



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202348248 A

(43)公開日：中華民國 112 (2023) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：112105172

(22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 02 月 14 日

(51)Int. Cl.：

*A61K38/16 (2006.01)**A61K35/74 (2015.01)**A61K38/38 (2006.01)**A61P25/00 (2006.01)*

(30)優先權：2022/02/15

歐洲專利局

22156843.9

2022/07/05

歐洲專利局

22183172.0

(71)申請人：德商梅茲製藥有限兩合公司 (德國) MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA (DE)
德國

(72)發明人：艾斯勒 卡爾海因茨 EISELE, KARL-HEINZ (DE)；芬克 克勞斯 FINK, KLAUS (DE)；泰勒 哈羅德 V TAYLOR, HAROLD V. (DE)；捷凱 克勞迪婭 JATZKE, CLAUDIA (DE)；庫巴赫 卡佳 KUBACH, KATJA (DE)

(74)代理人：祁明輝；林素華；涂綺玲

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：0 共 83 頁

(54)名稱

液體製劑及其製備方法與用途

(57)摘要

本發明涉及一種液體製劑，其包含(i)肉毒桿菌素、(ii)人類血清白蛋白和可選擇性的(iii)張力劑和/或(iv)緩衝劑。一方面，液體製劑的特徵在於鐵離子濃度非常低。另一方面，液體製劑的特徵在於不含或含濃度非常低的色氨酸和/或 N-乙酰基-色氨酸。根據本發明，液體製劑可以通過包括下述步驟的方法來製備：將人類血清白蛋白與螯合劑接觸以獲得混合物，並從混合物中移除螯合劑。此外，本發明涉及此液體製劑在治療適應症和美容狀況中的用途。

The present invention relates to a liquid formulation comprising (i) botulinum toxin, (ii) human serum albumin (HSA), and optionally (iii) a tonicity agent and/or (iv) a buffering agent. In one aspect, the liquid formulation is characterized by a very low iron ion concentration. In another aspect, liquid formulation is characterized by the absence or very low concentration of tryptophan and/or N-acetyl-tryptophan. According to the present invention, the liquid formulation can be prepared by a method comprising the steps of contacting human serum albumin with a chelating agent to obtain a mixture and removing the chelating agent from the mixture. Furthermore, the present invention relates to the use of the liquid formulation in the treatment of therapeutic indications and cosmetic conditions.

【發明摘要】

【中文發明名稱】液體肉毒桿菌素製劑及其用途

【英文發明名稱】LIQUID BOTULINUM TOXIN FORMULATION

AND USE THEREOF

【中文】

本發明涉及一種液體製劑，其包含(i)肉毒桿菌素、(ii)人類血清白蛋白和可選擇性的(iii)張力劑和/或(iv)緩衝劑。一方面，液體製劑的特徵在於鐵離子濃度非常低。另一方面，液體製劑的特徵在於不含或含濃度非常低的色氨酸和/或 N-乙醯基-色氨酸。根據本發明，液體製劑可以通過包括下述步驟的方法來製備：將人類血清白蛋白與螯合劑接觸以獲得混合物，並從混合物中移除螯合劑。此外，本發明涉及此液體製劑在治療治療適應症和美容狀況中的用途。

【英文】

The present invention relates to a liquid formulation comprising (i) botulinum toxin, (ii) human serum albumin (HSA), and optionally (iii) a tonicity agent and/or (iv) a buffering agent. In one aspect, the liquid formulation is characterized by a very low iron ion concentration. In another aspect, liquid formulation is characterized by the absence or very low concentration of tryptophan and/or

N-acetyl-tryptophan. According to the present invention, the liquid formulation can be prepared by a method comprising the steps of contacting human serum albumin with a chelating agent to obtain a mixture and removing the chelating agent from the mixture. Furthermore, the present invention relates to the use of the liquid formulation in the treatment of therapeutic indications and cosmetic conditions.

【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】液體肉毒桿菌素製劑及其用途

【英文發明名稱】LIQUID BOTULINUM TOXIN FORMULATION
AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種液體製劑，其包含(i)肉毒桿菌素(botulinum toxin，BT)、(ii)人類血清白蛋白(human serum albumin，HSA)以及選擇性的(iii)張力劑(tonicity agent)和/或(iv)緩衝劑。此液體製劑的特徵在於具有非常低的鐵濃度(iron concentration)和/或不包含或存在非常低濃度的色氨酸(tryptophan)和/或N-乙醯基-色氨酸(N-acetyl-tryptophan)；本發明特別是有關於一種通過下述方法所製備的液體製劑，此方法包括下述步驟：使用人類血清白蛋白(Human Serum Albumin)與螯合劑(chelating agent)接觸以獲得混合物，並從混合物中除去螯合劑。此外，本發明更涉及液體製劑在處理治療適應症(therapeutic indications)和美容狀況(cosmetic conditions)的用途。

【先前技術】

【0002】 肉毒桿菌神經毒素(Botulinum neurotoxins，BoNT；或肉毒桿菌素(BT))是一種細菌神經毒素家族，廣泛用於治療越來越多的

神經病學、醫學和美容狀況。有八種被廣泛接受的「經典」肉毒桿菌神經毒素血清型(BoNT serotypes)，後續以 BoNT/A-H表示之)。目前臨床所使用的兩種血清型為血清型A(以下簡稱BoNT/A)和血清型 B (以下簡稱BoNT/B)。肉毒桿菌神經毒素(以下簡稱BoNT)是由梭菌屬(Clostridium spp)，特別是肉毒梭菌(Clostridium botulinum)所產生的高分子量(高達約 900 kDa)形式的毒素複合物。這些毒素複合物由活性 150 kDa神經毒素和幾種複合蛋白(無毒神經毒素相關蛋白(non-toxic neurotoxin-associated proteins, NAPs，NAP))所組成。

【0003】 其中，150kDa神經毒素可以被合成為一種無活性的單鏈多肽(～150kDa)，其經過蛋白水解切割而可以形成一個輕鏈(LC，～50kDa)和一個重鏈(HC，～100kDa)，二者通過一個鏈間二硫鍵(inter-chain disulfide bond)相互連接。重鏈包括一個用於介導連結至受體的C 端結構域(C-terminal domain)和一個用於介導輕鏈錯位轉接(translocation)以橫跨內體膜(endosomal membranes)的 N 端結構域(N-terminal domain)。輕鏈在神經元中作為蛋白酶，用於裂解神經元 SNARE 蛋白。可阻止突觸囊泡(synaptic vesicle)與原生質膜(plasma membrane)的融合，從而抑制被選定的神經元釋放神經傳遞物質(neurotransmitters release)。

【0004】 由於BoNT的結構複雜性和所使用產品的低濃度，使得BoNT的配製非常具有挑戰性。BoNT對於各種條件(例如，熱且pH值呈鹼性)高度敏感。由於BoNT僅在其結構完整的情況下才具有功能，因此製備BoNT醫用劑型的挑戰是，配製一種組合物，可以在其生產、

儲存或使用過程中，保護產品中的BoNT免於失效(*inactivation*)或部分喪失生物活性。另一個問題是，BoNT的醫藥製劑包含極少量的高效毒素(人類致死劑量為約0.1至1ng/kg)，且每瓶僅約1ng。這加劇了起因於表面變性(*surface denaturation*)所導致的毒素活性喪失的問題。此外，BoNT製劑廣泛使用在不同應用領域，因此必須適合注射到不同類型的組織，例如肌肉、不同皮膚層(例如真皮、皮下組織)或腺體(例如唾液腺)。

【0005】鑑於上述情況，目前市面上的主要BoNT產品均以冷凍乾燥粉末(*lyophilized powders*)的形式提供，即在2-8°C甚至室溫下保存時，可以長期穩定的形式(例如Xeomin®)。冷凍乾燥形式的二種BoNT/A複合物，分別於1989年(Botox®, Allergan)和 1991年(Dysport®, Ipsen)首次投放市場。2005年，第一個不含複合蛋白的純150 kDa BoNT/A神經毒素的穩定劑型獲得批准(Xeomin®; Merz Pharmaceuticals)。然而，這些冷凍乾燥產品需要在使用前復溶(*reconstituted*)，這一過程可能會衍生劑量錯誤和無菌問題。因此，人們致力於開發更方便使用且易於給藥的BoNT液體製劑。

【0006】第一個BoNT液體製劑於2000年獲得批准，並於2001年在歐洲上市，名為 Neurobloc®。Neurobloc®(Eisai)是一種 BoNT/B複合物的無菌溶液，其配製在含有琥珀酸二鈉(*disodium succinate*)、氯化鈉、人類血清白蛋白(HSA)、辛酸鈉和 N-乙醯基色氨酸鈉的緩衝液中。然而，由於該產品的pH值為酸性，注射時可能會感到疼痛。對於 BoNT/A，迄今為止只有兩種液體製劑獲得上市批准：Innotox®

(Medytox)，但僅限於亞洲國內市場(例如韓國，2013年批准)，及 Alluzience® (Ipsen/Galderma)，後者已獲批准將於 2021 年在歐洲使用。這兩種液體製劑均含有 BoNT/A 毒素複合物，此外還含有水、氯化鈉、除污劑(detergent，Innotox®：聚山梨酯 20；Alluzience®：聚山梨酯 80)、氨基酸(Innotox®：蛋氨酸；Alluzience®：組氨酸)和額外的賦形劑(Innotox®：作為緩衝劑的磷酸鈉；Alluzience®：蔗糖)。

【0007】 儘管在液體肉毒桿菌素製劑的製備方面取得了這些進展，但仍然需要穩定的肉毒桿菌素液體製劑，特別是仍然需要新的選擇，開發在運輸和儲存過程中保持穩定的即用型肉毒桿菌素液體製劑。

〔發明目的〕

【0008】 因此，本發明的一個目的是提供一種穩定且適用於美容和治療應用的肉毒桿菌素液體製劑。

【發明內容】

【0009】 本發明係基於下述令人驚奇的發現：其中，將經過預處理的人類血清白蛋白(HSA)與螯合劑(例如 EDTA)一起醞釀(incubating)，隨後移除螯合劑，可以製備出表現出優異存儲穩定性及優異光穩定性(light stability)的肉毒桿菌素液體製劑。此外，本發明係基於以下述令人驚奇的發現：其中，鐵離子，特別是 Fe^{3+} 離子，對含有人類血清白蛋白的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性具有有害影響。

【0010】此外，本發明係基於下述令人驚訝的發現：其中，色氨酸和N-乙醯基-色氨酸會降低含有人類血清白蛋白(HSA)的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性。這一發現非常令人驚訝，因為市售人類血清白蛋白產品中，除了水和氯化鈉之外，通常還含有辛酸鈉(sodium caprylate)和 N-乙醯色氨酸，用以使人類血清白蛋白在高溫下包持穩定，從而將其加入肉毒桿菌素製劑中。更令人驚訝的是，色氨酸被習知技術描述為是肉毒桿菌素的穩定添加劑(參見例如EP 3 679 946)。

【0011】因此，在第一方面，本發明提供了一種液體製劑，其包含：

(i) 肉毒桿菌素；以及

(ii) 人類血清白蛋白(HSA)，

其中液體製劑含有濃度小於 $1\mu\text{M}$ 、較佳小於 500nM 、更佳小於 250nM 、最佳小於 100nM 的 Fe^{3+} 離子。

【0012】具有低 Fe^{3+} 濃度(例如，小於 $1\mu\text{M}$)的液體肉毒桿菌素製劑，可以通過下述方法來製備，此方法包括步驟(a)將人類血清白蛋白與螯合劑接觸，以獲得人類血清白蛋白和螯合劑的混合物；以及步驟(b)從混合物中移除螯合劑。

【0013】在第二方面，本發明提供了一種液體製劑，其包括

(i) 肉毒桿菌素；以及

(ii) 人類血清白蛋白(HSA)；

其中，液體製劑不包含色氨酸和N-乙醯基-色氨酸，或者含有濃度不超過 $50\mu\text{M}$ ，較佳不超過 $20\mu\text{M}$ ，更佳不超過 $10\mu\text{M}$ ，還更佳不超過

1 μ M，最佳為0 μ M，的色氨酸和 N-乙醯色氨酸(色氨酸和 N-乙醯色氨酸的總濃度)。

【0014】 根據本發明的第一和第二方面的液體製劑較佳更包括(iii)張力劑，特別是氯化鈉，和(iv)緩衝劑，特別是組氨酸緩衝劑、磷酸鹽緩衝劑或它們的混合物。此種不含或僅含有極低濃度的色氨酸和/或N-乙醯基-色氨酸的液體肉毒桿菌素製劑，可以通過(例如，採用透析法(dialysis))純化人類血清白蛋白(HSA)起始材料，以及將純化後的人類血清白蛋白(HSA)材料加入本發明的液體製劑的配方中，來加以製備。

【0015】 在第三方面，本發明提供了一種液體製劑，其包括：

(i) 肉毒桿菌素；以及

(ii) 人類血清白蛋白(HSA)，

其中，人類血清白蛋白的製備方法包括以下步驟：

(a)使人類血清白蛋白與螯合劑接觸，以獲得人類血清白蛋白和螯合劑的混合物；以及

(b)從混合物中移除螯合劑。

【0016】 此接觸步驟(a)的進行，較佳係將螯合劑(例如，EDTA)添加到包含有人類血清白蛋白的組合物(例如，人類血清白蛋白溶液)之中；並且將所得到的混合物醞釀一段預定時間；隨後選擇性地對含有螯合劑(例如 EDTA)的緩衝液進行透析。在步驟(b)中，通過任何合適的方法(例如，通過透析)移除螯合劑。

【0017】 此外，根據本發明第三方面的液體製劑較佳還包括(iii)張力劑，特別是氯化鈉，和/或(vi)緩衝劑，特別是由組氨酸緩衝劑、磷酸鹽緩衝劑或上述之組合。

【0018】 在第四方面，本發明涉及一種根據本發明第二方面所述的液體製劑的製備方法，其中該方法包括以下步驟：

-純化人類血清白蛋白起始材料，藉以獲得純化後的人類血清白蛋白材料。例如對人類血清白蛋白起始材料進行透析、滲濾(diafiltration)、超濾(ultrafiltration)、離子交換層析(ion exchange chromatography, IEC)、親和層析(affinity chromatography)、疏水作用層析(hydrophobic interaction chromatography, HIC)或場流分離(field-flow fractionation)，較佳係進行透析；

-將純化所獲得的人類血清白蛋白與肉毒桿菌素以及選擇性的其他組成分加以混合，藉以獲得此液體製劑。

【0019】 根據本發明第四方面的一個替代方法，其包括以下步驟：

-純化包含肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體組合物，藉以獲得純化後的液體組合物。例如對包含肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體組合物進行透析、滲濾、超濾、離子交換層析、親和層析、疏水作用層析或場流分離，較佳係進行透析；

-將純化所獲得的液體組合物與另外的組成分混合，以獲得此液體製劑。

【0020】 在第五方面，本發明涉及根據本發明的液體製劑用於治療，特別是用於治療神經肌肉疾病(neuromuscular diseases)、疼痛、

流口水(sialorrhea)、多汗症(hyperhidrosis)、泌尿系統疾病和神經系統疾病，的用途。

【0021】 在第六方面，本發明是有關於一種使用本發明的液體製劑來處理美容狀況、較佳為皮膚狀況、特別是處理皮膚細紋或褶皺或皺紋的美容(醫美 (aesthetic))用途。

【0022】 在第七方面，本發明提供了一種治療疾病或適應症的方法，包括向有需要的人施用有效劑量之本發明的液體製劑。

【0023】 根據本發明所提供的較佳液體製劑、其用途和使用方法的實施例，將在後附的申請專利範圍中加以闡述。

【0024】 通過參考本發明下述說明書的詳細描述和其所包含的具體實施例，可以更容易地理解本發明的精神範圍。

【圖式簡單說明】

【0025】 無。

【實施方式】

【0026】 本發明基於以下意外發現：在液體肉毒桿菌素製劑的配方中使用經過預處理的人類血清白蛋白(HSA)來降低其光敏感性，因而藉以改善光穩定性。此外，出乎意料地發現，通過螯合劑處理，隨後進行透析，可實現極低量的鐵離子(Fe^{3+} 離子)，進而顯著地增強含有人類血清白蛋白(HSA)之液體肉毒桿菌素製劑的光敏感性。這個發現令人驚訝，因為鐵相對常見且普遍存在，此外，發現其他金屬離子如銅、鈷或鎳，並不會表現出這種不穩定效應。

【0027】此外，本發明基於以下意外發現：色氨酸和/或N-乙醯基色氨酸會損害含有人類血清白蛋白(HSA)的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性(耐光性(photostability))。特別地，發現藉由螯合劑處理和隨後的透析，可以從傳統人類血清白蛋白(HSA)產品中移除N-乙醯基-色氨酸，以改善含有人類血清白蛋白的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性。

【0028】與粉末形式的冷凍乾燥肉毒桿菌素製劑相比，本發明的液體製劑由於在注射之前不需要復溶，而是可以立即使用(ready-to-use)，並且可以以例如，預充式注射器(prefilled syringe)的方式進行使用，因此可以有利地提供更進步的安全性和劑量準確度。此外，液體製劑優異的穩定性有利並簡化運輸和儲存以及醫生的操作。具體而言，本發明的液體製劑的優異光穩定性，可以簡化製造過程，允許產品在沒有大量光保護的情況下進行填充和包裝，並且可以減少在醫療人員處因使用前光照儲存所導致的潛在活性損失。此外，本發明的液體製劑不含可能導致增強注射疼痛的物質，從而增加了醫療人員和患者對製劑的接受度，特別是在美容領域。

【0029】不受理論的束縛，據信本發明所提供的製劑光敏感性，與用來製備液體肉毒桿菌素製劑的人類血清白蛋白(HSA)中所包含的物質(例如N-乙醯色氨酸和 Fe^{3+})有關。然而，這些物質的移除，是如何增強人類血清白蛋白(HSA)穩定肉毒桿菌素以對抗光線的能力，其確切的機制目前仍不清楚。

【0030】如本說明書中所使用的，用語「包括」，例如用語「包含」和「含有」以及其任何變體，例如主動型態的「包括」、「包含」

和「含有」，係指非排他性的包含(non-exclusive inclusion)，使得包括、包含或含有某元件或元件列表的製程、方法、製程產品、組合物或製劑不僅包括所述的那些元件，而且可以包括未明確列示於這些製程、方法、製程產品、組合物或製劑中的其他元件。此外，在本發明的框架內，用語「包括」「包含」、「含有」、主動型態的「包括」、「包含」和「含有」中的每一者及其任何變體，都可以被「由.....組成」或主動型態的「由.....組成」或其任何變體(例如，「基本上由...組成」)所代替。其中，「由.....組成」被理解為僅僅包括所指涉元件的排他性包含(exclusive inclusion)。

【0031】 在本發明的上下文中使用的用語「一」和「一個」和「該」以及類似的用法，應被解釋為包含單數和復數兩種意義。因此，除非本說明書另有說明或與上下文有特別指明，否則其也包含「至少一個」或「多於一個」。

【0032】 本說明書中的用語「液體製劑」或「液體肉毒桿菌素製劑」，通常是指含水製劑(aqueous formulation)並且通常是水溶液。本說明書中用語「液體製劑」可以與「液體組合物」互換使用。液體製劑通常是藥學上可接受的含水製劑，或者換言之，液體藥物製劑。本發明的液體製劑其pH範圍通常介於5.0至8.0之間；特別是介於5.5至7.5之間；且較佳是介於5.5至7.0或介於6.0至7.5之間，更佳是介於6.0至7.0之間。且最佳介於6.0至6.5之間。

【0033】 本說明書中的用語「藥學上可接受的」，是指液體製劑在施加於人類患者或受試者時不會引起不可接受的不良副作用。即，

這意味著此液體製劑適合人類使用。液態溶液可以是一種含有或不含有鹽水溶液的緩衝溶液，並且可以是生理鹽溶液，例如緩衝的(例如，以磷酸鹽和/或組氨酸進行緩衝的)生理鹽溶液。

【0034】 本說明書預期本發明的液體製劑可以被儲存在任何合適的容器系統中。用於儲存本發明的液體製劑的合適的容器系統是具有部分或完全封閉的空間的任何裝置，此空間可以被密封或被密封並且可以用於容納、儲存和/或運輸液體製劑。容器系統較佳是主要或部分由玻璃或塑膠(例如，有機聚合物)所製成的封閉(或密封)容器，並且包括例如以下形式的容器：(i)注射針筒(syringe)、(ii)指管(vial)、(iii)卡普耳(carpule)或(iv)安瓿(ampoule)。在本發明的一個較佳實施例中，液體製劑以預填充注射針筒的形式儲存在，如本領域已知的注射針筒之中。

【0035】 本說明書中的用語「肉毒桿菌素」不受特別限制，並且包括任何血清型的肉毒桿菌素(例如，BoNT/A-G)。例如，肉毒桿菌素可以是血清型A或B(BoNT/A、BoNT/B)。較佳的肉毒桿菌素為血清型A，更佳為血清型A1肉毒桿菌素(以下簡稱BoNT/A1)，最佳是由肉毒梭菌Hall菌株所產生的BoNT/A1。另外，肉毒桿菌素可以是可從肉毒桿菌屬的細菌中所獲得的天然神經毒素，或者可以是從任何其他的肉毒桿菌素，例如可以是從包括重組技術和遺傳或化學修飾等替代來源中所獲得的肉毒桿菌素。

【0036】 此外，如本說明書中的用語「肉毒桿菌素(BT)」和同義用語「肉毒桿菌神經毒素(BoNT)」，除非另有說明或上下文特別指明，

否則其係指純BoNT和/或其複合物。即，純BoNT和其複合蛋白的任何複合物(稱為「毒素複合物(toxin complex)」)。較佳地，在本發明的框架內，肉毒桿菌素是一種不含複合蛋白的BoNT，更佳地是一種不含血清型A複合蛋白的BoNT。

【0037】 本說明書中的用語「純肉毒桿菌神經素」，是指不含複合蛋白的肉毒桿菌神經毒素(有時也稱為「神經毒性組成分(neurotoxic component)」)，或更準確地說，是指不含神經毒素相關複合蛋白(neurotoxin-associated complexing proteins, NAPs)的肉毒桿菌神經素。此純肉毒桿菌神經毒素是一種(活性)神經毒性多肽，最終會抑制乙醯膽鹼(acetylcholine)釋放。它是一種雙鏈蛋白，由一條輕鏈(LC；約 50 kDa)和一條重鏈(HC；約 100kDa)所組成，二者通過一個二硫鍵連接在一起。因此，活性神經毒性多肽在本說明書中也可以稱為「150kDa神經毒素」、「肉毒桿菌神經毒素(150kDa)」或「神經毒性組成分」。

【0038】 本說明書中的用語「毒素複合物」，是指神經毒性組成分和一組複合蛋白(NAP)的高分子複合物。具體地，用語「毒素複合物」包括900kDa、500kDa和300kDa血清型A肉毒桿菌毒素複合物。複合蛋白是無毒的非血球凝集素(nontoxic nonhaemagglutinin NTNHA)，並且在血清型 A-D的菌株中是不同的血球凝集素(haemagglutinins, HA)。例如，900kDa複合物包含於onabotulinumtoxin A (Botox®/Vistabel®, Allergan, Inc., Irvine, CA, USA)之中。此外，作為活性劑的毒素複合物，也包含於Dysport® (Azzalure®, Ipsen, Paris, France)、Alluzience® (Ipsen/Galderma) 和 Innotox® (Medytox)之

中。也就是說，Botox®、Dysport®、Alluzience®和Innotox®中所包含的毒素複合物，是本發明含義內的毒素複合物。也就是本發明所述的「肉毒桿菌素」。根據本發明，肉毒桿菌素存在於本發明的液體製劑中的濃度範圍，可以介於1U/ml至1000U/ml之間，較佳介於10U/ml至200U/ml之間，更佳介於20U/ml至150U/ml之間，且最佳介於50U/ml至100U/ml之間。

【0039】 本說明書中的用語「單位」或「U」是指毒素的生物活性(生物效價(biological potency))，以及涉及對50%的測試小鼠致死的劑量(LD50)。更具體地，在本發明的上下文中，除非另有說明，否則LD50使用小鼠生物測定法(mouse bioassay，MBA)來進行測量。小鼠生物測定法可測定小鼠在腹腔注射之後，毒素/神經毒素的平均致死劑量(LD50)，即能夠殺死一組小鼠中的50%的毒素/神經毒素劑量。在此基礎上，本說明書所用的1單位(U)毒素/神經毒素，係定義為一隻小鼠的LD50($1.0LD50 = 1.0U$)。

【0040】 LD50小鼠生物測定法是肉毒桿菌素的各種生物、化學或免疫學檢測方法中的黃金標準，且是本領域的技術人員已知的(參見，例如，Pearce, L. B.; Borodic, G. E.; First, E. R.; MacCallum, R. D. Measurement of botulinum toxin activity: Evaluation of the lethality assay. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1994, 128:69-77)。本領域的技術人員能夠根據血清型和預定的用途來決定合適的肉毒桿菌素濃度。或者，採用以細胞為基底的(效價)分析法(cell-based assay)來測定肉毒桿菌素的活性，如WO 2009/114748、WO 2013/049508或

WO2014/207109中所述。本領域的技術人員將能夠藉由採用LD50參考標準來進行的校正，來將執行以細胞為基底的分析所獲得的肉毒桿菌素活性結果，與執行小鼠LD50測定所獲得的結果產生關聯。

【0041】 由於市售肉毒桿菌素製劑製造商使用的 LD50 測試方法存在差異，製造商用來指示其市售肉毒桿菌素製劑的單位效價是專有的，無法輕易進行比較。因此，在本發明的框架內，以下所提供的轉換率，可用於建立下述物質的比較效價: incobotulinumtoxinA (「INCO」; Xeomin®, Bocouture®; botulinum toxin serotype A, free of complexing proteins; Merz Pharmaceuticals GmbH), onabotulinumtoxinA (「ONA」; Botox®, Vistabel®; botulinum toxin complex of serotype A; Allergan Inc.), abobotulinumtoxinA (「ABO」; Dysport®, Azzalure®; botulinum toxin complex of serotype A; Medicis Pharmaceutical Corp., Galderma Lab.), rimabotulinumtoxinB (「RIM」; Myobloc®, NeuroBloc®; botulinum toxin serotype B; Solstice Neurosciences Inc.), and PurTox® (「TBD」; botulinum toxin serotype A; Mentor Worldwide LLC)。在本說明書中，ONA和INCO的轉化率為1:1。ONA/INCO:ABO的轉換率為1:2.5。ONA/INCO:RIM的轉換率為1:50。ONA/INCO:TBD的轉換率為1:1.5。此外，在本發明的上下文中，1U的INCO (Xeomin®)和1U的onabotulinumtoxinA (「ONA」; Botox®)應被定義為對應於一隻小鼠的LD50 (1.0LD50)，或如上所述方法測量所得的1U。

【0042】 本說明書中的用語「人類血清白蛋白」或其縮寫「HSA」，意指一種供體HSA (donor HSA)(一種源自人類血液的HSA，或更準確地說，一種源自人類血漿的HSA)和一種重組HSA。較佳地，人類血清白蛋白是一種供體HSA。在本發明中，人類血清白蛋白(HSA)係用來作為穩定蛋白(stabilizing protein)。本說明書中的用語「穩定蛋白」，通常是指能增進肉毒桿菌素之穩定性的多肽。根據本發明，HSA在液體製劑中的含量可以介於0.001% w/v至2.0% w/v之間，較佳介於0.001% w/v至1.00% w/v之間，更佳係介於0.01% w/v至0.5% w/v之間。又更加係介於0.02% w/v至0.3% w/v之間，最佳係介於0.03% w/v至0.15% w/v之間。

【0043】 在第一方面，本發明涉及一種液體製劑，其包含

(i) 肉毒桿菌素，以及

(ii) 人類血清白蛋白，

其中液體製劑含有濃度小於1 μ M的Fe³⁺離子。

【0044】 較佳地，液體製劑中的Fe³⁺的濃度小於1000nM、小於750nM、小於500nM或小於250nM，更佳地，液體製劑中的Fe³⁺濃度小於200nM、小於150nM，或小於100nM，特別較佳地，液體製劑中的Fe³⁺濃度小於50nM或小於10nM，並且最佳地，液體製劑中的Fe³⁺濃度小於1nM、小於100pM、小於10 pM，或小於1pM。

【0045】 金屬離子(例如，Ca²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺或Fe³⁺)的濃度可以通過本領域技術人員已知的測量方法，例如採用原子

吸收光譜法(atomic absorption spectroscopy, AAS)、感應耦合電漿質譜儀(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)和感應耦合電漿原子發射光譜儀(inductively coupled plasma atomic emission spectrometer, ICP-AES)(也稱為感應耦合電漿放射光譜儀 (inductively coupled plasma optical emission spectrometry, ICP-OES)), 來進行測定。較佳地, 可以採用ICP-MS或ICP-OES, 特別是ICP-OES, 來量金屬離子的濃度(另請參見Second Supplement to USP38-NF 33, Chemical Tests/<233>Elemental Impurities—Procedure 1 (ICP-OES) and Procedure 2 (ICP-MS), 201)。

【0046】 不受理論的限制, 據信本發明用於製備液體製劑的HSA材料, 特別是含有大量鐵離子的源自於人類血液的供體HSA, 含有大量的 Fe^{3+} , 其(至少部分地)導致未純化(未經處理)的HSA具有光敏誘導特性(photosensitivity-inducing properties)。

【0047】 除了上述優點之外, 本發明的這一方面還有利於製造程序和新制劑的開發。例如, 可以選擇設備(例如容器)和材料(例如賦形劑)以使最終產品中存在盡可能少的鐵。

【0048】 本發明的具有低 Fe^{3+} 濃度的液體肉毒桿菌素製劑, 可以通過下述方法進行製備, 此方法包括步驟(a)將人類血清白蛋白與螯合劑接觸, 藉以獲得人類血清白蛋白和螯合劑的混合物的, 以及步驟(b)從混合物中移除螯合劑。

【0049】 較佳地，本發明第一方面的液體製劑的製備方法與本發明第三方面所述的方法相同。此外，根據本發明的第一方面的液體製劑，可以具有與根據本發明的第三方面的液體製劑相同的組成分。因此，除非另有明確說明，對根據本發明第三方面的液體製劑給出的所有解釋、評論、公開、定義等，同樣適用於根據本發明第一方面的液體製劑。

【0050】 在第二方面，本發明涉及一種液體製劑，其包含

- (i) 肉毒桿菌素，以及
- (ii) 人類血清白蛋白，

其中液體製劑不含或含有不超過 $50\mu\text{M}$ 色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。

【0051】 本說明書中的用語「不含」色氨酸和N-乙醯基-色氨酸，是指液體製劑中沒有或完全不包含色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。具體來說，這意味著該製劑不含添加的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。或者，這意味著液體製劑中色氨酸和N-乙醯基色氨酸的濃度為 $0\mu\text{M}$ (即，根據四捨五入的一般規則 $<0.5\mu\text{M}$)。特別是 $\leq 0.1\mu\text{M}$ 或 $\leq 0.01\mu\text{M}$ 或 $\leq 0.001\mu\text{M}$ ，更具體地為 0nM (即，根據四捨五入的一般規則 $<0.5\text{nM}$)。本說明書中的用語「含有不超過...」的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸，是指所含有的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸總量可以 $\leq 50\mu\text{M}$ ，且較佳 $\leq 20\mu\text{M}$ ，更加 $\leq 10\mu\text{M}$ ，還更佳 $\leq 1\mu\text{M}$ ，又更佳 $\leq 0.1\mu\text{M}$ ，且最佳 $\leq 0.01\mu\text{M}$ 或 $\leq 0.001\mu\text{M}$ 。因此，本說明書中的用語「不含或含有不超過...」，是指液體製劑中色氨酸和N-

乙醯基-色氨酸的總量介於 $0\mu\text{M}$ 與 X 之間，或介於 0nM 與 X 之間，其中 X 可以為 $50\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 、 $0.01\mu\text{M}$ 和 $0.001\mu\text{M}$ 。

【0052】 氨基酸色氨酸和N-乙醯基-色氨酸的濃度可以藉由本領域技術人員已知的各種技術(例如，DC、HPLC、LC-MS、GC-MS、CE等)來加以測定。例如，N-乙醯基-色氨酸可以通過使用如 Nelis 等人所述。(Nelis et al., J. Chromatogr., 1985, 333(2):381-387)的液相層析法(liquid chromatography)，在逆相層析管柱(reversed-phase column)上，以波長280 nm 的UV 來進行測定；或者通過如 Yu 和 Finlayson 所述(Yu, M. W. and Finlayson, J. S., J. Pharm. Sci., 1984, 73(1):82-86)，基於蛋白質沉澱後剩餘的酸可容組成分的 UV 分光光度法來進行測定。例如，可以使用如Wentao等人所述(Wentao et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 401:3249-3261)包含液相串聯式質譜儀(liquid chromatography-tandem mass spectrometry)的方法來定量測定色氨酸。

【0053】 本說明書中的用語「色氨酸」是指L-色氨酸(L-tryptophan)、D-色氨酸(D-tryptophan)或L-色氨酸和D-色氨酸的混合物(D/L-色氨酸(D/L-tryptophan))。同樣地，本說明書中的用語「N-乙醯基-色氨酸」是指N-乙醯基-L-色氨酸(N-acetyl-L-tryptophan)、N-乙醯基-D-色氨酸(N-acetyl-D-tryptophan)或N-乙醯基-L-色氨酸和N-乙醯基-D-

色氨酸的混合物 (N-乙醯基-D/L-色氨酸 (N-acetyl-D/L-tryptophan))。

【0054】 用於製備液體製劑的人類血清白蛋白較佳為含有不超過50mM、更加為含有不超過20mM或10mM、還更佳為含有不超過1mM或0.1mM的人類血清白蛋白材料，最佳為含有不超過0.01nM或0mM的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。

【0055】 需要指出的是，市售的供體HSA產品均含有大量(>10mM)的N-乙醯基-色氨酸。因此，在用於配製本發明的液體製劑之前，需要純化此類產物，藉以將N-乙醯基-色氨酸的量降低至所需水平。以下結合本發明的第四方面詳細描述製備「純化後的HSA」的合適方法。簡而言之，可以通過對人類血清白蛋白起始材料進行透析、滲濾、超濾、離子交換層析、親和層析、疏水作用層析、場流分離或沉澱(precipitation)(例如，鹽析 (salt precipitation)、乙醇沉澱 (ethanol precipitation))，以移除色氨酸和/或N-乙醯基-色氨酸，獲得不含色氨酸和N-乙醯基色氨酸或含有少量色氨酸和N-乙醯基色氨酸的人類血清白蛋白(本說明書也稱為「純化後的HSA」)。

【0056】 根據本發明，本發明的液體製劑，例如根據本發明的第一、第二和/或第三方面的液體製劑，可以進一步包含如下文所詳述的(iii)張力劑和(iv)緩衝劑中的一種或兩種，特別是在與根據本發明的第三方面有關的液體製劑中。

【0057】 此外，本說明書還預期根據本發明第二方面的液體製劑較佳含有濃度小於1000nM的 Fe^{3+} 離子。具體地，液體製劑中的 Fe^{3+} 離子濃度較佳小於750nM、小於500nM或小於250nM；更佳地，液體製劑中的 Fe^{3+} 離子濃度小於200nM、小於150nM或小於100nM；特別佳地，液體製劑中的 Fe^{3+} 離子濃度小於50nM或小於10nM，且最佳地，液體製劑中的 Fe^{3+} 離子濃度小於1nM、小於100pM、小於10pM，或小於1pM。

【0058】 如上所述，還發現 Fe^{3+} 離子會降低肉毒桿菌素的光穩定性，從而增強色氨酸和 N-乙醯色氨酸的不穩定作用。據信，用於製備本發明的液體製劑的HSA材料，特別是源自人類血液的供體HSA，含有大量的 Fe^{3+} 離子，這會導致未純化的(未處理的)HSA的光穩定性特性降低。為了實現盡可能低的 Fe^{3+} 離子濃度，製造設備(例如，容器)和材料(例如，賦形劑)應有所選擇，藉以確保最終產品中鐵含量盡可能少。例如用於製造的容器應選擇不含鐵的材料，例如聚丙烯或聚碳酸酯。

【0059】 金屬離子(例如， Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Ni^{2+})的濃度，可以通過本領域技術人員已知的和上述公開的測量方法來測定。

【0060】 本發明的液體肉毒桿菌素製劑中低 Fe^{3+} 含量可以通過結合本發明的第四方面詳細描述的方法來實現，特別是通過如本說明書所述的方法來實現。此方法包括將人類血清白蛋白與螯合劑接觸，然後移除螯合劑。

【0061】 根據本發明，除非另有說明或指名，否則液體製劑還可以包含一種或多種藥學上可接受的額外賦形劑。例如，液體製劑可以包含甘油、蔗糖、乳糖、甘露醇、葡聚醣、透明質酸、聚乙烯吡咯烷酮、乳酸、檸檬酸、氨基酸(除了色氨酸和 N-乙醯基-色氨酸之外)、苯甲醇、利多卡因、明膠、羥乙基澱粉(hydroxyethyl starch, HES)、聚環氧乙烷和聚山梨酯(例如聚山梨酯 20 和聚山梨酯 80)中的一種或多種。其他合適的藥學上可接受的賦形劑，包括本領域熟知者，例如可參見: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania。

【0062】 本說明書還預期本發明所提供的液體製劑特別缺乏某些組成分(即，化合物、材料或物質)，例如特別缺乏螯合劑和/或磷酸鹽、去污劑、多醣、氨基酸、穩定胜肽(stabilizing peptides)等，包括其任何組合。本說明書中的用語「去污劑」與「界面活性劑」同義，並且旨在包括非離子型和離子型去污劑。本說明書中的用語「穩定胜肽」，通常是指由5至50個氨基酸所組成的胜肽，例如由10至40個氨基酸或15至30個氨基酸所組成的胜肽。因此，用語「穩定胜肽」並不包括HSA。

【0063】 在一個實施例中，本發明的液體製劑不含去污劑，特別是不含聚山梨酯，更特別地不含聚山梨酯20和/或聚山梨酯80。在另一實施例中，本發明的液體製劑不含有聚山梨酯20和/或聚山梨酯80。不含海藻酸鹽。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含琥珀酸鹽。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不

含有一種或多種(例如，2種、3種、4種或5種)選自由由精氨酸、谷氨酸、甲硫氨酸、色氨酸和絲氨酸組成的一組氨基酸。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含有糖，例如單醣、寡醣或多醣或其混合物。具體地，本發明的液體製劑可以不含蔗糖、乳糖、麥芽糖和海藻糖中的一種或多種(例如，2種、3種或4種)。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含有螯合劑，特別是不含本說明書中所描述與本發明相關的那些螯合劑，和/或磷酸鹽。本發明還預期液體製劑缺乏多於一種或所有上述化合物。

【0064】 在一個實施例中，本發明的液體製劑缺乏(i)去污劑和單醣、寡醣和多醣，(ii)去污劑和任何氨基酸，或去污劑和除了組氨酸之外的所有氨基酸，(iii)去污劑和穩定肽，(iv)單醣、寡醣和多醣以及任何氨基酸，或單醣、寡醣和多醣以及除了組氨酸之外的所有氨基酸，(v)單醣、寡醣和多醣以及穩定胜肽，(vi)任何氨基酸和穩定肽，或除了組氨酸和穩定肽之外的所有氨基酸，(vii)去污劑、單醣、寡醣和多醣以及任何氨基酸，或去污劑、單醣、寡醣和多醣以及除組氨酸和穩定肽之外的所有氨基酸組氨酸，(viii)去污劑、單醣、寡醣和多醣以及穩定肽，(ix)去污劑、任何氨基酸以及穩定胜肽，或去污劑、除了組氨酸之外的所有氨基酸以及穩定肽，(x)單醣、寡醣和多醣、任何氨基酸和穩定生肽，或單醣、寡醣和多醣、除組氨酸之外的所有氨基酸和穩定肽，(xi)去污劑、單醣、寡醣和多醣、任何氨基酸和穩定胜肽，或去垢劑、單醣、寡醣和多醣、除了組氨酸外的所有氨基酸和穩定生肽。

【0065】 在另一個實施例中，本發明的液體製劑不包含除了組氨酸之外的任何其他氨基酸。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含任何單醣、雙醣和三醣(trisaccharides)。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不包含除了HSA以外的任何其他穩定胜肽或蛋白質。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含磷酸鹽，例如磷酸鹽緩衝劑形式的磷酸鹽。

【0066】 在另外的實施例中，本發明的液體製劑缺乏(i)琥珀酸鹽和去污劑(例如聚山梨醇酯)，(ii)琥珀酸鹽和甲硫氨酸，(iii)琥珀酸鹽和蔗糖，(iv)去污劑(例如，聚山梨醇酯)和甲硫氨酸，(v)去污劑(例如，聚山梨醇酯)和蔗糖，(vi)甲硫氨酸和蔗糖，(vii)琥珀酸鹽、去污劑(例如，聚山梨醇酯)和甲硫氨酸，(xiii)琥珀酸鹽、去污劑(例如，聚山梨醇酯)和蔗糖，(ix)琥珀酸鹽、甲硫氨酸和蔗糖，(x)去污劑(例如聚山梨酯)、甲硫氨酸和蔗糖，和(xi)琥珀酸鹽、去污劑(例如聚山梨酯)、甲硫氨酸和蔗糖，(xii)去污劑(例如聚山梨酯)和組氨酸，(xiii)去污劑(例如聚山梨酯)、組氨酸和蔗糖。

【0067】 此外，本發明所述缺少缺少一種或多種組成分(即，化合物、材料或物質)的液體製劑，還可能缺乏螯合劑，特別是缺乏本說明書所描述的螯合劑(例如，EDTA)，並及/或磷酸鹽。

【0068】 此外，本發明的較佳液體製劑包含(i)肉毒桿菌素、(ii)HSA、(iii)張力劑以及不含或含有不超過50μM色氨酸和

N-乙醯基-色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至1.0% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.01% w/v至2.0% w/v之間，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.1% w/v至1.5% w/v之間，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.6% w/v至1.2% w/v之間，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，(iii)以氯化鈉作為張力劑，用量為0.9% w/v，不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)以氯化鈉作為張力劑，用量為0.9% w/v，不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

【0069】 本說明書還預期，在上下文中所描述的較佳和特佳的液體製劑中，色氨酸和N-乙醯基-色氨酸的濃度上限低於

50 μM ，較佳為低於10 μM ，更佳為低於1 μM ，還更佳為低於0.1 μM ，最佳為低於0.01 μM 或0.001 μM 。此外，本說明書還預期上下文中所描述的較佳和特佳的液體製劑，其特徵在於 Fe^{3+} 離子的濃度小於1000nM或小於500nM，更佳小於250nM或小於100nM，最佳小於10nM或小於1nM。

【0070】 本發明的較佳液體製劑包含(i)肉毒桿菌素、(ii)HSA、(iii)張力劑、(iv)緩衝劑、以及不含或含有不超過50 μM 的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01 % w/v至1.0 % w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.01 % w/v至2.0 % w/v之間，(iv)濃度介於1mM至100mM之間的緩衝劑，並且不含或含有不超過50 μM 的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii) 含量介於0.01 % w/v至0.5 % w/v之間的HSA，(iii))張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.01 % w/v至2.0 % w/v之間，(iv)濃度介於1mM至100mM之間的緩衝劑，並且不含或含有不超過50 μM 的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.05 % w/v至0.25 % w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.1 % w/v至2.0 % w/v之間，(iv)濃度介於1mM至100mM之間的緩衝劑，並且不含或含有不超過50 μM 的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA之間，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.6% w/v至1.3% w/v之間，(iv)濃度介於2mM至50mM之間的緩衝劑，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)0.9% w/v 的氯化鈉，(iv) 濃度介於5 mM 至20 mM 之間的緩衝劑，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

【0071】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素(ii)HSA，(iii)作為張力劑的氯化鈉，(iv) 選自組氨酸、磷酸鹽及其混合物的緩衝劑，用來作為緩衝劑。其中所述緩衝劑較佳為組氨酸，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

【0072】 特別較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至1.0% w/v之間的HSA，(iii)氯化鈉，其含量介於0.01% w/v至2.0% w/v之間，較佳為0.9% w/v，(iv)濃度介於1mM至100mM之間，選自於組氨酸、磷酸鹽及其混合物的緩衝劑，其中緩衝劑較佳為濃度介於1mM至100mM之間的組氨酸，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

【0073】 本發明的另一種特佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，(iii)含量為0.9% w/v的氯化鈉，(iv)濃度介於1mM至100mM之間，選自於組氨酸、磷酸鹽及其混合物的緩衝劑，其中所述緩衝劑較佳為濃度介於1mM至100mM之間的組氨酸，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

【0074】 本發明的又一特佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii) 含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii) 含量為0.9% w/v的氯化鈉，(iv) 選自於組氨酸、磷酸鹽及其混合物的緩衝劑，濃度介於1mM至100mM之間，較佳濃度介於2mM至50mM之間，或更佳介於5mM至20mM之間，其中緩衝劑較佳為濃度介於1mM至100mM之間的組氨酸，較佳濃度介於2mM至50mM之間，更佳介於5mM至20mM之間，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

【0075】 此外，上述較佳和特佳的液體製劑的pH，較佳為介於6.0至7.5之間的範圍，更佳為介於6.5至7.0之間的範圍。而且，肉毒桿菌素較佳是血清型A，並且更佳是血清型A的神經毒性成分。

【0076】 本發明較佳液體製劑的實施例如下：

製劑1：

50 U/ml 的BoNT/A

0.9% 的氯化鈉 (9mg/mL)

第 27 頁，共 73 頁(發明說明書)

0.085% 的HSA(純化後的，例如透析後的)(0.85mg/mL)

0.155% 的組氨酸(1.55mg/ml；~10mM)

色氨酸和N-乙醯基色氨酸< 50 μ m

pH值為6.0。

【0077】 實施例的製劑1中純化後的HSA可以通過根據本發明第四方面的方法之詳細描述的方法來製備。

【0078】 根據本發明，本發明的液體製劑較佳可以通過根據本發明的第四方面的方法來製備或獲得。此方法允許移除 HSA 起始材料(例如，市售 HSA 產品)中所包含的物質，包括 會使液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性惡化的N-乙醯基色氨酸。

【0079】 在第三方面，本發明市有關於一種液體製劑，其包含：

(i)肉毒桿菌素，以及

(ii)人類血清白蛋白(HSA)，

其中，所述液體製劑的製備方法包括下述步驟：

(a)將人類血清白蛋白與螯合劑接觸，以獲得人類血清白蛋白和螯合劑的混合物，以及

(b)從混合物中移除螯合劑。

【0080】 對於本發明的液體製劑的組成分(i)，肉毒桿菌素沒有特別限制並且可以包括任何血清型的肉毒桿菌素(例如，BoNT/A-G)。較佳地，肉毒桿菌素如上文所定義。

【0081】 有關液體製劑中的組成分(ii)，「人類血清白蛋白」或「HSA」是指供體HSA和重組HSA，且較佳是如上述所定義的供體HSA。HSA在液體製劑中的含量可以介於0.001% w/v至2.0% w/v之間、較佳含量介於0.001-1.00% w/v之間的量、更佳含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間，又更佳的含量介於0.001% w/v至2.0% w/v之間。再更佳的含量介於0.02% w/v至0.3% w/v之間，最佳含量介於0.03% w/v至0.15% w/v之間。

【0082】 根據本發明，本發明所述液體製劑的製備方法至少包括步驟(a)和(b)，其中第一步如下：

(a)將人類血清白蛋白與螯合劑接觸，得到人類血清白蛋白和螯合劑的混合物。

【0083】 如本說明書中的用語「接觸」是指在廣義地解釋中將兩個或更多個組成分放在一起。這可以通過多種不同的方法來實現，例如溶解(dissolving)、混合(mixing)、懸浮(suspending)、共混(blending,)、漿化(slurrying)、攪拌(stirring)、流動(flowing)、吸附(adsorbing,)、結合(binding)、萃取(extracting)等。通常，將螯合劑添加到包含HSA的組合物中(例如，HSA 溶液)，然後混合以獲得均勻混合物，並且選擇性地進行進一步製程步驟(例如，對含有螯合劑的緩衝液進行透析)。

【0084】 因此可預期，所述的「接觸」可以採用將HSA材料(例如水溶液形式的HSA材料)固定(loading)到固定化金屬親和性樹脂(immobilized metal affinity resin IMAC)上的方式來加

以實現。本說明書中的用語「固定化金屬親和性樹脂」包括但不限定於，含有能夠結合和配位多價陽離子的固定化功能部分 (immobilized functional moiety)(例如，亞氨基二乙酸 (iminodiacetic acid))的樹脂，例如 Cheating-Sepharose、Fractogel-EMD-Chelate、POROS 20MC、Matrex Cellufine Chelate、TALON 和 Chelex 100 樹脂。此類固定化金屬親和性樹脂，通常以本領域技術人員所習知的層析金屬親和管柱 (chromatographic metal affinity columns)的形式來使用。此外，如本說明書中的用語「接觸」還包括使用合適的固定化金屬親和樹脂來進行批次模式的結合。

【0085】 參照步驟(a)，其進一步指出，本發明所述液體製劑的製備方法中步驟(a)的用語：「人類血清白蛋白」和「螯合劑」，並未暗示其具有任何物理形式的限制，也未排除與HSA及螯合劑混合或包含在HSA和螯合劑中的其他物質或化合物的存在。這意味著在步驟(a)中與螯合劑接觸的「人類血清白蛋白」可以以任何的形式存在。例如，以固體或液體形式(例如，含水組合物(aqueous composition)或水溶液(aqueous solution))存在。同樣，在步驟(a)中與人類血清白蛋白接觸的「螯合劑」可以以任何形式存在。例如，以固體或液體形式(例如，含水組合物或水溶液)存在。此外，所述「使人類血清白蛋白與螯合劑接觸」並不排除(i)人類血清白蛋白是組合物的形式(例如，固體組合物或液體組合物，特別是含水組合物或水溶液))，該組合物在最終液體製劑中包含有一

種或多種附加的組成分，例如張力劑或緩衝劑；和/或(ii)螯合劑是一種組合物的形式(例如，固體組合物或液體組合物，特別是含水組合物或水溶液)，該組合物在最終液體製劑中包含有一種或多種附加的組成分，例如張力劑或緩衝劑。

【0086】 較佳地，步驟(a)中所獲得的混合物是含水混合物(aqueous mixture)。此種水性混合物可以通過不同的方式製備。例如，人類血清白蛋白可以是一種含水組合物的形式，例如水溶液，可以與固體形式或液體形式存在(例如以螯合劑的溶液形式存在)的螯合劑混合。此外，人類血清白蛋白可以是固體形式，例如冷凍乾燥材料，其可以與螯合劑和水溶液混合，或者與螯合劑的水溶液混合。較佳地，人類血清白蛋白是含水組合物的形式，更佳是水溶液的形式，且螯合劑是固體或含水組合物(例如，水溶液)。

【0087】 具體地，在步驟(a)中與螯合劑接觸的HSA可以是至少含有5% w/v的HSA、更佳為含有介於10% w/v至30% w/v的HSA，最佳含有20% w/v的HSA水溶液。此外，步驟(a)中所獲得的混合物的pH可調節至介於6.0至9.0之間；較佳的pH範圍介於6.5至8.5之間；更佳介於7.0至8.5之間；最佳介於7.0至8.0之間。

【0088】 此外，根據本發明用於製備液體製劑的方法，接觸步驟(a)可以包括下述幾個子步驟。例如，在一個實施例中，接觸步驟(a)包括下述步驟，或(僅)由下述步驟組成：將螯合劑(例如，EDTA)與人類血清白蛋白混合，將所述混合物醞釀一段預定的時

間，然後選擇性地以含有螯合劑的緩衝液對所述混合物進行透析。其中，所使用的螯合劑較佳與醞釀子步驟中所使用者相同。在另一個實施例中，不對混合物進行醞釀，而是(直接)以含有螯合劑的緩衝液對混合物進行透析。其中，所使用的螯合劑較佳與混合螯合劑(例如，EDTA)和人類血清白蛋白的步驟中所使用的螯合劑相同。在另一個實施例中，在透析之前不會將螯合劑與人類血清白蛋白混合。也就是說，接觸步驟(a)可包括或(僅)由使用含有螯合劑的緩衝液對混合物針對進行透析的步驟所組成。

【0089】 較佳地，步驟(a)包括下述步驟或(僅)由下述步驟所組成：將螯合劑添加到包含HSA的組合物(例如，HSA的溶液)中，或者將螯合劑與包含HSA的組合物(例如，HSA的溶液)進行混合。然後將所得的混合物醞釀一段時間，例如，靜置一段給定時間而不攪拌，或者是攪拌一段給定時間。

【0090】 醞釀時間不限於特定範圍，但通常為至少0.5小時，特別是至少1小時，更特別是至少2小時。醞釀時間的上限並非關鍵，但可以是例如1小時、2小時、5小時或10小時。因此，醞釀時間可以是例如介於0.5至5小時之間或介於1小時至10小時之間。同樣地，醞釀溫度沒有特別限制，例如可以在介於0°C至60°C之間的範圍內。較佳地，溫度介於0°C至30°C之間。這意味著室溫(20°C或25°C)是本發明內的合適溫度。如本領域技術人員所習知的，溫度會影響反應時間。通常可以選擇醞釀條件(例如時間和溫度)以使得最終產物中所含的螯合劑(例如EDTA)的殘留量

為 $100\mu\text{M}$ 或更少，較佳殘留量為 $10\mu\text{M}$ 或更少，更佳殘留量為 $1\mu\text{M}$ 或更少。

【0091】 可選擇性地，在醞釀步驟之後可以進行一個後續處理，例如以含有螯合劑的緩衝液對醞釀後的混合物進行透析。其所使用的螯合劑，通常與醞釀步驟中所使用的螯合劑相同。用於選擇性透析步驟中的螯合劑，其包含在透析緩衝液之中的濃度，較佳介於 0.1mM 至 1000mM 之間、更佳是以介於 1mM 至 200mM 之間、最佳是介於 10mM 至 100mM 之間。又較佳的是，透析步驟中所使用的緩衝液(i)具有介於7.5至8.5的pH值，(ii)進一步包含緩衝劑，較佳是根據最終組合物，或(iii)進一步包含張力劑，較佳為0.9% w/v的氯化鈉；或(i)和(ii)；或(i)和(iii)；或(ii)和(iii)；或(i)和(ii)和(iii)。

【0092】 在本發明中，本說明書的用語「螯合劑」並沒有特別限制，只要其能夠與金屬離子結合即可。本說明書的用語「螯合劑」也可稱為「螯合物(chelator)」或「多價螯合劑(sequestering agent)」。本說明書中所使用的螯合劑，通常是可以與金屬離子結合的有機化合物。金屬離子通常與充當多牙配位基(polydentate ligands)的有機螯合劑形成多個配位鍵。

【0093】 適用於本說明書所述的螯合劑，包括但不限定為：氨基多羧酸(aminopolycarboxylic acids)(例如，具有三至六個、較佳為四個羧酸官能基的氨基多羧酸)和其他化合物，例如檸檬酸鹽、卟啉(porphyrins)、N,N,N',N'-四(2-吡啶基甲基)-1,2-乙二

胺

(N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine , TPEN)、三乙烯四胺(triethylenetetramine , TETA)及其混合物。氨基多羧酸的實施例，包括次氨基三乙酸酯(nitrilotriacetate , NTA)、1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸酯(,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetate , DOTA)、乙二胺三乙酸酯(ethylenediaminetriacetate , TED)、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid , EDTA)、乙二醇-雙(1,4,7,10-四乙酸酯)(ethylene glycol-bis(o-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid , EGTA)、1,2-雙(鄰氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid , BAPTA)、二乙烯三胺五乙酸(diethylenetriaminepenta-acetic acid , DTPA)和三乙烯四胺六乙酸(triethylenetetraminehexaacetate , TTHA)。

【0094】 用於本說明書中的特佳的螯合劑包括通式(I)所表示的化合物：



其為具有至少四個羧酸官能基的氨基多羧酸化合物。R沒有特別限制，可以不含羧酸官能基，也可以含有1個或2個羧酸官能基。

較佳地，R不含或包含一個羧酸官能基，最佳是不包含任何羧酸官能基。

【0095】 通式(I)所表示的化合物的實施例，包括例如EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA。特佳用於本說明書的是EDTA、EGTA和DTPA，更佳是EDTA和DTPA，且最佳是EDTA。任何上述螯合劑的混合物也可用於本發明，例如作為溶液、固體或與偶聯基質(coupled to matrices)。

【0096】 在步驟(a)中，HSA較佳是與一定量的螯合劑接觸，使得螯合劑以介於0.1mM至1000mM之間或介於0.1mM至500mM之間的濃度，更加是介於0.5mM至500mM之間或介於1mM至500mM之間的濃度，最佳是介於10mM至100mM之間的濃度，存在於液體製劑中。

【0097】 根據本發明，所述液體製劑的製備方法還包括以下步驟：

(b)從混合物中移除螯合劑。

【0098】 在步驟(b)中，可以採用任何合適的技術來移除螯合劑，例如透析法(包括使用透析袋的傳統透析法、逆流透析法(counterflow dialysis)等)、逆滲透、過濾、掃流過濾(crossflow filtration)、超濾和層析法(例如，離子交換層析法或凝膠過濾層析法(gel filtration chromatography))。

【0099】 較佳，可以通過透析法移除螯合劑。透析通常在0°C至30°C的溫度範圍下，特別是在2°C至30°C或4°C至25°C的

溫度範圍下(包括室溫)，進行0.5至48小時，特別是1至24小時或1至12小時。此外，透析通常使用10至1000倍於醞釀後的HSA/螯合劑混合物體積的透析緩衝液來進行，並且透析緩衝液通常更換至少一次。所使用的透析膜可以具有例如10kDa的截留分子量(molecular weight cut-off, MWCO)。

【0100】 通常，選擇透析條件(例如，時間、溫度、緩衝液體積、緩衝液更換次數)，可以使最終產物中所包含的螯合劑(例如，EDTA)殘留量的濃度低於100 μ M，較佳濃度低於10 μ M，更佳濃度低於1 μ M。

【0101】 根據本發明的較佳實施例，首先藉由將HSA起始材料與螯合劑接觸來對HSA起始材料進行預處理，然後移除螯合劑。然後將所獲得經過預處理的HSA用於製備本發明的液體肉毒桿菌素製劑。本說明書中的用術語「人類血清白蛋白起始材料」，是指供體HSA材料(源自人類血液或更準確地說，源自人類血漿的HSA)或重組HSA材料，其可商購或常規獲得，意即不需進行了本說明書所述的預處理。本說明書中的用術語「人類血清白蛋白起始材料」也涵蓋供體HSA材料和重組HSA材料的混合物。

【0102】 更具體地，根據此一較佳實施例，包含(i)肉毒桿菌素和(ii)人類血清白蛋白的液體製劑，可以通過包括下述步驟的方法來製備：

(a)將人類血清白蛋白起始原料與螯合劑接觸，藉以獲得人類血清白蛋白起始原料和螯合劑的混合物，

(b)從混合物中移除螯合劑，得到經過預處理的人類血清白蛋白材料，和

(c)將肉毒桿菌毒與經過預處理的人類血清白蛋白材料混合。

【0103】 根據本發明的另一個較佳實施例，將一種液態預製劑(liquid pre-formulation)與螯合劑接觸，然後移除螯合劑以獲得液體製劑。本說明書中的用語「液態預製劑」，是指至少含有組成分(i)和(ii) (即，肉毒桿菌素和HSA)，且較佳含有所包含於最終液體組合物(特別是在組成分(iii)和(iv))中的所有組成分和物質，的液體製劑。在後者的情況下，處理和移除螯合劑即可產生最終的液體製劑。

【0104】 更具體地，根據此較佳實施例，包括(i)肉毒桿菌素和(ii)人類血清白蛋白的液體製劑係通過下述方法所製備，此方法包括下述步驟：

(a)將包含有肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體預製劑與螯合劑接觸，以獲得液體預製劑和螯合劑的混合物；以及
(b)從混合物中移除螯合劑，以獲得液體製劑。

【0105】 根據本發明，液體製劑(根據本說明書所述的任何方面，即根據第一、第二和第三方面)可以選擇性地更包括：

(iii)張力劑。

【0106】 本說明書中的用語「張力劑」，是指添加到可注射製劑中，以使製劑的滲透特性(osmotic characteristics)與生理液體(physiologic fluids)的滲透特性相似的試劑。張力劑也可稱

為「滲透壓調節劑(osmotic regulator)」。張力劑沒有特別限制並且可以例如選自由糖、鹽、聚合物及其混合物組成的一個群組。

【0107】 張力劑的實施例包括蔗糖、葡萄糖、碳酸鈉、氨基酸、聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG)、葡聚醣、環糊精和膠體(例如, 膠體多醣(colloidal polysaccharides))。通常, 張力劑的濃度介於0% w/v至2.0% w/v之間; 特別是介於0.01% w/v至2.0% w/v之間; 或介於0.1% w/v至1.5% w/v之間、更特別是介於0.6% w/v至1.2% w/v之間的範圍內。

【0108】 較佳地, 所述張力劑是氯化鈉(NaCl)。氯化鈉存在於本發明的液體製劑中的含量, 可以介於0.01% w/v至2.0% w/v之間; 較佳介於0.1% w/v至1.5% w/v之間; 更佳介於0.5% w/v至1.2% w/v之間或介於0.8% w/v至1.0% w/v之間。最佳為0.9% w/v。

【0109】 根據本發明, 液體製劑(根據本說明書所述的任何方面, 即根據第一、第二和第三方面)可以選擇性地更包括:
(iv)緩衝劑。

【0110】 本說明書中的用語「緩衝劑」, 是指一種可以將液體製劑的pH值維持在可接受的範圍內的試劑, 即能夠控制製劑的pH值的試劑。合適的緩衝劑是那些不與其他成分發生化學反應, 且其存在可以提供所需的pH值緩衝量的緩衝劑。此類緩衝劑包括例如氨基酸、醋酸鹽(acetate)、蘋果酸、抗壞血酸鹽、檸檬酸鹽、酒石酸鹽、富馬酸鹽、琥珀酸鹽、磷酸鹽、碳酸氫鹽

(bicarbonate)、TRIS、Bis-TRIS、ACES、MES、BES、MOPS、HEPES、TES、PIPES、三(羥甲基)甲基甘氨酸(tricine)和咪唑。

【0111】 較佳地，緩衝劑是磷酸鹽(即，磷酸鹽緩衝劑)、氨基酸、或其混合物。本說明書中的用語「磷酸鹽」，通常是指非質子化(unprotonated)和質子化形式及其任何鹽類。氨基酸可以選自於天門冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸、組氨酸、脯氨酸、牛磺酸、甲硫氨酸、絲氨酸、酪氨酸、色氨酸及其混合物。且較佳選自於組氨酸、脯氨酸、牛磺酸、甲硫氨酸、絲氨酸、酪氨酸及其混合物其中。最佳地，氨基酸是組氨酸。用於本說明書的最佳緩衝劑是組氨酸、磷酸鹽或其混合物。

【0112】 本發明液體製劑中緩衝劑的濃度較佳介於1mM至100mM之間，較佳介於2mM至50mM之間，更佳介於5mM至20mM之間。如果緩衝劑是氨基酸(例如，組氨酸)，則其存在於液體製劑中的濃度，可以介於1mM至100mM之間，較佳介於2mM至50mM之間；更佳介於5mM至20mM之間；最佳為10mM。如果緩衝劑是磷酸鹽，則其存在於液體製劑中的濃度，可以介於1mM至100mM之間；較佳係介於2mM至50mM之間；更佳介於5mM至20mM之間；最佳為10mM。

【0113】 此外，除非另有說明或指明，否則本發明的液體製劑還可以額外包含一種或多種藥學上可接受的賦形劑。例如，液體製劑可以含有甘油、蔗糖、乳糖、甘露醇、葡聚糖、透明質酸、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl-pyrrolidone)、乳酸、檸檬酸、氨基酸、苯甲醇、利多卡因(lidocaine)、明膠、羥乙基澱粉(hydroxyethyl starch, HES)、聚環氧乙烷和聚山梨酯(例如，聚

山梨酯20、聚山梨酯80)中的一種或多種。其他合適的藥學上可接受的賦形劑，包括本領域中所熟知者，例如可參見Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania。

【0114】 另一方面，本說明書還預期本發明的液體製劑特別缺乏某些組成分(即，化合物、材料或物質)，例如缺乏螯合劑、去污劑、多醣、氨基酸、穩定胜肽...等，包括其任意組合。本說明書中的用語「去污劑」與「界面活性劑」同義，且旨在包括非離子型和離子型的去污劑。本說明書中的用語「穩定胜肽」，通常是指由5至50個氨基酸所組成的胜肽，例如由10至40個氨基酸或由15至30個氨基酸所組成的胜肽。因此，用語「穩定胜肽」並不包括HSA。

【0115】 在一個實施例中，本發明的液體製劑不含去污劑，特別是不含聚山梨酯，更特別地不含聚山梨酯20和/或聚山梨酯80。在另一實施例中，本發明的液體製劑不含海藻酸鹽。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含琥珀酸鹽。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含有一種或多種(例如，2、3、4或5種)選自由精氨酸、谷氨酸、甲硫氨酸、色氨酸和絲氨酸所組成的一個氨基酸群組。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含糖，例如單醣、寡糖或多醣或其混合物。具體地，本發明的液體製劑可以不含蔗糖、乳糖、麥芽糖和海藻糖中的一種或多種(例如，2種、3種或4種)。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不包含螯合劑，特別是本說明書中結合本發明所描述的那些。本發明還預期液體製劑缺乏多於一種或所有上述化合物。

【0116】 在一個實施例中，本發明的液體製劑缺乏(i)去污劑和單醣、寡糖和多醣，(ii)去污劑和任何氨基酸，或去污劑和除了組氨酸之外的所有氨基酸，(iii)去污劑和穩定胜肽，(iv)單醣、寡糖和多醣以及任何氨基酸，或單醣、寡糖和多醣以及除了組氨酸之外的所有氨基酸，(v)單醣、寡糖和多醣以及穩定胜肽，(vi)任何氨基酸和穩定胜肽，或除了組氨酸和穩定胜肽之外的所有氨基酸，(vii)去污劑、單醣、寡糖和多醣以及任何氨基酸，或去污劑、單醣、寡糖和多醣以及除了組氨酸和穩定胜肽之外的所有氨基酸，(viii)去垢劑，單醣、寡糖和多醣，以及穩定胜肽，(ix)去垢劑，任何氨基酸以及穩定胜肽，或去垢劑，除了組氨酸之外的所有氨基酸以及穩定胜肽，(x)單醣、寡糖和多醣、任何氨基酸和穩定胜肽，或單醣、寡糖和多醣、除了組氨酸之外的所有氨基酸和穩定胜肽，(xi)去污劑、單醣、寡糖和多醣、任何氨基酸和穩定胜肽，或去垢劑、單醣、寡糖和多醣、除了組氨酸外的所有氨基酸以及穩定胜肽。

【0117】 在另一個實施例中，本發明的液體製劑不包含除了組氨酸之外的任何其他氨基酸。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含任何單醣、雙糖和三糖。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含除了HSA之外的任何其他穩定胜肽或蛋白質。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不包含磷酸鹽，例如磷酸鹽緩衝劑形式的磷酸鹽。

【0118】 在另外的實施例中，本發明的液體製劑缺乏(i)琥珀酸鹽和去污劑(例如聚山梨醇酯)，(ii)琥珀酸鹽和甲硫氨酸，(iii)琥珀酸鹽和蔗糖，(iv)去污劑(例如聚山梨醇酯)，(v)去污劑(例

如，聚山梨醇酯)和甲硫氨酸，(v)去污劑(例如，聚山梨醇酯)和蔗糖，(vi)甲硫氨酸和蔗糖，(vii)琥珀酸鹽、去污劑(例如，聚山梨醇酯)和甲硫氨酸，(xiii)琥珀酸鹽、去污劑(例如，聚山梨醇酯)和甲硫氨酸，(ix)琥珀酸鹽，甲硫氨酸和蔗糖，(x)去污劑(例如聚山梨醇酯)、甲硫氨酸和蔗糖，(xi)琥珀酸鹽、去污劑(例如聚山梨醇酯)、甲硫氨酸和蔗糖，(xii)去污劑(例如聚山梨醇酯和組氨酸)，(xiii)去污劑(例如聚山梨醇酯)、組氨酸和蔗糖。

【0119】 此外，缺少一種或多種組成分(即，化合物、材料或物質)的本發明的任何一種液體製劑，還可缺少螯合劑，特別是本說明書中所述的螯合劑。

【0120】 此外，本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，和(iii)張力劑。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至1.0% w/v之間的HSA，和(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，含量介於0.01% w/v至2.0% w/v之間。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，和(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，含量介於0.1% w/v至1.5% w/v之間。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，和(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，含量介於0.6% w/v至1.2% w/v之間。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，和(iii)含量為0.9% w/v，作為張力的氯化鈉劑。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度

介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，和(iii) 含量為0.9% w/v，作為張力劑的氯化鈉。

【0121】 本文還預期上下文中所描述的較佳液體製劑的特徵在於 Fe^{3+} 離子的濃度小於1 μM ，較佳小於1000nM或小於500nM，更佳小於250nM或小於100nM，最佳小於10nM或小於1nM。

【0122】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素、(ii)HSA、(iii)張力劑和(iv)緩衝劑。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii) 含量介於0.01% w/v至1.0% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉物，為含量範圍介於0.01% w/v至2.0% w/v之間，和(iv)緩衝劑，其濃度範圍介於1mM至100mM。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度範圍介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii) 含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量範圍介於0.01% w/v至2.0% w/v之間，以及(iv)緩衝劑，其濃度範圍介於1mM至100mM之間。本發明較佳的液體製劑包含(i) 濃度範圍介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii) 含量範圍介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量範圍介於0.1% w/v至2.0% w/v之間，以及(iv)緩衝劑，其濃度範圍介於1mM至100mM。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度範圍介於10U/ml至200U/ml的肉毒桿菌素，(ii) 含量範圍介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量範圍介於0.6% w/v至1.3% w/v之間，以及

(iv)緩衝劑，其濃度範圍介於2mM至50mM之間。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度範圍介於10mM至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量範圍介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)含量為0.9% w/v的氯化鈉，以及(iv)濃度範圍介於5mM至20mM之間的緩衝劑。本說明書還預期本段中所述較佳液體製劑的特徵在於 Fe^{3+} 離子的濃度小於1 μM ，較佳小於1000nM或小於500nM，更佳小於250nM或小於100nM。最佳小於10nM或小於1nM。

【0123】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，(iii)作為張力劑的氯化鈉，和(iv)選自於由組氨酸、磷酸鹽及其混合物的作為緩衝劑，其中所述緩衝劑較佳是組氨酸。

【0124】 本發明特佳的液體製劑包含(i)濃度範圍介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量範圍介於0.01% w/v至1.0% w/v之間的HSA，(iii)含量範圍介於0.01% w/v至2.0% w/v之間的氯化鈉，較佳為0.9% w/v，以及(iv)緩衝劑，其選自於組氨酸、磷酸鹽及其混合物，濃度範圍介於1mM至100mM之間，其中緩衝劑較佳為濃度範圍介於1mM至100mM之間的組氨酸。

【0125】 本發明另一種特佳的液體製劑包含(i)濃度範圍介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量範圍介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，(iii)含量為0.9% w/v的氯化鈉，和(iv)濃度範圍介於1mM至100mM之間，選自組氨酸、磷酸鹽及其混合物的緩衝劑，其中緩衝劑較佳為濃度範圍介於1mM至100mM之間的組氨酸。

【0126】 本發明的又一特佳的液體製劑包含(i)濃度範圍介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii) 含量範圍介於0.05 % w/v至0.25 % w/v之間的HSA，(iii) 含量為0.9 % w/v的氯化鈉，和(iv)選自組氨酸、磷酸鹽及其混合物的緩衝劑，濃度範圍介於1mM至100mM之間，較佳濃度範圍介於2mM至50mM之間，或更佳濃度範圍介於5mM至20mM之間。其中，緩衝劑較佳為濃度範圍介於1mM至100 mM的之間組氨酸，較佳濃度範圍介於2mM至50mM之間，或更佳濃度範圍介於5mM至20mM之間。

【0127】 此外，上述較佳和特佳的液體製劑具有範圍較佳介於6.0至7.5之間的pH值。此外，肉毒桿菌素較佳是血清型A，更佳是血清型A的神經毒性成分。

【0128】 本發明較佳液體製劑的實施例如下：

製劑1：

50 U/ml BoNT/A

0.9 % 氯化鈉 (9mg/mL)

0.085 % HSA (透析後的EDTA)(0.85mg/mL)

0.155 % 組氨酸(1.55mg/ml；~10mM)

pH值6.0

【0129】 製劑1 中HSA(透析後的EDTA)的實施例可以通過包括下述步驟的方法加以製備：

- 在每毫升濃度為20%的HSA溶液中添加37.2毫克的Na₂-EDTA，攪拌並用氫氧化鈉(NaOH)調整pH值至8.0；
- 室溫下攪拌醞釀6小時；

-在室溫下使用100倍體積的EDTA緩衝液(100mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ；10mM組氨酸；0.9% NaCl ，pH值為7.0)進行透析16小時，並在磁力攪拌器上輕輕攪拌(透析膜的載留分子量(MWCO)為10kDa)；

-在室溫下使用100倍體積的10mM組氨酸、0.9% NaCl ，和pH值6.0進行透析24小時，然後用新鮮緩衝液替換透析緩衝液，再透析24小時，並重複兩次以上。

【0130】在製劑1的實施例性，EDTA可以選擇性地被其他螯合劑例如EGTA、BAPTA或DTPA所替代。可以使用濃縮的EDTA溶液(例如，200mM EDTA，pH值8.0)來作為對HSA溶液中添加固體EDTA的替代方案。第一個透析步驟(針對EDTA緩衝液)也可以省略。也可以使用其他方法，例如掃流透析(crossflow dialysis)或超濾，來代替透析。

【0131】本發明還涉及一種包含肉毒桿菌素的液體製劑，其中，將此液體製劑置於40°C的高溫下儲存4週後，相較於初始毒素活性，其毒素活性降低不超過20% 此外，本發明涉及一種包含肉毒桿菌素的液體製劑，其中，將此液體製劑暴露於250°C 250W/m²的光源7下小時後，相較於初始毒素活性，其毒素活性降低不超過20%。較佳地，可以使用SUNTEST CPS+儀器(ATLAS Material Testing Technology LLC)來進行光穩定性測試，即在250W/m²下曝光7小時，其配備有濾光片組，用以提供對應於ISO 10977 的ID65(室內間接日光標準)，波長範圍介於320nm至800nm之間的光譜分佈，並配備有符合ICH Q1B的窗式玻璃濾光片(window glass filter)。

【0132】 此外，本發明還涉及製備本說明書所述液體肉毒桿菌素製劑的方法，包括添加本說明中所述的組成分，特別是添加組成分(i)至(ii)和選擇性的組成分(iii)和(vi)中的一種或多種。較佳的組成分為(i)、(ii)、(iii)和(iv)。本發明的液體製劑的製備沒有特別限制，且各自的配方技術是本領域技術人員已知的。如上所述，肉毒桿菌素的液體製劑通常是水溶液，較佳為食鹽水溶液，更佳為生理食鹽水溶液，且最佳的是含緩衝劑(例如，以磷酸鹽或組氨酸做為緩衝劑)的生理食鹽水溶液生理鹽水溶液。

【0133】 較佳地，首先溶解鹽，然後添加HSA，如果有需要就調整pH值，最後添加肉毒桿菌素。此添加順序並不是強制性要求，但被認為是可以安全地保留肉毒桿菌神經毒素(BoNT)的最大比活性。較佳地，製備液體肉毒桿菌素製劑的方法，不包括將粉末形式的冷凍乾燥後之肉毒桿菌素進行復溶。

【0134】 進一步，本發明涉及一種穩定液體肉毒桿菌素製劑的方法，此方法包括將肉毒桿菌素與HSA組合，其中所述HSA可以通過包括下述步驟的方法來製備：

(a)將含有HSA的組合物與螯合劑接觸，藉以獲得HSA和螯合劑的混合物；以及

(b)從混合物中移除螯合劑。

【0135】 更進一步，本發明涉及使用HSA來增進包含肉毒桿菌素的液體組合物的光和/或溫度穩定性的用途，其中所述HSA可以通過下述方法來製備，此方法包括下述步驟：

(a) 將含有HSA的組合物與螯合劑接觸，藉以獲得HSA和螯合劑的混合物；以及

(b)從混合物中移除螯合劑。

【0136】 更進一步，本發明涉及一種HSA，其可通過下述方式獲得：

(a) 將含有HSA的組合物與螯合劑接觸，藉以獲得HSA和螯合劑的混合物；以及

(b)從混合物中移除螯合劑。

【0137】 在第四方面，本發明涉及一種製備本發明所述之液體製劑的方法，其中此方法包括下述步驟：

-將人類血清白蛋白起始材料加以純化，藉以獲得純化後的人類血清白蛋白材料；

-將純化所得的人類血清白蛋白與肉毒桿菌素和可選擇性的其他組成分混合以獲得液體製劑；

或者

-將包含肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體組合物加以純化，藉以獲得純化後的液體組合物；

-將純化所得的液體組合物與額外的組成分混合，藉以獲得液體製劑。

【0138】 人類血清白蛋白起始材料如前文所定義，較佳地，是含有至少5% w/v的HSA、較佳為含量介於10% w/v至35% w/v之間水溶液形式的HSA、更加的含量範圍介於15% w/v至30% w/v之間，且最佳為含量範圍介於20% w/v至25% w/v之間的HSA。人類血清白蛋白起始材料可以含有色氨酸和N-乙醯基-色氨酸，特別是含有N-乙醯基-色氨酸，其含量大於5mM、含量為10mM或更多、含量為20mM或更多，或含量為30mM或更多。此外，步

驟(a)中所獲得的混合物的pH值可調整至6.0至介於9.0之間；較佳介於6.5至8.5之間；更佳介於7.0至8.5之間；最佳的pH範圍介於7.0至8.0之間。

【0139】 較佳地，在本發明方法的第一替代實施例中，用於產生純化後的人類血清白蛋白材料的純化步驟，其不含或含有不超過5mM，較佳不超過1mM；更佳不超過0.1mM，最佳不超過0.001mM，的色氨酸和/或N-乙醯基-色氨酸。在製備液體製劑時，稀釋純化後的人類血清白蛋白材料，藉以形成色氨酸和N-乙醯基-色氨酸的濃度落入本說明書所述的範圍內，例如小於50 μ M。

【0140】 此純化步驟可以通過將人類血清白蛋白起始材料或將含有肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體組合物加以透析、滲濾(掃流過濾)、超濾、層析純化(例如，離子交換層析、親和層析、疏水作用層析、場流分離)或沉澱(例如，鹽析、乙醇沉澱)。

【0141】 較佳地，是採用透析來進行純化。透析通常在0°C至30°C之間的溫度下，特別是在2°C至30°C之間的溫度下進行0.5至48小時，特別是1至24小時或1至12小時，在0°C至30°C的溫度下，特別是在2°C至30°C或4°C至25°C的溫度下，包括室溫。此外，透析通常採用醞釀後的HSA溶液體積的10至1000倍體積的透析緩衝液來進行，並且透析緩衝液通常更換至少一次。所使用的透析膜可以具有例如10kDa的截留分子量。

【0142】 例如，可以通過下述製程來獲得純化後的血清白蛋白：

-在磁力攪拌器輕輕攪拌的情況下，在室溫下，採用100倍體積的透析緩衝液(10mM組氨酸，0.9%NaCl，pH 6.0)，對市售的HSA產品進行透析24小時(透析膜的截留分子量為10kDa；

- 用新鮮的透析緩衝液更換緩衝液，再於室溫下進行透析24小時，並重複兩次以上。

【0143】 上述方法的第一個替代實施例，是先純化人類血清白蛋白起始材料，再將純化後所獲得的人類血清白蛋白與肉毒桿菌素和可選擇性的其他組成分混合，這是本發明較佳的選項。獲得本發明所述的液體製劑的混合步驟並無特別限制，且包括混合組成分(i)至(ii)以及可選擇性的組成分(iii)和(vi)中的一種或多種。較佳地，首先溶解鹽類，然後添加HSA，必要時須要調整pH值，最後添加肉毒桿菌素。此一操作順序並不是強制性要求，但被認為是可以安全地保留肉毒桿菌神經毒素的最大比活性(specific activity)。較佳地，製備液體肉毒桿菌素製劑的方法不包括將粉末形式的冷凍乾燥後之肉毒桿菌素進行復溶。

【0144】 如上述關於本發明的第一方面所述，本說明書還預期本發明所述的液體製劑具有較低的 Fe^{3+} 離子濃度，因為 Fe^{3+} 離子也對光穩定性產生去穩定作用(destabilising effect)。因此，根據本發明，為了去除 Fe^{3+} 離子，根據本發明所述方法的純化步驟，會以下述方式進行或更包括下述步驟：

-將人類血清白蛋白起始材料與螯合劑接觸，藉以獲得人類血清白蛋白起始材料和螯合劑的混合物；以及

-從混合物中移除去螯合劑，以獲得經螯合劑處理且純化後的人類血清白蛋白材料。

或者

-將包含肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體組合物與螯合劑接觸，藉以獲得液體組合物和螯合劑的混合物；以及

-從混合物中移除螯合劑，以獲得經螯合劑處理且純化後的液體製劑。

【0145】 在接觸步驟中，人類血清白蛋白起始材料以及包含肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體組合物，較佳分別與一定量的螯合劑接觸，這使得混合物中存在一定含量的螯合劑。其濃度介於0.1mM至1000mM之間或介於0.1mM至500mM之間，更佳介於0.5mM至500mM之間或介於1mM至500mM之間，且最佳介於10mM至100mM之間。

【0146】 螯合劑的移除可以通過透析、掃流過濾或超濾來進行。

【0147】 如本說明書中的語「接觸」，可以廣義地解釋為將兩個或更多個組成分放在一起。這可以通過多種不同的方法來實現，例如溶解、混合、懸浮、共混、漿化、攪拌、流動、吸附、結合、萃取等。通常，將螯合劑添加到包含HSA的組合物中(例如，HSA 溶液)，然後混合以獲得均勻混合物，並且選擇性地進行進一步的製程步驟(例如，對含有螯合劑的緩衝液進行透析)。

【0148】 因此，本說明書還預期所述的「接觸」，可以採用將HSA材料(例如水溶液形式的HSA材料)固定到固定化金屬親和性樹脂上的方式來加以實現。本說明書中的用語「固定化金屬親

和性樹脂」包括但不限定於，含有能夠結合和配位多價陽離子的固定化功能部分（例如，亞氨基二乙酸的樹脂，例如

Cheating-Sepharose、Fractogel-EMD-Chelate、POROS

20MC、Matrex Cellufine Chelate、TALON 和 Chelex 100 樹

脂。此類固定化金屬親和性樹脂，通常以本領域技術人員所習知的層析金屬親和管柱的形式來使用。此外，如本說明書中的用語「接觸」還包括使用合適的固定化金屬親和樹脂來進行批次模式的結合。

【0149】 關於接觸步驟，需進一步說明，如在接觸步驟的定義中所述的用語：「人類血清白蛋白」和「螯合劑」，並未暗示其具有任何物理形式的限制，也未排除與HSA及螯合劑混合或包含在HSA和螯合劑中的其他物質或化合物的存在。這意味著螯合劑接觸的「人類血清白蛋白」可以以任何的形式存在。例如，以固體或液體形式（例如，含水組合物或水溶液）存在。同樣地，與人類血清白蛋白起始材料接觸的「螯合劑」可以以任何形式存在，例如以固體或液體形式（例如，含水組合物或水溶液）存在。

【0150】 較佳地，在接觸步驟中所獲得的混合物是含水組合物。此種含水組合物可以通過不同的方式製備。例如，人類血清白蛋白可以是一種含水組合物的形式（例如水溶液），其可以與以固體形式或液體形式存在的螯合劑（例如，以水溶液形式存在的螯合劑）進行混合。此外，人類血清白蛋白可以是固體形式，例如冷凍乾燥材料，其與螯合劑和水溶液混合，或者與螯合劑的水溶液混合。較佳地，人類血清白蛋白是以含水組合物的形式存在，更

佳是以水溶液的形式存在，且螯合劑是一種固體或一種含水組合物(例如，水溶液)。

【0151】 特別地，在接觸步驟中與螯合劑接觸的HSA，可以是含有至少5% w/v HSA、較佳為濃度範圍介於10% w/v至35% w/v之間的水溶液形式的HSA，更佳為濃度範圍介於15% w/v至30% w/v之間的HSA水溶液，最佳為濃度範圍介於20% w/v至25% w/v之間的HSA水溶液。此外，步驟(a)中所獲得的混合物的pH值可以調整至介於6.0至9.0之間；pH值的範圍較佳介於6.5至8.5之間；更佳介於7.0至8.5之間；最佳介於7.0至8.0之間。

【0152】 此外，根據本發明製備液體製劑的方法中接觸步驟可以包括下述幾個子步驟：例如，在一個實施例中，接觸步驟)包括下述步驟，或(僅)由下述步驟組成：將螯合劑(例如，EDTA)與人類血清白蛋白混合，將所述混合物醞釀一段預定的時間，然後選擇性地以含有螯合劑的緩衝液對所述混合物進行透析。其中，所使用的螯合劑較佳與醞釀子步驟中所使用者相同。在另一個實施例中，不對混合物進行醞釀，而是(直接)以含有螯合劑的緩衝液對混合物進行透析。其中，所使用的螯合劑較佳與混合螯合劑(例如，EDTA)和人類血清白蛋白的步驟中所使用的螯合劑相同。在另一個實施例中，在透析之前不會將螯合劑與人類血清白蛋白混合。也就是說，接觸步驟(a)可包括或(僅)由使用含有螯合劑的緩衝液對混合物針對進行透析的步驟所組成

【0153】 較佳地，接觸步驟包括下述步驟或(僅)由下述步驟所組成：將螯合劑添加到包含HSA的組合物(例如，HSA的溶液)中，或者將螯合劑與包含HSA的組合物(例如，HSA的溶液)進行

混合。然後將所得的混合物醞釀一段時間，例如，靜置一段給定時間而不攪拌，或者是攪拌一段給定時間。

【0154】 醞釀時間不限於特定範圍，但通常為至少0.5小時，特別是至少1小時，更特別是至少2小時。醞釀時間的上限並非關鍵，但可以是例如1小時、2小時、5小時或10小時。因此，醞釀時間可以是例如介於0.5至5小時之間或介於1小時至10小時之間。同樣地，醞釀溫度沒有特別限制，例如可以在介於0°C至60°C之間的範圍內。較佳地，溫度介於0°C至30°C之間。這意味著室溫(20°C或25°C)是本發明內的合適溫度。如本領域技術人員所習知的，溫度會影響反應時間。通常可以選擇醞釀條件(例如時間和溫度)以使得最終產物中所含的螯合劑(例如EDTA)的殘留量為100µM或更少，較佳殘留量為10µM或更少，更佳殘留量為1µM或更少。

【0155】 可選擇性地，在醞釀步驟之後可以進行一個後續處理，例如以含有螯合劑的緩衝液對醞釀後的混合物進行透析。其所使用的螯合劑，通常與醞釀步驟中所使用的螯合劑相同。用於選擇性透析步驟中的螯合劑，其包含在透析緩衝液之中的濃度，較佳介於0.1mM至1000mM之間、更佳是以介於1mM至200mM之間、最佳是介於10mM至100mM之間。又較佳的是，透析步驟中所使用的緩衝液(i)具有介於7.5至8.5的pH值，(ii)進一步包含緩衝劑，較佳是根據最終組合物，或(iii)進一步包含張力劑，較佳為0.9% w/v的氯化鈉；或(i)和(ii)；或(i)和(iii)；或(ii)和(iii)；或(i)和(ii)和(iii)。

【0156】適用於本文的螯合劑如前述所定義。任何上述螯合劑的混合物也可用於本發明，例如用於作為溶液、固體或與偶聯基質。

【0157】根據本發明，可以採用任何適當的技術來移除螯合劑，例如例如透析法(包括使用透析袋的傳統透析法、逆流透析法等)、逆滲透、過濾、掃流過濾、超濾和層析法(例如，離子交換層析法或凝膠過濾層析法)。

【0158】較佳，可以通過透析法移除螯合劑。透析通常在 0°C 至 30°C 的溫度範圍下，特別是在 2°C 至 30°C 或 4°C 至 25°C 的溫度範圍下(包括室溫)，進行0.5至48小時，特別是1至24小時或1至12小時。此外，透析通常使用10至1000倍於醞釀後的HSA/螯合劑混合物體積的透析緩衝液來進行，並且透析緩衝液通常更換至少一次。所使用的透析膜可以具有例如10kDa的截留分子量。

【0159】通常，選擇透析條件(例如，時間、溫度、緩衝液體積、緩衝液更換次數)，可以使最終產物中所包含的螯合劑(例如，EDTA)殘留量的濃度低於 $100\mu\text{M}$ ，較佳濃度低於 $10\mu\text{M}$ ，更佳濃度低於 $1\mu\text{M}$ 。

【0160】在第五方面，本發明涉及一種將本發明的液體製劑用於治療的用途。

【0161】特別是，本發明的液體製劑可用於治療神經肌肉疾病、疼痛、流涎、多汗症、泌尿系統疾病和神經系統疾病。

【0162】示例的神經肌肉疾病包括肌張力障礙、頸部肌張力障礙、痙攣、中風後痙攣、眼瞼痙攣、震顫、多動性運動障礙和腦癱。泌尿系統疾病尤其包括以逼尿肌過度活動、膀胱過度活動、

神經源性膀胱和間質性膀胱炎為特徵的病症、外陰痛和慢性盆腔疼痛、良性前列腺增生(BPH)和逼尿肌括約肌協同失調(DSD)的治療。示例性的神經障礙包括慢性偏頭痛、三叉神經痛、周圍神經性疼痛、糖尿病性神經性疼痛和憂鬱症。

【0163】 在第六方面，本發明涉及將本發明所述的液體製劑用於治療美容狀況的用途。

【0164】 本發明的這個方面涉及本發明所述的液體製劑的純粹美學用途。較佳的待治療的美容狀況包括皮膚狀況，特別是皮膚皺紋、特別是面部皺紋的處理。

【0165】 本說明書的用語「皺紋(wrinkles)」，被廣義地解釋為不僅包括皺紋，還包括細紋(lines)、褶皺(rhytids)、溝紋(creases)、摺痕(folds和犁溝(furrows)。「細紋」、「皺紋」、「褶皺」、「溝紋」、和「褶痕)」等詞具有相似的定義，因此經常可以互換使用。在本發明中，「細紋」通常可與「皺紋」互換，但較佳是指比「皺紋」還深的皮膚凹陷。「溝紋」可與皺紋和細紋互換，且較佳是指線性的凹陷。「摺痕」可與皺紋、線條和褶皺互換，較佳是指輕微形式的皺紋，並且可以被描述為位於某些位置的特定皺紋。本說明書中所用的「褶皺」與皺紋具有基本相同的含義。然而，「褶皺」較佳是指由不規則的線條聚集形成的皮膚結構。「犁溝」是皮膚上的深褶皺或深線。

【0166】 較佳地，根據被本發明所治療的皺紋，是面部皺紋，包括水平前額紋、眉間皺眉紋、眶週紋、魚尾紋、兔紋(即，鼻子兩側向下放射的紋)、鼻唇溝、上唇唇線、下唇唇線、嘴角線、木偶線、口周唇線、口腔連合、唇頰皺痕和鵝卵石下巴。

第 56 頁，共 73 頁(發明說明書)

【0167】 為了治療上述面部皺紋，通常將肉桿菌素通過肌肉注射的方式，施加到以下肌肉：額肌(額頭橫紋)、降眉肌和皺眉肌(眉間皺眉紋)、眼輪匝肌(魚尾紋/眶週線)、鼻肌、鼻橫肌(兔子線)、提上唇肌(鼻唇溝)、口輪匝肌(上下唇線)、降口角肌(嘴角線、木偶紋、口腔連合、唇頰摺痕)和頰肌(口周唇紋、鵝卵石下巴)。

【0168】 本發明的液體製劑的另一個較佳的美容用途係涉及美容應用的用途，所述美容應用包括面部和/或身體的皮膚質量的回春(rejuvenation)和/或改善。

【0169】 在第七方面，本發明涉及一種治療疾病或病症的方法，其包括向有需要的人施加有效量的本發明所述的液體製劑。

【0170】 疾病或病症可以是上述所提到的疾病和狀況中的任一種，無論其是治療適應症還是美容適應症。因此，在一個實施例中，本發明涉及一種美容(醫美)狀況，較佳是皮膚狀況的處理(非治療性)方法，包括向有需要的人施用有效量的本發明所述的液體製劑。在另一個實施例中，本發明涉及一種美容(醫感)狀況，較佳是皮膚狀況的處理(非治療性)方法，包括將有效量的本發明所述液體製劑注射到有需要的人體內。

【0171】 本發明的另一較佳方法涉及一種使面部和/或身體皮膚質量回春和/或改善的方法，包括向需要的人施用有效量的本發明所述的液體製劑。

【0172】 除了患有可以根據本發明所述方法進行治療的疾病或狀況之外，待治療的人沒有特別的限制。本領域中的技術人員將能夠決定用於治療給定適應症或美容狀況的適當施給藥方

案。具體而言，注射可以是皮內、皮下(subdermal (subcutaneous))或肌內注射，這取決於待治療的疾病或狀況。

【0173】 除上述之外，本發明還涉及一種用於穩定液體肉毒桿菌素製劑的方法，該方法包括將肉毒桿菌素與人類血清白蛋白(HSA)加以組合，其中所述HSA是通過純化人類血清白蛋白來製備的。獲得如本發明第四方面所述的純化後的人類血清白蛋白材料的起始材料。

【0174】 此外，本發明還涉及一種將人類血清白蛋白(HSA)用於提供包含肉毒桿菌素的液體組合物的光和溫度穩定的用途，其中所述HSA是通過純化人類血清白蛋白起始材料來獲得如本發明第四方面所述的純化後的人類血清白蛋白材料。

實施例

I. 實施例1-3

【0175】 以下實施例說明本發明所述的液體肉毒桿菌素製劑及其製備方法。除非另有說明，所述的百分比為重量體積比(w/v)。

【0176】 肉毒桿菌素的生物活性，是使用如WO 2014/207109中所述的以細胞為基底的效價分析法(cell-based potency assay, CBA)來加以確定。簡而言之，將神經元細胞與含有神經毒素的樣品和已知效價的參考標準一起培養。

【0177】 培養期過後，將細胞裂解並通過免疫分析法(Immunoassay)來測定裂解後SNAP25蛋白的含量。然後藉由比較採用樣品進行處理後的細胞裂解率與採用參考標準進行處理後的細胞裂解率，來計算樣品的生物活性。

實施例1

含有經過傳統透析預處理之HSA的液體肉毒桿菌素製劑(非根據本發明)的光和儲存穩定性

【0178】 在最初的實驗中，發現不含複合蛋白的150kDa的血清型A肉毒桿菌神經毒素液體製劑(本說明書中也稱為「150kDa BoNT/A」)，其生物活性在暴露於光線(日光或室內光)後會劇烈低，且光敏感性會隨著人類血清白蛋白(HSA)濃度的增加而增加。在進一步的實驗中，本發明人意外地發現，通過添加錯合劑(complexing agent)，例如EDTA，可以顯著提高液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性和在40°C下的儲存穩定性，即使EDTA是以其鎂、鈣或鋅複合物的形式存在(結果未顯示)。

【0179】 鑑於這些發現，推測HSA中的某些未知成分會引發肉毒桿菌素的光敏性，且該成分可能以某種方式被螯合劑，例如EDTA，滅活或掩蔽。然而，在本發明人的進一步實驗中，令人驚訝地發現EDTA和導致注射疼痛感增加。因此，為了省去螯合劑，例如EDTA，本發明人嘗試通過透析的方式移除HSA中會導致光不穩定的未知成分。

【0180】 為達到此目的，在室溫下針，使用含有10mM組氨酸、0.9% NaCl、pH質為 6.0的緩衝液，對HSA(例如，20%)濃縮的儲備溶液(stock solutions)進行廣泛透析(extensively dialyzed)，持續4×12小時(緩衝液更換三次，緩衝液體積約為樣品體積的100倍)以獲得「透析後的HSA」。然後，分別使用透析

後的HSA和未透析的HSA來製備下述的肉毒桿菌毒液體製劑
(150 kDa BoNT/A，不含複合蛋白)：

製劑 1：65U/mL 肉毒桿菌素、0.1% HSA (未透析)、10mM
組氨酸、0.9% NaCl、pH值為6.0。

製劑 2：65U/mL 肉毒桿菌素、0.1% HSA (已透析)、10mM
組氨酸、0.9% NaCl、pH值為6.0。

【0181】 這兩種製劑的光穩定性，可以藉由測量暴露於
250W/m² 的光7小時後，相對於儲存在黑暗中的對照組樣品，的
肉毒桿菌素相對活性來加以判定。為了暴露於250W/m²光下17小
時，使用 SUNTEST CPS+ 儀器(ATLAS Material Testing
Technology LLC)，用以提供對應於ISO 10977 的ID65(室內間
接日光標準)，波長範圍介於320nm至800nm之間的光譜分佈，並
配備有符合ICH Q1B的窗式玻璃濾光片(window glass filter)。
測量結果如表1所示。

表 1. 含有未透析HSA或含有已透析HSA的液體肉毒桿菌素
製劑的光穩定性(7小時，250W/m²):

BoNT/A 製劑	透析	BoNT/A的相對活性(相對於對照組的%)
1	no	46%
2	yes	56%

【0182】 從表1中可以明顯看出，與含有未透析HSA的製劑1相比，含有已透析HSA的製劑2僅觀察到對光穩定性的有限影響。

【0183】 此外，通過測量在40°C下儲存2周和4週後，相對於對照組樣品在T0時，的肉毒桿菌素相對活性(在製劑1和2製備後立即測量)來判定製劑1和2的儲存穩定性。結果如表2所示。

表 2. 含有未透析HSA或含有已透析HSA的液體肉毒桿菌素製劑在40°C下的儲存穩定性:

BoNT/A 製劑	透析	BoNT/A 的相對活性(相對於 T0 時的對照組%)	
		在 40°C 下儲存 2 周	在 40°C 下儲存 4 周
1	no	66%	52%
2	yes	65%	51%

【0184】 可以看出，透析對於肉毒桿菌素的儲存穩定性沒有影響。

實施例2

含有經過錯合劑和透析預處理之HSA的液體肉毒桿菌素製劑的光和儲存穩定性

【0185】 儘管有實施例1的發現(即，光穩定性需要EDTA或EDTA複合物；已透析的HSA不會導致光穩定性和儲存穩定性的顯著改善)，發明人仍繼續研究出儘管不含EDTA等螯合劑但仍具有光穩定性和儲存穩定性的液體肉毒桿菌素製劑。

【0186】 首先，將EDTA添加至HSA濃縮儲備溶液(例如，20%)(100mM=含37.2mg Na₂-EDTA/ml的HSA溶液，pH值為8.0)，並下在室溫下攪拌醞釀6小時。然後，採用含有EDTA的緩衝液(100mM EDTA、10mM組氨酸、0.9% NaCl，pH值為7.0)，在室溫下對醞釀後的混合物進行透析16小時。所使用的透析膜的載留分子量為10kDa，且透析膜的填充體積為每cm²約0.2ml。透析緩衝液的體積約為樣品體積的100倍。

【0187】 之後，在室溫下採用體積為樣品體積約100倍，不含EDTA的透析緩衝液(10mM組氨酸，0.9% NaCl，pH值為6.0)進行透析24小，藉以移除EDTA。然後，用新鮮的透析緩衝液替換透析緩衝液，並再次進行透析24小時。重複兩次，以獲得預處理後的HSA (「經過EDTA透析後的HSA」)。

【0188】 然後使用經過預處理的HSA來製備肉毒桿菌素的液體製劑3(150kDa BoNT/A，無復合蛋白)。

製劑1：與實施例2的製劑1相同(65U/mL肉毒桿菌素，0.1% HSA(未透析)、10mM組氨酸、0.9% NaCl，pH值為6.0。

製劑 3：65U/mL 肉毒桿菌素、0.085% HSA(經過EDTA透析後)、10mM組氨酸、0.9% NaCl、pH值為6.0。

【0189】 製劑1和3的光穩定性可以通過測量暴露在250W/m²的光線7小時後，相對於儲存在黑暗中的對照組樣品，的肉毒桿菌素相對活性來判定。測量結果如表3所示。

表 3. 含有未透析HSA或經過EDTA透析後的HSA的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性(7小時，250W/m²):

BoNT/A 製劑	EDTA/ 透析	BoNT/A 的相對活性(相對於對照組的%)
1	no	46%
3	yes	84%

【0190】 如從表3中明顯看出的，與含有未經過預處理的HSA的製劑1相比，可以觀察到:含有經過EDTA透析後之HSA的製劑3，其光穩定性獲得顯著改善。

【0191】 此外，通過測量在40°C儲存2周和4週後，相對於T0時對照組樣品，的肉毒桿菌素相對活性(在製劑1和3製備後立即測量)來判定儲存穩定性。測量結果如表4所示。

表 4. 含有非透析HSA或含有經過EDTA透析後的HSA的液體肉毒桿菌素製劑在40°C下的儲存穩定性:

BoNT/A 製劑	EDTA/ 透析	BoNT/A 的相對活性(相對於 T0 時的對照組 %)	
		在 40°C 下儲存 2 周	在 40°C 下儲存 4 周
1	no	66%	52%
3	yes	94%	82%

【0192】 結果表明，與含有未處理(未透析)HSA的製劑1相比，經過EDTA處理和透析後的HSA，可以顯著地提高生物毒素的活性。

【0193】 綜上所述，上述實施例可以看出，如果使用螯合劑對HSA進行預處理，然後再通過，例如透析，移除螯合劑，可以出乎意料地從液體製劑中省略螯合劑(例如EDTA)。所獲得的製劑不僅對光和溫度(儲存)穩定，而且與含有螯合劑(例如 EDTA)的液體製劑相比，也可以減輕注射時的注射疼痛感。

實施例3

鐵離子對液體肉毒桿菌素製劑光穩定性的影響

【0194】 進行後續的實驗來研究金屬離子對光敏感性的影響。為此，將鈣(1mM Ca^{2+})、鈷(1mM Co^{2+})、銅(1mM Cu^{2+})、鎳(1 mM Ni^{2+})或鐵(1mM Fe^{3+})添加到含有50 U/ml的液體製劑中。其中，液體製劑包括150kDa BoNT/A、根據實施例2所製備的0.085%經過預處理的HSA(即經過EDTA處理和透析後的HSA)、10mM組氨酸、0.9% NaCl，pH值為6.0。所述液體製劑是用高純水、組氨酸和氯化鈉製備的，並且沒有使用鋼鐵設備。將所獲得的製劑暴露於光線(250W/m²下，7小時)並與儲存在黑暗中的對照組製劑進行比較。

【0195】 發現當與未添加鈣和鈷的製劑相比(與儲存在黑暗中的對照組製劑相比，殘餘的毒素活性為79%)，鈣(1mM Ca^{2+})的添加與鈷(1mM Co^{2+})的添加，對光穩定性沒有影響(與儲存在黑暗中的對照組製劑相比，殘餘的毒素活性為74%和77%)。添加銅 (1mM Cu^{2+}) 和鎳(1mM Ni^{2+})導致光穩定性降低的程度相對較

小。相反地，添加鐵(1mM Fe³⁺)反而會導致光穩定性急劇下降，與儲存在黑暗中的對照組製劑相比，暴露在光線下(250W/m²下，7小時)後，僅殘留1% 的殘餘毒素活性(結果未顯示)。

【0196】 根據上述結果，更進一步研究在10pM和100μM的濃度範圍內，Fe³⁺離子對於液體BoNT/A製劑的光敏感性的影響。與上述實驗類似，使用包含經過預處理的HSA(50U/ml肉毒桿菌素、0.085%經過預處理的HSA、10mM組氨酸、0.9% NaCl，pH值為6.0)的相同製劑，並且使用儲備溶液 (50mM Fe(NO₃)₃)，將Fe³⁺濃度調節至獲得所需的最終濃度。表5顯示在 250W/m² 光照下7小時後所測量到的生物活性，以及在黑暗中保存的各個樣品的所測量到的生物活性百分比。

表 5. 含有經過預處理的HSA和不同 Fe³⁺濃度的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性(7小時，250W/m²):

BoNT/A 製劑	[Fe ³⁺]	BoNT/A 的相對活性 (在黑暗中保存的%)
1	100 μM	0.4%
2	1 μM	9%
3	316 nM	66%
4	100 nM	82%
5	32 nM	77%
5	10 nM	75%
4	100 pM	74%
5	10 pM	78%
6	0 pM	78%

【0197】 從表4可以看出，在316nM濃度下， Fe^{3+} 離子對BoNT/A穩定性有顯著影響，穩定性下降>15%。在濃度為1 μM 時，製劑的光穩定性顯著降低；然而，仍然高於濃度大於1 μM 時的光穩定性。當濃度為1 μM 或更高時，添加的 Fe^{3+} 離子，在光影響下，對液體製劑中BoNT/A的穩定性產生極其負面的影響。

【0198】 在另一實驗中，發現攪拌含有經過預處理的HSA的液體肉毒桿菌素製劑(即，50U/ml肉毒桿菌素、0.085%經過預處理的HSA、10mM組氨酸、0.9% NaCl，pH值為6.0)，在不銹鋼燒杯中攪拌48小時，並暴露於光線(250W/m²，7小時)後，其量測所得的BoNT/A相對活性僅為約2%。而同一樣品在聚丙烯容器中攪拌48小時後，其量測所得的BoNT/A 相對活性為78%。這是一個非常令人驚訝的發現，可能是由於少量的 Fe^{3+} 離子從不銹鋼燒杯浸出到液體肉毒桿菌素製劑中所引起的，且這表明鐵離子是製備液體肉毒桿菌素製劑時所需要考慮的重要因素。

II. 實施例4-6

【0199】 以下實施例4至6進一步證明了根據本發明所述的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性。為此，製備了幾種液體肉毒桿菌素製劑(實施例4)，並且將每種所述製備的製劑的樣品暴露於250W/m²的光線下7小時或在黑暗中保存7小時作為對照組。然後，通過以細胞為基底的效價分析法(CBA)測量光照樣品和黑暗

保存樣品的肉毒桿菌素活性。光穩定性是以暴露於光線下之樣品的肉毒桿菌素活性的量測平均值以及黑暗保存樣品的肉毒桿菌素活性的量測平均值二者的百分比來表示。

【0200】 肉毒桿菌素的生物活性，是使用如WO 2014/207109中所述的以細胞為基底的效價分析法(CBA)來加以判定。簡而言之，將神經元細胞與含有神經毒素的樣品和已知效價的參考標準一起培養。培養期過後，將細胞裂解並通過免疫分析法來測定裂解後SNAP25蛋白的含量。然後藉由比較採用樣品進行處理後的細胞裂解率與採用參考標準進行處理後的細胞裂解率，來計算樣品的生物活性。

【0201】 為了暴露於250W/m²光下7小時，使用 SUNTEST CPS+ 儀器(ATLAS Material Testing Technology LLC)，用以提供對應於ISO 10977 的ID65(室內間接日光標準)，波長範圍介於320nm至800nm之間的光譜分佈，並配備有符合ICH Q1B的窗式玻璃濾光片。測量結果如表1所示

實施例4

不同肉毒毒素製劑的製備

【0202】 待分析光穩定性的製劑，其組成分標示於表6和7中。所使用的肉毒桿菌素(BoNT)為NT101。

表 6. 含有未經處理/預處理的HSA的測試製劑:

第 67 頁，共 73 頁(發明說明書)

組成分		製劑			
		I	II	III	IV
BoNT (U/ml)		50	50	50	50
HSA (mg/ml)	未經處理	1.0	-	1.0	-
	已透析	-	1.0	-	-
	EDTA-透析	-	-	-	0.85
NaCl (mg/ml)		9	9	9	9
組胺酸(mg/ml)		1.55	1.55	1.55	1.55
EDTA (mg/ml)		-	-	1.30	-
pH 值		6.0	6.0	6.0	6.0

表 7. 含有色氨酸 (Trp)/N-乙醯基色氨酸(N-AcTrp)的測試製劑:

組成分		製劑						
		1	2	3	4	5	6	7
BoNT (U/ml)		50	50	50	50	50	50	50
HSA EDTA-dial. (mg/ml)		0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
NaCl (mg/ml)		9	9	9	9	9	9	9
組胺酸(mg/ml)		1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
色氨酸 (mM)		-	-	-	-	10	0.08	-
N- 乙 醯 基 色 氨 酸 (mM)		10	2	0.4	0.08	-	-	-
pH 值		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

【0203】 製備「已透析的HSA」。將 10ml HSA 25% (CSL Behring) 轉移至透析卡匣(dialysis cassette)(Slide-A-Lyzer™, 10kDa MWCO, 12-30ml, Thermo

Scientific/Pierce)。將透析卡匣置於2升1.55g/l組氨酸、9g/l，pH值為6.0的溶液中，並在避光和攪拌(150rpm，磁力攪拌器)下進行透析24小時。隨後，用2升新鮮透析緩衝液(1.55g/l組氨酸、9g/l NaCl，pH值為6.0)替換透析緩衝液，並將此製程再重複3次，每次約12小時。透析卡匣中所得的內容物被稱為已透析的HSA或「HSA-透析」。其濃度如下所述。

【0204】 HSA-EDTA-透析的製備。將18ml HSA 25% (CSL Behring)與2ml 1M Na₂EDTA(pH值為8.0)混合。將所得溶液攪拌約6小時。然後，將約15ml溶液轉移至透析卡匣 (Slide-A-Lyzer™，10kDa MWCO，12-30ml，Thermo Scientific/Pierce)。將透析卡匣於2升1.55g/l組氨酸、9g/l NaCl、37.2g/l Na₂EDTA，pH值為7.0的溶液中，並在避光和攪拌(150rpm，磁力攪拌器)下進行透析24小時。

【0205】 接下來，將透析緩衝液更換為2升的1.55g/l組氨酸、9g/l NaCl，pH值為7.0，隨後進行三個循環，透析約12小時，並用2升新鮮透析液更換透析緩衝液。緩衝液(第一次緩衝液改變為 His/NaCl，pH值為6.5，第二次和第三次緩衝液改變為 His/NaCl，pH值為6.0)。透析卡匣中的最終內容物是經過 EDTA 透析的HSA材料(或「HSA-EDTA-透析」)。

【0206】 由於透析期間體積增加，透析後的HSA濃度通常顯著低於起始HSA溶液的濃度(25% w/v)。由於高蛋白質濃度預計不會造成顯著損失，因此認為HSA的絕對量沒有變化，並且根據本

領域技術人員已知的體積變化來計算濃度。透析後的HSA濃度測定為約8.1% w/v。

【0207】 安慰劑本體溶液(placebo bulk solutions)的製備。為了製備表6和7中所示但不含活性劑(BoNT)的製劑(本文稱為「安慰劑本體溶液」)，秤取HSA起始材料、NaCl和組氨酸，並將其溶解在水(Milli-Q)中。製備50mM色氨酸(Trp)和N-乙醯基色氨酸(N-AcTrp)儲備溶液(在溫水中分別為10.212g/l 和12.313g/l)，並根據所需色氨酸和N-乙醯基色氨酸的最終濃度劑量進行給藥。最後，通過添加1M NaOH或1M HCl將pH值調節至6.0，用水補足至最終體積，並將溶液通過0.22μm的過濾器進行無菌過濾。

【0208】 BoNT預稀釋液的製備。秤取13.44mg NT101放入無菌50ml低蛋白結合收集管(low protein binding tube)中，並與20.123g製劑7的無菌過濾後的安慰劑本體溶液混合，藉以獲得含有25,000U/ml BoNT的預稀釋液。

【0209】 樣品的製備。將20.0μl BoNT預稀釋液置於15ml無菌低蛋白結合管中，並添加9.98ml相應的安慰劑本體溶液。將溶液輕輕地上下顛倒10次以混合。然後，將3×1ml的每種溶液放入1.5ml低蛋白結合管中，並將這些管暴露在功率為250W/m²的光線下7小時。其餘的樣品溶液用鋁箔覆蓋，並在4°C下批量儲存直至測量(「黑暗儲存對照組」樣品)。

實施例5

不同液體BoNT製劑的光穩定性比較

【0210】 使用以細胞為基底的效價分析法(CBA)來測量表6中編號I至IV的製劑樣品中的肉毒桿菌素活性(進行多次測量)。其中，樣品是暴露於250W/m²的光線下7小時或在黑暗中儲存7小時。其結果是以光暴露樣品的活性，相對於黑暗存儲對照組樣品的活性，二者的百分比形式表示於表8中。

表8. 不同液體BoNT製劑的光穩定性比較：

BoNT 製劑		BoNT/A 的相對活性(相對於黑暗存儲對照組的%)
編號.	HSA	
I	HSA-未處理	46
II	HSA-透析	56
III	HSA 未處理+ EDTA	80
IV	HSA-EDTA-透析	84

【0211】 從表8可以看出，HSA的透析在一定程度上增加了BoNT對於光暴露的穩定性(參見製劑II與製劑I)。將 EDTA 添加到未處理的HSA中，具有顯著正面擴大的效果(參見配方 III)。然而，添加EDTA並不能完全防止光的不穩定效應。最佳的光穩定性，可以通過用EDTA進行預醞釀(pre-incubation)，隨後以不含EDTA的組氨酸緩衝液進行透析(參見配方 IV)來加以實現。這表明實驗所觀察到的光穩定性，可能不僅僅歸因於金屬離子，而是歸因於其他未知化合物。

實施例6

存在和不存在色氨酸和 N-乙醯基色氨酸時液體BoNT製劑的光穩定性

【0212】 使用以細胞為基底的效價分析法(CBA)來測量表7中製劑1至7樣品的肉毒桿菌素活性(進行多次測量)。其中，樣品是暴露於250W/m²的光線下7小時或在黑暗中儲存7小時。其結果是以光暴露樣品的活性，相對於黑暗存儲對照組樣品的活性，二者的百分比形式表示於表9中。

表 9. 存在或不存在色氨酸或N-乙醯基色氨酸時液體BoNT製劑的光穩定性比較：

BoNT 製劑			BoNT/A 的相對活性(相對於黑暗存儲對照組的%)
編號.	N-乙醯基色氨酸 (mM)	色氨酸 (mM)	
1	10	-	6
2	2	-	8
3	0.4	-	45
4	0.08	-	73
5	-	10	8
6	-	0.08	67
7	-	-	85

【0213】 可以看出，色氨酸和N-乙醯基-色氨酸二者均以劑量依賴性方式(dose dependent manner)，對BoNT液體製劑的光穩定性顯現出顯著的負面影響。在較高濃度(分別為10mM和2mM)下，光穩定性降低效果非常明顯，導致相對生物活性極低

(<10%)。在 色氨酸和N-乙醯基-色氨酸濃度低至80 μ M 時，與不含色氨酸和N-乙醯基-色氨酸的對照組製劑相比，暴露於光後BoNT的生物活性降低約10%(參見製劑4和6對比於製劑7)。

【0214】 80 μ M N-乙醯基色氨酸的濃度，相當於將25% w/v 的HSA起始材料(含有20mM N-乙醯基色氨酸)稀釋至0.1% w/v 或 1 mg/ml HSA。由於1mg/ml HSA是落入肉毒桿菌素製劑中通常使用的濃度範圍內的值，因此使用這種HSA起始材料，會導致BoNT/A製劑中的N-乙醯基-色氨酸濃度具有增加製劑光敏性的效應。因此，此色氨酸和N-乙醯色氨酸對於光穩定性產生負面影響的濃度範圍，具有重要的實際意義。

【符號說明】無。

【生物材料寄存】無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種液體製劑(liquid formulation)，包括：

(i) 一肉毒桿菌素(botulinum toxin)；以及

(ii) 一人類血清白蛋白(human serum albumin, HSA)；

其中該液體製劑含有小於 $1\mu\text{M}$ ，較佳小於 500nM ，更佳小於 250nM ，最佳小於 100nM 的一 Fe^{3+} 離子濃度。

【請求項2】 一種液體製劑，包括：

(i) 一肉毒桿菌素；以及

(ii) 一人類血清白蛋白；

其中該液體製劑不含和含有不超過 $50\mu\text{M}$ 的色氨酸(tryptophan)和 N-乙醯基色氨酸(N-acetyl-tryptophan)。

【請求項3】 一種液體製劑，包括：

(i) 一肉毒桿菌素；以及

(ii) 一人類血清白蛋白；

其中該液體製劑的一製備方法包括下述步驟：

(a) 將該人類血清白蛋白與一螯合劑(chelating agent)接觸，藉以獲得一人類血清白蛋白和螯合劑的混合物；以及

(b) 從該人類血清白蛋白和螯合劑的混合物中移除該螯合劑。

【請求項4】 如請求項1所述的液體製劑，其中該液體製劑的一製備方法包括下述步驟：

(a)將該人類血清白蛋白與一螯合劑接觸，藉以獲得一人類血清白蛋白和螯合劑的混合物；以及

(b)從該人類血清白蛋白和螯合劑的混合物中移除該螯合劑。

【請求項5】 如請求項3或4所述的液體製劑，其中在步驟(a)中，將一人類血清白蛋白原料與該螯合劑接觸，得到一人類血清白蛋白原料和螯合劑的混合物；在步驟(b)中，從該混合物中移除該螯合劑，得到一經過預處理的人類血清白蛋白原料；以及在進一步的一步驟(c)中，將該經過預處理的人類血清白蛋白材料與該肉毒桿菌素混合；其中該螯合劑較佳係藉由一透析(dialysis)、一過濾(filtration)、一掃流過濾(crossflow filtration)或一超濾(ultrafiltration)來移除；或

其中，在步驟(a)中，將包該含肉毒桿菌素和一人類血清白蛋白的一液體預製劑(liquid pre-formulation)與該螯合劑接觸，藉以獲得一液體預製劑和螯合劑的混合物，並且在步驟(b)中，從該液體預製劑和螯合劑的混合物中移除該螯合劑，以獲得該液體製劑；其中該螯合劑較佳係藉由一透析、一過濾、一掃流過濾或一超濾來移除。

【請求項6】 如請求項1至5中的任一者所述的液體製劑，其中該人類血清白蛋白在該液體製劑中的一含量介於0.001% w/v至1.00% w/v之間。

【請求項7】 如請求項2所述之液體製劑，其中該液體製劑具有小於1000nM，較佳小於500nM，更佳小於250nM的一 Fe^{3+} 離子濃度。

【請求項8】 如請求項1至7中的任一者所述的液體製劑，其中該液體製劑更包括：

(iii)一張力劑(tonicity agent)；或

其中該液體製劑更包括：

(iii) 一張力劑，其中該張力劑在該液體製劑中的一含量，介於0.01% w/v至2.0% w/v之間；或該張力劑為氯化鈉；或者該張力劑為氯化鈉，且在該液體製劑中的一含量，介於0.01% w/v至2.0% w/v之間。

【請求項9】 如請求項1至8中的任一者所述的液體製劑，其中該液體製劑更包括：

(iv) 一緩衝劑(buffering agent)；或

其中該液體製劑更包括：

(iv) 一緩衝劑，其中該緩衝劑在該液體製劑中的一濃度，介於1mM至100mM之間；或其中該緩衝劑為一氨基酸、一磷酸鹽或其混合物；或其中該緩衝劑為一組氨酸；或其中該緩衝劑為一組氨酸、一磷酸鹽或其混合物，且該組氨酸和該磷酸鹽在該液體製劑中的一濃度，介於1mM至100mM。

【請求項10】一種製備如請求項2或7或請求項8至9中的任一者，只要是依附於請求項2，所述的該液體製劑的方法，其中該方法包括下述步驟：

- 純化一人類血清白蛋白起始材料，藉以獲得一純化後的人類血清白蛋白材料；

- 將該純化後的人類血清白蛋白材料與該肉毒桿菌素以及一可選性的其他組成分混合，藉以獲得該液體製劑；或

- 純化包含該肉毒桿菌素和該人類血清白蛋白的一液體組合物，藉以獲得一純化後的液體組合物；

- 將該純化的液體組合物與一另外組成分混合，藉以獲得該液體製劑；

其中，該純化步驟較佳係通過對該人類血清白蛋白起始材料或包含該肉毒桿菌素和該人類血清白蛋白的該液體組合物進行一透析、一滲濾(diafiltration)、一超濾、一離子交換層析(ion exchange chromatography, IEC)、一親和層

析(affinity chromatography)、一疏水作用層析(hydrophobic interaction chromatography, HIC)、一場流分離(field-flow fractionation)、或一沉澱(例如, 鹽沉澱、乙醇沉澱)來進行。

【請求項11】如請求項10所述的液體製劑的製備方法, 其中該純化步驟如下述進行, 或者其中該純化步驟更包括:

- 將該人類血清白蛋白起始材料與該螯合劑接觸, 藉以獲得該人類血清白蛋白起始材料和螯合劑的混合物; 以及

- 從該人類血清白蛋白起始材料和螯合劑的混合物中移除該螯合劑, 以得到一經過螯合劑處理且純化後的人類血清白蛋白材料; 或

- 將包含該肉毒桿菌素和該人類血清白蛋白的該液體組合物與該螯合劑接觸, 藉以獲得一液體組合物和螯合劑的混合物, 以及

- 從該液體組合物和螯合劑的混合物中移除該螯合劑, 以獲得一螯合劑處理且純化後的液體製劑;

其中, 在該液體製劑的製備方法, 使(i)和(ii)接觸的步驟中, 較佳使該混合物中的該螯合劑, 具有介於1mM至500mM之間的一濃度; 且/或該螯合劑係通過該透析、該流過濾或該超濾來移除。

【請求項12】如請求項3至6及8和9中的任一者所述的液體製劑，或如請求項10或11所述的液體製劑的製備方法，其中該螯合劑係選自於由具有三至六個羧酸官能基的氨基多羧酸(aminopolycarboxylic acids)、檸檬酸鹽、卟啉(porphyrins)、N,N,N',N'-四(2-吡啶基甲基)-1,2-乙二胺(N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine, TPEN)、三乙烯四胺(triethylenetetramine, TETA)及上述任意混合物所組成的一群組；

較佳地，其中該螯合劑係由一通式(I)所表示的一氨基多羧酸化合物：



其中R不含羧酸官能基或含有1個或2個羧酸官能基；該氨基多羧酸化合物較佳係選自於由乙二胺四乙酸

(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、乙二醇-雙

(1,4,7,10-四乙酸酯)(ethylene

glycol-bis(o-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic

acid, EGTA)、1,2-雙(鄰氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸

(1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, BAPTA)、二乙烯三胺五乙酸

(diethylenetriaminepenta-acetic acid, DTPA)、三乙烯四

胺六乙酸(triethylenetetraminehexaacetate, TTHA)及上述任意混合物所組成的一群組。

【請求項13】如請求項至1至9和12中的任一者所述的液體製劑，或如請求項10或11所述的液體製劑的製備方法，其中該肉毒桿菌素為一肉毒桿菌神經毒素(Botulinum neurotoxins, BoNT)複合物；或其中該肉毒桿菌素為一不含複合蛋白(complexing proteins)的肉毒桿菌神經毒素；或其中該肉毒桿菌素為一血清型A；或其中該肉毒桿菌素為一不含複合蛋白的血清型A肉毒桿菌神經毒素；或其中該肉毒桿菌素為一血清型A，且以介於1U/ml至1000U/ml的一濃度存在；或其中該肉毒桿菌素為一不含複合蛋白的血清型A肉毒桿菌神經毒素，且以介於1U/ml至1000U/ml的一濃度存在；或其中該液體製劑的一pH值介於5.0至8.0之間的一範圍。

【請求項14】一種使用如請求項至1至9、12和13中的任一者所述的液體製劑來治療，特別是治療神經肌肉疾病(neuromuscular diseases)、流涎(sialorrhea)、疼痛(pain)、流涎(sialorrhea)、多汗症(hyperhidrosis)、泌尿系統疾病(urological disorder)和神經系統疾病(neurological disorders)的用途。

【請求項15】一種使用如請求項至1至9、12和13中的任一者所述的液體製劑來處理一美容狀況(cosmetic condition)的用途。

【發明摘要】**【中文發明名稱】** 液體製劑及其製備方法與用途**【英文發明名稱】** LIQUID FORMULATION PREPARING METHOD
AND USE THEREOF**【中文】**

本發明涉及一種液體製劑，其包含(i)肉毒桿菌素、(ii)人類血清白蛋白和可選擇性的(iii)張力劑和/或(iv)緩衝劑。一方面，液體製劑的特徵在於鐵離子濃度非常低。另一方面，液體製劑的特徵在於不含或含濃度非常低的色氨酸和/或 N-乙醯基-色氨酸。根據本發明，液體製劑可以通過包括下述步驟的方法來製備：將人類血清白蛋白與螯合劑接觸以獲得混合物，並從混合物中移除螯合劑。此外，本發明涉及此液體製劑在治療適應症和美容狀況中的用途。

【英文】

The present invention relates to a liquid formulation comprising (i) botulinum toxin, (ii) human serum albumin (HSA), and optionally (iii) a tonicity agent and/or (iv) a buffering agent. In one aspect, the liquid formulation is characterized by a very low iron ion concentration. In another aspect, liquid formulation is characterized by the absence or very low concentration of tryptophan and/or

N-acetyl-tryptophan. According to the present invention, the liquid formulation can be prepared by a method comprising the steps of contacting human serum albumin with a chelating agent to obtain a mixture and removing the chelating agent from the mixture. Furthermore, the present invention relates to the use of the liquid formulation in the treatment of therapeutic indications and cosmetic conditions.

【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】液體製劑及其製備方法與用途

【英文發明名稱】LIQUID FORMULATION PREPARING METHOD
AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種液體製劑，其包含(i)肉毒桿菌素(botulinum toxin, BT)、(ii)人類血清白蛋白(human serum albumin, HSA)以及選擇性的(iii)張力劑(tonicity agent)和/或(iv)緩衝劑。此液體製劑的特徵在於具有非常低的鐵濃度(iron concentration)和/或不包含或存在非常低濃度的色氨酸(tryptophan)和/或N-乙醯基-色氨酸(N-acetyl-tryptophan)；本發明特別是有關於一種通過下述方法所製備的液體製劑，此方法包括下述步驟：使用人類血清白蛋白(Human Serum Albumin)與螯合劑(chelating agent)接觸以獲得混合物，並從混合物中除去螯合劑。此外，本發明更涉及液體製劑在處理治療適應症(therapeutic indications)和美容狀況(cosmetic conditions)的用途。

【先前技術】

【0002】 肉毒桿菌神經毒素(Botulinum neurotoxins, BoNT；或肉毒桿菌素(BT))是一種細菌神經毒素家族，廣泛用於治療越來越多的

神經病學、醫學和美容狀況。有八種被廣泛接受的「經典」肉毒桿菌神經毒素血清型(BoNT serotypes)，後續以 BoNT/A-H表示之)。目前臨床所使用的兩種血清型為血清型A(以下簡稱BoNT/A)和血清型 B (以下簡稱BoNT/B)。肉毒桿菌神經毒素(以下簡稱BoNT)是由梭菌屬(Clostridium spp)，特別是肉毒梭菌(Clostridium botulinum)所產生的高分子量(高達約 900 kDa)形式的毒素複合物。這些毒素複合物由活性 150 kDa神經毒素和幾種複合蛋白(無毒神經毒素相關蛋白(non-toxic neurotoxin-associated proteins, NAPs，NAP))所組成。

【0003】 其中，150kDa神經毒素可以被合成為一種無活性的單鏈多肽(～150kDa)，其經過蛋白水解切割而可以形成一個輕鏈(LC，～50kDa)和一個重鏈(HC，～100kDa)，二者通過一個鏈間二硫鍵(inter-chain disulfide bond)相互連接。重鏈包括一個用於介導連結至受體的C 端結構域(C-terminal domain)和一個用於介導輕鏈錯位轉接(translocation)以橫跨內體膜(endosomal membranes)的 N 端結構域(N-terminal domain)。輕鏈在神經元中作為蛋白酶，用於裂解神經元 SNARE 蛋白。可阻止突觸囊泡(synaptic vesicle)與原生質膜(plasma membrane)的融合，從而抑制被選定的神經元釋放神經傳遞物質(neurotransmitters release)。

【0004】 由於BoNT的結構複雜性和所使用產品的低濃度，使得BoNT的配製非常具有挑戰性。BoNT對於各種條件(例如，熱且pH值呈鹼性)高度敏感。由於BoNT僅在其結構完整的情況下才具有功能，因此製備BoNT醫用劑型的挑戰是，配製一種組合物，可以在其生產、

儲存或使用過程中，保護產品中的BoNT免於失效(*inactivation*)或部分喪失生物活性。另一個問題是，BoNT的醫藥製劑包含極少量的高效毒素(人類致死劑量為約0.1至1ng/kg)，且每瓶僅約1ng。這加劇了起因於表面變性(*surface denaturation*)所導致的毒素活性喪失的問題。此外，BoNT製劑廣泛使用在不同應用領域，因此必須適合注射到不同類型的組織，例如肌肉、不同皮膚層(例如真皮、皮下組織)或腺體(例如唾液腺)。

【0005】鑑於上述情況，目前市面上的主要BoNT產品均以冷凍乾燥粉末(*lyophilized powders*)的形式提供，即在2-8°C甚至室溫下保存時，可以長期穩定的形式(例如Xeomin®)。冷凍乾燥形式的二種BoNT/A複合物，分別於1989年(Botox®, Allergan)和 1991年(Dysport®, Ipsen)首次投放市場。2005年，第一個不含複合蛋白的純150 kDa BoNT/A神經毒素的穩定劑型獲得批准(Xeomin®; Merz Pharmaceuticals)。然而，這些冷凍乾燥產品需要在使用前復溶(*reconstituted*)，這一過程可能會衍生劑量錯誤和無菌問題。因此，人們致力於開發更方便使用且易於給藥的BoNT液體製劑。

【0006】第一個BoNT液體製劑於2000年獲得批准，並於2001年在歐洲上市，名為 Neurobloc®。Neurobloc®(Eisai)是一種 BoNT/B複合物的無菌溶液，其配製在含有琥珀酸二鈉(*disodium succinate*)、氯化鈉、人類血清白蛋白(HSA)、辛酸鈉和 N-乙醯基色氨酸鈉的緩衝液中。然而，由於該產品的pH值為酸性，注射時可能會感到疼痛。對於 BoNT/A，迄今為止只有兩種液體製劑獲得上市批准：Innotox®

(Medytox)，但僅限於亞洲國內市場(例如韓國，2013年批准)，及 Alluzience® (Ipsen/Galderma)，後者已獲批准將於 2021 年在歐洲使用。這兩種液體製劑均含有 BoNT/A 毒素複合物，此外還含有水、氯化鈉、除污劑(detergent，Innotox®：聚山梨酯 20；Alluzience®：聚山梨酯 80)、氨基酸(Innotox®：蛋氨酸；Alluzience®：組氨酸)和額外的賦形劑(Innotox®：作為緩衝劑的磷酸鈉；Alluzience®：蔗糖)。

【0007】 儘管在液體肉毒桿菌素製劑的製備方面取得了這些進展，但仍然需要穩定的肉毒桿菌素液體製劑，特別是仍然需要新的選擇，開發在運輸和儲存過程中保持穩定的即用型肉毒桿菌素液體製劑。

〔發明目的〕

【0008】 因此，本發明的一個目的是提供一種穩定且適用於美容和治療應用的肉毒桿菌素液體製劑。

【發明內容】

【0009】 本發明係基於下述令人驚奇的發現：其中，將經過預處理的人類血清白蛋白(HSA)與螯合劑(例如 EDTA)一起醞釀(incubating)，隨後移除螯合劑，可以製備出表現出優異存儲穩定性及優異光穩定性(light stability)的肉毒桿菌素液體製劑。此外，本發明係基於以下述令人驚奇的發現：其中，鐵離子，特別是 Fe^{3+} 離子，對含有人類血清白蛋白的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性具有有害影響。

【0010】此外，本發明係基於下述令人驚訝的發現：其中，色氨酸和N-乙醯基-色氨酸會降低含有人類血清白蛋白(HSA)的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性。這一發現非常令人驚訝，因為市售人類血清白蛋白產品中，除了水和氯化鈉之外，通常還含有辛酸鈉(sodium caprylate)和 N-乙醯色氨酸，用以使人類血清白蛋白在高溫下包持穩定，從而將其加入肉毒桿菌素製劑中。更令人驚訝的是，色氨酸被習知技術描述為是肉毒桿菌素的穩定添加劑(參見例如EP 3 679 946)。

【0011】因此，在第一方面，本發明提供了一種液體製劑，其包含：

(i) 肉毒桿菌素；以及

(ii) 人類血清白蛋白(HSA)，

其中液體製劑含有濃度小於 $1\mu\text{M}$ 、較佳小於 500nM 、更佳小於 250nM 、最佳小於 100nM 的 Fe^{3+} 離子。

【0012】具有低 Fe^{3+} 濃度(例如，小於 $1\mu\text{M}$)的液體肉毒桿菌素製劑，可以通過下述方法來製備，此方法包括步驟(a)將人類血清白蛋白與螯合劑接觸，以獲得人類血清白蛋白和螯合劑的混合物；以及步驟(b)從混合物中移除螯合劑。

【0013】在第二方面，本發明提供了一種液體製劑，其包括

(i) 肉毒桿菌素；以及

(ii) 人類血清白蛋白(HSA)；

其中，液體製劑不包含色氨酸和N-乙醯基-色氨酸，或者含有濃度不超過 $50\mu\text{M}$ ，較佳不超過 $20\mu\text{M}$ ，更佳不超過 $10\mu\text{M}$ ，還更佳不超過

1 μ M，最佳為0 μ M，的色氨酸和 N-乙醯色氨酸(色氨酸和 N-乙醯色氨酸的總濃度)。

【0014】 根據本發明的第一和第二方面的液體製劑較佳更包括(iii)張力劑，特別是氯化鈉，和(iv)緩衝劑，特別是組氨酸緩衝劑、磷酸鹽緩衝劑或它們的混合物。此種不含或僅含有極低濃度的色氨酸和/或N-乙醯基-色氨酸的液體肉毒桿菌素製劑，可以通過(例如，採用透析法(dialysis))純化人類血清白蛋白(HSA)起始材料，以及將純化後的人類血清白蛋白(HSA)材料加入本發明的液體製劑的配方中，來加以製備。

【0015】 在第三方面，本發明提供了一種液體製劑，其包括：

(i) 肉毒桿菌素；以及

(ii) 人類血清白蛋白(HSA)，

其中，人類血清白蛋白的製備方法包括以下步驟：

(a)使人類血清白蛋白與螯合劑接觸，以獲得人類血清白蛋白和螯合劑的混合物；以及

(b)從混合物中移除螯合劑。

【0016】 此接觸步驟(a)的進行，較佳係將螯合劑(例如，EDTA)添加到包含有人類血清白蛋白的組合物(例如，人類血清白蛋白溶液)之中；並且將所得到的混合物醞釀一段預定時間；隨後選擇性地對含有螯合劑(例如 EDTA)的緩衝液進行透析。在步驟(b)中，通過任何合適的方法(例如，通過透析)移除螯合劑。

【0017】 此外，根據本發明第三方面的液體製劑較佳還包括(iii)張力劑，特別是氯化鈉，和/或(vi)緩衝劑，特別是由組氨酸緩衝劑、磷酸鹽緩衝劑或上述之組合。

【0018】 在第四方面，本發明涉及一種根據本發明第二方面所述的液體製劑的製備方法，其中該方法包括以下步驟：

-純化人類血清白蛋白起始材料，藉以獲得純化後的人類血清白蛋白材料。例如對人類血清白蛋白起始材料進行透析、滲濾(diafiltration)、超濾(ultrafiltration)、離子交換層析(ion exchange chromatography, IEC)、親和層析(affinity chromatography)、疏水作用層析(hydrophobic interaction chromatography, HIC)或場流分離(field-flow fractionation)，較佳係進行透析；

-將純化所獲得的人類血清白蛋白與肉毒桿菌素以及選擇性的其他組成分加以混合，藉以獲得此液體製劑。

【0019】 根據本發明第四方面的一個替代方法，其包括以下步驟：

-純化包含肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體組合物，藉以獲得純化後的液體組合物。例如對包含肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體組合物進行透析、滲濾、超濾、離子交換層析、親和層析、疏水作用層析或場流分離，較佳係進行透析；

-將純化所獲得的液體組合物與另外的組成分混合，以獲得此液體製劑。

【0020】 在第五方面，本發明涉及根據本發明的液體製劑用於治療，特別是用於治療神經肌肉疾病(neuromuscular diseases)、疼痛、

流口水(sialorrhea)、多汗症(hyperhidrosis)、泌尿系統疾病和神經系統疾病，的用途。

【0021】 在第六方面，本發明是有關於一種使用本發明的液體製劑來處理美容狀況、較佳為皮膚狀況、特別是處理皮膚細紋或褶皺或皺紋的美容(醫美 (aesthetic))用途。

【0022】 在第七方面，本發明提供了一種治療疾病或適應症的方法，包括向有需要的人施用有效劑量之本發明的液體製劑。

【0023】 根據本發明所提供的較佳液體製劑、其用途和使用方法的實施例，將在後附的申請專利範圍中加以闡述。

【0024】 通過參考本發明下述說明書的詳細描述和其所包含的具體實施例，可以更容易地理解本發明的精神範圍。

【圖式簡單說明】

【0025】 無。

【實施方式】

【0026】 本發明基於以下意外發現：在液體肉毒桿菌素製劑的配方中使用經過預處理的人類血清白蛋白(HSA)來降低其光敏感性，因而藉以改善光穩定性。此外，出乎意料地發現，通過螯合劑處理，隨後進行透析，可實現極低量的鐵離子(Fe^{3+} 離子)，進而顯著地增強含有人類血清白蛋白(HSA)之液體肉毒桿菌素製劑的光敏感性。這個發現令人驚訝，因為鐵相對常見且普遍存在，此外，發現其他金屬離子如銅、鈷或鎳，並不會表現出這種不穩定效應。

【0027】此外，本發明基於以下意外發現：色氨酸和/或N-乙醯基色氨酸會損害含有人類血清白蛋白(HSA)的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性(耐光性(photostability))。特別地，發現藉由螯合劑處理和隨後的透析，可以從傳統人類血清白蛋白(HSA)產品中移除N-乙醯基-色氨酸，以改善含有人類血清白蛋白的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性。

【0028】與粉末形式的冷凍乾燥肉毒桿菌素製劑相比，本發明的液體製劑由於在注射之前不需要復溶，而是可以立即使用(ready-to-use)，並且可以以例如，預充式注射器(prefilled syringe)的方式進行使用，因此可以有利地提供更進步的安全性和劑量準確度。此外，液體製劑優異的穩定性有利並簡化運輸和儲存以及醫生的操作。具體而言，本發明的液體製劑的優異光穩定性，可以簡化製造過程，允許產品在沒有大量光保護的情況下進行填充和包裝，並且可以減少在醫療人員處因使用前光照儲存所導致的潛在活性損失。此外，本發明的液體製劑不含可能導致增強注射疼痛的物質，從而增加了醫療人員和患者對製劑的接受度，特別是在美容領域。

【0029】不受理論的束縛，據信本發明所提供的製劑光敏感性，與用來製備液體肉毒桿菌素製劑的人類血清白蛋白(HSA)中所包含的物質(例如N-乙醯色氨酸和 Fe^{3+})有關。然而，這些物質的移除，是如何增強人類血清白蛋白(HSA)穩定肉毒桿菌素以對抗光線的能力，其確切的機制目前仍不清楚。

【0030】如本說明書中所使用的，用語「包括」，例如用語「包含」和「含有」以及其任何變體，例如主動型態的「包括」、「包含」

和「含有」，係指非排他性的包含(non-exclusive inclusion)，使得包括、包含或含有某元件或元件列表的製程、方法、製程產品、組合物或製劑不僅包括所述的那些元件，而且可以包括未明確列示於這些製程、方法、製程產品、組合物或製劑中的其他元件。此外，在本發明的框架內，用語「包括」「包含」、「含有」、主動型態的「包括」、「包含」和「含有」中的每一者及其任何變體，都可以被「由……組成」或主動型態的「由……組成」或其任何變體(例如，「基本上由…組成」)所代替。其中，「由……組成」被理解為僅僅包括所指涉元件的排他性包含(exclusive inclusion)。

【0031】 在本發明的上下文中使用的用語「一」和「一個」和「該」以及類似的用法，應被解釋為包含單數和復數兩種意義。因此，除非本說明書另有說明或與上下文有特別指明，否則其也包含「至少一個」或「多於一個」。

【0032】 本說明書中的用語「液體製劑」或「液體肉毒桿菌素製劑」，通常是指含水製劑(aqueous formulation)並且通常是水溶液。本說明書中用語「液體製劑」可以與「液體組合物」互換使用。液體製劑通常是藥學上可接受的含水製劑，或者換言之，液體藥物製劑。本發明的液體製劑其pH範圍通常介於5.0至8.0之間；特別是介於5.5至7.5之間；且較佳是介於5.5至7.0或介於6.0至7.5之間，更佳是介於6.0至7.0之間。且最佳介於6.0至6.5之間。

【0033】 本說明書中的用語「藥學上可接受的」，是指液體製劑在施加於人類患者或受試者時不會引起不可接受的不良副作用。即，

這意味著此液體製劑適合人類使用。液態溶液可以是一種含有或不含有鹽水溶液的緩衝溶液，並且可以是生理鹽溶液，例如緩衝的(例如，以磷酸鹽和/或組氨酸進行緩衝的)生理鹽溶液。

【0034】 本說明書預期本發明的液體製劑可以被儲存在任何合適的容器系統中。用於儲存本發明的液體製劑的合適的容器系統是具有部分或完全封閉的空間的任何裝置，此空間可以被密封或被密封並且可以用於容納、儲存和/或運輸液體製劑。容器系統較佳是主要或部分由玻璃或塑膠(例如，有機聚合物)所製成的封閉(或密封)容器，並且包括例如以下形式的容器：(i)注射針筒(syringe)、(ii)指管(vial)、(iii)卡普耳(carpule)或(iv)安瓿(ampoule)。在本發明的一個較佳實施例中，液體製劑以預填充注射針筒的形式儲存在，如本領域已知的注射針筒之中。

【0035】 本說明書中的用語「肉毒桿菌素」不受特別限制，並且包括任何血清型的肉毒桿菌素(例如，BoNT/A-G)。例如，肉毒桿菌素可以是血清型A或B(BoNT/A、BoNT/B)。較佳的肉毒桿菌素為血清型A，更佳為血清型A1肉毒桿菌素(以下簡稱BoNT/A1)，最佳是由肉毒梭菌Hall菌株所產生的BoNT/A1。另外，肉毒桿菌素可以是可從肉毒桿菌屬的細菌中所獲得的天然神經毒素，或者可以是從任何其他的肉毒桿菌素，例如可以是從包括重組技術和遺傳或化學修飾等替代來源中所獲得的肉毒桿菌素。

【0036】 此外，如本說明書中的用語「肉毒桿菌素(BT)」和同義用語「肉毒桿菌神經毒素(BoNT)」，除非另有說明或上下文特別指明，

否則其係指純BoNT和/或其複合物。即，純BoNT和其複合蛋白的任何複合物(稱為「毒素複合物(toxin complex)」)。較佳地，在本發明的框架內，肉毒桿菌素是一種不含複合蛋白的BoNT，更佳地是一種不含血清型A複合蛋白的BoNT。

【0037】 本說明書中的用語「純肉毒桿菌神經素」，是指不含複合蛋白的肉毒桿菌神經毒素(有時也稱為「神經毒性組成分(neurotoxic component)」)，或更準確地說，是指不含神經毒素相關複合蛋白(neurotoxin-associated complexing proteins, NAPs)的肉毒桿菌神經素。此純肉毒桿菌神經毒素是一種(活性)神經毒性多肽，最終會抑制乙醯膽鹼(acetylcholine)釋放。它是一種雙鏈蛋白，由一條輕鏈(LC；約 50 kDa)和一條重鏈(HC；約 100kDa)所組成，二者通過一個二硫鍵連接在一起。因此，活性神經毒性多肽在本說明書中也可以稱為「150kDa神經毒素」、「肉毒桿菌神經毒素(150kDa)」或「神經毒性組成分」。

【0038】 本說明書中的用語「毒素複合物」，是指神經毒性組成分和一組複合蛋白(NAP)的高分子複合物。具體地，用語「毒素複合物」包括900kDa、500kDa和300kDa血清型A肉毒桿菌毒素複合物。複合蛋白是無毒的非血球凝集素(nontoxic nonhaemagglutinin NTNHA)，並且在血清型A-D的菌株中是不同的血球凝集素(haemagglutinins, HA)。例如，900kDa複合物包含於onabotulinumtoxin A (Botox®/Vistabel®, Allergan, Inc., Irvine, CA, USA)之中。此外，作為活性劑的毒素複合物，也包含於Dysport® (Azzalure®, Ipsen, Paris, France)、Alluzience® (Ipsen/Galderma) 和 Innotox® (Medytox)之

中。也就是說，Botox®、Dysport®、Alluzience®和Innotox®中所包含的毒素複合物，是本發明含義內的毒素複合物。也就是本發明所述的「肉毒桿菌素」。根據本發明，肉毒桿菌素存在於本發明的液體製劑中的濃度範圍，可以介於1U/ml至1000U/ml之間，較佳介於10U/ml至200U/ml之間，更佳介於20U/ml至150U/ml之間，且最佳介於50U/ml至100U/ml之間。

【0039】 本說明書中的用語「單位」或「U」是指毒素的生物活性(生物效價(biological potency))，以及涉及對50%的測試小鼠致死的劑量(LD50)。更具體地，在本發明的上下文中，除非另有說明，否則LD50使用小鼠生物測定法(mouse bioassay，MBA)來進行測量。小鼠生物測定法可測定小鼠在腹腔注射之後，毒素/神經毒素的平均致死劑量(LD50)，即能夠殺死一組小鼠中的50%的毒素/神經毒素劑量。在此基礎上，本說明書所用的1單位(U)毒素/神經毒素，係定義為一隻小鼠的LD50($1.0LD50 = 1.0U$)。

【0040】 LD50小鼠生物測定法是肉毒桿菌素的各種生物、化學或免疫學檢測方法中的黃金標準，且是本領域的技術人員已知的(參見，例如，Pearce, L. B.; Borodic, G. E.; First, E. R.; MacCallum, R. D. Measurement of botulinum toxin activity: Evaluation of the lethality assay. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1994, 128:69-77)。本領域的技術人員能夠根據血清型和預定的用途來決定合適的肉毒桿菌素濃度。或者，採用以細胞為基底的(效價)分析法(cell-based assay)來測定肉毒桿菌素的活性，如WO 2009/114748、WO 2013/049508或

WO2014/207109中所述。本領域的技術人員將能夠藉由採用LD50參考標準來進行的校正，來將執行以細胞為基底的分析所獲得的肉毒桿菌素活性結果，與執行小鼠LD50測定所獲得的結果產生關聯。

【0041】 由於市售肉毒桿菌素製劑製造商使用的 LD50 測試方法存在差異，製造商用來指示其市售肉毒桿菌素製劑的單位效價是專有的，無法輕易進行比較。因此，在本發明的框架內，以下所提供的轉換率，可用於建立下述物質的比較效價: incobotulinumtoxinA (「INCO」; Xeomin®, Bocouture®; botulinum toxin serotype A, free of complexing proteins; Merz Pharmaceuticals GmbH), onabotulinumtoxinA (「ONA」; Botox®, Vistabel®; botulinum toxin complex of serotype A; Allergan Inc.), abobotulinumtoxinA (「ABO」; Dysport®, Azzalure®; botulinum toxin complex of serotype A; Medicis Pharmaceutical Corp., Galderma Lab.), rimabotulinumtoxinB (「RIM」; Myobloc®, NeuroBloc®; botulinum toxin serotype B; Solstice Neurosciences Inc.), and PurTox® (「TBD」; botulinum toxin serotype A; Mentor Worldwide LLC)。在本說明書中，ONA和INCO的轉化率為1:1。ONA/INCO:ABO的轉換率為1:2.5。ONA/INCO:RIM的轉換率為1:50。ONA/INCO:TBD的轉換率為1:1.5。此外，在本發明的上下文中，1U的INCO (Xeomin®)和1U的onabotulinumtoxinA (「ONA」; Botox®)應被定義為對應於一隻小鼠的LD50 (1.0LD50)，或如上所述方法測量所得的1U。

【0042】 本說明書中的用語「人類血清白蛋白」或其縮寫「HSA」，意指一種供體HSA (donor HSA)(一種源自人類血液的HSA，或更準確地說，一種源自人類血漿的HSA)和一種重組HSA。較佳地，人類血清白蛋白是一種供體HSA。在本發明中，人類血清白蛋白(HSA)係用來作為穩定蛋白(stabilizing protein)。本說明書中的用語「穩定蛋白」，通常是指能增進肉毒桿菌素之穩定性的多肽。根據本發明，HSA在液體製劑中的含量可以介於0.001% w/v至2.0% w/v之間，較佳介於0.001% w/v至1.00% w/v之間，更佳係介於0.01% w/v至0.5% w/v之間。又更加係介於0.02% w/v至 0.3% w/v之間，最佳係介於0.03% w/v至0.15% w/v之間。

【0043】 在第一方面，本發明涉及一種液體製劑，其包含

(i) 肉毒桿菌素，以及

(ii) 人類血清白蛋白，

其中液體製劑含有濃度小於1 μ M的Fe³⁺ 離子。

【0044】 較佳地，液體製劑中的Fe³⁺的濃度小於1000nM、小於750nM、小於500nM或小於250nM，更佳地，液體製劑中的Fe³⁺濃度小於200nM、小於150nM，或小於100nM，特別較佳地，液體製劑中的Fe³⁺濃度小於50nM或小於10nM，並且最佳地，液體製劑中的Fe³⁺濃度小於1nM、小於100pM、小於10 pM，或小於1pM。

【0045】 金屬離子(例如，Ca²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺或Fe³⁺)的濃度可以通過本領域技術人員已知的測量方法，例如採用原子

吸收光譜法(atomic absorption spectroscopy, AAS)、感應耦合電漿質譜儀(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)和感應耦合電漿原子發射光譜儀(inductively coupled plasma atomic emission spectrometer, ICP-AES)(也稱為感應耦合電漿放射光譜儀 (inductively coupled plasma optical emission spectrometry, ICP-OES)), 來進行測定。較佳地, 可以採用ICP-MS或ICP-OES, 特別是ICP-OES, 來量金屬離子的濃度(另請參見Second Supplement to USP38-NF 33, Chemical Tests/<233>Elemental Impurities—Procedure 1 (ICP-OES) and Procedure 2 (ICP-MS), 201)。

【0046】 不受理論的限制, 據信本發明用於製備液體製劑的HSA材料, 特別是含有大量鐵離子的源自於人類血液的供體HSA, 含有大量的 Fe^{3+} , 其(至少部分地)導致未純化(未經處理)的HSA具有光敏誘導特性(photosensitivity-inducing properties)。

【0047】 除了上述優點之外, 本發明的這一方面還有利於製造程序和新制劑的開發。例如, 可以選擇設備(例如容器)和材料(例如賦形劑)以使最終產品中存在盡可能少的鐵。

【0048】 本發明的具有低 Fe^{3+} 濃度的液體肉毒桿菌素製劑, 可以通過下述方法進行製備, 此方法包括步驟(a)將人類血清白蛋白與螯合劑接觸, 藉以獲得人類血清白蛋白和螯合劑的混合物的, 以及步驟(b)從混合物中移除螯合劑。

【0049】 較佳地，本發明第一方面的液體製劑的製備方法與本發明第三方面所述的方法相同。此外，根據本發明的第一方面的液體製劑，可以具有與根據本發明的第三方面的液體製劑相同的組成分。因此，除非另有明確說明，對根據本發明第三方面的液體製劑給出的所有解釋、評論、公開、定義等，同樣適用於根據本發明第一方面的液體製劑。

【0050】 在第二方面，本發明涉及一種液體製劑，其包含

- (i) 肉毒桿菌素，以及
- (ii) 人類血清白蛋白，

其中液體製劑不含或含有不超過 $50\mu\text{M}$ 色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。

【0051】 本說明書中的用語「不含」色氨酸和N-乙醯基-色氨酸，是指液體製劑中沒有或完全不包含色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。具體來說，這意味著該製劑不含添加的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。或者，這意味著液體製劑中色氨酸和N-乙醯基色氨酸的濃度為 $0\mu\text{M}$ (即，根據四捨五入的一般規則 $<0.5\mu\text{M}$)。特別是 $\leq 0.1\mu\text{M}$ 或 $\leq 0.01\mu\text{M}$ 或 $\leq 0.001\mu\text{M}$ ，更具體地為 0nM (即，根據四捨五入的一般規則 $<0.5\text{nM}$)。本說明書中的用語「含有不超過...」的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸，是指所含有的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸總量可以 $\leq 50\mu\text{M}$ ，且較佳 $\leq 20\mu\text{M}$ ，更加 $\leq 10\mu\text{M}$ ，還更佳 $\leq 1\mu\text{M}$ ，又更佳 $\leq 0.1\mu\text{M}$ ，且最佳 $\leq 0.01\mu\text{M}$ 或 $\leq 0.001\mu\text{M}$ 。因此，本說明書中的用語「不含或含有不超過...」，是指液體製劑中色氨酸和N-

乙醯基-色氨酸的總量介於 $0\mu\text{M}$ 與 X 之間，或介於 0nM 與 X 之間，其中 X 可以為 $50\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 、 $0.01\mu\text{M}$ 和 $0.001\mu\text{M}$ 。

【0052】 氨基酸色氨酸和N-乙醯基-色氨酸的濃度可以藉由本領域技術人員已知的各種技術(例如，DC、HPLC、LC-MS、GC-MS、CE等)來加以測定。例如，N-乙醯基-色氨酸可以通過使用如 Nelis 等人所述。(Nelis et al., J. Chromatogr., 1985, 333(2):381-387)的液相層析法(liquid chromatography)，在逆相層析管柱(reversed-phase column)上，以波長280 nm 的UV 來進行測定；或者通過如 Yu 和 Finlayson 所述(Yu, M. W. and Finlayson, J. S., J. Pharm. Sci., 1984, 73(1):82-86)，基於蛋白質沉澱後剩餘的酸可容組成分的 UV 分光光度法來進行測定。例如，可以使用如Wentao等人所述(Wentao et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 401:3249-3261)包含液相串聯式質譜儀(liquid chromatography-tandem mass spectrometry)的方法來定量測定色氨酸。

【0053】 本說明書中的用語「色氨酸」是指L-色氨酸(L-tryptophan)、D-色氨酸(D-tryptophan)或L-色氨酸和D-色氨酸的混合物(D/L-色氨酸(D/L-tryptophan))。同樣地，本說明書中的用語「N-乙醯基-色氨酸」是指N-乙醯基-L-色氨酸(N-acetyl-L-tryptophan)、N-乙醯基-D-色氨酸(N-acetyl-D-tryptophan)或N-乙醯基-L-色氨酸和N-乙醯基-D-

色氨酸的混合物 (N-乙醯基-D/L-色氨酸 (N-acetyl-D/L-tryptophan))。

【0054】 用於製備液體製劑的人類血清白蛋白較佳為含有不超過50mM、更加為含有不超過20mM或10mM、還更佳為含有不超過1mM或0.1mM的人類血清白蛋白材料，最佳為含有不超過0.01nM或0mM的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。

【0055】 需要指出的是，市售的供體HSA產品均含有大量(>10mM)的N-乙醯基-色氨酸。因此，在用於配製本發明的液體製劑之前，需要純化此類產物，藉以將N-乙醯基-色氨酸的量降低至所需水平。以下結合本發明的第四方面詳細描述製備「純化後的HSA」的合適方法。簡而言之，可以通過對人類血清白蛋白起始材料進行透析、滲濾、超濾、離子交換層析、親和層析、疏水作用層析、場流分離或沉澱(precipitation)(例如，鹽析 (salt precipitation)、乙醇沉澱 (ethanol precipitation))，以移除色氨酸和/或N-乙醯基-色氨酸，獲得不含色氨酸和N-乙醯基色氨酸或含有少量色氨酸和N-乙醯基色氨酸的人類血清白蛋白(本說明書也稱為「純化後的HSA」)。

【0056】 根據本發明，本發明的液體製劑，例如根據本發明的第一、第二和/或第三方面的液體製劑，可以進一步包含如下文所詳述的(iii)張力劑和(iv)緩衝劑中的一種或兩種，特別是在與根據本發明的第三方面有關的液體製劑中。

【0057】 此外，本說明書還預期根據本發明第二方面的液體製劑較佳含有濃度小於1000nM的 Fe^{3+} 離子。具體地，液體製劑中的 Fe^{3+} 離子濃度較佳小於750nM、小於500nM或小於250nM；更佳地，液體製劑中的 Fe^{3+} 離子濃度小於200nM、小於150nM或小於100nM；特別佳地，液體製劑中的 Fe^{3+} 離子濃度小於50nM或小於10nM，且最佳地，液體製劑中的 Fe^{3+} 離子濃度小於1nM、小於100pM、小於10pM，或小於1pM。

【0058】 如上所述，還發現 Fe^{3+} 離子會降低肉毒桿菌素的光穩定性，從而增強色氨酸和 N-乙醯色氨酸的不穩定作用。據信，用於製備本發明的液體製劑的HSA材料，特別是源自人類血液的供體HSA，含有大量的 Fe^{3+} 離子，這會導致未純化的(未處理的)HSA的光穩定性特性降低。為了實現盡可能低的 Fe^{3+} 離子濃度，製造設備(例如，容器)和材料(例如，賦形劑)應有所選擇，藉以確保最終產品中鐵含量盡可能少。例如用於製造的容器應選擇不含鐵的材料，例如聚丙烯或聚碳酸酯。

【0059】 金屬離子(例如， Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Ni^{2+})的濃度，可以通過本領域技術人員已知的和上述公開的測量方法來測定。

【0060】 本發明的液體肉毒桿菌素製劑中低 Fe^{3+} 含量可以通過結合本發明的第四方面詳細描述的方法來實現，特別是通過如本說明書所述的方法來實現。此方法包括將人類血清白蛋白與螯合劑接觸，然後移除螯合劑。

【0061】 根據本發明，除非另有說明或指名，否則液體製劑還可以包含一種或多種藥學上可接受的額外賦形劑。例如，液體製劑可以包含甘油、蔗糖、乳糖、甘露醇、葡聚醣、透明質酸、聚乙烯吡咯烷酮、乳酸、檸檬酸、氨基酸(除了色氨酸和 N-乙醯基-色氨酸之外)、苯甲醇、利多卡因、明膠、羥乙基澱粉(hydroxyethyl starch, HES)、聚環氧乙烷和聚山梨酯(例如聚山梨酯 20 和聚山梨酯 80)中的一種或多種。其他合適的藥學上可接受的賦形劑，包括本領域熟知者，例如可參見: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania。

【0062】 本說明書還預期本發明所提供的液體製劑特別缺乏某些組成分(即，化合物、材料或物質)，例如特別缺乏螯合劑和/或磷酸鹽、去污劑、多醣、氨基酸、穩定胜肽(stabilizing peptides)等，包括其任何組合。本說明書中的用語「去污劑」與「界面活性劑」同義，並且旨在包括非離子型和離子型去污劑。本說明書中的用語「穩定胜肽」，通常是指由5至50個氨基酸所組成的胜肽，例如由10至40個氨基酸或15至30個氨基酸所組成的胜肽。因此，用語「穩定胜肽」並不包括HSA。

【0063】 在一個實施例中，本發明的液體製劑不含去污劑，特別是不含聚山梨酯，更特別地不含聚山梨酯20和/或聚山梨酯80。在另一實施例中，本發明的液體製劑不含有聚山梨酯20和/或聚山梨酯80。不含海藻酸鹽。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含琥珀酸鹽。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不

第 21 頁，共 73 頁(發明說明書)

含有一種或多種(例如，2種、3種、4種或5種)選自由由精氨酸、谷氨酸、甲硫氨酸、色氨酸和絲氨酸組成的一組氨基酸。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含有糖，例如單醣、寡醣或多醣或其混合物。具體地，本發明的液體製劑可以不含蔗糖、乳糖、麥芽糖和海藻糖中的一種或多種(例如，2種、3種或4種)。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含有螯合劑，特別是不含本說明書中所描述與本發明相關的那些螯合劑，和/或磷酸鹽。本發明還預期液體製劑缺乏多於一種或所有上述化合物。

【0064】 在一個實施例中，本發明的液體製劑缺乏(i)去污劑和單醣、寡醣和多醣，(ii)去污劑和任何氨基酸，或去污劑和除了組氨酸之外的所有氨基酸，(iii)去污劑和穩定肽，(iv)單醣、寡醣和多醣以及任何氨基酸，或單醣、寡醣和多醣以及除了組氨酸之外的所有氨基酸，(v)單醣、寡醣和多醣以及穩定胜肽，(vi)任何氨基酸和穩定肽，或除了組氨酸和穩定肽之外的所有氨基酸，(vii)去污劑、單醣、寡醣和多醣以及任何氨基酸，或去污劑、單醣、寡醣和多醣以及除組氨酸和穩定肽之外的所有氨基酸組氨酸，(viii)去污劑、單醣、寡醣和多醣以及穩定肽，(ix)去污劑、任何氨基酸以及穩定胜肽，或去污劑、除了組氨酸之外的所有氨基酸以及穩定肽，(x)單醣、寡醣和多醣、任何氨基酸和穩定生肽，或單醣、寡醣和多醣、除組氨酸之外的所有氨基酸和穩定肽，(xi)去污劑、單醣、寡醣和多醣、任何氨基酸和穩定胜肽，或去垢劑、單醣、寡醣和多醣、除了組氨酸外的所有氨基酸和穩定生肽。

【0065】 在另一個實施例中，本發明的液體製劑不包含除了組氨酸之外的任何其他氨基酸。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含任何單醣、雙醣和三醣(trisaccharides)。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不包含除了HSA以外的任何其他穩定胜肽或蛋白質。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含磷酸鹽，例如磷酸鹽緩衝劑形式的磷酸鹽。

【0066】 在另外的實施例中，本發明的液體製劑缺乏(i)琥珀酸鹽和去污劑(例如聚山梨醇酯)，(ii)琥珀酸鹽和甲硫氨酸，(iii)琥珀酸鹽和蔗糖，(iv)去污劑(例如，聚山梨醇酯)和甲硫氨酸，(v)去污劑(例如，聚山梨醇酯)和蔗糖，(vi)甲硫氨酸和蔗糖，(vii)琥珀酸鹽、去污劑(例如，聚山梨醇酯)和甲硫氨酸，(xiii)琥珀酸鹽、去污劑(例如，聚山梨醇酯)和蔗糖，(ix)琥珀酸鹽、甲硫氨酸和蔗糖，(x)去污劑(例如聚山梨酯)、甲硫氨酸和蔗糖，和(xi)琥珀酸鹽、去污劑(例如聚山梨酯)、甲硫氨酸和蔗糖，(xii)去污劑(例如聚山梨酯)和組氨酸，(xiii)去污劑(例如聚山梨酯)、組氨酸和蔗糖。

【0067】 此外，本發明所述缺少缺少一種或多種組成分(即，化合物、材料或物質)的液體製劑，還可能缺乏螯合劑，特別是缺乏本說明書所描述的螯合劑(例如，EDTA)，並及/或磷酸鹽。

【0068】 此外，本發明的較佳液體製劑包含(i)肉毒桿菌素、(ii)HSA、(iii)張力劑以及不含或含有不超過50μM色氨酸和

N-乙醯基-色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至1.0% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.01% w/v至2.0% w/v之間，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.1% w/v至1.5% w/v之間，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.6% w/v至1.2% w/v之間，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，(iii)以氯化鈉作為張力劑，用量為0.9% w/v，不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)以氯化鈉作為張力劑，用量為0.9% w/v，不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

【0069】 本說明書還預期，在上下文中所描述的較佳和特佳的液體製劑中，色氨酸和N-乙醯基-色氨酸的濃度上限低於

50 μ M，較佳為低於10 μ M，更佳為低於1 μ M，還更佳為低於0.1 μ M，最佳為低於0.01 μ M或0.001 μ M。此外，本說明書還預期上下文中所描述的較佳和特佳的液體製劑，其特徵在於Fe³⁺離子的濃度小於1000nM或小於500nM，更佳小於250nM或小於100nM，最佳小於10nM或小於1nM。

【0070】 本發明的較佳液體製劑包含(i)肉毒桿菌素、(ii)HSA、(iii)張力劑、(iv)緩衝劑、以及不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至1.0% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.01% w/v至2.0% w/v之間，(iv)濃度介於1mM至100mM之間的緩衝劑，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基-色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.01% w/v至2.0% w/v之間，(iv)濃度介於1mM至100mM之間的緩衝劑，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.1% w/v至2.0% w/v之間，(iv)濃度介於1mM至100mM之間的緩衝劑，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA之間，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量介於0.6% w/v至1.3% w/v之間，(iv)濃度介於2mM至50mM之間的緩衝劑，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)0.9% w/v 的氯化鈉，(iv) 濃度介於5 mM 至20 mM 之間的緩衝劑，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

【0071】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素(ii)HSA，(iii)作為張力劑的氯化鈉，(iv) 選自組氨酸、磷酸鹽及其混合物的緩衝劑，用來作為緩衝劑。其中所述緩衝劑較佳為組氨酸，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

【0072】 特別較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至1.0% w/v之間的HSA，(iii)氯化鈉，其含量介於0.01% w/v至2.0% w/v之間，較佳為0.9% w/v，(iv)濃度介於1mM至100mM之間，選自於組氨酸、磷酸鹽及其混合物的緩衝劑，其中緩衝劑較佳為濃度介於1mM至100mM之間的組氨酸，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

【0073】 本發明的另一種特佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，(iii)含量為0.9% w/v的氯化鈉，(iv)濃度介於1mM至100mM之間，選自於組氨酸、磷酸鹽及其混合物的緩衝劑，其中所述緩衝劑較佳為濃度介於1mM至100mM之間的組氨酸，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

【0074】 本發明的又一特佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii) 含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii) 含量為0.9% w/v的氯化鈉，(iv) 選自於組氨酸、磷酸鹽及其混合物的緩衝劑，濃度介於1mM至100mM之間，較佳濃度介於2mM至50mM之間，或更佳介於5mM至20mM之間，其中緩衝劑較佳為濃度介於1mM至100mM之間的組氨酸，較佳濃度介於2mM至50mM之間，更佳介於5mM至20mM之間，並且不含或含有不超過50 μ M的色氨酸和N-乙醯基色氨酸。

【0075】 此外，上述較佳和特佳的液體製劑的pH，較佳為介於6.0至7.5之間的範圍，更佳為介於6.5至7.0之間的範圍。而且，肉毒桿菌素較佳是血清型A，並且更佳是血清型A的神經毒性成分。

【0076】 本發明較佳液體製劑的實施例如下：

製劑1：

50 U/ml 的BoNT/A

0.9% 的氯化鈉 (9mg/mL)

第 27 頁，共 73 頁(發明說明書)

0.085% 的HSA(純化後的，例如透析後的)(0.85mg/mL)

0.155% 的組氨酸(1.55mg/ml；~10mM)

色氨酸和N-乙醯基色氨酸< 50 μ m

pH值為6.0。

【0077】 實施例的製劑1中純化後的HSA可以通過根據本發明第四方面的方法之詳細描述的方法來製備。

【0078】 根據本發明，本發明的液體製劑較佳可以通過根據本發明的第四方面的方法來製備或獲得。此方法允許移除 HSA 起始材料(例如，市售 HSA 產品)中所包含的物質，包括 會使液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性惡化的N-乙醯基色氨酸。

【0079】 在第三方面，本發明市有關於一種液體製劑，其包含：

(i)肉毒桿菌素，以及

(ii)人類血清白蛋白(HSA)，

其中，所述液體製劑的製備方法包括下述步驟：

(a)將人類血清白蛋白與螯合劑接觸，以獲得人類血清白蛋白和螯合劑的混合物，以及

(b)從混合物中移除螯合劑。

【0080】 對於本發明的液體製劑的組成分(i)，肉毒桿菌素沒有特別限制並且可以包括任何血清型的肉毒桿菌素(例如，BoNT/A-G)。較佳地，肉毒桿菌素如上文所定義。

【0081】 有關液體製劑中的組成分(ii)，「人類血清白蛋白」或「HSA」是指供體HSA和重組HSA，且較佳是如上述所定義的供體HSA。HSA在液體製劑中的含量可以介於0.001% w/v至2.0% w/v之間、較佳含量介於0.001-1.00% w/v之間的量、更佳含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間，又更佳的含量介於0.001% w/v至2.0% w/v之間。再更佳的含量介於0.02% w/v至0.3% w/v之間，最佳含量介於0.03% w/v至0.15% w/v之間。

【0082】 根據本發明，本發明所述液體製劑的製備方法至少包括步驟(a)和(b)，其中第一步如下：

(a)將人類血清白蛋白與螯合劑接觸，得到人類血清白蛋白和螯合劑的混合物。

【0083】 如本說明書中的用語「接觸」是指在廣義地解釋中將兩個或更多個組成分放在一起。這可以通過多種不同的方法來實現，例如溶解(dissolving)、混合(mixing)、懸浮(suspending)、共混(blending,)、漿化(slurrying)、攪拌(stirring)、流動(flowing)、吸附(adsorbing,)、結合(binding)、萃取(extracting)等。通常，將螯合劑添加到包含HSA的組合物中(例如，HSA 溶液)，然後混合以獲得均勻混合物，並且選擇性地進行進一步製程步驟(例如，對含有螯合劑的緩衝液進行透析)。

【0084】 因此可預期，所述的「接觸」可以採用將HSA材料(例如水溶液形式的HSA材料)固定(loading)到固定化金屬親和性樹脂(immobilized metal affinity resin IMAC)上的方式來加

以實現。本說明書中的用語「固定化金屬親和性樹脂」包括但不限定於，含有能夠結合和配位多價陽離子的固定化功能部分 (immobilized functional moiety)(例如，亞氨基二乙酸 (iminodiacetic acid))的樹脂，例如 Cheating-Sepharose、Fractogel-EMD-Chelate、POROS 20MC、Matrex Cellufine Chelate、TALON 和 Chelex 100 樹脂。此類固定化金屬親和性樹脂，通常以本領域技術人員所習知的層析金屬親和管柱 (chromatographic metal affinity columns)的形式來使用。此外，如本說明書中的用語「接觸」還包括使用合適的固定化金屬親和樹脂來進行批次模式的結合。

【0085】 參照步驟(a)，其進一步指出，本發明所述液體製劑的製備方法中步驟(a)的用語：「人類血清白蛋白」和「螯合劑」，並未暗示其具有任何物理形式的限制，也未排除與HSA及螯合劑混合或包含在HSA和螯合劑中的其他物質或化合物的存在。這意味著在步驟(a)中與螯合劑接觸的「人類血清白蛋白」可以以任何的形式存在。例如，以固體或液體形式(例如，含水組合物(aqueous composition)或水溶液(aqueous solution))存在。同樣，在步驟(a)中與人類血清白蛋白接觸的「螯合劑」可以以任何形式存在。例如，以固體或液體形式(例如，含水組合物或水溶液)存在。此外，所述「使人類血清白蛋白與螯合劑接觸」並不排除(i)人類血清白蛋白是組合物的形式(例如，固體組合物或液體組合物，特別是含水組合物或水溶液))，該組合物在最終液體製劑中包含有一

種或多種附加的組成分，例如張力劑或緩衝劑；和/或(ii)螯合劑是一種組合物的形式(例如，固體組合物或液體組合物，特別是含水組合物或水溶液)，該組合物在最終液體製劑中包含有一種或多種附加的組成分，例如張力劑或緩衝劑。

【0086】 較佳地，步驟(a)中所獲得的混合物是含水混合物(aqueous mixture)。此種水性混合物可以通過不同的方式製備。例如，人類血清白蛋白可以是一種含水組合物的形式，例如水溶液，可以與固體形式或液體形式存在(例如以螯合劑的溶液形式存在)的螯合劑混合。此外，人類血清白蛋白可以是固體形式，例如冷凍乾燥材料，其可以與螯合劑和水溶液混合，或者與螯合劑的水溶液混合。較佳地，人類血清白蛋白是含水組合物的形式，更佳是水溶液的形式，且螯合劑是固體或含水組合物(例如，水溶液)。

【0087】 具體地，在步驟(a)中與螯合劑接觸的HSA可以是至少含有5% w/v的HSA、更佳為含有介於10% w/v至30% w/v的HSA，最佳含有20% w/v的HSA水溶液。此外，步驟(a)中所獲得的混合物的pH可調節至介於6.0至9.0之間；較佳的pH範圍介於6.5至8.5之間；更佳介於7.0至8.5之間；最佳介於7.0至8.0之間。

【0088】 此外，根據本發明用於製備液體製劑的方法，接觸步驟(a)可以包括下述幾個子步驟。例如，在一個實施例中，接觸步驟(a)包括下述步驟，或(僅)由下述步驟組成：將螯合劑(例如，EDTA)與人類血清白蛋白混合，將所述混合物醞釀一段預定的時

間，然後選擇性地以含有螯合劑的緩衝液對所述混合物進行透析。其中，所使用的螯合劑較佳與醞釀子步驟中所使用者相同。在另一個實施例中，不對混合物進行醞釀，而是(直接)以含有螯合劑的緩衝液對混合物進行透析。其中，所使用的螯合劑較佳與混合螯合劑(例如，EDTA)和人類血清白蛋白的步驟中所使用的螯合劑相同。在另一個實施例中，在透析之前不會將螯合劑與人類血清白蛋白混合。也就是說，接觸步驟(a)可包括或(僅)由使用含有螯合劑的緩衝液對混合物針對進行透析的步驟所組成。

【0089】 較佳地，步驟(a)包括下述步驟或(僅)由下述步驟所組成：將螯合劑添加到包含HSA的組合物(例如，HSA的溶液)中，或者將螯合劑與包含HSA的組合物(例如，HSA的溶液)進行混合。然後將所得的混合物醞釀一段時間，例如，靜置一段給定時間而不攪拌，或者是攪拌一段給定時間。

【0090】 醞釀時間不限於特定範圍，但通常為至少0.5小時，特別是至少1小時，更特別是至少2小時。醞釀時間的上限並非關鍵，但可以是例如1小時、2小時、5小時或10小時。因此，醞釀時間可以是例如介於0.5至5小時之間或介於1小時至10小時之間。同樣地，醞釀溫度沒有特別限制，例如可以在介於0°C至60°C之間的範圍內。較佳地，溫度介於0°C至30°C之間。這意味著室溫(20°C或25°C)是本發明內的合適溫度。如本領域技術人員所習知的，溫度會影響反應時間。通常可以選擇醞釀條件(例如時間和溫度)以使得最終產物中所含的螯合劑(例如EDTA)的殘留量

為 $100\mu\text{M}$ 或更少，較佳殘留量為 $10\mu\text{M}$ 或更少，更佳殘留量為 $1\mu\text{M}$ 或更少。

【0091】 可選擇性地，在醞釀步驟之後可以進行一個後續處理，例如以含有螯合劑的緩衝液對醞釀後的混合物進行透析。其所使用的螯合劑，通常與醞釀步驟中所使用的螯合劑相同。用於選擇性透析步驟中的螯合劑，其包含在透析緩衝液之中的濃度，較佳介於 0.1mM 至 1000mM 之間、更佳是以介於 1mM 至 200mM 之間、最佳是介於 10mM 至 100mM 之間。又較佳的是，透析步驟中所使用的緩衝液(i)具有介於7.5至8.5的pH值，(ii)進一步包含緩衝劑，較佳是根據最終組合物，或(iii)進一步包含張力劑，較佳為0.9% w/v的氯化鈉；或(i)和(ii)；或(i)和(iii)；或(ii)和(iii)；或(i)和(ii)和(iii)。

【0092】 在本發明中，本說明書的用語「螯合劑」並沒有特別限制，只要其能夠與金屬離子結合即可。本說明書的用語「螯合劑」也可稱為「螯合物(chelator)」或「多價螯合劑(sequestering agent)」。本說明書中所使用的螯合劑，通常是可以與金屬離子結合的有機化合物。金屬離子通常與充當多牙配位基(polydentate ligands)的有機螯合劑形成多個配位鍵。

【0093】 適用於本說明書所述的螯合劑，包括但不限定為：氨基多羧酸(aminopolycarboxylic acids)(例如，具有三至六個、較佳為四個羧酸官能基的氨基多羧酸)和其他化合物，例如檸檬酸鹽、卟啉(porphyrins)、N,N,N',N'-四(2-吡啶基甲基)-1,2-乙二

胺

(N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine, TPEN)、三乙烯四胺(triethylenetetramine, TETA)及其混合物。氨基多羧酸的實施例，包括次氨基三乙酸酯(nitrilotriacetate, NTA)、1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸酯(,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetate, DOTA)、乙二胺三乙酸酯(ethylenediaminetriacetate, TED)、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、乙二醇-雙(1,4,7,10-四乙酸酯)(ethylene glycol-bis(o-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, EGTA)、1,2-雙(鄰氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, BAPTA)、二乙烯三胺五乙酸(diethylenetriaminepenta-acetic acid, DTPA)和三乙烯四胺六乙酸(triethylenetetraminehexaacetate, TTHA)。

【0094】 用於本說明書中的特佳的螯合劑包括通式(I)所表示的化合物：



其為具有至少四個羧酸官能基的氨基多羧酸化合物。R沒有特別限制，可以不含羧酸官能基，也可以含有1個或2個羧酸官能基。

較佳地，R不含或包含一個羧酸官能基，最佳是不包含任何羧酸官能基。

【0095】 通式(I)所表示的化合物的實施例，包括例如EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA。特佳用於本說明書的是EDTA、EGTA和DTPA，更佳是EDTA和DTPA，且最佳是EDTA。任何上述螯合劑的混合物也可用於本發明，例如作為溶液、固體或與偶聯基質(coupled to matrices)。

【0096】 在步驟(a)中，HSA較佳是與一定量的螯合劑接觸，使得螯合劑以介於0.1mM至1000mM之間或介於0.1mM至500mM之間的濃度，更加是介於0.5mM至500mM之間或介於1mM至500mM之間的濃度，最佳是介於10mM至100mM之間的濃度，存在於液體製劑中。

【0097】 根據本發明，所述液體製劑的製備方法還包括以下步驟：

(b)從混合物中移除螯合劑。

【0098】 在步驟(b)中，可以採用任何合適的技術來移除螯合劑，例如透析法(包括使用透析袋的傳統透析法、逆流透析法(counterflow dialysis)等)、逆滲透、過濾、掃流過濾(crossflow filtration)、超濾和層析法(例如，離子交換層析法或凝膠過濾層析法(gel filtration chromatography))。

【0099】 較佳，可以通過透析法移除螯合劑。透析通常在0°C至30°C的溫度範圍下，特別是在2°C至30°C或4°C至25°C的

溫度範圍下(包括室溫)，進行0.5至48小時，特別是1至24小時或1至12小時。此外，透析通常使用10至1000倍於醞釀後的HSA/螯合劑混合物體積的透析緩衝液來進行，並且透析緩衝液通常更換至少一次。所使用的透析膜可以具有例如10kDa的截留分子量(molecular weight cut-off, MWCO)。

【0100】 通常，選擇透析條件(例如，時間、溫度、緩衝液體積、緩衝液更換次數)，可以使最終產物中所包含的螯合劑(例如，EDTA)殘留量的濃度低於100 μ M，較佳濃度低於10 μ M，更佳濃度低於1 μ M。

【0101】 根據本發明的較佳實施例，首先藉由將HSA起始材料與螯合劑接觸來對HSA起始材料進行預處理，然後移除螯合劑。然後將所獲得經過預處理的HSA用於製備本發明的液體肉毒桿菌素製劑。本說明書中的用術語「人類血清白蛋白起始材料」，是指供體HSA材料(源自人類血液或更準確地說，源自人類血漿的HSA)或重組HSA材料，其可商購或常規獲得，意即不需進行了本說明書所述的預處理。本說明書中的用術語「人類血清白蛋白起始材料」也涵蓋供體HSA材料和重組HSA材料的混合物。

【0102】 更具體地，根據此一較佳實施例，包含(i)肉毒桿菌素和(ii)人類血清白蛋白的液體製劑，可以通過包括下述步驟的方法來製備：

(a)將人類血清白蛋白起始原料與螯合劑接觸，藉以獲得人類血清白蛋白起始原料和螯合劑的混合物，

(b)從混合物中移除螯合劑，得到經過預處理的人類血清白蛋白材料，和

(c)將肉毒桿菌毒與經過預處理的人類血清白蛋白材料混合。

【0103】 根據本發明的另一個教佳實施例，將一種液態預製劑(liquid pre-formulation)與螯合劑接觸，然後移除螯合劑以獲得液體製劑。本說明書中的用語「液態預製劑」，是指至少含有組成分(i)和(ii) (即，肉毒桿菌素和HSA)，且較佳含有所包含於最終液體組合物(特別是在組成分(iii)和(iv))中的所有組成分和物質，的液體製劑。在後者的情況下，處理和移除螯合劑即可產生最終的液體製劑。

【0104】 更具體地，根據此較佳實施例，包括(i)肉毒桿菌素和(ii)人類血清白蛋白的液體製劑係通過下述方法所製備，此方法包括下述步驟：

(a)將包含有肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體預製劑與螯合劑接觸，以獲得液體預製劑和螯合劑的混合物；以及
(b)從混合物中移除螯合劑，以獲得液體製劑。

【0105】 根據本發明，液體製劑(根據本說明書所述的任何方面，即根據第一、第二和第三方面)可以選擇性地更包括：

(iii)張力劑。

【0106】 本說明書中的用語「張力劑」，是指添加到可注射製劑中，以使製劑的滲透特性(osmotic characteristics)與生理液體(physiologic fluids)的滲透特性相似的試劑。張力劑也可稱

為「滲透壓調節劑(osmotic regulator)」。張力劑沒有特別限制並且可以例如選自由糖、鹽、聚合物及其混合物組成的一個群組。

【0107】張力劑的實施例包括蔗糖、葡萄糖、碳酸鈉、氨基酸、聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG)、葡聚醣、環糊精和膠體(例如, 膠體多醣(colloidal polysaccharides))。通常, 張力劑的濃度介於0% w/v至2.0% w/v之間; 特別是介於0.01% w/v至2.0% w/v之間; 或介於0.1% w/v至1.5% w/v之間、更特別是介於0.6% w/v至1.2% w/v之間的範圍內。

【0108】較佳地, 所述張力劑是氯化鈉(NaCl)。氯化鈉存在於本發明的液體製劑中的含量, 可以介於0.01% w/v至2.0% w/v之間; 較佳介於0.1% w/v至1.5% w/v之間; 更佳介於0.5% w/v至1.2% w/v之間或介於0.8% w/v至1.0% w/v之間。最佳為0.9% w/v。

【0109】根據本發明, 液體製劑(根據本說明書所述的任何方面, 即根據第一、第二和第三方面)可以選擇性地更包括:
(iv)緩衝劑。

【0110】本說明書中的用語「緩衝劑」, 是指一種可以將液體製劑的pH值維持在可接受的範圍內的試劑, 即能夠控制製劑的pH值的試劑。合適的緩衝劑是那些不與其他成分發生化學反應, 且其存在可以提供所需的pH值緩衝量的緩衝劑。此類緩衝劑包括例如氨基酸、醋酸鹽(acetate)、蘋果酸、抗壞血酸鹽、檸檬酸鹽、酒石酸鹽、富馬酸鹽、琥珀酸鹽、磷酸鹽、碳酸氫鹽

(bicarbonate)、TRIS、Bis-TRIS、ACES、MES、BES、MOPS、HEPES、TES、PIPES、三(羥甲基)甲基甘氨酸(tricine)和咪唑。

【0111】 較佳地，緩衝劑是磷酸鹽(即，磷酸鹽緩衝劑)、氨基酸、或其混合物。本說明書中的用語「磷酸鹽」，通常是指非質子化(unprotonated)和質子化形式及其任何鹽類。氨基酸可以選自於天門冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸、組氨酸、脯氨酸、牛磺酸、甲硫氨酸、絲氨酸、酪氨酸、色氨酸及其混合物。且較佳選自於組氨酸、脯氨酸、牛磺酸、甲硫氨酸、絲氨酸、酪氨酸及其混合物其中。最佳地，氨基酸是組氨酸。用於本說明書的最佳緩衝劑是組氨酸、磷酸鹽或其混合物。

【0112】 本發明液體製劑中緩衝劑的濃度較佳介於1mM至100mM之間，較佳介於2mM至50mM之間，更佳介於5mM至20mM之間。如果緩衝劑是氨基酸(例如，組氨酸)，則其存在於液體製劑中的濃度，可以介於1mM至100mM之間，較佳介於2mM至50mM之間；更佳介於5mM至20mM之間；最佳為10mM。如果緩衝劑是磷酸鹽，則其存在於液體製劑中的濃度，可以介於1mM至100mM之間；較佳係介於2mM至50mM之間；更佳介於5mM至20mM之間；最佳為10mM。

【0113】 此外，除非另有說明或指明，否則本發明的液體製劑還可以額外包含一種或多種藥學上可接受的賦形劑。例如，液體製劑可以含有甘油、蔗糖、乳糖、甘露醇、葡聚糖、透明質酸、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl-pyrrolidone)、乳酸、檸檬酸、氨基酸、苯甲醇、利多卡因(lidocaine)、明膠、羥乙基澱粉(hydroxyethyl starch, HES)、聚環氧乙烷和聚山梨酯(例如，聚

山梨酯20、聚山梨酯80)中的一種或多種。其他合適的藥學上可接受的賦形劑，包括本領域中所熟知者，例如可參見Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania。

【0114】 另一方面，本說明書還預期本發明的液體製劑特別缺乏某些組成分(即，化合物、材料或物質)，例如缺乏螯合劑、去污劑、多醣、氨基酸、穩定胜肽...等，包括其任意組合。本說明書中的用語「去污劑」與「界面活性劑」同義，且旨在包括非離子型和離子型的去污劑。本說明書中的用語「穩定胜肽」，通常是指由5至50個氨基酸所組成的胜肽，例如由10至40個氨基酸或由15至30個氨基酸所組成的胜肽。因此，用語「穩定胜肽」並不包括HSA。

【0115】 在一個實施例中，本發明的液體製劑不含去污劑，特別是不含聚山梨酯，更特別地不含聚山梨酯20和/或聚山梨酯80。在另一實施例中，本發明的液體製劑不含海藻酸鹽。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含琥珀酸鹽。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含有一種或多種(例如，2、3、4或5種)選自由精氨酸、谷氨酸、甲硫氨酸、色氨酸和絲氨酸所組成的一個氨基酸群組。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含糖，例如單醣、寡糖或多醣或其混合物。具體地，本發明的液體製劑可以不含蔗糖、乳糖、麥芽糖和海藻糖中的一種或多種(例如，2種、3種或4種)。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不包含螯合劑，特別是本說明書中結合本發明所描述的那些。本發明還預期液體製劑缺乏多於一種或所有上述化合物。

【0116】 在一個實施例中，本發明的液體製劑缺乏(i)去污劑和單醣、寡糖和多醣，(ii)去污劑和任何氨基酸，或去污劑和除了組氨酸之外的所有氨基酸，(iii)去污劑和穩定胜肽，(iv)單醣、寡糖和多醣以及任何氨基酸，或單醣、寡糖和多醣以及除了組氨酸之外的所有氨基酸，(v)單醣、寡糖和多醣以及穩定胜肽，(vi)任何氨基酸和穩定胜肽，或除了組氨酸和穩定胜肽之外的所有氨基酸，(vii)去污劑、單醣、寡糖和多醣以及任何氨基酸，或去污劑、單醣、寡糖和多醣以及除了組氨酸和穩定胜肽之外的所有氨基酸，(viii)去垢劑，單醣、寡糖和多醣，以及穩定胜肽，(ix)去垢劑，任何氨基酸以及穩定胜肽，或去垢劑，除了組氨酸之外的所有氨基酸以及穩定胜肽，(x)單醣、寡糖和多醣、任何氨基酸和穩定胜肽，或單醣、寡糖和多醣、除了組氨酸之外的所有氨基酸和穩定胜肽，(xi)去污劑、單醣、寡糖和多醣、任何氨基酸和穩定胜肽，或去垢劑、單醣、寡糖和多醣、除了組氨酸外的所有氨基酸以及穩定胜肽。

【0117】 在另一個實施例中，本發明的液體製劑不包含除了組氨酸之外的任何其他氨基酸。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含任何單醣、雙糖和三糖。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不含除了HSA之外的任何其他穩定胜肽或蛋白質。在另一個實施例中，本發明的液體製劑不包含磷酸鹽，例如磷酸鹽緩衝劑形式的磷酸鹽。

【0118】 在另外的實施例中，本發明的液體製劑缺乏(i)琥珀酸鹽和去污劑(例如聚山梨醇酯)，(ii)琥珀酸鹽和甲硫氨酸，(iii)琥珀酸鹽和蔗糖，(iv)去污劑(例如聚山梨醇酯)，(v)去污劑(例

如，聚山梨醇酯)和甲硫氨酸，(v)去污劑(例如，聚山梨醇酯)和蔗糖，(vi)甲硫氨酸和蔗糖，(vii)琥珀酸鹽、去污劑(例如，聚山梨醇酯)和甲硫氨酸，(viii)琥珀酸鹽、去污劑(例如，聚山梨醇酯)和甲硫氨酸，(ix)琥珀酸鹽，甲硫氨酸和蔗糖，(x)去污劑(例如聚山梨醇酯)、甲硫氨酸和蔗糖，(xi)琥珀酸鹽、去污劑(例如聚山梨醇酯)、甲硫氨酸和蔗糖，(xii)去污劑(例如聚山梨醇酯和組氨酸)，(xiii)去污劑(例如聚山梨醇酯)、組氨酸和蔗糖。

【0119】此外，缺少一種或多種組成分(即，化合物、材料或物質)的本發明的任何一種液體製劑，還可缺少螯合劑，特別是本說明書中所述的螯合劑。

【0120】此外，本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，和(iii)張力劑。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至1.0% w/v之間的HSA，和(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，含量介於0.01% w/v至2.0% w/v之間。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，和(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，含量介於0.1% w/v至1.5% w/v之間。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，和(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，含量介於0.6% w/v至1.2% w/v之間。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml的肉毒桿菌素，(ii)含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，和(iii)含量為0.9% w/v，作為張力的氯化鈉劑。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度

介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，和(iii) 含量為0.9% w/v，作為張力劑的氯化鈉。

【0121】 本文還預期上下文中所描述的較佳液體製劑的特徵在於 Fe^{3+} 離子的濃度小於1 μM ，較佳小於1000nM或小於500nM，更佳小於250nM或小於100nM，最佳小於10nM或小於1nM。

【0122】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素、(ii)HSA、(iii)張力劑和(iv)緩衝劑。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii) 含量介於0.01% w/v至1.0% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉物，為含量範圍介於0.01% w/v至2.0% w/v之間，和(iv)緩衝劑，其濃度範圍介於1mM至100mM。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度範圍介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii) 含量介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量範圍介於0.01% w/v至2.0% w/v之間，以及(iv)緩衝劑，其濃度範圍介於1mM至100mM之間。本發明較佳的液體製劑包含(i) 濃度範圍介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii) 含量範圍介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量範圍介於0.1% w/v至2.0% w/v之間，以及(iv)緩衝劑，其濃度範圍介於1mM至100mM。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度範圍介於10U/ml至200U/ml的肉毒桿菌素，(ii) 含量範圍介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)張力劑，較佳為氯化鈉，其含量範圍介於0.6% w/v至1.3% w/v之間，以及

(iv)緩衝劑，其濃度範圍介於2mM至50mM之間。本發明較佳的液體製劑包含(i)濃度範圍介於10mM至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量範圍介於0.05% w/v至0.25% w/v之間的HSA，(iii)含量為0.9% w/v的氯化鈉，以及(iv)濃度範圍介於5mM至20mM之間的緩衝劑。本說明書還預期本段中所述較佳液體製劑的特徵在於 Fe^{3+} 離子的濃度小於1 μM ，較佳小於1000nM或小於500nM，更佳小於250nM或小於100nM。最佳小於10nM或小於1nM。

【0123】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，(iii)作為張力劑的氯化鈉，和(iv)選自於由組氨酸、磷酸鹽及其混合物的作為緩衝劑，其中所述緩衝劑較佳是組氨酸。

【0124】 本發明特佳的液體製劑包含(i)濃度範圍介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量範圍介於0.01% w/v至1.0% w/v之間的HSA，(iii)含量範圍介於0.01% w/v至2.0% w/v之間的氯化鈉，較佳為0.9% w/v，以及(iv)緩衝劑，其選自於組氨酸、磷酸鹽及其混合物，濃度範圍介於1mM至100mM之間，其中緩衝劑較佳為濃度範圍介於1mM至100mM之間的組氨酸。

【0125】 本發明另一種特佳的液體製劑包含(i)濃度範圍介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii)含量範圍介於0.01% w/v至0.5% w/v之間的HSA，(iii)含量為0.9% w/v的氯化鈉，和(iv)濃度範圍介於1mM至100mM之間，選自組氨酸、磷酸鹽及其混合物的緩衝劑，其中緩衝劑較佳為濃度範圍介於1mM至100mM之間的組氨酸。

【0126】 本發明的又一特佳的液體製劑包含(i)濃度範圍介於10U/ml至200U/ml之間的肉毒桿菌素，(ii) 含量範圍介於0.05 % w/v至0.25 % w/v之間的HSA，(iii) 含量為0.9 % w/v的氯化鈉，和(iv)選自組氨酸、磷酸鹽及其混合物的緩衝劑，濃度範圍介於1mM至100mM之間，較佳濃度範圍介於2mM至50mM之間，或更佳濃度範圍介於5mM至20mM之間。其中，緩衝劑較佳為濃度範圍介於1mM至100 mM的之間組氨酸，較佳濃度範圍介於2mM至50mM之間，或更佳濃度範圍介於5mM至20mM之間。

【0127】 此外，上述較佳和特佳的液體製劑具有範圍較佳介於6.0至7.5之間的pH值。此外，肉毒桿菌素較佳是血清型A，更佳是血清型A的神經毒性成分。

【0128】 本發明較佳液體製劑的實施例如下：

製劑1：

50 U/ml BoNT/A

0.9 % 氯化鈉 (9mg/mL)

0.085 % HSA (透析後的EDTA)(0.85mg/mL)

0.155 % 組氨酸(1.55mg/ml；~10mM)

pH值6.0

【0129】 製劑1 中HSA(透析後的EDTA)的實施例可以通過包括下述步驟的方法加以製備：

- 在每毫升濃度為20%的HSA溶液中添加37.2毫克的Na₂-EDTA，攪拌並用氫氧化鈉(NaOH)調整pH值至8.0；
- 室溫下攪拌醞釀6小時；

-在室溫下使用100倍體積的EDTA緩衝液(100mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ；10mM組氨酸；0.9% NaCl ，pH值為7.0)進行透析16小時，並在磁力攪拌器上輕輕攪拌(透析膜的載留分子量(MWCO)為10kDa)；

-在室溫下使用100倍體積的10mM組氨酸、0.9% NaCl ，和pH 值6.0 進行透析24小時，然後用新鮮緩衝液替換透析緩衝液，再透析24小時，並重複兩次以上。

【0130】 在製劑1的實施例性，EDTA可以選擇性地被其他螯合劑例如EGTA、BAPTA或DTPA所替代。可以使用濃縮的EDTA溶液(例如，200mM EDTA，pH值8.0)來作為對HSA溶液中添加固體EDTA的替代方案。第一個透析步驟(針對EDTA 緩衝液)也可以省略。也可以使用其他方法，例如掃流透析(crossflow dialysis)或超濾，來代替透析。

【0131】 本發明還涉及一種包含肉毒桿菌素的液體製劑，其中，將此液體製劑置於40°C的高溫下儲存4週後，相較於初始毒素活性，其毒素活性降低不超過20% 此外，本發明涉及一種包含肉毒桿菌素的液體製劑，其中，將此液體製劑暴露於250°C 250W/m²的光源7下小時後，相較於初始毒素活性，其毒素活性降低不超過20%。較佳地，可以使用SUNTEST CPS+儀器(ATLAS Material Testing Technology LLC)來進行光穩定性測試，即在250W/m²下曝光7小時，其配備有濾光片組，用以提供對應於ISO 10977 的ID65(室內間接日光標準)，波長範圍介於320nm至800nm之間的光譜分佈，並配備有符合ICH Q1B的窗式玻璃濾光片(window glass filter)。

第 46 頁，共 73 頁(發明說明書)

【0132】 此外，本發明還涉及製備本說明書所述液體肉毒桿菌素製劑的方法，包括添加本說明中所述的組成分，特別是添加組成分(i)至(ii)和選擇性的組成分(iii)和(vi)中的一種或多種。較佳的組成分為(i)、(ii)、(iii)和(iv)。本發明的液體製劑的製備沒有特別限制，且各自的配方技術是本領域技術人員已知的。如上所述，肉毒桿菌素的液體製劑通常是水溶液，較佳為食鹽水溶液，更佳為生理食鹽水溶液，且最佳的是含緩衝劑(例如，以磷酸鹽或組氨酸做為緩衝劑)的生理食鹽水溶液生理鹽水溶液。

【0133】 較佳地，首先溶解鹽，然後添加HSA，如果有需要就調整pH值，最後添加肉毒桿菌素。此添加順序並不是強制性要求，但被認為是可以安全地保留肉毒桿菌神經毒素(BoNT)的最大比活性。較佳地，製備液體肉毒桿菌素製劑的方法，不包括將粉末形式的冷凍乾燥後之肉毒桿菌素進行復溶。

【0134】 進一步，本發明涉及一種穩定液體肉毒桿菌素製劑的方法，此方法包括將肉毒桿菌素與HSA組合，其中所述HSA可以通過包括下述步驟的方法來製備：

(a)將含有HSA的組合物與螯合劑接觸，藉以獲得HSA和螯合劑的混合物；以及

(b)從混合物中移除螯合劑。

【0135】 更進一步，本發明涉及使用HSA來增進包含肉毒桿菌素的液體組合物的光和/或溫度穩定性的用途，其中所述HSA可以通過下述方法來製備，此方法包括下述步驟：

(a) 將含有HSA的組合物與螯合劑接觸，藉以獲得HSA和螯合劑的混合物；以及

(b)從混合物中移除螯合劑。

【0136】 更進一步，本發明涉及一種HSA，其可通過下述方式獲得：

(a) 將含有HSA的組合物與螯合劑接觸，藉以獲得HSA和螯合劑的混合物；以及

(b)從混合物中移除螯合劑。

【0137】 在第四方面，本發明涉及一種製備本發明所述之液體製劑的方法，其中此方法包括下述步驟：

-將人類血清白蛋白起始材料加以純化，藉以獲得純化後的人類血清白蛋白材料；

-將純化所得的人類血清白蛋白與肉毒桿菌素和可選擇性的其他組成分混合以獲得液體製劑；

或者

-將包含肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體組合物加以純化，藉以獲得純化後的液體組合物；

-將純化所得的液體組合物與額外的組成分混合，藉以獲得液體製劑。

【0138】 人類血清白蛋白起始材料如前文所定義，較佳地，是含有至少5% w/v的HSA、較佳為含量介於10% w/v至35% w/v之間水溶液形式的HSA、更加的含量範圍介於15% w/v至30% w/v之間，且最佳為含量範圍介於20% w/v至25% w/v之間的HSA。人類血清白蛋白起始材料可以含有色氨酸和N-乙醯基-色氨酸，特別是含有N-乙醯基-色氨酸，其含量大於5mM、含量為10mM或更多、含量為20mM或更多，或含量為30mM或更多。此外，步

驟(a)中所獲得的混合物的pH值可調整至6.0至介於9.0之間；較佳介於6.5至8.5之間；更佳介於7.0至8.5之間；最佳的pH範圍介於7.0至8.0之間。

【0139】 較佳地，在本發明方法的第一替代實施例中，用於產生純化後的人類血清白蛋白材料的純化步驟，其不含或含有不超過5mM，較佳不超過1mM；更佳不超過0.1mM，最佳不超過0.001mM，的色氨酸和/或N-乙醯基-色氨酸。在製備液體製劑時，稀釋純化後的人類血清白蛋白材料，藉以形成色氨酸和N-乙醯基-色氨酸的濃度落入本說明書所述的範圍內，例如小於50 μ M。

【0140】 此純化步驟可以通過將人類血清白蛋白起始材料或將含有肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體組合物加以透析、滲濾(掃流過濾)、超濾、層析純化(例如，離子交換層析、親和層析、疏水作用層析、場流分離)或沉澱(例如，鹽析、乙醇沉澱)。

【0141】 較佳地，是採用透析來進行純化。透析通常在0°C至30°C之間的溫度下，特別是在2°C至30°C之間的溫度下進行0.5至48小時，特別是1至24小時或1至12小時，在0°C至30°C的溫度下，特別是在2°C至30°C或4°C至25°C的溫度下，包括室溫。此外，透析通常採用醞釀後的HSA溶液體積的10至1000倍體積的透析緩衝液來進行，並且透析緩衝液通常更換至少一次。所使用的透析膜可以具有例如10kDa的截留分子量。

【0142】 例如，可以通過下述製程來獲得純化後的血清白蛋白：

-在磁力攪拌器輕輕攪拌的情況下，在室溫下，採用100倍體積的透析緩衝液(10mM組氨酸，0.9%NaCl，pH 6.0)，對市售的HSA產品進行透析24小時(透析膜的截留分子量為10kDa；

- 用新鮮的透析緩衝液更換緩衝液，再於室溫下進行透析24小時，並重複兩次以上。

【0143】 上述方法的第一個替代實施例，是先純化人類血清白蛋白起始材料，再將純化後所獲得的人類血清白蛋白與肉毒桿菌素和可選擇性的其他組成分混合，這是本發明較佳的選項。獲得本發明所述的液體製劑的混合步驟並無特別限制，且包括混合組成分(i)至(ii)以及可選擇性的組成分(iii)和(vi)中的一種或多種。較佳地，首先溶解鹽類，然後添加HSA，必要時須要調整pH值，最後添加肉毒桿菌素。此一操作順序並不是強制性要求，但被認為是可以安全地保留肉毒桿菌神經毒素的最大比活性(specific activity)。較佳地，製備液體肉毒桿菌素製劑的方法不包括將粉末形式的冷凍乾燥後之肉毒桿菌素進行復溶。

【0144】 如上述關於本發明的第一方面所述，本說明書還預期本發明所述的液體製劑具有較低的 Fe^{3+} 離子濃度，因為 Fe^{3+} 離子也對光穩定性產生去穩定作用(destabilising effect)。因此，根據本發明，為了去除 Fe^{3+} 離子，根據本發明所述方法的純化步驟，會以下述方式進行或更包括下述步驟：

-將人類血清白蛋白起始材料與螯合劑接觸，藉以獲得人類血清白蛋白起始材料和螯合劑的混合物；以及

-從混合物中移除去螯合劑，以獲得經螯合劑處理且純化後的人類血清白蛋白材料。

或者

-將包含肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體組合物與螯合劑接觸，藉以獲得液體組合物和螯合劑的混合物；以及

-從混合物中移除螯合劑，以獲得經螯合劑處理且純化後的液體製劑。

【0145】 在接觸步驟中，人類血清白蛋白起始材料以及包含肉毒桿菌素和人類血清白蛋白的液體組合物，較佳分別與一定量的螯合劑接觸，這使得混合物中存在一定含量的螯合劑。其濃度介於0.1mM至1000mM之間或介於0.1mM至500mM之間，更佳介於0.5mM至500mM之間或介於1mM至500mM之間，且最佳介於10mM至100mM之間。

【0146】 螯合劑的移除可以通過透析、掃流過濾或超濾來進行。

【0147】 如本說明書中的語「接觸」，可以廣義地解釋為將兩個或更多個組成分放在一起。這可以通過多種不同的方法來實現，例如溶解、混合、懸浮、共混、漿化、攪拌、流動、吸附、結合、萃取等。通常，將螯合劑添加到包含HSA的組合物中(例如，HSA 溶液)，然後混合以獲得均勻混合物，並且選擇性地進行進一步的製程步驟(例如，對含有螯合劑的緩衝液進行透析)。

【0148】 因此，本說明書還預期所述的「接觸」，可以採用將HSA材料(例如水溶液形式的HSA材料)固定到固定化金屬親和性樹脂上的方式來加以實現。本說明書中的用語「固定化金屬親

和性樹脂」包括但不限定於，含有能夠結合和配位多價陽離子的固定化功能部分（例如，亞氨基二乙酸的樹脂，例如

Cheating-Sepharose、Fractogel-EMD-Chelate、POROS

20MC、Matrex Cellufine Chelate、TALON 和 Chelex 100 樹

脂。此類固定化金屬親和性樹脂，通常以本領域技術人員所習知的層析金屬親和管柱的形式來使用。此外，如本說明書中的用語「接觸」還包括使用合適的固定化金屬親和樹脂來進行批次模式的結合。

【0149】 關於接觸步驟，需進一步說明，如在接觸步驟的定義中所述的用語：「人類血清白蛋白」和「螯合劑」，並未暗示其具有任何物理形式的限制，也未排除與HSA及螯合劑混合或包含在HSA和螯合劑中的其他物質或化合物的存在。這意味著螯合劑接觸的「人類血清白蛋白」可以以任何的形式存在。例如，以固體或液體形式(例如，含水組合物或水溶液)存在。同樣地，與人類血清白蛋白起始材料接觸的「螯合劑」可以以任何形式存在，例如以固體或液體形式(例如，含水組合物或水溶液)存在。

【0150】 較佳地，在接觸步驟中所獲得的混合物是含水組合物。此種含水組合物可以通過不同的方式製備。例如，人類血清白蛋白可以是一種含水組合物的形式(例如水溶液)，其可以與以固體形式或液體形式存在的螯合劑(例如，以水溶液形式存在的螯合劑)進行混合。此外，人類血清白蛋白可以是固體形式，例如冷凍乾燥材料，其與螯合劑和水溶液混合，或者與螯合劑的水溶液混合。較佳地，人類血清白蛋白是以含水組合物的形式存在，更

佳是以水溶液的形式存在，且螯合劑是一種固體或一種含水組合物(例如，水溶液)。

【0151】 特別地，在接觸步驟中與螯合劑接觸的HSA，可以是含有至少5% w/v HSA、較佳為濃度範圍介於10% w/v至35% w/v之間的水溶液形式的HSA，更佳為濃度範圍介於15% w/v至30% w/v之間的HSA水溶液，最佳為濃度範圍介於20% w/v至25% w/v之間的HSA水溶液。此外，步驟(a)中所獲得的混合物的pH值可以調整至介於6.0至9.0之間；pH值的範圍較佳介於6.5至8.5之間；更佳介於7.0至8.5之間；最佳介於7.0至8.0之間。

【0152】 此外，根據本發明製備液體製劑的方法中接觸步驟可以包括下述幾個子步驟：例如，在一個實施例中，接觸步驟)包括下述步驟，或(僅)由下述步驟組成：將螯合劑(例如，EDTA)與人類血清白蛋白混合，將所述混合物醞釀一段預定的時間，然後選擇性地以含有螯合劑的緩衝液對所述混合物進行透析。其中，所使用的螯合劑較佳與醞釀子步驟中所使用者相同。在另一個實施例中，不對混合物進行醞釀，而是(直接)以含有螯合劑的緩衝液對混合物進行透析。其中，所使用的螯合劑較佳與混合螯合劑(例如，EDTA)和人類血清白蛋白的步驟中所使用的螯合劑相同。在另一個實施例中，在透析之前不會將螯合劑與人類血清白蛋白混合。也就是說，接觸步驟(a)可包括或(僅)由使用含有螯合劑的緩衝液對混合物針對進行透析的步驟所組成

【0153】 較佳地，接觸步驟包括下述步驟或(僅)由下述步驟所組成：將螯合劑添加到包含HSA的組合物(例如，HSA的溶液)中，或者將螯合劑與包含HSA的組合物(例如，HSA的溶液)進行

混合。然後將所得的混合物醞釀一段時間，例如，靜置一段給定時間而不攪拌，或者是攪拌一段給定時間。

【0154】 醞釀時間不限於特定範圍，但通常為至少0.5小時，特別是至少1小時，更特別是至少2小時。醞釀時間的上限並非關鍵，但可以是例如1小時、2小時、5小時或10小時。因此，醞釀時間可以是例如介於0.5至5小時之間或介於1小時至10小時之間。同樣地，醞釀溫度沒有特別限制，例如可以在介於0°C至60°C之間的範圍內。較佳地，溫度介於0°C至30°C之間。這意味著室溫(20°C或25°C)是本發明內的合適溫度。如本領域技術人員所習知的，溫度會影響反應時間。通常可以選擇醞釀條件(例如時間和溫度)以使得最終產物中所含的螯合劑(例如EDTA)的殘留量為100μM或更少，較佳殘留量為10μM或更少，更佳殘留量為1μM或更少。

【0155】 可選擇性地，在醞釀步驟之後可以進行一個後續處理，例如以含有螯合劑的緩衝液對醞釀後的混合物進行透析。其所使用的螯合劑，通常與醞釀步驟中所使用的螯合劑相同。用於選擇性透析步驟中的螯合劑，其包含在透析緩衝液之中的濃度，較佳介於0.1mM至1000mM之間、更佳是以介於1mM至200mM之間、最佳是介於10mM至100mM之間。又較佳的是，透析步驟中所使用的緩衝液(i)具有介於7.5至8.5的pH值，(ii)進一步包含緩衝劑，較佳是根據最終組合物，或(iii)進一步包含張力劑，較佳為0.9% w/v的氯化鈉；或(i)和(ii)；或(i)和(iii)；或(ii)和(iii)；或(i)和(ii)和(iii)。

【0156】適用於本文的螯合劑如前述所定義。任何上述螯合劑的混合物也可用於本發明，例如用於作為溶液、固體或與偶聯基質。

【0157】根據本發明，可以採用任何適當的技術來移除螯合劑，例如例如透析法(包括使用透析袋的傳統透析法、逆流透析法等)、逆滲透、過濾、掃流過濾、超濾和層析法(例如，離子交換層析法或凝膠過濾層析法)。

【0158】較佳，可以通過透析法移除螯合劑。透析通常在0°C至30°C的溫度範圍下，特別是在2°C至30°C或4°C至25°C的溫度範圍下(包括室溫)，進行0.5至48小時，特別是1至24小時或1至12小時。此外，透析通常使用10至1000倍於醞釀後的HSA/螯合劑混合物體積的透析緩衝液來進行，並且透析緩衝液通常更換至少一次。所使用的透析膜可以具有例如10kDa的截留分子量。

【0159】通常，選擇透析條件(例如，時間、溫度、緩衝液體積、緩衝液更換次數)，可以使最終產物中所包含的螯合劑(例如，EDTA)殘留量的濃度低於100μM，較佳濃度低於10μM，更佳濃度低於1μM。

【0160】在第五方面，本發明涉及一種將本發明的液體製劑用於治療的用途。

【0161】特別是，本發明的液體製劑可用於治療神經肌肉疾病、疼痛、流涎、多汗症、泌尿系統疾病和神經系統疾病。

【0162】示例的神經肌肉疾病包括肌張力障礙、頸部肌張力障礙、痙攣、中風後痙攣、眼瞼痙攣、震顫、多動性運動障礙和腦癱。泌尿系統疾病尤其包括以逼尿肌過度活動、膀胱過度活動、

神經源性膀胱和間質性膀胱炎為特徵的病症、外陰痛和慢性盆腔疼痛、良性前列腺增生(BPH)和逼尿肌括約肌協同失調(DSD)的治療。示例性的神經障礙包括慢性偏頭痛、三叉神經痛、周圍神經性疼痛、糖尿病性神經性疼痛和憂鬱症。

【0163】 在第六方面，本發明涉及將本發明所述的液體製劑用於治療美容狀況的用途。

【0164】 本發明的這個方面涉及本發明所述的液體製劑的純粹美學用途。較佳的待治療的美容狀況包括皮膚狀況，特別是皮膚皺紋、特別是面部皺紋的處理。

【0165】 本說明書的用語「皺紋(wrinkles)」，被廣義地解釋為不僅包括皺紋，還包括細紋(lines)、褶皺(rhytids)、溝紋(creases)、摺痕(folds和犁溝(furrows)。「細紋」、「皺紋」、「褶皺」、「溝紋」、和「褶痕)」等詞具有相似的定義，因此經常可以互換使用。在本發明中，「細紋」通常可與「皺紋」互換，但較佳是指比「皺紋」還深的皮膚凹陷。「溝紋」可與皺紋和細紋互換，且較佳是指線性的凹陷。「摺痕」可與皺紋、線條和褶皺互換，較佳是指輕微形式的皺紋，並且可以被描述為位於某些位置的特定皺紋。本說明書中所用的「褶皺」與皺紋具有基本相同的含義。然而，「褶皺」較佳是指由不規則的線條聚集形成的皮膚結構。「犁溝」是皮膚上的深褶皺或深線。

【0166】 較佳地，根據被本發明所治療的皺紋，是面部皺紋，包括水平前額紋、眉間皺眉紋、眶週紋、魚尾紋、兔紋(即，鼻子兩側向下放射的紋)、鼻唇溝、上唇唇線、下唇唇線、嘴角線、木偶線、口周唇線、口腔連合、唇頰皺痕和鵝卵石下巴。

第 56 頁，共 73 頁(發明說明書)

【0167】 為了治療上述面部皺紋，通常將肉桿菌素通過肌肉注射的方式，施加到以下肌肉：額肌(額頭橫紋)、降眉肌和皺眉肌(眉間皺眉紋)、眼輪匝肌(魚尾紋/眶週線)、鼻肌、鼻橫肌(兔子線)、提上唇肌(鼻唇溝)、口輪匝肌(上下唇線)、降口角肌(嘴角線、木偶紋、口腔連合、唇頰摺痕)和頰肌(口周唇紋、鵝卵石下巴)。

【0168】 本發明的液體製劑的另一個較佳的美容用途係涉及美容應用的用途，所述美容應用包括面部和/或身體的皮膚質量的回春(rejuvenation)和/或改善。

【0169】 在第七方面，本發明涉及一種治療疾病或病症的方法，其包括向有需要的人施加有效量的本發明所述的液體製劑。

【0170】 疾病或病症可以是上述所提到的疾病和狀況中的任一種，無論其是治療適應症還是美容適應症。因此，在一個實施例中，本發明涉及一種美容(醫美)狀況，較佳是皮膚狀況的處理(非治療性)方法，包括向有需要的人施用有效量的本發明所述的液體製劑。在另一個實施例中，本發明涉及一種美容(醫感)狀況，較佳是皮膚狀況的處理(非治療性)方法，包括將有效量的本發明所述液體製劑注射到有需要的人體內。

【0171】 本發明的另一較佳方法涉及一種使面部和/或身體皮膚質量回春和/或改善的方法，包括向需要的人施用有效量的本發明所述的液體製劑。

【0172】 除了患有可以根據本發明所述方法進行治療的疾病或狀況之外，待治療的人沒有特別的限制。本領域中的技術人員將能夠決定用於治療給定適應症或美容狀況的適當施給藥方

案。具體而言，注射可以是皮內、皮下(subdermal (subcutaneous))或肌內注射，這取決於待治療的疾病或狀況。

【0173】 除上述之外，本發明還涉及一種用於穩定液體肉毒桿菌素製劑的方法，該方法包括將肉毒桿菌素與人類血清白蛋白(HSA)加以組合，其中所述HSA是通過純化人類血清白蛋白來製備的。獲得如本發明第四方面所述的純化後的人類血清白蛋白材料的起始材料。

【0174】 此外，本發明還涉及一種將人類血清白蛋白(HSA)用於提供包含肉毒桿菌素的液體組合物的光和溫度穩定的用途，其中所述HSA是通過純化人類血清白蛋白起始材料來獲得如本發明第四方面所述的純化後的人類血清白蛋白材料。

實施例

I. 實施例1-3

【0175】 以下實施例說明本發明所述的液體肉毒桿菌素製劑及其製備方法。除非另有說明，所述的百分比為重量體積比(w/v)。

【0176】 肉毒桿菌素的生物活性，是使用如WO 2014/207109中所述的以細胞為基底的效價分析法(cell-based potency assay, CBA)來加以確定。簡而言之，將神經元細胞與含有神經毒素的樣品和已知效價的參考標準一起培養。

【0177】 培養期過後，將細胞裂解並通過免疫分析法(Immunoassay)來測定裂解後SNAP25蛋白的含量。然後藉由比較採用樣品進行處理後的細胞裂解率與採用參考標準進行處理後的細胞裂解率，來計算樣品的生物活性。

實施例1

含有經過傳統透析預處理之HSA的液體肉毒桿菌素製劑(非根據本發明)的光和儲存穩定性

【0178】 在最初的實驗中，發現不含複合蛋白的150kDa的血清型A肉毒桿菌神經毒素液體製劑(本說明書中也稱為「150kDa BoNT/A」)，其生物活性在暴露於光線(日光或室內光)後會劇烈低，且光敏感性會隨著人類血清白蛋白(HSA)濃度的增加而增加。在進一步的實驗中，本發明人意外地發現，通過添加錯合劑(complexing agent)，例如EDTA，可以顯著提高液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性和在40°C下的儲存穩定性，即使EDTA是以其鎂、鈣或鋅複合物的形式存在(結果未顯示)。

【0179】 鑑於這些發現，推測HSA中的某些未知成分會引發肉毒桿菌素的光敏性，且該成分可能以某種方式被螯合劑，例如EDTA，滅活或掩蔽。然而，在本發明人的進一步實驗中，令人驚訝地發現EDTA和導致注射疼痛感增加。因此，為了省去螯合劑，例如EDTA，本發明人嘗試通過透析的方式移除HSA中會導致光不穩定的未知成分。

【0180】 為達到此目的，在室溫下針，使用含有10mM組氨酸、0.9% NaCl、pH質為 6.0的緩衝液，對HSA(例如，20%)濃縮的儲備溶液(stock solutions)進行廣泛透析(extensively dialyzed)，持續4×12小時(緩衝液更換三次，緩衝液體積約為樣品體積的100倍)以獲得「透析後的HSA」。然後，分別使用透析

後的HSA和未透析的HSA來製備下述的肉毒桿菌毒液體製劑
(150 kDa BoNT/A，不含複合蛋白)：

製劑 1：65U/mL 肉毒桿菌素、0.1% HSA (未透析)、10mM
組氨酸、0.9% NaCl、pH值為6.0。

製劑 2：65U/mL 肉毒桿菌素、0.1% HSA (已透析)、10mM
組氨酸、0.9% NaCl、pH值為6.0。

【0181】 這兩種製劑的光穩定性，可以藉由測量暴露於
250W/m² 的光7小時後，相對於儲存在黑暗中的對照組樣品，的
肉毒桿菌素相對活性來加以判定。為了暴露於250W/m²光下17小
時，使用 SUNTEST CPS+ 儀器(ATLAS Material Testing
Technology LLC)，用以提供對應於ISO 10977 的ID65(室內間
接日光標準)，波長範圍介於320nm至800nm之間的光譜分佈，並
配備有符合ICH Q1B的窗式玻璃濾光片(window glass filter)。
測量結果如表1所示。

表 1. 含有未透析HSA或含有已透析HSA的液體肉毒桿菌素
製劑的光穩定性(7小時，250W/m²):

BoNT/A 製劑	透析	BoNT/A的相對活性(相對於對照組的%)
1	no	46%
2	yes	56%

【0182】 從表1中可以明顯看出，與含有未透析HSA的製劑1相比，含有已透析HSA的製劑2僅觀察到對光穩定性的有限影響。

【0183】 此外，通過測量在40°C下儲存2周和4週後，相對於對照組樣品在T0時，的肉毒桿菌素相對活性(在製劑1和2製備後立即測量)來判定製劑1和2的儲存穩定性。結果如表2所示。

表 2. 含有未透析HSA或含有已透析HSA的液體肉毒桿菌素製劑在40°C下的儲存穩定性:

BoNT/A 製劑	透析	BoNT/A 的相對活性(相對於 T0 時的對照組%)	
		在 40°C 下儲存 2 周	在 40°C 下儲存 4 周
1	no	66%	52%
2	yes	65%	51%

【0184】 可以看出，透析對於肉毒桿菌素的儲存穩定性沒有影響。

實施例2

含有經過錯合劑和透析預處理之HSA的液體肉毒桿菌素製劑的光和儲存穩定性

【0185】 儘管有實施例1的發現(即，光穩定性需要EDTA或EDTA複合物；已透析的HSA不會導致光穩定性和儲存穩定性的顯著改善)，發明人仍繼續研究出儘管不含EDTA等螯合劑但仍具有光穩定性和儲存穩定性的液體肉毒桿菌素製劑。

【0186】 首先，將EDTA添加至HSA濃縮儲備溶液(例如，20%)(100mM=含37.2mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ /ml的HSA溶液，pH值為8.0)，並下在室溫下攪拌醞釀6小時。然後，採用含有EDTA的緩衝液(100mM EDTA、10mM組氨酸、0.9% NaCl，pH值為7.0)，在室溫下對醞釀後的混合物進行透析16小時。所使用的透析膜的載留分子量為10kDa，且透析膜的填充體積為每 cm^2 約0.2ml。透析緩衝液的體積約為樣品體積的100倍。

【0187】 之後，在室溫下採用體積為樣品體積約100倍，不含EDTA的透析緩衝液(10mM組氨酸，0.9% NaCl，pH值為6.0)進行透析24小，藉以移除EDTA。然後，用新鮮的透析緩衝液替換透析緩衝液，並再次進行透析24小時。重複兩次，以獲得預處理後的HSA (「經過EDTA透析後的HSA」)。

【0188】 然後使用經過預處理的HSA來製備肉毒桿菌素的液體製劑3(150kDa BoNT/A，無復合蛋白)。

製劑1：與實施例2的製劑1相同(65U/mL肉毒桿菌素，0.1% HSA(未透析)、10mM組氨酸、0.9% NaCl，pH值為6.0。

製劑 3：65U/mL 肉毒桿菌素、0.085% HSA(經過EDTA透析後)、10mM組氨酸、0.9% NaCl、pH值為6.0。

【0189】 製劑1和3的光穩定性可以通過測量暴露在 $250\text{W}/\text{m}^2$ 的光線7小時後，相對於儲存在黑暗中的對照組樣品，的肉毒桿菌素相對活性來判定。測量結果如表3所示。

表 3. 含有未透析HSA或經過EDTA透析後的HSA的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性(7小時，250W/m²):

BoNT/A 製劑	EDTA/ 透析	BoNT/A 的相對活性(相對於對照組的%)
1	no	46%
3	yes	84%

【0190】 如從表3中明顯看出的，與含有未經過預處理的HSA的製劑1相比，可以觀察到:含有經過EDTA透析後之HSA的製劑3，其光穩定性獲得顯著改善。

【0191】 此外，通過測量在40°C儲存2周和4週後，相對於T0時對照組樣品，的肉毒桿菌素相對活性(在製劑1和3製備後立即測量)來判定儲存穩定性。測量結果如表4所示。

表 4. 含有非透析HSA或含有經過EDTA透析後的HSA的液體肉毒桿菌素製劑在40°C下的儲存穩定性:

BoNT/A 製劑	EDTA/ 透析	BoNT/A 的相對活性(相對於 T0 時的對照組%)	
		在 40°C 下儲存 2 周	在 40°C 下儲存 4 周
1	no	66%	52%
3	yes	94%	82%

【0192】 結果表明，與含有未處理(未透析)HSA的製劑1相比，經過EDTA處理和透析後的HSA，可以顯著地提高生物毒素的活性。

【0193】 綜上所述，上述實施例可以看出，如果使用螯合劑對HSA進行預處理，然後再通過，例如透析，移除螯合劑，可以出乎意料地從液體製劑中省略螯合劑(例如EDTA)。所獲得的製劑不僅對光和溫度(儲存)穩定，而且與含有螯合劑(例如 EDTA)的液體製劑相比，也可以減輕注射時的注射疼痛感。

實施例3

鐵離子對液體肉毒桿菌素製劑光穩定性的影響

【0194】 進行後續的實驗來研究金屬離子對光敏感性的影響。為此，將鈣(1mM Ca^{2+})、鈷(1mM Co^{2+})、銅(1mM Cu^{2+})、鎳(1mM Ni^{2+})或鐵(1mM Fe^{3+})添加到含有50 U/ml的液體製劑中。其中，液體製劑包括150kDa BoNT/A、根據實施例2所製備的0.085%經過預處理的HSA(即經過EDTA處理和透析後的HSA)、10mM組氨酸、0.9% NaCl，pH值為6.0。所述液體製劑是用高純水、組氨酸和氯化鈉製備的，並且沒有使用鋼鐵設備。將所獲得的製劑暴露於光線(250W/m^2 下，7小時)並與儲存在黑暗中的對照組製劑進行比較。

【0195】 發現當與未添加鈣和鈷的製劑相比(與儲存在黑暗中的對照組製劑相比，殘餘的毒素活性為79%)，鈣(1mM Ca^{2+})的添加與鈷(1mM Co^{2+})的添加，對光穩定性沒有影響(與儲存在黑暗中的對照組製劑相比，殘餘的毒素活性為74%和77%)。添加銅(1mM Cu^{2+})和鎳(1mM Ni^{2+})導致光穩定性降低的程度相對較

小。相反地，添加鐵(1mM Fe³⁺)反而會導致光穩定性急劇下降，與儲存在黑暗中的對照組製劑相比，暴露在光線下(250W/m²下，7小時)後，僅殘留1% 的殘餘毒素活性(結果未顯示)。

【0196】 根據上述結果，更進一步研究在10pM和100μM的濃度範圍內，Fe³⁺離子對於液體BoNT/A製劑的光敏感性的影響。與上述實驗類似，使用包含經過預處理的HSA(50U/ml肉毒桿菌素、0.085%經過預處理的HSA、10mM組氨酸、0.9% NaCl，pH值為6.0)的相同製劑，並且使用儲備溶液 (50mM Fe(NO₃)₃)，將Fe³⁺濃度調節至獲得所需的最終濃度。表5顯示在 250W/m² 光照下7小時後所測量到的生物活性，以及在黑暗中保存的各個樣品的所測量到的生物活性百分比。

表 5. 含有經過預處理的HSA和不同 Fe³⁺濃度的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性(7小時，250W/m²):

BoNT/A 製劑	[Fe ³⁺]	BoNT/A 的相對活性 (在黑暗中保存的%)
1	100 μM	0.4%
2	1 μM	9%
3	316 nM	66%
4	100 nM	82%
5	32 nM	77%
5	10 nM	75%
4	100 pM	74%
5	10 pM	78%
6	0 pM	78%

【0197】 從表5可以看出，在316nM濃度下， Fe^{3+} 離子對BoNT/A穩定性有顯著影響，穩定性下降>15%。在濃度為1 μM 時，製劑的光穩定性顯著降低；然而，仍然高於濃度大於1 μM 時的光穩定性。當濃度為1 μM 或更高時，添加的 Fe^{3+} 離子，在光影響下，對液體製劑中BoNT/A的穩定性產生極其負面的影響。

【0198】 在另一實驗中，發現攪拌含有經過預處理的HSA的液體肉毒桿菌素製劑(即，50U/ml肉毒桿菌素、0.085%經過預處理的HSA、10mM組氨酸、0.9% NaCl，pH值為6.0)，在不銹鋼燒杯中攪拌48小時，並暴露於光線(250W/m²，7小時)後，其量測所得的BoNT/A相對活性僅為約2%。而同一樣品在聚丙烯容器中攪拌48小時後，其量測所得的BoNT/A 相對活性為78%。這是一個非常令人驚訝的發現，可能是由於少量的 Fe^{3+} 離子從不銹鋼燒杯浸出到液體肉毒桿菌素製劑中所引起的，且這表明鐵離子是製備液體肉毒桿菌素製劑時所需要考慮的重要因素。

II. 實施例4-6

【0199】 以下實施例4至6進一步證明了根據本發明所述的液體肉毒桿菌素製劑的光穩定性。為此，製備了幾種液體肉毒桿菌素製劑(實施例4)，並且將每種所述製備的製劑的樣品暴露於250W/m²的光線下7小時或在黑暗中保存7小時作為對照組。然後，通過以細胞為基底的效價分析法(CBA)測量光照樣品和黑暗

保存樣品的肉毒桿菌素活性。光穩定性是以暴露於光線下之樣品的肉毒桿菌素活性的量測平均值以及黑暗保存樣品的肉毒桿菌素活性的量測平均值二者的百分比來表示。

【0200】 肉毒桿菌素的生物活性，是使用如WO 2014/207109中所述的以細胞為基底的效價分析法(CBA)來加以判定。簡而言之，將神經元細胞與含有神經毒素的樣品和已知效價的參考標準一起培養。培養期過後，將細胞裂解並通過免疫分析法來測定裂解後SNAP25蛋白的含量。然後藉由比較採用樣品進行處理後的細胞裂解率與採用參考標準進行處理後的細胞裂解率，來計算樣品的生物活性。

【0201】 為了暴露於 $250\text{W}/\text{m}^2$ 光下7小時，使用 SUNTEST CPS+ 儀器(ATLAS Material Testing Technology LLC)，用以提供對應於ISO 10977 的ID65(室內間接日光標準)，波長範圍介於320nm至800nm之間的光譜分佈，並配備有符合ICH Q1B的窗式玻璃濾光片。測量結果如表1所示

實施例4

不同肉毒毒素製劑的製備

【0202】 待分析光穩定性的製劑，其組成分標示於表6和7中。所使用的肉毒桿菌素(BoNT)為NT101。

表 6. 含有未經處理/預處理的HSA的測試製劑:

第 67 頁，共 73 頁(發明說明書)

組成分		製劑			
		I	II	III	IV
BoNT (U/ml)		50	50	50	50
HSA (mg/ml)	未經處理	1.0	-	1.0	-
	已透析	-	1.0	-	-
	EDTA-透析	-	-	-	0.85
NaCl (mg/ml)		9	9	9	9
組胺酸(mg/ml)		1.55	1.55	1.55	1.55
EDTA (mg/ml)		-	-	1.30	-
pH 值		6.0	6.0	6.0	6.0

表 7. 含有色氨酸 (Trp)/N-乙醯基色氨酸(N-AcTrp)的測試
製劑:

組成分		製劑						
		1	2	3	4	5	6	7
BoNT (U/ml)		50	50	50	50	50	50	50
HSA EDTA-dial. (mg/ml)		0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
NaCl (mg/ml)		9	9	9	9	9	9	9
組胺酸(mg/ml)		1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
色氨酸 (mM)		-	-	-	-	10	0.08	-
N- 乙 醯 基 色 氨 酸 (mM)		10	2	0.4	0.08	-	-	-
pH 值		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

【0203】 製備「已透析的HSA」。將 10ml HSA 25% (CSL Behring) 轉移至透析卡匣(dialysis cassette)(Slide-A-Lyzer™, 10kDa MWCO, 12-30ml, Thermo

Scientific/Pierce)。將透析卡匣置於2升1.55g/l組氨酸、9g/l，pH值為6.0的溶液中，並在避光和攪拌(150rpm，磁力攪拌器)下進行透析24小時。隨後，用2升新鮮透析緩衝液(1.55g/l組氨酸、9g/l NaCl，pH值為6.0)替換透析緩衝液，並將此製程再重複3次，每次約12小時。透析卡匣中所得的內容物被稱為已透析的HSA或「HSA-透析」。其濃度如下所述。

【0204】 HSA-EDTA-透析的製備。將18ml HSA 25% (CSL Behring)與2ml 1M Na₂EDTA(pH值為8.0)混合。將所得溶液攪拌約6小時。然後，將約15ml溶液轉移至透析卡匣 (Slide-A-Lyzer™，10kDa MWCO，12-30ml，Thermo Scientific/Pierce)。將透析卡匣於2升1.55g/l組氨酸、9g/l NaCl、37.2g/l Na₂EDTA，pH值為7.0的溶液中，並在避光和攪拌(150rpm，磁力攪拌器)下進行透析24小時。

【0205】 接下來，將透析緩衝液更換為2升的1.55g/l組氨酸、9g/l NaCl，pH值為7.0，隨後進行三個循環，透析約12小時，並用2升新鮮透析液更換透析緩衝液。緩衝液(第一次緩衝液改變為 His/NaCl，pH值為6.5，第二次和第三次緩衝液改變為 His/NaCl，pH值為6.0)。透析卡匣中的最終內容物是經過 EDTA 透析的HSA材料(或「HSA-EDTA-透析」)。

【0206】 由於透析期間體積增加，透析後的HSA濃度通常顯著低於起始HSA溶液的濃度(25% w/v)。由於高蛋白質濃度預計不會造成顯著損失，因此認為HSA的絕對量沒有變化，並且根據本

領域技術人員已知的體積變化來計算濃度。透析後的HSA濃度測定為約8.1% w/v。

【0207】 安慰劑本體溶液(placebo bulk solutions)的製備。為了製備表6和7中所示但不含活性劑(BoNT)的製劑(本文稱為「安慰劑本體溶液」)，秤取HSA起始材料、NaCl和組氨酸，並將其溶解在水(Milli-Q)中。製備50mM色氨酸(Trp)和N-乙醯基色氨酸(N-AcTrp)儲備溶液(在溫水中分別為10.212g/l 和12.313g/l)，並根據所需色氨酸和N-乙醯基色氨酸的最終濃度劑量進行給藥。最後，通過添加1M NaOH或1M HCl將pH值調節至6.0，用水補足至最終體積，並將溶液通過0.22μm的過濾器進行無菌過濾。

【0208】 BoNT預稀釋液的製備。秤取13.44mg NT101放入無菌50ml低蛋白結合收集管(low protein binding tube)中，並與20.123g製劑7的無菌過濾後的安慰劑本體溶液混合，藉以獲得含有25,000U/ml BoNT的預稀釋液。

【0209】 樣品的製備。將20.0μl BoNT預稀釋液置於15ml無菌低蛋白結合管中，並添加9.98ml相應的安慰劑本體溶液。將溶液輕輕地上下顛倒10次以混合。然後，將3×1ml的每種溶液放入1.5ml低蛋白結合管中，並將這些管暴露在功率為250W/m²的光線下7小時。其餘的樣品溶液用鋁箔覆蓋，並在4°C下批量儲存直至測量(「黑暗儲存對照組」樣品)。

實施例5

第70頁，共73頁(發明說明書)

不同液體BoNT製劑的光穩定性比較

【0210】 使用以細胞為基底的效價分析法(CBA)來測量表6中編號I至IV的製劑樣品中的肉毒桿菌素活性(進行多次測量)。其中，樣品是暴露於250W/m²的光線下7小時或在黑暗中儲存7小時。其結果是以光暴露樣品的活性，相對於黑暗存儲對照組樣品的活性，二者的百分比形式表示於表8中。

表8. 不同液體BoNT製劑的光穩定性比較：

BoNT 製劑		BoNT/A 的相對活性(相對於黑暗存儲對照組的%)
編號.	HSA	
I	HSA-未處理	46
II	HSA-透析	56
III	HSA 未處理+ EDTA	80
IV	HSA-EDTA-透析	84

【0211】 從表8可以看出，HSA的透析在一定程度上增加了BoNT對於光暴露的穩定性(參見製劑II與製劑I)。將 EDTA 添加到未處理的HSA中，具有顯著正面擴大的效果(參見配方 III)。然而，添加EDTA並不能完全防止光的不穩定效應。最佳的光穩定性，可以通過用EDTA進行預醞釀(pre-incubation)，隨後以不含EDTA的組氨酸緩衝液進行透析(參見配方 IV)來加以實現。這表明實驗所觀察到的光穩定性，可能不僅僅歸因於金屬離子，而是歸因於其他未知化合物。

實施例6

存在和不存在色氨酸和 N-乙醯基色氨酸時液體BoNT製劑的光穩定性

【0212】 使用以細胞為基底的效價分析法(CBA)來測量表7中製劑1至7樣品的肉毒桿菌素活性(進行多次測量)。其中，樣品是暴露於250W/m²的光線下7小時或在黑暗中儲存7小時。其結果是以光暴露樣品的活性，相對於黑暗存儲對照組樣品的活性，二者的百分比形式表示於表9中。

表 9. 存在或不存在色氨酸或N-乙醯基色氨酸時液體BoNT製劑的光穩定性比較：

BoNT 製劑			BoNT/A 的相對活性(相對於黑暗存儲對照組的%)
編號.	N-乙醯基色氨酸 (mM)	色氨酸 (mM)	
1	10	-	6
2	2	-	8
3	0.4	-	45
4	0.08	-	73
5	-	10	8
6	-	0.08	67
7	-	-	85

【0213】 可以看出，色氨酸和N-乙醯基-色氨酸二者均以劑量依賴性方式(dose dependent manner)，對BoNT液體製劑的光穩定性顯現出顯著的負面影響。在較高濃度(分別為10mM和2mM)下，光穩定性降低效果非常明顯，導致相對生物活性極低

(<10%)。在 色氨酸和N-乙醯基-色氨酸濃度低至80 μ M 時，與不含色氨酸和N-乙醯基-色氨酸的對照組製劑相比，暴露於光後BoNT的生物活性降低約10%(參見製劑4和6對比於製劑7)。

【0214】 80 μ M N-乙醯基色氨酸的濃度，相當於將25% w/v 的HSA起始材料(含有20mM N-乙醯基色氨酸)稀釋至0.1% w/v 或 1 mg/ml HSA。由於1mg/ml HSA是落入肉毒桿菌素製劑中通常使用的濃度範圍內的值，因此使用這種HSA起始材料，會導致BoNT/A製劑中的N-乙醯基-色氨酸濃度具有增加製劑光敏性的效應。因此，此色氨酸和N-乙醯色氨酸對於光穩定性產生負面影響的濃度範圍，具有重要的實際意義。

【符號說明】無。

【生物材料寄存】無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種液體製劑(liquid formulation)，包括：

- (i) 一肉毒桿菌素(botulinum toxin)；以及
 - (ii) 一人類血清白蛋白(human serum albumin, HSA)；
- 其中該液體製劑含有小於 $1\mu\text{M}$ ，的一 Fe^{3+} 離子濃度。

【請求項2】 如請求項1所述的液體製劑，其中該 Fe^{3+} 離子濃度小於 500nM 。

【請求項3】 如請求項1所述的液體製劑，其中該 Fe^{3+} 離子濃度小於 250nM 。

【請求項4】 一種液體製劑，包括：

- (i) 一肉毒桿菌素；以及
- (ii) 一人類血清白蛋白；

其中該液體製劑不含和含有不超過 $50\mu\text{M}$ 的色氨酸(tryptophan)和 N-乙醯基色氨酸(N-acetyl-tryptophan)。

【請求項5】 一種液體製劑，包括：

- (i) 一肉毒桿菌素；以及
- (ii) 一人類血清白蛋白；

其中該液體製劑的一製備方法包括下述步驟：

(a)將該人類血清白蛋白與一螯合劑(chelating agent)接觸，藉以獲得一人類血清白蛋白和螯合劑的混合物；以及

(b)從該人類血清白蛋白和螯合劑的混合物中移除該螯合劑。

【請求項6】 如請求項1所述的液體製劑，其中該液體製劑的一製備方法包括下述步驟：

(a)將該人類血清白蛋白與一螯合劑接觸，藉以獲得一人類血清白蛋白和螯合劑的混合物；以及

(b)從該人類血清白蛋白和螯合劑的混合物中移除該螯合劑。

【請求項7】 如請求項4或5所述的液體製劑，其中在步驟(a)中，將一人類血清白蛋白原料與該螯合劑接觸，得到一人類血清白蛋白原料和螯合劑的混合物；在步驟(b)中，從該混合物中移除該螯合劑，得到一經過預處理的人類血清白蛋白原料；以及在進一步的一步驟(c)中，將該經過預處理的人類血清白蛋白材料與該肉毒桿菌素混合；或

其中，在步驟(a)中，將包該含肉毒桿菌素和一人類血清白蛋白的一液體預製劑(liquid pre-formulation)與該螯合劑接觸，藉以獲得一液體預製劑和螯合劑的混合物，並且在步

驟(b)中，從該液體預製劑和螯合劑的混合物中移除該螯合劑，以獲得該液體製劑。

【請求項8】 如請求項7所述的液體製劑，其中該螯合劑較佳係藉由一透析(dialysis)、一過濾(filtration)、一掃流過濾(crossflow filtration)或一超濾(ultrafiltration)來移除

【請求項9】 如請求項1至6中的任一者所述的液體製劑，其中該人類血清白蛋白在該液體製劑中的一含量介於0.001% w/v至1.00% w/v之間。

【請求項10】 如請求項4所述之液體製劑，其中該液體製劑具有小於1000nM的一 Fe^{3+} 離子濃度。

【請求項11】 如請求項4所述之液體製劑，其中該 Fe^{3+} 離子濃度小於500nM。

【請求項12】 如請求項4所述之液體製劑，其中該 Fe^{3+} 離子濃度小於250nM。

【請求項13】 如請求項1至6以及10-12中的任一者所述的液體製劑，其中該液體製劑更包括：

(iii)一張力劑(tonicity agent)；或

第3頁，共8頁(發明申請專利範圍)

其中該液體製劑更包括：

- (iii) 一張力劑，其中該張力劑在該液體製劑中的一含量，介於0.01% w/v至2.0% w/v之間；或該張力劑為氯化鈉；或者該張力劑為氯化鈉，且在該液體製劑中的一含量，介於0.01% w/v至2.0% w/v之間。

【請求項14】如請求項13所述的液體製劑，其中該液體製劑更包括：

- (iv) 一緩衝劑(buffering agent)；或

其中該液體製劑更包括：

- (iv) 一緩衝劑，其中該緩衝劑在該液體製劑中的一濃度，介於1mM至100mM之間；或其中該緩衝劑為一氨基酸、一磷酸鹽或其混合物；或其中該緩衝劑為一組氨酸；或其中該緩衝劑為一組氨酸、一磷酸鹽或其混合物，且該組氨酸和該磷酸鹽在該液體製劑中的一濃度，介於1mM至100mM。

【請求項15】一種製備如請求項2所述液體製劑的方法，其中該方法包括下述步驟：

- 進行一純化步驟，以純化一人類血清白蛋白起始材料，藉以獲得一純化後的人類血清白蛋白材料；以及

- 將該純化後的人類血清白蛋白材料與該肉毒桿菌素以及一可選性的其他組成分混合，藉以獲得該液體製劑；或
- 進行一純化步驟，以純化包含該肉毒桿菌素和該人類血清白蛋白的一液體組合物，藉以獲得一純化後的液體組合物；以及
- 將該純化的液體組合物與一另外組成分混合，藉以獲得該液體製劑。

【請求項16】如請求項15所述的液體製劑的製備方法，其中，該純化步驟係通過對該人類血清白蛋白起始材料或包含該肉毒桿菌素和該人類血清白蛋白的該液體組合物進行一透析、一滲濾(diafiltration)、一超濾、一離子交換層析(ion exchange chromatography, IEC)、一親和層析(affinity chromatography)、一疏水作用層析(hydrophobic interaction chromatography, HIC)、一場流分離(field-flow fractionation)、或一沉澱來進行。

【請求項17】如請求項15所述的液體製劑的製備方法，其中該純化步驟如下述進行，或者其中該純化步驟更包括：

- 將該人類血清白蛋白起始材料與該螯合劑接觸，藉以獲得該人類血清白蛋白起始材料和螯合劑的混合物；以及

-從該人類血清白蛋白起始材料和螯合劑的混合物中移除該螯合劑，以得到一經過螯合劑處理且純化後的人類血清白蛋白材料；或

-將包含該肉毒桿菌素和該人類血清白蛋白的該液體組合物與該螯合劑接觸，藉以獲得一液體組合物和螯合劑的混合物，以及

-從該液體組合物和螯合劑的混合物中移除該螯合劑，以獲得一螯合劑處理且純化後的液體製劑；

【請求項18】如請求項17所述的液體製劑的製備方法，其中在該液體製劑的製備方法，使(i)和(ii)接觸的步驟中，較佳使該混合物中的該螯合劑，具有介於1mM至500mM之間的一濃度；且/或該螯合劑係通過該透析、該流過濾或該超濾來移除。

【請求項19】如請求項15至18中的任一者所述的液體製劑的製備方法，其中該螯合劑係選自於由具有三至六個羧酸官能基的氨基多羧酸(aminopolycarboxylic acids)、檸檬酸鹽、卟啉(porphyrins)、N,N,N',N'-四(2-吡啶基甲基)-1,2-乙二胺

(N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine，TPEN)、三乙烯四胺(triethylenetetramine，TETA)及上述任意混合物所組成的一群組；

較佳地，其中該螯合劑係由一通式(I)所表示的一氨基多羧酸化合物：



其中R不含羧酸官能基或含有1個或2個羧酸官能基；該氨基多羧酸化合物較佳係選自於由乙二胺四乙酸

(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、乙二醇-雙

(1,4,7,10-四乙酸酯) (ethylene

glycol-bis(o-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic

acid, EGTA)、1,2-雙(鄰氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙

酸

(1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic

acid, BAPTA)、二乙烯三胺五乙酸

(diethylenetriaminepenta-acetic acid, DTPA)、三乙烯四

胺六乙酸(triethylenetetraminehexaacetate, TTHA)及上述

任意混合物所組成的一群組。

【請求項20】 如請求項15至18中的任一者所述的液體製劑的

製備方法，其中該肉毒桿菌素為一肉毒桿菌神經毒素

(*Botulinum neurotoxins*, BoNT)複合物；或其中該肉毒桿

菌素為一不含複合蛋白(complexing proteins)的肉毒桿菌神

經毒素；或其中該肉毒桿菌素為一血清型A；或其中該肉毒桿

菌素為一不含複合蛋白的血清型A肉毒桿菌神經毒素；或其中

該肉毒桿菌素為一血清型A，且以介於1U/ml至1000U/ml的一濃度存在；或其中該肉毒桿菌素為一不含複合蛋白的血清型A肉毒桿菌神經毒素，且以介於1U/ml至1000U/ml的一濃度存在；或其中該液體製劑的一pH值介於5.0至8.0之間的一範圍。

【請求項21】一種使用如請求項至1至14中的任一者所述的液體製劑來治療，特別是治療神經肌肉疾病(neuromuscular diseasesialorrhea)、疼痛(pain)、流涎(sialorrhea)、多汗症(hyperhidrosis)、泌尿系統疾病(urological disorder)和神經系統疾病(neurological disorders)的用途。

【請求項22】一種使用如請求項至1至14中的任一者所述的液體製劑來處理一美容狀況(cosmetic condition)的用途。