



(21) 申請案號：109110925

(22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 03 月 31 日

(51) Int. Cl. : *A61K38/48 (2006.01)* *A61K9/08 (2006.01)*
A61P21/00 (2006.01)(71) 申請人：台灣浩鼎生技股份有限公司 (中華民國) OBI PHARMA, INC. (TW)
臺北市南港區園區街 3 號 19 樓(72) 發明人：游 丞德 YU, TONYCHENG-DER (US)；曹子文 TSAU, TZU-WEN (TW)；王永
凱 WANG, YUNG-KAI (TW)；沈冠成 SHEN, KUAN-CHENG (TW)；吳岳縉 WU,
YUEH-CHIN (TW)；曾毓俊 TSENG, YU-CHUN (TW)

(74) 代理人：顏均宇

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：4 共 63 頁

(54) 名稱

A 型肉毒桿菌毒素複合物、其配製劑和使用方法

(57) 摘要

本發明揭露涉及一種 A 型肉毒桿菌毒素複合物、其配製劑和使用方法。本發明提供了一種 A 型肉毒桿菌毒素複合物，其包含 HA70、HA17、HA33、NTNH 和 BoNT/A1，其中所述肉毒桿菌毒素複合物具有 740~790 kDa 的分子量。與現有的肉毒桿菌毒素複合物相比，本發明的肉毒桿菌毒素複合物的分子量更小，安全性更高，且具有相當的治療效果。

The present disclosure relates to a type A botulinum toxin complex, and a formulation and used thereof. The botulinum toxin type A complex includes HA70, HA17, HA33, NTNH and BoNT / A1. The molecular weight of the botulinum toxin complex is 740 ~ 790 kDa. Comparing to the prior botulinum toxin complex, the botulinum toxin complex of the present disclosure has a smaller molecular weight, higher safety, and a considerable therapeutic effect.



202138002

【發明摘要】

【中文發明名稱】 A型肉毒桿菌毒素複合物、其配製劑和使用方法

【中文】 本發明揭露涉及一種A型肉毒桿菌毒素複合物、其配製劑和使用方法。本發明提供了一種A型肉毒桿菌毒素複合物，其包含HA70、HA17、HA33、NTNH和BoNT/A1，其中所述肉毒桿菌毒素複合物具有740~790 kDa的分子量。與現有的肉毒桿菌毒素複合物相比，本發明的肉毒桿菌毒素複合物的分子量更小，安全性更高，且具有相當的治療效果。

【英文】 The present disclosure relates to a type A botulinum toxin complex, and a formulation and used thereof. The botulinum toxin type A complex includes HA70, HA17, HA33, NTNH and BoNT / A1. The molecular weight of the botulinum toxin complex is 740 ~ 790 kDa. Comparing to the prior botulinum toxin complex, the botulinum toxin complex of the present disclosure has a smaller molecular weight, higher safety, and a considerable therapeutic effect.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 A型肉毒桿菌毒素複合物、其配製劑和使用方法

【技術領域】

【0001】 本發明涉及蛋白質美容用品或藥物領域，具體涉及肉毒桿菌毒素複合物。

【先前技術】

【0002】 皺紋是衰老的一個指示性標誌，可以由對皮膚的環境損害積累的生物化學、組織學和生理學變化引起。另外，其它次要因素也可以引起臉部皺紋的特徵性褶、溝和皺（Stegman et al., *The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery*, 2nd ed., St. Louis, Mo.: Mosby Year Book: 5-15 (1990)）。這些次要因素包括：恒定的重力拉力、皮膚上的頻繁且恒定的位置壓力（例如：在睡眠期間）和由面部肌肉收縮引起的重複面部運動（Stegman et al., *The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery*, 2nd ed., St. Louis, Mo.: Mosby Year Book: 5-15 (1990)）。

【0003】 已經使用了不同的技術以潛在緩解一些衰老的體症。這些技術的範圍包括從含有 α -羥基酸和視黃醇的面部保濕劑到外科手術和神經毒素的注射。例如：在1986年，Jean等人開發了一種使用A型肉毒桿菌毒素治療眉間區域運動相關皺紋的方法（Schantz and Scott, In Lewis G. E. (Ed) *Biomedical Aspects of Botulinum*, New York: Academic Press, 143-150 (1981)）。A型肉毒桿菌毒素處理皺紋的這種用途導致1992年該方法的發表（Schantz and Scott, In Lewis G. E. (Ed)

Biomedical Aspects of Botulinum, New York: Academic Press, 143-150 (1981))。直到1994年，又報導了臉上的其它與運動相關的皺紋的處理 (Scott, Ophthalmol, 87:1044-1049 (1980))。這導致了使用A型肉毒桿菌毒素進行美容醫療時代的到來。

【0004】 據報導A型肉毒桿菌毒素是人類已知的最致命的天然生物製劑。肉毒桿菌的孢子存在於土壤中並可在不適當消毒且密封的食品容器中生長。由細菌的攝食引起的肉毒桿菌中毒可能是致命的。肉毒桿菌毒素通過抑制乙醯膽鹼穿過神經肌肉連接處的釋放來阻止突觸傳遞，從而產生肌肉癱瘓的作用，並且認為肉毒桿菌毒素也以其它方式產生作用。其作用實質上阻斷了通常會引起肌肉痙攣或收縮，而導致癱瘓的信號。在過去的十年中，肉毒桿菌毒素的肌肉麻痹活性被用來達成各種治療效果。肉毒桿菌毒素的控制施用已經用於提供肌肉麻痹以治療各種醫學病症，例如以骨骼肌過度活躍為特徵的神經肌肉病症。用肉毒桿菌毒素治療的病症包括：偏側面肌痙攣、成人發作痙攣性斜頸、肛裂、臉痙攣、腦癱、頸椎張力障礙、偏頭痛、斜視、顛頷關節病症和各種類型的肌肉抽筋和痙攣。最近，肉毒桿菌毒素的肌肉麻痹作用已經應用於治療和美容的面部應用，例如：皺紋和面部肌肉痙攣或收縮後果的治療。

【0005】 除了A型肉毒桿菌毒素形式外，還有7種血清學上不同的肉毒桿菌毒素種類，它們也是由革蘭氏陽性菌肉毒桿菌產生。在這八種血清學上不同類型的肉毒桿菌毒素中，可導致癱瘓的七種血清型被命名為肉毒桿菌毒素血清型A、B、C、D、E、F和G，上述中的每一種透過用血清型特異性抗體中和來區分。每種肉毒桿菌毒素蛋白的分子量約為150kD。由於肉毒桿菌毒素的分子大小和分子結構，它不能穿過角質層和皮膚結構下部的多層。肉毒桿菌毒素的不同血清型在

不同動物物種中引起的癱瘓的作用和嚴重程度和持續時間方面不同。例如：在大鼠實驗中，透過癱瘓率進行測量，已經確定A型肉毒桿菌毒素的效力是B型肉毒桿菌毒素的500倍。另外，已經確定B型肉毒桿菌毒素在靈長類動物中在480U/kg劑量下是無毒性的。

【0006】 由肉毒桿菌釋放的肉毒桿菌毒素是含有約150kD肉毒桿菌毒素蛋白分子和相關非毒素蛋白的毒素複合物的組分。認為這些內源性非毒素蛋白包括血凝素蛋白（HA）家族，以及非血凝素蛋白（NTNH）。認為非毒素蛋白穩定毒素複合物中的肉毒桿菌毒素分子並當毒素複合物被攝取時保護其不被消化酸變性。因此，當毒素複合物經胃腸道給藥時，毒素複合物的非毒素蛋白保護肉毒桿菌毒素的活性，從而增強全身滲透。另外，認為一些非毒素蛋白特異性穩定血液中的肉毒桿菌毒素分子。

【0007】 毒素複合物中非毒素蛋白的存在通常導致毒素複合物的分子量大於裸露肉毒桿菌毒素分子的分子量，如前所述，其約為150kD。例如：肉毒桿菌可產生分子量約900kD、500kD或300kD的A型肉毒桿菌毒素複合物。B型和C型肉毒桿菌毒素以分子量為約700kD或約500kD的複合物的形式產生。D型肉毒桿菌毒素以分子量約為300kD或500kD的複合物的形式產生。E型和F型肉毒桿菌毒素僅作為分子量約300kD的複合物產生。

【0008】 為了對肉毒桿菌毒素提供額外的穩定性，毒素複合物通常在製造過程中通過將複合物與白蛋白結合來穩定。例如，Botox[®]（Allergan, Inc, Irvine, CA）是一種含有肉毒桿菌毒素的製劑，其含有100U A型肉毒桿菌毒素和輔助蛋白、0.5mg人白蛋白和0.9mg氯化鈉。白蛋白用於在不同的環境中結合和穩定毒素複合物，包括與製造、運輸、儲存和給藥相關的環境。

【0009】然而，目前可用的A型毒肉毒桿菌毒素複合物數目有限。本領域中仍然需要新的A型肉毒桿菌毒素複合物及其配製劑。

【發明內容】

【0010】鑒於本領域中需要更多的A型肉毒桿菌毒素複合物，發明人提供了一種新的A型肉毒桿菌毒素複合物。其與現有的產品（例如：Botox®）相比，本發明的A型肉毒桿菌毒素複合物分子量更小，因此生產成本更低；並且穩定性和安全性更高。

【0011】在一方面，本發明提供了一種A型肉毒桿菌毒素複合物，其中組成成分包含：HA70、HA17、HA33、NTNH、BoNT/A1，其中所述肉毒桿菌毒素組合物具有740~790 kDa的分子量。

【0012】在一個具體實施例中，A型肉毒桿菌毒素複合物由HA70、HA17、HA33、NTNH和BoNT/A1組成，並且具有約760 kDa的分子量。

【0013】在一個具體實施例中，HA70包含下列任一項：（1）SEQ ID NO.1的胺基酸序列；或（2）具有SEQ ID NO.1序列中添加、缺失、取代或插入一個或多個胺基酸所得到的胺基酸序列，並且保留HA70的功能。

【0014】在一個具體實施例中，HA17包含下列任一項：（1）SEQ ID NO.2的胺基酸序列；或（2）具有SEQ ID NO.2序列中添加、缺失、取代或插入一個或多個胺基酸所得到的胺基酸序列，並且保留HA17的功能。

【0015】在一個具體實施例中，HA33包含下列任一項：（1）SEQ ID NO.3的胺基酸序列；或（2）具有SEQ ID NO.3序列中添加、缺失、取代或插入一個或多個胺基酸所得到的胺基酸序列，並且保留HA33的功能。

【0016】 在一個具體實施例中，NTNH包含下列任一項：（1）SEQ ID NO.4的胺基酸序列；或（2）具有SEQ ID NO.4序列中添加、缺失、取代或插入一個或多個胺基酸所得到的胺基酸序列，並且保留NTNH的功能。

【0017】 在一個具體實施例中，BoNT/A1包含下列任一項：（1）SEQ ID NO.5的胺基酸序列；或（2）具有SEQ ID NO.5序列中添加、缺失、取代或插入一個或多個胺基酸所得到的胺基酸序列，並且保留BoNT/A1的功能。

【0018】 在另一方面，本發明提供了一種核酸，其用以合成本發明的A型肉毒桿菌毒素複合物。

【0019】 在另一方面，本發明提供了一種藥物組合物，其包含本發明的A型肉毒桿菌毒素複合物和藥學上或皮膚學上可接受的載體。

【0020】 在又一方面，本發明提供了一種液體配製劑，其包含請求項第1～6項中任一項的A型肉毒桿菌毒素複合物，其組成包含：人類血清白蛋白、甲硫氨酸、精氨酸、氯化鈉、Tween 80、檸檬酸鹽緩衝液、和/或磷酸鹽緩衝液。

【0021】 在又一方面，本發明提供了一種美容方法，其包括對有需要的受試者施用有效量的本發明的A型肉毒桿菌毒素複合物、醫藥組合物、或液體配製劑。

【0022】 在一個具體實施例中，美容方法包含：減少細紋和／或皺紋的外觀，特別是在臉部，或者擴大眼睛、提升嘴角，或者使上唇出現的紋路平滑，或者一般性緩解肌肉張力。

【0023】 在又一方面，本發明提供了一種治療或預防有需要的受試者中的由乙醯膽鹼突觸傳遞或釋放所引起的疾病的方法，其包含對受試者施用有效量的本發明的A型肉毒桿菌毒素複合物、醫藥組合物、或液體配製劑。

【0024】 在一個具體實施例中，疾病選自以骨骼肌過度活躍為特徵的神經肌肉病徵、神經疼痛、偏頭痛、膀胱活動過度、鼻炎、鼻竇炎、痤瘡、張力障礙、張力障礙性收縮、多汗症、膽鹼能神經系統控制的一個或多個腺體的分泌過多、偏側面肌痙攣、成人發作痙攣性斜頸、肛裂、臉痙攣、腦癱、頸肌張力障礙、斜視、顛頷關節病症和各種類型的肌肉抽筋和痙攣。

【0025】 在又一個方面，本發明提供了本發明的A型肉毒桿菌毒素複合物、藥物組合物或液體配製劑在製備美容用品或藥物組合物中的用途，所述美容用品用於減少細紋和／或皺紋的外觀，特別是在臉部，或者擴大眼睛、提升嘴角、或者使上唇出現的紋路平滑，或者一般性緩解肌肉張力；所述藥物用於治療或預防由乙醯膽鹼突觸傳遞或釋放引起的疾病。

【0026】 在一個具體實施例中，疾病選自以骨骼肌過度活躍為特徵的神經肌肉病症、神經疼痛、偏頭痛、膀胱活動過度、鼻炎、鼻竇炎、痤瘡、張力障礙、張力障礙性收縮、多汗症、膽鹼能神經系統控制的一個或多個腺體的分泌過多、偏側面肌痙攣、成人發作痙攣性斜頸、肛裂、臉痙攣、腦癱、頸肌張力障礙、斜視、顛頷關節病症和各種類型的肌肉抽筋和痙攣。

【0027】 在又一個方面，本發明提供了A型肉毒桿菌毒素複合物、藥物組合物或液體配製劑，用於減少細紋和／或皺紋的外觀，特別是在臉部，或者擴大眼睛、提升嘴角、或者使上唇出現的紋路平滑，或者一般性緩解肌肉張力；所述藥物用於治療或預防由乙醯膽鹼突觸傳遞或釋放引起的疾病。

【0028】 在一個具體實施例中，疾病選自以骨骼肌過度活躍為特徵的神經肌肉病症、神經疼痛、偏頭痛、膀胱活動過度、鼻炎、鼻竇炎、痤瘡、張力障礙、張力障礙性收縮、多汗症、膽鹼能神經系統控制的一個或多個腺體的分泌過多、

偏側面肌痙攣、成人發作痙攣性斜頸、肛裂、臉痙攣、腦癱、頸肌張力障礙、斜視、顛頷關節病症和各種類型的肌肉抽筋和痙攣。

【0029】本發明的A型肉毒桿菌毒素複合物(在本文中 also 稱為「OBI-858」)，與市售產品Botox[®]相比較具有以下優點：

【0030】(1) 其治療效果在小鼠動物實驗中(其有效劑量Effective Dose: ED50)與Botox[®]的治療效果相當，但是在小鼠動物實驗中其致死劑量(Lethal Dose: LD50)比Botox[®]的致死劑量更高，並且在小鼠動物實驗中其安全邊際量(safety margin)(MOS)亦比Botox[®]更高，其代表本發明可生產出比市售產品Botox[®]安全性更高的肉毒桿菌毒素製劑。

【0031】(2) 本發明的A型肉毒桿菌毒素複合物的總蛋白質分子量為760 kDa，與Botox[®]分子量900 kDa不同，是一種新的A型肉毒桿菌毒素複合物。

【0032】(3) 本發明的A型肉毒桿菌毒素複合物的配製劑具有改善的穩定性。

【圖式簡單說明】

【0033】圖1為利用尺寸排阻層析高效液相色譜(SEC-HPLC)檢測製品純度。

【0034】圖2為利用連接折射率和多角度激光散射(MALS)檢測製品分子量。

【0035】圖3(a)~(b)為利用電子顯微鏡(Electron microscopy)測定產品總蛋白質分子量。其中圖3(a) OBI-858，箭頭所指示為毒素顆粒；和圖3(b) 760 kDa L-PTC/A的參考品研究，箭頭指示四種不同的方向。

【0036】 圖4為利用DAS測定法的評分圖。

【實施方式】

【0037】 本發明涉及A型肉毒桿菌毒素複合物以及其液體配製劑。如本文中所述，本發明的組合物可應用於向受試者提供可注射的肉毒桿菌毒素之應用，其可用於各種治療、美容和／或化妝之目的。與現有A型肉毒桿菌毒素複合物產品相比，本發明的A型肉毒桿菌毒素複合物具有更好的安全性且增強或相當的效力。針對本發明的A型肉毒桿菌毒素複合物，本發明提供了用於該A型肉毒桿菌毒素複合物的液體配製劑，以提供優異的穩定性。

【0038】 如本文中所使用的術語「A型肉毒桿菌毒素複合物」，其指約150 kD的A型肉毒桿菌毒素蛋白分子以及相關的內源性非毒素蛋白，即血凝素蛋白（HA）和非毒素非血凝素蛋白（NTNH）所形成的複合物。血凝素蛋白由70 kDa、33 kDa、17 kDa的子成分（即HA70、HA33、HA17）組成。肉毒桿菌毒素複合物無需作為一個單一毒素源自肉毒桿。例如：肉毒桿菌毒素或經過修飾的肉毒桿菌毒素可以重組製備，然後與非毒素蛋白組合。也可以購買重組肉毒桿菌毒素，然後與非毒性蛋白質組合。

【0039】 在本文中，A型肉毒桿菌毒素複合物也可以含有如本文中所描述的HA70、HA33、HA17、NTNH或BoNT/A1，或者其變體。本文中所述之變體為在該序列（例如：SEQ ID No. 1~5中的任一種）中添加、缺失、取代或插入一個或多個胺基酸得到的氨基酸序列。

【0040】 術語「一個或幾個」是指很大程度上不損害蛋白質性活性的區域的數量。另外，術語「一個或幾個」所指代表的數量是例如1至100，較佳地為1

至80，更佳地為1至50，再仍更佳地為1至40，並且特別佳地為1至30、1至20、1至10、或1至5（例如：1、2、3、4或5）。

【0041】 以下本文中提供了具體實施例中所述的A型肉毒桿菌毒素複合物的各組成成分的序列。

【0042】 HA70（SEQ ID NO. 1）：

MNSSIKKIYNDIQEKVINYSDTIDLADGNYVVRRGDGWILSRQNQILGGSVIS
 NGSTGIVGDLRVNDNAIPYYYPTPSFNEEYIKNNIQTVFTNFTEANQIPIGFEFS
 KTAPSNKNLYMYLQYTYIRYEIHKVLQHEIIERAVLYVPSLGYVKSIEFNPGEK
 INKDFYFLTNDKCILNEQFLYKKILETTKNIPTNNIFNSKVSSTQRVLPYSNGL
 YVINKGDGYIRTNDKDLIGTLLIEAGSSGSIIQPRLRNTTRPLFTTSNDTKFSQQ
 YTEERLKDAFNVQLFNTSTSLFKFVEEAPSDKNICIKAYNTYEKYELIDYQNG
 SIVNKAEYYLPSLGYCEVTNAPSESEVVKMQVAEDGFIQNGPEEEIVVGVID
 PSENIQEINTAISDNYTYNIPGIVNNNPFYILFTVNTTGIYKINAQNNLPSLKIYE
 AIGSGNRNFQSGNLCDDDIKAINYITGFDSRNAKSYLVVLLNKDKNYIYIRVPQ
 TSSNIENQIQFKREEGDLRNLMNSSVNIIDNLNSTGAHYTRQSPDVHDYISY
 EFTIPGNFNNKDTSNIRLYTSYNQGIGTLFRVTETIDGYNLINIQQNLHLLNNT
 NSIRLLNGAIYILKVEVTELNYYNIRLHIDITN

【0043】 HA17（SEQ ID NO. 2）：

MSVERTFLPNGNYNIKSIFSGSLYLNPVSKSLTFSNESSANNQKWNVEYMAE
 NRCFKISNVAEPNKYLSYDNFGFISLDSLSNRCYWFPIKIAVNTYIMLSLNKV
 NELDYAWDIYDTNENILSQPLLLLPNFDIYNSNQMFKLEKI

【0044】 HA33（SEQ ID NO. 3）：

MEHYSVIQNSLNDKIVTISCKADTNLFFYQVAGNVSLFQQTRNYLERWRLIY

DSNKAAYKIKSMDIHNTNLVLTWNAPTHNISTQQDSNADNQYWLLKDIGN
 NSFIIASYKNPNLVLYADTVARNLKLSTLNNSNYIKFIIEDYIISDLNNFTCKISP
 ILDLNKVVQQVDVTNLNVNLYTWDYGRNQKWTIRYNEEKAAAYQFFNTILSN
 GVLTWIFSNGNTVRVSSSNDQNDAQYWLINPVSDTDETYTITNLRDTTKAL
 DLYGGQTANGTAIQVFNYHGDDNQKWNIRNP

【0045】 NTNH (SEQ ID NO. 4) :

MNINDNLSINSPVDNKNVVRARKTDTVFKAFKVAPNIWVAPERYYGESL
 SIDEEYKVDGGIYDSNFLSQDSEKDKFLQAIITLLKRINSTNAGEKLLSLISTAI
 PFPYGYIGGGYYAPNMITFGSAPKSNKLNLSISTIPFPYAGYRETNLSSD
 NKSFYASNIVIFGPGANIVENNTVIFYKKEDAENGMGTMTIWFQPFITYKYD
 EFYIDPAIELIKCLIKSLYFLYGIKPSDDLVIYRLRSELENIEYSQLNIVDLLVS
 GGIDPKFINTDPYWFTDNYFSNAKKVFEDHRNIYETEIEGNAIGNDIKLRK
 QKFRININDIWELNLNYFSKEFSIMMPDRFNNALKHFYRKQYYKIDYPENYSI
 NGFVNGQINAQLSLSDRNQDIINKPEEIIINLLNGNNVSLMRSNIYGDGLKSTV
 DDFYSNYKIPYNRAYEYHFNNSNDSSLDNVNIGVIDNIPEIIDVNPYKENC DK
 FSPVQKITSTREINTNIPWPINYLQAQNTNNEKFSLSDFVEVVSSKDKSLVYS
 FLSNVMFYLDSEKDNPIDTDKYYLWLREIFRNYSFDITATQEINTNCGINKV
 VTWFGKALNILNTSDSFVEEFQNLGAISLINKKENLSMPIIESYEIPNDMLGLP
 LNDLNEKLFNIYSKNTAYFKKIYYNFLDQWWTQYYSQYFDLICMAKRSVLA
 QETLIKRIIQKLSYLIGNSNISSDNLALMNLTTNTLRDISNESQIAMNNVDSF
 LNNAACVFESNIYPKFISFMEQCINNINIKTKEFIQKCTNINEDEKLQLINQNV
 FNSLDFEFLNIQNMKSLFSSETALLIKEETWPYELVLYAFKEPGNNVIGDASG
 KNTSIEYSKDIGLVYGINSDALYLNGSNQSSISFSNDFENGLTNSFSIYFWLRN

LGKDTIKSKLIGSKEDNCGWEIYFQDTGLVFNMIDSNGNEKNIYLSDVSNNS
 WHYITISVDRLKEQLLIFIDNLVANESIKEILNIYSSNIISLLENPSYIEGLTI
 LNKPTTSQEVLSNYFEVLNNSYIRDSNEERLEYNKTYQLYNYVFSDKPICEVK
 QNNNIYLTINNTNNLNLQASKFKLLSINPNKQYVQKLDEVIISVLDNMEKYIDI
 SEDNRLQLIDNKNNAKKMIISNDIFISNCLTLSYNGKYICLSMKDENHNWMIC
 NNDMSKYLYLWSFK

【0046】 BoNT/A1 (SEQ ID NO. 5) :

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIA YIKIPNAGQM QPVKAFKIH NKI WVIPERDTFT
 NPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTD LG
 RMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDG SYRSEELNLVIIGPSADI
 IQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFA
 TDPAVTLAHELHAGHRLYGI AINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFG
 GHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAS TLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKE
 KYLLSED TSGKFSVDK LKFDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNF DK
 AVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNT EINN MNFTK LKNFTGLF
 EFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLN
 KGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMP
 NIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEF EHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYT
 FFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIG
 PALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQ
 TIDNALS KRNEKWDEVYKYIVTNWLA KVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATK
 AIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMN
 SMIPYGVKREDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPF

QLSKYVDNQRLLSSTFTEYIKNIINTSILNLRYESNHLIDLRSYASKINIGSKVNF
 DPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNISLNNE
 YTIINCMENNSGWKVSLSNYGEIHWTLQDTQEIKQRVVFKEYSQMINISDYINRW
 IFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWI
 KYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSNNSGILKDFWGDYLYDKPYYMLNLYDPN
 KYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKD
 NIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVV
 MKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNAKLVASNWYNRQIER
 SSRTLGCSEFIPVDDGWGERPL

【0047】本發明還涉及一種透過將有效量的本發明組合物注射到有需要的受試者或患者上以產生生物效應的方法。其中，生物效應可以包括例如肌肉麻痺、減少分泌過多或出汗、治療神經性疼痛或偏頭痛、控制鼻炎或鼻竇炎、治療膀胱活動過度、減少肌肉痙攣、預防或減少痤瘡、減少或增強免疫反應、減少皺紋、或預防或治療各種其它病症。

【0048】本發明的組合物為可利用注射方式至受試者或患者（即需要特定治療的人或其它哺乳動物）的皮膚或上皮中。本文中術語「需要」是指包括與藥物或健康相關的需要（例如：治療相關不正常的面部肌肉痙攣的病症），以及化妝和主觀需要（例如：改變或改善面部組織的外觀）。在本發明組合物的最簡單形式中，它們可以包含水性藥學上可接受的稀釋劑，例如：緩衝鹽水（例如：磷酸鹽緩衝鹽水）。然而，組合物可包含通常在可注射藥物或化妝品組合物中常見的其它成分，包括與將被施用到的組織相容的皮膚學上或藥學上可接受的載體。如本文所述，術語「皮膚學上或藥學上可接受的」是指本文所述的組合物或其組成成分適於與組織接觸或用於一般患者而不會有毒性、不相容性、不穩定性、過

敏反應等。適當時，本發明的組合物可包含常規用於相關的領域，特別是化妝品和皮膚病學中的任何組分。

【0049】 根據本發明揭露的肉毒桿菌毒素複合物可以透過注射方式（通常使用注射器）遞送到皮膚下面的肌肉，或以產生癱瘓、產生鬆弛、緩解收縮、預防或緩解痙攣、減少腺輸出或其它所需作用的有效量作用於皮膚內的腺結構。以該種方式局部遞送肉毒桿菌毒素可以提供劑量減少、降低毒性，並且允許相對於可注射或可植入材料更精確的劑量優化以獲得所需的效果。

【0050】 施用本發明揭露的肉毒桿菌毒素複合物以遞送有效量的肉毒桿菌毒素。本文中所述術語「有效量」是指如下的量，其足以產生所需的肌肉麻痹或其它生物學或美學效果，但其隱含地也代表是安全量，即其足夠低以避免嚴重副作用。所需的效果包括放鬆某些肌肉，例如，減少細紋和/或皺紋的外觀，特別是在臉部，或者以其它方式調節臉部外觀，例如擴大眼睛，抬高嘴角，或者緩解肌肉張力。肌肉張力的緩解可以在臉部或其它地方進行。本發明的肉毒桿菌毒素複合物可通過注射給藥於患者，用於治療諸如皺紋，不希望的面部肌肉或其它肌肉痙攣，多汗症，痤瘡或身體其它需要緩解肌肉疼痛或痙攣的疾病。肉毒桿菌毒素複合物通過注射施用於肌肉或其它皮膚相關或其它標靶組織結構。可以例如，對腿部、肩部、背部(包括下背部)、腋部、手掌、足部、頸部、臉部、腹股溝、手或足的背部、肘部、上臂、膝部、上腿、臀部、軀幹、骨盆或有需要的身體的任何其它部分施用肉毒桿菌毒素複合物。

【0051】 本發明揭露的肉毒桿菌毒素複合物也可用於治療其它病症，其包括任何預防乙醯膽鹼突觸傳遞或釋放會帶來治療益處的病症。例如：本發明可治療的病況包括但不限於神經疼痛、偏頭痛或其它頭痛疼痛、膀胱活動過度、鼻炎、鼻竇炎、痤瘡、張力障礙、張力障礙性收縮、多汗症、以及膽鹼能神經系統控制的一個或多個腺體的分泌過多、以骨骼肌過度活躍為特徵的神經肌肉病症。可用

肉毒桿菌毒素治療的病症包括：半臉痙攣、偏側面肌痙攣、成人發作痙攣性斜頸、肛裂、臉痙攣、腦癱、頸肌張力障礙、斜視、顳頷關節病症和各種類型的肌肉抽筋和痙攣。本發明揭露還可用於降低或增強免疫反應，或治療已經建議或已經進行注射肉毒桿菌毒素複合物給藥的其它病症。本發明揭露的肉毒桿菌毒素複合物可以以固體形式進行製備，例如：凍乾粉末、片劑等，並且在使用前在以注射用水回溶以供使用。

【0052】 本發明揭露的肉毒桿菌毒素複合物、組合物或配製劑由醫師或其它保健專業人員進行給藥或在醫師或其它保健專業人員指導下進行給藥。它們可以在一次治療中或在一系列治療中隨時間施用。在較佳的實施例中，在需要與肉毒桿菌毒素相關的作用的一個或多個位置注射本發明揭露的肉毒桿菌毒素複合物、組合物或配製劑。由於肉毒桿菌毒素複合物的性質，肉毒桿菌毒素較佳以產生所需結果而不產生任何不利或不希望的結果的量、施用速率和施用頻率。

【0053】 在本文揭露中，配製劑包含人類血清白蛋白、甲硫氨酸、精氨酸、氯化鈉、Tween 80、檸檬酸鹽緩衝液、及/或磷酸鹽緩衝液。較佳地，配製劑包含人類血清白蛋白、氯化鈉以及溶解於50 mM檸檬酸鹽緩衝液的Tween 80。在配製劑中，人類血清白蛋白的濃度可以為0.1~1 mg/mL，例如0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9 mg/mL。氯化鈉的濃度可以為5~20 mg/mL，例如：6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、或19 mg/mL，更佳地為11.25 mg/mL。溶解於50 mM檸檬酸鹽緩衝液的Tween 80的濃度可以為0.1~0.3，例如0.2 mg/mL，最佳地為0.188 mg/mL。配製劑具有一定的pH值，例如：pH 4~8，較佳地為pH 5.6。

【0054】 在以下揭露中，透過參考下述具體實施例以更為詳細描述本發明構思。然而，這些具體實施例僅用於示例性目的，而不意圖限制本發明構思的範圍。

【0055】 具體實施例

【0056】 實施例1：OBI-858的製備過程

【0057】 (1) OBI-858原料藥製備過程

【0058】 將細胞庫的冷凍管中的OBI-858菌株復甦，並且使用培養基逐步擴增，然後接種到生產醱酵槽。完成細胞培養後，透過過濾除去細胞和細胞碎片。純化步驟包括：兩步沉澱、緩衝液交換和色譜步驟。色譜步驟後，透過0.22 μm濾器將產物過濾到原料藥容器，然後凍乾以獲得OBI-858原料藥。

【0059】 (2) 藥物產品（製劑）製備過程：

【0060】 用配製緩衝液回溶凍乾的OBI-858原料藥粉末。回溶後的溶液透過0.22 μm濾器進行滅菌，並且轉移到無菌隔離器中，然後凍乾以獲得OBI-858藥物產品。

【0061】 實施例2：OBI-858的鑒定

【0062】 (1) 基因組序列比對

【0063】 OBI-858生產用菌種為自主篩選發展之A型肉毒桿菌株，經全基因組定序確認為98.28 %相近於A 型肉毒桿菌ATCC 3502株，89.69 %相近於A型肉毒桿菌 Hall 株（如下表1所示），因此在菌種基因分析上有別於目前市面上發售之產品。

【0064】 表1：肉毒桿菌菌株基因組序列比對

肉毒桿菌菌株	基因組序列似度 (%)
<i>Clostridium botulinum</i> A str. ATCC 3502	98.28
<i>Clostridium botulinum</i> A str. ATCC 19397	90.29
<i>Clostridium botulinum</i> A str. Hall	89.69

<i>Clostridium botulinum</i> H04402 065(A5)	68.98
<i>Clostridium botulinum</i> A2 str. Kyoto	68.39
<i>Clostridium botulinum</i> A3 str. Loch Maree	48.84

【0065】 (2) 蛋白組成分析

【0066】 實驗材料／流程：

【0067】 為了實現最高的序列覆蓋，用不同的酶分解OBI-858蛋白樣品，然後進行LC-MS/MS分析。OBI-858蛋白首先用6 M尿素變性，用10 mM DTT於37 °C還原1小時，在黑暗中於室溫用50 mM IAM烷基化30分鐘。得到的蛋白質在50 mM碳酸氫銨中在以下條件下進行分解：

【0068】 (a) 於37 °C用胰蛋白酶分解18小時；

【0069】 (b) 於37 °C用Glu-C蛋白酶分解18小時；

【0070】 (c) 於37 °C用胰蛋白酶分解於37 °C中，並用Glu-C蛋白酶分解18小時；

【0071】 (d) 於37 °C用Lys-C分解18小時；

【0072】 (e) 於37 °C用胰凝乳蛋白酶分解18小時；

【0073】 (f) 於37 °C用嗜熱菌蛋白酶分解18小時。

【0074】 分解後，稀釋蛋白質樣品，並且用0.1% FA酸化以進行MS分析。

【0075】 用與Ultimate 3000 RSLC system (Dionex) 偶聯的Q Exactive質譜儀 (Thermo Scientific) 分析樣品。使用C18管柱 (Acclaim PepMap RSLC, 75 μ m x 150 mm, 2 μ m, 100 Å) 透過以下所揭示的梯度進行LC分離。

【0076】 表2：液相色譜串聯質譜法 (LC-MS/MS) 分析程序

時間 (分鐘)	流動相A	流動相B	流速 (μ L/min)
---------	------	------	-------------------

	(%)	(%)	
0	99	1	0.25
5.5	99	1	0.25
45	75	25	0.25
48	40	60	0.25
50	20	80	0.25
60	20	80	0.25
65	99	1	0.25
70	99	1	0.25

流動相A: 0.1%甲酸

流動相B: 99%乙腈+0.1%甲酸

【0077】 以m/z 300~2000的範圍進行全MS掃描，並且MS掃描中10個最強烈的離子進行碎裂處理以得到MS/MS譜。通過Proteome Discoverer 1.4進行Mascot資料庫搜索將原始資料加工成峰清單。

【0078】 實驗結果：

【0079】 在液相色譜串聯質譜法(LC-MS/MS)分析OBI-858 A型肉毒桿菌毒素氨基酸測序結果顯示，本毒素蛋白主要是由71 kDa、17 kDa、34 kDa、138 kDa與149 kDa五種不同大小蛋白質分子組成(如下表3所揭示)。對該五種不同的蛋白質進行定序，分別得到SEQ ID NO. 1~5的胺基酸序列。

【0080】 表3：根據定序序列計算的理論數值

蛋白質序列 ID	理論分子量 (Da)	蛋白質 名稱	胺基酸 數目	分子式
A5HZZ4	71391.01	HA-70	626	$C_{3200}H_{4953}N_{837}O_{999}S_8$
A5HZZ5	17034.31	HA-17	146	$C_{775}H_{1169}N_{191}O_{230}S_6$
A5HZZ6	33872.73	HA-33	293	$C_{1515}H_{2313}N_{409}O_{468}S_4$

A5HZZ8	138092.85	NTNH	1193	$C_{6240}H_{9555}N_{1569}O_{1905}S_{33}$
A5HZZ9	149425.84	BoNT/A1	1296	$C_{6763}H_{10452}N_{1744}O_{2011}S_{33}$

【0081】 (3) 分子排阻高效液相色譜 (SEC-HPLC) 檢測製品純度與連接折射率和分子排阻多角度鐳射散射 (SEC-MALS) 檢測製品分子量

【0082】 實驗材料／流程：

【0083】 SEC-MALS分析是組合的大小排阻層析高效液相色譜 (SEC-HPLC) 和靜態激光散射分析，使用Agilent 1260 HPLC系統進行，並且在線連接到含有SRT SEC-300 (5 μ m, 7.8 \times 300mm) 管柱的WYATT_DAWN HELEOS靜態激光散射檢測器。使用Chemstation軟件 (Agilent Technologies) 控制Agilent 1260 HPLC系統。使用ASTRA V軟件 (Wyatt Technology) 控制和分析光散射檢測器。將50 μ g OBI-858原料藥溶解於100 μ L 0.15 M硫酸鹽緩衝液 (pH 6.0)，然後注入樣品。使用流動相：0.15 M磷酸鹽緩衝液+0.1 M NaCl和200 ppm NaN₃；pH 6.0以0.5 mL/min的流速進行等度沖提。以280 nm的UV吸光度監測光散射實驗期間的OBI-858複合物濃度。使用比折光指數增量 (specific refractive index increment) (dn/dc)值0.185 mL/g和UV消光係數1.49 mL/(mg \times cm)從光散射數據計算OBI-858複合物的分子量。

【0084】 實驗結果：

【0085】 圖1顯示以分子排阻層析高效液相色譜 (SEC-HPLC) 檢測製品純度，本製品的純度達到99.36 %，圖2所揭示連接折射率和多角度鐳射散射 (MALS) 檢測製品分子量為接近760 kDa的蛋白。

【0086】 (4) 電子顯微鏡 (Electron microscopy) 測定

【0087】 實驗材料／流程：

【0088】 使用10 μ L去離子蒸餾水（DDW）中溶解的25 μ g OBI-858原料藥（測試品）和L-PTC/A（參考品）進行負染色的樣品製備。首先，將4 μ L OBI-858樣品溶液液滴吸附到輝光放電的碳塗覆的銅柵格，用去離子水逐滴清洗，用2%醋酸鉍醃染色並且風乾。使用JEM-2100F透射電子顯微鏡（TEM）記錄樣品圖像，該透射電子顯微鏡裝備有場發射電子源並且以200 kV的加速電壓操作。在DE12照相機上記錄圖像。

【0089】 實驗結果：圖3（a）～（b）顯示以電子顯微鏡（Electron microscopy）測定產品總蛋白質分子量，圖3（a）顯示OBI-858毒素顆粒外型（箭頭指示處），圖3（b）顯示和分子量760 kDa的L-PTC/A的參考品做比對，箭頭指示分別朝向四種不同的方向。以上試驗結果皆顯示OBI-858為接近760 kDa的毒素蛋白，因此本製品在總蛋白質分子量也有別於市面上900 kDa的A型肉毒桿菌毒素產品。

【0090】 實施例3：OBI-858功效性研究（Efficacy Study）

【0091】 這項研究的目的是在雌性ICR小鼠中評估OBI-858測試品的單劑量急性肌內（IM）功效。透過後趾外展評分測定法（Digit Abduction Scoring assay，DAS測定法）確定OBI-858測試品的功效，以計算IM中值有效劑量（ED50），安全邊際量以72小時IM LD50與48小時IM ED50之比值來決定。

【0092】 材料和方法

【0093】 測試品、參考品、媒介物和對照

【0094】 測試品

名稱 OBI-858

供應商 OBI Pharma, Inc.

批號 14004-25, 14004-30, 14004-35, 14004-45

貯存條件 -15 – -25 °C

其它特徵 一瓶無菌凍乾粉末含有1,350,440單位。

【0095】 參考品

名稱 BOTOX®

供應商 Allergan Inc.

批號 C3461 C2

貯存條件 -15 – -25 °C

其它特徵50個單位的A型肉毒桿菌毒素[每小瓶]

【0096】 媒介物和對照

【0097】 稀釋緩衝液（30 mM磷酸鹽緩衝鹽水、含0.2% w/v明膠、pH 6.8）

用作配製製劑的媒介物和給藥時的陰性對照。

【0098】 劑量製劑的製備和處置

【0099】 所有製劑均在預定的給藥日新鮮製備以當日使用。

【0100】 測試品回溶和劑量配方

【0101】 所有劑量製劑的製備程序均在位於測試設施中的II級生物安全櫃中進行。在給藥程序之前的給藥日進行劑量製劑的製備。

【0102】 將測試品作為凍幹材料包裝在無菌密封小瓶中。為了回溶凍乾的測試品，將1 mL稀釋緩衝液注入裝有測試品的小瓶中。劇烈搖動小瓶以溶解測試品，直到肉眼看不到回溶原料中的顆粒物質為止。回溶的測試品的儲備濃度為每毫升1350440 LD50單位（U）。然後，依照下表4中所揭示用回溶的測試品進行系列稀釋：

【0103】 表4：用於劑量製劑製備的測試品稀釋比例

劑量 濃度 (U/mL)	倍數 稀釋	稀釋 因數	給藥 體積 (μ L)	總體積 (μ L)	原料 體積 (μ L)	原料 ID	稀釋緩 衝液體 積(μ L)	組別	原料 ID
1350440	1	1	N/A	1000	N/A	N/A	1000	N/A	0(回溶)
168805	8	8	N/A	800	100	0	700	N/A	1
24115	7	56	N/A	700	100	1	600	N/A	2
3445	7	392	N/A	700	100	2	600	N/A	3
689	5	1960	N/A	2500	500	3	2000	N/A	4
200	3.445	6752.2	1445	3445	1000	4	2445	12	5
166.528	1.201	8109.4	402	2402	2000	5	402	11	6
139.005	1.198	9715.1	396	2396	2000	6	396	10	7
115.549	1.203	11687.2	406	2406	2000	7	406	9	8
96.532	1.197	13989.6	1394	2394	2000	8	394	8	9
64.013	1.508	21096.3	508	1508	1000	9	508	7	10
43.020	1.488	31391.3	488	1488	1000	10	488	6	11
28.509	1.509	47369.5	509	1509	1000	11	509	5	12
16.007	1.781	84365	781	1781	1000	12	781	4	13
9.003	1.778	150001	778	1778	1000	13	778	3	14
5.002	1.8	270001.8	1800	1800	1000	14	800	2	15

【0104】 為了製備每種連續稀釋液，將所需體積的稀釋緩衝液透過微量移液器轉移至具有上蓋的新鮮玻璃小瓶中。然後透過微量移液器將所需體積的待稀釋原液轉移到裝有稀釋緩衝液的小瓶中。透過反覆輕柔轉移液幾次進行混合，

然後反覆輕柔倒置，將小瓶上瓶蓋擰緊幾次。在每個轉移步驟完成時，將用過的微量移液器吸頭丟棄。劑量製劑製備完成時所得的原料5至原料15用作測試品劑量製劑。

【0105】 參考品回溶和劑量配方

【0106】 將參考製品作為凍乾材料包裝在無菌密封小瓶中。為了回溶凍乾的參考製品，將0.2 mL稀釋緩衝液注入裝有測試品的小瓶中。然後將小瓶劇烈搖動以溶解測試品，直到肉眼看不到回溶原料中的顆粒物為止。重建的測試品的庫存濃度為每毫升250 LD50單位（U）。然後，按照下表5用回溶的參考品進行系列稀釋：

【0107】 表5：用於劑量製劑製備的參考品稀釋比例

原料 ID	0 (重建)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
組別	N/A	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2
稀釋緩衝液體積 (µL)	1600	360	281	253	229	187	366	327	305	391	373	360
原料 ID	N/A	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
原料體積(µL)	0	1440	1400	1280	1130	950	720	670	600	500	480	450
總體積 (µL)	1600	1800	1681	1533	1359	1137	1086	997	905	891	853	810

給藥體積 (μL)	0	400	401	403	409	417	416	397	405	411	403	810
稀釋因數	1	1.25	1.501	1.798	2.162	2.587	3.903	5.807	8.759	15.609	27.739	49.930
倍數稀釋	1	1.25	1.201	1.198	1.203	1.197	1.508	1.488	1.508	1.782	1.777	1.8
劑量濃度 (U/mL)	250	200	166.568	139.078	115.642	96.623	64.059	43.049	28.541	16.016	9.013	5.007

【0108】 透過如上所揭示連續稀釋方案回溶參考品製備劑量製劑。為了製備每個連續稀釋液，將所需體積的稀釋緩衝液通過微量移液器轉移至帶有上蓋的新鮮玻璃小瓶中。然後通過微量移液器將所需體積的待稀釋原液轉移到裝有稀釋緩衝液的小瓶中。通過反覆輕柔移液幾次進行混合，然後反覆輕柔倒置，將小瓶上瓶蓋擰緊幾次。在每個轉移步驟完成時，將用過的微量移液器吸頭丟棄。劑量製劑製備完成時原料1至原料11用作參考品劑量製劑。

【0109】 研究動物

【0110】 以下描述了研究動物。

品系	ICR小鼠
來源	BioLASCO Taiwan Co., Ltd (Taipei, Taiwan)
組分配的動物數據	每批236雌性；共4批
備用動物	每批14雌性；共4批
給藥日的重量	18-22 克（體重範圍在體重平均值的正負10%內）
鑑定籠卡	耳刻，染料標記身體或尾部，以及籠卡

【0111】 選擇理由：以小鼠為測試系統，設計了本研究中測試品和參考品的藥物類別的功效和毒性確定的測定程序。雌性動物被用於該程序的開發，並且在先前的研究中還顯示，雌性動物更容易受到該測試品和參考品的藥物類別的藥理作用和毒性的影響。根據既定程序和先前的研究結果，選擇雌性小鼠作為本研究的測試系統。

【0112】 環境條件

【0113】 研究動物的飼養條件如下：動物在國際實驗動物管理評鑑及認證協會（Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International）認可的動物房中在具有草墊的聚碳酸酯籠子中個別飼養。溫度20.7～23.1 °C，相對濕度51.2～67.1 %，光週期：12小時光／12小時黑暗；飼料：高溫滅菌的Rodent Diet 5010（PMI® Nutrition International, Inc., MO, USA），任意提供。水：任意提供。定期分析食物和水。失誤和水的分析結果保存在測試設施的檔案中。預計食品 and 水中不會存在任何污染物。

【0114】 實驗設計

【0115】 動物適應和選擇：在給藥前，將動物在測試設施處隔離2天，並使其適應3～4天。至少在給藥前一天，在研究設計中將動物隨機分為研究組（第1～12組，每組分別具有兩個子組A和B）。每個分配的動物給四碼序列號。研究組或研究組子組的平均體重之間無統計學顯著性差異（ $p < 0.05$ ），由單因素方差分析（ANOVA）確定。未分配的動物即被指定為備用動物。如果在相應批次的第0天或之前出現健康問題（包括體重超過可接受的限制（24克））和／或懷疑的劑量錯誤，則將分配的動物替換為備用動物。第1天後將備用動物排除在研究範圍之外。

【0116】 研究設計：劑量組、標稱劑量濃度、劑量體積、標稱劑量水平以及每個劑量組的動物數如下表：

【0117】 表6：研究設計

組別	標稱劑量濃度 (U/mL) ^a	劑量體積 (mL/動物)	標稱劑量 (U/動物) ^b	動物總數(F: 雌性)	
				OBI-858	BOTOX [®]
1	0 ^c	0.02	0	10F	
				亞組 A	亞組 B
2	5	0.02	0.1	10F	10F
3	9	0.02	0.18	10F	10F
4	16	0.02	0.32	10F	10F
5	28.5	0.02	0.57	10F	10F
6	43	0.02	0.86	10F	10F
7	64	0.02	1.28	10F	10F
8	96.5	0.02	1.93	10F	10F
9	115.5	0.02	2.31	10F	10F
10	139	0.02	2.78	10F	10F
11	166.5	0.02	3.33	10F	10F
12	200	0.02	4	10F	10F
13	844,025	0.1	84,402.5	3F+ 3F ^d	0

a：有關計算出的劑量濃度如上所示。

b：除第13組外，實際劑量水平乘以劑量體積。

c：將稀釋緩衝液用於第1組動物的劑量（陰性對照組）。

d：第13組用於驗證測試品的完整性。在給藥日從備用動物中選擇第13組動物。

【0118】 測試品完整性的驗證

【0119】 在每批的給藥日（第0天），從備用動物庫中隨機選擇3隻動物。單獨地，回溶一小瓶的測試品（原料0），並且將原料0的一部分稀釋1.6倍。然後透過尾靜脈向選擇的測試動物靜脈內注射0.1mL回溶和稀釋的測試品。當透過在給藥後1小時內至少兩隻靜脈內給藥的試驗動物的死亡率驗證了試驗物品的完整性，將繼續進行主要研究動物的給藥。如果至少2隻動物在1小時內未能死

亡，則將丟棄特定小瓶的測試品原料0。在這種情況下，要從第二個測試品小瓶中製備新鮮的小瓶原料0，並用第二個小瓶的原料重複進行驗證測試。如果第二個小瓶也未通過驗證測試，則由於不合格的測試品效力，特定批次的劑量將被停止使用。由於所有測試品小瓶均通過了測試，因此在初始測試後沒有進行上述後續操作。

【0120】 測試品的施用途徑：肌肉注射右腓腸肌。

【0121】 選擇劑量水平和給藥途徑的理由

【0122】 透過選擇標稱劑量水平，以確定預期有1個數量級差異的肌肉內中值有效劑量（IM ED50）和肌肉內中值致死劑量（IM LD50）。

【0123】 施用頻率：單劑量。

【0124】 陰性對照施用

【0125】 作為陰性對照，將20 μ L稀釋緩衝液肌肉內注射到第1組劑量動物的右腓腸肌中。對照注射的程序與測試品注射的程序相同。

【0126】 死亡率觀察

【0127】 在給藥後第0天至少6小時觀察一次動物的死亡率。此後，在整個研究期間每天觀察動物的死亡率，同時進行DAS測定法（直至第3天）。對死亡率分別進行評分，並以每組為基礎計數以計算LD50。

【0128】 趾外展評分（DAS）測定法

【0129】 對於每批，在各批次的第0天給藥第一隻動物後24~26、48~50和72~74小時觀察研究動物的肌無力。透過DAS分析對肌無力進行評分。對於每隻動物，各別由兩位人員獨立記錄其肌無力得分。將兩個單獨觀察的分數取平均值進行分析。DAS測定法依據美國專利申請公開號US 2010/0168023 A1所揭露之內容進行。使用趾外展評分（DAS）測定法測量了肌肉麻痺，例如：Aoki, KR “A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in
第26頁，共 35 頁(發明說明書)

mice”, Toxicon 2001; 39(12):1815- 1820文章中所述。在DAS測定法中，小鼠的尾巴短暫地懸吊起來，引起特徵性的驚嚇反應，其中小鼠伸展其後肢並外展其後趾。小鼠能夠表現出此驚嚇反應的程度以五分制（從0~4）評分，其中0表正常的驚嚇反應，四代表趾外展和腿伸展的最大減少。趾外展的評分基於以下說明和標準：

【0130】 表7：趾外展評分（DAS）測定法的評分量表

趾外展 得分	4	腿彎曲，5趾接觸。
		死亡
	3	腿平坦，5趾接觸。
		腿彎曲，4趾接觸
	2	腿平坦，所有趾頂部略有開放空間。
		腿平坦，3趾接觸
	1	腿平坦，與未注射腿相比趾外展寬度有差異
		腿平坦，2趾接觸並且剩餘趾完全散開
	0	外觀完全正常（沒變化）

為了DAS分析的目的，在DAS研究時死亡的動物被賦予分數「4」。

【0131】 體重：至少在分組前和給藥前第0天測量體重一次。

【0132】 統計分析：概率分析用於擬合概率和分對數S形毒素單位/DAS響應曲線，併計算IM ED50和IM LD50值。使用Minitab®統計軟件進行分析。根據給藥後48小時的IM ED50（DAS）和給藥後72小時的IM LD50計算各批次的安全邊際量。迴歸分析的接受標準為 $R^2 > 0.9$ 。

【0133】 計算機系統：在線數據收集系統（版本6.3.2；Xybion Medical Systems Corporation）用於在測試設施中捕獲和分析體重數據。

【0134】 結果與討論**【0135】 OBI-858批次處理完整性的測試**

【0136】 下表8列出了OBI-858完整性測試的概述。

【0137】 表8：OBI-858完整性測試

批次	批次號	平均存活時間 (給藥後的分鐘數)
1	14004-25	34.0 ± 2.6
2	14004-30	33.3 ± 1.5
3	14004-35	34.7 ± 3.1
4	14004-45	31.7 ± 2.3

測試品的所有小瓶均通過完整性測試，平均給藥後存活時間少於1小時。

【0138】 體重：對於每批，單個劑量組的體重範圍在各自平均體重的±10%範圍內。體重超過24克的動物被替換。

【0139】 DAS測定法和ED50計算**【0140】 OBI-858**

【0141】 早在給藥後24小時，動物就表現出趾外展的體徵。趾外展的嚴重程度與在更高劑量下最大嚴重程度（包括死亡）時達到平台期之前的OBI-858劑量增加有關。在48小時IM ED50中，除批次1外的所有樣品均通過了迴歸分析的接受標準 ($R^2 > 0.9$)。依據下表所示，對於第2、3和4批次，給藥後48小時的ED50分別為0.33、0.32和0.36 U/動物。

【0142】 表9：測試品OBI858的48小時的ED50 (U/動物)

批次	ED50	低 95%	高 95%	R ² 值
1	0.21	0.13	0.35	0.89
2	0.33	0.27	0.41	0.97
3	0.32	0.23	0.46	0.92
4	0.36	0.27	0.47	0.95

第28頁，共 35 頁(發明說明書)

【0143】 BOTOX®

【0144】 早在給藥後24小時，動物就表現出趾外展的體徵。趾外展的嚴重程度與BOTOX®劑量的增加有關，但是對於獲得的最大嚴重性（包括死亡）的平台期，BOTOX®的劑量比OBI-858的劑量小。在48小時的IM ED50中，除批次1外的所有樣品均通過了迴歸分析的接受標準（ $R^2 > 0.9$ ）。依據下表所示，對於第2、3和4批次，給藥後48小時的ED50分別為0.22、0.24和0.23 U/動物。總體而言，BOTOX®的48小時IM ED50低於OBI-858。

【0145】 表10：BOTOX®的48小時的ED50（U/動物）

批次	ED50	低 95%	高 95%	R ² 值
1	0.36	0.21	0.60	0.82
2	0.22	0.19	0.25	0.99
3	0.24	0.22	0.26	1.00
4	0.23	0.19	0.29	0.98

【0146】 死亡率和LD50計算**【0147】 OBI-858**

【0148】 大多數死亡發生在給藥後72小時，儘管對於第11組和第12組早在給藥後48小時就觀察到死亡。依據下表所示，給藥後72小時，所有四個批次的LD50分別為3.00、3.42、3.33和3.35 U/動物。然而，在給藥後72小時，僅批次2、3和4具有在劑量相關線性範圍內的足夠劑量組用於迴歸分析，死亡百分率在0%至100%之間。（每個分析至少需要三個劑量組）。在這三個批次中，只有第2批次和第3批次通過了迴歸分析的接受標準。

【0149】 表11：測試品OBI858的72小時的LD50（U/動物）

批次	LD50	低 95%	高 95%	R ² 值
1	3.00			
2	3.42	2.70	4.32	0.99

3	3.33	3.31	3.36	1.00
4	3.35	1.66	6.75	0.86

【0150】 BOTOX®

【0151】 在以BOTOX®給藥的動物中，死亡發生的時間更早（最早在給藥後24小時），且劑量低於在以OBI-858給藥的動物中觀察到的劑量（給藥後72小時的第6組至第12組）。給藥後72小時，所有四個批次的LD50分別為2.21、1.63、2.14和1.57 U/動物（如下表13中所示）。但是，四批死亡率結果均未通過迴歸分析的接受標準。依據下表所示，對於批次2、3和4，在給藥後72小時，在劑量相關線性範圍內沒有劑量組。因此，無法對這些批次的計算得出的LD50進行迴歸分析。對於批次1，R²值為0.74，低於接受標準。

【0152】 表12：BOTOX®的72小時的LD50（U/動物）

批次	LD50	低 95%	高 95%	R ² 值
1	2.21	0.80	6.11	0.74
2	1.63			
3	2.14			
4	1.57			

【0153】 評估體重偏差對ED50結果的影響

【0154】 對於OBI-858和BOTOX®，在給藥時，在所需體重範圍內（18～22克）的動物與超重（大於22克）的動物之間，在計算的ED50之間沒有一致的變化趨勢。與總ED50值相比，從ED50計算中排除超重動物不會導致ED50值出現一致變化，如下表所示。

【0155】 表13：按體重範圍比較OBI858與BOTOX®的IM 48小時 ED50（U/動物）

批次	OBI-858			BOTOX®		
	48 小時 IM ED50	48 小時 IM ED50	48 小時 IM ED50	48 小時 IM ED50	48 小時 IM ED50	48 小時 IM ED50

第30頁，共 35 頁(發明說明書)

		(體重 18~ 22 g)	(體重 > 22 g)		(體重 18~ 22 g)	(體重 > 22 g)
1	0.21	0.19	0.23	0.36	0.36	0.41
2	0.33	0.33	0.40	0.22	0.21	0.22
3	0.32	0.37	0.32	0.24	0.25	0.25
4	0.36	0.38	0.36	0.23	0.24	0.25

【0156】此外，發現一隻動物在給藥時體重不足17.7克（低於18克閾值）。體重不足的動物（如ID 0193；組9，子集B（Botox[®]）；第2批）在所有評分中都獲得了與同一組其他動物相似的趾外展得分。因此，該事件對研究結果沒有影響（表14：測試品OBI858；表15：BOTOX[®]）。

【0157】安全邊際量（MOS）的估計：安全邊際量的計算方法為：72小時 IM LD50與48小時 IM ED50的比率。

【0158】對於四批測試，OBI-858的MOS值分別為14.07、10.32、10.33和9.29。對於四批測試，BOTOX[®]的MOS值分別為6.20、7.58、8.98和6.73。OBI-858的MOS始終高於BOTOX[®]（如表16中所揭示）。

【0159】結論

【0160】本研究中測試的所有OBI-858小瓶均通過了完整性測試。某些給藥時研究動物的體重升高（22至24克）對ED50計算的結果沒有顯著影響。對於OBI-858，72小時IM LD50和48小時IM ED50值分別為3.42和0.33 U/動物（批次2）以及3.33和0.32 U/動物（批次3）。批次2和批次3的相應MOS值分別為10.32和10.33。對於BOTOX[®]，72小時IM LD50和48小時IM ED50值分別為1.63和0.22 U/動物（批次2）以及2.14和0.24 U/動物（批次3）。批次2和批次3的相應MOS值分別為7.58和8.98。簡而言之，OBI-858的效力可與BOTOX[®]相當，但是它具有比BOTOX[®]高的72小時IM LD50和安全邊際量值。

【0161】表14：測試品OBI858的48小時的小鼠DAS得分

組別 (劑量水平) (U/動物)	批次 1		批次 2		批次 3		批次 4	
1 (0.00)	0.00±0.00 (6)	0.00±0.00 (4)	0.00±0.00 (7)	0.00±0.00 (3)	0.00±0.00 (9)	0.00±0.00 (1)	0.21±0.43 (7)	0.00±0.00 (3)
2 (0.10)	1.39±0.50 (9)	1.00±0.00 (1)	0.90±0.32 (5)	0.40±0.52 (5)	0.33±0.52 (3)	1.00±0.68 (7)	0.80±0.42 (5)	0.90±0.99 (5)
3 (0.18)	2.33±0.78 (6)	2.00±0.76 (4)	0.94±0.44 (8)	1.50±0.58 (2)	1.00±0.69 (6)	1.00±0.00 (1)	1.00±0.67 (5)	1.70±1.06 (5)
4 (0.32)	2.44±1.10 (9)	2.00±0.00 (1)	2.17±0.83 (6)	1.88±1.25 (4)	2.92±0.67 (6)	2.13±1.13 (4)	1.17±0.83 (7)	1.83±0.98 (3)
5 (0.57)	2.88±1.31* (8)	3.50±0.71 (1)	2.50±0.85 (5)	2.90±0.57 (5)	2.80±0.79 (5)	2.90±1.10 (5)	2.40±0.52 (5)	2.80±0.42 (5)
6 (0.86)	3.44±0.51 (8)	3.25±0.50 (2)	3.43±0.65 (7)	3.17±0.41 (3)	3.42±0.51 (6)	3.63±0.52 (4)	3.08±0.79 (6)	2.63±0.92 (4)
7 (1.28)	4.00±0.00 (6)	3.88±0.35 (4)	3.17±0.75 (3)	3.29±0.47 (7)	3.25±0.46 (4)	3.25±0.45 (6)	3.14±0.53 (7)	3.17±0.75 (3)
8 (1.93)	4.00±0.00 (8)	3.75±0.50 (2)	3.75±0.45 (6)	4.00±0.00 (4)	3.58±0.51 (6)	3.38±0.52 (4)	3.57±0.51 (7)	2.83±0.75 (3)
9 (2.31)	3.78±0.43 (9)	4.00±0.00 (1)	4.00±0.00 (9)	3.00±0.00 (1)	3.50±0.52 (6)	3.75±0.46 (4)	3.75±0.46 (4)	3.50±0.52 (6)
10 (2.78)	3.92±0.29 (6)	4.00±0.00 (4)	4.00±0.00 (8)	4.00±0.00 (2)	3.90±0.32 (5)	3.80±0.42 (5)	4.00±0.00 (6)	3.75±0.46 (4)
11 (3.33)	4.00±0.00 (6)	4.00±0.00 (4)	4.00±0.00 (8)	4.00±0.00 (2)	3.90±0.32 (5)	4.00±0.00 (5)	4.00±0.00 (8)	4.00±0.00 (2)
12 (4.00)	4.00±0.00 (8)	4.00±0.00 (2)	4.00±0.00 (7)	4.00±0.00 (3)	4.00±0.00 (8)	4.00±0.00 (2)	4.00±0.00 (7)	4.00±0.00 (3)

*有一隻小鼠在實驗過程中死亡，此動物已被排除於48小時DAS分析之外

【0162】 表15：BOTOX®的48小時的小鼠DAS得分

批次 4	
(n)	(m)
0.21±0.43 (7)	0.00±0.00 (3)
0.80±0.42 (5)	0.90±0.99 (5)
1.00±0.67 (5)	1.70±1.06 (5)
1.71±0.83 (7)	1.83±0.98 (3)
2.40±0.52 (5)	2.80±0.42 (5)
3.08±0.79 (6)	2.63±0.92 (4)
3.14±0.53 (7)	3.17±0.75 (3)
3.57±0.51 (7)	2.83±0.75 (3)
4.00±0.00 (8)	4.00±0.00 (2)
4.00±0.00 (5)	4.00±0.00 (5)
4.00±0.00 (8)	4.00±0.00 (2)
4.00±0.00 (9)	4.00±0.00 (1)

組別 (劑量水平) (U/動物)	批次 1		批次 2		批次 3	
	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)
1 (0.00)	0.00±0.00 (6)	0.00±0.00 (4)	0.00±0.00 (7)	0.00±0.00 (3)	0.00±0.00 (9)	0.00±0.00 (1)
2 (0.10)	1.39±0.50 (9)	1.00±0.00 (1)	0.90±0.32 (5)	0.40±0.52 (5)	0.33±0.52 (3)	1.00±0.68 (7)
3 (0.18)	2.33±0.78 (6)	2.00±0.76 (4)	0.94±0.44 (8)	1.50±0.58 (2)	1.00±0.69 (9)	1.00±0.00 (1)
4 (0.32)	2.44±1.10 (9)	2.00±0.00 (1)	2.17±0.83 (6)	1.88±1.25 (4)	2.92±0.67 (6)	2.13±1.13 (4)
5 (0.57)	2.88±1.31* (8)	3.50±0.71 (1)	2.50±0.85 (5)	2.90±0.57 (5)	2.80±0.79 (5)	2.90±1.10 (5)
6 (0.86)	3.44±0.51 (8)	3.25±0.50 (2)	3.43±0.65 (7)	3.17±0.41 (3)	3.42±0.51 (6)	3.63±0.52 (4)
7 (1.28)	4.00±0.00 (6)	3.88±0.35 (4)	3.17±0.75 (3)	3.29±0.47 (7)	3.25±0.46 (4)	3.25±0.45 (6)
8 (1.93)	4.00±0.00 (8)	3.75±0.50 (2)	3.75±0.45 (6)	4.00±0.00 (4)	3.58±0.51 (6)	3.38±0.52 (4)
9 (2.31)	3.69±0.48 (8)	3.75±0.50 (2)	4.00±0.00 (4)	4.00±0.00 (6)	4.00±0.00 (4)	4.00±0.00 (6)
10 (2.78)	3.61±0.50 (9)	3.00±0.00 (1)	4.00±0.00 (5)	4.00±0.00 (5)	4.00±0.00 (5)	4.00±0.00 (5)
11 (3.33)	4.00±0.00 (8)	4.00±0.00 (2)	4.00±0.00 (7)	4.00±0.00 (3)	4.00±0.00 (7)	4.00±0.00 (3)
12 (4.00)	4.00±0.00 (6)	4.00±0.00 (4)	4.00±0.00 (7)	4.00±0.00 (3)	4.00±0.00 (5)	4.00±0.00 (5)

【0163】 表16：OBI858與BOTOX®的安全邊際值

批次	OBI858	BOTOX®
1	14.07	6.20
2	10.32	7.58
3	10.33	8.98
4	9.29	6.73

【0164】 實施例4：OBI-858配製劑的穩定性測試

【0165】 實驗材料／流程：

【0166】 (1) LF08製劑：0.5 mg/mL 人類血清白蛋白，11.25 mg/mL氯化鈉以及0.188 mg/mL Tween 80溶解於50 mM磷酸鹽緩衝液（pH 6.3）。

【0167】 (2) LF09製劑： 0.5 mg/mL 人類血清白蛋白, 11.25 mg/mL氯化鈉以及0.188 mg/mL Tween 80溶解於50 mM檸檬酸鹽（檸檬酸鈉）緩衝液（pH 5.6）。

【0168】 (3) LF10製劑：0.5 mg/mL 甲硫氨酸, 11.25 mg/mL氯化鈉, 0.188 mg/mL Tween 80以及150 mM精氨酸溶解於50 mM檸檬酸鹽緩衝液（pH 6.0）。

【0169】 (4) LF11製劑：11.25 mg/mL氯化鈉以及0.188 mg/mL Tween溶解於50 mM磷酸鹽緩衝液（pH 6.3）。

【0170】 (5) 實驗動物：使用八隻雌性ICR小鼠（體重18至22克）經由靜脈注射0.1 mL OBI-858以進行致死劑量（LD50/mL）測試。

【0171】 實驗結果：

【0172】 (1) 不同製劑穩定性試驗：

【0173】 將凍乾後的OBI-858原料藥分別於四種製劑中溶解，於4°C儲放一天後置換於45°C儲放四十五天，於室溫下靜置1小時再實施小鼠靜脈注射。下表顯示四種製劑的致死劑量（LD50/mL），結果以LF09製劑的穩定性效果最好。

【0174】 表17：不同製劑穩定性試驗

製劑名稱	LF08	LF09	LF10	LF11
試驗前致死劑量 (LD50/mL)	6.15E+05	8.12E+05	6.75E+05	1.63E+05
穩定性試驗溫度	45 °C			
穩定性試驗時間	14 天			
試驗後致死劑量 (LD50/mL)	0	2.58E+05	0	0

【0175】 (2) LF09製劑4-60 °C穩定性加速試驗:

【0176】 將凍乾後的OBI-858原料藥分別於LF09製劑中溶解，於4°C儲放一天後置換於四種溫度（4°C、25°C、45°C與60°C）儲放七天，於室溫下靜置1小時再實施小鼠靜脈注射。下表顯示LF09製劑的致死劑量（LD50/mL），結果顯示LF09製劑在45°C環境下仍具有穩定性。

【0177】 表18：LF09製劑穩定性加速試驗

穩定性試驗溫度	4 °C	25 °C	45 °C	60 °C
試驗前致死劑量 (LD50/mL)	5.07E+05	5.07E+05	5.07E+05	5.07E+05
穩定性試驗時間	7 天			
試驗後致死劑量 (LD50/mL)	5.07E+05	5.07E+05	4.06E+05	0

【0178】 應當理解，本文中描述的例示性的具體實施例應當僅以描述意義而不是為了限制目的考慮。通常應當認為每個例示性的具體實施例內的特徵或方面的描述可用於其它例示性的具體實施例中的其它類似的特徵或方面。

【0179】 雖然已經參考附圖描述了一個或多個例示性的具體實施例，但是本領域普通技術人員應當理解可以在不背離如由所附權利要求書限定的發明構思的精神和範圍的前提下對其進行形式和細節的各種變化。

【符號說明】

【0180】 無

SEQUENCE LISTING

<110> 台灣浩鼎生技股份有限公司

<120> A型肉毒桿菌毒素複合物、其配製劑和使用方法

<130> OBIP-2TWPA

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 626

<212> PRT

<213> 肉毒桿菌(Clostridium botulinum)

<400> 1

Met Asn Ser Ser Ile Lys Lys Ile Tyr Asn Asp Ile Gln Glu Lys Val
1 5 10 15

Ile Asn Tyr Ser Asp Thr Ile Asp Leu Ala Asp Gly Asn Tyr Val Val
20 25 30

Arg Arg Gly Asp Gly Trp Ile Leu Ser Arg Gln Asn Gln Ile Leu Gly
35 40 45

Gly Ser Val Ile Ser Asn Gly Ser Thr Gly Ile Val Gly Asp Leu Arg
50 55 60

Val Asn Asp Asn Ala Ile Pro Tyr Tyr Tyr Pro Thr Pro Ser Phe Asn
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Ile Lys Asn Asn Ile Gln Thr Val Phe Thr Asn Phe Thr
85 90 95

Glu Ala Asn Gln Ile Pro Ile Gly Phe Glu Phe Ser Lys Thr Ala Pro
100 105 110

Ser Asn Lys Asn Leu Tyr Met Tyr Leu Gln Tyr Thr Tyr Ile Arg Tyr
115 120 125

Glu Ile Ile Lys Val Leu Gln His Glu Ile Ile Glu Arg Ala Val Leu
130 135 140

Tyr Val Pro Ser Leu Gly Tyr Val Lys Ser Ile Glu Phe Asn Pro Gly
145 150 155 160

Glu Lys Ile Asn Lys Asp Phe Tyr Phe Leu Thr Asn Asp Lys Cys Ile
165 170 175

Leu Asn Glu Gln Phe Leu Tyr Lys Lys Ile Leu Glu Thr Thr Lys Asn
180 185 190

Ile Pro Thr Asn Asn Ile Phe Asn Ser Lys Val Ser Ser Thr Gln Arg
195 200 205

Val Leu Pro Tyr Ser Asn Gly Leu Tyr Val Ile Asn Lys Gly Asp Gly
210 215 220

Tyr Ile Arg Thr Asn Asp Lys Asp Leu Ile Gly Thr Leu Leu Ile Glu
225 230 235 240

Ala Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ile Gln Pro Arg Leu Arg Asn Thr Thr
245 250 255

Arg Pro Leu Phe Thr Thr Ser Asn Asp Thr Lys Phe Ser Gln Gln Tyr
260 265 270

Thr Glu Glu Arg Leu Lys Asp Ala Phe Asn Val Gln Leu Phe Asn Thr
275 280 285

Ser Thr Ser Leu Phe Lys Phe Val Glu Glu Ala Pro Ser Asp Lys Asn
290 295 300

Ile Cys Ile Lys Ala Tyr Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Glu Leu Ile Asp
305 310 315 320

Tyr Gln Asn Gly Ser Ile Val Asn Lys Ala Glu Tyr Tyr Leu Pro Ser
 325 330 335

Leu Gly Tyr Cys Glu Val Thr Asn Ala Pro Ser Pro Glu Ser Glu Val
 340 345 350

Val Lys Met Gln Val Ala Glu Asp Gly Phe Ile Gln Asn Gly Pro Glu
 355 360 365

Glu Glu Ile Val Val Gly Val Ile Asp Pro Ser Glu Asn Ile Gln Glu
 370 375 380

Ile Asn Thr Ala Ile Ser Asp Asn Tyr Thr Tyr Asn Ile Pro Gly Ile
 385 390 395 400

Val Asn Asn Asn Pro Phe Tyr Ile Leu Phe Thr Val Asn Thr Thr Gly
 405 410 415

Ile Tyr Lys Ile Asn Ala Gln Asn Asn Leu Pro Ser Leu Lys Ile Tyr
 420 425 430

Glu Ala Ile Gly Ser Gly Asn Arg Asn Phe Gln Ser Gly Asn Leu Cys
 435 440 445

Asp Asp Asp Ile Lys Ala Ile Asn Tyr Ile Thr Gly Phe Asp Ser Pro
 450 455 460

Asn Ala Lys Ser Tyr Leu Val Val Leu Leu Asn Lys Asp Lys Asn Tyr
 465 470 475 480

Tyr Ile Arg Val Pro Gln Thr Ser Ser Asn Ile Glu Asn Gln Ile Gln
 485 490 495

Phe Lys Arg Glu Glu Gly Asp Leu Arg Asn Leu Met Asn Ser Ser Val
 500 505 510

Asn Ile Ile Asp Asn Leu Asn Ser Thr Gly Ala His Tyr Tyr Thr Arg
 515 520 525

Gln Ser Pro Asp Val His Asp Tyr Ile Ser Tyr Glu Phe Thr Ile Pro
 530 535 540

Gly Asn Phe Asn Asn Lys Asp Thr Ser Asn Ile Arg Leu Tyr Thr Ser
 545 550 555 560

Tyr Asn Gln Gly Ile Gly Thr Leu Phe Arg Val Thr Glu Thr Ile Asp
 565 570 575

Gly Tyr Asn Leu Ile Asn Ile Gln Gln Asn Leu His Leu Leu Asn Asn
 580 585 590

Thr Asn Ser Ile Arg Leu Leu Asn Gly Ala Ile Tyr Ile Leu Lys Val
 595 600 605

Glu Val Thr Glu Leu Asn Asn Tyr Asn Ile Arg Leu His Ile Asp Ile
 610 615 620

Thr Asn
 625

<210> 2

<211> 146

<212> PRT

<213> 肉毒桿菌(Clostridium botulinum)

<400> 2

Met Ser Val Glu Arg Thr Phe Leu Pro Asn Gly Asn Tyr Asn Ile Lys
 1 5 10 15

Ser Ile Phe Ser Gly Ser Leu Tyr Leu Asn Pro Val Ser Lys Ser Leu
 20 25 30

Thr Phe Ser Asn Glu Ser Ser Ala Asn Asn Gln Lys Trp Asn Val Glu
 35 40 45

Tyr Met Ala Glu Asn Arg Cys Phe Lys Ile Ser Asn Val Ala Glu Pro

50

55

60

Asn Lys Tyr Leu Ser Tyr Asp Asn Phe Gly Phe Ile Ser Leu Asp Ser
 65 70 75 80

Leu Ser Asn Arg Cys Tyr Trp Phe Pro Ile Lys Ile Ala Val Asn Thr
 85 90 95

Tyr Ile Met Leu Ser Leu Asn Lys Val Asn Glu Leu Asp Tyr Ala Trp
 100 105 110

Asp Ile Tyr Asp Thr Asn Glu Asn Ile Leu Ser Gln Pro Leu Leu Leu
 115 120 125

Leu Pro Asn Phe Asp Ile Tyr Asn Ser Asn Gln Met Phe Lys Leu Glu
 130 135 140

Lys Ile
 145

<210> 3

<211> 293

<212> PRT

<213> 肉毒桿菌(Clostridium botulinum)

<400> 3

Met Glu His Tyr Ser Val Ile Gln Asn Ser Leu Asn Asp Lys Ile Val
 1 5 10 15

Thr Ile Ser Cys Lys Ala Asp Thr Asn Leu Phe Phe Tyr Gln Val Ala
 20 25 30

Gly Asn Val Ser Leu Phe Gln Gln Thr Arg Asn Tyr Leu Glu Arg Trp
 35 40 45

Arg Leu Ile Tyr Asp Ser Asn Lys Ala Ala Tyr Lys Ile Lys Ser Met
 50 55 60

Asp Ile His Asn Thr Asn Leu Val Leu Thr Trp Asn Ala Pro Thr His
65 70 75 80

Asn Ile Ser Thr Gln Gln Asp Ser Asn Ala Asp Asn Gln Tyr Trp Leu
85 90 95

Leu Leu Lys Asp Ile Gly Asn Asn Ser Phe Ile Ile Ala Ser Tyr Lys
100 105 110

Asn Pro Asn Leu Val Leu Tyr Ala Asp Thr Val Ala Arg Asn Leu Lys
115 120 125

Leu Ser Thr Leu Asn Asn Ser Asn Tyr Ile Lys Phe Ile Ile Glu Asp
130 135 140

Tyr Ile Ile Ser Asp Leu Asn Asn Phe Thr Cys Lys Ile Ser Pro Ile
145 150 155 160

Leu Asp Leu Asn Lys Val Val Gln Gln Val Asp Val Thr Asn Leu Asn
165 170 175

Val Asn Leu Tyr Thr Trp Asp Tyr Gly Arg Asn Gln Lys Trp Thr Ile
180 185 190

Arg Tyr Asn Glu Glu Lys Ala Ala Tyr Gln Phe Phe Asn Thr Ile Leu
195 200 205

Ser Asn Gly Val Leu Thr Trp Ile Phe Ser Asn Gly Asn Thr Val Arg
210 215 220

Val Ser Ser Ser Asn Asp Gln Asn Asn Asp Ala Gln Tyr Trp Leu Ile
225 230 235 240

Asn Pro Val Ser Asp Thr Asp Glu Thr Tyr Thr Ile Thr Asn Leu Arg
245 250 255

Asp Thr Thr Lys Ala Leu Asp Leu Tyr Gly Gly Gln Thr Ala Asn Gly
260 265 270

Thr Ala Ile Gln Val Phe Asn Tyr His Gly Asp Asp Asn Gln Lys Trp
 275 280 285

Asn Ile Arg Asn Pro
 290

<210> 4

<211> 1193

<212> PRT

<213> 肉毒桿菌(Clostridium botulinum)

<400> 4

Met Asn Ile Asn Asp Asn Leu Ser Ile Asn Ser Pro Val Asp Asn Lys
 1 5 10 15

Asn Val Val Val Val Arg Ala Arg Lys Thr Asp Thr Val Phe Lys Ala
 20 25 30

Phe Lys Val Ala Pro Asn Ile Trp Val Ala Pro Glu Arg Tyr Tyr Gly
 35 40 45

Glu Ser Leu Ser Ile Asp Glu Glu Tyr Lys Val Asp Gly Gly Ile Tyr
 50 55 60

Asp Ser Asn Phe Leu Ser Gln Asp Ser Glu Lys Asp Lys Phe Leu Gln
 65 70 75 80

Ala Ile Ile Thr Leu Leu Lys Arg Ile Asn Ser Thr Asn Ala Gly Glu
 85 90 95

Lys Leu Leu Ser Leu Ile Ser Thr Ala Ile Pro Phe Pro Tyr Gly Tyr
 100 105 110

Ile Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Pro Asn Met Ile Thr Phe Gly Ser Ala
 115 120 125

Pro Lys Ser Asn Lys Lys Leu Asn Ser Leu Ile Ser Ser Thr Ile Pro

130

135

140

Phe Pro Tyr Ala Gly Tyr Arg Glu Thr Asn Tyr Leu Ser Ser Glu Asp
 145 150 155 160

Asn Lys Ser Phe Tyr Ala Ser Asn Ile Val Ile Phe Gly Pro Gly Ala
 165 170 175

Asn Ile Val Glu Asn Asn Thr Val Phe Tyr Lys Lys Glu Asp Ala Glu
 180 185 190

Asn Gly Met Gly Thr Met Thr Glu Ile Trp Phe Gln Pro Phe Leu Thr
 195 200 205

Tyr Lys Tyr Asp Glu Phe Tyr Ile Asp Pro Ala Ile Glu Leu Ile Lys
 210 215 220

Cys Leu Ile Lys Ser Leu Tyr Phe Leu Tyr Gly Ile Lys Pro Ser Asp
 225 230 235 240

Asp Leu Val Ile Pro Tyr Arg Leu Arg Ser Glu Leu Glu Asn Ile Glu
 245 250 255

Tyr Ser Gln Leu Asn Ile Val Asp Leu Leu Val Ser Gly Gly Ile Asp
 260 265 270

Pro Lys Phe Ile Asn Thr Asp Pro Tyr Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Phe
 275 280 285

Ser Asn Ala Lys Lys Val Phe Glu Asp His Arg Asn Ile Tyr Glu Thr
 290 295 300

Glu Ile Glu Gly Asn Asn Ala Ile Gly Asn Asp Ile Lys Leu Arg Leu
 305 310 315 320

Lys Gln Lys Phe Arg Ile Asn Ile Asn Asp Ile Trp Glu Leu Asn Leu
 325 330 335

Asn Tyr Phe Ser Lys Glu Phe Ser Ile Met Met Pro Asp Arg Phe Asn
 340 345 350

Asn Ala Leu Lys His Phe Tyr Arg Lys Gln Tyr Tyr Lys Ile Asp Tyr
 355 360 365

Pro Glu Asn Tyr Ser Ile Asn Gly Phe Val Asn Gly Gln Ile Asn Ala
 370 375 380

Gln Leu Ser Leu Ser Asp Arg Asn Gln Asp Ile Ile Asn Lys Pro Glu
 385 390 395 400

Glu Ile Ile Asn Leu Leu Asn Gly Asn Asn Val Ser Leu Met Arg Ser
 405 410 415

Asn Ile Tyr Gly Asp Gly Leu Lys Ser Thr Val Asp Asp Phe Tyr Ser
 420 425 430

Asn Tyr Lys Ile Pro Tyr Asn Arg Ala Tyr Glu Tyr His Phe Asn Asn
 435 440 445

Ser Asn Asp Ser Ser Leu Asp Asn Val Asn Ile Gly Val Ile Asp Asn
 450 455 460

Ile Pro Glu Ile Ile Asp Val Asn Pro Tyr Lys Glu Asn Cys Asp Lys
 465 470 475 480

Phe Ser Pro Val Gln Lys Ile Thr Ser Thr Arg Glu Ile Asn Thr Asn
 485 490 495

Ile Pro Trp Pro Ile Asn Tyr Leu Gln Ala Gln Asn Thr Asn Asn Glu
 500 505 510

Lys Phe Ser Leu Ser Ser Asp Phe Val Glu Val Val Ser Ser Lys Asp
 515 520 525

Lys Ser Leu Val Tyr Ser Phe Leu Ser Asn Val Met Phe Tyr Leu Asp

530

535

540

Ser Ile Lys Asp Asn Ser Pro Ile Asp Thr Asp Lys Lys Tyr Tyr Leu
 545 550 555 560

Trp Leu Arg Glu Ile Phe Arg Asn Tyr Ser Phe Asp Ile Thr Ala Thr
 565 570 575

Gln Glu Ile Asn Thr Asn Cys Gly Ile Asn Lys Val Val Thr Trp Phe
 580 585 590

Gly Lys Ala Leu Asn Ile Leu Asn Thr Ser Asp Ser Phe Val Glu Glu
 595 600 605

Phe Gln Asn Leu Gly Ala Ile Ser Leu Ile Asn Lys Lys Glu Asn Leu
 610 615 620

Ser Met Pro Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Ile Pro Asn Asp Met Leu Gly
 625 630 635 640

Leu Pro Leu Asn Asp Leu Asn Glu Lys Leu Phe Asn Ile Tyr Ser Lys
 645 650 655

Asn Thr Ala Tyr Phe Lys Lys Ile Tyr Tyr Asn Phe Leu Asp Gln Trp
 660 665 670

Trp Thr Gln Tyr Tyr Ser Gln Tyr Phe Asp Leu Ile Cys Met Ala Lys
 675 680 685

Arg Ser Val Leu Ala Gln Glu Thr Leu Ile Lys Arg Ile Ile Gln Lys
 690 695 700

Lys Leu Ser Tyr Leu Ile Gly Asn Ser Asn Ile Ser Ser Asp Asn Leu
 705 710 715 720

Ala Leu Met Asn Leu Thr Thr Thr Asn Thr Leu Arg Asp Ile Ser Asn
 725 730 735

Glu Ser Gln Ile Ala Met Asn Asn Val Asp Ser Phe Leu Asn Asn Ala
 740 745 750

Ala Ile Cys Val Phe Glu Ser Asn Ile Tyr Pro Lys Phe Ile Ser Phe
 755 760 765

Met Glu Gln Cys Ile Asn Asn Ile Asn Ile Lys Thr Lys Glu Phe Ile
 770 775 780

Gln Lys Cys Thr Asn Ile Asn Glu Asp Glu Lys Leu Gln Leu Ile Asn
 785 790 795 800

Gln Asn Val Phe Asn Ser Leu Asp Phe Glu Phe Leu Asn Ile Gln Asn
 805 810 815

Met Lys Ser Leu Phe Ser Ser Glu Thr Ala Leu Leu Ile Lys Glu Glu
 820 825 830

Thr Trp Pro Tyr Glu Leu Val Leu Tyr Ala Phe Lys Glu Pro Gly Asn
 835 840 845

Asn Val Ile Gly Asp Ala Ser Gly Lys Asn Thr Ser Ile Glu Tyr Ser
 850 855 860

Lys Asp Ile Gly Leu Val Tyr Gly Ile Asn Ser Asp Ala Leu Tyr Leu
 865 870 875 880

Asn Gly Ser Asn Gln Ser Ile Ser Phe Ser Asn Asp Phe Phe Glu Asn
 885 890 895

Gly Leu Thr Asn Ser Phe Ser Ile Tyr Phe Trp Leu Arg Asn Leu Gly
 900 905 910

Lys Asp Thr Ile Lys Ser Lys Leu Ile Gly Ser Lys Glu Asp Asn Cys
 915 920 925

Gly Trp Glu Ile Tyr Phe Gln Asp Thr Gly Leu Val Phe Asn Met Ile

930

935

940

Asp Ser Asn Gly Asn Glu Lys Asn Ile Tyr Leu Ser Asp Val Ser Asn
 945 950 955 960

Asn Ser Trp His Tyr Ile Thr Ile Ser Val Asp Arg Leu Lys Glu Gln
 965 970 975

Leu Leu Ile Phe Ile Asp Asp Asn Leu Val Ala Asn Glu Ser Ile Lys
 980 985 990

Glu Ile Leu Asn Ile Tyr Ser Ser Asn Ile Ile Ser Leu Leu Ser Glu
 995 1000 1005

Asn Asn Pro Ser Tyr Ile Glu Gly Leu Thr Ile Leu Asn Lys Pro
 1010 1015 1020

Thr Thr Ser Gln Glu Val Leu Ser Asn Tyr Phe Glu Val Leu Asn
 1025 1030 1035

Asn Ser Tyr Ile Arg Asp Ser Asn Glu Glu Arg Leu Glu Tyr Asn
 1040 1045 1050

Lys Thr Tyr Gln Leu Tyr Asn Tyr Val Phe Ser Asp Lys Pro Ile
 1055 1060 1065

Cys Glu Val Lys Gln Asn Asn Asn Ile Tyr Leu Thr Ile Asn Asn
 1070 1075 1080

Thr Asn Asn Leu Asn Leu Gln Ala Ser Lys Phe Lys Leu Leu Ser
 1085 1090 1095

Ile Asn Pro Asn Lys Gln Tyr Val Gln Lys Leu Asp Glu Val Ile
 1100 1105 1110

Ile Ser Val Leu Asp Asn Met Glu Lys Tyr Ile Asp Ile Ser Glu
 1115 1120 1125

Asp Asn Arg Leu Gln Leu Ile Asp Asn Lys Asn Asn Ala Lys Lys
 1130 1135 1140

Met Ile Ile Ser Asn Asp Ile Phe Ile Ser Asn Cys Leu Thr Leu
 1145 1150 1155

Ser Tyr Asn Gly Lys Tyr Ile Cys Leu Ser Met Lys Asp Glu Asn
 1160 1165 1170

His Asn Trp Met Ile Cys Asn Asn Asp Met Ser Lys Tyr Leu Tyr
 1175 1180 1185

Leu Trp Ser Phe Lys
 1190

<210> 5

<211> 1296

<212> PRT

<213> 肉毒桿菌(Clostridium botulinum)

<400> 5

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
 1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
 20 25 30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
 35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
 50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
 65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
 85 90 95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
 100 105 110

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
 115 120 125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
 130 135 140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
 145 150 155 160

Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
 165 170 175

Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
 180 185 190

Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
 195 200 205

Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
 210 215 220

Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
 225 230 235 240

Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
 245 250 255

Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
 260 265 270

Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
 275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
 290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
 305 310 315 320

Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
 325 330 335

Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
 340 345 350

Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
 355 360 365

Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
 370 375 380

Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
 385 390 395 400

Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
 405 410 415

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 420 425 430

Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
 435 440 445

Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
 450 455 460

Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
 465 470 475 480

Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
 485 490 495

Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
 500 505 510

Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
 515 520 525

Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
 530 535 540

Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
 545 550 555 560

His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
 565 570 575

Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
 580 585 590

Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
 595 600 605

Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
 610 615 620

Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
 625 630 635 640

Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
 645 650 655

Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
 660 665 670

Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
 675 680 685

Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
690 695 700

Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
705 710 715 720

Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
725 730 735

Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
740 745 750

Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
755 760 765

Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
770 775 780

Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785 790 795 800

Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
805 810 815

Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
820 825 830

Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
835 840 845

Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
850 855 860

Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
865 870 875 880

Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
885 890 895

Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
 900 905 910

Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
 915 920 925

Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser
 930 935 940

Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn
 945 950 955 960

Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
 965 970 975

Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu
 980 985 990

Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser
 995 1000 1005

Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg
 1010 1015 1020

Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln
 1025 1030 1035

Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile
 1040 1045 1050

Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp
 1055 1060 1065

Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu
 1070 1075 1080

Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys
1085 1090 1095

Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met
1100 1105 1110

Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val
1115 1120 1125

Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val
1130 1135 1140

Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr
1145 1150 1155

Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile
1160 1165 1170

Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn
1175 1180 1185

Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu
1190 1195 1200

Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser
1205 1210 1215

Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn
1220 1225 1230

Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly
1235 1240 1245

Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala
1250 1255 1260

Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu
1265 1270 1275

Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu
1280 1285 1290

Arg Pro Leu
1295

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種A型肉毒桿菌毒素複合物，其包含：HA70、HA17、HA33、NTNH和BoNT/A1，其中所述肉毒桿菌毒素複合物具有740-790 kDa的分子量。

【請求項2】 如請求項1所述之A型肉毒桿菌毒素複合物，其中所述HA70包含下列任一項：（1）SEQ ID NO. 1胺基酸序列，或是（2）在所述SEQ ID NO. 1胺基酸序列中添加、缺失、取代或插入一個或多個胺基酸得到的胺基酸序列，且其保留所述HA70的功能。

【請求項3】 如請求項1所述之A型肉毒桿菌毒素複合物，其中所述HA17包含下列任一項：（1）SEQ ID NO. 2胺基酸序列，或是（2）在所述SEQ ID NO. 2胺基酸序列中添加、缺失、取代或插入一個或多個胺基酸得到的胺基酸序列，且其保留所述HA17的功能。

【請求項4】 如請求項1所述之A型肉毒桿菌毒素複合物，其中所述HA33包含下列任一項：（1）SEQ ID NO. 3胺基酸序列；或是（2）在所述SEQ ID NO. 3胺基酸序列中添加、缺失、取代或插入一個或多個胺基酸得到的胺基酸序列，且其保留所述HA33的功能。

【請求項5】 如請求項1所述之A型肉毒桿菌毒素複合物，其中NTNH包含下列任一項：（1）SEQ ID NO. 4胺基酸序列，或是（2）在所述SEQ ID NO. 4胺基酸序列中添加、缺失、取代或插入一個或多個胺基酸得到的胺基酸序列，且其保留所述NTNH的功能。

【請求項6】 如請求項1所述之A型肉毒桿菌毒素複合物，其中所述BoNT/A1包含下列任一項：（1）SEQ ID NO. 5胺基酸序列，或是（2）在所述SEQ ID NO.

5胺基酸序列中添加、缺失、取代或插入一個或多個胺基酸得到的胺基酸序列，且其保留BoNT/A1的功能。

【請求項7】 如請求項1~6中任一項所述之A型肉毒桿菌毒素複合物，其中在小鼠／動物實驗中，所述A型肉毒桿菌毒素複合物之治療有效劑量（ED50）為0.1~0.5U。

【請求項8】 如請求項1~6中任一項所述之A型肉毒桿菌毒素複合物，其中在小鼠／動物實驗中，所述A型肉毒桿菌毒素複合物之致死劑量（LD50）為1~5U。

【請求項9】 如請求項1~6中任一項所述之A型肉毒桿菌毒素複合物，在小鼠／動物實驗中，所述A型肉毒桿菌毒素複合物之安全邊際量（MOS）為2~50。

【請求項10】 一種核酸，其用以編碼如請求項1~6中任一項所述之A型肉毒桿菌毒素。

【請求項11】 一種藥物組合物，其包含：如請求項1~6中任一項所述之A型肉毒桿菌毒素複合物和藥學上或皮膚學上可接受的載體，其中所述醫藥組合物為凍乾形式。

【請求項12】 一種液體配製劑，其包含：如請求項1~6中任一項所述之A型肉毒桿菌毒素複合物。

【請求項13】 如請求項12所述之液體配製劑，其中所述液體配製劑還包含：人類血清白蛋白、甲硫胺酸、精胺酸、氯化鈉、Tween 80、檸檬酸鹽緩衝液、和／或磷酸鹽緩衝液。

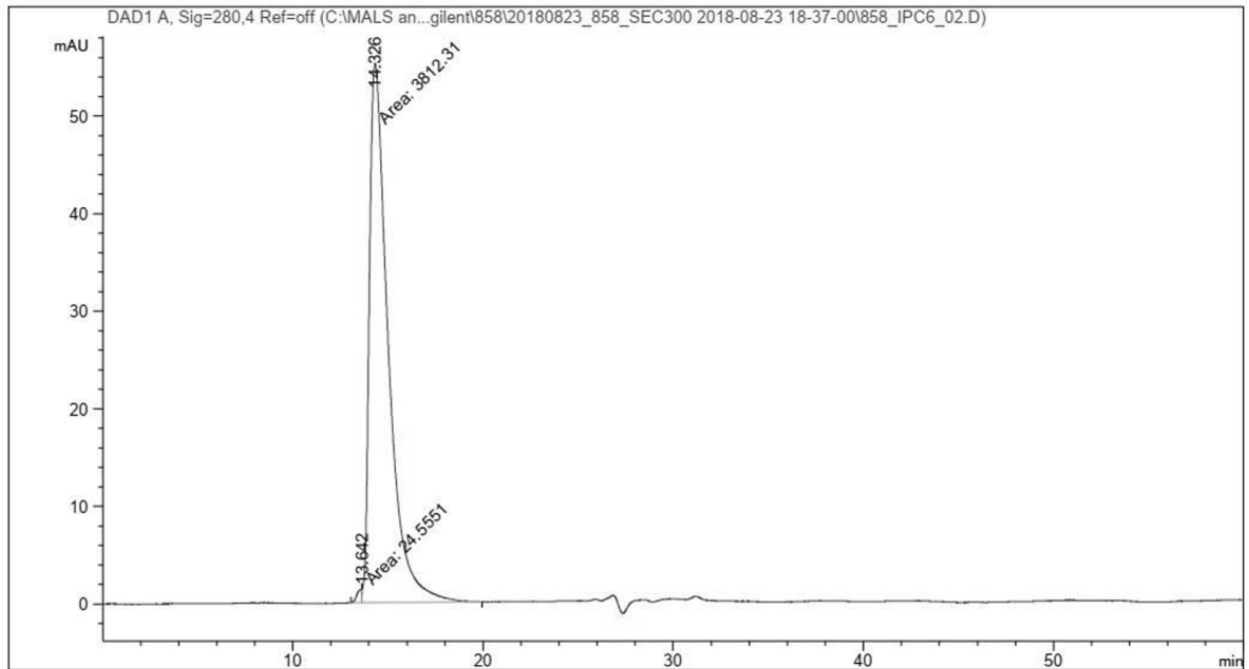
【請求項14】 一種將如請求項1~6中任一項所述之A型肉毒桿菌毒素複合物、如請求項11所述之藥物組合物、或如請求項12、13中任一項所述之液體配製

劑於製備美容用品之用途，其中所述美容用品用於臉部、眼睛、嘴角減少細紋和／或皺紋的外觀，或者一般性緩解肌肉張力。

【請求項15】 一種如請求項1～6中任一項所述之A型肉毒桿菌毒素複合物、如請求項11所述之藥物組合物、或如請求項12、13中任一項所述之液體配製劑用於製備治療或預防由乙醯膽鹼突觸傳遞或釋放引起的疾病之藥物的用途。

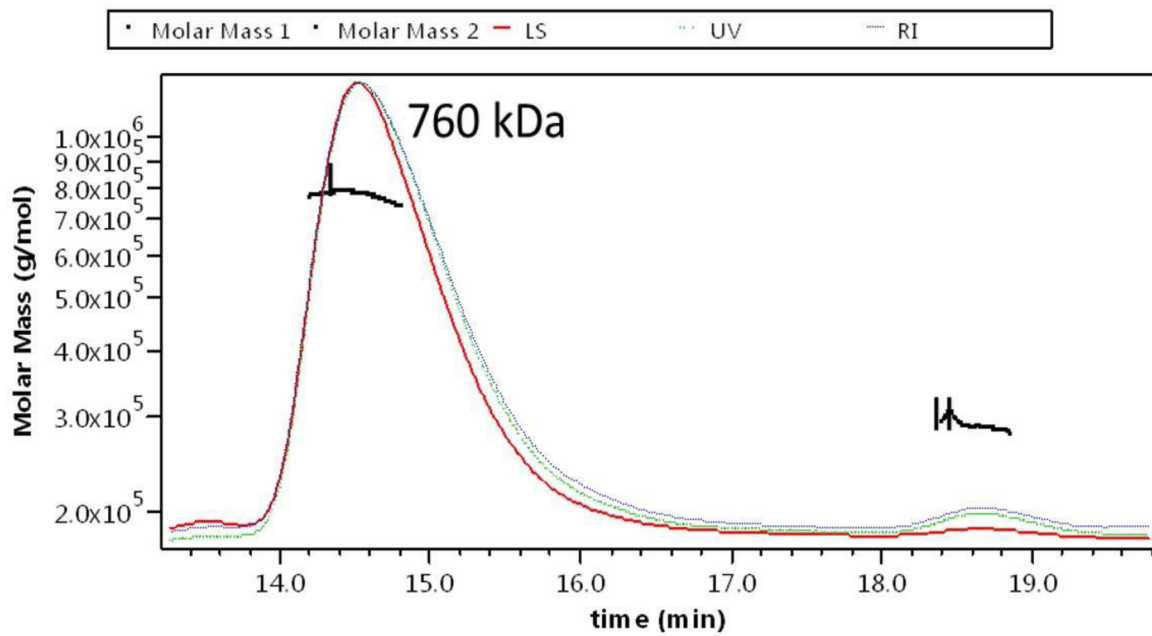
【請求項16】 如請求項15所述之藥物的用途，其中所述疾病選自以骨骼肌過度活躍為特徵的神經肌肉病症、神經疼痛、偏頭痛、膀胱活動過度、鼻炎、鼻竇炎、痤瘡、張力障礙、張力障礙性收縮、多汗症、膽鹼能神經系統控制的一個或多個腺體的分泌過多、偏側面肌痙攣、成人發作痙攣性斜頸，肛裂，臉痙攣，腦癱，頸肌張力障礙、斜視，顛頷關節病症和各種類型的肌肉抽筋和痙攣。

【發明圖式】



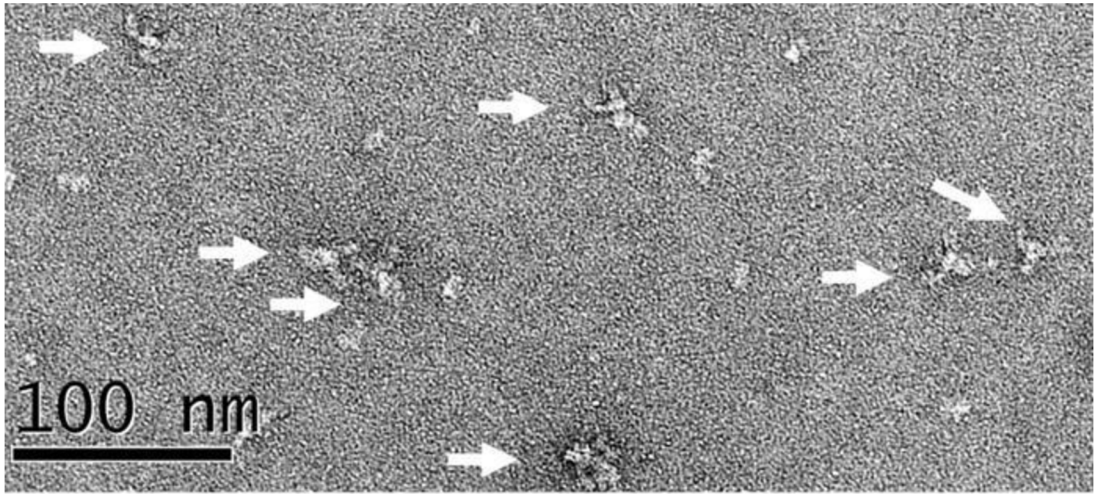
滯留時間 (分鐘)	峰寬 (分鐘)	峰高 (mAU)	峰面積	百分比(%)
13.642	0.2978	1.3745	24.5551	0.64
14.326	1.1506	55.2221	3812.31	99.36

【圖1】

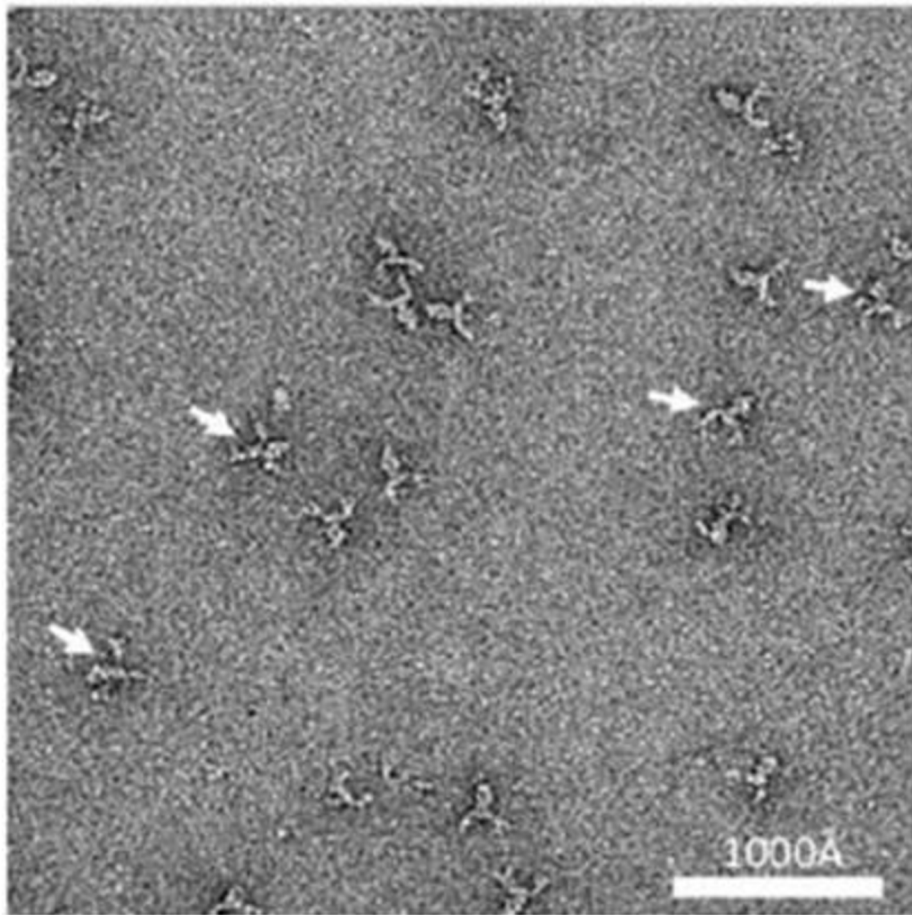


	RI ($dn/dc = 0.185$)	UV (EC=1.49)
平均	779	759

【圖2】

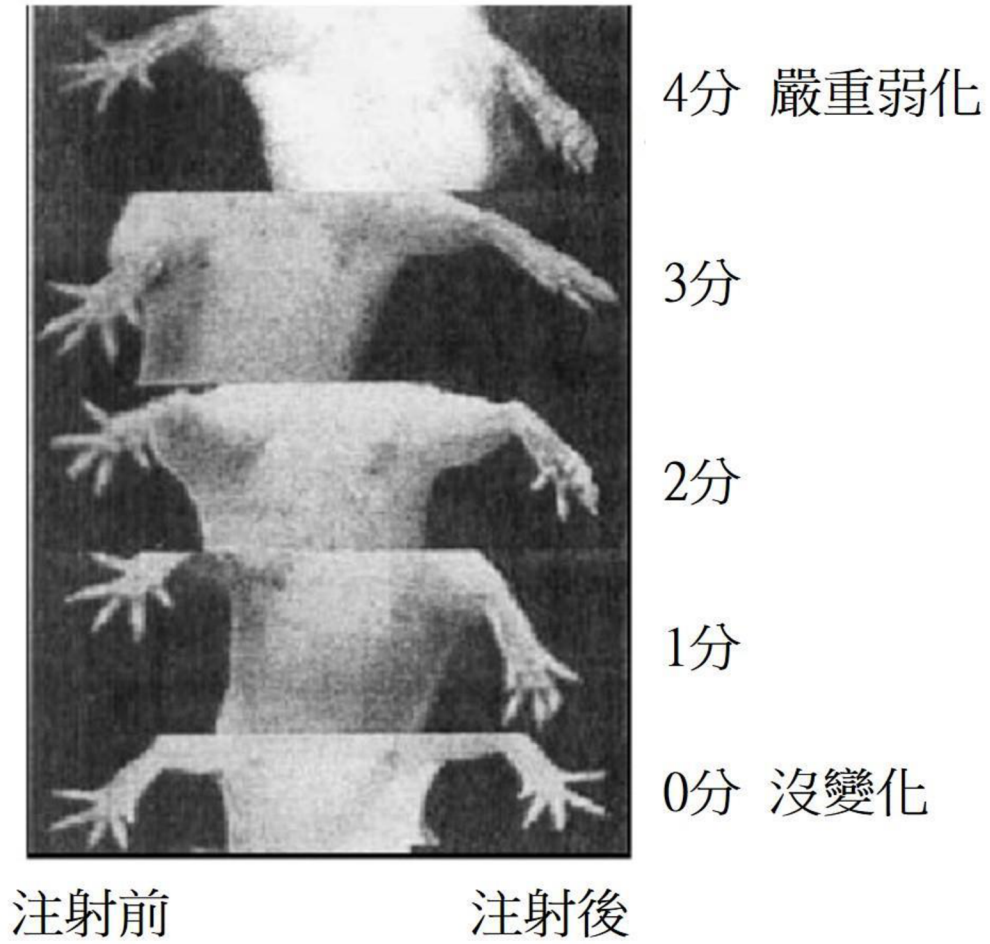


【圖3 (a)】



【圖3 (b)】

DAS 評分方法



【圖4】