

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-504249
(P2025-504249A)

(43)公表日 令和7年2月6日(2025.2.6)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42		
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02		
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全46頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-547688(P2024-547688)	(71)出願人	507409737		
(86)(22)出願日	令和5年2月14日(2023.2.14)		メルツ・ファルマ・ゲーエムベーハー・		
(85)翻訳文提出日	令和6年10月7日(2024.10.7)		ウント・コー・カーゲーアーアー		
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/053647		ドイツ国 6 0 3 1 8 フランクフルト／		
(87)国際公開番号	WO2023/156389		マイン エッケンハイマー・ラントシュ		
(87)国際公開日	令和5年8月24日(2023.8.24)		トラーセ 1 0 0		
(31)優先権主張番号	22156843.9	(74)代理人	100099759		
(32)優先日	令和4年2月15日(2022.2.15)		弁理士 青木 篤		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	100123582		
(31)優先権主張番号	22183172.0		弁理士 三橋 真二		
(32)優先日	令和4年7月5日(2022.7.5)	(74)代理人	100117019		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士 渡辺 陽一		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ	(74)代理人	100141977		
	最終頁に続く		弁理士 中島 勝		
		(74)代理人	100138210		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 液体ボツリヌス毒素製剤及びその使用

(57)【要約】

本発明は、(i) ボツリヌス毒素；(i i) ヒト血清アルブミン (H S A) ；並びに任意に、(i i i) 等張化剤及び／又は(i v) 緩衝剤；を含む、液体製剤に関する。一態様において、液体製剤は、鉄イオン濃度が極めて低いことを特徴とする。他の一態様において、液体製剤は、トリプトファン及び／又は N - アセチルトリプトファンを含まないか、又はそれらが極めて低濃度であることを特徴とする。本発明によれば、液体製剤は、ヒト血清アルブミンをキレート剤に接触させることによって混合物を得る工程と、混合物からキレート剤を除去する工程とを含む方法により、調製することができる。さらに、本発明は、治療適応症及び美容上の状態の治療における、液体製剤の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) ボツリヌス毒素；及び

(ii) ヒト血清アルブミン；

を含む液体製剤であって、

 Fe^{3+} イオンを $1\ \mu\text{M}$ 未満、好ましくは $500\ \text{nM}$ 未満、より好ましくは $250\ \text{nM}$ 未満の濃度で含む、

液体製剤。

【請求項 2】

(i) ボツリヌス毒素；及び

(ii) ヒト血清アルブミン；

を含む液体製剤であって、

トリプトファン及び N-アセチルトリプトファンを含まないか、又は $50\ \mu\text{M}$ 以下含む、
液体製剤。

【請求項 3】

(i) ボツリヌス毒素；及び

(ii) ヒト血清アルブミン；

を含む液体製剤であって、

(a) ヒト血清アルブミンをキレート剤に接触させることによって、ヒト血清アルブミンと前記キレート剤との混合物を得る工程；及び

(b) 前記キレート剤を前記混合物から除去する工程；

を含む方法によって調製される、

液体製剤。

【請求項 4】

(a) ヒト血清アルブミンをキレート剤に接触させることによって、ヒト血清アルブミンと前記キレート剤との混合物を得る工程；及び

(b) 前記キレート剤を前記混合物から除去する工程；

を含む方法によって調製される、

請求項 1 に記載の液体製剤。

【請求項 5】

工程 (a) において、ヒト血清アルブミン出発材料をキレート剤に接触させることにより、前記ヒト血清アルブミン出発材料と前記キレート剤との混合物を得て；工程 (b) において、前記混合物から前記キレート剤を除去することにより、前処理済ヒト血清アルブミン材料を得て；さらなるステップ (c) において、ボツリヌス毒素を前記前処理済ヒト血清アルブミン材料と混合し；前記キレート剤の除去は、好ましくは透析、濾過、クロスフロー濾過、もしくは限外濾過によって行われる、
あるいは、

工程 (a) において、ボツリヌス毒素とヒト血清アルブミンとを含む液体プレ製剤 (liquid pre-formulation) を前記キレート剤に接触させることにより、前記液体プレ製剤と前記キレート剤との混合物を得て；工程 (b) において、前記混合物から前記キレート剤を除去することにより、前記液体製剤を得て；前記キレート剤の除去は、好ましくは透析、濾過、クロスフロー濾過、もしくは限外濾過によって行われる、
請求項 3 又は 4 に記載の液体製剤。

【請求項 6】

前記ヒト血清アルブミンが前記液体製剤中に $0.001 \sim 1.00\%$ (w/v) の量で存在する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の液体製剤。

【請求項 7】

 Fe^{3+} イオンを $1000\ \text{nM}$ 未満、好ましくは $500\ \text{nM}$ 未満、より好ましくは 25

10

20

30

40

50

0 n M未満の濃度で含む、請求項 2 に記載の液体製剤。

【請求項 8】

前記液体製剤がさらに、

(i i i) 等張化剤

を含む；あるいは、

前記液体製剤がさらに、

(i i i) 等張化剤

を含み、前記等張化剤が前記液体製剤中に 0 . 0 1 ~ 2 . 0 % (w / v) の量で存在するか、前記等張化剤が塩化ナトリウムであるか、又は、前記等張化剤が塩化ナトリウムであって、かつ前記液体製剤中に 0 . 0 1 ~ 2 . 0 % (w / v) の量で存在する；

10

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の液体製剤。

【請求項 9】

前記液体製剤がさらに、

(i v) 緩衝剤

を含む；あるいは、

前記液体製剤がさらに、

(i v) 緩衝剤

を含み、前記緩衝剤が前記液体製剤中に 1 ~ 1 0 0 m M の濃度で存在するか、前記緩衝剤がアミノ酸、リン酸塩、もしくはそれらの混合物であるか、前記緩衝剤がヒスチジンであるか、又は、前記緩衝剤がヒスチジン、リン酸塩、もしくはそれらの混合物であって、かつ前記ヒスチジン及びリン酸塩が前記液体製剤中に 1 ~ 1 0 0 m M の濃度で存在する；

20

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の液体製剤。

【請求項 1 0】

－ ヒト血清アルブミン出発材料を精製することにより、精製ヒト血清アルブミン材料を得る工程；

－ 前記得られた精製ヒト血清アルブミンを、ボツリヌス毒素、及び任意にさらなる成分と混合することにより、前記液体製剤を得る工程；

あるいは、

－ ボツリヌス毒素とヒト血清アルブミンとを含む液体組成物を精製することにより、精製液体組成物を得る工程；

30

－ 前記得られた精製液体組成物をさらなる成分と混合することにより、前記液体製剤を得る工程；

を含み、

前記精製工程が、好ましくは、前記ヒト血清アルブミン出発材料に対して、又はボツリヌス毒素とヒト血清アルブミンとを含む前記液体組成物に対して、透析、透析濾過、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、フィールド・フロー・フラクショネーション、又は沈殿法（例えば塩析又はエタノール沈殿など）を行うことによって実施される、

請求項 2 もしくは 7 に記載の、又は請求項 2 に従属する限りにおいて請求項 8 及び 9 のいずれか 1 項に記載の、液体製剤を調製するための方法。

40

【請求項 1 1】

前記精製工程が以下のように実施されるか、又は前記精製工程がさらに以下の工程を含み：

－ ヒト血清アルブミン出発材料をキレート剤に接触させることにより、前記ヒト血清アルブミン出発材料と前記キレート剤との混合物を得る工程；及び、

－ 前記混合物から前記キレート剤を除去することにより、キレート剤処理済精製ヒト血清アルブミン材料を得る工程；

あるいは、

－ ボツリヌス毒素とヒト血清アルブミンとを含む液体組成物を前記キレート剤に接触させることにより、前記液体組成物と前記キレート剤との混合物を得る工程；及び、

50

ー 前記混合物から前記キレート剤を除去することにより、キレート剤処理済精製液体製剤を得る工程；

方法（i）及び（ii）における前記接触工程が、好ましくは混合物中の前記キレート剤の濃度が1 mM～500 mMであるように行われ、及び／又は、前記キレート剤の前記除去が透析、クロスフロー濾過、もしくは限外濾過によって行われる、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記キレート剤が、3～6個のカルボン酸官能基を有するアミノポリカルボン酸、クエン酸塩、ポリフィリン、N，N，N'，N'-テトラキス（2-ピリジニルメチル）-1，2-エタンジアミン（TPEN）、トリエチレンテトラミン（TETA）、及びこれらの混合物からなる群から選択され、

好ましくは、前記キレート剤が、一般式（I）：



のアミノポリカルボン酸であり、式中、Rはカルボン酸基を含まないか、又は、1もしくは2個のカルボン酸基を含み、前記アミノポリカルボン酸は好ましくはエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、エチレングリコールビス（b-アミノエチルエーテル）-N，N，N'，N'-四酢酸（EGTA）、1，2-ビス（o-アミノフェノキシ）エタン-N，N，N'，N'-四酢酸（BAPTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、トリエチレンテトラミン六酢酸（TTHA）、及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項3～6、8、及び9のいずれか1項に記載の液体製剤、又は請求項10もしくは11に記載の方法。

【請求項13】

前記ボツリヌス毒素がボツリヌス神経毒素複合体であるか、前記ボツリヌス毒素が複合化タンパク質を含まないボツリヌス神経毒素であるか、前記ボツリヌス毒素が血清型Aのものであるか、前記ボツリヌス毒素が複合化タンパク質を含まない血清型Aのボツリヌス神経毒素であるか、前記ボツリヌス毒素が血清型Aのものであって、1～1000 U/mlの濃度で存在するか、前記ボツリヌス毒素が複合化タンパク質を含まない血清型Aのボツリヌス神経毒素であって、1～1000 U/mlの濃度で存在するか、又は、前記液体製剤のpHが5.0～8.0の範囲内である、請求項1～9及び12のいずれか1項に記載の液体製剤、又は請求項10もしくは11に記載の方法。

【請求項14】

治療における使用のための、特に神経筋疾患、疼痛、流涎症、多汗症、泌尿器障害、及び神経障害の治療における使用のための、請求項1～9、12、及び13のいずれか1項に記載の液体製剤。

【請求項15】

美容上の状態の治療のための、請求項1～9、12、及び13のいずれか1項に記載の液体製剤の美容的使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、（i）ボツリヌス毒素；（ii）ヒト血清アルブミン（HSA）；並びに任意に、（iii）等張化剤及び／又は（iv）緩衝剤；を含む、液体製剤に関する。液体製剤は、鉄濃度が極めて低いこと、並びに／又は、トリプトファン及び／もしくはN-アセチルトリプトファンを含まないか、あるいはそれらが極めて低い濃度であることを特徴とする。本発明はまた、ヒト血清アルブミンをキレート剤に接触させることによって混合物を得る工程と、混合物からキレート剤を除去する工程とを含む方法によって調製される、液体製剤に関する。さらに、本発明は、治療適応症及び美容上の状態の治療における、液体製剤の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ボツリヌス神経毒（B o N T；又はボツリヌス毒素（B T））は細菌性神経毒の一種であり、神経学的な、医療上の、及び美容上の各種状態の治療に広範に使用されるようになってきている。広く認められている「古典的」B o N T血清型が8種存在しており、それらはB o N T／A～Hと呼ばれている。現在、A型（B o N T／A）及びB型（B o N T／B）という2種類の血清型が臨床的に使用されている。B o N Tは、クロストリジウム属（C l o s t r i d i u m）の種、特にボツリヌス菌（C l o s t r i d i u m b o t u l i n u m）によって、高分子量（約900kDaまで）の複合体の形で産生される。これらの毒素複合体は、活性な150kDaの神経毒と、いくつかの複合化タンパク質（非毒性神経毒関連タンパク質、N A P）とから構成されている。

10

【0003】

150kDaの神経毒は不活性な一本鎖ポリペプチド（約150kDa）として合成され、タンパク質分解によって切断されて、軽鎖（L C、約50kDa）及び重鎖（H C、約100kDa）が鎖間ジスルフィド結合で接続された状態になる。H Cは、受容体への結合を媒介するC末端ドメインと、エンドソーム膜を横切るL Cの移動を媒介するN末端ドメインとを含む。L Cはニューロン内でプロテアーゼとして働き、ニューロンのS N A R Eタンパク質を切断する。これによりシナプス小胞と原形質膜との融合が阻害され、特定のニューロンからの神経伝達物質の放出が抑制される。

【0004】

B o N Tの製剤化は、その構造が複雑であること、そして使用される製品濃度が低いことから、非常に困難である。B o N Tは、熱及びアルカリ性pHなど、様々な条件の影響を非常に受けやすい。したがって、B o N Tは、その構造が完全である場合にのみ機能的であるため、B o N Tの医療用剤形の調製に関する課題は、製品の製造、保存、又は使用中における生物活性の不活化又は部分的喪失からB o N Tを保護する組成物を処方することである。もう1つの問題は、B o N Tの医薬製剤が、強力な毒素（ヒト致死量は約0.1～1ng／kg）を、1バイアルあたりわずか約1ngという範囲で極めて少量含むということである。これは、表面変性による毒素活性の喪失という問題をさらに悪化させる。さらに、B o N Tの製剤は広範な各種用途に用いられるため、筋肉、皮膚の各層（真皮、皮下組織など）、又は腺（例えば、唾液腺）のような、大きく異なった種類の組織への注射に適合する必要がある。

20

30

【0005】

以上の観点から、現在入手可能な主なB o N T製品は、凍結乾燥粉末として、すなわち、2～8℃、又は室温で保存する場合であっても長期間安定な形態で、提供されている（例えば、X e o m i n（登録商標））。B o N T／A複合体の凍結乾燥形態は、1989年（B o t o x（登録商標）、A l l e r g a n）及び1991年（D y s p o r t（登録商標）、I p s e n）に初めて市場に導入された。2005年には、複合化タンパク質を含まない純粋な150kDaのB o N T／A神経毒の最初の安定した剤形が承認された（X e o m i n（登録商標）；M e r z P h a r m a c e u t i c a l s社）。しかし、これらの凍結乾燥製品は使用前に再構成する必要があり、この工程は投与ミス及び無菌性の問題をもたらす可能性がある。そのため、使用時の簡便性に優れ、容易に投与することができるB o N Tの液体製剤の開発に、大きな努力が払われてきた。

40

【0006】

B o N Tの最初の液体製剤は2000年に承認され、2001年に欧州においてN e u r o b l o c（登録商標）として発売された。N e u r o b l o c（登録商標）（エーザイ）は、コハク酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、ヒト血清アルブミン（H S A）、カプリル酸ナトリウム、及びN－アセチルトリプトファンナトリウムを含む緩衝液中にB o N T／B複合体を配合した、無菌溶液である。しかし、この製品は酸性のpHのため、注射された際に痛みを伴うことがある。B o N T／Aについては、これまでに2種類の液体製剤しか販売が承認されていない：アジア国内市場（例えば韓国、2013年に承認）限定のI n n o t o x（登録商標）（M e d y t o x）、及び2021年に欧州での使用が承

50

認められた Alluzience（登録商標）（Ipsen / Galderma）。これらの液体製剤はいずれも、BoNT/A毒素複合体に加えて、水、塩化ナトリウム、界面活性剤（Innotox（登録商標）：ポリソルベート20；Alluzience（登録商標）：ポリソルベート80）、アミノ酸（Innotox（登録商標）：メチオニン；Alluzience（登録商標）：ヒスチジン）、及び賦形剤（Innotox（登録商標）：緩衝剤としてリン酸ナトリウム；Alluzience（登録商標）：スクロース）を含む。

【0007】

液体ボツリヌス毒素製剤の調製におけるこれらの進歩にも関わらず、ボツリヌス毒素の安定した液体製剤に対するニーズが現在も存在し続けており、特に、輸送及び保存中に安定で、すぐに使用できる、ボツリヌス毒素の液体製剤を開発するための新たな選択肢に対する需要が依然として存在している。

10

【0008】

発明の目的

したがって、本発明は、美容及び治療用途における使用に好適な、ボツリヌス毒素の安定な液体製剤を提供することを目的とする。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、EDTAなどのキレート剤とともにインキュベートし、その後キレート剤を除去することによって前処理を行ったヒト血清アルブミン（HSA）が、優れた保存安定性だけでなく、改善された優れた光安定性をも示すボツリヌス毒素の液体製剤の調製を可能にするという、驚くべき発見に基づくものである。さらに、本発明は、鉄イオン、特に Fe^{3+} イオンが、HSAを含む液体ボツリヌス毒素製剤の光安定性に対して悪影響を及ぼすという、驚くべき発見に基づくものである。

20

【0010】

さらに、本発明は、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンが、ヒト血清アルブミン（HSA）を含む液体ボツリヌス毒素製剤の光安定性を低下させるという、驚くべき発見に基づいている。この発見はまさに驚くべきことである。なぜなら、市販のHSA製品には、水及び塩化ナトリウムに加えて、高温でHSAを安定化させるためのカプリル酸ナトリウム及びN-アセチルトリプトファンが通常含まれており、これによってボツリヌス毒素製剤への混入が起こるからである。それに加えて驚くべきことは、トリプトファンがボツリヌス毒素の安定化添加剤として記載されていることである（例えば、欧州特許第3679946号明細書を参照のこと）。

30

【0011】

すなわち、第1の態様において、本発明は、

(i) ボツリヌス毒素；及び

(ii) ヒト血清アルブミン（HSA）；

を含む液体製剤であって、

Fe^{3+} イオンを $1\mu M$ 未満、好ましくは 500 nM 未満、より好ましくは 250 nM 未満、最も好ましくは 100 nM 未満の濃度で含む、液体製剤を提供する。

40

【0012】

Fe^{3+} 濃度が $1\mu M$ 未満などの低さである液体ボツリヌス毒素製剤は、(a) ヒト血清アルブミンをキレート剤に接触させることによって、ヒト血清アルブミンと前記キレート剤との混合物を得る工程；及び、(b) 前記キレート剤を前記混合物から除去する工程；を含む方法によって調製することができる。

【0013】

第2の態様において、本発明は、

(i) ボツリヌス毒素；及び

(ii) ヒト血清アルブミン（HSA）；

50

を含む液体製剤であって、

前記液体製剤が、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又はトリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを $50\text{ }\mu\text{M}$ 以下、好ましくは $20\text{ }\mu\text{M}$ 以下、より好ましくは $10\text{ }\mu\text{M}$ 以下、さらに好ましくは $1\text{ }\mu\text{M}$ 以下、最も好ましくは $0\text{ }\mu\text{M}$ (Trp及びN-AcTrp両者の合計濃度) 含む、液体製剤を提供する。

【0014】

本発明の第1及び第2の態様による液体製剤は、好ましくは、(iii)等張化剤、特に塩化ナトリウム；及び、(iv)緩衝剤、特にヒスチジン緩衝剤、リン酸緩衝剤、又はそれらの混合物；をさらに含む。トリプトファン及び／又はN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は極めて低濃度しか含まない液体ボツリヌス毒素製剤は、HSA出発材料を透析などの方法により精製し、精製したHSA材料を本発明の液体製剤の製剤化において使用することにより、調製することができる。

10

【0015】

第3の態様において、本発明は、

(i)ボツリヌス毒素；及び

(ii)ヒト血清アルブミン(HSA)；

を含む液体製剤であって、

前記ヒト血清アルブミンが、

(a)ヒト血清アルブミンをキレート剤に接触させることによって、ヒト血清アルブミンと前記キレート剤との混合物を得る工程；及び

20

(b)前記キレート剤を前記混合物から除去する工程；

を含む方法によって調製される、

液体製剤を提供する。

【0016】

接触工程(a)は好ましくは、HSAを含む組成物(例えば、HSA溶液)にキレート剤(例えば、EDTA)を加え、得られた混合物を所定時間インキュベートし、その後任意に、キレート剤(例えば、EDTA)を含む緩衝液に対して透析することによって行われる。工程(b)では、キレート剤を任意の適切な方法、例えば透析によって除去する。

【0017】

さらに、本発明の第3の態様による液体製剤は、好ましくは、(iii)等張化剤、特に塩化ナトリウム；及び／又は、(vi)緩衝剤、特にヒスチジン緩衝剤、リン酸緩衝剤、又はそれらの混合物；をさらに含む。

30

【0018】

第4の態様において、本発明は、本発明の第2の態様による液体製剤を調製するための方法に関し、方法は、

－ヒト血清アルブミン出発材料に対して、透析、透析濾過、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、又はフィールド・フロー・フラクショネーション、好ましくは透析を行うことによって前記ヒト血清アルブミン出発材料を精製することで、精製ヒト血清アルブミン材料を得る工程；

40

－得られた精製ヒト血清アルブミンを、ボツリヌス毒素、及び任意にさらなる成分と混合することにより、液体製剤を得る工程；を含む。

【0019】

本発明の第4の態様による別の方法は、

－ボツリヌス毒素とヒト血清アルブミンとを含む液体組成物に対して、透析、透析濾過、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、又はフィールド・フロー・フラクショネーション、好ましくは透析を行うことによって、ボツリヌス毒素とヒト血清アルブミンとを含む前記液

50

体組成物を精製する工程；

－ 得られた精製液体組成物をさらなる成分と混合することにより、前記液体製剤を得る工程；
を含む。

【0020】

第5の態様において、本発明は、治療における使用のための、特に神経筋疾患、疼痛、流涎症、多汗症、泌尿器障害、及び神経障害の治療における使用のための、本発明の液体製剤に関する。

【0021】

第6の態様において、本発明は、美容上の状態、好ましくは皮膚状態、特に皮膚の細シワ、皺、又はシワの治療のための、本発明の液体製剤の美容的（審美的）使用に関する。

【0022】

第7の局面において、本発明は、有効量の本発明の液体製剤を、それを必要とする個人に投与することを含む、疾患又は状態を治療する方法を提供する。

【0023】

本発明による、液体製剤、その使用、及び使用方法の好ましい実施形態を、添付の特許請求の範囲に記載する。

【0024】

以下の発明の詳細な説明、及びそこに含まれる実施例を参照することにより、本発明がより容易に理解されるであろう。

【発明を実施するための形態】

【0025】

本発明は、液体ボツリヌス毒素製剤の製剤化において前処理済ヒト血清アルブミン（HSA）を使用することによって、光感受性が減少し、結果として光安定性が改善されるという、予期せぬ発見に基づくものである。さらには予想外にも、キレート剤処理に続き透析を行った後の、極めて少量の鉄イオン（ Fe^{3+} イオン）が、ヒト血清アルブミン（HSA）を含む液体ボツリヌス毒素製剤の光感受性を劇的に増加させることが見いだされた。これは驚くべきことである。なぜなら、鉄は比較的一般的で遍在する金属であり、さらに、銅、コバルト、又はニッケルなどの他の金属イオンは、このような不安定化作用を示さないことが判明したからである。

【0026】

さらに、本発明は、トリプトファン及び／又はN-アセチルトリプトファンが、ヒト血清アルブミン（HSA）含有液体ボツリヌス毒素製剤の光安定性を損なうという、予期せぬ発見に基づくものである。特に、キレート剤処理とその後の透析によって従来のHSA製品からN-アセチルトリプトファンを除去することで、光安定性が改善されたボツリヌス毒素の液体HSA含有製剤が得られることが判明した。

【0027】

本発明の液体製剤は、注射前に再構成する必要がなく、すぐに使用でき、また、プレフィルドシリンジなどの形態で使用できるため、粉末形態の凍結乾燥ボツリヌス毒素製剤と比較して、安全性及び投薬精度が有利に提供される。さらに、液体製剤の優れた安定性により、輸送及び保存、並びに医師による取り扱いが容易になり、簡略化される。特に、本発明の液体製剤の優れた光安定性により、製造工程が簡略化され、製品の充填及び包装の際に大規模な光からの保護が不要となり、また、使用前に、医師の環境下で保存中に光に曝露された場合に、活性が失われる可能性も減少する。さらに、本発明の液体製剤は注射の痛みを強める物質を含まないため、特に審美分野において、医師及び患者が製剤を受け入れ易くなる。

【0028】

理論に拘束されるものではないが、本発明の製剤の光感受性は、液体ボツリヌス毒素製剤の調製に使用されるHSAに含まれる、N-アセチルトリプトファン及び Fe^{3+} などの物質に関連すると考えられる。しかし、ボツリヌス毒素を光に対して安定化させるHS

10

20

30

40

50

Aの能力が、これらの物質を除去することによってどのように高まるのかについて、正確なメカニズムは未だ不明である。

【0029】

本明細書で使用される「含む (comprising)」という用語、そして同様に、「含む (including)」及び「含む (containing)」という用語や、「含む (comprise)」、「含む (include)」及び「含む (contain)」などのそれらのいずれの変形も、非排他的な包含を指すことを意図しており、ある要素又は要素のリストを含む (comprise)、含む (include)、又は含む (contain) プロセス、方法、プロダクトバイプロセス (product-by-process)、組成物、又は製剤は、それらの要素のみを含むのではなく、そのようなプロセス、方法、プロダクトバイプロセス、組成物、又は製剤に対して明示的に列挙されていない他の要素も含み得る。加えて、本発明の枠組みにおいては、「含む (comprise)」、「含む (comprising)」、「含む (include)」、「含む (including)」、「含む (contain)」、「含む (containing)」、及びそれらのいずれの変形も、示された要素の排他的な包含を指すと理解される「からなる (consist)」、「からなる (consisting)」、又はそれらのいずれかの変形 (例えば「から本質的になる (consist essentially of)」) で置き換えてもよいということが意図される。

10

【0030】

本発明の文脈で使用される「a」、「an」、及び「the」という用語、並びに類似の言及は、単数及び複数の両方を包含するように解釈され、したがって、本明細書で特に指示されない限り、又は文脈と明らかに矛盾しない限り、「少なくとも1つ」又は「1つより多い」ということに関連する場合がある。

20

【0031】

本明細書で使用される「液体製剤」又は「液体ボツリヌス毒素製剤」という用語は、一般に水性製剤のことを指し、典型的には水溶液のことである。ここで、「液体製剤」という用語は、「液体組成物」と互換的に使用される場合がある。上記液体製剤は一般に、薬学的に許容される液体製剤、すなわち液体医薬製剤である。本発明の液体製剤は、典型的には5.0～8.0の範囲、特に5.5～7.5の範囲、好ましくは5.5～7.0又は6.0～7.5の範囲、より好ましくは6.0～7.0の範囲、最も好ましくは6.0～6.5の範囲のpHを有する。

30

【0032】

本明細書で使用される「薬学的に許容される」という用語は、ヒトの患者又は対象に投与した場合に、液体製剤が、許容できない有害な副作用を引き起こさないことを意味する。すなわち、液体製剤がヒトへの使用に適していることを意味する。上記水溶液は、食塩水を用いた、又は用いない、緩衝液であってよく、緩衝 (例えば、リン酸及び／又はヒスチジン緩衝) 生理食塩水などの生理食塩水であってもよい。

【0033】

本明細書においては、本発明の液体製剤が、任意の適切な容器システム内に保存できることを企図している。本発明の液体製剤を保存するのに好適な容器システムは、密封することができるか、又は密封されており、液体を収容、保存、及び／又は輸送するのに使用可能な、部分的又は全体的に囲まれた空間を有する任意の装置である。容器システムは、好ましくは、ガラスもしくはプラスチック (有機ポリマーなど) 製の、又は部分的に、もしくは大部分がガラスもしくはプラスチック製の、閉じられた (又は密封された) 容器であり、例として、(i) シリンジ、(ii) バイアル、(iii) カルプーレ、又は(iv) アンプル、の形態の容器が挙げられる。本発明の好ましい一実施形態において、液体製剤は、当該分野で知られているように、プレフィルドシリンジの形態でシリンジに保存される。

40

【0034】

本明細書で使用される「ボツリヌス毒素」という用語は特に限定されるものではなく、

50

例として任意の血清型のボツリヌス毒素（例えば、B o N T / A ~ G）が挙げられる。例えば、ボツリヌス毒素は、血清型 A 又は B のボツリヌス毒素（B o N T / A、B o N T / B）であってよい。好ましくは、ボツリヌス毒素は、血清型 A、より好ましくは血清型 A 1（B o N T / A 1）であり、最も好ましくは、ボツリヌス菌 H a l l 株によって産生される B o N T / A 1 である。さらに、ボツリヌス毒素は、細菌であるボツリヌス菌から得られる天然の神経毒であってもよいし、組換え技術、及び遺伝的又は化学的修飾などによって代替的な供給源から得られるボツリヌス毒素などの、他の任意のボツリヌス毒素であってもよい。

【0035】

さらに、本明細書で使用される「ボツリヌス毒素」（「B T」）という用語、及びその同義語として使用される「ボツリヌス神経毒」（「B o N T」）は、特に断りのない限り、又は文脈による別段の指示がない限り、純粋なボツリヌス神経毒、及び／又はその任意の複合体、すなわち、純粋なボツリヌス神経毒と複合化タンパク質との任意の複合体（「毒素複合体」と呼ぶ）、を指すことが意図される。好ましくは、本発明の枠組みにおいて、ボツリヌス毒素は、複合化タンパク質を含まないボツリヌス神経毒であり、より好ましくは、複合化タンパク質を含まない血清型 A のボツリヌス神経毒である。

【0036】

本明細書で使用される「純粋なボツリヌス神経毒」という用語は、複合化タンパク質を含まないボツリヌス神経毒（「神経毒成分」とも呼ばれることがある）、より正確には、神経毒関連複合化タンパク質（N A P）を含まないボツリヌス神経毒のことを意味する。純粋なボツリヌス神経毒は、最終的にアセチルコリン放出を阻害する、（活性な）神経毒性ポリペプチドである。これは、ジスルフィド結合によって互いに結合した軽鎖（L C；約 50 k D a）と重鎖（H C；約 100 k D a）とを有する、二本鎖タンパク質である。したがって、活性な神経毒性ポリペプチドは、本明細書において、「150 k D a 神経毒」、「ボツリヌス菌神経毒（150 k D）」、又は「神経毒成分」とも呼ばれる場合がある。

【0037】

本明細書で使用する「毒素複合体」という用語は、神経毒成分と、一組の複合化タンパク質（N A P）との、高分子複合体のことを指す。特に、「毒素複合体」という用語には、900 k D a、500 k D a、及び 300 k D a のボツリヌス菌 A 型毒素複合体が含まれる。複合化タンパク質は、無毒性非ヘマグルチニン（N T N H A）と、血清型 A ~ D の株においては、各種ヘマグルチニン（H A）である。例えば、オナボツリヌス毒素 A（B o t o x（登録商標）／V i s t a b e l（登録商標）、A l l e r g a n 社、米国カリフォルニア州アーバイン）には、上記の 900 k D a 複合体が含まれている。また、D y s p o r t（登録商標）（A z z a l u r e（登録商標）、I p s e n、パリ、フランス）、A l l u z i e n c e（登録商標）（I p s e n／G a l d e r m a）、及び I n n o t o x（登録商標）（M e d y t o x）には、活性薬剤としての毒素複合体が含まれている。すなわち、B o t o x（登録商標）、D y s p o r t（登録商標）、A l l u z i e n c e（登録商標）、及び I n n o t o x（登録商標）に含まれる毒素複合体は、本発明の意味における毒素複合体であり、したがって、本発明による「ボツリヌス毒素」である。本発明によれば、ボツリヌス毒素は、本発明の液体製剤中に 1 ~ 1000 U / m l の範囲、好ましくは 10 ~ 200 U / m l の範囲、より好ましくは 20 ~ 150 U / m l の範囲、最も好ましくは 50 U / m l ~ 100 U / m l の範囲で存在してもよい。

【0038】

本明細書で使用される「単位」又は「U」という用語は、毒素の生物活性（生物学的効力）のことを指し、試験したマウスの 50 % に対して致死的な用量（L D 50）に関連する。より具体的には、本発明の文脈において、L D 50 は、特に断りのない限り、マウスバイオアッセイ（M B A）を用いて測定される。M B A では、毒素／神経毒をマウスに腹腔内注射した後の平均致死量（L D 50）、すなわちマウスの一群のうち 50 % を死亡させ得る毒素／神経毒の量を決定する。これに基づき、本明細書で使用される毒素／神経毒

10

20

30

40

50

の1単位(U)を、1マウスLD₅₀ (1.0 LD₅₀ = 1.0 U)と定義する。

【0039】

LD₅₀マウスバイオアッセイは、ボツリヌス毒素の様々な生物学的、化学的、又は免疫学的検出方法の中でもゴールド・スタンダードであり、当業者に公知である(例えば、Pearce, L. B.; Borodic, G. E.; First, E. R.; MacCallum, R. D. Measurement of botulinum toxin activity: Evaluation of the lethality assay. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1994, 128:69-77を参照のこと)。当業者であれば、血清型及び使用目的に応じて適切なボツリヌス毒素濃度を決定できるであろう。あるいは、国際公開第2009/114748号パンフレット、国際公開第2013/049508号パンフレット、又は国際公開第2014/207109号パンフレットに記載されているように、細胞ベースのアッセイを使用してボツリヌス毒素活性を測定することもできる。当業者であれば、細胞ベースのアッセイの結果得られたボツリヌス毒素活性を、LD₅₀標準試料を用いた校正によって、マウスLD₅₀アッセイで得られる結果と相関させることができるであろう。

10

【0040】

市販のボツリヌス毒素製剤の製造業者が使用するLD₅₀試験は互いに異なっているため、市販のボツリヌス毒素製剤の製造業者が示す単位効力はそれぞれ独自のものであり、容易に比較することはできない。したがって、本発明の枠組みにおいては、インコボツリヌス毒素A(「INCO」; Xeomin(登録商標)、Bocouture(登録商標); 複合化タンパク質を含まないボツリヌス毒素血清型A; Merz Pharmaceuticals社)、オナボツリヌス毒素A(「ONA」; Botox(登録商標)、Vistabel(登録商標); 血清型Aのボツリヌス毒素複合体; Allergan社)、アボボツリヌス毒素A(「ABO」; Dysport(登録商標)、Azzalure(登録商標); 血清型Aのボツリヌス毒素複合体; Medicis Pharmaceutical社、Galderma Lab社)、リマボツリヌス毒素B(「RIM」; Myobloc(登録商標)、NeuroBloc(登録商標); ボツリヌス毒素血清型B; Solstice Neurosciences社)、及びPurTox(登録商標)(「TBD」; ボツリヌス毒素血清型A; Mentor Worldwide社)の相対効力を、以下に提供する換算率を用いて確定する。本明細書で使用されるONAとINCOの換算率は、1:1である。ONA/INCO:ABOの換算率は、1:2.5である。ONA/INCO:RIMの換算率は、1:50であり、ONA/INCO:TBDの換算率は、1:1.5である。さらに、本発明の文脈において、1UのINCO(Xeomin(登録商標))及び1Uのオナボツリヌス毒素A(「ONA」; Botox(登録商標))は、上記のように測定された1マウスLD₅₀ (1.0 LD₅₀)、すなわち1Uに相当するとみなされるものとする。

20

30

【0041】

本明細書で使用される「ヒト血清アルブミン」という用語、又はその略語である「HSA」は、ドナーHSA(ヒト血液由来、又はより正確にはヒト血漿由来のHSA)及び組換えHSAを指すことが意図される。好ましくは、ヒト血清アルブミンはドナーHSAである。本発明においては、ヒト血清アルブミン(HSA)は安定化タンパク質として作用する。本明細書で使用される「安定化タンパク質」という用語は、一般に、ボツリヌス毒素の安定性の増加をもたらすポリペプチドのことを指す。本発明によれば、HSAは、液体製剤中に、0.001~2.0%(w/v)の量で、好ましくは0.001~1.00%(w/v)の量で、より好ましくは0.01~0.5%(w/v)の量で、さらに好ましくは0.02~0.3%(w/v)の量で、最も好ましくは0.03~0.15%(w/v)の量で、存在してもよい。

40

【0042】

第1の態様において、本発明は、

50

(i) ボツリヌス毒素；及び

(ii) ヒト血清アルブミン；

を含む液体製剤であって、

Fe^{3+} イオンを $1 \mu\text{M}$ 未満の濃度で含む、
液体製剤に関する。

【0043】

好ましくは、液体製剤中の Fe^{3+} 濃度は、 1000 nM 未満、 750 nM 未満、 500 nM 未満、又は 250 nM 未満であり、より好ましくは、液体製剤中の Fe^{3+} 濃度は、 200 nM 未満、 150 nM 未満、又は 100 nM 未満であり、特に好ましくは、液体製剤中の Fe^{3+} 濃度は、 50 nM 未満又は 10 nM 未満であり、最も好ましくは、液体製剤中の Fe^{3+} 濃度は、 1 nM 未満、 100 pM 未満、 10 pM 未満、又は 1 pM 未満である。

10

【0044】

金属イオン（例えば、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、又は Fe^{3+} ）の濃度は、原子吸光分光法（AAS）、誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）、及び誘導結合プラズマ原子発光分光法（ICP-AES）（誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-OES）とも呼ばれる）などの、当業者に公知の測定方法によって決定することができる。好ましくは、ICP-MS 又は ICP-OES、特に ICP-OES を用いて、金属イオンの濃度を測定してよい（USP 38-NF 33 の第 2 補遺、化学試験／<233> 元素不純物－手順 1（ICP-OES）及び手順 2（ICP-MS）、2015 も参照のこと）。

20

【0045】

理論によって限定されるものではないが、本発明の液体製剤を調製するために使用される HSA 材料、特に鉄イオンを多量に含むヒト血液由来のドナー HSA は、未精製（未処理）HSA の光感受性誘導特性の少なくとも部分的な原因となる、 Fe^{3+} イオンを相当量含むと考えられる。

【0046】

上述した利点に加えて、本発明のこの態様は、製造プロセス及び新規製剤の開発においても有利である。例えば、機器（容器など）及び材料（賦形剤など）を、最終産物に鉄が可能な限り含まれないように選択することができる。

30

【0047】

Fe^{3+} 濃度が低い本発明の液体ボツリヌス毒素製剤は、(a) ヒト血清アルブミンをキレート剤に接触させることによって、ヒト血清アルブミンと前記キレート剤との混合物を得る工程；及び、(b) 前記キレート剤を前記混合物から除去する工程；を含む方法によって調製してよい。

【0048】

好ましくは、本発明の第 1 の態様による液体製剤を調製する方法は、本発明の第 3 の態様に関連して記載された方法と同一である。また、本発明の第 1 の態様による液体製剤は、本発明の第 3 の態様による液体製剤と同一の組成を有していてもよい。したがって、本発明の第 3 の態様による液体製剤に対して与えられた全ての説明、コメント、開示、定義、及び同種のものは、明確に他の断りがない限り、本発明の第 1 の態様による液体製剤にも等しく適用される。

40

【0049】

第二の態様において、本発明は、

(i) ボツリヌス毒素；及び

(ii) ヒト血清アルブミン；

を含む液体製剤であって、

トリプトファン及び N-アセチルトリプトファンを含まないか、又は $50 \mu\text{M}$ 以下含む、
液体製剤に関する。

50

【0050】

本明細書で使用される、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを「含まない」という用語は、液体製剤がトリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まない、又は全く含まないということの意味する。具体的には、製剤にトリプトファン及びN-アセチルトリプトファンが添加されていないことを意味する。あるいは、液体製剤中のトリプトファン及びN-アセチルトリプトファンの濃度が、 $0\ \mu\text{M}$ （すなわち、四捨五入の一般的な規則に従い、 $<0.5\ \mu\text{M}$ ）、特に、 $\leq 0.1\ \mu\text{M}$ 、 $\leq 0.01\ \mu\text{M}$ 、又は $\leq 0.001\ \mu\text{M}$ 、さらには特に、 $0\ \text{nM}$ （すなわち、四捨五入の一般的な規則に従い、 $<0.5\ \text{nM}$ ）であることを意味する。本明細書で使用される、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを「～以下含む」という用語は、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンの総量が $\leq 50\ \mu\text{M}$ であってよく、好ましくは $\leq 20\ \mu\text{M}$ 、より好ましくは $\leq 10\ \mu\text{M}$ 、さらに好ましくは $\leq 1\ \mu\text{M}$ 、さらに好ましくは $\leq 0.1\ \mu\text{M}$ 、最も好ましくは $\leq 0.01\ \mu\text{M}$ もしくは $\leq 0.001\ \mu\text{M}$ であることを意味する。したがって、本明細書で使用される「含まないか、又は～以下含む」という用語は、液体製剤中のトリプトファン及びN-アセチルトリプトファンの総量が、 $0\ \mu\text{M}$ とXの間、又は $0\ \text{nM}$ とXの間であることを意味し、ここでXは $50\ \mu\text{M}$ 、 $20\ \mu\text{M}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ 、 $1\ \mu\text{M}$ 、 $0.1\ \mu\text{M}$ 、 $0.01\ \mu\text{M}$ 、及び $0.001\ \mu\text{M}$ である。

10

【0051】

アミノ酸であるトリプトファン及びN-アセチルトリプトファンの濃度は、当業者に公知のように、種々の技術（例えば、DC、HPLC、LC-MS、GC-MS、CEなど）によって測定することができる。例えば、N-アセチルトリプトファンは、Nelissら（Neliss et al., J. Chromatogr., 1985, 333(2): 381-387）に記載されているように、逆相カラムでの液体クロマトグラフィーを用いた分離と、 $280\ \text{nm}$ でのUV検出によって測定することができ、あるいは、Yu及びFinlayson（Yu, M. W. and Finlayson, J. S., J. Pharm. Sci., 1984, 73(1): 82-86）に記載されているように、タンパク質沈殿後に残る酸可溶性画分のUV分光分析に基づく方法によって測定することができる。トリプトファンは、例えば、Wentaoほか（Wentao et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 401: 3249-3261）によって記載されているように、液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法を用いた方法を使用して定量的に測定することができる。

20

30

【0052】

本明細書で使用される「トリプトファン」という用語は、L-トリプトファン、D-トリプトファン、又はL-トリプトファンとD-トリプトファンとの混合物（D/L-トリプトファン）のことを指す。同様に、本明細書で使用される「N-アセチルトリプトファン」という用語は、N-アセチル-L-トリプトファン、N-アセチル-D-トリプトファン、又はN-アセチル-L-トリプトファンとN-アセチル-D-トリプトファンとの混合物（N-アセチル-D/L-トリプトファン）のことを指す。

【0053】

液体製剤の調製に使用されるヒト血清アルブミンは、好ましくは $50\ \text{mM}$ 以下、より好ましくは $20\ \text{mM}$ 以下もしくは $10\ \text{mM}$ 以下、さらに好ましくは $1\ \text{mM}$ 以下もしくは $0.1\ \text{mM}$ 以下、最も好ましくは $0.01\ \text{nM}$ 以下もしくは $0\ \text{mM}$ のトリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含む、ヒト血清アルブミン材料である。

40

【0054】

市販のドナーHSA製品は全て、かなりの量（ $>10\ \text{mM}$ ）のN-アセチルトリプトファンを含んでいることが指摘されている。したがって、このような製品は、本発明の液体製剤の製剤化に使用する前に精製を行い、N-アセチルトリプトファンの量を所望の水準まで低下させる必要がある。「精製HSA」を調製するための好適な方法を、本発明の第4の態様と関連して以下に詳述する。簡単に述べると、トリプトファン及びN-アセチル

50

トリプトファンを含まない、又は少量しか含まない、ヒト血清アルブミン（本明細書では「精製HSA」とも呼ぶ）は、ヒト血清アルブミン出発材料に対して、透析、透析濾過、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、フィールド・フロー・フラクショネーション、又は沈殿法（例えば、塩析又はエタノール沈殿）を行うことにより、トリプトファン及び／又はN-アセチルトリプトファンを除去することによって得ることができる。

【0055】

本発明によれば、本発明の液体製剤、例えば、本発明の第1、第2、及び／又は第3の態様による液体製剤は、以下にさらに詳細に記載されるように、(iii)等張化剤；及び(iv)緩衝剤；の一方又は両方をさらに含んでもよい。このことは、特に本発明の第3の態様による液体製剤に関連する。

10

【0056】

さらに、本発明の第2の態様による液体製剤に含まれる Fe^{3+} イオンの濃度が好ましくは1000nM未満であることも、本明細書において企図される。具体的には、液体製剤中の Fe^{3+} 濃度は、好ましくは750nM未満、500nM未満、又は250nM未満であり、より好ましくは、液体製剤中の Fe^{3+} 濃度は、200nM未満、150nM未満、又は100nM未満であり、特に好ましくは、液体製剤中の Fe^{3+} 濃度は、50nM未満又は10nM未満であり、最も好ましくは、液体製剤中の Fe^{3+} 濃度は、1nM未満、100pM未満、10pM未満、又は1pM未満である。

【0057】

20

上述のように、 Fe^{3+} イオンはボツリヌス毒素の光安定性を低下させ、それによって、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンの不安定化作用を増加させることも判明している。本発明の液体製剤を調製するために使用されるHSA材料、特にヒト血液由来のドナーHSAは、未精製（未処理）HSAの光安定性減少特性に寄与する Fe^{3+} イオンを相当量含むと考えられる。可能な限り低い Fe^{3+} 濃度を達成するためには、例えばポリプロピレン又はポリカーボネートなどの鉄非含有材料製の容器を選択することなどにより、最終産物中に鉄が可能な限り存在しないように機器（容器など）及び材料（賦形剤など）を選択すべきである。

【0058】

金属イオン（ Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、及び Ni^{2+} など）の濃度は、当業者に公知の上記に開示された測定方法によって測定することができる。

30

【0059】

本発明の液体ボツリヌス毒素製剤の低 Fe^{3+} 含量は、本発明の第4の態様と関連して詳細に記載される方法、特に、本明細書に記載されるように、ヒト血清アルブミンをキレート剤に接触させ、次いでキレート剤を除去することを含む方法によって、達成することができる。

【0060】

本発明によれば、液体製剤は、特に断りのない限り、又は意図しない限り、1つ以上の追加の薬学的に許容される賦形剤をさらに含んでもよい。例えば、液体製剤は、グリセロール、スクロース、ラクトース、マンニトール、デキストラン、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドン、乳酸、クエン酸、アミノ酸（トリプトファン及びN-アセチルトリプトファン以外）、ベンジルアルコール、リドカイン、ゼラチン、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、ポリエチレンオキシド、及びポリソルベート（例えば、ポリソルベート20及びポリソルベート80）のうち、1つ以上を含んでもよい。他の好適な薬学的に許容される賦形剤としては、当該分野で周知のものが挙げられる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences（Mack Publishing社、ペンシルベニア州イーストン）を参照のこと。

40

【0061】

しかし本明細書では、本発明の液体製剤が特定の成分（すなわち、化合物、材料、又は物質）を、例えばキレート剤及び／又はリン酸塩、界面活性剤、多糖類、アミノ酸、安定

50

化ペプチド、及び同種のもの（それらの任意の組み合わせを含む）を、具体的に欠くことも企図される。本明細書で使用される「界面活性剤（detergent）」という用語は、「界面活性物質（surfactant）」と同義に使用され、非イオン性界面活性剤及びイオン性界面活性剤を含むことを意図している。本明細書で使用される「安定化ペプチド」という用語は、一般に、5～50個のアミノ酸からなるペプチドのことを意味し、例として、10～40個のアミノ酸又は15～30個のアミノ酸のペプチドなどが挙げられる。したがって、「安定化ペプチド」という用語からはHSAが除外される。

【0062】

一実施形態において、本発明の液体製剤は界面活性剤を含んでおらず、特にポリソルベートを含まず、さらには特に、ポリソルベート20及び／又はポリソルベート80を含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤はアルギン酸塩を含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤はコハク酸塩を含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、アルギニン、グルタミン酸、メチオニン、トリプトファン、及びセリンからなる群から選択される1つ以上（例えば、2個、3個、4個、又は5個）のアミノ酸を含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、単糖、オリゴ糖、もしくは多糖、又はそれらの混合物などの、糖類を含まない。特に、本発明の液体製剤は、スクロース、ラクトース、マルトース、及びトレハロースのうちの1つ以上（例えば、2個、3個、又は4個）を含まない場合がある。他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、キレート剤、特に本発明に関連して本明細書に記載されるキレート剤、及び／又は、リン酸塩を含まない。本発明においては、液体製剤が上述の化合物のうち複数を、又はそれら全てを、欠くことも企図される。

【0063】

一実施形態において、本発明の液体製剤は、(i)界面活性剤、並びに、単糖、オリゴ糖、及び多糖；(ii)界面活性剤及び任意のアミノ酸；又は、界面活性剤、及び、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸；(iii)界面活性剤及び安定化ペプチド；(iv)単糖、オリゴ糖、及び多糖、並びに任意のアミノ酸；又は、単糖、オリゴ糖、及び多糖、並びに、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸；(v)単糖、オリゴ糖、及び多糖、並びに安定化ペプチド；(vi)任意のアミノ酸、及び安定化ペプチド；又は、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸、及び安定化ペプチド；(vii)界面活性剤、単糖、オリゴ糖、及び多糖、並びに任意のアミノ酸；又は、界面活性剤、単糖、オリゴ糖、及び多糖、並びに、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸；(viii)界面活性剤、単糖、オリゴ糖、及び多糖、並びに安定化ペプチド；(ix)界面活性剤、任意のアミノ酸、及び安定化ペプチド；又は、界面活性剤、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸、及び安定化ペプチド；(x)単糖、オリゴ糖、及び多糖、任意のアミノ酸、並びに安定化ペプチド；又は、単糖、オリゴ糖、及び多糖、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸、並びに安定化ペプチド；(xi)界面活性剤、単糖、オリゴ糖、及び多糖、任意のアミノ酸、並びに安定化ペプチド；又は、界面活性剤、単糖、オリゴ糖、及び多糖、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸、並びに安定化ペプチド；を欠く。

【0064】

他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、ヒスチジン以外のいずれのアミノ酸も含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、単糖、二糖、及び三糖をいずれも含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、HSA以外の安定化ペプチド又はタンパク質をいずれも含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、リン酸塩、例えばリン酸緩衝剤の形態のリン酸塩を含まない。

【0065】

さらに他の実施形態において、本発明の液体製剤は、(i)コハク酸塩及び界面活性剤（ポリソルベートなど）；(ii)コハク酸塩及びメチオニン；(iii)コハク酸塩及びスクロース；(iv)界面活性剤（ポリソルベートなど）及びメチオニン；(v)界面活性剤（ポリソルベートなど）及びスクロース；(vi)メチオニン及びスクロース；(vii)コハク酸塩、界面活性剤（ポリソルベートなど）、及びメチオニン；(xiii)

）コハク酸塩、界面活性剤（ポリソルベートなど）、及びスクロース；（*i x*）コハク酸塩、メチオニン、及びスクロース；（*x*）界面活性剤（ポリソルベートなど）、メチオニン、及びスクロース、並びに（*x i*）コハク酸塩、界面活性剤（ポリソルベートなど）、メチオニン、及びスクロース；（*x i i*）界面活性剤（ポリソルベートなど）及びヒスチジン；（*x i i i*）界面活性剤（ポリソルベートなど）、ヒスチジン、及びスクロース；を欠く。

【0066】

また、1つ又は複数の成分（すなわち、化合物、材料、又は物質）を欠く本発明の液体製剤のいずれについても、キレート剤、特に、本明細書に記載のキレート剤（EDTAなど）、及び／又はリン酸塩を、さらに欠いてもよい。

【0067】

さらに、本発明の好ましい液体製剤の1つは、（*i*）ボツリヌス毒素；（*i i*）HSA；（*i i i*）等張化剤；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、（*i*）10 U/ml～200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；（*i i*）0.01%（w/v）～1.0%（w/v）の量のHSA；（*i i i*）0.01%（w/v）～2.0%（w/v）の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、（*i*）10 U/ml～200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；（*i i*）0.01%（w/v）～0.5%（w/v）の量のHSA；（*i i i*）0.1%（w/v）～1.5%（w/v）の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、（*i*）10 U/ml～200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；（*i i*）0.05%（w/v）～0.25%（w/v）の量のHSA；（*i i i*）0.6%（w/v）～1.2%（w/v）の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、（*i*）10 U/ml～200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；（*i i*）0.01%（w/v）～0.5%（w/v）の量のHSA；（*i i i*）0.9%（w/v）の量の、等張化剤としての塩化ナトリウム；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、（*i*）10 U/ml～200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；（*i i*）0.05%（w/v）～0.25%（w/v）の量のHSA；（*i i i*）0.9%（w/v）の量の、等張化剤としての塩化ナトリウム；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。

【0068】

また、本明細書では、上記及び下記段落に記載の好ましい液体製剤、及び特に好ましい液体製剤において、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンの濃度の上限は、50 μ M未満、好ましくは10 μ M未満、より好ましくは1 μ M未満、さらに好ましくは0.1 μ M未満、最も好ましくは0.01 μ M未満又は0.001 μ M未満であることが企図される。また、本明細書では、上記及び下記段落に記載の好ましい液体製剤、及び特に好ましい液体製剤は、Fe³⁺イオンの濃度が1000 nM未満又は500 nM未満、より好ましくは250 nM未満又は100 nM未満、最も好ましくは10 nM未満又は1 nM未満であることを特徴とし得ることが、さらに企図される。

【0069】

本発明の好ましい液体製剤の1つは、（*i*）ボツリヌス毒素；（*i i*）HSA；（*i i i*）等張化剤；（*i v*）緩衝剤；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、（*i*）10 U/ml～200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；（*i i*）0.01%（w/v）～1.0%（w/v）の量のHSA；（*i i i*）0.01%（w/v）～2.0%（w/v）の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；（*i v*）1 mM～100 mMの濃度の緩

10

20

30

40

50

衝剤；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10 U/ml $\sim$ 200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；(ii) 0.01% (w/v) $\sim$ 0.5% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.01% (w/v) $\sim$ 2.0% (w/v)の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；(iv) 1 mM $\sim$ 100 mMの濃度の緩衝剤；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10 U/ml $\sim$ 200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；(ii) 0.05% (w/v) $\sim$ 0.25% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.1% (w/v) $\sim$ 2.0% (w/v)の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；(iv) 1 mM $\sim$ 100 mMの濃度の緩衝剤；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10 U/ml $\sim$ 200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；(ii) 0.05% (w/v) $\sim$ 0.25% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.6% (w/v) $\sim$ 1.3% (w/v)の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；(iv) 2 mM $\sim$ 50 mMの濃度の緩衝剤；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10 U/ml $\sim$ 200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；(ii) 0.05% (w/v) $\sim$ 0.25% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.9% (w/v)の量の塩化ナトリウム；(iv) 5 mM $\sim$ 20 mMの濃度の緩衝剤；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。

10

20

【0070】

本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) ボツリヌス毒素；(ii) HSA；(iii) 等張化剤としての塩化ナトリウム；(iv) 緩衝剤としての、ヒスチジン、リン酸塩、及びそれらの混合物から選択される緩衝剤、好ましくはヒスチジン；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。

【0071】

本発明の特に好ましい液体製剤の1つは、(i) 10 U/ml $\sim$ 200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；(ii) 0.01% (w/v) $\sim$ 1.0% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.01% (w/v) $\sim$ 2.0% (w/v)、好ましくは0.9% (w/v)の量の塩化ナトリウム；(iv) 1 mM $\sim$ 100 mMの濃度のヒスチジン、リン酸塩、及びそれらの混合物から選択される緩衝剤、好ましくは、1 mM $\sim$ 100 mMの濃度のヒスチジン；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。

30

【0072】

本発明の特に好ましい他の液体製剤の1つは、(i) 10 U/ml $\sim$ 200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；(ii) 0.01% (w/v) $\sim$ 0.5% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.9% (w/v)の量の塩化ナトリウム；(iv) 1 mM $\sim$ 100 mMの濃度のヒスチジン、リン酸塩、及びそれらの混合物から選択される緩衝剤、好ましくは、1 mM $\sim$ 100 mMの濃度のヒスチジン；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。

40

【0073】

本発明の特に好ましい、さらに別の液体製剤の1つは、(i) 10 U/ml $\sim$ 200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；(ii) 0.05% (w/v) $\sim$ 0.25% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.9% (w/v)の量の塩化ナトリウム；(iv) 1 mM $\sim$ 100 mMの濃度の、好ましくは2 mM $\sim$ 50 mMの濃度の、より好ましくは5 mM $\sim$ 20 mMの濃度の、ヒスチジン、リン酸塩、及びそれらの混合物から選択される緩衝剤であって、好ましくは、1 mM $\sim$ 100 mMの濃度の、好ましくは2 mM $\sim$ 50 mMの濃度の、より好ましくは5 mM $\sim$ 20 mMの濃度のヒスチジン；を含み、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンを含まないか、又は50 μ M以下含む。

【0074】

50

さらに、上記の好ましい液体製剤、及び特に好ましい液体製剤は、好ましくは6.0～7.5の範囲、より好ましくは6.5～7.0の範囲のpHを有する。また、ボツリヌス毒素は好ましくは血清型Aであり、より好ましくは血清型Aの神経毒成分である。

【0075】

本発明の好ましい液体製剤の一例は以下の通りである：

製剤1：

50U/mL BoNT/A

0.9% NaCl (9mg/mL)

0.085% HSA (透析などにより精製) (0.85mg/mL)

0.155% ヒスチジン (1.55mg/mL; 約10mM)

Trp及びN-AcTrp <50µm

pH6.0。

【0076】

製剤例1の精製HSAは、本発明の第4の態様による方法と関連して詳細に記載されるプロセスによって調製することができる。

【0077】

本発明によれば、本発明の液体製剤は、好ましくは、本発明の第4の態様による方法によって調製されるか、又は取得可能である。この方法により、HSA出発材料（例えば、市販のHSA製品）に含まれる、液体ボツリヌス毒素製剤の光安定性を損なうN-アセチルトリプトファンなどの物質を除去することができる。

【0078】

第3の態様において、本発明は、

(i) ボツリヌス毒素；及び

(ii) ヒト血清アルブミン (HSA)；

を含む液体製剤であって、

(a) ヒト血清アルブミンをキレート剤に接触させることによって、ヒト血清アルブミンと前記キレート剤との混合物を得る工程；及び

(b) 前記キレート剤を前記混合物から除去する工程；

を含む方法によって調製される、

液体製剤に関する。

【0079】

本発明の液体製剤の成分(i)に関して、ボツリヌス毒素としては特に限定されるものではなく、任意の血清型のボツリヌス毒素(BoNT/A～G)が挙げられる。好ましくは、ボツリヌス毒素は上記定義の通りである。

【0080】

上記に定義した通り、液体製剤の成分(ii)に関して、「ヒト血清アルブミン」又は「HSA」とは、ドナーHSA及び組換えHSAを指すことを意図しており、好ましくはドナーHSAである。HSAは、液体製剤中に、0.001～2.0% (w/v)の量で、好ましくは0.001～1.00% (w/v)の量で、より好ましくは0.01～0.5% (w/v)の量で、さらに好ましくは0.02～0.3% (w/v)の量で、最も好ましくは0.03～0.15% (w/v)の量で、存在してもよい。

【0081】

本発明によると、本発明の液体製剤は、少なくとも工程(a)及び(b)を含む方法によって調製され、第1工程は以下の通りである：

(a) ヒト血清アルブミンをキレート剤に接触させることによって、ヒト血清アルブミンと前記キレート剤との混合物を得ること。

【0082】

本明細書で使用される「接触」という用語は、2つ以上の成分を1つに合わせるという広義の解釈を意図している。これは、溶解、混合、懸濁、配合、スラリー化、攪拌、フローイング・バイ(flowing by)、吸着、結合、抽出などの様々な異なる方法に

10

20

30

40

50

よって達成することができる。典型的には、キレート剤を、HSAを含む組成物（例えば、HSAの溶液）に添加し、次いで混合によって均一な混合物を得て、任意でさらなる処理工程（例えば、キレート剤含有緩衝液に対する透析）を行う。

【0083】

したがって、「接触」は、例えば水溶液の形態のHSA材料を、固定化金属親和性樹脂（IMAC）にロードすることによって達成可能であることも企図される。本明細書で使用される「固定化金属親和性樹脂」（IMAC）という用語は、限定されるものではないが、その例として、多価陽イオンを結合及び配位することができる固定化された官能基部分（イミノ二酢酸など）を含んだ樹脂、例えばChelating-Sepharose、Fractogel-EMD-Chelate、POROS 20MC、Matrex Cellufine Chelate、TALON、及びChellex 100樹脂などが挙げられる。このような固定化金属親和性樹脂は一般的に、当業者に公知のように、クロマトグラフィー金属アフィニティーカラムの形態で使用される。また、本明細書で使用される「接触」という用語は、適切な固定化金属親和性樹脂を使用するバッチモードでの結合（batch mode binding）のことも含む。

【0084】

さらに、工程（a）に関して、本発明の液体製剤を調製するための方法の工程（a）で使用される「ヒト血清アルブミン」及び「キレート剤」という用語は、それらの物理的形態に関する何らかの制限の意味を意図するものではなく、あるいは、HSA及びキレート剤と混合される、又はそれらに含まれる、他の物質又は化合物の存在を除外することを意図するものではないことに注意されたい。すなわち、工程（a）においてキレート剤に接触させる「ヒト血清アルブミン」は、固体又は液体（例えば、水性組成物もしくは水溶液）の形態など、いかなる形態で存在していてもよい。同様に、工程（a）においてヒト血清アルブミンに接触させる「キレート剤」は、固体又は液体（例えば、水性組成物もしくは水溶液）の形態など、いかなる形態で存在していてもよい。さらに、「ヒト血清アルブミンをキレート剤に接触させる」という表現は、（i）ヒト血清アルブミンが、組成物（例えば、固体組成物又は液体組成物、特に水性組成物又は水溶液）の形態であって、その組成物が、等張化剤又は緩衝剤などの、最終液体製剤に含まれる1つ以上の追加成分を含むものであること；及び／又は、（ii）キレート剤が、組成物（例えば、固体組成物又は液体組成物、特に水性組成物又は水溶液）の形態であって、その組成物が、等張化剤又は緩衝剤などの、最終液体製剤に含まれる1つ以上の追加成分を含むものであること；を除外するものではない。

【0085】

好ましくは、工程（a）で得られる混合物は水性混合物である。この水性混合物は、様々な方法で調製することができる。例えば、ヒト血清アルブミンは水性組成物、例えば水溶液の形態であってよく、この水性組成物を、固形又は液状で存在し得るキレート剤、例えば水溶液の形態で存在し得るキレート剤と、混合してよい。さらに、ヒト血清アルブミンは、キレート剤及び水溶液と混合された、又はキレート剤の水溶液と混合された、凍結乾燥材料などの固体の形態であってもよい。好ましくは、ヒト血清アルブミンは水性組成物、より好ましくは水溶液の形態であり、キレート剤は固体又は水性組成物（例えば水溶液）である。

【0086】

特に、工程（a）においてキレート剤に接触させるHSAは、少なくとも5%（w/v）のHSA、より好ましくは10～30%（w/v）のHSA、最も好ましくは20%（w/v）のHSAを含む、水溶液の形態であってよい。また、工程（a）で得られる混合物のpHは、6.0～9.0、好ましくは6.5～8.5、より好ましくは7.0～8.5、最も好ましくは7.0～8.0の範囲のpHに調整してよい。

【0087】

さらに、本発明による液体製剤を調製するための方法の接触工程（a）は、いくつかのサブ工程を含んでいてもよい。例えば、一実施形態において、接触工程（a）は、キレ

ト剤（例えば、EDTA）及びヒト血清アルブミンを混合する工程と、前記混合物を所定時間インキュベートする工程と、任意に、前記混合物をキレート剤、好ましくはインキュベーションサブ工程で使用されるものと同一のキレート剤、を含む緩衝液に対して透析する工程とを含むか、あるいはこれらの工程（のみ）からなる。他の一実施形態においては、前記混合物をインキュベートせずに、キレート剤を含む緩衝液に対する透析を（直接）行い、このキレート剤は、好ましくは、キレート剤（例えば、EDTA）とヒト血清アルブミンとを混合する工程で使用されるものと同一である。他の一実施形態においては、キレート剤とヒト血清アルブミンとを、透析前に混合しない。すなわち接触工程（a）は、前記混合物を、キレート剤を含む緩衝液に対して透析する工程を含むか、あるいはその工程（のみ）からなる。

10

【0088】

好ましくは、工程（a）は、キレート剤を、HSAを含む組成物（例えば、HSAの溶液）に加える工程；又は、キレート剤を、HSAを含む組成物（例えば、HSAの溶液）と混合する工程；を含むか、あるいはその工程（のみ）からなる。その後、得られた混合物を一定時間インキュベートする。例えば、攪拌せずに所定の時間静置するか、又は所定の時間攪拌する。

【0089】

インキュベーション時間は特定の範囲に限定されないが、典型的には少なくとも0.5時間、特に少なくとも1時間、さらには特に、少なくとも2時間である。インキュベーション時間の上限は重要ではなく、例えば1時間、2時間、5時間、又は10時間であってもよい。したがって、インキュベーション時間は、例えば、0.5～5時間、又は1時間～10時間であってもよい。同様に、インキュベーション温度も特に限定されず、例えば、0℃～60℃の範囲内であってもよい。好ましくは、温度は0℃～30℃である。すなわち、本発明において、室温（20℃又は25℃）は好適な温度である。当業者に公知であるように、温度は反応時間に影響する。一般に、インキュベーション条件（例えば、時間及び温度）は、最終産物に含まれるキレート剤（例えば、EDTA）の残存量が100 μM以下、好ましくは10 μM以下、より好ましくは1 μM以下となるように選択される。

20

【0090】

任意に、インキュベーション工程に続いてさらなる処理を行う。その例として、インキュベートされた混合物を、キレート剤を含む緩衝液に対して透析することが挙げられ、このキレート剤は、典型的には、インキュベーション工程で使用したものと同一である。この任意の透析工程で使用されるキレート剤は、好ましくは、0.1 mM～1000 mM、より好ましくは1 mM～200 mM、最も好ましくは10 mM～100 mMの濃度で透析緩衝液中に含まれる。また、透析工程で使用される緩衝液は、（i）7.5～8.5のpHを有すること；（ii）さらに緩衝剤を含み、それが好ましくは最終組成に応じたものであること；もしくは、（iii）さらに等張化剤を含み、それが好ましくは0.9%（w/v）塩化ナトリウムであること；又は、（i）及び（ii）；（i）及び（iii）；（ii）及び（iii）；もしくは、（i）及び（ii）及び（iii）；であることも好ましい。

30

40

【0091】

本発明において、本明細書中で使用される「キレート剤」という用語は、金属イオンを結合できるものであれば特に限定されない。本明細書で使用される「キレート剤」という用語は、「キレーター」又は「金属イオン封鎖剤」と称されることもある。本明細書で使用するためのキレート剤は、典型的には金属イオン結合性有機化合物である。金属イオンは一般に、多座配位子として作用する有機キレート剤と、複数の配位結合を形成する。

【0092】

本明細書で使用するのに適したキレート剤としては、限定されるものではないが、アミノポリカルボン酸（例えば、カルボン酸官能基を3～6個、好ましくは4個有するアミノポリカルボン酸）；並びに、クエン酸塩、ポルフィリン、TPEN（N，N，N'，N'－

50

テトラキス（２－ピリジニルメチル）－１，２－エタンジアミン）、ＴＥＴＡ（トリエチレンテトラミン）、及びこれらの混合物などの、他の化合物；が挙げられる。アミノポリカルボン酸の例として、ＮＴＡ（ニトリロ三酢酸）、ＤＯＴＡ（１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸）、ＴＥＤ（エチレンジアミノ三酢酸）、ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）、ＥＧＴＡ（エチレングリコールビス（ｄ－アミノエチルエーテル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸）、ＢＡＰＴＡ（１，２－ビス（ｏ－アミノフェノキシ）エタン－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸）、ＤＴＰＡ（ジエチレントリアミン五酢酸）、及びＴＴＨＡ（トリエチレンテトラミン六酢酸）が挙げられる。

【００９３】

本明細書で使用するための特に好ましいキレート剤としては、一般式（Ｉ）：



の化合物が挙げられ、これは少なくとも４個のカルボン酸官能基を有するアミノポリカルボン酸化合物である。Ｒ基は特に限定されず、カルボン酸官能基を含まなくてもよいし、１個又は２個のカルボン酸官能基を含んでいてもよい。好ましくは、Ｒ基はカルボン酸官能基を含まないか、又は１個含む。最も好ましくはカルボン酸官能基を含まない。

【００９４】

一般式（Ｉ）の化合物の例としては、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ、ＢＡＰＴＡ、ＤＴＰＡ、及びＴＴＨＡなどが挙げられる。本明細書で使用するのに特に好ましいのはＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ、及びＤＴＰＡであり、より好ましいのはＥＤＴＡ及びＤＴＰＡであり、最も好ましいのはＥＤＴＡである。上記のキレート剤のいずれかの混合物も、例えば溶液として、固体として、又はマトリックスに結合して、本発明において使用することができる。

【００９５】

工程（ａ）において、好ましくは、キレート剤が液体製剤中に０．１ｍＭ～１０００ｍＭ又は０．１ｍＭ～５００ｍＭ、より好ましくは０．５ｍＭ～５００ｍＭ又は１ｍＭ～５００ｍＭ、最も好ましくは１０ｍＭ～１００ｍＭの濃度で存在するように、ＨＳＡを一定量のキレート剤に接触させる。

【００９６】

本発明によれば、液体製剤を調製する方法は、以下の工程をさらに含む：

（ｂ）前記キレート剤を前記混合物から除去すること。

【００９７】

工程（ｂ）において、キレート剤は、透析（透析袋を用いる従来の透析、向流（ｃｏｕｎｔｅｒｆｌｏｗ）透析など）、逆浸透、濾過、クロスフロー濾過、限外濾過、及びクロマトグラフィー法（例えば、イオン交換クロマトグラフィー又はゲル濾過クロマトグラフィー）などの、任意の適切な技術によって除去してよい。

【００９８】

好ましくは、キレート剤は透析によって除去する。透析は、典型的には０．５～４８時間、特に１～２４時間又は１～１２時間、０℃～３０℃の温度、特に２℃～３０℃又は４℃～２５℃の温度、例えば室温で行う。さらに、透析は、典型的には、インキュベートしたＨＳＡ／キレート剤混合物の量の１０～１０００倍量の透析緩衝液に対して行い、透析緩衝液は通常、少なくとも１回交換する。使用する透析膜の分画分子量は、例えば１０ｋＤａである。

【００９９】

一般に、透析条件（例えば、時間、温度、緩衝液の量、緩衝液の交換回数）は、最終産物に含まれるキレート剤（例えば、ＥＤＴＡ）の残存量が１００μＭ以下の濃度、好ましくは１０μＭ以下の濃度、より好ましくは１μＭ以下の濃度となるように選択される。

【０１００】

本発明の好ましい一実施形態によれば、まずＨＳＡ出発材料をキレート剤に接触させることによって前処理し、次いでキレート剤を除去する。その後、こうして得られた前処理済ＨＳＡを使用して、本発明の液体ボツリヌス毒素製剤を調製する。本明細書で使用される「ヒト血清アルブミン出発材料」という用語は、市販の、又は従来法で入手可能な、す

10

20

30

40

50

なわち、本明細書に記載されるような前処理を施していない、ドナーHSA材料（ヒト血液由来、もしくはより正確にはヒト血漿由来の、HSA）又は組換えHSA材料のことを指すことが意図される。ドナーHSA材料と組換えHSA材料との混合物もまた、本明細書で使用される「ヒト血清アルブミン出発材料」という用語に包含される。

【0101】

より具体的には、この好ましい実施形態によれば、（i）ボツリヌス毒素；及び（ii）ヒト血清アルブミン；を含む液体製剤は、

（a）ヒト血清アルブミン出発材料をキレート剤に接触させることにより、前記ヒト血清アルブミン出発材料と前記キレート剤との混合物を得る工程；

（b）前記混合物から前記キレート剤を除去することにより、前処理済ヒト血清アルブミン材料を得る工程；及び、

（c）ボツリヌス毒素を前記前処理済ヒト血清アルブミン材料と混合する工程；を含む方法により調製される。

【0102】

本発明の他の好ましい一実施形態によれば、液体プレ製剤をキレート剤に接触させ、次いでキレート剤を除去することによって液体製剤を得る。本明細書で使用される「液体プレ製剤」という用語は、少なくとも成分（i）及び（ii）（すなわち、ボツリヌス毒素及びHSA）を含み、且つ、好ましくは最終液体組成物に含まれる全ての成分及び物質、特に成分（iii）及び（iv）を含む、液体製剤のことを指す。後者の場合、上記キレート剤処理及び除去を行うことで、最終的な液体製剤となる。

【0103】

より具体的には、この好ましい実施形態によれば、（i）ボツリヌス毒素；及び（ii）ヒト血清アルブミン；を含む液体製剤は、

（a）ボツリヌス毒素とヒト血清アルブミンとを含む液体プレ製剤を、キレート剤に接触させることにより、前記液体プレ製剤と前記キレート剤との混合物を得る工程；及び、

（b）前記混合物から前記キレート剤を除去することにより、液体製剤を得る工程；を含む方法により調製される。

【0104】

本発明によれば、（本明細書に記載の任意の態様による、すなわち、第1、第2、及び第3の態様による）液体製剤は、さらに任意に、

（iii）等張化剤；を含んでもよい。

【0105】

本明細書で使用される「等張化剤」という用語は、それを注射製剤に加えることにより、生理的液体と類似した浸透圧特性を製剤に与える薬剤のことを指す。等張化剤は「浸透圧調整剤」とも呼ばれる。等張化剤は特に限定されず、例えば、糖、塩、ポリマー、及びそれらの混合物からなる群から選択してもよい。

【0106】

等張化剤の例として、スクロース、グルコース、炭酸ナトリウム、アミノ酸、ポリエチレングリコール（PEG）、デキストラン、シクロデキストリン、及びコロイド（例えば、コロイド状多糖類）が挙げられる。典型的には、等張化剤の濃度は、0～2.0%（w/v）、特に0.01～2.0%（w/v）又は0.1～1.5%（w/v）、さらには特に、0.6～1.2%（w/v）の範囲である。

【0107】

好ましくは、等張化剤は塩化ナトリウム（NaCl）である。塩化ナトリウムは、本発明の液体製剤中に、0.01～2.0%（w/v）、好ましくは0.1～1.5%（w/v）、より好ましくは0.5～1.2%（w/v）又は0.8～1.0%（w/v）、最も好ましくは0.9%（w/v）の量で存在してもよい。

【0108】

本発明によれば、（本明細書に記載の任意の態様による、すなわち、第1、第2、及び

10

20

30

40

50

第3の態様による) 液体製剤は、さらに任意に、

(iv) 緩衝剤；

を含んでもよい。

【0109】

本明細書で使用される「緩衝剤」という用語は、液体製剤のpHを許容範囲内に維持する薬剤、すなわち製剤のpHを調節可能な薬剤のことを意味する。適切な緩衝剤は、他の成分と化学的に反応せず、所望のpH緩衝作用を提供するのに十分な量で存在する緩衝剤である。このような緩衝剤の例として、アミノ酸、酢酸塩、リンゴ酸、アスコルビン酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、リン酸塩、重炭酸塩、TRIS、Bis-TRIS、ACES、MES、BES、MOPS、HEPES、TES、PIPES、トリシン、及びイミダゾールなどが挙げられる。

10

【0110】

好ましくは、緩衝剤はリン酸塩（すなわち、リン酸緩衝剤）、アミノ酸、又はそれらの混合物である。本明細書で使用される「リン酸塩」という用語は、一般に、プロトン化されていない形態及びプロトン化された形態、並びにそれらの任意の塩のことを意味する。アミノ酸は、アスパラギン酸塩、グリシン、グルタミン酸塩、ヒスチジン、プロリン、タウリン、メチオニン、セリン、チロシン、トリプトファン、及びそれらの混合物から選択してもよく、好ましくは、ヒスチジン、プロリン、タウリン、メチオニン、セリン、チロシン、及びそれらの混合物から選択される。最も好ましくは、アミノ酸はヒスチジンである。本明細書で使用するのに最も好ましい緩衝剤は、ヒスチジン、リン酸塩、又はそれらの混合物である。

20

【0111】

本発明の液体製剤中の緩衝剤の濃度は、好ましくは1~100mM、好ましくは2~50mM、より好ましくは5~20mMである。緩衝剤がアミノ酸（例えば、ヒスチジン）である場合、それは液体製剤中に1~100mM、好ましくは2~50mM、より好ましくは5~20mM、最も好ましくは10mMの濃度で存在してもよい。緩衝剤がリン酸塩である場合、それは液体製剤中に1~100mM、好ましくは2~50mM、より好ましくは5~20mM、最も好ましくは10mMの濃度で存在してもよい。

【0112】

また、本発明の液体製剤は、特に断りのない限り、又は意図しない限り、1つ以上の追加の薬学的に許容される賦形剤をさらに含んでもよい。例えば、液体製剤は、グリセロール、スクロース、ラクトース、マンニトール、デキストラン、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドン、乳酸、クエン酸、アミノ酸、ベンジルアルコール、リドカイン、ゼラチン、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、ポリエチレンオキシド、及びポリソルベート（例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80）のうち、1つ以上を含んでもよい。他の好適な薬学的に許容される賦形剤としては、当該分野で周知のものが挙げられる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (MacK Publishing社、ペンシルベニア州イーストン)を参照のこと。

30

【0113】

一方、本発明の液体製剤が特定の成分（すなわち、化合物、材料、又は物質）を、例えばキレート剤、界面活性剤、多糖類、アミノ酸、安定化ペプチド、及び同種のもの（それらの任意の組み合わせを含む）を、具体的に欠くことも本明細書において企図される。本明細書で使用される「界面活性剤」という用語は、「界面活性物質」と同義に使用され、非イオン性界面活性剤及びイオン性界面活性剤を含むことを意図している。本明細書で使用される「安定化ペプチド」という用語は、一般に、5~50個のアミノ酸からなるペプチドのことを意味し、例として、10~40個のアミノ酸又は15~30個のアミノ酸のペプチドなどが挙げられる。したがって、「安定化ペプチド」という用語からはHSAが除外される。

40

【0114】

一実施形態において、本発明の液体製剤は界面活性剤を含んでおらず、特にポリソルベ

50

ートを含まず、さらには特に、ポリソルベート 20 及び／又はポリソルベート 80 を含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤はアルギン酸塩を含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤はコハク酸塩を含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、アルギニン、グルタミン酸、メチオニン、トリプトファン、及びセリンからなる群から選択される 1 つ以上（例えば、2 個、3 個、4 個、又は 5 個）のアミノ酸を含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、単糖、オリゴ糖、もしくは多糖、又はそれらの混合物などの、糖類を含まない。特に、本発明の液体製剤は、スクロース、ラクトース、マルトース、及びトレハロースのうちの 1 つ以上（例えば、2 個、3 個、又は 4 個）を含まない場合がある。他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、キレート剤、特に本発明と関連して本明細書に記載されるキレート剤を含まない。本発明においては、液体製剤が上述の化合物のうち複数を、又はそれら全てを、欠くことも企図される。

10

【0115】

一実施形態において、本発明の液体製剤は、(i) 界面活性剤、並びに、単糖、オリゴ糖、及び多糖；(ii) 界面活性剤及び任意のアミノ酸；又は、界面活性剤、及び、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸；(iii) 界面活性剤及び安定化ペプチド；(iv) 単糖、オリゴ糖、及び多糖、並びに任意のアミノ酸；又は、単糖、オリゴ糖、及び多糖、並びに、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸；(v) 単糖、オリゴ糖、及び多糖、並びに安定化ペプチド；(vi) 任意のアミノ酸、及び安定化ペプチド；又は、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸、及び安定化ペプチド；(vii) 界面活性剤、単糖、オリゴ糖、及び多糖、並びに任意のアミノ酸；又は、界面活性剤、単糖、オリゴ糖、及び多糖、並びに、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸；(viii) 界面活性剤、単糖、オリゴ糖、及び多糖、並びに安定化ペプチド；(ix) 界面活性剤、任意のアミノ酸、及び安定化ペプチド；又は、界面活性剤、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸、及び安定化ペプチド；(x) 単糖、オリゴ糖、及び多糖、任意のアミノ酸、並びに安定化ペプチド；又は、単糖、オリゴ糖、及び多糖、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸、並びに安定化ペプチド；(xi) 界面活性剤、単糖、オリゴ糖、及び多糖、任意のアミノ酸、並びに安定化ペプチド；又は、界面活性剤、単糖、オリゴ糖、及び多糖、ヒスチジンを除く全てのアミノ酸、並びに安定化ペプチド；を欠く。

20

【0116】

他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、ヒスチジン以外のいずれのアミノ酸も含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、単糖、二糖、及び三糖をいずれも含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、HSA 以外の安定化ペプチド又はタンパク質を含まない。他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、リン酸塩、例えばリン酸緩衝剤の形態のリン酸塩を含まない。

30

【0117】

さらに他の一実施形態において、本発明の液体製剤は、(i) コハク酸塩及び界面活性剤（ポリソルベートなど）；(ii) コハク酸塩及びメチオニン；(iii) コハク酸塩及びスクロース；(iv) 界面活性剤（ポリソルベートなど）及びメチオニン；(v) 界面活性剤（ポリソルベートなど）及びスクロース；(vi) メチオニン及びスクロース；(vii) コハク酸塩、界面活性剤（ポリソルベートなど）、及びメチオニン；(viii) コハク酸塩、界面活性剤（ポリソルベートなど）、及びスクロース；(ix) コハク酸塩、メチオニン、及びスクロース；(x) 界面活性剤（ポリソルベートなど）、メチオニン、及びスクロース、並びに (xi) コハク酸塩、界面活性剤（ポリソルベートなど）、メチオニン、及びスクロース；(xii) 界面活性剤（ポリソルベート及びヒスチジンなど）；(xiii) 界面活性剤（ポリソルベートなど）、ヒスチジン、及びスクロース；を欠く。

40

【0118】

また、1 つ又は複数の成分（すなわち、化合物、材料、又は物質）を欠く本発明の液体製剤のいずれについても、キレート剤、特に、本明細書に記載のキレート剤を、さらに欠

50

いてもよい。

【0119】

さらに、本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) ポツリヌス毒素；(ii) HSA；及び(iii) 等張化剤；を含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10～200 U/mlの濃度のポツリヌス毒素；(ii) 0.01～1.0% (w/v)の量のHSA；及び、(iii) 0.01～2.0% (w/v)の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；を含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10～200 U/mlの濃度のポツリヌス毒素；(ii) 0.01～0.5% (w/v)の量のHSA；及び、(iii) 0.1～1.5% (w/v)の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；を含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10～200 U/mlの濃度のポツリヌス毒素；(ii) 0.05～0.25% (w/v)の量のHSA；及び、(iii) 0.6～1.2% (w/v)の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；を含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10～200 U/mlの濃度のポツリヌス毒素；(ii) 0.01～0.5% (w/v)の量のHSA；及び、(iii) 0.9% (w/v)の量の、等張化剤としての塩化ナトリウム；を含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10～200 U/mlの濃度のポツリヌス毒素；(ii) 0.05～0.25% (w/v)の量のHSA；及び、(iii) 0.9% (w/v)の量の、等張化剤としての塩化ナトリウム；を含む。

10

【0120】

また、本明細書では、上記及び下記段落に記載の好ましい液体製剤は、 Fe^{3+} イオンの濃度が1 μ M未満、好ましくは1000 nM未満又は500 nM未満、より好ましくは250 nM未満又は100 nM未満、及び最も好ましくは10 nM未満又は1 nM未満であることを特徴とし得ることが、さらに企図される。

20

【0121】

本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) ポツリヌス毒素；(ii) HSA；(iii) 等張化剤；及び(iv) 緩衝剤；を含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10～200 U/mlの濃度のポツリヌス毒素；(ii) 0.01～1.0% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.01～2.0% (w/v)の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；及び、(iv) 1～100 mMの濃度の緩衝剤；を含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10～200 U/mlの濃度のポツリヌス毒素；(ii) 0.01～0.5% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.01～2.0% (w/v)の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；及び、(iv) 1～100 mMの濃度の緩衝剤；を含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10～200 U/mlの濃度のポツリヌス毒素；(ii) 0.05～0.25% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.1～2.0% (w/v)の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；及び、(iv) 1～100 mMの濃度の緩衝剤；を含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10～200 U/mlの濃度のポツリヌス毒素；(ii) 0.05～0.25% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.6～1.3% (w/v)の量の等張化剤、好ましくは塩化ナトリウム；及び、(iv) 2～50 mMの濃度の緩衝剤；を含む。本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) 10～200 U/mlの濃度のポツリヌス毒素；(ii) 0.05～0.25% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.9% (w/v)の量の塩化ナトリウム；及び、(iv) 5～20 mMの濃度の緩衝剤；を含む。また、本明細書では、本段落に記載の好ましい液体製剤は、 Fe^{3+} イオンの濃度が1 μ M未満、好ましくは1000 nM未満又は500 nM未満、より好ましくは250 nM未満又は100 nM未満、及び最も好ましくは10 nM未満又は1 nM未満であることを特徴とし得ることが、さらに企図される。

30

40

【0122】

本発明の好ましい液体製剤の1つは、(i) ポツリヌス毒素；(ii) HSA；(iii) 等張化剤としての塩化ナトリウム；並びに、(iv) 緩衝剤としての、ヒスチジン、リン酸塩、及びそれらの混合物から選択される緩衝剤、好ましくはヒスチジン；を含む。

50

【0123】

本発明の特に好ましい液体製剤の1つは、(i) 10~200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；(ii) 0.01~1.0% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.01~2.0% (w/v)、好ましくは0.9% (w/v)の量の塩化ナトリウム；及び、(iv) 1~100 mMの濃度のヒスチジン、リン酸塩、及びそれらの混合物から選択される緩衝剤、好ましくは1~100 mMの濃度のヒスチジン；を含む。

【0124】

本発明の特に好ましい他の液体製剤の一つは、(i) 10~200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；(ii) 0.01~0.5% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.9% (w/v)の量の塩化ナトリウム；及び、(iv) 1~100 mMの濃度のヒスチジン、リン酸塩、及びそれらの混合物から選択される緩衝剤、好ましくは1~100 mMの濃度のヒスチジン；を含む。

【0125】

本発明の特に好ましい、さらに別の液体製剤の一つは、(i) 10~200 U/mlの濃度のボツリヌス毒素；(ii) 0.05~0.25% (w/v)の量のHSA；(iii) 0.9% (w/v)の量の塩化ナトリウム；並びに、(iv) 1~100 mMの濃度の、好ましくは2 mM~50 mMの濃度の、より好ましくは5 mM~20 mMの濃度の、ヒスチジン、リン酸塩、及びそれらの混合物から選択される緩衝剤、好ましくは、1~100 mMの濃度の、好ましくは2 mM~50 mMの濃度の、より好ましくは5 mM~20 mMの濃度のヒスチジン；を含む。

【0126】

さらに、上記の好ましい液体製剤、及び特に好ましい液体製剤は、好ましくは6.0~7.5の範囲のpHを有する。また、ボツリヌス毒素は好ましくは血清型Aであり、より好ましくは血清型Aの神経毒成分である。

【0127】

本発明の好ましい液体製剤の一例は以下の通りである：

製剤1：

50 U/ml BoNT/A

0.9% NaCl (9 mg/ml)

0.085% HSA (EDTA-透析済) (0.85 mg/ml)

0.155% ヒスチジン (1.55 mg/ml；約10 mM)

pH 6.0

【0128】

製剤例1のHSA (EDTA-透析済)は、例えば、

— 20% HSA溶液1 mlあたりに37.2 mgのNa₂-EDTAを攪拌下で添加し、NaOHでpH 8.0に調整する工程；

— 攪拌下、室温で6時間インキュベートする工程；

— 室温にて16時間、マグネチックスターラー上で穏やかに攪拌しながら、100倍量のEDTA緩衝液 (100 mM Na₂-EDTA；10 mM ヒスチジン；0.9% NaCl (pH 7.0)) に対して透析 (透析膜のMWCO：10 kDa) を行う工程；

— 室温にて24時間、100倍量の10 mM ヒスチジン、0.9% NaCl (pH 6.0) に対して透析を行い、その後、透析緩衝液を新鮮な緩衝液に入れ替えてさらに24時間の透析を行い、これをさらに2回繰り返す工程；

を含むプロセスによって調製される。

【0129】

製剤例1において、EDTAは、任意にEGTA、BAPTA、又はDTPAなどの他のキレーターで置き換えることができる。HSA溶液に固体のEDTAを加える代わりに、濃縮EDTA溶液を使用することもできる (例えば、200 mM EDTA、pH 8.0)。最初の (EDTA緩衝液に対する) 透析工程を省略することもできる。透析の代わりに、クロスフロー透析又は限外濾過などの他の方法を用いることもできる。

【0130】

本発明はまた、ボツリヌス毒素を含む液体製剤であって、液体製剤を40℃の高温で4週間保存しても、初期毒素活性に対して毒素活性が20%より多く低下しない、液体製剤に関する。本発明はまた、ボツリヌス毒素を含む液体製剤であって、液体製剤を250W/m²の光源に7時間曝露しても、初期毒素活性に対して毒素活性が20%より多く低下しない、液体製剤に関する。好ましくは、光安定性試験、すなわち250W/m²での7時間の曝露には、ICH Q1Bに従った窓ガラスフィルターを使用し、ISO 10977によるID65（室内間接昼光基準）に対応する320～800nmの波長範囲の分光分布を提供するフィルターセットを備えた、SUNTEST CPS+装置（ATLAS Material Testing Technology社）を使用することができる。

10

【0131】

さらに、本発明は、本明細書に記載の液体ボツリヌス毒素製剤を調製する方法であって、本明細書に記載の成分、特に成分(i)～(ii)、及び任意に成分(iii)及び(vi)のうち1つ以上、好ましくは、成分(i)、(ii)、(iii)、及び(iv)、を加えることを含む方法に関する。本発明の液体製剤の調製は特に限定されず、それぞれの製剤化技術は当業者に公知である。上述したように、ボツリヌス毒素の液体製剤は一般に水溶液であり、好ましくは食塩水、より好ましくは生理食塩水、最も好ましくは緩衝（例えば、リン酸又はヒスチジン緩衝）生理食塩水である。

【0132】

好ましくは、まず塩を溶解し、次にHSAを加え、必要に応じてpHを調整し、そしてボツリヌス毒素を加える。この順番は必須条件ではないが、これによってBONTの最大比活性が確実に保たれると考えられる。好ましくは、液体ボツリヌス毒素製剤の調製方法は、粉末形態の凍結乾燥ボツリヌス毒素製剤の再構成を含まない。

20

【0133】

さらに、本発明は、液体ボツリヌス毒素製剤を安定化する方法に関し、この方法は、ボツリヌス毒素をヒト血清アルブミン(HSA)と組み合わせることを含み、HSAは、

(a) ヒト血清アルブミンを含む組成物をキレート剤に接触させることによって、ヒト血清アルブミンと前記キレート剤との混合物を得る工程；及び

(b) 前記キレート剤を前記混合物から除去する工程；

を含む方法によって調製される。

30

【0134】

さらに、本発明は、ボツリヌス毒素を含む液体組成物の光及び／又は温度安定性を高めるための、ヒト血清アルブミン(HSA)の使用に関し、HSAは、

(a) ヒト血清アルブミンを含む組成物をキレート剤に接触させることによって、ヒト血清アルブミンと前記キレート剤との混合物を得る工程；及び

(b) 前記キレート剤を前記混合物から除去する工程；

を含む方法によって調製される。

【0135】

さらに、本発明は、

(a) ヒト血清アルブミンを含む組成物をキレート剤に接触させることによって、ヒト血清アルブミンと前記キレート剤との混合物を得ること；及び

(b) 前記キレート剤を前記混合物から除去すること；

によって得ることができる、ヒト血清アルブミン(HSA)に関する。

40

【0136】

第4の態様において、本発明は、本発明の液体製剤を調製するための方法に関し、この方法は、

－ ヒト血清アルブミン出発材料を精製することによって、精製ヒト血清アルブミン材料を得る工程；

－ 得られた精製ヒト血清アルブミンを、ボツリヌス毒素、及び任意にさらなる成分と

50

混合することにより、液体製剤を得る工程；

あるいは、

－ ボツリヌス毒素とヒト血清アルブミンとを含む液体組成物を精製することにより、精製液体組成物を得る工程；

－ 得られた精製液体組成物をさらなる成分と混合することにより、液体製剤を得る工程；

を含む。

【0137】

ヒト血清アルブミン出発材料は、本明細書において上記で定義した通りである。好ましくは、ヒト血清アルブミン出発材料は、少なくとも5% (w/v) のHSA、好ましくは10% (w/v) ~ 35% (w/v) のHSA、より好ましくは15% (w/v) ~ 30% (w/v)、最も好ましくは20% (w/v) ~ 25% (w/v) のHSAを含む、水溶液の形態である。ヒト血清アルブミン出発材料は、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファン、特にN-アセチルトリプトファンを、5mM超の量、10mM以上の量、20mM以上の量、又は30mM以上の量で含んでもよい。また、工程(a)で得られる混合物のpHは、6.0~9.0、好ましくは6.5~8.5、より好ましくは7.0~8.5、最も好ましくは7.0~8.0の範囲のpHに調整してよい。

10

【0138】

好ましくは、本発明の方法の第1の選択肢において、精製工程により、トリプトファン及び／又はN-アセチルトリプトファンを含まない、又は、5mM以下、好ましくは1mM以下、より好ましくは0.1mM以下、最も好ましくは0.001mM以下含む、精製ヒト血清アルブミン材料が得られる。液体製剤の調製に際しては、精製ヒト血清アルブミン材料は、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンの濃度が本明細書に記載の範囲内、例えば50µM未満になるように希釈される。

20

【0139】

精製工程は、ヒト血清アルブミン出発材料、又はボツリヌス毒素とヒト血清アルブミンとを含む液体組成物を、透析；透析濾過（クロソフロー濾過）；限外濾過；イオン交換クロマトグラフィー（IEX）、アフィニティークロマトグラフィー、及び疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）等のクロマトグラフィー精製技術；フィールド・フロー・フラクショネーション；又は沈殿法（例えば、塩析もしくはエタノール沈殿）；に供することによって行ってもよい。

30

【0140】

好ましくは、精製は透析によって行われる。透析は、典型的には0.5~48時間、特に1~24時間又は1~12時間、0℃~30℃の温度、特に2℃~30℃又は4℃~25℃の温度、例えば室温で行う。さらに、透析は、典型的には、インキュベートしたHSA溶液の量の10~1000倍量の透析緩衝液に対して行い、透析緩衝液は通常、少なくとも1回交換する。使用する透析膜の分画分子量は、例えば10kDaである。

【0141】

例えば、精製血清アルブミンを、以下のプロセス：

－ 市販のHSA製品を、室温にて24時間、マグネチックスターラー上で穏やかに攪拌しながら、100倍量の透析緩衝液（10mM ヒスチジン、0.9% NaCl、pH 6.0）に対して透析（透析膜のMWCO：10kDa）を行うこと；

40

－ 緩衝液を新鮮な透析緩衝液に入れ替えて24時間の透析を行い、これをさらに2回繰り返すこと；

によって得てもよい。

【0142】

上記方法の第一の選択肢、すなわち、ヒト血清アルブミン出発材料を精製すること、並びに得られた精製ヒト血清アルブミンをボツリヌス毒素、及び任意にさらなる成分と混合することは、本発明において好ましいものである。本発明の液体製剤を得るための混合工程は、特に限定されるものではないが、例えば、成分(i)~(ii)、及び任意に成分

50

(i i i) 及び (v i) のうち 1 つ以上を混合することが挙げられる。好ましくは、まず塩を溶解し、次に H S A を加え、必要に応じて p H を調整し、そしてボツリヌス毒素を加える。この順番は必須条件ではないが、これによって B o N T の最大比活性が確実に保たれると考えられる。好ましくは、液体ボツリヌス毒素製剤の調製方法は、粉末形態の凍結乾燥ボツリヌス毒素製剤の再構成を含まない。

【0143】

本発明の第 1 の態様に関して上述したように、 $F e^{3+}$ イオンも光安定性に対して不安定化作用を及ぼすことから、本発明の液体製剤の $F e^{3+}$ イオン濃度が低いことも本明細書において企図される。したがって、本発明によれば、 $F e^{3+}$ イオンを除去するため、本発明による方法の精製工程は、以下のように実施されるか、又はさらに以下の工程を含む：

10

－ ヒト血清アルブミン出発材料をキレート剤に接触させることにより、前記ヒト血清アルブミン出発材料と前記キレート剤との混合物を得る工程；及び、

－ 前記混合物から前記キレート剤を除去することにより、キレート剤処理済精製ヒト血清アルブミン材料を得る工程；

あるいは、

－ ボツリヌス毒素とヒト血清アルブミンとを含む液体組成物をキレート剤に接触させることにより、前記液体組成物と前記キレート剤との混合物を得る工程；及び、

－ 前記混合物から前記キレート剤を除去することにより、キレート剤処理済精製液体製剤を得ること。

20

【0144】

接触工程において、好ましくは、キレート剤が混合物中に 0.1 mM ~ 1000 mM 又は 0.1 mM ~ 500 mM、より好ましくは 0.5 mM ~ 500 mM 又は 1 mM ~ 500 mM、最も好ましくは 10 mM ~ 100 mM の濃度で存在するように、ヒト血清アルブミン出発材料、及びボツリヌス毒素とヒト血清アルブミンとを含む液体組成物を、それぞれ一定量のキレート剤に接触させる。

【0145】

キレート剤の除去は、透析、クロスフロー濾過、又は限外濾過によって行ってもよい。

【0146】

本明細書で使用される「接触」という用語は、2 つ以上の成分を 1 つに合わせるという広義の解釈を意図している。これは、溶解、混合、懸濁、配合、スラリー化、攪拌、フローイング・バイ (flowing by)、吸着、結合、抽出などの様々な異なる方法によって達成することができる。典型的には、キレート剤を、H S A を含む組成物 (例えば、H S A の溶液) に添加し、次いで混合によって均一な混合物を得て、任意でさらなる処理工程 (例えば、キレート剤含有緩衝液に対する透析) を行う。

30

【0147】

したがって、「接触」は、例えば水溶液の形態の H S A 材料を、固定化金属親和性樹脂 (I M A C) にロードすることによって実行可能であることが本明細書において企図される。本明細書で使用される「固定化金属親和性樹脂」(I M A C) という用語は、限定されるものではないが、その例として、多価陽イオンを結合及び配位することができる固定化された官能基部分 (イミノ二酢酸など) を含んだ樹脂、例えば Chelating-Sephareose、Fractogel-EMD-Chelate、POROS 20MC、Matrex Cellufine Chelate、TALON、及び Chellex 100 樹脂などが挙げられる。このような固定化金属親和性樹脂は一般的に、当業者に公知のように、クロマトグラフィー金属アフィニティーカラムの形態で使用される。また、本明細書で使用される「接触」という用語は、適切な固定化金属親和性樹脂を使用するバッチモードでの結合のことも含む。

40

【0148】

また、接触工程に関して、接触工程の定義において使用される「ヒト血清アルブミン出発材料」及び「キレート剤」という用語は、それらの物理的形態に関する何らかの制限の

50

意味を意図するものではなく、あるいは、H S A 及びキレート剤と混合される、又はそれらに含まれる、他の物質又は化合物の存在を除外することを意図するものではないことに注意されたい。すなわち、キレート剤に接触させる「ヒト血清アルブミン出発材料」は、固体又は液体（例えば、水性組成物もしくは水溶液）の形態など、いかなる形態で存在していてもよい。同様に、ヒト血清アルブミン出発材料に接触させる「キレート剤」は、固体又は液体（例えば、水性組成物もしくは水溶液）の形態など、いかなる形態で存在していてもよい。

【0149】

好ましくは、接触工程で得られる混合物は水性混合物である。この水性混合物は、様々な方法で調製することができる。例えば、ヒト血清アルブミンは水性組成物、例えば水溶液の形態であってよく、この水性組成物を、固形又は液状で存在し得るキレート剤、例えば水溶液の形態で存在し得るキレート剤と、混合してよい。さらに、ヒト血清アルブミンは、キレート剤及び水溶液と混合された、又はキレート剤の水溶液と混合された、凍結乾燥材料などの固体の形態であってもよい。好ましくは、ヒト血清アルブミンは水性組成物、より好ましくは水溶液の形態であり、キレート剤は固体又は水性組成物（例えば水溶液）である。

10

【0150】

特に、接触工程においてキレート剤に接触させるH S Aは、少なくとも5% (w/v) のH S A、好ましくは10~35% (w/v) のH S A、より好ましくは15~30% (w/v) のH S A、最も好ましくは20% (w/v) ~25% (w/v) のH S Aを含む、水溶液の形態であってよい。また、工程(a)で得られる混合物のpHは、6.0~9.0、好ましくは6.5~8.5、より好ましくは7.0~8.5、最も好ましくは7.0~8.0の範囲のpHに調整してよい。

20

【0151】

さらに、本発明による液体製剤を調製するための方法の接触工程は、いくつかのサブ工程を含んでもよい。例えば、一実施形態において、接触工程は、キレート剤（例えば、EDTA）及びヒト血清アルブミンを混合する工程と、前記混合物を所定時間インキュベートする工程と、任意に、前記混合物をキレート剤、好ましくはインキュベーションサブ工程で使用されるものと同一のキレート剤、を含む緩衝液に対して透析する工程とを含むか、あるいはこれらの工程（のみ）からなる。他の一実施形態においては、前記混合物をインキュベートせずに、キレート剤を含む緩衝液に対する透析を（直接）行い、このキレート剤は、好ましくは、キレート剤（例えば、EDTA）とヒト血清アルブミンとを混合する工程で使用されるものと同一である。他の一実施形態においては、キレート剤とヒト血清アルブミンとを、透析前に混合しない。すなわち接触工程(a)は、前記混合物を、キレート剤を含む緩衝液に対して透析する工程を含むか、あるいはその工程（のみ）からなる。

30

【0152】

好ましくは、接触工程は、キレート剤を、H S Aを含む組成物（例えば、H S Aの溶液）に加える工程；又は、キレート剤を、H S Aを含む組成物（例えば、H S Aの溶液）と混合する工程；を含むか、あるいはその工程（のみ）からなる。その後、得られた混合物を一定時間インキュベートする。例えば、攪拌せずに所定の時間静置するか、又は所定の時間攪拌する。

40

【0153】

インキュベーション時間は特定の範囲に限定されないが、典型的には少なくとも0.5時間、特に少なくとも1時間、さらには特に、少なくとも2時間である。インキュベーション時間の上限は重要ではなく、例えば1時間、2時間、5時間、又は10時間であってもよい。したがって、インキュベーション時間は、例えば、0.5~5時間、又は1時間~10時間であってもよい。同様に、インキュベーション温度も特に限定されず、例えば、0℃~60℃の範囲内であってもよい。好ましくは、温度は0℃~30℃である。すなわち、本発明において、室温（20℃又は25℃）は好適な温度である。当業者に公知で

50

あるように、温度は反応時間に影響する。一般に、インキュベーション条件（例えば、時間及び温度）は、最終産物に含まれるキレート剤（例えば、EDTA）の残存量が100 μ M以下、好ましくは10 μ M以下、より好ましくは1 μ M以下となるように選択される。

【0154】

任意に、インキュベーション工程に続いてさらなる処理を行う。その例として、インキュベートされた混合物を、キレート剤を含む緩衝液に対して透析することが挙げられ、このキレート剤は、典型的には、インキュベーション工程で使用したものと同一である。この任意の透析工程で使用するキレート剤は、好ましくは、0.1 mM～1000 mM、より好ましくは1 mM～200 mM、最も好ましくは10 mM～100 mMの濃度で透析緩衝液中に含まれる。また、透析工程で使用する緩衝液は、(i) 7.5～8.5のpHを有すること；(ii) さらに緩衝剤を含み、それが好ましくは最終組成に応じたものであること；もしくは、(iii) さらに等張化剤を含み、それが好ましくは0.9% (w/v) 塩化ナトリウムであること；又は、(i) 及び(ii)；(i) 及び(iii)；(ii) 及び(iii)；もしくは、(i) 及び(ii) 及び(iii)；であることも好ましい。

10

【0155】

本明細書で使用するのに適したキレート剤は、本明細書において上記で定義した通りである。上記のキレート剤のいずれかの混合物も、例えば溶液として、固体として、又はマトリックスに結合して、本発明において使用することができる。

20

【0156】

本発明によれば、キレート剤は、透析（透析袋を用いる従来の透析、向流透析など）、逆浸透、濾過、クロスフロー濾過、限外濾過、及びクロマトグラフィー法（例えば、イオン交換クロマトグラフィー又はゲル濾過クロマトグラフィー）などの、任意の適切な技術によって除去してよい。

【0157】

好ましくは、キレート剤は透析によって除去する。透析は、典型的には0.5時間～48時間、特に1時間～24時間又は1時間～12時間、0℃～30℃の温度、特に2℃～30℃又は4℃～25℃の温度、例えば室温で行う。さらに、透析は、典型的には、インキュベートしたHSA／キレート剤混合物の量の10～1000倍量の透析緩衝液に対して行い、透析緩衝液は通常、少なくとも1回交換する。使用する透析膜の分画分子量は、例えば10 kDaである。

30

【0158】

一般に、透析条件（例えば、時間、温度、緩衝液の量、緩衝液の交換回数）は、最終産物に含まれるキレート剤（例えば、EDTA）の残存量が100 μ M以下の濃度、好ましくは10 μ M以下の濃度、より好ましくは1 μ M以下の濃度となるように選択される。

【0159】

第5の態様において、本発明は、治療における使用のための本発明の液体製剤に関する。

【0160】

特に、本発明の液体製剤は、神経筋疾患、疼痛、流涎症、多汗症、泌尿器障害、及び神経障害の治要において使用してもよい。

40

【0161】

神経筋疾患の例としては、ジストニア、頸部ジストニア、痙攣、脳卒中後痙縮、眼瞼痙攣、振戦、多動性運動障害、及び脳性麻痺などが挙げられる。泌尿器障害としては、特に、排尿筋過活動、過活動膀胱、神経因性膀胱及び間質性膀胱炎、外陰部痛及び慢性骨盤痛の治療、良性前立腺肥大症（BPH）、並びに排尿筋括約筋協調不全（DSD）、によって特徴づけられる状態が挙げられる。神経障害の例としては、慢性片頭痛、三叉神経痛、末梢神経障害性疼痛、糖尿病性神経障害性疼痛、及びうつ病などが挙げられる。

【0162】

50

第6の態様において、本発明は、美容上の状態の治療のための、本発明の液体製剤の美容的使用に関する。

【0163】

本発明のこの態様は、本発明の液体製剤の純粋に審美的な使用に関する。治療すべき好ましい美容上の状態としては、皮膚状態、特に皮膚のシワ、とりわけ顔のシワの治療が挙げられる。

【0164】

本明細書で使用される「シワ」という用語は、シワ (w r i n k l e) だけでなく、細シワ (l i n e)、浅ジワ (r h y t i d)、小ジワ (c r e a s e)、深ジワ (f u r r o w)、及び皺 (f o l d) も含むように広く解釈されるものとする。「細シワ」、「シワ」、「浅ジワ」、「小ジワ」、及び「皺」という語は類似した定義を共有し、したがって、互換的に使用されることが多い。本発明において、「細シワ」は一般的に「シワ」と互換的であるが、好ましくは「シワ」よりも浅い皮膚のくぼみを指す場合がある。「皺」はシワ及び細シワと互換的であり、好ましくは線状のくぼみである。「小ジワ」はシワ、細シワ、及び皺と互換的である。この用語は、好ましくは、シワの軽度の形態のことを指し、特定の位置にある特定のシワを説明する場合がある。本明細書において使用される「浅ジワ」は、シワと同じ意味を基本的に有する。しかし、「浅ジワ」は、好ましくは、細シワが不規則に集合することによって形成される皮膚の構造のことを指す。「深ジワ」は、皮膚における深い皺又は深い細シワである。

【0165】

好ましくは、本発明に従って治療されるシワは顔のシワであり、例として、額の横ジワ、眉間のシワ、目元のシワ、目尻のシワ、鼻根部のシワ（すなわち、鼻の両側面で下向きに広がるシワ）、ほうれい線、上唇の放射状のシワ、下唇の放射状のシワ、口角周囲のシワ、マリオネットライン、口元のシワ、口角、頤唇溝、及び顎の梅干しジワが挙げられる。

【0166】

上記の顔のシワを治療するため、ボツリヌス毒素は、通常、以下の筋肉への筋肉注射により投与される：前頭筋（額の横ジワ）、鼻根筋及び皺眉筋（眉間のシワ）、外側眼輪筋（目尻のシワ／目元のシワ）、横方向の鼻の筋肉である鼻筋、鼻根筋（鼻根部のシワ）、上唇鼻翼挙筋（ほうれい線）、口輪筋（上唇及び下唇の放射状のシワ）、口角下制筋（口角周囲のシワ、マリオネットライン、口角、頤唇溝）、及び頤筋（口元のシワ、顎の梅干しジワ）。

【0167】

本発明の液体製剤のさらに好ましい美容的使用の1つは、顔及び／又は身体の若返り及び／又は肌質の改善を含む美容用途のための使用に関する。

【0168】

第7の態様において、本発明は、有効量の本発明の液体製剤を、それを必要とする個人に投与することを含む、疾患又は状態を治療する方法に関する。

【0169】

疾患又は状態は、それが治療上の適応症であるか美容上の適応症であるかに関わりなく、本明細書において上記した疾患及び状態のいずれか1つであってよい。したがって、一実施形態において、本発明は、美容上の（審美的な）状態、好ましくは皮膚状態を治療する（非治療的）方法に関し、この方法は、有効量の本発明の液体製剤を、それを必要とする個人に投与することを含む。他の一実施形態において、本発明は、美容上の（審美的な）状態、好ましくは皮膚状態を治療する（非治療的）方法に関し、この方法は、有効量の本発明の液体製剤を、それを必要とする個人に注射することを含む。

【0170】

本発明のさらなる好ましい方法の1つは、顔及び／又は身体の若返り及び／又は肌質の改善の方法に関し、この方法は、有効量の本発明の液体製剤を、それを必要とする個人に投与することを含む。

【0171】

治療対象者は、本発明に従って治療可能な疾患又は状態を有する限りは、特に限定されない。当業者であれば、所与の治療上又は美容上の適応症の治療のための、適切な投与レジメンを決定することができるであろう。特に、注射は、治療すべき疾患又は状態に応じて、皮内、皮下、又は筋肉内注射であってもよい。

【0172】

上記とは別に、本発明はさらに、液体ボツリヌス毒素製剤を安定化するための方法に関し、この方法は、ボツリヌス毒素をヒト血清アルブミン（HSA）と組み合わせることを含み、HSAは、本発明の第4の態様に関連して記載されるように、ヒト血清アルブミン出発材料を精製することによって精製ヒト血清アルブミン材料を得ることにより調製される。

10

【0173】

さらに本発明は、ボツリヌス毒素を含む光及び温度安定性液体組成物を提供するための、ヒト血清アルブミン（HSA）の使用にも関し、HSAは、本発明の第4の態様に関連して記載されるように、ヒト血清アルブミン出発材料を精製することによって精製ヒト血清アルブミン材料を得ることにより調製される。

【実施例】

【0174】

I. 実施例1～3

以下の実施例により、本発明による液体ボツリヌス毒素製剤及びその調製方法を説明する。百分率は、特に断りのない限り、重量／体積（w／v）である。

20

【0175】

ボツリヌス毒素の生物活性は、国際公開第2014／207109号パンフレットに記載されているように、細胞ベースの効力アッセイ（CBA）を用いて決定した。簡単に説明すると、神経細胞を、神経毒含有試料、及び既知の効力の標準試料とともにインキュベートした。

【0176】

インキュベート時間後、細胞を溶解し、切断されたSNAP25タンパク質の量をイムノアッセイにより測定した。その後、試料で処理した細胞の切断率を、標準試料で処理した細胞の切断率と比較することにより、試料の生物活性を算出した。

30

【0177】

実施例1

従来の透析で前処理したHSAを含む（本発明によらない）液体ボツリヌス毒素製剤の、光及び保存安定性

最初の実験では、複合化タンパク質を含まない150kDaのA型ボツリヌス神経毒（本明細書では「150kDa BoNT/A」とも呼ぶ）の液体製剤の生物活性が、光（昼光又は室内光）への曝露後に大きく低下すること、そして、ヒト血清アルブミン（HSA）濃度の増加とともに光感受性が増加することが見出された。さらなる実験において、本願発明者らは、EDTAなどの錯化剤を加えることによって、液体ボツリヌス毒素製剤の40℃における光安定性及び保存安定性が有意に増加し得ることを予想外にも発見した。これは、EDTAが、そのマグネシウム、カルシウム、又は亜鉛錯体の形態で存在する場合であっても同様である（結果は示さず）。

40

【0178】

これらの結果を鑑みて、HSAに含まれる未知の成分が、ボツリヌス毒素の光感受性をもたらしたこと、及び、この成分を、EDTAなどのキレート剤によって、何らかの形で不活性化又はマスクし得ることが推測された。しかし、本願発明者らが行ったさらなる実験では、驚くべきことに、EDTAが注射の痛みを強めることが判明した。そこで本願発明者らは、EDTAなどのキレート剤無しで済ませるため、HSA中の光不安定性の原因となる未知の成分を、透析によって除去することを試みた。

【0179】

50

この目的のため、HSAの濃縮ストック溶液（例えば20%）を、10mM ヒスチジン、0.9% NaCl（pH6.0）の緩衝液に対して、室温にて4×12時間（3回の緩衝液交換、緩衝液は試料の100倍量）、周到に透析することにより、「透析済HSA」を得た。その後、透析済HSA及び非透析HSAを用いて、以下のボツリヌス毒素（複合化タンパク質を含まない150kDaのBoNT/A）の液体製剤を調製した：

製剤1：65U/mL ボツリヌス毒素、0.1% HSA（未透析）、10mM ヒスチジン、0.9% NaCl（pH6.0）

製剤2：65U/mL ボツリヌス毒素、0.1% HSA（透析済）、10mM ヒスチジン、0.9% NaCl（pH6.0）

【0180】

これら2つの製剤の光安定性について、250W/m²の光に7時間曝露後の相対ボツリヌス毒素活性を、暗所に保存した対照試料と比較において測定することにより決定した。前記の250W/m²の光に対する7時間の曝露には、ICH Q1Bに従った窓ガラスフィルターを使用し、ISO 10977によるID65（室内間接昼光基準）に対応する320～800nmの波長範囲の分光分布を提供するフィルターセットを備えた、SUNTEST CPS+装置（ATLAS Material Testing Technology社）を使用した。結果を表1に示す。

【表1】

未透析HSA又は透析済HSAを含む液体ボツリヌス毒素製剤の光安定性（7時間、250W/m²）

BoNT/A製剤	透析	相対BoNT/A活性 （対照に対する%）
1	無し	46%
2	有り	56%

【0181】

表1から明らかなように、未透析HSAを含む製剤1との比較において、透析済HSAを含む製剤2で観察された光安定性に対する影響は限定的であった。

【0182】

さらに、製剤1及び2の保存安定性について、40℃で2週間及び4週間保存後の相対ボツリヌス毒素活性を、T0の対照試料（製剤1及び2の調製直後に測定）との比較において測定することにより決定した。結果を表2に示す。

【表2】

未透析HSA又は透析済HSAを含む液体ボツリヌス毒素製剤の40℃での保存安定性

BoNT/A製剤	透析	相対BoNT/A活性 （T0における対照に対する%）	
		40℃で2週間保存後	40℃で4週間保存後
1	無し	66%	52%
2	有り	65%	51%

【0183】

透析がボツリヌス毒素の保存安定性に影響を与えないことが分かる。

【0184】

実施例2

錯化剤及び透析で前処理したHSAを含む液体ボツリヌス毒素製剤の、光及び保存安定性

実施例1の結果（すなわち、光安定性にEDTA又はEDTA複合体が必要なこと；透析済HSAが光安定性及び保存安定性の有意な改善をもたらさないこと）にも関わらず、

本願発明者らは、EDTAなどのキレート剤を含まなくとも光及び保存安定性である液体ボツリヌス毒素製剤の研究を継続した。

【0185】

まず、EDTAを、HSAの濃縮ストック溶液（例えば20%）に加え（100mM＝HSA溶液（pH8.0）1mlあたり37.2mgのNa₂-EDTA）、攪拌下で室温にて6時間インキュベートした。その後、インキュベート済の混合物を、EDTAを含む緩衝液（100mM EDTA、10mM ヒスチジン、0.9% NaCl（pH7.0））に対して、室温で16時間透析した。使用した透析膜はMWCOが10kDaの膜であり、充填量は透析膜1cm²あたり約0.2mlであった。透析緩衝液の量は、試料の約100倍量であった。

10

【0186】

その後、試料の約100倍量の、EDTAを含まない透析緩衝液（10mM ヒスチジン、0.9% NaCl（pH6.0））に対して室温で24時間透析を行うことにより、EDTAを除去した。その後、透析緩衝液を新鮮な透析緩衝液に交換し、再び24時間透析を行った。これを2回繰り返すことで、前処理済HSA（「EDTA-透析済HSA」）を得た。

【0187】

その後、この前処理済HSAを使用して、ボツリヌス毒素の液体製剤3（複合化タンパク質を含まない150kDaのBoNT/A）を調製した：

製剤1：実施例2の製剤1と同一（65U/mL ボツリヌス毒素、0.1% HSA（未透析）、10mM ヒスチジン、0.9% NaCl（pH6.0））

20

製剤3：65U/mL ボツリヌス毒素、0.085% HSA（EDTA-透析済）、10mM ヒスチジン、0.9% NaCl（pH6.0）

【0188】

製剤1及び3の光安定性について、250W/m²の光に7時間曝露後の相対ボツリヌス毒素活性を、暗所に保存した対照試料と比較において測定することにより決定した。結果を表3に示す。

【表3】

未透析HSA又はEDTA-透析済HSAを含む液体ボツリヌス毒素製剤の光安定性（7時間、250W/m²）

30

BoNT/A製剤	EDTA/ 透析	相対BoNT/A活性 （対照に対する%）
1	無し	46%
3	有り	84%

【0189】

表3から明らかなように、EDTA-透析済HSAを含む製剤3では、前処理していないHSAを含む製剤1と比較して、光安定性の顕著な改善が見られた。

【0190】

40

さらに、保存安定性について、40℃で2週間及び4週間保存後の相対ボツリヌス毒素活性を、T0の対照試料（製剤1及び3の調製直後に測定）との比較において測定することにより決定した。結果を表4に示す。

50

【表 4】

未透析HSA又はEDTA-透析済HSAを含む液体ボツリヌス毒素製剤の40℃での保存安定性

BoNT/A製剤	EDTA-透析	相対BoNT/A活性 (T0における対照に対する%)	
		40℃で2週間保存後	40℃で4週間保存後
1	無し	66%	52%
3	有り	94%	82%

10

【0191】

その結果、EDTA処理済かつ透析済HSAを使用すると、未処理（未透析）HSAを含む製剤1と比較して、生物学的毒素活性が有意に高くなることが示された。

【0192】

全体として、この実施例は、HSAをキレート剤で前処理した後、キレート剤を、例えば透析によって除去すれば、液体製剤にキレート剤（例えばEDTA）を、予想外にも、含めずに済むことを示している。得られた製剤は、光及び温度（保存）に安定であるだけでなく、EDTAなどのキレート剤を含む液体製剤と比較して、注射時の痛みが軽減されている。

【0193】

20

実施例3

液体ボツリヌス毒素製剤の光安定性に対する鉄イオンの影響

さらに、金属イオンが光感受性に及ぼす影響を調べる実験を行った。この観点から、カルシウム（1mM Ca^{2+} ）、コバルト（1mM Co^{2+} ）、銅（1mM Cu^{2+} ）、ニッケル（1mM Ni^{2+} ）、又は鉄（1mM Fe^{3+} ）を、50U/mlの150kDa BoNT/A、実施例2に従って調製した0.085%の前処理済HSA（すなわち、EDTA処理済かつ透析済HSA）、10mM ヒスチジン、0.9% NaClを含む液体製剤（pH6.0）に添加した。液体製剤は、高純度の水、ヒスチジン、及びNaClを使用し、鉄又はスチールの器具を使用せずに調製した。得られた製剤を光に曝露し（250W/m²で7時間）、暗所保存対照製剤と比較を行った。

30

【0194】

カルシウム及びコバルトを添加しない製剤（暗所保存対照製剤と比較して79%の残存毒素活性）との比較によれば、カルシウム（1mM Ca^{2+} ）の添加及びコバルト（1mM Co^{2+} ）の添加は光安定性に影響しない（暗所保存対照製剤と比較して74%及び77%の残存毒素活性）ことが分かった。銅（1mM Cu^{2+} ）及びニッケル（1mM Ni^{2+} ）の添加は、光安定性をやや低下させた。対照的に、鉄（1mM Fe^{3+} ）の添加は光安定性を大幅に低下させ、光への曝露（250W/m²で7時間）後の残存毒素活性は、暗所保存対照製剤と比較してわずか1%であった（結果は示さず）。

【0195】

これらの結果を踏まえ、液体BoNT/A製剤の光感受性に対する Fe^{3+} イオンの影響を、10pMから100μMの濃度範囲でより詳細に調べた。上述の実験と同様に、前処理済HSAを含む同じ製剤（50U/mlボツリヌス毒素、0.085%前処理済HSA、10mM ヒスチジン、0.9% NaCl（pH6.0））を使用し、ストック溶液（50mM $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ）を用いて Fe^{3+} 濃度を所望の最終濃度に調整した。250W/m²の光に7時間曝露した後に測定した生物活性を、暗所で保存した各試料について測定した生物活性に対する百分率で表したものを、表5に示す。

40

50

【表 5】

前処理済 H S A 及び各種濃度の $F e^{3+}$ を含む液体ボツリヌス毒素製剤の光安定性（7 時間、 $250 W/m^2$ ）

BoNT/A製剤	[Fe^{3+}]	相対BoNT/A活性 （暗所対照に対する%）
1	100 μM	0.4%
2	1 μM	9%
3	316 nM	66%
4	100 nM	82%
5	32 nM	77%
5	10 nM	75%
4	100 pM	74%
5	10 pM	78%
6	0 pM	78%

10

【0196】

表 4 から分かるように、316 nM の濃度では、 $F e^{3+}$ イオンは B o n T / A の安定性に大きな影響を及ぼし、安定性の低下は 15 % 超であった。光安定性は 1 μM の濃度で大きく低下するが、それでも 1 μM を超える濃度におけるよりも高い。1 μM 以上の濃度では、添加された $F e^{3+}$ イオンは、光の影響下での液体製剤中の B o N T / A の安定性に極めて悪影響を与える。

20

【0197】

別の実験では、前処理済 H S A を含む液体ボツリヌス毒素製剤（すなわち、50 U / m l ボツリヌス毒素、0.085 % 前処理済 H S A、10 m M ヒスチジン、0.9 % N a C l（p H 6.0））をステンレス製ビーカー内で 48 時間攪拌した結果、光曝露（ $250 W/m^2$ で 7 時間）後の相対 B o N T / A 活性はわずか約 2 % であり、ポリプロピレン容器中で 48 時間攪拌した同一試料で 78 % であったのとは対照的であった。これは極めて驚くべき発見であり、ステンレス製ビーカーから液体ボツリヌス毒素製剤に微量の $F e^{3+}$ イオンが溶出したためと推定され、鉄イオンが液体ボツリヌス毒素製剤を調製する際に考慮すべき重要な要素であることを示している。

30

【0198】

I I . 実施例 4 ~ 6

以下の実施例 4 ~ 6 により、本発明による液体ボツリヌス毒素製剤の光安定性をさらに証明する。この目的のために、いくつかの液体ボツリヌス毒素製剤を調製し（実施例 4）、調製した各製剤の試料を $250 W/m^2$ の光に 7 時間曝露したか、又は対照として暗所に 7 時間保管した。その後、光曝露試料及び暗所保存例のボツリヌス毒素活性を、細胞ベースの効力アッセイ（C B A）によって測定した。光安定性は、暗所保存試料のボツリヌス毒素活性測定値の平均に対する、光曝露試料のボツリヌス毒素活性測定値の平均の百分率で表される。

40

【0199】

ボツリヌス毒素の生物活性は、国際公開第 2014 / 207109 号パンフレットに記載されているように、細胞ベースの効力アッセイ（C B A）を用いて決定した。簡単に説明すると、神経細胞を、神経毒含有試料、及び既知の効力の標準試料とともにインキュベートした。インキュベート後、細胞を溶解し、切断された S N A P 25 タンパク質の量をイムノアッセイにより測定した。その後、試料で処理した細胞の切断率を、標準試料で処理した細胞の切断率と比較することにより、試料の生物活性を算出した。

【0200】

前記の $250 W/m^2$ の光に対する 7 時間の曝露には、I C H Q 1 B に従った窓ガラスフィルターを使用し、I S O 10977 による I D 65（室内間接昼光基準）に対応

50

する320～800nmの波長範囲の分光分布を提供するフィルターセットを備えた、SUNTEST CPS+装置（ATLAS Material Testing Technology社）を使用した。

【0201】

実施例4

各種ボツリヌス毒素製剤の調製

光安定性に関して分析を行った製剤の組成を表6及び7に示す。使用されたボツリヌス毒素（BoNT）はNT101であった。

【表6】

未処理／前処理済HSAを用いた試験製剤

成分		製剤			
		I	II	III	IV
BoNT (U/ml)		50	50	50	50
HSA (mg/ml)	未処理	1.0	－	1.0	－
	透析済	－	1.0	－	－
	EDTA-透析済	－	－	－	0.85
NaCl (mg/ml)		9	9	9	9
ヒスチジン (mg/ml)		1.55	1.55	1.55	1.55
EDTA (mg/ml)		－	－	1.30	－
pH		6.0	6.0	6.0	6.0

【表7】

トリプトファン（Trp）／N-アセチルトリプトファン（N-AcTrp）を含む試験製剤

成分		製剤						
		1	2	3	4	5	6	7
BoNT (U/ml)		50	50	50	50	50	50	50
HSA EDTA-透析済 (mg/ml)		0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
NaCl (mg/ml)		9	9	9	9	9	9	9
ヒスチジン (mg/ml)		1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
Trp (mM)		－	－	－	－	10	0.08	－
N-AcTrp (mM)		10	2	0.4	0.08	－	－	－
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

【0202】

「HSA-透析済」の調製。10mlの25% HSA（CSLベーリング）を透析カセット（Slide-A-Lyzer（商標）、10kDa MWCO、12～30ml、Thermo Scientific／Pierce）に移した。透析カセットを、1.55g／lのヒスチジン、9g／l（pH6.0）の溶液2リットル中に入れ、光保護下で攪拌（150rpm、マグネチックスターラー）しながら24時間透析した。次いで、透析緩衝液を2リットルの新鮮な透析緩衝液（1.55g／l ヒスチジン、9g／l NaCl（pH6.0））に交換し、この手順をさらに3回、それぞれ約12時間繰り返した。得られた透析カセットの内容物を、透析済HSA又は「HSA-透析済」と呼ぶ。濃度を以下のように測定した。

【0203】

HSA-EDTA-透析済の調製。18mlの25% HSA（CSL Behring）を、2mlの1M Na₂EDTA（pH8.0）と混合した。得られた溶液を約6時間攪拌した。その後、前記溶液15mlを透析カセット（Slide-A-Lyzer

(商標)、10 kDa MWCO、12～30 ml、Thermo Scientific / Pierce)に移した。透析カセットを、1.55 g/l ヒスチジン、9 g/l NaCl、37.2 g/l Na₂EDTA (pH 7.0)の溶液2リットル中に入れ、光保護下で攪拌しながら(150 rpm、マグネチックスターラー)24時間透析した。
【0204】

次に、透析緩衝液を2リットルの1.55 g/lヒスチジン、9 g/l NaCl (pH 7.0)に交換し、その後、約12時間の透析と、2リットルの新鮮な透析緩衝液への透析緩衝液交換とを3サイクル繰り返した(1回目の緩衝液交換はHis/NaCl (pH 6.5)、2回目及び3回目の緩衝液交換はHis/NaCl (pH 6.0))。得られた透析カセットの内容物を、EDTA-透析済HSA材料(又は「HSA-EDTA-透析済」と呼ぶ。

10

【0205】

透析後のHSA濃度は、透析中の体積増加のため、一般に、開始時のHSA溶液の濃度(25% (w/v))よりも有意に低くなる。タンパク質濃度が高いため、有意な損失は見込まれないことから、HSAの絶対量は変化しないと考え、当業者に公知のように体積変化に基づいて濃度を算出した。透析後のHSA濃度は、約8.1% (w/v)と決定された。

【0206】

プラセボバルク溶液の調製。活性薬剤(BONT)を含まないことを除けば表6及び7に示すものと同一である製剤(本明細書では「プラセボバルク溶液」と称する)を調製するため、出発材料であるHSA、NaCl、及びヒスチジンを秤量し、水(Milli-Q)に溶解した。トリプトファン(Trp)及びN-アセチルトリプトファン(N-AcTrp)の50 mMストック溶液を調製し(それぞれ10.212 g/l及び12.313 g/l、温水中)、所望の最終Trp及びN-AcTrp濃度に従って加えた。そして、1 M NaOH又は1 M HClを加えてpHを6.0に調整し、水を最終容量まで加えた後、0.22 µmのフィルターで溶液を滅菌濾過した。

20

【0207】

BONT前希釈物の調製。13.44 mgのNT101を、50 mlの滅菌済タンパク質低結合チューブに秤量し、滅菌濾過した製剤7のプラセボバルク溶液20.123 gと混合することにより、25,000 U/mlのBONTを含む前希釈物を得た。

30

【0208】

試料の準備。20.0 µlのBONT前希釈物を、15 mlの滅菌済タンパク質低結合チューブに入れ、それぞれのプラセボバルク溶液を9.98 ml加えた。溶液を穏やかに10回転倒攪拌することにより混合した。その後、3×1 mlの各溶液を1.5 mlの低結合チューブに入れ、これらを250 W/m²に7時間曝露した。各試料溶液の残りをアルミホイルで覆い、測定を行うまで4℃にてバルクで保存した(「暗所対照」試料)。

【0209】

実施例5

各種液体BONT製剤の光安定性の比較

250 W/m²の光に7時間曝露した、又は暗所で7時間保存した、表6の製剤I～I Vの試料のボツリヌス毒素活性を、CBAを用いて測定した(複数回測定)。結果を、暗所保存対照試料に対する光曝露試料の活性パーセントとして表8に示す。

40

【表 8】

各種液体 B o N T 製剤の光安定性の比較

BoNT 製剤		相対BoNT活性 (暗所対照試料に対する%)
No.	HSA	
I	HSA-未処理	46
II	HSA-透析済	56
III	HSA未処理+EDTA	80
IV	HSA-EDTA-透析済	84

10

【0210】

表 8 から分かるように、HSA の透析は、光曝露に対する B o N T の安定性をいくらか増加させる（製剤 II と製剤 I を比較参照）。未処理の HSA に EDTA を加えると、有効性が有意に高まる（製剤 III を参照）。しかし、この EDTA の添加は、光の不安定化作用からの完全な保護を提供しない。最良の光安定性は、EDTA を用いたプレインキュベーションと、その後の、EDTA を含まないヒスチジン緩衝液に対する透析によって達成される（製剤 IV を参照）。このことは、観察された光安定性が金属イオンだけによるものではなく、他の未知の化合物によるものかもしれないことを示している。

【0211】

実施例 6

トリプトファン及び N - アセチルトリプトファンの存在下及び非存在下における液体 B o N T 製剤の光安定性

250 W / m² で光に 7 時間曝露した、又は暗所で 7 時間保存した、表 7 の製剤 1 ~ 7 の試料のボツリヌス毒素活性を、CBA を用いて測定した（複数回測定）。結果を、暗所保存対照試料に対する光曝露試料の活性パーセントとして表 9 に示す。

20

【表 9】

トリプトファン又は N - アセチルトリプトファンの存在下又は非存在下における、液体 B o N T 製剤の光安定性の比較

BoNT 製剤			相対BoNT活性（暗所対照試料に対する%）
No.	N-AcTrp (mM)	Trp (mM)	
1	10	—	6
2	2	—	8
3	0.4	—	45
4	0.08	—	73
5	—	10	8
6	—	0.08	67
7	—	—	85

30

40

【0212】

トリプトファン及び N - アセチルトリプトファンはどちらも、用量依存的な様式で、B o N T 液体製剤の光に対する安定性に著しく悪影響を与える。高濃度（それぞれ 10 mM 及び 2 mM）では、光安定性を低下させる作用が顕著であり、相対的な生物活性が非常に低かった（10 % 未満）。Trp 又は N - A c T r p の濃度が 80 μM と低い場合、Trp 及び N - A c T r p を含まない対照製剤と比較して、光曝露後の B o N T の生物活性の低下は約 10 % である（製剤 4 及び 6 と製剤 7 とを比較参照）。

【0213】

80 μM という N - アセチルトリプトファン濃度は、25 % (w / v) の HSA 出発材

50

料（20 mMのN-AcTrpを含む）を希釈して0.1%（w/v）、すなわち1 mg/mlのHSAにした場合に相当する。HSAの1 mg/mlは、ボツリヌス毒素製剤において典型的に使用される濃度範囲内の値であるため、このようなHSA出発材料を使用する結果、BoNT/A製剤中のN-アセチルトリプトファン濃度により製剤の光感受性が高まる。したがって、トリプトファン及びN-アセチルトリプトファンが光安定性に悪影響を及ぼす濃度範囲は、実用上非常に重要である。

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/053647

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K9/00	A61K8/00	A61K47/42
		A61Q19/10
		A61P13/06
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61Q A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data, BIOSIS, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/330163 A1 (SOPARKAR CHARLES N S [US]) 30 December 2010 (2010-12-30) paragraph [0055]	1-9, 13-15
Y	-----	1-15
X	US 2006/269575 A1 (HUNT TERRENCE J [US]) 30 November 2006 (2006-11-30) paragraph [0242]	1-10, 13-15
Y	example 1	1-15
X	US 2003/138437 A1 (HUNT TERRENCE J [US]) 24 July 2003 (2003-07-24)	1-10, 13-15
Y	example 13	1-15
Y	WO 2017/203038 A1 (IPSEN BIOPHARM LTD [GB]; NESTLE SKIN HEALTH SA [CH]) 30 November 2017 (2017-11-30) the whole document	1-15

	-/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 April 2023		Date of mailing of the international search report 18/04/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schüle, Stefanie

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/053647

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2007/142290 A1 (TSUCHIDA EISHUN [JP] ET AL) 21 June 2007 (2007-06-21) the whole document -----	1-15

1

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/053647

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010330163 A1	30-12-2010	CA 2766649 A1	13-01-2011
		EP 2445509 A1	02-05-2012
		ES 2615281 T3	06-06-2017
		JP 5792718 B2	14-10-2015
		JP 2012531421 A	10-12-2012
		KR 20120107915 A	04-10-2012
		RU 2012102322 A	27-07-2013
		US 2010330163 A1	30-12-2010
		US 2014056869 A1	27-02-2014
		US 2015086528 A1	26-03-2015
		WO 2011005577 A1	13-01-2011
US 2006269575 A1	30-11-2006	NONE	
US 2003138437 A1	24-07-2003	US 2003138437 A1	24-07-2003
		US 2006099227 A1	11-05-2006
		US 2007081960 A1	12-04-2007
		US 2008108570 A1	08-05-2008
		US 2011152198 A1	23-06-2011
		US 2012237548 A1	20-09-2012
		US 2013296259 A1	07-11-2013
		US 2014199288 A1	17-07-2014
WO 2017203038 A1	30-11-2017	AR 108631 A1	12-09-2018
		AU 2017270359 A1	13-12-2018
		BR 112018074311 A2	01-10-2019
		CA 3025437 A1	30-11-2017
		CN 109562148 A	02-04-2019
		CN 111701010 A	25-09-2020
		DK 3463432 T3	04-01-2021
		DK 3679946 T3	07-02-2022
		EA 201892493 A1	30-04-2019
		EP 3463432 A1	10-04-2019
		EP 3679946 A1	15-07-2020
		EP 4026532 A1	13-07-2022
		ES 2846350 T3	28-07-2021
		ES 2911124 T3	17-05-2022
		GE P20207139 B	27-07-2020
		HR P20202070 T1	19-02-2021
		HR P20220024 T1	01-04-2022
		HU E052023 T2	28-04-2021
		HU E057640 T2	28-05-2022
		IL 263173 A	31-12-2018
		IL 285190 A	31-08-2021
		JP 7053498 B2	12-04-2022
		JP 2019517481 A	24-06-2019
		KR 20190022548 A	06-03-2019
		KR 20220054887 A	03-05-2022
		LT 3463432 T	25-01-2021
		LT 3679946 T	10-02-2022
		PL 3463432 T3	19-04-2021
		PL 3679946 T3	30-05-2022
		PT 3463432 T	12-01-2021
		PT 3679946 T	14-01-2022
		RS 62832 B1	28-02-2022
		RU 2018142149 A	29-06-2020
		SA 518400513 B1	03-11-2022
		SG 11201810561Y A	28-12-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/053647

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		SI 3463432 T1	26-02-2021
		SI 3679946 T1	29-04-2022
		TW 201742632 A	16-12-2017
		UA 123679 C2	12-05-2021
		US 2019183988 A1	20-06-2019
		US 2021330765 A1	28-10-2021
		WO 2017203038 A1	30-11-2017
		ZA 201807904 B	27-05-2020

US 2007142290 A1	21-06-2007	EP 1792917 A1	06-06-2007
		JP 2006045173 A	16-02-2006
		US 2007142290 A1	21-06-2007
		WO 2006016561 A1	16-02-2006

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	13/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/00

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL
,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,V
N,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 池田 達則

(72)発明者

カールーハインツ アイゼレ

ドイツ連邦共和国, 6 0 3 1 8 フランクフルト アム マイン, エッケンハイマー ラントシュト
ラーセ 1 0 0, ツェー／オー

(72)発明者

クラウス フィンク

ドイツ連邦共和国, 6 0 3 1 8 フランクフルト アム マイン, エッケンハイマー ラントシュト
ラーセ 1 0 0, ツェー／オー

(72)発明者

ハロルド ファウ．テイラー

ドイツ連邦共和国, 6 0 3 1 8 フランクフルト アム マイン, エッケンハイマー ラントシュト
ラーセ 1 0 0, ツェー／オー

(72)発明者

クラウディア ヤツケ

ドイツ連邦共和国, 6 0 3 1 8 フランクフルト アム マイン, エッケンハイマー ラントシュト
ラーセ 1 0 0, ツェー／オー

(72)発明者

カチヤ キューバッハ

ドイツ連邦共和国, 6 0 3 1 8 フランクフルト アム マイン, エッケンハイマー ラントシュト
ラーセ 1 0 0, ツェー／オー

F ターム (参考)

4C076 AA12 CC01 CC17 DD23 DD23D DD26 DD26Z DD51 DD51Z DD60
DD60Z EE41 FF11 FF36 FF63 GG41 GG42
4C084 AA02 AA03 BA44 CA04 DA33 MA05 MA17 NA03 ZA011 ZA012
ZA081 ZA082 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZA941 ZA942