



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106039294 A

(43)申请公布日 2016.10.26

(21)申请号 201610412863.9

A61K 47/34(2006.01)

(22)申请日 2006.03.03

A61P 25/00(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 25/06(2006.01)

60/658,434 2005.03.03 US

A61P 21/02(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

200680014839.4 2006.03.03

(71)申请人 雷文斯治疗公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 M·D·戴克 J·M·沃

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 崔锡强

(51)Int.Cl.

A61K 38/48(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书36页 附图16页

(54)发明名称

用于局部施用和经皮肤递送肉毒杆菌毒素的组合物和方法

(57)摘要

公开了用于经皮肤递送肉毒杆菌毒素的改良制剂。该制剂包含,例如,与带正电荷的主链非-共价连接的肉毒杆菌毒素,所述的主链具有分支或效应基团。制剂还包含分配剂、寡聚-桥或多聚阴离子桥,并可任选包含粘度改良剂。该制剂设计用于局部施用于患者的皮肤上并可用于处理皱纹、多汗症和其它与健康相关的问题。用于施用的试剂盒也得以描述。

1. 包含以下组分的组合物在制备药物中的用途,

所述组合物包含:肉毒杆菌毒素;载体,所述载体包含具有共价连接其上的带正电荷的效应基团的带正电荷的聚合主链;泊洛沙姆;皮肤病学或药学上可接受的赋形剂、稀释剂或介质;

所述药物用于局部施用于需要治疗疼痛的受试者的受感染区域;

其中,在所述组合物中,所述肉毒杆菌毒素与载体组分的带正电荷的聚合主链非共价连接;且包含具有共价连接其上的带正电荷的一个或多个效应基团的带正电荷的聚合主链的载体组分是用于非共价连接肉毒杆菌毒素且递送肉毒杆菌毒素至受感染区域从而治疗受试者的疼痛的唯一需要的组分。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述治疗的疼痛选自神经性疼痛、偏头痛、非偏头痛或肌肉痉挛痛的一种或多种。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述疼痛是神经性疼痛。

4. 根据权利要求2所述的用途,其中所述疼痛是偏头痛。

5. 根据权利要求2所述的用途,其中所述疼痛是非偏头痛。

6. 根据权利要求2所述的用途,其中所述疼痛是肌肉痉挛痛。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述药物局部施用于患者的皮肤。

8. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述带正电荷的聚合主链是多聚赖氨酸或聚乙烯亚胺(PEI)。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述带正电荷的聚合主链具有小于21,000的分子量。

10. 根据权利要求8所述的用途,其中所述带正电荷的效应基团是经保护的寡聚精氨酸或TAT结构域。

11. 根据权利要求10的用途,其中所述组合物进一步包含粘度修饰剂或凝胶剂。

12. 根据权利要求11的用途,其中所述粘度修饰剂或凝胶剂是聚乙二醇(PEG)或羟丙基纤维素(HPC)。

13. 根据权利要求10的用途,其中所述带正电荷的效应基团为选自以下的氨基酸序列: $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q(\text{SEQ ID NO:2})$ 、 $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q(\text{SEQ ID NO:3})$ 和 $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q(\text{SEQ ID NO:4})$,其中下标p和q各自独立地为0—20的整数。

14. 根据权利要求13的用途,其中所述带正电荷的效应基团包括氨基酸序列 $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q(\text{SEQ ID NO:2})$,其中下标p和q各自独立地为0—20的整数。

15. 根据权利要求13的用途,其中所述带正电荷的效应基团包括氨基酸序列 $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q(\text{SEQ ID NO:3})$,其中下标p和q各自独立地为0—20的整数。

16. 根据权利要求13的用途,其中所述带正电荷的效应基团包括氨基酸序列 $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q(\text{SEQ ID NO:4})$,其中下标p和q各自独立地为0—20的整数。

17. 根据权利要求13的用途,其中下标p和q各自独立地为0—8的整数。

18. 根据权利要求13的用途,其中下标p和q各自独立地为2—5的整数。

19. 根据权利要求8所述的用途,其中所述带正电荷的聚合主链是多聚赖氨酸,且所述带正电荷的效应基团包括氨基酸序列 $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q(\text{SEQ ID NO:2})$,其中下标p和q各自独立地为2—5的整数。

20. 根据权利要求8所述的用途,其中所述带正电荷的聚合主链是多聚赖氨酸,且所述带正电荷的效应基团包括氨基酸序列 $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$ (SEQ ID NO:3),其中下标p和q各自独立地为2-5的整数。

21. 根据权利要求8所述的用途,其中所述带正电荷的聚合主链是多聚赖氨酸,且所述带正电荷的效应基团包括氨基酸序列 $(\text{gly})_p\text{-RKRRQRRR-(gly)}_q$ (SEQ ID NO:4),其中下标p和q各自独立地为2-5的整数。

22. 根据权利要求1所述的用途,其中所述肉毒杆菌毒素是选自血清型A、B、C、D、E、F和G及其组合的血清型。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述肉毒杆菌毒素是血清型A。

24. 根据权利要求19所述的用途,其中所述肉毒杆菌毒素是血清型A。

25. 根据权利要求20所述的用途,其中所述肉毒杆菌毒素是血清型A。

26. 根据权利要求21所述的用途,其中所述肉毒杆菌毒素是血清型A。

27. 根据权利要求23所述的用途,其中所述肉毒杆菌毒素具有150,000的分子量。

28. 根据权利要求24所述的用途,其中所述肉毒杆菌毒素具有150,000的分子量。

29. 根据权利要求25所述的用途,其中所述肉毒杆菌毒素具有150,000的分子量。

30. 根据权利要求26所述的用途,其中所述肉毒杆菌毒素具有150,000的分子量。

31. 根据权利要求19所述的用途,其中所述多聚赖氨酸具有约21,000的分子量。

32. 根据权利要求20所述的用途,其中所述多聚赖氨酸具有约21,000的分子量。

33. 根据权利要求21所述的用途,其中所述多聚赖氨酸具有约21,000的分子量。

34. 根据权利要求11所述的用途,其中所述带正电荷的聚合主链是多聚赖氨酸,且氨基酸序列经由该氨基酸序列的C-端或N-端连接至多聚赖氨酸。

35. 根据权利要求19所述的用途,其中所述氨基酸序列经由该氨基酸序列的C-端或N-端连接至多聚赖氨酸。

36. 根据权利要求24所述的用途,其中所述氨基酸序列经由该氨基酸序列的C-端或N-端连接至多聚赖氨酸。

37. 根据权利要求25所述的用途,其中所述氨基酸序列经由该氨基酸序列的C-端或N-端连接至多聚赖氨酸。

38. 根据权利要求26所述的用途,其中所述氨基酸序列经由该氨基酸序列的C-端或N-端连接至多聚赖氨酸。

39. 根据权利要求10所述的用途,其中所述带正电荷的效应基团占组合物中总载体重量的至少约0.05%重量。

40. 根据权利要求39所述的用途,其中所述带正电荷的效应基团占组合物中总载体重量的至少约0.1%重量-约30%重量。

41. 根据权利要求13的用途,其中所述组合物包含血清型A的肉毒杆菌毒素,包含共价连接其上的具有氨基酸序列 $(\text{gly})_p\text{-RKRRQRRR-(gly)}_q$ (SEQ ID NO:4)的带正电荷的效应基团的多聚赖氨酸,和泊洛沙姆,其中下标p和q各自独立地为0-20的整数。

42. 根据权利要求41所述的用途,其中所述带正电荷的效应基团占组合物中总载体重量的至少约0.1%重量-约30%重量。

43. 根据权利要求41所述的用途,其中所述多聚赖氨酸具有约21,000的分子量。

44. 根据权利要求41的用途, 其中所述血清型A的肉毒杆菌毒素具有约150,000的分子量。

45. 根据权利要求1的用途, 其中所述皮肤病学或药学上可接受的赋形剂、稀释剂或介质是包含15%的泊洛沙姆的盐水溶液的含水的稀释剂, 且其中载体和肉毒杆菌毒素以相当于0.5mg载体比100U毒素的比率存在于盐水溶液中。

用于局部施用和经皮肤递送肉毒杆菌毒素的组合物和方法

[0001] 本分案申请是基于申请号为201110324571.7,申请日为2006年3月3日,发明名称为“用于局部施用和经皮肤递送肉毒杆菌毒素的组合物和方法”的原始中国专利申请的分案申请;所述申请号为201110324571.7、申请日为2006年3月3日、发明名称为“用于局部施用和经皮肤递送肉毒杆菌毒素的组合物和方法”的原始中国专利申请为申请号为200680014839.4、申请日为2006年3月3日、发明名称为“用于局部施用和经皮肤递送肉毒杆菌毒素的组合物和方法”的原始中国专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求于2005年3月3日申请的美国暂时专利申请案No.60/658,434的优先权。美国专利申请No.60/658,434在这里通过全文引入作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 皮肤保护身体的器官免受外界环境威胁并用作维持体温的恒温器。它由几个不同的层组成,每一层具有专门的功能。主要的层包括表皮层、真皮层和皮下组织。表皮层是在真皮层上的分层的上皮细胞,真皮层由结缔组织组成。表皮层和真皮层都进一步由内层脂肪组织的皮下组织支持。

[0005] 表皮层(皮肤的最上层)只有0.1-1.5毫米厚(Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7(1998))。它由角质形成细胞组成并基于它们的分化状态分为若干层。表皮层可进一步分为角质层和有活力的表皮,表皮由颗粒状melphigian和基底细胞组成。角质层是吸湿性的并且需要至少10%重量的水分来维持它的弹性和软度。吸湿性可部分地归因于角蛋白的持水能力。当角质层丧失它的软度和弹性时,它变得粗糙和易裂,导致干性皮肤。

[0006] 紧接在表皮层下面的真皮层为1.5-4毫米厚。它是皮肤的三层中最厚的层。另外,真皮层还是大部分皮肤结构的所在地,包括汗腺和脂腺(其通过皮肤中称为毛孔或粉刺的开口分泌物质)、毛囊、神经末梢,以及血液和淋巴管(Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7(1998))。但是,真皮层的主要成分是胶原蛋白和弹性蛋白。

[0007] 皮下组织是皮肤的最深层。它担当用于身体热量保存的隔热体并担当用于器官保护的减震器(Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7(1998))。另外,皮下组织还存储脂肪用于能量储备。皮肤的pH通常在5和6之间。该酸度是由于存在两性氨基酸、乳酸,以及皮脂腺分泌的脂肪酸。术语“酸性外膜(acid mantle)”指在皮肤的大部分区域上水溶性物质的存在。皮肤的缓冲能力部分归因于皮肤角质层中储藏的这些分泌物。

[0008] 皮肤的其中一项主要功能是为可能对正常内环境稳定有害的水和物质的运输提供一个屏障。如果没有坚韧的、半渗透性的皮肤,身体将会迅速脱水。皮肤有助于防止有害物质进入身体。

[0009] 皱纹是衰老的一个指示迹象,可通过从环境损害积累的生物化学、组织学和生理学变化引起(Benedetto, International Journal of Dermatology, 38:641-655(1999))。另外,存在能引起面部皱纹的特征性褶、沟和皱褶的其它次要因素(Stegman等, The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery, 2nded., St. Louis, MO: Mosby

Year Book:5-15(1990))。这些次要因素包括皮肤受到重力的持续拉力、频繁且持续的位置压力(即在睡觉过程中),以及由面部肌肉收缩引起的重复的面部运动(Stegman等,The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery,2nd ed.,St.Louis,MO: Mosby Year Book:5-15(1990))。

[0010] 已经采用不同的技术以可能减轻一些衰老迹象。这些技术从含有 α 羟酸和维生素A的面部增湿剂到手术操作以及注射神经毒素。例如,在1986年,Jean和Alastair Carruthers(由眼整形外科医师和皮肤科医师组成的夫妻团队)开始发展A型肉毒杆菌毒素的美容用途,用于处理眉间区域中与运动相关的皱纹(Schantz and Scott,In Lewis GE(Ed)Biomedical Aspects of Botulinum,New York:Academic Press,143-150(1981))。Carruthers将A型肉毒杆菌用于处理皱纹的使用导致他们在1992年开创性地发表了该方法(Schantz and Scott,In Lewis GE(Ed)Biomedical Aspects of Botulinum,New York:Academic Press,143-150(1981))。到1994年,该小组报道了对面部上其它运动-相关皱纹的体验(Scott,Ophthalmol,87:1044-1049(1980))。这接下来导致美容性A型肉毒杆菌处理时代的诞生。

[0011] 除了A型肉毒杆菌(botulinum),存在血清学相关但不同的7种其它的肉毒杆菌毒素。总的来说,肉毒杆菌毒素(也称为肉毒杆菌毒素或肉毒杆菌神经毒素)是通过革兰氏阳性细菌肉毒杆菌(clostridium botulinum)产生的神经毒素。它们通过阻止突触传递或释放乙酰胆碱跨越神经肌接点来产生肌肉麻痹,并认为也可以以其它的方式起作用。它们的作用基本上阻断了通常会引起肌肉痉挛或收缩的信号,导致麻痹。

[0012] 在这8种血清学相关的肉毒杆菌毒素中,有7种能引起麻痹,即肉毒杆菌神经毒素血清型A、B、C、D、E、F和G。这7种的每种通过类型特异性抗体的中和作用区分。但是,对于所有7种这些活性肉毒杆菌毒素血清型,肉毒杆菌毒素蛋白质分子的分子量都是约150kD。正如通过细菌释放的,肉毒杆菌毒素是含有所讨论的150kD肉毒杆菌毒素蛋白质分子连同相关非毒素蛋白质的复合体。A型肉毒杆菌毒素复合体可由梭菌属细菌以900kD、500kD和300kD的形式产生。B和C型肉毒杆菌毒素显然只作为700kD或500kD的复合体产生。D型肉毒杆菌毒素作为300kD和500kD的复合体产生。E和F型肉毒杆菌毒素只作为约300kD的复合体产生。据认为所述复合体(即分子量大于约150kD)含有非毒素血凝素蛋白质以及非毒素且无毒的非血凝素蛋白质。在摄入毒素时,这两种非毒素蛋白质(其连同肉毒杆菌毒素分子一起构成了相关的神经毒素复合体)可用于提供对抗肉毒杆菌毒素分子变性的稳定性和当其被消化时保护其对抗消化性酸。另外,有可能较大的(大于约150kD分子量)肉毒杆菌毒素复合体可导致肉毒杆菌毒素以较慢的扩散速率离开肉毒杆菌毒素复合体的肌肉注射位点。

[0013] 不同血清型的肉毒杆菌毒素在它们感染的动物种以及它们引起的麻痹的严重性和持续时间上不同。例如,如通过在大鼠中测量产生的麻痹速率,已经确定A型肉毒杆菌毒素比B型肉毒杆菌毒素有效500倍。另外,已经确定B型肉毒杆菌毒素在剂量为480U/kg(约为A型肉毒杆菌毒素的灵长类LD₅₀的12倍)时在灵长类中是无毒的。由于肉毒杆菌毒素的分子大小和分子结构,它不能够通过角质层和下面的皮肤结构的多个层。

[0014] 全身性肉毒杆菌毒素暴露引起的中毒症状(称为肉毒中毒)自古代以来就在欧洲存在。在1895年,Emile P.van Ermengem首次从生的咸猪肉分离出厌氧性产芽孢杆菌,所述的猪肉从在比利时死于肉毒中毒的猪的死后组织获得。Van Ermengem发现该疾病是由他所

命名的肉毒芽孢杆菌产生的细胞外毒素引起(Van Ermengem, *Z Hyyg Infektionskr*, 26:1-56; *Rev Infect*(1897))。该名称在1992年更改成肉毒杆菌。名称梭状芽孢杆菌用于反映这种微生物的厌氧特性以及它的形态特征(Carruthers和Carruthers, *Can J Ophthalmol*, 31:389-400(1996))。在20世纪20年代,在多次爆发食物中毒后粗产物形式的A型肉毒杆菌毒素得以分离。旧金山加利福尼亚大学的Herman Sommer博士第一次尝试纯化该神经毒素(Borodic等, *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*, 7:54-60(1991))。在1964年,Edward J. Schantz博士和他的同事分离出结晶体形式的上述神经毒素(Schantz等, In: Jankovi J, Hallet M(Eds) *Therapy with Botulinum Toxin*, New York, NY: Marcel Dekker, 41-49(1994))。到1949年, Burgen和他的同事能够证明肉毒杆菌毒素阻断了跨越神经肌肉接点的神经冲动(Burgen等, *J Physiol*, 109:10-24(1949))。1973年, Allan B. Scott首次在猴中使用肉毒杆菌毒素A(BTX-A)。Scott证明了持续3个月的可逆的眼肌麻痹(Lamanna, *Science*, 130:763-772(1959))。不久之后,报道了BTX-A是一种对人的斜视、脸痉挛和痉挛性斜颈的成功疗法(Baron等, In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM(Eds), *Bailey&Scotts Diagnostic Microbiology*, St. Louis, MO: Mosby Year Book, 504-523(1994); Carruthers和Carruthers, *Adv Dermatol*, 12:325-348(1997); Markowitz, In: Strickland GT(Eds) *Hunters Tropical Medicine*, 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 441-444(1991))。A型肉毒杆菌毒素据说是人类已知的最致命性的天然生物制剂。肉毒杆菌的孢子在土壤中发现并能够在不正确消毒的且密封的食物容器中生长。该细菌的摄入可导致肉毒中毒,这可能是致命的。

[0015] 同时,肉毒杆菌毒素的肌肉-麻痹效应已经用于治疗目的。肉毒杆菌毒素的受控施用已经用于提供肌肉麻痹来治疗病症,例如表征为机能亢进的骨骼肌的神经肌肉障碍。已经用肉毒杆菌毒素治疗的病症包括半侧面痉挛、成年型痉挛性斜颈、肛裂、脸痉挛、脑性麻痹、宫口梗阻性难产、偏头痛、斜视、颞侧下颌关节障碍(temperomandibular joint disorder),以及多种类型的肌肉痛性痉挛和痉挛。更近一些时候,已经利用肉毒杆菌毒素的肌肉-麻痹效应用于治疗性和美容性面部施用例如处理皱纹、皱眉引起的皱纹,以及面部肌肉痉挛或收缩的其它结果。

[0016] 考虑到肉毒杆菌毒素的毒性以及它的治疗用途潜力,开发用于安全施用该毒素的组合物和方法将是所期望的。肉毒杆菌毒素的局部施用因为下列原因而将会提供更安全且更理想的治疗备选方案:施用的无痛性质、可覆盖的更大治疗表面积、制备具有更高比活性的纯毒素的能力、应用肉毒杆菌治疗所需训练的减少、产生理想效果所需的量更少,以及不需要大量毒素来达到治疗性的临床效果。用于经皮肤递送肉毒杆菌毒素的有效手段,以及用于施用肉毒杆菌毒素治疗或预防不需要注射的许多病症的有效手段因而是非常理想的。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明涉及含有肉毒杆菌毒素的新的组合物,更特别涉及这样的组合物,其能够通过皮肤或上皮组织输送或递送(也称为“经皮肤递送”)肉毒杆菌毒素,并因此可局部施用来提供肉毒杆菌毒素给受试者,用于如在此描述的多种治疗、美容和/或美学目的。

[0019] 本发明的一方面是提供含有肉毒杆菌毒素和载体的组合物。该载体具有连接有带正电荷的分支基团的聚合主链。载体和肉毒杆菌毒素之间的连接是非共价的。

[0020] 本发明还提供了施用肉毒杆菌毒素给受试者的方法,该方法包括局部施用给受试

者的皮肤或上皮组织与有效量载体结合的肉毒杆菌毒素。该载体具有连接有带正电荷的分支基团的聚合主链,并且与肉毒杆菌毒素非共价结合。

[0021] 本发明的另一个方面是提供制剂,所述的制剂含有肉毒杆菌毒素、带正电荷的主链,以及至少一种选自分配剂(partitioning agent)、寡聚-桥(oligo-bridge)和聚阴离子桥(polyanion bridge)的成员,这样肉毒杆菌毒素与带正电荷的主链非共价地复合。该制剂可用于通过施用制剂至皮肤区域来处理皱纹。如果需要,可在施用该制剂后施用遮蔽剂(occlusion agent)。

[0022] 本发明的制剂还可用于治疗多汗症。本发明考虑的治疗方法包括:施用给皮肤区域本发明制剂以及随后任选施用遮蔽剂。

[0023] 本发明的另一方面是提供用于施用肉毒杆菌毒素给受试者的试剂盒。该试剂盒包含以用于其经皮肤递送的有效量存在的肉毒杆菌毒素,以及载体,所述载体具有连接有带正电荷的分支基团的聚合主链。载体和肉毒杆菌毒素之间的结合是非共价的。

[0024] 然而,本发明的另一方面是提供用于施用肉毒杆菌毒素给受试者的试剂盒。该试剂盒包含用于递送肉毒杆菌毒素至皮肤的装置和含有载体的组合物,所述载体具有连接有带正电荷的分支基团的聚合主链,所述的分支基团选自 $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ 、HIV-TAT及其片段,以及Antennapedia PTD,其中下标 $n1$ 是0至约20的整数,并且下标 $n2$ 独立地是从约5至约25的奇整数。

[0025] 在一个方面,本发明涉及含有肉毒杆菌毒素(如在此定义的)和载体的组合物,所述载体包含具有带正电荷的分支或效应基团的带正电荷的“主链”,如在此描述的。最优选地,带正电荷的载体是长链带正电荷的多肽或带正电荷的非肽基聚合物,例如聚亚烷基亚胺。本发明进一步涉及用于通过局部施用有效量的这种组合物优选至需要这种治疗的受试者或患者的皮肤而产生生物效应的方法,所述的生物效应例如是肌肉麻痹、减少分泌过多或出汗、治疗神经性疼痛或偏头痛、减少肌肉痉挛、预防或减少粉刺,或者减少或增强免疫应答。本发明还涉及用于产生美容或美学效果的方法,例如通过局部施用肉毒杆菌毒素至面部而不是通过注射进面部肌肉。

[0026] 本发明还提供了用于制备或配制组合物的试剂盒,所述的组合物包含载体和肉毒杆菌毒素,以及产生可使用的制剂或可依次用于产生这种制剂的预混合物所需的另外的物质。备选地,该试剂盒包括用于分别施用,但是协同作用,施用肉毒杆菌毒素和载体给受试者的手段。

[0027] 附图简述

[0028] 图1显示了一个实验的结果,该实验证明了用含有肽主链的本发明组合物经皮肤递送肉毒杆菌毒素的效力。

[0029] 图2是描述小鼠的后肢状态的照片,其中一个后肢区域用本发明的组合物处理,而另一后肢区域用不含根据本发明的载体的另一种含有肉毒杆菌毒素的组合物处理。

[0030] 图3是描述在用Revance's肉毒杆菌制剂局部处理之前和之后受试者前额上的皱纹的照片。

[0031] 图4显示了(A)在用Revance's肉毒杆菌制剂局部处理皱纹之后以及(b)在处理之前前额的Mikrosil印迹(cast)。这些Mikrosil印迹清楚地显示未处理的一侧具有更深的皱纹,所述的Mikrosil印迹是有用的,因为它们使可能来自给真实受试者照相的人为因素最

小化。

[0032] 图5:图5显示描述在处理之前于受试者前额上进行的Minor's淀粉/碘试验的照片。

[0033] 图6:图6a显示描述在施用Revance's肉毒杆菌制剂(A)和对照制剂(B)5天后Minor's淀粉/碘试验的照片。对照制剂含有分子量约21,000并具有TAT分支基团的带正电荷的多聚赖氨酸主链。这些照片在施用2分钟后获得。图6b与图6a相同,除了照片是在经过4分钟后获得以外。

[0034] 图7:显示在腋下多汗症试验中使用的给药区域。注意到,该给药区域的范围超过了腋毛覆盖的皮肤区域1厘米。

[0035] 图8:图8a显示了一个试验结果,该试验证明了肉毒杆菌毒素治疗人受试者的腋下多汗症的效力,所述的肉毒杆菌毒素作为使用短的肽基载体的局部用药剂治疗性地递送穿过完整的皮肤。该图描述了在用Botox加上短的肽基载体或单独用载体处理4周后按重量分析测量到的汗量(mg/5分钟)的显著减少。结果是作为与相同组基准值的比率的4周的值,显著性通过Wilcoxon分析($P < 0.05$, $N = 10$ 个患者)测定。图8b显示了一个试验结果,该试验证明肉毒杆菌毒素治疗人受试者的腋下多汗症的效力,所述的肉毒杆菌毒素使用短的肽基载体作为局部用药剂治疗性地递送经过完整的皮肤。该图描述了在用Botox加上短的肽基载体或单独用载体处理4周后按重量分析测量到的汗量(mg/5分钟)的显著减少。结果是作为对两者时间点的对照值的比率的治疗值,其显著性通过Wilcoxon分析($P < 0.05$, $N = 10$ 个患者)测定。

[0036] 图9显示了描述Minor's淀粉/碘试验的照片,所述试验在用Revance's肉毒杆菌制剂局部处理来治疗腋下多汗症之前和之后进行。显示了基线和2周时的淀粉碘试验,其中受试者#12的右侧腋窝用Revance's肉毒杆菌制剂处理(a和c)而左侧腋窝施用对照(b和d)。这些照片说明了在碘淀粉试验中用载体+botox处理后观察到的典型的效果。虽然在对照一侧上观察到一些交叉(与重量分析数据减少25%一致),但是处理引起显著减少(与经处理的一侧的重量分析数据减少65%一致)。

[0037] 图11a-d:在两个不同动物中局部施用无载体的肉毒杆菌毒素(图11a和图11c)或有KNR的肉毒杆菌毒素(图11b和图11d)7天后,通过碘-淀粉染色法(深蓝色的为阳性)显示的小鼠足部汗的产生。

[0038] 图10a和10b:图10(a)显示了在施用对照制剂给雄性CD 1小鼠后的肌力(muscle force)产生。图10(b)显示了在施用局部用“Revance Botox溶液”后的肌力产生。

[0039] 图12:改良的Franz Chamber。(a)仪器装置,包括贮器、循环式水浴锅、在线蠕动泵、在线Franz chamber和级分收集器。(b)单个的Franz chamber的横截面,显示了输入管和输出管、皮肤膜,以及供体化合物的放置。

[0040] 图13:K30T相对于对照样品的增加的流通量。(a)K30T对多聚赖氨酸(b)K30T对无载体。

[0041] 图14:在猪皮肤模型中Revance载体递送A型肉毒杆菌毒素穿过皮肤屏障的效力用改良的Franz chamber评估。显示了局部施用后增加的毒素流通量(图14a-f)。每个图描述了以不同载体:毒素质量比递送穿过猪的皮肤的局部用毒素的平均值和标准误差百分比。

[0042] 图15:描述链霉抗生物素蛋白染色(蓝色为阳性)的代表性显微照片,所述的链霉

抗生物素蛋白染色是在局部施用无载体的生物素化肉毒杆菌毒素(对照组,a-c),或具有K30T载体的生物素化肉毒杆菌毒素(处理组,d-f)后进行。

[0043] 图16:该图显示了对于含有K15T2的NNX(处理组)、无载体的NNX(对照组)以及NNX注射肌力减少的百分比。

[0044] 图17:该图显示了在局部施用A型肉毒杆菌毒素后减少了前额的皱纹。人受试者1在顶行并且受试者2在底端行。该图举例说明了处理前(基线)和处理后的状况。

[0045] 图18:比较了根据本发明的制剂和对照制剂的人的腋下多汗症试验。

[0046] 发明详述

[0047] 本发明提供了用于通过局部施用合适的制剂递送、尤其经皮肤递送肉毒杆菌毒素的组合物和方法。

[0048] 根据本发明,具有效应基团的带正电荷的载体分子,如在此描述的,已经发现适合作为肉毒杆菌毒素的运输系统,使得毒素能够经皮肤施用至肌肉和/或其它皮肤相关组织。运输发生,而无需共价修饰肉毒杆菌毒素。

[0049] “带正电荷的”表示载体在至少一些液相条件下,更优选在至少一些生理学兼容的条件下带有正电荷。更优选地,如在此使用的,“带正电荷的”表示所考虑的基团含有在所有pH条件下带电荷的官能团,例如季胺,或者含有在某些液相条件下,例如在伯胺的情形中pH变化的条件下,可获得正电荷的官能团。更优选的,如在此使用的,“带正电荷的”指具有在生理学兼容条件下与阴离子缔合的行为的那些基团。具有多个带正电荷的部分的聚合物不必是均聚物,这对于本领域技术人员将是显而易见的。带正电荷的部分的其它实例是现有技术所熟知的并可容易地采用,这对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0050] 一般而言,带正电荷的载体(也称为“带正电荷的主链”)通常是原子组成的直链,其链中的基团在生理pH下带正电荷,或带正电荷的基团连接至从主链延伸的侧链上。优选地,带正电荷的主链自身将不具有确定的酶促活性或治疗性生物学活性。线性主链是烃主链,在一些实施方案中,其由选自氮、氧、硫、硅和磷的杂原子间插。大多数主链的原子通常是碳。另外,主链将通常是重复单位(例如,氨基酸、聚(乙烯氧基)、聚(丙烯胺)、聚亚烷基胺等)的聚合物但可以是杂聚物。在一组实施方案中,带正电荷的主链是其中许多胺氮原子作为携带正电荷的铵基(四-取代的)存在的聚丙烯胺。在另一个实施方案中,带正电荷的主链是非肽基聚合物,其可以是杂聚物或均聚物例如聚亚烷基胺,如聚乙烯胺或聚丙烯胺,分子量约10,000-2,500,000、优选约100,000-1,800,000,并且最优选约500,000-1,400,000。在另一组实施方案中,主链已经连接有多个包含带正电荷的基团(例如铵基、吡啶鎓、磷鎓、铈、胍基团(guanidinium)或amidinium基团)的侧链部分。该组实施方案中的侧链部分可沿主链间隔放置,间隔是一致的或可变的。另外,侧链的长度可以相似或不同。例如,在一组实施方案中,侧链可以是具有1-20个碳原子并在远端(远离主链)以上述带正电荷的基团之一结尾的直或分支的烃链。在本发明的所有方面,载体与生物活性制剂之间的结合是通过非共价相互作用,其非限制性实例包括离子相互作用、氢键结合、范德华力或其组合。

[0051] 在一组实施方案中,带正电荷的主链是具有多个带正电荷的侧链基团(例如赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、高精氨酸等)的多肽。优选地,该多肽的分子量为约10,000-1,500,000,更优选约25,000-1,200,000,最优选约100,000-1,000,000。本领域的技术人员将理解,当

氨基酸用于本发明的这个部分时,在连接的中心,侧链可具有D-或L-型(R或S构型)。备选地,主链可以是多肽的类似物例如类肽(peptoid)。参见,例如Kessler, Angew.Chem.Int.Ed.Engl.32:543(1993);Zuckermann等,Chemtracts-Macromol.Chem.4:80(1992);以及Simon等,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 89:9367(1992)。简而言之,类肽是其中侧链连接至主链氮原子而不是 α -碳原子的多聚甘氨酸。同上,一部分侧链通常将会以带正电荷的基团结尾以提供带正电荷的主链成分。类肽的合成在例如美国专利No.5,877,278中描述,其在这里通过全文引入作为参考。如在此使用的术语,具有类肽主链结构的带正电荷的主链认为是“非肽”的,因为它们不是由在 α -碳位置具有天然存在的侧链的氨基酸组成。

[0052] 可使用多种其它主链,例如采用其中肽的酰胺键用代用品例如酯键、硫代酰胺($-\text{CSNH}-$)、反向的硫代酰胺($-\text{NHCS}-$)、氨基亚甲基($-\text{NHCH}_2-$)或反向的亚甲基氨基($-\text{CH}_2\text{NH}-$)基团、酮-亚甲基($-\text{COCH}_2-$)基团、次膦酸酯($-\text{PO}_2\text{RCH}_2-$)、膦酰胺(phosphonamidate)和膦酰胺酯(phosphonamidate ester)($-\text{PO}_2\text{RNH}-$)、反向的肽($-\text{NHCO}-$)、反式-烯基($-\text{CR}=\text{CH}-$)、氟代烯($-\text{CF}=\text{CH}-$)、二亚甲基($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、硫醚($-\text{CH}_2\text{S}-$)、羟基亚乙基($-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$)、亚甲基氧基($-\text{CH}_2\text{O}-$)、四唑(CN_4)、磺酰氨基($-\text{SO}_2\text{NH}-$)、亚甲基磺酰氨基($-\text{CHRSO}_2\text{NH}-$)、反向的磺酰氨基($-\text{NHSO}_2-$)替换的多肽的空间或电子模拟物,以及具有丙二酸酯和/或偕-二氨基-烷基亚单位的主链,例如,通过Fletcher等人综述的((1998)Chem.Rev.98:763)以及通过其中引用的参考文献详细描述。许多前述的取代产生相对于由 α -氨基酸形成的主链近似等排的聚合物主链。

[0053] 在上面提供的每个主链中,可以添加携带带正电荷的基团的侧链基团。例如,磺酰胺-连接的主链($-\text{SO}_2\text{NH}-$ 和 $-\text{NHSO}_2-$)可具有连接至氮原子的侧链基团。类似地,羟基乙烯基($-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$)键可具有连接至羟基取代基的侧链基团。本领域技术人员可容易地修改其它键化学来用标准合成方法提供带正电荷的侧链基团。

[0054] 在一个实施方案中,带正电荷的主链是具有分支基团(也称为效应基团)的多肽。如在此使用的,效应基团或分支基团是具有促进带正电荷主链运送通过组织或细胞膜的效果的任何物质。所述分支或效应基团的非限制性实例包括 $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ 、HIV-TAT或其片段,或Antennapedia的蛋白质转导结构域,或其片段,其中下标 $n1$ 是0-20,更优选0-8,依然更优选2-5的整数,并且下标 $n2$ 独立地是约5-25,更优选约7-17,最优选约7-13的奇整数。更进一步优选的是其中HIV-TAT片段具有式 $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-}(\text{gly})_q$ 、 $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-}(\text{gly})_q$ 或 $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-}(\text{gly})_q$ 的那些实施方案,其中下标 p 和 q 各自独立地是从0-20的整数并且所述片段经由该片段的C-端或N-端连接至主链。优选的HIV-TAT片段是其中下标 p 和 q 各自独立地是0-8,更优选2-5的整数。在另一个优选的实施方案中,带正电荷的侧链或分支基团是Antennapedia(Antp)的蛋白质转导结构域(PTD),或其保留活性的片段。优选地,带正电荷的载体包含侧链带正电荷的分支基团,所述分支基团的量为总载体重量的至少约0.05%,优选约0.05-45%重量,并且最优选约0.1-30%重量。对于具有式 $(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ 的带正电荷的分支基团,最优选的量是约0.1-25%。

[0055] 在另一个实施方案中,主链部分是多聚赖氨酸并且带正电荷的分支基团连接至赖氨酸侧链的氨基酸。多聚赖氨酸可具有的分子量为约10,000-1,500,000,优选约25,000-1,200,000,并且最优选约100,000-1,000,000。其可以是任何可商业获得的(Sigma Chemical

Company, St. Louis, Missouri, USA)多聚赖氨酸,例如MW>70,000的多聚赖氨酸、MW为70,000-150,000的多聚赖氨酸、MW为150,000-300,000的多聚赖氨酸以及MW>300,000的多聚赖氨酸。合适的多聚赖氨酸的选择将取决于组合物的剩余部分,并将足以总体提供净正电荷给组合物并提供优选为带负电荷成分的组合长度的1-4倍的长度。优选的带正电荷的分支基团或效应基团包括,例如-gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg(-Gly₃Arg₇)或HIV-TAT。在另一个优选的实施方案中,带正电荷的主链是长链的聚亚烷基亚胺例如聚乙烯亚胺,如分子量为约1,000,000的聚乙烯亚胺。

[0056] 包含多肽或聚亚烷基亚胺的带正电荷的主链或载体分子是新的化合物并形成本发明的一个方面,所述的主链或载体分子具有上述分支基团。

[0057] 在本发明的一个实施方案中,仅具有带正电荷的分支基团的带正电荷的载体是经皮肤递送肉毒杆菌毒素所需的。在特定的实施方案中,带正电荷的载体是具有多个带正电荷的侧链基团的多肽(如赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、高精氨酸等),如上描述的。优选地,所述多肽分子量至少为约10,000。在另一个实施方案中,带正电荷的载体是非肽基聚合物例如分子量至少约100,000的、具有多个带正电荷的侧链基团的聚亚烷基亚胺。这种聚亚烷基亚胺包括聚乙烯-和聚丙烯亚胺。在任一情况中,为了用作经皮肤递送唯一需要的试剂,带正电荷的载体分子包含带正电荷的分支或效应基团,包括-(gly)_{n1}-(arg)_{n2}、HIV-TAT或其片段,或者Antennapedia PTD或其片段,其中下标n1是0-20,更优选0-8,更优选2-5的整数,并且下标n2独立地是约5-25,更优选约7-17,并且最优选约7-13的奇整数。优选地,所述侧链或分支基团具有如上描述的通式-(gly)_{n1}-(arg)_{n2}。其它优选的实施方案是其中分支或效应基团是具有式(gly)_p-RGRDDRRQRRR-(gly)_q、(gly)_pYGRKKRRQRRR-(gly)_q或(gly)_p-RKRRQRRR-(gly)_q的HIV-TAT片段的那些,其中下标p和q各自独立的是0-20的整数并且所述片段通过该片段的C-端或N-端连接至载体分子。在连接中心,侧链的分支基团可具有D-或L-型(R或S构型)。优选的HIV-TAT片段是其中下标p和q各自独立地是0-8,更优选2-5的整数的。其它优选的实施方案是其中分支基团是Antennapedia PTD基团或其保持该基团活性的片段的那些。这些在本领域例如从Console等, J. Biol. Chem. 278:35109(2003)得知。优选地,带正电荷的载体包含侧链带正电荷的分支基团,所述分支基团的量是总载体重量的至少约0.05%,优选约0.05-45%重量,并且最优选约0.1-30%重量。对于具有式-(gly)_{n1}-(arg)_{n2}的带正电荷的分支基团,最优选的量是约0.1-25%。

[0058] 在另一个实施方案中,载体是具有带正电荷的分支基团的多聚赖氨酸,所述的分支基团连接至赖氨酸侧链氨基上。在该特定实施方案中使用的多聚赖氨酸可以是任何可商业获得的(例如Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA)多聚赖氨酸,例如MW>70,000的多聚赖氨酸、MW为70,000-150,000的多聚赖氨酸、MW为150,000-300,000的多聚赖氨酸以及MW>300,000的多聚赖氨酸。然而,优选多聚赖氨酸具有至少约10,000的MW。优选的带正电荷的分支基团或效应基团包括例如-gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg(-Gly₃Arg₇)、HIV-TAT或其片段,以及Antennapedia PTD或其片段。

[0059] 在本发明的另一个实施方案中,载体是相对短的多聚赖氨酸或聚乙烯亚胺(PEI)主链(其可以是直链的或分支的)并且其具有带正电荷的分支基团。这些载体可用于使治疗组合物中主链和肉毒杆菌毒素不受控制的集聚最小化,该集聚导致运输效率急剧降低。当载体是相对短的直链多聚赖氨酸或PEI主链时,该主链将具有低于75,000,更优选低于30,

000,并且最优选低于25,000的分子量。然而,当载体是相对短的分支的多聚赖氨酸或PEI主链时,主链将具有低于60,000,更优选低于55,000,并且最优选低于50,000的分子量。但是,如果如在此描述的分配剂包含于组合物中,则所述分支的多聚赖氨酸和PEI主链的分子量可达到75,000,而直链多聚赖氨酸和PEI主链的分子量可达到150,000。

[0060] 如在此描述的,术语“肉毒杆菌毒素”意指通过细菌或通过重组技术产生的任何已知类型的肉毒杆菌毒素,以及可随后发现的任何类型包括基因工程变体或融合蛋白。如上面提及的,目前,已经鉴定了7种免疫学上不同的肉毒杆菌神经毒素,即肉毒杆菌神经毒素血清型A、B、C、D、E、F和G,它们的每种通过用类型-特异性抗体中和来区分。肉毒杆菌毒素血清型可从Sigma-Aldrich和MetabioLogics, Inc. (Madison, Wisconsin)以及从其它来源商业获得。不同血清型的肉毒杆菌毒素在它们影响的动物种以及它们引发的麻痹的严重性和持续时间方面不同。至少两种类型的肉毒杆菌毒素(A型和B型)可商业获得用于治疗某些病症的制剂。例如,A型包含于商标为**BOTOX®**的Allergan制剂和商标为**DYSPORT®**的Ipsen制剂中,而B型包含于商标为**MYOBLOC®**的Elan制剂中。

[0061] 本发明组合物中使用的肉毒杆菌毒素可备选地是肉毒杆菌毒素衍生物,即,具有肉毒杆菌毒素活性但相对于天然存在的或重组天然肉毒杆菌毒素在任意部分或任意链上含有一个或多个化学或官能改变的化合物。例如,肉毒杆菌毒素可以是经修饰的神经毒素(例如,与天然的或重组产生的神经毒素或其片段或衍生物比较,具有至少一个它的氨基酸缺失、修饰或取代的神经毒素)。例如,肉毒杆菌毒素可以是已经以例如增强它的特性或减少不期望的副作用,但仍然保留期望的肉毒杆菌毒素活性的方式修饰了的肉毒杆菌毒素。肉毒杆菌毒素可以由细菌产生的任何肉毒杆菌毒素复合体,如上面描述的。备选地,肉毒杆菌毒素可以用重组或合成化学技术制备的毒素(例如,从不同肉毒杆菌毒素血清型的亚基或结构域制备的重组肽、融合蛋白或杂合神经毒素(例如,参见美国专利6,444,209))。肉毒杆菌毒素还可以是已经显示具有必需的肉毒杆菌毒素活性的整个分子的一部分,并且在这种情形中可以本身或作为组合物或缀合分子(例如融合蛋白)的部分使用。另外,肉毒杆菌毒素可以是肉毒杆菌毒素前体的形式,其自身可以是无毒的,例如无毒锌蛋白酶,其在溶蛋白性裂解后变成有毒。

[0062] 本发明还考虑肉毒杆菌毒素的组合物和混合物的一般使用,虽然由于它们不同的本质和特性,肉毒杆菌毒素血清型的混合物通常不会在医疗保健或化妆品工业中同时施用。

[0063] 本发明的组合物优选是施用至受试者或患者(即需要该特定治疗的人或其它哺乳动物)的皮肤或上皮组织的产品形式。术语“需要”表示包括药学或健康相关的需要,例如治疗涉及不期望的面肌痉挛的病症,以及美容和主观需要,例如改变或改善面部组织的外观。通常,组合物通过将肉毒杆菌毒素与载体,并通常与一种或多种另外的可药用载体或赋形剂混合制备。在它们的最简单形式中,它们可包含简单的含水可药用载体或稀释剂,例如缓冲盐水。然而,组合物可包含局部用药物组合物或化妆品组合物中典型的其它成分,包括皮肤学或药学上可接受的赋形剂、媒介物或介质(即与它们将施用的组织相兼容的赋形剂、媒介物或介质)。如在此使用的,术语“皮肤学或药学上可接受的”表示所描述的组合物或其成分适合用于与这些组织接触或适合用于患者,通常没有过度毒性、不相容性、不稳定性、变应性应答等。如果合适,本发明的组合物可包含在所考虑领域中,并且尤其在美容学和皮肤

病学中常规使用的任何成分。组合物还可以包含一些小的阴离子,优选多价阴离子,例如磷酸盐、天冬氨酸盐或柠檬酸盐。

[0064] 关于它们的形式,本发明组合物可包括用于施用至皮肤和可使用该组合物的其它组织的溶液剂、乳剂(包括微乳剂)、混悬剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、粉剂或其它典型的固体或液体组合物。除肉毒杆菌毒素和载体外,这些组合物还可包含通常用于这种产品的其它成分,例如抗微生物剂、增湿剂和水合剂(hydration agents)、穿透剂、防腐剂、乳化剂、天然或合成油脂、溶剂、表面活性剂、去污剂、润肤剂、抗氧化剂、芳香剂、充填剂、增稠剂、蜡、气味吸收剂、染料、着色剂、粉剂,并任选包括麻醉剂、止痒添加剂、植物提取物、调节剂、遮光或发光剂、闪光剂、保湿剂、云母(mica)、矿物质、多酚类、硅酮或其衍生物、防晒霜、维生素,以及植物药物。

[0065] 在特别优选的实施方案中,组合物包含凝胶剂和/或粘度修饰剂。通常加入这些制剂来增加组合物的粘度,以便使得组合物的施用更容易且更精确。另外,这些制剂有助于防止含水的肉毒杆菌毒素/载体溶液剂干燥,干燥将会导致肉毒杆菌毒素的活性降低。特别优选的制剂是不带电的且不会干扰肉毒杆菌毒素活性或毒素-载体复合物在跨越皮肤中的效力的那些制剂。凝胶剂可以是某些基于纤维素的凝胶剂,例如羟丙基纤维素(HPC)。在一些实施方案中,肉毒杆菌毒素/载体复合物配制成具有2-4% HPC的组合物。备选地,含有肉毒杆菌毒素/载体复合物的溶液剂的粘度可以通过加入聚乙二醇(PEG)改变。在其它实施方案中,肉毒杆菌毒素/载体溶液剂与预混合的粘稠剂例如**Cetaphil®**增湿剂组合。

[0066] 本发明的组合物可任选包含分配剂。如在此使用的,“分配剂”是具有防止或最小化肉毒杆菌毒素与本发明载体的不期望或不受控制的集聚的任何物质或添加剂。分配剂可例如在由于体积限制而必须采用浓缩的肉毒杆菌毒素溶液剂时是有用的。在这些情形中,分配剂使肉毒杆菌毒素保持分散,从而防止该毒素集聚,否则在没有分配剂时将会发生集聚。通常,分配剂是(1)无刺激性的、(2)不会破坏肉毒杆菌毒素、(3)不会使渗透性有任何增加、(4)提供可靠且稳定的粒度、(5)是不带电的,以及(6)不会干扰毒素和经皮肤载体的复合物。合适的分配剂的实例是乙醇(EtOH)。在优选的实施方案中,EtOH少于组合物的20%,并且最优选少于组合物的5%。

[0067] 作为实例,如果体积限制要求重构100U肉毒杆菌毒素于0.5ml,而不是2.5ml溶液中,通常观察到肉毒杆菌毒素将会显示出不期望的集聚,并因此降低了活性。然而,通过加入1%的EtOH作为分散剂,甚至在该浓度下24小时后仍保持完全的活性。作为另一个实例,**Botox®**以1.0ml 0.9% NaCl重构具有完全活性,而以0.5ml在1%和5% EtOH加上0.9% NaCl中重构产生具有完全活性的溶液剂。

[0068] 在本发明的某些实施方案中,将寡聚-或聚阴离子桥加入至肉毒杆菌毒素组合物中以提高毒素与带正电荷的主链载体的复合。正如本领域所熟知的,肉毒杆菌毒素实际上是不同蛋白质的复合物,这些蛋白质的一些是带正电荷的,而一些是带负电荷的。因为毒素成分的确切比例取决于毒素来源而不同,所以有可能来自某些来源的肉毒杆菌毒素具有较低的与在此描述的带正电荷的主链复合的倾向。然而,本发明的一方面是发现,通过加入寡聚-或聚阴离子桥至这类肉毒杆菌毒素,局部施用的功率和效力显著增加。这种寡聚-/聚阴离子桥的合适的实例包括磷酸钠(5%)、PBS或5%聚-L-天冬氨酸(例如MW为3000)。

[0069] 根据本发明的组合物可以是控制释放或持续释放组合物的形式,其中肉毒杆菌毒

素和载体包封于或以别的方式包含于一种物质中,这样它们以控制的方式在一段时间内释放至皮肤上。肉毒杆菌毒素和载体可以包含于基质、脂质体、小囊泡、微胶囊、微球等中,或包含于固体颗粒材料中,选择和/或构建所有上述物质用以使得肉毒杆菌毒素随时间过去释放。肉毒杆菌毒素和载体可以在一起封装(例如,在相同胶囊中)或分开封装(在单独的胶囊中)于胶囊中。

[0070] 使用在此描述的组合物,肉毒杆菌毒素可以以有效量递送至皮肤下面的肌肉,或递送至皮肤内部的腺结构来产生麻痹、产生松弛、减少收缩、防止或减轻痉挛、减少腺的排出量或产生其它期望效果。相对于可注射或可植入材料,以这种方式局部递送肉毒杆菌毒素能使剂量减少、减小毒性并使得能进行更精确的剂量优化来获得理想的效果。

[0071] 施用本发明的组合物以便施用有效量的肉毒杆菌毒素。如在此使用的,术语“有效量”表示如上定义的肉毒杆菌毒素的量,该量足以产生期望的肌肉麻痹或其它生物学或美学效果,但是隐含它是安全剂量,即足够低而能避免严重副作用的量。期望的效果包括松弛某些肌肉,为了例如减少特别是脸上的细纹和/或皱纹的出现,或以其它方式例如使眼睛变宽、提升嘴角、或使从上唇散开的皱纹平滑,或一般性解除肌紧张来调整外观。最后提及的效果(一般性解除肌紧张)可在面部或其它部位实现。本发明组合物可包含合适的有效量的肉毒杆菌毒素用于作为单剂量处理施用,或者可以是更加浓缩的,用于在施用处稀释或用于多次施用。通过使用根据本发明的带正电荷的载体,肉毒杆菌毒素可以经皮肤施用给受试者用于治疗病症例如不期望的面肌或其它肌肉痉挛、多汗症、痤疮或其中肌肉疼痛或痉挛的缓解是所期望的身体其它部位的病症。肉毒杆菌毒素经局部施用来经皮肤递送至肌肉或其它皮肤-相关结构。施用可在例如腿、肩、背(包括下背)、腋窝、掌、足、颈、腹股沟、手背或脚背、肘、上臂、膝、大腿、臀、躯干、骨盆或期望施用肉毒杆菌毒素的身体的任何其它部位进行。

[0072] 还可以施用根据本发明的肉毒杆菌毒素制剂用于治疗其它病症,包括治疗神经疼痛、预防或减少偏头痛或其它头痛、预防或减少痤疮、预防或减少张力障碍或张力障碍性收缩(主观的或临床的)、预防或减少与主观性或临床多汗症相关的症状、减少分泌过多或出汗、降低或增强免疫应答、或治疗已经建议或实施通过注射施用肉毒杆菌毒素的其它病症。

[0073] 还可施用在此描述的肉毒杆菌毒素或其它治疗性蛋白质用于免疫-相关目的。令人惊讶的是,可以施用在此描述的肉毒杆菌毒素用于减少免疫应答。更具体地说,本发明使得肉毒杆菌毒素能通过改变的施用途径递送,从而改变制剂的复合抗原的呈递。以这种方式,本发明可用于减少对肉毒杆菌毒素抗原的免疫应答,并便于重复施用而没有免疫-相关的活性减少。备选地,可制备并局部施用复合物来增强免疫应答,例如提供关于多种蛋白质的免疫,例如,用于儿童免疫而无需注射。对于与免疫-相关活性相关的使用,“有效量”指足以使受试者在施用或一系列施用肉毒杆菌毒素后产生对它的免疫应答的肉毒杆菌毒素的量。

[0074] 最优选地,组合物由或在医师或其它保健专家的指导下施用。它们可以以单次处理或在一段时间内以一系列周期性处理施用。为了经皮肤递送肉毒杆菌毒素用于上述目的,将如上描述的组合物局部施用至期望产生效果的一个位置或多个位置的皮肤上。在将含水的肉毒杆菌毒素/载体溶液剂直接施用至皮肤的实施方案中,优选覆盖接受治疗的区域(例如用Cetaphil®增湿剂)或用屏蔽物(例如Telfa)遮蔽受治疗的区域,以便防止溶

液干燥,溶液干燥将会导致毒素活性减少。由于它们的性质,最优选地,施用的肉毒杆菌毒素的量应该小心应用,以将产生期望效果而不会产生任何不利或不期望结果的施用比率和施用频率施用。因此,例如,本发明的局部用组合物应该以每 cm^2 皮肤面积约1U-20,000U,优选约1U-10,000U肉毒杆菌毒素的比率施用。这些范围内的较高剂量可优选与控制释放材料一起使用,例如,或者使在去除前在皮肤上停留时间更短。

[0075] 在施用肉毒杆菌毒素/载体组合物之前适当处理皮肤表面对于保持该溶液剂的效力是重要的。例如,在皮肤表面引入表面活性剂以在施用前除去皮肤上的表面油脂令人惊讶地是起反作用的,因为表面活性剂似乎破坏了肉毒杆菌毒素活性。即使随后在施用肉毒杆菌毒素/载体溶液剂前用水多次洗涤皮肤,这也会发生。甚至极其温和的表面活性剂,例如在婴儿擦剂中的那些,看起来也引起了这种现象。因此,在施用本发明组合物的优选方法中,皮肤仅用清水预先清洗。仅用水清洗看来还适度地提高了肉毒杆菌毒素的经皮肤运输。

[0076] 另外,可在施用肉毒杆菌毒素/载体复合物之前剥离皮肤以减少角质层。原则上,剥离皮肤的过程应该导致经皮肤运输肉毒杆菌毒素的效力增强。然而,用于剥离皮肤的方法是重要的。例如,丙酮-介导的人或动物中角质层的减少看起来减少了随后施用的肉毒杆菌毒素的活性。比较而言,胶带剥脱(即将胶带粘在皮肤表面并随后移除胶带)看起来使得肉毒杆菌毒素在小鼠模型和人中都能更深渗透并使剂量减少。据推测皮肤表面的磨损(例如通过使用磨擦垫(abrasive pads))将会引起与胶带剥脱类似的效果。

[0077] 本发明还包括用于经皮肤递送含有肉毒杆菌毒素和载体的组合物的装置,所述载体具有有如此定义的连接分支基团的带正电荷的主链。这种装置在结构上可与皮肤贴剂一样简单,或者可以是更复杂的装置,包括用于投放和监控组合物投放的手段,以及任选用于监控受试者状态(例如,监控受试者对投放的物质的反应)的手段。

[0078] 应该注意的是,用于构建该装置的材料的选择是重要的。用于构建递送装置的优选材料是不会通过降解或装置表面对肉毒杆菌毒素不期望的吸收而导致肉毒杆菌毒素/载体溶液剂活性丧失的那些材料。这种不期望的行为已经在例如当含水溶液剂中的肉毒杆菌毒素/载体接触聚丙烯表面时观察到,但是在肉毒杆菌毒素/载体接触聚氯乙烯(PVC)表面时未观察到。

[0079] 一般而言,组合物可以预先配制和/或预先安装于装置中或者可以稍后制备,例如使用试剂盒,该试剂盒保存有分开的两种成分(肉毒杆菌毒素和载体)但提供了用于在施用或施用前将它们混合的手段。载体分子的量或它与肉毒杆菌毒素的比率将取决于选择哪种载体用于所考虑的组合物。在给出的情况中,合适的载体分子的量或比率可容易地确定,例如通过进行一个或多个实验,例如在下面描述的那些试验确定。

[0080] 一般而言,本发明还包括用于施用肉毒杆菌毒素至需要它的受试者或患者的方法。该方法包括局部施用与载体一起的有效量的肉毒杆菌毒素,所述载体具有连接带正电荷的分支基团的带正电荷的主链,如在此描述的。“和…一起”表示两种成分(肉毒杆菌毒素和载体)在组合程序中施用,其可包括将它们组合为一种随后施用给受试者的组合物,或者将它们分开施用,但是以它们共同起作用以提供所需要有效量的治疗性蛋白质的递送的方式施用。例如,可首先施用含有载体的组合物至受试者的皮肤,之后应用含有肉毒杆菌毒素的皮肤贴剂或其它设备。肉毒杆菌毒素可以以干燥形式整合进皮肤贴剂或其它投药装置中,同时带正电荷的载体可以在施用贴剂之前施用至皮肤表面以便两者共同起作用,产

生期望的经皮肤递送。因此,这两种物质(载体和肉毒杆菌毒素)联合作用或者可能相互作用而在原位形成组合物或复合物。因此,本发明也包括一种试剂盒,该试剂盒包括用于经由皮肤分配肉毒杆菌毒素的装置以及含有载体或主链的液体、凝胶剂、乳剂等,并且该试剂盒适合应用于受试者的皮肤或上皮组织。用于在保健专家指导下或者通过患者或受试者施用本发明组合物的试剂盒还可以包括适合该目的的定制的涂药器(applicator)。

[0081] 本发明的组合物、试剂盒和方法使得能递送具有更高比活性的纯的肉毒杆菌毒素并潜在地改善了药物动力学。另外,载体可用作减少对外来辅助蛋白(例如,400-600mg的人血清白蛋白或250-500mg的重组血清白蛋白)和/或多糖稳定剂的需要的稳定剂,并可有利地减少了对肉毒杆菌毒素的免疫应答。另外,组合物适合在pH约4.5至约6.3的生理环境中使用,并因此可具有该pH值。根据本发明的组合物可以在室温下或在冷藏条件下存储。

[0082] 下面是本发明的代表性实施例。它们展示了功能性肉毒杆菌神经毒素复合物跨越皮肤的递送,而不需要共价修饰要递送的神经毒素。

实施例

[0083] 实施例1

[0084] 用Revance肽基载体体内运输肉毒杆菌毒素。

[0085] 该试验展示了:相对于对照,在单次施用后,使用肽基载体转运含有完整的标记蛋白质肉毒杆菌毒素的大复合物穿过完整的皮肤。

[0086] 主链选择:

[0087] 带正电荷的主链通过缀合-Gly₃Arg₇至多聚赖氨酸(MW 112,000)以18%的饱和度(即每100个赖氨酸残基中有18个与-Gly₃Arg₇缀合)装配,该缀合是通过末端甘氨酸与赖氨酸侧链的游离胺结合。所述经修饰的主链称为“KNR”。对照聚阳离子是相同大小且来自相同批次的未经修饰的多聚赖氨酸(称为“K”,Sigma Chemical Co.,St.Louis,MO)。

[0088] 治疗剂:

[0089] 选择Botox®商标的A型肉毒杆菌毒素(Allergan)用于该试验。它具有约150,000的分子量。

[0090] 样品的制备:

[0091] 根据生产商的说明书重构肉毒杆菌毒素。将一等分试样的蛋白质用经计算的12-倍摩尔过量的硫-NHS-LC生物素(Pierce Chemical)进行生物素化。标记产物称为“Btox-b”。

[0092] 在所有情形中,过量的聚阳离子用来装配最终的复合物,所述最终复合物如在递送高负电性的大的核苷酸复合物时具有过量的正电荷。净中性或净正电荷防止蛋白质复合物受到高度负电性细胞表面蛋白聚糖和细胞外基质的排斥。对于所有组将Btox-b剂量标准化,同样对要局部施用的组合物的总体积和终pH值标准化。如下制备样品:

[0093] “JMW-7”组:将每等分试样2.0单位的Btox-b(即总量为20U)和肽基载体KNR以计算的MW比例4:1混合至均匀,并用磷酸盐缓冲盐水将其稀释成200微升。将得到的组合物与1.8ml Cetaphil®乳剂混合至均匀并等分成200微升的等份。

[0094] “JMW-8”组:将每等分试样2.0单位的Btox-b(即总量为20U)和K以计算的MW比例4:1混合至均匀,并用磷酸盐缓冲盐水将其稀释至200微升。将得到的组合物与1.8ml

Cetaphil混合至均匀并等分成200微升的等份。

[0095] 用于在用肽基载体和标记Btox单次处理后测定经皮肤递送效率的动物实验:

[0096] 在实施处理过程中,将动物通过吸入异氟烷麻醉。在麻醉后,让C57 black 6小鼠(每组n=4)接受局部施用定量的200微升剂量的合适治疗物,所述治疗物施用至头颅部分的背后面皮肤(选择此处是因为小鼠不能用嘴或四肢触及该区域)。动物不进行脱毛。在初次处理30分钟后,将小鼠通过吸入CO₂安乐死,并由进行该盲法试验的观察者获取完整厚度的受处理的皮肤部分。将受处理部分分成三等份;将头颅部分固定在10%中性缓冲的福尔马林中12-16小时,随后存储于70%乙醇中直到进行石蜡包埋。将中间部分快速冷冻,将其直接用于由进行该盲法试验的观测者按下面概述的进行生物素显影。将受处理的近尾部分速冻用于溶解研究。

[0097] 生物素显影如下进行。简而言之,将每个切片浸入NeutrAvidin®缓冲液中1小时。为了显影碱性磷酸酶活性,将横切片在盐水中洗涤4次,随后将其浸入NBT/BCIP(Pierce Scientific)中1小时。随后将切片在盐水中冲洗并在具有平面-高度消色透镜的Nikon E600显微镜下对整体拍照。

[0098] 数据处理和统计分析:

[0099] 总的阳性染色由进行该盲法试验的观测者采用Image Pro Plus软件(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)进行分批图像分析测定,并将其对总的横断面积标准化以测定每个切片的百分比阳性染色。随后确定每组的平均值和标准误差,用Statview软件(Abacus, Berkeley, CA)在单向ANOVA重复测量中分析95%置信度时的显著性。

[0100] 结果:

[0101] 在单次局部施用含有KNR的Btox-b(“EB-Btox”)或含有K的Btox-b(“n1”)后,生物素化肉毒杆菌毒素阳性的平均横断面积报告为总面积的百分比。结果在下面的表1中给出并在图1中说明。在图1中,在用含有Btox-b和肽基载体KNR的“EB-Btox”以及含有Btox-b和聚阳离子K的“n1”(作为对照)每天处理一次处理三天后,确定对标记呈阳性的区域对总面积的百分比。描述了每组的平均值和标准误差。

[0102] 表1:在单次局部施用含有KNR(JMW-7)或K(JMW-8)的Btox-b 30分钟后,作为总横切面的百分比的标记肉毒杆菌毒素区域的平均值和

[0103] 标准误差。

[0104]

组	平均值	标准误差
JMW-7	33	5.333334
JMW-8	8.666667	0.333334

[0105] P=0.0001(99%时的显著性)

[0106] 实施例2

[0107] 具有肽基载体的局部用肉毒杆菌毒素制剂的治疗效果。

[0108] 实施例1表明肽基经皮肤载体在局部施用于鼠模型的完整皮肤后使得能有效转移肉毒杆菌毒素。然而,该试验未指出复合蛋白质肉毒杆菌毒素在转运穿过皮肤后是否以功能形式释放。因此建立下面的实验用以评估肉毒杆菌毒素是否可用这种肽基载体(同样,没有共价修饰该蛋白质)作为局部用药剂治疗性递送穿过完整的皮肤。

[0109] 带正电荷的主链同样通过以18%的饱和度(即每100个赖氨酸残基中有18个与-Gly₃Arg₇结合)将-Gly₃Arg₇缀合至多聚赖氨酸(MW112,000)来装配,所述的缀合是通过末端甘氨酸的羧基与赖氨酸侧链的游离胺结合。所述经修饰的主链称为“KNR”。对照聚阳离子是相同大小且来自相同批次的未经修饰的多聚赖氨酸(称为“K”,Sigma Chemical Co., St.Louis,MO)。使用与实施例1中相同的肉毒杆菌毒素治疗剂,并以相同的方式制备。样品如下制备:

[0110] “JMW-9”组:将每等分试样2.0单位的肉毒杆菌毒素(即总量为60U)和肽基载体KNR以计算的MW比例4:1混合至均匀,并用磷酸盐缓冲盐水将其稀释至600微升。将得到的组合物与5.4ml Cetaphil混合至均匀并等分成200微升的等份。

[0111] “JMW-10”组:将每等分试样2.0单位的肉毒杆菌毒素(即总量为60U)和K以MW比例4:1混合至均匀,并用磷酸盐缓冲盐水将其稀释至600微升。将得到的组合物与5.4ml Cetaphil混合至均匀并等分成200微升的等份。

[0112] “JMW-11”组:将无聚阳离子的、每等分试样2.0单位的肉毒杆菌毒素(即总量为60U)用磷酸盐缓冲盐水稀释至600微升。将得到的组合物与5.4ml Cetaphil混合至均匀并等分成200微升的等份。

[0113] 在用肽基载体和肉毒杆菌毒素单次处理后确定治疗效果的动物实验:

[0114] 在实施处理过程中,将动物通过吸入异氟烷麻醉。麻醉后,给C57 black 6小鼠(每组n=4)局部施用定量的400微升剂量的适当处理物,所述处理物均匀地从脚趾施用至大腿中部。二肢都接受处理,并且处理随机地发生在任一侧。动物不用脱毛。初次处理后30分钟,根据公开的关于在施用肉毒杆菌毒素后足的灵活性的足趾外展(digital abduction)能力打分来评估小鼠的足趾外展能力[Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. Toxicon. 2001 Dec; 39(12):1815-20]。也可以主观地评价小鼠的灵活性。

[0115] 数据处理和统计分析:

[0116] 足趾外展打分由进行该盲法试验的两名观测者独立地列表显示。随后确定每组的平均值和标准误差,用Statview软件(Abacus, Berkeley, CA)在单向ANOVA重复测量中分析95%置信度时的显著性。

[0117] 结果:

[0118] 单次局部施用含有KNR(“JMW-9”)、K(“JMW-10”)或无聚阳离子的稀释剂(“JMW-11”)的肉毒杆菌毒素后的平均足趾外展打分在表2中显示,并且在下面图2的代表性显微照片中举例说明。相对于两个对照,肽基载体KNR提供了统计上显著的对肉毒杆菌毒素的功能性跨越皮肤递送,这些试验是彼此可比较的。另外独立重复本试验(全部的三个独立试验都有一致的结论:统计上显著的麻痹作用来自含有KNR的局部用肉毒杆菌毒素而不是对照)证实了当前的发现,并显示在含有或不含K的局部用肉毒杆菌毒素(即两种对照)之间无显著差别。有趣地是,小鼠一致地移向麻痹的肢体(这在100%受处理的动物发生而0%的来自任一对照组的对照中发生)。如在图2中显示的,用肉毒杆菌毒素加上对照聚阳离子多聚赖氨酸或用无聚阳离子的肉毒杆菌毒素(“仅毒素”)处理的肢可移动足趾(作为提起时的防御机制),但是用肉毒杆菌毒素加上肽基载体KNR(“Revance's肉毒杆菌制剂”)处理的肢不能移动。

[0119] 表2:在单次局部施用具有肽基载体KNR的肉毒杆菌毒素(“JMW-9”)、具有对照聚阳离子K的肉毒杆菌毒素(“JMW-10”)或单独的肉毒杆

[0120] 菌毒素后30分钟的足趾外展打分。

[0121]

组	平均值	标准误差
JMW-9	3.333	0.333
JMW-10	0.333	0.333
JMW-11	0.793	0.300

[0122] $P=0.0351$ (95%的显著性)

[0123] 结论:

[0124] 该试验证明了肽基经皮肤载体可以跨越皮肤运输治疗有效量的肉毒杆菌治疗剂而无需共价修饰该治疗剂。该实验还证实了肉毒杆菌毒素在对照组中局部施用不起作用。

[0125] 实施例3

[0126] 具有非肽基载体的局部用肉毒杆菌毒素制剂的治疗效果。

[0127] 该试验证明了本发明中的非肽基载体的作用。

[0128] 方法:

[0129] 主链选择:

[0130] 带正电荷的主链通过以30%饱和度(即每100个赖氨酸残基中有30个与-Gly₃Arg₇缀合)将-Gly₃Arg₇缀合至MW 1,000,000的聚乙烯亚胺(PEI)来装配,该缀合是通过末端甘氨酸的羧基与PEI侧链的游离胺结合。所述经修饰的主链称为“PEIR”用以表示大的非肽基载体。对照聚阳离子是相同大小且来自相同批次的未经修饰的PEI(称为“PEI”,Sigma Chemical Co.,St.Louis,MO)。使用与实施例1中相同的肉毒杆菌毒素治疗剂。

[0131] 肉毒杆菌毒素根据生产商的说明书从Botox产品重构。在所有情形中,过量的聚阳离子用来装配最终的复合物,所述最终复合物如在递送高负电性的大的核苷酸复合物时具有过量的正电荷。净中性或净正电荷防止蛋白质复合物受到高度负电性细胞表面蛋白聚糖和细胞外基质的排斥。对于所有组将肉毒杆菌毒素剂量标准化,同样对要局部施用的组合物的总体积和终pH值标准化。如下制备样品:

[0132] “AZ”组:将每等分试样2.0单位的肉毒杆菌毒素(即总共为60U)和超纯形式的非肽基载体PEIR以计算的MW比例5:1混合至均匀,并用磷酸盐缓冲盐水将其稀释至600微升。将得到的组合物与5.4mlCetaphil混合至均匀并等分成200微升的等份。

[0133] “BA”组:将每等分试样2.0单位的肉毒杆菌毒素(即总量为60U)和PEI以5:1配比混合至均匀,并用磷酸盐缓冲盐水将其稀释至600微升。将得到的组合物与5.4ml Cetaphil混合至均匀并等分成200微升的等份。

[0134] 确定单次处理后的治疗效果的动物实验:

[0135] 在实施治疗过程中,将动物通过吸入异氟烷麻醉。麻醉后,给C57black 6小鼠(每组n=3)局部施用定量的400微升剂量的适当处理物,所述处理物均匀地从脚趾施用至大腿中部。二肢都接受处理,并且处理随机地发生在任一侧。动物不用脱毛。初次处理后30分钟,根据公开的用于在施用肉毒杆菌毒素后足的运动能力的足趾外展能力打分来评估小鼠的

足趾外展能力[Aoki,KR.A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A,B,and F in mice.Toxicon.2001 Dec;39(12):1815-20]。也可以主观地评价小鼠的灵活性。

[0136] 数据处理和统计分析：

[0137] 足趾外展打分由进行该盲法试验的两名观测者独立地列表显示。随后确定每组的平均值和标准误差，用Statview软件(Abacus,Berkeley,CA)在单向ANOVA重复测量中分析95%置信度时的显著性。

[0138] 结果：

[0139] 在单次局部施用具有超纯PEIR的肉毒杆菌毒素(“AZ”)或含有对照聚阳离子PEI的肉毒杆菌毒素(“BA”)后的平均足趾外展打分在表3中显示，并且重复试验如表4显示(对该试验进行单次独立的重复)。相对于对照，非肽基载体PEIR提供了统计上显著的对肉毒杆菌毒素的功能性跨皮肤递送。与前面一样，观察到动物偏向于麻痹的足绕圈行走。

[0140] 表3：在单次局部施用具有超纯PEIR的Botox(“AZ”)或含有对照聚阳离子PEI的Botox(“BA”)后30分钟的足趾外展打分。显示了平均值和标准误差。

[0141]

组	平均值	标准误差
BA	0.833	0.307
AZ	3.917	0.083

[0142] $P=0.0002$ (99%的显著性)

[0143] 表4：在单次局部施用含有超纯PEIR的Botox(“AZ1”)或含有对照聚阳离子PEI的Botox(“BA1”)后40分钟的足趾外展打分。显示了平均值和标准误差。

[0144]

组	平均值	标准误差
BA1	0.333	0.211
AZ1	3.833	0.167

[0145] $P=0.0001$ (99%的显著性)

[0146] 结论：

[0147] 该试验证明了非肽基经皮肤载体能够跨越皮肤输送治疗剂量的肉毒杆菌毒素而不需要预先共价修饰肉毒杆菌毒素。这些发现补充了有关肽基转移剂的那些发现。对使用非肽基或肽基载体来达到治疗效果的选择将使得能适应特定情况、环境，以及施用方法并增加了本发明经皮肤递送平台的宽度。

[0148] 实施例4

[0149] 具有肽基载体的局部用肉毒杆菌毒素制剂对前额多汗症和皱纹的治疗效果

[0150] 该试验证明：可用这种肽基载体将肉毒杆菌毒素作为局部用药剂治疗性递送穿过完整皮肤，用于治疗人受试者的前额多汗症和皱纹。

[0151] 前额多汗症和皱纹研究的实验过程：

[0152] 受试者前额的基线和治疗后的照片用具有Nikon TTL Macrospeedlight SB29s闪光灯的Nikon D70照相机(Nikon,Inc.USA)以蓝色背景拍摄。

[0153] 受试者前额的基线和治疗后的录像用Sony Digital Handycam可携式摄影机以蓝

色背景摄像。

[0154] 用10%局部用聚乙烯吡咯烷酮碘溶液(Walgreen Co.,Deerfield,Illinois)和Kingsford's 100%玉米淀粉(ACH Food Companies,Inc.,Memphis,Tennessee)进行Minor's淀粉/碘试验用以显影汗的产生。将受试者前额用无菌棉球涂上碘溶液(Johnson&Johnson Consumer Product Company,Skillman,New Jersey),并随后让其完全干燥。用无菌棉球将淀粉轻轻地涂于该区域。在环境室温下通过体力活动引起出汗。当汗溶解了碘并与淀粉反应后深蓝-黑斑出现。碘-淀粉试验的基线和治疗后的照片用具有Nikon TTL Macro-speedlight SB29s闪光灯的Nikon D70照相机以蓝色背景拍摄。将受试者前额用70%EtOH并随后用去离子水清洁。

[0155] 受试者前额上的预定治疗区域在处理进行前通过用于角质层的非损伤性胶带剥离方法处理。将预切割的胶带用强的压力施加于治疗区域数秒钟。通过拉扯胶带的一角迅速除去胶带。在除去第一张胶带后立即小心地将第二张胶带施加在相同区域。重复胶带-剥离3-5次。

[0156] 治疗准备:

[0157] 制备无菌0.9%氯化钠(Abbott Laboratories,North Chicago,Illinois)加上5%EtOH加上5%标为A-3C的短链聚天冬氨酸溶液(Donlar BioPolymer,Inc.Bedford Park,Illinois)的Botox重构溶液(即,对于每1.0毫升溶液,有900微升无菌0.9%氯化钠加上50微升100%EtOH加上50微升短链聚天冬氨酸溶液)。用0.9%氯化钠加上5%EtOH制备1毫克/毫升浓度的Kn21T(即,将500微升的Kn21T等分并加上25微升的100%EtOH)。如在此使用的,Kn21T指分子量为21,000并具有TAT分支基团的带正电荷的多聚赖氨酸主链。采用无菌3ml具有18G11/2的无乳胶注射器(Becton Dickinson&Co.,Franklin Lakes,New Jersey),用1.0毫升重构溶液重构100单位的Botox(Allergan,Irvine,CA)。通过倒转8次仔细混合该重构的Botox。将200单位的Botox用于每个受试者。Revance's肉毒杆菌制剂用200单位的Botox和Kn21T加上5%EtOH制备(即将2.0毫升的Botox加入至500微升Kn21T加25微升100%EtOH中),并置于室温下5分钟用于使复合物形成。

[0158] 对照溶液用重构溶液和Kn21T加上5%EtOH制备(即将2.0毫升重构溶液加入至500微升Kn21T加25微升100%EtOH中),并保持在室温下。

[0159] 处理施用:

[0160] 受试者斜躺在台子上,用防护罩遮盖眼、面和上身。将治疗剂用吸管均匀地施用至受试者前额,并用戴有无粉丁腈手套的手指进行圆周运动将其按摩进皮肤。将治疗区域用一薄层Cetaphil®保湿霜(Galderma,Fort Worth,TX)覆盖并孵育60分钟。孵育60分钟后,用无菌网垫除去治疗剂。将网垫和手套弃于生物危害品袋中。

[0161] 结果:

[0162] 图3描述了在用肽基载体和肉毒杆菌组合物局部处理后皱纹长度深度以及宽度显著减小。该试验证实了局部施用肉毒杆菌毒素(当与经皮肤载体组合时)能产生显著的肌肉麻痹而产生美容效果。图4是受处理皮肤(A)对未受处理的皮肤(B)的Mikrosil印迹。在未受处理皮肤的模型上皱纹是明显的。

[0163] 图5和图6a和6b显示了Minor's淀粉/碘试验的结果。图6a显示了在施用后2分钟拍摄的照片,图6a对应于用Revance's肉毒杆菌制剂处理的一侧和用只含有Kn21T载体的对照

制剂处理的一侧。图6b与图6a一样,除了它是在4分钟时拍摄之外。注意到在对照制剂的一侧面上更显著的着色,表明这一侧面的皮肤分泌更多的汗。还注意到在未受处理的一侧出汗开始更早。

[0164] 结论:

[0165] 该实施例证明了:局部施用肉毒杆菌毒素的复合物能在减少细微的和粗的皱纹方面产生显著的美容效果。这种跨上皮作用进一步证实:肌肉麻痹可在局部施用肉毒杆菌毒素复合物(例如在这里公开的那些)后用合适的载体完成。该实施例因而表明,局部施用肉毒杆菌毒素可导致减轻肌肉痉挛例如脸痉挛或斜颈,以及减轻肌肉痉挛相关的疼痛例如背下部疼痛。

[0166] 实施例5

[0167] 含有肽基载体的局部用肉毒杆菌毒素制剂对腋下多汗症的治疗效果

[0168] 该试验证明是否可以用这种肽基载体将肉毒杆菌毒素作为局部用药剂治疗性递送穿过完整皮肤,用于治疗人受试者的腋下多汗症(每组n=10个腋窝,每个患者有一个腋窝经处理而一个作为对照,以随机双盲的方式进行)。

[0169] 腋下多汗症研究的选择标准:

[0170] ●年龄:18岁或更大

[0171] ●健康自愿受试者

[0172] ●给予知情同意书并由自愿者签名

[0173] ●受试者愿意遵循指导并返回进行随访。

[0174] ●受试者表现先前存在的、主观性多汗症

[0175] ●受试者不是怀孕的或不打算在接下来的3个月怀孕。

[0176] ●受试者在旧金山或在研究地区附近生活和/或工作。

[0177] ●受试者在过去6个月内未曾治疗腋下出汗。

[0178] ●受试者在接下来的3个月内不打算治疗腋下出汗。

[0179] 重量测量步骤:

[0180] 作为重量测量步骤的一部分,首先让受试者适应试验地区。具体而言,每个受试者在72-77°F的室温下以休息体位坐15分钟。

[0181] 腋窝准备:(对于接下来的步骤,戴上无粉丁腈手套)将受试者换穿上一次性使用的披肩和乳罩(如果是女人)或脱掉所有上身衣服(如果是男人)以便充分暴露两腋。用药区域预先确定为每侧腋窝上由带有毛发的皮肤覆盖的区域,加上该含有毛发的皮肤向外扩展1cm的区域。将用药区域用取自50ml锥形管的预先弄湿的无菌网垫清洁,所述的清洁通过用该纱网的一侧以相同方向从顶端到底端进行5次长的擦拭。用洁净的预先弄湿的网垫再重复该步骤三次,同时每一次都小心不刺激或擦破皮肤。将网垫弃于垃圾中。对于其它腋窝,重复相同的清洗步骤。通过从腋窝顶部至底部使用用力的挤拍动作干干的无菌纱布干燥腋窝,同时小心不刺激或擦破皮肤。然后,通过将滤纸置于腋窝折缝下并让该滤纸处于试验点5分钟来进一步干燥腋窝,之后进行重量评估步骤。让患者坐着,他们的手臂以休息体位紧靠着他的/她的躯体。将滤纸弃于垃圾中。让受试者休息1分钟,在第一次重量评估之前不进行腋窝操作。

[0182] 出汗量测量(重量测量):(在这些测量之前戴上一对新的无粉丁腈手套)。受试者

举起他的或她的双手合于脑后以便完全暴露腋窝,同时部分倾斜(约45度)。从锥形存储管中取出一张预先称重的滤纸并放置于受试者的腋下,使滤纸的顶端与腋窝折痕线中心对齐。用手指将滤纸保持在原处,同时受试者放松手臂至身体一侧。受试者坐着,让双臂紧紧地贴着他的/她的躯干5分钟。当滤纸牢固地处于两侧腋下时开始计时。同时测量两侧腋窝。5分钟后,将滤纸从腋窝移出并放回原来各自的锥形管中。首先移出最先放置的滤纸。拧紧锥形管的盖以防止汗从管中蒸发。以1分钟时间间隔再重复两次获得汗液。

[0183] Minor's淀粉/碘试验:

[0184] 受试者举起他的/她的双手合于脑后以便完全暴露腋窝。将碘溶液如先前描述的用无菌纱垫涂于预先确定的腋窝区域并让其自然干燥。当碘完全干燥时,将很薄一层淀粉用棉球涂在碘覆盖的区域上。在施用淀粉前让碘风干以便减少假阳性和背景。受试者随后坐着,双臂紧紧地贴着他的/她的躯干。5分钟后,受试者举起他的/她的双臂并将双手合于脑后以便充分暴露腋窝。获得每侧腋窝的照片,照片上明确标出左腋和右腋以及日期。将腋窝用70%EtOH并随后用无菌去离子水清洗。

[0185] 处理剂准备:

[0186] 用盐水加上5%EtOH制备1毫克/毫升浓度的Kn21pr(即,将500微升的Kn21pr加上25微升100%EtOH)。如在此使用的,Kn21pr指分子量为21,000并具有分支基团(包含受保护的寡聚精氨酸)的带正电荷的多聚赖氨酸主链。使用无菌的具有18G11/2的3ml无乳胶注射器(Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey),用0.75毫升0.9%氯化钠(Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois)重构100单位的**Botox®**(Allergan, Irvine, CA)。通过倒转8次仔细混合该重构的**Botox®**。将200单位的**Botox®**用于每位受试者。处理溶液用200单位的**Botox®**和Kn21pr加上5%EtOH制备(即将1.5毫升的**Botox®**加入至500微升Kn21pr加上25微升100%EtOH)并在室温下保持5分钟以使复合物形成。在5分钟孵育期后,加入约1.0毫升4%的HPC(羟丙基纤维素)(含有1%EtOH)并用小金属调药刀轻轻地彻底混合。将均质的治疗剂溶液转移至3ml注射器中并盖上注射器顶端盖。(Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey)。

[0187] 对照溶液用0.9%氯化钠和Kn21pr加上5%EtOH制备(即将1.5毫升0.9%氯化钠加入至500微升Kn21pr加上25微升100%的EtOH中)并置于室温下5分钟。孵育后,加入约1.0毫升4%的HPC(含有1%EtOH)并用小型金属调药刀将其轻轻地彻底混合。将均质的对照溶液转移至3ml注射器并盖上注射器顶端盖。

[0188] 处理溶液施用(戴上无粉丁腈手套):

[0189] 受试者合上他的/她的双手手指互扣并置于脑后以便充分暴露受试者的腋窝。然后,受试者以约45度的角度斜躺在椅子上。如图7中显示的,直观地标出了用药区域(即超出含有毛发的皮肤1cm)用于施用。检查用药区域的干燥性。将注射器顶端盖从贴有标签的注射器(“L”表示左侧,“R”表示右侧)移除,并准备用于施用至患者的腋窝上。将处理溶液用注射器均匀地分散在用药区域并将其用手指将其按摩进皮肤1分钟。然后,受试者将他的/她的双臂沿着身体一侧放下并孵育60分钟。孵育60分钟后,用无菌网垫除去处理物。将网垫和手套弃于生物危害品袋中。允许受试者离开。

[0190] 结果:

[0191] Revance's局部用肉毒杆菌制剂减少了65%的出汗($P=0.0137$)。图8a显示在单独

用Kn21pr主链(对照)或用Kn21pr主链加上200U Botox处理4周后(随机选择边)的汗量的比较(与基线的比率)。统计分析用NPSS(P是如标明的,以及 $P<0.05$ 时的显著性)通过魏克森讯号等级检定(wilcoxon signed ranks)完成。[n=10个受试者]。

[0192] 第二次比较:图8b显示了在基线和在4周时比较的治疗剂与对照的比。该图显示在单独用kn21pr主链(对照)或用kn21pr主链加上200U Botox处理腋窝(随机选择边)4周后的出汗量(mg/5分钟)(处理与对照的比率)。统计分析用NPSS(P是如标明的,以及 $P<0.05$ 时的显著性)通过魏克森讯号等级检定完成。(P=0.0195)(Pr T p=0.0217)[n=10]。

[0193] 图9显示了描述用Revance's肉毒杆菌制剂局部处理来治疗腋下多汗症之前和之后的Minor's淀粉/碘试验的照片。显示了在基线和2周时的淀粉/碘试验,其中对于受试者#12,右侧腋窝用Revance's肉毒杆菌制剂处理(a和c)而左侧腋窝用对照处理(b和d)。这些照片说明了在淀粉碘试验中用载体+botox处理后观察到的典型的好处。尽管在对照侧观察到一些交叉(与重量测量数据25%的减少一致),但是处理引起了显著减少(与受处理一侧重量测量数据65%的减少一致)。

[0194] 结论:

[0195] 该实施例证实了:局部施用根据在此公开的本发明而形成的肉毒杆菌复合物在减少一群患有多汗症(主观的或定量的)的患者出汗方面容易产生治疗效果。当与手套组合以限制制剂在停留期间扩展时,这种减少出汗方面的效果也已经在上面介绍的前额案例中以及在手掌/足底应用中获得。这种经上皮递送肉毒杆菌毒素复合物来获得治疗效果进一步证实了:该方法可以延伸到其中NSAP功能或乙酰胆碱信号至关重要的其它病例,例如膀胱功能障碍或痉挛、胃肠应用,或者用于皮脂腺分泌来减少臭味或痤疮的预防/治疗。

[0196] 实施例6

[0197] Wipe-on Revance's肉毒杆菌制剂的预试验

[0198] 目的:

[0199] 在鼠模型中测定wipe-on Dysport的运输效力和肽基经皮肤载体(主链)的性能。

[0200] 方法:

[0201] 试验设计:使用重19-20g的C57BL/6雌性小鼠(Charles River,Wilmington,MA)。将动物用异氟烷麻醉并在小鼠的后肢上局部施用“Revance Dysport溶液剂”(表5)。恢复后,用足趾外展打分(DAS)值给后肢肌弱化打分。

[0202] 表5. 试验化合物和肽基经皮肤载体(主链)的描述。

[0203]

组	试验化合物	主链
CL	30U Dysport(制剂1)	Kn21T
CM	30U Dysport(制剂1)	Kn21Pr
CN	30U Dysport(制剂1)	KnR
CO	30U Dysport(制剂2)	Kn21T
CP	30U Dysport(制剂2)	Kn21Pr
对照	盐水	N/A

[0204] 试验化合物制备:制备无菌0.9%氯化钠的Dysport重构溶液(Abbott Laboratories,North Chicago,Illinois)。主链用0.9%氯化钠以1毫克/毫升的浓度制备。

使用无菌的具有18g11/2的3ml无乳胶注射器(Becton Dickinson&Co.,Franklin Lakes, New Jersey),用2.5毫升重构溶液重构500单位的Dysport(Ipsen)。通过倒转8次仔细混合该重构的Dysport。Revance's肉毒杆菌制剂用30单位的Dysport和主链(即将150微升的Dysport加入至75微升的Revance载体中)在微量离心管中制备,并置于室温下5分钟用于使复合物形成。

[0205] 局部施用:将动物用混合有氧的1.5%异氟烷麻醉并随后腹膜内注射0.05ml的啮齿动物麻醉混合物(3.75ml 100mg/ml氯胺酮、3.00ml 20mg/ml赛拉嗪以及23.25ml盐水)。麻醉后,将C57BL/6雌性小鼠(每组n=3)随机分组并准备接受治疗。让动物接受三次丙酮-胶带剥离处理。用吸管将“Revance Dysport溶液剂”施用于后肢上并戴上丁腈手套将其按摩进皮肤中。让动物在控制温度的环境下恢复以防止体温过低。记录基线和治疗后的照片、动物恢复的录像以及足趾外展打分(DAS)值。

[0206] 统计分析:

[0207] 随后用Statview®软件(Abacus Concepts,Berkeley,CA)测定每组的统计分析并表示为平均值和标准误差。所有比较的统计显著性以采用单因子ANOVA重复测量和Fisher PLSD post-hoc检验在95%的置信度下测定。

[0208] 结果:

[0209] 足灵活性打分用DAS值列表显示,其中打分为0表示正常的足趾外展(没有肌减弱)而打分为4表示足趾外展的最大减少(最大的肌弱化)[Aoki,K.R.A Comparison of the Safety Margins of Botulinum Neurotoxin Serotypes A,B,and F in mice.Toxicon.2001;39:1815-1820]。

[0210] 统计分析通过三次不同的比较测定并且结果在表6-8中显示。平均DAS值显示在单次局部施用“Revance Dysport溶液剂”后治疗组和对照之间统计上显著的肌弱化/麻痹。表6显示相对于对照每组由局部用Dysport产生的统计上显著的麻痹($P=0.0001$),而表7详细描述了相对于对照所有处理组在统计上显著的麻痹($P=0.0013$)。表8详细描述了在组之间以及相对于对照,用制剂1或2处理的组在统计上显著的麻痹($P=0.0024$)。

[0211] 在恢复后,观察到动物偏向于麻痹的肢绕圈行走。

[0212] 表6.足的灵活性打分-DAS值。列出了在处理30分钟每组的平均值和标准误差。

[0213]

组	平均值	标准误差
CL	2.500	0.267
CM	1.000	0.189
CN	0.375	0.183
CO	0.250	0.164
CP	0.500	0.189
对照	0.333	0.333

[0214] $P=0.0001$ (95%的显著性)

[0215] 表7.足的灵活性打分-DAS值。列出了对照和所有治疗组的平均值和标准误差。

[0216]

组	平均值	标准误差
---	-----	------

CL-CP	0.900	0.240
对照	0.000	0.000

[0217] $P=0.0013$ (95%的显著性)

[0218] 表8.足的灵活性打分-DAS值。列出了相对于对照施用制剂1或2的处理组的平均值和标准误差。

[0219]

组	平均值	标准误差
CL-CN	1.400	0.400
CO, CP	0.400	0.163
对照	0.000	0.000

[0220] $P=0.0024$ (95%的显著性)

[0221] 结论:

[0222] 该试验用于证明肽基经皮肤载体可以跨越皮肤运输治疗有效量的Dysport肉毒杆菌治疗剂而无需共价修饰该治疗剂。

[0223] 实施例7

[0224] 在小鼠后足模型中通过局部用肉毒杆菌毒素对出汗的抑制

[0225] 目的:

[0226] 在鼠模型中确定通过局部施用含有肽基载体的肉毒杆菌毒素(Revance's肉毒杆菌制剂)对出汗的抑制。

[0227] 方法:

[0228] 试验设计:使用重19-21g的雌性C57BL/6小鼠(Charles River,Wilmington,MA)。将动物用混合有氧的1.5%异氟烷麻醉并在该试验期间保持麻醉。将Botox以每条小鼠足2单位的剂量局部施用(表9)。通过胆碱能药物毛果芸香碱诱导出汗。[Kaszynski,E和Frisch SB.Mouse Foot Screen for the Inhibition of Sweating by Anticholinergic Drugs.(1974)Journal of Investigative Dermatology,62:510-513]。用Minor's淀粉-碘试验使汗显影。

[0229] 表9:试验化合物和肽基经皮肤载体(主链)的描述。

[0230]

组	试验化合物	主链
BO	2U Botox	N/A
BP	2U Botox	KNR
BQ	2U Botox	KNT

[0231] 试验化合物制备:毛果芸香碱溶液剂(Sigma Aldrich,Cat No.P0472)在注射前24小时制备。毛果芸香碱溶液剂用0.9%氯化钠以1毫克/毫升的浓度制备并通过涡旋2分钟充分混合。将该毛果芸香碱溶液剂采用PURADISC 25 TF一次性过滤装置(Whatman,25mm Dia.Catalog No.6784-2504)过滤灭菌,并用一大注射器注射进无菌小瓶中。然后,将该溶液用箔封盖。制备在70%乙醇中的2%碘溶液(Sigma Aldrich,Cat No.266426)并通过涡旋充分混合。随后将该碘溶液超声处理15分钟然后再次涡旋搅拌。主链用去离子水以1毫克/毫升的浓度制备。采用无菌的具有18G11/2的3ml无乳胶注射器(Becton Dickinson&Co.,

Franklin Lakes, New Jersey), 用1.0毫升0.9%的氯化钠重构100单位的Botox(Allergan, Irvine, CA)。通过倒转8次仔细混合该重构的Botox。治疗剂溶液用7单位的Botox和主链(即将70微升的Botox加入至35微升的KNR或KNT中并用35微升的PBS稀释)在微型离心管中制备, 并将其置于室温下5分钟用于使复合物形成。对照溶液用Botox和PBS制备(即将70微升的Botox加入至70微升的PBS中)。

[0232] 局部施用: 将动物用混合有氧的1.5%异氟烷麻醉并随后腹膜内注射0.07ml啮齿动物麻醉混合物(3.75ml 100mg/ml氯胺酮、3.00ml 20mg/ml赛拉嗪以及23.25ml的盐水), 并且根据需要补充异氟烷。在麻醉后, 将C57BL/6雌性小鼠(每组n=6)随机分成实验组。将20微升的处理溶液或对照溶液施用至指定的后足。将足底部用该溶液完全且充分地涂布。吸管尖用于施用试验溶液的薄的均匀涂层至足部。让动物在控制温度的环境下恢复以防止体温过低。将溶液用热灯完全干燥2分钟, 然后风干5分钟。随后将后足用约50微升的Cetaphil乳剂涂布。

[0233] 淀粉-碘试验: 进行Minors淀粉碘试验以便使在基线时和在处理后1周时的出汗分布显影。在通过将后肢浸入2%碘溶液中来施用碘溶液之前, 动物保持完全麻醉(具有稳定的生命体征)10分钟。将碘溶液用热灯完全干燥3分钟, 然后风干5分钟。随后用戴有无粉手套的手指将淀粉粉末用力擦入施用。用小的漆刷除去过量的淀粉粉末, 并然后用致密丝绒垫松散地涂敷淀粉粉末以增强均匀度。在毛果芸香碱注射后10、20和60分钟记录基线和处理后的照片。

[0234] 结果:

[0235] 动物的足部汗液通过Minor's淀粉碘试验显影。汗通过蓝-黑色着色指示。[Kuttner, C等, Treatment of Gustatory Sweating with Botulinum toxin A. (2001) Tnt Poster J Dent Oral Med. 3;3:poster 82]。

[0236] 蓝-黑色阳性斑点通常在毛果芸香碱注射后50-60分钟最好观察。淀粉-碘试验显示: 如在图11a-d中的代表性照片中显示的, 治疗组具有比对照明显少的蓝-黑色阳性斑点。

[0237] 实施例8

[0238] 在局部施用Revance's肉毒杆菌制剂后对肌力产生的评估

[0239] 目的:

[0240] 通过鼠模型中肌收缩力产生来评估局部施用B型肉毒杆菌毒素后的神经肌肉阻滞效果。

[0241] 方法:

[0242] 试验设计: 使用重27-33g的雄性CD1小鼠(Charles River, Wilmington, MA)。将小鼠按5只每组分组圈养并在处理之前允许随意摄取食物和水。将动物用混合有氧的1.5%异氟烷麻醉并在该试验期间保持麻醉。将每只小鼠后肢的用药位置用Andis Edger II无线可再充电的修剪器(Andis, Sturtevant, WI)仔细刮干净。将Dysport以每只小鼠肢25个单位的剂量局部施用。将未处理的正常小鼠, 以及用基础制剂(无毒素)以等效量局部施用处理的那些小鼠作为对照。肌收缩力在局部施用后2-3.5小时测量。

[0243] 试验化合物的制备: 制备含有5%EtOH和5%聚天冬氨酸溶液的无菌0.9%氯化钠的Dysport重构溶液剂(Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois)。主链用0.9%氯化钠以1毫克/毫升的浓度制备。采用无菌的具有18g11/2的3ml无乳胶注射器(Becton

Dickinson&Co.,Franklin Lakes,New Jersey),用2.5毫升重构溶液重构500单位的Dysport(Ipsen)。通过倒转8次仔细混合该重构的Dysport。Revance's肉毒杆菌制剂用25单位的Dysport和主链在微量离心管中制备(即将125微升的Dysport加入至62.5微升基于上面先前试验的短的肽基主链中),并置于室温下5分钟用于使复合物形成(n=2只动物存活)。对照只使用盐水作为活性剂(n=4只动物)。

[0244] 局部施用:用吸管将对照或Revance's肉毒杆菌制剂施用于后肢上并戴上丁腈手套将其按摩进皮肤中。将Dysport和主链在4℃下存储。在控制温度的环境下培养动物以防止体温过低。肌收缩力在局部施用后2-3.5小时测量。

[0245] 肌收缩力的产生:将肢通过用基尔希纳钢丝(K-wires)穿过股骨和胫骨将其绑在木桌上以防止运动而固定。腓肠肌保持在原位。在跟骨腱的远端周围绑上一金属缝线。随后将该腱在缝线远侧横切,并且将缝线连接至力传感器(model FT03,Grass,West Warwick,RI),传感器随后连接至力传感器放大器(model 13-G4615-50,Gould,Cleveland,OH)。将来自用Dysport处理的一侧的坐骨神经用递增的电压直接刺激(SD9刺激器,Grass,West Warwick,RI)直到获得最大的等大单收缩力。随后增加刺激频率直到产生最大的强直性张力。颤搐通过刺激一个运动单位产生,而肌强直通过超高级刺激所有运动单位的积累产生。在对照肢上重复相同的步骤。用连接至力传感器的标刻度的记录振荡器(RS 3800,Gould,Cleveland,OH)记录反应。[Ma J、Elsaidi GA、Smith TL等,Time course of recovery of juvenile skeletal muscle after botulinum toxin A injection.Am.J.Phys.Med.Rehabil.2004;83(10):774-780]。

[0246] 结果

[0247] 在先前的注射A型肉毒杆菌毒素的试验中,C57BL/6小鼠产生的肌力正常值具有60±15克的平均单收缩力和240±30克的平均肌强直力。在该先导性临床前试验中,发现相当的54±2克的平均单收缩力和241±20克的平均肌强直力。

[0248] 当评估含有Kn21Pr的局部用Dysport产生的肌力时,单次施用具有Kn21Pr的局部用Revance's肉毒杆菌毒素制剂处理的动物相对于用对照处理的动物在记录上显示没有反应,该反应导致单次收缩和强直反应约100%的降低,而在单次施用具有KnT的局部用Revance's肉毒杆菌毒素制剂处理的动物相对于用对照处理的动物,肌肉力产生显示下限单次收缩降低约58%而强直力降低约61%。表10和11分别显示了关于单收缩试验和肌强直试验的平均值和标准误差。

[0249] 表10.肌力产生-单收缩试验。列出了处理组和对照的平均值和标准误差。

[0250]

动物组	平均值	标准误差
处理组	19	10.97
对照	45*	0.00

[0251] *下限

[0252] 表11.肌力产生-肌强直试验。列出了处理组和对照的平均值和标准误差。

[0253]

动物组	平均值	标准误差
处理组	81	46.765

对照	210*	0.00
----	------	------

[0254] *下限

[0255] 结论:

[0256] 该研究用于证明以每小鼠肢25个单位局部施用Dysport可有效降低运动力的产生并显示了对治疗效果的证明。

[0257] 实施例9

[0258] 在局部施用Revance's肉毒杆菌制剂后对肌力产生的评估

[0259] 目的:

[0260] 通过鼠模型中肌收缩力产生来评估局部施用A型肉毒杆菌毒素后的神经肌肉阻滞效果。

[0261] 方法:

[0262] 试验设计:使用重27-33g的雄性CD1小鼠(Charles River,Wilmington,MA)。将小鼠按5只每组分组圈养并在处理之前允许随意摄取食物和水。将动物用混合有氧的1.5%异氟烷麻醉并在该试验期间内保持麻醉。将每只小鼠后肢的用药位置用Andis Edger II无线可再充电的修剪器(Andis,Sturtevant,WI)仔细刮干净。将Botox以每小鼠肢10个单位的剂量局部施用。将未处理的正常小鼠,以及用基础制剂(无毒素)以等效量局部施用处理的那些小鼠作为对照。肌收缩力在局部施用后2-3.5小时测量。

[0263] 试验化合物制备:制备含有5%EtOH和5%聚天冬氨酸溶液的无菌0.9%氯化钠的Botox重构溶液(Abbott Laboratories,North Chicago,Illinois)。主链用0.9%氯化钠以1毫克/毫升的浓度制备。采用无菌的具有18g11/2的3ml无乳胶注射器(Becton Dickinson& Co.,Franklin Lakes,New Jersey),用1.0毫升重构溶液重构100单位的Botox(Allergan,Irvine,CA)。通过倒转8次仔细混合该重构的Botox。“Revance Botox溶液剂”用10单位的Botox和主链在微量离心管中制备(即将100微升的Botox加入至50微升基于上面先前试验的短的肽基主链中),并置于室温下5分钟用于使复合物形成(n=2只动物存活)。对照只使用盐水作为活性剂(n=4只动物)。

[0264] 步骤:用吸管将对照或“Revance Botox溶液剂”施用于后肢上并戴上丁腈手套将其按摩进皮肤中。将Botox和主链在4℃下存储。在控制温度的环境下培养动物以防止体温过低。肌收缩力在局部施用后2-3.5小时测量。

[0265] 肌收缩力产生:将肢通过用基尔希纳钢丝穿过股骨和胫骨将其绑在木桌上以防止运动而固定。腓肠肌保持在原位。在跟骨腱的远端周围绑上一金属缝线。随后将该腱在缝线远侧横切,并且将缝线连接至力传感器(model FT03,Grass,West Warwick,RI),传感器随后连接至力传感器放大器(model 13-G4615-50,Gould,Cleveland,OH)。将来自用Botox处理的一侧的坐骨神经用递增的电压直接刺激(SD9刺激器,Grass,West Warwick,RI)直到获得最大的等大单收缩力。随后增加刺激频率直到产生最大的强直性张力。颤搐通过刺激一个运动单位产生,而肌强直通过超高级刺激所有运动单位的积累产生。在对照肢上重复相同的步骤。用连接至力传感器的标刻度的记录振动器(RS 3800,Gould,Cleveland,OH)记录反应。[Ma J,Elsaidi GA,Smith TL等,Time course of recovery of juvenile skeletal muscle after botulinum toxin A injection.Am.J.Phys.Med.Rehabil.2004;83(10):774-780]。

[0266] 结果:

[0267] 如在此进行的, C57BL/6小鼠产生的肌力正常值是 60 ± 15 克的平均单收缩力和 240 ± 30 克的平均肌强直力。在该探索性临床前试验中, 发现相当的 54 ± 2 克的平均单收缩力和 241 ± 20 克的平均肌强直力。

[0268] 当评估含有Kn21Pr的局部用Botox产生的肌力时, 单次施用具有Kn21Pr的局部用“Revance Botox溶液剂”处理的动物相对于用对照处理的动物在记录上(图10a和10b)显示没有反应, 该反应导致单次收缩和强直反应约100%的降低, 而在单次施用具有KNP的局部用“Revance Botox溶液剂”处理的动物相对于用对照处理的动物, 肌力产生显示下限单次收缩降低约90%而强直力降低约100%(无反应)。表12分别显示了关于单收缩试验和肌强直试验的平均值和标准误差。表13显示了平均的肌力产生和单收缩力及肌强直力降低的百分比的总结。

[0269] 表12: 肌力产生-肌强直试验。列出了处理组和对照的平均值和标准误差。

[0270]

动物组	平均值	标准误差
处理组	4.667	4.667
对照	45	0

[0271] *下限

[0272] 表13: 对实施例8和9的肌力产生试验的总结。列出了处理组和对照的平均值和%降低。

[0273]

处理剂	载体	产生的肌力	平均结果 (g)	平均%减少
Botox	Kn21T(2)/Kn21pr(1)	单收缩	5	90%
		肌强直	0	100%
Dysport	Kn21T/Kn21pr	单收缩	19	58%
		肌强直	81	61%
对照	N/A	单收缩	45*	0%
		肌强直	210*	0%

[0274] *下限

[0275] 结论:

[0276] 该试验用以证明以每小鼠肢25个单位局部施用Dysport以及以每小鼠肢10个单位局部施用Botox都可有效地减少运动力产生, 并显示了对治疗效果的证明。

[0277] 实施例10

[0278] 体外载体-介导的A型肉毒杆菌毒素穿越猪皮肤的经皮肤递送-Pt.1流通分析

[0279] 目的:

[0280] 评估我们的载体在递送A型肉毒杆菌毒素(BoNTA)跨越皮肤屏障中的效力。

[0281] 方法:

[0282] 生物素化毒素:将10微克A型肉毒杆菌毒素(List Biological Laboratories, Campbell, CA)再悬浮于100微升pH 7.4的PBS。加入20倍摩尔过量的硫-NHS-LC-生物素(Pierce, Rockford, IL),并使反应体积达到1毫升。将反应物在室温下孵育1小时,并用10K MWC0 Slide-A-Lyzer Dialysis Casette(Pierce, Campbell, CA)对PBS透析过夜。

[0283] 获得皮肤:完整的皮肤从雄性和雌性猪腹部获得(Lychron LLC, Mountain View, CA)。在运输过程中,将皮肤浸入含有PBS、10单位/毫升青霉素和10微克/毫升链霉素的冰浴中。用设定0.8mm厚度的皮刀(Padgett Instruments, Plainsboro, NJ)分离表皮和真皮。将皮肤在液氮中迅速冷冻并在-80℃下储存直到使用。

[0284] 试验:一式三份试验所有试验条件。对于每种样品,加入适量的载体和毒素(表14)并用PBS使体积达到200微升。

[0285] 表14:试验样品组成的描述

[0286]

毒素(μg)	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	1	1	1
载体	K30T	K30T	K30T	K30T	K30T	K30T	K30T	K30	无
载体(μg)	0.025	0.05	0.1	0.05	0.1	0.2	1	1	-

[0287] 将皮肤于使用前在37℃的水浴中立即解冻,切成1.5cmx1.5cm的正方形,并且将其固定在改良的Franz Chamber装置(PermeGear, Bethlehem, PA)中。将Haake DC10循环式水浴锅(Thermo Electron, Karlsruhe, 德国)设定为37℃。用IPC Ismatec蠕动泵(Irex, Wertheim-Mondfeld, 德国)将样品施加至皮肤表面,并且流通速率设为8.02微升/分钟。用Retriever IV级分收集器(Teledyne Isco, Lincoln, NE)收集流过级分,用ATM10 Indexing Controller(PermeGear, Bethlehem, PA)在0-1、1-2、2-3、3-4、4-6、6-8、8-12和12-20小时合并级分。对于仪器结构见图12。

[0288] 样品分析:系列稀释的生物素化毒素溶液用于构建标准曲线。将一平板涂上200微升的流通样品和标准样品并在室温下孵育2小时。随后用PBS中的0.1%吐温20(PBST)洗涤该平板3次。然后将每孔加入200微升的封闭缓冲液(PBST中20%的FBS)并在室温下孵育2小时。除去封闭缓冲液。将以1:1000存在于PBST中的2%FBS中的100微升链霉抗生物素-HRP加入至每孔,并将其在室温下孵育1小时。随后用PBST洗涤平板5次。加入100微升的OptEIA底物(BDBiosciences)至每孔并在室温下孵育10分钟来显影。加入50微升1N H₂SO₄淬灭该反应,并且在450nm下测量吸收。

[0289] 结果:

[0290] Revance载体显示出毒素递送的增强(见图13)。优化毒素浓度和载体:毒素质量比使毒素递送相对于对照在统计上显著增加(P<0.05)。

[0291] 实施例11

[0292] 体外载体-介导的经皮肤递送A型肉毒杆菌毒素穿越猪皮肤-Pt.2流通分析

[0293] 目的:

[0294] 使用改良的Franz chamber在猪皮模型中评估Revance载体递送A型肉毒杆菌毒素和牛小肠磷酸酶(CIP)穿越皮肤屏障的效力。

[0295] 方法:

[0296] 生物素化毒素:将10微克A型肉毒杆菌毒素(List Biological Laboratories, Campbell, CA和Sigma-Aldrich)再悬浮于100微升pH 7.4的PBS中。加入20倍摩尔过量的硫酸-NHS-LC-生物素(Pierce, Rockford, IL),并用PBS使反应体积达到1毫升。检查pH以确保7-9的pH范围用于结合。将反应物在室温下孵育1小时,并用10K MWC0 Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette(Pierce, Campbell, CA)相对PBS透析过夜。

[0297] 获取皮肤:完整的皮肤从雄性和雌性猪的腹部和肩部获得(Lychron LLC, Mountain View, CA)。在运输过程中,将皮肤浸入含有PBS、10单位/毫升青霉素和10微克/毫升链霉素的冰浴中。用设定0.8mm厚的皮刀(Padgett Instruments, Plainsboro, NJ)分离皮肤植皮(包括表皮和真皮的完整厚度)。将皮肤植皮在液氮中迅速冰冻并在-80℃下储存直到使用。

[0298] 试验:一式三份试验所有试验条件。存在3种有效负载组(payload group)和6种不同的载体。对于每种样品,加入适量的载体和毒素(表15)。有效负载和载体以下面的浓度制备:Kn8载体(Kn8、Kn8R和Kn8T)以10毫克/毫升制备;Kn21T载体以1毫克/毫升制备;K30T和Kn21pR以及A型肉毒杆菌毒素(List Labs和Sigma toxins)以0.1毫克/毫升制备;CIP以100单位/毫升制备。

[0299] 表15:试验样品组合物的描述

样品	有效负载	有效负载的量 (uL)	载体	载体量 (uL)	PBS (uL)
1	CIP	100	Kn8	100	0
2	CIP	100	Kn8R	100	0
3	CIP	100	Kn8T	100	0
[0300] 4	CIP	100	Kn21T	2.86	97.14
5	List 纯神经毒素	100	K30T	10	90
6	List 纯神经毒素	100	Kn21pR	10	90
7	Sigma 神经毒素+乳糖	100	K30T	10	90
8	Sigma 神经毒素+乳糖	100	Kn21pR	10	90

[0301] 将皮肤于使用前在37℃的水浴中立即解冻,切成1.5cmx1.5cm的正方形,并且将其在改良的Franz Chamber装置(PermeGear, Bethlehem, PA)中固定。将Haake DC10循环式水浴锅(Thermo Electron, Karlsruhe, 德国)设置为37℃。用IPC Ismatec蠕动泵(IDEX, Wertheim-Mondfeld, 德国)将样品施加至皮肤表面,并且流通速率设为8.02微升/分钟。用Retriever IV级分收集器(Teledyne Isco, Lincoln, NE)收集流通级分,用ATM10Indexing Controller(PermeGear, Bethlehem, PA)在0-1、1-2、2-3、3-4、4-6、6-8、8-12和12-20小时合并级分。

[0302] 样品分析:系列稀释的生物素化毒素溶液用于构建标准曲线。将平板用200微升的流通样品和标准样品包被并在室温下孵育2小时。随后用PBS中0.1%的吐温20(PBST)洗涤该平板3次。然后在每孔加入200微升的封闭缓冲液(PBST中20%的FBS)并在室温下孵育2小时。除去封闭缓冲液。将以1:1000存在于PBST中的2%FBS中的100微升链霉抗生物素-HRP加

入至每孔,并将其在室温下孵育1小时。然后用PBST洗涤平板5次。加入100微升的OptEIA底物(BD生物科学)至每孔并在室温下孵育10分钟以便显影。加入50微升1N H₂SO₄淬灭该反应,并且在450nm下测量吸收。

[0303] CIP:对CIP使用相似的步骤。选择CIP作为一种备选,因为它与肉毒杆菌毒素非常相似。它是具有相似分子量160KD的球状蛋白质。它便宜很多并且CIP具有高的特异活性。

[0304] 结果:

[0305] 表16:效力的总结:平均效力和标准误差用百分比显示。

[0306]	有效负载	载体	效力 (%)	标准误差 (%)
	CIP	Kn8	0.19	n/a
	CIP	Kn8R	0.26	n/a
	CIP	Kn8T	0.34	n/a
	CIP	Kn21T	0.66	0.18
	List 纯神经毒素	K30T	9.17	1.36
	List 纯神经毒素	Kn21pR	3.56	0.41
	Sigma 神经毒素+乳糖	K30T	5.44	0.19
	Sigma 神经毒素+乳糖	Kn21pR	4.61	0.59

[0307] 如表16中显示的,不同载体影响不同复合物的深度和向性。越短的主链(Kn8系列)停留在越表面从而越不容易流通。在给定主链长度下,TAT比寡聚精氨酸穿透更深。带较少电荷的种类如CIP不形成如此有效的粒子因此不会如此深的穿透。复合物成分如乳糖可改变载体的偏好(或者需要策略来形成稳定的颗粒)。

[0308] 实施例12

[0309] 体外载体-介导的经皮肤递送A型肉毒杆菌毒素穿越猪皮肤-Pt.3流通分析

[0310] 目的:

[0311] 用改良的Franz chamber在猪皮模型中评估Revance载体递送A型肉毒杆菌毒素穿过皮肤屏障的效力。

[0312] 方法:

[0313] 获得皮肤:完整的皮肤从雌性猪的肩部和腹部获得(Lychron LLC,Mountain View,CA)。在运输过程中,将皮肤浸入含有10单位/毫升青霉素和10mg/ml链霉素的PBS中并将其保持在冰上。用设定0.8mm厚的皮刀(Padgett Instruments,Plainsboro,NJ)分离皮肤植皮(包括表皮和真皮的完整厚度),并且将其在液氮中速冻并在-80℃下储存直至使用。

[0314] 生物素化毒素:将10ug A型肉毒杆菌毒素(List Biological Laboratories,Campbell,CA)再悬浮于100ul pH 7.4的PBS中。加入100倍摩尔过剩的硫-NHS-LC-生物素(Pierce,Rockford,IL),并用PBS使反应体积达到1ml。检查pH以确保7-9的pH范围用于结合。将反应物在室温下孵育2小时,并用10K MWC0 Slide-A-Lyzer Dialysis Casette

(Pierce, Campbell, CA)相对PBS透析过夜。第二天,将生物素化毒素等分(100ul/试管)并在4℃下存储。

[0315] 用于Franz Chamber的皮肤的准备:将皮肤于使用前在37℃的水浴中立即解冻,切成1.5cmx1.5cm的正方形,并且将其在改良的Franz Chamber装置(PermeGear, Bethlehem, PA)中固定。将Haake DC10循环式水浴锅(Thermo Electron, Karlsruhe, 德国)设置为37℃。用IPC Ismatec蠕动泵(IDEX, Wertheim-Mondfeld, 德国)将样品施加至皮肤表面,并且流通速率设为8.02微升/分钟。用Retriever IV级分收集器(Teledyne Isco, Lincoln, NE)收集流通级分,并用ATM10 Indexing Controller(Permegear, Bethlehem, PA)在0-1、1-2、2-3、3-4小时合并级分。

[0316] 制剂:对于每种样品,加入适量的载体和毒素。一式三份试验所有试验条件。处理组是含有Revance载体的生物素化毒素,而对照组是单独的生物素化毒素。将载体和A型肉毒杆菌毒素以不同的质量比制备以便优化毒素浓度以及毒素:载体质量比。

[0317] ELISA(蛋白质定量测定法):系列稀释(1:3和1:2)的生物素化毒素用于构建标准曲线。将平板用200微升的流通样品和标准样品包被并在室温下孵育2小时。2小时后,弃去样品和标准样品,在室温下每孔用300μl superbloc封闭缓冲液封闭平板1分钟,并重复两次。除去封闭缓冲液,并将以1:1000于含有2%FBS的PBST中的100μl链霉抗生物素-HRP加入至每孔,并将其在室温下孵育1小时。随后将平板在室温下用300μl(每孔)PBST(含有0.1%吐温20的PBS)洗涤5分钟,并重复2次。洗涤后,加入100ul OptEIA底物(BD Biosciences)至每孔并在室温下孵育10分钟以便显影。然后加入50μl 1 N H₂SO₄淬灭该反应,并且在450nm下测量吸收。

[0318] 结果:

[0319] 与对照比较,Revance载体显示出毒素递送的增加(见图14a-f)。

[0320] 实施例13

[0321] 体外载体-介导的经皮肤递送A型肉毒杆菌毒素穿越猪皮肤-皮肤分析

[0322] 目的:

[0323] 用改良的Franz chamber在猪皮肤模型中评估Revance载体递送A型肉毒杆菌毒素穿过皮肤屏障的效力。

[0324] 方法:

[0325] 生物素化毒素:将10微克A型肉毒杆菌毒素(List Biological Laboratories, Campbell, CA)再悬浮于100微升pH 7.4的PBS。加入20倍摩尔过量的硫-NHS-LC-生物素(Pierce, Rockford, IL),并用PBS使反应体积达到1毫升。检查pH以确保7-9的pH范围用于结合。将反应物在室温下孵育1小时,并用10K MWC0 Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette(Pierce, Campbell, CA)相对PBS透析过夜。

[0326] 获得皮肤:完整的皮肤从雌性猪的肩部获得(Lychron LLC, Mountain View, CA)。在运输过程中,将皮肤浸入含有PBS、10单位/毫升青霉素和10微克/毫升链霉素的冰浴中。用设定0.8mm厚的皮刀(Padgett Instruments, Plainsboro, NJ)分离皮肤植片(包括表皮和真皮的完整厚度)。将皮肤植片在液氮中速冻并在-80℃下储存直至使用。

[0327] 试验:一式三份试验所有试验条件。存在两个试验组。处理组是含有Revance K30T载体的生物素化毒素,而对照组为单独的生物素化毒素。对于每种样品,加入适量的载体和

毒素(表17)。将载体和A型肉毒杆菌毒素以0.1毫克/毫升的浓度制备。

[0328] 表17: 试验样品组合物的描述

[0329]

样品	有效负载	有效负载的量(uL)	载体	载体量(uL)	PBS(uL)
1	List毒素	100	K30Ts	10	90
2	List毒素	100	K30Ts	10	90
3	List毒素	100	K30Ts	10	90
4	List毒素	100	n/a	N/A	90
5	List毒素	100	n/a	N/A	90
6	List毒素	100	n/a	N/A	90

[0330] 将皮肤于使用前在37℃的水浴中立即解冻,切成1.5cmx1.5cm的正方形,并且将其在改良的Franz Chamber装置(PermeGear,Bethlehem,PA)中固定。将Haake DC10循环式水浴锅(Thermo Electron,Karlsruhe,德国)设置为37℃。用IPC Ismatec蠕动泵(Idx, Wertheim-Mondfeld,德国)将样品施加至皮肤表面,并且流通速率设为8.02微升/分钟。用Retriever IV级分收集器(Teledyne Isco,Lincoln,NE)收集流通级分,用ATM10Indexing Controller(PermeGear,Bethlehem,PA)在0-1、1-2、2-3、3-4、4-6、6-8、8-12和12-20小时合并级分。

[0331] 链霉抗生物素染色法:将速冻的皮肤切片并用PBS中的0.1%吐温20(PBST)水合。在室温下将切片用Blotto封闭缓冲液封闭2小时并随后用PBST以5分钟间隔冲洗3次。加入2%FBS中(PBST中)1:1000的链霉抗生物素-HRP,并且将切片在室温下孵育30分钟并随后用PBST以5分钟间隔冲洗3次。加入OptEIA底物(BD Biosciences)并在室温下孵育切片3分钟以便显影。将切片用PBST洗涤并盖上盖玻片。

[0332] 结果:

[0333] 照片:在具有4X放大的平面-复消色差物镜的Nikon E600显微镜上,用Retina 1300B照相机(Imaging,Burnaby,BC,Canada)为染色的切片拍照(图15)。

[0334] 实施例14

[0335] A型肉毒杆菌毒素在引起肌肉麻痹方面的效果

[0336] 目标:

[0337] 通过肌力产生试验研究在局部施用Revance's肉毒杆菌制剂中的毒素后,A型肉毒杆菌毒素在引起小鼠肌肉麻痹方面的效果。

[0338] 材料和方法:

[0339] 肉毒杆菌毒素:

[0340] Neuronox(Medy-Tox,Inc.,Korea)批次NNX0502,100U/小瓶;0.9%NaCl(无防腐剂,Abbott Laboratories,North Chicago,IL)

[0341] 多聚赖氨酸肽(载体):

[0342] K15T2

[0343] 试验组-10U毒素/小鼠,n=4

[0344]

	K15T2载体	无载体
--	---------	-----

Neuronox(NNX)	x	x
---------------	---	---

[0345] 多聚赖氨酸肽/毒素复合物的制备:

[0346] 目标载体:白蛋白/毒素质量比=1.1:1

[0347] Neuronox制剂:(0.5mg白蛋白/100U毒素)

[0348] 微量离心管中用0.9%NaCl制备K15T2载体的1.1mg/ml储液并通过涡旋混合。用0.5ml 0.9%的NaCl,通过将0.9%的NaCl缓慢注射进小瓶的侧壁来重构100U(1小瓶)的NNX,并通过轻轻倒转混合。(浓度是100U毒素/0.5ml)。将0.5ml载体储液缓慢注射进0.5ml重构的毒素中并轻轻倒转该载体/毒素小瓶10次,将其在室温下放置5分钟(小瓶垂直放置)并随后在给药前将其再次轻轻倒转。(浓度是100U毒素/1.0ml)。用1ml注射器和针头取出100μl该混合物。在施用前除去针头。(终浓度是10U毒素/100μl)。

[0349] 试验设计:将重22-26g的雄性CD1小鼠(Charles River,Wilmington,MA)用于接受处理并且将28-31g的雄性CD1小鼠用作对照。将小鼠按5只每组分圈养并在处理之前允许随意摄取食物和水。将动物用混合有氧的1.5%异氟烷麻醉并在该试验期间内保持麻醉,保持时间为30分钟。将每只小鼠后肢的用药位置用Andis Edger II无线可再充电的修剪器(Andis,Sturtevant,WI)仔细刮干净。将NNX以每小鼠肢10个单位的剂量局部施用。将以等体积局部施用的无肽基载体的毒素用作对照。肌收缩力在局部处理后4天测量。

[0350] 局部施用:

[0351] 将动物用混合有氧的异氟烷麻醉。100μl(10个单位)载体/毒素混合物通过用1ml无注射针头的注射器施用涂于随机选择的小鼠后足(剃了毛的)。另一后足用对照混合物处理。戴上丁腈手套将混合物按摩进后足中,在小鼠处于麻醉下孵育30分钟,然后用水冲洗用药位置并用纸巾擦干以清除用药位置的残留毒素。在局部施用和清洗后,将小鼠放回它的笼子圈养并在控制温度的环境下让其从麻醉状态中恢复。每天观察动物的全身毒性的行为迹象例如呼吸频率减少、用力呼吸、下垂和瞳孔放大或肌肉麻痹。在处理4天测量肌收缩力产生。

[0352] 肌收缩力产生:

[0353] 将肢通过用基尔希纳钢丝穿过股骨和胫骨将其绑在木桌上以防止运动而固定。腓肠肌保持在原位。在跟骨腱的远端周围绑上一金属缝线。随后将该腱在缝线远侧横切,并且将缝线连接至力传感器(model FT03,Grass,West Warwick,RI),传感器随后连接至力传感器放大器(model 13-G4615-50,Gould,Cleveland,OH)。直接刺激经NNX处理的一侧的坐骨神经(SD9刺激器,Grass,West Warwick,RI)。增加刺激频率直到产生最大的强直性张力。肌强直通过超高级刺激所有运动单位的积累产生。在对照肢上重复相同的步骤。用连接至力传感器的标刻度的记录振荡器(RS 3800,Gould,Cleveland,OH)记录反应。[Ma J、Elsaidi GA、Smith TL等,Time course of recovery of juvenile skeletal muscle after botulinum toxin A injection.Am.J.Phys.Med.Rehabil.2004;83(10):774-780]。

[0354] 结果:

[0355] 当评估含有肽基载体系统的局部用NNX的肌力产生时,显示了肌力的减小,导致经单次局部施用处理的动物中降低约55%肌强直反应,肌强直反应对于用含有K15T2的NNX处理的动物(处理组)具有128±11克的平均值而对于用无载体的NNX处理的动物(对照组)为286±16克(表18)。刺激频率的总结(包括对于每个刺激频率肌力产生的平均百分比、平均

值和标准误差)在表19中给出。图16显示了关于含有K15T2的NNX(治疗组)、无载体的NNX(对照组)以及NNX注射的肌力减少的百分比。

[0356] 表18:肌力产生-肌强直试验。列出了处理组和对照的平均值和标准误差。

[0357]

动物组	平均值	标准误差
处理组	128	11
对照	286	16

[0358] 表19:刺激频率的总结 列出了肌力的减少百分比、平均值和标准误差。

[0359]

刺激频率(Hz)	最大力	肌强直 25Hz	肌强直 40Hz	肌强直 60Hz	肌强直 100Hz	肌强直 150Hz	肌强直 200Hz
	g	g	g	g	g	g	g
Botox+载体(10U/小鼠)							
肌力减少 vs. 内部对照							
标准误差		14%	15%	5%	6%	14%	18%
平均		49%	34%	20%	30%	32%	39%
平均值	24	30	70	116	128	125	109
标准误差	8	8	16	7	11	25	33
单独 Botox-无载体组(U/小鼠)							
肌力减少 vs. 内部对照							
标准误差	14%	14%	19%	12%	9%	4%	2%
平均	3%	21%	3%	1%	-2%	-2%	-2%
平均值	63	76	155	233	284	283	267
标准误差	9	14	30	28	16	10	6

[0360] 结论:

[0361] 该试验证明了在载体系统中Revanco's肉毒杆菌制剂中的A型肉毒杆菌毒素在单次局部施用后引起小鼠肌肉麻痹方面是有效的。

[0362] 实施例15

[0363] 人体探索性研究:减少前额皱纹而对表情无功能损害的局部用A型肉毒杆菌毒素。

[0364] 局部用肉毒杆菌毒素的制备和施用:

[0365] 受试者1:首次处理-将4 μ g K15T2 Revance载体溶解于2.0ml 15%的泊洛沙姆(在0.9%氯化钠中并且无EtOH)中并通过倒转混合。在系列步骤中将1.0ml泊洛沙姆-载体混合物用于重构400U Botox(Allergan, Irvine, CA)并通过倒转混合。载体与毒素的终浓度比率是0.5 μ g载体/100U毒素。将局部用毒素溶液剂置于室温下5分钟。将总体积为1.0ml的毒素溶液剂用注射器涂至前额。在孵育30分钟后,将受处理的前额区域用5张湿润纸巾清洗,其中每张纸巾仅用于以一个方向擦洗前额一次。记录处理前(基线)和处理后的照片。

[0366] 受试者2:首次处理-将10 μ g A型肉毒杆菌毒素(List Biological Laboratories, Inc., Campbell, CA, product#130A)在1.0ml 0.9%的氯化钠中重构并进一步稀释成5ng/100 μ l的终浓度。通过倒转混合重构的毒素。将Revanco载体以1ng/20 μ l的浓度制备。将1ng载体混合进0.9%NaCl中的900 μ l 15%的泊洛沙姆中(无EtOH)。然后,加入100ml毒素至920 μ l的泊洛沙姆中以达到1:10的毒素:稀释液比例。将总体积为1.02ml的毒素溶液剂用注射器涂至前额。在孵育30分钟后,将受处理的前额区域用5张湿润纸巾以与受试者1相同的方式清洗。记录在处理前(基线)和处理后的照片。

[0367] 结果:

[0368] 图17显示了在处理前和后拍摄的照片。照片显示在局部施用A型肉毒杆菌毒素后前额皱纹减少。人受试者1(顶行)和受试者2(底端行)的处理前(基线)和处理后的照片。

[0369] 实施例16

[0370] 多汗症试验-治疗人受试者出汗过多的Revance局部用肉毒杆菌制剂

[0371] 目的:

[0372] 确定通过局部施用Revance's肉毒杆菌制剂抑制出汗的可行性。

[0373] 制剂:在单独的试管中的去离子水中制备1mg/ml的每种KNR和P6R-B主链,涡旋至充分混合。将**BOTOX®-100**单位(Allergan,Irvine,CA)用1.0ml去离子水(受试者1)或0.5ml 0.9%的NaCl(受试者2&3)重构并通过倒转混合。处理剂的储液通过加入在下表中显示的成分至1.7ml微量离心管中得以制备,将其涡旋90秒钟,并在室温下孵育5分钟用于使复合物形成。标记锥形管,R表示用于右边而L表示用于左边。将1.0ml储液转移至给定的锥形管中,1:5稀释液通过加入4.0ml Cetaphil(Galderma,Fort Worth,TX)并用金属调药刀充分混合而制备。

[0374]	受试者	Botox(U)	载体	比例 (毒素:稀释剂)	总体积
	1	20	KNR	5: 8	1.3 ml
	2	50	KNR	1: 1	1.5 ml

[0375] 重量评估:该方法的每一步骤须戴上丁腈(或无粉)手套操作。准备三层滤纸并用镊子将其置于锥形管中,确保滤纸接近螺旋盖。滤纸通过将盖上其螺旋盖的锥形管置于天平盘中间来在锥形管中预称重。每位受试者预称重三组滤纸。将滤纸同时置于每侧腋窝上。让受试者静坐,他们的手臂靠着他们的两侧并且双手在身体前交叉。在收集阶段,受试者在暖房中保持不动。在每10分钟的汗液收集阶段后,将滤纸移出并放回它们的试管中。用镊子将滤纸置于它们的初始位置,展开并接近螺旋盖,注意别撕裂滤纸。基线汗液测量以10分钟时间间隔收集3次。滤纸通过将盖有其螺旋盖的试管置于天平盘中间来再次称重并记录重量。

[0376] 药物施用步骤:戴上丁腈手套,将5.0ml(受试者1)和1.5ml(受试者2)检品或对照用金属调药刀(用于受试者1)或滚动涂药器(用于受试者2,以上下运动,然后圆周运动)局部施用至腋窝。在受试者2的情况中,将每侧腋窝用小的调药刀涂上约4ml的Cetaphil,并在室温(72-77°F)下孵育1小时以使处理溶液得以吸收。将腋窝用清洁布(Johnson&Johnson)擦去并清洁。

[0377] 观察:腋窝上的毛发是完整的。在处理溶液施用前不进行上蜡。受试者声称没有疼痛或不适。腋窝的两侧都具有麻刺感。没有刺激症状并且皮肤色素无变化。

[0378] 结果

[0379] 重量分析(人受试者1):在可行性试验中,对于人受试者#1,每侧腋窝在局部施用含有或不含Revance肽基载体的20U肉毒杆菌毒素(Botox)后最初7天。在标准条件下每10分钟产生的汗(mg)(p=0.0043)

[0380]

	仅肉毒杆菌(对照)	Revance's肉毒杆菌制剂
%横切片	20.5	13.4

[0381] 重量分析(人受试者2):在可行性试验中,对于人受试者#2,每侧腋窝在局部施用含有或不含Revance肽基载体的50U肉毒杆菌毒素(Botox)后最初7天。在标准条件下每10分钟产生的汗(mg)($p=0.0117$)。图18显示了受试者2在一侧腋窝施用根据本发明的肉毒杆菌毒素制剂,并且在另一侧施用对照制剂后的照片。

[0382]

	仅肉毒杆菌(对照)	Revance's肉毒杆菌制剂
%横切片	201	157

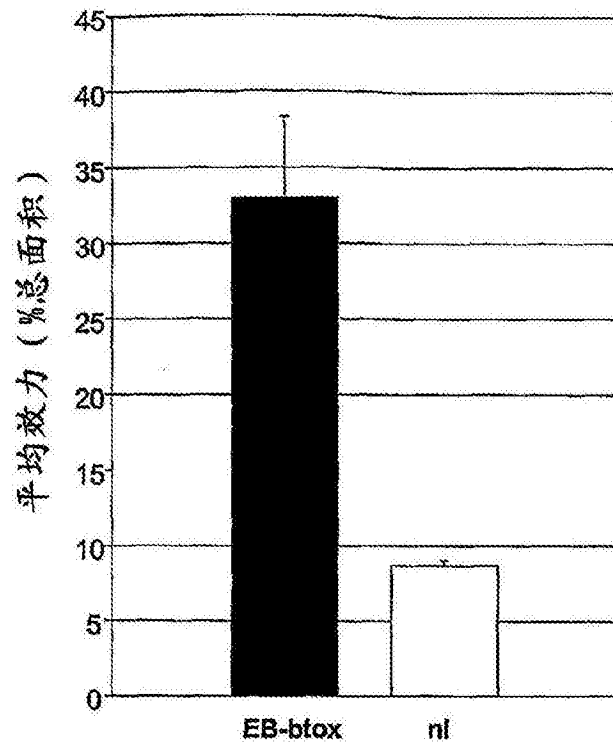


图1

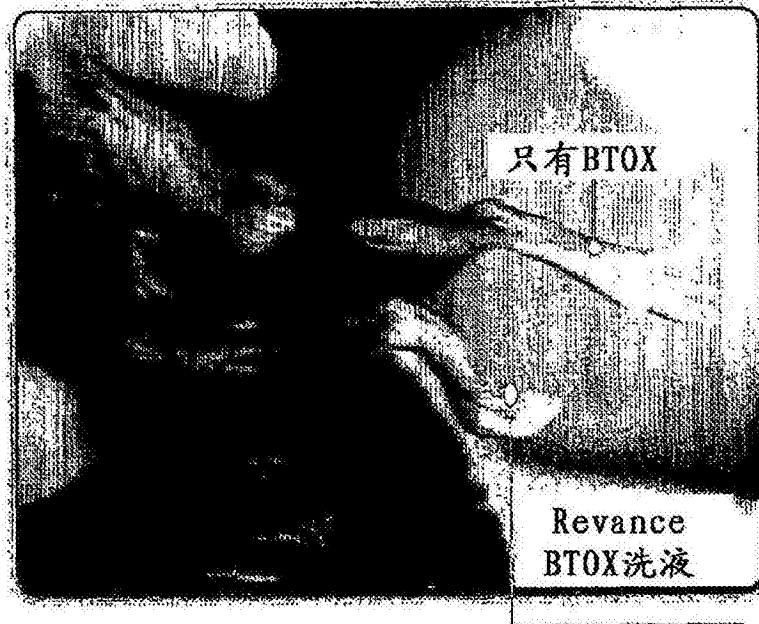
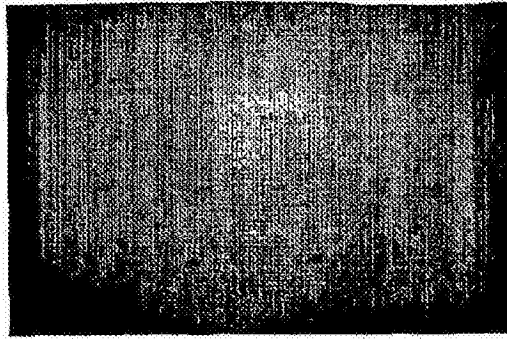
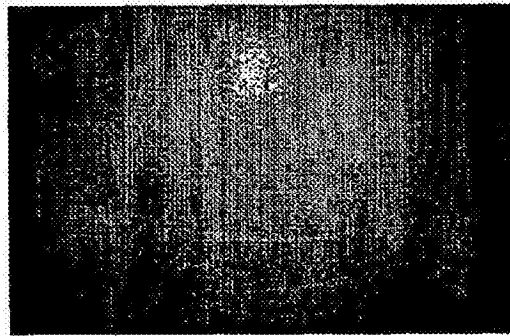


图2



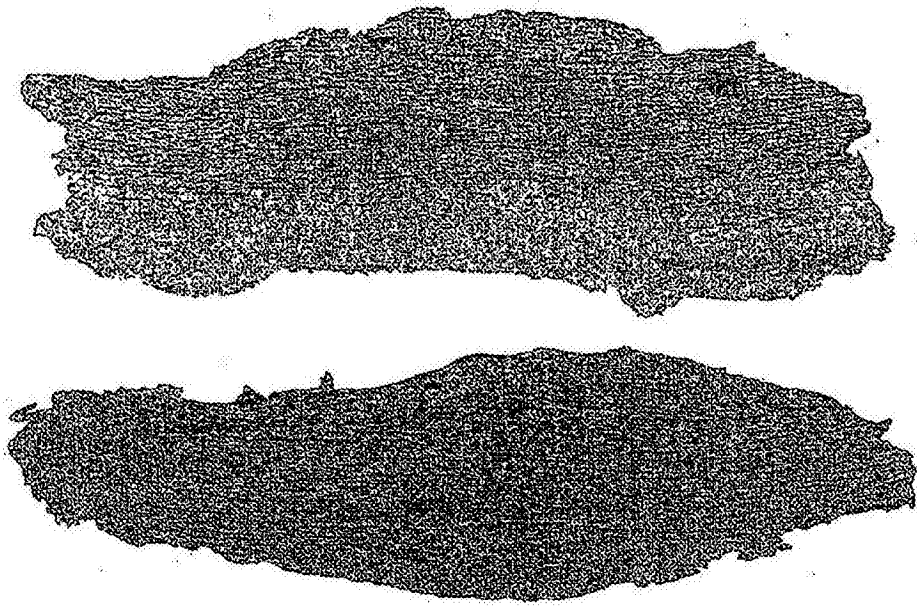
Revance's肉毒杆菌制剂



基线

图3

Revance's 肉毒杆菌制剂



基线

图4

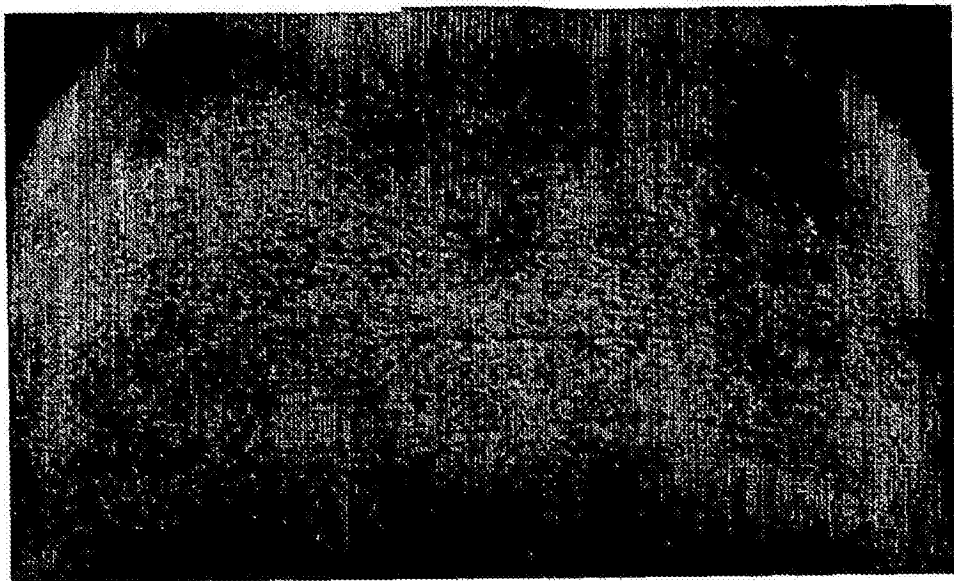


图5

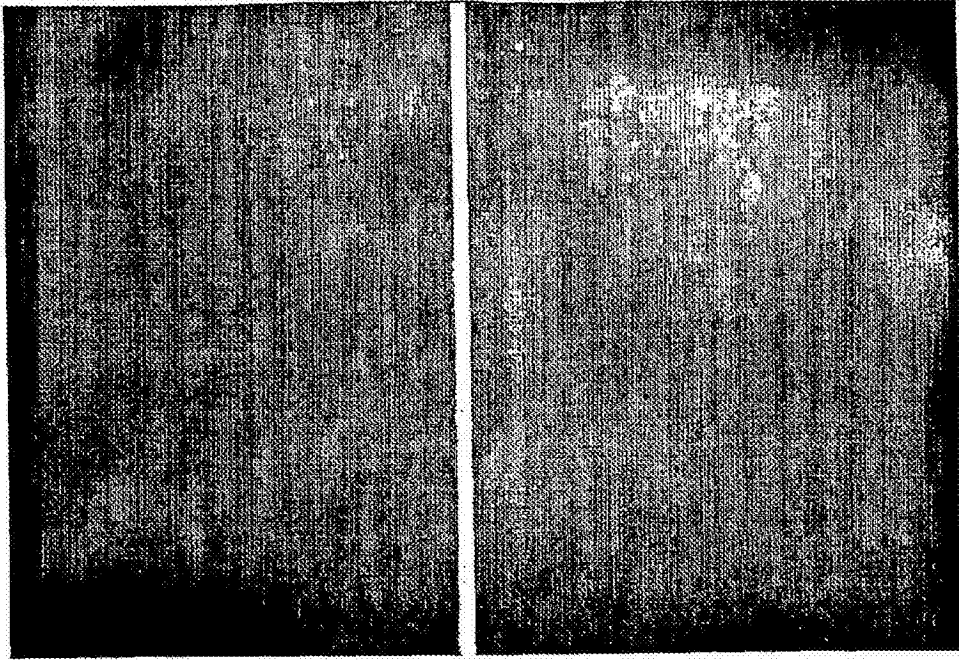


图6a

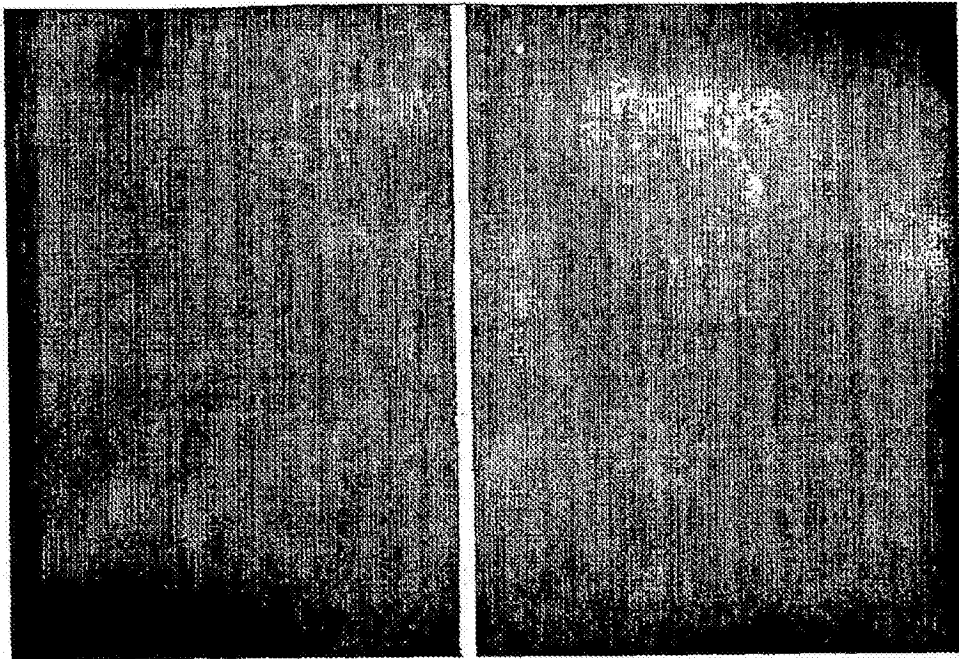


图6b

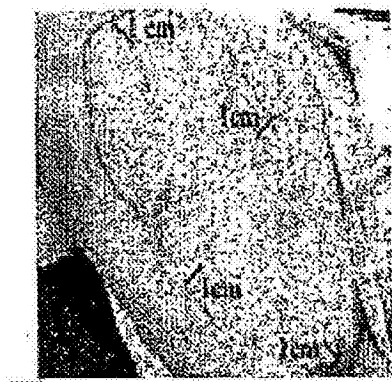


图7

端点与基线的比率, $P=0.0137$

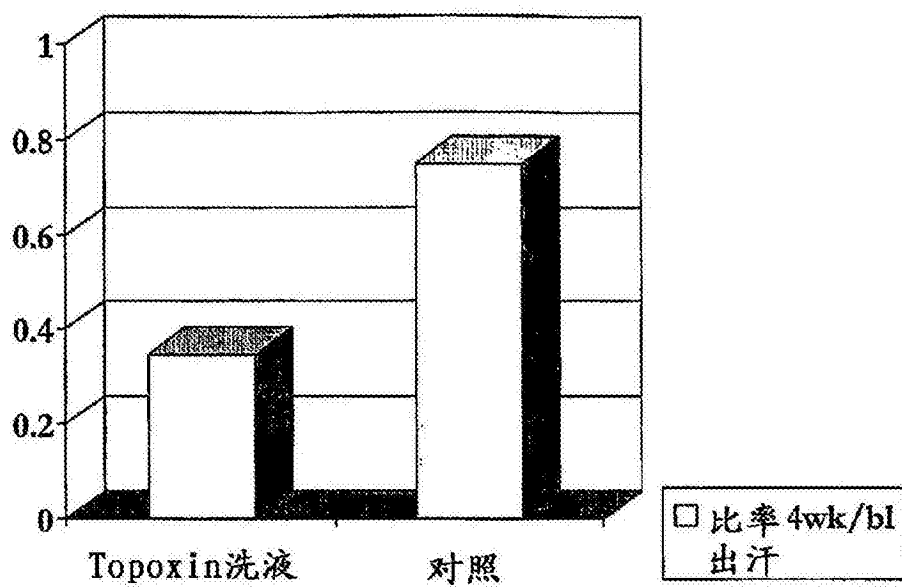


图8a

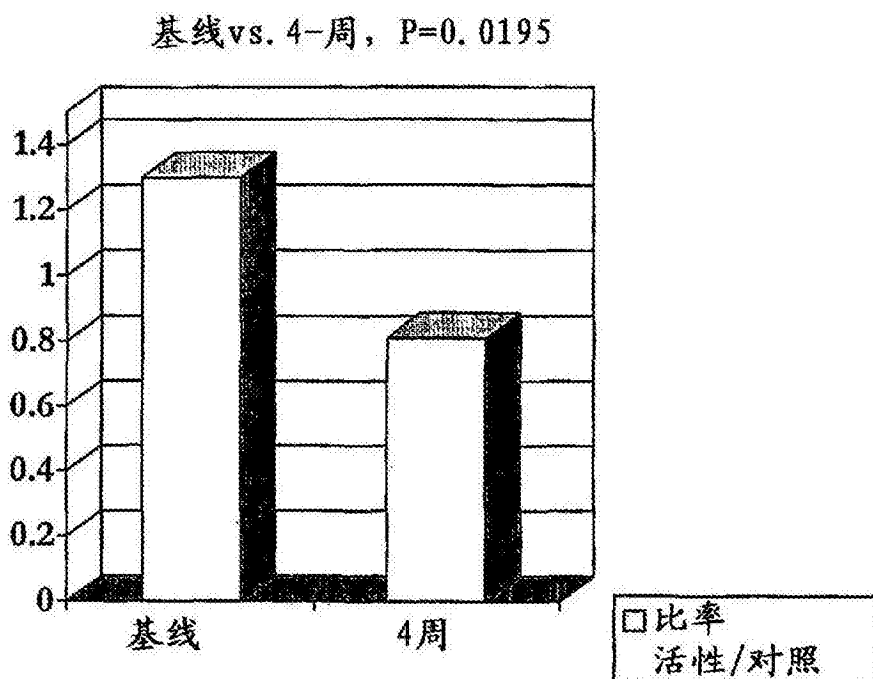


图8b

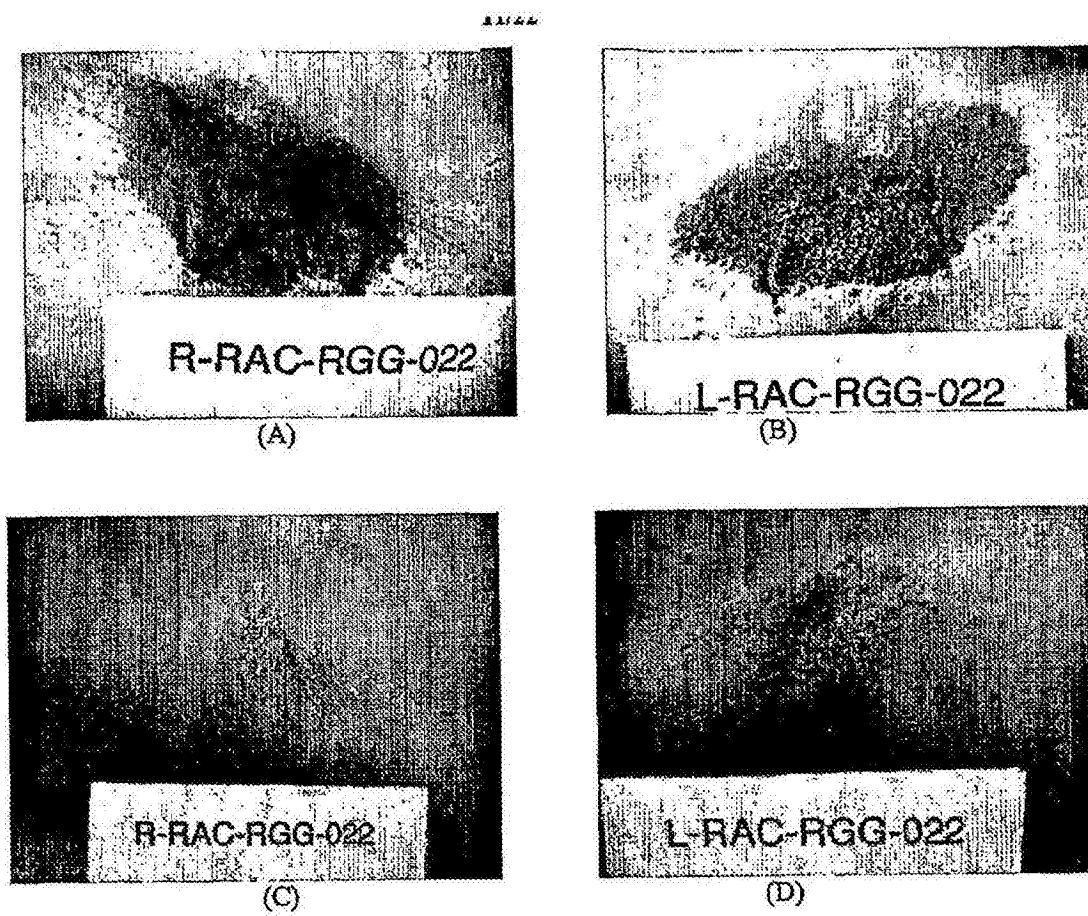


图9

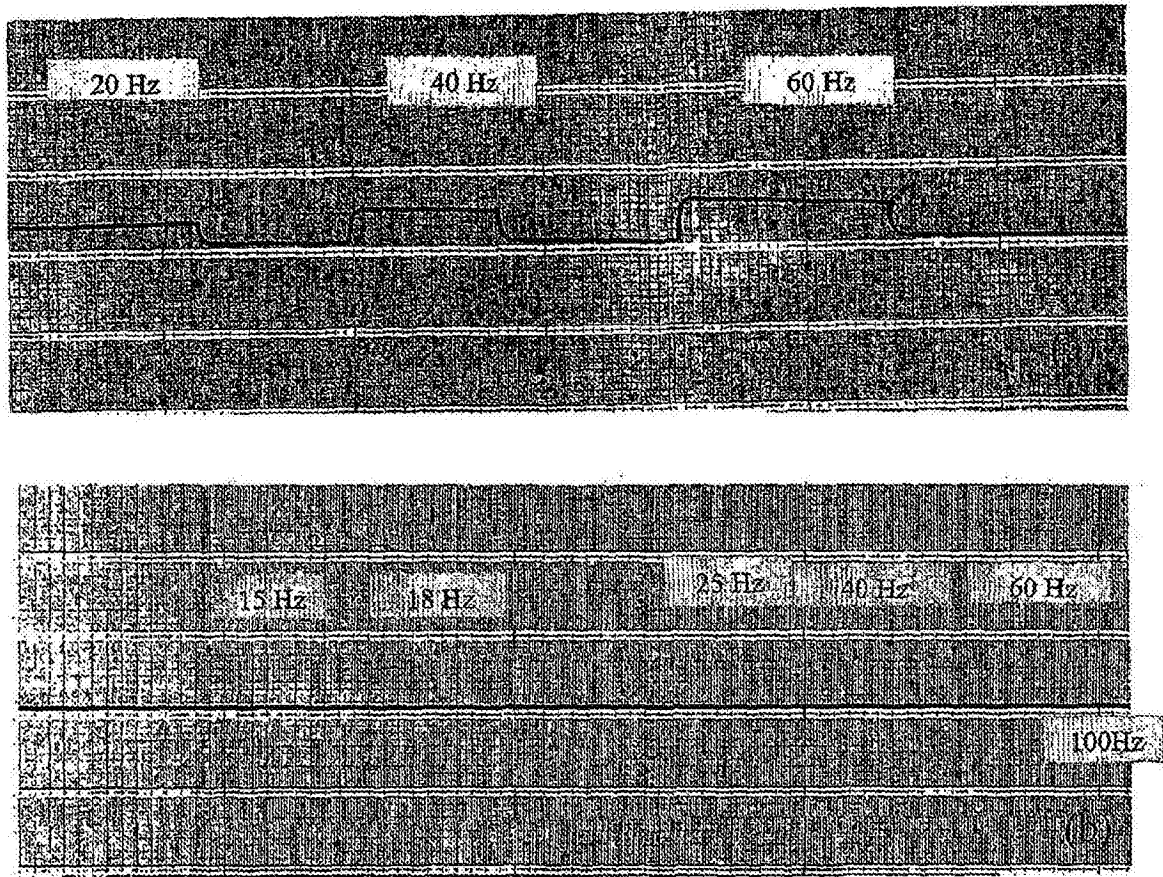


图10

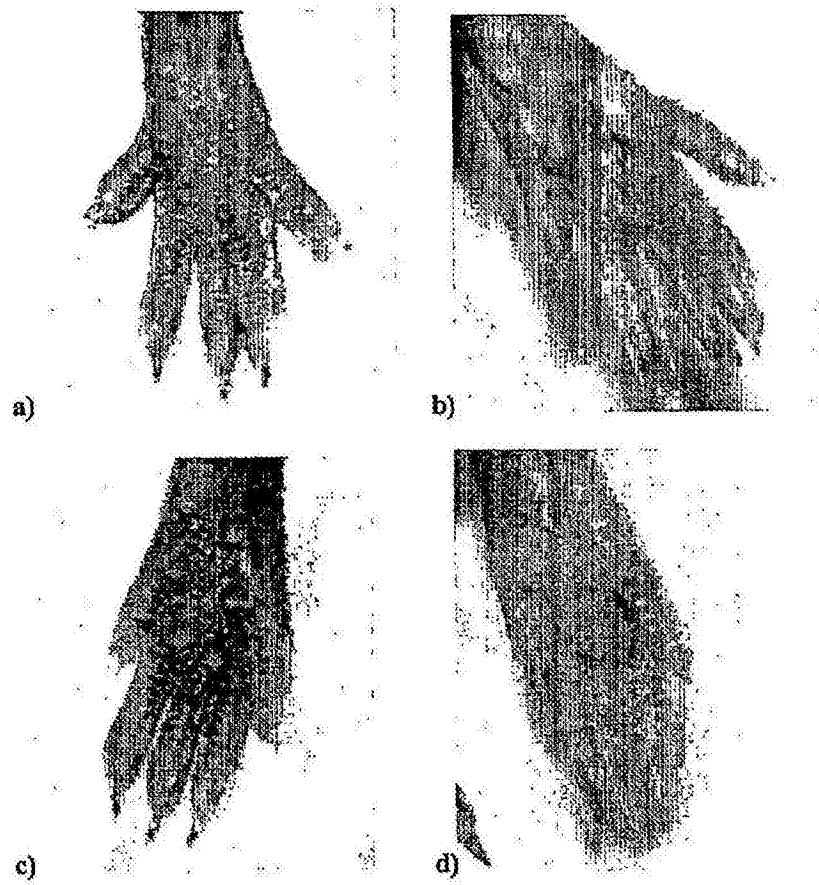


图11

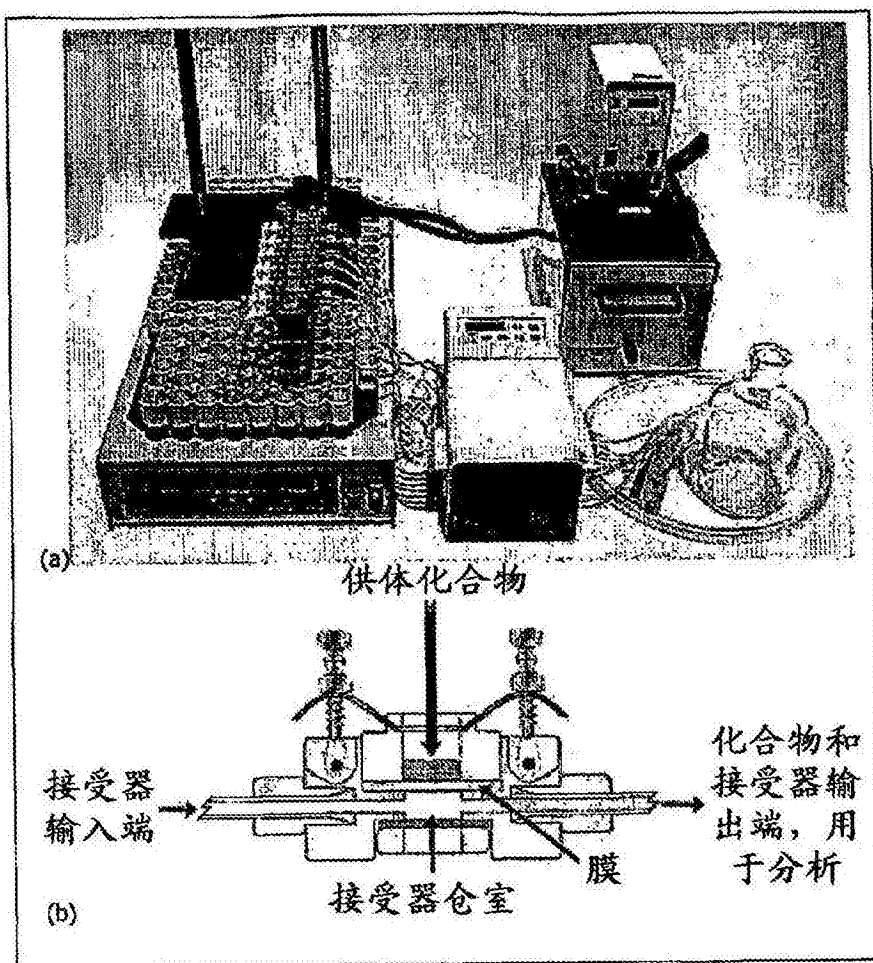


图12

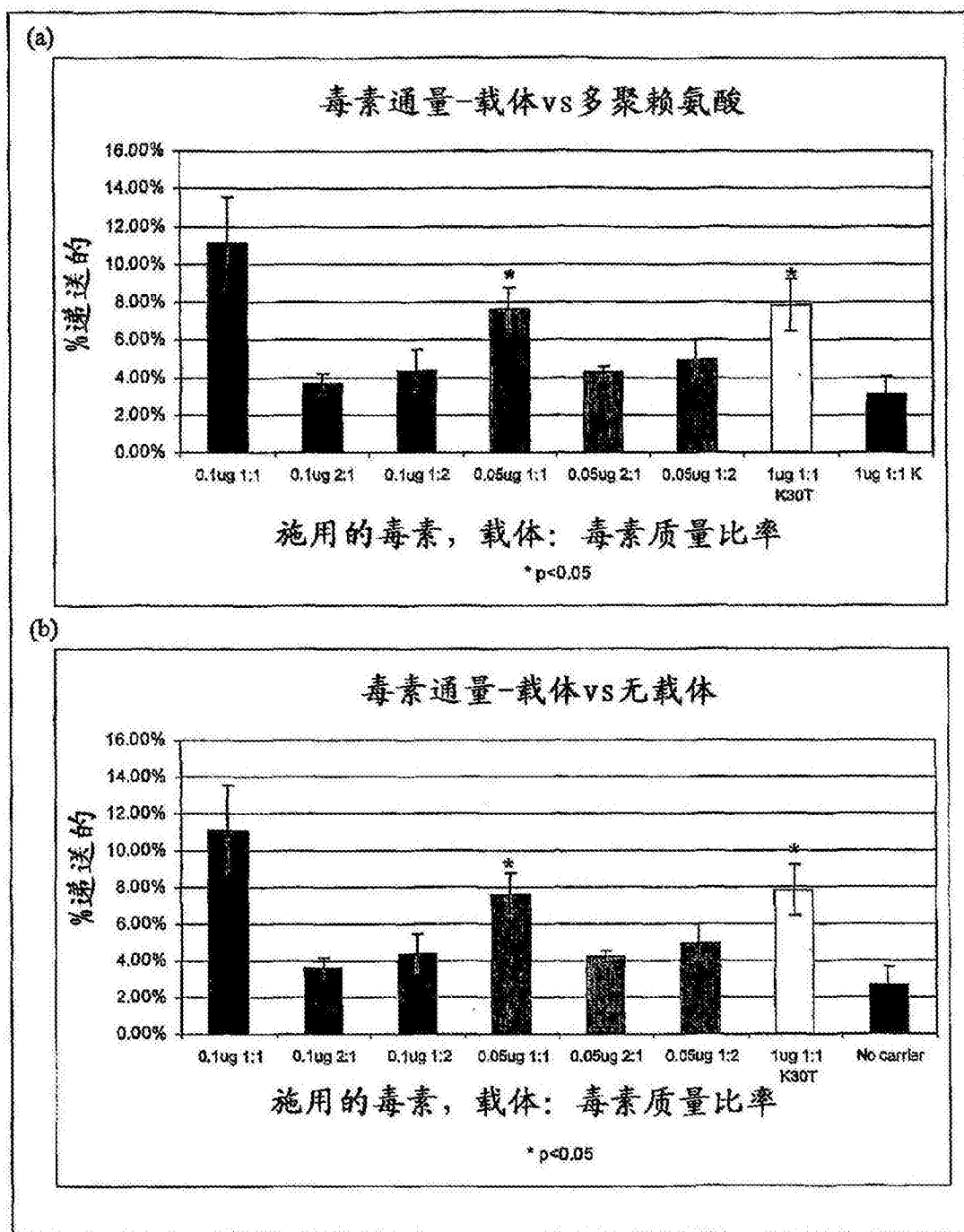
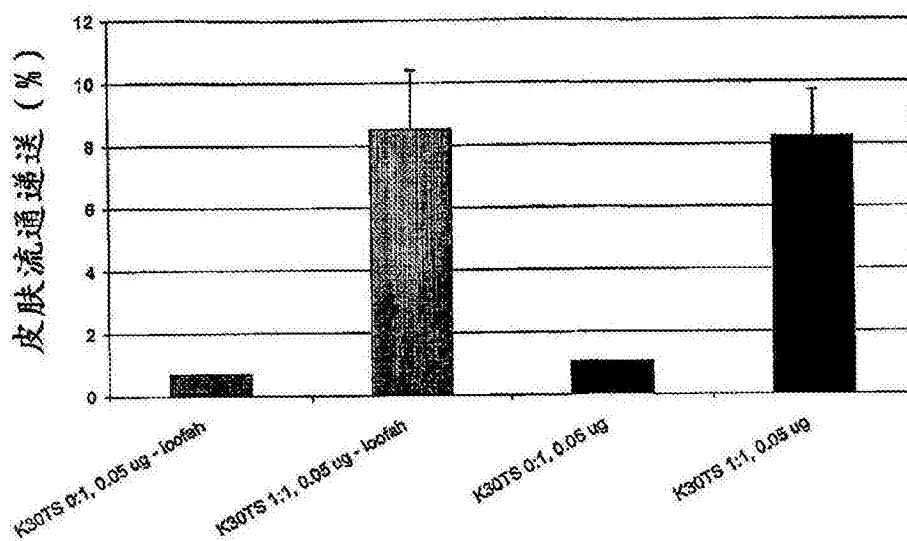


图13

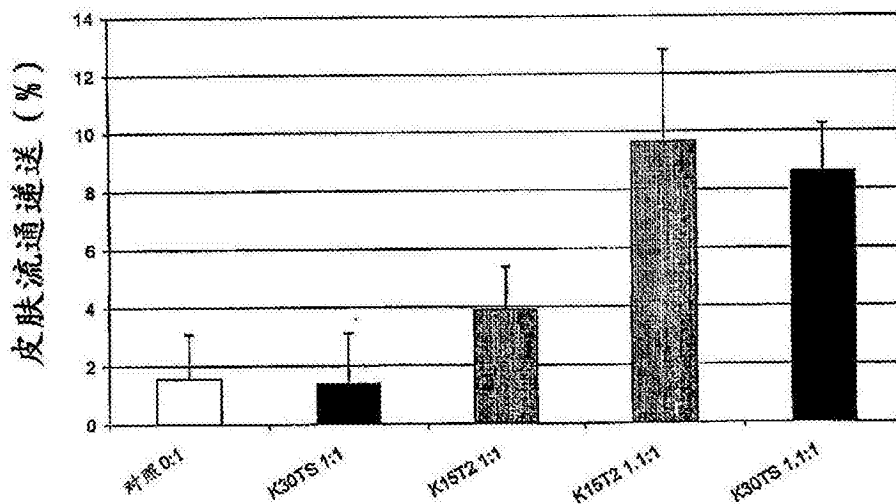
猪皮肤流通-局部施用毒素



局部施用毒素-载体: 毒素质量比率, 毒素量

图14a

猪皮肤流通-局部施用毒素



局部施用毒素-载体: 毒素质量比率, 毒素量

图14b

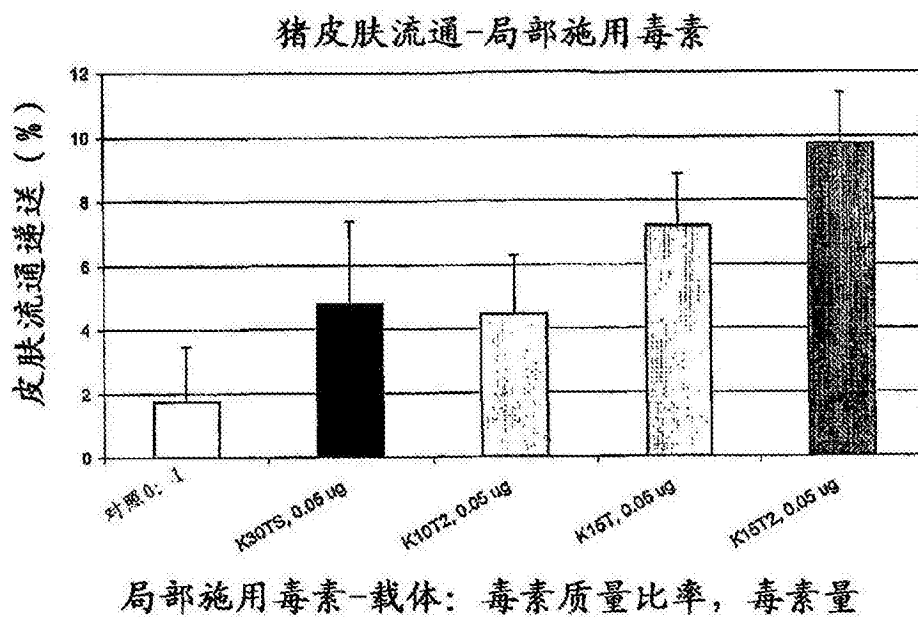


图14c

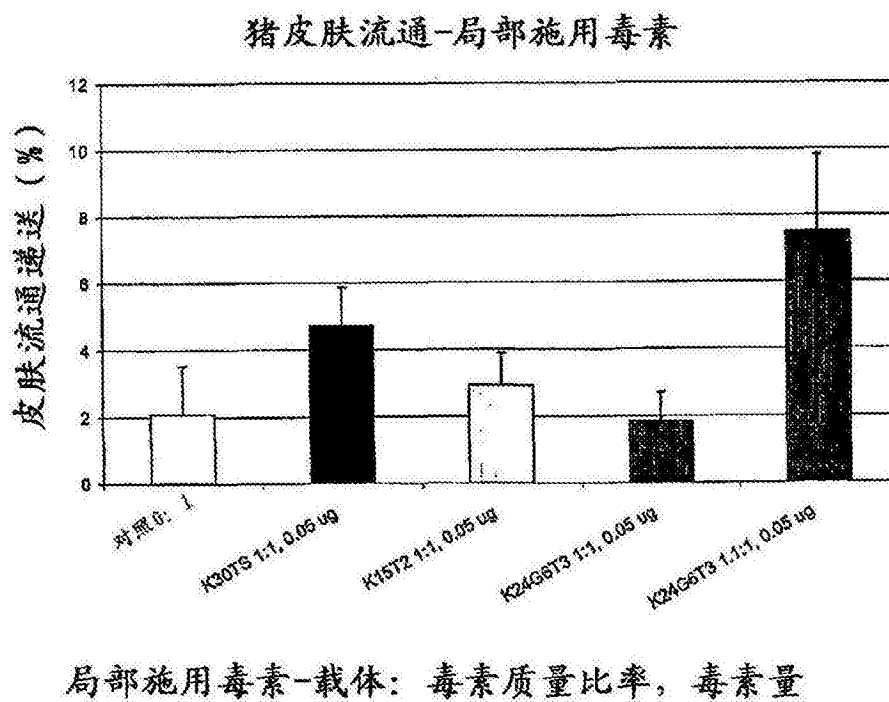


图14d

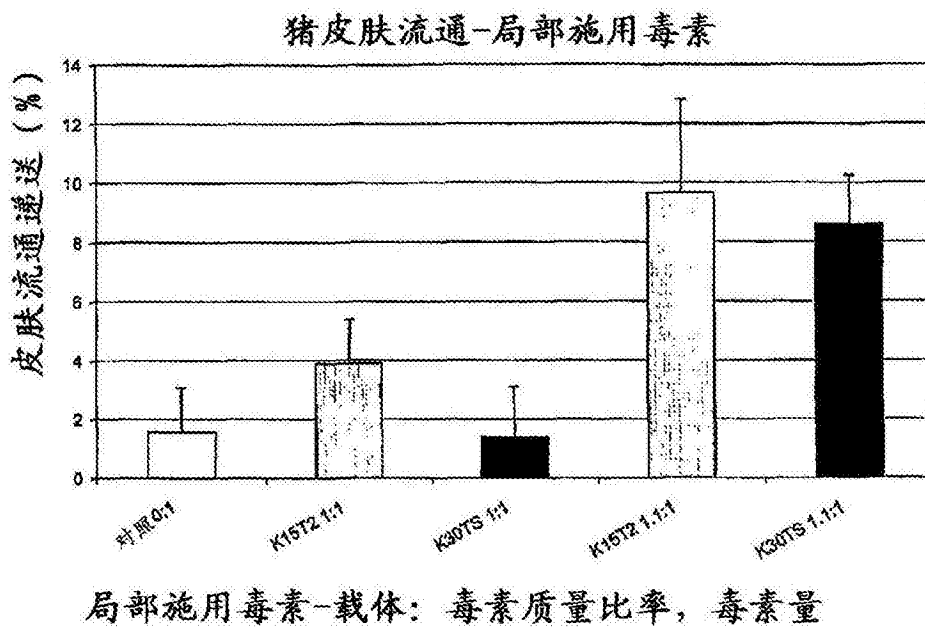


图14e

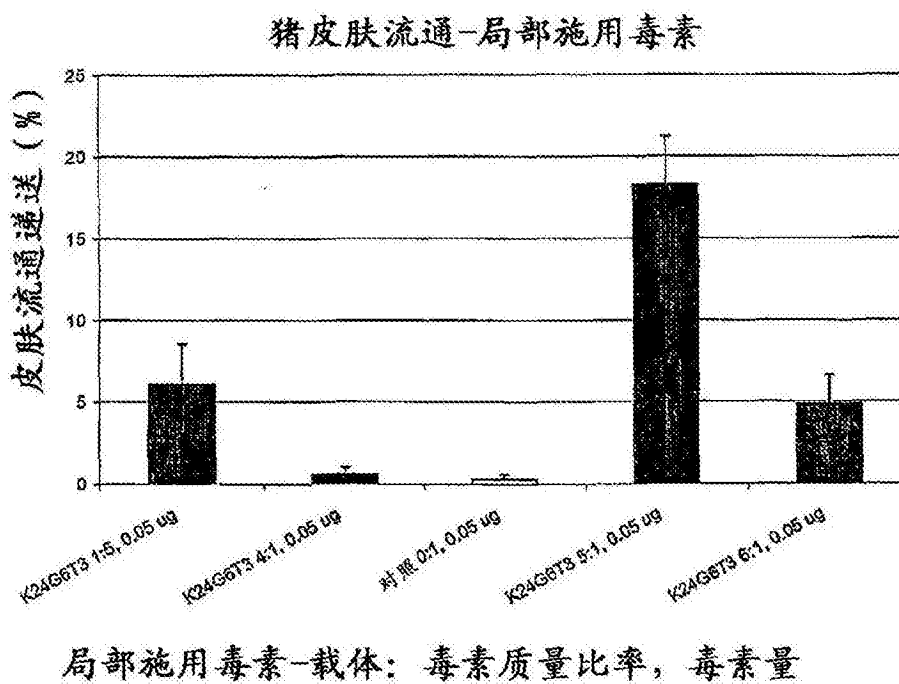


图14f

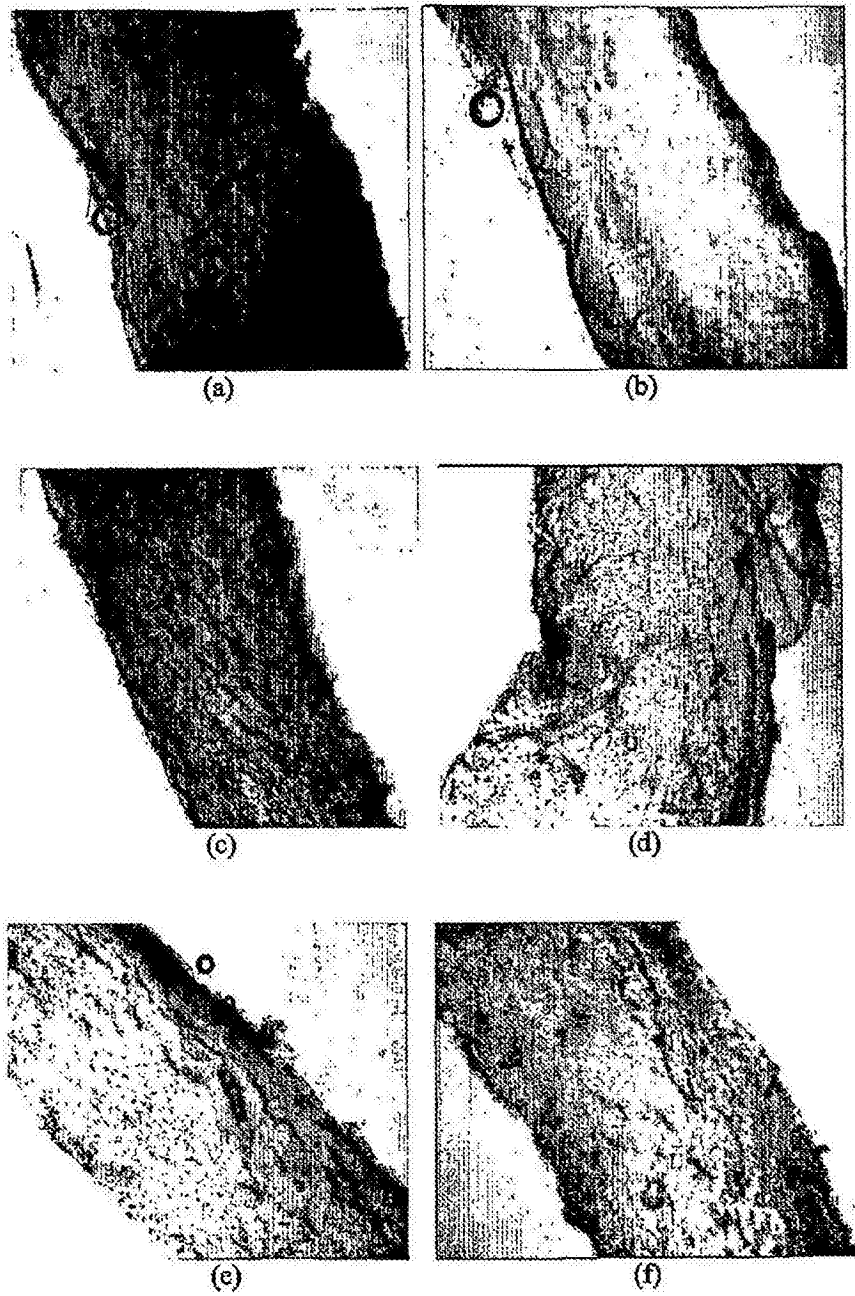


图15

肌力产生百分比

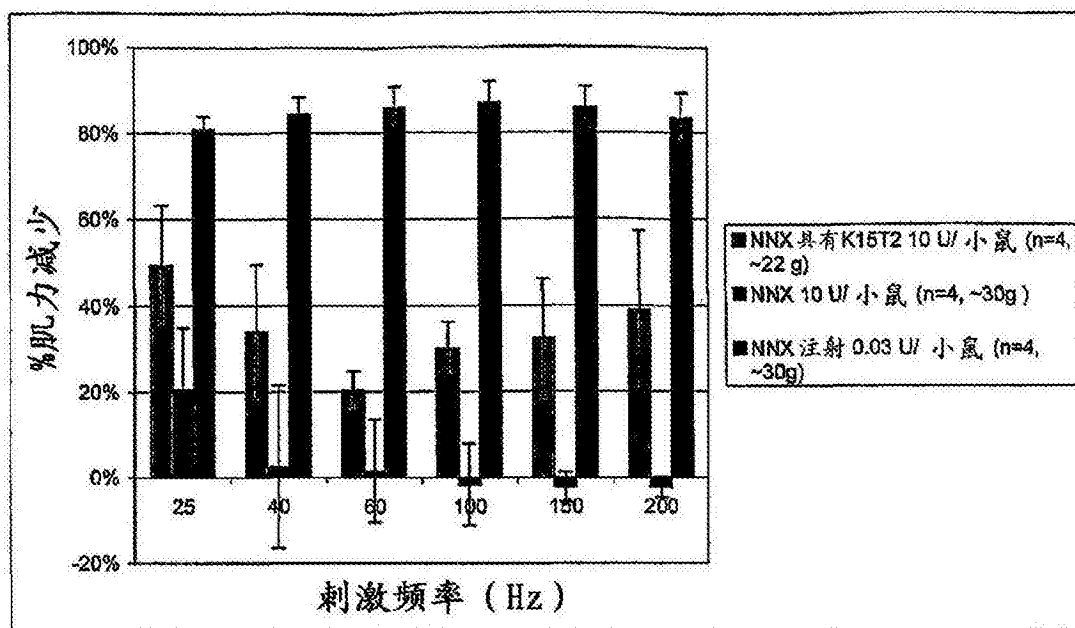


图16

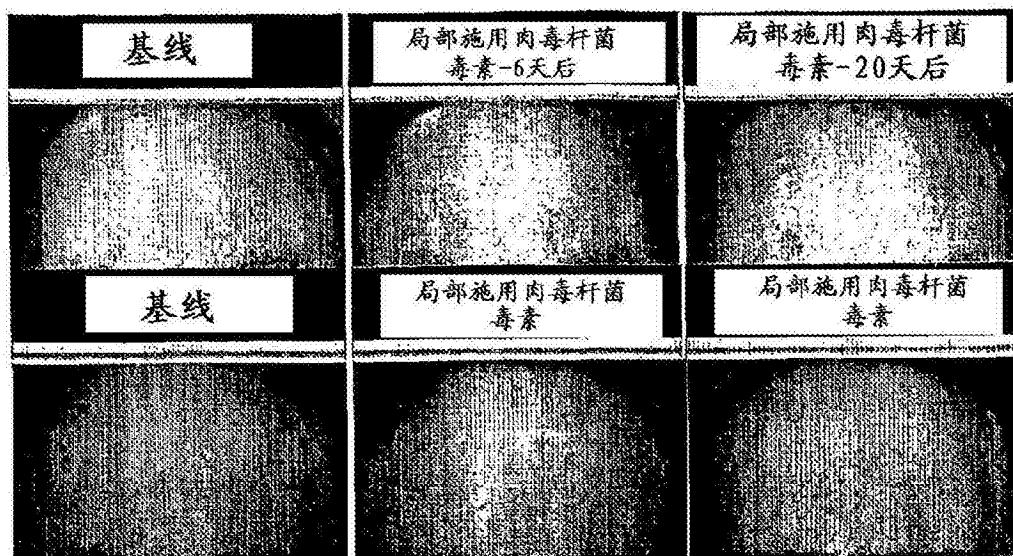


图17

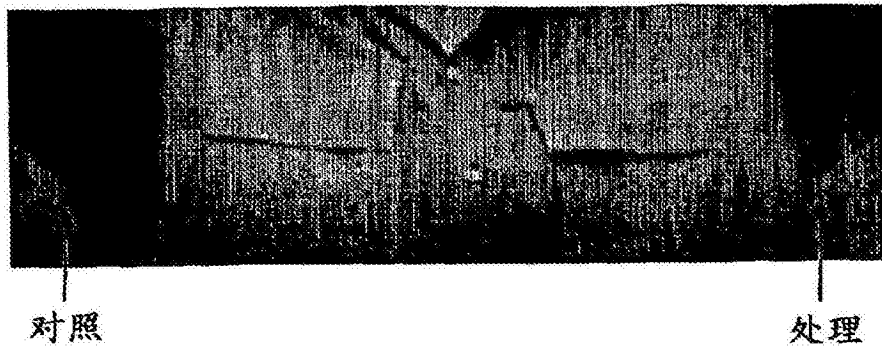


图18