



(21)申請案號：112105173 (22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 02 月 14 日

(51)Int. Cl. : *A61K38/48 (2006.01)* *A61K47/02 (2006.01)*
 A61K47/18 (2006.01) *A61K47/42 (2017.01)*
 A61K9/00 (2006.01) *A61P21/00 (2006.01)*
 A61P17/00 (2006.01) *A61P25/00 (2006.01)*
 A61K8/64 (2006.01) *A61K8/41 (2006.01)*
 A61Q19/08 (2006.01)

(30)優先權：2022/02/15 歐洲專利局 22156850.4

(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 KUHACH, 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 47 頁

(54)名稱
液體製劑及其製備方法與用途

(57)摘要

本發明是有關於一種液體肉毒桿菌素製劑，其包含：(i)肉毒桿菌素，(ii)穩定蛋白，例如人類血清白蛋白，(iii)螯合劑(例如，EDTA)或磷酸鹽，和可選擇性的(iv)鈣、鎂或鋅的鹽，(v)張力劑和/或(vi)緩衝劑。此外，本發明是有關於一種將液體肉毒桿菌素製劑用於適應症治療和美容處理的用途。

The present invention relates to a liquid botulinum toxin formulation comprising: (i) botulinum toxin, (ii) a stabilizing protein such as human serum albumin, (iii) a chelating agent (e.g., EDTA) or phosphate, and optionally (iv) a salt of calcium, magnesium or zinc, (v) a tonicity agent and/or (vi) a buffering agent. In addition, the present invention relates to the use of the liquid botulinum toxin formulation for therapeutic and cosmetic treatments.

【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】

本發明是有關於一種液體肉毒桿菌素製劑，其包含：(i)肉毒桿菌素，(ii)穩定蛋白，例如人類血清白蛋白，(iii)螯合劑(例如，EDTA)或磷酸鹽，和可選擇性的(iv)鈣、鎂或鋅的鹽，(v)張力劑和/或(vi)緩衝劑。此外，本發明是有關於一種將液體肉毒桿菌素製劑用於適應症治療和美容處理的用途。

【英文】

The present invention relates to a liquid botulinum toxin formulation comprising: (i) botulinum toxin, (ii) a stabilizing protein such as human serum albumin, (iii) a chelating agent (e.g., EDTA) or phosphate, and optionally (iv) a salt of calcium, magnesium or zinc, (v) a tonicity agent and/or (vi) a buffering agent. In addition, the present invention relates to the use of the liquid botulinum toxin formulation for therapeutic and cosmetic treatments.

【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】 本發明涉及一種液體肉毒桿菌素(botulinum toxin，BT)製劑，其包含：(i)肉毒桿菌毒素，(ii)穩定蛋白(stabilizing protein)，例如人類血清白蛋白(human serum albumin)，(iii)螯合劑(例如，EDTA)或磷酸鹽，和可選擇性的(iv)鈣、鎂或鋅的鹽，(v)張力劑(tonicity agent)和/或(vi)緩衝劑。此外，本發明涉及液體肉毒桿菌素製劑用於治療和美容處理的用途。

【先前技術】

【0002】 肉毒桿菌神經毒素(Botulinum neurotoxins，以下簡稱BoNT；或肉毒桿菌素(BT))是一系列的細菌神經毒素，廣泛用於治療越來越多的神經、醫療和美容疾病。BoNT有八種血清型(BoNT/A-H)。目前臨床使用兩種血清型，血清型A (BoNT/A)和血清型B (BoNT/B)。BoNT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】 由於肉毒桿菌神經毒素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。因此，BoNT製劑的主要挑戰之一，是最大限度地減少製造和儲存過程中的活性損失(activity loss)。

【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了上市批准：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)、胺基酸(Innotox®：蛋氨酸；Alluzience®：組胺酸)和額外的賦形劑(Innotox®：作為緩衝劑的磷酸鈉；Alluzience®：蔗糖)。

對於BoNT/A，迄今為止只有兩種液體製劑獲得了市場批准：Innotox® (Medytox)，但僅限於亞洲國內市場（例如韓國，2013 年批准），以及Alluzience® (Ipsen/Galderma)，後者已獲批用於將於2021 年在歐洲使用。這兩種液體製劑均含有BoNT/A 毒素複合物，除水外，還含有氯化鈉、清潔劑（Innotox®：聚山梨酯20；Alluzience®：聚山梨酯80）、胺基酸（Innotox®：聚山梨酯）蛋氨酸；Alluzience®：組胺酸）和附加賦形劑（Innotox®：作為緩沖劑的磷酸鈉；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。

【發明內容】

【0008】 本發明的一個目的是在提供一種可立即用於適應症治療和美容處理的穩定肉毒桿菌毒素液體製劑。

【0009】 本發明基於下述令人驚訝的發現，即向含有人類血清白蛋白(HSA)的肉毒桿菌素液體製劑中添加螯合劑(例如，EDTA)或磷酸鹽會促進改進製劑的熱光穩定性和光穩定性。

【0010】 因此，在一個方面，本發明提供了一種液體製劑，其包含：

(i) 肉毒桿菌素；

(ii)穩定蛋白(stabilizing protein)，較佳為人類血清白蛋白(HSA)；

以及

(iii)螯合劑或磷酸鹽。

【0011】 可選擇地，本發明的液體製劑還包含(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，或(v)張力劑(例如，氯化鈉)，或(vi)緩衝劑(例如，磷酸鹽緩衝劑或組胺酸緩衝劑或兩者)，或組分(iv)-(vi)中的兩種(例如，(iv)和(v)、(iv)和(vi)、或(v)和(vi))，或全部三個組分(iv)-(vi)。

【0012】 另一方面，本發明是有關於一中將根據本發明所述的液體製劑其用於治療，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。

【0013】 另一方面，本發明是有關於一中將根據本發明所述的液體製劑其用於處理美容狀況(cosmetic condition)、較佳為處理皮膚狀況、特別是用於處理皮膚細紋或褶皺或皺紋，的美容(醫美(aesthetic))用途。

【0014】 在又一個方面，本發明是有關於一種治療疾病或病症的方法，其包括向有需要的人施予有效量的本發明所述的液體製劑。

【0015】 根據本發明所提供的液體肉毒桿菌素製劑、其用途和使用方法的較佳實施例，將在後附的申請專利範圍中加以闡述。

【0016】 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】

【0017】 無。

【實施方式】

【0018】 本發明係基於以下意外的發現：包含有人類血清白蛋白(HSA)的肉毒桿菌素液體製劑中若存在螯合劑(例如，EDTA)或磷酸鹽時，不僅可以得到改進製劑的熱穩定性，而且有助於改進製劑的光穩定。此外，還意外地發現添加鈣鹽、鎂鹽或鋅鹽可以減輕注射疼痛。

【0019】 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(reconstituted)，而是可以立即使用(ready-to-use)，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療人員的操作。

【0020】 不受理論的束縛，據信穩定蛋白，例如 HSA，與所觀察到的光敏感性有關。進一步地，本發明所述的液體製劑具有更完善的光穩定性。換句話說，其表現出光誘導毒素活性損失(light-induced loss)的降低趨勢(光敏性的降低)。這一令人驚奇的發現是由於螯合劑或磷酸鹽，與 HSA 或包含在所使用的 HSA 材料中的組成分相互作用，或對其產生影響，從而避免或最小化光線對於 HSA 用來穩定肉毒桿菌素之能力的不利影響。

【0021】 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，並且可以減少在醫生處因使用前光照儲存所導致的潛在活性損失。總體而言，本發

明對於液體製劑光敏感性的降低，普遍地改善了肉毒桿菌素在注射治療期間的可操作性和易用性。

【0022】 一方面，本發明是有關於一種液體製劑，其包含：

- (i) 肉毒桿菌素；
- (ii) 穩定蛋白；以及
- (iii) 螯合劑或磷酸鹽。

【0023】 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)。

【0024】 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」。

【0025】 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/或組胺酸進行緩衝的)生理鹽溶液。

【0026】 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。

【0027】 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。

【0028】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，否則其係指純肉毒桿菌神經毒素和/或其複合物。即，純肉毒桿菌神經毒素和其複合蛋白的任何複合物(稱為「毒素複合物(toxin complex)」)。

【0029】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 100 kDa)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(150kD)」或「神經毒性組成分」。

【0030】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，包括在onabotulinumtoxin A (Botox®/Vistabel®, Allergan, Inc., Irvine, CA, USA)中的900kDa複合物。此外，包含在Dysport®(Azzalure®, Ipsen, Paris, France)、Alluzience®(Ipsen/Galderma)和Innotox®(Medytox)中作為活性劑的毒素複合物。

【0031】 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。

【0032】 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50%的毒素/神經毒素的劑量。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)。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。

【0033】 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。

【0034】 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。

【0035】 有關本發明液體製劑的組成分(ii)，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。如本說明書中所採用的用語「多肽」和用語「蛋白(質)」可互換使用，是指由多於10個胺基酸、較佳是由多於50個胺基酸、更佳是由多於100個胺基酸、又更佳是由多於100個胺基酸，最佳是由超過200個胺基酸，且較佳最多不超過1000個胺基酸，通過肽鍵連接在一起所組成的胜肽。用於本說明書中特佳的是，具有150至1000個胺基酸，或250至800個胺基酸、特別是300至1000個胺基酸或350至700個胺基酸的多肽。

【0036】 在本發明中，穩定蛋白可以是，例如人類血清白蛋白(HSA)、卵清蛋白(ovalbumin)、酪蛋白(casein)或其混合物。用於本說明書中特佳的是，人類血清白蛋白、卵清蛋白或其混合物，並且最佳是HSA。

【0037】 穩定蛋白或穩定蛋白的混合物，可以以介於0.001%w/v至2.0%w/v之間的含量、較佳以介於0.01%w/v至1.0%w/v之間的含量、更佳以介於0.01%w/v至0.5%w/v之間的含量，存在於液體製劑中。最佳的含量範圍介於0.02%w/v至0.3%w/v之間或介於0.03%w/v至0.10%w/v之間。最佳的穩定蛋白，即人類血清白蛋白(HSA)，較佳以介於0.001%w/v至1.00%w/v之間的含量、更佳以介於0.01%w/v至0.3%w/v之間的含量、最佳以介於0.02%w/v至0.15%w/v之間的含量存在於液體製劑中。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)、重組HSA和/或來自任何其他來源的HSA。較佳地，人類血清白蛋白是一種重組HSA或源自人類血液的HSA。

【0038】雖然不受理論的束縛，因為令人驚奇地發現:光穩定性會隨著HSA濃度的增加而降低。可認為本發明所述的製劑光敏感性至少部分與HSA或其所使用HSA材料中所包含的組成分有關。

【0039】有關組成分 (iii)，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。

【0040】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(1,4,7,10-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)。

【0041】 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**基團沒有特別限制，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**基團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。

【0042】 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。

【0043】 螯合劑存在的濃度，可以為至少0.01mM，或至少0.1mM，或至少1mM。較佳地，螯合劑存在的濃度範圍係介於0.01mM至100mM之間，或者以介於0.1mM至50mM之間，較佳

以介於0.05 mM至20 mM之間。更佳的濃度範圍介於1 mM至10 mM之間。

【0044】 進一步關於組成分(iii)，本說明書考慮在本發明的液體製劑中使用磷酸鹽來替代螯合劑，或除螯合劑之外再添加磷酸鹽，藉以實現製劑光敏感性的降低。事實上，出乎意料地發現：磷酸鹽的存在也會導致製劑光穩定性顯著的增加。磷酸鹽存在於液體製劑中的濃度，可以為至少0.1 mM，或至少1 mM或至少5 mM。較佳地，磷酸鹽存在於液體製劑中的濃度範圍介於0.1 mM至100 mM之間，較佳介於1 mM至50 mM之間，更佳介於5 mM至30 mM之間。

【0045】 較佳地，本發明的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)人類血清白蛋白，和(iii)螯合劑，較佳為EDTA。這種較佳的液體製劑，與上述的任何其他液體製劑一樣，可以進一步包含以下所描述的可選擇性組成分(iv)、(v)和(vi)中的一種或多種，即(iv)、或(v)、或(vi)，或(iv)和(v)，或(iv)和(vi)，或(v)和(vi)，或(iv)和(v)和(vi)。

【0046】 在本發明的一個較佳實施例中，液體製劑還可以包含鹼土金屬或過渡金屬的鹽類，較佳還包含：

(iv)鈣鹽、鎂鹽或鋅鹽或其混合物。

【0047】 較佳的鹽是鈣鹽、鎂鹽和鋅鹽，更佳為鈣鹽和鎂鹽，最佳為鈣鹽。在EDTA存在下，這些鹽的添加將導致EDTA 複合物的形成，即 EDTA與添加的金屬陽離子作為中心原子的複合

物。鹽的陰離子的性質並不重要，唯一的要求是鹽可溶於本發明的含水製劑中。例如，陰離子可以是藥學上可接受的無機酸和有機酸的陰離子。或者，螯合劑本身可形成金屬鹽的陰離子，並且將組成分(iii)和(iv)建構成，例如 $\text{Na}_2 \text{CaEDTA}$ ，添加到液體製劑中。

【0048】 合適的相對陰離子(counter anion)包括，例如醋酸根(acetate,)、天門冬氨酸根(aspartate)、苯磺酸根(benzenesulfonate)、苯甲酸根(benzoate)、besylate、碳酸氫根(bicarbonate)、酒石酸氫根(bitartrate)、溴根(bromide)、camsylate、碳酸根(carbonate)、氯鹽(chloride)、檸檬酸根(citrate)、癸酸根(decanoate)、依地酸根(edetate)、esylate、富馬酸根(fumarate)、gluceptate、葡萄糖酸根(gluconate)、麩氨酸根(glutamate)、乙醇酸根(glycolate) 乙二醇二苯甲酸鹽(glycollylarsanilate)、己酸鹽(hexanoate)、海巴胺(hydrabamine)、羥基萘甲酸鹽(hydroxynaphthoate)、碘化物(iodide)、乳糖酸鹽(lactobionate)、硝酸鹽(nitrate)、蘋果酸鹽(malate)、馬來酸鹽(maleate)、扁桃酸鹽(mandelate)、甲磺酸鹽(mesylate)、溴甲烷(methylbromide)、硝酸甲酯(methylnitrate)、硫酸甲酯(methylsulfate)、粘酸鹽(mucate)、萘磺酸鹽(napsylate)、硝酸鹽(nitrate)、辛酸鹽(octanoate)、油酸鹽(oleate)、棕櫚酸鹽(palmoate)、泛酸鹽(pantothenate)、

磷酸鹽(phosphate)、聚半乳糖醛酸鹽 (polygalacturonate)、丙酸鹽(propionate)、水楊酸鹽(salicylate)、硬脂酸鹽(stearate)、次乙酸鹽(subacetate)、琥珀酸鹽(succinate)、硫酸鹽(sulfate)、酒石酸鹽(tartrate)和 teoclate。

【0049】 較佳地，鹽是氯化物鹽。特佳的鹽包括氯化鈣(即 CaCl_2 及其水合物)、氯化鎂(即 MgCl_2 及其水合物)和氯化鋅(即 ZnCl_2 及其水合物)。在EDTA存在下，這些鹽的添加將導致 EDTA 複合物的形成，即EDTA與添加作為中心原子的金屬陽離子複合。

【0050】 一般來說，鹽的金屬離子的濃度與螯合劑的濃度預莫耳數大約相等。存在於液體製劑中的鹽濃度可以至少為0.01mM，或至少為0.1mM，或至少為1mM。較佳地，存在於液體製劑中的鹽濃度範圍介於0.01nM至100mM之間，較佳介於0.1nM至50mM之間，更佳介於0.05nM至20mM之間，最佳介於1nM至10mM之間。

【0051】 令人驚奇的是，本發明的發明人發現：添加鹼土金屬或過渡金屬的鹽，特別是鈣、鎂或鋅的鹽，可以顯著減輕液體的注射疼痛，同時能保持本發明所述製劑的儲存穩定性和光穩定性。這一發現是出乎意料的，因為(i)如上述液體肉毒桿菌素製劑會引起令人不快的注射疼痛感，既不可預見也非預期，(ii)添加鹼土金屬或過渡金屬的鹽，令人驚奇地發現，氯化鈣等螯合劑可顯著減輕注射疼痛，同時，(iii)液體製劑的儲存穩定性和光穩定性皆得以保持，儘管人們相信需要游離(非複合)螯合劑，方可獲得

光穩定效果。亦即是，令人驚訝地發現：含有中心金屬原子(例如 Ca^{2+})的螯合劑(例如，EDTA)仍然能夠保護肉毒桿菌素免受光照影響。

【0052】 根據本發明，液體製劑還可選擇性地包含：

(v)張力劑。

【0053】 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。

【0054】 張力劑的實施例包括蔗糖、葡萄糖、碳酸鈉、胺基酸、聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG)、葡聚糖、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。

【0055】 較佳地，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。

【0056】 根據本發明，液體製劑還可選擇性地包含：

(vi)緩衝劑。

【0057】 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胺基酸、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。

【0058】 較佳地，緩衝劑是磷酸鹽、胺基酸、或其混合物。值得注意的是，磷酸鹽在本發明中可發揮雙重作用:即其不只可充當磷酸鹽pH值緩衝劑，且還可發揮穩定本發明組成分(iii)的作用。胺基酸可以選自於天門冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸、組胺酸、脯氨酸、牛磺酸、甲硫氨酸、絲氨酸、酪氨酸、色氨酸及其混合物。且較佳選自於組胺酸、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，胺基酸是組胺酸。用於本說明書的最佳緩衝劑是組胺酸、磷酸鹽或其混合物。

【0059】 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。如果緩衝劑是胺基酸(例如，組胺酸)，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。

【0060】 本發明的液體製劑的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，且較佳介於5.5至7.0之間，或介於6.0至7.5之間，更佳介於6.0至7.0之間。且最佳介於6.0至6.5之間。

【0061】 此外，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，液體製劑中可以包含甘油、蔗糖、乳糖、甘露醇、葡聚糖、透明質酸、聚乙烯吡咯烷酮、乳酸、檸檬酸、胺基酸(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。其他藥學上可接受的合適賦形劑，包括本領域熟知者，例如可參見: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania。

【0062】 另一方面，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)，例如特別缺乏去污劑、多醣、胺基酸、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個胺基酸所組成的胜肽，例如由10至40個胺基酸或15至30個胺基酸所組成的胜肽。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胺基酸。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)。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)去污劑和任何胺基酸，或去污劑和除了組胺酸之外的所有胺基酸，(iii)去污劑和穩定肽，(iv)單醣、寡醣和多醣以及任何胺基酸，或單醣、寡醣和多醣以及除了組胺酸之外的所有胺基酸，(v)單醣、寡醣和多醣以及穩定胜肽，(vi)任何胺基酸和穩定肽，或除了組胺酸和穩定肽之外的所有胺基酸，(vii)去污劑、單醣、寡醣和多醣以及任何胺基酸，或去污劑、單醣、寡醣和多醣以及除組胺酸和穩定肽之外的所有胺基酸組胺酸，(viii)去污劑、單醣、寡醣和多醣以及穩定肽，(ix)去污劑、

任何胺基酸以及穩定胜肽，或去污劑、除了組胺酸之外的所有胺基酸以及穩定肽，(x)單醣、寡醣和多醣、任何胺基酸和穩定生肽，或單醣、寡醣和多醣、除組胺酸之外的所有胺基酸和穩定肽，(xi)去污劑、單醣、寡醣和多醣、任何胺基酸和穩定胜肽，或去垢劑、單醣、寡醣和多醣、除了組胺酸外的所有胺基酸和穩定生肽。

【0065】 在另一個實施例中，本發明的液體製劑不包含除了組胺酸之外的任何其他胺基酸。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。在另一個實施方案中，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)和組胺酸，(xiii)去污劑(例如聚山梨酯)、組胺酸和蔗糖。

【0067】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，和(iii)以通式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 所表示的螯合劑，其中R不含或包含一個或兩個羧酸官能基，最佳是不包含任何羧酸官能基。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)以通式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 所表示的螯合劑，其中R不含或包含一個或兩個羧酸官能基，且濃度範圍介於0.05mM至20mM之間。

【0068】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，和(iii)選自於由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，或選自於由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑。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0.5% w/v之間的HSA，和(iii)濃度介於0.05mM至20mM之間，選自於由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，或選自於由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑。

【0069】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，和(iii)EDTA。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)濃度介於0.05mM至20mM之間的EDTA。

【0070】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，(iii)以通式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 所表示的螯合劑，其中R不含或包含一個或兩個羧酸官能基，和(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，較佳為氯化鈣。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)濃度介於0.05mM至20mM之間，以通式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 所表示的螯合劑，其中R不含或包含一個或兩個羧酸官能基，和(iv)鈣、鎂或鋅的鹽，或它們的混合物，較佳為氯化鈣，濃度介於0.05mM至20mM之間。

【0071】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌毒素，(ii)HSA，(iii)選自於由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，或選自於由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，和(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，較佳為氯化鈣。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)濃度介於0.05mM至20mM之間，選自於由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，或選自於由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或它們的混合物，較佳為氯化鈣，濃度介於0.05mM至20mM之間。

【0072】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，(iii)EDTA，和(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，較佳為氯化鈣。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)濃度介於0.05mM至20mM之間的EDTA，和(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或它們的混合物，較佳為氯化鈣，濃度介於0.05mM至20mM之間。

【0073】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，(iii)以通式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 所表示的螯合劑，其中R不含或包含一個或兩個羧酸官能基，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，較佳為氯化鈣，和(v)磷酸鹽緩衝劑和/或組胺酸。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)濃度介於0.05mM至20mM之間，以通式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 所表示的螯合劑，其中R不含或包含一個或兩個羧酸官能基，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或它們的混合物，較佳為氯化鈣，濃度介於0.05mM至20mM之間，和(v)濃度介於2mM至50mM之間的磷酸鹽緩衝液和/或組胺酸。

【0074】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，(iii)選自於由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，或選自於由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，較佳為氯化鈣，和(v)磷酸鹽緩衝劑和/

或組胺酸。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)選自於由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，或選自於由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，濃度介於0.05mM至20mM之間，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或它們的混合物，較佳為氯化鈣，濃度介於0.05mM至20mM之間，和(v)濃度介於2mM至50mM之間的磷酸鹽緩衝液和/或組胺酸。

【0075】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，(iii)EDTA，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，較佳為氯化鈣，和(v)磷酸鹽緩衝液和/或組胺酸。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)濃度介於0.05mM至20mM之間的EDTA，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或它們的混合物，較佳為氯化鈣，濃度介於0.05mM至20mM之間，和(v)濃度介於2mM至50mM之間的磷酸鹽緩衝液和/或組胺酸。

【0076】 特佳的是，上述較佳的液體製劑還含有氯化鈉，特別是濃度為約0.9% w/v的氯化鈉。此外，pH值的範圍較佳介於6.0至7.5之間。此外，肉毒桿菌素較佳是血清型A，並且特別是血清型A的神經毒性成分。

【0077】 本發明液體製劑的較佳實施例包括：

製劑1：

50U/ml BoNT/A

0.9% 氯化鈉 (9mg/mL)

0.05% HSA (0.5mg/mL)

0.1% Na₂-EDTA (1mg/mL ; ~2.7nM) ,

pH值介於5.5至8.0之間(例如 , 6.0) , 並且可選擇性地

pH 緩衝液(例如 10mM磷酸鹽或10mM組胺酸)。

製劑2 :

50 U/ml BoNT/A

0.9% 氯化鈉 (9mg/mL)

0.085% HSA (0.85mg/mL)

0.155% 組胺酸(1.55mg/ml ; ~10mM)

0.13% Na₂-EDTA (1.3 mg/ ; ~3.5mM)

0.039% CaCl₂ (390μg/mL ; ~3.5mM)

pH值介於5.5至8.0之間(例如 , 6.0) , 並且可選擇性地

pH 緩衝液 (例如 , 10mM磷酸鹽)

【0078】 本發明更是有關於一種包含肉毒桿菌素的液體製劑，液體製劑在升高至溫度40°C中儲存4週後，儲存後的毒素活性相對於初始毒素活性，降低不超過35%。另一方面，本發明係涉及一種包含肉毒桿菌毒素的液體製劑，其中在將液體製劑暴露於250W/m²的光源下7小時後，暴露後的毒素活性相對於初始毒素活性，降低不超過35%。

【0079】 此外，本發明是有關於一種製備本文所述的液體肉毒桿菌素製劑的方法，其包括將本文所述的組成分，特別是組成分(i)至(iii)，和可選擇性的組成分(iv)至(vi)中的一種或多種加以組合。本發明的液體製劑的製備方法沒有特別限制，且相應的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，較佳是鹽水溶液，更佳的是生理鹽水溶液，且最佳的是可緩衝的(例如，以磷酸鹽或組胺酸進行緩衝的)生理鹽水溶液。

【0080】 較佳地，首先溶解鹽，然後添加HSA，必要時調節pH值，最後添加肉毒桿菌素。上述順序並不是強制性要求的，但據信可以安全地保留肉毒桿菌素的最大比活性。較佳地，製備液體肉毒桿菌素製劑的方法，並不包括復溶冷凍乾燥粉末形式的肉毒桿菌素製劑。

【0081】 此外，本發明是有關於一種用於穩定液體肉毒桿菌素製劑的方法，包括將(i)肉毒桿菌毒素、(ii)穩定蛋白，較佳為人類血清白蛋白(HSA)、(iii)螯合劑或磷酸鹽，和可選擇性的組成分(iv)至(vi)中的一種或多種，其中組成分(i)至(v)如本說明書中所定義。

【0082】 更進一步，本發明是有關於一種將本說明書中所定義的螯合劑用於增加水性肉毒桿菌素製劑的光穩定性的用途，所述水性肉毒桿菌素製劑含有(i)肉毒桿菌毒素和(ii)穩定蛋白，較佳為人類血清白蛋白(HSA)，和可選擇性的組成分(iv)至(vi)中的

一種或多種，其中組成分(i)、(ii)和(iv)至(vi)如本說明書中所定義。本說明書中的「增進光穩定性」是指含有螯合劑的含水肉毒桿菌素製劑在一特定溫度(例如，20°C)下，暴露於250W/m²的光線7小時之後所具有的肉毒桿菌素生物活性，比不含螯合劑的水性肉毒桿菌素製劑，在相同溫度(例如 20°C)下，暴露於250W/m²的光線7小時之後的肉毒桿菌素生物活性，高出至少20%，較佳高出至少40%，更佳高出至少60%，最佳高出至少80%。

【0083】 此外，本發明是有關於一種將磷酸鹽用於增加水性肉毒桿菌素製劑的光穩定性的用途，所述水性肉毒桿菌素製劑含有(i)肉毒桿菌毒素和(ii)穩定蛋白，較佳為人類血清白蛋白，和可選擇性的組成分(iv)至(vi)中的一種或多種，其中組成分(i)、(ii)和(iv)至(vi)如本說明書中所定義。本說明書中的「增進光穩定性」是指含有磷酸鹽的水性肉毒桿菌素製劑，在一特定溫度(例如，20°C)下，暴露於250W/m²的光線7小時之後所具有的肉毒桿菌素生物活性，比不含螯合劑的水性肉毒桿菌素製劑，在相同溫度(例如 20°C)下，暴露於250W/m²的光線7小時之後的肉毒桿菌素生物活性，高出至少10%，較佳高出至少20%，更佳高出至少30%，最佳高出至少40%。

【0084】 此外，本發明是有關於一種將鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物用於減輕肉毒桿菌素製劑注射疼痛的用途，所述肉毒桿菌素製劑包含(i)肉毒桿菌毒素，(ii)穩定蛋白，較佳為人類血清白蛋白(HSA)，(iii)螯合劑或磷酸鹽，和可選擇性的組成分(iv)至(vi)中的一種或多種，其中組成分(i)至(vi)如本說明書中所定義。

【0085】 另一方面，本發明是有關於一種將發明的液體製劑用於適應症治療的用途。

【0086】 具體地，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。神經肌肉疾病的示例，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。

【0087】 在又一個方面，本發明是有關於一種將本發明的液體製劑用於治療美容狀況的美容用途。

【0088】 本發明的這個方面是有關於一種將本發明的液體製劑用於純粹醫美的用途。較佳的待處理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。

【0089】 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。

【0090】 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。

【0091】 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)。

【0092】 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。

【0093】 在又一個方面，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。

【0094】 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(醫美)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。

【0095】 本發明的另一較佳方法是有關於一種使面部和/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的液體製劑。

【0096】 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。

實施例

【0097】 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)。

實施例 1

熱穩定性

【0098】 肉毒桿菌素的熱穩定性可以通過在 40°C 的高溫下，使用如 WO2013/049508 和 WO2014/207109 中所述以細胞為基

底的效價分析法(**cell-based potency assay**，**CBA**)測量肉毒桿菌素的生物活性隨著時間的變化量來加以判定。

【0099】 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(**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。

【0100】 將含有**HSA**的組合物(「**HSA**組合物」；50U/ml 的**BoNT/A**，0.1%的**HSA**，0.47%的蔗糖，0.9%的**NaCl**)與比較例1的組合物(50U/ml的**BoNT/A**，0.015%的聚山梨醇酯20、0.02%的甲硫氨酸、0.9%的**NaCl**、0.078%的**NaH₂PO₄**；pH值為6.5)進行比較，同時與比較例2的組合物(50U/ml **BoNT/A**、0.01%聚山梨醇酯80、0.155%組胺酸、0.4%蔗糖、0.9%**NaCl**；pH值為6.5)進行比較。將每種組合物的一部分，在溫度範圍2℃至8℃的黑暗環境中儲存，並在7天內(「**T0**」)採用以細胞為基底的效價分析法(**CBA**)進行分析。在判定生物活性之前，將組合物的剩餘部分在升高的溫度(40℃)下儲存2週。其中，所有組合物中所使用的肉毒桿菌素，是沒有復合蛋白的150kDa **BoNT/A**神經毒素。量測結果如表1所示。

表 1. 熱穩定性:

BoNT/A 組合物	在溫度 40℃下儲存 2 週 後相對於 T0 的 BoNT/A 活性變化
HSA 組合物 (非本發明)	-20%

比較例 1 組合物	-49%
比較例 2 組合物	-46%

【0101】 從表1可以看出:含有人血清白蛋白(HSA)的HSA組合物，明顯比均缺乏HSA作為穩定蛋白的比較例1和2的組合物更加穩定。因此，穩定蛋白如HSA的存在對於實現足夠高的毒素熱穩定性是重要的。

【0102】 藉由直接測量製造過程之後不同HSA濃度的液體組合物（75U/ml的BoNT/A，0.03-1.0mg/ml的HSA、10mM 磷酸鹽、10mM的組胺酸、0.9%的NaCl；pH值為 6.0）中BoNT/A(150kDa)的生物活性，來進一步探究HSA對肉毒桿菌素穩定性的影響，量測結果如表2所示。

表 2. HSA 濃度對 BoNT/A 活性的影響:

BoNT/A 組合物 (非本發明)	HSA 濃度	BoNT/A 活性
1	0.03 mg/ml	48 U/ml
2	0.1 mg/ml	63 U/ml
3	0.3 mg/ml	65 U/ml
4	1.0 mg/ml	75 U/ml

【0103】 從表2可以看出:毒素活性隨著HSA濃度的增加而增加。

實施例 2

熱穩定性

【0104】 當研究諸如上述各種液體製劑的穩定性時，令人驚訝地發現光線對於毒素穩定性具有顯著影響。使用 SUNTEST

CPS+ 儀器(ATLAS Material Testing Technology LLC)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)，進行光穩定性測試，以進一步探究這一發現。其中，光穩定性測試在250在250W/m²的光線照射下進行7小時。

【0105】 具體地，製備包含可緩衝的0.9% NaCl(pH值為6.0)和不同濃度人類血清白蛋白(0.03-1.0mg/ml的HSA)的多個BoNT/A(150kDa)組合物樣本，然後暴露於250W/m²光線下7小時。為了進行比較，將具有不同濃度(0.03mg/mL、0.1mg/mL、0.3mg/mL和1.0mg/mL)HSA的多個對應BoNT/A(150kDa)組合物(對照組)，在黑暗中保存相同的時間。之後，測量暴露於光線的組合物和儲存在黑暗中的相應對照組合物的生物活性。然後，計算以相對於對照組生物活性的百分比來表示的BoNT/A的相對活性，並以此來作為判定光穩定性的標準。 結果如表3所示。

表 3. HSA 對光穩定性的影響:

BoNT/A 組合物	HSA 濃度	BoNT/A 的相對活性 (相對於對照組的%)
1	0.03 mg/ml	82%
2	0.1 mg/ml	72%
3	0.3 mg/ml	70%
4	1.0 mg/ml	55%

【0106】 表3的結果顯示:含有HSA的組合物中BoNT/A的光穩定性隨著HSA濃度的增加而降低。因此，雖然熱穩定性隨著

HSA濃度的增加而增加(參見實施例1),但意外地發現HSA對光穩定性具有負面影響。進一步的研究(未顯示實際試驗結果)顯示:使用替代HSA的產品(重組HSA來代替供體HSA)或對HSA進行廣泛透析以去除潛在的小分子雜質(<10 kDa)並不會改變這些發現,即對光敏感度無影響。

實施例 3

光穩定性

【0107】 進行進一步的研究發現具有較低光敏感性,即較高光穩定性含有HSA的組合物。這些研究包括製備包含BoNT/A(150kDa)(不含複合蛋白)、0.1%的HSA、0.47%的蔗糖和0.9%的NaCl的液體組合物(「組合物1」)。另外,製備了對應於組合物1的兩種液體組合物,不同之處在於它們還分別含有2.7mM的EDTA(「組合物1+EDTA」)和20mM的磷酸鹽(「組合物1+磷酸鹽」;pH值為6.0)。此外,製備含有DTPA的組合物(「組合物2(DTPA)」),其包含BoNT/A(150kDa)、0.01%的HSA、0.015%的聚山梨醇酯20、10mM的磷酸鹽、0.155%的組胺酸、2.7mM的DTPA、0.9%的氯化鈉;pH值為6.0)。

【0108】 如上所述,將組合物1、組合物1+EDTA、組合物1+磷酸鹽和組合物2(DTPA)暴露於 $250\text{W}/\text{m}^2$ 的光線照射下進行7小時。同時,也將相同的組合物保存在黑暗中相同的時間(作為對照組)。然後,與儲存在黑暗中的相應對照組合物相比,測量各個液體組合物中BoNT/A的生物活性。結果如表4所示。

表 4. EDTA 和 DTPA 對光穩定性的影響：

BoNT/A 組合物	BoNT/A 的相對活性 (相對於對照組的%)
組合物 1	35%
組合物 1+EDTA	77%
組合物 1+Phosphate	60%
組合物 2 (DTPA)	77%

【0109】 從表4中可以明顯看出:螯合劑EDTA和DTPA的添加會導致含有HSA的BoNT/A組合物光穩定性的顯著改善。還發現磷酸鹽具有類似(但較弱)的積極作用。

實施例 4

螯合物存在下的光穩定性和儲存穩定性

【0110】 在隨後的實驗中，意外地發現本發明的液體製劑(0.9%的NaCl、3.5mM的EDTA、10的mM組胺酸、0.085%的HAS，pH值為6.0)在皮下注射時會引起相對強烈的注射疼痛。即使非常少量的EDTA(100μl，濃度僅為2.7 mM s.c.)也足以引起非常不愉快的疼痛感。各種對照組的使用已經排除疼痛感是來自於安慰劑效應或由pH值所引起的可能性。組胺酸也被排除是造成疼痛感的原因之一。事實證明:疼痛感是由於複合劑(complexing agent)EDTA造成的(未顯示實際試驗結果)。鑑於 EDTA二鈉(disodium EDTA)用於治療重金屬中毒、螯合療法和疫苗配製，這一發現是出乎意料的。

【0111】 然而，令人驚訝的是，發現向液體肉毒桿菌素製劑中添加鈣或鎂離子可以顯著減輕注射疼痛感，同時保有其對於光線的保護作用。此外，藉由除了添加EDTA外，還添加 EDTA複合物(EDTA和鎂、鈣或鋅離子)的方式，可以對40°C下的儲存穩定性產生積極影響。

【0112】 更具體地，在進行的實驗中，比較以下五種不同的BoNT/A 150kDa液體組合物(無復合蛋白)：

組合物 1: 0.103%的HSA、20mM的組胺酸、0.9%的NaCl，pH值為6.0。

組合物 2: 0.085%的HSA、10mM的組胺酸、0.9%的NaCl、3,5mM EDTA，pH值為6.0。

組合物 3: 0.085%的HSA、10mM的組胺酸、0.9%的NaCl、3,5mM EDTA、3.5mM MgCl₂，pH值為6.0。

組合物4: 0.085%的HSA、10mM的組胺酸、0.9%的NaCl、3,5mM EDTA、3.5mM ZnCl₂，pH值為6.0。

組合物 5: 0.085%的HSA、10mM的組胺酸、0.9%的NaCl、3,5mM EDTA、3.5mM CaCl₂，pH值為6.0。

【0113】 在暴露於光線(7小時，250W/m²；如前所述)之後，量測組合物中相對於儲存在黑暗中的對照組樣品的BoNT/A相對活性。結果如表5所示。

表 5. 不同液體肉毒桿菌素組合物的光穩定性(7小時，
250W/m²):

BoNT/A 組合物	EDTA	BoNT/A 的相對活性 (相對於對照組(T0)的%)
1	w/o EDTA	46%
2	Na-EDTA	80%
3	Na-Mg-EDTA	73%
4	Na-Zn-EDTA	70%
5	Na-Ca-EDTA	75%

【0114】 可以看出，含有EDTA的組合物比不含EDTA的組合物對於光線照射更穩定。鎂(Mg²⁺)、鈣(Ca²⁺)和鋅(Zn²⁺)複合金屬離子對光穩定性的影響很小。

【0115】 這些結果是令人驚訝的，因為游離EDTA的複合性質，被認定對於保護BoNT/A免受光線暴露的不穩定影響是至關重要的。但在上述實驗中游離EDTA的濃度卻非常低(例如，鋅在100 pM範圍內)。這與預期相反:可見鎂、鋅等金屬離子的添加，並沒有破壞EDTA的光保護作用。

【0116】 此外，在溫度40°C的環境下儲存2周和4週之後量測，對比於對照組樣品T0時(組合物製備後立即量測)，BoNT/A的相對活性。結果如表6所示。

表 6. 不同液體肉毒桿菌毒組合物在40°C下的儲存穩定性:

BoNT/A 組合物	EDTA	BoNT/A 的相對活性 (相對於對照組 (T0)的%)	
		40°C 儲存 2 周	40°C 儲存 4 周
1	w/o EDTA	79%	61%

2	Na-EDTA	89%	77%
3	Na-Mg-EDTA	84%	75%
4	Na-Zn-EDTA	85%	73%
5	Na-Ca-EDTA	79%	69%

【0117】 結果顯示:當在溫度40°C下儲存時，含有EDTA的製劑比不含EDTA的製劑更穩定。出乎意料的是，此結果進一步說明: 作為EDTA複合物的中心金屬離子鎂的離子和鋅離子，對於儲存穩定性影響很小。

【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，包括：

- (i) 一肉毒桿菌素(botulinum toxin, BT)；
- (ii) 一穩定蛋白(stabilizing protein)；以及
- (iii) 一螯合劑(chelating agent)或磷酸鹽。

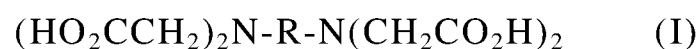
【請求項2】 如請求項1所述之液體製劑，其中該穩定蛋白係選自於一人類血清白蛋白(HSA)、一卵清蛋白(ovalbumin)、一酪蛋白(casein)或上述任意組合之一者；或

其中該穩定蛋白為一人類血清白蛋白。

【請求項3】 如請求項1或2所述之液體製劑，其中該穩定蛋白為一人類血清白蛋白，且該人類血清白蛋白存在於該液體製劑中的一濃度介於0.001% w/v至1.00% w/v之間。

【請求項4】 如請求項1至3中的任一者所述之液體製劑，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。

【請求項5】 如請求項4所述之液體製劑，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6】 如請求項1至5中的任一者所述之液體製劑，其中該螯合劑存在於該液體製劑中的一濃度介於0.01mM至100mM之間。

【請求項7】 如請求項1至6中的任一者所述之液體製劑，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(Botulinum neurotoxins, BoNT)；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。

【請求項8】 如請求項1至7中的任一者所述之液體製劑，包括：

- (i)該肉毒桿菌素；
- (ii) 一人類血清白蛋白(HSA)；以及
- (iii) 一乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)。

【請求項9】 如請求項1至8中的任一者所述之液體製劑，更包括：

- (iv)一鈣鹽、鎂鹽或鋅鹽或上述混合物；或
其中該液體製劑更包括：
- (iv)一鈣鹽、鎂鹽或鋅鹽或上述混合物；其中該鹽存在於該液體製劑中的一含量，介於0.01mM至100mM之間，其中該鹽是氯化鈣，且以介於0.01mM至100mM之間的一含量存在於該液體製劑中。

【請求項10】如請求項1至9中的任一者所述之液體製劑，更包括：

(v)一張力劑(tonicity agent)；或者

其中該液體製劑更包括：

(v)一張力劑，其中該張力劑在於該液體製劑中的一含量介於0.01% w/v至2.0% w/v之間；或者其中該張力劑是氯化鈉；或者其中該張力劑是氯化鈉，且存在於該液體製劑的一含量介於0.01% w/v至2.0% w/v之間。

【請求項11】如請求項1至10中的任一者所述之液體製劑，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12】如請求項1至11中的任一者所述之液體製劑，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13】一種如請求項至1至12中的任一者所述的液體製劑，用於治療，特別是用於治療神經肌肉疾病(neuromuscular diseases)、疼痛(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14】一種如請求項至1至12中的任一者所述的液體製劑，用於處理一美容狀況(cosmetic condition)的用途。

【請求項15】一種治療疾病或狀況(condition)的方法，包括向一有需要的人施予一有效量的如請求項至1至12中的任一者所述的液體製劑。

【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】**

本發明是有關於一種液體肉毒桿菌素製劑，其包含：(i)肉毒桿菌素，(ii)穩定蛋白，例如人類血清白蛋白，(iii)螯合劑(例如，EDTA)或磷酸鹽，和可選擇性的(iv)鈣、鎂或鋅的鹽，(v)張力劑和/或(vi)緩衝劑。此外，本發明是有關於一種將液體肉毒桿菌素製劑用於適應症治療和美容處理的用途。

【英文】

The present invention relates to a liquid botulinum toxin formulation comprising: (i) botulinum toxin, (ii) a stabilizing protein such as human serum albumin, (iii) a chelating agent (e.g., EDTA) or phosphate, and optionally (iv) a salt of calcium, magnesium or zinc, (v) a tonicity agent and/or (vi) a buffering agent. In addition, the present invention relates to the use of the liquid botulinum toxin formulation for therapeutic and cosmetic treatments.

【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】 本發明涉及一種液體肉毒桿菌素(botulinum toxin，BT)製劑，其包含：(i)肉毒桿菌毒素，(ii)穩定蛋白(stabilizing protein)，例如人類血清白蛋白(human serum albumin)，(iii)螯合劑(例如，EDTA)或磷酸鹽，和可選擇性的(iv)鈣、鎂或鋅的鹽，(v)張力劑(tonicity agent)和/或(vi)緩衝劑。此外，本發明涉及液體肉毒桿菌素製劑用於治療和美容處理的用途。

【先前技術】

【0002】 肉毒桿菌神經毒素(Botulinum neurotoxins，以下簡稱BoNT；或肉毒桿菌素(BT))是一系列的細菌神經毒素，廣泛用於治療越來越多的神經、醫療和美容疾病。BoNT有八種血清型(BoNT/A-H)。目前臨床使用兩種血清型，血清型A (BoNT/A)和血清型B (BoNT/B)。BoNT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】 由於肉毒桿菌神經毒素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。因此，BoNT製劑的主要挑戰之一，是最大限度地減少製造和儲存過程中的活性損失(activity loss)。

【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了上市批准：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)、胺基酸(Innotox®：蛋氨酸；Alluzience®：組胺酸)和額外的賦形劑(Innotox®：作為緩衝劑的磷酸鈉；Alluzience®：蔗糖)。

對於BoNT/A，迄今為止只有兩種液體製劑獲得了市場批准：Innotox® (Medytox)，但僅限於亞洲國內市場（例如韓國，2013 年批准），以及Alluzience® (Ipsen/Galderma)，後者已獲批用於將於2021 年在歐洲使用。這兩種液體製劑均含有BoNT/A 毒素複合物，除水外，還含有氯化鈉、清潔劑（Innotox®：聚山梨酯20；Alluzience®：聚山梨酯80）、胺基酸（Innotox®：聚山梨酯）蛋氨酸；Alluzience®：組胺酸）和附加賦形劑（Innotox®：作為緩沖劑的磷酸鈉；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。

【發明內容】

【0008】 本發明的一個目的是在提供一種可立即用於適應症治療和美容處理的穩定肉毒桿菌毒素液體製劑。

【0009】 本發明基於下述令人驚訝的發現，即向含有人類血清白蛋白(HSA)的肉毒桿菌素液體製劑中添加螯合劑(例如，EDTA)或磷酸鹽會促進改進製劑的熱光穩定性和光穩定性。

【0010】 因此，在一個方面，本發明提供了一種液體製劑，其包含：

(i) 肉毒桿菌素；

(ii)穩定蛋白(stabilizing protein)，較佳為人類血清白蛋白(HSA)；

以及

(iii)螯合劑或磷酸鹽。

【0011】 可選擇地，本發明的液體製劑還包含(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，或(v)張力劑(例如，氯化鈉)，或(vi)緩衝劑(例如，磷酸鹽緩衝劑或組胺酸緩衝劑或兩者)，或組分(iv)-(vi)中的兩種(例如，(iv)和(v)、(iv)和(vi)、或(v)和(vi))，或全部三個組分(iv)-(vi)。

【0012】 另一方面，本發明是有關於一中將根據本發明所述的液體製劑其用於治療，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。

【0013】 另一方面，本發明是有關於一中將根據本發明所述的液體製劑其用於處理美容狀況(cosmetic condition)、較佳為處理皮膚狀況、特別是用於處理皮膚細紋或褶皺或皺紋，的美容(醫美(aesthetic))用途。

【0014】 在又一個方面，本發明是有關於一種治療疾病或病症的方法，其包括向有需要的人施予有效量的本發明所述的液體製劑。

【0015】 根據本發明所提供的液體肉毒桿菌素製劑、其用途和使用方法的較佳實施例，將在後附的申請專利範圍中加以闡述。

【0016】 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】

【0017】 無。

【實施方式】

【0018】 本發明係基於以下意外的發現：包含有人類血清白蛋白(HSA)的肉毒桿菌素液體製劑中若存在螯合劑(例如，EDTA)或磷酸鹽時，不僅可以得到改進製劑的熱穩定性，而且有助於改進製劑的光穩定。此外，還意外地發現添加鈣鹽、鎂鹽或鋅鹽可以減輕注射疼痛。

【0019】 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(reconstituted)，而是可以立即使用(ready-to-use)，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療人員的操作。

【0020】 不受理論的束縛，據信穩定蛋白，例如 HSA，與所觀察到的光敏感性有關。進一步地，本發明所述的液體製劑具有更完善的光穩定性。換句話說，其表現出光誘導毒素活性損失(light-induced loss)的降低趨勢(光敏性的降低)。這一令人驚奇的發現是由於螯合劑或磷酸鹽，與 HSA 或包含在所使用的 HSA 材料中的組成分相互作用，或對其產生影響，從而避免或最小化光線對於 HSA 用來穩定肉毒桿菌素之能力的不利影響。

【0021】 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，並且可以減少在醫生處因使用前光照儲存所導致的潛在活性損失。總體而言，本發

明對於液體製劑光敏感性的降低，普遍地改善了肉毒桿菌素在注射治療期間的可操作性和易用性。

【0022】 一方面，本發明是有關於一種液體製劑，其包含：

- (i) 肉毒桿菌素；
- (ii) 穩定蛋白；以及
- (iii) 螯合劑或磷酸鹽。

【0023】 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)。

【0024】 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」。

【0025】 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/或組胺酸進行緩衝的)生理鹽溶液。

【0026】 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。

【0027】 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。

【0028】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，否則其係指純肉毒桿菌神經毒素和/或其複合物。即，純肉毒桿菌神經毒素和其複合蛋白的任何複合物(稱為「毒素複合物(toxin complex)」)。

【0029】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 100 kDa)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(150kD」或「神經毒性組成分」。

【0030】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，包括在onabotulinumtoxin A (Botox®/Vistabel®, Allergan, Inc., Irvine, CA, USA)中的900kDa複合物。此外，包含在Dysport®(Azzalure®, Ipsen, Paris, France)、Alluzience®(Ipsen/Galderma)和Innotox®(Medytox)中作為活性劑的毒素複合物。

【0031】 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。

【0032】 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50%的毒素/神經毒素的劑量。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)。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。

【0033】 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。

【0034】 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。

【0035】 有關本發明液體製劑的組成分(ii)，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。如本說明書中所採用的用語「多肽」和用語「蛋白(質)」可互換使用，是指由多於10個胺基酸、較佳是由多於50個胺基酸、更佳是由多於100個胺基酸、又更佳是由多於100個胺基酸，最佳是由超過200個胺基酸，且較佳最多不超過1000個胺基酸，通過肽鍵連接在一起所組成的胜肽。用於本說明書中特佳的是，具有150至1000個胺基酸，或250至800個胺基酸、特別是300至1000個胺基酸或350至700個胺基酸的多肽。

【0036】 在本發明中，穩定蛋白可以是，例如人類血清白蛋白(HSA)、卵清蛋白(ovalbumin)、酪蛋白(casein)或其混合物。用於本說明書中特佳的是，人類血清白蛋白、卵清蛋白或其混合物，並且最佳是HSA。

【0037】 穩定蛋白或穩定蛋白的混合物，可以以介於0.001%w/v至2.0%w/v之間的含量、較佳以介於0.01%w/v至1.0%w/v之間的含量、更佳以介於0.01%w/v至0.5%w/v之間的含量，存在於液體製劑中。最佳的含量範圍介於0.02%w/v至0.3%w/v之間或介於0.03%w/v至0.10%w/v之間。最佳的穩定蛋白，即人類血清白蛋白(HSA)，較佳以介於0.001%w/v至1.00%w/v之間的含量、更佳以介於0.01%w/v至0.3%w/v之間的含量、最佳以介於0.02%w/v至0.15%w/v之間的含量存在於液體製劑中。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)、重組HSA和/或來自任何其他來源的HSA。較佳地，人類血清白蛋白是一種重組HSA或源自人類血液的HSA。

【0038】雖然不受理論的束縛，因為令人驚奇地發現:光穩定性會隨著HSA濃度的增加而降低。可認為本發明所述的製劑光敏感性至少部分與HSA或其所使用HSA材料中所包含的組成分有關。

【0039】有關組成分 (iii)，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。

【0040】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(1,4,7,10-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)。

【0041】 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**基團沒有特別限制，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**基團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。

【0042】 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。

【0043】 螯合劑存在的濃度，可以為至少0.01mM，或至少0.1mM，或至少1mM。較佳地，螯合劑存在的濃度範圍係介於0.01mM至100mM之間，或者以介於0.1mM至50mM之間，較佳

以介於0.05 mM至20 mM之間。更佳的濃度範圍介於1 mM至10 mM之間。

【0044】 進一步關於組成分(iii)，本說明書考慮在本發明的液體製劑中使用磷酸鹽來替代螯合劑，或除螯合劑之外再添加磷酸鹽，藉以實現製劑光敏感性的降低。事實上，出乎意料地發現：磷酸鹽的存在也會導致製劑光穩定性顯著的增加。磷酸鹽存在於液體製劑中的濃度，可以為至少0.1 mM，或至少1 mM或至少5 mM。較佳地，磷酸鹽存在於液體製劑中的濃度範圍介於0.1 mM至100 mM之間，較佳介於1 mM至50 mM之間，更佳介於5 mM至30 mM之間。

【0045】 較佳地，本發明的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)人類血清白蛋白，和(iii)螯合劑，較佳為EDTA。這種較佳的液體製劑，與上述的任何其他液體製劑一樣，可以進一步包含以下所描述的可選擇性組成分(iv)、(v)和(vi)中的一種或多種，即(iv)、或(v)、或(vi)，或(iv)和(v)，或(iv)和(vi)，或(v)和(vi)，或(iv)和(v)和(vi)。

【0046】 在本發明的一個較佳實施例中，液體製劑還可以包含鹼土金屬或過渡金屬的鹽類，較佳還包含：

(iv)鈣鹽、鎂鹽或鋅鹽或其混合物。

【0047】 較佳的鹽是鈣鹽、鎂鹽和鋅鹽，更佳為鈣鹽和鎂鹽，最佳為鈣鹽。在EDTA存在下，這些鹽的添加將導致EDTA 複合物的形成，即 EDTA與添加的金屬陽離子作為中心原子的複合

物。鹽的陰離子的性質並不重要，唯一的要求是鹽可溶於本發明的含水製劑中。例如，陰離子可以是藥學上可接受的無機酸和有機酸的陰離子。或者，螯合劑本身可形成金屬鹽的陰離子，並且將組成分(iii)和(iv)建構成，例如 $\text{Na}_2 \text{CaEDTA}$ ，添加到液體製劑中。

【0048】 合適的相對陰離子(counter anion)包括，例如醋酸根(acetate,)、天門冬氨酸根(aspartate)、苯磺酸根(benzenesulfonate)、苯甲酸根(benzoate)、besylate、碳酸氫根(bicarbonate)、酒石酸氫根(bitartrate)、溴根(bromide)、camsylate、碳酸根(carbonate)、氯鹽(chloride)、檸檬酸根(citrate)、癸酸根(decanoate)、依地酸根(edetate)、esylate、富馬酸根(fumarate)、gluceptate、葡萄糖酸根(gluconate)、麩氨酸根(glutamate)、乙醇酸根(glycolate) 乙二醇二苯甲酸鹽(glycollylarsanilate)、己酸鹽(hexanoate)、海巴胺(hydrabamine)、羥基萘甲酸鹽(hydroxynaphthoate)、碘化物(iodide)、乳糖酸鹽(lactobionate)、硝酸鹽(nitrate)、蘋果酸鹽(malate)、馬來酸鹽(maleate)、扁桃酸鹽(mandelate)、甲磺酸鹽(mesylate)、溴甲烷(methylbromide)、硝酸甲酯(methylnitrate)、硫酸甲酯(methylsulfate)、粘酸鹽(mucate)、萘磺酸鹽(napsylate)、辛酸鹽(octanoate)、油酸鹽(oleate)、棕櫚酸鹽(palmoate)、泛酸鹽(pantothenate)、磷酸鹽

(phosphate)、聚半乳糖醛酸鹽 (polygalacturonate)、丙酸鹽 (propionate)、水楊酸鹽(salicylate)、硬脂酸鹽(stearate)、次乙酸鹽(subacetate)、琥珀酸鹽(succinate)、硫酸鹽(sulfate)、酒石酸鹽(tartrate)和 teoclate。

【0049】 較佳地，鹽是氯化物鹽。特佳的鹽包括氯化鈣(即 CaCl_2 及其水合物)、氯化鎂(即 MgCl_2 及其水合物)和氯化鋅(即 ZnCl_2 及其水合物)。在EDTA存在下，這些鹽的添加將導致 EDTA 複合物的形成，即EDTA與添加作為中心原子的金屬陽離子複合。

【0050】 一般來說，鹽的金屬離子的濃度與螯合劑的濃度預莫耳數大約相等。存在於液體製劑中的鹽濃度可以至少為0.01mM，或至少為0.1mM，或至少為1mM。較佳地，存在於液體製劑中的鹽濃度範圍介於0.01nM至100mM之間，較佳介於0.1nM至50mM之間，更佳介於0.05nM至20mM之間，最佳介於1nM至10mM之間。

【0051】 令人驚奇的是，本發明的發明人發現：添加鹼土金屬或過渡金屬的鹽，特別是鈣、鎂或鋅的鹽，可以顯著減輕液體的注射疼痛，同時能保持本發明所述製劑的儲存穩定性和光穩定性。這一發現是出乎意料的，因為(i)如上述液體肉毒桿菌素製劑會引起令人不快的注射疼痛感，既不可預見也非預期，(ii)添加鹼土金屬或過渡金屬的鹽，令人驚奇地發現，氯化鈣等螯合劑可顯著減輕注射疼痛，同時，(iii)液體製劑的儲存穩定性和光穩定性皆得以保持，儘管人們相信需要游離(非複合)螯合劑，方可獲得

光穩定效果。亦即是，令人驚訝地發現：含有中心金屬原子(例如 Ca^{2+})的螯合劑(例如，EDTA)仍然能夠保護肉毒桿菌素免受光照影響。

【0052】 根據本發明，液體製劑還可選擇性地包含：

(v)張力劑。

【0053】 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。

【0054】 張力劑的實施例包括蔗糖、葡萄糖、碳酸鈉、胺基酸、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。

【0055】 較佳地，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。

【0056】 根據本發明，液體製劑還可選擇性地包含：

(vi)緩衝劑。

【0057】 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胺基酸、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。

【0058】 較佳地，緩衝劑是磷酸鹽、胺基酸、或其混合物。值得注意的是，磷酸鹽在本發明中可發揮雙重作用：即其不只可充當磷酸鹽pH值緩衝劑，且還可發揮穩定本發明組成分(iii)的作用。胺基酸可以選自於天門冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸、組胺酸、脯氨酸、牛磺酸、甲硫氨酸、絲氨酸、酪氨酸、色氨酸及其混合物。且較佳選自於組胺酸、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，胺基酸是組胺酸。用於本說明書的最佳緩衝劑是組胺酸、磷酸鹽或其混合物。

【0059】 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。如果緩衝劑是胺基酸(例如，組胺酸)，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。

【0060】 本發明的液體製劑的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，且較佳介於5.5至7.0之間，或介於6.0至7.5之間，更佳介於6.0至7.0之間。且最佳介於6.0至6.5之間。

【0061】 此外，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，液體製劑中可以包含甘油、蔗糖、乳糖、甘露醇、葡聚糖、透明質酸、聚乙烯吡咯烷酮、乳酸、檸檬酸、胺基酸(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。其他藥學上可接受的合適賦形劑，包括本領域熟知者，例如可參見: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania。

【0062】 另一方面，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)，例如特別缺乏去污劑、多醣、胺基酸、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個胺基酸所組成的胜肽，例如由10至40個胺基酸或15至30個胺基酸所組成的胜肽。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胺基酸。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)。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)去污劑和任何胺基酸，或去污劑和除了組胺酸之外的所有胺基酸，(iii)去污劑和穩定肽，(iv)單醣、寡醣和多醣以及任何胺基酸，或單醣、寡醣和多醣以及除了組胺酸之外的所有胺基酸，(v)單醣、寡醣和多醣以及穩定胜肽，(vi)任何胺基酸和穩定肽，或除了組胺酸和穩定肽之外的所有胺基酸，(vii)去污劑、單醣、寡醣和多醣以及任何胺基酸，或去污劑、單醣、寡醣和多醣以及除組胺酸和穩定肽之外的所有胺基酸組胺酸，(viii)去污劑、單醣、寡醣和多醣以及穩定肽，(ix)去污劑、

任何胺基酸以及穩定胜肽，或去污劑、除了組胺酸之外的所有胺基酸以及穩定肽，(x)單醣、寡醣和多醣、任何胺基酸和穩定生肽，或單醣、寡醣和多醣、除組胺酸之外的所有胺基酸和穩定肽，(xi)去污劑、單醣、寡醣和多醣、任何胺基酸和穩定胜肽，或去垢劑、單醣、寡醣和多醣、除了組胺酸外的所有胺基酸和穩定生肽。

【0065】 在另一個實施例中，本發明的液體製劑不包含除了組胺酸之外的任何其他胺基酸。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。在另一個實施方案中，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)和組胺酸，(xiii)去污劑(例如聚山梨酯)、組胺酸和蔗糖。

【0067】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，和(iii)以通式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 所表示的螯合劑，其中R不含或包含一個或兩個羧酸官能基，最佳是不包含任何羧酸官能基。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)以通式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 所表示的螯合劑，其中R不含或包含一個或兩個羧酸官能基，且濃度範圍介於0.05mM至20mM之間。

【0068】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，和(iii)選自於由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，或選自於由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑。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0.5% w/v之間的HSA，和(iii)濃度介於0.05mM至20mM之間，選自於由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，或選自於由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑。

【0069】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，和(iii)EDTA。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)濃度介於0.05mM至20mM之間的EDTA。

【0070】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，(iii)以通式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 所表示的螯合劑，其中R不含或包含一個或兩個羧酸官能基，和(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，較佳為氯化鈣。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)濃度介於0.05mM至20mM之間，以通式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 所表示的螯合劑，其中R不含或包含一個或兩個羧酸官能基，和(iv)鈣、鎂或鋅的鹽，或它們的混合物，較佳為氯化鈣，濃度介於0.05mM至20mM之間。

【0071】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌毒素，(ii)HSA，(iii)選自於由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，或選自於由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，和(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，較佳為氯化鈣。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)濃度介於0.05mM至20mM之間，選自於由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，或選自於由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或它們的混合物，較佳為氯化鈣，濃度介於0.05mM至20mM之間。

【0072】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，(iii)EDTA，和(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，較佳為氯化鈣。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)濃度介於0.05mM至20mM之間的EDTA，和(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或它們的混合物，較佳為氯化鈣，濃度介於0.05mM至20mM之間。

【0073】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，(iii)以通式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 所表示的螯合劑，其中R不含或包含一個或兩個羧酸官能基，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，較佳為氯化鈣，和(v)磷酸鹽緩衝劑和/或組胺酸。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)濃度介於0.05mM至20mM之間，以通式 $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N-R-N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 所表示的螯合劑，其中R不含或包含一個或兩個羧酸官能基，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或它們的混合物，較佳為氯化鈣，濃度介於0.05mM至20mM之間，和(v)濃度介於2mM至50mM之間的磷酸鹽緩衝液和/或組胺酸。

【0074】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，(iii)選自於由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，或選自於由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，較佳為氯化鈣，和(v)磷酸鹽緩衝劑和/

或組胺酸。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)選自於由DOTA、TED、EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，或選自於由EDTA、EGTA、BAPTA、DTPA和TTHA所組成的一群螯合劑，濃度介於0.05mM至20mM之間，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或它們的混合物，較佳為氯化鈣，濃度介於0.05mM至20mM之間，和(v)濃度介於2mM至50mM之間的磷酸鹽緩衝液和/或組胺酸。

【0075】 本發明較佳的液體製劑包含(i)肉毒桿菌素，(ii)HSA，(iii)EDTA，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物，較佳為氯化鈣，和(v)磷酸鹽緩衝液和/或組胺酸。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)濃度介於0.05mM至20mM之間的EDTA，(iv)鈣、鎂或鋅的鹽或它們的混合物，較佳為氯化鈣，濃度介於0.05mM至20mM之間，和(v)濃度介於2mM至50mM之間的磷酸鹽緩衝液和/或組胺酸。

【0076】 特佳的是，上述較佳的液體製劑還含有氯化鈉，特別是濃度為約0.9% w/v的氯化鈉。此外，pH值的範圍較佳介於6.0至7.5之間。此外，肉毒桿菌素較佳是血清型A，並且特別是血清型A的神經毒性成分。

【0077】 本發明液體製劑的較佳實施例包括：

製劑1：

50U/ml BoNT/A

0.9% 氯化鈉 (9mg/mL)

0.05% HSA (0.5mg/mL)

0.1% Na₂-EDTA (1mg/mL ; ~2.7nM) ,

pH值介於5.5至8.0之間(例如 , 6.0) , 並且可選擇性地

pH 緩衝液(例如 10mM磷酸鹽或10mM組胺酸)。

製劑2 :

50 U/ml BoNT/A

0.9% 氯化鈉 (9mg/mL)

0.085% HSA (0.85mg/mL)

0.155% 組胺酸(1.55mg/ml ; ~10mM)

0.13% Na₂-EDTA (1.3 mg/ ; ~3.5mM)

0.039% CaCl₂ (390μg/mL ; ~3.5mM)

pH值介於5.5至8.0之間(例如 , 6.0) , 並且可選擇性地

pH 緩衝液 (例如 , 10mM磷酸鹽)

【0078】 本發明更是有關於一種包含肉毒桿菌素的液體製劑，液體製劑在升高至溫度40°C中儲存4週後，儲存後的毒素活性相對於初始毒素活性，降低不超過35%。另一方面，本發明係涉及一種包含肉毒桿菌毒素的液體製劑，其中在將液體製劑暴露於250W/m²的光源下7小時後，暴露後的毒素活性相對於初始毒素活性，降低不超過35%。

【0079】 此外，本發明是有關於一種製備本文所述的液體肉毒桿菌素製劑的方法，其包括將本文所述的組成分，特別是組成分(i)至(iii)，和可選擇性的組成分(iv)至(vi)中的一種或多種加以組合。本發明的液體製劑的製備方法沒有特別限制，且相應的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，較佳是鹽水溶液，更佳的是生理鹽水溶液，且最佳的是可緩衝的(例如，以磷酸鹽或組胺酸進行緩衝的)生理鹽水溶液。

【0080】 較佳地，首先溶解鹽，然後添加HSA，必要時調節pH值，最後添加肉毒桿菌素。上述順序並不是強制性要求的，但據信可以安全地保留肉毒桿菌素的最大比活性。較佳地，製備液體肉毒桿菌素製劑的方法，並不包括復溶冷凍乾燥粉末形式的肉毒桿菌素製劑。

【0081】 此外，本發明是有關於一種用於穩定液體肉毒桿菌素製劑的方法，包括將(i)肉毒桿菌毒素、(ii)穩定蛋白，較佳為人類血清白蛋白(HSA)、(iii)螯合劑或磷酸鹽，和可選擇性的組成分(iv)至(vi)中的一種或多種，其中組成分(i)至(v)如本說明書中所定義。

【0082】 更進一步，本發明是有關於一種將本說明書中所定義的螯合劑用於增加水性肉毒桿菌素製劑的光穩定性的用途，所述水性肉毒桿菌素製劑含有(i)肉毒桿菌毒素和(ii)穩定蛋白，較佳為人類血清白蛋白(HSA)，和可選擇性的組成分(iv)至(vi)中的

一種或多種，其中組成分(i)、(ii)和(iv)至(vi)如本說明書中所定義。本說明書中的「增進光穩定性」是指含有螯合劑的含水肉毒桿菌素製劑在一特定溫度(例如，20°C)下，暴露於250W/m²的光線7小時之後所具有的肉毒桿菌素生物活性，比不含螯合劑的水性肉毒桿菌素製劑，在相同溫度(例如 20°C)下，暴露於250W/m²的光線7小時之後的肉毒桿菌素生物活性，高出至少20%，較佳高出至少40%，更佳高出至少60%，最佳高出至少80%。

【0083】 此外，本發明是有關於一種將磷酸鹽用於增加水性肉毒桿菌素製劑的光穩定性的用途，所述水性肉毒桿菌素製劑含有(i)肉毒桿菌毒素和(ii)穩定蛋白，較佳為人類血清白蛋白，和可選擇性的組成分(iv)至(vi)中的一種或多種，其中組成分(i)、(ii)和(iv)至(vi)如本說明書中所定義。本說明書中的「增進光穩定性」是指含有磷酸鹽的水性肉毒桿菌素製劑，在一特定溫度(例如，20°C)下，暴露於250W/m²的光線7小時之後所具有的肉毒桿菌素生物活性，比不含螯合劑的水性肉毒桿菌素製劑，在相同溫度(例如 20°C)下，暴露於250W/m²的光線7小時之後的肉毒桿菌素生物活性，高出至少10%，較佳高出至少20%，更佳高出至少30%，最佳高出至少40%。

【0084】 此外，本發明是有關於一種將鈣、鎂或鋅的鹽或其混合物用於減輕肉毒桿菌素製劑注射疼痛的用途，所述肉毒桿菌素製劑包含(i)肉毒桿菌毒素，(ii)穩定蛋白，較佳為人類血清白蛋白(HSA)，(iii)螯合劑或磷酸鹽，和可選擇性的組成分(iv)至(vi)中的一種或多種，其中組成分(i)至(vi)如本說明書中所定義。

【0085】 另一方面，本發明是有關於一種將發明的液體製劑用於適應症治療的用途。

【0086】 具體地，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。神經肌肉疾病的示例，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。

【0087】 在又一個方面，本發明是有關於一種將本發明的液體製劑用於治療美容狀況的美容用途。

【0088】 本發明的這個方面是有關於一種將本發明的液體製劑用於純粹醫美的用途。較佳的待處理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。

【0089】 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。

【0090】 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。

【0091】 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)。

【0092】 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。

【0093】 在又一個方面，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。

【0094】 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(醫美)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。

【0095】 本發明的另一較佳方法是有關於一種使面部和/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的液體製劑。

【0096】 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。

實施例

【0097】 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)。

實施例 1

熱穩定性

【0098】 肉毒桿菌素的熱穩定性可以通過在 40°C 的高溫下，使用如 WO2013/049508 和 WO2014/207109 中所述以細胞為基

底的效價分析法(**cell-based potency assay**，**CBA**)測量肉毒桿菌素的生物活性隨著時間的變化量來加以判定。

【0099】 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(**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。

【0100】 將含有**HSA**的組合物(「**HSA**組合物」；50U/ml 的**BoNT/A**，0.1%的**HSA**，0.47%的蔗糖，0.9%的**NaCl**)與比較例1的組合物(50U/ml的**BoNT/A**，0.015%的聚山梨醇酯20、0.02%的甲硫氨酸、0.9%的**NaCl**、0.078%的**NaH₂PO₄**；pH值為6.5)進行比較，同時與比較例2的組合物(50U/ml **BoNT/A**、0.01%聚山梨醇酯80、0.155%組胺酸、0.4%蔗糖、0.9%**NaCl**；pH值為6.5)進行比較。將每種組合物的一部分，在溫度範圍2℃至8℃的黑暗環境中儲存，並在7天內(「**T0**」)採用以細胞為基底的效價分析法(**CBA**)進行分析。在判定生物活性之前，將組合物的剩餘部分在升高的溫度(40℃)下儲存2週。其中，所有組合物中所使用的肉毒桿菌素，是沒有復合蛋白的150kDa **BoNT/A**神經毒素。量測結果如表1所示。

表 1. 熱穩定性:

BoNT/A 組合物	在溫度 40℃下儲存 2 週 後相對於 T0 的 BoNT/A 活性變化
HSA 組合物 (非本發明)	-20%

比較例 1 組合物	-49%
比較例 2 組合物	-46%

【0101】 從表1可以看出:含有人血清白蛋白(HSA)的HSA組合物，明顯比均缺乏HSA作為穩定蛋白的比較例1和2的組合物更加穩定。因此，穩定蛋白如HSA的存在對於實現足夠高的毒素熱穩定性是重要的。

【0102】 藉由直接測量製造過程之後不同HSA濃度的液體組合物（75U/ml的BoNT/A，0.03-1.0mg/ml的HSA、10mM 磷酸鹽、10mM的組胺酸、0.9%的NaCl；pH值為 6.0）中BoNT/A(150kDa)的生物活性，來進一步探究HSA對肉毒桿菌素穩定性的影響，量測結果如表2所示。

表 2. HSA 濃度對 BoNT/A 活性的影響:

BoNT/A 組合物 (非本發明)	HSA 濃度	BoNT/A 活性
1	0.03 mg/ml	48 U/ml
2	0.1 mg/ml	63 U/ml
3	0.3 mg/ml	65 U/ml
4	1.0 mg/ml	75 U/ml

【0103】 從表2可以看出:毒素活性隨著HSA濃度的增加而增加。

實施例 2

熱穩定性

【0104】 當研究諸如上述各種液體製劑的穩定性時，令人驚訝地發現光線對於毒素穩定性具有顯著影響。使用 SUNTEST

CPS+ 儀器(ATLAS Material Testing Technology LLC)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)，進行光穩定性測試，以進一步探究這一發現。其中，光穩定性測試在250在250W/m²的光線照射下進行7小時。

【0105】 具體地，製備包含可緩衝的0.9% NaCl(pH值為6.0)和不同濃度人類血清白蛋白(0.03-1.0mg/ml的HSA)的多個BoNT/A(150kDa)組合物樣本，然後暴露於250W/m²光線下7小時。為了進行比較，將具有不同濃度(0.03mg/mL、0.1mg/mL、0.3mg/mL和1.0mg/mL)HSA的多個對應BoNT/A(150kDa)組合物(對照組)，在黑暗中保存相同的時間。之後，測量暴露於光線的組合物和儲存在黑暗中的相應對照組合物的生物活性。然後，計算以相對於對照組生物活性的百分比來表示的BoNT/A的相對活性，並以此來作為判定光穩定性的標準。 結果如表3所示。

表 3. HSA 對光穩定性的影響:

BoNT/A 組合物	HSA 濃度	BoNT/A 的相對活性 (相對於對照組的%)
1	0.03 mg/ml	82%
2	0.1 mg/ml	72%
3	0.3 mg/ml	70%
4	1.0 mg/ml	55%

【0106】 表3的結果顯示:含有HSA的組合物中BoNT/A的光穩定性隨著HSA濃度的增加而降低。因此，雖然熱穩定性隨著

HSA濃度的增加而增加(參見實施例1),但意外地發現HSA對光穩定性具有負面影響。進一步的研究(未顯示實際試驗結果)顯示:使用替代HSA的產品(重組HSA來代替供體HSA)或對HSA進行廣泛透析以去除潛在的小分子雜質(<10 kDa)並不會改變這些發現,即對光敏感度無影響。

實施例 3

光穩定性

【0107】 進行進一步的研究發現具有較低光敏感性,即較高光穩定性含有HSA的組合物。這些研究包括製備包含BoNT/A(150kDa)(不含複合蛋白)、0.1%的HSA、0.47%的蔗糖和0.9%的NaCl的液體組合物(「組合物1」)。另外,製備了對應於組合物1的兩種液體組合物,不同之處在於它們還分別含有2.7mM的EDTA(「組合物1+EDTA」)和20mM的磷酸鹽(「組合物1+磷酸鹽」;pH值為6.0)。此外,製備含有DTPA的組合物(「組合物2(DTPA)」),其包含BoNT/A(150kDa)、0.01%的HSA、0.015%的聚山梨醇酯20、10mM的磷酸鹽、0.155%的組胺酸、2.7mM的DTPA、0.9%的氯化鈉;pH值為6.0)。

【0108】 如上所述,將組合物1、組合物1+EDTA、組合物1+磷酸鹽和組合物2(DTPA)暴露於 $250\text{W}/\text{m}^2$ 的光線照射下進行7小時。同時,也將相同的組合物保存在黑暗中相同的時間(作為對照組)。然後,與儲存在黑暗中的相應對照組合物相比,測量各個液體組合物中BoNT/A的生物活性。結果如表4所示。

表 4. EDTA 和 DTPA 對光穩定性的影響：

BoNT/A 組合物	BoNT/A 的相對活性 (相對於對照組的%)
組合物 1	35%
組合物 1+EDTA	77%
組合物 1+Phosphate	60%
組合物 2 (DTPA)	77%

【0109】 從表4中可以明顯看出:螯合劑EDTA和DTPA的添加會導致含有HSA的BoNT/A組合物光穩定性的顯著改善。還發現磷酸鹽具有類似(但較弱)的積極作用。

實施例 4

螯合物存在下的光穩定性和儲存穩定性

【0110】 在隨後的實驗中，意外地發現本發明的液體製劑(0.9%的NaCl、3.5mM的EDTA、10的mM組胺酸、0.085%的HAS，pH值為6.0)在皮下注射時會引起相對強烈的注射疼痛。即使非常少量的EDTA(100μl，濃度僅為2.7 mM s.c.)也足以引起非常不愉快的疼痛感。各種對照組的使用已經排除疼痛感是來自於安慰劑效應或由pH值所引起的可能性。組胺酸也被排除是造成疼痛感的原因之一。事實證明:疼痛感是由於複合劑(complexing agent)EDTA造成的(未顯示實際試驗結果)。鑑於 EDTA二鈉(disodium EDTA)用於治療重金屬中毒、螯合療法和疫苗配製，這一發現是出乎意料的。

【0111】 然而，令人驚訝的是，發現向液體肉毒桿菌素製劑中添加鈣或鎂離子可以顯著減輕注射疼痛感，同時保有其對於光線的保護作用。此外，藉由除了添加EDTA外，還添加 EDTA複合物(EDTA和鎂、鈣或鋅離子)的方式，可以對40°C下的儲存穩定性產生積極影響。

【0112】 更具體地，在進行的實驗中，比較以下五種不同的BoNT/A 150kDa液體組合物(無複合蛋白)：

組合物 1: 0.103%的HSA、20mM的組胺酸、0.9%的NaCl，pH值為6.0。

組合物 2: 0.085%的HSA、10mM的組胺酸、0.9%的NaCl、3,5mM EDTA，pH值為6.0。

組合物 3: 0.085%的HSA、10mM的組胺酸、0.9%的NaCl、3,5mM EDTA、3.5mM MgCl₂，pH值為6.0。

組合物4: 0.085%的HSA、10mM的組胺酸、0.9%的NaCl、3,5mM EDTA、3.5mM ZnCl₂，pH值為6.0。

組合物 5: 0.085%的HSA、10mM的組胺酸、0.9%的NaCl、3,5mM EDTA、3.5mM CaCl₂，pH值為6.0。

【0113】 在暴露於光線(7小時，250W/m²；如前所述)之後，量測組合物中相對於儲存在黑暗中的對照組樣品的BoNT/A相對活性。結果如表5所示。

表 5. 不同液體肉毒桿菌素組合物的光穩定性(7小時，
250W/m²):

BoNT/A 組合物	EDTA	BoNT/A 的相對活性 (相對於對照組(T0)的%)
1	w/o EDTA	46%
2	Na-EDTA	80%
3	Na-Mg-EDTA	73%
4	Na-Zn-EDTA	70%
5	Na-Ca-EDTA	75%

【0114】 可以看出，含有EDTA的組合物比不含EDTA的組合物對於光線照射更穩定。鎂(Mg²⁺)、鈣(Ca²⁺)和鋅(Zn²⁺)複合金屬離子對光穩定性的影響很小。

【0115】 這些結果是令人驚訝的，因為游離EDTA的複合性質，被認定對於保護BoNT/A免受光線暴露的不穩定影響是至關重要的。但在上述實驗中游離EDTA的濃度卻非常低(例如，鋅在100 pM範圍內內)。這與預期相反:可見鎂、鋅等金屬離子的添加，並沒有破壞EDTA的光保護作用。

【0116】 此外，在溫度40°C的環境下儲存2周和4週之後量測，對比於對照組樣品T0時(組合物製備後立即量測)，BoNT/A的相對活性。結果如表6所示。

表 6. 不同液體肉毒桿菌毒組合物在40°C下的儲存穩定性:

BoNT/A 組合物	EDTA	BoNT/A 的相對活性 (相對於對照組(T0)的%)	
		40°C 儲存 2 周	40°C 儲存 4 周
1	w/o EDTA	79%	61%

2	Na-EDTA	89%	77%
3	Na-Mg-EDTA	84%	75%
4	Na-Zn-EDTA	85%	73%
5	Na-Ca-EDTA	79%	69%

【0117】 結果顯示:當在溫度40°C下儲存時，含有EDTA的製劑比不含EDTA的製劑更穩定。出乎意料的是，此結果進一步說明: 作為EDTA複合物的中心金屬離子鎂的離子和鋅離子，對於儲存穩定性影響很小。

【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，包括：

- (i) 一肉毒桿菌素(botulinum toxin，BT)；
- (ii) 一穩定蛋白(stabilizing protein)；以及
- (iii) 一螯合劑(chelating agent)或磷酸鹽。

【請求項2】 如請求項1所述之液體製劑，其中該穩定蛋白係選自於一人類血清白蛋白(HSA)、一卵清蛋白(ovalbumin)、一酪蛋白(casein)或上述任意組合之一者；或

其中該穩定蛋白為一人類血清白蛋白。

【請求項3】 如請求項1或2所述之液體製劑，其中該穩定蛋白為一人類血清白蛋白，且該人類血清白蛋白存在於該液體製劑中的一濃度介於0.001% w/v至1.00% w/v之間。

【請求項4】 如請求項1或2所述之液體製劑，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。

【請求項5】 如請求項4所述之液體製劑，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6】 如請求項1或2所述之液體製劑，其中該螯合劑存在於該液體製劑中的一濃度介於0.01mM至100mM之間。

【請求項7】 如請求項1或2所述之液體製劑，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(Botulinum neurotoxins, BoNT)；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。

【請求項8】 如請求項1或2所述之液體製劑，包括：

- (i)該肉毒桿菌素；
- (ii) 一人類血清白蛋白(HSA)；以及
- (iii) 一乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)。

【請求項9】 如請求項1或2所述之液體製劑，更包括：

- (iv)一鈣鹽、鎂鹽或鋅鹽或上述混合物；或
其中該液體製劑更包括：
- (iv)一鈣鹽、鎂鹽或鋅鹽或上述混合物；其中該鈣鹽、鎂鹽或鋅鹽或上述混合物存在於該液體製劑中的一含量，介於0.01mM至100mM之間。

【請求項10】 如請求項9所述之液體製劑，其中該鈣鹽、鎂鹽或鋅鹽或上述混合物是氯化鈣，且以介於0.01mM至100mM之間的一含量存在於該液體製劑中。

【請求項11】如請求項1或2所述之液體製劑，更包括：

(v)一張力劑(tonicity agent)；或者

其中該液體製劑更包括：

(v)一張力劑，其中該張力劑在於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12】如請求項11所述之液體製劑，其中該張力劑是氯化鈉；或者其中該張力劑是氯化鈉，且存在於該液體製劑的一含量介於0.01% w/v至2.0% w/v之間。

【請求項13】如請求項1或2所述之液體製劑，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。

【請求項14】如請求項13所述之液體製劑，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】如請求項1或2所述之液體製劑，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16】一種如請求項至1至15中的任一者所述的液體製劑，用於治療，特別是用於治療神經肌肉疾病(neuromuscular diseases)、疼痛(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17】一種如請求項至1至15中的任一者所述的液體製劑，用於處理一美容狀況(cosmetic condition)的用途。