

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-521067

(P2004-521067A)

(43) 公表日 平成16年7月15日(2004.7.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/74	A 6 1 K 35/74	G 4 C 0 8 7
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 5/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-504955 (P2002-504955)	(71) 出願人	503004390
(86) (22) 出願日	平成13年6月28日 (2001.6.28)		サンダース, イラ
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月25日 (2002.12.25)		アメリカ合衆国, ニューヨーク州 101
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/020523		28, ニューヨーク, イースト 93アー
(87) 国際公開番号	W02002/000172		ルディー ストリート 300, アパート
(87) 国際公開日	平成14年1月3日 (2002.1.3)		メント 43イー
(31) 優先権主張番号	60/214, 569	(74) 代理人	100072349
(32) 優先日	平成12年6月28日 (2000.6.28)		弁理士 八田 幹雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102912
			弁理士 野上 敦
		(74) 代理人	100110995
			弁理士 奈良 泰男
		(74) 代理人	100111464
			弁理士 齋藤 悦子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動物（哺乳動物）における有用な用途を目的とする破傷風毒素の使用法

## (57) 【要約】

動物における、特に哺乳動物における及びより特にヒトにおける、選択部位での神経機能または非神経細胞活性を調節するまたは制御するための破傷風毒素の使用法が提供される。動物における、特に哺乳動物における及びより特にヒトにおける選択部位での動物の神経機能または非神経細胞活性を調節する薬剤配合物がまた提供される。動物、特に哺乳動物及びより特にヒトの臨床的障害または症状の処置方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用がまた提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

神経毒が標的ニューロンの活性を可逆的に調節するように、治療上有効な量の破傷風毒素を動物の標的ニューロンの影響を受ける選択部位に投与することを有する、選択部位での動物の神経機能の調節方法。

## 【請求項 2】

治療上有効な量の破傷風毒素が選択部位での神経活性の減少または神経活性の可逆的な阻害応答を引き起こすのに十分である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

治療上有効な量の破傷風毒素が選択部位での神経活性の増加または神経活性の興奮応答を引き起こすのに十分である、請求項 1 に記載の方法。 10

## 【請求項 4】

標的ニューロンの神経支配除去を引き起こすのに十分な量の破傷風毒素を動物の標的ニューロンに影響を及ぼす選択部位に投与することを有し、該神経支配除去により標的ニューロンによって神経支配される選択部位での神経機能の可逆的な阻害応答が起こるものである、動物の神経機能の活性の抑制方法。

## 【請求項 5】

標的ニューロンによって神経支配される選択部位での神経機能の興奮応答を引き起こすのに十分な量の破傷風毒素を動物の標的ニューロンに影響を及ぼす選択部位に投与することを有する動物の神経機能の活性の向上方法。 20

## 【請求項 6】

神経活性の抑制または向上が約 1 時間から約 1 年の期間で起こる、請求項 1 ~ 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

神経活性の抑制または向上が約 1 週間から約 4 ヶ月の期間で起こる、請求項 1 ~ 5 に記載の方法。

## 【請求項 8】

( i ) 破傷風毒素の投与前に動物の血漿中に存在する破傷風毒素の抗体のレベルを測定し ; および

( i i ) 破傷風毒素のレベルが 0 . 1 I U / m l 未満である際には動物を免疫処置することをさらに有する請求項 1 ~ 5 に記載の方法。 30

## 【請求項 9】

( i ) 破傷風毒素の投与前に動物の血漿中に存在する破傷風毒素の抗体のレベルを測定し ; および

( i i ) 破傷風毒素のレベルが 0 . 1 I U / m l 未満である際には動物を免疫処置することをさらに有する請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 10】

( i ) 破傷風毒素の投与前に動物の血漿中に存在する破傷風毒素の抗体のレベルを測定し ; および

( i i ) 破傷風毒素のレベルが 0 . 1 I U / m l 未満である際には動物を免疫処置することをさらに有する請求項 7 に記載の方法。 40

## 【請求項 11】

該免疫処置は受動的または能動的に行なわれる、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 12】

該免疫処置は受動的または能動的に行なわれる、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 13】

該免疫処置は受動的または能動的に行なわれる、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 14】

血漿中に存在する破傷風毒素の抗体のレベルが抗体価によって測定される、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 15】

血漿中に存在する破傷風毒素の抗体のレベルが抗体価によって測定される、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 16】

血漿中に存在する破傷風毒素の抗体のレベルが抗体価によって測定される、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 17】

治療上有効な量の破傷風毒素が注射、局所適用、エアロゾル、または管若しくは体の開口部への点滴注入によって選択部位にデリバリーされる、請求項 1～5 に記載の方法。

## 【請求項 18】

治療上有効な量の破傷風毒素が注射、局所適用、エアロゾル、または管若しくは体の開口部への点滴注入によって選択部位にデリバリーされる、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 19】

治療上有効な量の破傷風毒素が注射、局所適用、エアロゾル、または管若しくは体の開口部への点滴注入によって選択部位にデリバリーされる、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 20】

治療上有効な量の破傷風毒素がリポソームまたは脂質二分子膜を有する人工ベシクル中に封入されて標的ニューロン中にデリバリーされる、請求項 1～5 に記載の方法。

## 【請求項 21】

治療上有効な量の破傷風毒素がリポソームまたは脂質二分子膜を有する人工ベシクル中に封入されて標的ニューロン中にデリバリーされる、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 22】

治療上有効な量の破傷風毒素がリポソームまたは脂質二分子膜を有する人工ベシクル中に封入されて標的ニューロン中にデリバリーされる、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 23】

治療上有効な量の破傷風毒素が製薬上許容できる担体中に懸濁される、請求項 1～5 に記載の方法。

## 【請求項 24】

治療上有効な量の破傷風毒素が製薬上許容できる担体中に懸濁される、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 25】

治療上有効な量の破傷風毒素が製薬上許容できる担体中に懸濁される、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 26】

破傷風毒素は凍結乾燥粉末の形態を有する、請求項 1～5 に記載の方法。

## 【請求項 27】

破傷風毒素は凍結乾燥粉末の形態を有する、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 28】

破傷風毒素は凍結乾燥粉末の形態を有する、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 29】

標的ニューロンは運動ニューロン、自律性ニューロン、及び感覚ニューロンからなる群より選択される、請求項 1～5 に記載の方法。

## 【請求項 30】

標的ニューロンは運動ニューロン、自律性ニューロン、及び感覚ニューロンからなる群より選択される、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 31】

標的ニューロンは運動ニューロン、自律性ニューロン、感覚ニューロンまたは中枢神経系のニューロンからなる群より選択される、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 32】

標的ニューロンの活性は神経伝達物質または神経ペプチドの放出を直接的にまたは間接的

10

20

30

40

50

に阻害することによって影響を受ける、請求項 1 ~ 5 に記載の方法。

【請求項 3 3】

標的ニューロンの活性は神経伝達物質または神経ペプチドの放出を直接的にまたは間接的に阻害することによって影響を受ける、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 3 4】

標的ニューロンの活性は神経伝達物質または神経ペプチドの放出を直接的にまたは間接的に阻害することによって影響を受ける、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】

治療上有効な量は、選択部位に対して約 1 0 0 単位 ~ 約 1 0 , 0 0 0 単位である、請求項 1、2 または 4 に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

治療上有効な量は、選択部位に対して約 5 0 0 単位 ~ 約 5 0 0 0 単位である、請求項 1、2 または 4 に記載の方法。

【請求項 3 7】

治療上有効な量は、選択部位に対して約 1 0 0 0 単位 ~ 約 2 0 0 0 単位である、請求項 1、2 または 4 に記載の方法。

【請求項 3 8】

治療上有効な量は、選択部位に対して約 1 0 0 単位 ~ 約 1 0 , 0 0 0 単位である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 3 9】

治療上有効な量は、選択部位に対して約 5 0 0 単位 ~ 約 5 0 0 0 単位である、請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 4 0】

治療上有効な量は、選択部位に対して約 1 0 0 0 単位 ~ 約 2 0 0 0 単位である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 4 1】

治療上有効な量は、選択部位に対して約 0 . 0 0 1 単位 ~ 約 2 0 0 0 単位である、請求項 1、3 または 5 に記載の方法。

【請求項 4 2】

治療上有効な量は、選択部位に対して約 1 単位 ~ 約 1 0 単位である、請求項 1、3 または 5 に記載の方法。

30

【請求項 4 3】

治療上有効な量は、選択部位に対して約 2 単位 ~ 約 4 単位である、請求項 1、3 または 5 に記載の方法。

【請求項 4 4】

治療上有効な量は、選択部位に対して約 0 . 0 0 1 単位 ~ 約 2 0 0 0 単位である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 4 5】

治療上有効な量は、選択部位に対して約 1 単位 ~ 約 1 0 単位である、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 4 6】

治療上有効な量は、選択部位に対して約 2 単位 ~ 約 4 単位である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 4 7】

選択部位は、睡眠無呼吸及びいびき、側彎、斜視、筋萎縮、筋ジストロフィー、ALS、若しくは重症筋無力症等の神経に損傷を受けた筋肉、筋肉量の減少、または顔面筋の緊張の減少に冒された組織または器官を有する、請求項 1、3 または 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

選択部位は、下部食道括約筋、肛門括約筋、膀胱、膀胱括約筋、膈括約筋、幽門括約筋、上部食道括約筋、結腸壁の筋肉などの組織または器官を有する、請求項 1、3 または 5 に

50

記載の方法。

【請求項 49】

選択部位は、睡眠無呼吸及びいびき、側彎、斜視、筋萎縮、筋ジストロフィー、ALS、若しくは重症筋無力症等の神経に損傷を受けた筋肉、筋肉量の減少、または顔面筋の緊張の減少に冒された組織または器官を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 50】

選択部位は、下部食道括約筋、肛門括約筋、膀胱、膀胱括約筋、膣括約筋、幽門括約筋、上部食道括約筋、結腸壁の筋肉などの組織または器官を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 51】

選択部位は、唾液の生産に影響を与える組織または器官を有し、該唾液の生産に影響を与える器官は、顎下腺、耳下腺、舌下腺、または口腔粘膜の小唾液腺を含む、請求項 1、3 または 5 に記載の方法。 10

【請求項 52】

選択部位は、唾液の生産に影響を与える組織または器官を有し、該唾液の生産に影響を与える器官は、顎下腺、耳下腺、舌下腺、または口腔粘膜の小唾液腺を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 53】

選択部位は、鼻充血、インポテンス、脱毛または低血圧に冒された組織器官を有する、請求項 1、3 または 5 に記載の方法。

【請求項 54】

選択部位は、鼻充血、インポテンス、脱毛または低血圧に冒された組織器官を有する、請求項 8 に記載の方法。 20

【請求項 55】

選択部位は、痙攣性発声障害、片側顔面痙攣及び眼瞼痙攣、下顎関節症候群 (temporal mandibular joint syndrome) 若しくは歯ぎしり、斜頸、頸痛、書痙、四肢筋拘縮 (limb muscle contracture)、筋肉内の神経の再生または片頭痛に冒された組織または器官を有する、請求項 1、2 または 4 に記載の方法。

【請求項 56】

選択部位は、痙攣性発声障害、片側顔面痙攣及び眼瞼痙攣、下顎関節症候群 (temporal mandibular joint syndrome) または歯ぎしり、斜頸、頸痛、書痙、四肢筋拘縮 (limb muscle contracture)、筋肉若しくは片頭痛における神経の再生に冒された組織または器官を有する、請求項 8 に記載の方法。 30

【請求項 57】

選択部位は、気管支痙攣、輪状咽頭痙攣、食道痙攣、アカラシア、肥満、直腸痙攣または裂肛に冒された組織または器官を有する、請求項 1、2 または 4 に記載の方法。

【請求項 58】

選択部位は、気管支痙攣、輪状咽頭痙攣、食道痙攣、アカラシア、肥満、直腸痙攣または裂肛に冒された組織または器官を有する、請求項 8 に記載の方法。 40

【請求項 59】

選択部位は、胃酸、前立腺肥大、鼻漏、唾液分泌、肺粘膜の刺激、乾癬、免疫寛容または免疫反応に冒された組織または器官を有する、請求項 1、2 または 4 に記載の方法。

【請求項 60】

選択部位は、胃酸、前立腺肥大、鼻漏、唾液分泌、肺粘膜の刺激、乾癬、免疫寛容または免疫反応に冒された組織または器官を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 61】

選択部位は、骨粗鬆症またはアンギナに冒された組織または器官を有する、請求項 1、2 または 4 に記載の方法。

【請求項 62】

選択部位は、骨粗鬆症またはアンギナに冒された組織または器官を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 6 3】

選択部位は、毛嚢、前立腺、弛緩した ( l a x ) 結合組織、老化した皮膚、炎症線維、増殖性またはアレルギー疾患における皮膚、皮脂腺、循環系の交感神経、胸腺の免疫応答を制御するニューロン、リンパ節、または神経免疫相互作用を有する組織、皮膚、消化管、扁桃腺、前眼房、胃粘膜、鼻粘膜または翼口蓋神経節を有する、請求項 1、2 または 4 に記載の方法。

【請求項 6 4】

治療上有効な量の破傷風毒素が標的ニューロンの影響を受ける選択部位へのデリバリーを目的とする製薬上許容できる担体中に懸濁されてなり、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位の約 1 0 0 単位 ~ 約 1 0 , 0 0 0 単位である、標的ニューロンの影響を受ける選択部位での動物の神経機能を調節することを目的とする薬剤配合物。 10

【請求項 6 5】

治療上有効な量の破傷風毒素が選択部位へのデリバリーを目的とする製薬上許容できる担体中に懸濁されてなり、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位に対して約 1 0 0 単位 ~ 約 1 0 , 0 0 0 単位である、選択部位での動物の神経機能の活性を抑制することを目的とする薬剤配合物。

【請求項 6 6】

選択部位は、痙攣性発声障害、片側顔面痙攣及び眼瞼痙攣、下顎関節症候群 ( t e m p o r a l m a n d i b u l a r j o i n t s y n d r o m e )、歯ぎしり、斜頸、頸痛、書痙、四肢筋拘縮 ( l i m b m u s c l e c o n t r a c t u r e )、筋肉内の神経の再生、片頭痛、気管支痙攣、輪状咽頭痙攣、食道痙攣、アカラシア、肥満、直腸痙攣、裂肛、胃酸、前立腺肥大、鼻漏、唾液分泌、肺粘膜の刺激、乾癬、免疫寛容または免疫反応、骨粗鬆症またはアンギナに冒された組織または器官を有する、請求項 6 5 に記載の薬剤配合物。 20

【請求項 6 7】

治療上有効な量の破傷風毒素が選択部位へのデリバリーを目的とする製薬上許容できる担体中に懸濁されてなり、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位に対して約 0 . 0 0 1 単位 ~ 約 2 0 0 0 単位である、選択部位での動物の神経機能の活性を向上することを目的とする薬剤配合物。 30

【請求項 6 8】

選択部位は、睡眠無呼吸及びいびき、側彎、斜視、筋萎縮、筋ジストロフィー、A L S、重症筋無力症等の神経に損傷を受けた筋肉、筋肉量の減少、顔面筋の緊張の減少、鼻充血、インポテンス、脱毛または低血圧に冒された組織または器官を有する、請求項 6 7 に記載の薬剤配合物。

【請求項 6 9】

選択部位は、下部食道括約筋、肛門括約筋、膀胱、膀胱括約筋、膣括約筋、幽門括約筋、上部食道括約筋、結腸壁の筋肉などの組織または器官を有する、請求項 6 7 に記載の薬剤配合物。 40

【請求項 7 0】

選択部位は、唾液の生産または鼻粘膜に影響を与える組織または器官を有し、該唾液の生産に影響を与える器官は、顎下腺、耳下腺、舌下腺、または口腔粘膜の小唾液腺を含む、請求項 6 7 に記載の薬剤配合物。

【請求項 7 1】

治療上有効な量の破傷風毒素を動物の臨床的障害または症状に関連する標的ニューロンの影響を受ける選択部位に投与することを有し、この際、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位の約 1 0 0 単位 ~ 約 1 0 , 0 0 0 単位である、動物の臨床的障害または症状の処置方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用。

【請求項 7 2】

動物の臨床的障害または症状に関連する動物の神経機能の活性を抑制するために動物の選択部位に治療上有効な量の破傷風毒素を投与することを有し、この際、破傷風毒素は標的ニューロンによって神経支配される選択部位での神経機能の興奮または可逆的な障害応答を引き起こし、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位の約100単位～約10,000単位である、動物の臨床的障害または症状の処置方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用。

【請求項73】

選択部位は、痙攣性発声障害、片側顔面痙攣及び眼瞼痙攣、下顎関節症候群 ( t e m p o r a l m a n d i b u l a r j o i n s y n d r o m e )、歯ぎしり、斜頸、頸痛、書痙、四肢筋拘縮 ( l i m b m u s c l e c o n t r a c t u r e )、筋肉内の神経の再生、片頭痛、気管支痙攣、輪状咽頭痙攣、食道痙攣、アカラシア、肥満、直腸痙攣、裂肛、胃酸、前立腺肥大、鼻漏、唾液分泌、肺粘膜の刺激、乾癬、免疫寛容または免疫反応、骨粗鬆症またはアングナに冒された組織または器官を有する、請求項72に記載の使用。

10

【請求項74】

動物の臨床的障害または症状に関連する動物の神経機能の活性を向上するために動物の選択部位に治療上有効な量の破傷風毒素を投与することを有し、この際、破傷風毒素は標的ニューロンによって神経支配される選択部位での神経機能の興奮または可逆的な障害応答を引き起こし、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位に対して約0.001単位～約2000単位である、動物の臨床的障害または症状の処置方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用。

20

【請求項75】

選択部位は、睡眠無呼吸及びいびき、側彎、斜視、筋萎縮、筋ジストロフィー、ALS、重症筋無力症等の神経に損傷を受けた筋肉、筋肉量の減少、顔面筋の緊張の減少、鼻充血、インポテンス、脱毛または低血圧に冒された組織または器官を有する、請求項74に記載の使用。

【請求項76】

選択部位は、下部食道括約筋、肛門括約筋、膀胱、膀胱括約筋、膣括約筋、幽門括約筋、上部食道括約筋、結腸壁の筋肉などの組織または器官を有する、請求項74に記載の使用

【請求項77】

選択部位は、唾液の生産または鼻粘膜に影響を与える組織または器官を有し、該唾液の生産に影響を与える器官は、顎下腺、耳下腺、舌下腺、または口腔粘膜の小唾液腺を含む、請求項74に記載の使用

30

【請求項78】

細胞活性がホルモン、神経若しくは血球由来の炎症性モジュレーター、コリン作動性分泌物、呼吸 ( r e s p i r a t o r y g l a n d )、消化若しくは尿腺 ( u r i n a r y g l a n d ) からの粘液分泌物を含む細胞成分の放出を含む、選択部位に治療上有効な量の破傷風毒素を投与することを有する、選択部位での動物の細胞活性の調節方法。

【請求項79】

細胞活性は、マクロファージ、単球、内分泌細胞または腎細胞を含む細胞中で起こる、請求項78に記載の方法。

40

【請求項80】

細胞活性は、約1時間から約1年の期間で調節される、請求項78に記載の方法。

【請求項81】

( i ) 破傷風毒素の投与前に動物の血漿中に存在する破傷風毒素の抗体のレベルを測定し；および

( i i ) 破傷風毒素のレベルが0.1IU/ml未満である際には動物を免疫処置することをさらに有する、請求項78に記載の方法。

【請求項82】

該免疫処置は受動的または能動的に行なわれる、請求項81に記載の方法。

50

## 【請求項 8 3】

血漿中に存在する破傷風毒素の抗体のレベルが抗体価によって測定される、請求項 8 2 に記載の方法。

## 【請求項 8 4】

治療上有効な量の破傷風毒素が注射、局所適用、エアロゾル、管若しくは体の開口部への点滴注入によって、リポソーム若しくは脂質二分子膜を有する人工ベシクル中に封入されて、選択部位にデリバリーされる、請求項 7 8 または 8 1 に記載の方法。

## 【請求項 8 5】

治療上有効な量の破傷風毒素が製薬上許容できる担体中に懸濁される、請求項 7 8 または 8 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 8 6】

破傷風毒素は凍結乾燥粉末の形態を有する、請求項 7 8 または 8 1 に記載の方法。

## 【請求項 8 7】

破傷風毒素の治療上有効な量は、選択部位に対して約 0 . 0 0 1 単位 ~ 約 1 0 , 0 0 0 単位である、請求項 7 8 または 8 1 に記載の方法。

## 【請求項 8 8】

破傷風毒素の治療上有効な量は、選択部位に対して約 1 単位 ~ 約 5 0 0 0 単位である、請求項 7 8 または 8 1 に記載の方法。

## 【請求項 8 9】

破傷風毒素の治療上有効な量は、選択部位に対して約 1 0 単位 ~ 約 1 0 0 0 単位である、請求項 7 8 または 8 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 9 0】

選択部位は、悪性癌腫または炎症状態によって冒された組織または器官を有する、請求項 7 8 または 8 1 に記載の方法。

## 【請求項 9 1】

治療上有効な量の破傷風毒素が選択部位へのデリバリーを目的とする製薬上許容できる担体中に懸濁されてなり、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位に対して約 0 . 0 0 1 単位 ~ 約 1 0 , 0 0 0 単位である、動物の細胞の細胞活性を調節することを目的とする薬剤配合物。

## 【請求項 9 2】

破傷風毒素の治療上有効な量は、選択部位に対して約 1 単位 ~ 約 5 0 0 0 単位である、請求項 9 0 に記載の薬剤配合物。

30

## 【請求項 9 3】

破傷風毒素の治療上有効な量は、選択部位に対して約 1 0 単位 ~ 約 1 0 0 0 単位である、請求項 9 0 に記載の薬剤配合物。

## 【請求項 9 4】

選択部位は、悪性癌腫または炎症状態によって冒された組織または器官を有する、請求項 9 0 に記載の薬剤配合物。

## 【請求項 9 5】

選択部位での動物の細胞活性を調節するために治療上有効な量の破傷風毒素を投与することを有し、該細胞活性はホルモン、神経若しくは血球由来の炎症性モジュレーター、コリン作動性分泌物、呼吸 ( r e s p i r a t o r y g l a n d ) 、消化若しくは尿腺 ( u r i n a r y g l a n d ) からの粘液分泌物を含む細胞成分の放出を含み、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位に対して約 0 . 0 0 1 単位 ~ 約 1 0 , 0 0 0 単位である、動物の臨床的障害または症状を効果的に処置する方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用。

40

## 【請求項 9 6】

選択部位での動物の細胞活性を調節するために治療上有効な量の破傷風毒素を投与することを有し、該細胞活性はホルモン、神経若しくは血球由来の炎症性モジュレーター、コリン作動性分泌物、呼吸 ( r e s p i r a t o r y g l a n d ) 、消化若しくは尿腺 ( u

50



rinary gland)からの粘液分泌物を含む細胞成分の放出を含み、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位に対して約1単位～約5,000単位である、動物の臨床的障害または症状を効果的に処置する方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用。

【請求項97】

破傷風毒素の治療上有効な量は、選択部位に対して約10単位～約1000単位である、請求項95に記載の使用。

【請求項98】

選択部位は、悪性癌腫または炎症状態によって冒された組織または器官を有する、請求項95に記載の使用。

10

【請求項99】

動物の選択部位に製薬上許容できる担体中に懸濁された破傷風毒素を投与することを有し、該破傷風毒素は痛みに関連する炎症性神経伝達物質若しくは神経ペプチドの放出を抑制する若しくは可逆的に阻害するのにまたは選択部位から中枢神経系への痛みの感覚の伝達を防止するのに十分な治療上有効な量である、動物によって経験される痛みの軽減方法。

【請求項100】

動物の選択部位を制御する炎症性神経伝達物質若しくは神経ペプチドの放出に影響を与える感覚ニューロンを神経支配除去する(denervate)のにまたは選択部位から中枢神経系への痛みの感覚の伝達を防止するのに十分な治療上有効な量の破傷風毒素を動物の選択部位に投与することを有する、動物によって経験される痛みの軽減方法。

20

【請求項101】

選択された筋肉の神経活性の増加または興奮応答を引き起こすのに十分な薬学上有効な量の破傷風毒素を筋肉の選択部位に投与することを有する、動物の筋肉量の増加方法。

【請求項102】

選択された筋肉は、骨格または平滑筋である、請求項101に記載の方法。

【請求項103】

実施例を参照しながら本明細書中で実質的に記載されるものである、動物の臨床的障害または症状を効果的に処置する方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用。

【請求項104】

実施例を参照しながら本明細書中で実質的に記載されるものである、動物の神経機能または非神経性細胞活性の調節方法。

30

【請求項105】

実施例を参照しながら本明細書中で実質的に記載されるものである、動物の神経機能または非神経性細胞活性の調節を目的とする薬剤配合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、概括的には、選択部位での、哺乳動物などの、動物の神経機能の調節方法に関するものである。本発明はまた、概括的には、選択部位での動物の他の非神経性細胞活性の調節方法に関するものである。本発明はまた、選択部位での動物の神経機能または非神経機能の調節を目的とする薬剤配合物を包含する。本発明はまた、動物の臨床的障害または症状の処置方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用に関するものである。

40

【0002】

発明の背景

クロストリジウムの神経毒は、人で知られている最も強力な毒素である。クロストリジウム・ボツリナム(Clostridium botulinum)菌を経口で摂取すると、ボツリヌス毒素(BT)を産生する。BTは、胃腸管から吸収されて、体中の筋肉に循環系によって輸送される。BTは、運動ニューロンに結合して運動ニューロンからの神経筋伝達を遮断し、ボツリヌス中毒として知られる致命的な麻痺を引き起こす。

50

## 【0003】

B Tの異常な性状の一としては、その作用は数ヶ月間継続するが患者は完全に回復することがある。このような独特な性状の結果、B Tは多くの臨床用途を有する。現在、少ない投与量のB Tの局所注射を用いて、広範な様々な臨床的な運動不全における筋肉の活性を抑制または遮断する。より近年では、B Tの使用は、神経筋伝達に使用される同じ神経伝達物質、すなわち、アセチルコリンを用いる自律神経の遮断にまで拡張されてきた。

## 【0004】

クロストリジウム細菌の他のクラスには、破傷風菌 (*Clostridia tetani*) がある。これらの細菌は、傷に感染して、破傷風毒素を産生する。破傷風毒素 (T T) は、感染部位から放出されて、体中の運動ニューロンにまで循環系によって運ばれる。運動ニューロンに直接作用せずに、破傷風毒素は、一般的に運動ニューロン活性を阻害するニューロンを遮断する中枢神経系に運ばれる。この結果、罹患筋肉で徐々に緊張が増し、ついに体中の筋肉の広範な痙攣が起こる。このような痙攣性麻痺は、しばしば致命的であり、呼吸抑制または循環虚脱から死に至る。

10

## 【0005】

破傷風は古来より疾患として認識されており、これは依然として世界中で共通である。多くの国では、抗原性を維持しつつ生物学的活性を除去するためにホルムアルデヒドに暴露する弱毒化形態の毒素である、破傷風毒素を子供に定常的にワクチン接種している。破傷風毒素は、製薬工業において最大の生物学的製剤である。

## 【0006】

破傷風毒素の作用は数週間から数ヶ月まで継続する。T Tがいったんニューロンシナプスに入り、これからの神経伝達を遮断した後は、このプロセスは可逆的である。機能の回復には、運動ニューロンに最終的に再度連結して、阻害活性を正常なレベルにまで回復する、ニューロンからの新たなプロセスの成長が必要である。この回復に必要な時間は数週間から5ヶ月までの範囲である (Struppler, A., et al. Arch Neurol, 8, 162 - 1782, (1963))。

20

## 【0007】

T T作用の非常に広い範囲によって、一回の注射によって長期間神経系のいずれかの部分を実際興奮または阻害できる。神経系はほとんどすべての器官及び生理学的機能を厳密にモニターし、制御するので、予想されなかったことに、T Tは広範な様々な臨床的障害の処置または軽減に対して非常に有益な用途を有しうることが分かった。

30

## 【0008】

破傷風は骨格筋の進行性痙攣性収縮及びしばしば致命的である自律神経系の過活動という特徴のある破傷風毒素による全身性の中毒である。

## 【0009】

全身性の疾患以外に、3種のより知られていない変異体または破傷風が知られている。これらは、新生児、頭部及び局所破傷風である。新生児破傷風は、全身性の弛緩麻痺として現れる新生児の致命的な中毒である。頭部破傷風は、顔面で起こり、周辺領域が筋痙攣すると共に、局所的な麻痺、最もしばしば顔面神経の麻痺を合併する (Dastur, F. D., et al., Journal Of Neurology, Neurosurgery And Psychiatry 40(8), 782 - 6 (1977))。局所性破傷風は、全身性破傷風に進行するまたは数週間から数ヶ月で消散するかもしれない筋肉群または四肢の隔離された痙攣である (Johns Hopkins Medical Journal, 149(2) 84 - 8, (1981); Jain, S., et al., Journal Of Neurology, 228(4), 289 - 93, (1982))。

40

## 【0010】

破傷風毒素は、すべての生物学的毒素のうち恐らく最も研究されたある独特な特性を有する。例えば、破傷風毒素は、すべての型のニューロンに結合する。その主な親和性は運動ニューロンに結合するものであるが、T Tは自律神経系のニューロン及び感覚ニューロン

50

にも結合する (Stockel, K., et al., Brain Research, 99, 1-16 (1975))。これに対して、ボツリヌス毒素は主に運動ニューロンに結合する。

【0011】

破傷風毒素は、ニューロンでその効果を起こすのに多数の特定の段階を必要とする。これらの段階としては、(i)末梢結合(peripheral binding); (ii)インターナリゼーション; (iii)逆行性輸送; (iv)中枢結合(central binding); 及び(v)膜内外インターナリゼーションが挙げられる。

【0012】

末梢結合では、毒素は細胞の表面に結合する。TTは、ほとんどすべてのニューロンのシナプス前膜に結合する。加えて、これは、ニューロン軸索の膜にも結合する。TTが結合する受容体はグングリオシドとして知られている分子のクラスである。BTもグングリオシドに結合するが、BTはコリン作動性ニューロンのシナプス前膜上のものに主に結合すると考えられるが、TTはすべてではないとしてもほとんどのニューロンのシナプス前膜に結合する。

10

【0013】

インターナリゼーション段階では、毒素は細胞中に運ばれる。TTはベシクルを形成するプロセスによってニューロン中に運ばれる。TTは、物理的にはニューロン内であるが、ベシクル内に維持されながら、毒素は膜によってニューロンの細胞質から分離される。これに対して、BTでは、インターナリゼーションされる前にシナプス前膜上の第二の分子がこれに結合する必要があると考えられる。BTが第二の分子に結合した後は、細胞膜を介して細胞質中を直接通り、これが末梢シナプス前膜で効果を発揮する理由である。

20

【0014】

逆行性輸送中、TTを含むベシクルは中枢神経系において細胞体に輸送される。次に、ベシクルは、細胞体またはその樹状突起の細胞膜と融合することにより、TTを運動ニューロンに接合する(synapsing)他のニューロンのプロセスで運動ニューロン間の細胞外空間中に蓄積する(Hilbig, G., K.O. Raker, et al., Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology, 307(3), 287-90, 1979)。

【0015】

中枢結合段階では、TTはすべてのニューロンに結合できる。しかしながら、TTは、抑制性ニューロンに対して非常により大きな親和性を有する。低濃度では、破傷風は、抑制性神経伝達物質であるGABA及びグリシンを使用するニューロンに対してより大きな親和性を有する(Montecucco, C., et al., Q Rev Biophys, 28(4), 423-72, (1995))。より高い濃度では、これはすべての神経伝達物質を遮断する。最終的に、破傷風毒素は、活動電位の伝達の局所的な遮断を引き起こす軸索への局所的な効果を有する。このメカニズムは不明であるが、結果が局所麻酔薬の作用と同様である。

30

【0016】

膜内外インターナリゼーション中は、毒素が第二のニューロンに結合したら、インターナリゼーションが起こり、その毒性効果が生じる。

40

【0017】

TTの作用の一次メカニズムは、細胞からのベシクルの放出を遮断することである。ニューロンでは、これらのベシクルは、神経伝達物質を含む。細胞の内膜へのベシクルの結合に係わるタンパク質は、SNARE(シナプトソーム関連タンパク質受容体(synaptosome associate protein receptor))群のタンパク質である。これらのタンパク質は、細胞内ベシクルが細胞膜にドッキングしてその内容物を放出するメカニズムの一部である。詳細には、破傷風毒素がVAMP(ベシクル関連膜タンパク質(vesicle associated membrane protein))を切断する。ボツリヌス毒素A及びEはSNAP-25を切断する;さらに、ボツリヌ

50

ス毒素CはSNAP-25及びシンタキシン(syntaxin)を切断する；破傷風毒素及びボツリヌス神経毒タイプB、D、F及びGはVAMP、シナプスベシクルを含む神経伝達物質の内在性タンパク質(integral protein)を切断する。

【0018】

ベシクル放出のメカニズムは、酵母由来のすべての細胞からヒトの細胞まで共通である。TT分子は、特定の結合及び輸送特性に応答できる重鎖、ならびにVAMPタンパク質への触媒作用を実際行なう軽鎖から構成される。TTがその作用を開始、実施できる非ニューロン細胞は数種であり、これらは実施例で討論されるであろう。

【0019】

多数の実験から、TTがある型の細胞中に結合、進入できない場合であっても、様々なメカニズムによって挿入できることが示された。細胞内に一旦入ると、TTはVAMPを切断して、ベシクルの放出をできなくする。異なる細胞は、ホルモン、神経ペプチド、リゾチームタンパク質、及び他の物質を分泌するメカニズムを使用する。特定の物質が細胞によって分泌される場合には、これは、分泌がVAMPタンパク質の使用を必要とする際にはTTによって遮断されるであろう。

【0020】

細胞は、細胞膜の外表面にガングリオシドを配置することによってTTに対して感受性になりうる。細胞中へのTTの他の挿入方法としては、TT、または最小限ではその軽鎖を、細胞に結合できる第2の分子と化学的に結合することによるものがある。加えて、TTは、マイクロピペットを用いた微量注入、加圧注入によって、リソソーム中への取り込みによって、または一時的に細胞膜をTTに浸透できるようにすることによって挿入できる。

【0021】

運動ニューロンはTT毒性の一次ターゲットである。運動ニューロンは、骨格筋の大きな錘外筋線維を神経支配する(innervate)コリン作動性ニューロンを意味する。骨格筋内にはより小さな錘内筋線維があり、これらはガンマニューロンと呼ばれるより小さなコリン作動性運動ニューロンによって神経支配される(innervated)。これらはまた、TTによって中毒にかかる(intoxicated)。最後に、平滑筋もまたコリン作動性ニューロンによって神経支配される。非常に多数のこれらのニューロンがコリン作動性であり、自律神経系の一部であると形式的に考えられるものの、特定の生物学的に同様の性質を有するため、討論では他の運動ニューロンと一緒にグループ分けされることもある。TTは、横紋筋線維に対するのと同様にして平滑筋の運動ニューロンに結合し、これを中毒にかける(intoxicate)ことが示された。

【0022】

高い投与量では、TTは、興奮性及び抑制性軸索双方からのすべての求心性インプットを遮断することによって神経筋接合部で、末梢において、及び中枢作用的に(centrally)双方で運動ニューロン活性を遮断することによって弛緩麻痺を引き起こすことができる。これらの2領域のうちどちらが中毒の所望の場合において優勢であるかは、TT感染がどこにあるかおよびどのようにして進行するかに依存する。

【0023】

頭部破傷風では、TTの3種の作用すべてが一緒に起こりうる。感染の部位では、筋肉がTTレベルが高くなるにつれて、弛緩麻痺を示し、神経筋シナプスが直接遮断される。加えて、高レベルの毒素が脳幹に運ばれて、中枢神経系のインプットを遮断する。しかしながら、感染の部位周辺の様々な距離では、TTの濃度が筋肉が痙攣している領域が見られるまで低下する(Dastur, F. D., et al., Journal Of Neurology, Neurosurgery And Psychiatry 40(8), 782-6 (1977))。

【0024】

破傷風毒素は、重量によって、またはより一般的には、生物学的アッセイによって、測定できる。破傷風の有効投与量は、単位、皮下注射された際に50%のマウスが死ぬ破傷風毒素の量で測定される。破傷風毒素の一単位は、1kgのマウスの体重当たり0.1~1

00 ngの毒素の範囲でありうる。マウスの半横隔膜アッセイ (mouse hemidiaphragm assay) では、500倍高い量の破傷風毒素が弛緩麻痺を引き起こすのに必要である (Bigalke, H. et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 312(3), 255-63, (1980))。したがって、等重量では、ボツリヌス毒素は弛緩麻痺を起こすが、破傷風毒素は痙性麻痺を起こすと予想される。

#### 【0025】

破傷風毒素は、運動ニューロンでのと同じ効果を自律性ニューロンで有する (Abboud, F.M., Hypertension, 4(3 Pt 2), 208-25, (1982))。全身性の破傷風では、自律神経系の興奮が顕著であり、高血圧 (Toritya, Y., I. et al., Endodontics And Dental Traumatology, 13(1), 6-12, (1997))、血圧の不規則な変化、高熱、及び大量の発汗などの症状で現われる。したがって、低濃度では、自律性の緊張が増し、生理学的な変化によりすべての器官が罹患する。

10

#### 【0026】

自律神経系は、神経伝達物質としてアセチルコリンを使用する副交感神経系及び神経伝達物質としてエピネフリンを使用する交感神経系に分かれる。副交感神経及び交感神経双方において、ニューロンは、中枢神経系から末梢器官までの全距離に到達しない。その代わりに、距離は、末梢でのどこかのシナプスを有する2個のニューロンを必要とする。交感神経系では、これらは、脊柱付近に位置する限られた数の大きな神経節中に一緒に集まる。副交感神経器官では、シナプスは、一般的に、標的器官付近のより小さな神経節中に位置する。双方の系において、神経節シナプス中で使用される神経伝達物質は、常に、アセチルコリンである。

20

#### 【0027】

交感神経系の末梢ニューロンはすべて神経伝達物質としてノルエピネフリンを使用してもよいが、標的器官細胞の応答は受容体の型に依存する。アドレナリン受容体には3種の型がある：アルファ (平滑筋の収縮)、ベータ1 (心臓の一過性頻脈及び脂肪酸の可動化 (mobilization)) 及びベータ2 (平滑筋の弛緩)。ノルエピネフリンの正確な効果は、表面で見出される受容体の型に基づいて異なる筋肉では完全に相対することに留意する。この情報の多くは、臨床的に関連のあるほとんどの器官で知られている。

30

#### 【0028】

神経節及び多数の神経伝達物質の存在は、運動系に対する自律神経系の複雑さを増加する。器官は、一般的に、副交感及び交感ニューロンによって神経支配され、これらは、一般的に、標的で反対の作用を有する。したがって、標的器官の解剖学及び生理学の理解は、所望の効果を達成しようとするために、TT注射の位置を計画するのに重要である。

#### 【0029】

感覚ニューロンは破傷風毒素によっても遮断されうる。感覚ニューロパシーは、臨床的な破傷風の症候群の一部である。クロストリジウムによる破傷風感染の一つの態様としては、感染部位での痛み及び炎症がこのような重篤な感染症で予想されるのよりかなり低いことがある。したがって、TTは感覚ニューロンを遮断すると考えられる。

40

#### 【0030】

シナプス連結を介して他のニューロンと直接連絡するのに一般的に使用される、神経伝達物質に加えて、ニューロンは、運動、感覚及び自律神経から神経ペプチドを放出する (SP、物質P; NKA、ニューロキニンA (neurokinin A); CGRP、カルシトニン遺伝子関連ペプチド; NPY、神経ペプチド; Y、インターロイキン及び成長因子)。これらの神経ペプチドは多くの異なる効果を有するが、最も重要なものの一つとして血管拡張及び炎症がある (Bigalke, H. et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 312(3), 255-63, (1980))。これらの神経ペプチドは神経伝達物質と同様のベシクルメカニズムによって放出されるため、TTによって遮断されうる。

50

## 【0031】

S N A R E タンパク質及びベシクル放出メカニズムは、神経伝達物質の放出以外の目的で細胞に使用される。事実、ほとんどすべての細胞分泌物の放出はこのメカニズムに依存する。これらとしては、ホルモン、酵素、及び炎症調節剤、呼吸、消化または尿腺からの粘液分泌物、ならびに神経及び白血球由来の炎症調節剤などが挙げられる ( Alexander, E. A., et al., American Journal of Physiology, 273 (6 Pt 2), F1054-7 (1997))。破傷風毒素を内在化することが知られる細胞としては、マクロファージ、内分泌細胞、及び腎細胞が挙げられる (Huet de la Tour, E., et al., Journal Of The Neurological Sciences, 40 (2-3), 123-31, (1979))。 10

## 【0032】

S N A R E タンパク質へのこれらの効果に加えて、クロストリジウムの毒素は他の細胞活性を妨げることが示された。例えば、これはアクチン分子がフィラメントを形成するのを防止する。アクチンは、細胞の形状及び移動に関わる主要な細胞骨格タンパク質である。この作用は、筋細胞の収縮を遮断でき、さらに白血球及び恐らく悪性細胞の移動を止めることができる。この毒素はまた、細胞のシグナル伝達 ( signaling ) をも妨げる。詳しくは、細胞表面上の受容体は、2次タンパク質のカスケードを促進することによって特定の分子に应答し、さらに、これにより分泌物の形態の変化から様々な細胞の機能が生じる。 20

## 【0033】

" O p h t h a l m i c a n d R e c o n s t r u c t i v e S u r g e r y " , 16 ( 2 ) , 101 - 13 , ( 2000 ) において、Fezza J. P. et al. は、免疫処置されたウサギで全身性のテタニーを生じずに極在化した眼輪筋を生じるのに破傷風毒素を使用することを開示する。眼瞼痙攣及び片側顔面痙攣の処置における破傷風毒素の潜在的な用途は投与量に関する詳細な情報またはこれらの状態を処置するのに破傷風毒素を使用しようと探索する当業者に有用である他の記載なく、示唆される。

## 【0034】

F o s t e r e t a l . の米国特許第 5 , 9 8 9 , 5 4 5 号には、痛みの処置を目的とする薬剤としてクロストリジウムの神経毒自体または他の成分に結合したクロストリジウムの神経毒の軽鎖の使用が記載される。F o s t e r e t a l . は、破傷風毒素の完全な分子の使用を開示していない。 30

## 【0035】

B i n d e r の米国特許第 5 , 7 1 4 , 4 6 8 号には、片頭痛の痛みの軽減に破傷風毒素の断片を使用することが記載される。B i n d e r 米国特許第 5 , 6 7 0 , 4 8 4 号には、ポツリヌス A 及び破傷風毒素による細胞増殖性の皮膚疾患 ( c u t a n e o u s c e l l - p r o l i f e r a t i v e d i s o r d e r ) の処置方法が開示される。双方の特許では、B i n d e r は、B T で使用するのと同様の T T 投与量を使用する。さらに、彼は、T T が彼の特許で開示される投与量では毒性が強すぎることを見出したため、有益な目的での T T の使用に反対している。 40

## 【0036】

S a n d e r s e t a l . の米国特許第 5 , 7 6 6 , 6 0 5 には、治療上有効な量のポツリヌス毒素を哺乳動物に投与することによる哺乳動物の自律神経機能の制御が記載される。破傷風毒素の開示はない。

## 【0037】

運動、自律及び感覚ニューロンへの神経毒の明らかな効果にもかかわらず、ヒトを含む、動物におけるこのような毒素、特に破傷風毒素の使用は制限されており、臨床用途には使用されてはいなかった。ゆえに、患者の選択部位での神経活性を向上または抑制しうる破傷風毒素による患者の処置方法に対する医療分野における必要性は依然としてある。同様にして、炎症状態等の、不適切な細胞活性によって引き起こされる臨床疾患の処置への破 50

傷風毒素の使用法に対する医療分野における必要性もまた依然としてある。さらに、依存性、耐薬性、及びより公知の薬剤と関連する副作用を排除しまたは最小限にしつつ、臨床上有益な結果を達成するまたは特定の機能不全を処置するために患者にデリバリーされる薬剤配合物に対する必要性が依然としてある。

【0038】

発明の目的

本発明の目的は、動物において、特に哺乳動物において及びより特にヒトにおいて有益な効果を達成するための破傷風毒素の使用法を提供することである。

【0039】

本発明の目的は、動物における、特に哺乳動物における及びより特にヒトにおける神経筋の機能不全の処置を提供することである。 10

【0040】

本発明の目的は、動物における、特に哺乳動物における及びより特にヒトにおける自律神経の機能不全の処置を提供することである。

【0041】

本発明の他の目的は、動物における、特に哺乳動物における及びより特にヒトにおける感覚機能を制御することである。

【0042】

本発明の目的は、動物における、特に哺乳動物における及びより特にヒトにおける神経の機能を調節または制御することである。 20

【0043】

本発明の他の目的は、動物における、特に哺乳動物における及びより特にヒトにおける非神経細胞活性を調節するのに破傷風毒素を使用することである。

【0044】

発明の要約

上記目的及び他の点で、本発明は、部分的に、破傷風毒素が標的ニューロンの活性を可逆的に調節するように、治療上有効な量の破傷風毒素を動物の標的ニューロンの影響を受ける選択部位に投与することを有する、選択部位での動物の神経機能の調節方法に関するものである。

【0045】

本発明の一態様においては、治療上有効な量の破傷風毒素は、選択部位での神経活性の減少または神経活性の可逆的な障害応答を引き起こすのに十分である。 30

【0046】

本発明の他の態様においては、治療上有効な量の破傷風毒素は、選択部位での標的ニューロン活性の増加または神経活性の興奮応答を引き起こすのに十分である。

【0047】

他の実施態様においては、本発明はさらに、標的ニューロンの神経支配除去を引き起こすのに十分な量の破傷風毒素を動物の標的ニューロンが影響を及ぼす選択部位に投与することを有し、該神経支配除去により標的ニューロンによって神経支配される選択部位での神経機能の可逆的な障害応答が起こるものである、動物の神経機能の活性の抑制方法に関するものである。 40

【0048】

さらに他の実施態様においては、本発明は、標的ニューロンによって神経支配される選択部位での神経機能の興奮応答を引き起こすのに十分な量の破傷風毒素を動物の標的ニューロンが影響を及ぼす選択部位に投与することを有する動物の神経機能の活性の向上方法に関するものである。

【0049】

他の態様においては、本発明は、神経機能を制御するために治療上有効な量の破傷風毒素を選択部位に投与することを有する、動物における、特に哺乳動物における及びより特にヒトにおける神経機能の制御方法に関するものである。 50

## 【0050】

前記方法のそれぞれを含む本発明の特定の実施態様においては、神経活性の抑制または向上は、約1時間から約1年の期間で起こる。特定の好ましい実施態様においては、神経活性の抑制または向上は、約1週間から約4ヶ月の期間で起こる。

## 【0051】

前記方法のそれぞれの実施態様においては、前記方法のそれぞれは、(i)破傷風毒素の投与前に動物の血漿中に存在する破傷風毒素の抗体のレベルを測定し；および(ii)破傷風毒素のレベルが0.1 IU/ml未満である際には動物を免疫処置することをさらに有する。免疫処置段階は、受動的または能動的に行なわれる。血漿中に存在する破傷風毒素の抗体のレベルは、抗体価または当該分野において既知の他の適切な方法によって測定される。

10

## 【0052】

前記方法の各実施態様においては、治療上有効な量の破傷風毒素は、注射、局所適用、エアロゾル、または管若しくは体の開口部への点滴注入によって選択部位にデリバリーされる。前記方法の特定の好ましい実施態様においては、治療上有効な量の破傷風毒素は、リポソームまたは脂質二分子膜を有する人工ベシクル中に封入されて標的ニューロン中にデリバリーされる。

## 【0053】

前記方法のそれぞれの実施態様においては、治療上有効な量の破傷風毒素は、製薬上許容できる担体中に懸濁される。

20

## 【0054】

前記方法のそれぞれの他の好ましい実施態様においては、破傷風毒素は、凍結乾燥粉末の形態を有する。

## 【0055】

前記方法のそれぞれの各前記実施態様においては、標的ニューロンは、運動ニューロン、自律性ニューロン、及び感覚ニューロンまたは中枢神経性のニューロンを包含する。

## 【0056】

前記方法のそれぞれの実施態様においては、標的ニューロンの活性は、神経伝達物質または神経ペプチドの放出を直接的にまたは間接的に阻害することによって影響を受ける。

30

## 【0057】

標的ニューロンの神経活性が可逆的に阻害されるまたは標的ニューロンが神経支配除去される本発明の特定の好ましい実施態様においては、TTの治療上有効な量は、選択部位に対して約100単位～約10,000単位である。

## 【0058】

標的ニューロンの神経活性が破傷風毒素の投与によって可逆的に阻害されるまたは標的ニューロンが神経支配除去される他のより好ましい実施態様においては、TTの治療上有効な量は、選択部位に対して約500単位～約5000単位である。

## 【0059】

標的ニューロンの神経活性を可逆的に阻害するまたは標的ニューロンを神経支配除去する前記方法のそれぞれの他の最も好ましい実施態様においては、TTの治療上有効な量は、選択部位に対して約1000単位～約2000単位である。

40

## 【0060】

破傷風毒素の投与によって標的ニューロンの神経活性が向上するまたは標的ニューロンによって神経支配される選択部位での神経機能の興奮応答が起こる、前記方法のそれぞれの特定の他の好ましい実施態様においては、TTの治療上有効な量は、選択部位に対して約0.01単位～約2000単位である。前記方法のそれぞれの特定のより好ましい実施態様においては、治療上有効な量は、選択部位に対して約1単位～約10単位である。前記方法の特定の最も好ましい実施態様においては、治療上有効な量は、選択部位に対して約2単位～約4単位である。

50



## 【0061】

前記方法のそれぞれの特定の他の実施態様においては、破傷風毒素が選択部位に投与されると、骨格筋の組織または器官と関連する標的ニューロンでの興奮応答が誘発される。これらの前記した実施態様では、適用可能な臨床疾患としては、以下に制限されないが、睡眠無呼吸及びいびき、側彎、斜視、筋萎縮、筋ジストロフィー、ALS、若しくは重症筋無力症等の神経に損傷を受けた筋肉、筋肉量の減少、または顔面筋の緊張の減少が挙げられる。

## 【0062】

前記方法のそれぞれの他の実施態様においては、TTが投与されると、以下に制限されないが、下部食道括約筋、肛門括約筋、膀胱、膀胱括約筋、膣括約筋、幽門括約筋、上部食道括約筋、結腸壁の筋肉などの組織または器官などの平滑筋での神経活性の興奮応答が誘発される。

10

## 【0063】

本発明の方法が自律副交感神経系の標的ニューロンの興奮応答を誘発するTTの投与を含む、本発明の他の実施態様においては、選択部位としては、唾液の生産に影響を与える組織または器官があり、当該唾液の生産に影響を与える器官としては、顎下腺、耳下腺、舌下腺、または口腔粘膜の小唾液腺が挙げられる。

## 【0064】

本発明の方法が自律交感神経系の標的ニューロンの興奮応答を誘発するTTの投与を含む、本発明のさらなる他の実施態様においては、選択部位は、鼻充血、インポテンス、脱毛または低血圧に冒された組織器官を有する。

20

## 【0065】

前記方法の特定の他の実施態様においては、痙攣性発声障害、片側顔面痙攣及び眼瞼痙攣、下顎関節症候群(temporal mandibular joint syndrome)若しくは歯ぎしり、斜頸、頸痛、書痙、四肢筋拘縮(limb muscle contracture)、筋肉内の神経の再生または片頭痛に冒された組織または器官などの選択部位での可逆的な阻害応答を誘発するために、破傷風毒素が骨格筋に投与される。適用可能な骨格筋としては、声帯ひだ、顔面筋、咬筋、胸鎖乳突筋、僧帽筋、前腕筋、四肢の筋肉、側頭筋及び他の不特定の筋肉が挙げられる。

## 【0066】

TTの投与が可逆的な阻害応答を誘発するものである、前記方法の他の実施態様においては、破傷風毒素は、気管支痙攣、輪状咽頭痙攣、食道痙攣、アカラシア、肥満、直腸痙攣または裂肛に冒された平滑筋の組織または器官などの他の選択部位に投与される。筋肉としては、肺の平滑筋、輪状咽頭筋(cricopharyngeus muscle)、食道、下部食道括約筋、胃壁筋、結腸壁の筋肉及び括約筋が挙げられる。

30

## 【0067】

前記方法のさらなる他の実施態様においては、破傷風毒素は、胃酸、前立腺肥大、鼻漏、唾液分泌、肺粘膜の刺激、乾癬、免疫寛容または免疫反応に冒された組織または器官などの選択部位で投与されることによって可逆的な阻害応答を誘発する。前記実施態様において、適用できる標的ニューロンは、自律副交感神経系の一部であり、これとしては、胃神経の供給、前立腺、鼻腔内粘膜、肺粘膜、顎下腺、皮膚及び胸腺が挙げられる。前記方法の特定の他の実施態様においては、TTの適用の他の選択部位として、骨粗鬆症または骨、冠状動脈及び心筋等のアンギナに冒された組織または器官が挙げられる。

40

## 【0068】

前記方法のそれぞれの特定の他の実施態様においては、TTは、1:200,000~約1:100,000の量で選択部位の標的ニューロンに血管収縮薬と共に投与されうる。血管収縮薬は、破傷風毒素の投与の前に、これと同時にまたはこの直後に投与されてもよい。本発明に使用できる血管収縮薬としては、以下に制限されないが、エピネフリン、ノルエピネフリン、またはエピネフリルボレート(epinephryl borate)が挙げられる。

50

## 【0069】

他の態様においては、本発明は、治療上有効な量の破傷風毒素が標的ニューロンの影響を受ける選択部位へのデリバリーを目的とする製薬上許容できる担体中に懸濁されてなり、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位に対して約100単位～約10,000単位である、標的ニューロンの影響を受ける選択部位での動物の神経機能を調節することを目的とする薬剤配合物に関するものである。

## 【0070】

他の態様においては、本発明は、治療上有効な量の破傷風毒素が選択部位へのデリバリーを目的とする製薬上許容できる担体中に懸濁されてなり、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位に対して約100単位～約10,000単位である、選択部位での動物の神経機能の活性を抑制することを目的とする薬剤配合物に関するものである。前記実施態様において、選択部位としては、痙攣性発声障害、片側顔面痙攣及び眼瞼痙攣、下顎関節症候群 (temporal mandibular joint syndrome)、歯ぎしり、斜頸、頸痛、書痙、四肢筋拘縮 (limb muscle contracture)、片頭痛、気管支痙攣、輪状咽頭痙攣、食道痙攣、アカラシア、肥満、直腸痙攣、裂肛、胃酸、前立腺肥大、鼻漏、唾液分泌、肺粘膜の刺激、乾癬、免疫寛容または免疫反応、骨粗鬆症またはアンギナに冒された組織または器官が挙げられる。

10

## 【0071】

さらに他の態様においては、本発明は、治療上有効な量の破傷風毒素が選択部位へのデリバリーを目的とする製薬上許容できる担体中に懸濁されてなり、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位に対して約0.001単位～約2000単位である、選択部位での動物の神経機能の活性を向上することを目的とする薬剤配合物に関するものである。この実施態様の薬剤配合物に関する選択部位は、睡眠無呼吸及びいびき、側彎、斜視、筋萎縮、筋ジストロフィー、ALS、重症筋無力症等の神経に損傷を受けた筋肉、筋肉量の減少、顔面筋の緊張の減少、鼻充血、インポテンス、脱毛または低血圧に冒された組織または器官を有する。この実施態様の薬剤配合物に関する他の選択部位としては、下部食道括約筋、肛門括約筋、膀胱、膀胱括約筋、膈括約筋、幽門括約筋、上部食道括約筋、結腸壁の筋肉などの組織または器官が挙げられる。この実施態様の薬剤配合物に関する他の選択部位としては、唾液の生産または鼻粘膜に影響を与える組織または器官が挙げられ、上記唾液の生産に影響を与える器官は、顎下腺、耳下腺、舌下腺、または口腔粘膜の小唾液腺を含む。

20

30

## 【0072】

本発明はさらに、治療上有効な量の破傷風毒素を動物の臨床的障害または症状に関連する標的ニューロンの影響を受ける選択部位に投与することを有し、この際、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位の約100単位～約10,000単位である、動物の臨床的障害または症状の処置方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用に関するものである。

## 【0073】

本発明の他の態様は、動物の臨床的障害または症状に関連する動物の神経機能の活性を抑制するために動物の選択部位に治療上有効な量の破傷風毒素を投与することを有し、この際、破傷風毒素は標的ニューロンによって神経支配される選択部位での神経機能の興奮または可逆的な阻害応答を引き起こし、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位の約100単位～約10,000単位である、動物の臨床的障害または症状の処置方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用に関するものである。本発明のこの態様において、選択部位は、痙攣性発声障害、片側顔面痙攣及び眼瞼痙攣、下顎関節症候群 (temporal mandibular joint syndrome)、歯ぎしり、斜頸、頸痛、書痙、四肢筋拘縮 (limb muscle contracture)、筋肉内の神経の再生、片頭痛、気管支痙攣、輪状咽頭痙攣、食道痙攣、アカラシア、肥満、直腸痙攣、裂肛、胃酸、前立腺肥大、鼻漏、唾液分泌、肺粘膜の刺激、乾癬、免疫寛容または免疫反応、骨粗鬆症またはアンギナに冒された組織または器官を有する。

40

## 【0074】

50

さらなる他の態様においては、本発明は、動物の臨床的障害または症状に関連する動物の神経機能の活性を向上するために動物の選択部位に治療上有効な量の破傷風毒素を投与することを有し、この際、破傷風毒素は標的ニューロンによって神経支配される選択部位での神経機能の興奮または可逆的な障害応答を引き起こし、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位の約0.001単位～約2000単位である、動物の臨床的障害または症状の処置方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用に関するものである。本発明のこの実施態様において、選択部位は、睡眠無呼吸及びいびき、側彎、斜視、筋萎縮、筋ジストロフィー、ALS、重症筋無力症等の神経に損傷を受けた筋肉、筋肉量の減少、顔面筋の緊張の減少、鼻充血、インポテンス、脱毛または低血圧に冒された組織または器官を有する。前記実施態様に関する他の選択部位としては、下部食道括約筋、肛門括約筋、膀胱、膀胱括約筋、膈括約筋、幽門括約筋、上部食道括約筋、結腸壁の筋肉などの組織または器官が挙げられる。前記実施態様に関する他の選択部位は、唾液の生産または鼻粘膜に影響を与える組織または器官を有し、該唾液の生産に影響を与える器官は、顎下腺、耳下腺、舌下腺、または口腔粘膜の小唾液腺を有する。

10

**【0075】**

本発明のさらなる他の態様は、細胞活性がホルモン、神経若しくは血球由来の炎症性モジュレーター、コリン作動性分泌物、呼吸(respiratory gland)、消化若しくは尿腺(urinary gland)からの粘液分泌物を含む細胞成分の放出を含む、選択部位に治療上有効な量の破傷風毒素を投与することを有する、選択部位での動物の細胞非神経(non-neural)活性の調節方法に関するものである。

20

**【0076】**

前記実施態様において、細胞活性は、マクロファージ、単球、内分泌細胞または腎細胞を含む細胞中で起こる。この実施態様において、細胞活性は、約1時間から約1年の期間で調節される。好ましい実施態様においては、細胞活性は、1週間から4ヶ月の期間、制御または調節されうる。

**【0077】**

細胞活性の調節に関する前記方法のそれぞれの特定の実施態様においては、前記各方法のそれぞれはさらに、(i)破傷風毒素の投与前に動物の血漿中に存在する破傷風毒素の抗体のレベルを測定し；および(ii)破傷風毒素のレベルが0.1IU/ml未満である際には動物を免疫処置することを有する。免疫処置は受動的または能動的に行なわれる。血漿中に存在する破傷風毒素の抗体のレベルは、抗体価によって測定される。

30

**【0078】**

前記方法のそれぞれの特定の実施態様においては、治療上有効な量の破傷風毒素は、注射、局所適用、エアロゾル、管若しくは体の開口部への点滴注入によって、リポソーム若しくは脂質二分子膜を有する人工ベシクル中に封入されて選択部位にデリバリーされる。前記実施態様において、治療上有効な量の破傷風毒素は製薬上許容できる担体中に懸濁される。加えて、破傷風毒素は、凍結乾燥粉末の形態を有してもよい。

**【0079】**

細胞活性の調節に関する前記方法の実施態様において、破傷風毒素の治療上有効な量は、選択部位に対して約0.001単位～約10,000単位である。

40

**【0080】**

前記方法の他のより好ましい実施態様においては、破傷風毒素の治療上有効な量は、選択部位に対して約1単位～約5000単位である。

**【0081】**

前記方法の他の最も好ましい実施態様においては、破傷風毒素の治療上有効な量は、選択部位に対して約10単位～約1000単位である。

**【0082】**

前記方法のそれぞれの特定の実施態様において、選択部位は、悪性癌腫または炎症状態によって冒された組織または器官を有する。

**【0083】**

50

さらなる他の態様においては、本発明は、治療上有効な量の破傷風毒素が選択部位へのデリバリーを目的とする製薬上許容できる担体中に懸濁されてなり、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位に対して約0.001単位～約10,000単位である、動物の細胞の細胞活性を調節することを目的とする薬剤配合物に関するものである。

【0084】

他のより好ましい実施態様においては、本発明は、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位に対して約1単位～約5000単位である、前記方法の薬剤組成物に関するものである。

【0085】

さらなる他の最も好ましい実施態様においては、本発明は、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位に対して約10単位～約1000単位である、前記方法の薬剤組成物に関するものである。

10

【0086】

本発明の特定の実施態様においては、薬剤組成物は、悪性癌腫または炎症状態によって冒された組織または器官を有する選択部位で投与される。

【0087】

本発明の他の態様は、選択部位での動物の細胞活性を調節するために治療上有効な量の破傷風毒素を投与することを有し、該細胞活性はホルモン、神経若しくは血球由来の炎症性モジュレーター、コリン作動性分泌物、呼吸(respiratory gland)、消化若しくは尿腺(urinary gland)からの粘液分泌物を含む細胞成分の放出を含み、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位の約0.001単位～約10,000単位である、動物の臨床的障害または症状を効果的に処置する方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用に関するものである。

20

【0088】

好ましい実施態様において、本発明は、選択部位での動物の細胞活性を調節するために治療上有効な量の破傷風毒素を投与することを有し、該細胞活性はホルモン、神経若しくは血球由来の炎症性モジュレーター、コリン作動性分泌物、呼吸(respiratory gland)、消化若しくは尿腺(urinary gland)からの粘液分泌物を含む細胞成分の放出を含み、破傷風毒素の治療上有効な量が選択部位の約1単位～約5,000単位である、動物の臨床的障害または症状を効果的に処置する方法を目的とする薬剤の調製における破傷風毒素の使用に関するものである。最も好ましい実施態様においては、破傷風毒素の使用は、選択部位に対して約10単位～約1000単位の治療上有効な量である。破傷風毒素の前記使用において、選択部位は、悪性癌腫または炎症状態によって冒された組織または器官を有する。

30

【0089】

本発明はまた、動物の選択部位に製薬上許容できる担体中に懸濁された破傷風毒素を投与することを有し、該破傷風毒素は痛みに関連する炎症性神経伝達物質若しくは神経ペプチドの放出を抑制するまたは可逆的に阻害するのに十分な治療上有効な量である、動物によって経験される痛みの軽減方法に関するものである。

【0090】

他の態様においては、本発明は、動物の選択部位を制御する炎症性神経伝達物質または神経ペプチドの放出に影響を与える感覚ニューロンを神経支配除去する(denervate)のに十分な治療上有効な量の破傷風毒素を動物の選択部位に投与することを有する、動物によって経験される痛みの軽減または遮断方法に関するものである。

40

【0091】

さらなる他の態様においては、本発明は、選択された筋肉の神経活性の増加または興奮応答を引き起こすのに十分な薬学上有効な量の破傷風毒素を筋肉の選択部位に投与することを有する、動物の筋肉量(muscle mass)の増加方法に関するものである。

【0092】

本発明のこれら及び他の利点は、本明細書に記載される詳細な説明及び実施例から認識さ

50

れるであろう。詳細な説明及び実施例は、本発明の理解を促進するものであるが、本発明の概念を制限するものではない。

【0093】

本発明の詳細な説明

動物への有効な量の破傷風毒素の投与による動物の神経機能の調節を目的とする方法及び薬剤組成物が提供される。これらの方法及び組成物は、多くの臨床的障害または疾患の管理または処置に使用できる。

【0094】

神経機能の調節または制御の文脈において、本明細書に使用される際の、「選択部位」は、標的ニューロンによって直接または間接的に影響を受ける ( a f f e c t e d ) 組織または器官を包含するものと規定される。非神経、細胞活性の調節の文脈において、「選択部位」は、ホルモン、神経若しくは血球由来の炎症性モジュレーター、コリン作動性分泌物 ( c h o l i n e r g i c c a u s e d s e c r e t i o n s )、酸分泌物、呼吸 ( r e s p i r a t o r y g l a n d )、消化若しくは尿腺 ( u r i n a r y g l a n d ) からの粘液分泌物等の細胞成分の放出を含むことによって非神経細胞によって直接または間接的に影響を受ける組織または器官を意味する。

10

【0095】

本明細書に使用される際の、「調節」ということばは、「制御」ということばで置き換えて使用され、必要条件まで調節する ( a d j u s t ) または規制する ( r e g u l a t e ) ことを意味する。

20

【0096】

本明細書に使用される際の、「標的ニューロン」ということばは、選択部位での生理学的変化を引き起こすのに十分な治療上有効な量の破傷風毒素の存在によって直接または間接的に影響を受けるニューロンを意味する。標的ニューロンとしては、以下に制限されないが、特に神経伝達物質または神経ペプチドの取り込み、輸送または阻害に関連する感覚ニューロン、運動ニューロン、介在ニューロン、自律及び中枢神経性ニューロンとして機能的に明らかにされるニューロンが挙げられる。

【0097】

「治療上有効な量」ということばは、破傷風毒素が標的とされる症状の出現率や重篤度を減少させるのに十分な無毒な量で投与されることを意味する。毒素がニューロンの緊張を増加するのに使用される際には、好ましい量は、反対の効果 ( 神経支配除去 ) を引き起こすボツリヌス毒素の量と等しくてもよい。破傷風毒素が標的ニューロンの神経支配除去を引き起こすのに使用される際には、その量は、同等の効果達成するのに必要なボツリヌス毒素の同量より約500倍高くてもよい。

30

【0098】

本明細書に使用される際の、「患者」ということばは、本明細書中に開示される組成物および方法によって処置されるいずれかの動物を広範に意味する。特に、開示される方法及び組成物は、神経機能の調節が簡便であるまたは望ましい場合には、獣医の診療及び動物の例えば、鳥や哺乳動物の飼畜に用途があるであろう。「動物」ということばは、哺乳動物及び特にヒトを含む、動物界のすべてのものを包含する。

40

【0099】

本発明の目的のために、破傷風毒素は、例えば、「Tetanus Toxoid Purogenated」の商品名でWayne, N. J. 所在のLederle Laboratoriesで市販される。本発明の方法は、好ましくは、重及び軽鎖双方を含む完全な破傷風毒素の製薬上安全な形態、さらにはAB断片等の、これの断片の使用を包含するであろう。タンパク質ならびに破傷風毒素の重または軽鎖部分のハイブリッドなどの他のタンパク質などの他の部分との組み合わせもまた本発明に包含される。

【0100】

より詳細には、本発明の目的のために、破傷風毒素、およびこれの断片の使用が包含される。加えて、破傷風毒素の結合タンパク質部分を分離して、他のタンパク質を細胞中に入

50

れられるように他のタンパク質と組み合わせて使用することが有益であるかもしれない。また、そうしなければ入ることができない細胞に毒素タンパク質を入れるために破傷風毒素の毒素タンパク質部分を他のタンパク質に結合させることも有益であるかもしれない。

【0101】

当業者は、どのようにして製薬上安全な形態の、好ましくは非催奇形性である形態の破傷風毒素を得るかを知っているであろう、または容易に確認できる。本発明の神経毒のほとんどでは、製薬上の安全性は線量依存性であるので、比較的低い投与量の毒素は発症させるのに十分であることが知られている投与量に比べて「安全」であろう。

【0102】

好ましくは、本発明の破傷風毒素は、製薬上許容できる担体における組成物として投与されるであろう。その目的のためには、シナプス前神経毒組成物が、望ましい純度の毒素を生理学上許容できる滅菌担体と混合することによって投与用に調製される。このような担体は、使用される投与量及び濃度でレシピエントに無毒であろう。通常、このような組成物の調製は、神経毒を緩衝液、アスコルビン酸等の抗酸化剤、低分子量（約10残基未満）のポリペプチド、タンパク質、アミノ酸、グルコースまたはデキストリン等の炭水化物、EDTA等のキレート化剤、グルタチオンならびに他の安定化剤及び賦形剤と合わせることを必要とする。このような組成物はまた、凍結乾燥されてもよく、製薬上許容できる、即ち、適切に調製されて、所望の用途に使用されるのに容認されるであろう。

10

【0103】

他の薬剤と異なり、同重量の神経毒の生物学的活性は、一般的に、毒を生産する様々な実験間で異なる。この理由としては、すべての調製物から完全に他のタンパク質を除去できないまたは毒素の単離中に分子によってはその生物学的活性を失いやすいことがある。

20

【0104】

バイオアッセイによる測定が、破傷風毒素の標準的な調製物を得るのに一般的に使用される。破傷風毒素の毒性を測定するのに使用される一般的なバイオアッセイは、皮下注射された際に50%のマウスを殺すのに必要な平均投与量である。この毒素量は、マウスのLD<sub>50</sub>、若しくはmMLD（マウスの最小致死量）と、または単に破傷風毒素の単位と称される。

【0105】

神経毒の実験研究に一般的に使用される他のバイオアッセイとしては、マウスの半横隔膜調製（mouse hemidiaphragm preparation）（Bulbring, E., J Phys (London), 1, 38-61, (1946)）がある。これは、マウスの横隔膜の半分及びこれを神経支配する神経から構成されるインビトロアッセイである。神経は電氣的に刺激されて横隔膜を収縮させ、神経筋の伝達物質を遮断する際の様々な毒素製剤の効果を正確に測定できる。この特定のアッセイの利点としては、研究者さらには臨床医に一般的に興味のある神経の連結である、神経筋接合部での毒素の効果を正確に測定することである。

30

【0106】

ワクチン製剤以外では、破傷風毒素は商業的に使用されない；単位を構成する一般的な標準物質がない。代わりに、単位は、0.3 ng/kgから25 ng/kgまで変化することがHaberman, et al.によって報告された（Habermann, et al., Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 311(1), 33-40, (1980)）。局所的な効果に必要な破傷風毒素の量は、所望の興奮性または阻害性作用、神経組織の特定の型（Montecucco, C. and G. Schiavo, Q Rev Biophys, 28(4), 423-72 (1995)）、効果が望ましい組織または器官の大きさ、注射される物質、神経の活性、温度（Habermann, E., F. Dreyer, and H. Bigalke, Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 311(1), 33-40, (1980)）および他の因子によって変化するであろう。

40

50

## 【0107】

破傷風毒素の単位を構成する絶対的な標準重量は存在せず、破傷風毒素は臨床用途では使用されていなかったため、標準物質を採用する強制的な理由がなかった。破傷風毒素の将来的な臨床用途では、供給メーカー (commercial vendor) が単位服用量形態の破傷風毒素の標準化されかつ安定した製剤を製造、配布する必要があるかもしれない。現在では、標準物質はなく、様々な会社または実験室で一般的に使用される単位を構成する破傷風毒素の重量は約 0.1 ng ~ 100 ng の範囲であり、ほとんどは約 1 ng である。この理由により、本発明で使用される際には、破傷風毒素の 1 単位は、0.02 ng の破傷風毒素を意味する。

## 【0108】

B T とは逆に、T T は、臨床用途で使用されていなかった。T T が B T に比べて潜在的にかなりより臨床的に有用となる様々な特別な性質を有するので、これは驚くべきことである。まず、これは、すべてのクラスのニューロン：運動、自律、及び感覚ニューロンに結合する。これに対して、ボツリヌス毒素は、運動ニューロンに結合する。第二に、T T は、中枢神経系に運ばれる。毒素は末梢神経、ほとんど運動ニューロンに結合するものの、これは末梢ニューロンを中毒にすることによって一次効果を引き起こさない。代わりに、この毒素は、運動ニューロンの軸索内で脊柱や脳幹中に位置するその細胞体に運ばれる。ここで、運動ニューロンは毒素を放出して、シナプスを通過して、中枢神経系のニューロン中に結合して入る。第三に、これは、すべてではないが、ほとんどの神経伝達物質：アセチルコリン、ノルエピネフリン、エピネフリン、ドーパミン、グルタミン酸塩、GABA、グリシン、セロトニン、さらには神経ペプチド CGRP、神経ペプチド Y、P 物質など；ならびに神経内分泌ホルモンオキシトシン、バソプレシンの放出を遮断する。中枢神経系では、毒素は主に神経伝達物質 GABA 及びグリシンを使用するニューロンに結合する。結合後は、毒素はこれらのニューロンに入り、これらの神経伝達物質の放出を遮断する。GABA 及びグリシンを含むニューロンは、中枢神経系の阻害性ニューロンである。一般的に、運動ニューロンは多くの阻害性及び興奮性ニューロンからのインプットを受け取り、これらの対立する影響は相互に打ち消しあう。しかしながら、阻害性ニューロンが遮断された後は、興奮性ニューロンが対立しない運動ニューロンを刺激できるため、運動ニューロン活性が上がってこれらの中毒にかかった運動ニューロンによって神経支配された筋肉内の活性が向上する。临床上では、これは最終段階で絶え間ない痙攣に達する筋肉の緊張の増加として見られる。第四に、T T は、末梢及び中枢神経の活性の増加ならびに使用される投与量によってはこれらの同じ神経の遮断を引き起こすことができる。

## 【0109】

破傷風毒素の作用メカニズムとしては、この使用によって誘発される興奮作用が間接的であることがある。破傷風毒素は、筋肉を神経支配する運動ニューロン等の末梢ニューロンに吸収され、脊柱内の運動ニューロンの細胞体に運び戻される。次に、これはシナプス前空間に放出される。運動ニューロンは興奮性または阻害性のいずれかの多くの他のニューロンに連結する。正常な状態では、これらのインプットは運動ニューロンが適当な筋肉の運動を行なうのに十分なくらい興奮されるように均衡がとれている。阻害性ニューロンは神経伝達物質であるグリシンまたは GABA を使用し、破傷風毒素はこれらのニューロンに結合した後、遮断する (Bigalke, H., et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 316(2), 143-8, (1981))。阻害性ニューロンが遮断されると、興奮性インプットのみが残り、筋肉の活性が向上する。

## 【0110】

各筋肉は興奮及び阻害の様々な混合を有する。例えば、咬筋はかなりの興奮性インプットを有する筋肉である。破傷風毒素が咬筋を供給する運動ニューロンへのすべての阻害性インプットを遮断すると、非常に強力でかつ長期間の痙攣になる。咬筋のこの痙攣は顎の閉めを固く結び、全身性疾患を意味する「破傷風 (lock jaw)」ということばの由来となる。

10

20

30

40

50

## 【0111】

ほとんどの筋肉用途では、破傷風毒素を注射して、長期間の痙攣を得ることは望ましくない。代わりに、一般的に必要なのは、筋肉の緊張の増加をやわらげる温和 (mild) である。したがって、非常に低い投与量が局所的な興奮用途で使用される。例えば、ネコの後脚に後肢の下腿3頭筋中に1.5 ngを注射した場合には、破傷風毒素は約1週間後に肢の不完全な伸展を発症させた (Takano, et al., Toxicol 27 (4), 431-8, (1989))。7.5 ng以上を注射したところ、ネコの肢は動物が解消できないようなこわばった連続的な痙攣で伸展したままであった。

## 【0112】

同様に、ヒトの筋肉または他の標的組織での興奮用途は、筋肉の大きさならびに興奮性及び阻害性インプットの根本的な神経混合によって0.001~10 ngの範囲の投与量を必要とする。所望の適用を達成するために、当業者は、前記範囲の下限での量を使用することで始め、待つて効果を観察することが有用であることを理解する。適当なレベルが達成されるまで破傷風毒素の量を次々増やしていてもよい。

## 【0113】

破傷風毒素はまた、神経筋接合部で直接末梢神経の伝達を遮断して、弛緩性麻痺を引き起こす。実験から、この直接的な神経の遮断効果は、興奮を引き起こすのに使用されるのに比べて約500倍多くの破傷風毒素必要とすることが示される (Habermann, E., et al., Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharm 311 (1), 33-40, (1980))。興奮または阻害の異なる効果を生じるこの投与量の大きな不一致の理由は不明である。

## 【0114】

局所的な麻痺はその効果を達成するために0.5~50 ngの破傷風毒素またはそれ以上を必要とするので、これらの量は免疫処置されないヒトの致死量に近いまたはこの量を超える。免疫処置されないヒトの致死量は、約2.5 ng/kgまたは70 kgのヒトで175 ngである。したがって、神経の遮断のための破傷風毒素の使用は少量の毒素を必要とするより小さな標的に限定されてもよい。したがって、破傷風毒素を投与する前に知られているヒトの免疫状態を確認することは重要である。全員の免疫処置がアメリカ合衆国及びほとんどの工業国で行なわれている。免疫状態は破傷風抗体の国際単位で測定される。0.1 IU/mlを超える血漿中の抗体含量は、全身性破傷風に対して保護的であると30  
考えられる。免疫状態のレベルは免疫処置後は高く、次の数年間で徐々に下がる。研究から、ワクチン接種された成人ヒトの半分が0.1 IU/ml未満であることが示された。このようなヒトは恐らく免疫レベルを上げるために追加のワクチン接種が必要であろう。

## 【0115】

破傷風毒素は、局所麻酔と同様、神経の軸索での活動電位をも遮断できる。その結果、破傷風毒素はその経過に沿って神経に注射して遮断するのに使用できるため、臨床上的有用性が増す。ボツリヌス毒素とは異なり、破傷風毒素はニューロン軸索の膜に結合する (Herrerros, et al., European Journal Neurosci 9 (12), 2677-86, (1997))。局所的な破傷風の動物実験モデルから、注射された筋肉から軸索の外の脊柱に戻る神経の経過に沿った多量の毒素が示される (40  
Erdmann, et al., Neuryn Schmiedeberg's, Archive of Pharmacology, 290 (4), 357-373, (1975))。局所的な破傷風を有する患者の生理学的な研究から、神経の伝導は抑制または遮断され、これはシナプスでの遮断とは別の効果であることが示唆される (Dastur, F.D., et al., Journal Of Neurology, Neurosurgery And Psychiatry 40 (8), 782-6 (1977))。

## 【0116】

また、多くの報告された注射は、筋肉内の適切な極在化のために筋電図の使用を必要とするかもしれない。これは、針の先端を用いて筋肉活性を検出し、多くのボツリヌス毒素注 50



射で定常的である。

【0117】

予想されなかったことに、破傷風毒素の大量の注射は全身性または局所的な拡散を伴わずに筋肉内になされる。部分的には、これは、神経膜に対して破傷風毒素が有する非常に高い親和性により、これによりニューロンと迅速に結合するためである (Critchley, D. R., et al., J Cell Biol, 100(5), 1499-507 (1985))。さらなるメカニズムが副作用の危険性を減らすのに使用できる。一例としては、アドレナリン1:100,000倍希釈液、フェニレフリン1/2%または他の血管収縮剤の注射液への添加がある。これらは、一時的な局所的な血管収縮及び血流量の減少を引き起こすため、破傷風毒素が体循環に入る機会を減少するであろう。

10

【0118】

本発明で使用できる他の血管収縮剤としては、以下に制限されないが、エピネフリン、ノルエピネフリン、またはエピネフリルボレート (epinephryl borate) が挙げられる。

【0119】

他のさらなる用法注意としては、大量が局所的に注射される際の破傷風毒素の全身性拡散を防止するようにすることがある。例えば、破傷風抗毒素を、ある時間遅らせてであるが破傷風毒素の注射部位と同じ部位にまたは異なる部位のいずれかに、注射してもよい (Fezza, J. P., et al., Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery, 16(2), 101-113, (2000))。ウサギでは、一般的な2kgのウサギでの破傷風毒素の致死量は約1~10ngまたは0.5~5ng/kgである。しかしながら、25ng、致死量の2,500~25,000倍の注射液が、口輪筋中に安全に注射された。この実験では、250IUの破傷風抗毒素を、後脚の筋肉中に同時に筋肉内注射して、全身への拡散を遮断した。5日目に、これらの動物は毒性の局所的または全身の拡散なく注射された眼瞼の不全麻痺を示した。明らかに、これは投与量の最大限であり、破傷風毒素の量を125IUにまで減少する、または破傷風毒素の注射量を37.5ngにまで増加するのいずれかのスペクトルにより、毒性の局所的または全身の兆候がでた (Fezza, J. P., et al., Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery, 16(2), 101-113, (2000))。

20

30

【0120】

特定の好ましい実施態様においては、破傷風毒素は、運動ニューロン機能を制御するのに使用される。例えば、毒素を、標的領域での運動ニューロンの神経活性を向上するのに十分な量体内 (例えば、特定の筋肉) の特定の標的部位に局所的に投与する。次に、これにより当該ニューロンによって神経支配される筋肉細胞の神経刺激が上がる。これにより、筋肉の緊張が増し、神経が短い長さで固定化される場合には、迅速に短い長さに適応するであろう (Abe, Y., et al., Acta Otolaryngol (Stockh), 112(4), 703-9, (1992))。または、破傷風毒素の量を調節することによって、反対の効果、例えば、ニューロンの神経支配除去を得てもよい。臨床上有益な効果のためには、治療上有効な量の破傷風毒素が投与される。

40

【0121】

好ましい実施態様においては、緊張を増すために低濃度の破傷風毒素が、オトガイ舌筋、オトガイ舌骨及び口蓋帆筋 (例えば、睡眠無呼吸の処置を目的として) ; 嚥下困難を有する患者の嚥下を補助するために、咽頭筋 ; 副棘筋 (paraspinal muscle) (例えば、側彎の処置を目的として) ; 外眼筋 (例えば、斜視の処置を目的として) ; 固定化肢の筋肉 (例えば、長期のギプス包帯固定中の萎縮を防止するため) ; 筋肉の緊張を回復するためにALS等の麻痺性の神経疾患の異なる筋肉に ; 下部食道括約筋 (例えば、食道の逆流を制御するため) ; 胃の筋肉 (例えば、胃の拘縮及び食欲減退のため) ; 顔面筋 (例えば、緊張の増加及び若々しい外見のため) ; 運動の代わりとして筋肉量を増加するための標的筋肉に投与される。

50

## 【0122】

他の好ましい実施態様においては、緊張を減少するために高濃度の破傷風毒素が、顔面筋または眼瞼の痙攣を抑制するために顔面筋に；筋筋膜疼痛及び頭痛を処置するために側頭筋に；斜頸及び子宮頸部のジストニーを処置するために、子宮頸部の筋肉に；筋ジストロフィ、ALS、重症筋無力症のための様々な標的筋肉；肢の筋肉（例えば、脳卒中後に見られるような、上位運動ニューロンの病変から生じる痙攣または拘縮を処置するために）；歯軋りを抑制するために顎筋に；痙性発声障害及び外傷性状態を処置するために喉頭筋に；書痙を処置するために前腕筋に；夜間の攣り（night cramp）を処置するために脚の筋肉に；運動神経の分枝形成の促進が外傷性の神経の損傷後の神経の再生中などで有用であるいずれかの筋肉に投与される。

10

## 【0123】

特定の実施態様においては、破傷風毒素は、自律神経系の特定部分（例えば、標的組織または器官）に局所的に投与されて、この領域でのニューロンの活性を制御し、さらに当該ニューロンによって神経支配される標的自律神経系に影響を与えてもよい。

## 【0124】

特定の実施態様においては、破傷風毒素は、その領域でのニューロンの活性を向上するのに十分な治療上有益な低い量を、標的自律神経系（例えば、組織または腺）に局所的に投与する。これにより、当該ニューロンによって神経支配される細胞（例えば、組織または腺）の刺激が増加する。破傷風毒素は、口内乾燥、乾性眼及び萎縮性膣炎を処置するために唾液、涙及び膣腺に；ミルクの生産を増加するために乳腺に；鼻充血及びアレルギー性症候を処置するために鼻粘膜に；勃起を持続させ、インポテンスを処置するために脈管系組織に；ホルモンの生産を増すために膵臓及び他の内分泌腺に；運動性を向上させて便秘を処置するために結腸及び他の胃腸器官に；喘息及び慢性の閉塞性疾患における平滑筋を弛緩するために肺の交感神経に；胃の収縮を引き起こし及び満腹感を出して食欲を減退させ体重を減少させるために胃の平滑筋に；漿液粘液の生産（serous mucous production）及び線毛の輸送を増加して嚢胞性線維症を処置するために肺の粘液腺（pulmonary mucus gland）に；脂肪分解及び脂肪細胞の収縮を起こすために脂肪組織に投与されてもよい。

20

## 【0125】

特定の実施態様においては、より高い量を自律神経活性を抑制するために使用してもよい。臨床で使用する際には、破傷風毒素は、脱毛症を処置するために毛嚢に；増大した前立腺を収縮させるために前立腺に；代謝を改善して高齢者の弛緩した皮膚を処置するために結合組織に；痛覚及び炎症を抑制するために傷んだ線維（pain fiber）に；乾癬やアトピー性皮膚炎等の増殖性またはアレルギー性疾患の皮膚に；アクネを処置するために皮膚の皮脂腺に；耳垢を減らすために耳管の皮膚（ear canal skin）の皮脂腺に；血圧を下げるために循環系の交感神経に；胸腺及び脾臓、リンパ節、または神経免疫相互作用が存在する組織における免疫応答を神経修飾するために；外来抗原の認識を防止して寛容を生じるために皮膚、消化管または粘膜に；その大きさを減少するために扁桃腺に；体液の生産を減らして高眼圧を処置するために前眼房に；逆流性食道炎における酸の生産を減少するために胃の粘膜に；鼻漏を減少するため、及び肥満細胞のヒスタミンの放出への神経の影響を抑制してアレルギー性の症状を抑制するために鼻粘膜に；血管拡張ニューロンを遮断して真性片頭痛を防止するために翼口蓋神経節に、治療上有効な量、投与される。

30

40

## 【0126】

特定の好ましい実施態様においては、破傷風毒素は、鼻充血鼻漏及びアレルギー症状を処置する（Ado, A. D., *Ekspierimentalnai a I Klinicheskai a Farmakologiya*, 58 (3), 43-5 (1995); Albegger, K., Hno, 36 (10), 389-98 (1988); Agro, A. et al., *Advances In Neuroimmunology*, 5 (3), 311-9, (1995))、免疫応答を調節する（Ado, A.

50

D., Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk, (7), 48-51 (1993); Albanese, A., et al., Mov Disord, 12(5), 764-6, (1997)、便秘時の肛門括約筋を弛緩する(Sabbadini, E. et al., Neuroimmunomodulation, 2(4), 184-202, (1995))、ペニス勃起に影響を与える、様々な器官における炎症及び痛みを抑制する、乾癬等の病気における皮膚の増殖を抑制する、抗原の寛容(antigen tolerance)を誘発する、血圧を下げる、片頭痛を抑制する、唾液の分泌を向上する若しくは抑制する、発汗を抑制する、前立腺の大きさを減少する、結合組織を増加する、ならびに脱毛を制御するために、治療上有効な量を標的自律神経系に投与される。

10

## 【0127】

特定の実施態様においては、破傷風毒素は、可逆的な感覚の遮断を行なうために感覚ニューロンに投与される。このような使用の一用途としては、例えば、痛みを遮断または抑制するのに有効な量を局所的に投与することによって、身体のある部分から痛みを遮断することがある。他の実施態様としては、例えば、リウマチ様関節炎で治療上有益な量を関節に局所的に投与することによって、感覚ニューロンによって放出される炎症メディエーターを遮断することがある。

## 【0128】

特定の他の実施態様においては、破傷風毒素は、直接または末梢神経からの逆行性輸送の結果としてのいずれかで、中枢神経系の部分に適用される。

20

## 【0129】

特定の他の実施態様においては、破傷風毒素は、有益な効果のために非神経細胞に投与される。これらとしては、炎症を抑制するためにマクロファージ及び他の白血球、ホルモンの分泌を抑えるために内分泌細胞、酸の生産を減少するために胃壁細胞、緑内障での眼内圧を減少するために眼の体液産生細胞、運動性及び転移を減らすために悪性細胞が挙げられる。

## 【0130】

本発明はまた、例えば、標的家畜動物の筋肉量を増加するための、破傷風毒素の家畜への使用に関するものである。これとしては、ミルク及び肉の生産が挙げられる。

## 【0131】

本発明によると、破傷風毒素は、様々な投与形式によって投与されてもよい。局所的に投与される場合には、投与形式としては、以下に制限されないが、注射(加圧ジェット注射を含む)、エアロゾル(鼻、上気道または肺への投与を目的とする)、局所適用(皮膚及び粘膜上ならびに内体表面上(外科手術中または外傷の処置中など)開放創、ならびに管(唾液、乳腺、涙管)または体の開口部(尿道、肛門、経口)への点滴注入によるものが挙げられる。

30

## 【0132】

特定の標的部位に局所的に投与される場合には、破傷風毒素は、好ましくは全身効果を有さずに、その領域のニューロンの活性に影響を与える。破傷風毒素は軸索によって吸収されるので、神経によって神経支配される異なる器官または組織によって受けられる神経活性を遮断または向上するために、神経の経路に沿って投与されてよい。好ましい実施態様においては、破傷風毒素は、体内の標的部位に局所的に投与される。しかしながら、場合によっては、局所的な適用によって、毒素の広範な分布を故意に生じうる場合がある。例えば、局所的な適用は、中枢神経系の大部分に分布するように、髄液に対して;または動脈に灌流する体部分に分布するように動脈中にであってもよい。特定の実施態様においては、破傷風毒素の適用は、例えば、身体中に分布するように体循環中への、全身性であってもよい。

40

## 【0133】

薬理的なレベルでの破傷風毒素の局所的な適用によって、局所的な神経末端によるその吸収および中枢神経系(CNS)へのその逆行性輸送が起こる。局所的な適用は、以下に

50

制限されないが、注射、例えば、加圧ジェット注射、及び塗布 (topical application) などの、すべてのデリバリー手段を含む。CNSでは、破傷風毒素はシナプスを介して (transynaptically) 運ばれ、阻害性ニューロンに結合する。その結果、末梢ニューロンの脱抑制が起こり、その活性が上昇する。増加の正確な量及びそのパターンはその特定のニューロンの生物学に関連する。家畜用途等のCNSに広範に分布させるためには、毒素を髄液中に直接注射してもよい。

## 【0134】

毒素を必要な膜レセプターのない細胞に投与する場合には、毒素をリポソーム、脂質二分子膜を有する人工ベシクル中に封入してもよい。ベシクルは注射の領域で細胞と同化し (merge)、内部に毒素をデリバリーする。特異性を向上するために、リポソームの表面を標的細胞にリポソームを特異的にドッキングできる抗体や糖タンパク質等の特定のタンパク質で被覆してもよい。

10

## 【0135】

## 実施例

本発明をさらに下記実施例において説明する。実施例は、本発明の概念に含まれる生成物のあるものおよびこれの作製方法を詳細に説明するものである。いうまでもなく、これらは本発明の概念を限定するものと解されるものではない。多数の変更及び修飾が本発明に関してなされる。下記実施例で使用される材料は容易に市販される。

## 【0136】

破傷風毒素の興奮性筋肉内用途を実施例1~18で詳細に述べる。破傷風毒素の適用によって誘発される阻害応答を実施例19~37で詳細に述べる。自律神経系の神経での緊張の増加は多くの場合望ましい。この作用メカニズムは筋肉内で観察されるものと同様である。注射部位からの逆行性輸送は阻害性輸入インプット (inhibitory afferent input) を引き起こす。実施例30、33及び38では、ホロクリン分泌である内分泌細胞及びマクロファージの細胞活性を調節または制御するための破傷風毒素の使用が詳細に述べられている。

20

## 【0137】

## 実施例1

## 睡眠無呼吸及びいびき

本実施例では、いびき及び閉塞性の睡眠無呼吸を有する60歳齢の男性に、口腔底の粘膜を介して針を通すことによって破傷風毒素を注射する。1単位の破傷風毒素を双方のオトガイ舌筋に注射した。オトガイ舌骨筋に入るまで針をさらに進め、各筋肉にさらに1単位注射した。針を除いて、硬口蓋の端2cm以内の軟口蓋の口腔粘膜に再挿入した。1単位の破傷風毒素を各拳筋に注射する。1週間以内に、睡眠中のいびき及び閉塞の発生率は減少する。

30

## 【0138】

睡眠無呼吸及びいびきは、オトガイ舌筋および/またはオトガイ舌骨筋、張筋及び口蓋帆拳筋に作用する臨床的狀態である。睡眠無呼吸は、上気道 (舌及び軟口蓋) の軟組織が吸気中の空気の流れを妨げることにより空気流及びその領域の軟組織の振動が一部閉塞する (いびき) または空気流が完全に閉塞する一般的な疾患である。閉塞の結果としては、睡眠パターンの障害、いびき、昼間の傾眠、集中しにくさがあり、気分の低下、高血圧、及び心臓病の原因となる。閉塞性睡眠無呼吸の病態生理としては、オトガイ舌筋及び他の上気道筋肉の活性の減少がある。オトガイ舌筋が舌根に挿入して、相動性活性 (phasical activity) を、舌を前に動かして気道を拡張する吸気と同調させる。オトガイ舌骨筋は舌骨に入り、同様の吸気活性を有する。張筋及び口蓋帆拳筋もまた、軟口蓋をかなり移動する吸気活性を有する。本実施態様では、オトガイ舌筋および/またはオトガイ舌骨筋、張筋及び口蓋帆拳筋への1単位の破傷風毒素の投与 (例えば、注射) により、相動性運動 (phasical motion) の幅が増加し、及び気道の閉塞が抑制される。

40

## 【0139】

50

## 実施例 2

## 側彎 - 副棘筋 (paraspinal muscle)

側彎、脊椎の彎曲に罹っている10歳の女性患者を、副棘筋中に100単位の破傷風毒素を注射することによって処置する。1～3日で、患者は筋肉の緊張の増加を示し、脊椎がまっすぐになる。

【0140】

側彎で起こる脊椎の発達上の調整不良 (developmental misalignment) は、脊椎をまっすぐにするであろう適当な筋肉中への破傷風毒素の投与 (例えば、注射) で修正できた。筋肉活性の長期間の増加による骨のこのリモデリングには数多くの他の用途がある。他の例としては、顔の骨を再配置するために頭蓋顔面筋からの興奮

10

【0141】

## 実施例 3

## 斜視

斜視を患っている、または眼の配置が不適切である、5歳の男性患者を、位置不良の眼 (misaligned eye) の内側直筋への0.1単位の破傷風毒素の注射によって処置する。1～3日で、眼は一直線に移動する。本実施例は、再配置が筋肉の軟組織で起こる以外は実施例2に記載されるのと同様の概念を説明するものである。外直筋または他の適当な筋肉中への破傷風毒素の投与 (例えば、注射) は、緊張活性を増加し、眼球の配列をまっすぐにする。

20

【0142】

## 実施例 4

## 筋肉の萎縮の防止

25歳の男性患者は、大腿骨が骨折しており、6週間、脚をギブス包帯される予定である。10単位の破傷風毒素を大腿の各筋肉に注射する。1～3日後に、固定された筋肉の緊張が増加する。6週間後に、ギブス包帯を除いたところ、筋肉は予想より萎縮を示さない。

【0143】

重篤な骨折または靭帯断裂後に、ギブス包帯及び固定により、固定された肢の筋肉が萎縮してしまう。この望ましくない副作用は、その緊張を増し、萎縮を防止するためにギブス包帯前に筋肉に破傷風毒素を投与 (例えば、注射により) することによって防止される。

30

【0144】

## 実施例 5

## 食道の逆流 (esophageal reflux) - 下部食道括約筋

下部食道括約筋では、逆流性食道炎に冒されている50歳齢の男性に、1単位の破傷風毒素を注射する。3日で、逆流性酸度の症状は抑制される。

【0145】

下部食道括約筋の弛緩によって、酸分が食道上部に逆流する。この一般的な医療上の問題は、下部食道括約筋への破傷風毒素の投与 (例えば、注射) によって防止されうる。この実施例から、緊張の増加は食道の逆流の発生を防止することが示される。

40

【0146】

## 実施例 6

## 膀胱または便 (bowel) 失禁 - 括約筋

尿失禁のある50歳齢の女性の外 (陰部神経) 及び内 (下腸間膜動脈神経節の交感神経軸索) 尿道括約筋に、1単位の破傷風毒素を注射する。3日で、これらの括約筋における筋肉の緊張の増加が尿失禁を緩和する。

【0147】

関連する実施例では、尿失禁のある50歳齢の男性の尿道括約筋に、膀胱鏡を用いて直接見ながら1単位の破傷風毒素を注射する。1～3日で、尿失禁の症状は改善する。

【0148】

50

多くの医学的な状態は、失禁、尿または便の内容物を含んでおくことができないことをもたらす。括約筋の緊張の減少が問題である場合には、括約筋への破傷風毒素の投与（例えば、注射）が緊張を増加しうる。注射されうる別の括約筋としては、膣口、幽門括約筋、及び上部食道括約筋がある。

【0149】

#### 実施例 7

##### 胃の拘縮および食欲の減退

肥満の40歳齢の女性の胃壁の平滑筋および/または幽門括約筋に、内視鏡を用いて直接見ながら100単位の破傷風毒素を注射する。1～3日後に、彼女は、十分な満足感を感じ、食欲が減退する。

【0150】

満足感は少なくとも部分的に胃の膨満によることは知られている。外科的な方法が、胃の大きさを外科的に減少することによって効果の利点を得るように設計されてきた。代わりに、破傷風毒素の投与（例えば、注射）が胃壁になされてもよい。平滑筋の神経支配で誘導される緊張の増加は、経時的に、その大きさを減らすであろう。この効果としては、より少量の食物の摂取後の満足感がある。

【0151】

#### 実施例 8

##### 筋ジストロフィー、ALS、重症筋無力症

多くの神経疾患及び老齢化は、筋肉への輸出活性の減少と関連する。最小限の数の運動軸索が存在している限り、この活性は破傷風毒素の投与（例えば、注射）で増加しうる。特定の筋肉は、病気の状態に依存するが、すべての骨格筋を包含する。

【0152】

#### 実施例 9

##### 筋拘縮

脳血管発作後に右腕の痙攣性収縮に見舞われた60歳齢の女性の右腕の3頭筋に、10単位の破傷風毒素を注射した。1～3日後に、拘縮の症状が抑制され、腕はより伸長する状態になる。

【0153】

拘縮、発作及び他の上位運動ニューロンの損傷によって、肢の筋肉ならびに特に上肢の屈筋及び下肢の伸筋の脱抑制が起こる。破傷風毒素の投与（例えば、注射）は、拘縮とは反対の筋肉の緊張を増加でき、これにより、肢がよりニュートラル位置になる。

【0154】

#### 実施例 10

##### 顔面筋の緊張

70歳齢の女性患者の各口輪筋に、全部で1単位の破傷風毒素を分けて注射する。3日で、筋肉の緊張が改善され、眼周辺の組織の弛緩が抑制される。

【0155】

本実施例から、顔面筋への破傷風毒素の投与により、緊張が増加して患者の外見が若々しくなることが示される。若々しい外見は顔面筋の良好な緊張によるものである。老齢者では、この緊張が顔面筋への投与（例えば、直接注射による）によって改善できた。使用されるこの処置に有効であるうと最も考えられる筋肉は、笑う筋肉である笑筋及び方形筋ならびに眼窩周囲筋（*periorbital muscle*）である。これらの筋肉の緊張の増加は、老齢者で見られる皮膚の余分なしわを平らにし、眼瞼形成術の代わりとして非常に使用される。

【0156】

#### 実施例 11

##### 運動の代わりとしての筋肉量の増加

25歳齢の重量挙げの選手の両方の2頭筋に、10単位の破傷風毒素を注射する。1～3日で、2頭筋の緊張が増す。1～6週間で、筋肉の量及び強さが増加する。

10

20

30

40

50

## 【0157】

筋肉の緊張および/または量の増加は、通常、美容面の、競争面の、予防面のまたはハビリ面の理由により望ましい。運動の効果を望むものは、もっぱら緊張を増し、肥大を生じることが目的として2頭筋等の有益な筋肉に注射を受けるであろう。競技の選手では、同じ方法が機能的な効果のために使用できる。一例としては、一般的な運動では修正できず、破傷風毒素の注射を受けることによって有益でありうる(benite)特定の腕の筋肉の相対的な弱さを有する重量挙げの選手がある。場合によっては、筋肉の緊張の増加は、美容上および医学上双方で望ましい。一例としては、腹壁の筋肉がある。腹壁の筋肉の弱さは、腹をたるませ、また、患者の背に障害をおわせやすくする。腹筋への破傷風毒素の注射は腹壁の緊張を増して平らにし、脊柱の配列を補助する。

10

## 【0158】

## 実施例12

嚥下困難による咽頭の病的興奮

脳血管発作後に嚥下困難になった60歳齢の女性の下及び中咽頭収縮筋に、1単位の破傷風毒素を注射する。1~3日後に、嚥下困難の症状が改善する。

## 【0159】

## 実施例13

鼻充血抑制 - 鼻粘膜

本実施例では、長期間続くアレルギー性鼻炎により鼻充血のある20歳齢の男性の各鼻甲介を覆う粘膜に、1単位の破傷風毒素を注射する。1週間後、充血はかなり抑制する。

20

## 【0160】

鼻充血は、アレルギー性及び感染性鼻炎の主要な症状であり、すべての医療の中で最も一般的な苦情である。鼻腔内の鼻甲介を覆っている粘膜は、一部血流の変化の結果厚みを変えることができる。充血抑制(decongestion)のメカニズムは、交換神経系の活性の増加に関わる。詳しくは、鼻粘膜への交感神経の緊張の増加は、細動脈及び細静脈の平滑筋を収縮させて、粘膜を縮ませる。

## 【0161】

本実施例から、鼻粘膜への破傷風毒素の投与(例えば、注射)は鼻充血抑制を生じることが示される。

## 【0162】

## 実施例14

ペニス勃起および射精

糖尿病性ネフロパシーによりインポテンスである40歳齢の男性のペニスの基部に、1単位の破傷風毒素を注射して、自律神経さらには坐骨海綿体及び球海綿体筋への外陰の運動神経の神経活性を増加を起す。1週間で、患者は興奮時に勃起を維持できる。

30

## 【0163】

ペニス機能の制御は、副交感及び交感神経支配双方の複合して混合したものである。仙骨神経叢からのコリン作動性交感神経は、勃起を可能にする血管拡張を引き起こす。アドレナリン作動性交感ニューロンは、精管及び精囊の平滑筋を活性化する。射精は、交感神経応答である。尿道球腺及び前立腺の分泌物は、副交感神経の制御下にある。様々な医学的な理由による自律神経の機能不全はインポテンスを引き起こしうる。

40

## 【0164】

適当な自律交感神経の活性を制御するための破傷風毒素の適用により所望の結果が得られることが、本実施例から明らかである。

## 【0165】

## 実施例15

結合組織の増加

70歳齢の女性の顔の皮膚の様々な四半分に、4つの別の注射液でデリバリーされた全1単位の破傷風毒素を注射する。神経活性の増加により、皮膚の皮層が厚くなり、外見がより若々しくなる。

50

## 【0166】

結合組織は、線維芽細胞または筋線維芽細胞によって形成される。皮膚領域への運動及び神経の供給の神経支配除去は皮膚の厚みをかなり減少することは知られている。皮膚への神経の供給の活性は、明らかに結合組織の生産を刺激する。

## 【0167】

本実施例から、破傷風毒素が結合組織を増加し、これによりより若々しい外見にするために皮膚の皮層に適用（例えば、注射）できることが示される。

## 【0168】

## 実施例 16

## 脱毛

壮年性脱毛症である50歳齢の男性の頭皮のはげている領域に、0.25単位の破傷風毒素を含む注射液で複数回注射する。1ヶ月で、患者は、この領域に初期の再発毛に気づく。

## 【0169】

脱毛は、毛嚢への自律神経支配の活性の減少に一部よるものと考えられる。ラットでの実験から、発育相（発毛）が毛嚢周辺の神経内の自律神経活性の増加と関連することが示される。脱毛領域の皮膚への破傷風毒素の投与（例えば、注射）が自律神経活性を増加して、脱毛を遅延するまたは逆転することが見出される。

## 【0170】

## 実施例 17

## 破傷風毒素の家畜への使用

ウシ、ヤギ、ヒツジ、コヒツジ、ブタ、家禽、魚、無脊椎動物及び他の動物はすべて、肉のために育てられ、収穫される。ほとんどの場合、これらの動物から収穫される重要な肉は、筋肉である。筋肉の大きさを増加することは肉生産量の増加になる。本実施態様では、破傷風毒素を動物に投与（例えば、注射）して、筋肉肥大を引き起こす。

## 【0171】

一例としては、シチメンチョウの胸筋を、シチメンチョウの各胸筋に1単位の破傷風毒素を注射することによって増加する。2日後に、筋肉の緊張は筋肉内で増し、筋肉量は増加するであろう。

## 【0172】

ウシに、腰椎穿刺し、1単位の破傷風毒素を脳脊髄中に点滴注入する。翌日、動物はすべての筋肉の緊張の緩やかな増加を示す。次の2ヶ月で、筋肉量は最低10%増加する。

## 【0173】

## 実施例 18

## ミルクの生産の増加

ミルクは、動物から収穫される他の製品である。ミルクの生産は、かなりホルモンによるものであるが、神経系がミルクの分泌に大きな役割を果たし、生産に役割を果たす証拠がある。

## 【0174】

乳腺への直接投与（例えば、注射）またはその管を介した逆行性投与（例えば、注射）によって、神経活性が増加し、このような増加はミルクの生産の増加になる。

## 【0175】

乳牛に、それぞれ、1単位の破傷風毒素を注射した。2日で、乳頭内の平滑筋の緊張が増し、ミルクの生産量が増加する。

## 【0176】

## 実施例 19

## 発汗 - 皮膚

ハイパーヒドロシス（hyperhidrosis）とも呼ばれる、発汗は、交感神経系の制御を受けるが、神経節後ニューロンによって使用される神経伝達物質はアセチルコリンである。臨床的に重要な発汗の位置としては、腋窩；足（湿気が運動選手の足の真菌感

10

20

30

40

50



染を引き起こす) ; 生殖領域 ( またのかゆみ ) ; 手のひら及び額が挙げられる。

【 0 1 7 7 】

一実施例では、わきの下から過剰に発汗する 4 0 歳 齢 の 男 性 の こ の 領 域 に 、 1 0 0 0 単 位 の 破 傷 風 毒 素 を 注 射 す る 。 3 日 以 内 に 発 汗 の 減 少 に 気 づ く 。

【 0 1 7 8 】

本実施例から、破傷風毒素等の抗コリン作動性薬剤投与は汗の生産を遮断できることが示される。

【 0 1 7 9 】

実施例 2 0

鼻漏 ( 鼻漏後 ( p o s t n a s a l d r i p ) ) - 鼻粘膜

10

鼻漏は、鼻からの過剰な分泌物の生産であり、アレルギー性、感染性及び血管運動神経性鼻炎の主要な症状である。抗コリン作動性薬剤投与は、短期間に鼻漏を遮断するのに有効であるまたはヒトの鼻腔内の鼻甲介に注射される。鼻分泌腺を供給する神経節後細胞体を含む副交感神経節は翼口蓋神経節中にある。

【 0 1 8 0 】

一実施例では、7 0 歳 齢 の 女 性 は 、 一 日 中 大 量 の 水 様 の 鼻 漏 を 訴 へ て い る 。 双 方 の 下 鼻 甲 介 に 5 0 0 単 位 の 破 傷 風 毒 素 を 注 射 し た と ころ 、 3 日 で 鼻 漏 が 抑 制 さ れ る 。

【 0 1 8 1 】

他の実施例では、5 0 歳 齢 の 男 性 は 、 通 年 性 の ア レ ル ギ ー 性 及 び 大 量 の 鼻 粘 液 の 鼻 漏 を 訴 へ て い る 。 翼 口 蓋 管 を 介 し て お よ び 翼 口 蓋 空 間 に 硬 口 蓋 の 口 側 か ら 針 を 通 し 、 5 0 0 単 位 の 破 傷 風 毒 素 を そ れ ぞ れ の 側 か ら 注 射 す る 。 鼻 漏 の 症 状 が 破 傷 風 毒 素 で 処 置 し て か ら 3 日 以 内 に 改 善 す る 。

20

【 0 1 8 2 】

ゆえに、破傷風毒素を使用することによる翼口蓋神経節でのコリン作動性神経伝達の遮断はまた鼻漏を抑制するのにも有効である。

【 0 1 8 3 】

実施例 2 1

前立腺肥大 - 前立腺

前立腺肥大により排尿が困難である 6 0 歳 齢 の 男 性 の 前 立 腺 に 、 5 0 0 単 位 の 破 傷 風 毒 素 を 注 射 す る 。 破 傷 風 毒 素 を 注 射 し て か ら 1 ヶ 月 で 、 患 者 は 彼 の 症 状 が 徐 々 に 減 退 す る の に 気 付 く 。

30

【 0 1 8 4 】

前立腺肥大は、5 0 歳 齢 の 男 性 で は 一 般 的 で あり 、 排 尿 を 開 始 す る の が 困 難 で あり 。

【 0 1 8 5 】

本実施例から、前立腺への破傷風毒素の注射により前立腺が縮小することが示される。

【 0 1 8 6 】

実施例 2 2

喘息、C O P D - 肺粘液分泌

気管支炎を有する 6 0 歳 齢 の 男 性 は 、 過 剰 な 肺 粘 液 の 症 状 を 有 す る 。 5 0 0 0 単 位 の 破 傷 風 毒 素 を 1 0 c c の 生 理 食 塩 液 と 混 合 し 、 3 0 分 間 、 患 者 に エ ア ロ ザ ル 投 与 し 、 吸 入 さ せ た 。 2 日 で 、 患 者 は 粘 液 の 生 産 の 減 少 に 気 付 く 。

40

【 0 1 8 7 】

多くの肺疾患の主な症状は、過剰量の粘液の生産である。これらの疾患としては、喘息、慢性の閉塞性疾患、気管支炎、気管支拡張症及び嚢胞性線維症がある。肺の粘液は、気管支を覆っている呼吸粘膜内の小腺 ( s m a l l g l a n d ) に よ っ て 生 産 さ れ る 。

【 0 1 8 8 】

本実施例から、粘液の生産は破傷風毒素を適用して肺粘膜の副交感神経活性を阻害することによって制御されることが示される。

【 0 1 8 9 】

50

## 実施例 2 3

## 喘息、COPD - 気管支の平滑筋

多くの肺疾患が慢性または急性の気道閉塞の症状を有する。細気管支の管腔は、副交感神経の制御下にある平滑筋の収縮によってかなり制御される。

## 【0190】

喘息もちの13歳齢の女の子に軽い麻酔をかけ、気管支鏡を口から気管中に挿入する。薄いゲージ経気管支針 (thin gauge transbronchial needle) を用いて、100単位の破傷風毒素を20回粘膜を介して注射する。これから数週間で、気管支痙攣の症状が改善する。本実施例から、粘膜を介した破傷風毒素の経粘膜 (transmucosal) 吸収または注射が副交感神経活性を遮断し、気管支痙攣を予防することが示される。

10

## 【0191】

## 実施例 2 4

## 唾液分泌 - 耳下、顎下及び舌下腺

多くの神経に損傷を受けた患者は唾液が肺に入ることを防止しにくい。細菌を含んだ唾液が肺に混入すると、致命的な肺炎が生じうる。

## 【0192】

筋萎縮性側索硬化症を有する60歳齢の女性は、唾液を吸引していた。この患者の3つの主な唾液腺のそれぞれに100単位の破傷風毒素を600単位の全投与量となるように左右に注射した。2日で、唾液分泌はかなり抑制され、唾液を吸引しなくなった。ゆえに、唾液分泌は、副交感神経の制御下にあり、唾液分泌量は、動物及びヒト双方に破傷風毒素を注射すると、減少することが示された。

20

## 【0193】

## 実施例 2 5

## 括約筋 - 裂肛および便秘

便秘を引き起こす肛門括約筋の緊張の増加は、出口閉塞 (outlet obstruction) と呼ばれ、パーキンソン病及び他の神経状態で起こる。

## 【0194】

パーキンソン病を有しかついきみ (straining) 時に恥骨直腸筋の逆の活性化 (paradoxical activation) を伴う65歳齢の男性患者を、恥骨直腸筋の2箇所全1000単位の破傷風毒素を注射して処置する。3日以内に、患者は、排便中に腹圧の減少を経験する。

30

## 【0195】

慢性の裂肛は、内肛門括約筋の収縮によって維持される。括約筋の外科手術による切出しは患者の85~95%で成功するが、括約筋を永久的に脆弱化し、肛門の変形及び失禁を生じさせるかもしれない。

## 【0196】

他の実施例においては、慢性の裂肛を有する35歳齢の女性の肛門括約筋の2箇所に、全1000単位を注射する。1~3日で、肛門括約筋の緊張が減少し、裂溝が2ヶ月後に治癒する。

40

## 【0197】

これらの実施例から、ボツリヌス毒素の注射は肛門括約筋を弛緩させ、治癒するのに良好に使用されることが明らかである。

## 【0198】

## 実施例 2 6

## アカラシア - 下部食道括約筋

下部食道括約筋のコリン作動性神経支配の収縮緊張の増加は嚥下を妨げる。

## 【0199】

40歳齢の男性は、食道のアカラシアを有し、嚥下が非常に困難である。可撓性の内視鏡を食道に通し、300単位の破傷風毒素を下部食道括約筋に経粘膜的に (transmu

50

c o s s a l l y ) 注入する。3日で、患者は嘔下の改善に気付く。

【0200】

この症状は、破傷風毒素の経粘膜による注射によって良好に処置できることが示される。

【0201】

実施例27

肥満 - 胃壁筋

30歳齢の女性の食道を介して及び胃中に内視鏡を通した。胃の洞壁筋 ( a n t r a l w a l l m u s c l e ) に、1000単位の破傷風毒素を注入する。1週間後、患者の食物の消費が減り、体重が減少し始める。

【0202】

空腹及び飽満感、胃壁の収縮の状態に部分的に関連する。胃洞の麻痺は、胃を空にして、初期の飽満感を引き起こす。したがって、病的肥満の患者は胃壁への破傷風毒素の内視鏡による注射によって利益を得ることができることが示される。

【0203】

実施例27

免疫寛容

皮膚(または粘膜)のある領域に対する副交感神経の遮断後のこの領域への抗原に注射は抗原に対する免疫寛容 ( i m m u n e t o l e r a n c e ) を誘発することは示されている。破傷風毒素さらには抗原の投与(例えば、注射)は抗原に対する寛容を誘導できる。この効果は、自己免疫疾患を処置するまたは改善するのに使用できる。

【0204】

挿入句的に記載される推定の抗原性タンパク質を有する自己免疫疾患としては、以下に制限されないが：実験的自己免疫性脳脊髄炎(ミエリン塩基性タンパク質)；喘息(タイプIIコラーゲン)；ブドウ膜炎(S抗原、インターフォトリセプター結合タンパク質 ( i n t e r p h o t o r e c e p t o r b i n d i n g p r o t e i n ) ) ；糖尿病(インスリン、グルタミンデカルボキシラーゼ)；重症筋無力症(アセチルコリンレセプター)；甲状腺炎(サイログロブリン)；および多発性硬化症(ミエリン)が挙げられる。

【0205】

多発性硬化症を有する40歳齢の女性の左前腕の皮膚に、1000単位の破傷風毒素を注射する。1週間後、ミエリンを同じ部位に注射する。1ヶ月以内に、患者は症状の抑制を示す。

【0206】

免疫寛容が好ましい他の領域としては、器官の移植がある。ヒトは、一般的に、移植器官中の細胞の表面上に存在する、外来タンパク質、特に主要組織適合タンパク質に対する免疫反応を発揮する。

【0207】

器官の移植に関する他の例では、腎臓の移植を必要とする40歳齢の女性の左腕の皮膚に、1000単位の破傷風毒素を注射する。1週間後に、潜在的なドナー由来の細胞表面抗原を同じ領域に注射する。1ヶ月後、患者について、右前腕の皮膚に同じ細胞表面抗原を注射することによって寛容を試験する。顕著な反応がなかったことから、寛容が達成され、移植が行なわれたことが示される。

【0208】

ゆえに、領域への破傷風毒素の投与(例えば、注射)により、抗原の提示が次に起こり、その抗原に対する寛容が誘発される。この効果は、自己免疫疾患を有する患者または同種移植若しくは異種移植の潜在的なレシピエントによって有益でありうる。

【0209】

実施例29

胃酸

胃酸の生産は、副交感神経の制御を受ける。しかしながら、酸の生産を遮断する他の方法が、酸を生産する壁細胞にある。これらの細胞は、ベシクルの放出によってH<sup>+</sup>を分泌し

10

20

30

40

50

、直接遮断されうる (Alexander et al., American Journal of Physiology, 273 (6 Pt. 2), F 1054-7, (1997))。第三の方法としては、酸の生産を増加するホルモン、セクレチン及びガストリンを遮断することがある。別の有益な効果としては、酵素トリプシンの生産を遮断することがある。

【0210】

実施例30

ホロクリン分泌

ホロクリン腺は、脂質分泌物を生産する皮膚の分泌腺の一つのクラスであり、部分的に神経の制御を受ける。ホロクリン腺としては、皮脂及び毛嚢腺、耳垢腺 (cerumen gland) 及び乳酸が挙げられる。破傷風毒素の投与 (例えば、注射) によるこれらの腺への神経インプットの遮断は、様々な医学的な状態で有用であり、例としては、分泌物の過剰な生産が炎症及び感染の原因であるアクネがある。

10

【0211】

また、耳垢の過剰な生産は、耳鼻咽喉科医を訪れる最も一般的な理由の一つである。耳管の皮膚への投与 (例えば、注射) は、耳垢の生産を遮断し、耳管への耳垢 (ear wax) の蓄積を防止するであろう。

【0212】

加えて、破傷風毒素は、皮脂腺の活性を遮断するため、皮膚状態アクネの有益な効果を提供するのに使用される。

20

【0213】

実施例31

皮膚疾患

乾癬、アトピー性皮膚炎 (じんま疹)、白斑はすべて、副交感神経活性に関連する。皮膚のある領域の神経支配除去が神経支配除去領域でのこれらの皮膚疾患を消散することは長い間知られてきた。罹患領域への破傷風毒素の投与 (例えば、注射) は、活性を遮断し、症状の改善または消散 (resolution) を起こしうる。破傷風毒素の皮膚への注射は、選択部位での副交感神経活性を減少することによって、上記で列挙した皮膚疾患を抑制できる。

【0214】

実施例32

片頭痛

翼口蓋神経節への破傷風毒素の投与 (例えば、注射) は、頸動脈への翼口蓋神経を遮断し、これにより片頭痛の原因であるこれらの神経によって引き起こされる動脈の痙攣を遮断するであろう。緊張性頭痛等の片頭痛は側頭筋への注射によって処置されうる。

30

【0215】

実施例33

脂肪組織

脂肪組織によるグルコースの取込みは脂質の生産に必要である。リポソームによってデリバリーされる破傷風毒素は脂肪細胞による脂質グルコースの取込みを遮断し、その大きさを小さくする。他の内分泌細胞の細胞活性は、破傷風毒素の投与 (注射による) によって阻害されうる。破傷風毒素による処置によって影響を受ける内分泌細胞としては、甲状腺、膵臓及び腫瘍細胞が挙げられる。

40

【0216】

実施例34

鋤鼻器官

鋤鼻器官は、フェロモンを知覚し、生殖挙動及び他の自律神経系の欲求に役割を果たす。この器官への破傷風毒素の投与 (例えば、注射) は、これらの欲求を遮断、または向上できる。

【0217】

50

## 実施例 3 5

## 免疫系 T 細胞の成熟および放出

副交感神経活性は、胸腺及び脾臓由来の T 細胞の成熟及び放出に関連する。T 細胞は、抗原認識の細胞メディエーターである。副交感神経活性が増加すると、T 細胞の成熟及び放出が向上する；これらの器官が急性的に神経支配除去されると、反対のことが起こる。様々な投与量での胸腺および/または脾臓への破傷風毒素の投与（例えば、注射）は、T 細胞の放出を向上または抑制できる。

## 【0218】

HIV 及び低い T 細胞数を有する 25 歳齢の患者の胸腺に、100 単位の破傷風毒素を注射する。1 週間後、血中の T 細胞レベルは増加する。

10

## 【0219】

多発性硬化症を有する 50 歳齢の女性は病気が急激に悪化し、彼女の胸腺に 100 単位を注射する。注射してから 1 週間で、症状が改善する。

## 【0220】

## 実施例 3 6

## 破傷風毒素の感覚用途

ボツリヌスとは異なり、破傷風毒素は、感覚神経と結合して入り、逆行性輸送され、知覚消失を引き起こすことが示された。これらの考察は、実験動物でさらには臨床的な破傷風でなされた。求心性神経活性の減少に加えて、破傷風毒素は、これらの神経ペプチドが破傷風毒素によって不活性化されるタンパク質 VAMP を用いた SNARE メカニズムによるので、感覚神経（物質 p、神経ペプチド Y、CGRP）からの炎症性メディエーターの放出を遮断するであろう。この効果の最も重要な用途としては、体のある部分から痛みを遮断することがありうる。例えば、慢性の関節痛は、関節の滑液包中への破傷風毒素の投与（例えば、注射）によって遮断されうる。

20

## 【0221】

慢性の痛みのある右股関節の変形性関節を有する 75 歳齢の女性の関節に、1000 単位の破傷風毒素を注射する。1 週間以内に、患者の痛みが減少した。上記実施例から、投与の特定の標的は特定の臨床的な状態によって変化しうるが、これとしては、骨、軟骨、靭帯、筋肉、筋膜、粘膜、皮膚、側膜、神経上膜、滑膜、神経腫、及び平滑筋が挙げられる。

30

## 【0222】

感覚遮断の他の用途としては、炎症の原因となっている軸索 - 軸索反射がある。感覚軸索は、神経によって神経支配されるいずれかの領域での反射性血管拡張（膨疹 - 嗅覚反応（wheal and flair reaction）とも称する）を誘発することによって侵害刺激に反応する。破傷風毒素は、この反射を誘発する神経ペプチドの放出を遮断できる。

## 【0223】

慢性の気管支炎ならびに過剰な粘液の生産及びパラオキシスマルナ（paraoxysmal）咳の症状を有する 65 歳齢の男性に、30 分間、1000 単位の破傷風毒素を含むエアロゾル投与用溶液を吸入させる。2 日後、咳が抑制される。

40

## 【0224】

上記実施例から、感覚遮断の他の用途が、慢性の咳、粘液の生産及び肺内の感覚レセプター（intrapulmonary sensory receptor）によって発症する気管支痙攣にありうることを示される。本実施態様においては、破傷風毒素は吸入エアロゾルによって良好にデリバリーされる。

## 【0225】

## 実施例 3 7

## 心臓血管系

心臓血管系、心臓、動脈、及び静脈は、広範な自律神経支配を有する。心臓では、交感神経活性が心拍数及び収縮力を増加する。副交感神経の刺激は、心臓を遅くし、収縮力を減

50

少する。心房から心室への収縮の伝達は房室結節 ( a t r i a v e n t r i c u l a r n o d e ) ( A V ) 節によって制御されるものの、心臓の収縮速度は洞房結節、心臓の右房の小神経節によって制御される。

【 0 2 2 6 】

破傷風毒素薬剤配合物によって処置されうる心臓疾患としては、心不整脈：頻脈、徐脈、及び心室細動がある。さらなる疾患としては、アンギナおよび/または心筋梗塞を生じる冠状動脈痙攣がある。冠状動脈のカテーテル挿入 ( c a t h e r i z a t i o n ) によって、心室を灌流する血液中に破傷風毒素を放出させ、特定の環状動脈を使用することによって最も冒されている心臓の領域に破傷風毒素を局所的に分布させることもできる。これらの場合には、阻害量の破傷風毒素が、交感神経の刺激を阻害することによっておよび心筋細胞に直接作用することによって心臓の興奮を抑制できる。より高い阻害量での冠状動脈への破傷風毒素の注入によって、平滑筋の交感神経の活性化を抑制し、冠状動脈痙攣の強さを減少してアンギナを改善する。興奮レベルでの洞房結節 ( S A ) への破傷風毒素の注入は、副交感神経活性を増加し、心拍数を遅らせて不整脈および/またはアンギナの可能性を減少できる。心臓の上述した領域に達するカテーテル技術の使用は、当業者には既知であり、過度の実験を必要としない。

10

【 0 2 2 7 】

実施例 3 8

白血球

単球及びマクロファージは、破傷風毒素の取込み及びインターナリゼーションを可能にするレセプターを有する。内在化すると、毒素は細胞の移動性さらにはベシクルの分泌の根底をなす分子メカニズムを破壊する。多くの炎症プロセスは、マクロファージのまたはその領域への移動と関連する。炎症の領域に入ると、これらの細胞は、炎症を促進するまたは組織の破壊を引き起こす他のサイトカインを放出する。破傷風毒素の投与は、マクロファージの移動を遅延できるまたは停止でき、さらに、その領域での細胞からの炎症性メディエーターの放出を防止できる。破傷風毒素はまた、好中球の凝集及び分泌を遮断できるが、細胞のインターナリゼーションのためにはリポソームのようなベクターを必要とする。リウマチ様関節炎は、滑液包に直接投与する、この治療が有益でありうる疾患の一例である。これは、マクロファージ等の特定の標的細胞の細胞活性を制御するのに破傷風毒素を使用する一例である。

20

30

【 0 2 2 8 】

このように、本発明の好ましい実施態様であると現在考えられるものを説明してきたが、当業者は、他の及びさらなる修飾および変更が本発明の真の精神を逸脱することなくなされうることを認識するであろうし、また、添付の特許請求の範囲に記載される本発明の概念に含まれるすべてのさらなる及び他のこのような修飾及び変更を包含するものである。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/00172 A2

- (51) International Patent Classification: A61K CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/20523
- (22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/214,569 28 June 2000 (28.06.2000) US
- (71) Applicant and  
(72) Inventor: SANDERS, Ira [US/US], Apartment 43E, 300 East 93rd Street, New York, NY 10128 (US).
- (74) Agents: BOYADJIAN, Livia, S. et al.; Davidson, Davidson & Kappel, LLC, 485 Seventh Avenue, 14th Floor, New York, NY 10018 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:  
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/00172 A2

(54) Title: METHODS FOR USING TETANUS TOXIN FOR BENEFICIAL PURPOSES IN ANIMALS (MAMMALS)

(57) Abstract: Methods of using tetanus toxin to modulate or control neural functions or nonneutral cellular activities at selected sites in animals, particularly in mammals, and more particularly in humans, are provided. Pharmaceutical formulations to modulate neural functions or non-neutral cellular activities of an animal at selected sites in animals, particularly in mammals, and more particularly in humans are also provided. Uses of tetanus toxin in preparation of medicaments for methods of treating clinical disorders or symptoms of animals, particularly mammals and more particularly humans are also provided.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

**METHODS FOR USING TETANUS TOXIN FOR BENEFICIAL PURPOSES  
IN ANIMALS (MAMMALS)**

**FIELD OF INVENTION**

5 The invention relates broadly to methods of modulating a neural function of an animal, including a mammal, at a selected site. The invention also relates broadly to methods of modulating other nonneural cellular activity of an animal at a selected site. The invention also encompasses pharmaceutical formulations for modulating a neural function or a non-neural cellular function of an animal at a selected site. The invention also relates to the use of tetanus toxin in the preparation of medicaments for methods of treating clinical disorders or  
10 symptoms of an animal.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

The Clostridial neurotoxins are the most potent toxins known to man. When *Clostridium botulinum* bacteria are ingested orally they produce botulinum toxin (BT). BT is  
15 absorbed from the gastrointestinal tract and is transported by the circulatory system to muscles throughout the body. The BT binds to and blocks neuromuscular transmission from motor neurons causing a fatal paralysis known as botulism.

An unusual attribute of the BT is that its action lasts for months but the patient completely recovers. As a result of this unique attribute, BT has many clinical uses. At  
20 present, the local injection of small doses of BT is used to decrease or block muscle activity in a wide variety of clinical motor disorders. More recently, the use of BT has been extended to block autonomic nerves that use the same neurotransmitter used in neuromuscular transmission, namely, acetylcholine.

The other class of Clostridial bacteria is *Clostridia tetani*. These bacteria infect  
25 wounds and produce tetanus toxin. Tetanus toxin (TT) is released from the site of the infection and is distributed by the circulatory system to motor neurons throughout the body. Instead of acting on the motor neurons directly, the tetanus toxin is transported to the central nervous system where it blocks neurons that normally inhibit motor neuron activity. The result is a gradually increasing tone in affected muscles that culminates in a widespread  
30 spasm of muscles throughout the body. The resulting spastic paralysis is often fatal with death resulting from respiratory depression or circulatory collapse.



WO 02/00172

PCT/US01/20523

Tetanus has been recognized as a disorder since antiquity and it is still common throughout the world. Many countries routinely vaccinate children with tetanus toxoid, an attenuated form of the toxin that is exposed to formaldehyde to remove its biological activity while retaining its antigenicity. Tetanus toxoid is the largest biologic product in the pharmaceutical industry.

The action of the tetanus toxin lasts from weeks to months. Once TT enters into and blocks neurotransmission from neuron synapses the process is irreversible. Recovery of function requires the growth of a new process from the neuron that eventually reconnects to the motor neuron and restores the inhibitory activity back to normal levels. The time required for this recovery varies from weeks to up to five months (Struppler, A., *et al.* Arch Neurol, 8, 162-1782, (1963)).

The extremely broad range of TT actions allows it to either excite or inhibit practically any part of the nervous system for prolonged periods of time with a single injection. Since the nervous system closely monitors and controls nearly every organ and physiological function it has been unexpectedly found that TT can have extensive beneficial utility for the treatment or amelioration of a wide variety of clinical disorders.

Tetanus is a systemic intoxication by the tetanus toxin which is characterized by progressive spastic contraction of the skeletal muscles and overactivity of the autonomic nervous system that is often fatal.

Other than the systemic disorder three lesser known variants of tetanus are known. These are neonatal, cephalic and local tetanus. Neonatal tetanus is a fatal intoxication of newborn babies that is manifest as a systemic flaccid paralysis. Cephalic tetanus occurs on the face and combines a localized paralysis, most often of the facial nerve, with a surrounding area of muscle spasm (Dastur, F.D., *et al.*, Journal Of Neurology, Neurosurgery And Psychiatry 40(8), 782-6 (1977)). Local tetanus is an isolated spasm of a muscle group or limb that may progress to systemic tetanus or resolve over weeks to months (Johns Hopkins Medical Journal, 149(2) 84-8, (1981); Jain, S., *et al.*, Journal Of Neurology, 228(4), 289-93, (1982)).

The tetanus toxin has some unique properties that have made it perhaps the most studied of all biological toxins. For example, the tetanus toxin binds to all types of neurons. Although its primary affinity is to bind to motor neurons, TT also binds to neurons of the

WO 02/00172

PCT/US01/20523

autonomic nervous system and sensory neurons (Stockel, K., *et al.*, Brain Research, 99, 1-16 (1975)). In contrast, the botulinum toxins principally bind to motor neurons.

5 Tetanus toxin requires multiple specific steps to cause its effects in neurons. These steps include (i) peripheral binding; (ii) internalization; (iii) retrograde transport; (iv) central binding; and (v) transmembrane internalization.

10 In peripheral binding the toxin binds to the surface of the cell. TT binds to the presynaptic membrane of practically all neurons. In addition it also binds to the membrane of the neuron's axon. The receptors to which TT binds are a class of molecules known as gangliosides. BT also binds to gangliosides, however BT appears to bind principally to those  
10 on the presynaptic membrane of cholinergic neurons, whereas TT binds to the pre-synaptic membrane of most if not all neurons.

15 In the internalization step the toxin is brought into the cell. TT is brought into the neuron by the process of forming a vesicle. While TT remains inside the vesicle, although physically inside the neuron, the toxin is separated from the cytoplasm of the neuron by a membrane. In contrast, BT is thought to require a second molecule on the presynaptic membrane to bind to before being internalized. After BT binds to the second molecule it passes through the cell membrane directly into the cytoplasm, which is why it exerts its effect at the peripheral presynaptic membrane.

20 During the retrograde transport the vesicles containing TT are transported to the cell body in the central nervous system. The vesicle then fuses with the cell membrane of the cell body or its dendrites thereby depositing TT into the extracellular space between the motor neuron on the processes of other neurons synapsing onto the motor neuron (Hilbig, G., K.O. Räker, *et al.*, Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology, 307(3), 287-90, 1979.

25 In the central binding step TT can bind to all neurons. However, TT has a much greater affinity for the inhibitory neurons. At low concentrations, tetanus has greater affinity for the neurons that use the inhibitory neurotransmitters GABA and glycine (Montecucco, C. *et al.*, Q Rev Biophys, 28(4), 423-72, (1995)). At higher concentrations, it blocks all neurotransmitters. Finally, tetanus toxin has a local effect on axons that causes a local block of the propagation of action potentials. The mechanism for this is unknown but the result is  
30 similar to the action of a local anesthetic.

During the transmembrane internalization, once the toxin binds to a second neuron it is internalized and produces its toxic effect.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

The primary mechanism of action of TT is to block the release of vesicles from a cell. In neurons these vesicles contain neurotransmitters. The proteins that are involved in the attachment of a vesicle to the inner membrane of a cell are the SNARE (synaptosome associate protein receptor) family of proteins. These proteins are part of the mechanism by which intracellular vesicles dock to cell membranes and release their contents. Specifically, 5 tetanus toxin cleaves VAMP (vesicle associated membrane protein). Botulinum toxins A and E cleave SNAP-25; and botulinum toxin C cleaves SNAP-25 and syntaxin; tetanus toxin and botulinum neurotoxins type B, D, F and G cleave VAMP, an integral protein of the neurotransmitter containing synaptic vesicles.

10 The mechanism of vesicle release is common to all cells from yeast to the cells of humans. The TT molecule is composed of a heavy chain that is responsible for its specific binding and transport properties, and a light chain that actually performs the catalytic action on the VAMP protein. There are a few non-neuronal cells in which TT is capable of entering and performing its action and these will be discussed in the examples.

15 Multiple experiments have shown that even if TT is incapable of binding and entering into a type of cell it can be inserted by a variety of mechanisms. Once inside the cell TT cleaves VAMP and disables vesicle release. Different cells use the mechanism to secrete hormones, neuropeptides, lysozyme proteins, and other substances. Whatever specific substance is secreted by the cell it will be blocked by TT if secretion requires the use of 20 VAMP protein.

Cells can be made susceptible to TT by placing gangliosides onto the external surface of the cell membrane. Another manner of inserting TT into cells is by chemically combining the TT, or at a minimum its light chain, with a second molecule that is capable of binding to the cell. In addition the TT can be inserted by micro injection using micropipettes, pressure 25 injection, by incorporation into lysosomes, or by temporarily making the cell membrane permeable to TT.

Motor neurons are the primary target of TT toxicity. Motor neurons refer to cholinergic neurons that innervate the large extrafusal muscle fibers of skeletal muscle. Within skeletal muscle are smaller intrafusal muscle fibers and these are innervated by a 30 smaller cholinergic motor neuron called a gamma neuron. These also are intoxicated by TT. Finally, smooth muscle is also innervated by cholinergic neurons. Although the vast majority of these neurons are cholinergic and are formally considered part of the autonomic nervous

WO 02/00172

PCT/US01/20523

system they are sometimes grouped with the other motor neurons for discussion because they have certain biologically similar properties. TT has been shown to bind to and intoxicate the motor neurons of smooth muscles in the same manner as it does to striated muscle fibers.

5 It should be noted that at high doses TT can cause a flaccid paralysis by blocking motor neuron activity both in the periphery, at the neuromuscular junction, and centrally, by blocking all afferent input from both excitatory and inhibitory axons. Which of the two areas predominate in a given case of intoxication is dependent on where the TT infection is and how it progresses.

10 In cephalic tetanus all three actions of TT can occur together. At the site of infection the muscle exhibits a flaccid paralysis as TT levels are high and the neuromuscular synapses are blocked directly. In addition high levels of the toxin are transported back to the brainstem to block central nervous system input. However at variable distances surrounding the site of infection the concentration of TT falls until areas are seen in which muscles are in spasm (Dastur, F.D., *et al.*, Journal Of Neurology, Neurosurgery And Psychiatry 40(8), 782-6  
15 (1977)).

Tetanus toxin can be measured by weight or, more commonly, by biological assay. The effective dose of tetanus is measured in units, the amount of tetanus toxin that is lethal to 50% of mice when injected subcutaneously. A unit of tetanus toxin may range between 0.1 to 100 ng of toxin per kg of mouse body weight. In the mouse hemi diaphragm assay, a 500  
20 times higher dose of tetanus toxin is needed to cause a flaccid paralysis (Bigalke, H. *et al.*, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 312(3), 255-63, (1980)). Therefore at equivalent weights tetanus toxin would be expected to cause a spastic paralysis while botulinum toxin causes a flaccid paralysis.

Tetanus toxin has the same effects on autonomic neurons as it does on motor neurons  
25 (Abboud, F.M., Hypertension, 4 (3 Pt 2), 208-25, (1982)). In systemic tetanus excitation of the autonomic nervous system is prominent and manifest by such symptoms as high blood pressure (Toriya, Y., I. *et al.*, Endodontics And Dental Traumatology, 13 (1), 6-12, (1997)), erratic changes in blood pressure, high fever, and profuse sweating. Therefore, low concentrations result in increased autonomic tone with physiological changes resulting in all  
30 organs affected.

The autonomic nervous system is divided into the parasympathetic system which uses acetylcholine as its neurotransmitter and the sympathetic systems which uses epinephrine as

WO 02/00172

PCT/US01/20523

the neurotransmitter. In both the parasympathetic and sympathetic systems neurons do not reach the entire distance from the central nervous system to the peripheral organ. Instead the distance requires two neurons with a synapse somewhere in the periphery. In the sympathetic system these are grouped together in a limited number of large ganglia located near the spinal column. In the parasympathetic organ the synapse is usually located in a smaller ganglia near the target organ. In both systems the neurotransmitter used in the ganglia synapses is always acetylcholine.

Although the peripheral neurons of the sympathetic nervous system may all use norepinephrine as their neurotransmitter, the response of the target organ cells is dependent on the type of receptor. There are three types of adrenergic receptors: alpha (smooth muscle contraction), beta1 (cardiac acceleration and fatty acid mobilization) and beta 2 (smooth muscle relaxation). Note that the exact effect of norepinephrine may be entirely opposite on different muscles based on the type of receptors found on the surface. Much of this information is known for most organs that are clinically relevant.

The presence of ganglia and multiple neurotransmitters increases the complexity of the autonomic system relative to the motor system. An organ is usually innervated by both parasympathetic and sympathetic neurons and they usually have opposite actions on the target. Therefore an understanding of the anatomy and physiology of the target organ is important in planning the location of a TT injection so that the desired effect is to be achieved.

Sensory neurons can also be blocked by tetanus toxin. Sensory neuropathies are part of the symptom complex of clinical tetanus. One aspect of Clostridial tetanus infection is that pain and inflammation at the site of infection are much lower than would be expected in such serious infections. Therefore, it is believed that TT blocks sensory neurons.

In addition to neurotransmitters, which are usually used to directly communicate with other neurons through synaptic connections, neurons release neuropeptides from motor, sensory and autonomic nerves (SP, substance P; NKA, neurokinin A; CGRP, calcitonin gene-related peptide; NPY, neuropeptide Y, interleukins and growth factors). These neuropeptides have many different effects but one of the most important is vasodilatation and inflammation. (Bigalke, H. *et al.*, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 312(3), 255-63, (1980)). These neuropeptides are released by the same vesicle mechanism as neurotransmitters and therefore can be blocked by TT.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

The SNARE proteins and the vesicle release mechanism are used by cells for purposes other than the release of neurotransmitters. In fact, the release of practically all cellular secretions depends on this mechanism. These include the release of hormones, enzymes, and inflammatory modulators, mucus secretions from respiratory, digestive and urinary glands, and inflammatory modulators from nerves and white blood cells (Alexander, E.A., *et al.*, *American Journal of Physiology*, 273 (6 Pt 2), F1054-7 (1997)). Cells known to internalize tetanus toxin include macrophages, endocrine cells, and renal cells (Huet de la Tour, E., *et al.*, *Journal Of The Neurological Sciences*, 40(2-3), 123-31, (1979)).

In addition to their effect on SNARE proteins, Clostridial toxins have been shown to interfere with other cell activities. For example, it can prevent actin molecules from forming into filaments. Actin is the main cellular skeleton protein involved in cell shape and movement. This action can block the contraction of muscle cells as well as stop the migration of white blood cells and possibly malignant cells also. The toxins also interfere with cell signaling. Specifically, receptors on a cell's surface respond to specific molecules by promoting a cascade of secondary proteins that in turn result in a variety of cell functions from changes in morphology to secretion.

In "Ophthalmic and Reconstructive Surgery," 16 (2), 101-13, (2000), Fezza J.P. *et al.* disclose the use of tetanus toxin to cause localized orbiculari oculi weakness without producing systemic tetany in immunized rabbits. Potential uses of tetanus toxin in treatment of blepharospasm and hemifacial spasm are suggested without provisions of any detailed information regarding dosage or other description useful to one skilled in the art seeking to use the tetanus toxin to treat these conditions.

U.S. Patent No. 5,989,545 to Foster *et al.* describes the use of the light chain of a clostridial neurotoxin by itself or linked to other moieties as a pharmaceutical for the treatment of pain. Foster *et al.* do not disclose the use of the entire molecule of tetanus toxin.

U.S. Patent No. 5,714,468 to Binder describes the use of a fragment of tetanus toxin to reduce pain in migraine headaches. U.S. Patent No. 5,670,484 to Binder discloses a method for treatment of cutaneous cell-proliferative disorders with Botulinum toxin A and tetanus toxin. In both patents, Binder uses the same TT dosages as are used for BT. Moreover, he discourages the use of TT for beneficial purposes because he found that TT to be too toxic at the dosages disclosed in his patents.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

U.S. Patent No. 5,766,605 to Sanders *et al.* describes the control of autonomic nerve function in a mammal by administering to the mammal a therapeutically effective amount of Botulinum toxin. There is no disclosure of tetanus toxin.

5 Despite the apparent effects of neurotoxins on motor, autonomic and sensory neurons, the use of such toxins, and especially tetanus toxin in animals, including humans, has been limited and has never been used for clinical applications. Thus, there remains a need in the medical art for methods of treating patients with tetanus toxin that can cause an increase or decrease in neural activity at selected sites of the patient. Similarly, there is still a need in the medical arts for methods using tetanus toxin to treat clinical disorders caused by improper  
10 cellular activity, such as inflammatory conditions. Further, there remains a need for pharmaceutical formulations that can be delivered to a patient to achieve clinically beneficial results or treat certain dysfunctions, while eliminating or minimizing dependence, tolerance, and side effects associated with more conventional drugs.

#### **OBJECTS OF THE INVENTION**

15 It is an object of the invention to provide a method of using tetanus toxin to achieve beneficial effects in animals, particularly in mammals and more particularly in humans.

It is an object of the invention to provide a treatment of neuromuscular dysfunctions in animals, particularly in mammals and more particularly in humans.

20 It is an object of the invention to provide a treatment of autonomic nerve dysfunctions in animals, particularly in mammals and more particularly in humans.

It is another object of the invention to control sensory functions in particularly animals, particularly in mammals and more particularly in humans..

It is an object of the invention to modulate or control neural functions in animals, particularly in mammals and more particularly in humans.

25 It is another object of the invention to use tetanus toxin modulate non-neural cellular activities of cells in animals, particularly in mammals and more particularly in humans.

#### **SUMMARY OF THE INVENTION**

In view of the above objects and others, the present invention is directed in part to a method of modulating a neural function of an animal at a selected site affected by target  
30 neurons, the method including administering a therapeutically effective amount of tetanus toxin to the selected site of the animal such that the tetanus toxin reversibly modulates the activity of the target neurons.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

In one aspect of the present invention, a therapeutically effective amount of tetanus toxin is sufficient to cause decrease in neural activity or reversible inhibitory response of the neural activity at the selected site.

5 In another aspect of the present invention, the therapeutically effective amount of tetanus toxin is sufficient to cause increase in target neuron activity or an excitatory response of the neural activity at the selected site.

10 In another embodiment, the present invention is further directed to a method for decreasing the activity of a nerve function in an animal including administering to a selected site affecting target neurons of an animal an amount of tetanus toxin sufficient to cause a denervation of the target neurons, wherein the denervation results in a reversible inhibitory response of the nerve function at the selected site innervated by the target neurons.

15 In yet another embodiment, the present invention is directed to a method for increasing the activity of a nerve function in an animal comprising administering to a selected site affecting target neurons of an animal an amount of tetanus toxin sufficient to cause an excitatory response of the nerve function at the selected site innervated by the target neurons.

In another aspect, the invention is related to a method for controlling neural function in animals, particularly mammals, and more particularly humans, comprising administering to a selected site a therapeutically effective amount of tetanus toxin to control the neural function.

20 In certain embodiments of the present invention including each of the foregoing methods, the decrease or increase in neural activity occurs over a period of time from about one hour to about one year. In certain preferred embodiments, the decrease or increase in neural activity occurs over a period of time from about one week to about four months.

25 In certain embodiments of each of the foregoing methods, each of the foregoing methods includes: (i) determining the level of antibodies of tetanus toxin present in blood plasma of the animal prior to administering of any tetanus toxin; and (ii) immunizing the animal when the level of tetanus toxin is below 0.1 IU/ml. The immunizing step is performed passively or actively. The level of antibodies of tetanus toxin present in blood plasma is determined by antibody titer or any applicable other method known in the art.

30 In each of the embodiments of the foregoing methods the therapeutically effective amount of tetanus toxin is delivered at the selected site by injection, topical application, aerosol, or instillation into ducts or body orifices. In certain preferred embodiments of the



WO 02/00172

PCT/US01/20523

foregoing methods the therapeutically effective amount of tetanus toxin is delivered to the target neurons encapsulated into liposomes or artificial vesicles with bi-layer lipid membranes.

5 In certain preferred embodiments of each of the foregoing methods, the therapeutically effective amount of tetanus toxin is suspended in a pharmaceutically acceptable carrier.

In other preferred embodiments of each of the foregoing methods, the tetanus toxin is in the form of freeze-dried powder.

10 In each of the foregoing embodiments of each of the foregoing methods the target neurons include motor neurons, autonomic neurons, sensory neurons or neurons of the central nervous system.

In certain embodiments of each of the foregoing methods, the activity of the target neurons is affected by inhibiting directly or indirectly the release of neurotransmitters or neuropeptides.

15 In certain preferred embodiments of the invention wherein the neural activity of the target neurons is reversibly inhibited or the target neurons are denervated, the therapeutically effective amount of TT is from about 100 units to about 10,000 units for the selected site.

20 In other more preferred embodiments wherein the neural activity of the target neurons is reversibly inhibited or the target neurons are denervated by administration of tetanus toxin, the therapeutically effective amount of TT is from about 500 units to about 5000 units for the selected site.

In other most preferred embodiments of each of the foregoing methods of reversibly inhibiting the neural activity of or denervating the target neurons, the therapeutically effective amount of TT is from about 1000 units to about 2000 units for the selected site.

25 In certain other preferred embodiments of each of the foregoing methods, wherein the administration of tetanus toxin results in the increase of the neural activity of the target neurons or in an excitatory response of the nerve function at the selected site innervated by the target neurons, the therapeutically effective amount of TT is from about 0.01 units to about 2000 units for the selected site. In certain more preferred embodiments of each of the  
30 foregoing methods, the therapeutically effective amount is from about 1 unit to about 10 units

WO 02/00172

PCT/US01/20523

for the selected site. In certain most preferred embodiments of the foregoing methods, the therapeutically effective amount is from about 2 units to about 4 units for the selected site.

In certain other embodiments of each of the foregoing methods, whenever the tetanus toxin is administered at a selected site it evokes an excitatory response in target neurons associated with tissues or organs of the skeletal muscles. For these foregoing embodiments, applicable clinical disorders include without limitation sleep apnea and snoring, scoliosis, strabismus, muscle atrophy, neurologically impaired muscles including muscular dystrophy, ALS, or myasthenia gravis, decrease in muscle mass, or decrease in facial muscle tone.

In other embodiments of each of the foregoing methods, whenever the administration of TT evokes an excitatory response of neural activity in smooth muscles such as tissues or organs including without limitation lower esophageal sphincter, anal sphincter, bladder, bladder sphincter, vaginal sphincter, pyloric sphincter, upper esophageal sphincter, colon wall muscles.

In other embodiments of the invention, wherein the methods of the invention include administration of TT evoking an excitatory response of target neurons of the autonomic, parasympathetic nervous system, the selected sites include tissues or organs affecting saliva production, the organs affecting saliva production including the submandibular gland, parotid gland, sublingual gland, or minor salivary glands of the oral mucosa.

In yet other embodiments, wherein the methods of invention include administration of TT to evoke an excitatory response of target neurons of the autonomic sympathetic nervous system, the selected site comprises tissues or organs affected by nasal congestion, impotence, hair loss or hypotension.

In certain other embodiments of the foregoing methods, the tetanus toxin is administered to skeletal muscles to evoke a reversible inhibitory response at the selected sites including tissues or organs affected by spastic dysphonia, hemifacial spasm and blepharospasm, temporal mandibular joint syndrome or bruxism, torticollis, neck pain, writer's cramp, limb muscle contracture, nerve regeneration within a muscle or migraine headache. The applicable skeletal muscles include vocal folds, facial muscles, masseter muscle, sternocleidomastoid muscle, trapezius muscle, forearm muscles, limb muscles, temporalis muscles and other unspecified muscles.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

In other embodiments of the foregoing methods, wherein the administration of TT evokes a reversible inhibitory response, the tetanus toxin is administered to other selected sites including tissues or organs of smooth muscles affected by bronchospasm, cricopharyngeal spasm, esophageal spasm, achalasia, obesity, spastic colon or anal fissures.

5 The muscles include pulmonary smooth muscles, cricopharyngeus muscle, esophagus, lower esophager sphincter, stomach wall muscles, colon wall muscles and anal sphincter.

In yet other embodiments of the foregoing methods, tetanus toxin evokes reversible inhibitory responses by administering it at the selected site including tissues or organs affected by gastric acid, prostate hypertrophy, rhinorrhea, salivation, irritation of pulmonary  
10 mucosa, psoriasis, immune tolerance or immune reaction. In the foregoing embodiments, the applicable target neurons are part of the autonomic parasympathetic system and include gastric nerve supply, prostate gland, intranasal mucosa, pulmonary mucosa, submandibular gland, skin and thymus. In certain other embodiments of the foregoing methods, other  
15 selected sites for TT application include tissues or organs affected by osteoporosis or angina including bones, coronary arteries and cardiac muscles.

In certain other embodiments of each of the foregoing methods TT can be administered with a vasoconstrictor at the target neurons of the selected site in an amount from about 1:200,000 to about 1:100,000. The vasoconstrictor can be administered prior to, contemporaneously with or immediately after the administration of the tetanus toxin.  
20 Vasoconstrictors useful in the present invention include without limitation epinephrine, norepinephrine, or epinephryl borate.

In another aspect, the invention is directed to a pharmaceutical formulation for modulating a neural function of an animal at a selected site affected by target neurons, the formulation comprising a therapeutically effective amount of tetanus toxin suspended in a  
25 pharmaceutically acceptable carrier for delivery to the selected site, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 100 units to 10,000 units for the selected site.

In another aspect, the invention is directed to a pharmaceutical formulation for decreasing the activity of a nerve function in an animal at a selected site, the formulation  
30 comprising a therapeutically effective amount of tetanus toxin suspended in a pharmaceutically acceptable carrier for delivery to the selected site, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 100 units to 10,000 units for

WO 02/00172

PCT/US01/20523

the selected site. In the foregoing embodiment the selected site includes tissues or organs affected by spastic dysphonia, hemifacial spasm and blepharospasm, temporal mandibular joint syndrome, bruxism, torticollis, neck pain, writer's cramp, limb muscle contracture, migraine headache, bronchospasm, cricopharyngeal spasm, esophageal spasm, achalasia, obesity, spastic colon, anal fissures, gastric acid, prostate hypertrophy, rhinorrhea, salivation, irritation of pulmonary mucosa, psoriasis, immune tolerance or immune reaction, osteoporosis or angina.

In yet another aspect, the invention relates to a pharmaceutical formulation for increasing the activity of a nerve function in an animal at a selected site, the formulation comprising a therapeutically effective amount of tetanus toxin suspended in a pharmaceutically acceptable carrier for delivery to the selected site wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 0.001 units to about 2000 units for the selected site. The selected site for the pharmaceutical formulation of this embodiment comprises tissues or organs affected by sleep apnea and snoring, scoliosis, strabismus, muscle atrophy, neurologically impaired muscles including muscular dystrophy, ALS, myasthenia gravis, decrease in muscle mass, decrease in facial muscle tone, nasal congestion, impotence, hair loss or hypotension. Other selected sites for the pharmaceutical formulation of this embodiment include tissues or organs including lower esophageal sphincter, anal sphincter, bladder, vaginal sphincter, pyloric sphincter, upper esophageal sphincter, colon wall muscles. Other selected sites for the pharmaceutical formulation of this embodiment include tissues or organs affecting saliva production or nasal mucosa, the organs affecting saliva production including submandibular gland, parotid gland, sublingual gland, or minor salivary glands of the oral mucosa.

The invention is further directed to the use of tetanus toxin in the preparation of a medicament for a method of treating a clinical disorder or symptom of an animal, comprising administering a therapeutically effective amount of tetanus toxin to a selected site affected by target neurons related to the clinical disorder or symptom of the animal, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 100 units to 10,000 units of the selected site.

Another aspect of the invention is directed to the use of tetanus toxin in the preparation of a medicament for a method of treating a clinical disorder or symptom in an animal, comprising administering a therapeutically effective amount of tetanus toxin at a

WO 02/00172

PCT/US01/20523

selected site of the animal in order to decrease the activity of a nerve function in the animal, the nerve function related to the clinical disorder or symptom of the animal, wherein the tetanus toxin causes an excitatory or reversible inhibitory response of the nerve function at the selected site innervated by the target neurons, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 100 units to 10,000 units of the selected site. In this aspect of the invention, the selected site comprises tissues or organs affected by spastic dysphonia, hemifacial spasm and blepharospasm, temporal mandibular joint syndrome, bruxism, torticollis, neck pain, writer's cramp, limb muscle contracture, nerve regeneration within a muscle, migraine headache, bronchospasm, cricopharyngeal spasm, esophageal spasm, achalasia, obesity, spastic colon, anal fissures, gastric acid, prostrate hypertrophy, rhinorrhea, salivation, irritation of pulmonary mucosa, psoriasis, immune tolerance or immune reaction, osteoporosis or angina.

In yet another aspect, the present invention is directed to the use of tetanus toxin in the preparation of a medicament for a method of treating a clinical disorder or symptom in an animal, comprising administering a therapeutically effective amount of tetanus toxin at a selected site of the animal in order to increase the activity of a nerve function in the animal, the nerve function related to the clinical disorder or symptom of the animal, wherein the tetanus toxin causes an excitatory or reversible inhibitory response of the nerve function at the selected site innervated by the target neurons, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 0.001 units to about 2000 units for the selected site. In this embodiment of the invention the selected site comprises tissues or organs affected by sleep apnea and snoring, scoliosis, strabismus, muscle atrophy, neurologically impaired muscles including muscular dystrophy, ALS, myasthenia gravis, decrease in muscle mass, decrease in facial muscle tone, nasal congestion, impotence, hair loss or hypotension. Other selected sites for the foregoing embodiment include tissues or organs including lower esophageal sphincter, anal sphincter, bladder, bladder sphincter, vaginal sphincter, pyloric sphincter, upper esophageal sphincter, colon wall muscles. Other selected sites for the foregoing embodiment comprise tissues or organs affecting saliva production or nasal mucosa, the organs affecting saliva production including submandibular gland, parotid gland, sublingual gland, or minor salivary glands of oral mucosa.

Yet another aspect to the invention is directed to a method of modulating a cellular, non-neural activity of an animal at a selected site, the method comprising administering at the

WO 02/00172

PCT/US01/20523

selected site a therapeutically effective amount of the tetanus toxin, wherein the cellular activity includes release of a cellular component comprising hormones, inflammatory modulators from nerves or blood cells, cholinergic caused secretions, mucus secretions from respiratory, digestive or urinary glands.

5 In the foregoing embodiment, the cellular activity occurs in cells including macrophages, monocytes, endocrine cells or renal cells. In this embodiment the cellular activity is modulated over a period from about one hour to about one year. In a preferred embodiment the cellular activity can be controlled or modulated over a period of one week to four months.

10 In certain embodiments of each of the foregoing methods related to modulating cellular activity, each of the foregoing methods further comprises: (i) determining the level of antibodies of tetanus toxin present in blood plasma of the animal prior to administering of any tetanus toxin; and (ii) immunizing the animal when the level of tetanus toxin is below 0.1 IU/ml. The immunizing is performed passively or actively. The level of antibodies present in  
15 blood plasma is determined by antibody titer.

In certain embodiments of each of the foregoing methods the therapeutically effective amount of tetanus toxin is delivered at the selected site by injection, topical application, aerosol, instillation into ducts or body orifices, encapsulated into liposomes or artificial vesicles with bi-layer lipid membrane. In the foregoing embodiments the therapeutically  
20 effective amount of tetanus toxin is suspended in a pharmaceutically acceptable carrier. Additionally, the tetanus toxin can be in the form of a freeze-dried powder.

In the embodiments of the foregoing methods related to modulating cellular activity the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 0.001 units to about 10,000 units for the selected site.

25 In other more preferred embodiments of the foregoing methods, the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 1 unit to about 5000 units for the selected site.

In other most preferred embodiments of the foregoing methods, the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 10 units to about 1000 units for the selected site.

30 In certain embodiments of each of the foregoing methods the selected site comprises tissues or organs affected by malignant carcinoma or inflammatory conditions.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

In yet another aspect, the invention relates to a pharmaceutical formulation for modulating a cellular activity of cells of an animal, the formulation comprising a therapeutically effective amount of tetanus toxin suspended in a pharmaceutically acceptable carrier for delivery to the selected site, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 0.001 units to about 10,000 units for the selected site.

In another more preferred embodiment, the invention relates to the pharmaceutical formulations of the foregoing methods, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 1 unit to about 5000 units for the selected site.

In yet another most preferred embodiment, the invention related to the pharmaceutical formulations of the foregoing methods, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 10 units to about 1000 units for the selected site.

In certain embodiments of the invention the pharmaceutical formulations are administered at a selected site comprising tissues or organs affected by malignant carcinoma or inflammatory conditions.

Another aspect of the invention is directed to the use of the tetanus toxin in the preparation of a medicament for a method of effectively treating a clinical disorder or symptom in an animal, comprising administering a therapeutically effective amount of tetanus toxin in order to modulate a cellular activity of an animal at a selected site, the cellular activity including release of a cellular component including hormones, inflammatory modulators from nerves or blood cells, cholinergic caused secretions, mucus secretions from respiratory, digestive or urinary glands, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 0.001 units to about 10,000 units for the selected site.

In a preferred embodiment the invention is directed to the use of the tetanus toxin in the preparation of a medicament for a method of effectively treating a clinical disorder or symptom in an animal, comprising administering a therapeutically effective amount of tetanus toxin in order to modulate a cellular activity of an animal at a selected site, the cellular activity including release of a cellular component including hormones, inflammatory modulators from nerves or blood cells, cholinergic caused secretions, acid secretions mucus secretions from respiratory, digestive or urinary glands, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 1 unit to about 5,000 units for the selected site. In a most preferred embodiment the use of the tetanus toxin is in a therapeutically effective amount from about 10 units to about 1000 units for the selected site. In the foregoing uses of

WO 02/00172

PCT/US01/20523

tetanus toxin, the selected site comprises tissues or organs affected by malignant carcinoma or inflammatory conditions.

The invention is also directed to a method for the alleviation of pain experienced by an animal comprising administering tetanus toxin suspended in a pharmaceutically acceptable carrier to a selected site of the animal, the tetanus toxin in a therapeutically effective amount sufficient to decrease or reversibly inhibit the release of inflammatory neurotransmitters or neuropeptides associated with the pain.

In another aspect, the invention relates to a method for the alleviation or blocking of pain sensation experienced by an animal comprising administering tetanus toxin to a selected site of the animal in a therapeutically effective amount sufficient to denervate sensory neurons affecting the release of inflammatory neurotransmitters or neuropeptides controlling the selected site of the animal.

In yet another aspect, the invention is directed to a method for the increase of muscle mass in an animal comprising administering to a selected site of a muscle a pharmaceutically effective amount of tetanus toxin sufficient to cause an increase or an excitatory response in the neural activity of the selected muscle. In the foregoing method the selected muscle is a skeletal or smooth muscle.

These and other advantages of the present invention will be appreciated from the detailed description and examples which are set forth herein. The detailed description and the examples enhance the understanding of the invention, but are not intended to limit the scope of the invention.

#### **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

Methods and pharmaceutical compositions for modulating a neural function of an animal by the administration of an effective amount of tetanus toxin to an animal are provided. These methods and compositions can be used for management or treatment of many clinical disorders or diseases.

As used herein, in the context of modulating or controlling a neural function, a "selected site" is defined to include a tissue or organ affected directly or indirectly by a target neuron. In the context of modulating non-neural, cellular activity, a "selected site" refers to a tissue or organ affected directly or indirectly by a non-neural cellular by including release of a cellular component such as hormones, inflammatory modulators from nerves or blood cells,



WO 02/00172

PCT/US01/20523

cholinergic caused secretions, acid secretions, mucus secretions from respiratory, digestive or urinary glands.

As used herein, the term "modulating" is used interchangeably with the term "controlling" and means to adjust to a requirement or regulate.

5 As used herein, the term "target neurons" refers to a neuron that is affected directly or indirectly by the presence of tetanus toxin in a therapeutically effective amount sufficient to cause a physiological change at the selected site. Target neurons include without limitation neurons functionally clarified as sensory neurons, motor neurons, interneurons, autonomic and central nervous system neurons particularly related to uptake, transport or inhibition of neurotransmitters or neuropeptides.

10 The term "therapeutically effective amount" means that the tetanus toxin is administered in a non-toxic amount sufficient to cause reduction in the occurrence or magnitude of the symptoms being targeted. When the toxin is used to increase the neuronal tone, a preferred amount may be equal to the amount of botulinum toxin that causes the opposite effect (denervation). When tetanus toxin is used to cause denervation of the target neurons, the amount may be about 500 times greater than the same amount of botulinum toxin required to achieve a similar effect.

15 As used herein, the term "patient" broadly refers to any animal that is to be treated with the compositions and by the methods herein disclosed. In particular, the disclosed methods and compositions will find use in veterinary practice and animal husbandry for, e.g., birds and mammal, wherever modulation of neural function is convenient or desirable. The term "animal" includes all members of the animal kingdom, including mammals and especially humans.

20 For purposes of the present invention, tetanus toxin is commercially available from for example, Lederle Laboratories of Wayne, N. J. under the tradename "Tetanus Toxoid Purogenated." The method of the invention will preferably encompass the use of pharmaceutically safe forms of the intact tetanus toxin, including both heavy and light chains, as well as any fragment thereof, such as an AB fragment. Combinations with other moieties such as other proteins including a hybrid of a protein and the heavy or light chain portion of the tetanus toxin are also included in the present invention.

30 More specifically, for purposes of the present invention, the use of tetanus toxin, as well as a fragment thereof, is contemplated. In addition, it may be beneficial to separate the

WO 02/00172

PCT/US01/20523

binding protein portion of the tetanus toxin to use in association with other proteins to allow the other proteins to enter a cell. It may also be beneficial to bind the toxic protein portion of the tetanus toxin to other proteins to allow the toxic protein to enter cells it would otherwise be incapable of entering.

5 Those of ordinary skill in the art will know, or can readily ascertain, how to obtain tetanus toxins, in a pharmaceutically safe form, preferably, a form that is nonteratogenic. For most of the neurotoxins of the invention, pharmaceutical safety will be dose-dependent such that relatively low dosages of toxin will be "safe" as compared to dosages which are known to be sufficient to produce disease.

10 Preferably, the tetanus toxins of the invention will be administered as a composition in a pharmaceutically acceptable carrier. To that end, presynaptic neurotoxin compositions are prepared for administration by mixing a toxin of the desired degree of purity with physiologically acceptable sterile carriers. Such carriers will be nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed. Ordinarily, the preparation of such compositions  
15 entails combining the neurotoxin with buffers, antioxidants such as ascorbic acid low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides, proteins, amino acids, carbohydrates including glucose or dextrans, chelating agents such as EDTA, glutathione and other stabilizers and excipients. Such compositions may also be lyophilized and will be pharmaceutically acceptable; i.e., suitably prepared and approved for use in the desired  
20 application.

Unlike other pharmaceuticals, the biological activity of the same weight of a neurotoxin commonly varies between the different laboratories that produce the toxin. The reason for this is that not all preparations completely remove other proteins or that during isolation of the toxin some molecules tend to lose their biological activity.

25 Measurement by a biological assay is normally used to obtain a standard preparation of the tetanus toxin. A common biological assay used to measure the toxicity of tetanus toxin is the average dose needed to kill 50% of mice when injected subcutaneously. This amount of toxin is referred to as the mouse LD<sub>50</sub>, or the mMLD (mouse minimum lethal dose), or simply as a unit of tetanus toxin.

30 Another biological assay commonly used in experimental studies of neurotoxins is the mouse hemi diaphragm preparation (Bulbring, E., J Phys (London), 1, 38-61, (1946)). This is an in vitro assay consisting of half of the diaphragm of a mouse and the nerve that innervates

WO 02/00172

PCT/US01/20523

it. The nerve is electrically stimulated to cause the diaphragm to contract and the effect of different toxin preparations on blocking the neuromuscular transmission can be precisely measured. The advantage of this particular assay is that it precisely measures the effect of toxin at the neuromuscular junction, which is the neural connection that is usually of interest to investigators as well as clinicians.

Except for vaccine preparations, tetanus toxin is not used commercially; there is no current standard that composes a unit. Instead, the unit has been reported by Haberman, et al. to vary from 0.3 ng/kg to 25 ng/kg (Habermann, et al., *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 311(1), 33-40, (1980)). The dose of tetanus toxin needed for a local effect will vary depending on the desire for excitatory or inhibitory action, the specific type of neural tissue (Montecucco, C. and G. Schiavo, *Q Rev Biophys*, 28(4), 423-72 (1995)), the size of the tissue or organ in which the effect is desired, the species to be injected, the activity of the nerve, temperature (Habermann, E., F. Dreyer, and H. Bigalke, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 311(1), 33-40, (1980)) and other factors.

There is no absolute standard weight that constitutes a unit of tetanus toxin, and as tetanus toxin has never been used for clinical applications there has never been any compelling reason to adopt a standard. In future clinical applications of tetanus toxin a commercial vendor would be required to produce and distribute a standardized and consistent preparation of tetanus toxin in unit dose form. At present there is no standard, and the weight of tetanus toxin constituting a unit that is currently available from different companies or laboratories varies from approximately 0.1 ng to 100 ng, with most being approximately 1ng. For this reason, as used in the present invention a unit of tetanus toxin means 0.02 ng of tetanus toxin.

In contrast to BT, TT has never been used for clinical applications. This is surprising as TT has a variety of special qualities that makes it potentially much more clinically useful than BT. First, it binds to all classes of neurons: motor, autonomic, and sensory. In contrast the botulinum toxin binds to motor neurons. Secondly, TT is transported to the central nervous system. Although the toxin binds to peripheral nerves, mostly motor neurons, it does not cause its primary effect by intoxicating the peripheral neuron. Instead the toxin is transported within the axons of the motor neurons to their cell bodies located in the spinal column and brain stem. There the motor neurons release the toxin, allowing to pass the synapse and bind and enter into neurons of the central nervous system. Thirdly, it blocks the

WO 02/00172

PCT/US01/20523

release of most if not all neurotransmitters: acetylcholine, norepinephrine, epinephrine, dopamine, glutamate, GABA, glycine, serotonin, as well as neuropeptides CGRP, neuropeptide Y, substance P and others; and neuroendocrine hormones oxytocin, vasopressin. In the central nervous system the toxin binds preferentially to neurons that use the neurotransmitters GABA and glycine. After binding the toxin enters into these neurons and blocks the release of these neurotransmitters. The GABA and glycine containing neurons are the inhibitory neurons of the central nervous system. Normally a motor neuron receives input from many inhibitory and excitatory neurons and these opposing influences largely cancel each other. However after inhibitory neurons are blocked the excitatory neurons can stimulate the motor neurons unopposed so that the motor neuron activity increases causing increased activity in the muscle innervated by these intoxicated motor neurons. Clinically this is seen as increased muscle tone that reaches an unremitting spasm in its final stages. Fourthly, TT can cause increased activity of peripheral and central nerves as well as blocking these same nerves depending on the exact dosage used.

The mechanism of action of tetanus toxin is such that the excitatory action evoked by its use is indirect. The tetanus toxin is taken up by a peripheral neuron such as the motor neuron innervating a muscle and is transported back to the cell body of the motor neuron in the spinal column. It is then released into the presynaptic space. Motor neurons are connected to many other neurons that are either excitatory or inhibitory. Under normal circumstances these inputs are balanced so that the motor neuron is excited just enough to perform the appropriate muscle movements. The inhibitory neurons use the neurotransmitters glycine or GABA, and the tetanus toxin binds to and then blocks these neurons (Bigalke, H., *et al.*, Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol, 316(2), 143-8, (1981)). When the inhibitory neurons are blocked only the excitatory input remains and the activity of the muscle increases.

Each muscle has a different mixture of excitation and inhibition. For example the masseter muscle is a muscle that has a great deal of excitatory input. If tetanus toxin blocks all the inhibitory input to the motor neurons supplying the masseter muscle it goes into an extremely strong and prolonged spasm. This spasm of the masseter muscle clenches the jaw shut and is the origin of the term "lockjaw" that refers to the systemic disease.

In most muscle applications it is not desirable to inject the tetanus toxin to obtain a prolonged spasm. Instead, what is usually needed is a mild to moderate increase in muscle

WO 02/00172

PCT/US01/20523

tone. Therefore, very low doses are used for local excitatory applications. For example, when the hind limb of a cat was injected with 1.5 ng into the triceps surae muscle of the hind leg, the tetanus toxin caused an incomplete extension of the leg developed after about one week (Takano, *et al.*, *Toxicon* 27(4), 431-8, (1989)). When 7.5 ng or more were injected the leg of the cat remained extended in a stiff continuous spasm that the animal could not overcome.

Similarly, excitatory applications in human muscle or other target tissue requires doses in the range of 0.001 to 10 ng depending on the size of the muscle and its underlying neural mixture of excitatory and inhibitory inputs. To achieve the desired application, those skilled in the art understand that it is useful to begin by using a dose at the lower end of the foregoing range and wait to observe the effects. Subsequent increasing doses of tetanus toxin can be given until the proper level is achieved.

Tetanus toxin can also block peripheral neural transmission directly at the neuromuscular junction to cause a flaccid paralysis. Experiments show that this direct neural blocking effect requires approximately 500 times more tetanus toxin than those used to cause excitation (Habermann, E., *et al.*, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 311(1), 33-40, (1980)). The reason for this large disparity in dosages causing the different effects of excitation or inhibition is unknown.

As local paralysis may require 0.5 to 50 ng of tetanus toxin or more to achieve its effect, these doses approach or exceed the lethal dose for a non-immunized human. The lethal dose for a non-immunized human is approximately 2.5 ng/kg or 175 ng for a 70 kg individual. Therefore use of tetanus toxin for neural block may be restricted to smaller targets requiring low amounts of toxin. It would, therefore, be critical to ascertain the immune status of the human be known prior to administering the tetanus toxin. Universal immunization is performed in the United States and most industrialized nations. Immune status is measured in international units of tetanus antibody. A blood plasma antibody content greater than 0.1 IU/ml is considered protective against systemic tetanus. The level of immune status is high after immunization and gradually falls over in the following years. Studies have shown that half of vaccinated human adults have less than 0.1 IU/ml. Such individuals would probably require booster vaccination to raise their levels of immunity.

Tetanus toxin can also block action potentials in nerve axons just like local anesthetics. As a result, tetanus toxin can be used to inject and block any nerve along its

WO 02/00172

PCT/US01/20523

course, thus increasing its clinical usefulness. Unlike botulinum toxin, tetanus toxin binds to the membrane of the neuronal axon (Herreros, et al., *European Journal Neurosci* 9(12), 2677-86, (1997)). Experimental animal models of local tetanus show large amounts of the toxin along the course of the nerve leading from the injected muscle back to the spinal column outside of the axons (Erdmann, et al., *Neuryn Schmiedebergs, Archive of Pharmacology*, 290(4), 357-373, (1975)). Physiological studies of patients with local tetanus suggest that the nerve conduction is decreased or blocked, which is a separate effect from the block at synapses, (Dastur, F.D., *et al.*, *Journal Of Neurology, Neurosurgery And Psychiatry* 40(8), 782-6 (1977)).

Also many of the proposed injections might require the use of electromyography for proper localization within the muscle. This uses the tip of the needle to sense muscle activity and is routine in many botulinum toxin injections.

Unexpectedly large injections of tetanus toxin can be made into a muscle without systemic or regional spread. Partly this is due to extremely high affinity that the tetanus toxin has for the neural membrane that causes it to bind rapidly with neurons (Critchley, D.R., *et al.*, *J Cell Biol*, 100(5), 1499-507 (1985)). Additional mechanisms can be used to reduce the risk of side effects. An example would be to add adrenaline 1:100,000 dilution, phenylephrine ½% or other vasoconstricting agents to the injection. These would cause a temporary local vasoconstriction and decrease in blood flow, thereby decreasing the opportunity for the tetanus toxin to enter the systemic circulation.

Other vasoconstrictors useful in the present invention include without limitation epinephrine, norepinephrine, or epinephryl borate.

Other additional precautions can be taken to prevent the systemic spread of tetanus toxin when large doses are injected locally. For example, the tetanus anti toxin can be injected, either into the same site as tetanus toxin injection but with some time delay or at a distant site (Fezza, J.P., *et al.*, *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, 16(2), 101-113, (2000)). In the rabbit the lethal dose of tetanus toxin in a typical 2 kg rabbit is approximately 1-10 ng or 0.5-5ng/kg. However, an injection of 25 ng, 2,500 to 25,000 times the lethal dose, was injected safely into the orbicularis oculi muscle. In this experiment 250 IU of tetanus antitoxin were simultaneously injected intramuscularly into a hind limb muscle and blocked any systemic spread. At five days these animals demonstrated paresis of the injected eyelid without any local or systemic spread of toxicity. Clearly this is at the highest end of dosage,

WO 02/00172

PCT/US01/20523

spectrum as either reducing the amount of tetanus toxin to 125 IU, or increasing the injected dose of tetanus toxin to 37.5 ng, resulted in local or systemic signs of toxicity (Fezza, J.P., *et al.*, *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, 16(2), 101-113, (2000)).

In certain preferred embodiments, the tetanus toxin is used to control motor neuron  
5 function. For example, the toxin is administered locally to a particular target site in the body (e.g., particular muscles) in a sufficient amount to increase the neural activity of the motor neurons in the target area. This in turn increases neural stimulation of muscle cells innervated by said neurons. This results in increased muscle tone, and if the muscle is immobilized in a shortened length, it will rapidly adapt to the shortened length (Abe, Y., *et al.*, *Acta*  
10 *Otolaryngol (Stockh)*, 112 (4), 703-9, (1992)). Alternatively, by adjusting the amount of the tetanus toxin, one may produce an opposite effect, e.g., denervation of the neurons. For a clinically beneficial effect, a therapeutically effective amount of the tetanus toxin is administered.

In preferred embodiments, low concentrations of tetanus toxin to increase tone are  
15 administered to genioglossus, geniohyoid and soft palate muscles (e.g., for treatment of sleep apnea); pharyngeal muscles, to aid swallowing in patients with dysphagia; paraspinal muscle (e.g., for treatment of scoliosis); extraocular muscle (e.g., for treatment of strabismus); muscles in the immobilized limb (e.g., to prevent atrophy during long-term casting); to  
20 different muscle in paralytic neurological diseases such as ALS to restore muscle tone; lower esophageal sphincter (e.g., to control esophageal reflux); stomach muscle (e.g., for gastric contracture and decreased appetite); facial muscles (e.g., for increased tone and youthful appearance); target muscles to increase muscle mass as a substitute for exercise.

In other preferred embodiments high concentrations of tetanus toxin to decrease tone  
are administered to facial muscles to decrease facial muscle or eyelid spasm; to temporal  
25 muscles to treat myofascial pain and headache; to cervical muscles, to treat torticollis and cervical dystonia; various target muscles for muscular dystrophy, ALS, myasthenia gravis; limb muscles (e.g., to treat spasm or contracture resulting from upper motor neuron lesions, such as seen after strokes); to jaw muscles to decrease bruxism; to laryngeal muscles to treat  
30 spasmodic dysphonia and hyperfunctional conditions; to forearm muscles to treat writers cramp; to leg muscles to treat night cramps; in any muscle where increased branching of motor nerves is beneficial such as during nerve regeneration after traumatic nerve injury.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

In certain embodiments, the tetanus toxin may be administered locally to a particular part of the autonomic system (e.g., target tissue or organ) to control the activity of the neurons in that area, which also in turn affects the target autonomic system innervated by said neurons.

5 In certain embodiments, the tetanus toxin is administered locally to a target autonomic system (e.g., tissue or gland) in a therapeutically beneficial low amount sufficient to increase the activity of the neurons in that area. This results in increased stimulation of the cells (e.g., of tissue or gland) innervated by said neurons. Tetanus toxin may be administered to salivary, lacrimal and vaginal glands to treat dry mouth, dry eye and atrophic vaginitis; to mammary  
10 glands to increase milk production; to nasal mucosa to treat nasal congestion and allergic symptoms; to penile vasculature tissue to prolong erections and treat impotence; to pancreas and other endocrine glands to increase hormone production; to colon and other gastrointestinal organs to increase motility to treat constipation; to sympathetic nerves of the lung to relax smooth muscle in asthma and chronic obstructive diseases; to gastric smooth  
15 muscle to cause gastric shrinkage and cause feelings of satiety to decrease appetite and cause weight loss; to pulmonary mucus glands to increase serous mucous production and cilia transport to treat cystic fibrosis; to adipose tissue to cause lipolysis and fat cell shrinkage.

In certain other embodiments, higher doses may be used to decrease autonomic neural activity. When used clinically, the tetanus toxin is administered in a therapeutically effective  
20 amount to hair follicles to treat hair loss; to prostate glands to cause shrinkage of an enlarged prostate; to connective tissue to increase its metabolism to treat the lax skin of the aged; to pain fibers to decrease pain sensation and inflammation; to skin in proliferative or allergic diseases such as psoriasis and atopic dermatitis; to sebaceous glands of skin to treat acne; to sebaceous glands of ear canal skin to decrease ear wax; to sympathetic nerves of the  
25 circulatory system to decrease blood pressure; to neuromodulate the immune response in the thymus and spleen, lymph nodes, or any tissue where neural immune interactions exist; to skin, digestive tract or mucosa to prevent recognition of foreign antigens to produce tolerance; to tonsils to decrease their size; to the anterior chamber of the eye to decrease fluid production to treat ocular hypertension; to gastric mucosa to decrease acid production in  
30 reflux esophagitis; to the nasal mucosa to decrease rhinorrhea, and to decrease the neural influence on mast cell histamine release to decrease allergic symptoms; to pterygopalatine ganglia to block vasodilatory neurons to prevent true migraine headache.



WO 02/00172

PCT/US01/20523

In certain preferred embodiments, the tetanus toxin is administered to the target autonomic system in a therapeutically effective amount to treat nasal congestion rhinorrhea and allergic symptoms (Ado, A.D., *Eksperimentalnaia i Klinicheskaia Farmakologija*, **58** (3), 43-5 (1995); Albegger, K., *Hno*, **36** (10), 389-98 (1988); Agro, A. *et al.*, *Advances In Neuroimmunology*, **5** (3), 311-9, (1995)) modulate immune responses (Ado, A.D., *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*, (7), 48-51 (1993); Albanesc, A., *et al.*, *Mov Disord*, **12**(5), 764-6, (1997)), relax anal sphincters in constipation (Sabbadini, E. *et al.*, *Neuroimmunomodulation*, **2** (4), 184-202, (1995)) affect penile erection, decrease inflammation and pain in various organs, decrease skin proliferation in diseases such as psoriasis, invoke antigen tolerance, decrease blood pressure, decrease migraine headache, increase or decrease salivation, decrease sweating, decrease the size of the prostate gland, increase the connective tissues, and control hair loss.

In certain other embodiments, the tetanus toxin is administered to sensory neurons to cause a reversible sensory block. One application of such use would be to block pain from any part of the body, e.g., by locally administering to that part an amount effective to block or decrease the pain. Another embodiment would be to block the inflammatory mediators released by sensory neurons, e.g., by locally administering to a joint a therapeutic beneficial amount in rheumatoid arthritis.

In certain other embodiments tetanus toxin is applied to parts of the central nervous system, either directly or as a result of retrograde transport from a peripheral nerve.

In certain other embodiments tetanus toxin is administered to non-neuronal cells for beneficial effect. These include macrophages and other white blood cells to decrease inflammation, endocrine cells to decrease the secretion of hormones, parietal cells of the stomach to decrease acid production, fluid producing cells in the eye to decrease intraocular pressure in glaucoma, malignant cells to decrease motility and metastases.

The present invention is also directed to veterinary uses of tetanus toxin, e.g., to increase the muscle mass of a target veterinary animal. This includes milk and meat production.

According to the present invention, tetanus toxin may be administered by variety of modes of administration. When administered locally, the mode of administration includes but is not limited to injection (including pressure jet injectors), aerosolized (for nasal, upper airway or lung administration), topical application (on skin and mucous membranes and on

WO 02/00172

PCT/US01/20523

internal body surfaces (such as during surgery or in the treatment of trauma) open wounds, and by instillation into ducts (salivary, mammary, lacrimal) or body orifices (urethra, anus, oral).

5 When administered locally to a particular target site, the tetanus toxin affects the activity of the neurons in that area, preferably without having a systemic effect. As tetanus toxin is taken up by axons it can be administered along the course of a nerve to block or increase the neural activity received by a distant organ or tissue innervated by the nerve. In preferred embodiments, the tetanus toxin is administered locally to a target site in the body. However, in certain cases, local application can deliberately result in a wide distribution of  
10 the toxin. For example, the local application can be to the cerebrospinal fluid, so that it is distributed to large parts of the central nervous system; or into an artery to be distributed to the body part that the artery perfuses. In certain embodiments, application of the tetanus toxin may be systemic, e.g., into the systemic circulation so that there is distribution throughout the body.

15 Local application of tetanus toxin at pharmacological levels causes their uptake by local nerve endings and their retrograde transport to the central nervous system (CNS). In local application encompassing all means of delivery, including but not limited to injection, e.g., pressure jet injectors, and topical application. In the CNS the tetanus toxin is transported transynaptically and binds to inhibitory neurons. The result is the disinhibition of the  
20 peripheral neuron and an increase in its activity. The exact amount of the increase and its pattern is related to the biology of that particular neuron. For widespread distribution in the CNS such as the veterinary applications the toxin can be directly injected into the cerebrospinal fluid.

25 When the toxin is to be administered to cells that lack the necessary membrane receptors, the toxin may be encapsulated into liposomes, artificial vesicles with bi-layer lipid membranes. The vesicles would merge with cells in the area of injection and deliver the toxin internally. To increase specificity the surface of the liposomes can be coated with specific proteins such as antibodies or glycoproteins that allow specific docking of the liposome to the target cell.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

**EXAMPLES**

The invention is further described in the following examples. The examples are illustrative of some of the products and methods of making the same falling within the scope of the present invention. They are, of course, not to be considered in any way restrictive of the scope of the invention. Numerous changes and modification can be made with respect to the invention. The materials used in the examples hereinbelow are readily commercially available.

Excitatory intramuscular applications of tetanus toxin are illustrated in examples 1-18. Inhibitory responses elicited by application of tetanus toxin are illustrated in examples 19 to 37. Increased tone in the nerves of the autonomic system is desirable in many conditions. The mechanism of action is similar to that observed in muscles. Retrograde transport from the site of injection causes block of inhibitory afferent input. Examples 30, 33 and 38 illustrate the use of tetanus toxin to modulate or control cellular activity of holocrine secretions endocrine cells and macrophages.

**EXAMPLE 1****Sleep Apnea and Snoring**

In this example, a 60 year old male with snoring and obstructive sleep apnea is injected with tetanus toxin by passing a needle through the mucosa in the floor of the mouth. 1 unit of tetanus toxin is injected into both genioglossus muscles. The needle is advanced further until the geniohyoid muscle is entered and a further 1 unit is injected into each muscle. The needle is removed and reinserted through the oral mucosa of the soft palate within 2 centimeters of the edge of the hard palate. 1 unit of tetanus toxin is injected into each levator muscle. Within one week the incidence of snoring and obstruction during sleep decreases.

Sleep apnea and snoring are clinical conditions affecting genioglossus and/or geniohyoid, tensor and levator veli palatini muscles. Sleep apnea is a common disorder in which soft tissue of the upper airway (tongue and soft palate) impede the flow of air during inspiration thereby causing a partial obstruction to airflow and vibration of the soft tissue of the area (snoring) or complete obstruction to airflow. The result of the obstruction includes disturbed sleep patterns, snoring, daytime somnolence, difficulty in concentrating, and contributes to mood depression, hypertension and cardiac disease. The pathophysiology of obstructive sleep apnea includes a decrease in activity of the genioglossus and other upper

WO 02/00172

PCT/US01/20523

airway muscles. The genioglossus muscle inserts into the base of the tongue and has phasic activity synchronous with inspiration that moves the tongue forward to dilate the airway. The geniohyoid inserts into the hyoid bone and has a similar inspiratory activity. The tensor and levator veli palatini also have inspiratory activity that moves the soft palate superiorly. In this embodiment, administration (e.g., injections) of 1 unit of tetanus toxin into the genioglossus and/or geniohyoid, tensor and levator veli palatini muscles can result in increased amplitude of the phasic motions and decrease the airway obstruction.

#### **Example 2**

##### **Scoliosis – paraspinal muscle**

10 A female patient age 10 suffering from scoliosis, curvature of the spine, is treated by injection of 100 units of tetanus toxin into paraspinal muscles. In 1-3 days the patient shows increased tone in muscles that serve to straighten the spine.

The developmental misalignment of the spine that occurs with scoliosis could be corrected with administration (e.g., injections) of tetanus toxin into the proper muscles that would straighten the spine. This remodeling of a bone by long-term increase in muscular activity has numerous other applications. Other examples include obtaining an excitatory response from craniofacial muscles in order to rearrange the facial skeleton.

#### **EXAMPLE 3**

##### **Strabismus**

20 A male patient age 5, suffering from strabismus, or improper alignment of the eyes, is treated by injection of 0.1 unit of tetanus toxin into the medial rectus muscle of the misaligned eye. In 1 to 3 days the eye moves into alignment. This example illustrates concept similar to that described in Example 2 except that rearrangement occurs in the muscular soft tissue. Administration (e.g., injections) of tetanus toxin into the lateral rectus or other appropriate muscle increases its tonic activity and causes a straightening of the alignment of the globe.

#### **EXAMPLE 4**

##### **PREVENTING MUSCLE ATROPHY**

30 A male patient age 25 is suffering from a fracture of the femur and is scheduled to have a leg cast placed for 6 weeks. 10 units of tetanus toxin is injected into each muscle of the thigh. After 1 to 3 days the tone of the immobilized muscles increases. After 6 weeks the cast is removed and the muscles show less atrophy than expected.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

After a severe bone fracture or ligament tear, casting and immobilization can result in atrophy of the muscles of the immobilized limbs. This undesirable side effect is prevented by the administration (e.g., via injection) of tetanus toxin into the muscles prior to casting to increase their tone and prevent atrophy.

5

**EXAMPLE 5****Esophageal reflux – lower esophageal sphincter**

In the lower esophageal sphincter, a 50 year old male with afflicted with reflux esophagitis is injected with 1 unit of tetanus toxin. In 3 days the symptoms of reflux acidity decrease.

10

Laxity in the lower esophageal sphincter results in reflux of acid contents up the esophagus. This common medical problem can be prevented by administration (e.g., injection) of tetanus toxin into the lower esophageal sphincter. This example demonstrates that the increase of tone prevents esophageal reflux from occurring.

**EXAMPLE 6**

15

**Bladder or bowel incontinence – sphincters**

A 50 year old female having urinary incontinence is injected with 1 unit of tetanus toxin into the external (pudendal nerves) and internal (sympathetic axons from the inferior mesenteric ganglion) urethral sphincters. In 3 days increased muscle tone in these sphincters relieves the urinary incontinence.

20

In a related example, a 50 year old male with urinary incontinence is injected with 1 unit of tetanus toxin into the urinary sphincter under direct vision using a cystoscope. In 1-3 days the symptoms of urinary continence improve.

25

Many medical conditions result in incontinence, the inability to contain urine or bowel contents. In those cases where decreased tone of the sphincter is the problem, administration (e.g., injections) of the tetanus toxin into the sphincter can increase tone. Additional sphincters that could be injected include the vaginal introitus, pyloric sphincter, and upper esophageal sphincter.

**EXAMPLE 7****Gastric contracture and decreased appetite**

30

A 40 year old female suffering from obesity is injected with 100 units of tetanus toxin into the smooth muscle of the stomach wall and/or pyloric sphincter under direct vision using an endoscope. After 1 to 3 days she feels more satiated and her appetite decreases.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

It is known that the feeling of satiety is at least partly due to distension of the stomach. Some surgical procedures have been designed to take advantage of the effect by surgically decreasing the size of the stomach. Instead, administration (e.g., injections) of tetanus toxin can be made into the stomach wall. The increased tone induced in the innervation of the stomach smooth muscle would, over time, decrease its size. The effect is a feeling of satiety after smaller amounts of food intake.

**EXAMPLE 8****Muscular dystrophy, ALS, myasthenia gravis**

Many neurological disorders and aging are associated with a decrease in the efferent activity to muscles. So long as a minimum number of motor axons are still present, this activity can be increased with administration (e.g., injections) of tetanus toxin. The particular muscle is dependent on the conditions of the disease but includes all skeletal muscles.

**EXAMPLE 9****Muscle Contracture**

A 60 year old female is suffering from spastic contraction of her right arm after a cerebral vascular accident is injected with 10 units of tetanus toxin into the triceps muscle of the right arm. After 1-3 days the symptoms of contracture decrease and the arm rests in a more extended position.

Contracture, stroke and other upper motor neuron lesions result in a disinhibition of limb muscles and especially the flexors of the upper limb and the extensors of the lower. Administration (e.g., injections) of tetanus toxin can increase tone in the muscle opposite to the contracture and result in a more neutral position of the limb.

**EXAMPLE 10****Facial Muscle Tone**

Each orbicularis oculi muscle of a 70 year old female patient is injected with a total of 1 unit of tetanus toxin in divided doses. In 3 days the tone of the muscle improves and the tissue laxity around the eyes decreases.

This example illustrates that the administration of tetanus toxin to facial muscle increases the tone and youthful appearance of the patient. A youthful appearance is due in part to good tone in facial muscles. In the aged this tone could be improved by administration (e.g., via direct injection) into the facial muscle. The muscles most likely to benefit from this treatment useful are the smile muscles rhizorius and quadratus and the periorbital muscles.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

Increased tone in these muscles flatten the redundant folds of skin seen in aging and are used largely as a substitute for a blepharoplasty.

**Example 11**

**Increased muscle mass as a substitute for exercise**

5 A 25 year old weight lifter has 10 units of tetanus toxin injected into both biceps. In 1-3 days the tone of the biceps muscles increases. In 1 to 6 weeks the mass and strength of the muscle increases.

Increases in muscle tone and/or mass is generally desirable for cosmetic, competitive, preventative or rehabilitative reasons. Those who desire the effects of exercise would undergo  
10 injection into the muscle of interest such as the biceps strictly for the purpose of increasing tone and causing hypertrophy. In competitive athletes the same method can be used for a functional effect. An example might be a weightlifter with a relative weakness in certain arm muscles that cannot be corrected with normal exercise and could be benefited by undergoing a tetanus toxin injections. In certain conditions the effect of increased tone are both cosmetic  
15 and medically desirable. One example is the muscle of the abdominal wall. Weak muscles of the abdominal wall allow sagging of the abdomen and also predispose the patient to back injury. Injection of tetanus toxin into the abdominal muscles increases the tone of the abdominal wall causing it to flatten and help with spinal alignment.

**EXAMPLE 12**

**Pharyngeal Paresis with Dysphagia**

20 A 60 year old female suffering from dysphagia after a cerebrovascular accident is injected with 1 unit of tetanus toxin into the inferior and middle constrictor muscles after 1-3 days the symptoms of dysphagia improve.

**EXAMPLE 13**

**Nasal Decongestion – Nasal Mucosa**

25 In this example, a 20 year old male with nasal congestion due to perennial allergic rhinitis is injected with 1 unit of tetanus toxin into the mucosa covering each turbinate. After one week there is a noticeable decrease in congestion.

Nasal congestion is the major symptom of allergic and infectious rhinitis and is one of  
30 the most common complaints in all of medicine. The mucosa covering the intranasal turbinates is capable of changing thickness partly as a result of changes in blood flow. The mechanism of decongestion involves increased activity of the sympathetic nervous system.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

Specifically, increased tone in sympathetic nerves to the nasal mucosa contracts smooth muscle in arterioles and venules and shrinks the mucosa.

This example illustrates that administration (e.g., injections) of tetanus toxin into the nasal mucosa causes nasal decongestion.

5

**EXAMPLE 14****Penile erections and ejaculation**

A 40 year old male with impotence due to a diabetic neuropathy is injected with 1 unit of tetanus toxin into the base of the penis causing increased neural activity in the autonomic nerves as well as the pudendal motor nerves to the ischiocavernosus and bulbospongiosus muscle. In one week the patient can maintain an erection when aroused.

The control of the penile function is a complex mixture of both parasympathetic and sympathetic innervation. Cholinergic sympathetic nerves from the sacral plexus cause the vasodilation enabling erections. Adrenergic sympathetic neurons activate the smooth muscle of the vas deferens and seminal vesicles. Emission of ejaculate is a sympathetic response. Secretions of the bulbourethral and prostate are under parasympathetic control. Autonomic dysfunction from a variety of medical reasons can cause impotence.

It is apparent from this example that the application of tetanus toxin to control the activity of the appropriate autonomic sympathetic nerves results in the desired result.

**EXAMPLE 15**

20

**Increased connective tissue**

A 70 year old female is injected with a total of 1 unit of tetanus toxin delivered in four separate injections to various quadrants of the skin of the face. Increased neural activity results in a thicker dermal layer to the skin and a more youthful appearance.

Connective tissue is formed by fibroblasts or myofibroblasts. It is known that denervation of the motor and nerve supply to an area of skin causes a significant decrease in skin thickness. The activity of the nerve supply to skin apparently simulates the production of connective tissue.

This example demonstrates that tetanus toxin can be applied (e.g., by injection) to the dermal layer of the skin to increase connective tissues, resulting in a more youthful appearance.

30



WO 02/00172

PCT/US01/20523

**EXAMPLE 16****Hair loss**

A fifty year old male with male pattern baldness is injected in the bald area of the scalp with multiple injections of 0.25 unit of tetanus toxin. In one month the patient notes  
5 early hair regrowth in the area.

Hair loss appears to be in part due to decreased activity of the autonomic innervation to hair follicles. Experiments in rats show that anagen (hair growth) is associated with increased sympathetic activity within the nerves surrounding the hair follicle. It is seen that administration (e.g., injections) of tetanus toxin into the skin in areas of hair loss increases  
10 autonomic activity and slows or reverses hair loss.

**EXAMPLE 17****Veterinary uses of tetanus toxin**

Cattle, goats, sheep, lamb, pigs, poultry, fish, invertebrates and other animals are all raised and harvested for their meat. In most cases the important meat harvested from these  
15 animals is muscle. Increased muscle size translates into increased meat production. In this embodiment tetanus toxin would be administered (e.g., injection) to animals to cause muscular hypertrophy.

In one example the pectoralis muscle of the turkey is increased by applying an injection of 1 unit of tetanus toxoid into each pectoralis muscle of the turkey. After 2 days  
20 muscle tone would increase in the muscles and the mass of the muscle would increase.

A cow undergoes a lumbar puncture and 1 unit of tetanus toxin is instilled into the cerebrospinal fluid. The next day the animal exhibits mildly increased tone of all muscles. Over the next two months the muscle mass of the cow increases by 10%.

**EXAMPLE 18****Increase in Milk Production**

Milk is another product that is harvested from animals. Milk production is largely hormonal but there is evidence that the nervous system plays a large role in secretion of milk and plays a role in production.  
25

Direct administration (e.g., injection) into the mammary gland or retrograde administration (e.g., injection) through its duct can result in increased neural activity and such  
30 increase translates into increased milk production.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

A dairy cow has injected into each teat 1 unit of tetanus toxin. In 2 days the tone of the smooth muscle within the teat increases and the quantity of milk produced increases.

**EXAMPLE 19****Sweating – skin**

5 Sweating, also called hyperhidrosis, is under the control of the sympathetic nervous system but the neurotransmitter used by the post ganglionic neuron is acetylcholine. The locations of clinical important sweating include the armpit; the feet (the humidity causes the fungal infection of athlete's foot); the genital area (crotch itch); the palms and the brow.

10 In one example, a forty year male experiencing excessive sweating from the axillae is injected in this area with 1000 units of tetanus toxin. Decrease in sweating is noted within 3 days.

This example illustrates that an anticholinergic medication such as tetanus toxin is capable of blocking the production of sweat.

**EXAMPLE 20****Rhinorrhea (post nasal drip) - nasal mucosa**

15 Rhinorrhea is the production of excessive secretions from the nose and is a major symptom of allergic, infectious and vasomotor rhinitis. Anticholinergic medication is effective for blocking rhinorrhea for brief periods or injected into the intranasal turbinates of humans. The parasympathetic ganglia that contains the postganglionic cell bodies that supply the nasal secretory glands is in the pterygopalatine ganglia.

In one example, a 70 year old female complains of profuse watery rhinorrhea throughout the day. Injections of 500 units of tetanus toxin are made into both inferior turbinates with decreased rhinorrhea in 3 days.

25 In another example, a 50 year old male complains of perennial allergies and profuse nasal mucus rhinorrhea. A needle is passed from the oral side of the hard palate through the pterygopalatine canal and into the pterygopalatine space and 500 units of tetanus toxin are injected on each side. The symptoms of rhinorrhea improve within 3 days from treatment with tetanus toxin.

30 Thus, blocking cholinergic neural transmission in the pterygopalatine ganglia by using tetanus toxin is also effective at decreasing rhinorrhea.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

**EXAMPLE 21****Prostatic hypertrophy- prostate gland**

A 60 year old male with difficulty voiding due to prostatic hypertrophy is injected with 500 units of tetanus toxin into the prostate gland. Over the month following the injection with tetanus toxin the patient notices gradual decrease in his symptoms.

Prostatic hypertrophy is common in males over 50 years of age and causes difficulties in initiating urination. It has long been known that denervation of the autonomic innervation of the gland causes it to decrease in size.

This example demonstrates that injections of tetanus toxin into the prostate gland causes it to shrink.

**EXAMPLE 22****Asthma, COPD - Pulmonary mucus secretion**

A 60 year old male patient with bronchitis has the symptoms of excessive pulmonary mucus. 5000 units of tetanus toxin are mixed with 10cc of normal saline and aerosolized and inhaled by the patient over a 30 minute period. In 2 days the patient notes a decrease in mucus production.

A prominent symptom of many lung diseases is the production of excessive amounts of mucus. These diseases include asthma, chronic obstructive pulmonary disease, bronchitis, bronchiectasis and cystic fibrosis. Pulmonary mucus is produced by small glands within the respiratory mucosa covering the bronchi.

This example illustrates that mucus production is controlled by application of tetanus toxin to inhibit parasympathetic neural activity of pulmonary mucosa.

**EXAMPLE 23****Asthma, COPD - Bronchial smooth muscle**

Many lung diseases have the symptom of chronic or acute airway obstruction. The lumen of bronchioles is largely controlled by contraction of smooth muscle that is under parasympathetic control.

A 13 year girl with asthma is placed under light anesthesia and a bronchoscope is inserted through the mouth and into the trachea. Using a thin gauge transbronchial needle injections of 100 units each of tetanus toxin are made through the mucosa. In the following weeks the symptom of bronchospasm is improved. This example illustrates that

WO 02/00172

PCT/US01/20523

transmucosal absorption or injection of tetanus toxin through the mucosa blocks parasympathetic activity and prevents bronchospasm.

**EXAMPLE 24****5                    Salivation – parotid, submaxillary and sublingual glands**

Many neurologically impaired patients have difficulty preventing saliva from entering their lungs. Contamination of the lungs with the bacteria laden saliva can lead to a lethal pneumonia.

10                    A 60 year old female with amyotrophic lateral sclerosis has been aspirating saliva. The patient has 100 units of tetanus toxin injected into each of the three major salivary glands bilaterally for a total dose of 600 units. In two days salivation has decreased considerably and she no longer aspirates saliva. Thus, salivation is under parasympathetic control and the amount of salivation has been shown to decrease when both animals and humans are injected with tetanus toxin.

**15                    EXAMPLE 25****Sphincters - Anal fissures and constipation**

Increased tone in the anal sphincter causing constipation is called outlet obstruction and occurs in Parkinson disease as well as other neurological conditions.

20                    A 65 year old male patient with Parkinson's disease and associated paradoxical activation of the puborectalis muscle during straining is treated with an injection of a total of 1000 units of tetanus toxin into two sites of the puborectalis muscle. Within 3 days the patient experiences a decline in straining pressure during evacuation.

25                    Chronic anal fissure is maintained by contraction of the internal anal sphincter. Surgical sectioning of the sphincter is successful in 85% to 95% of patients however permanently weakens the sphincter and may cause anal deformity and incontinence.

In another example, a 35 year old female with a chronic anal fissure is injected with a total of 1000 units into two sites of the anal sphincter. In 1- 3 days tone of the anal sphincter decreases and the fissure heals over the following 2 months.

30                    From these examples, it is apparent that injections of botulinum toxin can successfully be used to relax the anal sphincter and allow it to heal.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

**EXAMPLE 26****Achalasia – lower esophageal sphincter**

Increased contraction tone of the cholinergic innervation of the lower esophageal sphincter can interfere with swallowing.

5 A 40 year old male has achalasia of the esophagus with severe difficulties in swallowing. A flexible endoscope is passed into the esophagus and 300 units of tetanus toxin are injected transmucosally into the lower esophageal sphincter. In 3 days the patient notices improvement in swallowing.

10 It is shown that this condition can be successfully treated with transmucosal injections of tetanus toxin.

**EXAMPLE 27****Obesity – gastric wall muscle**

15 A 30 year old female has a flexible endoscope passed through the esophagus and into the stomach. The antral wall muscle of the stomach is injected with 1000 units of tetanus toxin. After 1 week the food consumption of the patient decreases and she begins to lose weight.

The feeling of hunger and satiation are partly related to the state of contraction of the stomach wall. The paralysis of the gastric antrum slows the emptying of the stomach and causes feeling of early satiety. It is therefore, shown that patients with morbid obesity can  
20 benefit from endoscopic injections of tetanus toxin into the stomach wall.

**EXAMPLE 28****Immune tolerance**

25 It has been shown that blocking the parasympathetic nerves to an area of skin (or mucosa) followed by injection of antigen into the area invokes immune tolerance to the antigen. Administration (e.g., injections) of tetanus toxin followed by the antigen can induce tolerance to the antigen. This effect can be used to treat or ameliorate autoimmune disorders.

Autoimmune diseases with their putative antigenic proteins set forth parenthetically include without limitations: experimental autoimmune encephelomyelitis (myelin basic protein); arthritis (type II collagen); uveitis (S-antigen, interphotoreceptor binding protein);  
30 diabetes (insulin, glutamine decarboxylase); myasthenia gravis (acetylcholine receptor); thyroiditis (thyroglobulin); and multiple sclerosis (myelin).

WO 02/00172

PCT/US01/20523

A forty year old female with multiple sclerosis is injected with 1000 units of tetanus toxin into the skin of the left forearm. One week later myelin is injected into the same site. Within a month the patient exhibits a decrease in symptoms.

Another area in which immune tolerance is beneficial is organ transplantation.

5 Humans normally develop an immune reaction to the foreign proteins, especially major histocompatibility protein, that is present on the surface of the cells in the transplanted organ.

In another example pertaining to organ transplantation, a 40 year old female requiring a kidney transplant is injected with 1000 units of tetanus toxin into the skin of the left arm. After one week cell surface antigens from a potential donor are injected into the same area. In  
10 one month the patient is tested for tolerance by injection of the same cell surface antigens into the skin of the right forearm. No noticeable reaction indicates that tolerance has been achieved and the transplant can be done.

Thus, administration of tetanus toxin into a region of (e.g., injections) allows subsequent presentation of an antigen to invoke tolerance to that antigen. This effect could  
15 be beneficial to patients with autoimmune disease or potential recipients of allografts or xenograft organs.

#### **EXAMPLE 29**

##### **Gastric acid**

Gastric acid production is under the control of the parasympathetic nerves. However,  
20 an additional method of blocking the acid production is in the parietal cells that produce the acid. They secrete  $H^+$  by vesicle release and can be blocked directly (Alexander et al., American Journal of Physiology, 273 (6 Pt. 2), F 1054-7, (1997)). A third method is to block the hormones that increase acid production, secretin and gastrin. An additional beneficial effect would be to block the production of the enzyme trypsin.

25

#### **EXAMPLE 30**

##### **Holocrine secretion**

Holocrine glands are a class of skin secretory glands that produce a lipid secretion and are partly under neural control. Holocrine glands include sebaceous and follicular glands, cerumen glands and mammary glands. Blocking the neural input to these glands by  
30 administration (e.g., injection) of tetanus toxin may be useful in a variety of medical conditions, examples include acne where over production of secretion is the basis for the inflammation and infection.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

Also cerumen overproduction is one of the most common reasons for visits to otolaryngologists. Administration (e.g., injection) to the skin of the ear canal would block cerumen production and prevent ear wax accumulation in the ear canal.

5 In addition, the tetanus toxin may be used to block the activity of the sebaceous glands, thereby providing beneficial effects in the skin condition acne.

**EXAMPLE 31****Skin disorders**

Psoriasis, atopic dermatitis (hives), vitiligo are all related to parasympathetic activity. It has long been known that denervation of an area of skin causes resolution of these skin disorders in the denervated area. Administration of the tetanus toxin (e.g., by injection) into affected areas can block the activity and cause improvement or resolution of the symptoms. Skin injections with tetanus toxin can decrease of the skin disorders listed above by decreasing the parasympathetic activity at selected sites.

**EXAMPLE 32****Migraine**

15 Administration of the tetanus toxin (e.g., by injection) into the pterygopalatine ganglia would block postganglionic nerves to the carotid artery and thereby block the arterial spasms caused by these nerves that is the basis for migraine headaches. Migraine like tension headaches could be treated by injection into the temporalis muscle.

**EXAMPLE 33****Adipose tissue**

20 Glucose uptake by adipose tissue is necessary for lipid production. Tetanus toxin delivered by liposomes blocks lipid glucose uptake by fat cells and can cause a decrease in their size. The cellular activity of other endocrine cells can be inhibited by administration (via injection) of tetanus toxin. Endocrine cells affected by treatment with tetanus toxin include thyroid, pancreatic and tumor cells.

**EXAMPLE 34****Vomeronasal organ**

30 The vomeronasal organ senses pheromones and plays a role in reproductive behavior and other autonomic drives. Administration (e.g., injection) of tetanus toxin into this organ can block, or increase these drives.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

**EXAMPLE 35****Immune system T cell maturation and release**

Parasympathetic activity is related to maturation and release of T cells from the thymus and spleen. T cells are the cellular mediators of antigen recognition. Increased  
5 parasympathetic activity increases the maturation and release of T cells; the opposite occurs when these organs are acutely denervated. Administration (e.g., injection) of tetanus toxin into the thymus and/or spleen at various doses can either increase or decrease the release of T cells.

10 A 25 year old patient with HIV and low T cell counts is injected with 100 unit of tetanus into his thymus gland. After 1 week T cell levels in the blood increase.

A 50 year old female with multiple sclerosis has an acute worsening of her disease and is injected with 100 units into her thymus gland. One week after the injection the symptoms are ameliorated.

**EXAMPLE 36****Sensory uses of tetanus toxin**

15 Unlike botulinum, tetanus toxin has been shown to bind and enter sensory nerves, undergo retrograde transport and cause anesthesia. These observations have been made in experimental animals as well as in clinical tetanus. In addition to the decrease in afferent neural activity the tetanus toxin would block the release of inflammatory mediators from the  
20 sensory nerve (substance p, neuropeptide Y, CGRP) as these neuropeptides are by SNARE mechanism using the protein VAMP that is inactivated by tetanus toxin. The most important use for this effect can be to block pain from any part of the body. For example, chronic joint pain can be blocked by administration of the tetanus toxin (e.g., by injection) into the joint bursa.

25 A 75 year old female with a degenerative right hip joint with chronic pain undergoes an injection of 1000 units of tetanus toxin into the joint. Within one week the pain of the patient has decreased. The above example illustrates that the specific target of administration can vary with a specific clinical condition but can include bone, cartilage, ligament, muscle, fascia, mucosa, skin, pleural membranes, epineurium, synovial membranes, neuromas, and  
30 smooth muscle.

Another use for sensory blockade is the axon-axonal reflexes underlying inflammation. Sensory axons react to noxious stimuli by evoking a reflex vasodilation in the



WO 02/00172

PCT/US01/20523

entire region innervated by the nerve (sometimes referred to as the wheal and flair reaction). Tetanus toxin can block the release of the neuropeptides that evoke this reflex.

A 65 year old male with chronic bronchitis and the symptoms of excess mucus production and paroxysmal coughing inhales an aerosolized solution of 1000 units of tetanus toxin for 30 minutes. Two days later his coughing decreases.

The above examples show that another use for sensory blockade can be in the chronic cough, mucus production and bronchospasm initiated by intra pulmonary sensory receptors. In this embodiment the tetanus toxin is best delivered by inhaled aerosol.

#### EXAMPLE 37

##### Cardiovascular system

The cardiovascular system, the heart, arteries, and veins have extensive autonomic innervation. In the heart sympathetic activity causes increased heart rate and contractile force. Parasympathetic stimulation slows the heart and decreases contractile force. The rate of cardiac contraction is controlled by the sinoatrial node, a small ganglia in the right atrium of the heart, while the propagation of the contraction from atria to ventricles is controlled by the atrioventricular node (AV) node.

Cardiac disorders which can be treated with tetanus toxin pharmaceutical formulations include the cardiac arrhythmias: tachycardia, bradycardia, and ventricular fibrillation. Additional disorders include coronary spasm resulting in angina and/or myocardial infarction. Catherization of the coronary arteries allows release of tetanus toxin into the blood perfusing the ventricles and the particular coronary artery used allows some localized distribution of the toxin to areas of the heart most affected. In these cases inhibitory doses of tetanus toxin can decrease cardiac excitability by inhibiting sympathetic stimulation and by a direct effect on cardiac myocytes. Injection of tetanus toxin into coronary arteries at the higher inhibitory doses results in decreased sympathetic activation of the smooth muscle and decreases the intensity of coronary artery spasm ameliorating angina. Injection of tetanus toxin into the sinoatrial (SA) node at excitatory levels can increase parasympathetic activity and slow the heart rate decreasing the possibility of arrhythmia and/or angina. The use of catherization techniques that reach the above mentioned areas of the heart are well known to those skilled in the art and do not require undue experimentation.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

**EXAMPLE 38****White blood cells**

Monocytes and macrophages have receptors that allow uptake and internalization of tetanus toxin. Once internalized the toxin disrupts the molecular mechanism underlying cellular mobility as well as secretion of vesicles. Many inflammatory processes are associated with the migration of macrophages or to the area. Once in the region of inflammation these cells release other cytokines that increase inflammation or cause tissue breakdown. Administration of tetanus toxin can slow or stop the migration of macrophages as well as prevent the release of inflammatory mediators from cells in the area. Tetanus toxin is also capable of blocking the aggregation and secretion of neutrophils but requires of vector like liposomes for cell internalization. Rheumatoid arthritis is an example of a disorder that can benefit from this therapy, with administration directly into the synovial bursa. This is an example of using tetanus toxin to control cellular activity of specific target cells such as macrophages.

Thus, while there have been described what are presently believed to be the preferred embodiments of the present invention, those skilled in the art will appreciate that other and further modifications and changes can be made without departing from the true spirit of the invention, and it is intended to include all further and other such modifications and changes which come within the scope of the invention as set forth in the appended claims.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

## WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of modulating a neural function of an animal at a selected site affected by target neurons, the method comprising administering a therapeutically effective amount of tetanus toxin to the selected site of the animal such that the neurotoxin reversibly  
5 modulates the activity of the target neurons.
2. The method of claim 1, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is sufficient to cause decrease in neural activity or reversible inhibitory response of the neural activity at the selected site.
3. The method of claim 1, wherein the therapeutically effective amount of  
10 tetanus toxin is sufficient to cause increase in neural activity or an excitatory response of the neural activity at the selected site.
4. A method for decreasing the activity of a nerve function in an animal comprising administering to a selected site affecting target neurons of an animal an amount of tetanus toxin sufficient to cause a denervation of the target neurons, wherein the denervation  
15 results in reversible inhibitory response of the nerve function at the selected site innervated by the target neurons.
5. A method for increasing the activity of a nerve function in an animal comprising administering to a selected site affecting target neurons of an animal an amount of tetanus toxin sufficient to cause an excitatory response of the nerve function at the selected  
20 site innervated by the target neurons.
6. The method of claims 1-5, wherein the decrease or increase in neural activity occurs over a period of time from about one hour to about one year.
7. The method of claims 1-5, wherein the decrease or increase in neural activity occurs over a period of time from about one week to about four months.
- 25 8. The method of claims 1 to 5, further comprising:  
(i) determining the level of antibodies of tetanus toxin present in blood plasma of the animal prior to administering of any tetanus toxin; and  
(ii) immunizing the animal when the level of tetanus toxin is below 0.1 IU/ml.
- 30 9. The method of claim 6, further comprising:  
(i) determining the level of antibodies of tetanus toxin present in blood plasma of the animal prior to administering of any tetanus toxin; and

WO 02/00172

PCT/US01/20523

- (ii) immunizing the animal when the level of tetanus toxin is below 0.1 IU/ml.
10. The method of claim 7, further comprising:
- (i) determining the level of antibodies of tetanus toxin present in blood plasma of the animal prior to administering of any tetanus toxin; and
- 5 (ii) immunizing the animal when the level of tetanus toxin is below 0.1 IU/ml.
11. The method of claim 8, wherein the immunizing is performed passively or actively.
- 10 12. The method of claim 9, wherein the immunizing is performed passively or actively.
13. The method of claim 10, wherein the immunizing is performed passively or actively.
14. The method of claim 11, wherein the level of antibodies of tetanus toxin
- 15 present in blood plasma is determined by antibody titer.
15. The method of claim 12, wherein the level of antibodies of tetanus toxin present in blood plasma is determined by antibody titer.
16. The method of claim 13, wherein the level of antibodies of tetanus toxin present in blood plasma is determined by antibody titer.
- 20 17. The method of claims 1-5, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is delivered at the selected site by injection, topical application, aerosol, or instillation into ducts or body orifices.
18. The method of claim 8, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is delivered at the selected site by injection, topical application, aerosol, or
- 25 *instillation into ducts or body orifices.*
19. The method of claim 9, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is delivered at the selected site by injection, topical application, aerosol, or instillation into ducts or body orifices.
- 30 20. The method of claims 1-5, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is delivered to the target neurons encapsulated into liposomes or artificial vesicles with bi-layer lipid membranes.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

21. The method of claim 8, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is delivered to the target neurons encapsulated into liposomes or artificial vesicles with bi-layer lipid membranes.
22. The method of claim 9, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is delivered to the target neurons encapsulated into liposomes or artificial vesicles with bi-layer lipid membranes.
23. The method of claims 1-5, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is suspended in a pharmaceutically acceptable carrier.
24. The method of claim 8, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is suspended in a pharmaceutically acceptable carrier.
25. The method of claim 9, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is suspended in a pharmaceutically acceptable carrier.
26. The method of claims 1-5, wherein the tetanus toxin is in the form of freeze-dried powder.
27. The method of claim 8, wherein the tetanus toxin is in the form of freeze-dried powder.
28. The method of claim 9, wherein the tetanus toxin is in the form of freeze-dried powder.
29. The method of claims 1-5, wherein the target neurons are selected from the group consisting of motor neurons, autonomic neurons, and sensory neurons.
30. The method of claim 8, wherein the target neurons are selected from the group consisting of motor neurons, autonomic neurons, and sensory neurons.
31. The method of claim 9, wherein the target neurons are selected from the group consisting of motor neurons, autonomic neurons, sensory neurons or neurons of the central nervous system.
32. The method of claims 1-5, wherein the activity of the target neurons is affected by inhibiting directly or indirectly the release of neurotransmitters or neuropeptides.
33. The method of claim 8, wherein the activity of the target neurons is affected by inhibiting directly or indirectly the release of neurotransmitters or neuropeptides.
34. The method of claim 9, wherein the activity of the target neurons is affected by inhibiting directly or indirectly the release of neurotransmitters or neuropeptides.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

35. The method of claims 1, 2, or 4, wherein the therapeutically effective amount is from about 100 units to about 10,000 units for the selected site.
36. The method of claims 1, 2, or 4, wherein the therapeutically effective amount is from about 500 units to about 5000 units for the selected site.
- 5 37. The method of claims 1, 2 or 4, wherein the therapeutically effective amount is from about 1000 units to about 2000 units for the selected site.
38. The method of claim 8, wherein the therapeutically effective amount is from about 100 units to about 10,000 units for the selected site.
39. The method of claim 8, wherein the therapeutically effective amount is from  
10 about 500 units to about 5000 units for the selected site.
40. The method of claim 8, wherein the therapeutically effective amount is from about 1000 units to about 2000 units for the selected site.
41. The method of claims 1, 3, or 5, wherein the therapeutically effective amount is from about 0.001 units to about 2000 units for the selected site.
- 15 42. The method of claims 1, 3, or 5, wherein the therapeutically effective amount is from about 1 unit to about 10 units for the selected site.
43. The method of claims 1, 3, or 5, wherein the therapeutically effective amount is from about 2 units to about 4 units for the selected site.
44. The method of claim 8, wherein the therapeutically effective amount is from  
20 about 0.001 units to about 2000 units for the selected site.
45. The method of claim 8, wherein the therapeutically effective amount is from about 1 unit to about 10 units for the selected site.
46. The method of claim 8, wherein the therapeutically effective amount is from about 2 units to about 4 units for the selected site.
- 25 47. The method of claims 1, 3, or 5 wherein the selected site comprises tissues or organs affected by sleep apnea and snoring, scoliosis, strabismus, muscle atrophy, neurologically impaired muscles including muscular dystrophy, ALS, or myasthenia gravis, decrease in muscle mass, or decrease in facial muscle tone.
48. The method of claims 1, 3, or 5, wherein the selected site comprises tissues or  
30 organs including lower esophageal sphincter, anal sphincter, bladder, bladder sphincter, vaginal sphincter, pyloric sphincter, upper esophageal sphincter, colon wall muscles.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

49. The method of claim 8, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by sleep apnea and snoring, scoliosis, strabismus, muscle atrophy, neurologically impaired muscles including muscular dystrophy, ALS, or myasthenia gravis, decrease in muscle mass, or decrease in facial muscle tone.

50. The method of claim 8, wherein the selected site comprises tissues or organs including lower esophageal sphincter, anal sphincter, bladder, bladder sphincter, vaginal sphincter, pyloric sphincter, upper esophageal sphincter, colon wall muscles.

51. The method of claims 1, 3 or 5, wherein the selected site comprises tissues or organs affecting saliva production, the organs affecting saliva production including submandibular gland, parotid gland, sublingual gland, or minor salivary glands of the oral mucosa.

52. The method of claim 8, wherein the selected site comprises tissues or organs affecting saliva production, the organs affecting saliva production including submandibular gland, parotid gland, sublingual gland, or minor salivary glands of oral mucosa.

53. The method of claim 1, 3 or 5, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by nasal congestion, impotence, hair loss or hypotension.

54. The method of claim 8, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by nasal congestion, impotence, hair loss or hypotension.

55. The method of claims 1, 2 or 4, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by spastic dysphonia, hemifacial spasm and blepharospasm, temporal mandibular joint syndrome or bruxism, torticollis, neck pain, writer's cramp, limb muscle contracture, nerve regeneration within a muscle or migraine headache.

56. The method of claim 8, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by spastic dysphonia, hemifacial spasm and blepharospasm, temporal mandibular joint syndrome or bruxism, torticollis, neck pain, writer's cramp, limb muscle contracture, nerve regeneration within a muscle or migraine headache.

57. The method of claim 1, 2 or 4, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by bronchospasm, cricopharyngeal spasm, esophageal spasm, achalasia, obesity, spastic colon or anal fissures.

58. The method of claim 8, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by bronchospasm, cricopharyngeal spasm, esophageal spasm, achalasia, obesity, spastic colon or anal fissures.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

59. The method of claims 1, 2 or 4, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by gastric acid, prostate hypertrophy, rhinorrhea, salivation, irritation of pulmonary mucosa, psoriasis, immune tolerance or immune reaction.

60. The method of claim 8, wherein the selected site comprises tissues or organs  
5 affected by gastric acid, prostate hypertrophy, rhinorrhea, salivation, irritation of pulmonary mucosa, psoriasis, immune tolerance or immune reaction.

61. The method of claims 1, 2 or 4, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by osteoporosis or angina.

62. The method of claim 8, wherein the selected site comprises tissues or organs  
10 affected by osteoporosis or angina.

63. The method of claims 1, 2, 4 wherein the selected site comprises hair follicles, prostate gland, connective tissue of lax, aged skin, inflamed fibers, skin in proliferative or allergic diseases, sebaceous gland, sympathetic nerve of the circulatory system, neurons controlling an immune response in thymus, lymph nodes, or tissue having a neural immune  
15 interaction, skin, digestive tract, tonsils, anterior chamber of the eye, gastric mucosa, nasal mucosa or pterygopalatine ganglia.

64. A pharmaceutical formulation for modulating a neural function of an animal at a selected site affected by target neurons, the formulation comprising a therapeutically effective amount of tetanus toxin suspended in a pharmaceutically acceptable carrier for  
20 delivery to the selected site, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 100 units to 10,000 units of the selected site.

65. A pharmaceutical formulation for decreasing the activity of a nerve function in an animal at a selected site, the formulation comprising a therapeutically effective amount of tetanus toxin suspended in a pharmaceutically acceptable carrier for delivery to the selected  
25 site, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 100 units to 10,000 units for the selected site.

66. The pharmaceutical formulation of claim 65, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by spastic dysphonia, hemifacial spasm and blepharospasm, temporal mandibular joint syndrome, bruxism, torticollis, neck pain, writer's  
30 cramp, limb muscle contracture, nerve regeneration within a muscle, migraine headache, bronchospasm, cricopharyngeal spasm, esophageal spasm, achalasia, obesity, spastic colon,



WO 02/00172

PCT/US01/20523

anal fissures, gastric acid, prostate hypertrophy, rhinorrhea, salivation, irritation of pulmonary mucosa, psoriasis, immune tolerance or immune reaction, osteoporosis or angina.

67. A pharmaceutical formulation for increasing the activity of a nerve function in an animal at a selected site, the formulation comprising a therapeutically effective amount of tetanus toxin suspended in a pharmaceutically acceptable carrier for delivery to the selected site wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 0.001 units to about 2000 units for the selected site.

68. The pharmaceutical formulation of claim 67, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by sleep apnea and snoring, scoliosis, strabismus, muscle atrophy, neurologically impaired muscles including muscular dystrophy, ALS, myasthenia gravis, decrease in muscle mass, decrease in facial muscle tone, nasal congestion, impotence, hair loss or hypotension.

69. The pharmaceutical formulation of claim 67, wherein the selected site comprises tissues or organs including lower esophageal sphincter, anal sphincter, bladder, bladder sphincter, vaginal sphincter, pyloric sphincter, upper esophageal sphincter, colon wall muscles.

70. The pharmaceutical formulation of claim 67, wherein the selected site comprises tissues or organs affecting saliva production or nasal mucosa, the organs affecting saliva production including submandibular gland, parotid gland, sublingual gland, or minor salivary glands of the oral mucosa.

71. The use of tetanus toxin in the preparation of a medicament for a method of treating a clinical disorder or symptom of an animal, comprising administering a therapeutically effective amount of tetanus toxin to a selected site affected by target neurons related to the clinical disorder or symptom of the animal, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 100 units to 10,000 units of the selected site.

72. The use of tetanus toxin in the preparation of a medicament for a method of treating a clinical disorder or symptom in an animal, comprising administering a therapeutically effective amount of tetanus toxin at a selected site of the animal in order to decrease the activity of a nerve function in the animal, the nerve function related to the clinical disorder or symptom of the animal, wherein the tetanus toxin causes an excitatory or reversible inhibitory response of the nerve function at the selected site innervated by the

WO 02/00172

PCT/US01/20523

target neurons, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 100 units to 10,000 units of the selected site.

73. The use of claim 72, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by spastic dysphonia, hemifacial spasm and blepharospasm, temporal mandibular  
5 joint syndrome, bruxism, torticollis, neck pain, writer's cramp, limb muscle contracture, nerve regeneration within a muscle, migraine headache, bronchospasm, cricopharyngeal spasm, esophageal spasm, achalasia, obesity, spastic colon, anal fissures, gastric acid, prostrate hypertrophy, rhinorrhea, salivation, irritation of pulmonary mucosa, psoriasis, immune tolerance or immune reaction, osteoporosis or angina.

74. The use of tetanus toxin in the preparation of a medicament for a method of  
10 treating a clinical disorder or symptom in an animal, comprising administering a therapeutically effective amount of tetanus toxin at a selected site of the animal in order to increase the activity of a nerve function in the animal, the nerve function related to the clinical disorder or symptom of the animal, wherein the tetanus toxin causes an excitatory or  
15 reversible inhibitory response of the nerve function at the selected site innervated by the target neurons, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 0.001 units to about 2000 units for the selected site.

75. The use of claim 74, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by sleep apnea and snoring, scoliosis, strabismus, muscle atrophy, neurologically  
20 impaired muscles including muscular dystrophy, ALS, myasthenia gravis, decrease in muscle mass, decrease in facial muscle tone, nasal congestion, impotence, hair loss or hypotension.

76. The use of claim 74, wherein the selected site comprises tissues or organs including lower esophageal sphincter, anal sphincter, bladder, bladder sphincter, vaginal  
sphincter, pyloric sphincter, upper esophageal sphincter, colon wall muscles.

77. The use of claim 74, wherein the selected site comprises tissues or organs  
25 affecting saliva production or nasal mucosa, the organs affecting saliva production including submandibular gland, parotid gland, sublingual gland, or minor salivary glands of oral mucosa.

78. A method of modulating a cellular activity of an animal at a selected site, the  
30 method comprising administering at the selected site a therapeutically effective amount of the tetanus toxin, wherein the cellular activity includes release of a cellular component

WO 02/00172

PCT/US01/20523

comprising hormones, inflammatory modulators from nerves or blood cells, cholinergic secretions, mucus secretions from respiratory, digestive or urinary glands.

79. The method of claim 78, wherein the cellular activity occurs in cells including macrophages, monocytes, endocrine cells or renal cells.

5 80. The method of claim 78, wherein the cellular activity is modulated over a period from about one hour to about one year.

81. The method of claim 78, further comprising:

(i) determining the level of antibodies of tetanus toxin present in blood plasma of the animal prior to administering of any tetanus toxin; and

10 (ii) immunizing the animal when the level of tetanus toxin is below 0.1 IU/ml.

82. The method of claim 81, wherein the immunizing is performed passively or actively.

15 83. The method of claim 82, wherein the level of antibodies present in blood plasma is determined by antibody titer.

84. The method of claim 78 or 81, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is delivered at the selected site by injection, topical application, aerosol, instillation into ducts or body orifices, encapsulated into liposomes or artificial vesicles with bi-layer lipid membrane.

20 85. The method of claim 78 or 81, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is suspended in a pharmaceutically acceptable carrier.

86. The method of claim 78 or 81, wherein the tetanus toxin is in the form of a freeze-dried powder.

25 87. The method of claim 78 or 81, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 0.001 units to about 10,000 units for the selected site.

88. The method of claim 78 or 81, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 1 unit to about 5000 units for the selected site.

89. The method of claim 78 or 81, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 10 units to about 1000 units for the selected site.

30 90. The method of claim 78 or 81, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by malignant carcinoma or inflammatory conditions.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

91. A pharmaceutical formulation for modulating a cellular activity of cells of an animal, the formulation comprising a therapeutically effective amount of tetanus toxin suspended in a pharmaceutically acceptable carrier for delivery to the selected site, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 0.001 units to about 10,000 units for the selected site.

92. The pharmaceutical formulation of claim 90, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 1 unit to about 5000 units for the selected site.

93. The pharmaceutical formulation of claim 90, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 10 units to about 1000 units for the selected site.

94. The pharmaceutical formulation of claim 90, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by malignant carcinoma or inflammatory conditions.

95. The use of the tetanus toxin in the preparation of a medicament for a method of effectively treating a clinical disorder or symptom in an animal, comprising administering a therapeutically effective amount of tetanus toxin in order to modulate a cellular activity of an animal at a selected site, the cellular activity including release of a cellular component including hormones, inflammatory modulators from nerves or blood cells, cholinergic secretions, mucus secretions from respiratory, digestive or urinary glands, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 0.001 units to about 10,000 units for the selected site.

96. The use of the tetanus toxin in the preparation of a medicament for a method of effectively treating a clinical disorder or symptom in an animal, comprising administering a therapeutically effective amount of tetanus toxin in order to modulate a cellular activity of an animal at a selected site, the cellular activity including release of a cellular component including hormones, inflammatory modulators from nerves or blood cells, cholinergic secretions, mucus secretions from respiratory, digestive or urinary glands, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 1 units to about 5,000 units for the selected site.

97. The use of claim 95, wherein the therapeutically effective amount of tetanus toxin is from about 10 units to about 1000 units for the selected site.

98. The use of claim 95, wherein the selected site comprises tissues or organs affected by malignant carcinoma or inflammatory conditions.

WO 02/00172

PCT/US01/20523

99. A method for the alleviation of pain experienced by an animal comprising administering tetanus toxin suspended in a pharmaceutically acceptable carrier to a selected site of the animal, the tetanus toxin in a therapeutically effective amount sufficient to decrease or reversibly inhibit the release of inflammatory neurotransmitters or neuropeptides associated with the pain or to prevent transmission of pain sensation from the selected site to the central nervous system.

100. A method for the alleviation of pain experienced by an animal comprising administering tetanus toxin to a selected site of the animal in a therapeutically effective amount sufficient to denervate sensory neurons affecting the release of inflammatory neurotransmitters or neuropeptides controlling the selected site of the animal or to prevent transmission of pain sensation from the selected site to the central nervous system.

101. A method for the increase of muscle mass in an animal comprising administering to a selected site of a muscle a pharmaceutically effective amount of tetanus toxin sufficient to cause an increase in the neural activity or an excitatory response of the selected muscle.

102. The method of claim 101, wherein the selected muscle is a skeletal or smooth muscle.

103. The use of tetanus toxin in the preparation of a medicament for a method of effectively treating a clinical disorder or symptom in an animal, which use is substantially as herein described with reference to the Examples.

104. A method of modulating a neural function or a nonneural cellular activity of an animal, which method is substantially as herein described with reference to the Examples.

105. A pharmaceutical composition for modulating a neural function or a nonneural cellular activity of an animal, which composition is substantially as herein described with reference to the example.

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/000172 A3**

- (51) International Patent Classification: **A61K 39/00**, 39/08, 39/02 CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, IR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/20523
- (22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/214,569 28 June 2000 (28.06.2000) US Declaration under Rule 4.17:  
*of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*
- (71) Applicant and  
(72) Inventor: SANDERS, Ira [US/US]; Apartment 43E, 300 East 93rd Street, New York, NY 10128 (US). Published:  
*with international search report*
- (74) Agents: BOYADJIAN, Livia, S. et al.; Davidson, Davidson & Kappel, I.J.C., 485 Seventh Avenue, 14th Floor, New York, NY 10018 (US). (88) Date of publication of the international search report:  
7 August 2003
- (81) Designated States (national): AL, AG, AL, AM, AI, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/000172 A3

(54) Title: METHODS FOR USING TETANUS TOXIN FOR BENEFICIAL PURPOSES IN ANIMALS (MAMMALS)

(57) Abstract: Methods of using tetanus toxin to modulate or control neural functions or nonneural cellular activities at selected sites in animals, particularly in mammals, and more particularly in humans, are provided. Pharmaceutical formulations to modulate neural functions or non-neural cellular activities of an animal at selected sites in animals, particularly in mammals, and more particularly in humans are also provided. Uses of tetanus toxin in preparation of medicaments for methods of treating clinical disorders or symptoms of animals, particularly mammals and more particularly humans are also provided.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/20523			
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(G) : A 61 K, 39/00, A 61 K, 39/08, A 61 K, 39/02 US CL : 424/239.1, 424/184.1, 424/236.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/184.1, 424/236.1, 424/239.1  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)					
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.			
X	KITAMURA et al. Gangliosides are Binding Substances in Nucleal Cells for Tetanus and Botulinum Toxins in Mice, <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> 1999, pages 1-3.	1-5, 64-77 and 91-98			
X	US 5,714,468 A (BINDER) 03 February 1998.	1-5, 41-43 and 55			
X	US 5,670,484 A (BINDER) 23 September 1997.	1-5, 41-43, 47-48, and 51-53 and 63			
Y	US 5,766,605 A (SANDERS ET AL) 16 June 1998.	1-5, 41-43, 51 and 59			
Y	WO 93/05800 A1 (ALLERGAN INC.) 01 April 1993.	1-5, 36-37, 41-43, 47-48, 51, 53, 55, 57, 59, 61 and 63			
A	SCHANTZ et al. Microbiological Reviews. Properties and Use of Botulinum Toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine. March 1992, p. 80-99.	1-5, 36-37, 41-43, 47, 48, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63			
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.					
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width:100%"> <tr> <td style="width:33%">           "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "B" earlier application or patent published on or after the international filing date            "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="width:33%">           "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to underlie the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "Z" document member of the same patent family         </td> <td style="width:33%">           "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to underlie the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "Z" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to underlie the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to underlie the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to underlie the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to underlie the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 01 October 2001 (01.10.2001)		Date of mailing of the international search report OCT 1 2002			
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Vanessa Ford Telephone No. (703) 308-4735 <i>Janice Ford</i>			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
	International application No. PCT/US01/20524
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>	
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Claim Nos.: 6-35, 38-40, 44-46, 49, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 103 and 105 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claims unsearchable.
2.	<input type="checkbox"/> Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/> Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-5, 36-37, 41-43, 47-48, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 and 104.
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/20525

Group I, claims 1-5, 36-37, 41-43, 47-48, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 and 104, drawn to a method of modulating a neural function of an animal comprising a tetanus toxin.  
 Group II, claims 64-70, 91-94 and 105 are drawn to a pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of tetanus toxin.  
 Group III, claims 71-77, 95-98 and 103 are drawn to a method of using tetanus toxin in the preparation of a medicament.  
 Group IV, claims 78-90, drawn to a method of modulating cellular activity of an animal at a selected site by administering at the selected site a therapeutically effective amount of a tetanus toxin.  
 Group V, claims 99-100, drawn to a method for alleviation of pain experienced by an animal comprising administering tetanus toxin.  
 Group VI, claims 101-102, drawn to a method for the increase of muscle mass comprising administering tetanus toxin.

This International Searching Authority considers that the international application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated below.  
 The inventions listed as Group I-VI do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature linking Groups I-VI appears to be the tetanus toxin.

However, Kitamura et al. (1999) teach a tetanus toxin solution being administered to mice. The mice were injected with 0.1 ml of tetanus toxin solution in phosphate buffered saline containing 0.5% bovine serum albumin.

Therefore, the technical feature linking the inventions of groups I-VI does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2, as it does not define a contribution over the prior art.

The special technical feature of Group I is considered to be a method for modulating neural function of an animal comprising administering a tetanus toxin.

The special technical feature of Group II is considered to be a pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of tetanus toxin.

The special technical feature of Group III is considered to be a method of using tetanus in the preparation of a medicament.

The special technical feature of Group IV is considered to be a method of modulating cellular activity of an animal at a selected site by administering at the selected site a therapeutically effective amount of a tetanus toxin.

The special technical feature of Group V is considered to be a method for alleviation of pain experienced by an animal comprising administering tetanus toxin.

The special technical feature of Group VI is considered to be the increase of muscle mass comprising administering tetanus toxin.

Accordingly, Groups I-VI are not so linked by the same or a corresponding special technical feature as to form a single general inventive concept.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/02	A 6 1 P 9/02	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 11/04	A 6 1 P 11/04	
A 6 1 P 11/08	A 6 1 P 11/08	
A 6 1 P 11/16	A 6 1 P 11/16	
A 6 1 P 13/08	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 13/10	A 6 1 P 13/10	
A 6 1 P 15/02	A 6 1 P 15/02	
A 6 1 P 15/10	A 6 1 P 15/10	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/14	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 17/16	A 6 1 P 17/16	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 21/06	A 6 1 P 21/06	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/06	A 6 1 P 25/06	
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 27/16	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100114649

弁理士 宇谷 勝幸

(72)発明者 サンダース, イラ

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 0 1 2 8, ニューヨーク, イースト 9 3 アールディー ス  
トリート 3 0 0, アpartment 4 3 イー

F ターム(参考) 4C084 AA02 BA44 DA33 MA13 MA24 MA44 MA59 MA66 NA14 ZA062  
ZA082 ZA332 ZA342 ZA362 ZA592 ZA662 ZA702 ZA812 ZA892 ZA922  
ZA942 ZA972 ZB082 ZB092 ZB112 ZB262  
4C087 AA01 BC68 CA10 MA13 MA24 MA44 MA59 MA66 NA14 ZA06  
ZA08 ZA33 ZA34 ZA36 ZA59 ZA66 ZA70 ZA81 ZA89 ZA92  
ZA94 ZA97 ZB08 ZB09 ZB11 ZB26