

FORMULACIONES INYECTABLES DE TOXINA BOTULÍNICA Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS QUE TIENEN UNA ALTA TASA DE RESPUESTA Y UNA LARGA DURACIÓN DEL EFECTO

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

5 La solicitud reclama el beneficio de la prioridad a la solicitud de patente provisional estadounidense núm. 62/594,529, titulada "Injectable Botulinum Toxin Formulations and Methods of Use Thereof Having High Response Rate and Long Duration of Effect" de Rubio, presentada el 4 de diciembre de 2017 y reclama el beneficio de la prioridad a la solicitud de patente provisional estadounidense núm. 62/774,850, titulada "Injectable Botulinum Toxin Formulations and Methods of Use Thereof Having High Response Rate and
10 Long Duration of Effect" de Rubio, presentada el 3 de diciembre de 2018, ambas incorporadas en la presente en su totalidad.

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere a composiciones inyectables que comprenden toxina botulínica que pueden administrarse a un sujeto para diversos fines terapéuticos, estéticos y/o cosméticos. Las composiciones inyectables y los métodos en los que se usan estas composiciones proporcionan tratamientos ventajosos que resultan en altas tasas de respuesta y una larga duración del efecto, por ejemplo, una duración del efecto de 26 a 40 semanas, así como tasas de respuesta aún más altas y/o más larga duración del efecto después de tratamientos subsecuentes.

20

Antecedentes de la invención

La piel protege los órganos del cuerpo de las amenazas ambientales externas y actúa como un termostato para mantener la temperatura corporal. Se compone de varias capas diferentes, cada una con funciones especializadas. Las capas principales incluyen la epidermis, la dermis y la hipodermis. La
25 epidermis es una capa estratificadora de células epiteliales que recubre la dermis, que consiste en tejido conectivo. Tanto la epidermis como la dermis están apoyadas por la hipodermis, una capa interna de tejido adiposo.

La epidermis, la capa superior de la piel, tiene un grosor de solo 0.1 a 1.5 milímetros (Inlander, Skin, New York, N.Y.: *People's Medical Society*, 1-7 (1998)). Se compone de queratinocitos y se divide en
30 varias capas en función de su estado de diferenciación. La epidermis puede clasificarse en el estrato córneo y la epidermis viable, que consiste en las células basales y de Malpighi granulares. El estrato córneo es higroscópico y requiere al menos 10 % de humedad en peso para mantener su flexibilidad y suavidad. La higroscopicidad es atribuible en parte a la capacidad de la queratina de retener agua. Cuando la capa córnea pierde su suavidad y flexibilidad, se vuelve áspera y quebradiza, dando como resultado una piel
35 seca.

La dermis, que se encuentra justo debajo de la epidermis, tiene un grosor de 1.5 a 4 milímetros. Es la más gruesa de las tres capas de la piel. La mayoría de las estructuras de la piel, incluidas las glándulas sudoríparas y grasas (que secretan sustancias a través de aberturas en la piel llamadas poros o

comedones), folículos pilosos, terminaciones nerviosas y vasos sanguíneos y linfáticos se encuentran en la dermis (Inlander, Skin, New York, N.Y.: *People's Medical Society*, 1-7 (1998)). Sin embargo, los componentes de la dermis son colágeno y elastina.

La hipodermis es la capa de la piel más profunda. Actúa como un aislante para la conservación del calor corporal y como un amortiguador para la protección de los órganos (Inlander, Skin, New York, N.Y.: *People's Medical Society*, 1-7 (1998)). Además, la hipodermis también almacena grasa para reservas de energía. El pH de la piel normalmente está entre 5 y 6. Esta acidez se debe a la presencia de aminoácidos anfóteros, ácido láctico y ácidos grasos de las secreciones de las glándulas sebáceas. El término "manto ácido" se refiere a la presencia de sustancias solubles en agua en la mayoría de las regiones de la piel. La capacidad de amortiguación de la piel se debe en parte a estas secreciones almacenadas en la capa córnea de la piel.

Las arrugas, uno de los signos reveladores del envejecimiento, pueden ser causadas por cambios bioquímicos, histológicos y fisiológicos que se acumulan a partir del daño ambiental a la piel. (Benedetto, *International Journal of Dermatology*, 38:641-655 (1999)). Además, existen otros factores secundarios que pueden causar pliegues, surcos y dobleces característicos de las arrugas faciales (Stegman et al., *The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery*, 2nd ed., St. Louis, Mo.: Mosby Year Book: 5-15 (1990)). Estos factores secundarios incluyen la fuerza de gravedad constante, la presión posicional frecuente y constante sobre la piel (p. ej., durante el sueño) y los movimientos faciales repetidos causados por la contracción de los músculos faciales (Stegman et al., *The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery*, 2nd ed., St. Louis, Mo.: Mosby Year Book: 5-15 (1990)).

Se han utilizado diferentes técnicas para mitigar potencialmente algunos de los signos del envejecimiento. Estas técnicas van desde humectantes faciales que contienen ácidos alfa hidroxí y retinol hasta procedimientos quirúrgicos e inyecciones de neurotoxinas. Por ejemplo, en 1986, Jean y Alastair Carruthers, un equipo formado por un cirujano oculoplástico y un dermatólogo, desarrollaron un método para usar la forma tipo A de la toxina botulínica para el tratamiento de las arrugas asociadas al movimiento en el área de la glabella (Schantz and Scott, In Lewis G. E. (Ed) *Biomedical Aspects of Botulinum*, New York: Academic Press, 143-150 (1981)). El uso de la forma tipo A de toxina botulínica de los Carruthers para el tratamiento de arrugas condujo a la publicación seminal de este enfoque en 1992 (Schantz and Scott, In Lewis G. E. (Ed) *Biomedical Aspects of Botulinum*, New York: Academic Press, 143-150 (1981)). Para 1994, el mismo equipo reportó experiencias con otras arrugas asociadas con el movimiento en la cara (Scott, *Ophthalmol*, 87:1044-1049 (1980)). Esto a su vez llevó al nacimiento de la era del tratamiento cosmético utilizando la forma de tipo A de la toxina botulínica.

Se informa que la forma tipo A de la toxina botulínica es el agente biológico natural más letal conocido por el hombre. Las esporas *Clostridium botulinum* se encuentran en el suelo y pueden crecer en contenedores de alimentos esterilizados y sellados incorrectamente. El botulismo, que puede ser fatal, puede ser causado por la ingesta de la bacteria. La toxina botulínica actúa para producir parálisis de los músculos, previniendo la transmisión sináptica al inhibir la liberación de la acetilcolina a través de la unión neuromuscular y se cree que actúa también de otras maneras. Su acción bloquea esencialmente las

señales que normalmente causarían espasmos o contracciones musculares, lo que resulta en parálisis. Durante la última década, la actividad paralizadora muscular de la toxina botulínica se ha aprovechado para lograr una variedad de efectos terapéuticos. La administración controlada de la toxina botulínica se ha utilizado para proporcionar parálisis muscular para tratar una variedad de afecciones médicas, por ejemplo, trastornos neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. Las afecciones que se han tratado con toxina botulínica incluyen espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica de inicio en adultos, fisura anal, blefaroespasmo, parálisis cerebral, distonía cervical, dolores de cabeza tipo migraña, estrabismo, trastorno de la articulación temporomandibular y varios tipos de calambres y espasmos musculares. Más recientemente, los efectos paralizantes musculares de la toxina botulínica se han aplicado a aplicaciones faciales terapéuticas y cosméticas, como el tratamiento de arrugas, líneas de expresión y otros resultados de espasmos o contracciones de los músculos faciales.

Además de la forma tipo A de la toxina botulínica, existen otras siete formas serológicamente distintas de toxina botulínica que también son producidas por la bacteria grampositiva *C. botulinum*. De estos ocho tipos de toxina botulínica serológicamente distintos, los siete que pueden causar parálisis han sido designados como serotipos de toxina botulínica A, B, C, D, E, F y G. Cada uno de estos se distingue por la neutralización con anticuerpos específicos de tipo. Los diferentes serotipos de toxina botulínica varían en el efecto y en la gravedad y duración de la parálisis que evocan en diferentes especies animales. Por ejemplo, en ratas, se ha determinado que la toxina botulínica tipo A es 500 veces más potente que la toxina botulínica tipo B, medida por la tasa de parálisis. Además, se ha determinado que la toxina botulínica tipo B no es tóxica en primates a una dosis de 480 U/kg, aproximadamente 12 veces la LD₅₀ en primates para el tipo A.

Liberada por la bacteria *C. botulinum*, la toxina botulínica es un componente de un complejo de toxinas que contiene la molécula de proteína de toxina botulínica de aproximadamente 150 kD junto con proteínas no tóxicas asociadas. Se cree que estas proteínas endógenas no tóxicas incluyen una familia de proteínas hemaglutininas, así como proteínas no hemaglutininas. Se ha informado que las proteínas no tóxicas estabilizan la molécula de toxina botulínica en el complejo de toxinas y la protegen contra la desnaturalización por los ácidos digestivos cuando se ingiere el complejo de toxinas. Por consiguiente, las proteínas no tóxicas del complejo de toxinas protegen la actividad de la toxina botulínica y de ese modo mejoran la penetración sistémica cuando el complejo de toxinas se administra a través del tracto gastrointestinal. Adicionalmente, se cree que algunas de las proteínas no tóxicas estabilizan específicamente la molécula de la toxina botulínica en la sangre.

La presencia de proteínas no tóxicas en los complejos de toxinas típicamente hace que los complejos de toxinas tengan pesos moleculares mayores que los de la molécula de toxina botulínica sola. La proteína de la toxina botulínica de peso molecular en sí es de aproximadamente 150 kD, aunque los diferentes complejos de serotipos varían en tamaño. Por ejemplo, la bacteria *C. botulinum* puede producir complejos de toxina botulínica tipo A que tienen pesos moleculares de aproximadamente 900 kD, 500 kD o 300 kD. Las toxinas botulínicas tipos B y C se producen como complejos que tienen un peso molecular de aproximadamente 700 kD o aproximadamente 500 kD. La toxina botulínica tipo D se produce como

complejos que tienen pesos moleculares de aproximadamente 300 kD o 500 kD. Las toxinas botulínicas tipos E y F solo se producen como complejos que tienen un peso molecular de aproximadamente 300 kD.

Para proporcionar estabilidad adicional a la toxina botulínica, los complejos de toxina se estabilizan convencionalmente combinando 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 toxina botulínica tipo A con proteínas accesorias, 0.5 miligramos de albúmina humana y 0.9 miligramos de cloruro de sodio.

Debido al tamaño de la molécula y la estructura molecular de la toxina botulínica, por sí sola no cruza el estrato córneo de la piel y las múltiples capas de la arquitectura subyacente de la piel. Por consiguiente, la toxina botulínica se administra típicamente a pacientes mediante inyección de composiciones que contienen complejo de toxina botulínica y albúmina. Sin embargo, existen varios problemas asociados con este enfoque. 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 desde estos pozos subdérmicos para causar parálisis no deseada en las áreas circundantes del cuerpo. Este problema se agrava cuando el área a tratar es grande y se requieren muchas inyecciones de toxina para tratar el área. Además, debido a que los complejos de toxinas inyectadas contienen proteínas y albúmina que no son toxinas que estabilizan la toxina botulínica y aumentan el peso molecular del complejo de toxinas, los complejos de toxinas tienen una vida media larga en el cuerpo y pueden causar una respuesta antigénica indeseable en el paciente. Por ejemplo, algunos pacientes desarrollarán, a lo largo del tiempo, una reacción alérgica a la albúmina utilizada como estabilizador en las formulaciones comerciales actuales. Además, los complejos de toxina pueden inducir al sistema inmunitario del paciente a formar anticuerpos neutralizantes, de modo que se requieren mayores cantidades de toxina en administraciones subsecuentes para lograr el mismo efecto. Cuando esto ocurre, las inyecciones subsecuentes deben colocarse cuidadosamente para que no liberen una gran cantidad de toxina en el torrente sanguíneo del paciente, lo que podría llevar a una intoxicación sistémica fatal. Las formulaciones que contienen albúmina introducen el riesgo, por ejemplo, de una respuesta adversa a la albúmina, como un mayor riesgo de respuesta alérgica, así como el riesgo de contaminación de patógenos para ciertas fuentes de sangre.

En vista de los inconvenientes asociados con los tratamientos actuales y las formulaciones actuales de toxina botulínica, sería altamente deseable tener una formulación inyectable de toxina botulínica que sea eficaz y estable, pero que exhiba una antigenicidad reducida y una menor tendencia a difundirse localmente después de la inyección. Sería deseable también usar dicha formulación de toxina botulínica con fines terapéuticos y/o cosméticos, en particular, un tratamiento estable y de acción más prolongada que requiera menos intervenciones que produzcan tasas de respuesta elevadas y mejoradas sin un aumento de los efectos secundarios.

Breve descripción de la invención

La invención se refiere a métodos de uso de las formulaciones inyectables de toxina botulínica para

la administración a un individuo para lograr un beneficio terapéutico y/o cosmético que tiene una tasa de respuesta sorprendentemente alta y una larga duración del efecto.

En un aspecto, esta invención proporciona composiciones inyectables que comprenden toxina botulínica asociada no covalentemente con un portador cargado positivamente. En modalidades preferidas, las composiciones de la invención poseen una o más ventajas sobre las formulaciones comerciales convencionales de toxina botulínica, tales como BOTOX® o MYOBLOC®. Por ejemplo, en algunas modalidades, las composiciones pueden exhibir una o más ventajas sobre las formulaciones inyectables de toxina botulínica convencionales, que incluyen una antigenicidad reducida, una tendencia reducida a la difusión en el tejido circundante después de la inyección, una mayor duración de la eficacia clínica o una potencia mejorada en comparación con las formulaciones convencionales.

En modalidades preferidas, el componente de toxina botulínica comprende la toxina botulínica del serotipo A que tiene un peso molecular de 150 kDa. El componente de toxina botulínica puede seleccionarse de un complejo de toxina botulínica (incluida la neurotoxina de 150 kD con proteínas accesorias encontradas en complejos nativos producidos por *C. botulinum*), un complejo de toxina botulínica reducida (incluida la neurotoxina de 150 kD con algunas, pero no todas, las proteínas accesorias nativas) y la propia molécula de toxina botulínica de 150 kD sin proteínas accesorias (no tóxicas).

En modalidades preferidas, ciertas moléculas no nativas (es decir, moléculas que no se encuentran en los complejos de toxina botulínica obtenidos de la bacteria *Clostridium botulinum*) se agregan a la toxina botulínica, a los complejos de toxina botulínica y, en particular, a los complejos reducidos de toxina botulínica (como se define en la presente), para mejorar la difusión de las toxinas a través de los tejidos. Las moléculas no nativas se asocian de forma no covalente con la toxina y actúan como potenciadores de la penetración que mejoran la capacidad de la toxina para alcanzar las estructuras blanco 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 potenciadores de penetración pueden ser portadores cargados positivamente, tales como péptidos catiónicos, que no tienen actividad inherente a la toxina botulínica y que también contienen uno o más dominios de transducción de proteínas como se describe en la presente.

De acuerdo con la invención, el portador cargado positivamente es adecuado como sistema de transporte para la toxina botulínica sin modificación covalente de la molécula de la toxina, lo que permite que la toxina se inyecte con características mejoradas, que incluyen una duración de acción más larga y una tasa de respuesta más alta en comparación con las composiciones de toxina botulínica sin el portador cargado positivamente. El portador cargado positivamente comprende una estructura principal cargada positivamente, a la que están covalentemente unidos grupos de eficiencia (también denominados dominios de transducción de proteínas (PTD, por sus siglas en inglés) o péptidos penetrantes en las células (CPP, por sus siglas en inglés)), más preferiblemente en uno o ambos extremos de la estructura. En ciertas modalidades, los grupos de eficiencia son las secuencias de aminoácidos del grupo que consiste en HIV-TAT o fragmentos de los mismos; el PTD de Antennapedia o un fragmento del mismo; $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ (SEQ ID NO: 5) en el que el subíndice $n1$ es un número entero de 0 hasta aproximadamente 20 y $n2$ es independientemente un número entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25; o $(\text{gly})_p-$

RGRDDRRQRRR-(gly)_q (SEQ ID NO: 1), (gly)_p-YGRKKRRQRRR-(gly)_q (SEQ ID NO: 2), o (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q (SEQ ID NO: 3), en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de 0 a aproximadamente 20. En una modalidad particularmente preferida, el portador cargado positivamente tiene la secuencia de aminoácidos RKKRRQRRRG- (K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4) (denominado también en la presente "RTP004"). En otras modalidades adicionales, el portador cargado positivamente tiene la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR- G-(K)₁₅-G-YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 7), RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅-G- RGRDDRRQRRR (SEQ ID NO: 8), o RKKRRQRRR-Q-(K)₁₅-Q-RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 11).

En algunas modalidades, el portador se proporciona en la composición que contiene toxina botulínica en una cantidad de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 1 µg por U del componente de toxina botulínica, preferiblemente de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 µg por U, más preferiblemente de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.35 µg por U a aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.3 µg por U y más preferiblemente aproximadamente 0.234 µg por unidad de toxina botulínica. Por ejemplo, la composición que contiene toxina botulínica puede contener de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 µg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 µg, de aproximadamente 7 a aproximadamente 12 µg, o de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 µg del portador. En una modalidad, la toxina botulínica está en una cantidad de dosificación seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 20 U a aproximadamente 60 U y el portador es un portador cargado positivamente presente en la composición en una cantidad seleccionada de aproximadamente 4.7 a aproximadamente 14 µg, para proporcionar una relación de aproximadamente 0.234 µg/U de toxina botulínica.

En algunas modalidades, el excipiente de la composición que contiene toxina botulínica comprende uno o más componentes estabilizadores adicionales seleccionados del grupo que consiste en L-histidina, clorhidrato de L-histidina, polisorbato 20 y dihidrato de trehalosa.

En algunas modalidades particularmente preferidas, el excipiente comprende dihidrato de trehalosa. Por ejemplo, por un vial de 50 U, el excipiente puede comprender de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 40 mg o aproximadamente 34 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 36 mg, aproximadamente 37 mg, aproximadamente 38 mg, aproximadamente 39 mg o aproximadamente 40 mg de trehalosa. En algunas modalidades particularmente preferidas, el excipiente comprende polisorbato 20. Por ejemplo, por un vial de 50 U, el excipiente puede comprender de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 1 mg, de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.5 mg, de aproximadamente 0.075 mg a aproximadamente 0.25 mg, de aproximadamente 0.08 mg a aproximadamente 0.15 mg o aproximadamente 0.09 mg, aproximadamente 0.095 mg, aproximadamente 0.1 mg, aproximadamente 0.105 mg, aproximadamente 0.11 mg, aproximadamente 0.12 mg, aproximadamente 0.13 mg, aproximadamente 0.14 mg o aproximadamente 0.15 mg de polisorbato 20. En una modalidad particularmente preferida, por 50 U, el excipiente contiene aproximadamente 36 mg de trehalosa y aproximadamente 0.1 mg de polisorbato 20.

En una modalidad particularmente preferida, denominada como "RT002," la composición es una

formulación inyectable, que contiene la molécula de toxina botulínica del subtipo A de 150 kD, asociada de forma no covalente con un péptido portador cargado positivamente que tiene la fórmula RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4), y que no contiene proteínas accesorias o componentes derivados de animales y se describe en el documento WO 2010/151840 (PCT/US2010/040104) de Thompson *et al.*,
 5 “Formulaciones de toxina botulínica libres de albúmina.” Véase también, Stone *et al.*, 2011, “Characterization and duration of action of a new botulinum toxin type A formulation” *Toxicon*, 58:159-167; Garcia-Murray, “Safety and efficacy of RT002, an injectable botulinum toxin type A, durante treating glabellar lines: results of a phase 1/2, open-label, sequential dose-escalation study” *Dermatol Surg.* 2015 Jan; 41 Suppl 1:S47-55 y Carruthers, *et al.*, Injectable DaxibotulinumtoxinA durante the Treatment of
 10 Glabellar Lines: A Phase 2, Randomized, Dose- Ranging, Double-Blind, Multicenter Comparison with Onabotulinumtoxin A and Placebo. *Dermatol. Surg.* 2017; 43: 1321-1331, que describe la formulación RT002; así como el documento WO 2017/075468 (PCT/US2016/059492) de Ruegg *et al.*, titulado “Formulaciones inyectables de toxina botulínica y métodos de uso de la misma, que tiene larga duración de efecto terapéutico o cosmético”; solicitud internacional PCT de Ruegg titulada “Composiciones, kits y
 15 métodos de la toxina botulínica transmucosa para tratar los trastornos de la vejiga” presentada el 28 de agosto de 2018; la solicitud internacional PCT/US2018/059265, de Rubio titulada “Formulaciones de toxina botulínica y métodos de uso de la misma en la fascitis plantar”, presentada el 5 de noviembre de 2018 y la solicitud internacional PCT/US18/33397, de Ruegg titulada “Métodos de tratamiento para la distonía cervical”, presentada el 18 de mayo de 2018; cada uno incorporado por referencia en la presente en su
 20 totalidad. RT002 se proporciona generalmente en forma liofilizada, en un vial de 50 U de toxina botulínica A de 150 kDa, sin proteínas accesorias (no tóxicas), que contiene 0.1 mg de polisorbato 20, 36 mg de trehalosa y 11.7 µg de RTP004 como portador, para dar un relación de masa de péptido:toxina de 51,000:1 en el vial de 50 U.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir un efecto biológico inyectando
 25 una cantidad terapéutica o cosméticamente eficaz de una composición de la invención a un sujeto en necesidad de la misma. El efecto biológico puede incluir, por ejemplo, parálisis muscular u otro efecto conocido por la administración de toxina botulínica. Tales efectos incluyen, por ejemplo, uno o más de tratamiento del dolor neurológico, dolor de cabeza o dolor de cabeza tipo migraña, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica de inicio en adultos, fisura anal, blefaroespasma, parálisis cerebral, estrabismo,
 30 trastorno de la articulación temporomandibular, acné, distonía, contracciones distónicas, hiperhidrosis o hipersecreción de una glándula controlada por el sistema nervioso colinérgico; tratamiento o manejo de rinitis, sinusitis, vejiga hiperactiva, distonía cervical, fascitis plantar; reducción de espasmos musculares y reducción o mejora de una respuesta inmune. En ejemplos particulares, el efecto es una reducción en la gravedad de las arrugas, líneas finas, surcos, particularmente en la cara, tal como una reducción en la
 35 gravedad de las líneas glabellares, también conocidas como líneas de expresión.

Los métodos y composiciones descritos en la presente proporcionan el componente de toxina botulínica en una cantidad eficaz para producir al menos un efecto biológico deseado. En ciertas modalidades, la toxina botulínica se administra de aproximadamente 1 U a aproximadamente 300 U,

preferiblemente de aproximadamente 10 U a aproximadamente 200 U, más preferiblemente de aproximadamente 20 U a aproximadamente 100 U o de aproximadamente 20 U a aproximadamente 60 U. En modalidades preferidas, la toxina botulínica está en una cantidad de dosificación seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 10 U, aproximadamente 20 U, aproximadamente 30 U, aproximadamente 40 U, aproximadamente 60 U, y aproximadamente 80 U, preferiblemente aproximadamente 40 U.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para administrar toxina botulínica a un sujeto para lograr un efecto de duración prolongada con respecto a un beneficio terapéutico o cosmético deseado para el sujeto. En un ejemplo particular, la invención proporciona un método de administración de toxina botulínica para lograr un efecto de duración prolongada en la reducción de las líneas glabellares de un individuo. En algunas modalidades, el método comprende administrar mediante inyección una dosis de una composición inyectable estéril en uno o más músculos asociados con líneas glabellares para lograr el efecto de duración prolongada después del tratamiento, es decir, eficacia sostenida o una tasa de respuesta de larga duración, después del tratamiento. Por ejemplo, en algunas modalidades, la administración de las composiciones de toxina botulínica resulta en una duración de efecto mejorada, tal como una mejora en las líneas glabellares que dura más que el tratamiento con formulaciones convencionales de toxina botulínica, extendiendo de esta manera los intervalos de tratamiento. Las modalidades preferidas proporcionan una mejora en la gravedad de la línea glabellar durante al menos aproximadamente 3 meses a aproximadamente 11 meses, aproximadamente 5 meses a aproximadamente 10 meses, aproximadamente 6 meses a aproximadamente 10 meses o aproximadamente 28 semanas a aproximadamente 40 semanas. En modalidades preferidas, tales como el uso de una dosis de toxina botulínica de 40 U, la duración del efecto es al menos aproximadamente 24 semanas, al menos aproximadamente 26 semanas, al menos aproximadamente 28 semanas, al menos aproximadamente 30 semanas, al menos aproximadamente 32 semanas, al menos aproximadamente 34 semanas, al menos aproximadamente 36 semanas, al menos aproximadamente 40 semanas, o al menos aproximadamente 42 semanas, antes de administrar una segunda o subsecuente dosis de tratamiento.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para lograr un beneficio terapéutico o cosmético deseado para el sujeto, donde el método comprende un régimen de dosificación que tiene múltiples tratamientos con una duración de efecto prolongada y, por lo tanto, intervalos más largos entre tratamientos sucesivos en comparación con los regímenes que usan toxina botulínica convencional. En una modalidad particular, la invención proporciona un método para reducir las líneas glabellares en un individuo, en donde el método comprende un régimen de dosificación que tiene múltiples tratamientos con duración de efecto prolongada y, por consiguiente, intervalos más largos entre tratamientos sucesivos en comparación con los regímenes para reducir las líneas glabellares usando formulaciones de toxina botulínica convencionales. En modalidades particulares, el intervalo antes de administrar una segunda dosis o subsecuente de tratamiento de la composición es mayor o igual a aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 38 semanas,

aproximadamente 40 semanas o mayor o igual a aproximadamente 42 semanas, después de la dosis de tratamiento inicial o después de las dosis de tratamiento subsecuentes.

En modalidades preferidas, el efecto es la reducción en la gravedad de una línea glabellar. En tales modalidades, la administración puede comprender al menos una inyección en uno o más músculos seleccionados del grupo que consiste en el músculo corrugador derecho, el músculo corrugador izquierdo y el músculo prócer. Por ejemplo, en algunas de estas modalidades, se inyectan de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 U, preferiblemente aproximadamente 8 U del componente toxina botulínica se inyectan en el aspecto medial del músculo corrugador derecho, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 U, preferiblemente de aproximadamente 8 U se inyectan en aspecto lateral del músculo corrugador derecho; de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 U, preferiblemente aproximadamente 8 U se inyectan en el aspecto del músculo corrugador izquierdo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 U, preferiblemente de aproximadamente 8 U se inyectan en el aspecto lateral del músculo corrugador izquierdo y de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 U, preferiblemente aproximadamente 8 U en el músculo prócer.

Los métodos de tratamiento logran una duración sorprendentemente larga y altas tasas de respuesta. En modalidades particulares, la invención proporciona métodos para reducir una arruga, línea o surco en un individuo en necesidad de los mismos, el método comprende: administrar al individuo mediante inyección en uno o más músculos o estructuras faciales asociadas con la arruga, línea o surco del individuo una composición que comprende: un diluyente farmacéuticamente aceptable para inyección; un componente de toxina botulínica que es toxina botulínica del serotipo A que tiene un peso molecular de 150 kDa sin proteínas accesorias no tóxicas; un portador cargado positivamente que tiene la secuencia de aminoácidos RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4); en donde el componente de toxina botulínica se administra al individuo en una cantidad de dosis de tratamiento de aproximadamente 20 U a aproximadamente 60 U, o aproximadamente 40 U por tratamiento inyectable, más preferiblemente en donde la dosis de tratamiento se divide entre inyecciones en uno o más músculos seleccionados del grupo formado por el músculo corrugador derecho, el músculo corrugador izquierdo y el músculo prócer; en donde el portador cargado positivamente está asociado no covalentemente con el componente botulínico; y en donde la inyección de la composición proporciona una dosis de tratamiento única que tiene al menos una duración de efecto de aproximadamente 26 semanas para reducir la arruga, línea o surco del individuo, extendiendo de esta manera la duración del intervalo de tratamiento para el individuo. La arruga, línea o surco está preferiblemente en la cara del individuo, como una línea glabellar.

Por consiguiente, los métodos y usos de la composición farmacéutica, como se describió anteriormente, permiten métodos para tratar una línea glabellar de un individuo en necesidad del mismo con toxina botulínica inyectable, en donde el método comprende un curso de tratamiento que tiene múltiples intervalos de tratamiento con duración prolongada del efecto y la duración de los intervalos de tratamiento, el curso de tratamiento comprende: administrar mediante inyección una dosis de tratamiento inicial de una composición inyectable estéril en el complejo glabellar del individuo para lograr una reducción en la gravedad de la línea glabellar después del tratamiento inicial con la composición; en donde la composición

comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable adecuado para inyección; un componente de toxina botulínica que es toxina botulínica del serotipo A que tiene un peso molecular de 150 kDa sin proteínas accesorias no tóxicas; y un portador cargado positivamente que tiene la secuencia de aminoácidos RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4); en donde el componente de toxina botulínica se administra al individuo en una dosis de tratamiento de aproximadamente 20 U a aproximadamente 60 U o aproximadamente 40 U por tratamiento inyectable, más preferiblemente en donde la dosis de tratamiento se divide entre inyecciones en uno o más músculos seleccionados del grupo que consiste en el músculo corrugador derecho, el músculo corrugador izquierdo y el músculo prócer; en donde el portador cargado positivamente está asociado no covalentemente con el componente de toxina botulínica; en donde la dosis de tratamiento inicial de la composición administrada por inyección al individuo proporciona una duración del efecto que dura al menos aproximadamente 26 semanas; y administrar dosis de tratamiento subsecuentes de la composición mediante inyección al individuo a intervalos de tratamiento que comprenden una duración más larga o igual de aproximadamente 26 semanas a al menos aproximadamente 40 semanas después de la dosis de tratamiento inicial y entre cada dosis de tratamiento subsecuente.

En algunas modalidades de los métodos y usos descritos en los dos párrafos anteriores, la composición logra una duración de efecto prolongada de al menos aproximadamente 27 semanas, al menos aproximadamente 28 semanas, al menos aproximadamente 29 semanas, o al menos aproximadamente 30 semanas. En algunas modalidades de este tipo, el portador cargado positivamente está presente en dicha composición farmacéutica en una cantidad de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.3 µg por unidad del componente de toxina botulínica, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.234 µg por unidad de componente de toxina botulínica. Alternativamente o además, en algunas modalidades de este tipo, el excipiente comprende al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, clorhidrato de L-histidina, polisorbato 20 y dihidrato de trehalosa, preferiblemente dihidrato de trehalosa.

La duración del efecto proporcionada por las composiciones de la invención y los métodos y usos de la misma, proporcionan ventajas significativas en comparación con la técnica. Los sujetos sometidos a tratamiento con composiciones que contienen toxina botulínica consideran que la duración del efecto es muy importante. Una duración del efecto larga, sostenida, que puede lograrse incluso con un solo tratamiento con una dosis eficaz de acuerdo con la invención, permite menos inyecciones durante un ciclo de tratamiento completo para un sujeto. Por ejemplo, una duración de efecto prolongada de un tratamiento inyectable único con un producto que tiene una eficacia y seguridad claras, de acuerdo con lo provisto por las composiciones y métodos de la presente invención, ofrece menos incomodidad, menos costo y más conveniencia para los sujetos sometidos a tratamientos. Por consiguiente, un producto que proporciona un efecto significativo y sostenido, después de un tratamiento inyectable único, proporciona una solución a una necesidad insatisfecha en la técnica tanto para profesionales como para pacientes. Por lo tanto, las composiciones y métodos de la invención proporcionan una solución al problema de uno o más tratamientos demasiado frecuentes, dolorosos e inconvenientes, así como mejorar el bienestar general de

los pacientes.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para lograr un beneficio terapéutico o cosmético deseado para el sujeto con tasas de respuesta más altas en comparación con las formulaciones de toxina botulínica convencionales. En algunas modalidades, la invención proporciona métodos para tratar una arruga, línea, surco o línea glabellar de un individuo en necesidad del mismo con toxina botulínica inyectable, el método comprende: administrar al individuo mediante inyección en uno o más músculos o estructuras faciales asociados con la arruga, línea o surco del individuo (tal como el complejo glabellar) una composición que comprende: un diluyente farmacéuticamente aceptable para inyección; un componente de toxina botulínica que es toxina botulínica del serotipo A que tiene un peso molecular de 150 kDa sin proteínas accesorias no tóxicas; un portador cargado positivamente que tiene la secuencia de aminoácidos RKKRRQRRRG-(K)₁₅- GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4); en donde el componente de toxina botulínica se administra al individuo en una cantidad de dosis de tratamiento de aproximadamente 20 U a aproximadamente 60 U o aproximadamente 40 U por tratamiento inyectable, más preferiblemente en donde la dosis de tratamiento se divide entre inyecciones en uno o más músculos seleccionados del grupo formado por el músculo corrugador derecho, el músculo corrugador izquierdo y el músculo prócer; en donde el portador cargado positivamente está asociado no covalentemente con el componente botulínico; y en donde la inyección de la composición proporciona un efecto de reducción de la gravedad de la arruga, línea, surco o línea glabellar, con una tasa de respuesta aumentada para individuos, a los que se les administró la composición farmacéutica, en comparación con los individuos a los que se les administraron formulaciones convencionales de toxina botulínica.

En tales modalidades preferidas, el efecto dura durante al menos aproximadamente 4 semanas en más del 55 %, preferiblemente más del 60 %, más preferiblemente más del 70 % de los individuos a los que se les administró la composición farmacéutica. En modalidades más preferidas, el efecto dura durante al menos aproximadamente 16 semanas en más del 35 %, preferiblemente más del 50 %, más preferiblemente más del 70 % de los individuos a los que se les administró la composición farmacéutica. En modalidades aún más preferidas, el efecto dura durante al menos aproximadamente 24 semanas en más del 15 %, lo más preferiblemente más del 25 % de los individuos a los que se les administró la composición farmacéutica.

La presente invención también proporciona kits para preparar formulaciones que contienen toxina botulínica, un complejo de toxina botulínica o un complejo de toxina botulínica reducida y un portador cargado positivamente o una premezcla que a su vez puede usarse para producir una tal formulación. Asimismo, se proporcionan kits que contienen medios para administrar secuencialmente el componente de toxina botulínica y el portador cargado positivamente.

En aún otro aspecto, la invención proporciona métodos y composiciones para usarse en el aumento de la duración de la acción de la toxina botulínica para reducir las arrugas, líneas o surcos en un individuo en necesidad del mismo administrando una pluralidad de tratamientos sucesivos de toxina botulínica, donde un primer tratamiento de la composición de toxina botulínica se administra al individuo mediante inyección en o cerca de una arruga, línea o surco; seguido de al menos un tratamiento sucesivo. En

modalidades preferidas, el primer tratamiento reduce dichas arrugas, líneas o surcos durante al menos aproximadamente 20 semanas y uno o más tratamientos sucesivos reducen las arrugas, líneas o surcos durante más tiempo que el logrado después de dicho primer tratamiento. En modalidades particulares, la composición comprende un componente de toxina botulínica en una dosis de aproximadamente 10 U a aproximadamente 100 U, dicho componente de toxina botulínica comprende toxina botulínica del serotipo A que tiene un peso molecular de 150 kDa, sin proteínas accesorias (no toxínicas) y un componente portador cargado positivamente que comprende una estructura de polilisina cargada positivamente que tiene covalentemente unido a la misma uno o más grupos de eficacia cargados positivamente que tienen una secuencia de aminoácidos de (gly)p-RGRDDRRQRRR-(gly)q (SEQ ID NO: 1), (gly)p-YGRKKRRQRRR-(gly)q (SEQ ID NO: 2) o (gly)p-RKKRRQRRR-(gly)q (SEQ ID NO: 3), en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de desde 0 hasta 20; en donde el portador cargado positivamente está asociado no covalentemente con el componente botulínico. En las modalidades más preferidas, la dosis es 40 U y/o el portador cargado positivamente tiene la secuencia de aminoácidos RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4). En modalidades aún más preferidas, dicho portador cargado positivamente y dicho componente de toxina botulínica están presentes en dicha composición farmacéutica en una relación de masa de aproximadamente 20,000:1 a aproximadamente 55,000:1 y/o el portador cargado positivamente está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 µg /40 U, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 µg/40 U; de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 µg/40 U o aproximadamente 12 µg por 40 U de dicho componente de toxina botulínica. En modalidades incluso más preferidas, el excipiente comprende al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, clorhidrato de L-histidina, polisorbato 20 y dihidrato de trehalosa, más preferiblemente, dihidrato de trehalosa.

En aún otro aspecto adicional, la invención proporciona métodos y composiciones para usarse en el aumento de la probabilidad de lograr una respuesta a la toxina botulínica de reducción de arrugas, líneas o surcos en un individuo en necesidad de los mismos, mediante la administración de una pluralidad de tratamientos sucesivos de toxina botulínica, donde un primer tratamiento de la composición de toxina botulínica se administra al individuo mediante inyección en o cerca de una arruga, línea o surco; seguido de al menos un tratamiento sucesivo que tiene una mayor probabilidad de reducir la arruga, línea o surco que el primer tratamiento. En modalidades particulares, la composición comprende un componente de toxina botulínica en una dosis de aproximadamente 10 U a aproximadamente 100 U, dicho componente de toxina botulínica comprende toxina botulínica del serotipo A que tiene un peso molecular de 150 kDa y un componente de portador cargado positivamente que comprende una estructura de polilisina cargada positivamente que tiene covalentemente unido a la misma uno o más grupos de eficacia cargados positivamente que tienen una secuencia de aminoácidos de (gly)p-RGRDDRRQRRR-(gly)q (SEQ ID NO: 1), (gly)p-YGRKKRRQRRR-(gly)q (SEQ ID NO: 2) o (gly)p-RKKRRQRRR-(gly)q (SEQ ID NO: 3), en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de desde 0 hasta 20; en donde el portador cargado positivamente está asociado no covalentemente con el componente botulínico. En modalidades más preferidas, la dosis es 40 U y/o el portador cargado positivamente tiene la secuencia de

aminoácidos RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4). En modalidades más preferidas, dicho portador cargado positivamente y dicho componente de toxina botulínica están presentes en dicha composición farmacéutica en una relación de masa de aproximadamente 20,000:1 a aproximadamente 55,000:1; y/o el portador cargado positivamente está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 µg /40 U, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 µg/40 U; de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 µg/40 U o aproximadamente 12 µg de 40 U de dicho componente de toxina botulínica. En modalidades incluso más preferidas, el excipiente comprende al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, clorhidrato de L-histidina, polisorbato 20 y dihidrato de trehalosa, más preferiblemente, dihidrato de trehalosa.

En modalidades particulares de las invenciones descritas en los dos párrafos anteriores, la arruga, línea o surco es una línea glabellar. En tales modalidades, la administración puede comprender al menos una inyección en uno o más músculos seleccionados del grupo que consiste en el músculo corrugador derecho, el músculo corrugador izquierdo y el músculo prócer. En modalidades aún más preferidas, los tratamientos repetidos resultan en menos efectos secundarios después de la administración de la composición, particularmente, ptosis palpebral reducida.

Breve descripción de las figuras

El archivo de la patente o la solicitud contiene por lo menos un dibujo realizado en color. Las copias de esta patente o publicación de la solicitud de patente con dibujos a color se proporcionarán por la oficina bajo solicitud y pago de la tarifa necesaria.

La **figura 1** presenta un gráfico de barras que muestra el tiempo requerido para volver al valor de la puntuación de abducción digital inicial (DAS) (0.4) después de la administración repetida de BOTOX® o RT003, una formulación que incluye toxina botulínica tipo A de 150 kDa sin proteínas accesorias (RTT150) y un portador cargado positivamente que tiene la secuencia de aminoácidos RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4).

Las **figuras 2A y 2B**: La **figura 2A** muestra la pata trasera de un ratón inyectado con un tinte oscuro para indicar la porción del músculo gastrocnemio de un ratón que se ve afectado por la inyección en la línea lateral a la media. La **figura 2B** muestra la pata trasera de un ratón inyectado con un tinte oscuro para indicar la porción del músculo gastrocnemio de un ratón que se ve afectado por la inyección en la línea media.

La **figura 3** muestra las puntuaciones de abducción digital (DAS) medidas en función del tiempo después de la inyección de RT003, RTT150 o BOTOX® en la línea lateral a media o la porción media del músculo gastrocnemio de un ratón.

Las **figuras 4A y 4B** muestran curvas de Kaplan-Meier que muestran la duración de la respuesta en varios grupos de tratamiento del estudio clínico descrito en el ejemplo 5 en la presente. Las curvas de Kaplan-Meier representan los resultados de análisis de la eficacia primaria del estudio clínico y demuestran la duración de la respuesta para al menos una mejora de 1 punto desde el inicio para la Evaluación Global por el Investigador - Gravedad de las Arrugas Faciales (IGA-FWS, por sus siglas en inglés) en los grupos

de tratamiento indicados. La **figura 4A** muestra las curvas de Kaplan-Meier para el grupo de tratamiento tratado con placebo, el grupo de tratamiento tratado con VISTABEL®/BOTOX® 20 U y el grupo de tratamiento tratado con RT002 40 U. La **figura 4B** muestra las curvas de Kaplan-Meier para el grupo de tratamiento tratado con placebo, el grupo de tratamiento tratado con VISTABEL®/BOTOX® 20 U, el grupo de tratamiento tratado con RT002 20 U, el grupo de tratamiento tratado con RT002 40 U y el grupo de tratamiento tratado con RT002 60 U.

Las **figuras 5A a 5C** muestran los resultados del punto final primario de dos brazos de estudio de un ensayo clínico de fase 3 descrito en el ejemplo 7 en la presente. La **figura 5A** muestra los puntos finales primarios en la semana 4 (población con intención de tratar) para los dos brazos, mostrando la proporción de sujetos que lograron al menos una respuesta compuesta de 2 puntos con el ceño fruncido al máximo (*p < 0.0001 vs. placebo en una prueba de Cochran-Mantel-Haenszel estratificada por el centro del estudio). La **figura 5B** muestra los gráficos de Kaplan-Meier de Tiempo de Retorno hasta, empeoramiento respecto al inicio tanto en la escala IGA-FWS como en la Gravedad de Arrugas Faciales por el Paciente (PFWS, por sus siglas en inglés) para los dos brazos (casos observados) (ITT). La **figura 5C** muestra los gráficos de Kaplan-Meier de Tiempo de Mantenimiento de Gravedad de Arrugas Nula o Leve en las escalas IGA-FWS o PFWS de los dos brazos (casos observados) (ITT).

Las **figuras 6A a 6B** comparan los dos brazos del estudio de fase 3 con el ejemplo 5. La **figura 6A** muestra una comparación del punto final primario en la semana 4 de los dos brazos del estudio de fase 3 con los resultados del ejemplo 5, comparando el porcentaje de sujetos en cada población de ITT que logran al menos una respuesta compuesta de 2 puntos con el ceño fruncido al máximo. La **figura 6B** compara los dos brazos del estudio de fase 3 con el ejemplo 5, en términos de la respuesta nula o leve en IGA-FWS y PFWS a lo largo del tiempo.

La **figura 7** muestra el porcentaje de sujetos que mantienen ninguna arruga o arrugas leves en función de estas puntuaciones a lo largo del tiempo para cada uno de los dos brazos, en comparación con los resultados del ejemplo 5, así como con otras formulaciones de toxina botulínica.

La **figura 8** representa los dos brazos con respuesta nula o leve de la ITT del estudio de fase 3 en PFWS con relación al ejemplo 5.

La **figura 9** representa los dos brazos de la respuesta nula o leve del estudio de fase 3 en PFWS en relación con el ejemplo 5 y en relación con la toxina botulínica tipo A.

La **figura 10** representa los dos brazos de la tasa de respuesta del estudio de fase 3 de ≥ 1 punto de respuesta en IGA-FWS a lo largo del tiempo en relación con el ejemplo 5 (PP).

La **figura 11** representa el porcentaje de sujetos que mantienen al menos una mejora de 1 punto desde el inicio en la puntuación IGA-FWS a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos y para el ejemplo 5.

La **figura 12** representa el porcentaje de sujetos que mantienen al menos una mejora de 1 punto desde el inicio en la puntuación PFWS a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos y para el ejemplo 5.

La **figura 13** representa el porcentaje de sujetos que mantienen al menos una mejora de 1 punto

desde el inicio en las puntuaciones IGA-FWS y PFWS a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos del estudio de fase 3.

La **figura 14** representa el porcentaje de sujetos que mantienen un estado de gravedad de arrugas nulo o leve (puntuación de 0 o 1) en IGA-FWS a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos (líneas púrpura y azul) y para el ejemplo 5 (línea roja).

La **figura 15** representa el porcentaje de sujetos que mantienen un estado de gravedad de arrugas nulo o leve (puntuación de 0 o 1) en IGA-FWS a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos (líneas púrpura y azul) en base a respondedores compuestos de 2 puntos en la semana 4.

La **figura 16** representa el porcentaje de sujetos que mantienen un estado de gravedad de arrugas nulo o leve (puntuación de 0 o 1) en IGA-FWS o PFWS a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos (líneas púrpura y azul).

La **figura 17** representa el porcentaje de sujetos que vuelven al inicio tanto en IGA-FWS como en PFWS a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos del estudio de fase 3 (líneas púrpura y azul).

La **figura 18** representa la clasificación de satisfacción global del paciente después del tratamiento para cada uno de los dos brazos del estudio de fase 3.

La **figura 19** representa fotografías de un sujeto que muestra una mejora de 2 puntos en IGA-FWS y PFWS en la semana 4 (ceño fruncido al máximo) después del tratamiento; y una duración sostenida de 1 punto del efecto hasta la semana 24.

Las **figuras 20A a 20B** representan fotografías de un sujeto diferente que muestra una mejora de 2 puntos en IGA-FWS y PFWS en la semana 4 (ceño fruncido al máximo) después del tratamiento; y una duración sostenida de 1 punto de efecto hasta la semana 24 (**figura 20A**) y la semana 32 (**figura 20B**).

Las **figuras 21A a 21B** representan el diseño del estudio para un estudio de seguridad abierto descrito en la presente (**figura 21A**) y un resumen de este estudio en comparación con los brazos 1 y 2 del ejemplo 7 (**figura 21B**).

La **figura 22** representa los sitios de inyección ejemplares para el tratamiento de líneas glabellares leves a moderadas con RT002.

La **figura 23** representa un programa ejemplar de evaluaciones de ensayos para un estudio clínico para evaluar la seguridad de RT002.

Las **figuras 24A a 24B** representan la proporción de sujetos que mantienen una mejoría en las líneas glabellares en la semana 4 entre los estudios. La **figura 24A** representa sujetos que logran una respuesta compuesta de al menos 2 puntos en la semana 4 en el estudio de fase 3 del ejemplo 8; la **figura 24B** representa los sujetos que logran al menos una puntuación de +1 en las puntuaciones de GAIS del Investigador y el Sujeto en la semana 4 en los estudios de fase 3 del ejemplo 7, brazos 1 y 2 y el ejemplo 8.

Las **figuras 25A a 25B** representan el porcentaje de sujetos en el ejemplo 7 y el ejemplo 8 que tienen puntuaciones de “ninguna” arruga o arruga “leve” en respuesta al tratamiento en varios puntos de tiempo después del tratamiento, de acuerdo con lo evaluado por IGA-FW (**figura 25A**) y PFWS (**figura 25B**).

Las **figuras 26A a 26B** representan el porcentaje de sujetos en el ejemplo 7 y el ejemplo 8 en comparación a lo largo del tiempo después del tratamiento de pérdida de puntuaciones “nulas” o “leves” tanto en IGA-FWS como en PFWS (**figura 26A**); y de pérdida para volver al inicio tanto en IGA-FWS como en PFWS (**figura 26B**).

5 Las **figuras 27A a 27B** representan el porcentaje de sujetos en el ejemplo 8 que muestra una respuesta de acuerdo con lo evaluado por GAIS del sujeto (P-GAIS) con el ceño fruncido al máximo (**figura 27A**) o por GAIS del Investigador (I-GAIS) con el ceño fruncido al máximo (**figura 27B**), a lo largo del tiempo después del tratamiento.

10 Las **figuras 28A a 28B** representan fotografías de sujetos que ejemplifican una mejora de 2 puntos de acuerdo con IGA-FWS y PFWS en la semana 4, con una duración de efecto sostenida hasta la semana 16 y una mejora de 1 punto restante en la semana 24.

La **figura 29** representa el tiempo medio hasta la pérdida de puntuaciones nulas o leves tanto en IGA-FWS como en PFWS por subgrupo.

15 La **figura 30** representa el tiempo medio para volver al inicio tanto en IGA-FWS como en PFWS por subgrupo.

Descripción detallada de la invención

20 Esta invención se refiere a composiciones que contienen toxina botulínica para usarse en la producción de tasas de respuesta más altas y/o duración del efecto más larga, o duración de la acción más larga, en aplicaciones terapéuticas y/o cosméticas de la toxina botulínica. En particular, la invención se refiere a composiciones que contienen toxina botulínica para usarse en la producción de tasas de respuesta más altas en pacientes con líneas de expresión, durante un período de tiempo prolongado, en comparación con preparaciones de toxina botulínica disponibles comercialmente, tales como BOTOX®.

25 En un aspecto, las composiciones usadas están en formulaciones inyectables estériles que pueden administrarse a un individuo mediante inyección, tal como mediante inyección en uno o más músculos asociados con la afección que se está tratando, p. ej., uno o más músculos asociados con las líneas glaberales moderadas a graves. Como se usa en la presente, los términos composiciones y formulaciones son esencialmente intercambiables cuando se refieren a las composiciones y formulaciones de acuerdo con la presente invención.

Composiciones inyectables

30 Las composiciones inyectables de esta invención, en modalidades preferidas, estabilizan la toxina y/o permiten su administración a través de los tejidos después de la inyección, de modo que la toxina tiene una o más ventajas, tales como antigenicidad reducida, un mejor perfil de seguridad, potencia mejorada, inicio más rápido de eficacia clínica, tasas de respuesta más altas y mayor duración de la eficacia clínica en comparación con las formulaciones comerciales convencionales de toxina botulínica (p. ej., BOTOX® o MYOBLOC®). En modalidades particularmente preferidas, las composiciones inyectables proporcionan un atributo de difusión o propagación reducido desde el sitio de inyección después de la inyección, localizando de esta manera la toxina y su efecto donde se desee y disminuyendo los efectos no específicos o no

deseados de la toxina en ubicaciones distantes del sitio de inyección. Las composiciones inyectables comprenden una toxina botulínica en asociación no covalente con una cantidad eficaz de un portador cargado positivamente, el portador comprende una estructura cargada positivamente que tiene covalentemente unidos a la misma “grupos de eficiencia” cargados positivamente, que también se denominan dominios de transducción de proteínas (PTD)) o péptidos penetrantes en células (CPP). De acuerdo con la presente invención, el portador cargado positivamente es adecuado como un sistema de transporte para la toxina botulínica, permitiendo que la toxina se inyecte con características mejoradas, como se discutió anteriormente, sin modificación covalente de la molécula de toxina.

Las siguientes secciones describen varios componentes de las composiciones para usarse en la presente invención.

El componente de toxina botulínica

El término “toxina botulínica” como se usa la presente puede referirse a cualquiera de los tipos conocidos de toxina botulínica (p. ej., moléculas de proteína toxina botulínica de 150 kD asociadas con los diferentes serotipos de *C. botulinum*), ya sea producida por la bacteria o por técnicas recombinantes, así como cualquier tipo que pueda descubrirse posteriormente, incluidos los serotipos recién descubiertos y las variantes genéticamente modificadas o proteínas de fusión. Como se mencionó anteriormente, actualmente se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas inmunológicamente distintas, es decir, los serotipos de neurotoxina botulínica A, B, Cl, D, E, F y G, cada uno de los cuales se distingue por la neutralización con anticuerpos específicos de tipo. Los diferentes serotipos de la toxina botulínica varían en las especies animales que afectan y en la gravedad y duración de la parálisis que la provocan. En modalidades preferidas, la composición comprende una toxina botulínica del serotipo A.

Los serotipos de toxina botulínica están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y de Metabiologics, Inc. (Madison, WI), así como de otras fuentes. Al menos dos tipos de toxina botulínica, tipos A y B, están disponibles comercialmente en formulaciones para el tratamiento de ciertas afecciones. El tipo A, por ejemplo, está contenido en preparaciones de Allergan, Inc., que tienen la marca registrada BOTOX®, así como en preparaciones de Ipsen Limited, que tienen la marca registrada DYSPORT®. La formulación original Botox®, se preparó por Schantz en 1979 (Schantz *et al.*, “Preparation and characterization of botulinum toxin type A for human treatment” Therapy with Botulinum Toxin. Vol. 109. New York, NY: Marcel Dekker; 1994. pp. 10-24). El tipo B está contenido, por ejemplo, en preparaciones de Elan Pharmaceuticals que tienen la marca registrada MYOBLOC®. La toxina botulínica recombinante también se puede comprar, p. ej., de List Biological Laboratories, Campbell, CA.

El término “toxina botulínica” puede referirse alternativamente a un derivado de toxina botulínica, que es, un compuesto que tiene 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 toxinas botulínicas nativas recombinantes o naturales. Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser una neurotoxina modificada que es una neurotoxina que tiene al menos uno de sus aminoácidos eliminados, modificados o reemplazados, en comparación con una forma nativa, o la neurotoxina modificada puede ser una neurotoxina producida por vía recombinante o un derivado o fragmento de la misma. Por ejemplo, la toxina

botulínica puede ser una que ha sido modificada de una manera que, por ejemplo, mejora sus propiedades o disminuye los efectos secundarios indeseables, pero que aún retiene la actividad deseada de la toxina botulínica. Alternativamente, la toxina botulínica usada en esta invención puede ser una toxina preparada usando técnicas químicas recombinantes o sintéticas, p. ej., un péptido recombinante, una proteína de fusión o una neurotoxina híbrida, por ejemplo, preparada a partir de subunidades o dominios de diferentes serotipos de toxina botulínica (véase la patente estadounidense núm. 6,444,209, por ejemplo). La toxina botulínica también puede ser una porción de la molécula global que se ha demostrado que posee la actividad de toxina botulínica necesaria y, en tal caso, puede usarse *per se* o como parte de una combinación o molécula conjugada, por ejemplo, una proteína de fusión. Alternativamente, la toxina botulínica puede estar en forma de un precursor de toxina botulínica, que puede ser no tóxico, por ejemplo, una proteasa de zinc no tóxica que se vuelve tóxica en la escisión proteolítica.

El término “complejo de toxina botulínica” o “complejo de toxinas”, como se usa en la presente, se refiere a la molécula de proteína toxina botulínica de aproximadamente 150 kD (que pertenece a cualquiera de los serotipos de toxina botulínica A-G), junto con proteínas endógenas no tóxicas asociadas (es decir, proteína hemaglutinina y proteína no hemaglutinina no tóxica producida por la bacteria *C. botulinum*). En algunas modalidades, el complejo de toxinas botulínicas no necesita derivarse de la bacteria *C. botulinum* como un complejo de toxina unitaria, sino que puede ser, por ejemplo, la toxina botulínica que se prepara por vía recombinante primero y después se combina con las proteínas no tóxicas.

El término “complejo de toxina botulínica reducida” o “complejo de toxina reducida” se refiere a los complejos de toxina botulínica que tienen cantidades reducidas de proteína no tóxica en comparación con las cantidades que se encuentran naturalmente en los complejos de toxina botulínica producidos por la bacteria *C. botulinum*. En una modalidad, los complejos de toxina botulínica reducida se preparan usando cualquier método de separación de proteínas convencional para extraer una fracción de la proteína hemaglutinina o proteína no hemaglutinina no tóxica de los complejos de toxina botulínica derivados de la bacteria *C. botulinum*. Por ejemplo, se pueden producir complejos reducidos de toxina botulínica disociando los complejos de toxina botulínica a través de la exposición a glóbulos rojos a un pH de 7.3, HPLC, diálisis, columnas, centrifugación y otros métodos para extraer proteínas de los complejos. Otros procedimientos que pueden usarse, se describen, p. ej., en la patente estadounidense núm. 9,469,849 de Ruegg, titulada “Métodos y sistema para purificar neurotoxina botulínica no compleja,” WO 2006/096163 de Allergan, Inc., titulada “Sistema y proceso libre de productos de origen animal para purificar una toxina botulínica” y la EP 1514556 B1, de Allergan, Inc., titulada “Composiciones farmacéuticas de toxina botulínica”, cada una incorporada en la presente como referencia en su totalidad. Alternativamente, cuando los complejos reducidos de toxina botulínica se van a producir mediante la combinación de toxina botulínica producida sintéticamente con proteínas no tóxicas, se puede agregar simplemente menos proteína hemaglutinina o no hemaglutinina no tóxica a la mezcla de lo que estaría presente para complejos de toxina botulínica natural.

Cualquiera de las proteínas no tóxicas (p. ej., proteína hemaglutinina o no hemaglutinina no tóxica o ambas) en los complejos de toxina botulínica reducida puede reducirse independientemente, en

cualquier cantidad. Por ejemplo, aunque la cantidad de proteínas endógenas no tóxicas puede reducirse en la misma cantidad en algunos casos, esta invención también contempla reducir cada una de las proteínas endógenas no tóxicas en diferentes cantidades, así como reducir al menos una de las proteínas endógenas no tóxicas, pero no las otras.

5 En ciertas modalidades ejemplares, una o más proteínas no tóxicas se reducen en al menos aproximadamente 0.5 %, 1 %, 3 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con las cantidades que normalmente se encuentran en los complejos de toxina botulínica. Como se indicó anteriormente, la bacteria *C. botulinum* produce siete serotipos diferentes de toxina. Las preparaciones comerciales se fabrican con diferentes cantidades relativas de proteínas no tóxicas. Por ejemplo, MYOBLOC® tiene 5000 U de toxina botulínica tipo B por mL con albúmina de suero humano al 0.05 %, succinato de sodio 0.01 M y cloruro de sodio 0.1 M. DYSPORT® tiene 500 U de complejo de toxina botulínica tipo A-hemaglutinina con 125 µg de albúmina y 2.4 mg de lactosa. En ciertas modalidades, sustancialmente toda la proteína no tóxica (p. ej., (mayor a 95 %, 96 %, 97 %), 98 %, o 99 % de la proteína hemaglutinina o proteína no hemaglutinina no tóxica) que normalmente se encontraría en los complejos de toxina botulínica derivados de la bacteria *C. botulinum* se elimina del complejo de toxina botulínica.

15 Por consiguiente, en diversas modalidades, el componente de toxina botulínica de las presentes composiciones puede seleccionarse de un complejo de toxina botulínica (que incluye la neurotoxina de 150 kD con proteínas accesorias encontradas en complejos nativos producidos por la bacteria *C. botulinum*, como se ha descrito anteriormente), un complejo de toxina botulínica (incluida la neurotoxina de 150 kD con algunas, pero no todas, las proteínas accesorias nativas) y la molécula de toxina botulínica de 150 kD, sin proteínas accesorias (no tóxicas).

25 En la presente composición, la toxina botulínica se asocia de forma no covalente con un portador para formar un complejo sin modificación covalente de la molécula de toxina botulínica. La asociación entre el portador y la toxina botulínica implica uno o más tipos de interacción no covalente, cuyos ejemplos no limitantes incluyen interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o combinaciones de los mismos. Véase también, p. ej., WO 2005/084410 (PCT/US2005/007524), de Dake *et al.*, “Composiciones y métodos para la aplicación tópica y administración transdérmica de toxinas botulínicas”, que describe además cómo la asociación no covalente evita la necesidad de modificar covalentemente la molécula de toxina que se administra. Las moléculas portadoras para usarse en las composiciones se describen a continuación.

Moléculas portadoras

35 De acuerdo con la presente invención, una molécula portadora cargada positivamente, que tiene covalentemente unidos a la misma grupos de eficacia, como se describe en la presente, se ha encontrado adecuada como un sistema de transporte para la toxina botulínica. En ciertas modalidades, el portador cargado positivamente no tendrá otra actividad biológica enzimática o terapéutica.

Los portadores cargados positivamente permiten que la toxina se inyecte con una administración mejorada a las estructuras blanco, lo que resulta en una disminución de la difusión lejos de los músculos inyectados, como uno o más músculos asociados con las líneas glabellares. Además de mejorar el

suministro de toxina botulínica, los portadores cargados positivamente pueden, en ciertas modalidades preferidas, estabilizar la toxina botulínica contra la degradación. En tales modalidades, la proteína hemaglutinina y la proteína no hemaglutinina no tóxica que normalmente están presentes para estabilizar la toxina botulínica pueden reducirse u omitirse por completo, por ejemplo, como se describió anteriormente. De la misma manera, la albúmina exógena que normalmente se agrega durante la fabricación puede omitirse.

Los portadores cargados positivamente ejemplares que se pueden usar en composiciones inyectables de la invención se describen, p. ej., en WO 2002/007773 (PCT/US2001/023072) de Waugh *et al.*, “Sistemas de transporte biológico de componentes múltiples;” WO 2005/084410 (PCT/US2005/007524) de Dake *et al.*, “Composiciones y métodos para aplicación tópica y administración transdérmica de toxinas botulínicas;” WO 2010/151840 (PCT/US2010/040104) de Thompson *et al.*, “Formulaciones de toxina botulínica libre de albúmina;” WO 2009/015385 (PCT/US2008/071350) de Stone *et al.*, “Péptido antimicrobiano, composiciones y métodos de uso;” WO 2013/112974 (PCT/US2013/023343) de Waugh *et al.*, “Métodos y escalas de evaluación para medir la gravedad de las arrugas;” patente estadounidense núm. 9,956,435 de Ruegg *et al.* “Formulaciones inyectables de toxina botulínica;” y WO 2014/066916 (PCT/US2013/67154) de Ruegg *et al.* “Composiciones y métodos para el tratamiento seguro de la rinitis;” portadores adicionales se describen, p. ej., en US 2016/0166703 A1 de Tan *et al.*, titulada “Composiciones de moléculas portadoras y métodos relacionados” y en US 2014/0056811 A1 de Jacob, *et al.*, titulada “Nuevos péptidos penetrantes en células y usos de los mismos,” cada uno de los cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Por el uso de los términos “cargado positivamente” o “catiónico”, se entiende que el portador tiene una carga positiva en al menos algunas condiciones de fase de solución, más preferiblemente, en al menos algunas condiciones fisiológicamente compatibles. Más específicamente, “cargado positivamente” o “catiónico” significa que el grupo en cuestión contiene funcionalidades que están cargadas bajo condiciones fisiológicas de pH, por ejemplo, una amina cuaternaria, o que el grupo contiene una funcionalidad que puede adquirir carga positiva bajo ciertas condiciones de fase de la solución, tales como cambios de pH en el caso de aminas primarias. Más preferiblemente, “cargado positivamente” o “catiónico”, como se usa en la presente, se refiere a aquellos grupos que tienen el comportamiento de asociarse con aniones en condiciones fisiológicamente compatibles. Generalmente, el portador cargado positivamente comprende una estructura cargada positivamente, que se describe con más detalle a continuación.

Estructuras cargadas positivamente de las moléculas portadoras

La estructura cargada positivamente es una cadena de átomos, ya sea con grupos en la cadena que llevan una carga positiva a pH fisiológico, o con grupos que llevan una carga positiva unida a las cadenas laterales. Generalmente, la estructura es una estructura de hidrocarburo lineal, la cual, en algunas modalidades, está interrumpida por heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio o fósforo. La mayoría de los átomos de la estructura son generalmente carbono. Adicionalmente, la estructura será a menudo un polímero de unidades repetitivas (p. ej., aminoácidos, poli(etileneoxi), poli(propilenamina), polialquilenimina y similares) y puede ser un homopolímero o un heteropolímero.

En ciertas modalidades preferidas, la estructura cargada positivamente comprende un péptido catiónico, tal como un polipéptido que tiene múltiples grupos de cadena lateral cargadas positivamente (p. ej., lisina, arginina, ornitina, homoarginina y similares). Un técnico en la materia apreciará que cuando se usan aminoácidos en esta parte de la invención, las cadenas laterales pueden tener la forma D o L (configuración R o S) en el centro de unión.

Como se usa en la presente, el término “péptido” se refiere a una secuencia de aminoácidos, pero no tiene connotación con respecto al número de residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos. Por consiguiente, el término “péptido” puede abarcar polipéptidos y proteínas. Por ejemplo, las estructuras de péptidos catiónicos de la invención pueden comprender de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos. En modalidades preferidas, la estructura del péptido catiónico comprende de 10 a 20 aminoácidos o 0, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos, siendo preferiblemente residuos de aminoácidos de polilisina.

En modalidades particularmente preferidas, la estructura cargada positivamente es una polilisina. En algunas modalidades, la polilisina puede tener un peso molecular que es al menos aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500 o 6000 Da y menos de aproximadamente 2,000,000, 1,000,000, 500,000, 250,000, 100,000, 75,000, 50,000 y 25,000 Da. Dentro del rango de 100 a 2,000,000 Da, se contempla que el rango inferior y/o superior se puede aumentar o disminuir, respectivamente, en 100, siendo cada subrango resultante una modalidad específicamente contemplada de la invención. La polilisina contemplada por esta invención puede ser cualquiera de las polilisinias disponibles comercialmente (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 un PM de 150,000 a 300,000 y polilisina con un PM > 300,000.

En algunas modalidades preferidas, la polilisina tiene un peso molecular de aproximadamente 1,000 a aproximadamente 1,500,000 Da, de aproximadamente 2,000 a aproximadamente 800,000 Da o de aproximadamente 3,000 a aproximadamente 200,000 Da. En modalidades más preferidas, la polilisina tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 10,000 Da, de aproximadamente 500 a aproximadamente 5,000 Da, de aproximadamente 1,000 a aproximadamente 4,000 Da, de aproximadamente 1,500 a aproximadamente 3,500 Da o de aproximadamente 2,000 a aproximadamente 3,000 Da. Especialmente preferido es un polipéptido de polilisina que tiene de 10 a 20 lisinas (SEQ ID NO: 9), más preferiblemente, 15 lisinas. La selección de una polilisina apropiada dependerá de los componentes restantes de la composición y será suficiente para proporcionar una carga positiva neta global a un portador cargado positivamente.

En otra modalidad, la estructura cargada positivamente es un polímero no peptídico, que puede ser un hetero u homopolímero tal como una polialquilenimina, por ejemplo, una polietilenimina o polipropilenimina. En algunas modalidades, la estructura cargada positivamente es una polipropilenamina, en donde varios átomos de nitrógeno de amina están presentes como grupos amonio (tetra-sustituidos) que llevan una carga positiva. En otro grupo de modalidades, la estructura ha unido una pluralidad de

porciones de cadena lateral que incluyen grupos cargados positivamente (p. ej., grupos amonio, grupos piridinio, grupos fosfonio, grupos sulfonio, grupos guanidinio o grupos amidinio).

Alternativamente, la estructura puede comprender análogos de aminoácidos y/o aminoácidos sintéticos. La estructura puede ser también un análogo de un polipéptido como un peptoide. Véase, 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. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367 (1992)). Brevemente, un peptoide es una poliglicina en la que la cadena lateral está unida a los átomos de nitrógeno de la estructura en lugar de a los átomos de carbono alfa. Como anteriormente, una parte o todas las cadenas laterales terminarán típicamente en un grupo cargado positivamente para proporcionar un componente principal cargado positivamente. La síntesis de peptoides se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense núm. 5,877,278, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Como el término se utiliza en la presente, las estructuras cargadas positivamente que tienen un constructo de la estructura del peptoide se consideran “no peptídicos” ya que no están compuestas de aminoácidos que tienen cadenas laterales naturales en las ubicaciones de carbono alfa.

Se puede usar una variedad de otras estructuras utilizando, por ejemplo, imitadores estéricos o electrónicos de polipéptidos, en donde los enlaces amida del péptido se reemplazan con sustitutos, tales como enlaces éster, grupos de tioamidas (--CSNH--), tioamida invertida (--NHCS--), aminometileno (--NHCH₂--), o metilenamino invertido (--CH₂NH--), grupos cetometileno (--COCH₂--), fosfinato (--PO₂RCH₂--), fosfonamido y éster de fosfonamido (--PO₂RNH--), péptido invertido (--NHCO--), trans-alqueno (--CR=CH--), fluoroalqueno (--CF=CH--), dimetileno (--CH₂CH₂--), tioéter (--CH₂S--), hidroxietileno (--CH(OH)CH₂--), metilenoxi (--CH₂O--), tetrazol (CN₄), sulfonamido (--SO₂NH--), metilenosulfonamido (--CHRSO₂NH--), sulfonamida invertida (--NH₂SO₂--), y estructuras con subunidades malonato y/o gem-diamin-alquilo, por ejemplo, de acuerdo con lo revisado por *et al.* ((1998) *Chem. Rev.* 98:763) y detallado por las referencias citadas en los mismos. Muchas de las sustituciones anteriores resultan en estructuras de polímeros aproximadamente isostéricos en relación con estructuras formadas a partir de alfa-aminoácidos.

En una modalidad particularmente preferida, el portador comprende una estructura de polilisina o polietilenimina (PEI) relativamente corta (que puede ser lineal o ramificada) y que tiene grupos de eficacia cargados positivamente, unidos covalentemente. Cuando un portador comprende una estructura de polilisina o PEI lineal relativamente corto, la estructura tendrá un peso molecular de menos de 75,000 Da, más preferiblemente menos de 30,000 Da, y lo más preferiblemente, menos de 25,000 Da. Cuando el portador es una estructura de polilisina o PEI ramificada relativamente corta, sin embargo, la estructura de la polilisina o PEI tendrá una masa molecular menor a 60,000 Da, más preferiblemente menor a 55,000 Da y lo más preferiblemente menor a 50,000 Da. En modalidades más particularmente preferidas, la estructura cargada positivamente es una polilisina y los grupos de eficiencia cargados positivamente están unidos a la lisina en los extremos C y/o N. Los grupos de eficiencia se describen en detalle a continuación.

Grupos de eficiencia

Generalmente, la estructura cargada positivamente tiene covalentemente unido uno o más grupos de eficiencia (PTD o CPP). Los grupos de eficiencia se pueden colocar en espacios a lo largo de la

estructura que son consistentes en separaciones o variables. En modalidades preferidas, uno o más grupos de eficiencia están unidos a cualquiera de los extremos, o más preferiblemente a cada uno de los dos extremos, de la estructura del portador. Además, la longitud de los grupos de eficiencia puede ser similar o diferente. En modalidades que usan estructuras de peptoides, como se proporciona anteriormente, los grupos de eficiencia pueden unirse covalentemente a diversos átomos o grupos de la estructura. Por ejemplo, las estructuras enlazadas a sulfonamida ($--SO_2NH--$ y $--NH SO_2--$) pueden tener grupos de eficiencia unidos a los átomos de hidrógeno. De la misma manera, el enlace hidroxietileno ($--CH(OH)CH_2--$) puede soportar grupos de eficiencia unidos a los sustituyentes hidroxilo. Un técnico en la materia puede adaptar fácilmente las otras químicas de enlace para proporcionar grupos de eficiencia utilizando métodos sintéticos estándar.

Como se usa en la presente, un grupo de eficiencia es cualquier agente que tiene el efecto de promover la translocación de la estructura cargada positivamente a través de un tejido o membrana celular y/o mejorar el suministro de una molécula asociada con la estructura a un sitio blanco. Ejemplos no limitantes de grupos de eficiencia incluyen HIV-TAT o fragmentos del mismo, el PTD de Antennapedia o un fragmento del mismo, o $-(gly)_{n1}-(arg)_{n2}$ (SEQ ID NO: 5) en el que el subíndice $n1$ es un número entero de 0 a aproximadamente 20, más preferiblemente de 0 a aproximadamente 8, aún más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 y el subíndice $n2$ es independientemente un número entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 17, lo más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 13.

En algunas modalidades, el fragmento de HIV-TAT no contiene la región rica en cisteína de la molécula de HIV-TAT, para minimizar los problemas asociados con la agregación de disulfuro. Preferiblemente, los fragmentos del HIV-TAT y Antennapedia retienen la actividad de transducción de proteínas de la proteína completa. Un grupo de eficiencia preferido es, por ejemplo, $-Gly_3Arg_7$ (SEQ ID NO: 10). Grupos de eficiencia aún más preferidos, en algunas modalidades, son aquellos en donde el fragmento HIV-TAT tiene la secuencia de aminoácidos $(gly)_p-RGRDDRRQRRR-(gly)_q$ (SEQ ID NO: 1), $(gly)_p-YGRKKRRQRRR-(gly)_q$ (SEQ ID NO: 2), o $(gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q$ (SEQ ID NO: 3), en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de 0 a aproximadamente 20, o en donde p y q son cada uno independientemente el número entero 1. En ciertas modalidades preferidas, p es uno y q es cero o p es cero y q es uno. Los fragmentos HIV-TAT preferidos son aquellos en los que los subíndices p y q son independientemente números enteros de 0 a 8, más preferiblemente de 0 a 5. En algunas modalidades, el fragmento o grupo de eficiencia se une a la estructura a través del extremo C o el extremo N del fragmento de la secuencia de aminoácidos del grupo de eficiencia.

En algunas modalidades, los grupos de eficiencia son el PTD de Antennapedia (Antp), o un fragmento del mismo que retiene la actividad. Estos son conocidos en la técnica, por ejemplo, de 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 (SEQ ID NO: 6).

En algunas modalidades, los grupos de eficiencia comprenden un péptido que tiene el aminoácido

KLAKLAK (SEQ ID NO: 12). Otros grupos de eficiencia ejemplares incluyen cualquiera de los CPP descritos en US 2016/0166703 A1 de Tan *et al.*, titulada "Composiciones de moléculas portadoras y métodos relacionados" y en US 2014/0056811 A1 de Jacob, *et al.*, titulada "Nuevos péptidos penetrantes en las células y usos de los mismos", cada una de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

En algunas modalidades particularmente preferidas, el portador cargado positivamente es un péptido cargado positivamente que tiene la secuencia de aminoácidos RKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4); o un péptido cargado positivamente que tiene la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 7); o un péptido cargado positivamente que tiene la secuencia de aminoácidos RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RGRDDRRQRRR (SEQ ID NO: 8); o un péptido cargado positivamente que tiene la secuencia de aminoácidos RKKRRQRRR-Q-(K)₁₅-Q-RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 11), para usarse en las composiciones y métodos de la invención.

Cantidades eficaces de portador

Para las composiciones de la invención, la cantidad de portador se selecciona en relación con la cantidad de toxina botulínica presente en una composición para promover la estabilidad y/o el suministro de la toxina a los sitios blanco.

Sin desear limitarse por la teoría, se cree que las estructuras cargadas positivamente forman una interacción electrostática no covalente con dominios de superficie aniónica de toxina botulínica para mejorar la penetración en los tejidos blanco. Se cree que la estructura cargada positivamente del portador también interactúa con estructuras extracelulares cargadas negativamente y superficies celulares en el punto de administración, de modo que estas interacciones restringen la toxina botulínica al sitio blanco, reduciendo los efectos secundarios no deseados debido a la propagación a estructuras no intencionales. Además, se cree que los portadores descritos en la presente ayudan a minimizar la agregación de las estructuras y la toxina botulínica en las composiciones terapéuticas, lo que causaría que la eficiencia del transporte disminuya drásticamente. En modalidades preferidas, la concentración de portadores en las composiciones es suficiente para mejorar el suministro de la toxina botulínica a objetivos moleculares tales como placas nerviosas motoras de uno o más músculos asociados con las líneas glabellares, p. ej., el complejo glabellar.

Además, una vez más, sin querer limitarse a la teoría, se cree que la tasa de penetración sigue una cinética mediada por el receptor, de manera que la penetración del tejido aumenta con cantidades crecientes de moléculas que mejoran la penetración hasta un punto de saturación, sobre el cual la tasa de transporte se vuelve constante. Por lo tanto, en modalidades preferidas, la cantidad de portador en una composición que contiene toxina botulínica se selecciona para que sea igual o aproximadamente igual a la cantidad que maximiza la velocidad de penetración justo antes de la saturación.

En algunas modalidades, el portador se proporciona en la composición que contiene toxina botulínica en una cantidad de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 1 µg por U del componente de toxina botulínica, preferiblemente de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 µg por U, más preferiblemente de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.35 µg por U o de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.3 µg por U y más preferiblemente de aproximadamente 0.234 µg por unidad de toxina

botulínica. En algunas modalidades, un portador cargado positivamente es una cantidad mayor a aproximadamente 2.5, mayor a aproximadamente 5 o mayor a aproximadamente 7.5 µg por 40 U de 150 kDa de molécula de toxina botulínica por si misma son proteínas accesorias (no tóxicas). Por ejemplo, las composiciones inyectables de la presente invención pueden comprender aproximadamente 0.16 µg/U, aproximadamente 0.18 µg/U, aproximadamente 0.2 µg/U, aproximadamente 0.21 µg/U, aproximadamente 0.22 µg/U, aproximadamente 0.23 µg/U, aproximadamente 0.234 µg/U, aproximadamente 0.24 µg/U, aproximadamente 0.25 µg/U, aproximadamente 0.26 µg/U, aproximadamente 0.28 µg /U o aproximadamente 0.3 µg por U de toxina botulínica.

En algunas modalidades, la composición que contiene toxina botulínica puede contener de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 µg, aproximadamente 5 a aproximadamente 15 µg, aproximadamente 7 a aproximadamente 12 µg, o aproximadamente 8 a aproximadamente 10 µg o aproximadamente 9 µg del portador. En una modalidad preferida, la toxina botulínica está en una cantidad de dosis seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 20 U a aproximadamente 60 U, p. ej., aproximadamente 40 U y el portador es un portador cargado positivamente presente en la composición en una cantidad seleccionada de aproximadamente 4.7 a aproximadamente 14 µg para proporcionar una relación de 0.234 µg/U de toxina botulínica.

Generalmente, la relación de masa del portador, preferiblemente RTP004, al componente de toxina botulínica, preferiblemente la toxina tipo A de 150 kDa sin proteínas accesorias, es aproximadamente 15,000:1 a aproximadamente 60,000:1, preferiblemente aproximadamente 20,000:1 a aproximadamente 55,000:1, tal como aproximadamente 25,000:1, aproximadamente 30,000:1, aproximadamente 35,000:1, aproximadamente 40,000:1, aproximadamente 45,000:1 o aproximadamente 50,000:1. En modalidades más particulares, la relación de masa al portador, preferiblemente RTP004 al componente de toxina botulínica, preferiblemente la toxina tipo A de 150 kDa sin proteínas accesorias, es de aproximadamente 21,000:1, aproximadamente 22,000:1, aproximadamente 23,000:1, aproximadamente 24,000:1 o aproximadamente 25,000:1; en otras modalidades más particulares, la relación de masa al portador, preferiblemente RTP004 al componente de toxina botulínica, preferiblemente la toxina tipo A de 150 kDa sin proteínas accesorias es de aproximadamente 49,000:1, aproximadamente 50,000:1, aproximadamente 51,000:1, aproximadamente 52,000:1 o aproximadamente 53,000:1. Por ejemplo, por 50 U o por 100 U de toxina, la masa del portador peptídico puede ser de aproximadamente 10 µg, aproximadamente 11 µg o aproximadamente 12 µg, tal como de aproximadamente 11.7 µg en algunas modalidades particularmente preferidas, tal como cuando la cantidad de toxina es de aproximadamente 40 U. En una modalidad, la relación molar del portador, preferiblemente RTP004 al componente de toxina botulínica, preferiblemente la toxina tipo A de 150 kDa sin proteínas accesorias, es una relación molar 3:1 de portador:toxina.

En algunas modalidades, el portador se proporciona en la composición que contiene toxina botulínica en una cantidad de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 1 µg por U del componente de toxina botulínica, preferiblemente de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 µg por U, más preferiblemente de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.1 µg por U y más preferiblemente de aproximadamente 0.075 µg por unidad de toxina botulínica. En algunas modalidades preferidas, se usa un

portador cargado positivamente en una cantidad mayor a aproximadamente 1.75 µg por 40 U de la molécula de toxina botulínica de 150 kDa sin proteínas accesorias, que es mayor a aproximadamente 0.04 µg/U, hasta aproximadamente 0.1 µg/U, aproximadamente 0.2 µg/U, aproximadamente 0.4 µg/U, aproximadamente 0.6 µg/U, aproximadamente 0.8 µg/U o aproximadamente 1/ µg U. Por ejemplo, las composiciones inyectables de la presente invención pueden comprender aproximadamente 0.045 µg/U, aproximadamente 0.050 µg/U, aproximadamente 0.055 µg/U, aproximadamente 0.060 µg/U, aproximadamente 0.065 µg/U, aproximadamente 0.070 µg/U, aproximadamente 0.075 µg/U, aproximadamente 0.080 µg/U, aproximadamente 0.085 µg/U, aproximadamente 0.090 µg/U, aproximadamente 0.095 µg /U, o aproximadamente 0.1 µg por U de toxina botulínica.

En una modalidad particular, el portador cargado positivamente es RKKRRQRRRG- (K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4) (también denominado en la presente “RTP004”) y está presente a aproximadamente 3 µg por 40 U de toxina botulínica, haciendo referencia a la molécula de proteína de toxina de 150 kDa sin proteínas accesorias. En una modalidad particular de las composiciones inyectables, la toxina botulínica está presente en una cantidad de aproximadamente 20 U, 40 U o 60 U (haciendo referencia a la molécula de la proteína toxina de 150 kDa sin proteínas accesorias) y el portador RTP004 está en una cantidad de aproximadamente 1.5 µg, aproximadamente 3.0 µg o aproximadamente 4.5 µg, respectivamente.

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de las composiciones para usarse en el logro de altas tasas de respuesta y/o larga duración de un efecto terapéutico o cosmético, generalmente se preparan mezclando el componente de toxina botulínica (que contiene las proteínas no tóxicas asociadas, proteínas no tóxicas asociadas reducidas o la molécula de 150 kD sola sin proteínas accesorias no tóxicas) con un portador descrito en la presente y además con uno o más excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados para inyección. En su forma más simple, pueden contener un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, como solución salina amortiguada (p. ej., solución salina amortiguada con fosfatos). La formulación farmacéutica también puede contener otros ingredientes típicamente encontrados en composiciones farmacéuticas o cosmeceúticas inyectables, que incluyen un portador, vehículo o medio farmacéuticamente aceptable que es compatible con los tejidos a los que se aplicará.

El término “farmacéuticamente aceptable” describe composiciones o componentes que son adecuados para usarse en contacto con tejidos a los que se aplicarán las composiciones o componentes, o para usarse en pacientes en general, sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica indebida y similares. Según sea adecuado, las composiciones de la invención pueden comprender cualquier ingrediente usado convencionalmente en los campos bajo consideración, particularmente en cosmética y dermatología.

Por ejemplo, las formulaciones para uso inyectable pueden contener, según corresponda, ingredientes típicamente utilizados en dichos productos, tales como antimicrobianos, agentes hidratantes, agentes de relleno de tejidos o rellenos de tejidos, conservantes, emulsionantes, aceites naturales o sintéticos, disolventes, tensoactivos, detergentes, agentes gelificantes, antioxidantes, rellenos, espesantes,

polvos, agentes para controlar la viscosidad y agua, y opcionalmente incluyen anestésicos, activos contra la picazón, extractos botánicos, agentes acondicionadores, minerales, polifenoles, siliconas o derivados de los mismos, vitaminas y fitomedicinales.

En modalidades preferidas, las formulaciones que contienen toxina botulínica no comprenden albúmina u otros excipientes derivados de proteínas animales. Como se señaló anteriormente, un estabilizador exógeno (p. ej., albúmina) se agrega típicamente para estabilizar las formulaciones de toxina botulínica convencionales. Por ejemplo, en el caso de BOTOX®, se usan 0.5 mg de albúmina humana por 100 U de complejo de toxina botulínica tipo A para estabilizar el complejo. En modalidades preferidas, la cantidad de estabilizante añadido en las composiciones de toxina botulínica de la presente es menor que la cantidad añadida convencionalmente, debido a la capacidad del componente portador para actuar como estabilizador por derecho propio. Por ejemplo, la cantidad de albúmina exógena agregada puede ser una cantidad menor al exceso convencional a mil veces de la albúmina exógena. En modalidades particularmente preferidas, no se agrega albúmina exógena como un estabilizador a las composiciones de la invención, produciendo de esta manera composiciones de toxina botulínica libres de albúmina. En algunas modalidades más particularmente preferidas, la formulación contiene poco o ninguna otra proteína derivada de animales, dando un producto libre de proteínas animales.

Formulaciones inyectables

Las formulaciones inyectables pueden estar en cualquier forma adecuada para administración por inyección y/o almacenamiento hasta su uso en dicha administración. Por ejemplo, las formulaciones inyectables de las composiciones usadas para tratar las líneas glabellares, de acuerdo con algunas modalidades de esta invención, pueden incluir soluciones, emulsiones (incluidas microemulsiones), suspensiones, geles, polvos u otras composiciones sólidas o líquidas típicas usadas en conexión con administración por inyección a músculo y otros tejidos objetivo en relación con el uso cosmético de la toxina botulínica.

En modalidades preferidas, las composiciones de la invención están presentes en formulaciones estériles, de baja viscosidad adecuadas para inyección con una jeringa. Las composiciones de la invención pueden estar en forma de un polvo liofilizado que se reconstituye para su uso, por ejemplo, usando solución salina estéril u otros diluyentes, excipientes o vehículos fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables, especialmente aquellos conocidos para usarse en formulaciones inyectables. En ciertas modalidades, 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 (0.0001 a 2 Pa·s), más preferiblemente de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 500 cP (0.0002 a 0.5 Pa·s), aún más preferiblemente de aproximadamente 0.3 a aproximadamente 50 cP (0.0003 a 0.05 Pa·s) y aún más preferiblemente de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 2.0 cP (0.0004 a 0.002 Pa·s).

En algunas modalidades, las formulaciones inyectables pueden estar en forma de composiciones de liberación controlada o de liberación sostenida, que comprenden el componente de toxina botulínica y un portador cargado positivamente encapsulado o contenido de otro modo dentro de un material para que se liberen dentro del tejido de una manera controlada a lo largo del tiempo. Por ejemplo, la composición

que comprende la toxina botulínica y el portador cargado positivamente puede estar contenido 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 se pueden encapsular junto con
 5 (es decir, en la misma cápsula) o por separado (es decir, en cápsulas por separado).

En algunas modalidades, el excipiente de la composición para inyección que contiene toxina botulínica comprende uno o más componentes estabilizadores adicionales. En algunas modalidades, las composiciones de la invención comprenden formulaciones líquidas (acuosas) que comprenden una toxina botulínica y un portador cargado positivamente como se describe en la presente, así como uno o más
 10 seleccionados del grupo que consiste en un azúcar no reductor (tal como un disacárido reductor o un trisacárido no reductor), un tensoactivo no iónico y un amortiguador fisiológicamente compatible, que es capaz de mantener un pH adecuado. Los pH adecuados incluyen, por ejemplo, pH en el rango de pH 4.5 a pH 7.5 o pH 4.5 a pH 6.8, o pH 4.5 a pH 6.5. Se debe entender que un pH adecuado incluye también los valores de pH superiores e inferiores en el rango, p. ej., un pH de 6.5 o un pH de 7.5. Tales formulaciones
 15 farmacéuticas se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense núm. 9,340,587 de Thompson *et al.*, titulada "Formulaciones de toxina botulínica libre de albúmina;" patente estadounidense núm. 9,956,435, de Ruegg *et al.* titulada "Formulaciones inyectables de toxina botulínica;" y WO 2014/066916 (PCT/US2013/67154) de Ruegg *et al.* "Composiciones y métodos para el tratamiento seguro de la rinitis", incorporadas por referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, la concentración del azúcar no reductor en la composición líquida está en el rango de aproximadamente 10 % a aproximadamente 40 % (p/v) y la concentración del tensoactivo no iónico está en el intervalo de aproximadamente 0.005 % a aproximadamente 0.5 % > (p/v). Las composiciones líquidas pueden secarse, preferiblemente por liofilización, para producir composiciones sólidas estabilizadas, que después pueden reconstituirse para su uso, como se describe anteriormente.
 25 Preferiblemente, las composiciones secas, p. ej., liofilizadas, sólidas son composiciones sólidas no cristalinas y amorfas y pueden estar en forma de polvos.

En ciertas modalidades, las composiciones de la invención contienen un azúcar no reductor, que es preferiblemente un disacárido, cuyos ejemplos no limitantes incluyen trehalosa, incluidas sus formas anhidras e hidratadas o sacarosa, así como combinaciones de los mismos. En algunas modalidades, la
 30 forma hidratada de trehalosa, dihidrato de trehalosa, es preferible. En otras modalidades, las composiciones contienen un trisacárido, un ejemplo no limitante del mismo es la rafinosa. En general, la concentración del azúcar no reductor, preferiblemente un disacárido, está en el intervalo de 10 % > a 40 % > (p/v), preferiblemente de aproximadamente 10 % > a aproximadamente 25 % > (p/v), más preferiblemente de aproximadamente 15 % a aproximadamente 20 % (p/v). En algunas modalidades preferidas, la
 35 concentración del azúcar no reductor, preferiblemente un disacárido es de aproximadamente 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 % >, 18 % >, 19 % o 20 % (p/v).

En general, las composiciones de la invención pueden incluir cualquier tensoactivo no iónico que tenga la capacidad de estabilizar la toxina botulínica y que sea adecuado para uso farmacéutico. En

algunas modalidades, el tensoactivo no iónico es un polisorbato, tal como, a modo de ejemplo no limitativo, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y polisorbato 80. En otras modalidades, el tensoactivo no iónico es un éster de sorbitán, cuyos ejemplos no limitantes incluyen SPAN® 20, SPAN® 60, SPAN® 65 y SPAN® 80. Se pueden utilizar también los tensoactivos no iónicos Triton® X- 100 o NP-40. Además, se puede usar una combinación de los diferentes tensoactivos no iónicos. En ciertas modalidades preferidas, el tensoactivo no iónico es un polisorbato, un poloxámero y/o un sorbitán, los polisorbatos y los sorbitanos son particularmente preferidos. En algunas modalidades, el tensoactivo no iónico está presente en las composiciones de la invención en el intervalo de aproximadamente 0.005 % a aproximadamente 0.5 %, de aproximadamente 0.01 % a aproximadamente 0.2 %, de aproximadamente 0.02 % a aproximadamente 0.1 %, o de aproximadamente 0.05 % a aproximadamente 0.08 %, incluyendo los valores superiores e inferiores. En algunas modalidades preferidas, las composiciones de la invención contienen un tensoactivo no iónico en la cantidad de (aproximadamente) 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 %.

En general, para las formulaciones inyectables en la presente, cualquier amortiguador fisiológicamente compatible capaz de mantener un pH apropiado es adecuado para su uso. Ejemplos no limitantes de tales amortiguadores incluyen sales de ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico e histidina. Los ejemplos no limitantes de concentraciones de amortiguador adecuadas incluyen concentraciones de amortiguadores en el intervalo de aproximadamente 0.400 % a aproximadamente 0.600 %, de aproximadamente 0.450 % a aproximadamente 0.575 %, o de aproximadamente 0.500 % a aproximadamente 0.565 %. Las composiciones de la invención también pueden comprender una mezcla de sales amortiguadoras, cuyos ejemplos no limitantes incluyen citrato/acetato, citrato/histidina, citrato/tartrato, maleato/histidina o succinato/histidina.

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 y que no tiene proteínas accesorias asociadas; un portador cargado positivamente (p. ej., péptido); un disacárido no reductor o un trisacárido no reductor, preferiblemente un disacárido, presente en un intervalo de 10 % a 40 % (p/v); un tensoactivo no iónico, preferiblemente, un polisorbato o un éster de sorbitán, presente en el intervalo de 0.005 % a 0.5 % (p/v); y un amortiguador fisiológicamente compatible, tal como ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico o histidina, presente en el intervalo de 0.400 % a 0.600 %; de 0.450 % a 0.575 %, de 0.500 % a 0.565 %, para mantener el pH entre 4.5. y 7.5.

En modalidades particularmente preferidas, la formulación farmacéutica para inyección comprende L-histidina y/o clorhidrato de L-histidina como agentes estabilizadores adicionales. En modalidades particularmente preferidas, el excipiente comprende dihidrato de trehalosa, polisorbato 20, L-histidina y clorhidrato de L-histidina.

Uso de las formulaciones inyectables

En otro aspecto de la invención, las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente se usan para producir un efecto biológico, preferiblemente un efecto biológico de duración prolongada y/o un efecto

producido en porcentajes más altos de pacientes tratados, con respecto a un beneficio terapéutico o cosmético deseado. La formulación farmacéutica generalmente se administra a un individuo en necesidad de la misma para proporcionar una cantidad terapéutica o cosméticamente eficaz de toxina botulínica. El término “en necesidad de” pretende incluir tanto las necesidades farmacéuticas como las relacionadas con la salud (p. ej., tratar afecciones que involucran espasmos musculares faciales indeseables), así como las necesidades cosméticas y subjetivas (p. ej., alterar o mejorar la apariencia del tejido facial).

Las formulaciones de toxina botulínica de acuerdo con la invención pueden administrarse mediante inyección (típicamente usando una jeringa) a los músculos subyacentes de la piel, o a las estructuras glandulares dentro de la piel u otras estructuras blanco, en una cantidad eficaz para producir parálisis, producir relajación, aliviar las contracciones, prevenir o aliviar espasmos, reducir el gasto glandular u otros efectos deseados. La administración local de la toxina botulínica de esta manera puede permitir reducciones de dosis, reducir la toxicidad y permitir una optimización de dosis más precisa para los efectos deseados en relación con otros materiales inyectables o implantables.

Las composiciones de la invención se administran para suministrar una cantidad terapéuticamente o cosméticamente eficaz de la toxina botulínica. El término “cantidad eficaz” o “cantidad terapéutica o cosméticamente eficaz”, como se usa en la presente, significa una cantidad de toxina botulínica 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 para evitar efectos secundarios graves. Los efectos deseados incluyen la relajación de ciertos músculos con el objetivo de, por ejemplo, disminuir la aparición de líneas finas y/o arrugas, especialmente en la cara, o ajustar la apariencia facial de otras maneras, como ampliar los ojos, levantar las esquinas de la boca, o líneas suaves que se extienden desde el labio superior, o el alivio general de la tensión muscular, p. ej., en la cara o en algún otro lugar.

La toxina botulínica se puede administrar mediante inyección a los músculos u otras estructuras a la piel o al tejido blanco. Generalmente, una formulación de acuerdo con la invención se inyecta en un lugar o lugares donde se desea un efecto asociado con la toxina botulínica. La administración se puede realizar, por ejemplo, a la cara, piernas, hombros (incluyendo espalda baja), axila, palmas, pies, cuello, cara, ingle, dorso de las manos o pies, codos, parte superior de los brazos, rodillas, parte superior de las piernas, glúteos, torso, pelvis o cualquier otra parte del cuerpo donde se desee la administración de la toxina botulínica.

La administración de las composiciones inyectables que contienen toxina botulínica de esta invención se puede llevar a cabo para tratar cualquier afección para la cual la prevención de la transmisión sináptica o la liberación de acetilcolina conferiría un beneficio terapéutico o cosmético. Por ejemplo, las condiciones que se pueden tratar por las composiciones de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, dolor neurológico, dolor de cabeza tipo migraña u otro dolor de cabeza, vejiga hiperactiva, rinitis, sinusitis, acné, distonía, contracciones distónicas (ya sean subjetivas o clínicas), hiperhidrosis (ya sea subjetiva o clínica) e hipersecreción de una o más glándulas controladas por el sistema nervioso colinérgico. Las composiciones de esta invención también pueden usarse para reducir o mejorar la respuesta inmune, o el tratamiento de otras afecciones para las cuales se ha sugerido o realizado la

administración de toxina botulínica por inyección. En algunas modalidades, el efecto biológico es la reducción de los espasmos musculares faciales indeseables u otros espasmos musculares.

En modalidades particulares, la composición que contiene toxina botulínica se administra para reducir la gravedad de las arrugas, líneas finas, surcos, particularmente en la cara, tal como una reducción en la gravedad de las líneas glabellares. Las composiciones de la invención son particularmente adecuadas para el tratamiento de líneas finas, tales como líneas finas faciales y líneas glabellares de un sujeto.

La glabella es la piel entre las cejas y sobre la nariz. Las líneas glabellares o faciales glabellares (a menudo denominadas "líneas de expresión") son aquellas líneas verticales que se desarrollan entre las cejas y pueden aparecer como una sola línea vertical o como dos o más líneas y también pueden aparecer en ángulo hacia las esquinas interiores de las cejas. Cuando una persona frunce el ceño, los músculos de la parte inferior de la frente se contraen en dirección descendente, lo que hace que la piel entre las cejas se arrugue. Las líneas se forman por la acción repetida de fruncir el ceño debido a la falta de elasticidad en la piel. Más específicamente, las líneas glabellares surgen de los músculos corrugador lateral y prócer vertical en la cara. El corrugador deprime la piel creando una línea vertical, es decir, un surco rodeado por crestas de músculos tensos (es decir, líneas de expresión). La edad, la exposición al sol y la genética son factores contribuyentes. La toxina botulínica se usa para bloquear los impulsos nerviosos, paralizando temporalmente los músculos que causan las líneas de expresión, dando a la piel una apariencia más suave y fresca.

La gravedad de las líneas glabellares de un sujeto puede ser evaluada por varios criterios, ya sea por un profesional de la salud y/o por el sujeto. Para la evaluación de alguien diferente del sujeto, se puede utilizar un sistema de puntuación de clasificación de Evaluación Global por el Investigador - Gravedad de Arrugas Faciales (IGA-FWS). Específicamente, la puntuación de clasificación de IGA-FWS de (0) se utiliza para indicar que no hay gravedad de las arrugas faciales; se utiliza una puntuación de clasificación de IGA-FWS de (1) para indicar la gravedad leve de las arrugas faciales; se utiliza una puntuación de clasificación de IGA-FWS de (2) para indicar una gravedad moderada de las arrugas faciales; y se utiliza una puntuación de clasificación de IGA-FWS de (3) para indicar la gravedad severa de las arrugas faciales. Como lo aprecia un técnico en la materia, una guía fotográfica muestra los grados de gravedad de las arrugas y puede ser utilizada por la persona que realiza la evaluación, durante el entrenamiento previo y/o como referencia durante la evaluación.

Se puede utilizar la Gravedad de las Arrugas Faciales por el Paciente (PFWS) por el sujeto mismo para evaluar la gravedad de sus arrugas faciales. Los sujetos pueden completar la PFWS basándose en el ceño fruncido al máximo para evaluar la gravedad de las líneas glabellares. El sujeto puede verse en un espejo o en una imagen de sí mismo. El sistema de puntuación de clasificación PFWS es como sigue: una puntuación de clasificación de PFWS de (0) indica que no hay gravedad de las arrugas, con la descripción asociada de "sin arrugas", una puntuación de clasificación de PFWS de (1) indica gravedad leve de las arrugas, con la descripción asociada de "arrugas muy superficiales"; una puntuación de clasificación de PFWS de (2) indica gravedad moderada de las arrugas, con la descripción asociada de "arrugas moderadas"; y una puntuación de clasificación de PFWS de (3) indica gravedad grave de las arrugas, con

la descripción asociada de “arrugas profundas”.

La apariencia visual de arrugas, líneas o surcos también se puede evaluar utilizando una serie de criterios diferentes o adicionales, como la Escala de Mejoría Estética Global del Paciente (GAIS, por sus siglas en inglés). Esta escala se puede utilizar por el sujeto o una persona diferente al sujeto para evaluar la apariencia visual de una línea glabellar, tal como el ceño fruncido al máximo y/o en reposo después del ceño fruncido al máximo, para determinar la mejora de la condición inicial. En algunas modalidades, se usa una GAIS de gravedad de 7 puntos, cuando una puntuación de clasificación de “3” indica “muchísimo mejor”, una puntuación de clasificación de “2” indica “mucho mejor”; una puntuación de clasificación de “1” indica “mejor”; una puntuación de clasificación de “0” indica “sin cambio”; una puntuación de clasificación de “-1” indica “peor”; una puntuación de clasificación de “-2” indica “mucho peor” y una puntuación de clasificación de “-3” indica “muchísimo peor”. Un sujeto puede usar un espejo o una fotografía de sí mismo/misma para la evaluación.

En algunas modalidades, los métodos de la invención producen un efecto de reducción en la gravedad de las arrugas moderadas y/o severas, de acuerdo con una o más de las escalas descritas anteriormente, preferiblemente arrugas moderadas a graves. Una reducción en la gravedad puede ser una mejora de 1 punto, 2 puntos o 3 puntos o más, en una o más escalas descritas en la presente.

La seguridad y la eficacia de las formulaciones inyectables descritas en la presente también se pueden evaluar evaluando uno o más nervios craneales después de la inyección en la región de la cara, cabeza o cuello, como uno o más nervios craneales que inervan el objetivo y la musculatura adyacente. Por ejemplo, en algunas modalidades, se evalúan los nervios craneales II a VII, donde el nervio craneal II es el nervio óptico, el nervio craneal III es el nervio oculomotor, el nervio craneal IV es el nervio troclear, el nervio craneal V es el nervio trigémino, el nervio craneal VI es el nervio abducens y el nervio craneal VII es el nervio facial.

La seguridad y la eficacia de las formulaciones inyectables descritas en la presente también pueden evaluarse evaluando la fuerza de los músculos faciales después de la inyección en el área de la cara, la cabeza o el cuello. La fuerza de los músculos faciales se puede evaluar utilizando la Escala del Consejo de Investigación Médica para la Evaluación de la potencia muscular (MRC, por sus siglas en inglés). La MRC es una escala confiable y validada para evaluar la debilidad muscular y ayuda a la investigación de lesiones nerviosas periféricas. Por ejemplo, se puede evaluar la fuerza de los músculos orbicular (párpado), elevadores laterales de la ceja y los músculos laterales orbitales zigomáticos en cada lado de la cara. En la escala MRC, una clasificación de (0) corresponde a “sin movimiento”; una clasificación de (1) corresponde a “parpadeo perceptible en el músculo”; una clasificación de (2) corresponde a “movimiento solo si se elimina la gravedad”; una clasificación de (3) corresponde a “puede mover la extremidad contra la gravedad”; una clasificación de (4) corresponde a “puede moverse contra la gravedad y cierta resistencia ejercida por el examinador” y una clasificación de (5) corresponde a “potencia normal”.

Dosificación y administración

Los métodos y composiciones descritos en la presente proporcionan el componente de toxina botulínica en una dosis o cantidad eficaz para lograr al menos un efecto biológico, preferiblemente un efecto

biológico de duración prolongada, con respecto a un beneficio terapéutico o cosmético deseado, más preferiblemente lograr el efecto en un porcentaje mayor de sujetos que reciben tratamiento. Generalmente, se proporcionan cantidades terapéutica o cosméticamente eficaces como dosis en unidades de toxina botulínica contenidas en las formulaciones farmacéuticas para administración por inyección, de acuerdo con la presente invención.

En ciertas modalidades que usan formulaciones inyectables, la toxina botulínica se administra para proporcionar de aproximadamente 1 U a aproximadamente 300 U, preferiblemente de aproximadamente 10 U a aproximadamente 200 U, más preferiblemente de aproximadamente 20 U a aproximadamente 100 U; o más específicamente, de aproximadamente 10 U a aproximadamente 30 U, de aproximadamente 30 U a aproximadamente 50 U, o de aproximadamente 50 U a aproximadamente 70 U por tratamiento inyectable. En modalidades preferidas, las composiciones que contienen toxina botulínica de la invención se administran a un sujeto en necesidad de las mismas mediante inyección de manera tal que, se proporciona una dosis mayor que aproximadamente 10 U, aproximadamente 20 U, aproximadamente 30 U, aproximadamente 40 U, aproximadamente 60 U o aproximadamente 80 U de la toxina botulínica. En modalidades preferidas, la composición se administra mediante inyección en una cantidad 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 tratamiento inyectable. Las cantidades o dosis entre las cantidades o dosis anteriores también están contempladas, 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 modalidades particularmente preferidas, la toxina botulínica está en una cantidad de dosificación seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 10 U, aproximadamente 20 U, aproximadamente 30 U, aproximadamente 40 U, aproximadamente 60 U y aproximadamente 80 U, más preferiblemente la toxina botulínica del serotipo A, más preferiblemente la molécula de 150 kDa de toxina botulínica del serotipo A sin proteínas accesorias. Generalmente, en una cantidad de aproximadamente 100 pg/kg de la molécula de 150 kDa de toxina botulínica A sin proteínas accesorias corresponderá a aproximadamente 16 U/kg, en formulaciones inyectables líquidas de la presente invención. En una modalidad particular, la composición se administra por inyección como una dosis de tratamiento única en una cantidad que proporciona 20 U, 30 U, 35 U, 40 U, 45 U, 50 U o 60 U de toxina botulínica para resultar en una disminución de arrugas y/o líneas faciales, como una reducción en la gravedad de las líneas glabellares.

Un “tratamiento inyectable” se refiere a un tratamiento único que puede comprender una o más inyecciones al paciente, p. ej., todas dentro de una sola visita del paciente, como una serie de inyecciones administradas dentro de segundos o minutos entre sí; y/o administrado en la misma área general del cuerpo del paciente (p. ej., el complejo glabellar) a través de uno o más sitios de inyección en proximidad relativamente cercana (p. ej., aproximadamente 1 cm, aproximadamente 2 cm, aproximadamente 3 cm, aproximadamente 4 cm o aproximadamente 5 cm de separación).

En general, los métodos y procedimientos para medir la actividad de la toxina botulínica, es decir, unidades (U) de la actividad de toxina botulínica, son conocidos y practicados por los técnicos en la materia.

Brevemente, los ensayos de dosis letal media (ensayos LD₅₀) 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 comercialmente 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 calculada (LD₅₀) en ratones hembra Swiss-Webster. Véase, Hoffman, R.O. et al., 1986, *Int. Ophthalmol. Clin.*, 26:241-50, así como DePass, L.R., 1989, *Toxicol. letters*, 49:159-170; y Pearce, L.B. et al., 1994, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 128:69-77, que describen también los ensayos de letalidad en la técnica.

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: Cuarenta y ocho (48) ratones hembra CD-1 con un peso de 17 a 23 gramos se asignan aleatoriamente a seis dosis del elemento 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 elemento de prueba se refiere a la preparación de toxina botulínica o la muestra que se ensaya o analiza. Los animales se alojan ocho por jaula y se pesan dentro de las 24 horas posteriores a la 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 mediante inyección intraperitoneal. Después de la inyección, los ratones regresan 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 obtener el valor LD₅₀ en relación con un estándar de referencia que se evalúa utilizando el 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 para comparación para derivar la potencia relativa del artículo de prueba. El valor LD₅₀ determinado se corrige para las diluciones acumulativas realizadas para asignar un valor de potencia relativa para el artículo de prueba puro (sin diluir).

Las alternativas a las pruebas LD₅₀ incluyen ensayos que utilizan líneas celulares neuronales o pruebas de endopeptidasa, que evitan las pruebas en animales (véase, por ejemplo, Sesardic *et al.*, "Alternatives a the LD50 assay durante botulinum toxin potency testing: Strategies and progress towards refinement, reduction and replacement" *Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences*, August 21-25, 2007, 14 Special Issue, pp 581-585). Tales métodos se pueden usar, además o en lugar de los ensayos de LD₅₀, para determinar las unidades de toxina botulínica para un componente de toxina botulínica de las composiciones de la invención.

Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden contener una cantidad terapéutica o cosméticamente eficaz de la toxina botulínica para su aplicación como un tratamiento de dosis única, tal como una inyección única o un tratamiento inyectable único. Alternativamente, las formulaciones farmacéuticas pueden ser más concentradas, p. ej., para la dilución en el lugar de administración, o pueden contener cantidades terapéuticamente o cosméticamente eficaces de la toxina botulínica para usarse en múltiples aplicaciones, como el uso en un número específico de aplicaciones secuenciales sobre un curso de tratamiento o durante un período de tiempo. La administración local de la toxina botulínica, como se

describe en la presente, puede proporcionar reducciones de dosis, reducir la toxicidad y permitir una optimización de dosis más precisas para los efectos deseados en relación con las formulaciones de toxina botulínica convencionales. En modalidades preferidas, la dosis (p. ej., en unidades y el volumen) se selecciona para optimizar el suministro de la toxina al receptor/neurotransmisor blanco que contiene músculo o nociceptores fasciales/periósticos. La optimización se puede basar, por ejemplo, en los principios de distribución de dilución de dosis (véase, p. ej., patente estadounidense núm. 8,632,768 y la patente estadounidense núm. 8,506,970).

Generalmente, la formulación farmacéutica que contiene toxina botulínica se administra a un paciente en necesidad de la misma, mediante inyección en, o cerca de, uno o más de los músculos asociados con la afección a tratar, en un paciente en necesidad de la misma. La administración “cerca de” o “en” una estructura significa la administración lo suficientemente cerca de la estructura para permitir que el componente de toxina botulínica se difunda fácilmente a la estructura, teniendo en cuenta la difusión reducida de las composiciones de toxina botulínica descritas en la presente. Por ejemplo, la administración cerca del complejo glabellar significa la administración dentro de aproximadamente 0.05 mm, aproximadamente 0.1 mm, aproximadamente 0.5 mm, aproximadamente 1 mm, aproximadamente 5 mm, aproximadamente 10 mm, aproximadamente 15 mm o aproximadamente 20 mm de la estructura blanco. En ciertas modalidades, se puede usar ultrasonido u otras técnicas de visualización para guiar la colocación de la inyección o las fracciones de inyección.

En modalidades particulares, la condición es líneas glabellares graves a moderadas, y la formulación farmacéutica se inyecta en uno o más músculos del complejo glabellar. La formulación se puede inyectar aplicando presión con el dedo sobre el borde orbital medial superior mientras se impulsa la aguja a través de la piel hacia el músculo subyacente. En modalidades más particulares, una dosis de tratamiento se divide entre inyecciones en uno o más músculos seleccionados del grupo que consiste en el músculo corrugador derecho, el músculo corrugador izquierdo y el músculo prócer, administrados durante un tratamiento inyectable dado. Por ejemplo, la dosis de tratamiento total puede dividirse en la mitad, tercios, cuartos, quintos, sextos, séptimos, octavos, novenos o décimos, etc., y se inyectan cantidades de dosis específicas en diferentes estructuras blanco.

Por ejemplo, en una modalidad, se inyecta una fracción de la dosis de tratamiento total en cada uno de varios sitios de inyección en la frente, entre las cejas del sujeto sometido a tratamiento. Por ejemplo, se inyecta una dosis de aproximadamente 10 U a aproximadamente 20 U, aproximadamente 10 U a aproximadamente 15 U, o aproximadamente 13 U de toxina botulínica en cada uno de los músculos corrugadores izquierdos, el músculo corrugador derecho y el músculo prócer. Como otro ejemplo, se inyecta una dosis de aproximadamente 10 U a aproximadamente 30 U, aproximadamente 15 U a aproximadamente 20 U, o aproximadamente 16 U de toxina botulínica en cada uno de los músculos corrugador izquierdo y corrugador derecho, y se inyecta una dosis de aproximadamente 5 U a aproximadamente 15 U, aproximadamente 7 U a aproximadamente 10 U, o aproximadamente 8 U de toxina botulínica en el músculo prócer. En una modalidad especialmente preferida, se aplican dos inyecciones en cada músculo corrugador, y una inyección en el músculo prócer, para un total de 5 inyecciones, por ejemplo,

una dosis de aproximadamente 5 U a aproximadamente 15 U, aproximadamente 7 U a aproximadamente 10 U, o aproximadamente 8 U de toxina botulínica se inyecta en cada una de los aspectos mediales del músculo corrugador izquierdo, el aspecto lateral del músculo corrugador izquierdo, el aspecto medial del músculo corrugador derecho, el aspecto lateral del músculo corrugador derecho y el músculo prócer.

5 En algunas modalidades, el paciente a tratar 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, 72, 73, 75, 77, 78, 80 años o más.

Más preferiblemente, las formulaciones se administran con 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
10 largo del tiempo. Debido a su naturaleza, la toxina botulínica se administra preferiblemente en una cantidad, velocidad de aplicación y frecuencia que producirá el resultado deseado sin producir resultados adversos o indeseados graves.

Duración prolongada

En otro aspecto, la invención proporciona métodos y usos de las formulaciones farmacéuticas,
15 descritas en la presente, para lograr una duración del efecto prolongada. En modalidades preferidas, las formulaciones descritas en la presente se usan para administrar toxina botulínica a un sujeto en necesidad de la misma para producir un efecto terapéutico de duración prolongada en comparación con los tratamientos que usan formulaciones convencionales de toxina botulínica. En algunas modalidades, el método comprende administrar mediante inyección una dosis terapéutica o cosméticamente eficaz de una
20 formulación inyectable estéril, como se describe en la presente, preferiblemente en uno o más músculos u otras estructuras asociadas con líneas glabellares u otras líneas o arrugas, para lograr el efecto de duración prolongada después del tratamiento inyectable. En modalidades preferidas, la administración de las composiciones de toxina botulínica resulta en una duración mayor del efecto, tal como una mejora en al menos el efecto biológico asociado con un beneficio terapéutico o cosmético, que dura más que el
25 tratamiento con formulaciones convencionales de toxina botulínica, permitiendo de esta manera intervalos más largos entre tratamientos

Las modalidades particularmente preferidas permiten un efecto terapéutico y/o cosmético, en particular, una reducción en la gravedad de las líneas glabellares, durante aproximadamente 3 meses a aproximadamente 11 meses, aproximadamente 5 meses a aproximadamente 10 meses, aproximadamente
30 6 meses a aproximadamente 10 meses, o aproximadamente 16 semanas hasta aproximadamente 24 semanas, o aproximadamente 28 semanas hasta aproximadamente 40 semanas. En modalidades preferidas, la duración del efecto es al menos aproximadamente 16 semanas, al menos aproximadamente 20 semanas, al menos aproximadamente 24 semanas, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 28 semanas, al menos aproximadamente 7 meses, al menos aproximadamente 30
35 semanas, al menos aproximadamente 32 semanas, al menos aproximadamente 8 meses, al menos aproximadamente 34 semanas, al menos aproximadamente 36 semanas, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 40 semanas, al menos aproximadamente 10 meses o al menos aproximadamente 42 semanas, antes de administrar una segunda o subsecuente dosis de tratamiento. En

modalidades particulares, el intervalo antes de administrar una segunda o subsecuente dosis de tratamiento de la composición es mayor que o igual a 26 semanas, 28 semanas, 30 semanas, 32 semanas, 34 semanas, 36 semanas, 38 semanas, 40 semanas, o mayor que o igual a 42 semanas, después de la dosis de tratamiento inicial o después de las dosis de tratamiento subsecuentes.

La duración del efecto con respecto a la reducción de líneas, arrugas o surcos puede evaluarse mediante cualquier medida descrita en la presente o conocida en la técnica, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, cualquiera o más medidas discutidas en los ejemplos en la presente, en particular el **ejemplo 7**, p. ej., para los puntos finales primarios y/o secundarios, pueden usarse para medir la duración del efecto. Por ejemplo, puede considerarse que una reducción en una línea glabellar dura hasta el momento en que la línea vuelve al inicio, antes del tratamiento inicial; o puede considerarse que dura hasta que se pierden uno o más “puntos”, con base en una o más medidas para evaluar la gravedad de las arrugas, como se describe en la presente; o puede considerarse que duran mientras se mantengan calificaciones de 0 o 1 (ninguna o arrugas leves), nuevamente basado en una o más medidas para evaluar la gravedad de las arrugas, como se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos y usos de las formulaciones farmacéuticas, descritas en la presente, en un régimen de tratamiento para lograr un efecto biológico asociado con un beneficio terapéutico o cosmético, donde los intervalos entre uno o más tratamientos sucesivos son más largos que los de un régimen de tratamiento para el mismo usando formulaciones convencionales de toxina botulínica, como por ejemplo, como cuando se usan múltiples tratamientos para mantener una meta de tratamiento. Por ejemplo, la invención proporciona, en algunas modalidades, un método para reducir la gravedad de las líneas glabellares en un sujeto, donde el método comprende un curso de tratamiento que tiene múltiples tratamientos con una duración de efecto prolongada y, en consecuencia, intervalos más largos entre tratamientos sucesivos en comparación con regímenes que usan formulaciones convencionales de toxina botulínica (es decir, formulaciones que no contienen una molécula portadora, como se describe en la presente). Por ejemplo, los productos que contienen toxina botulínica sin un portador descrito en la presente proporcionan típicamente un efecto durante menos de 6 meses, tal como solo durante aproximadamente de 3 a 4 meses.

En modalidades particulares, el intervalo antes de administrar una segunda o subsecuente dosis de tratamiento de la composición que contiene toxina botulínica es mayor o igual a al menos aproximadamente 26 semanas, al menos aproximadamente 28 semanas, al menos aproximadamente 30 semanas, al menos aproximadamente 32 semanas, al menos aproximadamente 34 semanas, al menos aproximadamente 36 semanas, al menos aproximadamente 38 semanas, al menos aproximadamente 40 semanas, o al menos aproximadamente 42 semanas o igual a aproximadamente 42 semanas, después de la dosis de tratamiento inicial o después de dosis de tratamiento subsecuentes. Una duración media entre dosis puede ser de 23 semanas, al menos 23 semanas o más de 23 semanas; 24 semanas, al menos 24 semanas o más de 24 semanas; 25 semanas, al menos 25 semanas o más de 25 semanas; 26 semanas, al menos 26 semanas o más de 26 semanas; 27 semanas, al menos 27 semanas o más de 27 semanas; 28 semanas, al menos 28 semanas o más de 28 semanas; 30 semanas, al menos 30 semanas o más de

30 semanas, p. ej., hasta aproximadamente un año.

En particular, uno o más de los resultados en los párrafos anteriores de esta sección se obtienen en modalidades que comprenden administrar mediante inyección una dosis de una formulación inyectable estéril en un músculo o estructura facial asociada con la arruga, línea facial o surco (como el complejo glabellar) para lograr una reducción de su gravedad después del tratamiento, preferentemente después de un primer tratamiento. En algunas modalidades de este tipo, la composición comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable para inyección; toxina botulínica, tal como toxina botulínica A, preferiblemente la molécula de 150 kDa sin proteínas accesorias y un portador cargado positivamente que comprende una estructura de polilisina cargada positivamente que tiene covalentemente unido a la misma uno o más grupos de eficacia cargados positivamente que tienen una secuencia de aminoácidos de (gly)_p-RGRDDRRQRRR-(gly)_q (SEQ ID NO: 1), (gly)_p-YGRKKRRQRRR-(gly)_q (SEQ ID NO: 2), o (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q (SEQ ID NO: 3), en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de desde 0 hasta 20, preferentemente en donde el portador comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos de RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4). Más preferentemente, la toxina botulínica se administra mediante inyección al individuo en una dosis de tratamiento única en una cantidad que proporciona de aproximadamente 10 U a aproximadamente 100 U, o aproximadamente 20, 50 o 60 U de toxina botulínica, más preferentemente 40 U por tratamiento inyectable. En un ejemplo particular, la formulación farmacéutica comprende además un disacárido no reductor tal como sacarosa o trehalosa, preferentemente dihidrato de trehalosa; un tensoactivo no iónico, tal como polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, o un éster de sorbitán; y una solución amortiguadora compatible fisiológicamente, tal como ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico e histidina, que es capaz de mantener un pH adecuado, tal como un pH en el intervalo de pH 4.5 a pH 6.5 o en el intervalo de pH 4.5 a pH 7.5, por ejemplo, en cantidades p/v como se describen en la presente; y/o la relación en masa de portador:toxina es de aproximadamente 20,000:1 a aproximadamente 55,000:1, más preferentemente aproximadamente 51,000:1. En modalidades aún más preferidas, la formulación libre de albúmina y/o libre de proteínas animales y la composición farmacéutica comprende 0.1 mg de polisorbato 20, 36 mg de dihidrato de trehalosa y 8 µg, 9 µg, 10 µg, 11 µg, 12 µg, 13 µg, 14 µg y 15 µg, más preferiblemente 11.7 µg, RTP004 por 50 U de la toxina de tipo A de 150 kDa sin proteínas accesorias y la dosis de tratamiento es de 40 U.

En algunas de dichas modalidades, la administración comprende aproximadamente de 3 a 7 inyecciones en un tratamiento único, preferentemente 5 inyecciones en el complejo glabellar, tal como en donde de aproximadamente 5 U a aproximadamente 15 U, aproximadamente 7 U a aproximadamente 10 U, o aproximadamente 8 U del componente de toxina botulínica se inyectan en cada uno de los aspectos mediales del músculo corrugador derecho, el aspecto lateral del músculo corrugador derecho, el aspecto medial del músculo corrugador izquierdo, el aspecto lateral del músculo corrugador izquierdo y el músculo procerus, en un tratamiento único (por ejemplo, todo en una sola visita, en una serie de inyecciones con una diferencia de segundos a minutos entre sí), más preferentemente utilizando de 0.01 a aproximadamente 1 mL/inyección, aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.8 mL/inyección,

aproximadamente 0.04 a aproximadamente 0.6 mL/inyección, aproximadamente 0.06 a aproximadamente 0.4 mL/inyección, aproximadamente 0.08 a aproximadamente 0.2 mL/inyección o aproximadamente 0.1 mL/inyección. Véase también el **ejemplo 7**.

En modalidades preferidas, tales como las mencionadas anteriormente, el efecto terapéutico o cosmético puede tener al menos aproximadamente 6 meses a aproximadamente 10 meses de duración, o aproximadamente una duración de 26 semanas a 40 semanas, antes de que se administre una segunda o una dosis de tratamiento subsecuente. Más preferiblemente, el efecto terapéutico o cosmético prolongado se logra después del tratamiento mediante un tratamiento de inyección única de la composición, tal como mediante una formulación farmacéutica como se describe en el párrafo anterior. Aún más preferiblemente, los regímenes de tratamiento, como se describen en la presente proporcionan una mejora sostenida en la apariencia de las líneas faciales, tal como una reducción sostenida en la gravedad de las líneas glabellares.

En una modalidad particular, una dosis única de una composición de la invención que contiene un portador cargado positivamente como se describe y una toxina botulínica A de 150 kDa, sin proteínas accesorias, en una cantidad de dosificación de 40 U proporciona un efecto de larga duración en el tratamiento de las líneas glabellares, p. ej., durante al menos 24 semanas, 25 semanas, 26 semanas, 27 semanas o 28 semanas, o 30, 32, 34 o 36 semanas, p. ej., hasta aproximadamente un año.

En el curso de tratamiento de acuerdo con la presente invención, las formulaciones inyectables pueden administrarse a intervalos menos frecuentes después de una dosis de tratamiento inicial basada en la duración prolongada del efecto proporcionado por las dosis terapéuticamente y cosméticamente eficaces de las composiciones y métodos de la invención como se describe en la presente. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden administrarse (o dosificarse) a un individuo en necesidad de las mismas aproximadamente dos veces al año, tal como, p. ej., cada 7 meses, 8 meses, 9 meses o 10 meses, u 11 meses o una vez al año, mediante la práctica de los métodos de la invención. En una modalidad particular, a un individuo se le administra una dosis de una composición de la invención dos veces al año. Una duración media entre las dosis puede ser de 23 semanas, 24 semanas, 25 semanas, 26 semanas, 27 semanas, 28 semanas, 29 semanas, o 30 semanas o 31 semanas, 32 semanas, 33 semanas, 34 semanas, 35 semanas o 36 semanas, dependiendo del tratamiento terapéutico o cosmético y/o el deseo de tratamiento de acuerdo con lo determinado por el individuo a tratar.

Tasas de respuesta más altas

Junto con la duración prolongada del efecto o en modalidades alternativas, también se ha encontrado sorprendentemente que el efecto biológico ocurre en una mayor proporción de individuos que reciben tratamiento en comparación con las preparaciones de toxina botulínica disponibles comercialmente, como BOTOX®. Es decir, en algunas modalidades, el efecto terapéutico o cosmético, después de la administración de una formulación que contiene toxina botulínica descrita en la presente, se produce y/o dura durante un período de tiempo prolongado para una mayor proporción de individuos que reciben la formulación farmacéutica de toxina botulínica en comparación con las formulaciones convencionales de toxina botulínica, tales como formulaciones que carecen de un portador cargado positivamente, como se describe en la presente.

Por ejemplo, la administración de una composición farmacéutica descrita en la presente puede producir un efecto biológico, con beneficio terapéutico o cosmético, tal como una reducción en la gravedad de una arruga, línea (p. ej., una línea glabellar) o surco, que dura durante al menos aproximadamente 4 semanas en 40 % a 90 % de los individuos a los que se les administró la formulación. En modalidades preferidas, la respuesta se mantiene, o el efecto dura, durante aproximadamente 4 semanas en aproximadamente 55 % a aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 % a aproximadamente 70 % o de aproximadamente 65 % a aproximadamente 75 % de los individuos a los que se les administró la composición farmacéutica. En algunas modalidades, la respuesta se mantiene o el efecto dura, durante al menos aproximadamente 4 semanas en al menos más de aproximadamente 55 %, más de aproximadamente 56 %, más de aproximadamente 58 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 62 %, más de aproximadamente 65 %, más de aproximadamente 66 %, más de aproximadamente 68 %, más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 72 %, más de aproximadamente 73 % o más de aproximadamente 75 % de los individuos a los que se les administró la formulación farmacéutica, como se describe en la presente (p. ej., como en el **ejemplo 7**), hasta aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, o aproximadamente 90 % de los individuos a los que se les administró la formulación farmacéutica.

En modalidades más preferidas, el efecto, tal como una reducción en la gravedad de una arruga, línea (p. ej., una línea glabellar) o surco, dura durante al menos aproximadamente 16 semanas en aproximadamente 30 % a aproximadamente 80 % de individuos a los que se les administró la formulación, tal como dura durante aproximadamente 16 semanas en aproximadamente 35 % a aproximadamente 40 %, aproximadamente 40 % a aproximadamente 50 % o aproximadamente 50 % a aproximadamente 70 % de los individuos a los que se les administró la formulación farmacéutica. En algunas modalidades, la respuesta se mantiene o el efecto dura, durante al menos aproximadamente 16 semanas en al menos más de aproximadamente 35 %, más de aproximadamente 36 %, más de aproximadamente 38 %, más de aproximadamente 40 %, más de aproximadamente 43 %, más de aproximadamente 45 %, más de aproximadamente 47 %, más de aproximadamente 50 %, más de aproximadamente 53 %, más de aproximadamente 55 %, más de aproximadamente 57 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 63 %, más de aproximadamente 65 %, más de aproximadamente 68 %, más preferiblemente más de 70 %, más de 73 % o más de 75 % de los individuos a los que se les administró la formulación farmacéutica como se describe en la presente (p. ej., como en el **ejemplo 7**), hasta aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 % o aproximadamente 90 % de los individuos a los que se les administró la formulación farmacéutica.

En modalidades aún más preferidas, el efecto, tal como una reducción en la gravedad de una arruga, línea (p. ej., una línea glabellar) o surco, dura durante al menos aproximadamente 24 semanas en aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 % de los individuos a los que se les administró la formulación farmacéutica, tal como, dura durante aproximadamente 24 semanas en aproximadamente 15 % a aproximadamente 20 %, o aproximadamente 20 % a aproximadamente 30 % de los individuos a los que se les administró la formulación farmacéutica. En algunas modalidades, la respuesta se mantiene,

o el efecto dura, durante al menos aproximadamente 24 semanas en al menos más de aproximadamente 15 %, más de aproximadamente 16 %, más de aproximadamente 18 %, más de aproximadamente 20 %, más de aproximadamente 22 %, más de aproximadamente 23 %, más de aproximadamente 25 %, más de aproximadamente 27 %, o más de aproximadamente 30 % de los individuos a los que se les administró la formulación farmacéutica, como se describe en la presente (p. ej., como en el **ejemplo 7**), hasta aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, o aproximadamente 50 % de los individuos a los que se les administró la formulación farmacéutica.

Por lo tanto, los métodos y composiciones para su uso, como se describe anteriormente, proporcionan métodos para reducir la gravedad de una arruga, línea (p. ej., una línea glabellar) o surco de un individuo en necesidad de los mismos, con una tasa de respuesta aumentada para los individuos, a cada uno se le administró la composición farmacéutica, en comparación con individuos a los que se les administraron las formulaciones de toxina botulínica convencionales. En particular, uno o más de los resultados en los párrafos anteriores de esta sección se obtienen en modalidades que comprenden administrar mediante inyección una dosis de una formulación inyectable estéril en un músculo o estructura facial asociada con la arruga, línea facial o surco (como el complejo glabellar) para lograr una reducción de su gravedad después del tratamiento, preferentemente después de un primer tratamiento. En algunas modalidades de este tipo, la composición comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable para inyección; toxina botulínica, tal como toxina botulínica A, preferiblemente la molécula de 150 kDa sin proteínas accesorias y un portador cargado positivamente que comprende una estructura de polilisina cargada positivamente que tiene covalentemente unido a la misma uno o más grupos de eficacia cargados positivamente que tienen una secuencia de aminoácidos de (gly)p- RGRDDRRQRRR-(gly)q (SEQ ID NO: 1), (gly)p-YGRKKRRQRRR-(gly)q (SEQ ID NO: 2), o (gly)p-RKKRRQRRR-(gly)q (SEQ ID NO: 3), en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un número entero de desde 0 hasta 20, preferentemente en donde el portador comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos de RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4). Más preferentemente, la toxina botulínica se administra mediante inyección al individuo en una dosis de tratamiento única en una cantidad que proporciona de aproximadamente 10 U a aproximadamente 100 U, o aproximadamente 20, 50 o 60 U de toxina botulínica, más preferentemente 40 U por tratamiento inyectable. En un ejemplo particular, la formulación farmacéutica comprende además un disacárido no reductor tal como sacarosa o trehalosa, preferentemente dihidrato de trehalosa; un tensoactivo no iónico, tal como polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, o un éster de sorbitán; y una solución amortiguadora compatible fisiológicamente, tal como ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido maleico e histidina, que es capaz de mantener un pH adecuado, tal como un pH en el intervalo de pH 4.5 a pH 6.5 o en el intervalo de pH 4.5 a pH 7.5, por ejemplo, en cantidades p/v como se describen en la presente; y/o la relación en masa de portador:toxina es de aproximadamente 20,000:1 a aproximadamente 55,000:1, más preferentemente aproximadamente 51,000:1. En modalidades aún más preferidas, la formulación es libre de albúmina y/o libre de proteína animal y la composición farmacéutica comprende 0.1 mg de polisorbato 20, 36 mg de dihidratado de trehalosa y 8 µg, 9 µg, 10 µg, 11 µg, 12 µg, 13 µg, 14 µg, 15 µg, más

preferiblemente 11.7 µg RTP004, por 50 U de la toxina tipo A de 150 kDa sin proteínas accesorias (no tóxicas) y la dosis de tratamiento es de 40 U.

En algunas de dichas modalidades, la administración comprende aproximadamente de 3 a 7 inyecciones en un tratamiento único, preferentemente 5 inyecciones en el complejo glabellar, tal como en donde de aproximadamente 5 U a aproximadamente 15 U, aproximadamente 7 U a aproximadamente 10 U, o aproximadamente 8 U del componente de toxina botulínica se inyectan en cada uno de los aspectos mediales del músculo corrugador derecho, el aspecto lateral del músculo corrugador derecho, el aspecto medial del músculo corrugador izquierdo, el aspecto lateral del músculo corrugador izquierdo y el músculo procerus, en un tratamiento único (por ejemplo, todo en una sola visita, en una serie de inyecciones con una diferencia de segundos a minutos entre sí), más preferentemente usar de 0.01 a aproximadamente 1 mL/inyección, aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.8 mL/inyección, aproximadamente 0.04 a aproximadamente 0.6 mL/inyección, aproximadamente 0.06 a aproximadamente 0.4 mL/inyección, aproximadamente 0.08 a aproximadamente 0.2 mL/inyección o aproximadamente 0.1 mL/inyección. Véase también el **ejemplo 7**.

Kits

Esta invención contempla también el uso de una variedad de dispositivos de administración para administrar composiciones que contienen toxina botulínica descritas en la presente a través de la piel para producir un efecto biológico, preferiblemente un efecto de duración prolongada en un alto porcentaje de sujetos que reciben tratamiento, con respecto a un tratamiento terapéutico o beneficio cosmético. Tales dispositivos pueden incluir, sin limitación, una aguja y una jeringa o pueden involucrar dispositivos más sofisticados capaces de dispensar y monitorear la dispensación de la composición, y opcionalmente monitorear la condición del sujeto en uno o más aspectos (p. ej., monitorear la reacción del sujeto a las sustancias que se dispensan).

Cabe señalar que la elección de los materiales para la construcción del dispositivo es importante. Los materiales preferidos para la construcción de dispositivos de administración son aquellos que no llevan a una pérdida de actividad de la composición de toxina botulínica/portador, ya sea por degradación o adsorción no deseada de la toxina botulínica en la superficie del dispositivo. Un tal comportamiento no deseado se ha observado, por ejemplo, cuando la toxina botulínica/portador en una solución acuosa entra en contacto con superficies de polipropileno, pero no cuando la solución de toxina botulínica/portador entra en contacto con las superficies de cloruro de polivinilo (PVC).

En algunas modalidades, las composiciones se pueden formular y/o instalar previamente en un dispositivo de administración. Esta invención contempla también las modalidades en donde las composiciones se proporcionan en un kit que almacena uno o más componentes por separado de los componentes restantes. Por ejemplo, en ciertas modalidades, la invención proporciona un kit que almacena por separado el componente de toxina botulínica y el portador en contenedores separados (p. ej., empaque primario y secundario) para combinarse en el momento de la aplicación o antes. La cantidad de portador a toxina botulínica dependerá de que portador se elija para usarse en la composición en cuestión.

Por ejemplo, la cantidad de portador a toxina botulínica se puede proporcionar en una relación

seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 0.01 µg/U, aproximadamente 0.02 µg/U, aproximadamente 0.04 µg/U, aproximadamente 0.06 µg/U, aproximadamente 0.08 µg/U, aproximadamente 0.1 µg/U, aproximadamente 0.12 µg/U, aproximadamente 0.14 µg/U, aproximadamente 0.15 µg/U, aproximadamente 0.16 µg/U, aproximadamente 0.18 µg/U, aproximadamente 0.20 µg/U, aproximadamente 0.22 µg/U, aproximadamente 0.23 µg/U, aproximadamente 0.234 µg/U, aproximadamente 0.24 µg/U, aproximadamente 0.25 µg/U, aproximadamente 0.26 µg/U, aproximadamente 0.28 µg/U, aproximadamente 0.3 µg/U, aproximadamente 0.32 µg/U, aproximadamente 0.34 µg/U, aproximadamente 0.36 µg/U, aproximadamente 0.38 µg/U o aproximadamente 0.4 µg/U de toxina botulínica, preferiblemente la toxina de tipo A de 150 kDa sin proteínas accesorias y más preferiblemente cuando el portador es RTP004. En modalidades particulares, la toxina botulínica se proporciona en una cantidad de aproximadamente 40 U (haciendo referencia a la molécula de proteína de tipo A de 150 kDa sin proteínas accesorias) y el portador RTP004 se proporciona en una cantidad de aproximadamente 6 µg, aproximadamente 7 µg, aproximadamente 8 µg, aproximadamente 9 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 11 µg o aproximadamente 12 µg.

En otras modalidades, el portador es RTP004 y se proporciona en una cantidad mayor a aproximadamente 1.75 µg por 40 U de molécula de toxina botulínica de 150 kDa sin proteínas accesorias, que es, mayor a aproximadamente 0.04 µg/U. Por ejemplo, la cantidad de portador a toxina botulínica se puede proporcionar en una proporción seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 0.045 µg/U, aproximadamente 0.050 µg/U, aproximadamente 0.055 µg/U, aproximadamente 0.060 µg/U, aproximadamente 0.065 µg/U, aproximadamente 0.070 µg/U, aproximadamente 0.075 µg/U, aproximadamente 0.080 µg/U, aproximadamente 0.085 µg/U, aproximadamente 0.090 µg/U, aproximadamente 0.095 µg/U o aproximadamente 0.1 µg por U de toxina botulínica. En modalidades particulares, la toxina botulínica se proporciona en una cantidad de aproximadamente 20 U, 40 U o 60 U (haciendo referencia a la molécula de proteína tóxica de 150 kDa sin proteínas accesorias) y el portador RTP004 se proporciona en una cantidad de aproximadamente 1.5 µg, aproximadamente 3.0 µg o aproximadamente 4.5 µg, respectivamente.

La invención contempla también enfoques para administrar el componente de toxina botulínica a un sujeto o paciente en necesidad del mismo, en el que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de toxina botulínica junto con un portador, como se describe en la presente. Por "junto con" se entiende que los dos componentes (toxina botulínica y portador) se administran en un procedimiento combinado, que puede implicar combinarlos antes de la administración a un sujeto, o administrarlos por separado, pero de una manera tal que actúan juntos para proporcionar el suministro necesario de una cantidad terapéuticamente eficaz de la toxina. La toxina botulínica se puede almacenar en forma seca en una jeringa u otro dispositivo dispensador y el portador puede inyectarse o aplicarse por vía tópica antes de la aplicación de la toxina para que los dos actúen juntos, lo que resulta en la mejora deseada de la penetración en el tejido y/u otras características mejoradas sobre las formulaciones convencionales de toxina botulínica, como se detalla anteriormente. En este sentido, las dos sustancias (portador y toxina botulínica) actúan en combinación o interactúan para formar una composición o combinación *in situ*. Por consiguiente, la

invención incluye también un kit con un dispositivo para dispensar la toxina botulínica y un líquido, gel o similar, que contiene el portador y que es adecuado para la aplicación tópica o inyección en el tejido blanco. 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 sujeto, pueden incluir también un aplicador personalizado adecuado para ese propósito.

Tratamiento repetido con larga duración, tasas de respuesta altas y seguridad continua

En otro aspecto adicional, la invención está dirigida a métodos y composiciones para usarse en la administración de una pluralidad de tratamientos sucesivos con toxina botulínica, que proporcionan resultados y ventajas consistentemente, como se describe anteriormente. En particular, un componente de toxina botulínica en asociación no covalente con un portador cargado positivamente se puede administrar más de una vez a un individuo para reducir la gravedad de una arruga, línea o surco, particularmente en la cara, p. ej., una línea glabellar. En algunas modalidades preferidas, un tratamiento subsecuente logra una duración del efecto terapéutico o cosmético más larga, tal como una duración más larga de la reducción de arrugas, líneas o surcos, en comparación con la duración del efecto después de un primer tratamiento o un tratamiento anterior. En algunas modalidades preferidas, un tratamiento subsecuente logra una respuesta en un porcentaje más alto de individuos que reciben tratamiento, en comparación con la tasa de respuesta después de un primer tratamiento o un tratamiento anterior, como un porcentaje más alto de sujetos que muestran reducción en las líneas glabellares y/o mantienen la reducción por largos períodos de tiempo. En algunas modalidades preferidas, un tratamiento subsecuente permite una respuesta con menos efectos secundarios en comparación con los efectos secundarios asociados con un primer tratamiento o un tratamiento anterior, tal como menos eventos adversos después de la repetición de las líneas glabellares. En modalidades más preferidas, un tratamiento subsecuente logra dos o más mejoras con respecto al primer tratamiento o al anterior, como lograr una mayor duración y menos eventos adversos, mayor duración y mayor probabilidad de respuesta, mayor probabilidad de respuesta y menos eventos adversos. En modalidades más preferidas, un tratamiento subsecuente logra una duración más larga, menos eventos adversos y una mayor probabilidad de respuesta en un individuo que recibe el tratamiento repetido, en comparación con la respuesta de ese individuo después de un tratamiento previo.

En modalidades particulares, la composición para usarse en lograr una o más mejoras tras el tratamiento repetido comprende un componente de toxina botulínica en una dosis de aproximadamente 1 U a aproximadamente 300 U, preferiblemente de aproximadamente 10 U a aproximadamente 200 U, más preferiblemente de aproximadamente 20 U a aproximadamente 100 U; o más específicamente de aproximadamente 10 U a aproximadamente 30 U, de aproximadamente 30 U a aproximadamente 50 U, o aproximadamente 50 U a aproximadamente 70 U por tratamiento inyectable. En modalidades preferidas, las composiciones que contienen toxina botulínica de la invención se administran a un sujeto en necesidad de las mismas mediante inyección de manera tal que, se proporciona una dosis mayor que aproximadamente 10 U, aproximadamente 20 U, aproximadamente 30 U, aproximadamente 40 U, aproximadamente 60 U o aproximadamente 80 U de la toxina botulínica. En modalidades preferidas, la composición se administra mediante inyección en una cantidad 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 tratamiento inyectable. Las cantidades o dosis entre las cantidades o dosis anteriores también están contempladas, 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.

- 5 En modalidades particularmente preferidas, la toxina botulínica está en una cantidad de dosificación seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 10 U, aproximadamente 20 U, aproximadamente 30 U, aproximadamente 40 U, aproximadamente 60 U y aproximadamente 80 U, más preferiblemente la toxina botulínica del serotipo A, más preferiblemente la molécula de 150 kDa de toxina botulínica del serotipo A. Generalmente, la cantidad de aproximadamente 100 pg/kg de la molécula de toxina botulínica
- 10 tipo A de 150 kDa son proteínas accesorias, corresponderá a aproximadamente 16 U/kg en formulaciones líquidas inyectables de la presente invención.

Los tratamientos repetidos pueden usar la misma dosis o dosis diferentes, p. ej., escalamiento de dosis o disminución de dosis en tratamientos diferentes. En una modalidad particular, la composición se administra por inyección en tratamientos repetidos que proporcionan cada uno aproximadamente la misma

15 dosis, tal como una dosis establecida en el párrafo anterior, preferiblemente una dosis de aproximadamente 20 U, aproximadamente 40 U o aproximadamente 60 U de toxina botulínica tipo A que tiene un PM de 150 kDa, sin proteínas accesorias, para reducir las arrugas, líneas o surcos, como una reducción en la gravedad de las líneas glabellares, por un período de tiempo prolongado, que excede la duración después de un primer tratamiento o tratamiento anterior.

20 En particular, uno o más de los resultados en los párrafos anteriores de esta sección se obtienen en modalidades que comprenden administrar sucesivamente mediante inyección una dosis de una formulación inyectable estéril en al menos una estructura muscular o facial asociada con la arruga, la línea facial o el surco (como el complejo glabellar). En algunas modalidades de este tipo, la composición comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable para inyección; toxina botulínica, tal como toxina

25 botulínica A, preferiblemente la molécula de 150 kDa sin proteínas accesorias y un portador cargado positivamente que comprende una estructura de polilisina cargada positivamente que covalentemente tiene unido a la misma uno o más grupos de eficacia cargados positivamente que tienen una secuencia de aminoácidos de (gly)p- RGRDDRRQRRR-(gly)q (SEQ ID NO: 1), (gly)p-YGRKKRRQRRR- (gly)q (SEQ ID NO: 2), o (gly)p-RKKRRQRRR-(gly)q (SEQ ID NO: 3), en donde los subíndices p y q son cada uno

30 independientemente un número entero desde 0 hasta 20, preferiblemente en donde el portador comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4). Más preferiblemente, la toxina botulínica se administra mediante inyección al individuo en una dosis de tratamiento en una cantidad que proporciona de aproximadamente 10 U a aproximadamente 100 U, o aproximadamente 20, 50 o 60 U de toxina botulínica, más preferiblemente 40 U por tratamiento inyectable.

35 En un ejemplo particular, la formulación farmacéutica comprende además un disacárido no reductor tal como sacarosa o trehalosa, preferentemente dihidrato de trehalosa; un tensoactivo no iónico, tal como polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, o un éster de sorbitán; y una solución amortiguadora compatible fisiológicamente, tal como ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido

tartárico, ácido maleico e histidina, que es capaz de mantener un pH adecuado, tal como un pH en el intervalo de pH 4.5 a pH 6.5 o en el intervalo de pH 4.5 a pH 7.5, p. ej., en cantidades p/v como se describen en la presente; y/o la relación en masa de portador:toxina es de aproximadamente 20,000:1 a aproximadamente 55,000:1, más preferentemente aproximadamente 51,000:1. En modalidades aún más preferidas, la formulación es libre de albúmina y/o libre de proteína animal y la composición farmacéutica comprende 0.1 mg de polisorbato 20, 36 mg de dihidratado de trehalosa y 8 µg, 9 µg, 10 µg, 11 µg, 12 µg, 13 µg, 14 µg, 15 µg, más preferiblemente 11.7 µg RTP004, por 50 U de la toxina tipo A de 150 kDa sin proteínas accesorias (no tóxicas) y la dosis de tratamiento es de 40 U.

En algunas modalidades de este tipo, la administración comprende aproximadamente de 3 a 7 inyecciones en un tratamiento único, preferiblemente 5 inyecciones en el complejo glabellar, tal como cuando se inyectan de aproximadamente 10 U a aproximadamente 30 U, de aproximadamente 15 U a aproximadamente 20 U, o aproximadamente 16 U del componente de toxina botulínica en cada uno de los músculos corrugador derecho y el músculo corrugador izquierdo, y de aproximadamente 5 U a aproximadamente 15 U, de aproximadamente 7 U a aproximadamente 10 U, o de aproximadamente 8 U del componente de toxina botulínica en el músculo prócer, en un tratamiento dado (p. ej., todo en una sola visita, en una serie de inyecciones con una diferencia de segundos a minutos), más preferiblemente usando de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1 mL/inyección, de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.8 mL/inyección, de aproximadamente 0.04 a aproximadamente 0.6 mL/inyección, de aproximadamente 0.06 a aproximadamente 0.4 mL/inyección, de aproximadamente 0.08 a aproximadamente 0.2 mL/inyección, o aproximadamente 0.1 mL/inyección. Véase también el **ejemplo 8**.

Duración prolongada adicional después del tratamiento repetido

En algunas modalidades particulares, la invención proporciona métodos y composiciones para usarse en el aumento de la duración de la acción de la toxina botulínica para reducir las arrugas, líneas o surcos en un individuo en necesidad de los mismos mediante la administración de una pluralidad de tratamientos sucesivos de toxina botulínica, donde un primer tratamiento de la composición de toxina botulínica se administra al individuo mediante inyección en o cerca de una arruga, línea o surco; seguido de al menos un tratamiento sucesivo. En modalidades preferidas, el primer tratamiento reduce dichas arrugas, líneas o surcos durante al menos aproximadamente 20 semanas y uno o más tratamientos sucesivos reducen la arruga, línea o surco durante más tiempo que el logrado después del primer tratamiento.

En modalidades particulares, la arruga, línea o surco a reducir en gravedad es una línea glabellar. En tales modalidades más particulares, la administración puede comprender al menos una inyección en uno o **más** músculos seleccionados del grupo que consiste en el músculo corrugador derecho, el músculo corrugador izquierdo y el músculo prócer. En modalidades más particulares, la administración es como se describe anteriormente, en el **ejemplo 7** o el **ejemplo 8** a continuación.

La duración del efecto en la reducción de las líneas glabellares después de tratamientos repetidos se puede evaluar generalmente de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica o descrito en este documento, incluidas las medidas descritas anteriormente para evaluar durante después de un primer

tratamiento y/o en el **ejemplo 8**. Las modalidades particularmente preferidas proporcionan una reducción en la gravedad de la línea glabellar, durante al menos aproximadamente 20 semanas, al menos aproximadamente 24 semanas, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 28 semanas, al menos aproximadamente 7 meses, al menos aproximadamente 30 semanas, al menos aproximadamente 32 semanas, al menos aproximadamente 8 meses, al menos aproximadamente 34 semanas, al menos aproximadamente 36 semanas, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 40 semanas, al menos aproximadamente 10 meses o al menos aproximadamente 42 semanas, antes de que se administra la segunda dosis o una dosis de tratamiento subsecuente. En modalidades particulares, el intervalo antes de administrar una segunda o subsecuente dosis de tratamiento de la composición es mayor que o igual a 26 semanas, 28 semanas, 30 semanas, 32 semanas, 34 semanas, 36 semanas, 38 semanas, 40 semanas, o mayor que o igual a 42 semanas, después de la dosis de tratamiento inicial o después de las dosis de tratamiento subsecuentes.

Generalmente, se administra un tratamiento subsecuente o sucesivo después del período de duración del efecto, p. ej., después de que la gravedad de las líneas glabellares aumenta de no ser visible o leve, a parecer moderada o grave, o después de regresar al inicio, antes del tratamiento. En algunas modalidades, el tratamiento subsecuente o sucesivo se administra antes, por ejemplo, antes de que la arruga se vuelva visible o antes de que la arruga vuelva a su apariencia antes del primer tratamiento. Por consiguiente, en algunas modalidades, se administra un tratamiento sucesivo o subsecuente de aproximadamente 12 semanas a aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 16 semanas a aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 16 semanas a aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 18 semanas a aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 20 semanas a aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 21 semanas a aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 22 semanas a aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 23 semanas a aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 24 semanas a aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 25 semanas, a aproximadamente 31 semanas y aproximadamente 26 semanas a aproximadamente 30 semanas.

En algunas modalidades, el paciente a tratar 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, 72, 73, 75, 77, 78, 80 años o más. En tales modalidades preferidas, la duración prolongada del efecto y/o el intervalo entre tratamientos sucesivos puede ser cualquiera del período de tiempo descrito anteriormente o más, en particular, aproximadamente 26 a aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 27 a aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 28 a aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 29 a aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 30 a aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 31 a aproximadamente 42 semanas o aproximadamente 32 a aproximadamente 40 semanas.

Se apreciará que aumentar la duración del efecto después de los tratamientos subsecuentes permite intervalos de tiempo cada vez más largos entre tratamientos sucesivos. Por ejemplo, un curso de tratamiento con composiciones que comprenden toxina botulínica asociada no covalentemente con un portador cargado positivamente, puede tener un primer intervalo entre el primer y el segundo tratamiento

que es más corto que el segundo intervalo entre el segundo y el tercer tratamiento, que puede ser igual o más corto que el tercer intervalo entre el tercer y cuarto tratamientos, etc. Por ejemplo, el curso del tratamiento puede comprender un primer intervalo de aproximadamente 12 semanas y un segundo mayor a 12 semanas, como aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 16 semanas o aproximadamente 20 semanas. El curso del tratamiento puede comprender un primer intervalo de aproximadamente 16 semanas y un segundo intervalo de más de 16 semanas, tal como aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 20 semanas o aproximadamente 22 semanas. El curso del tratamiento puede comprender un primer intervalo de aproximadamente 20 semanas y un segundo intervalo de más de 20 semanas, tal como aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 24 semanas o aproximadamente 26 semanas. El curso del tratamiento puede comprender un primer intervalo de aproximadamente 24 semanas y un segundo intervalo de más de 24 semanas, tal como aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 28 semanas o aproximadamente 30 semanas. Los intervalos durante el curso del tratamiento pueden aumentar durante uno, dos, tres o más ciclos de tratamiento; o solo en los primeros ciclos, como solo en los ciclos uno, dos y tres, o solo en los ciclos uno y dos.

En algunas modalidades, el intervalo entre los tratamientos de toxina botulínica subsecuentes es de aproximadamente 12 semanas a aproximadamente 36 semanas, de aproximadamente 16 semanas a aproximadamente 34 semanas, de aproximadamente 16 semanas a aproximadamente 32 semanas, de aproximadamente 18 semanas a aproximadamente 36 semanas, de aproximadamente 20 semanas a aproximadamente 36 semanas, de aproximadamente 21 semanas a aproximadamente 35 semanas, de aproximadamente 22 semanas a aproximadamente 34 semanas, de aproximadamente 23 semanas a aproximadamente 33 semanas, de aproximadamente 24 semanas a aproximadamente 32 semanas, de aproximadamente 25 semanas a aproximadamente 31 semanas y de aproximadamente 26 semanas a aproximadamente 30 semanas. En modalidades preferidas, el intervalo entre tratamientos subsecuentes de toxina botulínica es mayor de aproximadamente 20 semanas a aproximadamente 36 semanas, mayor de aproximadamente 22 semanas a aproximadamente 34 semanas, mayor de aproximadamente 24 semanas a aproximadamente 32 semanas, o mayor de aproximadamente 26 semanas a aproximadamente 30 semanas. En modalidades más preferidas, el intervalo subsecuente es al menos uno del segundo intervalo, el tercer intervalo, el cuarto intervalo y el quinto intervalo.

Se apreciará además que los intervalos más largos se traducen en menos tratamientos durante un período de tiempo, como en el período durante el cual el sujeto desea tratamiento.

Tasa de respondedores aumentada después del tratamiento repetido

En algunas modalidades particulares, la invención proporciona métodos y composiciones para usarse en el aumento de la probabilidad de lograr una respuesta a la toxina botulínica de reducir arrugas, líneas o surcos en un individuo en necesidad de la misma, mediante la administración de una pluralidad de tratamientos sucesivos de toxina botulínica, donde un primer tratamiento de la composición de toxina botulínica se administra al individuo mediante inyección en o cerca de una arruga, línea o surco; seguido de al menos un tratamiento sucesivo que tiene una mayor probabilidad de reducir las arrugas, líneas o surcos que el primer tratamiento. En modalidades preferidas, la arruga, la línea o el surco es una línea

glabellar. En particular, la respuesta en la reducción de arrugas, líneas o surcos es una duración prolongada de la respuesta, de manera que un individuo tiene una mayor probabilidad de mantener la respuesta a la toxina botulínica durante un período prolongado después de repetir los tratamientos. Por ejemplo, un sujeto puede tener una mayor probabilidad de mantener una reducción en las líneas glabellares, de acuerdo con lo evaluado por una o más medidas descritas en la presente, durante 4 semanas después de un tratamiento subsecuente, en comparación con la probabilidad de mantener la reducción durante 4 semanas después de un primer tratamiento. Más preferiblemente, un sujeto tiene una mayor probabilidad de mantener una reducción en las líneas glabellares, de acuerdo con lo evaluado por una o más medidas descritas en la presente, durante 8 semanas, durante 12 semanas, durante 16 semanas, durante 20 semanas, durante 24 semanas, durante 28 semanas, durante 32 semanas o durante 36 semanas después de un tratamiento subsecuente, en comparación con la probabilidad de mantener la reducción durante 8 semanas, durante 12 semanas, durante 16 semanas, durante 20 semanas, durante 24 semanas, durante 28 semanas, durante 32 semanas o durante 36 semanas, respectivamente, después del primer tratamiento.

En algunas modalidades, la reducción en la arruga, línea o surco, tal como una línea glabellar, dura durante al menos aproximadamente 4 semanas en al menos 80 % de individuos después de la administración de la primera dosis de tratamiento y/o durante al menos 85 % de los individuos después de la administración de la segunda o subsecuente dosis de tratamiento. En modalidades preferidas, la reducción en la arruga, línea o surco, tal como una línea glabellar, dura durante al menos aproximadamente 4 semanas en al menos 95 % de los individuos después de la administración de la primera dosis de tratamiento y/o en al menos 90 % de los individuos después de la administración de la segunda o una dosis de tratamiento subsecuente. En modalidades más preferidas, la reducción en la arruga, línea o surco, dura durante al menos aproximadamente 4 semanas en al menos 90 % de los individuos después de la administración de la primera dosis de tratamiento, y/o en al menos 95 % de los individuos después de la administración de la segunda o una dosis de tratamiento subsecuente (véase, p. ej., **ejemplo 8**).

Por ejemplo, la administración de una composición farmacéutica descrita en la presente puede producir una reducción en la gravedad de una arruga, línea (p. ej., una línea glabellar) o surco, que dura por lo menos aproximadamente 4 semanas en 40 a 90 % de los individuos después de un primer tratamiento y dura por lo menos aproximadamente 4 semanas en un porcentaje mayor después de un tratamiento subsecuente. En modalidades preferidas, la respuesta se mantiene, o el efecto dura, durante aproximadamente 4 semanas en aproximadamente 55 a aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 % a aproximadamente 70 %, o aproximadamente 65 % a aproximadamente 75 % de los individuos a los que se les administró el primer tratamiento, y dura aproximadamente 4 semanas en aproximadamente 60 a aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 % a aproximadamente 75 %, o aproximadamente 70 % a aproximadamente 80 % de los individuos a los que se les administró el segundo tratamiento. En algunas modalidades, la respuesta se mantiene o el efecto dura, durante al menos 4 semanas en al menos más de aproximadamente 55 %, más de aproximadamente 56 %, más de aproximadamente 58 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 62 %, más de aproximadamente 65 %, más de aproximadamente 66 %, más de aproximadamente 68 %, más de aproximadamente 70 %, más de

aproximadamente 72 %, más de aproximadamente 73 % o más de aproximadamente 75 %, hasta aproximadamente 80 % de los individuos a los que se les administró el primer tratamiento y durante al menos aproximadamente 4 semanas en en al menos más de aproximadamente 57 %, más de aproximadamente 58 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 62 %, más de aproximadamente 64 %, más de aproximadamente 67 %, más de aproximadamente 68 %, más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 72 %, más de aproximadamente 74 %, más de aproximadamente 75 % o más de aproximadamente 77 % de los individuos a los que se les administró el segundo tratamiento (véase, p. ej., **ejemplo 8**), hasta aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 % o aproximadamente 90 % de los individuos a los que se les administró el segundo tratamiento de la formulación farmacéutica.

Efectos secundarios reducidos después del tratamiento repetido

En algunas modalidades particulares, la invención proporciona métodos y composiciones para usarse en la reducción de los efectos secundarios asociados con la administración de toxina botulínica en la reducción de arrugas, líneas o surcos en un individuo en necesidad de la misma mediante la administración de una pluralidad de tratamientos sucesivos de toxina botulínica, donde un primer tratamiento de la composición de toxina botulínica se administra al individuo mediante inyección en o cerca de una arruga, línea o surco; seguido de al menos un tratamiento sucesivo que produce menos efectos secundarios que el primer tratamiento. En modalidades preferidas, la arruga, la línea o el surco es una línea glabellar.

El efecto secundario o el evento adverso, asociado con la administración de toxina botulínica es cualquier evento adverso que sea un evento adverso emergente o relacionado con el tratamiento definido, probable o posible, en términos de su relación con la administración de toxina botulínica, p. ej., como se describe en el **ejemplo 8**. El evento adverso puede ser leve, moderado, grave o severo, p. ej., como se describe en el **ejemplo 8**. Particularmente, el uso de una composición que comprende toxina botulínica asociada no covalentemente con un portador cargado positivamente puede reducir los efectos secundarios (eventos adversos) generalmente asociados con la propagación distante de la toxina. Tales efectos adversos incluyen, sin limitación, trastorno acomodativo, arreflexia, aspiración, visión borrosa, botulismo, trastorno de la función del párpado, ptosis palpebral, parálisis facial, paresia facial, paresia del cuarto nervio craneal, parálisis de los nervios periféricos, parálisis periférica, debilidad muscular del piso pélvico, aspiración de neumonía, deterioro del reflejo pupilar, bradicardia, ptosis de la frente, parálisis bulbar, estreñimiento, parálisis de los nervios craneales, parálisis de los nervios craneales, parálisis diafragmática, diplopía, boca seca, disartria, disfagia, disfonía, disnea, paresia muscular extraocular, paresia, trastornos gastrointestinales, cuadriparesia, dolores de cabeza, hemiparesia, paresia del nervio hipogloso, hiporreflexia, hipotonía, monoparesia, debilidad muscular, parálisis, parálisis flácida, íleo paralítico, paraparesia, paresia del nervio craneal, insuficiencia respiratoria, paro respiratorio, depresión respiratoria, trastorno del habla, paresia del tercer par craneal, paresia del nervio trigémino, retención urinaria, parálisis de las cuerdas vocales, paresia de las cuerdas vocales y xeroftalmia (ojos secos).

En modalidades preferidas, el tratamiento repetido de acuerdo con los métodos y usos de la

presente lleva a menos casos y/o gravedad reducida de uno o más de tales eventos adversos en comparación con el tratamiento inicial. En una modalidad más preferida, la frecuencia y/o gravedad de la ptosis palpebral se reduce después de un tratamiento subsecuente en comparación con la ptosis palpebral después de un primer tratamiento.

5 Se entiende que los siguientes ejemplos y modalidades aquí descritas son para fines ilustrativos y que varias modificaciones o cambios a la luz de la misma serán sugeridos a los técnicos en la materia y se incluyen dentro del espíritu y alcance de esta solicitud y el alcance de las reivindicaciones anexas. Los valores numéricos calificados por “aproximadamente” se refieren también en la presente al valor numérico exacto.

10 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas en la presente se incorporan por referencia en su totalidad para todos los fines.

Ejemplos

Ejemplo 1: Duración de la parálisis muscular local en un modelo murino

15 Este ejemplo compara la duración de la parálisis muscular local en ratones inyectados con RT003 o BOTOX®. RT003 es un ejemplo de formulación inyectable de acuerdo con la invención que contiene toxina botulínica tipo A (purificada para eliminar todas las proteínas no tóxicas endógenas) y un portador cargado positivamente con la secuencia RKKRRQRRRG-(K)₁₅- GRKKRRQRRR. BOTOX® también contiene toxina botulínica tipo A, pero se agrega albúmina exógena para estabilizar la molécula de toxina
20 botulínica tipo A.

La parálisis muscular se midió utilizando el ensayo de puntuación de abducción digital de referencia (DAS) de acuerdo con lo informado por Aoki, K.R. en “A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice”, *Toxicon* 2001 ;39(12): 1815—1820. En el ensayo DAS, un ratón se suspende brevemente por la cola para provocar una respuesta de sobresalto característica en la que el
25 ratón extiende sus extremidades posteriores y abduce sus dedos posteriores. La medida en la que el ratón puede exhibir esta respuesta de sobresalto se califica en una escala de cinco puntos (de 0 a 4), donde cero representa una respuesta de sobresalto normal y cuatro representa la reducción máxima en la abducción de dígitos y la extensión de la pierna. La puntuación se realiza por un observador sin conocimiento de la medida en la que el ratón ha sido tratado con la neurotoxina. Se determinó que la puntuación inicial
30 utilizando el ensayo DAS era de 0.4 para una población de animales no tratada.

El estudio reportado en este ejemplo implicó diez animales (5 ratones en el grupo tratado con RT003 y 5 ratones en el grupo tratado con BOTOX®). Cada uno de los animales se inyectó tres veces con la formulación de toxina botulínica respectiva (es decir, RT003 o BOTOX®), con un período de 40 días entre cada dosificación. Después de la inyección, se contó el número de días durante los cuales todos los
35 animales en cada grupo de prueba estuvieron por encima del inicio de 0.4 del ensayo DAS. Los resultados, mostrados en la figura 1 indican que la puntuación del ensayo DAS para el grupo tratado con RT003 se mantuvo por encima del valor inicial durante 25, 22 y 21 días, después del primer, segundo y tercer tratamiento, respectivamente. Por el contrario, la puntuación del ensayo DAS para el grupo tratado con

BOTOX® se mantuvo por encima del valor inicial durante 11, 8 y 11 días, después del primer, segundo y tercer tratamiento, respectivamente.

Estos datos del ensayo DAS indican que la parálisis muscular local causada por la formulación RT003 dura aproximadamente el doble que la parálisis muscular local causada por BOTOX®. Este resultado tiene implicaciones importantes para usos terapéuticos de RT003 y otros compuestos que contienen toxina botulínica inyectable de acuerdo con la invención. En particular, mediante el uso de composiciones inyectables de acuerdo con la invención, se puede reducir significativamente la frecuencia de las inyecciones de seguimiento requeridas para mantener un efecto cosmético o terapéutico particular causado por la toxina botulínica. A su vez, la frecuencia reducida de aplicaciones puede resultar en una mejor eficacia a largo plazo, ya que el sujeto es menos propenso a desarrollar anticuerpos contra la toxina botulínica.

Ejemplo 2: Formulaciones de toxina botulínica inyectables con un perfil de seguridad mejorado

En las últimas décadas, la toxina botulínica se ha utilizado como agente terapéutico para tratar una variedad de afecciones, incluidas las arrugas, la hiperhidrosis y los espasmos musculares. Sin embargo, como la toxina botulínica es la toxina natural más potente conocida por los humanos, la administración inadecuada de la toxina puede ser extremadamente peligrosa. Por ejemplo, la administración sistémica accidental de la toxina botulínica puede provocar parálisis, dificultad para respirar e incluso la muerte. Además, incluso si la toxina botulínica se administrara adecuadamente a una región localizada del cuerpo como parte de un tratamiento terapéutico, la toxina tiene una tendencia natural a difundirse a lo largo del tiempo, lo que aumenta el riesgo de parálisis no deseada en otras partes del cuerpo. Por ejemplo, cuando se inyecta toxina botulínica alrededor de los ojos para tratar las arrugas, se puede difundir a los músculos que controlan el movimiento de los párpados. Si esto ocurre, los músculos de los párpados pueden quedar parcialmente paralizados, lo que lleva a una afección bien conocida conocida como “caída del párpado”, en la que el párpado está parcialmente cerrado e interfiere con la visión normal.

Un aspecto de esta invención es proporcionar formulaciones inyectables de toxina botulínica con un perfil de seguridad mejorado en comparación con las formulaciones de toxina botulínica comerciales disponibles actualmente. En modalidades preferidas, las formulaciones de toxina botulínica inyectable tienen una tendencia reducida a difundirse después de la inyección. De esta manera, ciertas formulaciones de la invención permiten una administración más exacta de la toxina botulínica, reduciendo dramáticamente los efectos secundarios no deseados asociados con la difusión local no controlada de la toxina botulínica.

Este ejemplo reporta un estudio comparativo de la tendencia de la toxina botulínica en diversas formulaciones a difundirse después de la inyección. El estudio implica tres formulaciones de toxina botulínica: (1) BOTOX®; (2) RT003, una solución amortiguada y estabilizada que contiene la molécula de toxina botulínica tipo A de 150 kD sin proteínas accesorias, asociada de forma no covalente con un portador cargado positivamente que tiene la fórmula RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR; y (3) RTT150, que es idéntica a la formulación RT003, excepto que no contiene un portador cargado positivamente presente en RT003.

Al músculo gastrocnemio de cada uno de los ratones utilizados en el estudio se inyectó una de las formulaciones de toxina botulínica mencionadas anteriormente, ya sea en la porción lateral o media del músculo (**figura 2A**), o en la porción de la línea media del músculo (**figura 2B**). Los ensayos DAS se realizaron en cada uno de los ratones durante cuatro días después de la inyección con la toxina botulínica para determinar si la toxina botulínica de la formulación respectiva exhibía alguna tendencia a difundirse desde el músculo gastrocnemio hacia las patas traseras del ratón. A partir de los ensayos DAS, cualquier capacidad disminuida de los animales de prueba para abducir sus dedos posteriores se interpretó como una indicación de difusión de la toxina botulínica.

La figura 3 muestra los resultados de los ensayos DAS realizados después de inyectar a los animales de prueba las diferentes formulaciones de toxina botulínica como se describió anteriormente. Se debe notar que las puntuaciones de abducción digital se agrupan en dos grupos, que corresponden a si la inyección se realizó en la línea media o en la porción lateral a media del músculo gastrocnemio. Las puntuaciones DAS generalmente inferiores para las inyecciones de la línea media, en comparación con las puntuaciones DAS para las inyecciones de la línea lateral a la media, indican que el grado de parálisis de las patas traseras de los animales de prueba es generalmente menor después de la inyección en la línea media. Sin desear limitarse por la teoría, se cree que este comportamiento es el resultado de la mayor distancia que tiene que recorrer la toxina botulínica para alcanzar los dedos posteriores de un animal de prueba después de la inyección en la línea media, en comparación con la inyección de línea lateral a media. Se cree que esta distancia de viaje mayor requerida por la toxina botulínica disminuye la probabilidad de parálisis de los dedos posteriores.

La figura 3 muestra una puntuación de abducción digital de cero para los cuatro días después de la inyección en la línea media de la formulación RT003. Este resultado indica que la toxina botulínica en la formulación RT003 permanece localizada en la porción de la línea media del músculo gastrocnemio después de la inyección y que no se produce difusión causante de parálisis en la escala de tiempo del experimento. Por el contrario, las puntuaciones de abducción digital DAS de 0.4 superiores a los iniciales se observaron después de la inyección de las formulaciones RTT150 y BOTOX®, con la puntuación DAS promedio superior para la formulación BOTOX®. Los resultados del DAS para las formulaciones RTT150 y BOTOX® indican que se observó parálisis de los dedos posteriores de los animales de prueba después de la inyección en la línea media de estas formulaciones, con un mayor grado de parálisis después de la inyección de la formulación BOTOX®. Estos datos sugieren que las moléculas de toxina botulínica en las formulaciones RTT150 y BOTOX® son capaces de difundirse localmente después de la inyección, con un mayor grado de difusión local para las moléculas de toxina botulínica en la formulación BOTOX®.

La figura 3 muestra también que la parálisis de los dedos posteriores se observa para todos los animales de prueba después de la inyección en la línea lateral a la media, independientemente de la formulación específica de la toxina botulínica. Como se ha discutido anteriormente, se cree que este grado mayor de parálisis después de la inyección en línea lateral a la media, en comparación con la inyección en la línea media, se relaciona con una distancia de viaje más corta para la toxina botulínica a las patas traseras de los animales de prueba. Sin embargo, si bien las tres formulaciones de toxina botulínica

muestran difusión causante de parálisis después de la inyección en línea lateral a media, el grado de parálisis en los animales de prueba inyectados con RT003 es menor, en promedio, que el grado de parálisis observado para las formulaciones RTT150 y BOTOX® durante la escala de tiempo del experimento. Por lo tanto, los datos del ensayo DAS correspondientes a la inyección en la línea lateral a media son cualitativamente similares a los de la inyección en la línea media, ya que muestran una tendencia disminuida a la difusión local de la toxina botulínica para la formulación RT003, en comparación con RTT150 y BOTOX®.

Se puede hacer una comparación de la tasa de difusión local después de la inyección en línea media y la inyección en línea lateral a la media considerando un parámetro llamado “índice de difusión”, que se define de acuerdo con la ecuación (1):

$$\text{Índice de difusión} = \frac{\text{Puntuación de abducción digital de la línea media}}{\text{puntuación de abducción digital de la línea lateral a la media}} \times 100 \quad (1).$$

Debido a que las puntuaciones de abducción digital pueden variar de 0 a 4, y se espera que las puntuaciones de abducción digital de la línea lateral a la media sean más altas que las puntuaciones de abducción digital de la línea media (como se discutió anteriormente), los valores del índice de difusión típicamente variarán de 0 a 100. Un valor del índice de difusión que se aproxima a 100 indica que la proporción de las puntuaciones de abducción digital de la línea media y de la línea lateral a la línea media se aproxima a la unidad. Esto puede ocurrir si las tasas de difusión después de la inyección son lo suficientemente altas como para que los tiempos de difusión para que la toxina botulínica alcance y paralice los dígitos posteriores del animal de prueba después de la inyección en la línea media y lateral a la línea media son comparables o casi iguales. En el otro extremo, los valores del índice de difusión que se aproximan a cero indican que la proporción de las puntuaciones de abducción digital de la línea media y la línea lateral a la línea media se acercan a cero. Esto puede ocurrir si la difusión de la toxina botulínica después de la inyección en la línea media es tan baja que no es suficiente para causar parálisis en los dedos posteriores de los animales de prueba, a pesar de que se observa parálisis después de la inyección de línea lateral a media.

La **tabla 1** a continuación muestra los valores del índice de difusión calculados utilizando las puntuaciones de abducción digital después de la inyección de BOTOX®, RT003 y RTT150 en la línea media o lateral a la media, como se reporta en el experimento correspondiente a la **figura 3**. En la escala de tiempo del experimento, los valores del índice de difusión correspondientes a la inyección de la formulación BOTOX® son más altos que los valores observados para las formulaciones RTT150 y RT003. Esto indica que, para la inyección de la formulación BOTOX®, la relación de las puntuaciones de abducción digital de la línea media y de la línea lateral a la línea media están más cerca de la unidad, en comparación con las relaciones observadas para las formulaciones RTT150 y RT003. Debido a que la toxina botulínica se debe difundir aún más para causar parálisis de los dedos posteriores de un animal de prueba después de la inyección en la línea media, la observación de que la relación de las puntuaciones de abducción digital en la línea media y la línea lateral a la media después de la inyección de BOTOX® está más cerca de la unidad sugiere que la tasa de difusión de la toxina botulínica después de la inyección en la línea media de BOTOX® es bastante sustancial en relación con la tasa después de la inyección en la línea lateral a la media. En

otras palabras, la longitud incrementada de la trayectoria de difusión asociada con la inyección en la línea media es una barrera menor para causar parálisis de los dedos posteriores.

Por el contrario, los valores del índice de difusión para RT003 son todos cero en la escala de tiempo de cuatro días del experimento. Este resultado indica que no se observa difusión que induce parálisis después de la inyección en la línea media de RT003. En otras palabras, la formulación RT003 que contiene la molécula de toxina botulínica tipo A asociada no covalentemente con un portador cargado positivamente, permite la localización mejorada de la toxina botulínica inyectada tipo A. De esta manera, la formulación RT003 ofrece un perfil de seguridad mejorado en comparación con el de la formulación BOTOX® y minimiza la parálisis no deseada.

Los valores del índice de difusión observados para RTT150, aunque no son cero como en el caso de RT003, son aún menores que los observados para la formulación de BOTOX®. Véase, **tabla 1**. Este resultado indica que se produce suficiente difusión de la toxina botulínica para producir una parálisis de los dedos posteriores en el plazo de cuatro días del experimento, pero el tiempo requerido para la difusión de la toxina botulínica que causa la parálisis es relativamente más largo después de la inyección en la línea media.

Tabla 1

Mediciones del índice de difusión de la toxina botulínica para RTT150, BOTOX® y RT003

	Días después del tratamiento				
	0	1	2	3	4
BOTOX®	NA	42	38	38	9
RT003	NA	0	0	0	0
RTT150	NA	20	20	27	17

Ejemplo 3: Las formulaciones de toxina botulínica inyectables con tendencia reducida para generar anticuerpos

Cuando la toxina botulínica se inyecta periódicamente en un paciente para tratar una afección no deseada, como las arrugas, a menudo se observa que la eficacia de la toxina botulínica disminuye con inyecciones sucesivas, aunque la duración de los efectos de la toxina botulínica puede permanecer igual. Se cree que este fenómeno es el resultado de la formación de anticuerpos contra la toxina botulínica por parte del sistema inmune del paciente. Desde la perspectiva del tratamiento, la formación de anticuerpos contra la toxina botulínica por parte del paciente no es deseable, ya que se requieren dosis cada vez mayores de toxina botulínica para lograr el mismo efecto, lo que presenta serios problemas relacionados con la seguridad y el costo.

En ciertas modalidades, esta invención proporciona formulaciones de toxina botulínica inyectables que tienen una tendencia disminuida a inducir la formación de anticuerpos, en comparación con las formulaciones comerciales disponibles actualmente de toxina botulínica inyectable. Por consiguiente, en

estas modalidades, las formulaciones de toxina botulínica ayudan a minimizar el riesgo asociado con la inyección de toxina botulínica al permitir usar, a lo largo del tiempo, menos toxina para lograr el mismo efecto.

En este ejemplo, los datos del ensayo DAS obtenidos después de inyecciones repetidas de RT003 y BOTOX® como se describe en el **ejemplo 2** se analizan en función del tiempo para determinar cómo cambia la eficacia de estas dos formulaciones después de la administración repetida a los mismos animales de prueba. Generalmente, después de la administración repetida de cualquier formulación, la duración de los efectos con toxina botulínica son los mismos. Sin embargo, el grado de parálisis muscular tras la administración repetida varía de acuerdo con la formulación. Para cuantificar el cambio en el grado de parálisis muscular, el cambio porcentual en las puntuaciones de abducción digital después de la inyección de RT003 o BOTOX® se determinó de acuerdo con la ecuación (2):

$$\% \text{ de cambio en DAS} = \frac{\text{DAS para el tratamiento enésimo} - \text{DAS para el primer tratamiento}}{\text{DAS para el primer tratamiento}} \times 100 \quad (2).$$

Debido a que el numerador de la ecuación (2) es la diferencia entre las puntuaciones de abducción medidas para el enésimo y el primer tratamiento, el cambio porcentual en DAS será negativo si la puntuación de abducción digital medida para el enésimo tratamiento es menor a la puntuación de abducción digital medida para el primer tratamiento. En otras palabras, el cambio de porcentaje en DAS es negativo cuando se observa menor parálisis después del enésimo tratamiento, en comparación con el primer tratamiento. La **tabla 2** muestra el cambio porcentual en los valores DAS medidos después de la administración repetida de las formulaciones RT003 y BOTOX® de acuerdo con el procedimiento descrito en el **ejemplo 2**.

Tabla 2

Cambio porcentual en el valor DAS después de la administración repetida de RT003 y BOTOX®

	1 ^{er} tratamiento	1 ^{er} retratamiento	2 ^{do} retratamiento
RT003	0 %	0 %	-30 %
BOTOX®	0 %	-44 %	-67 %

Como se indica en la **tabla 2**, después del primer tratamiento repetido, el cambio porcentual en la puntuación de abducción digital fue -44 % para la formulación de BOTOX®, lo que sugiere una caída sustancial en la eficacia. Por el contrario, el cambio porcentual en la puntuación de abducción digital para la formulación RT003 fue cero, lo que indica que la puntuación DAS después del segundo tratamiento repetido fue la misma que después de la administración inicial y el primer tratamiento repetido. Este resultado indica que el grado de parálisis observado después del primer tratamiento repetido de RT003 es el mismo que el grado de parálisis que después del primer tratamiento, y que se produjo una formación insignificante de anticuerpos neutralizantes en los animales de prueba incluso después del primer tratamiento repetido. Después del segundo tratamiento repetido de RT003 y BOTOX®, los cambios porcentuales calculados en los valores de DAS fueron negativos para ambas formulaciones, aunque la

magnitud del cambio porcentual en los valores de DAS para la formulación de RT003 fue la mitad del valor determinado para BOTOX®. El cambio porcentual mayor y negativo en los valores de DAS observado para BOTOX® sugiere que los animales de prueba tuvieron una mayor tasa de generación de anticuerpos frente a BOTOX®, en comparación con RT003. Por consiguiente, estos datos indican que las formulaciones contempladas en esta invención, como RT003, pueden tener una menor tendencia a inducir la formación de anticuerpos que neutraliza el efecto de la toxina botulínica. Por lo tanto, este resultado sugiere que al usar formulaciones contempladas por esta invención, a lo largo del tiempo, se puede usar menos toxina botulínica para lograr el mismo efecto terapéutico.

Ejemplo 4: Formulaciones de toxina botulínica inyectables con estabilidad mejorada

Este ejemplo demuestra que las moléculas portadoras cargadas positivamente utilizadas en las formulaciones inyectables de toxina botulínica de la invención no solo mejoran el perfil de seguridad de las formulaciones (**ejemplo 2**), sino que mejoran también su estabilidad. La **tabla 3** muestra los resultados de los experimentos de reposo, en donde las formulaciones RT003 y RTT150 se dejan reposar a 4 °C (solo RT003) y a 40 °C (tanto RT003 como RTT150) durante varios intervalos de tiempo. Después del reposo a temperaturas específicas durante tiempos específicos, la potencia de las formulaciones RT003 y RTT150 se midió a través de una serie de ensayos IP LD₅₀ en ratones. Los resultados, resumidos en la tabla 3, indican que la potencia de RT003 no cambia esencialmente después del reposo a 4 °C, incluso después de seis meses. Además, la potencia de la formulación RT003, medida por la capacidad de la formulación de asesinar a los animales objetivo en un ensayo IP LD₅₀, disminuye solo ligeramente incluso si la formulación RT003 se deja reposar a temperatura elevada (40 °C) durante seis meses. Por el contrario, la formulación RTT150 mostró una disminución significativa en potencia después de solo un mes en reposo a 40 °C. Dado que las formulaciones RT003 y RTT150 son idénticas, con la excepción de que la formulación RT003 también contiene una molécula portadora cargada positivamente que tiene la fórmula RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR, estos datos indican que la molécula portadora cargada positivamente mejora la estabilidad de la toxina botulínica en la formulación RT003.

Tabla 3

Resultados de los ensayos LD₅₀ de ratón después del reposo de la RT003 y de la RTT150 en varias condiciones

	Condición (°C)	Tiempo (meses)	% de blanco
RT003	4	0	100 %
	4	6	118 %
	40	6	93 %
RTT150	40	1	< 50 %

Ejemplo 5: Formulación inyectable de toxina botulínica que muestra efectos de duración a largo plazo en el tratamiento de las líneas glaberales

Este ejemplo describe un estudio clínico y un análisis intermedio de los resultados en la semana 24 para evaluar la seguridad, la eficacia y la duración del efecto de una composición inyectable de la

invención que contiene toxina botulínica tipo A y un portador cargado positivamente que comprende un polipéptido de polilisina cargado positivamente que tiene covalentemente unido al mismo uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente, llamados 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 péptido portador cargado positivamente que tiene la fórmula RKKRRQRRRG-(K)¹⁵-GRKKRRQRRR (RTP004; SEQ ID NO: 4), y que no contiene proteínas accesorias o componentes derivados de animales. Se usa RT002 en el estudio para el tratamiento de líneas glabellares moderadas a severas. El excipiente comprende 0.1 mg de polisorbato 20, 36 mg de hidrato de trehalosa y 11.7 µg de RTP004, por 50 U de la toxina tipo A de 150 kDa sin proteínas accesorias y la dosis de tratamiento es 40 U.

El estudio clínico fue un estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, con rango de dosis, controlado con activo y placebo, de fase 2, diseñado y realizado para evaluar la seguridad, la eficacia y la duración del efecto de un solo tratamiento (una vez) mediante inyección de RT002 para la mejora temporal en la apariencia de líneas glabellares en adultos. Tres dosis, 20 U, 40 U y 60 U de RT002 se evaluaron en comparación con un activo, es decir VISTABEL®/BOTOX® (dosis 20 U mediante inyección intramuscular y un control de placebo (inyección intramuscular). El tratamiento inyectable fue una sola inyección intramuscular. Asimismo, se evaluó la duración del efecto de un solo tratamiento de RT002 en tres niveles de dosis versus VISTABEL®/BOTOX® Cosmetic.

El producto RT002 está compuesto de neurotoxina botulínica de 150 kD purificada sin proteínas accesorias, denominada RTT150, formulada en un polvo liofilizado. En estudios no clínicos, RT002 ha demostrado que exhibe menor difusión que otras formas de la neurotoxina botulínica A (BoNTA) y puede ofrecer mayor control del efecto en los sitios blanco con menos efectos secundarios debido a la propagación distante de la toxina en los músculos vecinos. Además, la formulación de la toxina botulínica tipo A libre de aditivos RT002 tiene la capacidad de permitir un menor potencial inmunogénico debido a la ausencia de proteínas no activas presentes en la formulación. Además, RT002 fue bien tolerada después de la administración intramuscular de dosis repetida de hasta 50 U/kg en ratas.

Régimen de dosificación y técnica de inyección: El régimen de dosificación de RT002 para este estudio fue un tratamiento único ya sea de RT002 (20 U, 40 U o 60 U), placebo o VISTABEL® / BOTOX®, que se dosificó a 20 U por sujeto, como una inyección intramuscular de 0.1 mL en cada uno de los 5 sitios de inyecciones en la frente (0.5 mL en total), entre las cejas del sujeto sometido a tratamiento. Todos los tratamientos fueron inyecciones intramusculares administradas por un médico capacitado. Más específicamente, los sujetos del estudio recibieron un tratamiento único de 0.1 mL por tratamiento inyectable en cinco sitios de inyección: dos inyecciones en cada músculo corrugador y una inyección en el músculo prócer. Los investigadores, el personal del sitio, los sujetos y el patrocinador fueron cegados a las asignaciones del grupo de tratamiento. Aproximadamente 250 sujetos adultos, mujeres y hombres, de 30 a 65 años de edad y con buena salud general, con líneas glabellares moderadas a severas al ingreso, se inscribieron en el estudio.

Las líneas glabellares faciales surgen del corrugador lateral y los músculos prócer verticales en la

cara. Estos pueden identificarse fácilmente mediante la palpación de la masa muscular mientras el paciente frunce el ceño al máximo. El corrugador deprime la piel creando una línea vertical, es decir, un surco, rodeado de bordes de músculos tensos (es decir, líneas de expresión). Debido a la ubicación, tamaño y el uso de los músculos varían notablemente entre los individuos, los médicos que administran la toxina botulínica inyectable deben comprender la anatomía relevante del área involucrada y cualquier alteración de la anatomía debido a procedimientos quirúrgicos previos. Para reducir el riesgo de ptosis, se realizan los siguientes pasos de manera óptima: (i) se debe evitar la inyección en el elevador palpebral superior o cerca de él, particularmente en pacientes con depresores de cejas más grandes; (ii) las inyecciones en el corrugador medial deben estar al menos 1 centímetro por encima del reborde supraorbitario óseo; (iii) se debe garantizar que el volumen/dosis inyectada sea exacto; y (iv) la toxina no se debe inyectar a menos de 1 centímetro por encima de la ceja central. La toxina botulínica se inyecta aplicando presión con el dedo sobre el reborde orbitario medial superior mientras se avanza la aguja a través de la piel hacia el músculo subyacente.

Para el estudio, se evaluó la gravedad de las líneas glabellares por el investigador y el sujeto. Para la evaluación por el investigador, se utilizó el sistema de clasificación de Evaluación Global por el Investigador - Gravedad de Arrugas Faciales (IGA-FWS) como sigue: una puntuación de clasificación de IGA-FWS de (0) indicó que no hay gravedad de las arrugas faciales; una puntuación de clasificación de IGS-FWS de (1) indicó una gravedad leve de las arrugas faciales; una puntuación de clasificación de IGA-FWS de (2) indicó una gravedad moderada de las arrugas faciales y una puntuación de clasificación de IGA-FWS de (3) indicó gravedad severa de las arrugas faciales. Como se aprecia por el técnico en la materia, una guía fotográfica muestra los grados de gravedad de las arrugas, utilizados por el investigador y referencia.

Evaluación de la gravedad de las arrugas faciales por el paciente (PFWS): Se utilizó la gravedad de las arrugas faciales del paciente (PFWS, por sus siglas en inglés) para la evaluación de la gravedad de las arrugas faciales de un sujeto. Los sujetos completaron la gravedad de las arrugas faciales del paciente (PFWS) con el ceño fruncido al máximo para evaluar la gravedad de las líneas glabellares en la visita de selección, la visita de tratamiento (día 0) previa al tratamiento, las visitas de seguimiento (semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32) y visita de fin de estudio (semana 24, 28, 32 o 36, según corresponda) o visita de interrupción temprana, si corresponde. El formato de evaluación se proporcionó directamente al sujeto para completarlo mientras revisaba las líneas glabellares utilizando un espejo de mano que se le proporcionó. El sistema de puntuación de clasificación PFWS fue el siguiente: una puntuación de clasificación de PFWS de (0) indicó que no hay gravedad de de las arrugas, con descripción asociada “sin arrugas”; una puntuación de clasificación de PFWS de (1) indicó gravedad leve de las arrugas, con descripción asociada de “arrugas muy superficiales”; una puntuación de clasificación de PFWS de (2) indicó gravedad de arrugas moderada, con descripción asociada de “arrugas moderadas”; y una puntuación de clasificación de PFWS de de (3) indicó gravedad severa de las arrugas, con descripción asociada de “arrugas profundas”. De acuerdo con el estudio, se requirió una clasificación IGA-FWS y PFWS de (2) moderada o (3) severa para las líneas glabellares de un sujeto para que el sujeto se inscribiera en el

estudio.

Los sujetos se aleatorizaron 1:1:1:1:1 a uno de los tratamientos de la **tabla 4** a continuación.

Tabla 4 - Descripción de los grupos de tratamiento

Grupo de tratamiento	Elemento de prueba y dosis	Núm. de sujetos
1	RT002 20 U	50
2	RT002 40 U	50
3	RT002 60 U	50
4	Placebo	50
5	Comparador activo (VISTABEL®/BOTOX® 20 U)	50

Los sujetos inscritos en el estudio tuvieron visitas de selección y tratamientos y evaluaciones de seguridad y eficacia de seguimiento durante todo el estudio durante hasta 36 semanas. Se proporcionó un diario del sujeto para el período inicial de 2 semanas para documentar el inicio de la respuesta al tratamiento. Los sujetos se evaluaron con una llamada telefónica en la semana 1 y durante las visitas en las semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 del estudio. Se les realizó seguimiento a todos los sujetos por al menos 24 semanas después del tratamiento. Si la puntuación de la Evaluación Global por el Investigador - Gravedad de Arrugas Faciales (IGA-FWS) del sujeto con el ceño fruncido al máximo regresó al valor inicial entre las visitas de las 24 semanas y 36 semanas, la visita en la que se registró esa puntuación se consideró la Visita de fin de estudio para el sujeto.

La duración del estudio fue de hasta 38 semanas, incluido un período de selección de hasta dos semanas seguido de un solo tratamiento y un período de seguimiento de hasta 36 semanas después del tratamiento. Se les realizó seguimiento a todos los sujetos por al menos 24 semanas después del tratamiento. Los sitios de inyección se evaluaron en la visita de selección, visita de tratamiento (día 0), antes y después del tratamiento (para determinar si hubo una reacción inmediata al producto en investigación), visitas de seguimiento (semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32) y visita de fin de estudio (semana 24, 28, 32 o 36, según corresponda) o visita de interrupción temprana, si corresponde. La evaluación se realizó como una evaluación global de los 5 sitios de inyección y evaluó el eritema, el edema, sensación de ardor o escozor, y picazón, como se describe por el sujeto.

Además, el investigador evaluó los nervios craneales II a VII en la visita de tratamiento (día 0) previa al tratamiento, en las visitas de seguimiento (semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32) y en la visita de fin de estudio (semana 24, 28, 32 o 36, según corresponda) o visita de interrupción temprana, según corresponda. Las puntuaciones para las evaluaciones del nervio craneal se capturaron de la siguiente manera: una puntuación de clasificación de (1) correspondió a "Normal"; una puntuación de clasificación de (2) correspondió a "Anormal, no clínicamente significativo"; una puntuación de clasificación de (3) correspondió a "Anormal, clínicamente significativo"; una puntuación de clasificación de (4) correspondió a "No evaluado". Para estas evaluaciones, el nervio craneal II es el nervio óptico; el nervio craneal III es el nervio oculomotor; el nervio IV es el nervio troclear; el nervio craneal V es el nervio trigémino; el nervio craneal VI es el nervio abducens y el nervio craneal VII es el nervio facial. The Regional House-Brackmann Facial Nerve Grading System (Yen, T.L. et al., 2003, *Otol. Neurotol.*, 24(1): 118-122) fue diseñado para

evaluar la sincinesis y las cuatro ramificaciones principales del nervio facial (VII) que inervan la musculatura objetivo y adyacente. El investigador evaluó la funcionalidad del nervio facial (VII) en la visita de tratamiento (día 0) previa al tratamiento, visitas de seguimiento (semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32) y la visita de fin de estudio (semana 24, 28, 32 o 36) según sea adecuado) o visita de interrupción temprana, según corresponda.

La fuerza de los músculos faciales se evaluó utilizando la Escala del Consejo de Investigación Médica para la Evaluación de la potencia muscular (MRC). MRC es una escala confiable y validada para evaluar la debilidad muscular y ayuda a la investigación de lesiones nerviosas periféricas (Paternostro-Sluga, 2008). Se evaluaron el músculo orbicular (párpado), elevadores laterales de las cejas y los músculos orbiculares zigomáticos en cada lado de la cara. En la escala MRC para la Evaluación de la potencia muscular, una puntuación de clasificación de (0) corresponde a “sin movimiento”; una puntuación de clasificación de (1) corresponde a “parpadeo perceptible en el músculo”; una puntuación de clasificación de (2) corresponde a “movimiento solo si se elimina la gravedad”; una puntuación de clasificación de (3) corresponde a “puede mover la extremidad contra la gravedad”; una puntuación de clasificación de (4) corresponde a “puede moverse contra la gravedad y cierta resistencia ejercida por el examinador; y una puntuación de clasificación de (5) corresponde a “potencia normal”.

Se realizaron consultas de propagación distante de toxinas con los sujetos en la visita de tratamiento (día 0) posterior al tratamiento, llamada telefónica de seguimiento (semana 1), visitas de seguimiento (semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32) y visita de fin de estudio (semana 24, 28, 32 o 36, según corresponda) o visita de interrupción temprana, según corresponda. Además, los eventos adversos (EA) se evaluaron también en los mismos puntos de tiempo. Sin limitarse, los ejemplos de EA incluyen visión doble, parálisis de los párpados, debilidad muscular, cansancio extremo y dificultad para tragar, respirar y hablar.

Las evaluaciones de eficacia incluyeron la evaluación del investigador de la gravedad de la línea glabellar y las escalas de mejora de la línea glabellar, la evaluación del sujeto de la gravedad de la línea glabellar y la mejora incluyendo los cuestionarios del sujeto y el inicio de efecto evaluado diariamente por el sujeto. Las evaluaciones de eficacia se realizaron con el sujeto en una posición sentada. Para tener una posición visual constante durante la evaluación, el investigador le pide al sujeto que se enfoque en un punto fijo en la sala de examen. La evaluación se debe realizar en una habitación con buena iluminación cenital (no se debe utilizar una luz de examen) o luz natural desde una ventana (pero no la luz solar directa). En cada visita a la clínica, el investigador evaluó la apariencia visual (con el ceño fruncido al máximo y en reposo después del ceño fruncido al máximo) de las líneas glabellares utilizando una puntuación de escala/clasificación de IGA-FWS de 4 puntos apta para el propósito para la Puntuación de Gravedad de las Arrugas Faciales, de la siguiente manera: una puntuación de clasificación de (0) correspondió a sin arrugas faciales; una puntuación de clasificación de (1) correspondió a arrugas faciales leves; una puntuación de clasificación de (2) correspondió a arrugas faciales moderadas; y una puntuación de clasificación de (3) correspondió a arrugas faciales severas. La evaluación representó la gravedad de las arrugas en cada punto de tiempo dado y no se basó en una comparación con el nivel previo al tratamiento.

Las evaluaciones se completaron óptimamente por el mismo investigador y lo más cerca posible a la misma hora del día en cada visita. En un esfuerzo por estandarizar la clasificación de la gravedad de las arrugas entre los investigadores, se utilizó un conjunto de fotografías que muestran los grados de gravedad de las arrugas para la capacitación de los investigadores. Asimismo, se proporcionó una guía fotográfica a cada centro de estudio para ayudar en la evaluación del investigador.

Escala de Mejoría Estética Global del Paciente (GAIS): El investigador y el sujeto evaluaron la apariencia visual (con el ceño fruncido al máximo y en reposo después del ceño fruncido al máximo) de la mejora de la línea glabellar desde la condición inicial utilizando la Escala de Mejoría Estética Global del Paciente (GAIS) de 7 puntos de gravedad que se muestra en la **tabla 5** a continuación. Los sujetos del estudio completaron la Escala de Mejoría Estética Global del Paciente (GAIS) con el ceño fruncido al máximo y en reposo después del ceño fruncido al máximo, para evaluar la apariencia visual de la mejora de la línea glabellar desde la condición inicial en las visitas de seguimiento (semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32) y la visita de fin de estudio (semana 24, 28, 32 o 36, según corresponda) o visita de interrupción temprana, según corresponda. El formato de evaluación GAIS se proporcionó directamente al sujeto para completar mientras se revisaba el área tratada utilizando un espejo de mano suministrado. Los sujetos con lentes de contacto vieron de manera óptima sus líneas glabellares mientras usaban sus lentes de contacto. Se aconsejó a los sujetos que usaban anteojos que vieran sus líneas glabellares sin anteojos si fuera posible. Si se necesitaban anteojos para que el sujeto vea sus líneas glabellares, entonces se utilizaron los anteojos para la evaluación. La evaluación del sujeto se completó antes de que el investigador completara la evaluación IGA-FWS.

Tabla 5 - Escala de Mejoría Estética Global

Puntuación de clasificación	Mejora en las arrugas
-3	Muchísimo peor
-2	Mucho peor
-1	Peor
0	Sin cambio
1	Mejor
2	Mucho mejor
3	Muchísimo mejor

En cada visita a la clínica, el sujeto evaluó la apariencia visual (con el ceño fruncido al máximo) de las líneas glabellares utilizando la siguiente escala de 4 puntos para la evaluación de la Gravedad de las Arrugas Faciales del Paciente (**tabla 6** a continuación). El formato de evaluación se proporcionó directamente al sujeto para completar mientras se revisaba el área de tratamiento glabellar utilizando el espejo de mano suministrado. En cuanto a la evaluación GAIS anterior, los sujetos con lentes de contacto vieron óptimamente sus líneas glabellares mientras usaban sus lentes de contacto. Se aconsejó a los

sujetos que usaban anteojos que vieran sus líneas glabellares sin anteojos si fuera posible. Si se necesitaban anteojos para que el sujeto vea sus líneas glabellares, entonces se utilizaron los anteojos para la evaluación. La evaluación del sujeto se completó antes de que el investigador completara la evaluación IGA-FWS. La evaluación representó la gravedad de las arrugas en cada punto de tiempo dado y no se basó en una comparación con el nivel de defecto previo al tratamiento. Las evaluaciones se completaron óptimamente por el sujeto lo más cerca posible al mismo tiempo en cada visita.

Tabla 6 - Gravedad de las Arrugas Faciales del Paciente (PFWS)

Puntuación de clasificación	Gravedad de las arrugas	Descripción
0	Ninguna	Sin arrugas
1	Leve	Arrugas muy superficiales
2	Moderada	Arrugas moderadas
3	Grave	Arrugas profundas

Las evaluaciones adicionales de los sujetos durante el estudio incluyeron una clasificación de la importancia de la duración del efecto al elegir un tratamiento estético (proporcionado en la visita de tratamiento (día 0); una clasificación de la satisfacción de los sujetos con los resultados del tratamiento (en la visita de la semana 4), en forma de un cuestionario para calificar su satisfacción con los resultados del tratamiento, se preguntó a los sujetos qué tan satisfechos o insatisfechos estaban con la apariencia del área tratada de la cara; y una clasificación de su satisfacción con la duración del efecto del tratamiento (en la visita de fin de estudio (semana 24, 28, 32 o 36, según corresponda) o visita de interrupción temprana, según corresponda).

Se tomaron fotografías digitales del área de tratamiento en visita de tratamiento (día 0) previa al tratamiento, en las visitas de seguimiento (semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32) y en la visita de fin de estudio (semana 24, 28, 32 o 36, según corresponda) o en la visita de interrupción temprana. Las fotografías digitales fueron tomadas de manera controlada y estandarizada. Se proporcionaron fotografías de referencia y capacitación adecuada al personal del sitio y a los investigadores. Los sujetos no utilizaron óptimamente maquillaje en la cara o en los ojos de ningún tipo. Para minimizar el reflejo de luz de la piel, las áreas tratadas se secaron con una almohadilla con alcohol y se dejaron secar para eliminar el aceite de la piel antes de tomar fotografías. Las fotografías incluían la vista frontal del sujeto con el ceño fruncido al máximo y en reposo después del ceño fruncido al máximo.

Análisis estadístico: Todos los programas estadísticos y los análisis se realizaron con SAS versión 9.3 o superior. Debido a que este estudio no se realizó para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento al nivel de 0.05, se espera que el valor p obtenido de varias pruebas descritas a continuación establezca tendencias estadísticas. No se realizaron ajustes para la multiplicidad de las pruebas. Las características demográficas e iniciales se resumieron para las poblaciones con intención de tratar (ITT), por protocolo (PP) y de seguridad. Las estadísticas descriptivas se proporcionaron para todas las variables de eficacia en todos los puntos de tiempo por grupos de

tratamiento, así como por grupo de tiempo y por geografía/país. Se analizaron análisis de eficacia para las poblaciones ITT y PP. Los análisis de seguridad se realizaron en la población de seguridad.

Poblaciones Todos los sujetos que fueron asignados aleatoriamente y recibieron tratamiento (al menos 1 dosis de medicación del estudio) se incluyeron en la población con intención de tratar (ITT). Todos los sujetos que se aleatorizaron, recibieron tratamiento y que habían proporcionado al menos una evaluación de seguridad posterior al tratamiento, se incluyeron en la población de seguridad. La población por protocolo (PP) incluyó sujetos de la población ITT que completaron la evaluación de 24 semanas sin una violación importante del protocolo. Los sujetos fueron excluidos de la población PP por cualquiera de las siguientes razones: (i) el sujeto violó los criterios de inclusión/exclusión; (ii) el sujeto se perdió la visita de la semana 24; (iii) el sujeto usó un medicamento prohibido; (iv) la visita de la semana 24 del sujeto fue ± 5 días fuera de horario (fuera de la variación permitida en los días de visita programados).

Para los grupos de seguridad y las comparaciones de eficacia, los sujetos se asignaron aleatoriamente a 5 grupos de tratamiento (RT002 20 U; RT002 40 U; RT002 60 U; placebo; Comparador activo). Las comparaciones de eficacia primaria se realizaron entre cada dosis de RT002 y comparador activo; cada dosis de RT002 y placebo; así como el comparador activo con placebo. Se evaluó una relación riesgo a beneficio para examinar las tendencias a favor de al menos una de las dosis de RT002 versus el comparador activo en las evaluaciones clave del estudio (proporción de respondedores al mes 6 y duración de la respuesta medida hasta 36 semanas; frecuencia de EA).

Dentro de cada grupo de tratamiento, las puntuaciones faltantes para IGA-FWS, PFWS y GAIS para la población ITT fueron imputadas por la imputación múltiple Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para análisis basados en la proporción de respondedores. El análisis de sensibilidad para el punto final primario se realizó utilizando imputaciones basadas en el último método de observación realizado.

Se utilizaron estadísticas descriptivas para resumir las características demográficas (p. ej., edad, sexo, raza, etc.) y las características de fondo (p. ej., IGA-FWS, PFWS, etc.). El historial médico pasado o en curso, el cumplimiento de las visitas de estudio y el uso de medicamentos anteriores y concomitantes se resumieron para todos los sujetos y se presentaron en una lista por sujeto.

Eficacia: Para la eficacia, se evaluó la eficacia clínica primaria por un evaluador cegado que calificó la gravedad de las líneas glabulares del sujeto con el ceño fruncido al máximo utilizando IGA-FWS. Un respondedor se define como un sujeto que tiene una mejora de un punto o más en IGA-FWS versus el inicio y que no ha regresado a IGA-FWS inicial en el punto de tiempo de evaluación. Para los propósitos de análisis primario, la proporción de respondedores se comparó entre cada dosis de RT002 y el comparador activo en la semana 24. Cada grupo de tratamiento RT002 se comparó por separado con placebo y el comparador activo. El comparador activo también se comparó con el placebo en cada visita. Las comparaciones se realizaron con las pruebas Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) estratificadas por IGA-FWS inicial.

Para los propósitos del análisis primario, se comparó la Duración de Respuesta entre cada una de las dosis de RT002 y el comprador activo utilizando el método de Kaplan-Meier. La duración de la respuesta se midió desde el momento de la inyección hasta el momento en que un sujeto volvió a su gravedad inicial

de acuerdo con lo medido por el Investigador Cegado con base en IGA-FWS. Si el sujeto no logró una mejora de un punto en comparación con el inicio de acuerdo con IGA-FWS en o antes de la semana 4, la duración de respuesta se consideró cero. Si el sujeto logró una mejora de al menos 1 punto de acuerdo con IGA-FWS en la semana 4 o antes, pero no volvió al inicio en la semana 36 (último punto de tiempo), dicho sujeto fue controlado en la semana 36 (fecha de la última evaluación) para el análisis. La prueba de rangos logarítmicos se utilizó para comparar la duración de respuesta entre RT002 y el comparador activo. Una Relación Riesgo a Beneficio calculada para cada grupo de tratamiento fue igual a la suma del número de eventos adversos relacionados con el tratamiento dividido por la suma de la duración de los días de respuesta para los sujetos en el grupo de tratamiento. Si un sujeto logró una mejora de al menos 1 punto basado en IGA-FWS en la semana 4 o antes, pero volvió al inicio en la semana 36 (último punto de tiempo), entonces su contribución a la suma de beneficios fue el número de días entre el inicio y el último día de visita.

Para análisis secundarios, los puntos finales secundarios utilizados se definen como sigue: (1) Proporción de respondedores en la semana 2 y en las semanas 4 a 36 con el énfasis en las evaluaciones de la semana 12 y la semana 24. Las comparaciones entre los grupos de tratamiento se basaron en la prueba CMH estratificada por la gravedad inicial de la variable analizada cuando fue posible. Cada grupo de tratamiento se comparó con placebo y se comparó por separado con el comparador activo para aquellos sujetos que tenían una gravedad inicial que posiblemente podría permitir la mejora requerida para el éxito. El comparador activo también se comparó con el placebo en cada visita.

Los respondedores se evaluaron con base en varias definiciones: (i) aquellos que mejoran en al menos 2 puntos con base en IGA-FWS versus el inicio; (ii) aquellos que mejoran en al menos 1 punto con base en IGA-FWS versus el inicio; (iii) aquellos que tienen puntuaciones de IGA-FWS de 0 o 1; (iv) aquellos que mejoran al menos 1 punto con base en PFWS; (v) aquellos que mejoran en al menos 2 puntos con base en PFWS; (vi) aquellos que tienen una puntuación de al menos 1 en la escala GAIS;

(2) Puntos finales secundarios con base en varias definiciones de duración de respuesta. A los sujetos que no lograron una mejora como se especifica en cada definición a continuación en la semana 4 se les asignó la duración 0; los sujetos que lograron una mejora como se define a continuación pero que no volvieron al inicio en la semana 36 fueron controlados en la semana 36 (fecha de la última evaluación). Los grupos de tratamiento se compararon utilizando la prueba de rangos logarítmicos. Para cada definición y grupo de tratamiento, se calculó una relación de riesgo a beneficio como se describió anteriormente. Las definiciones para la duración de la respuesta incluyen (i) el tiempo desde la inyección hasta la puntuación GAIS menor a 1 para una definición de respondedores de al menos 1 en GAIS; (ii) tiempo desde la inyección hasta la reversión al inicio para una definición de respondedores de al menos 2 puntos de mejora en IGA-FWS; (iii) tiempo desde la inyección hasta la reversión al inicio para una definición de respondedores de al menos 1 punto de mejora en PFWS; (iv) tiempo desde la inyección hasta la reversión al inicio para una definición de respondedores de al menos 2 puntos de mejora en PFWS; (v) tiempo desde la inyección hasta la reversión al inicio para una definición de respondedores de al menos 1 punto de mejora en IGA-FWS utilizando el modelo de riesgos proporcionales con término para el tratamiento, la gravedad inicial y el

tratamiento por interacción de la gravedad inicial; y (vi) tiempo desde la inyección hasta la reversión al inicio para una definición de respondedores de al menos 1 punto de mejora en PFWS utilizando el modelo de riesgos proporcionales con término para el tratamiento, la gravedad inicial y el tratamiento por interacción de la gravedad inicial. Se realizó un análisis exploratorio para correlacionar las puntuaciones de evaluación GAIS del sujeto con las tasas de respondedores basadas en el PFWS para los cambios de 1 y 2 puntos. Se utilizaron los análisis de correlación y regresiones logísticas, según corresponda.

Datos de los pacientes: Los resultados por paciente reportados respaldaron los hallazgos del investigador sobre la duración y la eficacia del tratamiento con RT002. A las 24 semanas (4 meses), la dosis de 40 U de RT002 continuó proporcionando tasas de respuesta clínicamente más altas en la Escala de Mejoría Estética Global del Sujeto (GAIS) con 46.3 % de los sujetos tratados con RT002 40 U versus 31 % de los sujetos tratados con BOTOX® Cosmetic que tienen una puntuación de clasificación de al menos 1. En la semana 16, en comparación con la duración de “hasta 120 días” de BOTOX® Cosmetic, de acuerdo con la información de la etiqueta, la dosis de RT00240 U alcanzó tasas de respuesta estadísticamente significativas más altas medidas por al menos una mejora de 1 punto en la Escala de Gravedad de las Arrugas del Paciente (PWS) y al menos una clasificación de 1 punto en la Escala de Mejoría Estética Global del Sujeto. El 76.9 % de los sujetos tratados con RT002 40 U mantuvo al menos una mejora de 1 punto en PWS en comparación con 58.5 % de sujetos tratados con BOTOX® Cosmetic. Además, 89.7 % de los sujetos tratados con RT002 40 U mantuvo al menos una puntuación de 1 punto en GAIS en comparación con 70.7 % de los sujetos tratados con BOTOX® Cosmetic.

Seguridad: El producto RT002 mostró un perfil de seguridad y eficacia altamente comparable con BOTOX® Cosmetic. Los eventos adversos fueron generalmente leves y se asociaron principalmente con los efectos de la inyección misma. Todos los grupos de dosis de RT002 exhibieron un excelente perfil de seguridad general con EA que fueron predominantemente localizados, transitorios y de gravedad leve. No se produjeron EA graves en un grupo de dosis activa. Los grupos de dosis de 20 U y 40 U de RT002 fueron bien tolerados y clínicamente superiores a BOTOX® con respecto a causar ptosis. Además, RT002 exhibió menos propagación descendiente a las dosis de 20 U y 40 U. Tanto las dosis de 20 U como las de 40 U no causan ptosis en ningún sujeto tratado con esas dosis de RT002 en ningún momento, en comparación con el 1.9 % en el grupo tratado con BOTOX® Cosmetic. Se observó una tasa de ptosis del 5.7 % en sujetos del grupo de tratamiento con RT002 60 U. Estos eran de naturaleza transitoria, como se ve típicamente con el tratamiento con BOTOX®. La difusión reducida de RT002 es consistente con estudios no clínicos y anteriores y apoya una propagación reducida de toxina, como se observa en sujetos tratados con composiciones de la invención que contienen toxina botulínica, como la toxina botulínica A, y un portador cargado positivamente que comprende una estructura tal como polilisina, con uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente, unidos covalentemente como se describe en la presente, tal como RT002.

Dosificación y duración del efecto: Sin desear limitarse, los resultados del análisis intermedio respaldan una selección de dosis de 40 U como una dosis óptima para el tratamiento único con las composiciones que contienen botulina de la invención, en base a las altas tasas de respuesta, la duración

del efecto y el perfil de seguridad positivo. Además, las composiciones de la invención, tal como RT002, tienen una duración de efectos sostenida y duradera, p. ej., durante al menos 6 meses, después de la administración por inyección a un sujeto. De acuerdo con lo determinado por el análisis intermedio de los resultados del estudio, el tratamiento de las líneas glabellares de los sujetos con el producto RT002 logró un efecto de duración superior en comparación con el tratamiento de las líneas glabellares en los sujetos con BOTOX® Cosmetic. De hecho, se demostró una mediana de 5.9 meses de mejora de 1 punto en IGA en el grupo de dosis de RT002 40 U (23.6 semanas) versus una duración de 18.8 semanas en sujetos tratados con BOTOX® Cosmetic ($p = 0.020$) basado en el método de análisis Kaplan Meier. (véanse, por ejemplo, las **figuras 4A y 4B**). Se debe destacar que, en el mes 6, un número significativo de sujetos tratados con RT002 fueron monitoreados en el análisis provisional de la duración, ya que todavía eran respondedores. En el mes 6, casi un tercio (~33 %) de los sujetos en el grupo de tratamiento de RT002 40 U todavía no tenían arrugas, o no tenían casi ninguna, después de un solo tratamiento ($p = 0.041$) versus 12 % de los sujetos en el grupo de tratamiento con BOTOX® Cosmetic. Además, se le dio seguimiento al grupo de dosis alta durante 32 semanas después del tratamiento para evaluar la duración de la respuesta y se logró una duración media de 29.4 semanas o 7.3 meses de acuerdo con las evaluaciones del investigador y el sujeto.

La duración del efecto que proporcionan las composiciones de la invención, tales como RT002, así como los métodos y usos de tratamiento de las mismas, proporcionan ventajas que los sujetos sometidos a tratamiento consideran de gran importancia para ellos para un tratamiento estético. Una duración de efecto tan larga y sostenida, particularmente lograda por una dosis de producto de inyección única o una vez, es decir, RT002, permite menos inyecciones por curso de tratamiento para un sujeto, que es importante para la comodidad, conveniencia y bienestar general del sujeto. Un producto que ofrece efectos significativos y sostenidos, mantenido durante al menos un período de 6 meses después de una dosis de tratamiento única por inyección del producto a un sujeto, proporciona una solución a una necesidad insatisfecha en la técnica tanto para profesionales como para pacientes.

Resumen de los resultados provisionales; Los resultados demuestran que una composición de la invención representada por el producto RT002 demostró ser superior a BOTOX® Cosmetic, medida por la duración media del efecto y las tasas de respondedores con una mejora de 1 punto y 2 puntos en IGA-FWS, y el porcentaje de pacientes que lograron o se mantuvieron sin arrugas o arrugas leves de conformidad con el sistema de puntuación IGA-FWS descrito anteriormente. El estudio logró resultados estadísticamente significativos para el punto final primario de eficacia de la mejora de 1 punto en IGA-FWS a los 28 días. El análisis intermedio de la semana 24 demostró una diferenciación clínicamente significativa en los resultados obtenidos por el tratamiento único de sujetos con una dosis inyectada de RT002 versus inyección con BOTOX® Cosmetic.

De acuerdo con lo determinado también por el análisis intermedio, RT002 logró una duración de efecto de aproximadamente 6 meses con altas tasas de respuesta. RT002 logró una duración superior del efecto en comparación con BOTOX® Cosmetic, demostrando una duración media de 5.9 meses de mejora de 1 punto en las líneas glabellares basadas en la escala de Evaluación Global por el Investigador -

Gravedad de Arrugas Faciales (IGA-FWS) en el grupo de dosis de 40 U (23.6 semanas) versus 18.8 semanas para BOTOX® Cosmetic ($p = 0.020$) basado en el método de análisis de Kaplan Meier. A las 24 semanas (6 meses), RT002 a dosis de 40 U y 60 U continuó proporcionando tasas de respuesta clínicamente más altas en el 35.9 % y el 29.3 % de los sujetos, respectivamente, manteniendo una mejora de 1 punto frente al 19 % de los pacientes tratados con BOTOX® Cosmetic. RT002 alcanzó su objetivo principal de eficacia de al menos 1 punto de mejora en la escala del investigador (IGA-FWS) a los 28 días, así como el resultado informado por el paciente. RT002 tasas de respuesta del 100 % en todos los grupos de dosis en el punto final primario de eficacia de 28 días de una mejora de 1 punto en la Evaluación Global del Investigador - Gravedad de Arrugas Faciales (IGA-FWS). RT002 logró tasas de respuesta superiores al 97 % en todos los grupos de tratamiento de dosis en el punto final primario de eficacia de 28 días de una mejora de 1 punto en la Escala de Arrugas Faciales del Paciente. Los datos de eficacia mostraron que el 96 % de los sujetos fueron calificados con gravedad de arrugas nula o leve con el ceño fruncido al máximo 4 semanas después del tratamiento de acuerdo con la evaluación del investigador clínico y el 83 % de los sujetos se evaluaron a sí mismos que han logrado tener ningún arruga o arrugas leves con el ceño fruncido al máximo en el mismo punto de tiempo. RY002 fue bien tolerado y no se encontraron eventos adversos graves. No se produjo ptosis palpebral en sujetos en los grupos de tratamiento con dosis de 20 U o 40 U de RT002. Se observó respuesta a la dosis en el estudio; los sujetos que recibieron la dosis de 40 U de RT002 mostraron tasas de respuesta particularmente altas.

En general, RT002 para inyección ha sido bien tolerado en todos los niveles de dosis sin ninguna preocupación de seguridad sistémica o local o evidencia de propagación. RTT150 para inyección ha sido bien tolerado en ensayos clínicos sin evidencia de propagación más allá del sitio de tratamiento con ninguna dosis. Los eventos adversos en el ensayo clínico abierto de fase 1/2 con aumento de dosis, RT002-CL001, fueron generalmente leves, localizados y transitorios. Los eventos adversos más comunes observados fueron dolor de cabeza y reacciones en el sitio de inyección. Ningún sujeto en ninguna cohorte experimentó ptosis. No se registraron eventos adversos graves y las tasas de eventos adversos no cambiaron en frecuencia, gravedad o tipo con dosis crecientes. Treinta y cuatro (34) sujetos reportaron 131 EA. Los eventos adversos más comunes reportados fueron dolor de cabeza (31 informes; 17 sujetos); prurito en el lugar de la inyección (34 eventos; 8 sujetos), dolor en el lugar de la inyección (ardor) (14 eventos; 6 sujetos) y trastornos oculares (14 eventos; 5 sujetos). Además de los eventos adversos, las evaluaciones de seguridad en el estudio RT002-CL001 incluyeron pruebas de laboratorio clínico (hematología, química sanguínea, análisis de orina y tiempo de protrombina), anticuerpos séricos para la toxina RTT150 y péptido RTP004, evaluación de los nervios craneales II a VII y la fuerza de los músculos faciales, medicación terapéutica concomitante y prueba de embarazo en orina para mujeres en edad fértil. No hubo evidencia de propagación más allá del sitio de tratamiento con ninguna dosis y ninguna evidencia de exposición sistémica basada en los resultados de laboratorio clínico y las evaluaciones físicas. Todos los sujetos fueron negativos para anticuerpos contra toxina y péptido.

Ejemplo 6: Estudio de seguimiento con la formulación inyectable de toxina botulínica que muestra efectos a largo plazo en el tratamiento de las líneas glabellares

RT002 se evaluó también en un ensayo clínico de fase 2, rango de dosis, activo y controlado con placebo, RT002-CL002, en Canadá, para evaluar la seguridad, eficacia y duración de una sola administración para el tratamiento de líneas glabellares moderadas a graves en adultos. El estudio incluyó a 268 sujetos (más de 50 por grupo de tratamiento), que fueron tratados con 20, 40 o 60 U de RT002, 20 U de BOTOX Cosmetic o placebo. Para el tratamiento de las líneas glabellares, el régimen de dosificación propuesto en el ensayo clínico fue un tratamiento único de 20, 40 o 60 unidades por sujeto, inyección intramuscular de 0.1 mL en cada uno de los 5 sitios de inyecciones en la frente. Las dosis de 16, 32, 48 o 64 U basadas en el método de potencia de solución salina actual (correspondiente a 25, 50, 75 y 100 U en el método de potencia de solución amortiguadora de fosfato de gelatina anterior) fueron bien toleradas en un ensayo clínico de fase 1/2 (Estudio RT002 -CL001; 12 sujetos por grupo de dosis; 48 sujetos en total).

Los datos provisionales mostraron que RT002 logró su medición de eficacia primaria para las tres dosis a las 4 semanas. El estudio demostró una duración media del efecto de RT002 de 6 meses basada en una mejora de al menos 1 punto en las líneas glabellares con el ceño fruncido al máximo en la escala de Evaluación Global por el Investigador-Gravedad de las Arrugas Faciales. Los resultados informados por sujeto fueron consistentes con los hallazgos del investigador sobre la duración y la eficacia de RT002. En todas las cohortes, RT002 parecía ser generalmente seguro y bien tolerado. Los eventos adversos fueron generalmente leves, localizados y transitorios. No se registraron eventos adversos graves ni evidencia de exposición sistémica a ninguna de las tres dosis evaluadas.

Ejemplo 7: Eficacia y seguridad de una formulación inyectable de toxina botulínica que muestra una tasa de respuesta más alta y efectos de duración a largo plazo en el tratamiento de líneas glabellares de moderadas a severas (Estudios de fase 3, brazo 1 y brazo 2)

Este ejemplo describe dos brazos de un estudio clínico y análisis de resultados primarios de los resultados en la semana 36 para evaluar la seguridad, eficacia y duración del efecto de una composición inyectable de la invención que contiene toxina botulínica A y un portador cargado positivamente que comprende un polipéptido de polilisina cargado positivamente que tiene covalentemente unido a la misma uno o más grupos de eficiencia cargados positivamente, llamados RT002. El producto RT002 es una formulación inyectable, que contiene la molécula de toxina botulínica del subtipo A de 150 kD sin proteínas accesorias, que está asociada de forma no covalente con un péptido portador cargado positivamente que tiene la fórmula RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (RTP004; SEQ ID NO: 4) y que no contiene proteínas accesorias o componentes derivados de animales. Se usa RT002 en el estudio para el tratamiento de líneas glabellares moderadas a severas. El excipiente comprende 0.1 mg de polisorbato 20, 36 mg de dihidrato de trehalosa y 11.7 µg de RTP004, por 50 U de la toxina A de 150 kDa sin proteínas accesorias (y la dosis de tratamiento es de 40 U).

Se incluyeron dos brazos de tratamiento activo con RT002 en el estudio clínico, que fue un estudio de fase 3, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, pivotal, multicéntrico, diseñado y realizado

para evaluar la seguridad, eficacia y duración del efecto de una administración única (una vez) mediante inyección de RT002 para la mejora temporal en la aparición de líneas glabellares moderadas a severas en adultos. La dosis de 40 U de RT002 se evaluó en comparación con el control con placebo (inyección intramuscular). El tratamiento inyectable fue una inyección intramuscular única, colocada en 5 áreas diferentes dentro del complejo glabellar, una en el prócer y otra en los aspectos medial y lateral de los músculos corrugadores derecho e izquierdo (8 U por cada sitio de inyección). Asimismo se evaluó la duración del efecto de un tratamiento único de RT002 a la dosis de 40 U.

El producto RT002 está compuesto de neurotoxina botulínica purificada de 150 kDa sin proteínas accesorias, denominado RTT150, formulado como polvo liofilizado. En estudios no clínicos, RT002 ha demostrado que exhibe menor difusión que otras formas de la neurotoxina botulínica A (BoNTA) y puede ofrecer mayor control del efecto en los sitios blanco con menos efectos secundarios debido a la propagación distante de la toxina en los músculos vecinos. Además, la formulación de la toxina botulínica tipo A libre de aditivos RT002 tiene la capacidad de permitir un menor potencial inmunogénico debido a la ausencia de proteínas no activas presentes en la formulación. Además, RT002 fue bien tolerado después de la administración intramuscular de dosis repetida de hasta 50 U/kg en ratas. RTP004 se ha dosificado a la dosis máxima factible sin efecto en estudios dérmicos, de genotoxicidad y reproductivos y no produjo hallazgos significativos en estudios parenterales con un múltiplo de seguridad de más de 9,500 veces.

Régimen de dosificación y técnica de inyección: El régimen de dosificación de RT002 para este estudio fue un tratamiento único de RT002 (40 U) o placebo, como una inyección intramuscular de 0.1 mL en cada uno de los 5 sitios de inyecciones en la frente (0.5 mL en total), entre las cejas, del sujeto sometido a tratamiento. Todos los tratamientos fueron inyecciones intramusculares administradas por un médico capacitado. Más específicamente, los sujetos del estudio recibieron un tratamiento único de 0.1 mL por tratamiento inyectable en cinco sitios de inyección: dos inyecciones en cada músculo corrugador y una inyección en el músculo prócer. Los investigadores, el personal del sitio, los sujetos y el patrocinador fueron cegados a las asignaciones del grupo de tratamiento. Aproximadamente 300 sujetos adultos, mujeres y hombres, de 18 a 75 años de edad y con buena salud general, con líneas glabellares moderadas a severas al inicio, se inscribieron en cada uno de los dos estudios, para un total de aproximadamente 600 sujetos. Específicamente, había 303 pacientes en el primer brazo y 306 en el segundo.

La duración fue de hasta 38 semanas de estudio, incluido un período de selección de hasta dos semanas seguido de un solo tratamiento y un período de seguimiento de hasta 36 semanas después del tratamiento. A todos los pacientes se les dio seguimiento durante al menos 24 semanas después del tratamiento. A partir de la semana 24 después del tratamiento, a los pacientes se les dio seguimiento hasta que la gravedad de sus arrugas en las líneas glabellares en el ceño fruncido al máximo volvió al inicio tanto en la Evaluación Global del Investigador - Gravedad de Arrugas Faciales (IGA-FWS) como en las evaluaciones de Gravedad de Arrugas Faciales del Paciente (PFWS).

Las líneas glabellares faciales surgen del corrugador lateral y los músculos prócer verticales en la cara. Estos pueden identificarse fácilmente mediante la palpación de la masa muscular mientras el paciente frunce el ceño al máximo. El corrugador deprime la piel creando una línea vertical, es decir, un surco,

rodeado de bordes de músculos tensos (es decir, líneas de expresión). Debido a la ubicación, tamaño y el uso de los músculos varían notablemente entre los individuos, los médicos que administran la toxina botulínica inyectable deben comprender la anatomía relevante del área involucrada y cualquier alteración de la anatomía debido a procedimientos quirúrgicos previos. Para reducir el riesgo de ptosis, se realizan los siguientes pasos de manera óptima: (i) se debe evitar la inyección en el elevador palpebral superior o cerca de él, particularmente en pacientes con depresores de cejas más grandes; (ii) las inyecciones de corrugador medial deben estar al menos 1 cm por encima de la cresta supraorbitaria ósea; (iii) se debe garantizar que el volumen/dosis inyectada sea exacto; y (iv) la toxina no debe inyectarse a menos de 1 cm por encima de la ceja central. La toxina botulínica se inyecta aplicando presión con el dedo sobre el reborde orbitario medial superior mientras se avanza la aguja a través de la piel hacia el músculo subyacente.

Determinación del tamaño de muestra

Las estimaciones de la eficacia del tratamiento tomadas de trabajos anteriores mostraron que un tamaño de muestra de 200 y 100 para 40 U de RT002 para inyección y placebo, respectivamente, tiene más del 99 % de potencia para detectar una diferencia entre los grupos de tratamiento para el punto final de eficacia primaria: proporción de respondedores compuestos de 2 puntos en la semana 4 con base en una prueba chi-cuadrada bilateral a un nivel alfa de 0.05 (tasa de respuesta de al menos 50 % vs. 1 %). Se eligió el tamaño de la muestra de 300 pacientes para garantizar la potencia adecuada para detectar una diferencia entre los grupos de tratamiento para la tasa de respuesta de los puntos finales secundarios clave en visitas posteriores.

Evaluación de la gravedad de las líneas glabellares

Para el estudio, se evaluó la gravedad de las líneas glabellares por el investigador y el sujeto. Para la evaluación por el investigador, se usó un sistema de puntuación de clasificación de Evaluación Global del Investigador - Gravedad de Arrugas Faciales (IGA-FWS) de la siguiente manera: una puntuación de clasificación IGA-FWS de (0) indicaba que no había gravedad de las arrugas faciales ("Nula"), descrito como "sin arrugas"; una puntuación de clasificación IGA-FWS de (1) indicó gravedad leve de las arrugas faciales ("Leve"), descrita como "arrugas muy superficiales"; una puntuación de clasificación IGA-FWS de (2) indicó gravedad moderada de las arrugas faciales ("Moderada"), descrita como "arrugas moderadas"; y una puntuación de clasificación IGA-FWS de (3) indicó gravedad severa de las arrugas faciales ("Grave"), descrita como "arrugas profundas y surcadas". La evaluación se realiza con el ceño fruncido al máximo y después en reposo. Como se aprecia por el técnico en la materia, una guía fotográfica muestra los grados de gravedad de las arrugas, utilizados como referencia.

Evaluación de la gravedad de las arrugas faciales por el paciente (PFWS): Se utilizó la Gravedad de las Arrugas Faciales del Paciente (PFWS) para la evaluación de la gravedad de las arrugas faciales de un sujeto. Los sujetos completaron la Gravedad de las Arrugas Faciales del Paciente (PFWS) con el ceño fruncido al máximo para evaluar la gravedad de las líneas glabellares en la visita de selección, la visita de tratamiento (día 0) previa al tratamiento, las visitas de seguimiento (semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32) y la visita de fin de estudio (semana 24, 28, 32 o 36, según corresponda) o visita de interrupción temprana, según corresponda. El formato de evaluación se proporcionó directamente al sujeto para completarlo.

mientras revisaba las líneas glabellares utilizando un espejo de mano suministrado. El sistema de puntuación de clasificación fue como sigue: una puntuación de clasificación PFWS de (0) indicó que no hay gravedad de las arrugas, con descripción asociada “sin arrugas”; una puntuación de clasificación PFWS de (1) indicó gravedad leve de las arrugas, con descripción asociada de “arrugas muy superficiales”; una puntuación de clasificación PFWS de (2) indicó gravedad moderada de las arrugas, con descripción asociada de “arrugas moderadas”; y una puntuación de clasificación de PFWS de (3) indicó gravedad de “arrugas severas”, con descripción asociada de “arrugas profundas”. De acuerdo con el estudio, fue necesaria una clasificación de IGA-FWS y de PFWS de (1) moderada o (3) severa para las líneas glabellares de un sujeto para que un sujeto se inscribiera.

Los sujetos se aleatorizaron en una proporción de 2:1 al grupo de tratamiento con RT002 o placebo, respectivamente. Los sujetos inscritos en el estudio tuvieron visitas de selección y tratamientos y evaluaciones de seguridad y eficacia de seguimiento durante todo el estudio durante al menos 24 semanas y hasta 36 semanas, después del tratamiento. Se realizó una sola administración en la semana 0. Los pacientes regresan para las visitas de seguimiento en las semanas 1, 2, 4 (punto final primario), y cada 4 semanas a partir de ahí, con la semana 24 comienza la última visita obligatoria y continúan cada 4 semanas hasta la semana 36, la visita final.

Los pacientes capturaron su evaluación de la apariencia de las líneas con el ceño fruncido al máximo, en un diario para el período inicial de 2 semanas después del tratamiento, utilizando la escala de gravedad de 4 puntos, descrita en la presente. El inicio del efecto del tratamiento se determinó con base en el diario del paciente al evaluar la severidad de las líneas glabellares a través del tiempo dentro de las primeras dos semanas después del tratamiento. El inicio del efecto del tratamiento se definió conforme el tiempo cuando la puntuación de la clasificación bajó 1 punto o más de los valores iniciales. Esto se incluyó en la evaluación del punto final secundario.

Evaluaciones de eficacia y seguridad

Las evaluaciones de eficacia primaria incluyeron la evaluación del investigador de la gravedad de la línea glabellar y la mejora de la línea glabellar, y la evaluación del paciente de la gravedad y mejora de la línea glabellar.

Gravedad de las arrugas del ceño fruncido - Evaluación global por el paciente y el investigador

La gravedad de las arrugas del ceño se evaluó tanto por el paciente (Gravedad de las Arrugas del Ceño Fruncido del Paciente [PFWS]) y del investigador (Evaluación Global del Investigador - Gravedad de Arrugas Faciales [IGA-FWS]) utilizando una escala de clasificación de 4 puntos mostrada en la **tabla 7**. La gravedad se evalúa con el ceño fruncido al máximo y en reposo después del ceño fruncido al máximo tanto por el paciente como por el investigador. Las puntuaciones oscilan de 0 = nula a 3 = grave.

Tabla 7 - Gravedad de las arrugas con el ceño fruncido

Puntuación de clasificación	Gravedad de las arrugas con el ceño fruncido	Descripción
0	Ninguna	Sin arrugas
1	Leve	Arrugas muy superficiales
2	Moderada	Arrugas moderadas
3	Grave	Arrugas profundas

Punto final de eficacia primaria

El punto final primario se derivó de las puntuaciones del ceño fruncido al máximo, obtenidas en la semana 4, y se definió como lograr una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) y una mejora de al menos dos puntos desde el inicio tanto en la escala IGA-FWS como PFWS al mismo tiempo. La respuesta se abrevió como “respuesta compuesta de 2 puntos”.

Puntos finales de eficacia secundaria

Los puntos finales secundarios, derivados de las evaluaciones de IGA-FWS y PFWS con el ceño fruncido al máximo, se describen a continuación. Para los puntos finales que se evaluaron en pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4, los datos de casos observados con el ceño fruncido al máximo se deben usar para realizar esta evaluación.

(1) Proporción de pacientes que logran una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) en IGA-FWS en las semanas 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36.

(2) Proporción de pacientes que logran una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) en IGA-FWS y PFWS en las semanas 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36.

(3) Proporción de pacientes que logran una respuesta compuesta de 2 puntos en las semanas 2, 4*, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36. (*Este es un punto final primario).

(4) Proporción de pacientes que logran una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) en PFWS en las semanas 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36.

(5) Tiempo hasta la pérdida de una respuesta de 2 puntos o mayor en IGA-FWS y PFWS, para pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y están en el grupo RT002.

(6) Tiempo hasta la pérdida de una respuesta de 2 puntos o mayor en IGA-FWS y PFWS, para pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y están en el grupo RT002.

(7) Tiempo de retorno a, empeoramiento respecto al inicio, tanto en IGA-FWS como en PFWS, para pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y están en el grupo RT002.

(8) Tiempo de retorno a, a empeoramiento respecto al inicio, tanto en IGA-FWS y PFWS, para todos los pacientes en el grupo RT002.

(9) Tiempo de retorno a moderada o grave tanto en IGA-FWS como en PFWS, para pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y están en el grupo RT002.

(10) Tiempo de retorno a moderada o grave tanto en IGA-FWS como en PFWS, para todos los pacientes en el grupo RT002.

(11) Tiempo de retorno a moderada o grave en IGA-FWS, para pacientes que lograron la respuesta

compuesta de 2 puntos en la semana 4 y están en el grupo RT002.

(12) Tiempo de retorno a moderada o grave en IGA-FWS, para todos los pacientes en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo

Puntos finales de eficacia exploratoria

5 Los puntos finales exploratorios, derivados de las evaluaciones IGA-FWS y PFWS con el ceño fruncido al máximo, son:

(1) Proporción de pacientes que logran una mejora de al menos un punto en IGA-FWS y PFWS simultáneamente (abreviado en adelante como “respuesta compuesta de 1 punto”) en cada visita desde la semana 1 a la semana 36.

10 (2) Proporción de pacientes que logran una mejora de al menos un punto en IGA-FWS en cada visita desde la semana 1 a la 36.

(3) Proporción de pacientes que logran una mejora de al menos un punto en PFWS en cada visita desde la semana 1 a la 36.

15 (4) En el subconjunto de pacientes que logran una respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4, la proporción de pacientes que logran una respuesta compuesta de 2 puntos en cada visita desde la semana 1 a la 36.

(5) En el subconjunto de pacientes que logran una respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4, la proporción de pacientes que logran una respuesta compuesta de 1 punto en cada visita desde la semana 1 a la semana 36.

20 (6) En el subconjunto de pacientes que logran una respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4, la proporción de pacientes que logran una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) en IGA-FWS y PFWS en cada visita desde la semana 1 a 36.

(7) Proporción de pacientes que logran una mejoría de al menos 2 puntos en IGA-FWS en cada visita desde la semana 1 a la 36.

25 (8) Proporción de pacientes que logran una mejoría de al menos 2 puntos en PFWS en cada visita desde la semana 1 a la 36.

Evaluaciones adicionales

30 **Diario del paciente:** Los pacientes capturaron su evaluación de la apariencia de las líneas del ceño fruncido al máximo, en un diario durante el período inicial de 2 semanas después del tratamiento, utilizando la escala de gravedad de 4 puntos descrita anteriormente para la gravedad de las arrugas del ceño fruncido. El inicio del efecto del tratamiento se determinó con base en el diario del paciente al evaluar la severidad de las líneas glabellares a través del tiempo dentro de las primeras dos semanas después del tratamiento. El inicio del efecto del tratamiento se definió conforme el tiempo cuando la puntuación de la clasificación bajó 1 punto o más de los valores iniciales. Esto se incluyó en la evaluación del punto final

35 secundario.

Satisfacción global del paciente con el cuestionario del tratamiento: Se les preguntó a los pacientes qué tan satisfechos o insatisfechos están con los resultados del tratamiento utilizando una escala de 7 puntos en la semana 4. Este cuestionario de tratamiento se basó en cómo se ve el área tratada de la

cara, de acuerdo con la **tabla 8**. La puntuación de clasificación se utilizó como un punto final secundario.

Tabla 8 - Satisfacción global con la escala de cuestionario de tratamiento

Puntuación de clasificación	Mejora en las arrugas	
5	0	Muy insatisfecho
	1	Insatisfecho
	2	Algo insatisfecho
	3	Ni satisfecho ni insatisfecho
	4	Algo satisfecho
	5	Satisfecho
10	6	Muy satisfecho

Escala de Mejoría Estética Global: El investigador y el paciente evaluaron la apariencia visual (con el ceño fruncido al máximo y en reposo después del ceño fruncido al máximo) de la mejora de la línea glabellar desde la condición inicial utilizando la siguiente Escala de Mejoría Estética Global de 7 puntos, como se muestra en la **tabla 9**.

Tabla 9 - Escala de Mejoría Estética Global

Puntuación de clasificación	Mejora en las arrugas	
	-3	Muchísimo peor
	-2	Mucho peor
	-1	Peor
20	0	Sin cambio
	1	Mejor
	2	Mucho mejor
	3	Muchísimo mejor

Los puntos finales de eficacia exploratoria derivados de esta evaluación son:

(1) Proporción de pacientes que alcanzan una puntuación ≥ 1 en GAIS en cada visita desde la semana 1 a la semana 36 (con la evaluación del investigador con el ceño fruncido al máximo, en reposo después del ceño fruncido al máximo y la autoevaluación del paciente con el ceño fruncido al máximo, en reposo después del ceño fruncido al máximo, resumidos por separado).

(2) Proporción de pacientes que logran una puntuación ≥ 2 (es decir, mucho mejor o muchísimo mejor) en GAIS en cada visita desde la semana 1 a la semana 36 (con la evaluación del investigador con el ceño fruncido al máximo, en reposo después de ceño fruncido al máximo y la autoevaluación del paciente con el ceño fruncido al máximo, en reposo después del ceño fruncido al máximo, resumidos por separado).

(3) Proporción de pacientes que logran una puntuación ≥ 3 (muchísimo mejor) en GAIS en cada visita desde la semana 1 a la semana 36 (con la evaluación del investigador con el ceño fruncido al máximo, en reposo después del ceño fruncido al máximo y la autoevaluación del paciente con el ceño fruncido al máximo, en reposo después del ceño fruncido al máximo, resumidos por separado).

(4) Puntuación GAIS a lo largo del tiempo desde la semana 1 hasta la semana 36 (con la evaluación del investigador con el ceño fruncido al máximo, en reposo después del ceño fruncido al máximo y la

autoevaluación con el ceño fruncido al máximo, en reposo después del ceño fruncido al máximo, resumidos por separado).

Escala de Impacto en las Líneas de Expresión: Se les pidió a los pacientes que calificaran sus sentimientos sobre los resultados del tratamiento en sus líneas de expresión usando la Escala de Impacto en las Líneas de Expresión (FLIS). FLIS está comprendida de 5 preguntas, cada una con una **escala** de 11 puntos que varía de 0 a 10. La puntuación total, que varía de 0 a 50, es la suma de las puntuaciones de las 5 preguntas. Los puntos finales exploratorios fueron la puntuación total y las puntuaciones de las preguntas individuales.

Autoevaluación de la Edad Facial: Los pacientes calificaron su edad percibida en un cuestionario de Autoevaluación de la Edad Facial (FASE) y calificaron su percepción de la edad que piensan que tienen después del tratamiento (mayor que la edad real, menor que la edad real, edad real). Estas respuestas se utilizaron como puntos finales exploratorios.

Fotografías: Para aquellos pacientes que dieron su consentimiento para la fotografía, se tomaron fotografías digitales estandarizadas del área de tratamiento, incluida la vista frontal del paciente con el ceño fruncido al máximo y en reposo después del ceño fruncido al máximo. Las fotografías se puntuaron de acuerdo con la gravedad de las líneas glabellares utilizando IGA-FWS de la Tabla de Gravedad de las Arrugas del Ceño y a través de la Revisión del Panel Independiente (IPR). Además, se determinó una respuesta de 2 puntos, definida como lograr una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) y una mejora de al menos dos puntos desde el inicio en IGA-FWS en la semana 4.

Evaluaciones de seguridad

Eventos adversos: Todos los eventos adversos (EA) se registraron y clasificaron de acuerdo con la terminología de MedDRA. La gravedad de los EA se calificó como leve, moderada o grave. Los EA con un inicio en o después de la fecha y hora del tratamiento del estudio fueron emergentes del tratamiento.

Los puntos finales de seguridad derivados de los EA fueron:

(1) Frecuencia, gravedad y relación con el fármaco del estudio de los eventos adversos emergentes del tratamiento durante las primeras cuatro semanas posteriores al tratamiento y la duración total del estudio

(2) Frecuencia, gravedad y relación con el fármaco del estudio de los eventos adversos emergentes del tratamiento durante las primeras cuatro semanas posteriores al tratamiento y la duración total del estudio.

Consulta de la propagación distante de la toxina (EA específicos y síntomas de la consulta de debilidad neuromuscular): La consulta de propagación distante de la toxina se realizó en la visita de tratamiento antes y después del tratamiento, visitas de seguimiento y visita de evaluación final o visita de interrupción temprana, según corresponda. Los pacientes fueron consultados de manera general sobre la lista de eventos adversos potencialmente sugestivos de propagación distante de toxina.

Datos del laboratorio clínico: Las muestras que se tomaron sin ayuno para hematología, química, coagulación (tiempo de protrombina) y análisis de orina se recolectaron durante la selección, la semana 4 y en la visita de evaluación final. En el seguimiento y en las visitas de la semana 2, 4 y 12, se recogieron

muestras de sangre para detectar anticuerpos.

Tabla 10 - Pruebas clínicas de laboratorio

	Química de suero	Hematología	Análisis de orina	Pruebas adicionales
5	Glucosa	Hemoglobina	Evaluación general y significancia clínica	Tiempo de protrombina (PT)
	Bilirrubina total	Hematocrito		Prueba de embarazo en orina (sólo a WOCBP)
	Fosfatasa alcalina	Conteo de glóbulos rojos		Anticuerpo en suero para toxina daxibotulínica A y RTP004
10	Nitrógeno ureico en sangre	Conteo de plaquetas		
	Alanina aminotransferasa	Conteo de leucocitos (total)		
	Aspartato aminotransferasa	Conteo de leucocitos (diferencial)		
	WOCBP = Mujeres en edad fértil			

Prueba de anticuerpos: La prueba de anticuerpos para RT002 y RTP004 se realizó cualitativamente usando un ensayo de selección y, si es positivo, se evaluó mediante un ensayo de confirmación. El ensayo de confirmación resultó tanto en una evaluación cualitativa (positiva/negativa) como en una concentración cuantitativa si fuera positiva. Las muestras que resulten positivas mediante el ensayo de confirmación analizarán también el anticuerpo neutralizante.

Signos vitales: Los signos vitales (es decir, la temperatura corporal, la frecuencia respiratoria, la frecuencia del pulso radial en posición sentada y las presiones sanguíneas sistólica y diastólica en posición sentada) se obtuvieron en la visita de selección y tratamiento (antes y después del tratamiento), semana 2, evaluación final o visitas de interrupción temprana y en cualquier visita donde se informaron signos o síntomas de toxicidad botulínica.

Examen físico: Se realizó un examen físico, además de los signos vitales, incluido el examen neurológico de la cara, apariencia general, piel, cuello (incluida la tiroides), ojos, oídos, nariz, garganta, corazón, pulmones, abdomen, ganglios linfáticos y extremidades se realizó en las visitas de selección, semana 2 y evaluación final o interrupción temprana. Los hallazgos significativos del examen físico que están presentes antes de la administración del producto en investigación se deben incluir en la página del Historial Médico. Se registraron hallazgos significativos del examen físico que cumplen con la definición de un evento adverso.

ECG de 12 derivaciones: En la selección y en la semana 4, se obtuvo un ECG de 12 derivaciones estándar sencilla en posición supina.

Evaluación del sitio de inyección: Los sitios de inyección se evaluaron en la visita de selección, visita de tratamiento antes y después del tratamiento, visitas de seguimiento y visita de evaluación final o visita de interrupción temprana, según corresponda. La evaluación se realizará como una evaluación global de los 5 sitios de inyección, como se muestra en la **tabla 11**.

Tabla 11 - Evaluación del sitio de inyección

Descriptor de evaluación	¿Presente?	
	Si	No
Eritema		
Edema		
Ardor o Escozor (sensación descrita por el paciente)		
Picazón (sensación descrita por el paciente)		
Hematomas		

Evaluación de los nervios craneales II a VII: El investigador realizó la evaluación de los nervios craneales II a VII (lados izquierdo o derecho por separado) en la selección, visita de tratamiento antes del tratamiento y después del tratamiento, visitas de seguimiento y visita de evaluación final o visita de interrupción temprana, según corresponda. Las puntuaciones para cada nervio craneal se capturaron como se describe en la **tabla 12**.

Tabla 12 - Evaluación de los nervios craneales

Clasificación	Descripción
1	Normal
2	Anormal, no clínicamente significativo
3	Anormal, clínicamente significativo
4	No evaluado

Sistema de Gradación Regional del Nervio Facial de House-Brackmann: El investigador evaluó la funcionalidad del nervio facial (VII) en la visita de selección, visita de tratamiento antes y después del tratamiento, visitas de seguimiento y visita de evaluación final o visita de interrupción temprana, según corresponda. Consulte la **tabla 13**:

Tabla 13 - Sistema de Gradación Regional del Nervio Facial de House-Brackmann

Frente	1	Movimiento normal de frente.
	2	Ligera debilidad en el movimiento de frente.
	3	Asimetría obvia pero no desfigurante con el movimiento, simétrica en reposo.
	4	Debilidad obvia de asimetría desfigurante con el movimiento, simétrica en
	5	Movimiento apenas perceptible en la frente, asimétrico en reposo.
	6	Sin movimiento.
Ojo	1	Cierre normal de los ojos.
	2	Debilidad leve en el cierre de los ojos.
	3	Debilidad obvia pero capaz de cerrar los ojos.
	4	Incapaz de cerrar los ojos con el máximo esfuerzo.
	5	Movimiento de los párpados apenas perceptible.
	6	Sin movimiento.
Parte media de la cara	1	Movimiento normal de la parte media de la cara.
	2	Ligera debilidad en el movimiento de la parte media de la cara.
	3	Debilidad obvia pero no desfigurante, simétrica en reposo.
	4	Debilidad obvia y asimetría desfigurante con el movimiento, simétrica en reposo.

5		5	Movimiento apenas perceptible en la parte media de la cara, asimétrica en reposo.
		6	Sin movimiento.
	Boca	1	Movimiento normal de la comisura de los labios.
		2	Debilidad ligera del movimiento de la esquina de la boca.
		3	Debilidad obvia pero no desfigurante, simétrica en reposo.
		4	Debilidad obvia y asimetría desfigurante con el movimiento, simétrica en reposo.
		5	Movimiento apenas perceptible de la esquina de la boca, asimétrico en reposo.
		6	Sin movimiento.
10	Sincinesia	1	Ninguna.
		2	Leve - obvia pero no desfigurante.
		3	Severa - desfigurante o interfiere con la función.

Evaluación de la fuerza de los músculos faciales: La fuerza de los músculos faciales se evaluó mediante la Escala del Consejo de Investigación Médica (MRC) para la Evaluación de la potencia muscular. Se evaluaron los siguientes músculos a cada lado de la cara; orbicular del ojo (párpado), elevadores de cejas laterales, zigomático. Véase, **tabla 14**. El investigador evaluó la fuerza del músculo facial en la visita de tratamiento antes y después del tratamiento, visitas de seguimiento y visita de evaluación final o visita de interrupción temprana, según corresponda.

Tabla 14 - Escala MRC para Evaluación de la potencia muscular

20	Escala de clasificación	Descripción
	0	sin movimiento
25	1	el parpadeo es perceptible en el músculo
	2	movimiento solo si se elimina la gravedad
	3	puede mover la extremidad contra la gravedad
	4	puede moverse contra la gravedad y cierta resistencia ejercida por el examinador
	5	potencia normal

Análisis estadístico: Toda la programación estadística se realizó utilizando el sistema de análisis estadístico (SAS) versión 9.3 o superior.

La mayoría de los puntos finales de eficacia se analizaron con el centro de prueba como factor de estratificación. El ensayo estaba destinado a realizarse de tal manera que se inscribiera un mínimo de 5 pacientes ITT en cada grupo de tratamiento en cada centro/sitio del ensayo. En el caso de que hubiera muy pocos pacientes en un brazo de tratamiento en un solo sitio, este sitio se combinó con otro para lograr el tamaño mínimo de muestra deseado por brazo. Los centros pequeños (< 5 pacientes ITT en un grupo de tratamiento) se agruparon de mayor a menor hasta que el centro agrupado tiene ≥ 5 pacientes ITT en cada grupo de tratamiento (William *et al*, 2006, "Effects of a New Hormone Therapy, Drospirenone and 17- β - Estradiol, in Postmenopausal Women With Hypertension", *Hypertension*, 48:246-253). Si algún centro necesita ser agrupado, entonces cualquier análisis realizado por el centro de prueba fue realizado por el centro agrupado.

Poblaciones de análisis

Población con intención de tratar: Todos los pacientes que se aleatorizaron y recibieron tratamiento están incluidos en la población con intención de tratar (ITT). Los resúmenes fueron por tratamiento aleatorio.

5 **Población por protocolo:** La población por protocolo (PP) incluyó pacientes de la población ITT que completaron las primeras 4 semanas del estudio sin una violación importante del protocolo. Se tomaron decisiones sobre las exclusiones de la población PP antes de develar el estudio, con la excepción de los
10 pacientes que recibieron la dosis/tratamiento incorrecto. Los pacientes fueron excluidos de la población de PP por cualquiera de las siguientes razones: el paciente viola los criterios de inclusión/exclusión; el paciente
10 recibe una dosis incorrecta; el paciente recibe tratamiento incorrecto; el paciente usa un medicamento prohibido antes de la semana 4; el paciente pierde la visita de la semana 4; la visita de la semana 4 del
10 paciente es mayor a ± 3 días fuera de la ventana; al paciente le falta la evaluación IGA-FWS o PFWS en la semana 4.

15 **Población de seguridad:** Todos los pacientes que fueron aleatorizados, recibieron tratamiento y proporcionaron al menos una evaluación de seguridad posterior al tratamiento, se incluyeron en la población de Seguridad. Los resúmenes fueron por tratamiento realmente recibido.

20 Se produjo un resumen de la duración de la participación del paciente en el estudio, incluyendo la duración n, media, DE, mediana, mínima y máxima en semanas, así como el número y porcentaje de
20 pacientes en las siguientes categorías de duración: < 4 semanas, 4 a < 12 semanas, 12 a < 24 semanas, y 24 a 36 semanas.

25 **Características demográficas e iniciales:** Se utilizaron estadísticas descriptivas para resumir las características demográficas e iniciales por grupo de tratamiento y en general. Las variables continuas se
25 resumieron utilizando el número de observaciones no faltantes, media, desviación estándar, mediana, mínimo y máximo. Los datos categóricos se resumieron utilizando el número y el porcentaje de pacientes
25 en cada categoría.

30 Los datos demográficos incluyen edad, sexo, raza y etnia. La edad en años se clasificó como 18 a 45, > 45 a 55 y > 55 a 75 para resumir por grupo de tratamiento y en general. Las características iniciales
30 incluyen toxina botulínica tipo A previa, el tiempo transcurrido desde la última inyección de toxina botulínica tipo A previa y el tipo de piel Fitzpatrick, así como la evaluación inicial de los cuestionarios de eficacia,
30 PFWS, IGA-FWS, FLIS y FASE. Los resúmenes se produjeron para las poblaciones ITT y PP mediante tratamiento aleatorizado; y, para la población de Seguridad por el tratamiento real recibido.

Análisis de eficacia: Se proporcionaron estadísticas descriptivas para todas las variables de eficacia en todos los puntos por grupo de tratamiento.

35 A menos que se especifique lo contrario, el método principal para manejar los datos de eficacia faltantes se basó en la imputación del peor resultado a nivel de paciente para el grupo RT002 (grupo RT002)
35 y la imputación del mejor resultado a nivel de paciente para el grupo placebo (imputación del peor/mejor resultado). De acuerdo con el diseño del estudio, se todos los pacientes debían ser monitoreados durante
35 un mínimo de 24 semanas. Por esta razón, la imputación se realizó solo durante la visita de la semana 24.

Para los puntos finales que son compuestos y/o derivados de evaluaciones del estudio, primero se realizó la imputación de los datos faltantes en las evaluaciones originales.

Asimismo, se utilizó un enfoque de imputación múltiple basado en modelos como un análisis de sensibilidad adicional. Los pacientes que violaron los criterios de inclusión/exclusión debido al uso de medicamentos prohibidos después de la semana 4 podrían haberse incluido en el análisis de sensibilidad anterior si sumaran hasta el 10 % o más de los pacientes del estudio.

El ajuste de multiplicidad entre los puntos finales secundarios se evaluó utilizando un Plan de control de errores tipo I. Se proporcionaron valores p no ajustados para guiar las reglas de prueba de hipótesis en el Plan de control de errores tipo I.

Análisis de eficacia primaria: La proporción de pacientes que tuvieron una respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 se comparó entre RT002 y placebo usando la prueba de Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) estratificada por el centro de prueba usando una prueba bilateral con una tasa de error tipo I de 0.05 utilizando la población ITT con la imputación del peor/mejor resultado. Como análisis de sensibilidad, el análisis primario se repitió utilizando la imputación múltiple en lugar de la imputación del peor/mejor resultado en la población ITT. Como un análisis de sensibilidad adicional, la prueba de CMH se realizó utilizando los casos observados solo en la población PP. La prueba de Breslow-Day se calculó para evaluar la homogeneidad de las razones de posibilidades.

Se proporcionaron valores P basados en pruebas CMH bilaterales. Las estimaciones puntuales de la diferencia se calcularon con la estimación de Mantel-Haenszel de la diferencia de riesgo común. Para verificar la consistencia, también se calculó la estimación de resumen de la diferencia de riesgo común y se comparó con la estimación de Mantel-Haenszel, pero no se informó en las tablas. Los IC del 95 %, bilaterales se calcularon con los límites de confianza estratificados de Newcombe para la diferencia de riesgo común, utilizando el método de Yan y Su (2010). Los límites de confianza estratificados de Newcombe se construyeron a partir de los límites de confianza estratificados de Wilson para las proporciones de fila comunes (generales). Primero, se calcularon los límites de confianza individuales de Wilson para las proporciones de las filas en cada tabla 2X2 (estrato). Estos límites de confianza de Wilson del estrato se combinaron para formar límites de confianza de Wilson estratificados para las proporciones generales de las filas mediante el uso de pesas Mantel-Haenszel.

Análisis de eficacia secundaria: Hay múltiples puntos finales secundarios. Estos se agruparon con base en el método de análisis estadístico que se les aplicó. Hubo 4 grupos diferentes de puntos finales secundarios, grupos A, B, C y D, con diferentes pruebas estadísticas para cada grupo. La imputación de los puntos finales secundarios se realizó utilizando la población ITT con la imputación del peor/mejor resultado para los grupos A y B. La imputación múltiple también se realizó en los puntos finales en los grupos A y B en la población ITT. Para los grupos A, B y C, los análisis realizados fueron para todos los pacientes, así como para los pacientes de acuerdo con la gravedad inicial (moderada o grave, de acuerdo con la evaluación IFA-FWS), para evaluar la magnitud del efecto del tratamiento de la gravedad de las arrugas del paciente al inicio en estas medidas de resultado.

Grupo A: Se evaluó la reducción de la gravedad a lo largo del tiempo para los siguientes puntos

5 finales secundarios de eficacia en forma de proporción de pacientes que tenían una respuesta utilizando diversas definiciones de respuesta. Para cada punto final en las visitas seleccionadas, la proporción de pacientes con una respuesta se comparó entre los grupos de tratamiento utilizando la prueba CMH estratificada por el centro de prueba. Los valores p, las estimaciones puntuales y los IC del 95 % se calcularon utilizando los mismos métodos que con el punto final primario.

(1) La proporción de pacientes que lograron una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) en IGA-FWS con el ceño fruncido al máximo por visita seleccionada (semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24) usando (a) la imputación del peor/mejor resultado en la población ITT; (b) la imputación múltiple en la población ITT; (c) los casos observados en la población PP.

10 (2) La proporción de pacientes que lograron una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) en IGA-FWS y PFWS con el ceño fruncido al máximo por visita seleccionada (semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24) utilizando (a) la imputación del peor/mejor resultado en la población de ITT; (b) la imputación múltiple en la población ITT; (c) los casos observados en la población PP.

15 Grupo B: Para los puntos finales secundarios en este grupo, la proporción de respondedores y la diferencia en las proporciones, con un IC de Wald del 90 % se resumieron por grupo de tratamiento y visita. Los dos puntos finales del grupo A se incluyeron en el grupo B para incluir todas las semanas y proporcionar el IC de Wald del 90 % para estos puntos finales.

20 (1) La proporción de pacientes que logran una respuesta compuesta de 2 puntos en cada visita (semanas 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36) utilizando (a) la imputación del peor/mejor resultado en la población IRR; (b) la imputación múltiple en la población ITT; (c) los casos observados en la población PP; (d) la imputación del peor/mejor resultado en la población ITT de acuerdo con la gravedad inicial según IGA-FWS.

25 (2) La proporción de pacientes que logran una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) en IGA-FWS y PFWS en cada visita (semanas 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36) utilizando (a) la imputación del peor/mejor resultado en la población ITT; (b) la imputación múltiple en la población ITT; (c) los casos observados en la población PP; (d) la imputación del peor/mejor resultado en la población ITT de acuerdo con la gravedad inicial según IGA-FWS.

30 (3) La proporción de pacientes que logran una puntuación de 0 a 1 (nula o leve) en IGA-FWS en cada visita (semanas 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36) utilizando (a) la imputación del peor/mejor resultado en la población ITT; (b) la imputación múltiple en la población ITT; (c) los casos observados en la población PP; (d) la imputación del peor/mejor resultado en la población ITT de acuerdo con la gravedad inicial según IGA-FWS.

35 (4) La proporción de pacientes que logran una puntuación de 0 a 1 (nula o leve) en PFWS en cada visita (semanas 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36) utilizando (a) la imputación del peor/mejor resultado en la población ITT; (b) la imputación múltiple en la población ITT; (c) los casos observados en la población PP; (d) la imputación del peor/mejor resultado en la población ITT de acuerdo con la gravedad inicial según IGA-FWS.

Grupo C: Se trazaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el grupo RT002 para los

siguientes puntos finales de tiempo hasta el evento. Se generaron estimaciones puntuales de la duración media y los IC del 95 % bilaterales, utilizando la transformación log-log. También se proporcionaron estimaciones de las tasas de supervivencia y el IC del 95 % bilateral, utilizando la transformación log-log, de la tasa en las semanas 8, 12, 16, 20 y 24. Las tasas para las semanas 2 y 4 se incluyeron en los análisis de todos los pacientes en el grupo RT002. Todos los análisis se realizaron para la población ITT utilizando casos observados.

(2) Tiempo hasta la pérdida de 2 puntos o una respuesta mayor ya sea en IGA-FWS o PFWS,

(a) para pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y estaban en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo; (b) para los pacientes que cumplieron con la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y estaban en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo de acuerdo con la gravedad inicial según IGA-FWS.

(2) Tiempo hasta la pérdida de 2 puntos o una respuesta mayor ya sea en IGA-FWS o PFWS, (a) para pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y estaban en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo; (b) para los pacientes que cumplieron con la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y estaban en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo de acuerdo con la inicial según IGA-FWS.

(3) Tiempo de retorno a, empeoramiento respecto al inicio tanto en IGA-FWS como en PFWS, (a) para pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y estaban en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo; (b) para pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y estaban en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo de acuerdo con la gravedad inicial según IGA-FWS; (c) para todos los pacientes en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo; (d) para todos los pacientes en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo de acuerdo con la gravedad inicial según IGA-FWS.

(4) Tiempo de retorno a moderada o grave tanto en IGA-FWS y PFWS, (a) para pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y estuvieron en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo; (b) para pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y estuvieron en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo de acuerdo con la gravedad inicial según IGA-FWS; (c) para todos los pacientes en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo; (d) para todos los pacientes en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo de acuerdo con la gravedad inicial según IGA-FWS.

(5) Tiempo de retorno a moderada o grave en IGA-FWS, (a) para pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y estuvieron en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo; (b) para pacientes que lograron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y estuvieron en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo de acuerdo con la gravedad inicial según IGA-FWS; (c) para todos los pacientes en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo; (d) para todos los pacientes en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo de acuerdo con la gravedad inicial según IGA-FWS.

Grupo D: Los puntos finales en el grupo D se resumieron descriptivamente de la siguiente manera:

(1) La satisfacción global del paciente con el cuestionario de tratamiento se resumió utilizando el

número y el porcentaje de pacientes con cada respuesta. Se presentará el IC del 90 % bilateral, utilizando intervalos de confianza de Wald asintóticos.

(2) El inicio del efecto del tratamiento, a partir del diario del paciente, se resumió utilizando el número y el porcentaje de pacientes con un inicio del efecto y sin un inicio del efecto. Además, se presentaron estadísticas descriptivas (mediana, mínima, máxima, cuartiles 25 y 75) del tiempo de inicio para los pacientes con un inicio del efecto del tratamiento. El inicio del efecto del tratamiento se restringió a los primeros 14 días del estudio.

Análisis de la eficacia exploratoria: Todos los puntos finales de eficacia exploratoria se resumen descriptivamente por grupo de tratamiento y por visita. Las comparaciones de grupos de tratamiento se realizan para algunos puntos finales exploratorios utilizando métodos similares a los especificados para los puntos finales de eficacia primaria y secundaria. Los análisis de los puntos finales exploratorios se realizan en la población ITT solo para los datos observados.

Para cada punto final exploratorio derivado de las evaluaciones IGA-FWS y PFWS en cada visita, la proporción de pacientes con una respuesta se compara entre los grupos de tratamiento utilizando la prueba CMH estratificada por el centro de prueba. Los valores p, las estimaciones puntuales y los IC del 95 % se calculan utilizando los mismos métodos que con el punto final primario.

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier del tiempo transcurrido hasta la pérdida de al menos una mejora de 1 punto desde el inicio se trazan como se indica anteriormente (ver grupo C). Se generan estimaciones puntuales de la duración media y los IC del 95 %, bilateral, utilizando la transformación log-log. Este análisis se realizará para lo siguiente:

(1) Tiempo hasta la pérdida de al menos 1 punto de mejora desde el inicio en IGA-FWS, (a) para todos los pacientes en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo; (b) para pacientes que lograron al menos 1 punto de mejora desde el inicio en IGA-FWS y están en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo.

(1) Tiempo hasta la pérdida de al menos 1 punto de mejora desde el inicio en PFWS, (a) para todos los pacientes en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo; (b) para pacientes que lograron al menos 1 punto de mejora desde el inicio en PFWS y están en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo.

(3) Tiempo hasta la pérdida de al menos 1 punto de mejora desde el inicio en IGA-FWS y PFWS, (a) para todos los pacientes en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo; (b) para pacientes que lograron al menos 1 punto de mejora desde el inicio tanto en IGA-FWS como en PFWS y están en el grupo RT002 con el ceño fruncido al máximo.

Para los puntos finales derivados de la evaluación GAIS, el número y el porcentaje de pacientes que alcanzan puntuaciones ≥ 1 , ≥ 2 y ≥ 3 se resumen por grupo de tratamiento y visita. Para la puntuación GAIS, el número y el porcentaje de pacientes en cada nivel de escala se resumen por grupo de tratamiento y visita. Las evaluaciones del investigador y del sujeto se resumen por separado para la evaluación realizada con el ceño fruncido al máximo y la evaluación realizada en reposo después del ceño fruncido al máximo.

La puntuación total de FLIS y las puntuaciones de las preguntas individuales se resumen

descriptivamente por grupo de tratamiento y visita con n, media (DE), SEM, mediana, mínimo y máximo.

Para el cuestionario FASE, las preguntas “¿De qué edad crees que te ves ahora?”, Número de años más viejo y Número de años más joven, se resumen con n, media (DE), SEM, mediana, mínimo y máximo. Para la pregunta “¿Te sientes como si parecieras mayor o menor que tu edad real en este momento?”, el número y el porcentaje de pacientes en cada categoría se resumen por grupo de tratamiento y visita.

Las evaluaciones IGA-FWS de las fotografías evaluadas por la Revisión del Panel Independiente (IPR, por sus siglas en inglés) se resumen por el número y el porcentaje de pacientes en cada nivel de gravedad por grupo de tratamiento y visita, con el ceño fruncido al máximo. Además, se proporciona el número y el porcentaje de pacientes con una respuesta de 2 puntos en el IGA-FWS en la semana 4 para cada grupo de tratamiento y se presenta la diferencia entre los grupos de tratamiento, junto con el IC del 90 % de Wald, bilateral para la diferencia.

Examen de subgrupos: Los análisis de subgrupos para el punto final primario y los puntos finales secundarios clave asociados con las evaluaciones IGA-FWS y/o PFWS se realizan con subgrupos clasificados por tratamiento previo con toxina botulínica tipo A (sí/no), género y grupo de edad (se utilizarán dos subgrupos de grupos de edad: 18 a 45 años, > 45 a 55 años, > 55 a 75 años y 18 a 65 años, > =65 años). Específicamente, se examinaron los siguientes puntos finales por subgrupo:

(1) Proporción de pacientes que logran una respuesta compuesta de 2 puntos; (2) proporción de pacientes que alcanzan una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) en IGA-FWS y PFWS; (3) proporción de pacientes que alcanzan una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) en IGA-FWS; (4) proporción de pacientes que alcanzan una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) en PFWS; (5) respuesta sobre la satisfacción global del paciente con el cuestionario de tratamiento; (6) el inicio del efecto del tratamiento, derivado del diario del paciente.

Debido a que los análisis de subgrupos tienen un poder estadístico inherentemente más bajo que los análisis de la cohorte completa, solo se presentan estadísticas descriptivas para los grupos de tratamiento individuales. Los análisis de subgrupos en el punto final primario y los puntos finales secundarios en los grupos A y B se realizan en la población ITT con imputación del peor/mejor resultado. Asimismo, se resumen los análisis de subgrupos en los puntos finales secundarios del Grupo C y D utilizando datos observados en la población ITT.

Análisis de seguridad

Se realizaron resúmenes y análisis de seguridad en la población de seguridad. Se presentaron estadísticas descriptivas para resumir los datos de seguridad.

Grado de exposición: Todos los pacientes recibieron una administración de producto en investigación. La suma del volumen de producto en investigación inyectado y el volumen de producto en investigación inyectado en cada uno de los cinco sitios de inyección se resumieron por grupo de tratamiento utilizando estadísticas descriptivas (número de observaciones no faltantes, media, mediana, mínimo, máximo y desviación estándar).

Evaluaciones del sitio de inyección: Las evaluaciones del sitio de inyección se resumieron

utilizando el número y el porcentaje de pacientes que informaron la presencia de cada elemento (eritema, edema, ardor o escozor, picazón y hematomas) por grupo de tratamiento y visita, así como el número y el porcentaje de pacientes con una reacción en cualquier visita posterior al tratamiento. Además, el número y el porcentaje de pacientes que informaron cualquier elemento del sitio de inyección se resumió por grupo de tratamiento y por visita, así como en cualquier visita posterior al tratamiento. Además, el número y los porcentajes de pacientes con el elemento especificado se resumieron de acuerdo con la primera visita en la que estuvo presente la reacción.

Eventos adversos: Todos los EA emergentes del tratamiento (EAET) se enumeraron y resumieron por grupo de tratamiento, clasificación de órganos del sistema, término preferido, gravedad, relación y gravedad. Los eventos adversos graves (EAG) se resumieron por grupo de tratamiento, gravedad y relación con el tratamiento del estudio y se enumeraron por paciente por separado.

Evaluaciones de los nervios: Los exámenes de los nervios craneales II-VII, para las funciones Reacción pupilar a la luz y acomodación, Movimientos extraoculares, Motricidad y Sensación macroscópica, para los lados derecho e izquierdo cada uno, se tabularon por grupo de tratamiento y visita.

El Sistema de Calificación Regional del Nervio Facial por House-Brackmann (Yen, 2003) se tabuló para los lados derecho e izquierdo de las cuatro ramas principales del nervio facial (VII) que inervan la musculatura objetivo y adyacente (frente, ojo, cara media y boca) y gravedad de la sincinesis. Estas tabulaciones fueron por grupo de tratamiento y visita.

La fuerza de los músculos faciales de los lados derecho e izquierdo del músculo orbicular de los ojos, elevadores de cejas laterales y el músculo orbicular zigomático lateral, se tabuló por grupo de tratamiento y visita.

Cambios en la conducta del estudio o análisis planificados: Los cambios en los análisis planificados incluyen el método de manejo de los datos faltantes para el grupo placebo, la selección y priorización de los puntos finales secundarios, y el procedimiento de prueba para controlar el error general tipo I del estudio. Específicamente, se realizaron los siguientes cambios en los puntos finales:

(1) Los análisis de respondedores IGA-FWS y PFWS que se dividieron entre secundaria y exploratoria de acuerdo con la semana de evaluación ahora son todos secundarios.

(2) El inicio del efecto del tratamiento basado en el diario del paciente y la satisfacción global del paciente con el tratamiento se han trasladado de exploratorio a secundario.

(3) Los puntos finales GAIS son todos exploratorios, en lugar de que algunos se consideren secundarios.

(4) Se han incluido puntos finales exploratorios adicionales basados en IGA-FWS y/o PFWS: (b) proporción de pacientes que logran una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) tanto en IGA-FWS como en PFWS simultáneamente; (b) proporción de pacientes que logran una mejora de al menos un punto en IGA-FWS y en PFWS, por separado; (c) proporción de pacientes que logran una mejora de al menos dos puntos en IGA-FWS y en PFWS, por separado; (d) proporción de pacientes que logran una respuesta compuesta de 1 o 2 puntos en el subconjunto de pacientes que logran una respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4; (e) proporción de pacientes que alcanzan puntuaciones de 0 o 1 (ninguno o leve) tanto en IGA-

FWS como en PFWS, en el subconjunto de pacientes que logran una respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4.

(5) Se han incluido dos puntos finales de tiempo adicionales para eventos, basados en IGA-FWS y/o PFWS: (a) Tiempo hasta la pérdida de 2 puntos o mayor respuesta en IGA-FWS y PFWS (b) Tiempo hasta la pérdida de 2 puntos o mayor respuesta en IGA-FWS o PFWS (c) Tiempo de retorno a moderada o grave en IGA -FWS.

(6) El punto final exploratorio de “Mejora de las líneas glabellares por evaluación GAIS en reposo después del ceño fruncido al máximo a lo largo del tiempo” se elimina ya que este punto final se evalúa por la proporción de pacientes con una puntuación ≥ 1 , ≥ 2 y ≥ 3 a lo largo del tiempo, además de la puntuación media con el tiempo.

Asimismo, se hicieron evaluaciones sobre el tiempo de retorno. El tiempo de retorno empeoramiento respecto al inicio tanto en IGA-FWS como en PFWS se evalúa mediante una serie de medidas, que incluyen (1) el número de días desde la fecha de inicio del tratamiento hasta la primera visita en la que regresan tanto de acuerdo con IGA-FWS como PFWS a, empeoramiento respecto al inicio después de las últimas semanas 1, 2 y 4, en las cuales se observa una mejora con respecto al inicio en ambas. Si no hay tal visita, la censura ocurre en la última visita con IGA-FWS y PFWS disponibles. Si no se observa mejoría con respecto al valor inicial tanto en IGA-FWS como en PFWS en las semanas 1, 2 y 4, entonces el tiempo se establece en 0; y (2) el número de días desde la primera mejoría desde el inicio en IGA-FWS y PFWS hasta el retorno subsecuente más temprano a, empeoramiento respecto al inicio en ambos en IGA-FWS y PFWS. Si no se observa un retorno subsecuente o un empeoramiento respecto al inicio, se produce la censura en la última visita con IGA-FWS y PFWS disponibles. Para pacientes que no mejoran en comparación con el inicio tanto en IGA-FWS como en PFWS en cualquier visita en la semana 4 o después, el tiempo se establece en 0.

Resultados del estudio: Resultados de primera línea de los dos brazos del estudio de fase 3 para líneas glabellares en la semana 36

Disposición de los sujetos: La **tabla 15** describe la disposición de las poblaciones ITT, de Seguridad y Por protocolo en ambos brazos del estudio.

Tabla 15

	Brazo 1		Brazo 2	
	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=201)	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=204)
Completó la semana 4	97 (95.1 %)	196 (97.5 %)	99 (97.1 %)	203 (99.5 %)
Completó la semana 24	91 (89.2 %)	188 (93.5 %)	93 (91.2 %)	199 (97.5 %)
Completó el estudio	93 (91.2 %)	182 (90.5 %)	93 (91.2 %)	191 (93.6 %)
Interrupción temprana	9 (8.8 %)	19 (9.5 %)	9 (8.8 %)	13 (6.4 %)
Retiró el consentimiento	4 (3.9 %)	8 (4.0 %)	5 (4.9 %)	9 (4.4 %)
Pérdida de seguimiento	4 (3.9 %)	6 (3.0 %)	3 (3.9 %)	1 (0.5 %)
Desviación del protocolo	1 (1.0 %)	0	0	1 (0.5 %)
Discreción del investigador	0	1 (0.5 %)	1 (1.0 %)	1 (0.5 %)
Otro	0	4 (2.0 %)	0	1 (0.5 %)

Como lo muestra la **tabla 15**, una alta proporción (89.2 a 97.5 %) de los sujetos completaron la visita de la semana 24, y una proporción igualmente alta (90.5 a 93.6 %) de los sujetos completaron los estudios. Casi todos (95.1 a 99.5 %) de los 609 sujetos en ambos brazos del estudio completaron la visita de la semana 4 (punto final primario). La baja frecuencia de interrupción temprana (6.4 a 9.5 %) refuerza que los dos estudios fueron bien ejecutados. Se debe destacar que la proporción de sujetos excluidos de la población por protocolo es relativamente baja y oscila entre 8.8 a 22.5 %.

Análisis de las poblaciones: La **tabla 16** muestra el análisis de las diferentes poblaciones.

Tabla 16

	Brazo 1		Brazo 2	
	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=201)	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=204)
Intención de tratar (ITT)	102 (100 %)	201 (100 %)	102 (100 %)	204 (100 %)
Seguridad	102 (100 %)	201 (100 %)	101 (99.0 %) *	205 (100.5 %)
Por protocolo (PP)	79 (77.5 %)	176 (87.6 %)	90 (88.2 %)	186 (91.2 %)
Excluidos de PP	23 (22.5 %)	25 (12.4 %)	12 (11.8 %)	18 (8.8 %)
Visita de la semana 4 fuera de horario	12 (11.8 %)	15 (7.5 %)	6 (5.9 %)	9 (4.4 %)
Faltó a la visita de la semana 4	5 (4.9 %)	5 (2.5 %)	3 (2.9 %)	1 (0.5 %)
Sin IGA-FWS o PFWS en la semana 4	5 (4.9 %)	5 (2.5 %)	3 (2.9 %)	1 (0.5 %)
Utilizó medicación prohibida antes de la semana 4	1 (1.0 %)	1 (0.5 %)	0	1 (0.5 %)
Violación de criterios I/E	6 (5.9 %)	6 (3.0 %)	2 (2.0 %)	7 (3.4 %)
Recibió tratamiento incorrecto	0	0	1 (1.0 %)	0
Kit de tratamiento fuera de secuencia	0	1 (0.5 %)	0	0

Demografía: La **tabla 17** muestra la demografía de las poblaciones de estudio. Tanto las cohortes de placebo como las de activo estaban bien equilibradas con respecto a la proporción de mujeres (86.3 a 89.7 %) y una edad media de 50 (49.0 a 50.9).

Tabla 17

	Brazo 1		Brazo 2	
	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=201)	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=204)
Mujeres, n (%)	88 (86.3 %)	174 (86.6 %)	87 (85.3 %)	183 (89.7 %)
Edad (años), media (DE), Intervalo	49.0 (11.13) 22, 74	50.9 (11.22) 23, 74	50.5 (9.98 %) 27, 75	49.6 (9.84) 21, 73
18 a 45 años	32 (31.4 %)	58 (28.9 %)	30 (29.4 %)	62 (30.4 %)
46 a 55 años	41 (40.2 %)	68 (33.8 %)	42 (41.2 %)	91 (44.6 %)
56 a 75 años	29 (28.4 %)	75 (37.3 %)	30 (29.4 %)	51 (25.0 %)
Hispanica/Latina, n (%)	25 (24.5 %)	47 (23.4 %)	10 (9.8 %)	19 (9.3 %)
Raza				
Blanca	81 (79.4 %)	173 (86.1 %)	92 (90.2 %)	180 (88.2 %)
Negra/Afroamericana	8 (7.8 %)	10 (5.0 %)	3 (2.9 %)	9 (4.4 %)
Asiática	2 (2.0 %)	7 (3.5 %)	5 (4.9 %)	11 (5.4 %)

	Brazo 1		Brazo 2	
	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=201)	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=204)
Otra	11 (10.8 %)	11 (5.5 %)	2 (2.0 %)	4 (2.0 %)

Características iniciales: La **tabla 18** muestra el porcentaje de uso previo de toxina botulínica y otras características. En el brazo 1, la proporción de uso previo de toxina botulínica fue menor (44.1 a 45.8 %) en relación con el brazo 2 (58.8 a 59.3 %). Los valores iniciales durante meses desde el último uso de toxina botulínica (22.6 a 32.2), IGA-FWS con el ceño fruncido al máximo y PFWS con el ceño fruncido al máximo estaban relativamente bien equilibrados en los brazos 1 y 2.

Tabla 18

	Brazo 1		Brazo 2	
	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=201)	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=204)
Toxina botulínica A previa, n (%)	45 (44.1 %)	92 (45.8 %)	60 (58.8 %)	121 (59.3 %)
Meses desde el último BoNT-A* media (DE) rango	22.6 (19.61) 1, 94	32.2 (37.05) 7, 205	23.0 (24.36) 7, 121	22.7 (23.67) 7, 193
IGA-FWS con el ceño fruncido al máximo				
Moderada	66 (64.7 %)	123 (61.2 %)	67 (65.7 %)	129 (63.2 %)
Grave	36 (35.3 %)	78 (38.8 %)	35 (34.3 %)	75 (36.8 %)
PFWS con el ceño fruncido al máximo				
Moderada	64 (62.7 %)	120 (59.7 %)	49 (48.0 %)	106 (52.0 %)
Grave	38 (37.3 %)	81 (40.3 %)	53 (52.0 %)	98 (48.0 %)

Eficacia: Los estudios pivotaes de fase 3 de los brazos 1 y 2 con RT002 inyectable (RT002; Daxi) a 40 U para el tratamiento de líneas glabellares excedieron o cumplieron con los resultados observados en el **ejemplo 5**, un estudio de fase 2 con duración de 24 semanas, observado en medidas de tasa y duración de respuesta clave.

Se cumplió el punto final primario con una respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 del 74 % con RT002 versus 0 % y 1 % para placebo ($p < 0.0001$) en los brazos 1 y 2, respectivamente, con los resultados que exceden los observados en el **ejemplo 5**. Los resultados se muestran en la **figura 5A**. Los resultados que usan medidas adicionales se muestran en las **figuras 5B a 5C**.

La **figura 5B** presenta los gráficos de Kaplan-Meier del Tiempo de retorno, empeoramiento respecto al, Inicio, tanto en la escala IGA-FWS como en la PFWS en pacientes en el grupo RT002 del brazo 1 y brazo 2 (casos observados) (ITT). El Tiempo de Retorno, empeoramiento respecto al, Inicio, tanto en la escala IGA-FWS como en la PFWS es el número de días desde la fecha de inicio del tratamiento hasta la primera visita en la que tanto IGA-FWS como PFWS regresan al inicio o empeoran después de la última de las semanas 1, 2 y 4, en las que se observa una mejora con respecto al valor inicial en ambas. Si no

hay tal visita, la censura ocurre en la última visita con IGA-FWS y PFWS disponibles. Si no hay mejoría con respecto al valor inicial tanto en IGA-FWS como en PFWS en las semanas 1, 2 y 4, entonces el tiempo se establece en 0.

La figura 5C presenta Gráficos de Kaplan-Meier de Tiempo de Mantenimiento de Gravedad de Arrugas Nula o Leve en Escalas IGA-FWS o PFWS en pacientes en el grupo RT002 de cada uno de los dos brazos de estudio (Casos observados) (ITT). El tiempo de retorno a moderada o grave tanto en IGA-FWS como en PFWS es el número de días desde la fecha de inicio del tratamiento hasta la primera visita en la que IGA-FWS o PFWS regresan a moderada o grave después de las últimas semanas 1, 2 y 4 en donde IGA-FWS o PFWS es nula o leve. Si no hay tal visita, la censura ocurre en la última visita con IGA-FWS o PFWS disponibles. Si tanto IGA-FWS como PFWS son nulas o leves en las semanas 1, 2 y 4, entonces el tiempo se establece en 0.

Las tablas 19A a 19B y las tablas 20A a 20B proporcionan datos adicionales con respecto a los análisis de Tiempo de retorno.

Las tablas 19A a 19B presentan estadísticas para el Retorno, empeoramiento respecto al Inicio tanto en IGA-FWS como en PFWS, para todos los pacientes en el grupo RT002 de cada uno de los dos brazos del estudio con el ceño fruncido al máximo (Casos observados) (Población con intención de tratar). N es el número de pacientes en el grupo RT002. Los porcentajes se basan en N. El Tiempo de retorno, empeoramiento respecto al Inicio tanto en IGA-FWS como en PFWS es el número de días desde la fecha de inicio del tratamiento hasta la primera visita en la que regresan tanto IGA-FWS como PFWS, empeoramiento respecto al inicio después de las últimas semanas 1, 2 y 4 en las que se observa una mejora con respecto al inicio en ambos. Si no hay tal visita, la censura ocurre en la última visita con IGA-FWS y PFWS disponibles. Si no hay mejoría con respecto al valor inicial tanto en IGA-FWS como en PFWS en las semanas 1, 2 y 4, entonces el tiempo se establece en 0. Las estadísticas resumidas son estimaciones de Kaplan-Meier. + indica una observación censurada.

Tabla 19A

Estadísticas		RT002 40 U N=201
Pacientes con el evento		164 (81.6 %)
Censurado		37 (18.4 %)
Tiempo de respuesta medio		194.0
IC del 95 % para mediana		(173.0, 196.0)
Mín. - Máx.		0, 263+
Tasa de supervivencia (IC del 95 %)		
Semana 8		97.5 % (94.1 %, 99.0 %)
Semana 12		96.0 % (92.1 %, 98.0 %)
Semana 16		90.9 % (85.9 %, 94.1 %)
Semana 20		83.1 % (77.1 %, 87.7 %)
Semana 24		64.8 % (57.6 %, 71.1 %)

Tabla 19B

Estadísticas		RT002 40 U N=201
	Pacientes con el evento	174 (85.3 %)
	Censurado	30 (14.7 %)
5	Tiempo de respuesta medio	182.0
	IC 95 % para la media	(169.0, 196.0)
	Mín. - Máx.	0, 279
Tasa de supervivencia (IC 95 %)		
	Semana 8	97.1 % (93.6 %, 98.7 %)
10	Semana 12	96.1 % (92.3 %, 98.0 %)
	Semana 16	93.1 % (88.6 %, 95.8 %)
	Semana 20	85.6 % (80.0 %, 89.8 %)
	Semana 24	60.7 % (53.6 %, 67.1 %)

Las **tablas 20A a 20B** presentan Retorno a, empeoramiento respecto al Inicio, tanto en IGA-FWS como en PFWS, para los pacientes que alcanzaron la respuesta compuesta de 2 puntos en la semana 4 y están en el grupo RT002 de cada uno de los dos brazos de estudio con el ceño fruncido al máximo (Casos observados) (Población con intención de tratar). N es el número de pacientes en el grupo RT002 donde hay respondedores compuestos de 2 puntos en la semana 4. Los porcentajes se basan en N. El Tiempo de retorno, o Peor que, el Inicio tanto en IGA-FWS como en PFWS es el número de días desde la fecha de inicio del tratamiento hasta la primera visita en la que regresan tanto IGA-FWS como PFWS, o peor que, el inicio después de las últimas semanas 1, 2 y 4 en las que se observa una mejora con respecto al inicio en ambos. Si no hay tal visita, la censura ocurre en la última visita con IGA-FWS y PFWS disponibles. Si no hay mejoría con respecto al valor inicial tanto en IGA-FWS como en PFWS en las semanas 1, 2 y 4, entonces el tiempo se establece en 0. Las estadísticas resumidas son estimaciones de Kaplan-Meier. + indica una observación censurada.

Tabla 20A

Estadísticas		RT002 40 U N=145
	Pacientes con el evento	112 (77.2 %)
	Censurado	33 (22.8 %)
30	Tiempo de respuesta medio	196.0
	IC 95 % para la media	(182.0, 199.0)
	Mín. - Máx.	29+, 263+
Tasa de supervivencia (IC 95 %)		
	Semana 8	100.0 % (100.0 %, 100.0 %)
35	Semana 12	99.3 % (95.1 %, 99.9 %)
	Semana 16	97.2 % (92.6 %, 98.9 %)
	Semana 20	89.3 % (82.9 %, 93.4 %)
	Semana 24	71.1 % (62.8 %, 77.9 %)

Tabla 20B

Estadísticas		RT002 40 U N=145
Pacientes con el evento		145 (96.7 %)
Censurado		5 (3.3 %)
Tiempo de respuesta medio		168.0
IC 95 % para la media		(156.0, 168.0)
Mín. - Máx.		54, 279
Tasa de supervivencia (IC 95 %)		
Semana 8		98.0 % (93.9 %, 99.4 %)
Semana 12		96.0 % (91.3 %, 98.2 %)
Semana 16		83.2 % (76.2 %, 88.4 %)
Semana 20		68.5 % (60.4 %, 75.3 %)
Semana 24		41.6 % (33.7 %, 49.4 %)

Las **tablas 21A a 21B** proporcionan resultados para el porcentaje de diferentes grupos de tratamiento que no muestran arrugas o que muestran arrugas leves, basadas en IGA-FWS y PFWS a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos del estudio. *p < 0.0001 vs. placebo en ambos casos. La prueba de Cochran-Mantel-Haensel estratificada por el centro de estudio se utilizó para las comparaciones de la tasa de respuesta para Daxi (RT002) vs. placebo en cada punto de tiempo en la población ITT. Los datos faltantes fueron imputados con el peor resultado post-inicio para RT002 y el mejor resultado para placebo.

Tabla 21A - Evaluación del investigador (IGA-FWS)

Semana	Brazo 1		Brazo 2	
	RT002 40 U (n=201)	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=204)	Placebo (n=102)
2	93.5 % *	3.9 %	98.0 % *	2.0 %
4	97.5 % *	4.9 %	97.5 % *	3.9 %
8	91.5 % *	7.8 %	94.6 % *	2.9 %
12	84.1 % *	2.9 %	88.2 % *	2.9 %
16	71.1 % *	5.9 %	74.0 % *	2.9 %
20	53.2 %	2.9 %	54.4 % *	2.9 %
24	35.3 % *	2.0 %	29.4 % *	2.0 %

Tabla 21B - Evaluación del paciente (PFWS)

Semana	Brazo 1		Brazo 2	
	RT002 40 U (n=201)	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=204)	Placebo (n=102)
2	92.5 % *	3.9 %	91.2 % *	3.9 %
4	92.0 % *	1.0 %	90.2 % *	3.9 %
8	84.6 % *	2.0 %	85.3 % *	6.9 %
12	72.6 % *	2.9 %	71.6 % *	5.9 %
16	57.2 % *	5.9 %	53.4 % *	5.9 %
20	44.8 % *	2.9 %	35.8 % *	6.9 %
24	23.9 % *	1.0 %	21.6 % *	2.0 %

Las **tablas 22A a 22B** presentan la satisfacción global del paciente con el tratamiento en la visita de la semana 4 (casos observados) (población con intención de tratar), para pacientes en cada uno de los dos brazos del estudio.

Tabla 22A

Satisfacción global del paciente con el tratamiento	Placebo N=102	RT002 40 U N-201	Diferencia (IC 90 %)
Semana 4, Número de pacientes a nivel de escala (%)			
Muy insatisfecho	38 (37.3 %)	2 (1.0 %)	4.2 (4.0, 4.4)
Insatisfecho	25 (24.5 %)	1 (0.5 %)	
Algo insatisfecho	7 (6.9 %)	1 (0.5 %)	
Ni satisfecho ni insatisfecho	23 (22.5 %)	5 (2.5 %)	
Algo satisfecho	2 (2.0 %)	11 (5.5 %)	
Satisfecho	2 (2.0 %)	40 (19.9 %)	
Muy satisfecho	0	136 (67.7 %)	

Tabla 22B

Satisfacción global del paciente con el tratamiento	Placebo N=102	RT002 40 U N-201	Diferencia (IC 90 %)
Semana 4, Número de pacientes a nivel de escala (%)			
Muy insatisfecho	38 (37.3 %)	2 (1.0 %)	4.2 (4.0, 4.4)
Insatisfecho	25 (24.5 %)	1 (0.5 %)	
Algo insatisfecho	7 (6.9 %)	1 (0.5 %)	
Ni satisfecho ni insatisfecho	23 (22.5 %)	5 (2.5 %)	
Algo satisfecho	2 (2.0 %)	11 (5.5 %)	
Satisfecho	2 (2.0 %)	40 (19.9 %)	
Muy satisfecho	0	136 (67.7 %)	

Las **tablas 23A a 23B** proporcionan resultados para el porcentaje de diferentes grupos de tratamiento que no muestran arrugas o muestran arrugas leves, con base en IGA-FWS y PFWS, a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos del estudio en comparación con los resultados en el estudio del ejemplo 5. (* $p < 0.0001$ vs. placebo en ambos casos; ** $p < 0.01$ (vs. placebo en el estudio del **ejemplo 5**). La prueba de Cochran-Mantel-Haensel estratificada por el centro de estudio se utilizó para las comparaciones de la tasa de respuesta para Daxi (RT002) vs. placebo en cada punto de tiempo en la población ITT. Los datos faltantes fueron imputados con el peor resultado post-inicio para RT002 y el mejor resultado para placebo.

Tabla 23A

	Brazo 1	Brazo 2	Ejemplo 5
Semana	RT002 40 U (n=201)	RT002 40 U (n=204)	RT002 40 U (n=39)
2	93.5 % *	98.0 % *	97.3 % **
4	97.5 % *	97.5 % *	97.4 % **

8	91.5 % *	94.6 % *	97.4 % **
12	84.1 % *	88.2 % *	84.6 % **
16	71.1 % *	74.0 % *	66.7 % **
20	53.2 %	54.4 % *	46.2 % **
24	35.3 % *	29.4 % *	30.8 % **

Tabla 23B

Semana	Brazo 1	Brazo 2	Ejemplo 5
	RT002 40 U (n=201)	RT002 40 U (n=204)	RT002 40 U (n=39)
2	92.5 % *	91.2 % *	91.9 % **
4	92.0 % *	90.2 % *	94.9 % **
8	84.6 % *	85.3 % *	86.8 % **
12	72.6 % *	71.6 % *	84.6 % **
16	57.2 % *	53.4 % *	61.5 % **
20	44.8 %	35.8 % *	35.9 % **
24	23.9 % *	21.6 % *	20.5 % **

Las **tablas 24A a 24B** muestran además que se observaron tasas de respuesta robustas nula o leve hasta la semana 24 en la Evaluación del investigador (IGA-FWS) (**tabla 24A**) y en la Evaluación del paciente (**tabla 24B**) (* $p < 0.0001$ vs. placebo en todos los puntos de tiempo hasta la semana 24; se usó la prueba de Cochran-Mantel-Haenszel estratificada por el centro de estudio para la comparación de la tasa de respuesta para RT002 vs. placebo en cada punto de tiempo en la población ITT; los datos faltantes fueron imputados con el peor resultado post-inicio para RT002 y mejor resultado para placebo). Por ejemplo, el brazo 1 y el brazo 2 tuvieron tasas de respuesta de 71 % y 74 % en la semana 16, y 35 % y 29 % en la semana 24 para IGA-FWS, respectivamente.

Tabla 24A

Sem	Brazo 1		Brazo 2	
	RT002 40 U n=201	Placebo n=102	RT002 40 U n=204	Placebo n=102
2	93.5 % *	3.9 %	98.0 % *	2.0 %
4	97.5 % *	4.9 %	97.5 % *	3.9 %
8	91.5 % *	7.8 %	94.6 % *	2.9 %
12	84.1 % *	2.9 %	88.2 % *	2.9 %
16	71.1 % *	5.9 %	74.0 % *	2.9 %
20	53.2 % *	2.9 %	54.4 % *	2.9 %
24	35.3 % *	2.0 %	29.4 % *	2.0 %

Tabla 24B

Sem	Brazo 1		Brazo 2	
	RT002 40 U n=201	Placebo n=102	RT002 40 U n=204	Placebo n=102
2	92.5 % *	3.9 %	91.2 % *	3.9 %
4	92.0 % *	1.0 %	90.2 % *	3.9 %
8	84.6 % *	2.0 %	85.3 % *	6.9 %
12	72.6 % *	2.9 %	71.6 % *	5.9 %
16	57.2 % *	5.9 %	53.4 % *	5.9 %
20	44.8 % *	2.9 %	35.8 % *	6.9 %
24	23.9 % *	1.0 %	21.6 % *	2.0 %

Las **tablas 25A a 25B** comparan estos resultados con los del **ejemplo 5**, y muestran tasas robustas de respuesta nula o leve observadas hasta la semana 24 en la Evaluación del investigador (IGA-FWS) (**tabla 25A**) y en la Evaluación del Paciente (PFWS) (**tabla 25B**) (* $p < 0.0001$ (vs. placebo),

** $p < 0.01$ (vs. placebo); la prueba de Cochran-Mantel-Haenszel estratificada por el centro de estudio se usó para la comparación de la tasa de respuesta para RT002 vs. placebo en cada punto de tiempo en la población ITT; los datos faltantes fueron imputados con el peor resultado post-inicio para RT002 y el mejor resultado para placebo). Se observaron tasas robustas de respuesta nula o leve en IGA-FWS hasta la semana 24. Las tasas de respuesta para cada uno de los dos brazos fueron 71 % y 74 %, en la semana 16 y 35 %, y 29 %, en la semana 24, respectivamente ($p < 0.0001$ versus placebo en todos los puntos de tiempo hasta la semana 24). En el estudio del **ejemplo 5**, la tasa de respuesta a la dosis de 40 U de RT00 fue del 67 % en la semana 16 y del 31 % en la semana 24, en comparación con la tasa de respuesta de 20 U de toxina onabotulínica A la semana 16 del 31.7 % y la tasa de respuesta de la semana 24 del 11.9 % (ver de nuevo Carruthers 2017 y Allergan, Inc. BOTOX® (toxina onabotulínica A) Información de Prescripción, 2013).

Tabla 25A

Sem	Brazo 1	Brazo 2	EX. 5
	RT002 40 U n=201	RT002 40 U n=204	RT002 40 U n=39
2	93.5 % *	98.0 % *	97.3 % **
4	97.5 % *	97.5 % *	97.4 % **
8	91.5 % *	94.6 % *	97.4 % **
12	84.1 % *	88.2 % *	84.6 % **
16	71.1 % *	74.0 % *	66.7 % **
20	53.2 % *	54.4 % *	46.2 % **
24	35.3 % *	29.4 % *	30.8 % **

Tabla 25B

Sem	Brazo 1	Brazo 2	EX. 5
	RT002 40 U n=201	RT002 40 U n=204	RT002 40 U n=39
2	92.5 % *	91.2 % *	91.9 % **
4	92.0 % *	90.2 % *	94.9 % **
8	84.6 % *	85.3 % *	86.8 % **
12	72.6 % *	71.6 % *	84.6 % **
16	57.2 % *	53.4 % *	61.5 % **
20	44.8 %	35.8 % *	35.9 % **
24	23.9 % *	21.6 % *	20.5 % **

Como se muestra también en las **figuras 6A a 6B**, estos resultados exceden los obtenidos en el **ejemplo 5** que muestran, en la semana 4, una respuesta compuesta de 2 puntos de 52.8 % con RT002 (**figura 6A**) (* $p < 0.0001$ (vs. placebo en una prueba de Cochran-Mantel-Haenszel estratificada por centro de estudio) (ver también Carruthers, 2017)).

La **figura 6B** compara el brazo 1 y el brazo 2 de este estudio con el **ejemplo 5**, en términos de la respuesta nula o respuesta leve en IGA-FWS y PFWS a lo largo del tiempo. El **ejemplo 5** mostró, en la semana 16, una respuesta del 67 %, y en la semana 24, una respuesta del 31 % (**figura 6B**). En el estudio de fase 3, los datos faltantes fueron imputados con el peor resultado post-inicio (o el mejor resultado para el brazo con placebo) en las visitas hasta la semana 24. La imputación de no respondedores se utilizó para las visitas posteriores a la semana 24. En el **ejemplo 5**, las tasas de respuesta fueron de los sujetos con datos.

La **figura 7** presenta el porcentaje de sujetos que no mantienen arrugas o mantienen arrugas leves en función de la puntuación IGA-FWS y PFWS a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos del presente estudio, para el **ejemplo 5**, y para varias otras formulaciones de toxina botulínica. La **figura 7** se

basa en la **figura 6** al incluir la respuesta nula o leve de acuerdo con IGA-FWS y PFWS a lo largo del tiempo de acuerdo con los instructivos de toxina onabotulínica A, toxina abobotulínica A y toxina incobotulínica A. Por ejemplo, la toxina onabotulínica A 20 U, que mostró una tasa de respuesta de la semana 16 del 31.7 % y una tasa de respuesta de la semana 24 del 11.9 %. Específicamente, la línea continua azul brillante representa Abobot GL-1 (toxina abobotulínica A descrita en el instructivo de Dysport en los EE. UU. para su estudio GL-1); la línea discontinua de color azul brillante representa Abobot GL-3 (toxina abobotulínica A descrita en el prospecto de Dysport en el instructivo de EE. UU. para su estudio GL-3), la naranja representa Onabot USP1 (toxina onabotulínica A como se describe en el instructivo de EE. UU. correspondiente); el triángulo abierto rojo representa Incobot GL-1 (toxina incobotulínica A descrito en el instructivo de Xeomin en los EE. UU. para su estudio GL-1); y el triángulo cerrado rojo representa Incobot GL-2 (toxina incobotulínica A descrita en el instructivo de Xeomin en los EE. UU. para su estudio GL-2). En los brazos del estudio de fase 3, para la población ITT, los datos faltantes fueron imputados con el peor resultado post-inicio (o el mejor resultado para el brazo de placebo) en las visitas hasta la semana 24. La imputación de no respondedores se utilizó para las visitas posteriores a la semana 24. Con respecto a los resultados del **ejemplo 5**, las tasas de respuesta fueron de los sujetos ITT con datos.

Las **figuras 8 a 10** muestran además los resultados del estudio de fase 3. La **figura 8** representa una respuesta nula o leve de acuerdo con PFWS en relación con el **ejemplo 5**. En el estudio de fase 3, los datos faltantes fueron imputados con el peor resultado post-inicio (o el mejor resultado para el brazo con placebo) en las visitas hasta la semana 24. La imputación de no respondedores se utilizó para las visitas posteriores a la semana 24. En el **ejemplo 5**, las tasas de respuesta fueron de los sujetos con datos.

La **figura 9** representa una respuesta nula o leve de acuerdo con PFWS en relación con la toxina abobotulínica A. En el estudio de fase 3 (ITT), los datos faltantes fueron imputados con el peor resultado post-inicio (o el mejor resultado para el brazo de placebo) en las visitas hasta la semana 24. La imputación de no respondedores se utilizó para las visitas posteriores a la semana 24. En el **ejemplo 5**, las tasas de respuesta fueron de sujetos ITT con datos.

La **figura 10** representa la tasa de respuesta de ≥ 1 punto en IGA-FWS a lo largo del tiempo del brazo 1 y el brazo 2 (ITT) del presente estudio con relación al **ejemplo 5** (PP). En el estudio de fase 3, los datos faltantes fueron imputados con el peor resultado post-inicio (o el mejor resultado para el brazo con placebo) en las visitas hasta la semana 24. La imputación de no respondedores se utilizó para las visitas posteriores a la semana 24. En el **ejemplo 5**, las tasas de respondedores fueron de los sujetos de la población PP.

Las **figuras 11 a 13** resumen además estos resultados. Los dos brazos de este estudio son los primeros y únicos estudios de fase 3 en pacientes con líneas glabellares moderadas a severas que demostraron una eficacia confirmatoria de ≥ 24 semanas en múltiples medidas de resultado clínicamente significativas. Ambos estudios de fase 3 excedieron los resultados del estudio del **ejemplo 5**, con una duración media de ≥ 1 punto de mejora desde el inicio en IGA-FWS y PFWS de 24.1 y 23.7 a 23.9 semanas en ambas evaluaciones tanto del investigador (**figura 11**) como del sujeto (**figura 12**), respectivamente.

Por el contrario, el estudio en el **ejemplo 5** demostró una mejoría de ≥ 1 punto en IGA-FWS de

23.6 semanas de duración media con RT002 40 U frente a 18.8 semanas con 20 U de toxina onabotulínica A ($p < 0.03$) (Carruthers, 2017). **La figura 13** representa una comparación de IGA-FWS y PFWS para los dos brazos de este estudio.

Las figuras 14 a 16 representan que el mantenimiento del estado de gravedad de las arrugas nulo o leve (puntuación de 0 o 1) con 40 U de RT002 en IGA-FWS y PFWS replicó la duración observada con resultados de mejora ≥ 1 punto. **La figura 14** presenta el porcentaje de sujetos que mantienen un estado de gravedad de arrugas nulo o leve (puntuación de 0 o 1) en IGA-FWS a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos del presente estudio (líneas púrpura y azul) y para el **ejemplo 5** (línea roja). **La figura 15** presenta el porcentaje de sujetos que mantienen un estado de gravedad de arrugas nulo o leve (puntuación de 0 o 1) en IGA-FWS a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos del presente estudio (líneas púrpura y azul), en base a respondedores compuestos de 2 puntos en la semana 4. **La figura 16** presenta el porcentaje de sujetos que mantienen un estado de gravedad de arrugas nulo o leve (puntuación de 0 o 1) en IGA-FWS o PFWS a lo largo del tiempo, para cada uno de los dos brazos del presente estudio (líneas púrpura y azul).

La figura 17 representa la duración media de 27.7 semanas (6.5 meses) y 26 semanas (6.1 meses) en el brazo 1 y 2, respectivamente, de este estudio. El tiempo medio de retorno a la gravedad inicial de las arrugas con RT002 tanto en IGA-FWS como en PFWS superó los seis meses.

Satisfacción global del paciente: Se observaron tasas de satisfacción global del paciente altas en la semana 4 en ambos brazos del estudio. **La figura 18** representa las tasas de satisfacción de “Satisfecho” o “Muy satisfecho” del 91 % y 88 % para los brazos 1 y 2, respectivamente, en una escala de 7 puntos.

Las figuras 19 a 20 muestran fotografías de sujetos ejemplares del estudio de fase 3. **La figura 19** presenta fotografías de un sujeto que muestra una mejora de 2 puntos de acuerdo con IGA-FWS y PFWS en la semana 4 (ceño fruncido al máximo) después del tratamiento con 40 U RT002 y una duración sostenida de 1 punto del efecto hasta la semana 24.

Las figuras 20A a 20B presenta fotografías de un sujeto diferente que muestra una mejora de 2 puntos de acuerdo con IGA-FWS y PFWS en la semana 4 (ceño fruncido al máximo) después del tratamiento con 40 U de RT002; y una duración sostenida del efecto de 1 punto hasta la semana 24 (**figura 20B**) y 32 semanas (**figura 20B**).

Seguridad:

Se observó que RT002 40 U era generalmente segura y bien tolerada hasta la semana 36 en ambos brazos. El porcentaje de sujetos en el brazo 1 y 2 con eventos adversos fue del 36 % y 46 %, respectivamente, en el grupo RT002; y 25 % y 24 %, respectivamente, en el grupo placebo. Consulte **tabla 26**, que resume los eventos adversos. La mayoría de los eventos en el grupo RT002 fueron de gravedad leve y se consideraron no relacionados con el fármaco del estudio. Ningún sujeto en el grupo RT002 dejó el estudio debido a los EA. Dos sujetos en cada brazo experimentaron un EA grave en el grupo RT002, ninguno de los cuales estaba relacionado con el tratamiento. Los EA relacionados con el tratamiento en el brazo 1 y 2 ocurrieron en 17.4 % y 21.0 % de los sujetos, respectivamente, en el grupo RT002; y 8 % y 9

%, respectivamente, en el grupo placebo.

Tabla 26

	Brazo 1		Brazo 2	
	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=201)	Placebo (n=101)	RT002 40 U (n=204)
Muerte, n (%)	0	0	0	0
EA graves (EAG), n (%)	1 (1.0 %)	2 (1.0 %)	1 (1.0 %)	2 (1.0 %)
Sujetos con cualquier EA, n (%)	25 (24.5 %)	72 (35.8 %)	24 (23.8 %)	94 (45.9 %)
Grave	1 (1.0 %)	4 (2.0 %)	1 (1.0 %)	2 (1.0 %)
Sujetos con cualquier EA relacionado con el tratamiento, n (%)	8 (7.8 %)	35 (17.4 %)	10 (9.9 %)	43 (21.0 %)
EAG	0	0	0	0
Sujetos con cualquier EA que lleva a la interrupción del estudio, n (%)	0	0	0	0

En el grupo RT002 en ambos estudios, los eventos más comunes fueron dolor de cabeza (6 a 7 %) y dolor en el lugar de la inyección (2.4 % a 5 %); las tasas de edema y eritema relacionados con la inyección fueron ≤ 2.4 % y todos los casos fueron de gravedad leve. Se observó una tasa general de ptosis palpebral del 2.2 %, con una duración media de 60 días. La **tabla 27** resume el número de eventos adversos relacionados con el tratamiento por término preferido (> 2 % en cualquier brazo) (* 6 casos de gravedad leve, 3 casos de gravedad moderada; todos resueltos sin secuelas). Duración media de 60 días; † Trastorno ocular con > 2 casos por grupo. Todos los casos de gravedad leve. (‡Duración media de 30 días).

Tabla 27

Término preferido	Brazo 1		Brazo 2	
	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=201)	Placebo (n=101)	RT002 40 U (n=205)
Dolor de cabeza	3 (2.9 %)	4 (7.0 %)	1 (1.0 %)	12 (5.9 %)
Dolor en el sitio de inyección	4 (3.9 %)	10 (5.0 %)	4 (4.0 %)	5 (2.4 %)
Ptosis palpebral*†	0	5 (2.5 %)	0	4 (2.0 %)
Eritema en el sitio de inyección	0	0	4 (4.0 %)	5 (2.4 %)
Edema en el sitio de inyección	0	1 (0.5 %)	3 (3.0 %)	5 (2.4 %)
Blefaroespasmos†	0	0	0	3 (1.5 %)
Ptosis de cejas†‡	0	2 (1.0 %)	0	1 (0.5 %)

Los eventos adversos y graves se muestran en la **tabla 28** y la **tabla 29**. La **tabla 28** resume los eventos adversos graves ** por término preferido (* El EA grave también es un EA severo; ** ninguno de los eventos adversos graves estuvo relacionado con el tratamiento).

Tabla 28

EA grave Término preferido	Brazo 1		Brazo 2	
	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=201)	Placebo (n=101)	RT002 40 U (n=205)
Insuficiencia de médula ósea*	0	1 (0.5 %)	0	0
Influenza	0	1 (0.5 %)	0	0
Sepsis*	0	1 (0.5 %)	0	0
Síndrome del túnel carpiano	0	1 (0.5 %)	0	0
Ansiedad*	1 (1.0 %)	0	0	0
Nefrolitiasis	0	1 (0.5 %)	0	0
Congestión del tracto respiratorio	0	1 (0.5 %)	0	0
Conjuntivitis	0	0	0	1 (0.5 %)
Perforación uterina*	0	0	0	1 (0.5 %)
Leiomiomasarcoma recurrente*	0	0	1 (1.0 %)	0
Leiomioma uterino*	0	0	0	1 (0.5 %)

La **tabla 29** resume los Eventos Adversos Graves** por término preferido (*ninguno de los EA graves está relacionado con el tratamiento).

Tabla 29

Término preferido	Brazo 1		Brazo 2	
	Placebo (n=102)	RT002 40 U (n=201)	Placebo (n=101)	RT002 40 U (n=205)
Insuficiencia de médula ósea*	0	1 (0.5 %)	0	0
Sepsis	0	1 (0.5 %)	0	0
Ansiedad*	1 (1.0 %)	0	0	0
Perforación uterina*	0	0	0	1 (0.5 %)
Leiomiomasarcoma recurrente*	0	0	1 (1.0 %)	0
Leiomioma uterino*	0	0	0	1 (0.5%)

Ejemplo 8: Estudio de seguridad de seguimiento de la formulación inyectable de la toxina botulínica que muestra una seguridad mejorada, tasas de respuesta más altas y una duración del efecto más larga en el tratamiento de las líneas glabellares en los tratamientos sucesivos

Además de los dos ensayos fundamentales planificados, el programa de fase 3 incluye un ensayo de seguridad abierto a largo plazo, que está diseñado para evaluar la seguridad a largo plazo de RT002 para el tratamiento de líneas glabellares moderadas a severas en adultos después de administración tanto de tratamiento único como de tratamiento repetido. El estudio de seguridad a largo plazo incluyó aproximadamente 1,500 sujetos en múltiples sitios. Dependiendo del número de tratamientos y la duración del seguimiento, un sujeto puede estar en el estudio por un máximo de 84 semanas.

El estudio de seguridad incluyó un ensayo prospectivo de fase 3, abierto, multicéntrico, de dosis repetidas para evaluar la seguridad de administraciones únicas y repetidas de RT002 en el tratamiento de líneas glabellares moderadas a severas. El estudio de seguridad incluyó aproximadamente 60 centros y aproximadamente 1,500 sujetos inscritos, además de aproximadamente 600 sujetos inscritos en los brazos 1 y 2 del estudio de fase del **ejemplo 7**, descrito en la presente, para tratamientos repetidos. Los sujetos recibieron hasta tres tratamientos repetidos. Los sujetos del **ejemplo 7** recibieron un tratamiento en el ensayo principal y hasta dos en este ensayo, para un total de tres tratamientos; los sujetos recién inscritos recibieron hasta dos tratamientos. **La figura 21A** representa el diseño del estudio. Los seguimientos se refieren a sujetos elegibles para un nuevo tratamiento a partir de la semana 12 cuando tanto IGA-FWS como PFWS vuelven al inicio. **La figura 21B** muestra una descripción general de este estudio en comparación con los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7**. * indica centros de los EE. UU.; ** indica centros de EE. UU. y Canadá.

Todos los sujetos fueron monitoreados durante al menos 12 semanas, y hasta 36 semanas, después de cada tratamiento para evaluaciones de seguridad. Si las puntuaciones de PFWS e IGA-FWS con el ceño fruncido al máximo vuelven al inicio en la visita de la semana 12, o en una visita entre las semanas 12 y 36, la visita en la que se registran estas dos puntuaciones se convierte en la visita de evaluación final, y para aquellos sujetos que recibieron múltiples tratamientos, esta visita sirvió como una visita de re-tratamiento y se consideró como el inicio para este ensayo; además, estos sujetos tuvieron una visita de evaluación final en la semana 12 después de su tratamiento elegible final.

Régimen de dosificación Todos los tratamientos fueron inyecciones intramusculares administradas por un médico capacitado. La administración se realizó como se describe en el **ejemplo 7**. Véase también la **figura 23**, que indica los sitios de inyección utilizados en este ensayo. Los sujetos recibieron un total de 0.5 mL de tratamiento, con 0.1 mL administrados por inyección en cinco sitios de inyección: dos inyecciones en cada músculo corrugador y una inyección en el músculo prócer. La dosis fue de 40 U por tratamiento inyectable, dividida entre los cinco sitios de inyección. La duración de la participación del sujeto varió de acuerdo con el número de tratamientos, la respuesta a RT002 y la duración del seguimiento. Un sujeto puede haber estado en el estudio durante un máximo de 86 semanas, incluido un período de evaluación de dos semanas.

Visitas del estudio: Selección (-semana 2), Tratamiento (día 0), publicar el primer seguimiento del tratamiento en las semanas 1, 2, 4, 8 y 12, después en las semanas 16, 20, 24, 28, 32, 36 o hasta el re-tratamiento. Publicar el segundo seguimiento del tratamiento (para los sujetos que se vuelven a tratar), en las semanas 1, 2, 4, 8 y 12, después en las semanas 16, 20, 24, 28, 32 y 36 o hasta el re-tratamiento (3ª dosis). Publicar el tercer seguimiento del tratamiento (para los sujetos que reciben el 3er tratamiento), en las semanas 1, 2, 4, 8 y 12. Los sujetos elegibles para el re-tratamiento mostraron el retorno de las puntuaciones de severidad IGA-FWS y PFWS al inicio. La variación permitida desde el día de la visita programada fue de +/- 2 días para la semana 1 (después del tratamiento); +/- 3 días para cada una de las semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36.

La figura 22 describe además el programa de evaluaciones de ensayos seguido en este ensayo.

En particular, “a” indica la visita de evaluación final del **ejemplo 7** (estudio de fase 3, brazos 1 y 2) al final de la prueba PT y la prueba de anticuerpos en suero de la semana 12, sirvieron como punto de partida para el giro de esta prueba; “b” indica que los sujetos pueden ser elegibles para el re-tratamiento cuando la IGA-FWS y la PFWS regresaron al inicio en la semana 12, o en una visita entre las semanas 12 y 36; “c” indica que los sujetos que han recibido múltiples tratamientos completaron la visita de evaluación final en la semana 12 después del tratamiento final; “d” indica el procedimiento realizado antes del tratamiento; “e” indica el procedimiento realizado después del tratamiento; “f” indica que, si es positiva, esta prueba se confirmó mediante una prueba de embarazo en suero; “g” indica que el PT solo se recolectó en la selección; “h” indica que, si se informaron signos o síntomas de propagación distante de las toxinas, se registraron signos vitales; “i” indica que las fotografías incluyen la vista frontal del sujeto con el ceño fruncido al máximo y en reposo después del ceño fruncido al máximo. Durante el primer tratamiento, estas fotos se tomaron al inicio del estudio, en las semanas 4, 16, 20, 24 y fin del estudio (EOS, por sus siglas en inglés). Durante el segundo tratamiento, se tomaron fotos al inicio, en la semana 4 y EOS. En centros selectos, las fotografías también incluyeron la frente del sujeto en reposo y después al máximo levantamiento de la frente en la visita de inicio y en las visitas de seguimiento; “j” señala que las fotografías se obtuvieron del sujeto en la mirada primaria con la ceja relajada y en la mirada primaria con la ceja elevada; “k” señala que, si se informaron u observaron signos de ptosis, se obtuvieron fotografías.

Evaluaciones de seguridad: pruebas de laboratorio clínico (hematología, química, tiempo de protrombina [PT], análisis de orina); prueba de embarazo en orina (UPT) para mujeres en edad fértil (WOCBP); pruebas de anticuerpos en suero para RT002 y RTP004; evaluación del sitio de inyección; evaluación de los nervios craneales II a VII; evaluación de la fuerza de los músculos faciales; medicaciones concomitantes; recopilación de eventos adversos (REA); consulta de propagación distante de toxinas; signos vitales y examen físico.

Como se describe en la **tabla 30**, las muestras tomadas sin ayuno para hematología, química sanguínea, coagulación (tiempo de protrombina; solo selección) y análisis de orina se recolectaron en las visitas de selección, semana 4, antes del re-tratamiento (según corresponda) y en la visita de evaluación final. En las visitas de selección y en la semana 2, 4 y 12, se recolectaron muestras de sangre para anticuerpos.

Tabla 30 - Pruebas clínicas de laboratorio

Química de suero Hematología		Análisis de orina	Pruebas adicionales
Glucosa	Hemoglobina	Gravedad específica	Tiempo de protrombina (PT) (en selección únicamente)
Bilirrubina total	Hematocrito	pH	Prueba de embarazo en orina (sólo a WOCBP)
Fosfatasa alcalina	Conteo de glóbulos rojos	Glucosa	Anticuerpos en suero para toxina daxibotulínica A y RTP004*

	Nitrógeno ureico en sangre	Conteo de plaquetas	Proteína
	Alanina aminotransferasa	Conteo de leucocitos (total)	Bilirrubina en sangre
5	Aspartato aminotransferasa	Conteo de leucocitos (diferencial)	Cetonas
WOCBP = Mujeres en edad fértil *Solo en las visitas de selección, semana 2, 4 y 12			

10 **Prueba de anticuerpos:** Si el título de anticuerpos se desarrolló para el producto durante el curso del tratamiento con RT002, las muestras de ese sujeto se sometieron a un ensayo de protección de ratón para detectar anticuerpos neutralizantes.

Los anticuerpos en suero para RT002 y RTP004 se resumieron utilizando estadísticas descriptivas, y las tendencias analizadas para resultados de anticuerpos positivos y correlacionadas con eventos clínicamente significativos relacionados con la inmunogenicidad. Específicamente, se presentaron estadísticas descriptivas que muestran la frecuencia de resultados positivos de anticuerpos, así como los eventos clínicamente significativos relacionados con la inmunogenicidad a lo largo del tiempo.

20 **Signos vitales:** Los signos vitales (es decir, la temperatura corporal, la frecuencia respiratoria, la frecuencia del pulso radial en posición sentada y las presiones sanguíneas sistólica y diastólica en posición sentada) se obtuvieron en la visita de selección y tratamiento (antes y después del tratamiento), semana 2, evaluación final o visitas de interrupción temprana y en cualquier visita donde se informaron signos o síntomas de toxicidad botulínica.

25 **Examen físico:** Se realizó un examen físico, además de los signos vitales, incluido el examen neurológico de la cara, apariencia general, piel, cuello (incluida la tiroides), ojos, oídos, nariz, garganta, corazón, pulmones, abdomen, ganglios linfáticos y extremidades se realizó en la selección, semana 2 y evaluación final o visitas de interrupción temprana. Los hallazgos significativos del examen físico que están presentes antes de la administración del producto en investigación se incluyeron como historial médico. Se registraron hallazgos significativos del examen físico que cumplen con la definición de un evento adverso.

30 **Evaluación del sitio de inyección:** Los sitios de inyección se evaluaron en la visita de selección, visita de tratamiento antes y después del tratamiento, visitas de seguimiento y visita de evaluación final o visita de interrupción temprana, según corresponda. La evaluación se realizó como una evaluación global de los 5 sitios de inyección, como se muestra en la **tabla 11**, a continuación.

35 **Evaluación de los nervios craneales II a VII:** Evaluación de los nervios craneales II a VII (lados izquierdo y derecho por separado) se realizó en la selección, visita de tratamiento antes y después del tratamiento, visitas de seguimiento y visita de evaluación final o visita de interrupción temprana, según corresponda. Las puntuaciones para cada nervio craneal se capturaron como se describe en la **tabla 12** anterior. Los procedimientos de examen son como se detallan en la **tabla 31**.

Tabla 31: Criterios de evaluación de los nervios craneales II a VII

	Nervio craneal	Nombre del nervio	Función	Prueba
5	II III	Nervio óptico Nervio oculomotor	Reacción pupilar a la luz y la acomodación	Decir al sujeto que mire a lo lejos. Encender una luz brillante oblicuamente en cada pupila. Buscar: • Reflejo de luz directa - Constricción pupilar en el mismo ojo. • Reacción consensuada - Construcción pupilar en el ojo opuesto. • Acomodación - mover la linterna hacia la nariz y observar la constricción pupilar.
10	III IV VI	Nervio oculomotor Nervio troclear Nervio abducens	Movimientos extraoculares	Pararse con los dos pies directamente frente al sujeto. Usar su dedo para hacer un barrido horizontal de izquierda a derecha del sujeto al nivel de los ojos del sujeto. Repetir este barrido horizontal al nivel de la frente y el mentón. Buscar el movimiento conjugado normal de los ojos en cada dirección o cualquier desviación de lo normal. Unos pocos latidos de nistagmo en la mirada lateral lejana son normales.
15	V	Nervio trigémino	Motor	Pedir al sujeto que apriete los dientes. Palpar los músculos temporales y maseteros y observar la fuerza del músculo.
20			Sensación de asco.	Decir al sujeto que cierre los ojos. Con un bastoncillo de algodón u otro objeto similar, tocar la frente, las mejillas y la mandíbula del sujeto con el extremo de algodón opaco y el extremo de madera más afilado de forma aleatoria. Pedir al sujeto que diga si siente que el objeto es romo o filoso. Comparar la sensación en ambos.
25	VII	Nervio facial	Motor	El Sistema de Calificación Regional de Nervios Faciales de House-Brackmann se utilizará para evaluar las ramificaciones de los nervios faciales en reposo y durante la conversación con el sujeto. Pedir al sujeto que: • Levante ambas cejas. • Frunza el ceño. • Cierre ambos ojos con fuerza mientras el investigador intenta abrir los párpados. • Muestre los dientes superiores e inferiores. • Sonría. • Infle ambas mejillas.
30				

Sistema de Gradación Regional del Nervio Facial de House-Brackmann: Este sistema fue diseñado para evaluar la sincinesis y las 4 ramificaciones principales del nervio facial (VII) que inervan la musculatura objetivo y adyacente (Yen, et al., 2003, *Otol Neurotol.* 24(1): 118-122). El investigador evaluó la funcionalidad del nervio facial (VII) en la selección, visita de tratamiento antes y después del tratamiento, visitas de seguimiento y visita de evaluación final o visita de interrupción temprana, si corresponde. Refiérase a la **tabla 13**, anterior y la **tabla 32** a continuación.

Tabla 32

5	Frente	1	Movimiento normal de frente.
		2	Ligera debilidad en el movimiento de frente.
		3	Asimetría obvia pero no desfigurante con el movimiento, simétrica en reposo.
		4	Debilidad obvia de asimetría desfigurante con el movimiento, simétrica en reposo.
		5	Movimiento apenas perceptible en la frente, asimétrico en reposo.
		6	Sin movimiento.
10	Ojo	1	Cierre normal de los ojos.
		2	Debilidad leve en el cierre de los ojos.
		3	Debilidad obvia pero capaz de cerrar los ojos.
		4	Incapaz de cerrar los ojos con el máximo esfuerzo.
		5	Movimiento de los párpados apenas perceptible.
		6	Sin movimiento.
15	Parte media de la cara	1	Movimiento normal de la parte media de la cara.
		2	Ligera debilidad en el movimiento de la parte media de la cara.
		3	Debilidad obvia pero no desfigurante, simétrica en reposo.
		4	Debilidad obvia y asimetría desfigurante con el movimiento, simétrica en reposo.
		5	Movimiento apenas perceptible en la parte media de la cara, asimétrica en reposo.
		6	Sin movimiento.
20	Boca	1	Movimiento normal de la esquina de la boca.
		2	Ligera debilidad del movimiento de la esquina de la boca.
		3	Debilidad obvia pero no desfigurante, simétrica en reposo.
		4	Debilidad obvia y asimetría desfigurante con el movimiento, simétrica en reposo.
		5	Movimiento apenas perceptible de la esquina de la boca, asimétrico en reposo.
		6	Sin movimiento.
25	Sincinesia	1	Ninguna.
		2	Leve - obvia pero no desfigurante.
		3	Severa - desfigurante o interfiere con la función.

Evaluación de la fuerza del músculo facial: La fuerza de los músculos faciales se evaluó utilizando la Escala del Consejo de Investigación Médica (MRC) para la Evaluación de la potencia muscular (Patemostro-Sluga, *et al.*, 2008, *J Rehabil Med.* 40:665-671). Se evaluaron los siguientes músculos a cada lado de la cara; orbicular del ojo (párpado), elevadores de cejas laterales, zigomático. Véase, **tabla 14**. El investigador evaluó la fuerza de los músculos faciales en la visita de tratamiento antes y después del tratamiento, visitas de seguimiento y visita de evaluación final o visita de interrupción temprana, según corresponda.

Eventos adversos: Los eventos adversos (EA) se clasificaron como leves, moderados o graves, y se evaluaron en la visita de tratamiento posterior al tratamiento, las visitas de seguimiento y la visita de evaluación final o visita de interrupción temprana, según corresponda.

Consulta de la propagación distante de la toxina (EA específicos y síntomas de la consulta de debilidad neuromuscular): La consulta de propagación distante de la toxina se realizó en la visita de tratamiento antes y después del tratamiento, visitas de seguimiento y visita de evaluación final o visita de interrupción temprana, según corresponda. Los pacientes fueron consultados de manera general

en la lista de eventos adversos potencialmente sugestivos de diseminación distante de toxinas, incluyendo trastorno de acomodación, arreflexia, aspiración, visión borrosa, botulismo, trastorno de la función del párpado, ptosis palpebral, parálisis facial, paresia facial, paresia del cuarto nervio craneal, parálisis del nervio periférico, parálisis periférica, debilidad muscular del piso pélvico, aspiración de neumonía, deterioro del reflejo pupilar, bradicardia, ptosis de las cejas, parálisis bulbar, estreñimiento, perlesía del nervio craneal, parálisis del nervio craneal, parálisis diafragmática, diplopia, boca seca, disartria, disfagia, disfonía, disnea, paresia muscular extraocular, paresia, trastornos gastrointestinales, cuadriparesia, dolores de cabeza, hemiparesia, paresia del nervio hipogloso, hiporreflexia, hipotonía, monoparesia, debilidad muscular, parálisis, parálisis flácida, íleo paralítico, paraparesia, paresia del nervio craneal, insuficiencia respiratoria, paro respiratorio, depresión respiratoria, trastorno del habla, paresia del tercer nervio craneal, paresia del nervio trigémino, retención urinaria, parálisis de las cuerdas vocales, paresia de las cuerdas vocales y xeroftalmia (ojos secos).

Evaluaciones de efectividad: Evaluación Global de las Arrugas Faciales del Investigador-Gravedad de las Arrugas del Ceño Fruncido (IGA-FWS); Gravedad de las Arrugas del Ceño Fruncido del Paciente (PFWS); y la Escala de Mejoría Estética Global del Paciente (GAIS). Las evaluaciones son como se describe anteriormente.

Otras evaluaciones: fotografías del área de tratamiento. Se tomaron fotografías digitales estandarizadas del área de tratamiento. Para obtener fotos que fueran útiles para evaluar la presencia de ptosis, ya sea al inicio del estudio para propósitos de comparación, o en visitas subsecuentes donde hay signos reportados u observados de sospecha de ptosis, las fotografías se tomaron de manera estandarizada con la cámara provista por el patrocinador. Las dos fotos tomadas en cada punto de tiempo fueron 1) del sujeto con la mirada primaria con la ceja relajada, y 2) del sujeto con la mirada primaria con la ceja elevada. Las fotografías también incluyeron la frente del sujeto con la elevación máxima de la frente y en reposo después de la elevación máxima de la frente.

Diagnóstico y criterios de elegibilidad abreviados principales: Pacientes ambulatorios, hombres o mujeres no embarazadas, mujeres no lactantes, de 18 años de edad o más, y con buena salud general con líneas glabellares moderadas (2) o severas (3) con el ceño fruncido al máximo según el IGA-FWS y PFWS.

Elemento de prueba, dosis, administración: RT002, 40 U, inyección IM, 0.5 mL. El producto RT002 es una formulación inyectable, que contiene la molécula de toxina botulínica del subtipo A de 150 kD sin proteínas accesorias, que está asociada de forma no covalente con un péptido portador cargado positivamente que tiene la fórmula RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR (RTP004; SEQ ID NO: 4), y que no contiene proteínas accesorias o componentes derivados de animales. El excipiente comprende 0.1 mg de polisorbato 20, 36 mg de hidrato de trehalosa y 11.7 µg de RTP004, por 50 U de la toxina tipo A de 150 kDa sin proteínas accesorias y la dosis de tratamiento es 40 U.

Análisis estadístico: Toda la programación estadística se realizará utilizando el sistema de análisis estadístico (SAS) versión 9.4 o superior.

Los sujetos del estudio fueron elegibles para recibir hasta tres tratamientos. Para fines de análisis,

se definió el período de resumen correspondiente para cada tratamiento. Para el resumen general del ensayo, se incluyeron todos los datos disponibles observados durante el ensayo. Para los análisis asociados con un tratamiento específico, el resumen incluyó todos los datos observados desde un tratamiento hasta el siguiente tratamiento, o hasta la última visita del ensayo cuando no hay tratamiento subsecuente. Para tener en cuenta la duración variable del seguimiento del sujeto, se calculó la duración total del seguimiento (es decir, pacientes-años) para cada período de resumen. Para el resumen general del ensayo, el valor inicial fue el último valor disponible antes del primer tratamiento. Para los resúmenes asociados con un tratamiento específico, el inicio fue el último valor disponible antes del tratamiento (es decir, reasignado).

La población evaluable para la seguridad incluyó a todos los sujetos que están expuestos al producto en investigación y que proporcionan información de seguridad posterior al tratamiento. Los análisis asociados específicamente con cada uno de los tres períodos de tratamiento se realizaron en un subconjunto de la población evaluable de seguridad, incluidos solo aquellos sujetos que recibieron tratamiento de prueba y tienen información de seguridad posterior al tratamiento para el tratamiento específico. Estas subpoblaciones evaluables para la seguridad se identificaron respectivamente como Tratamiento-1-Evaluable, Tratamiento-2-Evaluable o Tratamiento-3-Evaluable.

Para los sujetos que estaban inscritos en el grupo de tratamiento activo en el ensayo anterior, el primer tratamiento RT002 en este ensayo de seguridad abierto fue, de hecho, su segundo tratamiento con RT002. De acuerdo con la exposición previa del sujeto a RT002, se definieron los siguientes dos grupos de resumen para el análisis: Grupo A y grupo B. El primer grupo incluyó a todos los sujetos que recibieron RT002 en el brazo 1 o en el brazo 2 del **ejemplo 7**, y el último grupo incluirá los sujetos restantes del ensayo.

Análisis de seguridad: Todos los eventos adversos (EA) emergentes del tratamiento que ocurrieron durante el ensayo se registraron y clasificaron de acuerdo con la terminología de MedDRA y como se describe en la presente. Un EA se puede definir como cualquier evento médico desfavorable (p. ej., signo, síntoma, enfermedad, síndrome, enfermedad intercurrente, hallazgo de laboratorio anormal clínicamente significativo, lesión o accidente) que emerge o empeora después de la administración del producto en investigación y hasta el final de la participación en el ensayo que no necesariamente tiene una relación causal con la administración del producto en investigación. Por lo tanto, un EA puede ser cualquier signo desfavorable y/o involuntario (incluido un resultado de laboratorio anormal clínicamente significativo), síntoma o enfermedad asociada temporalmente con el uso de un producto en investigación, independientemente de que se considere relacionado con el producto en investigación. Un EA emergente del tratamiento es aquel que ocurre después de cualquier período de exposición al tratamiento. Los EA incluyen cualquier cambio clínicamente significativo en las evaluaciones de seguridad del ensayo (p. ej., signos vitales, evaluación del sitio de inyección, evaluación de los nervios craneales II a VII y evaluación de la fuerza de los músculos faciales) después del tratamiento.

Las condiciones preexistentes, que aumentan en frecuencia o gravedad, o un cambio en la naturaleza como consecuencia del uso de un producto en investigación, también se considerarán eventos

adversos. Un EA inesperado es una reacción adversa, cuya naturaleza o gravedad no es consistente con la información del producto aplicable.

Un evento adverso grave (EAG) es cualquier evento médico desafortunado que resulte en cualquiera de los siguientes resultados: muerte, amenaza de vida, discapacidad/incapacidad persistente o significativa o interrupción sustancial de la capacidad del sujeto para llevar a cabo funciones normales de la vida, requiere hospitalización del paciente o prolonga la hospitalización (es decir, una hospitalización prolongada más allá de la duración esperada de la estadía; anomalía congénita/defecto de nacimiento (es decir, un resultado adverso en un niño o feto de un sujeto expuesto al producto en investigación antes de la concepción o durante el embarazo), no cumple con ninguno de los criterios graves anteriores, pero de acuerdo con el juicio médico apropiado puede poner en peligro al sujeto o requiere atención médica o intervención quirúrgica para prevenir uno de los resultados enumerados anteriormente (es decir, es un evento médico significativo o importante).

Los datos de seguridad recopilados para el período de prueba general se resumieron para la población evaluable para la seguridad. Los resúmenes asociados con cada uno de los tres períodos de tratamiento se realizaron en la subpoblación correspondiente (es decir, Tratamiento-1-Evaluable, Tratamiento-2-Evaluable o Tratamiento-3-Evaluable). Para tener en cuenta la duración variable del seguimiento del sujeto, se calculó la duración total del seguimiento (es decir, años del paciente) para cada período de resumen. Se presentaron estadísticas descriptivas para resumir los datos de seguridad.

Causalidad y gravedad del producto en investigación: La relación de un EA con el producto en investigación se evaluó de la siguiente manera: **Definido** significa que existe una secuencia de tiempo clínicamente plausible entre el inicio del EA y la administración del producto en investigación; cuando el evento responde al retiro del producto en investigación y/o se repite con la readministración del producto en investigación; **Probable** significa que hay una secuencia de tiempo clínicamente plausible entre el inicio del EA y la administración del producto en investigación; es poco probable que el EA sea causado por la enfermedad concurrente/subyacente, otros fármacos o procedimientos; **Posible** significa que puede haber o no una secuencia de tiempo clínicamente plausible entre el inicio del EA y la administración del producto en investigación y no se puede descartar una causa; **No tratado**: significa que no existe una relación temporal o causal con la administración del producto en investigación.

Categoría del EA: **Leve** significa que el evento puede ser notable por sujeto; no influye en las actividades diarias; generalmente no requiere intervención; **moderado** significa que el evento puede ser de gravedad suficiente para incomodar al sujeto; el desempeño de las actividades diarias puede verse influenciado; la intervención puede ser necesaria; **grave** significa que el evento puede causar graves molestias; generalmente interfiere con las actividades diarias; el sujeto puede no ser capaz de continuar en el estudio, generalmente se necesita de tratamiento u otra intervención.

Se resumieron todos los eventos adversos emergentes del tratamiento informados, en términos de la cantidad de sujetos que informaron eventos, clasificación de órganos del sistema, término preferido, gravedad, relación con el fármaco del ensayo y severidad. Al resumir los eventos por causalidad y gravedad, cada sujeto se contó solo una vez dentro de una clase de órgano del sistema o un término

preferido al usar el evento con la mayor relación y la mayor gravedad dentro de cada clasificación. Se proporcionó una lista de EA que conducen a la interrupción prematura del ensayo por parte del sujeto. Los eventos adversos graves (EAG) se enlistaron por tema, resumidos por gravedad y relación con el tratamiento del ensayo. Los resúmenes de EA y EAG se realizaron para el ensayo en general y para cada uno de los tres períodos de tratamiento. Para los EAG y EA clave (tal como los que sugieren una propagación distante de la toxina), se calculó la tasa por inyección y la tasa por paciente-año. Asimismo, se proporcionó un intervalo de confianza del 95 % para la tasa.

Análisis de efectividad: Las medidas del resultado de efectividad, como IGA-FWS, PFWS, GAIS, se evaluaron con el ceño fruncido al máximo y en reposo después del ceño fruncido al máximo a lo largo del tiempo durante el ensayo. Se calcularon las tasas de respuesta y la duración de la respuesta. Los datos de efectividad se resumieron tal como se observaron sin imputación de datos faltantes. Se proporcionaron estadísticas descriptivas para todas las variables de efectividad en todos los puntos de tiempo para el grupo de resumen. Se proporcionaron intervalos de confianza del 95 % y/o valores de p para comparar la diferencia entre los subgrupos de interés (p. ej., mujeres vs. hombres, primer tratamiento frente a segundo tratamiento, etc.) según corresponda. Se trazaron curvas de Kaplan-Meier para los puntos finales del tiempo hasta el evento. Cuando se realizaron comparaciones (p. ej., mujeres vs. hombres, primer tratamiento frente a segundo tratamiento, etc.), las pruebas se realizaron a un nivel significativo de 0.05 sin ajuste por multiplicidad.

Justificación del tamaño de muestra: Este fue un ensayo de seguridad con todos los sujetos tratados con el mismo producto en investigación. El tamaño de muestra de aproximadamente 2,100 se consideró adecuado para evaluar la seguridad basada en varios enfoques. Con aproximadamente 2,100 sujetos siendo tratados en este ensayo, se concluyó que con una confianza del 95 %, la incidencia de un evento desfavorable no es más del 0.15 % cuando no ocurrió tal evento durante el ensayo. Con $n = 2,100$, la precisión (basada en un intervalo de confianza exacto del 95 %) para estimar una incidencia de evento fue como máximo ± 2.22 % cuando la incidencia real es de alrededor del 50 %, o aproximadamente ± 1.0 % cuando la incidencia real está en el rango del 5 %. El tamaño de $n = 2,100$ también tenía una potencia adecuada para evaluar si la incidencia de cierto evento es equivalente a una incidencia fija, por ejemplo, hay una potencia de > 95 % para demostrar que la incidencia es equivalente a 3 % bajo un margen equivalente de 1.5 % y un nivel significativo de 0.05 (basado en dos pruebas unilaterales).

Con al menos 400 de los 2,100 sujetos inscritos que recibieron hasta tres tratamientos, hubo una potencia del 86 % para detectar un aumento en la incidencia desde el primer tratamiento hasta el tercer tratamiento a un nivel significativo de 0.05 (prueba unilateral) cuando la incidencia de eventos aumenta del 3 % en el primer tratamiento al 6 % en el tercer tratamiento. Además, con $n = 400$, el intervalo de confianza exacto del 95 % fue de 1.6 a 5.2 % para una incidencia observada del 3 % y de 3.1 a 7.6 % para una incidencia observada del 5 %.

Puntos finales del estudio

Puntos finales de seguridad: Incidencia, gravedad y relación con el fármaco del ensayo de eventos adversos emergentes del tratamiento durante cada tratamiento y el ensayo en general; e

incidencia, gravedad y relación con el fármaco del ensayo de eventos adversos graves emergentes del tratamiento durante cada tratamiento y el ensayo en general. La población evaluable de seguridad incluye a todos los sujetos expuestos al producto en investigación.

Puntos finales de efectividad: A menos que se especifique lo contrario, todos los puntos finales asociados con IGA-FWS, PFWS o GAIS de aquí en adelante se basaron en evaluaciones con el ceño fruncido al máximo. Cuando corresponda, también se resumieron puntos finales similares basados en evaluaciones en reposo después del ceño fruncido al máximo. Para los puntos finales que se derivan de una comparación con el inicio, se aplicaron por separado dos reglas de derivación que utilizan diferentes puntos de tiempo de referencia como inicio (es decir, inicio del ensayo o inicio del tratamiento). Estos incluyen: tiempo de retratamiento desde el primer tratamiento del ensayo (solo en Tratamiento-1-Evaluable); tiempo hasta el retratamiento desde el segundo tratamiento del ensayo (solo en Tratamiento-2-Evaluable); tiempo de retorno a, empeoramiento respecto al inicio tanto en IGA-FWS como PFWS; tiempo de retorno a 2 o 3 (moderado o severo) en IGA-FWS y PFWS; proporción de sujetos con una mejora de ≥ 2 puntos con respecto al valor inicial tanto en IGA-FWS como en PFWS en cada visita a lo largo del tiempo; proporción de sujetos con una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) en IGA-FWS en cada visita a lo largo del tiempo; proporción de sujetos con una puntuación de 0 o 1 (nula o leve) en PFWS en cada visita a lo largo del tiempo; proporción de sujetos con una mejoría de ≥ 1 punto desde el inicio en IGA-FWS y PFWS en cada visita a lo largo del tiempo; proporción de sujetos con una mejoría de ≥ 1 punto (es decir, mejorado, mucho mejor o muchísimo mejor) en GAIS en cada visita a lo largo del tiempo (con la evaluación del investigador y la autoevaluación del sujeto resumidas por separado); proporción de sujetos con una mejora de ≥ 2 puntos (es decir, mucho mejor o muchísimo mejor) en GAIS en cada visita a lo largo del tiempo (con la evaluación del investigador y la autoevaluación del sujeto resumidas por separado); proporción de sujetos con una mejora de ≥ 3 puntos (es decir, muchísimo mejor) en GAIS en cada visita a lo largo del tiempo (con la evaluación del investigador y la autoevaluación del sujeto resumidas por separado); puntuación media de GAIS en cada visita a lo largo del tiempo (con la evaluación del investigador y la autoevaluación del sujeto resumidas por separado).

Puntos clave de efectividad:

- Proporción de sujetos con una mejora de ≥ 2 puntos desde el inicio en IGA-FWS y PFWS a lo largo del tiempo;
- Proporción de sujetos con una puntuación de 0 o 1 (Nula o Leve) de acuerdo con la evaluación de IGA-FWS y PFWS a lo largo del tiempo;
- Tiempo hasta la pérdida de Nula o Leve en IGA-FWS y PFWS;
- Tiempo de retorno a, empeoramiento respecto al, inicio tanto en IGA_FWS como PWS; y
- Proporción de sujetos con una mejora de ≥ 1 punto en GAIS de acuerdo con la evaluación del investigador y del sujeto a lo largo del tiempo.

Los puntos claves de efectividad se realizaron para el resumen general del ensayo y por período de tratamiento.

Breve comparación con el ejemplo 7: Tanto los investigadores como los sujetos tomaron

capacitación al inicio del ensayo en una Escala de Gravedad de Arrugas validada de 4 puntos para evaluar la severidad de las líneas de expresión glabellares. Al ingreso, se requirió que los sujetos tuvieran una gravedad de arrugas en la línea glabellar de moderada o severa de lo evaluado tanto por el investigador como por el sujeto.

5 **Resultados del ejemplo 8**

Este estudio confirmó el perfil de seguridad establecido en dos estudios fundamentales de fase 3 (**ejemplo 7**), sin nuevos problemas de tolerabilidad o seguridad reportados, y tasas estables o decrecientes de EA después de la administración repetida. Se administraron un total de 3830 tratamientos con RT002 (40 U) a 2691 sujetos en este estudio. No hubo evidencia de EA acumulativos durante 3 ciclos de
10 tratamiento, lo que sugiere que el patrón de seguridad de RT002 se mantuvo estable después de la administración repetida.

Resumen de seguridad: RT002 fue bien tolerado en 3,800 tratamientos en líneas glabellares (ceño fruncido); los eventos adversos fueron leves, localizados y transitorios; la tasa de EA relacionados con el tratamiento disminuyó con los tratamientos sucesivos; la tasa de ptosis palpebral fue inferior al 1 %
15 por tratamiento. Los eventos adversos relacionados con el tratamiento se experimentaron en menos tratamientos (14 %) en el estudio del **ejemplo 8** en 66 sitios de ensayos clínicos, en comparación con los estudios de los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7** (18 %) realizados en 30 sitios.

Resumen de EA: El 39 % de los sujetos experimentaron un evento adverso durante el curso del estudio. En general, la incidencia de EAET no aumentó durante los ciclos de tratamiento sucesivos y la
20 mayoría de los eventos fueron de gravedad leve y la mayoría se consideró que no estaban relacionados con el tratamiento. Los eventos adversos más comunes reportados fueron dolor de cabeza (5.9 % de los sujetos), nasofaringitis (4.3 %), dolor en el lugar de la inyección (3.3 %), eritema en el lugar de la inyección (2.9 %), edema en el lugar de la inyección (2.6 %), eritema (2.4 %) e infección del tracto respiratorio superior (2.0 %). Se produjeron EA graves en el 1.1 % de los sujetos y ninguno estuvo relacionado con el
25 tratamiento.

EA relacionados con el tratamiento: El 18 % de los sujetos informaron eventos adversos que se consideraron relacionados con RT002 o el procedimiento de administración. Los efectos adversos relacionados con el tratamiento fueron generalmente de gravedad leve. Los efectos adversos relacionados con el tratamiento más frecuentes fueron dolor de cabeza (4.6 % de los sujetos), dolor en el lugar de la
30 inyección (3.2 %), eritema en el lugar de la inyección (2.1 %), edema en el lugar de la inyección (2.6 %) y eritema (2.0 %). Porcentajes progresivamente más bajos de sujetos que experimentaron EA relacionados con el tratamiento después de repetir el tratamiento. En los sujetos que recibieron tres tratamientos sucesivos: para el tratamiento 1, el **13.5 %** de los sujetos experimentaron EA relacionados con el tratamiento, para el tratamiento 2, el **4.1 %** de los sujetos experimentaron EA relacionados con el
35 tratamiento; y para el tratamiento 3, el **3.8 %** de los sujetos experimentaron EA relacionados con el tratamiento.

Ptosis palpebral: Se observó una tasa de ptosis palpebral baja del 0.9 % (35 eventos en 3830 tratamientos), y ocurrió en el 1.3 % de los sujetos en 66 sitios. Esto se compara favorablemente con una

tasa de 2.2 % en 405 sujetos tratados en los estudios del **ejemplo 7** en 30 sitios.

Sorprendentemente, la tasa de aparición de ptosis palpebral disminuyó con los ciclos de tratamiento RT002 subsecuentes: para el tratamiento 1, el **1.0 %** de los sujetos experimentaron EA relacionados con el tratamiento; para el tratamiento 2, el **0.8 %** de los sujetos experimentaron EAG relacionados con el tratamiento; y para el tratamiento 3, el **0.7 %** de los sujetos experimentaron EA relacionados con el tratamiento. Todas las ptosis palpebral menos una fueron de presentación unilateral, y la mayoría fueron de gravedad leve y tuvieron una duración media de 45 días.

Resumen de efectividad/eficacia: Este estudio demostró una eficacia que excedía o era comparable a la observada en los dos brazos del estudio del **ejemplo 7** con RT002 a una dosis de 40 U. La eficacia de RT002 fue altamente consistente en múltiples ciclos de tratamiento y múltiples puntos finales que evaluaron tanto las tasas de respuesta como la duración del efecto.

Los resultados de eficacia tanto en el **ejemplo 7** como en el **ejemplo 8** representan las tasas de respuesta más altas y la mayor duración del efecto observado en los ensayos de registro para líneas glabellares moderadas a severas. La efectividad de DAXI (RT002 para estos ensayos clínicos) se mantuvo más allá de un solo tratamiento con una proporción muy alta de sujetos que cumplieron el objetivo de tratamiento Sin arrugas o Arrugas leves tan rápido como en la semana 1. En general, hubo una respuesta superior al 90 % en la semana 1; la eficacia excedió o fue comparable a la observada en el **ejemplo 7**.

Las tasas de respuesta nula o leve aumentaron durante la semana 4 en los 3 ciclos de tratamiento hasta al menos el 95 % de los investigadores en IGA-FWS y el 91 % de los sujetos en PFWS, confirmando la respuesta robusta observada en los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7**. En la semana 4, los sujetos en el **ejemplo 8** lograron una tasa de respuesta superior al 95 % y una tasa de alta respuesta compuesta de 2 puntos, que aumentó con cada ciclo de tratamiento sucesivo: Ciclo de tratamiento 1 = 73.2 %, ciclo de tratamiento 2 = 77.5 % y ciclo de tratamiento 3 = 79.6 %. Los resultados del **ejemplo 8** confirman la alta tasa de respuesta compuesta de 2 puntos observada en la semana 4 en sujetos que participaron en los estudios de los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7** de 73.6 % y 74.0 %, respectivamente.

Resumen de las tasas de respondedores: Los resultados de este estudio representan las tasas de respondedores más altas observadas en los ensayos de registro para líneas glabellares. Una proporción muy alta de sujetos cumplió con los objetivos del tratamiento. En la semana 4, el 95 % de los investigadores y el 91 % de los sujetos calificaron al sujeto como que no tenía líneas glabellares o tenía líneas glabellares leves (en las escalas IGA-FWS PFWS, respectivamente) en todos los ciclos de tratamiento. Además, el 99 % de los investigadores y el 97 % de los sujetos informaron una mejora en las líneas glabellares en la semana 4 en todos los ciclos de tratamiento en GAIS. Más del 70 % de los investigadores y más del 60 % de los sujetos informaron que mantenían una mejoría en la semana 24 en los ciclos 1 y 2. Además, la proporción de sujetos que cumplieron con el punto final de respuesta compuesta de 2 puntos exigido por la FDA fue comparable con los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7**, con tasas de respondedores de 73.2 %, 77.5 % y 79.6 % en la semana 4 en los ciclos de tratamiento 1, 2 y 3, respectivamente.

La dosis repetida de RT002 fue efectiva, con una duración prolongada del efecto y altas tasas de respuesta que aumentaron a lo largo del tiempo, en sujetos que recibieron 3 tratamientos (n = 340):

- mejora de 2 puntos IGA: 73.2 % / 77.7 % / 79.6 %
- Puntuaciones nulas o leves de IGA: 95.8 % / 96.6 % / 97.7 %

Resumen de la duración del efecto: Los resultados del **ejemplo 8** confirman la larga duración del beneficio clínico observado con la dosis de 40 U de RT001 en los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7** demuestran consistencia en los ciclos de tratamiento. El tiempo medio de retorno al inicio de la gravedad de la línea glabellar fue de 28 semanas en los ciclos de tratamiento 1 y 2 y también es consistente a lo largo del tiempo necesario para perder el efecto del tratamiento completo observado en los estudios fundamentales de los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7**. El tiempo medio hasta la pérdida de la gravedad de arrugas nulas o leves fue de 24 semanas en los ciclos de tratamiento 1 y 2 del **ejemplo 8**, de acuerdo con lo evaluado por el investigador y el sujeto e idéntico a la duración del beneficio clínico se observa en los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7**.

La duración del efecto en los subgrupos de Edad y Exposición Previa a la Toxina fue similar o mayor que la población general del **ejemplo 8**, lo que demuestra la previsibilidad y la consistencia de RT002 en el tratamiento de las líneas glabellares. Por edad: el tiempo para volver a la gravedad inicial de las arrugas en sujetos de 65 años o más fue de 31 semanas, en comparación con 28 semanas para sujetos de menos de 65 años y para la población general del **ejemplo 8**. Los sujetos de 65 años o mayores experimentaron el mismo tiempo hasta la pérdida de gravedad nula o leve de las arrugas con una duración media de 24 semanas que aquellos sujetos menores a 65 años y la población general del **ejemplo 8**. Por exposición previa a toxinas: El tiempo medio para volver a la gravedad inicial de las arrugas fue de 28 semanas y el tiempo medio hasta la pérdida de gravedad nula o leve de las arrugas fue de 24 semanas, independientemente de la exposición previa a BoNTA en el momento del tratamiento con RT002.

Resumen de consistencia: La seguridad, la eficacia y la duración excedieron o fueron comparables a las observadas en el **ejemplo 7**; perfil consistente con los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7** y otros neuromoduladores aprobados; se observó una duración prolongada del efecto en todos los grupos de tratamiento; incluyendo la edad y la experiencia en el tratamiento con toxinas.

Conclusiones: Este estudio evaluó la eficacia y seguridad a largo plazo de múltiples tratamientos de RT002 para el tratamiento de líneas glabellares (GL) moderadas a severas. El intervalo entre cada tratamiento fue de al menos 12 semanas con una duración máxima del tratamiento de 36 semanas. El estudio proporciona hasta 84 semanas de datos de seguimiento y una exposición más extensa al fármaco del estudio que los ensayos del **ejemplo 7**. Este estudio es el primer estudio a largo plazo de RT002 que imita la administración repetida a lo largo del tiempo en un entorno clínico. Se inscribieron un total de 2691 sujetos, con 1033 sujetos que recibieron múltiples tratamientos (hasta 3).

Las altas tasas de respuesta y la larga duración del efecto se observaron después del tratamiento único y se mantuvieron durante varios tratamientos en este estudio, reafirmando los resultados observados en los estudios de tratamiento único del **ejemplo 7** en un estudio más amplio, con una selección más amplia de sitios clínicos.

La eficacia robusta observada en los estudios de tratamiento único del **ejemplo 7** se mantuvieron con tratamientos sucesivos con RT002 y no se observaron nuevos problemas de seguridad, mientras que

la incidencia de los EA relacionados con el tratamiento disminuyó con los tratamientos sucesivos. Este estudio demostró que hasta 3 tratamientos de líneas glabellares con RT002 durante 84 semanas fueron bien tolerados, y que más del 95 % de los pacientes alcanzaron el objetivo de tratamiento de gravedad nula o leve, con duración del efecto, definida como la mediana del tiempo hasta la pérdida de respuesta nula o leve, que dura 24 semanas.

Detalles adicionales de los resultados del estudio son como sigue.

Este estudio incluyó a casi 2,700 sujetos, cumpliendo un punto de referencia de al menos 2,100 tratamientos individuales y 500 tratamientos triples.

Disposición de sujetos: véase **tabla 33** y **tablas 34A a 34B**.

Tabla 33

Disposición	N (%)
Número de sujetos inscritos	2,691
Número de sujetos que completaron el estudio	2,314 (86.0 %)
Número de sujetos que interrumpieron el estudio	377 (14.0 %)
Razones para interrupción	
Retiro de los sujetos	196 (7.3 %)
Pérdida de seguimiento	99 (3.7 %)
Desviación del protocolo	53 (2.0 %)
Otro	15 (0.6 %)
Discreción del investigador	8 (0.3 %)
Eventos adversos	5 (0.2 %)
Muerte*	1 (0.40 %)

*Secundario al homicidio

Tabla 34A

	Total en el ejemplo 8
Número de sujetos	2,691
Tratamiento de RT002 40 U recibido en Ej. 8	
Ciclo de tratamiento #1	2,380
Ciclo de tratamiento #2	882
Ciclo de tratamiento #3	568
Número de tratamientos totales	3,830

Tabla 34B

		Elegibilidad de tratamiento de RT002 U en el ejemplo 8			Total
		Uno*	Dos†	Tres*	
5	Número de sujetos	1658	477	556	
Tratamiento de RT002 40 U recibido en Ej. 8					
	Ciclo de tratamiento #1	1658	477	556	
	Ciclo de tratamiento #2	—	362	437‡	
	Ciclo de tratamiento #3	—	—	340	
10	Número de tratamientos totales	1658	839	1333	3830

*Sujetos de novo; †Sujetos del ejemplo 7, brazos 1 y 2; ‡51 sujetos fueron elegibles para recibir el tratamiento 3 debido al mantenimiento del efecto del tratamiento en la semana 36.

Datos demográficos comparados con el ejemplo 7: La población del tratamiento fue similar a los de los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7**, véase la **tabla 35** y la **tabla 36**.

Tabla 35

	Ej. 7 Brazos 1 y 2 agrupados (N=405)	Todos los sujetos (N=2691)
Mujeres, n (%)	357 (88.1 %)	2383 (88.6 %)
Edad (años), media (DE) rango [mín., máx.]	50.2 (1.46) [21,74]	49.5 (11.27) [21, 86]
Raza		
Blanca	353 (87.2 %)	2407 (89.4 %)
Negra/Afroamericana	19 (4.7 %)	129 (4.8 %)
Asiática	18 (4.4 %)	73 (2.7 %)
Otro	15 (3.7 %)	83 (3.0 %)
Etnia		
Hispanica/Latina	66 (16.2 %)	516 (19.2 %)
No hispanica/Latina	339 (83.5 %)	2175 (80.8 %)

Tabla 36

	Ej. 7 Brazos 1 & 2 Agrupados (N=405)	Ej. 8 (N=2691)
BoNT-A* previa, n (%)	213 (52.6)	1074 (39.9 %)
Meses desde el último rango medio (DE) de BoNT-A*	27.4 (1.59) [7, 205]	34.9 (41.78) [0.2, 320]
PFWS con el ceño fruncido al máximo		
Moderada	226 (55.8)	1482 (55.1 %)
Grave	179 (44.2 %)	1208 (44.9 %)

IGA-FWS con el ceño fruncido al máximo		
Moderada	252 (62.2 %)	1651 (61.4 %)
Grave	153 (37.8 %)	1040 (38.6 %)

5

Resultados de seguridad: Resumen de eventos adversos en comparación con el **ejemplo 7**:

La mayoría de los EA fueron de gravedad leve y no se produjeron efectos adversos relacionados con el tratamiento en ningún ensayo del **ejemplo 7** y el **ejemplo 8**. Véase, **tabla 37**.

Tabla 37

10

15

20

	Ej. 7 brazos 1 y 2 agrupados (N=406) n (%)	Ej. 8 (N=2691) n (%)
Muerte*	0	1 (< 0.1 %)
EA graves (EAG)	4 (1.0 %)	29 (1.1 %)
Sujetos con cualquier EA	166 (40.9)	1043 (38.8 %)
Leve	124 (30.5 %)	739 (27.5 %)
Moderada	36 (8.9 %)	267 (9.9 %)
Grave	6 (1.5 %)	37 (1.4 %)
Sujetos con cualquier EA que lleva a la interrupción del estudio	0	5 (0.2 %)
Eventos adversos relacionados con el tratamiento**		
Sujetos con cualquier EA relacionado con el tratamiento	78 (19.2 %)	480 (17.8 %)
AEG relacionado con el tratamiento	0	0

* Secundario al homicidio; **Considerado por el investigador como posiblemente, probable o definitivamente relacionado con el tratamiento.

25

La **tabla 38** muestra eventos adversos independientemente de la causalidad (≥ 2 %) en comparación con el **ejemplo 7**.

Tabla 38

30

35

Término preferido	Ej. 7 brazos 1 y 2 agrupados (N=406) n (%)	Ej. 8 (N=2691) n (%)
Dolor de cabeza	37 (9.1 %)	158 (5.9 %)
Nasofaringitis	17 (4.1 %)	119 (4.4 %)
Dolor en el sitio de inyección	15 (3.6 %)	105 (3.9 %)
Eritema en el sitio de inyección	5 (1.2 %)	90 (3.3 %)
Edema en el sitio de inyección	5 (1.2 %)	76 (2.8 %)
Eritema	1 (0.2 %)	56 (2.1 %)
Infección del tracto respiratorio superior	11 (2.7 %)	55 (2.0 %)

La **tabla 39A a 39B** y la **tabla 40** muestran eventos adversos relacionados con el tratamiento (≥ 1 %) en comparación con el **ejemplo 7**. Como se muestra en la **tabla 39A**, la tasa de EA relacionados con

el tratamiento fue baja y disminuyó con tratamientos sucesivos en el estudio del **ejemplo 8**.

Tabla 39A

5	Preferido Término	Ej. 7 Brazos 1&2 Agrupados (N=406), n (%)	Ej. 8 (N=2691) n (%)	Tratamientos con RT002 40 U en el Ej. 8		
				Uno (n=2380) n (%)	Dos (n=882) n (%)	Tres (n=568) n (%)
	Cualquier EA relacionado con el tratamiento	78 (19.2 %)	480 (17.8 %)	400 (16.8 %)	86 (9.8 %)	40 (7.0 %)
	Dolor de cabeza	26 (6.4 %)	124 (4.6 %)	102 (4.3 %)	13 (1.5 %)	12 (2.1 %)
10	Dolor en el sitio de inyección	15 (3.7 %)	98 (3.6 %)	81 (3.4 %)	18 (2.0 %)	7 (1.2 %)
	Eritema en el sitio de inyección	5 (1.2 %)	81 (3.0 %)	64 (2.7 %)	22 (2.5 %)	8 (1.4 %)
	Edema en el sitio de inyección	6 (1.5 %)	76 (2.8 %)	56 (2.7 %)	21 (2.4 %)	9 (1.6 %)
15	Ptosis palpebral*	9 (2.2 %)	33 (1.2 %)	23 (1.0 %)	7 (0.8 %)	4 (0.7 %)

*29 (85 %) casos de gravedad leve, 5 (15 %) casos de gravedad moderada. Tiempo medio de resolución - 45 días.

Tabla 39B

20	Término preferido		Ej. 7 Brazos 1 & 2 Agrupados (N=406) n (%)		Ej. 8 (N=2691) n (%)	
	Dolor de cabeza		26 (6.4 %)		124 (4.6 %)	
	Dolor en el sitio de inyección		15 (3.7 %)		98 (3.6 %)	
	Eritema en el sitio de inyección		5 (1.2 %)		81 (3.0 %)	
25	Edema en el sitio de inyección		6 (1.5 %)		76 (2.8 %)	
	Ptosis palpebral*		9 (2.2 %)		34 (1.3 %)	
	Estudio general		Tratamiento con RT002 40 U			
			Ciclo Uno (n=2380)	Ciclo Dos (n=882)	Ciclo Tres (n=568)	Total (n=3830)
	Ptosis palpebral*		23 (1 %)	7 (0.8 %)	4 (0.7 %)	34 (0.9 %)

*29 (85 %) casos de gravedad leve, 5 (15 %) casos de gravedad moderada. Tiempo medio de resolución - 45 días.

Tabla 40

35	Término preferido	Ej. 7 brazos 1 y 2 agrupados (N=406) n (%)	Ej. 8 General (N=2591) n (%)	Uno (n=2380)	Dos (n=882)	Tres (n=568)	Total (n=3830)
	Dolor de cabeza	26 (6.4 %)	124 (4.6 %)	102 (4.3 %)	13 (1.5 %)	12 (2.1 %)	127 (3.3 %)
	Dolor en el sitio de inyección	15 (3.7 %)	98 (3.6 %)	81 (3.4 %)	18 (2.0 %)	7 (1.2 %)	106 (2.7 %)

Eritema en el sitio de inyección	5 (1.2 %)	81 (3.0 %)	64 (2.7 %)	22 (2.5 %)	8 (1.4 %)	94 (2.5 %)
Edema en el sitio de inyección	6 (1.5 %)	76 (2.8 %)	56 (2.7 %)	21 (2.4 %)	9 (1.6 %)	86 (2.2 %)
Ptosis palpebral*	9 (2.2 %)	33 (1.2 %)	22 (0.9 %)	7 (0.8 %)	4 (0.7 %)	33 (0.8 %)

La **tabla 41** muestra los EA en los ciclos de tratamiento entre los sujetos que recibieron los tres tratamientos (n = 340).

Tabla 41

	Ciclo de tratamiento de RT002 40 U		
Estudio general	Uno	Dos	Tres
Cualquier evento adverso	116 (34.1 %)	89 (34 %)	53 (15.6 %)
Evento adverso por gravedad			
Leve	85 (25.0 %)	56 (16.5 %)	36 (10.6 %)
Moderada	28 (8.2 %)	31 (9.1 %)	17 (5.0 %)
Grave	3 (0.9 %)	2 (0.6 %)	0
EA relacionado con el tratamiento*	13.5 %	4.1 %	3.8 %
Término preferido (> 2 %)			
Dolor de cabeza	16 (4.7 %)	3 (0.9 %)	2 (0.6 %)
Eritema	8 (2.4 %)	2 (0.6 %)	0
Edema	7 (2.1 %)	2 (0.6 %)	0

*Considerado por el investigador como posiblemente, probable o definitivamente relacionado con el tratamiento.

Resultados de eficacia: Las **figuras 24A a 24B** representan la proporción de sujetos que mantienen una mejoría en las líneas glabellares en la semana 4 en los estudios. La **figura 24A** representa la proporción de sujetos que logran ≥ 2 puntos de respuesta compuesta con el ceño fruncido al máximo en la semana 4 en los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7** y el **ejemplo 8**. Como se muestra, la respuesta compuesta de 2 puntos fue comparable entre los estudios y tratamientos. Además, RT002 mejoró significativamente la apariencia de la gravedad de la línea glabellar, y la respuesta al tratamiento aumentó durante los ciclos de tratamiento sucesivos. La **figura 24B** representa sujetos que alcanzan al menos una puntuación de +1 en las puntuaciones de GAIS de Investigadores y Sujetos en la semana 4 en los estudios de fase 3 del **ejemplo 7**, brazos 1 & 2, y el **ejemplo 8**.

La **tabla 42A y tabla 42B** muestran el porcentaje de sujetos en el **ejemplo 7** y el **ejemplo 8** que tienen puntuaciones de arrugas de “nula” o “leve” en respuesta al tratamiento en varios puntos de tiempo después del tratamiento, de acuerdo con lo evaluado por IGA-FWS y PFWS. Como se muestra, se observaron tasas de respuesta robustas en las medidas clave para resultado nulo/leve.

Tabla 42A**Evaluación del investigador (IGA-FWS)**

5	SEMANA	Ej. 7 Brazos 1 y 2 agrupa- dos (%) n= 406	Ej. 8 Tratamiento		
			UNO (%) n=2380	DOS (%) n=882	TRES (%) n=568
10	1	93.8	91.8	91.5	92.3
	2	95.8	96.6	93.9	96.1
	4	97.5	95.8	96.6	97.7
	8	93.1	91.6	92.2	93.7
15	12	86.2	81.2	83.9	84.5
	16	72.6	67.6	59.4	—
	20	53.8	50.3	45.2	—
	24	32.3	34.0	32.7	—
35	28	15.1	22.6	20.9	—
	32	7.7	15.0	10.4	—
	36	4.0	7.3	4.8	—

Tabla 42B**Evaluación del paciente (PFWS)**

5	SEMANA	Ej. 7 Brazos 1 y 2 agrupa- dos (%) n= 406	Ej. 8 Tratamiento		
			UNO (%) n=2380	DOS (%) n=882	TRES (%) n=568
10	1	96.4	85.1	87.2	85.4
	2	91.9	92.0	90.0	92.1
	4	91.1	91.6	92.3	93.1
	8	84.9	82.4	83.0	85.0
15	12	72.1	68.4	69.7	74.3
	16	55.3	52.5	44.6	—
	20	40.2	36.6	34.8	—
	24	22.7	26.5	22.9	—
35	28	11.1	18.8	16.0	—
	32	5.7	12.7	8.5	—
	36	1.7	7.2	3.4	—

La **figura 25A** y la **figura 25B** representa estos datos gráficamente, mostrando el porcentaje de sujetos en el **ejemplo 7** y el **ejemplo 8** que tienen puntuaciones de arrugas “nula” o “leve” en respuesta al tratamiento en varios puntos temporales después del tratamiento, de acuerdo con lo evaluado por IGA-FWS (**figura 25A**) y PFWS (**figura 25B**). Como se muestra, los resultados fueron consistentes en ambos casos entre los estudios y los ciclos.

La **figura 26A** y la **figura 26B** describe el porcentaje en el **ejemplo 7** y el **ejemplo 8** versus al tiempo después del tratamiento para la pérdida de puntuaciones “nulas” o “leves” tanto en IGA-FWS como en PFWS (**figura 26A**); y de pérdida para volver al inicio tanto en IGA-FWS como en PFWS (**figura 26B**). Como se muestra en la **figura 26A**, la duración media de 24 semanas se logró para el tiempo hasta la pérdida de la gravedad de las arrugas nula/leve en los ciclos de tratamiento uno y dos del **ejemplo 8** (es decir, después del primer y segundo tratamientos con RT002), confirmando el tiempo hasta la pérdida de puntuaciones nulas/leves en los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7**. Como se muestra en la **figura 26B**, la mediana de la duración de 28 semanas se logró para el tiempo de retorno al inicio en los ciclos de tratamiento uno y dos del **ejemplo 8** (es decir, después del primer y segundo tratamiento con RT002), confirmando el tiempo de retorno al inicio en los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7**.

La **figura 27A** y la **figura 27B** representa el porcentaje de sujetos en el **ejemplo 8** que muestra una respuesta evaluada por la GAIS del sujeto (P-GAIS) con el ceño fruncido al máximo (**figura 27A**) o por la GAIS del investigador (I-GAIS) con el ceño fruncido al máximo (**figura 27B**), a lo largo del tiempo después del tratamiento. La respuesta es una puntuación mayor o igual a 1.

Fotografías: La **figura 28A** y la **figura 28B** representan fotografías de sujetos que ejemplifican los resultados discutidos de este estudio. La **figura 28A** representa un ejemplo de mejora de 2 puntos de

acuerdo con IGA-FWS y PFWS en la semana 4, con una duración sostenida del efecto hasta la semana 16; y una mejora de 1 punto restante en la semana 24. **La figura 28B** representa otro ejemplo de mejora de 2 puntos de acuerdo con IGA-FWS y PFWS en la semana 4, con una duración de efecto prolongada hasta la semana 16; y una mejora de 1 punto restante en la semana 24.

5 **Análisis de subgrupos:** La **figura 29** y la **figura 30** proporcionan información adicional sobre la respuesta por subgrupo.

La **figura 29** representa la mediana del tiempo hasta la pérdida de puntuaciones nulas o leves tanto en IGA-FWS como en PFWS por subgrupo. Como se muestra, la duración del tratamiento de 24 semanas se logró independientemente de la edad y la experiencia previa con toxinas.

10 La **figura 30** representa el tiempo medio para volver al inicio tanto en IGA-FWS como en PFWS por subgrupo. Como se muestra, la duración del tratamiento de 28 semanas se logró en sujetos menores a 65 años, independientemente de la experiencia previa con toxinas, con una duración prolongada a 31.4 semanas en los mayores a 65 años.

15 **Resumen general:** En este estudio, 2,691 pacientes fueron tratados con RT002 sin nuevos problemas de seguridad o tolerabilidad, con un perfil de seguridad consistente con estudios previos en el **ejemplo 5** y el **ejemplo 7**. En total, se administraron 3,830 inyecciones de RT002 40 U en el estudio del **ejemplo 8**. En particular, se observó una tasa baja de ptosis palpebral, es decir, 0.9 % (35 eventos en 3,830 tratamientos), y ocurrió en el 1.3 % de los sujetos en 66 sitios. Esto se compara con la tasa de 2.2 % en 405 sujetos tratados en los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7** en 30 sitios.

20 El **ejemplo 8** demostró una eficacia que excedía o era comparable a la observada en los ensayos pivotales de los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7** y 3 estudios pivotales con RT002 a una dosis de 40 U. Los resultados del **ejemplo 8** confirman la larga duración del beneficio clínico observado con la dosis de 40 U de RT002 en los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7** y demuestran consistencia en los ciclos de tratamiento. El tiempo medio hasta la pérdida de gravedad nula o leve de las arrugas fue de 24 semanas tanto en el ciclo de tratamiento 1 como en el ciclo de tratamiento 2 en el **ejemplo 8**, de acuerdo con lo evaluado tanto por el investigador como por el sujeto. Esto es idéntico a la duración del beneficio clínico observado en los brazos 1 y 2 del **ejemplo 7**. El tiempo medio para volver a la gravedad inicial de las líneas glabellares fue de 28 semanas en los ciclos de tratamiento 1 y 2 y también es consistente a lo largo del tiempo necesario para perder el efecto del tratamiento completo observado en los ensayos de los brazos 1 y 2 controlados con placebo del **ejemplo 7**.

30