



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 600**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04762485 .3**  
96 Fecha de presentación : **22.07.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1648485**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **Formulación para medicamentos proteicos sin adición de seroalbúmina humana (HSA).**

30 Prioridad: **22.07.2003 DE 103 33 317**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.08.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.08.2011**

73 Titular/es: **MERZ PHARMA GmbH & Co. KGaA**  
**Eckenheimer Landstrasse 100**  
**60318 Frankfurt AM Main, DE**

72 Inventor/es: **Frevert, Jürgen**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 600 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Formulación para medicamentos proteicos sin adición de seroalbúmina humana (HSA)

5 La presente invención se refiere a una composición de sustancias no peptídicas de bajo peso molecular, los principios activos proteicos, formulada como medicamento, estabilizada y en la que en ella se renuncia al uso de HSA. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que además de este principio activo proteico contiene también sustancias no peptídicas de bajo peso molecular.

10 El desarrollo de la ingeniería genética proporciona una multiplicidad de medicamentos novedosos cuyos principios activos lo representan proteínas. En comparación con medicamentos convencionales cuyos principios activos están constituidos por sustancias de bajo peso molecular, las proteínas de alto peso molecular se caracterizan por una alta eficacia a menor cantidad de sustancia y por consiguiente se utilizan en concentraciones o dosis muy pequeñas.

15 A tales pequeñas concentraciones o dosis los fabricantes de medicamentos se enfrentan a un problema. Las proteínas tienen concretamente la propiedad de adherirse a superficies sólidas. Debido a esta adsorción una gran parte de la cantidad de principio activo proteico utilizada puede perderse. A este respecto este efecto es naturalmente tanto mayor cuanto menor sea la concentración del principio activo proteico a administrar. Sin una formulación adecuada el principio activo proteico puede incluso perderse totalmente.

Otro problema de estos medicamentos o de los principios activos proteicos radica en la alta inestabilidad de las proteínas. Estas pueden p.ej. oxidarse fácilmente (restos de cisteína, metionina) o desaminarse (asparragina), o se escinden en fragmentos o se agregan formando complejos mayores. Una formulación eficiente debería evitar tales pérdidas de principio activo proteico y garantizar un producto estable.

20 Como la unión de proteínas a superficies es inespecífica, puede impedirse la pérdida de principio activo por adición de otra proteína (inespecífica) en gran exceso. Como la proteína adicional no debería tener a ser posible ningún efecto farmacológico y tampoco estimular la producción de anticuerpos, para este fin se utiliza actualmente seroalbúmina humana (HSA), que además puede adquirirse a buen precio, pues se utiliza en grandes cantidades como substitutivo del plasma. Así, actualmente una serie de medicamentos (distintos interferones, factores de crecimiento, toxinas botulínicas y vacunas) en el mercado contienen como estabilizador HSA.

25 En el caso de la HSA se trata de un producto obtenido de sangre humana que por consiguiente a pesar de comprobación prescrita puede estar contaminado (p.ej. por virus) y proporcionar una transmisión de una enfermedad al receptor del medicamento que contiene HSA (especialmente porque algunas veces aparecen (pueden) nuevos patógenos que no pueden detectarse a su debido tiempo mediante ensayos). Las autoridades componentes instan por consiguiente a substituir la HSA en nuevas autorizaciones de medicamentos. Por este motivo no debería utilizarse HSA en formulaciones de medicamentos - en tanto pueda substituirse por otras sustancias.

30 La seroalbúmina humana (HSA) es especialmente adecuada por distintos motivos para la formulación de un principio activo proteico. Es una proteína y por consiguiente puede inhibir o neutralizar todas las reacciones inespecíficas al principio activo proteico. Esto es válido en especial para reacciones en superficies límite (líquido-sólido, líquido-gas) que pueden conducir a una desnaturalización del principio activo (Henson y col. (1970), Colloid Interface Sci 32, 162-165). La presencia de HAS protege por consiguiente de la desnaturalización. Las proteínas tienen además una afinidad por las superficies a las que se unen inespecíficamente mediante interacciones hidrófobas (Norde W. (1995) Cells Mater 5, 97-112). Con un exceso de HSA estos sitios de unión en las superficies pueden saturarse, de modo que el principio activo proteico permanece en solución, lo que es especialmente forzosamente preciso si la dosis del principio activo proteico es pequeña.

35 Además, la presencia de HSA protege de la desnaturalización durante el envasado y dado el caso la liofilización así como en el almacenamiento del medicamento (p.ej. de procesos de degradación oxidativa o de una desaminación de la asparragina).

40 Una proteína que proteja así el principio activo debería naturalmente no presentar ella misma ningún efecto farmacológico, una condición que cumple la HSA. Como es una proteína humana, la HSA tampoco debería actuar como antígeno, es decir, no debería estimular la producción de anticuerpos. Pero como la HSA se aísla de la sangre y se purifica mediante procedimientos físico-químicos, no se puede excluir básicamente que mediante el proceso de purificación se formen neoepítopos, es decir nuevas estructuras de antígenos, contra los que el receptor de la mezcla de HSA y principio activo proteico forma anticuerpos. En este caso podría llegarse a reacciones secundarias no deseadas. Debido a posibles reacciones secundarias no es deseable el uso de otra proteína o de una mezcla de oligopéptidos.

50 Fundamentalmente se considera también gelatina como estabilizador. En este caso se trata sin embargo de una

proteína animal que causa reacciones inmunológicas y que también podría ser portador de agentes patógenos.

El uso de HSA o de otro estabilizador adecuado para el principio activo proteico es también especialmente importante en medicamentos cuyos principios activos proteicos están contenidos o se administran en dosis extraordinariamente bajas. Puesto que las proteínas son sobre todo a bajas concentraciones extremadamente lábiles y se unen además inmediatamente a sitios de unión inespecíficos disponibles. Como consecuencia de esto se han perdido para el uso terapéutico. Como ejemplos de un principio activo proteico que se utiliza a dosis extraordinariamente bajas son de mencionar las neurotoxinas de *Clostridium botulinum*. Estas proteínas de alta actividad actúan en cantidades mínimas (estas son o la neurotoxina de *Clostridium botulinum* de tipo A es de todos aquellos medicamentos desarrollados hasta ahora aquel que se administra con la dosis mínima (500 pg/frasco de vidrio).

Por la descripción del estado de la técnica, que describe esencialmente como un agente protector semejante solo la HSA, se desprende que existe una necesidad de proporcionar alternativas a la HSA como estabilizador para principios activos proteicos en medicamentos. Correspondientemente, los inventores se han planteado el cometido de desarrollar una composición que proteja/estabilice los principios activos proteicos en medicamentos al menos tan bien como la HSA.

El cometido planteado lo ha resuelto el inventor porque ha desarrollado una composición de sustancias no peptídicas de bajo peso molecular formulada en medicamentos, estabilizada y en la que en ella se renuncia al uso de HSA. Esta composición se designa en lo que sigue también como "composición para la estabilización".

La presente invención se refiere conforme a un primer aspecto a una composición libre de proteínas extrañas que se puede formular con principios activos proteicos para dar medicamentos. Esta composición para la estabilización se basa preferiblemente en sustancias de bajo peso molecular que se preparan conforme a la farmacopea europea (Ph. Eur.) y están admitidas como coadyuvantes farmacéuticos. Esto permite en especial renunciar a la HSA y garantizar no solamente un almacenamiento estable de los principios activos proteicos o del medicamento sin pérdida de los principios activos, sino que se elimina también el riesgo de que el medicamento correspondientemente administrado esté contaminado con agentes infecciosos. Es sorprendente que tales sustancias de bajo peso molecular y "sencillas" como las que se utilizan conforme a la invención para la composición para la estabilización presentan la capacidad de prestación deseada y pueden substituir a la HSA.

La composición conforme a la invención para la estabilización substituye a la HSA por una combinación de distintas sustancias de bajo peso molecular exentas de efectos secundarios que protegen de la pérdida de principios activos por adsorción a superficies así como por desnaturalización y procesos de descomposición química de los principios activos proteicos disueltos o liofilizados. Además de esto la composición para la estabilización impide la descomposición química de los principios activos en el almacenamiento durante un tiempo > 6 meses también a temperatura elevada.

La composición para la estabilización conforme a la invención presenta los componentes indicados en la reivindicación 1, que son:

a) una sustancia tensioactiva, preferiblemente un detergente (tensioactivo) no iónico,

y

b) una mezcla de al menos dos aminoácidos, en la que los al menos dos aminoácidos son Glu y Gln o Asp y Asn.

La composición para la estabilización conforme a la invención contiene según otra forma de realización preferida uno o varios de los siguientes otros componentes:

c) un disacárido, preferiblemente sucrosa (sacarosa, azúcar de caña), trehalosa o lactosa;

d) ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), preferiblemente en forma de una de sus sales, como del EDTA-Na<sub>4</sub>.

Las composiciones para la estabilización conforme a la invención preferidas contienen o bien los componentes a), b) y c), o los componentes a), b) y d), o los componentes a), b), c) y d). Todos estas composiciones preferidas son o bien solubles en medios acuosos o son soluciones acuosas.

Es ventajoso que todas las sustancias utilizadas en la composición para la estabilización como coadyuvantes están autorizadas para preparados farmacéuticos y por consiguiente han sido investigadas también toxicológicamente minuciosamente, es decir, que pueden añadirse sin más ensayos a la composición para la estabilización conforme a la invención. Ha sido sorprendente que una combinación precisamente definida de estas sustancias sencillas presenta la eficacia deseada, concretamente para proporcionar una formulación exenta de seroalbúmina estable para principios

activos proteicos.

Conforme a un segundo aspecto la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un principio activo proteico y a la composición para la estabilización anteriormente indicada que comprende los componentes a) y b), o a una de las composiciones para la estabilización preferidas anteriormente indicadas.

5 El principio activo o principio activo proteico se prepara (disuelve) preferiblemente en una solución acuosa que contiene los componentes a) y b) y dado el caso también c) y/o d). A continuación puede liofilizarse. Si realmente debe liofilizarse, es especialmente ventajosa la adición previa de componente c). Después de la liofilización la composición farmacéutica está presente en forma de polvo, que (preferiblemente con agua para inyectables (WFI)) puede reconstituirse.

10 Correspondientemente, la composición farmacéutica se presenta preferiblemente como polvo liofilizado o secado a vacío que es soluble en medios acuosos. Antes de la utilización terapéutica el liofilizado o polvo se reconstituye preferiblemente con agua para inyectables (WFI). La composición farmacéutica puede sin embargo presentarse también en forma líquida, preferiblemente como solución acuosa.

15 Las composiciones farmacéuticas conforme a la invención preferidas de la presente invención contienen además de los componentes anteriormente mencionados a) y b) como proteína un factor de coagulación como el factor VIII (la globulina antihemofílica), una citocina como un interferón, en especial como interferón alfa, beta o gamma, una enzima como una urocinasa o estreptocinasa, un activador del plasminógeno o una neurotoxina de alta pureza (para la definición de "neurotoxina de alta pureza" véase más adelante) o un complejo de neurotoxina de *Clostridium botulinum*, en especial de *Clostridium botulinum* de los tipos A, B, C, D, E, F o G. Como las toxinas clostrídicas, en especial en su forma de alta pureza, se formulan como medicamento en cantidades mínimas, son la proteína preferida. Son especialmente preferidas las neurotoxinas de alta pureza de los tipos A y B.

20 Otras composiciones farmacéuticas preferidas de la presente invención contienen además de los componentes a) y b) anteriormente mencionados y el principio activo adicionalmente el componente c) anteriormente definido, el componente d) anteriormente definido, o estos dos componentes conjuntamente.

25 Las dos composiciones conforme a la invención contienen los al menos dos aminoácidos (i) ácido aspártico y asparragina, o (ii) ácido glutámico y glutamina. Preferiblemente las composiciones contienen sin embargo al menos tres (ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico; ácido aspártico, asparragina, glutamina; ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina; asparragina, ácido glutámico, glutamina) de estos cuatro aminoácidos o incluso la totalidad de los cuatro (ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico, glutamina). Preferiblemente los distintos aminoácidos se utilizan en una concentración de 20 a 200 mM, mejor de 20 a 100 mM, en especial de 50 mM. Esto corresponde en un envasado de 0,5 ml de solución de partida tras secado a una cantidad de 1,3 mg a 14,7 o de 1,3 a 7,4 mg, en especial de aproximadamente 3,7 mg por aminoácido en polvo.

30 En otra forma de realización preferida de ambas composiciones de la presente invención la sustancia tensioactiva (el tensioactivo) es un detergente no iónico, preferiblemente un polisorbato (como polisorbato 20 o polisorbato 80) o un poloxámero (como poloxámero 184 o poloxámero 188). Si la composición farmacéutica está presente en forma líquida, la proporción del polisorbato asciende preferiblemente a 0,01 a 0,5% en peso, se prefiere una proporción de 0,2% en peso. Esto corresponde tras p.ej. una liofilización de 0,5 ml de solución de partida a una cantidad de 0,05 a 2,5 mg, preferiblemente de 1 mg, de polisorbato.

35 En una forma de realización todavía más preferida de ambas composiciones de la presente invención el disacárido es sacarosa, trehalosa o lactosa. La sacarosa es especialmente preferida. Si la composición farmacéutica conforme a la invención está presente como solución, esta contiene preferiblemente de 2 a 10% en peso, más preferiblemente 5% en peso del disacárido, especialmente de sacarosa.

40 Además es preferido, como ya se ha descrito, el uso de componente d), un formador de complejos. Este ejerce un efecto estabilizador adicional. La concentración del ácido etilendiaminotetraacético en la solución de partida de la composición farmacéutica asciende preferiblemente a 0,1 a 1,0 mM, en especial a 5 mM.

45 Ambos tipos de composiciones conforme a la presente invención presentan preferiblemente un valor del pH de 5,0 a 8,5, con especial preferencia un valor del pH de 6,0 a 8,0, en especial de 6,0 a 7,0 ó 6,5. El valor del pH, dado el caso, en tanto sea necesario o se desee, se ajusta con NaOH.

50 Las neurotoxinas de *Clostridium botulinum* ya mencionadas al principio, en especial las neurotoxinas de *Clostridium botulinum* de los tipos A y B, deben formularse para fines farmacéuticos en dosis muy bajas. Por consiguiente, la cualidad de la composición conforme a la invención para la estabilización se demuestra especialmente buena con este principio activo extremadamente difícil de manejar. Otros principios activos proteicos se formulan en cantidades claramente superiores; la HSA puede por consiguiente substituirse así más fácilmente por la composición para la

estabilización conforme a la invención.

La toxina de *Clostridium botulinum* de tipo A (nombre comercial Botox<sup>®</sup>, Fa. Allergan, Dysport<sup>®</sup>, Fa. Ipsen) se utiliza desde hace muchos años para la terapia de distintas formas de distonías (p.ej. beflarospasmo, tortícolis), de espasticidades, para el tratamiento de la hiperhidrosis, pero también en el campo cosmético para la eliminación de arrugas cutáneas. En el caso de este principio activo se trata de un complejo proteico que se sintetiza por bacterias de crecimiento anaerobio (*Clostridium botulinum*). El agente activo en este complejo proteico es una proteína de peso molecular de 150 kD, la neurotoxina botulínica (BoNT). Esta toxina o neurotoxina actúa en la placa motora terminal e inhibe la transmisión del impulso nervioso al músculo y conduce por consiguiente a una parálisis de ese músculo. Este mecanismo de acción permite utilizar la neurotoxina en enfermedades en las que la transmisión de los estímulos está alterada patológicamente, es decir, tiene lugar una descarga de acetilcolina acrecentada.

Las toxinas o neurotoxinas botulínicas que se venden actualmente en el mercado se basan todas en el complejo de toxina de *Clostridium botulinum*, es decir, la neurotoxina, la molécula propiamente activa, está incluida en un conjunto de proteínas con distintos pesos moleculares: estas son distintas hemaglutininas (15 kD, 19 kD, 35 kD, 52 kD) así como una proteína atóxica no hemaglutinante (NTNH, 120 kD). Sin estas llamadas proteínas protectoras la neurotoxina aislada es muy inestable y se degrada fácilmente por proteasas. Las proteínas protectoras o proteínas complejantes son pues superfluas para la acción propiamente dicha en la célula nerviosa, pero juegan un papel en la estabilización de la sensible neurotoxina. Por otra parte hay datos de que estas proteínas complejantes ejercen un efecto inmunoestimulador que podría ser responsable de que un 5-10% de los pacientes desarrollen anticuerpos, que conducen irremisiblemente al fin de la terapia con este tipo de neurotoxina ("Secondary Nonresponder"). Además es de pensar que los pacientes se cargan con proteína extraña (las proteínas complejantes), lo que farmacológicamente no es forzosamente necesario. Es por consiguiente razonable utilizar como principio activo neurotoxina pura, exenta de proteínas de complejo, pero que por su baja dosis y labilidad precisa una formulación especialmente eficiente.

La condición previa para el uso de la neurotoxina exenta de proteínas de complejo (la neurotoxina exenta de proteínas de complejo se designa en ocasiones también como neurotoxina de alta pureza) como principio activo en un medicamento ha consistido pues en desarrollar una composición farmacéutica que garantice la estabilidad de la actividad biológica de la neurotoxina de alta pureza durante un tiempo prolongado. Esta condición previa la ha cumplido el inventor proporcionando la composición para la estabilización conforme a la invención.

Los dos medicamentos que se encuentran hoy en día en el mercado basados en la neurotoxina de tipo A contienen como estabilizador esencial HSA (el Botox<sup>®</sup> contiene en 100 unidades de principio activo 0,5 mg de HSA y adicionalmente 0,9 mg de cloruro sódico, mientras que el Dysport<sup>®</sup> en 500 unidades de principio activo contiene 0,125 mg de HSA y además 2,5 mg de lactosa). El Neurobloc<sup>®</sup> basado en el complejo de toxina de tipo B está compuesto con 2000 unidades por una solución con 500 µg/ml de HSA, succinato sódico 0,01 M y cloruro sódico 0,1 M. Como se ha descrito anteriormente la HSA sirve en especial para impedir la adsorción de la toxina en las paredes de los recipientes (botellas de vidrio, jeringas, cánulas) y protegerla de la desnaturalización. Sin la seroalbúmina (o sin sustancias que substituyan su efecto) la toxina se pierde irremisiblemente. Esto es debido sobre todo al hecho de que la cantidad de neurotoxina en estos medicamentos es extraordinariamente pequeña (el Botox<sup>®</sup> contiene 5 ng, el Dysport<sup>®</sup> 20 ng de complejo de toxina por unidad de envase (frasquitos)). En tanto no esté presente ninguna otra proteína se ocupan por la toxina los suficientes sitios de unión a proteína inespecíficos presentes. En presencia de un alto exceso (> 50.000 veces) como en los medicamentos indicados, se ocupan los sitios de unión por la HSA, de modo que el complejo de neurotoxina permanece en disolución. La probabilidad de que se adsorba la neurotoxina de alta pureza exenta de complejo a la superficie sólida del recipiente es considerablemente mayor, pues la cantidad de proteína en la neurotoxina pura para una dosis de 100 unidades asciende solamente a 500 pg.

La solicitud de patente WO 01/58472 describe una formulación para el complejo de *Clostridium botulinum* de tipo A que está compuesta esencialmente por hidroxietilalmidón. Se citan ejemplos en los que la formulación es estable un año. Con la neurotoxina de alta pureza, por tanto exenta de proteínas de complejo, no se describe estudio alguno. Sin embargo se constata que la toxina presenta una inestabilidad significativa tras la eliminación de las hemaglutininas. Además, se observa que la toxina botulínica de alta pureza es tan inestable que para la fabricación de una composición farmacéutica presenta solamente una utilidad limitada. ("La proteína toxina tiene una marcada inestabilidad al eliminar la proteína hemaglutinina" y "La toxina botulínica pura es tan lábil que tiene una utilidad práctica limitada para preparar una composición farmacéutica") Sin embargo no se menciona que la formulación descrita a base de hidroxietilalmidón es también eficiente para la estabilización de la neurotoxina de alta pureza.

Una formulación de neurotoxina de alta pureza que contiene HSA se describe en las patentes de EEUU 5,512,547 y 5,756,468. En la primera patente se describe una formulación que contiene HSA así como trehalosa y maltotriosa o sacáridos emparentados. La segunda patente indica una formulación que complementariamente a estos sacáridos contiene también metionina o cisteína. La necesidad de utilizar HSA en una formulación de neurotoxina de alta pureza se describe igualmente en una publicación (Goodenough y col. (1992) Appl. Environm Microbiol 58 3426-3428).

La composición farmacéutica conforme a la invención puede prepararse por ejemplo como sigue: Una disolución del principio activo (p.ej. de una neurotoxina de *Clostridium botulinum*) se diluye con la composición para la estabilización (en forma de una solución acuosa) a una concentración de 1,0 - 1,2 ng/ml (= 200 unidades/ml) y a continuación se esteriliza por filtración. Se envasan respectivos 5 ml de esta dilución en frasquitos, se liofilizan o secan a vacío y se almacenan hasta la utilización terapéutica. Un frasquito contiene por consiguiente un liofilizado o polvo secado a vacío con aproximadamente 100 unidades de la neurotoxina. El liofilizado o polvo para la administración a pacientes se reconstituye con 2 - 8 ml de WFI. La composición descrita para la estabilización conforme a la presente invención garantiza un total reencuentro del principio activo proteico (de la neurotoxina) tras la dilución, esterilización por filtración, envasado y liofilización. El liofilizado es a 37°C estable más de 6 meses.

5

### 10 Ejemplo 1

Debía comprobarse si el uso de la composición para la estabilización conforme a la invención en comparación con un tampón fosfato o una composición de un tampón fosfato y polisorbato hacía posible un mayor reencuentro.

Todos los coadyuvantes (excipientes) utilizados se adquirieron a fabricantes en calidad farmacéutica. La neurotoxina de tipo A de *Clostridium botulinum* puede obtenerse en List Biological Laboratories, Inc. Campell, California, EEUU o se produjo conforme a DasGupta, B.R. (1984) *Toxicon* 3, 415-424.

15

Una solución de neurotoxina de tipo A de *Clostridium botulinum* (168 µg/ml) se diluyó con una composición para la estabilización conforme a la presente invención a una concentración de 0,5 µg/ml. La composición para la estabilización fue 50 mM en lo relativo a ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico y glutamina, contenía 0,05% en peso de polisorbato 20 y presentaba un pH de 7,5.

20

Se realizó otra dilución a 1,2 ng/ml (aprox. 200 DL<sub>50</sub>/ml) con distintas soluciones (véase la Tabla 1). Tras una filtración a través de un filtro de 0,22 µ se envasaron en frasquitos de vidrio (6R, Fa. MÜNnerstätt) respectivos 0,5 ml de estas soluciones diluidas adicionalmente y se almacenaron a 37°C. Los frasquitos se cerraron con un tapón de goma. Tras 15 horas de almacenamiento se determinó la concentración de la neurotoxina en las distintas soluciones mediante un inmunoensayo enzimático (EIA) específico convencional.

25

Tabla 1

Composición	Concentración o contenido	Reencontrado (%)
<b>Solución 1</b>		
Fosfato Na	50 mM	0
<b>Solución 2</b>		
Fosfato Na	50 mM	62,5
Polisorbato 20	0,05% en peso	
<b>Solución 3</b>		
Ácido aspártico	50 mM	111
Asparragina	50 mM	
Ácido glutámico	50 mM	
Glutamina	50 mM	
Polisorbato 20	0,05% en peso	
EDTA	0,5 mM	

La formulación escogida proporcionó un reencuentro total tras una incubación a 37°C.

### Ejemplo 2

Debía comprobarse si una composición farmacéutica conforme a la invención con 200 unidades de neurotoxina de tipo

A/ml (1,2 ng/ml) era estable durante un tiempo prolongado.

5 A partir de una solución madre con 0,5 µg/ml de neurotoxina de tipo A de *Clostridium botulinum* se preparó conforme al Ejemplo 1 una dilución con una concentración de 1,2 ng/ml usando las composiciones indicadas en la Tabla 2. Tras esterilización por filtración se envasaron respectivos 0,5 ml de estas composiciones en frasquitos, que se cerraron con un tapón de goma. Tras 15 horas de almacenamiento a 4°C y a 37°C se determinó la cantidad de neurotoxina de tipo A mediante ELISA.

Tras 8 meses de almacenamiento a 4°C se determinó la actividad biológica en los frasquitos mediante un ensayo ex vivo. A este respecto se determinó la actividad de las composiciones mediante el ensayo de diafragma de ratón (Wohlfahrt K. y col. (1997) Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 355, 225-340).

10 Tabla 2

Composición	Concentración o contenido	15 h		Reencontrado (%) tras 8 meses (4°C)
		4°C	37°C	
Ácido aspártico	50 mM	100	21	100
Aspargina	50 mM			
Ácido glutámico	50 mM			
Glutamina	50 mM			
Polisorbato 80	0,05% en peso			
Ácido aspártico	50 mM	12	0	-
Aspargina	50 mM			
Ácido glutámico	50 mM			
Glutamina	50 mM			

Una solución compuesta por los aminoácidos Asn, Asp, Gln y Glu (respectivamente 50 mM) y polisorbato 80 fue estable a 4°C durante al menos 8 meses.

**Ejemplo 3**

15 Debía comprobarse qué efecto estabilizador ejercían distintas mezclas de los aminoácidos. Las composiciones farmacéuticas se ajustaron nuevamente a una concentración de 1,2 ng/ml de neurotoxina de tipo A de *Clostridium botulinum* (200 unidades/ml) (diluciones realizadas conforme al Ejemplo 1 o con las soluciones indicadas en la Tabla 3) y tras esterilización por filtración a través de un filtro de 0,22 µ se almacenaron a 4°C. Los resultados de una determinación de neurotoxina por inmunoensayo enzimático están representados en la Tabla 3.

20 Tabla 3

Composición	Concentración o contenido	Valor del pH	Reencontrado (%)
Ácido aspártico	50 mM	7,5	65
Aspargina	50 mM		
EDTA	0,5 mM		
Polisorbato 20	0,05% en peso		
Sacarosa	1% en peso		

Composición	Concentración o contenido	Valor del pH	Reencontrado (%)
Ácido glutámico	50 mM	7,5	12
Glutamina	50 mM		
EDTA	0,5 mM		
Polisorbato 20	0,05% en peso		
Sacarosa	1% en peso		
Ácido glutámico	50 mM	7,5	10
EDTA	0,5 mM		
Polisorbato 20	0,05% en peso		
Sacarosa	1% en peso		
Ácido aspártico	50 mM	7,5	106
Asparragina	50 mM		
Ácido glutámico	50 mM		
Glutamina	50 mM		
EDTA	0,5 mM		
Polisorbato 20	0,05% en peso		
Sacarosa	1% en peso		

Una mezcla de todos los cuatro aminoácidos proporcionó un reencuentro total del principio activo.

#### Ejemplo 4

- 5 Debía comprobarse a qué valor del pH proporcionaba la formulación desarrollada el reencuentro máximo. La formulación se preparó a valores del pH de 6,0 a 8,0 a una concentración de 1,2 mg/ml de neurotoxina de tipo A de *Clostridium botulinum* y tras filtración a través de un filtro de 0,22  $\mu$  se almacenaron a 37°C. Los resultados de la determinación de neurotoxina por inmunoensayo los muestra la Tabla 4.

Tabla 4

Composición	Concentración o contenido	Valor del pH	Reencontrado tras		
			2 días	9 días	21 días
Ácido aspártico	50 mM	6,0	100	95	78
Asparragina	50 mM				
Ácido glutámico	50 mM				
Glutamina	50 mM				
EDTA	0,5 mM				
Polisorbato 20	0,05% en peso				
Sacarosa	1% en peso				

Composición	Concentración o contenido	Valor del pH	Reencontrado tras		
			2 días	9 días	21 días
Ácido aspártico	50 mM	6,5	100	92	83
Asparragina	50 mM				
Ácido glutámico	50 mM				
Glutamina	50 mM				
EDTA	0,5 mM				
Polisorbato 20	0,05% en peso				
Sacarosa	1% en peso				
Ácido aspártico	50 mM				
Asparragina	50 mM				
Ácido glutámico	50 mM				
Glutamina	50 mM				
EDTA	0,5 mM				
Polisorbato 20	0,05% en peso				
Sacarosa	1% en peso				
Ácido aspártico	50 mM	7,5	100	61	55
Asparragina	50 mM				
Ácido glutámico	50 mM				
Glutamina	50 mM				
EDTA	0,5 mM				
Polisorbato 20	0,05% en peso				
Sacarosa	1% en peso				
Ácido aspártico	50 mM				
Asparragina	50 mM				
Ácido glutámico	50 mM				
Glutamina	50 mM				
EDTA	0,5 mM				
Polisorbato 20	0,05% en peso				
Sacarosa	1% en peso				

A valores del pH de 6,0 y 6,5 resultaron los mejores reencuentros

#### Ejemplo 5

Debía comprobarse a qué concentración de los 4 aminoácidos ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico y glutamina se consigue el reencuentro máximo. A partir de una dilución a 0,5 µg/ml de neurotoxina de tipo A de

*Clostridium botulinum* se preparó otra dilución a 1,2 µg/ml y tras filtración a través de un filtro de 0,22 µ se envasó en frascos GR en una dosis de 0,5 ml por frasco. Tras cerrarlos con un tapón de goma se almacenaron a 4°C durante 15 h y a continuación se determinó la cantidad de neurotoxina/frasco.

Tabla 5 a

Composición	Concentración o contenido	Valor del pH	Reencontrado (en %)
Ácido aspártico	200 mM	7,5	19
Aspargina	200 mM		
Ácido glutámico	200 mM		
Glutamina	200 mM		
Polisorbato 20	0,01% en peso		
EDTA	0,5 mM		
Sacarosa	5% en peso		
Ácido aspártico	100 mM	7,5	56
Aspargina	100 mM		
Ácido glutámico	100 mM		
Glutamina	100 mM		
Polisorbato 20	0,01% en peso		
EDTA	0,5 mM		
Sacarosa	5% en peso		
Ácido aspártico	50 mM	7,5	93
Aspargina	50 mM		
Ácido glutámico	50 mM		
Glutamina	50 mM		
Polisorbato 20	0,01% en peso		
EDTA	0,5 mM		
Sacarosa	5% en peso		

5

Tabla 5 b

Composición	Concentración o contenido	Valor del pH	Reencontrado (%)
Ácido aspártico	50 mM	6,5	79
Aspargina	50 mM		
Ácido glutámico	50 mM		
Glutamina	50 mM		
EDTA	0,5 mM		
Polisorbato 20	0,2% en peso		
Sacarosa	5% en peso		

Composición	Concentración o contenido	Valor del pH	Reencontrado (%)
Ácido aspártico	50 mM	6,5	86
Asparragina	50 mM		
Ácido glutámico	50 mM		
Glutamina	50 mM		
EDTA	0,5 mM		
Polisorbato 20	0,2% en peso		
Sacarosa	5% en peso		
Ácido aspártico	20 mM	6,5	0
Asparragina	20 mM		
Ácido glutámico	20 mM		
Glutamina	20 mM		
EDTA	0,5 mM		
Polisorbato 20	6,2% en peso		
Sacarosa	5% en peso		
Ácido aspártico	10 mM	6,5	0
Asparragina	10 mM		
Ácido glutámico	10 mM		
Glutamina	10 mM		
EDTA	0,5 mM		
Polisorbato 20	0,2% en peso		
Sacarosa	5% en peso		

Para la formulación líquida resultó una concentración de los aminoácidos de 50 mM como eficiente para el reencuentro del principio activo.

#### Ejemplo 6

- 5 Se investigó qué composición de aminoácidos proporcionaba el reencuentro máximo tras una liofilización, no utilizándose en esta preparación nada de EDTA. La solución envasada (0,5 ml) se liofilizó y se almacenó durante la noche a 4°C. Los liofilizados se reconstituyeron en 0,5 ml de agua para inyectables. La concentración de neurotoxina se determinó mediante inmunoensayo enzimático.

Tabla 6

Composición	Concentración o contenido	Valor del pH	Reencontrado (%) en el liofilizado
Ácido aspártico	100 mM	6,5	0
Asparragina	100 mM		
Sacarosa	5% en peso		
Polisorbato 80	0,2% en peso		

Ácido aspártico	50 mM		
Asparragina	50 mM	6,5	20
Sacarosa	5% en peso		
Polisorbato 80	0,2% en peso		
Ácido aspártico	100 mM		
Ácido glutámico	100 mM	6,5	9,3
Asparragina	100 mM		
Sacarosa	5% en peso		
Polisorbato 80	0,2% en peso		
Ácido aspártico	50 mM		
Ácido glutámico	50 mM	6,5	56
Asparragina	50 mM		
Sacarosa	5% en peso		
Polisorbato 80	0,2% en peso		
Ácido aspártico	100 mM		
Ácido glutámico	100 mM	6,5	20
Sacarosa	5% en peso		
Polisorbato 80	0,2% en peso		
Ácido aspártico	50 mM		
Asparragina	50 mM	6,5	87
Ácido glutámico	50 mM		
Glutamina	50 mM		
Sacarosa	5% en peso		
Polisorbato 80	0,2% en peso		

El reencuentro máximo del principio activo en los liofilizados se produjo cuando estuvieron presentes en la composición todos los 4 aminoácidos y esto en una concentración de 50 mM.

#### Ejemplo 7

- 5 A partir de una dilución previa de la neurotoxina de tipo A de *Clostridium botulinum* en una disolución que era respectivamente 50 mM en ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico y glutamina y 0,5 mM en EDTA, y que además presentaba 0,2% en peso de polisorbato 80 y 5% en peso de sacarosa así como un pH de 6,5, se preparó una dilución final de 1,26 ng de neurotoxina de tipo A/ml (200 U/ml) en una disolución con la misma composición y se filtró a través de un filtro de membrana de 0,22 µ. De esta se pipetearon respectivos 0,5 ml a frascos de vidrio 6R y a continuación se liofilizaron. El liofilizado se disolvió en WFI. El contenido de principio activo (neurotoxina de tipo A) se determinó por inmunoensayo enzimático. Se determinó 96% en peso del principio activo. Para la comprobación de la actividad biológica del principio activo reencuentrado se disolvió el liofilizado y se ensayó en diafragma. El liofilizado de un frasco contenía 110 unidades (correspondiente a 110% de reencuentro).
- 10

**Ejemplo 8**

Análogamente al Ejemplo 7 se prepararon liofilizados y a continuación se almacenaron a 37°C. Tras 3 meses se determinó el contenido de principio activo por inmunoensayo. Se determinó 94% en peso del principio activo utilizado. La comprobación de la actividad/frasquito en el ensayo biológico (ensayo en diafragma) proporcionó un contenido de 102 unidades/frasquito.

**Ejemplo 9**

A partir de una dilución previa de interferón beta en una disolución (que para una preparación era sin y para otra preparación 0,5 mM en EDTA) que era respectivamente 50 mM en ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico y glutamina y que presentaba además 0,2% en peso de polisorbato 80 y 5% en peso de sacarosa así como un pH de 7,0, se prepararon diluciones finales con 20 µg/ml (4 unidades internacionales de Mio/ml) en disoluciones preparadas con composición correspondiente y se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,22 µ. De los filtrados se pipetearon sendos 1 ml a frasquitos de vidrio 6R y a continuación se liofilizaron. Los liofilizados se disolvieron en WFI. El contenido de principio activo (interferón beta) se determinó por inmunoensayo enzimático. Se determinaron 18,8 (sin EDTA) y 19,6 µg (EDTA 0,5 mM) del principio activo respectivamente. Para la comprobación de la actividad biológica del principio activo reencontrado se disolvió el liofilizado y se determinó la actividad por bioensayo convencional (inhibición del efecto citopático en células VERO en comparación con el patrón de referencia). Se reencontraron 94 y 95% en peso respectivamente de la actividad biológica utilizada.

**Ejemplo 10**

A partir de una dilución previa de factor de coagulación sanguínea VIII en una disolución que era respectivamente 50 mM en ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico y glutamina y 0,5 mM en EDTA, y que presentaba además 0,2% en peso de polisorbato y 5% en peso de sacarosa así como un pH de 7,3, se preparó una dilución final con 250 unidades internacionales/ml en una disolución con la misma composición y se filtró a través de un filtro de membrana de 0,22 µ. En una preparación se utilizó polisorbato 20, en otra polisorbato 80. De los filtrados obtenidos se pipetearon sendos 1 ml a frasquitos de vidrio 6R y a continuación se liofilizaron. Los liofilizados se disolvieron en WFI. El contenido de principio activo (factor de coagulación sanguínea VIII) se determinó por ensayo de coagulación convencional. Se determinaron 238 (P 20) y 245 (P 80) unidades internacionales por frasquito respectivamente.

**Ejemplo 11**

A partir de una dilución previa de factor de estreptocinasa en una disolución que era respectivamente 50 mM en ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico y glutamina y 0,5 mM en EDTA, y que presentaba además 0,2% en peso de polisorbato y 2,5, 5 ó 7,5% en peso de sacarosa así como un pH de 7,0, se preparó una dilución final con 250.000 unidades internacionales/ml en disoluciones con composición correspondiente y se filtró a través de un filtro de membrana de 0,22 µ. De los filtrados se pipetearon sendos 1 ml a frasquitos de vidrio 6R y a continuación se liofilizaron. Los liofilizados se disolvieron en WFI. El contenido de principio activo (estreptocinasa) se determinó por el ensayo de fibrinólisis convencional. Se determinaron 236.500, 247.000 y 242.500 unidades internacionales por frasquito respectivamente.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición para la estabilización de principios activos proteicos en medicamentos que está exenta de seroalbúmina humana, que comprende los dos componentes siguientes:
  - a) una sustancia tensioactiva, preferiblemente un detergente (tensioactivo) no iónico,
  - 5 y
  - b) una mezcla de al menos dos aminoácidos, en la que los al menos dos aminoácidos son Glu y Gln o Asp y Asn.
2. La composición conforme a la reivindicación 1, que además comprende al menos uno de los siguientes componentes:
  - 10 c) un disacárido, preferiblemente sucrosa (sacarosa, azúcar de caña), trehalosa o lactosa,
  - d) ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), preferiblemente en forma de una de sus sales, como del EDTA-Na<sub>4</sub>.
3. La composición conforme a la reivindicación 1 ó 2, que comprende los componentes a), b) y c), los componentes a), b) y d) o los componentes a), b), c) y d).
- 15 4. La composición conforme a una de las reivindicaciones precedentes, composición que es soluble en medios acuosos o está presente como solución acuosa.
5. Composición farmacéutica que comprende un principio activo proteico y la composición para la estabilización conforme a una de las reivindicaciones precedentes.
6. La composición farmacéutica conforme a la reivindicación 5, composición farmacéutica que está presente como polvo liofilizado o secado al vacío que es soluble en medios acuosos.
- 20 7. La composición farmacéutica conforme a la reivindicación 5 ó 6, en la que el principio activo proteico es un factor de coagulación como el factor VIII (la globulina antihemofílica), una citocina como un interferón, en especial como interferón alfa, beta o gamma, una enzima como una urocinasa o estreptocinasa, un activador del plasminógeno o una neurotoxina de alta pureza o un complejo de neurotoxina de *Clostridium botulinum* de los tipos A o B.
- 25 8. La composición para la estabilización conforme a una de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición farmacéutica conforme a una de las reivindicaciones 5 a 7, en la que los al menos dos aminoácidos son (i) ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico; ácido aspártico, asparragina, glutamina; ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina; asparragina, ácido glutámico, glutamina; o ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico y glutamina.
9. La composición conforme a la reivindicación 8, en la que las concentraciones de los distintos aminoácidos son respectivamente de 20 a 200 mM, mejor de 20 a 100 mM, en especial de 50 mM.
- 30 10. La composición conforme a la reivindicación 8 ó 9, en la que la sustancia tensioactiva es un detergente no iónico.
11. La composición conforme a una de las reivindicaciones 8 a 10, en la que el detergente no iónico es un polisorbato como polisorbato 20 o polisorbato 80 o un poloxámero como poloxámero 184 o 188.
12. La composición conforme a una de las reivindicaciones 8 a 11, en la que el disacárido es sacarosa, trehalosa o lactosa.
- 35 13. La composición conforme a una de las reivindicaciones 8 a 12, en la que el valor del pH de la composición en disolución se encuentra en 5,0 a 8,5, en especial en 6,0 a 8,0, en especial en 6,0 a 7,0 ó 6,5.