

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 798**

51 Int. Cl.:
A61K 47/42 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08765945 .4**
96 Fecha de presentación: **28.05.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2170400**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2010**

54 Título: **Composición líquida farmacéutica de toxina botulínica con estabilidad mejorada**

30 Prioridad:
10.07.2007 KR 20070069363

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2012

73 Titular/es:
MEDY-TOX, INC. (100.0%)
641-4 Kak-ri Ochang-eup Cheongwon-gun
Chungcheongbuk-do 363-883, KR

72 Inventor/es:
JUNG, HYUN HO;
YANG, GI HYEOK;
KIM, HACK WOO;
WOO, HEE DONG y
RHEE, CHANG HOON

74 Agente/Representante:
PONTI SALES, Adelaida

ES 2 391 798 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

Composición líquida farmacéutica de toxina botulínica con estabilidad mejorada

5 **Campo técnico**

[0001] La presente invención se refiere, en general, a una composición farmacéutica de toxina botulínica líquida más estable y más particularmente a una composición farmacéutica líquida que comprende una toxina botulínica en combinación con polisorbato 20 y metionina y opcionalmente isoleucina.

10

Técnica anterior

[0002] La toxina botulínica es una proteína de neurotoxina producida por la bacteria *Clostridium botulinum*. Esta toxina bloquea la liberación presináptica de la acetilcolina en la unión neuromuscular, causando parálisis flácida (floja) de músculos en mamíferos. La toxina ha demostrado ser eficaz para tratar estrabismo, blefaroespasmio idiopático y espasmo hemifacial. Además, recientemente se ha encontrado que proporciona alivio para varias alteraciones motoras de músculos involuntarios que incluyen tortícolis espasmódica, distonía oromandibular y disfonía espasmódica. Además, la toxina botulínica recibió la aprobación de la FDA para la mejora temporal en el aspecto facial de líneas de expresión de moderadas a graves y para el tratamiento no quirúrgico de hiperhidrosis (sudoración excesiva de las axilas).

[0003] Las proteínas de la toxina botulínica serotipo A y B se han formulado ahora en formas de dosificación para su uso en aplicaciones médicas tales como el tratamiento de tortícolis, blefaroespasmio, hiperhidrosis, etc., además de en aplicaciones cosméticas tales como la reducción de arrugas. Sin embargo, los fármacos de proteínas que incluyen proteínas de la toxina botulínica tienen muchos problemas durante la preparación de los mismos. Los problemas, la mayoría de los cuales se atribuyen a la inestabilidad de las proteínas, son particularmente pronunciados para los fármacos de proteínas que se formulan con muy bajas concentraciones de proteínas activas, tales como toxinas botulínicas.

[0004] Adhiriendo las mismas sobre superficies sólidas, las proteínas de la toxina botulínica, cuando se encierran en recipientes, son aptas para adherirse a las paredes internas de los recipientes, produciendo una pérdida del principio activo. También se requiere un agente estabilizante para prevenir que las proteínas se oxiden o degraden en fragmentos.

[0005] La albúmina se selecciona en la mayoría de los casos para su uso como un estabilizador en la formulación de toxina botulínica. Además de estabilizar los componentes de proteína activa en composiciones farmacéuticas, la albúmina disfruta de la ventaja de que muestra inmunogenicidad insignificativa, incluso cuando se inyecta en el cuerpo. Sin embargo, los productos de suero tales como la albúmina no están completamente libres de la posibilidad de contaminarse con patógenos o microorganismos y, por tanto, actúan de mediadores de la enfermedad, particularmente enfermedades víricas o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

[0006] Frecuentemente se emplea gelatina en lugar de albúmina. Sin embargo, se recomienda no usar la gelatina como un estabilizador para la formulación de fármacos debido a que esta proteína, similarmente a la albúmina, también se obtiene de animales y puede mediar en enfermedades.

45

[0007] La patente coreana N° 10-0799400 proporciona un estabilizador derivado de fuentes no animales para la formulación farmacéutica de toxina botulínica en el que la albúmina de suero recombinante (rSA), producida en levadura, se aplica a la formulación farmacéutica. Sin embargo, no puede evitarse por completo la posibilidad de que un neoepítipo, una nueva estructura antigénica, pueda generarse en el transcurso de la producción, aislamiento y recuperación de la albúmina de suero recombinante (rSA), provocando una respuesta inmunitaria al receptor del fármaco. La patente coreana N° 10-0665469 desvela una composición farmacéutica que comprende una toxina botulínica, polisacáridos (incluyendo hidroxietilalmidón) y un aminoácido tal como lisina, glicina, histidina o arginina. Esta composición farmacéutica se proporciona en una forma de dosificación preparada por liofilización y desafortunadamente debe almacenarse a baja temperatura en un refrigerador o congelador. El requisito para que la toxina botulínica liofilizada se descongele o diluya justo antes de uso puede producir un error en la proteína. Además de ser inconveniente para su uso, las toxinas botulínicas liofilizadas son difíciles de desarrollar en un tipo de administración de jeringuilla precargada.

[0008] La publicación de patente de EE.UU. N° 2007-0134199 sugiere una composición para la estabilización de agentes de proteínas en productos farmacéuticos. La composición comprende un detergente no iónico, preferentemente polisorbato, y una combinación de tanto glutamina o ácido glutámico como asparagina y ácido aspártico. Se observó que una dilución de toxina botulínica en la composición líquida era estable durante 8 meses cuando se almacenó a 4°C. Sin embargo, debido a que el almacenamiento a 37°C disminuyó la actividad de la dilución en el plazo de un mes, la composición tiene uso limitado para la estabilización de agentes de proteínas, tales como toxina botulínica, en productos farmacéuticos que van a almacenarse a temperatura ambiente. En opinión de los presentes inventores, esta deficiencia se atribuyó a la presencia de los aminoácidos polares y

65

particularmente a los aminoácidos ácidos tales como ácido glutámico o ácido aspártico.

Descripción de la invención

5 Problema técnico

[0009] Por consiguiente, la presente invención se ha realizado teniendo en cuenta los problemas anteriores que se producen en la técnica anterior, y un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que pueda mantener la actividad de la toxina botulínica incluso después de almacenarse durante un largo periodo de tiempo a temperatura ambiente, además de a una temperatura refrigerada, y esté en una forma líquida más conveniente para su uso que una forma liofilizada.

[0010] Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica líquida en la que la actividad de la toxina botulínica pueda mantenerse estable en condiciones de refrigeración o a altas temperaturas sin usar ni proteína derivada de animal, tal como albúmina o gelatina, como un estabilizador para toxina botulínica, ni aminoácidos polares o ácidos tales como glutamina, ácido glutámico, asparagina o ácido aspártico.

Solución técnica

[0011] Conduciendo a la presente invención, la investigación intensiva y rigurosa realizada por los presentes inventores con muchos detergentes y aminoácidos en la preservación estable de toxina botulínica bajo condiciones de altas temperaturas produjo el hallazgo de que una combinación de polisorbato 20 y metionina y opcionalmente isoleucina puede mejorar enormemente la estabilidad de la toxina botulínica a temperatura ambiente o superior.

[0012] Según la presente invención se proporciona una composición farmacéutica líquida que comprende toxina botulínica, polisorbato 20 y metionina, en la que el polisorbato 20 está presente en una cantidad de 0,01 a 50 mg por 100 unidades de toxina botulínica y en la que la metionina está presente en una cantidad de 0,5 a 100 μ moles por 100 unidades de toxina botulínica. La composición puede comprender adicionalmente isoleucina.

[0013] En la composición farmacéutica líquida, la metionina está presente en una cantidad de 0,5 a 100 μ moles por 100 unidades de toxina botulínica, y preferentemente oscila en una concentración de 0,5 a 100 mM y más preferentemente de 25 a 75 mM.

[0014] En la composición farmacéutica líquida según la presente invención, el polisorbato 20 está presente en una cantidad de 0,01 a 50 mg por 100 unidades de toxina botulínica y preferentemente oscila en concentración de 0,01 a 50 mg/ml y más preferentemente de 0,1 a 2,5 mg/ml.

[0015] En la composición farmacéutica líquida según la presente invención, la toxina botulínica se selecciona de un grupo que consiste en los serotipos A, B, C, D, E, F y G de la toxina botulínica y puede estar en una forma no compleja o en una forma compleja con una proteína. Preferentemente, la toxina botulínica oscila en concentración de 50 a 5.000 unidades/ml.

[0016] La composición farmacéutica líquida según la presente invención oscila preferentemente en pH de 5,5 a 7,0.

Efectos ventajosos

[0017] Empleando como estabilizadores de la toxina botulínica, en lugar de la proteína derivada de animal albúmina o gelatina, una combinación de polisorbato 20 y metionina, opcionalmente con isoleucina, la composición farmacéutica líquida según la presente invención elimina el riesgo de contaminar el cuerpo con patógenos o microorganismos derivados del suero y puede administrarse con seguridad.

[0018] Además, la composición farmacéutica líquida de la presente invención puede ser conveniente para su uso como una inyección directa para pacientes. Además, además de a temperaturas refrigeradas, en términos de la estabilidad durante el almacenamiento de la toxina botulínica a 25 ~ 37°C, la composición farmacéutica líquida de la presente invención es muy útil para guardar toxina botulínica bajo condiciones de emergencia tal como un entorno sin mantenimiento a baja temperatura, siendo superior a las composiciones farmacéuticas líquidas convencionales que emplean tanto detergentes como aminoácidos.

[0019] La composición farmacéutica líquida de la presente invención puede prepararse fácilmente debido a que emplea un detergente y aminoácido(s) sin un proceso de liofilización.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

[0020] Según la presente invención se proporciona una composición farmacéutica líquida con mejora en la estabilidad de la botulina. Particularmente, la composición farmacéutica líquida comprende una toxina botulínica,

polisorbato 20 y metionina y opcionalmente isoleucina.

[0021] La composición farmacéutica líquida que comprende una toxina botulínica, polisorbato 20 y metionina, o alternativamente, una toxina botulínica, polisorbato 20, metionina e isoleucina según la presente invención se ha mejorado mucho en la estabilidad de la toxina botulínica.

[0022] Con el empleo de polisorbato 20, metionina y opcionalmente isoleucina, en lugar de una proteína derivada de animal como la albúmina o la gelatina como estabilizadores para la toxina botulínica, la composición farmacéutica líquida de la presente invención excluye el posible riesgo de infectar al receptor con patógenos o microorganismos derivados del suero y, por tanto, es segura para la ingestión en el cuerpo. Además, el uso de los estabilizadores polisorbato 20, metionina y opcionalmente isoleucina en combinación garantiza una mayor estabilidad para la toxina botulínica a 25 ~ 27°C que su uso de una manera separada.

[0023] La toxina botulínica, un constituyente de la composición farmacéutica líquida según la presente invención, puede ser una seleccionada de entre los serotipos A, B, C, D, E, F y G. El término toxina botulínica es un término genérico que engloba la familia de toxinas producidas por la bacteria anaerobia *Clostridium botulinum* y, hasta la fecha, se han identificado siete serotipos de neurotoxinas inmunológicamente distintos. A éstos se les han dado las designaciones A, B, C, D, E, F y G, que se diferencian entre sí por sus efectos sobre animales diana, y el grado de parálisis y la duración. Se sabe que todos los serotipos de la toxina botulínica actúan de neurotoxina inhibiendo el neurotransmisor acetilcolina en las uniones neuromusculares.

[0024] La toxina botulínica de la composición farmacéutica líquida según la presente invención puede estar en una forma no compleja o en una forma compleja con otra proteína. La toxina botulínica serotipo A, B, C, D, E, F o G sola, sintetizada por *Clostridium botulinum*, tiene por sí misma un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. Cuando se expresa en *Clostridium botulinum*, la toxina botulínica forma diversos complejos con proteínas de hemaglutinina y proteínas de no hemaglutinina que ayudan y protegen la actividad de la misma. Los complejos de tipo A de botulina que se producen naturalmente tienen un peso molecular de aproximadamente 900 kDa, 500 kDa o 300 kDa. Se mide que los pesos moleculares son aproximadamente 500 kDa para complejos de tipo B y complejos de tipo C de toxina botulínica, aproximadamente 300 kDa o 500 kDa para complejos de tipo D y aproximadamente 300 kDa para complejos de tipo E y tipo F.

[0025] Aunque no está gravemente limitada, la concentración de la toxina botulínica en la composición farmacéutica líquida de la presente invención oscila preferentemente de 50 a 5.000 unidades/ml dependiendo del uso general de la misma.

[0026] La metionina está presente en una cantidad de 0,5 a 100 µmoles por 100 unidades de toxina botulínica y preferentemente oscila en concentración de 0,5 a 100 mM y más preferentemente de 25 a 75 mM en la composición farmacéutica líquida de la presente invención.

[0027] Una unidad (U) de toxina botulínica se define como la DL₅₀ tras la inyección intraperitoneal en ratones Swiss Webster hembra que pesan 18 ~ 20 gramos cada uno. La DL₅₀ de toxina botulínica en ratones se corresponde con aproximadamente 50 picogramos.

[0028] Un contenido de metionina inferior a 0,5 µmoles por 100 unidades de toxina botulínica no puede garantizar la estabilización de la toxina botulínica a un nivel deseable tras el almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. Por otra parte, si la metionina se usa en una cantidad que supera 100 µmoles por 100 unidades de toxina botulínica, el incremento en exceso puede no prometer un efecto de estabilización adicional, además de incurrir en una desventaja económica. En la composición farmacéutica líquida de la presente invención, la metionina oscila adecuadamente en la concentración de 0,5 a 100 mM cuando la toxina botulínica tiene una concentración de 100 unidades/ml. Su concentración apropiada se ajusta a 25 ~ 75 mM en consideración del intervalo de concentración de polisorbato 20. Si la concentración de metionina es inferior a 25 mM en la composición farmacéutica líquida de la presente invención, su efecto de estabilización a largo plazo sobre la toxina botulínica a temperatura ambiente no alcanza el nivel deseable, que puede obtenerse en el intervalo de concentración apropiado de toxina botulínica. Por otra parte, una concentración de metionina que supera los 75 mM no proporciona ningún efecto adicional.

[0029] En la composición farmacéutica líquida de la presente invención, el polisorbato 20 está presente en una cantidad de 0,01 a 50 mg por 100 unidades de toxina botulínica y preferentemente oscila en concentración de 0,01 a 50 mg/ml y más preferentemente de 0,1 a 2,5 mg/ml.

[0030] Los polisorbatos son una clase de emulsionantes usados en algunos productos farmacéuticos y en la preparación de alimentos. Se usan frecuentemente en cosméticos para disolver aceites esenciales en productos basados en agua (aceite en agua). Hay muchos tipos de polisorbatos que se clasifican por un número que se refiere al número total de grupos oxietileno tales como polisorbato 20, 40, 60 y 80. La composición farmacéutica líquida de la presente invención emplea polisorbato 20 (comercialmente disponible como el nombre de marca Tween 20) como un estabilizador para toxina botulínica.

[0031] Si la composición farmacéutica líquida de la presente invención contiene polisorbato 20 en una cantidad inferior a 0,01 mg por 100 unidades de toxina botulínica, su efecto de estabilización a largo plazo sobre la toxina botulínica a temperatura ambiente no alcanza un nivel deseable. Por otra parte, una concentración de polisorbato 20 que supera 50 mg/ml no proporciona ningún efecto adicional, además de incurrir en una desventaja económica. A una concentración de 100 unidades/ml de toxina botulínica en la composición farmacéutica líquida de la presente invención, el polisorbato 20 está apropiadamente presente en una cantidad de 0,01~50 mg/ml y preferentemente en una cantidad de 0,1~2,5 mg/ml cuando se tiene en cuenta la concentración de metionina. Si la concentración de polisorbato 20 en la composición farmacéutica líquida de la presente invención es inferior a 0,1 mg/ml, su efecto de estabilización a largo plazo sobre la toxina botulínica a temperatura ambiente no alcanza un nivel deseado, que puede obtenerse por la concentración diana de polisorbato 20. Por otra parte, una concentración de polisorbato 20 que supera los 2,5 mg/ml no proporciona ningún efecto adicional.

[0032] Según la presente invención, la composición farmacéutica líquida tiene un pH de 5,5 - 7,0. En la composición farmacéutica líquida de la presente invención ajustada a un pH de 5,5 ~ 7,0, la toxina botulínica se mantiene estable a temperatura ambiente (particularmente 40°C) durante un largo periodo de tiempo.

Modo para la invención

[0033] Un mejor entendimiento de la presente invención puede obtenerse mediante los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero que no deben interpretarse como el límite de la presente invención.

[0034] 1. Procedimiento experimental

[0035] (1) Preparación de composición de toxina botulínica líquida

[0036] Una toxina botulínica se diluyó a una concentración final de 100 unidades/ml en una disolución estabilizante.

[0037] (2) Ensayo de estabilidad de la toxina botulínica

[0038] Mientras que la composición de toxina botulínica líquida preparada se almacenó a una cierta temperatura, se tomaron muestras de 1 ml de la misma a intervalos predeterminados. 1 ml de la composición líquida muestreada se diluyó 10 veces usando 9 ml de una disolución para inyección. La muestra diluida se inyectó intraperitonealmente en cinco ratones ICR hembra (Instituto de investigación del cáncer, EE.UU.) (a una dosis de 0,3 ml por ratón, es decir, 3 unidades/ratón). Mientras que los ratones se observaron 3 días después de la inyección intraperitoneal, se analizaron el número de muertes y la tasa de mortalidad. La composición de toxina botulínica líquida se evaluó por mantenimiento de la actividad de la toxina botulínica cuando la tasa de mortalidad fue del 50% o superior.

[0039] 2. Selección del estabilizador de la toxina botulínica

[0040] Se prepararon composiciones de toxina botulínica líquida que contenían diversos candidatos de estabilizador de la toxina botulínica y se analizaron para la estabilidad de la toxina botulínica con el tiempo durante el almacenamiento a 25°C o 37°C. Los resultados de los experimentos de estabilidad a 25°C y 37°C se resumen en las Tablas 1 y 2, respectivamente. En las Tablas 1 y 2, HSA representa albúmina de suero humano y PEG8000 representa polietilenglicol 8000.

[0041] A 25°C, como se observa en la Tabla 1, la actividad de la toxina botulínica se mantuvo durante un largo periodo de tiempo en una composición líquida que comprendía L-metionina (20 mM) + polisorbato 20 (2 mg/ml) + toxina botulínica (100 unidades/ml), HSA (5 mg/ml) + polisorbato 20 (2 mg/ml) + toxina botulínica (100 unidades/ml), L-isoleucina (50 mM) + polisorbato 20 (2 mg/ml) + toxina botulínica (100 unidades/ml), un hidroxietilalmidón (10 mg/ml) + polisorbato 20 (2 mg/ml) + toxina botulínica (100 unidades/ml). A 37°C se descubrió que la composición líquida que comprendía L-metionina (20 mM) + polisorbato 20 (2 mg/ml) + toxina botulínica (100 unidades/ml) o HSA (5 mg/ml) + polisorbato 20 (2 mg/ml) + toxina botulínica (100 unidades/ml) mantenía la actividad de la toxina botulínica durante un largo periodo de tiempo tal y como se observa en la Tabla 2.

[0042] De los resultados se reconoce que una combinación de metionina y polisorbato 20 actúa como estabilizador sustituible para una combinación de HAS y polisorbato 20 o una combinación de hidroxietilalmidón y polisorbato 20. Por tanto, una combinación de isoleucina y polisorbato 20 emergió como candidato de estabilizador sustituible por estabilizadores convencionales.

[0043]

TABLA 1

Ej. n°	Composición de toxina botulínica			Tasa de mortalidad (%)				
	Estabilizador (conc.)	Polisor 20 (mg/ml)	Toxina b. (unidades/ml)	Día 0	Día 6	Día 14	Día 23	Día 35
1	L-Met (20mM)	2,0	100	100	100	100	100	100
C.1	-	2,0	100	100	0	-	-	-
C.2	HAS (5 mg/ml)	-	100	100	100	0	-	-
C.3	HAS (5 mg/ml)	2,0	100	100	100	100	100	100
C.4	L-Arg (50 mM)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.5	L-Ile (50 mM)	2,0	100	100	80	100	60	80
C.6	L-Glu (50 mM)	2,0	100	100	100	0	-	-
C.7	His (10 mM)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.8	Glu (8 mg/ml)	2,0	100	100	100	60	0	-
C.9	Gly (2 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.10	Glm de Na (10 mM)	2,0	100	100	100	0	-	-
C.11	Hidroxiethylalmidón (10 mg/ml)	2,0	100	100	100	80	80	60
C.12	Manitol (50 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.13	Sorbitol (50 mg/ml)	2,0	100	100	60	0	-	-
C.14	Glucosa C8 (50 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.15	Trehalosa C8 (50 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.16	Sacarosa (50 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.17	Lactosa (50 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.18	PEG8000 (100 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.19	Ácido hialurónico (10 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-

5 [0044]

TABLA 2

Ej. n°	Composición de toxina botulínica			Tasa de mortalidad (%)				
	Estabilizador (conc.)	Polisor 20 (mg/ml)	Toxina b. (unidades/ml)	Día 0	Día 6	Día 14	Día 23	Día 35
1	L-Met (20 mM)	2,0	100	100	100	100	100	100
C.1	-	2,0	100	100	0	-	-	-
C.2	HAS(5 mg/ml)	-	100	100	100	0	-	-
C.3	HAS (5 mg/ml)	2,0	100	100	100	80	100	100
C.4	L-Arg(50 mM)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.5	L-Ile (50 mM)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.6	L-Glu (50 mM)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.7	His (10 mM)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.8	Glu (8 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.9	Gly (2 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.10	Glm de Na (10 mM)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.11	Hidroxiethylalmidón (10 mg/ml)	2,0	100	100	100	0	-	-
C.12	Manitol (50 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.13	Sorbitol (50 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.14	Glucosa C8 (50 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.15	Trehalosa C8 (50 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.16	Sacarosa (50 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.17	Lactosa (50 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.18	PEG8000 (100 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-
C.19	Ácido hialurónico (10 mg/ml)	2,0	100	100	0	-	-	-

[0045] 3. Estabilidad de la toxina botulínica a diversas concentraciones de metionina

- 10 [0046] Las composiciones de toxina botulínica líquidas que comprenden diversas concentraciones de metionina en combinación con polisorbato 20 como estabilizadores de la toxina botulínica se ensayaron para la capacidad de mantener la actividad de la toxina botulínica bajo una condición de almacenamiento de 37°C. Los resultados experimentales de la estabilidad de la toxina botulínica de acuerdo con un cambio en la concentración de metionina se resumen en la Tabla 3, a continuación.

[0047]

TABLA 3

Ej. nº	Composición de toxina botulínica			Tasa de mortalidad (%)							
	Met (mM)	Polisor 20 (mg/ml)	Toxina b. (unidades/ml)	Día							
				4	10	18	24	29	44	56	70
2	0,5	2,0	100	100	100	100	100	100	100	60	0
3	1,0	2,0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	20	2,0	100	100	100	100	100	100	100	100	0
5	50	2,0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	100	2,0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C.20	-	2,0	100	0	-	-	-	-	-	-	-

5 [0048] Como se observa en la Tabla 3, la actividad de la toxina botulínica se mantuvo estable durante 56 días a una concentración de metionina de 0,5~20 mM y durante 70 días a una concentración de metionina de 50~100 mM. La composición empleando tanto metionina como polisorbato 20 mejoró enormemente la estabilidad de la toxina botulínica en comparación con la composición empleando solo polisorbato 20.

10 [0049] 4. Estabilidad de la toxina botulínica a diversas concentraciones de polisorbato 20

[0050] Las composiciones de toxina botulínica líquidas que comprenden metionina en combinación con diversas concentraciones de polisorbato 20 como estabilizadores de la toxina botulínica se ensayaron para la capacidad de mantener la actividad de la toxina botulínica bajo una condición de almacenamiento de 37°C. Los resultados experimentales de la estabilidad de la toxina botulínica de acuerdo con un cambio en la concentración de polisorbato se resumen en la Tabla 4, a continuación.

[0051]

TABLA 4

Ej. nº	Composición de toxina botulínica			Tasa de mortalidad (%)					
	Met (mM)	Polisor 20 (mg/ml)	Toxina b. (unidades/ml)	Día					
				30	60	90	120	167	202
7	20	0,01	100	100	100	100	100	80	0
8	20	0,5	100	100	80	100	100	80	100
9	20	2,0	100	100	100	80	100	80	100
10	20	10	100	100	100	80	100	40	0
11	20	50	100	100	0	-	-	-	-
C.21	1	-	100	0	-	-	-	-	-
C.22	5	-	100	0	-	-	-	-	-
C.23	10	-	100	0	-	-	-	-	-
C.24	20	-	100	0	-	-	-	-	-

20 [0052] Como se observa en la Tabla 4, la actividad de la toxina botulínica se mantuvo estable durante 202 días a una concentración de polisorbato 20 de 0,5~2,0 mg/ml, durante 167 días a una concentración de polisorbato 20 de 0,01 mg/ml y durante 120 días a una concentración de polisorbato 20 de 10 mg/ml. La composición empleando tanto metionina como polisorbato 20 mejoró enormemente en la estabilidad de la toxina botulínica en comparación con la composición empleando solo metionina.

25

[0053] 5. Estabilidad de la toxina botulínica a diversas concentraciones de metionina y polisorbato 20

[0054] Las composiciones de toxina botulínica líquidas que comprenden diversas concentraciones de una combinación de metionina y polisorbato 20 como estabilizadores de la toxina botulínica se ensayaron para su capacidad para mantener la actividad de la toxina botulínica bajo una condición de almacenamiento de 37°C. Los resultados experimentales (tasa de mortalidad, %) de la estabilidad de la toxina botulínica después del almacenamiento durante 30 y 60 días a diversas concentraciones de metionina y polisorbato 20 (Ejemplo 12) se resumen en las Tablas 5 y 6, respectivamente. En las composiciones de toxina botulínica líquida usadas en los experimentos, la toxina botulínica tuvo una concentración de 100 unidades/ml.

35

[0055] El análisis estadístico de los datos de las Tablas 5 y 6 sugiere que una combinación de 25~75 mM de metionina y 0,1~2,5 mg/ml de polisorbato 20 estabilizan la toxina botulínica a la mayor eficiencia.

[0056]

TABLA 5

Conc. de polisorbato 20/Met		Met (mM)						
		1	5	10	25	50	75	100
Polisorbato 20 (mg/ml)	0,1	100	100	80	100	100	100	100
	0,5	100	100	80	100	100	100	100
	2,5	100	100	100	100	100	100	100
	10	100	100	100	100	100	100	100
	25	100	100	100	100	100	100	100
	50	80	100	100	80	80	100	100

[0057]

5

TABLA 6

Conc. de polisorbato 20/Met		Met (mM)						
		1	5	10	25	50	75	100
Polisorbato 20 (mg/ml)	0,1	100	100	80	100	100	80	100
	0,5	100	100	80	100	100	100	100
	2,5	100	100	100	80	100	100	100
	10	0	40	0	100	100	100	40
	25	0	80	80	100	-	100	60
	50	0	0	0	0	80	-	0

[0058]

6. Estabilidad de la toxina botulínica en composiciones de toxina botulínica líquidas con diversos pH

[0059]

Diversas composiciones de toxina botulínica líquidas (Ejemplo 13) con un pH de 5,5~7,0, en las que la metionina y el polisorbato 20 se combinaron en sus intervalos respectivos de concentración óptima para la estabilización de toxina botulínica, se prepararon y se ensayaron para la capacidad para mantener la actividad de la toxina botulínica bajo una condición de almacenamiento de 40°C. El pH de las composiciones de toxina botulínica líquidas se ajustó con HCl o NaOH. Cada una de las composiciones tuvo una concentración de toxina botulínica de 100 unidades/ml. Los resultados de la estabilidad de la toxina botulínica según el pH de la composición líquida se resumen en la Tabla 7, a continuación.

[0060]

Como se observa en la FIG. 7, la actividad de la toxina botulínica se mantuvo estable durante 90 días en composiciones de toxina botulínica líquidas que contenían 25~75 mM de metionina combinadas con 0,25~0,75 mg/ml de polisorbato 20 oscilando el pH de las mismas de 5,5 a 7,0 bajo una condición de almacenamiento de 40°C.

[0061]

TABLA 7

Composición de toxina botulínica			Tasa de mortalidad (%)				
Met (mM)	Polisorbato 20 (mg/ml)	pH	Día				
			7	15	30	60	90
25	0,25	5,5	100	100	100	100	100
		6,0	100	100	100	100	100
		6,5	100	100	100	100	100
		7,0	100	100	100	100	100
	0,5	5,5	100	100	100	100	100
		6,0	100	100	100	100	100
		6,5	100	100	100	100	100
		7,0	100	100	100	100	100
	0,75	5,5	100	100	100	100	100
		6,0	100	100	100	100	100
		6,5	100	100	100	100	100
		7,0	100	100	100	100	100
50	0,25	5,5	100	100	100	100	100
		6,0	100	100	100	100	100
		6,5	100	100	100	100	100
		7,0	100	100	100	100	100
	0,5	5,5	100	100	100	100	100
		6,0	100	100	100	100	100
		6,5	100	100	100	100	100
		7,0	100	100	100	100	100
	0,75	5,5	100	100	100	100	100
		6,0	100	100	100	100	100

75	0,25	6,5	100	100	100	100	100
		7,0	100	100	100	100	100
		5,5	100	100	100	100	100
		6,0	100	100	100	100	100
		6,5	100	100	100	100	100
		7,0	100	100	100	100	100
	0,5	5,5	100	100	100	100	100
		6,0	100	100	100	100	100
		6,5	100	100	100	100	100
		7,0	100	100	100	100	100
	0,75	5,5	100	100	100	100	100
		6,0	100	100	100	100	100
		6,5	100	100	100	100	100
		7,0	100	100	100	100	100

[0062] 7. Estabilidad de la toxina botulínica en la composición farmacéutica líquida que contiene una combinación de metionina, isoleucina y polisorbato

[0063] Como se ha descrito anteriormente, una combinación de isoleucina y polisorbato 20, además de una combinación de metionina y polisorbato 20, se identificó como candidata para estabilizar la toxina botulínica. Basándose de este resultado, una combinación de metionina, isoleucina y polisorbato 20 se ensayó para la capacidad de estabilizar la toxina botulínica bajo una condición de almacenamiento de 37°C. En la composición líquida, la toxina botulínica tuvo una concentración de 100 unidades/ml.

10 **[0064]**

TABLA 8

Ej. nº	Composición de toxina botulínica			Tasa de mortalidad (%)					
	Met (mM)	Ile (mg/ml)	Polisorbato 20 (mg/ml)	Día					
				30	60	90	120	167	202
14	20	10	0,5	100	100	80	100	100	100
15	20	10	2,0	100	80	80	100	100	0
16	20	10	10	100	100	100	100	100	100
C.25	-	10	-	80	0	-	-	-	-
C.26	20	10	-	0	-	-	-	-	-
C.27	-	10	0,5	0	-	-	-	-	-
C.28	-	1	2,0	0	-	-	-	-	-
C.29	-	10	2,0	0	-	-	-	-	-
C.30	-	30	2,0	0	-	-	-	-	-
C.31	-	50	2,0	0	-	-	-	-	-
C.32	-	100	2,0	0	-	-	-	-	-
C.33	-	10	10	0	-	-	-	-	-

[0065] Como se observa en la FIG. 8, la actividad de la toxina botulínica se mantuvo durante un largo periodo de tiempo (aproximadamente 200 días) bajo una condición de almacenamiento de 37°C por una combinación de metionina, isoleucina y polisorbato 20, pero se averiguó que prácticamente desapareció antes del periodo de 30 días en las composiciones líquidas que contenían isoleucina sola o en combinación con metionina o polisorbato 20.

Aplicabilidad industrial

20 **[0066]** Como se ha descrito hasta ahora, la composición farmacéutica de toxina botulínica líquida según la presente invención muestra estabilidad de la toxina botulínica enormemente mejorada. Es útil en el tratamiento de distonía, espasmo muscular rígido, trastornos neurológicos (migraña, lumbago, trastorno de la columna cervical, etc.), además de en la aplicación cosmética para el tratamiento de hiperhidrosis y la reducción de arrugas. Además, la composición farmacéutica de toxina botulínica líquida de la presente invención puede usarse directamente como
 25 inyección y garantiza la actividad de la toxina botulínica durante un largo periodo de tiempo incluso a 25 - 37°C, además de a una temperatura refrigerada, lo que resulta muy ventajoso para el transporte y venta.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica líquida que comprende toxina botulínica, polisorbato 20 y metionina, en la que el polisorbato 20 está presente en una cantidad de 0,01 a 50 mg por 100 unidades de toxina botulínica y en la que la metionina está presente en una cantidad de 0,5 a 100 μ moles por 100 unidades de toxina botulínica.
2. La composición farmacéutica líquida según la reivindicación 1, en la que la metionina oscila en una concentración de 0,5 a 100 mM.
- 10 3. La composición farmacéutica líquida según la reivindicación 2, en la que la metionina oscila en una concentración de 25 a 75 mM.
4. La composición farmacéutica líquida según la reivindicación 1, en la que el polisorbato 20 oscila en una concentración de 0,01 a 50 mg/ml.
- 15 5. La composición farmacéutica líquida según la reivindicación 4, en la que el polisorbato 20 oscila en una concentración de 0,1 a 2,5 mg/ml.
6. La composición farmacéutica líquida según la reivindicación 1, en la que la toxina botulínica se selecciona de un grupo que consiste en los serotipos A, B, C, D, E, F y G de la toxina botulínica.
- 20 7. La composición farmacéutica líquida según la reivindicación 6, en la que la toxina botulínica está en una forma no compleja o en una forma compleja con una proteína.
- 25 8. La composición farmacéutica líquida según la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica líquida oscila en un pH de 5,5 a 7,0.
9. La composición farmacéutica líquida según la reivindicación 1 que comprende además isoleucina.
- 30 10. La composición farmacéutica líquida según la reivindicación 1, en la que la toxina botulínica oscila en una concentración de 50 a 5.000 unidades/ml.