



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

**(11) PI 0516836-8 B1**

**(22) Data do Depósito: 24/08/2005**

**(45) Data de Concessão: 14/02/2018**



---

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE UM DEFEITO COSMÉTICO; E MÉTODO NÃO TERAPÊUTICO PARA O TRATAMENTO DE UM DEFEITO COSMÉTICO

**(51) Int.Cl.:** A61K 8/99; A61K 8/64; A61K 8/66; A61K 8/02; A61Q 19/08

**(52) CPC:** A61K 8/99,A61K 8/64,A61K 8/66,A61K 8/025,A61Q 19/08,A61K 2800/654

**(30) Prioridade Unionista:** 01/10/2004 US 10/957,004

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

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

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"COMPOSIÇÃO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE UM DEFEITO  
COSMÉTICO; E MÉTODO NÃO TERAPÊUTICO PARA TRATAMENTO DE UM  
DEFEITO COSMÉTICO"**

Antecedentes

A presente invenção se refere a composições cosméticas e métodos para o uso de tais composições para aumentar as características cosméticas de um indivíduo, tal como o uso de tais composições para tratar deficiências de contorno de pele, incluindo rugas, de um indivíduo.

Deficiências de Contorno de Pele

Por uma variedade de razões, o dano à pele frequentemente resulta em deficiências de contorno de pele e outras anomalias de pele, incluindo rugas. A fim de corrigir as deficiências de contorno e outras anomalias da pele, as pessoas frequentemente recorrem a cirurgia cosmética, tais como *liftings* faciais e dermolipectomia e/ou injeção de vários materiais, tais como micropartículas sólidas, de silicone e colágeno. A patente U.S. nº 6,436,424 descreve microesferas injetáveis e incháveis para aumento dérmico. Composições líquidas contendo toxina botulínica foram usadas para tratar rugas.

Toxina Botulínica

O gênero *Clostridium* tem mais do que cento e vinte sete espécies, agrupadas de acordo com sua morfologia e funções. A bactéria gram positiva, anaeróbica *Clostridium botulinum* produz uma neurotoxina de polipeptídeo potente, toxina botulínica, que causa uma doença neuromuscular em seres humanos e animais denominada botulismo. Os esporos de *Clostridium botulinum*

são encontrados no solo e pode se desenvolver em recipientes alimentícios selados e esterilizados inadequadamente de fábrica de enlatados de base caseira, que são a causa de muitos dos casos de botulismo. Os efeitos de botulismo tipicamente aparecem de 18 a 36 horas após ingerir os gêneros alimentícios infectados com uma cultura ou esporos de *Clostridium botulinum*. A toxina botulínica pode aparentemente passar sem atenuar através do revestimento do intestino e atacar os neurônios motores periféricos. Os sintomas de intoxicação por toxina botulínica podem progredir desde de dificuldade de andar, engolir e de falar até a paralisia dos músculos respiratórios e morte.

Toxina botulínica do tipo A é o agente biológico natural mais letal conhecido pelo homem. Cerca de 50 picogramas de uma toxina botulínica do tipo A (complexo de neurotoxina purificado) (disponível da Allergam, Inc., de Irvine, Califórnia sob a marca registrada BOTOX® em frascos de 100 unidades) é uma LD50 em camundongos (isto é, 1 unidade). Uma unidade de BOTOX® contém de cerca de (cerca de 56 attomoles) 50 picogramas de complexo de toxina botulínica do tipo A. De modo interessante, em uma base molar, a toxina botulínica do tipo A é cerca de 1,8 bilhões de vezes mais letal do que difteria, cerca de 600 milhões de vezes mais letal do que cianeto de sódio, cerca de 30 milhões de vezes mais letal do que toxina de cobra e cerca de 12 milhões de vezes mais letal do que cólera. Singh, *Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins*, págs. 63-84 (capítulo 4) de *Natural Toxins II*, editado por B. R. Singh e outros, Plenum Press New York (1976) (onde a LD50 mencionada de toxina botulínica do tipo A de 0,3 ng se iguala em 1 U é corrigida pelo fato

de que cerca de 0,05 ng de BOTOX® se igual em 1 unidade). Uma unidade (U) de toxina botulínica é definida como a LD50 quando da injeção intraperitoneal em camundongos Swiss Webster pesando de 18 a 20 gramas cada.

Sete neurotoxinas botulínicas em geral imunologicamente distintas foram caracterizadas, estas sendo respectivamente sorotipos A, B, C1, D, E, F e G de neurotoxina botulínica cada um dos quais é distinguido por neutralização com anticorpos específicos do tipo selvagem. Os sorotipos diferentes de toxina botulínica variam na espécie de animal que eles afetam na severidade e duração da paralisia que eles evocam. Por exemplo, foi determinado que a toxina botulínica do tipo A é 500 vezes mais potente, quando medida pela taxa de paralisia produzida no rato, do que é toxina botulínica do tipo B. Adicionalmente, a toxina botulínica do tipo B foi determinada ser não-tóxica em primatas a uma dose de 480 U/kg que é cerca de 12 vezes o LD50 de primata para toxina botulínica do tipo A. Moyer E. e outros, Botulinum Toxin Type B: Experimental and Experience Clinical, estando no capítulo 6, págs. 71-85 of "Terapy With Botulinum Toxin", editao por Jankovic, J. e outros (1994), Marcel Dekker, Inc. Toxina botulínica aparentemente se liga com alta afinidade a neurônios motores colinérgicos, é deslocada para dentro do neurônio e bloqueia a liberação de acetilcolina. A captação pode ocorrer através de receptores de baixa afinidade, bem como por fagocitose e pinocitose.

Independentemente do sorotipo, o mecanismo de peso molecular de intoxicação por toxina parece ser similar e envolver pelo menos três etapas ou estágios. Na

primeira etapa do processo, a toxina se liga à membrana pré-sináptica do neurônio alvo através de uma interação específica entre a cadeia pesada, cadeia H, e um receptor de superfície celular; o receptor é pensado ser diferente para cada tipo de toxina botulínica e para toxina de tétano. O segmento de extremidade de carboxila da cadeia H, HC, parece ser importante para o direcionamento da toxina para a superfície da célula.

Na segunda etapa, a toxina atravessa a membrana de plasma da célula envenenada. A toxina é primeiramente engolida pela célula através de endocitose mediada por receptor e um endossoma contendo a toxina é formado. A toxina então livra-se do endossoma para dentro do citoplasma da célula. Esta etapa é pensada ser mediada pelo segmento de extremidade de amino da cadeia H, HN, que dispara uma mudança conformacional da toxina em resposta a um pH de cerca de 5,5 ou mais baixa. Endossomas são conhecidos como processando uma bomba de próton que diminui pH intra-endossomal. A mudança conformacional expõe resíduos hidrofóbicos na toxina, que permite que a toxina se implante na membrana endossomal. A toxina (ou no mínimo a cadeia leve) então desloca através da membrana endossomal para dentro do citoplasma.

Na última etapa do mecanismo de atividade de toxina botulínica parece envolver redução da ligação de dissulfeto que uni a cadeia pesada, cadeia H e a cadeia leve, cadeia L. A atividade tóxica de toxinas botulina e de tétano está contida na cadeia L da holotoxina; a cadeia L é uma endopeptidase de zinco ( $Zn^{++}$ ) que seletivamente cliva proteínas essenciais para o reconhecimento e alojamento de vesículas contendo neurotransmissor com a superfície citoplásmica da

membrana de plasma, e fusão das vesículas com a membrana de plasma. Neurotoxina de tétano, toxina botulínica do tipos B, D, F e G causam degradação de sinaptobrevina (também chamada de proteína de membrana associada a vesícula (VAMP)), uma proteína de membrana sinaptossomal. A maior parte de VAMP presente no superfície citoplásmica da vesícula sináptica é removida como um resultado de qualquer um destes eventos de clivagem. Toxina botulínica de sorotipo A e E clivam SNAP-25. Toxina botulínica de sorotipo C1 foi originalmente pensada clivar sintaxina, mas demonstrou clivar sintaxina e SNAP-25. Cada uma das toxinas botulínicas especificamente cliva uma ligação diferente, exceto toxina botulínica do tipo B (e toxina de tétano) que clivam a mesma ligação. Cada uma destas clivagens bloqueia o processo de alojamento de membrana de vesícula, desse modo prevenindo exocitose de conteúdo de vesícula.

Toxinas botulínicas foram usadas em ambientes clínicos para o tratamento de distúrbios neuromusculares caracterizadas por músculos esqueléticos hiperativos (isto é, distúrbios motores). Em 1989 um complexo de toxina botulínica do tipo A foi aprovado pela U.S. Food and Drug Administration para o tratamento de blefaroespasma, estrabismo e espasmo hemifacial. Subsequentemente, uma toxina botulínica do tipo A foi também aprovada pela FDA para o tratamento de distonia cervical e para o tratamento de linhas glabellar e uma toxina botulínica do tipo B foi aprovada para o tratamento de distonia cervical. Sorotipos de toxina botulínica de não tipo A aparentemente têm uma potência mais baixa e/ou uma duração mais curta de atividade quando comparados com toxina botulínica do tipo A.

Efeitos clínicos de toxina botulínica do tipo A intramuscular periférica são usualmente vistos dentro de uma semana de injeção. A duração típica de alívio sintomático de uma única injeção intramuscular de toxina botulínica do tipo A produz em média cerca de 3 meses, embora períodos significativamente mais longos de atividade terapêutica foram relatados.

Embora todos os sorotipos de toxinas botulínicas aparentemente inibam liberação do neurotransmissor acetilcolina no junção neuromuscular, eles fazem isso por afetar de proteína neurosecretórias diferentes e/ou clivar estas proteína nos sítios diferentes. Por exemplo, botulínica tipos A e E ambas clivam a proteína associada sinaptossomal de 25 quiloDáton (kd) (SNAP-25), mas eles direcionam diferentes sequências de aminoácidos dentro desta proteína. Toxina botulínica do tipos B, D, F e G agem sobre proteína associada a vesícula (VAMP), também chamada de sinaptobrevina), com cada sorotipo clivando a proteína em um sítio diferente. Finalmente, a toxina botulínica do tipo C1 demonstrou clivar tanto sintaxina quanto SNAP-25. Estas diferenças no mecanismo de ação pode afetar a potência relativa e/ou duração de ação de vários sorotipos de toxina botulínica. Aparentemente, um substrato para uma toxina botulínica pode ser encontrado em uma variedade do tipos de células diferentes. Vide, por exemplo, *Biochem J* 1; 339 (pt 1): 159-65:1999, e *Mov Disord*, 10(3):376:1995 (células B de ilhota pancreática contém pelo menos SNAP-25 e sinaptobrevina).

O peso molecular do molécula de proteína de toxina botulínica, para todos os sete dos sorotipos de toxina botulínica conhecidos, é cerca de 150 kD. De modo interessante, as toxinas botulínicas são liberadas por

*Clostridial bacterium* como complexos compreendendo a molécula de proteína toxina botulínica de 150 kD juntamente com proteínas de sem toxinas associadas. Assim, o complexo de toxina botulínica do tipo A pode ser produzido por *Clostridial bacterium* como formas de 900 kD, 500 kD e 300 kD. A toxina botulínica do tipos B e C1 são aparentemente produzidas como um único complexo de 700 kD ou de 500 kD. A toxina botulínica do tipo D é produzida tanto como complexos de 300 kD quanto de 500 kD. Finalmente, toxina botulínica do tipos E e F são produzidas como apenas complexos de cerca de 300 kD. Acredita-se que os complexos (isto é, o peso molecular maior do que cerca de 150 kD) contenham uma proteína de hemaglutinina de sem toxina de uma proteína de não hemaglutinina não-tóxica e de sem toxina. Estas duas proteínas de sem toxina (que juntamente com o molécula de toxina botulínica compreendem o complexo de neurotoxina relevante) podem agir para prover estabilidade contra desnaturação que forma a molécula de toxina botulínica e proteção contra ácidos digestivos quando toxina é ingerida. Adicionalmente, é possível que os complexos de toxina botulínica maior (peso molecular maior do que cerca de 150 kD) podem resultar em uma taxa mais baixa de difusão de toxina botulínica para longe de um sítio da injeção intramuscular de um complexo de toxina botulínica.

Estudos *in vitro* indicaram que a toxina botulínica inibe a liberação induzida por cátion de potássio de tanto acetilcolina quanto norepinefrina a partir de culturas de células primárias de tecido do tronco cerebral. Adicionalmente, foi relatado que toxina botulínica inibe a liberação evocada tanto de glicina

quanto glutamato em culturas primárias dos neurônios da medula espinhal e que nas preparações de sinaptossoma do cérebro toxina botulínica inibe a liberação de cada um dos neurotransmissores de acetilcolina, dopamina, norepinefrina (Habermann E., e outros, Tetanus Toxin and Botulinum A and C Neurotoxins Inhibit Noradrenaline Release From Cultured Mouse Brain, J Neurochem 51 (2);522-527:1988) CGRP, substance P and glutamate (Sanchez-Prieto, J., e outros, Botulinum Toxin A Blocks Glutamate Exocytosis From Guinea Pig Cerebral Cortical Synaptosomes, Eur J. Biochem 165;675-681:1897. Assim, quando as concentrações adequadas são usadas, a liberação evocada por estímulo da maioria dos neurotransmissores é bloqueada pela toxina botulínica. Vide, por exemplo, Pearce, L.B., Pharmacologic Characterization of Botulinum Toxin For Basic Science and Medicine, Toxicon 35(9); 1373-1412 at 1393; Bigalke H., e outros, Botulinum A Neurotoxin Inhibits Non-Cholinergic Synaptic Transmission in Mouse Spinal Cord Neurons in Cultura, Brain Research 360;318- 324:1985; Habermann E., Inhibition by Tetanus and Botulinum A Toxin of the release of [3H]Noradrenaline and [3H]GABA From Rat Brain Homogenate, Experientia 44;224-226: 1988, Bigalke H., e outros, 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;244-251:1981, e; Jankovic J. e outros, Therapy With Botulinum Toxin, Marcel Dekker, Inc., (1994), pág. 5.

A toxina botulínica do tipo A pode ser obtida pelo estabelecimento de desenvolvimento de culturas de *Clostridium botulinum* em um fermentador e então a coleta

e purificação da mistura fermentada de acordo com os procedimentos conhecidos. Todos os sorotipos de toxina botulínica são inicialmente sintetizados como proteína de cadeia simples inativas que pode ser clivada ou marcada por proteases para se tornar neuroativa. As cepas bacterianas que tornam sorotipos A e G da toxina botulínica possuem proteases endógenas e sorotipos A e G podem, portanto, ser recuperados a partir de culturas bacterianas em sua forma ativa. Em contraste com isso, os sorotipos C1, D e E da toxina botulínica são sintetizados pelas cepas não proteolíticas e são, portanto tipicamente inativadas quando recuperadas a partir da cultura. Os sorotipos B e F são produzidos tanto por cepas proteolíticas quanto não proteolíticas e, portanto, podem ser recuperadas ou na forma ativa ou inativa. No entanto, mesmo as cepas proteolíticas que produzem, por exemplo, o sorotipo de toxina botulínica do tipo B apenas clivam uma porção da toxina produzida. A proporção exata da molécula cortada ou não cortada depende da duração da incubação e da temperatura da cultura. Portanto, uma determinada percentagem de qualquer preparação da, por exemplo, toxina do tipo B da toxina botulínica provavelmente está inativa, possivelmente explicando a potência significativamente conhecida da toxina botulínica do tipo B quando comparada com a toxina botulínica do tipo A. A presença de moléculas da toxina botulínica inativas em uma preparação clínica contribuirá para a carga de proteína total da preparação, que tinha sido ligada para antigenicidade aumentada, sem contribuir para sua eficácia clínica. Adicionalmente, sabe-se que a toxina botulínica do tipo B tem, após injeção intramuscular, menor duração de atividade e é também menos potente do

que a toxina botulínica do tipo A no mesmo nível de dose.

A toxina botulínica do tipo A cristalina de alta qualidade pode ser produzida a partir da cepa Hall A de *Clostridium botulinum* com características de  $\geq 3 \times 10^7$  U/mg, uma  $A_{260/278}$  de menos do que 0,60 e um padrão distinto na eletroforese de gel. O processo conhecido de Shantz pode ser usado para se obter a toxina botulínica do tipo A cristalina, como indicado em Shantz, E. J. e outros, Properties e use of Botulinum toxin and Other Microbiol Neurotoxins in Medicine, Microbiol Vide. 56;80-99:1992. Em geral, o complexo da toxina botulínica do tipo A pode ser isolado e purificado a partir de uma fermentação cultivando *Clostridium botulinum* tipo A em um meio adequado. O processo conhecido pode também ser usado, após a separação das proteínas de sem toxina, para se obter toxinas botulínicas pura, tal como, por exemplo: toxina botulínica tipo A purificada com um peso molecular de cerca de 150 kD, com uma potência específica de  $1-2 \times 10^8$  LD50 U/mg ou mais; toxina botulínica tipo B purificada, com um peso molecular de cerca de 150 kD com uma potência específica de  $1-2 \times 10^8$  LD50 U/mg ou mais; toxina botulínica tipo F purificada, com um peso molecular de cerca de 150 kD com uma potência específica de  $1-2 \times 10^7$  LD50 U/mg ou mais.

As toxinas botulínicas e/ou complexos de toxina botulínica podem ser obtidos a partir de List Biological Laboratories, Inc., Campbell, California; the Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, RU; Wako (Osaka, Japão), Metabiologics (Madison, Wiscosin) bem como da Sigma Chemicals of St Louis, Missouri. A toxina botulínica pura pode também ser usada para preparar uma composição farmacêutica.

Como enzimas, com um modo geral, as atividade biológicas das toxinas botulínicas (que são peptidases intracelulares) são dependentes, pelo menos em parte, da sua conformação dimensional. Assim, a toxina botulínica tipo A é desintoxicada por calor, vários produtos químicos de tensionamento de superfície e de secagem de superfície. Adicionalmente, sabe-se que a diluição do complexo de toxina obtida pelo cultivo, fermentação e purificação conhecidos para as concentrações de toxina muito inferiores usadas para a formulação da composição farmacêutica resulta em detoxificação rápida da toxina a menos que um agente de estabilização esteja presente. A diluição da toxina de quantidades em miligramas em uma solução contendo nanogramas por mililitro apresenta dificuldades significativas devido à rápida perda de toxicidade específica após tal diluição grande. Uma vez que a toxina pode ser usada meses ou anos após a composição farmacêutica contendo toxina ser formulada, a toxina pode ser estabilizada com um agente de estabilização tais como albumina e gelatina.

Uma toxina botulínica comercialmente disponível contendo a composição farmacêutica é vendida sob a marca registrada BOTOX® (Allergan, Inc., de Irvine, Califórnia). BOTOX® consiste em um complexo de toxina botulínica do tipo A purificado, albumina e cloreto de sódio embalados em forma estéril, seca à vácuo. A toxina botulínica do tipo A é produzida a partir de uma cultura da cepa Hall de *Clostridium botulinum* cultivada em um meio contendo amina de N-Z e extrato de levedura. O complexo de toxina botulínica do tipo A é purificado a partir da solução de cultura por uma série de precipitações ácidas em um complexo cristalino que

constituído pela proteína de toxina de alto peso molecular ativa e uma proteína hemaglutinina associada. O complexo cristalino é redissolvido em uma solução contendo solução salina e albumina, e é filtrada por esterilidade (0,2 microns) antes da secagem à vácuo. O produto seco à vácuo é armazenado em um congelador a ou abaixo de  $-5^{\circ}\text{C}$ . O BOTOX® pode ser reconstituído com solução salina não conservada, estéril antes da injeção intramuscular. Cada frasco de BOTOX® contém cerca de 100 unidades (U) de complexo de neurotoxina purificado de toxina botulínica do tipo A de *Clostridium botulinum*, 0,5 miligramas de albumina de soro humana e 0,9 miligramas de cloreto de sódio em uma forma seca à vácuo, estéril sem conservante.

Para reconstituir BOTOX® seco a vácuo, solução salina normal estéril sem um conservante; (0,9% de Injeção de Cloreto de Sódio) é usado por criar a quantidade adequada de diluente na seringa de tamanho apropriado. Uma vez que BOTOX® pode ser desnaturado por borbulhamento ou agitação violenta similar, o diluente é suavemente injetado para dentro do frasco. Por razões de esterilidade o BOTOX® é de preferência administrado no período de 4 horas depois que o frasco é removido do congelador e reconstituído. Durante estas quatro horas, BOTOX® reconstituído pode ser armazenado em uma geladeira a cerca de  $2^{\circ}\text{C}$  a cerca de  $8^{\circ}\text{C}$ . BOTOX® refrigerado, reconstituído foi relatado reter sua potência por pelo menos cerca de duas semanas. *Neurology*, 48:249-53: 1997.

Foi relatado que toxina botulínica do tipo A foi usada em ambientes clínicos como segue:

- (1) cerca de 75-125 unidades de BOTOX® por

injeção intramuscular (múltiplos músculos) para tratar distonia cervical;

(2) 5-10 unidades de BOTOX® por injeção intramuscular para tratar linhas glabellares (sulcos na testa) (5 unidades injetadas intramuscularmente para dentro do músculo prócero e 10 unidades injetadas intramuscularmente para dentro de cada músculo da sobrancelha);

(3) cerca de 30-80 unidades de BOTOX® para tratar constipação por injeção no intraesfincter da músculo puborretal;

(4) cerca de 1-5 unidades por músculo de BOTOX® injetado muscularmente para tratar blefaroespasmos por injeção do músculo ocular orbicular pré-társico lateral da pálpebra superior e o ocular orbicular pré-társico lateral da pálpebra inferior.

(5) para tratar estrabismo, músculos extraoculares foram injetados intramuscularmente com entre cerca de 1-5 unidades de BOTOX®, a quantidade injetada que varia com base tanto no tamanho do músculo a ser injetado quanto a extensão de paralisia muscular desejada (isto é, quantidade de correção de dioptria desejada).

(6) para tratar espasticidade de pálpebra superior após acidente vascular cerebral por injeções intramusculares do BOTOX® para dentro dos cinco músculos flexores de pálpebra superior diferentes, como se segue:

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

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

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

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

(e) bíceps brachii: 50 U a 200 U. Cada um dos

cinco músculos indicados foi injetado na mesma sessão de tratamento, de modo que o paciente receba de 90 U a 360 U de BOTOX® no músculo flexor de pálpebra superior por injeção intramuscular a cada sessão de tratamento.

(7) para tratar enxaqueca, injeção de injetada pericranial (injetado simetricamente para dentro de músculo glabellar, frontal e temporal) de 25 U de BOTOX® mostrou benefício significativo como um tratamento profilático de enxaqueca em comparação com veículo como medido por medições diminuídas de frequência de enxaqueca, severidade máxima, vômito associado e uso de medicação aguda durante o período de três meses após a injeção de 25 U.

Sabe-se que a toxina botulínica do tipo A pode ter uma eficácia de até 12 meses (European J. Neurology 6 (Supp 4): S111-S1150:1999), e em algumas circunstâncias por tão longo quanto 27 meses, quando usada para tratar glândulas, tal como no tratamento de hiperidrose. Vide, por exemplo, Bushara K., Toxina botulínica and rhinorrhea, Otolaryngol Head Neck Surg 1996;114(3):507, e The Laryngoscope 109:1344-1346: 1999. No entanto, a duração usual de uma injeção intramuscular de Botox® é tipicamente cerca de 3 a 4 meses.

O sucesso de toxina botulínica do tipo A para tratar uma variedade de condições clínicas levaram ao interesse em outros sorotipos de toxina botulínica. Duas preparações de botulina do tipo A comercialmente disponível para o uso em seres humanos estão BOTOX® disponíveis da Allergan, Inc., de Irvine, California, e Dysport® disponível da Beaufour Ipsen, Porton Down, England. Uma preparação de toxina botulínica do tipo B (MyoBloc®) está disponível de Elan Pharmaceuticals of

San Francisco, California.

Além de ter ações farmacológicas na área periférica, toxinas botulínicas podem também ter efeitos inibitórios no sistema nervoso central. Trabalho por Weigand e outros, Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1976; 292,161- 165, and Habermann, Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1974; 281, 47-56 mostraram que toxina botulínica é capaz de ascender à área espinhal por transporte retrógrado. Como tal, uma toxina botulínica injetada a uma localização periférica, por exemplo, intramuscularmente, pode ser transportada de modo retrógrado em direção a medula espinhal.

A patente U.S. n° 5.989.545 descreve que uma neurotoxina clostridial modificada ou seu fragmento, de preferência toxina botulínica, quimicamente conjugado ou recombinantemente fundido a uma porção de direcionamento particular pode ser usado para tratar dor por administração do agente à medula espinhal.

Uma toxina botulínica também tem sido proposta para, ou foi usada para tratar otite média do ouvido (patente U.S. n° 5.766.605), distúrbio de ouvido interno (patente U.S. n<sup>os</sup> 6.265. 379; 6.358.926), dor de cabeça por tensão, (patente U.S. n° 6.458.365), dor de cabeça enxaqueca (patente U.S. n° 5.714.468), dor pós-operatória e dor visceral (patente U.S. n° 6.464.986), crescimento de cabelo e retenção de cabelo (patente U.S. n° 6.299.893), psoríase e dermatite (patente U.S. n° 5.670.484), músculos lesionados (patente U.S. n° 6.423.319) vários cânceres (patente U.S. n<sup>os</sup> 6.139.845), distúrbios de músculo liso (patente U.S. n° 5.437.291), e inflamação neurogênico (patente U.S. n° 6.063.768). Implantes de liberação controlada de toxina são

conhecidos (vide, por exemplo, as patentes nos 6.306.423 e 6.312.708) como é administração de toxina botulínica transdérmica (pedido de patente U.S. nº de série 10/194805).

Adicionalmente, uma toxina botulínica pode ter um efeito para reduzir dor inflamatória induzida em um modelo de formalina de rato Aoki K., e outros, Mechanisms of the antinociceptive effect of subcutaneous Botox: Inhibition of peripheral and central nociceptive processing, Cephalalgia 23 de setembro de 2003(7):649. Além do mais, foi relatado que bloqueio de nervo de toxina botulínica pode causar uma redução de espessura epidérmica. Li Y, e outros, Sensory and motor denervation influences epidermal thickness in rat foot glabrous skin, Exp Neurol 1997;147:452-462 (vide a pág. 459). Finalmente, é conhecido a administração de uma toxina botulínica ao pé para tratar suor de pé excessivo (Katsambas A., e outros. Doenças cutâneas do pé: Unapproved treatments, Clin Dermat. 12002 Nov-Dec; 20(6):689-699; Sevim, S., e outros, Terapia de toxina botulínica A para hiperidrose palmar e plantar, Acta Neurol Belg 2002 Dec;102(4):167-70), dedos dos pés (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., e outros, idiopathic toe walking: Treatment with toxina botulínica A injection, Dev Med Child Neurol 2002;44(Suppl 91):6), and foot dystonia (Rogers J., e outros, Injections of toxina botulínica A in foot dystonia, Neurology 1993 Apr;43(4 Suppl 2)).

Toxina de tétano, bem como derivados (isto é, com uma porção de direcionamento não nativa), fragmentos,

híbridos ou suas quimeras podem também ter utilidade terapêutica. A toxina de tétano porta muitas similaridades às toxinas botulínicas. Assim tanto a toxina de tétano quanto as toxinas botulínicas são polipeptídios produzidos por espécies proximamente relacionadas de *Clostridium* (*Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum*, respectivamente). Adicionalmente, tanto a toxina de tétano quanto as toxinas botulínicas são proteínas de duas-cadeias constituídas de uma cadeia leve (peso molecular de cerca de 50 kD) covalentemente ligadas a uma ligação de dissulfeto simples a uma cadeia pesada (peso molecular cerca de 100 kD). Portanto, o peso molecular de toxina de tétano e de cada uma das sete toxinas botulínicas (não-complexadas) é cerca de 150 kD. Além do mais, a toxina de tétano e as toxinas botulínicas, a cadeia leve porta o domínio que exhibe atividade biológica intracelular (protease), enquanto a cadeia pesada compreende os domínios de deslocamento de membrana celular e (imunogênicos) de ligação de receptor.

Além disso, tanto a toxina de tétano quanto as toxinas botulínicas exibem uma alta afinidade específica para receptores de gangliocida sobre a superfície de neurônios colinérgicos pré-sinápticos. Endocitose mediada por receptor de toxina de tétano por neurônios colinérgicos periféricos resulta de transporte axonal retrógrado, bloqueamento da liberação de neurotransmissores inibitórios a partir de sinapses centrais e uma paralisia espástica. De modo contrário, endocitose mediada por receptor de toxina botulínica por neurônios colinérgicos periféricos resulta em pouco, se algum transporte retrógrado, inibição de exocitose de acetilcolina dos neurônios motores periféricos

intoxicados e uma paralisia flácida.

Finalmente, a toxina de tétano e toxinas botulínicas assemelham-se entre si tanto na biossíntese quanto na arquitetura molecular. Assim, há uma identidade total de 34% entre as sequências de proteínas da toxina de tétano e a toxina botulínica do tipo A, e uma identidade de sequência tão alta como 62% para alguns domínios funcionais. Binz T. e outros, The Complete Sequence of Botulinum Neurotoxin Type A and Comparison with Other Clostridial Neurotoxins, J Biological Chemistry 265(16);9153-9158:1990.

#### Acetilcolina

Tipicamente apenas um tipo simples de neurotransmissor de molécula pequena é liberado por cada tipo de neurônio no sistema nervoso de um mamífero, embora haja evidência que sugere que vários neuromoduladores possam ser liberados pelo mesmo neurônio. O neurotransmissor acetilcolina é secretado pelos neurônios em muitas áreas do cérebro, mas especificamente pelas células piramidais grandes do córtex motor, por vários neurônios diferentes nos gânglios basais, pelos neurônios motores que inervam os músculos esqueléticos, pelos neurônios pré-gangliônicos do sistema nervoso autônomo (tanto simpático quanto parassimpático), pelas fibras da receptáculo 1 da fibra do fuso muscular, pelos neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso parassimpático, e por algum dos neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso simpático. Essencialmente, apenas as fibras nervosas parassimpáticas pós-gangliônicas das glândulas sudoríparas, os músculos piloerector e poucos vasos sanguíneos são colinérgicos

como a maior parte dos neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso simpático e secretam o neurotransmissor norepinefrina. Na maioria dos casos acetilcolina tem um efeito excitatório. No entanto, acetilcolina é conhecida por ter efeitos inibitórios a algumas das extremidades nervosas parassimpáticas periféricas, tal como inibição de taxa cardíaca pelo nervo vago.

Os sinais eferentes do sistema nervoso autônomo são transmitidos para o corpo através ou do sistema nervoso simpático ou do sistema nervoso parassimpático. Os neurônio pré-gangliônicos do sistema nervoso simpático se prolongam a partir de corpos de células de neurônio simpáticos pré-gangliônicos localizados no chifre intermediolateral da medula espinhal. As fibras nervosas simpáticas pregangliônicas, que se prolongam a partir do corpo de célula, realizam sinapse com neurônios pós-gangliônicos localizados ou no gânglio simpático paravertebral ou em um gânglio pré-vertebral. Uma vez que, os neurônio pré-gangliônicos tanto do sistema nervoso simpático quanto parassimpático são colinérgicos, a aplicação de acetilcolina à gânglios excitarão tanto neurônios pós-gangliônicos parassimpáticos quanto simpáticos.

Acetilcolina ativa dois tipos de receptores, receptores muscarínicos e nicotínicos. Os receptores muscarínicos são encontrados em todas as células efetoras estimuladas pelos neurônio, pós-gangliônicos do sistema nervoso parassimpático bem como aqueles estimulados pelos neurônios colinérgicos pos-gangliônicos do sistema nervoso simpático. Os receptores nicotínicos são encontrados na medula adrenal, bem como dentro dos gânglios autônomos, isto é, sobre a superfície da célula

do neurônio pós-gangliônico, na sinapse entre neurônios pré-gangliônicos e pós-gangliônicos de ambos os sistemas parassimpáticos e simpáticos. Receptores nicotínicos são também encontrados em muitas extremidades nervosas não autônomas, por exemplo, nas membranas de fibras de músculo esquelético na junção neuromuscular.

Acetilcolina é liberada a partir dos neurônios colinérgicos quando vesículas intracelulares, claras, pequenas se fundem com a membrana celular neuronal pré-simpática. Uma ampla variedade de células secretórias não neurais, tais como, medula adrenal (bem como a linha de célula de PC12) e células das ilhotas pancreáticas liberam catecolaminas e hormônio para tiróide, respectivamente, a partir de vesículas de núcleo denso grandes. A linha de célula de P12 é um clone de células de feocromocitoma de rato extensivamente usado como um modelo de cultura de tecido para estudos de desenvolvimento aimpatoadrenal. Toxina botulínica inibe a liberação de ambos os tipos de compostos a partir de ambos os tipos de célula *in vitro*, permeabilizadas (como por eletroporação) ou por injeção direta da toxina para dentro de célula desnervada. Toxina botulínica é também conhecida por bloquear liberação do neurotransmissor glutamato a partir de cultuas de células de sinaptossomas corticais.

Uma junção neuromuscular é formada em músculo esquelético pela proximidade de axônios às células musculares. Um sinal transmitido através do sistema nervoso resulta em uma ação potencial no axônio terminal, com ativação de canais de íons e que resulta da liberação do neurotransmissor acetilcolina a partir das vesículas sinápticas intraneuronal, por exemplo, na placa terminal

motora da junção neuromuscular. A acetilcolina atravessa o espaço extracelular para ligar-se com proteínas do receptor de acetilcolina sobre a superfície da placa terminal muscular. Uma vez que a ligação suficiente ocorreu, uma ação potencial da célula muscular causa mudanças de canal de íons de membrana específica, resultando em contração da célula muscular. A acetilcolina é então liberada a partir das células musculares e é metabolizada por colinesterases no espaço extracelular. Os metabólitos são reciclados de volta para o axônio terminal para reprocessamento em outra acetilcolina.

A patente U.S. nº 6.585.993 descreve um sistema de neurotoxina de liberação controlada. A patente U.S. nº 6.505.399 descreve um implante de toxina botulínica biodegradável. A patente U.S. nº 6.383.509 descreve um implante de neurotoxina biodegradável. A patente U.S. nº 6.312. descreve um implante de toxina botulínica. A patente U.S. nº 6.306.423 descreve um implante de neurotoxina.

Assim, permanece uma necessidade de novas composições e métodos que podem ser usados para tratar condições de pele e aumentar características cosméticas dos indivíduos.

#### Sumário

A presente invenção direciona-se a esta necessidade e fornece nova composição cosmética e métodos que fornecem tratamento efetivos de longa duração de defeitos cosméticos.

Em uma ampla concretização, uma composição útil para o tratamento de um defeito cosmético em um indivíduo compreende um componente de toxina botulínica; e um

componente de microesfera compreendendo uma pluralidade de microesferas incháveis. O componente de toxina botulínica pode compreender uma ou mais toxinas botulínicas, tais como toxina botulínica do tipo A, B, C, D, E, F ou G. O componente de microesfera pode ser entendido como sendo um material de hidrogel, e pode compreender uma pluralidade de partículas de polímeros reticulados. A toxina botulínica pode ser misturada com, acoplada a, ou encapsulada pelas partículas.

Em uma concretização, uma composição útil para o tratamento de um defeito cosmético em um indivíduo compreende uma quantidade de toxina botulínica do tipo A; e uma pluralidade de microesferas incháveis eficazes no tratamento de um defeito cosmético do indivíduo.

As presentes composições fornecem tratamento melhorado de defeitos cosméticos em relação a composições substancialmente idênticas sem um componente de toxina botulínica.

A presente invenção também inclui um método de tratamento de uma deficiência ou defeito cosmético por administração de uma composição cosmética, tais como as composições expostas acima, a um indivíduo que necessita de tratamento, tal como uma pessoa a qual deseja tal tratamento cosmético.

Cada e todas as características descritas aqui, e cada e todas as combinações de duas ou mais de tais características, estão incluídas dentro do escopo da presente invenção com a condição de que as características incluídas em tal combinação não sejam mutuamente inconsistentes. Além disso, qualquer característica ou combinação de características podem ser especificamente excluída de qualquer concretização da

presente invenção.

Aspectos e vantagens adicionais da presente invenção são indicados na seguinte descrição e reivindicações, particularmente quando consideradas em combinação com os desenhos anexos.

#### Definições

As seguintes definições se aplicam aqui.

"Cerca de" significa mais ou menos dez por cento do valor assim qualificado.

"Biocompatível" significa que não há resposta antigênica ou inflamatória significativa a administração da composição.

"Composto biologicamente ativo" significa um composto que pode afetar uma mudança benéfica no indivíduo ao qual é administrado. Por exemplo, "compostos biologicamente ativo" incluem neurotoxinas.

"Quantidade eficaz" quando aplicado a compostos biologicamente ativos significa que a quantidade do composto que é em geral suficiente para efetuar uma mudança desejada no indivíduo. Por exemplo, onde o efeito desejado é uma redução de uma ruga, uma quantidade eficaz do composto é a quantidade que cause pelo menos uma redução substancial da ruga, e sem resultar em toxicidade significativa.

"Quantidade eficaz" quando aplicada a um constituinte de ingrediente não ativo de uma composição injetável (tal como veículo usado para mistura com uma toxina botulínica) refere-se àquela quantidade do constituinte de ingrediente não ativo que seja suficiente para influenciar positivamente a liberação e/ou a atividade do ingrediente ativo quando administrado a um indivíduo. Esta "quantidade eficaz" pode ser determinada

com base no ensinamento neste relatório e no conhecimento geral na técnica.

"Neurotoxina" significa um agente que pode interromper transmissão de impulso nervoso através de uma junção neuroglandular ou neuromuscular, bloquear ou reduzir exocitose neuronal de um neurotransmissor ou alterar a ação potencial a um portão de voltagem do canal de sódio de um neurônio. Exemplos de neurotoxinas incluem toxinas botulínicas, toxinas de tétano, saxitoxinas, e tetrodotoxina.

"Tratamento" significa qualquer tratamento de uma doença em um mamífero, e inclui (i) evitar que a doença ocorra ou; (ii) inibir a doença, isto é, interromper seu desenvolvimento; (iii) aliviar a doença, isto é, reduzir a incidência de sintomas e/ou causar regressão da doença. Tratamento cosmético refere-se a redução ou tratamento de uma ou mais deficiências ou defeitos cosméticos.

"Microesferas" referem-se a um polímero ou combinações de polímeros transformados em corpos ou elementos de vários tamanhos. As microesferas podem estar em qualquer forma, embora elas estejam frequentemente em forma substancialmente esféricas.

Microesferas "incháveis", como usadas aqui, referem-se a microesferas que são capazes de expandir no tamanho, e ainda manter-se substancialmente da mesma forma, em certas condições tais como contato com fluidos fisiológicos ou outros fluidos aquosos. De preferência, as microesferas incháveis da presente invenção podem ser expandidas até cerca de 4 vezes do seu diâmetro original ou 15 vezes de seu volume original. O grau de inchamento pode ser controlado por controle de fatores tais como os

solventes em que elas estão suspensas, polímeros específicos usados para produzir as microesferas e grau de reticulação. Esta propriedade permite que as microesferas sejam facilmente injetadas através de agulhas de calibre 30 ou menores, e ainda serem inchadas e seguras no sítio da injeção e de tamanho suficiente para evitar ou reduzir a chance de serem eliminadas pelo sistema autoimune do indivíduo.

"Polímeros de alta absorção de água" como usados na presente invenção referem-se a polímeros que podem absorver pelo menos 5% em peso de água ou que são capazes de aumentar o peso seco dos polímeros até cerca de 20 vezes de seu peso seco original. As microesferas das presentes composições também compreendem partículas que são "hidrofílicas", que, como usadas na invenção, significam que as partículas podem dissolver-se em, absorver, ou misturar facilmente com água ou solução aquosa.

Microesferas "biodegradáveis" referem-se a microesferas que são capazes de serem absorvidas pelo corpo, quimicamente, fisiologicamente, ou por outro meio biológico, durante um período de tempo.

"Substancialmente esférica" em geral significa uma forma que está próxima de uma esfera perfeita, que é definida como um volume que apresenta a mais baixa área de superfície externa. Especificamente, "substancialmente esférica" na presente invenção significa, quando da visão de qualquer sessão transversal da partícula, a diferença entre o diâmetro maior médio e o diâmetro menor médio é menor do que 20%. As superfícies das microesferas da presente invenção parecem lisas sob ampliação de até 100 vezes. As microesferas da presente invenção podem

compreender, além das partículas, outros materiais como descritos e definidos aqui.

"Aumento dérmico" no contexto da presente descrição refere-se a qualquer mudança no estado natural de uma pele do indivíduo e áreas relacionadas devido a ações externas. As áreas que podem ser mudadas por aumento dérmico incluem mas não são limitadas a, epiderme, derme, camada subcutânea, gordura, músculo eretor de pêlos, haste de cabelo, poro de suor, glândula sebácea e musculatura subdérmica. Aumento dérmico é usado para tratar defeitos cosméticos e/ou deficiências cosméticas.

"Promotor de adesão celular" como usado aqui refere-se a qualquer material que, por causa de sua presença em ou associação com as microesferas, promove ou aumenta a adesividade de células à superfície das microesferas. Estes materiais são frequentemente proteínas que estão ligadas à superfície das microesferas através de ligações covalentes das proteína e dos polímeros.

"Agente terapêutico" como usado aqui refere-se a qualquer substância que provê efeitos terapêuticos ao processo de aumento dérmico ou respostas biológicas ou fisiológicas ao aumento dérmico. Um exemplo de agente terapêutico é uma neurotoxina que é eficaz no relaxamento de músculos. Um exemplo de uma neurotoxina adequada é uma neurotoxina produzida por bactérias Clostridial, tais como *Clostridium beratti*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum*. Como descritas aqui, composições preferidas compreendem um componente de toxina botulínica. Um componente de toxina botulínica é uma porção da composição que inclui um ou

mais tipos de toxina botulínica selecionados do grupo que consiste em toxina botulínica do tipos A, B, C, D, E, F e G. O componente de toxina botulínica pode compreender uma toxina botulínica produzida por uma bactéria Clostridial, ou produzida por tecnologia recombinante. A toxina botulínica pode ser recombinantemente produzida ou uma toxina botulínica híbrida. Em composições preferidas, o componente de toxina botulínica compreende uma toxina botulínica do tipo A, tal como a toxina botulínica comercialmente disponível sob a marca registrada, BOTOX® (Allergan, Inc., CA).

"Modificação química" na presente invenção significa as mudanças de características e propriedades químicas das microesferas, ou durante seu processo de produção ou a título de mistura ou contato delas com vários agentes ou tecidos, tal que as microesferas tenham a capacidade de realizar, além do aumento dérmico, outras funções uma vez que injetadas para dentro do corpo.

#### Descrição

Composições e métodos foram inventados para fornecer tratamento eficaz, de longa duração, da pele ou condições dérmicas. As presentes composições compreendem microesferas incháveis e uma ou mais neurotoxinas Clostridial. Os presentes métodos e composições cosméticos podem ser eficazes no aumento da pele de um indivíduo, tal como uma pessoa, para melhorar características cosméticas do indivíduo. Assim, a presente invenção refere-se a tratamento cosmético de uma condição dérmica, tais como rugas, outras deficiências de contorno da pele, e semelhantes. Ou afirmado diferentemente, a presente invenção refere-se a composições e métodos para o tratamento de um ou mais

deficiências ou defeitos cosméticos.

Em uma concretização da presente invenção, uma composição compreende um componente de toxina botulínica, e um componente de microesfera. Uma composição pode ser administrada, tal como por injeção, para prover um benefício cosmético ou terapêutico a um indivíduo. Correspondentemente, a composição pode ser útil para aumento dérmico. O componente de microesfera da composição compreende uma pluralidade de microesferas inchável. Por exemplo, a composição compreende uma pluralidade de microesferas que incham quando em contato com um fluido aquoso, tal como um fluido fisiológico. A composição é de preferência estéril quando administrada a um indivíduo. Além disso, antes da administração, a composição pode ser provida em um estado liofilizado, ou pode incluir um componente de solvente não-aquoso. Assim, as presentes composições podem ser entendidas como compreendendo um componente de toxina botulínica, tais como um ou mais toxinas botulínicas, e um material de hidrogel, tal como um material inchável em água. O material de hidrogel pode ser as microesferas descritas aqui.

O componente de toxina botulínica pode estar associado ao componente de microesfera de modo que a composição seja eficaz em melhorar ou aumentar uma característica cosmética, tal como um defeito do indivíduo. Sem querer estar ligado pela teoria, um mecanismo fisiológico pode ser proposto para a eficácia da invenção como descrito aqui para o tratamento de um defeito ou deficiência cosmético usando-se neurotoxina Clostridial. Essencialmente, levanta-se a hipótese de que o uso de uma neurotoxina Clostridial, tal como toxina

botulínica, pode inibir liberação de acetilcolina a partir de um ou mais nervos que inervam um músculo associado à deficiência ou defeito cosmético para relaxar o músculo, e as microesferas da composição podem aumentar em tamanho quando administradas subdermicamente ou intradermicamente para aumentar a pele e reduzir a deficiência ou defeito cosmético, desse modo tratando a deficiência ou defeito cosmético.

Assim, o aumento da pele de um indivíduo pode ser alcançado pela combinação do inchamento das microesferas, e pela atividade enzimática de uma toxina botulínica do componente de toxina botulínica. Como indicado aqui, o componente de toxina botulínica das presentes composições podem compreender uma toxina botulínica selecionada do grupo que consiste em toxina botulínica do tipos A, B, C, D, E, F, G e suas misturas. Em certas composições preferidas, o componente de toxina botulínica compreende apenas uma toxina botulínica do tipo A. A toxina botulínica do tipo A é desejável devido a sua alta potência em seres humanos, pronta disponibilidade, e uso conhecido para o tratamento de distúrbios do músculo liso e esquelético quando localmente administrada por injeção intramuscular.

Embora as presentes composições sejam descritas com referência particular a toxinas botulínicas, outras neurotoxinas podem ser eficazes nas presentes composições, com ou sem toxinas botulínicas, e tais outras neurotoxinas estão incluídas dentro do escopo da presente invenção. Exemplos de outras neurotoxinas Clostridial dentro do escopo da presente invenção incluem neurotoxinas produzidas por espécies de *Clostridium butyricum* e *Clostridium beratti*. A presente invenção

também inclui o uso de (a) neurotoxinas Clostrial obtidas ou processadas por cultura de bactérias, extração, concentração, preservação, secagem por congelamento e/ou reconstituição de toxina; e/ou (b) neurotoxinas modificadas ou recombinantes, isto é, neurotoxinas que têm tido um ou mais aminoácidos ou sequências de aminoácidos deliberadamente deletados, modificados ou substituídos por procedimentos de modificação de aminoácido químicos/bioquímicos conhecidos ou por uso de tecnologias recombinante de vetor recombinante/célula hospedeira conhecidas, bem como derivados ou fragmentos de neurotoxinas assim produzidos. Estas variantes de neurotoxina mantêm a capacidade de inibir neurotransmissão entre, ou no meio de neurônios, e algumas destas variantes podem prover durações aumentadas de efeitos inibitórios quando comparados com neurotoxinas nativas, ou podem prover especificidade de ligação aumentada aos neurônios expostos às neurotoxinas. Estas variantes de neurotoxina podem ser selecionadas por triagem das variantes usando-se ensaios convencionais para identificar neurotoxinas que têm os efeitos fisiológicos desejado de inibição de neurotransmissão.

Toxinas botulínicas para o uso de acordo com a presente invenção podem ser armazenadas em forma seca a vácuo, liofilizadas em recipientes sob pressão a vácuo ou como líquidos estáveis. Antes da liofilização a toxina botulínica pode ser combinada com excipientes, estabilizadores e/ou veículos farmacologicamente aceitáveis, tal como albumina. O material liofilizado pode ser reconstituído com solução salina ou água para criar uma solução ou composição contendo a toxina botulínica a ser administrada ao paciente.

A neurotoxina pode ser combinada com o componente de microesfera e armazenada por períodos de tempo prolongados antes da administração a um indivíduo, ou pode ser combinada com o componente de microesfera em uma composição injetável, por exemplo, imediatamente antes da administração a um indivíduo. Cuidado deve ser tomado para reduzir a quantidade de líquido, tal como um líquido aquoso, nas composições compreendendo um componente de microesfera uma vez que o componente de microesfera tem uma pluralidade de microesferas incháveis.

A quantidade da toxina Clostridial nas composições, ou administrada de acordo com os presentes métodos, podem variar de acordo com as características particulares do distúrbio de pele a ser tratado, incluindo sua severidade e outras variáveis do paciente incluindo tamanho, peso, idade e responsividade a terapia. Para orientar o médico, tipicamente, não menos do que cerca de 1 unidade e não mais do que cerca de 50 unidades de uma toxina botulínica do tipo A (tal como BOTOX®) são administrados por sítio de injeção (isto é, para cada localização de pele injetada), por sessão de tratamento do paciente. Para uma toxina botulínica do tipo A tal como DYSPORT®, não menos do que 2 unidades e não mais do que cerca de 200 unidades da toxina botulínica do tipo A são administradas por sítio de administração ou injeção, por sessão de tratamento do paciente. Para uma toxina botulínica do tipo B tal como MYOBLOC®, não menos do que cerca de 40 unidades e não mais do que 2500 unidades da toxina botulínica do tipo B são administradas por sítio de injeção, por sessão de tratamento do paciente. Menos do que cerca de 1, 2 ou 40

unidades (de BOTOX®, DYSPORT® e MYOBLOC® respectivamente) não conseguem alcançar um efeito terapêutico desejado, enquanto mais do que cerca de 50, 200 ou 2500 unidades (de BOTOX®, DYSPORT® e MYOBLOC® respectivamente) podem resultar em hipotonicidade muscular indesejada ou observável, fraqueza e/ou paralisia.

Mais de preferência: para BOTOX® não menos do que 2 unidades e não mais do que cerca de 20 unidades de uma toxina botulínica do tipo A; para DYSPORT® não menos do que cerca de 4 unidades e não mais do que cerca de 100 unidades, e; para MYOBLOC®, não menos do que cerca de 80 unidades e não mais do que cerca de 1000 unidades são, respectivamente, administradas para sítio de injeção, por sessão de tratamento do paciente.

Mais de preferência: para BOTOX® não menos do que 5 unidades e não mais do que cerca de 15 unidades de uma toxina botulínica do tipo A; para DYSPORT® não menos do que cerca de 20 unidades e não mais do que cerca de 75 unidades, e; para MYOBLOC®, não menos do que cerca de 200 unidades e não mais do que cerca de 750 unidades são, respectivamente, administradas para sítio de injeção, por sessão de tratamento do paciente. É importante observar que pode haver múltiplos sítios de injeção (isto é, uma padrão de injeções) para cada sessão de tratamento do paciente.

Assim, o componente de toxina botulínica das presentes composições pode compreender uma quantidade de toxina botulínica em uma faixa de cerca de 1 unidade a cerca de 50.000 unidades. A quantidade de componente de toxina botulínica presente na composição variará dependendo do tipo da toxina botulínica provido, tal como

o sorotipo ou cepa de toxina botulínica, e a quantidade da composição a ser administrada a um paciente. Em certas composições, a toxina botulínica compreende uma quantidade de 10 unidades a cerca de 2.000 unidades de uma toxina botulínica do tipo A. Em outras composições, o componente de toxina botulínica compreende uma quantidade de toxina botulínica em uma faixa de cerca de 100 unidades a cerca de 30.000 unidades de uma toxina botulínica do tipo B. De preferência, as presentes composições apenas compreendem toxinas botulínicas biologicamente ativas como um agente terapêutico. Por exemplo, as presentes composições estão substancialmente livres de um toxóide botulínico.

As presentes composições cosméticas também compreendem microesferas incháveis. As microesferas das presentes composições são também de preferência hidrofílicas, não-tóxicas e substancialmente esféricas. As microesferas são pelo menos uma porção, incluindo uma porção total de um componente de microesfera. O componente de microesfera assim tem um diâmetro de microesfera médio (por exemplo, o diâmetro médio de uma população de microesferas presentes na composição). Em certas concretizações das presentes composições, o diâmetro de microesfera médio depois da administração da composição a um indivíduo está entre cerca de um a cerca de 4 vezes maior do que o diâmetro da microesfera médio depois da administração. O aumento no diâmetro da microesfera médio é devido à inchabilidade das microesferas. Por exemplo, quando a composição é administrada a um indivíduo, as microesferas contatam um fluido, tal como um fluido de corpo aquoso. As microesferas incorporam o fluido e incham como um

resultado.

As microesferas das presentes composições podem compreender uma pluralidade de polímeros reticulados. Tais polímeros podem ser reticulados usando-se métodos convencionais rotineiramente conhecidos por pessoas versadas na técnica. Os polímeros das microesferas podem ser hidrofílicos. Assim, como descrito aqui, o componente de microesfera das presentes composições podem ser um material de hidrogel. As microesferas incham quando em contato com um fluido líquido. Como entendido por uma pessoa versada na técnica, o grau de polímeros reticulados em geral depende das propriedades dos materiais poliméricos tais como seu caráter iônico, da hidrofiliabilidade dos materiais poliméricos, e do grau de reticulação. Propriedades, tais como concentração iônica e sal e nível de pH, do solvente em que as microesferas são suspensas ou com as quais as microesferas estão sendo postas em contato também afetam o grau de inchamento.

Por controle do tamanho e do grau de inchamento de certos polímeros reticulados e inchados, seguros, eficazes e aumento dérmico de longa duração podem ser alcançados usando-se microesferas. Em geral, materiais poliméricos tendo alta capacidade de absorção de água são primeiramente escolhidos. A inchabilidade destes polímero pode ser também manipulada por controle do caráter iônico do polímero e o grau de reticulação por métodos conhecidos por uma pessoa versada.

As microesferas da presente invenção podem ser aniônicas ou catiônicas. Microesferas catiônicas podem ser desejáveis devido a sua capacidade superior de promoção da adesão celular. O grau de reticulação das microesferas pode ser mudado quimicamente ou através de

radiação. Uma variedade de agentes de reticulação pode ser usada, incluindo, mas não-limitada a, diacrilato de tetrametileno glicol, dimetacrilato de tetraetileno glicol, dimetacrilato de etileno glicol, metacrilato e dimetacrilato de pentaeritritol. As microesferas da invenção podem compreender de cerca de 0,5% a cerca de 20% em peso molecular de reticuladores. Por exemplo, as microesferas compreendem de cerca de 1% a cerca de 5% em peso de reticuladores.

O inchamento das microesferas compreendendo estes polímeros podem ser mais controlado por controle do solvente em que as microesferas são suspensas. Isto pode ser alcançado através de duas etapas como descritas aqui. Em primeiro lugar, o tamanho das microesferas antes da injeção é controlado por uso de solventes apropriados, concentração de sal e nível de pH de acordo com as microesferas específicas usadas. As microesferas antes da injeção podem permanecer no seu tamanho original ou inchar até certo grau devido a seu contato com o solvente. O inchamento pré-injeção é controlado de modo que as microesferas sejam facilmente injetadas através de agulhas de calibre 30 ou menores. Em segundo lugar, depois da injeção e no contato com tecidos no sítio da injeção, as microesferas podem ainda inchar em tamanho predeterminado ou manter seu tamanho pré-injeção, no qual qualquer tamanho permitirá as microesferas serem seguras no sítio de injeção e alcançar o efeito de aumento dérmico desejado. O grau de inchamento pré-injeção, e assim o inchamento pré-injeção, é determinado pelas microesferas particulares usadas e a natureza e localização da deficiências de pele a ser tratada.

Microesferas para o uso nas presentes

composições podem ter faixas de diâmetros de cerca de 10  $\mu\text{m}$  a cerca de 400  $\mu\text{m}$  antes do inchamento. Por exemplo, antes do inchamento, os diâmetros das microesferas podem variar de cerca de 10  $\mu\text{m}$  a cerca de 200  $\mu\text{m}$ , tais como, de cerca de 10  $\mu\text{m}$  a cerca de 120  $\mu\text{m}$ . Depois da injeção e inchamento, as microesferas em geral têm diâmetros médios maiores do que 40  $\mu\text{m}$ , por exemplo, maior do que cerca de 50  $\mu\text{m}$ , tal como maior do que cerca de 70  $\mu\text{m}$ . As microesferas das presentes composições são capazes de inchar até cerca de quatro vezes seus diâmetros originais ou cerca de 15 vezes seu volume original. O tamanho total das microesferas depois da administração pode ser controlado, por vários meios discutidos aqui, de modo que as microesferas sejam seguras no sítio da injeção enquanto minimizam ou reduzem lesões potenciais aos tecidos. Além disso, os tamanhos totais das microesferas depois da injeção são predeterminados com base em fatores tais como as condições fisiológicas do sítio de injeção, os tamanhos de microesferas originais, o solvente usado e o inchamento pré-injeção das microesferas. Assim, um plano de injeção específico pode ser projetado de acordo com o aumento dérmico particular necessário do caso. Estes tamanhos e propriedades das microesferas são vantajosas pelo fato de que elas permitem que as microesferas sejam facilmente injetadas através de agulhas de calibre 30 ou menores, no entanto as microesferas são grandes suficientes de modo que elas serão seguras no sítio de injeção e não serão digeridas ou eliminadas por macrófagos ou outros elementos do sistema imune.

As microesferas também parecem ser resistentes a força de injeção criada por agulhas de calibre 30 ou

menores e ao esforço de contração muscular gerado durante e depois do processo de injeção. As microesferas são também termicamente estéreis que permitem facilidade, esterilização conveniente e armazenagem congelada para a preparação de injeção.

Muitos tipos de polímeros reticulados tendo alta capacidade de absorção de água são adequados para o uso nas presentes composições. Tais polímeros reticulados são de preferência não-tóxicos a tecidos e células e são biocompatíveis. De preferência, os polímeros selecionados do grupo que consiste em polímero de acrilato de sódio, polímeros de acrilamida, polímeros ou copolímeros derivados de acrilamida, copolímero de álcool vinílico e de acrilato de sódio, produtos de saponificação de copolímero de acetato de vinila e de éster de ácido acrílico, copolímero de éster de ácido acrílico e de acetato de vinila, copolímero de maleato de metila e de acetato de vinila, copolímero reticulado de anidrido maléico-isobutileno, copolímero de enxerto de acrilonitrila-amido e seus produtos de saponificação, polímero de poliácrlato de sódio reticulado e óxido de polietileno reticulado.

As microesferas da presente invenção podem ser biodegradáveis ou não-biodegradáveis. Além disso, as microesferas da presente invenção são termicamente estáveis que permitem fácil esterilização convencional, e armazenagem por congelamento. As microesferas para o uso na presente invenção são também estáveis em suspensão que permite que as micropartículas a serem formuladas e armazenadas em suspensão e injetadas com óleos ou líquidos diferentes. Mais especificamente, a natureza hidrofílica das microesferas permite a colocação delas em

suspensão, e em particular, em forma estéril de soluções injetáveis, enquanto evitando a formação de agregados e adesão às paredes de recipientes de armazenagem e dispositivos de implantação, tais cateteres, seringas, agulhas, e semelhantes.

As microesferas da presente invenção podem conter dentro de sua estrutura ou sobre suas superfícies outros produtos químicos ou agentes, portanto, exibindo propriedades particulares, tais como efeitos terapêuticos, rádio-opacificação e efeitos de contraste; promoção de direcionamento da adesão celular; e capacidade de ser quimicamente modificados. Assim, as microesferas podem compreender um agente selecionado do grupo que consiste em agentes de rádio-opacificação, agentes de contraste, agentes de direcionamento e suas misturas. Em uma concretização das presentes composições, as microesferas compreendem um promotor de adesão celular. Em uma outra concretização, as microesferas podem compreender células providas sobre a superfície ou superfícies das microesferas. As células podem ser células autólogas.

As microesferas da presente invenção podem adicionalmente estarem associadas a agente ou meio de contraste. Meios de contraste úteis dentro da presente invenção podem ser encontrados em Dawson e outros. Contrast Medium in Practice (Springer-Verlag, 1994). Dispositivos de contraste incluem, e não são limitados a, dispositivos ultrassônicos, dispositivos superparamagnéticos e meios de contraste de gadolínio. De preferência, o meio de contraste inclui qualquer meio que contenham sais de bário ou iodo, tal como sais de alto peso molecular, incluindo ácido acrilamino-e-propion-

amido-3-triiodo-2,4,6-benzóico, que podem ser preparados sob as condições descritas por Boschetti e outros (Bull. Soc. Chim., N° 4 França (1986)). No caso de sais de bário ou de magnetita, eles podem ser diretamente introduzidos em forma de pó na solução de monômero inicial.

Em uma outra concretização da invenção, as microesferas têm propriedades específicas para promoção de crescimento celular e adesão celular adequados, tornando as microesferas particularmente úteis para certos aumentos dérmicos. Células podem estar associadas às microesferas, através da adesão ou outros meios, antes da injeção. As células podem ser células autólogas obtidas a partir ou derivadas do recebimento individual da composição cosmética. Estas células autólogas são de preferência do mesmo tipo de células que necessitam ser reparadas no aumento dérmico, tais como células adiposas, células musculares, células dérmicas, células epidérmicas ou suas misturas. As células autólogas podem também de preferência serem células que aumentam ou promovem o crescimento ou ligação de células ou tecidos, tais como células de fibroblasto.

Vários tipos de promotores ou agentes de adesão celular bem conhecidos na técnica podem ser usados nas microesferas das presentes composições. Por exemplo, agentes de adesão celular podem ser selecionados de colágeno, gelatina, glicosaminoglicanos, fibronectinas, lectinas, polications (tais polilisina, quitosano e semelhantes), matriz extracelular, produtos de degradação de células ou de tecidos, ou qualquer outro agente de adesão celular biológico sintético ou natural.

Agentes formadores ou promotores de adesão celular podem ser introduzidos nas microesferas por

procedimentos de acoplamento químico bem conhecidos em cromatografia por afinidade, mencionado pelo termo "imobilização de ligante". Um outro método de introdução é por difusão dentro da rede de gel que constitui a conta e então aprisionamento das moléculas difundidas no local por precipitação ou reticulação química.

A neurotoxina, tal como a toxina botulínica, das presentes composições está associada ao componente de microesfera para prover tratamento eficaz de uma condição dérmica. A neurotoxina pode ser misturada com as microesferas de modo que a neurotoxina e as microesferas sejam fisicamente distintas, mas que cooperativamente interagem para prover os benefícios cosméticos desejados descritos aqui. Ou, a neurotoxina pode ser acoplada com as microesferas. Por exemplo, as microesferas podem ser quimicamente modificadas de modo que elas sejam fisicamente acopladas à neurotoxina. Por exemplo, a neurotoxina pode ser covalentemente acoplada às microesferas. Alternativamente, a neurotoxina pode ser incorporada na rede polimérica das microesferas, de modo que a neurotoxina não é liberável a partir das microesferas até que as microesferas inchem. Ou, a neurotoxina pode ser complexada com as microesferas como um resultado de interações iônicas que não são ligações covalentes.

Incorporação das neurotoxinas nas microesferas das presentes composições pode ser realizada usando-se qualquer método rotineiro conhecido por pessoas de habilidade comum na técnica. Por exemplo, a incorporação pode ser realizada por mistura de microesferas secas com soluções da neurotoxina em uma solução aquosa ou hidroorgânica. As microesferas incham por adsorção da

solução e incorporam a neurotoxina na rede de micropartículas. A neurotoxina pode permanecer dentro da microesfera devido ao mecanismo ativo de adsorção essencialmente com base no efeito de troca de íons.

As microesferas da presente invenção podem adicionalmente possuir a propriedade de não-agregação, que usualmente resulta de uma carga iônica das microesferas. Esta propriedade facilita injeção e aumento dérmico de modo eficaz, especialmente em situações onde células estão associadas às microesferas. Esta propriedade é importante para o aumento dérmico da presente invenção uma vez que ela torna a injeção das microesferas através de agulhas de calibre 30 ou menores possível e mais fácil. Esta propriedade das microesferas também evita que elas se agreguem ou aderem as paredes das agulhas ou seringas ou outro dispositivo usado no processo.

As microesferas das presentes composições podem ser obtidas por método padrão de polimerização descrito na técnica tais como Patente Francesa 2.378.808 e patentes U.S. nos. 5.648.100 e 5.635.215. Em geral, a polimerização de monômeros em solução é realizada a uma temperatura que varia de entre cerca de 0°C e cerca de 100°C, por exemplo, entre cerca de 40°C e cerca de 60°C na presença de um iniciador de reação de polimerização.

Microesferas também podem ser preparadas por polimerização por suspensão, polimerização gota por gota ou qualquer outro método conhecido por pessoa ordinariamente versada na técnica. O modo de preparação de microesfera selecionado usualmente dependerá das características desejadas, tais como diâmetro de microesfera e composição química, para as microesferas

resultantes. As microesferas podem também ser produzidas por métodos da polimerização descrita na técnica (vide, por exemplo, E. Boschetti, *Microspheres for Biochromatography and Biomedical Applications. Parte I, Preparation of Microbeads In: Microspheres, Microencapsulation and Liposomes*, John Wiley & Sons, Arshady R., 2:171-189 (1999)). As microesferas também podem ser preparadas partindo de uma solução aquosa de monômeros contendo agentes de adesão tal como colágeno (gelatina é um colágeno desnaturado). A solução é então misturada com um solvente compatível não-aquoso para criar uma suspensão em gotículas, que são então transformadas em gel sólido por polimerização de monômeros por meio de catálise apropriada. As microesferas são então coletadas por filtração ou centrifugação e são lavadas.

As presentes composições podem compreender um componente de veículo. O componente de veículo de certas composições úteis pode ser uma composição aquosa, e em certas concretizações, o componente de veículo é uma solução salina. No entanto, muitos tipos de emulsões ou solventes podem ser usados como um veículo biocompatível para as presentes composições. O solvente pode ser em tal condição que as microesferas podem ser uniformemente suspensas e, mais importantemente, o inchamento das microesferas pode ser controlado por ajuste do solvente, do sal e da concentração iônica, do valor de pH, ou suas combinações. Alguns solventes adequados adicionais para as presentes composições incluem soluções de base aquosa tais como soluções de PBS, soluções de base alcoólica e outras soluções hidroorgânicas biocompatíveis conhecidas na técnica.

Concentração de sal e nível de pH do solvente são usados para controlar o grau de inchamento das microesferas uma vez que elas são suspensas em solvente. A presença de cátions tais como sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro, zinco e amônio têm vários níveis de efeitos no grau de inchamento das microesferas dependendo do polímero e sal específicos usados. O grau de inchamento das microesferas é particularmente controlável por mudança do equilíbrio de cátions menores e cátions maiores entre o solvente e as microesferas. Um nível de sal de 0,01 M a 5 M é eficaz para evitar que as microesferas inchem. Enquanto as microesferas incham desinibidamente sob um nível de pH neutro, a mudança de nível de pH pode afetar o grau de inchamento. Para as microesferas aniônicas, o nível de pH preferido para encolher as microesferas ou para evitar que elas inchem é de cerca de 0,5 a 5. Para as microesferas catiônicas, um nível de pH varia de cerca de 6 a cerca de 11 é vai encolher as microesferas ou evitar que elas inchem. Assim, pH ácido pode prover efeitos benéficos quando a composição compreende tanto microesferas aniônicas quanto neurotoxina botulínica.

Quando suspensas no solvente e antes da injeção, as microesferas podem inchar e o grau de inchamento é controlado pelo solvente e outras condições, tais como tempo e temperatura da suspensão. O inchamento pré-injeção das microesferas é também determinado pela inchamento pós-injeção desejado para as microesferas. Assim, as microesferas que obtiveram alto grau de inchamento antes da injeção incharão pouco depois da injeção, enquanto que as microesferas que incharam pouco antes da injeção obterão um grau mais alto de inchamento

depois da injeção. O tamanho das microesferas antes, durante e depois da injeção é em geral controlado de modo que sejam facilmente injetáveis através de agulhas de calibre 30 ou menores, mas ainda estão protegidas no local da injeção.

O veículo biocompatível da presente invenção pode também ser uma emulsão. Nesta concretização, as propriedades das microesferas, especialmente seu tamanho e grau de inchamento, são preservadas através do equilíbrio bem controlado entre as fases aquosas e não-aquosas na emulsão.

As presentes composições podem compreender um componente de toxina botulínica associado a um componente de microesfera de modo que a composição seja eficaz no aumento de uma característica cosmética de um indivíduo por um período de tempo que varia de cerca de 1 mês a cerca de seis anos depois da administração ao indivíduo. Vantajosamente, as presentes composições proveem efeitos cosméticos aumentados em relação a composições substancialmente idênticas sem uma neurotoxina, tal como toxina botulínica. Por exemplo, as presentes composições podem prover um melhoramento ou aumento cosmético devido aos efeitos paralíticos da neurotoxina, e a natureza inchável das microesferas. Além disso, o componente de toxina botulínica pode estar associado ao componente de microesfera de modo que a toxina botulínica mantenha uma atividade enzimática depois da passagem através de uma agulha de cerca de calibre 30 ou menor.

Assim, a presente composição injetável compreende microesferas em uma quantidade de cerca de 10% a cerca de 90% em peso e o veículo de biocompatível em uma quantidade de cerca de 10% a cerca de 90% em peso.

Por exemplo, a quantidade varia de 10% a 50% em peso para microesferas e de 50 a 90% para veículo biocompatível. A quantidade relativa das microesferas e as mudanças de veículo de acordo com a necessidade de aumento dérmico específico realizado, dependendo dos fatores tais como tamanho de agulha usada, do tipo de microesferas e dos veículos usados, do tipo de deficiência de pele, da área de injeção, do tipo de tecido ou de células a serem aumentadas, e se células estão associadas às microesferas antes da injeção.

Para preparar uma suspensão das microesferas, microesferas esterilizadas secas podem ser misturadas com um solvente desejada a um tempo predeterminado tal que o inchamento de pré-injeção das microesferas é controlado. O solvente pode ser pré-esterilizado ou a suspensão de microesferas e o solvente podem ser esterilizados juntos antes de sua injeção. Fatores tais como o material, o tamanho e o grau de reticulação das microesferas; o tipo, o volume, a concentração de sal, o nível de pH e a temperatura do solvente; e o tempo de mistura são todos considerados antes que uma suspensão injetável seja produzida e a injeção seja realizada depois disso.

A composição da presente invenção é facilmente injetável, através de agulhas de calibre 30 ou menores, para dentro de todas as partes de um indivíduo, tal como um ser humano, o qual deseja tratamento de uma deficiência ou defeito cosmético. A composição pode ser administrada, tal como por injeção, sem causar dor ou desconforto significativo. Isto é devido, entre outros fatores, ao tamanho e à resiliência física das microesferas, à natureza biocompatível do veículo, e à quantidade da composição administrada de acordo com o

caráter e localização da deficiência de pele.

Em uma outra concretização da presente invenção, uma composição útil para o aumento dérmico em um indivíduo compreende uma quantidade de uma toxina botulínica do tipo A de aumento dérmico, e uma pluralidade de microesferas incháveis eficazes no aumento de uma condição dérmica do indivíduo. Tal composição pode ser uma composição injetável eficaz no tratamento de rugas. Por exemplo, tal composição pode ser eficaz na provisão de tratamento de longa duração de linhas marionete, linhas glabellares, pés de galinha, sulcos na testa ou suas combinações. A toxina botulínica do tipo A é tipicamente provida em uma quantidade eficaz na provisão de um efeito anti-ruga de longa duração em relação a uma composição substancialmente idêntica sem uma toxina botulínica. Em certas composições, a composição também compreende pelo menos uma toxina botulínica adicional, tal como toxina botulínica do tipo B, C, D, E, F ou G. Como discutido aqui, a pluralidade de microesferas da composição tem um diâmetro de microesfera médio, e em certas composições, o diâmetro de microesfera médio aumenta depois da injeção para dentro do indivíduo de cerca de 1 vez a cerca de quatro vezes o diâmetro de microesfera médio antes da injeção.

Embora exemplos de vias de administração e dosagens sejam providos, a via apropriada de administração e dosagem são em geral determinadas em uma base de caso para caso pelo médico atendente. Tais determinações são rotineiras por aquele ordinariamente versado na técnica (vide, por exemplo, *Harrison's Principles of Internal Medicine* (1998), editado por Anthony Fauci e outros, 14<sup>a</sup> ed., publicado por McGraw

Hill). Por exemplo, a via e a dosagem para a administração de uma neurotoxina Clostridial de acordo com a presente invenção descrita pode ser selecionada com base nos critérios tais como as características de solubilidade da neurotoxina escolhida bem como a intensidade e o escopo da condição cosmética a ser tratada.

Em uma outra concretização da presente invenção, um método para o tratamento de uma condição dérmica, tal como ruga ou outra deficiência de pele, compreende a administração da composição descrita aqui a um indivíduo que necessita de tratamento, o qual deseja tal tratamento para a condição dérmica. Como discutido acima, as presentes composições são eficazes no tratamento de condições dérmicas incluindo linhas de marionete, linhas glabellares, pés de galinha, sulcos na testa ou suas combinações. As composições podem ser injetadas para dentro do indivíduo usando-se uma agulha ou um dispositivo sem agulha. Em certas concretizações, o método compreende injeção subdérmica da composição no indivíduo. Por exemplo, a administração pode compreender a injeção da composição através de uma agulha de não mais do que cerca de calibre 30. Em certas concretizações, o método compreende a administração de uma composição compreendendo uma toxina botulínica do tipo A. Os presentes métodos podem ser eficazes no tratamento de uma condição dérmica por um tempo mais longo em relação a administração de uma composição substancialmente idêntica sem uma toxina botulínica.

Em uma outra concretização, o método pode incluir uma etapa adicional de administração de uma toxina botulínica ao indivíduo. Assim, ao indivíduo pode

ser administrada uma composição compreendendo uma toxina botulínica e uma pluralidade de microesferas incháveis, e uma composição diferente apenas compreendendo uma toxina botulínica como um agente terapêutico ou cosmético.

A injeção das composições pode ser realizada por seringa, cateteres, agulhas e outros meios para injeção ou infusão de microesferas em um meio líquido. A injeção pode ser realizado sobre qualquer área do corpo de um mamífero que necessita de tratamento, incluindo, mas não-limitado a, face, pescoço, torso, braços, mãos, pernas e pés. A injeção pode ser para dentro de qualquer posição na área específica tal como camada de epiderme, derme, gordura ou subcutânea. Uma posição eficaz particular de injeção de acordo com os presentes métodos da invenção, é a camada subcutânea, que permite as microesferas e os agentes associados e as células funcionarem mais eficazmente.

A frequência e a quantidade de injeção da presente invenção é determinada com base na natureza e localização da deficiência de pele particular a ser tratada. Geralmente, por causa da estabilidade e do caráter de longa duração da presente composição injetável, múltiplas injeções não são necessárias. Em certos casos, no entanto, injeção repetida pode ser desejada para alcançar ótimos resultados. A frequência e a quantidade da injeção para cada caso particular é determinada pela pessoa ordinária versada na técnica.

Como descrito aqui, depois da injeção, as microesferas se tornam seguras na posição da injeção. As microesferas não são significativamente digeridas ou eliminadas por macrófagos ou outros elementos do sistema imune. Além do mais, as microesferas não deslocarão ou

não deslizarão para longe do local da injeção. O posicionamento seguro das microesferas perto do sítio da injeção é devido, entre outros fatores, a seu tamanho, a resiliência física, e a hidrofiliabilidade. A inchabilidade das microesferas no sítio de injeção é importante no auxílio seguro das microesferas no sítio de injeção. Ao entrar em contato com fluidos fisiológicos e as células no sítio de injeção, as microesferas podem também inchar, se não incharem pré-injeção, ou o inchamento é controlado para um nível mais baixo. A condição fisiológica, incluindo concentração de sal (por exemplo, sódio e potássio) e nível de pH, pode também auxiliar as microesferas incharem para o tamanho desejado.

Esta propriedade das microesferas permite controle preciso da injeção e torna possível que as microesferas trabalhem juntas na posição de injeção e proveem uma armação para aumento dérmico eficaz. Por causa da precisão da injeção e a segurança das microesferas no sítio de injeção providas pela invenção, agora é possível criar uma armação de microesferas no sítio de injeção, sem formar uma "armação de microesferas antes da injeção. A "armação injetável" compreendendo um componente de neurotoxina de Clostridial é especialmente vantajoso sobre a técnica anterior em que procedimentos cirúrgicos são necessários a fim de implantar uma armação para certos aumentos dérmicos ou exigem administração separada de uma composição de toxina botulínica. Esta descrição significativamente reduz a complexidade de aumento dérmico quando uma armação é desejada para aumento dérmico mais eficaz em certos casos. Esta única contribuição da presente invenção para aumento dérmico e o tratamento de deficiências da pele é tornada possível,

em parte, pelo tamanho bem controlado e grau de inchamento das microesferas, bem como os efeitos neurotóxicos da neurotoxina, como discutidos acima. A capacidade de formar uma armação no sítio de injeção sem formar uma armação antes que a injeção torne as microesferas e neurotoxina da presente invenção particularmente eficazes na provisão de aumento dérmico. O tamanho da armação é determinado pela quantidade e frequência da injeção, que é por sua vez determinado pela natureza e localização da deficiência de pele a ser tratada.

Os presentes métodos são particularmente adequados para o tratamento de deficiências de contorno de pele, que são usualmente resultados de idade, exposição ambiental, perda de peso, gravidez, lesão, cirurgia ou suas combinações. O envelhecimento e exposição ambiental frequentemente causam rugas sobre várias posições da pele. Perda de peso e gravidez, por outro lado, frequentemente causam marcas de rugas sobre várias posições na pele, especialmente sobre estômago, áreas da parte inferior do corpo e pernas. Lesão e cirurgia frequentemente resultam cicatrizes em áreas de lesão e operação.

Deficiências de contorno específicas adequadas para o tratamento pelo presente método da invenção incluem, mas não são limitadas a, linhas de franzimento das sombrancelhas, linhas de preocupação, rugas, pés de galinha, linhas de marionete e cicatrizes internas e externas incluindo cicatrizes resultadas de lesão, ferimentos, acidentes, picadas, cirurgia. Os presentes métodos vantajosamente provê tratamento de aumento dérmico para estas várias deficiências de contorno de um

modo estável, de longa duração e eficaz em comparação as composições anteriores. Particularmente adequado para o tratamento de acordo com a presente invenção são deficiências de contorno de tais áreas como olhos, bochechas, nariz, lábios, testa e pescoço.

A presente invenção também provê método para o tratamento de deficiência de pele especialmente deficiências causadas por doenças tais como acne e câncer. Estas deficiências podem ser resultados diretos ou indiretos das doenças, tais como deficiências causadas pelo tratamento das doenças.

A presente invenção adicionalmente provê método de causar aumento dérmico por injeção da composição injetável não diretamente dentro do corpo, mas extracorporeamente para dentro de órgãos, componentes de órgãos, ou tecidos antes da inclusão dos ditos tecidos, órgãos ou componentes de órgãos para dentro do corpo.

Um kit para a realização do aumento dérmico é também incluído pela presente descrição. O kit compreende uma agulha de calibre 30 ou menor e uma seringa correspondente, em que a seringa opcionalmente contém uma composição compreendendo microesferas biocompatíveis, incháveis, hidrofílicas, não-tóxicas e substancialmente esféricas e um veículo biocompatível. O kit também compreende uma composição de neurotoxina Clostridial, tal como uma composição de toxina botulínica. A composição de neurotoxina pode ser provida na seringa com as microesferas, mas de preferência, a composição de neurotoxina é misturada com a composição de microesfera imediatamente antes da administração ao indivíduo. A composição é injetável através da agulha e as microesferas não são capazes de serem digeridas ou

eliminadas pelo macrófago ou outros elementos do dito sistema imune de mamífero.

Alternativamente, o kit de aumento dérmico compreende uma agulha de calibre 30 ou menor, uma seringa correspondente, e recipientes separados contendo as microesferas em forma seca e o solvente biocompatível. As microesferas esterilizadas secas e o solvente estão prontos para serem misturados para injeção ou em seus respectivos recipientes ou na seringa. Estes kits de aumento dérmico são estéreis e prontos para o uso. Os kits são projetados em várias formas com base nos tamanhos das seringas e das agulhas, e do volume da composição injetável contida ali, que por sua vez são baseados nas deficiências de pele no qual os kits são projetados para tratar.

#### Exemplos

Os seguintes exemplos não-limitantes proveem àqueles ordinariamente versado na técnica com métodos preferidos específicos para tratar condições dentro do escopo da presente invenção e não têm a finalidade de limitar o escopo da invenção. Nos seguintes exemplos vários modos de administração não sistêmica de uma neurotoxina Clostridial podem ser realizados.

#### Exemplo 1

##### **Composições cosméticas de toxina botulínica**

Em um pipeta contendo 100 ml de água desmineralizada, 58 g de cloreto de sódio e 27 g de acetato de sódio são dissolvidos. 400 ml de glicerol são adicionados e então o pH é ajustado entre 5,9 e 6,1. Então 90 g de N-tris-hidróxi-metil metilacrilamida, 35 mg de dietilaminoetilacril-amida e 10 g de N,N-metileno-bis-acrilamida são adicionados. A composição é aquecida a 60-

70° C e 100 moles de uma solução de gelatina de 300 mg/ml quente são adicionados. O volume total da mistura é ajustado para 980 ml por adição de água quente e então 20 ml de uma solução de persulfato de amônio de 70 mg/ml e 4 ml de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina são adicionados.

Esta solução é despejada para dentro de óleo de parafina a 50-70°C agitando-se. Depois de poucos minutos, a reação de polimerização de monômeros acrílicos é manifestada por um aumento de temperatura. As microesferas são então recuperadas por decantação, são lavadas cuidadosamente, são peneiradas e são esterilizadas em uma autoclave em um meio tamponado.

Aquelas microesferas, depois da calibração por peneiramento, possuem as características, desejadas para o aumento dérmico.

As microesferas são combinadas com toxina botulínica do tipo A (por exemplo, BOTOX®) em uma forma liofilizada, e são armazenadas secas a -4°C por vários meses. As microesferas e toxina botulínica do tipo A são solubilizadas com solução salina antes da administração a um indivíduo.

#### Exemplo 2

O procedimento do Exemplo 1 é seguido, usando-se toxina botulínica do tipo B ao invés de toxina botulínica do tipo A.

#### Exemplos 3 a 7

O procedimento do Exemplo 1 é seguindo usando-se uma das toxina botulínica do tipos C, D, E, F, e G ao invés de toxina botulínica do tipo A.

#### Exemplo 8

O procedimento do Exemplo 1 é seguido com a adição de uma segunda toxina botulínica outra que não do

tipo A.

Exemplo 9

Uso de toxina botulínica do tipo A e microesferas incháveis para tratar linhas de marionete

Uma mulher de 48 anos de idade com linhas de marionete procura tratamento com seu médico. A mulher indaga sobre injeções de BOTOX®. O médico recomenda a administração de um novo produto que utiliza tanto toxina botulínica quanto microesferas incháveis. A mulher concorda. A composição do Exemplo 1 é injetada para dentro do músculo depressor angulioris sobre cada lado da boca da mulher. Cada sítio de injeção recebe cerca de 10 unidades de toxina botulínica. Dentro de cerca de 7 dias, as linhas de marionete começam a desaparecer. As linhas de marionete permanecem reduzidas por cerca de 2 anos depois daquele único tratamento.

Exemplo 10

Uso de toxina botulínica tipo A e microesferas incháveis para tratar linhas glabellares

Um homem de 32 anos de idade com sulcos na testa procura tratamento com BOTOX® com seu médico. O médico recomenda um novo produto que utiliza tanto toxina botulínica quanto microesferas incháveis. A composição do Exemplo 1 é injetada para dentro dos músculos corrugador e prócero da testa do homem. Cada sítio de injeção recebe cerca de 5-10 unidades de toxina botulínica. Dentro de cerca de 3 dias, as linhas glabellares começam a desaparecer. As linhas glabellares totalmente desaparecem em cerca de 14 dias e permanecem reduzidas por cerca de 1 ano depois daquele único tratamento.

Exemplo 11

Uso de toxina botulínica do tipo A e

microesferas incháveis para tratar pés de galinha

Um homem de 57 anos de idade com pés de galinha que resultam de anos de exposição ao sol procura tratamento com seu médico. O médico recomenda um produto que utiliza tanto toxina botulínica quanto microesferas incháveis. A composição do Exemplo 1 é injetada subdermicamente sobre cada lado dos olhos do paciente. Cada sítio de injeção recebe cerca de 3 unidades de toxina botulínica, com várias injeções efetuadas sobre cada lado do olho. Os pés de galinha desaparecem dentro de cerca de 10 dias depois do tratamento, e permanecem reduzidas por seis meses.

#### Exemplo 12

Uso de toxina botulínica do tipo A e microesferas incháveis para lift da fonte

Uma mulher de 60 anos de idade apresenta sobrelhas que se estendem abaixo de seu osso frontal. Seu médico recomenda um produto que utiliza tanto toxina botulínica quanto microesferas incháveis. A composição do Exemplo 1 é injetada subdermicamente acima de cada olho. Cada sítio de injeção recebe cerca de 10 unidades de toxina botulínica, com várias injeções produzidas sobre cada lado do olho. O caimento da sobrelha é reduzido no período de cerca de 14 dias, e é substancialmente aliviada por 1 ano depois da administração.

Em cada um dos exemplos de 9-12 acima a toxina botulínica do tipo B, C, D, E, F ou G pode ser usada como substituição a toxina botulínica do tipo A usada acima, por exemplo, por uso de 250 unidades da toxina botulínica do tipo B. A quantidade específica da toxina botulínica (tal como BOTOX® administrada depende da variedade de fatores a serem pesados e administrado dentro do

discernimento do médico atendente e em cada um dos exemplos quantidades insignificantes da toxina botulínica aparecem sistematicamente com nenhum efeito colateral significativo.

As presentes composições e métodos podem prover uma ou mais das seguintes vantagens:

1. as composições injetáveis não são facilmente deslocadas dentro dos tecidos em que eles são originalmente injetados,

2. as composições injetáveis não são prontamente eliminadas ou bioquimicamente ou através de macrófago ou outros elementos do sistema imune,

3. as composições incluem materiais de tamanho suficiente para serem injetados através de agulhas de calibre 30 ou menores,

4. as microesferas são flexíveis e não são frágeis, facilitando a injeção fácil sem serem,

5. as microesferas injetadas não são irregularmente formadas e não se acumular entre si,

6. as composições injetáveis proveem duração de terapia aumentada ou aperfeiçoamentos cosméticos em relação com materiais sem uma neurotoxina, e

7. as composições injetadas proveem melhoramentos nos resultados terapêuticos ou cosméticos devido aos efeitos sinérgicos pelas microesferas incháveis e as neurotoxinas, assim, os defeitos cosméticos podem ser dramaticamente reduzidos ou eliminados.

8. o efeito cosmético pode ser reduzido ou eliminado por pelo menos cerca de 2 meses a cerca de seis anos quando do uso das presentes composições.

9. pouco ou nenhum efeito colateral

significativo ocorre a partir de injeção ou implante intramuscular (ou intradérmica ou subdérmica) da neurotoxina Clostridial.

10. os presentes métodos podem resultar nos efeitos colaterais desejáveis de uma atitude mais positiva, e uma qualidade de vida aperfeiçoada.

Estes benefícios, se sozinho ou em combinações, aumentam a eficácia do tratamento e são seguros, mais convenientes e confortáveis para os pacientes.

Embora a presente invenção fosse descrita em detalhes em relação a certas composições e métodos preferidos, outras concretizações, versões e modificações dentro do escopo da presente invenção são possíveis. Por exemplo, uma ampla variedade de neurotoxinas podem ser eficazmente usadas nos métodos da presente invenção. Adicionalmente, a presente invenção inclui métodos de administração local para aliviar uma deficiência ou defeito cosmético em que duas ou mais neurotoxinas, tais como duas ou mais toxinas botulínica, são administradas concorrentemente ou consecutivamente.

Por exemplo, toxina botulínica do tipo A pode ser administrada até que uma perda de resposta clínica ou anticorpos neutralizantes se desenvolverem, após a administração de toxina botulínica do tipo B. Alternativamente, uma combinação de quaisquer duas ou mais dos sorotipos A-G botulínica pode ser localmente administrada para controlar o início e duração do resultado cosmético. Além do mais, compostos de não-neurotoxina podem ser administrados antes de, concorrentemente com ou subsequente a administração da neurotoxina para provar efeito auxiliar tal como início aumentado ou mais rápido de desnervação antes da

neurotoxina, tal como toxina botulínica, começa a exercer seu efeito terapêutico.

Minha invenção também inclui dentro do escopo o uso da neurotoxina, tais como toxina botulínica, e microesferas incháveis de um medicamento para o tratamento de um defeito ou deficiência cosmética por administração local da composição.

Todas as referências, artigos, patentes, pedidos e publicações indicados acima são incorporados aqui por referência em suas totalidades.

Adequadamente, a essência e escopo das seguintes reivindicações não são limitados às descrições das concretizações preferidas indicadas acima.

### **REIVINDICAÇÕES**

1. Composição útil para o tratamento de um defeito cosmético em um indivíduo, **caracterizada por** compreender:

um componente de toxina botulínica, em que o dito componente compreende uma quantidade de toxina botulínica na faixa de 1 unidade a 50.000 unidades ou o dito componente de toxina botulínica compreende apenas toxina botulínica de tipo A; e

um componente de microesfera compreendendo uma pluralidade de microesferas incháveis; a composição sendo livre de um toxóide botulínico.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** o componente de toxina botulínica compreender uma toxina botulínica selecionada do grupo que consiste em toxinas botulínicas dos tipos A, B, C, D, E, F, G, e suas misturas.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** o componente de toxina botulínica compreender uma quantidade de toxina botulínica em uma faixa de 10 unidades a 2.000 unidades de uma toxina botulínica de tipo A.

4. Composição de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** o componente de toxina botulínica compreender uma quantidade de toxina botulínica em uma faixa de 100 unidades a 30.000 unidades de uma toxina botulínica de tipo B.

5. Composição de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** o componente de microesfera ter um diâmetro médio de microesfera, e o diâmetro médio de microesfera após a administração ao indivíduo estar entre uma a quatro vezes maior do que o diâmetro médio de microesfera antes da administração.

6. Composição de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** as microesferas compreenderem um agente selecionado do grupo que consiste em agentes de rádio-opacificação, agentes de contraste, agentes de direcionamento, e suas misturas.

7. Composição de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** compreender um componente de veículo.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** o componente de veículo ser uma composição aquosa.

9. Composição de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** o componente de veículo ser uma solução salina.

10. Composição de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a composição ser uma composição injetável eficaz no tratamento de rugas.

11. Composição de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada por** as rugas serem selecionadas do grupo que consiste em linhas de marionete, linhas glabellares, pés de galinha, sulcos na testa, e suas combinações.

12. Composição de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada por** a pluralidade de microesferas ter o diâmetro médio de microesfera, e em que o diâmetro médio de microesfera aumenta após a injeção para dentro do indivíduo de uma vez a quatro vezes o diâmetro médio de microesfera antes da injeção.

13. Composição de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** compreender uma toxina botulínica adicional selecionada do grupo que consiste em toxina botulínica dos tipos B, C, D, E, F, e G.

14. Método não terapêutico para tratamento de um defeito cosmético, **caracterizado por** compreender administração da composição conforme definida na

reivindicação 1 a um indivíduo.

15. Método não terapêutico de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado por** o defeito cosmético ser uma ruga.

16. Método não terapêutico de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado por** o defeito cosmético ser uma condição selecionada do grupo que consiste em linhas de marionete, linhas glabellares, pés de galinha, sulcos na testa, e suas combinações.

17. Método de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado por** a administração compreender injetar uma composição compreendendo uma toxina botulínica do tipo A.