

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 010**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2006 E 13178507 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2679217**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas no proteicas de toxina clostridial estabilizadas**

30 Prioridad:

06.10.2005 US 725126 P

21.09.2006 US 524683

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

18.08.2016

73 Titular/es:

ALLERGAN, INC. (100.0%)

2525 Dupont Drive

Irvine, CA 92612, US

72 Inventor/es:

HUNT, TERRENCE J.

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 580 010 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

Composiciones farmacéuticas no proteicas de toxina clostridial estabilizadas

ANTECEDENTES

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas de la toxina clostridial. En particular, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas de la toxina clostridial con un excipiente no proteico que funciona para estabilizar la toxina clostridial (que es una toxina botulínica) presente en la composición farmacéutica.

10 Una composición farmacéutica es una formulación que contiene al menos un ingrediente activo (tal como una toxina clostridial), así como, por ejemplo, uno o más excipientes, tampones, soportes, estabilizantes, conservantes y/o agentes de carga, y es adecuada para la administración a un paciente para lograr un resultado de diagnóstico o efecto terapéutico deseado. Las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria tienen utilidad de diagnóstico, terapéutica y/o de investigación.

15 Para la estabilidad al almacenamiento y la conveniencia de manipulación, una composición farmacéutica puede formularse como un polvo liofilizado (es decir, secado por congelación) o secado en vacío que se puede reconstituir con un fluido adecuado tal como solución salina o agua, antes de la administración a un paciente. Alternativamente, la composición farmacéutica se puede formular como una disolución o suspensión acuosa. Una composición farmacéutica puede contener un ingrediente activo proteínico. Desafortunadamente, un ingrediente activo proteínico puede ser muy difícil de estabilizar (es decir, mantener en un estado en el que se minimiza la pérdida de actividad biológica), resultando por lo tanto en una pérdida de proteína y/o una pérdida de actividad de la proteína durante la formulación, reconstitución (si se requiere) y durante el período de almacenamiento antes de utilizar una proteína que contiene una composición farmacéutica. Los problemas de estabilidad pueden producirse debido a la desnaturalización, degradación, dimerización y/o polimerización de proteínas. Diversos excipientes tales como albúmina y gelatina se han utilizado con diferentes grados de éxito para tratar y estabilizar un ingrediente activo proteico presente en una composición farmacéutica. Además, se han utilizado crioprotectores tales como alcoholes para reducir la desnaturalización de la proteína bajo las condiciones de congelación de la liofilización.

25 Excipientes de Proteínas

Se han utilizado diversas proteínas tales como albúmina y gelatina para estabilizar una toxina botulínica presente en una composición farmacéutica. Las albúminas son proteínas plasmáticas pequeñas, abundantes. La albúmina sérica humana tiene un peso molecular de aproximadamente 69 kiloDalton (kD) y ha sido utilizada como un ingrediente no activo en una composición farmacéutica, en donde pueda servir como un soporte a granel y un estabilizante de determinados ingredientes activos de proteínas, presentes en una composición farmacéutica.

35 La función de estabilización de la albúmina en una composición farmacéutica puede estar presente tanto durante la formulación multi-etapa de la composición farmacéutica como tras la posterior reconstitución de la composición farmacéutica formulada. Por lo tanto, la estabilidad puede ser impartida por la albúmina a un ingrediente activo proteínico en una composición farmacéutica, por ejemplo, (1) reduciendo la adherencia (a lo que se alude comúnmente como "pegajosidad") del ingrediente activo proteico a superficies tales como las superficies de objetos de vidrio de laboratorio, vasos, al vial en el que se reconstituye la composición farmacéutica y a la superficie interior de una jeringuilla utilizada para inyectar la composición farmacéutica. La adherencia de un ingrediente activo proteico a las superficies puede conducir a la pérdida de ingrediente activo y a la desnaturalización del ingrediente activo proteico retenido restante, reduciendo ambas la actividad total del ingrediente activo presente en la composición farmacéutica, y; (2) la reducción de la desnaturalización del ingrediente activo que se puede producir tras la preparación de una solución de baja dilución del ingrediente activo.

45 Además de ser capaz de estabilizar un ingrediente activo proteico en una composición farmacéutica, la albúmina de suero humano tiene también la ventaja de una inmunogenicidad generalmente despreciable cuando se inyecta en un paciente humano. Un compuesto con una inmunogenicidad apreciable puede provocar la producción de anticuerpos contra él, que puede conducir a una reacción anafiláctica y/o al desarrollo de resistencia a los fármacos, volviéndose con ello la enfermedad o trastorno a tratar en potencialmente refractario a la composición farmacéutica que tiene una componente inmunogénico.

50 La albúmina recombinante se ha propuesto como un estabilizador en una composición farmacéutica de toxina botulínica. Por lo tanto, la solicitud de patente de EE.UU. publicada número 2003 0118598 (Hunt) describe usos de diversos excipientes tales como albúmina recombinante, colágeno o un almidón para estabilizar una toxina botulínica presente en una composición farmacéutica.

El colágeno es la proteína más abundante en mamíferos, comprendiendo una cuarta parte de todas las proteínas en el cuerpo y es el constituyente principal de los tejidos conjuntivos tales como la piel, ligamentos y tendones. El colágeno nativo es una triple hélice de tres proteínas de alto peso molecular. Cada una de las tres cadenas de

proteínas que comprenden la hélice de colágeno tiene más de 1400 aminoácidos. Al menos veinticinco tipos distintos de colágenos se han identificado en seres humanos.

El colágeno se ha utilizado en cosmética como material de carga para el tratamiento de problemas de contorno de la piel tales como surcos para suavizar la línea de sonrisa y las líneas de expresión, pliegues entre las cejas, arrugas en la comisura de los ojos y arrugas finas verticales por encima y por debajo de los labios. El colágeno también es útil para suavizar determinadas cicatrices traumáticas o de acné y marcas de viruela virales tales como las marcas de la varicela. Para tales fines, el colágeno se inyecta en la dermis para elevar la piel.

La gelatina se puede obtener mediante la hidrólisis de colágeno. La gelatina se ha utilizado en algunas composiciones farmacéuticas de ingrediente activo proteico como un sustituto de albúmina. De manera notable, la gelatina es una proteína derivada de animales y, por lo tanto, tiene el mismo riesgo de infectividad potencial que el que puede poseer la albúmina de suero humano. La patente china CN 1215084 describe una toxina botulínica de tipo A exenta de albúmina, formulada con gelatina nativa (un hidrolizado de colágeno), una proteína de origen animal, dextrano y sacarosa. La patente de Estados Unidos número 6.087.327 también describe una composición de toxina botulínica de tipos A y B formulada con gelatina nativa.

Desafortunadamente, a pesar de sus efectos estabilizadores conocidos, existen inconvenientes significativos para el uso de excipientes de proteínas, tales como albúmina o gelatina, en una composición farmacéutica. Por ejemplo la albúmina y la gelatina son costosas y cada vez más difíciles de obtener. Además, los productos de la sangre o productos derivados de los animales tales como albúmina y gelatina, cuando se administran a un paciente, pueden someter al paciente a un riesgo potencial de recibir agentes patógenos transmitidos por la sangre o agentes infecciosos. Por lo tanto, se sabe que existe la posibilidad de que la presencia de un excipiente de proteínas derivado de animales en una composición farmacéutica puede dar como resultado una incorporación inadvertida de elementos infecciosos en la composición farmacéutica. Por ejemplo, se ha informado que el uso de albúmina de suero humano puede transmitir priones a una composición farmacéutica. Un prión es una partícula infecciosa proteinácea que se hipotetizó que surge como una isoforma conformacional anormal de la misma secuencia de ácido nucleico que hace la proteína normal. Se ha hipotetizado adicionalmente que la infectividad reside en una "reacción de reclutamiento" de la proteína isoforma normal a la isoforma de proteína priónica a un nivel post traduccional. Aparentemente, la proteína celular endógena normal es inducida a plegarse de forma errónea en una conformación priónica patógena.

Por lo tanto, es deseable encontrar un excipiente adecuado que se pueda utilizar para estabilizar la toxina botulínica presente en una composición farmacéutica de toxina botulínica. Preferiblemente, el estabilizador de la toxina botulínica no es una proteína derivada de una fuente animal (es decir, mamífero).

Toxina botulínica

El género *Clostridium* tiene más de ciento veintisiete especies, agrupadas por morfología y función. La bacteria anaerobia gram-positiva *Clostridium botulinum* produce una potente neurotoxina polipeptídica, la toxina botulínica, que provoca una enfermedad neurológica en seres humanos y animales a la que se alude como botulismo. *Clostridium botulinum* y sus esporas se encuentran comúnmente en el suelo y la bacteria puede crecer en recipientes para alimentos mal esterilizados y sellados de conservas caseras, que son la causa de muchos de los casos de botulismo. Los efectos del botulismo aparecen típicamente 18 a 36 horas después de comer los alimentos infectados con un cultivo o esporas de *Clostridium botulinum*. La toxina botulínica puede pasar aparentemente no atenuada a través del revestimiento del intestino y atacar a las neuronas motoras periféricas. Los síntomas de la intoxicación por toxina botulínica pueden progresar desde dificultad para caminar, tragar y hablar hasta la parálisis de los músculos respiratorios y la muerte.

La toxina botulínica tipo A es el agente biológico natural más letal conocido por el hombre. Alrededor de 50 picogramos de toxina botulínica (complejo de neurotoxina purificada) de tipo A es una DL₅₀ en ratones. Curiosamente, sobre una base molar, la toxina botulínica tipo A es 1,8 billones de veces más letal que la difteria, 600 millones de veces más letal que el cianuro de sodio, 30 millones de veces más letal que cobrotoxina y 12 millones de veces más letal que el cólera. Singh, Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins, páginas 63-84 (capítulo 4) de Natural Toxins II, editado por B.R. Singh et al., Plenum Press, Nueva York (1976) (en donde la DL₅₀ establecida de la toxina botulínica tipo A de 0,3 ng igual a 1 U se corrige por el hecho de que aproximadamente 0,05 ng de BOTOX® es igual a 1 unidad). Una unidad (U) de toxina botulínica se define como la DL₅₀ después de la inyección intraperitoneal en ratones Swiss Webster hembras con un peso de 18-20 gramos cada uno. En otras palabras, una unidad de toxina botulínica es la cantidad de toxina botulínica que mata al 50% de un grupo de ratones Swiss Webster hembras. Siete neurotoxinas botulínicas en general inmunológicamente distintas han sido caracterizadas, siendo éstas respectivamente neurotoxina botulínica serotipos A, B, C₁, D, E, F y G, cada una de las cuales se distingue por neutralización con anticuerpos específicos del tipo. Los diferentes serotipos de toxina botulínica varían en las especies animales a las que afectan y en la gravedad y duración de la parálisis que provocan. Por ejemplo, se ha determinado que la toxina botulínica tipo A es 500 veces más potente, medida por la tasa de parálisis producida en la rata, que la toxina botulínica de tipo B. Adicionalmente, se ha determinado que la toxina botulínica tipo B no es

tóxica en primates a una dosis de 480 U/kg que es aproximadamente 12 veces la DL_{50} en primates para la toxina botulínica tipo A. Las toxinas botulínicas aparentemente se unen con alta afinidad a neuronas motoras colinérgicas, se translocan en la neurona y bloquean la liberación presináptica de acetilcolina.

Las toxinas botulínicas se han utilizado en entornos clínicos para el tratamiento de trastornos neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperactivos. La toxina botulínica tipo A fue aprobada por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos en 1989 para el tratamiento del blefaroespasmio esencial, estrabismo y espasmo hemifacial en pacientes de más de doce años de edad. Los efectos clínicos de la inyección periférica (es decir, intramuscular o subcutánea) de la toxina botulínica de tipo A se ven habitualmente una semana después de la inyección y, a menudo, en el espacio de unas pocas horas después de la inyección. La duración típica del alivio sintomático (es decir, parálisis flácida del músculo) de una única inyección intramuscular de toxina botulínica tipo A puede ser de aproximadamente tres meses a aproximadamente seis meses.

Aunque todas las toxinas botulínicas serotipos aparentemente inhiben la liberación del neurotransmisor acetilcolina en la unión neuromuscular, lo hacen afectando a diferentes proteínas neurosecretoras y/o escindiendo estas proteínas en diferentes sitios. La toxina botulínica A es una endopeptidasa de zinc que puede hidrolizar específicamente un enlace peptídico de la proteína intracelular SNAP-25, asociada a vesícula. Botulinum tipo E también escinde la proteína asociada al sinaptosoma (SNAP-25) de 25 kiloDalton (kD), pero fija como objetivo diferentes secuencias de aminoácidos dentro de esta proteína, en comparación con la toxina botulínica tipo A. La toxina botulínica tipos B, D, F y G actúa sobre la proteína asociada a vesículas (VAMP, también llamada sinaptobrevina), escindiendo cada uno de los serotipo la proteína en un sitio diferente. Finalmente, se ha demostrado que la toxina botulínica tipo C_1 escinde tanto sintaxina como SNAP-25. Estas diferencias en el mecanismo de acción pueden afectar a la potencia relativa y/o a la duración de la acción de los diversos serotipos de toxina botulínica.

Independientemente del serotipo, el mecanismo molecular de la intoxicación por toxina parece ser similar e implica al menos tres etapas o fases. En la primera etapa del proceso, la toxina se une a la membrana presináptica de la neurona diana a través de una interacción específica entre la cadena pesada (cadena H) y un receptor de la superficie de la célula; se piensa que el receptor es diferente para cada uno de los serotipos de toxina botulínica y para la toxina del tétanos. El segmento del extremo carboxilo de la cadena H, H_C , parece ser importante para fijar como objetivo de la toxina la superficie de la célula.

En la segunda etapa, la toxina cruza la membrana plasmática de la célula envenenada. La toxina es envuelta primero por la célula a través de endocitosis mediada por receptor, y se forma un endosoma que contiene la toxina. Entonces la toxina escapa del endosoma al citoplasma de la célula. Se piensa que esta última etapa está mediada por el segmento del extremo amino de la cadena H, H_N , que desencadena un cambio conformacional de la toxina en respuesta a un pH de aproximadamente 5,5 o inferior. Se sabe que los endosomas poseen una bomba de protones que disminuye el pH intra-endosomal. El cambio conformacional deja al descubierto residuos hidrófobos en la toxina, lo que permite que la toxina sea embebida en sí misma en la membrana endosomal. La toxina se transloca a continuación a través de la membrana endosomal en el citosol.

La última etapa del mecanismo de la actividad de la toxina botulínica parece implicar la reducción del enlace disulfuro que une las cadenas H y L. La actividad tóxica completa de las toxinas botulínica y tetánica está contenida en la cadena L de la holotoxina; la cadena L es una endopeptidasa de zinc (Zn^{++}) que escinde selectivamente proteínas esenciales para el reconocimiento y acoplamiento de vesículas que contienen neurotransmisores con la superficie citoplásmica de la membrana plasmática, y la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. La neurotoxina tetánica, la toxina botulínica B, D, F y G provocan la degradación de la sinaptobrevina (también llamada proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP)), una proteína de la membrana sinaptosomal. La mayor parte de la VAMP presente en la superficie citosólica de la vesícula sináptica se separa como resultado de uno cualquiera de estos eventos de escisión. Cada una de las toxinas escinde específicamente un enlace diferente.

El peso molecular de la molécula de proteína de toxina botulínica, para los siete serotipos de toxina botulínica conocidos, es de aproximadamente 150 kD. Las toxinas botulínicas son liberadas por la bacteria clostridial en forma de complejos que comprenden la molécula de proteína de toxina botulínica de 150 kD junto con proteínas no toxina asociadas. Por lo tanto, la toxina botulínica de tipo A puede ser producida por la bacteria clostridial como formas de 900 kD, 500 kD y 300 kD. La toxina botulínica tipos B y C_1 se produce aparentemente como sólo un complejo de 500 kD. La toxina botulínica tipo D se produce como complejos tanto de 300 kD como de 500 kD. Finalmente, la toxina botulínica tipos E y F se produce como complejos de sólo aproximadamente 300 kD. Se cree que los complejos (es decir, peso molecular mayor que aproximadamente 150 kD) contienen una proteína hemaglutinina no toxina y una proteína no hemaglutinina no toxina y no tóxica. Estas dos proteínas no toxinas (que junto con la molécula de toxina botulínica pueden comprender el complejo de neurotoxina relevante) pueden actuar para proporcionar estabilidad contra la desnaturalización de la molécula de toxina botulínica y la protección contra los ácidos digestivos cuando se ingiere la toxina. Adicionalmente, es posible que los complejos de toxina botulínica más grandes (mayores que aproximadamente 150 kD de peso molecular) puedan resultar en una tasa de difusión más lenta de la toxina botulínica alejados de un sitio de inyección intramuscular de un complejo de toxina botulínica. Los complejos de

toxina se pueden disociar en proteína toxina y proteínas hemaglutinina tratando el complejo con glóbulos rojos a un pH de 7,3. La proteína toxina tiene una marcada inestabilidad después de la separación de la proteína hemaglutinina.

- 5 Todos los serotipos de toxina botulínica son producidos por bacterias *Clostridium botulinum* como proteínas de cadena sencilla inactivas que deben ser escindidas o melladas por proteasas para convertirse en neuroactivas. Las cepas bacterianas que producen toxina botulínica serotipos A y G poseen proteasas endógenas y los serotipos A y G pueden ser recuperados, por lo tanto, de cultivos bacterianos predominantemente en su forma activa. En contraposición, la toxina botulínica serotipos C₁, D y E es sintetizada por cepas no proteolíticas y, por tanto, son típicamente inactivas cuando se recuperan del cultivo. Los serotipos B y F son producidos por ambas cepas proteolíticas y no proteolíticas y, por lo tanto, se pueden recuperar tanto en la forma activa como inactiva. Sin embargo, incluso las cepas proteolíticas que producen, por ejemplo, la toxina botulínica de tipo serotipo B solamente escinden una parte de la toxina producida. La proporción exacta de moléculas melladas a no melladas depende de la duración de la incubación y de la temperatura del cultivo. Por lo tanto, un determinado porcentaje de cualquier preparación de, por ejemplo, la toxina botulínica de tipo B es probable que sea inactivo, posiblemente representando la potencia significativamente menor conocida de toxina botulínica tipo B en comparación con la toxina botulínica tipo A. La presencia de moléculas de toxina botulínica inactivas en una preparación clínica contribuirá a la carga global de proteína de la preparación, que ha sido relacionada con una mayor antigenicidad, sin contribuir a su eficacia clínica. Adicionalmente, se sabe que la toxina botulínica tipo B tiene, tras inyección intramuscular, una duración de actividad más corta y es también menos potente que la toxina botulínica de tipo A al mismo nivel de dosis.
- 10
- 15
- 20 Estudios in vitro han indicado que la toxina botulínica inhibe la liberación, inducida por cationes potasio, tanto de acetilcolina como de norepinefrina de cultivos celulares primarios de tejido del bulbo raquídeo. Adicionalmente, se ha informado que la toxina botulínica inhibe la liberación provocada tanto de glicina como de glutamato en cultivos primarios de neuronas de la médula espinal y que en preparaciones de sinaptosomas de cerebro la toxina botulínica inhibe la liberación de cada uno de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina, norepinefrina, CGRP y glutamato.
- 25
- 30 Toxina botulínica de tipo A cristalina de alta calidad puede producirse a partir de la cepa Hall A de *Clostridium botulinum* con características de $\geq 10^7$ U/mg, una A_{260}/A_{278} de menos de 0,60 y un patrón distinto de bandas en electroforesis en gel. El proceso de Schantz conocido puede ser utilizado para obtener toxina botulínica de tipo A cristalina, como se expone en Schantz, E.J., et al, Properties and use of Botulinum toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine, Microbiol Rev. 56: 80-99 (1992). En general, el complejo de toxina botulínica de tipo A puede ser aislado y purificado a partir de una fermentación anaerobia cultivando *Clostridium botulinum* tipo A en un medio adecuado. La toxina bruta se puede recoger por precipitación con ácido sulfúrico y concentrar por ultramicrofiltración. La purificación se puede llevar a cabo disolviendo el precipitado ácido en cloruro de calcio. Entonces la toxina puede precipitarse con etanol frío. El precipitado se puede disolver en tampón fosfato de sodio y centrifugar. Tras el secado se puede obtener entonces un complejo de toxina botulínica cristalina tipo A de aproximadamente 900 kD con una potencia específica de 3×10^7 DL₅₀ U/mg o mayor. Este proceso conocido también puede utilizarse, tras la separación de las proteínas no toxinas, para obtener toxinas botulínicas puras tales como, por ejemplo: toxina botulínica tipo A purificada con un peso molecular de aproximadamente 150 kD con una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ DL₅₀ U/mg o mayor; toxina botulínica tipo B purificada con un peso molecular de aproximadamente 156 kD con una potencia específica de $1-2 \times 10^8$ DL₅₀ U/mg o mayor; y toxina botulínica tipo F purificada con un peso molecular de aproximadamente 155 kD con una potencia específica de $1-2 \times 10^7$ DL₅₀ U/mg o mayor.
- 35
- 40

- 45 Toxinas y complejos de toxina botulínica se pueden obtener, por ejemplo, de List Biological Laboratories, Inc., Campbell, California; el Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Reino Unido; Wako (Osaka, Japón), así como de Sigma Chemicals de St Louis, Missouri. Toxina botulínica comercialmente disponible que contiene composiciones farmacéuticas incluye BOTOX® (complejo de neurotoxina de toxina botulínica de tipo A con albúmina de suero humano y cloruro de sodio) disponible de Allergan, Inc., de Irvine, California, en viales de 100 unidades en forma de un polvo liofilizado a ser reconstituido con cloruro de sodio al 0,9% antes de su uso), Dysport® (complejo de hemaglutinina y toxina de *Clostridium botulinum* tipo A con albúmina de suero humano y lactosa en la formulación), disponible de Ipsen Limited, Berkshire, Reino Unido en forma de un polvo a ser reconstituido con cloruro de sodio al 0,9% antes de su uso), y MyoBloc™ (una disolución inyectable que comprende toxina botulínica tipo B, albúmina de suero humano, succinato de sodio y cloruro de sodio a un pH de aproximadamente 5,6, disponible de Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, California).
- 50

- 55 El éxito de la toxina botulínica tipo A para tratar una diversidad de afecciones clínicas ha conducido al interés en otros serotipos de toxina botulínica. Adicionalmente, la toxina botulínica pura se ha utilizado para tratar a seres humanos. Véase, p. ej., Kohl A., et al., Comparison of the effects of botulinum toxin A (Botox (R)) with the highly-purified neurotoxin (NT201) in the extensor digitorum brevis muscle test. Mov Disord 2000; 15 (Supl 3):165. Por lo tanto, se puede preparar una composición farmacéutica utilizando una toxina botulínica pura.

Se sabe que la toxina botulínica tipo A es soluble en disoluciones acuosas diluidas a pH 4-6,8. A pH por encima de aproximadamente 7 las proteínas no tóxicas estabilizadoras se disocian de la neurotoxina, lo que resulta en una

pérdida gradual de toxicidad, en particular a medida que aumentan el pH y la temperatura. Schantz E.J., et al Preparation and characterization of botulinum toxin type A for human treatment (en particular las páginas 44-45), siendo el capítulo 3 de Jankovic, J., et al, Therapy with Botulinum Toxin, Marcel Dekker, Inc (1994).

5 La patente europea EP1112082 ("Formulaciones líquidas estables de la toxina botulínica"), expedida el 31 de julio de 2002 reivindica una formulación estable líquida farmacéutica de toxina botulínica que comprende un tampón (pH 5-6) y una toxina botulínica, en donde la formulación de toxina es estable en forma de líquido durante al menos un año a temperaturas entre 0-10 C o al menos 6 meses a temperaturas entre 10 y 30 C. Una formulación farmacéutica de toxina botulínica de este tipo (una realización de la cual se vende comercialmente bajo el nombre comercial MyoBloc® o NeuroBloc® por Solstice Neurosciences, Inc., de San Diego, California) se prepara como una disolución
10 líquida (no se lleva a cabo liofilización o secado al vacío alguno) que no requiere reconstitución antes de su uso.

La patente de EE.UU. Nº 5.512.547 (Johnson et al) titulada "Pharmaceutical Composition of Botulinum Neurotoxin and Method of Preparation", expedida el 30 de abril de 1996 reivindica una formulación botulínica pura de tipo A que comprende albúmina y trehalosa, estables al almacenamiento a 37 grados C.

15 La patente de EE.UU. Nº 5.756.468 (Johnson et al), expedida el 26 de mayo de 1998 ("Pharmaceutical Compositions of Botulinum Toxin or Botulinum Neurotoxin and Method of Preparation") reivindica una formulación de toxina botulínica liofilizada que comprende un tioalquilo, albúmina y trehalosa que se puede almacenar entre 25 grados C y 42 grados C.

20 La patente de EE.UU. Nº 5.696.077 (Johnson et al) titulada "Pharmaceutical Composition Containing Botulinum B Complex", expedida el 9 de diciembre de 1997 reivindica una formación de complejo de botulina tipo B liofilizado y libre de cloruro de sodio que comprende un complejo de tipo B y un excipiente de proteína.

Goodnough M.C., et al., Stabilization of botulinum toxin type A during lyophilization, Appl Environ Microbiol 1992; 58(10):3426-3428; y Goodnough M.C., et al, Recovery of type A-botulin toxin following lyophilization , Acs Symposium Series 1994; 567(-): 193-203.

25 La solicitud de patente china CN 1215084A discute una toxina botulínica de tipo A libre de albúmina formulada con gelatina, una proteína de origen animal. La patente de Estados Unidos Nº 6.087.327 también describe una composición de toxina botulínica de tipos A y B formulada con gelatina. Estas formulaciones, por lo tanto, no eliminan el riesgo de transmitir un derivado de proteína animal o acompañan a un elemento infeccioso.

Se ha informado que BoNT/A ha sido utilizado en diversos entornos clínicos, incluyendo los siguientes:

30 (1) aproximadamente 75-125 unidades de BOTOX®¹ por inyección intramuscular (múltiples músculos) para tratar la distonía cervical;

(2) 5-10 unidades de BOTOX® por inyección intramuscular para tratar líneas glabellares (arrugas de la frente) (5 unidades inyectadas intramuscularmente en el músculo procerus y 10 unidades inyectadas intramuscularmente en cada uno de los músculos corrugadores superciliares);

35 (3) aproximadamente 30-80 unidades de BOTOX® para tratar el estreñimiento por inyección intraesfínter del músculo puborrectal;

(4) aproximadamente 1-5 unidades por músculo de BOTOX® inyectado intramuscularmente para tratar el blefaroespasma inyectando al músculo lateral pretarsal orbicular ocular del párpado superior y el lateral pretarsal orbicular ocular del párpado inferior;

40 (5) para tratar el estrabismo, los músculos extraoculares han sido inyectados 1 Disponible de Allergan Inc. de Irvine California bajo el nombre comercial BOTOX® intramuscularmente con entre aproximadamente 1-5 unidades de BOTOX®, variando la cantidad inyectada en base tanto al tamaño del músculo a inyectar como al grado de la parálisis muscular deseada (es decir, cantidad de corrección de dioptrías deseada).

45 (6) para tratar la espasticidad de las extremidades superiores después de apoplejía por inyecciones intramusculares de BOTOX® en cinco músculos flexores diferentes de las extremidades superiores, como sigue:

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

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

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

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

(e) bíceps brachii: 50 U a 200 U. A cada uno de los cinco músculos indicados se les ha inyectado en la misma sesión de tratamiento, de manera que el paciente recibe de 90 U a 360 U de BOTOX® de músculo flexor de las extremidades superiores por inyección intramuscular en cada sesión de tratamiento.

- 5 (7) para tratar la migraña, la inyección pericraneal (inyectada simétricamente en los músculos glabellar, frontalis y temporales) la inyección de 25 U de BOTOX® ha demostrado un beneficio significativo como un tratamiento profiláctico de la migraña en comparación con vehículo según se mide por medidas reducidas de frecuencia de la migraña, gravedad máxima, vómitos asociados y uso de medicación aguda durante un período de tres meses después de la inyección de 25 U.
- 10 Es sabido que la toxina botulínica tipo A puede tener una eficacia de hasta 12 meses (European J. Neurología 6 (Sup. 4): S111-S1150: 1999), y en algunas circunstancias durante tanto como 27 meses. The Laryngoscope 109:1344-1346:1999. Sin embargo, la duración habitual de una inyección intramuscular de Botox® es típicamente de aproximadamente 3 a 4 meses.
- 15 El éxito de la toxina botulínica tipo A para tratar una diversidad de afecciones clínicas ha conducido al interés en otros serotipos de toxina botulínica. Adicionalmente, la toxina botulínica pura ha sido utilizada en seres humanos. Véase, p. ej., Kohl A., et al., Comparison of the effect of botulinum toxin A (Botox(R)) with the highly-purified neurotoxin (NT 201) in the extensor digitorum brevis muscle test, Mov Disord 2000; 15 (Supl. 3):165. Por lo tanto, se puede preparar una composición farmacéutica utilizando una toxina botulínica pura.
- 20 La molécula de toxina botulínica (aproximadamente 150 kDa), así como los complejos de toxina botulínica (aproximadamente 300-900 kDa) tales como el complejo de toxina de tipo A también son extremadamente susceptibles a la desnaturalización debido a la desnaturalización de la superficie, el calor y las condiciones alcalinas. La toxina inactivada forma proteínas toxoides que pueden ser inmunogénicas. Los anticuerpos resultantes pueden volver a un paciente refractario a la inyección de toxina.
- 25 Al igual que con las enzimas en general, las actividades biológicas de las toxinas botulínicas (que son peptidasas intracelulares) dependen, al menos en parte, de su conformación tridimensional. Por lo tanto, la toxina botulínica tipo A es destoxificada por el calor, diversos productos químicos que estiran la superficie y secan la superficie. Adicionalmente, se sabe que la dilución del complejo de toxina obtenido por el cultivo conocido, la fermentación y la purificación a las concentraciones de toxina mucho, mucho más bajas utilizadas para la formulación de composiciones farmacéuticas resulta en una rápida destoxificación de la toxina, a menos que esté presente un
- 30 agente estabilizador adecuado. La dilución de la toxina desde cantidades de miligramos a una disolución que contiene nanogramos por mililitro presenta dificultades significativas debido a la rápida pérdida de toxicidad específica tras tan gran dilución. Dado que la toxina puede utilizarse meses o años después de haberse formulado la toxina que contiene la composición farmacéutica, la toxina debe ser estabilizada con un agente estabilizador. Hasta la fecha, el único agente estabilizante con éxito para este propósito han sido las proteínas derivadas de animales
- 35 albúmina sérica humana y gelatina.
- Una toxina botulínica disponible en el mercado que contiene la composición farmacéutica se vende bajo la marca comercial BOTOX® (disponible de Allergan, Inc., de Irvine, California). BOTOX® consiste en un complejo de toxina botulínica tipo A purificada, albúmina de suero humano y cloruro sódico envasado en forma estéril, secada al vacío. La toxina botulínica tipo A se hace de un cultivo de la cepa Hall de Clostridium botulinum cultivada en un medio que
- 40 contiene N-Z amina y extracto de levadura. El complejo de toxina botulínica tipo A se purifica de la disolución de cultivo por una serie de precipitaciones con ácidos hasta formar un complejo cristalino que consiste en la proteína toxina de alto peso molecular activa y una proteína hemaglutinina asociada. El complejo cristalino se re-disuelve en una disolución que contiene solución salina y albúmina y se filtra en condiciones estériles (0,2 micras) antes del secado al vacío. BOTOX® se puede reconstituir con solución salina estéril, no conservada, antes de la inyección
- 45 intramuscular. Cada uno de los viales de BOTOX® contiene aproximadamente 100 unidades (U) de complejo de toxina de tipo A de Clostridium botulinum, 0,5 miligramos de albúmina de suero humano y 0,9 miligramos de cloruro de sodio en una forma estéril, secada al vacío, sin un conservante.
- Para reconstituir BOTOX® secado al vacío se utiliza solución salina normal estéril sin un conservante (inyección de Cloruro de Sodio al 0,9%) aspirando la cantidad apropiada de diluyente en la jeringa de tamaño apropiado. Dado
- 50 que BOTOX® se desnaturaliza por burbujeo o agitación violenta similar, el diluyente se inyecta suavemente en el vial. Por razones de esterilidad, BOTOX® debe administrarse dentro de las cuatro horas después de la reconstitución. Durante este período de tiempo, el BOTOX® reconstituido se almacena en nevera (2° a 8°C). BOTOX® reconstituido es transparente, incoloro y está libre de partículas. El producto secado al vacío se almacena en un congelador a o por debajo de -5°C.
- 55 Se ha informado de que una alternativa apropiada a la albúmina de suero humano como un estabilizador de la toxina botulínica puede ser otra proteína o, alternativamente, un compuesto de bajo peso molecular (no proteico). 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 de octubre de 1990; Karger (1992), 225-239.

Muchas sustancias utilizadas comúnmente como soportes y agentes de carga en composiciones farmacéuticas han demostrado ser inadecuadas como excipientes no proteicos para estabilizar la toxina botulínica presente en una composición farmacéutica. Por ejemplo, se ha encontrado que la celobiosa disacárido es inadecuada como un estabilizador de la toxina botulínica. Por lo tanto, se sabe que el uso de celobiosa como un excipiente en unión con albúmina y cloruro de sodio resulta en un nivel mucho más bajo de toxicidad (recuperación de 10%) después de liofilización de toxina botulínica de tipo A cristalina con estos excipientes, en comparación con la toxicidad después de la liofilización sólo con albúmina de suero humano (> 75% a > 90% de recuperación). Goodnough et al., Stabilization of Botulinum Toxin Type A During Lyophilization, App & Envir. Micro. 58 (10) 3426-3428 (1992).

Además de ello, los sacáridos, incluyendo los polisacáridos, son, en general, malos candidatos para servir como estabilizantes de proteínas. Por lo tanto, se sabe que una composición farmacéutica que contiene un ingrediente activo proteico es inherentemente inestable si la formulación de proteína comprende un sacárido (tal como glucosa o un polímero de glucosa) o hidratos de carbono, ya que se sabe que las proteínas y la glucosa interactúan juntas y se someten a la bien descrita reacción de Maillard, debido a la naturaleza reductora de glucosa y polímeros de glucosa. Gran parte del trabajo se ha dedicado a intentos, en su mayoría sin éxito, en la prevención de esta reacción proteína-sacárido, por ejemplo, la reducción de la humedad o el uso de azúcares no reductores. De manera significativa, la vía degradativa de la reacción de Maillard puede dar como resultado una insuficiencia terapéutica del ingrediente activo proteínico. Por lo tanto, una formulación farmacéutica que comprende proteína y un sacárido reductor, hidrato de carbono o azúcar, tal como un polímero de glucosa, es inherentemente inestable y no se puede almacenar durante un largo periodo de tiempo sin una pérdida significativa de actividad biológica deseada de la proteína ingrediente activo.

Polisacáridos particulares de alto peso molecular (almidones), tales como hidroxietil-almidón, han sido propuestos como estabilizadores de la toxina botulínica presente en una composición farmacéutica de toxina botulínica. Véase, p. ej., la patente europea EP 1 253 932, expedida el 27 de abril de 2005.

En particular, una de las razones por las que albúmina o gelatina pueden funcionar eficazmente como un estabilizador de un ingrediente activo proteínico en una composición farmacéutica es porque, al ser proteínas, estos estabilizadores no se someten a la reacción de Maillard con el ingrediente activo proteína en una composición farmacéutica. Por lo tanto, uno esperaría encontrar y buscar un sustituto para estos excipientes proteicos utilizados para estabilizar la toxina botulínica presente en una composición farmacéutica de toxina botulínica entre otras proteínas.

Las características únicas de la toxina botulínica y su formulación en una composición farmacéutica adecuada restringen y obstaculizan y hacen que sea problemática la búsqueda de un sustituto para un estabilizador de proteínas en formulaciones farmacéuticas que contienen una toxina botulínica. Siguen ejemplos de cuatro de estas características únicas.

En primer lugar, la toxina botulínica es una proteína relativamente grande para su incorporación en una formulación farmacéutica (el peso molecular del complejo de toxina botulínica de tipo A es 900 kD) y, por lo tanto, es inherentemente frágil y lábil. El tamaño del complejo de toxina lo hace mucho más friable y lábil que las proteínas más pequeñas y menos complejas, agravando de este modo las dificultades de formulación y manipulación si se ha de mantener la estabilidad de la toxina. Por lo tanto, un estabilizador de la toxina botulínica debe ser capaz de interactuar con la toxina de una manera que no desnaturalice, fragmente o desintoxique de otra manera la molécula de toxina ni provoque una disociación de las proteínas no-toxina presentes en el complejo de toxina.

En segundo lugar, como el producto biológico más letal conocido, se requiere una seguridad, precisión y exactitud excepcionales en todas las etapas de la formulación de una toxina botulínica que contiene la composición farmacéutica. Por lo tanto, un estabilizador de la toxina botulínica no debe ser en sí mismo tóxico o difícil de manipular para no exacerbar los requisitos, ya extremadamente rigurosos, de la formulación de composición farmacéutica que contiene toxina botulínica.

En tercer lugar, dado que la toxina botulínica fue la primera toxina microbiana que se aprobó (por la FDA en 1989) inyectable para el tratamiento de enfermedades humanas, protocolos específicos tuvieron que ser desarrollados y aprobados para el cultivo, la producción a granel, la formulación en un producto farmacéutico y el uso de la toxina botulínica. Consideraciones importantes son la pureza de la toxina y la dosis para la inyección. La producción por cultivo y la purificación deben llevarse a cabo de modo que la toxina no esté expuesta a cualquier sustancia que pueda contaminar el producto final, incluso en cantidades trazas y pueda provocar reacciones indebidas en el paciente. Estas restricciones requieren el cultivo en medio simplificado sin el uso de productos cárnicos de animales y la purificación por procesos que no impliquen disolventes o resinas sintéticos. La preparación de la toxina utilizando enzimas, diversos intercambiadores tales como los presentes en columnas de cromatografía y disolventes sintéticos puede introducir contaminantes y, por lo tanto, se excluyen de etapas de formulación preferidas. Además,

la toxina botulínica tipo A se desnaturaliza fácilmente a temperaturas por encima de 40 grados C, pierde toxicidad cuando se forman burbujas en la interfase aire/líquido, y se desnaturaliza en presencia de nitrógeno o dióxido de carbono.

En cuarto lugar, existen dificultades particulares para estabilizar la toxina botulínica tipo A, porque el tipo A consiste en una molécula de toxina de aproximadamente 150 kD en asociación no covalente con proteínas no toxina que pesan aproximadamente 750 kD. Se piensa que las proteínas no toxina preservan o ayudan a estabilizar las estructuras secundaria y terciaria de las que depende la toxicidad. Procedimientos o protocolos aplicables a la estabilización de no proteínas o proteínas relativamente más pequeñas no son aplicables a los problemas inherentes a la estabilización de los complejos de toxina botulínica tales como el complejo de toxina botulínica de tipo A de 900 kD. Así, mientras que de pH 3,5 a 6,8 las proteínas de toxina tipo A de toxina y de no toxina están unidas de forma no covalente entre sí, en condiciones ligeramente alcalinas (pH > 7,1) la toxina muy lábil se libera del complejo de toxina. Como se ha expuesto anteriormente, la toxina botulínica pura (es decir, la molécula de 150 kD) se ha propuesto como el ingrediente activo en una composición farmacéutica.

A la vista de la naturaleza única de la toxina botulínica y los requisitos establecidos anteriormente, la probabilidad de encontrar un estabilizante no proteico adecuado para los estabilizadores de proteínas utilizados en composiciones farmacéuticas que contienen la toxina botulínica deben ser vistas de forma realista que se aproximan a cero. Antes de la presente invención, sólo las proteínas de origen animal, albúmina de suero humano y gelatina se habían conocido que tienen utilidad como estabilizantes apropiados de la toxina botulínica presente en una formulación farmacéutica. Por lo tanto, se sabe que la albúmina, por sí misma o con una o más sustancias adicionales tales como fosfato de sodio o citrato de sodio, permite una alta recuperación de la toxicidad de la toxina botulínica tipo A después de la liofilización. Por desgracia, como ya se ha expuesto, la albúmina de suero humano, como un producto agrupado de la sangre, puede, al menos en potencia, portar elementos infecciosos o que provocan una enfermedad cuando están presentes en una composición farmacéutica. De hecho, cualquier producto de origen animal o proteína tal como albúmina de suero humano o gelatina también puede contener potencialmente pirógenos u otras sustancias que pueden provocar reacciones adversas tras la inyección en un paciente.

Lo que se necesita, por lo tanto, es una composición farmacéutica de toxina clostridial, en la que la toxina clostridial (que es una toxina botulínica) se estabiliza mediante un excipiente no proteico.

SUMARIO

La presente invención satisface esta necesidad y proporciona una composición farmacéutica de toxina botulínica que se estabiliza mediante un excipiente no proteico.

Definiciones

Tal como se utiliza en esta memoria, las palabras o términos recogidos a continuación tienen las siguientes definiciones.

"Aproximadamente" significa que el elemento, parámetro o término así calificado abarca una gama de más o menos diez por ciento por encima y por debajo del valor del elemento, parámetro o término indicado.

"Administración" o "administrar" significa la etapa de dar (es decir, administrar) una composición farmacéutica a un sujeto. Las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria se "administran localmente" p. ej., administración intramuscular (i.m.), administración intradérmica, administración subcutánea, administración intratecal, administración intraperitoneal (i.p.), administración, o vías de administración tópica (transdérmica) e implantación (es decir, de un dispositivo de liberación lenta tal como implante polimérico o bomba miniosmótica).

"Proteína animal libre" significa la ausencia de sangre derivada, sangre agrupada y otros productos o compuestos derivados de animales. "Animal" significa un mamífero (tal como un ser humano), aves, reptiles, peces, insectos, arañas u otra especie animal. "Animal" excluye microorganismos tales como bacterias. Por lo tanto, una composición farmacéutica libre de proteínas animales dentro del alcance de esta invención puede incluir una neurotoxina clostridial. Por ejemplo, una composición farmacéutica libre de proteínas animales significa una composición farmacéutica que está sustancialmente libre o esencialmente libre o totalmente libre de una albúmina derivada de suero, gelatina y otras proteínas de origen animal, tales como inmunoglobulinas. Un ejemplo de una composición farmacéutica libre de proteínas animales es una composición farmacéutica que comprende o que consiste en una toxina botulínica (como el ingrediente activo) y un polisacárido adecuado como estabilizador o excipiente.

"Toxina botulínica" significa una neurotoxina producida por *Clostridium botulinum*, así como una toxina botulínica (o la cadena ligera o la cadena pesada de la misma) hecha de forma recombinante por una especie no clostridial. La frase "toxina botulínica", tal como se utiliza en esta memoria, abarca la toxina botulínica serotipos A, B, C, D, E, F y G. La toxina botulínica, tal como se usa en este documento, también abarca tanto un complejo de toxina botulínica (es decir, complejos de 300, 600 y 900 kDa), así como la toxina botulínica purificada (es decir, aproximadamente 150 kDa). "Toxina botulínica purificada" se define como una toxina botulínica que está aislada, o sustancialmente

aislada, de otras proteínas, incluyendo proteínas que forman un complejo de toxina botulínica. Una toxina botulínica purificada puede ser de más de 95% de pureza, y preferiblemente de más de 99% de pureza. Las citotoxinas C₂ y C₃ botulínicas, que no son neurotoxinas, se excluyen del alcance de la presente invención.

- 5 "Neurotoxina clostridial" significa una neurotoxina producida a partir de, o nativa de una bacteria clostridial tal como *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* o *Clostridium beratti*, así como una neurotoxina clostridial hecha de forma recombinante por una especie no clostridial.

"Totalmente libre (es decir, terminología "que consiste en") significa que dentro del intervalo de detección del instrumento o procedimiento que se esté utilizando, no se puede detectar la presencia de la sustancia o no se puede confirmar su presencia.

- 10 "Esencialmente libre" (o "consiste esencialmente en") significa que sólo se pueden detectar cantidades trazas de la sustancia.

- 15 "Toxina botulínica modificada" significa una toxina botulínica que ha tenido al menos uno de sus aminoácidos suprimidos, modificados o reemplazados, en comparación con una toxina botulínica nativa. Adicionalmente, la toxina botulínica modificada puede ser una neurotoxina producida de forma recombinante, o un derivado o fragmento de una neurotoxina hecha de forma recombinante. Una toxina botulínica modificada conserva al menos una actividad biológica de la toxina botulínica nativa tal como la capacidad de unirse a un receptor de toxina botulínica, o la capacidad de inhibir la liberación de neurotransmisores de una neurona. Un ejemplo de una toxina botulínica modificada es una toxina botulínica que tiene una cadena ligera de un serotipo de toxina botulínica (tal como el serotipo A) y una cadena pesada de un serotipo de toxina botulínica diferente (tal como serotipo B). Otro ejemplo de 20 una toxina botulínica modificada es una toxina botulínica acoplada a un neurotransmisor tal como sustancia P.

- "Composición farmacéutica" significa una formulación en la que un ingrediente activo puede ser una neurotoxina clostridial tal como una toxina botulínica. La palabra "formulación" significa que hay al menos un ingrediente adicional en la composición farmacéutica además de un ingrediente activo de neurotoxina clostridial. Por lo tanto, una composición farmacéutica es una formulación que es adecuada para la administración diagnóstica o terapéutica 25 (es decir, por inyección intramuscular o subcutánea o por inserción de un depósito o implante) a un sujeto tal como un paciente humano. La composición farmacéutica puede estar: en un estado liofilizado o secado al vacío; una disolución formada después de la reconstitución de la composición farmacéutica liofilizada o secada al vacío con solución salina o agua, o como una disolución que no requiere reconstitución. El ingrediente activo de neurotoxina puede ser uno de los serotipos de toxina botulínica A, B, C₁, D, E, F o G o una toxina tetánica, todos los cuales se pueden hacer de forma nativa por bacterias clostridiales. Tal como se ha establecido, una composición farmacéutica puede ser líquida o sólida, por ejemplo secada al vacío. Los ingredientes constitutivos de una composición farmacéutica se pueden incluir en una única composición (es decir todos los ingredientes constituyentes, a excepción de cualquier fluido de reconstitución requerido, están presentes en el momento de la composición inicial de la composición farmacéutica) o como un sistema de dos componentes, por ejemplo una composición secada al 35 vacío reconstituida con un diluyente tal como disolución salina, cuyo diluyente contiene un ingrediente no presente en la composición inicial de la composición farmacéutica. Un sistema de dos componentes proporciona el beneficio de permitir la incorporación de ingredientes que no son lo suficientemente compatibles para el almacenamiento en anaquel a largo plazo con el primer componente del sistema de dos componentes. Por ejemplo, el vehículo de reconstitución o diluyente puede incluir un conservante que proporciona una protección suficiente contra el crecimiento microbiano durante el periodo de uso, por ejemplo de una semana de almacenamiento refrigerado, pero no está presente durante el periodo de almacenamiento en el congelador de dos años, tiempo durante el cual se podría degradar la toxina. Otros ingredientes, que pueden no ser compatibles con una toxina clostridial u otros ingredientes durante largos periodos de tiempo, se pueden incorporar de esta manera; es decir, añadir en un segundo vehículo (es decir, en el líquido de reconstitución) aproximadamente en el momento de uso.

- 45 "Estabilizador" (o "estabilizador primario") es un agente químico que ayuda a preservar o mantener la estructura biológica (es decir, la conformación tridimensional) y/o la actividad biológica de una proteína (tal como una neurotoxina clostridial, tal como una toxina botulínica). Los estabilizadores utilizados en esta memoria son no-proteínas. El estabilizador primario puede ser un agente sintético que no produciría una respuesta inmunogénica (o produciría una respuesta inmune atenuada) en un sujeto que recibe una composición que contiene el estabilizador primario. Estabilizadores adicionales también pueden ser incluidos en una composición farmacéutica. Estos 50 estabilizadores adicionales o secundarios se pueden utilizar solos o en combinación con los estabilizadores primarios. Estabilizadores secundarios a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a derivados de aminoácidos no oxidantes (tal como un derivado de triptófano tal como N-acetil-triptófano ("NAT")), caprilato (es decir, caprilato de sodio), un polisorbato (es decir, P80), aminoácidos, y cationes de metales divalentes tales como zinc. Una composición farmacéutica también puede incluir agentes conservantes tales como alcohol bencílico, ácido benzoico, fenol, parabenos y ácido sórbico.

"Estabilizando", "estabiliza" o "estabilización" significa que un ingrediente activo farmacéutico ("PAI") conserva al menos 20% y hasta el 100% de su actividad biológica (que puede ser evaluada como potencia o como toxicidad por

una medida DL_{50} o DE_{50} in vivo) en presencia de un compuesto que se está estabilizando, se estabiliza o que proporciona la estabilización al PAI. Por ejemplo, tras (1) la preparación de diluciones en serie a partir de una disolución a granel o de partida, o (2) tras la reconstitución con solución salina o agua de una composición farmacéutica liofilizada o secada al vacío que contiene toxina botulínica que ha sido almacenada en o por debajo de aproximadamente -2 grados C durante entre seis meses y cuatro años, o (3) para una disolución acuosa de toxina botulínica que contiene la composición farmacéutica que se ha almacenado a entre aproximadamente 2 grados y aproximadamente 8 grados C durante seis meses a cuatro años, la toxina botulínica presente en la composición de la disolución farmacéutica reconstituida o acuosa tiene (en presencia de un compuesto que se está estabilizando, estabiliza o que proporciona estabilización al PAI) más de aproximadamente 20% y hasta aproximadamente 100% de la potencia o toxicidad que la toxina botulínica biológicamente activa tenía antes de ser incorporada en la composición farmacéutica.

"Sustancialmente libre" significa presente en un nivel de menos de uno por ciento en peso de la composición farmacéutica.

"Formulación terapéutica" significa una formulación que se puede utilizar para tratar y, con ello, aliviar un trastorno o una enfermedad tal como un trastorno o una enfermedad caracterizada por la hiperactividad (es decir, espasticidad) de un músculo periférico.

La toxina botulínica puede estar presente como un complejo de toxina botulínica (es decir, como un complejo de aproximadamente 300 a aproximadamente 900 kiloDalton dependiendo del serotipo particular de toxina botulínica) o la toxina botulínica puede estar presente como una toxina botulínica pura o purificada (es decir, como la molécula de toxina botulínica de aproximadamente 150 kiloDalton).

Las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria pueden tener un pH de entre aproximadamente 5 y 7,3 cuando se reconstituyen o después de la inyección.

Esta invención puede ponerse en práctica utilizando una composición que comprende una toxina botulínica tipo A. En otras realizaciones de la invención, los métodos anteriores se pueden poner en práctica con una composición que comprende toxina botulínica de tipo B. En realizaciones adicionales de la invención, los métodos pueden ponerse en práctica con una composición que comprende una pluralidad de serotipos de toxina botulínica tales como los serotipos de toxina botulínica seleccionados del grupo que consiste en toxina botulínica serotipos A, B, C₁, D, E, F y G. En determinadas realizaciones de la invención, se pueden utilizar toxinas botulínicas purificadas. En otras realizaciones, se pueden utilizar toxinas botulínicas modificadas.

Todavía en realizaciones adicionales de la invención, las composiciones utilizadas en los métodos anteriores se pueden administrar por vía intramuscular al paciente. En otras realizaciones, las composiciones se pueden administrar por vía subcutánea y/o intratecal.

Esta invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende (o que consiste en, o que consiste esencialmente en) una toxina botulínica, en donde la toxina botulínica no está estabilizada por un excipiente proteico, un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un monosacárido, un disacárido y un trisacárido, y un aminoácido que es metionina.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que una composición farmacéutica de toxina clostridial, con una toxina clostridial estabilizada, se puede hacer utilizando un excipiente no proteico como estabilizador primario de la toxina clostridial.

El autor de la invención ha descubierto que un sustituto adecuado para un excipiente de proteínas, tal como albúmina o gelatina en una composición farmacéutica de toxina clostridial puede ser un compuesto no proteico.

El excipiente no proteína utilizada en la presente invención puede impartir estabilidad a un ingrediente activo de neurotoxina, que es una toxina botulínica, presente en la composición farmacéutica mediante: (1) la reducción de la adherencia (a la que se alude comúnmente como "pegajosidad") de la toxina botulínica a las superficies, tales como las superficies de vidrio de laboratorio, recipientes, el vial en el que se reconstituye la composición farmacéutica y la superficie interior de la jeringuilla utilizada para inyectar la composición farmacéutica. La adherencia de la toxina botulínica a las superficies puede conducir a la pérdida de toxina botulínica y a la desnaturalización de la toxina botulínica retenida, ambas reducen la toxicidad de la toxina botulínica presente en la composición farmacéutica. (2) la reducción de la desnaturalización de la toxina botulínica y/o la disociación de la toxina botulínica de otras proteínas no toxinas presentes en el complejo de toxina botulínica, cuyas actividades de desnaturalización y/o disociación pueden producirse debido a la baja dilución de la toxina botulínica presente en la composición farmacéutica (es decir, antes de la liofilización o del secado al vacío) y en la composición farmacéutica reconstituida. (3) reducción de la pérdida de toxina botulínica (es decir, debido a la desnaturalización o disociación de proteínas no toxina en el complejo) durante los cambios considerables del pH y la concentración que tienen lugar durante la preparación, el procesamiento y la reconstitución de la composición farmacéutica.

Los tres tipos de estabilizaciones de toxina botulínica proporcionados por los estabilizadores que no son proteínas descritos en esta memoria conservan y preservan la toxina botulínica con su toxicidad nativa antes de la inyección de la composición farmacéutica.

- 5 En determinadas realizaciones de la invención, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender una pluralidad de serotipos de toxina botulínica. En otras palabras, la composición puede incluir dos o más diferentes serotipos de toxina botulínica. Por ejemplo, una composición puede incluir la toxina botulínica serotipos A y B. En otra realización, una composición puede incluir toxina botulínica serotipos A y E. El uso de una combinación de serotipos de toxina botulínica permitirá a cuidadores personalizar la composición para lograr un efecto deseado sobre la base de la afección a tratar. En una realización adicional de la invención, la composición
- 10 puede comprender una toxina botulínica modificada. La toxina botulínica modificada inhibirá preferiblemente la liberación de neurotransmisor de una neurona, pero puede tener una potencia mayor o menor que la toxina botulínica nativa, o puede tener un efecto biológico mayor o menor que la toxina botulínica nativa. Debido a que las composiciones de la invención pueden utilizarse para el tratamiento relativamente a largo plazo de los animales, las composiciones se pueden proporcionar en una forma relativamente pura. En una realización, las composiciones son de una calidad farmacéutica. En determinadas realizaciones, la neurotoxina clostridial tiene una pureza mayor que
- 15 95%. En realizaciones adicionales, la neurotoxina clostridial tiene una pureza mayor que 99%.

La invención también abarca la adición de un conservante, ya sea en el diluyente o formulación en sí, para permitir un almacenamiento prolongado. Un conservante preferido es solución salina conservada que contiene alcohol bencílico.

- 20 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar utilizando modos convencionales de administración. En realizaciones preferidas de la invención, las composiciones se administran al sujeto por vía intramuscular o por vía subcutánea. En otras realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse por vía intratecal. Además, las composiciones de la invención se pueden administrar con uno o más agentes analgésicos o anestésicos.
- 25 El modo más eficaz de administración y el régimen de dosificación para las composiciones de esta invención depende del tipo, gravedad y curso de la afección a tratar, la salud y respuesta al tratamiento del animal, y el juicio del médico tratante. Por consiguiente, los métodos y las dosificaciones de las composiciones deben ser adaptados al sujeto individual.
- A modo de ejemplo, y no a modo de limitación, puede ser preferible administrar la composición de la invención por
- 30 vía intramuscular para reducir un espasmo muscular.

La invención también abarca una composición farmacéutica que comprende una toxina botulínica y un colágeno para su uso para tratar una diversidad de afecciones en las que la toxina botulínica actúa para paralizar un músculo y el colágeno actúa para proporcionar una carga dérmica.

- 35 Las composiciones que contienen otros serotipos de toxina botulínica pueden contener diferentes dosis de la toxina botulínica. Por ejemplo, la toxina botulínica tipo B puede ser proporcionada en una composición a una dosis mayor que una composición que contiene la toxina botulínica tipo A. En una realización de la invención, la toxina botulínica tipo B puede administrarse en una cantidad entre aproximadamente 1 U/kg y 150 U/kg. La toxina botulínica tipo B también se puede administrar en cantidades de hasta 20.000 U (unidades de ratón, tal como se describió anteriormente). En otra realización de la invención, la toxina botulínica tipos E o F se puede administrar en
- 40 concentraciones entre aproximadamente 0,1 U/kg y 150 U/kg. Además, en las composiciones que contienen más de un tipo de toxina botulínica, cada uno de los tipos de toxina botulínica se puede proporcionar en una dosis relativamente más pequeña que la dosis utilizada típicamente para un solo serotipo de toxina botulínica. La combinación de serotipos de toxina botulínica puede entonces proporcionar un grado y una duración de la parálisis adecuados, sin un aumento de la difusión de las neurotoxinas (p. ej., véase la patente de EE.UU. Nº 6.087.327).
- 45 Un excipiente no proteico que se utiliza en una composición farmacéutica de toxina botulínica dentro del alcance de la presente invención es metionina. La formulación de la toxina botulínica liofilizada se puede reconstituir con solución salina, agua o con un diluyente habitual para afectar al comportamiento después de la reconstitución o inyección.

Ejemplo 1

- 50 Uso de una Composición Farmacéutica de Toxina Botulina

A un hombre de 48 años de edad se le diagnostica una afección muscular espástica, tal como distonía cervical. En el paciente se inyectan por vía intramuscular entre aproximadamente 10^{-3} U/kg y aproximadamente 35 U/kg de una composición farmacéutica de toxina botulínica de tipo A de una formulación que contiene lactosa y PVP. En el espacio de 1-7 días se alivian los síntomas de la afección muscular espástica y el alivio de los síntomas

55 persiste durante al menos aproximadamente 2 meses y aproximadamente 6 meses.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención descrita en esta memoria tiene muchas ventajas, que incluyen las siguientes:

- 5 1. la composición farmacéutica se puede preparar exenta de cualquier producto de la sangre tal como albúmina y, por lo tanto, exento de cualquier elemento infeccioso de producto de la sangre tal como un prion.
2. la composición farmacéutica tiene estabilidad y un alto % de recuperación de la potencia de toxinas, equiparable o superior al alcanzado con composiciones farmacéuticas actualmente disponibles.
- 10 3. toxicidad reducida, tal como se evalúa mediante administración intramuscular o intravenosa.
4. antigenicidad reducida.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica de toxina botulínica libre de proteína animal, que comprende:

una toxina botulínica;

5 un primer compuesto seleccionado del grupo que consiste en un monosacárido, un disacárido y un trisacárido; y

un segundo compuesto que es un aminoácido, que es metionina.