamente 300 U a 450 U, de toxina botulínica por dosis del tratamiento por sujeto para el tratamiento de la distonía cervical. Según la invención, un tratamiento tiene una duración de varias semanas o meses, por ejemplo, durante al menos 10 semanas, durante al menos 12 semanas, durante al menos 16 semanas, durante al menos 20 semanas, durante al menos 24 semanas, o durante al menos 6 meses, o más de 6 meses, como 6, 7, 8, 9 o 10 meses o más. En realizaciones, la toxina botulínica es del serotipo A, B, C, D, E, F o G. En una realización, la toxina botulínica es del serotipo A. En una realización, la toxina botulínica del serotipo A tiene un peso molecular de 150 kDa. En una realización, la toxina botulínica del serotipo A está en forma de un complejo de mayor peso molecular como se describe *supra*. En realizaciones preferidas, la toxina botulínica de 150 kDa

o las formas de mayor peso molecular de la toxina están en formulaciones libres de albúmina. En una realización, la cadena principal polimérica cargada positivamente es polilisina o polietilenimina. En una realización, el uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente incluyen $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ (SEC ID NO: 5), en el que el subíndice $n1$ es un número entero de 0 a 20, más preferiblemente de 0 a 8, aún más preferiblemente de 2 a 5, y el subíndice $n2$ es independientemente un número entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, más preferiblemente aproximadamente 7 a aproximadamente 17, lo de mayor preferencia de aproximadamente 7 a aproximadamente 13. En algunas realizaciones, el uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente tienen la secuencia de aminoácidos $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-}(\text{gly})_q$ (SEC ID NO: 1), $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-}(\text{gly})_q$ (SEC ID NO: 2) o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-}(\text{gly})_q$ (SEC ID NO: 3), en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de 0 a 20. En ciertas realizaciones preferidas, p es uno y q es cero o p es cero y q es uno. En otras realizaciones preferidas, los subíndices p y q son cada uno independientemente números enteros de 0 a 8, más preferiblemente de 0 a 5. En una realización particular, el portador cargado positivamente tiene la secuencia de aminoácidos $\text{RKKRRQRRRG-(K)}_{15}\text{-GRKKRRQRRR}$ (SEC ID NO: 4). En otras realizaciones, el uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente se unen a la cadena principal cargada positivamente a través del C-terminal o N-terminal del grupo de eficiencia, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente están unidos a cualquiera de los extremos, o a ambos extremos, de la cadena principal de polilisina cargada positivamente del portador cargado positivamente. En realizaciones particulares, la cadena principal cargada positivamente es polilisina y la toxina botulínica es del serotipo A. En otra realización particular, la toxina botulínica del serotipo A tiene un peso molecular de 150 kDa, la cadena principal cargada positivamente es polilisina y uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente unidos covalentemente tienen la secuencia de aminoácidos $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-}(\text{gly})_q$ (SEC ID NO: 1), $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-}(\text{gly})_q$ (SEC ID NO: 2) o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-}(\text{gly})_q$ (SEC ID NO: 3), en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de 0 a 20, o son cada uno independientemente los valores expuestos anteriormente; o el portador cargado positivamente tiene la secuencia de aminoácidos $\text{RKKRRQRRRG-(K)}_{15}\text{-GRKKRRQRRR}$ (SEC ID NO: 4). En realizaciones, la composición se administra por inyección en una cantidad o dosis

que proporciona 20 U o al menos 20 U; 30 U o al menos 30 U; 40 U o al menos 40 U; 50 U o al menos 50 U; 60 U o al menos 60 U; 70 U o al menos 70 U; 80 U o al menos 80 U; 90 U o al menos 90 U; o 100 U o al menos 100 U de toxina botulínica por inyección. También se contemplan cantidades o dosis entre las cantidades o dosis anteriores, por ejemplo, 25 U o al menos 25 U; 35 U o al menos 35 U; 45 U o al menos 45 U, y similares. En realizaciones particulares, la composición se administra por inyección como una única dosis del tratamiento en una cantidad que proporciona aproximadamente 100 U a 450 U; o más específicamente, de aproximadamente 100 U a 200 U o de aproximadamente 200 U a 300 U o de aproximadamente 300 U a 450 U, de toxina botulínica y se logra y mantiene una respuesta o efecto durante un período prolongado, por ejemplo, durante al menos 10 semanas, durante al menos 12 semanas, durante al menos 16 semanas, durante al menos 20 semanas, al menos 24 semanas, al menos 6 meses o más de 6 meses, como, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, o 10 meses o más.

[0069] Sin desear ser limitante, en un tratamiento, las composiciones de la invención pueden administrarse a intervalos menos frecuentes después de una dosis del tratamiento inicial con base en la duración prolongada del efecto proporcionado por las dosis terapéuticamente efectivas de las composiciones y los métodos de la invención, tal como se describe en este documento. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden administrarse (o dosificar) a un individuo que lo necesite aproximadamente dos veces al año (aproximadamente cada 6 meses), o cada 7 meses, 8 meses, 9 meses o 10 meses o más, mediante la práctica de los métodos de la invención. En una realización particular, se le administra a un individuo una dosis de una composición de la invención dos veces al año. La duración media entre dosis puede ser de 6 meses, al menos 6 meses o superior a 6 meses, dependiendo del tratamiento terapéutico o cosmético y/o del deseo de tratamiento que el individuo que se está tratando determine. Por lo tanto, la dosificación de un individuo con las composiciones de la invención puede ocurrir dos veces al año o más de dos veces al año y, por ejemplo, cada 6, 7, 8, 9 o 10 meses después de una dosis inicial. Una composición de la invención puede dosificarse en el intervalo apropiado a aproximadamente 100 U a 450 U; o más específicamente, de aproximadamente 100 U a 200 U o de aproximadamente 200 U a 300 U o de aproximadamente 300 U a 450 U, de toxina botulínica en la composición.

[0070] Esta invención también contempla el uso de una variedad de dispositivos de administración para inyectar composiciones que contienen toxina botulínica descritas en este

documento a través de la piel. Dichos dispositivos pueden incluir, sin limitación, una aguja y una jeringa, o pueden implicar dispositivos más sofisticados capaces de dispensar y controlar la dispensación de la composición y, opcionalmente, monitorear la condición del sujeto en uno o más aspectos (por ejemplo, controlar la reacción del sujeto a las sustancias que están siendo dispensadas).

[0071] En algunas realizaciones, las composiciones pueden preformularse y/o preinstalarse en un dispositivo de administración como tal. Esta invención también contempla realizaciones en las que las composiciones se proporcionan en un kit que almacena uno o más componentes independientes de los componentes restantes. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la invención proporciona un kit que almacena por separado la toxina botulínica y el portador cargado positivamente para combinarse al momento o antes de la aplicación. La cantidad del portador cargado positivamente o la relación de concentración de estas moléculas con respecto a la toxina botulínica dependerá de qué portador se elija para usar en la composición en cuestión. La cantidad o relación apropiada de la molécula portadora en un caso dado se puede determinar fácilmente, por ejemplo, al realizar uno o más experimentos tales como los descritos a continuación.

[0072] En general, la invención también contempla un método para administrar toxina botulínica (alternativamente como complejos de toxina botulínica o complejos reducidos de toxina botulínica) a un sujeto o paciente que lo necesite, en el que se administra una cantidad efectiva de toxina botulínica junto con un portador cargado positivamente, tal como se describe en este documento. Se entiende por “junto con” que los dos componentes (toxina botulínica y portador cargado positivamente) se administran en un procedimiento de combinación, que puede implicar combinarlos antes de la administración a un sujeto, o administrarlos por separado, pero de una manera que actúen para proporcionar la administración requerida de una cantidad efectiva de la proteína terapéutica. Por ejemplo, una composición que contiene el portador cargado positivamente se puede administrar primero a la piel del sujeto, seguido de la aplicación de un parche para la piel, una jeringa u otro dispositivo que contenga la toxina botulínica. La toxina botulínica puede almacenarse en forma seca en una jeringa u otro dispositivo dispensador y el portador cargado positivamente puede inyectarse antes de la aplicación de la toxina de manera que los dos actúen juntos, dando como resultado la potenciación deseada de la penetración del tejido. En ese sentido, por lo tanto, las dos sustancias (portador cargado positivamente y toxina

botulínica) actúan en combinación o quizás interactúan para formar una composición o combinación *in situ*. Por consiguiente, la invención también incluye un kit con un dispositivo para dispensar toxina botulínica y un líquido, gel o algo similar que contiene el portador cargado positivamente y que es adecuado para inyectar a la piel o al tejido objetivo de un sujeto. Los kits para administrar las composiciones de las invenciones, ya sea bajo la dirección de un profesional de la salud o por el paciente o el sujeto, también pueden incluir un aplicador personalizado adecuado para ese propósito.

[0073] Las composiciones de esta invención son adecuadas para uso en entornos fisiológicos con un pH que varía de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,3 y, por lo tanto, pueden tener dicho pH. Sin embargo, las composiciones que tienen un pH que varía de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5 también están abarcadas por la invención como se describe en este documento. Las composiciones de acuerdo con esta invención se pueden almacenar a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración.

[0074] En algunas realizaciones, el paciente a ser tratado tiene 65 años de edad, al menos 65 años de edad o más de 65 años de edad. Por ejemplo, el paciente puede tener 65, 66, 68, 70, 75, 80 años o más.

EJEMPLOS

[0075] **Ejemplo 1**

[0076] Este ejemplo es un estudio clínico abierto, secuencial, que aumenta la dosis de DaxibotulinumtoxinA Inyectable (RT002) para tratar la distonía cervical aislada que va de moderada a severa, un trastorno del movimiento del cuello, en adultos. En múltiples sitios en los Estados Unidos, se inscribieron treinta y siete sujetos con distonía cervical que va de moderada a severa. La primera cohorte del ensayo de 12 sujetos recibió una única dosis de hasta 200 unidades de RT002 inyectable, la segunda cohorte de 12 sujetos recibió entre 200 y 300 unidades y la tercera cohorte de 13 sujetos recibió de 300 a 450 unidades. El estudio mostró resultados positivos de eficiencia y que el RT002 fue generalmente seguro y bien tolerado.

[0077] Todos los sujetos fueron monitoreados hasta que regresaron al valor inicial o hasta un total de 24 semanas después del tratamiento. Debido a la larga duración del efecto visto en la

primera cohorte, los sujetos en la segunda y tercera cohorte tuvieron la opción de continuar. Varios pacientes eligieron permanecer en el estudio y serán monitoreados hasta por 36 semanas.

[0078] El criterio de valoración principal de eficiencia del estudio de Fase 2 fue una mejora en los síntomas de distonía medidos por el cambio (reducción) desde el valor inicial en la calificación total de la Escala de Toronto Western para la Tortícolis Espasmódica (TWSTRS) a las cuatro semanas. TWSTRS es una escala compuesta validada que cubre diferentes características de la condición de distonía cervical. La primera parte de la escala se basa en los hallazgos físicos y la gravedad de la distonía, la segunda parte califica el nivel percibido de discapacidad del paciente y la tercera parte califica el dolor asociado con la afección. El protocolo del estudio también presenta una serie de criterios de valoración de eficiencia secundarios.

[0079] En resumen, los objetivos del estudio fueron:

- evaluar la seguridad y la eficiencia preliminar de RT002 para inyección en sujetos con distonía cervical aislada y
- evaluar la duración del efecto de RT002 para inyección en el tratamiento de la distonía cervical aislada.

[0080] El criterio de valoración principal fue:

- mejora de la distonía, medida por el cambio desde el valor inicial en la calificación total de TWSTRS en la semana 4 (TWSTRS = Escala de Toronto Western para la Tortícolis Espasmódica).

[0081] Los criterios de valoración secundarios fueron:

- cambio desde el valor inicial en la calificación total de TWSTRS;
- cambio desde el valor inicial en la calificación de la subescala de TWSTRS: (es decir, escala de gravedad TWSTRS, escala de discapacidad TWSTRS y escala de dolor TWSTRS);
- duración del efecto, evaluado por el número de semanas desde el tratamiento hasta el regreso de los síntomas que justifican el tratamiento, considerado al momento que un sujeto alcanza o excede su calificación total objetivo de TWSTRS, o el sujeto expresa la necesidad de tratamiento y el investigador acepta que es necesario;

- porcentaje de encuestados que muestran mejoría en CGIC (impresión clínica global de cambio); y

- calidad de vida clasificada por el paciente, medida por el cambio desde el valor inicial en la calificación total de CDIP-58 (perfil de impacto de la distonía cervical-58) (todos los intervalos posteriores al tratamiento).

[0082] RESULTADOS DE PRIMERA LÍNEA DE 24 SEMANAS:

[0083] DURACIÓN DEL EFECTO AL MENOS 24 SEMANAS: La duración media del efecto fue de al menos 24 semanas para cada una de las tres cohortes de dosis estudiadas. La duración del efecto se definió como el número de semanas desde el tratamiento hasta el regreso de los signos y síntomas que justifican el retratamiento, según los sujetos que alcanzaron su calificación objetiva de la Escala de Toronto Western para la Tortícolis Espasmódica (TWSTRS). Como referencia, el tratamiento actual de la distonía cervical requiere la inyección de toxina botulínica aproximadamente cada 3 meses (12 semanas) o 4 veces al año.

[0084] RESULTADOS DE EFICIENCIA POSITIVA: La medición principal de eficacia de 4 semanas del ensayo fue la mejoría en los signos y síntomas de la distonía cervical según lo determinado por la reducción de la calificación total de TWSTRS desde el valor inicial. En la semana 4, el inyectable RT002 mostró una reducción media clínicamente significativa del 38 % desde el valor inicial en las tres cohortes. Esta reducción continuó aumentando al 50 % en la semana 6 para todos los sujetos, fue del 42 % en la semana 12 y se mantuvo en o por encima del 30 % hasta la semana 24. Como referencia, los ensayos controlados con placebo para productos de toxina botulínica del tipo A aprobados para tratar la distonía cervical tuvieron una reducción en la calificación total de TWSTRS desde el valor inicial del 21% al 26% en la semana 4 y del 13% al 16% en la semana 12.

[0085] En el criterio de valoración secundario clave, el porcentaje de respondedores que muestran mejoría en la impresión clínica global de cambio (CGIC), el 97% de todos los sujetos experimentaron una mejoría en los síntomas de distonía cervical en la semana 4.

[0086] GENERALMENTE SEGURO Y BIEN TOLERADO: En las tres cohortes, el inyectable RT002 parecía ser generalmente seguro y bien tolerado hasta la semana 24. No hubo eventos adversos graves ni aumento de dependencia de dosis en eventos adversos. Los eventos adversos relacionados con el tratamiento fueron generalmente transitorios y de gravedad leve a moderada, con un caso de dolor de cuello reportado como severo. Los eventos adversos más

comunes fueron disfagia o dificultad para tragar (14%), de los cuales todos los casos fueron de gravedad leve, enrojecimiento en el sitio de inyección (8%), hematomas en el sitio de inyección (5%), dolor en el sitio de inyección (5%), tensión muscular (5%) y debilidad muscular (5%). Como referencia, los ensayos para productos de toxina botulínica del tipo A aprobados para tratar la distonía cervical tienen eventos adversos para la disfagia que van del 13% al 39%.

[0087] Los pacientes con distonía cervical sufren de dolor y debilitamiento considerables, lo que afecta drásticamente su calidad de vida. Casi todos los sujetos en este estudio respondieron al tratamiento y la mayoría seguía respondiendo a RT002 a las 24 semanas. Las FIGURAS 1-8 proporcionan datos adicionales sobre el diseño del estudio y los resultados.

[0088] **El resumen de seguridad del estudio:** RT002 parecía ser generalmente seguro y bien tolerado hasta la semana 24 en todos los grupos de dosis evaluados, sin aumento en los eventos adversos durante el tratamiento (TEAE) tras el aumento de la dosis.

[0089] Total de 22 TEAE relacionados con el tratamiento informados en 13 de 37 sujetos (35%).

[0090] - Informe más frecuente: disfagia (14%), eritema en el sitio de inyección (8%), hematomas en el sitio de inyección (5%), dolor en el sitio de inyección (5%), tensión muscular (5%) y debilidad muscular (5%).

[0091] - Todos los TEAE fueron de gravedad leve o moderada, excepto un caso de dolor de cuello reportado como severo (inicio del día 10, duración de 2 días).

[0092] No hubo eventos graves reportados.

[0093] Todos los TEAE relacionados con el tratamiento de especial interés se resolvieron con tasas de incidencia similares o menores en comparación con estudios previos de BoNTA (ensayos de otros productos BoNTA aprobados para tratar la DC tienen tasas de disfagia que van del 13 al 39%; incluye BOTOX, Dysport y Xeomin. Datos que se informan en la información de prescripción del producto).

[0094] - Disfagia: 14% (5/37; todos leves); duración promedio 35 días.

[0095] - Debilidad muscular: 5% (2/37; 1 leve, 1 moderado), ambos locales

[0096] - Dolor de cuello: 3% (1/37; grave)

[0097] El resumen de eficiencia del estudio:

[0098] Duración del efecto: La duración media del efecto, definida como sujetos que mantienen al menos el 20% del beneficio del tratamiento alcanzado en la semana 4 (calificación objetivo de TWSTRS), fue > 24 semanas para cada una de las 3 cohortes estudiadas.

[0099] - al analizarse mediante los grupos de dosis A y B, la duración media del efecto fue > 24 semanas para ambos grupos.

[00100] Mejora en los signos y síntomas de la DC: Se observó una reducción clínicamente significativa desde el valor inicial en la calificación total de TWSTRS del 38% en la semana 4 en todos los sujetos.

[00101] - la mejoría desde el valor inicial alcanzó un máximo del 50% en la semana 6 y la mayoría de este beneficio en el tratamiento se mantuvo en > 30% hasta la semana 24.

[00102] Tasa de respuesta de impresión global de cambio: El 97% de todos los sujetos experimentaron una mejoría (calificación > 1) en la semana 4 en sus síntomas de distonía cervical según lo evaluado por la impresión clínica global de cambio (CGIC).

[00103] En una realización preferida de esta invención, la composición inyectable de la invención contiene toxina botulínica A y un portador cargado positivamente que comprende un polipéptido de polilisina cargado positivamente que tiene uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente unidos covalentemente, llamado RT002. El producto RT002 es una formulación inyectable, que contiene la molécula de toxina botulínica del subtipo A de 150 kD, que no está asociada covalentemente con un péptido portador cargado positivamente que tiene la fórmula RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEC ID NO: 4) y que no contiene proteínas accesorias o componentes derivados de animales del método preferido de esta invención, se administra un único tratamiento (una vez) por inyección de RT002 para el tratamiento de la distonía cervical, opcionalmente en diferentes ubicaciones musculares en el cuello de un sujeto. La dosis del tratamiento preferida es más de 100 U, 100-200U, 200-300U y 300-450 U, de RT002. El producto RT002 está compuesto de neurotoxina botulínica purificada de 150 kDa, denominada RTT150, formulada en un polvo liofilizado. En estudios no clínicos, se ha demostrado que el RT002 muestra menos dispersión que otras formas de neurotoxina botulínica

A (BoNTA) y puede ofrecer más control del efecto en sitios objetivo con menos efectos secundarios debido a la diseminación distante de la toxina a los músculos vecinos. Además, la formulación de toxina botulínica del tipo A libre de aditivos RT002 tiene la capacidad de proporcionar menos potencial inmunogénico debido a la ausencia de proteínas no activas presentes en la formulación. Además, el RT002 fue bien tolerado después de la administración intramuscular de dosis repetidas de hasta 50 U / kg en ratas.

[00104] Régimen de dosificación y técnica de inyección: El régimen de dosificación preferido de RT002 de esta invención es un tratamiento único de RT002 (dosificado hasta 100 U, 100-200 U, 200-300 U o 300-450 U por sujeto, como una inyección intramuscular de 0,1 ml en sitios de inyección en el cuello del sujeto sometido a tratamiento.

[00105] La dispersión reducida del RT002 es consistente con estudios no clínicos y previos y soporta una diseminación reducida de la toxina, tal como se observa en sujetos tratados con composiciones de la invención los cuales contienen toxina botulínica, tal como la toxina botulínica A y un portador cargado positivamente que comprende una cadena principal, tal como la polilisina, con uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente unidos covalentemente tal como se describe en el presente documento, como por ejemplo, el RT002.

[00106] Dosis y duración del efecto: Sin desear ser limitante, los resultados del análisis intermedio soportan una selección de dosis de más de 100U como una dosis óptima para un único tratamiento con las composiciones que contienen botulino de la invención, con base en las tasas de respuesta altas, la duración del efecto y el perfil de seguridad positivo. Además, las composiciones de la invención, tales como el RT002, tienen un efecto de duración sostenida y duradera, por ejemplo, durante al menos 6 meses, después de la administración por inyección a un sujeto. La duración del efecto proporcionado por las composiciones de la invención, tales como el RT002, así como los métodos de tratamiento y sus usos, proporcionan ventajas en que los sujetos sometidos a tratamiento consideran que la duración del efecto después del tratamiento es de gran importancia para ellos. Una duración prolongada y sostenida del efecto, conseguida particularmente por una sola dosis o una sola de inyección del producto, es decir, RT002, permite menos inyecciones por tratamiento para un sujeto, lo cual es importante para la comodidad, conveniencia y bienestar general del sujeto. Un producto que proporciona efectos significativos y sostenidos, que se mantiene durante al menos un período de 6 meses después de una única

dosis del tratamiento por inyección del producto a un sujeto proporciona una solución a una necesidad que no se ha logrado en la técnica tanto para médicos como para pacientes.

[00107] Se entiende que los siguientes ejemplos y realizaciones descritos en este documento son para fines ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los expertos en la materia y se incluirán dentro del espíritu y ámbito de esta aplicación y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

[00108] Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes publicadas que se citan en este documento se incorporan aquí por referencia en su totalidad para todos los efectos.