



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0417493-3 B1**



**(22) Data do Depósito: 08/12/2004**

**(45) Data de Concessão: 13/11/2018**

---

**(54) Título:** USO DE UMA TOXINA BOTULÍNICA PARA TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS DA PELE

**(51) Int.Cl.:** A61K 38/48; A61P 17/00; A61P 17/12.

**(30) Prioridade Unionista:** 09/12/2003 US 10/731,973.

**(73) Titular(es):** ALLERGAN, INC..

**(72) Inventor(es):** ERIC R. FIRST.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2004041327 de 08/12/2004

**(87) Publicação PCT:** WO 2005/056050 de 23/06/2005

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 09/06/2006

**(57) Resumo:** "TERAPIA COM TOXINA BOTULÍNICA PARA DISTÚBIOS DA PELE". A presente invenção refere-se a métodos para tratamento de distúrbios da pele por administração local de uma toxina clostridial, tal como uma toxina botulínica, a um paciente com um distúrbio de pele, tal como verruga, calosidade ou joanete.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"USO DE UMA TOXINA BOTULÍNICA PARA TRATAMENTO DE DISTÚR-  
BIOS DA PELE"**.

[001] Antecedentes

[002] A presente invenção refere-se a métodos para o tratamento de distúrbios da pele. Em particular a presente invenção refere-se a métodos para tratamento de distúrbios da pele por administração de uma neurotoxina clostridial a um paciente.

[003] Distúrbios da Pele

[004] A pele (sinonimamente, a cútis) é uma membrana protetora que cobre o corpo e é composta de diversas camadas, incluindo a epiderme e a córnea. Um distúrbio da pele é uma anormalidade ou um crescimento anormal da pele e pode aparecer em qualquer local da cútis, tal como em uma mão, pé ou face de um paciente. Alguns distúrbios da pele são mais prevaescentes em locais sob pressão, desgaste ou que comportam peso, tal como no pé. Um distúrbio da pele pode ser uma verruga, joanete, calosidade, calo, úlcera, neuroma, dedo em martelo, dermatofibroma, quelóide, nevo (tal como um nevo típico ou nevos displásticos), granuloma (tal como granuloma piogênico) e uma ceratose (tal como uma ceratose seborreica).

[005] Um joanete é um inchamento localizado, tanto no aspecto medial ou dorsal na primeira junta da falange do metatarso do pé, e pode ser causado por uma bolsa inflamada. Uma bolsa é um saco fechado preenchido com fluido que pode se formar em uma área submetida à fricção. Um joanete pode ser devido a hallux valgus, que é um desvio da ponta do dedão para o lado de fora do pé. Isto pode fazer com que o primeiro metatarso e o dedão formem um ângulo anormal para o lado esquerdo. Um joanete pode então se desenvolver como resposta à pressão de um sapato

apertado na ponta deste ângulo.

[006] Uma calosidade é uma "almofada" de cútis protetora formada por uma camada superior de pele espessada que se forma devido à fricção repetida da pele naquele local. Um calo é uma pequena calosidade que se desenvolve no topo dos dedos devido à pressão ou fricção contra sapatos ou outros dedos. Um calo também pode se desenvolver devido a uma condição de dedo em martelo, que é uma contração anormal ou deformação dos dedos devido a um deslocamento parcial ou completo de uma das juntas dos dedos ou da junta onde o dedo se une ao resto dos pés. À medida que o dedo se torna deformado, ele pode friccionar contra um sapato, e a irritação resultante pode causar a formação de pele adicional e mais espessa (uma calosidade) como uma resposta protetora naquele local da cútis.

[007] Uma úlcera é uma ferida da pele de cura lenta. Uma úlcera de estágio um é caracterizada por avermelhar a pele sobre uma área óssea. A vermelhidão na pele não vai embora quando a pressão é aliviada. Uma úlcera de estágio dois é caracterizada por uma bolha, descascamento ou rachadura da pele. Há uma perda parcial da espessura da pele envolvendo as duas camadas de topo da pele. Uma úlcera de estágio três exibe pele rachada e algumas vezes uma drenagem de sangue. Há uma perda total da espessura da pele envolvendo tecido subcutâneo. Finalmente, uma úlcera de estágio quatro é caracterizada por uma rachadura da pele envolvendo pele, músculo, tendão e ossos e está comumente associada com uma infecção óssea (osteomielite). Úlceras podem ser debilitantes e dolorosas.

[008] Verrugas são crescimentos de pele não-cancerosos causados pela infecção na camada do topo da pele por um papilomavírus. Verrugas são usualmente da cor da pele e podem parecer ásperas ao toque, mas elas podem

ser escuras, planas e macias. Há diferentes tipos de verrugas incluindo as verrugas comuns, verrugas nos pés (plantares) e verrugas planas. Uma verruga plantar é uma pequena lesão na pele que se assemelha a uma calosidade e verifica-se na planta do pé ou dedos.

[009] Um neuroma é uma inchação ou escara de um pequeno nervo que se conecta a dois dedos e fornece a sensação a esses dedos. Os sintomas de um neuroma podem incluir dor ou dormência, usualmente afetando o terceiro e quarto. Neuromas freqüentemente iniciam-se como uma dormência ou suavidade na bola do pé.

[0010] Terapias comuns para distúrbios da pele incluem o uso de vários produtos farmacêuticos tópicos e sistêmicos, e/ou cirurgia para extirpar o distúrbio. Produtos farmacêuticos tipicamente têm efeitos colaterais indesejados, e infelizmente deve haver uma significativa recorrência do distúrbio da pele (novo crescimento) após cirurgia, bem como uma possível infecção.

[0011] Toxina Botulínica

[0012] O gênero clostridium tem mais do que cento e vinte e sete espécies, agrupadas de acordo com sua morfologia e funções. A bactéria anaeróbica, grão positiva clostridium botulinum produz uma neurotoxina polipeptídica potente, toxina botulínica, que causa uma doença neuroparalítica em seres humanos e animais referida como botulismo. Os esporos de clostridium botulinum são encontrados no solo e podem crescer em recipientes impropriamente esterilizados e recipientes de alimentos lacrados de enlatados domésticos, que são a causa de muitos casos de botulismo. Os efeitos do botulismo aparecem tipicamente 18 até 36 horas após a ingestão de alimentos infectados com cultura ou esporos de clostridium botulinum. A toxina botulinum pode aparentemente passar de forma não-

atenuada através da parede do intestino e atacar neurônios motores periféricos. Os sintomas da intoxicação por toxina botulínica podem progredir de uma dificuldade para caminhar, engolir, e falar, até a paralisia dos músculos respiratórios e morte.

[0013] Toxina botulínica do tipo A é o agente biológico natural mais letal conhecido para o homem. Cerca de 50 picogramas de uma toxina botulínica do tipo A comercialmente disponível (complexo de neurotoxina purificada)<sup>1</sup> é um LD50 em camundongos (por exemplo 1 unidade). Uma unidade de BOTOX® contém cerca de 50 picogramas (cerca de 56 attomoles) de complexo de toxina botulínica do tipo A.

[0014] (<sup>1</sup>Disponível na Allergan, Inc., de Irvine, Califórnia sob o nome comercial BOTOX® em frascos de 100 unidades).

[0015] Interessantemente, em uma base molar, a toxina botulínica do tipo A é cerca de 1,8 bilhões de vezes mais letal do que difteria, cerca de 600 milhões de vezes mais letal do que cianeto de sódio, cerca de 30 milhões de vezes mais letal do que toxina de cobra, e cerca de 12 milhões de vezes mais letal do que cólera. Singh, *Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins*, páginas 63-84 (capítulo 4) de *Natural Toxins II*, editado por B. R. Singh et al., Pelnum Press, Nova Iorque (1976) (onde o LD50 citado de toxina botulínica do tipo A de 0,3 ng igual a 1 U é corrigido para o fato de que cerca de 0,05 ng de BOTOX® é igual a 1 unidade). Uma unidade (U) de toxina botulínica é definida como o LD50 em injeção intraperitoneal em camundongos fêmeas Swiss Webster pesando 18 até 20 gramas cada.

[0016] Sete neurotoxinas botulínicas geralmente imunologicamente distintas foram caracterizadas, essas sendo respectivamente sorotipos de neurotoxina botulínica A, B,

C1, D, E, F e G cada um dos quais é distinto por neutralização com anticorpos de tipo específico. Os diferentes sorotipos de toxina botulínica variam nas espécies animais que eles afetam e na gravidade e duração da paralisia que eles provocam. Por exemplo, foi determinado que a toxina botulínica do tipo A é 500 vezes mais potente medida pela taxa de paralisia produzida no rato, do que o é a toxina botulínica do tipo B. Adicionalmente, a toxina botulínica do tipo B foi determinada como sendo não-tóxica em primatas a uma dose de 480 U/kg, que é cerca de 12 vezes o LD50 primata para toxina botulínica do tipo A. Moyer E et al., Botulinum Toxin Type B: experimental and Clinical Experience, capítulo 6, páginas 71-85, de "Therapy With Botulinum Toxin", editado por Jankovic, J. et al., (1994), Marcel Dekker, Inc., Toxina botulínica aparentemente liga-se com alta afinidade a neurônios motores colinérgicos, é translocada no neurônio e bloqueia o desprendimento de acetilcolina. Absorção adicional pode ocorrer através de receptores de pouca afinidade, bem como por fagocitose e pinocitose.

[0017] Independentemente do sorotipo, o mecanismo molecular da intoxicação por toxina parece ser similar e envolver pelo menos três etapas ou estágios. Na primeira etapa do processo, a toxina se liga à membrana pré-sináptica do neurônio alvo através de uma interação específica entre a cadeia pesada, cadeia H, e um receptor de superfície celular; pensa-se que o receptor é diferente para cada tipo de toxina botulínica e para toxina de tétano. O segmento final carboxila da cadeia H, HC, parece ser importante para mirar a toxina na superfície celular.

[0018] Na segunda etapa, a toxina atravessa a membrana plasmática da célula envenenada. A toxina é primeiramente engolfada pela célula através de endocitose mediada por

receptor e é formado um endossoma contendo a toxina. A toxina depois escapa do endossoma para dentro do citoplasma da célula. Esta etapa acredita-se ser mediada pelo segmento final amino da cadeia H, HN, que aciona uma mudança conformacional da toxina em resposta ao pH de cerca de 5,5 ou menos. Endossomas são conhecidos como possuidores de uma bomba de próton que diminui o pH intra-endossomal. A mudança conformacional expõe resíduos hidrófobos na toxina, o que permite à toxina se aleitar na membrana endossomal. A toxina (ou no mínimo a cadeia leve) depois desloca-se através da membrana endossomal para dentro do citoplasma.

[0019] A última etapa do mecanismo da atividade da toxina botulínica parece envolver a redução da ligação de dissulfeto que se une à cadeia pesada, cadeia H, e à cadeia leve, cadeia L. Toda a atividade tóxica de botulinum e da toxina do tétano está contida na cadeia L da holotoxina; a cadeia L é uma endopeptidase de zinco (Zn<sup>++</sup>) que seletivamente cliva proteínas essenciais para reconhecimento e ligação das vesículas contendo neurotransmissores com a superfície citoplásmica da membrana plasmática, e fusão das vesículas com a membrana plasmática. A neurotoxina do tétano, tipos de toxina botulínica B, D, F e G causam a degradação de sinaptobrevina (também denominada proteína de membrana associada à vesícula (VAMP)), uma proteína de membrana sinaptossomal. A maior parte da VAMP presente na superfície citoplásmica da vesícula sináptica é removida como um resultado de quaisquer um desses eventos de clivagem. Sorotipos A e E da toxina botulínica clivam SNAP - 25. Sorotipo C1 da toxina botulínica foi cogitado originalmente para clivar sintaxina, mas verificou-se que clivava sintaxina e SNAP-25. Cada uma das toxinas botulínicas especificamente cliva uma ligação dife-

rente, exceto toxina botulínica do tipo B (e toxina de tétano) que cliva a mesma ligação. Cada uma dessas clivagens bloqueia o processo de ligação na membrana vesicular, evitando assim a exocitose do teor da vesícula.

[0020] Toxinas botulínicas têm sido usadas em ajustes clínicos para o tratamento de distúrbios neuromusculares caracterizados por músculos hiperativos do esqueleto (isto é distúrbios motores). Em 1989 uma toxina botulínica do complexo do tipo A foi aprovada pela U.S. Food and Drug Administration para o tratamento de blefaroespasma, estrabismo e espasmo hemifacial. Subseqüentemente, uma toxina botulínica do tipo A também foi aprovada pela FDA para o tratamento de distonia cervical e para o tratamento de linhas glabellares, e uma toxina botulínica do tipo B foi aprovada para o tratamento da distonia cervical. Sorotipos da toxina botulínica do não-tipo A aparentemente têm uma potência menor e/ou uma duração mais curta de atividade se comparada à toxina botulínica do tipo A. Efeitos clínicos da toxina botulínica intramuscular periférica do tipo A são vistos usualmente uma semana após a injeção. A duração típica do alívio sintomático de uma injeção intramuscular de toxina botulínica do tipo A varia em cerca de três meses, apesar de períodos significativamente mais longos de atividade terapêutica terem sido mencionados.

[0021] Apesar de todos os sorotipos de toxinas botulínicas aparentemente inibirem o desprendimento do neurotransmissor acetilcolina na junção neuromuscular, eles assim o fazem para afetar diferentes proteínas neurosecretoras e/ou clivar essas proteínas em locais diferentes. Por exemplo, botulinas dos tipos A e E ambas clivam a proteína (SNAP-25) associada ao 25 quiloDalton (kD) sinaptossomal, mas elas objetivam uma seqüência diferente

de aminoácidos dentro desta proteína. Tipos de toxina botulínica B, D, F e G agem em proteína associada a vesícula (VAMP, também denominada sinaptobrevina), com cada sorotipo clivando a proteína em diferentes locais. Finalmente, mostrou-se que toxina botulínica do tipo C1 cliva ambos a syntaxina e SNAP-25. Essas diferenças no mecanismo de ação podem afetar a potência relativa e/ou duração de ação dos vários sorotipos de toxina botulínica. Aparentemente, em uma variedade de diferentes tipos celulares, pode-se observar um substrato para uma toxina botulínica. Ver, por exemplo, *Biochem J* 1; 339 (pt1): 159-65: 1999, e *Mov. Disord.*, 10(3): 376:1995 (as células B das ilhotas pancreáticas contêm pelo menos SNAP-25 e sinaptobrevina).

[0022] O peso molecular da molécula de proteína de toxina botulínica, para todos os sete sorotipos de toxina botulínica conhecidos, é de cerca de 150 kD. Interessantemente, as toxinas botulínicas são desprendidas por *Clostridial Bacterium* como complexos compreendendo moléculas de proteína de toxina botulínica de 150 kD juntamente com proteínas não-tóxicas associadas. Portanto, o complexo de toxina botulínica do tipo A pode ser produzido por *Clostridial bacterium* nas formas de 900 kD, 500 kD e 300 kD. Toxina botulínica do tipo B e C1 é aparentemente produzida como somente um complexo de 700 kD ou 500 kD. Toxina botulínica do tipo D é produzida como ambos os complexos 300 kD e 500 kD. Finalmente, toxinas botulínicas dos tipos E e F são produzidas somente como complexos de aproximadamente 300 kD. Acredita-se que os complexos (isto é, peso molecular maior do que 150 kD) contenham uma proteína hemaglutimina não-tóxica e uma proteína de não-hemaglutinina não-toxina e não-tóxica. Essas duas proteínas de não-toxina (que juntamente com a molécula de

toxina botulínica compreendem o complexo de neurotoxina relevante) podem agir fornecendo estabilidade contra a desnaturação da molécula de toxina botulínica e proteção contra ácidos digestivos quando a toxina é ingerida. Adicionalmente, é possível que os maiores complexos de toxina botulínica (maior que cerca de 150 kD de peso molecular) possam resultar em uma taxa mais lenta de difusão da toxina botulínica de um local de injeção intramuscular de um complexo de toxina botulínica.

[0023] Estudos in vitro indicaram que toxina botulínica inibe o desprendimento induzido pelo cátion potássio de ambas as culturas celulares de acetilcolina e norepinefrina a partir de culturas de células primárias do tecido de tronco cerebral. Adicionalmente, reportou-se que toxina botulínica inibe o desprendimento evocado de ambos glicina e glutamato em culturas primárias de neurônios da medula espinhal, e preparados de toxina botulínica em sinaptossomas cerebrais inibem o desprendimento de cada um dos neurotransmissores acetilcolina, dopamina, norepinefrina (Habermann E., et al., Tetanus Toxin and Botulinum A and C Neurotoxins Inhibit Noradrenaline Release From Cultured Mouse Brain, *J. Neurochem* 51(2); 522-527:1988) CGRP, substância P e glutamato (Sanchez-Prieto, J., et al., Toxin A Blocks Glutamate Exocytosis From Guinea Pig Cerebral Cortical Synaptosomes, *Eur. J. Biochem* 165;675-681: 1897. Portanto, quando concentrações adequadas são utilizadas, o estímulo evocado ao desprendimento da maior parte dos neurotransmissores é bloqueado pela toxina botulínica. Ver por exemplo, Pearce, L. B., Pharmacologic Characterization of Botulinum Toxin For Basic Science and Medicine, *Toxicon* 35(9); 1373-1412 em 1393; Bigalke Botulinum A Neurotoxin Inhibits Non-Cholinergic Synaptic Transmission in Mouse Spinal Cord

Neurons in Culture, Brain Research 360; 318-324; 1985; Habermann E., Inhibition by Tetanus and Botulinum A Toxin of the release of [3H] Noradrenaline and [3H] GABA From Rat Brain Homogenate, *Experientia* 44; 224-226:1988, Bigalke H., et al., Toxin and Botulinum A Toxin Inhibit Release and Uptake of Various Transmitters, as Studied with Parficulate Preparations From Rat Brain and Spinal Cord, *Naunyn-Schmiedeberg's*. 316;244-251:1981, e; Jankovic J. et al., *Therapy With Botulinum Toxin*, Marcel Dekker, Inc., (1994), página 5.

[0024] Toxina botulínica do tipo A pode ser obtida pelo estabelecimento e crescimento de culturas de *Clostridium botulinum* em um fermentador e depois cultivo 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 niqueladas por proteases para tornarem-se neuroativos. As cepas bacterianas que fazem com que os sorotipos A e G da toxina botulínica possuam proteases e sorotipos A e G endógenos podem, portanto, ser recuperadas de culturas bacterianas predominantemente nas suas formas ativas. Em contraste, sorotipos de toxina botulínica C1, D e E são sintetizados por cepas não-proteolíticas e são, portanto, tipicamente inativados quando recuperados de cultura. Os sorotipos B e F são produzidos por ambas as cepas proteolíticas e não-proteolíticas e, portanto, podem ser recuperados tanto na forma ativa ou inativa. Entretanto, mesmo as cepas proteolíticas que produzem, por exemplo, o sorotipo da toxina botulínica do tipo B, clivam somente uma porção da toxina produzida. A proporção exata de moléculas quebradas até não-quebradas depende do comprimento de incubação e da temperatura da cultura. Portanto, uma certa porcenta-

gem de qualquer preparado de toxina da toxina botulínica do tipo B pode ser inativa, possivelmente levando-se em conta a potência significativamente baixa conhecida da toxina botulínica do tipo B se comparado à toxina botulínica do tipo A. A presença de moléculas de toxina botulínica inativas em um preparado clínico contribuirá para a carga total de proteína do preparado, o que é associado a aumentada antigenicidade, sem contribuir para sua eficácia clínica. Adicionalmente, sabe-se que toxina botulínica do tipo B tem, mediante injeção intramuscular, uma duração mais curta de atividade e é também, portanto, menos potente do que a toxina botulínica do tipo A no mesmo nível de dosagem.

[0025] Toxina botulínica do tipo A cristalina de alta qualidade pode ser produzida a partir da cepa Hall A de *Clostridium botulinum* com características de  $\geq 3 \times 10^7$  U/mg, um A260/A278 menor do que 0,60 e um padrão distinto de bandeamento em gel eletroforese. O processo conhecido de Shantz pode ser usado para se obter toxina botulínica cristalina do tipo A, conforme indicado em Shantz, E. J, et al., *Properties and use of Botulinum toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine*, *Microbiol Rev.* 56; 80-99:1992. Geralmente, o complexo de toxina botulínica do tipo A pode ser isolado e purificado de uma fermentação anaeróbica através do cultivo de *Clostridium botulinum* do tipo A em um meio apropriado. O processo conhecido também pode ser utilizado com a separação das proteínas não-tóxicas, para obter toxinas botulínicas puras, tais como por exemplo: toxina botulínica purificada do tipo A com aproximadamente 150 kD de peso molecular com uma potência de 1-2 X 10<sup>8</sup> LD50 U/mg ou maior; toxina botulínica purificada do tipo B com aproximadamente 156 kD de peso molecular com uma potência específica de 1-2X 10<sup>8</sup> LD50 U/mg

ou maior; e toxina botulínica purificada do tipo F com aproximadamente um peso molecular de 155 kD com uma potência específica de  $1-2 \times 10^7$  LD50 U/mg ou maior.

[0026] Toxinas botulínicas e/ou complexos de toxinas botulínicas podem ser obtidos da lista do Biological Laboratories, Inc., Campbell, California; o Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, U.K.; Wako (Osaka, Japão), Metabiologics (Madison, Wisconsin) bem como da Sigma Chemicals of St Louis, Missouri. Toxina botulínica pura também pode ser usada para preparar uma composição farmacêutica.

[0027] Assim como as enzimas, geralmente as atividades biológicas das toxinas botulínicas (que são peptidases intracelulares) dependem, pelo menos em parte, de sua conformação tridimensional. Portanto, toxina botulínica do tipo A é destoxicada mediante calor, alongamento da superfície por vários produtos químicos e secagem da superfície. Adicionalmente, sabe-se que a diluição do complexo de toxina obtido pela cultura conhecida, fermentação e purificação a concentrações muito, muito mais baixas usadas para formulação da composição farmacêutica, resulta em rápida destoxicação da toxina a menos que um agente de estabilização apropriado esteja presente. A diluição da toxina de quantidades em miligrama a uma solução contendo nanogramas por mililitro apresenta dificuldades significativas devido à rápida perda de toxicidade específica com tal diluição maior. Já que a toxina pode ser empregada meses ou anos após a composição farmacêutica contendo a toxina ser formulada, a toxina pode ser estabilizada com um agente de estabilização, tal como albumina e gelatina.

[0028] Uma toxina botulínica comercialmente disponível contendo uma composição farmacêutica é vendida sob a mar-

ca registrada BOTOX® (disponível na Allergan, Inc., de Irvine, California). BOTOX® consiste em um complexo de toxina botulínica do tipo A, albumina e cloreto de sódio empacotado em uma forma estéril, secada a vácuo. A toxina botulínica do tipo A é preparada a partir de uma cultura da cepa Hall de Clostridium Botulinum cultivada em um meio contendo aminos N-Z e extrato de cevada. O complexo de toxina botulínica do tipo A é purificado da solução de cultura por uma série de precipitações de ácido para formar um complexo cristalino consistindo na proteína da toxina de elevado peso molecular ativo e uma proteína de hemaglutinina associada. O complexo cristalino é redissolvido em uma solução contendo solução salina e albumina e é filtrada estéril (0,2 micron) antes de secagem a vácuo. O produto secado a vácuo é armazenado em um refrigerador a ou abaixo de - 5oC. BOTOX® pode ser reconstituído com solução salina estéril, não-conservada antes da injeção intramuscular. Cada frasco de BOTOX® contém cerca de 100 unidades (U) de complexo de neurotoxina purificada de toxina Clostridium Botulinum do tipo A, 0,5 miligrama de albumina de soro humano e 0,9 miligramas de cloreto de sódio em uma forma estéril, secada a vácuo sem um conservante.

[0029] Para reconstituir BOTOX® secado a vácuo, solução salina normal estéril sem um conservante; (0,9% de injeção de cloreto de sódio é usada tomando-se a quantidade apropriada de diluente no tamanho de seringa apropriado. Já que BOTOX® pode ser desnaturado por borbulhamento ou agitação violenta similar, o diluente é gentilmente injetado no frasco. Por razões de esterilidade BOTOX® é de preferência administrado dentro de quatro horas após o frasco ser removido do freezer e reconstituído. Durante essas quatro horas, BOTOX® reconstituído por ser

armazenado em um refrigerador a cerca de 20C, até cerca de 80C. BOTOX® reconstituído, refrigerado tem sido mencionado como retentor de sua potência por pelo menos duas semanas. Neurologia, 48:249-53:1997.

[0030] Foi mencionado que toxina botulínica do tipo A foi utilizada em ajustes clínicos como se segue:

(1) cerca de 75-125 unidades de BOTOX® por injeção intramuscular (múltiplos músculos) para tratar distonia cervical;

(2) 5-10 unidades de BOTOX® por injeção intramuscular para tratar linhas glabellares (sulcos da testa) (5 unidades injetadas intramuscularmente no músculo pró-cero e 10 unidades intramuscularmente em cada músculo do supercílio corrugador);

(3) cerca de 30-80 unidades de BOTOX® para tratar constipação por injeção intra-esfincter do músculo puborectalis;

(4) cerca de 1-5 unidades por músculo de BOTOX® intramuscularmente injetado para tratar blefaroespasmos injetando no músculo orbicularis oculi pré-tarsal lateral da pálpebra superior e no orbicularis pré-tarsal lateral da pálpebra inferior.

(5) para tratar estrabismo, músculos extraoculares foram injetados intramuscularmente com 1-5 unidades de BOTOX®, a quantidade injetada variando com o tamanho do músculo a ser injetado e na extensão da paralisia muscular desejada (isto é, quantidade de dioptria de correção desejada).

(6) para tratar espasticidade do membro superior em seguida a um acidente vascular cerebral (AVC) por injeções intramusculares de BOTOX® em cinco diferentes músculos flexores dos membros superiores, como se segue:

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

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

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

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

(e) biceps brachii: 50 U a 200 U. Cada um dos cinco músculos indicado foi injetado na mesma sessão de tratamento de modo que o paciente recebe de 90 U a 360 U de BOTOX® para o músculo flexor dos membros superiores por injeção intramuscular em cada sessão de tratamento.

(7) para tratar enxaquecas, injeção pericranial (injetada simetricamente nos músculos glabellares, frontalis e temporalis) de 25 U de BOTOX® mostrou significativo benefício como um tratamento profilático de enxaquecas, comparado a veículos conforme medido por medidas reduzidas de frequência de enxaqueca, gravidade máxima, associado com vômito e uso de medicação aguda pelo período de três meses após a injeção de 25 U.

[0031] Sabe-se que toxina botulínica do tipo A pode ter uma eficácia de até 12 meses (European J. Neurology 6 (Suppl 4): páginas 111-Páginas 1150:1999), e em algumas circunstâncias por tanto tempo quanto 27 meses, quando usada para tratar glândulas, tais como no tratamento de hiperhidrose. Ver por exemplo Bushara K., Botulinum toxin and rhinorrhea, Otolaryngol Head Neck Surg 1996; 114(3): 507, e The Laryngoscope 109:1344-1346:1999. Entretanto, a duração usual de uma injeção intramuscular de BOTOX® é tipicamente de cerca de 3 até 4 meses.

[0032] O sucesso da toxina botulínica do tipo A para tratar uma variedade de condições clínicas levou ao interesse em outros sorotipos de toxina botulínica. Dois preparados comercialmente disponíveis de botulinum do tipo A para uso em humanos são BOTOX® disponível na Allergan, Inc., de Irvine, California, e Dysport® disponível na Beaufour Ipsen, Porton Down, Inglaterra. Um preparado de

toxina botulínica do tipo B (Myobloc®) está disponível na Elan Pharmaceuticals de São Francisco, California.

[0033] Além de possuir ações farmacológicas em locais periféricos, toxinas botulínicas também podem ter efeitos inibidores no sistema nervoso central. Trabalho por Weigand et al, Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1976, 292, 161-165, e Habermann, Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1974; 281, 47-56 mostrou que toxina botulínica pode ascender para a área espinhal por transporte retrógrado. Como tal, uma toxina botulínica injetada em local periférico, por exemplo intramuscularmente, pode ser retrogradamente transportada à medula espinhal.

[0034] A patente U.S. No 5 989 545 descreve que uma neurotoxina clostridial modificada ou um fragmento dela, de preferência uma toxina botulínica, quimicamente conjugada ou recombinantemente fundida a uma porção alvo particular, pode ser empregada para tratar dor por administração do agente à medula espinhal.

[0035] Uma toxina botulínica também foi proposta ou tem sido empregada para tratar a otite do ouvido médio (Patente U.S. 5 766 605), distúrbios do ouvido interno (Patentes U.S. 6 265 379; 6 358 926), tensão de dor de cabeça (Patente U.S. 6 458 365), dor de cabeça enxaqueca (Patente U.S. 5 714 468), dor pós-operatória e dor visceral (Patente U.S. 6 464 986), crescimento capilar e retenção capilar (Patente U.S. 6 299 893), psoríase e dermatite (Patente U.S. 5 670 484), músculos lesionados (Patente U.S. 6 423 319) vários cânceres (Patente U.S. 6 139 845), distúrbios musculares leves (Patente U.S. 5 437 291), e inflamação neurogênica (Patente U.S. 6 063 768). Implantes de toxina de desprendimento controlado são conhecidos (ver por exemplo as patentes U.S. 6 306 423 e 6 312 708), como o é a administração de toxina botulínica

transdérmica (pedido de patente U.S. número de série 10/194805).

[0036] Adicionalmente, uma toxina botulínica pode ter um efeito na redução de dor inflamatória induzida em um modelo de formalina de rato. Aoki, K., et al, Mechanisms of the antinociceptive effect of subcutaneous Botox : Inhibition of peripheral and central nociceptive processing,, Cephalalgia 2003 Sep; 23(7): 649. Além disso, foi reportado que o bloqueio do nervo por toxina botulínica pode causar uma redução da espessura epidérmica. Li Y., et al., Sensory and motor denervation influences epidermal thickness in rat foot glabrous skin, Exp Neurol 1997; 147:452-462 (ver página 459). Finalmente, sabe-se administrar uma toxina botulínica aos pés, para tratá-los contra suor excessivo (Katsambas A., et al., Cutaneous diseases of the foot : Unapproved treatments, Clin. Dermatol. 2002 Nov-Dez; 20(6):689-699; Sevim, S., et al., Botulinum toxin-A therapy for palmar and plantar hyperhidrosis, Acta Neurol. Belg. 2002 Dez; 102(4): 167-70), dedos espásticos (Suputtitada, A., Local botulinum toxin type A injections in the treatment of spastic toes, Am. J. Phys. Med. Rehabil. 2002 Out; 81(10): 770-5), caminhar de dedos idiopáticos (Tacks, L., et al., Idiopathic toe walking : Treatment with botulinum toxin A injection, Dev. Med. Child Neurol. 2002; 44(Suppl 91):6), e distonia do pé (Rogers J., et al., Injections of botulinum toxin A in foot dystonia, Neurology 1993 Abril; 43 (4 Suppl. 2)).

[0037] Toxina de tétano, bem como seus derivados (isto é com uma porção alvo não-nativa), fragmentos, híbridos e suas quimeras dos mesmos também podem ter utilidade terapêutica. A toxina do tétano comporta muitas similaridades com as toxinas botulínicas. Portanto, ambas a toxina do tétano e a toxina botulínica são polipeptídeos feitos por

espécies proximamente relacionadas de *Clostridium* (*Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum*, respectivamente).

[0038] Adicionalmente, ambos a toxina do tétano e as toxinas botulínicas são proteínas de dicadeias compostas por uma cadeia leve (peso molecular cerca de 50 kD) covalentemente ligadas por uma única ligação de dissulfeto a uma cadeia pesada (peso molecular cerca de 100 kD). Além disso, o peso molecular da toxina do tétano e cada uma das sete toxinas botulínicas (não-complexadas) é de cerca de 150 kD. Além disso, para ambas a toxina do tétano e as toxinas botulínicas, a cadeia leve comporta o domínio que exibe atividade biológica intracelular (protease), enquanto que a cadeia pesada compreende a ligação do receptor (imunogênica) e domínios translocais da membrana celular.

[0039] Além disso, ambas a toxina do tétano e as toxinas botulínicas exibem uma elevada afinidade específica para receptores gangliocidas na superfície dos neurônios pressinápticos colinérgicos. Endocitose da toxina do tétano mediada por receptor por neurônios colinérgicos periféricos resulta em transporte axonal retrógrado, bloqueio do desprendimento de neurotransmissores inibitórios das sinapses centrais, e uma paralisia espática. Contrariamente, endocitose mediada por receptor de toxina botulínica por neurônios colinérgicos periféricos resulta em pouco, se de todo, qualquer transporte retrógrado, inibição de acetilcolina exocitose dos neurônios motores periféricos intoxicados e paralisia flácida.

[0040] Finalmente, a toxina do tétano e as toxinas botulínicas assemelham-se umas às outras em ambas biossíntese e arquitetura molecular. Portanto, há uma identidade total de 34% entre as seqüências de proteína da toxina do tétano e a toxina botulínica do tipo A, e uma seqüência

de identidade tão alta quanto 62% para alguns domínios funcionais. Binz T. et al., The Complete Sequence of Botulinum Neurotoxin Type A and Comparison with Other Clostridial Neurotoxins, J. Biological Chemistry 265 (16); 9 153-9 158: 1990.

[0041] Acetilcolinas

[0042] Tipicamente somente um único tipo de neurotransmissor de molécula pequena é desprendido para cada tipo de neurônio no sistema nervoso mamífero, apesar de haver evidência que sugere que diversos neuromoduladores podem ser desprendidos pelo mesmo neurônio. O neurotransmissor acetilcolina é secretado por neurônios em muitas áreas do cérebro, mas especificamente pelas células piramidais grandes do córtex motor, por diferentes neurônios nos gânglios basais, pelos neurônios motores que inervam os músculos esqueléticos, pelos neurônios pré-gangliônicos do sistema nervoso autônomo (ambos simpáticos e parassimpáticos), pelas fibras do saco 1 do feixe de fibras musculares, pelos neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso parassimpático, e por alguns dos neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso simpático. Essencialmente, somente as fibras do nervo simpático pós-gangliônicos se fibram até as glândulas sudoríparas, os músculos pilorretores, e alguns vasos sanguíneos são colinérgicos, assim como a maioria dos neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso simpático secretam o neurotransmissor norepinefrina. Na maioria dos casos acetilcolina tem um efeito excitante. Entretanto, acetilcolina é conhecida como tendo efeitos inibitórios em algumas finalizações do nervo parassimpático periférico, tal como inibição da taxa cardíaca pelo nervo vago. Os sinais eferentes do sistema nervoso autônomo são transmitidos ao corpo através do sistema nervoso para ssimpático. Os neurônios pré-

gangliônicos do sistema nervoso simpático se estendem dos corpos das células neuronais simpáticas pré-gangliônicas localizadas no corno lateral intermediário da medula espinhal. As fibras nervosas simpáticas pré-gangliônicas, estendem-se do corpo celular, sinapse com neurônios pós-gangliônicos localizados tanto em um gânglio simpático para-vertebral ou em um gânglio pré-vertebral. Já que os neurônios pré-gangliônicos de ambos o sistema nervoso simpático e parassimpático são colinérgicos, a aplicação de acetilcolina aos gânglios excitará ambos os neurônios simpáticos e parassimpáticos pós - gangliônicos.

[0043] Acetilcolina ativa dois tipos de receptores, receptores muscarínicos e nicotínicos. Os receptores muscarínicos são observados em todas as células efetoras estimuladas pelo sistema pós-gangliônico, neurônios do sistema nervoso parassimpático, bem como aqueles estimulados pelos neurônios colinérgicos pós-gangliônicos do sistema nervoso simpático. Os receptores nicotínicos são encontrados na medula adrenal, bem como dentro dos gânglios autonômicos: isto é, na superfície das células do neurônio pós-gangliônico como a sinapse entre os neurônios pré-gangliônicos e pós-gangliônicos de ambos os sistemas simpáticos e parassimpáticos.

[0044] Receptores nicotínicos também são encontrados em muitas terminações nervosas não-autonômicas, por exemplo, nas membranas das fibras musculares do esqueleto na junção neuromuscular.

[0045] Acetilcolina é desprendida de neurônios colinérgicos quando pequenas vesículas, claras, intracelulares, fundem com a membrana celular neuronal pré-sináptica. Uma ampla variedade de células secretoras não-neuronais, tais como medula adrenal (bem como a linha celular PC12) e células das ilhotas pancreáticas, despren-

dem catecolaminas e hormônio paratiróide, respectivamente, de grandes vesículas de núcleo denso. A linha celular PC12 é um clone de células de feocromocitoma de rato extensivamente utilizadas como um modelo de cultura de tecido para estudos do desenvolvimento simpatoadrenal. Toxina botulínica inibe o desprendimento de ambos os tipos de compostos de células in vitro, permeabilizadas (como por eletroporação) ou por injeção direta da toxina na célula desnervada. Toxina botulínica também é conhecida por bloquear o desprendimento do neurotransmissor de glutamato de culturas celulares de sinaptossomas corticais.

[0046] Uma junção neuromuscular é formada em músculos do esqueleto pela proximidade de axônios nas células musculares. Um sinal transmitido através do sistema nervoso resulta em uma ação potencial no terminal axônio, com a ativação de canais de íon e resultando no desprendimento do neurotransmissor acetilcolina das vesículas sinápticas intraneuronais, por exemplo, na placa terminal motora da junção neuromuscular. A acetilcolina atravessa o espaço extracelular para ligar-se às proteínas receptoras de acetilcolina na superfície da placa terminal muscular. Ocorrendo uma ligação suficiente, um potencial de ação da célula muscular causa mudanças específicas do canal iônico da membrana, resultando na contração das células musculares. A acetilcolina é então desprendida das células musculares e metabolizada por colinesterases no espaço extracelular. Os metabólitos são reciclados de volta ao terminal axônio para reprocessamento para formar acetilcolina.

[0047] O que é necessário portanto é um método terapêuticamente eficaz para tratamento de um distúrbio da pele.

[0048] Sumário

[0049] A presente invenção vai de encontro a esta necessidade e fornece métodos para tratar eficazmente um distúrbio da pele por meio de administração local de uma neurotoxina clostridial.

[0050] Um método dentro do escopo da presente invenção para tratamento de um distúrbio da pele pode ter a etapa de administração local de uma neurotoxina clostridial a um local de um distúrbio de pele de um paciente, tal como uma face, mão ou pé de um paciente. Por administração local quer-se dizer que a neurotoxina clostridial é administrada, por injeção, diretamente a, em ou nas vizinhas de uma região de um distúrbio de pele.

[0051] A neurotoxina pode ser administrada localmente em uma quantidade entre cerca de  $10^{-3}$  unidades/kg de peso de um paciente e cerca de 35 unidades/kg de peso de um paciente. De preferência, a neurotoxina é localmente administrada em uma quantidade entre cerca de  $10^{-2}$  U/kg e cerca de 25 U/kg de peso de um paciente. Mais preferentemente, a neurotoxina é administrada em uma quantidade entre  $10^{-1}$ U/kg e cerca de 15 U/kg. Em um método particularmente preferido dentro do âmbito da presente invenção, a neurotoxina é localmente administrada em uma quantidade entre cerca de 1 U/kg e cerca de 10 U/kg. Em um ajuste clínico pode ser vantajoso injetar de 1 U até 3000 U de uma neurotoxina, tal como toxina botulínica do tipo A ou B, a um local de distúrbio de pele por aplicação tópica ou administração sub-dérmica, para tratar eficazmente o distúrbio de pele.

[0052] Uma neurotoxina apropriada para uso na prática da presente invenção pode ser preparada por uma bactéria Clostridial, tal como Clostridium botulinum, Clostridium butyricum ou clostridium beratti. A neurotoxina empregada pode ser uma neurotoxina modificada, que é uma neurotoxi-

na que tem pelo menos um de seus aminoácidos deletados, modificados ou substituídos, se comparado a uma neurotoxina nativa. Adicionalmente, a neurotoxina pode ser uma neurotoxina recombinantemente preparada, ou um derivado ou fragmento de uma neurotoxina recombinante. A neurotoxina pode ser uma toxina botulínica, tal como um dos serotipos de toxina botulínica, A, B, C1, D, E, F ou G. Tipo de toxina botulínica preferido para uso na prática da presente invenção é a toxina botulínica do tipo A.

[0053] Um método de acordo com a invenção pode ser executado por administração de uma toxina clostridial a um paciente com, ou que está predisposta a, distúrbio de pele. A toxina clostridial usada é de preferência uma toxina botulínica (tanto como um complexo ou como uma molécula pura [isto é cerca de 150 kDa], tal como toxina botulínica A, B, C, D, E, F ou G. A administração da toxina clostridial pode ser por uma via transdérmica (isto é por aplicação de uma toxina clostridial em um veículo como creme, emplastro ou loção), via subdérmica (isto é subcutânea ou intramuscular) ou por via intra -dérmica de administração.

[0054] A dose de uma toxina clostridial usada de acordo com a presente invenção é menos do que a quantidade de toxina que seria usada para paralisar um músculo, já que a intenção de um método de acordo com a presente invenção, não é a de paralisar um músculo, mas de tratar o distúrbio de pele.

[0055] As seguintes definições são aplicadas aqui:

[0056] "Cerca de" significa aproximadamente ou quase e no contexto de um valor numérico ou faixa indicada aqui significa  $\pm 10\%$  do valor numérico ou faixa descrita ou reivindicada.

[0057] "Aliviando" significa uma redução na ocorrência

de um sintoma de distúrbio de pele. Portanto, aliviando inclui alguma redução, redução significativa, redução quase que total, e redução total de um sintoma de distúrbio da pele. Um efeito aliviador pode não aparecer clinicamente entre 1 a 7 dias depois da administração de uma neurotoxina clostridial a um paciente.

[0058] "Toxina botulínica" significa uma neurotoxina botulínica como toxina pura (isto é com cerca de 150 kDa de peso de molécula) ou como um complexo (isto é com cerca de 300 até cerca de 900 kDa de complexo de peso compreendendo uma molécula de neurotoxina e uma ou mais moléculas não-tóxicas associadas), e exclui toxinas botulínicas que não são neurotoxinas, tais como as toxinas botulínicas citotóxicas C2 e C3, mas que inclui as toxinas preparadas recombinantemente, híbridas, modificadas e quiméricas.

[0059] "Administração local" ou "localmente administrado" significa administração (isto é por uma via subcutânea, intramuscular, sub-dérmica ou trans-dérmica) de um agente farmacêutico a, ou às vizinhanças de, um local dérmico ou sub-dérmico de um paciente.

[0060] "Distúrbios da pele" significa uma pele localizada anormalmente que pode ser um crescimento de pele, tal como uma verruga, calo, calosidade ou nevo.

[0061] "Tratamento" significa aliviar (ou eliminar) pelo menos um sintoma de um distúrbio da pele, tanto temporariamente ou permanentemente.

[0062] A neurotoxina clostridial é administrada em uma quantidade terapêuticamente eficaz para aliviar um sintoma de distúrbio de pele. Uma neurotoxina clostridial apropriada pode ser preparada a partir de uma neurotoxina preparada por uma bactéria, por exemplo, a neurotoxina pode ser preparada a partir de um *Clostridium botulinum*,

*Clostridium butyricum*, ou *Clostridium beratti*. Em certas modalidades da invenção, o distúrbio da pele pode ser tratado por aplicação (tópica) ou na (intra ou transdérmico) pele de um paciente de uma toxina botulínica. A toxina botulínica pode ser uma toxina botulínica do tipo A, tipo B, tipo C1, tipo D, tipo E, tipo F, ou tipo G. Os efeitos aliviadores da toxina botulínica no distúrbio de pele podem persistir entre cerca de 2 semanas (isto é com administração de uma toxina botulínica agindo por um período curto, tal como uma toxina botulínica do tipo E) e por 5 anos (mediante implante de um implante de toxina botulínica com desprendimento controlado). A neurotoxina botulínica pode ser uma neurotoxina botulínica recombinantemente preparada, tal como toxina botulínica preparada por uma bactéria *E. coli*. Além disso, ou alternativamente, a neurotoxina botulínica pode ser uma neurotoxina modificada, isto é, uma neurotoxina botulínica que tem pelo menos um de seus aminoácidos excluído, modificado ou substituído, se comparado a uma neurotoxina botulínica nativa ou modificada pode ser uma neurotoxina botulínica preparada por um recombinante ou um derivado ou fragmento do mesmo.

[0063] Um método para tratamento de um distúrbio de pele de acordo com a presente invenção compreende a etapa de administração local de uma toxina botulínica a um paciente com um distúrbio de pele para aliviar o distúrbio da pele. A toxina botulínica pode ser selecionada do grupo que consiste nos tipos de toxina botulínica A, B, C, D, E, F e G. Toxina botulínica do tipo A é uma toxina botulínica preferida.

[0064] Um modalidade detalhada da minha invenção pode compreender um método para tratamento de um distúrbio da pele, por administração local a um paciente com um dis-

túrbio de pele, de entre cerca de 1 unidade e cerca de 3000 unidades de uma toxina botulínica (por exemplo entre cerca de 1-50 unidades de uma toxina botulínica do tipo A ou entre cerca de 50 até 3000 unidades de uma toxina botulínica do tipo B), aliviando assim o distúrbio da pele entre cerca de duas semanas e cerca de 5 anos.

[0065] A invenção também abrange um método para tratamento do distúrbio da pele por administração local de uma toxina botulínica (tal como uma toxina botulínica do tipo A, B, C, D, E, F ou G em uma quantidade de 1 unidade até 3000 unidades por sessão de tratamento) a um paciente predisposto a sofrer distúrbio da pele, evitando assim que o paciente sofra um distúrbio da pele. Um paciente predisposto a um distúrbio da pele é um ser humano que experimentou um distúrbio da pele pelo menos uma vez dentro dos últimos doze meses. A administração local pode ser realizada por administração subcutânea ou tópica da toxina botulínica ou dentro da pele do paciente onde o distúrbio da pele está localizado. O distúrbio da pele pode ser reduzido em grandeza de cerca de 20% até 100%.

[0066] Descrição

[0067] A presente invenção está com base na descoberta de que um distúrbio da pele pode ser tratado por administração local de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma neurotoxina clostridial, tal como uma neurotoxina botulínica. A neurotoxina botulínica (tal como um sorotipo A, B, C1, D, E, F ou G de neurotoxina botulínica) pode ser injetada em ou aplicada topicamente a ou nas vizinhanças de um distúrbio de pele de um paciente. Alternativamente, a toxina botulínica pode ser administrada a um neurônio intradérmico ou sub-dérmico para assim regular para baixo, inibir ou suprimir um distúrbio de pele neuronalmente mediado ou influenciado.

[0068] Sem querer estar limitado por teoria, um mecanismo fisiológico pode ser proposto para a eficácia da minha invenção conforme divulgado aqui para o tratamento de um distúrbio de pele usando uma neurotoxina clostridial. Essencialmente, existe a hipótese de que o uso de uma toxina botulínica pode inibir o desprendimento de acetilcolina e/ou de outro neurotransmissor ou neuropeptídeo por um ou mais nervos dérmicos ou estruturas que inervam ou influenciam um distúrbio de pele, para permitir assim um tratamento eficaz de um distúrbio de pele. Alternativamente, a neurotoxina clostridial administrada pode ter um efeito direto no distúrbio da pele. Por tratamento eficaz quer dizer que o distúrbio de pele se torna menos doloroso, menos inflamado e/ou regride (isto é torna-se menor em tamanho [isto é mais fino] ou desaparece de todo).

[0069] No que se refere ao mecanismo fisiológico proposto para uso de uma neurotoxina clostridial para tratar um distúrbio de pele conforme indicado aqui, sabe-se que ceratinócitos humanos podem responder a acetilcolinas. Acredita-se que acetilcolina é desprendida por ceratinócitos para funcionar como um hormônio local na epiderme. Grandó S. et al., Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine J. Invest.Dermatol. 1993 Jul; 101(1):32-6. Ceratinócitos epidérmicos humanos possuem enzimas colinérgicas, que sintetizam e degradam acetilcolinas e exprimem ambas as classes nicotínicas e muscarínicas de receptores colinérgicos nas suas superfícies celulares. Esses receptores de superfície celular ceratinócitos epidérmicos ligam acetilcolinas e iniciam várias respostas significativamente, a presença em ceratinócitos de um sistema colinérgico funcional sugere um papel para acetilcolinas na maioria, se não em todos os aspectos da

função ceratinócito. Acetilcolina emprega cálcio como um mediador de seus efeitos em ceratinócitos. Por sua vez, mudanças na concentração de cálcio podem afetar a expressão e função de enzimas colinérgicas ceratinócitas e receptores colinérgicos. Em diferentes estágios de sua diferenciação, ceratinócitos demonstram combinações únicas de enzimas colinérgicas e tipos de receptores colinérgicos. Grando S., Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors, J Investig Dermatol Symp Proc. 1997 Aug; 2(1): 41-8.

[0070] Importaneamente, inervação da pele exerce influência na proliferação de ceratinócitos e a espessura da epiderme. Huang et al., Influence of cutaneous nerves on keratinocyte proliferation and epidermal thickness in mice. Neuroscience. 1999; 94(3): 965-73. Diversas linhas de evidência sugerem que nervos que terminam na pele têm influências profundas em seu alvo, a epiderme. Ver, por exemplo Grando S., Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 1997 Agosto; 2(1):41-8; Grando S., et al., Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. Invest Dermatol., 1996 Set; 107 (3): 412-8; Ndoye A., et al., Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholinereceptor subtypes in human epidermis, J. Invest. Dermatol. 1998 setembro; 111(3):410-6; Palacios J., et al., Cholinergic neuropharmacology : an update, Acta Psychiatr ScandSuppl. 1991; 366: 27-33; Whitehouse P., et al., Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in Alzheimer's disease and related disorders, J

[0071] Neural Transm Suppl. 1987; 24:175-82; Arredondo J., et al., Central role of alpha7 nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium, J.

Cell Biol. 28 de outubro de 2002; 159 (2): 325-36; Andreadis S., et al., Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system, FASEB J. abril de 2001; 15 (60): 898-906; Krnjevic K., Central Cholinergic mechanisms and function. Prog Brain Res. 1993; 98:285-92; Epidermal expression of the full length extracellular calcium-sensing receptor is required for normal keratinocyte differentiation, J. Cell Physiol. julho de 2002; 192(1): 45-54; Grando S., et al., Human Keratinocytes Synthesize, secrete, and degrade acetylcholine J. Invest Dermatol. julho de 1993; 101(1):32-6; Zia S., et al. Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration, J Pharmacol Exp Ther. junho de 2000; 293(3): 973-81; Nguyen V., et al., Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion Life Sci 28 de março de 2003;72(18-19): 2081-5; Nguyen V., et al., Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon severtagogue action acetylcholine, J. Cell Sci. março de 2001; 114 (Pt 6): 1189-204; Grando S., et al., Keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors: immunolocalization and partial characterization, J. Invest. Dermatol. Jan. 1995; 104(1): 95-100; Lin Y., et al., (2001) Cutaneous nerve terminal degeneration in painful mononeuropathy, Experimental Neurology. 170(2):290-6; Pan C., et al., (2001) Degeneration of nociceptive nerve terminals in human peripheral neuropathy, Neuroreport. 12(4): 787-92; Hsiung-F., et al., (2001) Quantitative pathology of cutaneous nerve terminal degeneration in the human skin, Acta Neuropathologica 10:455-461; KoM., et al., Cutaneous nerve degeneration induced by acrylamide in mice, Neuroscience Letters (200)

293(3): 195-8; Lin Y., et al., Quantitative sensory testing: normative values and its application in diabetic neuropathy, *Acta Neurol, Taiwan* 1998; 7:176-184; T. Huang, et al., Influence of cutaneous nerves on keratiocyte proliferation and epidermal thickness in mice, *Neuroscience* 94: 965-973, 1999; Hsieh S., et al., Pathology of nerve terminal degeneration in the skin, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2000; 59(4): 2987-307; Huang I. et al., Influence of cutaneous nerves on keratinocyte proliferation and epidermal thickness in mice, *Neuroscience*. 1999; 94(3): 965-73; Hsieh S., et al., Modulation of keratinocyte proliferation by skin innervation. *Journal of Investigative Dermatology*, 1999; 113(4): 579-86; Chen W., et al., Trophic interactions between sensory nerves and their targets, *Journal of Biomedical Science*. 1999;6(2): 79-85; Chiang H-Y, et al., Regional difference in epidermal thinning after skin denervation, *Exp Neurol* 1998; 154(1): 137-45; Hsieh S., et al., Skin innervation and its influence on the epidermis, *J. Biomed Sci* 1997; 4:264-268; Lee M., et al., Clinical and electrophysiological characteristics of inflammatory demyelinating neuropathies, *Acta Neurol Taiwan* 1997; 6:283-288; Wu T., et al., Demonstration of human papillomavirus (HPV) genomic amplification and viral-like particles from CaSki cell line in SCID mice, *J. Virol. Methods* 1997; 65:287-298; Hsieh S., et al., Epidermal denervation and its effects on keratinocytes and Langerhans cells, *J. Neurocytol* 1996; 25:513-524; McCarthy B., et al., Inervação Cutânea em Neuropatias Sensoriais: Avaliação por Biópsia da Pele, *Neurol* 1995; 45:1848-1855; Griffin J., et al., Axonal degeneration and disorders of the axonal cytoskeleton. Em: Waxman S., isto é, *The Axon*. Nova Iorque: Oxford University Press, 1995:375-390.

[0072] Portanto, pode ser postulado que uma toxina botulínica pode ser empregada para induzir a desnervação e assim pode tratar um distúrbio da pele - evitando (isto é regulando para baixo) o desprendimento de vários neuropeptídeos por nervos que inervam a pele. Entre esses neuropeptídeos estão as taquicinininas, a substância P e a neuroquinina A, o peptídeo de gene relacionado à calcitonina (CGRP), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e a somatoestatina, todos os quais foram mencionados como modulando as funções celulares da pele, tais como proliferação celular. Conforme indicado previamente, o desprendimento da maior parte de neurotransmissores e neuropeptídeos relativos podem ser bloqueados pela toxina botulínica. Ver por exemplo Hockfelt T., Neuropeptides in perspective: The last ten years, *Neuron* 1991; 7:867-879; Xu Z-Qd et al, Galanin/GMAP and NPY-like immunoreactivities in locus coeruleus and noradrenergic nerve terminals in the hippocampal formation and cortex with notes on the galanin-R1 and - R2 receptors. *J. Comp. Neurol.* 1998; 392:227-252; Xu Z-QD et al, Galanin-5-hydroxytryptamine interactions electrophysiological, immunohistochemical and in situ hybridization studies on rat dorsal raphe neurons with a note on galanin R1 and R2 receptors. *Neuroscience* 1998; 87:79-94; Johnson M., Synaptic glutamate release by postnatal rat serotonergic neurons in microculture, *Neuron* 1994; 12:433-442; Sneddon P., et al., Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are cotransmitters in the guinea-pig vas deferens. *J., Physiol.* 1984; 347: 561-580; Kaneko T., et al., Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain, *Brain Res.* 1990; 507:141-154; Kasakov L., et al., Direct evidence for concomitant release of noradrenaline, adeno-

sine 5'-triphosphate and neuropeptide Y from sympathetic nerve supplying the guinea-pig vasdeferens. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1988;22:75-82; Nicholas A. et al., Glutamate-like immunoreactivity in medulla oblongata catecholamine substance P neurons, *NeuroReport*, 1990; 1:235-238; Nicholas A. et al., Kupfermann II, Functional studies of cotransmission. *Physiol. Rev.* 1991; 71: 683-732.48:545-59; Lundberg J., Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system : Integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide, *Pharmacol. Rev.* 1996; 48:113-178; Hsieh S., et al., Skin Innervation and Its Effects on the Epidermis, *J. Biomed Sci.* 1997; 4(5): 264-268; Legat F., et al., Repeated subinflammatory ultraviolet B irradiation increases substance P and calcitonin gene-related peptide content and augments mustard oil-induced neurogenic inflammation in the skin of rats, *Neurosci Lett.* 6 de setembro de 2002; 329(3): 309-13; White S., et al., Asahina A., et al., Specific induction of cAMP in Langerhans cells by calcitonin gene-related peptide : relevance to functional effects, *Proc Natl Acad Sci EUA.* 29 de agosto de 1995; 92(18):8323-7; Inaba N., et al., Capsaicin-induced calcitonin gene-related peptide release from isolated rat stomach measured with a new chemiluminescent enzyme immunoassay, *Jpn J Pharmacol.* Nov. 1996; 72(3) 223-9; Hosoi J., et al., Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide, *Nature*, 13 de maio de 1993; 363 (6425):159-63.

[0073] A figura 1 ilustra um mecanismo de ação de uma toxina botulínica ("Btx" na figura 1). Uma toxina botulínica pode inibir o desprendimento de cGRP, SP, e glutamato dos nervos sensoriais dérmicos, e também inibir o desprendimento direto desses mediadores das células cerati-

nócitas, endoteliais e melanocíticas da pele. Sabe-se que neuropeptídeos desprendidos pelos nervos sensoriais que inervam a pele e epiderme de contato e células dérmicas podem modular diretamente funções de ceratinócitos, células de Langerhans (LC), células mastoidais, células endoteliais microvasculares dérmicas e imuno células de infiltração. Na figura 1, NO é óxido nitroso, o GRP é peptídeo relativo ao gen calcitonina, Ach é acetilcolina, cGRP-R é o receptor para a molécula cGRP, v-dil significa vasodilatação e SP é a substância P.

[0074] Além disso, foi demonstrado que a desnervação da pele pode fazer com que a epiderme comece a degenerar ou se torne mais fina. Hsieh S., et al., Modulation of keratinocyte proliferation by skin innervation, *J. Invest Dermatol.* 1999 Out; 113(4): 579-86; Hsieh S., et al., Epidermal denervation and its effects on keratinocytes and Langerhans, *J Neurocitol* 1996 set.; 25(9):513-24.); Chiang, et al., Regional difference in epidermal thinning after skin denervation, *Exp Neurol* 1998 Nov; 154(1):137-45; Li Y., et al., Sensory and motor denervation influence epidermal thickness in rat foot glabrous skin, *Exp Neurol.* 1997 out; 147(2): 452-62 (o bloqueio da toxina botulínica fez com que a espessura da epiderme fosse significativamente reduzida na área central da planta da pata do rato).

[0075] A invenção abrange métodos para tratamento de um crescimento de pele. Um crescimento de pele pode resultar em dor e/ou inflamação do local do crescimento da pele. Notadamente, um crescimento da pele pode ocorrer em um paciente que não é um candidato para uma terapia invasiva, tal como cirurgia em um paciente diabético. Portanto, a invenção inclui o uso de uma toxina botulínica para tratar um crescimento de pele fazendo-o regredir (tornar-

se menor) e/ou aliviar a dor e inflamação que possam acompanhar um distúrbio da pele, tal como um joanete, calosidade, neuroma, úlcera, verrugas, calo, ou dedo em martelo.

[0076] A quantidade de toxina clostridial administrada de acordo com um método dentro do escopo da invenção descrita pode variar de acordo com as características particulares do distúrbio da pele sendo tratado, incluindo sua gravidade e outras variáveis de vários pacientes, incluindo tamanho, peso, idade, e resposta à terapia. Para guiar o praticante, tipicamente, não menos do que cerca de 1 unidade e não mais do que cerca de 50 unidades de toxina botulínica do tipo A (tal como BOTOX®) é administrada por local de injeção (isto é para cada local injetado de distúrbio da pele), por sessão de tratamento patente. Para uma toxina botulínica do tipo A tal como DYS-PORT®, não menos do que cerca de 2 unidades e não mais do que cerca de 200 unidades da toxina botulínica do tipo A são administradas por administração ou local de injeção, por sessão de tratamento patente. Para uma toxina botulínica do tipo B tal como MYOBLOC®, não menos do que cerca de 40 unidades e não mais do que cerca de 2500 unidades da toxina botulínica do tipo B são administradas por administrador ou local de injeção, por sessão de tratamento patente. Menos do que cerca de 1, 2 ou 40 unidades (de BOTOX®, DYS-PORT® e MYOBLOC®, respectivamente) pode falhar em conseguir um efeito terapêutico desejado, enquanto não mais do que cerca de 50, 200 ou 2500 unidades (de BOTOX®, DYS-PORT® e MYOBLOC® respectivamente) pode resultar em hipotonicidade muscular, fraqueza e/ou paralisia clinicamente observáveis e indesejadas.

[0077] Mais preferentemente: para BOTOX® não menos do que cerca de 2 unidades e não mais do que cerca de 20

unidades de uma toxina botulínica do tipo A; para DYS-PORT® não menos do que cerca de 4 unidades e não mais do que cerca de 100 unidades, e; para MYOBLOC®, não menos do que cerca de 80 unidades e não mais do que cerca de 1000 unidades são, respectivamente, administradas por local de injeção, por sessão de tratamento patente.

[0078] Mais preferentemente: para BOTOX® não menos do que cerca de 5 unidades e não mais do que cerca de 15 unidades de uma toxina botulínica do tipo A; para DYS-PORT® não menos do que cerca de 20 unidades e não mais do que cerca de 75 unidades, e; para Myobloc®, não menos do que cerca de 200 unidades e não mais do que cerca de 750 unidades são, respectivamente, administradas por local de injeção, por sessão de tratamento patente. É importante notar que pode haver múltiplos locais de injeção (isto é um padrão de injeções) para cada sessão de tratamento do paciente.

[0079] Apesar de serem fornecidos exemplos de vias de administração e dosagens, as vias apropriadas de administração e dosagem são geralmente determinadas em uma base caso a caso, pelo clínico receitante. Tais determinações são rotina daqueles versados na técnica (ver por exemplo, Princípios de Harrison da Medicina Interna (1998), editado por Anthony Fauci et al., 14 a edição, publicada por MacGraw Hill). Por exemplo, a via e dosagem da administração de uma neurotoxina clostridial de acordo com a presente invenção descrita podem ser selecionadas com base em critérios, tal como as características de solubilidade da neurotoxina escolhida bem como a intensidade e âmbito de um distúrbio da pele.

[0080] A presente invenção é com base na descoberta de que o local de administração de uma toxina clostridial pode fornecer alívio significativo e duradouro para um

distúrbio de pele. Uma toxina clostridial usada de acordo com a invenção descrita aqui pode inibir a transmissão de sinais químicos ou elétricos entre os grupos neuronais selecionados que estão envolvidos na geração de um distúrbio da pele. As toxinas clostridiais de preferência não são citotóxicas para as células que são expostas à toxina clostridial. A toxina clostridial pode inibir a neurotransmissão reduzindo ou evitando a exocitose do neurotransmissor dos neurônios expostos à toxina clostridial. Ou a toxina clostridial aplicada pode reduzir a neurotransmissão, inibindo a geração de potenciais de ação dos neurônios expostos à toxina. O efeito de alívio do distúrbio da pele fornecido pela toxina clostridial pode persistir por um período relativamente longo de tempo, por exemplo por mais do que dois meses, e potencialmente por muitos anos.

[0081] Exemplos de toxinas clostridiais dentro do âmbito da presente invenção incluem neurotoxinas preparadas pelas espécies de *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* e *Clostridium beratti*. Além disso, as toxinas botulínicas usadas nos métodos da invenção podem ser uma toxina botulínica selecionada de um grupo de toxina botulínica dos tipos A, B, C, D, E, F, e G. Em um modalidade da invenção, a neurotoxina botulínica administrada ao paciente é toxina botulínica do tipo A. A toxina botulínica do tipo A é desejável devido a sua elevada potência em humanos, pronta disponibilidade, e uso conhecido para o tratamento de distúrbios musculares leves e do esqueleto quando localmente administradas por injeção intramuscular. A presente invenção também inclui o uso de (a) neurotoxinas clostridiais obtidas ou processadas por cultura bacteriana, extração de toxina, concentração, preservação ou neurotoxinas recombinantes, isto é neurotoxinas que

tiveram um ou mais aminoácidos ou seqüências de aminoácidos deliberadamente apagadas, modificadas ou substituídas por procedimentos de modificação química/bioquímica de aminoácidos ou pelo uso de tecnologias recombinantes de vetor recombinante/célula hospedeira conhecidas, bem como derivados ou fragmentos de neurotoxinas assim preparadas. Essas variantes de neurotoxina retêm a capacidade de inibir a neurotransmissão entre ou inter neurônios, e algumas dessas variantes podem fornecer durações aumentadas de efeitos inibidores, se comparadas às neurotoxinas nativas, ou podem fornecer especificidade de ligação aumentada aos neurônios expostos às neurotoxinas. Essas variantes de neurotoxina podem ser selecionadas por monitoramento das variantes usando ensaios convencionais para identificar as neurotoxinas que têm os efeitos fisiológicos desejados de inibição da neurotransmissão.

[0082] Toxinas botulínicas para uso de acordo com a presente invenção podem ser armazenadas em recipientes liofilizados, secadas a vácuo em recipientes sob pressão de vácuo, ou como líquidos estáveis. Antes da liofilização a toxina botulínica pode ser combinada com excipientes farmacologicamente aceitáveis, estabilizantes e/ou carreadores, tais como albumina. O material liofilizado pode ser reconstituído com solução salina ou água para criar uma solução ou composição contendo a toxina botulínica a ser administrada ao paciente.

[0083] Apesar da composição poder conter somente um único tipo de neurotoxina, tal como toxina botulínica do tipo A como o ingrediente ativo para suprimir a neurotransmissão, outras composições terapêuticas podem incluir dois ou mais tipos de neurotoxinas, que podem fornecer tratamento terapêutico aperfeiçoado de um distúrbio de pele. Por exemplo, uma composição administrada a um paci-

ente pode incluir toxina botulínica do tipo A e toxina botulínica do tipo B. A administração de uma composição única contendo duas neurotoxinas diferentes pode permitir a concentração eficaz de cada uma das neurotoxinas em doses menores do que se uma única neurotoxina fosse administrada ao paciente, ao mesmo tempo que ainda se consegue os efeitos terapêuticos desejados. A composição administrada ao paciente também pode conter outros ingredientes farmacêuticamente ativos, tais como, receptor de proteína ou moduladores de canal de ferro, em combinação com a neurotoxina ou neurotoxinas. Esses moduladores podem contribuir para a redução na neurotransmissão entre os vários neurônios. Por exemplo, uma composição pode conter moduladores de receptor de ácido gama aminobutírico (GABA) do tipo A que aumentam os efeitos inibidores mediados pelo receptor GABAA. O receptor GABAA inibe a atividade receptora neuronal desviando eficazmente o fluxo da corrente através da membrana celular. Moduladores de receptor GABAA podem aumentar os efeitos inibidores do receptor de GABAA e reduzir a transmissão elétrica ou sinal químico dos neurônios. Exemplos de moduladores de receptor GABAA incluem benzodiazepinas, tais como diazepam, oxaxepam, lorazepam, prazepam, alprazolam, halazepam, clordiazepóxido, e clorazepatos. Composições também podem conter moduladores de receptor de glutamato, que diminuem os efeitos excitatórios mediados pelos receptores de glutamato. Exemplos de moduladores de receptor de glutamato incluem agentes que inibem o fluxo corrente através de AMPA, NMDA, e/ou tipos de cainato de receptores de glutamato. As composições também podem incluir agentes que modulam receptores de dopamina, tais como antipsicóticos, receptores de norepinefrina, e/ou receptores de serotonina. As composições também podem incluir agentes

que afetam o fluxo do íon através de canais de cálcio com porta de voltagem, canais de potássio, e/ou canais de sódio. Portanto, as composições usadas para tratar um distúrbio da pele podem incluir uma ou mais neurotoxinas, tais como toxinas botulínicas, além de moduladores de receptor de canal de íons que podem reduzir a neurotransmissão.

[0084] A neurotoxina pode ser administrada por qualquer método apropriado conforme determinado pelo clínico de plantão. Os métodos de administração permitem que a neurotoxina seja administrada localmente a um tecido alvo selecionado. Métodos de administração incluem injeção a uma solução ou composição contendo a neurotoxina, conforme descrito acima, e incluem a implantação de um sistema de desprendimento controlado que controladamente desprende a neurotoxina para o tecido alvo. Tais sistemas de desprendimento controlado reduzem a necessidade de injeções repetidas. A difusão de uma atividade biológica de uma toxina botulínica dentro de um tecido parece ser uma função de dose e pode ser graduada. Jankovic J., et al, *Terapia com Toxina Botulínica*, Marcel Dekker, Inc., (1994), página 150. Portanto, a difusão da toxina botulínica pode ser controlada para reduzir potencialmente efeitos colaterais indesejáveis que podem afetar as capacidades cognitivas do paciente. Por exemplo, a neurotoxina pode ser administrada de modo que a neurotoxina primariamente afete os sistemas neurais que acredita-se estarem envolvidos na geração de um distúrbio de pele.

[0085] Um polímero de polianidrido, Gliadel® (Stolle R & D, Inc., Cincinnati, OH) um copolímero de policarboxifenoxipropano e ácido sebácico em uma proporção de 20:80, foi usado para preparar implantes, e foi implantado intracranialmente para tratar gliomas malignos. Polímeros e

BCNU podem ser co-dissolvidos em cloreto de metileno e secados por atomização em microesferas. As microesferas podem então ser prensadas em discos de 1,4 cm de diâmetro e 1,0 mm de espessura por moldagem por compressão, empacotamento em bolsas de laminado de alumínio sob atmosfera de nitrogênio e esterilizadas por 2,2 megaRads de irradiação gamma. O polímero permite o desprendimento de carmustina por um período de 2-3 semanas, apesar de poder levar mais do que um ano para o polímero ser amplamente degradado. Brem, H., et al, Seleção Controlada de Placebo de Segurança e Eficiência de Entrega Intraoperativa Controlada por Polímeros Biodegradáveis de Quimioterapia para Gliomas Recorrentes, Lancet 345; 1008-1012:1995.

[0086] Implantes úteis na prática dos métodos divulgados aqui podem ser preparados por misturação de uma quantidade desejada de uma neurotoxina estabilizada (tal como BOTOX® não-reconstituído) em uma solução de um polímero apropriado dissolvido em cloreto de metileno. A solução pode ser preparada à temperatura ambiente. A solução pode então ser transferida a uma placa de Petre e o cloreto de metileno evaporado em um dessecador a vácuo. Dependendo do tamanho do implante desejado e então da quantidade de neurotoxina incorporada, uma quantidade apropriada da neurotoxina seca incorporada ao implante é comprimida em cerca de (8000 p.s.i.) por 5 segundos ou em (3000 p.s.i.) por 17 segundos em um molde para formar discos de implante encapsulando a neurotoxina. Ver, por exemplo, Fung L. K. et al., Farmacocinética de fornecimento intersticial de carmustina 4-hidroperóxiciclofosfamidás e paclitaxel a partir de um implante de Polímero Biodegradável no Cérebro de Macacos, Pesquisa de Câncer, 58; 672-684; 1998.

[0087] Administração local de uma toxina clostridial, tal como uma toxina botulínica, pode fornecer um alto ní-

vel de toxina terapêutica local. Um desprendimento controlado de polímero capaz de longo prazo, fornecimento local de uma toxina clostridial a um distúrbio de pele alvo permite a dosagem eficaz do tecido alvo. Um implante apropriado, conforme indicado na patente U. S. número 6 306 423 intitulada "Implante de Neurotoxina", permite a introdução direta de um agente quimioterápico a um tecido alvo via um desprendimento controlado de polímero. Os polímeros de implante usados são de preferência hidrófobos, de modo a proteger a neurotoxina anexada ao polímero a partir da decomposição de água até que a toxina seja desprendida no meio ambiente do tecido alvo.

[0088] A administração local de uma toxina botulínica de acordo com a presente invenção, por injeção ou implante a um tecido alvo, fornece uma alternativa superior a uma administração sistêmica de produtos farmacêuticos a pacientes para aliviar distúrbios de pele.

[0089] A quantidade de uma toxina clostridial selecionada para administração local a um tecido alvo de acordo com a presente invenção descrita pode ser variada com base em critérios tais como a gravidade do distúrbio da pele sendo tratado, características de solubilidade da toxina neurotoxina escolhida, bem como a idade, sexo, peso e saúde do paciente. Por exemplo, a extensão da área da pele influenciada acredita-se ser proporcional ao volume de neurotoxina injetado, enquanto a quantidade do distúrbio da pele que suprime o efeito, na maior parte das faixas de dosagem, acredita-se ser proporcional à concentração de uma toxina clostridial administrada. Métodos para determinação da via apropriada de administração e dosagem são geralmente determinadas em uma base caso a caso pelo clínico receitante. Tais determinações são rotina para aqueles versado na técnica (ver, por exemplo, Princípios

de Harrison de Medicina Interna (1998), editado por Anthony Fauci et al, 14a edição, publicado por McGraw Hill).

[0090] Significativamente, um método dentro do âmbito da presente invenção pode fornecer função paciente aperfeiçoada. "Função paciente aperfeiçoada" pode ser definida como um aperfeiçoamento medido por fatores tais como uma dor reduzida, menor tempo gasto acamado, movimentação aumentada, atitude mais saudável, estilo de vida mais variado e/ou cura permitida pela tonificação normal do músculo. Função paciente aperfeiçoada é sinônimo de uma qualidade de vida aperfeiçoada (QOL). QOL pode ser avaliado usando-se por exemplo os procedimentos de pontuação de inspeção de saúde SF-12 ou SF-36. SF-36 avalia a saúde física e mental do paciente nos oito domínios de funcionamento físico, limitações de papel devido a problemas físicos, funcionamento social, dor no corpo, saúde mental geral, limitações de papel devido a problemas emocionais, vitalidade e percepções de saúde geral. As marcas obtidas podem ser comparadas a valores publicados disponíveis para várias populações gerais e pacientes.

[0091] EXEMPLOS

[0092] Os seguintes exemplos não-limitantes fornecem, àqueles versados na técnica, métodos específicos preferidos para tratar condições dentro do âmbito da presente invenção e não são pretendidos como limitantes do âmbito da invenção. Nos exemplos que se seguem vários modos de administração não-sistêmica de neurotoxina clostridial podem ser executados. Por exemplo, por aplicação tópica (creme ou bandagem transdérmica), injeção subcutânea, ou por implante de um implante com desprendimento controlado.

[0093] Exemplo 1

[0094] Uso de uma toxina botulínica para tratar um esporão ósseo

[0095] Uma mulher diabética de 61 anos se apresenta com uma dor que se desenvolveu no fundo de seu calcanhar, e ficou pior. A paciente não está ciente de ter qualquer dano que o tivesse causado. A paciente é diagnosticada como tendo um esporão ósseo doloroso no centro do calcanhar esquerdo. Ela menciona uma dor na maior parte do tempo, mas quando a paciente sai pela primeira vez da cama, pela manhã, ou ao levantar-se após estar sentada por um período de tempo durante o dia, a dor no calcanhar é quase que insuportável, sentindo como se o calcanhar tivesse se contundido ao cair de uma rocha com pés descalços, mas é pior. Muitas terapias incluindo lidocaína tópica, NSAIDS, e terapia, são testadas com pouca ajuda. Cirurgia não é uma opção devido à pobre circulação sanguínea dos membros inferiores da paciente. Portanto, toxina botulínica do tipo A como 30 unidades totais pode ser aplicada seguindo o uso de um anestésico tópico, 10 U/local em três locais de injeção subcutâneas espaçadas homoganeamente, uma longe da outra, sobre a área dolorida. No acompanhamento 2 semanas mais tarde, a paciente pode reportar alívio significativo da dor e pode tolerar caminhar. Quatro semanas mais tarde a paciente pode reportar nenhuma dor e ser capaz de tolerar andar distâncias maiores do que duas semanas mais cedo.

[0096] Exemplo 2

[0097] Uso de uma Toxina Botulínica para Tratar Calos e Joanetes

[0098] Um homem de 54 anos que caminhou extensamente em um grande parque de diversões por três dias com seu neto, reportou dor significativa próxima ao lado direito de seu dedão do pé, e do lado plantar do calcanhar do

mesmo pé. A dor pode se tornar excruciante e desabilitante. O paciente tem uma história de calos dolorosos em ambos os pés, que são recorrentes, apesar do tratamento médico e ortótico. Mediante exame, nota-se uma consistência de crescimento de 6 cm<sup>2</sup> e uma área inflamada circular de 8 cm<sup>2</sup>, do lado plantar, consistente com um joanete. Um tratamento com uma toxina botulínica do tipo A pode ser começada como 50 U de toxina injetada (2 locais/25U cada) intradermicamente no calo e 30 U no joanete. 14 dias mais tarde o paciente pode reportar alívio significativo em ambas as áreas afetadas. Dois meses mais tarde, o paciente pode reportar uma redução de mais de 50% no tamanho do calo e 60% do tamanho do joanete, sem dor. O paciente pode ser capaz de retornar às atividades de caminhar normalmente e também pode tolerar andar grandes distâncias.

[0099] Exemplo 3

[00100] Uso de uma Toxina Botulínica para Tratar Verrugas Genitais

[00101] Uma paciente de 48 anos apresenta uma história de verrugas genitais. O exame da paciente revela seis caroços coloridos de carne ou pequenas verrugas maculopapulares semelhantes a couve-flor de vários tamanhos (0,05 cm<sup>2</sup> até 2 cm<sup>2</sup>). A paciente foi tratada com diferentes métodos de tratamento; aplicação direta de bleomicina, ácido acetilsalicílico, com pouco ou nenhum alívio. A paciente recusa métodos de tratamento a laser ou outros tipos invasivos. Uma toxina botulínica do tipo A é aplicada diretamente nas áreas de verruga via injeção intradérmica, em uma quantidade eficaz de, mas não limitada, a 5U/cm<sup>2</sup>, para um total de 30 U. Por acompanhamento 34 semanas mais tarde, 3 das verrugas menores podem ter desaparecido completamente e, em 2 meses, a paciente pode reportar o desaparecimento das verrugas remanescentes.

[00102] Exemplo 4

[00103] Uso de Toxina Botulínica para Tratar Verrugas Plantares

[00104] Um homem de 54 anos tem uma história de verrugas plantares e retorna para a clínica seguindo uma exacerbção do crescimento de verrugas na região plantar do seu pé direito. Examinando 3 verrugas de tamanhos variados (1 cm<sup>2</sup>, 2,5 cm<sup>2</sup> e 4,4 cm<sup>2</sup>), com um anel de cor avermelhada circundando 2 das 3 verrugas, sugerindo inflamação. O paciente tentou bleomicina mas o alívio foi mínimo e causou dor significativa seguida à injeção. Portanto, uma neurotoxina botulínica é considerada uma alternativa e 5U/cm<sup>2</sup> podem ser aplicadas em uma formulação tópica, diretamente à verruga em um total de 45 U. 2 meses mais tarde, em consulta de acompanhamento, o paciente pode reportar um completo alívio da dor, e através de exame constatou-se não haver sinais de inflamação (anéis avermelhados não estavam presentes), e 2 das 3 verrugas tinham desaparecido completamente somente com ~ 1 cm<sup>2</sup> dos 4,4 cm<sup>2</sup> de verrugas visíveis.

[00105] Em cada um dos exemplos acima uma toxina botulínica do tipo B, C, D, E, F ou G pode ser substituída pela toxina botulína do tipo A empregada acima, por exemplo, pelo uso de 250 unidades de uma toxina botulínica do tipo B. A quantidade específica de uma toxina botulínica (tal como BOTOX®) administrada, dependendo de uma variedade de fatores a serem pesados e considerados dentro da discreção do clínico de plantão e, em cada um dos exemplos, de quantidades insignificantes de toxina botulínica, aparece sistemicamente sem nenhum efeito lateral significativo.

[00106] Um método para tratamento de um distúrbio de pele de acordo com a invenção divulgado aqui tem muitos

benefícios e vantagens, incluindo as seguintes:

1. os sintomas de um distúrbio de pele pode ser dramaticamente reduzido ou eliminado.

2. os sintomas de um distúrbio de pele podem ser reduzidos ou eliminados por pelo menos cerca de duas semanas até cerca de seis meses por injeção de neurotoxina, e cerca de um ano até cerca de cinco anos, com o uso de um implante de neurotoxina com desprendimento controlado.

3. a neurotoxina clostridial injetada ou implantada mostra pouca ou nenhuma tendência a difundir ou ser transportada para fora da injeção intramuscular (ou intradérmica ou subdérmica) ou local de implante.

4. poucos ou nenhum efeito colateral indesejável significativo ocorre da injeção intramuscular (ou intradérmica ou subdérmica) ou implante da neurotoxina Clostridial.

5. Os presentes métodos podem resultar nos efeitos colaterais desejáveis de maior mobilidade paciente, uma atitude mais positiva, e uma qualidade de vida aperfeiçoada.

[00107] Apesar da presente invenção ter sido descrita em detalhes no que se refere a certos métodos preferidos, outros modalidades, versões, e modificações dentro do âmbito da presente invenção são possíveis. Por exemplo, uma ampla variedade de neurotoxinas pode ser eficazmente usada nos métodos da presente invenção. Adicionalmente, a presente invenção inclui os métodos de administração para aliviar um distúrbio de pele no qual duas ou mais neurotoxinas, tais como duas ou mais toxinas botulínicas, são administradas concorrentemente ou consecutivamente. Por exemplo, toxina botulínica do tipo A pode ser administrada até que ocorra uma perda de resposta clínica ou anticorpos neutralizadores desenvolvidos, seguidos por admi-

nistração da toxina botulínica do tipo B. Alternativamente, uma combinação de quaisquer dois ou mais dos serotipos botulínicos A-G podem ser localmente administrados para controlar o início e a duração do resultado terapêutico desejado. Além disso, os compostos de neurotoxina podem ser administrados antes de, concorrentemente a, ou subseqüentemente à administração da neurotoxina para efeito adjunto comprovado, tal como início aumentado ou mais rápido de desnervação antes da neurotoxina, tal como toxina botulínica, começar a exercer seu efeito terapêutico.

[00108] Uma toxina botulínica pode ser administrada ela própria ou em combinação de dois ou mais serotipos de toxina botulínica. A toxina botulínica pode ser uma toxina recombinantemente preparada ou um híbrido de toxina.

[00109] A presente invenção também inclui, dentro de seu âmbito, o uso de uma neurotoxina, tal como uma toxina botulínica, na preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio de pele, por administração local da neurotoxina.

[00110] Todas as referências, artigos, patentes, pedidos de patentes e publicações indicados acima são anexados aqui como referência em sua totalidade.

[00111] Concordantemente, o espírito e âmbito das seguintes reivindicações não deveriam estar limitados às descrições das modalidades preferidos indicados acima.

### **REIVINDICAÇÕES**

1. Uso de uma toxina botulínica **caracterizado por** ser para a preparação de um medicamento para tratamento de um distúrbio de pele selecionado a partir do grupo consistindo de uma verruga, joanete, calo, calosidade, neuroma, dedo em martelo, dermatofibroma, nevo, granuloma ou ceratose.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a toxina botulínica ser uma toxina botulínica do tipo A, B, C, D, E, F, ou G.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a toxina botulínica ser uma toxina botulínica do tipo A.

4. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a administração ser por administração tópica ou subcutânea da toxina botulínica.

5. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a verruga, o joanete, o calo, ou a calosidade ser tratado pela redução da dor associada com a verruga, o joanete, o calo, ou a calosidade.

6. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a verruga, o joanete, o calo, ou a calosidade ser tratado pela redução da inflamação associada com a verruga, o joanete, o calo, ou a calosidade.

7. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a verruga, o joanete, o calo, ou a calosidade ser tratado pela redução do tamanho associado com a verruga, o joanete, o calo, ou a calosidade.

8. Uso de uma toxina botulínica **caracterizado por** ser para a preparação de um medicamento para tratamento de uma verruga por administração de uma quantidade eficaz da toxina botulínica à verruga.

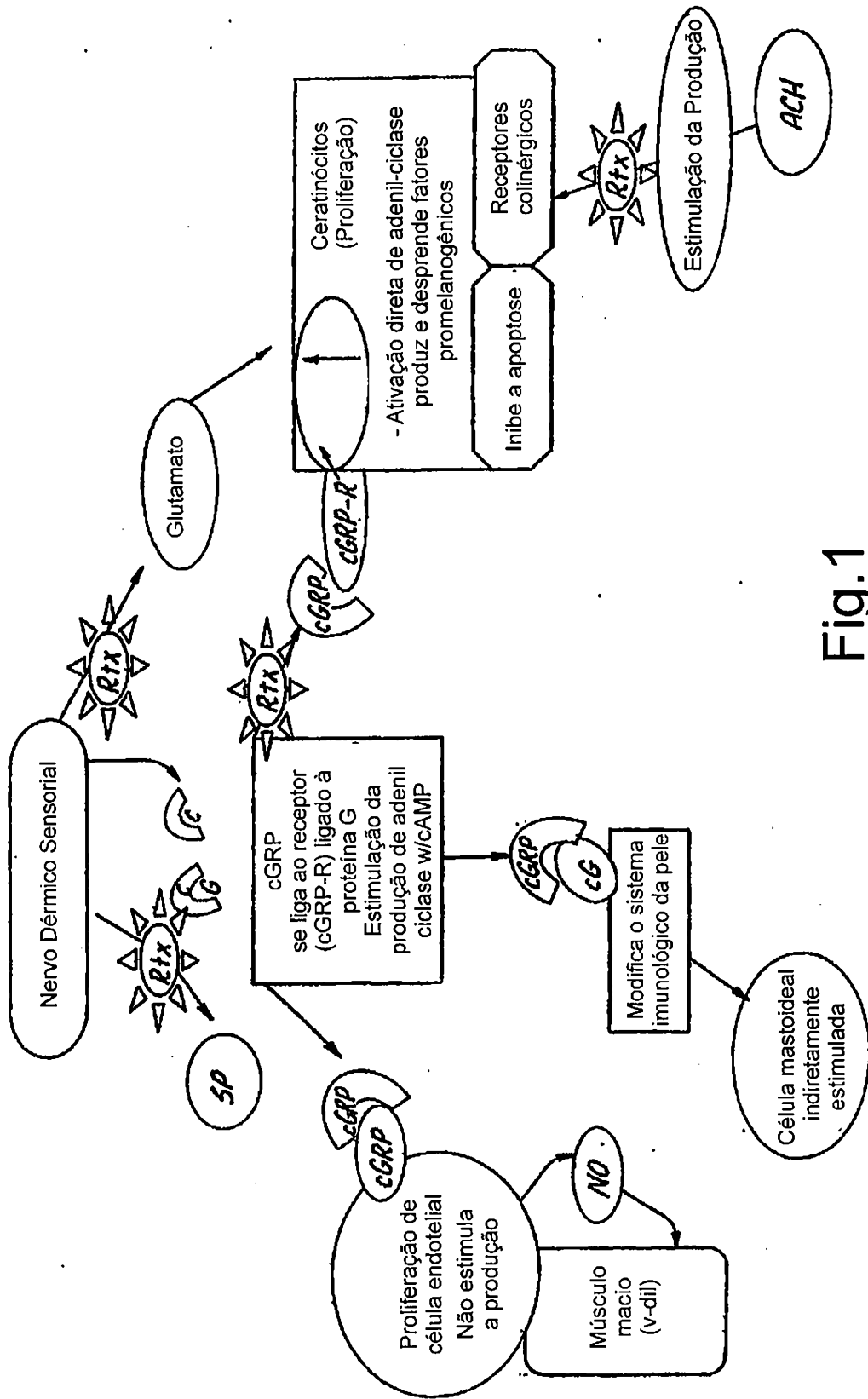


Fig.1