



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0619134-7 B1



(22) Data do Depósito: 01/12/2006

(45) Data de Concessão: 10/12/2019

(54) Título: NANOEMULSÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, COMPOSIÇÃO, MÉTODOS COSMÉTICOS PARA O TRATAMENTO DE RUGAS, LINHAS FACIAIS E/OU LINHAS DO PESCOÇO, E DE RETARDAR O INÍCIO DAS RUGAS, LINHAS FACIAIS E/OU LINHAS DO PESCOÇO, E, MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE UMA NANOEMULSÃO

(51) Int.Cl.: A61K 8/06; A61K 8/64; A61Q 19/08.

(52) CPC: A61K 8/06; A61K 8/64; A61Q 19/08; A61K 2800/413; A61K 2800/91.

(30) Prioridade Unionista: 01/12/2005 US 60/741,139.

(73) Titular(es): UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS LOWELL.

(72) Inventor(es): ROBERT NICOLosi; JONATHAN EDELSON.

(86) Pedido PCT: PCT US2006046236 de 01/12/2006

(87) Publicação PCT: WO 2008/045107 de 17/04/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/06/2008

(57) Resumo: NANOEMULSÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA TRANSDERMICAMENTE A UM INDIVÍDUO, DE TRATAMENTO DE, E DE RETARDAR O INÍCIO DAS, RUGAS, LINHAS FACIAIS E/OU LINHAS DO PESCOÇO, E DE FABRICAÇÃO DE UMA NANOEMULSÃO. A forma de realização aqui descrita se relaciona com as nanoemulsões compreendendo toxinas botulínicas. Em uma forma de realização, as nanoemulsões são preparadas pela microfluidificação com pressão elevada e compreendem uma distribuição do tamanho de partícula exclusivamente entre 10 e 300 nm. As nanoemulsões contempladas pela presente invenção são úteis para o tratamento cosmético e médico das condições de contratura muscular. Por exemplo, a toxina botulínica pode relaxar os músculos faciais tal que as rugas da pele se tomem mais lisas e menos perceptíveis. Além disso, a presente invenção contempla uma formulação cosmética que pode ser auto-administrada, por exemplo, na privacidade do lar e sem supervisão médica.

NANOEMULSÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, COMPOSIÇÃO, MÉTODOS COSMÉTICOS PARA O TRATAMENTO DE RUGAS, LINHAS FACIAIS E/OU LINHAS DO PESCOÇO, E DE RETARDAR O INÍCIO DAS RUGAS, LINHAS FACIAIS E/OU LINHAS DO PESCOÇO, E, MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE UMA NANOEMULSÃO

Pedidos Relacionados

[001] O presente pedido é relacionado e reivindica a prioridade sob 35 USC 119(e) para USSN 60/741.139, depositado em 01 de dezembro de 2005 (o pedido '139); os conteúdos inteiros do pedido '139 são aqui incorporados por referência.

Fundamentos

[002] A toxina botulínica tem sido utilizada na dermatologia cosmética para tratar uma variedade de condições e distúrbios da pele. Por exemplo, a toxina botulínica tem sido usada para tratar rugas (por exemplo, linhas faciais hipercinéticas), faixas da platisma, faixas décolleté, hiperidrose, e certos distúrbios neuromusculares. Tipicamente, a toxina botulínica é liberada por injeção dentro do local de interesse (isto é, no grupo muscular pertinente responsável pela ruga ou formação de faixa; na pele contendo glândulas sudoríparas; etc).

[003] Infelizmente, as estratégias correntes para a liberação da toxina botulínica geram numerosos efeitos adversos. Por exemplo, técnicas de injeção impróprias podem danificar o tecido e/ou podem liberar toxina botulínica em locais não premeditados e/ou indesejáveis. Na região periocular, ptose da pálpebra e sobrelance são efeitos adversos importantes. Dor, hematoma, equimose e contusão também podem ocorrer.

[004] Embora técnicas (por exemplo, esfriamento da pele antes da injeção para reduzir a dor, hematoma, equimose e contusão) tenham sido desenvolvidas as quais podem minimizar certos efeitos colaterais, permanece uma necessidade para o desenvolvimento de sistemas e/ou formulações

melhoradas para a liberação da toxina botulínica.

Sumário da Invenção

[005] A presente invenção fornece composições de nanopartícula (por exemplo, nanoemulsões) contendo toxina botulínica. Tais composições são úteis, por exemplo, em várias aplicações cosméticas e médicas. Em algumas formas de realização da invenção, as composições de nanopartícula botulínicas são utilizadas para suavizar as rugas. Em algumas formas de realização da invenção, as composições de nanopartícula botulínicas são utilizadas para tratar a hiperidrose. Em algumas formas de realização da invenção, as composições de nanopartícula botulínicas são utilizadas para tratar a contratura e/ou superatividade muscular. Outros usos das composições de nanopartícula botulínicas da invenção são aqui descritas e/ou serão evidentes para uma pessoa de habilidade usual na técnica.

[006] Em algumas formas de realização da presente invenção, as composições de nanopartícula botulínicas são preparadas mediante a exposição às forças de cisalhamento elevadas em algumas formas de realização, as composições de nanopartícula botulínicas são preparadas pela microfluidificação; em algumas formas de realização, as composições de nanopartícula botulínicas são preparadas pela homogeneização de alta pressão.

[007] As composições de nanopartícula botulínicas da invenção podem ser administradas por qualquer meio disponível incluindo, mas não limitado a eles, transdermicamente e por injeção (por exemplo, injeção intravenosa, subcutânea ou intramuscular). A presente invenção abrange a descoberta de que certas composições de nanopartícula de toxina botulínica podem ser liberadas transdermicamente sem mudar ou alterar a estrutura da pele. Por exemplo, agentes abrasivos ou agentes que desgastam ou deterioram a camada superficial da pele não são requeridos para obter a liberação transdérmica de toxina botulínica de acordo com a presente invenção. Assim,

em muitas formas de realização, a liberação transdérmica da toxina botulínica é executada sem irritação significativa da pele.

[008] De acordo com a presente invenção, a liberação transdérmica pode ser executada em qualquer uma de uma variedade de formatos. Em algumas formas de realização, uma composição de nanopartícula botulínica da invenção é incorporada dentro de um creme de tal modo que a toxina botulínica seja administrada a um indivíduo mediante a aplicação do crema na pele. Em algumas formas de realização, uma composição de nanopartícula botulínica da invenção é incorporada dentro de um emplastro transdérmico de tal modo que a toxina botulínica seja administrada a um indivíduo a partir do emplastro.

[009] Em algumas formas de realização, as composições de nanopartícula botulínicas da invenção são emulsões contendo uma população de partículas tendo diâmetros máximos e mínimos, em que a diferença entre os diâmetros máximos e mínimos não excede a cerca de 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, ou menos nm.

[010] Em algumas formas de realização, as partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições de nanopartícula botulínicas da invenção possuem diâmetros que são menores do que cerca de 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 130, 120, 115, 110, 100, 90, 80 nm, ou menos.

[011] Em algumas formas de realização, as partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições de nanopartícula botulínicas da invenção possuem diâmetros dentro da faixa de cerca de 10 e cerca de 600 nanômetros. Em algumas formas de realização, as partículas dentro das composições de nanopartícula botulínicas da invenção possuem diâmetros dentro da faixa de cerca de 10 a 300, 10 a 200, 10 a 150, 10 a 130, 10 a 120, 10 a 115, 10 a 110, 10 a 100 ou 10 a 90 nm.

[012] Em algumas formas de realização, as partículas (por exemplo,

partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições de nanopartícula botulínicas da invenção possuem um tamanho médio de partícula que está abaixo de cerca de 300, 250, 200, 150, 130, 120 ou 115, 110, 100 ou 90 nm. Em algumas formas de realização, o tamanho médio de partícula está dentro da faixa de cerca de 10 a 300, 50 a 250, 60 a 200, 65 a 150, 70 a 130 nm. Em certas formas de realização, o tamanho médio de partícula é de cerca de 80 a 110 nm. Em algumas formas de realização, o tamanho médio de partícula é de cerca de 90 a 100 nm.

[013] Em algumas formas de realização, uma maioria das partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições da invenção possui diâmetros abaixo de um tamanho específico ou dentro de uma faixa específica. Em algumas formas de realização, a maioria é mais do que 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% ou mais das partículas na composição.

[014] Em certas formas de realização, as composições de nanopartícula da invenção são substancialmente livres de partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) tendo diâmetros maiores do que cerca de 120 nanômetros. Em algumas formas de realização, as partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições de nanopartícula botulínicas da invenção possuem diâmetros dentro da faixa de cerca de 30 e cerca de 115 nanômetros. Em algumas formas de realização, a maioria das partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro da composição possui diâmetros dentro desta faixa; em certas formas de realização, tais composições são substancialmente livres de partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) tendo diâmetros maiores do que cerca de 115 nanômetros. Em algumas formas de realização, as partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições de nanopartícula botulínicas da invenção possuem diâmetros dentro da faixa de cerca de 30 a cerca de 70 nanômetros. Em certas formas de realização, a

maioria das partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro de tais composições possui diâmetros dentro desta faixa; em algumas formas de realização as composições são substancialmente livres de partículas com diâmetros maiores do que cerca de 70 nanômetros.

[015] Em algumas formas de realização, as composições de nanopartícula botulínicas da invenção possuem pelo menos duas populações distintas de partículas. Por exemplo, em algumas de tais formas de realização, uma maioria das partículas nas composições de nanopartícula da invenção possui diâmetros dentro da faixa de cerca de 30 a 70 nm, enquanto uma segunda população de partículas possui diâmetros dentro da faixa de 70 a 120 nm. Em algumas de tais formas de realização, a composição não é contaminada com partículas maiores do que 120 nm de diâmetro.

[016] Em certas formas de realização, a toxina botulínica está presente parcial ou inteiramente dentro das nanopartículas nas composições de nanopartícula botulínicas da invenção; em algumas formas de realização, a toxina botulínica é adsorvida na superfície das nanopartículas nas composições botulínicas da invenção; em certas formas de realização, a toxina botulínica é associada com a interface entre as nanopartículas e o meio de dispersão. Em algumas formas de realização, a toxina botulínica é observada em dois ou mais destes locais dentro da composição de nanopartícula.

[017] Em algumas formas de realização da invenção, a toxina botulínica é selecionada do grupo consistindo do tipo A, tipo B, tipo C₁, tipo C₂, tipo D, tipo E e tipo G. Em certas formas de realização, a toxina botulínica está presente como uma proteína isolada; em algumas formas de realização, a toxina botulínica está presente como parte de um complexo de proteína.

[018] Este pedido se refere às várias publicações de patente, todas das quais são aqui incorporadas por referência.

Definições

[019] Abrasão: O termo “abrasão”, como aqui usado, se refere a qualquer meio de alterar, romper, remover ou destruir a camada superior da pele. Em algumas formas de realização, a abrasão se refere a um meio mecânico de alterar, romper, remover ou destruir a camada superior da pele. Em certas formas de realização, abrasão se refere a um meio químico de alterar, romper, remover ou destruir a camada superior da pele. Para fornecer mais alguns exemplos, agentes tais como esfoliantes, partículas finas (por exemplo, partículas de magnésio ou alumínio), ácidos (por exemplo, ácidos alfa-hidróxi ou ácidos beta-hidróxi), álcoois, podem causar abrasão. Em geral, intensificadores da penetração tais como aqueles descritos, por exemplo, por Donovan (por exemplo, Publicações US 2004/009180 e 2005/175636, e PCT Publication WO 04/06954), e Graham (por exemplo, Patente U.S. nº 6.939.852 e US Publication 2006/093624), etc., são esperados de causar abrasão. Naturalmente, aqueles de habilidade usual na técnica observarão que um agente particular pode causar abrasão quando presente em uma concentração, ou em associação com um ou mais de outros agentes, mas não pode causar abrasão sob circunstâncias diferentes. Assim, quer sim quer não um material particular é um “agente abrasivo” dependendo do contexto. A abrasão pode facilmente ser avaliada por aqueles de habilidade usual na técnica, por exemplo, mediante a observação de vermelhidão ou irritação da pele e/ou exame histológico da pele apresentando alteração, rompimento, remoção ou erosão do estrato córneo.

[020] Administração: O termo “administração”, como aqui usado se refere à liberação de uma composição de nanopartícula da invenção em um indivíduo, não é limitado a qualquer via de administração particular, mas se refere a qualquer via de administração aceita como apropriada pela comunidade médica. Por exemplo, a presente invenção contempla vias de liberação ou administração que incluem, mas não são limitados a elas,

transdérmicas, intramusculares ou subcutâneas. Em certas formas de realização da invenção, a administração é transdérmica.

[021] Agente biologicamente ativo: Como aqui usado, a frase “agente biologicamente ativo” se refere a qualquer substância que tenha atividade em um sistema e/ou organismo biológico. Por exemplo, uma substância que, quando administrada a um organismo e possui um efeito biológico sobre o organismo, é considerada ser biologicamente ativa. Nas formas de realização particulares, onde uma proteína ou polipeptídeo é biologicamente ativo, um parte desta proteína ou polipeptídeo que compartilha pelo menos uma atividade biológica da proteína ou polipeptídeo é tipicamente referida como uma parte “biologicamente ativa”. A toxina botulínica é um agente biologicamente ativo de acordo com a presente invenção.

[022] Composição de nanopartícula botulínica: O termo “composição de nanopartícula botulínica” como aqui usado, se refere a qualquer composição de nanopartícula em que pelo menos uma nanopartícula inclui uma toxina botulínica. A toxina botulínica pode estar presente dentro da nanopartícula, na superfície da nanopartícula e/ou dentro de uma membrana micelar que define a nanopartícula.

[023] Toxina botulínica: O termo “toxina botulínica”, como aqui usado, se refere a qualquer neurotoxina produzida pelo *Clostridium botulinum*. Exceto quando de outra maneira indicada, o termo abrange fragmentos ou partes (por exemplo, a cadeia leve e/ou a cadeia pesada) de tal neurotoxina que retêm atividade apropriada (por exemplo, atividade de relaxante muscular). A frase “toxina botulínica”, como aqui usada, abrange os sorotipos de toxina botulínica A, B, C, D, E, F e G. A toxina botulínica, como aqui usada, também abrange igualmente um complexo de toxina botulínica (isto é, por exemplo, os complexos de 300, 600 e 900 kD) assim como a toxina botulínica purificada (isto é, por exemplo, isolada) (isto é, por

exemplo, ao redor de 150 kD). A “toxina botulínica purificada” é definida como uma toxina botulínica que é isolada, ou substancialmente isolada, de outras proteínas, incluindo a proteína que está como um complexo de toxina botulínica. Uma toxina purificada pode ser mais do que 95% de pureza, e preferivelmente é mais do que 99% de pureza. Aqueles de habilidade usual na técnica observarão que a presente invenção não é limitada a qualquer fonte particular de toxina botulínica. Por exemplo, a toxina botulínica para uso de acordo com a presente invenção pode ser isolada de *Clostridium botulinum*, pode ser quimicamente sintetizada, pode ser produzida recombinantemente (isto é, em uma célula hospedeira ou organismo diferente de *Clostridium botulinum*), etc.

[024] Produto cosmético: O termo “produto cosmético”, como aqui usado, se refere a qualquer agente (por exemplo, peróxido de benzoíla ou retinol) que possua propriedades tanto cosméticas quanto farmacêuticas. Um produto cosmético é geralmente útil para aplicações externas para melhorar o complexo ou a aparência física global. Os produtos cosméticos podem ser aplicados como composições incluindo, mas não são limitados a eles, cremes, óleos, espumas, pulverizações, líquidos etc. Para fornecer mais alguns exemplos, carotenóides, compostos fenólicos e/ou antioxidantes solúveis em água podem atuar como produtos cosméticos.

[025] Formulação cosmética: O termo “formulação cosmética” é aqui usado para se referir a uma composição topicamente aplicada que contém um ou mais agentes tendo propriedades cosméticas. Para fornecer mais alguns exemplos, uma formulação cosmética pode ser um amaciante de pele, emulsão tipo loção de nutrição, loção de limpeza, creme de limpeza, suco leitoso de pele, loção emoliente, creme de massagem, creme emoliente, base de maquiagem, batom, emplastro facial ou gel facial, formulação limpadora tal como xampus, enxágües, limpadores de corpo, tônicos capilares ou sabões, e/ou uma composição dermatológica tal como uma loção,

ungüento, gel, creme, emplastro e/ou pulverização.

[026] Creme: O termo “creme” refere-se a uma composição dispersável, tipicamente formulada para aplicação na pele. Os cremes tipicamente contêm uma matriz com base em óleo e/ou ácido graxo. Os cremes formulados de acordo com a presente invenção podem conter nanopartículas e podem ser capazes de penetração substancialmente completa (por exemplo, de tais nanopartículas) através da pele após a administração. Um tal creme pode também atuar como um portador para materiais incorporados (por exemplo, para uma toxina botulínica).

[027] Meio de dispersão: O termo “meio de dispersão” como aqui usado, se refere a um meio líquido em que as partículas (por exemplo, nanopartículas) são dispersas. Em geral, uma dispersão é formada quando pelo menos dois materiais imiscíveis são combinados. Uma dispersão de “óleo em água” é aquela em que partículas oleosas são dispersas dentro de um meio de dispersão aquoso. Uma dispersão de água em óleo é aquela em que as partículas aquosas são dispersas dentro de um meio de dispersão oleoso. Aqueles de habilidade usual na técnica observarão que uma dispersão pode ser formada de qualquer um de dois meios imiscíveis e não é limitada estritamente às combinações de meios aquosos e oleosos. O termo “meio de dispersão” portanto se aplica amplamente à qualquer meio de dispersão apesar de que é comum se referir às categorias “aquosas” e “oleosas”.

[028] Encapsulado: O termo “encapsulado” (também “encapsular” ou “encapsulação”) é aqui usado para significar que a entidade encapsulada é completamente circundada por um outro material. Para fornecer mais exemplo, um agente biologicamente ativo (por exemplo, toxina botulínica) pode ser encapsulado dentro de uma nanopartícula em uma emulsão da invenção. Tal encapsulação pode ser obtida, por exemplo, durante a formação de uma composição de nanopartícula (por exemplo, nanoemulsão), por exemplo, durante a microfluidificação.

[029] Em conjunto com: Como aqui usada, a frase proferida “em conjunto com” se refere à co-liberação de dois ou mais objetos. Em particular, de acordo com a presente invenção, a frase é aqui usada em referência à liberação de um agente biologicamente ativo com nanopartículas da invenção e/ou composições de nanopartícula. Uma substância ou agente é liberado em conjunto com as nanopartículas quando a substância ou agente for combinado com as nanopartículas e/ou composições de nanopartícula; for encapsulado ou completamente circundado pelas nanopartículas; for associado com uma interface de nanopartícula; e/ou for adsorvido na superfície externa de uma nanopartícula. Uma substância ou agente a ser liberado em conjunto com as nanopartículas e/ou composições de nanopartícula pode ou não pode ser covalentemente ligada às nanopartículas e/ou composições de nanopartícula. Uma substância ou agente a ser liberado em conjunto com as nanopartículas e/ou composições de nanopartícula pode ou não pode ser ligada às nanopartículas e/ou composições de nanopartícula mediante às forças de adsorção. Em muitas formas de realização da presente invenção, o agente biologicamente ativo liberado em conjunto com uma nanopartícula ou composição de nanopartícula é a toxina botulínica.

[030] Microfluidificado: O termo “microfluidificado” é de uma forma geral aqui usado para descrever as composições que foram expostas à força de cisalhamento elevada. Em algumas formas de realização da invenção, as composições foram processadas por um instrumento ou um dispositivo conhecido como um “microfluidificador”. No entanto, em seu amplo sentido, o termo abrange qualquer composição que foi exposta à força de cisalhamento elevada por qualquer meio. Por exemplo, a força de cisalhamento elevada pode ser administrada por cavitação ou por homogeneização e alta pressão. Alternativa ou adicionalmente, a força de cisalhamento elevada pode ser mediante a exposição em pressão elevada, por exemplo, cerca de 15.000 psi (103,4 MPa). Em algumas formas de realização, tal pressão elevada está

dentro da faixa de cerca de 18.000 a cerca de 26.000 (124,1 a 179,3 MPa); em algumas formas de realização, está dentro da faixa de cerca de 20.000 a 25.000 psi (137,9 a 172,4 MPa). Como indicado, a força de cisalhamento elevado pode ser administrada pela passagem através de um instrumento tal como, por exemplo, um Microfluidizer[®] Processor (Microfluidics Corporation/MFIC Corporation) ou outro dispositivo semelhante. Os Microfluidizer[®] Processors fornecem alta pressão e uma taxa de cisalhamento elevada resultante mediante a aceleração do produto através de microcanais em uma alta velocidade para a redução do tamanho para a faixa de nanoescala. O fluido é dividido em dois e é empurrado através de microcanais com dimensões típicas na ordem de 75 microns em altas velocidades (na faixa de 50 a 300 m/s). Quando o fluido sai dos microcanais forma jatos que colidem com os jatos dos microcanais opostos. Nos canais o fluido experimenta o cisalhamento elevado (até 10^7 1/s) que está em ordens de magnitude mais elevadas do que aquelas das tecnologias convencionais. As colisões de jato resultam na mistura em nível submicron. Portanto, o cisalhamento elevado e o impacto são responsáveis pela redução do tamanho de partícula e mistura de fluidos de múltiplas fases na tecnologia de Microfluidizer[®]. Em algumas formas de realização da presente invenção, uma amostra é “microfluidificada” através da exposição às forças de cisalhamento elevadas durante um período de tempo menor do que cerca de 10 minutos. Em algumas formas de realização, o período de tempo é menor do que cerca de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 minuto(s). Em certas formas de realização, o período de tempo está dentro da faixa de cerca de 1 a 2 minutos ou menos; em algumas formas de realização, o período de tempo é de cerca de 30 segundos. Em algumas formas de realização da invenção, uma amostra é “microfluidificada” através de uma exposição única às forças de cisalhamento elevadas; tais formas de realização são referidas aqui como microfluidificação de “passagem única”.

[031] Nanoemulsão: Uma emulsão é tradicionalmente definida na técnica “como um sistema ... consistindo de um líquido disperso com ou sem um emulsificante em um líquido imiscível geralmente em gotículas de tamanho maior do que a coloidal” Medline Plus Online Medical Dictionary, Merriam Webster (2005). O termo “nanoemulsão”, como aqui usado, se refere a uma emulsão em que pelo menos algumas das gotículas (ou partículas) possuem diâmetros na faixa de tamanho nanômetro. Como ficará entendido por aqueles de habilidade usual na técnica, uma nanoemulsão é caracterizada por gotículas ou partículas mil vezes menores do que as gotículas ou partículas da microemulsão.

[032] Nanopartícula: Como aqui usado, o termo “nanopartícula” se refere a qualquer partícula tendo um diâmetro de menos do que 1000 nanômetros (nm). Em certas formas de realização, uma nanopartícula possui um diâmetro de menos do que 300 nm, como definido pela National Science Foundation. Em algumas formas de realização, uma nanopartícula possui um diâmetro de menos do que 100 nm como definido pelos National Institutes of Health. Aqueles de habilidade usual na técnica observarão que, o termo “nanopartícula” como aqui usado descreve a fase dispersa em uma dispersão ou emulsão.

[033] Composição de nanopartícula: Como aqui usado, o termo “composição de nanopartícula” refere-se a qualquer composição que inclui pelo menos uma nanopartícula. Em algumas formas de realização, uma composição de nanopartícula é uma coleção uniforme de nanopartículas. As composições de nanopartícula aqui descritas são tipicamente emulsões ou dispersões. Em certas formas de realização, uma composição de nanopartícula é estável. Em algumas formas de realização, uma composição de nanopartícula inclui um ou mais agentes biologicamente ativos a serem liberados em conjunto com as nanopartículas. Em certas formas de realização, a composição de nanopartícula é uma nanoemulsão. Será observado por

aqueles de habilidade usual na técnica que uma composição de nanopartícula pode ser preparada de acordo com qualquer meio disponível incluindo, por exemplo, meios químicos ou mecânicos. Em algumas formas de realização da presente invenção, uma composição de nanopartícula é preparada por submeter uma amostra à microfluidificação. Em algumas formas de realização da invenção, uma composição de nanopartícula é preparada sem o uso de solventes tóxicos e/ou é substancialmente livre de solventes tóxicos.

[034] Não contaminado com: A frase “não contaminado com”, quando aqui usado para se referir à uma composição de nanopartícula, é sinônimo com “substancialmente livre de” e descreve uma composição de nanopartícula não contendo mais do que cerca de 50% do material recitado. Por exemplo, se uma composição de nanopartícula for dita ser “substancialmente livre de” partículas cujo diâmetro está fora de uma faixa determinada, então não mais do que cerca de 50% das partículas nesta composição possuem diâmetros fora da faixa. Em algumas formas de realização, não mais do que 25% das partículas estão fora da faixa. Em certas formas de realização, não mais do que 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% ou menos das partículas possuem diâmetros fora da faixa determinada.

[035] Farmaceuticamente aceitável: O termo “farmaceuticamente aceitável” como aqui usado, se refere aos agentes que, dentro do escopo do julgamento médico seguro, são adequados para uso em contato com os tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, proporcional com uma relação de benefício/risco razoável.

[036] Pré-mistura: O termo “pré-mistura” como aqui usado, se refere a qualquer combinação de componentes que seja usada para gerar uma composição de nanopartícula ou de acordo com a presente invenção. Por exemplo, uma pré-mistura é qualquer coleção de ingredientes que, quando

submetida à força de cisalhamento elevada, gera nanopartículas de acordo com a presente invenção. Em algumas formas de realização, uma pré-mistura é uma coleção de ingredientes que, quando submetida à força de cisalhamento elevada, gera uma composição de nanopartícula tal como uma composição de nanopartícula uniforme. Uma pré-mistura freqüentemente contém um meio líquido de dispersão e outros componentes suficientes para gerar nanopartículas dentro do meio de dispersão. De acordo com a presente invenção, a toxina botulínica pode também ser incluída na pré-mistura. A pré-mistura também pode conter um ou mais tensoativos e/ou outros agentes. Em certas formas de realização, a pré-mistura constitui uma solução. Em algumas formas de realização em que a pré-mistura inclui a toxina botulínica e/ou um outro agente biologicamente ativo, a toxina botulínica (e/ou outro agente biologicamente ativo) está em solução antes da força de cisalhamento elevada ser aplicada na pré-mistura.

[037] Refratário: O termo “refratário” como aqui usado, se refere a qualquer indivíduo que não responde com uma eficácia clínica esperada seguinte a liberação de um agente biologicamente ativo ou composição farmacêutica como normalmente observado pela equipe médica em exercício.

[038] Auto-administração: O termo “auto-administração”, como aqui usado, refere-se à situação onde um indivíduo possui a capacidade de administrar uma composição a si mesmo sem requerer supervisão médica. Em algumas formas de realização da invenção, a auto-administração pode ser executada fora de um cenário clínico. Para fornecer mais um exemplo, em algumas formas de realização da invenção, um creme cosmético facial pode ser administrado por um indivíduo em sua própria casa.

[039] Molécula Pequena: Em geral, uma “molécula pequena” é entendida na técnica de ser uma molécula orgânica que é menor do que cerca de 5 quilodaltons (Kd) de tamanho. Em algumas formas de realização, a molécula pequena é menor do que cerca de 3 Kd, 2 Kd ou 1 Kd. Em certas

formas de realização, a molécula pequena é menor do que cerca de 800 daltons (D), 600 D, 500 D, 400 D, 300 D, 200 D ou 100 D. Em algumas formas de realização, as moléculas pequenas são não poliméricas. Em certas formas de realização, as moléculas pequenas não são proteínas, peptídeos ou aminoácidos. Em algumas formas de realização, as moléculas pequenas não são sacarídeos ou polissacarídeos.

[040] Estável: O termo “estável”, quando aplicado aqui nas composições de nanopartícula, significa que as composições mantêm um ou mais aspectos de sua estrutura física (por exemplo, faixa e/ou distribuição de tamanho das partículas) durante um período de tempo. Em algumas formas de realização da invenção, uma composição de nanopartícula estável é aquela para a qual o tamanho médio de partícula, o tamanho máximo de partícula, a faixa de tamanhos de partícula, e/ou a distribuição de tamanhos de partícula (isto é, a porcentagem de partículas acima de um tamanho designado e/ou fora de uma faixa designada de tamanhos) é mantida durante um período de tempo. Em certas formas de realização, o período de tempo é pelo menos cerca de uma hora; em algumas formas de realização o período de tempo é de cerca de 5 horas, 10 horas, um (1) dia, uma (1) semana, duas (2) semanas, um (1) mês, dois (2) meses, três (3) meses, quatro (4) meses, cinco (5) meses, seis (6) meses, oito (8) meses, dez (10) meses, doze (12) meses, vinte e quatro (24) meses, ou mais longo. Em algumas formas de realização, o período de tempo está dentro da faixa de cerca de um (1) dia a vinte e quatro (24) meses, duas (2) semanas a doze (12) meses, dois (2) meses a cinco (5) meses, etc. Por exemplo, se uma população de partículas de nanoemulsão for submetida à armazenagem prolongada, às mudanças de temperatura e/ou às mudanças no pH e uma maioria das nanopartículas na população mantiver um diâmetro dentro de uma faixa determinada (isto é, por exemplo, entre aproximadamente 10 a 120 nm), a nanoemulsão é estável. Para algumas de tais populações, uma maioria é mais do que cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% ou mais. Em certas formas de realização da invenção, onde uma composição de nanopartícula compreende a toxina botulínica e/ou pelo menos um outro agente biologicamente ativo, a composição de nanopartícula é considerada estável se a concentração de agente biologicamente ativo (por exemplo, toxina botulínica) for mantida na composição durante o período designado de tempo sob uma faixa designada de condições.

[041] Indivíduo: O termo “indivíduo” como aqui usado, se refere a qualquer animal a qual uma composição de nanopartícula da invenção possa ser liberada ou administrada. Por exemplo, um indivíduo pode ser um ser humano, cachorro, gato, vaca, porco, cavalo, camundongo, rato, gerbo, hamster etc. Em muitas formas de realização da presente invenção, o indivíduo é um ser humano.

[042] Sintomas são reduzidos: De acordo com a presente invenção, os “sintomas são reduzidos” quando um ou mais sintomas de uma doença, distúrbio ou condição particular são reduzidos em magnitude (por exemplo, intensidade) ou frequência. Para os propósitos de clareza, um retardo no início de um sintoma particular é considerado uma forma de reduzir a frequência do sintoma. Para fornecer mais alguns exemplos, onde a condição em questão for rugas faciais, os sintomas desta condição são reduzidos quando a profundidade e/ou gravidade de uma ou mais rugas na área selecionada for reduzida. Onde a condição em questão for a contratura muscular, os sintomas são reduzidos quando o músculo se torna menos tenso e mais flácido. Não é planejado que a presente invenção seja limitado apenas aos casos onde os sintomas são eliminados. A presente invenção especificamente contempla o tratamento tal que um ou mais sintomas é/são reduzidos (e a condição do indivíduo é desse modo “melhorada”), embora não completamente eliminados.

[043] Quantidade terapeuticamente eficaz: Como aqui usado, o

termo “quantidade terapeuticamente eficaz” significa uma quantidade que é suficiente, quando administrada a um indivíduo que sofre ou suscetível a uma doença, distúrbio e/ou condição, para tratar a doença, distúrbio e/ou condição. Aqueles de habilidade usual na técnica observarão que o termo “quantidade terapeuticamente eficaz” de fato não exige que o tratamento bem sucedido seja alcançado em um indivíduo particular. Mais exatamente, uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser aquela quantidade que fornece uma resposta farmacológica desejada quando administrada ou liberada em um número significativo de indivíduos com necessidade de tal tratamento. Fica especificamente compreendido que os indivíduos particulares podem, de fato, ser “refratários” à uma “quantidade terapeuticamente eficaz”. Para fornecer mais um exemplo, um indivíduo refratário pode ter uma biodisponibilidade baixa tal que a eficácia clínica não seja obtida. Em algumas formas de realização, referência à uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser uma referência à uma quantidade como medida em um ou mais tecidos específicos.

[044] Solvente tóxico: Como aqui usado, o termo “solvente tóxico” se refere a qualquer substância que possa alterar, romper, remover ou destruir um tecido de animal. Como deve ficar entendido por uma pessoa de habilidade usual na técnica, um tecido de animal pode incluir células vivas, células mortas, matriz extracelular, conexões celulares, moléculas biológicas, etc. Para fornecer mais alguns exemplos, os solventes tóxicos incluem sulfóxido de dimetila, dimetil acetimida, dimetil foramida, clorofórmio, tetrametil foramida, acetona, acetatos e alcanos.

[045] Tratamento: com aqui usado, o termo “tratamento” (também “tratar” ou “tratando”) se refere a qualquer administração de um agente biologicamente ativo que parcial ou completamente alivia, melhora, alivia, atrasa o início, reduz a gravidade e/ou reduz a incidência de um ou mais sintomas ou aspectos de uma doença, distúrbio e/ou condição particular (por exemplo, rugas faciais). Tal tratamento pode ser de um indivíduo que não

apresenta sinais da doença distúrbio e/ou condição pertinente e/ou de um indivíduo que apresenta apenas sinais precoces da doença, distúrbio e/ou condição. Alternativa ou adicionalmente, tal tratamento pode ser de um indivíduo que apresenta um ou mais sinais estabelecidos da doença, distúrbio e/ou condição pertinente.

[046] Uniforme: O termo “uniforme”, quando aqui usado em referência à uma composição de nanopartícula, se refere à uma composição de nanopartícula em que as nanopartículas individuais possuem uma faixa específica de tamanhos de diâmetro médio. Por exemplo, em algumas formas de realização, uma composição de nanopartícula uniforme é aquela em que a diferença entre o diâmetro mínimo e o diâmetro máximo não excede a aproximadamente 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50 ou menos nm. Em certas formas de realização, as partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições de nanopartícula botulínicas uniformes da invenção possuem diâmetros que são menores do que cerca de 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 130, 120, 115, 110, 100, 90, 80 nm, ou menos. Em algumas formas de realização, as partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições de nanopartícula botulínicas uniformes da invenção possuem diâmetros dentro da faixa de cerca de 10 e cerca de 600 nanômetros. Em algumas formas de realização, as partículas dentro das composições de nanopartícula botulínicas uniformes da invenção possuem diâmetros dentro da faixa de cerca de 10 a 300, 10 a 200, 10 a 150, 10 a 130, 10 a 120, 10 a 115, 10 a 110, 10 a 100 ou 10 a 90 nm. Em algumas formas de realização, as partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições de nanopartícula botulínicas da invenção possuem um tamanho médio de partícula que está abaixo de cerca de 300, 250, 200, 150, 130, 120 ou 115, 110, 100 ou 90 nm. Em algumas formas de realização, o tamanho médio de partícula está dentro da faixa de cerca de 10 a 300, 50 a 250, 60 a

200, 65 a 150, 70 a 130 nm. Em certas formas de realização, o tamanho médio de partícula é de cerca de 80 a 110 nm. Em algumas formas de realização, o tamanho médio de partícula é de cerca de 90 a 100 nm. Em algumas formas de realização, uma maioria das partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições de nanopartícula uniformes da invenção possui diâmetros abaixo de um tamanho específico ou dentro de uma faixa específica. Em algumas formas de realização, a maioria é mais do que 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% ou mais das partículas na composição. Em certas formas de realização da invenção, uma composição de nanopartícula uniforme é obtida pela microfluidificação de uma amostra.

Breve Descrição dos Desenhos

[047] A Figura 1 mostra uma forma de realização de uma distribuição do diâmetro de partícula de uma nanoemulsão de toxina botulínica microfluidificada.

[048] A Figura 2 mostra uma forma de realização de uma distribuição de diâmetro de partícula de microemulsão de toxina botulínica homogeneizada.

[049] A Figura 3 mostra um paciente que tenta a elevação máxima da sobrancelha antes (Painel A) e duas semanas após (Painel B) da administração tópica de uma composição da invenção compreendendo a composição de nanopartícula botulínica.

Descrição de Certas Formas de realização Preferidas

[050] A presente invenção diz respeito às composições de nanoemulsão de toxina botulínica úteis para tratamentos cosméticos e médicos. Entre outras coisas, a presente invenção fornece sistemas para a produção de composições de nanopartícula que compreendem a toxina botulínica, e ainda fornece métodos de uso de tais composições em vários contextos. Em uma forma de realização, um tratamento médico alivia a

contratura e/ou a superatividade muscular; em uma outra forma de realização, um tratamento médico alivia a hiperidrose. Em uma forma de realização, um tratamento cosmético suaviza as rugas da pele. Em uma forma de realização, uma nanoemulsão de toxina botulínica é preparada pela microfluidificação. A administração de nanoemulsões de toxina botulínica pode ser executada por métodos incluindo, mas não limitados a eles, injeção intramuscular ou aplicação tópica transdérmica.

Biologia da Toxina Botulínica

[051] A toxina botulínica (BTX) é produzida na natureza pela bactéria gram positiva anaeróbica *Clostridium botulinum* e é uma neurotoxina de polipeptídeo potente. Mais notavelmente, a BTX causa uma enfermidade neuroparalítica em seres humanos e animais, referida como botulismo. A BTX pode aparentemente passar desocupada através do revestimento do intestino e atacar os neurônios motores periféricos. Os sintomas de intoxicação por toxina botulínica pode progredir da dificuldade de caminhar, engolir e falar até a paralisia dos músculos respiratórios, e morte.

[052] A BTX-A é o agente biológico natural mais letal conhecido pelo homem. A LD₅₀ em camundongos Swiss Webster fêmeas (18 a 20 g) para BTX-A comercialmente disponível é de cerca de 50 picogramas; esta quantidade é definida como Unidade 1 de BTX-A. Em uma base molar, a BTX-A é de cerca de 1,8 bilhão de vezes mais letal do que a difteria, cerca de 600 milhões de vezes mais letal do que o cianeto de sódio, cerca de 30 milhões de vezes mais letal do que a toxina de cobra e cerca de 12 milhões de vezes mais letal do que a cólera (Singh, et al., ed., “Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins” Natural Toxins II, pp. 63-84, Plenum Press, New York, 1996).

[053] Os sorotipos diferentes de toxina botulínica variam nas espécies animais que eles afetam e na gravidade e duração da paralisia que eles invocam. Por exemplo, foi determinado que a BTX-A seja 500 vezes

mais potente do que a BTX-B, como medido pela taxa de paralisia produzida no rato. Adicionalmente, a BTX-B foi determinada ser não tóxica em primatas em uma dose de 480 U/kg, que é de cerca de 12 vezes a LD₅₀ do primata com relação a BTX-A. Além disso, é sabido que a toxina botulínica tipo B possui, após a injeção intramuscular, uma duração mais curta de atividade e é também menos potente do que a BTX-A no mesmo nível de dose.

[054] A toxina botulínica aparentemente se liga com afinidade elevada aos neurônios motores colinérgicos, é translocada para dentro do neurônio e bloqueia a liberação de acetilcolina.

[055] As toxinas botulínicas foram usadas em ambientes clínicos para o tratamento de certos distúrbios neuromusculares. Em particular, a BTX-A foi aprovada pela U.S. Food and Drug Administration para o tratamento de blefaroespasmos, estrabismo, e espasmo hemifacial. Os sorotipos de toxina botulínica não tipo A aparentemente possuem uma potência mais baixa e/ou duração mais curta de atividade quando comparados com a BTX-A. Os efeitos clínicos da BTX-A intramuscular periférica são geralmente vistos dentro de uma semana de injeção. A duração típica do alívio sintomático de uma injeção intramuscular de BTX-A em média é ao redor de três meses.

[056] Embora todos os sorotipos de toxina botulínica aparentemente inibem a liberação da acetilcolina neurotransmissora na conexão neuromuscular, eles o fazem por afetar diferentes proteínas neurosecretórias e/ou clivar estas proteínas em diferentes locais. Por exemplo, os tipos botulínicos A e B ambos clivam a proteína associada sinaptossomal de 25 quilodalton (kD) (SNAP-25), mas eles atingem diferentes seqüências de aminoácido dentro desta proteína. Os tipos de toxina botulínica B, D, F e G atuam na proteína associada com a vesícula (VAMP, também chamada de sinaptobrevina), com cada sorotipo clivando a proteína em um local diferente.

Finalmente, a toxina botulínica tipo C₁ foi mostrada de clivar tanto a syntaxina quanto a SNAP-25. Estas diferenças no mecanismo de ação podem afetar a potência relativa e/ou duração da ação dos vários sorotipos de toxina botulínica. Significativamente, é sabido que o citosol das células B das ilhotas pancreáticas contém pelo menos SNAP-25 (Biochem J 1;339 (pt 1):159-65 (Abril 1999)), e sinaptobrevina (Mov Disord 1995 Maio; 10(3): 376).

[057] O peso molecular da molécula de proteína da toxina botulínica, para todos os sete dos sorotipos de toxina botulínica conhecidos, é de cerca de 150 kD. De maneira interessante, as toxinas botulínicas são liberadas pela bactéria Clostridial como complexos compreendendo a molécula da proteína de toxina botulínica 150 kD junto das proteínas de não toxina associadas. Assim, o complexo de BTX-A pode ser produzido pela bactéria Clostridial como formas de 900 kD, 500 kD e 360 kD. Os tipos de toxina botulínica B e C₁ são aparentemente produzidos como apenas um complexo de 500 kD. A toxina botulínica tipo D é produzida como complexos tanto 300 kD quanto 500 kD. Finalmente, os tipos de toxina botulínica E e F são produzidos como apenas complexos de aproximadamente 300 kD.

[058] Os complexos BTX (isto é, aquelas composições tendo pesos moleculares maiores do que cerca de 150 kD) são supostos de conter uma proteína hemaglutinina não toxina e uma proteína não hemaglutinina não toxina e não tóxica. Estas duas proteínas de não toxinas (que junto da molécula de toxina botulínica compreendem o complexo de neurotoxina pertinente) podem atuar para fornecer estabilidade contra a desnaturação da molécula de toxina botulínica e proteção contra os ácidos digestivos quando a toxina for ingerida. Adicionalmente, é possível que os maiores complexos de toxina botulínica (maior do que cerca de 150 kD de peso molecular) podem resultar em uma taxa mais lenta de difusão da toxina botulínica longe de um local de injeção intramuscular de um complexo de toxina botulínica.

[059] As proteínas e BTX ou os complexos de BTX podem ser

utilizados de acordo com a presente invenção. De fato, será observado por aqueles de habilidade usual na técnica que qualquer parte ou fragmento de uma proteína ou complexo de BTX que retenha a atividade apropriada pode ser utilizada como aqui descrito.

[060] Os estudos in vitro têm indicado que a toxina botulínica inibe a liberação induzida por cátion de potássio tanto da acetilcolina quanto da norepinefrina das culturas de célula primária do tecido do tronco cerebral. Adicionalmente, foi relatado que a toxina botulínica inibe a liberação invocada tanto de glicina quanto de glutamato nas culturas primárias dos neurônios da medula espinhal e que nas preparações sinaptossomas cerebrais a toxina botulínica inibe a liberação de cada um dos neurotransmissores acetilcolina, dopamina, norepinefrina, CGRP e glutamato.

[061] Como observado acima, a fonte de toxina botulínica não é crítica para a presente invenção. Para os propósitos de perfeição, no entanto, observamos que uma variedade de fontes, incluindo fontes comerciais, para certas preparações de toxina botulínica está facilmente disponível.

[062] Por exemplo, a BTX ou o complexo de BTX pode ser obtido pelo estabelecimento e desenvolvimento de culturas de *Clostridium botulinum* em um fermentador e depois colheita e purificação da mistura fermentada de acordo com os procedimentos conhecidos. Todos os sorotipos de toxina botulínica são inicialmente sintetizados como proteínas de cadeia única inativas que devem ser clivadas ou marcadas por proteases para se tornarem neuroativas. As cepas bacterianas que produzem os sorotipos de toxina botulínica A e G possuem proteases endógenas e os sorotipos A e G podem, portanto, ser recuperados das culturas bacterianas em sua forma predominantemente ativa. Ao contrário, os sorotipos de toxina botulínica C₁, D e E são sintetizados por cepas não proteolíticas e são, portanto, tipicamente inativados quando recuperados da cultura. Os sorotipos B e F são produzidos por cepas tanto proteolíticas quanto não proteolíticas e, portanto, podem ser

recuperados na forma ativa ou inativa. No entanto, mesmo as cepas proteolíticas que produzem, por exemplo, o sorotipo BTX-A, tipicamente apenas clivam uma parte da toxina produzida. A proporção exata de moléculas marcadas para não marcadas pode depender do comprimento da incubação e da temperatura da cultura. Portanto, uma certa porcentagem de qualquer preparação de, por exemplo, a toxina BTX-A, é provável de ser inativa. A presença de moléculas de toxina botulínica inativas em uma preparação clínica contribuirá para a carga de proteína total da preparação, que foi ligada em algumas preparações de toxina botulínica comercialmente disponíveis para aumentar a antigenicidade, sem contribuir com a sua eficácia clínica.

[063] A toxina botulínica cristalina de alta qualidade tipo A pode ser produzida da cepa Hall A de *Clostridium botulinum* com características de $\geq 3 \times 10^7$ U/mg, um A_{260}/A_{278} de menos do que 0,60 e um modelo distinto de coligação em eletroforese de gel. O processo conhecido Schantz pode ser usado para obter a toxina botulínica cristalina incluindo o tipo A (Shantz et al., 1992, Microbiol. Ver., 56:80).

[064] Geralmente, o complexo de toxina botulínica pode ser isolado e purificado a partir de uma fermentação anaeróbica mediante o cultivo de *Clostridium botulinum* (por exemplo, tipo A) em um meio adequado. O processo conhecido pode ser usado, após a separação das proteínas de não toxinas, para obter as toxinas botulínicas puras, tais como, por exemplo: toxina botulínica purificada tipo A com um peso molecular de aproximadamente 150 kD com uma potência específica de $1-2 \times 10^8$ LD₅₀ U/mg ou maior; toxina botulínica purificada tipo B com um peso molecular de aproximadamente 156 kD com uma potência específica de $1-2 \times 10^8$ LD₅₀ U/mg ou maior, e; toxina botulínica purificada tipo F com um peso molecular de aproximadamente 155 kD com uma potência específica de $1-2 \times 10^7$ LD₅₀ U/mg ou maior.

[065] Alternativa ou adicionalmente, as toxinas botulínicas e complexos de toxina anteriormente preparados e purificados podem ser obtidos de, por exemplo, List Biological Laboratories, Inc., Campbell, Calif.; the Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, U.K.; Wako (Osaka, Japão) assim como da Sigma Chemicals of St Louis, Mo.

[066] A toxina botulínica pura, quando administrada como uma solução livre, é tão instável que geralmente não é utilizada para se preparar uma composição farmacêutica. Além disso, os complexos de toxina botulínica, tais como o complexo tipo A de toxina, podem também ser suscetíveis à desnaturação devido à desnaturação superficial, calor e condições alcalinas. Em alguns casos, a toxina inativada forma proteínas toxóides que podem ser imunogênicas. Os anticorpos resultantes podem tornar um paciente refratário à injeção de toxina.

[067] Em algumas formas de realização, a presente invenção fornece composições de nanopartícula de toxina botulínica (por exemplo, nanoemulsões) em que a toxina botulínica possui estabilidade melhorada quando comparada com as soluções livres correntemente administrada. Isto é, em algumas formas de realização, a toxina botulínica presente em uma composição de nanopartícula da invenção é protegida, pelo menos em parte, de pelo menos uma condição adversa tal como calor, condições alcalinas, condições ácidas, enzimas de degradação, anticorpos de organismo hospedeiro, etc. Alternativa ou adicionalmente, a toxina botulínica presente nas composições de nanopartícula da invenção pode apresentar menos desnaturação superficial do que uma preparação comparável diferente de toxina botulínica em solução livre. Para fornecer mais um exemplo específico, 50 picogramas de uma toxina botulínica dentro de uma nanoemulsão microfluidificada de acordo com a presente invenção serão protegidos de certas condições adversas, etc que podem resultar na desnaturação superficial.

[068] De fato, um aspecto da presente invenção abrange o

reconhecimento de que a toxina botulínica pode ser estabilizada mediante a incorporação em uma composição de nanopartícula. Aqueles de habilidade usual na técnica facilmente observarão que uma composição de nano partícula de acordo com este aspecto da presente invenção pode ser preparada por qualquer meio disponível.

[069] A presente invenção ainda fornece composições de nanopartícula de toxina botulínica (por exemplo, nanoemulsões) em que a toxina botulínica possui capacidade melhorada de penetrar a pele quando comparada com as soluções livres correntemente administradas. Por exemplo, a toxina botulínica incorporada dentro de uma nanoemulsão microfluidificada de acordo com a presente invenção possui propriedades de permeabilidade da membrana melhoradas quando comparada com tais soluções livres. Em uma forma de realização, o tempo mínimo entre a administração e o acúmulo intracelular resulta em um método de administração tendo eficácia melhorada e efeitos colaterais diminuídos.

[070] Além do mais, como aqui demonstrado, a presente invenção fornece composições de nanopartícula de toxina botulínica das quais a toxina botulínica pode atravessar a pele sem requerer alteração ou rompimento das estruturas da pele. Por exemplo, as tecnologias comercialmente disponíveis para administração transdérmica de agentes biologicamente ativos tradicionalmente requerem rompimento químico, físico, elétrico ou outro de pelo menos a camada externa da pele. Tal rompimento pode causar irritação, efeitos colaterais médicos indesejáveis, e/ou resultados estéticos indesejáveis. A presente invenção fornece composições de nanopartícula de toxina botulínica que, quando administradas na pele, não significativa ou perceptivelmente irritam a pele e/ou desgastam o estrato córneo, e ainda permitem a toxina botulínica penetrar na pele para ter seus efeitos biológicos.

[071] Quando com as proteínas de uma forma geral, as atividades biológicas das toxinas botulínicas (que são peptidases intracelulares) pode ser

afetadas pelas mudanças na conformação tridimensional. Assim, a toxina botulínica tipo A pode ser desintoxicada por calor, vários produtos químicos, estiramento superficial e secagem superficial. Adicionalmente, é sabido que a diluição do complexo de toxina obtido pelo cultivo, fermentação e purificação conhecidos para as concentrações de toxina muito, muito mais baixas usadas para a composição farmacêutica resulta na rápida desintoxicação da toxina a não ser que um agente estabilizante adequado esteja presente. A diluição da toxina a partir de quantidades em miligramas em uma solução contendo nanogramas por mililitro apresenta dificuldades significativas por causa da rápida perda de toxicidade específica após tal grande diluição. Visto que a toxina pode ser usada meses ou anos após a composição farmacêutica contendo toxina ser formulada, as preparações de solução da toxina devem ser formuladas com um agente estabilizante, tal como albumina.

[072] Como observado acima, a presente invenção fornece preparações estabilizadas de toxina botulínica. Entretanto, a estabilidade adicional que pode ser concedida pela própria formulação da invenção, em algumas formas de realização da invenção, o uso de estabilizantes adicionais é contemplado. Por exemplo, em algumas formas de realização, pelo menos uma proteína adicional é utilizada juntamente com a toxina botulínica. Em algumas formas de realização, esta proteína adicional compreende albumina. Em certas formas de realização, esta proteína adicional compreende uma ou mais das proteínas naturalmente encontradas em um complexo de toxina botulínica. De fato, em algumas formas de realização da invenção, um complexo de toxina botulínica completo é empregado. Em algumas de tais formas de realização, a albumina também é utilizada. Assim, em certas formas de realização, a presente invenção fornece uma nanoemulsão microfluidificada botulínica compreendendo albumina.

[073] Em algumas formas de realização da presente invenção, a

toxina botulínica utilizada é o BOTOX[®]. O BOTOX[®] consiste de um complexo de toxina botulínica purificada tipo A, albumina e cloreto de sódio acondicionado em forma secada a vácuo estéril.

[074] A toxina botulínica tipo A presente no BOTOX[®] é produzida a partir de uma cultura da cepa Hall de *Clostridium botulinum* desenvolvida em um meio contendo N-Z amina e extrato de levedura. O complexo de toxina botulínica tipo A é purificado a partir da solução de cultura por uma série de precipitações ácidas em um complexo cristalino consistindo da proteína de toxina de peso molecular elevado ativa e uma proteína hemaglutinina associada. O complexo cristalino é re-dissolvido em uma solução contendo salina e albumina e filtrada estéril (0,2 microns) antes da secagem a vácuo. O BOTOX[®] pode ser reconstituído com salina não conservada estéril antes da injeção intramuscular. Cada frasco de BOTOX[®] contém cerca de 100 unidades (U) de complexo de neurotoxina purificada de toxina de *Clostridium botulinum* tipo A, 0,5 miligrama de albumina do soro humano, e 0,9 miligrama de cloreto de sódio em uma forma secada a vácuo estéril sem um conservante.

[075] Correntemente, o BOTOX[®] é geralmente reconstituído com cloreto de sódio a 0,9% para administração por injeção. Uma vez que o BOTOX[®] pode ser desnaturado por borbulhamento ou agitação violenta similar, o diluente é suavemente injetado dentro do frasco. O BOTOX[®], como uma solução livre, é recomendado para ser administrado dentro de quatro horas após a reconstituição. Além disso, entre a reconstituição e injeção, é ainda recomendado que o BOTOX[®] reconstituído seja armazenado em um refrigerador (isto é, por exemplo, entre 2° a 8°C). O BOTOX[®] reconstituído é transparente, sem cor e livre de matéria particulada.

[076] Foi relatado que o BOTOX[®] tem sido usado em ambientes clínicos como se segue:

(1) cerca de 75 a 125 unidades de BOTOX[®] per injeção

intramuscular (múltiplos músculos) para tratar a distonia cervical;

(2) de 5 a 10 unidades de BOTOX[®] per injeção intramuscular para tratar as linhas glabellares (sulcos da sobrancelha) (5 unidades injetadas intramuscularmente em cada músculo da sobrancelhas corrugado);

(3) cerca de 30 a 80 unidades de BOTOX[®] para tratar a constipação por injeção intra-esfíncter do músculo puborretal;

(4) cerca de 1 a 5 unidades per músculo de BOTOX[®] injetado intramuscularmente para tratar o blefaroespasmio mediante a injeção no músculo orbicular do olho pré-tarsiano lateral da pálpebra superior e orbicular do olho pré-tarsiano lateral da pálpebra inferior.

(5) para tratar estrabismo, os músculos extraoculares têm de ser injetados intramuscularmente com cerca de 1 a 5 unidades de BOTOX[®], a quantidade injetada variando com base tanto no tamanho do músculo a ser injetado quanto na extensão da paralisia muscular desejada (isto é, quantidade de correção de dioptria desejada).

(6) para tratar a espasticidade do membro superior seguinte ao acidente vascular cerebral por injeções intramusculares de BOTOX[®] em cinco músculos flexores do membro superior diferentes, como se segue:

(a). digitorum profundus flexor: 7,5 U a 30 U

(b). digitorum sublimus flexor: 7,5 U a 30 U

(c). carpi ulnaris flexor: 10 U a 40 U

(d) carpi radialis flexor: 15 U a 60 U

(e). bíceps dos braços: 50 U a 200 U

Cada um dos cinco músculos indicados foi injetado na mesma sessão de tratamento, de modo que o paciente recebe de 90 U a 360 U de BOTOX[®] no músculo flexor do membro superior mediante a injeção intramuscular em cada sessão de tratamento.

(7) para tratar enxaqueca, injeção injetada pericranial (injetada simetricamente nos músculos glabellares, frontais e temporais) de 25 U de

BOTOX[®] tem mostrado benefício significativo como um tratamento profilático de enxaqueca comparado com veículo quando medido por medições diminuídas da frequência de enxaqueca, gravidade máxima, vômito associado e uso de medicação aguda durante o período de três meses seguintes à injeção de 25 U.

[077] A presente invenção demonstra (ver, por exemplo, os Exemplos 4 e 5) que uma composição de nanopartícula botulínica da invenção contendo BOTOX[®], quando incorporada em um creme que é aplicado na pele para a liberação transdérmica da toxina, alcança resultados biológicos (isto é, redução de rugas) comparáveis com aqueles historicamente observados com injeção de uma solução de toxina botulínica contendo aproximadamente o mesmo em relação ao BOTOX[®].

[078] As respostas clínicas positivas de toxina botulínica tipo A tem levado a interesses em outros sorotipos de toxina botulínica. Um estudo de duas preparações do tipo A botulínico comercialmente disponível (BOTOX[®] e DYSPORT[®]) e preparações de toxinas botulínicas tipos B e F (ambos obtidos da Wako Chemicals, Japão) foi realizado para determinar a eficácia, segurança e potencial antigênico do enfraquecimento muscular local. As preparações de toxina botulínica foram injetadas na cabeça no músculo gastrocnêmico (0,5 a 200,0 unidades/kg) e o enfraquecimento muscular foi avaliado usando o ensaio de marcação de abdução digital de camundongo (DAS). Os valores ED₅₀ foram calculados a partir das curvas de resposta de dose.

[079] Aos camundongos adicionais foram dadas injeções intramusculares para determinar as doses LD₅₀. O índice terapêutico foi calculado como LD₅₀/ED₅₀. Os grupos separados de camundongos receberam injeções nos membros traseiros de BOTOX[®] (5,0 a 10,0 unidades/kg) ou toxina botulínica tipo B (50,0 a 400,0 unidades/kg), e foram testados com relação a fraqueza muscular e consumo de água aumentado, este sendo um

modelo putativo para a boca seca. O potencial antigênico foi avaliado por injeções intramusculares mensais em coelhos (1,5 ou 6,5 ng/kg para a toxina botulínica tipo B ou 0,15 ng/kg de BOTOX®). A fraqueza muscular máxima e duração foram relacionados com a dose para todos os sorotipos.

[080] Os valores DAS ED₅₀ (unidades/kg) eram como se segue: BOTOX®: 6,7, DYSPORT®: 24,7, toxina botulínica tipo B: 27,0 a 244,0, toxina botulínica tipo F: 4,3. O BOTOX® tinha uma duração mais longa de ação do que a toxina botulínica tipo B ou toxina botulínica tipo F. Os valores de índice terapêutico eram como se segue: BOTOX®: 10,5, DYSPORT®: 6,3, toxina botulínica tipo B: 3,2. O consumo de água foi maior nos camundongos injetados com toxina botulínica tipo B do que com BOTOX®, embora a toxina botulínica tipo B tenha sido menos eficaz no enfraquecimento muscular. Após quatro meses de injeções 2 de 4 (onde tratado com 1,5 ng/kg) e 4 de 4 (onde tratado com 6,5 ng/kg) coelhos desenvolveram anticorpos contra a toxina botulínica tipo B. Em um estudo separado, 0 de 9 coelhos tratados com BOTOX® demonstraram anticorpos contra a toxina botulínica tipo A. Os resultados de DAS indicam potências máximas relativas de toxina botulínica tipo A sendo iguais à toxina botulínica tipo F, e toxina botulínica tipo F sendo maior do que a toxina botulínica tipo B. Com referência à duração do efeito, a toxina botulínica tipo A foi maior do que a toxina botulínica tipo B, e a duração do efeito da toxina botulínica tipo B foi maior do que a toxina botulínica tipo F. Como mostrado pelos valores do índice terapêutico; as duas preparações comerciais de toxina botulínica tipo A (BOTOX® e DYSPORT®) são diferentes. O comportamento de consumo de água aumentado observado seguinte a injeção no membro traseiro de toxina botulínica tipo B indica que quantidades clinicamente significativas deste sorotipo entraram na circulação sistêmica do murino. Os resultados também indicam que de modo a obter eficácia comparável com a toxina botulínica tipo A, é necessário aumentar as doses dos sorotipos examinados. A dosagem aumentada, no entanto, pode

comprometer a segurança. Além disso, nos coelhos, o tipo B foi mais antigênico do que foi o BOTOX[®], possivelmente por causa da carga superior de proteína injetada para obter uma dose eficaz de toxina botulínica tipo B. Eur J Neurol 6 (Suppl 4):S3-S10 (1999).

[081] Como aqui indicado, a presente invenção contempla o uso de toxina botulínica de qualquer sorotipo. Aqueles de habilidade usual na técnica facilmente serão capazes de avaliar a apropriabilidade de um sorotipo particular durante um uso particular e, de acordo com os ensinamentos inclusos, serão capazes de preparar composições de nanopartícula contendo tal toxina botulínica. Assim, a presente invenção fornece composições de nanopartícula contendo toxina botulínica de qualquer sorotipo, incluindo as composições contendo apenas proteínas de toxina botulínica e composições contendo aquelas ou outras proteínas. Em algumas formas de realização, tais outras proteínas compreendem ou consistem de albumina; em certas formas de realização, os complexos de toxina botulínica são empregados.

[082] As fontes comercialmente disponíveis de toxina botulínica que podem ser utilizadas de acordo com a presente invenção incluem, mas não são limitados a elas, BOTOX[®], DYSPORT[®] (complexo de hemaglutinina da toxina de Clostridium botulinum tipo A com albumina de soro humano e lactose; Ispen Limited, Berkshire U.K.) e/ou MYOBLOC[®] (uma solução injetável consistindo de toxina botulínica tipo B, albumina de soro humano, succinato de sódio, e cloreto de sódio, pH 5,6, Elan Pharmaceuticals, Dublin, Ireland), etc.

Composições de Nanopartícula

[083] Como aqui descrito, a presente invenção fornece, entre outras coisas, composições incluindo as composições de nanopartícula que contêm toxina botulínica.

[084] Em geral, uma composição de nanopartícula é qualquer composição que inclui pelo menos uma nanopartícula. As composições de

nanopartícula botulínicas são composições de nanopartícula que contêm toxina botulínica. A toxina botulínica pode ser encapsulada ou completamente circundada por uma ou mais nanopartículas; associada com a interface de nanopartícula; e/ou adsorvida na superfície externa de uma ou mais nanopartículas. A toxina botulínica pode ou não pode ser covalentemente ligada às nanopartículas e/ou composições de nanopartícula pelas forças de adsorção.

[085] Em algumas formas de realização, as composições de nanopartícula da invenção possuem uma coleção uniforme de nanopartículas. Por exemplo, em algumas formas de realização, a diferença entre os diâmetros mínimos e os diâmetros máximos das nanopartículas em uma composição de nanopartícula da invenção não excede a cerca de 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, ou menos nm.

[086] Em algumas formas de realização, as partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições de nanopartícula botulínicas da invenção possuem diâmetros que são menores do que cerca de 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 130, 120, 115, 110, 100, 90, 80 nm, ou menos.

[087] Em algumas formas de realização, as partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições de nanopartícula botulínicas da invenção possuem diâmetros dentro da faixa de cerca de 10 e cerca de 600 nanômetros. Em algumas formas de realização, as partículas dentro das composições de nanopartícula botulínicas da invenção possuem diâmetros dentro da faixa de cerca de 10 a 300, 10 a 200, 10 a 150, 10 a 130, 10 a 120, 10 a 115, 10 a 110, 10 a 100 ou 10 a 90 nm.

[088] Em algumas formas de realização, as partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições de nanopartícula botulínicas da invenção possuem um tamanho médio de partícula que está abaixo de cerca de 300, 250, 200, 150, 130, 120 ou 115,

110, 100 ou 90 nm. Em algumas formas de realização, o tamanho médio de partícula está dentro da faixa de cerca de 10 a 300, 50 a 250, 60 a 200, 65 a 150, 70 a 130 nm. Em certas formas de realização, o tamanho médio de partícula é de cerca de 80 a 110 nm. Em algumas formas de realização, o tamanho médio de partícula é de cerca de 90 a 100 nm.

[089] Em algumas formas de realização, uma maioria das partículas (por exemplo, partículas contendo toxina botulínica) dentro das composições da invenção possui diâmetros abaixo de um tamanho específico ou dentro de uma faixa específica. Em algumas formas de realização, a maioria é mais do que 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% ou mais das partículas na composição.

[090] Em algumas formas de realização, as composições de nanopartícula da invenção são substancialmente livres de partículas tendo um diâmetro com excesso de 120 nm. Especificamente, em certas formas de realização, menos do que 50% das nanopartículas nas composições de nanopartícula da invenção possuem um diâmetro com excesso de 120 nm. Em algumas formas de realização, menos do que 25% das partículas possuem um diâmetro com excesso de 120 nm. Em certas formas de realização, menos do que 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% ou menos das partículas possuem um diâmetro com excesso de 120 nm. Além disso, em algumas formas de realização, as nanopartículas nas composições de nanopartícula da invenção possuem diâmetros dentro da faixa de 10 a 120 nm.

[091] O potencial zeta é uma medição do potencial elétrico em um plano de cisalhamento. Um plano de cisalhamento é uma superfície imaginária que separa uma camada fina do líquido ligado à uma superfície sólida (por exemplo, a superfície das nanopartículas da invenção) e que mostra o comportamento elástico do resto do líquido (por exemplo, meio de dispersão líquido) mostrando o comportamento viscoso normal. Em algumas

formas de realização, as nanopartículas da invenção possuem um potencial zeta variando entre -50 mV a +50 mV. Em certas formas de realização, as nanopartículas da invenção possuem um potencial zeta variando entre -25 mV a +25 mV. Em algumas formas de realização, as nanopartículas da invenção possuem um potencial zeta variando entre -10 mV a +10 mV.

[092] As composições de nanopartícula da invenção são tipicamente emulsões ou dispersões. Em certas formas de realização, as composições são dispersões de “óleo em água” (isto é, dispersões em que as partículas oleosas são dispersas dentro de um meio de dispersão aquoso); em algumas formas de realização, as composições são dispersões de “água em óleo” (isto é, dispersões em que as partículas aquosas são dispersas dentro de um meio de dispersão oleosa).

[093] Em certas formas de realização, as composições de nanopartícula da invenção não requerem solventes tóxicos. Ao contrário, muitas estratégias convencionais para a indução da formação de nanopartículas em uma composição utilizam solventes tóxicos (tipicamente orgânicos). Em algumas formas de realização, as composições de nanopartícula da invenção não requerem polímeros. Ao contrário, muitas estratégias convencionais para a preparação das composições que contêm as estruturas de nanopartícula requerem polímeros.

[094] Em algumas formas de realização, as composições de nanopartícula da invenção possuem melhor absorção tecidual e/ou melhor biocompatibilidade do que outras composições de nanopartícula. Por exemplo, em certas formas de realização, as composições de nanopartícula da invenção possuem melhor absorção de tecido e/ou melhor biocompatibilidade do que as composições de nanopartícula que não são uniformes, que utilizam um ou mais solventes tóxicos (por exemplo, orgânicos), e/ou que utilizam um ou mais polímeros.

[095] Em certas formas de realização, as composições de

nanopartícula da invenção (por exemplo, composições de nanopartícula botulínicas) são estáveis. Em algumas formas de realização da invenção, uma composição de nanopartícula estável é aquela para a qual o tamanho médio de partícula, o tamanho máximo de partícula, a faixa de tamanho de partícula e/ou a distribuição de tamanho de partícula (isto é, a porcentagem de partículas acima de um tamanho designado e/ou fora de uma faixa designada de tamanho) é mantido durante um período de tempo. Em certas formas de realização, o período de tempo é de pelo menos cerca de uma hora; em algumas formas de realização, o período de tempo é e cerca de 5 horas, 10 horas, um (1) dia, uma (1) semana, duas (2) semanas, um (1) mês, dois (2) meses, três (3) meses, quatro (4) meses, cinco (5) meses, seis (6) meses, oito (8) meses, dez (10) meses, doze (12) meses, vinte e quatro (24) meses, ou mais longo. Em algumas formas de realização, o período de tempo está dentro da faixa de cerca de um (1) dia a vinte e quatro (24) meses, duas (2) semanas a doze (12) meses, dois (2) meses a cinco (5) meses, etc. Por exemplo, se uma população de partículas de nanoemulsão for submetida à armazenagem prolongada, às mudanças de temperatura e/ou às mudanças no pH e uma maioria das nanopartículas na população mantiver um diâmetro dentro de uma faixa determinada (isto é, por exemplo, entre aproximadamente 10 a 120 nm), a composição de nanopartícula é estável. Para algumas de tais populações, uma maioria é mais do que cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% ou mais. Em certas formas de realização da invenção, onde uma composição de nanopartícula compreende a toxina botulínica e/ou pelo menos um outro agente biologicamente ativo, a composição de nanopartícula é considerada estável se a concentração de agente biologicamente ativo (por exemplo, toxina botulínica) for mantida na composição durante o período designado de tempo sob uma série designada de condições.

[096] Como aqui descrito, as composições de nanopartícula da

invenção são úteis em várias aplicações médicas, cosméticas e nutracêuticas. Tais composições podem ser liberadas a um indivíduo por qualquer via de administração disponível incluindo, mas não limita a eles, injeção, liberação oral, liberação transdérmica, etc. Em certas formas de realização, as composições são liberadas por injeção. Em certas formas de realização, as composições são liberadas transdermicamente.

[097] Deve ser observado que as composições de nanopartícula botulínicas da invenção são facilmente distinguíveis de outras composições contendo toxina botulínica que foram descritas. Por exemplo, Donovan tem descrito uma preparação em que a toxina botulínica foi incorporada em uma vesícula de lipídeo para a liberação transdérmica (Publicação US 2004/0009180). Tais vesículas também requerem a incorporação de um agente intensificador, tal como um álcool, para facilitar a absorção de toxina botulínica através da pele. Donovan também descreve uma neurotoxina que é incorporada em uma transfersoma, que são portadores deformáveis contendo lipídeos e amaciantes de membrana (Hofer et al., 2000, World J. Surg., 24:1187; e Patente U.S. no 6.165.500). Donovan especificamente descreve a preparação de lipossomas de fosfatidil colina + colato de sódio que incorporam a toxina botulínica.

[098] Suvanprakorn et al. também têm descrito suspensões de materiais encapsulados de lipossoma em macro-glóbulos distintos; literalmente uma das centenas de compostos que é dito ser aperfeiçoável para a encapsulação é o “BOTOX®” (Publicação US 2004/0224012). Incluídos nos métodos contemplados de produção destas lipossomas vesiculares multi-lamelares são liofilização/reidratação e desidratação de solução orgânica/reidratação aquosa. Estes métodos convencionais de produção de lipossomas devem ser esperados de produzir vesículas com tamanho de micropartícula.

Métodos de Produção das Composições de Nanopartícula

[0099] Em geral, as composições de nanopartícula da invenção (por exemplo, composições de nanopartícula botulínicas) podem ser preparadas por qualquer método disponível. Em algumas formas de realização, as composições de nanopartícula são preparadas por meios químicos. No entanto, os meios químicos freqüentemente requerem solventes tóxicos (tipicamente orgânicos); em algumas formas de realização, as composições de nanopartícula são preparadas de acordo com a presente invenção sem utilizar tais solventes.

[0100] Em certas formas de realização da presente invenção, as composições de nanopartícula são preparadas mediante a preparação de uma pré-mistura e submeter a pré-mistura às forças elevadas de cisalhamento. Como aqui usado, o termo “força de cisalhamento” se refere à uma força que é paralela à face de um material, quando oposta à uma força que é perpendicular à face de um material.

[0101] Qualquer método conhecido na técnica pode ser usado para gerar forças de cisalhamento elevadas. Em algumas formas de realização, a cavitação é usada para gerar forças de cisalhamento elevadas. De acordo com a presente invenção, o uso de energia mecânica (isto é, forças de cisalhamento elevadas) pode substituir ou minimizar qualquer necessidade de utilizar solventes químicos caros e/ou tóxicos; pode aumentar a velocidade em que as nanopartículas se agrupam, pode aumentar o rendimento das nanopartículas geradas em uma mistura particular de componentes, e/ou pode grandemente reduzir o custo total da preparação das composições de nanoemulsão. Além disso, naquelas formas de realização em que um agente tal como um agente biologicamente ativo (por exemplo, toxina botulínica) é incorporado nas composições de nanopartícula da invenção, o uso de força de cisalhamento elevada pode aumentar a capacidade de carga da nanopartícula quando comparado com os métodos tradicionais de formação de nanopartículas. Nos

métodos tradicionais, a carga de agentes dentro ou sobre a superfície das nanopartículas, tipicamente conta com a difusão do agente no interior e/ou na superfície da nanopartícula. De acordo com a presente invenção, o uso de força de cisalhamento elevada pode levar em conta a fabricação de partículas menores (por exemplo, na média) e/ou uma distribuição mais rigorosa dos tamanhos de partícula em uma composição de nanopartícula.

[0102] Em algumas formas de realização, as forças de cisalhamento elevadas são obtidas mediante a exposição em pressão elevada, por exemplo, mediante o fluxo turbulento contínuo em alta pressão, por exemplo, cerca de 15.000 psi (103,4 MPa). Em certas formas de realização, tal alta pressão está dentro da faixa de cerca de 18.000 a cerca de 26.000 (124,1 a 179,3 MPa); em algumas formas de realização, está dentro da faixa de cerca de 20.000 a 25.000 psi (137,9 a 172,4 MPa).

[0103] Em certas formas de realização, a força de cisalhamento elevada ou alta pressão pode ser administrada por cavitação ou homogeneização em pressão elevada.

[0104] Em algumas formas de realização, a força de cisalhamento elevada pode ser administrada pela passagem através de um instrumento tal como, por exemplo, um Microfluidizer[®] Processor (Microfluidics Corporation/MFIC Corporation) ou outro dispositivo semelhante. Os Microfluidizer[®] Processors fornecem alta pressão e uma taxa de cisalhamento elevada resultante mediante a aceleração do produto através de microcanais em uma alta velocidade para a redução do tamanho para a faixa de nanoescala. O fluido é dividido em dois e é empurrado através de microcanais com dimensões típicas na ordem de 75 microns em altas velocidades (na faixa de 50 a 300 m/s). Quando o fluido sai dos microcanais forma jatos que colidem com os jatos dos microcanais opostos. Nos canais o fluido experimenta o cisalhamento elevado (até 10^7 1/s) que está em ordens de magnitude mais elevadas do que aquelas das tecnologias convencionais. As

colisões de jato resultam na mistura em nível submícron. Portanto, o cisalhamento elevado e o impacto são responsáveis pela redução do tamanho de partícula e mistura de fluidos de múltiplas fases na tecnologia de Microfluidizer[®].

[0105] De uma forma mais geral, um microfluidizador pode ser qualquer dispositivo que provê de energia uma bomba intensificadora de atuação única. A bomba intensificadora amplifica a pressão hidráulica em um nível selecionado que, por sua vez, concede esta pressão à corrente do produto. Quando a bomba percorre através de seu curso de pressão, move o produto em pressão constante através da câmara de interação. Dentro da câmara de interação estão os microcanais de geometria fixa especialmente designados através dos quais a corrente do produto acelerará para altas velocidades, criando forças de cisalhamento e impacto elevadas que podem gerar uma composição de nanopartícula uniforme (por exemplo, nanoemulsão) quando a velocidade elevada da corrente do produto invadir a si mesma e nas superfícies resistentes ao desgaste.

[0106] Quando a bomba intensificadora completa seu curso de pressão, inverte a direção e colhe um novo volume de produto. No final do curso de entrada, novamente inverte a direção e move o produto em pressões constantes, desse modo repetindo o processo.

[0107] Após sair da câmara de interação, o produto flui através de um trocador térmico embutido que regula o produto para uma temperatura desejada. Neste ponto, o produto pode ser recirculado através do sistema para outro processamento ou direcionado externamente para a próxima etapa no processo (Patentes US 4.533.254 e 4.908.154).

[0108] Em algumas formas de realização da presente invenção, uma amostra é “microfluidizado” através da exposição às forças de cisalhamento elevadas por um período de tempo menor do que cerca de 10 minutos. Em algumas formas de realização, o período de tempo é menor do que cerca de 9,

8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 minuto(s). Em certas formas de realização, o período de tempo está dentro da faixa de cerca de 1 a 2 minutos ou menos; em algumas formas de realização, o período de tempo é de cerca de 30 segundos.

[0109] Em algumas formas de realização da invenção, uma amostra é “microfluidificada” através de uma exposição única às forças de cisalhamento elevadas; tais formas de realização são referidas aqui como microfluidificação de “passagem única”.

[0110] Em geral, a pré-mistura da qual as composições de nanopartícula da invenção são preparadas através da aplicação de força de cisalhamento elevada é esperada conter pelo menos dois materiais imiscíveis, um dos quais constituirá o meio de dispersão (isto é, o meio líquido em que as partículas (por exemplo, nanopartículas) são dispersas na composição de nanopartícula final). Uma dispersão de “óleo em água” é aquela em que partículas oleosas são dispersas dentro de um meio de dispersão aquoso. Uma dispersão de água em óleo é aquela em que as partículas aquosas são dispersas dentro de um meio de dispersão oleoso. Aqueles de habilidade usual na técnica observarão que uma dispersão pode ser formada de qualquer um de dois meios imiscíveis e não é limitada estritamente às combinações de meios aquosos e oleosos. O termo “meio de dispersão” portanto se aplica amplamente a qualquer meio de dispersão apesar de que é comum se referir às categorias “aquosas” e “oleosas”.

[0111] Assim, em certas formas de realização da invenção, a pré-mistura conterá um meio de dispersão aquoso e um meio oleoso que se torna disperso na forma de nanopartícula no meio de dispersão; em algumas formas de realização, a pré-mistura contém um meio de dispersão oleoso e um meio aquoso que se torna disperso na forma de nanopartícula nos meios de dispersão oleosos.

[0112] Aqueles de habilidade usual na técnica estarão bem cientes dos meios aquosos adequados que podem ser usados como meios de dispersão ou

como meios a serem dispersos de acordo com a presente invenção. Representativos de tais meios aquosos incluem, por exemplo, água, soluções de salina (incluindo salina tamponada de fosfato), água para injeção, álcoois de cadeia curta, dextrose a 5%, soluções de Ringer (injeção de Ringer lactada, injeção de Ringer lactada acrescida de dextrose a 5%, injeção de Ringer acilada), Normosol-M, Isolyte E, e outros mais, e combinações dos mesmos.

[0113] Aqueles de habilidade usual na técnica também estarão bem cientes dos meios oleosos adequados que podem ser usados como meios de dispersão ou como meios a serem dispersos de acordo com a presente invenção. Representativos de tais meios oleosos incluem, por exemplo, óleos de amêndoa, semente de damasco, abacate, babaçu, bergamota, semente corrente preta, borragem, cade, camomila, canola, alcaravia, carnaúba, mamona, canela, manteiga de cacau, coco, fígado de bacalhau, café, milho, semente de algodão, avestruz, eucalipto, onagra, peixe, linhaça, gerânio, fruto do cabaceiro, semente de uva, avelã, hissopo, jojoba, kukui nut, lavanda, alfazema, limão, litsea cubeba, macadâmia, malva, caroço de manga, semente de espuma do prado, mink, noz moscada, oliva, laranja, laranja áspera, palmeira, caroço de palmeira, caroço de pêsego, amendoim, semente de papoula, semente de abóbora, semente de colza, farelo de arroz, alecrim, cártamo, sândalo, sasquana, segurelha, sea buckthorn, gergelim, manteiga de shea, silicona, feijão de soja, girassol, tea tree, cardo, tsubaki, vetiver, noz e germe de trigo; estearato de butila; triglicerídeo caprílico; triglicerídeo cáprico; ciclometicona; sebacato de dietila; dimeticona 360; miristato de isopropila; óleo mineral; octildodecanol; álcool oleílico; óleo de silocona; e combinações dos mesmos.

[0114] Além dos dois meios imiscíveis, uma pré-mistura de acordo com a presente invenção pode incluir, por exemplo, um ou mais agentes biologicamente ativos (por exemplo, toxina botulínica) e/ou um ou mais tensoativos ou agentes emulsificantes. Os tensoativos adequados ou agentes

emulsificantes incluem, mas não são limitados a eles, fosfoglicerídeos; fosfatidilcolinas; fosfatidilcolina de dipalmitoíla (DPPC); dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE); dioleiloxipropiltriethylamônio (DOTMA); dioleilfosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; diacilglicerol; diacilglicerolsuccinato; difosfatidil glicerol (DPPG); hexanodecanol; álcoois graxos tais como polietileno gliol (PEG); éter polioxietileno-9-laurílico; um ácido graxo tensoativo, tal como ácido palmítico ou ácido oléico; ácidos graxos; monoglicerídeos de ácido graxo; diglicerídeos de ácido graxo; amidas de ácido graxo; trioleato de sorbitano (Span 85) glicoolato; monolaurato de sorbitano (Span 20); polissorbato 20 (Tween-20); polissorbato 60 (Tween-60); polissorbato 65 (Tween-65); polissorbato 80 (Tween-80); polissorbato 85 (Tween-85); monoestearato de polioxietileno; surfactina; um poloxômero; um éster de ácido graxo de sorbitano tal como trioleato de sorbitano; lecitina; lisolecitina; fosfatidilserina; fosfatidilinositol; esfingomielina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardiolipina; ácido fosfatídico; cerebrosídeos; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecil-amina; palmitato de acetila; rinooleato de glicerol; estearato de hexadecila; miristato de isopropila; tiloxapol; poli(etileno glicol)5000-fosfatidiletanolamina; poli(etileno glicol)400-monoestearato; fosfolipídeos; detergentes sintéticos e/ou naturais tendo propriedades elevadas de tensoativo; deoxicolatos; ciclodextrinas; sais caotrópicos; agentes de formação de par de íon; e combinações dos mesmos. O componente de tensoativo pode ser uma mistura de diferentes tensoativos. Estes tensoativos podem ser extraídos e purificados de uma fonte natural ou podem ser preparados sinteticamente em laboratório. Em uma forma de realização preferida, os tensoativos são comercialmente disponíveis.

[0115] Em algumas formas de realização da presente invenção, todos os componentes presentes na composição de nanopartícula final estão presentes na pré-mistura e são submetidos à força de cisalhamento elevada

para produzir a composição de nanopartícula. Em algumas formas de realização da presente invenção, um ou mais dos componentes que estão presentes na composição de nanopartícula final estão ausentes da pré-mistura ou estão presentes na pré-mistura em uma quantidade menor do que na composição de nanopartícula final. Isto é, em algumas formas de realização da presente invenção, um ou mais materiais são adicionados à composição de nanopartícula após a pré-mistura ser submetida à força de cisalhamento elevada.

[0116] Em certas formas de realização da invenção, a pré-mistura é preparada como uma solução antes da aplicação da força de cisalhamento elevada. Em particular, para as composições de nanopartícula que incluem pelo menos um agente biologicamente ativo (por exemplo, toxina botulínica), é freqüentemente desejável para o agente biologicamente ativo ser dissolvido na pré-mistura antes da força de cisalhamento elevada ser aplicada. Assim, em muitas formas de realização, o agente biologicamente ativo é solúvel em pelo menos um dos meios (ou em combinação de meios utilizados na pré-mistura). Em algumas formas de realização da invenção, tal dissolução requer aquecimento; em outras formas de realização não requer.

[0117] Em certas formas de realização da presente invenção, os componentes da pré-mistura podem se agrupar dentro das partículas antes da aplicação da força de cisalhamento elevada. Pelo menos algumas de tais partículas podem ser micropartículas ou mesmo nanopartículas. Em algumas formas de realização, uma composição de nanopartícula da invenção é preparada a partir de uma pré-mistura, em que a pré-mistura é selecionada do grupo compreendendo uma suspensão ou uma microemulsão. Em algumas formas de realização, no entanto, as estruturas de partícula não se formam na pré-mistura antes da aplicação da força de cisalhamento elevada.

[0118] Em certas formas de realização da invenção, quantidades relativas de componentes da pré-mistura são selecionadas ou ajustadas para

gerar nanopartículas tendo características desejadas. Em algumas formas de realização, a pré-mistura compreende óleo e tensoativo em uma relação variando entre 0,5 a 10. Em algumas formas de realização, a relação de óleo para tensoativo é de aproximadamente 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 ou 10:1. Em algumas formas de realização, a relação de tensoativo para óleo é de aproximadamente 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 ou 10:1. Em algumas formas de realização, a pré-mistura compreende óleo e tensoativo em uma relação variando entre 0,5 a 2. Em certas formas de realização, a relação de óleo para tensoativo é de aproximadamente 0,5:1, 1:1 ou 2:1. Em algumas formas de realização, a relação de tensoativo para óleo é de aproximadamente 0,5:1, 1:1 ou 2:1. Em certas formas de realização, a relação de óleo para tensoativo é de aproximadamente 1:1.

[0119] Em algumas formas de realização, o percentual de óleo na pré-mistura varia entre 0% a 30%. Em certas formas de realização o percentual de óleo na pré-mistura é de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%. Em algumas formas de realização o percentual de óleo é de aproximadamente 8%. Em certas formas de realização o percentual de óleo é de aproximadamente 5%.

[0120] Em algumas formas de realização, o percentual de tensoativo na pré-mistura varia entre 0% a 30%. Em algumas formas de realização o percentual de tensoativo na pré-mistura é de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%. Em algumas formas de realização o percentual de tensoativo é de aproximadamente 8%. Em certas formas de realização o percentual de tensoativo é de aproximadamente 5%.

[0121] Em algumas formas de realização, a composição de nanopartícula não contém mais do que um óleo. Em certas formas de realização, a composição de nanopartícula pode compreender dois ou mais

óleos. Em algumas formas de realização, a composição de nanopartícula não contém mais do que um tensoativo. Em algumas formas de realização, a composição de nanopartícula pode compreender dois ou mais tensoativos.

[0122] Em algumas formas de realização, a composição de nanopartícula consiste essencialmente de água, um óleo, um tensoativo, e uma toxina botulínica. Em certas formas de realização, a composição de nanopartícula consiste essencialmente de água, um óleo, um tensoativo, pelo menos uma toxina botulínica, e pelo menos uma substância usada para produzir e/ou conservar a composição de nanopartícula (por exemplo, proteínas, sais, etc.).

[0123] Em algumas formas de realização, a composição de nanopartícula consiste de água, um óleo, um tensoativo, e uma toxina botulínica. Em certas formas de realização, a composição de nanopartícula consiste de água, um óleo, um tensoativo, pelo menos uma toxina botulínica, e pelo menos uma substância usada para produzir e/ou conservar a composição de nanopartícula (por exemplo, proteínas, sais, etc.).

Métodos de Administração das Composições de Nanopartícula

[0124] A presente invenção fornece métodos de liberação das composições de nanopartícula (por exemplo, composições de nanopartícula botulínicas) para várias aplicações incluindo, por exemplo, aplicações cosméticas, nutracêuticas e médicas. Tais composições de nanopartícula podem incluir um ou mais agentes biologicamente ativos. Em muitas formas de realização, as composições de nanopartícula incluem a toxina botulínica.

[0125] Em algumas formas de realização, a presente invenção contempla métodos de liberar as composições de nanopartícula da invenção incluindo, mas não limitados a eles, vias de administração transdérmicas, intramusculares ou subcutâneas. Estas vias de administração são particularmente favorecidas para formulações (por exemplo, certas composições de nanopartícula de toxina botulínica) que são destinadas a

terem um efeito localizado. A absorção tecidual subsequente dos ingredientes da formulação, no entanto, nem sempre é prognosticável.

[0126] Em algumas formas de realização da presente invenção, as formulações da invenção podem ser encapsuladas, por exemplo, usando portadores com base em lipídeo, por exemplo, para facilitar a entrada nas células. As eficácias do portador com base em lipídeo, no entanto, podem ser dependentes da; i) composição de lipídeo (isto é, por exemplo, tamanho e carga molecular); ii) estrutura (por exemplo, tamanho molecular e ionização do pH) de qualquer agente biologicamente ativo ou outra entidade incluída na composição; e iii) saúde total do indivíduo. A presente invenção contempla as composições e os métodos relacionados para uniformizar as nanoemulsões microfluidificadas compreendendo cada um dos portadores com base em lipídeo, desse modo melhorando a biodisponibilidade dos produtos cosméticos (isto é, por exemplo, toxinas botulínicas).

[0127] A presente invenção especificamente fornece métodos de administração da toxina botulínica, e particularmente de administração das composições de nanopartícula de toxina botulínica, para o tratamento de vários distúrbios, doenças ou condições. Os efeitos clínicos da injeção periférica (isto é, intramuscular ou subcutânea), ou administração transdérmica topicamente aplicada, de toxinas botulínicas, são geralmente vistos dentro de uma semana. A duração típica do alívio sintomático (isto é, por exemplo, paralisia do músculo flácido) de uma injeção intramuscular única de toxina botulínica tipo A pode estar presente por até quatro meses ou mais longo; as durações do efeito clínico seguinte a administração transdérmica de toxinas botulínicas de acordo com a presente invenção podem estar presentes por até quatro meses ou mais longo, dependendo das características do paciente individual e/ou de uma formulação específica da preparação de nanopartícula botulínica da invenção.

[0128] Será observado por aqueles de habilidade usual na técnica que

a toxina botulínica é correntemente administrada quase exclusivamente por injeção, e em particular mediante a injeção de uma solução salina líquida, geralmente reconstituída de uma preparação liofilizada.

[0129] Como aqui anteriormente debatido, a toxina botulínica no contexto de tais preparações é especialmente vulnerável à instabilidade resultante em uma perda de proteína e/ou perda de atividade de proteína. Tal instabilidade é suspeita de um resultado desnaturação, degradação, dimerização e/ou polimerização de proteína. A formulação mais comum conhecida de ter efeitos estabilizantes botulínicos é albumina humana. As conseqüências imunológicas possíveis da albumina derivada humana foram recentemente debatidas (Publicação US 2005/0238667). Esta publicação propõe que os estabilizantes com base em sacarídeo de albumina recombinante e aminoácidos anti-oxidantes podem resultar em toxinas botulínicas tendo uma eficácia melhorada em relação às preparações de albumina nativa.

[0130] Como também já foi debatido, o BOTOX[®] (um complexo de toxina de *Clostridium botulinum* purificada tipo A, albumina do soro humano, e cloreto de sódio acondicionados em uma forma seca a vácuo estéril) é correntemente reconstituído para injeção usando salina normal estéril sem um conservante (cloreto de sódio a 0,9%, grau de injeção). Especificamente, os protocolos padrão de injeção envolvem tirar a própria quantidade de diluente na seringa de tamanho apropriado. Visto que o BOTOX[®] é desnaturado por borbulhação ou agitação violenta similar, o diluente é suavemente injetado em um frasco contendo uma quantidade designada de BOTOX[®] liofilizado. Por razões de esterilidade, os protocolos padrão de injeção envolvem a administração de soluções aquosas de BOTOX[®] dentro de quatro horas após a reconstituição.

[0131] Embora os problemas com as preparações de toxina botulínica disponíveis (incluindo estabilidade dos fluxos, esterilidade dos fluxos, etc.)

tenham sido bem conhecidos, algumas formulações melhoradas foram desenvolvidas. Além disso, a injeção permanece o método padrão para a liberação de toxina botulínica, não obstante o desagradável das técnicas invasivas de uma forma geral, desconforto do paciente, etc.

[0132] A presente invenção fornece composições de toxina botulínica melhoradas (por exemplo, composições de nanopartícula de toxina botulínica), e ainda fornece métodos melhorados de liberação da toxina botulínica. Em particular, a presente invenção fornece métodos de liberação das composições de nanopartícula botulínicas (por qualquer via de administração disponível), e ainda fornece métodos de liberação da toxina botulínica por vias de administração diferentes da injeção.

[0133] Em geral, as composições de nanoemulsão botulínicas da invenção podem ser administradas por qualquer meio incluindo, sem limitação, parenteral, oral, transdérmica, bucal, oftálmica, vaginal, retalmente, etc. Em certas formas de realização, no entanto, as composições são administradas por injeção; em algumas formas de realização por injeção subcutânea, em algumas formas de realização por injeção intramuscular, em algumas formas de realização por injeção intravenosa, etc. Em certas formas de realização, as composições de nanopartícula botulínicas da invenção são administradas transdermicamente.

[0134] Em certas formas de realização, a presente invenção fornece métodos de administração da toxina botulínica transdermicamente. A pele humana compreende a derme e a epiderme. A epiderme possui várias camadas de tecido, a saber, estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal (identificadas em ordem da superfície externa da pele interna).

[0135] O estrato córneo apresenta a barreira mais significativa na liberação transdérmica de medicações de uma forma geral, e presumivelmente de toxina botulínica em particular. O estrato córneo é tipicamente cerca de 10

a 15 µm de espessura, e consiste de células queratinizadas niveladas (corneócitos) dispostas em várias camadas. O espaço intracelular entre os corneócitos é enchido com estruturas lipídicas, e pode desempenhar um papel importante na penetração das substâncias através da pele (Bauerova et al., 2001, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 26:85).

[0136] O resto da epiderme abaixo do estrato córneo é de aproximadamente 150 µm de espessura. A derme é de cerca de 1 a 2 mm de espessura e está localizada abaixo da epiderme. A derme é inervada por vários vasos capilares assim como processos neuronais.

[0137] A administração transdérmica de produtos farmacêuticos geralmente tem sido o objeto de pesquisa na tentativa de fornecer uma via de administração alternativa de medicações sem as conseqüências indesejáveis associadas com as injeções e liberação oral. Por exemplo, as agulhas freqüentemente causam dor localizada, e potencialmente expõem os pacientes que recebem as injeções às doenças conduzidas pelo sangue. A administração oral freqüentemente sofre de biodisponibilidade fraca de medicamentos devido ao ambiente extremamente ácido do estômago do paciente.

[0138] Esforços têm sido feitos para desenvolver técnicas de administração transdérmica para certos produtos farmacêuticos em uma tentativa de superar estas deficiências mediante o fornecimento de administração não invasiva. É geralmente desejável com a administração transdérmica reduzir o dano à uma pele do paciente. Assim, a administração transdérmica de medicação pode reduzir ou eliminar a dor associada com injeções, reduzir a probabilidade de contaminação sanguínea, e melhorar a biodisponibilidade dos medicamentos assim que eles sejam incorporados sistemicamente.

[0139] Tradicionalmente, as experiências na administração transdérmica de medicação têm sido focalizadas em aumentar a permeabilidade do estrato córneo. Algumas experiências têm incluído o uso

de agentes intensificadores químicos que aumentam a permeabilidade das moléculas através da pele. Algumas experiências têm incluído o uso de aparelhos mecânicos para desviar ou remover as partes do estrato córneo. Além disso, as experiências têm incluído o uso de ultra-som ou iontoforese para facilitar a penetração de produtos farmacêuticos através da pele. Em muitos casos, o objetivo tem sido para um agente farmacêutico, tipicamente uma molécula pequena, através da pele, tipicamente de modo que um agente possa passar para o leito capilar na derme onde o agente possa ser sistemicamente incorporado no indivíduo para obter um efeito terapêutico.

[0140] Embora as moléculas pequenas tenham sido um foco das técnicas de administração transdérmica, é importante observar que parece que as moléculas grandes, tais como polipeptídeos, e complexos de proteína, são também receptivas à administração transdérmica. A eritropoietina, que é de cerca de 48 kD, também foi de modo bem sucedido transdermicamente administrada com a assistência de ultra-som (Mitragotri et al., 1995, Science, 269:850; e Patentes US 5.814.599 e 6.002.961).

[0141] A presente invenção fornece, entre outras coisas, métodos de administração da toxina botulínica transdermicamente que não requerem o uso de abrasivo ou outros agentes de rompimento (quer químicos, mecânicos, elétricos, magnéticos, etc). Mais exatamente, os presentes inventores têm surpreendentemente observado que a toxina botulínica incorporada dentro das composições de nanopartícula da invenção é efetivamente liberada transdermicamente sem outras etapas para permeabilizar ou romper o estrato córneo. O uso de tais agentes ou etapas com as composições de nanopartícula botulínicas da invenção não é necessariamente excluído em todas as formas de realização da presente invenção, mas também não é requerido.

[0142] A presente invenção, portanto, fornece métodos de administração da toxina botulínica através da aplicação tópica de uma composição de nanopartícula botulínica da invenção. Em algumas formas de

realização, a composição de nanopartícula botulínica da invenção é aplicada diretamente na pele e para absorção através das camadas epidérmicas. Em algumas formas de realização, a composição de nanopartícula botulínica pode penetrar a camada superior da pele, incluindo o estrato córneo, poros dérmicos e/ou glândulas dérmicas, sem o uso de intensificadores de penetração da pele químicos ou mecânicos ou outros agentes que causam abrasão.

[0143] Será observado por aqueles de habilidade usual na técnica que as composições da invenção para a administração tópica podem ter uma formulação cosmética tal como amaciante de pele, emulsão tipo loção de nutrição, loção de limpeza, creme de limpeza, suco leitoso de pele, loção emoliente, creme de massagem, creme emoliente, base de maquiagem, batom, emplastro facial ou gel facial, formulação limpadora tal como xampus, enxágües, limpadores de corpo, tônicos capilares ou sabões, ou composição dermatológica tal como loções, ungüentos, géis, cremes, emplastos e/ou pulverizações.

[0144] Uma composição da invenção para a administração tópica pode ser formulada e/ou administrada tal que uma quantidade de toxina botulínica entre cerca de 10^{-3} U/kg e 10 U/kg passa através da pele do paciente. Em algumas formas de realização, a composição é formulada e/ou administrada de modo que entre cerca de 10^{-2} U/kg e cerca de 1 U/kg passam através da pele do paciente. Em algumas formas de realização, a composição é formulada e/ou administrada de modo que entre cerca de 10^{-1} U/kg e cerca de 1 U/kg passam através da pele do paciente. Em certas formas de realização, a composição é formulada e/ou administrada de modo que entre cerca de 0,1 unidade e cerca de 5 unidades passam através da pele do paciente em um alvo subdérmico.

[0145] Aqueles de habilidade usual na técnica observarão que as unidades aqui relatam às Unidades que são biologicamente equivalentes ou

bioativamente equivalente com as Unidades definidas pelos fabricantes comerciais de toxina botulínica.

[0146] Os efeitos terapêuticos de toxina botulínica administrada de acordo com a presente invenção podem persistir contanto que persistam os efeitos da solução injetada. Os efeitos de tal solução injetada podem persistir por até 4 meses. Além disso, o uso de um portador polimérico sistêmico que possa reter a toxina botulínica de modo que seja liberada lentamente pode prolongar os efeitos por até cerca de cinco anos (Patente US 6.312.708).

[0147] Em uma forma de realização, a presente invenção fornece uma formulação tópica de toxina botulínica que evita as complicações potenciais incluindo, mas não limitado a elas, toxicidade sistêmica ou envenenamento de botulismo. Em uma forma de realização, as dosagens de toxina botulínica (incluindo os tipos A, B, C, D, E, F ou G) podem variar de tão baixa quanto 1 unidade a tão elevada quanto cerca de 20.000 unidades, com risco mínimo de efeitos colaterais adversos. As dosagens particulares podem variar dependendo da condição sendo tratada e regime terapêutico sendo utilizado. Por exemplo, tratamento de músculos subdérmicos hiperativos pode requerer dosagens transdérmicas elevadas (por exemplo, de 1000 unidades a 20.000 unidades) de toxina botulínica. Em comparação, o tratamento de inflamação neurogênica ou glândulas sudoríparas hiperativas pode requerer dosagens transdérmicas relativamente pequenas (por exemplo, cerca de 1 unidade a cerca de 1.000 unidades) de toxina botulínica.

[0148] Uma forma de realização da presente invenção contempla uma composição farmacêutica que compreende uma toxina botulínica estabilizada para a liberação transdérmica em um paciente humano. A toxina botulínica pode ser selecionada do grupo consistindo de toxina botulínica tipos A, B, C₁, D, E, F e G, uma toxina botulínica isolada e/ou purificada (isto é, cerca de 150 kD), assim como toxina botulínica nativa ou recombinantemente produzida. A composição pode compreender entre cerca de 1 unidade a cerca

de 20.000 unidades da toxina botulínica, e a composição pode compreender uma quantidade de toxina botulínica suficiente para obter um efeito terapêutico duradouro entre 1 mês e 5 anos.

[0149] Em algumas formas de realização, a presente invenção fornece formulações tópicas de toxina botulínica (por exemplo, de composições de nanopartícula botulínicas) que permitem a toxina botulínica penetrar através da pele do indivíduo sem penetração na quantidade significativa através de um vaso sanguíneo. Por exemplo, em algumas formas de realização da invenção, menos do que cerca de 25%, ou mesmo menos do que cerca de 5% da toxina botulínica presente na composição farmacêutica penetra em um vaso sanguíneo após a aplicação de uma preparação tópica e/ou transdérmica da invenção.

[0150] Aqueles de habilidade usual na técnica observarão que as composições da invenção que alcançam a administração transdérmica de toxina botulínica podem ser incorporadas em um dispositivo tal como, por exemplo, um emplastro.

[0151] Uma variedade de estruturas de emplastro transdérmicas é conhecida na técnica; aqueles de habilidade usual observarão que as composições de nanopartícula botulínicas da invenção podem facilmente ser incorporadas em qualquer uma de uma variedade de tais estruturas. Em algumas formas de realização, um emplastro transdérmico pode ainda compreender uma pluralidade de agulhas que se prolongam a partir de um lado do emplastro que é aplicado na pele, em que as agulhas se prolongam a partir do emplastro para projetar através do estrato córneo da pele. Em algumas formas de realização, as agulhas não rompem um vaso sanguíneo.

[0152] Em algumas formas de realização da presente invenção, a toxina botulínica (por exemplo, uma composição de nanopartícula botulínica) pode ser fornecida em um depósito no emplastro de modo que a pressão aplicada ao emplastro faz com que a toxina botulínica seja direcionada para

fora do emplastro (opcionalmente através de agulhas) e através do estrato córneo.

[0153] Em certas formas de realização da presente invenção, um emplastro transdérmico inclui um adesivo. Alguns exemplos de emplastros adesivos são bem conhecidos (por exemplo, ver as Patentes US Des. 296.006; 6.010.715; 5.591.767; 5.008.110; 5.683.712; 5.948.433 e 5.965.154). Os emplastros adesivos são geralmente caracterizados como tendo uma camada adesiva, que será aplicada à uma pele de pessoa, um depósito ou reservatório para sustentar um agente farmacêutico, e uma superfície exterior que impede o vazamento do produto farmacêutico do depósito. A superfície exterior de um emplastro é tipicamente não adesiva.

[0154] De acordo com a presente invenção, a neurotoxina é incorporada dentro do emplastro de modo que a neurotoxina permaneça estável por períodos prolongados de tempo. Por exemplo, a neurotoxina pode estar presente em uma composição de nanopartícula botulínica da invenção. Alternativa ou adicionalmente, a neurotoxina pode ser incorporada dentro de uma matriz polimérica que estabiliza a neurotoxina, e permite a neurotoxina difundir da matriz e do emplastro. A neurotoxina pode também ser incorporada na camada adesiva do emplastro de modo que uma vez o emplastro seja aplicado na pele, a neurotoxina possa difundir através da pele. Em uma forma de realização, a camada adesiva pode ser ativada por calor onde as temperaturas de cerca de 37°C fazem com que o adesivo lentamente funda de modo que a neurotoxina se difunda através da pele. O adesivo pode permanecer pegajoso quando armazenado em menos do que 37°C, e uma vez aplicado na pele, o adesivo perde sua gomosidade quando funde. A administração da toxina está completa assim que o emplastro não mais adere à pele.

[0155] Aqueles de habilidade usual na técnica observarão que um emplastro transdérmico é mais um exemplo de um dispositivo com o qual as

composições de nanopartícula botulínicas da invenção podem ser administradas. Para fornecer mais alguns outros exemplos, o dispositivo pode ser empregado de modo que permita a composição ser aplicada sem primeiro aplicar a composição nos dedos de alguém, o que pode levar à paralisia indesejável dos dedos. Os dispositivos adequados incluem espátulas, esfregões, seringas sem agulhas e emplastros adesivos. O uso de espátulas ou esfregões, ou coisa parecida, pode requerer o dispositivo a ser inserido em um recipiente contendo a composição. O uso de seringas pode ser executado por encher a seringa com a composição. A composição pode depois ser topicamente dispersa pelas espátulas ou esfregões, ou pode ser expelida das seringas sobre a pele da pessoa.

[0156] Em muitas formas de realização da invenção, pode ser desejável limitar a liberação da toxina botulínica em apenas uma área de liberação planejada. Em algumas formas de realização, tal liberação limitada pode ser executada mediante a utilização de uma composição de nanopartícula botulínica da invenção em um dispositivo de aplicação que permita a aplicação da composição em um local alvo sobre a pele sem aplicar a composição nas áreas de local não alvo da pele. Claramente, um emplastro transdérmico pode ser utilizado para esta finalidade. Alternativa ou adicionalmente, se a toxina botulínica for para ser aplicada apenas em uma área selecionada, outras áreas podem ser cobertas ou pré-tratadas ou de outra maneira protegidas da exposição.

Aplicações de Tratamento da Toxina Botulínica

[0157] Como aqui descrito, muitas formas de realização da presente invenção envolvem a liberação de toxina botulínica em um indivíduo no contexto de uma composição de nanopartícula. Tal liberação é útil em uma variedade de contextos, incluindo em particular certas aplicações cosméticas e médicas. Certas tais aplicações são debatidas com maiores detalhes abaixo.

Aplicações Cosméticas

[0158] A toxina botulínica A (BTXA) se tornou um medicamento amplamente usado na dermatologia cosmética. Os efeitos adversos da BTXA observados com o uso cosmético possuem um impacto significativo sobre a submissão do paciente. Correntemente, a BTXA é administrada pela equipe médica e em um ambiente clínico tanto porque a BTXA é administrada por injeção, que requer pessoal treinado, quanto porque as ferramentas principais para prevenir os efeitos adversos da BTXA são de conhecimento de habilidade. O uso de técnicas de injeção corretas é obrigatório visto que a maioria dos efeitos indesejáveis é causada pela técnica incorreta. O conhecimento da anatomia humana (isto é, por exemplo, músculos faciais e extrafaciais), é importante para os médicos selecionarem a dose, tempo e técnica ideais.

[0159] Os efeitos adversos mais comuns dos procedimentos correntes para a administração de BTXA são dor e hematoma. Por exemplo, quando a solução de BTXA for administrada por injeção na região periocular, pálpebra e ptose da sobrancelha são comuns os efeitos adversos. Os efeitos adversos tais como dor, hematoma, equimose e contusão podem também ocorrer na face superior e inferior e em locais extrafaciais. Outros efeitos adversos possíveis incluem, mas não são limitados a eles, dor de cabeça e possível interação com medicações concomitantes. Sugestões têm sido feitas para evitar os efeitos adversos mais indesejáveis mediante a implementação das próprias técnicas de diluição, armazenagem e injeção, assim como a exclusão cuidadosa de pacientes com quaisquer contra-indicações. A dor, hematoma, equimose e contusão podem ser impedidas mediante o esfriamento da pele antes e após a injeção de BTXA. A ptose da pálpebra superior pode ser parcialmente corrigida usando colírios de apraclonidina ou fenilefrina (Wollina et al., 2005, Am. J. Clin. Dermatol., 6:141). No entanto, os efeitos adversos significativos permanecem com estratégias correntes.

[0160] Ao contrário, a presente invenção fornece métodos e composições para segura e eficazmente administrar toxinas botulínicas em uma maneira que minimize os efeitos colaterais adversos. Em uma forma de realização, a presente invenção contempla o método de administração botulínica como uma composição tópica e/ou localmente liberada que compreende uma composição de nanopartícula tal como uma nanoemulsão microfluidificada. Em uma forma de realização, a composição é formulada como um creme, unguento, óleo, espuma, pulverização ou gel.

[0161] Aqueles de habilidade usual na técnica observarão que as composições de nanopartícula botulínicas da invenção podem ser formuladas juntamente com qualquer uma de uma variedade de meios cosmeticamente aceitáveis nas preparações cosméticas tais como líquidos, cremes, emulsões, géis, loções espessantes ou pós; elas podem conter água e também qualquer solvente cosmeticamente aceitável, em particular, monoálcoois, tais como alcanóis tendo de 1 a 8 átomos de carbono (como etanol, isopropanol, álcool benzílico e álcool feniletílico), poliálcoois, tais como alquilenos glicólicos (como glicerina, etileno glicol e propileno glicol), e éteres glicólicos, tais como éteres mono-, di- e tri-etileno glicol monoalquílicos, por exemplo, éter etileno glicol monometílico e éter dietileno glicol monometílico, usados isoladamente ou em uma mistura. Tais componentes podem estar presentes, por exemplo, nas proporções de até tanto quanto 70% em peso, em relação ao peso da composição total.

[0162] As preparações cosméticas incluindo as composições de nanopartícula botulínicas da invenção podem conter pelo menos uma carga, especialmente para obter um produto fosco, que é especialmente desejável para indivíduos com pele oleosa. O termo “carga” significa qualquer partícula que seja sólida em temperatura ambiente e pressão atmosférica, usada isoladamente ou em combinação, que não reage quimicamente com os vários ingredientes da composição e que seja insolúvel nestes ingredientes, mesmo

quando estes ingredientes forem levados à uma temperatura acima da temperatura ambiente e especialmente ao seu ponto de amolecimento ou ao seu ponto de fusão. Tais cargas inertes tipicamente possuem pontos de fusão pelo menos mais elevados do que 170°C, e melhor ainda mais elevados do que 200°C.

[0163] As cargas podem ser absorventes ou não absorventes, isto é, capazes em particular de absorver os óleos da composição e também as substâncias biológicas secretadas pela pele. Em algumas formas de realização, as cargas são particuladas e possuem um diâmetro aparente variando de 0,01 a 150 µm, preferivelmente de 0,5 a 120 µm e melhor ainda variando de 1 a 80 µm. Um diâmetro aparente corresponde ao diâmetro do círculo em que a partícula elementar é inscrita ao longo de sua menor dimensão (espessura para lamelas).

TRATAMENTO DE RUGAS

[0164] As rugas faciais que envolvem as regiões da testa, glabellares, ritides e/ou periorbitais são um problema estético comum e são julgados relacionados à superatividade da musculatura facial subjacente. Por exemplo, o desenvolvimento de rugas glabellares é relacionado, pelo menos em parte, com as dinâmicas do próceros subjacente, músculo superciliar e músculos orbiculares do olho. As linhas faciais são consideradas problemáticas porque elas produzem a aparência de envelhecimento. Em alguns casos, elas podem também ser mal interpretadas como manifestações de emoções negativas (por exemplo, ira, ansiedade, tristeza), fadiga ou estresse.

[0165] Nos últimos anos, as injeções de soluções de toxina botulínica tornaram-se uma das terapias mais populares para o tratamento de linhas faciais hiperfuncionais. Após a injeção, a toxina atua para paralisar ou debilitar os músculos miméticos faciais. Isto aparentemente reduz ou elimina a aparência de rugas. Sadick NS., “The cosmetic use of botulinum toxin type B in the upper face” Clin Dermatol. 22(1):29-33 (2004).

[0166] O uso cosmético inicial de uma solução de toxina botulínica foi para o tratamento de linhas franzidas da testa (Carruthers et al., 1992, J. Dermatol. Surg. Oncol., 18:17). Também foi observado que a injeção de solução de BTX na platíma produz uma elevação da boca (Brandt et al., 1998, Dermatol. Surg. 24:1232). A injeção de solução de BTX na ponta do queixo também foi feita para o tratamento de vinco mental prominente (Carruthers et al., “Cosmetic Uses of Botulinum A Exotoxin”, pp. 325-48, Advances in Dermatology, James, et al., eds., Mosby-Yearbook, Chicago, 1997).

[0167] A presente invenção fornece composições de nanopartícula para o tratamento de rugas faciais e/ou expressões faciais de má aparência (por exemplo, devido à superatividade da musculatura facial subjacente). Naturalmente, os princípios e/ou composições pertinentes para o tratamento de rugas e/ou expressões faciais podem igualmente ser aplicados nas linhas ou rugas indesejáveis causadas pela atividade muscular em outro lugar no corpo (por exemplo, linhas do pescoço, etc.). Em algumas formas de realização, as composições de nanopartícula da invenção para uso no tratamento de rugas compreendem uma ou mais toxinas neuromusculares; em certas formas de realização tais toxinas são capazes de bloquear a atividade muscular facial; em algumas formas de realização, tais toxinas compreendem a toxina botulínica (BTX). Em algumas formas de realização, a presente invenção contempla a administração de uma nanoemulsão de toxina botulínica microfluidificada nas rugas faciais.

[0168] Foi recentemente sugerido que o início das rugas e/ou linhas faciais pode ser retardado pelo uso a longo prazo do tratamento com toxina botulínica tipo A através de repetidas injeções (Bind, 2006, Arch. Facial Plast. Surg., 8:426). No entanto, as injeções repetidas são dolorosas ao paciente, e existe um risco de injetar em grupos musculares não planejados, potencialmente causando efeitos colaterais adversos (por exemplo, ptose). Em

algumas formas de realização, uma nanoemulsão botulínica é aplicada na face e/ou pescoço sobre um período prolongado de tempo para retardar o início de linhas ou rugas faciais (ou pescoço). Em algumas formas de realização, uma nanoemulsão botulínica é aplicada em intervalos regulares na face e/ou pescoço durante um período prolongado de tempo para retardar o início das linhas ou rugas faciais. Em certas formas de realização, uma toxina botulínica é aplicada em intervalos regulares na face e/ou pescoço durante um período de tempo maior do que 6 meses para retardar o início das linhas ou rugas faciais. Em algumas formas de realização, uma toxina botulínica é aplicada em intervalos regulares na face e/ou pescoço durante um período de tempo maior do que 1 não para retardar o início das linhas ou rugas faciais. Em certas formas de realização, uma toxina botulínica é aplicada em intervalos regulares na face e/ou pescoço durante um período de tempo maior do que 5 anos para retardar o início das linhas ou rugas faciais. Em certas formas de realização, uma toxina botulínica é aplicada em intervalos regulares na face e/ou pescoço durante um período de tempo maior do que 10 anos para retardar o início das linhas ou rugas faciais.

LINHAS FACIAIS HIPERCINÉTICAS

[0169] A injeção e toxina botulínica tipo B (BTX-B) foi avaliada no manejo das linhas faciais hiperfuncionais. Por exemplo, vinte e quatro pacientes foram tratados com 400 a 800 unidades de BTX-B no músculo superciliar, orbicular do olho ou frontal. As melhoras da linha facial podem ser avaliadas usando a Wrinkle Improvement Score (WIS) and Rated Numeric Kinetic Line Scale (RNKLS). Um estudo relatou um início do efeito dentro de 72 horas. WIS e RNKLS para todos os locais foram estatisticamente melhores após o tratamento, com o efeito durável por 8 semanas. Em geral, os pacientes observaram uma melhora moderada (grau 2) em WIS e uma melhora 2 pontos na RNKLS (Ramirez et al., 2002, Otolaryngol. Head Neck Surg., 126:459).

[0170] Em algumas formas de realização, a presente invenção

contempla a administração de uma composição de nanopartícula botulínica tal como uma nanoemulsão de toxina botulínica microfluidificada nas linhas faciais. Em algumas formas de realização, a presente invenção contempla a administração de uma composição de nanopartícula botulínica nas regiões da face que tipicamente desenvolvem rugas antes da formação da ruga. É esperado que repetir tal administração pode retardar o início e/ou reduzir a intensidade ou gravidade das rugas que podem no final das contas se desenvolver (Binder, 2006, Arch Facila Plast. Surg., 8:426).

FAIXAS DE PLATISMA

[0171] A platisma é uma ampla camada fina de músculo que está situada em cada lado do pescoço imediatamente sob a fáscia superficial que pertence ao grupo de músculos faciais, que é innervada pelo nervo facial, e que puxa o lábio inferior e o canto da boca para o lado e para baixo e quando movido poderosamente expande o pescoço e puxa a sua pele de modo ascendente.

[0172] A injeção de toxina botulínica Z foi relatada de tratar o arqueamento das faixas musculares da platisma hipertrófica (isto é, tipicamente referido como o envelhecimento do pescoço). Um sistema de classificação (I a IV) com base nas ritides do pescoço horizontais, faixas de platisma e frouxidão da pele pode categorizar o grau de deformidade e servir como uma diretriz para as dosagens sugeridas de botulismo. Por exemplo: o Tipo II se refere às ritides do pescoço horizontais suaves; flacidez do músculo da platisma suave fina; e frouxidão suave da pele; Tipo III se refere às ritides do pescoço horizontais moderadas; flacidez do músculo da platisma moderada espessa; e frouxidão moderada da pele (Matarasso et al., 1999, Plast. Reconstr. Surg., 103:645).

[0173] Em uma forma de realização, a presente invenção contempla a administração de uma composição de nanopartícula botulínica tal como uma nanoemulsão de toxina botulínica fluidificada nas faixas de platisma.

Aplicações MédicasDistúrbios Neuromusculares

[0174] A BTX produzida pela bactéria *Clostridium botulinum* reversivelmente paralisa o músculo estriado quando administrada em doses sub-letais. A BTX foi usada no tratamento de vários distúrbios e condições neuromusculares que envolvem o espasmo e/ou contratura muscular incluindo várias formas de paralisia, contratura facial, distonia, espasmo hemifacial, tremor, espasticidade (por exemplo, resultante da esclerose múltipla), músculo retro-orbital, e várias outras condições oftamológicas (Carruthers et al., 1996, J. Am. Acad. Dermatol., 34:788).

Paralisia Facial

[0175] Foi relatado que a injeção de BTX em um grupo de músculos em um lado de uma face do paciente foi usada para tratar a sincinese e assimetria vertical causada pela paralisia no nervo facial (Armstrong et al., 1996, Clin. Otolaryngol., 21:15). Neste procedimento, os músculos levantadores dos ângulos da boca, zigomáticos principais, risórios e depressores dos ângulos da boca associados com a boca juntamente com vários músculos associados com os olhos sobre o lado normal da face do paciente, onde todos são tratados como um grupo de modo a afetar a simetria vertical inteira da face do paciente para compensar os efeitos da paralisia do nervo sobre o lado não tratado da face.

[0176] Em uma forma de realização, a presente invenção contempla a administração de uma composição de nanopartícula botulínica tal como uma nanoemulsão de toxina botulínica microfluidificada aos músculos faciais espásticos.

Blefaroespasmo

[0177] O blefaroespasmo é diagnosticado em resposta à contração repetida e rítmica dos músculos da pálpebra (isto é, também conhecido como espasmo da pálpebra). Em alguns exemplos, a pálpebra pode repetidamente

fechar (ou quase fechar) e reabrir. A origem desta condição comumente resulta da fadiga, estresse e/ou cafeína. Logo que os espasmos começa, no entanto, eles podem continuar de quando em quando durante alguns dias.

[0178] As contrações mais severas, onde a pálpebra completamente fecha, são possíveis. Esta condição agravada pode ser causada pela irritação da superfície do olho (córnea) ou das membranas que revestem as pálpebras (conjuntiva). Esta forma de repuxo da pálpebra dura por muito mais tempo, é freqüentemente muito desconfortável, e pode também fazer com que suas pálpebras fechem completamente.

[0179] Os sintomas de blefaroespasma incluem, mas não são limitados a eles, um repuxo descontrolável repetitivo ou espasmos de sua pálpebra (geralmente a pálpebra superior), sensibilidade leve ou visão obscura.

[0180] Em algumas formas de realização, a presente invenção contempla a administração de uma composição de nanopartícula botulínica tal como uma nanoemulsão de toxina botulínica microfluidificada no músculo da pálpebra.

Paralisia Cerebral

[0181] A paralisia cerebral inclui um grupo de distúrbios caracterizados pela perda de movimento ou perda de outras funções nervosas. Estes distúrbios são causados por lesões no cérebro que ocorrem durante o desenvolvimento fetal ou perto do momento do parto. A paralisia cerebral pode ser causada por lesão ao cérebro (a maior parte do cérebro, que está envolvida com as faculdades mentais superiores, sensações, e atividades musculares voluntárias).

[0182] A lesão ao cérebro pode resultar na perda das funções nervosas em áreas amplamente diferentes. A descoberta clássica de CP é a espasticidade (tono muscular aumentado) que pode afetar um único membro, um lado do corpo (hemiplegia espástica), ambas as pernas (diplegia espástica)

ou ambos os braços (quadriplegia espástica). Além disso, pode existir a perda parcial ou completa do movimento (paralisia), anormalidades sensoriais, e defeitos de audição e visão. As anormalidades de linguagem são comuns e ataques apopléticos podem ocorrer.

[0183] A função intelectual em pacientes com CP pode variar de normal extremamente inteligente a retardo mental grave. Os sintomas são geralmente evidentes antes de 2 anos e em casos graves pode aparecer tão prematuro quanto 3 meses. A paralisia cerebral é um tipo não progressivo de encefalopatia (lesão no cérebro) e os sintomas diretamente resultantes da doença não pioram.

[0184] As classificações de paralisia cerebral incluem espásticos, discinéticos, atáxicos e misturadas. A paralisia cerebral espástica inclui cerca de 50% dos casos. A paralisia cerebral discinética (atetóide) afeta cerca de 20%. Envolve o desenvolvimento de movimentos anormais (torceduras, solavancos ou outros movimentos) A paralisia cerebral atáxica envolve tremores, marcha instável, perda de coordenação e movimentos anormais. Afeta cerca de 10%. Os 20% remanescentes são classificados com misturados, com qualquer combinação dos sintomas acima.

[0185] Os sintomas de paralisia cerebral incluem, mas não são limitados a eles, ataques apopléticos, contrações musculares, dificuldade de sugar ou alimentar, respiração irregular, desenvolvimento retardado das habilidades motoras, tais como esticar, sentar, rolar, rastejar, andar, retardo motomental, retardo mental, anormalidades de linguagem (disartria), anormalidades visuais, anormalidades de audição, espasticidade, contraturas progressivas das juntas, raio de ação limitado de movimento, ou dentes em cavilha.

[0186] As toxinas botulínicas são eficazes no tratamento de criança com paralisia cerebral e outras hipertônias mediante a diminuição da deformidade, promoção de função, melhora do controle motor e alongamento

dos músculos encurtados. Para as crianças com hipertonia focal, as toxinas botulínicas oferecem uma dramática, mas temporária, mudança repetível que afeta a reabilitação. Pesquisa rápida tem capturado o efeito positivo das toxinas na diminuição da capacidade e limitações funcionais. O uso a longo prazo de toxinas botulínicas e o papel que as toxinas desempenham em toda a vida breve vida da pessoa com um distúrbio hipertônico da infância devem ser ainda determinados (Gaebler-Spira et al., 2003, Phys. Méd. Rehabil. Clin. N. Am., 14:703).

[0187] Em uma forma de realização, a presente invenção contempla a administração de uma composição de nanopartícula botulínica tal como uma nanoemulsão de toxina botulínica microfluidificada a um paciente que apresenta sintomas de hipertonia. Em uma forma de realização, a hipertonia compreende a paralisia cerebral. Em uma forma de realização, o paciente é uma criança.

Estrabismo

[0188] O estrabismo envolve o desvio do alinhamento de um olho em relação ao outro e é também referido como estrábicos, esotropia, exotropia, piscar de olhos ou leucoma. Acredita-se que o estrabismo é causado por uma falta de coordenação entre os olhos. Como um resultado, os olhos olham em diferentes direções e não focalizam simultaneamente em um ponto único.

[0189] Na maioria dos casos de estrabismo em crianças, a causa é desconhecida. Em mais do que a metade destes casos, o problema está presente no ou pouco depois do parto (estrabismo congênito). Quando os dois olhos falham em focalizar sobre a mesma imagem, o cérebro pode aprender a ignorar o fornecimento de um olho. Se isto é deixado continuar, o olho que o cérebro ignora nunca verá bem. Esta perda de visão é chamada de ambliopia, e é freqüentemente associada com o estrabismo.

[0190] O estrabismo adquirido em adultos pode ser causado por lesões na órbita do olho ou cérebro, incluindo lesões rigorosas na cabeça e

acidente vascular cerebral. A pessoa com diabetes freqüentemente tem perda de circulação que causa um estrabismo paralítico adquirido. A perda de visão em um olho de qualquer causa geralmente fará com que o olho gradualmente se torne visível (exotropia). Pela razão dos cérebros dos adultos já serem desenvolvidos para a visão, os problemas associados com a ambliopia, em que o cérebro ignora o fornecimento de um olho, não ocorrem com o estrabismo adulto.

[0191] Os sintomas de estrabismo incluem, mas não são limitados a eles, olhos que parecem vinhos, olhos que não se alinham na mesma direção, movimento dos olhos não coordenado, visão dupla, ou visão em apenas um olho com perda da percepção de profundidade.

[0192] Os resultados a longo prazo da terapia botulínica em pacientes tendo esotropia adquirida foram relatados. Sessenta e oito crianças (faixa de idade, 8 a 64 meses) com esotropia adquirida foram inscritas em um estudo prospectivo. A toxina botulínica foi injetada nos dois recti medianos. As duas condições motoras e sensoriais foram avaliadas em 1 e 2 semanas; 3, 6 e 12 meses; e a cada ano após a última injeção.

[0193] Após uma continuação média de 4,8 anos depois da última injeção, o sucesso motor foi obtido em 36 crianças com uma injeção (52,9%), aumentando para 48 (70,6%) e 60 (88,2%) crianças após duas e três injeções, respectivamente. Quarenta e oito (70,6%) pacientes tiveram pelo menos fusão periférica (binocularidade de categoria 1) e 32 (47,1%) tiveram estereoauidade de pelo menos 400 segundos de linha curva (binocularidade de categoria 2). Hipermetropia mais elevada, ambliopia menos severa, e um ângulo menor de esotropia foram os melhores prognosticadores do sucesso motor. A ambliopia mínima e alinhamento motor favorável foram associados com melhor resultado de binocularidade.

[0194] A toxina botulínica pode ser um tratamento a longo prazo eficaz de esotropia adquirida. É especialmente útil em crianças com

hipermetropia elevada, ambliopia mínima, e pequeno desvio esotrópico (Tejedor et al., 2001, Investigative Ophthalmology and Visual Science, 42:2542).

[0195] Em uma forma de realização, a presente invenção contempla a administração de uma composição de nanopartícula botulínica tal como uma nanoemulsão de toxina botulínica microfluidificada em um paciente que apresenta sintomas de estrabismo. Em uma forma de realização, o paciente é uma criança.

Distonia

[0196] A distonia é uma condição médica que compreende movimentos lentos e torcidos involuntários. Um movimento descontrolado ou lento é definido como uma piora do tônus muscular (geralmente em grupos musculares grandes), causando contrações lentas involuntárias da cabeça, membros, tronco ou pescoço (isto é, distonia cervical). Os movimentos torcidos sinuosos lentos dos músculos (atetose) ou contração muscular sustentada (distonia) podem ser causadas por várias condições, incluindo paralisia cerebral, encefalite, efeitos colaterais de medicamento, encefalopatia hepática, e coreia de Huntington. O movimento anormal pode ser reduzido ou cessar durante o sono, mas pior por estresse emocional. As atitudes anormais e às vezes grotescas podem ser uma manifestação destes movimentos.

[0197] Em uma forma de realização, a presente invenção contempla a administração de uma composição de nanopartícula botulínica tal como uma nanoemulsão de toxina botulínica microfluidificada à um paciente que apresenta sintomas de distonia.

Hiperplasia Da Próstata

[0198] A injeção de toxina botulínica pode ser eficaz em homens com hiperplasia prostática benigna. Trinta homens com hiperplasia prostática benigna foram inscritos em um estudo controlado por placebo escolhido a esmo. Após uma avaliação de linha de base, cada participante recebeu 4 ml de

solução injetada na glândula da próstata. Os pacientes no grupo de controle receberam solução de salina e os pacientes no grupo tratado receberam 200 U de toxina botulínica. O resultado de cada grupo foi avaliado mediante a comparação das contagens de sintoma, concentração de antígeno específico da próstata no soro, volume da próstata, volume de urina residual pós esvaziamento, e taxas máximas de fluxo de urina.

[0199] Após 2 meses, 13 pacientes no grupo tratado e 3 no grupo de controle tiveram alívio sintomático subjetivo ($P = 0,0007$). Nos pacientes que receberam toxina botulínica, a contagem de sintoma foi reduzida em 65% comparada com os valores da linha de base e pela concentração de antígeno específico da próstata no soro em 51% da linha de base. Nos pacientes que receberam salina, a contagem de sintoma e a concentração de antígeno específico da próstata no soro não foram significativamente mudadas comparadas com os valores da linha de base e os valores em 1 mês. Seguiu-se o cálculo da média $19,6 \pm 3,8$ meses (Maria et al., 2003, Urology 62:259).

[0200] Em uma forma de realização, a presente invenção contempla a administração de uma composição de nanopartícula botulínica tal como uma nanoemulsão de toxina botulínica microfluidificada à um paciente que apresenta sintomas de hiperplasia da próstata.

Hiperidrose

[0201] A hiperidrose é uma condição médica em que uma pessoa sua excessiva e imprevisivelmente. As pessoas com hiperidrose podem suar mesmo quando a temperatura estiver fria, e quando elas estão em repouso. O suor ajuda o corpo a ficar frio e é perfeitamente natural. As pessoas suam mais em temperaturas quentes, quando elas se exercitam, ou em resposta às situações que a tornam nervosas, irritadas, embaraçadas, ou assustadas.

[0202] No entanto, o suor excessivo ocorre sem tais causas. Aqueles com hiperidrose parecem ter glândulas sudoríparas superativas. O suor descontrolável pode levar ao desconforto significativo, tanto físico quanto

emocional. Quando o suor excessivo afeta as mãos, pés e axilas, é chamado de hiperidrose primária ou focal. A hiperidrose primária afeta de 2% a 3% da população, ainda menos do que 40% dos pacientes com esta condição procuram conselho médico. Na maioria dos casos de hiperidrose primária, nenhuma causa pode ser observada. Da a impressão de ocorrer em família. Se o suor ocorre como um resultado de uma outra condição médica, é chamado de hiperidrose secundária. O suor pode ser em todo o corpo, ou pode ser localizado em uma área. As condições que causam a hiperidrose secundária incluem, mas não são limitados a elas, acromegalia, hipertireoidismo, distúrbios do controle da glicose, feocromocitoma, síndrome carcinóide, câncer, tuberculose, infecções, menopausa, lesão da medula espinhal, acidente vascular cerebral, doenças de Parkinson, doença cardíaca ou pulmonar, medicações, substâncias de abuso, ou condições de ansiedade. O sintoma primário de hiperidrose é a umidade.

[0203] A toxina botulínica tipo A (BOTOX[®]) foi aprovada pela FDA em 2004 para o tratamento de suor severo na axila, uma condição chamada hiperidrose axilar primária. Pequenas doses de toxina botulínica purificada injetadas na axila temporariamente bloqueiam os nervos que estimulam o suor. Os efeitos colaterais incluem dor no local da injeção e sintomas semelhantes à gripe. O BOTOX[®] usado para o suor das palmas pode causar fraqueza branda, mas temporária e dor intensa.

[0204] Em uma forma de realização, a presente invenção contempla a administração de uma composição de nanopartícula botulínica tal como uma nanoemulsão de toxina botulínica microfluidificada à um paciente que apresenta sintomas de hiperidrose.

Exemplificação

[0205] Os seguintes exemplos são apenas destinados a fornecer ilustrações das formas de realização específicas contempladas pela presente invenção. Os exemplos não são destinados de qualquer maneira a serem

limitativos.

Exemplo 1: Formulação de Nanoemulsão Botulínica

[0206] Este exemplo apresenta uma forma de realização da nanoemulsão preparada pela microfluidificação que compreende a toxina botulínica (isto é, por exemplo, BOTOX[®]).

[0207] Uma preparação para a microfluidificação foi feita como se segue:

1. 5 g de óleo de soja e 5 g de Tween 80 foram misturados, aquecimento quando necessário (tipicamente não requerido) para emulsificar a mistura.

2. 100 Unidades de BOTOX[®], incorporados dentro de uma matriz de albumina humana (Allergan, Irvine CA), foram adicionados à 100 ml de água deionizada/destilada e agitados até que uniformemente misturados.

3. A preparação da Etapa 1 foi adicionada à preparação da Etapa 2 e agitada até que uniformemente misturada.

4. A preparação foi homogeneizada durante 1 minuto (ver as distribuições de partícula resultantes na Tabela 1 e Figura 1)

5. Procedimento de microfluidificação de passagem única em 24.000 psi (165,5 MPa) foi executado usando um Microfluidizer[®] Processor.

[0208] A nanoemulsão resultante foi avaliada com relação ao tamanho de partícula usando o classificador de partícula Malvern Nano S capaz de classificar as partículas entre cerca de 0,6 nm a 6000 nm. A preparação de nanoemulsão de BOTOX[®] tinha dois pontos máximos de tamanho de partícula tendo um tamanho médio de partícula de 95,33 nm (Tabela 2 e Figura 2).

Tabela 1: Distribuição do Tamanho de Partícula de uma Microemulsão de BOTOX® Homogeneizada

		Diam.	intensidade	largura (nm)
Z-média: 3391	ponto	1512	100	76.6
PDI: 0.341	ponto	0	0	0
interceptação:	ponto	0	0	0

Tabela 2: Distribuição do Tamanho de Partícula de uma Nanoemulsão de BOTOX® Microfluidificada

		Diam. (nm)	intensidade%	largura (nm)
Z-média:	ponto	134.2	76.49	31.03
PDI: 0.252	ponto	44.97	23.51	6.34
interceptação:	ponto	0	0	0

Exemplo 2: Efeito Relaxante Muscular das Nanoemulsões de BOTOX® Injetadas

[0209] Este exemplo apresenta uma forma de realização de nanoemulsões de BOTOX® que possuem eficácia comparável como injeções de BOTOX® em solução livre como uma solução de salina.

[0210] O esquema experimental comparou as seguintes duas preparações de BOTOX®:

1) nanoemulsões de BOTOX®, preparadas de acordo com o Exemplo 1, foram injetadas através de injeção intramuscular (IM) na pata traseira (músculo gastrocnêmico) de camundongos fêmeas Swiss Webster.

2) Soluções de salina de BOTOX® foram injetadas através de injeção intramuscular (IM) no músculo gastrocnêmico da pata traseira de camundongos fêmeas Swiss Webster.

[0211] O ensaio Digit Abduction Score (DAS) foi usado para determinar a eficácia de enfraquecimento do músculo local (Aoki, 1999). Os valores DAS foram designados como se segue: (0) pé chato, dispersão digital mesmo quando a perda de controle; (1) pé chato, uma diferença na largura da abdução digital comparado com a pata de controle ou dois dígitos que tocam e a dispersão em repouso completamente; (2) pé chato, ligeira abertura de espaço nas extremidades de todos os dígitos ou três dígitos que se tocam; (3) cinco dígitos que se tocam se o pé for chato, quatro dígitos juntos se o pé for curvado; (4) pé curvado, todos os cinco dígitos que se tocam.

[0212] A injeção de nanoemulsão de BOTOX[®] e solução salina de BOTOX[®] foram avaliadas pelo DAS sete dias sob um protocolo cego. As contagens de DAS de 1 a 2 foram observados tanto para a nanoemulsão de toxina botulínica (3,96 U/5 µl) quanto para a solução de salina de toxina botulínica (3,96 U/5 µl). O grupo de controle, que é uma nanoemulsão vazia, tinha DAS (0). Cada grupo (nanoemulsão de toxina botulínica, salina e controle) era compreendido de cinco (5) animais.

[0213] Esta informação comprova que as técnicas de microfluidificação não destroem as características funcionais da toxina botulínica como demonstrado pela injeção de solução salina de toxina botulínica não microfluidificada e que as nanoemulsões de toxina botulínica são funcionalmente eficazes.

Exemplo 3: Efeito Relaxante Muscular de Nanoemulsões de BOTOX[®] Transdérmicas

[0214] Este exemplo demonstra a eficácia terapêutica das nanoemulsões botulínicas transdermicamente aplicadas (isto é, por exemplo, uma nanoemulsão de BOTOX[®]).

[0215] Uma nanoemulsão de BOTOX[®] (9,9 U/100 µl), preparada de acordo com o Exemplo 1, foi topicamente administrada no músculo gastrocnêmico da pata traseira de cinco (5) camundongos fêmeas Swis

Webster. Um grupo de controle de cinco (5) camundongos fêmeas Swiss Webster recebeu uma nanoemulsão identicamente preparada exceto que o BOTOX® foi omitido. Durante os sete dias seguintes ao tratamento, as contagens DAS de 1 a 2 foram observadas, marcadas de acordo com o Exemplo 2, para o grupo tratado com nanoemulsão de toxina botulínica, mas não no grupo de controle. A piora da pele (por exemplo, irritação, vermelhidão, etc.) não foi observada em qualquer momento após o tratamento. Os dados mostram que uma nanoemulsão de toxina botulínica é biologicamente ativa após a administração transdérmica em uma maneira similar às injeções de toxina botulínica convencionalmente administradas.

Exemplo 4: Efeitos Relaxantes Musculares Devido à Administração de uma Nanoemulsão Botulínica: Comparação Controlada de Botilinum Padrão Injetado vs. Nanoemulsão Botulínica Tópica em Camundongos

[0216] Este exemplo forneceu uma experiência controlada para demonstrar que a aplicação de uma nanoemulsão botulínica tópica da invenção pode induzir os efeitos relaxantes musculares equivalentes à uma preparação botulínica injetada padrão (que não era uma nanoemulsão).

Método

[0217] Trinta e cinco camundongos Swiss Webster fêmeas foram adquiridos da Charles River em aproximadamente 20 gramas de peso. Após a chegada, todos os animais foram adaptados em suas gaiolas durante uma semana (grupo alojado de 5 camundongos por gaiola per Grupo com definido abaixo) e providos com forragem de gaiola padrão e ração Purina 5001. Após uma semana, o Digit Abduction Scoring (DAS) foi usado para determinar a função muscular local seguinte a aplicação de uma nanoemulsão de BOTOX® preparada de acordo com o Exemplo 1. No ensaio DAS, os camundongos foram suspensos pelas caudas brevemente (10 segundos) para extrair uma resposta de susto característica em que o animal estendeu as suas patas traseiras e abduziu seus dedos traseiros. Este ensaio foi executado uma vez

uma por semana durante 3 semanas.

[0218] Três preparações de tratamento foram preparadas para três grupos de tratamento de camundongos: 1) BOTOX[®] em uma solução de salina para injeção, 2) uma nanoemulsão contendo BOTOX[®] e 3) uma nanoemulsão “vazia” contendo todos os constituintes da nanoemulsão de BOTOX[®] exceto o BOTOX[®] que foi também processado através do Microfluidizer[®] Processor em uma maneira idêntica à nanoemulsão contendo BOTOX[®].

Paradigmas de Tratamento

[0219] O Grupo 1 (IM) de 15 Camundongos foi injetado com 10 U/5 µl de BOTOX[®]/kg de peso corporal que foi colocado em suspensão em uma solução de salina e depois injetado no músculo gastrocnêmico da pata traseira dos camundongos.

[0220] O Grupo 2 (Tópica) de 15 Camundongos foi tratado topicamente com 10 U/100 µl de nanoemulsão de BOTOX[®]/kg de peso corporal que foi aplicada na pele dos camundongos sobre o músculo gastrocnêmico da pata traseira.

[0221] O Grupo 3 (Controle) de 15 Camundongos foi tratado topicamente com nanoemulsão vazia não nenhum BOTOX[®]/kg que foi aplicada na pele dos camundongos sobre o músculo gastrocnêmico da pata traseira.

Avaliação

[0222] Uma semana após a injeção e/ou aplicação transdérmica, o ensaio DAS foi usado para determinar os efeitos potenciais de enfraquecimento do músculo local do tratamento. Este ensaio foi executado uma vez por semana durante as próximas três semanas. Seguinte a injeção e/ou aplicação transdérmica de BOTOX[®] ou uma preparação de controle, os graus variáveis da abdução digital foram classificados em uma escala de cinco pontos (0 = normal a 4 = redução máxima na abdução digital e extensão da

perna) por um observador que foi camuflado para o tratamento.

Resultados e Conclusão

[0223] Em uma semana após o tratamento, o grupo de camundongos (Grupo #2) tratados com a preparação de nanoemulsão botulínica tópica alcançou uma contagem de $2,8 \pm 0,3$ na escala Aoki comparada com o grupo de controle de camundongos (Grupo #3) tratado com a nanoemulsão vazia que tinha uma contagem de $0,5 \pm 0,3$ ($P < .001$). Por comparação, aqueles camundongos (Grupo # 1) injetados com botulinum em uma solução salina possuíam uma contagem de $3,5 \pm 0,3$. Em três semanas após o tratamento, tanto o grupo de camundongos tratados com a preparação de nanoemulsão botulínica tópica quanto aqueles camundongos injetados com botulinum em salina tinham contagens Aoki que estavam em níveis de controle, como esperado pela literatura publicada sobre o botulinum injetado. (Este decremento na escala Aoki em camundongos foi observado repetidamente com o botulinum, que não obstante tinha um efeito anti-rugas contínuo durante vários meses quando usado como doses terapêuticas em seres humanos). Além disso, a piora da pele (por exemplo, irritação, vermelhidão, etc) não foi observada em qualquer momento após o tratamento.

[0224] Em resumo, estes dados controlados sugerem fortemente que a preparação de nanoemulsão botulínica tópica liberou um efeito biológico comparável ao botulinum injetado.

Exemplo 5: Administração de Composição de Nanopartícula Botulínica em um Indivíduo Humano para Suavizar as Rugas

[0225] Uma nanoemulsão botulínica tópica da invenção foi preparada e aplicada à uma pessoa com rugas significativas na testa para determinar se pode ser eficaz no relaxamento dos músculos na testa que geraram estas rugas (em aproximadamente a mesma maneira que deve ser esperado da administração de botulinum colocado em suspensão em uma solução de salina simples que foi injetada nestes músculos).

Métodos

[0226] Uma nanoemulsão botulínica foi preparada empregando as seguintes etapas:

1. Agitar 800 mg de óleo de soja e 800 mg de Tween 80 em um frasco estéril durante 5 minutos
2. Adicionar 8m4 ml de salina a 0,9% com 4500 unidades de uma toxina botulínica tipo A farmacêutica aprovada. Agitar durante 20 minutos.
3. Homogeneizar a amostra durante 1 minuto
4. Agitar a amostra durante 20 minutos
5. Microfluidificar uma vez em 23.000 psi (158,6 MPa)

[0227] A nanoemulsão foi adicionada em um volume igual de creme de pele (Base PCCA Vanishing Cream Light) e foi submetida a vórtice em um creme uniforme.

[0228] Um paciente que possuía rugas horizontais significativas sobre sua testa, representando superatividade destes músculos frontais, foi selecionado par o tratamento. Este paciente nunca foi tratado com um produto botulínico ou um produto de carga dérmica. O paciente foi avaliado antes do tratamento por um cirurgião plástico com certificado do conselho usando uma escala de rugas de 4 pontos, com uma classificação de “1” igual a “nenhuma ruga” e uma classificação de “4” igual a ruga significativa. O paciente foi avaliado usando esta escala quando sua face estava “em repouso” e quando ele tentou criar o máximo de rugas mediante a contração de seus músculos frontais que foi obtida pelo esforço de maximamente elevar suas sobrancelhas (“Maximal Brow Elevation”).

[0229] Este paciente tinha uma classificação de 4 em repouso e 4 na elevação máxima da sobrancelha. Ele demonstrou excelente mobilidade de ser capaz de contrair os músculos frontais. O paciente foi fotografado usando uma câmara SLR digital assim como vídeo digital, tanto em repouso como

quando solicitado a executar uma Maximal Brow Elevation (Figura 3A, elevação máxima da sobrancelha antes do tratamento).

[0230] O paciente foi solicitado não utilizar qualquer maquiagem facial ou protetor solar no dia do tratamento, mas lavar sua face antes de vir ao consultório com Ivory Soap. Quando no consultório, 0,6 cm³ do creme de nanoemulsão (como preparado no Exemplo 1) foi aplicado na testa do paciente sobre a distribuição de seus músculos frontais pelo cirurgião plástico. O creme foi aplicado na pele da testa do paciente por uma pipeta e esfregado na pele pelo cirurgião usando seu dedo (coberto por uma luva plástica) até que o creme não mais estivesse visível pelo cirurgião. O paciente foi observado no consultório do médico durante três horas. Ele foi solicitado de não tocar na sua testa durante 12 horas e depois lavá-la com Ivory Soap e água. O paciente foi observado na manutenção após 1 dia e depois em 1, 2, 4, 8 e 12 semanas. Nas visitas de manutenção, as rugas do paciente em repouso e na Elevação Máxima de Sobrancelha foram avaliadas pelo médico. Igualmente, o médico repetiu as fotografias de retrato digitais padronizadas e vídeo.

Resultados

[0231] Pela primeira semana após o tratamento, o paciente foi incapaz de contrair seus músculos da testa como evidenciado por uma incapacidade de levantar sua sobrancelha na Elevação Máxima de Sobrancelha requerida. A avaliação clínica do médico foi que o tratamento tinha induzido uma paralisia completa dos músculos tratados que era equivalente aos tratamentos que ele tinha executado em outros pacientes usando injeções de toxina botulínica em uma área de tratamento similar. O paciente tinha uma ligeira restauração da mobilidade da sobrancelha na semana 8, mas continuou a ter uma redução significativa em sua mobilidade de sobrancelha na semana 12 de observação.

[0232] O paciente foi capaz de mover seus outros músculos faciais sob as áreas da pele não tratadas e nenhum efeito colateral foi observado pelo

cirurgião plástico, incluindo nenhuma mudança na pele imediatamente após o tratamento ou em qualquer visita de manutenção. Da mesma maneira, o paciente não relatou nenhum efeito colateral, incluindo quaisquer mudanças em sua pele (por exemplo, irritação, vermelhidão, etc.) em qualquer momento após o tratamento.

Conclusão

[0233] Em resumo, esta experiência fortemente sugere que a preparação de nanoemulsão botulínica tópica liberou um efeito biológico e clínico significativo que foi avaliado pelo cirurgião plástico ser comparável em eficácia clínica com aquele que teria sido esperado seguindo um tratamento padrão de botulinum injetado (em uma solução salina simples) por este paciente.

Exemplo 6: Outras Formulações de Composição de Nanopartícula Botulínica

[0234] Uma variedade de diferentes composições de nanopartícula botulínicas foi preparada de acordo com o Exemplo 1 exceto que em alguns casos, existiram diferenças no equipamento usado, na pressão aplicada, na quantidade de botulinum adicionada, e o volume de composição de nanopartícula preparada, que pode ser responsável pela variabilidade dos tamanhos observados. O seguinte tamanho médio de partícula e as distribuições foram observados (Tabela 3):

Tabela 3: Distribuição do Tamanho de Partícula de Nanoemulsões de BOTOX® Microfluidizadas

	tamanho médio de partícula (nm)						
	76.8	91.5	94.2	95.3	97.9	112.4	média 95
distribuição limiar (nm)							
% acima de	36.4	48.6	47.6	54.7	50.7	53.8	49
% acima de	21.0	37.8	35.5	37.3	40.8	45.2	36
% acima de	9.1	27.4	24.8	20.3	31.4	36.8	25

% acima de	2.8	16.1	10.3	1.5	15.7	21.7	11
% acima de	0.0	0.6	4.5	0.0	3.6	9.6	3

Exemplo 7: Conexão de Pressão Aplicada ao Tamanho Médio de Partícula Obtido

[0235] Uma formulação de pré-mistura foi preparada como descrita no Exemplo 1 (exceto para a ausência de toxina botulínica) e foi dividida em 4 alíquotas de 100 ml, A-D, cada uma das quais foi passada através de um Microfluidizer[®] em uma pressão diferente, resultando em um tamanho médio de partícula diferente, como indicado abaixo na Tabela 4:

Tabela 4: Tamanho de Partícula de Nanoemulsões de BOTOX[®]
Microfluidizadas em Diferentes Pressões

preparação	Pressão (psi) (1 psi = 6,9 kPa)	tamanho médio de partícula (nm)
A	3.500	142 nm
	10.000	107 nm
C	17.000	94 nm
D	24.000	89 nm

Equivalentes e Escopo

[0236] O que precede foi uma descrição de certas formas de realização preferidas não limitativas da invenção. Aqueles qualificados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar não usando mais nenhuma experiência rotineira, muitos equivalentes às formas de realização específicas da invenção aqui descritas. Aqueles de habilidade usual na técnica observarão que várias mudanças e modificações desta descrição podem ser feitas sem divergir do espírito ou escopo da presente invenção, como definido nas reivindicações que seguem.

[0237] Nas reivindicações os artigos tais como “um”, “uma”, “o” e “a” podem significar um ou mais do que um a não ser que indicado ao contrário ou de outra maneira evidente do contexto. As reivindicações e

descrições que incluem “ou” entre um ou mais membros de um grupo são considerados satisfeitos se um, ou mais do que um ou todos os membros do grupo estiverem presentes, forem empregados, ou de outra maneira pertinentes a um dado produto ou processo a não ser que indicado ao contrário ou de outra maneira evidente do contexto. A invenção inclui as formas de realização em que exatamente um membro do grupo está presente, empregado, ou de outra maneira pertinente a um dado produto ou processo. A invenção também inclui as formas de realização em que mais do que um ou todos os membros do grupo estão presentes, empregados, ou de outra maneira pertinente a um dado produto ou processo. Além disso, deve ficar entendido que a invenção abrange todas as variações, combinações e permutações em que uma ou mais limitações, elementos, cláusulas, termos descritivos, etc. de uma ou mais das reivindicações ou das partes pertinentes da descrição são introduzidas em uma outra reivindicação. Por exemplo, qualquer reivindicação que seja dependente de uma outra reivindicação pode ser modificada para incluir uma ou mais limitações observadas em qualquer outra reivindicação que seja dependente da mesma reivindicação base. Além disso, onde as reivindicações relacionam uma composição, deve ficar entendido que os métodos de uso da composição para qualquer uma das propostas aqui apresentadas são incluídos, e os métodos de produção da composição de acordo com qualquer um dos métodos de produção aqui divulgados ou outros métodos conhecidos na técnica são incluídos, a não ser que de outra maneira indicado ou a não ser que ficasse evidente a uma pessoa de habilidade usual na técnica em que uma contradição ou inconsistência surgisse. Além disso, a invenção abrange as composições preparadas de acordo com qualquer um dos métodos para a preparação das composições aqui divulgadas.

[0238] Onde os elementos forem apresentados como listas, por exemplo, em formato de grupo Markush, deve ficar entendido que cada subgrupo dos elementos é também divulgado, e qualquer elemento pode ser

removido do grupo. É da mesma forma observado que o termo “compreendendo” é planejado a ser aberto e permite a inclusão de elementos ou etapas adicionais. Deve ficar entendido que, em geral, onde a invenção, ou aspectos da invenção, for/forem referido(s) como compreendendo elementos, aspectos, etapas, etc. particulares, certas formas de realização da invenção ou aspectos da invenção consistem, ou consistem essencialmente, de tais elementos, aspectos, etapas, etc. Para os propósitos de simplicidade aquelas formas de realização não foram aqui especificamente apresentadas *in haec verba*. Assim, para cada forma de realização da invenção que compreende um ou mais elementos, aspectos, etapas, etc., a invenção também fornece formas de realização que consistem ou consistem essencialmente destes elementos, aspectos, etapas, etc.

[0239] Onde as faixas são fornecidas, os pontos finais são incluídos. Além disso, deve ficar compreendido que a não ser que de outra maneira indicada ou de outra maneira evidente do contexto e/ou a compreensão de uma pessoa de habilidade usual na técnica, os valores que são expressos como faixas podem assumir qualquer valor específico dentro das faixas mencionadas em diferentes formas de realização da invenção, até a décima parte da unidade do limite mais baixo da faixa, a não ser que o contexto claramente dite de outra maneira. Deve ficar entendido que a não ser que de outra maneira indicada ou de outra maneira evidente do contexto e/ou a compreensão de uma pessoa de habilidade usual na técnica, os valores expressos como faixas podem assumir qualquer subfaixa dentro da faixa fornecida, em que os pontos finais da subfaixa são expressos no mesmo grau de exatidão como a décima parte da unidade do limite mais baixo da faixa.

[0240] Além disso, deve ficar compreendido que qualquer forma de realização particular da presente invenção pode ser explicitamente excluída de qualquer uma ou mais das reivindicações. Qualquer forma de realização, elemento, aspecto, aplicação ou aspecto das composições e/ou métodos da

invenção (por exemplo, qualquer toxina botulínica, qualquer óleo, qualquer tensoativo, qualquer meio de dispersão, qualquer nanopartícula ou composição compreendendo qualquer nanopartícula, qualquer método de fabricação de nanopartículas, qualquer via ou local de administração, qualquer propósito para o qual uma composição é administrada, etc.) pode ser excluída de qualquer uma ou mais reivindicações. Para propósitos de brevidade, todas as formas de realização em que um ou mais elementos, aspectos, propósitos ou aspectos são excluídos não são aqui apresentados explicitamente.

REIVINDICAÇÕES

1. Nanoemulsão, caracterizada pelo fato de compreender uma população de partículas, em que 50 a 100% das partículas possui diâmetros entre 10 e 300 nanômetros, ou em que 50 a 100% das partículas possui uma faixa de diâmetros entre 10 e 250 nanômetros, ou em que 50 a 100% das partículas possui uma faixa de diâmetros entre 10 e 200 nanômetros, ou em que 50 a 100% das partículas possui uma faixa de diâmetros entre 10 e 150 nanômetros, ou em que 50 a 100% das partículas possui uma faixa de diâmetros entre 10 e 120 nanômetros, ou em que 50 a 100% das partículas possui uma faixa de diâmetros entre 10 e 100 nanômetros, ou em que 50 a 100% das partículas possui uma faixa de diâmetros entre 10 e 50 nanômetros, e em que dita nanoemulsão compreende uma toxina botulínica, um óleo e um surfactante.

2. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que 70% a 100% das partículas possuem um tamanho médio de partícula na faixa de 70 e 130 nanômetros ou na faixa de 80 e 110 nanômetros.

3. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que 50 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 300 nm, ou em que 25 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 300 nm, ou em que 10 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 300 nm, ou em que 5 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 300 nm, ou em que 1 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 300 nm.

4. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que 50 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 200 nm, ou em que 25 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 200 nm, ou em que 10 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 200 nm, ou em que 5 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 200 nm, ou em que 1 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 200 nm.

5. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que 50 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 120 nm, ou em que 25 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 120 nm, ou em que 10 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 120 nm, ou em que 5 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 120 nm, ou em que 1 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 120 nm.

6. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo é de 0 a 600 nm, ou em que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo é de 0 a 500 nm, ou em que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo é de 0 a 400 nm, ou em que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo é de 0 a 300 nm, ou em que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo é de 0 a 200 nm, ou em que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo é de 0 a 100 nm, ou em que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo é de 0 a 50 nm.

7. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que as partículas possuem um diâmetro médio de 300 nm ou 200 nm ou 150 nm ou 100 nm ou 75 nm ou 50 nm.

8. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 100 a 300 nm, ou em que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 50 a 250 nm, ou em que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 60 a 200 nm, ou em que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 65 a 150 nm, ou em que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 70 a 130 nm, ou em que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 80 a 110 nm, ou em

que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 90 a 100 nm.

9. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão é estável, ou em que 50 a 100% das partículas é estável por 1 dia a 24 meses, ou em que 50 a 100% das partículas é estável por 2 semanas a 24 meses, ou em que 50 a 100% das partículas é estável por 2 meses a 24 meses, ou em que 50 a 100% das partículas é estável por 5 meses a 24 meses, ou em que 50 a 100% das partículas é estável por 12 meses a 24 meses, ou em que 50 a 100% das partículas é estável por 24 meses.

10. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão foi gerada mediante a exposição à força de cisalhamento elevada, ou em que a nanoemulsão foi gerada mediante a exposição à força de cisalhamento elevada por 0 a 10 minutos, 0 a 2 minutos, 0 a 1 minuto ou 0 a 30 segundos.

11. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão foi gerada mediante a exposição às pressões de 3.000 psi (20,7 MPa) a 24.000 psi (165,5 MPa), 10.000 psi (69 MPa) a 24.000 psi (165,5 MPa), 18.000 psi (124,1 MPa) a 24.000 psi (165,5 MPa) ou 24.000 psi (165,5 MPa).

12. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão foi gerada por microfluidificação, ou em que a nanoemulsão foi gerada por microfluidificação em uma pressão de 3.000 psi (20,7 MPa) a 24.000 psi (165,5 MPa), 10.000 psi (69 MPa) a 24.000 psi (165,5 MPa), 18.000 psi (124,1 MPa) a 24.000 psi (165,5 MPa), ou 24.000 psi (165,5 MPa), preferencialmente em que a microfluidificação é microfluidificação de passagem única.

13. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão foi gerada por cavitação ou

homogeneização de alta pressão.

14. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a toxina botulínica é encapsulada dentro das partículas, ou em que a toxina botulínica é adsorvida na superfície das partículas, ou em que a toxina botulínica é associada com a interface de partícula.

15. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a toxina botulínica é selecionada do grupo compreendendo o tipo A, tipo B, tipo C₁, tipo C₂, tipo D, tipo F e tipo G.

16. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a toxina botulínica é um complexo de toxina botulínica, preferencialmente em que o complexo de toxina botulínica compreende uma proteína hemaglutinina não toxina e uma proteína não hemaglutinina não tóxica.

17. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a toxina botulínica é incorporada dentro de uma matriz de albumina, preferencialmente em que a albumina é albumina humana.

18. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a toxina botulínica é uma proteína de toxina botulínica purificada ou fragmento da mesma, ou em que a toxina botulínica é isolada de outras proteínas, ou em que a toxina botulínica é isolada de proteínas não-toxina, ou em que a toxina botulínica é isolada de *Clostridium botulinum*.

19. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a toxina botulínica é quimicamente sintetizada, ou em que a toxina botulínica é produzida recombinantemente.

20. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão ou as partículas, ou a toxina

botulínica pode penetrar na pele sem alterar ou mudar a pele, ou em que a nanoemulsão ou as partículas, ou a toxina botulínica pode penetrar a pele sem o uso de intensificadores de permeação da pele ou abrasivos.

21. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão pode penetrar a camada superior da pele sem o uso de intensificadores de permeação da pele ou abrasivos, preferencialmente em que a camada superior da pele é a superfície do estrato córneo, ou em que a camada superior da pele inclui poros dérmicos, ou em que a camada superior da pele inclui glândulas dérmicas.

22. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão pode penetrar a pele sem o uso de intensificadores de permeação químicos ou abrasivos ou sem o uso de intensificadores de permeação mecânicos ou abrasivos.

23. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão possui apenas um óleo.

24. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão possui apenas um tensoativo.

25. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o óleo e o tensoativo estão presentes em uma relação variando de 0,5 a 2,0 ou em uma relação variando de 0,5 a 1,5 ou em uma relação variando de 0,5 a 1,0 ou em uma relação variando de 1,0 a 2,0 ou em uma relação variando de 1,5 a 2,0.

26. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o percentual de óleo na nanoemulsão varia de 1% a 30%, de 1% a 20% ou de 1% a 10%, ou em que o percentual de óleo na nanoemulsão é de 8% ou 5%.

27. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o percentual de tensoativo na nanoemulsão varia de 1% a 30%, de 1% a 20%, de 1% a 10%, ou em que o percentual de

tensoativo na nanoemulsão é de 8% ou 5%.

28. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tensoativo é um detergente não iônico.

29. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tensoativo é selecionado do grupo consistindo de fosfoglicerídeos; fosfatidilcolinas; fosfatidilcolina de dipalmitoíla (DPPC); dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE); dioleiloxipropiltriethylamônio (DOTMA); dioleoilfosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; diacilglicerol; diacilglicerolsuccinato; difosfatidil glicerol (DPPG); hexanodecanol; álcoois graxos tais como polietileno gliol (PEG); éter polioxietileno-9-laurílico; um ácido graxo tensoativo, tal como ácido palmítico ou ácido oléico; ácidos graxos; monoglicerídeos de ácido graxo; diglicerídeos de ácido graxo; amidas de ácido graxo; trioleato de sorbitano (Span 85) glicoolato; monolaurato de sorbitano (Span 20); polissorbato 20 (Tween-20); polissorbato 60 (Tween-60); polissorbato 65 (Tween-65); polissorbato 80 (Tween-80); polissorbato 85 (Tween-85); monoestearato de polioxietileno; surfactina; um poloxômero; um éster de ácido graxo de sorbitano tal como trioleato de sorbitano; lecitina; lisolecitina; fosfatidilserina; fosfatidilinositol; esfingomielina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardiolipina; ácido fosfatídico; cerebrosídeos; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecil-amina; palmitato de acetila; rinooleato de glicerol; estearato de hexadecila; miristato de isopropila; tiloxapol; poli(etileno glicol)5000-fosfatidiletanolamina; poli(etileno glicol)400-monoestearato; fosfolipídeos; detergentes sintéticos e/ou naturais tendo propriedades elevadas de tensoativo; deoxicolatos; ciclodextrinas; sais caotrópicos; agentes de formação de par de íon; e combinações dos mesmos.

30. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão compreende partículas oleosas

que são dispersas em um meio de dispersão aquoso, preferencialmente em que o meio de dispersão aquoso é selecionado do grupo consistindo de água, solução salina, tampão fosfato-salino, álcoois de cadeia curta, dextrose a 5%, solução de Ringer, injeção de Ringer lactada, injeção de Ringer lactada acrescida de dextrose a 5%, injeção de Ringer acilada, Normosol-M, Isolyte E, e combinações dos mesmos.

31. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1 ou 30, caracterizada pelo fato de que as partículas oleosas compreendem um óleo, em que o óleo é selecionado do grupo consistindo de óleos de amêndoa, semente de damasco, abacate, babaçu, bergamota, semente corrente preta, borragem, cade, camomila, canola, alcaravia, carnaúba, mamona, canela, manteiga de cacau, coco, fígado de bacalhau, café, milho, semente de algodão, avestruz, eucalipto, onagra, peixe, linhaça, gerânio, fruto do cabaceiro, semente de uva, avelã, hissopo, miristato de isopropila, jojoba, kukui nut, lavanda, alfazema, limão, litsea cubeba, macadâmia, malva, caroço de manga, semente de espuma do prado, mink, noz moscada, oliva, laranja, laranja áspera, palmeira, caroço de palmeira, caroço de pêssgo, amendoim, semente de papoula, semente de abóbora, semente de colza, farelo de arroz, alecrim, cártamo, sândalo, sasquana, segurelha, sea buckthorn, gergelim, manteiga de shea, silicona, feijão de soja, girassol, tea tree, cardo, tsubaki, vetiver, noz ou germén de trigo, estearato de butila, triglicerídeo caprílico, triglicerídeo cáprico, ciclometicona, sebacato de dietila, dimeticona 360, miristato de isopropila, óleo mineral, octildodecanol, álcool olefílico, óleo de silicona, e combinações dos mesmos.

32. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão compreende partículas aquosas que são dispersas em um meio de dispersão oleoso, preferencialmente em que as partículas aquosas compreendem uma substância aquosa selecionada do grupo consistindo de água, solução de salina, tampão fosfato-salino, álcoois

de cadeia curta, dextrose a 5%, solução de Ringer, injeção de Ringer lactada, injeção de Ringer lactada acrescida de dextrose a 5%, injeção de Ringer acilada, ou Normosol-M, Isolyte E, ou em que o meio de dispersão oleoso é preferencialmente selecionado do grupo consistindo de óleos de amêndoa, semente de damasco, abacate, babaçu, bergamota, semente corrente preta, borragem, cade, camomila, canola, alcaravia, carnaúba, mamona, canela, manteiga de cacau, coco, fígado de bacalhau, café, milho, semente de algodão, avestruz, eucalipto, onagra, peixe, linhaça, gerânio, fruto do cabaceiro, semente de uva, avelã, hissopo, miristato de isopropila, jojoba, kukui nut, lavanda, alfazema, limão, litsea cubeba, macadâmia, malva, caroço de manga, semente de espuma do prado, mink, noz moscada, oliva, laranja, laranja áspera, palmeira, caroço de palmeira, caroço de pêsego, amendoim, semente de papoula, semente de abóbora, semente de colza, farelo de arroz, alecrim, cártamo, sândalo, sasquana, segurelha, sea buckthorn, gergelim, manteiga de shea, silicona, feijão de soja, girassol, tea tree, cardo, tsubaki, vetiver, noz ou germén de trigo, e combinações dos mesmos ou estearato de butila, triglicerídeo caprílico, triglicerídeo cáprico, ciclometicona, sebacato de dietila, dimeticona 360, miristato de isopropila, óleo mineral, octildodecanol, álcool olefílico, óleo de silicona, e combinações dos mesmos.

33. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a toxina botulínica é parte de um complexo compreendendo uma toxina botulínica associada com as proteínas não-toxinas.

34. Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a nanoemulsão foi gerada mediante a exposição à força de cisalhamento elevada.

35. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma nanoemulsão como definida na reivindicação 1, ou a nanoemulsão como definida reivindicação 1 em que 50 a 100% das partículas

possui um diâmetro de 0 a 120 nm, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo seja de 0 a 100 nm, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 60 a 200 nm, preferencialmente em que a composição é formulada como um creme, uma loção, um gel, um unguento, uma pulverização, um pó, um emoliente, e combinações dos mesmos.

36. Composição de acordo com a reivindicação 35, caracterizada pelo fato de que é para administração transdérmica a um indivíduo.

37. Composição de acordo com a reivindicação 35 ou 36, caracterizada pelo fato de que a composição é administrada transdermicamente usando um emplastro adesivo, ou em que a composição é administrada transdermicamente usando uma espátula, ou em que a composição é administrada transdermicamente usando um esfregão, ou em que a composição é administrada transdermicamente usando uma seringa sem uma agulha, ou em que a composição é administrada transdermicamente usando um dedo com luva, ou em que a composição é administrada transdermicamente usando um dedo não protegido, ou em que a composição é administrada transdermicamente usando um dispositivo que permite a aplicação da composição em um local alvo sobre a pele sem aplicar a composição em locais não alvo da pele.

38. Composição de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de que toda a toxina botulínica penetra na pele, ou em que 99a 100% da toxina botulínica penetra na pele, ou em que 95a 100% da toxina botulínica penetra na pele, ou em que 90a 100% da toxina botulínica penetra na pele, ou em que 75a 100% da toxina botulínica penetra na pele, ou em que 50a 100% da toxina botulínica penetra na pele, ou em que 25a 100% da toxina botulínica penetra na pele, ou em que 10a 100% da toxina botulínica

penetra na pele, ou em que 1 a 100% da toxina botulínica penetra na pele.

39. Composição de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que é para o tratamento de rugas, linhas faciais e/ou linhas do pescoço, preferencialmente em que as rugas, linhas faciais e/ou linhas do pescoço são selecionadas do grupo consistindo de linhas faciais hipercinéticas, rugas faciais, faixas da platísmia, faixas décolleté, e combinações das mesmas, mais preferencialmente em que as rugas faciais envolvem uma ou mais da região da testa, região glabellar, região frontal, região temporal, região rítmica ou região periorbital.

40. Composição de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada de modo a tratar a hiperidrose.

41. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende a nanoemulsão como definida na reivindicação 1, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que 50 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 120 nm, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo seja de 0 a 100 nm, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 60 a 200 nm para administração transdérmica de toxina botulínica a um indivíduo.

42. Método cosmético para o tratamento de rugas, linhas faciais e/ou linhas do pescoço, caracterizado pelo fato que compreende as etapas de:

(a) fornecer:

(i) um indivíduo que apresenta os sintomas de rugas, linhas faciais e/ou linhas do pescoço;

(ii) uma composição compreendendo a nanoemulsão como definida na reivindicação 1, ou a nanoemulsão como definida na

reivindicação 1 em que 50 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 120 nm, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo seja de 0 a 100 nm, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 60 a 200 nm; e

(b) administrar a composição na pele do indivíduo tal que os sintomas sejam reduzidos.

43. Método cosmético de retardar o início das rugas, linhas faciais e/ou linhas do pescoço, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) fornecer:

(i) um indivíduo que não apresenta os sintomas de rugas, linhas faciais e/ou linhas do pescoço;

(ii) uma composição compreendendo a nanoemulsão como definida na reivindicação 1, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que 50 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 120 nm, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo seja de 0 a 100 nm, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 60 a 200 nm; e

(b) administrar a composição na pele do indivíduo tal que o início dos sintomas seja retardado.

44. Método de fabricação de uma nanoemulsão, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) fornecer uma pré-mistura compreendendo:

(i) um óleo;

(ii) um tensoativo; e

(iii) uma fase aquosa; e

(b) submeter a pré-mistura à força de cisalhamento elevada ou homogeneização de alta pressão por um período de tempo e sob condições que resulte em uma composição de nanopartícula como definida na reivindicação 1, ou na nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que 50 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 120 nm, ou na nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo seja de 0 a 100 nm, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 60 a 200 nm, preferencialmente em que a pré-mistura compreende uma toxina botulínica.

45. Método de fabricação de uma nanoemulsão, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) fornecer um pré-mistura compreendendo:

(i) um óleo;

(ii) um tensoativo; e

(iii) uma fase aquosa;

(iv) uma toxina botulínica;

(b) formar uma solução compreendendo a pré-mistura; e

(c) submeter a pré-mistura à força de cisalhamento elevada ou homogeneização de alta pressão por um período de tempo e sob condições que resulte em uma composição de nanopartícula como definida na reivindicação 1, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que 50 a 100% das partículas possuem um diâmetro de 0 a 120 nm, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que a diferença entre o diâmetro de partícula mínimo e o diâmetro de partícula máximo seja de 0 a 100 nm, ou a nanoemulsão como definida na reivindicação 1 em que as partículas possuem um diâmetro médio variando entre 60 a 200 nm;

em que o óleo e o tensoativo estão opcionalmente presentes

em uma relação variando entre 0,5 a 2,0 (em peso); e em que a força de cisalhamento elevada é opcionalmente gerada por microfluidificação.

46. Composição de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de ser para parcial ou completamente aliviar, melhorar, reviver, inibir, retardar o início, reduzir a gravidade e / ou reduzir a incidência de um ou mais sintomas ou características de uma condição associada à pele.

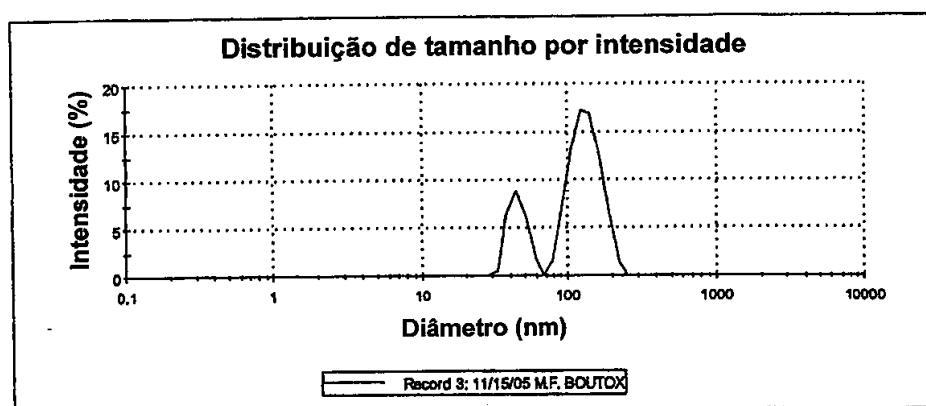
47. Composição de acordo com a reivindicação 46, caracterizada pelo fato de que a condição associada à pele é selecionada do grupo que consiste em: paralisia facial, contratura facial, espasmo hemifacial, blefaroespasma e hiperidrose.

48. Composição de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de ser para inibir a liberação de acetilcolina em uma junção neuromuscular de um sujeito.

49. Composição de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de ser para o tratamento de uma doença, distúrbio ou condição que envolve liberação de acetilcolina em uma junção 50 de um sujeito.

50. Composição de acordo com a reivindicação 49, caracterizada pelo fato de que a doença, distúrbio ou condição envolve espasmo muscular e / ou contratura muscular.

51. Composição de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de que a doença, distúrbio ou condição é rugas, linhas faciais, linhas do pescoço, paralisia facial, blefaroespasma, contratura facial, distonia, espasmo hemifacial, tremores, espasticidade, uma condição que envolve um músculo retroorbital, uma condição oftálmica, hiperplasia da próstata, hiperidrose, constipação, espasticidade do membro após acidente vascular cerebral ou enxaqueca.

**Figura 1**

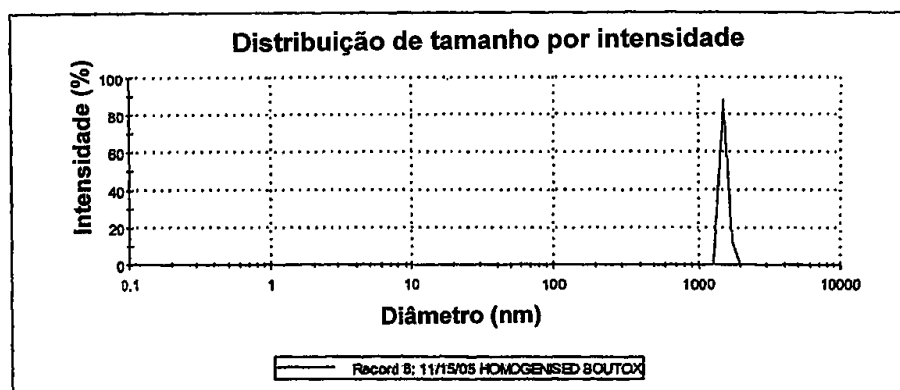
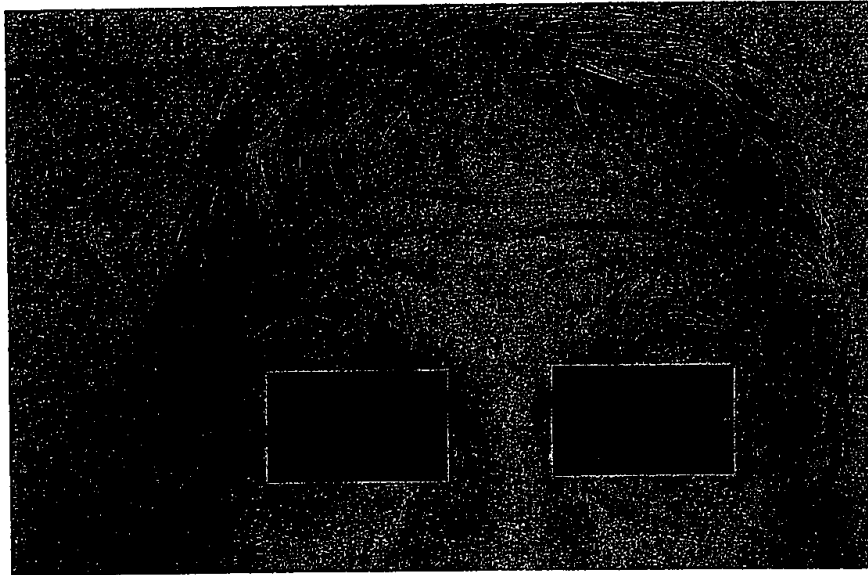
**Figura 2**

Figura 3A**Figura 3B****Figura 3**