



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119031902 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 26

(21) 申请号 202380033828.4

(22) 申请日 2023.02.14

(30) 优先权数据

22156843.9 2022.02.15 EP

22183172.0 2022.07.05 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/053647 2023.02.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/156389 EN 2023.08.24

(71) 申请人 莫茨药物股份两合公司

地址 德国

(72) 发明人 卡尔-海因茨·艾泽勒

克劳斯·芬克 哈罗德·V·泰勒

克劳迪娅·亚茨克

卡特娅·屈巴赫

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

专利代理师 刘明海 胡彬

(51) Int.Cl.

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 8/00 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01)

A61Q 19/10 (2006.01)

A61P 13/06 (2006.01)

(54) 发明名称

液体肉毒杆菌毒素制剂及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种液体制剂,其包含(i)肉毒杆菌毒素,(ii)人血清白蛋白(HSA),和任选的(iii)张力剂和/或(iv)缓冲剂。一方面,所述液体制剂的特征在于非常低的铁离子浓度。另一方面,液体制剂的特征在于不含或含有非常低浓度的色氨酸和/或N-乙酰基-色氨酸。根据本发明,所述液体制剂可以通过包括以下步骤的方法制备:将人血清白蛋白与螯合剂接触以获得混合物,并从所述混合物中去除所述螯合剂。此外,本发明涉及所述液体制剂在治疗适应症和美容病况的治疗中的用途。

1. 一种液体制剂,其包含

(i) 肉毒杆菌毒素和

(ii) 人血清白蛋白,

其中所述液体制剂包含浓度小于 $1\mu\text{M}$,优选小于 500nM ,更优选小于 250nM 的 Fe^{3+} 离子。

2. 一种液体制剂,其包含

(i) 肉毒杆菌毒素和

(ii) 人血清白蛋白,

其中所述液体制剂不含或含有不超过 $50\mu\text{M}$ 色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。

3. 一种液体制剂,其包含

(i) 肉毒杆菌毒素和

(ii) 人血清白蛋白,

其中所述液体制剂通过包括以下步骤的方法制备:

(a) 将人血清白蛋白与螯合剂接触以获得人血清白蛋白和螯合剂的混合物,和

(b) 从混合物中除去螯合剂。

4. 根据权利要求1所述的液体制剂,其中所述液体制剂通过包括以下步骤的方法制备:

(a) 将人血清白蛋白与螯合剂接触以获得人血清白蛋白和螯合剂的混合物,和

(b) 从混合物中除去螯合剂。

5. 根据权利要求3或4所述的液体制剂,其中,在步骤(a)中,将人血清白蛋白起始材料与螯合剂接触以获得所述人血清白蛋白起始材料和螯合剂的混合物,并且在步骤(b)中,从混合物中去除所述螯合剂以获得预处理的人血清白蛋白材料,并且在进一步的步骤(c)中,将肉毒杆菌毒素与所述预处理的人血清白蛋白材料混合,其中所述螯合剂优选通过透析、过滤、错流过滤或超滤去除,

或者

其中,在步骤(a)中,将包含肉毒杆菌毒素和人血清白蛋白的液体预制剂与螯合剂接触以获得所述液体预制剂和螯合剂的混合物,并且在步骤(b)中,从所述混合物中去除螯合剂,以获得液体制剂,其中所述螯合剂优选通过透析、过滤、错流过滤或超滤去除。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的液体制剂,其中所述人血清白蛋白以 0.001 到 $1.00\%\text{w/v}$ 的量存在于所述液体制剂中。

7. 根据权利要求2所述的液体制剂,其中所述液体制剂包含浓度小于 1000nM ,优选小于 500nM ,更优选小于 250nM 的 Fe^{3+} 离子。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的液体制剂,其中所述液体制剂还包含:

(iii) 张力剂,

或者其中所述液体制剂还包含:

(iii) 张力剂,其中所述张力剂以 $0.01-2.0\%\text{w/v}$ 的量存在于所述液体制剂中,

或者其中所述张力剂是氯化钠,或者其中所述张力剂是氯化钠并且以 $0.01-2.0\%\text{w/v}$ 的量存在于所述液体制剂中。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的液体制剂,其中所述液体制剂还包含:

(iv) 缓冲剂,

或者其中所述液体制剂还包含:

(iv) 缓冲剂,其中所述缓冲剂以1-100mM的浓度存在于所述液体制剂中,或者其中所述缓冲剂是氨基酸、磷酸盐或其混合物,或者其中所述缓冲剂是组氨酸,或者其中所述缓冲剂是组氨酸、磷酸盐或其混合物,并且所述组氨酸和磷酸盐以1-100mM的浓度存在于液体制剂中。

10. 用于制备根据权利要求2或7,或从属于权利要求2时的权利要求8和9任一项所述的液体制剂的方法,其中所述方法包括以下步骤:

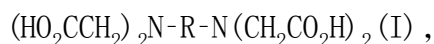
- 纯化人血清白蛋白起始材料以获得纯化的人血清白蛋白材料,
 - 将获得的纯化的人血清白蛋白与肉毒杆菌毒素和任选的其它组分混合以获得液体制剂,
- 或者
- 纯化包含肉毒杆菌毒素和人血清白蛋白的液体组合物以获得纯化的液体组合物,
 - 将获得的纯化的液体组合物与其他组分混合以获得液体制剂,其中优选通过对人血清白蛋白起始材料或包含肉毒杆菌毒素和人血清白蛋白的液体组合物进行透析、渗滤、超滤、离子交换层析、亲和层析、疏水相互作用层析、场流分级分离或沉淀(例如盐沉淀、乙醇沉淀)来进行纯化步骤。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述纯化步骤如下进行,或者其中所述纯化步骤另外包含以下步骤:

- 将人血清白蛋白起始材料与螯合剂接触以获得人血清白蛋白起始材料和螯合剂的混合物,和
- 从混合物中除去螯合剂以获得螯合剂-处理的纯化的人血清白蛋白材料,或者
- 将包含肉毒杆菌毒素和人血清白蛋白的液体组合物与螯合剂接触,以获得液体组合物和螯合剂的混合物,和
- 从混合物中除去螯合剂以获得螯合剂处理的纯化的液体制剂,其中方法(i)和(ii)中的接触步骤优选以使得所述螯合剂在混合物中的浓度为1mM至500mM的方式进行,和/或所述螯合剂的去除通过透析、错流过滤或超滤进行。

12. 根据权利要求3至6、8和9中任一项所述的液体制剂或根据权利要求10或11所述的方法,其中所述螯合剂选自由以下组成的组:具有三到六个羧酸官能团的氨基多羧酸、柠檬酸盐、吡啶、N,N,N',N'-四(2-吡啶基甲基)-1,2-乙二胺(TPEN)、三亚乙基四胺(TETA)及其混合物。

优选地,其中所述螯合剂是通式(I)的氨基多羧酸:



其中R不包含羧酸基团或包含一个或两个羧酸基团,所述氨基多羧酸优选选自由以下组成的组:乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇-双(b-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)、1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、三亚乙基四胺六乙酸(TTHA)及其混合物。

13. 根据权利要求1-9和12中任一项所述的液体制剂或根据权利要求10或11所述的方法,其中所述肉毒杆菌毒素为肉毒杆菌神经毒素络合物,或其中所述肉毒杆菌毒素为不含络合蛋白的肉毒杆菌神经毒素,或其中所述肉毒杆菌毒素为血清型A的肉毒杆菌毒素,或其中所述肉毒杆菌毒素为不含络合蛋白的血清型A的肉毒杆菌神经毒素,或其中所述肉毒杆

菌毒素为血清型A的肉毒杆菌毒素且以1-1000U/ml的浓度存在,或其中所述肉毒杆菌毒素为不含络合蛋白的血清型A的肉毒杆菌神经毒素且以1-1000U/ml的浓度存在,或者其中所述液体制剂的pH在5.0-8.0的范围内。

14.根据权利要求1-9、12和13中任一项所述的液体制剂,其用于治疗,尤其用于治疗神经肌肉疾病、疼痛、流涎、多汗症、泌尿系统障碍和神经系统障碍。

15.根据权利要求1-9、12和13中任一项所述的液体制剂用于治疗美容病况的美容用途。

液体肉毒杆菌毒素制剂及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种液体制剂,其包含(i)肉毒杆菌毒素,(ii)人血清白蛋白(HSA),和任选的(iii)张力剂和/或(iv)缓冲剂。该液体制剂的特征在于铁浓度非常低和/或色氨酸和/或N-乙酰基-色氨酸不存在或浓度非常低。本发明还涉及一种液体制剂,其通过包括以下步骤的方法制备:将人血清白蛋白与螯合剂接触以获得混合物,并从混合物中除去螯合剂。此外,本发明涉及液体制剂在治疗适应症和美容病况的治疗中的用途。

背景技术

[0002] 肉毒杆菌神经毒素(BoNT或肉毒杆菌毒素(BT))是细菌神经毒素的一个家族,其被广泛用于治疗越来越多的神经、医学和美容病况。有八种被广泛接受的“经典”BoNT血清型,命名为BoNT/A-H。目前临床使用的有两种血清型,A型(BoNT/A)和B型(BoNT/B)。BoNT由梭菌属物种(*Clostridium* spp.),特别是肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)产生,以高分子量(高达~900kDa)络合物的形式存在。这些毒素络合物由活性150kDa的神经毒素和多种络合蛋白(无毒神经毒素相关蛋白,NAP)组成。

[0003] 150kDa神经毒素被合成为一种无活性的单链多肽(~150kDa),其被蛋白水解切割成通过链间二硫键连接的轻链(LC,~50kDa)和重链(HC,100kDa)。HC包含介导与受体结合的C-末端结构域和介导LC跨内体膜转位的N-末端结构域。LC在神经元中充当蛋白酶并切割神经SNARE蛋白。这阻止了突触小泡与质膜的融合,从而抑制了选定神经元的神经递质释放。

[0004] BoNT的配制非常具有挑战性,因为其结构复杂且所用的产品浓度低。BoNT极易受各种条件的影响,如热和碱性pH。因此,由于BoNT只有在其结构完整的情况下才有功能,所以制备BoNT的医学剂型的挑战是配制一种组合物,该组合物在产品的生产、储存或使用过程中保护BoNT免于失活或部分丧失生物活性。另一个问题是BoNT的药物制剂包含极少量的高效力毒素(人类致死剂量为约0.1至1ng/kg),每瓶仅约1ng。这加剧了由于表面变性导致的毒素活性丧失的问题。此外,BoNT的制剂用于广泛的不同应用,因此必须与注射到非常不同类型的组织中相容,例如肌肉、不同的皮肤层(例如真皮、皮下组织)或腺体(例如唾液腺)。

[0005] 鉴于以上所述,目前可用的主要BoNT产品是以冻干粉末的形式提供的,即在2-8°C甚至室温下储存时长期稳定的形式(例如**Xeomin®**)。冻干形式的BoNT/A络合物于1989年(**Botox®**,Allergan)和1991年(**Dysport®**,Ipsen)首次上市。在2005年,不含络合蛋白的纯150kDa BoNT/A神经毒素的第一个稳定剂型被批准(**Xeomin®**;Merz制药公司)。然而,这些冻干产品需要在使用前重新配制,这一过程可能导致剂量误差和无菌问题。因此,已经进行了大量的努力来开发BoNT的液体制剂,其使用更方便并且可以容易地施用。

[0006] BoNT的第一个液体制剂于2000年获得批准,并于2001年作为**Neurobloc®**在欧洲上市。**Neurobloc®**(Eisai)是BoNT/B络合物的无菌溶液,配制在含有琥珀酸二钠、氯化钠、

人血清白蛋白 (HSA)、辛酸钠和N-乙酰基-色氨酸钠的缓冲液中。然而,由于其酸性pH值,该产品在注射时可能会有疼痛。对于BoNT/A,迄今为止只有两种液体制剂获得了市场批准: **Innotox[®]** (Medytox),但仅限于亚洲国内市场(例如,韩国,2013年批准),以及 **Alluzience[®]** (Ipsen/Galderma),2021年批准在欧洲使用。这两种液体制剂都含有BoNT/A毒素络合物,并且除了水之外,还含有氯化钠、去污剂 (**Innotox[®]**: polysorbate 20; **Alluzience[®]**: 聚山梨醇酯80),氨基酸 (**Innotox[®]**: 蛋氨酸; **Alluzience[®]**: 组氨酸) 和另外的赋形剂 (**Innotox[®]**: 磷酸钠作为缓冲剂; **Alluzience[®]**: 蔗糖)。

[0007] 尽管在液体肉毒杆菌毒素制剂的制备方面取得了这些进展,但是仍然需要稳定的肉毒杆菌毒素液体制剂,特别是仍然需要新的选择来开发在运输和储存期间稳定的即用型肉毒杆菌毒素液体制剂。

[0008] 本发明的目的

[0009] 因此,本发明的一个目的是提供适用于美容和治疗应用的稳定的肉毒杆菌毒素液体制剂。

发明内容

[0010] 本发明基于令人惊讶的发现,即通过与螯合剂如EDTA一起孵育,然后除去螯合剂而预处理的人血清白蛋白 (HSA) 能够制备肉毒杆菌毒素的液体制剂,其不仅表现出优异的储存稳定性,而且表现出优异的和改善的光稳定性。此外,本发明基于令人惊讶的发现,即铁离子,特别是 Fe^{3+} 离子,对含有HSA的液体肉毒杆菌毒素制剂的光稳定性具有有害影响。

[0011] 此外,本发明基于色氨酸和N-乙酰基-色氨酸降低含有人血清白蛋白 (HSA) 的液体肉毒杆菌毒素制剂的光稳定性的惊人发现。这一发现非常令人惊讶,因为市售的HSA产品除了水和氯化钠之外,通常含有辛酸钠和N-乙酰基-色氨酸,以在高温下稳定HSA,它们以这种方式进入肉毒杆菌毒素制剂。这也是令人惊讶的,因为色氨酸被描述为肉毒杆菌毒素的稳定化添加剂(参见,例如,EP 3 679946)。

[0012] 因此,第一方面,本发明提供了一种液体制剂,其包含:

[0013] (i) 肉毒杆菌毒素和

[0014] (ii) 人血清白蛋白 (HSA),

[0015] 其中所述液体制剂包含浓度小于 $1\mu\text{M}$,优选小于 500nM ,更优选小于 250nM ,最优选小于 100nM 的 Fe^{3+} 离子。

[0016] 具有例如小于 $1\mu\text{M}$ 的低 Fe^{3+} 浓度的液体肉毒杆菌毒素制剂可通过包括以下步骤的方法来制备: 步骤(a) 将人血清白蛋白与螯合剂接触以获得人血清白蛋白和螯合剂的混合物,以及步骤(b) 从混合物中除去螯合剂。

[0017] 第二方面,本发明提供了一种液体制剂,其包含:

[0018] (i) 肉毒杆菌毒素和

[0019] (ii) 人血清白蛋白 (HSA),

[0020] 其中所述液体制剂不含色氨酸和N-乙酰基-色氨酸,或者含有不超过 $50\mu\text{M}$,优选不超过 $20\mu\text{M}$,更优选不超过 $10\mu\text{M}$,还更优选不超过 $1\mu\text{M}$,最优选 $0\mu\text{M}$ 的色氨酸和N-乙酰基-色氨酸 (Trp和N-AcTrp的总浓度)。

[0021] 根据本发明第一和第二方面的液体制剂优选还包含(iii)张力剂,特别是氯化钠,和(iv)缓冲剂,特别是组氨酸缓冲剂、磷酸盐缓冲剂或其混合物。不含或仅含极低浓度色氨酸和/或N-乙酰基-色氨酸的液体肉毒杆菌毒素制剂可通过用诸如透析的方法纯化HSA起始材料并在本发明液体制剂的制剂中使用纯化的HSA起始材料来制备。

[0022] 第三方面,本发明提供了一种液体制剂,其包含:

[0023] (i) 肉毒杆菌毒素和

[0024] (ii) 人血清白蛋白(HSA),

[0025] 其中所述人血清白蛋白通过包括以下步骤的方法制备:

[0026] (a) 将人血清白蛋白与螯合剂接触以获得人血清白蛋白和螯合剂的混合物,和

[0027] (b) 从混合物中除去螯合剂。

[0028] 接触步骤(a)优选通过将螯合剂(例如,EDTA)加入到包含HSA的组合物(例如,HSA溶液)中,并将所得混合物孵育预定时间,任选随后对含有螯合剂(例如,EDTA)的缓冲液进行透析来进行。在步骤(b)中,螯合剂通过任何合适的方法(例如通过透析)除去。

[0029] 此外,根据本发明第三方面的液体制剂优选还包含(iii)张力剂,特别是氯化钠,和/或(vi)缓冲剂,特别是组氨酸缓冲剂、磷酸盐缓冲剂或其混合物。

[0030] 第四方面,本发明涉及制备根据本发明第二方面的液体制剂的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0031] -纯化人血清白蛋白起始材料以获得纯化的人血清白蛋白材料,例如通过对人血清白蛋白起始材料进行透析、渗滤、超滤、离子交换层析、亲和层析、疏水相互作用层析或场流分馏,优选透析,

[0032] -将获得的纯化的人血清白蛋白与肉毒杆菌毒素和任选的其它组分混合以获得液体制剂,

[0033] 根据本发明第四方面的替代方法包括以下步骤:

[0034] -纯化包含肉毒杆菌毒素和人血清白蛋白的液体组合物以获得纯化的液体组合物,例如通过对包含肉毒杆菌毒素和人血清白蛋白的液体组合物进行透析、渗滤、超滤、离子交换层析、亲和层析、疏水相互作用层析或场流分馏,优选透析,

[0035] -将获得的纯化的液体组合物与其他组分混合,以获得液体制剂。

[0036] 第五方面,本发明涉及用于治疗的根据本发明的液体制剂,特别是用于治疗神经肌肉疾病、疼痛、流涎、多汗症、泌尿系统疾病和神经系统疾病。

[0037] 第六方面,本发明涉及本发明的液体制剂的美容(美学)用途,用于治疗美容病况,优选皮肤病况,特别是用于治疗皮肤纹理或褶皱或皱纹。

[0038] 第七方面,本发明提供一种治疗疾病或病况的方法,包括给有需要的人施用有效量的本发明的液体制剂。

[0039] 在所附权利要求中阐述了根据本发明的液体制剂、其用途和使用方法的优选实施方案。

[0040] 通过参考本发明的以下具体实施方式和其中包括的实施例,可以更容易地理解本发明。

具体实施方式

[0041] 本发明基于意想不到的发现,即在液体肉毒杆菌毒素制剂的制剂中使用预处理的人血清白蛋白(HSA)导致光敏感性降低,从而导致光稳定性提高。此外,出乎意料地发现,通过螯合剂处理然后透析获得的非常少量的铁离子(Fe^{3+} 离子)显著增加了含有人血清白蛋白(HSA)的液体肉毒杆菌毒素制剂的光敏感性。这是令人惊讶的,因为铁是相对常见和普遍存在的,此外,发现其他金属离子如铜、钴或镍不显示这种不稳定作用。

[0042] 此外,本发明基于意想不到的发现,即色氨酸和/或N-乙酰基-色氨酸损害含人血清白蛋白(HSA)的液体肉毒杆菌毒素制剂的光稳定性(光稳定性)。具体而言,发现通过螯合剂处理和随后的透析从常规HSA产品中去除N-乙酰基-色氨酸,导致含有HSA的肉毒杆菌毒素液体制剂具有改善的光稳定性。

[0043] 与粉末形式的冻干肉毒杆菌毒素制剂相比,本发明的液体制剂有利地提供了改善的安全性和剂量准确性,因为该制剂不需要在注射前重构,而是即用型的,并且可以例如以预填充注射器的形式使用。此外,液体制剂的优异稳定性促进和简化了运输和储存以及医生的操作。特别地,本发明的液体制剂的优异的光稳定性简化了制造过程,允许产品在没有大量避光保护的情况下被填充和包装,并且减少了由于使用前在医生处暴露在光下储存而导致的潜在的活性损失。此外,本发明的液体制剂不含导致注射疼痛加剧的物质,从而增加了医生和患者对该制剂的接受度,特别是在美容领域。

[0044] 不受理论的束缚,据信本发明制剂的光敏感性与用于制备液体肉毒杆菌毒素制剂的HSA中包含的物质如N-乙酰基-色氨酸和 Fe^{3+} 有关。然而,去除这些物质如何增加HSA对于肉毒杆菌毒素对光的稳定能力的确切机制仍然不清楚。

[0045] 如本文所用,术语“包含”,和术语“包括”、“含有”,及其任何变体,如“包含”、“包括”和“含有”一样,旨在表示非排他性的包括,使得包含、包括或含有一种元素或一系列元素的工艺、方法、通过工艺获得的产品、组合物或制剂不仅包括那些元素,还可以包括没有明确列出的用于这样的工艺、方法、通过工艺获得的产品、组合物或制剂的其它元素。此外,在本发明的框架内,意图是术语“包含”、“包括”、“含有”及其任何变体中的每一个都可以由术语“由...组成”或其任何变体(例如,“基本上由...组成”)来代替,这将被理解为指代所指示的元素的排他性包括。

[0046] 在本发明的上下文中使用的术语“一”和“一个”和“该”以及类似的引用应被解释为涵盖单数和复数,因此,也可涉及“至少一个”或“多于一个”,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾。

[0047] 本文所用术语“液体制剂”或“液体肉毒杆菌毒素制剂”通常指水性制剂,通常是水性溶液。在本文中,术语“液体制剂”可以与“液体组合物”互换使用。液体制剂通常是药学上可接受的液体制剂,或者换句话说,是液体药物制剂。本发明的液体制剂通常具有5.0-8.0,特别是5.5-7.5,优选5.5-7.0或6.0-7.5,更优选6.0-7.0,最优选6.0-6.5的pH值。

[0048] 本文使用的术语“药学上可接受的”是指当给予人类患者或受试者时,液体制剂不会引起不可接受的不良反应。即,这意味着液体制剂适合人类使用。水性溶液可以是缓冲溶液,有或没有盐溶液,并且可以是生理盐溶液,例如缓冲(例如,磷酸盐和/或组氨酸缓冲)生理盐溶液。

[0049] 本文预期本发明的液体制剂可以储存在任何合适的容器系统中。用于储存本发明

的液体制剂的合适的容器系统是具有部分或完全封闭的空间的任何装置,该空间可以是密封的或被密封的,并且可以用于容纳、储存和/或运输液体制剂。容器系统优选是由玻璃或塑料(例如,有机聚合物)制成或部分或主要由玻璃或塑料制成的封闭(或密封)容器,并且包括例如以下形式的容器:(i)注射器,(ii)小瓶,(iii)卡普耳,或(iv)安瓿。在本发明的一个优选实施方案中,如本领域已知的,液体制剂以预填充注射器的形式储存在注射器中。

[0050] 本文所用术语“肉毒杆菌毒素”没有特别限制,包括任何血清型(BoNT/A-G)的肉毒杆菌毒素。例如,所述肉毒杆菌毒素可以是血清型A或B(BoNT/A,BoNT/B)。优选地,肉毒杆菌毒素是血清型A,更优选血清型A1(BoNT/A1),最优选由肉毒杆菌Ha11菌株产生的BoNT/A1。此外,所述肉毒杆菌毒素可以是可从细菌肉毒杆菌获得的天然神经毒素或任何其它肉毒杆菌毒素,例如可从替代来源获得的肉毒杆菌毒素,包括重组技术和遗传或化学修饰。

[0051] 此外,如本文所用,术语“肉毒杆菌毒素”(“BT”)和同义术语“肉毒杆菌神经毒素”(“BoNT”)是指纯肉毒杆菌神经毒素和/或其任何络合物,即纯肉毒杆菌神经毒素和络合蛋白的任何络合物(称为“毒素络合物”),除非另有规定或上下文另有说明。优选地,在本发明的框架内,肉毒杆菌毒素是不含络合蛋白的肉毒杆菌神经毒素,更优选不含血清型A的络合蛋白的肉毒杆菌神经毒素。

[0052] 本文所用的术语“纯肉毒杆菌神经毒素”是指不含络合蛋白的肉毒杆菌神经毒素(有时也称为“神经毒性成分”),或者更准确地说,是指不含神经毒素相关络合蛋白(NAPs)的肉毒杆菌神经毒素。纯肉毒杆菌神经毒素是最终抑制乙酰胆碱释放的(活性)神经毒性多肽。它是一种双链蛋白,包含通过二硫键结合在一起的轻链(LC;约50kDa)和重链(HC;约100kDa)。因此,活性神经毒性多肽在本文中也可称为“150kDa神经毒素”、“肉毒杆菌神经毒素(150kD)”或“神经毒性成分”。

[0053] 本文所用的术语“毒素络合物”是指所述神经毒性成分和一组络合蛋白(NAP)的高分子络合物。特别地,术语“毒素络合物”包括900kDa、500kDa和300kDa的A型肉毒杆菌毒素络合物。所述络合蛋白是无毒的非血凝素(NTNHA),在A-D血清型菌株中是不同的血凝素(HA)。例如,900kDa络合物包含在onabotulinumtoxin A中(**Botox®/Vistabel®**, Allergan, Inc., Irvine, CA, USA)。此外,**Dysport® (Azzalure®)**, Ipsen, 法国巴黎)、**Alluzience®** (Ipsen/Galderma)和**Innotox®** (Medytox)中含有作为活性剂的毒素络合物。也就是说,包含在**Botox®**、**Dysport®**、**Alluzience®**和**Innotox®**中的毒素络合物是本发明意义上的毒素络合物,因此是根据本发明的“肉毒杆菌毒素”。根据本发明,肉毒杆菌毒素可以1-1000U/ml的范围,优选以10-200U/ml的范围,更优选以20-150U/ml的范围,最优选以50U/ml-100U/ml的范围存在于本发明的液体制剂中。

[0054] 本文所用术语“单位”或“U”是指毒素的生物活性(生物效价),涉及对50%受试小鼠致死的剂量(LD₅₀)。更具体地说,在本发明的上下文中,除非另有说明,LD₅₀是用小鼠生物测定法(MBA)测量的。MBA确定小鼠腹膜内注射后毒素/神经毒素的平均致死剂量(LD₅₀),即能够杀死一组小鼠的50%的毒素/神经毒素的剂量。在此基础上,如本文所用,1单位(U)的毒素/神经毒素定义为一个小鼠LD₅₀(1.0LD₅₀=1.0U)。

[0055] LD₅₀小鼠生物测定法是肉毒杆菌毒素的各种生物、化学或免疫学检测方法中的金标准,并且是本领域技术人员已知的(参见,例如,Pearce, L.B.; Borodic, G.E.; First,

E.R.;MacCallum,R.D.Measurement of botulinum toxin activity:Evaluation of the lethality assay.Toxicol.Appl.Pharmacol.1994,128:69-77)。本领域技术人员将能够根据血清型和预期用途确定合适的肉毒杆菌毒素浓度。或者,也可使用基于细胞的测定来确定肉毒杆菌毒素活性,如W0 2009/114748、W0 2013/049508或W02014/207109中所述。本领域技术人员将能够通过使用LD₅₀参照标准进行校准,将基于细胞的测定获得的肉毒杆菌毒素活性结果与小鼠LD₅₀测定获得的结果相关联。

[0056] 由于商业肉毒杆菌毒素制剂制造商使用的LD₅₀试验存在差异,制造商为其商业肉毒杆菌毒素制剂标明的单位效价是专有的,不容易进行比较。因此,在本发明的框架内,下面提供的转换率用于建立incobotulinumtoxinA(“INCO”;**Xeomin®**, **Bocouture®**;肉毒杆菌毒素血清型A,不含络合蛋白;Merz Pharmaceuticals GmbH)、onabotulinumtoxinA(“ONA”;**Botox®**, **Vistabel®**;血清型A的肉毒杆菌毒素络合物;Allergan Inc.)、abobotulinumtoxinA(“ABO”;**Dysport®**, **Azzalure®**;血清型A的肉毒杆菌毒素络合物;Medicis Pharmaceutical Corp.,Galderma Lab.)、rimabotulinumtoxinB(“RIM”;**Myobloc®**, **NeuroBloc®**;肉毒杆菌毒素血清型B;Solstice Neurosciences Inc.)和**PurTox®**(“TBD”;肉毒杆菌毒素血清型A;Mentor Worldwide LLC)的相对效价。在本文中,ONA和INCO的转换率为1:1.ONA/INCO:ABO的转换率为1:2.5.ONA/INCO:RIM的转换率为1:50,ONA/INCO:TBD的转换率为1:1.5。此外,在本发明的范围内,1U的INCO(**Xeomin®**)和1U的onabotulinumtoxinA(“ONA”;**Botox®**)应被视为对应于按上述方法测量的一只小鼠LD50(1.0LD50),或1U。

[0057] 如本文所用,术语“人血清白蛋白”或其缩写“HSA”是指供体HSA(来源于人血液,或更准确地说,来源于人血浆的HSA)和重组HSA。优选地,人血清白蛋白是供体HSA。在本发明中,人血清白蛋白(HSA)作为稳定蛋白。如本文所用,术语“稳定蛋白”通常指导致肉毒杆菌毒素稳定性增加的多肽。根据本发明,HSA可以0.001-2.0%w/v的量,优选0.001-1.00%w/v的量,更优选0.01-0.5%w/v的量,还更优选0.02-0.3%w/v的量,最优选0.03-0.15%w/v的量存在于液体制剂中。

[0058] 第一方面,本发明涉及一种液体制剂,其包含:

[0059] (i) 肉毒杆菌毒素和

[0060] (ii) 人血清白蛋白,

[0061] 其中所述液体制剂包含浓度小于1μM的Fe³⁺离子

[0062] 优选地,液体制剂中的Fe³⁺浓度小于1000nM、小于750nM、小于500nM或小于250nM,更优选地,液体制剂中的Fe³⁺浓度小于200nM、小于150nM或小于100nM,特别优选地,液体制剂中的Fe³⁺浓度小于50nM或小于10nM,最优选地,液体制剂中的Fe³⁺浓度小于1nM、小于100pM、小于10pM或小于1pM。

[0063] 金属离子(例如Ca²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺或Fe³⁺)的浓度可以通过本领域技术人员已知的测量方法来确定,例如原子吸收光谱(AAS)、电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)和电感耦合等离子体原子发射光谱(ICP-AES)(也称为电感耦合等离子体光发射光谱(ICP-OES))。优选地,ICP-MS或ICP-OES,特别是ICP-OES,可用于测量金属离子的浓度(另见Second Supplement to USP38-NF 33,Chemical Tests/<233>Elemental Impurities-Procedure

1 (ICP-OES) and Procedure 2 (ICP-MS), 2015)。

[0064] 不囿于理论,据信用于制备本发明液体制剂的HSA材料,特别是来自含有大量铁离子的人血的供体HSA,含有大量的 Fe^{3+} 离子,这是未纯化的(未处理的)HSA的光敏诱导特性的原因——至少部分原因。

[0065] 除了上述优点之外,本发明的这一方面在制造工艺和新配方的开发中也是有利的。例如,设备(例如容器)和材料(例如赋形剂)可以这样选择,使得最终产品中存在尽可能少的铁。

[0066] 具有低 Fe^{3+} 浓度的本发明的液体肉毒杆菌毒素制剂可以通过包括以下步骤的方法来制备,(a)将人血清白蛋白与螯合剂接触以获得人血清白蛋白和螯合剂的混合物,以及步骤(b)从混合物中除去螯合剂。

[0067] 优选地,制备根据本发明第一方面的液体制剂的方法与结合本发明第三方面描述的方法相同。此外,根据本发明第一方面的液体制剂可以具有与根据本发明第三方面的液体制剂相同的组成。因此,除非另有明确说明,对根据本发明第三方面的液体制剂给出的所有解释、评论、公开、定义等同样适用于根据本发明第一方面的液体制剂。

[0068] 第二方面,本发明涉及一种液体制剂,其包含:

[0069] (i) 肉毒杆菌毒素和

[0070] (ii) 人血清白蛋白,其中所述液体制剂不含或含有不超过 $50\mu\text{M}$ 色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。

[0071] 本文所用术语“不含”色氨酸和N-乙酰基-色氨酸是指液体制剂不含或完全不含色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。具体而言,这意味着该制剂不含添加的色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。或者,这意味着液体制剂中色氨酸和N-乙酰基-色氨酸的浓度为 $0\mu\text{M}$ (即,根据四舍五入的一般规则 $<0.5\mu\text{M}$),特别是 $\leq 0.1\mu\text{M}$ 或 $\leq 0.01\mu\text{M}$ 或 $\leq 0.001\mu\text{M}$,更特别是 0nM (即,根据四舍五入的一般规则 $<0.5\text{nM}$)。如本文所用,术语“含有不超过……”色氨酸和N-乙酰基-色氨酸是指色氨酸和N-乙酰基-色氨酸的总量可以是 $\leq 50\mu\text{M}$,优选 $\leq 20\mu\text{M}$,更优选 $\leq 10\mu\text{M}$,还更优选 $\leq 1\mu\text{M}$,还更优选 $\leq 0.1\mu\text{M}$,最优选 $\leq 0.01\mu\text{M}$ 或 $\leq 0.001\mu\text{M}$ 。因此,如本文所用,术语“不含或含有不超过……”,是指液体制剂中色氨酸和N-乙酰基-色氨酸的总量在 $0\mu\text{M}$ 和X之间或在 0nM 和X之间,其中X是 $50\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 、 $0.01\mu\text{M}$ 和 $0.001\mu\text{M}$ 。

[0072] 氨基酸色氨酸和N-乙酰基-色氨酸的浓度可以通过各种技术(例如,DC、HPLC、LC-MS、GC-MS、CE等)来测定。例如,N-乙酰基-色氨酸可以通过使用如Nelis等人(Nelis等人, J. Chromatogr., 1985, 333(2): 381-387)所述的反相柱上的液相色谱进行分离和280nm处的UV检测来测定,或通过如Yu和Finlayson(Yu, M. W. 和Finlayson, J. S., J. Pharm. Sci., 1984, 73(1): 82-86)所述的基于蛋白质沉淀后剩余的酸溶性部分的紫外分光光度测定的方法来测定。色氨酸可以例如使用如Wentao等人(Wentao et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 401: 3249-3261)所述的涉及液相色谱-串联质谱法的方法定量测定。

[0073] 本文所用术语“色氨酸”是指L-色氨酸、D-色氨酸或L-色氨酸和D-色氨酸的混合物(D/L-色氨酸)。同样,本文使用的术语“N-乙酰基-色氨酸”是指N-乙酰基-L-色氨酸、N-乙酰基-D-色氨酸或N-乙酰基-L-色氨酸和N-乙酰基-D-色氨酸的混合物(N-乙酰基-D/L-色氨酸)。

[0074] 用于制备液体制剂的人血清白蛋白优选是含有不超过50mM,更优选不超过20mM或10mM,还更优选不超过1mM或0.1mM,最优选不超过0.01nM或0mM色氨酸和N-乙酰基-色氨酸的人血清白蛋白材料。

[0075] 据悉,市售的HSA产品都含有大量的N-乙酰基-色氨酸(>10mM)。因此,在用于配制本发明的液体制剂之前,需要对这些产品进行纯化,以将N-乙酰基-色氨酸的量降低至所需水平。下文结合本发明的第四方面详细描述了制备“纯化的HSA”的合适方法。简而言之,不含或含少量色氨酸和N-乙酰基-色氨酸的人血清白蛋白(在本文中也称为“纯化的HSA”)可通过对人血清白蛋白起始材料进行透析、渗滤、超滤、离子交换层析、亲和层析、疏水作用层析、场流分级分离或沉淀(例如盐沉淀、乙醇沉淀),从而除去色氨酸和/或N-乙酰基-色氨酸来获得。

[0076] 根据本发明,本发明的液体制剂,例如根据本发明的第一、第二和/或第三方面的液体制剂,可以还包含以下更详细描述(iii)张力剂和(iv)缓冲剂中的一种或两种,特别是与根据本发明的第三方面的液体制剂相关。

[0077] 此外,本文还预期根据本发明第二方面的液体制剂优选包含浓度小于1000nM的 Fe^{3+} 离子。具体地,液体制剂中的 Fe^{3+} 浓度优选小于750nM、小于500nM或小于250nM,更优选地,液体制剂中的 Fe^{3+} 浓度小于200nM、小于150nM或小于100nM,特别优选地,液体制剂中的 Fe^{3+} 浓度小于50nM或小于10nM,最优选地,液体制剂中的 Fe^{3+} 浓度小于1nM、小于100pM、小于10pM或小于1pM。

[0078] 如上所述,还发现 Fe^{3+} 离子降低了肉毒杆菌毒素的光稳定性,因此增加了色氨酸和N-乙酰基-色氨酸的去稳定作用。据信用于制备本发明液体制剂的HSA材料,特别是来自人血的供体HSA,含有大量的 Fe^{3+} 离子,这导致未纯化(未处理)的HSA的光稳定性降低。为了获得尽可能低的 Fe^{3+} 浓度,设备(例如容器)和材料(例如赋形剂)的选择应使得最终产品中存在尽可能少的铁,例如通过选择由不含铁的材料如聚丙烯或聚碳酸酯制成的容器。

[0079] 金属离子(例如, Fe^{3+} 和 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+})的浓度可以通过本领域技术人员已知的和上文公开的测量方法来确定。

[0080] 本发明的液体肉毒杆菌毒素制剂的低 Fe^{3+} 含量可通过结合本发明的第四方面详细描述的方法实现,特别是通过包括将人血清白蛋白与螯合剂接触,然后如本文所述除去螯合剂的方法。

[0081] 根据本发明,除非另有说明或意图,所述液体制剂可还包含一种或多种其它的药学上可接受的赋形剂。例如,所述液体制剂可以包含甘油、蔗糖、乳糖、甘露醇、葡聚糖、透明质酸、聚乙烯吡咯烷酮、乳酸、柠檬酸、氨基酸(除色氨酸和N-乙酰基-色氨酸之外)、苯甲醇、利多卡因、明胶、羟乙基淀粉(HES)、聚环氧乙烷和聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80)中的一种或多种。其它合适的药学上可接受的赋形剂包括本领域熟知的那些,参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania。

[0082] 然而,本文还预期本发明的液体制剂特别缺乏某些组分(即化合物、材料或物质),例如螯合剂和/或磷酸盐、去污剂、多糖、氨基酸、稳定肽等,包括其任何组合。如本文所用,术语“去污剂”与“表面活性剂”同义,旨在包括非离子和离子去污剂。本文使用的术语“稳定肽”通常指由5至50个氨基酸组成的肽,例如10至40个氨基酸或15至30个氨基酸的肽。因此,

术语“稳定肽”不包括HSA。

[0083] 在一个实施方案中,本发明的液体制剂不含去污剂,特别是不含聚山梨醇酯,更特别是不含聚山梨醇酯20和/或聚山梨醇酯80。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含藻酸盐。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含琥珀酸盐。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含一种或多种(例如2、3、4或5种)选自精氨酸、谷氨酸、蛋氨酸、色氨酸和丝氨酸组成的组的氨基酸。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含糖类,例如单糖、寡糖或多糖或其混合物。特别地,本发明的液体制剂可以不包含一种或多种(例如,2、3或4种)蔗糖、乳糖、麦芽糖和海藻糖。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含螯合剂,特别是本文结合本发明描述的那些,和/或磷酸盐。在本发明中还考虑了液体制剂缺少一种以上或全部上述化合物。

[0084] 在一个实施方案中,本发明的液体制剂缺少(i)去污剂和单糖、寡糖和多糖,(ii)去污剂和任何氨基酸,或去污剂和除组氨酸外的所有氨基酸,(iii)去污剂和稳定肽,(iv)单糖、寡糖和多糖和任何氨基酸,或单糖、寡糖和多糖和除组氨酸外的所有氨基酸,(v)单糖、寡糖和多糖和稳定肽,(vi)任何氨基酸和稳定肽,或除组氨酸外的所有氨基酸和稳定肽,(vii)去污剂,单糖、寡糖和多糖以及任何氨基酸,或去污剂,单糖、寡糖和多糖以及除组氨酸之外的所有氨基酸,(viii)去污剂,单糖、寡糖和多糖,以及稳定肽,(ix)去污剂,任何氨基酸,以及稳定肽,或去污剂,除组氨酸之外的所有氨基酸,以及稳定肽,(x)单糖、寡糖和多糖,任何氨基酸,以及稳定肽,或单糖、寡糖和多糖,除组氨酸之外的所有氨基酸,以及稳定肽,(xi)去污剂,单糖、寡糖和多糖,任何氨基酸和稳定肽,或去污剂,单糖、寡糖和多糖,除组氨酸外的所有氨基酸,和稳定肽。

[0085] 在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含除组氨酸之外的任何其他氨基酸。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含任何单糖、二糖和三糖。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含除HSA以外的任何其它稳定肽或蛋白质。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含磷酸盐,如磷酸盐缓冲液形式的磷酸盐。

[0086] 在其它实施方案中,本发明的液体制剂缺少(i)琥珀酸盐和去污剂(例如,聚山梨醇酯),(ii)琥珀酸盐和甲硫氨酸,(iii)琥珀酸盐和蔗糖,(iv)去污剂(例如,聚山梨醇酯)和甲硫氨酸,(v)去污剂(例如,聚山梨醇酯)和蔗糖,(vi)甲硫氨酸和蔗糖,(vii)琥珀酸盐,去污剂(例如,聚山梨醇酯)和甲硫氨酸,(xiii)琥珀酸盐,去污剂(例如,聚山梨醇酯)和蔗糖,(ix)琥珀酸盐,甲硫氨酸和蔗糖,(x)去污剂(例如,聚山梨醇酯)、甲硫氨酸和蔗糖,以及(xi)琥珀酸盐、去污剂(例如,聚山梨醇酯)、甲硫氨酸和蔗糖,(xii)去污剂(例如,聚山梨醇酯)和组氨酸,(xiii)去污剂(例如,聚山梨醇酯)、组氨酸和蔗糖)。

[0087] 此外,缺少一种或多种组分(即化合物、材料或物质)的本发明的任何液体制剂可以还缺少螯合剂,特别是本文所述的螯合剂(例如EDTA),和/或磷酸盐。

[0088] 此外,本发明优选的液体制剂包含(i)肉毒杆菌毒素,(ii)HSA,(iii)张力剂,以及不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.01%w/v至1.0%w/v的HSA,(iii)0.01%w/v至2.0%w/v的张力剂,优选氯化钠,以及不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.01%w/v至0.5%w/v的HSA,(iii)0.1%w/v至1.5%w/v的张力剂,优选氯化钠,以及不含或含有不超

过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.05%w/v至0.25%w/v的HSA,(iii)0.6%w/v至1.2%w/v的张力剂,优选氯化钠,以及不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.01%w/v至0.5%w/v的HSA,(iii)0.9%w/v的作为张力剂的氯化钠,以及不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.05%w/v至0.25%w/v的HSA,(iii)0.9%w/v的作为张力剂的氯化钠,以及不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。

[0089] 本文还考虑了在前面和下面段落中描述的优选和特别优选的液体制剂中,色氨酸和N-乙酰基-色氨酸的浓度上限低于50 μ M,优选10 μ M,更优选1 μ M,还更优选0.1 μ M,最优选0.01 μ M或0.001 μ M。此外,本文还考虑了在前面和下面段落中描述的优选和特别优选的液体制剂的特征可能在于Fe³⁺离子的浓度小于1000nM或小于500nM,更优选小于250nM或小于100nM,最优选小于10nM或小于1nM。

[0090] 本发明优选的液体制剂包含(i)肉毒杆菌毒素,(ii)HSA,(iii)张力剂,(iv)缓冲剂,以及不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.01%w/v至1.0%w/v的HSA,(iii)0.01%w/v至2.0%w/v的张力剂,优选氯化钠,(iv)浓度为1mM至100mM的缓冲剂,以及不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.01%w/v至0.5%w/v的HSA,(iii)0.01%w/v至2.0%w/v的张力剂,优选氯化钠,(iv)浓度为1mM至100mM的缓冲剂,以及不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.05%w/v至0.25%w/v的HSA,(iii)0.1%w/v至2.0%w/v的张力剂,优选氯化钠,(iv)浓度为1mM至100mM的缓冲剂,以及不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.05%w/v至0.25%w/v的HSA,(iii)0.6%w/v至1.3%w/v的张力剂,优选氯化钠,(iv)浓度为2mM至50mM的缓冲剂,以及不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.05%w/v至0.25%w/v的HSA,(iii)0.9%w/v的氯化钠,(iv)浓度为5mM至20mM的缓冲剂,以及不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。

[0091] 本发明优选的液体制剂包含(i)肉毒杆菌毒素,(ii)HSA,(iii)作为张力剂的氯化钠,(iv)选自作为缓冲剂的组氨酸、磷酸盐及其混合物的缓冲剂,其中缓冲剂优选为组氨酸,并且不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。

[0092] 特别优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.01%w/v至1.0%w/v量的HSA,(iii)0.01%w/v至2.0%w/v量的氯化钠,优选0.9%w/v,(iv)浓度为1mM至100mM的选自组氨酸、磷酸盐及其混合物的缓冲剂,其中所述缓冲剂优选为浓度为1mM至100mM的组氨酸,并且不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。

[0093] 本发明的另一种特别优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.01%w/v至0.5%w/v的HSA,(iii)0.9%w/v的氯化钠,(iv)浓度为1mM至100mM的选自组氨酸、磷酸盐及其混合物的缓冲剂,其中缓冲剂优选浓度为1mM至100mM的组

氨酸,并且不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。

[0094] 本发明的另一种特别优选的液体制剂包含(i)浓度为10U/ml至200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.05%w/v至0.25%w/v的HSA,(iii)0.9%w/v的氯化钠,(iv)浓度为1mM至100mM,优选浓度为2mM至50mM,更优选5mM至20mM的选自组氨酸、磷酸盐及其混合物的缓冲剂,其中所述缓冲剂优选为浓度为1mM至100mM,优选浓度为2mM至50mM,更优选5mM至20mM的组氨酸,并且不含或含有不超过50 μ M色氨酸和N-乙酰基-色氨酸。

[0095] 此外,上述优选和特别优选的液体制剂的pH优选在6.0至7.5的范围内,更优选在6.5至7.0的范围内。此外,所述肉毒杆菌毒素优选为血清型A,更优选为血清型A的神经毒性成分。

[0096] 本发明的优选示例性液体制剂如下:

[0097] 制剂1:

[0098] 50U/ml BoNT/A

[0099] 0.9% NaCl (9mg/mL)

[0100] 0.085% HSA(纯化的,例如透析的) (0.85mg/mL)

[0101] 0.155%组氨酸 (1.55mg/ml; ~10mM)

[0102] Trp和N-AcTrp<50 μ m

[0103] pH 6.0。

[0104] 示例性制剂1的纯化的HSA可以通过结合根据本发明第四方面的方法详细描述的过程来制备。

[0105] 根据本发明,本发明的液体制剂优选通过根据本发明第四方面的方法制备或获得。该方法允许去除HSA起始材料(例如,商业HSA产品)中包含的物质,包括N-乙酰基-色氨酸,其会破坏液体肉毒杆菌毒素制剂的光稳定性。

[0106] 在第三方面,本发明涉及一种液体制剂,其包含:

[0107] (i) 肉毒杆菌毒素和

[0108] (ii) 人血清白蛋白(HSA),

[0109] 其中所述液体制剂通过包括以下步骤的方法制备:

[0110] (a) 将人血清白蛋白与螯合剂接触以获得人血清白蛋白和螯合剂的混合物,和

[0111] (b) 从混合物中除去螯合剂。

[0112] 关于本发明液体制剂的组分(i),肉毒杆菌毒素没有特别限制,并且包括任何血清型(例如BoNT/A-G)的肉毒杆菌毒素。优选地,肉毒杆菌毒素如上文所定义。

[0113] 关于液体制剂的组分(ii),“人血清白蛋白”或“HSA”是指供体HSA和重组HSA,优选供体HSA,如上文所定义。HSA可以0.001-2.0%w/v的量,优选0.001-1.00%w/v的量,更优选0.01-0.5%w/v的量,还更优选0.02-0.3%w/v的量,最优选0.03-0.15%w/v的量存在于液体制剂中。

[0114] 根据本发明,本发明的液体制剂通过至少包括步骤(a)和(b)的方法制备,第一步如下:

[0115] (a) 将人血清白蛋白与螯合剂接触以获得人血清白蛋白和螯合剂的混合物。

[0116] 如本文所用,术语“接触”旨在广义地解释为将两个或更多个组分放在一起。这可以通过各种不同的方法实现,例如溶解、混合、悬浮、混合、制浆、搅拌、流过、吸附、结合、提

取等。通常,将螯合剂添加到包含HSA的组合物(例如,HSA溶液)中,随后混合以获得均匀的混合物,并任选地进行进一步的处理步骤(例如,对含螯合剂的缓冲液进行透析)。

[0117] 因此,也考虑了“接触”可以通过将HSA材料,例如以水性溶液的形式,装载到固定化金属亲和树脂(IMAC)上来实现。本文使用的术语“固定化金属亲和树脂”(IMAC)包括但不限于含有能够结合和配位多价阳离子的固定化功能部分(例如亚氨基二乙酸)的树脂,例如螯合-琼脂糖凝胶、Fractogel-EMD-螯合物、POROS 20MC、Matrex Cellufine螯合物、TALON和Chelex 100树脂。如本领域技术人员所知,这种固定化金属亲和树脂通常以层析金属亲和柱的形式使用。此外,如本文所用,术语“接触”还包括使用合适的固定化金属亲和树脂的分批模式结合。

[0118] 关于步骤(a),还需要指出的是,在制备本发明液体制剂的方法的步骤(a)中使用的术语“人血清白蛋白”和“螯合剂”并不意味着对它们的物理形式有任何限制,也不排除与HSA和螯合剂混合或包含在其中的其它物质或化合物的存在。这意味着在步骤(a)中与螯合剂接触的“人血清白蛋白”可以以任何形式存在,例如以固体或液体的形式(例如,水性组合物或水性溶液)。同样,在步骤(a)中与人血清白蛋白接触的“螯合剂”可以以任何形式存在,例如以固体或液体的形式(例如,水性组合物或水性溶液)。此外,“使人血清白蛋白与螯合剂接触”的表述不排除(i)人血清白蛋白是组合物的形式(例如,固体组合物或液体组合物,特别是水性组合物或水性溶液),该组合物包含一种或多种包含在最终液体制剂中的其它组分,例如张力剂或缓冲剂,和/或(ii)螯合剂是组合物的形式(例如,固体组合物或液体组合物,特别是水性组合物或水性溶液),其包含一种或多种包含在最终液体制剂中的其它组分,例如张力剂或缓冲剂。

[0119] 优选地,步骤(a)中获得的混合物是水性混合物。这种水性混合物可以用不同的方法制备。例如,人血清白蛋白可以是水性组合物的形式,例如水性溶液,其与可以固体形式或液体形式存在的螯合剂(例如以螯合剂水性溶液的形式)混合。此外,人血清白蛋白可以是固体形式,例如冻干材料,其与螯合剂和水性溶液或螯合剂的水性溶液混合。优选地,人血清白蛋白为水性组合物的形式,更优选为水性溶液,螯合剂为固体或水性组合物(例如水性溶液)。

[0120] 特别地,在步骤(a)中与螯合剂接触的HSA可以是水性溶液的形式,其包含至少5% w/v的HSA,更优选10-30% w/v的HSA,最优选20% w/v的HSA。此外,可以将步骤(a)中获得的混合物的pH调节至6.0-9.0,优选6.5-8.5,更优选7.0-8.5,最优选7.0-8.0的范围内。

[0121] 此外,根据本发明的制备液体制剂的方法的接触步骤(a)可以包括几个子步骤。例如,在一个实施方案中,接触步骤(a)包括以下步骤:混合螯合剂(例如,EDTA)和人血清白蛋白,将所述混合物孵育确定的时间,以及任选地将所述混合物对含有螯合剂的缓冲液进行透析,所述螯合剂优选与孵育子步骤中使用的相同;或者接触步骤(a) (仅)由所述步骤组成。在另一个实施方案中,所述混合物不进行孵育,而是(直接)在含有螯合剂的缓冲液中进行透析,螯合剂优选与在混合螯合剂(例如EDTA)和人血清白蛋白的步骤中使用的相同。在另一个实施方案中,螯合剂和人血清白蛋白在透析前不混合。也就是说,接触步骤(a)可以包括对含有螯合剂的缓冲液透析所述混合物的步骤;或(仅)由对含有螯合剂的缓冲液透析所述混合物的步骤组成。

[0122] 优选地,步骤(a)包括向包含HSA的组合物(例如HSA溶液)中加入螯合剂的步骤,或

者将螯合剂与包含HSA的组合物(例如HSA溶液)混合的步骤,或者(仅)由所述步骤组成。然后将所得混合物孵育一段时间,例如,在不搅拌的情况下静置给定时间,或者搅拌给定时间。

[0123] 孵育时间不限于特定范围,但通常为至少0.5小时,特别是至少1小时,更特别是至少2小时。孵育时间的上限并不重要,可以是例如1小时、2小时、5小时或10小时。因此,孵育时间可以是例如0.5至5小时或1小时至10小时。同样,孵育温度没有特别限制,例如可以在0°C至60°C的范围内。优选地,所述温度为0°C至30°C。这意味着室温(20°C或25°C)是本发明中合适的温度。如技术人员所知,温度影响反应时间。通常,选择孵育条件(例如时间和温度),使得包含在最终产品中的螯合剂(例如EDTA)的残留量为100μM或更少,优选10μM或更少,更优选1μM或更少。

[0124] 任选地,孵育步骤之后是还有进一步的处理,例如用含有螯合剂的缓冲液透析孵育的混合物,螯合剂通常与孵育步骤中使用的螯合剂相同。在该任选的透析步骤中使用的螯合剂优选以0.1mM-1000mM,更优选1mM-200mM,最优选10mM-100mM的浓度包含在透析缓冲液中。还优选在透析步骤中使用的缓冲液(i)具有7.5-8.5的pH,(ii)优选根据最终组成还包含缓冲剂,或(iii)还包含张力剂,优选0.9%氯化钠w/v,或(i)和(ii),或(i)和(iii),或(ii)和(iii),或(i)和(ii)和(iii)。

[0125] 在本发明中,本文使用的术语“螯合剂”没有特别限制,只要它能够结合金属离子即可。本文使用的术语“螯合剂”也可称为“螯合试剂”或“掩蔽剂”。本文使用的螯合剂通常是结合金属离子的有机化合物。金属离子通常与作为多齿配体的有机螯合剂形成多重配位键。

[0126] 适用于本文的螯合剂包括但不限于氨基多羧酸(例如,具有三至六个,优选四个羧酸官能团的氨基多羧酸)和其它化合物,如柠檬酸盐、吡啶、TPEN(N,N,N',N'-四(2-吡啶基甲基)-1,2-乙二胺)、TETA(三亚乙基四胺)及其混合物。示例性的氨基多羧酸包括NTA(次氨基三乙酸酯)、DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸酯)、TED(乙二胺三乙酸酯)、EDTA(乙二胺四乙酸)、EGTA(乙二醇-双(β-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸)、BAPTA(1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸)、DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)和TTHA(三亚乙基四胺六乙酸)。

[0127] 本文使用的特别优选的螯合剂包括通式(I)的化合物:

[0128] $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}-\text{R}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ (I),

[0129] 其是具有至少四个羧酸官能团的氨基多羧酸化合物。R基团没有特别限制并且可以不包含羧酸官能团或包含一个或两个羧酸官能团。优选地,R基团不包含或包含一个羧酸官能团,最优选不包含羧酸官能团。

[0130] 通式(I)的化合物的示例包括,例如,EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA。本文特别优选使用的是EDTA、EGTA和DTPA,更优选的是EDTA和DTPA,最优选的是EDTA。任何上述螯合剂的混合物也可用于本发明,例如作为溶液、固体或偶联到基质上。

[0131] 在步骤(a)中,HSA优选与一定量的螯合剂接触,使得螯合剂以0.1mM-1000mM或0.1mM-500mM,更优选0.5mM-500mM或1mM-500mM,最优选10mM-100mM的浓度存在于液体制剂中。

[0132] 根据本发明,制备液体制剂的方法还包括以下步骤:

[0133] (b) 从混合物中除去螯合剂。

[0134] 在步骤(b)中,螯合剂可以通过任何合适的技术除去,例如透析(包括使用透析袋的常规透析、逆流透析等)、反渗透、过滤、错流过滤、超滤和色谱方法(例如,离子交换色谱或凝胶过滤色谱)。

[0135] 优选地,螯合剂通过透析除去。透析通常在0°C至30°C的温度下,特别是在2°C至30°C或4°C至25°C的温度下,包括室温下进行0.5-48小时,特别是1-24小时或1-12小时。此外,透析通常在体积为孵育的HSA/螯合剂混合物体积的10至1000倍的透析缓冲液中进行,并且透析缓冲液通常至少更换一次。所使用的透析膜可以具有例如10kDa的分子量截止值(cut-off)。

[0136] 通常,选择透析条件(例如,时间、温度、缓冲液体积、缓冲液更换次数),使得最终产品中螯合剂(例如,EDTA)的残留量浓度为100μM或更低,优选浓度为10μM或更低,更优选浓度为1μM或更低。

[0137] 根据本发明的一个优选实施方案,HSA起始材料首先通过与螯合剂接触进行预处理,然后除去螯合剂。然后将由此获得的预处理的HSA用于制备本发明的液体肉毒杆菌毒素制剂。如本文所用,术语“人血清白蛋白起始材料”是指供体HSA材料(来源于人血液,或更准确地说,来源于人血浆的HSA)或重组HSA材料,其可通过商业途径或常规途径获得,即未经过本文所述的预处理。本文所用术语“人血清白蛋白起始材料”也包括供体HSA材料和重组HSA材料的混合物。

[0138] 更具体地,根据该优选实施方案,包含(i)肉毒杆菌毒素和(ii)人血清白蛋白的液体制剂通过包括以下步骤的方法制备:

[0139] (a) 将人血清白蛋白起始材料与螯合剂接触以获得人血清白蛋白起始材料和螯合剂的混合物,

[0140] (b) 从混合物中除去螯合剂以获得预处理的人血清白蛋白材料,和

[0141] (c) 将肉毒杆菌毒素与预处理的人血清白蛋白材料混合。

[0142] 根据本发明的另一个优选实施方案,液体预制剂与螯合剂接触,然后除去螯合剂以获得液体制剂。本文所用术语“液体预制剂”是指至少含有组分(i)和(ii)(即肉毒杆菌毒素和HSA)的液体制剂,优选含有最终液体组合物中包含的所有组分和物质,尤其是组分(iii)和(iv)。在后者的情况下,螯合剂的处理和去除产生最终的液体制剂。

[0143] 更具体地,根据该优选实施方案,包含(i)肉毒杆菌毒素和(ii)人血清白蛋白的液体制剂通过包括以下步骤的方法制备:

[0144] (a) 将包含肉毒杆菌毒素和人血清白蛋白的液体预制剂与螯合剂接触,以获得液体预制剂和螯合剂的混合物,和

[0145] (b) 从混合物中除去螯合剂以获得液体制剂。

[0146] 根据本发明,液体制剂(根据本文描述的任何方面,即根据第一、第二和第三方面)可以任选地还包含:

[0147] (iii)张力剂。

[0148] 如本文所用,术语“张力剂”是指添加到可注射制剂中以使制剂在渗透特性上类似于生理液体的试剂。张力剂也可以称为“渗透调节剂”。张力剂没有特别的限制,例如可以选自由糖、盐、聚合物及其混合物组成的组。

[0149] 示例性的张力剂包括蔗糖、葡萄糖、碳酸钠、氨基酸、聚乙二醇(PEG)、葡聚糖、环糊精和胶体(例如胶体多糖)。典型地,张力剂的浓度在0-2.0%w/v,特别是0.01-2.0%w/v或0.1-1.5%w/v,更特别是0.6-1.2%w/v的范围内。

[0150] 优选地,张力剂是氯化钠(NaCl)。氯化钠可以0.01-2.0%w/v,优选0.1-1.5%w/v,更优选0.5-1.2%w/v或0.8-1.0%w/v,最优选0.9%w/v的量存在于本发明的液体制剂中。

[0151] 根据本发明,液体制剂(根据本文描述的任何方面,即根据第一、第二和第三方面)可以任选地还包含:

[0152] (vi) 缓冲剂。

[0153] 本文所用的术语“缓冲剂”是指将液体制剂的pH保持在可接受范围内的试剂,即能够控制制剂pH的试剂。合适的缓冲剂是那些不与其它成分发生化学反应的缓冲剂,其存在量足以提供所需程度的pH缓冲。这样的缓冲液包括例如氨基酸、乙酸盐、苹果酸、抗坏血酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐、TRIS、Bis-TRIS、ACES、MES、BES、MOPS、HEPES、TES、PIPES、三(羟甲基)甲基甘氨酸和咪唑。

[0154] 优选地,缓冲剂是磷酸盐(即磷酸盐缓冲液)、氨基酸或其混合物。本文使用的术语“磷酸盐”通常指未质子化和质子化的形式及其任何盐。氨基酸可选自天冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸、组氨酸、脯氨酸、牛磺酸、蛋氨酸、丝氨酸、酪氨酸、色氨酸及其混合物,优选选自组氨酸、脯氨酸、牛磺酸、蛋氨酸、丝氨酸、酪氨酸及其混合物。最优选地,氨基酸是组氨酸。本文使用的最优选的缓冲剂是组氨酸、磷酸盐或它们的混合物。

[0155] 本发明的液体制剂中缓冲剂的浓度优选为1-100mM,优选为2-50mM,更优选为5-20mM。如果缓冲剂是氨基酸(例如,组氨酸),其可以以1-100mM,优选2-50mM,更优选5-20mM,最优选10mM的浓度存在于液体制剂中。如果缓冲剂是磷酸盐,它可以以1-100mM,优选2-50mM,更优选5-20mM,最优选10mM的浓度存在于液体制剂中。

[0156] 此外,本发明的液体制剂可进一步包含一种或多种另外的药学上可接受的赋形剂,除非另有说明或意图。例如,液体制剂可以包含甘油、蔗糖、乳糖、甘露醇、葡聚糖、透明质酸、聚乙烯吡咯烷酮、乳酸、柠檬酸、氨基酸、苯甲醇、利多卡因、明胶、羟乙基淀粉(HES)、聚环氧乙烷和聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80)中的一种或多种。其它合适的药学上可接受的赋形剂包括本领域熟知的那些,参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania。

[0157] 另一方面,本文还预期本发明的液体制剂特别缺乏某些组分(即化合物、材料或物质),例如螯合剂、去污剂、多糖、氨基酸、稳定肽等,包括其任何组合。如本文所用,术语“去污剂”与“表面活性剂”同义,旨在包括非离子和离子去污剂。本文使用的术语“稳定肽”通常指由5至50个氨基酸组成的肽,例如10至40个氨基酸或15至30个氨基酸的肽。因此,术语“稳定肽”不包括HSA。

[0158] 在一个实施方案中,本发明的液体制剂不含去污剂,特别是不含聚山梨醇酯,更特别是不含聚山梨醇酯20和/或聚山梨醇酯80。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含藻酸盐。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含琥珀酸盐。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含一种或多种(例如2、3、4或5种)选自由精氨酸、谷氨酸、蛋氨酸、色氨酸和丝氨酸组成的组的氨基酸。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含糖类,例如单糖、寡糖或多糖或其混合物。特别地,本发明的液体制剂可以不包含一种或多种(例如,2、3

或4种)蔗糖、乳糖、麦芽糖和海藻糖。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含螯合剂,特别是本文结合本发明描述的那些。在本发明中还考虑了液体制剂缺少一种以上或全部上述化合物。

[0159] 在一个实施方案中,本发明的液体制剂缺少(i)去污剂和单糖、寡糖和多糖,(ii)去污剂和任何氨基酸,或去污剂和除组氨酸外的所有氨基酸,(iii)去污剂和稳定肽,(iv)单糖、寡糖和多糖和任何氨基酸,或单糖、寡糖和多糖和除组氨酸外的所有氨基酸,(v)单糖、寡糖和多糖和稳定肽,(vi)任何氨基酸和稳定肽,或除组氨酸和稳定肽外的所有氨基酸,(vii)去污剂,单糖、寡糖和多糖以及任何氨基酸,或去污剂,单糖、寡糖和多糖以及除组氨酸之外的所有氨基酸,(viii)去污剂,单糖、寡糖和多糖,以及稳定肽,(ix)去污剂,任何氨基酸,以及稳定肽,或去污剂,除组氨酸之外的所有氨基酸,以及稳定肽,(x)单糖、寡糖和多糖,任何氨基酸,以及稳定肽,或单糖、寡糖和多糖,除组氨酸之外的所有氨基酸,以及稳定肽,(xi)去污剂,单糖、寡糖和多糖,任何氨基酸和稳定肽,或去污剂,单糖、寡糖和多糖,除组氨酸外的所有氨基酸,和稳定肽。

[0160] 在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含除组氨酸之外的任何其他氨基酸。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含任何单糖、二糖和三糖。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含除HSA以外的任何其它稳定肽或蛋白质。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含磷酸盐,如磷酸盐缓冲液形式的磷酸盐。

[0161] 在其它实施方案中,本发明的液体制剂缺少(i)琥珀酸盐和去污剂(例如,聚山梨醇酯),(ii)琥珀酸盐和甲硫氨酸,(iii)琥珀酸盐和蔗糖,(iv)去污剂(例如,聚山梨醇酯)和甲硫氨酸,(v)去污剂(例如,聚山梨醇酯)和蔗糖,(vi)甲硫氨酸和蔗糖,(vii)琥珀酸盐,去污剂(例如,聚山梨醇酯)和甲硫氨酸,(xiii)琥珀酸盐,去污剂(例如,聚山梨醇酯)和蔗糖,(ix)琥珀酸盐,甲硫氨酸和蔗糖,(x)去污剂(例如,聚山梨醇酯)、甲硫氨酸和蔗糖,以及(xi)琥珀酸盐、去污剂(例如,聚山梨醇酯)、甲硫氨酸和蔗糖,(xii)去污剂(例如,聚山梨醇酯和组氨酸),(xiii)去污剂(例如,聚山梨醇酯)、组氨酸和蔗糖)。

[0162] 此外,缺少一种或多种组分(即化合物、材料或物质)的本发明的任何液体制剂可以还缺少螯合剂,特别是本文所述的螯合剂。

[0163] 此外,本发明优选的液体制剂包含(i)肉毒杆菌毒素,(ii)HSA,和(iii)张力剂。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.01-1.0%w/v的HSA,和(iii)0.01-2.0%w/v的张力剂,优选氯化钠。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.01-0.5%w/v的HSA,和(iii)0.1-1.5%w/v的张力剂,优选氯化钠。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.05-0.25%w/v的HSA,和(iii)0.6-1.2%w/v的张力剂,优选氯化钠。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.01-0.5%w/v的HSA,和(iii)0.9%w/v的作为张力剂的氯化钠。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)0.05-0.25%w/v的HSA,和(iii)0.9%w/v的作为张力剂的氯化钠。

[0164] 本文还考虑了在前面和下面段落中描述的优选液体制剂的特征在于 Fe^{3+} 离子的浓度小于1 μM ,优选小于1000nM或小于500nM,更优选小于250nM或小于100nM,最优选小于10nM或小于1nM。

[0165] 本发明优选的液体制剂包含(i)肉毒杆菌毒素,(ii)HSA,(iii)张力剂,和(iv)缓

冲剂。本发明优选的液体制剂包含 (i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 0.01-1.0% w/v的HSA, (iii) 0.01-2.0% w/v的张力剂, 优选氯化钠, 和 (iv) 浓度为1-100mM的缓冲剂。本发明优选的液体制剂包含 (i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 0.01-0.5% w/v的HSA, (iii) 0.01-2.0% w/v的张力剂, 优选氯化钠, 和 (iv) 浓度为1-100mM的缓冲剂。本发明优选的液体制剂包含 (i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 0.05-0.25% w/v的HSA, (iii) 0.1-2.0% w/v的张力剂, 优选氯化钠, 和 (iv) 浓度为1-100mM的缓冲剂。本发明优选的液体制剂包含 (i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 0.05-0.25% w/v的HSA, (iii) 0.6-1.3% w/v的张力剂, 优选氯化钠, 和 (iv) 浓度为2-50mM的缓冲剂。本发明优选的液体制剂包含 (i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 0.05-0.25% w/v的HSA, (iii) 0.9% w/v的氯化钠, 和 (iv) 浓度为5-20mM的缓冲剂。本文还考虑了在本段落中描述的优选液体制剂的特征在于 Fe^{3+} 离子的浓度小于1 μM , 优选小于1000nM或小于500nM, 更优选小于250nM或小于100nM, 最优选小于10nM或小于1nM。

[0166] 本发明优选的液体制剂包含 (i) 肉毒杆菌毒素, (ii) HSA, (iii) 作为张力剂的氯化钠, 和 (iv) 选自作为缓冲剂的组氨酸、磷酸盐及其混合物的缓冲剂, 其中所述缓冲剂优选为组氨酸。

[0167] 本发明特别优选的液体制剂包含 (i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 0.01-1.0% w/v的HSA, (iii) 0.01-2.0% w/v, 优选0.9% w/v的氯化钠, 和 (iv) 浓度为1-100mM的选自组氨酸、磷酸盐及其混合物的缓冲剂, 其中所述缓冲剂优选浓度为1-100mM的组氨酸。

[0168] 本发明的另一种特别优选的液体制剂包含 (i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 0.01-0.5% w/v的HSA, (iii) 0.9% w/v的氯化钠, 和 (iv) 浓度为1-100mM的选自组氨酸、磷酸盐及其混合物的缓冲剂, 其中所述缓冲剂优选浓度为1-100mM的组氨酸。

[0169] 本发明的另一种特别优选的液体制剂包含 (i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 0.05-0.25% w/v的HSA, (iii) 0.9% w/v的氯化钠, 和 (iv) 浓度为1-100mM, 优选浓度为2mm-50mM, 或更优选5mM-20mM的选自组氨酸、磷酸盐及其混合物的缓冲剂, 其中所述缓冲剂优选浓度为1-100mM, 优选浓度为2mM至50mM, 更优选5mM至20mM的组氨酸。

[0170] 此外, 上述优选和特别优选的液体制剂的pH优选在6.0至7.5的范围内。此外, 所述肉毒杆菌毒素优选为血清型A, 更优选为血清型A的神经毒性成分。

[0171] 本发明的优选示例性液体制剂如下:

[0172] 制剂1:

[0173] 50U/ml BoNT/A

[0174] 0.9% NaCl (9mg/mL)

[0175] 0.085% HSA (EDTA透析的) (0.85mg/mL)

[0176] 0.155% 组氨酸 (1.55mg/mL; ~10mM)

[0177] pH 6.0

[0178] 示例性制剂1的HSA (EDTA透析的) 通过包括以下步骤的示例性方法制备:

[0179] -在搅拌下向每毫升20% HSA溶液中加入37.2mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 并用NaOH调节pH值至8.0,

[0180] -在室温下搅拌孵育6小时,

[0181] -在室温下用100倍体积的EDTA缓冲液(100mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$;10mM组氨酸;0.9% NaCl pH 7.0)透析16小时,并在磁力搅拌器上轻轻搅拌(透析膜的MWC0为10kDa)

[0182] -在室温下用100倍体积的10mM组氨酸、0.9% NaCl pH 6.0透析24小时,然后用新鲜缓冲液替换透析缓冲液,再透析24小时,并重复两次以上。

[0183] 在示例性制剂1中,EDTA可以任选地被其他螯合剂替代,例如EGTA、BAPTA或DTPA。作为向HSA溶液中加入固体EDTA的替代方案,可以使用浓缩的EDTA溶液(例如,200mM EDTA, pH 8.0)。第一次透析步骤(对EDTA缓冲液)也可以省略。其他方法,如错流透析或超滤,也可以用来代替透析。

[0184] 本发明还涉及包含肉毒杆菌毒素的液体制剂,其中所述液体制剂在40°C的高温下储存4周后,相对于初始毒素活性,毒素活性降低不超过20%。此外,本发明涉及包含肉毒杆菌毒素的液体制剂,其中所述液体制剂暴露于250W/m²的光源7小时后,相对于初始毒素活性,毒素活性降低不超过20%。优选地,对于光稳定性测试,即,对于在250W/m²下暴露7小时,可以使用SUNTEST CPS+仪器(ATLAS Material Testing Technology LLC),其配备有滤光器组,以提供320-800nm波长范围内的光谱分布,其对应于ISO 10977的ID65(室内间接日光标准),使用根据ICH Q1B的窗玻璃滤光器。

[0185] 此外,本发明还涉及制备本文所述的液体肉毒杆菌毒素制剂的方法,包括添加本文所述的组分,特别是组分(i)至(ii),以及任选的一种或多种组分(iii)和(vi),优选组分(i)、(ii)、(iii)和(iv)。本发明的液体制剂的制备不受特别限制,并且相应的制剂技术是本领域技术人员已知的。如上所述,肉毒杆菌毒素的液体制剂通常是水性溶液,优选盐溶液,更优选生理盐溶液,最优选缓冲的(例如磷酸盐或组氨酸缓冲的)生理盐溶液。

[0186] 优选地,首先溶解盐,然后加入HSA,必要时调节pH,最后加入肉毒杆菌毒素。此顺序不是强制性要求,但被认为可以安全地保持BoNT的最大比活性。优选地,制备液体肉毒杆菌毒素制剂的方法不包括粉末形式的冻干肉毒杆菌毒素制剂的重新配制。

[0187] 此外,本发明涉及稳定液体肉毒杆菌毒素制剂的方法,该方法包括将肉毒杆菌毒素与人血清白蛋白(HSA)组合,其中HSA通过包括以下步骤的方法制备:

[0188] (a) 将包含人血清白蛋白的组合物与螯合剂接触以获得人血清白蛋白和螯合剂的混合物,和

[0189] (b) 从混合物中除去螯合剂。

[0190] 另外,本发明涉及人血清白蛋白(HSA)用于增加包含肉毒杆菌毒素的液体组合物的光和/或温度稳定性的用途,其中HSA通过包括以下步骤的方法制备:

[0191] (a) 将包含人血清白蛋白的组合物与螯合剂接触以获得人血清白蛋白和螯合剂的混合物,和

[0192] (b) 从混合物中除去螯合剂。

[0193] 此外,本发明涉及人血清白蛋白(HSA),其可通过以下方法获得

[0194] (a) 将包含人血清白蛋白的组合物与螯合剂接触以获得人血清白蛋白和螯合剂的混合物,和

[0195] (b) 从混合物中除去螯合剂。

[0196] 第四方面,本发明涉及制备液体制剂的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0197] -纯化人血清白蛋白起始材料以获得纯化的人血清白蛋白材料,

[0198] -将获得的纯化的人血清白蛋白与肉毒杆菌毒素和任选的其它组分混合以获得液体制剂,

[0199] 或者

[0200] -纯化包含肉毒杆菌毒素和人血清白蛋白的液体组合物以获得纯化的液体组合物,

[0201] -将获得的纯化的液体组合物与其他组分混合,以获得液体制剂。

[0202] 人血清白蛋白起始材料如上文所定义。优选地,它是水性溶液的形式,含有至少5%重量/体积的HSA,优选10%重量/体积至35%重量/体积的HSA,更优选15%重量/体积至30%重量/体积,最优选20%重量/体积至25%重量/体积的HSA。所述人血清白蛋白起始材料可以含有色氨酸和N-乙酰基-色氨酸,特别是N-乙酰基-色氨酸,其含量大于5mM,10mM或更多,20mM或更多,或30mM或更多。此外,可以将步骤(a)中获得的混合物的pH调节至6.0至9.0,优选6.5至8.5,更优选7.0至8.5,最优选7.0至8.0的范围内。

[0203] 优选地,在本发明方法的第一个替代方案中,纯化步骤导致纯化的人血清白蛋白材料不含或含有不超过5mM,优选不超过1mM,更优选不超过0.1mM,最优选不超过0.001mM色氨酸和/或N-乙酰基-色氨酸。在制备液体制剂时,稀释纯化的人血清白蛋白材料,使色氨酸和N-乙酰基-色氨酸的浓度落入本文所述的范围内,例如低于50 μ M。

[0204] 纯化步骤可通过对人血清白蛋白起始材料或包含肉毒杆菌毒素和人血清白蛋白的液体组合物进行透析、渗滤(错流过滤)、超滤、色谱纯化技术如离子交换色谱(IEX)、亲和色谱和疏水相互作用色谱(HIC)、场流分级分离或沉淀(例如盐沉淀、乙醇沉淀)来进行。

[0205] 优选地,通过透析纯化。透析通常在0°C至30°C的温度下,特别是在2°C至30°C或4°C至25°C的温度下,包括室温下进行0.5-48小时,特别是1-24小时或1-12小时。此外,透析通常在体积为孵育的HSA溶液体积的10至1000倍的透析缓冲液中进行,并且透析缓冲液通常至少更换一次。所使用的透析膜可以具有例如10kDa的分子量截止值。

[0206] 例如,纯化的血清白蛋白可以通过以下方法获得:

[0207] -在室温下,在磁力搅拌器的温和搅拌下,用100倍体积的透析缓冲液(10mM组氨酸,0.9% NaCl,pH 6.0)透析市售HSA产品24小时(透析膜的MWC0为10kDa),

[0208] -用新鲜透析缓冲液更换缓冲液,在室温下透析24小时,并重复两次以上。

[0209] 上述方法的第一种替代方案,即纯化人血清白蛋白起始材料并将获得的纯化的人血清白蛋白与肉毒杆菌毒素和任选的其它组分混合,在本发明中是优选的。获得本发明液体制剂的混合步骤没有特别限制,包括混合组分(i)至(ii)和任选的一种或多种组分(iii)和(vi)。优选地,首先溶解盐,然后加入HSA,必要时调节pH,最后加入肉毒杆菌毒素。该顺序不是强制性要求,但被认为可以安全地保持BoNT的最大比活度。优选地,制备液体肉毒杆菌毒素制剂的方法不包括粉末形式的冻干肉毒杆菌毒素制剂的重构。

[0210] 如上关于本发明的第一方面所述,本文还预期本发明的液体制剂具有低Fe³⁺离子浓度,因为Fe³⁺离子也对光稳定性产生不稳定作用。因此,根据本发明,为了除去Fe³⁺离子,根据本发明的方法的纯化步骤如下进行或另外包含以下步骤:

[0211] -将人血清白蛋白起始材料与螯合剂接触以获得人血清白蛋白起始材料和螯合剂的混合物,和

[0212] -从混合物中除去螯合剂以获得螯合剂处理的纯化的人血清白蛋白材料,或者

[0213] -将包含肉毒杆菌毒素和人血清白蛋白的液体组合物与螯合剂接触,以获得液体组合物和螯合剂的混合物,和

[0214] -从混合物中除去螯合剂以获得螯合剂处理的纯化的液体制剂。

[0215] 在接触步骤中,人血清白蛋白起始材料和包含肉毒杆菌毒素和人血清白蛋白的液体组合物分别优选与一定量的螯合剂接触,使得螯合剂以0.1mM至1000mM或0.1mM至500mM,更优选0.5mM至500mM或1mM至500mM,最优选10mM至100mM的浓度存在于混合物中。

[0216] 螯合剂的去除可以通过透析、错流过滤或超滤来进行。

[0217] 如本文所用,术语“接触”旨在广义地解释为将两个或更多个组分放在一起。这可以通过各种不同的方法实现,例如溶解、混合、悬浮、混合、制浆、搅拌、流过、吸附、结合、提取等。通常,将螯合剂添加到包含HSA的组合物(例如,HSA溶液)中,随后混合以获得均匀的混合物,并任选地进行进一步的处理步骤(例如,对含螯合剂的缓冲液进行透析)。

[0218] 因此,本文也考虑了“接触”可以通过将HSA材料,例如以水性溶液的形式,装载到固定化金属亲和树脂(IMAC)上来进行。本文使用的术语“固定化金属亲和树脂”(IMAC)包括但不限于含有能够结合和配位多价阳离子的固定化功能部分(例如亚氨基二乙酸)的树脂,例如螯合-琼脂糖凝胶、Fractogel-EMD-螯合物、POROS20MC、Matrex Cellufine螯合物、TALON和Chelex 100树脂。如本领域技术人员所知,这种固定化金属亲和树脂通常以层析金属亲和柱的形式使用。此外,如本文所用,术语“接触”还包括使用合适的固定化金属亲和树脂的分批模式结合。

[0219] 关于接触步骤,需要还指出的是,在接触步骤的定义中使用的术语“人血清白蛋白起始材料”和“螯合剂”并不意味着对其物理形式的任何限制,也不排除与HSA和螯合剂混合或包含在其中的其它物质或化合物的存在。这意味着与螯合剂接触的“人血清白蛋白起始材料”可以以任何形式存在,例如以固体或液体的形式(例如,水性组合物或水性溶液)。同样,与人血清白蛋白起始材料接触的“螯合剂”可以以任何形式存在,例如以固体或液体的形式(例如,水性组合物或水性溶液)。

[0220] 优选地,在接触步骤中获得的混合物是水性混合物。这种水性混合物可以用不同的方法制备。例如,人血清白蛋白可以是水性组合物的形式,例如水性溶液,其与可以固体形式或液体形式存在的螯合剂(例如以螯合剂水性溶液的形式)混合。此外,人血清白蛋白可以是固体形式,例如冻干材料,其与螯合剂和水性溶液或螯合剂的水性溶液混合。优选地,人血清白蛋白为水性组合物的形式,更优选为水性溶液,螯合剂为固体或水性组合物(例如水性溶液)。

[0221] 特别地,在接触步骤中与螯合剂接触的HSA可以是水性溶液的形式,包含至少5% w/v的HSA,优选10% w/v至35% w/v的HSA,更优选15% w/v至30% w/v的HSA,最优选20% w/v至25% w/v的HSA。此外,可以将步骤(a)中获得的混合物的pH调节至6.0至9.0,优选6.5至8.5,更优选7.0至8.5,最优选7.0至8.0的范围内。

[0222] 此外,根据本发明的制备液体制剂的方法的接触步骤可以包括几个子步骤。例如,在一个实施方案中,接触步骤包括以下步骤:混合螯合剂(例如,EDTA)和人血清白蛋白,将所述混合物孵育确定的时间,以及任选地将所述混合物对含有螯合剂的缓冲液进行透析,所述螯合剂优选与孵育子步骤中使用的相同;或者接触步骤(仅)由所述步骤组成。在另一个实施方案中,所述混合物不进行孵育,而是(直接)在含有螯合剂的缓冲液中进行透析,螯

合剂优选与在混合螯合剂(例如EDTA)和人血清白蛋白的步骤中使用的相同。在另一个实施方案中,螯合剂和人血清白蛋白在透析前不混合。也就是说,接触步骤(a)可以包括对含有螯合剂的缓冲液透析所述混合物的步骤;或(仅)由对含有螯合剂的缓冲液透析所述混合物的步骤组成。

[0223] 优选地,接触步骤包括向包含HSA的组合物(例如HSA溶液)中加入螯合剂的步骤,或者将螯合剂与包含HSA的组合物(例如HSA溶液)混合的步骤,或者(仅)由所述步骤组成。然后将所得混合物孵育一段时间,例如,在不搅拌的情况下静置给定时间,或者搅拌给定时间。

[0224] 孵育时间不限于特定范围,但通常为至少0.5小时,特别是至少1小时,更特别是至少2小时。孵育时间的上限并不重要,可以是例如1小时、2小时、5小时或10小时。因此,孵育时间可以是例如0.5至5小时或1小时至10小时。同样,孵育温度没有特别限制,例如可以在0℃至60℃的范围内。优选地,所述温度为0℃至30℃。这意味着室温(20℃或25℃)是本发明中合适的温度。如技术人员所知,温度影响反应时间。通常,选择孵育条件(例如时间和温度),使得包含在最终产品中的螯合剂(例如EDTA)的残留量为100μM或更少,优选10μM或更少,更优选1μM或更少。

[0225] 任选地,孵育步骤之后是还有进一步的处理,例如用含有螯合剂的缓冲液透析孵育的混合物,螯合剂通常与孵育步骤中使用的螯合剂相同。在该任选的透析步骤中使用的螯合剂优选以0.1mM-1000mM,更优选1mM-200mM,最优选10mM-100mM的浓度包含在透析缓冲液中。还优选在透析步骤中使用的缓冲液(i)具有7.5-8.5的pH,(ii)优选根据最终组成还包含缓冲剂,或(iii)还包含张力剂,优选0.9%氯化钠w/v,或(i)和(ii),或(i)和(iii),或(ii)和(iii),或(i)和(ii)和(iii)。

[0226] 适用于本文的螯合剂如上文所定义。任何上述螯合剂的混合物也可用于本发明,例如作为溶液、固体或偶联到基质上。

[0227] 根据本发明,螯合剂可以通过任何合适的技术除去,例如透析(包括使用透析袋的常规透析、逆流透析等)、反渗透、过滤、错流过滤、超滤和色谱方法(例如,离子交换色谱或凝胶过滤色谱)。

[0228] 优选地,螯合剂通过透析除去。透析通常在0℃至30℃的温度下,特别是在2℃至30℃或4℃至25℃的温度下,包括室温下进行0.5-48小时,特别是1-24小时或1-12小时。此外,透析通常在体积为孵育的HSA/螯合剂混合物体积的10至1000倍的透析缓冲液中进行,并且透析缓冲液通常至少更换一次。所使用的透析膜可以具有例如10kDa的分子量截止值。

[0229] 通常,选择透析条件(例如,时间、温度、缓冲液体积、缓冲液更换次数),使得最终产品中螯合剂(例如,EDTA)的残留量浓度为100μM或更低,优选浓度为10μM或更低,更优选浓度为1μM或更低。

[0230] 第五方面,本发明涉及用于治疗的本发明的液体制剂。

[0231] 具体而言,本发明的液体制剂可用于治疗神经肌肉疾病、疼痛、流涎、多汗症、泌尿系统疾病和神经系统疾病。

[0232] 示例性的神经肌肉疾病包括肌张力障碍、颈部肌张力障碍、痉挛、中风后痉挛、眼睑痉挛、震颤、运动过度性运动障碍和脑瘫。泌尿系统疾病包括以逼尿肌活动过度、膀胱活动过度、神经源性膀胱和间质性膀胱炎为特征的疾病,外阴痛和慢性骨盆痛的治疗,良性前

列腺增生 (BPH) 和逼尿肌括约肌协同失调 (DSD)。示例性的神经障碍包括慢性偏头痛、三叉神经痛、外周神经病性疼痛、糖尿病性神经病性疼痛和抑郁症。

[0233] 第六方面,本发明涉及本发明的液体制剂用于治疗美容病况的美容用途。

[0234] 本发明的这一方面涉及本发明液体制剂的纯美学用途。待处理的优选美容病况包括皮肤病况,特别是皮肤皱纹的处理,尤其是面部皱纹的处理。

[0235] 本文所用的术语“皱纹”应广义地解释为不仅包括皱纹,还包括纹路、纹理、折痕、沟纹和褶皱。“纹路”、“皱纹”、“纹理”、“折痕”和“褶皱”这些词有相似的定义,因此经常互换使用。在本发明中,“纹路”通常可与“皱纹”互换,但优选是指深度小于“皱纹”的皮肤凹陷。“褶皱”可与皱纹和纹路互换,优选为线性凹陷。“折痕”可与皱纹、纹路和褶皱互换。它优选地指轻微形式的皱纹,并且可以描述特定位置的特定皱纹。本文所用的“纹理”基本上具有与皱纹相同的含义。然而,“纹理”优选是指由不规则聚集的线条形成的皮肤结构。“沟纹”是皮肤上的深褶皱或深纹路。

[0236] 优选地,根据本发明治疗的皱纹是面部皱纹,包括水平前额纹、眉间皱眉纹、眶周纹、鱼尾纹、兔唇纹(即,鼻子两侧的向下辐射纹)、鼻唇沟、上径向唇纹、下径向唇纹、嘴角纹、木偶纹、口周唇纹、口连合、唇颈折痕和鹅卵石状下巴。

[0237] 为了治疗上述面部皱纹,肉毒杆菌毒素通常通过肌肉注射施用至以下肌肉:额肌(水平前额纹)、降眉间肌和皱眉肌(眉间皱眉纹)、眼轮匝肌外侧(鱼尾纹/眶周纹)、鼻肌、鼻横肌降眉间肌(兔唇纹)、鼻翼上唇提肌(鼻唇沟)、口轮匝肌(上和下径向唇纹)、降口角肌(嘴角纹、木偶纹、口连合、唇颈折痕)和颈肌(口周唇纹、鹅卵石状下巴)。

[0238] 本发明液体制剂的进一步优选的美容用途涉及包括面部和/或身体的皮肤质量的恢复和/或改善的美容应用的用途。

[0239] 第七方面,本发明涉及一种治疗疾病或病况的方法,包括给有需要的人施用有效量的本发明的液体制剂。

[0240] 所述疾病或病况可以是上文提及的任何一种疾病和病况,无论其是治疗适应症还是美容适应症。因此,在一个实施方案中,本发明涉及治疗美容(美学)病况,优选皮肤病况的(非治疗性)方法,包括向有需要的人施用有效量的本发明液体制剂。在另一个实施方案中,本发明涉及治疗美容(美学)病况,优选皮肤病况的(非治疗性)方法,包括将有效量的本发明液体制剂注射到有此需要的人体内。

[0241] 本发明进一步优选的方法涉及面部和/或身体皮肤质量的恢复和/或改善的方法,包括给有需要的人施用有效量的本发明液体制剂。

[0242] 除了患有可以根据本发明治疗的疾病或病况外,待治疗的人没有特别的限制。本领域技术人员将能够确定用于治疗给定治疗或美容适应症的适当施用方案。特别地,根据待治疗的疾病或病况,注射可以是皮内、皮下或肌肉注射。

[0243] 除了上述之外,本发明还涉及一种用于稳定液体肉毒杆菌毒素制剂的方法,该方法包括将肉毒杆菌毒素与人血清白蛋白(HSA)混合,其中如本发明第四方面所述,通过纯化人血清白蛋白起始材料以获得纯化的人血清白蛋白材料来制备HSA。

[0244] 此外,本发明还涉及人血清白蛋白(HSA)用于提供包含肉毒杆菌毒素的光和温度稳定的液体组合物的用途,其中如本发明第四方面所述,通过纯化人血清白蛋白起始材料以获得纯化的人血清白蛋白材料来制备HSA。

[0245] 实施例

[0246] I. 实施例1至3

[0247] 以下实施例说明了根据本发明的液体肉毒杆菌毒素制剂及其制备方法。除非另有说明,百分比是重量体积比(w/v)。

[0248] 使用WO 2014/207109中描述的基于细胞的效力测定法(CBA)来确定肉毒杆菌毒素的生物活性。简而言之,将神经元细胞与含有神经毒素的样品和已知效力的参考标准一起孵育。

[0249] 孵育一段时间后,裂解细胞,并通过免疫测定法测定裂解的SNAP25蛋白的量。然后通过比较用样品处理的细胞和用参考标准处理的细胞的裂解率,计算样品的生物活性。

[0250] 实施例1

[0251] 通过常规透析预处理的含有HSA的液体肉毒杆菌毒素制剂(不是根据本发明)的光稳定性和储存稳定性

[0252] 在最初的实验中,发现不含络合蛋白的150kDa型肉毒杆菌神经毒素液体制剂(本文也称为“150kDa BoNT/A”)的生物活性在暴露于光(日光或室内光)后显著降低,并且光敏感性随着人血清白蛋白(HSA)浓度的增加而增加。在进一步的实验中,本发明人意外地发现液体肉毒杆菌毒素制剂在40°C下的光稳定性和储存稳定性可通过添加络合剂如EDTA而显著增加,即使EDTA以其镁、钙或锌络合物的形式存在(结果未显示)。

[0253] 鉴于这些发现,推测HSA中的未知成分导致了肉毒杆菌毒素的光敏性,并且该成分可以通过某种方式被螯合剂如EDTA灭活或掩盖。然而,在本发明人进行的进一步实验中,令人惊讶地发现EDTA导致注射疼痛增加。因此,为了省去螯合剂如EDTA,本发明人试图通过透析除去HSA中引起光不稳定性的未知成分。

[0254] 为达此目的,在室温下对10mM组氨酸、0.9% NaCl、pH 6.0的缓冲液充分透析HSA的浓缩储备溶液(例如,20%)4×12小时(三次缓冲液更换,缓冲液体积约为样品体积的100倍),以获得“透析的HSA”。然后将透析的HSA和未透析的HSA用于制备以下肉毒杆菌毒素(150kDa BoNT/A,无络合蛋白)液体制剂:

[0255] 制剂1:65U/mL肉毒杆菌毒素,0.1% HSA(未透析),10mM组氨酸,0.9% NaCl,pH 6.0

[0256] 制剂2:65U/mL肉毒杆菌毒素,0.1% HSA(透析的),10mM组氨酸,0.9% NaCl,pH 6.0

[0257] 这两种制剂的光稳定性通过测量在250W/m²的光照下暴露7小时后相对于储存在暗处的对照样品的相对肉毒杆菌毒素活性来确定。对于在250W/m²的光下暴露7小时,使用SUNTEST CPS+仪器(ATLAS Material Testing Technology LLC),该仪器配备有滤光器组以提供320-800nm波长范围内的光谱分布,,其对应于ISO 10977的ID65(室内间接日光标准),使用根据ICH Q1B的窗玻璃滤光器。结果如表1所示。

[0258] 表1. 含有未透析的HSA或透析的HSA的液体肉毒杆菌毒素制剂的光稳定性(7h, 250W/m²)

[0259]

BoNT/A 制剂	透析	相对 BoNT/A 活性(% 对照)
1	否	46%
2	是	56%

[0260] 从表1中可以明显看出,与含有未透析的HSA的制剂1相比,含有透析的HSA的制剂2对光稳定性的影响有限。

[0261] 此外,制剂1和2的储存稳定性通过测量在40℃储存2周和4周后相对于T0时(在制剂1和2制备后立即测量)的对照样品的相对肉毒杆菌毒素活性来确定。结果如表2所示。结果如表2所示。

[0262] 表2. 含有未透析的HSA或透析的HSA的液体肉毒杆菌毒素制剂在40℃下的储存稳定性

[0263]

BoNT/A 制剂	透析	相对 BoNT/A 活性(T0 时%对照)	
		在 40℃储存 2 周后	在 40℃储存 4 周后
1	否	66%	52%
2	是	65%	51%

[0264] 可以看出,透析对肉毒杆菌毒素的储存稳定性没有影响。

[0265] 实施例2

[0266] 用络合剂和透析预处理的含HSA的液体肉毒杆菌毒素制剂的光稳定性和储存稳定性

[0267] 尽管实施例1的发现(即EDTA或EDTA络合物是光稳定性所需的;透析的HSA不会导致光稳定性和储存稳定性的显著改善),但本发明人继续研究尽管不含螯合剂(如EDTA)但仍是光稳定的和储存稳定的液体肉毒杆菌毒素制剂。

[0268] 首先,将EDTA加入到HSA的浓缩储备溶液(例如,20%)(100mM=37.2mg Na₂-EDTA/ml HSA溶液,pH 8.0)中,并在室温下搅拌孵育6小时。然后,将孵育的混合物在室温下对含有EDTA的缓冲液(100mM EDTA,10mM组氨酸,0.9% NaCl,pH 7.0)透析16小时。所用的透析膜是MWC0为10kDa的膜,填充体积为约0.2ml/cm²透析膜。透析缓冲液的体积为样品体积的约100倍。

[0269] 此后,在室温下用体积为样品体积约100倍的无EDTA透析缓冲液(10mM组氨酸,

0.9% NaCl, pH 6.0) 透析24小时, 除去EDTA。然后用新鲜的透析缓冲液替换透析缓冲液, 并再次透析24小时。重复两次以获得预处理的HSA (“EDTA-透析的HSA”)。

[0270] 然后将该预处理的HSA用于制备肉毒杆菌毒素的液体制剂3 (150kDa BoNT/A, 不含络合蛋白):

[0271] 制剂1: 与实施例2的制剂1相同 (65U/mL肉毒杆菌毒素, 0.1%

[0272] HSA (未透析), 10mM组氨酸, 0.9% NaCl, pH 6.0)

[0273] 制剂3: 65U/mL肉毒杆菌毒素, 0.085% HSA (EDTA-透析的), 10mM

[0274] 组氨酸, 0.9% NaCl, pH 6.0

[0275] 制剂1和3的光稳定性通过测量在250W/m²下暴露于光7小时后相对于储存在暗处的对照样品的相对肉毒杆菌毒素活性来确定。结果如表3所示。结果如表3所示。

[0276] 表3. 含有未透析的HSA或EDTA-透析的HSA的液体肉毒杆菌毒素制剂的光稳定性 (7h, 250W/m²)

[0277]	BoNT/A 制剂	EDTA/透析	相对 BoNT/A 活性(%对照)
	1	否	46%
	3	是	84%

[0278] 从表3中可以明显看出, 与含有未预处理的HSA的制剂1相比, 含有EDTA-透析的HSA的制剂3的光稳定性有显著提高。

[0279] 此外, 通过测量在40°C下储存2和4周后相对于T0时 (在制剂1和3制备后立即测量) 的对照样品的相对肉毒杆菌毒素活性来确定储存稳定性。结果如表4所示。结果如表4所示。

[0280] 表4. 含有未透析的HSA或EDTA-透析的HSA的液体肉毒杆菌毒素制剂在40°C下的储存稳定性

[0281]	BoNT/A 制剂	EDTA-透析	相对 BoNT/A 活性(T0 时%对照)	
			在 40°C储存 2 周后	在 40°C储存 4 周后
	1	否	66%	52%
	3	是	94%	82%

[0282] 结果表明, 与含有未处理的 (未透析的) HSA的制剂1相比, 使用EDTA处理和透析的

HSA导致显著更高的生物毒素活性。

[0283] 总的来说,该实施例表明,如果用螯合剂预处理HSA,然后通过例如透析除去螯合剂,螯合剂(例如EDTA)可以意外地从液体制剂中省略。所得制剂不仅对光和温度(储存)稳定,而且与含有螯合剂如EDTA的液体制剂相比,注射时显示出减少的注射疼痛。

[0284] 实施例3

[0285] 铁离子对液体肉毒杆菌毒素制剂光稳定性的影响

[0286] 还进行了实验来研究金属离子对光敏性的影响。为此,将钙(1mM Ca^{2+})、钴(1mM Co^{2+})、铜(1mM Cu^{2+})、镍(1mM Ni^{2+})或铁(1mM Fe^{3+})加入到含有50U/ml 150kDa BoNT/A、0.085%根据实施例2制备的预处理的HSA(即EDTA处理和透析的HSA)、10mM组氨酸、0.9% NaCl、pH 6.0的液体制剂中。所述液体制剂是用高纯水、组氨酸和NaCl制备的,不使用铁或钢设备。将所得制剂暴露于光下(在250W/m²下7小时),并与黑暗储存的对照制剂进行比较。

[0287] 发现当与没有添加钙和钴的制剂(与黑暗储存的对照制剂相比79%的残余毒素活性)相比时,添加钙(1mM Ca^{2+})以及添加钴(1mM Co^{2+})对光稳定性没有影响(与黑暗储存的对照制剂相比74%和77%的残余毒素活性)。添加铜(1mM Cu^{2+})和镍(1mM Ni^{2+})导致光稳定性相对较小的降低。相反,添加铁(1mM Fe^{3+})导致光稳定性急剧降低,与黑暗储存的对照制剂(结果未显示)相比,暴露于光下(250W/m²下7小时)后仅剩余1%的残余毒素活性。

[0288] 鉴于这些结果,在10pM至100μM的浓度范围内更详细地研究了 Fe^{3+} 离子对液体BoNT/A制剂的光敏感性的影响。类似于上述实验,使用包含预处理的HSA(50U/ml肉毒杆菌毒素、0.085%预处理的HSA、10mM组氨酸、0.9% NaCl, pH 6.0)的相同制剂,并且使用储备溶液(50mM $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$)将 Fe^{3+} 浓度调节至所需的最终浓度。在暴露于250W/m²的光下7小时后测量的生物活性表示为在黑暗中储存的各个样品测量的生物活性的百分比,如表5所示。

[0289] 表5. 含有预处理HSA和不同 Fe^{3+} 浓度的液体肉毒杆菌毒素制剂的光稳定性(7h, 250W/m²)

[0290]

BoNT/A 制剂	[Fe ³⁺]	相对 BoNT/A 活性(% 黑暗对照)
1	100 μ M	0.4%
2	1 μ M	9%
3	316 nM	66%
4	100 nM	82%
5	32 nM	77%
5	10 nM	75%
4	100 pM	74%
5	10 pM	78%
6	0 pM	78%

[0291] 从表4可以看出,在316nM的浓度下,Fe³⁺离子对BonT/A稳定性有显著影响,稳定性降低>15%。在1 μ M的浓度下,光稳定性显著降低;然而,它仍然高于在1 μ M以上的浓度。在1 μ M和更高的浓度下,在光的影响下,加入的Fe³⁺离子对液体制剂中BoNT/A的稳定性具有极其负面的影响。

[0292] 在另一个实验中,发现将含有预处理的HSA(即50U/ml肉毒杆菌毒素、0.085%预处理的HSA、10mM组氨酸、0.9% NaCl, pH 6.0)的液体肉毒杆菌毒素制剂在不锈钢烧杯中搅拌48小时导致暴露于光下(250W/m²下7小时)后的相对BoNT/A活性仅为约2%,相比之下,在聚丙烯容器中搅拌48小时的相同样品活性为78%。这是一个非常令人惊讶的发现,可能是由少量Fe³⁺离子从不锈钢烧杯中浸出到液体肉毒杆菌毒素制剂中引起的,并表明铁离子是制备液体肉毒杆菌毒素制剂时要考虑的重要因素。

[0293] II. 实施例4至6

[0294] 以下实施例4至6还证明了根据本发明的液体肉毒杆菌毒素制剂的光稳定性。为此,制备了几种液体肉毒杆菌毒素制剂(实施例4),并且将每种所述制备的制剂的样品暴露于250W/m²的光下7小时,或者在黑暗中储存7小时作为对照。然后,通过基于细胞的效力分析(CBA)测量暴露于光的样品和黑暗储存的样品的肉毒杆菌毒素活性。光稳定性表示为暴

露于光的样品的肉毒杆菌毒素活性的平均值与黑暗储存的样品的肉毒杆菌毒素活性的平均值的百分比。

[0295] 使用W0 2014/207109中描述的基于细胞的效力测定法 (CBA) 来确定肉毒杆菌毒素的生物活性。简而言之,将神经元细胞与含有神经毒素的样品和已知效力的参考标准一起孵育。孵育期后,裂解细胞,并通过免疫测定法测定裂解的SNAP25蛋白的量。然后通过比较用样品处理的细胞和用参考标准处理的细胞的分裂率,计算样品的生物活性。

[0296] 对于在 $250\text{W}/\text{m}^2$ 的光下暴露7小时,使用SUNTEST CPS+仪器(ATLAS Material Testing Technology LLC),其配备有滤光器组,以提供320-800nm波长范围内的光谱分布,其对应于ISO 10977的ID65(室内间接日光标准),使用根据ICH Q1B的窗玻璃滤光器。

[0297] 实施例4

[0298] 不同肉毒杆菌毒素制剂的制备

[0299] 待分析光稳定性的制剂的组成如表6和表7所示。使用的肉毒杆菌毒素 (BoNT) 是NT101。

[0300] 表6. 含有未处理/预处理的HSA的测试制剂

组成		制剂			
		I	II	III	IV
BoNT (U/ml)		50	50	50	50
HSA (mg/ml)	未处理的	1.0	-	1.0	-
	透析的	-	1.0	-	-
	EDTA-透析	-	-	-	0.85
NaCl (mg/ml)		9	9	9	9
组氨酸 (mg/ml)		1.55	1.55	1.55	1.55
EDTA (mg/ml)		-	-	1.30	-
pH		6.0	6.0	6.0	6.0

[0303] 表7. 含色氨酸 (Trp) /N-乙酰基-色氨酸 (N-AcTrp) 的测试制剂

组成	制剂						
	1	2	3	4	5	6	7
[0304] BoNT (U/ml)	50	50	50	50	50	50	50
HSA EDTA 透析(mg/ml)	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
NaCl (mg/ml)	9	9	9	9	9	9	9
组氨酸 (mg/ml)	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
Trp (mM)	-	-	-	-	10	0.08	-
[0305]	N-AcTrp (mM)	10	2	0.4	0.08	-	-
	pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

[0306] “透析的HSA”的制备。将10ml 25% HSA(CSL Behring) 转移到透析盒中(Slide-A-Lyzer™, 10kDa MWC0, 12-30ml, Thermo Scientific/Pierce)。将透析盒置于2升溶液(1.55g/L组氨酸, 9g/L NaCl, pH 6.0)中, 在避光和搅拌(150rpm, 磁力搅拌器)下透析24小时。随后, 用2升新鲜的透析缓冲液(1.55g/L组氨酸, 9g/L NaCl, pH 6.0)代替透析缓冲液, 并将该过程重复三次以上, 每次约12小时。透析盒的最终内容物被称为透析的HSA或“HSA透析液”。如下所述测定浓度。

[0307] “透析的HSA-EDTA”的制备。将18ml 25% HSA(CSL Behring)与2ml 1MNa₂EDTA(pH 8.0)混合。将所得溶液搅拌约6小时。然后, 将约15mL的所述溶液转移到透析盒中(Slide-A-Lyzer™, 10kDa MWC0, 12-30mL, Thermo Scientific/Pierce)。将透析盒置于2升的溶液(1.55g/L组氨酸、9g/L NaCl、37.2g/LNa₂EDTA、pH 7.0)中, 在避光和搅拌(150rpm, 磁力搅拌器)下透析24小时。

[0308] 接下来, 用2升的1.55g/l组氨酸、9g/l NaCl、pH 7.0代替透析缓冲液, 接着透析约12小时, 用2升新鲜透析缓冲液更换透析缓冲液(第一次用His/NaCl、pH 6.5更换缓冲液, 第二次和第三次用His/NaCl、pH 6.0更换缓冲液)。透析盒的最终内容物是EDTA透析的HSA材料(或“HSA-EDTA透析液”)。

[0309] 由于透析过程中的体积增加, 透析后的HSA浓度通常显著低于起始HSA溶液的浓度(25%w/v)。由于蛋白质浓度高, 预计不会有明显的损失, HSA的绝对量被认为是不变的, 浓度是根据技术人员已知的体积变化计算的。透析后的HSA浓度测定为约8.1%w/v。

[0310] 安慰剂原液的制备。为了制备表6和7中所示的但不含活性剂(BoNT)的制剂(本文中称为“安慰剂原液”), 称取起始材料HSA、NaCl和组氨酸, 并溶于水(Milli-Q)。制备色氨酸

(Trp) 和 N-乙酰基-色氨酸 (N-AcTrp) 的 50mM 储备溶液 (分别为 10.212g/l 和 12.313g/l, 在温水中), 并根据所需的最终 Trp 和 N-AcTrp 浓度进行给药。最后, 通过加入 1M NaOH 或 1M HCl 将 pH 调节至 6.0, 用水补充至最终体积, 并将溶液通过 0.22 μ m 过滤器无菌过滤。

[0311] BoNT 预稀释液的制备。将 13.44mg NT101 称重到 50mL 无菌低蛋白结合管中, 并与 20.123g 无菌过滤的制剂 7 的安慰剂原液混合, 以获得含有 25,000U/ml BoNT 的预稀释液。

[0312] 样品的制备。将 20.0 μ l BoNT 预稀释液置于无菌的 15ml 低蛋白结合管中, 并加入 9.98ml 相应的安慰剂原液。将溶液轻轻倒置 10 次以混合。然后, 将 3 $\times$ 1ml 每种溶液置于 1.5ml 低结合管中, 并将其暴露于 250W/m² 下 7 小时。每个样品溶液的剩余部分用铝箔覆盖, 并在 4 $^{\circ}$ C 下批量储存, 直到测量 (“黑暗对照” 样品)。

[0313] 实施例 5

[0314] 不同液体 BoNT 制剂的光稳定性比较

[0315] 使用 CBA (多次测量) 测量表 6 中制剂 I 至 IV 的样品的肉毒杆菌毒素活性, 所述样品暴露于 250W/m² 的光下 7 小时或在黑暗中储存 7 小时。表 8 所示结果为暴露于光的样品相对于黑暗中储存的对照样品的活性百分比。

[0316] 表 8. 不同液体 BoNT 制剂的光稳定性比较

BoNT 制剂		相对 BoNT 活性 (%黑暗对照样品)
编号	HSA	
I	未处理的 HSA	46
II	透析的-HSA	56
III	未处理的 HSA + EDTA	80
IV	透 析 的 HSA-	84
EDTA		

[0319] 从表 8 中可以看出, HSA 的透析在一定程度上增加了 BoNT 对光暴露的稳定性 (参见制剂 II vs. 制剂 I)。向未处理的 HSA 中加入 EDTA 具有显著更大的积极作用 (参见制剂 III)。然而, 加入 EDTA 并不能完全防止光的不稳定作用。通过用 EDTA 预孵育, 然后用不含 EDTA 的组氨酸缓冲液透析, 可获得最佳的光稳定性 (参见制剂 IV)。这表明所观察到的光稳定性可能不

仅仅是由于金属离子,而是由于其他未知的化合物。

[0320] 实施例6

[0321] 存在和不存在色氨酸和N-乙酰基-色氨酸时液体BoNT制剂的光稳定性

[0322] 使用CBA(多重测量)测量表7中制剂1至7的样品的肉毒杆菌毒素活性,所述样品暴露于250W/m²的光下7小时或在黑暗中储存7小时。表9所示结果为暴露于光的样品相对于黑暗中储存的对照样品的活性百分比。

[0323] 表9.存在或不存在色氨酸或N-乙酰基-色氨酸时液体BoNT制剂的光稳定性比较

编号	BoNT 制剂		相对 BoNT 活性(%黑暗 对照样品)
	N- AcTrp (mM)	Trp (mM)	
1	10	-	6
2	2	-	8
3	0.4	-	45
4	0.08	-	73
5	-	10	8
6	-	0.08	67
7	-	-	85

[0326] 可以看出,色氨酸和N-乙酰基-色氨酸都以剂量依赖的方式对BoNT液体制剂的光稳定性有显著的负面影响。在较高的浓度下(分别为10mM和2mM),光稳定性降低的效果如此明显,以至于相对生物活性特别低(<10%)。与不含Trp和N-AcTrp的对照制剂相比,在低至80μM浓度的Trp或N-AcTrp下,暴露于光后BoNT生物活性降低约10%(参见制剂4和6vs.制剂7)。

[0327] 80μM N-乙酰基-色氨酸的浓度对应于将25%w/v HSA起始材料(含有20mM N-AcTrp)稀释至0.1%w/v或1mg/ml HSA。由于1mg/ml HSA的值落在肉毒杆菌毒素制剂中通常使用的浓度范围内,因此使用这种HSA起始材料导致BoNT/A制剂中的N-乙酰基-色氨酸浓度

具有增加的光敏性。因此,色氨酸和N-乙酰基-色氨酸对光稳定性产生负面影响的浓度范围具有重要的实际意义。