



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119095579 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 06

(21) 申请号 202380036434.4

(22) 申请日 2023.04.28

(30) 优先权数据

2206362.2 2022.04.29 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2023/051152 2023.04.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/209403 EN 2023.11.02

(71) 申请人 益普生生物制药有限公司

地址 英国

(72) 发明人 N·格里戈尔 L·庞斯

K·拉弗尔 P·皮考特

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 高飞 黄革生

(51) Int.Cl.

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

权利要求书4页 说明书61页

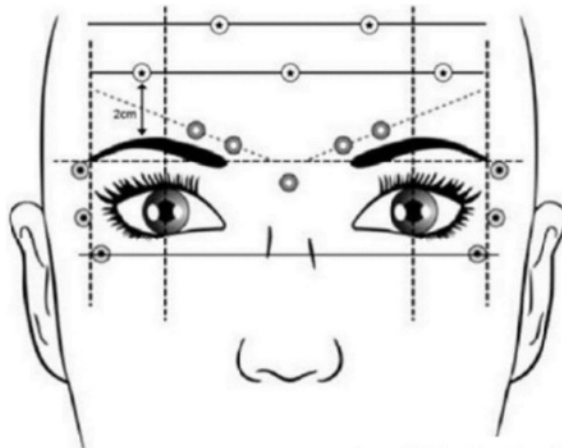
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

上面部纹的治疗

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗面部纹的修饰的BoNT/A,其中修饰的BoNT/A通过在受试者面部的多个位点进行肌肉内注射来施用,其中修饰的BoNT/A以每个位点大于1754pg(例如大于1800pg)修饰的BoNT/A的单位剂量施用,其中多个位置选自:皱眉肌肌肉的最多两个位置和降眉间肌肌肉的最多一个位置,用于治疗眉间纹,额肌肌肉的最多五个位置,用于治疗额头纹,以及眼轮匝肌肌肉的最多三个位置,用于治疗外眦纹,其中在治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达88,000pg,并且其中修饰的BoNT/A包含BoNT/A轻链和易位结构域(H_N 结构域),以及BoNT/B受体结合结构域(H_C 结构域)。



● 眉间纹注射点
● 外眦纹注射点
● 额头纹注射点

1. 用于治疗面部纹的用途的修饰的BoNT/A, 其中修饰的BoNT/A通过肌肉内注射施用在受试者面部的多个位点,

其中修饰的BoNT/A以每个位点大于1754pg (例如, 大于1800pg) 的修饰的BoNT/A单位剂量施用,

其中, 多个位点选自:

皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点, 用于治疗眉间纹,

额肌肌肉的最多五个位点, 用于治疗额头纹; 和

眼轮匝肌肌肉的最多三个位点, 用于治疗外眦纹,

其中治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达88,000pg, 并且

其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域 (H_N 结构域) 以及BoNT/B受体结合结构域 (H_C 结构域)。

2. 根据权利要求1所述用途的修饰的BoNT/A, 其中修饰的BoNT/A的单位剂量大于1754pg, 并且其中修饰的BoNT/A的单位剂量高达8,000pg的修饰的BoNT/A。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述用途的修饰的BoNT/A, 其中修饰的BoNT/A的单位剂量大于1754pg, 并且其中修饰的BoNT/A的单位剂量高达7,500pg的修饰的BoNT/A。

4. 根据前述权利要求中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中修饰的BoNT/A的单位剂量大于1754pg, 并且其中修饰的BoNT/A的单位剂量高达5,000pg的修饰的BoNT/A。

5. 根据前述权利要求中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中单位剂量为2000至3500pg的修饰的BoNT/A, 优选地其中单位剂量为2250pg至3250pg的修饰的BoNT/A。

6. 根据前述权利要求中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中单位剂量为约2500pg的修饰的BoNT/A, 优选地其中单位剂量为2500pg的修饰的BoNT/A。

7. 根据权利要求1-4中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中单位剂量为3500-5500pg的修饰的BoNT/A, 优选地其中单位剂量为3800pg至4200pg的修饰的BoNT/A。

8. 根据权利要求1-4或7中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中单位剂量为约4000pg的修饰的BoNT/A, 优选地其中单位剂量为4000pg的修饰的BoNT/A。

9. 根据前述权利要求中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达80,000pg。

10. 根据前述权利要求中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中修饰的BoNT/A具有大于7的安全比, 其中安全比计算为: 以pg/小鼠测量的-10% 体重变化所需的毒素剂量除以以pg/小鼠测量的DAS ED_{50} , 其中 ED_{50} = 产生DAS评分2所需的剂量。

11. 根据前述权利要求中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中修饰的BoNT/A用于治疗眉间纹, 优选地其中将所述修饰的BoNT/A施用到皱眉肌肌肉的两个位点和降眉间肌肌肉的一个位点, 更优选地其中所述修饰的BoNT/A施用到总共五个位点。

12. 根据前述权利要求中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中修饰的BoNT/A用于治疗眉间纹, 优选地其中将所述修饰的BoNT/A施用到每块皱眉肌肌肉的两个位点和降眉间肌肌肉的一个位点, 更优选地其中所述修饰的BoNT/A施用到总共五个位点。

13. 根据权利要求11或权利要求12所述用途的修饰的BoNT/A, 其中对眉间纹施用的总剂量为12,000pg至13,000pg的修饰的BoNT/A; 优选地其中单位剂量为2000pg至3000pg的修饰的BoNT/A, 更优选地其中单位剂量为2500pg的修饰的BoNT/A。

14. 根据权利要求11-13中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中对眉间纹施用的总剂量为约12,500pg的修饰的BoNT/A, 优选地其中对眉间纹施用的总剂量为12,500pg的修饰的BoNT/A。

15. 根据权利要求11或权利要求12所述用途的修饰的BoNT/A, 其中对眉间纹施用的总剂量为19,000pg至21,000pg的修饰的BoNT/A; 优选地其中单位剂量为3500至4500pg的修饰的BoNT/A, 更优选地其中单位剂量为4000pg的修饰的BoNT/A。

16. 根据权利要求11-12或15中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中对眉间纹施用的总剂量为约20,000pg的修饰的BoNT/A, 优选地其中对眉间纹施用的总剂量为20,000pg的修饰的BoNT/A。

17. 根据权利要求1-10中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中修饰的BoNT/A用于治疗额头纹, 优选地其中所述修饰的BoNT/A施用到额肌肌肉的五个位点。

18. 根据权利要求17所述用途的修饰的BoNT/A, 其中对额头纹施用的总剂量为12,000pg至13,000pg的修饰的BoNT/A; 优选地其中单位剂量为2000pg至3000pg的修饰的BoNT/A, 更优选地其中单位剂量为2500pg的修饰的BoNT/A。

19. 根据权利要求17-18中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中对额头纹施用的总剂量为约12,500pg的修饰的BoNT/A, 优选地其中对额头纹施用的总剂量为12,500pg的修饰的BoNT/A。

20. 根据权利要求17所述用途的修饰的BoNT/A, 其中对额头纹施用的总剂量为19,000pg至21,000pg的修饰的BoNT/A; 优选地其中单位剂量为3500pg至4500pg的修饰的BoNT/A, 更优选地其中单位剂量为4000pg的修饰的BoNT/A。

21. 根据权利要求17或20中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中对额头纹施用的总剂量为约20,000pg的修饰的BoNT/A, 优选地其中用对额头纹施用的总剂量为20,000pg的修饰的BoNT/A。

22. 根据权利要求1-10中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中修饰的BoNT/A用于治疗外眦纹, 优选地其中所述修饰的BoNT/A施用到眼轮匝肌肌肉的三个位点(例如在其外部)以治疗外眦纹, 更优选地其中所述修饰的BoNT/A施用到总共六个位点。

23. 根据权利要求1-10或22中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中修饰的BoNT/A用于治疗外眦纹, 优选地其中所述修饰的BoNT/A施用到每块眼轮匝肌肌肉的三个位点(例如在每块眼轮匝肌肌肉的外部)以治疗外眦纹。

24. 根据权利要求22或权利要求23所述用途的修饰的BoNT/A, 其中对外眦纹施用的总剂量为14,000pg至16,000pg的修饰的BoNT/A; 优选地其中单位剂量为2000至3000pg的修饰的BoNT/A, 更优选地其中单位剂量为2500pg的修饰的BoNT/A。

25. 根据权利要求22至24中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中对外眦纹施用的总剂量为约15,000pg的修饰的BoNT/A, 优选地其中对外眦纹施用的总剂量为15,000pg的修饰的BoNT/A。

26. 根据权利要求22至23中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中对外眦纹施用的总剂量为23,000pg至25,000pg的修饰的BoNT/A; 优选地其中单位剂量为3500pg至4500pg的修饰的BoNT/A, 更优选地其中单位剂量为4000pg的修饰的BoNT/A。

27. 根据权利要求22至23中任一项所述用途的修饰的BoNT/A, 其中对外眦纹施用的总

剂量为约24,000pg的修饰的BoNT/A,优选地其中对外眦纹施用的总剂量为24,000pg的修饰的BoNT/A。

28.根据权利要求1-10中任一项所述用途的修饰的BoNT/A,其中修饰的BoNT/A用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹,优选地其中:

- 将所述修饰的BoNT/A施用到皱眉肌肌肉的两个位点和降眉间肌肌肉的一个位点,用于治疗眉间纹;

- 将所述修饰的BoNT/A施用到额肌肌肉的五个位点;并且

- 将所述修饰的BoNT/A施用到眼轮匝肌肌肉外部的三个位点,用于治疗外眦纹。

29.根据前述权利要求中任一项所述用途的修饰的BoNT/A,其中修饰的BoNT/A用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹,优选地其中:

- 将所述修饰的BoNT/A施用到每块皱眉肌肌肉的两个位点和降眉间肌肌肉的一个位点,用于治疗眉间纹;

- 将所述修饰的BoNT/A施用到额肌肌肉的五个位点;并且

- 将所述修饰的BoNT/A施用到每块眼轮匝肌肌肉的三个位点(优选在每块眼轮匝肌肌肉的外部),用于治疗外眦纹。

30.根据权利要求28或权利要求29所述用途的修饰的BoNT/A,其中用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹的总剂量为43,000至44,000pg的修饰的BoNT/A;优选地其中单位剂量为2000pg至3000pg的修饰的BoNT/A,更优选地其中单位剂量为2500pg的修饰的BoNT/A。

31.根据权利要求28-30中任一项所述用途的修饰的BoNT/A,其中用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹的总剂量为约44,000pg的修饰的BoNT/A,优选地其中用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹的总剂量为44,000pg的修饰的BoNT/A。

32.根据权利要求28或权利要求29所述用途的修饰的BoNT/A,其中用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹的总剂量为63,000至65,000pg的修饰的BoNT/A;优选地其中单位剂量为3500pg至4500pg的修饰的BoNT/A,更优选地其中单位剂量为4000pg的修饰的BoNT/A。

33.根据权利要求28、29或32所述用途的修饰的BoNT/A,其中用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹的总剂量为约64,000pg的修饰的BoNT/A,优选地其中用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹的总剂量为64,000pg的修饰的BoNT/A。

34.根据前述权利要求中任一项所述用途的修饰的BoNT/A,其中将所述修饰的BoNT/A施用至8、10、12、14或16个位点。

35.根据前述权利要求中任一项所述用途的修饰的BoNT/A,其中将所述修饰的BoNT/A施用至7、9、11、13或15个位点。

36.根据前述权利要求中任一项所述用途的修饰的BoNT/A,其中修饰的BoNT/A包含与SEQ ID NO:6具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的多肽序列;优选地其中修饰的BoNT/A包含与SEQ ID NO:6具有至少70%序列同一性的多肽序列。

37.根据前述权利要求中任一项所述用途的修饰的BoNT/A,其中修饰的BoNT/A包含BoNT/A轻链和易位结构域,以及BoNT/B H_C结构域,并且其中24.04pg的修饰的BoNT/A对应于小鼠的计算半数致死量(LD₅₀) (例如,并且其中1单位是对应于小鼠的计算半数致死量(LD50)的修饰的BoNT/A的量)。

38.一种修饰的肉毒杆菌神经毒素A (BoNT/A) 的单位剂量形式,该单位剂量形式包含:

a. 大于73单位的修饰的BoNT/A, 其中1单位是对应于小鼠的计算半数致死量 (LD_{50}) 的修饰的BoNT/A的量; 或者

b. 大于1754pg (优选大于1800pg) 的修饰的BoNT/A; 并且

c. 任选地, 药学上可接受的载体、赋形剂、佐剂和/或盐, 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域 (H_N 结构域) 以及BoNT/B受体结合结构域 (H_C 结构域)。

39. 根据权利要求38的单位剂量形式, 其包含:

a. 大于73单位且最多332.8单位的修饰的BoNT/A; 或者

b. 大于1754pg (优选大于1800pg) 并且最多8000pg的修饰的BoNT/A。

40. 根据权利要求38或权利要求39的单位剂量, 其中单位剂量形式包含2000pg至3500pg的修饰的BoNT/A, 优选2250pg至3250pg的修饰的BoNT/A。

41. 根据权利要求38至39中的任一项的单位剂量形式, 其中所述单位剂量形式包含约2500pg的修饰的BoNT/A, 优选地其中单位剂量形式包含2500pg的修饰的BoNT/A。

42. 根据权利要求38或权利要求39的单位剂量形式, 其中单位剂量形式包含3500pg至5500pg的修饰的BoNT/A, 优选3800pg至4200pg的修饰的BoNT/A。

43. 根据权利要求38、39或42中任一项的单位剂量形式, 其中所述单位剂量形式包含约4000pg的修饰的BoNT/A, 优选地其中所述单位剂量形式包含4000pg的修饰的BoNT/A。

44. 试剂盒, 其包括:

a. 根据权利要求38-43中任一项的单位剂量形式; 以及

b. 其用于治疗面部纹 (例如眉间纹、额头纹和/或外眦纹) 的使用说明; 以及

c. 可选地, 稀释剂。

上面部纹的治疗

发明领域

[0001] 本发明涉及美容治疗(例如用于治疗功能亢进面部纹)。更详细地,本发明提供美容治疗方法,包括施用长效神经毒素,更具体地说,涉及使用长效肉毒杆菌毒素治疗美容缺陷的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 功能亢进面部纹是常见的美学缺陷,包括但不限于:眉间纹、外眦纹、额头纹和皱纹、鱼尾纹、眉间纹、鼻唇沟、唇纹和木偶纹。上部面部纹可出现在额头、眉间和眶外侧区域。皱眉表情也可能导致眉间和额头区域出现皱纹,而微笑表情也可能导致外眦区域出现皱纹。该区域过于明显的纹常常被误解为疲劳,导致患者对其外表感到非常苦恼。事实上,过于明显的面部纹是由于底层肌肉的功能性拉动而出现的,最终会导致皮肤起皱。在眉间复合体中,这些肌肉包括皱眉肌、降眉间肌和降眉肌,而眼轮匝肌负责产生外眦纹。

[0004] 在过去的几十年里,随着老龄人口的不断增长,人们对美容手术的需求也越来越大,以扭转衰老的面容,尤其是面部。人们对外表的日益关注导致了許多不同产品和程序的开发,例如手术、各种类型的表面重修和使用填充剂。由于这些方法都不是完全没有风险的,因此需要持续研究以提供最安全、最有效的面部衰老治疗方法。

[0005] 虽然有五个因素相互作用,导致面部衰老,但主要有两个因素(皮肤和底层肌肉)相互作用,导致更明显的细纹和褶皱,而不是皱纹。许多疗法已经发展到治疗皱纹和治疗纹和褶皱的皮肤因素,其中包括各种类型的表面重修、皮肤科产品和用于软组织增强的注射。

[0006] 治疗面部纹的另一种美容方法是向面部皮肤的底层肌肉施用神经毒素,特别是肉毒梭菌神经毒素。**Dysport®**是一种含有从A型肉毒梭菌菌株(*Clostridium botulinum* type A strain)中分离和纯化的药物BoNT/A血凝素复合物(BTX-A-HAC)的药用产品。市场上还有几种由肉毒梭菌自然产生的其他药用BoNT/A产品。

[0007] BoNT/A选择性抑制突触前神经末梢释放乙酰胆碱,从而阻断神经肌肉接头处的胆碱能传递,导致肌肉收缩降低和肌肉张力降低,使注射的肌肉放松。

[0008] **Dysport®**获批用于治疗眉间纹,最大总剂量可达50单位,可在皱眉肌肌肉和降眉间肌肌肉上注射(见图1)。**Dysport**的临床效果可持续长达四个月。临床研究表明,重复给药最多四次仍能保持疗效。但是,**Dysport**的施用频率不应超过每三个月一次。到目前为止,**Dysport**尚未获得FDA批准用于治疗额头纹和外眦纹。

[0009] 为了避免全身神经系统影响,许多基于梭菌毒素的美容治疗利用梭菌毒素治疗剂直接施用到给定靶位点(例如靶组织)。以这种方式施用基于梭菌毒素的治疗剂时的一个问题是毒素会从施用位点扩散到周围组织或全身循环中。毒素从目标组织扩散被认为是导致不良副作用的原因,在极端情况下可能会危及生命。当以高剂量、高浓度和高注射体积使用梭菌毒素治疗剂(例如BoNT治疗剂)时,这可能是一个特别令人担忧的问题。据报道,与此问题相关的商业BoNT/A治疗剂的不良反应包括乏力、全身肌肉无力、复视、眼睑下垂、吞咽困难、发声困难、构音障碍、尿失禁和呼吸困难。吞咽和呼吸困难可能危及生命,并且有报道称毒素扩散会导致死亡。

[0010] 本发明克服了上述一个或多个问题。

发明内容

[0011] 本发明人意外地发现,修饰的BoNT/A在面部纹的美容治疗中具有特别的用途。修饰的BoNT/A可以包括BoNT/A轻链和易位结构域以及BoNT/B受体结合结构域(H_c 结构域),这导致修饰的BoNT/A表现出在施用位点增加的保留(减少从施用位点的扩散)和增加的作用持续时间(例如6-9个月)。有利的是,修饰的BoNT/A具有与未修饰的BoNT/A(例如Dysport[®])相比改进的安全性。这种改进的安全性可以通过本文描述的修饰的BoNT/A的高安全比(Safety Ratio)来表示。修饰的BoNT/A可以包括一个或多个表面暴露氨基酸残基的修饰,从而导致净正电荷增加。增加的电荷促进多肽与阴离子细胞外成分之间的静电相互作用,从而促进多肽与细胞表面之间的结合。反过来,这会在施用位点增加药物的保留(减少从施用位点的扩散),从而延长作用时间(例如6-9个月)。

[0012] 基于本文的临床前数据(参见实施例11),已显示可以向受试者施用更高的总量的修饰BoNT/A,同时在如此高的剂量下实现与未修饰BoNT/A(例如Dysport[®])相似的安全性。因此,在达到最大总剂量之前,修饰BoNT/A可以在面部纹的美容治疗中注射到更多的肌肉/位点。这是一个重要且有利的发现,并且产生了改进的面部纹美容治疗,同时为临床医生提供了更广泛的治疗选择。治疗可以得到改进,因为与使用未修饰BoNT/A(例如Dysport[®])的治疗相比,它提供更持久的治疗(导致给药频率较低)和/或能够针对受试者进行定制,例如,使临床医生能够根据受试者的审美要求在特定位点施用。与常规治疗方案相比,本发明的治疗得到了改进。

[0013] 此外,本发明提供了方便、安全且有效的单剂量单位以及可在单次治疗中安全施用的总(最大)剂量。本发明还提供了相应的指导,指导所述剂量单位可施用到肌肉的次数(包括每块肌肉的注射位点数),而不会对患者产生毒性。因此,根据本发明的治疗对于临床医生来说要简单得多,并且有助于避免剂量不足和/或剂量过量。

发明内容

[0014]

[0015] 在一个方面,本发明提供了修饰的BoNT/A,其用于治疗面部纹(例如,持续时间比未修饰的BoNT/A(例如,SEQ ID NO:2)治疗的持续时间更长),其中修饰的BoNT/A通过肌肉内注射施用在受试者面部的多个位点,

[0016] 其中修饰的BoNT/A以每个位点大于73单位修饰的BoNT/A的单位剂量施用,并且其中1单位是对应于小鼠的计算半数致死量(LD_{50})的修饰的BoNT/A的量,

[0017] 其中,多个位点选自:

[0018] 皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点,用于治疗眉间纹,

[0019] 额肌肌肉的最多五个位点,用于治疗额头纹;和

[0020] 眼轮匝肌肌肉的最多三个位点,用于治疗外眦纹(例如,眼轮匝肌肌肉外部的最多三个位点,用于治疗外眦纹),

[0021] 其中治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达3,661单位,并且

[0022] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域,以及BoNT/B受体结合结构域

(H_c结构域)。

[0023] 还提供了相应(在制造药物中)的用途和治疗面部纹的方法。

[0024] 在相关方面,本发明提供了一种治疗面部纹的方法(例如,持续时间比未修饰的BoNT/A(例如,SEQ ID NO:2)治疗的持续时间更长),该方法包括通过肌肉内注射将修饰的肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)施用到受试者面部的多个位点,

[0025] 其中修饰的BoNT/A以每个位点大于73单位修饰的BoNT/A的单位剂量施用,并且其中1单位是对应于小鼠的计算半数致死量(LD₅₀)的修饰的BoNT/A的量,

[0026] 其中,多个位点选自:

[0027] 皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点,用于治疗眉间纹,

[0028] 额肌肌肉的最多五个位点,用于治疗额头纹;和

[0029] 眼轮匝肌肌肉的最多三个位点,用于治疗外眦纹(例如,眼轮匝肌外部的最多三个位点,用于治疗外眦纹),

[0030] 其中治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达3,661单位,并且

[0031] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域,以及BoNT/B受体结合结构域(H_c结构域)。

[0032] 在另一个相关方面,本发明提供了修饰的肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)在制造用于治疗面部纹的药物中的用途(例如,持续时间比未修饰的BoNT/A(例如,SEQ ID NO:2)治疗的持续时间更长),其中修饰的BoNT/A通过肌肉内注射施用到受试者面部的多个位点,

[0033] 其中修饰的BoNT/A以每个位点大于73单位修饰的BoNT/A的单位剂量施用,并且其中1单位是对应于小鼠的计算半数致死量(LD₅₀)的修饰的BoNT/A的量,

[0034] 其中,多个位点选自:

[0035] 皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点,用于治疗眉间纹,

[0036] 额肌肌肉的最多五个位点,用于治疗额头纹;和

[0037] 眼轮匝肌肌肉的最多三个位点,用于治疗外眦纹(例如,眼轮匝肌外部的最多三个位点,用于治疗外眦纹),

[0038] 其中治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达3,661单位,并且

[0039] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域,以及BoNT/B受体结合结构域(H_c结构域)。

[0040] 在一个方面,本发明提供了用于治疗面部纹的修饰的BoNT/A(例如,持续时间比未修饰的BoNT/A(例如,SEQ ID NO:2)治疗的持续时间更长),其中修饰的BoNT/A通过肌肉内注射施用到受试者面部的多个位点,

[0041] 其中修饰的BoNT/A以每个位点大于73单位修饰的BoNT/A的单位剂量施用,并且其中1单位是对应于小鼠的计算半数致死量(LD₅₀)的修饰的BoNT/A的量,

[0042] 其中,多个位点选自:

[0043] 皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点,用于治疗眉间纹,

[0044] 额肌肌肉的最多五个位点,用于治疗额头纹;和

[0045] 眼轮匝肌肌肉的最多三个位点,用于治疗外眦纹(例如,眼轮匝肌外部的最多三个位点,用于治疗外眦纹),

[0046] 优选地,其中多个位点包括最多皱眉肌肌肉的两个位点和降眉间肌肌肉的一个位

点(或由其组成),用于治疗眉间纹,

[0047] 其中治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达1144单位(例如高达1019单位),并且

[0048] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域,以及BoNT/B受体结合结构域(H_C结构域)。

[0049] 在相关方面,本发明提供了一种治疗面部纹的方法(例如,持续时间比未修饰的BoNT/A(例如,SEQ ID NO:2)治疗的持续时间更长),该方法包括通过肌肉内注射将修饰的肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)施用到受试者面部的多个位置,

[0050] 其中修饰的BoNT/A以每个位点大于73单位修饰的BoNT/A的单位剂量施用,并且其中1单位是对应于小鼠的计算半数致死量(LD₅₀)的修饰的BoNT/A的量,

[0051] 其中,多个位点选自:

[0052] 皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点,用于治疗眉间纹,

[0053] 额肌肌肉的最多五个位点,用于治疗额头纹;和

[0054] 眼轮匝肌肌肉的最多三个位点,用于治疗外眦纹(例如,眼轮匝肌外部的最多三个位点,用于治疗外眦纹),

[0055] 优选地,其中多个位点包括皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点(或由其组成),用于治疗眉间纹,

[0056] 其中治疗期间施用的修饰BoNT/A的总剂量高达1144单位(例如高达1019单位),并且

[0057] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域,以及BoNT/B受体结合结构域(H_C结构域)。

[0058] 在另一个相关方面,本发明提供了修饰的肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)在制造用于治疗面部纹的药物中的用途(例如,持续时间比未修饰的BoNT/A(例如,SEQ ID NO:2)治疗的持续时间更长),其中修饰的BoNT/A通过肌肉内注射施用到受试者面部的多个位点,

[0059] 其中修饰的BoNT/A以每个位点大于73单位修饰的BoNT/A的单位剂量施用,并且其中1单位是对应于小鼠的计算半数致死量(LD₅₀)的修饰的BoNT/A的量,

[0060] 其中,多个位点选自:

[0061] 皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点,用于治疗眉间纹,

[0062] 额肌肌肉的最多五个位点,用于治疗额头纹;和

[0063] 眼轮匝肌肌肉的最多三个位点,用于治疗外眦纹(例如,眼轮匝肌外部的最多三个位点,用于治疗外眦纹),

[0064] 优选地,其中多个位点包括皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点(或由其组成),用于治疗眉间纹,

[0065] 其中治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达1144单位(例如高达1019单位),并且

[0066] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域,以及BoNT/B受体结合结构域(H_C结构域)。

[0067] 在另一方面,本发明提供了用于治疗面部纹的修饰的BoNT/A(例如,持续时间比未修饰的BoNT/A(例如,SEQ ID NO:2)治疗的持续时间更长),其中修饰的BoNT/A通过肌肉内

注射施用到受试者面部的多个位点，

[0068] 其中修饰的BoNT/A以每个位点大于1754pg (例如大于1800pg) 修饰的BoNT/A的单位剂量施用，

[0069] 其中，多个位点选自：

[0070] 皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点，用于治疗眉间纹，

[0071] 额肌肌肉的最多五个位点，用于治疗额头纹；和

[0072] 眼轮匝肌肌肉的最多三个位点，用于治疗外眦纹 (例如，眼轮匝肌外部的最多三个位点，用于治疗外眦纹)，

[0073] 其中治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达88,000 (例如高达80,000pg)，并且

[0074] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域，以及BoNT/B受体结合结构域(H_c结构域)。

[0075] 在相关方面，本发明提供了一种治疗面部纹的方法 (例如，持续时间比未修饰的BoNT/A (例如，SEQ ID NO:2) 治疗的持续时间更长)，该方法包括通过肌肉内注射将修饰的肉毒杆菌神经毒素A (BoNT/A) 施用到受试者面部的多个位点，

[0076] 其中修饰的BoNT/A以每个位点大于1754pg (例如大于1800pg) 修饰的BoNT/A的单位剂量施用，

[0077] 其中，多个位点选自：

[0078] 皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点，用于治疗眉间纹，

[0079] 额肌肌肉的最多五个位点，用于治疗额头纹；和

[0080] 眼轮匝肌肌肉的最多三个位点，用于治疗外眦纹 (例如，眼轮匝肌外部的最多三个位点，用于治疗外眦纹)，

[0081] 其中治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达88,000 (例如高达80,000pg)，并且

[0082] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域，以及BoNT/B受体结合结构域(H_c结构域)。

[0083] 在另一个相关方面，本发明提供了修饰的肉毒杆菌神经毒素A (BoNT/A) 在制造用于治疗面部纹的药物中的用途 (例如，持续时间比未修饰的BoNT/A (例如，SEQ ID NO:2) 治疗的持续时间更长)，其中修饰的BoNT/A通过肌肉内注射施用到受试者面部的多个位点，

[0084] 其中修饰BoNT/A以每个位点大于1754pg (优选大于1800pg，更优选大于2555pg) 修饰的BoNT/A的单位剂量施用，

[0085] 其中，多个位点选自：

[0086] 皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点，用于治疗眉间纹，

[0087] 额肌肌肉的最多五个位点，用于治疗额头纹；和

[0088] 眼轮匝肌肌肉的最多三个位点，用于治疗外眦纹 (例如，眼轮匝肌外部的最多三个位点，用于治疗外眦纹)，

[0089] 其中治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达88,000 (例如高达80,000pg)，并且

[0090] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域，以及BoNT/B受体结合结构域

(H_C结构域)。

[0091] 在另一方面,本发明提供了用于治疗面部纹的修饰的BoNT/A(例如,持续时间比未修饰的BoNT/A(例如,SEQ ID NO:2)治疗的持续时间更长),其中修饰的BoNT/A通过肌肉内注射施用到受试者面部的多个位点,

[0092] 其中,修饰的BoNT/A以每个位点大于1754pg(例如大于1800pg)修饰的BoNT/A的单位剂量施用,

[0093] 其中,多个位点选自:

[0094] 皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点,用于治疗眉间纹,

[0095] 额肌肌肉的最多五个位点,用于治疗额头纹;和

[0096] 眼轮匝肌肌肉的最多三个位点,用于治疗外眦纹(例如,眼轮匝肌外部的最多三个位点,用于治疗外眦纹),

[0097] 优选地,其中多个位点包括皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点(或由其组成),用于治疗眉间纹,

[0098] 其中治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达27,500(例如高达25,000pg),并且

[0099] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域,以及BoNT/B受体结合结构域(H_C结构域)。

[0100] 在相关方面,本发明提供了一种治疗面部纹的方法(例如,持续时间比未修饰的BoNT/A(例如,SEQ ID NO:2)治疗的持续时间更长),该方法包括通过肌肉内注射将修饰的肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)施用到受试者面部的多个位点,

[0101] 其中修饰的BoNT/A以每个位点大于1754pg(例如大于1800pg)修饰的BoNT/A的单位剂量施用,

[0102] 其中,多个位点选自:

[0103] 皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点,用于治疗眉间纹,

[0104] 额肌肌肉的最多五个位点,用于治疗额头纹;和

[0105] 眼轮匝肌肌肉的最多三个位点,用于治疗外眦纹(例如,眼轮匝肌外部的最多三个位点,用于治疗外眦纹),

[0106] 优选地,其中多个位点包括皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点(或由其组成),用于治疗眉间纹,

[0107] 其中治疗期间施用的修饰BoNT/A的总剂量高达27,500(例如高达25,000pg),并且

[0108] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域,以及BoNT/B受体结合结构域(HC结构域)。

[0109] 在另一个相关方面,本发明提供了修饰的肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)在制造用于治疗面部纹的药物中的用途(例如,持续时间比未修饰的BoNT/A(例如,SEQ ID NO:2)治疗的持续时间更长),其中修饰的BoNT/A通过肌肉内注射施用到受试者面部的多个位点,

[0110] 其中修饰BoNT/A以每个位点大于1754pg(优选大于1800pg,更优选大于2555pg)修饰的BoNT/A的单位剂量施用,

[0111] 其中,多个位点选自:

[0112] 皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点,用于治疗眉间纹,

- [0113] 额肌肌肉的最多五个位点,用于治疗额头纹;和
- [0114] 眼轮匝肌肌肉的最多三个位点,用于治疗外眦纹(例如,眼轮匝肌外部的最多三个位点,用于治疗外眦纹),
- [0115] 优选地,多个位点包括皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点(或由其组成),用于治疗眉间纹,
- [0116] 其中治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总剂量高达27,500pg(例如高达25,000pg),并且
- [0117] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域,以及BoNT/B受体结合结构域(H_C结构域)。
- [0118] 所述面部纹最优选被称为“上面部纹”,并且(如上述方面所反映的)包括眉间纹、额头纹和外眦纹。本发明可涉及治疗所述面部纹中的任一种(例如,上面部纹)或其任何组合。例如,眉间纹、额头纹和外眦纹这三种均可通过本发明的方法治疗。尽管如此,可以靶向特定类型的面部纹。例如,所治疗的面部纹可为眉间纹。此外,或替代地,所治疗的面部纹可为额头纹。此外,或替代地,所治疗的面部纹可为外眦纹。
- [0119] 本发明可以治疗特定面部纹组合。面部纹组合的示例包括:
- [0120] 眉间纹和额头纹;
- [0121] 眉间纹和外眦纹;
- [0122] 额头纹和外眦纹。
- [0123] 本发明所治疗的面部纹的优选组合可为眉间纹和外眦纹。
- [0124] 所指的“肌肉”是指受影响的肌肉,其对本发明所针对的潜在美学状况有贡献(例如,通过过度紧张(tightness)、拉伸(tension)或紧实(tone))。
- [0125] 第一组肌肉由降眉间肌肌肉限定,第二组肌肉由皱眉肌肌肉限定,第三组肌肉由眼轮匝肌肌肉限定,并且第四组肌肉由额肌肌肉限定。
- [0126] 在整个本公开内容中,术语“皱眉肌肌肉的最多两个位点”可以与术语“每块皱眉肌肌肉的最多两个位点”互换使用,注意有两块皱眉肌肌肉。因此,修饰的BoNT/A可以在皱眉肌肌肉的最多四个位点施用,例如,前提是修饰的BoNT/A在每块皱眉肌肌肉的最多两个位点施用。
- [0127] 皱眉肌(corrugator)又称为皱眉肌(corrugator supercilli)。
- [0128] (向其施用单位剂量的修饰的BoNT/A的)眼轮匝肌的位点优选位于眼轮匝肌的外部。术语“眼轮匝肌肌肉的外部”可与术语“外侧上部眼轮匝肌肌肉”互换使用。
- [0129] 在“眼轮匝肌肌肉的最多三个位点”进行施用可能包括:
- [0130] a) 将单位剂量的修饰的BoNT/A施用至外侧上部眼轮匝肌肌肉(例如,靠近受试者的第一只眼睛);
- [0131] b) 将单位剂量的修饰的BoNT/A施用至内侧上部眼轮匝肌肌肉(例如,靠近受试者的第一只眼睛);并且
- [0132] c) 将单位剂量的修饰的BoNT/A施用至外侧下部眼轮匝肌肌肉(例如,靠近受试者的第一只眼睛)。
- [0133] 在“眼轮匝肌肌肉的最多三个位点”进行施用可能包括:
- [0134] a) 将单位剂量的修饰的BoNT/A施用至外侧上部眼轮匝肌肌肉(例如,靠近受试者

的第一只眼睛)；

[0135] b) 将单位剂量的修饰的BoNT/A施用至外侧下部眼轮匝肌肌肉的第一个位点(例如,靠近受试者的第一只眼睛);并且

[0136] c) 将单位剂量的修饰的BoNT/A施用至外侧下部眼轮匝肌肌肉的第二个(不同)位点(例如,靠近受试者的第一只眼睛)。

[0137] 在整个本公开内容中,术语“眼轮匝肌肌肉的最多三个位点”可以与术语“每块眼轮匝肌肌肉的最多三个位点”互换使用,注意眼轮匝肌肌肉有两块。类似地,在整个本公开内容中,术语“眼轮匝肌肌肉外部的最多三个位点”可以与术语“每块眼轮匝肌肌肉的最多三个位点,位于眼轮匝肌肌肉外部”互换使用,注意眼轮匝肌肌肉有两块。因此,修饰的BoNT/A可以施用到眼轮匝肌肌肉的最多六个位点,例如,前提是修饰的BoNT/A施用到每块眼轮匝肌肌肉的最多三个位点。

[0138] 在“眼轮匝肌肌肉的最多三个位点”进行施用可能包括:

[0139] a) 对每块外侧上部眼轮匝肌肌肉施用单位剂量的修饰的BoNT/A;

[0140] b) 对每块内侧上部眼轮匝肌肌肉施用单位剂量的修饰的BoNT/A;并且

[0141] c) 对每块外侧下部眼轮匝肌肌肉施用单位剂量的修饰的BoNT/A。

[0142] 在“眼轮匝肌肌肉的最多三个位点”进行施用可能包括:

[0143] a) 对每块外侧上部眼轮匝肌肌肉(例如,靠近受试者的第一只眼睛)施用单位剂量的修饰的BoNT/A;

[0144] b) 将单位剂量的修饰的BoNT/A施用至外侧下部眼轮匝肌肌肉的第一个位点(例如,靠近受试者的第一只眼睛);并且

[0145] c) 对每块外侧下部眼轮匝肌肌肉的第二个(不同)位点(例如,靠近受试者的第一只眼睛)施用单位剂量的修饰的BoNT/A。

[0146] 提到“上”眼轮匝肌肌肉时,是指上眼睑的眼轮匝肌肌肉。同样,提到“下”眼轮匝肌肌肉时,是指下眼睑的眼轮匝肌肌肉。

[0147] 本领域技术人员理解术语“内侧”(例如在解剖学的背景下)意味着朝向身体的中线。类似地,本领域技术人员理解术语“外侧”(例如在解剖学的背景下)意味着远离身体的中线。因此:

[0148] - “外侧”上部眼轮匝肌肌肉是指上眼睑的眼轮匝肌肌肉位点,远离身体中线

[0149] - “内侧”上部眼轮匝肌肌肉是指上眼睑的眼轮匝肌肌肉位点,位于身体中线

[0150] 附近

[0151] - “外侧”下部眼轮匝肌肌肉是指下眼睑的眼轮匝肌肌肉位点,远离身体中线。

[0152] 术语“外侧上部眼轮匝肌肌肉”可与术语“上眼睑的眼轮匝肌肌肉外部”同义使用。术语“内侧上部眼轮匝肌肌肉”可与术语“上眼睑的眼轮匝肌肌肉内部”同义使用。术语“外侧下部眼轮匝肌肌肉”可与术语“下眼睑的眼轮匝肌肌肉外部”同义使用。

[0153] 眼轮匝肌肌肉由“睑板前部”和“眶隔前部”(均可注射)组成。眼轮匝肌肌肉由“眶部”组成。

[0154] 优选地,施用至眼轮匝肌肌肉的单位剂量可施用至所述肌肉的眶部,更优选地施用至眼轮匝肌肌肉外部(例如外侧部)的眶部。因此,用于治疗外眦纹的多个位点可包括眼轮匝肌肌肉外部(例如外侧部)的眶部的最多三个位点(或由其组成)。

[0155] 对外侧上部眼轮匝肌肌肉进行施用可能意味着对外侧“睑板前”上部眼轮匝肌肌肉进行施用,或者对外侧“眶隔前”上部眼轮匝肌肌肉进行施用。

[0156] 对内侧上部眼轮匝肌肌肉进行施用可能意味着对内侧上部“睑板前”眼轮匝肌肌肉进行施用,或者对内侧上部“眶隔前”眼轮匝肌肌肉进行施用。

[0157] 对外侧下部眼轮匝肌肌肉进行施用可能意味着对外侧下部“睑板前”眼轮匝肌肌肉进行施用,或者对外侧下部“眶隔前”眼轮匝肌肌肉进行施用。

[0158] 当向外侧上部眼轮匝肌肌肉施用,所述单位剂量可施用至眶隔前部(换句话说,施用至外侧“眶隔前”上部眼轮匝肌肌肉)。当向内侧上部眼轮匝肌肌肉施用,所述单位剂量可施用至眶隔前部(换句话说,施用至内侧上部“眶隔前”眼轮匝肌肌肉)。当向外侧下部眼轮匝肌肌肉施用,所述单位剂量可施用至眶隔前部(换句话说,施用至外侧下部“眶隔前”眼轮匝肌肌肉)。

[0159] 施用修饰的BoNT/A的位点数量可能根据待治疗的面部纹而有所不同。

[0160] 例如,待治疗的面部纹可为眉间纹,术语“多个位点”可以表示最多三个位点,其中多个位点包括皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点(或由其组成),用于治疗眉间纹。优选将两个单位剂量的修饰的BoNT/A施用到皱眉肌的两个不同位点,并将一个单位剂量施用到降眉间肌的一个位点,用于治疗眉间纹(例如,使得三个单位剂量施用至三个不同位点)。可以治疗面部一侧的眉间纹,术语“多个位点”可以表示如上定义的最多三个的位点,使得受试者接受最多三个单位剂量的修饰的BoNT/A。

[0161] 待治疗的面部纹可为眉间纹,术语“多个位点”可以表示最多六个位点,其中单位剂量的修饰的BoNT/A作用于每块皱眉肌肌肉上最多两个位点和降眉间肌肌肉上最多一个位点,用于治疗眉间纹。优选将两个单位剂量的修饰的BoNT/A施用到每块皱眉肌的两个不同位点,将一个单位剂量施用到降眉间肌的一个位点,用于治疗眉间纹(例如,使得五个单位剂量施用至五个不同位点)。可以治疗面部两侧的眉间纹,术语“多个位点”可以表示如上定义的最多六个位点,使得受试者接受最多六个单位剂量的修饰的BoNT/A。

[0162] 待治疗的面部纹可为额头纹,术语“多个位点”可以指额肌肌肉的最多两个、三个、四个或五个位点,用于治疗额头纹。优选将五个单位剂量施用到额肌的五个不同位点,用于治疗额头纹(例如,使得五个单位剂量施用至五个不同位点)。

[0163] 待治疗的面部纹可为外眦纹,术语“多个位点”可以表示眼轮匝肌肌肉的最多两个或三个位点(例如,眼轮匝肌肌肉外部的最多两个或三个位点)。优选将三个单位剂量的修饰的BoNT/A施用到眼轮匝肌肌肉的三个不同位点,用于治疗外眦纹(例如,使得三个单位剂量施用至三个不同位点)。可以治疗面部一侧的外眦纹,术语“多个位点”可以表示如上定义的最多三个位点,使得受试者接受最多三个单位剂量的修饰的BoNT/A。

[0164] 待治疗的面部纹可为外眦纹,术语“多个位点”可以表示每块眼轮匝肌肌肉的最多两个或三个位点(例如,每块眼轮匝肌肌肉的最多两个或三个位点,位于眼轮匝肌肌肉外部)。优选将三个单位剂量的修饰的BoNT/A施用至每块眼轮匝肌肌肉的三个不同位点以治疗外眦纹(例如,使得六个单位剂量施用至六个不同位点)。可以治疗面部两侧的外眦纹,术语“多个位点”可以表示如上定义的最多六个位点,使得受试者接受最多六个单位剂量的修饰的BoNT/A。

[0165] 待治疗的面部纹可为眉间纹和额头纹,术语“多个位点”可表示最多八个位点,其

中多个位点包括皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点(或由其组成),用于治疗眉间纹,以及额肌肌肉的最多五个位点(或由其组成),用于治疗额头纹。优选将两个单位剂量的修饰的BoNT/A施用到皱眉肌的两个不同位点,和将一个单位剂量施用到降眉间肌的一个位点,用于治疗眉间纹,和将五个单位剂量施用到额肌肌肉的五个不同位点,用于治疗额头纹(例如,使得八个单位剂量施用至八个不同位点)。

[0166] 待治疗的面部纹可为眉间纹和额头纹,术语“多个位点”可以表示最多十个位点,其中多个位点包括每块皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点(或由其组成),用于治疗眉间纹,以及额肌肌肉的最多五个位点(或由其组成),用于治疗额头纹。优选将两个单位剂量的修饰的BoNT/A施用到每块皱眉肌的两个不同位点,和将一个单位剂量施用到降眉间肌一个位点,用于治疗眉间纹,和将五个单位剂量施用到额肌肌肉的五个不同位点,用于治疗额头纹(例如,使得十个单位剂量施用至十个不同位点)。

[0167] 待治疗的面部纹可为眉间纹和外眦纹,术语“多个位点”可表示最多三个、四个、五个或六个位点,其中多个位点包括(或由)皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点,用于治疗眉间纹,以及眼轮匝肌肌肉的最多两个或三个位点(例如,眼轮匝肌肌肉外部的最多两个或三个位点),用于治疗外眦纹。优选将两个单位剂量的修饰的BoNT/A施用至皱眉肌的两个不同位点,和将一个单位剂量施用至降眉间肌的一个位点,用于治疗眉间纹,和将三个单位剂量的修饰的BoNT/A施用至眼轮匝肌肌肉的三个不同位点,用于治疗外眦纹(例如,将六个单位剂量施用至六个不同位点)。

[0168] 待治疗的面部纹可为眉间纹和外眦纹,且术语“多个位点”可表示最多三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或十一个位点,其中多个位点包括每块皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点(或由其组成),用于治疗眉间纹,以及每块眼轮匝肌肌肉的最多两个或三个位点(例如,每块眼轮匝肌肌肉的最多两个或三个位点,位于眼轮匝肌肌肉的外部),用于治疗外眦纹。优选地,将两个单位剂量的修饰的BoNT/A施用到每块皱眉肌的两个不同位点,和将一个单位剂量施用到降眉间肌的一个位点,用于治疗眉间纹,和将三个单位剂量的修饰的BoNT/A施用到每块眼轮匝肌肌肉的三个不同位点,用于治疗外眦纹(例如,使得十一个单位剂量施用至十一个不同位点)。

[0169] 待治疗的面部纹可为额头纹和外眦纹,术语“多个位点”可表示最多四个、五个、六个、七个或八个位点,其中多个位点包括额肌肌肉的最多两个、三个、四个或五个位点(或由其组成),用于治疗额头纹,以及眼轮匝肌肌肉的最多两个或三个位点(例如,眼轮匝肌肌肉外部的最多两个或三个位点),用于治疗外眦纹。优选将五个单位剂量施用到额肌肌肉的五个不同位点,用于治疗额头纹,和将三个单位剂量的修饰的BoNT/A施用到眼轮匝肌肌肉的三个不同位点,用于治疗外眦纹(例如,使得八个单位剂量施用至八个不同位点)。

[0170] 待治疗的面部纹可为额头纹和外眦纹,术语“多个位点”可表示最多四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或十一个位点,其中多个位点包括额肌肌肉的最多两个、三个、四个或五个位点(或由其组成),用于治疗额头纹,以及每块眼轮匝肌肌肉的最多两个或三个位点(例如,每块眼轮匝肌肌肉外部的最多两个或三个位点),用于治疗外眦纹。优选将五个单位剂量施用到额肌肌肉的五个不同位点,用于治疗额头纹,和将三个单位剂量的修饰的BoNT/A施用到每块眼轮匝肌肌肉的三个不同位点,用于治疗外眦纹(例如,使得十一个单位剂量施用至十一个不同位点)。

[0171] 待治疗的面部纹可为眉间纹、前额纹和外眦纹,术语“多个位点”可以表示最多四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个或十六个位点,其中多个位点包括(或由以下组成)

[0172] -皱眉肌肌肉的最多两个位点的和降眉间肌肌肉的最多一个位点,用于治疗眉间纹,

[0173] -额肌肌肉的最多两个、三个、四个或五个位点,用于治疗额头纹,以及

[0174] -眼轮匝肌肌肉的最多两个或三个位点(例如,眼轮匝肌肌肉外部的最多两个或三个位点),用于治疗外眦纹。

[0175] 优选的是:

[0176] -将两个单位剂量的修饰的BoNT/A施用至皱眉肌的两个不同位点,并将一个单位剂量施用至降眉间肌的一个位点,用于治疗眉间纹,

[0177] -将五个单位剂量注射到额肌肌肉的五个不同位点,用于治疗额头纹,并且

[0178] -将三个单位剂量的修饰的BoNT/A施用至眼轮匝肌肌肉的三个不同位点(例如其外部),用于治疗外眦纹

[0179] - (例如,将十一个单位剂量施用至十一个不同位点)。

[0180] 待治疗的面部纹可为眉间纹、额头纹和外眦纹,且术语“多个位点”可表示最多四、五、六、七、八、九、十、十一个、十二、十三个、十四个、十五或十六个位点,其中所述多个位点包括(或由以下组成):

[0181] -每块皱眉肌肌肉的最多两个位点,降眉间肌肌肉的一个位点,用于治疗眉间纹,

[0182] -额肌肌肉的最多两个、三个、四个或五个位点,用于治疗额头纹,以及

[0183] -每块眼轮匝肌肌肉的最多两个或三个位点(例如,每块眼轮匝肌肌肉外部的最多两个或三个位点),用于治疗外眦纹。

[0184] 优选的是:

[0185] -将两个单位剂量的修饰的BoNT/A施用到每块皱眉肌的两个不同位点,并将一个单位剂量施用至降眉间肌的一个位点,用于治疗眉间纹,

[0186] -将五个单位剂量注射到额肌肌肉的五个不同位点,用于治疗额头纹,并且

[0187] -将三个单位剂量的修饰的BoNT/A施用至每块眼轮匝肌肌肉(例如其外部)的三个不同位置,用于治疗外眦纹

[0188] - (例如,将十六个单位剂量施用至十一个不同的位点)。

[0189] 因此,术语“多个位点”可以表示最多两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个或十六个位点。优选地,术语“多个位点”可以指“最多16个位点”。

[0190] 术语“多个位点”可以表示两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个或十六个位点。优选地,术语“多个位点”可以表示16个位点。

[0191] 因此,修饰的BoNT/A可通过肌肉内注射的方式在受试者面部的最多16个位点进行施用,例如

[0192] -皱眉肌肌肉的最多四个位点(例如,前提是将修饰的BoNT/A施用至每块皱眉肌肌肉的最多两个位点)和降眉间肌肌肉的一个位点,用于治疗眉间纹;

[0193] -额肌肌肉的最多五个位点,用于治疗额头纹;以及

[0194] -眼轮匝肌肌肉的最多六个位点(例如,前提是将修饰的BoNT/A施用至每块眼轮匝肌肌肉的最多三个位点),用于治疗外眦纹。

[0195] 多个位点可位于同一肌肉群上(例如,左右皱眉肌肌肉、左右眼轮匝肌肌肉)。类似地,多个位点可位于同一肌肉上(例如,右皱眉肌肌肉或左皱眉肌肌肉;或右眼轮匝肌肌肉或左眼轮匝肌肌肉)。类似地,多个位点可位于所述肌肉和肌肉群的组合上。因此,可提供个性化治疗方案。

[0196] 根据本发明使用的修饰的BoNT/A的效力优选通过小鼠LD₅₀测定法根据标准技术来确定。在所述测定法中,1单位定义为对应于小鼠中计算的半数致死量(LD₅₀)的修饰的BoNT/A的量。优选地,对应于小鼠中计算的半数致死腹膜内剂量。

[0197] 具体而言,在所述测定中对应于1单位的修饰BoNT/A的量优选为24.04pg。

[0198] 术语“最多”用于指代某个值(例如最多3661单位)时,是指最多且包括所述值。因此,例如,提及施用“最多3661单位”修饰的BoNT/A包括施用3661单位的修饰BoNT/A以及施用少于3661单位的修饰BoNT/A。作为另一个示例,提及施用“最多80,000pg”修饰的BoNT/A包括施用80,000pg修饰的BoNT/A以及施用少于80,000pg修饰的BoNT/A。

[0199] 通过在多个位点肌肉内注射来施用一剂修饰的BoNT/A。每个位点施用单个单位剂量。术语“施用(单个)单位剂量”是指施用基本上全部的(单个)单位剂量。优选地,在已复原的修饰的BoNT/A的小瓶中最多仅残留(例如高达1%、0.1%或0.01%)(单个)单位剂量。然而,优选地施用全部的(单个)单位剂量。根据肌肉群,通常将(单个)单位剂量施用至选自第一群(本文所述)的肌肉,通常将2x单位施用至选自第二群(本文所述)的肌肉,通常将3x单位施用至选自第三群(本文所述)的肌肉,并且通常将5x单位施用至选自第四群(本文所述)的肌肉。

[0200] 单位剂量可以用修饰的BoNT/A的单位来表示。例如,24.04pg可能对应于1单位的修饰的BoNT/A。例如,2404pg的BoNT/A可以表示为100单位的修饰的BoNT/A。

[0201] 单位剂量可为大于73单位的修饰的BoNT/A。单位剂量范围的上限可为3,661、3000、2500、2000、1500、1000、500或100单位的修饰的BoNT/A。单位剂量范围的下限可为75、100、150、200、300或500单位的修饰的BoNT/A。优选地,修饰的BoNT/A的单位剂量大于73单位至3000单位、100单位至2500单位,更优选地200单位至2000单位。

[0202] 如上所述,修饰的BoNT/A的单位剂量可以大于73单位。单位剂量范围的上限可为300、250、200、150、100或50单位的修饰的BoNT/A,优选上限为300单位。单位剂量范围的下限可为75、100、150、200、300单位,优选下限为100单位。优选地,修饰的BoNT/A的单位剂量为100-300单位的修饰的BoNT/A,例如150单位至250单位。

[0203] 修饰的BoNT/A的单位剂量可选自:100单位至300单位、150单位至250单位、以及175单位至225单位。

[0204] 单位剂量可为大于1754pg至8000pg的修饰的BoNT/A。换言之,单位剂量可为大于1754pg且最多8000pg的修饰的BoNT/A。单位剂量范围的上限可为8,000、7,000、6,000、5,000、4,000、3,000、2,000或1,000pg的修饰的BoNT/A,优选上限为5,000pg。单位剂量范围的下限可为1,800、2,000、2,500、3000或4,000pg的修饰的BoNT/A,优选下限为1,800。修饰的BoNT/A的单位剂量可选自:1,800至8,000pg、2,000至6,000pg,最优选3,000至6,000pg。修

饰的BoNT/A的单位剂量可以为4,500至5,500pg的修饰的BoNT/A,例如4,900至5,100pg。

[0205] 单位剂量可大于1800pg修饰的BoNT/A。单位剂量可大于1800pg且最多7000pg的修饰的BoNT/A,例如大于1800pg且最多6000pg修饰的BoNT/A。单位剂量可大于2000pg且最多5000pg修饰的BoNT/A。

[0206] 单位剂量可大于2555pg。例如,单位剂量可大于2555pg且最多8000pg的修饰的BoNT/A,例如大于2555pg且最多6000pg。

[0207] 单位剂量可为2000pg、2500pg、3000pg、4000pg、4500pg、5000pg、5500pg、6000pg、6500pg、7000pg、7500pg或8000pg的修饰的BoNT/A。

[0208] 更优选的是,单位剂量为2000至3500pg修饰的BoNT/A。例如,单位剂量可为2250pg至3250pg修饰的BoNT/A。特别优选的单位剂量可为约2500pg (例如 $2500\text{pg} \pm 10\%$) 修饰的BoNT/A,例如单位剂量可以优选为2500pg修饰的BoNT/A。另一优选的单位剂量可为约3000pg (例如 $3000\text{pg} \pm 10\%$) 修饰的BoNT/A,例如单位剂量可为3000pg修饰的BoNT/A。

[0209] 单位剂量可为3500-5500pg修饰的BoNT/A。例如,单位剂量可为3800pg至4200pg修饰的BoNT/A。单位剂量可为4800至5200pg修饰的BoNT/A。特别优选的单位剂量可为约4000pg (例如 $4000\text{pg} \pm 10\%$) 修饰的BoNT/A,例如单位剂量可为4000pg修饰的BoNT/A。另一特别优选的单位剂量可为约5000pg (例如 $5000\text{pg} \pm 10\%$) 修饰的BoNT/A,例如单位剂量可为5000pg修饰的BoNT/A。

[0210] 单位剂量可以以“单位”来表示,也可以以pg量来表示。修饰的BoNT/A的单位剂量也可以同时以单位和量(pg)来表示。

[0211] 当治疗面部纹时,修饰的BoNT/A可以施用到选自以下的多个位点:皱眉肌肌肉的最多两个位点和降眉间肌肌肉的最多一个位点,用于治疗眉间纹,额肌肌肉的最多五个位点,用于治疗额头纹;以及眼轮匝肌肌肉外部的最多三个位点,用于治疗外眦纹。

[0212] 实施本发明的治疗方案时所施用的总剂量最多可为3661单位。换句话说,在给定的治疗期间施用的修饰的BoNT/A的总量最多可为3661单位。总剂量最多可为3500、3000、2500、2000、1500或1000单位的修饰的BoNT/A。优选地,总剂量最多可为3327.8单位的修饰的BoNT/A。

[0213] 实施本发明的治疗方案时施用的总剂量最多可为88000、85000、80000、75000、70000、65000、60000、55000、50000、45000、40000、35000或30000pg的修饰的BoNT/A,优选地最多80000pg的修饰的BoNT/A。因此,总剂量的上限可为88000、85000、80000、75000、70000、65000、60000、55000、50000、45000、40000、35000或30000pg的修饰的BoNT/A,优选为80000pg的修饰的BoNT/A。总剂量的下限可为25000、20000、15000、10000、5000pg、2000pg、1000pg、500pg或50pg的修饰的BoNT/A。例如,总剂量的下限可为25000、20000、15000、10000或5000pg的修饰的BoNT/A。

[0214] 实施本发明的治疗方案时施用的总剂量可为7,000pg至8,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用7,000pg至8,000pg修饰的BoNT/A (例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约7,500pg (例如, $7,500\text{pg} \pm 10\%$) 修饰的BoNT/A,例如总剂量可为7,500pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用约7,500pg (例如, $7,500\text{pg} \pm 10\%$) 修饰的BoNT/A,例如可以向受试者施用7,500pg修饰的BoNT/A (例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0215] 实施本发明的治疗方案时施用的总剂量可为10,000pg至20,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用10,000pg至20,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。例如,总剂量可为11,500pg至12,500pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用11,500pg至12,500pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约12,000pg(例如,12,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如总剂量可为12,000pg修饰的BoNT/A。因此,可向受试者施用约12,000pg(例如12,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如可向受试者施用12,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0216] 例如,总剂量可为12,000pg至13,000pg的修饰的BoNT/A。因此,可向受试者施用12,000pg至13,000pg的修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约12,500pg(例如,12,500pg $\pm$ 10%)的修饰的BoNT/A,例如总剂量可为12,500pg的修饰的BoNT/A。因此,可向受试者施用约12,500pg(例如,12,500pg $\pm$ 10%)的修饰的BoNT/A,例如可向受试者施用12,500pg的修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0217] 向受试者施用的总剂量可为14,000pg至16,000pg的修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用14,000pg至16,000pg的修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约15,000pg(例如,15,000pg $\pm$ 10%)的修饰的BoNT/A,例如,总剂量可为15,000pg的修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用约15,000pg(例如,15,000pg $\pm$ 10%)的修饰BoNT/A,例如,可以向受试者施用15,000pg的修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0218] 实施本发明的治疗方案时施用的总剂量可为18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。例如,总剂量可为19,000pg至21,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用19,000pg至21,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约20,000pg(例如,20,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如总剂量可为20,000pg修饰的BoNT/A。因此,可向受试者施用约20,000pg(例如20,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如可向受试者施用20,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0219] 实施本发明的治疗方案时施用的总剂量可为22,000pg至23,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用22,000pg至23,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约22,500pg(例如,22,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如总剂量可为22,500pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用约22,500pg(例如,22,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如可以向受试者施用22,500pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0220] 向受试者施用的总剂量可为23,000pg至25,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用23,000pg至25,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约24,000pg(例如,24,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如,总剂量可为24,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用约24,000pg(例如,24,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如,可以向受试者施用24,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0221] 向受试者施用的总剂量可为24,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受

试者施用24,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约25,000pg(例如,24,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如总剂量可为25,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用约25,000pg(例如,25,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如可以向受试者施用25,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0222] 向受试者施用的总剂量可为27,000pg至28,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用27,000pg至28,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约27,500pg(例如,27,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如,总剂量可为27,500pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用约27,500pg(例如,27,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如,可以向受试者施用27,500pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0223] 向受试者施用的总剂量可为31,000pg至33,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用31,000pg至33,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约32,000pg(例如,32,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如,总剂量可为32,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用约32,000pg(例如,32,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如,可以向受试者施用32,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0224] 总剂量可为35,000pg至37,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用35,000pg至37,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约36,000pg(例如,36,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如总剂量可为36,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用约36,000pg(例如,36,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如可以向受试者施用36,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0225] 实施本发明的治疗方案时施用的总剂量可为35,000至45,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用35,000至45,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约40,000pg(例如,40,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如总剂量可为40,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用约40,000pg(例如,40,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如可以向受试者施用40,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0226] 实施本发明的治疗方案时施用的总剂量可为43,000至44,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用43,000至44,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约44,000pg(例如,44,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如总剂量可为44,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用约44,000pg(例如,44,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如可以向受试者施用44,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0227] 实施本发明的治疗方案时施用的总剂量可为60,000至70,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用60,000至70,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。实施本发明的治疗方案时施用的优选总剂量可为63,000至65,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用63,000至65,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)。特别优选的总剂量可为约64,000pg(例如,64,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,例如总剂

量可为64,000pg修饰的BoNT/A。因此,可向受试者施用药64,000pg (例如64,000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,例如可向受试者施用64,000pg修饰的BoNT/A (例如,通过本文所述的多个单位剂量)。

[0228] 总剂量可为12,000pg至13,000pg修饰的BoNT/A,单位剂量可为2000至3500pg修饰的BoNT/A。因此,可向受试者施用12,000pg至13,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量为2000至3500pg修饰的BoNT/A。

[0229] 特别优选的总剂量可为约12,500pg (例如12,500pg $\pm$ 10%) 的修饰BoNT/A,例如总剂量可为12,500pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是2000至3500pg修饰的BoNT/A。优选的总剂量是12,500pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是2000至3500pg修饰的BoNT/A。更优选的总剂量是12,500pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是2500pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用12,500pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是2500pg修饰的BoNT/A。

[0230] 总剂量可为14,000pg至16,000pg修饰的BoNT/A,单位剂量可为2000至3500pg修饰的BoNT/A。因此,可向受试者施用14,000pg至16,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量为2000至3500pg修饰的BoNT/A。特别优选的总剂量可为约15,000pg (例如15,000pg $\pm$ 10%) 的修饰的BoNT/A,例如总剂量可为15,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是2000至3500pg修饰的BoNT/A。优选的总剂量是15,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是2000至3500pg修饰的BoNT/A。更优选的总剂量是15,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是2500pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用15,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是2500pg修饰的BoNT/A。

[0231] 实施本发明的治疗方案时施用的总剂量可为18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg修饰的BoNT/A。

[0232] 特别优选的总剂量可为约20,000pg (例如20,000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,例如总剂量可为20,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg修饰的BoNT/A。优选的总剂量是20,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg修饰的BoNT/A。更优选的总剂量是20,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是4000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用20,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是4000pg修饰的BoNT/A。

[0233] 实施本发明的治疗方案时,施用的总剂量可以为23,000pg至25,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量为3500-5500pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用23,000pg至25,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量为3500-5500pg修饰的BoNT/A。

[0234] 特别优选的总剂量可为约24,000pg (例如24,000pg $\pm$ 10%) 的修饰BoNT/A,例如总剂量可为24,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg修饰的BoNT/A。优选的总剂量是24,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg修饰的BoNT/A。更优选的总剂量是24,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是4000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用24,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是4000pg修饰的BoNT/A。

[0235] 实施本发明的治疗方案时施用的总剂量可为43,000至44,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是2000至3500pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用43,000至44,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是2000至3500pg修饰的BoNT/A。特别优选的总剂量可为约44,000pg (例如44,000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,其中单位剂量是2000至3500pg修饰的BoNT/A,例如总剂量可为44,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是2000至3500pg修饰的BoNT/A。因

此,可向受试者施用约44,000pg (例如44,000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,其中单位剂量为2000至3500pg修饰的BoNT/A。优选可向受试者施用44,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量为2000至3500pg修饰的BoNT/A。例如,可向受试者施用约44,000pg (例如44,000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,其中单位剂量为约2500pg (例如2500pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A。更优选可向受试者施用44,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量为2500pg修饰的BoNT/A。

[0236] 实施本发明的治疗方案时所施用的总剂量可为60,000至70,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用60,000至70,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg修饰的BoNT/A。实施本发明的治疗方案时所施用的优选总剂量可为63,000至65,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用63,000至65,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg修饰的BoNT/A。特别优选的总剂量可为约64,000pg (例如64,000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg修饰的BoNT/A。例如,总剂量可为64,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用约64,000pg (例如64,000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,其中单位剂量是3500-5500pg的修饰BoNT/A。优选可以向受试者施用约64,000pg (例如64,000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,其中单位剂量为约4000pg (例如4,000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A。更优选可以向受试者施用64,000pg修饰的BoNT/A,其中单位剂量为4000pg修饰的BoNT/A。

[0237] 总剂量可能因待治疗的面部纹或面部纹组合而异。下文将更详细地讨论任何给定面部纹的优选总剂量示例。

[0238] 实施眉间纹治疗方案时施用的总剂量最多可为30000、25000、20000、15000、10000或5000pg修饰的BoNT/A,优选最多25000pg修饰的BoNT/A。实施眉间纹治疗方案时可施用的特别优选的总剂量可约为12,500pg (例如12,500pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,例如单位剂量可为12,500pg修饰的BoNT/A。实施眉间纹治疗方案时可施用的另一特别优选的总剂量可约为20,000pg (例如20,000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,例如单位剂量可为20,000pg修饰的BoNT/A。

[0239] 实施眉间纹治疗方案时施用的总剂量可为7,000pg至8,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用7,000pg至8,000pg修饰的BoNT/A (例如,通过本文所述的多个单位剂量) 以治疗眉间纹。特别优选的总剂量可为约7,500pg (例如,7,500pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,以治疗眉间纹,例如总剂量可为7,500pg修饰的BoNT/A,以治疗眉间纹。因此,可向受试者施用约7,500pg (例如7,500pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A以治疗眉间纹,例如可向受试者施用7,500pg修饰的BoNT/A (例如,通过本文所述的多个单位剂量) 以治疗眉间纹。

[0240] 实施眉间纹的治疗方案时施用的总剂量可为10,000pg至20,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用10,000pg至20,000pg修饰的BoNT/A (例如,通过本文所述的多个单位剂量) 以治疗眉间纹。例如,总剂量可为11,500pg至12,500pg修饰的BoNT/A,以治疗眉间纹。因此,可以向受试者施用11,500pg至12,500pg修饰的BoNT/A (例如,通过本文所述的多个单位剂量) 以治疗眉间纹。特别优选的总剂量可为约12,000pg (例如12,000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,例如总剂量可为12,000pg修饰的BoNT/A,以治疗眉间纹。因此,可以向受试者施用约12,000pg (例如12,000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹,例如可以向受试者施用12,000pg修饰的BoNT/A (例如,通过本文所述的多个单位剂量) 以治疗眉间纹。

[0241] 实施眉间纹的治疗方案时施用的总剂量可为12,000pg至13,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用12,000pg至13,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹。特别优选的总剂量可为约12,500pg(例如,12,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,以治疗眉间纹,例如总剂量可为12,500pg修饰的BoNT/A,以治疗眉间纹。因此,可向受试者施用约12,500pg(例如12,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹,例如可向受试者施用12,500pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹。

[0242] 实施眉间纹的治疗方案时施用的总剂量可为18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹。例如,总剂量可为19,000pg至21,000pg修饰的BoNT/A,以治疗眉间纹。因此,可以向受试者施用19,000pg至21,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹。特别优选的总剂量可为约20,000pg(例如20,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹,例如总剂量可为20,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹。因此,可以向受试者施用约20,000pg(例如20,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹,例如可以向受试者施用20,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗眉间纹。

[0243] 实施额头纹的治疗方案时施用的总剂量最多可为30000、25000、20000、15000、10000或5000pg修饰的BoNT/A,优选地最多25000pg修饰的BoNT/A。

[0244] 实施额头纹的治疗方案时施用的总剂量可为12,000pg至13,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用12,000pg至13,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗额头纹。特别优选的总剂量可为约12,500pg(例如,12,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗额头纹,例如总剂量可为12,500pg修饰的BoNT/A以治疗额头纹。因此,可向受试者施用约12,500pg(例如12,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A来治疗额头纹,例如可向受试者施用12,500pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)来治疗额头纹。

[0245] 实施额头纹治疗方案时施用的总剂量可为18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A。因此,可向受试者施用18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗额头纹。例如,总剂量可为19,000pg至21,000pg修饰的BoNT/A,以治疗额头纹。因此,可向受试者施用19,000pg至21,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗额头纹。特别优选的总剂量可为约20,000pg(例如20,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗额头纹,例如总剂量可为20,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗额头纹。因此,可以向受试者施用约20,000pg(例如20,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗额头纹,例如可以向受试者施用20,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗额头纹。

[0246] 实施外眦纹治疗方案时施用的总剂量最多可为30000、25000、20000、15000、10000或5000pg修饰的BoNT/A,优选地高达25000pg的修饰的BoNT/A。

[0247] 实施外眦纹治疗方案时施用的总剂量可为7,000pg至8,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用7,000pg至8,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗外眦纹。特别优选的总剂量可为约7,500pg(例如,7,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗外眦纹,例如总剂量可为7,500pg修饰的BoNT/A,用于治疗外眦纹。因此,可向受试者施用约7,500pg(例如7,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A用于治疗外眦纹,例如可向

受试者施用7,500pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗外眦线。

[0248] 实施外眦纹治疗方案时施用的总剂量可为10,000pg至20,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用10,000pg至20,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗外眦纹。例如,总剂量可为11,500pg至12,500pg修饰的BoNT/A,用于治疗外眦纹。因此,可以向受试者施用11,500pg至12,500pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗外眦纹。特别优选的总剂量可为约12,000pg(例如12,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,如总剂量可为12,000pg的修饰BoNT/A,用于治疗外眦纹。因此,可以向受试者施用约12,000pg(例如12,000pg $\pm$ 10%)的修饰BoNT/A,用于治疗外眦纹,例如可以向受试者施用12,000pg的修饰BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗外眦纹。

[0249] 实施外眦纹治疗方案时施用的总剂量可为14,000pg至16,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用14,000pg至16,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗外眦线。特别优选的总剂量可为约15,000pg(例如,15,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗外眦纹,例如总剂量可为15,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗外眦纹。因此,可向受试者施用约15,000pg(例如15,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A来治疗外眦纹,例如可向受试者施用15,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)来治疗外眦纹。

[0250] 实施外眦纹治疗方案时施用的总剂量可为23,000pg至25,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用23,000pg至25,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗外眦纹。特别优选的总剂量可为约24,000pg(例如,24,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗外眦纹,例如总剂量可为24,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗外眦纹。因此,可向受试者施用约24,000pg(例如24,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A用于治疗外眦纹,例如可向受试者施用24,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗外眦纹。

[0251] 实施眉间纹和额头纹的治疗方案时施用的总剂量可为18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和额头纹。例如,总剂量可为19,000pg至21,000pg修饰的BoNT/A,以治疗眉间纹和额头纹。因此,可以向受试者施用19,000pg至21,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和前额头纹。特别优选的总剂量可为约20,000pg(例如20,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和额头纹,例如总剂量可为20,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和额头纹。因此,可以向受试者施用约20,000pg(例如20,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和额头纹,例如可以向受试者施用20,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗眉间纹和额头纹。

[0252] 实施眉间纹和额头纹的治疗方案时施用的总剂量可为24,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用24,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和额头纹。特别优选的总剂量可为约25,000pg(例如,24,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和额头纹,例如总剂量可为25,000pg修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和额头纹。因此,可向受试者施用约25,000pg(例如25,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和额头纹,例如可向受试者施用25,000pg修饰的BoNT/A(例如,

通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和额头纹。

[0253] 实施眉间纹和额头纹治疗方案时施用的总剂量可为31,000pg至33,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用31,000pg至33,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和额头纹。特别优选的总剂量可为约32,000pg(例如,32,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和额头纹,例如总剂量可为32,000pg修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和额头纹。因此,可向受试者施用约32,000pg(例如32,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和额头纹,例如可向受试者施用32,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和额头纹。

[0254] 实施眉间纹和额头纹治疗方案时施用的总剂量可为35,000至45,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用35,000至45,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和额头纹。特别优选的总剂量可为约40,000pg(例如,40,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和额头纹,例如总剂量可为40,000pg修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和额头纹。因此,可向受试者施用约40,000pg(例如40,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和额头纹,例如可向受试者施用40,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和额头纹。

[0255] 实施眉间纹和外眦纹治疗方案时施用的总剂量可为14,000pg至16,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用14,000pg至16,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约15,000pg(例如,15,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和外眦纹,例如总剂量可为15,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和外眦纹。因此,可向受试者施用约15,000pg(例如15,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间线和外眦纹,例如可向受试者施用15,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间线和外眦纹。

[0256] 实施眉间纹和外眦纹的治疗方案时施用的总剂量可为18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和外眦纹。例如,总剂量可为19,000pg至21,000pg修饰的BoNT/A,以治疗眉间纹和外眦纹。因此,可以向受试者施用19,000pg至21,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约20,000pg(例如20,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和外眦纹,例如总剂量可为20,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和外眦纹。因此,可以向受试者施用约20,000pg(例如20,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和外眦纹,例如可以向受试者施用20,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗眉间纹和外眦纹。

[0257] 实施眉间纹和外眦纹的治疗方案时施用的总剂量可为22,000pg至23,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用22,000pg至23,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约22,500pg(例如,22,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和外眦纹,例如总剂量可为22,500pg修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和外眦纹。因此,可向受试者施用约22,500pg(例如22,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间线和外眦纹,例如可向受试者施用22,500pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间线和外眦纹。

[0258] 实施眉间纹和外眦纹的治疗方案时施用的总剂量可为23,000pg至25,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用23,000pg至25,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约24,000pg(例如,24,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和外眦纹,例如总剂量可为24,000pg修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和外眦纹。因此,可向受试者施用约24,000pg(例如24,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和外眦纹,例如可向受试者施用24,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗外眦纹。

[0259] 实施眉间纹和外眦纹治疗方案时施用的总剂量可为27,000pg至28,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用27,000pg至28,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗眉间纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约27,500pg(例如,27,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和外眦纹,例如总剂量可为27,500pg修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和外眦纹。因此,可向受试者施用约27,500pg(例如27,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和外眦纹,例如可向受试者施用27,500pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗眉间纹和外眦纹。

[0260] 实施眉间纹和外眦纹治疗方案时施用的总剂量可为31,000pg至33,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用31,000pg至33,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗眉间纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约32,000pg(例如,32,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和外眦纹,例如总剂量可为32,000pg修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和外眦纹。因此,可向受试者施用约32,000pg(例如32,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A用于治疗眉间纹和外眦纹,例如可向受试者施用32,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗眉间纹和外眦纹。

[0261] 实施眉间纹和外眦纹治疗方案时施用的总剂量可为35,000pg至37,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用35,000pg至37,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约36,000pg(例如,36,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和外眦纹,例如总剂量可为36,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和外眦纹。因此,可向受试者施用约36,000pg(例如36,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和外眦纹,例如可向受试者施用36,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和外眦纹。

[0262] 实施眉间纹和外眦纹治疗方案时施用的总剂量可为43,000至44,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用43,000至44,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约44,000pg(例如,44,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和外眦纹,例如总剂量可为44,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹和外眦纹。因此,可向受试者施用约44,000pg(例如44,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹和外眦纹,例如可向受试者施用44,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹和外眦纹。

[0263] 实施额头纹和外眦纹的治疗方案时施用的总剂量可为18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用18,000pg至26,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗额头纹和外眦纹。例如,总剂量可为19,000pg至21,000pg修饰的BoNT/A,以治疗额头纹和外眦纹。因此,可以向受试者施用19,000pg至21,000pg修饰的

BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗额头纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约20,000pg(例如20,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗额头纹和外眦纹,例如总剂量可为20,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗额头纹和外眦纹。因此,可以向受试者施用约20,000pg(例如20,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗额头纹和外眦纹,例如可以向受试者施用20,000pg的修饰BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗额头纹和外眦纹。

[0264] 实施额头纹和外眦纹的治疗方案时施用的总剂量可为27,000pg至28,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用27,000pg至28,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗额头纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约27,500pg(例如,27,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗额头纹和外眦纹,例如总剂量可为27,500pg修饰的BoNT/A,用于治疗额头纹和外眦纹。因此,可向受试者施用约27,500pg(例如27,500pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A来治疗额头纹和外眦纹,例如可向受试者施用27,500pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文描述的多个单位剂量)用于治疗额头纹和外眦纹。

[0265] 实施额头纹和外眦纹的治疗方案时施用的总剂量可为31,000pg至33,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用31,000pg至33,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗额头纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约32,000pg(例如,32,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗额头纹和外眦纹,例如总剂量可为32,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗额头纹和外眦纹。因此,可向受试者施用约32,000pg(例如32,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A来治疗额头纹和外眦纹,例如可向受试者施用32,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)来治疗额头纹和外眦纹。

[0266] 实施额头纹和外眦纹的治疗方案时施用的总剂量可为43,000至44,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用43,000至44,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗额头纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约44,000pg(例如,44,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗额头纹和外眦纹,例如总剂量可为44,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗额头纹和外眦纹。因此,可向受试者施用约44,000pg(例如44,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A来治疗额头纹和外眦纹,例如可向受试者施用44,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗额头纹和外眦纹。

[0267] 实施眉间纹、额头纹和外眦纹的治疗方案时施用的总剂量可为43,000至44,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用43,000至44,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹、额头纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约44,000pg(例如,44,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹,例如总剂量可为44,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹。因此,可向受试者施用约44,000pg(例如44,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A以治疗眉间纹、额头纹和外眦纹,例如可向受试者施用44,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹。

[0268] 实施治疗眉间纹、额头纹和外眦纹的方案时施用的总剂量可为60,000至70,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用60,000至70,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹、额头纹和外眦纹。实施眉间纹、额头纹和外眦纹的治疗方案时施用的优选总剂量可为63,000至65,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施

用63,000至65,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹、额头纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约64,000pg(例如64,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹,例如总剂量可为64,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹。因此,可以向受试者施用约64,000pg(例如64,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹,例如可以向受试者施用64,000pg修饰的BoNT/A(例如通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹。

[0269] 实施眉间纹、额头纹和外眦纹的治疗方案时施用的总剂量可为75,000pg至88,000pg修饰的BoNT/A。因此,可以向受试者施用75,000pg至88,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)以治疗眉间纹、额头纹和外眦纹。特别优选的总剂量可为约80,000pg(例如,80,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹,例如总剂量可为80,000pg修饰的BoNT/A,用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹。因此,可向受试者施用约80,000pg(例如80,000pg $\pm$ 10%)修饰的BoNT/A用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹,例如可向受试者施用80,000pg修饰的BoNT/A(例如,通过本文所述的多个单位剂量)用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹。

[0270] 当治疗眉间纹、额头纹和外眦纹时,总剂量可高达88,000pg(例如最多80,000pg)。

[0271] 技术人员将考虑受试者最近是否接受过(或随后是否接受过)梭菌神经毒素(例如BoNT)的额外治疗,例如作为美容治疗或不同适应症治疗的一部分。使用本领域的常规技术,技术人员将相应地调整本治疗方案。

[0272] 根据本发明,对多块肌肉的施用优选在同一治疗过程中进行。

[0273] 与未修饰的BoNT/A(例如Dysport[®])相比,本发明的修饰的BoNT/A优选具有更长的作用持续时间。术语“治疗面部纹的持续时间比未修饰BoNT/A治疗的持续时间更长”可能意味着与施用未修饰BoNT/A相比,施用本发明的修饰的BoNT/A后面部纹减少的时间更长。所述作用持续时间可以至少为1.25 $\times$ 、1.5 $\times$ 、1.75 $\times$ 、2.0 $\times$ 或2.25 $\times$ 。修饰的BoNT/A的作用持续时间可以为6至9个月。例如,作用持续时间可以至少为:4.5个月(从开始)、5.0个月、5.5个月、6个月、6.5个月、7.0个月、7.5个月、8.0个月、8.5个月或9.0个月。在特定实施方案中,作用持续时间可以大于9.0个月。优选地,作用持续时间可以大于9.0个月。所述减少可以通过与表现出等效症状的等效对照受试者进行比较来确定,所述等效症状已经用未修饰的BoNT/A治疗。在对照受试者的一种或多种症状的严重程度与未修饰的BoNT/A治疗之前基本相同(例如相同)的时间段内,用根据本发明的修饰的BoNT/A治疗的受试者可以表现出等效的一种或多种症状的改善,与用修饰的BoNT/A治疗之前的一种或多种症状的严重程度相比,改善至少5%、10%、25%或50%。未修饰的BoNT/A优选为以双链形式存在的SEQ ID NO: 2。换句话说,本文所述的未修饰的BoNT/A优选为SEQ ID NO:2的双链形式。

[0274] 可以在施用修饰的BoNT/A后的适当时间段重复治疗。鉴于作用持续时间约为未修饰的BoNT/A(例如Dysport[®])的两倍,因此后续施用之间的间隔比用未修饰的BoNT/A(例如Dysport[®])治疗受试者时适当更长。可以在前次施用后至少18、20、25或30周向受试者再次施用根据本发明的修饰的BoNT/A。例如,可以在前次施用后至少18-45周、优选20-35周向受试者再次施用根据本发明的修饰的BoNT/A。

[0275] 本文所用的“受试者”可为哺乳动物,例如人类或其他哺乳动物。优选地,“受试者”

是指人类受试者。受试者优选为没有与施用修饰的BoNT/A的肌肉相关的疾病状态的受试者。例如,优选地,受试者没有眼睑痉挛或面肌痉挛(例如典型的面肌痉挛)。特别优选地,受试者没有眼睑痉挛。

[0276] 根据本发明进行治疗的受试者可为不适合用未修饰的BoNT/A和/或用另一种梭菌神经毒素进行治疗的受试者。所述受试者可为对未修饰的BoNT/A和/或另一种梭菌神经毒素的治疗有抗性的受试者。抗性可能是由于受试者对梭菌神经毒素产生免疫反应而产生的,包括产生抗梭菌神经毒素抗体。

[0277] 术语“治疗(treat)”或“治疗(treating)”是指面部纹的美容治疗,包括预防性治疗(例如,防止面部纹的出现)以及矫正性治疗(治疗已有面部纹的受试者)。因此,本文所述的任何方法、使用的修饰的BoNT/A或用途均可适当地描述为“使用所述修饰的BoNT/A治疗所述面部纹的美容方法”。此外或替代地,本文所述的任何方法、使用的修饰的BoNT/A或用途均可适当地描述为“治疗所述面部纹的所述修饰的BoNT/A的非治疗性用途”。

[0278] 优选地,本文所用的“治疗(treat)”或“治疗(treating)”指矫正治疗。本文所用的术语“治疗(treat)”或“治疗(treating)”是指面部纹和/或其症状。本文所述的治疗可以使眉间纹的水平相对于治疗前的眉间纹的水平降低至少5%、10%、25%或50%。本文所述的治疗可以使额头纹的水平相对于治疗前的额头纹的水平降低至少5%、10%、25%或50%。本文所述的治疗可以使外眦纹的水平相对于治疗前的外眦纹的水平降低至少5%、10%、25%或50%。本文所述的治疗可以使眉间纹和外眦纹的水平相对于治疗前的眉间纹和外眦纹的水平降低至少5%、10%、25%或50%。本文所述的治疗可以使眉间纹和额头纹的水平相对于治疗前的眉间纹和额头纹的水平降低至少5%、10%、25%或50%。本文所述的治疗可以使外眦纹和额头纹的水平相对于治疗前的外眦纹和额头纹的水平降低至少5%、10%、25%或50%。本文所述的治疗可以使眉间纹、外眦纹和额头纹的水平相对于治疗前的眉间纹、外眦纹和额头纹的水平降低至少5%、10%、25%或50%。

[0279] BoNT/A梭状芽胞杆菌属细菌产生的梭菌神经毒素的一个例子。此类梭菌神经毒素的其他例子包括破伤风梭菌(TeNT)和肉毒梭菌(BoNT)血清型B-G和X产生的毒素(参见WO 2018/009903 A2),以及巴氏梭菌(*C. baratii*)和丁酸梭菌(*C. butyricum*)产生的毒素。所述神经毒素具有高度效力和特异性,可毒害神经元和它们所递送到的其他细胞。梭菌毒素是已知的最强毒素之一。例如,肉毒杆菌神经毒素对小鼠的半数致死量(LD₅₀)值范围为0.5至5ng/kg,具体取决于血清型。破伤风和肉毒杆菌毒素均通过抑制受影响神经元的功能起作用,特别是抑制神经递质的释放。肉毒杆菌毒素作用于神经肌肉接头并抑制周围神经系统中的胆碱能传递,而破伤风毒素作用于中枢神经系统。

[0280] 自然界中,梭菌神经毒素(包括BoNT/A)合成为单链多肽,该多肽在翻译后通过蛋白水解切割事件进行修饰,形成由二硫键连接在一起的两条多肽链。切割发生在特定的切割位点,通常称为活化位点(例如活化环),该位点位于提供链间二硫键的半胱氨酸残基之间。这种双链形式是毒素的活性形式。这两条链被称为重链(H链)(其分子量约为100kDa)和轻链(L链)(其分子量约为50kDa)。H链包含N端易位成分(H_N结构域)和C端靶向成分(H_C结构域)。切割位点位于L链和易位结构域成分之间。在H_C结构域与其靶神经元结合并在通过内体内化将结合的毒素内化到细胞内之后,H_N结构域将L链转移穿过内体膜并进入细胞溶胶,而L链则提供蛋白酶功能(也称为非细胞毒性蛋白酶(non-cytotoxic protease))。

[0281] 非细胞毒性蛋白酶通过蛋白水解切割细胞内运输蛋白(称为SNARE蛋白,例如 SNAP-25、VAMP或Syntaxin)起作用-参见Gerald K (2002)《细胞与分子生物学》(第4版)约翰·威利父子出版公司("Cell and Molecular Biology" (4th edition) John Wiley & Sons, Inc.)。首字母缩略词SNARE源自术语可溶性NSF附着受体(Soule NSF Attachment Receptor),其中NSF表示N-乙基马来酰亚胺敏感因子(N-ethylmaleimide-Sensitive-Factor)。SNARE蛋白是细胞内囊泡融合不可或缺的,因此也是通过囊泡运输从细胞中分泌分子不可或缺的。蛋白酶功能是锌依赖性内切肽酶活性,并对SNARE蛋白表现出高底物特异性。因此,一旦递送到所需的靶细胞,非细胞毒性蛋白酶就能够抑制靶细胞的细胞分泌。梭菌毒素的L链蛋白酶是非细胞毒性蛋白酶,可切割SNARE蛋白。

[0282] 鉴于SNARE蛋白的普遍存在性,肉毒杆菌毒素等梭菌神经毒素已成功应用于多种治疗。

[0283] 肉毒梭菌和破伤风梭菌产生毒素的遗传基础的更多详细信息,请参阅Henderson等人(1997)出版的《梭菌:分子生物学和发病机制》,美国学术出版社。

[0284] 如上所述,梭菌神经毒素由两条多肽链组成,重链(H链)的分子量约为100kDa,轻链(L链)的分子量约为50kDa。H链包含C端靶向成分(受体结合结构域或H_C结构域)和N端易位成分(H_N结构域)。

[0285] 梭菌神经毒素结构域在下文中更详细地描述。

[0286] L链参考序列的示例包括:

[0287] A型肉毒杆菌神经毒素:氨基酸残基1-448

[0288] B型肉毒杆菌神经毒素:氨基酸残基1-440

[0289] 上述参考序列应被视为指南,因为根据亚血清型可能会出现轻微的变化。例如,US2007/0166332(在此以引用的方式全文并入)引用了略有不同的梭菌序列:

[0290] A型肉毒杆菌神经毒素:氨基酸残基M1-K448

[0291] B型肉毒杆菌神经毒素:氨基酸残基M1-K441

[0292] 易位结构域是梭菌神经毒素H链的片段,约相当于H链的氨基末端一半,或对应于完整H链中该片段的结构域。

[0293] 参考易位结构域的示例包括:

[0294] A型肉毒杆菌神经毒素-氨基酸残基(449-871)

[0295] B型肉毒杆菌神经毒素-氨基酸残基(441-858)

[0296] 上述参考序列应被视为指南,因为根据亚血清型可能会出现轻微变化。例如,US2007/0166332(在此通过引用并入)引用了略有不同的梭菌序列:

[0297] A型肉毒杆菌神经毒素-氨基酸残基(A449-K871)

[0298] B型肉毒杆菌神经毒素-氨基酸残基(A442-S858)

[0299] 在本发明的上下文中,多种包含易位结构域的BoNT/AH_N区域可用于本发明的方面。BoNT/A重链的H_N区域长度约为410-430个氨基酸,并包含易位结构域。研究表明,梭菌神经毒素重链的H_N区域的整个长度对于易位结构域的易位活性而言并非必需的。因此,该实施方案的方面可以包括包含易位结构域的BoNT/AH_N区域,该易位结构域的长度例如为至少350个氨基酸、至少375个氨基酸、至少400个氨基酸或至少425个氨基酸。该实施方案的其它方面可以包括包含易位结构域的BoNT/A H_N区域,该易位结构域的长度例如为最多350个氨

基酸、最多375个氨基酸、最多400个氨基酸或最多425个氨基酸。

[0300] 术语 H_N 涵盖天然存在的BoNT/A H_N 部分,以及具有自然界中不存在的氨基酸序列和/或合成氨基酸残基的修饰的BoNT/A H_N 部分。优选地,所述修饰的BoNT/A H_N 部分仍表现出上述的易位功能。

[0301] 梭菌神经毒素受体结合结构域(H_C)参考序列的示例包括:

[0302] BoNT/A——N872-L1296

[0303] BoNT/B——E859-E1291

[0304] 梭菌神经毒素(如BoNT)的~50kDa H_C 结构域包含两个不同的结构特征,称为 H_{CC} 和 H_{CN} 结构域,每个结构特征通常为~25kDa。参与受体结合的氨基酸残基被认为主要位于 H_{CC} 结构域中。天然梭菌神经毒素的 H_C 结构域可包含约400-440个氨基酸残基。该事实由以下出版物证实,每个出版物均通过引用整体并入本文:Umland TC (1997) Nat. Struct. Biol. 4: 788-792; Herreros J (2000) Biochem. J. 347: 199-204; Halpern J (1993) J. Biol. Chem. 268: 15, pp. 11188-11192; Rummel A (2007) PNAS 104: 359-364; Lacey DB (1998) Nat. Struct. Biol. 5: 898-902; Knapp (1998) Am. Cryst. Assoc. Abstract Papers 25: 90; Swaminathan和Eswaramoorthy (2000) Nat. Struct. Biol. 7: 1751-1759; 以及Rummel A (2004) Mol. Microbiol. 51 (3), 631-643。

[0305] H_{CN} 结构域的示例(参考)包括:

[0306] A型肉毒杆菌神经毒素-氨基酸残基(872-1110)

[0307] B型肉毒杆菌神经毒素-氨基酸残基(859-1097)

[0308] 上述序列位置可能根据血清型/亚型略有不同,(参考) H_{CN} 结构域的进一步例子包括:

[0309] A型肉毒杆菌神经毒素-氨基酸残基(874-1110)

[0310] B型肉毒杆菌神经毒素-氨基酸残基(861-1097)

[0311] H_{CC} 结构域的示例(参考)包括:

[0312] A型肉毒杆菌神经毒素-氨基酸残基(Y1111-L1296)

[0313] B型肉毒杆菌神经毒素-氨基酸残基(Y1098-E1291)

[0314] WO 2017/191315 A1(以引用的方式并入本文)教导了修饰的BoNT/A(例如“嵌合梭菌神经毒素”)及其制备和制造方法。因此,用于本发明的包含肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)轻链和易位结构域(BoNT/A H_N)以及BoNT/B受体结合结构域(H_C 结构域)的修饰的BoNT/A可为WO 2017/191315 A1中教导的修饰的BoNT/A。

[0315] 修饰的BoNT/A可称为“嵌合梭菌神经毒素(chimeric clostridial neurotoxin)”。本文所用的术语“嵌合梭菌神经毒素”或“嵌合神经毒素”是指包含来自第一梭菌神经毒素血清型的梭菌神经毒素轻链和易位结构域(H_N 结构域)以及源自第二不同梭菌神经毒素血清型的受体结合结构域(H_C 结构域)(优选由其组成)的神经毒素。具体而言,用于本发明的经修饰的BoNT/A(例如嵌合梭菌神经毒素)包含肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)轻链和易位结构域(H_N 结构域)以及BoNT/B受体结合结构域(H_C 结构域)。经修饰的BoNT/A(例如嵌合梭菌神经毒素)的BoNT/A LH_N 结构域与BoNT/B H_C 结构域共价连接。本发明的修饰的BoNT/A(例如嵌合梭菌神经毒素)可称为嵌合肉毒杆菌神经毒素。所述嵌合梭菌神经毒素在本文中也称为“BoNT/AB”、“mrBoNT/AB”或“BoNT/AB嵌合体”。

[0316] L链和H_N结构域(任选地包括完整或部分活化环,例如当修饰的BoNT/A为单链形式时为完整活化环,当修饰的BoNT/A为双链形式时为切割的/部分活化环)可统称为LH_N结构域。因此,LH_N结构域不进一步包括H_C结构域。

[0317] 修饰的BoNT/A可能基本上由肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)轻链和易位结构域(H_N结构域)以及BoNT/B受体结合结构域(H_C结构域)组成。

[0318] 术语“基本上由……组成”是指修饰的BoNT/A不进一步包含赋予多肽额外功能(例如,当施用于受试者时)的一个或多个氨基酸残基。换句话说,“基本上由”肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)轻链和易位结构域(H_N结构域)以及BoNT/B受体结合结构域(H_C结构域)组成的多肽可以进一步包含一个或多个氨基酸残基(与肉毒杆菌毒素A(BoNT/A)轻链和易位结构域(H_N结构域)以及BoNT/B受体结合结构域(H_C结构域)的氨基酸残基相同),但所述一个或多个其他氨基酸残基不赋予多肽额外功能(例如,当施用于受试者时)。额外功能可以包括酶活性、结合活性和/或任何生理活性。

[0319] 除任何梭菌神经毒素序列外修饰的BoNT/A还可包含非梭菌神经毒素序列,只要非梭菌神经毒素序列不破坏修饰的BoNT/A(例如,嵌合梭菌神经毒素)实现其治疗效果的能力即可。优选地,非梭菌神经毒素序列不是具有催化活性(例如,酶活性)的序列。在一个实施方案中,本发明的修饰的BoNT/A不包含非梭菌催化活性结构域。在一个实施方案中,修饰的BoNT/A不包含进一步的催化活性结构域。在一个实施方案中,非梭菌序列不是与细胞受体结合的序列。换句话说,在一个实施方案中,非梭菌序列不是细胞受体的配体。细胞受体可为蛋白质细胞受体,例如整合膜蛋白。细胞受体的例子可以在IUPHAR Guide to Pharmacology Database, 2019.4版中找到,网址为https://www.guidetopharmacology.org/download.jsp#db_reports。非梭菌神经毒素序列可以包括有助于纯化的标签,例如His标签。在一个实施方案中,本发明的修饰的BoNT/A不包含标签或用于添加标签的位点,例如分选酶受体或供体位点。

[0320] 优选地,修饰的BoNT/A可以由肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)轻链和易位结构域(H_N结构域)以及BoNT/B受体结合结构域(H_C结构域)组成。

[0321] 修饰的BoNT/A包含轻链,该轻链能够表现出非细胞毒性蛋白酶活性并能够在靶神经元的胞质溶胶中切割SNARE蛋白。可使用基于细胞的和体内的测定来确定包含L链和功能细胞结合和易位结构域的梭菌神经毒素是否具有非细胞毒性蛋白酶活性。本领域中常规使用诸如趾外展评分(DAS)测定、背根神经节(DRG)测定、脊髓神经元(SCN)测定和小鼠中膈神经偏侧膈(PNHD)测定之类的测定。用于确定非细胞毒性蛋白酶活性的合适测定可为Aoki KR, Toxicon 39:1815-1820;2001或Donald等人(2018), Pharmacol Res Perspect, e00446, 1-14中描述的测定,其通过引用并入本文。

[0322] 当施用于受试者时,修饰的BoNT/A优选处于其活性双链形式,其中轻链和重链通过二硫键连接在一起。当BoNT/A(例如修饰的BoNT/A)在本文中通过多肽序列(SEQ ID NO)定义时,序列(SEQ ID NO)的L链部分可构成双链梭菌神经毒素(例如双链修饰的BoNT/A)的第一链,并且H_N和H_C结构域一起可构成双链梭菌神经毒素(例如双链修饰的BoNT/A)的第二链,其中第一链和第二链通过二硫键连接在一起。技术人员将理解蛋白酶可在梭菌神经毒素(例如修饰的BoNT/A)的活化环内的一个或多个位置处进行切割,优选在活化环内的两个位置处切割。当切割发生在活化环内的多于一个位置(优选两个位置)时,序列的C末端L链

部分的小片段可能不存在于双链梭菌神经毒素序列(例如双链修饰的BoNT/A)中。鉴于此,双链梭菌神经毒素(例如双链修饰的BoNT/A)的序列可能与相应的单链梭菌神经毒素(例如单链修饰的BoNT/A)的序列略有不同。该小片段可为1-15个氨基酸。具体地,在一个实施方案中,当使用Lys-C将单链修饰的BoNT/A转换为双链修饰的BoNT/A时,序列的C末端L链部分中不存在的小片段可为SEQ ID NO:9或10。

[0323] 最优选地,用于本发明的修饰的BoNT/A可包含BoNT/A轻链和易位结构域(BoNT/A LH_N结构域)和BoNT/B H_C结构域。BoNT/A LH_N结构域与BoNT/BH_C结构域共价连接。所述修饰的BoNT/A在本文中也称为“BoNT/AB”或“BoNT/AB嵌合体”。

[0324] LH_N结构域的C端氨基酸残基可以对应于分隔BoNT/A的LH_N和H_C结构域的3₁₀螺旋的第一氨基酸残基,并且H_C结构域的N端氨基酸残基可以对应于分隔BoNT/B中的LH_N和H_C结构域的3₁₀螺旋的第二氨基酸残基。

[0325] BoNT/A多肽序列的一个例子如SEQ ID NO:2所示。

[0326] BoNT/B多肽序列的一个例子是SEQ ID NO:8(UniProt登记号B1INP5)。

[0327] 本文提及的分隔BoNT/A的LH_N和H_C结构域的3₁₀螺旋的第一氨基酸残基”是指分隔LH_N和H_C结构域的3₁₀螺旋的N端残基。

[0328] 分隔BoNT/B的LH_N和H_C结构域的3₁₀螺旋的第二个氨基酸残基”是指分隔LH_N和H_C结构域的3₁₀螺旋的N端残基之后的氨基酸残基。

[0329] “3₁₀螺旋”是蛋白质和多肽中发现的一种二级结构,与α螺旋、β折叠和反向转弯一起存在。3₁₀螺旋中的氨基酸排列成右手螺旋结构,其中每个完整转弯由三个残基和十个原子完成,这些原子将它们之间的分子内氢键分开。每个氨基酸对应于螺旋中的120°转弯(即螺旋每个转弯有三个残基),沿螺旋轴平移2.0Å(=0.2nm),并且在通过形成氢键形成的环中有10个原子。最重要的是,氨基酸的NH基团与三个残基之前的氨基酸的C=O基团形成氢键;这种重复的i+3→i氢键定义了3₁₀螺旋。3₁₀螺旋是结构生物学中的标准概念,本领域技术人员对此很熟悉。

[0330] 此3₁₀螺旋对应于形成实际螺旋的四个残基和两个帽(或过渡)残基,这四个残基的两端各有一个帽残基。本文使用的术语“分隔LH_N和H_C结构域的3₁₀螺旋”由这6个残基组成。

[0331] 通过进行结构分析和序列比对,确定了一条3₁₀螺旋,该螺旋将LH_N和H_C结构域分隔开来。该3₁₀螺旋的N端(即LH_N结构域的C端部分)被α螺旋包围,C端(即H_C结构域的N端部分)被β链包围。3₁₀螺旋的第一个(N端)残基(帽或过渡残基)螺旋也对应于该α螺旋的C端残基。

[0332] 分隔LH_N和H_C结构域的3₁₀螺旋可以通过例如公开可用的肉毒杆菌神经毒素晶体结构确定,例如3BTA(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3BTA>)和1EPW(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EPW>)分别代表肉毒杆菌神经毒素A1和B1。

[0333] 公开可用的计算机建模和比对工具也可用于确定其他神经毒素中分隔LH_N和H_C结构域的3₁₀螺旋的位置,例如同源性建模服务器L00PP(学习、观察和输出蛋白质模式,<http://loop.org>)、PHYRE(蛋白质同源性/模拟识别引擎,<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>)和Rosetta(<https://www.rosettacommons.org/>)、蛋白质叠加服务器SuperPose(<http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/>)、比对程序Clustal Omega(<http://www.clustal.org/omega/>)以及分子和细胞生物学家互联网资源

(<http://molbiol-tools.ca/>) 中列出的许多其他工具/服务。特别是“H_N/H_{CN}”连接处周围的区域可能在结构上高度保守,这使其成为叠加不同血清型的理想区域。

[0334] 例如,可采用以下方法确定其他神经毒素中该3₁₀螺旋的序列:

[0335] 1. 结构同源性建模工具LOOP (<http://loopp.org>) 可用于基于BoNT/A1晶体结构(3BTA.pdb) 获取其他BoNT血清型的预测结构;

[0336] 2. 这样获得的结构(pdb) 文件可以编辑为仅包含H_{CN}结构域的N末端及其之前约80个残基(属于H_N结构域的一部分),从而保留结构上高度保守的“H_N/H_{CN}”区域;

[0337] 3. 蛋白质叠加服务器SuperPose (<http://wishart.biology.ualberta.ca/superpose/>) 可用于将每种血清型叠加到3BTA.pdb结构上;

[0338] 4. 可以检查叠加的pdb文件来定位BoNT/A1的H_C结构域起始处的3₁₀螺旋,然后可以识别另一血清型中的相应残基。

[0339] 5. 可以将其他BoNT血清型序列与Clustal Omega比对,以检查相应残基是否正确。

[0340] LH_N、H_C和3₁₀螺旋结构域的示例如下所示:

[0341]

神经毒素	保藏号 (小数点后加 序列号)	LH _N	Hc	3 ₁₀ 螺旋
BoNT/A1 (SEQ ID NO: 2)	A5HZZ9.1	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷
BoNT/A2	X73423.3	1-872	873-1296	⁸⁷² NIVNTS ⁸⁷⁷
BoNT/A3	DQ185900.1 (又名 Q3LRX9.1)	1-872	873-1292	⁸⁷² NIVNTS ⁸⁷⁷
BoNT/A4	EU341307.1 (又名 Q3LRX8.1)	1-872	873-1296	⁸⁷² NITNAS ⁸⁷⁷
BoNT/A5	EU679004.1 (又名 C1IPK2.1)	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷
BoNT/A6	FJ981696.1	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷
BoNT/A7	JQ954969.1 (又名 K4LN57.1)	1-872	873-1296	⁸⁷² NIINTS ⁸⁷⁷
BoNT/A8	KM233166.1	1-872	873-1297	⁸⁷² NITNTS ⁸⁷⁷
BoNT/B1 (SEQ ID NO: 8)	B1INP5.1	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B2	AB084152.1 (又名 Q8GR96.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B3	EF028400.1 (又名 A2I2S2.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B4	EF051570.1 (又名 A2I2W0.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
BoNT/B5	EF033130.1 (又名 A2I2U6.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ DILNNI ⁸⁶⁴

[0342]	神经毒素	保藏号 (小数点后加序列号)	LH _N	H _C	3 ₁₀ 螺旋
	BoNT/B6	AB302852.1 (又名 A8R089.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
	BoNT/B7	JQ354985.1 (又名 H9CNK9.1)	1-859	860-1291	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴
	BoNT/B8	JQ964806.1 (又名 I6Z8G9.1)	1-859	860-1292	⁸⁵⁹ EILNNI ⁸⁶⁴

[0343] 通过结构分析和序列比对发现,在所有肉毒杆菌和破伤风神经毒素中,分隔LH_N和H_C结构域的3₁₀螺旋之后的β链都是保守结构,并且从分隔LH_N和H_C结构域的3₁₀螺旋的第一个残基开始时,从第8个残基开始(例如,对于BoNT/A1,从残基879开始)。

[0344] BoNT/AB嵌合体可以包含与来自BoNT/B的H_C结构域共价连接的来自BoNT/A的LH_N结构域,其中LH_N结构域的C末端氨基酸残基对应于位于BoNT/A的H_C结构域起点(N末端)的β链的N末端第八个氨基酸残基,并且其中H_C结构域的N末端氨基酸残基对应于位于BoNT/B的H_C结构域起点(N末端)的β链的N末端第七个氨基酸残基。

[0345] BoNT/AB嵌合体可以包含与来自BoNT/B的H_C结构域共价连接的来自BoNT/A的LH_N结构域,其中LH_N结构域的C末端氨基酸残基对应于位于BoNT/A的LH_N结构域末端(C末端)的α螺旋的C末端氨基酸残基,并且其中H_C结构域的N末端氨基酸残基对应于紧邻位于BoNT/B的LH_N结构域末端(C末端)的α螺旋的C末端氨基酸残基的C末端的氨基酸残基。

[0346] BoNT/AB嵌合体的设计原理是尽量确保二级结构不受影响,从而尽量减少对三级结构和每个结构域功能的任何改变。不受理论的束缚,假设通过不破坏3₁₀螺旋的四个中心氨基酸残基,可以确保修饰的BoNT/A(例如嵌合神经毒素)具有最佳构象,从而使修饰的BoNT/A(例如嵌合神经毒素)能够充分发挥其功能。

[0347] 事实上,令人惊讶的是,仅保留BoNT/A的3₁₀螺旋的第一个氨基酸残基和BoNT/B的3₁₀螺旋以后的第二个氨基酸残基,不仅可以产生可溶的、功能性的BoNT/AB嵌合体,而且可以产生优于其他BoNT/AB嵌合体的特性,特别是效力提高、安全比提高和/或作用持续时间延长(以及与未修饰的BoNT/A-例如SEQ ID NO:2,如双链形式的SEQ ID NO:2相比,安全比提高和/或作用持续时间增加)。

[0348] BoNT/A轻链、BoNT/A易位结构域和/或BoNT/B H_C结构域可为修饰的BoNT/A轻链、BoNT/A易位结构域和/或BoNT/B H_C结构域或其衍生物,包括但不限于下文所述的那些。修饰的BoNT/A轻链、BoNT/A易位结构域和/或BoNT/B H_C结构域或衍生物可含有一个或多个与BoNT/A轻链、BoNT/A易位结构域和/或BoNT/B H_C结构域的天然(未修饰)形式相比已被修饰的氨基酸,或者可含有一个或多个插入的氨基酸,这些氨基酸在BoNT/A轻链、BoNT/A易位结构域和/或BoNT/B H_C结构域的天然(未修饰)形式中不存在。举例来说,相对于天然(未修饰)BoNT/A轻链、BoNT/A易位结构域和/或BoNT/B H_C结构域序列,修饰的BoNT/A轻链、BoNT/A易位结构域和/或BoNT/B H_C结构域可在一个或多个结构域中具有修饰的氨基酸序列。此

类修饰可修饰其功能方面,例如生物活性或持久性。因此,在一个实施方案中,BoNT/A轻链、BoNT/A易位结构域和/或BoNT/B H_C结构域是修饰的BoNT/A轻链、BoNT/A易位结构域和/或BoNT/B H_C结构域,或修饰的BoNT/A轻链、BoNT/A易位结构域和/或BoNT/B H_C结构域衍生物。

[0349] 修饰的BoNT/B H_C结构域可具有一个或多个修饰,以改变与靶神经细胞的结合,例如与天然(未修饰)BoNT/B H_C结构域相比,提供更高或更低的亲和力结合。BoNT/B H_C结构域中的此类修饰可包括修饰H_C结构域的神经节苷脂结合位点或蛋白质(例如突触结合蛋白)结合位点中的残基,从而改变与靶神经细胞的神经节苷脂受体和/或蛋白质受体的结合。此类修饰的神经毒素的例子在WO 2006/027207和WO 2006/114308中有所描述,这两篇文献均以引用的方式全文并入本文。

[0350] 修饰的轻链可在其氨基酸序列中具有一个或多个修饰,例如底物结合或催化结构域中的修饰,其可改变或修饰修饰的轻链的SNARE蛋白特异性,优选条件是所述修饰不会催化失活所述轻链。此类修饰的神经毒素的例子在WO 2010/120766和US2011/0318385中描述,两者均通过引用全文并入本文。

[0351] BoNT/A的LH_N结构域可对应于SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至872,或与其具有至少70%序列同一性的多肽序列。BoNT/A的LH_N结构域可对应于SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至872,或与其具有至少80%、90%或95%序列同一性的多肽序列。优选地,BoNT/A的LH_N结构域对应于SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至872。

[0352] BoNT/B的H_C结构域可对应于SEQ ID NO:8的氨基酸残基860至1291,或与其具有至少70%序列同一性的多肽序列。BoNT/B的H_C结构域可对应于SEQ ID NO:8的氨基酸残基860至1291,或与其具有至少80%、90%或95%序列同一性的多肽序列。优选地,BoNT/B的H_C结构域对应于SEQ ID NO:8的氨基酸残基860至1291。

[0353] 优选地,BoNT/AB嵌合体包含BoNT/A1 LH_N结构域和BoNT/B1 H_C结构域。更优选地,LH_N结构域对应于BoNT/A1 (SEQ ID NO:2)的氨基酸残基1至872,而H_C结构域对应于BoNT/B1 (SEQ ID NO:8)的氨基酸残基860至1291。

[0354] 最优选地,BoNT/B H_C结构域还包含H_{CC}亚结构域中的至少一个氨基酸残基取代、插入、插入缺失(indel)或缺失,与天然BoNT/B序列相比,所述H_{CC}亚结构域具有增加BoNT/B神经毒素对人SytII的结合亲和力的效果。WO 2013/180799和WO 2016/154534(均通过引用并入本文)中公开了BoNT/B H_{CC}亚结构域中的合适氨基酸残基取代、插入、插入缺失或缺失。

[0355] H_{CC}亚结构域中的合适氨基酸残基取代、插入、插入缺失或缺失可以包括选自下列的取代突变:V1118M;Y1183M;E1191M;E1191I;E1191Q;E1191T;S1199Y;S1199F;S1199L;S1201V;E1191C、E1191V、E1191L、E1191Y、S1199W、S1199E、S1199H、W1178Y、W1178Q、W1178A、W1178S、Y1183C、Y1183P及其组合。

[0356] H_{CC}亚结构域中的合适氨基酸残基取代、插入、插入缺失或缺失还可包括选自下列的两个取代突变的组合:E1191M和S1199L、E1191M和S1199Y、E1191M和S1199F、E1191Q和S1199L、E1191Q和S1199Y、E1191Q和S1199F、E1191M和S1199W、E1191M和W1178Q、E1191C和S1199W、E1191C和S1199Y、E1191C和W1178Q、E1191Q和S1199W、E1191V和S1199W、E1191V和S1199Y或E1191V和W1178Q。

[0357] BoNT/B H_{CC}亚结构域中的合适的氨基酸残基取代、插入、插入缺失或缺失还可以包括三种取代突变的组合,即E1191M、S1199W和W1178Q。

[0358] BoNT/B H_{CC}亚结构域中的氨基酸残基取代、插入、插入/缺失或缺失包括两个取代突变的组合,即E1191M和S1199Y。此类修饰存在于例如SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的修饰的BoNT/A(例如BoNT/AB嵌合体)中。E1191M可以对应于SEQ ID NO:6的位置1204,而S1199Y可以对应于位置1212。因此,SEQ ID NO:6可以包括1204M和1212Y。

[0359] 该修饰可为与SEQ ID NO:8所示的未修饰BoNT/B相比的修饰,其中氨基酸残基编号通过与SEQ ID NO:8比对确定。由于SEQ ID NO:8位置1处存在甲硫氨酸残基(以及对应于本文所述修饰BoNT/A多肽的SEQ ID NO)是可选的,因此技术人员在确定氨基酸残基编号时会考虑甲硫氨酸残基的存在/不存在。例如,当SEQ ID NO:8包括甲硫氨酸时,位置编号将如上所定义(例如,E1191将是SEQ ID NO:8的E1191)。或者,当SEQ ID NO:8中不存在甲硫氨酸时,氨基酸残基编号应修改-1(例如,E1191将是SEQ ID NO:8的E1190)。因此,修饰的BoNT/A多肽序列的起始甲硫氨酸氨基酸残基可为可选的或不存在的。当本文所述其他多肽序列的位置1处的甲硫氨酸存在/不存在时,适用类似的考虑,并且技术人员将使用本领域的常规技术容易地确定正确的氨基酸残基编号。

[0360] 用于本发明的修饰的BoNT/A可包含与选自SEQ ID NO:3-7的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽序列。例如,与选自SEQ ID NO:3-7的多肽序列具有至少80%、90%、95%或99.9%序列同一性的多肽序列。优选地,用于本发明的修饰的BoNT/A可包含选自SEQ ID NO:3-7的多肽序列(更优选地由其组成)。

[0361] 优选修饰的BoNT/A包含与SEQ ID NO:6具有至少70%序列同一性的多肽序列。例如,与SEQ ID NO:6具有至少80%、90%、95%或99.9%序列同一性的多肽序列。最优选,用于本发明的修饰的BoNT/A可以包含(更优选由其组成)SEQ ID NO:6。

[0362] 本文所用的术语“缺失”是指多肽中一个或多个氨基酸残基被去除,而缺失位点的一个或多个氨基酸残基未被替换。因此,当从具有x个氨基酸残基的多肽序列(例如)中删除一个氨基酸残基时,所得多肽具有x-1个氨基酸残基。

[0363] 本文所用的术语“插入缺失”是指多肽中一个或多个氨基酸残基的缺失,以及在缺失位点插入与缺失的氨基酸残基数不同数量的氨基酸残基(更多或更少的氨基酸残基)。因此,对于从具有x个氨基酸残基(例如)的多肽序列中缺失两个氨基酸残基的插入缺失,所得多肽具有x-1个氨基酸残基或 $x \geq 1$ 个氨基酸残基。插入和缺失可以按任何顺序进行,可以连续进行,也可以同时进行。

[0364] 本文所用的术语“取代”是指在同一位置用相同数量的氨基酸残基替换一个或多个氨基酸残基。因此,对于具有x个氨基酸残基(例如)的多肽序列的取代,所得多肽也具有x个氨基酸残基。优选地,取代是在单个氨基酸位置的取代。

[0365] 本文所用的术语“插入”是指在插入位点处添加一个或多个多肽的氨基酸残基,而不缺失一个或多个多肽的氨基酸残基。因此,当将一个氨基酸残基插入具有x个氨基酸残基(例如)的多肽序列时,所得多肽具有x+1个氨基酸残基。

[0366] 通过取代、插入或缺失氨基酸残基来修饰蛋白质的方法是本领域已知的。例如,可以通过修饰编码BoNT/A(例如编码未修饰的BoNT/A)的DNA序列来引入氨基酸修饰。这可以使用标准分子克隆技术来实现,例如通过定点诱变,其中使用编码所需氨基酸的短链DNA(寡核苷酸)来使用聚合酶替换原始编码序列,或者通过使用多种酶(例如连接酶和限制性内切酶)插入/删除基因的部分。或者,可以化学合成修饰的基因序列。通常,可以通过修饰

编码天然梭菌神经毒素(或其部分)的核酸来进行修饰,使得由核酸编码的修饰的BoNT/A(或其部分)包含修饰。或者,可合成编码包含所述修饰的经修饰的梭菌神经毒素(或其部分)的核酸。

[0367] 当本文所述的修饰的BoNT/A的多肽序列包含标签(例如用于纯化的His标签)时,所述标签是可选的。优选地,在使用根据本发明的修饰的BoNT/A之前去除所述标签。

[0368] 如上所述,本文所述的修饰的BoNT/A具有增强的组织保留特性,这还提供了增强的效力和/或作用持续时间,并且可以允许增加剂量而不会产生任何额外的负面影响。定义这些有利特性的一种方式是在修饰的BoNT/A的安全比。在这方面,可以通过测量相关动物模型(例如小鼠,在施用后七天内检测到体重减轻)中的体重减轻百分比来实验评估梭菌毒素的不良影响(由毒素从施用位点扩散引起)。相反,可以通过趾外展评分(DAS)测定(一种肌肉麻痹的测量方法)来实验评估梭菌毒素所需的中靶效应。DAS测定可通过将20 μ l梭菌毒素(配制于明胶磷酸盐缓冲液中)注射到小鼠腓肠肌/比目鱼肌复合体中,然后使用Aoki的方法(Aoki KR, Toxicon 39:1815-1820;2001)评估趾外展评分来进行。在DAS测定中,将小鼠短暂地通过尾巴悬挂,以引发特征性的惊吓反应,小鼠会伸展后肢并外展后指。注射梭菌毒素后,根据五分量表对不同程度的趾外展进行评分(0=正常至4=趾外展和腿部伸展最大程度减少)。

[0369] 然后,神经毒素(例如,本发明的修饰的BoNT/A(或用于比较的未修饰的BoNT/A))的安全比可以表示为体重下降10%所需的毒素量(在小鼠给药后前七天内达到峰值效果时测量)与DAS评分为2所需的神经毒素量之间的比率。因此,需要高安全比评分,并且表明神经毒素能够有效地麻痹靶肌肉,而几乎没有不良的脱靶效应。本发明的修饰的BoNT/A的安全比高于等效未修饰的(天然)BoNT/A的安全比。

[0370] 高安全比在治疗中特别有利,因为它代表治疗指数的增加。换句话说,这意味着与替代梭菌神经毒素疗法相比,可以使用减少的剂量和/或可以使用增加的剂量而不会产生任何额外的(例如有害的)影响。使用更高剂量的神经毒素而不会产生额外影响的可能性特别有利,因为更高的剂量通常会导致神经毒素的作用时间更长。

[0371] 修饰的BoNT/A的效力可以表示为当施用于小鼠腓肠肌/比目鱼肌复合体时导致给定DAS评分的神经毒素的最小剂量,例如DAS评分为2(ED_{50} 剂量)或DAS评分为4。修饰的BoNT/A的效力还可以表示为在测量神经毒素切割SNARE的细胞测定中的 EC_{50} 剂量,例如在测量修饰的BoNT/A切割SNAP25的细胞测定中的 EC_{50} 剂量。

[0372] 修饰的BoNT/A的作用持续时间可以表示为在向小鼠腓肠肌/比目鱼肌复合体施用给定剂量的神经毒素(例如导致DAS评分为4的最小剂量的神经毒素)后恢复DAS评分为0所需的时间。

[0373] 因此,在一个实施方案中,本发明的修饰的BoNT/A具有大于7的安全比(例如,至少8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或50),其中安全比计算如下:-10%体重变化所需的毒素剂量(pg/小鼠)除以DAS ED_{50} (pg/小鼠) [ED_{50} = 产生DAS评分2所需的剂量]。例如,修饰的BoNT/A可具有至少8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或50的安全比。

[0374] 在一个实施方案中,本发明的修饰的BoNT/A具有至少10的安全比。在一个实施方案中,本发明的修饰的BoNT/A具有至少15的安全比。

[0375] 优选地,修饰的BoNT/A具有至少10的安全比(例如安全比为10),更优选至少12或

13(例如14-15)。

[0376] 修饰的BoNT/A的安全比可大于7至50,例如8-45、10-20或12-15。

[0377] 在使用中,本发明的修饰BoNT/A为双链形式。

[0378] 用于本发明的修饰的BoNT/A可包含与选自SEQ ID NO:3-7的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽序列。例如,与选自SEQ ID NO:3-7的多肽序列具有至少80%、90%、95%或99.9%序列同一性的多肽序列。优选地,用于本发明的修饰的BoNT/A可包含选自SEQ ID NO:3-7的多肽序列(更优选地由其组成)。在所述修饰的BoNT/A神经毒素(例如嵌合梭菌神经毒素)中,优选SEQ ID NO:6。

[0379] 因此,优选修饰的BoNT/A(例如,嵌合梭菌神经毒素)包含与SEQ ID NO:6具有至少70%序列同一性的多肽序列。更优选地,包含与SEQ ID NO:6具有至少80%、90%、95%或99.9%序列同一性的多肽序列。最优选地,用于本发明的修饰的BoNT/A(例如,嵌合梭菌神经毒素)可包含SEQ ID NO:6(更优选地由其组成)。

[0380] 本发明的双链修饰的BoNT/A可包含与SEQ ID NO:3-7中的任一项具有至少70%、80%、90%、95%、99.9%或100%序列同一性的多肽序列的L链部分,构成双链修饰的BoNT/A的第一链,并且可包含与SEQ ID NO:3-7中的任一项具有至少70%、80%、90%、95%、99.9%或100%序列同一性的多肽序列的H_N和H_C结构域,共同构成双链修饰的BoNT/A的第二链,其中第一链和第二链通过二硫键连接在一起。

[0381] 当切割发生在包含与SEQ ID NO:3-7中的任一项具有至少70%、80%、90%、95%、99.9%或100%序列同一性的多肽序列的修饰的BoNT/A的活化环内的多于一个位置(优选两个位置)上时,则与SEQ ID NO:3-7中任一项具有至少70%、80%、90%、95%、99.9%或100%序列同一性的序列的C端L链部分的小片段可能不存在于双链修饰的BoNT/A中。鉴于此,双链修饰的BoNT/A(例如,包含与SEQ ID NO:3-7中任一项具有至少70%、80%、90%、95%、99.9%或100%序列同一性的多肽序列)的序列可能与包含与SEQ ID NO:3-7中任一项具有至少70%、80%、90%、95%、99.9%或100%序列同一性的多肽序列的相应单链修饰的BoNT/A的序列略有不同。小片段可为1-15个氨基酸。具体地,在一个实施方案中,当使用Lys-C将单链修饰的BoNT/A转换为双链梭菌神经毒素时,缺失的所述序列的C末端L链部分的小片段可为SEQ ID NO:9或10。

[0382] 优选地,本发明的双链修饰的BoNT/A可包含与SEQ ID NO:6具有至少70%、80%、90%、95%、99.9%或100%序列同一性的多肽序列的L链部分,构成双链修饰的BoNT/A的第一链,并且可包含与SEQ ID NO:6具有至少70%、80%、90%、95%、99.9%或100%序列同一性的多肽序列的H_N和H_C结构域,一起构成双链修饰的BoNT/A的第二链,其中第一链和第二链通过二硫键连接在一起。

[0383] 当切割发生在包含与SEQ ID NO:6具有至少70%、80%、90%、95%、99.9%或100%序列同一性的多肽序列的修饰的BoNT/A的活化环内的多于一个位置(优选两个位置)上时,则与SEQ ID NO:6具有至少70%、80%、90%、95%、99.9%或100%序列同一性的序列的C端L链部分的小片段可能不存在于双链修饰的BoNT/A中。鉴于此,双链修饰的BoNT/A(例如,包含与SEQ ID NO:6具有至少70%、80%、90%、95%、99.9%或100%序列同一性的多肽序列)的序列可能与包含与SEQ ID NO:6具有至少70%、80%、90%、95%、99.9%或100%序列同一性的多肽序列的相应单链修饰的BoNT/A的序列略有不同,小片段可为1-15个氨基

酸。具体地,在一个实施方案中,当使用Lys-C将单链修饰的BoNT/A转换为双链修饰的BoNT/A时,缺失的所述序列的C末端L链部分的小片段可为SEQ ID NO:9或10。

[0384] 在特别优选的实施方案中,双链修饰的BoNT/A包括包含与SEQ ID NO:11或12(优选SEQ ID NO:11)具有至少70%、80%、90%、95%或99.9%序列同一性的多肽序列的轻链和包含与SEQ ID NO:13具有至少70%、80%、90%、95%或99.9%序列同一性的多肽序列的重链(或由其组成),其中轻链和重链通过二硫键连接在一起。更优选地,双链修饰的BoNT/A包括包含SEQ ID NO:11或12(优选SEQ ID NO:11)的轻链和包含SEQ ID NO:13的重链(或由其组成),其中轻链和重链通过二硫键连接在一起。甚至更优选地,双链修饰的BoNT/A包含具有SEQ ID NO:11的轻链和具有SEQ ID NO:13的重链(或由其组成),其中轻链和重链通过二硫键连接在一起。二硫键优选由SEQ ID NO:11或12的半胱氨酸残基429和SEQ ID NO:13的半胱氨酸残基6形成和/或位于两者之间。

[0385] 在优选实施方案中,本发明的修饰的BoNT/A(例如嵌合梭菌神经毒素)不包含除轻链和重链之外的治疗剂或诊断剂(例如核酸、蛋白质、肽或小分子治疗剂或诊断剂)。例如,在一个实施方案中,修饰的BoNT/A(例如嵌合梭菌神经毒素)可以不包含共价或非共价关联的治疗剂或诊断剂。因此,本发明的修饰的BoNT/A(例如嵌合梭菌神经毒素)优选不作为进一步的治疗剂或诊断剂的递送载体。

[0386] 在其中本文描述的修饰的BoNT/A(例如,嵌合梭菌神经毒素)具有用于纯化的标签(例如,His标签)和/或接头的实施方案中,所述标签和/或接头是可选的。

[0387] 修饰的BoNT/A优选是非复合形式(即可以不含存在于天然存在的梭菌神经毒素复合物(例如BoNT/A复合物)中的复合蛋白)。此类复合蛋白的例子包括神经毒素相关蛋白(NAP)和无毒非血凝素组分(NTNH)。然而,修饰的BoNT/A优选是重组修饰的BoNT/A。本发明的修饰的BoNT/A可以使用重组核酸技术来生产。因此,在一个实施方案中,修饰的BoNT/A(如本文所述)是重组修饰的BoNT/A(例如嵌合梭菌神经毒素)。

[0388] 在一个实施方案中,提供包含编码修饰的BoNT/A的核酸序列的核酸(例如,DNA)。在一个实施例中,将核酸序列制备为包含启动子和终止子的DNA载体的一部分。核酸序列可从本文所述的任何核酸序列中选择。

[0389] 在优选的实施方案中,载体具有选自以下的启动子:

	启动子	诱导	剂典型诱导条件
[0390]	Tac (杂合)	IPTG	0.2 mM (0.05-2.0mM)
	AraBAD	L-阿拉伯糖	0.2%(0.002-0.4%)
	T7-lac 操纵子	IPTG	0.2 mM(0.05-2.0mM)

[0391] 在另一优选例中,所述载体具有选自以下的启动子:

	启动子	诱导	剂典型诱导条件
	Tac (杂合)	IPTG	0.2 mM (0.05-2.0mM)
[0392]	AraBAD	L-阿拉伯糖	0.2%(0.002-0.4%)
	T7-lac 操纵子	IPTG	0.2 mM(0.05-2.0mM)
	T5-lac 操纵子	IPTG	0.2 mM(0.05-2.0mM)

[0393] 核酸分子可以使用本领域已知的任何合适方法制备。因此,核酸分子可以使用化学合成技术制备。或者,本发明的核酸分子可以使用分子生物学技术制备。

[0394] 本发明的DNA构建体优选在计算机上设计,然后通过常规DNA合成技术合成。

[0395] 上述核酸序列信息可根据需要采用的最终宿主细胞(例如大肠杆菌)表达系统进行密码子偏向性修饰。

[0396] 术语“核苷酸序列”和“核酸”在本文中同义使用。优选地,核苷酸序列是DNA序列。

[0397] 本发明的修饰的BoNT/A可以以单链或双链形式存在。然而,修饰的BoNT/A优选以双链形式存在,其中L链通过二硫键与H链(或其组分,例如H_N结构域)连接。

[0398] 可以使用如下方法生产具有轻链和重链的单链修饰BoNT/A,所述方法包括在表达宿主中表达编码修饰BoNT/A的核酸,裂解宿主细胞以提供含有单链修饰的BoNT/A的宿主细胞匀浆,以及分离单链修饰BoNT/A。可以使用如下方法对本文所述的单链修饰的BoNT/A进行蛋白水解处理,所述方法包括将单链修饰的BoNT/A与蛋白酶(例如Lys-C)接触,所述蛋白酶水解修饰的BoNT/A的活化环中的肽键,从而将单链修饰的BoNT/A转化为相应的双链修饰的BoNT/A(例如其中轻链和重链通过二硫键连接在一起)。优选通过这种方法获得双链修饰BoNT/A。

[0399] 本文所用的术语“可获得”也涵盖术语“已获得”。在一个实施方案中,术语“可获得”意为已获得。

[0400] 因此,本发明中使用的修饰的BoNT/A优选为由单链BoNT/A产生的双链修饰BoNT/A,其中单链BoNT/A包含本文所述的多肽序列或由其组成。例如,本发明中使用的修饰的BoNT/A优选是由包含与SEQ ID NO:6具有至少70%(例如至少80%、90%、95%或99.9%)序列同一性的多肽序列的多肽产生的双链修饰的BoNT/A。最优选地,本发明中使用的修饰的BoNT/A是由包含SEQ ID NO:6(甚至更优选地由其组成)的多肽产生的双链修饰的BoNT/A。因此,在一些实施方案中,修饰的BoNT/A是双链修饰的BoNT/A,其中轻链(L链)通过二硫键与重链(H链)连接,所述二硫键可通过包括使单链修饰的BoNT/A与水解其活化环中的肽键的蛋白酶接触的方法获得,从而将单链修饰的BoNT/A转化为相应的双链修饰的BoNT/A。因此,在一些实施方案中,修饰的BoNT/A是双链修饰的BoNT/A,其中轻链(L链)通过二硫键与重链(H链)连接,所述二硫键可通过包括将包含SEQ ID NO:6的单链修饰的BoNT/A与水解其活化环中的肽键的蛋白酶接触的方法获得,从而将单链修饰的BoNT/A转化为相应的双链修饰的BoNT/A。在一些实施方案中,修饰的BoNT/A是双链修饰的BoNT/A,其中L链通过二硫键与H链连接,所述二硫键可通过将包含SEQ ID NO:6的单链修饰的BoNT/A与水解其活化环中的肽键的蛋白酶接触的方法获得,从而将单链修饰的BoNT/A转化为相应的双链修饰的BoNT/A。

[0401] 用于切割活化环的蛋白酶优选是Lys-C。WO 2014/080206、WO 2014/079495和EP 2677029A2中教导了切割活化环以产生双链梭菌神经毒素的合适蛋白酶和方法,这些文献以引用的方式并入本文中。Lys-C可以切割活化环C端的一个或多个赖氨酸残基。当Lys-C切割活化环不止一次时,技术人员将理解,与本文所示的SEQ ID NO相比,双链修饰的BoNT/A的活化环的小肽可能不存在。

[0402] 本文使用的术语“一个或多个”可表示至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20。在一个实施方案中,其中“一个或多个”位于列表之前,“一个或多个”可表示该列表的所有成员。类似地,本文使用的术语“至少一个”可表示至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20。在一个实施方案中,其中“至少一个”位于列表之前,“至少一个”可表示该列表的所有成员。

[0403] 本文所用的术语“障碍(disorder)”也涵盖“疾病”。在一个实施例中,障碍是疾病。

[0404] 本发明的修饰型BoNT/A可以以任何适合的方式配制以施用于受试者,例如作为药物组合物的一部分。此类药物组合物包含本发明的修饰型BoNT/A和药学上可接受的载体、赋形剂、佐剂、推进剂和/或盐。

[0405] 液体剂型通常利用修饰的BoNT/A和无热原无菌媒介物制备。修饰的BoNT/A可以溶解或悬浮在媒介物中,具体取决于所用的媒介物和浓度。在制备溶液时,修饰的BoNT/A可以溶解在媒介物中,如果需要,可以通过添加氯化钠使溶液等渗,并使用无菌技术通过无菌过滤器过滤进行灭菌,然后装入合适的无菌小瓶或安瓿瓶中并密封。或者,如果溶液稳定性足够,则可以通过高压灭菌对密封容器中的溶液进行灭菌。有利的是,可以将诸如缓冲剂、增溶剂、稳定剂、防腐剂或杀菌剂、悬浮剂或乳化剂和/或局部麻醉剂等添加剂溶解在媒介物中。

[0406] 干粉在使用前溶解或悬浮在合适的媒介物中,可通过在无菌区域使用无菌技术将预灭菌成分装入无菌容器中来制备。或者,也可在无菌区域使用无菌技术将成分溶解在合适的容器中。然后将产品冷冻干燥,并在无菌条件下密封容器。

[0407] 适用于本文所述给药途径的肠外悬浮液以基本相同的方式制备,不同之处在于无菌成分悬浮在无菌媒介物中,而不是溶解,并且不能通过过滤进行灭菌。这些成分可以在无菌状态下分离,或者也可以在分离后进行灭菌,例如通过伽马射线灭菌。

[0408] 有利的是,可在组合物中包含悬浮剂(例如聚乙烯吡咯烷酮)以促进组分的均匀分布。

[0409] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗上面部纹的修饰的肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)的单位剂量形式(unit dosage form),其包含:

[0410] a. 大于73单位的修饰的BoNT/A;或

[0411] b. 大于1754pg(优选大于1800pg)的修饰的BoNT/A;以及

[0412] c. 任选地,药学上可接受的载体、赋形剂、佐剂和/或盐,

[0413] 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域,以及BoNT/B受体结合结构域(H_C结构域)。

[0414] 在一个方面,本发明提供了用于治疗上面部纹的修饰的肉毒杆菌神经毒素A(BoNT/A)的单位剂量形式,该单位剂量形式包含:

[0415] a. 大于73单位至332.8单位的修饰BoNT/A,其中1单位是对应于小鼠的计算半数致死量(LD₅₀)的修饰的BoNT/A的量;或者

- [0416] b. 大于1754pg (优选大于1800pg) 至8000pg的修饰BoNT/A; 以及
- [0417] c. 任选地, 药学上可接受的载体、赋形剂、佐剂和/或盐,
- [0418] d. 其中修饰的BoNT/A包括BoNT/A轻链和易位结构域 (H_N 结构域) 以及BoNT/B受体结合结构域 (H_C 结构域)。
- [0419] 所述单位剂量形式可包括:
- [0420] a. 100单位至200单位修饰的BoNT/A; 或
- [0421] b. 4000pg至6000pg的修饰的BoNT/A。
- [0422] 用于治疗面部纹的单位剂量形式可包含73单位至332.8单位修饰的BoNT/A。所述范围的上限可为300、250、200、150或100单位修饰的BoNT/A, 优选上限为200单位。所述范围的下限可为80、90、100、150、200或250单位修饰的BoNT/A, 优选下限为100单位。优选地, 单位剂量形式包含90至250单位修饰的BoNT/A, 例如100单位至200单位。
- [0423] 用于治疗面部纹的单位剂量形式可包含1755pg至8000pg修饰的BoNT/A。所述范围的上限可为7500、7000、6500、6000、5500、5000、4500、4000、3500或3000pg修饰的BoNT/A, 优选上限为7000pg。所述范围的下限可为1800、2000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500或5,000pg修饰的BoNT/A, 优选下限为2000pg。优选地, 单位剂量形式包含2000pg至7000pg修饰的BoNT/A, 例如4,000pg至6,000pg。
- [0424] 单位剂量形式可以包含1800-7000pg、2000-6500pg、2500-6000修饰的BoNT/A, 优选4000-5500pg修饰的BoNT/A。
- [0425] 单位剂量形式可包含大于1754pg至8000pg的修饰的BoNT/A。单位剂量形式的上限可为8,000、7,000、6,000、5,000、4,000、3,000、2,000或1,000pg修饰的BoNT/A, 优选上限为5,000pg。单位剂量形式的下限可为1,800、2,000、2,500、3000或4,000pg修饰的BoNT/A, 优选下限为1,800pg修饰的BoNT/A。单位剂量形式可包含: 1,800至8,000pg, 或2,000至6,000pg的修饰的BoNT/A, 更优选3,000至6,000pg修饰的BoNT/A。单位剂量形式可为4,500至5,500pg的修饰的BoNT/A, 例如4,900至5,100pg修饰的BoNT/A。
- [0426] 单位剂量形式可包含大于1800pg的修饰的BoNT/A。单位剂量形式可包含大于1800pg最多7000pg的修饰的BoNT/A, 例如大于1800pg最多6000pg的修饰BoNT/A。单位剂量形式可包含大于2000pg最多5000pg的修饰的BoNT/A。
- [0427] 单位剂量形式可包含大于2555pg。例如, 单位剂量形式可包含大于2555pg最多8000pg修饰的BoNT/A, 例如大于2555pg最多6000pg的修饰的BoNT/A。
- [0428] 单位剂量形式可包含2000pg、2500pg、3000pg、4000pg、4500pg、5000pg、5500pg、6000pg、6500pg、7000pg、7500pg或8000pg的修饰的BoNT/A。
- [0429] 更优选的是, 单位剂量形式可包含2000至3500pg修饰的BoNT/A。例如, 单位剂量形式可包含2250pg至3250pg修饰的BoNT/A。特别优选的单位剂量形式可包含约2500pg (例如2500pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A, 例如, 单位剂量形式可优选包含2500pg修饰的BoNT/A。另一种合适的单位剂量形式可包含约3000pg (例如3000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A, 例如, 单位剂量形式可包含3000pg修饰的BoNT/A。
- [0430] 单位剂量形式可包含3500-5500pg修饰的BoNT/A。例如, 单位剂量形式可包含3800pg至4200pg修饰的BoNT/A。单位剂量形式可包含4800至5200pg修饰的BoNT/A。特别合适的单位剂量形式可包含约4000pg (例如4000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A, 例如单位剂量形式

可包含4000pg修饰的BoNT/A。另一种特别优选的单位剂量形式可包含约5000pg (例如5000pg $\pm$ 10%) 修饰的BoNT/A,例如单位剂量形式可优选包含5000pg修饰的BoNT/A。

[0431] 还提供了试剂盒,其包括:

[0432] a.如上文所定义的单位剂量形式;以及

[0433] b.用于治疗面部纹的说明;以及

[0434] c.可选地,稀释剂。

[0435] 还提供了试剂盒,其包括:

[0436] a.如上文所定义的单位剂量形式;以及

[0437] b.用于治疗眉间纹的使用说明;以及

[0438] c.可选地,稀释剂。

[0439] 还提供了试剂盒,其包括:

[0440] a.如上文所定义的单位剂量形式;以及

[0441] b.用于治疗额头纹的使用说明;以及

[0442] c.可选地,稀释剂。

[0443] 还提供了试剂盒,其包括:

[0444] a.如上文所定义的单位剂量形式;以及

[0445] b.用于治疗外眦纹的使用说明;以及

[0446] c.可选地,稀释剂。

[0447] 还提供了试剂盒,其包括:

[0448] a.如上文所定义的单位剂量形式;以及

[0449] b.用于治疗眉间纹、额头纹和外眦纹的使用说明;以及

[0450] c.可选地,稀释剂。

[0451] 单位剂量形式中的修饰BoNT/A可包含与SEQ ID NO:3-7中任一项具有至少70%序列同一性的多肽序列。例如,与SEQ ID NO:3-7中任一项具有至少80%、90%、95%或99.9%序列同一性的多肽序列。

[0452] 优选单位剂量形式中的修饰BoNT/A包含与SEQ ID NO:6具有至少70%序列同一性的多肽序列。例如,与SEQ ID NO:6具有至少80%、90%、95%或99.9%序列同一性的多肽序列。最优选,修饰BoNT/可包含SEQ ID NO:6(更优选由其组成)。

[0453] 与本发明的各种治疗用途相关的实施方案可应用于本发明的方法、组合物(例如单位剂量形式)和试剂盒,反之亦然。

[0454] 序列同源性

[0455] 可以使用多种序列比对方法中的任一种来确定百分比同一性,包括但不限于全局方法、局部方法和混合方法,例如片段方法。确定百分比同一性的方案是本领域技术人员能力范围内的常规程序。全局方法将序列从分子的开头到结尾进行比对,并通过将各个残基对的分数相加并施加空位罚分来确定最佳比对。非限制性方法包括例如CLUSTAL W,参见例如Julie D.Thompson等人,CLUSTAL W:Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting,Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice,22(22)Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994);以及迭代细化,参见例如Osamu Gotoh,Improving the Sensitivity of

Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice 264(4) J.Mol.Biol.823-838 (1996)。局部方法通过识别所有输入序列共有的一个或多个保守基序来比对序列。非限制性方法包括,例如,匹配框 (Match-box), 参见,例如, Eric Depiereux 和 Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501-509 (1992); 吉布斯抽样, 参见, 例如, C.E.Lawrence 等人, Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) Science 208-214 (1993); Align-M, 参见例如 Ivo Van Waillie 等人, Align-M: A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics: 1428-1435 (2004)。

[0456] 因此, 百分比序列同一性是通过常规方法确定的。参见, 例如, Altschul 等人, Bull.Math.Bio. 48:603-16, 1986 和 Henikoff 和 Henikoff, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89: 10915-19, 1992。简而言之, 将两个氨基酸序列进行比对, 以优化比对分数, 使用空位开放罚分为 10, 空位延伸罚分为 1, 以及 Henikoff 和 Henikoff 的 “blosum 62” 评分矩阵 (同上), 如下所示 (氨基酸用标准单字母代码表示)。

[0457] 两个或多个核酸或氨基酸序列之间的 “序列同一性百分比” 是序列所共有的相同位置数量的函数。因此, 同一性百分比可以计算为相同核苷酸/氨基酸的数量除以核苷酸/氨基酸的总数, 再乘以 100。序列同一性百分比的计算还可以考虑空位的数量以及需要引入以优化两个或多个序列的比对的每个空位的长度。序列比较和两个或多个序列之间的同一性百分比的确定可以使用本领域技术人员熟悉的特定数学算法 (例如 BLAST) 进行。

[0458] 用于确定序列同一性的比对分数

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
[0459] I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

[0460] 然后按如下公式计算同一性百分比：

[0461] 相同匹配总数

[0462] _____ x100

[0463] [较长序列的长度加上

[0464] 引入较长序列的空位数量

[0465] 以便对齐两个序列]

[0466] 基本同源的多肽的特征是具有一个或多个氨基酸取代、缺失或添加。这些变化优选是轻微的,即保守的氨基酸取代(见下文)和其他不会显著影响多肽折叠或活性的取代;小的缺失,通常为1到约30个氨基酸;以及小的氨基或羧基末端延伸,例如氨基末端的甲硫氨酸残基、最多约20-25个残基的小接头肽或亲和标签。

[0467] 保守氨基酸取代

基本成分:	精氨酸
	赖氨酸
	组氨酸
酸性:	谷氨酸
	天冬氨酸
极性:	谷氨酰胺
	天冬酰胺
疏水性:	亮氨酸
	异亮氨酸
[0468]	缬氨酸
	芳香族:
	苯丙氨酸
小:	色氨酸
	酪氨酸
	甘氨酸
	丙氨酸
	丝氨酸
	苏氨酸
	蛋氨酸

[0469] 除了20种标准氨基酸外,非标准氨基酸(例如4-羟基脯氨酸、6-N-甲基赖氨酸、2-氨基异丁酸、异缬氨酸和 α -甲基丝氨酸)可取代本发明多肽的氨基酸残基。有限数量的非保守氨基酸、非遗传密码编码的氨基酸和非天然氨基酸可取代多肽氨基酸残基。本发明多肽还可包含非天然存在的氨基酸残基。

[0470] 非天然存在的氨基酸包括但不限于反式-3-甲基脯氨酸、2,4-亚甲基脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸、反式-4-羟基脯氨酸、N-甲基甘氨酸、异苏氨酸、甲基苏氨酸、羟基乙基半胱氨酸、羟基乙基同型半胱氨酸、硝基谷氨酰胺、同型谷氨酰胺、哌可酸、叔亮氨酸、正缬氨酸、2-氮杂苯丙氨酸、3-氮杂苯丙氨酸、4-氮杂苯丙氨酸和4-氟苯丙氨酸。本领域已知多种将非天然存在的氨基酸残基掺入蛋白质的方法。例如,可以采用体外系统,其中使用化学氨酰化的抑制tRNA来抑制无义突变。合成氨基酸和氨酰化tRNA的方法是本领域已知的。含有无义突变的质粒的转录和翻译是在包含大肠杆菌S30提取物和市售酶及其他试剂的无细胞系统中进行的。蛋白质通过色谱法纯化。参见例如Robertson等人,J. Am. Chem. Soc. 113: 2722, 1991; Ellman等人, Methods Enzymol. 202: 301, 1991; Chung等人, Science 259: 806-9, 1993; 和Chung等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10145-9, 1993)。在第二种方法中,通过微注射突变的mRNA和化学氨酰化的抑制tRNA在爪蟾卵母细胞(Xenopus oocytes)中进行翻译(Turcatti等人, J. Biol. Chem. 271: 19991-8, 1996)。在第三种方法中,在不存在要替换

的天然氨基酸(例如苯丙氨酸)的情况下以及存在所需的非天然存在氨基酸(例如2-氮杂苯丙氨酸、3-氮杂苯丙氨酸、4-氮杂苯丙氨酸或4-氟苯丙氨酸)的情况下培养大肠杆菌细胞。将非天然存在氨基酸掺入多肽中以取代其天然对应物。参见Koide等人,Biochem.33:7470-6,1994。可以通过体外化学修饰将天然氨基酸残基转化为非天然存在物种。化学修饰可以与定点诱变相结合,以进一步扩大取代的范围(Wynn and Richards,Protein Sci.2:395-403,1993)。

[0471] 有限数量的非保守氨基酸、不由遗传密码编码的氨基酸、非天然存在的氨基酸和非天然氨基酸可以取代本发明多肽的氨基酸残基。

[0472] 本发明多肽中的必需氨基酸可根据本领域已知方法鉴定,例如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(Cunningham and Wells,Science 244:1081-5,1989)。生物相互作用位点也可结合假定接触位点氨基酸的突变,通过结构物理分析来确定,如通过核磁共振、晶体学、电子衍射或光亲和标记等技术来确定。参见,例如,de Vos等人,Science 255:306-12,1992;Smith等人,J.Mol.Biol.224:899-904,1992;Wlodaver等人,FEBS Lett.309:59-64,1992。必需氨基酸的身份也可以通过与本发明多肽的相关成分(例如易位或蛋白酶成分)的同源性分析来推断。

[0473] 可以使用已知的诱变和筛选方法进行和测试多个氨基酸取代,例如Reidhaar-Olson和Sauer(Science 241:53-7,1988)或Bowie和Sauer(Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:2152-6,1989)公开的方法。简而言之,这些作者公开了同时随机化多肽中两个或多个位置、选择功能性多肽、然后对诱变多肽进行测序以确定每个位置上允许的取代范围的方法。可以使用的其它方法包括噬菌体展示(例如Lowman等人,Biochem.30:10832-7,1991;Ladner等人,美国专利号5,223,409;Huse,WIPO出版物WO 92/06204)和区域定向诱变(Derbyshire等人,Gene46:145,1986;Ner等人,DNA7:127,1988)。

[0474] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。Singleton等人的《微生物学和分子生物学词典》,第20版,John Wiley和Sons,New York(1994),以及Hale&Marham的《哈珀柯林斯生物学词典》,Harper Perennial,NY(1991)为技术人员提供了本公开内容中使用的许多术语的通用词典。

[0475] 本公开内容不受本文公开的示例性方法和材料限制,任何与本文所述方法和材料类似或等同的方法和材料均可用于实践或测试本公开内容的实施方案。数值范围包括定义范围的数字。除非另有说明,否则任何核酸序列均以5'到3'方向从左到右书写;氨基酸序列以氨基到羧基方向从左到右书写。

[0476] 本文提供的标题并非对本公开内容的各个方面或实施例的限制。

[0477] 本文使用氨基酸的名称、三个字母的缩写或单个字母的缩写来指代氨基酸。本文所用的术语“蛋白质”包括蛋白质、多肽和肽。本文所用的术语“氨基酸序列”与术语“多肽”和/或术语“蛋白质”同义。在某些情况下,“氨基酸序列”与术语“肽”同义。在某些情况下,“氨基酸序列”与术语“酶”同义。术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用。在本公开内容和权利要求中,可以使用氨基酸残基的常规单字母和三字母代码。氨基酸的三字母代码符合IUPACIUB生物化学命名联合委员会(JCBN)的定义。还应理解,由于遗传密码的简并性,多肽可以由多于一个核苷酸序列编码。

[0478] 在整个说明书中可能出现其他术语定义。在更详细地描述示例性实施方案之前,应理解本公开内容不限于所描述的特定实施方案,因此可能有所不同。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案,并非旨在限制,因为本公开内容的范围仅由附加的权利要求限定。

[0479] 当提供数值范围时,应理解,还明确披露了该范围的上限和下限之间的每个中间值(除非上下文另有明确规定),精确到下限单位的十分之一。在规定范围内的任何规定值或中间值与该规定范围内的任何其他规定值或中间值之间的每个较小范围均涵盖在本公开内容内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在该范围内或排除在该范围外,并且在较小范围内包括任一限值、不包括限值或包括两个限值的每个范围也涵盖在本公开内容内,但不包括所述范围内的任何明确排除的限值。当所述范围包括一个或两个限值时,排除其中一个或两个限值的范围也涵盖在本公开内容内。

[0480] 必须注意的是,如本文和所附权利要求书中所用,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指代物,除非上下文另有明确规定。因此,例如,提及“一种肉毒杆菌神经毒素A”包括多种此类候选药物,提及“该肉毒杆菌神经毒素A”包括提及一种或多种梭菌神经毒素及其本领域技术人员已知的等效物,等等。

[0481] 本文讨论的出版物仅因其在在本申请的提交日期之前披露而提供。本文的任何内容均不应被解释为承认此类出版物构成所附权利要求的现有技术。

[0482] 附图简要说明

[0483] 现在将参考以下附图和实施例仅通过示例的方式来描述本发明的实施方案。

[0484] 图1显示了FDA批准用于治疗成人面部纹的Dysport®剂量。

[0485] 图2显示了纯化的重组BoNT/AB嵌合体1、2和3A(分别为SEQ ID NO:3-4)的SDS-PAGE。泳道标记为“Maker”(分子量标记)、“-DTT”(氧化BoNT/AB嵌合体样品)和“+DTT”(还原BoNT/AB嵌合体样品)。

[0486] 图3显示了重组BoNT/AB嵌合体1、2和3A(分别转化为双链形式的SEQ ID NO:3、4和5)对大鼠脊髓神经元中SNAP-25的切割。将培养的大鼠原代脊髓神经元(SCN)暴露于不同浓度的重组BoNT/AB嵌合体1、2或3A 24小时,温度为37°C,10% CO₂的湿润氛围中。然后用补充有DTT和核酸酶(Benzonase)的1xNuPAGE缓冲液裂解细胞。将样品转移到微量离心管中,在加热块上以90°C加热5分钟,然后储存在-20°C下,然后通过蛋白质印迹分析SNAP-25切割情况。使用多克隆抗体检测SNAP-25,该抗体可检测SNAP-25的全长和切割形式(Sigma#S9684)。抗兔HRP(Sigma#A6154)用作二抗。

[0487] 图4显示了小鼠趾外展评分试验。在短暂全身麻醉下,将药物注射到小鼠的一条后肢的腓肠肌-比目鱼肌复合肌中;使用趾外展评分(DAS)以0-4的量表测量肌肉无力。确定每种剂量的DAS最大值并绘制剂量图,将数据拟合到4参数logistic方程,确定ED50和导致DAS 4的剂量(DAS 4剂量)值。

[0488] 图5显示纯化的重组BoNT/AB嵌合体3B和3C(分别为SEQ ID NO:6和7)的SDS-PAGE。泳道标记为“Maker”(分子量标记)、“-DTT”(氧化BoNT/AB嵌合体样品)和“+DTT”(还原BoNT/AB嵌合体样品)。

[0489] 图6显示了人类诱导性多能干细胞来源的周围神经元(PERI.4U-Axiogenesis,德国)中未修饰的BoNT/A和BoNT/AB嵌合体3B和3C(分别为SEQ ID NO:2、6和7)对SNAP-25的切

割。将PERI.4U细胞暴露于不同浓度的重组BoNT/A或BoNT/AB嵌合体3B或3C中24小时,在37℃,含5% CO₂的湿润CO₂氛围中。然后用补充有DTT和核酸酶(Benzonase)的1x NuPAGE缓冲液裂解细胞。将样品转移到微量离心管中,在加热块上以90℃加热5分钟,并储存在-20℃下,然后通过蛋白质印迹分析SNAP-25切割情况。使用多克隆抗体检测SNAP-25,该抗体可检测SNAP-25的全长和切割形式(Sigma#S9684)。抗兔HRP(Sigma#A6154)用作二抗。

[0490] 图7显示了小鼠趾外展评分试验中肌肉无力随时间的变化。在短暂全身麻醉下,将药物注射到小鼠的一条后肢的腓肠肌-比目鱼肌复合肌中;使用趾外展评分(DAS)以0-4的量表测量肌肉无力。对在注射的前四天诱导DAS为4的最低剂量组的动物进行监测,直到肌肉无力完全恢复到DAS为0(未观察到肌肉无力)。

[0491] 图8显示了治疗眉间纹时修饰的BoNT/A肌肉施用的注射位点。

[0492] 图9显示了治疗眉间纹和额头纹时修饰的BoNT/A肌肉施用的注射位点。

[0493] 图10显示了仅治疗外眦纹时修饰的BoNT/A肌肉施用的注射位点。

[0494] 图11显示了治疗眉间纹、额头纹和外眦纹时修饰的BoNT/A肌肉施用的注射位点。

[0495] 序列表

[0496] 当下列任一SEQ ID NO中指出了起始Met氨基酸残基或相应的起始密码子时,所述残基/密码子是可选的。

[0497] SEQ ID NO:1(未修饰BoNT/A的核苷酸序列)

ATGCCATTTCGTCAACAAGCAATTCAACTACAAAGACCCAGTCAACGGCGTCGACATCGCATACATCAAGATTCCGAACGC
CGGTCAAATGCAGCCGGTTAAGGCTTTTAAGATCCACAACAAGATTTGGGTTATCCCGGAGCGTGACACCTTCACGAACC
CGGAAGAAGGCGATCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAGCAAGTCCCTGTCAGCTACTACGATTTCGACGTACCTGAGCAGC
GATAACGAAAAAGATAACTACCTGAAAGGTGTGACCAAGCTGTTTCAACGTATCTACAGCACGGATCTGGGTCGCATGCT
GCTGACTAGCATTGTTTCGCGGTATCCCGTTCTGGGGTGGTAGCACGATTGACACCGAACTGAAGGTTATCGACACTAACT
GCATTAACGTTATTCAACCGGATGGTAGCTATCGTAGCGAAGAGCTGAATCTGGTCATCATTGGCCCCGAGCGCAGACATT

[0498]

[0499]

ATCCAATTCGAGTGCAAGAGCTTTGGTCACGAGGTTCTGAATCTGACCCGCAATGGCTATGGTAGCACCCAGTACATTGCTGTTTTTCGCGGATTTTACCTTCGGCTTTGAAGAGAGCCTGGAGGTTGATACCAATCCGTGCTGGGTGCGGGCAAATTCGCTACCGATCCGGCTGTACGCTGGCCCATGAACTGATCCACGAGGCCACCGCTGTACGGCATTGCCATCAACCCAAACCGTGTGTTCAAGGTTAATACGAATGCATACTACGAGATGAGCGGCCCTGGAAGTCAGCTTGAAGAAGTGGCAGCTTCGGTGGCCATGACGCTAAATTCATTGACAGCTTGCAAGAGAATGAGTTCGGTCTGTACTACTATAACAAATTCAGAGACATTGCAAGCACGTTGAACAAGGCCAAAAGCATCGTTGGTACTACCGCGTCGTTGCAGTATATGAAGAATGTGTTTAAAGAGAAGTACCTGCTGTCCGAGGATACCTCCGGCAAGTTTAGCGTTGATAAGCTGAAGTTTGACAACTGTACAAGATGCTGACCGGATTTTACACCGAGGACAACCTTTGTGAAATTTCTTCAAAGTGTGTAATCGTAAACCTATCTGAATTTTGACAAAGCGGTTTCAAGATTAACATCGTGCCGAAGGTGAACTACACCATCTATGACGGTTTTAACCTGCGTAACACCAACCTGGCGGCGAACTTTAACGGTCAGAATACGGAATCAACAACATGAATTTACGAAGTTGAAGAAGTTCACGGGTCTGTTTCGAGTTCTATAAGCTGCTGTGCGTGCAGGATCATCACCAGCAAAACCAAAAGCCTGGACAAAGGCTACAACAAGGCGCTGAATGACCTGTGCATTAAGGTAACAATTTGGGATCTGTTCTTTTCGCCATCCGAAGATAATTTTACCAACGACCTGAACAAGGGTGAAGAAATCACGAGCATACGAATATTGAAGCAGCGGAAGAGAATATCAGCCTGGATCTGATCCAGCAGTACTATCTGACCTTTAACTTCGACAATGAACCGGAGAACATTAGCATTGAGAATCTGAGCAGCGACATTATCGGTGAGTGGACGCGCAATATCGGAACGTTTCCCGAACGGCAAAAAGTACGAGCTGGACAAGTACACTATGTTCCATTACCTGCGTGACAGGAGTTTGAAACACGGTAAAGCCGTATCGCGCTGACCAACAGCGTTAACGAGGCCCTGCTGAACCCGAGCCGTGTCTATACCTTCTTCAGCAGCGACTATGTTAAGAAAGTGAACAAAGCCACTGAGGCCGCGATGTTCCCTGGGCTGGGTGGAACAGCTGGTATATGACTTCACGGACGAGACGAGCAAGTGAGCACTACCGACAAAATTGCTGATATTACCATCATTATCCCGTATATTGGTCCGGCATGAACATTGGCAACATGCTGTACAAAGACGATTTTGTGGGTGCCCTGATCTTCTCCGGTGCCGTGATTCTGCTGGAGTTCATTCGGAGATTGCGATCCCGGTGTTGGGTACCTTCGCGCTGGTGTCTTACATCGCAATAAGGTTCTGACGGTTCAGACCATCGATAACGCGCTGTCGAAACGTAATGAAAAATGGGACGAGGTTTACAAATACATTGTTACGAATTTGGCTGGCGAAAGTCAATACCCAGATCGACCTGATCCGTAAAGAAAATGAAAGAGGCGCTGGAGAATCAGGCGGAGGCCACCAAGCAATTATCAACTACCAATACAACAGTACACGGAAGAGAGAATAACATTAACCTCAATATCGATGATTTGAGCAGCAAGCTGATGAATCTATCAACAAAGCGATGATCAATATCAACAAGTTTTTGAATCAGTGTAGCGTTTCGTACCTGATGAATAGCATGATTCGGTATGGCGTCAAACGCTCTGGAGGACTTCGACGCCAGCTGAAAGATGCGTTGCTGAAATACATTTACGACAATCGTGGTACGCTGATTGGCCAAGTTGACCGCTTGAAAGACAAAGTTAAACAATACCCTGAGCACCGACATCCCATTTCAACTGAGCAAGTATGTTGATAATCAACGTCTGTTGAGCACTTTCACCGAGTATATCAAAAACATCATCAATACTAGCATTCTGAACCTGCGTTACGAGAGCAATCATCTGATTGATCTGAGCCGTTATGCAAGCAAGATCAACATCGGTAGCAAGGTCAATTTTGACCCGATCGATAAGAACCAGATCCAGCTGTTAATCTGGAATCGAGCAAAATGAGGTTATCCTGAAAAACGCCATTGTCTACAACCTCCATGTACGAGAATTTCTCCACCAGCTTCTGGATTTCGCATCCCGAAATACTTCAACAGCATTAGCCTGAACAAGGTATACTATCATCAACTGTATGGAGAACAACAGCGGTTGGAAGGTGTCTCTGAACATGGTGAGATCATTTGGACCTTGACGGACCCCAAGAGATCAAGCAGCGCTCGTGTTCAGTACTCTCAAATGATCAACATTTCCGATTACATTAATCGTTGGATCTTCGTGACCATTACGAATAACCGTCTGAATAACAGCAAGATTTACATCAATGGTCGCTTGATCGATCAGAAACCGATTAGCAACCTGGGTAATATCCACGCAAGCAACAACATTATGTTCAAATTTGGACGGTTCGCCGATACCCATCGTTATATCTGGATCAAGTATTTCAACCTGTTTGATAAAGAACTGAATGAGAAGGAGATCAAAGATTTGTATGACAACCAATCTAACAACGCGCATTTTGAAGGACTTCTGGGGCGATTATCTGCAATACGATAAGCCGTACTATATGCTGAACCTGTATGATCCGAACAAATATGTGGATGTCAATAATGTGGGTATTCGTGGTTACATGTATTTGAAGGGTCCGCGTGGCAGCGTTATGACGACCAACATTTACCTGAACTCTAGCCTGTACCGTGGTACGAAATTCATCATTAAAGAAATATGCCAGCGGCAACAAGATAACATTGTGCGTAATAACGATCGTGTCTACATCAACGTGGTCTGGAAGAATAAGAGTACCGTCTGGCGACCAACGCTTCGACGGCGGGTGTGAGAAAATTTCTGAGCGGTTGGAGATCCCTGATGTGCGTAATCTGAGCCAAGTCGTGGTTATGAAGAGCAAGAACGACAGGGTATCACTAACAAGTGCAAGATGAACCTGCAAGACAACAATGGTAACGACATCGGCTTTATTGGTTTCCACAGTTCAACAATATTGCTAAACTGGTAGCGAGCAATTGGTACAATCGTCAGATTGAGCGCAGCAGCCGTACTTTGGGCTGTAGCTGGGAGTTTTATCCCGTCGATGATGGTTGGGGCGAACGTCCGCTG

[0500]

SEQ ID NO:2 (未修饰BoNT/A的多肽序列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWIPIPERDFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSLDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIGPSADI IQFECKSFGEVLNLTRNGYSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELHIHAGHRLYGIINPN RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEK YLLSEDTSKGFSDKLKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNNTLAAN FNGQNTIEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKYNNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEF

[0501]

[0502]

HGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVQIDNALSKEKWEDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRDLKDKVNNLTSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNN EYTIINC MENNSGWKVS LNYGEIIWTLQDTQEIKQRVVFKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDEKELNEKEIKDLYDNQSN SGILKDFWGDYLYQDKPYMLNLYDPN KYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSMVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVMKSKNDQGITNCKMNLQDNNNGNDIGFIFGHQFNNAIKLVASNWYNRQIERSSRTLGC SWEFIPVDDGGERPL

[0503]

SEQ ID NO:3 (修饰的BoNT/A“嵌合体1”的多肽序列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIHWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAPN RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLEDSTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKKFKV LNRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLNNTNLAANFNGQNTNINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKYNGKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQYYLTFFNFNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIEFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVQIDNALSKEKWEDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRDLKDKVNNLTSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTEYIKSEILNIIILNRYKDNLDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINC MNNSGWKISIRGNRIIWTLLIDINGKTKSVFFEYNIREDISSEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIERYKIQSYSEYLLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEKFIIRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRYTYKYFKKEEMKFLFAPYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTEHHHHHHHHHH

[0505]

SEQ ID NO:4 (修饰的BoNT/A“嵌合体2”的多肽序列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIHWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAPN RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLEDSTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKKFKV LNRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLNNTNLAANFNGQNTNINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKYNGKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQYYLTFFNFNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIEFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMMLYKDDFVGALIFSG

[0506]

[0507]

AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVQIDNALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR LKDK
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTTEYIKNIILNLIILNRYKDNNLIDLSGYGAKVEV
YDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIH
NEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLLIDINGKTKSVFFEYNIREDIS EYINRWFFVTI
TNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDDIDRTQFIWMKYFSIFNTELS
QSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKY
NQNSKYINYRDLYIGEFIIIRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYKYFK
KEEMKFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESG
IVFEEYKDYFCISKWYLKEV KRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTEHHHHHHHHHHHHHHH

[0508]

SEQ ID NO:5 (修饰的BoNT/A“嵌合体3A”的多肽序列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKA FKIHNKIWIPIPERDTFTNPEEGDLN
PPPEAKQVPVSYDDSTYLSTDNEKDNYLKGVT KLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGG
STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGY
GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIIHAGHRLYGI AINPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKF KDIASTLNKA
KSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLEDTSKGKFSVDK LKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKV
LNRKTYLNFDAVKF KINIVPKVNYTIYDGFNL RNTNLAANFNGQNT EINNMFNFKLKNFT
GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE
ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENIS IENLSSDIIGQLELMPNIE RFPNG
KKYELDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEA
AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSG
AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVQIDNALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA
MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR LKDK
VNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTTEYIKNIILNLIILNRYKDNNLIDLSGYGAKVEV
YDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIH
NEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLLIDINGKTKSVFFEYNIREDIS EYINRWFFVTI
TNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDDIDRTQFIWMKYFSIFNTELS
QSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKY
NQNSKYINYRDLYIGEFIIIRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYKYFK
KEEMKFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESG
IVFEEYKDYFCISKWYLKEV KRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTEHHHHHHHHHHHHHHH

[0509]

[0510]

SEQ ID NO:6 (修饰的BoNT/A“嵌合体3B”的多肽序列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKA FKIHNKIWIPIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDDSTYLST
DNEKDNYLKGVT KLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIGPSADII
QFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIIHAGHRLYGI AINPN
RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKF KDIASTLNKA KSIVGTTASLQYMKNVFKEK
YLLSEDTSKGKFSVDK LKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDAVKF KINIVPKVNYTIYDGFNL RNTNLAAN
FNGQNT EINNMFNFKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE
ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENIS IENLSSDIIGQLELMPNIE RFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEF
EGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPA
LNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVQIDNALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLAK
VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSM
IPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR LKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTTEYIKNIILNLIILN
RYKDNNLIDLSGYGAKVEVYDGVELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNQNIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIH

[0511]

[0512]

NEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLLIDINGKTKSVFFEYNIREDIS EYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTD
IKDIREVIANGEIIFKLDGDDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNK
SYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLYIGEFIIIRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYKYFK
KEEMKFLAPIYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEV
KRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE

[0513] SEQ ID NO:7 (修饰的BoNT/A“嵌合体3C”的多肽序列)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWIPIPERDTFTNPEEGDLN
 PPPEAKQVPVSYDDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGG
 STIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFSGHEVLNLTRNGY
 GSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIIHAGHRLYGIAPNP
 RVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASLTNKA
 KSIVGTTASLQYMKNVFKKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKKFKV
 LNRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLNNTNLAANFNGQNTNINNMNFTKLKNFT
 GLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEE
 ITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIEFPNG
 KKYELDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEA
 AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSG
 AVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQVTDNALSQRNEKWDEVYKYIVTNWLAK
 VNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA
 MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRGTIGQVDRLLKDK
 VNNTLSTDIPIQLSKYVDNQRLSTFTYIKNIILNIIILNRYKDNLLIDLSGYGAKVEV
 YDGVLELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNNIIFNSVFLDFSVSWIRIPKYKNDGIQNYIH
 NEYTIINCMKNNSGWKISIRGNRIIWTLDINGKTKSVFFEYNIREDISSEYINRWFFVTI
 TNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIIDRTQFIWMKYFSIFNTELS
 QSNIEERYKIQSYSEYKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKY
 NQNSKYINYRDLYIGEKFIIRKSNSSQINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRYTYKYFK
 KEEKFLFLAPISDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESG
 IVFEEYKDYFCISKWYLKEVKKRPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE

[0515] SEQ ID NO:8 (BoNT/B多肽序列)

MPVTINNENYNDPIDNNIIMMEPPFARGTGRIYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFN
 KSSGIFNRDVCYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIPYLG
 DRRVPLEEFNTNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNH
 FASREGFGGIMQMFKCPEYVSFVFNQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHელიHVLHGLY
 GIKVDDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFGRIV
 DRLNKVLVCISDPNININIKNFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETN
 IAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEGFNISDKDMEKEYRGQNKAINKQA
 YEEISKEHLAVYKIQMCKSVKAPGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKSKNERIEYNTQSN
 YIENDFPINELILDLDLISKIELPSENTESLTDNFNDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIFQY
 LYSQTFPLDIRDISLTSSFDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGVWKQIVND
 FVIEANKSNTMDKIADISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFELIAGASILLEFIPELLI
 PVVGAFLLSEYIDNKNKIIKTIDNALTKRNEKWSMDYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMY
 KALNYQAQALEEIIKYRYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNENGINQAIDNINNFINGCSV
 SYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYKSKVNKYLKTIMPFDL
 SIYTDNTILIEFMFNKYNSEILNIIILNRYKDNLLIDLSGYGAKVEVYDGVLELNDKNQFK
 LTSSANSKIRVTQNNIIFNSVFLDFSVSWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNNS
 GWKISIRGNRIIWTLDINGKTKSVFFEYNIREDISSEYINRWFFVTITNNLNNAKIYING
 KLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIEERYKIQSY
 SEYKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINYRDLY
 IGEKFIIRKSNSSQINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRYTYKYFKKEEKFLFLAPISD
 SDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCIS
 KWYLKEVKKRPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE

[0518] SEQ ID NO:9-C端L链片段

[0519] TKSLDKGYNK

[0520] SEQ ID NO:10-C端L链片段2

[0521] SLDKGYNK

[0522] SEQ ID NO:11-双链L链1

PFVVKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFAKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDYDSTYLST
NEKDNYLKGVTKLFEIRIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEELNLVIGPSADII
[0523] QFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAPNPNR
VFKVNTNAYYEMSGLEVSEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKY
LLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANF
NGQNTTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSK

[0524] SEQ ID NO:12-双链L链2

PFVVKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFAKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDYDSTYLST
NEKDNYLKGVTKLFEIRIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGYSRSEELNLVIGPSADII
[0525] QFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAPNPNR
VFKVNTNAYYEMSGLEVSEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKY
LLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANF
NGQNTTEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTK

[0526] SEQ ID NO:13-双链H链

ALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQL
ELMPNIEFRFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEGHKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVE
[0527] QLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTALVSYIANK
VLTVDQTDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDD
LSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRKDKVNNTLSTD
IPFQLSKYVDNQRLSTFTTEYIKNILNIIILNRYKDNNDLIDLSGYGAKVEVYDGVLELNDKNQFKLTSSANSKIRVTQNO
NIIFNSVFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMMNSGWKISIRGNRIIWTLDINGKTKSVFFEYNIREDI
SEYINRWFFVTITNNLNNAKIYINGKLESNTDIKDIREVIANGEIIFKLDGDIQRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIERY
KIQSYSEYLDKDFGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQNSKYINRDLYIGEKFIIRKNSNSQS
INDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRYTYKYFKKEEMKFLAPIDYDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEI
GLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFCISKWYLKEVKKRPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE

实施例

[0528] 实施例1

[0529] BoNT/AB嵌合体的克隆、表达和纯化

[0530] 使用标准分子生物学技术,从编码亲本血清型分子的DNA和适当的寡核苷酸构建BoNT/AB嵌合构建体1、2、3A、3B和3C(分别为SEQ ID NO:3-7)。然后将它们克隆到带有或不带有C端His₁₀标签的pJ401表达载体中,并转化到BLR(DE3)大肠杆菌细胞中以进行过度表达。这些细胞在2L带挡板锥形瓶中以37℃和225RPM振荡培养,其中含有1L修饰的Terrific Broth(mTB),并补充了适当的抗生素。一旦A₆₀₀达到>0.5,培养箱温度就会降低到16℃,然后在一小时后用1mM IPTG诱导20小时,以225RPM振荡,以表达重组BoNT/AB构建体。

[0531] 收获的细胞通过超声波裂解,并在4℃下以4500RPM的速度离心1小时以澄清。然后在硫酸铵中提取重组BoNT/AB嵌合分子,并通过标准快速蛋白液相色谱(FPLC)技术纯化。这涉及使用疏水相互作用树脂进行捕获和使用阴离子交换树脂进行中间纯化步骤。然后用内蛋白酶Lys-C对部分纯化的分子进行蛋白水解切割以产生活性双链。用第二个疏水相互作用树脂进一步纯化以获得最终的BoNT/AB嵌合体。

[0532] 对于带有十组氨酸标签(H₁₀)(嵌合体1、2、3A)的BoNT/AB嵌合分子,捕获步骤采用固定化镍树脂代替疏水相互作用树脂。。

[0533] 每个嵌合体的序列如表1所示。

[0534]	分子	SEQ ID NO	序列
	嵌合体 1	3	A1:1-871+B1:858-1291(E1191M/S1199Y)+His ₁₀ - 标签
	嵌合体 2	4	A1:1-874+ELGGGGSEL+B1:858- 1291(E1191M/S1199Y)+His ₁₀ -标签
	嵌合体 3A	5	A1:1-872+B1:860-1291(E1191M/S1199Y)+His ₁₀ - 标签
	嵌合体 3B	6	A1:1-872+B1:860-1291(E1191M/S1199Y)
	嵌合体 3C	7	A1:1-872+B1:860-1291

[0535] 表1-嵌合BoNT/AB构建体

[0536] 实施例2

[0537] BoNT/AB嵌合体1、2和3A的比较

[0538] 具有C端His₁₀标签和E1191M/S1199Y双突变的BoNT/AB嵌合体1、2和3A按照实施例1(图2)所述进行纯化,并进行功能活性测试。

[0539] 大鼠脊髓神经元SNAP-25切割试验

[0540] 制备大鼠脊髓神经元(SCN)的原代培养物,并在96孔组织培养板中培养3周(如Masuyer等人,2011,J.Struct.Biol.Structure and activity of a functional derivative of Clostridium botulinum neurotoxin B;以及Chaddock等人,2002,Protein Expr.Purif.Expression and purification of catalytically active,non-toxic endopeptidase derivatives of Clostridium botulinum toxin type A中所述)。在SCN补料培养基中制备BoNT/AB的连续稀释液。收集并过滤待处理的孔中的生长培养基(0.2μm过滤器)。将125μL过滤培养基加回到每个测试孔中。然后将125μL稀释毒素添加到板中(重复三个孔)。将处理过的细胞在37℃、10% CO₂下孵育24±1小时)。

[0541] 使用SNAP-25切割试验分析BoNT活性

[0542] 处理后,去除BoNT,并在PBS(Gibco,英国)中清洗细胞一次。在补充有0.1M二硫苏糖醇(DTT)和250单位/mL核酸酶(benzonase)(Sigma)的1x NuPAGE裂解缓冲液(Life Technologies)中裂解细胞。通过SDS-PAGE分离裂解物蛋白并转移到硝酸纤维素膜上。用SNAP-25特异性的一抗(Sigma#S9684)探测膜,该抗体可识别未切割的SNAP-25以及被BoNT/A内肽酶切割的SNAP-25。使用的二抗是HRP偶联的抗兔IgG(Sigma#A6154)。通过增强化学发光检测条带并使用pXi6 Access(Synoptics,英国)进行成像。使用GeneTools软件(Syngene,剑桥,英国)测定条带强度,并计算在每个BoNT浓度下切割的SNAP-25百分比。数据拟合到4参数logistic方程,并使用GraphPad Prism版本6(GraphPad)计算pEC₅₀。

[0543] 下表2提供了在大鼠SCN SNAP-25切割试验中确定的嵌合体1、2和3A的pEC₅₀值。这

些结果表明,三种BoNT/AB嵌合体保留了进入大鼠脊髓神经元并切割其目标底物的能力。然而,在该试验中,嵌合体3A比嵌合体1和2更有效(另见图3)。

[0544]

	pEC ₅₀ ±SEM
嵌合体1	12.42±0.04
嵌合体2	12.57±0.01
嵌合体3A	12.89±0.04

[0545] 表2.pEC₅₀值。

[0546] 趾外展评分(DAS)测定

[0547] 在DAS测定中测量BoNT/AB嵌合体1、2和3A活性的方法是基于小鼠在短暂地用尾巴悬挂时的惊跳反应趾伸展反射。这种反射被记为趾外展评分(DAS),在将BoNT注射到后爪的腓肠肌-比目鱼肌中后,这种反射受到抑制。小鼠被短暂地用尾巴悬挂以引起特征性的惊跳反应,动物会伸展后肢并外展后趾。(Aoki等人,1999,Eur.J.Neurol.;6(补充4)S3-S10)。

[0548] 注射当天,小鼠在麻醉室中接受含3%异氟烷的氧气麻醉。每只小鼠在右后爪腓肠肌-比目鱼肌肉内注射BoNT/AB嵌合体或媒介物(含0.2%明胶的磷酸盐缓冲液)。

[0549] 注射神经毒素后,对不同程度的趾外展进行评分,评分范围为0至4,其中0=正常,4=趾外展和腿部伸展最大程度减少。ED₅₀是通过非线性调整分析确定的,使用每个剂量的最大效应的平均值。所用的数学模型是4参数logistic模型。

[0550] 服药后第一天每2小时进行一次DAS;此后每天进行3次,持续4天。

[0551] 图4显示了嵌合体1、2和3A(分别将SEQ ID NO:3、4和5转化为双链形式)的拟合曲线。嵌合体3A曲线向左移动,这意味着与嵌合体1和2相比,较低剂量的嵌合体3A实现了类似的DAS反应,因此表明在小鼠DAS测定中,嵌合体3A比其他嵌合体更有效;另见下表(表3),其中提供了每个嵌合体的计算ED₅₀值和导致DAS 4(最高分数)的剂量。

[0552] 下表3提供了未修饰重组BoNT/A1(rBoNT/A1-转化为双链形式的SEQ ID NO:2)和嵌合体1、2和3A在小鼠DAS测定中确定的ED₅₀和DAS 4剂量。这些结果表明,在三种嵌合体中,嵌合体3A在体内诱导肌肉无力方面具有最高的效力。图4和表3中所示的研究是在从Charles River实验室获得的小鼠中进行的。

[0553]

	ED ₅₀ (pg/小鼠)	DAS 4 剂量 (pg/小鼠)
rBoNT/A1	1	5
嵌合体 1	23	200
嵌合体 2	89	>300
嵌合体 3A	18	133

[0554] 表3.ED₅₀值。

[0555] 实施例3

[0556] BoNT/AB嵌合体3B、3C与未修饰的BoNT/A1的比较

[0557] 未标记的BoNT/AB嵌合体3B和3C(分别存在和不存在E1191M/S1199Y双突变)(SEQ

ID NO:6和7)如实施例1(图5)所述进行纯化,并且使用未修饰的BoNT/A(转化为双链形式的SEQ ID NO:2)作为参考测试功能活性。人类多能干细胞SNAP-25切割试验

[0558] 冷冻保存的PERI.4U细胞购自Axiogenesis(德国科隆)。按照制造商的建议进行细胞解冻和接种。简而言之,将装有细胞的冷冻管在37℃水浴中解冻2分钟。轻轻重新悬浮后,将细胞转移到50mL管中。用制造商提供的1mL Peri.4U®解冻培养基清洗冷冻管,然后将培养基逐滴转移到50mL管中的细胞悬浮液中,然后再将2mL Peri.4U®解冻培养基逐滴添加到50mL管中。然后使用血细胞计数器计数细胞。此后,将另外6mL Peri.4U®解冻培养基添加到细胞悬浮液中。在室温下以260xg(例如1,100RPM)离心6分钟,获得细胞沉淀。然后将细胞悬浮于制造商提供的完全Peri.4U®培养基中。将细胞以50,000至150,000细胞/cm²的密度接种在涂有聚L-鸟氨酸和层粘连蛋白的细胞培养板上。细胞在37℃、湿润的CO₂气氛下培养,培养期间每2-3天彻底更换培养基。

[0559] 对于毒素处理,在Peri.4U®培养基中制备BoNT的连续稀释液。收集并过滤待处理孔中的培养基(0.2μm过滤器)。将125μL过滤后的培养基加回到每个测试孔中。然后将125μL稀释的毒素添加到板中(三个重复孔)。将处理过的细胞在37℃、10% CO₂下孵育48±1小时)。

[0560] 使用SNAP-25切割试验分析BoNT活性

[0561] 处理后,去除BoNT,并在PBS(Gibco,英国)中清洗细胞一次。在补充有0.1M二硫苏糖醇(DTT)和250单位/mL核酸酶(benzonase)(Sigma)的1xNuPAGE裂解缓冲液(Life Technologies)中裂解细胞。通过SDS-PAGE分离裂解物蛋白并转移到硝酸纤维素膜上。用SNAP-25特异性的一抗(Sigma#S9684)探测膜,该抗体可识别未切割的SNAP-25以及被BoNT/A内肽酶切割的SNAP-25。使用的二抗是HRP偶联的抗兔IgG(Sigma#A6154)。通过增强化学发光检测条带并使用pXi6 Access(Synoptics,英国)进行成像。使用GeneTools软件(Syngene,剑桥,英国)测定条带强度,并计算在每个BoNT浓度下切割的SNAP-25百分比。数据拟合到4参数logistic方程,并使用GraphPad Prism版本6(GraphPad)计算pEC₅₀。

[0562] 图6显示,嵌合体3B和3C在诱导性人类多能干细胞中切割SNAP-25时表现出比rBoNT/A1更强的效力,但前者明显更强。这可以通过双重突变来解释,这种突变增加了嵌合体3B对这些细胞中存在的人类突触结合蛋白II蛋白受体的亲和力(图6、表4)。

[0563]	pEC ₅₀ ±SEM
rBoNT/A1	10.21±0.05
嵌合体3B	12.38±0.06
嵌合体3C	10.72±0.08

[0564] 表4. pEC₅₀值。

[0565] 趾外展评分(DAS)测试-安全比

[0566] 在DAS测定中测量BoNT活性的方法是基于小鼠在短暂地用尾巴悬挂时的惊跳反应趾伸展反射。这种反射被记为趾外展评分(DAS),在将BoNT注射到后爪的腓肠肌-比目鱼肌中后,这种反射会受到抑制。小鼠被短暂地用尾巴悬挂以引起特征性的惊跳反应,动物会伸展后肢并外展后趾。(Aoki等人,1999,Eur.J.Neurol.;6(补充4)S3-S10)。

[0567] 注射当天,小鼠在麻醉室中接受含3%异氟烷的氧气麻醉。每只小鼠在右后爪的腓肠肌-比目鱼肌肉内注射BoNT或媒介物(含0.2%明胶的磷酸盐缓冲液)。

[0568] 注射神经毒素后,对不同程度的趾外展进行评分,评分范围为0至4,其中0=正常,4=趾外展和腿部伸展最大程度减少。ED₅₀是通过非线性调整分析确定的,使用每个剂量的最大效应的平均值。所用的数学模型是4参数logistic模型。

[0569] 给药后第一天每2小时进行一次DAS;此后所有剂量的DAS每天进行3次,持续4天。注射媒介物和注射前四天诱导DAS为4的最低剂量组的动物随后受到监测,直到肌肉无力完全恢复至DAS为0(未观察到肌肉无力)。

[0570] 为了计算安全比,所有动物在注射毒素前一天(D0)称重,此后在整个研究期间每天称重一次。每天计算每个剂量组的平均体重、其标准偏差和标准误差平均值。为了获得BoNT的安全比($-10\% \Delta BW/ED_{50}$),将研究期间任何时间剂量组的平均体重低于同一剂量组D0时平均体重的10%的剂量除以所研究的BoNT的ED₅₀。致死剂量定义为该剂量组中一只或多只动物死亡的剂量。

[0571] 图7显示了未修饰的BoNT/A、嵌合体3B和嵌合体3C(转化为双链形式的SEQ ID NO: 2、6和7)在小鼠趾外展评分测定中肌肉无力持续时间随时间的变化,表明嵌合体的作用持续时间更长。

[0572] 下表5提供了小鼠DAS测定中rBoNT/A1和嵌合体3B和3C的ED₅₀和DAS 4剂量。该表还提供了DAS 4剂量直至肌无力完全恢复至DAS 0(未观察到肌无力)的总作用持续时间。此外,该表还显示了小鼠致死剂量和安全比($-10\% \Delta BW/ED_{50}$),如上文所定义。与rBoNT/A1相比,嵌合体3B和3C的作用持续时间更长、安全比更好、致死剂量更高。图7和表5中所示的研究是在从Janvier实验室获得的小鼠中进行的。

[0573]

	ED50 (DAS2)剂量 (pg/小鼠)	DAS 4 剂量 (pg/小鼠)	最低 DAS 4 剂量的总作 用持续时间 (天)	小鼠致 死剂量 (pg)	安全比 (-10%ΔBW/ED ₅₀)
rBoNT/A1	0.9	2.3	29	18	4.5
嵌合体 3B	8.0	89	42	200	14.1
嵌合体 3C	5.0	26	42	8.9	7.4

[0574] 表5. BoNT/AB嵌合体的DAS和安全比。

[0575] 实施例4

[0576] 治疗眉间纹的剂量方案

[0577] 修饰的BoNT/A以冻干粉形式提供,装在2mL透明玻璃小瓶中,每瓶含有15ng修饰的BoNT/A。冻干粉用无菌氯化钠0.9% v/w无防腐剂溶液和稀释剂(仅含有修饰的BoNT/A赋形剂的配方缓冲液)混合物重构。重构后,根据需要进一步稀释溶液。

[0578] 中度至重度眉间纹按照图8所示的注射方案进行治疗。

[0579] 单位剂量为20-300pg(2-35单位)。

[0580] 肌肉内注射按单位剂量最多可在5个位点进行,最大总剂量为1500pg(177单位)。

[0581] 实施例5

[0582] 治疗眉间纹和额头纹的剂量方案

[0583] 修饰的BoNT/A以冻干粉形式提供,装在2mL透明玻璃小瓶中,每瓶含有15ng修饰的BoNT/A。冻干粉用无菌氯化钠0.9% v/w无防腐剂溶液和稀释剂(仅含有修饰的BoNT/A赋形剂的配方缓冲液)混合物重构。重构后,根据需要进一步稀释溶液。

[0584] 中度至重度眉间纹和额头纹按照图9所示的注射方案进行治疗。

[0585] 单位剂量为20-300pg (2-35单位)。

[0586] 肌肉内注射按单位剂量最多可在10个位点进行,最大总剂量为3000pg (355单位)。

[0587] 实施例6

[0588] 治疗外眦纹的剂量方案

[0589] 修饰的BoNT/A以冻干粉形式提供,装在2mL透明玻璃小瓶中,每瓶含有15ng修饰的BoNT/A。冻干粉用无菌氯化钠0.9% v/w无防腐剂溶液和稀释剂(仅含有修饰的BoNT/A赋形剂的配方缓冲液)混合物重构。重构后,根据需要进一步稀释溶液。

[0590] 中度至重度外眦纹按照图10所示的注射方案进行治疗。

[0591] 单位剂量为20-300pg (2-35单位)。

[0592] 肌肉内注射按单位剂量最多可在6个位点进行,最大总剂量为1800pg (213单位)。

[0593] 实施例7

[0594] 治疗眉间纹、额头纹和外眦纹的剂量方案

[0595] 修饰的BoNT/A以冻干粉形式提供,装在2mL透明玻璃小瓶中,每瓶含有15ng修饰的BoNT/A。冻干粉用无菌氯化钠0.9% v/w无防腐剂溶液和稀释剂(仅含有修饰的BoNT/A赋形剂的配方缓冲液)混合物重构。重构后,根据需要进一步稀释溶液。

[0596] 中度至重度眉间纹、额头纹和外眦纹按照图11所示的注射方案进行治疗。

[0597] 单位剂量为20-300pg (2-35单位)。

[0598] 肌肉内注射按单位剂量最多可在16个位点进行,最大总剂量为4800pg (569单位)。

[0599] 实施例8

[0600] 修饰的BoNT/A(转化为双链形式的SEQ ID NO:6)的进一步表征

[0601] 转化为双链形式的修饰的BoNT/A(例如BoNT/AB嵌合体)SEQ ID NO:6在小鼠LD₅₀测定中进行了测试,结果为1.202ng/kg。因此,1单位的SEQ ID NO:6在该测定中对应于24.04pg。

[0602] 此外,在大鼠DAS测定中测试了所述BoNT/AB嵌合体,以确定与Dysport[®]相比的作用持续时间(按照实施例6)。结果列于下表6中:

[0603]		Dysport [®] 3 U/大鼠 15 U/kg	BoNT/AB 300 pg/大鼠 1.5 ng/kg
	作用持续时间(中位数天数)	21.9	47.7

[0604] 表6.作用持续时间。

[0605] 总之,BoNT/AB的作用持续时间比Dysport[®]长得多并且与SEQ ID NO:6相似。因此,预计SEQ ID NO:6的单位剂量和给药方案可以类似地应用于BoNT/AB,以提供更好的面

部纹治疗。

[0606] 实施例9

[0607] 针对上面部纹的修饰的BoNT/A(转化为双链形式的SEQ ID NO:6)单位剂量的计算

[0608] 根据临床前药理学数据,计算出了适合人体使用修饰的BoNT/A的单位剂量范围(UD)。

[0609] 计算得出SEQ ID NO:6的DAS ED₅₀为13pg/kg。ED₅₀被视为最低药理活性剂量,比同一动物物种中4ng/kg的未观察到不良反应水平(NOEL)低约300倍。大鼠中SEQ ID NO:6的ED₅₀为13pg/kg,相当于体重60公斤的人的0.8ng剂量。

[0610] 因此,选定单位剂量的下限为20pg,上限为1500pg,该剂量低于两个非临床安全性物种(大鼠和猴子)的NOEL 4ng/kg换算成60kg体重的人体剂量。

[0611] 鉴于安全性的提高,治疗上面部纹的最大总剂量设定为24,000pg,这是根据非临床安全物种(大鼠和猴子)的NOEL 4ng/kg换算成60kg体重的人体剂量得出的。

[0612] 实施例10

[0613] 使用修饰的BoNT/A(转化为双链形式的 SEQ ID NO: 6)治疗眉间纹的给药方案

[0614] 修饰的BoNT/A以冻干粉形式提供,装于小瓶中,每瓶含36ng修饰的BoNT/A。冻干粉经过重组。

[0615] 中度至重度眉间纹按照图8所示的注射方案进行治疗。

[0616] 单位剂量为20-1500pg (0.8-62单位)。

[0617] 肌肉内注射按单位剂量最多注射5个位点,最大总剂量为7500pg (312单位)。

[0618] 实施例11

[0619] 使用修饰的BoNT/A(转化为双链形式的SEQ ID NO:6)治疗眉间纹和额头纹的给药方案

[0620] 修饰的BoNT/A以冻干粉形式提供,装于小瓶中,每瓶含36ng修饰的BoNT/A。冻干粉经过重组。

[0621] 中度至重度眉间纹和额头纹按照图9所示的注射方案进行治疗。

[0622] 单位剂量为20-1500pg (0.8-62单位)。

[0623] 肌肉内注射按单位剂量最多可在10个位点进行,最大总剂量为15,000pg (624单位)。

[0624] 实施例12

[0625] 使用修饰的BoNT/A(转化为双链形式的SEQ ID NO: 6)治疗外眦纹的给药方案

[0626] 修饰的BoNT/A以冻干粉形式提供,装于小瓶中,每瓶含36ng修饰的BoNT/A。冻干粉经过重组。

[0627] 中度至重度外眦纹按照图10所示的注射方案进行治疗。

[0628] 单位剂量为20-1500pg (0.8-62单位)。

[0629] 肌肉内注射按单位剂量最多可在6个位点进行,最大总剂量为9000pg (374单位)。

[0630] 实施例13

[0631] 使用修饰的BoNT/A(转化为双链形式的SEQ ID NO:6)治疗眉间纹、额头纹和外眦纹的给药方案

[0632] 修饰的BoNT/A以冻干粉形式提供,装于小瓶中,每瓶含36ng修饰的BoNT/A。冻干粉

经过重组。

[0633] 中度至重度眉间纹、额头纹和外眦纹按照图11所示的注射方案进行治疗。

[0634] 单位剂量为20-1500pg (0.8-62单位)。

[0635] 肌肉内注射按单位剂量最多可在16个位点进行,最大总剂量为24,000pg (998单位)。

[0636] 实施例14

[0637] 使用修饰的BoNT/A (转化为双链形式的SEQ ID NO:6) 在人体中的安全性和有效性

[0638] 进行了一项综合I/II期多中心、双盲、随机、Dysport和安慰剂对照的剂量递增和剂量探索研究,以评估修饰的BoNT/A (转化为双链形式的SEQ ID NO:6) 在治疗成人中度至重度上面部纹方面的安全性和有效性。所述上面部纹包括眉间纹、额头纹和外眦纹。该研究包括对具有成人上面部纹的独特患者队列进行人体顺序剂量递增。所述上面部皱纹包括眉间纹、额头纹和外眦纹。每块肌肉内注射单位剂量的修饰的BoNT/A、Dysport或安慰剂。6个队列施用了不同(增加)量的修饰的BoNT/A (转化为双链形式的SEQ ID NO:6)。总剂量范围为0.1至6.0ng。修饰的BoNT/A注射到了脸部上方最多16个位点(眉间纹5个位点、额头纹5个位点以及外眦纹两侧各3个位点-见图11)。

[0639] 结果表明,尽管每块肌肉的剂量极高,但所有测试的修饰的BoNT/A单位剂量和总剂量(即高达6,000pg)均有效、安全耐受,并且未观察到任何不良反应。这表明修饰的BoNT/A不会从注射位点扩散,并凸显了修饰的BoNT/A (SEQ ID NO:6) 的卓越安全性。基于这些发现,可以相信可向每块肌肉施用更高的单位剂量而不会产生不良反应。此外,鉴于毒素不会全身扩散,可以相信可施用最多13-14倍的单位剂量而不会产生安全问题。

[0640] 因此,我们选择高达5,000pg $\pm$ 10%的单位剂量,在面部上部区域最多注射16次(例如,眉间纹的五个位点、额头纹的五个位点以及外眦纹两侧的三个位点),用于治疗上面部纹。因此,治疗期间注射的总剂量将分别高达80,000($\pm$ 10%)。

[0641] 例如,已选择高达5,000pg $\pm$ 10%的单位剂量来治疗眉间纹(每个皱眉肌两个,降眉间肌一个),眉间区域的总剂量高达25,000pg,这比两个非临床安全物种(大鼠和猴子)的4ng/kg的NOAEL转化为60kg体重的人体剂量低约10倍。

[0642] 事实上,如实施例21所解释的,5次注射(每个皱眉肌两次,降眉间肌一次)每次4,000pg单位剂量(以提供20,000pg的总剂量)耐受性良好。

[0643] 实施例15

[0644] 使用修饰的BoNT/A (转化为双链形式的SEQ ID NO: 6) 治疗眉间纹的给药方案

[0645] 修饰的BoNT/A以冻干粉形式提供,装于小瓶中,每瓶含36ng修饰的BoNT/A。冻干粉经过重组。

[0646] 中度至重度眉间纹按照图11所示的注射方案进行治疗。也就是说,每块皱眉肌最多注射两个单位剂量,降眉间肌注射一个单位剂量。

[0647] 单位剂量为 >1754 pg至5,000ng。治疗期间施用的修饰的BoNT/A总剂量高达88,000pg。这比Dysport[®]在治疗面部纹时可以施用的最大总剂量高出14倍多,不会接近毒性极限(传统治疗方案的顾虑)。因此,临床医生能够根据患者的情况量身定制治疗方案,因为医生知道可以施用总剂量88,000pg,而不用担心毒性,从而可以治疗受试者的其他肌肉和/或确保每块肌肉和/或位点都接受有效剂量。

[0648] 实施例16

[0649] 使用修饰的BoNT/A(转化为双链形式的SEQ ID NO:6)治疗眉间纹和额头纹的给药方案

[0650] 修饰的BoNT/A以冻干粉形式提供,装于小瓶中,每瓶含36ng修饰的BoNT/A。冻干粉经过重组。

[0651] 中度至重度眉间纹和额头纹按照图9所示的注射方案进行治疗。即,每块皱眉肌最多注射两个单位剂量,降眉间肌注射一个单位剂量;额肌最多注射五个单位剂量。

[0652] 单位剂量为>1754pg至5,000ng。治疗期间施用的修饰的BoNT/A总剂量高达88,000pg。这比Dysport®在治疗面部皱纹时可以施用的最大总剂量高出14倍多,不会接近毒性极限(传统治疗方案的顾虑)。因此,临床医生能够根据患者的情况量身定制治疗方案,因为医生知道可以施用总剂量88,000pg,而不用担心毒性,从而可以治疗受试者的其他肌肉和/或确保每块肌肉和/或位点都接受有效剂量。

[0653] 实施例17

[0654] 使用修饰的BoNT/A(转化为双链形式的SEQ ID NO:6)治疗外眦纹的给药方案

[0655] 修饰的BoNT/A以冻干粉形式提供,装于小瓶中,每瓶含36ng修饰的BoNT/A。冻干粉经过重组。

[0656] 中度至重度外眦纹按照图10所示的注射方案进行治疗。也就是说,每块眼轮匝肌最多注射三个单位剂量。

[0657] 单位剂量为>1754pg至5,000ng。治疗期间施用的修饰的BoNT/A总剂量高达88,000pg。这比Dysport®在治疗面部皱纹时可以施用的最大总剂量高出14倍多,不会接近毒性极限(传统治疗方案的顾虑)。因此,临床医生能够根据患者的情况量身定制治疗方案,因为医生知道可以施用总剂量88,000pg,而不用担心毒性,从而可以治疗受试者的其他肌肉和/或确保每块肌肉和/或位点都接受有效剂量。

[0658] 实施例18

[0659] 使用修饰的BoNT/A(转化为双链形式的SEQ ID NO:6)治疗眉间纹、额头纹和外眦纹的给药方案

[0660] 修饰的BoNT/A以冻干粉形式提供,装于小瓶中,每瓶含36ng修饰的BoNT/A。冻干粉经过重组。

[0661] 中度至重度眉间纹、额头纹和外眦纹按照图11所示的注射方案进行治疗。也就是说,每块皱眉肌最多注射两个单位剂量,降眉间肌注射一个单位剂量;额肌最多注射五个单位剂量;每块眼轮匝肌最多注射三个单位剂量。

[0662] 单位剂量为>1754pg至5,000ng。治疗期间施用的修饰的BoNT/A总剂量高达88,000pg。这比Dysport®在治疗面部皱纹时可以施用的最大总剂量高出14倍多,不会接近毒性极限(传统治疗方案的顾虑)。因此,临床医生能够根据患者的情况量身定制治疗方案,因为医生知道可以施用总剂量88,000pg,而不用担心毒性,从而可以治疗受试者的其他肌肉和/或确保每块肌肉和/或位点都接受有效剂量。

[0663] 实施例19

[0664] 上脸部纹患者的治疗

[0665] John, 55岁,患有严重的眉间纹、额头纹和外眦纹。将修饰的BoNT/A (SEQ ID NO:6) 以一个或多个单位剂量 (1x单位剂量=5000pg) 的方式施用至以下肌肉:

[0666] -两个单位剂量 (因此皱眉肌上有四个单位剂量) 至每块皱眉肌肌肉和降眉间肌肌肉的一个位点,用于治疗眉间纹,

[0667] -五个单位剂量至额肌肌肉,用于治疗额头纹;以及

[0668] -三个单位剂量 (因此在眼轮匝肌上注射六个单位剂量) 至每块眼轮匝肌肌肉外部,用于治疗外眦纹。

[0669] 施用的总剂量为80,000ng (+/-10%) 修饰的BoNT/A (转化为双链形式的SEQ ID NO:6)。

[0670] 所有纹 (皱纹) 都得到缓解,皮肤看起来干净年轻,而且由于修饰的BoNT/A的持续时间长,John不需要超过9个月的进一步治疗。因此,与接受未修饰BoNT/A治疗的同等受试者相比,John接受的注射频率较低 (例如每年)。此外,由于修饰的BoNT/A的安全性得到改善,Bill没有表现出任何副作用。

[0671] 实施例20

[0672] 修饰BoNT/A (转化为双链形式的SEQ ID NO:6) 在人体中的安全性和有效性 SEQ ID NO:6 (转化为双链形式) 通过肌肉内注射的方式施用于人类受试者。受试者被施用于2x 15,000pg单位剂量 (即总共30,000pg)、2x 25,000pg单位剂量 (即总共50,000pg) 或2x 36,000pg单位剂量 (即总共72,000pg) 的修饰BoNT/A (转化为双链形式的SEQ ID NO:6)。

[0673] 结果表明,所有经测试的修饰的BoNT/A单位剂量均能有效麻痹肌肉、安全耐受,并且未观察到任何不良反应,尽管每块肌肉的剂量极高 (例如25,000pg和36,000pg单位剂量)。这表明修饰的BoNT/A不会从注射位点扩散,并凸显了修饰的BoNT/A (转化为双链形式的SEQ ID NO:6) 的卓越安全性。

[0674] 本文在治疗面部皱纹的背景下描述的单位剂量和总剂量完全在对本文描述的这种有利的修饰的BoNT/A分子安全有效的剂量范围内,为临床医生提供了治疗选择方面的灵活性,包括利用修饰的BoNT/A (例如转化为双链形式的SEQ ID NO:6) 的有利特性和卓越的安全性。

[0675] 实施例21

[0676] 修饰的BoNT/A (转化为双链形式的SEQ ID NO:6) 在治疗眉间纹中的安全性和有效性

[0677] SEQ ID NO:6 (转化为双链形式) 通过肌肉内注射的方式施用于人类受试者。

[0678] 一组受试者接受了5次注射 (每侧皱眉肌2次,降眉间肌1次),每次2,500pg单位剂量,总剂量为12,500pg。另一组受试者接受了5次注射 (每侧皱眉肌2次,降眉间肌1次),每次4,000pg单位剂量,总剂量为20,000pg。

[0679] 眉间纹减少。结果表明,所有测试的修饰的BoNT/A单位剂量均安全耐受,并且没有观察到不良反应,尽管每块肌肉的剂量非常高。这表明修饰的BoNT/A不会从注射位点扩散,并突出了修饰的BoNT/A (转化为双链形式的SEQ ID NO:6) 的卓越安全性。

[0680] 上述说明书中提到的所有出版物均以引用的方式并入本文中。本领域技术人员将清楚本发明所述方法和系统的各种修改和变化,而不会偏离本发明的范围和精神。尽管本发明已结合特定的优选实施例进行了描述,但应理解,所要求保护的发明不应过度局限于

这些特定的实施例。事实上,对于生物化学和生物技术或相关领域的技术人员来说,实施本发明的所述模式的各种修改都是显而易见的,这些修改旨在属于以下权利要求的范围。

适应症	推荐的浓度	推荐的DYSPOORT剂量
眉间纹, 成人	12单位/0.1 mL 或 20单位/0.1 mL	50单位, 分成5等份, 每份10单位 (0.08 mL) 或 50单位, 分成5等份, 每份10单位 (0.05 mL)

图1

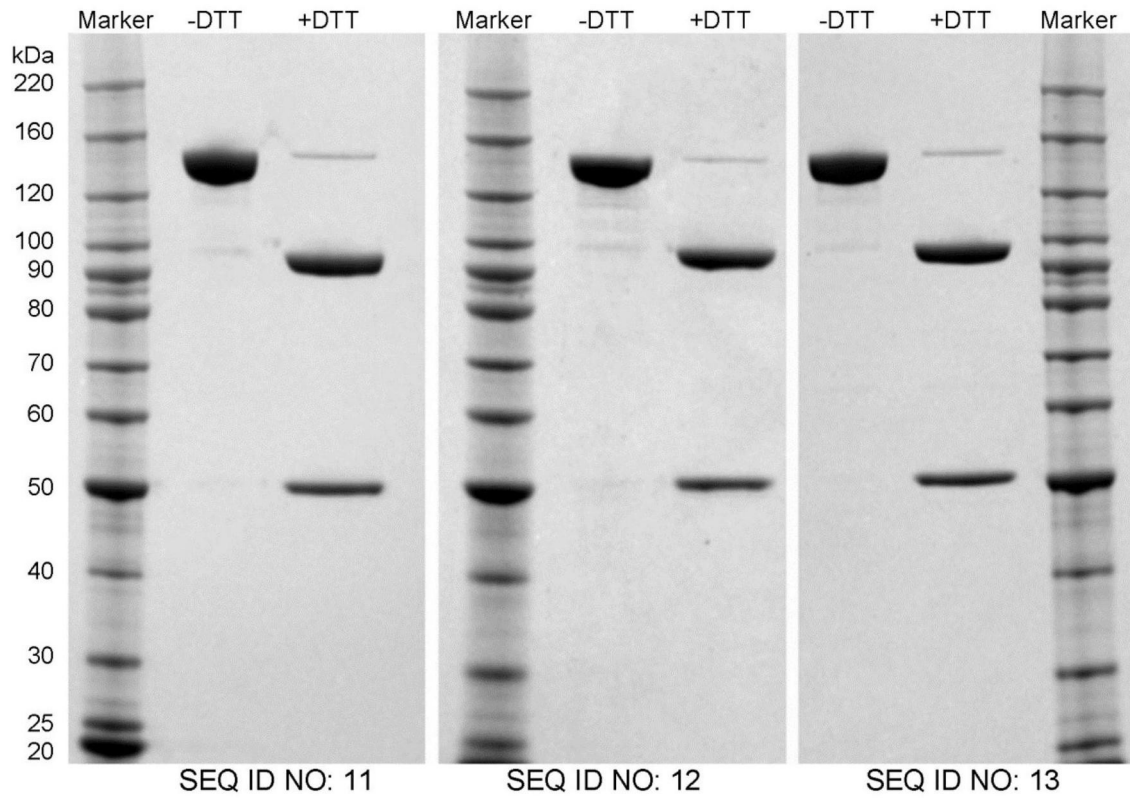


图2

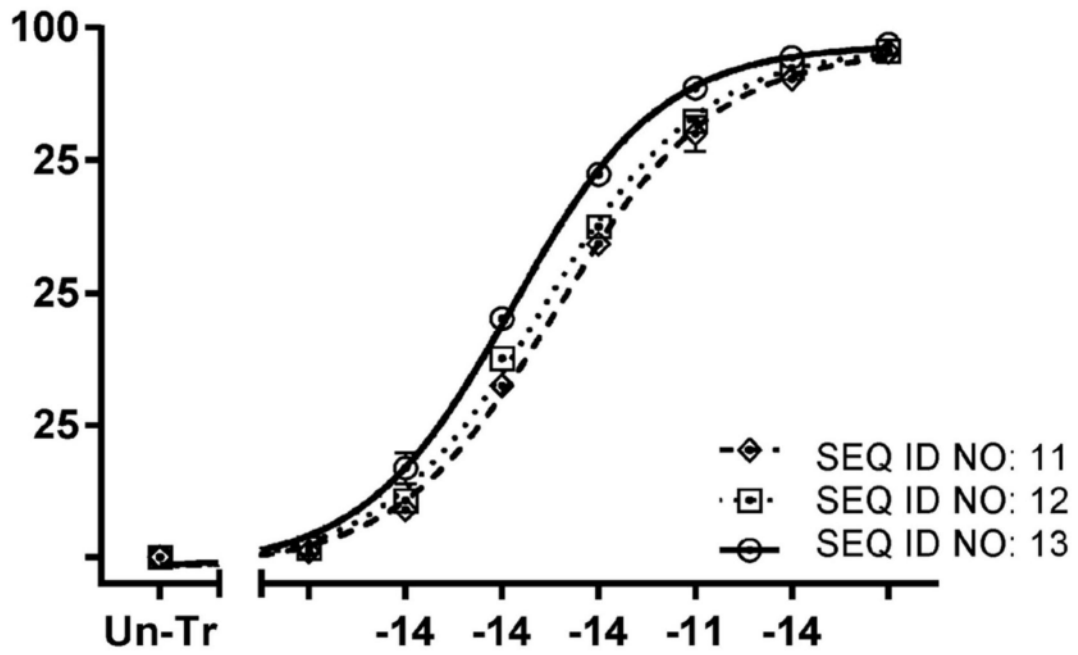


图3

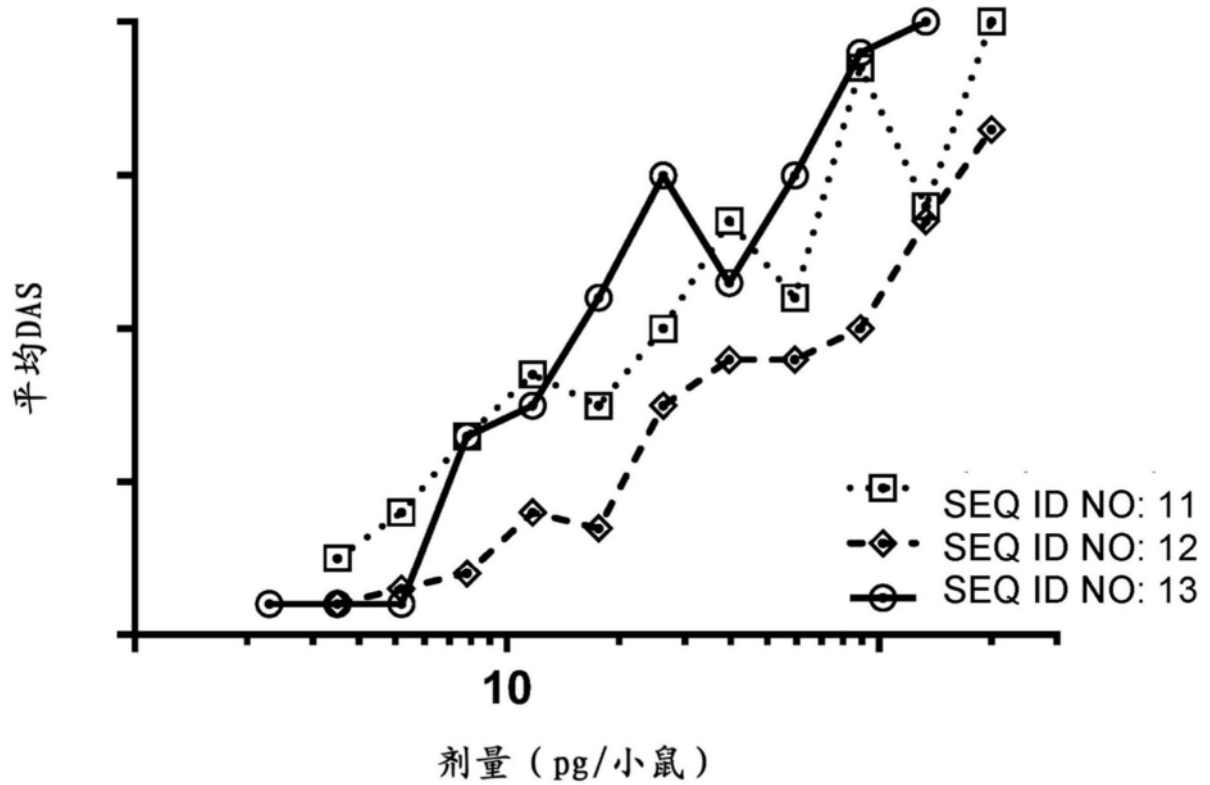


图4

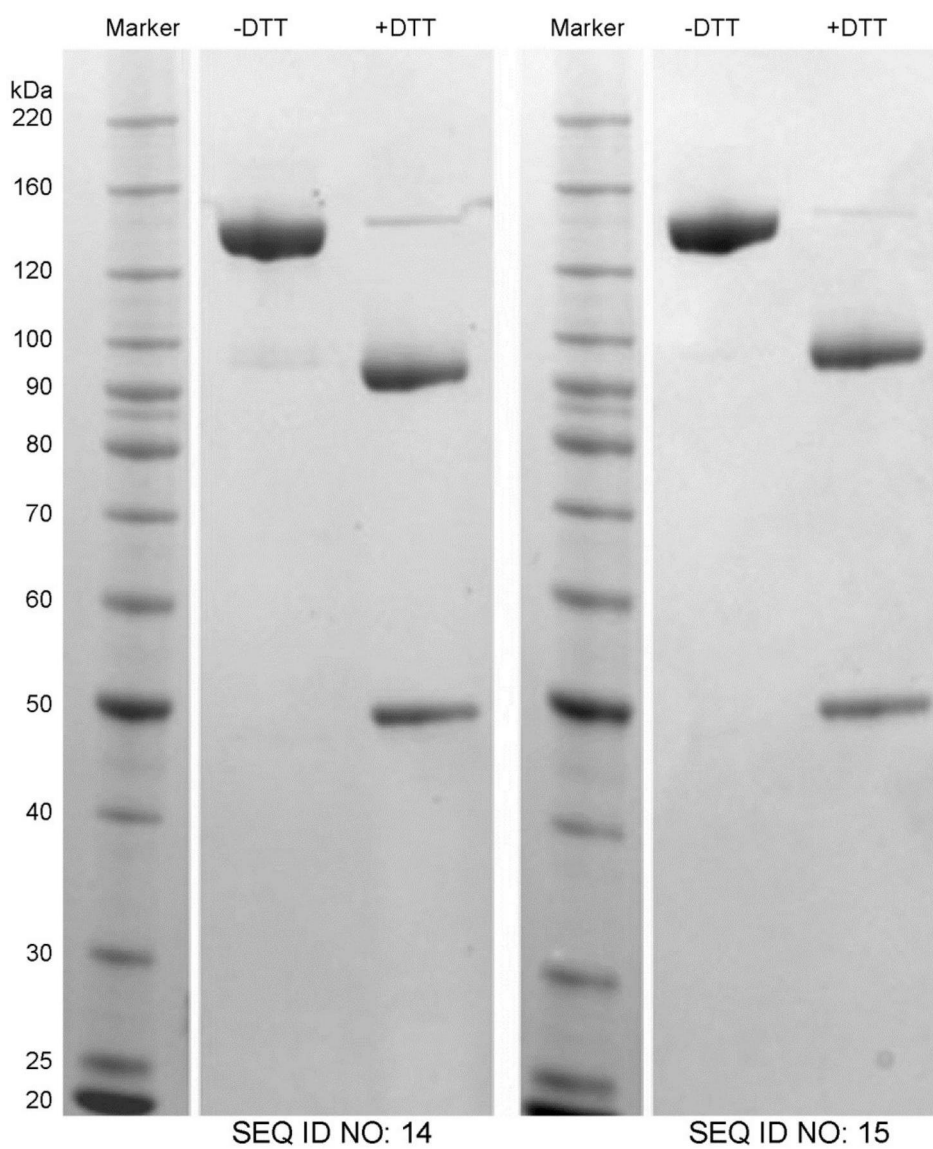


图5

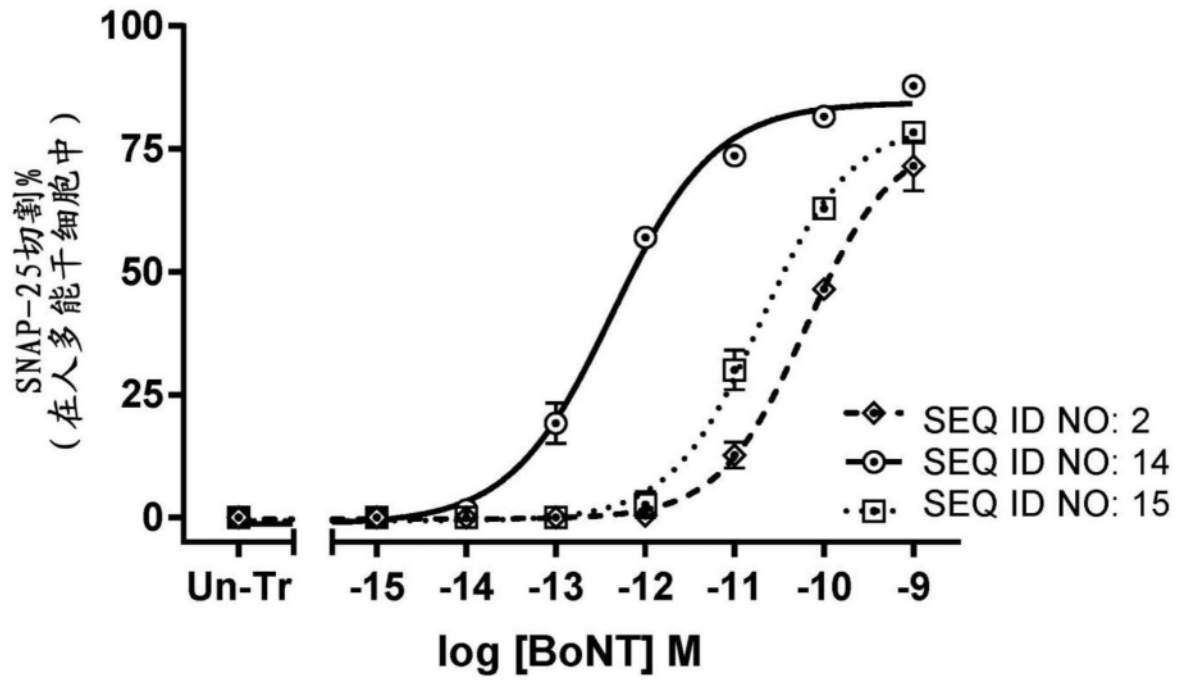


图6

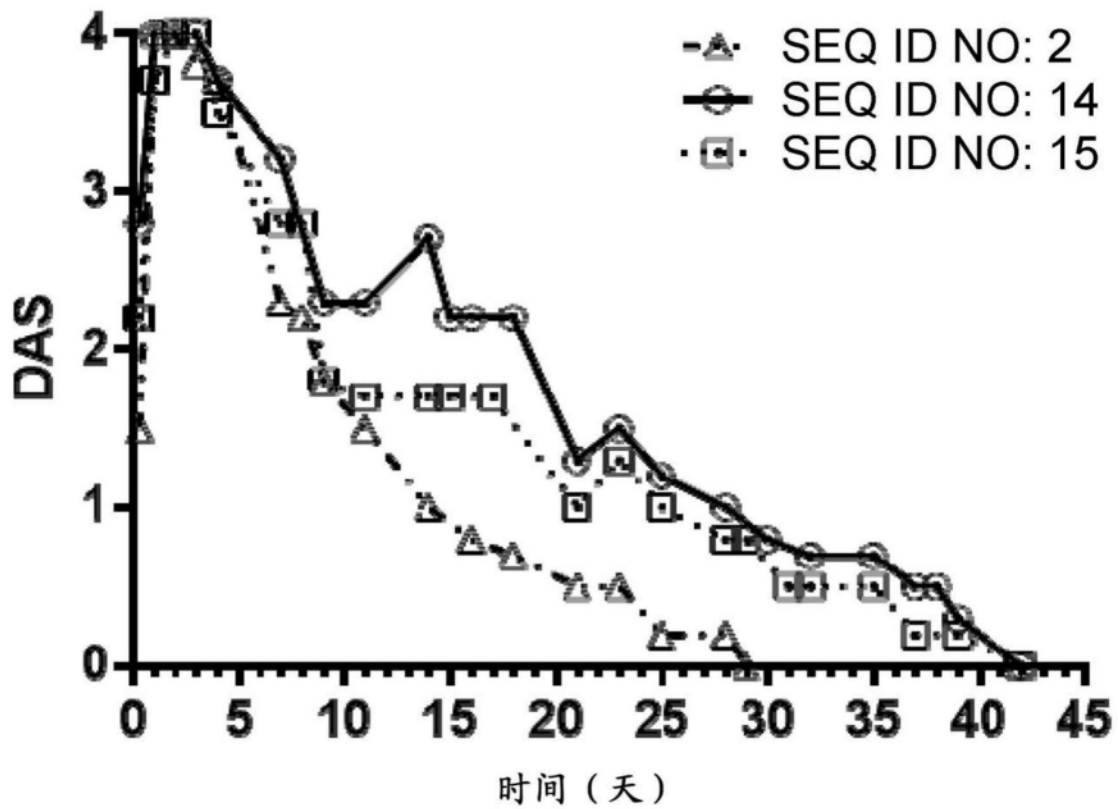
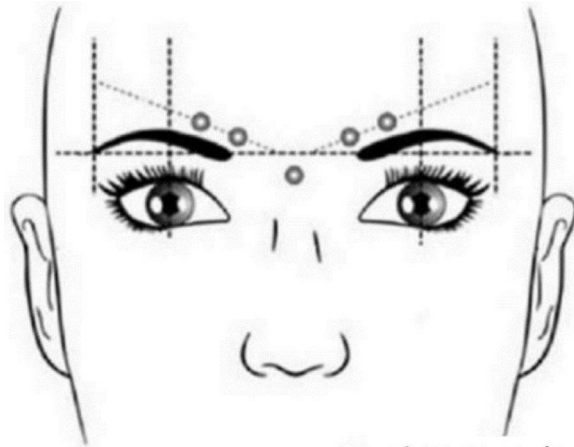
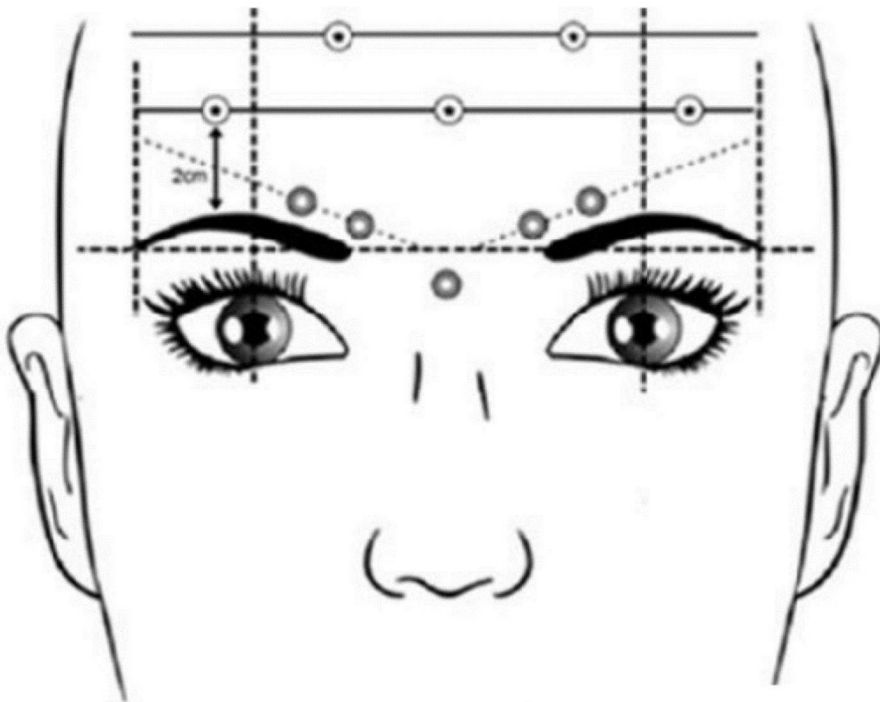


图7



● 眉间纹注射点

图8



● 眉间纹注射点
○ 额头纹注射点

图9

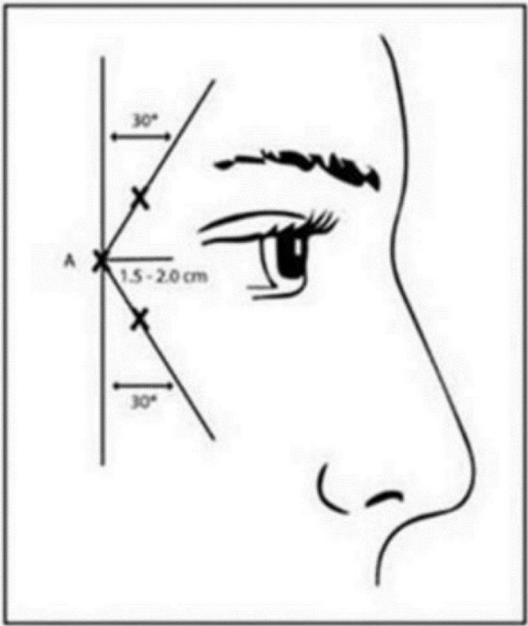


图10

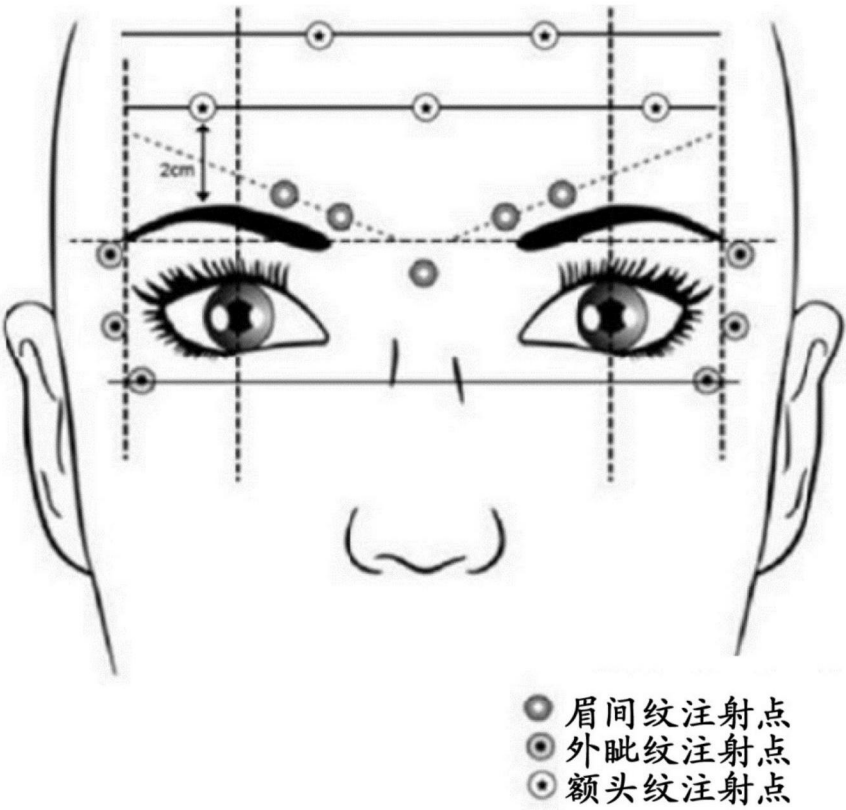


图11