

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038124**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.09

(21) Номер заявки
201892493

(22) Дата подачи заявки
2017.05.26

(51) Int. Cl. *A61K 38/48* (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 31/405 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)

**(54) ЖИДКАЯ КОМПОЗИЦИЯ НЕЙРОТОКСИНА, СТАБИЛИЗИРОВАННАЯ
ТРИПТОФАНОМ ИЛИ ТИРОЗИНОМ**

(31) PCT/EP2016/062085

(32) 2016.05.27

(33) EP

(43) 2019.04.30

(86) PCT/EP2017/062785

(87) WO 2017/203038 2017.11.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИПСЕН БИОФАРМ ЛИМИТЕД (GB);
ГАЛЬДЕРМА ХОЛДИНГ СА (CH)**

(72) Изобретатель:
**Ярстад Андерс, Фриис Анна, Шталь
Ульф, Гурелль Анн, Агрен Барбро,
Эдстром Эмилия, Пикетт Эндрю (SE)**

(74) Представитель:
**Хмара М.В., Осипов К.В., Липатова
И.И., Новоселова С.В., Дощечкина
В.В., Пантелеев А.С., Ильмер Е.Г.
(RU)**

(56) WO-A1-2015166242
WO-A1-2006013370
US-A1-2003092622
EP-A1-0909564
WO-A1-2009008595
WO-A2-2006005910
US-A1-2006269575

(57) Изобретение относится к стабильным жидким композициям нейротоксинов, не содержащим животных белков, но содержащим поверхностно-активное вещество, аминокислоту, выбранную из триптофана и тирозина, буфер, включающий ионы натрия, хлорид-ионы и фосфат-ионы, при этом композиции имеют величину pH от 5,5 до 8 и стабильны в течение 2 месяцев. Такие композиции подходят для применения в терапии и, в частности, для введения пациенту для достижения требуемого терапевтического или эстетического эффекта. Изобретение также относится к применению аминокислоты, выбранной из триптофана и тирозина, для защиты белкового нейротоксина от разрушения в жидкой композиции, не содержащей белков животного происхождения.

038124 B1

038124 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к жидким композициям нейротоксинов, не содержащим животных белков. В частности, настоящее изобретение относится к жидким композициям ботулинического нейротоксина, не содержащим животных белков, стабилизированным небелковыми вспомогательными веществами.

Композиции нейротоксинов, описанные в данном контексте, могут применяться в терапии и, в частности, могут вводиться пациенту для достижения требуемого терапевтического или эстетического эффекта.

Предшествующий уровень техники

Клостридиальные нейротоксины, продуцируемые в природе штаммами клостридий, являются одними из самых токсичных биологических агентов, известных на сегодняшний день, и в то же время представляют собой мощное средство для лечения целого ряда нервно-мышечных расстройств и эндокринных нарушений, включая дистонию мышц шеи, мышечную спастичность, блефароспазм, гипергидроз или сialорею. Они также находят применение в эстетической медицине для разглаживания морщин.

Для применения в качестве фармацевтического продукта композиция нейротоксина должна быть такой, чтобы ее можно было хранить без существенной потери активности нейротоксина.

Во всех разрешенных в настоящее время к применению композициях ботулинических нейротоксинов в качестве стабилизатора используют животный (в том числе, человеческий) белок, как правило, человеческий сывороточный альбумин (англ. HSA - human serum albumin).

Однако присутствие в фармацевтических композициях животных белков, таких как HSA, является нежелательным из-за риска, пусть даже минимального, случайной передачи пациенту переносимых животными инфекционных агентов, таких как прионы.

В данной области техники раскрыты не содержащие животных белков композиции ботулинического токсина. Например, в патентном документе WO 0158472 описаны лиофилизированные композиции, в которых для стабилизации ботулинического токсина используют полисахарид, такой как 2-гидроксиметилкрахмал. В патентном документе WO 2005007185 описаны композиции, в которых для стабилизации ботулинического токсина используют поверхностно-активное вещество и смесь по меньшей мере двух аминокислот, выбранных из Glu и Gln или Asp и Asn.

Однако большинство композиций предшествующего уровня техники нестабильны в жидкой форме и поэтому хранятся в лиофилизированной или сублимированной форме. Такие композиции перед введением пациенту необходимо восстанавливать стерильным физиологическим раствором. Подобная стадия восстановления сопряжена с потерей времени врача, риском ошибки при разведении, а также с риском загрязнения во время процесса восстановления. Кроме того, поставщик ботулинического токсина должен обучить врачей, чтобы гарантировать, что стадия восстановления выполнена надлежащим образом.

Вследствие этого жидкие композиции являются предпочтительными, поскольку они избавляют врача от потери времени, позволяют исключить риск ошибки при разведении, риск загрязнения и необходимость в обеспечении обучения поставщиком.

Жидкие композиции, не содержащие HSA, описаны, например, в патентном документе WO 2006005910, раскрывающем жидкие композиции ботулинического токсина, содержащие поверхностно-активное вещество, хлорид натрия и дисахарид. В патентном документе WO 2009008595 раскрыты жидкие композиции ботулинического токсина, содержащие полисорбат 20 и метионин.

Целью настоящего изобретения является обеспечение предпочтительных жидких композиций ботулинического нейротоксина, не содержащих животных белков, пригодных для хранения и для применения в терапии. В частности, стабилизирующая композиция должна поддерживать стабильность продукта, не должна содержать животных белков, а также должна быть пригодной для стабилизации нейротоксина, не содержащего комплексообразующих белков.

Краткое описание сущности изобретения

Первым аспектом настоящего изобретения является жидкая композиция, содержащая или, по существу, состоящая из белкового нейротоксина, поверхностно-активного вещества, аминокислоты, выбранной из триптофана и тирозина, буфера, включающего ионы натрия, хлорид-ионы и фосфат-ионы, имеющая величину pH в диапазоне от 5,5 до 8, стабильная в течение продолжительного времени и не содержащая белков животного происхождения.

Другим аспектом является применение жидких композиций в соответствии с изобретением в терапии и/или в косметических средствах.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является использование аминокислоты, выбранной из триптофана и тирозина, для защиты белкового нейротоксина от разрушения в жидкой композиции, не содержащей белков животного происхождения.

Подробное описание изобретения

Первым аспектом настоящего изобретения является жидкая композиция, содержащая или, по существу, состоящая из белкового нейротоксина, поверхностно-активного вещества, аминокислоты, выбранной из триптофана и тирозина, буфера, включающего ионы натрия, хлорид-ионы и фосфат-ионы, имеющая величину pH в диапазоне от 5,5 до 8, стабильная в течение продолжительного времени и не содер-

жащая белков животного происхождения.

Выражение "не содержащая животных белков" следует понимать как не содержащая белка животного, в том числе человеческого, происхождения.

Нейротоксин представляет собой вещество, действующее на нервную клетку и поражающее неврологическую функцию. К белковым нейротоксинам относятся ботулинические токсины (BoNT) и столбнячный токсин (TeNT). Предпочтительно белковый нейротоксин является ботулиническим нейротоксином.

Ботулинические нейротоксины представляют собой металлопротеазы с молекулярной массой 150 кДа, состоящие в их активной форме из легкой цепи (L) с молекулярной массой 50 кДа и тяжелой цепи (H) с молекулярной массой 100 кДа, связанных дисульфидным мостиком. L-цепь представляет собой цинк-протеазу, которая внутриклеточно расщепляет один из белков SNARE (англ. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor - растворимый, чувствительный к N-этилмалеиду рецептор стыковочных белков), участвующих в опосредованном везикулами выделении нейротрансмиттеров, тем самым нарушая опосредуемые нейротрансмиттерами механизмы. Тяжелая цепь объединяет в себе два домена: N-концевой домен транслокации (H_N) с молекулярной массой 50 кДа и C-концевой рецептор-связывающий домен (H_C) с молекулярной массой 50 кДа. H_C домен ботулинического нейротоксина содержит две различные структурные единицы, называемые H_{CC} и H_{CN} доменами. Считается, что аминокислотные остатки, занятые в связывании с рецептором, расположены главным образом в H_{CC} домене.

Ботулинические нейротоксины классифицируют по 7 антигенно различным серотипам (от А до G). Примеры аминокислотных последовательностей для каждого серотипа обозначены в данном контексте как SEQ ID NO: с 1 по 7.

Различные домены для каждой из последовательностей могут быть, например, следующими.

Серотип	L цепь	H _N домен	H _{CN} домен	H _{CC} домен
BoNT/A (SEQ ID NO 1)	1–448	449–871	872–1110	1111–1296
BoNT/B (SEQ ID NO 2)	1–440	441–858	859–1097	1098–1291
BoNT/C (SEQ ID NO 3)	1–441	442–866	867–1111	1112–1291
BoNT/D (SEQ ID NO 4)	1–445	446–862	863–1098	1099–1276
BoNT/E (SEQ ID NO 5)	1–422	423–845	846–1085	1086–1252
BoNT/F (SEQ ID NO 6)	1–439	440–864	865–1105	1106–1274
BoNT/G (SEQ ID NO 7)	1–441	442–863	864–1105	1106–1297

Специалистам будет понятно, что могут быть некоторые изменения в каждом из доменов ботулинического нейротоксина.

BoNT воздействуют, например, на нервно-мышечный синапс, подавляя высвобождение ацетилхолина и, тем самым, препятствуя мышечному сокращению. Интоксикация нервных окончаний является обратимой и ее продолжительность варьируется для различных серотипов BoNT.

В природе BoNT продуцируется бактериями *Clostridium botulinum* и другими видами клостридий, такими как *C. butyricum*, *C. baratii* и *C. argentinense*, в составе мультибелковых комплексов, защищающих нейротоксин от протеолитического расщепления. Под "ботулиническим нейротоксином в форме комплекса" подразумевается ботулинический нейротоксин и один или более из белков, по своей природе являющихся частью таких мультибелковых комплексов (нейротоксин-ассоциированные белки или "NAP"). NAP состоят из нетоксических негемагглютининов (NTNH) и гемагглютининов (HA-17, HA-33 и HA-70). Под "ботулиническим нейротоксином высокой степени чистоты" подразумевается ботулинический нейротоксин, по существу, не содержащий NAP.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения ботулинический нейротоксин является ботулиническим нейротоксином в форме комплекса. Согласно другому варианту осуществления ботулинический нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин высокой степени чистоты.

Способ получения BoNT посредством культивирования природных клостридиальных штаммов и очистки их в форме комплекса либо в особо чистой форме описаны, например, в работе Pickett, Andy "Botulinum toxin as a clinical product: manufacture and pharmacology (Ботулинический токсин как клинический продукт: получение и фармакологические характеристики)", *Clinical Applications of Botulinum Neurotoxin* (Клинические применения ботулинического нейротоксина). Springer New York, 2014, 7-49.

Особо чистый или, по существу, чистый ботулинический нейротоксин может быть получен из бел-

кового комплекса, содержащего ботулинический токсин, например, с помощью способа, описанного в работе Current topics in Microbiology and Immunology (Актуальные темы в микробиологии и иммунологии) (1995), 195, p. 151-154.

В качестве альтернативы ботулинический нейротоксин высокой степени чистоты может быть получен путем рекомбинантной экспрессии гена BoNT на гетерологичном хозяине, таком как *E. coli*, с последующей очисткой от него.

Предпочтительно белковый нейротоксин является ботулиническим нейротоксином. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения ботулинический нейротоксин является ботулиническим нейротоксином в форме комплекса. Согласно другому варианту осуществления ботулинический нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин высокой степени чистоты.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения ботулинический нейротоксин является ботулиническим нейротоксином, очищенным из его природного клостридиального штамма. Согласно другому варианту осуществления ботулинический нейротоксин является ботулиническим нейротоксином, получаемым рекомбинантно на гетерологичном хозяине, таком как *E. coli*.

Согласно настоящему изобретению ботулинический нейротоксин может быть BoNT серотипов A, B, C, D, E, F или G.

Согласно настоящему изобретению ботулинический нейротоксин может быть модифицированным ботулиническим нейротоксином. Согласно настоящему изобретению "модифицированный BoNT" означает BoNT, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7. Предпочтительно модифицированный BoNT имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7. Предпочтительно модифицированный BoNT представляет собой BoNT, чья аминокислотная последовательность отличается от SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 менее чем на 600, 400, 200, 150, 100, 50 или 20 аминокислотных замен, делеций или вставок, например на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотные замены, делеции или вставки.

Согласно настоящему изобретению рекомбинантный ботулинический нейротоксин может быть химерным ботулиническим нейротоксином. Согласно настоящему изобретению "химерный BoNT" состоит из L, H_N, H_{CN} и H_{CC} доменов, не принадлежащих к одному и тому же серотипу. Например, химерный BoNT может состоять из L цепи одного серотипа и полной H цепи (H_N, H_{CN} и H_{CC} домены) другого серотипа. Химерный BoNT может также состоять из L цепи и H_N домена (LH_N) одного серотипа и H_C домена (H_{CN} и H_{CC}) другого серотипа. Химерный BoNT может также состоять из L цепи и H_N и H_{CN} доменов (расширенный LH_N) одного серотипа и H_{CC} домена другого серотипа.

В соответствии с изобретением домен легкой цепи (L) может иметь аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентичность последовательности с одной из следующих аминокислотных последовательностей и сохраняющую способность расщеплять один из белков SNARE, участвующих в выделении опосредованного везикулой нейротрансмиттера:

аминокислота 1-448 последовательности SEQ ID NO: 1,
аминокислота 1-440 последовательности SEQ ID NO: 2,
аминокислота 1-441 последовательности SEQ ID NO: 3,
аминокислота 1-445 последовательности SEQ ID NO: 4,
аминокислота 1-422 последовательности SEQ ID NO: 5,
аминокислота 1-439 последовательности SEQ ID NO: 6,
аминокислота 1-441 последовательности SEQ ID NO: 7.

В соответствии с изобретением H_N домен может иметь аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентичность последовательности с одной из следующих аминокислотных последовательностей и сохраняющую способность транслокации:

аминокислота 449-871 последовательности SEQ ID NO: 1,
аминокислота 441-858 последовательности SEQ ID NO: 2,
аминокислота 442-866 последовательности SEQ ID NO: 3,
аминокислота 446-862 последовательности SEQ ID NO: 4,
аминокислота 423-845 последовательности SEQ ID NO: 5,
аминокислота 440-864 последовательности SEQ ID NO: 6,
аминокислота 442-863 последовательности SEQ ID NO: 7.

В соответствии с изобретением H_C домен может иметь аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентичность последовательности с одной из следующих аминокислотных последовательностей и сохраняющую способность связываться с нервно-мышечной клеткой:

аминокислота 872-1296 последовательности SEQ ID NO: 1,
аминокислота 859-1291 последовательности SEQ ID NO: 2,
аминокислота 867-1291 последовательности SEQ ID NO: 3,

аминокислота 863-1276 последовательности SEQ ID NO: 4,
 аминокислота 846-1252 последовательности SEQ ID NO: 5,
 аминокислота 865-1274 последовательности SEQ ID NO: 6,
 аминокислота 864-1297 последовательности SEQ ID NO: 7.

В соответствии с изобретением Н_{СС} домен может иметь аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентичность последовательности с одной из следующих аминокислотных последовательностей и сохраняющую способность связываться с нервно-мышечной клеткой:

аминокислота 1111-1296 последовательности SEQ ID NO: 1,
 аминокислота 1098-1291 последовательности SEQ ID NO: 2,
 аминокислота 1112-1291 последовательности SEQ ID NO: 3,
 аминокислота 1099-1276 последовательности SEQ ID NO: 4,
 аминокислота 1086-1252 последовательности SEQ ID NO: 5,
 аминокислота 1106-1274 последовательности SEQ ID NO: 6,
 аминокислота 1106-1297 последовательности SEQ ID NO: 7.

Указанные выше эталонные последовательности следует рассматривать как направляющие, поскольку в зависимости от подсеротипов могут иметь место незначительные изменения.

"Процент идентичности последовательностей" между двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислотными последовательностями является функцией числа идентичных нуклеотидов/аминокислот в идентичных положениях для выравненных последовательностей. Таким образом, % идентичности можно рассчитать как число идентичных нуклеотидов/аминокислот в каждом положении при выравнивании, поделенное на общее число нуклеотидов/аминокислот в выравненной последовательности, и умноженное на 100. При вычислении % идентичности последовательностей могут также учитываться число гэпов и длина каждого гэпа, вводимого для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя или более последовательностями может быть выполнено с использованием конкретных математических алгоритмов, таких как BLAST, хорошо знакомых специалистам.

Поверхностно-активные вещества (или поверхностно-активные агенты) представляют собой соединения, способные снижать поверхностное натяжение между жидкостью и твердым веществом или между двумя жидкостями.

Поверхностно-активные вещества могут быть неионными, анионными, катионными или амфотерными. В композициях в соответствии с изобретением поверхностно-активное вещество предпочтительно является неионным поверхностно-активным веществом. Неионные поверхностно-активные вещества включают простые алкиловые эфиры полиоксиэтилена, такие как простой монододециловый эфир октаэтиленгликоля или простой монододециловый эфир пентаэтиленгликоля; простые алкиловые эфиры полиоксипропиленгликоля; простые алкиловые эфиры глюкозидов, такие как децилглюкозид, лаурилглюкозид или октилглюкозид; простые октилфеноловые эфиры полиоксиэтиленгликоля, такие как Triton X-100; простые алкилфеноловые эфиры полиоксиэтиленгликоля, такие как Nopoxunol-9; сложные алкиловые эфиры глицерина, такие как глицериллаурат; сложные алкиловые эфиры полиоксиэтиленгликоль-сорбитана, такие как полисорбаты; сложные алкиловые эфиры сорбитана, такие как Spans; кокамид МЭА, кокамид ДЭА; додецилдиметиламиноксид; блок-сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, такие как полосамеры; полиэтоксифирированный таловый амин (англ. POEA).

Согласно предпочтительному варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит неионное поверхностно-активное вещество, представляющее собой полисорбат, предпочтительно полисорбат 20 (PS20), полисорбат 60 (PS60) или полисорбат 80 (PS80). Наиболее предпочтительно неионное поверхностно-активное вещество представляет собой PS80. В случае, если поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, его концентрация предпочтительно составляет от 0,001 до 15 об.%, более предпочтительно от 0,005 до 2 об.%, более предпочтительно от 0,01 до 1% например 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 или 1 об.%. Согласно одному из вариантов осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой PS80 в концентрации от 0,05 до 0,2 об.%, например приблизительно 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19 или 0,20 об.%.

PS20 имеет плотность приблизительно 1,1 г/мл. PS60 имеет плотность приблизительно 1,044 г/мл. PS80 имеет плотность приблизительно от 1,06 до 1,09 г/мл.

Считается, что полисорбаты образуют мицеллы и предотвращают адсорбцию белков поверхностями и агрегацию белков. Не желая быть связанными теорией, можно предположить, что при разложении/окислении полисорбаты могут образовывать перекиси и кислоты, способные влиять на стабильность белков. Поэтому считается предпочтительным, чтобы концентрация полисорбата в композиции продукта была как можно ниже. Таким образом, считается предпочтительным, чтобы концентрация полисорбата не более чем в 200 раз превышала его критическую мицеллярную концентрацию (англ. CMC), более предпочтительно она не должна превышать более чем в 100, 50, 20, 10 или 5 раз свою CMC.

Для PS20 (Mw 1227,5 г/моль) величина CMC составляет приблизительно 8×10^{-5} М при температуре

21°C, т.е. приблизительно 0,01 (мас./об.)%.

Для PS60 (Mw 1309 г/моль) величина СМС составляет приблизительно 21×10^{-6} М при температуре 21°C, т.е. приблизительно 0,003 (мас./об.)%.

Для PS80 (Mw 1310 г/моль) величина СМС составляет приблизительно 12×10^{-6} М при температуре 21°C, т.е. приблизительно 0,002 (мас./об.)%.

Согласно предпочтительному варианту осуществления концентрация полисорбата в 1-200 раз превышает его СМС при данной температуре, например при температуре приблизительно 21°C предпочтительно в 2-100 раз превышает его СМС, например, приблизительно в 20 или 50 раз превышает его СМС.

Жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит аминокислоту, являющуюся триптофаном или тирозином. Не желая быть связанными теорией, можно предположить, что триптофан или тирозин могут предотвращать окисление активного белка, делающее его нефункциональным. В действительности, считается, что аминокислота, добавленная в молярном избытке по отношению к нейротоксину, будет окисляться в первую очередь, сохраняя нейротоксин. Можно также предположить, что триптофан или тирозин могут нейтрализовать реакционноспособные продукты разложения поверхностно-активных веществ, таких как полисорбаты.

Предпочтительно аминокислота является триптофаном. Более предпочтительно аминокислота является L-триптофаном.

Концентрация аминокислоты предпочтительно составляет приблизительно от 0,1 до 5 мг/мл, более предпочтительно от 0,1 до 5 мг/мл, от 0,25 до 3 мг/мл, например приблизительно 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 или 3 мг/мл.

Композиция в соответствии с изобретением содержит буфер, включающий ионы натрия, хлорид- и фосфат-ионы. Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что буферы, не содержащие ионов натрия, хлорид- и фосфат-ионов, снижали стабильность токсина. Предпочтительно буфер также содержит ионы калия.

Буфер может быть получен, например, объединением солей хлорида натрия, хлорида калия и фосфата натрия. Концентрация хлорида натрия предпочтительно составляет от 10 до 500 мМ, предпочтительно приблизительно от 25 до 300 мМ, например приблизительно 25, 50, 75, 100, 140, 150, 200, 250 или 300 мМ.

Концентрация фосфата натрия предпочтительно составляет от 1 до 100 мМ, предпочтительно от 2 до 50 мМ, например приблизительно 2, 5, 10, 20, 30, 40 или 50 мМ.

Концентрация хлорида калия предпочтительно составляет от 1 до 50 мМ, предпочтительно от 1 до 10 мМ, например приблизительно 1, 2, 3, 4, 5 или 10 мМ.

Композиция в соответствии с изобретением имеет величину pH в диапазоне от 5,5 до 8. Согласно предпочтительному варианту осуществления величина pH лежит в диапазоне от 6,0 до 7,5, например составляет приблизительно 6,3, 6,35, 6,4, 6,45, 6,5, 6,55, 6,6, 6,65, 6,7, 6,75, 6,8, 6,85, 6,9, 6,95, 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35, 7,4, 7,45 или 7,5. Предпочтительно величина pH отличается не более чем на одну единицу от физиологического значения pH (которое составляет приблизительно 7,4).

Композиция в соответствии с изобретением является жидкой. Композиция предпочтительно содержит водный разбавитель, более предпочтительно воду, например стерильную воду, воду для инъекций, очищенную воду, стерильную воду для инъекций.

Предпочтительно композиция является изотонической и подходит для инъекции пациенту, в частности пациенту человеку.

Количество ботулинического нейротоксина обычно выражают в мышинных единицах LD50 (летальная доза для 50% животных), определяемых как средняя летальная доза при внутрибрюшинном введении мышам.

Мышиная единица LD50 (MLD50) для ботулинических токсинов не является стандартизированной единицей. В действительности анализы, используемые разными производителями зарегистрированных для продажи токсинов, различаются, в частности, выбором буфера для разведения. Например, в тесте, применяемом для Dysport®, используется желатин-фосфатный буфер, тогда как в анализе, применяемом для BOTOX®, в качестве разбавителя используется солевой раствор. Можно предположить, что желатиновые буферы защищают токсин при высоких разведениях, используемых при анализах LD50. Напротив, использование в качестве разбавителя солевого раствора, как полагают, приводит к некоторой потере эффективности. Этим можно объяснить, почему при тестировании с помощью анализа, применяемого для Dysport®, одна единица BOTOX® была эквивалентна приблизительно трем единицам Dysport (Straughan, D.W., 2006, ATLA 34(3), 305-313; Hambleton и Pickett, Hambleton, P. и A.M. Pickett., 1994, Journal of the Royal Society of Medicine 87, 11: 719).

Предпочтительно буфер для разведения, используемый для определения мышинной LD50, является желатин-фосфатным буфером. Например, мышинная LD50 может быть определена, как описано в работе Hambleton, P. et al., Production, purification and toxoiding of Clostridium botulinum type A toxin (Образование, очистка и токсоидирование токсина Clostridium botulinum типа A). Eds. G. E. Jr Lewis, P.S. Angel. Academic Press, Inc., New York, USA, 1981, p. 248. Вкратце, образцы ботулинического токсина серийно

разводят в буфере, содержащем 0,2% (мас./об.) желатина и 0,07М Na₂HPO₄ при pH 6,5. Группам мышей (например, от 4 до 8 мышей в группе) весом приблизительно по 20 г вводят внутривенно образец разбавленного токсина (например, по 0,5 мл каждому животному). Группы разведения, например 5 групп разведения, выбирают таким образом, чтобы они включали дозу 50% летального исхода. За мышами наблюдают в течение 96 ч и оценивают 50% мышиную летальную дозу (MLD50).

Композиция в соответствии с изобретением предпочтительно содержит от 4 до 10000 единиц LD50 ботулинического нейротоксина на 1 мл, более предпочтительно от 10 до 2000 единиц LD50 ботулинического нейротоксина на 1 мл, например 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или 1500 единиц LD50 ботулинического нейротоксина на 1 мл.

Количество ботулинического нейротоксина также может быть выражено в нг. Композиция в соответствии с изобретением предпочтительно содержит приблизительно от 0,01 до 75 нг ботулинического нейротоксина на 1 мл, более предпочтительно приблизительно от 0,03 до 20 нг ботулинического нейротоксина на 1 мл, более предпочтительно приблизительно от 0,1 до 15 нг ботулинического нейротоксина на 1 мл, например приблизительно 0,15, 0,3, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нг ботулинического нейротоксина на 1 мл.

Композиция в соответствии с изобретением не содержит животных белков. В частности, композиции в соответствии с изобретением не содержат альбумин и, в частности, не содержат человеческий сывороточный альбумин. Предпочтительно композиция в соответствии с изобретением не содержит животных продуктов, что означает, что она не содержит компонентов животного (в том числе человеческого) происхождения. Предпочтительно композиция в соответствии с изобретением не содержит белок, отличный от белкового нейротоксина. Согласно другому варианту осуществления композиция в соответствии с изобретением не содержит белок, отличный от белкового нейротоксина и одного или более NAR (нейротоксин-ассоциированных белков). Во избежание недоразумений следует отметить, что аминокислоты не являются белками.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения композиция не содержит сахарады, в том числе моносахарида, дисахарида и полисахарида.

Жидкая композиция в соответствии с изобретением стабильна в течение продолжительного времени. Например, она стабильна в течение 2 месяцев при температуре от 2 до 8°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 3 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно предпочтительному варианту осуществления она стабильна в течение 6 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 12 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 18 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 24 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 36 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 3 месяцев при комнатной температуре, например при температуре 25°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 6 месяцев при комнатной температуре, например при температуре 25°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 2 месяцев при температуре 37°C.

Жидкую композицию в соответствии с изобретением предпочтительно хранят при температуре от 0 до 30°C. Согласно предпочтительному варианту осуществления ее хранят при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно другому варианту осуществления ее хранят при комнатной температуре. Предпочтительно композицию не замораживают.

Стабильность можно оценить посредством сравнения активности ботулинического нейротоксина в течение некоторого времени. Активность ботулинического нейротоксина может относиться к способности активности ботулинического нейротоксина связываться с его рецептором-мишенью на клетке, транслоцировать легкую цепь в клетку и/или расщеплять его мишени-белки SNARE.

Способы измерения активности ботулинического нейротоксина хорошо известны в данной области техники. Активность ботулинического нейротоксина может быть оценена, например, при помощи теста летальности мышей (LD50), как описано выше, с помощью анализа на основе мышечной ткани, такого как мышинный гемидиафрагмальный тест (например, как описано в работе Bigalke, H. and Rummel A., *Toxins* 7, 12 (2015):4895-4905), с использованием клеточного анализа (например, как описано в работах WO 201349508 или WO 2012166943) или анализа внеклеточной протеолитической активности, такого как BoTest® (набор для обнаружения ботулинического нейротоксина, доступный из компании BioSentinel Inc.).

Предпочтительно композиция в соответствии с изобретением считается стабильной, если имеет место потеря не более определенного процента активности в течение данного периода времени и при данной температуре.

Согласно одному из вариантов осуществления композиция в соответствии с изобретением считается стабильной, если имеет место потеря не более 30% внеклеточной протеолитической активности в течение 3, 6, 12, 18, 24 или 36 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например потеря не более 30% внекле-

точной протеолитической активности в течение 6 месяцев при температуре 5°C. Предпочтительно композиция в соответствии с изобретением считается стабильной, если имеет место потеря не более 20% внеклеточной протеолитической активности в течение 3 месяцев при температуре 5°C, более предпочтительно в течение 6, 12, 18, 24 или 36 месяцев при температуре 5°C. Согласно другому варианту осуществления композиция в соответствии с изобретением считается стабильной, если имеет место потеря не более 40% внеклеточной протеолитической активности в течение 3 месяцев при комнатной температуре, например при температуре 25°C. Предпочтительно композиция в соответствии с изобретением считается стабильной, если имеет место потеря не более 30% внеклеточной протеолитической активности в течение 3 месяцев при температуре 25°C, более предпочтительно в течение 6 месяцев при температуре 25°C. Согласно другому варианту осуществления композиция в соответствии с изобретением считается стабильной, если имеет место потеря не более 50% внеклеточной протеолитической активности в течение 2 месяцев при температуре 37°C. Внеклеточная протеолитическая активность может быть измерена с помощью анализа BoTest®.

Согласно одному из вариантов осуществления композиция в соответствии с изобретением считается стабильной, если имеет место потеря не более 30% в единицах MLD50 в течение 2, 3, 6, 12, 18, 24 или 36 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например потеря не более 30% в единицах MLD50 в течение 6 месяцев при температуре 5°C. Предпочтительно композиция в соответствии с изобретением считается стабильной, если имеет место потеря не более 20% в единицах MLD50 в течение 2 месяцев при температуре 5°C, более предпочтительно в течение 3, 6, 12, 18, 24 или 36 месяцев при температуре 5°C. Согласно другому варианту осуществления композиция в соответствии с изобретением считается стабильной, если имеет место потеря не более 40% в единицах MLD50 в течение 2 или 3 месяцев при комнатной температуре, например при температуре 25°C. Предпочтительно композиция в соответствии с изобретением считается стабильной, если имеет место потеря не более 30% в единицах MLD50 в течение 3 месяцев при температуре 25°C, более предпочтительно в течение 6 месяцев при температуре 25°C. Согласно другому варианту осуществления композиция в соответствии с изобретением считается стабильной, если имеет место потеря не более 50% в единицах MLD50 в течение 2 месяцев при температуре 37°C. Единицы MLD50 могут быть измерены, как указано выше.

Жидкие композиции в соответствии с изобретением могут храниться в герметичных флаконах или шприцах, например в стеклянных флаконах или шприцах, предпочтительно в стеклянных флаконах или шприцах типа 1 (или "нейтральных для организма (body neutral)"). Предпочтительно кислород во флаконе или шприце отсутствует либо присутствует в очень небольшом количестве. Флаконы или шприцы могут заполняться, например, в атмосфере с содержанием кислорода менее 100 м.д. (миллионные доли), предпочтительно менее 50 м.д., при этом в качестве защитной среды во флаконах может применяться газообразный азот. При использовании стеклянных флаконов они могут быть закрыты, например, пробками из хлорбутилового или бромбутилового каучука, в качестве которых могут применяться пробки с покрытием FluroTec®. Предпочтительно жидкие композиции в соответствии с изобретением хранят в стеклянных флаконах, закрытых пробками с покрытием FluroTec®.

Согласно одному из вариантов осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

- от 4 до 10000 единиц LD50 ботулинического нейротоксина на 1 мл,
- от 0,001 до 15 об.% полисорбата,
- от 0,1 до 5 мг/мл триптофана,
- от 10 до 500 mM NaCl,
- от 1 до 50 mM KCl,
- от 1 до 100 mM фосфата натрия,
- имеет величину pH от 5,5 до 8 и стабильна в течение 6 месяцев при температуре 5°C.

Согласно одному из вариантов осуществления, жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или по существу состоит из:

- от 10 до 2000 единиц LD50 ботулинического нейротоксина на 1 мл,
- от 0,005 до 2 об.% полисорбата,
- от 0,1 до 5 мг/мл триптофана,
- от 25 до 300 mM NaCl,
- от 1 до 10 mM KCl,
- от 2 до 50 mM фосфата натрия,
- имеет величину pH от 6,0 до 7,5 и стабильна в течение 12 месяцев при температуре 5°C.

Согласно одному из вариантов осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

- от 10 до 2000 единиц LD50 ботулинического нейротоксина на 1 мл,
- от 0,05 до 0,2 об.% полисорбата 80,
- от 0,1 до 5 мг/мл триптофана,
- от 25 до 300 mM NaCl,

от 1 до 10 мМ KCl,
от 2 до 50 мМ фосфата натрия,
имеет величину pH от 6,0 до 7,5 и стабильна в течение 12 месяцев при температуре 5°C.

Согласно одному из вариантов осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина А,
0,2 об.% полисорбата 80,
1 мг/мл триптофана,
140 мМ NaCl,
3 мМ KCl,
10 мМ фосфата натрия,
где величина pH указанной композиции составляет приблизительно 6,6.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина А,
0,04 об.% полисорбата 80,
1 мг/мл триптофана,
140 мМ NaCl,
3 мМ KCl,
10 мМ фосфата натрия,
где величина pH указанной композиции составляет приблизительно 6,9.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина В,
0,25 об.% полисорбата 20,
4 мг/мл триптофана,
140 мМ NaCl,
3 мМ KCl,
10 мМ фосфата натрия,
где величина pH указанной композиции составляет приблизительно 7,4.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина А,
0,01 об.% полисорбата 80,
0,25 мг/мл триптофана,
255 мМ NaCl,
2 мМ фосфата натрия,
где величина pH указанной композиции составляет приблизительно 7,2.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина А,
0,01 об.% полисорбата 80,
0,25 мг/мл триптофана,
255 мМ NaCl,
10 мМ KCl,
50 мМ фосфата натрия,
где величина pH указанной композиции составляет приблизительно 6,3.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина А,
1 об.% полисорбата 80,
0,25 мг/мл триптофана,
255 мМ NaCl,
50 мМ фосфата натрия,
где величина pH указанной композиции составляет приблизительно 6,3.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина А,
1 об.% полисорбата 80,
3 мг/мл триптофана,
255 мМ NaCl,
10 мМ KCl,

50 мМ фосфата натрия,
где величина рН указанной композиции составляет приблизительно 7,2.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина А,
0,1 об.% полисорбата 80,
1,625 мг/мл триптофана,
140 мМ NaCl,
3 мМ KCl,
10 мМ фосфата натрия,
где величина рН указанной композиции составляет приблизительно 6,75.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина А,
0,01 об.% полисорбата 80,
1 мг/мл триптофана,
140 мМ NaCl,
3 мМ KCl,
10 мМ фосфата натрия,
где величина рН указанной композиции составляет приблизительно 6,75.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина А,
0,1 об.% полисорбата 80,
1 мг/мл триптофана,
140 мМ NaCl,
3 мМ KCl,
10 мМ фосфата натрия,
где величина рН указанной композиции составляет приблизительно 6,75.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина А,
1 об.% полисорбата 80,
1 мг/мл триптофана,
140 мМ NaCl,
3 мМ KCl,
10 мМ фосфата натрия,
где величина рН указанной композиции составляет приблизительно 6,75.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина В,
15 об.% полисорбата 20,
1 мг/мл триптофана,
140 мМ NaCl,
3 мМ KCl,
10 мМ фосфата натрия,
где величина рН указанной композиции составляет приблизительно 7,4.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина В,
15 об.% полисорбата 20,
4 мг/мл триптофана,
140 мМ NaCl,
3 мМ KCl,
10 мМ фосфата натрия,
где величина рН указанной композиции составляет приблизительно 7,4.

Согласно другому варианту осуществления жидкая композиция в соответствии с изобретением содержит или, по существу, состоит из

ботулинического нейротоксина В,
0,25 об.% полисорбата 20,
4 мг/мл триптофана,
140 мМ NaCl,

3 мМ КСl,

10 мМ фосфата натрия,

где величина рН указанной композиции составляет приблизительно 7,4.

Еще одним аспектом является применение жидких композиций в соответствии с изобретением в терапии.

Жидкие композиции в соответствии с изобретением могут применяться в терапии для лечения или профилактики мышечных заболеваний, нейромышечных заболеваний, неврологических заболеваний, офтальмологических нарушений, болевых состояний, психологических расстройств, заболеваний суставов, воспалительных заболеваний, эндокринных нарушений или урологических заболеваний.

Например, жидкие композиции в соответствии с изобретением могут применяться для лечения или профилактики заболевания, состояния или синдрома, выбранных из следующего перечня:

офтальмологические нарушения, выбранные из группы, состоящей из блефароспазма, косоглазия (в том числе рестриктивного косоглазия или миогенного косоглазия), амблиопии, осциллопии, защитного птоза, терапевтического птоза для защиты роговицы, нистагма, эзотропии, диплопии, энтропиона, ретракции века, орбитальной миопатии, гетерофории, сопутствующего смещения осей, несопутствующего смещения осей, первичной или вторичной эзотропии или экзотропии, межъядерной офтальмоплегии, косой девиации, синдрома Дуэйна и ретракции верхнего века;

двигательные расстройства, включая гемифациальный спазм, кривошее, мышечную спастичность у детей или взрослых (например, при церебральном параличе, после инсульта, рассеянном склерозе, у пациентов с черепно-мозговой травмой или травмой спинного мозга), идиопатические фокальные дистонии, ригидность мышц, писчий спазм, дистонию рук, паралич VI нерва, оромандибулярную дистонию, тремор головы, позднюю дискинезию, позднюю дистонию, профессиональные судороги (в том числе судорогу у музыкантов), паралич лицевого нерва, спазм сведения челюстей, лицевой спазм, синкинезию, тремор, первичный писчий тремор, миоклонию, синдром скованного человека, дистонию ступней, паралич лицевого нерва, синдром болезненности рук и движения пальцев, тиковые расстройства, дистонические тики, синдром Туретта, нейромиотонию, дрожь подбородка, паралич латеральной прямой мышцы, дистонический выворот ступни, дистонию челюсти, синдром кролика, мозжечковое дрожание, паралич III нерва, нистагм мягкого нёба, акатизию, мышечные судороги, паралич IV нерва, симптом "застывания" при ходьбе, дистонию мышц-разгибателей туловища, синкинезию после паралича лицевого нерва, вторичную дистонию, болезнь Паркинсона, хорею Хантингтона, эпилепсию, застойный период дистонии, лицевой столбняк, миокимию и доброкачественный синдром крампи-фасцикуляции;

оториноларингологические заболевания, включая спастическую дисфонию, ушные заболевания, нарушение слуха, треск в ушах, шум в ушах, головокружение, синдром Меньера, дисфункцию улиткового нерва, заикание, перстнеглоточную дисфагию, бруксизм, закрытие гортани при хронической аспирации, гранулема голосовой складки, вентрикулярную дистонию, вентрикулярную дисфонию, мутационную дисфонию, тризм, храп, тремор голоса, аспирацию, дистонию с протрузией языка, небный тремор, глубокий прикус и дистонию мышц гортани; синдром первого кусания (First Bite Syndrome);

нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта, включая ахалазию, анальную трещину, запор, дисфункцию височно-нижнечелюстного сустава, дисфункцию сфинктера Одди, стойкую гипертензию сфинктера Одди, нарушения кишечной мускулатуры, пуборектальный синдром, анизмус, спазм привратника желудка, дисфункцию жёлчного пузыря, дисфункцию двигательной активности желудочно-кишечного тракта или пищевода, диффузный спазм пищевода и парез желудка;

заболевания мочеполовой системы, включая детрузорно-сфинктерную диссинергию, гиперрефлексию детрузора, нейрогенную дисфункцию мочевого пузыря (например, у пациентов с болезнью Паркинсона, спинномозговой травмой, инсультом или рассеянным склерозом), гиперактивный мочевой пузырь, нейрогенную сверхактивность детрузора, спазмы мочевого пузыря, недержание мочи, задержку мочеиспускания, гипертрофированную шейку пузыря, дисфункцию опорожнения, интерстициальный цистит, вагинизм, эндометриоз, тазовую боль, увеличение предстательной железы (доброкачественную гиперплазию предстательной железы), простатодию, рак предстательной железы и приапизм;

дерматологические заболевания, включая нарушения пролиферации клеток кожи, раневые дефекты кожного покрова, псориаз, розацеа, акне; редкие наследуемые кожные заболевания, такие как синдром Фокса-Фордайса или болезнь Хейли-Хейли; уменьшение келоидных и гипертрофических рубцов; уменьшение размера пор; воспалительные состояния кожи; болезненные воспалительные состояния кожи;

болевые состояния, включая боль в спине (боль в верхней части спины, боль в пояснице), миофасциальный болевой синдром, головную боль напряжения, фибромиалгию, болевые синдромы, миалгию, мигрень, хлыстовую травму, боль в суставах, послеоперационную боль, боль, не связанную с мышечным спазмом, и боль, связанную с заболеваниями гладкой мускулатуры;

воспалительные заболевания, включая панкреатит, нейрогенные воспалительные заболевания (в том числе подагра, тендинит, бурсит, дерматомиозит и анкилозирующий спондилит);

секреторные заболевания, такие как избыточные секреции желёз, гипергидроз (в том числе гипергидроз подмышечной области, гипергидроз ладоней и синдром Фрея), гиперсаливация, сиалорея, бро-

мидроз, повышенная секреция слизи, повышенное слезотечение, дисфункция голокρινной железы; избыточное салоотделение;

респираторные заболевания, включая риниты (в том числе аллергические риниты), ХОЗЛ (англ. COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease - хроническое обструктивное заболевание легких), астму и туберкулез;

гипертрофические заболевания, включая мышечную гипертрофию, гипертрофию жевательной мышцы, акромегалию и нейрогенную гипертрофию передней большеберцовой мышцы с миалгией;

заболевания суставов, включая бурсит локтевого сустава ("теннисный" локоть) (или эпикондилит локтевого сустава), воспаление суставов, коксартроз, остеоартрит, патологию головки мышцы-вращателя плеча, ревматоидный артрит и синдром канала запястья;

эндокринные нарушения, такие как диабет 2-го типа, гиперглюкагонемия, гиперинсулинизм, гипoinsулинизм, гиперкальциемия, гипокальциемия, заболевания щитовидной железы (в том числе болезнь Грейвса, тиреоидит, тиреоидит Хашимото, гипертиреоз и гипотиреоз), заболевания паразитовидной железы (в том числе гиперпаратиреоз и гипопаратиреоз), синдром Кушинга и ожирение;

аутоиммунные заболевания, такие как системная красная волчанка;

пролиферативные заболевания, включая опухоли параганглиомы, рак предстательной железы и костные опухоли;

травматические повреждения, включая спортивные травмы, травмы мышц, повреждения сухожилий и переломы костей; и

применение в ветеринарии (например, иммобилизация млекопитающих, колики у лошадей, ахалазия животных или мышечные спазмы животных).

Жидкие композиции в соответствии с изобретением также могут применяться в эстетической медицине (т.е. для улучшения косметического внешнего вида), в частности, для лечения или профилактики появления морщин кожи, в частности морщин лица, таких как межбровные морщины, морщины контура глаз, глабеллярные морщин, опущение уголков рта, морщины шеи (платизмальные тяжи), морщины подбородка (подбородочная мышца, "апельсиновая корка", подбородок с ямочкой), морщины лба, морщины типа "поцарапанной кожи", лифтинг носа или складки после сна. Согласно данному аспекту изобретения субъект, подлежащий лечению или профилактике с целью улучшения косметического внешнего вида, предпочтительно не страдает каким-либо из заболеваний, состояний или синдромов, описанных выше. Более предпочтительно указанный субъект является здоровым субъектом (т.е. не страдающим каким-либо заболеванием, состоянием или синдромом).

Жидкие композиции в соответствии с изобретением могут применяться в сочетании с другим терапевтическим соединением. Согласно одному из вариантов осуществления жидкие композиции в соответствии с изобретением вводят в сочетании с обезболивающим соединением для устранения боли, в частности, в сочетании с опиоидным производным, таким как морфин, как описано в патентном документе WO 2007/144493, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно другому варианту осуществления жидкие композиции в соответствии с изобретением вводят в сочетании с гиалуроновой кислотой, например, для лечения рака предстательной железы, как описано в патентном документе WO 2015/044416, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является использование аминокислоты, выбранной из триптофана и тирозина, для защиты белкового нейротоксина от разрушения в жидкой композиции, не содержащей белков животного происхождения.

Согласно предпочтительному варианту осуществления аминокислота является триптофаном, более предпочтительно L-триптофаном.

Предпочтительно белковый нейротоксин является ботулиническим нейротоксином. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения ботулинический нейротоксин является ботулиническим нейротоксином в форме комплекса. Согласно другому варианту осуществления ботулинический нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин высокой степени чистоты. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения ботулинический нейротоксин является ботулиническим нейротоксином, очищенным из его природного клостридиального штамма. Согласно другому варианту осуществления ботулинический нейротоксин является ботулиническим нейротоксином, получаемым рекомбинантно на гетерологичном хозяине, таком как *E. coli*. Согласно настоящему изобретению ботулинический нейротоксин может быть BoNT серотипов A, B, C, D, E, F или G. Согласно настоящему изобретению ботулинический нейротоксин может быть модифицированным ботулиническим нейротоксином, как описано выше. Согласно настоящему изобретению рекомбинантный ботулинический нейротоксин может быть химерным ботулиническим нейротоксином, как описано выше.

Согласно предпочтительному варианту осуществления аминокислоту используют в сочетании с поверхностно-активным веществом и буфером, включающим ионы натрия, хлорид-ионы и фосфат-ионы, при этом жидкая композиция имеет величину pH от 5,5 до 8. Предпочтительно поверхностно-активное вещество является неионным поверхностно-активным веществом, более предпочтительно полисорбатом, например PS20, PS60 или PS80. Наиболее предпочтительно неионное поверхностно-активное вещество является PS80. Предпочтительно буфер также содержит ионы калия. Буфер может быть получен, напри-

мер, объединением солей хлорида натрия, хлорида калия и фосфата натрия. Согласно предпочтительному варианту осуществления величина pH лежит в диапазоне от 6,0 до 7,5, например составляет 6,3, 6,35, 6,4, 6,45, 6,5, 6,55, 6,6, 6,65, 6,7, 6,75, 6,8, 6,85, 6,9, 6,95, 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35, 7,4, 7,45 или 7,5. Предпочтительно величина pH отличается не более чем на одну единицу от физиологической pH (составляющей приблизительно 7,4).

Согласно предпочтительному варианту применения в соответствии с изобретением жидкая композиция стабильна в течение 2 месяцев. Например, она стабильна в течение 2 месяцев при температуре от 2 до 8°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 3 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно предпочтительному варианту осуществления она стабильна в течение 6 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 12 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 18 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 24 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 36 месяцев при температуре от 2 до 8°C, например при температуре 5°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 3 месяцев при комнатной температуре, например при температуре 25°C. Согласно одному из вариантов осуществления она стабильна в течение 6 месяцев при комнатной температуре, например при температуре 25°C.

Описание примеров осуществления изобретения

1. Приготовление стабильных жидких композиций ботулинического токсина типа А.

Готовили жидкие препараты ботулинического токсина, содержащие 15 нг/мл высокоочищенного BoNT/A, 15 об.% полисорбата 20, аминокислоту, выбранную из тирозина (Tyr), триптофана (Trp) и цистеина (Cys) или смеси метионина (Met), тирозина (Tyr), триптофана (Trp) и цистеина (Cys) (Sigma Aldrich), и фосфатно-солевой буфер (PBS из компании Calbiochem) (140 mM NaCl, 10 mM фосфата натрия и 3 mM KCl с pH 7,4 при температуре 25°C), фильтровали при помощи фильтров из ПВДФ (поливинилиденфторида) с размером пор 0,22 мкм и хранили в силиконизированных стеклянных шприцах емкостью 2 мл в течение 6 дней при температуре 40°C, после чего для каждого препарата проводили тест для оценки эффективности.

При выполнении теста для оценки эффективности содержимое шприцов с препаратами переносили в стеклянные флаконы емкостью 2 мл (Chromacol, Gold) с крышками, содержащими мембрану из каучука, обработанного ПТФЭ (Chromacol), или в пластиковые микроцентрифужные пробирки емкостью 1,7 мкл (Axugen, Maximum Recovery), те и другие имеют низкую адсорбцию белка. После этого препараты разводили 0,9% раствором NaCl, содержащим 3% человеческого сывороточного альбумина (HSA). В тот же день, когда выполняли разведение, по 50 мкл образца каждого препарата вводили в икроножную мышцу мышей. За мышами наблюдали в течение 3 дней и регистрировали степень паралича.

Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Испытание влияния добавок аминокислот на стабильность BoNT/A в условиях ускоренного старения (6 дней при температуре 40°C)

Результаты паралича у мышей: "-" не анализировали, WN - без замечаний, PA - паралич и † - смерть

Композиция			Тест для оценки эффективности		Оценка активности		
Буфер	Конц. BoNT/A	Аминокислота	Разведение в 0,9 NaCl с 3% HSA (кратность)	Инъектируемая доза (нг)	День 1	День 2	День 3
PBS pH 7,4 15% полисорбат 20	15 нг/мл	Trp 0,25 мг/мл + Cys 0,25 мг/мл + Met 0,25 мг/мл + Tyr 0,25 мг/мл	2 ×	0,25	–	–	WN
			20 ×	0,025	–	–	WN
		Cys 1 мг/мл	2 ×	0,25	–	–	WN
			20 ×	0,025	–	–	WN
		Tyr 0,74	2 ×	0,25	–	–	Резки

		мг/мл					й паралич всей брюшной полос- ти
			20 ×	0,025	–	–	WN
		Трп 1 мг/мл	2 ×	0,25	–	†	
			20 ×	0,025	–	–	WN
		–	2 ×	0,25	–	–	WN
			20 ×	0,025	–	–	WN

Было установлено, что тирозин и триптофан оказывают защитное действие против разложения BoNT/A. Было обнаружено, что триптофан обладает самым сильным защитным действием. Цистеин, а также смесь, содержащая все четыре аминокислоты, не оказывали защитного действия.

1. Приготовление стабильной жидкой композиции ботулинического токсина типа В.

Готовили жидкие препараты ботулинического токсина, содержащие 350 нг/мл высокоочищенного BoNT/B, 15 об.% полисорбата 20, аминокислоту, выбранную из тирозина (Тур), триптофана (Трп) и цистеина (Cys) или смеси метионина (Met), тирозина (Тур), триптофана (Трп) и цистеина (Cys), и фосфатно-солевой буфер (PBS), при pH 7,4, фильтровали при помощи фильтров с размером пор 0,22 мкм и хранили в силиконизированных стеклянных шприцах емкостью 2 мл в течение двух недель при температуре 40°C, после чего для каждого препарата проводили тест для оценки эффективности, как описано выше.

Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Испытание влияния добавок аминокислот на стабильность BoNT/B в условиях ускоренного старения (две недели при температуре 40°C)

Результаты паралича у мышей: "-" - не анализировали, WN - без замечаний, РА - паралич и † - смерть

Композиция			Тест для оценки эффективности		Оценка активности		
Буфер	Конц. BoNT/B	Аминокислота	Разведение в 0,9 NaCl с 3% HSA (кратность)	Инъецируемая доза (нг)	День 1	День 2	День 3
PBS pH 7,4 15% полисорбат 20	350 нг/мл	Трп 0,25 мг/мл + Cys 0,25 мг/мл + Met 0,25 мг/мл + Тур 0,25 мг/мл	10 ×	1,75	–	–	РА
		Cys 1 мг/мл	10 ×	1,75	–	–	РА
		Тур 0,575 мг/мл	10 ×	1,75	–	†	
		Трп 1 мг/мл	10 ×	1,75	–	†	
			35 ×	0,5	–	–	РА

Было установлено, что тирозин и триптофан оказывают защитное действие против разложения BoNT/B. Цистеин, а также смесь, содержащая все четыре аминокислоты, также обладали защитным действием, но в меньшей степени.

2. Оценка различных концентраций триптофана и полисорбата 20.

Готовили жидкие препараты ботулинического токсина, содержащие BoNT/A или BoNT/B высокой степени чистоты и различные концентрации полисорбата 20 (PS20) и триптофана, и фосфатно-солевой буфер (PBS) при pH 7,4, фильтровали при помощи фильтров с размером пор 0,22 мкм и хранили в силиконизированных стеклянных шприцах емкостью 2 мл. Испытания эффективности в отношении паралича задней конечности проводили для каждого препарата, как описано выше.

Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Оценка влияния концентраций Тгр и полисорбата 20 (PS20) на стабильность BoNT/A или BoNT/B
 Результаты паралича у мышей: "-" - не анализировали, WN - без замечаний, PA - паралич и † - смерть

Композиция				ИСПЫТАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ										
BoNT	Конц. BoNT (нг/мл)	Тгр (мг/мл)	PS20 (%)	Разведение в 0,9 NaCl с 3% HSA (кратность)	Инъекционная доза (нг)	Оценка эффективности (1-3д) для образцов, хранившихся при разных температурах и продолжительности								
						5°C			25°C					
						6 месяцев			5 недель			4 месяцев		
						1д	2д	3д	1д	2д	3д	1д	2д	3д
BoNT/A	15	8	15	1 ×	0,75	–	†		–	–	†	–	–	PA
				5 ×	0,15	–	–	†	–	–	†	–	–	WN
	15	8	0,25	1 ×	0,75	–	†		–	–	†*	–	–	†
				5 ×	0,15	–	–	†	–	†*		–	–	WN ²
	15	1	15	1 ×	0,75	–	†		–	†		†		
				5 ×	0,15	–	–	†	–	–	†	–	†	PA ³
BoNT/B	100	8	15	1 ×	5	–	–	†	–	–	†	–	–	PA
				10 ×	0,5	–	–	PA ¹	–	–	PA	–	–	PA
	100	8	0,25	1 ×	5	–	–	†	–	–	†	†		
				10 ×	0,5	–	–	PA ⁴	–	–	WN ¹	–	–	PA
	100	1	15	1 ×	5	–	–	†	–	–	†	†		
				10 ×	0,5	–	–	PA ⁴		–	PA	–	–	PA

Степень паралича (PA): 1. Затронуты пальцы ног; 2. Легкое онемение задней конечности; 3. Парализованы обе задние конечности; 4. Парализована задняя конечность; элюирующий буфер от очистки (5): 50 mM ацетата натрия, pH 4,5, с 0,2% (об./об.) полисорбата 20 и 400 mM хлорида натрия; * возможно, произошло смешивание двух разведений BoNT/A при 25°C 8 мг/мл Тгр, 0,25% полисорбата 20.

3. Оценка различных концентраций солей в препаратах BoNT/B.

Готовили жидкие препараты ботулинического токсина, содержащие 100 нг/мл высокоочищенного BoNT/B, полисорбат 20, триптофан от различных поставщиков аминокислот и буфер, выбранный из PBS с pH 7,4 (Calbiochem), 12 mM фосфатного буфера с pH 7 (Apoteket) и 20 mM ацетата натрия (NaAc) с pH 5,5 (NaAc фирмы Fluka и уксусная кислота фирмы Merck), фильтровали при помощи фильтров с размером пор 0,22 мкм и хранили в силиконизированных стеклянных шприцах емкостью 2 мл. Испытания эффективности в отношении паралича задней конечности проводили для каждого препарата, как описано выше.

Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Оценка влияния различных концентраций солей на стабильность BoNT/B
 Результаты паралича у мышей: "-" - не анализировали, WN - без замечаний, PA - паралич и † - смерть

Конц. BoNT/ B (нг/мл)	Буфер	Поставщи к и конц. Тгр	PS20 (%)	Испытание эффективности		Оценка эффективности (1-3д) для образцов, хранившихся с разной продолжительностью					
				Разведение в 0,9 NaCl с 3% HSA (кратность)	Инъек- цируе- мая до- за (нг)	40°C					
						2 недели			5 недель		
						1д	2д	3д	1д	2д	3д
100	PBS pH 7,4	Ajinomoto 4 мг/мл	15	1 ×	5	–	†				
				10 ×	0,5	–	–	PA			
100	PBS pH 7,4	Sigma Aldrich 4 мг/мл	15	1 ×	5	–	†				
				10 ×	0,5	–	–	PA			
100	PBS pH 7,4	Sigma Aldrich 1 мг/мл	15	1 ×	5	–	†				
				10 ×	0,5	–	–	PA			
100	PBS pH 7,4	Sigma Aldrich 4 мг/мл	0,25	1 ×	5	–	†		–	†	
				10 ×	0,5	–	–	PA	–	–	PA ²
100	12 mM Phosphate pH 7	Sigma Aldrich 4 мг/мл	15	1 ×	5	–	–	WN			
				10 ×	0,5	–	–	WN ¹			
100	20 mM NaAc pH 5,5	Sigma Aldrich 4 мг/мл	15	1 ×	5	–	–	PA			
				10 ×	0,5	–	–	PA			

1. Некоторая потеря функции; 2. Слабый паралич.

Результаты показывают, что препараты, содержащие PBS буфер (включающий ионы натрия, хлорид-ионы, фосфат-ионы и ионы калия), по-видимому, играют определенную роль в стабильности ботулинического токсина.

4. Оценка различных стабилизаторов.

Готовили жидкие препараты ботулинического токсина, содержащие 15 нг/мл высокоочищенного BoNT/A, полисорбат 20 (PS20) или полисорбат 80 (PS80) или HSA, триптофан и PBS, фильтровали при помощи фильтров с размером пор 0,22 мкм и хранили в силиконизированных стеклянных шприцах емкостью 2 мл. Испытания эффективности в отношении паралича задней конечности проводили для каждого препарата, как описано выше.

Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Оценка воздействия различных поверхностно-активных веществ на стабильность BoNT/A
 Результаты паралича у мышей: "-" - не анализировали, WN - без замечаний, PA - паралич и † - смерть

Конц. BoNT/ A (нг/мл)	Буфер	Тгр	Стабилизатор	Испытание эффективности		Оценка эффективности (1-3д) для образцов, хранившихся с разной продолжительностью								
				Разведение в 0,9 NaCl с 3% HSA (кратность)	Инъек- цируе- мая до- за (нг)	40°C								
						6 дней			4 недель			3 месяца		
						1д	2д	3д	1д	2д	3д	1д	2д	3д
15	PBS pH 7,4	1 мг/мл	PS 80 0,25%	1,7 ×	0,45	†			†			–	–	PA ³
				15 ×	0,05	†			†			–	–	WA
15	PBS pH 7,4	1 мг/мл	PS 20 0,25%	1,7 ×	0,45	†			†			–	–	PA ²
				15 ×	0,05	†			–	–	PA	–	–	WN
15	PBS pH 7,4	–	HSA 1 мг/мл	1,7 ×	0,45	†			†			–	†	
				15 ×	0,05	†			†			–	–	PA ¹

1. Сильный паралич обеих задних конечностей; 2. Лапы расположены под углом; 3. Сильный паралич.

5. Оценка различных композиций.

Готовили жидкие препараты ботулинического токсина, содержащие 10 нг/мл высокоочищенного BoNT/A, 0,25% PS80, 1 мг/мл триптофана и PBS, как описано выше. Величину pH доводили до 6,6 и 7,0 с помощью добавления HCl. Каждый из препаратов хранили в течение 5 недель при температуре 40°C.

Каждый из препаратов разбавляли 10-кратно и проводили испытания эффективности в отношении паралича задней конечности, как описано выше (0,05 нг на инъекцию). В обоих случаях паралич задней конечности наблюдался на 3 день. Паралич был более сильным при использовании препарата с величиной pH 6,6.

6. Оценка различных композиций.

Готовили жидкие препараты ботулинического токсина, содержащие 0,3 нг/мл высокоочищенного BoNT/A, полисорбат, выбранный из PS20 и PS80, 1 мг/мл триптофана и 12 мМ PBS, при pH 7,4, как описано выше. Величину pH каждого препарата доводили до pH 6,6 или 6,9 с помощью добавления 1,2M HCl.

Полисорбат 20 испытывали при одной концентрации, 0,2 (мас./об.)%, что соответствует примерно его 20-кратной СМС (критической мицеллярной концентрации, составляющей приблизительно 0,01 (мас./об.)% при температуре 21°C). Полисорбат 80 испытывали при концентрациях 0,04 и 0,2 (мас./об.)%, что соответствует приблизительно его 20- и 100-кратной СМС (составляющей приблизительно 0,002 (мас./об.)% при температуре 21°C).

Таблица 6

Выбор полисорбата и величины pH

Композиция	PS20 (мас./об.)%	PS80 (мас./об.)%	pH
PS20-1	0,2	–	6,6
PS20-2	0,2	–	6,9
PS80-1	–	0,04	6,6
PS80-2	–	0,04	6,9
PS80-3	–	0,2	6,6

По 0,5 мл каждого препарата заполняли в длинные стеклянные шприцы емкостью 1 мл (BD) и закрывали плунжером с фторуглеродным покрытием.

Эффективность определяли при помощи испытания в отношении паралича задней конечности у мышей, как описано выше.

Ни для одной из композиций не наблюдалось никакого снижения эффективности по истечении 6 месяцев хранения при температуре 5°C и после 25°C.

7. Оценка различных композиций.

Готовили девятнадцать различных композиций, содержащих ботулинический нейротоксин типа А высокой степени очистки с различными концентрациями полисорбата 80, триптофана, фосфата натрия, хлорида натрия, хлорида калия и различными pH. Каждая композиция имела целевую номинальную эффективность 500 Ед/мл. Каждую композицию дегазировали, фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и заполняли во флаконы. В качестве защитной атмосферы внутри флаконов использовали газообразный азот. Заполнение осуществляли в анаэробной камере. Каждую композицию в виде аликвот по 1 мкл в атмосфере азота заполняли в стеклянные флаконы емкостью 2 мл, закрывали пробками FluroTec®, запечатывали при помощи алюминиевых колпачков с отрывной накладкой и хранили в вертикальном положении.

Стабильность 19 композиций оценивали при температурах 5°C, 25°C и 37°C, используя для измерения эффективности набор BoTest®.

Таблица 7

Композиции вспомогательных веществ

Название компонента	pH	Фосфат натрия (мМ)	Триптофан (мг/мл)	Полисорбат 80 (об.%)	NaCl (мМ)	KCl (мМ)
N1	6,3	2	0,25	0,01	25	0
N2	7,2	2	0,25	0,01	255	0
N3	6,3	50	0,25	0,01	255	10
N4	7,2	50	0,25	0,01	25	10
N5	6,3	2	3	0,01	255	10

N6	7,2	2	3	0,01	25	10
N7	6,3	50	3	0,01	25	0
N8	7,2	50	3	0,01	255	0
N9	6,3	2	0,25	1	25	10
N10	7,2	2	0,25	1	255	10
N11	6,3	50	0,25	1	255	0
N12	7,2	50	0,25	1	25	0
N13	6,3	2	3	1	255	0
N14	7,2	2	3	1	25	0
N15	6,3	50	3	1	25	10
N16	7,2	50	3	1	255	10
N17	6,75	10	1,625	0,1	140	3

Таблица 8

Компоненты упаковки

Изделие	Номер изделия, поставщик
Флакон из боросиликатного прозрачного стекла, тип I плюс, 2 мл	1097221, Schott
Пробка Westar RS из бромбутилового каучука, покрытая Flurotec, серого цвета, 13 мм	1356 4023/50, West
Алюминиевый колпачек с отрывной накладкой, 13 мм	5920-6623, West

Для всех композиций раствор оставался прозрачным и по большей части бесцветным.

Концентрации вспомогательных веществ, тестируемые в данном исследовании, по-видимому, не влияют на величину pH композиций в тестируемом промежутке времени. Результаты эффективности представлены в табл. 9.

Таблица 9

Результаты определения эффективности с использованием BoTest

	pH	Исходная эффективность (Ед/мл) (BoTest) 0 месяцев	Остаточная эффективность по сравнению с исходной (BoTest)					
			2 месяца 37°C		6 месяцев 25°C		6 месяцев 5°C	
			Ед/мл	%	Ед/мл	%	Ед/мл	%
N1	6,3	86	0	0	0	0	39	45
N2	7,2	474	210	44	389	82	485	102
N3	6,3	449	288	64	406	90	512	114
N4	7,2	299	62	21	368	123	406	136
N5	6,3	378	263	70	385	102	422	112
N6	7,2	93	0	0	0	0	52	56
N7	6,3	238	0	0	0	0	239	100
N8	7,2	375	305	81	402	107	450	120
N9	6,3	196	0	0	100	51	294	150
N10	7,2	354	201	57	408	115	411	116
N11	6,3	438	197	45	372	85	492	112
N12	7,2	411	96	23	295	72	417	101
N13	6,3	304	185	61	403	133	416	137
N14	7,2	206	0	0	0	0	183	89
N15	6,3	197	155	79	231	117	214	109
N16	7,2	476	227	48	390	82	685	144
N17	6,75	402	250	62	286	71	488	121

Для нескольких композиций имела место потеря не более 30% эффективности в течение 6 месяцев при температуре 5°C, и/или не более приблизительно 40% эффективности в течение 3 месяцев при температуре 25°C. и/или не более приблизительно 50% активности в течение 2 месяцев при температуре 37°C.

8. Оценка PS60.

Готовили композицию, содержащую ботулинический нейротоксин типа А высокой степени очистки

с 0,1% (об./об.) PS60, 1 мг/мл L-триптофана, 10 мМ фосфата натрия, 140 мМ хлорида натрия, 3 мМ хлорида калия и воду для инъекций. Величину pH с помощью HCl доводили до 6,75. Композиция имела целевую номинальную эффективность 100 Ед/мл. Композицию дегазировали, фильтровали через фильтры с размером пор 0,2 мкм и заполняли во флаконы емкостью 2 мл в асептических условиях в анаэробной камере с атмосферой азота при объеме наполнения 1 мл. Во флаконах в качестве защитной атмосферы использовали газообразный азот. Флаконы закрывали пробками с покрытием FluroTec®, запечатывали при помощи алюминиевых колпачков с отрывной накладкой.

Таблица 10

Компоненты упаковки	
Изделие	Номер изделия, поставщик
Флакон из боросиликатного прозрачного стекла, тип I плюс, 2 мл	1097221, Schott
Пробка Inj из бромбутила с покрытием, 4023-50, серая, 13 мм	INJ13TB3WRS, Nordic Pack
Синий алюминиевый колпачек с отрывной накладкой, 13 мм	5920-1164, Nordic Pack

Эффективность с течением времени при температурах 37 и 25°C определяли с помощью теста MLD50, как описано в данном контексте.

При температуре 37°C остаточная эффективность по истечении 9 недель составляла приблизительно от 50 до 55% от начальной эффективности.

При температуре 25°C остаточная эффективность по истечении 3 месяцев составляла приблизительно 80% от начальной эффективности.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкая композиция с эффектом защиты ботулинического нейротоксина от разрушения, содержащая ботулинический нейротоксин, поверхностно-активное вещество, аминокислоту, выбранную из триптофана и тирозина, буфер, включающий ионы натрия, хлорид-ионы и фосфат-ионы,

где указанная жидкая композиция имеет величину pH от 5,5 до 8, и

где указанная композиция не содержит белков животного происхождения.

2. Жидкая композиция по п.1, где указанная жидкая композиция стабильна в течение 2 месяцев при температуре от 2 до 8°C.

3. Жидкая композиция по п.1 или 2, где поверхностно-активное вещество является неионным поверхностно-активным веществом.

4. Жидкая композиция по п.3, где неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, предпочтительно полисорбат 20, полисорбат 60 или полисорбат 80.

5. Жидкая композиция по любому из пп.1-4, где аминокислота представляет собой триптофан, предпочтительно L-триптофан.

6. Жидкая композиция по любому из пп.1-5, где буфер дополнительно включает ионы калия.

7. Жидкая композиция по любому из пп.1-6, где указанная композиция имеет величину pH от 6,0 до 7,5.

8. Жидкая композиция по любому из пп.1-7, где не более 30% внеклеточной протеолитической активности теряется в течение 2, 3, 6, 12, 18, 24 или 36 месяцев при температуре 5°C.

9. Жидкая композиция по любому из пп.1-8, где ботулинический нейротоксин выбран из природного ботулинического нейротоксина в форме комплекса, природного ботулинического нейротоксина высокой чистоты и рекомбинантного ботулинического нейротоксина.

10. Жидкая композиция по п.9, где ботулинический нейротоксин представляет собой рекомбинантный ботулинический нейротоксин, выбранный из ботулинического нейротоксина типов A, B, C, D, E, F или G, модифицированного ботулинического нейротоксина и химерного ботулинического нейротоксина.

11. Жидкая композиция по любому из пп.1-10, где указанная жидкая композиция содержит

от 0,01 до 75 нг ботулинического нейротоксина на 1 мл,

от 0,001 до 15 об.% полисорбата,

от 0,1 до 5 мг/мл триптофана,

от 10 до 500 мМ NaCl,

от 1 до 50 мМ KCl,

от 1 до 100 мМ фосфата натрия,

имеет величину pH в диапазоне от 5,5 до 8 и стабильна в течение 6 месяцев при температуре 5°C.

12. Жидкая композиция по п.11, где указанная жидкая композиция содержит

от 0,03 до 20 нг ботулинического нейротоксина на 1 мл,

от 0,05 до 0,2 об.% полисорбата 80,

от 0,1 до 5 мг/мл триптофана,

от 25 до 300 мМ NaCl,

от 1 до 10 мМ KCl,

от 2 до 50 мМ фосфата натрия,

имеет величину pH в диапазоне от 6,0 до 7,5 и стабильна в течение 12 месяцев при температуре 5°C.

13. Применение жидкой композиции по любому из пп.1-12 в терапии.

14. Применение жидкой композиции по п.13 для лечения или профилактики мышечных заболеваний, нейромышечных заболеваний, неврологических заболеваний, офтальмологических заболеваний, болевых состояний, психологических расстройств, заболеваний суставов, воспалительных заболеваний, эндокринных нарушений или урологических заболеваний.

15. Применение жидкой композиции по любому из пп.1-12 в эстетической медицине для лечения или профилактики появления морщин кожи.

16. Применение жидкой композиции по п.15 для лечения или профилактики появления морщин лица, таких как лицевые межбровные складки, морщины контура глаз, глабеллярные морщины, опущение уголков рта, морщины шеи (платизмальные тяжи), морщины подбородка (подбородочная мышца, "апельсиновая корка", подбородок с ямочкой), морщины лба, морщины типа "поцарапанной кожи", лифтинг носа или складки после сна.

17. Применение аминокислоты, выбранной из триптофана и тирозина, для защиты ботулинического нейротоксина от разрушения в жидкой композиции, не содержащей белков животного происхождения и содержащей поверхностно-активное вещество и буфер, включающий ионы натрия, хлорид-ионы и фосфат-ионы.

18. Применение по п.17, где аминокислота является триптофаном.

19. Применение по п.17, где аминокислоту используют в сочетании с поверхностно-активным веществом и буфером, включающим ионы натрия, хлорид-ионы и фосфат-ионы, при этом указанная жидкая композиция имеет величину pH от 5,5 до 8.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
