

A型肉毒杆菌毒素复合物、其配制剂和使用方法

技术领域

5 本发明涉及蛋白质美容用品或药物领域，具体涉及肉毒杆菌毒素复合物。

背景技术

皱纹是衰老的一个指示性标志，可以由对皮肤的环境损害积累的生物学、组织学和生理学变化引起。另外，其它次要因素也可以引起脸部皱纹的特征性褶、沟和皱(Stegman et al., The Skin of the Aging Face
10 Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed., St. Louis, Mo.: Mosby Year Book: 5-15 (1990))。这些次要因素包括恒定的重力拉力、皮肤上的频繁且恒定的位置压力(例如，在睡眠期间)和由面部肌肉收缩引起的重复面部运动(Stegman et al., The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery,
15 2nd ed., St. Louis, Mo.: Mosby Year Book: 5-15 (1990))。

已经使用了不同的技术以潜在缓解一些衰老的体征。这些技术的范围包括从含有 α -羟基酸和视黄醇的面部保湿剂到外科手术和神经毒素的注射。例如，在1986年，Jean等人开发了一种使用A型肉毒毒素治疗眉间区域运动相关皱纹的方法(Schantz and Scott, In Lewis G. E. (Ed)
20 Biomedical Aspects of Botulinum, New York: Academic Press, 143-150 (1981))。A型肉毒毒素处理皱纹的这种用途导致1992年该方法的发表(Schantz and Scott, In Lewis G. E. (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, New York: Academic Press, 143-150 (1981))。直到1994年，又报道了脸上的其它与运动相关的皱纹的处理(Scott, Ophthalmol, 87:1044-1049 (1980))。
25 这导致了使用A型肉毒毒素进行美容医疗时代的到来。

据报道A型肉毒毒素是人类已知的最致命的天然生物制剂。肉毒梭菌的孢子存在于土壤中并可在不适当消毒且密封的食品容器中生长。由细菌的摄食引起的肉毒中毒可能是致命的。肉毒毒素通过抑制乙酰胆碱穿过神经肌肉连接处的释放来阻止突触传递，从而起到产生肌肉瘫痪的作用，并且认为肉毒毒素也以其它方式起作用。其作用实质上阻断了通常
30

会引起肌肉痉挛或收缩，导致瘫痪的信号。在过去的十年中，肉毒毒素的肌肉麻痹活性被用来达到各种治疗效果。肉毒毒素的控制施用已经用于提供肌肉麻痹以治疗各种医学病症，例如以骨骼肌过度活跃为特征的神经肌肉病症。用肉毒毒素治疗的病症包括偏侧面肌痉挛、成人发作性5 痉挛性斜颈、肛裂、睑痉挛、脑瘫、颈椎张力障碍、偏头痛、斜视、颞颌关节病症和各种类型的肌肉抽筋和痉挛。最近，肉毒毒素的肌肉麻痹作用已经应用于治疗和美容的面部应用，例如皱纹和面部肌肉痉挛或收缩后果的治疗。

除了A型肉毒毒素形式外，还有7种血清学上不同的肉毒毒素形式，10 它们也由革兰氏阳性菌肉毒梭菌产生。在这八种血清学上不同类型的肉毒毒素中，可导致瘫痪的七种血清型被命名为肉毒毒素血清型A、B、C、D、E、F和G，这些中的每一种通过用类型特异性抗体中和来区分。每种肉毒毒素蛋白的分子量约为150kD。由于肉毒毒素的分子大小和分子结构，它不能穿过角质层和皮肤结构下部的多层。肉毒毒素的不同血清型在不同15 动物物种中引起的瘫痪的作用和严重程度和持续时间方面不同。例如，在大鼠中，已经确定A型肉毒毒素的效力是B型肉毒毒素的500倍，如通过瘫痪率测量的。另外，已经确定B型肉毒毒素在灵长类动物中在480U/kg剂量下是无毒的。

由肉毒梭菌细菌释放的肉毒毒素是含有约150kD肉毒毒素蛋白分子20 和相关非毒素蛋白的毒素复合物的组分。认为这些内源性非毒素蛋白包括血凝素蛋白(HA)家族，以及非血凝素蛋白(NTNH)。认为非毒素蛋白稳定毒素复合物中的肉毒毒素分子并当毒素复合物被摄取时保护其不被消化酸变性。因此，当毒素复合物经胃肠道给药时，毒素复合物的非毒素蛋白保护肉毒毒素的活性，从而增强全身渗透。另外，认为一些非毒素25 蛋白特异性稳定血液中的肉毒毒素分子。

毒素复合物中非毒素蛋白的存在通常导致毒素复合物的分子量大于裸肉毒毒素分子的分子量，如前所述，其约为150kD。例如，肉毒梭菌细菌可产生分子量约900kD、500kD或300kD的A型肉毒毒素复合物。B型和C型肉毒毒素以分子量为约700kD或约500kD的复合物的形式产生。D型肉30 毒毒素以分子量约为300kD或500kD的复合物的形式产生。E型和F型肉毒

毒素仅作为分子量约300kD的复合物产生。

为了对肉毒毒素提供额外的稳定性，毒素复合物通常在制造过程中通过将复合物与白蛋白结合来稳定。例如，Botox[®] (Allergan, Inc, Irvine, CA)是一种含有肉毒毒素的制剂，其含有100U A型肉毒杆菌毒素和辅助蛋白、0.5mg人白蛋白和0.9mg氯化钠。白蛋白用于在不同的环境中结合和稳定毒素复合物，包括与制造、运输、储存和给药相关的环境。

然而，目前可用的A型毒肉毒杆菌素复合物数目有限。本领域中仍然需要新的A型肉毒杆菌毒素复合物及其配制剂。

10

发明内容

鉴于本领域中需要更多的 A 型毒素复合物，发明人提供了一种新的 A 型肉毒杆菌毒素复合物。与现有的产品(例如 Botox[®])相比，本发明的 A 型肉毒杆菌毒素复合物分子量更小，因此生产成本更小；并且稳定性和安全性更高。

15 在一方面，本发明提供了一种 A 型肉毒杆菌毒素复合物，其包含 HA70 组分、HA17 组分、HA33 组分、NTNH 组分和 BoNT/A1 组分，其中所述肉毒杆菌毒素组合物具有 740-790 kDa 的分子量。

在一个实施方案中，A 型肉毒杆菌毒素复合物由 HA70 组分、HA17 组分、HA33 组分、NTNH 组分和 BoNT/A1 组分组成，并且具有约 760kDa 20 的分子量。

在一个实施方案中，HA70 组分包含下列任一项：

(1) SEQ ID NO. 1 的氨基酸序列；或

(2) 具有 SEQ ID NO. 1 中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸得到的氨基酸序列，且保留 HA70 组分的功能。

25 在一个实施方案中，HA17 组分包含下列任一项：

(1) SEQ ID NO. 2 的氨基酸序列；或

(2) 具有 SEQ ID NO. 2 中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸得到的氨基酸序列，且保留 HA17 组分的功能。

在一个实施方案中，HA33 组分包含下列任一项：

30 (1) SEQ ID NO. 3 的氨基酸序列；或

(2) 具有 SEQ ID NO. 3 中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸得到的氨基酸序列，且保留 HA33 组分的功能。

在一个实施方案中，NTNH 组分包含下列任一项：

(1) SEQ ID NO. 4 的氨基酸序列；或

5 (2) 具有 SEQ ID NO. 4 中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸得到的氨基酸序列，且保留 NTNH 组分的功能。

在一个实施方案中，BoNT/A1 组分包含下列任一项：

(1) SEQ ID NO. 5 的氨基酸序列；或

10 (2) 具有 SEQ ID NO. 5 中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸得到的氨基酸序列，且保留 BoNT/A1 组分的功能。

在另一个方面，本发明提供了核酸，其编码本发明的 A 型肉毒杆菌毒素复合物。

在另一个方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含本发明的 A 型肉毒杆菌毒素复合物和药学上或皮肤学上可接受的载体。

15 在又一个方面，本发明提供了一种液体配制剂，其包含权利要求 1-6 中任一项的 A 型肉毒杆菌毒素复合物，其组成包含人类血清白蛋白、甲硫氨酸、精氨酸、氯化钠、Tween 80、柠檬酸盐缓冲液、及/或磷酸盐缓冲液。

20 在又一个方面，本发明提供了一种美容方法，其包括对有需要的受试者施用有效量的本发明的 A 型肉毒杆菌毒素复合物、药物组合物或液体配制剂。

在一个实施方案中，美容方法包括减少细纹和/或皱纹的外观，特别是在脸部，或者扩大眼睛、提升嘴角、或者使上唇出现的纹路平滑，或者一般性缓解肌肉张力。

25 在又一个方面，本发明提供了一种治疗或预防有需要的受试者中的由乙酰胆碱突触传递或释放引起的疾病的方法，其包括对受试者施用有效量的本发明的 A 型肉毒杆菌毒素复合物、药物组合物或液体配制剂。

30 在一个实施方案中，疾病选自以骨骼肌过度活跃为特征的神经肌肉病症、神经疼痛、偏头痛、膀胱活动过度、鼻炎、鼻窦炎、痤疮、张力障碍、张力障碍性收缩、多汗症、胆碱能神经系统控制的一个或多个腺

体的分泌过多、偏侧面肌痉挛、成人发作痉挛性斜颈，肛裂，睑痉挛，脑瘫，颈肌张力障碍、斜视，颞颌关节病症和各种类型的肌肉抽筋和痉挛。

在又一个方面，本发明提供了本发明的 A 型肉毒杆菌毒素复合物、
5 药物组合物或液体配制剂在制备美容用品或药物中的用途，所述美容用品用于减少细纹和/或皱纹的外观，特别是在脸部，或者扩大眼睛、提升嘴角、或者使上唇出现的纹路平滑，或者一般性缓解肌肉张力；所述药物用于治疗或预防由乙酰胆碱突触传递或释放引起的疾病。

在一个实施方案中，疾病选自以骨骼肌过度活跃为特征的神经肌肉
10 病症、神经疼痛、偏头痛、膀胱活动过度、鼻炎、鼻窦炎、痤疮、张力障碍、张力障碍性收缩、多汗症、胆碱能神经系统控制的一个或多个腺体的分泌过多、偏侧面肌痉挛、成人发作痉挛性斜颈，肛裂，睑痉挛，脑瘫，颈肌张力障碍、斜视，颞颌关节病症和各种类型的肌肉抽筋和痉挛。

15 在又一个方面，本发明提供了 A 型肉毒杆菌毒素复合物、药物组合物或液体配制剂，用于减少细纹和/或皱纹的外观，特别是在脸部，或者扩大眼睛、提升嘴角、或者使上唇出现的纹路平滑，或者一般性缓解肌肉张力；所述药物用于治疗或预防由乙酰胆碱突触传递或释放引起的疾病。

20 在一个实施方案中，疾病选自以骨骼肌过度活跃为特征的神经肌肉病症、神经疼痛、偏头痛、膀胱活动过度、鼻炎、鼻窦炎、痤疮、张力障碍、张力障碍性收缩、多汗症、胆碱能神经系统控制的一个或多个腺体的分泌过多、偏侧面肌痉挛、成人发作痉挛性斜颈，肛裂，睑痉挛，脑瘫，颈肌张力障碍、斜视，颞颌关节病症和各种类型的肌肉抽筋和痉挛。
25 挛。

本发明的 A 型肉毒杆菌毒素复合物(在本文中也称为“OBI-858”)，与市售产品 Botox[®]相比较具有以下优点：

(1)其治疗效果在小鼠动物实验中(有效剂量Effective Dose: ED50)与
Botox[®]的治疗效果相当，但是在小鼠动物实验中其致死剂量(Lethal
30 Dose: LD50)比Botox[®]的致死剂量更高，并且在小鼠动物实验中其安

全边际量(safety margin) (MOS)亦比Botox[®]更高,表明本发明可生产出比市售产品Botox[®]安全性更高的肉毒杆菌毒素制剂。

(2)本发明的A型肉毒杆菌毒素复合物的总蛋白质分子量为760 kDa,与Botox[®]分子量900 kDa不同,是一种新的A型肉毒杆菌毒素复合物。

5 (3)本发明的A型肉毒杆菌毒素复合物的配制剂具有改善的稳定性。

附图说明

图 1: 分子排阻高效液相色谱(SEC-HPLC)检测制品纯度。

图 2: 连接折射率和多角度激光散射(MALS)检测制品分子量。

10 图 3: 电子显微镜(Electron microscopy)测定产品总蛋白质分子量。(a) OBI-858, 箭头指示毒素颗粒; 和(b) 760 kDa L-PTC/A 的参考品研究, 箭头指示四种不同的方向。

图 4: DAS 测定法的评分图。

具体实施方式

15

本发明涉及A型肉毒杆菌毒素复合物以及其液体配制剂。如本文所述,本发明的组合物可用作向受试者提供肉毒毒素的可注射应用,用于各种治疗,美容和/或化妆目的。与现有A型肉毒杆菌毒素复合物产品相比,本发明的A型肉毒杆菌毒素复合物具有更好的安全性且增强或相当的效力。针对本发明的A型肉毒杆菌毒素复合物,本发明提供了用于该A型肉毒杆菌毒素复合物的液体配制剂,提供优异的稳定性。

20

如本文中使用,术语“A型肉毒杆菌毒素复合物”指约150kD的A型肉毒杆菌毒素蛋白分子以及相关的内源性非毒素蛋白,即血凝素蛋白(HA)和非毒素非血凝素蛋白(NTNH)形成的复合物。血凝素蛋白由70、33和17 kDa的子组分,即HA70、33和17组成。肉毒杆菌毒素复合物无需作为一个单一毒素源自肉毒梭菌细菌。例如,肉毒杆菌毒素或经过修饰的肉毒杆菌毒素可以重组制备,然后与非毒素蛋白组合。也可以购买重组肉毒杆菌毒素,然后与非毒性蛋白质组合。

25

在本文中,A型肉毒杆菌毒素复合物也可以含有如本文中描述的HA70、33、17、NTNH或BoNT/A1,或者其变体。变体是在本文中描述

30

的序列(例如 SEQ ID No. 1-5 中的任一种)中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸得到的氨基酸序列。

术语“一个或几个”是指很大程度上不损害蛋白质性活性的区域的数量。由术语“一个或几个”指代的数量是例如 1 至 100, 优选地 1 至 80, 更优选地 1 至 50, 仍更优选地 1 至 40, 并且特别优选地 1 至 30、1 至 20、1 至 10 或 1 至 5(例如 1、2、3、4 或 5)。

下文中提供了实施例中的A型肉毒杆菌毒素复合物的各组分的序列。

HA70 (SEQ ID NO. 1)

MNSSIKKIYNDIQEKVINYSIDTIDLADGNYVVRRGDGWILSRQNQILG
10 GSVISNGSTGIVGDLRVNDNAIPYYPTPSFNEEYIKNNIQT VFTNFTEA
NQIPIGFEFSKTAPSNKNLYMYLQYTYIRYEIHKVLQHEIIERAVLYVPSL
GYVKSIEFNPGKINKDFYFLTNDKCILNEQFLYKKILETTKNIPTNNIF
NSKVSSTQRVLPYSNGLYVINKGDGYIRTNDKDLIGTLLIEAGSSGSIIQ
PRLRNTTRPLFTTSNDTKFSQQYTEERLKD A FNVQLFNTSTSLFKFVEE
15 APSDKNICIKAYNTYEK YELIDYQNGSIVNKA EYYLPSLGYCEVTNAP
SPESEVVKMQVAEDGFIQNGPEEEIVVGVIDPSENIQEINTAISDNYTYN
IPGIVNNNPFYILFTVNTTGIYKINAQNNLPSLKIYE AIGSGNRNFQSGN
LCDDDIKAINYITGFDSPNAKSYLVVLLNKDKNY YIRVPQTSSNIENQI
QFKREEGDLRLNMNSSVNIIDNLNSTGAHYYTRQSPDVHDYISYEFTIP
20 GNFNKDTSNIRLYTSYNQGIGTLFRVTETIDGYNLINIQQNLHLLNNT
NSIRLLNGAIYILKVEVTELN NYNIRLHIDITN

HA17 (SEQ ID NO.2)

MSVERTFLPNGNYNIKSIFSGSLYLNPVSKSLTFSNESSANNQKWNVEY
25 MAENRCFKISNVAEPNK YLSYDNFGFISLDSLSNRCYWFPIKIAVNTYI
MLSLNKVNELDYAWDIYDTNENILSQPLLLPNFDIYNSNQMFKLEKI

HA33 (SEQ ID NO. 3)

MEHYSVIQNSLNDKIVTISCKADTNLFFYQVAGNVSLFQQTRNYLERW
30 RLIYDSNKAAYKIKSMDIHNTNLVLTWNAPTHNISTQQDSNADNQYW
LLKDIGNNSFIASYNPNLVLYADTVARNLKLSTLNNSNYIKFIIEDYI
ISDLNNFTCKISPILDLNKVVQQVDVTNLNVNLYTWDYGRNQKWTIR
YNEEKAAYQFFNTILSNGVLTWIFSNNGTVRVSSNDQNDAQYWLIN
PVSDTDETYTITNLRD TTKALDLYGGQTANGTAIQVFNYHGDDNQKW
35 NIRNP

NTNH (SEQ ID NO. 4)

MNINDNLSINSPVDNKNVVVVVRARKTDTVFKAFKVAPNIWVAPERYY
GESLSIDEEYKVDGGIYDSNFLSQDSEKDKFLQAIITLLKRINSTNAGE
KLLSLISTAIPFPYGYIGGGYYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLISSTIPFPY
AGYRETNYLSSSEDNKSFYASNIVIFGPGANIVENNTVFYKKEDAENGM
5 GTMTEIWFQPFLTYKYDEFYIDPAIELIKCLIKSLYFLYGIKPSDDLVIPY
RLRSELENIEYSQNLIVDLLVSGGIDPKFINTDPYWFTDNYFSNAKKVF
EDHRNIYETEIEGNNNAIGNDIKLRLLKQKFRININDIWELNLNYFSKEFSI
MMPDRFNNALKHFYRKQYYKIDYPENYSINGFVNGQINAQLSLSDRN
QDIINKPEEIIINLLNGNNVSLMRSNIYGDGLKSTVDDFYSNYKIPYNRA
10 YEYHFNNNSNDSSLDNVNIGVIDNIPEIIDVNPYKENCDFSPVQKITSTR
EINTNIPWPINYLQAQNTNNEKFSLSDDFVEVVSSKDKSLVYSFSLSNVM
FYLDSIKDNSPIDTDKKYYLWLREIFRNYSFDITATQEINTNCGINKVVT
WFGKALNILNTSDSFVEEFQNLGAISLINKKENLSMPIIESYEIPNDMLG
LPLNDLNEKLFNIYSKNTAYFKKIYYNFLDQWWTQYYSQYFDLICMA
15 KRSVLAQETLIKRIIQKKLSYLIGNSNISSDNLALMNLTNTNLRDISNE
SQIAMNNVDSFLNNAICVFESNIYPKFISFMEQCINNINIKTKEFIQKC
TNINEDEKLQLINQNVFNSLDFEFLNIQNMKSLFSSETALLIKEETWPY
ELVLYAFKEPGNNVIGDASGKNTSIEYSKDIGLVYGINS DALYLNQSNQ
SISFSNDDFFENGLTNSFSIYFWLRNLGKDTIKSKLIGSKEDNCGWEIYFQ
20 DTGLVFNMIDSNGNEKNIYLSVSNNSWHYITISVDRLKEQLLIFIDDN
LVANESIKEILNIYSSNIISLSENPNPSYIEGLTILNKPTTSQEVLSNYFEV
LNNSYIRDSNEERLEYNKTYQLYNYVFSKDPICEVKQNNNIYLTINNTN
NLNLQASKFKLLSINPNKQYVQKLDEVIISVLDNMEKYIDISEDNRLQL
IDNKNNAKKMIISNDIFISNCLTLSYNGKYICLSMKDENHNW MICNND
25 MSKYLYLWSFK

BoNT/A1 (SEQ ID NO. 5)

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWVIPER
DTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLF
30 ERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYR
SEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGF
EESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAINPNRVFKV
NTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHD AKFIDSLQENEFRLYYYNKF KDI
ASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLFKFDKL
35 YKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDG
FNL RNTNLAANFNGQNT EINN MNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITS
KTKSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITS DT
NIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERF
PNGKKYELDKYTMFHYLRAQEF EHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTF

FSSDYVKKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIII
PYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIA
NKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKM
KEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKA
5 MININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNR
GTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSFTFEYIKNIINT
SILNLRYESNHLIDLRYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVIL
KNAIVYNSMYENFSTSFWRIPKYFNSISLNNEYTIINCMENNSGWKVS
LNYGEIHWTLQDTQEIKQRVVFYKYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNN
10 SKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLF
KELNEKEIKDLYDNQSNISGILKDFWGDYLYQYDKPYYMLNLYDPNKY
VDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIKKYASGNK
DNIVRNNDRVYINVVVKNKEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLS
QVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNIKLVASN
15 WYNRQIERSSRTLGCSEFIPVDDGWGERPL

本发明还涉及一种通过将有效量的本发明组合物注射到有需要的受试者或患者上来产生生物效应的方法。生物效应可以包括例如肌肉麻痹，减少分泌过多或出汗，治疗神经性疼痛或偏头痛，控制鼻炎或鼻窦炎，治疗膀胱活动过度，减少肌肉痉挛，预防或减少痤疮，减少或增强免疫
20 反应，减少皱纹，或预防或治疗各种其它病症。

本发明的组合物为允许注射到受试者或患者(即，需要特定治疗的人或其它哺乳动物)的皮肤或上皮中的形式。术语“需要”是指包括与药物或健康相关的需要(例如，治疗涉及不希望的面部肌肉痉挛的病症)，以及化妆和主观需要(例如，改变或改善面部组织的外观)。在它们的最简单形式中，它们可以包含水性药学上可接受的稀释剂，例如缓冲盐水(例如磷酸盐缓冲盐水)。然而，组合物可包含通常在可注射药物或化妆品组合物中发现的其它成分，包括与将被施用到的组织相容的皮肤学上或药学上可接受的载体。如本文所用，术语“皮肤学上或药学上可接受的”是指
25 本文描述的组合物或其组分适于与组织接触或用于一般患者而没有不应有的毒性、不相容性、不稳定性、过敏反应等。适当时，本发明的组合物可包含常规用于所考虑的领域，特别是化妆品和皮肤病学中的任何组分。

根据本发明的肉毒杆菌毒素复合物可以通过注射(通常使用注射器)

递送到皮肤下面的肌肉，或以产生瘫痪，产生松弛，缓解收缩，预防或缓解痉挛，减少腺输出或其它所需作用的有效量作用于皮肤内的腺结构。以这种方式局部递送肉毒毒素可以提供剂量减少，降低毒性，并且允许相对于可注射或可植入材料更精确的剂量优化以获得所需的效果。

5 施用本发明的肉毒杆菌毒素复合物以递送有效量的肉毒毒素。本文所用术语“有效量”是指如下的量，其足以产生所需的肌肉麻痹或其它生物学或美学效果，但其隐含地是安全量，即其足够低以避免严重副作用。所需的效果包括放松某些肌肉，例如，减少细纹和/或皱纹的外观，特别是在脸部，或者以其它方式调节脸部外观，例如扩大眼睛，抬高嘴角，或者缓解肌肉张力。肌肉张力的缓解可以在脸部或其它地方进行。
10 本发明的肉毒杆菌毒素复合物可通过注射给药于患者，用于治疗诸如皱纹，不希望的面部肌肉或其它肌肉痉挛，多汗症，痤疮或身体其它需要缓解肌肉疼痛或痉挛的疾病。肉毒杆菌毒素复合物通过注射施用于肌肉或其它皮肤相关或其它靶组织结构。可以例如，对腿部、肩部、背部(包括下背部)、腋部、手掌、足部、颈部、脸部、腹股沟、手或足的背部、
15 肘部、上臂、膝部、上腿、臀部、躯干、骨盆或有需要的身体的任何其它部分施用肉毒杆菌毒素复合物。

 本发明的肉毒杆菌毒素复合物的给药也可用于治疗其它病症，包括任何预防乙酰胆碱突触传递或释放会带来治疗益处的病症。例如，可由
20 本发明治疗的病况包括但不限于神经疼痛、偏头痛或其它头痛疼痛、膀胱活动过度、鼻炎、鼻窦炎、痤疮、张力障碍、张力障碍性收缩、多汗症、以及胆碱能神经系统控制的一个或多个腺体的分泌过多、以骨骼肌过度活跃为特征的神经肌肉病症。用肉毒毒素治疗的病症包括半脸痉挛，偏侧面肌痉挛、成人发作痉挛性斜颈，肛裂，睑痉挛，脑瘫，颈肌张力
25 障碍、斜视，颞颌关节病症和各种类型的肌肉抽筋和痉挛。本发明还可用于降低或增强免疫应答，或治疗已经建议或已经进行注射肉毒杆菌毒素复合物给药的其它病症。本发明的肉毒杆菌毒素复合物可以制备以固体形式制备，例如冻干末、片剂等，并且在使用前在注射用水中重建以供使用。

30 本发明的肉毒杆菌毒素复合物、组合物或配制剂由医师或其它保健

专业人员给药或在医师或其它保健专业人员指导下给药。它们可以在一次治疗中或在一系列治疗中随时间施用。在优选的实施方案中，在需要与肉毒毒素相关的作用的一个或多个位置注射根据本发明的肉毒杆菌毒素复合物、组合物或配制剂。由于肉毒杆菌毒素复合物的性质，肉毒毒素优选以产生所需结果而不产生任何不利或不希望的结果的量，施用速率和频率施用。

在本文中，配制剂包含人类血清白蛋白、甲硫氨酸、精氨酸、氯化钠、Tween 80、柠檬酸盐缓冲液、及/或磷酸盐缓冲液。优选地，配制剂包含人类血清白蛋白、氯化钠以及溶解于50 mM柠檬酸盐缓冲液的Tween 80。在配制剂中，人类血清白蛋白的浓度可以为0.1-1，例如0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9 mg/mL。氯化钠的浓度可以为5-20，例如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、或19 mg/mL，更优选为11.25 mg/mL。溶解于50 mM柠檬酸盐缓冲液的Tween 80的浓度可以为0.1-0.3，例如0.2 mg/mL，更优选为0.188 mg/mL。配制剂具有一定的pH值，例如4-8，优选地pH 5.6。

在下文中，通过参考下述实施例来更为详细描述本发明构思。然而，这些实施例仅用于例示性目的，而不意图限制本发明构思的范围。

实施例

实施例1: OBI-858的制备过程

(1) OBI-858原料药制备过程:

将细胞库的冷冻管中的OBI-858细菌复苏，并且使用培养基逐步扩充，然后接种到生产发酵罐。完成细胞培养后，通过过滤除去细胞和细胞碎片。纯化步骤包括两步沉淀、缓冲液交换和色谱步骤。色谱步骤后，通过0.22 μ m滤器将产物过滤到原料药容器，然后冻干以得到OBI-858原料药。

(2) 药物产品(制剂)制备过程:

用配制缓冲液重建冻干的OBI-858原料药粉末。重建后的溶液通过0.22 μ m滤器进行灭菌，并且转移到无菌隔离器中，然后冻干以获得OBI-858药物产品。

实施例2: OBI-858的鉴定**(1) 基因组序列比对**

OBI-858生产用菌种为自主筛选发展之A型肉毒梭菌株, 经全基因组定序确认为98.28 %相近于A 型肉毒梭菌3502株, 89.69 %相近于A型肉毒梭菌 Hall 株 [表1], 因此在菌种基因分析上有别于目前市面上发售之产品。

表1: 肉毒杆菌菌株基因组序列比对

肉毒杆菌菌株	基因组序列似度(%)
<i>Clostridium botulinum</i> A str. ATCC 3502	98.28
<i>Clostridium botulinum</i> A str. ATCC 19397	90.29
<i>Clostridium botulinum</i> A str. Hall	89.69
<i>Clostridium botulinum</i> H04402 065(A5)	68.98
<i>Clostridium botulinum</i> A2 str. Kyoto	68.39
<i>Clostridium botulinum</i> A3 str. Loch Maree	48.84

(2) 蛋白组成分析**实验材料/流程:**

为了实现最高的序列覆盖, 用不同的酶分解OBI-858蛋白样品, 然后进行LC-MS/MS分析。OBI-858蛋白首先用6 M尿素变性, 用10 mM DTT于37 °C还原1小时, 在黑暗中于室温用50 mM IAM烷基化30分钟。得到的蛋白质在50 mM碳酸氢铵中在以下条件下进行分解:

- (a) 于37 °C用胰蛋白酶分解18小时;
- (b) 于37 °C用Glu-C蛋白酶分解18小时;
- (c) 于37 °C用胰蛋白酶分解 + 于37 °C用Glu-C蛋白酶分解18小时;
- (d) 于37 °C用Lys-C分解18小时;
- (e) 于37 °C用胰凝乳蛋白酶分解18小时;
- (f) 于37 °C用嗜热菌蛋白酶分解18小时。

分解后, 稀释蛋白质样品, 并且用0.1% FA酸化以进行MS分析。

用与Ultimate 3000 RSLC system (Dionex)偶联的Q Exactive质谱仪(Thermo Scientific)分析样品。使用C18柱(Acclaim PepMap RSLC, 75 μm x 150 mm, 2 μm , 100 Å)通过以下所示的梯度进行LC分离。

表2: 液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)分析程式

时间(分钟)	流动相A (%)	流动相B (%)	流速($\mu\text{L}/\text{min}$)
0	99	1	0.25
5.5	99	1	0.25
45	75	25	0.25
48	40	60	0.25
50	20	80	0.25
60	20	80	0.25
65	99	1	0.25
70	99	1	0.25

5 流动相A: 0.1%甲酸

流动相B: 99%乙腈+0.1%甲酸

以m/z 300-2000的范围进行全MS扫描, 并且MS扫描中10个最强烈的离子进行碎裂处理以得到MS/MS谱。通过Proteome Discoverer 1.4进行Mascot数据库搜索将原始数据加工成峰列表。

10

实验结果:

在液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)分析OBI-858 A型肉毒毒素氨基酸测序结果显示, 本毒素蛋白主要是由 71 kDa、17 kDa、34 kDa、138 kDa与149 kDa五种不同大小蛋白质分子组成 [表3]。对这五种不同的蛋白质进行商业测序, 分别得到SEQ ID NO. 1-5的氨基酸序列。具体地, HA70组分的氨基酸序列为SEQ ID NO. 1, HA17组分的氨基酸序列为SEQ ID NO. 2, HA33组分的氨基酸序列为SEQ ID NO. 3, NTNH组分的氨基酸序列为SEQ ID NO. 4, 以及BoNT/A1组分的氨基酸序列为SEQ ID NO. 5。

20

表3: 根据测序序列计算的理论数值

蛋白质序列 ID	理论分子量 (Da)	蛋白质名称	氨基酸数目	分子式
A5HZZ4	71391.01	HA-70	626	C ₃₂₀₀ H ₄₉₅₃ N ₈₃₇ O ₉₉₉ S ₈
A5HZZ5	17034.31	HA-17	146	C ₇₇₅ H ₁₁₆₉ N ₁₉₁ O ₂₃₀ S ₆
A5HZZ6	33872.73	HA-33	293	C ₁₅₁₅ H ₂₃₁₃ N ₄₀₉ O ₄₆₈ S ₄
A5HZZ8	138092.85	NTNH	1193	C ₆₂₄₀ H ₉₅₅₅ N ₁₅₆₉ O ₁₉₀₅ S ₃₃
A5HZZ9	149425.84	BoNT/A1	1296	C ₆₇₆₃ H ₁₀₄₅₂ N ₁₇₄₄ O ₂₀₁₁ S ₃₃

(3) 分子排阻高效液相色谱(SEC-HPLC)检测制品纯度与连接折射率和分子排阻多角度激光散射(SEC-MALS)检测制品分子量

实验材料/流程:

- 5 SEC-MALS 分析是组合的大小排阻高效液相色谱(SEC-HPLC)和静态光散射分析, 使用 Agilent 1260 HPLC 系统进行, 并且在线连接到含有 SRT SEC-300 (5 μ m, 7.8 $\times$ 300mm)柱的 WYATT_DAWN HELEOS 静态光散射检测器。使用 Chemstation 软件(Agilent Technologies)控制 Agilent 1260 HPLC 系统。使用 ASTRA V 软件(Wyatt Technology)控制和分析光散射检测器。
- 10 将 50 μ g OBI-858 原料药溶解于 100 μ L 0.15 M 硫酸盐缓冲液(pH 6.0), 然后注入样品。使用流动相: 0.15 M 磷酸盐缓冲液+0.1 M NaCl 和 200 ppm NaN₃; pH 6.0 以 0.5 mL/min 的流速进行等度洗脱。以 280 nm 的 UV 吸光度监测光散射实验期间的 OBI-858 复合物浓度。使用比折光指数增量(specific refractive index increment) (dn/dc)值 0.185 mL/g 和 UV 消光系数
- 15 数 1.49 mL/(mg $\times$ cm)从光散射数据计算 OBI-858 复合物的分子量。

实验结果:

- 图1显示以分子排阻高效液相色谱(SEC-HPLC)检测制品纯度, 本制品的纯度达到99.36 %, 图2连接折射率和多角度激光散射(MALS)检测制品
- 20 分子量为接近760 kDa的蛋白。

(4) 电子显微镜(Electron microscopy)测定

实验材料/流程:

使用10 μL去离子蒸馏水(DDW)中溶解的25 μg OBI-858原料药(测试品)和L-PTC/A(参考品)进行负染色的样品制备。首先, 将4 μL OBI-858样品溶液液滴吸附到辉光放电的碳涂覆的铜栅格, 用去离子水逐滴清洗, 用2 %醋酸铀酰染色, 并且风干。使用JEM-2100F透射电子显微镜(TEM)记录样品图像, 该透射电子显微镜装备有场发射电子源并且以200 kV的加速电压操作。在DE12照相机上记录图像。

实验结果:

图3显示以电子显微镜(Electron microscopy)测定产品总蛋白质分子量, 图3a显示OBI-858毒素颗粒外型(箭头指示处), 图3b显示和分子量760 kDa的L-PTC/A的参考品做比对, 箭头指示分别朝向四种不同的方向。以上试验结果皆显示OBI-858为接近760 kDa的毒素蛋白, 因此本制品在总蛋白质分子量也有别于市面上900 kDa的A型肉毒毒素产品。

实施例3: OBI-858功效性研究(Efficacy Study)

这项研究的目的是在雌性ICR小鼠中评估OBI-858测试品的单剂量急性肌肉(IM)功效。通过后趾外展评分测定法(Digit Abduction Scoring assay, DAS测定法)确定OBI-858测试品的功效, 以计算IM中值有效剂量(ED50), 安全边际量以72小时IM LD50与48小时IM ED50之比值来决定。

材料和方法

测试品、参考品、媒介物和对照

测试品

名称	OBI-858
供应商	OBI Pharma, Inc.
批号	14004-25, 14004-30, 14004-35, 14004-45
贮存条件	-15 – -25 °C
其它特征	一瓶无菌冻干粉末含有 1,350,440 单位。

参考品

名称 BOTOX®
 供应商 Allergan Inc.
 批号 C3461 C2
 贮存条件 -15 – -25 °C

- 5 其它特征 50 个单位的 A 型肉毒杆菌毒素[每小瓶]

媒介物 and 对照

稀释缓冲液(30 mM 磷酸盐缓冲盐水, 含 0.2% w/v 明胶, pH 6.8)用作配制制剂的媒介物和给药时的阴性对照。

剂量制剂的制备和处置

- 10 所有制剂均在预定的给药日新鲜制备以用于当日使用。

测试品重建和剂量配方

所有剂量制剂的制备程序均在位于测试设施中的 II 级生物安全柜中进行。在给药程序之前的给药日进行剂量制剂的制备。

- 15 将测试品作为冻干材料包装在无菌密封小瓶中。为了重建冻干的测试品, 将 1 mL 稀释缓冲液注入装有测试品的小瓶中。剧烈摇动小瓶以溶解测试品, 直到肉眼看不到重建原料中的颗粒物质为止。重建的测试品的储备浓度为每毫升 1350440 LD50 单位(U)。然后, 按照下表 4 用重建的测试品进行系列稀释:

表 4: 用于剂量制剂制备的测试品稀释方案

原料 ID	0(重建)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
组	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2
稀释缓冲液体积 (μL)	1000	700	600	600	2000	2445	402	396	406	394	508	488	509	781	778	800
原料 ID	N/A	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
原料体积 (μL)	N/A	100	100	100	500	1000	2000	2000	2000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
总体积 (μL)	1000	800	700	700	2500	3445	2402	2396	2406	2394	1508	1488	1509	1781	1778	1800
给药体积	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1445	402	396	406	1394	508	488	509	781	778	1800

(μL)																
稀释因子	1	8	56	392	1960	6752.2	8109.4	9715.1	11687.2	13989.6	21096.3	31391.3	47369.5	84365	150001	270001.8
倍数稀释	1	8	7	7	5	3.445	1.201	1.198	1.203	1.197	1.508	1.488	1.509	1.781	1.778	1.8
剂量浓度 (U/mL)	1350440	168805	24115	3445	689	200	166.528	139.005	115.549	96.532	64.013	43.020	28.509	16.007	9.003	5.002

- 为了制备每种系列稀释液，将所需体积的稀释缓冲液通过微量移液器转移至带盖的新鲜玻璃小瓶中。然后通过微量移液器将所需体积的待稀释原液转移到装有稀释缓冲液的小瓶中。通过反复轻柔移液几次进行混合，然后反复轻柔倒置，将小瓶上瓶盖拧紧几次。在每个转移步骤完成时，将用过的微量移液器吸头丢弃。剂量制剂制备完成时所得的原料 5 至原料 15 用作测试品剂量制剂。

参考品重建和剂量配方

- 将参考制品作为冻干材料包装在无菌密封小瓶中。为了重建冻干的参考制品，将 0.2 mL 稀释缓冲液注入装有测试品的小瓶中。然后将小瓶剧烈摇动以溶解测试品，直到肉眼看不到重建原料中的颗粒物为止。重建的测试品的库存浓度为每毫升 250 LD50 单位(U)。然后，按照下表用重建的参考品进行系列稀释：

表 5：用于剂量制剂制备的参考品稀释方案

原料ID (重建)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
组	N/A	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2
稀释缓冲液体积(μL)	1600	360	281	253	229	187	366	327	305	391	373	360
原料ID	N/A	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
原料体积(μL)	0	1440	1400	1280	1130	950	720	670	600	500	480	450
总体积(μL)	1600	1800	1681	1533	1359	1137	1086	997	905	891	853	810
给药体积(μL)	0	400	401	403	409	417	416	397	405	411	403	810
稀释因子	1	1.25	1.501	1.798	2.162	2.587	3.903	5.807	8.759	15.609	27.739	49.930
倍数稀释	1	1.25	1.201	1.198	1.203	1.197	1.508	1.488	1.508	1.782	1.777	1.8

剂量浓度 (U/mL)	250	200	166.568	139.078	115.642	96.623	64.059	43.049	28.541	16.016	9.013	5.007
----------------	-----	-----	---------	---------	---------	--------	--------	--------	--------	--------	-------	-------

通过如上系列稀释方案由重建的参考品制备剂量制剂。为了制备每个系列稀释液，将所需体积的稀释缓冲液通过微量移液器转移至带盖的新鲜玻璃小瓶中。然后通过微量移液器将所需体积的待稀释原液转移到5 装有稀释缓冲液的小瓶中。通过反复轻柔移液几次进行混合，然后反复轻柔倒置，将小瓶上瓶盖拧紧几次。在每个转移步骤完成时，将用过的微量移液器吸头丢弃。剂量制剂制备完成时原料 1 至原料 11 用作参考品剂量制剂。

研究动物

10 以下描述了研究动物。

品系 ICR 小鼠

来源 BioLASCO Taiwan Co., Ltd (Taipei, Taiwan)

组分配的动物数据 每批 236 雌性: 共 4 批

备用动物 每批 14 雌性: 共 4 批

15 给药日的重量 18-22 克(体重范围在体重平均值的正负 10%内)

鉴定笼卡 耳刻, 染料标记身体或尾部, 以及笼卡

选择理由：以小鼠为测试系统，设计了本研究中测试品和参考品的药物类别的的功效和毒性确定的测定程序。雌性动物被用于该程序的开发，并且在先前的研究中还显示，雌性动物更容易受到该测试品和参考品的药物类别的药理作用和毒性的影响。根据既定程序和先前的研究结果，选择雌性小鼠作为本研究的测试系统。

环境条件

研究动物的饲养条件如下： 动物在国际实验动物管理评鉴及认证协会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)认可的动物房中在具有草垫的聚碳酸酯笼子中个别饲养。温度 20.7 – 23.1 °C，相对湿度 51.2 – 67.1 %，光周期：12 小时光/12 小时黑暗；饲料：高温灭菌的 Rodent Diet 5010 (PMI® Nutrition International, Inc., MO, USA)，任意提供。水：任意提供。定期分析食物和水。食物和水的

分析结果保存在测试设施的档案中。预计食品和水不会存在任何污染物。

实验设计

- 动物适应和选择:** 在给药前, 将动物在测试设施处隔离 2 天, 并使其适应 3-4 天。至少在给药前一天, 在研究设计中将动物随机分为研究组(第 1-12 组, 每组分别具有两个子组 A 和 B)。每个分配的动物给四码序列号。研究组或研究组子组的平均体重之间无统计学显著性差异($p < 0.05$), 由单因素方差分析(ANOVA)确定。未分配的动物被指定为备用动物。如果在相应批次的第 0 天或之前出现健康问题[包括体重超过可接受的限制(24 克)]和/或怀疑的剂量错误, 则将分配的动物替换为备用动物。第 1 天后将备用动物排除在研究范围之外。

研究设计: 剂量组、标称剂量浓度、剂量体积、标称剂量水平以及每个剂量组的动物数如下表:

表 6: 研究设计

组	标称剂量浓度 (U/mL) ^a	剂量体积 (mL/动物)	标称剂量 (U/动物) ^b	动物总数(F: 雌性)	
				OBI-858	BOTOX [®]
1	0 c	0.02	0	10F	
				亚组 A	亚组 B
2	5	0.02	0.1	10F	10F
3	9	0.02	0.18	10F	10F
4	16	0.02	0.32	10F	10F
5	28.5	0.02	0.57	10F	10F
6	43	0.02	0.86	10F	10F
7	64	0.02	1.28	10F	10F
8	96.5	0.02	1.93	10F	10F
9	115.5	0.02	2.31	10F	10F
10	139	0.02	2.78	10F	10F
11	166.5	0.02	3.33	10F	10F
12	200	0.02	4	10F	10F

13	844,025	0.1	84,402.5	3F+ 3F ^d	0
----	---------	-----	----------	---------------------	---

- a: 有关计算出的剂量浓度的信息见上文。
- b: 除第 13 组外，实际剂量水平乘以剂量体积。
- c: 将稀释缓冲液用于第 1 组动物的剂量(阴性对照组)。
- d: 第 13 组用于验证测试品的完整性。在给药日从备用动物中选择第 13 组动物。

测试品完整性的验证

在每批的给药日(第 0 天)，从备用动物库中随机选择 3 只动物。单独地，重建单个小瓶的测试品(原料 0)，并且将原料 0 的一部分稀释 1.6 倍。然后通过尾静脉向选择的测试动物静脉内注射 0.1mL 重建和稀释的测试品。当通过在给药后 1 小时内至少两只静脉内给药的试验动物的死亡证实了试验物品的完整性，将继续进行主要研究动物的给药。如果至少 2 只动物在 1 小时内未能死亡，则将丢弃特定小瓶的测试品原料 0。在这种情况下，要从第二个测试品小瓶中制备新鲜的小瓶原料 0，并用第二个小瓶的原料重复进行验证测试。如果第二个小瓶也未通过验证测试，则由于不合格的测试品效力，特定批次的剂量将被停止。由于所有测试品小瓶均通过了测试，因此在初始测试后没有进行上述后续操作。

测试品的施用途径： 肌肉注射右腓肠肌。

选择剂量水平和给药途径的理由

通过选择标称剂量水平，以确定预期有 1 个数量级差异的肌肉内中值有效剂量(IM ED50)和肌肉内中值致死剂量(IM LD50)。

施用频率： 单剂量。

阴性对照施用

作为阴性对照，将 20μL 稀释缓冲液肌肉内注射到第 1 组剂量动物的右腓肠肌中。对照注射的程序与测试品注射的程序相同。

死亡率观察

在给药后第 0 天至少 6 小时观察一次动物的死亡率。此后，在整个研究期间每天观察动物的死亡率，同时进行 DAS 测定法(直至第 3 天)。对死亡率分别进行评分，并以每组为基础计数以计算 LD50。

趾外展评分(DAS)测定法

对于每批,在各批次的第 0 天给药第一只动物后 24-26、48-50 和 72-74 小时观察研究动物的肌无力。通过 DAS 分析对肌无力进行评分。对于每只动物,各别由两位人员独立记录其肌无力得分。将两个单独观察的分数取平均值进行分析。DAS 测定法依据以下美国专利申请公开号 US 2010/0168023 A1 进行。使用趾外展评分(DAS)测定法测量了肌肉麻痹,如 Aoki, K. R. “A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice”, Toxicon 2001; 39(12):1815-1820 所述。在 DAS 测定法中,小鼠的尾巴短暂地悬吊起来,引起特征性的惊吓反应,其中小鼠伸展其后肢并外展其后趾。小鼠能够表现出此惊吓反应的程度以五分制(从 0-4)评分,其中 0 表正常的惊吓反应,四代表趾外展和腿伸展的最大减少。趾外展的评分基于以下说明和标准:

表 7: 趾外展评分(DAS)测定法的评分量表

趾外展得分	4	腿弯曲, 5 趾接触。
		死亡
	3	腿平坦, 5 趾接触。
		腿弯曲, 4 趾接触
	2	腿平坦, 所有趾顶部略有开放空间。
		腿平坦, 3 趾接触
	1	腿平坦, 与未注射腿相比趾外展宽度有差异
		腿平坦, 2 趾接触并且剩余趾完全散开
	0	外观完全正常(没变化)

为了 DAS 分析的目的, 在 DAS 研究时死亡的动物被赋予分数 “4”。

15 **体重:** 至少在分组前和给药前第 0 天测量体重一次。

统计分析: 概率分析用于拟合概率和分对数 S 形毒素单位/DAS 响应曲线,并计算 IM ED50 和 IM LD50 值。使用 Minitab[®] 统计软件进行分析。根据给药后 48 小时的 IM ED50(DAS)和给药后 72 小时的 IM LD50 计算各批次的安全边际量。回归分析的接受标准为 $R^2 > 0.9$ 。

- 5 **计算机系统:** 在线数据收集系统(版本 6.3.2; Xybion Medical Systems Corporation)用于在测试设施中捕获和分析体重数据。

结果与讨论

OBI-858 批次处理完整性的测试

- 10 下表列出了 OBI-858 完整性测试的概述。

表 8: OBI-858 完整性测试

批次	批次号	平均存活时间(给药后的分钟数)
1	14004-25	34.0 ± 2.6
2	14004-30	33.3 ± 1.5
3	14004-35	34.7 ± 3.1
4	14004-45	31.7 ± 2.3

测试品的所有小瓶均通过完整性测试,平均给药后存活时间少于 1 小时。

- 15 **体重:** 对于每批,单个剂量组的体重范围在各自平均体重的 $\pm 10\%$ 范围内。体重超过 24 克的动物被替换。

DAS 测定法和 ED50 计算

OBI-858

- 20 早在给药后 24 小时,动物就表现出趾外展的体征。趾外展的严重程度与在更高剂量下最大严重程度(包括死亡)时达到平台期之前的 OBI-858 剂量增加有关。在 48 小时 IM ED50 中,除批次 1 外的所有样品均通过了回归分析的接受标准($R^2 > 0.9$)。依据下表所示,对于第 2、3 和 4 批次,给药后 48 小时的 ED50 分别为 0.33、0.32 和 0.36 U/动物。

表 9: 测试品 OBI858 的 48 小时的 ED50 (U/动物)

批次	ED50	低 95%	高 95%	R^2 值
1	0.21	0.13	0.35	0.89

2	0.33	0.27	0.41	0.97
3	0.32	0.23	0.46	0.92
4	0.36	0.27	0.47	0.95

BOTOX®

早在给药后 24 小时，动物就表现出趾外展的体征。趾外展的严重程度与 BOTOX®剂量的增加有关，但是对于获得的最大严重性(包括死亡)的平台期，BOTOX®的剂量比 OBI-858 的剂量小。在 48 小时的 IM ED50 中，除批次 1 外的所有样品均通过了回归分析的接受标准($R^2 > 0.9$)。依据下表所示，对于第 2、3 和 4 批次，给药后 48 小时的 ED50 分别为 0.22、0.24 和 0.23 U/动物。总体而言，BOTOX®的 48 小时 IM ED50 低于 OBI-858。

表10: BOTOX®的48小时的ED50(U/动物)

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

死亡率和 LD50 计算

OBI-858

大多数死亡发生在给药后 72 小时，尽管对于第 11 组和第 12 组早在给药后 48 小时就观察到死亡。依据下表所示，给药后 72 小时，所有四个批次的 LD50 分别为 3.00、3.42、3.33 和 3.35 U/动物。然而，在给药后 72 小时，仅批次 2、3 和 4 具有在剂量相关线性范围内的足够剂量组用于回归分析，死亡百分率在 0%至 100%之间。(每个分析至少需要三个剂量组)。在这三个批次中，只有第 2 批次和第 3 批次通过了回归分析的接受标准。

表 11: 测试品 OBI858 的 72 小时的 LD50(U/动物)

批次	LD50	低 95%	高 95%	R ² 值
----	------	-------	-------	------------------

1	3.00			
2	3.42	2.70	4.32	0.99
3	3.33	3.31	3.36	1.00
4	3.35	1.66	6.75	0.86

BOTOX[®]

在以 BOTOX[®] 给药的动物中, 死亡发生的时间更早(最早在给药后 24 小时), 且剂量低于在以 OBI-858 给药的动物中观察到的剂量(给药后 72 小时的第 6 组至第 12 组)。给药后 72 小时, 所有四个批次的 LD50 分别为 2.21、1.63、2.14 和 1.57 U/动物[表 13]。但是, 四批死亡率结果均未通过回归分析的接受标准。依据下表所示, 对于批次 2、3 和 4, 在给药后 72 小时, 在剂量相关线性范围内没有剂量组。因此, 无法对这些批次的计算得出的 LD50 进行回归分析。对于批次 1, R^2 值为 0.74, 低于接受标准。

表12: BOTOX[®]的72小时的LD50(U/动物)

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

评估体重偏差对 ED50 结果的影响

对于 OBI-858 和 BOTOX[®], 在给药时, 在所需体重范围内(18-22 克)的动物与超重(大于 22 克)的动物之间, 在计算的 ED50 之间没有一致的变化趋势。与总 ED50 值相比, 从 ED50 计算中排除超重动物不会导致 ED50 值出现一致变化, 如下表所示。

表 13: 按体重范围比较 OBI858 与 BOTOX[®]的 IM 48 小时 ED50(U/动物)

OBI-858				BOTOX [®]		
48 h IM	48 h IM ED50	48 h IM		48 h IM	48 h IM	48 h IM

批次	ED50	(体重: 18-22 g)	ED50 (体重 > 22 g)	ED50	ED50 (体重: 18-22 g)	ED50 (体重 > 22 g)
1	0.21	0.19	0.23	0.36	0.36	0.41
2	0.33	0.33	0.40	0.22	0.21	0.22
3	0.32	0.37	0.32	0.24	0.25	0.25
4	0.36	0.38	0.36	0.23	0.24	0.25

此外，发现一只动物在给药时体重不足 17.7 克(低于 18 克阈值)。体重不足的动物[ID 0193; 组 9, 子集 B(Botox[®]); 第 2 批]在所有评分中都获得了与同一组其他动物相似的趾外展得分。因此，该事件对研究结果没有影响[表 14: 测试品 OBI858; 表 15: BOTOX[®]]

安全边际量(MOS)的估计: 安全边际量的计算方法为: 72 小时 IM LD50 与 48 小时 IM ED50 的比率。

对于四批测试, OBI-858 的 MOS 值分别为 14.07、10.32、10.33 和 9.29。对于四批测试, BOTOX[®] 的 MOS 值分别为 6.20、7.58、8.98 和 6.73。

OBI-858 的 MOS 始终高于 BOTOX[®][表 16]。

结论

本研究中测试的所有 OBI-858 小瓶均通过了完整性测试。某些给药时研究动物的体重升高(22 至 24 克)对 ED50 计算的结果没有显著影响。

对于 OBI-858, 72 小时 IM LD50 和 48 小时 IM ED50 值分别为 3.42 和 0.33 U/动物(批次 2)以及 3.33 和 0.32 U/动物(批次 3)。批次 2 和批次 3 的相应 MOS 值分别为 10.32 和 10.33。对于 BOTOX[®], 72 小时 IM LD50 和 48 小时 IM ED50 值分别为 1.63 和 0.22 U/动物(批次 2)以及 2.14 和 0.24 U/动物(批次 3)。批次 2 和批次 3 的相应 MOS 值分别为 7.58 和 8.98。简而言之, OBI-858 的效力可与 BOTOX[®] 相当, 但是它具有比 BOTOX[®] 高的 72 小时 IM LD50 和安全边际量值。

表14: 测试品OBI858的48小时的小鼠DAS得分

组 (剂量水平 (U/动物))	批次 1		批次 2		批次 3		批次 4	
	18 ≦ BW ≦ 22 g (n)	> 22 g (n)	18 ≦ BW ≦ 22 g (n)	> 22 g (n)	18 ≦ BW ≦ 22 g (n)	> 22 g (n)	18 ≦ BW ≦ 22 g (n)	> 22 g (n)
1 (0.00)	0.00 ± 0.00 (6)	0.00 ± 0.00 (4)	0.00 ± 0.00 (7)	0.00 ± 0.00 (3)	0.00 ± 0.00 (9)	0.00 ± 0.00 (1)	0.21 ± 0.43 (7)	0.00 ± 0.00 (3)
2 (0.10)	1.39 ± 0.50 (9)	1.00 ± 0.00 (1)	0.90 ± 0.32 (5)	0.40 ± 0.52 (5)	0.33 ± 0.52 (3)	1.00 ± 0.68 (7)	0.80 ± 0.42 (5)	0.90 ± 0.99 (5)
3 (0.18)	2.33 ± 0.78 (6)	2.00 ± 0.76 (4)	0.94 ± 0.44 (8)	1.50 ± 0.58 (2)	1.00 ± 0.69 (9)	1.00 ± 0.00 (1)	1.00 ± 0.67 (5)	1.70 ± 1.06 (5)
4 (0.32)	2.44 ± 1.10 (9)	2.00 ± 0.00 (1)	2.17 ± 0.83 (6)	1.88 ± 1.25 (4)	2.92 ± 0.67 (6)	2.13 ± 1.13 (4)	1.71 ± 0.83 (7)	1.83 ± 0.98 (3)
5 (0.57)	2.88 ± 1.31* (8)	3.50 ± 0.71 (1)	2.50 ± 0.85 (5)	2.90 ± 0.57 (5)	2.80 ± 0.79 (5)	2.90 ± 1.10 (5)	2.40 ± 0.52 (5)	2.80 ± 0.42 (5)
6 (0.86)	3.44 ± 0.51 (8)	3.25 ± 0.50 (2)	3.43 ± 0.65 (7)	3.17 ± 0.41 (3)	3.42 ± 0.51 (6)	3.63 ± 0.52 (4)	3.08 ± 0.79 (6)	2.63 ± 0.92 (4)
7 (1.28)	4.00 ± 0.00 (6)	3.88 ± 0.35 (4)	3.17 ± 0.75 (3)	3.29 ± 0.47 (7)	3.25 ± 0.46 (4)	3.25 ± 0.45 (6)	3.14 ± 0.53 (7)	3.17 ± 0.75 (3)
8 (1.93)	4.00 ± 0.00 (8)	3.75 ± 0.50 (2)	3.75 ± 0.45 (6)	4.00 ± 0.00 (4)	3.58 ± 0.51 (6)	3.38 ± 0.52 (4)	3.57 ± 0.51 (7)	2.83 ± 0.75 (3)
9 (2.31)	3.78 ± 0.43 (9)	4.00 ± 0.00 (1)	4.00 ± 0.00 (9)	3.00 ± 0.00 (1)	3.50 ± 0.52 (6)	3.75 ± 0.46 (4)	3.75 ± 0.46 (4)	3.50 ± 0.52 (6)
10 (2.78)	3.92 ± 0.29 (6)	4.00 ± 0.00 (4)	4.00 ± 0.00 (8)	4.00 ± 0.00 (2)	3.90 ± 0.32 (5)	3.80 ± 0.42 (5)	4.00 ± 0.00 (6)	3.75 ± 0.46 (4)
11 (3.33)	4.00 ± 0.00 (6)	4.00 ± 0.00 (4)	4.00 ± 0.00 (8)	4.00 ± 0.00 (2)	3.90 ± 0.32 (5)	4.00 ± 0.00 (5)	4.00 ± 0.00 (8)	4.00 ± 0.00 (2)
12 (4.00)	4.00 ± 0.00 (8)	4.00 ± 0.00 (2)	4.00 ± 0.00 (7)	4.00 ± 0.00 (3)	4.00 ± 0.00 (8)	4.00 ± 0.00 (2)	4.00 ± 0.00 (7)	4.00 ± 0.00 (3)

*有一只小鼠在实验过程中死亡，此动物已被排除于48小时DAS分析之外

表15: BOTOX®的48小时的小鼠DAS得分

组 (剂量水平 (U/动物))	批次 1		批次 2		批次 3		批次 4	
	18 $\leq$ BW $\leq$ 22 g (n)	> 22 g (n)	18 $\leq$ BW $\leq$ 22 g (n)	> 22 g (n)	18 $\leq$ BW $\leq$ 22 g (n)	> 22 g (n)	18 $\leq$ BW $\leq$ 22 g (n)	> 22 g (n)
1 (0.00)	0.00 $\pm$ 0.00 (6)	0.00 $\pm$ 0.00 (4)	0.00 $\pm$ 0.00 (7)	0.00 $\pm$ 0.00 (3)	0.00 $\pm$ 0.00 (9)	0.00 $\pm$ 0.00 (1)	0.21 $\pm$ 0.43 (7)	0.00 $\pm$ 0.00 (3)
2 (0.10)	1.39 $\pm$ 0.50 (9)	1.00 $\pm$ 0.00 (1)	0.90 $\pm$ 0.32 (5)	0.40 $\pm$ 0.52 (5)	0.33 $\pm$ 0.52 (3)	1.00 $\pm$ 0.68 (7)	0.80 $\pm$ 0.42 (5)	0.90 $\pm$ 0.99 (5)
3 (0.18)	2.33 $\pm$ 0.78 (6)	2.00 $\pm$ 0.76 (4)	0.94 $\pm$ 0.44 (8)	1.50 $\pm$ 0.58 (2)	1.00 $\pm$ 0.69 (9)	1.00 $\pm$ 0.00 (1)	1.00 $\pm$ 0.67 (5)	1.70 $\pm$ 1.06 (5)
4 (0.32)	2.44 $\pm$ 1.10 (9)	2.00 $\pm$ 0.00 (1)	2.17 $\pm$ 0.83 (6)	1.88 $\pm$ 1.25 (4)	2.92 $\pm$ 0.67 (6)	2.13 $\pm$ 1.13 (4)	1.71 $\pm$ 0.83 (7)	1.83 $\pm$ 0.98 (3)
5 (0.57)	2.88 $\pm$ 1.31* (8)	3.50 $\pm$ 0.71 (1)	2.50 $\pm$ 0.85 (5)	2.90 $\pm$ 0.57 (5)	2.80 $\pm$ 0.79 (5)	2.90 $\pm$ 1.10 (5)	2.40 $\pm$ 0.52 (5)	2.80 $\pm$ 0.42 (5)
6 (0.86)	3.44 $\pm$ 0.51 (8)	3.25 $\pm$ 0.50 (2)	3.43 $\pm$ 0.65 (7)	3.17 $\pm$ 0.41 (3)	3.42 $\pm$ 0.51 (6)	3.63 $\pm$ 0.52 (4)	3.08 $\pm$ 0.79 (6)	2.63 $\pm$ 0.92 (4)
7 (1.28)	4.00 $\pm$ 0.00 (6)	3.88 $\pm$ 0.35 (4)	3.17 $\pm$ 0.75 (3)	3.29 $\pm$ 0.47 (7)	3.25 $\pm$ 0.46 (4)	3.25 $\pm$ 0.45 (6)	3.14 $\pm$ 0.53 (7)	3.17 $\pm$ 0.75 (3)
8 (1.93)	4.00 $\pm$ 0.00 (8)	3.75 $\pm$ 0.50 (2)	3.75 $\pm$ 0.45 (6)	4.00 $\pm$ 0.00 (4)	3.58 $\pm$ 0.51 (6)	3.38 $\pm$ 0.52 (4)	3.57 $\pm$ 0.51 (7)	2.83 $\pm$ 0.75 (3)
9 (2.31)	3.69 $\pm$ 0.48 (8)	3.75 $\pm$ 0.50 (2)	4.00 $\pm$ 0.00 (4)	4.00 $\pm$ 0.00 (6)	4.00 $\pm$ 0.00 (4)	4.00 $\pm$ 0.00 (6)	4.00 $\pm$ 0.00 (8)	4.00 $\pm$ 0.00 (2)
10 (2.78)	3.61 $\pm$ 0.50 (9)	3.00 $\pm$ 0.00 (1)	4.00 $\pm$ 0.00 (5)	4.00 $\pm$ 0.00 (5)	4.00 $\pm$ 0.00 (5)	4.00 $\pm$ 0.00 (5)	4.00 $\pm$ 0.00 (5)	4.00 $\pm$ 0.00 (5)
11 (3.33)	4.00 $\pm$ 0.00 (8)	4.00 $\pm$ 0.00 (2)	4.00 $\pm$ 0.00 (7)	4.00 $\pm$ 0.00 (3)	4.00 $\pm$ 0.00 (7)	4.00 $\pm$ 0.00 (3)	4.00 $\pm$ 0.00 (8)	4.00 $\pm$ 0.00 (2)
12 (4.00)	4.00 $\pm$ 0.00 (6)	4.00 $\pm$ 0.00 (4)	4.00 $\pm$ 0.00 (7)	4.00 $\pm$ 0.00 (3)	4.00 $\pm$ 0.00 (5)	4.00 $\pm$ 0.00 (5)	4.00 $\pm$ 0.00 (9)	4.00 $\pm$ 0.00 (1)

表16: OBI858与BOTOX®的安全边际值

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

实施例4: OBI-858配制剂的稳定性测试**实验材料/流程:**

- 5 (1) LF08制剂:
0.5 mg/mL 人类血清白蛋白, 11.25 mg/mL 氯化钠以及0.188 mg/mL Tween 80溶解于50 mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.3)。
- (2) LF09制剂:
0.5 mg/mL 人类血清白蛋白, 11.25 mg/mL 氯化钠以及0.188 mg/mL Tween 80溶解于50 mM柠檬酸盐 (柠檬酸钠) 缓冲液(pH 5.6)。
- 10 (3) LF10制剂:
0.5 mg/mL 甲硫氨酸, 11.25 mg/mL 氯化钠, 0.188 mg/mL Tween 80以及150 mM精氨酸溶解于50 mM柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)。
- (4) LF11制剂:
15 11.25 mg/mL 氯化钠以及0.188 mg/mL Tween溶解于50 mM磷酸盐缓冲液(pH 6.3)。
- (5) 实验动物:
使用八只雌性ICR小鼠(体重18至22克)经由静脉注射0.1 mL OBI-858以进行致死剂量(LD50/mL)测试。

20

实验结果:

- (1) 不同制剂稳定性试验:
将冻干后的OBI-858原料药分别于四种制剂中溶解, 于4 °C储放一天后置换于45 °C储放四十五天, 于室温下静置1小时再实施小鼠静脉注射。下表显示四种制剂的致死剂量(LD50/mL), 结果以LF09制剂的稳定
- 25

性效果最好。

表17: 不同制剂稳定性试验

制剂名称	LF08	LF09	LF10	LF11
试验前致死剂量 (LD50/mL)	6.15E+05	8.12E+05	6.75E+05	1.63E+05
稳定性试验温度	45 °C			
稳定性试验时间	14 天			
试验后致死剂量 (LD50/mL)	0	2.58E+05	0	0

(2) LF09制剂4-60°C稳定性加速试验:

- 5 将冻干后的OBI-858原料药分别于LF09制剂中溶解，于4 °C储放一天后置换于四种温度(4 °C、25 °C、45 °C与60 °C)储放七天，于室温下静置1小时再实施小鼠静脉注射。下表显示LF09制剂的致死剂量(LD50/mL)，结果显示LF09制剂在45 °C环境下仍具有稳定性。

表18: LF09制剂稳定性加速试验

稳定性试验温度	4 °C	25 °C	45 °C	60 °C
试验前致死剂量 (LD50/mL)	5.07E+05	5.07E+05	5.07E+05	5.07E+05
稳定性试验时间	7 天			
试验后致死剂量 (LD50/mL)	5.07E+05	5.07E+05	4.06E+05	0

10

应当理解，本文中描述的例示性的实施方案应当仅以描述意义而不是为了限制目的考虑。通常应当认为每个例示性的实施方案内的特征或方面的描述可用于其它例示性的实施方案中的其它类似的特征或方面。虽然已经参考附图描述了一个或多个例示性的实施方案，但是本领域普

15 通技术人员应当理解可以在不背离如由所附权利要求书限定的发明构思的精神和范围的前提下对其进行形式和细节的各种变化。

权利要求书

1. 一种 A 型肉毒杆菌毒素复合物, 其包含 HA70 组分、HA17 组分、HA33 组分、NTNH 组分和 BoNT/A1 组分, 其中所述肉毒杆菌毒素复合物具有 740-790 kDa 的分子量。
- 5 2. 根据权利要求 1 的 A 型肉毒杆菌毒素复合物, 其中 HA70 组分包含下列任一项:
- (1) SEQ ID NO. 1 的氨基酸序列; 或
- (2) 具有 SEQ ID NO. 1 中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸得到的氨基酸序列, 且保留 HA70 组分的功能。
- 10 3. 根据权利要求 1 的 A 型肉毒杆菌毒素复合物, 其中 HA17 组分包含下列任一项:
- (1) SEQ ID NO. 2 的氨基酸序列; 或
- (2) 具有 SEQ ID NO. 2 中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸得到的氨基酸序列, 且保留 HA17 组分的功能。
- 15 4. 根据权利要求 1 的 A 型肉毒杆菌毒素复合物, 其中 HA33 组分包含下列任一项:
- (1) SEQ ID NO. 3 的氨基酸序列; 或
- (2) 具有 SEQ ID NO. 3 中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸得到的氨基酸序列, 且保留 HA33 组分的功能。
- 20 5. 根据权利要求 1 的 A 型肉毒杆菌毒素复合物, 其中 NTNH 组分包含下列任一项:
- (1) SEQ ID NO. 4 的氨基酸序列; 或
- (2) 具有 SEQ ID NO. 4 中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸得到的氨基酸序列, 且保留 NTNH 组分的功能。
- 25 6. 根据权利要求 1 的 A 型肉毒杆菌毒素复合物, 其中 BoNT/A1 组分包含下列任一项:
- (1) SEQ ID NO. 5 的氨基酸序列; 或
- (2) 具有 SEQ ID NO. 5 中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸得到的氨基酸序列, 且保留 BoNT/A1 组分的功能。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项的 A 型肉毒杆菌毒素复合物, 在小鼠/动物实验中, 其治疗有效剂量(ED50)包括 0.1-0.5 U。

8. 根据权利要求 1-6 中任一项的 A 型肉毒杆菌毒素复合物, 在小鼠/动物实验中, 其致死剂量(LD50)包括 1-5 U。

5 9. 根据权利要求 1-6 中任一项的 A 型肉毒杆菌毒素复合物, 在小鼠/动物实验中, 其安全边际量(MOS)包括 2-50。

10. 一种核酸, 其编码根据权利要求 1-6 中任一项的 A 型肉毒杆菌毒素。

11. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1-6 中任一项的 A 型肉毒杆菌毒素复合物和药学上或皮肤学上可接受的载体, 优选地为冻干形式。

12. 一种液体配制剂, 其包含权利要求 1-6 中任一项的 A 型肉毒杆菌毒素复合物。

13. 根据权利要求 12 所述的液体配制剂, 其包含人类血清白蛋白、甲硫氨酸、精氨酸、氯化钠、Tween 80、柠檬酸盐缓冲液、及/或磷酸盐缓冲液。

14. 一种美容方法, 其包括对有需要的受试者施用有效量的权利要求 1-6 中任一项的 A 型肉毒杆菌毒素复合物、权利要求 11 的药物组合物或权利要求 12 或 13 的液体配制剂。

15. 权利要求 14 的美容方法, 其包括减少细纹和/或皱纹的外观, 特别是在脸部, 或者扩大眼睛、提升嘴角、或者使上唇出现的纹路平滑, 或者一般性缓解肌肉张力。

16. 一种治疗或预防有需要的受试者中的由乙酰胆碱突触传递或释放引起的疾病的方法, 其包括对受试者施用有效量的权利要求 1-6 中任一项的 A 型肉毒杆菌毒素复合物、权利要求 11 的药物组合物或权利要求 12 或 13 的液体配制剂。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述疾病选自以骨骼肌过度活跃为特征的神经肌肉病症、神经疼痛、偏头痛、膀胱活动过度、鼻炎、鼻窦炎、痤疮、张力障碍、张力障碍性收缩、多汗症、胆碱能神经系统控制的一个或多个腺体的分泌过多、偏侧面肌痉挛、成人发作痉挛性斜颈, 肛裂, 睑痉挛, 脑瘫, 颈肌张力障碍、斜视, 颞颌关节病症和各种类型的肌肉

抽筋和痉挛。

18. 权利要求 1-6 中任一项的 A 型肉毒杆菌毒素复合物、权利要求 11 的药物组合物或权利要求 12 或 13 的液体配制剂在制备美容用品或药物中的用途，所述美容用品用于减少细纹和/或皱纹的外观，特别是在脸部，或者扩大眼睛、提升嘴角、或者使上唇出现的纹路平滑，或者一般性缓解肌肉张力；所述药物用于治疗或预防由乙酰胆碱突触传递或释放引起的疾病。

19. 权利要求 18 的用途，其中所述疾病选自以骨骼肌过度活跃为特征的神经肌肉病症、神经疼痛、偏头痛、膀胱活动过度、鼻炎、鼻窦炎、痤疮、张力障碍、张力障碍性收缩、多汗症、胆碱能神经系统控制的一个或多个腺体的分泌过多、偏侧面肌痉挛、成人发作痉挛性斜颈，肛裂，睑痉挛，脑瘫，颈肌张力障碍、斜视，颞颌关节病症和各种类型的肌肉抽筋和痉挛。

20. 权利要求 1-6 中任一项的 A 型肉毒杆菌毒素复合物、权利要求 11 的药物组合物或权利要求 12 或 13 的液体配制剂，用于减少细纹和/或皱纹的外观，特别是在脸部，或者扩大眼睛、提升嘴角、或者使上唇出现的纹路平滑，或者一般性缓解肌肉张力；所述药物用于治疗或预防由乙酰胆碱突触传递或释放引起的疾病。

21. 权利要求 20 的 A 型肉毒杆菌毒素复合物、药物组合物或液体配制剂，其中所述疾病选自以骨骼肌过度活跃为特征的神经肌肉病症、神经疼痛、偏头痛、膀胱活动过度、鼻炎、鼻窦炎、痤疮、张力障碍、张力障碍性收缩、多汗症、胆碱能神经系统控制的一个或多个腺体的分泌过多、偏侧面肌痉挛、成人发作痉挛性斜颈，肛裂，睑痉挛，脑瘫，颈肌张力障碍、斜视，颞颌关节病症和各种类型的肌肉抽筋和痉挛。

25