República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0614474-8 A2**

BRPI0614474A2

(22) Data de Depósito: 24/07/2006
(43) Data da Publicação: 29/03/2011
(RPI 2099)

(51) Int.Cl.:
A61K 47/42
A61K 47/02
A61K 38/48

(54) Título: **COMPOSIÇÕES MELHORADAS DE TOXINA BOTULÍNICA**

(30) Prioridade Unionista: 01/08/2005 US 11/195,268

(73) Titular(es): ALLERGAN INC

(72) Inventor(es): TERRENCE J. HUNT

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006028603 de 24/07/2006

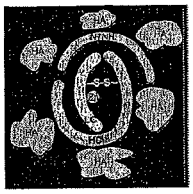
(87) Publicação Internacional: WO 2007/016018de 08/02/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES MELHORADAS DE TOXINA BOTULINICA Uma composição farmacêutica de toxina botulíniça de potência elevada que compreende dois excipientes (tal como, albumina e cloreto de sódio) em uma relação de peso para peso dentre cerca de 1 e cerca de 100.

Complexo de Neurotoxina Botulínica

- Composição do complexo
  - Proteína neurotóxica (cerca de 150 kD)
  - Pode conter proteínas de hemaglutinina não tóxica (NTHA) e não hemaglutinina não tóxica (NTNH)
- Tamanhos do complexo
  - 900 kD: somente tipo A
  - 55- kD: tipos A, B, C_1, D
  - 300 kD: tipos A, B, C_1, D, E, F

Complexo de 900 kD Tipo A



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÕES MELHORADAS DE TOXINA BOTULÍNICA".**

ANTECEDENTES

A presente invenção refere-se à composições farmacêuticas melhoradas de toxina botulínica. Em particular, a presente invenção refere-se à composições farmacêuticas de toxina botulínica com uma potência aumentada.

Uma composição farmacêutica é uma formulação que contém pelo menos um ingrediente ativo (tal como, por exemplo, uma toxina Clostrídica, tal como uma neurotoxina botulínica) como também, por exemplo, um ou mais excipientes, tampões, veículos, estabilizadores, conservantes e/ou agentes encorpantes, e é adequada para administração para um paciente para alcançar um efeito ou resultado desejado. As composições farmacêuticas descritas aqui podem ter utilidade de diagnóstico, terapêutica, cosmética e/ou de pesquisa em várias espécies, tal como, por exemplo, em pacientes ou indivíduos humanos.

Para estabilidade de armazenamento e conveniência de manipulação, uma composição farmacêutica pode ser formulada como um pó secado a vácuo ou liofilizado (isto é, secagem por congelamento) que pode ser reconstituído com um fluido adequado, tal como solução salina ou água, antes da administração a um paciente. Alternadamente, a composição farmacêutica pode ser formulada como uma suspensão ou solução aquosa. Uma composição farmacêutica pode conter um ingrediente ativo proteináceo. Infelizmente, um ingrediente ativo de proteína pode ser muito difícil para estabilizar (isto é, mantido em um estado onde a perda de atividade biológica seja minimizada), resultando então em uma perda de proteína e/ou perda de atividade de proteína durante a formulação, reconstituição (se preciso for) e durante o período de armazenamento antes de uso de uma proteína que contém composição farmacêutica. Os problemas de estabilidade de ingrediente ativo de proteína podem ocorrer por causa de desnaturação, degradação, dimerização, e/ou polimerização da proteína. Vários excipientes, tal como, albuminas, gelatinas, polissacarídeos e aminoácidos (nativos ou re-

combinantes) têm sido empregados com graus diferentes de sucesso para tentar e estabilizar um ingrediente ativo de proteína presente em uma composição farmacêutica. Adicionalmente, os crioprotetores tal como álcoois foram empregados para reduzir a desnaturação de proteína sob as condições de congelamento de liofilização.

As albuminas são proteínas de plasma pequenas, abundantes. A albumina de soro humano tem um peso molecular de cerca de 69 kiloDaltons (kD) e tem sido empregada como um ingrediente não ativo em uma composição farmacêutica onde pode servir como veículo de volume e estabilizador de certos ingredientes ativos de proteína, presentes em uma composição farmacêutica.

A função de estabilização de albumina em uma composição farmacêutica pode estar presente tanto durante a formulação de multietapa da composição farmacêutica quanto na reconstituição posterior da composição farmacêutica formulada. Desse modo, a estabilidade pode ser dada através de albumina a um ingrediente ativo proteináceo em uma composição farmacêutica por, por exemplo, (1) redução da adesão (geralmente referido como "aderência") do ingrediente ativo de proteína às superfícies, tal como as superfícies de artigos de vidro de laboratório, recipientes, ao frasco no qual a composição farmacêutica é reconstituída e à superfície interna de uma seringa empregada para injetar a composição farmacêutica. A adesão de um ingrediente ativo de proteína às superfícies pode levar a perda de ingrediente ativo e a desnaturação do ingrediente ativo de proteína retido restante, ambos dos quais reduzem a atividade total do ingrediente ativo presente na composição farmacêutica e; (2) redução da desnaturação do ingrediente ativo que pode ocorrer na preparação de uma solução de baixa diluição do ingrediente ativo.

Como também podendo estabilizar um ingrediente ativo de proteína em uma composição farmacêutica, a albumina de soro humano também tem a vantagem de imunogenicidade geralmente desprezível quando injetada em um paciente humano. Um composto com uma imunogenicidade apreciável pode causar a produção de anticorpos contra ele o que pode le-

var a uma reação anafilática e/ou ao desenvolvimento de resistência a fármaco, com a doença ou distúrbio a ser tratado desse modo tornando-se potencialmente refratário à composição farmacêutica que tem um componente imunogênico. A gelatina tem sido empregada em algumas composições farmacêuticas de ingrediente ativo de proteína como um substituto de albumina.

Toxina Botulínica

A bactéria gram positiva *Clostridium botulinum* anaeróbia, produz uma neurotoxina de polipeptídeo potente, toxina botulínica que causa uma doença neuroparalítica nos seres humanos e animais referidos como botulismo. *Clostridium botulinum* e seus esporos são geralmente encontrados no solo e a bactéria pode crescer dentro de recipientes de comida impropriamente lacrados e esterilizados de fábricas de conservas com base em caseiros, que são a causa de muitos dos casos de botulismo. Os efeitos de botulismo tipicamente aparecem 18 a 36 horas após comer os alimentos infectados com uma cultura ou esporos de *Clostridium botulinum*. A toxina botulínica pode aparentemente passar desatenuada através do revestimento do intestino e atacar os neurônios motores periféricos. Os sintomas de intoxicação de toxina botulínica podem progredir de dificuldade de caminhar, engolir, e falar a paralisia dos músculos respiratórios e morte.

A toxina botulínica tipo A é o agente biológico natural mais letal conhecido pelo homem. Aproximadamente 50 picogramas de toxina botulínica (complexo de neurotoxina purificado) tipo A é um LD_{50} em camundongos. De forma interessante, em uma base molar, toxina botulínica tipo A é 1,8 bilhão vezes mais letal do que a difteria, 600 milhões de vezes mais letal do que cianeto de sódio, 30 milhões de vezes mais letal que cobrotoxina e 12 milhões de tempos mais letal que cólera. *"Singh, Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins"*, páginas 63-84 (capítulo 4) de Natural Toxins II, editado por B. R. Singh e outros, Plenum Press, Nova York (1976) (onde o LD_{50} declarado de toxina botulínica tipo A de 0,3 ng se iguala a 1 U, é corrigido pelo fato que cerca de 0,05 ng de BOTOX® se iguala a 1 unidade). Uma unidade (U) de toxina botulínica é definida como o LD_{50} em injeção intraperitoneal em

camundongos Suíços Webster femininos que pesam 18-20 gramas cada. Em outras palavras, uma unidade de toxina botulínica é a quantidade de toxina botulínica que mata 50% de um grupo de camundongos Suíços Webster femininos. Sete neurotoxinas botulínicas geralmente imunologicamente distintas têm sido caracterizadas, estas sendo respectivamente sorotipos de neurotoxina botulínica A, B, C_1, D, E, F, e G cada das quais é distinguida através de neutralização com anticorpos de tipo específico. Os sorotipos diferentes de toxina botulínica variam nas espécies animais que eles afetam e na severidade e duração da paralisia que eles evocam. Por exemplo, foi determinado que toxina botulínica tipo A é 500 vezes mais potente, quando medida pela taxa de paralisia produzida no camundongo, do que é a toxina botulínica tipo B. Adicionalmente, a toxina botulínica tipo B foi determinada ser não tóxica em primatas a uma dose de 480 U/kg que é cerca de 12 vezes o LD_{50} de primata para toxina botulínica tipo A. As toxinas botulínicas que aparentemente se ligam com afinidade elevada aos neurônios motores colinérgicos, são translocadas no neurônio e bloqueiam a liberação présinática de acetilcolina.

As toxinas botulínicas têm sido empregadas em ajustes clínicos para o tratamento de distúrbios neuromusculares caracterizados por músculos esqueléticos hiperativos. A toxina botulínica tipo A foi aprovada pela Administração de Droga e Comida dos Estados Unidos em 1989 para o tratamento de blefaroespasmo essencial, estrabismo e espasmo hemifacial em pacientes acima de doze anos de idade. Os efeitos clínicos de injeção periférica (isto é, intramuscular ou subcutânea) de toxina botulínica tipo A são normalmente vistos dentro de uma semana de injeção, e freqüentemente dentro de algumas horas após a injeção. A duração típica de alívio sintomático (isto é, paralisia de músculo flácido) de uma única injeção intramuscular de toxina botulínica tipo A pode ser de cerca de três meses a cerca de seis meses.

Embora todos os sorotipos de toxinas botulínicas aparentemente inibam a liberação da acetilcolina neurotransmissora na junção neuromuscular, eles a fazem então afetando proteínas neurosecretoras diferentes e/ou

clivando estas proteínas em sítios diferentes. A toxina botulínica A é um endopeptidase de zinco que pode especificamente hidrolisar uma ligação de peptídeo da proteína associada à vesícula, intracelular, SNAP-25. Botulínica Tipo E também cliva a proteína associada sinaptossômica de 25 kiloDalton (kD) (SNAP-25), porém alveja as seqüências de aminoácido diferentes dentro desta proteína, quando comparado com a toxina botulínica tipo A. A toxina botulínica tipos B, D, F e G atuam em proteína associada à vesícula (VAMP, também chamado sinaptobrevina), com cada sorotipo clivando a proteína em um sítio diferente. Finalmente, a toxina botulínica tipo C_1 foi mostrada clivar tanto sintaxina quanto SNAP-25. Estas diferenças no mecanismo de ação podem afetar a duração e/ou potência relativa de ação dos vários sorotipos de toxina botulínica.

Independente do sorotipo, o mecanismo molecular de intoxicação de toxina parece ser similar e envolver pelo menos três etapas ou estágios. Na primeira etapa do processo, a toxina se liga à membrana présináptica do neurônio alvo através de uma interação específica entre a cadeia pesada (cadeia H) e um receptor de superfície de célula; o receptor é considerado ser diferente para cada sorotipo de toxina botulínica e para toxina de tétano. O segmento final de carboxila da cadeia H, H_c, parece ser importante para o alvejamento da toxina à superfície de célula.

Na segunda etapa, a toxina cruza a membrana plasmática da célula envenenada. A toxina é engolida primeiro pela célula através de endocitose mediada pelo receptor, e um endossoma que contém a toxina é formado. A toxina em seguida escapa do endossoma no citoplasma da célula. Acredita-se que esta última etapa seja mediada pelo segmento final de amino da cadeia H, H_N, que ativa uma alteração conformacional da toxina em resposta a um pH de cerca de 5,5 ou mais baixo. Os endossomas são conhecidos por possuírem uma bomba de próton que diminui pH intra-endossômico. O desvio conformacional expõe os resíduos hidrofóbicos na toxina, que permite para a toxina se embutir na membrana endossômica. A toxina em seguida se transloca através da membrana endossômica no citosol.

A última etapa do mecanismo de atividade de toxina botulínica parece envolver a redução de ligação de dissulfeto unindo a cadeia de L e H. A atividade tóxica inteira de toxinas botulínicas e de tétano é contida na cadeia de L da holotoxina; a cadeia de L é um zinco (Zn++) endopeptidase que seletivamente cliva as proteínas essenciais para reconhecimento e acoplamento de vesículas contendo neurotransmissores com a superfície citoplásmica da membrana plasmática, e fusão das vesículas com a membrana plasmática. A neurotoxina de tétano, toxina botulínica B, D, F, e G causam a degradação de sinaptobrevina (também chamada proteína de membrana associada à vesícula (VAMP)), uma proteína de membrana sinaptossômica. A maioria das VAMP presente na superfície cistólica da vesícula sináptica é removida como um resultado de qualquer um destes eventos de clivagem. Cada toxina especificamente cliva uma ligação diferente.

O peso molecular da molécula de proteína de toxina botulínica, para todos os sete dos sorotipos de toxina botulínica conhecidos, é cerca de 150 kD. De forma interessante, as toxinas botulínicas são liberadas através de bactérias Clostrídicas como complexos que compreendem a molécula de proteína de toxina botulínica de 150 kD junto com as proteínas de não toxina associadas. Desse modo, o complexo de toxina botulínica tipo A pode ser produzido através de bactéria Clostrídica como formas de 900 kD, 500 kD e 300 kD. As toxinas botulínicas tipos B e C_1 aparentemente são produzidas como um complexo de somente 500 kD. A toxina botulínica tipo D é produzida com ambos complexos de 300 kD e 500 kD. Finalmente, as toxinas botulínicas tipos E e F são produzidas como complexos de cerca de somente 300 de kD. Acredita-se que os complexos (isto é peso molecular maior do que cerca de 150 kD) contenham uma proteína de hemaglutinina de não toxina e uma proteína de não hemaglutinina não tóxica de não toxina. Estas duas proteínas de não toxina (que junto com a molécula de toxina botulínica pode compreender o complexo deneurotoxina relevante) podem atuar para fornecer estabilidade contra desnaturação à molécula de toxina botulínica e proteção contra ácidos digestivos quando a toxina é ingerida. Adicionalmente, é possível que os complexos de toxina botulínica maiores (maior do que

cerca de 150 kD de peso molecular) possam resultar em uma taxa mais lenta de difusão da toxina botulínica longe de um local de injeção intramuscular de um complexo de toxina botulínica. Os complexos de toxina podem ser dissociados em proteína de toxina e proteínas de hemaglutinina tratando o complexo com células vermelhas do sangue em pH 7,3. A proteína de toxina tem uma instabilidade acentuada na remoção da proteína de hemaglutinina.

Todos os sorotipos de toxina botulínica são feitos através de bactérias *Clostridium botulinum* como proteínas de cadeia única inativas que devem ser clivadas ou cortadas através de protease para se tornar neuroativas. As cepas bacterianas que fabricam os sorotipos de toxina botulínica A e G possuem protease endógena e os sorotipos A e G pode então ser recuperado de culturas bacterianas em predominantemente sua forma ativa. Em contraste, os sorotipos de toxina botulínica C_1, D, e E são sintetizados através de cepas não proteolíticas e são então tipicamente inativos quando recuperados de cultura. Os sorotipos B e F são produzidos através de ambas as cepas proteolíticas e não proteolíticas e então podem ser recuperados na forma ou ativa ou inativa. Entretanto, até mesmo as cepas proteolíticas que produzem, por exemplo, o sorotipo tipo B de toxina botulínica somente clivam uma porção da toxina produzida. A proporção exata de moléculas cortadas e não cortadas depende da duração de incubação e da temperatura da cultura. Portanto, certa porcentagem de qualquer preparação, por exemplo, da toxina tipo B de toxina botulínica é provável que seja inativa, possivelmente sendo responsável pela potência significantemente mais baixa conhecida de toxina botulínica tipo B quando comparado com a toxina botulínica tipo o A. A presença de moléculas de toxina botulínica inativas em uma preparação clínica contribuirá com a carga de proteína total da preparação, que tem sido unida a antigenicidade aumentada, sem contribuir com sua eficácia clínica. Adicionalmente, sabe-se que a toxina botulínica tipo B tem, em injeção intramuscular, uma duração mais curta de atividade e também é menos potente do que a toxina botulínica tipo A no mesmo nível de dose.

Em estudos *in vitro* foi indicado que a toxina botulínica inibe o cátion de potássio induzido pela liberação tanto de acetilcolina quanto de

norepinefrina de culturas de célula primária de tecido do tronco encefálico. Adicionalmente, foi reportado que a toxina botulínica inibe a liberação evocada tanto de glicina quanto de glutamato em culturas primárias de neurônios da espinha dorsal e que em preparações de sinaptossoma do cérebro a toxina botulínica inibe a liberação de cada dos neurotransmissores de acetilcolina, dopamina, norepinefrina, CGRP e glutamato.

A toxina botulínica tipo A cristalina de qualidade elevada pode ser produzida da cepa Hall A de *Clostridium botulinum* com características de $\geq 3 \times 10^7$ U/mg, um A_{260}/A_{278} de menos do que 0,60 e um padrão distinto de bandas em eletroforese de gel. O processo de Schantz conhecido pode ser empregado para obter toxina botulínica tipo A cristalina, como apresentado em Schantz, EJ. , e outros, *"Properties and use of Botulinum toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine"*, Microbiol Rev. 56: 80-99 (1992). Geralmente, o complexo de toxina botulínica tipo A pode ser isolado e pode ser purificado de uma fermentação anaeróbia cultivando- se *Clostridium botulinum* tipo A em um meio adequado. A toxina bruta pode ser colhida através de precipitação com ácido sulfúrico e pode ser concentrada através de ultramicrofiltração. A purificação pode ser realizada dissolvendo-se o precipitado de ácido em cloreto de cálcio. A toxina pode em seguida ser precipitada com etanol frio. O precipitado pode ser dissolvido em tampão de fosfato de sódio e pode ser centrifugado. Na secagem podem então ser obtidos aproximadamente 900 kD de complexo de toxina botulínica tipo A cristalina com uma potência específica de 3×10^7 LD_{50} U/mg ou maior. Este processo conhecido também pode ser empregado, em separação das proteínas de não toxina, para obter toxinas botulínicas puras, tal como, por exemplo: toxina botulínica tipo A purificada com um peso molecular de aproximadamente 150 kD com uma potência específica de $1\text{-}2 \times 10^8$ LD_{50} U/mg ou maior; toxina botulínica tipo B purificada, com um peso molecular de aproximadamente 156 kD com uma potência específica de $1\text{-}2 \times 10^8$ LD_{50} U/mg ou maior, e; toxina botulínica tipo F purificada com um peso molecular de aproximadamente 155 kD com uma potência específica de $1\text{-}2 \times 10^7$ LD_{50} U/mg ou maior.

Um puro (isto é, toxina botulínica de 150 kDa livre das proteínas complexas de não toxina) pode ser obtido carregando-se uma solução de um complexo de toxina botulínica sobre um cromatógrafo de permuta de íons adequado em um tampão de pH 8 para desassociar as proteínas complexas de não toxina da molécula de toxina botulínica de 150 kDa, desse modo fornecendo (no fluxo através da coluna) uma solução de um componente neurotóxico de toxina botulínica com um peso molecular de aproximadamente 150 kD.

A toxina botulínica pura (isto é, o componente neurotóxico de peso molecular de aproximadamente 150 kDa de um complexo de toxina botulínica) tem sido empregada para tratar os seres humanos. Vide, por exemplo, Kohl A., e outros, *"Comparison of the effect of botulinum toxin A (Botox (R)) with the highly-purified neurotoxin (NT 201) in the extensor digitorum brevis muscle test"*, Mov Disord 2000;15(Suppl 3): 165. Conseqüentemente, uma composição farmacêutica de toxina botulínica pode ser preparada empregando-se uma toxina botulínica pura (aproximadamente 150 kDa), ao invés do uso de um complexo de toxina botulínica. Uma toxina botulínica tipo A pura está disponível de Merz Pharmaceuticals sob o nome comercial XEOMIN.

As toxinas botulínicas e complexos de toxina já preparados e purificados adequados para preparar formulações farmacêuticas podem ser obtidos de *"List Biological Laboratories, Inc."*, Campbell, California; the Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, U.K.; Wako (Osaka, Japão), como também de Sigma Chemicals de St Louis, Missouri.

Os exemplos de uso clínico de uma toxina botulínica são:

(1) cerca de 75-125 unidades de BOTOX®[1] por injeção intramuscular (músculos múltiplos) tratar distonia cervical;

(2) 5-10 unidades de BOTOX® por injeção intramuscular para tratar linhagens glabelares (sulcos da sobrancelha) (5 unidades injetadas intramuscularmente no músculo prócero e 10 unidades injetadas intramuscularmente em cada músculo corrugador das sobrancelhas);

(3) cerca de 30-80 unidades de BOTOX® para tratar constipação

por injeção intra-efíncter do músculo puborretal;

(4) cerca de 1-5 unidades por músculo de BOTOX® intramuscularmente injetado para tratar blefaroespasmo injetando-se no músculo orbicular do olho pré-társico lateral da pálpebra superior e o orbicular do olho pré-társico lateral da pálpebra inferior.

(5) tratar estrabismo, os músculos extra-oculares foram intramuscularmente injetados com entre cerca de 1-5 unidades de BOTOX®, a quantidade injetada variando com base tanto no tamanho do músculo a ser injetado quando na extensão de paralisia de músculo desejado (isto é, quantidade de correção de dioptria desejada).

(6) tratar espasticidade do membro superior seguinte ao acidente vascular cerebral por injeções intramusculares de BOTOX® em cinco diferentes músculos flexores do membro superior, como segue:

(a) flexor profundo dos dedos: 7,5 U a 30 U

(b) flexor superficial dos dedos: 7,5 U a 30 U

(c) flexor ulnar do punho: 10 U a 40 U

(d) flexor radial do punho: 15 U a 60 U

(e) bíceps do braço: 50 U a 200 U. Cada um dos cinco músculos indicados foi injetado na mesma sessão de tratamento, de forma que o paciente receba de 90 U a 360 U de BOTOX® de músculo flexor do membro superior por injeção intramuscular em cada sessão de tratamento.

(7) tratar enxaqueca, injeção injetada pericranialmente (simetricamente injetado no músculo glabelar, frontal e temporal) de 25 U de BOTOX® mostrou benefício significante como um tratamento profilático de enxaqueca comparado ao veículo como medido por medidas diminuídas de freqüência de enxaqueca, gravidade máxima, vomitando associado e uso de medicamento agudo durante o período de três meses que segue a injeção de 25 U.

Sabe-se que a toxina botulínica tipo A pode ter uma eficácia durante até 12 meses (European J. Neurology 6 (Supp 4): S111-S1150:1999), e em algumas circunstâncias contanto que em 27 meses. O Laryngoscope 109:1344-1346:1999. Entretanto, a duração habitual do efeito de uma inje-

ção intramuscular de Botox® é tipicamente cerca de 3 a 4 meses.

O sucesso da toxina botulínica tipo A para tratar uma variedade de condições clínicas levou ao interesse por outros sorotipos de toxina botulínica. A Patente Européia EP1112082 ("Formulações líquidas estáveis de toxina botulínica"), emitida em 31 de julho de 2002, reivindica uma formulação de toxina botulínica farmacêutica líquida estável que compreende um tampão (pH 5-6) e uma toxina botulínica, onde a formulação de toxina é estável como um líquido durante pelo menos um ano a temperaturas entre 0-10 C ou pelo menos 6 meses a temperaturas entre 10 e 30 C. Tal formulação farmacêutica de toxina botulínica (uma modalidade da qual é comercialmente vendido sob o nome comercial MyoBloc® ou NeuroBloc® por Solstício Neurosciences, Inc., de San Diego, Califórnia) é preparada como uma solução líquida (nenhuma liofilização ou secagem a vacuo é realizada) que não requer reconstituição antes do uso.

O Pedido de Patente Chinês CN 1215084A descreve uma toxina botulínica tipo A livre de albumina formulada com gelatina, uma proteína derivada de animal. A Patente U.S. 6.087.327 também descreve uma composição de toxina botulínica Tipo A e B formulada com gelatina.

A Patente U.S. 5.512.547 (Johnson e outros) intitulada *"Composição Farmacêutica de Neurotoxina botulínica e Método de Preparação"* emitida em 30 de abril de 1996, reivindica uma formulação botulínica Tipo A pura que compreende albumina e trealose, armazenamento estável a 37°C.

A Patente U.S. 5.756.468 (Johnson e outros) emitida em 26 de maio de 1998 ("Composições Farmacêuticas de Toxina Botulínica ou Neurotoxina Botulínica e Método de Preparação"), e reivindica uma formulação de toxina botulínica liofilizada que compreende um tioalquila, albumina e trealose que podem ser armazenados entre 25°C e 42°C.

A Patente U.S. 5.696.077 (Johnson e outros) intitulada *"Composição Farmacêutica que Contém Complexo Botulínico B"* emitida em 9 de dezembro de 1997 e reivindica que uma formação de complexo botulínico tipo B livre de cloreto de sódio, secada por congelamento, que compreende um complexo tipo B e um excipiente de proteína.

A Publicação de Pedido de Patente U.S. número 2003 0118598 (Hunt) descreve o uso de vários excipientes tal como uma albumina recombinante, colágeno ou um amido para estabilizar uma toxina botulínica.

Goodnough M.C., e outros, *"Stabilization of botulinum toxin type A during lyophilization"*, Appl Environ Microbiol 1992;58(10):3426-3428, e; Goodnough M.C., e outros, *"Recovery of type-A botulinal toxin following lyophilization"*, Acs Symposium Series 1994;567(-): 193-203 descubra formulações de toxina botulínica que compreendem albumina e cloreto de sódio em uma relação de cerca de 0,6:1 (isto é, 5 mg de BSA ou HSA por ml e 9 mg de NaCl por ml de solução de toxina botulínica reconstituída) e declara que a eliminação de cloreto de sódio da formulação de toxina botulínica (e aumento do HSA para até 9 mg/ml nas formulações livres de sal) contribuiu significantemente para obter uma formulação com toxina botulínica ativa.

A molécula de toxina botulínica (cera de 150 kDa), como também os complexos de toxina botulínica (cerca de 300-900 kDa), tal como o complexo de toxina tipo A, são extremamente suscetíveis a desnaturação devido à desnaturação de superfície, calor, e condições alcalinas. A toxina inativa forma proteínas de toxóide que podem ser imunogênicas. Os anticorpos resultantes podem tornar um paciente refratário à injeção de toxina.

Como no caso de enzimas geralmente, as atividades biológicas das toxinas botulínicas (que são peptidases intracelulares) são dependentes, pelo menos em parte, de suas três conformações dimensionais. Desse modo, a toxina botulínica tipo A é desintoxicada através de calor, estiramento de superfície de várias substâncias químicas, e secagem de superfície. Adicionalmente, sabe-se que a diluição do complexo de toxina obtido pela cultura conhecida, fermentação e purificação para concentrações de toxina muito mais baixas empregadas para formulação de composição farmacêutica, resulta na detoxificação rápida da toxina a menos que um agente estabilizante adequado esteja presente. A diluição da toxina de quantidades de miligrama para uma solução que contém nanogramas por mililitro apresenta dificuldades significantes por causa da perda rápida de toxicidade específica em tal grande diluição. Uma vez que a toxina botulínica pode ser empregada me-

ses ou anos após a composição farmacêutica que contém toxina botulínica ser formulada, a toxina botulínica deve ser estabilizada com agente estabilizante, tal como uma albumina ou gelatina. Adicionalmente, para estabilidade de armazenamento, a toxina botulínica pode ser processada em um estado sólido (isto é, um pó) por técnicas conhecidas de liofilização ou secagem a vácuo.

Além, qualquer uma das condições de pH severo, temperatura e faixa de concentração requeridas para liofilizar (secar por congelamento) ou secar a vácuo uma composição farmacêutica que contém toxina botulínica em um formato de armazenamento e transporte de toxina (pronta para uso ou reconstituição por um médico) pode desintoxicar a toxina. Desse modo, a gelatina e albumina de soro foram empregadas com um pouco de sucesso para estabilizar a toxina botulínica.

Uma composição farmacêutica que contém toxina botulínica comercialmente disponível é vendida sob a marca registrada BOTOX® (disponível de Allergan, Inc., Irvine, Califórnia). BOTOX® consiste em um complexo de toxina botulínica tipo A purificada, albumina de soro humano, e cloreto de sódio embalado na forma estéril, secado a vacuo. A toxina botulínica tipo A é feita de uma cultura da cepa HALL de *Clostridium botulinum* crescido em um meio contendo amina N-Z e extrato de levedura. O complexo de toxina botulínica tipo A é purificado da solução de cultura por uma série de precipitações ácidas para um complexo cristalino que consiste na proteína de toxina de peso molecular elevado ativa e uma proteína de hemaglutinina associada. O complexo cristalino é redissolvido em uma solução que contém solução salina e albumina e filtrado estéril (0,2 mícron) antes de secagem a vácuo. BOTOX® pode ser reconstituído com solução salina estéril, não preservada antes de injeção intramuscular. Cada frasco de BOTOX® contém cerca de 100 unidades (U) de complexo de toxina de *Clostridium botulinum* tipo A, 0,5 miligrama de albumina de soro humano e 0,9 miligramas de cloreto de sódio em uma forma estéril, secada a vácuo sem um conservante.

Para reconstituir BOTOX® secado a vácuo, solução salina normal estéril sem um conservante (0,9% de injeção de Cloreto de sódio) é em-

pregada preparando-se a quantidade apropriada de diluente na seringa de tamanho apropriado. Uma vez que BOTOX® é desnaturado borbulhando-se ou por agitação violenta similar, o diluente é suavemente injetado no frasco. Por razões de esterilidade, o BOTOX® deveria ser administrado dentro de cerca de 72 horas após a reconstituição. Durante este período de tempo, BOTOX® reconstituído é armazenado em um refrigerador (2° a 8°C). O BOTOX® reconstituído é claro, incolor e livre de material particulado. O produto secado a vácuo é armazenado em um congelador ou refrigerador.

Outras composições farmacêuticas que contêm toxina botulínica comercialmente disponíveis incluem Dysport® (complexo de hemaglutinina de toxina tipo A de *Clostridium botulinum* com albumina de soro humano e lactose na formulação, disponível de Ipsen Limitado, Berkshire, REINO UNIDO como um pó a ser reconstituído com 0,9% de cloreto de sódio antes do uso), e MyoBloc® (uma solução injetável que compreende toxina botulínica tipo B, albumina de soro humano, succinato de sódio, e cloreto de sódio em cerca de pH 5,6, disponível de Elan Corporation, Dublin, Irlanda).

Foi reportado que uma alternativa adequada para albumina de soro humano como um estabilizador de toxina botulínica pode ser outra proteína ou alternativamente um composto de peso molecular baixo (não proteína). Carpender e outros, *"Interactions of Stabilizing Additives with Proteins During Freeze-Thawing and Freeze-Drying, International Symposium on Biological Product Freeze-Drying and Formulation"*, 24-26 de outubro de 1990; Karger (1992), 225-239.

Acredita-se que a albumina de soro humano funcione em uma composição farmacêutica como mais que um mero agente encorpante. Desse modo, a albumina aparentemente pode interagir com a toxina botulínica para aumentar a potência da neurotoxina. Por exemplo, sabe-se que a albumina de soro bovino pode atuar como mais que um mero excipiente estabilizante para toxina botulínica tipo A, uma vez que a albumina de soro bovino aparentemente também acelera a taxa de catálise de substratos de peptídeo sintético, cujos substratos se assemelham ao substrato intraneuronal SNAP-25 para toxina botulínica tipo A Schmidt, e outros, *"Endoproteinase*

Activity of Type A Botulinum Neurotoxin Substrate Requirements and Activation by Serum Albumin, J. of Protein Chemistry", 16 (1), 19-26 (1997). Desse modo, a albumina pode ter um efeito de potencialização, aparentemente afetando-se os cinéticos da taxa, na ação proteolítica intracelular de uma toxina botulínica no substrato da toxina. Este efeito de potencialização pode ser devido a albumina que acompanhou a toxina botulínica sob endocitose da toxina em um neurônio alvo ou o efeito de potencialização pode ser devido à presença preexistente da albumina citoplásmica dentro da proteína de neurônio antes da endocitose da toxina botulínica.

Acetilcolina

Tipicamente somente um único tipo de neurotransmissor de molécula pequeno é liberado por cada tipo de neurônio no sistema nervoso do mamífero. A acetilcolina neurotransmissora é segregada através de neurônios em muitas áreas do cérebro, porém especificamente pelas células piramidais grandes do córtex motor, através de vários neurônios diferentes nos gânglios basais, pelos neurônios motores que inervam os músculos de esqueleto, pelos neurônios pré-gangliônicos do sistema nervoso autônomo (ambos simpáticos e parassimpáticos), pelos neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso parassimpático, e por alguns dos neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso simpático. Essencialmente, somente as fibras nervosas simpáticas pós-gangliônicas para as glândulas sudoríparas, os músculos piloeretor e alguns vasos sanguíneos são colinérgicos quando a maioria dos neurônios pós-gangliônico do sistema nervoso simpático segrega a norepinefrina neurotransmissora. Na maioria dos casos a acetilcolina tem um efeito excitatório. Entretanto, a acetilcolina é conhecida por ter efeitos inibidores em algumas das terminações nervosas parassimpáticas periféricas, tal como inibição da taxa cardíaca pelo nervo vagal.

Os sinais eferentes do sistema nervoso autônomo são transmitidos ao corpo através do sistema nervoso simpático ou sistema nervoso parassimpático. Os neurônios pré-gangliônicos do sistema nervoso simpático se estendem de corpos de célula de neurônio simpático pré-gangliônicas localizadas no chifre intermediolateral da espinha dorsal. As fibras nervosas

simpáticas pré-gangliônicas, se estendem do corpo de célula, sinapse com neurônios pós-gangliônicos localizados ou em um gânglio simpático paravertebral ou em um gânglio pré-vertebral. Desde então, os neurônios pré-gangliônicos de ambos o sistema nervoso simpático e parassimpático são colinérgicos, a aplicação de acetilcolina aos gânglios excitará ambos os neurônios pós-gangliônicos simpáticos e parassimpáticos.

A acetilcolina ativa dois tipos de receptores, receptores muscarínicos e nicotínicos. Os receptores muscarínicos são encontrados em todas as células efetoras estimuladas pelos neurônios pós-gangliônicos, do sistema nervoso parassimpático como também naqueles estimulados pelos neurônios colinérgicos pós-gangliônicos do sistema nervoso simpático. Os receptores nicotínicos são encontrados na medula adrenal, como também dentro dos gânglios autônomos, isto é na superfície da célula do neurônio pós-gangliônico à sinapse entre os neurônios pré-gangliônicos e pós-gangliônicos de ambos os sistemas simpático e parassimpático. Os receptores nicotínicos também são encontrados em muitas terminações nervosas não autônomas, por exemplo, nas membranas de fibras de músculo de esqueleto na junção neuromuscular.

A acetilcolina é liberada de neurônios colinérgicos quando vesículas pequenas, claras, intracelulares se fundem com a membrana de célula neuronal pré-sináptica. Uma ampla variedade de células secretoras não neuronais, tal como, medula adrenal (como também a linhagem de célula PC12) e células ilhotas pancreáticas liberam catecolaminas e hormônio paratiróide, respectivamente, de grandes vesículas de núcleo denso. A linhagem de célula PC12 é um clone de células de feocromocitoma de rato extensivamente empregadas como um modelo de cultura de tecido para estudos de desenvolvimento de simpatoadrenal. A toxina botulínica inibe a liberação de ambos os tipos de compostos de ambos os tipos de células *in vitro*, permeabilizadas (como por eletroporação) ou por injeção direta da toxina na célula desnervada. A toxina botulínica também é conhecida por bloquear a liberação do glutamato neurotransmissor de culturas de célula de sinaptossomas corticais.

Uma junção neuromuscular é formada no músculo de esqueleto

pela proximidade de axônios para células de músculo. Um sinal transmitido através dos resultados do sistema nervoso em uma ação potencial de axônio terminal, com ativação de canais de íon e liberação resultante da acetilcolina neurotransmissora de vesículas sinápticas intraneuronais, por exemplo, na placa terminal motora da junção neuromuscular. A acetilcolina cruza o espaço extracelular para se ligar com as proteínas receptoras de acetilcolina na superfície da placa terminal do músculo. Uma vez que a ligação suficiente ocorreu, um potencial de ação da célula do músculo causa alterações do canal de íon da membrana específica, resultando em contração da célula do músculo. A acetilcolina é então liberada das células do músculo e metabolizada através de colinesterases no espaço extracelular. Os metabólitos são recirculadas de volta no axônio terminal para reprocessamento em outra acetilcolina.

Desse modo, o que é necessário é um processo para preparar uma formulação farmacêutica de toxina botulínica onde pouca ou nenhuma toxina botulínica seja perdida durante a composição do processo. Alternativamente declarado, o que é necessário é um processo para preparar uma formulação farmacêutica de toxina botulínica que permite uma recuperação elevada da toxina botulínica após a reconstituição. A perda de toxina botulínica durante a composição (que leva a uma recuperação inferior) apresenta a possibilidade de toxina inativa (toxóide) estar presente no produto final reconstituído, desse modo aumentando um potencial antigênico do produto sob administração a um paciente. O ideal teórico é ter 100% da toxina botulínica que entra no processo de composição presente no produto final reconstituído e presente como toxina botulínica biologicamente ativa.

O que também é necessário, portanto, é uma composição farmacêutica que contém toxina botulínica com uma potência mais elevada, quando comparada com as potências de composições farmacêuticas conhecidas de toxina botulínica. Expresso de uma maneira alternativa, o que é necessário é uma composição farmacêutica de toxina botulínica com uma potência mais elevada da toxina botulínica para cada nanograma da toxina botulínica presente na composição farmacêutica de toxina botulínica.

SUMÁRIO

A presente invenção atende esta necessidade de fornecer um processo para preparar uma formulação farmacêutica de toxina botulínica na qual pouca ou nenhuma toxina botulínica é perdida durante o processo de composição. Alternativamente declarado, um processo no escopo da presente invenção permite a preparação de uma formulação farmacêutica de toxina botulínica com uma recuperação elevada da toxina botulínica após a reconstituição. Significantemente, os processos no escopo da presente invenção abrangem o ideal teórico permitindo-se que cerca de 100% da toxina botulínica que entra no processo de composição esteja presente no produto final reconstituído como toxina botulínica biologicamente ativa.

Adicionalmente a presente invenção atende às necessidades expressas acima se fornecendo-se uma composição farmacêutica toxina botulínica com uma potência mais elevada (isto é, um aumento), quando comparado com as potências de composições farmacêuticas conhecidas de toxina botulínica. Em particular, a presente invenção atende a esta necessidade fornecendo-se uma composição farmacêutica de toxina botulínica em pó (devido, por exemplo, a secagem por congelamento, liofilização e/ou secagem a vácuo) que sob (isto é, depois de) reconstituição com um fluido aquoso (tal como solução salina ou água) tem uma potência aumentada (como determinado, por exemplo, pelo ensaio de LD_{50} de camundongo), quando comparado com a potência após a reconstituição com um fluido aquoso de uma composição farmacêutica de toxina botulínica em pó conhecida (tal como Botox® ou Dysport®). A potência na reconstituição pode ser referida como potência "após" recuperação. Conseqüentemente, a presente invenção inclui uma composição farmacêutica de toxina botulínica com uma potência aumentada na recuperação, ou sinonimamente com uma potência de recuperação ou recuperada aumentada.

Brevemente, um aspecto importante da presente invenção para atender estas necessidades duais de uma conservação elevada (isto é, perda baixa ou pequena) da quantidade da toxina botulínica que entra em um processo de composição (quando comparado com a quantidade de toxina

botulínica ativa presente no produto final composto), e uma potência recuperada de composição farmacêutica de toxina botulínica elevada, é obtido compondo-se a composição farmacêutica de toxina botulínica de forma sólida tal que dois dos excipientes presentes na composição farmacêutica de toxina botulínica estejam presentes, pelo menos durante o processo de composição, em uma relação de peso para peso particular ou em uma faixa de relação de peso para peso particular.

DEFINIÇÕES

Como empregado aqui, as palavras ou apresentados abaixo têm as seguintes definições.

"Cerca de" significa que o item, parâmetro ou termo então qualificado abrange uma faixa de mais ou menos dez por cento acima e abaixo do valor do item, parâmetro ou termo declarado.

"Administração", ou "administrador" significa a etapa de dar (isto é, administrar) uma composição farmacêutica a um indivíduo. As composições farmacêuticas descritas aqui são "administradas localmente". As rotinas sistêmicas (isto é, intravenosa ou oral) de administração são excluídas do escopo da presente invenção, na medida onde uma administração sistêmica resultaria em efeitos sistêmicos de um ingrediente ativo sistemicamente administrado. A administração sistêmica de um ingrediente ativo alvejado que não resulta em efeitos sistêmicos não é excluída do escopo da presente invenção (vide, por exemplo, Pedidos de Patentes dos Estados Unidos publicados 20040086532 e 20040086531). A administração local inclui, porém não está limitada a, administração intramuscular (i.m.), administração intradérmica ou subdérmica, administração subcutânea, administração intratecal, administração intraperitoneal (i.p.), contato tópico, e implantação de um dispositivo de liberação lenta tal como implante polimérico ou bomba miniosmótica.

"Toxina botulínica" significa uma neurotoxina produzida por *Clostridium botulinum*, como também uma toxina botulínica (ou a cadeia leve ou a cadeia pesada desta) feita recombinantemente por uma espécie não Clostrídica. A frase "toxina botulínica", como empregado aqui, abrange os soroti-

pos de toxina botulínica A, B, C, D, E, F e G. A toxina botulínica, como empregado aqui, também abrange igualmente um complexo de toxina botulínica (isto é, os complexos de 300, 600 e 900 kDa) como também a toxina botulínica purificada (isto é, cerca de 150 kDa). A "toxina botulínica purificada" (ou pura) é definida como uma toxina botulínica que é isolada, ou substancialmente isolada, de outras proteínas, incluindo proteínas que formam um complexo de toxina botulínica. Uma toxina botulínica purificada (ou pura) pode ser maior do que 95% pura, e preferivelmente é maior do que 99% pura.

"Neurotoxina Clostrídica" significa uma neurotoxina produzida de, ou nativo para, uma bactéria Clostrídica, tal como *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* ou *Clostridium beratti*, como também uma neurotoxina Clostrídica feita recombinantemente por uma espécie não Clostrídica.

"Potência realçada" com respeito a uma composição farmacêutica que contém toxina botulínica significa que a composição tem uma potência (como determinado, por exemplo, pelo ensaio de LD_{50} de camundongo) que é de pelo menos 5% e até 50%, ou mais, maior do que a potência de uma composição farmacêutica de toxina botulínica de referência. Uma composição farmacêutica de toxina botulínica de referência pode conter uma toxina botulínica, cloreto de sódio e HSA, onde a albumina e o cloreto de sódio estão presentes em uma relação de peso para peso de cerca de 0,6:1.

"Completamente livre" (isto é, terminologia "consistindo em") significa que na faixa de detecção do instrumento ou processo sendo empregado, a substância não pode ser detectada ou sua presença não pode ser confirmada.

"Essencialmente livre" (ou "consistindo essencialmente em") significa que somente quantidades de traço da substância podem ser detectadas.

"Excipiente" significa uma substância presente em uma composição farmacêutica diferente do ingrediente farmacêutico ativo presente na composição farmacêutica. Um excipiente pode ser um tampão, veículo, estabilizador, conservante, diluente, veículo, e/ou agente encorpante, tal como

uma albumina, gelatina, colágeno e/ou cloreto de sódio.

"Imobilização" significa uma etapa que impede um indivíduo de mover uma ou mais partes do corpo. Se um número suficiente de partes do corpo está imobilizado, o indivíduo será conseqüentemente imobilizado. Desse modo, "imobilização" abrange a imobilização de uma parte de corpo, tal como um membro, e/ou a imobilização completa de um indivíduo.

"Toxina botulínica modificada" significa uma toxina botulínica que teve pelo menos um de seus aminoácidos deletado, modificado, ou substituído, quando comparado com uma toxina botulínica nativa. Adicionalmente, a toxina botulínica modificada pode ser uma neurotoxina recombinantemente produzida, ou um derivado ou fragmento de uma neurotoxina recombinantemente feita. Uma toxina botulínica modificada retém pelo menos uma atividade biológica da toxina botulínica nativa, tal como, a capacidade de se ligar a um receptor de toxina botulínica, ou a capacidade de inibir a liberação de neurotransmissor de um neurônio. Um exemplo de uma toxina botulínica modificada é uma toxina botulínica que tem uma cadeia leve de um sorotipo de toxina botulínica (tal como sorotipo A), e uma cadeia pesada de um sorotipo de toxina botulínica diferente (tal como, sorotipo B). Outro exemplo de uma toxina botulínica modificada é uma toxina botulínica acoplada a um neurotransmissor, tal como, substância P.

"Pacientes" significa um indivíduo humano ou não humano recebendo cuidado médico ou veterinário. Conseqüentemente, como descoberto aqui, as composições podem ser empregadas para tratar qualquer animal, tal como os mamíferos.

"Composição farmacêutica" significa uma formulação na qual um ingrediente ativo pode ser uma neurotoxina, tal como uma neurotoxina Clostrídica. A palavra "formulação" significa que há pelo menos um ingrediente adicional na composição farmacêutica além de um ingrediente ativo de neurotoxina. Uma composição farmacêutica é então uma formulação que é adequada para uso de diagnóstico, terapêutico ou cosmético (isto é, através de injeção intramuscular ou subcutânea ou por inserção de um depósito ou implante) a um indivíduo, tal como um paciente humano. A composição farma-

cêutica pode estar: em uma condição secada a vácuo ou liofilizada; uma solução formada após reconstituição da composição farmacêutica liofilizada ou secada a vácuo com solução salina ou água, ou; como uma solução que não requer reconstituição. O ingrediente ativo de neurotoxina pode ser um dos sorotipos de toxina botulínica A, B, C_1, D, E, F ou G ou uma toxina de tétano, todos dos quais podem ser feitos nativamente através de bactérias Clostrídicas. Como declarado, uma composição farmacêutica pode ser líquida ou sólida, por exemplo, secada a vácuo. Os ingredientes constituintes de uma composição farmacêutica podem ser incluídos em uma única composição (isto é, todos os ingredientes constituintes, com exceção de qualquer fluido de reconstituição exigido, estão presentes na hora da composição inicial da composição farmacêutica) ou como um sistema de dois componentes, por exemplo, uma composição secada a vácuo reconstituída com um diluente tal como solução salina cujo diluente contém um ingrediente (tal como, água) não presente na composição inicial da composição farmacêutica.

"Polissacarídeo" significa um polímero de mais do que dois monômeros de molécula de sacarídeo cujos monômeros podem ser idênticos ou diferentes.

"Estabilizador de proteína" (ou "estabilizador primário") é um agente químico que ajuda a preservar ou manter a estrutura biológica (isto é, as três conformações dimensionais) e/ou a atividade biológica de uma proteína (tal como, uma neurotoxina Clostrídica, tal como uma toxina botulínica). Os estabilizadores podem ser proteínas ou polissacarídeos. Os exemplos de estabilizadores de proteína incluem amido de hidroxietila (teta-amido), albumina de soro, gelatina, colágeno, como também uma albumina recombinante, gelatina ou colágeno. Como descrito aqui, o estabilizador primário pode ser um agente sintético que não produziria uma resposta imunogênica (ou produz uma resposta imune atenuada) em um indivíduo recebendo uma composição que contém o estabilizador primário. Em outras modalidades da invenção, os estabilizadores de proteína podem ser proteínas das mesmas espécies do animal que está sendo administrado pela proteína. Os estabilizadores adicionais também podem ser incluídos em uma composição farma-

cêutica. Estes estabilizadores adicionais ou secundários podem ser empregados sozinhos ou em combinação com estabilizadores primários, tal como proteínas e polissacarídeos. Os estabilizadores secundários exemplares incluem, porém não estão limitados a, derivados de aminoácido não oxidantes (tal como, um derivado de triptofano, tal como N - acetil-triptofano (" NAT")), caprilato (isto é, caprilato de sódio), um polissorbato (isto é, P80), aminoácidos, e cátions de metal divalente, tal como zinco. Uma composição farmacêutica também pode incluir os agentes conservantes tal como álcool benzílico, ácido benzóico, fenol, parabenos e ácido sórbico. Um "estabilizador recombinante" é um "estabilizador primário" feito por meios recombinantes, tal como, por exemplo, uma albumina recombinantemente feita (tal como, uma albumina de soro humano recombinantemente feita), colágeno, gelatina ou um cresol, tal como um M-cresol.

"Estabilizando", "estabiliza", ou "estabilização" significa que um ingrediente ativo farmacêutico (" PAI") retém pelo menos 20% e até 100% de sua atividade biológica (que pode ser avaliada como potência ou como toxicidade por uma medição de LD_{50} ou ED_{50} *in vivo*) na presença de um composto que está estabilizando, estabiliza ou que fornece estabilização ao PAI. Por exemplo, em (1) preparação de diluições seriais de uma solução de matéria-prima ou volume, ou (2) em reconstituição com solução salina ou água de uma composição farmacêutica que contém toxina botulínica liofilizada, ou secada a vácuo à qual foi armazenada em ou abaixo de cerca de -2°C durante entre seis meses e quatro anos, ou (3) para uma composição farmacêutica que contém toxina botulínica de solução aquosa que foi armazenada a entre cerca de 2° e cerca de 8°C durante seis meses a quatro anos, a toxina botulínica presente na composição farmacêutica de solução aquosa ou reconstituída tem (na presença de um composto que está estabilizando, estabiliza ou que fornece estabilização ao PAI) mais do que cerca de 20% e até cerca de 100% da potência ou toxicidade que a toxina botulínica biologicamente ativa teve antes de ser incorporada na composição farmacêutica.

"Substancialmente livre" significa presente a um nível de menos do que um por cento em peso da composição farmacêutica.

"Formulação terapêutica" significa que uma formulação pode ser empregada para tratar e desse modo aliviar um distúrbio ou uma doença, tal como um distúrbio ou uma doença caracterizada por hiperatividade (isto é, espasticidade) de um músculo periférico.

Uma composição farmacêutica no escopo da invenção pode compreender uma toxina Clostrídica, tal como uma toxina botulínica, e um excipiente que atua para estabilizar a composição farmacêutica de toxina A no escopo da invenção também pode consistir essencialmente em uma toxina botulínica, e um estabilizador. Adicionalmente, a composição farmacêutica no escopo da invenção pode consistir em uma toxina botulínica, e um estabilizador recombinante.

A toxina botulínica pode estar presente como um complexo de toxina botulínica (isto é, como um complexo de cerca de 300 kiloDalton a cerca de 900 kiloDalton, dependendo do sorotipo de toxina botulínica particular empregado) ou a toxina botulínica pode está presente como uma toxina botulínica purificada ou pura (significando presente como o componente neurotóxico de cerca de 150 kiloDalton de um complexo de toxina botulínica) que é livre, substancialmente ou essencialmente livre de qualquer proteína do complexo de toxina botulínica (isto é, removida da associação das proteínas HA e NTNH). Desse modo, como mostrado pela Figura 1, uma toxina botulínica feita naturalmente pela bactéria *Clostridium botulinum* é feita tipicamente como um complexo compreendendo a molécula de toxina botulínica (uma proteína com um peso molecular de cerca de 150 kiloDaltons) (também referida como o componente neurotóxico) e uma disposição de proteínas não tóxicas (hemaglutininas e não hemaglutininas) em uma associação estrita, entretanto não covalente com o componente neurotóxico. Desse modo, como mostrado pela Figura 1, pode haver até cerca de sete moléculas não neurotóxicas (peso total de cerca de 750 kDa) associadas (não covalentemente) com o (cerca de 150 kDa) componente neurotóxico para formar um complexo de neurotoxina botulínica tipo A de 900 kDa. Na Figura 1: HA = NTHA = uma hemaglutinina não tóxica; LC = cadeia leve (cerca de 50 kDa); HC = cadeia pesada (cerca de 100 kDa); - S-S - = a ligação de dissulfeto

única que une o LC e o HC, e; Zn = um átomo de zinco (toxina botulínica é um zinco endopeptidase). Conseqüentemente, LC mais HC é uma molécula com um peso molecular de cerca de 150 kDa, e este é o componente neurotóxico do (no caso de toxina botulínica tipo A) complexo de 900 kDa.

Qualquer estabilizador recombinante que estiver presente em uma composição farmacêutica dentro do escopo da invenção pode ser uma albumina recombinante, um colágeno recombinante, uma gelatina de recombinante e/ou outro estabilizador primário recombinante. A composição farmacêutica também pode compreender um estabilizador secundário, tal como um metal (isto é, zinco) ou NAT.

Significantemente, uma composição farmacêutica dentro do escopo da invenção pode ter uma potência ou estabilidade aumentada. Por potência aumentada é entendido que a potência de uma primeira composição farmacêutica de toxina botulínica é maior do que a potência de uma segunda composição farmacêutica de toxina botulínica. Por exemplo, uma primeira composição farmacêutica de toxina botulínica pode ter uma relação particular (tal como, 28:1) de dois excipientes (tal como, albumina e cloreto de sódio) presente na primeira composição. Uma segunda composição farmacêutica de toxina botulínica pode ter uma relação conhecida (tal como, cerca de 0,6:1) dos mesmos dois excipientes (isto é albumina e cloreto de sódio) presentes na segunda composição. A potência e potências relativas podem ser determinadas por um método empregado para determinar uma atividade biológica de uma toxina botulínica, tal como um ensaio de LD_{50} de camundongo. Geralmente, potência maior significa que uma quantidade menor (isto é, menos unidades) de uma composição farmacêutica de toxina botulínica é requerida para paralisar um músculo. Preferivelmente, uma primeira composição farmacêutica de toxina botulínica tem pelo menos uma potência maior de 5 % (e até uma potência maior que 50%) do que faz a segunda composição farmacêutica de toxina botulínica.

Uma composição farmacêutica dentro do escopo da presente invenção também pode incluir uma neurotoxina, e um polissacarídeo. O polissacarídeo estabiliza a neurotoxina. As composições farmacêuticas descri-

tas aqui podem ter um pH dentre cerca de 5 e 7,3 quando reconstituídas ou sob injeção.

A composição farmacêutica é adequada para administração a um paciente humano para alcançar um efeito terapêutico, e a neurotoxina pode ser um dos sorotipos de toxina botulínica A, B, C_1, D, E, F e G.

Uma outra modalidade da presente invenção é um método para usar uma composição farmacêutica, o método compreendendo a etapa de administração local da composição farmacêutica a um paciente para alcançar um efeito terapêutico ou cosmético.

Composições Farmacêuticas Particulares

A invenção abrange uma composição farmacêutica que compreende: (a) uma toxina botulínica; (b) um primeiro excipiente, onde o primeiro excipiente é uma albumina, e;

(c) um segundo excipiente,

(d) onde a relação de peso para peso do primeiro excipiente para o segundo excipiente presente na composição farmacêutica é maior do que 0,6 e menos do que cerca de 100. A potência da toxina botulínica nesta composição farmacêutica pode ser entre cerca de 5% maior e cerca de 200% maior do que a potência de uma toxina botulínica em uma composição farmacêutica de comparação. A composição farmacêutica de comparação pode conter: (a) a mesma quantidade e tipo de toxina botulínica, e; (b) os mesmos primeiro e segundo excipientes, como faz a composição farmacêutica, e; (c) os primeiro e segundo excipientes podem estar presentes na composição farmacêutica de comparação em uma relação de peso para peso de 0,6 ou menos. Adicionalmente, a potência da toxina botulínica na composição farmacêutica pode ser cerca de 10% maior e cerca de 100% maior do que a potência da toxina botulínica na composição farmacêutica de comparação. Nesta composição farmacêutica a toxina botulínica está presente como um complexo de toxina botulínica ou a toxina botulínica pode estar presente como uma toxina botulínica pura (isto é, como um componente neurotóxico com um peso molecular de cerca de 150 kiloDaltons, e em substancialmente livre das proteínas do complexo de toxina botulínica).

O primeiro excipiente na composição farmacêutica pode ser uma albumina de soro ou uma albumina recombinante. O segundo excipiente na composição farmacêutica pode ser cloreto de sódio. A relação de peso para peso do primeiro excipiente para o segundo excipiente presente na composição farmacêutica é entre cerca de 1 e cerca de 50.

Uma modalidade detalhada de uma composição farmacêutica dentro do escopo da invenção pode compreender: (a) entre cerca de 2,0 X 10^{-11} gramas e cerca de 3,5 X 10^{-11} gramas de um toxina botulínica tipo A para cada unidade de toxina botulínica presente na composição farmacêutica, a unidade da toxina botulínica sendo determinada por um ensaio de potência de LD_{50} camundongo; (b) uma albumina, e (c) cloreto de sódio, (d) onde a relação de peso para peso da albumina para o cloreto de sódio presente na composição farmacêutica é maior do que 0,6 e menor do que cerca de 100. A potência da toxina botulínica na composição farmacêutica pode ser entre cerca de 5% maior e cerca de 200% maior do que a potência de uma toxina botulínica em uma composição farmacêutica de comparação, cuja composição farmacêutica de comparação contém (a) a mesma quantidade e tipo de toxina botulínica, e (b) a mesma albumina e cloreto de sódio, como faz a composição farmacêutica da reivindicação 10, e (c) a albumina e cloreto de sódio estão presentes na composição farmacêutica de comparação em uma relação de peso para peso de 0,6 ou menos. A potência da toxina botulínica na composição farmacêutica pode ser entre cerca de 10% maior e cerca de 100% maior do que a potência da toxina botulínica na composição farmacêutica de comparação. Alternativamente, a relação de peso para peso da albumina para o cloreto de sódio, presente na composição farmacêutica pode ser entre cerca de 1 e cerca de 50.

A invenção também abrange um processo para a fabricação de uma composição farmacêutica (a) combinando-se cerca de 2,5 ng de um complexo de toxina botulínica tipo A com uma albumina e cloreto de sódio em uma relação de peso para peso da albumina para o cloreto de sódio na composição farmacêutica maior do que 0,6 e menor do que cerca de 100, para formar uma mistura, e; (b) secagem a vácuo da mistura, para desse

modo obter uma composição farmacêutica com uma potência após a reconstituição dentre cerca de 70 unidades e cerca de 130 unidades. Este processo pode também compreender a etapa, antes da etapa de secagem a vácuo, de liofilizar a mistura. Uma composição farmacêutica útil pode ser feita por este processo.

A invenção também abrange uma composição farmacêutica adequada para administração a um ser humano, compreendendo: (a) uma toxina botulínica; (b) cloreto de sódio, e; (b) um estabilizador, onde a potência da toxina botulínica presente na composição farmacêutica é cerca de 40 unidades/ng. A relação de peso para peso da albumina para o cloreto de sódio presente nesta composição farmacêutica pode ser maior do que 0,6 e menor do que cerca de 100. O estabilizador pode ser um estabilizador recombinante, tal como uma albumina recombinante, um colágeno recombinante, e/ou uma gelatina recombinante. A toxina botulínica pode ser selecionada do grupo que consiste em tipos de toxinas botulínicas A, B, C, D, E, e F.

A invenção também abrange uma composição farmacêutica adequada para administração a um ser humano, compreendendo: (a) uma toxina botulínica; (b) cloreto de sódio, e; (b) uma albumina, onde a potência da toxina botulínica presente na composição farmacêutica é entre cerca de 24 unidades/ng e cerca de 60 unidades/ng. A relação de peso para peso da albumina para o cloreto de sódio pode ser maior do que 0,6 e menor o que cerca de 100.

A invenção também abrange uma composição farmacêutica adequada para administração a um ser humano, compreendendo: (a) uma toxina botulínica; (b) cloreto de sódio, e; (c) uma albumina, onde a relação de peso para peso da albumina para o cloreto de sódio presente na composição farmacêutica é entre cerca de 1 e cerca de 40 e a potência da toxina botulínica presente na composição farmacêutica é entre cerca de 24 unidades/ng e cerca de 60 unidades/ng.

A invenção também abrange um processo para a fabricação de uma composição farmacêutica de toxina botulínica que tem uma potência

dentre cerca de 30 a 40 unidades/ng e que é adequada para administração a um ser humano, o processo compreendendo as etapas de: (a) adicionar um complexo de toxina botulínica tipo A que tem uma potência dentre cerca de 30-40 unidades/ng para albumina e cloreto de sódio em uma relação de peso para peso de cerca de 1 a cerca de 40, para formar uma mistura; (b) secagem a vácuo ou liofilização da mistura, e; (c) reconstituição da mistura com solução salina normal, para desse modo obter uma composição farmacêutica de toxina botulínica que tem uma potência dentre cerca de 30 a 40 unidades/ng.

Finalmente, a invenção também abrange um método para tratar uma condição terapêutica ou cosmética, o método compreendendo a etapa de administrar a um mamífero uma composição farmacêutica de toxina botulínica que tem uma potência de cerca de 40 unidades/ng.

Os métodos precedentes podem ser praticados e as composições feitas empregando-se uma composição que compreende uma toxina botulínica tipo A. Em outras modalidades da invenção, os métodos precedentes podem ser praticados com uma composição que compreende toxina botulínica tipo B. Em outras modalidades da invenção, os métodos podem ser praticados com uma composição que compreende uma pluralidade de sorotipos de toxina botulínica, tal como os sorotipos de toxina botulínica selecionados do grupo que consiste em sorotipos de toxina botulínica A, B, C_1, D, E, F e G. Em certas modalidades da invenção, as toxinas botulínicas purificadas podem ser empregadas. Em outras modalidades, as toxinas botulínicas modificadas podem ser empregadas. As composições empregadas nos métodos precedentes também podem incluir um ou mais aminoácidos além da toxina botulínica e do polissacarídeo. As modalidades da invenção descrita aqui podem ser administradas intramuscularmente (dentro ou para as imediações de um músculo estriado, liso ou cardíaco), intradermicamente, topicamente, subcutaneamente, dentro de ou para as imediações de uma glândula, em um lúmen do corpo (tal como em um lúmen de bexiga) e/ou intratecalmente.

FIGURAS

As seguintes figuras ilustram os aspectos da invenção.

Figura 1 é uma representação diagramática de um complexo de toxina botulínica de 900 kiloDalton.

Figura 2 é um gráfico que mostra a potência de LD_{50} de camundongo após a reconstituição (no eixo Y) de formulações de toxina botulínica secadas a vácuo, liofilizadas feitas com 2,5 ng de toxina botulínica, 500 μ de HSA e de zero a 10N (9000 μg) de NaCl.

Figura 3 apresenta em três eixos dos dados de potência recuperada para várias formulações de toxina botulínica experimentais. O eixo de X da Figura 3 representa a quantidade de cloreto de sódio (NaCl) presente em preparações de frasco de pesquisa ou experimentais em múltiplos do cloreto de sódio normalizado (N) contra os 900 μg de conteúdo de NaCl em um frasco de 100 unidades de Botox®. Desse modo, O número inteiro um no eixo X na Figura 1 representa 900 μg de NaCl. O eixo Y da Figura 3 representa a quantidade de albumina de soro humano (HSA) presente nas mesmas preparações de frasco experimentais em múltiplos do HSA normalizado contra os 500 μg de conteúdo de HSA em um Frasco de 100 unidades de Botox®. Desse modo, o número inteiro um no eixo de Y na Figura 3 representa 500 μg de HSA. O eixo Z da Figura 3 representa a potência recuperada destas composições de toxina botulínica experimentais secadas a vácuo, onde cada frasco conteve exatamente a mesma quantidade de toxina botulínica (2,5 ng) e onde cada composição farmacêutica de toxina botulínica foi reconstituída com a mesma quantidade de solução salina normal, e sua potência após a reconstituição determinada pelo ensaio de LD_{50} de camundongo.

DESCRIÇÃO

A presente invenção é baseada na descoberta de uma toxina botulínica estável com uma potência aumentada pode ser feita com uma relação particular de excipientes em uma composição farmacêutica de toxina botulínica.

Descobriu-se que a potência de uma toxina botulínica em uma composição farmacêutica de toxina botulínica pode ser aumentada signifi-

cantemente formulando-se a composição farmacêutica de toxina botulínica com relações particulares dos excipientes na composição farmacêutica de toxina botulínica. Tais relações de excipientes particulares permitem a obtenção de uma composição farmacêutica de toxina botulínica que tem uma potência mais elevada do que faz uma composição farmacêutica de toxina botulínica com relações de excipiente diferentes. Por exemplo, a invenção permite que uma composição farmacêutica de toxina botulínica seja preparada com uma potência mais elevada por nanograma de toxina botulínica presente na composição farmacêutica de toxina botulínica, do que a potência de uma composição farmacêutica de toxina botulínica com relações de excipientes diferentes.

A toxina botulínica presente na composição farmacêutica de toxina botulínica pode ser uma toxina botulínica tipo A, B, C, D, E, F ou G nativa, recombinante, híbrida, quimérica ou modificada. Adicionalmente, a toxina botulínica pode estar presente na composição farmacêutica de toxina botulínica ou como um complexo ou como uma toxina botulínica pura. Um complexo de toxina botulínica compreende uma molécula de toxina botulínica (cerca de 150 kDa) e uma ou mais proteínas de hemaglutinina não tóxica e/ou não hemaglutinina não tóxica. O complexo pode ter um peso molecular de, por exemplo, 300, 600 ou 900 kDa, com a quantidade em excesso de 150 kDa que são atribuídas aos tóxico componentes de proteína de hemaglutinina não tóxica e/ou não hemaglutinina não tóxica do complexo. A molécula de toxina botulínica de 150 kDa também é referida como o componente neurotóxico e como a toxina botulínica pura.

Um excipiente que pode estar presente em uma composição farmacêutica de toxina botulínica pode ser uma proteína tal como uma albumina, tal como uma albumina de soro humano ou uma albumina recombinantemente feita. Outro excipiente que pode estar presente em uma composição farmacêutica de toxina botulínica pode ser o cloreto de sódio. A albumina e cloreto de sódio podem ser empregados como excipientes estabilizantes em uma composição farmacêutica de toxina botulínica. É conhecido o uso de cloreto de sódio e albumina como agentes encorpantes em uma

composição farmacêutica de toxina botulínica. A albumina é empregada como um excipiente para estabilizar a toxina durante a secagem e impedir a toxina de aderir às superfícies, tal como as superfícies de vidro sobre as quais a toxina pode entrar em contato durante a fabricação e armazenamento. Vide, por exemplo, Rader R.A., Botulinum toxin A, em Ronald Rader, ed. BIOPHARMA: Biopharmaceutical Products em U.S. Market Rockville, MD: Biotechnology Information Institute; 2001 :pp. 271-274 (332), e; Rader R.A., Botulinum toxin B, em Ronald Rader, ed. BIOPHARMA: Biopharmaceutical Products em U.S. Market Rockville, MD: Biotechnology Information Institute; 2001 :pp. 274- 276 (333).

Uma modalidade da invenção é uma composição farmacêutica de toxina botulínica com relações particulares da albumina para o de cloreto de sódio presente em uma composição farmacêuticas de toxina botulínica. Descobriu-se que tais relações permitem um aumento significante na potência de uma composição farmacêutica de toxina botulínica liofilizada ou seca-da á vácuo reconstituída.

Há várias razões por que não seria esperado que a alteração de uma relação de excipientes presentes em uma composição farmacêutica de toxina botulínica aumentaria a potência da toxina botulínica, e por que alguém esperaria exatamente que o oposto ocorresse.

Primeiro, a toxina botulínica é uma proteína relativamente grande para incorporação em uma formulação farmacêutica (o peso molecular do complexo de toxina botulínica tipo A é 900 kD) e é portanto inerentemente frágil e lábil. O tamanho do complexo de toxina a torna muito mais friável e lábil do que as proteínas menores, menos complexas, desse modo compondo as dificuldades de formulação e manipulação se estabilidade da toxina tiver que ser mantida. Conseqüentemente, a alteração de uma relação de excipientes presentes em uma composição farmacêutica de toxina botulínica seria esperada desnaturar, fragmentar ou de outro modo desintoxicar a molécula de toxina ou causar desassociação das proteínas de não toxina presentes no complexo de toxina.

Segundo, como o produto biológico conhecido mais letal, segu-

rança excepcional, precisão, e exatidão são requeridos em todas as etapas da formulação de uma toxina botulínica que contém composição farmacêutica. Desse modo, a alteração de uma relação de excipientes presentes em uma composição farmacêutica de toxina botulínica seria esperada exacerbar ou interferir com a toxina botulínica já extremamente estrita que contém exigências de formulação de composição farmacêutica.

Terceiro, uma vez que a toxina botulínica foi a primeira toxina microbiana a ser aprovada (pelo FDA em 1989) para injeção para o tratamento de doença humana, protocolos específicos tiveram que ser desenvolvidos e aprovados para a cultura, produção em volume, formulação em um farmacêutico e uso de toxina botulínica. Considerações importantes são a pureza e dose da toxina para injeção. Conseqüentemente, a alteração de uma relação de excipientes presentes em uma composição farmacêutica de toxina botulínica seria esperada interferir com as exigências de dosagem e pureza de toxina.

Quarto, as dificuldades particulares existem para estabilizar toxina botulínica tipo A, porque o tipo A consiste em uma molécula de toxina de cerca de 150 kD em associação não covalente com proteínas de não toxina que pesam cerca de 750 kD. Acredita-se que as proteínas de não toxina preservem ou ajudem a estabilizar as estruturas secundárias e terciárias das quais a toxicidade é dependente. Os procedimentos ou protocolos aplicáveis à estabilização de não proteínas ou a proteínas relativamente menores não são aplicáveis aos problemas inerentes com estabilização dos complexos de toxina botulínica, tal como o complexo toxina botulínica tipo A de 900 kD. Desse modo, ao mesmo tempo onde de pH 3,5 a 6,8 a toxina tipo A e proteínas de não toxina são unidas juntas não covalentemente, sob condições ligeiramente alcalinas (pH > 7,1), a toxina muito lábil é liberada do complexo de toxina. Como apresentado previamente, toxina botulínica pura (isto é, a molécula de 150 kD) foi proposta como o ingrediente ativo em uma composição farmacêutica. Desse modo, a alteração de uma relação de excipientes presentes em uma composição farmacêutica de toxina botulínica seria esperada desequilibrar este equilíbrio de estabilidade de toxina frágil.

Descobriu-se que dentro de certas faixas quando concentrações de albumina foram aumentadas quando comparadas com a concentração de cloreto de sódio, a potência da composição farmacêutica de toxina botulínica reconstituída aumentou. Também se descobriu que dentro de certas faixas, quando concentrações de cloreto de sódio foram aumentadas quando comparado com a concentração de albumina, a potência da composição farmacêutica de toxina botulínica reconstituída diminuiu. Surpreendentemente, descobriu-se que uma concentração elevada (absoluta) de cloreto de sódio não é danosa para a potência após reconstituição contanto que certa relação do cloreto de sódio para a albumina tenha sido mantida. Desse modo, descobriu-se que existem relações ideais de cloreto de sódio para albumina (independente das quantidades absolutas de cloreto de sódio ou de albumina presente) na qual uma potência aumentada da composição farmacêutica de toxina botulínica após reconstituição possa ser obtida.

Como apresentado acima, descobriu-se que a estabilização de relações particulares de cloreto de sódio para albumina em uma composição farmacêutica de toxina botulínica antes da liofilização ou secagem por congelamento pode ser empregada para otimizar a potência da composição farmacêutica de toxina botulínica reconstituída.

Significantemente, também se descobriu que a reconstituição da composição farmacêutica de toxina botulínica com solução salina normal (0,9%), o fluido de reconstituição típico, não afete a otimização da potência da composição farmacêutica de toxina botulínica obtida através de certas relações estabelecidas de cloreto de sódio para albumina na composição farmacêutica de toxina botulínica antes de sua liofilização ou secagem por congelamento. Esta descoberta, portanto permite a conservação da tonicidade da composição farmacêutica de toxina botulínica reconstituída administrada a um paciente.

Sem desejar estar ligado a teoria, pode ser uma hipótese que o estabelecimento de certas relações de cloreto de sódio para albumina na composição farmacêutica de toxina botulínica antes de sua liofilização ou secagem por congelamento permita obter uma potência otimizada da com-

posição farmacêutica de toxina botulínica após sua reconstituição fornecendo-se um ambiente físico e químico hospitaleiro para a toxina botulínica durante as etapas ou procedimentos do processamento (composição ou formulação) ao mesmo tempo onde também reduzindo a adsorção da toxina botulínica em superfícies de contato (tal como, frascos de vidro). Presumivelmente, o processamento de uma composição farmacêutica de toxina botulínica com relações não otimizadas de cloreto de sódio e albumina, danifica a molécula de toxina botulínica e aumenta sua adsorção às superfícies.

Desse modo, a alteração da relação de NaCl/HSA para uma relação particular pode aumentar a potência da toxina porque menos toxina é por conseguinte perdida durante o congelamento para desnaturação e adsorção às superfícies (este dois fenômenos podem ser referidos, por exemplo, desnaturação causada por adsorção). HSA pode atuar como um crioprotetor e NaCl como um degradante. Tipicamente, alguma quantidade de uma toxina botulínica aderirá à superfície de vidro. Determinou-se que quando menos NaCl está presente em uma composição farmacêutica de toxina botulínica, a toxina secada a vácuo não adere a uma superfície de vidro, desse modo indicando que NaCl pode facilitar ou podem causar adsorção da toxina às superfícies de processamento ou armazenamento. Desse modo, as relações de HSA:NaCl particulares podem ser ideais porque elas permitonde HSA forneça a crioproteção suficiente ao mesmo tempo onde contrariando um efeito danoso (adsorção de superfície) causado pelo NaCl presente.

Desse modo, a descrição permite que uma composição farmacêutica de toxina botulínica seja feita com uma potência que seja essencialmente 100% da potência teoricamente possível. Adicionalmente a potência otimizada é mantida após a reconstituição com solução salina, o que permite a administração de uma composição farmacêutica de toxina botulínica isotônica. O resultado é um uso industrial mais eficiente do ingrediente ativo da toxina botulínica e uma exposição reduzida do paciente a toxina botulínica degradada na composição farmacêutica de toxina botulínica final.

Uma vantagem significante da invenção é que permite uma composição farmacêutica de toxina botulínica ser fabricada (composta de

uma toxina botulínica bruta ou em volume) com consideravelmente menos toxina botulínica. Isto permite um processo industrial mais eficiente no qual menos toxina em volume é empregada para fabricar a composição farmacêutica de toxina botulínica final. Adicionalmente, porque a composição farmacêutica de toxina botulínica final contém menos toxina botulínica, o paciente, em uma unidade para base de unidade, é administrado com menos toxina botulínica, com vantagens resultantes de menos efeitos colaterais, tal como imunogenicidade reduzida. Especificamente, a invenção permite uma composição farmacêutica de toxina botulínica ser feita com a mesma potência, porém com de cerca de 5% menos a cerca de 50% menos a toxina botulínica total presente na composição farmacêutica de toxina botulínica. Por exemplo, uma composição farmacêutica de toxina botulínica que antigamente compreendia cerca de 20 unidades de toxina botulínica para cada 1 ng de toxina botulínica presente pode, de acordo com a invenção, ser feita agora com até 40 unidades de toxina botulínica para cada 1 ng de toxina botulínica presente na composição farmacêutica de toxina botulínica.

Um processo de fabricação de composição farmacêutica de toxina botulínica (composição) pode tipicamente requerer tanto quanto 50% de sobrepreço, significando que o processo industrial que é iniciado com uma quantidade 1,5X (isto é, 150 unidades) de uma toxina botulínica fornece uma composição farmacêutica de toxina botulínica com uma quantidade 1X (isto é, 100 unidades) da toxina botulínica. Um processo de fabricação ou composição é o processo pelo qual uma toxina botulínica (referida como toxina bruta ou em volume) obtida de fermentação bacteriana é em seguida diluída, composta e processada para a preparação de uma composição farmacêutica de toxina botulínica adequada para administração aos seres humanos para propósitos terapêuticos e/ou cosméticos.

Desse modo, há uma perda inexplicada de até 50% da potência da toxina botulínica durante o processo de composição. Foi postulado que o sobrepreço de 50% é requerido devido à perda e/ou desnaturação de toxina botulínica durante o processo de composição. A invenção indica que o sobrepreço de até 50% de toxina botulínica não é perdido durante a composi-

ção, porém de preferência a composição química da formulação é o parâmetro crítico na obtenção de recuperação total de toxina no produto acabado. Nenhum sobrepreço é necessário quando as relações otimizadas dos excipientes são empregadas fornecendo-se o ambiente apropriado durante o processo de secagem a vácuo. Ao mesmo tempo onde não querendo estar ligado através de teoria, é plausível que relações ideais reduzam a adsorção às superfícies e desnaturação durante o processo de secagem.

Desse modo, a invenção permite que uma composição farmacêutica de toxina botulínica seja feita com, por exemplo, de cerca de 34% menos (se a quantidade de toxina botulínica em um frasco de 100 unidades for reduzida de 3,8 ng para 2,5 ng) a cerca de 48% menos (se a quantidade de toxina em um frasco de 100 unidades for reduzida de 4,8 ng para 2,5 ng, a cerca de cerca de 50% menos (se a quantidade de toxina em um frasco de 100 unidades for reduzida de 5,0 ng para 2,5 ng.

A albumina de soro humano (derivada de plasma) está comercialmente disponível de várias fontes, incluindo, por exemplo, Bayer Corporation, divisão farmacêutica, Elkhart, Illinois, sob o nome comercial Plasbumin®. Plasbumin® é conhecido por conter albumina obtida de plasma venoso humano misturado como também caprilato de sódio (um ácido graxo, também conhecido como octanoato) e acetiltriptofano ("NAT"). Vide, por exemplo, a inserção de produto Bayer Plasbumin® -20 (orientações para uso) fornecida com o produto e como publicado em http://actsysmedical.com/PDF/plasbumin20.pdf. O caprilato e acetiltriptofano em albumina de soro humano comercialmente disponível são adicionados aparentemente por exigência de FDA para estabilizar a albumina durante pasteurização a 60 graus C. durante 10 horas antes de venda comercial. Vide, por exemplo, Peters, T., Jr., *All About Albumin Biochemistry, Genetics and Medical Applications, Academic Press* (1996), páginas 295 e 298. A albumina humana recombinante está disponível de várias fonts, incluindo, por exemplo, de Bipha Corporation of Chitose, Hokkaido, Japão, Welfide Corporation de Osaka, Japão, e de Delta Biotechnology, Nottingham, REINO UNIDO, como um produto de fermentação de levedura, sob o nome comercial

Recombumin®.

É conhecido expressar albumina de soro humano recombinante (rHSA) nas espécies de levedura *Pichia pastoris*. Vide, por exemplo, Kobayashi K., e outros, The development of recombinant human serum albumin, Ther Apher, novembro de 1998; 2(4):257-62, e; Ohtani W., e outros, Physicochemical and immunochemical properties of recombinant human serum albumin from Pichia pastoris, Anal Biochem, 1 de fevereiro, e 1998; 256(1):56-62. Vide também a Patente U.S. 6.034.221 e Patentes Européias 330 451 e 361 991. Uma vantagem clara de um rHSA é que ele é livre de patógenos derivados do sangue.

As relações de excipientes apresentadas aqui podem ser acreditadas ajudar a fornecer estabilidade a um ingrediente ativo de neurotoxina, tal como uma toxina botulínica, presente na composição farmacêutica por: (1) redução adesão (geralmente referido como "aderência") da toxina botulínica às superfícies, tal como as superfícies de artigos de vidro de laboratório, recipientes, o frasco no qual a composição farmacêutica é reconstituída e a superfície interna da seringa empregada para injetar a composição farmacêutica. A adesão da toxina botulínica às superfícies pode levar a perda de toxina botulínica e a desnaturação de toxina botulínica retida, ambas das quais reduzem a toxicidade da toxina botulínica presente na composição farmacêutica; (2) redução da desnaturação da toxina botulínica e/ou dissociação da toxina botulínica de outras proteínas de não toxina presentes no complexo de toxina botulínica, cujas atividades de desnaturação e/ou dissociação podem ocorrer por causa da baixa diluição da toxina botulínica presente na composição farmacêutica (isto é, antes da liofilização ou secagem a vácuo) e na composição farmacêutica reconstituída; (3) redução da perda de toxina botulínica (isto é, devido à desnaturação ou dissociação de proteínas não toxina no complexo) durante as alterações consideráveis de concentração e pH que ocorrem durante a preparação, processamento e reconstituição da composição farmacêutica.

Os três tipos de estabilizações de toxina botulínica presumivelmente fornecidas pelas relações apresentadas aqui podem conservar e pre-

servar a toxina botulínica com toxicidade nativa antes de injeção da composição farmacêutica.

Em certas modalidades da invenção, as composições farmacêuticas da invenção podem compreender uma pluralidade de sorotipos de toxina botulínica. Em outras palavras, a composição pode incluir dois ou mais diferentes sorotipos de toxina botulínica. Por exemplo, uma composição pode incluir sorotipos de toxina botulínica A e B. Em outra modalidade, uma composição pode incluir sorotipos de toxina botulínica A e E. O emprego de uma combinação de sorotipos de toxina botulínica permitirá aos cuidadores personalizarem a composição para alcançar um efeito desejado com base na condição sendo tratada. Em uma modalidade adicional da invenção, a composição pode compreender uma toxina botulínica modificada. A toxina botulínica modificada preferivelmente inibirá a liberação de neurotransmissores de um neurônio, porém pode ter uma potência maior ou menor do que a toxina botulínica nativa, ou pode ter um efeito biológico maior ou menor do que a toxina botulínica nativa. Porque as composições da invenção podem ser empregadas para tratamento relativamente longo de animais, as composições podem ser fornecidas em uma forma relativamente pura. Em uma modalidade, as composições são de um grau farmacêutico. Em certas modalidades, a neurotoxina clostrídica tem uma pureza maior do que 95%. Em modalidades adicionais, a neurotoxina clostrídica tem uma pureza maior do que 99%.

A invenção também abrange a adição de um conservante, ou no diluente ou formulação propriamente dita, para permitir o armazenamento prolongado. Um conservante preferido é álcool benzílico contendo solução salina preservada.

Uma formulação líquida pode ser vantajosa. Uma apresentação de etapa única (por exemplo, seringa pré-carregada) ou uma configuração de produto que o usuário perceba como uma apresentação de etapa única (por exemplo, seringa em câmara dual) forneceria conveniência eliminando-se a etapa de reconstituição. A secagem por congelamento é um processo complicado, oneroso e difícil. As formulações líquidas são freqüentemente

mais fáceis e mais econômicas para produzir. Por outro lado, as formulações líquidas são sistemas dinâmicos e, portanto mais suscetíveis à interação de excipiente, reações rápidas, crescimento bacteriano, e oxidação, do que as formulações de secagem por congelamento. Um conservante compatível pode ser necessário. Os antioxidantes tal como metionina também poderiam ser úteis como limpadores especialmente se tensoativos são empregados para reduzir a adsorção uma vez que muitos destes compostos contêm ou produzem peróxidos. Quaisquer dos excipientes estabilizantes que podem ser empregados em uma formulação secada por congelamento (por exemplo, amido de hidroxietila ou um aminoácido tal como lisina) poderiam ser adaptados ao uso em uma formulação líquida para ajudar na redução da adsorção e estabilizar a toxina. As suspensões similares àquelas desenvolvidas para insulina são também os candidatos bons. Adicionalmente, a estabilização da toxina botulínica em um veículo líquido poderia requerer um veículo de baixo pH uma vez que a toxina é reportada ser lábil em pH acima de 7. Esta acidez poderia produzir queimação e picadas na injeção. Uma seringa binária poderia ser empregada. A inclusão de um tampão co-dispensado, suficiente para elevar o pH a níveis fisiológicos, aliviaria o desconforto de injeção de um pH baixo ao mesmo tempo onde mantendo a toxina a um baixo pH durante o armazenamento. Outra opção de seringa em câmara dual incluiria o material diluente e liofilizado segregado em câmara separada, somente misturando em uso. Esta opção fornece as vantagens de uma formulação líquida sem o tempo e recursos adicionais.

Como descrito aqui, a neurotoxina pode ser preparada e purificada empregando técnicas bem-conhecidas na área. A toxina purificada pode ser diluída subseqüentemente em um estabilizador tal como um polissacarídeo (por exemplo, hetamido), ou uma albumina de soro recombinante, ou uma albumina de soro das espécies de animal que recebem a neurotoxina. É preferido que o estabilizador previna ou reduza a desnaturação da toxina, e produza nenhuma, ou mínimas respostas, imunogênicas no animal que receberá a toxina. Alíquotas da toxina diluída são em seguida liofilizadas empregando os procedimentos convencionais.

A neurotoxina liofilizada pode ser reconstituída antes de administrar a neurotoxina a um indivíduo adicionando-se água, solução salina, ou qualquer solução de tampão à neurotoxina liofilizada. Em certas modalidades, os tampões livres de sódio podem ser preferidos para ajudar a reduzir a desnaturação da neurotoxina.

As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas empregando modos convencionais de administração. Em modalidades preferidas da invenção, as composições são administradas intramuscularmente ou subcutaneamente ao indivíduo. Em outras modalidades, as composições da invenção podem ser administradas intratecalmente. Além disso, as composições da invenção podem ser administradas com um ou mais agentes analgésicos ou anestésicos.

O modo mais eficaz de administração e regime de dosagem para as composições desta invenção depende do tipo, severidade, e curso da condição sendo tratada, a saúde do animal e resposta ao tratamento, e o julgamento do doutor do tratamento. Conseqüentemente, os métodos e dosagens das composições deveriam ser adaptados ao indivíduo individual.

As composições da invenção também podem ser injetadas nos músculos lisos (quando comparadas com os músculos estriados) para tratar disfunção colônica, da bexiga, esofágica, ou gastrointestinal, incluindo, porém não limitado à acalasia, fissura anal, esfíncter hiperativo de Oddi. A administração das composições pode reduzir ou pode prevenir as conseqüências sistêmicas desfavoráveis de tratamento com drogas que especificamente não atuam no órgão de interesse.

As composições que contêm toxina botulínica podem ser administradas intramuscularmente, intratecalmente, ou subcutaneamente para aliviar a dor experimentada pelo animal. Estes tratamentos também são restritos ao local de injeção e têm efeitos colaterais mínimos comparados com as abordagens sistêmicas atuais de tratamento destas síndromes de dor com drogas que aliviam a dor.

O alívio da dor praticando-se os métodos da invenção pode ser determinado observando-se a redução no número de sintomas que o animal

está exibindo. Um ou mais dos sintomas pode ser reduzido.

Como indicado acima, as dosagens da neurotoxina, tal como toxina botulínica, nas composições podem variar. Em uma modalidade, as composições contêm uma quantidade terapeuticamente eficaz de neurotoxina, por exemplo, entre cerca de 1 U e cerca de 500 U de toxina botulínica tipo A. Preferivelmente as quantidades estão entre cerca de 10 U e cerca de 300 U. Mais preferivelmente a quantidade é entre cerca de 20 U e 250 U, tal como cerca de 50 U a 200 U, ou 70 U.

Alternativamente, a toxina botulínica, tal como toxina botulínica tipo A, pode ser administrada em quantidades entre cerca de 10^{-3} U/kg e cerca de 60 U/kg para aliviar a dor experimentada por um mamífero. Preferivelmente, a toxina botulínica empregada é administrada em uma quantidade dentre cerca de 10^{-2} U/kg e cerca de 50 U/kg. Mais preferivelmente, a toxina botulínica é administrada em uma quantidade dentre cerca de 10^{-1} U/kg e aproximadamente 40 U/kg. Mais preferivelmente, a toxina botulínica é administrada em uma quantidade dentre cerca de 1 U/kg e cerca de 30 U/kg. Em uma modalidade particularmente preferida dos presentes métodos descritos, a toxina botulínica é administrada em uma quantidade dentre cerca de 1 U/kg e cerca de 20 U/kg.

As composições que contêm outros sorotipos de toxina botulínica podem conter dosagens diferentes da toxina botulínica. Por exemplo, a toxina botulínica tipo B pode ser fornecida em uma composição em uma dose maior do que uma composição que contém toxina botulínica tipo A. Em uma modalidade da invenção, a toxina botulínica tipo B pode ser administrada em uma quantidade entre cerca de 1 U/kg e 150 U/kg. A toxina botulínica tipo B também pode ser administrada em quantidades de até 20.000 U (unidades de camundongo, como descrito acima). Em outra modalidade da invenção, as toxinas botulínicas tipo E ou F podem ser administradas em concentrações entre cerca de 0,1 U/kg e 150 U/kg. Além disso, em composições que contêm mais do que um tipo de toxina botulínica, cada tipo de toxina botulínica pode ser fornecido em uma dose relativamente menor do que a dose tipicamente empregada para um único sorotipo de toxina botulínica. A

combinação de sorotipos de toxina botulínica pode então fornecer um grau e duração adequados de paralisia sem um aumento na difusão das neurotoxinas (por exemplo, vide Patente U.S. No. 6.087.327).

O processo de composição empregado na preparação de Botox® (uma composição farmacêutica em pó secada á vácuo) começa com a entrada de cerca de 150 unidades da toxina botulínica de volume no processo de composição. O produto final (pronto para reconstituição) compreende somente cerca de 100 unidades da toxina botulínica (bem como a quantidade específica de albumina e cloreto de sódio como excipientes adicionados durante o processo de composição). Desse modo, cerca de 50 unidades de toxina botulínica (cerca de um terço da quantidade da toxina botulínica que entrou no processo de composição) é perdida durante a composição, por exemplo, por desnaturação, absorção e inativação da toxina botulínica sobre as superfícies de processamento. Conseqüentemente, foi necessário começar o processo de composição com um sobrepreço de cerca de 50% (isto é, início com cerca de 150 unidades de toxina botulínica para obter um produto com cerca de 100 unidades de toxina botulínica).

Cem unidades de toxina botulínica tipicamente compreendem de cerca de 3,6 ng a cerca de 5 ng de toxina botulínica. Descobriu-se que alterando-se a relação dos excipientes de cloreto de sódio e albumina empregados nos processos de composição é possível: (1) remover o fator de sobrepreço de 50%, e; (2) em um nanograma ao nanograma de base, obter uma toxina botulínica mais potente. Eliminando-se o fator de sobrepreço de 50% no processo de composição, alguém pode ter cerca de 100 unidades de toxina botulínica que entra no processo de composição, e ainda na conclusão do processo de composição ainda pode obter o produto com cerca de 100 unidades de toxina botulínica. Adicionalmente, alguém pode obter um produto de toxina botulínica de 100 unidades que compreende somente cerca de 2,4 ng de toxina botulínica, quando comparado ao 3,6 a 5 ng previamente requerido de toxina botulínica requerida para obter um produto de toxina botulínica de 100 unidades. Desse modo, a potência da toxina botulínica que foi previamente tão baixa quanto cerca de 20 unidades por ng (100 unidades

divididas por 5 ng) pode agora ser aumentada para tão elevada quanto cerca de 42 unidades por ng (100 unidades divididas por 2,4 ng), que se iguala a um aumento de potência de cerca de 110%.

As composições farmacêuticas de toxina botulínica comercialmente disponíveis aprovadas por órgãos fiscalizadores para uso em seres humanos para tratar uma ou mais indicações incluem BOTOX® (Allergan, Inc, Irvine, Califórnia), Dysport® (Ipsen Pharmaceuticals, Paris, França) e MyoBloc® (Solstice Neurosciences, San Diego, Califórnia).

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos não limitantes fornecem àqueles de capacidade ordinária na técnica métodos e formulações preferidas específicas e não são pretendidos limitar o escopo da invenção.

Nos Exemplos abaixo, o ensaio de $dose_{50}$ letal de camundongo bem-conhecido ("MLD_{50}") foi empregado para determinar a potência recuperada das formulações de toxina botulínica feitas. O MLD_{50} é um método para medir a potência de uma toxina botulínica por injeção intraperitoneal da toxina botulínica em camundongos femininos (cerca de semanas de idade) pesando 17-22 gramas cada no início do ensaio. Cada camundongo é mantido em uma posição deitado em decúbito dorsal com sua cabeça inclinada para baixo e é intraperitonealmente injetado no abdômen direito inferior em um ângulo de cerca de 30 graus empregando uma agulha de 25 a 27 gauge 3/8" a 5/8" com uma das várias diluições seriais da toxina botulínica em solução salina. As taxas de mortalidade durante as 72 horas resultantes para cada diluição são registradas. As diluições são preparadas de forma que a diluição mais concentrada produza uma taxa de mortalidade de pelo menos 80% dos camundongos injetados, e a última diluição de concentração produz uma taxa de mortalidade não maior do que 20% dos camundongos injetados. Deve haver um mínimo de quatro diluições que se incluem dentro da faixa decrescente de monotonia das taxas de mortalidade. A faixa de monotonia decrescente começa com uma taxa de mortalidade de não menos do que 80%. Dentro das taxas decrescentes de monotonia de quatro ou mais, as duas taxas maiores e as duas taxas menores têm que estar diminuindo (isto é,

não equivalente). A diluição na qual 50% dos camundongos morrem dentro de três dias após o período observação da injeção é definida como uma diluição que compreende uma unidade (1 U) da toxina botulínica.

Nas Tabelas que seguem, "normalizado" quer dizer com respeito à quantidade empregada em um frasco de 100 unidades de Botox®.

Exemplo 1

Formulações de Toxina Botulínica de Potência Elevada (Método de Pesquisa) com Várias Relações de Cloreto de sódio para Albumina

Uma experiência foi realizada para avaliar a potência recuperada de numerosas formulações de frasco de pesquisa de toxina botulínica com a mesma quantidade de complexo de toxina botulínica tipo A em cada formulação, porém com quantidades diferentes de HSA e NaCl presentes dentro de cada formulação. Desse modo, ao mesmo tempo onde 2,5 ng da toxina botulínica foi empregado constantemente por frasco, cada frasco de formulação conteve de 0M (0 μg) de HSA a 10N (5000 μg) de HSA, e de 0M (0 μg) de NaCl a 10N (9000 μg) de NaCl.

Os dados na Tabela 1 foram obtidos empregando procedimentos de preparação de lote de pesquisa. Desse modo, os dados da Tabela 1 foram obtidos misturando-se uma das sete quantidades diferentes especificadas de cloreto de sódio (NaCl) (de uma quantidade de 0,1 N de 90 μg por frasco a uma quantidade de 10N de 9000 μg por frasco) com uma das três quantidades diferentes especificadas de albumina de soro humano (HSA) (Bayer) (de uma quantidade de 0,5N de 250 μg por frasco a uma quantidade de 1 N de 500 μg por frasco) com água estéril e a mesma quantidade (2,5 ng/frasco) de complexo de toxina botulínica tipo A para preparar frascos de composição farmacêutica de toxina botulínica experimental ou de pesquisa. Estes frascos foram então colocados em um liofilizador, secado a vácuo e tampões. Os frascos foram então reconstituídos com solução salina normal e testados quanto à potência recuperada empregando uma versão refinada do ensaio de LD_{50} de potência de camundongo.

Significantemente, a Tabela 1 mostra que, quando comparado com a formulação de pesquisa equivalente Botox® (isto é, a formulação de

frasco de pesquisa que continha 500 μg de HSA, 900 μg de NaCl e 2,5 ng de complexo de toxina botulínica tipo A, e teve uma potência recuperada de 57 unidades)), uma potência elevada (61 a 89 unidades de atividade de toxina botulínica por frasco, isto é, de 107% a 156% maior do que a potência do formulação de pesquisa equivalente Botox®) foi obtido para cada uma das seis formulações que tiveram relações de HSA:NaCl maiores do que 0,6 (as relações de HSA:NaCl na Tabela 1 que foram maiores do que 0,6 foram relações de 0,7 a 5,6.

Os dados da Tabela 1, portanto mostram que uma formulação de toxina botulínica de potência elevada pode ser obtida aumentando-se a relação de HSA:NaCl da formulação.

Tabela 1: Potência de Formulações de Toxina Botulínica com Relações de HSA:NaCl de 0,03 a 5,6

NaCl normalizado (μg/frasco)	HSA normalizado (μg/frasco)		
	0,5 (250)	0,75 (375)	1 (500)
0,1 (90)	81 (2,8)	74 (4,2)	89 (5,6)
0,5 (450)	49 (0,6)	68 (0,8)	64 (1,1)
0,75 (675)	45 (0,4)	60 (0,6)	61 (0,7)
1 (900)	44 (0,3)	52 (0,4)	57 (0,6)
2 (1800)	49 (0,1)	56 (0,2)	62 (0,3)
5 (4500)	41 (0,06)	46 (0,08)	59 (0,1)
10 (9000)	49 (0,03)	48 (0,04)	58 (0,06)

Um outro exemplo que mostra a potência de formulações de pesquisa reconstituídas feitas de acordo com os procedimentos apresentados neste Exemplo 1 é fornecido pela Tabela 2 abaixo e pela Figura 2. A Tabela 2 mostra que as formulações que contiveram uma quantidade de 1N constante (500 μg) de HSA, 2,5 ng de toxina botulínica e quantidades de NaCl que variaram de zero a 10N (9000 μg), tiveram uma potência que não variou significantemente como a relação de HSA:NaCl que foi diminuída para abaixo de 0,6, porém que a potência da formulação aumentou de cerca de 57 unidades a cerca de 90 unidades, quando a relação de HSA:NaCl foi aumentada de 0,6 para cerca de 5.6.

Tabela 2: Potência de Formulações de Toxina Botulínica com 1 N e Relações de HSA:NaCl de 0,06 a 5,6

Quantidade Normalizada de NaCl	Relação de HSA:NaCl	Potência
10	0,06	59
5	0,1	60
2	0,3	61
1	0,6	58
0,75	0,7	62
0,5	1,1	65
0,1	5,6	89

A Figura 2 é uma representação gráfica dos dados da Tabela 2.

A Figura 3 apresenta uma vista combinada em três eixos dos dados gerados por este Exemplo 1. Figura 3 mostra que quando a relação de HSA:NaCl é aumentada além cerca de 0,6 (ou: (a) mantendo-se a quantidade de HSA na formulação constante [a uma quantidade entre 0 e 10N] e diminuindo a quantidade de NaCl na formulação [de 10N a 0], ou; (b) mantendo-se a quantidade de NaCl constante e aumentando-se a quantidade de HSA na formulação), geralmente a potência recuperada da formulação aumenta. A quantidade de toxina botulínica em todas as formulações empregadas para gerar os dados da Figura 3 foi constante a 2,5 ng por frasco.

Exemplo 2

Formulações de Toxina Botulínica de Potência Elevada (Método Comercial) com Relação Particular de Cloreto de Sódio para Albumina .

Uma outra experiência foi realizada na qual as composições farmacêuticas de toxina botulínica foram feitas (compostas) empregando complexo de toxina botulínica tipo A, cloreto de sódio e albumina de soro humano. As composições farmacêuticas de toxina botulínica contendo relações diferentes de cloreto de sódio para HSA foram compostas empregando os procedimentos de lote de fabricação comercial. As composições foram então cada uma liofilizadas e secadas a vácuo para um estado em pó sólido, seguido por reconstituição com solução salina e avaliação de potência recuperada de LD_{50} de camundongo.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3. Os dados da Tabela 3 foram obtidos como segue: para os dados de BOTOX (última fila na Tabela 3), frascos de 100 unidades de Botox® foram reconstituídos com solução salina normal seguido por uso do ensaio de LD_{50} de camundongo para medir a potência. O 1 N de HSA, 2N de HSA, 5N de HSA e 10N de HSA representam formulações compostas do mesmo modo empregadas para a fabricação de Botox® e com os mesmos excipientes, reconstituídas da mesma maneira, e potência avaliada empregando o mesmo ensaio de LD_{50} de camundongo, com somente as seguintes alterações:

(1) um (1 N), dois (2N), cinco (5N) ou dez vezes (10N) tanto HSA foi empregado no processo de composição para a fabricação destas quatro formulações complexas de toxina botulínica tipo A, quando comparado com quanto HSA é empregado na fabricação de Botox®. Desse modo, como mostrado na Tabela 3, a formulação de 1 N (1 N significando normalizado para conter a mesma quantidade daquele excipiente como está presente em um frasco 100 de unidades de Botox®) foi composta para conter 500 µg de HSA, ao mesmo tempo onde a formulação de 10N foi composta para conter 5000 µg de HSA.

(2) a quantidade de complexo de toxina botulínica tipo A empregada em cada das quatro formulações de 1 N de HSA, 2N de HSA, 5N de HSA e 10N de HSA foi 2,4 ng.

(3) a quantidade de cloreto de sódio empregada no processo de composição para a fabricação de cada das quatro formulações complexas de toxina botulínica tipo A foi alterada para fornecer, uma relação de peso para peso constante do HSA para NaCl na formulação de 28. Desse modo, em cada uma destas quatro formulações a relação de HSA:NaCl foi 47 vezes o que é para Botox® (28 vs 0,6).

Significantemente, a Tabela 3 mostra que uma potência elevada (95 a 103 unidades de atividade de toxina botulínica por frasco) foi obtida para cada das quatro relações de HSA:NaCl de 28 formulações de toxina botulínica, e que esta potência elevada foi obtida no uso de cerca de 33% a cerca de 52% de menos toxina botulínica (quando comparado para usar de

cerca de 3,6 ng a cerca de 5 ng de toxina botulínica por frasco de Botox®).

Adicionalmente, como mostrado pela Tabela 3, através de amplas faixas das quantidades absolutas de HSA e cloreto de sódio presente, uma relação de peso para peso de HSA para cloreto de sódio de 28 permitiu consistentemente uma potência de cerca de 40 unidades por ng da toxina botulínica composta e reconstituída a ser obtida.

Tabela 3: Potência de Formulações de Toxina Botulínica com uma Relação de HSA:NaCl de 28

	Toxina de HSA:NaCl		NaCl	HSA	Potência
	Relação em peso	(ng/frasco)	(µg/frasco)	(µg/frasco)	(n=2)
1N HSA	28	2,4	18	500	96
2N HSA	28	2,4	36	1000	103
5N HSA	28	2,4	90	2500	98
10N HSA	28	2,4	180	5000	95
BOTOX	0,6	3,6 a 5	900	500	70-100

Desse modo, esta experiência mostrou que no processo de fabricação (composição), 50% de sobrepreço pode ser eliminado alterando-se a relação da composição da formulação, ao mesmo tempo onde ainda empregando os excipientes e processos industriais existentes.

Uma composição farmacêutica de acordo com a invenção descrita aqui tem muitas vantagens, incluindo que a composição farmacêutica pode ter estabilidade elevada e % de recuperação elevada de potência de toxina comparável ou superior àquela obtida com composições farmacêuticas atualmente disponíveis.

Várias referências e/ou publicações foram citadas aqui, os conteúdos das quais, em suas totalidades, estão aqui incorporados por referência.

Embora a presente invenção tenha sido descrita em detalhes com respeito a certos métodos preferidos, outras modalidades, versões, e modificações dentro do escopo da presente invenção são possíveis. Por exemplo, uma ampla variedade de polissacarídeos, proteínas e aminoácidos estabilizantes está dentro do escopo da presente invenção.

Conseqüentemente, o espírito e escopo das seguintes reivindicações não deveriam estar limitados às descrições das modalidades preferidas apresentadas acima.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica que compreende :

(a) uma toxina botulínica;

(b) um primeiro excipiente, no qual o primeiro excipiente é uma albumina, e;

(c) um segundo excipiente;

(d) no qual a relação de peso para peso do primeiro excipiente para o segundo excipiente presente na composição farmacêutica é maior do que 0,6 e menor do que cerca de 100.

2. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, no qual a potência da toxina botulínica na composição farmacêutica é entre cerca de 5% maior e cerca de 200% maior do que a potência de uma toxina botulínica em uma composição farmacêutica de comparação, cuja composição farmacêutica de comparação contém (a) a mesma quantidade e tipo da toxina botulínica, e (b) o mesmo primeiro excipiente e o mesmo segundo excipiente, como contido na composição farmacêutica de reivindicação 1, e; (c) os primeiro e segundo excipientes estão presentes na composição farmacêutica de comparação em uma relação de peso para peso de 0,6 ou menos.

3. Composição farmacêutica da reivindicação 2, no qual a potência da toxina botulínica na composição farmacêutica é entre cerca de 10% maior, e cerca de 100% maior do que a potência da toxina botulínica na composição farmacêutica de comparação.

4. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, no qual a toxina botulínica está presente como um complexo de toxina botulínica.

5. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, no qual a toxina botulínica está presente como uma toxina botulínica pura.

6. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, no qual o primeiro excipiente é uma albumina de soro.

7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, no qual o primeiro excipiente é uma albumina recombinante.

8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, no qual o segundo excipiente é cloreto de sódio.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, no qual a relação de peso para peso do primeiro excipiente para o segundo excipiente presente na composição farmacêutica é entre cerca de 1 e cerca de 50.

10. Composição farmacêutica, que compreende:

(a) entre cerca de 2,0 X 10^{-1} gramas e cerca de 3,5 X 10^{-11} gramas de um toxina botulínica tipo A para cada unidade de toxina botulínica presente na composição farmacêutica, a unidade da toxina botulínica sendo determinada por um ensaio de potência de LD_{50} de camundongo;

(b) uma albumina, e

(c) cloreto de sódio,

(d) no qual a relação de peso para peso da albumina para o cloreto de sódio presente na composição farmacêutica é maior do que 0,6 e menor do que cerca de 100.

11. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, no qual a potência da toxina botulínica na composição farmacêutica é entre cerca de 5% maior e cerca de 200% maior do que a potência de uma toxina botulínica em uma composição farmacêutica de comparação, cuja composição farmacêutica de comparação contém (a) a mesma quantidade e tipo de toxina botulínica, e (b) a mesma albumina e cloreto de sódio, como faz a composição farmacêutica da reivindicação 10, e (c) a albumina e cloreto de sódio estão presentes na composição farmacêutica de comparação em uma relação de peso para peso de 0,6 ou menos.

12. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 11, no qual a potência da toxina botulínica na composição farmacêutica é entre cerca de 10% maior e cerca de 100% maior do que a potência da toxina botulínica na composição farmacêutica de comparação.

13. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, no qual a toxina botulínica está presente como um complexo de toxina botulínica.

14. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, no qual a toxina botulínica está presente como uma toxina botulínica pura.

15. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, no qual a albumina é uma albumina de soro.

16. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, no qual a albumina é uma albumina recombinante.

17. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, no qual a relação de peso para peso da albumina para o cloreto de sódio, presente na composição farmacêutica é entre cerca de 1 e cerca de 50.

18. Processo para a fabricação de uma composição farmacêutica, o processo que compreende as etapas de:

(a) combinar cerca de 2,5 ng de um complexo de toxina botulínica tipo A com uma albumina e cloreto de sódio em uma relação de peso para peso da albumina para o cloreto de sódio na composição farmacêutica maior do que 0,6 e menor do que cerca de 100, para formar uma mistura, e;

(b) secar a vácuo a mistura, para desse modo obter uma composição farmacêutica com uma potência após a reconstituição dentre cerca de 70 unidades e cerca de 130 unidades.

19. Processo, de acordo com a reivindicação 18, adicionalmente compreendendo a etapa, antes da etapa de secagem a vácuo, de liofilização da mistura.

20. Composição farmacêutica, feita pelo processo como definido na reivindicação 18.

21. Composição farmacêutica, adequada para administração a um ser humano, compreendendo:

(a) uma toxina botulínica;

(b) cloreto de sódio, e;

(c) um estabilizador; no qual a potência da toxina botulínica presente na composição farmacêutica é cerca de 40 unidades para cada nanograma da toxina botulínica.

22. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação

21, no qual a relação de peso para peso da albumina para o cloreto de sódio presente na composição farmacêutica é maior do que 0,6 e menor do que cerca de 100.

23. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 21, no qual a toxina botulínica está presente como um complexo de toxina botulínica.

24. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 16, no qual a toxina botulínica está presente como uma toxina botulínica pura.

25. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 16, no qual o estabilizador é uma proteína.

26. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 16, no qual o estabilizador é um estabilizador recombinante.

27. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 21, no qual o estabilizador recombinante é selecionado do grupo que consiste em uma albumina recombinante, um colágeno recombinante e uma gelatina recombinante.

28. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 21, no qual o estabilizador é uma albumina.

29. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 21, no qual o estabilizador é uma albumina recombinante.

30. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 21, no qual a toxina botulínica é selecionada do grupo que consiste em toxinas botulínicas tipos A, B, C, D, E, e F.

31. Composição farmacêutica, adequada para administração a um ser humano, compreendendo:

(a) uma toxina botulínica;

(b) cloreto de sódio, e;

(b) uma albumina;

no qual a potência da toxina botulínica presente na composição farmacêutica é entre cerca de 24 unidades/ng e cerca de 60 unidades/ng.

32. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação

31, no qual a relação de peso para peso da albumina para o cloreto de sódio é maior do que 0,6 e menor do que cerca de 100.

33. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 31, no qual a albumina é uma albumina de soro.

34. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 31, no qual a albumina é uma albumina recombinante.

35. Composição farmacêutica, adequada para administração a um ser humano, compreendendo:

(a) uma toxina botulínica;

(b) cloreto de sódio, e;

(b) uma albumina;

no qual a relação de peso para peso da albumina para o cloreto de sódio presente na composição farmacêutica é entre cerca de 1 e cerca de 40 e a potência da toxina botulínica presente na composição farmacêutica é entre cerca de 24 unidades/ng e cerca de 60 unidades/ng.

36. Processo, para a fabricação de uma composição farmacêutica de toxina botulínica que tem uma potência dentre cerca de 30 a 40 unidades/ng e é adequado para administração a um ser humano, o processo compreendendo as etapas de :

(a) adicionar um complexo de toxina botulínica tipo A tendo uma potência dentre cerca de 30-40 unidades/ng para albumina e cloreto de sódio em uma relação de peso para peso de cerca de 1 a cerca de 40, para formar uma mistura;

(b) secagem a vácuo ou liofilização da mistura, e;

(c) reconstituir a mistura com solução salina normal, para desse modo obter uma composição farmacêutica de toxina botulínica tendo uma potência dentre cerca de 30 - 40 unidades/ng.

37. Método, para tratar uma condição terapêutica ou cosmética, o método compreendendo a etapa de administrar a um mamífero uma composição farmacêutica de toxina botulínica que tem uma potência de cerca de 40 unidades/ng.

FIG 1

Complexo de Neurotoxina Botulínica

- Composição do complexo
  - Proteína neurotóxica (cerca de 150 kD)
  - Pode conter proteínas de hemaglutinina não tóxica (NTHA) e não hemaglutinina não tóxica (NTNH)
- Tamanhos do complexo
  - 900 kD: somente tipo A
  - 55- kD: tipos A, B, C_1, D
  - 300 kD: tipos A, B, C_1, D, E, F

Complexo de 900 kD Tipo A

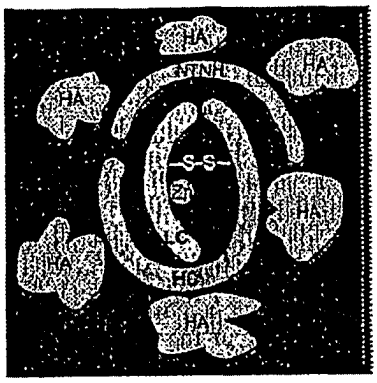


FIG 2

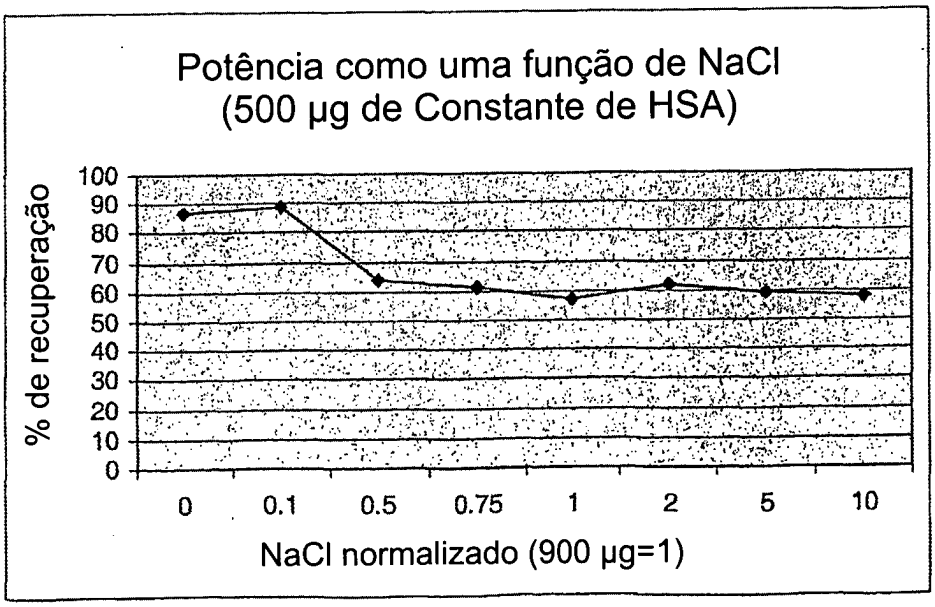
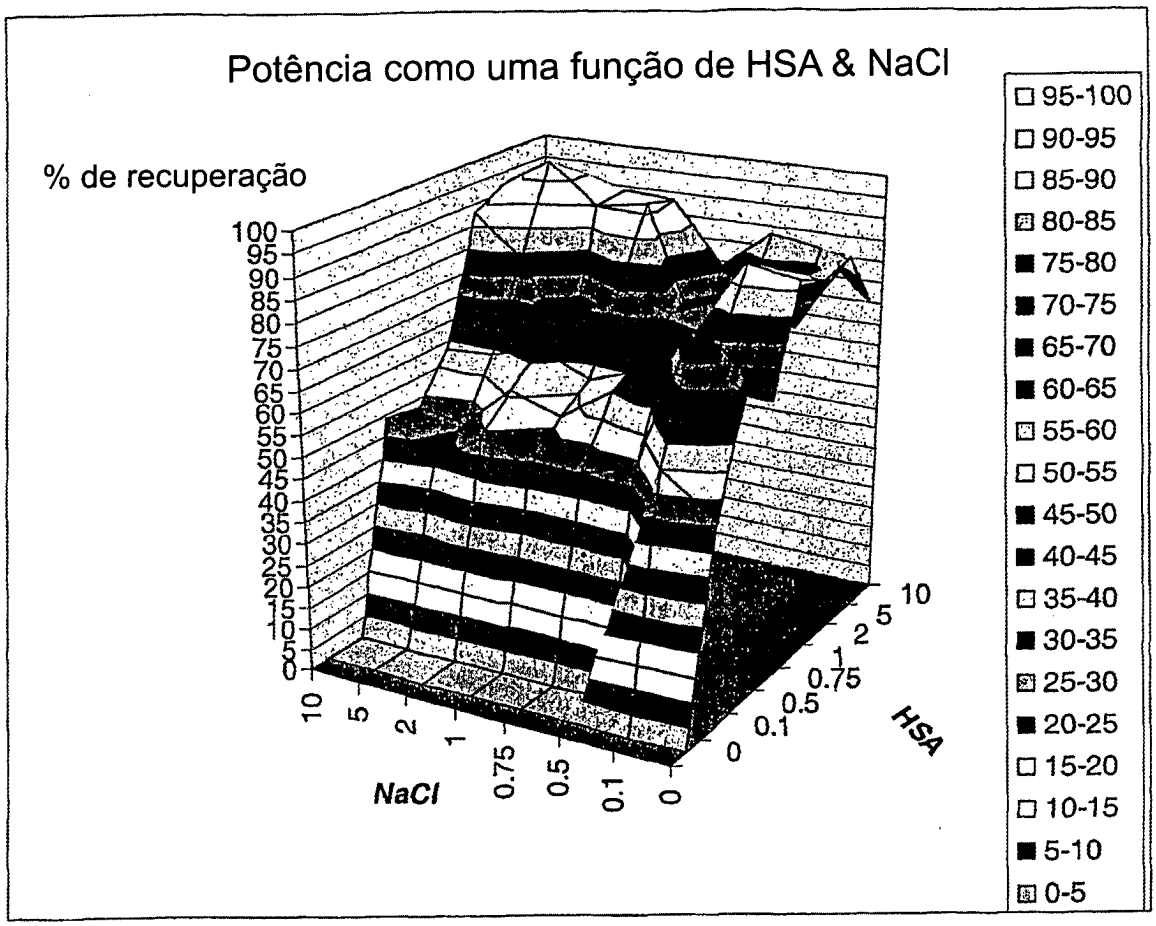


FIG 3


Potência como uma função de HSA & NaCl
% de recuperação
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
NaCl
10
5
2
1
0.75
0.5
0.1
0
HSA
10
5
2
1
0.75
0.5
0.1
0
95-100
90-95
85-90
80-85
75-80
70-75
65-70
60-65
55-60
50-55
45-50
40-45
35-40
30-35
25-30
20-25
15-20
10-15
5-10
0-5

PI 0614474-8

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES MELHORADAS DE TOXINA BOTULÍNICA".**

Uma composição farmacêutica de toxina botulínica de potência elevada que compreende dois excipientes (tal como, albumina e cloreto de sódio) em uma relação de peso para peso dentre cerca de 1 e cerca de 100.