

FORMULACIÓN LÍQUIDA DE TOXINA BOTULÍNICA Y SU USO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a formulaciones líquidas que comprenden (i) toxina botulínica, (ii) albúmina sérica humana (HSA, según las siglas en inglés), (iii) ácido hialurónico, y (iv) un alditol. Las formulaciones líquidas se caracterizan por una estabilidad mejorada frente a la luz. La invención se refiere además a un método de preparación de las formulaciones líquidas y al uso de las formulaciones líquidas en el tratamiento de indicaciones terapéuticas y cosméticas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las neurotoxinas botulínicas (BoNTs; o toxina botulínica (BT), según las siglas en inglés) son una familia de neurotoxinas bacterianas ampliamente utilizadas para tratar una creciente variedad de afecciones neurológicas, médicas y cosméticas. Existen siete serotipos "clásicos" de BoNT ampliamente aceptados, designados BoNT/A-G). Dos serotipos, el tipo A (BoNT/A) y el tipo B (BoNT/B), están actualmente en uso clínico. Las BoNT son producidas por *Clostridium spp*, en particular *Clostridium botulinum*, en forma de complejos de alto peso molecular (hasta ~900 kDa). Estos complejos de toxinas están compuestos por la neurotoxina activa de 150 kDa y varias proteínas complejantes (proteínas asociadas a neurotoxinas no tóxicas, NAPs, según las siglas en inglés).

La neurotoxina de 150 kDa se sintetiza como un polipéptido inactivo de cadena simple (~150 kDa), que se escinde proteolíticamente para lograr una cadena ligera (en adelante LC, por sus siglas en inglés, ~50 kDa) y una cadena pesada (en adelante HC, por sus siglas en inglés ~100 kDa) conectadas por un enlace disulfuro entre cadenas. La HC contiene un dominio C-terminal mediador de la unión a los receptores y un dominio N-terminal mediador de la translocación de la LC a través de las membranas endosomales. La LC actúa como una proteasa en las neuronas y escinde las proteínas SNARE neuronales. Esto bloquea la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, inhibiendo así la liberación de neurotransmisores de neuronas seleccionadas.

La formulación de BoNTs es muy exigente, debido a su complejidad estructural y a las bajas concentraciones de producto utilizadas. La BoNT es muy susceptible a diversas condiciones como el calor y el pH alcalino. Por lo tanto, dado que la BoNT sólo es funcional si su estructura está intacta, el reto en relación con la preparación de una forma de dosificación médica de la BoNT es formular una composición que proteja la BoNT de la inactivación o la pérdida parcial de actividad biológica durante la producción, el almacenamiento o el uso del producto.

Además, debido a la potencia extremadamente alta de la BoNT, con una dosis letal

humana en el rango de sólo alrededor de 0.1-1 ng/kg, las formulaciones farmacéuticas de la BoNT comprenden cantidades extremadamente pequeñas de la toxina en el rango de sólo alrededor de 1 ng por vial. Esto agrava el conocido problema de la pérdida de actividad de la toxina debido a la desnaturalización de la superficie. Por consiguiente, una de las principales dificultades a sortear en la formulación de las BoNTs es minimizar la pérdida de actividad durante la fabricación y el almacenamiento.

Al mismo tiempo, las formulaciones de las BoNTs deben ser adecuadas para su uso médico en una amplia gama de indicaciones diferentes. Esto significa que la formulación de la BoNT debe ser compatible con la inyección en tejidos de muchos tipos diferentes, como ser músculos, diferentes capas de piel (dermis, subcutis) o glándulas (por ejemplo, glándula salival).

En vista de lo antedicho, los principales productos de BoNT actualmente disponibles en el mercado se suministran como polvos liofilizados, es decir, en una forma que es estable durante un largo periodo de tiempo cuando se almacena a 2-8 °C o incluso a temperatura ambiente. Las formas liofilizadas del complejo BoNT/A se introdujeron por primera vez en el mercado en 1989 (Botox®, Allergan) y 1991 (Dysport®, Ipsen). En 2005, se aprobó la primera forma de dosificación estable de la neurotoxina BoNT/A pura de 150 kDa sin proteínas complejantes (Xeomin®; Merz Pharmaceuticals). Sin embargo, estos productos liofilizados se deben reconstituir con anterioridad a su uso, un proceso que puede dar lugar a errores de dosificación y problemas de esterilidad. Por lo tanto, se han hecho grandes esfuerzos para desarrollar formulaciones líquidas de BoNT, que son más cómodas de usar y se pueden administrar fácilmente.

Una formulación líquida comercial de BoNT está disponible bajo la marca comercial Neurobloc® (Eisai). Se trata de una solución estéril del complejo BoNT/B formulada en un búfer que contiene succinato disódico, cloruro sódico, albúmina sérica humana (HSA), caprilato sódico y N-acetiltryptofanato sódico. Otras formulaciones líquidas disponibles en el mercado se venden bajo las marcas Innotox® (Medytox) y Alluzience® (Ipsen/Galderma). Ambas formulaciones líquidas contienen el complejo de toxina BoNT/A y, además de agua, cloruro sódico, un detergente (Innotox®: polisorbato 20; Alluzience®: polisorbato 80), un aminoácido (Innotox®: metionina; Alluzience®: histidina) y un excipiente adicional (Innotox®: fosfato sódico como búfer; Alluzience®: sacarosa).

El documento US 8 372 645 revela un método para estabilizar una neurotoxina botulínica de Clostridium botulinum de tipo A, B, C1, D, E, F, o G o una mezcla de dos o más neurotoxinas botulínicas, donde la neurotoxina o mezcla de neurotoxinas está libre de las proteínas complejantes que forman naturalmente complejos con las neurotoxinas botulínicas, que comprende entremezclar la neurotoxina con un agente estabilizador no proteínico en una solución acuosa en una cantidad eficaz para retener la actividad biológica de la neurotoxina, donde la

solución acuosa no contiene proteínas derivadas de mamíferos. El agente estabilizador no proteínico se selecciona entre uno o más de los siguientes: ácido hialurónico, polivinilpirrolidona y polietilenglicol. La composición puede comprender además un polialcohol seleccionado entre uno o más de inositol, manitol y sorbitol. La solución acuosa comprende un búfer de pH. La
5 composición puede liofilizarse.

El documento US 7 780 967 revela una composición farmacéutica que consiste esencialmente en un polisacárido de alto peso molecular y una toxina botulínica, donde la toxina botulínica está estabilizada por el polisacárido de alto peso molecular y donde la composición farmacéutica tiene una toxicidad reducida. El polisacárido de alto peso molecular se selecciona
10 del grupo que consiste en hidroximetilalmidón, hidroxietilalmidón, hidroxipropilalmidón, hidroxibutilalmidón e hidroxipentilalmidón.

El documento US 2012/0141532 revela una composición farmacéutica que comprende una neurotoxina botulínica y un portador viscoso para la neurotoxina botulínica, donde el portador viscoso se selecciona del grupo de portadores viscosos que consiste en ácido hialurónico, carbómero, ácido poliacrílico, policarbofilo de celulosa, polivinilpirrolidona, gelatina, dextrina,
15 polisacárido, poliácridamida, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo, quitosanos, algenatos y derivados y mezclas de los mismos.

El documento WO 2010/090677 revela una composición farmacéutica de toxina clostridial libre de proteínas animales y en forma sólida que comprende un ingrediente activo de toxina clostridial, una cantidad eficaz de un excipiente de azúcar y una cantidad eficaz de excipiente tensioactivo, donde el excipiente de azúcar es un monosacárido, un disacárido o un trisacárido, y donde el excipiente tensioactivo es un poloxámero, un polisorbato, un polioxietilenglicol dodecil éter o un polioxietileno octil fenil éter. La composición es regulada a un pH de entre 5.5 y 6.5 utilizando un búfer citrato, un búfer fosfato, un búfer histidina o un búfer fosfato histidina. La
20 composición puede comprender además una cantidad eficaz de cloruro sódico. El excipiente polimérico no proteico es un dextrano, un polietilenglicol, una polietilenimina, una polivinilpirrolidona, un acetato de polivinilo, una inulina, un almidón o un derivado del almidón. La composición comprende además una cantidad eficaz de un excipiente polimérico no proteico. El ingrediente activo de la toxina clostridial es estable durante al menos un año cuando se almacena
25 a temperatura ambiente o bajo cero.

El documento WO2017/148915 revela finalmente una composición que contiene toxina botulínica que comprende ácido hialurónico no reticulado y albúmina sérica humana.

A pesar de estos avances en la preparación de formulaciones líquidas de toxina botulínica, sigue existiendo la necesidad de crear nuevas opciones para desarrollar formulaciones líquidas
35 de toxina botulínica listas para usar, que sean estables durante su transporte y almacenamiento.

OBJETO DE LA INVENCION

Es objeto de la presente invención proporcionar una formulación líquida estable de toxina botulínica lista para su uso en tratamientos terapéuticos y cosméticos.

5

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que el uso de un estabilizador proteico pre-tratado en base a albúmina sérica humana (HSA) en la formulación de una toxina botulínica líquida da como resultado una reducida sensibilidad a la luz y, por lo tanto, una
10 mejorada estabilidad a la luz. Además, inesperadamente se descubrió que cantidades muy bajas de iones de hierro (iones Fe^{3+}) aumentan drásticamente la sensibilidad a la luz de las formulaciones de toxina botulínica líquida que contienen albúmina sérica humana (HSA). Esto es sorprendente ya que el hierro es relativamente común y ubicuo, y además, se encontró que otros iones metálicos como el cobre, el cobalto o el níquel no muestran este efecto desestabilizador.

15 Además, la presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que el triptófano y el N-acetil-triptófano disminuyen la estabilidad a la luz de las formulaciones de toxina botulínica líquida que contienen albúmina sérica humana (HSA). Este hallazgo es muy sorprendente, ya que los productos comerciales de HSA, además de agua y cloruro sódico, suelen contener caprilato sódico y N-acetil-triptófano para estabilizar la HSA a altas temperaturas, que de esta
20 forma pasan a la formulación de toxina botulínica. También es sorprendente porque el triptófano se describe como aditivo estabilizador para la toxina botulínica (véase, por ejemplo, EP 3 679 946).

Se ha descubierto además que la presencia de un estabilizador no proteínico que comprende un ácido hialurónico y la presencia de un alditol contribuyen a mejorar la estabilidad
25 a la luz de la formulación líquida.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una formulación líquida que comprende agua y los siguientes componentes:

toxina botulínica,

albúmina de suero humano,

30 ácido hialurónico,

alditol;

donde:

la formulación líquida comprende un agente quelante; o

la formulación líquida comprende un agente quelante y una sal metálica seleccionada

35 entre una sal de calcio, magnesio, zinc y sus mezclas; o bien

dicha albúmina sérica humana ha sido sometida al siguiente proceso que comprende los pasos a) y c) o los pasos b) y c):

puesta en contacto de la albúmina sérica humana con un agente quelante para obtener una mezcla de albúmina sérica humana y el agente quelante

5 puesta en contacto de la albúmina sérica humana con un agente quelante y una sal metálica seleccionada entre calcio, magnesio o zinc, y sus mezclas, para obtener una mezcla de albúmina sérica humana, el agente quelante y la sal metálica

eliminar el agente quelante de la mezcla obtenida en el paso a) o en el paso b) mediante diálisis, filtración, filtración de flujo cruzado o ultrafiltración, preferentemente mediante diálisis; o

10 bien

(IV) la formulación líquida se ha sometido al siguiente proceso que comprende los pasos d) y f) o los pasos e) y f):

poner en contacto una formulación líquida que comprenda los componentes (i) a (iv) con un agente quelante para obtener una mezcla de dicha formulación líquida y el agente quelante;

15 poner en contacto una formulación líquida que comprenda los componentes i) a iv) con un agente quelante y una sal metálica seleccionada entre calcio, magnesio o zinc, o una mezcla de éstos, para obtener una mezcla de dicha formulación líquida, el agente quelante y la sal metálica

eliminar el agente quelante de la mezcla obtenida en el paso d) o en el paso e) mediante diálisis, filtración, filtración de flujo cruzado o ultrafiltración, preferentemente mediante diálisis.

20 En un segundo aspecto, la invención proporciona una formulación líquida que comprende agua y los siguientes componentes:

toxina botulínica,

albúmina de suero humano,

ácido hialurónico,

25 alditol, donde el alditol es sorbitol.

En una forma de forma de modalidad del primer y segundo aspecto, la formulación líquida comprende además uno o ambos de los componentes (v) y (vi):

(v) agente de tonicidad,

(vi) agente búfer.

30 En una forma de forma de modalidad del primer o segundo aspecto, la toxina botulínica es un complejo de neurotoxina botulínica; o

la toxina botulínica es una neurotoxina botulínica libre de proteínas complejantes; o

la toxina botulínica es del serotipo A; o

la toxina botulínica es neurotoxina botulínica de serotipo A libre de proteínas complejantes;

35 o

la toxina botulínica es del serotipo A y está presente en una concentración de 1-1000 U/ml;

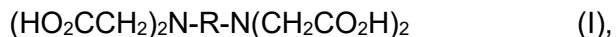
o

la toxina botulínica es neurotoxina botulínica del serotipo A libre de proteínas complejantes y está presente en una concentración de 1-1000 U/ml.

5 En una forma de forma de modalidad del primer o segundo aspecto, la albúmina de suero humano está presente en la formulación líquida a una concentración de 0.001-1.00% p/v.

En una forma de forma de modalidad del primer aspecto y en las formas de forma de modalidad que se refieren al mismo, el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en ácidos aminopolicarboxílicos que tienen de tres a seis grupos funcionales de ácido carboxílico, citrato, porfirinas, N,N,N',N'-tetrakis(2-piridinilmetil)-1,2-etanodiamina (TPEN), trietilentetramina (TETA), y mezclas de los mismos,

preferentemente donde el agente quelante es un ácido aminopolicarboxílico de la fórmula general (I):



15 donde R no comprende ningún grupo de ácido carboxílico o comprende uno o dos grupos de ácido carboxílico; el ácido aminopolicarboxílico se selecciona preferentemente del grupo formado por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), etilenglicol-bis(α-aminoetiléter)-N, N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), trietilentetramina-hexaacetato (TTHA), y
20 mezclas de los mismos; o

donde el agente quelante es ácido 2,2',2''-nitriлотriacético.

En una forma de forma de modalidad del primer aspecto y las formas de forma de modalidad que se refieren al mismo, la sal metálica está presente en la formulación líquida en una cantidad de 0.01-100 mM; o donde la sal metálica es cloruro de calcio y está presente en la
25 formulación líquida en una cantidad de 0.01-100 mM.

En una forma de forma de modalidad del primer aspecto y del segundo aspecto o de las formas de forma de modalidad que se refieren a los mismos, la formulación líquida contiene iones Fe^{3+} en una concentración inferior a 1 μM , preferentemente inferior a 500 nM, y más preferentemente inferior a 250 nM.

30 En una forma de forma de modalidad del primer aspecto y del segundo aspecto o de las formas de forma de modalidad correspondientes, la concentración de triptófano y N-acetil-triptófano en la formulación líquida no es superior a 50 μM , preferentemente no superior a 20 μM , más preferentemente no superior a 10 μM , aún más preferentemente no superior a 1 μM , y más preferentemente 0 μM , de triptófano y N-acetil-triptófano (concentración total de Trp y N-AcTrp).

35 En una forma de forma de modalidad del primer y segundo aspecto o las formas de forma

de modalidad que se refieren a los mismos, el ácido hialurónico no está reticulado; o

el ácido hialurónico está presente en una concentración de 2 a 10 mg/ml y donde el ácido hialurónico no está reticulado.

5 En otra forma de forma de modalidad, el ácido hialurónico está presente en una concentración de 2 a 10 mg/ml y donde el ácido hialurónico está reticulado.

En una forma de forma de modalidad del primer aspecto y las formas de forma de modalidad que se refieren al mismo, el alditol se selecciona entre glicerol, manitol, isomaltosa, lactitol, sorbitol, xilitol, treitol, eritritol y arabitol, preferentemente entre manitol y sorbitol.

10 En una forma de forma de modalidad del primer y segundo aspecto o las formas de forma de modalidad que se refieren a los mismos, el alditol está presente en una concentración de 20 a 100 mg/ml.

En una forma de forma de modalidad del primer y segundo aspecto y las formas de forma de modalidad que se refieren a los mismos,

15 (v) el agente de tonicidad está presente en la formulación líquida en una cantidad de 0.01-2.0 % p/v, o el agente de tonicidad es cloruro de sodio, o el agente de tonicidad es cloruro de sodio y está presente en la formulación líquida en una cantidad de 0.01-2.0 % p/v;

(vi) el agente búfer está presente en la formulación líquida en una concentración de 1-100 mM, o el agente búfer es ácido cítrico, un aminoácido, fosfato o una mezcla de los mismos, o el agente búfer es histidina, o el agente búfer es histidina, fosfato o una mezcla de los mismos, y la
20 histidina y el fosfato están presentes en la formulación líquida en una concentración de 1-100 mM.

En una forma de forma de modalidad del primer y segundo aspecto o las formas de forma de modalidad que se refieren a los mismos, el pH de la formulación líquida está en el intervalo de 5.0 a 8, preferentemente de 5.5 a 6.5.

25 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método de fabricación de la formulación líquida tal como se define en el primer aspecto o en cualquiera de las formas de forma de modalidad que se refieren al mismo, que comprende:

mezclar los componentes (i) a (iv) y opcionalmente (v) y/o (vi) en un líquido que comprende agua; y

30 un agente quelante; o

un agente quelante y una sal metálica seleccionada entre una sal de calcio, magnesio, zinc y sus mezclas; o

donde el método comprende los pasos (a) y (c) o los pasos (b) y (c):

35 contactar la albúmina de suero humano con un agente quelante para obtener una mezcla de albúmina de suero humano y el agente quelante;

poner en contacto dicha albúmina de suero humano con un agente quelante y una sal metálica seleccionada entre calcio, magnesio o zinc, o una mezcla de los mismos, para obtener una mezcla de albúmina de suero humano, el agente quelante y la sal metálica; y

eliminar el agente quelante de la mezcla obtenida en el paso (a) o en el paso (b) mediante diálisis, filtración, filtración de flujo cruzado o ultrafiltración, preferentemente mediante diálisis; o bien

(IV) donde el método comprende los pasos (d) y (f) o los pasos (e) y (f):

(d) poner en contacto una formulación líquida que comprenda los componentes (i) a (iv) con un agente quelante para obtener una mezcla de dicha formulación líquida y el agente quelante;

(e) poner en contacto una formulación líquida que comprenda los componentes i) a iv) con un agente quelante y una sal metálica seleccionada entre calcio, magnesio o zinc, o mezclas de los mismos, para obtener una mezcla de dicha formulación líquida, el agente quelante y la sal metálica;

(f) eliminar el agente quelante de la mezcla obtenida en el paso (d) o en el paso (e) mediante diálisis, filtración, filtración de flujo cruzado o ultrafiltración, preferentemente mediante diálisis;

preferentemente, donde la puesta en contacto en el paso (a) o en el paso (b) se lleva a cabo mezclando la composición que comprende albúmina de suero humano con el agente quelante o el agente quelante y la sal metálica, o donde la puesta en contacto en los pasos (d) y (e) se lleva a cabo mezclando una formulación líquida que comprende los componentes (i) a (iv) con el agente quelante o el agente quelante y la sal metálica de tal manera que la concentración del agente quelante en la formulación líquida es de 1 mM - 500 mM;

bien la invención se refiere a un método de fabricación de la formulación líquida definida en el segundo aspecto o en cualquiera de las formas de forma de modalidad que se refieren al mismo, que comprende:

mezclar los componentes (i) a (iv) y opcionalmente (v) y/o (vi) en un líquido que comprende agua.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a la formulación líquida como se define en el primer y segundo aspecto o cualquiera de las formas de forma de modalidad que se refieren a la misma para su uso en terapia, en particular para su uso en el tratamiento de enfermedades neuromusculares, dolor, sialorrea, hiperhidrosis, trastornos urológicos y trastornos neurológicos,

En un quinto aspecto, la invención se refiere al uso de la formulación líquida como se define en el primer o segundo aspecto o cualquiera de las formas de forma de modalidad que se refieren a la misma en una aplicación cosmética / no terapéutica.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad o afección, que comprende la administración de una cantidad eficaz de la formulación líquida tal como se define en el primer o segundo aspecto o cualquiera de las formas de forma de modalidad que se refieren al mismo a una persona que lo necesite.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "que comprende", al igual que los términos "que incluye" y "que contiene", y cualesquiera variaciones de los mismos tales como "comprende", "incluye" y "contiene", han de referirse a una inclusión no exclusiva, de tal manera que un proceso, método, producto por proceso, composición o formulación que comprende, incluye o contiene un elemento o lista de elementos no incluye únicamente dichos elementos, sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente para dicho proceso, método, producto por proceso, composición o formulación. Además, en el marco de la presente invención, cada uno de los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "incluyendo", "contiene", "que contiene", y cualquier variación de los mismos, ha de poder sustituirse por el término "consiste" o "consistente", o cualquier variación de los mismos (por ejemplo, "consiste esencialmente en"), que se entenderá se refiere a una inclusión exclusiva de los elementos indicados.

Los términos "un" y "una" y "el/la/los/las" y referencias similares utilizados en el contexto de la presente invención se deben interpretar de forma que abarquen tanto el singular como el plural y, por lo tanto, también pueden referirse a "al menos uno" o "más de uno", a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente.

El término "formulación líquida" o "formulación líquida de toxina botulínica", tal como aquí se lo emplea, se refiere generalmente a una formulación acuosa y es típicamente una solución acuosa. En el presente documento, el término "formulación líquida" se puede utilizar indistintamente con "composición líquida". Preferentemente, la formulación líquida es una formulación líquida farmacéuticamente aceptable o, en otras palabras, una formulación farmacéutica líquida. El término "farmacéuticamente aceptable", tal como aquí se lo emplea, significa que la formulación líquida no causa efectos secundarios adversos inaceptables cuando se administra a un paciente o sujeto humano, es decir, significa que la formulación líquida es adecuada para el uso humano. La solución acuosa puede ser una solución regulada, con o sin una solución salina, y puede ser una solución salina fisiológica como una solución salina fisiológica regulada (por ejemplo, regulada con fosfato y/o histidina).

Toxina botulínica

En cuanto al componente (i), la toxina botulínica no está particularmente limitada e incluye toxina botulínica de cualquier serotipo (por ejemplo, BoNT/A-G). Por ejemplo, la toxina botulínica puede ser del serotipo A o B (BoNT/A, BoNT/B). Preferentemente, la toxina botulínica es del serotipo A, más preferentemente del serotipo A1 (BoNT/A1), y más preferentemente BoNT/A1
5 producida por la cepa Hall de Clostridium botulinum. Además, la toxina botulínica puede ser una neurotoxina natural obtenible a partir de la bacteria Clostridium botulinum o cualquier otra toxina botulínica, como una toxina botulínica obtenible a partir de fuentes alternativas, incluidas las tecnologías recombinantes y la modificación genética o química.

Además, tal como aquí se lo emplea, el término "toxina botulínica" ("BT") y el término
10 sinónimo "neurotoxina botulínica" ("BoNT") se refieren a la neurotoxina botulínica pura y/o cualquier complejo de la misma, es decir, cualquier complejo de neurotoxina botulínica pura y proteínas complejantes (denominado "complejo de toxina").

El término "neurotoxina botulínica pura", tal como aquí se lo emplea, significa la neurotoxina botulínica libre de proteínas complejantes (a veces también denominada
15 "componente neurotóxico"), o más precisamente, la neurotoxina botulínica sin proteínas complejantes asociadas a la neurotoxina (NAP). La neurotoxina botulínica pura es el polipéptido neurotóxico (activo) que inhibe en última instancia la liberación de acetilcolina. Se trata de una proteína de cadena doble compuesta por una cadena ligera (LC; aproximadamente 50 kDa) y una cadena pesada (HC; aproximadamente 100 kDa), unidas por un enlace disulfuro. Por
20 consiguiente, el polipéptido neurotóxico activo también se puede denominar en el presente documento "neurotoxina de 150 kDa", "neurotoxina de Clostridium botulinum (150 kD)" o "componente neurotóxico".

El término "complejo de toxina", tal como aquí se lo emplea, se refiere a un complejo de alto peso molecular del componente neurotóxico y un conjunto de proteínas complejantes (PAN).
25 En particular, el término "complejo de toxina" incluye los complejos de toxina de tipo A de Clostridium botulinum de 900 kDa, 500 kDa y 300 kDa. Las proteínas complejantes son la no hemaglutinina no tóxica (NTNHA) y, en las cepas de los serotipos A-D, diferentes hemaglutininas (HAs). Por ejemplo, el complejo de 900 kDa está incluido en la onabotulinumtoxina A (Botox®/Vistabel®, Allergan, Inc., Irvine, CA, EE.UU.). Asimismo, un complejo de toxina como
30 agente activo está contenido en Dysport® (Azzalure®, Ipsen, París, Francia), Alluzience® (Ipsen/Galderma) e Innotox® (Medytox).

La concentración de la toxina botulínica en las formulaciones líquidas de la presente invención puede estar en el intervalo de 1-1000 U/ml, preferentemente en el intervalo de 10-200 U/ml, más preferentemente en el intervalo de 20-150 U/ml, como 50 U/ml o 100 U/ml.

35 El término "unidades" o "U", tal como aquí se lo emplea, se refiere a la actividad biológica

(potencia biológica) de la toxina y se relaciona con la dosis que es letal para el 50% de los ratones probados (LD50). Más concretamente, en el contexto de la presente invención, la DL50 se mide utilizando el bioensayo en ratones (MBA, según las siglas en inglés), a menos que se indique lo contrario. El MBA determina la dosis letal media (DL50) de toxina/neurotoxina tras la inyección intraperitoneal en ratones, es decir, la dosis de toxina/neurotoxina capaz de matar al 50 % de un grupo de ratones. Sobre esta base, 1 unidad (U) de toxina/neurotoxina, tal como se emplea en el presente documento, se define como una DL50 de ratón ($1.0 \text{ DL50} = 1.0 \text{ U}$). El bioensayo de LD50 en ratón es el patrón oro entre los diversos métodos de detección biológica, química o inmunológica de la toxina botulínica y es conocido por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Pearce, L. B.; Borodic, G. E.; First, E. R.; MacCallum, R. D. Measurement of botulinum toxin activity: Evaluation of the lethality assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994, 128:69-77). Un experto en la técnica podrá determinar las concentraciones de toxina botulínica adecuadas en función del serotipo y del uso previsto.

Alternativamente, también se puede usar un ensayo basado en células para determinar la actividad de la toxina botulínica, como se describe en los documentos WO 2009/114748, WO 2013/049508 o WO2014/207109. Un experto en la técnica podrá correlacionar los resultados de actividad de toxina botulínica obtenidos con un ensayo basado en células con los resultados obtenidos en el ensayo de LD50 en ratón mediante calibración usando un estándar de referencia de LD50.

Debido a las diferencias en las pruebas LD50 utilizadas por los fabricantes de formulaciones comerciales de toxina botulínica, las potencias unitarias indicadas por los fabricantes para sus formulaciones comerciales de toxina botulínica son patentadas y no se pueden comparar fácilmente. Por consiguiente, en el marco de la presente invención, los tipos de conversión proporcionados a continuación se utilizan para establecer las potencias comparativas de incobotulinumtoxinA ("INCO"; Xeomin®, Bocouture®; toxina botulínica de serotipo A, libre de proteínas complejantes; Merz Pharmaceuticals GmbH), onabotulinumtoxinA ("ONA"; Botox®, Vistabel®; complejo de toxina botulínica de serotipo A; Allergan Inc.), abobotulinumtoxinA ("ABO"; Dysport®, Azzalure®; complejo de toxina botulínica del serotipo A; Medicis Pharmaceutical Corp, Galderma Lab.), rimabotulinumtoxinB ("RIM"; Myobloc®, NeuroBloc®; toxina botulínica de serotipo B; Solstice Neurosciences Inc.), y PurTox® ("TBD"; toxina botulínica de serotipo A; Mentor Worldwide LLC). Para su uso en el presente documento, el índice de conversión de ONA e INCO es de 1:1. El índice de conversión de ONA/INCO:ABO es de 1:2.5. El índice de conversión de ONA/INCO:RIM es de 1:50, y el índice de conversión de ONA/INCO:TBD es de 1:1.5.

Albúmina sérica humana (HSA)

En cuanto al componente (ii) de la formulación líquida de la presente invención, la

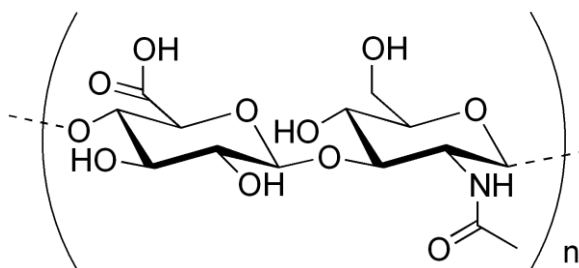
albúmina sérica humana (HSA) actúa como proteína estabilizadora. El término "proteína estabilizadora" se refiere generalmente a un polipéptido que produce un aumento de la estabilidad de la toxina botulínica. La HSA puede estar presente en la formulación líquida en una cantidad de 0.001-2.0 % p/v, preferentemente en una cantidad de 0.001-1.00 % p/v, más preferentemente en una cantidad de 0.01-0.5 % p/v, aún más preferentemente en una cantidad de 0.02-0.3 % p/v, y más preferentemente en una cantidad de 0.03-0.15 % p/v.

En el contexto de la presente invención, el término "albúmina sérica humana" o "HSA" se refiere a HSA de donante (HSA derivada de sangre humana o, más precisamente, de plasma humano) y a HSA recombinante. En una forma de forma de modalidad preferida, la albúmina sérica humana es HSA de donante. En otra forma de forma de modalidad preferida, la albúmina sérica humana es HSA recombinante.

En la formulación líquida según el primer aspecto, la HSA o una pre-formulación que contiene HSA se somete a un agente quelante para unir o eliminar cationes metálicos, en particular iones Fe^{3+} , que pueden afectar negativamente a la estabilidad, en particular a la estabilidad a la luz. Esto se describe con mayor grado de detalle a continuación.

Ácido hialurónico

En lo que hace al componente (iii), el término "ácido hialurónico" tal como se lo emplea dentro del contexto de la presente invención, conocido también como HA (según las siglas en inglés), hialuronato, o hialuronano, es un glicosaminoglicano aniónico no sulfatado, que se puede representar con la siguiente fórmula estructural:



Así, el ácido hialurónico se puede considerar como un polímero de disacáridos, donde dichos disacáridos se componen de dos derivados de la glucosa, a saber, ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina. En el disacárido, el ácido glucurónico está glucosídicamente $\beta(1\rightarrow3)$ -ligado a la N-acetilglucosamina, que a su vez está ligada-glucosídicamente $\beta(1\rightarrow4)$ al siguiente ácido glucurónico.

Cabe señalar que en la presente invención el término "ácido hialurónico" comprende a todas las sales, hidratos y/o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo. Preferentemente,

el ácido hialurónico está presente en forma de sal sódica.

Tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, el término "ácido hialurónico" se puede entender en el sentido más amplio como cualquier fracción de ácido hialurónico conocida en la técnica.

5 El ácido hialurónico puede estar presente en forma de cadenas lineales no reticuladas y en forma de ácidos hialurónicos reticulados.

Según una forma preferida de forma de modalidad de la invención, el ácido hialurónico utilizado en las formulaciones líquidas según la invención no está reticulado; o bien

10 el ácido hialurónico está presente en una concentración de 2 a 10 mg/ml y donde el ácido hialurónico no está reticulado.

Según otra forma de forma de modalidad, el ácido hialurónico está presente en una concentración de 2 a 10 mg/ml, donde el ácido hialurónico está reticulado.

En una forma de forma de modalidad, el ácido hialurónico utilizado en las formulaciones líquidas de acuerdo con la invención, también se puede someter a un agente quelante de forma
15 análoga a la purificación de HSA para eliminar los iones metálicos que pueden afectar negativamente a la estabilidad a la luz.

En una forma preferida de forma de modalidad, el ácido hialurónico utilizado en las formulaciones líquidas de acuerdo con la invención tiene un peso molecular medio de 100 KDa a 8 MDa, preferentemente de 500 KDa a 7 MDa, más preferentemente de 1 MDa a 6 MDa, más
20 preferentemente de 2 MDa a 5 MDa, más preferentemente de 2 MDa a 4.5 MDa, más preferentemente de 2.5 a 4.5 MDa, más preferentemente de 2.5 MDa a 4.0 MDa, en particular de 3.0 a 3.8 MDa.

En otra forma preferida de forma de modalidad, el ácido hialurónico utilizado en las formulaciones líquidas de acuerdo con la invención no está reticulado, y tiene un peso molecular
25 medio de 100 KDa a 8 MDa, preferentemente de 500 KDa a 7 MDa, más preferentemente de 1 MDa a 6 MDa, más preferentemente de 2 MDa a 5 MDa, más preferentemente de 2 MDa a 4.5 MDa, más preferentemente de 2.5 a 4.5 MDa, más preferentemente de 2.5 MDa a 4.0 MDa, más preferentemente de 2.5 MDa a 4.0 MDa, más preferentemente de 2.5 MDa a 4.0 MDa. 0 MDa, en particular de 3.0 a 3.8 MDa.

30 Alditol

En cuanto al componente (iv), el término "alditol" utilizado en el presente documento es sinónimo del término "alcohol de azúcar". Los alcoholes de azúcar tienen la fórmula general $\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$. Los alcoholes de azúcar comunes son el etilenglicol, el glicerol, el eritritol, el treitol, el arabitol, el xilitol, el ribitol, el manitol, el sorbitol, el galactitol, el fucitol, el iditol,
35 el inositol, el volemitol, el isomalt, el maltitol, el lactitol, el maltotriitol, el maltotetraitol y el poliglicol.

Almacenamiento de la formulación líquida de la invención

La formulación líquida de la presente invención se puede almacenar en cualquier sistema contenedor adecuado. Un sistema contenedor adecuado para almacenar la formulación líquida de la presente invención es cualquier dispositivo que tenga un espacio parcial o totalmente cerrado que se pueda sellar o esté sellado y se pueda utilizar para contener, almacenar y/o transportar formulaciones líquidas. Un sistema contenedor es preferentemente un contenedor cerrado (o sellado) hecho de, o parcial o predominantemente hecho de, vidrio o plástico (por ejemplo, polímeros orgánicos) e incluye, por ejemplo, contenedores en forma de (i) una jeringa, (ii) un vial, (iii) una cánula, o (iv) una ampolla. En una forma preferida de forma de modalidad de la presente invención, la formulación líquida se almacena en una jeringa en forma de jeringa precargada, como se conoce en la técnica.

La formulación líquida de la presente invención proporciona ventajosamente una seguridad y precisión de dosificación mejoradas en comparación con las preparaciones de toxina botulínica liofilizada en forma de polvo, ya que la formulación no se necesita reconstituir antes de la inyección, sino que está lista para su uso y se puede utilizar, por ejemplo, en forma de jeringa precargada. Además, la excelente estabilidad de la formulación líquida facilita y simplifica el transporte y el almacenamiento, así como la manipulación por parte del médico. En particular, la estabilidad superior a la luz de la formulación líquida de la presente invención simplifica el proceso de fabricación, permite que el producto se llene y envase sin una amplia protección contra la luz, y reduce la pérdida potencial de actividad debido al almacenamiento expuesto a la luz en el consultorio del médico antes de su uso. Además, la formulación líquida de la presente invención no contiene sustancias que aumenten el dolor de la inyección, lo que favorece la aceptación de la formulación por parte de médicos y pacientes, especialmente en el campo de la estética.

La formulación líquida de acuerdo con el primer aspecto

En el primer aspecto de la invención, se proporciona una formulación líquida que comprende agua y los siguientes componentes:

toxina botulínica,
albúmina de suero humano,
ácido hialurónico,
alditol.

De acuerdo con la invención, la formulación líquida contiene o está elaborada por medio de un agente quelante.

En la forma de modalidad (I), la formulación líquida comprende un agente quelante.

En la forma de modalidad (II), la formulación líquida comprende un agente quelante y una sal metálica seleccionada entre una sal de calcio, magnesio, zinc y sus mezclas.

En la forma de modalidad (III), dicha albúmina sérica humana ha sido sometida al siguiente proceso que comprende los pasos a) y c) o los pasos b) y c):

puesta en contacto de la albúmina sérica humana con un agente quelante para obtener una mezcla de albúmina sérica humana y el agente quelante

5 puesta en contacto de la albúmina sérica humana con un agente quelante y una sal metálica seleccionada entre calcio, magnesio o zinc, y sus mezclas, para obtener una mezcla de albúmina sérica humana, el agente quelante y la sal metálica

eliminar el agente quelante de la mezcla obtenida en el paso a) o en el paso b) mediante diálisis, filtración, filtración de flujo cruzado o ultrafiltración, preferentemente mediante diálisis.

10 En la forma de modalidad (IV), la formulación líquida ha sido sujeta al siguiente proceso que comprende los pasos d) y f) o los pasos e) y f):

poner en contacto una formulación líquida que comprenda los componentes (i) a (iv) con un agente quelante para obtener una mezcla de dicha formulación líquida y el agente quelante;

15 poner en contacto una formulación líquida que comprenda los componentes i) a iv) con un agente quelante y una sal metálica seleccionada entre calcio, magnesio o zinc, o una mezcla de éstos, para obtener una mezcla de dicha formulación líquida, el agente quelante y la sal metálica

eliminar el agente quelante de la mezcla obtenida en la etapa d) o en la etapa e) mediante diálisis, filtración, filtración de flujo cruzado o ultrafiltración, preferentemente mediante diálisis.

Se señala que los términos "albúmina sérica humana" y "agente quelante" no pretenden
20 implicar ninguna restricción en cuanto a su forma física ni excluir la presencia de otras sustancias o compuestos que se mezclan con, o se incluyen en, la HSA y el agente quelante. Esto significa que la "albúmina sérica humana" que se pone en contacto en los pasos (a) y (b) o (d) y (e) con el agente quelante puede estar presente en cualquier forma, como en forma de un sólido o un líquido (por ejemplo, una composición acuosa o una solución acuosa). Asimismo, el "agente quelante"
25 puede estar presente en cualquier forma, ya sea en forma de un sólido o un líquido (por ejemplo, una composición acuosa o una solución acuosa). Además, la expresión "poner en contacto albúmina sérica humana con un agente quelante" en las formas de modalidad III o IV no excluye que la albúmina sérica humana esté en forma de una composición (por ejemplo, una composición sólida o una composición líquida, en particular una composición acuosa o una
30 solución acuosa) que contenga uno o más componentes adicionales incluidos en la formulación líquida final, como un agente de tonicidad o un agente búfer o, y/o el agente quelante esté en forma de una composición (por ejemplo, una composición sólida o una composición líquida, en particular una composición acuosa o una solución acuosa) que contenga uno o más componentes adicionales incluidos en la formulación líquida final, como un agente de tonicidad o un agente
35 búfer.

Preferentemente, la mezcla obtenida en el paso (a) o en el paso (d) es una mezcla acuosa. Esta mezcla acuosa se puede preparar de diferentes maneras. Por ejemplo, la albúmina sérica humana puede estar en forma de una composición acuosa, por ejemplo, una solución acuosa, que se mezcla con el agente quelante que puede estar presente en forma sólida o en forma líquida, por ejemplo, en forma de una solución acuosa del agente quelante. Además, la albúmina sérica humana puede estar en forma de un sólido, por ejemplo, un material liofilizado, que se mezcla con un agente quelante y una solución acuosa o con una solución acuosa del agente quelante. Preferentemente, la albúmina sérica humana está en forma de una composición acuosa, más preferentemente una solución acuosa, y el agente quelante es un sólido o una composición acuosa (por ejemplo, una solución acuosa).

En particular, la HSA que se pone en contacto en el paso (a) o la HSA que está contenida en la formulación líquida se pone en contacto en el paso (d) con un agente quelante que puede estar en forma de una solución acuosa que contiene al menos 5 % p/v de HSA, más preferentemente 10-30 % p/v de HSA, y lo más preferentemente 20 % p/v de HSA. Además, el pH de la mezcla obtenida en el paso (a) o el paso (d) se puede ajustar a un pH en el intervalo de 6.0-9.0, preferentemente 6.5-8.5, más preferentemente 7.0-8.5, y lo más preferentemente 7.0-8.0.

Además, el paso de contacto (a) o el paso (d) del método para preparar la formulación líquida según la presente invención puede comprender varios subpasos. Por ejemplo, en una forma de modalidad, la puesta en contacto en el paso (a) comprende, o consiste (solamente) en, los pasos de mezclar un agente quelante (por ejemplo, EDTA) y albúmina sérica humana, incubar dicha mezcla durante un tiempo determinado y, opcionalmente, someter dicha mezcla a diálisis frente a un búfer que contiene un agente quelante, siendo el agente quelante preferentemente el mismo que el utilizado en la subetapa de incubación. En otra forma de modalidad, dicha mezcla no se incuba sino que se somete (directamente) a diálisis frente a un búfer que contiene un agente quelante, siendo el agente quelante preferentemente el mismo que el utilizado en el paso de mezclar un agente quelante (por ejemplo, EDTA) y albúmina sérica humana. En otra forma de modalidad, el agente quelante y la albúmina sérica humana no se mezclan antes de la diálisis. Es decir, el paso de puesta en contacto (a) puede comprender, o puede consistir (solamente) en, el paso de someter dicha mezcla a diálisis frente a un búfer que contiene un agente quelante.

Preferentemente, el paso (a) comprende, o consiste (solamente) en, una etapa de adición de un agente quelante a una composición que comprende HSA (por ejemplo, una solución de HSA) o de mezcla de un agente quelante con una composición que comprende HSA (por ejemplo, una solución de HSA). La mezcla resultante se incuba luego durante algún tiempo, por ejemplo, se deja reposar durante un tiempo determinado sin agitar o se agita durante un tiempo determinado.

El tiempo de incubación no está confinado a un rango específico sino que es normalmente de al menos 0,5 horas, particularmente al menos 1 hora, y más particularmente al menos 2 horas. El límite superior del tiempo de incubación no es crítico y puede ser, por ejemplo, 1 hora, 2 horas, 5 horas o 10 horas. Por lo tanto, el tiempo de incubación puede ser, por ejemplo, de 0.5 a 5 horas o de 1 hora a 10 horas. Asimismo, la temperatura de incubación no está particularmente limitada y puede, por ejemplo, estar dentro del rango de 0 °C a 60 °C. Preferentemente, la temperatura es de 0 °C a 30 °C. Esto significa que la temperatura ambiente (20 °C o 25 °C) es una temperatura adecuada dentro de la presente invención. Como sabe el experto en la técnica, la temperatura influye en el tiempo de reacción. Generalmente, las condiciones de incubación (por ejemplo, tiempo y temperatura) se seleccionan de manera que la cantidad residual de agente quelante (por ejemplo, EDTA) que está contenida en el producto final sea 100 µM o menos, preferentemente 10 µM o menos, más preferentemente 1 µM o menos.

Opcionalmente, el paso de incubación es seguido por un procesamiento adicional tal como la diálisis de la mezcla incubada contra un búfer que contiene un agente quelante, normalmente el mismo agente quelante que el que fuera utilizado en el paso de incubación. El agente quelante utilizado en esta etapa opcional de diálisis está contenido preferentemente en el búfer de diálisis a una concentración de 0.1 mM - 1000 mM, más preferentemente 1 mM - 200 mM, y lo más preferentemente 10 mM - 100 mM. También se prefiere que el búfer utilizado en el paso de diálisis (i) tenga un pH de 7.5 - 8.5, (ii) comprenda además un agente búfer, preferentemente de acuerdo con la composición final, o (iii) comprenda además un agente de tonicidad, preferentemente 0.9% de cloruro de sodio p/v, o (i) y (ii), o (i) y (iii), o (ii) y (iii), o (i) y (ii) y (iii).

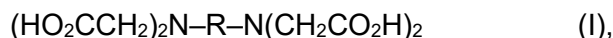
El contacto en el paso (d) puede comprender sub-pasos análogos.

Dentro de la presente invención, el término "agente quelante", como se utiliza en el presente documento, no está particularmente limitado en la medida en que sea capaz de unirse a iones metálicos. El término "agente quelante", tal como se lo utiliza en el presente documento, también se puede referir a "quelante" o "agente secuestrante". Los agentes quelantes que se emplean en el presente documento son normalmente compuestos orgánicos que se unen a iones metálicos. Los iones metálicos generalmente forman múltiples enlaces coordinados con los agentes quelantes orgánicos que actúan como ligandos polidentados.

Los agentes quelantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, entre otros a, ácidos aminopolicarboxílicos (por ejemplo, ácidos aminopolicarboxílicos que tienen de tres a seis, preferentemente cuatro, grupos funcionales de ácido carboxílico) y otros compuestos tales como citrato, porfirinas, TPEN (N,N,N',N'-tetrakis(2-piridinilmetil)-1,2-etanodiamina), TETA (trietilentetramina) y mezclas de los mismos. Los ácidos aminopolicarboxílicos ejemplares

incluyen NTA (nitrilotriacetato o ácido 2,2',2''-nitrilotriacético), DOTA (1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetato), TED (etilendiaminotriacetato), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), EGTA (ácido etilenglicol-bis(□-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético), BAPTA (ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético), DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) y TTHA (hexaacetato de trietilentetramina).

Los agentes quelantes particularmente preferidos para su uso en la presente invención, son compuestos de la fórmula general (I):



que son compuestos de ácido aminopolicarboxílico que tienen al menos cuatro grupos funcionales de ácido carboxílico. El grupo R no está particularmente limitado y puede no comprender ningún grupo funcional de ácido carboxílico o uno o dos grupos funcionales de ácido carboxílico. Preferentemente, el grupo R no comprende ningún grupo funcional de ácido carboxílico o un solo grupo funcional de ácido carboxílico, más preferentemente ningún grupo funcional de ácido carboxílico.

Entre los ejemplos de compuestos de fórmula general (I) se incluyen, por ejemplo, EDTA, EGTA, BAPTA, DTPA, y TTHA. Se prefieren especialmente para su uso en la presente invención EDTA, EGTA y DTPA, siendo más preferidos EDTA y DTPA, y siendo el más preferido EDTA. También se pueden utilizar en la presente invención mezclas de cualquiera de los agentes quelantes mencionados anteriormente, por ejemplo, como soluciones, sólidos o acoplados a matrices.

En otra forma de modalidad, el agente quelante es o comprende ácido 2,2',2''-nitrilotriacético.

En el paso (a), a la HSA se la pone preferentemente en contacto con una cantidad del agente quelante de modo que el agente quelante esté presente en la formulación líquida a una concentración de 0.1 mM - 1000 mM o 0.1 mM - 500 mM, más preferentemente 0.5 mM - 500 mM o 1 mM - 500 mM, y con mayor preferencia 10 mM - 100 mM.

En el paso (b), se puede eliminar al agente quelante mediante cualquier técnica apropiada tal como por ejemplo diálisis (incluyendo diálisis convencional utilizando una bolsa de diálisis, diálisis a contraflujo, etc.), ósmosis inversa, filtración, filtración de flujo cruzado, ultrafiltración y métodos cromatográficos (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de filtración en gel).

Preferentemente, al agente quelante se lo retira mediante diálisis. La diálisis es normalmente llevada a cabo durante 0.5-48 horas, en particular 1-24 horas o 1-12 horas, a una temperatura de 0 °C a 30 °C, particularmente a una temperatura de 2 °C a 30 °C o de 4 °C a 25 °C, inclusive a temperatura ambiente. Además, la diálisis se lleva a cabo normalmente contra

un volumen de búfer de diálisis de 10 a 1000 veces el volumen de la mezcla de HSA/agente quelante incubada, y el búfer de diálisis se cambia normalmente al menos una vez. La membrana de diálisis utilizada puede tener un límite de peso molecular de, por ejemplo, 10 kDa.

Generalmente, las condiciones de diálisis (por ejemplo, tiempo, temperatura, volumen del búfer, cantidad de cambios de búfer) se seleccionan de modo tal que la cantidad residual de agente quelante (por ejemplo, EDTA) queda contenida en el producto final en una concentración de 100 μM o menor, preferentemente en una concentración de 10 μM o menor, más preferentemente en una concentración de 1 μM o menor.

De acuerdo con una forma preferida de modalidad de la presente invención, a un material de partida de HSA se le da un tratamiento previo poniéndolo en contacto con un agente quelante, que a continuación es retirado. La HSA pre-tratada así obtenida se utiliza después para preparar la formulación líquida de toxina botulínica de la presente invención. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "material de partida de albúmina sérica humana" se refiere al material de HSA donante (HSA derivada de sangre humana o, más precisamente, de plasma humano) o material de HSA recombinante, tal como se puede obtener en el mercado o convencionalmente, es decir, sin haber sido sometido a un pre-tratamiento como se describe en el presente documento. Una mezcla de material de HSA donante y de HSA recombinante también está comprendida en el término "material de partida de albúmina sérica humana", tal como se utiliza en el presente documento.

Más específicamente, de acuerdo con esta forma preferida de modalidad (III), la formulación líquida que comprende (i) toxina botulínica y (ii) albúmina sérica humana se prepara mediante un método que comprende los siguientes pasos:

poner en contacto una albúmina sérica humana (material de partida) con un agente quelante para obtener una mezcla de la albúmina sérica humana (material de partida) y el agente quelante, o

poner en contacto la albúmina sérica humana (material de partida) con un agente quelante y una sal metálica seleccionada de calcio, magnesio o cinc, y mezclas de los mismos para obtener una mezcla de albúmina sérica humana, el agente quelante, y la sal metálica;

retirar el agente quelante de la mezcla para obtener un material de albúmina sérica humana pretratado, y

g) mezclar toxina botulínica con el material de albúmina sérica humana pretratado.

En presencia de EDTA, la adición de las sales seleccionadas de calcio, magnesio o cinc, y las mezclas de las mismas en el paso (b) dará como resultado la formación de complejos de EDTA, es decir, EDTA con el catión metálico añadido complejo como átomo central. La naturaleza del anión de la sal es irrelevante, siendo el único requisito que la sal sea soluble en la formulación

acuosa de la presente invención. Por ejemplo, el anión puede ser un anión de ácidos orgánicos e inorgánicos farmacéuticamente aceptables. Alternativamente, el propio agente quelante puede formar el anión de la sal metálica, y los componentes (iii) y (iv) se añaden a la formulación líquida como, por ejemplo, Na_2CaEDTA .

5 Los contra-aniones adecuados son, por ejemplo, acetato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, besilato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, decanoato, edetato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolato, glicolilarsanilato, hexanoato, hidrabamina, hidroxinaftoato, yoduro, lactobionato, nitrato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, 10 octanoato, oleato, palmoato, pantotenato, fosfato, poligalacturonato, propionato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tartrato y teocloato.

Preferentemente, las sales son sales de cloruro. Las sales particularmente preferidas incluyen cloruro de calcio (es decir, CaCl_2 y sus hidratos), cloruro de magnesio (es decir, MgCl_2 y sus hidratos) y cloruro de cinc (es decir, ZnCl_2 y sus hidratos). En presencia de EDTA, la adición 15 de estas sales dará como resultado la formación de complejos de EDTA, es decir, EDTA con el catión metálico añadido complejoado como átomo central.

Generalmente, se prevé que la concentración del ion metálico de la sal sea aproximadamente equimolar a la concentración del agente quelante. La sal puede estar presente en la formulación líquida a una concentración de al menos 0.01 mM o al menos 0.1 mM o al 20 menos 1 mM. Preferentemente, la sal está presente en la formulación líquida en una concentración de 0.01-100 mM, preferentemente 0.1-50 mM, más preferentemente 0.05-20 mM, y con mayor preferencia 1-10 mM.

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención descubrieron que la adición de una sal de un metal alcalinotérreo o un metal de transición, en particular una sal de calcio, 25 magnesio o zinc, reduce notablemente el dolor de inyección de la formulación líquida de la presente invención mientras que al mismo tiempo mantiene la estabilidad frente al almacenamiento y la luz. Este hallazgo fue inesperado porque (i) se encontró que las formulaciones líquidas de toxina botulínica como se describieron anteriormente en este documento causaban un dolor de inyección desagradable, que no era previsible ni predecible, (ii) 30 se encontró sorprendentemente que la adición de una sal de un metal alcalinotérreo como cloruro de calcio o un metal de transición reducía drásticamente el dolor de la inyección, al mismo tiempo, (iii) la estabilidad de almacenamiento y luz de la formulación líquida se mantuvo a pesar de la creencia de que se requiere un agente quelante libre (no complejo) para obtener el efecto estabilizador de luz, es decir, se encontró sorprendentemente que un agente quelante (por 35 ejemplo, EDTA) que contiene un átomo de metal central (por ejemplo, Ca^{2+}) todavía era capaz

de proteger la toxina botulínica de la luz.

De acuerdo con otra forma preferida de modalidad de la presente invención, una preformulación líquida se pone en contacto con un agente quelante, seguido del retiro de dicho agente quelante para obtener la formulación líquida. El término "preformulación líquida", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una formulación líquida que contiene al menos los componentes (i) y (ii) (es decir, toxina botulínica y HSA), y preferentemente contiene todos los componentes y sustancias que se incluyen en la composición líquida final, en particular los componentes (iii) y (iv). En el caso de este último, el tratamiento y la eliminación del agente quelante dan como resultado la formulación líquida final.

Más específicamente, según esta forma preferida de modalidad, la formulación líquida que comprende (i) toxina botulínica y (ii) albúmina sérica humana se prepara mediante un método que comprende los siguientes pasos:

d) poner en contacto una preformulación líquida que comprende toxina botulínica y albúmina sérica humana con el agente quelante para obtener una mezcla de la preformulación líquida y el agente quelante, o

e) poner en contacto una preformulación líquida que comprende toxina botulínica y albúmina sérica humana con un agente quelante y una sal metálica seleccionada de calcio, magnesio o cinc, o una mezcla de los mismos para obtener una mezcla de dicha formulación líquida, el agente quelante y la sal metálica;

f) retirar el agente quelante de la mezcla para obtener un material de albúmina sérica humana pretratado.

Ventajosamente, la HSA pre-tratada proporciona una baja concentración de iones Fe^{3+} .

En una forma preferida de modalidad, la formulación líquida contiene iones Fe^{3+} en una concentración de menos de 1 μM .

Preferentemente, la concentración de Fe^{3+} en la formulación líquida es menos de 1000 nM, menos de 750 nM, menos de 500 nM, o menos de 250 nM, más preferentemente, la concentración de Fe^{3+} en la formulación líquida es menos de 200 nM, menos de 150 nM, o menos de 100 nM, particularmente preferente la concentración de Fe^{3+} en la formulación líquida es menos de 50 nM o menos de 10 nM, y con mayor preferencia la concentración de Fe^{3+} en la formulación líquida es menos de 1 nM, menos de 100 pM, menos de 10 pM, o menos de 1 pM.

Ventajosamente, la HSA pre-tratada no contiene o contiene concentraciones bajas de triptófano y N-acetil-triptófano.

En una forma preferida de modalidad, la concentración de triptófano y N-acetil-triptófano en la formulación líquida no es más de 50 μM , preferentemente no más de 20 μM , más preferentemente no más de 10 μM , aún más preferentemente no más de 1 μM , y con mayor

preferencia 0 μM , de triptófano y N-acetil-triptófano (concentración total de ambos Trp y N-AcTrp).

El término "no contiene" triptófano y N-acetil-triptófano, tal como se lo emplea en el presente documento, significa que la formulación líquida está libre de, o completamente libre de, triptófano y de N-acetil-triptófano. Específicamente, significa que la formulación no contiene triptófano y N-acetil-triptófano añadido. Alternativamente, significa que la concentración de triptófano y N-acetil-triptófano en la formulación líquida es 0 μM (es decir, de acuerdo con las reglas generales de redondeo $< 0.5 \mu\text{M}$), en particular $\leq 0.1 \mu\text{M}$ o $\leq 0.01 \mu\text{M}$ o $\leq 0.001 \mu\text{M}$, más particularmente 0 nM (es decir, de acuerdo con las reglas generales de redondeo $< 0.5 \text{ nM}$). El término "no contiene más de" triptófano y N-acetil-triptófano, como se lo emplea en el presente documento, significa que la cantidad total de triptófano y de N-acetil-triptófano puede ser $\leq 50 \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 20 \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 10 \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 1 \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 0.1 \mu\text{M}$, y preferentemente $\leq 0.01 \mu\text{M}$ o $\leq 0.001 \mu\text{M}$. De la misma forma, el término "no contiene o no contiene más de", tal como se emplea en el presente documento, significa que la cantidad total de triptófano y N-acetil-triptófano en la formulación líquida está entre 0 μM y X o entre 0 nM y X, siendo X 50 μM , 20 μM , 10 μM , 1 μM , 0.1 μM , 0.01 μM y 0.001 μM micras.

La concentración de iones metálicos (por ejemplo, Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , or Fe^{3+}) se puede determinar mediante métodos de medición conocidos por los expertos en la técnica, como espectroscopia de absorción atómica (AAS), espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) (también denominada espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)). Preferentemente, se puede utilizar ICP-MS o ICP-OES, en particular ICP-OES, para medir la concentración de iones metálicos (véase también el Segundo Suplemento de USP38-NF 33, Chemical Tests / $<233>$ Elemental Impurities – Procedure 1 (ICP-OES) y Procedure 2 (ICP-MS), 2015).

La concentración de los aminoácidos triptófano y N-acetil-triptófano se puede determinar mediante diversas técnicas (por ejemplo, DC, HPLC, LC-MS, GC-MS, CE, etc.), como conocen los expertos en la técnica. Por ejemplo, el N-acetil-triptófano se puede determinar mediante separación utilizando cromatografía líquida en una columna de fase inversa y detección UV a 280 nm como se describe en Nelis et al. (Nelis et al., J. Chromatogr., 1985, 333(2):381-387) o mediante un método basado en espectrofotometría UV de la fracción soluble en ácido que queda después de la precipitación de la proteína como se describe en Yu y Finlayson (Yu, M. W. y Finlayson, J. S., J. Pharm. Sci., 1984, 73(1):82-86). El triptófano se puede determinar cuantitativamente, por ejemplo, utilizando un método que implica cromatografía líquida-

espectrometría de masas en tándem, como la describen Wentao et al. (Wentao et al., Analytical y Bioanalytical Chemistry, 2011, 401:3249-3261).

El término "triptófano", tal como se lo emplea en el presente documento, se refiere a L-triptófano, D-triptófano o una mezcla de L-triptófano y D-triptófano (D/L-triptófano). Asimismo, el término "N-acetiltriptófano", como se utiliza en el presente documento, se refiere a N-acetil-L-triptófano, N-acetil-D-triptófano o una mezcla de N-acetil-L-triptófano y N-acetil-D-triptófano (N-acetil-D/L-triptófano).

La albúmina sérica humana utilizada para preparar la formulación líquida es preferentemente un material de albúmina sérica humana que contiene no más de 50 mM, más preferentemente no más de 20 mM o 10 mM, aún más preferentemente no más de 1 mM o 0.1 mM, y con mayor preferencia no más de 0.01 mM o 0 mM de triptófano y N-acetil-D-triptófano.

Se señala que todos los productos comerciales de HSA donante contienen N-acetiltriptófano en cantidades significativas (> 10 mM). Por lo tanto, dichos productos necesitan purificarse para reducir la cantidad de N-acetil-D-triptófano hasta el nivel deseado antes de su uso para la formulación líquida de la presente invención. A continuación, se describen en detalle los métodos adecuados para preparar la "HSA purificada" en relación con el tercer aspecto de la presente invención. En resumen, la albúmina sérica humana sin triptófano y N-acetil-D-triptófano (también denominada en el presente documento "HSA purificada") se puede obtener sometiendo un material de partida de albúmina sérica humana a diálisis, diafiltración, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, fraccionamiento de flujo de campo o precipitación (por ejemplo, precipitación con sal, precipitación con etanol), lo que da como resultado la eliminación de triptófano y/o N-acetil-D-triptófano.

Sin quedar limitados por la teoría, se cree que el material de HSA utilizado para preparar la formulación líquida de la presente invención, en particular la HSA donante derivada de sangre humana que contiene grandes cantidades de iones de hierro, contiene una cantidad significativa de iones Fe^{3+} que son responsables, al menos en parte, de las propiedades inductoras de fotosensibilidad de la HSA no purificada (no tratada).

Además de las ventajas mencionadas anteriormente, este aspecto de la presente invención también es ventajoso en el desarrollo de procesos de elaboración y nuevas formulaciones. Por ejemplo, los equipos (por ejemplo, recipientes) y los materiales (por ejemplo, excipientes) se pueden seleccionar de tal manera que haya la menor cantidad posible de hierro presente en el producto final.

Además, la presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que el triptófano y el N-acetil-D-triptófano disminuyen la estabilidad a la luz de las formulaciones líquidas de toxina

botulínica que contienen albúmina sérica humana (HSA). Este hallazgo es muy sorprendente, ya que los productos comerciales de HSA, además de agua y cloruro de sodio, suelen contener caprilato de sodio y N-acetil-D-triptófano para estabilizar la HSA a altas temperaturas, que de esta manera entran en la formulación de la toxina botulínica. También es sorprendente porque el triptófano se describe como aditivo estabilizador para la toxina botulínica (véase, por ejemplo, EP 3 679 946).

Preferentemente, el método para preparar la formulación líquida según el segundo aspecto de la presente invención es el mismo que el método descrito en relación con el primer aspecto de la presente invención. Además, la formulación líquida según el primer aspecto de la presente invención puede tener la misma composición que la composición de la formulación líquida según el segundo aspecto de la presente invención. Por lo tanto, todas las explicaciones, comentarios, revelaciones, definiciones y similares proporcionados para la formulación líquida según el primer aspecto de la presente invención se aplican igualmente a la formulación líquida según el segundo aspecto de la presente invención, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

La formulación líquida de acuerdo con el segundo aspecto

En un Segundo aspecto, la presente invención se refiere a una formulación líquida, que comprende agua y los siguientes componentes:

toxina botulínica,
albúmina sérica humana,
ácido hialurónico,
alditol, donde el alditol es sorbitol.

En una forma preferida de modalidad, la formulación acuosa de acuerdo con el segundo aspecto contiene Fe^{3+} iones en una concentración de menos de 1 μM .

Preferentemente, la concentración de Fe^{3+} en la formulación líquida es menor de 1000 nM, menor de 750 nM, menor de 500 nM, o menor de 250 nM, más preferentemente, la concentración de Fe^{3+} en la formulación líquida es menor de 200 nM, menor de 150 nM, o menor de 100 nM, particularmente preferente la concentración de Fe^{3+} en la formulación líquida es menor de 50 nM o menor de 10 nM, y con mayor preferencia la concentración de Fe^{3+} en la formulación líquida es menor de 1 nM, menor de 100 pM, menor de 10 pM, o menor de 1 pM.

En una forma preferida de modalidad, la concentración de triptófano y N-acetil-triptófano en la formulación líquida es de no más de 50 μM , preferentemente no más de 20 μM , más preferentemente no más de 10 μM , aún más preferentemente no más de 1 μM , y con mayor preferencia 0 μM , de triptófano y N-acetil-triptófano (concentración total de ambos Trp y N-AcTrp).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una formulación líquida, que comprende agua y los siguientes componentes:

toxina botulínica,
albúmina sérica humana,
5 ácido hialurónico,
alditol.

En una forma preferida de modalidad, la formulación acuosa según el segundo aspecto contiene iones Fe^{3+} en una concentración menor de 1 μM .

Preferentemente, la concentración de Fe^{3+} en la formulación líquida es menor de 1000
10 nM, menor de 750 nM, menor de 500 nM o menor de 250 nM, más preferentemente, la
concentración de Fe^{3+} en la formulación líquida es menor de 200 nM, menor de 150 nM o menor
de 100 nM, particularmente preferente la concentración de Fe^{3+} en la formulación líquida es menor
de 50 nM o menor de 10 nM, y con mayor preferencia la concentración de Fe^{3+} en la formulación
líquida es menor de 1 nM, menor de 100 pM, menor de 10 pM o menor de 1 pM.

15 En una forma preferida de modalidad, la concentración de triptófano y N-acetil-triptófano
en la formulación líquida es no más de 50 μM , preferentemente no más de 20 μM ,
preferentemente no más de 10 μM , aún más preferentemente no más de 1 μM , y con mayor
preferencia 0 μM , de triptófano y N-acetil-triptófano (concentración total de ambos Trp y N-
AcTrp).

20 De acuerdo con la presente invención, la formulación líquida como se define en el primer
o segundo aspecto o en el aspecto adicional comprende además uno o ambos componentes (v)
y (vi):

(v) un agente de tonicidad,
(vi) un agente búfer.

25 El término "agente de tonicidad", tal como se lo emplea en el presente documento, se
refiere a un agente que se añade a formulaciones inyectables para hacer que las formulaciones
sean similares en características osmóticas a los fluidos fisiológicos. El agente de tonicidad
también se puede denominar "regulador osmótico". El agente de tonicidad no está
particularmente limitado y puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en azúcares,
30 sales, polímeros y mezclas de los mismos.

Los agentes de tonicidad ejemplares incluyen sacarosa, glucosa, carbonato de sodio,
aminoácidos, polietilenglicol (PEG), dextrano, ciclodextrina y coloides (por ejemplo, polisacáridos
coloidales). Normalmente, la concentración del agente de tonicidad está en el rango de 0 – 2.0 %
p/v, en particular 0.01 – 2.0 % p/v o 0.1-1.5 % p/v, más particularmente 0.6-1.2 % p/v.

35 Preferentemente, el agente de tonicidad es cloruro de sodio (NaCl). El cloruro de sodio

puede estar presente en la formulación líquida de la presente invención en una cantidad de 0.01 – 2.0 % p/v, preferentemente 0.1 – 1.5 % p/v, más preferentemente 0.5 – 1.2 % p/v o 0.8 – 1.0 % p/v, y con mayor preferencia 0.9 % p/v.

El término "agente búfer", tal como se lo emplea en el presente documento, significa un agente que mantiene el pH de la formulación líquida en un rango aceptable, es decir, un agente capaz de controlar el pH de la formulación. Los agentes búfer adecuados son aquellos que no son químicamente reactivos con otros ingredientes y están presentes en cantidades suficientes para proporcionar el grado deseado de regulación del pH. Dichos agentes búfer incluyen, por ejemplo, aminoácidos, acetato, ácido málico, ascorbato, citrato, tartrato, fumarato, succinato, fosfato, bicarbonato, TRIS, Bis-TRIS, ACES, MES, BES, MOPS, HEPES, TES, PIPES, tricina e imidazol.

Preferentemente, el agente búfer es fosfato (es decir, un búfer de fosfato), un aminoácido o una mezcla de los mismos. El término "fosfato", tal como se emplea en el presente documento, generalmente significa formas no protonadas y protonadas o cualquiera de sus sales. El aminoácido se puede seleccionar entre aspartato, glicina, glutamato, histidina, prolina, taurina, metionina, serina, tirosina, triptófano y mezclas de los mismos, y se selecciona preferentemente entre histidina, prolina, taurina, metionina, serina, tirosina, triptófano y las mezclas de éstos.

En una forma de modalidad de la presente invención, el componente (iv) de la formulación líquida es sorbitol y el agente búfer (vi) es fosfato.

Más preferentemente, el aminoácido es histidina.

El agente búfer más preferido para su uso en el presente documento es histidina, fosfato o una mezcla de éstos.

La concentración del agente búfer en la formulación líquida de la presente invención es preferentemente 1-100 mM, preferentemente 2-50 mM, más preferentemente 5-20 mM. Si el agente búfer es un aminoácido (por ejemplo, histidina), puede estar presente en la formulación líquida en una concentración de 1-100 mM, preferentemente 2-50 mM, más preferentemente 5-20 mM, y con mayor preferencia 10 mM. Si el agente búfer es fosfato, puede estar presente en la formulación líquida en una concentración de 1-100 mM, preferentemente 2-50 mM, más preferentemente 5-20 mM, y con mayor preferencia 10 mM.

El pH de la formulación líquida de la presente invención está normalmente en el rango de 5.0-8.0, particularmente en el rango de 5.5-7.5, y preferentemente en el rango de 5.5-7.0 o 6.0-7.5, más preferentemente en el rango de 6.0-7.0, y con mayor preferencia en el rango de 6.0-6.5.

La viscosidad de la formulación líquida de la presente invención está típicamente en el rango de 0.1 a 100 Pa•s, preferentemente de 0.3 a 50 Pa•s, más preferentemente de 0.5 a 10 Pa•s, y con mayor preferencia en el rango de 0.8 a 05 Pa•s. En una modalidad particularmente

preferida de la presente invención la viscosidad de la formulación líquida está en el rango de 1 a 3 Pa•s. El término "viscosidad" tal como se lo emplea en el presente documento significa "viscosidad compleja" a 1 Hz y se determina típicamente en un reómetro de cizallamiento, por ejemplo, mediante un reómetro de cizallamiento de placa y cono en modo oscilante.

5 Además, las formulaciones líquidas de la presente invención pueden comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales, a menos que se indique o pretenda lo contrario. Por ejemplo, las formulaciones líquidas pueden contener uno o más de sacarosa, lactosa, dextrano, polivinilpirrolidona, ácido láctico, ácido cítrico, aminoácidos, alcohol bencílico, lidocaína, gelatina, hidroxietilalmidón (HES), óxido de polietileno, y polisorbato (por
10 ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados comprenden aquellos bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

 Por otra parte, también se contempla en el presente documento que las formulaciones líquidas de la presente invención carecen específicamente determinados componentes (es decir,
15 compuestos, materiales o sustancias), por ejemplo, agentes quelantes, detergentes, polisacáridos, aminoácidos, péptidos estabilizadores, y similares, inclusive cualquier combinación de los mismos.

 Tal como se lo emplea en el presente documento, el término "detergente", se utiliza como sinónimo de "tensioactivo" e incluye detergentes no iónicos y iónicos. El término "péptido
20 estabilizador", tal como se utiliza en el presente documento, generalmente significa un péptido que consiste en 5 a 50 aminoácidos, tal como un péptido de 10 a 40 aminoácidos o de 15 a 30 aminoácidos. Por lo tanto, el término "péptido estabilizador" excluye HSA.

 En una forma de modalidad, la formulación líquida de la presente invención no contiene detergentes, particularmente no contiene polisorbato, más particularmente no contiene
25 polisorbato 20 y/o polisorbato 80. En otra forma de modalidad, la formulación líquida de la presente invención no contiene alginato. En otra forma de modalidad, la formulación líquida de la presente invención no contiene succinato. En otra forma de modalidad, la formulación líquida de la presente invención no contiene uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: arginina, ácido glutámico, metionina, triptófano y serina. En otra forma
30 de modalidad, la formulación líquida de la presente invención no contiene un sacárido, tal como un mono-, oligo- o polisacárido o una mezcla de los mismos. En particular, la formulación líquida de la presente invención puede no contener uno o más (por ejemplo, 2, 3 o 4) de sacarosa, lactosa, maltosa y trehalosa. En otra forma de modalidad, la formulación líquida de la presente invención no contiene un agente quelante, en particular aquellos descritos en este documento
35 en relación con la presente invención. También se contempla dentro de la presente invención que

la formulación líquida carezca de más de uno, o de todos los compuestos mencionados anteriormente.

En una forma de modalidad, la formulación líquida de la presente invención carece de (i) detergentes y mono-, oligo- y polisacáridos, (ii) detergentes y cualquier aminoácido, o detergentes y todos los aminoácidos excepto histidina, (iii) detergentes y péptidos estabilizadores, (iv) mono-, oligo- y polisacáridos y cualquier aminoácido, o mono-, oligo- y polisacáridos y todos los aminoácidos excepto histidina, (v) mono-, oligo- y polisacáridos y péptidos estabilizadores, (vi) cualquier aminoácido y péptidos estabilizadores, o todos los aminoácidos excepto histidina y péptidos estabilizadores, (vii) detergentes, mono-, oligo- y polisacáridos y cualquier aminoácido, o detergentes, mono-, oligo- y polisacáridos y todos los aminoácidos excepto histidina, (viii) detergentes, mono-, oligo- y polisacáridos, y péptidos estabilizadores, (ix) detergentes, cualquier aminoácido ácido, y péptidos estabilizadores, o detergentes, todos los aminoácidos excepto histidina, y péptidos estabilizadores, (x) mono-, oligo- y polisacáridos, cualquier aminoácido, y péptidos estabilizadores, o mono-, oligo- y polisacáridos, todos los aminoácidos excepto histidina, y péptidos estabilizadores, (xi) detergentes, mono-, oligo- y polisacáridos, cualquier aminoácido, y péptidos estabilizadores, o mono-, oligo- y polisacáridos, todos los aminoácidos excepto histidina, y péptidos estabilizadores.

En otra forma de modalidad, las formulaciones líquidas de la presente invención no contienen ningún otro aminoácido que la histidina. En otra forma de modalidad, la formulación líquida de la presente invención no contiene ningún mono, di- y trisacárido. En otra forma de modalidad, la formulación líquida de la presente invención no contiene ningún otro péptido o proteína estabilizante distinto de HSA. En otra forma de modalidad, las formulaciones líquidas de la presente invención no contienen fosfato tal como en forma de búfer fosfato.

En aún otras formas de modalidad, las formulaciones líquidas de la presente invención carecen de (i) succinato y un detergente (por ejemplo, polisorbato), (ii) succinato y metionina, (iii) succinato y sacarosa, (iv) un detergente (por ejemplo, polisorbato) y metionina, (v) un detergente (por ejemplo, polisorbato) y sacarosa, (vi) metionina y sacarosa, (vii) succinato, un detergente (por ejemplo, polisorbato) y metionina, (viii) succinato, un detergente (por ejemplo, polisorbato) y sacarosa, (ix) succinato, metionina y sacarosa, (x) un detergente (por ejemplo, polisorbato), metionina y sacarosa, y (xi) succinato, un detergente (por ejemplo, polisorbato), metionina y sacarosa, (xii) un detergente (por ejemplo polisorbato e histidina), (xiii) un detergente (por ejemplo polisorbato), histidina y sacarosa).

Además, cualquiera de las formulaciones líquidas de la presente invención que carezca de uno o más componentes (es decir, compuestos, materiales o sustancias) puede carecer además de un agente quelante, en particular los agentes quelantes descritos en este

documento.

Además, una formulación líquida preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.01-1.0 % p/v, (iii) ácido hialurónico en una cantidad de 2 a 10 mg/ml, (iv) un alditol en una cantidad de 10 – 100 mg/ml, (v) un agente de tonicidad, preferentemente cloruro de sodio, en una cantidad de 0.01-2.0 % p/v, y (vi) un agente búfer en una cantidad de 1-100 mM.

Una formulación líquida preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.01-0.5% p/v, (iii) ácido hialurónico en una cantidad de 2 a 10 mg/ml, (iv) un alditol en una cantidad de 10 – 100 mg/ml, (v) un agente de tonicidad, preferentemente cloruro de sodio, en una cantidad de 0.1-1.5% p/v, y un agente búfer en una cantidad de 1-100 mM.

Una formulación líquida preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.01-0.5% p/v, (iii) ácido hialurónico en una cantidad de 2 a 10 mg/ml, (iv) un alditol en una cantidad de 10 – 100 mg/ml, (v) un agente de tonicidad, preferentemente cloruro de sodio, en una cantidad de 0.6-1.2% p/v, y (vi) un agente búfer en una cantidad de 5-90 mM.

Otra formulación líquida preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.01-0.5% p/v, (iii) ácido hialurónico en una cantidad de 2 a 10 mg/ml, (iv) un alditol en una cantidad de 20 – 90 mg/ml, (v) cloruro de sodio como agente de tonicidad en una cantidad de 0.9% p/v, y (vi) un agente búfer en una cantidad de 5-90 mM.

Otra formulación líquida preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.05 -0.25% p/v, (iii) ácido hialurónico en una cantidad de 2 a 10 mg/ml, (iv) un alditol en una cantidad de 20 – 90 mg/ml, (v) cloruro de sodio como agente de tonicidad en una cantidad de 0.9% p/v, y (vi) un agente búfer en una cantidad de 5-90 mM.

También se contempla en este documento que las formulaciones líquidas preferidas descritas en el párrafo anterior así como en los párrafos siguientes se pueden caracterizar por una concentración de iones Fe^{3+} de menos de 1 μM , preferentemente menos de 1000 nM o menos de 500 nM, más preferentemente menos de 250 nM o menos de 100 nM, y con mayor preferencia menos de 10 nM o menos de 1 nM.

También se contempla aquí que las formulaciones líquidas descritas en el párrafo anterior, así como en los párrafos siguientes se pueden caracterizar porque la concentración de triptófano y N-acetil-triptófano en la formulación líquida es no más de 50 μM , preferentemente no más de 20 μM , más preferentemente no más de 10 μM , aún más preferentemente no más de

1 μM , y con mayor preferencia 0 μM , de triptófano y N-acetil-triptófano (concentración total tanto de Trp como de N-AcTrp).

Otra formulación líquida preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.01-1.0% p/v, (v) un agente de tonicidad, preferentemente cloruro de sodio, en una cantidad de 0.01-2.0% p/v, y (vi) un agente búfer en una concentración de 1-100 mM. Una formulación líquida preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.01-0.5% p/v, (v) un agente de tonicidad, preferentemente cloruro de sodio, en una cantidad de 0,01-2,0% p/v, y (vi) un agente búfer en una concentración de 1-100 mM. Una formulación líquida preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.05-0.25% p/v, (v) un agente de tonicidad, preferentemente cloruro de sodio, en una cantidad de 0.1-2.0% p/v, y (vi) un agente búfer en una concentración de 1-100 mM. Una formulación líquida preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.05-0.25% p/v, (v) un agente de tonicidad, preferentemente cloruro de sodio, en una cantidad de 0.6-1.3% p/v, y (vi) un agente búfer en una concentración de 2-50 mM. Una formulación líquida preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.05-0.25% p/v, (v) cloruro de sodio en una cantidad de 0.9% p/v, y (vi) un agente búfer en una concentración de 5-20 mM. La concentración de (iii) ácido hialurónico puede estar en el rango de 2 a 10 mg/ml, y la concentración de (iv) alditol puede estar en el rango de 10 – 100 mg/ml, respectivamente.

También se contempla en el presente documento que las formulaciones líquidas preferidas descritas anteriormente se pueden caracterizar por una concentración de iones Fe^{3+} de menos de 1 μM , preferentemente menos de 1000 nM o menos de 500 nM, más preferentemente menos de 250 nM o menos de 100 nM, y con mayor preferencia menos de 10 nM o menos de 1 nM.

También se contempla en el presente documento que las formulaciones líquidas descritas anteriormente se pueden caracterizar porque la concentración de triptófano y N-acetil-triptófano en la formulación líquida no es más de 50 μM , preferentemente no más de 20 μM , más preferentemente no más de 10 μM , aún más preferentemente no más de 1 μM , y con mayor preferencia 0 μM , de triptófano y N-acetil-triptófano (concentración total tanto de Trp como de N-AcTrp).

Una formulación líquida preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica, (ii) HSA, (iii) ácido hialurónico, (iv) alditol, (v) cloruro de sodio como agente de tonicidad, y (vi) un agente búfer seleccionado entre histidina, fosfato y una mezcla de los mismos como agente búfer,

en donde el agente búfer es preferentemente histidina.

Una formulación líquida particularmente preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.01-1.0% p/v, (iii) ácido hialurónico en una cantidad de 2 a 10 mg/ml, (iv) alditol en una cantidad de 10 – 100 mg/ml, (v) cloruro de sodio en una cantidad de 0.01-2.0% p/v, preferentemente 0.9% p/v, y (vi) un agente búfer seleccionado entre histidina, fosfato y una mezcla de los mismos en una concentración de 1-100 mM, en donde el agente búfer es preferentemente histidina en una concentración de 1-100 mM.

Otra formulación líquida particularmente preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.01-0.5% p/v, (iii) ácido hialurónico en una cantidad de 2 a 10 mg/ml, (iv) un alditol en una cantidad de 10-100 mg/ml, (v) cloruro de sodio en una cantidad de 0.9% p/v, y (vi) un agente búfer seleccionado entre histidina, fosfato y una mezcla de los mismos en una concentración de 1-100 mM, donde el agente búfer es preferentemente histidina en una concentración de 1-100 mM.

Otra formulación líquida particularmente preferida de la presente invención comprende (i) toxina botulínica en una concentración de 10-200 U/ml, (ii) HSA en una cantidad de 0.05-0.25% p/v, (iii) ácido hialurónico en una cantidad de 2 a 10 mg/ml, (iv) alditol en una cantidad de 10 – 100 mg/ml, (v) cloruro de sodio en una cantidad de 0.9% p/v, y (vi) un agente búfer seleccionado entre histidina, fosfato y una mezcla de los mismos en una concentración de 1-100 mM, preferentemente en una concentración de 2 mM a 50 mM o, más preferentemente 5 mM a 20 mM, en donde el agente búfer es preferentemente histidina en una concentración de 1-100 mM, preferentemente en una concentración de 2 mM a 50 mM, más preferentemente 5 mM a 20 mM,

Además, las formulaciones líquidas preferidas y particularmente preferidas descriptas anteriormente tienen un pH que está preferentemente en el rango de 6.0-7.5. Además, la toxina botulínica es preferentemente del serotipo A y, más preferentemente, es el componente neurotóxico del serotipo A.

Una formulación líquida ejemplar preferida de la presente invención es la siguiente:

Formulación 1:

BoNT/A (sin proteínas complejantes)	50 U/ml
HSA (pretratada con EDTA y dializada)	0.85 mg/ml
Ácido hialurónico no reticulado (3,3 MDa)	5 mg/ml
Sorbitol	35 mg/ml
NaCl	0.9% (9 mg/mL)
Fosfato sódico	10 mM
pH	6

La HSA (dializada con EDTA) de la Formulación ejemplar 1 se prepara mediante un proceso ejemplar que incluye los siguientes pasos:

adición de 37.2 mg de Na₂-EDTA por ml de 20% Solución de HSA con agitación y ajuste a pH 8.0 con NaOH,

5 incubación durante 6 horas a temperatura ambiente con agitación,

diálisis frente a un volumen de 100 veces superior de búfer EDTA (100 mM Na₂-EDTA; 10 mM histidina; 0.9 % NaCl pH 7.0) durante 16 h a temperatura ambiente con agitación suave en agitador magnético (MWCO de membrana de diálisis 10 kDa)

10 diálisis frente a un volumen de 100 veces superior de 10 mM histidina, 0.9 % NaCl pH 6.0 durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de sustitución del búfer de diálisis por búfer nuevo y dialización durante otras 24 h, y repetición dos veces más.

En la Formulación ejemplar 1, el EDTA se puede sustituir opcionalmente por otros quelantes como EGTA, BAPTA o DTPA. Como alternativa a la adición de EDTA sólido a la solución de HSA, se puede utilizar una solución de EDTA concentrada (por ejemplo, EDTA 200 mM, pH 8.0). También se puede omitir el primer paso de diálisis (contra búfer de EDTA). También se pueden utilizar otros métodos, como la diálisis de flujo cruzado o la ultrafiltración, en lugar de la diálisis.

Otra formulación líquida preferida es la Formulación 2:

Formulación 2:

20	BoNT/A (sin proteínas complejas)	50 U/ml
	HSA (pre-tratada con EDTA y dializada)	0.85 mg/ml
	Ácido hialurónico no reticulado	
	(3,3 MDa, pre-tratado con EDTA y dializado)	5 mg/ml
	Sorbitol	35 mg/ml
25	NaCl	0.2% (2 mg/ml)
	Fosfato de sodio	10mM
	pH	6

Otra formulación líquida preferida es la Formulación 3:

Formulación 3:

30	BoNT/A (sin proteínas complejas)	50 U/ml
	HSA (pre-tratada con EDTA y dializada)	0.85 mg/ml
	Ácido hialurónico no reticulado (3,3 MDa)	5 mg /ml
	Manitol	70 mg/ml
	NaCl	0.2% (2 mg/ml)
35	Histidina	10mM

La presente invención también se refiere a una formulación líquida que comprende una toxina botulínica, en donde la actividad de la toxina no se reduce en más de un 20%, con respecto a la actividad inicial de la toxina, tras el almacenamiento de la formulación líquida durante 4 semanas a una temperatura elevada de 40°C. Además, la presente invención se refiere a una formulación líquida que comprende una toxina botulínica, en donde la actividad de la toxina no se reduce en más de un 20%, con respecto a la actividad inicial de la toxina, tras la exposición de la formulación líquida durante 7 horas a una fuente de luz a 250 W/m². Preferentemente, para las pruebas de fotoestabilidad, es decir, para la exposición durante 7 horas a 250 W/m², se puede utilizar un instrumento SUNTEST CPS+ (ATLAS Material Testing Technology LLC), equipado con un juego de filtros para proporcionar una distribución espectral en el rango de longitud de onda de 320-800 nm correspondiente al ID65 (estándar de luz diurna indirecta en interiores) según ISO 10977 con un filtro de vidrio de ventana según ICH Q1B.

Método de elaborar formulaciones líquidas tal como se definen en el primer y segundo aspecto de acuerdo con un tercer aspecto

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere además a un método para elaborar la formulación líquida como se define en el primer aspecto o cualquiera de las formas de modalidad que hacen referencia al mismo, que comprende:

mezclar los componentes (i) a (iv) y opcionalmente (v) y/o (vi) en un líquido que comprende agua; y

un agente quelante; o

un agente quelante y una sal metálica seleccionada entre una sal de calcio, magnesio, cinc, y las mezclas de los mismos; o

en donde el método comprende los pasos (a) y (c) o los pasos (b) y (c):

poner en contacto la albúmina sérica humana con un agente quelante para obtener una mezcla de albúmina sérica humana y el agente quelante;

poner en contacto dicha albúmina sérica humana con un agente quelante y una sal metálica seleccionada entre calcio, magnesio o cinc, o una mezcla de los mismos, para obtener una mezcla de albúmina sérica humana, el agente quelante, y la sal metálica; y

eliminar el agente quelante de la mezcla obtenida en el paso (a) o el paso (b) mediante diálisis, filtración, filtración de flujo cruzado o ultrafiltración, preferentemente mediante diálisis; o

en donde el método comprende los pasos (d) y (f) o los pasos (e) y (f):

(d) poner en contacto una formulación líquida que comprende los componentes (i) a (iv) con un agente quelante para obtener una mezcla de dicha formulación líquida y el agente

quelante;

(e) poner en contacto una formulación líquida que comprende los componentes (i) a (iv) con un agente quelante y una sal metálica seleccionada entre calcio, magnesio o cinc, o mezclas de los mismos para obtener una mezcla de dicha formulación líquida, el agente quelante, y la sal metálica;

(f) eliminar el agente quelante de la mezcla obtenida en el paso (d) o el paso (e) mediante diálisis, filtración, filtración de flujo cruzado o ultrafiltración, preferentemente mediante diálisis.

Preferentemente, en donde el contacto en el paso (a) o el paso (b) se lleva a cabo mezclando la composición que comprende albúmina sérica humana con el agente quelante o el agente quelante y la sal metálica o en donde el contacto en el paso (d) y (e) se lleva a cabo mezclando una formulación líquida que comprende los componentes (i) a (iv) con el agente quelante o el agente quelante y la sal metálica de manera que la concentración del agente quelante en la formulación líquida sea de 1 mM – 500 mM.

Además, la invención se refiere a un método para elaborar la formulación líquida que se define en el segundo aspecto o cualquiera de las formas de modalidad que hacen referencia al mismo, que comprende:

mezclar los componentes (i) a (iv) y opcionalmente (v) y/o (vi) en un líquido que comprende agua.

La preparación de las formulaciones líquidas de la presente invención no está particularmente limitada y las técnicas de formulación respectivas son conocidas por los expertos en la técnica. Como se ha descrito anteriormente, la formulación líquida de toxina botulínica es generalmente una solución acuosa, preferentemente una solución salina, más preferentemente una solución salina fisiológica, y con mayor preferencia una solución salina fisiológica regulada (por ejemplo, con búfer de fosfato o histidina).

Preferentemente, las sales se disuelven primero, luego se añade HSA, se ajusta el pH si es necesario, y finalmente se añade la toxina botulínica. Este orden no es un requisito obligatorio, pero se cree que preserva de forma segura la actividad específica máxima de la BoNT. Preferentemente, el método para preparar la formulación líquida de toxina botulínica no comprende la reconstitución de una preparación de toxina botulínica liofilizada en forma de polvo.

Uso de las formulaciones líquidas tal como se definen en el primer y Segundo aspecto de acuerdo con un cuarto aspecto

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una formulación líquida de la presente invención para su uso en terapia.

En particular, la formulación líquida de la presente invención se puede usar en el tratamiento de enfermedades neuromusculares, dolor, sialorrea, hiperhidrosis, trastornos

urológicos y trastornos neurológicos. Las enfermedades neuromusculares ejemplares incluyen distonía, espasmo, temblor, trastornos del movimiento hipercinético y parálisis cerebral. Los trastornos urológicos incluyen, entre otros, afecciones caracterizadas por hiperactividad del detrusor, vejiga hiperactiva, vejiga neurogénica y cistitis intersticial, tratamiento de vulvodinia y dolor pélvico crónico, hiperplasia prostática benigna (HPB) y disinergia del esfínter detrusor (DSD). Los trastornos neurológicos ejemplares incluyen migrañas crónicas o episódicas, distonía cervical, dolor neuropático periférico, espasticidad (posterior a un accidente cerebrovascular) y blefaroespasma.

Generalmente, la formulación líquida de la presente invención se administra por vía intramuscular, subcutánea, subdérmica o intradérmica.

Uso de las formulaciones líquidas tal como se definen en el primer y segundo aspecto, de acuerdo con un quinto aspecto

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un uso cosmético de la formulación líquida de la presente invención para el tratamiento de una afección cosmética.

En una forma de modalidad, el uso de la presente invención puede ser un uso cosmético, por lo que también puede ser un uso no terapéutico. El uso de la presente invención puede ser realizado por profesionales de la cosmética, profesionales de la cosmética o profesionales de la salud.

Este aspecto de la presente invención se refiere a un uso puramente estético de la formulación líquida de la presente invención. Las afecciones cosméticas preferidas a tratar incluyen afecciones de la piel, en particular el tratamiento de arrugas de la piel, en particular de la cara.

El término "arrugas", tal como se lo emplea en el presente documento, se debe interpretar de manera amplia a fin de incluir no solo arrugas, sino también líneas, arrugas, pliegues, surcos y pliegues. Las palabras "líneas", "arrugas", "arrugas de pliegue", "pliegues" y "pliegues" comparten una definición similar y, por lo tanto, a menudo se usan indistintamente. En la presente invención, "líneas" son generalmente intercambiables con "arrugas" pero pueden referirse preferentemente a una depresión cutánea que es menos profunda que una "arruga". Un "pliegue" es intercambiable con arrugas y líneas y es preferentemente una depresión lineal. Un "pliegue" es intercambiable con arrugas, líneas y pliegues. Se refiere preferentemente a una forma leve de arrugas y puede describir la arruga específica en ciertas ubicaciones. Una "arruga", como se usa en el presente documento, tiene esencialmente el mismo significado de arruga. Sin embargo, una "arruga" se refiere preferentemente a una estructura de la piel que se forma por la agregación irregular de líneas. Un "surco" es un pliegue profundo o una línea profunda en la piel.

Preferentemente, las arrugas tratadas de acuerdo con la presente invención son arrugas

faciales que incluyen líneas horizontales de la frente, líneas glabellares (por ejemplo, líneas glabellares del entrecejo), líneas periorbitales, patas de gallo, líneas de conejo (es decir, líneas que irradian hacia abajo en los lados de la nariz), pliegues nasolabiales, líneas periorales de los labios, líneas radiales de los labios superiores, líneas radiales de los labios inferiores, líneas de las comisuras de la boca, líneas de marioneta, líneas periorales de los labios, comisuras orales, pliegue labiomentoniano y mentón en empedrado.

A fin de tratar las arrugas faciales mencionadas anteriormente, la toxina botulínica se administra habitualmente mediante una inyección intramuscular en los siguientes músculos: músculo frontal (líneas horizontales de la frente), músculos procerus y corrugador (líneas glabellares del entrecejo), músculo orbicularis oculi lateral (patas de gallo/líneas periorbitales), nasalis, procerus para músculos nasales transversales (líneas de conejo), elevador del labio superior y del ala de la nariz (pliegues nasolabiales), orbicularis oris (líneas radiales del labio superior e inferior), depresor del ángulo de la boca (líneas de la comisura de la boca, líneas de marioneta, comisuras orales, pliegue labiomentoniano), músculos y mentalis (líneas periorales del labio, mentón en empedrado).

Otro uso cosmético preferido de la formulación líquida de la presente invención se refiere al uso para aplicaciones cosméticas que comprenden el rejuvenecimiento y/o la mejora de la calidad de la piel de la cara y/o del cuerpo.

En otra forma preferida de modalidad, el rejuvenecimiento y/o la mejora de la calidad de la piel del rostro y/o del cuerpo comprende la mejora y/o reducción y/o relleno y/o prevención de arrugas, en particular de arrugas resultantes de la actividad muscular tal como la actividad mímica, alisado de la piel, mejora de la laxitud de la piel, efecto lifting, hidratación y/o suavizado de la piel, mejora y/o reducción y/o relleno de líneas faciales, aumento de tejidos blandos, mejora del soporte subdérmico de las cejas, almohadillas de grasa bucal y malar, mejora de los surcos lagrimales, mejora del aspecto de la nariz, resolución de asimetrías faciales, mejora de las líneas de la mandíbula, o una combinación de dos o más de los mismos.

Generalmente, la formulación líquida de la presente invención se administra por vía intramuscular, subcutánea, subdérmica o intradérmica.

Uso de formulaciones líquidas tal como se definen en el primer y segundo aspecto, de acuerdo con un sexto aspecto

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar una enfermedad o afección, que comprende administrar una cantidad eficaz de la formulación líquida de la presente invención a una persona que lo necesite.

La enfermedad o afección puede ser cualquiera de las enfermedades y afecciones mencionadas anteriormente, independientemente de si se trata de una indicación terapéutica o

cosmética. Por lo tanto, en una forma de modalidad, la presente invención se refiere a un método para tratar una afección terapéutica, que comprende administrar una cantidad eficaz de la formulación líquida de la presente invención a una persona que lo necesite. En otra forma de modalidad, la presente invención se refiere a un método (no terapéutico) para tratar una afección cosmética (estética), preferentemente una afección cutánea, que comprende inyectar una cantidad eficaz de la formulación líquida de la presente invención a una persona que lo necesite.

La persona que se va a tratar no está particularmente limitada más allá de tener una enfermedad o afección que se pueda tratar de acuerdo con la presente invención. Los expertos en la técnica podrán determinar regímenes de administración adecuados para el tratamiento de una indicación terapéutica o cosmética determinada.

En particular, la inyección puede ser intradérmica, subdérmica (subcutánea) o intramuscular, dependiendo de la enfermedad o afección a tratar.

Otros aspectos

Además, la presente invención se refiere a un uso de una albúmina sérica humana (HSA) para aumentar la estabilidad a la luz y/o a la temperatura de una composición líquida que comprende una toxina botulínica, en donde la HSA se prepara mediante un método que comprende los siguientes pasos:

poner en contacto una composición que comprende albúmina sérica humana con un agente quelante para obtener una mezcla de albúmina sérica humana y el agente quelante; o

poner en contacto la albúmina sérica humana con un agente quelante y una sal metálica seleccionada de calcio, magnesio o cinc, y mezclas de los mismos para obtener una mezcla de albúmina sérica humana, el agente quelante, y la sal metálica;

y

(c) retirar el agente quelante de la mezcla.

Además, la presente invención se refiere a una albúmina sérica humana (HSA) que se puede obtener mediante

poner en contacto una composición que comprende albúmina sérica humana con un agente quelante para obtener una mezcla de albúmina sérica humana y el agente quelante; o

poner en contacto albúmina sérica humana con un agente quelante y una sal metálica seleccionada de calcio, magnesio o cinc, y mezclas de los mismos para obtener una mezcla de albúmina sérica humana, el agente quelante, y la sal metálica;

y

(c) retirar el agente quelante de la mezcla.

Además, la presente invención se refiere a un método para estabilizar una formulación líquida de toxina botulínica, comprendiendo el método la combinación de toxina botulínica con

una albúmina sérica humana (HSA), en donde la HSA se prepara mediante un método que comprende los siguientes pasos:

poner en contacto una composición que comprende albúmina sérica humana con un agente quelante para obtener una mezcla de albúmina sérica humana y el agente quelante; o

5 poner en contacto albúmina sérica humana con un agente quelante y una sal metálica seleccionada de calcio, magnesio o cinc, y mezclas de los mismos para obtener una mezcla de albúmina sérica humana, el agente quelante, y la sal metálica; y

(c) retirar el agente quelante de la mezcla.

10 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran la formulación de toxina botulínica líquida según la presente invención y su método de preparación. Los porcentajes son peso por volumen (p/v) a menos que se indique lo contrario.

Se entenderá además que el alcance abarca los valores numéricos proporcionados como
15 valores comúnmente redondeados que abarcan los límites de redondeo enteros. Por ejemplo, el alcance de "1 mg" abarca el intervalo de 0.50 a 1.49 mg.

Los valores numéricos de la presente invención, sin embargo, también revelan los valores más detallados de uno o más órdenes de magnitud más en detalle. En consecuencia, por ejemplo, "1 mg" también puede incluir la revelación específica de "1.0 mg".

20 La actividad biológica de la toxina botulínica se determinó usando un ensayo de potencia basado en células (CBA) como se describe en WO 2014/207109. En resumen, se incubaron células neuronales con la muestra que contenía neurotoxina y un estándar de referencia de potencia conocida. Tras el periodo de incubación, se lisaron las células y se determinó la cantidad de proteína SNAP25 escindida mediante un inmunoensayo. A continuación, se calculó la
25 actividad biológica de la muestra comparando la tasa de escisión de las células tratadas con la muestra con las tratadas con el patrón de referencia.

EJEMPLO 1

Estabilidad a la luz y al almacenamiento de formulaciones líquidas de toxina botulínica que contienen HSA pretratada mediante diálisis convencional (no según la presente invención)

30 En experimentos iniciales, se descubrió que la actividad biológica de las formulaciones líquidas de la neurotoxina botulínica tipo A de 150 kDa libre de proteínas complejantes (también denominada en el presente documento "BoNT/A de 150 kDa") disminuía fuertemente tras la exposición a la luz (luz diurna o luz ambiente) y que la sensibilidad a la luz aumentaba con el incremento de las concentraciones de albúmina sérica humana (HSA). En otros experimentos
35 adicionales, los presentes inventores descubrieron inesperadamente que la estabilidad a la luz y

la estabilidad de almacenamiento a 40°C de las formulaciones de toxina botulínica líquida podían aumentarse significativamente añadiendo agentes complejantes tales como EDTA, incluso si el EDTA estaba presente en forma de sus complejos de magnesio, calcio o zinc (no se muestran los resultados).

A la vista de estos resultados, se supuso que un componente desconocido en la HSA causaba la fotosensibilidad de la toxina botulínica y que este componente podía inactivarse o enmascarse de algún modo mediante un agente quelante como el EDTA. Sin embargo, en experimentos posteriores llevados a cabo por los presentes inventores, se descubrió sorprendentemente que el EDTA provocaba un aumento del dolor de la inyección. Por lo tanto, para prescindir de agentes quelantes como el EDTA, los presentes inventores han intentado eliminar el componente desconocido en la HSA que causa la inestabilidad lumínica mediante diálisis.

Para este propósito, una solución madre concentrada de HSA (por ejemplo, 20%) se dializó extensivamente a temperatura ambiente contra un búfer de 10 mM histidina, 0.9% NaCl, pH 6.0, durante 4 x 12 horas (tres cambios de búfer, volumen de búfer aproximadamente 100 veces el volumen de muestra) para obtener un "HSA dializado". A continuación, la HSA dializada y la HSA no dializada se utilizaron para preparar las siguientes formulaciones líquidas de toxina botulínica (150 kDa BoNT/A sin proteínas complejantes):

Formulación 1: 65 U/mL de toxina botulínica, 0.1% de HSA (no dializada), 10 mM de histidina, 0.9% de NaCl, pH 6.0

Formulación 2: 65 U/mL de toxina botulínica, 0.1% de HSA (dializada), 10 mM de histidina, 0.9% de NaCl, pH 6.0

La estabilidad a la luz de estas dos formulaciones se determinó midiendo la actividad relativa de la toxina botulínica después de la exposición a la luz durante 7 horas a 250 W/m² en relación con una muestra de control almacenada en la oscuridad. Para la exposición a la luz durante 7 horas a 250 W/m², se utilizó un instrumento SUNTEST CPS+ (ATLAS Material Testing Technology LLC), equipado con un juego de filtros para proporcionar una distribución espectral en el rango de longitud de onda de 320-800 nm correspondiente a la ID65 (norma de luz diurna indirecta en interiores) según ISO 10977 con un filtro de cristal de ventana según ICH Q1B. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Estabilidad a la luz (7 h, 250 W/m²) de formulaciones de toxina botulínica líquida que contienen HSA no-dializada o HSA dializada

Formulación BoNT/A	Diálisis	Actividad relativa BoNT/A (% de control)
1	no	46%
2	sí	56%

5 Como se desprende de la Tabla 1, solo se observó una influencia limitada en la estabilidad a la luz para la Formulación 2 que contenía HSA dializada en comparación con la Formulación 1 que contenía HSA no dializada.

Además, la estabilidad de almacenamiento de las Formulaciones 1 y 2 se determinó midiendo la actividad relativa de la toxina botulínica después del almacenamiento a 40 °C durante 2 y 4 semanas en relación con una muestra de control en T0 (medida inmediatamente después de la preparación de las Formulaciones 1 y 2). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Estabilidad de almacenamiento a 40°C de formulaciones líquidas de toxina botulínica que contienen HSA no dializada o HSA dializada

Formulación BoNT/A	Diálisis	Actividad relativa BoNT/A (% de control a T0)	
		Luego de almacenamiento durante 2 semanas a 40°C	Luego de almacenamiento durante 4 semanas a 40°C
1	no	66%	52%
2	sí	65%	51%

Como se puede ver, la diálisis no tiene impacto en la estabilidad de almacenamiento de la toxina botulínica.

EJEMPLO 2

Estabilidad a la luz y durante el almacenamiento de formulaciones líquidas de toxina botulínica que contienen HSA pre-tratada con agente quelante y diálisis

A pesar de los hallazgos del Ejemplo 1 (es decir, se requiere EDTA o complejos de EDTA para la estabilidad a la luz; el HSA dializado no produce una mejora significativa de la estabilidad a la luz y al almacenamiento), los presentes inventores han continuado investigando una formulación de toxina botulínica líquida que sea estable a la luz y al almacenamiento a pesar de estar libre de un agente quelante como EDTA.

En primer lugar, se añadió EDTA a una solución madre concentrada de HSA (por ejemplo,

20%) (100 mM = 37.2 mg de Na₂-EDTA por ml de solución de HSA a pH 8.0) y se incubó durante 6 horas a temperatura ambiente con agitación. A continuación, la mezcla incubada se dializó contra un búfer con EDTA (100 mM EDTA, 10 mM histidina, 0.9% NaCl, pH 7.0) durante 16 horas a temperatura ambiente. La membrana de diálisis utilizada era una membrana con un MWCO de 10 kDa y el volumen de llenado era de unos 0.2 ml por cm² de membrana de diálisis. El volumen del búfer de diálisis era aproximadamente 100 veces el volumen de la muestra.

A continuación, se eliminó el EDTA mediante diálisis durante 24 horas a temperatura ambiente con un volumen de búfer de diálisis sin EDTA (10 mM de histidina, 0.9% de NaCl, pH 6.0) de aproximadamente 100 veces el volumen de la muestra. A continuación, se sustituyó el búfer de diálisis por búfer de diálisis nuevo y se volvió a dializar durante 24 horas. Esto se repitió dos veces para obtener la HSA pre-tratada ("HSA dializada con EDTA").

Esta HSA pre-tratada se utilizó entonces para preparar la Formulación 3 líquida de toxina botulínica (150 kDa BoNT/A sin proteínas complejantes):

Formulación 1: idéntica a la Formulación 1 del Ejemplo 2 (65 U/mL de toxina botulínica, 0.1% de HSA (no dializado), 10 mM de histidina, 0.9% de NaCl, pH 6.0).

Formulación 3: 65 U/mL de toxina botulínica, 0.085% de HSA (EDTA-dializado), 10 mM de histidina, 0.9% de NaCl, pH 6.0

La estabilidad a la luz de las Formulaciones 1 y 3 se determinó midiendo la actividad relativa de la toxina botulínica después de la exposición a la luz durante 7 horas a 250 W/m² en relación con una muestra de control almacenada en la oscuridad. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Estabilidad a la luz (7 h, 250 W/m²) de las formulaciones líquidas de toxina botulínica que contienen HSA no-dializada o HSA dializada con EDTA

Formulación BoNT/A	Diálisis/ EDTA/	Actividad relativa BoNT/A (% de control)
1	no	46%
3	sí	84%

Como se desprende de la Tabla 3, se observó una marcada mejora en la estabilidad a la luz para la Formulación 3 que contenía HSA dializada con EDTA en comparación con la Formulación 1 que contenía HSA no pre-tratada.

Además, la estabilidad de almacenamiento se determinó midiendo la actividad relativa de la toxina botulínica después del almacenamiento a 40 °C durante 2 y 4 semanas en relación con una muestra de control en T0 (medida inmediatamente después de la preparación de las Formulaciones 1 y 3). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Estabilidad de almacenamiento a 40°C de formulaciones líquidas de toxina botulínica que contienen HSA no dializada o HSA dializada con EDTA

Formulación BoNT/A	Diálisis-EDTA	Actividad relativa BoNT/A (% de control a T0)	
		Luego de almacenamiento durante 2 semanas a 40°C	Luego de almacenamiento durante 4 semanas a 40°C
1	no	66%	52%
3	si	94%	82%

Los resultados muestran que el uso de HSA tratada con EDTA y dializada produce una actividad biológica de toxina significativamente mayor en comparación con la Formulación 1 que contiene HSA no tratada (no dializada).

En general, este ejemplo muestra que el agente quelante (por ejemplo, EDTA) se puede omitir inesperadamente de la formulación líquida si la HSA se trata previamente con un agente quelante seguido de la eliminación del agente quelante mediante, por ejemplo, diálisis. La formulación resultante no sólo es estable a la luz y a la temperatura (almacenamiento), sino que también muestra menor dolor cuando se inyecta en comparación con las formulaciones líquidas que contienen un agente quelante como EDTA.

EJEMPLO 3

Impacto de los iones de hierro en la estabilidad a la luz de formulaciones líquidas de toxina botulínica

Se llevaron a cabo más experimentos para investigar la influencia de los iones metálicos en la sensibilidad a la luz. Para ello, se añadió calcio (1 mM Ca^{2+}), cobalto (1 mM Co^{2+}), cobre (1 mM Cu^{2+}), níquel (1 mM Ni^{2+}) o hierro (1 mM Fe^{3+}) a una formulación líquida que contenía 50 U/ml de BoNT/A de 150 kDa, HSA pre-tratada al 0.085% preparada de acuerdo con el Ejemplo 2 (es decir, HSA tratada con EDTA y dializada), 10 mM de histidina, 0.9% de NaCl, pH 6.0. Dicha formulación líquida se preparó con agua de alta pureza, histidina y NaCl, y sin utilizar equipos de hierro o acero. Las formulaciones resultantes se expusieron a la luz (7 horas a 250 W/m²) y se compararon con formulaciones de control almacenadas en la oscuridad.

Se descubrió que la adición de calcio (1 mM Ca^{2+}) así como la adición de cobalto (1 mM Co^{2+}) no tienen efecto sobre la estabilidad a la luz (74% y 77% de actividad toxínica residual en comparación con las formulaciones de control almacenadas en la oscuridad), en comparación con la formulación sin calcio ni cobalto añadidos (79% de actividad toxínica residual en

comparación con la formulación de control almacenada en la oscuridad). La adición de cobre (1 mM Cu²⁺) y níquel (1 mM Ni²⁺) causó una reducción relativamente pequeña de la estabilidad a la luz. Por el contrario, la adición de hierro (1 mM Fe³⁺) causó una reducción drástica de la estabilidad a la luz, con sólo un 1% de actividad de toxina residual restante después de la exposición a la luz (7 horas a 250 W/m²) en comparación con la formulación de control almacenada en la oscuridad (no se muestran los resultados).

En vista de estos resultados, se investigó con más detalle la influencia de los iones Fe³⁺ en la sensibilidad a la luz de las formulaciones líquidas de BoNT/A en un rango de concentración entre 10 pM y 100 µM. De forma análoga a los experimentos descritos anteriormente, se utilizó la misma formulación compuesta por HSA pre-tratada (50 U/ml de toxina botulínica, 0.085% de HSA pre-tratada, 10 mM de histidina, 0.9% de NaCl, pH 6.0) y se ajustó la concentración de Fe³⁺ a la concentración final deseada utilizando soluciones madre (50 mM de Fe(NO₃)₃). En la Tabla 5 se muestra la actividad biológica medida tras la exposición a la luz durante 7 horas a 250 W/m², expresada como porcentaje de la actividad biológica medida para la muestra respectiva almacenada en la oscuridad.

Tabla 5. Estabilidad a la luz (7 h, 250 W/m²) de formulaciones líquidas de toxina botulínica que contienen HSA pre-tratada y concentraciones Fe³⁺ variables

Formulación BoNT/A	[Fe ³⁺]	Actividad relativa BoNT/A (% de control oscuro)
1	100 µM	0.4%
2	1 µM	9%
3	316 nM	66%
4	100 nM	82%
5	32 nM	77%
5	10 nM	75%
4	100 pM	74%
5	10 pM	78%
6	0 pM	78%

Como se puede ver en la Tabla 5, a una concentración de 316 nM, los iones Fe³⁺ tienen un impacto significativo en la estabilidad de BoNT/A, con una disminución de la estabilidad de > 15%. A una concentración de 1 µM, la estabilidad a la luz se reduce significativamente; sin embargo, sigue siendo mayor que a concentraciones superiores a 1 µM. A una concentración de 1 µM y superior, los iones Fe³⁺ añadidos tienen un efecto extremadamente negativo sobre la estabilidad de BoNT/A en formulaciones líquidas bajo la influencia de la luz.

En otro experimento, se descubrió que la agitación de la formulación líquida de toxina botulínica que contenía la HSA pretratada (es decir, 50 U/ml de toxina botulínica, 0.085% de HSA pre-tratada, 10 mM de histidina, 0.9% de NaCl, pH 6,0) durante 48 horas en un vaso de precipitados de acero inoxidable dio como resultado una actividad BoNT/A relativa después de la exposición a la luz (7 horas a 250 W/m²) de sólo alrededor del 2% en comparación con el 78% obtenido para la misma muestra agitada durante 48 horas en un recipiente de polipropileno. Se trata de un hallazgo muy sorprendente, probablemente causado por la lixiviación de pequeñas cantidades de iones Fe³⁺ del vaso de acero inoxidable a la formulación de toxina botulínica líquida, y demuestra que los iones de hierro son un factor importante a tener en cuenta cuando se preparan formulaciones de toxina botulínica líquida.

EJEMPLO 4

Preparación de formulaciones estables líquidas de toxina botulínica

La preparación de la solución a granel de las formulaciones de toxina botulínica se realizó con reactivos y materiales que contienen o liberan cantidades mínimas de contaminantes metálicos (por ejemplo, agua purificada, recipientes de polipropileno, agitadores de PTFE, etc.).

Se mezclaron 5 g de hialuronato sódico (3.3 MDa no coencadenado) con 500 ml de agua estéril purificada durante 48 h para permitir el hinchamiento y la disolución homogénea.

La solución madre de HSA se pre-trató con EDTA y se dializó como se describe en el Ejemplo 2.

Se disolvieron 2 g de cloruro de sodio, 1.56 g de fosfato monosódico (NaH₂PO₄ - 2 H₂O) y 35 g de sorbitol en 450 ml de agua purificada y se ajustó el pH de esta solución a pH 6.0 con NaOH. A continuación, se añadieron las soluciones madre de HSA (pre-tratada con EDTA y dializada) y BoNT/A (por ejemplo, 4.25 ml de HSA al 20% y 50 µl de BoNT/A 1 MU/ml). Se añadió agua purificada hasta un volumen final de 500 ml y la solución se filtró estérilmente. Finalmente, la solución se combinó con la solución de hialuronato y se mezcló durante 2 h mediante agitación suave.

La solución a granel se introdujo en jeringas de 1 ml y se almacenó a 2-8 °C.