



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 310**

51 Int. Cl.:
A61K 38/48 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07010256 .1**
96 Fecha de presentación : **08.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1820510**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2007**

54 Título: **Terapia con toxina botulínica para enfermedades de la piel.**

30 Prioridad: **09.12.2003 US 731973**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.03.2010

73 Titular/es: **ALLERGAN, Inc.**
2525 Dupont Drive
Irvine, California 92612, US

72 Inventor/es: **First, Eric R.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 335 310 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 335 310 T3

DESCRIPCIÓN

Terapia con toxina botulínica para enfermedades de la piel.

5 Antecedentes

La presente invención tiene que ver con métodos para el tratamiento de enfermedades de la piel. La presente invención tiene que ver en particular con métodos para el tratamiento de enfermedades de la piel mediante administración de una neurotoxina Clostridial a un paciente.

10 Enfermedades de la piel

La piel (sinónimo cutis) es una membrana protectora que cubre el cuerpo y está compuesta de varias capas incluyendo la epidermis y el tiloma. Una enfermedad de la piel es una anomalía o un crecimiento anormal de piel y puede ocurrir en cualquier lugar del cutis tal como una mano, un pie o el rostro del paciente. Algunas enfermedades de la piel son más prevalente en lugares sujetos a presión, desgaste o peso tales como los pies. Una enfermedad de la piel puede ser una verruga, juanete, callo, tiloma, úlcera, neuroma, dedo del pie en martillo, dermatofibroma, queloma, mola (tal como la típica mola o nevo displásico), granuloma (tal como granuloma piógeno) y un queratoma (tal como un queratoma seborreico).

Un juanete es una hinchazón localizada ya sea en la cara dorsal de la primera articulación metarsofalangeal del pie y puede ser causado por una verruga inflamada. Una verruga es un saco cerrado lleno de fluido que se puede formar en un área sujeta a fricción. Un juanete puede deberse a un hallux valgus el cual es una desviación de la punta del dedo gordo del pie hacia el exterior del mismo. Esto puede causar que el primer metatarso y el dedo gordo formen un ángulo anormal hacia la izquierda. Un juanete se puede desarrollar entonces en respuesta a la presión de un zapato estrecho en el punto de este ángulo.

Un callo es una almohadilla protectora del cutis conformada por una capa superior de piel gruesa la cual se forma debido al roce repetido de la piel en dicho lugar. Una tiloma es un pequeño callo que se forma en la superficie superior de los dedos de los pies debido a presión o roce contra el zapato o contra otros dedos. Un tiloma también se puede formar debido a condiciones de dedo en forma de martillo que es una contracción anormal o pandeado del dedo gordo del pie debido a una dislocación parcial o total de una de las uniones de dicho dedo o del sitio donde este dedo se une con el resto del pie. A medida que el dedo se deforma puede rozar contra el zapato y la irritación resultante puede causar la formación de más piel y más gruesa (una tiloma) como respuesta protectora en ese sitio del cutis.

Una úlcera es una herida de la piel, de curación lenta. Una úlcera de etapa uno se caracteriza por un enrojecimiento de la piel sobre un área ósea. El enrojecimiento de la piel no desaparece al liberar la presión. Una úlcera de etapa dos se caracteriza por una ampolla, descascaramiento o quiebre de la piel. Hay una pérdida parcial de espesor de la piel que involucra las dos capas superiores de la misma. Una úlcera de etapa tres exhibe piel quebrada y algunas veces sangrado. Se da una pérdida total del espesor de la piel que involucra tejido subcutáneo. Finalmente, una úlcera de etapa cuatro se caracteriza por un rompimiento en la piel que involucra a la piel, el músculo, tendón y hueso y que a menudo se asocia con infecciones óseas (osteomielitis). Las úlceras pueden ser debilitantes y dolorosas.

Las verrugas son crecimientos no cancerosos de la piel debidos a infección de la capa superior por un papilomavirus. Las verrugas son usualmente de color piel y pueden sentirse ásperas al tacto pero pueden ser oscuros, planas y suaves. Existen diferentes clases de verrugas incluyendo las verrugas comunes, verrugas del pie (plantares) y verrugas planas. Una verruga plantar es una pequeña lesión de la piel que parece un callo y se encuentra en la parte inferior del pie o dedos de los pies.

Un neuroma es una hinchazón o cicatrización de un pequeño nervio que se conecta a dos dedos y provee la sensación a los mismos. Los síntomas de un neuroma pueden incluir dolor o adormecimiento que usualmente afecta al tercero y cuarto. Los neuromas frecuentemente inician con un adormecimiento o tersura del empeine del pie.

Las terapias corrientes para los problemas de la piel incluyen el uso de varios productos farmacéuticos tópicos o sistémicos y/o cirugía para retirar el problema. Los productos farmacéuticos típicamente presentan problemas laterales indeseables y, desafortunadamente, puede darse niveles significativos de recurrencia del problema cutáneo (recurrencia) luego de la cirugía, así como la posibilidad de infección.

60 Toxina Botulínica

El género clostridio tiene más de ciento veintisiete especies agrupadas de acuerdo a su morfología y funciones. La bacteria anaeróbica clostridio botulínico gram positiva produce una potente neurotoxina polipeptídica, la toxina botulínica, la cual causa una enfermedad neuroparalítica en humanos y animales conocida como botulismo. Las esporas del clostridio botulínico se encuentran en el suelo y pueden crecer en contenedores de alimentos inadecuadamente esterilizados y sellados de conservas caseras, lo cual es la causa de muchos casos de botulismo. Los efectos del botulismo aparecen 18 a 36 horas después de ingerir los alimentos infectados con cultivos o esporas de clostridio botulínico. La toxina botulínica puede pasar aparentemente no atenuada a través del tracto digestivo y atacar las neuronas motrices

ES 2 335 310 T3

periféricas. Los síntomas de intoxicación con toxina botulínica pueden progresar desde dificultad para caminar, tragar y hablar a parálisis del tracto respiratorio y muerte.

La toxina botulínica tipo A es el agente biológico natural más letal conocido por el hombre. Cerca de 50 picogramos de una toxina botulínica tipo A comercialmente disponible (complejo neurotoxina purificado, Allergan, Inc., Irving, California BOTOX® en viales de 100 unidades) tienen una DL₅₀ en ratones (e.j. 1 unidad). Una unidad de BOTOX® contiene cerca de 50 picogramos (cerca de 56 atomoles) de complejo toxina botulínica tipo A. Es interesante que, en una base molar, el complejo toxina botulínica A es cerca de 1,8 billones de veces más letal que la difteria, cerca de 600 millones de veces más letal que el cianuro de sodio, cerca de 30 millones de veces más letal que la toxina de la cobra y cerca de 12 millones de veces más letal que el cólera. Singh, *Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins*, páginas 63-84 (capítulo 4) de *Natural Toxins II*, editado por B. R. Singh *et al.*, Plenum Press, Nueva York (1976) (donde la DL₅₀ indicada de toxina botulínica tipo A de 0,3 ng equivalente a 1 U se corrige por el hecho de que cerca de 0,05 ng de BOTOX® equivale a 1 unidad). Una unidad (U) de toxina botulínica se define como la DL₅₀ luego de inyección intraperitoneal a ratones hembras Swiss Webster con pesos entre 18 y 20 gramos cada una.

¹Disponible en Allergan, Inc., de Irvine, California, bajo el nombre comercial BOTOX® en viales de 100 unidades).

Se han caracterizado siete neurotoxinas botulínicas generalmente diferentes desde el punto de vista inmunológico. Estas son respectivamente los serotipos de neurotoxina botulínica A, B, C1, D, E, F y G cada una de las cuales se distingue por neutralización con anticuerpos de tipo específicos. Los diferentes serotipos de la toxina botulínica varían en las especies animales que afectan y en la severidad y duración de la parálisis que provocan. Por ejemplo, se ha determinado que el tipo de toxina botulínica A es 500 veces más potente, medido por la rata de parálisis producida en ratas, que la toxina botulínica tipo B. Adicionalmente, se ha determinado que la toxina botulínica tipo B no es tóxica en primates a una dosis de 480 U/kg que es aproximadamente 12 veces la DL₅₀ para la toxina botulínica tipo A en primates. Moyer *et al.*, *Botulinum Toxin Type B: Experimental and Clinical Experience*, en capítulo 6, páginas 71-85 de "Therapy With Botulinum Toxin", editado por Jankovic, J. *et al.* (1994), Marcel Dekker, Inc. La toxina botulínica que aparentemente se une con gran afinidad a neuronas motrices colinérgicas es translocada a la neurona y bloquea la liberación de acetilcolina. Una captación adicional puede ocurrir a través de receptores de baja afinidad así como por fagocitosis y pinocitosis.

Independientemente del serotipo, el mecanismo molecular de la intoxicación con la toxina parece ser similar y parece involucrar al menos tres pasos o estadios. En el primer paso del proceso la toxina se une a la membrana presináptica de la neurona objetivo a través de una interacción específica entre la cadena pesada, cadena H, y un receptor de superficie celular; se cree que el receptor es diferente para cada tipo de toxina botulínica y toxina tétano. El segmento del carboxilo terminal de la cadena H, HC, parece ser importante en la unión de la toxina a superficie celular.

En la segunda etapa la toxina cruza la membrana plasmática de la célula envenenada. Inicialmente la toxina es engolfada por la célula a través de endocitosis mediada por receptores y se forma un endosoma que contiene la toxina. Luego la toxina escapa del endosoma hacia el citoplasma de la célula. Se cree que este paso es mediado por el segmento amino terminal de la cadena H, HN, que dispara un cambio conformacional de la toxina en respuesta a un pH de cerca de 5,5 o inferior. Se sabe que los endosomas poseen una bomba de protones que disminuye el pH intraendosomal. El cambio conformacional expone residuos hidrofóbicos en la toxina lo que permite a ésta alojarse en la membrana endosomal. La toxina (o por lo menos la cadena liviana) se transloca entonces a través de la membrana endosomal en el citoplasma.

El último paso del mecanismo de la actividad de la toxina botulínica involucra la reducción del enlace disulfuro que une las cadenas pesada, cadena H, y liviana, cadena L. La actividad tóxica completa de las toxinas botulínica y tétano está contenida en la cadena L de la holotoxina; la cadena L es una endopeptidasa de zinc (Zn⁺⁺) que rompe selectivamente proteínas esenciales para el reconocimiento y acoplamiento a vesículas, que contienen neurotransmisor, con la superficie citoplasmática de la membrana plásmica, y fusión de las vesículas con la membrana plásmica. La neurotoxina tétano, la toxinas botulínica tipos B, D, F y G causan degradación de la sinaptobrevina (también denominada proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP)), una proteína sinaptosomal de membrana. La mayoría de la VAMP presente en la superficie citoplásmica de la vesícula sináptica es removida como resultado de cualquiera de éstos eventos de rompimiento. Las toxinas botulínicas serotipo A y E rompen al SNAP-25. Inicialmente se creía que la toxina botulínica tipo C1 rompía la syntaxina pero se encontró que rompe la syntaxina y la SNAP-25. Cada una de las toxinas botulínica rompen específicamente un enlace diferente excepto la toxina botulínica tipo B (y la toxina del tétano) que rompe el mismo enlace. Cada uno de estos rompimientos bloquea el proceso de acoplamiento vesícula-membrana con lo cual se previene la exocitosis del contenido de la vesícula.

Las toxinas botulínicas se han utilizado en ámbitos clínicos para el tratamiento de enfermedades neuromusculares caracterizadas por músculos esqueléticos hiperactivos (p. e., enfermedades motrices). En 1989 un complejo toxina botulínica tipo A fue aprobado por la FDA de los Estados Unidos para el tratamiento de blefaroespasmos, estrabismo y espasmo hemifacial. Subsecuentemente una toxina botulínica tipo A fue también aprobada por la FDA para el tratamiento de distonía cervical y para el tratamiento de líneas glabelares y una toxina botulínica tipo B fue aprobada para el tratamiento de distonía cervical. Los serotipos toxina botulínica tipo no A aparentemente tienen un potencial más bajo y/o una duración de la actividad más corta si se les compara con la toxina botulínica tipo A. Los efectos clínicos periféricos intramusculares de la toxina botulínica tipo A aparecen usualmente una semana luego de la inyección. La

ES 2 335 310 T3

duración típica del alivio sintomático de una sola inyección intramuscular de toxina botulínica tipo A es en promedio tres meses, aunque períodos de actividad terapéutica significativamente mayores han sido reportados.

5 Aunque todos los serotipos de toxinas botulínicas aparentemente inhiben la liberación del neurotransmisor acetilcolina en la unión neuromuscular, lo hacen afectando diferentes proteínas neurosecretoras y/o rompiendo éstas proteínas en diferentes sitios. Por ejemplo, las botulínicas tipos A y E rompen ambas la proteína sinaptosomalmente asociada (SNAP-25) de 25 kiloDalton (kD), pero apuntan a diferentes secuencias dentro de esta proteína. Las toxinas botulínicas tipos B, D, F y G actúan sobre proteínas asociadas a las vesículas (VAMP, también denominadas synap-
10 tobrevin), donde cada serotipo rompe la proteína en un sitio diferente. Finalmente, se ha demostrado que la toxina botulínica tipo C1 rompe tanto a la sintaxina como a la SNAP-25. Estas diferencias en el mecanismo de acción pueden afectar el potencial relativo y/o duración de la acción de los diferentes serotipos de toxina botulínica. Aparentemente un sustrato para una toxina botulínica puede hallarse en una variedad de diferentes tipos de célula. Ver p. e., *Biochem J.* 1; 339 (pt 1): 159-65: 1999, y *Mov Disord*, 10(3): 376: 1995 (células B islet pancreáticas contienen al menos SNAP-
15 25 y sinaptobrevin).

El peso molecular de la molécula proteica de la toxina botulínica, para todos los siete serotipos de la toxina botulínica conocidos, es cerca de 150 kD. Interesantemente las toxinas botulínicas son liberadas por la bacteria clostridial como complejos que incluyen a la molécula proteica de la toxina botulínica de 150 kD junto con proteínas asociadas no tóxicas. De ésta manera el complejo toxina botulínica tipo A puede ser producido por la bacteria clostridial en
20 las formas 900 kD, 500 kD y 300 kD. La toxina botulínica tipo D es producida tanto como complejo 300 kD como complejo 500 kD. Finalmente, las toxinas botulínicas tipos E y F son producidas únicamente como complejos aproximadamente de 300 kD. Se cree que los complejos (p. e., pesos moleculares superiores a aproximadamente 300 kD) contienen una proteína no tóxica hemaglutinina y una proteína no tóxica no hemaglutinina. Estas dos proteínas no tóxicas (que junto con la molécula toxina botulínica conforman el complejo neurotóxico relevante) pueden actuar dando
25 estabilidad contra la desnaturalización de la molécula de la toxina botulínica y protección contra los ácidos digestivos cuando la toxina es ingerida. Adicionalmente, es posible que los complejos de toxina botulínica mayores (superiores a unos 150 kD en peso molecular) puedan resultar en ratas de difusión más bajas de la toxina botulínica lejos del sitio de inyección intramuscular del complejo toxina botulínica.

30 Estudios *in vitro* han indicado que la toxina botulínica inhibe la liberación inducida del catión potasio, tanto de la acetilcolina como de la norepinefrina, a partir de cultivos de células primarias de tejidos del tallo encefálico. Adicionalmente se ha reportado que la toxina botulínica inhibe la liberación evocada tanto de la glicina como del glutamato en cultivos primarios de neuronas de la espina dorsal y que en preparaciones sinaptosómicas cerebrales la toxina botulínica inhibe la liberación de cada uno de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina, norepinefrina (Habermann
35 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, substancia P y glutamato (Sanchez-Prieto, J., *et al.*, *Botulinum Toxin A Blocks Glutamate Synaptosomes*, *Eur J. Biochem* 165; 675-681: 1987). Así, cuando se emplean concentraciones adecuadas la liberación por estímulos evocados de la mayoría de los neurotransmisores es bloqueada por la toxina botulínica. Ver p. e., Pearce, L. B., *Pharmacologic Characterization of Botulinum Toxin For Basic Science and Medicine*, *Toxicon* 35(9); 1373-1442 a 1393; Bigalke H., *et al.*, *Botulinum A Neurotoxin Inhibits Non-Cholinergic Synaptic Transmission in Mouse Spinal Cord Neurons in Culture*, *Brain Research* 360; 318-324: 1985; Habermann
40 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.*, *Tetanus Toxin and Botulinum A Toxin Inhibit Release and Uptake of Various Transmitters, as Studied with Particulate Preparations From Rat Brain and Spinal Cord*, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316; 224-251: 1981, y Jankovic J. *et al.*, *Therapy With Botulinum Toxin*, Marcel Dekker, Inc., (1994), página 5.

La toxina botulínica tipo A puede ser obtenida estableciendo y creciendo cultivos de *Clostridium botulinum* en un fermentador y luego cosechando y purificando la mezcla fermentada de acuerdo a procedimientos conocidos. Todos
50 los serotipos de la toxina botulínica son sintetizados inicialmente como cadenas únicas proteicas que tienen que ser cortadas o escindidas mediante proteasas para convertirse en neuroactivas. Las cepas bacteriales que fabrican la toxina botulínica serotipos A y G poseen proteasas endógenas y los serotipos A y G pueden por lo tanto ser recuperados de los cultivos bacteriales predominantemente en sus formas activas. En contraste, la toxina botulínica serotipos C1, D y E son sintetizados por cepas no proteolíticas y por consiguiente son típicamente desactivadas cuando se recuperan
55 de los cultivos. Los serotipos B y F son producidos por cepas tanto proteolíticas como no proteolíticas y por lo tanto pueden ser recuperadas ya sea en forma activa o inactiva. Sin embargo, aún las cepas proteolíticas que producen, por ejemplo, la toxina botulínica serotipo tipo B, rompen tan solo una porción de la toxina producida. La proporción exacta de moléculas escindidas o no escindidas depende del período de la incubación y de la temperatura del cultivo. Por lo tanto, cierto porcentaje de cualquier preparación de, por ejemplo, la toxina botulínica tipo B es probable que sea inactivo, posiblemente dando cuenta del potencial significativamente inferior conocido de la toxina botulínica
60 tipo B comparado con la toxina botulínica tipo A. La presencia de moléculas inactivas de toxina botulínica en una preparación clínica contribuirá a la carga proteica total de la preparación, la cual ha sido vinculada a la antigenicidad aumentada, sin contribuir a su eficacia clínica. Adicionalmente, se sabe que la toxina botulínica tipo B tiene, luego de una inyección intramuscular, un período de duración de su actividad más corto y que también es menos potente que la
65 toxina botulínica tipo A al mismo nivel de dosificación.

Toxina botulínica tipo A cristalina de alta calidad puede ser producida a partir de la cepa *Hall A* del *Clostridium botulinum* con características de $\geq 3 \times 10^7$ U/mg, una A260/A278 de menos de 0,60 y un patrón distintivo de bandas

ES 2 335 310 T3

sobre electroforesis en gel. El conocido proceso Shantz puede ser usado para obtener toxina botulínica tipo A tal como se explica en Shantz, E. J., *et al.*, Properties and use of Botulinum Toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine, Microbiol Rev. 56; 80-99: 1992. En forma general, el complejo toxina botulínica tipo A puede ser aislado y purificado a partir de una fermentación anaeróbica cultivando *Clostridium botulinum* tipo A en un medio adecuado. El proceso conocido también puede ser utilizado, luego de la separación de las proteínas no tóxicas, para obtener toxinas botulínicas purificadas tales como por ejemplo: toxina botulínica tipo A purificada con un peso molecular aproximado de 150 kD con un potencial específico de 1-2 X 10⁸ DL50 U/mg o mayor; toxina botulínica tipo B purificada con un peso molecular aproximado de 156 kD con un potencial específico de 1-2 X 10⁸ DL50 U/mg o superior y toxina botulínica purificada tipo F con un peso molecular aproximado de 155 kD con un potencial específico de 1-2 X 10⁷ DL50 U/mg o superior.

Las toxinas botulínicas y/o los complejos toxinas botulínicas pueden ser obtenidos de List Biological Laboratories, Inc., Campbell, California; el Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, UK.; Wako (Osaka, Japón), Metabiologics (Madison, Wisconsin) así como de Sigma Chemicals de St Louis, Missouri. La toxina botulínica pura también puede ser utilizada para preparar una composición farmacéutica.

Al igual que con las enzimas en general, las actividades biológicas de las toxinas botulínicas (que son peptidasas intracelulares) dependen de, al menos en parte, su conformación tridimensional. De ésta manera la toxina botulínica tipo A se desactiva por calor, por varios compuestos químicos estiradores de superficie y por secado superficial. Adicionalmente se sabe que la dilución del complejo toxina obtenido por el cultivo, fermentación y purificación de las toxinas, mucho más bajas concentraciones de toxina usadas en formulaciones farmacológicas da como resultado la rápida desactivación de la toxina a menos que se encuentre presente un agente estabilizante adecuado. La dilución de la toxina desde el orden de los miligramos hasta una solución que contenga nanogramos por mililitro presenta dificultades significativas debido a la rápida pérdida de toxicidad específica producto de tan grande dilución. Puesto que la toxina puede ser utilizada meses o años después de formularse la composición farmacéutica que la contiene, la toxina puede ser estabilizada con un agente estabilizador tal como albúmina o gelatina.

Una composición farmacéutica, comercialmente disponible, que contiene toxina botulínica se vende bajo el nombre BOTOX[®] (disponible en Allergan, Inc., de Irvine, California). BOTOX[®] consiste de un complejo toxina botulínica tipo A purificado, albúmina y cloruro de sodio, empacado en forma estéril y secado al vacío. La toxina botulínica tipo A se fabrica a partir de un cultivo de cepa Hall del *Clostridium botulinum* cultivado en un medio que contiene N-Z amina y extracto de levadura. El complejo toxina botulínica tipo A se purifica a partir de la solución del cultivo mediante una serie de precipitaciones ácidas hasta un complejo cristalino que consiste de la proteína toxina activa de alto peso molecular y una proteína hemaglutinina asociada. El complejo cristalino es rediseñado en una solución salina que contiene albúmina y se filtra en forma esterilizada (0,2 micras) antes del secado al vacío. El producto secado al vacío es almacenado en congelador a, o por debajo de, -5°C. BOTOX[®] puede ser reconstituido antes de la inyección intramuscular, con solución salina estéril, no preservada. Cada vial de BOTOX[®] contiene cerca de 100 unidades (U) de complejo neurotóxico toxina *Clostridium botulinum* tipo A purificado, 0,5 miligramos de albúmina de suero humano y 0,9 miligramos de cloruro de sodio en forma estéril, secada al vacío, sin preservantes.

Para reconstituir BOTOX[®] secado al vacío, solución salina normal estéril, sin un preservante; (inyección de cloruro de sodio 0,9%) es utilizada sacando la cantidad adecuada de diluyente con una jeringa de tamaño adecuado. Puesto que el BOTOX[®] puede ser desnaturalizado por burbujeo o por una agitación violenta similar, el diluyente se inyecta de manera suave en el vial. Por razones de esterilidad el BOTOX[®] es preferiblemente administrado dentro de las siguientes cuatro horas de haber sido retirado el vial del refrigerador y haber sido reconstituido. Durante estas cuatro horas el BOTOX[®] reconstituido puede ser almacenado en un refrigerador entre unos 2°C y 8°C. Se ha reportado que el BOTOX[®] reconstituido y refrigerado retiene su potencial durante al menos unas dos semanas. Neurology, 48: 249-53: 1997.

Se ha reportado que la toxina botulínica tipo A ha sido utilizada en ambientes clínicos como sigue:

(1) cerca de 75-125 unidades de BOTOX[®] por inyección intramuscular (múltiples músculos) para el tratamiento de distonía cervical;

(2) 5-10 unidades de BOTOX[®] por inyección intramuscular para tratar líneas glabellares (surcos en las cejas) (5 unidades inyectadas intramuscularmente en el músculo procerus y 10 unidades inyectadas intramuscularmente en cada músculo corrugator supercilii);

(3) Cerca de 30-80 unidades de BOTOX[®] para el tratamiento de constipación por inyección intraesfinteral del músculo puborectalis.

(4) Cerca de 1-5 unidades de BOTOX[®] por músculo intramuscularmente inyectado para el tratamiento de blefaroespasma inyectando el músculo lateral pretarsiano orbicularis oculi del párpado inferior.

(5) Para el tratamiento del estrabismo se han inyectado músculos extraoculares intramuscularmente con entre 1 y 5 unidades de BOTOX[®]. La cantidad inyectada varía dependiendo del tamaño del músculo que se va a inyectar y la cantidad de parálisis muscular deseada (e.j., cantidad de corrección de dioptrías deseada).

ES 2 335 310 T3

(6) Para el tratamiento de la espasticidad del miembro superior después de un ataque mediante inyecciones de BOTOX® en cinco diferentes músculos flexores del miembro superior, como sigue:

(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: 10 U a 40 U

(e) Bíceps brachii: 50 U a 200 U. Cada uno de los cinco músculos indicados han sido inyectados durante la misma sesión de tratamiento de tal manera que el paciente recibe entre 90 U y 360 U por inyección intramuscular en cada sesión del tratamiento.

(7) Para tratamiento de la migraña, inyectada pericranealmente (inyectada simétricamente en los músculos glabellar, frontalis y temporalis). La inyección de 25 U de BOTOX® ha mostrado ser de significativo beneficio como tratamiento profiláctico de la migraña comparado con vehículo tal como se evalúa por las mediciones disminuidas en la frecuencia de la migraña, severidad máxima, vomito asociado y uso agudo del medicamento durante un período de tres meses luego de la inyección de 25 U.

Se sabe que la toxina botulínica tipo A puede tener una eficacia de hasta 12 meses (European J. Neurology 6 (supp 4): S111-S1150: 1999), y en algunas circunstancias durante tanto como 27 meses, cuando se utiliza para tratar glándulas, tal como en el tratamiento de la hiperhidrosis. Ver p. e., Bushara K., Botulinum toxin and rhinorrhea, Otolaryngol Head Neck Surg 1996; 114 (3): 507, y The Laryngoscope 109: 1344-1346. Sin embargo, la duración usual de una inyección intramuscular de BOTOX® es típicamente entre 3 y 4 meses.

El éxito de la toxina botulínica tipo A en el tratamiento de una variedad de condiciones clínicas a conducido al interés en otros serotipos de la toxina botulínica. Dos preparaciones botulínicas tipo A comercialmente disponibles son el BOTOX® de Allergan Inc., de Irvine, California y el Dy sport® de Beaufor Ipsen, Porton Down, Inglaterra. Una preparación toxina botulínica tipo B (MyoBloc®) es disponible de Elan Pharmaceuticals de San Francisco, California.

Adicionalmente a presentar acciones farmacológicas en lugares periféricos, la toxinas botulínicas también pueden tener efectos inhibitorios en el sistema nervioso central. El trabajo de Weigand *et al*, Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1976; 292, 161-165 y Habermann, Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1974; 281, 47-56 mostró que la toxina botulínica es capaz de ascender al área espinal mediante transporte retrógrado. Como tal una toxina botulínica inyectada en un lugar periférico, por ejemplo intramuscularmente, puede ser transportada retrógradamente a la espina dorsal.

La patente U. S. Nº 5.989.545 revela que una neurotoxina clostridial modificada o su fragmento, preferiblemente una toxina botulínica, químicamente conjugada u fusionada mediante recombinación a un segmento objetivo en particular, puede ser usada para el tratamiento del dolor mediante administración del agente a la espina dorsal.

Una toxina botulínica también ha sido propuesta para el tratamiento de la otitis media del oído (patente U.S. 5.766.605), enfermedades del oído medio (patentes U.S. 6.265379 y 6.358.926), dolor de cabeza por tensión (patente U.S. 6.458.365), dolor de cabeza por migraña (patente U.S. 5.714.468), dolor post-operatorio y dolor visceral (patente U.S. 6.464.986), crecimiento del cabello y retención del cabello (patente U.S. 6.299.893), soriasis y dermatitis (patente U.S. 5.670.484), músculos maltratados (patente 6.423.319), varios tipos de cáncer (patente U.S. 6.139.845), problemas musculares suaves (patente U.S. 5.437.291) e inflamación neurogénica (patente U.S. 6.063.768). Implantes de liberación controlada de toxinas son conocidos (ver por e.j., patentes U.S. 6.306.423 y 6.312.708) como administración de toxina botulínica en forma transdérmica (aplicación a patente U.S. serial número 10/194805).

Adicionalmente, una toxina botulínica puede tener un efecto reductor del dolor inflamatorio inducido en una rata modelo con formalina. Aoki K., *et al*, Mechanisms of the antinociceptive effect of subcutaneous Botox: Inhibition of the peripheral and central nociceptive processing, Cephalalgia 2003 Sep; 23(7): 649. Adicionalmente, se ha reportado que el bloqueo nervioso por la toxina botulínica puede causar una reducción del espesor epidérmico. 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, se sabe que la administración de toxina botulínica al pie para el tratamiento de la sudoración excesiva (Katsambas A., *et al*, Cutaneous diseases of the foot: Unapproved treatments, Clin Dermatol 2002 Nov-Dec; 20(6): 689- 699; Sevim, S., *et al*, Botulinum toxin-A therapy for palmar and plantar hiperhidrosis, Acta Neurol Belg 2002 Dec; 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 Oct; 81 (10): 770-5), idiopathic toe walking (Tacks, L., *et al*, Idiopathic toe walking: Treatment with botulinum toxin A injection, Dev Med Child Neurol 2002; 44 (Suppl 91):6), y distonía del pie (Rogers J., *et al*, Injectins of botulinum toxin A in foot dystonia, Neurology 1993 Apr; 43 (4 Suppl 2)).

La toxina del tétano así como derivados (p.e., con un segmento objetivo no nativo), fragmentos, híbridos y sus quimeras también pueden presentar interés terapéutico. La toxina del tétano presenta muchas similitudes con las to-

ES 2 335 310 T3

xinas botulínicas. De ésta manera, ambas, la toxina del tétano y las toxinas botulínicas son polipéptidos fabricados por especies muy cercanas del *Clostridium* (*Clostridium tetani* y *Clostridium botulinum*, respectivamente). Adicionalmente, ambas, la toxina del tétano y las toxinas botulínicas son proteínas de doble cadena compuestas de una cadena liviana (peso molecular alrededor de 50 kD) unida covalentemente, mediante un solo enlace disulfuro, a una cadena pesada (peso molecular alrededor de 100 kD). De aquí el peso molecular de la toxina del tétano y de cada una de las toxinas botulínicas (sin acomplejar) es de alrededor de 150 kD. Adicionalmente, para ambas, la toxina del tétano y las toxinas botulínicas, la cadena liviana contiene el dominio que exhibe la actividad biológica (proteasa) mientras que la cadena pesada incluye al receptor de enlace (inmunogénico) y los dominios de translocación de membrana celular.

Adicionalmente, ambas, la toxina del tétano y las toxinas botulínicas exhiben una alta afinidad específica por receptores gangliósidos en la superficie de las neuronas presinápticas colinérgicas. La endocitosis mediada por receptor de la toxina del tétano por neuronas periféricas colinérgicas da como resultado transporte axonal retrógrado, bloqueo de la liberación de neurotransmisores inhibidores a partir de la sinapsis central y una parálisis espástica. Contrariamente, la endocitosis mediada por receptor de la toxina botulínica por neuronas periféricas colinérgicas da como resultado poco, si algún, transporte retrógrado, inhibición de la exocitosis de la acetilcolina a partir de las neuronas motrices periféricas y una parálisis flácida.

Finalmente, la toxina del tétano y la toxina botulínica se parecen entre sí tanto en biosíntesis como en arquitectura molecular. Así, hay un 34% global de identidad entre las secuencias proteicas de la toxina tétano y la toxina botulínica tipo A y una secuencia de identidad tan alta como el 62% para algunos dominios funcionales. Binz T. *et al.*, The Complete Sequence of Botulinum Neurotoxin Type A and Comparison with Other Clostridial Neurotoxins, *J Biological Chemistry* 265(16); 9153-9158: 1990.

Acetilcolina

Típicamente solamente un tipo de molécula neurotransmisora pequeña es liberada por cada tipo de neurona en el sistema nervioso de los mamíferos, aunque existe evidencia que sugiere que varios neuromoduladores pueden ser liberados por la misma neurona. El neurotransmisor acetilcolina es secretado por neuronas en muchas áreas del cerebro pero específicamente por las grandes células piramidales de la corteza motriz, por varias neuronas diferentes en el ganglio basal, por las neuronas motrices que inervan los músculos esqueléticos, por las neuronas pregangliónicas del sistema nervioso autónomo (ambos, simpático y parasimpático), por la bolsa 1 de fibras de la fibra muscular del eje, por las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso parasimpático y por algunas de las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso simpático. Esencialmente solo las fibras nerviosas simpáticas postgangliónicas a las glándulas sudoríparas, los músculos piloerectores y unos pocos vasos sanguíneos son colinérgicos como la mayoría de las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso simpático secretan el neurotransmisor norepinefrina. En la mayoría de los casos la acetilcolina tiene un efecto inhibitorio. Sin embargo, la acetilcolina se conoce por tener efectos inhibitorios en algunas de las terminales nerviosas parasimpáticas periféricas, tal como la inhibición del ritmo cardíaco mediante el nervio vago.

Las señales eferentes del sistema nervioso autónomo son transmitidas al cuerpo a través del sistema nervioso simpático o del sistema nervioso parasimpático. Las neuronas pregangliónicas del sistema nervioso simpático se extienden desde los cuerpos celulares de la neurona simpática localizada en el cuerno intermediolateral de la espina dorsal. Las fibras nerviosas simpáticas pregangliónicas, que se extienden desde el cuerpo celular, hacen sinápsis con neuronas postgangliónicas localizadas ya sea un ganglio simpático paravertebral o en un ganglio prevertebral. Puesto que las neuronas pregangliónicas de ambos sistemas nerviosos, simpático y parasimpático son colinérgicos. La aplicación de acetilcolina al ganglio excitará ambas neuronas postgangliónicas, simpática y parasimpática.

La acetilcolina activa dos tipos de receptores, los receptores muscarínicos y nicotínicos. Los receptores muscarínicos se encuentran en todas las células efectoras estimuladas por las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso parasimpático, así como en aquellas estimuladas por las neuronas postgangliónicas colinérgicas del sistema nervioso simpático. Los receptores nicotínicos se encuentran en la médula adrenal así como dentro del ganglio autónomo, esto es, sobre la superficie celular de la neurona postgangliónica en la sinapsis entre las neuronas pregangliónica y postgangliónica de ambos sistemas, simpático y parasimpático. Los receptores nicotínicos se encuentran también en muchas terminaciones no autónomas, por ejemplo en las membranas de las fibras musculares esqueléticas en la unión neuromuscular.

La acetilcolina es liberada de las neuronas colinérgicas cuando pequeñas y claras vesículas intracelulares se fusionan con la membrana celular neuronal presináptica. Una amplia variedad de células secretoras no neurales, tales como la médula adrenal (así como la línea celular PC12) y células islote pancreáticas liberan catecolaminas y hormona paratiroidea respectivamente a partir de grandes vesículas de núcleo denso. La línea celular PC12 es un clon de células pleocromocitoma de la rata ampliamente utilizada como un modelo de cultivo de tejido para estudios de desarrollo simpatoadrenal. La toxina botulínica inhibe la liberación de ambos tipos de compuesto a partir de ambos tipos de célula *in vitro*, permeabilizada (como por electroporación) o por ingestión directa de la toxina en la célula denervada. La toxina botulínica se sabe que también bloquea la liberación del neurotransmisor glutamato de cultivos de células sinaptosomas corticales.

ES 2 335 310 T3

Una unión neuromuscular se forma en el músculo esquelético mediante la proximidad de axones de las células musculares. Una señal transmitida a través del sistema nervioso resulta en una acción potencial en el axón terminal, con activación de canales iónicos y resultando en la liberación del neurotransmisor acetilcolina de las vesículas sinápticas interneuronales, por ejemplo en placa terminal motriz de la unión neuromuscular. La acetilcolina cruza el espacio extracelular para unirse con proteínas receptoras de acetilcolina sobre la superficie de la placa terminal muscular. Una vez que ha ocurrido suficiente unión, un potencial de acción de la célula muscular causa cambios en canales iónicos de membrana específica dando como resultado la contracción de las células musculares. La acetilcolina es entonces liberada de las células musculares y es metabolizada por colinesterasas en el espacio extracelular. Los metabolitos son reciclados de nuevo al axón terminal para ser reprocesados nuevamente en acetilcolina.

Lo que se necesita entonces es un método terapéutico efectivo para tratar una enfermedad de la piel.

Resumen

La presente invención satisface esta necesidad y provee métodos para tratar efectivamente una enfermedad de la piel mediante la administración local de una neurotoxina clostridial.

Un método dentro del objetivo de la presente invención para el tratamiento de problemas de la piel puede incluir el paso de administración local de una neurotoxina clostridial a un sitio del paciente con problemas cutáneos, tal como la cara, mano o pie. Por administración local se significa que la neurotoxina clostridial es administrada, por inyección, directamente a, en o cerca a una región de la piel con problemas.

La neurotoxina puede ser administrada localmente en una cantidad entre cerca a unas 10^{-3} unidades/kg de peso del paciente y unas 35 unidades/kg de peso del paciente. Preferiblemente la neurotoxina se administra localmente en una cantidad entre aproximadamente 10^{-2} U/kg y 25 U/kg de peso de paciente. Más preferiblemente la neurotoxina es administrada en una cantidad aproximada entre 10^{-1} U/kg y 15 U/kg. En un método particularmente preferido dentro del objetivo de la presente invención, la neurotoxina es administrada localmente en una cantidad entre 1 U/kg y cerca a 10 U/kg. En un ámbito clínico puede ser ventajoso inyectar entre 1 U a 3000 U de una neurotoxina, tal como toxina botulínica tipo A o B, a un lugar con problemas cutáneos mediante la aplicación tópica o mediante administración subdérmica, para tratar efectivamente el problema de la piel.

Una neurotoxina adecuada para uso en la práctica de la presente invención puede ser fabricada por una bacteria clostridial tal como el *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* o *Clostridium beratti*. La neurotoxina puede ser una neurotoxina modificada, esto es, una neurotoxina en la que al menos uno de sus aminoácidos ha sido retirado, modificado o reemplazado si se le compara con una neurotoxina nativa. Adicionalmente, la neurotoxina puede ser producida recombinantemente o se puede producir un derivado o un fragmento de una neurotoxina recombinante. La neurotoxina puede ser una toxina botulínica, tal como una de los serotipos A, B, C₁, D, E, F o G. Una toxina botulínica preferida para ser usada en la práctica de la presente invención es la toxina botulínica tipo A.

Un método acorde a mi invención puede ser efectuado mediante la administración de toxina clostridial a un paciente con, o quien está predispuesto a, problemas cutáneos. La toxina clostridial utilizada es preferiblemente una toxina botulínica (ya sea como complejo o pura [p.e., molécula de alrededor de 150 kDa tal como la toxina botulínica A, B, C, D, E, F o G. La administración de la toxina clostridial puede ser a través de una ruta de administración transdérmica (p.e., por aplicación de una toxina clostridial en una crema, parche o loción), una ruta subdérmica (p.e., subcutánea o intramuscular) o una ruta intradérmica.

La dosis de toxina clostridial utilizada de acuerdo a la presente invención es menor que la cantidad de toxina que se emplearía para paralizar un músculo ya que la intención de un método acorde a la presente invención no es paralizar un músculo sino tratar un problema cutáneo.

Las siguientes definiciones se aplican aquí:

“Cerca de” o “alrededor de” significa aproximadamente o muy cercano, y en el contexto de un valor o rango numérico expresado aquí, significa $\pm 10\%$ del valor numérico o del rango expresado o reivindicado.

“Alivio” significa la reducción en la ocurrencia de los síntomas de una enfermedad de la piel. Así, el alivio incluye alguna reducción, reducción significativa, reducción casi completa y reducción total de los síntomas de un problema cutáneo. Un efecto de alivio puede no aparecer clínicamente 1 a 7 días después de la administración de una neurotoxina clostridial a un paciente.

“Toxina botulínica” significa una neurotoxina botulínica ya sea como toxina pura (p.e., molécula con un peso de alrededor de 150 kDa) o como un complejo (p.e., un complejo con peso entre cerca de 300 y alrededor de 900 kDa que incluya la molécula de una neurotoxina y una o más moléculas asociadas no tóxicas), y excluye las toxinas botulínicas que no son neurotoxinas tales como las toxinas botulínicas citotóxicas C2 y C3, pero incluye toxinas botulínicas hechas recombinantemente, híbridas, modificadas y quiméricas.

“Administración local” o “localmente administrada” significa administración (p.e., por vía subcutánea, intramuscular, subdérmica o transdérmica) de un agente farmacéutico a, o en las proximidades de, un lugar dérmico o subdérmico de un paciente.

5 “Enfermedad (o problema) de la piel” significa una anormalidad cutánea que puede ser un crecimiento de la piel como una verruga, tiloma, callo o lunar.

“Tratar” significa aliviar (o eliminar) al menos uno de los síntomas de un problema cutáneo, ya sea de manera temporal o permanente.

10

La neurotoxina clostridial es administrada en una cantidad terapéuticamente efectiva para aliviar un síntoma de un problema cutáneo. Una neurotoxina clostridial adecuada puede ser una neurotoxina fabricada por una bacteria, por ejemplo, la neurotoxina puede ser fabricada por un *Clostridium botulinum*, un *Clostridium butyricum* o un *Clostridium beratti*. En ciertas modalidades de la invención, el problema de la piel puede ser tratado aplicando (en forma tópica) o
 15 inyectando (intra o transdérmicamente) a la piel del paciente una toxina botulínica. La toxina botulínica puede ser una toxina botulínica tipo A, tipo B, tipo C1, tipo D, tipo E, tipo F o tipo G. Los efectos de alivio del problema cutáneo de la toxina botulínica pueden persistir durante aproximadamente 2 semanas (p.e., luego de la administración de una toxina botulínica de corta acción tal como la toxina botulínica tipo E) y 5 años (p.e., luego de la implantación de un implante de liberación de toxina botulínica). La neurotoxina botulínica puede ser una neurotoxina hecha recombinantemente, tales como las toxinas botulínicas producidas por una bacteria *E. coli*. Adicional o alternativamente,
 20 la neurotoxina botulínica puede ser una neurotoxina modificada que es una neurotoxina botulínica a la que se le ha retirado, modificado o reemplazado por lo menos uno de sus aminoácidos, comparada con una neurotoxina nativa o la neurotoxina botulínica modificada puede ser puede ser una neurotoxina botulínica producida recombinantemente o un derivado o su fragmento.

25

Un método para tratar un problema cutáneo acorde a la presente invención puede incluir el paso de administración local de una toxina botulínica a un paciente con un problema cutáneo para aliviar dicho problema de la piel. La toxina botulínica puede ser seleccionada de un grupo consistente de toxinas botulínicas tipos A, B, C, D, E, F y G. La toxina botulínica tipo A es la toxina botulínica preferida.

30

Una modalidad detallada de mi invención puede incluir un método para el tratamiento de problemas de la piel mediante administración local, a un paciente con un problema cutáneo, de entre alrededor de 1 y alrededor de 3.000 unidades de una toxina botulínica (por ejemplo entre alrededor de 1 y 50 unidades de una toxina botulínica tipo A o entre alrededor de 50 y 3000 unidades de una toxina botulínica tipo B), por lo tanto aliviando el problema cutáneo
 35 durante alrededor de dos semanas y alrededor de 5 años.

35

Mi invención también incluye un método para el tratamiento de problemas de la piel mediante la administración local de toxina botulínica (tal como la toxina botulínica tipo A, B, C, D, E, F o G en una cantidad de alrededor de 1 unidad a 3000 unidades por sesión se tratamiento) a un paciente predispuesto a experimentar enfermedades cutáneas, previniendo de ésta manera que el paciente experimente un problema cutáneo. Un paciente predispuesto a problemas de la piel es un humano que ha experimentado problemas cutáneos al menos una vez durante los últimos doce meses. La administración local puede efectuarse por administración subcutánea o tópica de la toxina botulínica en un lugar de o dentro de la piel del paciente donde se localice el problema. El problema cutáneo puede ser reducido en tamaño entre alrededor del 20% y el 100%.

45

Descripción

La presente invención está basada en el descubrimiento de que un problema cutáneo puede ser tratado mediante la administración local de una cantidad terapéuticamente efectiva de una neurotoxina clostridial, tal como una neurotoxina botulínica. La neurotoxina botulínica (tal como las neurotoxinas botulínicas serotipos A, B, C1, D, E, F o G) pueden ser inyectadas a, o aplicadas en forma tópica, las proximidades de un problema cutáneo de un paciente. Alternativamente, la toxina botulínica puede ser administrada a una neurona intradérmica o subdérmica, para de esta manera regular por disminución, inhibir o suprimir un problema cutáneo influenciado por o de origen neuronal.

55

Sin el deseo de apegarse a la teoría, se puede proponer un mecanismo fisiológico para la eficacia de mi invención tal como se revela aquí para el tratamiento de un problema cutáneo utilizando una neurotoxina clostridial. Esencialmente, se ha hipotetizado que el uso de una toxina botulínica puede inhibir la liberación de acetilcolina y/o de otro neurotransmisor o neuropéptido por parte de uno o varios nervios dérmicos o estructuras que inervan o que tienen influencia sobre un problema cutáneo, para permitir por lo tanto el tratamiento efectivo de un problema de la piel.
 60 En forma alternativa, la neurotoxina clostridial administrada puede tener un efecto directo sobre el problema cutáneo. Por tratamiento efectivo se significa que el problema de la piel se hace menos doloroso, disminuye la inflamación y/o regresa (p.e., se hace menor en tamaño [p.e., más delgado] o desaparece del todo).

60

Con relación al mecanismo fisiológico propuesto para el uso de una neurotoxina clostridial para el tratamiento de problemas de la piel como se expuso aquí, se sabe que los queratinocitos humanos pueden tener una respuesta a la acetilcolina. Se cree que la acetilcolina es liberada por queratinocitos para que actúe como una hormona local en la epidermis. Grand S. *et al.*, Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine, *J Invest Dermatol.* 1993 Jul; 101 (1): 32-6. Los queratinocitos epidérmicos humanos poseen enzimas colinérgicas que sintetizan y degra-

65

dan la acetilcolina y expresan ambas clases, nicotínica y muscarínica, de receptores colinérgicos sobre sus superficies celulares. Estos receptores de superficie celular de los queratinocitos dérmicos enlazan la acetilcolina e inician varias respuestas celulares. Significativamente, la presencia en los queratinocitos de un sistema colinérgico funcional sugiere un papel para la acetilcolina en la mayoría, sino en todos, los aspectos de la función del queratinocito. La acetilcolina emplea calcio como mediador para sus efectos sobre los queratinocitos. A su vez, los cambios en la concentración del calcio pueden afectar la expresión y función de las enzimas colinérgicas del queratinocito y de los receptores colinérgicos. En diferentes etapas de su diferenciación, los queratinocitos demuestran combinaciones únicas de enzimas colinérgicas y de tipos de receptores colinérgicos. Grando S., Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors, *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1979 Aug; 2(1): 41-8.

De forma importante, la inervación de la piel ejerce influencia sobre la proliferación de queratinocitos y el grosor de la epidermis. Huang *et al.*, Influence of cutaneous nerves on keratinocyte proliferation and epidermal thickness in mice. *Neuroscience.* 1999(3): 965-73. Varias líneas de evidencia sugieren que los nervios que terminan en la piel tienen profunda influencia sobre su objetivo, la epidermis. Ver p.e., Grando S., Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors, *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1997 Aug; 2(1): 41-8; Grando S; *et al.*, Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *Invest Dermatol.* 1996 Sep; 107(3): 412-8; Ndoye A., *et al.*, Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1998, Sep; 111(3): 410-6; Palacios J., *et al.*, Cholinergic neuropharmacology: an update, *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 1991; 366: 27- 33; Whitehouse P., *et al.*, Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in Alzheimer's disease and related disorders, *J 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.* 2002 Oct 28; 159(2): 325-36; Andreadis S., *et al.*, Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system, *FASEB J.*, 2002 Apr; 15(6): 898-906; Krmjevic 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.* 2002 Jul; 192 (1): 45- 54; Grando S., *et al.*, Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol.* 1993 Jul; 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.* 2000 Jun; 293(3): 973-81; Nguyen V., *et al.*, Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion *Life Sci.* 2003 Mar 28; 72(18-19): 2081-5; Nguyen V., *et al.*, Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectants upon secretagogue action of acetylcholine *J Cell Sci.* 2001 Mar; 114(Pt 6): 1189-204; Grando S., *et al.*, Keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors: immunolocalization and partial characterization, *J Invest Dermatol.* 1995 Jan: 95-100; Lin Y., *et al.*, (2001) Cutaneous nerve terminal degeneration in painful monouropathy, *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* 102: 455-461; Ko M., *et al.*, Cutaneous nerve degeneration induced by acrylamide in mice, *Neuroscience Letters.* (2000) 293(3): 195-8; Lin Y., *et al.*, Quantitative sensor 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 keratinocyte 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) 297-307; 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 innervations. *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 innervations 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., *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.*, Cutaneous innervations in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy, *Neurol* 1995; 45: 1848-1855; Griffin J., *et al.*, Axonal degeneration and disorders of the axonal cytoskeleton. En: Waxman S., *et al* *The Axon.* New York: Oxford University Press, 1995: 375-390.

De ésta manera se puede postular que una toxina botulínica puede ser utilizada para inducir denervación y por lo tanto con ella se puede tratar una enfermedad cutánea - previniendo (e.j., regular por disminución) la liberación de varios neuropéptidos liberados por nervios que inervan la piel. Entre estos neuropéptidos están las taquininas, sustancia P y neuroquinina A, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la somatostatina, todos los cuales han sido reportados como moduladores de funciones de las células cutáneas como la de la proliferación celular. Como se indicó anteriormente, la liberación de la mayoría de neurotransmisores y neuropéptidos relacionados puede ser bloqueada por la toxina botulínica. Ver p.e., Hokfel., 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, adenosine 5'-triphosphate and neuropeptide Y from sympathetic nerve supplying the guinea-pig vas deferens. *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 I., 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.* 2002 Sep 6;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 USA.* 1995 Aug 29;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.* 1996 Nov; 72(3):223-9; Hosoi J., *et al.*, Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide, *Nature.* 1993 May 13;363(6425):159-63.

La Figura 1 ilustra un mecanismo de acción de una toxina botulínica ("Btx" en la Figura 1). Una toxina botulínica puede inhibir la liberación de cGRP, SP y glutamato de los nervios sensoriales dérmicos y también inhibir la liberación directa de éstos mediadores del queratinocito cutáneo, células endoteliales y melanocitos. Se sabe que los neuropeptidos liberados por los nervios sensoriales que inervan la piel y que hacen contacto con las células epidérmicas y dérmicas pueden modular directamente las funciones de los queratinocitos, las células de Langerhans (LC), células mast, células endoteliales microvasculares dérmicas e infiltrar células inmunológicas. En la Figura 1 NO es óxido nítrico, cGRP es péptido relacionado con el gen calcitonina, Ach es acetilcolina, cGRP-R es el receptor de la molécula cGRP, v-dil significa vasodilatación y SP es la sustancia P.

Adicionalmente, se ha demostrado que la denervación de la piel puede hacer que la epidermis empiece a degenerarse o a hacerse más delgada. Hsieh S., *et al.*, Epidermal denervation and its effects on keratinocytes and Langerhans cells, *J Neurocytol.* 1996 Sep; 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 Oct; 147 (2): 452-62 (botulinum toxin blockade caused epidermal thickness to be significantly reduced in the central area of the sole of the rat foot).

Mi invención incluye métodos para el tratamiento de problemas cutáneos. Un crecimiento de la piel puede generar dolor y/o inflamación en el lugar de crecimiento de la piel. Notablemente, un crecimiento de la piel puede ocurrir en un paciente que no es candidato a una terapia invasiva, caso de cirugía en caso de diabetes. De ésta manera mi invención incluye el uso de una toxina botulínica para el tratamiento de crecimiento de piel causando su decrecimiento (se hace más pequeño) y/o para el alivio del dolor y de la inflamación que puede acompañar dicho problema cutáneo (un juanete, callo, neuroma, ulcera, verruga, tiloma o dedo en martillo).

La cantidad de toxina clostridial administrada de acuerdo a un método dentro del objetivo de la invención revelada puede variar de acuerdo a características particulares del problema cutáneo que se trata, incluyendo su severidad y otras variables del paciente incluyendo tamaño, peso, edad y respuesta a la terapia. Para guiar al practicante, típicamente se administra no menos de alrededor de 1 unidad y no más de alrededor de 50 unidades de una toxina botulínica tipo A (tal como BOTOX®) por lugar de inyección (p.e., a cada lugar enfermo de la piel inyectada) por sesión de tratamiento de paciente sesión de tratamiento. Para una toxina botulínica tipo A tal como el DYSPORT®, se administran no menos de alrededor de 2 unidades y no más de alrededor de 200 unidades de la toxina botulínica tipo A por lugar de administración o inyección, por sesión de tratamiento de paciente. Menos de alrededor de 1, 2 ó 40 unidades (de BOTOX®, DYSPORT® y MYOBLOC®) puede generar indeseables y clínicamente observables hipotonicidad muscular, debilidad y/o parálisis.

Más preferiblemente: para BOTOX®, no menos de alrededor de 2 unidades y no más de alrededor de 20 unidades de una toxina botulínica tipo A; para DYSPORT®, no menos de alrededor de 4 unidades y no más de alrededor de 100 unidades y; para MYOBLOC®, no menos de alrededor de 80 unidades y no más de alrededor de 1000 unidades son, respectivamente, administradas por sitio de inyección, por sesión de tratamiento de paciente.

Más preferiblemente: para BOTOX®, no menos de alrededor de 5 unidades y no más de alrededor de 15 unidades de una toxina botulínica tipo A; para DYSPORT®, no menos de alrededor de 20 unidades y no más de alrededor de 75 unidades y; para MYOBLOC®, no menos de alrededor de 200 unidades y no más de alrededor de 750 unidades son, respectivamente, administradas por sitio de inyección, por sesión de tratamiento de paciente. Es importante notar que puede haber múltiples sitios de inyección (p.e., un patrón de inyecciones) por cada sesión de tratamiento por paciente.

Aunque ejemplos de rutas de administración y dosis son provistos, la ruta apropiada de administración y la dosis son determinadas por el médico tratante generalmente con base a cada caso. Tales determinaciones son rutinarias para alguien de experiencia ordinaria en el arte (ver por ejemplo, *Harrison's Principles of Internal Medicine* (1998), editado por Anthony Fauci *et al.*, 14ª edición, publicado por McGraw Hill). Por ejemplo, la ruta y dosis para la administración de una neurotoxina clostridial de acuerdo a la presente invención revelada pueden ser seleccionadas con base en criterios tales como las características de solubilidad de la neurotoxina escogida así como en la intensidad y objetivo de un problema cutáneo.

La presente invención está basada en el descubrimiento de que la administración local de una toxina clostridial puede proveer alivio significativo y duradero a un problema cutáneo. Una toxina clostridial utilizada de acuerdo a la invención revelada aquí puede inhibir la transmisión de señales eléctricas o químicas entre grupos neuronales seleccionados involucrados en la generación del problema cutáneo. Las toxinas clostridiales preferiblemente son no citotóxicas a las células que están expuestas a la toxina clostridial. La toxina clostridial puede inhibir la neurotransmisión reduciendo o previniendo la exocitosis del neurotransmisor de las neuronas expuestas a la toxina clostridial. O la toxina clostridial aplicada puede reducir la neurotransmisión inhibiendo la generación de los potenciales de acción de las neuronas expuestas a la toxina. El efecto de alivio del problema cutáneo provisto por la toxina clostridial puede persistir por un periodo de tiempo relativamente largo, por ejemplo, durante más de dos meses y, potencialmente, durante varios años.

Ejemplos de toxinas clostridiales dentro del objetivo de la presente invención incluyen neurotoxinas fabricadas por las especies *Clostridium botulinum*, el *Clostridium butyricum* y el *Clostridium beratii*. Adicionalmente, las toxinas botulínicas utilizadas en los métodos de la invención pueden ser toxinas botulínicas seleccionada de un grupo de toxinas botulínicas tipos A, B, C, D, E, F y G. En una modalidad de la invención la neurotoxina botulínica administrada al paciente es la toxina botulínica tipo A. La toxina botulínica tipo A es deseable debido a su alta potencia en humanos, fácil disponibilidad y uso conocido para el tratamiento de problemas del esqueleto y de los músculos lisos cuando se administra localmente mediante inyección intramuscular. La presente invención también incluye el uso de (a) neurotoxinas clostridiales obtenidas o procesadas mediante el cultivo de bacterias, la extracción de la toxina, su concentración, preservación, criosecado y/o reconstitución y/o (b) neurotoxinas recombinantes o modificadas, esto es, neurotoxinas a las que deliberadamente se les ha suprimido, modificado o reemplazado uno o más aminoácidos o secuencias de aminoácidos, mediante procedimientos químicos o bioquímicos de modificación de aminoácidos o mediante el uso de tecnologías recombinantes conocidas de células huésped/vector recombinante así como derivados o fragmentos de neurotoxinas fabricados de esta manera. Estas variantes de neurotoxinas retienen la habilidad de inhibir la neurotransmisión entre neuronas y algunas de éstas variantes pueden suministrar duraciones incrementadas de efectos inhibitorios, si se les compara con neurotoxinas nativas, o pueden proveer especificidad de enlace mejorada a las neuronas expuestas a las neurotoxinas. Estas variantes de neurotoxinas pueden ser seleccionadas tamizando las variantes mediante el empleo de ensayos convencionales para la identificación de neurotoxinas que tienen el efecto deseado de inhibición de la neurotransmisión.

Las toxinas botulínicas para uso de acuerdo a la presente invención pueden ser almacenadas en recipientes al vacío en forma liofilizada o secadas al vacío o como líquidos estables. Antes de la liofilización la toxina botulínica puede ser combinada con excipientes, estabilizantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables tales como la albúmina. El material liofilizado puede ser reconstituido con solución salina o agua para crear una solución o composición que contenga la toxina botulínica que va a ser administrada al paciente.

Aunque la composición puede contener solamente un único tipo de neurotoxina como ingrediente activo, tal como toxina botulínica tipo A, para suprimir la neurotransmisión, otras composiciones terapéuticas pueden incluir dos o más tipos de neurotoxinas, lo cual puede proveer un tratamiento terapéutico reforzado para un problema cutáneo. Por ejemplo, una composición administrada a un paciente puede incluir toxina botulínica tipo A y toxina botulínica tipo B. La administración de una sola composición que contenga dos neurotoxinas diferentes puede permitir que la concentración efectiva de cada una de las neurotoxinas sea menor que si se administrara al paciente una única neurotoxina al tiempo que se logra el mismo efecto terapéutico. La composición administrada al paciente puede también contener otros ingredientes activos farmacéuticamente activos tales como receptores proteicos o moduladores de canal iónico, en combinación con la o las neurotoxinas. Estos moduladores pueden contribuir a la reducción en la neurotransmisión entre las diferentes neuronas. Por ejemplo, una composición puede contener moduladores de receptores del ácido gama aminobutírico (GABA) tipo A que potencian los efectos inhibitorios mediados por el receptor GABAA. El receptor GABAA inhibe la actividad neuronal desviando efectivamente el flujo de corriente a través de la membrana celular. Los moduladores de los receptores GABAA pueden potenciar los efectos inhibitorios de los receptores GABAA y reducir la transmisión eléctrica o química de las neuronas. Ejemplos de moduladores de receptores GABAA incluyen las benzodiazepinas tales como el diazepam, axaxepam, lorazepam, prazepam, alprazolam, halazeapam, clordiazepoxido y clorazepato. Las composiciones pueden también contener moduladores de receptores glutamato que disminuyen los efectos excitatorios mediados por los receptores glutamato. Ejemplos de moduladores de receptores glutamato incluyen agentes que inhiben el flujo de corriente a través de tipos AMPA, NMDA y/o kainato de receptores glutamato. Las composiciones pueden también incluir agentes que modulen receptores dopamina tales como antipsicóticos, receptores norepinefrina y/o receptores serotonina. Las composiciones también pueden incluir agentes que afecten el flujo iónico a través de canales de calcio de compuerta voltaica, canales de potasio y/o canales de sodio. De ésta manera las composiciones utilizadas para el tratamiento de un problema cutáneo pueden incluir una o más, tales como las toxinas botulínicas, adicionalmente a moduladores de receptores de canal iónico que pueden reducir la neurotransmisión.

La neurotoxina puede ser administrada por cualquier método adecuado según sea determinado por el médico tratante. Los métodos de administración permiten que la neurotoxina sea administrada localmente a un tejido objetivo seleccionado. Los métodos de administración incluyen la inyección de una solución o composición que contiene la neurotoxina, tal como se describió anteriormente, e incluye la implantación de un sistema de liberación controlada que libere en forma controlada las neurotoxinas al tejido objetivo. Tales sistemas de liberación controlada reducen la necesidad de repetidas inyecciones. La difusión de la actividad biológica de una toxina botulínica dentro de un tejido parece ser función de la dosis y puede ser graduada. Jankovic J., *et al.*, Therapy With Botulinum Toxin, Marcel Dekker, Inc., (1994), página 150. De ésta manera la difusión de la toxina botulínica puede ser controlada para reducir

efectos laterales potencialmente indeseados que pueden afectar las habilidades cognitivas del paciente. Por ejemplo, la neurotoxina puede ser administrada de tal manera que la neurotoxina afecte primariamente los sistemas neuronales que se cree están involucrados en la generación de un problema cutáneo.

5 Un polímero polianhídrido, Gliadel® (Stolle R & D, Inc., Cincinnati, OH) un copolímero del poli-carboxifenoxi-
propano y el ácido sebaico en una proporción de 20:80 ha sido utilizado para fabricar implantes y ha sido implantado
intracranalmente para tratar gliomas malignos. El polímero y el BCNU pueden ser codisueltos en cloruro de metileno
y formar con ellos microesferas mediante secado por aerosol. Las microesferas pueden entonces ser comprimidas en
10 discos de 1,4 cm en diámetro y 1,0 mm de espesor mediante un molde de compresión, luego empacadas en tabletas
de papel aluminio bajo atmósfera de nitrógeno y esterilizadas mediante radiación gama de 2,2 megaRads. El polímero
permite la liberación de carmustina durante un periodo de 2-3 semanas, aunque puede tomar más de un año para que
el polímero sea degradado notoriamente. Brem, H., *et al.*, Placebo-Controlled Trial of Safety and Efficacy of Intraope-
rative Controlled Delivery by Biodegradable Polymers of Chemotherapy for Recurrent Gliomas, *lancet* 345; 1008-
1012: 1995.

15 Implantes útiles en la práctica de los métodos revelados aquí pueden ser preparados mezclando una cantidad
deseable de neurotoxina estabilizada (tal como BOTOX® no reconstituido) en una solución de un polímero disuelto
adecuadamente en cloruro de metileno. La solución puede ser preparada a temperatura ambiente. La solución puede
entonces ser transferida a un disco de petri y el cloruro de metileno evaporado en un desecador al vacío. Dependiendo
20 del tamaño deseado del implante y por lo tanto de la cantidad de neurotoxina incorporada, una cantidad adecuada de
neurotoxina seca que incorpore el implante es comprimida a alrededor de de 8000 psi durante 5 segundo o a 3000 psi
durante 17 segundos en un molde para formar discos de implante que encapsulen la neurotoxina. Ver p.e., Fung L. K.
et al., Pharmacokinetics of Interstitial Delivery of Carmustine 4-Hydroperoxycyclophosphamide and Paclitaxel From
a Biodegradable Polymer Implant in the Monkey Brain, *Cancer Research* 58; 672- 684: 1998.

25 La administración local de una toxina clostridial, tal como la toxina botulínica puede proveer un nivel alto, local,
terapéutico de la toxina. Un polímero de liberación controlada capaz de liberación local a largo plazo de una toxina
clostridial en un lugar enfermo objetivo de la piel, permite la dosificación efectiva de dicho tejido objetivo. Un im-
plante adecuado, tal como el definido en la patente U.S. número 6'306.423 titulada "Neurotoxin Implant", permite
30 la introducción directa de un agente quimioterapéutico a un tejido objetivo vía un polímero de liberación controlada.
Los polímeros de implante utilizados son preferiblemente hidrofóbicos de tal forma que protejan de descomposición
inducida por el agua a la neurotoxina incorporada al polímero hasta que la toxina sea liberada en el ambiente del tejido
objetivo.

35 La administración local de toxina botulínica, acorde a la presente invención, mediante inyección o implante a un
tejido objetivo provee una alternativa superior a la administración sistémica de fármacos a pacientes para aliviar
el problema cutáneo.

40 La cantidad de toxina clostridial seleccionada para la administración local a un órgano tejido de acuerdo a la
presente y revelada invención, puede variar dependiendo de criterios tales como severidad del problema cutáneo que
se desea tratar, de las características de solubilidad de la toxina neurotóxica escogida así como de la edad, sexo, peso
y salud del paciente. Por ejemplo, se cree que la extensión de área de piel influenciada es proporcional al volumen
de neurotoxina inyectada, mientras se cree que que la cantidad del efecto supresor del problema cutáneo es, para la
45 mayoría de rangos de dosificación, proporcional a la concentración de una toxina clostridial administrada. Los métodos
para la determinación de la ruta apropiada son generalmente determinados con base caso a caso por el médico tratante.
Tales determinaciones son rutinarias para alguien experimentado en el arte (ver por ejemplo Harrison's Principles of
Internal Medicine (1998), editado por Anthony Fauci *et al.*, 14ª edición, publicado por McGraw Hill).

50 De forma significativa, un método dentro del objetivo de la presente invención puede proveer una función mejorada
del paciente. "Función Mejorada del Paciente" se puede definir como una mejoría medida por factores tales como
disminución del dolor, reducción del tiempo en cama, incremento en las caminatas, actitud más saludable, estilo de
vida más variado y/o alivio permitido por tono muscular normal. La función mejorada del paciente es sinónimo de
55 calidad de vida mejorada (CDV). La CDV puede ser evaluada usando, por ejemplo, los conocidos procedimientos
de calificación de salud SF-12 o SF-36. El SF-36 evalúa la salud física y mental de un paciente en ocho dominios
de funcionamiento físico, limitaciones de su rol debido a problemas físicos, funcionamiento social, dolor corporal,
salud mental general, limitaciones en su rol debido a problemas emocionales, vitalidad y percepciones de salud en
general. El puntaje obtenido se puede comparar a valores publicados disponibles para varias poblaciones, en general
y de pacientes.

60 Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes, proveen a aquellos experimentados en el arte, con métodos específicos
preferidos para el tratamiento de condiciones dentro del objetivo de la presente invención. En los siguientes ejemplos
65 varios modos de administración no sistémica de una neurotoxina clostridial pueden ser efectuados. Por ejemplo, por
aplicación tópica (crema o parche transdérmico), inyección subcutánea o por implantación de un implante liberador
controlado.

ES 2 335 310 T3

Ejemplo 1

Uso de una toxina botulínica para el tratamiento de espolones óseos

5 Una mujer diabética de 61 años se presenta con un dolor que se ha desarrollado en la parte inferior de su tobillo y ha empeorado. La paciente no recuerda haber sufrido alguna lesión que causara el dolor. La paciente es diagnosticada con un doloroso espolón óseo en el centro de su tobillo izquierdo. Ella reporta un dolor tenue la mayoría del tiempo, pero al levantarse en la mañana o luego de un prolongado descanso sentada durante el día el dolor es casi insoportable, con la sensación de que el tobillo estuviera magullado por la caída descalza sobre rocas, pero peor. Se han intentado
10 varias terapias incluyendo la aplicación tópica de lidocaína NSAIDS, sin ningún resultado. Una cirugía está descartada debido a la pobre circulación sanguínea de los miembros inferiores de la paciente. Por lo tanto, luego de la aplicación tópica de un analgésico local, se puede aplicar toxina botulínica tipo A en forma de 30 unidades, 10 U/sitio en tres inyecciones subcutáneas en sitios espaciados homogéneamente sobre el área del dolor. Luego de un seguimiento de 2 semanas la paciente puede reportar un alivio significativo del dolor y puede tolerar el caminar. Cuatro semanas más tarde puede reportar no sentir ningún dolor y es capaz de tolerar caminadas más largas que dos semanas atrás.
15

Ejemplo 2

Uso de una toxina botulínica para tratar tilomas y juanetes

Un hombre de 54 años quien ha venido caminando extensivamente en un parque de diversiones durante tres días con su nieto reporta un dolor significativo en el lado proximal, lado derecho de su dedo grande del pie y en el lado plantar del talón del mismo pie. El dolor puede hacerse excruciating y lisiador. El paciente había tenido una historia
25 clínica de dolorosos tilomas y juanetes en ambos pies, los cuales eran recurrentes a pesar de tratamientos médicos y orthotics. Luego de un chequeo se nota un crecimiento de 6 cm² consistente con un tiloma y un área circular de 8 cm², inflamada en el lado plantar, consistente con un juanete. Se puede comenzar un tratamiento con una toxina botulínica tipo A como 50 U de toxina inyectada (2 lugares/25 U cada uno) intradérmicamente en el tiloma y 30 U en el juanete. 14 días más tarde el paciente puede reportar un alivio significativo en ambas áreas afectadas. Dos meses más tarde el
30 paciente puede reportar una reducción de más del 50% en el tamaño del tiloma y del 60% en el tamaño del juanete, sin dolor. El paciente puede ahora regresar a sus actividades normales de caminata y puede tolerar el caminar grandes distancias.

Ejemplo 3

Uso de una toxina botulínica para el tratamiento de verruga genitales

Una mujer de 48 años se presenta con una historia de verrugas genitales. El examen de la paciente revela seis
40 pupas o verrugas maculopapulares en forma de coliflor, color piel, de varios tamaños (0,05 cm² a 2 cm²). La paciente ha sido tratada con diferentes métodos de tratamiento, aplicación directa de bleomicina, ácido acetilsalicílico, con poco o ningún alivio. La paciente se rehúsa a láser u otros tratamientos con métodos invasivos. Se aplica una toxina botulínica tipo A directamente en las áreas de la verruga vía inyección intradérmica, en una cantidad efectiva de, pero no limitada a 5 U/cm² para un total de 30 U. Luego de 4 semanas, 3 de las verrugas más pequeños pueden haber
45 desaparecido completamente y en el segundo mes el paciente puede reportar la desaparición de las otras verrugas.

Ejemplo 4

Uso de una toxina botulínica para el tratamiento de verrugas plantares

Un hombre de 54 años tiene una historia de dolorosas verrugas plantares y regresa a la clínica después de un crecimiento desmedido de verrugas en la región plantar de su pie derecho. En el examen médico 3 verrugas de diferentes
55 tamaños (1 cm², 2,5 cm² y 4,4 cm²), con un anillo color rubor alrededor de 2 de los 3 verrugas sugiriendo inflamación. El paciente ha ensayado bleomicina pero el alivio fue mínimo y causó un dolor significativo luego de la inyección. Por lo tanto se consideró una neurotoxina botulínica como una alternativa y se puede aplicar 5 U/cm² en una formulación tópica directamente a la verruga para un total de 45 U. Durante el seguimiento, dos meses más tarde, el paciente reportó completo alivio del dolor y durante el examen no se encontró signos de inflamación (no había anillos color rubor), y 2 de las 3 verrugas habían desaparecido completamente con solo 1 cm² del verruga de 4,4 cm² visible.
60

En cada uno de los ejemplos anteriores una toxina botulínica tipo B, C, D, E, F o G puede ser substituída por la toxna botulínica tipo A usada anteriormente, por ejemplo utilizando 250 unidades de una toxina botulínica tipo B. La cantidad específica administrada de una toxina botulínica (tal como BOTOX[®]) depende de una variedad de factores a ser ponderados y considerados dentro del criterio del médico tratante y en cada uno de los ejemplos cantidades
65 insignificantes de toxina botulínica aparecen sistemáticamente sin efectos laterales significativos.

Un método para el tratamiento de problemas cutáneos acorde a la invención revelada aquí tiene muchos beneficios y ventajas incluyendo las siguientes:

ES 2 335 310 T3

1. Los síntomas de un problema cutáneo pueden ser dramáticamente reducidos o eliminados.

2. Los síntomas de un problema cutáneo pueden ser reducidos o eliminados durante al menos dos semanas a seis meses por cada inyección de neurotoxina y durante alrededor de uno a cinco años con el uso de un implante.

3. La neurotoxina clostridial inyectada o implantada muestra poca o ninguna tendencia a difundirse o a ser transportada lejos del lugar de inyección o implante intramuscular (o intradérmico).

4. Pocos o no significativos efectos laterales ocurren a partir de una inyección o implante intramuscular (o intradérmico o subdérmico) de una neurotoxina botulínica.

5. Los presentes métodos pueden resultar en el deseable efecto lateral de tener una mayor movilidad de los pacientes, una actitud más positiva y una calidad de vida mejorada.

Aunque la presente invención ha sido descrita en detalle con relación a ciertos métodos preferidos, otras modalidades, versiones y modificaciones son posibles dentro del objetivo de la presente invención. Por ejemplo, una amplia variedad de neurotoxinas pueden ser usadas eficazmente en los métodos de la presente invención. Adicionalmente, la presente invención incluye métodos de administración local para aliviar un problema cutáneo donde dos o más neurotoxinas, tales como dos o más neurotoxinas botulínicas, se administran concurrente o consecutivamente. Por ejemplo, la toxina botulínica tipo A puede ser administrada hasta una pérdida en la respuesta clínica o hasta que se desarrollen anticuerpos neutralizadores, para seguir luego con la administración de toxina botulínica tipo B. Alternativamente, se puede administrar localmente una combinación de cualquiera dos o más de los serotipos botulínicos A-G con el fin de controlar el inicio y duración del resultado terapéutico deseado. Adicionalmente, se puede administrar compuestos no neurotóxicos antes, concurrentemente con subsecuentemente a la administración de la neurotoxina con el fin de obtener un efecto tal como un inicio potenciado o más rápido de denervación antes de que la neurotoxina, tal como una toxina botulínica, empiece a inducir su efecto terapéutico.

Una toxina botulínica puede ser administrada por si misma o en combinación con uno o más de los otros serotipos de toxinas botulínicas. La toxina botulínica puede ser una toxina hecha recombinante o híbrida.

Mi invención también incluye dentro de su objetivo el uso de una neurotoxina, tal como una toxina botulínica, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un problema cutáneo mediante la administración de la neurotoxina.

Todas las referencias, artículos, patentes, solicitudes y publicaciones establecidas anteriormente se incorporan aquí por referencia en sus totalidades.

En consecuencia, el espíritu y el alcance de las siguientes reivindicaciones no deberían limitarse a la descripción de las realizaciones preferentes establecidos anteriormente.

Referencias citadas en la descripción

La lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente Europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la compilación de los textos, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO declina cualquier responsabilidad en este aspecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5989545 A [0029]
- US 5766605 A [0030]
- US 6265 A [0030]
- US 379 A [0030]
- US 6358926 B [0030]
- US 6458365 B [0030]
- US 5714468 A [0030]
- US 6464986 B [0030]
- US 6299893 B [0030]
- US 5670484 A [0030]

ES 2 335 310 T3

• US 6423319 B [0030]

• US 6139845 A [0030]

5 • US 5437291 A [0030]

• US 6063768 A [0030]

• US 6306423 B [0030] [0071]

10

• US 6312708 B [0030]

• US 194805 A [0030]

15

Literatura ajena a las patentes citada en la descripción

• Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins. **SINGH**. *Natural Toxins* II. 63-84 [0010]

20

• Botulinum Toxin Type B: Experimental and Clinical Experience. **MOYER E et al.** Therapy With Botulinum Toxin. *Marcel Dekker, Inc*, 1994, 71-85 [0011]

• *Biochem J*, 1999, vol. 1 (339), 159-65 [0016]

25

• *Mov Disord*, 1995, vol. 10 (3), 376 [0016]

• **HABERMANN E. et al.** Tetanus Toxin and Botulinum A and C Neurotoxins Inhibit Noradrenaline Release From Cultured Mouse Brain. *J Neurochem*, 1988, vol. 51 (2), 522-527 [0018]

30

• **SANCHEZ-PRIETO, J. et al.** Botulinum Toxin A Blocks Glutamate Exocytosis From Guinea Pig Cerebral Cortical Synaptosomes. *Eur J Biochem*, 1997, vol. 165, 675- 681 [0018]

• **PEARCE, L.B.** Pharmacologic Characterization of Botulinum Toxin For Basic Science and Medicine. *Toxicon*, vol. 35 (9), 1373-1412 [0018]

35

• **BIGALKE H. et al.** Botulinum A Neurotoxin Inhibits Non-Cholinergic Synaptic Transmission in Mouse Spinal Cord Neurons in Culture. *Brain Research*, 1985, vol. 360, 318-324 [0018]

40

• **HABERMANN E.** Inhibition by Tetanus and Botulinum A Toxin of the release of [3H]Noradrenaline and [3H] GABA From Rat Brain Homogenate. *Experientia*, 1988, vol. 44, 224-226 [0018]

• **BIGALKE H. et al.** Tetanus Toxin and Botulinum A Toxin Inhibit Release and Uptake of Various Transmitters, as Studied with Particulate Preparations From Rat Brain and Spinal Cord. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1981, vol. 316, 244- 251 [0018]

45

• **JANKOVIC J. et al.** Therapy With Botulinum Toxin. *Marcel Dekker, Inc*, 1994, 5 [0018]

• **SHANTZ, E.J. et al.** Properties and use of Botulinum toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine. *Microbiol Rev.*, 1992, vol. 56, 80-99 [0020]

50

• *Neurology*, 1997, vol. 48, 249-53 [0024]

• *European J. Neurology*, 1999, vol. 6, S111-S1150 [0026]

55

• **BUSHARA K.** Botulinum toxin and rhinorrhea. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1996, vol. 114 (3), 507 [0026]

• *The Laryngoscope*, 1999, vol. 109, 1344-1346 [0026]

• **WEIGAND et al.** *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1976, vol. 292, 161-165 [0028]

60

• **HABERMANN.** *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1974, vol. 281, 47-56 [0028]

• **AOKI K. et al.** Mechanisms of the antinociceptive effect of subcutaneous Botox: Inhibition of peripheral and central nociceptive processing. *Cephalalgia*, September 2003, vol. 23 (7), 649 [0031]

65

• **LI Y et al.** Sensory and motor denervation influences epidermal thickness in rat foot glabrous skin. *Exp Neurol*, 1997, vol. 147, 452-462 [0031]

ES 2 335 310 T3

- **KATSAMBAS A. et al.** Cutaneous diseases of the foot: Unapproved treatments. *Clin Dermatol*, November 2002, vol. 20 (6), 689-699 [0031]
- 5 • **SEVIM, S. et al.** Botulinum toxin-A therapy for palmar and plantar hyperhidrosis. *Acta Neurol Belg*, December 2002, vol. 102 (4), 167-70 [0031]
- **SUPUTTITADA, A.** Local botulinum toxin type A injections in the treatment of spastic toes. *Am J Phys Med Rehabil*, October 2002, vol. 81 (10), 770-5 [0031]
- 10 • **TACKS, L. et al.** Idiopathic toe walking: Treatment with botulinum toxin A injection. *Dev Med Child Neurol*, 2002, vol. 44, 6 [0031]
- **ROGERS J. et al.** Injections of botulinum toxin A in foot dystonia. *Neurology*, April 1993, vol. 43 [0031]
- 15 • **BINZ T. et al.** The Complete Sequence of Botulinum Neurotoxin Type A and Comparison with Other Clostridial Neurotoxins. *J Biological Chemistry*, 1990, vol. 265 (16), 9153-9158 [0034]
- **GRANDO S. et al.** Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol.*, July 1993, vol. 101 (1), 32-6 [0054] [0055]
- 20 • **GRANDO S.** Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Investig Dermatol Symp Proc.*, August 1997, vol. 2 (1), 41-8 [0054]
- **HUANG et al.** Influence of cutaneous nerves on keratinocyte proliferation and epidermal thickness in mice. *Neuroscience*, 1999, vol. 94 ((3)), 965-73 [0055]
- 25 • **GRANDOS.** Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Investig Dermatol Symp Proc*, August 1997, vol. 2 (1), 41-8 [0055]
- **GRANDO S. et al.** Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *Invest Dermatol.*, September 1996, vol. 107 (3), 412-8 [0055]
- 30 • **NDOYE A. et al.** Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human epidermis. *J Invest Dermatol.*, September 1998, vol. 111 (3), 410-6 [0055]
- 35 • **PALACIOS J. et al.** Cholinergic neuropharmacology: an update. *Acta Psychiatr Scand Suppl.*, 1991, vol. 366, 27-33 [0055]
- **WHITEHOUSE P. et al.** Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in Alzheimer's disease and related disorders. *J Neural Transm Suppl.*, 1987, vol. 24, 175-82 [0055]
- 40 • **ARREDONDO J. et al.** Central role of alpha7 nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium. *J Cell Biol.*, 28 October 2002, vol. 159 (2), 325-36 [0055]
- 45 • **ANDREADIS S. et al.** Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system. *FASEB J.*, April 2001, vol. 15 (6), 898-906 [0055]
- **KRNJEVIC K.** Central cholinergic mechanisms and function. *Prog Brain Res.*, 1993, vol. 98, 285-92 [0055]
- 50 • Epidermal expression of the full-length extracellular calcium-sensing receptor is required for normal keratinocyte differentiation. *J Cell Physiol.*, July 2002, vol. 192 (1), 45-54 [0055]
- **ZIA S. et al.** Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *J Pharmacol Exp Ther.*, June 2000, vol. 293 (3), 973-81 [0055]
- 55 • **NGUYEN V.** Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion. *Life Sci.*, 28 March 2003, vol. 72 (18-19), 2081-5 [0055]
- **NGUYEN V. et al.** Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectants upon secretagogue action of acetylcholine. *J Cell Sci.*, March 2001, vol. 114, 1189-204 [0055]
- 60 • **GRANDO S. et al.** Keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors: immunolocalization and partial characterization. *J Invest Dermatol.*, January 1995, vol. 104 (1), 95-100 [0055]
- 65 • **LIN Y. et al.** Cutaneous nerve terminal degeneration in painful mononeuropathy. *Experimental Neurology.*, vol. 170 (2), 290-6 [0055]

ES 2 335 310 T3

- **PAN C. et al.** Degeneration of nociceptive nerve terminals in human peripheral neuropathy. *Neuroreport.*, 2001, vol. 12 (4), 787-92 [0055]
- **HSIUNG-F. et al.** Quantitative pathology of cutaneous nerve terminal degeneration in the human skin. *Acta Neuropathologica*, 2001, vol. 102, 455-461 [0055]
- **KO M. et al.** Cutaneous nerve degeneration induced by acrylamide in mice. *Neuroscience Letters.*, 2000, vol. 293 (3), 195-8 [0055]
- **LIN Y. et al.** Quantitative sensory testing: normative values and its application in diabetic neuropathy. *Acta Neurol Taiwan*, 1998, vol. 7, 176-184 [0055]
- **T. HUANG et al.** Influence of cutaneous nerves on keratinocyte proliferation and epidermal thickness in mice. *Neuroscience*, 1999, vol. 94, 965-973 [0055]
- **HSIEH S. et al.** Pathology of nerve terminal degeneration in the skin. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2000, vol. 59 (4), 297-307 [0055]
- **HUANG I. et al.** Influence of cutaneous nerves on keratinocyte proliferation and epidermal thickness in mice. *Neuroscience*, 1999, vol. 94 (3), 965-73 [0055]
- **HSIEH S. et al.** Modulation of keratinocyte proliferation by skin innervation. *Journal of Investigative Dermatology*, 1999, vol. 113 (4), 579-86 [0055]
- **CHEN W. et al.** Trophic interactions between sensory nerves and their targets. *Journal of Biomedical Science*, 1999, vol. 6 (2), 79-85 [0055]
- **CHIANG H-Y et al.** Regional difference in epidermal thinning after skin denervation,. *Exp Neurol*, 1998, vol. 154 (1), 137-45 [0055]
- **HSIEH S. et al.** Skin innervation and its influence on the epidermis. *J Biomed Sci*, 1997, vol. 4, 264-268 [0055]
- **LEE M. et al.** Clinical and electrophysiological characteristics of inflammatory demyelinating neuropathies. *Acta Neurol Taiwan*, 1997, vol. 6, 283-288 [0055]
- **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, vol. 65, 287-298 [0055]
- **HSIEH S. et al.** Epidermal denervation and its effects on keratinocytes and Langerhans cells. *J Neurocytol*, 1996, vol. 25, 513-524 [0055]
- **MCCARTHY B. et al.** Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy. *Neurol*, 1995, vol. 45, 1848-1855 [0055]
- Axonal degeneration and disorders of the axonal cytoskeleton. **GRIFFIN J. et al.** *The Axon. Oxford University Press*, 1995, 375-390 [0055]
- **HOKFELT T.** Neuropeptides in perspective : The last ten years,. *Neuron*, 1991, vol. 7, 867-879 [0056]
- **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, vol. 392, 227-252 [0056]
- **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, vol. 87, 79-94 [0056]
- **JOHNSON M.** Synaptic glutamate release by postnatal rat serotonergic neurons in microculture. *Neuron*, 1994, vol. 12, 433-442 [0056]
- **SNEDDON P. et al.** Pharamcological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are cotransmitters in the guinea-pig vas deferens. *J. Physiol.*, 1984, vol. 347, 561-580 [0056]
- **KANEKO T. et al.** Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain. *Brain Res.*, 1990, vol. 507, 141-154 [0056]

ES 2 335 310 T3

- **KASAKOV L. et al.** Direct evidence for concomitant release of noradrenaline, adenosine 5'-triphosphate and neuropeptide Y from sympathetic nerve supplying the guinea-pig vas deferens. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 1988, vol. 22, 75-82 [0056]
- 5 • **NICHOLAS A. et al.** Glutamate-like immunoreactivity in medulla oblongata catecholamine/substance P neurons. *NeuroReport*, 1990, vol. 1, 235-238 [0056]
- **NICHOLAS A.; KUPFERMANN I. et al.** Functional studies of cotransmission. *Physiol. Rev.*, 1991, vol. 71
10 48, 683-732 54559 [0056]
- **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, vol. 48, 113-178 [0056]
- 15 • **HSIEH S. et al.** Skin Innervation and Its Effects on the Epidermis. *J Biomed Sci.*, 1997, vol. 4 (5), 264-268 [0056]
- **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.*,
20 06 September 2002, vol. 329 (3), 309-13 [0056]
- **WHITE S.; ASAHINA A. et al.** Specific induction of cAMP in Langerhans cells by calcitonin gene-related peptide: relevance to functional effects., *Proc Natl Acad Sci USA.*, 29 August 1995, vol. 92 (18), 8323-7 [0056]
- 25 • **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.*, November 1996, vol. 72 (3), 223-9 [0056]
- **HOSOI J. et al.** Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature*, 13 May 1993, vol. 363 (6425), 159-63 [0056]
- 30 • **HSIEH S. et al.** Modulation of keratinocyte proliferation by skin innervation. *J Invest Dermatol.*, October 1999, vol. 113 (4), 579-86 [0058]
- **HSIEH S. et al.** Epidermal denervation and its effects on keratinocytes and Langerhans cells. *J Neurocytol.*,
35 September 1996, vol. 25 (9), 513-24 [0058]
- **CHIANG et al.** Regional difference in epidermal thinning after skin denervation. *Exp Neurol*, November 1998, vol. 154 (1), 137-45 [0058]
- 40 • **LI Y. et al.** Sensory and motor denervation influence epidermal thickness in rat foot glabrous skin. *Exp Neurol.*, October 1997, vol. 147 (2), 452-62 [0058]
- Harrison's Principles of Internal Medicine. *McGraw Hill*, 1998 [0063] [0073]
- 45 • **JANKOVIC J. et al.** *Therapy With Botulinum Toxin Marcel Dekker, Inc*, 1994, 150 [0068]
- **BREM, H. et al.** Placebo-Controlled Trial of Safety and Efficacy of Intraoperative Controlled Delivery by Biodegradable Polymers of Chemotherapy for Recurrent Gliomas. *Lancet*, 1995, vol. 345, 1008-1012 [0069]
- 50 • **FUNG L. K. et al.** Pharmacokinetics of Interstitial Delivery of Carmustine 4- Hydroperoxycyclophosphamide and Paclitaxel From a Biodegradable Polymer Implant in the Monkey Brain. *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 672-684 [0070]

55

60

65

ES 2 335 310 T3

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de una toxina botulínica para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de la piel seleccionada del grupo consistente en un neuroma, dedo en martillo, dematofibroma, lunar, granuloma, o una queratosis.

2. El uso de acuerdo a la reivindicación 1, donde la toxina botulínica es una toxina botulínica tipo A, B, C, D, E, F o G.

10 3. El uso de acuerdo a la reivindicación 1, donde la toxina botulínica es una toxina botulínica tipo A.

4. El uso de acuerdo a la reivindicación 1, donde la toxina botulínica es administrada en una cantidad entre de 1 unidad y alrededor de 3000 unidades.

15 5. El uso de acuerdo a la reivindicación 1, donde la administración es por administración tópica o subcutánea de la toxina botulínica.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

