

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 479 515**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48	(2006.01)	A61K 47/32	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01)	A61Q 19/00	(2006.01)
A61K 31/728	(2006.01)	A61Q 19/08	(2006.01)
A61P 21/02	(2006.01)		
A61P 25/06	(2006.01)		
A61K 8/64	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 47/02	(2006.01)		
A61K 47/10	(2006.01)		
A61K 47/26	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2005 E 10181506 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2266599**

54 Título: **Composición terapéutica con una neurotoxina botulínica**

30 Prioridad:

26.07.2004 US 591196 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.07.2014

73 Titular/es:

**MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA (100.0%)
Eckenheimer Landstrasse 100
60318 Frankfurt, DE**

72 Inventor/es:

TAYLOR, HAROLD VICTOR

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 479 515 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 terapéutica con una neurotoxina botulínica.

5 La presente invención corresponde a composiciones farmacéuticas que comprenden una neurotoxina botulínica de *Clostridium botulinum*, donde la neurotoxina está libre de las proteínas complejantes presentes de forma natural en el complejo de la neurotoxina botulínica, o una neurotoxina botulínica modificada químicamente o modificada por manipulación genética, donde dicha toxina botulínica modificada está libre de las proteínas complejantes que forman complejos con las neurotoxinas botulínicas de forma natural. Además, las composiciones farmacéuticas de la
10 presente invención tienen buena estabilidad y están formuladas de manera ventajosa libres de seroalbúmina humana.

La albúmina de origen humano se ha utilizado como vehículo principal y estabilizador de los principios activos proteicos presentes en composiciones farmacéuticas. Se ha demostrado que la albúmina estabiliza los principios
15 activos proteicos en composiciones farmacéuticas por medio de la reducción de la adhesión y de la desnaturalización del principio activo. Además, la albúmina inyectada a un paciente humano no es inmunogénica.

No obstante, el uso de albúmina en una composición farmacéutica plantea importantes inconvenientes. Se ha atribuido a la albúmina la transmisión de ciertos virus estables, priones u otros compuestos infecciosos o patógenos, p. ej., la encefalopatía espongiforme humana transmisible (TSE). Por este motivo han aumentado los controles regulatorios sobre las composiciones farmacéuticas que contienen seroalbúmina humana. En forma similar, en algunas composiciones farmacéuticas que contienen principios activos proteicos se ha usado gelatina como reemplazante de la albúmina. Por tratarse de una proteína derivada de mamífero, la gelatina plantea el mismo riesgo de transmisión de patógenos. En consecuencia, existe la necesidad de un sustituto de los estabilizantes proteicos
20 derivados de mamífero.

Los complejos de toxina botulínica están compuestos por una mezcla de proteínas clostridiales. Son hemaglutininas con diferentes masas moleculares, una proteína hemoaglutinante (Mr de aproximadamente 120.000) y una neurotoxina (Mr de aproximadamente 150.000). Forman un complejo estable en ácido que es responsable de la toxicidad oral en los casos de intoxicación alimentaria. A diferencia de la neurotoxina pura, el complejo resiste el medio agresivo del tracto gastrointestinal y hace posible la absorción enteral de la neurotoxina, que llega a las células diana a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático, donde induce el bloqueo de la liberación de neurotransmisor. Esta acción se sigue de parálisis muscular y del cese de diversas funciones del sistema autónomo. Los pacientes intoxicados mueren por insuficiencia muscular respiratoria. Como la neurotoxina pura se degrada en el tracto gastrointestinal, por lo que no tiene lugar su absorción enteral, no resulta tóxica al ser ingerida. Con la administración parenteral, los efectos terapéuticos de la neurotoxina y del complejo no difieren entre sí, ya que en los tejidos el complejo se descompone en sus constituyentes y únicamente la toxina resulta captada por las células diana.
25

Actualmente hay dos productos que comprenden neurotoxina botulínica tipo A y que están aprobados para el tratamiento del blefaroespasmio, el espasmo hemifacial y la tortícolis espasmódica: BOTOX® y DYSPORT®. La neurotoxina botulínica, en el estado actual de la técnica, se inyecta directamente en los músculos distónicos o espásticos, en los que la neurotoxina se libera del complejo a pH fisiológico y produce el efecto farmacológico buscado. Se encuentran en curso ensayos clínicos para tratar otros trastornos del sistema nervioso (p. ej., espasticidades, migraña, lumbalgia, trastornos de la columna cervical, hipersialorrea). El complejo de toxina botulínica tipo A (Mr 900.000) está aprobado para la terapia de diversas distonías. Los productos aprobados se emplean también para indicaciones cosméticas, tales como hiperhidrosis y arrugas pronunciadas. Los otros complejos de toxinas del *Clostridium botulinum* (de los tipos B, C1, D, E, F, G), así como toxinas que se derivan de estas toxinas del *Clostridium botulinum* por modificación química o manipulación genética también son adecuados para estas terapias.
30
35
40
45
50

BOTOX® y DYSPORT® se presentan para uso del médico en forma liofilizada para reconstitución inmediatamente antes de su uso. Lamentablemente, la dosis requerida para cada paciente y para cada indicación no es uniforme. Por esta razón, a menudo se congela o se refrigera la composición ya reconstituida para su uso posterior. Se ha evaluado la estabilidad de la potencia de estas composiciones reconstituidas conservadas. Se observó que BOTOX® una vez reconstituido pierde por lo menos el 44% de su potencia cuando se lo guarda refrigerado durante 12 horas. Asimismo, cuando la composición reconstituida se congela a -70°C, pierde el 70% de su potencia. Gartlan, M.G., and Hoffman, H.T. Crystalline preparation of botulinum toxin type A (Botox): Degradation in potency with storage, *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 102(2): 135-140 (1992). Esta inestabilidad tiene como resultado una significativa variación de la dosis y el desperdicio de producto. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es el desarrollo y la producción de una formulación líquida estable y liofilizada de toxina botulínica que tiene mejores características de manipulación que las formulaciones existentes.
55
60

Se ha desarrollado una nueva composición farmacéutica que comprende neurotoxina botulínica (tipo A, B, C1, D, E, F o G) que está libre de hemaglutininas y otras proteínas exógenas. De este modo se reduce la carga proteica total de una formulación farmacéutica sin reducir la cantidad de toxina. Hemos encontrado en estudios de antigenicidad
65

que la neurotoxina pura de todos los tipos, a diferencia de los productos comerciales del tipo A y de los complejos de los tipos B a G, no induce formación de anticuerpos, o lo hace en mínimo grado. Con el uso terapéutico de este producto farmacéutico recién desarrollado (neurotoxina pura de los tipos A, B, C1, D, E, F o G), no hay fracaso de la terapia debido a anticuerpos, incluso tras la administración repetida.

5 No obstante, como se señaló anteriormente, surgen problemas para la formulación. Como compuesto proteico activo, la toxina botulínica es muy lábil. Además, los complejos de toxina botulínica son extremadamente susceptibles a la desnaturalización por desnaturalización superficial, calor y condiciones alcalinas.

10 Como sucede generalmente con las enzimas, las actividades biológicas de las toxinas botulínicas (que son peptidasas intracelulares) dependen, por lo menos en parte, de su conformación tridimensional. Por lo tanto, las toxinas botulínicas pueden ser detoxificadas por calor, diversos compuestos químicos, estiramiento de la superficie y secado de la superficie. Además, se conoce que las concentraciones de toxina diluida que se usan en las indicaciones aprobadas resultan en una rápida detoxificación de la toxina, a menos que haya presente un agente estabilizante adecuado. Asimismo, la estabilidad de la toxina es un importante factor para el almacenamiento. Por este motivo resultan esenciales los agentes estabilizantes. Hasta el presente, la estabilidad se ha obtenido por medio de la formulación con las proteínas albúmina y gelatina derivadas de mamífero. Como se señaló anteriormente, las proteínas derivadas de mamífero plantean el riesgo de que ciertos virus estables, priones u otros compuestos infecciosos o patógenos provenientes de los donantes puedan contaminar la toxina.

20 Además, las condiciones que existen durante la liofilización, incluyendo pH, temperatura, dilución y presiones de vacío, provocan la detoxificación de la toxina. Hasta ahora, para estabilizar la toxina botulínica, se han venido utilizando con cierto éxito proteínas derivadas de mamífero, como gelatina y seroalbúmina, que representan los estabilizantes estándar.

25 Por ejemplo, la toxina botulínica comercial que contiene la composición farmacéutica BOTOX® (disponible en Allergan, Inc., Irvine, California) consiste en un complejo purificado de toxina botulínica tipo A, albúmina y cloruro de sodio envasado en forma estéril y secado al vacío. Cada vial de BOTOX® contiene aproximadamente 100 unidades (U) de complejo de toxina de *Clostridium botulinum* tipo A, 0,5 miligramos de seroalbúmina humana y 0,9 miligramos de cloruro de sodio en una presentación estéril, secada al vacío y sin conservante.

30 La técnica está plagada de intentos para lograr la estabilización de composiciones proteicas. Carpender et al., Interactions of Stabilizing Additives with Proteins During Freeze-Thawing and Freeze-Drying, International Symposium on Biological Product Freeze-Drying and Formulation, 24-26 October 1990; Karger (1992), 225-239.

35 El uso del disacárido celobiosa como excipiente, en conjunción con albúmina y cloruro de sodio, demuestra degradación de la toxicidad (recuperación del 10%) tras la liofilización de la toxina botulínica cristalizada tipo A con estos excipientes, en comparación con la toxicidad tras la liofilización solamente con albúmina (recuperación >75% a >90%). Goodnough et al., Stabilization of Botulinum Toxin Type A During Lyophilization, App & Envir. Micro. 58 (10) 3426-3428 (1992).

40 Asimismo, formulaciones proteicas que comprenden un sacárido (tal como glucosa o un polímero de glucosa) o carbohidratos no son estables debido a que se ha demostrado que las proteínas y la glucosa interactúan entre sí y sufren degradación por reacción de Maillard debido a la índole reductora de la glucosa y de los polímeros de glucosa. En cambio, alcoholes, p. ej., inositol, manitol, no son reductores y se emplean desde hace mucho como excipientes crioprotectores para estabilizar proteínas durante la liofilización.

45 En vista de la inestabilidad de la toxina botulínica y de los riesgos que acompañan a estabilizantes derivados de mamíferos y a los polisacáridos, sigue siendo un objetivo de los investigadores de formulaciones la obtención de un estabilizador de proteínas adecuado.

RESUMEN DE LA INVENCION

50 Es un objeto de la presente invención proporcionar un sustituto no proteico de las proteínas derivadas de mamífero en composiciones farmacéuticas que contienen toxina botulínica o una toxina que se deriva de la toxina botulínica por modificación química o manipulación genética. Esta nueva formulación debe tener baja inmunogenicidad, preferiblemente insignificante, al ser inyectada a un paciente humano.

55 En consecuencia, lo que consideramos está comprendido por nuestra invención se puede resumir, *inter alia*, de la siguiente manera:

60 Composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una neurotoxina botulínica de *Clostridium botulinum* del tipo A, B, C1, D, E, F o G, donde dicha al menos una neurotoxina está libre de las proteínas complejantes que forman complejos con neurotoxinas botulínicas de forma natural, y un agente estabilizante no proteico para neurotoxina botulínica que conserva la actividad biológica de la neurotoxina botulínica en una solución acuosa,

donde dicho agente estabilizante es ácido hialurónico y donde dicha composición está libre de agentes estabilizantes proteicos derivados de mamíferos seleccionados entre albúmina y gelatina.

5 Dicha composición farmacéutica, donde dicha al menos una neurotoxina botulínica está modificada químicamente o modificada por manipulación genética.

Dicha composición farmacéutica, que comprende un amortiguador del pH;

10 Dicha composición farmacéutica, donde el amortiguador del pH es acetato de sodio;

Dicha composición farmacéutica, que comprende un crioprotector;

Dicha composición farmacéutica, donde el crioprotector es un polialcohol;

15 Dicha composición farmacéutica, donde el polialcohol se selecciona entre uno o más de los polialcoholes inositol, manitol y sorbitol;

Dicha composición farmacéutica, que está liofilizada;

20 Dicha composición farmacéutica, para la administración a un animal, incluyendo un humano, en una cantidad efectiva para el tratamiento de una condición para la cual está indicada la terapia o el tratamiento con neurotoxina botulínica;

25 Dicha composición farmacéutica, de la condición para la cual está indicada la terapia o el tratamiento con neurotoxina botulínica se selecciona entre condiciones cosméticas, blefaroespasma, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, espasticidades, distonías, migraña, lumbalgia, trastornos de la columna cervical, estrabismo, hiperhidrosis e hipersialorrea;

30 Dicha composición farmacéutica, donde la condición cosmética son las arrugas pronunciadas;

35 Así como una preparación de neurotoxina botulínica que comprende al menos una neurotoxina botulínica seleccionada entre *Clostridium botulinum* del tipo A, B, C1, D, E, F o G, donde dicha al menos una neurotoxina está libre de las proteínas complejantes que forman complejos con neurotoxinas botulínicas de forma natural, y un agente estabilizante no proteico para neurotoxina botulínica que conserva la actividad biológica de la neurotoxina botulínica en una solución acuosa, donde dicho agente estabilizante es ácido hialurónico y donde dicha preparación está libre de agentes estabilizantes proteicos derivados de mamíferos seleccionados entre albúmina y gelatina.

40 Dicha preparación de neurotoxina botulínica, donde dicha al menos una neurotoxina botulínica está modificada químicamente o modificada por manipulación genética

Dicha preparación de neurotoxina botulínica, donde la solución acuosa comprende un amortiguador del pH;

Dicha preparación de neurotoxina botulínica, donde el amortiguador del pH es acetato de sodio;

45 Así como un método para estabilizar al menos una neurotoxina botulínica seleccionada entre *Clostridium botulinum* del tipo A, B, C1, D, E, F o G, donde dicha al menos una neurotoxina está libre de las proteínas complejantes que forman complejos con neurotoxinas botulínicas de forma natural, que comprende entremezclar dicha al menos una neurotoxina con un agente estabilizante no proteico para neurotoxina botulínica en una solución acuosa en una cantidad efectiva para conservar la actividad biológica de la neurotoxina, donde dicho agente estabilizante es ácido hialurónico y donde dicha preparación está libre de agentes estabilizantes proteicos derivados de mamíferos seleccionados entre albúmina y gelatina.

50 Dicho método, donde la al menos una neurotoxina botulínica está modificada químicamente o modificada por manipulación genética;

55 Dicho método, donde la solución acuosa comprende un amortiguador del pH;

Dicho método, donde el amortiguador del pH es acetato de sodio;

60 Dicho método, donde la solución acuosa comprende un crioprotector;

Dicho método, donde la solución acuosa está liofilizada;

65 Una preparación de neurotoxina botulínica tal como se define aquí para su uso en el tratamiento de blefaroespasma, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, espasticidades, migraña, lumbalgia, trastornos de la columna cervical, estrabismo, hiperhidrosis, hipersialorrea y distonías;

Así como un método para tratar condiciones cosméticas, que comprende administrar una preparación de neurotoxina botulínica tal como se define aquí;

5 Dicho método, donde la condición cosmética son las arrugas pronunciadas;

Así como el uso de dicha preparación de neurotoxina botulínica para la fabricación de un medicamento para tratar una condición en la que está indicada la terapia con neurotoxina botulínica.

10 DEFINICIONES

Como se usan en la presente, las palabras o términos que figuran a continuación tienen las siguientes definiciones.

15 "Composición farmacéutica" es una formulación en la que un principio activo, en este caso una toxina botulínica, o la toxina botulínica libre de proteína hemaglutinante de la presente, o una toxina que se deriva de toxina botulínica por modificación química o por manipulación genética, es estabilizada por una sustancia que no es una proteína derivada de mamífero. Dicha composición farmacéutica puede ser adecuada para administración con fines diagnósticos o terapéuticos (es decir, por inyección intramuscular o subcutánea) a un paciente humano. La composición farmacéutica puede estar liofilizada o secada al vacío, reconstituida o en solución. El principio activo de la toxina botulínica puede ser uno de los serotipos de toxina botulínica A, B, C1, D, E, F o G, todos los cuales pueden ser sometidos a nueva modificación para quedar libres de las proteínas complejantes presentes en la neurotoxina natural o en la modificada químicamente o la modificada por manipulación genética.

20 "Formulación terapéutica" se refiere a la capacidad de la formulación de la presente para tratar/aliviar una condición tal como una condición secundaria a hiperactividad (es decir, espasticidad) de un músculo periférico.

25 "Estabilizante", "estabiliza" o "estabilización" significa que el principio activo, es decir, una toxina botulínica o una toxina que se deriva de toxina botulínica por modificación química o por manipulación genética, presente en una composición farmacéutica en solución reconstituida o acuosa tiene más de aproximadamente el 20% y hasta aproximadamente el 100% de la toxicidad que tenía la toxina botulínica biológicamente activa antes de ser incorporada a la composición farmacéutica.

30 "Crioprotector" se refiere a excipientes que resultan en que el principio activo, es decir, una toxina botulínica o una toxina que se deriva de toxina botulínica por modificación química o por manipulación genética, presente en una composición farmacéutica en solución reconstituida o acuosa tiene más de aproximadamente el 20% y hasta aproximadamente el 100% de la toxicidad que tenía la toxina botulínica biológicamente activa antes de ser liofilizada en la composición farmacéutica.

35 "Amortiguador del pH" se refiere a sustancias químicas capaces de ajustar el valor del pH de una composición, solución y similares a un cierto valor o a ciertos límites de pH.

"Polialcohol" se refiere a carbohidratos alifáticos o cicloalifáticos que tienen más de un grupo funcional hidroxilo pero ningún grupo funcional carbonilo (como, por ejemplo, en los compuestos de azúcar).

40 "Libre de agentes estabilizantes proteicos derivados de mamífero" significa que la composición o preparación no contiene cantidades detectables de agentes estabilizantes derivados de proteínas de mamífero.

45 "Modificación química" se refiere a métodos conocidos en la técnica para modificar la toxina botulínica nativa de cualquier serotipo por medio de reacciones químicas o mecanismos similares; se refiere especialmente a sustituciones, deleciones, inserciones, adiciones o modificaciones postraslacionales de aminoácidos de la toxina botulínica.

50 "Manipulación genética" se refiere a métodos conocidos en la técnica para modificar la toxina botulínica de cualquier serotipo por medio de la modificación de la codificación genética de la toxina botulínica o de los respectivos ácidos nucleicos, como DNA o RNA.

55 DESCRIPCIÓN

60 La presente invención describe el descubrimiento de que se puede formular una composición farmacéutica que contiene una neurotoxina estable libre de toda proteína derivada de mamífero o mezcla de albúmina de donante mediante la incorporación de un agente estabilizante no proteico, específicamente ácido hialurónico. La presente invención concierne al desarrollo de una composición de toxina botulínica que está formulada con un ácido hialurónico. Dicha composición es una composición más segura y que posee una notable estabilidad.

65 Por fortuna, la significación de la composición de la presente reside en que la toxina botulínica o una toxina que se deriva de toxina botulínica por modificación química o por manipulación genética no está formulada en un

estabilizante proteico derivado de mamífero. Se ha determinado que una formulación con ácido hialurónico, en particular una que incorpora un amortiguador del pH, especialmente amortiguador de acetato de sodio, y/o un crioprotector, puede actuar aumentando la estabilidad y la vida útil de la composición farmacéutica de la presente.

- 5 Además, la composición farmacéutica o preparación de la presente preferiblemente no sólo está libre de un agente estabilizante proteico derivado de mamífero sino también de toda proteína estabilizante.

10 La presente invención no está limitada a composiciones farmacéuticas, sino que también concierne a procesos para estabilizar composiciones de toxina botulínica o composiciones de una toxina derivada de toxina botulínica por modificación química o por manipulación genética. Mediante la incorporación de ácido hialurónico a la composición, se estabiliza la toxina botulínica o la toxina que se deriva de toxina botulínica por modificación química o por manipulación genética. Además, la estabilidad se puede mejorar mediante la incorporación a la composición farmacéutica de un amortiguador el pH, con lo que se estabiliza el pH y se contribuye a la duración de la toxina reconstituida y/o mediante la inclusión en la composición farmacéutica de un crioprotector, con lo que se aumenta la estabilidad del liofilizado y la duración del producto almacenado.

15 Se prefiere que la naturaleza y la cantidad del amortiguador del pH permita estabilizar o ajustar el pH de la composición o preparación de la presente a valores entre aproximadamente 4 y 7,5. Amortiguadores adecuados del pH pueden ser sistemas amortiguadores de citrato, fosfato y, especialmente, de acetato, en particular sistemas amortiguadores de acetato de sodio. Sorpresivamente, se ha encontrado que si se usa un amortiguador de acetato en la composición o preparación de la presente y dicha composición o preparación se liofiliza, el acetato se puede remover de la composición o preparación durante el liofilizado; después de reconstituirla o descongelarla, la composición o preparación tiene un pH aproximadamente neutro (entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5). Esto resulta ventajoso cuando la composición o preparación se administra a una persona o paciente que la necesita, especialmente cuando se inyecta en un músculo, ya que entonces la composición o preparación de toxina botulínica (casi) neutra provoca menos dolor que una composición o preparación comparable que tiene un pH ácido, por ejemplo, de 4.

20 Una realización detallada de la presente invención puede ser una composición farmacéutica adecuada para inyección en un paciente humano, que incluye una toxina botulínica o una toxina que se deriva de toxina botulínica por modificación química o por manipulación genética, y ácido hialurónico, donde dicha composición optativamente tiene el pH estabilizado con un amortiguador de pH adecuado, en particular por un amortiguador de acetato de sodio, y / o un polialcohol crioprotector.

25 La composición farmacéutica es adecuada para administración a un paciente humano para obtener un efecto terapéutico y la neurotoxina puede ser uno de los serotipos de toxina botulínica A, B, C1, D, E, F y G, preferiblemente una toxina botulínica que está libre de las proteínas complejantes presentes en la neurotoxina natural o en la neurotoxina modificada químicamente o modificada por manipulación genética. La neurotoxina modificada también está libre de las proteínas complejantes que forman complejos con la neurotoxina botulínica de forma natural.

30 La modificación de la neurotoxina derivada de neurotoxina botulínica realizada por modificación química o manipulación genética puede estar localizada en cada parte de la proteína de la neurotoxina, por ejemplo, en la parte de la cadena pesada y/o en la parte de la cadena liviana de la molécula de la neurotoxina. Puede haber una modificación o más modificaciones. Preferiblemente, la cadena pesada de la proteína de la neurotoxina derivada de neurotoxina botulínica comprende una o más modificaciones que pueden aumentar o reducir la afinidad de la neurotoxina para unirse a las células nerviosas, en comparación con la neurotoxina natural. Dicha neurotoxina modificada puede comprender por lo menos una sustitución y/o delección y/o inserción y/o adición y/o modificación postraslacional de aminoácidos de la neurotoxina y, preferiblemente, de la cadena pesada de la neurotoxina.

35 La composición farmacéutica comprende, además del principio activo de la neurotoxina, ácido hialurónico y conserva su potencia sustancialmente sin modificar durante períodos de seis meses, un año, dos años, tres años y/o cuatro años si se la almacena a una temperatura entre aproximadamente +8°C y aproximadamente -20°C. Adicionalmente, al ser reconstituidas, las composiciones farmacéuticas indicadas pueden tener una potencia o una recuperación porcentual entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 100%.

40 Una composición farmacéutica dentro del alcance de la presente invención puede incluir una neurotoxina y un ácido hialurónico. El ácido hialurónico estabiliza la neurotoxina. Las composiciones farmacéuticas reveladas en la presente pueden tener un pH entre aproximadamente 4 y 7,5 al ser reconstituidas o al ser inyectadas. El ácido hialurónico en la composición farmacéutica de la presente está preferiblemente combinado con la toxina botulínica de la presente en una cantidad de 0,1 a 10 mg, especialmente 1 mg de ácido hialurónico por ml en una solución de 200 U/ml de toxina botulínica. Más preferiblemente, la solución de la presente contiene también 1-100 mM, especialmente 10 mM de un amortiguador de acetato de sodio.

45 En otra realización preferente, la composición puede contener un polialcohol como crioprotector. Ejemplos de polialcoholes que se pueden usar incluyen, p. ej., inositol, manitol y otros alcoholes no reductores.

Debe entenderse que la composición o preparación de la presente no contiene trehalosa o maltotriosa ni compuestos de azúcares o polihidroxi relacionados que a veces se usan como crioprotectores.

- 5 Por lo tanto, la presente invención comprende una toxina botulínica formulada en una composición farmacéutica que contiene un ácido hialurónico estabilizante. Adicionalmente, la composición farmacéutica puede contener un sistema de amortiguador de acetato de sodio y/o un crioprotector alcohólico. Los siguientes ejemplos tienen carácter meramente ilustrativo y no son limitativos.
- 10 La preparación o composición farmacéutica de la presente es útil para tratar una condición para la cual está indicada la terapia o el tratamiento con neurotoxina botulínica. En un aspecto, se puede usar para tratar condiciones cosméticas como arrugas y arrugas pronunciadas. En otro aspecto, se puede usar para tratar una condición, donde la condición se selecciona entre blefaroespasma, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, espasticidades, migraña, lumbalgia, trastornos de la columna cervical, estrabismo, hiperhidrosis, hipersialorrea y distonías. Además,
- 15 la preparación o composición farmacéutica de la presente también se usa para la fabricación de un medicamento para tratar una condición en la que está indicada la terapia con neurotoxina botulínica, donde la condición se selecciona preferiblemente entre condiciones cosméticas, blefaroespasma, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, espasticidades, migraña, lumbalgia, trastornos de la columna cervical, estrabismo, hiperhidrosis, hipersialorrea y distonías. Otras indicaciones médicas tratables con la preparación o composición farmacéutica de la
- 20 presente son, entre otras, acalambramiento benigno, temblor esencial, mioquimias, hipertrofia muscular neurogénica, mioclonía del velo del paladar, mioclonía medular, trastornos de sinquinesis / VII par craneal, síndrome de retracción ocular de Duane, nistagmo, ptosis terapéutica para la protección de la córnea, oscilopsia, disfonía espasmódica, granuloma, puberofonía, estenosis glótica posterior, rebalanceo, tartamudez, fracaso de la TEP, temblor esencial de la voz, tics vocales, trastornos del cricofaríngeo, bruxismo, hipertrofia del masetero, obesidad mórbida, acalasia, fisura anal, anismo, hipo incoercible, constipación severa, dolor anorrectal, gastroparesia,
- 25 trastornos anales benignos, diverticulosis esofágica, esfínter de Oddi, lágrimas de cocodrilo, sialoceles, sialorrea, babeo, fístula parotídea, síndrome de Frey, ptialismo, disinergia detrusor-esfínter, vejiga hiperactiva, vaginismo, retención urinaria, hiperplasia, hiperplasia benigna, cefalea tensional, dolor cervicogénico, dolor miofascial, apraxia de la apertura palpebral, sinquinesis secundaria a parálisis del nervio facial, tartamudeo con bloqueos de la glotis,
- 30 olor corporal, rinitis intrínseca.

EJEMPLOS

- 35 Las preparaciones de toxina botulínica de la presente invención, y sus composiciones farmacéuticas y los métodos para usarlas en tratamientos, han demostrado poseer propiedades únicas y ventajas que hacen que "el objeto de la invención en conjunto", tal como se reivindica en la presente, no resulte evidente. Con técnicas de ensayo confiables y aceptadas, las preparaciones de toxina botulínica y sus composiciones farmacéuticas han exhibido las siguientes propiedades y características de valor:

EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE LA TOXINA BOTULÍNICA

- 40 La neurotoxina pura de *Clostridium botulinum* tipo A se obtiene mediante un proceso basado en el proceso de DasGupta & Sathyamoorthy. El *Clostridium botulinum* tipo A se cultiva en un tanque de fermentación de 20 l en un medio que consiste en 2% de proteosa peptona, 1% de extracto de levadura, 1% de glucosa y 0,05% de tioglicolato de sodio. Después de un desarrollo durante 72 horas, se precipita la toxina agregando ácido sulfúrico 3 N (pH final = 3,5). El precipitado y la biomasa centrifugada se extrae con solución amortiguadora de fosfato de sodio 0,2 M a un
- 45 pH de 6,0.

- 50 Después de remover los ácidos nucleicos por precipitación con sulfato de protamina, se precipita la toxina agregando sulfato de amonio. El precipitado, después de solubilizarlo y dializarlo contra 50 mM de fosfato de sodio a pH 6,0 está unido a una columna de DEAE-Sephadex® al mismo pH y se eluye con 150 mM de NaCl. A continuación, se realiza una cromatografía en una columna de QAE-Sephadex® que ha sido equilibrada con 50 mM de amortiguador Tris/HCl a pH 7,9. La toxina se eluye por medio de un gradiente de NaCl. En el último paso, la
- 55 toxina se pasa por cromatografía en SP-Sephadex® a pH 7,0. En este caso, la toxina unida se eluye de la columna usando un gradiente de NaCl (0-300mM). La toxina purificada se analiza por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y exhibe una pureza del 95 +/- 5%. La actividad biológica se determina con el ensayo de la LD50 en ratón: una unidad LD50 corresponde a 4,8 pg de proteína.

EJEMPLO 2: COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA TERMINADA QUE CONTIENE ÁCIDO HIALURÓNICO

- 60 La neurotoxina purificada del Ejemplo 1 se usó para preparar una solución que comprende 200 U de preparación de toxina botulínica y 1 mg de ácido hialurónico por mililitro de agua destilada. La solución se vertió en viales.

EJEMPLO 3: COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA TERMINADA QUE CONTIENE ÁCIDO HIALURÓNICO Y AMORTIGUADOR DE ACETATO DE SODIO

5 La neurotoxina purificada del Ejemplo 1 se usó para preparar una solución que comprende 200 U de preparación de toxina botulínica y 1 mg de ácido hialurónico por mililitro de agua destilada y se ajustó a un pH de 4,5; 5,0 y 5,5 mediante el agregado de 10 mM de solución amortiguadora de acetato de sodio. La solución se vertió en viales.

EJEMPLO 4: DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA FORMULACIÓN DE TOXINA BOTULÍNICA

10 Se preparó la formulación del Ejemplo 2 y se la comparó con la toxina botulínica formulada en seroalbúmina humana (HSA). En formulación, ambas preparaciones poseían la misma actividad. A las 24 y a las 48 horas, la estabilidad de la formulación del Ejemplo 2 era equiparable a la de la preparación con HSA, registrándose una pérdida inferior al 5% de la actividad inicial en ambas muestras.

15 EJEMPLO 5: DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA FORMULACIÓN DE TOXINA BOTULÍNICA BAJO DIFERENTES pH

20 Se prepararon las formulaciones del Ejemplo 3 y se las comparó con la toxina botulínica formulada en seroalbúmina humana (HSA). En formulación, tanto las preparaciones de la presente en cada nivel de pH como la preparación con HSA poseían la misma actividad. La preparación a pH 4,5 exhibió una pérdida de aproximadamente el 50% de la actividad al sexto día. Las preparaciones a pH 5,0 y 5,5 perdieron toda la actividad al sexto día.

EJEMPLO 6: DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA FORMULACIÓN DE TOXINA BOTULÍNICA BAJO DIFERENTES pH Y LIOFILIZACIÓN

25 Se prepararon las formulaciones del Ejemplo 3 y se las comparó con la toxina botulínica formulada en seroalbúmina humana (HSA). En formulación, la preparación de la presente a pH 4,5 poseía la misma actividad que la preparación con HSA. Es destacable que no se detectó pérdida de actividad con la liofilización.

30 EJEMPLO 7: USO DE UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE TOXINA BOTULÍNICA

35 Una mujer de 50 años pide tratamiento de su blefaroespasmio. Se inyecta a la paciente por vía intramuscular entre aproximadamente 10 U y aproximadamente 20 U de una preparación de toxina botulínica del Ejemplo 3 que contiene ácido hialurónico. En el curso de 1 - 7 días, los síntomas del blefaroespasmio se alivian y el alivio de los síntomas persiste por lo menos entre aproximadamente 2 meses y aproximadamente 6 meses.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación de neurotoxina botulínica que comprende al menos una neurotoxina botulínica seleccionada entre *Clostridium botulinum* del tipo A, B, C1, D, E, F y G, donde dicha al menos una neurotoxina está libre de las proteínas complejantes que forman complejos con neurotoxinas botulínicas de forma natural, y un agente estabilizante no proteico para neurotoxina botulínica que conserva la actividad biológica de la neurotoxina botulínica en una solución acuosa, donde dicho agente estabilizante es ácido hialurónico y donde dicha preparación está libre de agentes estabilizantes proteicos derivados de mamíferos seleccionados entre albúmina y gelatina.
- 10 2. La preparación de neurotoxina botulínica según la reivindicación 1, donde dicha al menos una neurotoxina botulínica está modificada químicamente o por manipulación genética.
3. La preparación de neurotoxina botulínica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además un amortiguador del pH.
- 15 4. La preparación de neurotoxina botulínica según la reivindicación 3, donde el amortiguador del pH es acetato de sodio.
- 20 5. La preparación de neurotoxina botulínica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en forma de una composición farmacéutica.
6. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, que comprende además un crioprotector.
7. La composición farmacéutica según la reivindicación 6, donde el crioprotector es un polialcohol.
- 25 8. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, donde el polialcohol se selecciona entre uno o más de inositol, manitol y sorbitol.
9. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 que está en forma liofilizada.
- 30 10. Un método para estabilizar al menos una neurotoxina botulínica seleccionada entre *Clostridium botulinum* del tipo A, B, C1, D, E, F y G, donde dicha al menos una neurotoxina está libre de las proteínas complejantes que forman complejos con neurotoxinas botulínicas de forma natural, que comprende entremezclar dicha al menos una neurotoxina con un agente estabilizante no proteico para neurotoxina botulínica en una solución acuosa en una cantidad efectiva para conservar la actividad biológica de la neurotoxina, donde dicho agente estabilizante es ácido hialurónico y donde dicha preparación está libre de agentes estabilizantes proteicos derivados de mamíferos seleccionados entre albúmina y gelatina.
- 35 11. El método según la reivindicación 10, donde dicha al menos una neurotoxina botulínica está modificada químicamente o por manipulación genética.
- 40 12. El método según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, donde la solución acuosa comprende además un amortiguador del pH.
- 45 13. El método según la reivindicación 12, donde el amortiguador del pH es acetato de sodio.
- 50 14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde la solución acuosa comprende además un crioprotector.
- 55 15. El método según la reivindicación 14, donde la solución acuosa está liofilizada.
16. Una preparación de neurotoxina botulínica tal como se define en cualquier de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de una condición seleccionada entre blefaroespasma, espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica, espasticidades, migraña, lumbalgia, trastornos de la columna cervical, estrabismo, hiperhidrosis, hipersialorrea y distonías.
17. Un método para tratar una condición cosmética seleccionada entre arrugas y arrugas pronunciadas que comprende administrar una preparación de neurotoxina botulínica tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.