

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-504247
(P2025-504247A)

(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 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	4 C 0 8 3	
A 6 1 P	25/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/02	4 C 0 8 4	
A 6 1 P	13/00 (2006.01)	A 6 1 P	13/00		
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全26頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-547665(P2024-547665)				(71)出願人 512042433
(86)(22)出願日	令和5年2月14日(2023.2.14)				メルツ ファーマ ゲゼルシャフト ミット
(85)翻訳文提出日	令和6年10月9日(2024.10.9)				ベシュレンクテル ハフツング ウント
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/053634				コンパニー コマンディト ゲゼルシャフ
(87)国際公開番号	WO2023/156385				ト アウフ アクティーン
(87)国際公開日	令和5年8月24日(2023.8.24)				ドイツ連邦共和国, 6 0 3 1 8 フラン
(31)優先権主張番号	22156850.4				クフルト アム マイン, エッケンハイマ
(32)優先日	令和4年2月15日(2022.2.15)				ー ラントシュトラーセ 1 0 0
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)				(74)代理人 100099759
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,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,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV				弁理士 青木 篤
最終頁に続く				(74)代理人 100123582	弁理士 三橋 真二
				(74)代理人 100117019	弁理士 渡辺 陽一
				(74)代理人 100141977	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などの安定化タンパク質、(i i i) キレート剤 (例えば、E D T A) 又はリン酸塩、及び任意選択的に (i v) カルシウム、マグネシウム、又は亜鉛の塩、(v) 等張化剤、及び／又は (v i) 緩衝剤を含む液体ボツリヌス毒素製剤に関する。さらに、本発明は、治療及び美容的治療のための液体ボツリヌス毒素製剤の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下を含む液体製剤：

- (i) ボツリヌス毒素、
- (ii) 安定化タンパク質、及び
- (iii) キレート剤又はリン酸塩。

【請求項 2】

前記安定化タンパク質が、ヒト血清アルブミン、オボアルブミン、カゼイン、及びこれらの混合物から選択されるか、又は安定化タンパク質がヒト血清アルブミンである、請求項 1 に記載の液体製剤。

10

【請求項 3】

前記安定化タンパク質がヒト血清アルブミンであり、及びヒト血清アルブミンが液体製剤中に 0.001～1.00% w/v の濃度で存在する、請求項 1 又は 2 に記載の液体製剤。

【請求項 4】

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、ポリフィリン類、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)、トリエチレントトラミン(TEETA)、及びこれらの混合物からなる群から選択される、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の液体製剤。

20

【請求項 5】

請求項 4 に記載の液体製剤であって、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、

ここで、R は、カルボン酸基を全く含まないか、又は 1 つ若しくは 2 つのカルボン酸基を含み、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(β-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)、トリエチレントトラミン六酢酸(TTHA)、及びこれらの混合物からなる群から選択される、液体製剤。

30

【請求項 6】

前記キレート剤が液体製剤中に 0.01～100 mM の濃度で存在する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の液体製剤。

【請求項 7】

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の液体製剤であって、

ここで、前記ボツリヌス毒素が複合タンパク質を含まないボツリヌス神経毒であるか、又はここで、前記ボツリヌス毒素が血清型 A であるか、

又はここで、前記ボツリヌス毒素が複合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か、

又はここで、前記ボツリヌス毒素が血清型 A であり、かつ 1～1000 U/ml の濃度で存在するか、

40

又はここで、前記ボツリヌス毒素が複合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り、かつ 1～1000 U/ml の濃度で存在する、液体製剤。

【請求項 8】

以下を含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の液体製剤：

- (i) ボツリヌス毒素、
- (ii) ヒト血清アルブミン、及び
- (iii) EDTA。

【請求項 9】

請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の液体製剤であって、

ここで、前記液体製剤が、

50

(i v) カルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物を含むか

、
又はここで、前記液体製剤が、

(i v) カルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物をさらに含み、ここで、前記塩は前記液体製剤中に 0.01～100 mM の量で存在し、ここで前記塩は塩化カルシウムであり、かつ前記液体製剤中に 0.01～100 mM の量で存在する、液体製剤。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の液体製剤であって、

ここで、前記液体製剤が、

(v) 等張化剤をさらに含むか、

又はここで、前記液体製剤が、

(v) 等張化剤をさらに含み、ここで、前記等張化剤は前記液体製剤中に 0.01～2.0 % w/v の量で存在するか、又はここで、前記等張化剤は塩化ナトリウムであるか、又はここで、前記等張化剤は塩化ナトリウムであり、かつ前記液体製剤中に 0.01～2.0 % w/v の量で存在する、液体製剤。

【請求項 11】

請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の液体製剤であって、

ここで、前記液体製剤が、

(vi) 緩衝剤をさらに含むか、

又はここで、前記液体製剤が、

(vi) 緩衝剤をさらに含み、ここで、前記緩衝剤が前記液体製剤中に 1～100 mM の量で存在するか、又はここで、前記緩衝剤がアミノ酸、リン酸塩、又はこれらの混合物であるか、又はここで、前記緩衝剤がヒスチジンであるか、又はここで、前記緩衝剤がヒスチジン、リン酸塩、又はこれらの混合物であり、かつ前記ヒスチジン及びリン酸塩は前記液体製剤中に 1～100 mM の量で存在する、液体製剤。

【請求項 12】

その pH が 5.0～8.0 の範囲である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の液体製剤。

【請求項 13】

治療に使用するための、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使用するための、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の液体製剤。

【請求項 14】

美容的状態の処置のための、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の液体製剤の美容的使用。

【請求項 15】

請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の液体製剤の有効量をそれを必要とする人に投与することを含む、疾患又は状態の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、(i) ボツリヌス毒素、(ii) ヒト血清アルブミンなどの安定化タンパク質、(iii) キレート剤（例えば EDTA）又はリン酸塩、及び任意選択的に (iv) カルシウム、マグネシウム、又は亜鉛の塩、(v) 等張化剤、及び／又は (vi) 緩衝剤を含む液体ボツリヌス毒素製剤に関する。さらに、本発明は、治療的及び美容的処置のための液体ボツリヌス毒素製剤の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

10

20

30

40

50

ボツリヌス神経毒素（B o N T、又はボツリヌス毒素（B T））は、ますます多様化する神経学的、医学的、及び美容上の状態の処置に広く使用されている細菌神経毒素のファミリーである。B o N Tには8つの血清型（B o N T / A ~ H）がある。現在臨床で使用されているのは、A型（B o N T / A）とB型（B o N T / B）の2つの血清型である。B o N Tは、クロストリジウム（C l o s t r i d i u m）属菌種、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（最大約900kDa）複合体の形態で生成される。これらの毒素複合体は、活性な150kDa神経毒といくつかの複合タンパク質（非毒性神経毒関連タンパク質、N A P）で構成されている。

【0003】

150kDa神経毒は、不活性な単鎖ポリペプチド（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、鎖間ジスルフィド結合でつながれた軽鎖（L C、約50kDa）と重鎖（H C、約100kDa）が得られる。H Cには、受容体への結合を媒介するC末端ドメインと、エンドソーム膜を介してL Cの転座を媒介するN末端ドメインが含まれている。L Cはニューロン内でプロテアーゼとして作用し、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の融合がブロックされ、こうして選択されたニューロンからの神経伝達物質の放出が阻害される。

【0004】

B o N Tの製剤化は、その構造の複雑さと使用される製品濃度の低さのために非常に困難である。B o N Tは、熱やアルカリ性pHなどのさまざまな条件に極めて感受性である。従って、B o N Tは構造が完全な場合にしか機能しないため、B o N Tの医療用剤形を調製する際の課題は、製品の製造、保存、又は使用中にB o N Tが不活性化したり、生物学的活性が部分的に失われたりしないように防御する組成物を製剤化することである。さらに、B o N Tの力価は極めて高く、ヒトの致死量はわずか約0.1~1ng/kgの範囲であるため、B o N Tの医薬製剤には、バイアルあたりわずか約1ngの範囲の極めて少量の毒素しか含まれていない。これにより、表面変性による毒素活性の損失という既知の問題が悪化する。従って、B o N Tの製剤化における主な課題の1つは、製造及び保存中の活性損失を最小限に抑えることである。

【0005】

これらの要因により、現在入手可能な主なB o N T製品は、凍結乾燥粉末、つまり2~8℃又は室温でも長期間安定している形態で提供されている（X e o m i n（登録商標））。凍結乾燥形態のB o N T / A複合体は、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、タンパク質複合体を含まない純粋な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）。しかし、これらの凍結乾燥製品は使用前に復元する必要があり、このプロセスにより投与ミスや無菌性の問題が発生する可能性がある。従って、より使いやすく、簡単に投与できるB o N Tの液体製剤の開発に多大な努力が払われてきた。

【0006】

B o N Tの最初の液体製剤は2000年に承認され、ヨーロッパで2001年に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）（E i s a i）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酸ナトリウムを含む緩衝液で処方されたB o N T / B複合体の無菌溶液である。しかし、この製品は酸性pHのため、注射すると痛みを伴う場合がある。B o N T / Aについては、これまでに市販承認を得ている液剤が2つだけである。1つはI n n o t o x（登録商標）（M e d y t o x）で、アジア国内市場（例えば韓国、2013年に承認）に限定されており、もう1つは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）で、これは2021年に欧州での使用が承認された。これらの液体製剤は両方とも、B o N T / A毒素複合体と、水に加えて、塩化ナトリウム、洗浄剤（I n n o t o x（登録商標）：ポリソルベート20、

10

20

30

40

50

A l l u z i e n c e（登録商標）：ポリソルベート80）、アミノ酸（I n n o t o x（登録商標）：メチオニン、A l l u z i e n c e（登録商標）：ヒスチジン）、及び追加の賦形剤（I n n o t o x（登録商標）：緩衝剤としてのリン酸ナトリウム、A l l u z i e n c e（登録商標）：スクロース）が含まれている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【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かかわらず、輸送及び保存中に安定しており、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しい選択肢が依然として必要とされている。

10

【0008】

本発明の目的

本発明の目的は、治療及び美容的処置にすぐに使用できる、安定したボツリヌス毒素の液体製剤を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の概要

本発明は、ヒト血清アルブミン（H S A）を含むボツリヌス毒素の液体製剤にキレート剤（例えば、E D T A）又はリン酸塩を添加すると、熱及び光の両方に対して安定な改良された製剤が得られるという驚くべき発見に基づいている。

20

【0010】

従って、1つの態様において、本発明は、以下を含む液体製剤を提供する：

（i）ボツリヌス毒素、

（i i）安定化タンパク質、好ましくはヒト血清アルブミン（H S A）、及び

（i i i）キレート剤又はリン酸塩。

【0011】

任意選択的に、本発明の液体製剤は、さらに、（i v）カルシウム、マグネシウム若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、あるいは（v）等張化剤（例えば、塩化ナトリウム）、あるいは（v i）緩衝剤（例えば、リン酸緩衝液若しくはヒスチジン緩衝液、又はその両方）、あるいは成分（i v）～（v i）のうちの2つ（例えば、（i v）と（v）、（i v）と（v i）、又は（v）と（v i））、又は成分（i v）～（v i）の3つすべてを含む。

30

【0012】

別の態様において、本発明は、治療に使用するための、特に神経筋疾患、疼痛、流涎症、多汗症、泌尿器疾患、及び神経疾患の治療に使用するための、本発明の液体製剤に関する。

【0013】

さらなる態様において、本発明は、美容上の状態、好ましくは皮膚の状態、特に皮膚の線又は折り目の処置のための、本発明の液体製剤の美容的（美的）使用に関する。

【0014】

40

さらに別の態様において、本発明は、本発明の液体製剤の有効量を、それを必要とする人に投与することを含む、疾患の治療方法又は状態の処置方法に関する。

【0015】

本発明による液体ボツリヌス毒素製剤、その使用及び使用方法の好適な実施態様は、添付の特許請求の範囲に記載される。

【0016】

本発明は、以下の本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、より容易に理解することができる。

【発明を実施するための形態】

【0017】

50

発明の詳細な説明

本発明は、ヒト血清アルブミン（HSA）を含むボツリヌス毒素の液体製剤にキレート剤（例えば、EDTA）又はリン酸塩が存在すると、熱だけでなく光に対しても安定な改良された製剤が得られるという予期せぬ発見に基づいている。さらに、予想外に、カルシウム、マグネシウム、又は亜鉛の塩を添加すると注射の痛みが軽減されることが分かった。

【0018】

本発明の液体製剤は、注射前に製剤を復元する必要がなく、すぐに使用できるため、粉末状の凍結乾燥ボツリヌス毒素製剤と比較して、安全性及び投与精度が向上するという利点がある。さらに、液体製剤は優れた安定性を示し、それによって輸送及び保存、並びに

10

【0019】

理論に拘束されるものではないが、観察された光感受性には、例えばHSAなどの安定化タンパク質が関与していると考えられる。さらに、本発明の液体製剤は光安定性が向上しており、すなわち、光による毒素活性の損失が低減している（光感受性が低下している）という驚くべき知見は、HSA又は使用されるHSA材料に含まれる成分と相互作用するか、又はそれらに影響を及ぼすキレート剤又はリン酸塩によるものであり、その結果、HSAがボツリヌス毒素を安定化する能力に対する光の悪影響が回避されるか、又は最小限に抑えられるためと考えられる。

【0020】

本発明の液体ボツリヌス毒素製剤の光安定性が向上しているため、製造工程が簡素化され、広範な光防御なしでも製品を充填及び包装することができ、使用するまで医師の場所で光に曝露された状態で保存することによる活性損失の可能性が低減される。全体的に、本発明の液体製剤の感受性の低下により、注射処置中のボツリヌス毒素の取り扱いやすさ及び使いやすさが全体的に改善される。

20

【0021】

1つの態様において、本発明は、

(i) ボツリヌス毒素、

(ii) 安定化タンパク質、及び

(iii) キレート剤又はリン酸塩、を含む液体製剤に関する。

30

【0022】

本明細書で使用される用語「含む (comprising)」は、「含む (including)」及び「含む (containing)」という用語、並びにそれらの変形、例えば「含む (comprises)」、「含む (includes)」、及び「含む (contains)」は、非排他的包含を指すことを意図しており、要素又は要素のリストを含む (comprises)、含む (includes)、又は含む (contains) プロセス、方法、プロダクトバイプロセス、組成物、又は配合物は、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、又は配合物について明示的にリストされていない他の要素を含むことができる。さらに、本発明の枠組み内では、用語「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含む (includes)」、「含む (including)」、「含む (contains)」、「含む (containing)」、及びこれらの変形のそれぞれは、用語「構成される (consists)」又は「構成される (consisting)」又はこれらの任意の変形（たとえば、「本質的に構成される (consists essentially of)」）に置き換えることができることを意図しており、これは、示された要素の排他的包含を指すものと理解される。

40

【0023】

本明細書の文脈で使用される用語「a」、「an」、「the」、及び同様の参照は、単数形と複数形の両方を網羅するものと解釈されるべきであり、従って、本明細書で特に断りのない限り、又は文脈によって明らかに矛盾しない限り、「少なくとも1つ」又は「

50

2つ以上」にも関係する可能性がある。

【0024】

本明細書で使用される用語「液体製剤」は、一般に水性製剤を指し、典型的には水溶液である。本明細書において用語「液体製剤」は、「液体組成物」と互換的に使用することができる。好ましくは、液体製剤は、医薬的に許容し得る液体製剤である。本明細書で使用される用語「医薬的に許容し得る」は、液体製剤がヒト患者又は被験体に投与されたときに許容できない副作用を引き起こさないことを意味する。すなわち、液体製剤がヒトの使用に適していることを意味する。水溶液は、緩衝液であってもよく、生理食塩水を含む場合も含まない場合もあるし、緩衝された（例えば、リン酸塩及び／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。

10

【0025】

本発明の液体製剤は、任意の適切な容器システムに保存することができる。本発明の液体製剤を保存するための適切な容器システムは、密封可能又は密封されており、液体製剤を収容、保存、及び／又は輸送するために使用できる、部分的に又は完全に密閉された空間を有する任意の器具である。容器システムは、好ましくは、ガラス又はプラスチック（例えば、有機ポリマー）で作られた、又は部分的に若しくは主に作られた密閉（又は密封）容器であり、例えば、（i）シリンジ、（ii）バイアル、（iii）カープル、又は（iv）アンプルの形態の容器を含む。本発明の好適な実施態様において、液体製剤は、当該技術分野で知られているように、予備充填されたシリンジの形態のシリンジに保存される。

20

【0026】

成分（i）に関して、ボツリヌス毒素は特に限定されず、任意の血清型（BoNT/A～G）のボツリヌス毒素を含む。例えば、ボツリヌス毒素は、血清型A又はB（BoNT/A、BoNT/B）のものであり得る。好ましくは、ボツリヌス毒素は血清型Aであり、より好ましくは血清型A1（BoNT/A1）であり、最も好ましくは、ボツリヌス菌（*Clostridium botulinum*）Hall株によって産生されるBoNT/A1である。さらに、ボツリヌス毒素は、ボツリヌス菌（*Clostridium botulinum*）から得られる天然の神経毒、又は組換え技術や遺伝子又は化学修飾を含む代替源から得られるボツリヌス毒素などの他のボツリヌス毒素でもよい。

【0027】

さらに、本明細書で使用される用語「ボツリヌス毒素」（「BT」）及び同義で使用される用語「ボツリヌス神経毒素」（「BoNT」）は、純粋なボツリヌス神経毒素及び／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素と複合タンパク質（「毒素複合体」と呼ばれる）の任意の複合体を指すことを意図している。

30

【0028】

本明細書で使用される用語「純粋なボツリヌス神経毒素」は、複合タンパク質（「神経毒性成分」と呼ばれることもある）を含まないボツリヌス神経毒素、又はより正確には、神経毒素関連複合タンパク質（NAP）を含まないボツリヌス神経毒素を意味する。純粋なボツリヌス神経毒素は、最終的にアセチルコリンの放出を阻害する（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結合された軽鎖（LC、約50 kDa）と重鎖（HC、約100 kDa）からなる二本鎖タンパク質である。従って、活性な神経毒性ポリペプチドはまた、本明細書では「150 kDa神経毒」、「ボツリヌス菌神経毒（150 kD）」、又は「神経毒性成分」とも呼ばれる。

40

【0029】

本明細書で用いられる「毒素複合体」という用語は、神経毒性成分と一連の複合タンパク質（NAP）との高分子複合体を指す。特に、「毒素複合体」という用語には、900 kDa、500 kDa、及び300 kDaのボツリヌス菌A型毒素複合体が含まれる。複合タンパク質は、非毒性の非血球凝集素（NTNHA）であり、血清型A～Dの株では、異なる血球凝集素（HA）である。例えば、900 kDa複合体は、オナボツリナムトキシンA（Botox（登録商標）／Vistabel（登録商標）、Allergan，

50

Inc., Irvine, CA, USA)に含まれる。また活性剤としての毒素複合体は、Dysport (登録商標) (Azzalure (登録商標)、psen, Paris, France)、Alluzience (登録商標) (lpsen/Galderma)、及びInnotox (登録商標) (Medytox)に含まれている。

【0030】

本発明の液体製剤中のボツリヌス毒素の濃度は、1～1000 U/mlの範囲であり、好ましくは10～200 U/mlの範囲、より好ましくは20～150 U/mlの範囲、例えば50 U/ml又は100 U/mlである。

【0031】

本明細書で使用される「単位」又は「U」という用語は、毒素の生物学的活性（生物学的力価）を指し、試験されたマウスの50%に致死的な用量（LD₅₀）に関連する。より具体的には本発明の文脈では、特に明記しない限り、LD₅₀はマウスバイオアッセイ（MBA）を使用して測定される。MBAは、マウスの腹腔内注射後の毒素／神経毒の平均致死量（LD₅₀）、すなわち、マウス群の50%を殺すことができる毒素／神経毒の量を決定する。これに基づいて、本明細書で使用される毒素／神経毒1単位（U）は、1マウスLD₅₀（1.0 LD₅₀=1.0 U）として定義される。LD₅₀マウスバイオアッセイは、ボツリヌス毒素のさまざまな生物学的、化学的、又は免疫学的検出方法のゴールドスタンダードであり、当業者に知られている（たとえば、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）。当業者は、血清型及び意図された用途に応じて、適切なボツリヌス毒素濃度を決定することができる。

【0032】

あるいは、WO2009/114748、WO2013/049508、又はWO2014/207109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決定することもできる。当業者は、LD₅₀参照標準を使用する校正により、細胞ベースのアッセイで得られたボツリヌス毒素活性の結果をマウスLD₅₀アッセイで得られた結果と相関させることができる。

【0033】

市販のボツリヌス毒素製剤の製造業者が使用するLD₅₀試験には違いがあるため、彼らが市販のボツリヌス毒素製剤について示す単位力価は独自のものであり、簡単に比較することはできない。従って、本発明の枠組み内では、以下に示す変換率を使用して、インコボツリヌス毒素A（「INCO」、Xeomin (登録商標)、Bocouture (登録商標)；ボツリヌス毒素血清型A、複合タンパク質を含まない；Merz Pharmaceuticals GmbH）、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 Inc.）、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 Corp., Galderma Lab.）、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 Neuroscience Inc.）、及びPurTox (登録商標)（「TBD」；ボツリヌス毒素血清型A；Mentor Worldwide LLC）の相対的力価が確立される。本明細書で使用するために、ONAとINCOの変換率は1：1である。ONA／INCO：ABOの変換率は1：2.5である。ONA／INCO：RIMの変換率は1：50であり、ONA／INCO：TBDの変換率は1：1.5である。

【0034】

本発明の液体製剤の成分（ii）に関して、用語「安定化タンパク質」は、一般に、ボ

10

20

30

40

50

ツリヌス毒素の安定性を増大させるポリペプチドを指す。本明細書において使用される用語「ポリペプチド」は、用語「タンパク質」と互換的に使用され、10個を超えるアミノ酸、好ましくは50個を超えるアミノ酸、より好ましくは100個を超えるアミノ酸、最も好ましくは200個を超えるアミノ酸、そして好ましくは1000個以下のアミノ酸がペプチド結合によって連結されたアミノ酸から成るペプチドを指す。本明細書において特に好ましいのは、150～1000個のアミノ酸、又は250～800個のアミノ酸、特に300～1000個のアミノ酸又は350～700個のアミノ酸を含むポリペプチドである。

【0035】

本発明において、安定化タンパク質は、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、オボアルブミン、カゼイン、又はこれらの混合物であり得る。本明細書における使用に特に好ましいのは、ヒト血清アルブミン、オボアルブミン、又はこれらの混合物であり、最も好ましいのはHSAである。

【0036】

安定化タンパク質又は安定化タンパク質の混合物は、液体製剤中に、0.001～2.0% w/v、好ましくは0.01～1.0% w/v、より好ましくは0.01～0.5% w/v、及び最も好ましくは0.02～0.3% w/v又は0.03～0.10% w/vの量で存在することができる。最も好ましい安定化タンパク質、すなわちヒト血清アルブミン（HSA）は、液体製剤中に、好ましくは0.001～1.00% w/v、より好ましくは0.01～0.3% w/v、及び最も好ましくは0.02～0.15% w/vの量で存在する。本明細書で使用される用語「ヒト血清アルブミン」又は「HSA」は、ドナーHSA（ヒト血液由来、より正確にはヒト血漿由来のHSA）、組み換えHSA、及び／又は他の任意の供給源由来のHSAを指すものとする。好ましくは、ヒト血清アルブミンは、組み換えHSA又はヒト血液由来のHSAである。

【0037】

理論に拘束されるものではないが、驚くべきことに、HSA濃度が増加すると光安定性が低下することが見いだされたため、本発明の製剤の光感受性は、少なくとも部分的にHSA、又は使用されるHSA材料に含まれる成分に関係していると考えられる。

【0038】

成分(iii)に関して、キレート剤は、金属イオンを結合できる限り、特に限定されない。本明細書で使用される用語「キレート剤」はまた、「キレート剤」又は「金属イオン封鎖剤」とも呼ばれる。本明細書で使用するキレート剤は、通常、金属イオン結合有機化合物である。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多重配位結合を形成する。

【0039】

本発明で使用するのに適したキレート剤には、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、3～6個、好ましくは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）、及び他の化合物、例えばクエン酸、ポリフィリン類、TPEN（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）、TETA（トリエチレントトラミン）、及びこれらの混合物が含まれる。代表的なアミノポリカルボン酸には、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（β-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（ジエレントリアミン五酢酸）、TTHA（トリエチレントトラミン六酢酸）が含まれる。

【0040】

本発明で使用するのに特に好ましいキレート剤には、一般式（I）：



の化合物が含まれ、これは少なくとも4つ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全く含まないか、又は1つ又は2つのカルボン酸官能基を含むことができる。好ましくは、R基はカルボン酸官能基を全く含まないか、又は1つのカルボン酸官能基を含み、最も好ましくはカルボン酸官能基を含まない。

【0041】

一般式(I)の化合物の例には、例えば、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA、及びTTHAが含まれる。本発明で使用するのに特に好ましいのはEDTA、EGTA、及びDTPAであり、さらに好ましくはEDTA及びDTPAであり、最も好ましくはEDTAである。本発明において、上記のキレート剤のいずれかの混合物も使用することができる。

10

【0042】

キレート剤は、少なくとも0.01mM、又は少なくとも0.1mM、又は少なくとも1mMの濃度で存在してもよい。好ましくは、キレート剤は、0.01~100mMの濃度で、又は0.1~50mMの濃度で、より好ましくは0.05~20mMの濃度で、及び最も好ましくは1~10mMの濃度で存在する。

【0043】

さらに成分(iii)について、本発明の液体製剤では、キレート剤の代わりに又はキレート剤に加えて、製剤の光感受性を低減するためにリン酸塩を使用してもよいことが本明細書で企図されている。実際、リン酸塩の存在によっても光安定性が著しく向上することが予想外に判明した。リン酸塩は、液体製剤中に、少なくとも0.1mM、又は少なくとも1mM、又は少なくとも5mMの濃度で存在してもよい。好ましくは、リン酸塩は、液体製剤中に、0.1~100mM、好ましくは1~50mM、より好ましくは5~30mMの濃度で存在する。

20

【0044】

好ましくは、本発明の液体製剤は、(i)ボツリヌス毒素、(ii)ヒト血清アルブミン、及び(iii)キレート剤、好ましくはEDTAを含む。この好ましい液体製剤は、本明細書で上述した他の液体製剤と同様に、以下に記載する任意の成分(iv)、(v)、及び(vi)のうちの1つ又はそれ以上、すなわち(iv)、又は(v)、又は(vi)、又は(iv)と(v)、又は(iv)と(vi)、又は(v)と(vi)、又は(vi)と(v)と(vi)をさらに含んでもよい。

30

【0045】

本発明の好適な実施態様において、液体製剤は、アルカリ土類金属又は遷移金属の塩をさらに含んでもよく、好ましくは、さらに以下を含む：

(iv)カルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物。

【0046】

好ましい塩は、カルシウム、マグネシウム及び亜鉛の塩であり、より好ましくはカルシウム及びマグネシウムの塩であり、最も好ましくはカルシウムの塩である。EDTAの存在下では、これらの塩を添加すると、EDTA錯体、すなわち、中心原子として錯体を形成した添加された金属陽イオンを有するEDTAが形成される。塩の陰イオンの性質は重要ではなく、唯一の要件は、塩が本発明の水性製剤に可溶性であることである。例えば、陰イオンは、医薬的に許容し得る無機酸及び有機酸の陰イオンであってもよい。あるいは、キレート剤自体が金属塩の陰イオンを形成することができ、成分(iii)及び(iv)は、例えば Na_2CaEDTA として液体製剤に添加される。

40

【0047】

適切な対陰イオンには塩、例えば、酢酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、ベシル酸塩、重炭酸塩、重酒石酸塩、臭化物、カンシル酸塩、炭酸塩、塩化物、クエン酸塩、デカン酸塩、エデト酸塩、エシル酸塩、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコール酸塩、グリコリルアルサニル酸塩、ヘキサ酸塩、ヒドラバミン、ヒドロキシナフトエ酸塩、ヨウ化物、ラクトビオン酸塩、硝酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、メチル臭化物、メチル硝酸塩

50

、メチル硫酸塩、ムチン酸塩、ナプシル酸塩、硝酸塩、オクタン酸塩、オレイン酸塩、パルモ酸塩、パントテン酸塩、リン酸塩、ポリガラクトロン酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、亜酢酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、及びデオクル酸塩が含まれる。

【0048】

好ましくは、塩は塩化物である。特に好ましい塩には、塩化カルシウム（すなわち、 CaCl_2 及びその水和物）、塩化マグネシウム（すなわち、 MgCl_2 及びその水和物）、及び塩化亜鉛（すなわち、 ZnCl_2 及びその水和物）が含まれる。EDTAの存在下では、これらの塩を添加すると、EDTA錯体、すなわち、中心原子として錯体を形成した添加された金属陽イオンを有するEDTAが形成される。

10

【0049】

一般に、塩の金属イオンの濃度は、キレート剤の濃度とほぼ等モルであることが想定される。塩は、液体製剤中に少なくとも0.01mM、又は少なくとも0.1mM、又は少なくとも1mMの濃度で存在することができる。好ましくは、塩は、液体製剤中に、0.01~100mM、好ましくは0.1~50mM、より好ましくは0.05~20mM、最も好ましくは1~10mMの濃度で存在する。

【0050】

驚くべきことに、本発明の発明者らは、アルカリ土類金属又は遷移金属の塩、特にカルシウム、マグネシウム、又は亜鉛の塩を添加すると、本発明の液体製剤の注射時の痛みが著しく軽減されると同時に、保存安定性及び光安定性が維持されることを発見した。この発見は予想外であった。なぜなら、(i) 本明細書に記載の液体ボツリヌス毒素製剤は、予見も予測もできなかった不快な注射痛を引き起こすことが判明したため、(ii) 塩化カルシウムなどのアルカリ土類金属又は遷移金属の塩を添加すると、驚くべきことに、注射痛が劇的に軽減されることが判明し、同時に、(iii) 光安定化効果を得るには遊離の（非錯化）キレート剤が必要であると考えられていたにもかかわらず、液体製剤の保存安定性及び光安定性が維持されたためである。すなわち、中心金属原子（例えば、 Ca^{2+} ）を含むキレート剤（例えば、EDTA）は、驚くべきことに、ボツリヌス毒素を光から防御することができることが判明した。

20

【0051】

本発明によれば、液体製剤は、任意選択的に、さらに以下を含むことができる：

30

(v) 等張化剤。

【0052】

本明細書で使用される用語「等張化剤」は、注射用製剤に添加されて、製剤の浸透圧特性を生理液に類似させる薬剤を指す。等張化剤はまた「浸透圧調節剤」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、及びこれらの混合物からなる群から選択することができる。

【0053】

例示的な等張化剤には、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）が含まれる。通常、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、より具体的には0.6~1.2% w/vの範囲である。

40

【0054】

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、及び最も好ましくは0.9% w/vの量で存在することができる。

【0055】

本発明によれば、液体製剤は、任意選択的に、さらに以下を含むことができる：

(vi) 緩衝剤。

50

【0056】

本明細書で使用される用語「緩衝剤」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を制御できる薬剤を意味する。適切な緩衝剤は、他の成分と化学的に反応せず、所望のpH緩衝度を提供するのに十分な量で存在するものである。このような緩衝剤には、例えば、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、トリス、ビスートリス、ACES、MES、BES、MOPS、ヘプス、TES、PIPES、トリシン、及びイミダゾールが含まれる。

【0057】

好ましくは、緩衝剤は、リン酸塩、アミノ酸、又はこれらの混合物である。リン酸塩は、本発明において二重の役割を果たすことができ、すなわち、これはリン酸pH緩衝剤として機能し、本発明の成分(iii)として安定化効果を発揮することができることに留意されたい。アミノ酸は、アスパラギン酸、グリシン、グルタミン酸、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、及びこれらの混合物から選択することができ、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、トリプトファン、及びこ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、又はこれらの混合物である。

【0058】

本発明の液体製剤中の緩衝剤の濃度は、好ましくは1~100mM、より好ましくは2~50mM、及び最も好ましくは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、緩衝剤は液体製剤中に1~100mM、好ましくは2~50mM、より好ましくは5~20mM、及び最も好ましくは10mMの濃度で存在することができる。緩衝剤がリン酸塩である場合、緩衝剤は液体製剤中に1~100mM、好ましくは2~50mM、より好ましくは5~20mM、及び最も好ましくは10mMの濃度で存在することができる。

【0059】

本発明の液体製剤のpHは、典型的には5.0~8.0の範囲、特に5.5~7.5の範囲であり、及び好ましくは5.5~7.0又は6.0~7.5の範囲であり、より好ましくは6.0~7.0の範囲であり、及び最も好ましくは6.0~6.5の範囲である。

【0060】

さらに、本発明の液体製剤は、特に明記又は意図されない限り、1つ又はそれ以上の追加の医薬的に許容し得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、ヒアルロン酸、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）のうちの1つ又はそれ以上を含んでもよい。その他の適切な医薬的に許容し得る賦形剤には、当技術分野でよく知られているもの（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania を参照）が含まれる。

【0061】

一方、本発明の液体製剤には、特定の成分（すなわち、化合物、材料又は物質）、例えば、洗浄剤、多糖類、アミノ酸、安定化ペプチドなど（これらの任意の組み合わせを含む）が特に含まれないことも企図されている。本明細書で使用される用語「洗浄剤」は「界面活性剤」と同義で使用され、非イオン性洗浄剤及びイオン性洗浄剤を含むことを意図している。本明細書で使用される用語「安定化ペプチド」は、一般に5~50アミノ酸からなるペプチドを、例えば、10~40個のアミノ酸、又は15~30個のアミノ酸のペプチドを意味する。従って、用語「安定化ペプチド」はHSAを除外する。

【0062】

1つの実施態様において、本発明の液体製剤は洗浄剤を含まず、特にポリソルベートを

10

20

30

40

50

含まず、より具体的にはポリソルベート 20 及び／又はポリソルベート 80 を含まない。別の実施態様において、本発明の液体製剤はアルギン酸塩を含まない。別の実施態様において、本発明の液体製剤はコハク酸塩を含まない。別の実施態様において、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 つ又はそれ以上（例えば、2、3、4、又は 5 つ）のアミノ酸を含まない。別の実施態様において、本発明の液体製剤は、糖類、例えば単糖類、オリゴ糖類、多糖類、又はこれらの混合物を含まない。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、トレハロースのうちの 1 つ又はそれ以上（例えば、2、3、又は 4 つ）を含有しいことがある。また、本発明において、液体製剤が、上記化合物の 1 つ又はそれ以上、又は全てを欠くことも企図される。

10

【0063】

1 つの実施態様において、本発明の液体製剤は、以下が欠失している：（i）洗浄剤、並びに単糖類、オリゴ糖類、及び多糖類、（ii）洗浄剤と任意のアミノ酸、又は洗浄剤とヒスチジン以外のすべてのアミノ酸、（iii）洗浄剤と安定化ペプチド、（iv）単糖類、オリゴ糖類、及び多糖類と任意のアミノ酸、又は単糖類、オリゴ糖類、及び多糖類とヒスチジン以外のすべてのアミノ酸、（v）単糖類、オリゴ糖類、及び多糖類と安定化ペプチド、（vi）任意のアミノ酸と安定化ペプチド、又はヒスチジン以外のすべてのアミノ酸と安定化ペプチド、（vii）洗浄剤、単糖類、オリゴ糖類、及び多糖類と任意のアミノ酸、又は洗浄剤、単糖類、オリゴ糖類、及び多糖類とヒスチジン以外のすべてのアミノ酸、（viii）洗浄剤、単糖類、オリゴ糖類、及び多糖類と安定化ペプチド、（ix）洗浄剤、任意のアミノ酸、及び安定化ペプチド、又は洗浄剤、ヒスチジン以外のすべてのアミノ酸と安定化ペプチド、（x）単糖類、オリゴ糖類、及び多糖類、任意のアミノ酸と安定化ペプチド、又は単糖類、オリゴ糖類、及び多糖類、ヒスチジン以外のすべてのアミノ酸と安定化ペプチド、（xi）洗浄剤、単糖類、オリゴ糖類、及び多糖類、任意のアミノ酸と安定化ペプチド、又は洗浄剤、単糖類、オリゴ糖類、及び多糖類、ヒスチジン以外のすべてのアミノ酸と安定化ペプチド。

20

【0064】

別の実施態様において、本発明の液体製剤は、ヒスチジン以外のアミノ酸を含まない。別の実施態様において、本発明の液体製剤は、いかなる単糖類、二糖類、及び三糖類も含まない。別の実施態様において、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。別の実施態様において、本発明の液体製剤は、例えばリン酸緩衝液の形態のようなリン酸塩を含まない。

30

【0065】

本発明の好適な実施態様において、液体製剤は、以下が欠失している：（i）コハク酸塩と洗浄剤（例えば、ポリソルベート）、（ii）コハク酸塩とメチオニン、（iii）コハク酸塩とスクロース、（iv）洗浄剤（例えば、ポリソルベート）とメチオニン、（v）洗浄剤（例えば、ポリソルベート）とスクロース、（vi）メチオニンとスクロース、（vii）コハク酸塩、洗浄剤（例えば、ポリソルベート）、及びメチオニン、（viii）コハク酸塩、洗浄剤（例えば、ポリソルベート）、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）洗浄剤（例えば、ポリソルベート）、メチオニン、及びスクロース、並びに（xi）コハク酸塩、洗浄剤（例えば、ポリソルベート）、メチオニン、及びスクロース、（xii）洗浄剤（例えば、ポリソルベート）とヒスチジン、（xiii）洗浄剤（例えば、ポリソルベート）、ヒスチジン、及びスクロース。

40

【0066】

本発明の好ましい液体製剤は、（i）ボツリヌス毒素、（ii）HSA、及び（iii）一般式 $(HO_2CCH_2)_2N-R-N(CH_2CO_2H)_2$ のキレート剤を含み、ここで、R はカルボン酸基を含まないか、又は 1 つ又は 2 つのカルボン酸基を含む。本発明の好ましい液体製剤は、（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、及び（iii）0.05～20 mM の濃度の

50

般式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}-\text{R}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ のキレート剤を含み、ここで、Rはカルボン酸基を含まないか、又は1つ又は2つのカルボン酸基を含む。

【0067】

本発明の好ましい液体製剤は、(i) ボツリヌス毒素、(ii) HSA、及び(iii) DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA、及びTTHAからなる群から選択されるキレート剤、又はEDTA、EGTA、BAPTA、DTPA、及びTTHAからなる群から選択されるキレート剤を含む。本発明の好ましい液体製剤は、(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、及び(iii) DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA、及びTTHAからなる群から選択されるキレート剤、又は0.05~20 mMの濃度のEDTA、EGTA、BAPTA、DTPA及び、TTHAからなる群から選択されるキレート剤を含む。

10

【0068】

本発明の好ましい液体製剤は、(i) ボツリヌス毒素、(ii) HSA、及び(iii) EDTAを含む。本発明の好ましい液体製剤は、(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、及び(iii) 0.05~20 mMの濃度のEDTAを含む。

【0069】

本発明の好ましい液体製剤は、(i) ボツリヌス毒素、(ii) HSA、(iii) 一般式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}-\text{R}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ のキレート剤(ここで、Rはカルボン酸基を含まないか、又は1つ又は2つのカルボン酸基を含む)、及び(iv) カルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、好ましくは塩化カルシウムを含む。本発明の好ましい液体製剤は、(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) 0.05~20 mMの濃度の一般式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}-\text{R}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ のキレート剤(ここで、Rはカルボン酸基を含まないか、1つ又は2つのカルボン酸基を含む)、及び(iv) 0.05~20 mMの濃度のカルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、好ましくは塩化カルシウムを含む。

20

【0070】

本発明の好ましい液体製剤は、(i) ボツリヌス毒素、(ii) HSA、及び(iii) DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA、及びTTHAからなる群から選択されるキレート剤、又はEDTA、EGTA、BAPTA、DTPA、及びTTHAからなる群から選択されるキレート剤、及び(iv) カルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、好ましくは塩化カルシウムを含む。本発明の好ましい液体製剤は、(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) DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA、及びTTHAからなる群から選択されるキレート剤、又は0.05~20 mMの濃度のEDTA、EGTA、BAPTA、DTPA及び、TTHAからなる群から選択されるキレート剤、及び(iv) 0.05~20 mMの濃度のカルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、好ましくは塩化カルシウムを含む。

30

40

【0071】

本発明の好ましい液体製剤は、(i) ボツリヌス毒素、(ii) HSA、(iii) EDTA、及び(iv) カルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、好ましくは塩化カルシウムを含む。本発明の好ましい液体製剤は、(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) 0.05~20 mMの濃度のEDTA、及び(iv) 0.05~20 mMの濃度のカルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、好ましくは塩化カルシウムを含む。

【0072】

50

本発明の好ましい液体製剤は、(i) ボツリヌス毒素、(ii) HSA、(iii) 一般式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}-\text{R}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ のキレート剤（ここで、R はカルボン酸基を含まないか、又は1つ又は2つのカルボン酸基を含む）、(iv) カルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、好ましくは塩化カルシウム、及び(v) リン酸緩衝液及び／又はヒスチジンを含む。本発明の好ましい液体製剤は、(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) 0.05～20 mM の濃度の一般式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}-\text{R}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ のキレート剤（ここで、R はカルボン酸基を含まないか、又は1つ又は2つのカルボン酸基を含む）、(iv) 0.05～20 mM の濃度のカルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、好ましくは塩化カルシウム、及び(v) 2～50 mM の濃度のリン酸緩衝液及び／又はヒスチジンを含む。

10

【0073】

本発明の好ましい液体製剤は、(i) ボツリヌス毒素、(ii) HSA、(iii) DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA、及びTTHAからなる群から選択されるキレート剤、又はEDTA、EGTA、BAPTA、DTPA、及びTTHAからなる群から選択されるキレート剤、(iv) カルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、好ましくは塩化カルシウム、及び(v) リン酸緩衝液及び／又はヒスチジンを含む。本発明の好ましい液体製剤は、(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) 0.05～20 mM の濃度のDOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA、及びTTHAからなる群から選択されるキレート剤、又はEDTA、EGTA、BAPTA、DTPA、及びTTHAからなる群から選択されるキレート剤、(iv) 0.05～20 mM の濃度のカルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、好ましくは塩化カルシウム、及び(v) 2～50 mM の濃度のリン酸緩衝液及び／又はヒスチジンを含む。

20

【0074】

本発明の好ましい液体製剤は、(i) ボツリヌス毒素、(ii) HSA、(iii) EDTA、(iv) カルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、好ましくは塩化カルシウム、及び(v) リン酸緩衝液及び／又はヒスチジンを含む。本発明の好ましい液体製剤は、(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) 0.05～20 mM の濃度のEDTA、(iv) 0.05～20 mM の濃度のカルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物、好ましくは塩化カルシウム、及び(v) 2～50 mM の濃度のリン酸緩衝液及び／又はヒスチジンを含む。

30

【0075】

特に好ましくは、上記の好ましい液体製剤は、塩化ナトリウム、特に約0.9 % w/v の濃度の塩化ナトリウムをさらに含む。さらに、pHは好ましくは6.0～7.5の範囲である。さらに、ボツリヌス毒素は、好ましくは血清型Aであり、特に血清型Aの神経毒性成分である。

【0076】

40

本発明の例示的な好ましい液体製剤は、以下を含む：

製剤1：

50 U/ml B o N T / A
 0.9 % Na C I (9 mg / mL)
 0.05 % H S A (0.5 mg / mL)
 0.1 % Na₂-E D T A (1 mg / mL ; 約2.7 mM)、
 pH 5.5～8.0 (例えば、6.0)、及び任意選択的に
 pH緩衝液 (例えば、10 mM リン酸塩又は10 mM ヒスチジン)

製剤2：

50 U / mL B o N T / A

50

0.9% NaCl (9 mg/mL)
0.085% HSA (0.85 mg/mL)
0.155% ヒスチジン (1.55 mg/mL; 約 10 mM)
0.13% Na₂-EDTA (1.3 mg/mL; 約 3.5 mM)
0.039% CaCl₂ (390 µg/mL; 約 3.5 mM)
pH 5.5~8.0 (例えば、6.0)、及び任意選択的に
pH 緩衝液 (例えば、10 mM リン酸塩)

【0077】

本発明はまた、ボツリヌス毒素を含む液体製剤に関し、ここで、液体製剤を 40℃ の高温で 4 週間保存しても、毒素活性は初期の毒素活性と比較して 35% を超えて低下することはない。別の態様において、本発明は、ボツリヌス毒素を含む液体製剤に関し、ここで、液体製剤を 250 W/m² の光源に 7 時間曝露しても、毒素活性は初期の毒素活性と比較して 35% を超えて低下することはない。

10

【0078】

さらに、本発明はさらに、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) ~ (iii) と、任意選択的に成分 (iv) ~ (vi) のうちの 1 つ又はそれ以上とを組み合わせ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、及び最も好ましくは緩衝化 (例えば、リン酸緩衝化又はヒスチジン緩衝化) 生理食塩水である。

20

【0079】

好ましくは、最初に塩が溶解され、次に HSA が添加され、必要に応じて pH を調整し、最後にボツリヌス毒素が添加される。この順序は必須要件ではないが、ボツリヌス毒素の最大比活性を安全に維持すると考えられる。好ましくは、液体ボツリヌス毒素製剤を調製する方法は、粉末形態の凍結乾燥ボツリヌス毒素製剤の復元を含まない。

【0080】

さらに、本発明は、(i) ボツリヌス毒素、(ii) 安定化タンパク質、好ましくはヒト血清アルブミン (HSA)、(iii) キレート剤又はリン酸塩、及び任意選択的に成分 (iv) ~ (vi) のうちの 1 つ又はそれ以上を混合することを含む、液体ボツリヌス毒素製剤を安定化する方法に関し、ここで、成分 (i) ~ (v) は本明細書で定義される通りである。

30

【0081】

さらに、本発明は、(i) ボツリヌス毒素、及び (ii) 安定化タンパク質、好ましくはヒト血清アルブミン、及び任意選択的に成分 (iv) ~ (vi) のうちの 1 つ又はそれ以上を含む水性ボツリヌス毒素製剤の光安定性を向上させるための、本明細書で定義されるキレート剤の使用に関し、ここで、成分 (i)、(ii)、及び (iv) ~ (vi) は本明細書で定義される通りである。この文脈における「光安定性の向上」とは、キレート剤を含む水性ボツリヌス毒素製剤について言及され、前記製剤は、ある温度 (例えば、20℃) で 250 W/m² の光に 7 時間曝露された後の生物学的ボツリヌス毒素活性が、同じ温度 (例えば、20℃) で 250 W/m² の光に 7 時間曝露された後の、キレート剤を含まない水性ボツリヌス毒素製剤のボツリヌス毒素活性よりも、少なくとも 20% 高く、好ましくは少なくとも 40% 高く、より好ましくは少なくとも 60% 高く、及び最も好ましくは少なくとも 80% 高い生物学的ボツリヌス毒素活性を有する。

40

【0082】

さらに、本発明は、(i) ボツリヌス毒素、及び (ii) 安定化タンパク質、好ましくはヒト血清アルブミン、及び任意選択的に成分 (iv) ~ (vi) のうちの 1 つ又はそれ以上を含む水性ボツリヌス毒素製剤の光安定性を向上させるためのリン酸塩の使用に関し、ここで、成分 (i)、(ii)、及び (iv) ~ (vi) は本明細書で定義される通りである。この文脈における「光安定性の向上」とは、リン酸塩を含む水性ボツリヌス毒素

50

製剤が、ある温度（例えば20℃）で250W/m²の光に7時間曝露された後の生物学的ボツリヌス毒素活性が、同じ温度（例えば20℃）で250W/m²の光に7時間曝露された後のリン酸塩を含まない水性ボツリヌス毒素製剤の生物学的ボツリヌス毒素活性より、少なくとも10%以上、好ましくは少なくとも20%以上、より好ましくは少なくとも30%未満、最も好ましくは少なくとも40%以上高いことを指す。

【0083】

さらに、本発明は、(i)ボツリヌス毒素、(ii)安定化タンパク質、好ましくはヒト血清アルブミン(HSA)、(iii)キレート剤又はリン酸塩、及び任意選択的に成分(iv)～(vi)の1つ又はそれ以上を含むボツリヌス毒素製剤の注射痛を軽減するためのカルシウム、マグネシウム、若しくは亜鉛の塩、又はこれらの混合物の使用に関し、ここで成分(i)～(vi)は本明細書で定義される通りである。

10

【0084】

別の態様において、本発明は、治療に使用するための本発明の液体製剤に関する。

【0085】

特に、本発明の液体製剤は、神経筋疾患、疼痛、流涎症、多汗症、泌尿器疾患、及び神経疾患の治療に使用することができる。神経筋疾患の例には、ジストニア、頸部ジストニア、痙攣、脳卒中後痙攣、眼瞼痙攣、振戦、多動性運動障害、及び脳性麻痺が含まれる。泌尿器疾患には、特に排尿筋過活動、過活動膀胱、神経因性膀胱、及び間質性膀胱炎を特徴とする症状、外陰部痛及び慢性骨盤痛、良性前立腺肥大症(BPH)、及び排尿筋括約筋協調不全(DSD)の治療が含まれる。神経疾患の例には、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、及びうつ病が含まれる。

20

【0086】

さらに別の態様において、本発明は、美容的状態の処置のための本発明の液体製剤の美容的使用に関する。

【0087】

本発明のこの態様は、本発明の液体製剤の純粋に美的用途に関する。処置すべき好ましい美容上の状態には、皮膚の状態、特に皮膚、特に顔のしわの処置が含まれる。

【0088】

本明細書で使用される用語「しわ(wrinkle)」は、小じわ(wrinkle)だけでなく、線、しわ(rhytid)、しわ(crease)、深いしわ(furrow)、及び折り目(fold)も含むように広く解釈される。「線」、「小じわ」、「しわ」、「大きなしわ」、及び「折り目」という語は、同様の定義を共有しているため、しばしば互換的に使用される。本発明において、「線」は一般に「小じわ」と互換可能であるが、好ましくは「小じわ」よりも浅い皮膚のくぼみを指す場合がある。「折り目」は、しわ及び線と互換可能であり、好ましくは線状のくぼみである。「しわ」は、小じわ、線、及び折り目と互換可能である。これは、好ましくは、軽度の小じわを指し、特定の場所の特定の小じわを説明している場合もある。本明細書で使用されている「しわ(rhytid)」は、小じわと本質的に同じ意味である。しかし、「しわ(rhytid)」は、好ましくは、不規則な線の集合によって形成される皮膚構造を指す。「深いしわ」は、皮膚の深い折り目又は深い線である。

30

40

【0089】

好ましくは、本発明に従って処置されるしわは、水平な額のしわ、眉間のしわ、眼窩周囲のしわ、カラスの足跡、バニーライン（すなわち、鼻の側面に下向きに放射状に伸びる線）、鼻唇溝、上唇放射状線、下唇放射状線、口角線、マリオネット線、口囲唇線、口角交連線、唇鬚線、及び石畳顎を含む顔のしわである。

【0090】

上述した顔面のしわを処置するために、ボツリヌス毒素は、通常、以下の筋肉に筋肉内注射によって投与される：前頭筋（額の水平線）、鼻根筋及び皺眉筋（眉間のしわ）、外側眼輪筋（カラスの足跡／眼窩周囲のしわ）、鼻筋、鼻根筋及び横鼻筋（バニーライン）、上唇鼻翼挙筋（ほうれい線）、口輪筋（上下の放射状唇線）、口角下制筋（口角線、マ

50

リオネット線、口交連、口唇オートガイ線）、及びオートガイ筋（口囲唇線、石畳状の顎）。

【0091】

本発明の液体製剤のさらに好ましい美容用途は、顔及び／又は体の皮膚の質の若返り及び／又は改善を含む美容用途への使用に関する。

【0092】

さらに別の態様において、本発明は、本発明の液体製剤の有効量をそれを必要とする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。

【0093】

疾患又は状態は、治療適応症であるか美容的適応症であるかに関係なく、上記で述べた疾患及び状態のいずれか1つであってもよい。従って、1つの実施態様において、本発明は、本発明の液体製剤の有効量をそれを必要とする人に投与することを含む、美容（美的）状態、好ましくは皮膚状態を処置する（非治療）方法に関する。別の実施態様において、本発明は、本発明の液体製剤の有効量をそれを必要とする人に注射することを含む、美容上の（美的）状態、好ましくは皮膚状態を処置する（非治療的）方法に関する。

【0094】

本発明のさらに好ましい方法は、本発明の液体製剤の有効量をそれを必要とする人に投与することを含む、顔及び／又は体の皮膚の質を若返らせ及び／又は改善する方法に関する。

【0095】

処置される人は、本発明に従って処置できる疾患又は状態を有すること以外は特に制限されない。当業者は、所定の治療又は美容的適応症の処置に適切な投与計画を決定することができる。特に、注射は、処置される疾患又は状態に応じて、皮内、皮下（*subdermal*）（皮下（*subcutaneous*））、又は筋肉内であってもよい。

【実施例】

【0096】

以下の実施例は、本発明による液体ボツリヌス毒素製剤を例示する。特に他に明記されない限り、パーセントは重量／体積（*w/v*）である。

【0097】

実施例 1

熱安定性

ボツリヌス毒素の熱安定性は、40℃の高温でボツリヌス毒素の生物学的活性の経時の変化を測定することによって決定した。生物学的活性は、WO2013/049508及びWO2014/207109に記載されているように、細胞ベースの力価アッセイ（CBA）を使用して決定した。

【0098】

簡単に説明すると、神経細胞を、神経毒素を含む試料及び既知の力価の参照標準物質とともにインキュベートした。インキュベーション時間後、細胞を溶解し、切断されたSNAP25タンパク質の量を免疫アッセイによって決定した。次に、試料の生物学的活性は、試料で処理した細胞の切断率を参照標準物質で処理した細胞と比較することにより算出される。

【0099】

HSA含有組成物（「HSA組成物」；50U/mL BoNT/A、0.1% HSA、0.47% サッカロース、0.9% NaCl）を、比較組成物1（50U/mL BoNT/A、0.015% ポリソルベート20、0.02% メチオニン、0.9% NaCl、0.078% NaH_2PO_4 ；pH 6.5）及び比較組成物2（50U/mL BoNT/A、0.01% ポリソルベート80、0.155% ヒスチジン、0.4% サッカロース、0.9% NaCl；pH 6.5）と比較した。各組成物の一部を暗所で2～8℃で保存し、7日以内にCBAで分析した（「T0」）。組成物の残りの部分は、高温（40℃）で2週間保存した後、生物学的活性を測定した。すべての組成物で使用したボツリヌス毒素は、複合タンパク質を含まない150kDa BoNT/A神経毒であった。結果を

10

20

30

40

50

表 1 に示す。

【表 1】

表 1. 熱安定性

B o N T / A 組成物	T 0 と比較した 4 0 °C で 2 週間後の B o N T / A 活性の変化
H S A 組成物 (本発明ではない)	− 2 0 %
比較組成物 1	− 4 9 %
比較組成物 2	− 4 6 %

【0100】

表 1 からわかるように、ヒト血清アルブミン (H S A) を含む H S A 組成物は、安定化タンパク質としての H S A が欠如している比較組成物 1 及び 2 よりも顕著に安定している。従って、H S A などの安定化タンパク質の存在は、十分に高い毒素熱安定性を達成する上で重要である。

【0101】

ボツリヌス毒素の安定性に対する H S A の影響は、製造プロセス直後 (上記の T 0 時点 ; 0 はすべての試験試料で同じであった) に、異なる H S A 濃度 (7 5 U / m l B o N T / A、0 . 0 3 ~ 1 . 0 m g / m l H S A、1 0 m M リン酸塩、1 0 m M ヒスチジン、0 . 9 % N a C l、p H 6 . 0) の液体組成物中の B o N T / A (1 5 0 k D a) の生物学的活性を測定することによってさらに試験した。結果を表 2 に示す。

【表 2】

表 2. H S A 濃度の B o N T / A 活性への影響

B o N T / A 組成物 (本発明ではない)	H S A 濃度	B o N T / 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

【0102】

表 2 からわかるように、毒素活性は H S A 濃度の上昇とともに上昇する。

【0103】

実施例 2

光感受性

上述したようなさまざまな液体製剤の安定性を調査したところ、驚くべきことに、光が毒素の安定性に大きく影響することがわかった。この発見は、S U N T E S T C P S + 機器 (A T L A S M a t e r i a l T e s t i n g T e c h n o l o g y L L C) を用いる光安定性試験によってさらに研究された。この機器には、I S O 1 0 9 7 7 の I D 6 5 (屋内間接昼光基準) に対応する 3 2 0 ~ 8 0 0 n m の波長範囲のスペクトル分布を提供するフィルターセットを備えており、I C H Q 1 B に従う窓ガラスフィルターも備えている。光安定性試験は 2 5 0 W / m ² で 7 時間実施された。

【0104】

具体的には、緩衝化 0 . 9 % N a C l (p H 6 . 0) 及び異なる濃度のヒト血清アルブミン (0 . 0 3 ~ 1 . 0 m g / m l H S A) を含む B o N T / A (1 5 0 k D a) 組成物を調製し、次に 2 5 0 W / m ² の光に 7 時間曝露した。比較のために、異なる濃度の H S A (0 . 0 3 m g / m l、0 . 1 m g / m l、0 . 3 m g / m l、及び 1 . 0 m g / m l) を含む同一の B o N T / A (1 5 0 k D a) 組成物を、同じ時間暗所に保存した (対照)。その後、光に曝露した組成物と暗所に保存した各対照組成物の生物学的活性を測定した。それぞれの対照のパーセントとして表される相対 B o N T / A 活性を、光安定性の尺度として計算した。結果を表 3 に示す。

【表 3】

表 3. H S A の光安定性への影響

B o N T / A 組成物	H S A 濃度	相対 B o N T / A 活性 (対照の%)
1	0.03 mg/ml	82%
2	0.1 mg/ml	72%
3	0.3 mg/ml	70%
4	1.0 mg/ml	55%

10

【0105】

表 3 の結果は、H S A 含有組成物中の B o N T / A の光安定性が H S A 濃度の上昇とともに低下することを示す。従って、熱安定性は H S A 濃度の上昇とともに上昇するが（例 1 を参照）、予想外に H S A は光安定性に悪影響を及ぼすことが判明した。さらなる試験（結果は示されていない）により、代替の H S A 製品（ドナー H S A の代わりに組み換え H S A）の使用、又は潜在的な小分子不純物（< 10 k D a）を除去するための H S A の徹底的な透析が、これらの知見を変えないこと、すなわち光感受性に影響を及ぼさないことが明らかになった。

【0106】

実施例 3

光安定性

光感受性が低い、すなわち光安定性が高い H S A 含有組成物を見つけるために、さらなる試験を行った。これらの試験には、複合タンパク質を含まない B o N T / A（150 k D a）、0.1% H S A、0.47% サッカロース、及び 0.9% N a C l を含む液体組成物（組成物「1」）の調製が含まれた。さらに、組成物 1 に対応する 2 つの液体組成物を調製したが、これらは、それぞれ 2.7 m M E D T A（組成物「1 + E D T A」）及び 20 m M リン酸塩（組成物「1 + リン酸塩」；p H 6.0）をさらに含む点が異なっていた。さらに、B o N T / A（150 k D a）、0.01% H S A、0.015% ポリソルベート 20、10 m M リン酸塩、0.155% ヒスチジン、2.7 m M D T P A、0.9% N a C l、p H 6.0 を含む、D T P A を含む組成物（組成物「2（D T P A）」）を調製した。

20

30

【0107】

組成物 1、1 + E D T A、1 + リン酸塩、及び 2（D T P A）を、上述したように 250 W / m² の光に 7 時間曝露した。並行して、同一の組成物を同じ時間暗所で保存した（対照）。次に、生物学的 B o N T / A 活性を、暗所に保存したそれぞれの対照組成物と比較して測定した。結果を表 4 に示す。

【表 4】

表 4. 光安定性への E D T A 及び D T P A の影響

B o N T / A 組成物	相対 B o N T / A 活性 (対照の%)
1	35%
1+EDTA	77%
1+Phosphate	60%
2 (DTPA)	77%

40

【0108】

表 4 から明らかなように、キレート剤 E D T A 及び D T P A を添加すると、H S A 含有 B o N T / A 組成物の光安定性が顕著に改善される。リン酸塩も、同様であるがより弱いプラス効果を発揮することもわかった。

50

【0109】

実施例 4

キレート錯体の存在下での光安定性と保存安定性

以下の実験において、予想外に、本発明の液体製剤（0.9% NaCl、3.5 mM EDTA、10 mM ヒスチジン、0.085% HSA、pH 6.0）を皮下注射すると、比較的強い注射痛が生じることが判明した。非常に少量の EDTA（わずか 2.7 mM s.c. の濃度で 100 μ l）でも、非常に不快な痛みが生じた。痛みがプラセボ効果又は pH によって引き起こされた可能性を排除するために、さまざまな対照を使用した。ヒスチジンは原因であることは除外できた。焼けつくような痛みは、錯化剤 EDTA によるものであることが判明した（結果は示していない）。この知見は、EDTA ナトリウムが重金属中毒の治療、キレート療法、及びワクチンの配合に使用されているという事実を考慮すると、予想外であった。

10

【0110】

しかし、驚くべきことに、液体ボツリヌス毒素製剤にカルシウムイオン又はマグネシウムイオンを添加すると、注射の痛みが大幅に軽減され、一方、光に対する防御効果は維持されることがわかった。また、40℃での保存安定性に対するプラスの効果は、EDTA の添加だけでなく、EDTA 錯体（EDTA とマグネシウム、カルシウム、又は亜鉛イオン）の添加によっても得られた。

【0111】

より具体的には、実施した実験において、BoNT/A 150 kDa（複合タンパク質を含まない）の以下の5つの異なる液体組成物を比較した：

20

組成物 1：0.103% HSA、20 mM ヒスチジン、0.9% NaCl、pH 6.0

組成物 2：0.085% HSA、10 mM ヒスチジン、0.9% NaCl、3.5 mM EDTA、pH 6.0

組成物 3：0.085% HSA、10 mM ヒスチジン、0.9% NaCl、3.5 mM EDTA、3.5 mM MgCl₂、pH 6.0

組成物 4：0.085% HSA、10 mM ヒスチジン、0.9% NaCl、3.5 mM EDTA、3.5 mM ZnCl₂、pH 6.0。

組成物 5：0.085% HSA、10 mM ヒスチジン、0.9% NaCl、3.5 mM EDTA、3.5 mM CaCl₂、pH 6.0。

30

【0112】

相対 BoNT/A 活性は、光に曝露（250 W/m² で 7 時間、上記参照）した後、暗所に保存した対照試料と比較して測定した。結果を表 5 に示す。

【表 5】

表 5. さまざまな液体ボツリヌス毒素組成物の光安定性（7 時間、250 W/m²）

BoNT/A 組成物	EDTA	相対 BoNT/A 活性 (対照(T0)の%)
1	EDTA 無し	46%
2	Na-EDTA	80%
3	Na-Mg-EDTA	73%
4	Na-Zn-EDTA	70%
5	Na-Ca-EDTA	75%

40

【0113】

わかるように、EDTA を含む組成物は、EDTA を含まない組成物よりも光に対して顕著に安定している。マグネシウム（Mg²⁺）、カルシウム（Ca²⁺）、及び亜鉛（Zn²⁺）の錯化金属イオンは、安定化特性にわずかな影響しか与えない。

【0114】

これらの結果は驚くべきものである。なぜなら、遊離 EDTA の錯化特性は光曝露による不安定化作用から BoNT/A を防御するために不可欠であると考えられていたが、上

50

記の実験では、遊離 E D T A の濃度は非常に低かったからである（例えば、亜鉛の場合 1 0 0 p M の範囲）。しかし、予想に反して、マグネシウムや亜鉛などの金属イオンを添加しても、E D T A の光防御効果は失われなかった。

【 0 1 1 5 】

さらに、4 0 ° C で 2 週間及び 4 週間保存した後、T 0（組成物の調製直後）の対照試料と比較して、相対的な B o N T / A 活性を測定した。結果を表 6 に示す。

【表 6】

表 6. さまざまな液体ボツリヌス毒素組成物の 4 0 ° C での保存安定性

B o N T / A 組成物	EDTA	相対 B o N T / A 活性（対照 (T0) の %）	
		40°C で 2 週間保存後	40°C で 4 週間保存後
1	EDTA 無し	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%

10

【 0 1 1 6 】

結果は、E D T A を含む製剤が、4 0 ° C で保存した場合に、E D T A を含まない製剤よりも安定していることを示している。予想外に、結果はさらに、E D T A 錯体の中心金属イオンとしてのマグネシウムイオンと亜鉛イオンが、安定化特性にほとんど影響を与えないことを示している。

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/053634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K8/00 A61K9/00 A61K47/02 A61K47/18 A61K47/42	
	A61K38/48	
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		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/39166 A1 (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND [US]) 12 December 1996 (1996-12-12) page 4, line 33 - line 36; claims 6, 7, 9 page 5, line 9 - line 10 page 3, line 20 - line 27 -----	1-9, 13-15
X	WO 2018/200991 A1 (BONTI INC [US]) 1 November 2018 (2018-11-01) paragraph [0091] -----	1-3, 9-15
X	EP 0 593 176 A2 (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND [US]) 20 April 1994 (1994-04-20) page 3, line 7 - line 10 -----	1-3, 7, 9, 11-15
X	WO 2021/195968 A1 (OBI PHARMA INC [CN]) 7 October 2021 (2021-10-07) example 4 -----	1-3, 7, 9-15
	----- -/--	
☒ 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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
1 May 2023		11/05/2023
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 Frelichowska, J

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/053634

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/188618 A1 (KOREA PRIME PHARM CO LTD [KR]) 2 November 2017 (2017-11-02) claim 1; example 2 -----	1-15
A	US 2002/168727 A1 (SMITH LEONARD [US] ET AL) 14 November 2002 (2002-11-14) paragraph [0093] -----	1-15

1

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/053634

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9639166 A1	12-12-1996	AU 4746096 A WO 9639166 A1	24-12-1996 12-12-1996
WO 2018200991 A1	01-11-2018	AU 2018258591 A1 CA 3060669 A1 EP 3615669 A1 US 2021108187 A1 US 2023016041 A1 WO 2018200991 A1	07-11-2019 01-11-2018 04-03-2020 15-04-2021 19-01-2023 01-11-2018
EP 0593176 A2	20-04-1994	EP 0593176 A2 JP H06192118 A	20-04-1994 12-07-1994
WO 2021195968 A1	07-10-2021	AU 2020440362 A1 BR 112021024058 A2 CN 114222754 A EP 3932938 A1 JP 2022548189 A KR 20220003061 A SG 112021112828 A US 2022257730 A1 WO 2021195968 A1	04-11-2021 11-10-2022 22-03-2022 05-01-2022 17-11-2022 07-01-2022 29-11-2021 18-08-2022 07-10-2021
WO 2017188618 A1	02-11-2017	NONE	
US 2002168727 A1	14-11-2002	NONE	

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	47/18	(2017.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/12
A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	8/64	(2006.01)	A 6 1 K	8/64
A 6 1 K	8/19	(2006.01)	A 6 1 K	8/19
A 6 1 Q	19/00	(2006.01)	A 6 1 Q	19/00

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,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,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,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,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210

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 ラントシュトラッセ 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 ラントシュトラッセ 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 ラントシュトラッセ 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 ラントシュトラッセ 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 ラントシュトラッセ 1 0 0, ツェー／オー

F ターム (参考) 4C076 AA11 CC01 DD22Z DD23D DD43 DD49 DD51 DD51Z DD60 EE41Q

FF14 FF61 FF63

4C083 AA031 AA032 AB281 AB282 AB332 AC532 AC852 AD411 AD412

4C084 AA02 BA44 CA03 MA16 NA03 ZA011 ZA081 ZA811