

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97120349

A61K 38/16 (2006.01)

※ 申請日期：97.5.30

※IPC 分類：~~A61J~~ C07K 14/33 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61K 9/19 (2006.01)

基於以固態型式之肉毒桿菌毒素之神經毒素成份以提供溫度穩定之肌肉型鬆弛劑的方法

PROCESS FOR PROVIDING A TEMPERATURE – STABLE MUSCLE
RELAXANT ON THE BASIS OF THE NEUROTOXIC COMPONENT
OF BOTULINUM TOXIN IN SOLID FORM

A61P 21/02 (2006.01)

二、申請人：(共 1 人)

姓名或者名稱：(中文/英文)

德商默茲製藥公司
MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA

代表人：(中文/英文)

克里斯汀 普茲奇
PERTSCHY, CHRISTIAN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國法蘭克福市安克漢莫土地街100號
ECKENHEIMER LANDSTRASSE 100 D-60318 FRANKFURT/MAIN,
GERMANY

國 籍：(中文/英文)

德國 GERMANY

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 史溫 葛蘭
GREIN, SWEN
2. 葛德 J 曼德
MANDER, GERD J.
3. 麥瑟斯 馬克斯
MARX, MATTHIAS

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY
2. 德國 GERMANY
3. 德國 GERMANY

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或者 ☐ 第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2007年06月01日；07010912.9
2. 美國；2007年06月01日；60/932,624
3. 歐洲專利機構；2007年10月12日；07020025.8
4. 美國；2007年10月12日；60/998,858
5. 美國；2008年05月29日；12/154,982
6. 美國；2008年05月29日；12/154,983

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- 1.
- 2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係提供高溫之肌肉型鬆弛劑之方法，其中該肌肉型鬆弛劑為包括不含配位蛋白質之肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之固態乾燥型組合物。

【先前技術】

肉毒桿菌毒素係由梭菌產生。抗原上不同血清型之肉毒桿菌毒素有7種，即肉毒桿菌毒素A、B、C、D、E、F和G。肉毒桿菌毒素通常以複合體型式從溶解的梭菌培養液中釋放，即賦予肉毒桿菌毒素之毒性(所謂"神經毒素成份")之次單位與其他細菌蛋白質結合而一起形成毒素複合體。該複合體之分子量可於約300,000 Da與900,000 Da之間變化。複合體蛋白質為如不同的紅血球凝集素。該毒素複合體之蛋白質自身為無毒的，但據信其可為神經毒素成份提供穩定性並為肉毒桿菌中毒中經口毒性之主要原因。與毒素複合體不同，呈分離和純型式，即不含任何配位梭菌蛋白質之神經毒素成份係酸不穩定且無法抵抗胃腸道中具攻擊性的環境。

肉毒桿菌毒素複合體之神經毒素成份最初以單一多肽鏈形式形成，其在血清型A之情況下具有約150 kDa之分子量。在其他血清型中，已觀察到：取決於細菌來源，神經毒素成份之分子量於約145與約170 kDa之間變化。比如，在血清型A之情況中，多肽之蛋白水解處理產生呈由經由二硫鍵連接之重鏈和輕鏈組成之雙鏈多肽型式之活性多

肽。在人體中，重鏈調節與突觸前膽鹼性神經端之結合和毒素內化至細胞。咸相信，輕鏈係賦予毒性效應，作為鋅-肽鏈內切酶並分解負責膜融合之特異蛋白質(SNARE複合體)(參見，如Montecucco C., Shiavo G., Rosetto O：破傷風和肉毒桿菌神經毒素之作用機制Arch Toxicol. 1996; 18 (Suppl.): 342-354)。

藉由干擾細胞內膜溶合過程，肉毒桿菌毒素阻止乙醯膽鹼釋放入突觸間隙。肉毒桿菌毒素在神經肌肉結合處之總作用為干擾神經肌肉傳輸且實際上為去神經支配肌肉。肉毒桿菌毒素亦在其他外周類膽鹼突觸處具有活性而使唾液分泌或出汗減少。

肉毒桿菌毒素複合體之神經毒素次單位於本文係指"神經毒素成份"或"不含配位蛋白質之神經毒素成份"。

整個本發明申請案中所用之術語"肉毒桿菌毒素"("botulinum toxin"、"botulinum toxins")不僅係指不含其他任何梭菌蛋白質之神經毒素成份，亦指"肉毒桿菌毒素複合體"：本文中術語"肉毒桿菌毒素"係用於複合體與神經毒素成份之間不必或不需要區別之情況。複合體通常包含額外所謂的"無毒"蛋白質，吾人亦將其稱為"配位蛋白質"或"細菌蛋白質"。

"BoNT"或"NT"為有關不含配位蛋白質之肉毒桿菌毒素之NT化合物的常用簡寫。

儘管肉毒桿菌毒素複合體具有毒性效應，其已用於大量疾病中作為治療劑。1989年，美國批准將肉毒桿菌毒素血

清型A用於人體中以治療斜視、臉癱攣和其他疾病。其以肉毒桿菌毒素A蛋白質複合體形式，比如以商品名稱BOTOX (Allergan Inc)或DYSPORT (Ipsen Ltd)經由商業途徑獲得。對於治療應用，將複合體直接注入至待治療之肌肉中。在生理pH下，毒素係自蛋白質複合體釋放並產生所需藥理學作用。

對病人投藥，典型地經肌肉直接投入感染肌肉之前，該組合物係先溶於生理鹽水中。

有關基於肉毒桿菌毒素之藥劑之組成和劑量及有關基於肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之藥劑的組成、劑量和投與次數可參考US 60/817 756。

除了上述配位蛋白質之功能外，已預測：其亦可保護毒桿菌毒素複合體之神經毒素成份免受嚴格環境條件影響，而且神經毒素成份本身係極易降解及/或去活性，尤其處短期溫度應壓力時，如一般在溫暖至炎熱氣候中或夏日期間儲存及/或運輸。

基於該原因，過去一般極小心地防止基於肉毒桿菌毒素之藥劑和尤其那些基於肉毒桿菌毒素之神經毒素成份者之溫度高於4°C，比如接近20°C。大多數情況下，含有包括肉毒桿菌毒素之固態乾燥型組合物之小瓶係冰凍儲存(約-20°C)，儲存在冰下或至少儲存在冰箱裏(約4°C)。必要之冷卻裝置增加提供藥劑的成本。

鑒於以上情形，申請者進行基於肉毒桿菌毒素之肌肉型鬆弛劑之溫度穩定性之相關研究。驚奇地發現：在溫度

上，肉毒桿菌毒素之神經毒素成份明顯比工藝中預料者更穩定。

【發明內容】

本發明關於一種在高於 20°C 之較高溫度，如高於 30°C 或 45°C 下提供肌肉型鬆弛劑之方法，其中該肌肉型鬆弛劑為固態乾燥型組合物，其包括不含配位蛋白質之肉毒桿菌毒素之神經毒素成份；更佳地，該方法涉及儲存及/或運輸。在另一個實施例中，該準備為製備肌肉型鬆弛劑之方法之一個步驟，比如，在已經乾燥包含肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之蛋白質後實施之一個步驟。

在一個實施例中，提供溫度高於 45°C 之肌肉型鬆弛劑，其中該肌肉型鬆弛劑為不含配位蛋白質之肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之固態乾燥型組合物。

在另一個實施例中，該準備涉及儲存及/或運輸及/或為製備該肌肉型鬆弛劑之方法之一個步驟。

在另一個實施例中，令該肌肉型鬆弛劑處於高於 45°C 和高達 70°C 之溫度達一段不超過90天之期間。在另一實施例中，該段期間範圍可從10分鐘至90天。在另一實施例中，溫度係介於 45°C 與 60°C 之間且該段期間範圍係從10分鐘至90天。在另一實施例中，該段期間範圍係從10分鐘至30天。在另一實施例中，溫度係介於 65°C 與 70°C 之間且該段期間範圍係從10分鐘至10天。

在另一個實施例中，該肌肉型鬆弛劑係經運輸及/或儲存而無須任何人工冷卻裝置。

在另一個實施例中，該組合物為肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之凍乾粉。

在另一個實施例中，該組合物進一步包括蔗糖及/或人類血清蛋白。

在另一個實施例中，該組合物進一步包括至少一種選自由分別不同於蔗糖和人類血清蛋白之低溫保護劑、穩定劑、pH緩衝液、賦形劑及其混合組成之群之成份。

在另一個實施例中，該神經毒素成份是肉毒桿菌毒素A型之神經毒素成份。

【實施方式】

本發明關於一種提供溫度高於20°C之肌肉型鬆弛劑之方法，其中該肌肉型鬆弛劑為包括不含配位劑之肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之固態乾燥型組合物。在另一個實施例中，該肌肉型鬆弛劑係在45°C及/或以上之溫度下提供，其中該肌肉型鬆弛劑為包括不含配位劑之肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之固態乾燥型組合物。本發明範圍內，術語"提供"包括本文所定義之肌肉型鬆弛劑之任何類型的提供，特別係儲存、運輸或製備肌肉型鬆弛劑之一個步驟。術語"提供"亦包括肌肉型鬆弛劑處於一從冰凍狀態(-20°C)或冷卻狀態(+4°C)至高於20°C之溫度之溫度上升的步驟。在另一個實施例中，該肌肉型鬆弛劑係在45°C及/或以上之溫度下提供，其中該肌肉型鬆弛劑為不含配位劑之肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之固態乾燥型組合物。

本發明範圍內，將應用所有型式之肉毒桿菌毒素之神經

毒素成份，特別是不同血清型。此外，經修飾及/或重組產生之肉毒桿菌毒素之神經毒素成份，包括個別突變和缺少者等亦在本發明範圍內。關於合適之突變可參考WO 2006/027207 A1、WO 2006/114308 A1和EP07014785.5，將其以引用方式完全併入本文中。另外，在本發明範圍內，可使用不同血清型之混合物(以神經毒素成份及/或其重組型之型式，如肉毒桿菌神經毒素A型和B型之混合物)。然而，本發明亦關於經化學修飾之神經毒素，如特別是一種或多種表面或溶劑暴露之胺基酸藉由聚乙二醇化、糖化、硫酸酯化、磷酸化或任何其他修飾法進行者。

在一個實施例中，該組合物包括肉毒桿菌毒素A型之神經毒素成份。在另一個實施例中，肉毒桿菌毒素為抗原上不同之血清型A、B、C、D、E、F或G之肉毒桿菌毒素。不論何處提及肉毒桿菌毒素血清型A、B、C、D、E、F或G，亦涵蓋該等血清型之已知變體，如血清型A1、A2、A3、B1、B2、B3、C1、C2、C3、D1、D2、D3、E1、E2、E3、F1、F2、F3或G1、G2、G3。根據本發明，可使用一種血清型或不同血清型之混合物。在一個實施例中，肉毒桿菌毒素為肉毒桿菌毒素A。

在另一個實施例中，亦涵蓋肉毒桿菌毒素之異構型、同系物、直系同源體和旁系同源體，其顯示至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或高達100%之序列一致性。可藉由任何適宜產生可靠結果之運算法算得序列一致性，比如藉由使用FASTA運算法(W.R. Pearson & D.J.

Lipman PNAS (1988) 85:2444-2448)算得。

術語"神經毒素成份"亦包括發現於肉毒芽孢梭菌之其他血清型中之功能性同系物。在本發明之一個實施例中，神經毒素成份不含任何其他肉毒芽孢梭菌蛋白質，在一個實施例中，神經毒素成份亦不含潛在可能與其結合之RNA。神經毒素成份可為具有約150 kDa之單鏈前驅蛋白質或經蛋白水解處理之神經毒素成份，其包括可藉由一或多個二硫鍵連接之約50 kDa之輕鏈(L_c)和約100 kDa之重鏈(H_c)(對於評論，參見如Simpson LL, Ann Rev Pharmacol Toxicol. 2004; 44:167-93)。在另一個實施例中，可使用單鏈和經處理之神經毒素成份之混合物。

根據本發明之教示，藥劑可能不含任何肉毒桿菌毒素複合體中所發現異於神經毒素成份之蛋白質。神經毒素成份之前驅蛋白質可為已分解或未分解。然而，在一個實施例中，該前驅物已分解成重鏈和輕鏈。如本文他處所指出般，多肽可為野生型序列或其一或多個殘基可經修飾。修飾包括可對如多肽之攝取或穩定性有益之化學修飾，如醯化、乙醯化、醯化、醯胺化或類似修飾。然而，神經毒素成份之多肽鏈可交替地或額外地藉由增加、替換或缺少一或多個胺基酸殘基進行修飾。

上文所指之神經毒素成份可為組合物之一部分或為一醫藥組合物。此本文所用之醫藥組合物可包括如以神經毒素成份型式作為唯一活性成份之肉毒桿菌毒素，或可含有其他醫藥活性成份如止痛劑及/或其他神經毒素。

本文所用之"醫藥組合物"是一種調配物，其中含有或包括可用作藥劑或診斷之活性成份。該醫藥組合物可能適宜用於對病人之診斷或治療性投藥(比如，藉由肌內注射或皮下注射方式)。

本發明之一個實施例中，該組合物可包括神經毒素成份及玻尿酸及/或聚乙炔吡咯啉酮及/或聚乙二醇，該組合物係視情況藉由合適之pH緩衝液，特別是藉由乙酸钠緩衝液及/或低溫保護劑多元醇穩定pH。

在一個實施例中，神經毒素成份之生物活性如在小鼠LD₅₀分析中所測得為每ng神經毒素成份中含50至250 LD₅₀單位。在另一個實施例中，神經毒素成份之生物活性為約150 LD₅₀單位。該150 LD₅₀單位係指每毫克所含之單位。一般地，本發明之醫藥組合物包括量為約6 pg至約30 ng之神經毒素成份。

包括呈分離型式之肉毒桿菌毒素A型之神經毒素成份之醫藥組合物可經由商業途徑由德國Merz Pharmaceuticals GmbH以商標Xeomin[®]獲得。肉毒桿菌毒素A型和B型之神經毒素成份之生產係敘述於如國際專利申請案WO 00/74703和WO 2006/133818中。

在一個實施例中，該組合物包括肉毒桿菌毒素A型之神經毒素成份。該組合物為肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之固態乾燥型組合物。在另一個實施例中，該組合物進一步包括如蔗糖或人類血清蛋白或兩者；在另一個實施例中，人類血清蛋白與蔗糖之比例為約1:5。在一個實施例中，

該組合物是Xeomin[®]。在另一個實施例中，該人類血清蛋白為重組人類血清蛋白。或者，該組合物不含源自哺乳動物之蛋白質如人類血清蛋白。任何此溶液可藉由以其他非蛋白質穩定劑(如下)替換血清蛋白提供足夠神經毒素穩定性。

在本發明專利申請案範圍內，可使用基於肉毒桿菌毒素A型之神經毒素成份之藥劑，在另一個實施例中，可以使用經由Merz Pharmaceutical以商標Xeomin[®]分銷之產品。這是因為當應用基於肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之醫藥組合物，如Xeomin[®]時，發現病人體內產生抗體之趨勢低於投與基於肉毒桿菌毒素A型複合體之藥劑。不受任何理論限制，咸信：肉毒桿菌毒素複合體中之紅血球凝集素對免疫系統具有活化能力。

有關基於肉毒桿菌毒素之藥劑的組成和劑量及關於基於肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之藥劑之組成、劑量和投與次數可參考PCT/EP2007/005754。

在一個實施例中，該組合物為肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之凍乾粉，該組合物可進一步包括蔗糖及/或人類血清蛋白。在該後一組合物中，人類血清蛋白與蔗糖之比例可為如約1:5。在一個實施例中，該組合物為Xeomin[®]。

該組合物可包含其他賦形劑。術語"賦形劑"係指存在於醫藥組合物中異於醫藥組合物中所存在之活性醫藥成份之物質。賦形劑可為緩衝液、載體、抗黏劑、止痛劑、黏合劑、崩解劑、填充劑、稀釋劑、防腐劑、媒介物、環糊精

及/或體積膨脹劑比如清蛋白、凝膠、膠原蛋白、氯化鈉、防腐劑、低溫保護劑及/或穩定劑。

"pH緩衝液"係指可將組合物、溶液及類似物之pH值調整至一特定值或一特定pH範圍之化學物質。在一個實施例中，該pH範圍可於pH 5與pH 8之間；在另一個實施例中，該pH範圍可於pH 7與pH 8之間；在另一個實施例中，該pH範圍可於pH 7.2與pH 7.6之間；在另一實施例中，該pH值為7.4。在另一個實施例中，當該醫藥組合物在重組時或注射後，其pH係在pH 4與pH 7.5之間；在另一個實施例中，其pH係在pH 6.8與pH 7.6之間；在另一實施例中，其pH係在pH 7.4與pH 7.6之間。

在一個實施例中，該組合物亦包含1-100 mM乙酸鈉緩衝液；在另一個實施例中，其包含10 mM乙酸鈉緩衝液。

所指pH範圍僅為典型實例且實際pH可包含任何介於上列數值間之區間。根據本發明教示之合適緩衝液為如磷酸鈉緩衝液、乙酸鈉緩衝液、TRIS緩衝液或在上列pH範圍內適宜緩衝之任何緩衝液。

本文中之術語"室溫"係指任何於+20°C與+25°C之間之溫度，極佳者為任何下列溫度：+20°C、+21°C、+22°C、+23°C、+24°C或+25°C，和其間之任何值。

"穩定"("Stabilizing"、"stabilizes"或"stabilization")意指該活性成份，即在併入醫藥組合物之前，重組或水溶液醫藥組合物中之神經毒素成份具有大於約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%和高達約100%生物活

性神經毒素成份具有之毒性。

該類穩定劑之實例為凝膠或清蛋白，在一個實施例中，其為人體來源或從重組源獲得。亦包括源自非人類或非動物來源之蛋白質。該穩定劑可藉由化學方式或重組基因修飾。在本發明之一個實施例中，想像使用醇類，如肌醇、甘露醇作為低溫保護劑賦形劑以在凍乾過程中穩定蛋白質。

在本發明之另一個實施例中，該穩定劑可為包括玻尿酸、聚乙烯吡咯啶酮、聚乙二醇或其任何組合物之非蛋白質穩定劑。在另一個實施例中，該聚乙烯吡咯啶酮例如可為(Kollidon[®])。其他穩定劑可為羥乙基澱粉或藻酸鹽。該等組合物可視情況藉由合適之pH緩衝液，特別是藉由乙酸钠緩衝液或低溫保護劑或兩者穩定pH。除了所提及之穩定劑外，該組合物可包含水和至少一種多元醇，比如甘露醇或山梨醇或其混合物。其亦可包含單糖、二糖或更高碳數之多糖，比如葡萄糖、蔗糖或果糖。該類組合物被視為具有顯著穩定性之安全組合物。

在一個實施例中，本發明醫藥組合物中之玻尿酸係以每ml之200 U/ml神經毒素溶液中0.1至10 mg，特別係1 mg玻尿酸之量與本發明神經毒素成份結合。

當存在於本發明組合物中時，該聚乙烯吡咯啶酮以一提供一重組溶液之量與本發明神經毒素成份結合，其中該重組溶液在每ml之200 U/ml肉毒桿菌毒素之神經毒素成份溶液中含有10至500 mg，特別係100 mg之聚乙烯吡咯啶酮。

在另一實施例中，重組係在高達8 ml之溶液中進行。此使濃度下降至每ml之25 U/ml神經毒素成份溶液中含有12.5 mg之聚乙烯吡咯啉酮。在另一實施例中，目標溶液亦包含1-100 mM乙酸鈉緩衝液；在另一實施例中，目標溶液包含10 mM乙酸鈉緩衝液。

在一個實施例中，本發明醫藥組合物中之聚乙二醇係以一提供一重組溶液之量與本發明神經毒素成份結合，其中該重組溶液在每ml之200 U/ml肉毒桿菌毒素溶液中含有10至500 mg之聚乙烯吡咯啉酮，在另一實施例中，含有100 mg之聚乙烯吡咯啉酮。在另一實施例中，目標溶液亦包含1-100 mM乙酸鈉緩衝液；在另一實施例中，目標溶液包含10 mM乙酸鈉緩衝液。

在一個實施例中，當儲存在約+80°C與約-20°C之間之溫度下時，根據本發明之該醫藥組合物保持其效力實質上不變達6個月、1年、2年、3年及/或4年之時間。此外，所指醫藥組合物在重組後具有約20%與約100%之間之效力或恢復率。

在另一實施例中，該穩定劑係選自工藝上熟知之非硫烷、甲硫胺酸或海藻糖之穩定劑。

"低溫保護劑"係指賦形劑，其使重組或水溶液醫藥組合物中之神經毒素成份在該醫藥組合物中被冷凍乾燥之前具有大於約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%和高達100%生物活性神經毒素成份具有之毒性。該"低溫保護劑"係指可產生活性成份之賦形劑。

在另一實施例中，該組合物可包含多元醇以作為低溫保護劑。在一個實施例中，該組合物可包含多羥基化合物。可使用之多元醇實例包括如肌醇、甘露醇和其他非還原性醇類。該組合物之一些實施例不包括蛋白質穩定劑，或不含海藻糖或麥芽三糖或乳糖或蔗糖或相關糖，或有時用作低溫保護劑之碳水化合物。

術語"防腐劑"係分別指可以預防該組合物內微生物、昆蟲、細菌或其他污染生物生長或存活之一種或一群物質。防腐劑亦防止該組合物產生非所需之化學變化。本專利範圍內可使用之防腐劑為技術熟練者知曉之最新技術之所有防腐劑。可使用之防腐劑實例尤其包括如苺醇、苯甲酸、殺藻胺、丙酸鈣、硝酸鈉、亞硝酸鈉、亞硫酸鹽(二氧化硫、亞硫酸氫鈉、亞硫酸氫鉀等)、乙二胺四乙酸二鈉、甲醛、戊二醛、矽藻土、乙醇、甲基氯代異噻唑啉酮、丁基化羥基茴香醚及/或丁基化羥基甲苯。

術語"止痛劑"係指以不同方式對外周神經系統和中樞神經系統起作用之止痛藥物，尤其包括Paracetamol[®](醋氨酚)，非類固醇消炎藥物(NSAIDs)如水楊酸鹽，麻醉藥如嗎啡，具有麻醉性能之合成藥物如Tramadol[®]及其他多種藥物。亦包含任何具有局部麻醉效果之化合物，如利多卡因(lidocaine)、苺醇、苯甲酸及其他物。

在一個實施例中，止痛劑為組合物之一部分；在另一實施例中，止痛劑係在以化學性去神經化劑處理之前、期間或之後投與。

典型地，以上所引用之肌肉型鬆弛劑之準備分別涉及該等物之儲存及/或運輸，或者為製備該肌肉型鬆弛劑方法中之一個步驟，更為適宜地為包含肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之蛋白質乾燥後於高溫下所實施之一個步驟。"高溫"意指高於 20°C ，如高於 25°C 或高於 30°C 之溫度。在例外情況下，即在基於肉毒桿菌毒素之神經毒素成份儲存在 0°C 以下之環境中，術語"高溫"分別指高於 0°C 或高於 4°C 或高於 10°C 、高於 20°C 或 25°C 或 30°C 之溫度。

在另一實施例中，令該肌肉型鬆弛劑處於一位於 30°C 以上至高達 70°C 之範圍內之溫度達一段不超過90天之期間。如擅長該項技術者較佳係了解該段該肌肉型鬆弛劑處於個別溫度之期間可為介於數分鐘與90天之間的任何時間間隔。典型地，考慮到提供該肌肉型鬆弛劑之環境，特別是涉及儲存及/或運輸之情形，該段期間將不少於10分鐘。這些短期間在下列情況下係尤其重要：在運輸後及儲存前於炎熱氣候下，令該肌肉型鬆弛劑受太陽光直射，如在飛機場或街道上。因此，本發明範圍內之典型期間為10分鐘、30分鐘、1小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、2週、3週、1個月、2個月和3個月(90天)。明顯地，以上所提之期間僅為典型實例，實際期間可以更長或更短並包含介於上列數值間之任何間隔。

關於該肌肉型鬆弛劑所處之溫度，典型地，擅長該項技術者可預見高於 20°C 之溫度下限。有關本文所指定之溫度

和溫度範圍，擅長該項技術者理解該肌肉型鬆弛劑/組合物所處之溫度上限較佳不高於70°C。亦即，該肌肉型鬆弛劑所處之溫度較佳係位於20°C以上至高達70°C之範圍內。因此，在本發明範圍內，令該肌肉型鬆弛劑分別處於一高於20°C或高於25°C或高於30°C或高於35°C或高於40°C或高於45°C或高於50°C或高於60°C或高於65°C至高達70°C之溫度。提供、較佳係運輸及/或儲存該肌肉型鬆弛劑之環境可能產生之任何介於既定值20°C以上至高達70°C之間之特定溫度以及個別溫度間隔皆再次位於本發明範圍內。

下列溫度和時間間隔代表本發明之實施例。根據第一個實施例，令該肌肉型鬆弛劑處於一30°C以上並高達70°C之溫度達一段不超過90天之期間，更佳係處於一30°C以上並高達70°C之溫度達一段範圍從10分鐘至90天之期間，更佳係在一介於40°C與60°C之間之溫度下達一段範圍從10分鐘至90天之期間。

在另一實施例中，期間係從10分鐘至30天，而溫度範圍係從30°C以上至高達70°C或從40°C至60°C或從50°C至60°C。

在另一實施例中，代表極端條件之溫度係位於65°C與70°C之間之範圍內且該肌肉型鬆弛劑處於該溫度之期間係位於10分鐘至10天之範圍內或從10分鐘至3天。

由於本發明作為基礎之發現，如今，可提供如上概述之肌肉型鬆弛劑而不需使用人工冷卻裝置。此發現對於運輸及/或儲存該肌肉型鬆弛劑係尤其重要。而且，本發明在

高溫、可能結合較高濕度之環境下係特別有意義的。

本發明現進一步以如下文所敘述之非限制性實例方式證明。

實例

本實例已利用可經由商業途徑獲得之產品 Xeomin[®] 實施。Xeomin[®] 為包含肉毒桿菌神經毒素 A 型 (150 kD) 作為活性成份之凍乾粉。毒素以缺口雙鏈型式存在，即，其包含一重鏈和一輕鏈。毒素係從肉毒芽孢梭菌培養液 (ATCC 3205 菌株) 獲得。其已經純化至不含任何配位蛋白質之程度。Xeomin[®] 進一步包括人類血清蛋白和蔗糖。

將 Xeomin[®] 樣本 (未開封小瓶、未經重組) 分別在 60°C 之溫度下儲存 30 天 (實例 1)，70°C 下儲存 10 天 (圖 2) 和 80°C 下儲存 10 天 (對比實例 3)。儲存係利用具有狹窄溫度容差 ($\pm 2^\circ\text{C}$) 之合格培養器實施。逐日連續從培養器中取出樣本並將其儲存在 5°C 下直到分析。

為評估 Xeomin[®] 之穩定性，分別測得利用已知之小鼠 LD₅₀ 分析之生物活性、以 pg/vial $\times 10$ 表示之神經毒素成份含量、蔗糖含量 (以 % 表示) 和 HSA 含量 (以 % 表示)。以上所提之方法係根據歐洲藥典中制定之要求實施。

實例 1

根據此實例，Xeomin[®] 在 60°C 之溫度下儲存高達 1 個月。結果顯示於圖 1。

從該圖明顯可見 Xeomin[®] 品質未受在 60°C 下儲存高達 1 個月所影響。事實上，生物活性 (LD₅₀ 分析) 和神經毒素濃度

(ELISA)在整個儲存時期保持不變。此外，人類血清蛋白(HSA)和蔗糖之量顯示隨著時間無顯著變化。總言之，Xeomin[®]之儲存壽命規格之所有參數在60℃下儲存1個月後達到。同樣地，低於60℃之儲存條件的所有穩定性資料顯示對產品品質無有害影響(未顯示出資料)。

實例 2

根據該實例，Xeomin[®]在70℃之溫度下儲存高達10天之時間。結果顯示於圖2。

Xeomin[®]之品質未受在70℃下儲存高達10天之時間而有顯著影響。生物活性、神經毒素濃度以及HSA和蔗糖含量再次隨時間未顯示顯著變化。總言之，該實例證明：Xeomin[®]之品質未受在70℃下儲存高達10天而有顯著影響。

實例 3(對比)

在此(對比)示例中，令Xeomin[®]在80℃下儲存高達10天之時間。相較於60℃和70℃下之穩定性資料，℃可觀察到生物活性(LD₅₀分析)急劇降低。神經毒素在儲存前3天期間活性進一步降低並在5天內完全去活性。該實例顯示：在一相對較短之期間後，至少80℃之溫度對基於肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之肌肉型鬆弛劑的穩定性已具有有害影響。

【圖式簡單說明】

圖1顯示在60℃下儲存一段高達30天之時間後，溫度對Xeomin[®]之生物活性的影響；該生物活性係在所指時間點

測得；

圖2顯示在70℃下儲存一段高達10天之時間後，溫度對Xeomin®之生物活性的影響；該生物活性係在所指時間點測得；

圖3顯示在80℃下儲存一段高達10天之時間後，溫度對Xeomin®之生物活性的影響；該生物活性係在所指時間點測得。

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種在溫度高於20℃下提供肌肉型鬆弛劑之方法，其中該肌肉型鬆弛劑為固態乾燥型組合物，其包括不含配位蛋白質之肉毒桿菌毒素之神經毒素成份。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to a process for providing a muscle relaxant at temperatures above 20°C, wherein said muscle relaxant is a solid dry composition comprising the neurotoxic component of botulinum toxin free of complexing proteins.

十、申請專利範圍：

1. 一種於溫度高於20℃下提供肌肉型鬆弛劑之方法，其中該肌肉型鬆弛劑為固態乾燥型組合物，其包括不含配位蛋白質之肉毒桿菌毒素之神經毒素成份。
2. 如請求項1之方法，其中該提供涉及儲存及/或運輸及/或為製備該肌肉型鬆弛劑之製程中之一個步驟。
3. 如請求項1或2之方法，其中令該肌肉型鬆弛劑處於一20℃以上至高達70℃之溫度達一段不超過90天之期間。
4. 如前述請求項中任一項之方法，其中該期間範圍係從10分鐘至90天。
5. 如前述請求項中任一項之方法，其中該溫度係介於20℃和60℃之間，且該期間範圍係從10分鐘至90天。
6. 如前述請求項中任一項之方法，其中該期間範圍係從10分鐘至30天。
7. 如前述請求項中任一項之方法，其中該溫度係介於20℃和70℃之間，且該期間範圍係從10分鐘至10天。
8. 如請求項2至7中任一項之方法，其中該肌肉型鬆弛劑係經運輸及/或儲存而無需任何人工冷卻裝置。
9. 如前述請求項中任一項之方法，其中該組合物為肉毒桿菌毒素之神經毒素成份之凍乾粉。
10. 如前述請求項中任一項之方法，其中該組合物進一步包括蔗糖及/或人類血清蛋白。
11. 如前述請求項中任一項之方法，其中該組合物進一步包括至少一種選自由分別不同於蔗糖及人類血清蛋白之低

溫保護劑、穩定劑、pH緩衝液、賦形劑、及其混合物所組成之群之成份。

12. 如前述請求項中任一項之方法，其中該神經毒素成份是肉毒桿菌毒素A型之神經毒素成份。

十一、圖式：

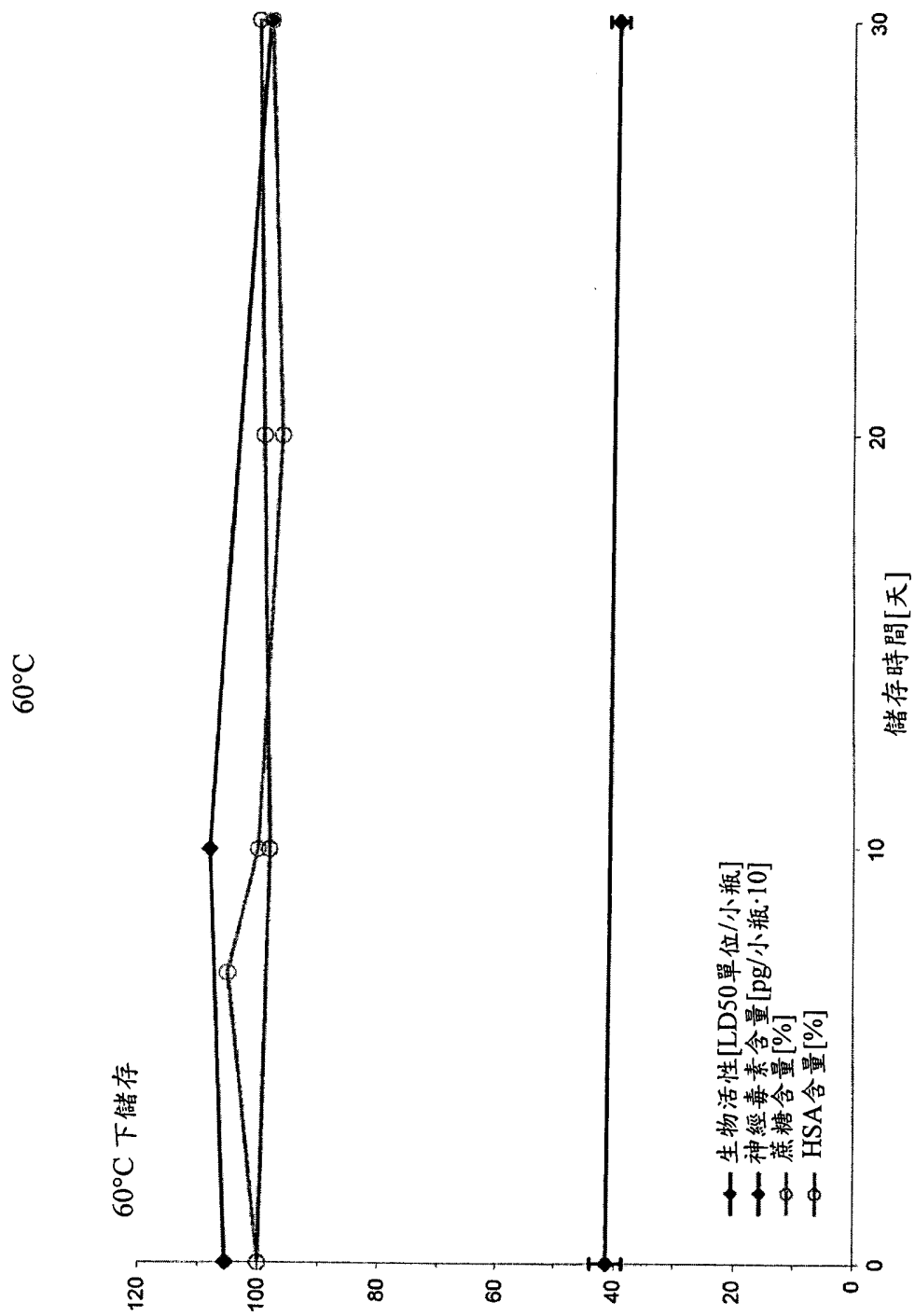


圖 1

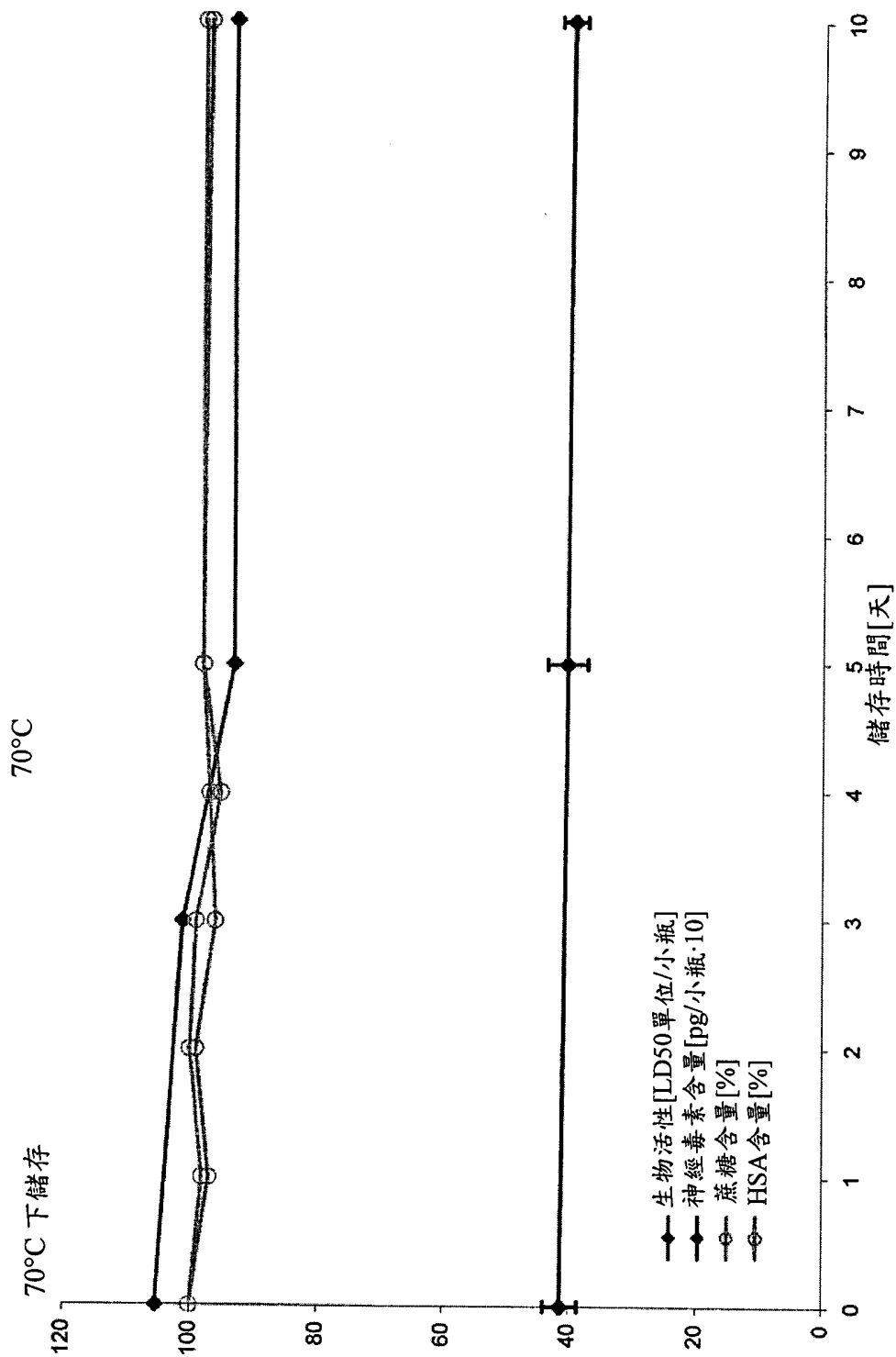


圖 2

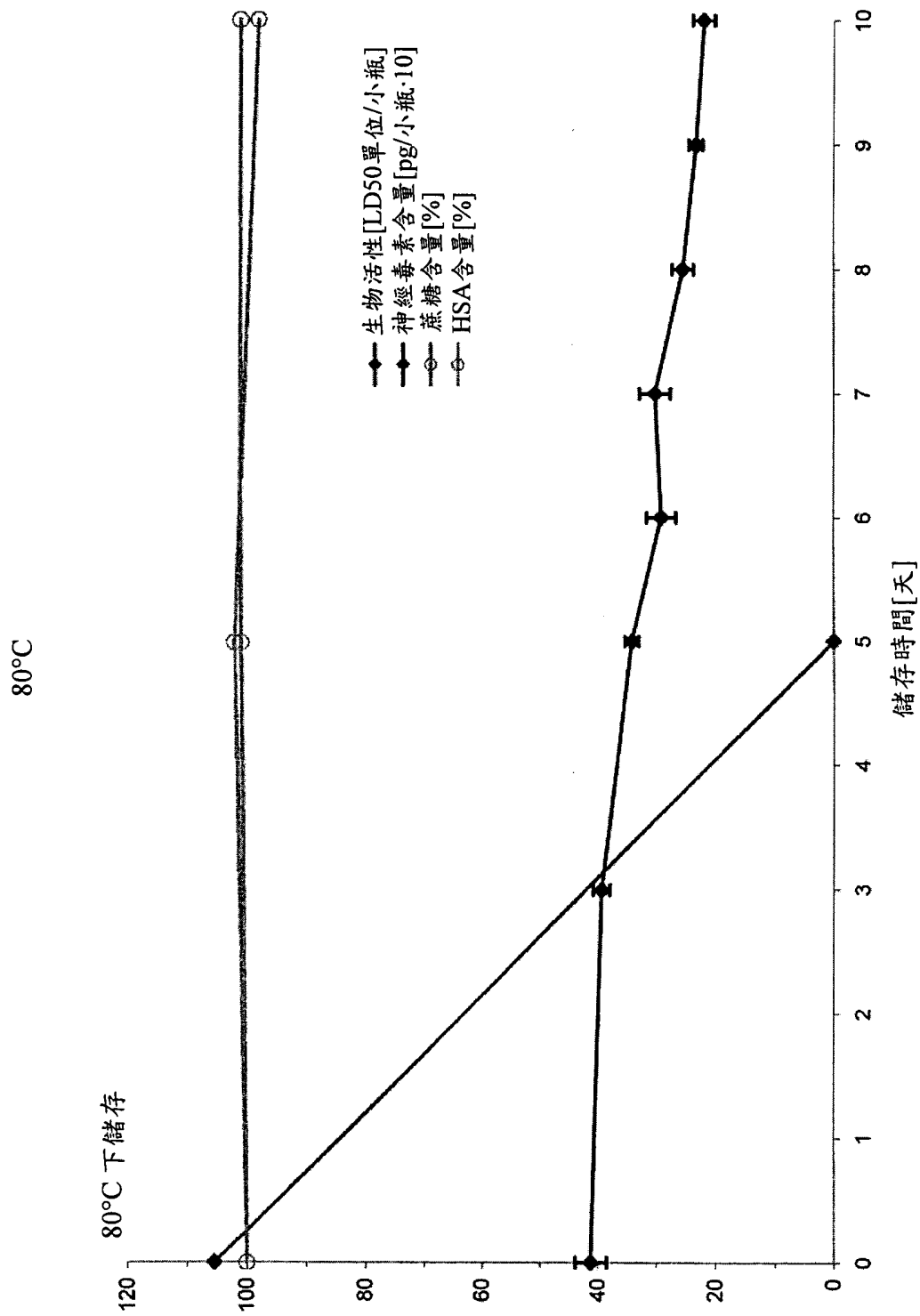


圖 3

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)