



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118829442 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 22

(21) 申请号 202380022129.X

(22) 申请日 2023.02.14

(30) 优先权数据

22156850.4 2022.02.15 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/053634 2023.02.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/156385 EN 2023.08.24

(71) 申请人 莫茨药物股份两合公司

地址 德国

(72) 发明人 卡尔-海因茨·艾泽勒

克劳斯·芬克 哈罗德·V·泰勒

克劳迪娅·亚茨克

卡特娅·屈巴赫

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

专利代理师 刘明海 胡彬

(51) Int.Cl.

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/18 (2017.01)

A61K 47/42 (2017.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 13/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/18 (2006.01)

权利要求书2页 说明书17页

(54) 发明名称

液体肉毒杆菌毒素制剂及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种液体肉毒杆菌毒素制剂,其包含:(i)肉毒杆菌毒素,(ii)稳定蛋白如人血清白蛋白,(iii)螯合剂(例如EDTA)或磷酸盐,以及任选的(iv)钙盐、镁盐或锌盐,(v)张力剂和/或(vi)缓冲剂。此外,本发明涉及液体肉毒杆菌毒素制剂用于治疗 and 美容处理的用途。

1. 一种液体制剂,其包含
 - (i) 肉毒杆菌毒素,
 - (ii) 稳定蛋白,和
 - (iii) 螯合剂或磷酸盐。
2. 根据权利要求1所述的液体制剂,其中所述稳定蛋白选自人血清白蛋白、卵清蛋白、酪蛋白及其混合物,或者其中所述稳定蛋白是人血清白蛋白。
3. 根据权利要求1或2所述的液体制剂,其中所述稳定蛋白是人血清白蛋白,并且所述人血清白蛋白以0.001-1.00%w/v的浓度存在于所述液体制剂中。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的液体制剂,其中所述螯合剂选自由以下组成的组:具有三到六个羧酸官能团的氨基多羧酸、柠檬酸盐、吡啶、N,N,N',N'-四(2-吡啶基甲基)-1,2-乙二胺(TPEN)、三亚乙基四胺(TETA)及其混合物。
5. 权利要求4所述的液体制剂,其中所述螯合剂是通式(I)的氨基多羧酸:
$$(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}-\text{R}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2 \text{ (I)},$$
其中R不包含羧酸基团或包含一个或两个羧酸基团,所述氨基多羧酸优选自由以下组成的组:乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇-双(β -氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)、1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、三亚乙基四胺六乙酸(TTHA)及其混合物。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的液体制剂,其中所述螯合剂以0.01-100mM的浓度存在于所述液体制剂中。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的液体制剂,其中所述肉毒杆菌毒素为不含络合蛋白的肉毒杆菌神经毒素,或其中所述肉毒杆菌毒素为血清型A的肉毒杆菌毒素,或其中所述肉毒杆菌毒素为不含络合蛋白的血清型A的肉毒杆菌神经毒素,或其中所述肉毒杆菌毒素为血清型A的肉毒杆菌毒素且以1-1000U/ml的浓度存在,或其中所述肉毒杆菌毒素为不含络合蛋白的血清型A的肉毒杆菌神经毒素且以1-1000U/ml的浓度存在。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的液体制剂,其包含
 - (i) 肉毒杆菌毒素,
 - (ii) 人血清白蛋白,以及
 - (iii) EDTA。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的液体制剂,其中所述液体制剂进一步包含:
 - (iv) 钙盐、镁盐或锌盐,或其混合物,或者其中所述液体制剂进一步包含:
 - (iv) 钙盐、镁盐或锌盐或其混合物,其中所述盐以0.01-100mM的量存在于液体制剂中,其中所述盐是氯化钙,并且以0.01-100mM的量存在于液体制剂中。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的液体制剂,其中所述液体制剂进一步包含:
 - (v) 张力剂,或者其中所述液体制剂进一步包含:
 - (v) 张力剂,其中所述张力剂以0.01-2.0%w/v的量存在于所述液体制剂中,或者其中所述张力剂是氯化钠,或者其中所述张力剂是氯化钠并且以0.01-2.0%w/v的量存在于所述液体制剂中。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的液体制剂, 其中所述液体制剂进一步包含:

(vi) 缓冲剂,

或者其中所述液体制剂进一步包含:

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

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的液体制剂, 其中所述液体制剂的pH在5.0到8.0的范围内。

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

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

15. 一种治疗疾病或病况的方法, 其包括向有此需要的人施用有效量的权利要求1-12中任一项所述的液体制剂。

液体肉毒杆菌毒素制剂及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种液体肉毒杆菌毒素制剂,其包含:(i)肉毒杆菌毒素,(ii)稳定蛋白如人血清白蛋白,(iii)螯合剂(例如EDTA)或磷酸盐,以及任选的(iv)钙盐、镁盐或锌盐,(v)张力剂和/或(vi)缓冲剂。此外,本发明涉及液体肉毒杆菌毒素制剂用于治疗 and 美容处理的用途。

背景技术

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

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

[0004] BoNTs的配制非常具有挑战性,因为其结构复杂且所用的产品浓度低。BoNT极易受各种条件的影响,如热和碱性pH。因此,由于BoNT只有在其结构完整的情况下才有功能,所以制备BoNT的医学剂型的挑战是配制一种组合物,该组合物在产品的生产、储存或使用过程中保护BoNT免于失活或部分丧失生物活性。此外,由于BoNT的极高效力,人类致死剂量仅为约0.1-1ng/kg,BoNT的药物制剂包含极少量的毒素,每瓶仅约1ng。这加剧了已知的由于表面变性导致的毒素活性丧失的问题。因此,BoNT配方中的主要挑战之一是在生产和储存过程中最小化活性损失。

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

[0006] BoNT的第一个液体制剂于2000年获得批准,并于2001年作为**Neurobloc[®]**在欧洲上市。**Neurobloc[®]**(Eisai)是BoNT/B络合物的无菌溶液,配制在含有琥珀酸二钠、氯化钠、人血清白蛋白(HSA)、辛酸钠和N-乙酰色氨酸钠的缓冲液中。然而,由于其酸性pH值,该产品在注射时可能会有疼痛。对于BoNT/A,迄今为止只有两种液体制剂获得了市场批准:

Innotox[®] (Medytox), 但仅限于亚洲国内市场 (例如, 韩国, 2013 年批准), 以及 **Alluzience**[®] (Ipsen/Galderma), 2021 年批准在欧洲使用。这两种液体制剂都含有 BoNT/A 毒素络合物, 并且除了水之外, 还含有氯化钠、去污剂 (**Innotox**[®]: polysorbate 20; **Alluzience**[®]: 聚山梨醇酯 80), 氨基酸 (**Innotox**[®]: 蛋氨酸; **Alluzience**[®]: 组氨酸) 和另外的赋形剂 (**Innotox**[®]: 磷酸钠作为缓冲剂; **Alluzience**[®]: 蔗糖)。

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

[0008] 本发明的目的

[0009] 本发明的目的是提供一种肉毒杆菌毒素的稳定液体制剂, 其可直接用于治疗 and 美容处理。

发明内容

[0010] 本发明基于令人惊讶的发现, 即向含有人血清白蛋白 (HSA) 的肉毒杆菌毒素液体制剂中加入螯合剂 (例如 EDTA) 或磷酸盐会产生对热和光都稳定的改良制剂。

[0011] 因此, 一方面, 本发明提供了一种液体制剂, 其包含:

[0012] (i) 肉毒杆菌毒素,

[0013] (ii) 稳定蛋白, 优选人血清白蛋白 (HSA), 和

[0014] (iii) 螯合剂或磷酸盐。

[0015] 任选地, 本发明的液体制剂进一步包含 (iv) 钙盐、镁盐或锌盐, 或其混合物, 或 (v) 张力剂 (例如氯化钠), 或 (vi) 缓冲剂 (例如磷酸盐缓冲剂或组氨酸缓冲剂或两者), 或组分 (iv) - (vi) 中的两种 (例如 (iv) 和 (v)、(iv) 和 (vi), 或 (v) 和 (vi)), 或组分 (iv) - (vi) 中的所有三种。

[0016] 在另一方面, 本发明涉及用于治疗的根据本发明的液体制剂, 特别是用于治疗神经肌肉疾病、疼痛、流涎、多汗症、泌尿系统疾病和神经系统疾病。

[0017] 在另一方面, 本发明涉及本发明的液体制剂的美容 (美学) 用途, 用于治疗美容病况, 优选皮肤病况, 特别是用于治疗皮肤纹理或褶皱或皱纹。

[0018] 在另一方面, 本发明涉及一种治疗疾病或病况的方法, 包括给有需要的人施用有效量的本发明的液体制剂。

[0019] 在所附权利要求中阐述了根据本发明的液体肉毒杆菌毒素制剂、其用途和使用方法的优选实施方案。

[0020] 通过参考本发明的以下具体实施方式和其中包括的实施例, 可以更容易地理解本发明。

具体实施方式

[0021] 本发明基于意想不到的发现, 即在含有人血清白蛋白 (HSA) 的肉毒杆菌毒素液体制剂中螯合剂 (例如 EDTA) 或磷酸盐的存在导致不仅对热而且对光稳定的改进制剂。此外, 出乎意料地发现, 加入钙盐、镁盐或锌盐可减轻注射疼痛。

[0022] 与粉末形式的冻干肉毒杆菌毒素制剂相比, 本发明的液体制剂有利地提供了改善的安全性和剂量准确性, 因为该制剂在注射前不需要重新配制, 而是即用型的。此外, 该液

体制剂表现出优异的稳定性,从而便于运输和储存以及医生的处理。

[0023] 不受理论的束缚,据信稳定蛋白,例如HSA,与观察到的光敏感性有关。进一步认为,本发明的液体制剂具有改善的光稳定性,或者换句话说表现出降低的光诱导的毒素活性损失(降低的光敏性)的惊人发现是由于螯合剂或磷酸盐与HSA或所用HSA材料中包含的组分相互作用或对其施加影响,从而避免或最小化光对HSA稳定肉毒杆菌毒素能力的不利影响。

[0024] 本发明的液体肉毒杆菌毒素制剂的改善的光稳定性简化了制造过程,允许产品在没有大量避光保护的情况下被填充和包装,并且减少了由于使用前在医生处的暴露于光的储存而导致的潜在的活性损失。总的来说,本发明液体制剂敏感性的降低通常提高了注射治疗期间肉毒杆菌毒素的可操作性和易用性。

[0025] 一方面,本发明涉及一种液体制剂,其包含

[0026] (i) 肉毒杆菌毒素,

[0027] (ii) 稳定蛋白,和

[0028] (iii) 螯合剂或磷酸盐。

[0029] 如本文所用,术语“包含”,和术语“包括”、“含有”,及其任何变体,如“包含”、“包括”和“含有”一样,旨在表示非排他性的包括,使得包含、包括或含有一种元素或一系列元素的工艺、方法、通过工艺获得的产品、组合物或制剂不仅包括那些元素,还可以包括没有明确列出的用于这样的工艺、方法、通过工艺获得的产品、组合物或制剂的其它元素。此外,在本发明的框架内,意图是术语“包含”、“包括”、“含有”及其任何变体中的每一个都可以由术语“由...组成”或其任何变体(例如,“基本上由...组成”)来代替,这将被理解为指代所指示的元素的排他性包括。

[0030] 在本发明的上下文中使用的术语“一”和“一个”和“该”以及类似的引用应被解释为涵盖单数和复数,因此,也可涉及“至少一个”或“多于一个”,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾。

[0031] 本文所用的术语“液体制剂”通常是指水性制剂,通常是水溶液。在本文中,术语“液体制剂”可以与“液体组合物”互换使用。优选地,液体制剂是药学上可接受的液体制剂。本文使用的术语“药学上可接受的”是指当施用于人类患者或受试者时,液体制剂不会引起不可接受的不良反应。即,这意味着液体制剂适合人类使用。水溶液可以是缓冲溶液,有或没有盐溶液,并且可以是生理盐溶液,如缓冲(例如,磷酸盐和/或组氨酸缓冲)生理盐溶液。

[0032] 本发明的液体制剂可以储存在任何合适的容器系统中。用于储存本发明的液体制剂的合适的容器系统是具有部分或完全封闭的空间的任何装置,该空间可以是密封的或被密封的,并且可以用于容纳、储存和/或运输液体制剂。容器系统优选是由玻璃或塑料(例如,有机聚合物)制成或部分或主要由玻璃或塑料制成的封闭(或密封)容器,并且包括例如以下形式的容器:(i) 注射器,(ii) 小瓶,(iii) 卡普耳,或(iv) 安瓿。在本发明的一个优选实施方案中,如本领域已知的,液体制剂以预填充注射器的形式储存在注射器中。

[0033] 对于组分(i),所述肉毒杆菌毒素没有特别限制,包括任何血清型(BoNT/A-G)的肉毒杆菌毒素。例如,所述肉毒杆菌毒素可以是血清型A或B(BoNT/A, BoNT/B)。优选地,肉毒杆菌毒素是血清型A,更优选血清型A1(BoNT/A1),最优选由肉毒杆菌Ha11菌株产生的BoNT/

A1。此外,所述肉毒杆菌毒素可以是可从细菌肉毒杆菌获得的天然神经毒素或任何其它肉毒杆菌毒素,如可从替代来源获得的肉毒杆菌毒素,包括重组技术和遗传或化学修饰。

[0034] 此外,如本文所用,术语“肉毒杆菌毒素”(“BT”)和同义术语“肉毒杆菌神经毒素”(“BoNT”)是指纯肉毒杆菌神经毒素和/或其任何络合物,即纯肉毒杆菌神经毒素和络合蛋白的任何络合物(称为“毒素络合物”)。

[0035] 本文所用的术语“纯肉毒杆菌神经毒素”是指不含络合蛋白的肉毒杆菌神经毒素(有时也称为“神经毒性成分”),或者更准确地说,是指不含神经毒素相关络合蛋白(NAPs)的肉毒杆菌神经毒素。纯肉毒杆菌神经毒素是最终抑制乙酰胆碱释放的(活性)神经毒性多肽。它是一种双链蛋白,包含通过二硫键结合在一起的轻链(LC;约50kDa)和重链(HC;约100kDa)。因此,活性神经毒性多肽在本文中也可称为“150kDa神经毒素”、“肉毒杆菌神经毒素(150kD)”或“神经毒性成分”。

[0036] 本文所用的术语“毒素络合物”是指所述神经毒性成分和一组络合蛋白(NAP)的高分子络合物。特别地,术语“毒素络合物”包括900kDa、500kDa和300kDa的A型肉毒杆菌毒素络合物。所述络合蛋白是无毒的非血凝素(NTNHA),在A-D血清型菌株中是不同的血凝素(HA)。例如,900kDa络合物包含在onabotulinumtoxin A中(**Botox[®]**/**Vistabel[®]**,Allergan, Inc., Irvine, CA, USA)。此外,**Dysport[®]** (**Azzalure[®]**, Ipsen, 法国巴黎)、**Alluzience[®]** (Ipsen/Galderma) 和 **Innotox[®]** (Medytox) 中含有作为活性剂的毒素络合物。

[0037] 本发明的液体制剂中肉毒杆菌毒素的浓度可以在1-1000U/ml的范围内,并且优选在10-200U/ml的范围内,更优选在20-150U/ml的范围内,例如50U/ml或100U/ml。

[0038] 本文所用术语“单位”或“U”是指毒素的生物活性(生物效价),涉及对50%受试小鼠致死的剂量(LD₅₀)。更具体地说,在本发明的上下文中,LD₅₀是用小鼠生物测定法(MBA)测量的,除非另有说明。MBA确定小鼠腹膜内注射后毒素/神经毒素的平均致死剂量(LD₅₀),即能够杀死一组小鼠的50%的毒素/神经毒素的剂量。在此基础上,如本文所用,1单位(U)的毒素/神经毒素定义为一小鼠LD₅₀ (1.0LD₅₀ = 1.0U)。LD₅₀小鼠生物测定法是肉毒杆菌毒素的各种生物、化学或免疫学检测方法中的金标准,并且是本领域技术人员已知的(参见,例如, Pearce, L.B.; Borodic, G.E.; First, E.R.; MacCallum, R.D. Measurement of botulinum toxin activity: Evaluation of the lethality assay. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1994, 128: 69-77)。本领域技术人员将能够根据血清型和预期用途确定合适的肉毒杆菌毒素浓度。

[0039] 或者,也可使用基于细胞的测定来确定肉毒杆菌毒素活性,如WO 2009/114748、WO 2013/049508或WO2014/207109中所述。本领域技术人员将能够通过使用LD₅₀参照标准进行校准,将基于细胞的测定获得的肉毒杆菌毒素活性结果与小鼠LD₅₀测定获得的结果相关联。

[0040] 由于商业肉毒杆菌毒素制剂制造商使用的LD₅₀试验存在差异,制造商为其商业肉毒杆菌毒素制剂标明的单位效价是专有的,不容易进行比较。因此,在本发明的框架内,下面提供的转换率用于建立incobotulinumtoxinA (“**INCO[®]**”; **Xeomin[®]**, **Bocouture[®]**肉毒杆菌毒素血清型A,不含络合蛋白; Merz Pharmaceuticals GmbH)、onabotulinumtoxinA (“**ONA[®]**”; **Botox[®]**, **Vistabel[®]**; 血清型A的肉毒杆菌毒素络合物; Allergan Inc.)、abobotulinumtoxinA (“**ABO[®]**”; **Dysport[®]**, **Azzalure[®]**; 血清型A的肉毒杆菌毒素络合物;

Medicis Pharmaceutical Corp., Galderma Lab.)、rimabotulinumtoxinB (“RIM”; Myobloc®, NeuroBloc®; 血清型B肉毒杆菌毒素; Solstice Neurosciences Inc.) 和 PurTox® (“TBD”; 血清型A肉毒杆菌毒素; Mentor Worldwide LLC) 的相对效价。在本文中, ONA和INCO的转换率为1:1。ONA/INCO:ABO的转换率为1:2.5。ONA/INCO:RIM的转换率为1:50, ONA/INCO:TBD的转换率为1:1.5。

[0041] 对于本发明所述液体制剂的组分(ii), 术语“稳定蛋白”通常指导致肉毒杆菌毒素稳定性增加的多肽。如本文所用, 术语“多肽”可与术语“蛋白质”互换使用, 是指由通过肽键连接在一起的超过10个氨基酸, 优选超过50个氨基酸, 更优选超过100个氨基酸, 最优选超过200个氨基酸, 且最多优选不超过1000个氨基酸组成的肽。特别优选的是, 本文使用的多肽具有150至1000个氨基酸或250至800个氨基酸, 特别是300至1000个氨基酸或350至700个氨基酸。

[0042] 在本发明中, 稳定蛋白可以是例如人血清白蛋白(HSA)、卵清蛋白、酪蛋白或其混合物。本文特别优选使用的是人血清白蛋白、卵清蛋白或其混合物, 最优选的是HSA。

[0043] 稳定蛋白或稳定蛋白混合物在液体制剂中的存在量可以是0.001-2.0%w/v, 优选0.01-1.0%w/v, 更优选0.01-0.5%w/v, 最优选0.02-0.3%w/v或0.03-0.10%w/v。最优选的稳定蛋白, 即人血清白蛋白(HSA), 优选在液体制剂中的存在量是0.001-1.00%w/v, 更优选0.01-0.3%w/v, 最优选0.02-0.15%w/v。如本文所用, 术语“人血清白蛋白”或“HSA”是指供体HSA(来自人血液, 或更准确地说, 来自人血浆的HSA)、重组HSA和/或来自任何其它来源的HSA。优选地, 人血清白蛋白是重组HSA或来自人血液的HSA。

[0044] 不受理论的束缚, 认为本发明制剂的光敏性至少部分与HSA或所用HSA材料中包含的成分有关, 因为令人惊讶地发现光稳定性随着HSA浓度的增加而降低。

[0045] 对于组分(iii), 所述螯合剂没有特别限制, 只要它能够结合金属离子即可。本文使用的术语“螯合剂”也可称为“螯合试剂”或“多价螯合剂”。本文使用的螯合剂通常是结合金属离子的有机化合物。金属离子通常与作为多齿配体的有机螯合剂形成多重配位键。

[0046] 适用于本文的螯合剂包括但不限于氨基多羧酸(例如, 具有三至六个, 优选四个羧酸官能团的氨基多羧酸)和其它化合物, 如柠檬酸盐、吡啶、TPEN(N, N, N', N'-四(2-吡啶基甲基)-1,2-乙二胺)、TETA(三亚乙基四胺)及其混合物。示例性的氨基多羧酸包括NTA(次氨基三乙酸酯)、DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸酯)、TED(乙二胺三乙酸酯)、EDTA(乙二胺四乙酸)、EGTA(乙二醇-双(β-氨基乙基醚)-N, N, N', N'-四乙酸)、BAPTA(1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N, N, N', N'-四乙酸)、DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)和TTHA(三亚乙基四胺六乙酸)。

[0047] 本文使用的特别优选的螯合剂包括通式(I)的化合物:

[0048] $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}-\text{R}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ (I),

[0049] 其是具有至少四个羧酸官能团的氨基多羧酸化合物。R基团没有特别限制并且可以不包含羧酸官能团或包含一个或两个羧酸官能团。优选地, R基团不包含或包含一个羧酸官能团, 最优选不包含羧酸官能团。

[0050] 通式(I)的化合物的示例包括, 例如, EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA。本文特别优选使用的是EDTA、EGTA和DTPA, 更优选的是EDTA和DTPA, 最优选的是EDTA。任何上述螯合剂的混合物也可用于本发明。

[0051] 螯合剂可以以至少0.01mM或至少0.1mM或至少1mM的浓度存在。优选地,螯合剂以0.01-100mM或0.1-50mM的浓度存在,更优选以0.05-20mM的浓度存在,最优选以1-10mM的浓度存在。

[0052] 另外,对于组分(iii),本文还考虑在本发明的液体制剂中使用磷酸盐来代替螯合剂或除螯合剂之外还使用磷酸盐,以实现降低制剂的光敏性。事实上,出乎意料地发现,磷酸盐的存在也导致光稳定性显著增加。磷酸盐可以以至少0.1mM或至少1mM或至少5mM的浓度存在于液体制剂中。优选地,磷酸盐以0.1-100mM,优选1-50mM,更优选5-30mM的浓度存在于液体制剂中。

[0053] 优选地,本发明的液体制剂包含(i)肉毒杆菌毒素,(ii)人血清白蛋白,和(iii)螯合剂,优选EDTA。如同上文所述的任何其它液体制剂,该优选的液体制剂可进一步包含一种或多种下文所述的任选组分(iv)、(v)和(vi),即(iv)、或(v)、或(vi)、或(iv)和(v)、或(iv)和(vi)、或(v)和(vi)、或(iv)和(v)和(vi)。

[0054] 在本发明的一个优选实施方案中,液体制剂可以进一步包含碱土金属或过渡金属的盐,并且优选进一步包含:

[0055] (iv)钙盐、镁盐或锌盐,或其混合物。

[0056] 优选的盐是钙盐、镁盐和锌盐,更优选钙盐和镁盐,最优选钙盐。在EDTA存在下,这些盐的加入将导致EDTA络合物的形成,即EDTA与作为中心原子的加入的金属阳离子络合。盐的阴离子的性质并不重要,唯一的要求是该盐可溶于本发明的水性制剂中。例如,阴离子可以是药理学上可接受的无机酸和有机酸的阴离子。或者,螯合剂本身可以形成金属盐的阴离子,并且将组分(iii)和(iv)加入到液体制剂中,例如 Na_2CaEDTA 。

[0057] 合适的抗衡阴离子包括,例如,乙酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、碳酸氢盐、酒石酸氢盐、溴化物、樟脑磺酸盐、碳酸盐、氯化物、柠檬酸盐、癸酸盐、依地酸盐、esylate、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、乙醇酸盐、glycollylarsanilate、己酸盐、hydrabamine、羟基萘甲酸盐、碘化物、乳糖酸盐、硝酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基溴化物、甲基硝酸盐、甲基硫酸盐、mucate、萘磺酸盐、硝酸盐、辛酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、泛酸盐、磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、次醋酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐和teoclolate。

[0058] 优选地,盐是氯化物盐。特别优选的盐包括氯化钙(即 CaCl_2 及其水合物)、氯化镁(即 MgCl_2 及其水合物)和氯化锌(即 ZnCl_2 及其水合物)。在EDTA存在下,这些盐的加入将导致EDTA络合物的形成,即EDTA与作为中心原子的加入的金属阳离子络合。

[0059] 通常,设想盐中金属离子的浓度与螯合剂的浓度大约等摩尔。盐可以以至少0.01mM或至少0.1mM或至少1mM的浓度存在于液体制剂中。优选地,盐以0.01-100mM,优选0.1-50mM,更优选0.05-20mM,最优选1-10mM的浓度存在于液体制剂中。

[0060] 令人惊讶的是,本发明的发明人发现,添加碱土金属或过渡金属的盐,特别是钙盐、镁盐或锌盐,显著降低了本发明液体制剂的注射疼痛,同时保持了储存和光稳定性。这一发现是出乎意料的,因为(i)发现如上所述的液体肉毒杆菌毒素制剂引起不愉快的注射疼痛,这种疼痛是不可预见的,也是不可预测的,(ii)令人惊讶地发现加入碱土金属或过渡金属的盐如氯化钙可显著减轻注射疼痛,同时,(iii)液体制剂的储存和光稳定性得以保持,尽管认为需要游离的(未络合的)螯合剂来获得光稳定效果,即令人惊讶地发现含有中

心金属原子(例如 Ca^{2+})的螯合剂(例如EDTA)仍然能够保护肉毒杆菌毒素免受光的影响。

[0061] 根据本发明,所述液体制剂可以任选地进一步包含:

[0062] (v)张力剂。

[0063] 如本文所用,术语“张力剂”是指添加到可注射制剂中以使制剂在渗透特性上类似于生理液体的试剂。张力剂也可以称为“渗透调节剂”。张力剂没有特别的限制,例如可以选自由糖、盐、聚合物及其混合物组成的组。

[0064] 示例性的张力剂包括蔗糖、葡萄糖、碳酸钠、氨基酸、聚乙二醇(PEG)、葡聚糖、环糊精和胶体(例如胶体多糖)。典型地,张力剂的浓度在0-2.0%w/v,特别是0.01-2.0%w/v或0.1-1.5%w/v,更特别是0.6-1.2%w/v的范围内。

[0065] 优选地,张力剂是氯化钠(NaCl)。氯化钠可以0.01-2.0%w/v,优选0.1-1.5%w/v,更优选0.5-1.2%w/v或0.8-1.0%w/v,最优选0.9%w/v的量存在于本发明的液体制剂中。

[0066] 根据本发明,所述液体制剂可以任选地进一步包含:

[0067] (vi)缓冲剂。

[0068] 本文所用的术语“缓冲剂”是指将液体制剂的pH保持在可接受范围内的试剂,即能够控制制剂pH的试剂。合适的缓冲剂是那些不与其它成分发生化学反应的缓冲剂,其存在量足以提供所需程度的pH缓冲。这样的缓冲液包括例如氨基酸、乙酸盐、苹果酸、抗坏血酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐、TRIS、Bis-TRIS、ACES、MES、BES、MOPS、HEPES、TES、PIPES、三(羟甲基)甲基甘氨酸和咪唑。

[0069] 优选地,所述缓冲剂是磷酸盐、氨基酸或其混合物。注意,磷酸盐在本发明中可以发挥双重作用,即,它可以作为磷酸盐pH缓冲剂,并且还作为本发明的组分(iii)发挥稳定作用。氨基酸可选自天冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸、组氨酸、脯氨酸、牛磺酸、蛋氨酸、丝氨酸、酪氨酸、色氨酸及其混合物,优选选自组氨酸、脯氨酸、牛磺酸、蛋氨酸、丝氨酸、酪氨酸、色氨酸及其混合物。最优选地,氨基酸是组氨酸。本文使用的最优选的缓冲剂是组氨酸、磷酸盐或它们的混合物。

[0070] 本发明的液体制剂中缓冲剂的浓度优选为1-100mM,更优选为2-50mM,最优选为5-20mM。如果缓冲剂是氨基酸(例如,组氨酸),其可以以1-100mM,优选2-50mM,更优选5-20mM,最优选10mM的浓度存在于液体制剂中。如果缓冲剂是磷酸盐,它可以以1-100mM,优选2-50mM,更优选5-20mM,最优选10mM的浓度存在于液体制剂中。

[0071] 本发明的液体制剂的pH通常在5.0-8.0的范围内,特别是在5.5-7.5的范围内,优选在5.5-7.0或6.0-7.5的范围内,更优选在6.0-7.0的范围内,最优选在6.0-6.5的范围内。

[0072] 此外,本发明的液体制剂可进一步包含一种或多种另外的药学上可接受的赋形剂,除非另有说明或意图。例如,液体制剂可以包含甘油、蔗糖、乳糖、甘露醇、透明质酸、乳酸、柠檬酸、氨基酸、苯甲醇、利多卡因、明胶、羟乙基淀粉(HES)、聚氧化乙烯和聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80)中的一种或多种。其它合适的药学上可接受的赋形剂包括本领域熟知的那些,参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania。

[0073] 另一方面,本文还预期本发明的液体制剂特别缺乏某些组分(即化合物、材料或物质),例如去污剂、多糖、氨基酸、稳定肽等,包括其任何组合。如本文所用,术语“去污剂”与“表面活性剂”同义,旨在包括非离子和离子去污剂。本文使用的术语“稳定肽”通常指由5至

50个氨基酸组成的肽,例如10至40个氨基酸或15至30个氨基酸的肽。因此,术语“稳定肽”不包括HSA。

[0074] 在一个实施方案中,本发明的液体制剂不含去污剂,特别是不含聚山梨醇酯,更特别是不含聚山梨醇酯20和/或聚山梨醇酯80。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含藻酸盐。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含琥珀酸盐。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含一种或多种(例如2、3、4或5种)选自由精氨酸、谷氨酸、蛋氨酸、色氨酸和丝氨酸组成的组的氨基酸。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含糖类,例如单糖、寡糖或多糖或其混合物。特别地,本发明的液体制剂可以不包含一种或多种(例如,2、3或4种)蔗糖、乳糖、麦芽糖和海藻糖。在本发明中还考虑了液体制剂缺少一种以上或全部上述化合物。

[0075] 在一个实施方案中,本发明的液体制剂缺少(i)去污剂和单糖、寡糖和多糖,(ii)去污剂和任何氨基酸,或去污剂和除组氨酸外的所有氨基酸,(iii)去污剂和稳定肽,(iv)单糖、寡糖和多糖和任何氨基酸,或单糖、寡糖和多糖和除组氨酸外的所有氨基酸,(v)单糖、寡糖和多糖和稳定肽,(vi)任何氨基酸和稳定肽,或除组氨酸外的所有氨基酸和稳定肽,(vii)去污剂,单糖、寡糖和多糖以及任何氨基酸,或去污剂,单糖、寡糖和多糖以及除组氨酸之外的所有氨基酸,(viii)去污剂,单糖、寡糖和多糖,以及稳定肽,(ix)去污剂,任何氨基酸,以及稳定肽,或去污剂,除组氨酸之外的所有氨基酸,以及稳定肽,(x)单糖、寡糖和多糖,任何氨基酸,以及稳定肽,或单糖、寡糖和多糖,除组氨酸之外的所有氨基酸,以及稳定肽,(xi)去污剂,单糖、寡糖和多糖,任何氨基酸和稳定肽,或去污剂,单糖、寡糖和多糖,除组氨酸外的所有氨基酸,和稳定肽。

[0076] 在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含除组氨酸之外的任何其他氨基酸。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含任何单糖、二糖和三糖。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含除HSA以外的任何其它稳定肽或蛋白质。在另一个实施方案中,本发明的液体制剂不含磷酸盐,如磷酸盐缓冲液形式的磷酸盐。

[0077] 根据本发明的优选实施方案,液体制剂缺少(i)琥珀酸盐和去污剂(例如,聚山梨醇酯),(ii)琥珀酸盐和甲硫氨酸,(iii)琥珀酸盐和蔗糖,(iv)去污剂(例如,聚山梨醇酯)和甲硫氨酸,(v)去污剂(例如,聚山梨醇酯)和蔗糖,(vi)甲硫氨酸和蔗糖,(vii)琥珀酸盐,去污剂(例如,聚山梨醇酯)和甲硫氨酸,(xiii)琥珀酸盐,去污剂(例如,聚山梨醇酯)和蔗糖,(ix)琥珀酸盐,甲硫氨酸和蔗糖,(x)去污剂(例如,聚山梨醇酯)、甲硫氨酸和蔗糖,以及(xi)琥珀酸盐、去污剂(例如,聚山梨醇酯)、甲硫氨酸和蔗糖,(xii)去污剂(例如,聚山梨醇酯和组氨酸),(xiii)去污剂(例如,聚山梨醇酯)、组氨酸和蔗糖)。

[0078] 本发明优选的液体制剂包含(i)肉毒杆菌毒素,(ii)HSA,和(iii)通式为 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}-\text{R}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 的螯合剂,其中R不包含羧酸基团或包含一个或两个羧酸基团。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)含量为0.01-0.5%w/v的HSA,和(iii)浓度为0.05-20mM的通式为 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}-\text{R}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 的螯合剂,其中R不包含羧酸基团或包含一个或两个羧酸基团。

[0079] 本发明优选的液体制剂包含(i)肉毒杆菌毒素,(ii)HSA,和(iii)选自由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA组成的组的螯合剂或选自由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA组成的组的螯合剂。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒

素, (ii) 含量为0.01-0.5%w/v的HSA, 和(iii) 浓度为0.05-20mM的选自由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA组成的组的螯合剂或选自由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA组成的组的螯合剂。

[0080] 本发明优选的液体制剂包含(i) 肉毒杆菌毒素, (ii) HSA, 和(iii) EDTA。本发明优选的液体制剂包含(i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 含量为0.01-0.5%w/v的HSA, 和(iii) 浓度为0.05-20mM的EDTA。

[0081] 本发明优选的液体制剂包含(i) 肉毒杆菌毒素, (ii) HSA, (iii) 通式为 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 的螯合剂, 其中R不包含羧酸基团或包含一个或两个羧酸基团, 和(iv) 钙盐、镁盐或锌盐, 或其混合物, 优选氯化钙。本发明优选的液体制剂包含(i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 含量为0.01-0.5%w/v的HSA, (iii) 浓度为0.05-20mM的通式为 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 的螯合剂, 其中R不包含羧酸基团或包含一个或两个羧酸基团, 和(iv) 浓度为0.05-20mM的钙盐、镁盐或锌盐, 或其混合物, 优选氯化钙。

[0082] 本发明优选的液体制剂包含(i) 肉毒杆菌毒素, (ii) HSA, (iii) 选自由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA组成的组的螯合剂或选自由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA组成的组的螯合剂, 和(iv) 钙盐、镁盐或锌盐或其混合物, 优选氯化钙。本发明优选的液体制剂包含(i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 含量为0.01-0.5%w/v的HSA, (iii) 浓度为0.05-20mM的选自由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA组成的组的螯合剂或选自由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA组成的组的螯合剂, 和(iv) 浓度为0.05-20mM的钙盐、镁盐或锌盐, 或其混合物, 优选氯化钙。

[0083] 本发明优选的液体制剂包含(i) 肉毒杆菌毒素, (ii) HSA, (iii) EDTA, 和(iv) 钙盐、镁盐或锌盐, 或其混合物, 优选氯化钙。本发明优选的液体制剂包含(i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 含量为0.01-0.5%w/v的HSA, (iii) 浓度为0.05-20mM的EDTA, 和(iv) 浓度为0.05-20mM的钙盐、镁盐或锌盐或其混合物, 优选氯化钙。

[0084] 本发明优选的液体制剂包含(i) 肉毒杆菌毒素, (ii) HSA, (iii) 通式为 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 的螯合剂, 其中R不包含羧酸基团或包含一个或两个羧酸基团, (iv) 钙盐、镁盐或锌盐, 或其混合物, 优选氯化钙, 和(v) 磷酸盐缓冲液和/或组氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 含量为0.01-0.5%w/v的HSA, (iii) 浓度为0.05-20mM的通式为 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 的螯合剂, 其中R不包含羧酸基团或包含一个或两个羧酸基团, (iv) 浓度为0.05-20mM的钙盐、镁盐或锌盐, 或其混合物, 优选氯化钙, 和(v) 浓度为2-50mM的磷酸盐缓冲液和/或组氨酸。

[0085] 本发明优选的液体制剂包含(i) 肉毒杆菌毒素, (ii) HSA, (iii) 选自由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA组成的组的螯合剂或选自由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA组成的组的螯合剂, (iv) 钙盐、镁盐或锌盐或其混合物, 优选氯化钙, 和(v) 磷酸盐缓冲液和/或组氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i) 浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素, (ii) 含量为0.01-0.5%w/v的HSA, (iii) 浓度为0.05-20mM的选自由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA组成的组的螯合剂或选自由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA组成的组的螯合剂, (iv) 浓度为0.05-20mM的钙盐、镁盐或锌盐, 或其混合物, 优选氯化钙, 和(v) 浓度为2-50mM的磷酸盐缓冲液和/或组氨酸。

[0086] 本发明优选的液体制剂包含(i) 肉毒杆菌毒素, (ii) HSA, (iii) EDTA, (iv) 钙盐、镁

盐或锌盐,或其混合物,优选氯化钙,和(v)磷酸盐缓冲液和/或组氨酸。本发明优选的液体制剂包含(i)浓度为10-200U/ml的肉毒杆菌毒素,(ii)含量为0.01-0.5%w/v的HSA,(iii)浓度为0.05-20mM的EDTA,(iv)浓度为0.05-20mM的钙盐、镁盐或锌盐或其混合物,优选氯化钙,和(v)浓度为2-50mM的磷酸盐缓冲液和/或组氨酸。

[0087] 特别优选的是,上述优选的液体制剂还含有氯化钠,特别是浓度为约0.9%w/v的氯化钠。此外,pH优选在6.0-7.5的范围内。此外,肉毒杆菌毒素优选为血清型A,尤其是血清型A的神经毒性成分。

[0088] 本发明的示例性优选液体制剂包括以下:

[0089] 制剂1:

[0090] 50U/ml BoNT/A

[0091] 0.9% NaCl (9mg/mL)

[0092] 0.05% HSA (0.5mg/mL)

[0093] 0.1% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (1mg/mL; $\sim 2.7\text{mM}$),

[0094] pH 5.5-8.0 (例如,6.0),以及任选的

[0095] pH缓冲液 (例如,10mM磷酸盐或10mM组氨酸)

[0096] 制剂2:

[0097] 50U/ml BoNT/A

[0098] 0.9% NaCl (9mg/mL)

[0099] 0.085% HSA (0.85mg/mL)

[0100] 0.155% 组氨酸 (1.55mg/mL; $\sim 10\text{mM}$)

[0101] 0.13% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (1.3mg/mL; $\sim 3.5\text{mM}$)

[0102] 0.039% CaCl_2 (390 μg /mL; $\sim 3.5\text{mM}$)

[0103] pH 5.5-8.0 (例如,6.0),以及任选的

[0104] pH缓冲液 (例如,10mM磷酸盐)

[0105] 本发明还涉及包含肉毒杆菌毒素的液体制剂,其中所述液体制剂在40°C的高温下储存4周后,相对于初始毒素活性,毒素活性降低不超过35%。在另一方面,本发明涉及包含肉毒杆菌毒素的液体制剂,其中所述液体制剂暴露于250W/m²的光源7小时后,相对于初始毒素活性,毒素活性降低不超过35%。

[0106] 此外,本发明还涉及制备本文所述的液体肉毒杆菌毒素制剂的方法,包括将本文所述的组分,特别是组分(i)至(iii),以及任选的一种或多种组分(iv)至(vi)进行组合。本发明的液体制剂的制备不受特别限制,并且相应的技术是本领域技术人员已知的。如上所述,肉毒杆菌毒素的液体制剂通常是水溶液,优选盐溶液,更优选生理盐溶液,最优选缓冲的(例如磷酸盐或组氨酸缓冲的)生理盐溶液。

[0107] 优选地,首先溶解盐,然后加入HSA,必要时调节pH,最后加入肉毒杆菌毒素。此顺序不是强制性要求,但被认为可以安全地保持肉毒杆菌毒素的最大比活性。优选地,制备液体肉毒杆菌毒素制剂的方法不包括粉末形式的冻干肉毒杆菌毒素制剂的重新配制。

[0108] 此外,本发明涉及稳定液体肉毒杆菌毒素制剂的方法,包括将(i)肉毒杆菌毒素,(ii)稳定蛋白,优选人血清白蛋白(HSA),(iii)螯合剂或磷酸盐,和组分(iv)至(vi)的任选地一种或多种组合,其中组分(i)至(v)如本文所定义。

[0109] 更进一步,本发明涉及本文定义的螯合剂用于增加水性肉毒杆菌毒素制剂的光稳定性的用途,所述制剂包含(i)肉毒杆菌毒素和(ii)稳定蛋白,优选人血清白蛋白,以及组分(iv)至(vi)的任选地一种或多种组合,其中组分(i)、(ii)和(iv)至(vi)如本文所定义。本文中的“光稳定性增加”是指含有螯合剂的水性肉毒杆菌毒素制剂,其在一定温度(例如,20°C)下暴露于250W/m²的光照下7小时后,其生物肉毒毒素活性比不含螯合剂的水性肉毒毒素制剂在相同温度(例如,20°C)下暴露于250W/m²的光照下7小时后的生物肉毒杆菌毒素活性高至少20%,优选高至少40%,更优选高至少60%,最优选高至少80%。

[0110] 此外,本发明涉及磷酸盐用于增加水性肉毒杆菌毒素制剂的光稳定性的用途,所述制剂包含(i)肉毒杆菌毒素和(ii)稳定蛋白,优选人血清白蛋白,以及任选的一种或多种组分(iv)至(vi),其中组分(i)、(ii)和(iv)至(vi)如本文所定义。本文中的“光稳定性增加”是指含有磷酸盐的水性肉毒杆菌毒素制剂,其在一定温度(例如,20°C)下暴露于250W/m²的光照下7小时后,其生物肉毒毒素活性比不含磷酸盐的水性肉毒毒素制剂在相同温度(例如,20°C)下暴露于250W/m²的光照下7小时后的生物肉毒杆菌毒素活性高至少10%,优选高至少20%,更优选高至少30%,最优选高至少40%。

[0111] 此外,本发明涉及钙盐、镁盐或锌盐或其混合物用于减轻肉毒杆菌毒素制剂的注射疼痛的用途,所述制剂包含(i)肉毒杆菌毒素,(ii)稳定蛋白,优选人血清白蛋白(HSA),(iii)螯合剂或磷酸盐,以及任选的一种或多种组分(iv)至(vi),其中组分(i)至(vi)如本文所定义。

[0112] 另一方面,本发明涉及用于治疗的本发明的液体制剂。

[0113] 具体而言,本发明的液体制剂可用于治疗神经肌肉疾病、疼痛、流涎、多汗症、泌尿系统疾病和神经系统疾病。示例性的神经肌肉疾病包括肌张力障碍、颈部肌张力障碍、痉挛、中风后痉挛、眼睑痉挛、震颤、运动过度性运动障碍和脑瘫。泌尿系统疾病包括以逼尿肌活动过度、膀胱活动过度、神经源性膀胱和间质性膀胱炎为特征的疾病,外阴痛和慢性骨盆痛的治疗,良性前列腺增生(BPH)和逼尿肌括约肌协同失调(DSD)。示例性的神经障碍包括慢性偏头痛、三叉神经痛、外周神经病性疼痛、糖尿病性神经病性疼痛和抑郁症。

[0114] 在另一方面,本发明涉及本发明的液体制剂用于治疗美容病况的美容用途。

[0115] 本发明的这一方面涉及本发明液体制剂的纯美学用途。待处理的优选美容病况包括皮肤病况,特别是皮肤皱纹的处理,尤其是面部皱纹的处理。

[0116] 本文所用的术语“皱纹”应广义地解释为不仅包括皱纹,还包括纹路、纹理、折痕、沟纹和褶皱。“纹路”、“皱纹”、“纹理”、“折痕”和“褶皱”这些词有相似的定义,因此经常互换使用。在本发明中,“纹路”通常可与“皱纹”互换,但优选是指深度小于“皱纹”的皮肤凹陷。“褶皱”可与皱纹和纹路互换,优选为线性凹陷。“折痕”可与皱纹、纹路和褶皱互换。它优选地指轻微形式的皱纹,并且可以描述特定位置的特定皱纹。本文所用的“纹理”基本上具有与皱纹相同的含义。然而,“纹理”优选是指由不规则聚集的线条形成的皮肤结构。“沟纹”是皮肤上的深褶皱或深纹路。

[0117] 优选地,根据本发明治疗的皱纹是面部皱纹,包括水平前额纹、眉间皱眉纹、眶周纹、鱼尾纹、兔唇纹(即,鼻子两侧的向下辐射纹)、鼻唇沟、上径向唇纹、下径向唇纹、嘴角纹、木偶纹、口周唇纹、口连合、唇颈折痕和鹅卵石状下巴。

[0118] 为了治疗上述面部皱纹,肉毒杆菌毒素通常通过肌肉注射施用至以下肌肉:额肌

(水平前额纹)、降眉间肌和皱眉肌(眉间皱眉纹)、眼轮匝肌外侧(鱼尾纹/眶周纹)、鼻肌、鼻横肌降眉间肌(兔唇纹)、鼻翼上唇提肌(鼻唇沟)、口轮匝肌(上和下径向唇纹)、降口角肌(嘴角纹、木偶纹、口连合、唇颈折痕)和颈肌(口周唇纹、鹅卵石状下巴)。

[0119] 本发明液体制剂的进一步优选的美容用途涉及包括面部和/或身体的皮肤质量的恢复和/或改善的美容应用的用途。

[0120] 在另一个方面,本发明涉及一种治疗疾病或病况的方法,包括给有需要的人施用有效量的本发明的液体制剂。

[0121] 所述疾病或病况可以是上文提及的任何一种疾病和病况,无论其是治疗适应症还是美容适应症。因此,在一个实施方案中,本发明涉及治疗美容(美学)病况,优选皮肤病况的(非治疗性)方法,包括向有需要的人施用有效量的本发明液体制剂。在另一个实施方案中,本发明涉及治疗美容(美学)病况,优选皮肤病况的(非治疗性)方法,包括将有效量的本发明液体制剂注射到有此需要的人体内。

[0122] 本发明进一步优选的方法涉及面部和/或身体皮肤质量的恢复和/或改善的方法,包括给有需要的人施用有效量的本发明液体制剂。

[0123] 除了患有可以根据本发明治疗的疾病或病况外,待治疗的人没有特别的限制。本领域技术人员将能够确定用于治疗给定治疗或美容适应症的适当施用方案。特别地,根据待治疗的疾病或病况,注射可以是皮内、皮下或肌肉注射。

[0124] 实施例

[0125] 以下实施例说明了根据本发明的液体肉毒杆菌毒素制剂。除非另有说明,百分比是重量体积比(w/v)。

[0126] 实施例1

[0127] 热稳定性

[0128] 肉毒杆菌毒素的热稳定性通过在40°C的高温下测量肉毒杆菌毒素的生物活性随时间的变化来确定。生物活性使用WO 2013/049508和WO 2014/207109中描述的基于细胞的效力测定(CBA)来确定。

[0129] 简而言之,将神经元细胞与含有神经毒素的样品和已知效力的参考标准一起孵育。孵育期后,裂解细胞,并通过免疫测定法测定裂解的SNAP25蛋白的量。然后通过比较用样品处理的细胞和用参考标准处理的细胞的分裂率,计算样品的生物活性。

[0130] 将含有HSA的组合物(“HSA组合物”;50U/ml BoNT/A,0.1% HSA,0.47%蔗糖,0.9% NaCl)与对比组合物1(50U/ml BoNT/A,0.015%聚山梨醇酯20,0.02%甲硫氨酸,0.9% NaCl,0.078% NaH₂PO₄;pH 6.5)和对比组合物2(50U/ml BoNT/A,0.01%聚山梨醇酯80,0.155%组氨酸,0.4%蔗糖,0.9% NaCl;pH 6.5)进行比较。将每种组合物的一部分在2-8°C下储存于暗处,并在7天内在CBA中分析(“T0”)。将组合物的剩余部分在高温(40°C)下储存2周,然后测定生物活性。所有组合物中使用的肉毒杆菌毒素是不含络合蛋白的150kDa BoNT/A神经毒素。结果如表1所示。

[0131] 表1.热稳定性

[0132]	BoNT/A 组合物	相对于 T0, 在 40℃ 下 2 周后 BoNT/A 活性的变化
	HSA 组合物 (非发明)	-20%
	(对比组合物 1)	-49%
	(对比组合物 2)	-46%

[0133] 从表1可以看出,含有人血清白蛋白 (HSA) 的HSA组合物明显比不含HSA作为稳定蛋白的对比组合物1和2更稳定。因此,稳定蛋白如HSA的存在对于获得足够高的毒素热稳定性是重要的。

[0134] 通过测量在不同HSA浓度的液体组合物 (75U/ml BoNT/A, 0.03-1.0mg/ml HSA, 10mM磷酸盐, 10mM组氨酸, 0.9% NaCl; pH 6.0) 中BoNT/A (150kDa) 的生物活性,进一步研究了HSA对肉毒杆菌毒素稳定性的影响,这一测量是在生产过程后直接进行的 (在如上所述的T0时;所有研究样品的T0均相同)。结果如表2所示。

[0135] 表2.HSA浓度对BoNT/A活性的影响

[0136]	BoNT/A 组合物(非发明)	HSA 浓度	BoNT/A 活性
	1	0.03 mg/ml	48 U/ml
	2	0.1 mg/ml	63 U/ml
	3	0.3 mg/ml	65 U/ml
	4	1.0 mg/ml	75 U/ml

[0137] 从表2可以看出,毒素活性随着HSA浓度的增加而增加。

[0138] 实施例2

[0139] 光敏性

[0140] 当研究如上所述的各种液体制剂的稳定性时,惊奇地发现光对毒素稳定性有显著

影响。通过使用SUNTEST CPS+仪器(ATLAS Material Testing Technology LLC)的光稳定性测试进一步研究了这一发现,该仪器配备有滤光器组,以提供320-800nm波长范围内的光谱分布,这对应于使用根据ICH Q1B的窗玻璃滤光器的ISO 10977的ID65(室内间接日光标准)。光稳定性测试在250和250W/m²下进行7小时。

[0141] 具体地,制备包含缓冲的0.9% NaCl (pH 6.0) 和不同浓度的人血清白蛋白(0.03-1.0mg/ml HSA) 的BoNT/A(150kDa) 组合物,然后在250W/m²下暴露于光7小时。为了比较,将具有不同浓度HSA(0.03mg/mL、0.1mg/mL、0.3mg/mL和1.0mg/mL) 的相同BoNT/A(150kDa) 组合物在黑暗中储存相同的时间(对照)。此后,测量暴露于光下的组合物和储存在暗处的相应对照组合物的生物活性。然后计算相对BoNT/A活性,以相应对照的百分比表示,作为光稳定性的量度。结果如表3所示。

[0142] 表3.HSA对光稳定性的影响

[0143]	BoNT/A 组合物	HSA 浓度	相对 BoNT/A 活性 (%对照)
	1	0.03 mg/ml	82%
	2	0.1 mg/ml	72%
	3	0.3 mg/ml	70%
	4	1.0 mg/ml	55%

[0144] 表3的结果表明,BoNT/A在含HSA的组合物中的光稳定性随着HSA浓度的增加而降低。因此,尽管热稳定性随着HSA浓度的增加而增加(见实施例1),但意外地发现HSA对光稳定性有负面影响。进一步的研究(结果未显示)显示,使用替代的HSA产品(重组HSA代替供体HSA) 或对HSA的进行大量透析以去除潜在的小分子杂质(<10kDa) 不会改变这些发现,即,对光敏性没有影响。

[0145] 实施例3

[0146] 光稳定性

[0147] 进行了进一步的研究以发现具有较低光敏性,即较高光稳定性的含HSA的组合物。这些研究包括制备包含不含络合蛋白的BoNT/A(150kDa)、0.1% HSA、0.47%蔗糖和0.9% NaCl的液体组合物(组合物“1”)。此外,制备了对应于组合物1的两种液体组合物,不同之处在于它们还分别含有2.7mM EDTA(组合物“1+EDTA”)和20mM磷酸盐(组合物“1+磷酸盐”;pH 6.0)。此外,制备含有DTPA的组合物(组合物“2(DTPA)”),其包含BoNT/A(150kDa)、0.01% HSA、0.015%聚山梨醇酯20、10mM磷酸盐、0.155%组氨酸、2.7mM DTPA、0.9% NaCl;

pH6.0)。

[0148] 如上所述,将组合物1、1+EDTA、1+磷酸盐和2 (DTPA) 暴露于250W/m²的光下7小时。同时,同样的组合物也在黑暗中储存相同的时间(对照)。然后,测量生物BoNT/A活性,与储存在暗处的相应对照组合物进行比较。结果如表4所示。

[0149] 表4. EDTA和DTPA对光稳定性的影响

	BoNT/A 组合物	相对 BoNT/A 活性 (%对照)
[0150]	1	35%
	1+EDTA	77%
	1+磷酸盐	60%
[0151]	2 (DTPA)	77%

[0152] 从表4可以明显看出,螯合剂EDTA和DTPA的加入导致含HSA的BoNT/A组合物的光稳定性显著提高。还发现磷酸盐发挥类似但较弱的积极作用。

[0153] 实施例4

[0154] 在螯合物存在下的光稳定性和储存稳定性

[0155] 在随后的实验中,意外地发现当皮下注射时,本发明的液体制剂(0.9%NaCl, 3.5mM EDTA, 10mM组氨酸, 0.085% HSA, pH 6.0)引起相对强烈的注射疼痛。即使是非常少量的EDTA(100μl, 浓度仅为2.7mM皮下注射)也已经引起非常不愉快的疼痛。使用了多种对照来排除疼痛是安慰剂效应或由pH引起的可能性。作为原因,组氨酸也可以被排除。结果证明,灼痛是由于络合剂EDTA(结果未显示)。鉴于EDTA二钠用于重金属中毒的治疗、螯合疗法和疫苗的配制,这一发现是出乎意料的。

[0156] 然而,令人惊讶的是,发现向液体肉毒杆菌毒素制剂中加入钙或镁离子显著降低了注射疼痛,同时保持了对光的保护作用。此外,不仅通过添加EDTA,而且通过添加EDTA络合物(EDTA和镁、钙或锌离子)获得了对40°C下储存稳定性的积极影响。

[0157] 更具体地说,在进行的实验中,比较了以下五种不同的BoNT/A 150kDa液体组合物(不含络合蛋白):

[0158] 组合物1: 0.103% HSA, 20mM组氨酸, 0.9% NaCl, pH 6.0

[0159] 组合物2: 0.085% HSA, 10mM组氨酸, 0.9% NaCl, 3.5mM EDTA, pH6.0

[0160] 组合物3: 0.085% HSA, 10mM组氨酸, 0.9% NaCl, 3.5mM EDTA, 3.5

[0161] mM MgCl₂, pH 6.0

[0162] 组合物4:0.085% HSA,10mM组氨酸,0.9% NaCl,3,5mM EDTA,3.5

[0163] mM ZnCl_2 , pH 6.0.

[0164] 组合物5:0.085% HSA,10mM组氨酸,0.9% NaCl,3,5mM EDTA,3.5

[0165] mM CaCl_2 , pH 6.0.

[0166] 暴露于光下 ($250\text{W}/\text{m}^2$ 下7小时; 见上文) 后, 测定相对于储存在暗处的对照样品的相对BoNT/A活性。结果如表5所示。

[0167] 表5. 不同液体肉毒杆菌毒素组合物的光稳定性 (7小时, $250\text{W}/\text{m}^2$)

[0168]	BoNT/A 组合物	EDTA	相对 BoNT/A 活性(% 对照(T0))
	1	w/o EDTA	46%
	2	Na-EDTA	80%
	3	Na-Mg-EDTA	73%
	4	Na-Zn-EDTA	70%
	5	Na-Ca-EDTA	75%

[0169] 可以看出, 含有EDTA的组合物比不含EDTA的组合物对光明显更稳定。镁 (Mg^{2+})、钙 (Ca^{2+}) 和锌 (Zn^{2+}) 络合的金属离子对稳定性能只有很小的影响。

[0170] 这些结果是令人惊讶的, 因为游离EDTA的络合性质被认为是保护BoNT/A免受光暴露的不稳定影响所必需的, 但是游离EDTA的浓度在上述实验中非常低 (例如, 对于锌在100pM的范围内)。然而, 与预期相反, 金属离子如镁和锌的加入并没有消除EDTA的光保护作用。

[0171] 此外, 相对于T0时的对照样品 (在组合物制备后立即), 在40°C储存2和4周后测定相对BoNT/A活性。结果如表6所示。

[0172] 表6. 不同液体肉毒杆菌毒素组合物在40°C下的储存稳定性

[0173]

BoNT/A 组合物	EDTA	相对 BoNT/A 活性(%对照(T0))	
		在 40℃储存 2 周后	在 40℃储存 4 周后
1	w/o EDTA	79%	61%
2	Na-EDTA	89%	77%
3	Na-Mg-EDTA	84%	75%
4	Na-Zn-EDTA	85%	73%
5	Na-Ca-EDTA	79%	69%

[0174] 结果表明,含有EDTA的制剂在40℃储存时比不含EDTA的制剂更稳定。出乎意料的是,结果进一步表明作为EDTA络合物中心金属离子的镁和锌离子对稳定性能的影响很小。