

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491791 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.09.18

(22) Дата подачи заявки  
2023.01.13

(51) Int. Cl. *A61K 38/48* (2006.01)  
*A61K 8/66* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 47/02* (2006.01)  
*A61K 47/18* (2006.01)  
*A61Q 19/08* (2006.01)

(54) ЛЕЧЕНИЕ МЕЖБРОВНЫХ МОРЩИН И БОКОВЫХ ПЕРИОРБИТАЛЬНЫХ  
МОРЩИН ОТ УМЕРЕННЫХ ДО СИЛЬНО ВЫРАЖЕННЫХ

(31) 63/299,705; 63/399,127

(32) 2022.01.14; 2022.08.18

(33) US

(86) PCT/GV2023/050061

(87) WO 2023/135428 2023.07.20

(71) Заявитель:

ГАЛЬДЕРМА ХОЛДИНГ СА (СН);  
ИПСЕН БИОФАРМ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

Аксен Ева, Линь Сяомин, Вайнберг  
Фелипе, Магире Кортни, Нильссон  
Анна (СН)

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам лечения межбровных морщин и боковых периорбитальных морщин с применением жидких композиций, содержащих ботулинический нейротоксин.

Предпочтительное наименование	Интенсивность	QM-1114-DP (N = 222)	Плацебо (N = 75)
		Субъекты/явления	Субъекты/явления
Головная боль	Всего	5 (2.3%) / 5	
	Слабая	2 (0.9%) / 2	
	Умеренная	3 (1.4%) / 3	0 / 0
	Сильная	0	
Блефароптоз	Всего	2 (0.9%) / 2	
	Слабая	2 (0.9%) / 2	0 / 0
	Умеренная	0	
	Сильная	0	
Гематома в месте инъекции	Всего	1 (0.5%) / 1	
	Слабая	1 (0.5%) / 1	0 / 0
	Умеренная	0	
	Сильная	0	

N = количество субъектов в выборке для определения безопасности  
Не наблюдали нежелательных явлений, которые привели бы к досрочному прекращению исследования

202491791

A1

A1

202491791

## ЛЕЧЕНИЕ МЕЖБРОВНЫХ МОРЩИН И БОКОВЫХ ПЕРИОРБИТАЛЬНЫХ МОРЩИН ОТ УМЕРЕННЫХ ДО СИЛЬНО ВЫРАЖЕННЫХ

### ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 Настоящая заявка претендует на приоритет предварительной патентной заявки US 63/299705, поданной 14 января 2022 г., и предварительной патентной заявки US 63/399127, поданной 18 августа 2022 г., согласно Статье 35 U.S.C. § 119(e). Содержания указанных предварительных патентных заявок полностью включены в настоящую работу посредством ссылки.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

10 Настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения межбровных морщин (англ. glabellar lines, далее сокращенно "GL") и боковых периорбитальных морщин (морщин у наружных уголков глаз или морщин кантальной области, так называемых "гусиных лапок", англ. lateral canthal lines, далее сокращенно "LCL"), имеющих выраженность от умеренной до сильной и очень  
15 сильной, посредством применения препаратов, содержащих ботулинический нейротоксин. Изобретение также относится к жидким препаратам и композициям, содержащим ботулинический нейротоксин.

### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

20 Приведенная ниже справочная информация об уровне техники предоставлена исключительно для лучшего понимания существующего уровня техники и не составляет и не описывает предшествующий уровень техники.

В настоящее время описаны семь различающихся в общем иммунологическом отношении ботулинических нейротоксинов – серотипы ботулинического нейротоксина A, B, C, D, E, F и G – каждый из которых может быть  
25 отличен от других по нейтрализации типоспецифических антител. В качестве примера можно привести товарный знак BOTOX®, который относится к ботулотоксину типа A (BoNT-A), очищенному комплексу нейротоксина, коммерчески поставляемому Компанией Allergan, Inc. (Irvine, Калифорния). Инъекции BOTOX® являются популярной косметической терапией, которая временно уменьшает  
30 выраженность мелких и более глубоких морщин.

В настоящее время имеются четыре одобренных в США продукта BoNT-A: BOTOX COSMETIC®, DYSPORT®, XEOMIN® и JEUVEAU®. Для обеспечения

стабильности, все эти продукты хранят в лиофилизованном виде или в высушенном  
сублимацией виде. Несмотря на то, что каждый из этих продуктов в качестве  
активного ингредиента содержит BoNT-A, активность, стабильность и безопасность  
этих продуктов не одинаковы. Напротив, многие из этих продуктов имеют  
5 относительно различающиеся активность, стабильность и безопасность, и работа с  
каждым из указанных продуктов осложняется тем, что перед введением пациенту  
врач должен производить восстановление (т.е. приготовление раствора) препарата.

В большом количестве клинических испытаний BoNT-A отмечали такое  
нежелательное явление, как опущение верхнего века (“блефароптоз”), которое  
10 возникало с различной частотой в группах, получавших лечение. Важно отметить,  
что опущение верхнего века не возникало ни в одной группе, получавшей плацебо –  
это показывает, что опущение века непосредственно связано с инъекцией  
ботулинического токсина. При обзоре исследований, в которых суммарно  
участвовали более 8000 пациентов, было обнаружено, что частота возникновения  
15 блефароптоза составляла приблизительно 2,5%. В частности, опущение верхнего  
века наблюдали при применении препаратов Botox (частота возникновения – 3%) и  
Jeuveau (частота возникновения – 2%).

Таким образом, в настоящее время имеется необходимость в создании  
безопасного препарата, содержащего ботулинический нейротоксин, применение  
20 которого не приводит к опущению верхнего века или вызывает его с меньшей  
частотой и с меньшей выраженностью, где препарат предпочтительно находится в  
жидком виде, подходящем для хранения и применения в лечении.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В целом, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим  
25 ботулинический нейротоксин, и к способам лечения морщин и складок, таких как  
боковые периорбитальные морщины (LCL), лобные морщины и межбровные  
морщины (GL).

Один из аспектов настоящего изобретения относится к способам лечения  
морщин в верхней части лица (например, межбровных морщин (GL), боковых  
30 периорбитальных морщин (LCL), лобных морщин или их комбинации) у субъекта-  
человека, где способы отличаются пониженным риском опущения верхнего века;  
способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества  
жидкой композиции, включающей ботулинический нейротоксин, что приводит к

уменьшению выраженности GL, LCL, лобных морщин или их комбинации, где ботулинический нейротоксин с меньшей вероятностью вызывает опущение верхнего века по сравнению с продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин с более низкой ферментативной активностью или более низкой удельной активностью.

5 Другими словами, изобретением предоставлена включающая ботулинический нейротоксин жидкая композиция для лечения морщин в верхней части лица (например, межбровных морщин (GL), боковых периорбитальных морщин (LCL), лобных морщин или их комбинации) у субъекта-человека, отличающаяся пониженным риском опущения верхнего века, где способ включает введение

10 терапевтически эффективного количества жидкой композиции, включающей ботулинический нейротоксин субъекту, что приводит к уменьшению выраженности морщин в верхней части лица (например, GL, LCL, лобных морщин или их комбинации), причем ботулинический нейротоксин с меньшей вероятностью вызывает опущение верхнего века по сравнению с продуктом, содержащим

15 ботулинический нейротоксин с более низкой ферментативной активностью или более низкой удельной активностью. В альтернативном случае в настоящем описании термин “ферментативная активность” может быть заменен, например, термином “протеолитическая активность L-цепи”, поскольку L-цепь ботулинического нейротоксина включает домен протеазы, который расщепляет целевой белок

20 SNARE (сокр. от англ.: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, т.е. растворимый чувствительный к N-этилмалеимиду фактор, обеспечивающий прикрепление белков).

Это наблюдение является неожиданным, поскольку, если ботулинический нейротоксин применяют для лечения морщин в верхней части лица (как описано

25 выше), то ожидается, что ботулинический нейротоксин, имеющий относительно высокую эффективность (например, имеющий относительно высокую ферментативную активность или имеющий относительно высокую удельную активность) будет с большей вероятностью вызывать опущение века по сравнению с продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин с относительно низкой

30 эффективностью (например, с относительно низкой ферментативной активностью или с относительно низкой удельной активностью). Опущение века происходит, когда ботулинический нейротоксин распространяется за пределы целевых мышц и попадает в расположенные вблизи мышцы глазного века, вызывая атонический паралич (опускание) века. Таким образом, несмотря на то, что для достижения

35 выраженного косметического эффекта может быть желательным применение

ботулинического нейротоксина, имеющего относительно высокую эффективность, такой подход представляется ошибочным, поскольку весьма вероятно, что подобный ботулинический нейротоксин будет вызывать птоз века.

5 Другой аспект относится к косметическому способу лечения морщин в  
верхней части лица (например, межбровных морщин (GL), боковых  
периорбитальных морщин (LCL), лобных морщин или их комбинации) у субъекта-  
человека, где способ отличается пониженным риском опущения верхнего века;  
способ включает введение терапевтически эффективного количества жидкой  
композиции, включающей ботулинический нейротоксин субъекту, что приводит к  
10 уменьшению выраженности морщин в верхней части лица (например, GL, LCL,  
лобных морщин или их комбинации), и в способе ботулинический нейротоксин с  
меньшей вероятностью вызывает опущение верхнего века по сравнению с  
продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин с более низкой  
ферментативной активностью или более низкой удельной активностью.

15 Другой аспект относится к способу лечения морщин в верхней части лица  
(например, GL, LCL, лобных морщин или их комбинации) субъекта, где способ  
включает введение субъекту терапевтически эффективного количества  
ботулинического нейротоксина (предпочтительно жидкой композиции, включающей  
ботулинический нейротоксин), что приводит к уменьшению выраженности лицевых  
20 морщин, и в этом способе частота возникновения опущения верхнего века у  
субъектов снижена. Другой аспект относится к способу лечения морщин в верхней  
части лица (например, GL, LCL, лобных морщин или их комбинации) субъекта, где  
способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества  
ботулинического нейротоксина (предпочтительно жидкой композиции, включающей  
25 ботулинический нейротоксин), что приводит к уменьшению выраженности лицевых  
морщин, и в способе частота возникновения опущения верхнего века у субъектов  
снижена по сравнению с частотой возникновения опущения верхнего века у  
субъектов, получающих лечение альтернативным продуктом, содержащим  
ботулинический нейротоксин с более низкой ферментативной активностью или с  
30 более низкой удельной активностью. Другими словами, изобретением предоставлен  
ботулинический нейротоксин (предпочтительно жидкая композиция, включающая  
ботулинический нейротоксин) для лечения морщин в верхней части лица (например,  
GL, LCL, лобных морщин или их комбинации) субъекта, где лечение приводит к  
уменьшению выраженности лицевых морщин, и частота возникновения опущения  
35 верхнего века у субъектов снижена. Другой аспект относится к ботулиническому

нейротоксину (предпочтительно к жидкой композиции, включающей ботулинический нейротоксин) для лечения морщин в верхней части лица (например, GL, LCL, лобных морщин или их комбинации) субъекта, где лечение приводит к уменьшению выраженности лицевых морщин, и частота возникновения опущения верхнего века у 5 субъектов снижена по сравнению с частотой возникновения опущения верхнего века у субъектов, получающих лечение альтернативным продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин с более низкой ферментативной активностью или с более низкой удельной активностью.

10 При лечении межбровных морщин ботулинический нейротоксин обычно вводят в два или менее участка мышцы, сморщивающей бровь, и в один участок мышцы гордецов.

При лечении лобных морщин ботулинический нейротоксин обычно вводят в пять или менее участков лобной мышцы.

15 При лечении боковых периорбитальных морщин ботулинический нейротоксин обычно вводят в три или менее участка, находящихся на внешней части круговой мышцы глаза.

Морщины в верхней части лица могут представлять собой межбровные морщины. Лицевые морщины могут быть лицевыми морщинами от умеренных до 20 выраженных, например, умеренными лицевыми морщинами или выраженными лицевыми морщинами. Частота возникновения опущения верхнего века может составлять менее 1%, предпочтительно не более 0,9%. Общая доза введенного ботулинического нейротоксина (за визит/пребывание/сутки) для лечения межбровных морщин может составлять от 40 до 60 единиц (предпочтительно 50 25 единиц), где 1 единица представляет собой количество ботулинического нейротоксина, которое соответствует вычисленной средней летальной дозе (LD50) (сокр. от англ. "lethal dose 50", то есть "летальная доза, приводящая к гибели 50% 30 испытуемых организмов") для мышей. Общая доза введенного ботулинического нейротоксина (за визит/пребывание/сутки) для лечения боковых периорбитальных морщин может составлять от 50 до 70 единиц (предпочтительно 60 единиц), где 1 единица представляет собой количество BoNT/A, которое соответствует вычисленной средней летальной дозе (LD50) для мышей.

В некоторых примерах осуществления субъект не ощущает серьезных нежелательных явлений. В некоторых примерах осуществления у субъекта с

меньшей вероятностью происходит опущение верхнего века по сравнению с лечением продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин, выбранным из BOTOX Cosmetic®, Xeomin® и Jeuveau®. В некоторых примерах осуществления продукт, содержащий ботулинический нейротоксин с более низкой ферментативной активностью, выбран из Botox Cosmetic®, Xeomin® и Jeuveau®.

Ботулинический нейротоксин может иметь ферментативную активность, нормализованную по концентрации ботулинического нейротоксина, составляющую приблизительно 1,16 БЕ/BoNT (где “БЕ” означает ботулинические единицы, т.е. единицы ботулотоксина). Дополнительно или в альтернативном случае настоящее изобретение относится к способу лечения межбровных морщин (GL), боковых периорбитальных морщин (LCL), лобных морщин или их комбинации, отличающемуся пониженным риском опущения верхнего века, у субъекта-человека, нуждающегося в таком лечении, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества жидкой композиции, включающей ботулинический нейротоксин, что приводит к уменьшению выраженности GL, LCL, лобных морщин или их комбинации, и ботулинический нейротоксин имеет ферментативную активность, нормализованную по концентрации ботулинического нейротоксина, составляющую приблизительно 1,16 БЕ/BoNT. Введение ботулинического нейротоксина (например, препарата, содержащего ботулинический нейротоксин с ферментативной активностью, нормализованной по концентрации ботулинического нейротоксина, составляющей менее 1,16 БЕ/BoNT, или удельной активностью, составляющей менее приблизительно  $2,0 \times 10^8$  Е/мг, такого как Botox Cosmetic®, Xeomin® и Jeuveau®) субъекту-человеку может приводить к риску развития или повышению вероятности развития опущения верхнего века. Субъект-человек также может испытывать опущение верхнего века и/или иметь историю развития опущения верхнего века при введении ботулинического нейротоксина. В другом примере осуществления субъект-человек не является субъектом, который (i) не подвержен риску развития опущения верхнего века, (ii) не испытывает опущения верхнего века и/или (iii) не имеет истории развития опущения верхнего века при введении ботулинического нейротоксина в любой дозе или с любой ферментативной активностью.

Активность жидкой композиции может составлять приблизительно 97 БЕ/мл или более, и необязательно ферментативная активность жидкой композиции, нормализованная по концентрации ботулинического нейротоксина, может составлять приблизительно 10. Другой аспект настоящего изобретения относится к

способам лечения межбровных морщин (GL), боковых периорбитальных морщин (LCL), лобных морщин или их комбинации у субъекта-человека, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества жидкой композиции, включающей ботулинический нейротоксин, что приводит к уменьшению  
5 выраженности GL, LCL, лобных морщин или их комбинации, и в способах (i) активность жидкой композиции составляет приблизительно 97 БЕ/мл или более, и необязательно ферментативная активность жидкой композиции, нормализованная по концентрации ботулинического нейротоксина, составляет приблизительно 10.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов  
10 удельная BoNT активность жидкого препарата составляет приблизительно  $2,0 \times 10^8$  ед./мг (т.е. единиц/мг) общего белка, где удельную активность (ед./мг) необязательно определяют как отношение эффективности LD50 для мышей, выраженной в ед./мл, к общему количеству белка, определяемому микроанализом с бицинхониновой кислотой (мг/мл).

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов  
15 ферментативная активность жидкого препарата, нормализованная по концентрации ботулинического нейротоксина, составляет приблизительно 1,16 БЕ/BoNT, где ферментативную активность ботулинического нейротоксина необязательно определяют способом BOTEST™.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов  
20 относительная эффективность жидкого препарата, нормализованная по концентрации ботулинического нейротоксина, составляет приблизительно 1,20 единиц/BoNT, где ферментативную активность ботулинического нейротоксина определяют в клеточном анализе.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов  
25 жидкий препарат не содержит вспомогательных веществ, полученных из организма человека или животного.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов  
30 частота возникновения опущения верхнего века может составлять менее 2%. Процентная доля случаев опущения верхнего века, указанная в настоящей работе, предпочтительно соответствует проценту пациентов, у которых наблюдается опущение верхнего века, в когорте (например, в когорте, содержащей по меньшей мере 50 пациентов), в которой каждому пациенту был введен препарат BoNT. Это

означает, что при введении жидкой композиции, описанной в настоящей работе, когорте субъектов, менее 2% от этой когорты демонстрируют опущение века. В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов частота возникновения опущения верхнего века составляет менее 2%, менее 1,9%, менее 1,8%, менее 1,7%, менее 1,5%, менее 1,4%, менее 1,3%, менее 1,2%, менее 1,1%, менее 1,0% или достигает 0,9%. Например, частота возникновения опущения верхнего века может составлять не более 1,0%. Предпочтительно частота возникновения опущения верхнего века может составлять не более 0,9%. При этом частота возникновения опущения верхнего века после лечения альтернативным продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин (например, продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин с более низкой ферментативной активностью или более низкой удельной активностью), может составлять более 2%.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов опущение верхнего века у субъекта не происходит.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов у субъекта с меньшей вероятностью будет наблюдаться опущение верхнего века по сравнению с последствиями лечения продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин, выбранным из BOTOX Cosmetic®, Xeomin® и Jeuveau®. В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов у субъекта с меньшей вероятностью будет наблюдаться опущение верхнего века по сравнению с последствиями лечения альтернативным продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин, который хранили в сухом виде (например, в виде лиофилизированного порошка) и затем восстанавливали для введения субъекту.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов GL, LCL или их комбинация имеют вид от умеренных до выраженных.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов GL, LCL или их комбинация являются выраженными или сильно выраженными.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов жидкая композиция, включающая ботулинический нейротоксин, не включает животных белков или сопутствующих белков.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов субъекту обрабатывают только GL. В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов субъекту обрабатывают только LCL. В некоторых

примерах осуществления любого из описанных выше способов субъекту обрабатывают комбинацию GL и LCL. В любом из этих примеров осуществления GL и/или LCL могут располагаться на одной или на обеих сторонах лица субъекта.

5 В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов лечение обеспечивает более высокий процент пациентов с объективным (положительным) ответом, чем лечение Botox Cosmetic®. В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов лечение обеспечивает более высокий процент пациентов с положительным ответом, чем лечение альтернативным продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин, который  
10 хранили в сухом виде (например, в виде лиофилизированного порошка) и затем восстанавливали для введения субъекту.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов жидкая композиция включает приблизительно 4 буферных агента. Например, жидкая композиция может включать первый буферный агент, присутствующий в  
15 концентрации от приблизительно 100 мМ до приблизительно 300 мМ или в концентрации приблизительно от 0,1 мг/мл до 10 мг/мл. Жидкая композиция может включать второй буферный агент, присутствующий в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ или в концентрации приблизительно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл. Жидкая композиция может включать  
20 третий буферный агент, присутствующий в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ или в концентрации приблизительно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл. Жидкая композиция может включать четвертый буферный агент, присутствующий в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ или в концентрации приблизительно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл. Жидкая композиция  
25 может включать пятый буферный агент, присутствующий в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ или в концентрации приблизительно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл. В некоторых примерах осуществления буферные агенты выбраны из группы, состоящей из хлорида натрия, хлорида калия, фосфата натрия, фосфата калия, дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата  
30 дигидрофосфата натрия.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов жидкая композиция включает приблизительно один стабилизатор, который необязательно представляет собой аминокислоту. Например, аминокислота может быть выбрана из группы, состоящей из аланина, валина, лейцина, изолейцина,

метионина, фенилаланина, тирозина и триптофана. В некоторых примерах осуществления аминокислота находится в D изоформе или L изоформе. В некоторых примерах осуществления аминокислота присутствует в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 3,0 мг/мл.

- 5 В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов жидкая композиция включает приблизительно одно поверхностно-активное вещество, которое необязательно представляет собой неионное поверхностно-активное вещество. В некоторых примерах осуществления неионное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от приблизительно 0,01% (об./об.) до приблизительно 5,0% (об./об.) или в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 3,0 мг/мл.

- 15 В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов ботулинический нейротоксин выбран из группы, состоящей из ботулинического нейротоксина типов A, B, C, D, E, F и G. В частности, ботулинический нейротоксин может представлять собой ботулинический нейротоксин типа A.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов pH жидкой композиции составляет от 6,6 до 6,9. В некоторых примерах осуществления pH может составлять 6,75 или приблизительно 6,75.

- 20 В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов молекулярная масса ботулинического нейротоксина составляет приблизительно 150 кДа.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов осмотическая концентрация жидкой композиции составляет от 270 мосмоль/кг до 310 мосмоль/кг.

- 25 В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов субъекту вводят от 1 до 100 единиц ботулинического токсина. В некоторых примерах осуществления субъекту вводят от 10 до 75 единиц ботулинического токсина. В некоторых примерах осуществления субъекту вводят от 25 до 75 единиц ботулинического токсина. В некоторых примерах осуществления субъекту вводят 30 10, 25, 30, 45, 50, 60, 75 или 90 единиц ботулинического токсина.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов жидкую композицию вводят посредством инъекции. Инъекция может представлять

собой, например, подкожную, чрескожную (трансдермальную), внутрикожную (интрадермальную) или внутримышечную инъекцию. В некоторых примерах осуществления субъекту вводят совокупность инъекций в межбровную область. В некоторых примерах осуществления соседние инъекции вводят на расстоянии друг от друга, составляющем от приблизительно 0,5 см до приблизительно 10 см. В некоторых примерах осуществления соседние инъекции вводят на расстоянии друг от друга, составляющем от приблизительно 1,5 см до приблизительно 3 см. В некоторых примерах осуществления инъекции вводят в мышцу гордецов и мышцы, сморщивающие бровь, находящиеся на одной или на обеих сторонах лица. В некоторых примерах осуществления инъекции сначала делают в мышцу гордецов, а затем в мышцы, сморщивающие бровь, находящиеся на одной или на обеих сторонах лица, перемещаясь от середины к периферии. В некоторых примерах осуществления все инъекции производят в область, расположенную приблизительно на 1 см выше верхнего глазничного валика, и внутри области, ограниченной линиями, проходящими через середину зрачков. В некоторых примерах осуществления все инъекции производят в область, расположенную приблизительно на 1 см выше центральной части надбровной дуги или остеоидной надбровной дуги. В некоторых примерах осуществления субъекту вводят совокупность инъекций в область, расположенную ниже латеральной спайки век (ниже наружного угла глаза), в наружную часть круговой мышцы глаза и/или на расстоянии от 1 см до 2 см от глазничного валика. В некоторых примерах осуществления субъекту дополнительно вводят совокупность инъекций в область ниже латеральной спайки век, в наружную часть круговой мышцы глаза и/или на расстоянии от 1 см до 2 см от глазничного валика.

В некоторых примерах осуществления любого из описанных выше способов для подавления (ингибирования) повторного проявления GL, LCL или их комбинации способ повторяют через определенные промежутки времени, составляющие от приблизительно 1 месяца до приблизительно 6 месяцев. В некоторых примерах осуществления для подавления такого повторного проявления способ повторяют через определенные промежутки времени, составляющие от приблизительно 3 месяцев до приблизительно 6 месяцев. В некоторых примерах осуществления для подавления такого повторного проявления способ повторяют через приблизительно 4 месяца.

Настоящее изобретение также относится к жидким композициям, включающим ботулинический нейротоксин, подходящим для применения в лечении

межбровных морщин и/или боковых периорбитальных морщин у субъекта, как описано в настоящей работе.

Настоящее изобретение также относится к применению жидких композиций, включающих ботулинический нейротоксин, в лечении межбровных морщин и/или боков периорбитальных морщин, как описано в настоящей работе.

Приведенное ниже подробное описание является иллюстративным и предлагаемым для лучшего разъяснения изобретения, но не является ограничивающим.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

10 На Фиг. 1 представлена демонстрация выраженности межбровных морщин (GL) согласно шкале, созданной Компанией Merz Aesthetic (англ. шкала Merz Aesthetic Scale, сокращенно "MAS"), в состоянии покоя и согласно шкале MAS для GL в динамике.

15 На Фиг. 2 представлена оценочная матрица выраженности межбровных морщин.

На Фиг. 3 представлена частота положительного ответа на лечение межбровных морщин субъектов с применением QM1114-DP с течением времени по оценке Исследователя в реальных условиях.

20 На Фиг. 4 представлен анализ по шкале общего эстетического улучшения (англ. Global Aesthetic Improvement Scale, сокращенно GAIS) межбровных морщин субъектов в исследовании лечения с применением QM1114-DP с течением времени.

На Фиг. 5 представлены результаты безопасности (нежелательные явления, связанные с лечением) лечения межбровных морщин с применением QM1114-DP.

25 На Фиг. 6 представлена оценочная матрица выраженности боковых периорбитальных морщин.

На Фиг. 7 представлена частота положительного ответа на лечение боковых периорбитальных морщин у субъектов с течением времени в исследовании лечения с применением QM1114-DP по оценке Исследователя в реальных условиях.

На Фиг. 8 представлен анализ по шкале общего эстетического улучшения (GAIS) боковых периорбитальных морщин субъектов в исследовании лечения с применением QM1114-DP с течением времени.

5 На Фиг. 9 представлены результаты безопасности (нежелательные явления, связанные с лечением) лечения боковых периорбитальных морщин с применением QM1114-DP.

На Фиг. 10 представлена частота положительного ответа с течением времени на лечение межбровных морщин по оценке Исследователя в реальных условиях.

10 На Фиг. 11 представлена частота положительного ответа с течением времени на лечение боковых периорбитальных морщин по оценке Исследователя в реальных условиях.

На Фиг. 12 представлен анализ по шкале общего эстетического улучшения (GAIS).

15 На Фиг. 13 представлен процент пациентов с комбинированным улучшением на 2 балла состояния межбровных морщин.

На Фиг. 14 представлена оценка межбровных морщин, данная Исследователем.

На Фиг. 15 представлен процент пациентов с комбинированным улучшением на 2 балла состояния боковых периорбитальных морщин.

20 На Фиг. 16 представлена оценка боковых периорбитальных морщин, данная Исследователем.

На Фиг. 17 представлена ферментативная активность, определяемая в анализе BoTest™.

25 На Фиг. 18 представлена удельная активность, определяемая способом BoTest™, нормализованная по BoNT-A согласно специфическому анализу ELISA (BOLISA™). На верхнем изображении представлены результаты однократного эксперимента по определению удельной активности, выраженной в единицах BoTest ед./ОБЕ (единицы/относительные ботулинические единицы). На нижнем изображении представлена величина, выраженная в ед./пикограмм.

На Фиг. 19 представлена относительная эффективность, полученная в клеточном анализе, нормализованная по концентрации BoNT-A.

5 На Фиг. 20 представлен препарат (QM-1114) с высокой степенью чистоты (более 98%), определяемой по основному пику СВЭЖХ-ГПХ (способ: сверхэффективная жидкостная хроматография – гель-проникающая хроматография).

10 На Фиг. 21 представлены результаты анализа SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, англ.: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), в котором не наблюдали обнаруживаемых загрязнений, и присутствовали лишь ожидаемые полосы BoNT-A1.

15 На Фиг. 22 представлен процент субъектов с положительным ответом на лечение LCL по комбинированной оценке Исследователя и Субъекта, выраженной как улучшение на 2 балла, по прошествии месяца 1 при самой широкой улыбке. У 26 субъектов, получавших QM-1114, и 4 субъектов, получавших плацебо, оценивание по прошествии месяца 1 проводили удаленно, и поэтому их не включали в данный анализ. CMH – критерий Кохрана – Мантеля – Хенселя (англ. Cochran-Mantel-Haenszel); ILA – оценка Исследователя в реальных условиях, от англ. “Investigator Live Assessment”; LCL – боковые периорбитальные морщины; SLA – личная оценка субъекта, от англ. “Subject Live Assessment”.

20 На Фиг. 23 представлен момент времени появления эффекта лечения. В частности, момент времени появления эффекта лечения LCL на основании данных из дневника субъекта.

На Фиг. 24 представлена частота положительного ответа на лечение, полученная на основании оценки Исследователя при самой широкой улыбке.

25 На Фиг. 25 представлена оцениваемая Исследователем при самой широкой улыбке частота положительного ответа на лечение, которая составила улучшение не менее 1 балла при оценке выраженности LC.

30 На Фиг. 26 показано время, в течение которого боковые периорбитальные морщины (LCL) возвращались к первоначальному состоянию после окончания лечения.

СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ  
ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Далее более подробно описаны примеры осуществления настоящего изобретения. Однако аспекты изобретения могут быть воплощены в различных формах и не должны рассматриваться лишь как аспекты, ограниченные описанными в настоящей работе примерами осуществления. Напротив, приведенные примеры осуществления даны для более полного и понятного описания изобретения и полностью раскрывают объем изобретения для специалистов в данной области техники. Терминология, применяемая в настоящем описании, использована лишь с  
10 целью рассмотрения конкретных примеров осуществления и не должна рассматриваться как ограничивающая.

Если из контекста явно не следует иное, то предполагается, что различные признаки способов, описанные в настоящей работе, могут быть применены в любой комбинации. Кроме того, также согласно изобретению, в некоторых примерах  
15 осуществления любой рассмотренный признак или комбинация рассмотренных признаков могут быть исключены или пропущены. Так, если в описании указано, что способ включает этапы А, В и С, то предполагается, что любой из этапов А, В или С или их комбинация могут быть исключены и пропущены, как по отдельности, так и в любой комбинации.

20 Если из контекста явно не следует иное, то все рассмотренные примеры осуществления, признаки и термины включают как приведенный пример осуществления, признак или термин, так и его биологические эквиваленты.

***I. Определения***

25 Употребляемые в настоящей работе формы единственного числа и указательные формы относятся как к единственному, так и к множественному числу, если явно не указано, что они обозначают только формы единственного числа.

Несмотря на то, что это не всегда явно указано, следует понимать, что всем числовым обозначениям предшествует термин “приблизительно”. Термин “приблизительно” означает, что рассматриваемое число не ограничено точной  
30 указанной цифрой и включает числа, по существу находящиеся в области приближения к указанному числу, но при этом не выходит за пределы объема изобретения. Употребляемый в настоящей работе термин “приблизительно” должен быть понятен специалистам в данной области техники и может до некоторой

степени изменяться в том контексте, в котором его употребляют. Если имеются области применения, в которых этот термин оказывается неясным для специалистов в данной области техники, учитывая контекст, в котором его употребляют, термин “приблизительно” означает плюс или минус 15%, 10%, 5%, 1%, или 0,1% от конкретной величины.

Также употребляемое в настоящей работе выражение “и/или” относится к и включает любые и все возможные комбинации одного или более связанных с ним перечисленных пунктов, а также отсутствие комбинаций, если выбрана альтернатива (“или”).

Употребляемые в настоящей работе термины “вводить”, “введение” или “введенный” относятся к (1) предоставлению, выдаче, дозированию и/или назначению, например, медицинским работником или его или ее уполномоченным представителем или под его/ее руководством, и (2) внесению внутрь, приему или потреблению, например, с помощью медицинского работника или самим субъектом.

Введение включает, без ограничений, пероральное, парентеральное введение (например, внутримышечное, внутривенное, интрацеребральное введение, интрацистернальную инъекцию или инфузию, подкожную инъекцию или через имплантат), введение через ингаляционный спрей, назальное, вагинальное, ректальное, подъязычное, уретральное введение (например, через уретральный суппозиторий) или топические виды введения (например, в виде геля, мази, крема, аэрозоля и т.д.), и препарат может быть получен, как таковой или совместно, в виде подходящих стандартных лекарственных форм, содержащих традиционные нетоксичные фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, наполнители и несущие среды, подходящие для каждого из путей введения. Изобретение не ограничено типом пути введения, композиции или режима дозирования. Фармацевтические композиции, описанные в настоящей работе, “вводят локально” (локальное или местное введение), то есть их вводят в участок или вблизи участка, в котором требуется достичь терапевтического результата или эффекта. Введение может быть односторонним или двусторонним, в зависимости от нужд конкретного пациента.

Употребляемые в настоящей работе термины “лечение” или “терапия” включают снижение или смягчение выраженности межбровных морщин (GL) и/или боковых периорбитальных морщин (LCL) или одного или более их симптомов, независимо от того, считаются ли GL или LCL “вылеченными” или “устраненными”, и

независимо от того, считаются ли все симптомы исчезнувшими. Этот термин также включает уменьшение или предотвращение прогрессирования GL, LCL и/или одного или более их симптомов и достижение любого терапевтического и/или профилактического полезного эффекта.

5 Термин “ботулинический токсин” (“ботулотоксин”) означает ботулинический нейротоксин типа А, В, С, D, Е, F или G либо в виде чистого токсина (т.е. нейротоксичный компонент с молекулярной массой приблизительно 150 килоДальтон), либо в виде комплекса ботулотоксина (с молекулярной массой от  
10 приблизительно 300 до приблизительно 900 килоДальтон), включающего рекомбинантные, химерные, гибридные, перепрограммированные ботулинические нейротоксины и ботулинические нейротоксины с модифицированной последовательностью аминокислот, но исключая ботулотоксины, которые не являются нейротоксинами, такие как цитотоксичные ботулотоксины С<sub>2</sub> и С<sub>3</sub>.

15 “Локальное (местное) введение” означает введение (т.е. посредством подкожного, внутримышечного, внутрикожного введения, введения под кожу/шкуру, введения внутрь органа, например, инъекцией в стенку мочевого пузыря или в тело простаты, или чрескожного введения) фармацевтического агента в или вблизи целевой ткани, мышцы или подкожного участка несистемным путем. Таким образом, локальное введение исключает системные пути введения (т.е. в кровеносную  
20 систему), такие как внутривенное или пероральное введение. Периферическое введение означает введение в периферию (т.е. в участок на или в лице, конечности, туловище или голове пациента), в отличие от введения во внутренний орган или кишечник (т.е. во внутренности).

25 “Фармацевтическая композиция” означает препарат, в котором активным ингредиентом (активным агентом) может быть *ботулинический* нейротоксин. Термин “препарат” означает, что, кроме активного агента, фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один дополнительный ингредиент. Таким образом, фармацевтическая композиция – это препарат, подходящий для косметического, диагностического или терапевтического введения (т.е. посредством  
30 подкожной или внутримышечной инъекции) субъекту, такому как пациент-человек.

“Эффективным количеством” является количество, достаточное для достижения благоприятных или требуемых результатов, таких как уменьшение, смягчение или разглаживание межбровных морщин и/или боковых периорбитальных морщин. Эффективное количество согласно изобретению также включает

количество, достаточное для предотвращения усиления образования межбровных морщин или боковых периорбитальных морщин или для уменьшения уже образовавшихся межбровных морщин. Таким образом, точное “эффективное количество” не может быть установлено. Эффективное количество может быть  
5 введено за одно или более введений, нанесений или дозировок. Доставка агента зависит от ряда переменных величин, которые включают период времени, в течение которого применяют индивидуальную стандартную лекарственную форму, участок введения агента, выраженность межбровных морщин, путь введения и т.д. Однако следует понимать, что конкретные дозировки терапевтических агентов согласно  
10 настоящему изобретению для любого конкретного субъекта зависят от ряда различных факторов, которые включают активность конкретного применяемого соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету субъекта, момент введения, скорость выведения из организма, комбинацию лекарственных средств и тяжесть конкретного подвергаемого лечению нарушения и форму  
15 введения. Для оптимизации безопасности и эффективности, терапевтические дозировки могут быть оттитрованы. Дозировка может быть определена врачом и отрегулирована, в зависимости от необходимости, для соответствия наблюдаемого эффекта от лечения. Предпочтительно, введение эффективного количества не приводит к возникновению побочных явлений (например, опущения верхнего века).

## 20 ***II. Жидкая композиция, содержащая BoNT***

Изобретение относится к жидким композициям, включающим ботулинический нейротоксин (BoNT) и буфер, которые подходят для хранения в жидком виде и для  
лечения межбровных морщин без дополнительного восстановления или смешивания. Другими словами, описанные жидкие композиции “готовы к  
25 использованию” и в отличие от других содержащих BoNT продуктов, коммерчески доступных в настоящее время, не требуют какого-либо специального приготовления. Таким образом, жидкую композицию согласно настоящему изобретению можно сравнить с альтернативным продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин, который хранят в сухом виде (например, в виде  
30 лиофилизированного порошка) и который требует восстановления для введения субъекту.

Ботулинический нейротоксин (BoNT) представляет собой белковый димер массой 150 килоДальтон (кДа), состоящий из тяжелой цепи с массой 100 кДа и легкой цепи с массой 50 кДа. Эти две цепи соединены дисульфидной связью,

формируемой двумя цистеиновыми остатками. Легкая цепь представляет собой фермент, который разрезает синаптосомально-ассоциированный белок массой 25 кДа (SNAP-25). Тяжелая цепь опосредует связывание и интернализацию белка токсина. В отличие от других коммерчески доступных BoNT, ботулинический нейротоксин в виде жидкой композиции согласно изобретению (один из примеров осуществления которой в настоящей работе далее обозначается QM1114) стабилен в жидком виде и не требует восстановления или смешивания перед использованием. В некоторых примерах осуществления BoNT в составе жидкой композиции представляет собой ботулинический нейротоксин типа А (BoNT-A1). Как указано в разделе "Примеры", неограничивающий пример осуществления жидкой композиции согласно изобретению, прошедший клинические испытания на людях, был обозначен как QM1114 (или QM1114-DP). Таким образом, QM1114 является неограничивающим примером осуществления жидкой композиции согласно изобретению, которая более подробно рассмотрена ниже с описанием включаемых вспомогательных веществ и соответствующих свойств.

Кроме того, для целей настоящего изобретения жидкая композиция (например, QM1114) не содержит вспомогательных веществ, полученных из организма человека или животного, и такой препарат может быть изготовлен способом, полностью исключаящим добавление животного материала, с высокой степенью чистоты с применением фильтрования и/или хроматографии. Способ может не включать этапы осаждения или лиофилизации. Препарат может иметь нейтральный или практически нейтральный pH (например, pH, составляющий 6,5, 6,6, 6,7, 6,75, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5). В некоторых примерах осуществления pH может составлять приблизительно 6,75.

Жидкая композиция (например, QM1114) имеет удельную активность, сравнимую с активностью конкурентных продуктов или еще более высокую. Удельной активностью можно назвать активность определенного количества токсина, и она может быть рассчитана делением измеренной активности (например, измеренной в клеточном анализе эффективности или в анализе BOTEST™) на количество фермента, присутствующего во время измерения активности (например, способом BOLISA®). Например, удельная активность BoNT может составлять приблизительно  $1,5 \times 10^8$ , приблизительно  $1,6 \times 10^8$ , приблизительно  $1,7 \times 10^8$ , приблизительно  $1,8 \times 10^8$ , приблизительно  $1,9 \times 10^8$ , приблизительно  $2,0 \times 10^8$ , приблизительно  $2,1 \times 10^8$ , приблизительно  $2,2 \times 10^8$ , приблизительно  $2,3 \times 10^8$ , приблизительно  $2,4 \times 10^8$  или приблизительно  $2,5 \times 10^8$  ед./мг общего белка или более,

где удельную активность (ед./мг) вычисляют делением эффективности LD50, определенной для мышей и выраженной в ед./мл, на общее количество белка, которое определяют микроанализом с бицинхониновой кислотой (мг/мл). В некоторых примерах осуществления удельная активность может составлять

5 приблизительно  $2,0 \times 10^8$  ед./мг общего белка. В некоторых примерах осуществления жидкая композиция согласно изобретению (например, QM1114) имеет более высокую удельную активность, чем другие клинические препараты, содержащие BoNT, такие как Botox Cosmetic<sup>®</sup>, Xeomin<sup>®</sup> и Jeuveau<sup>®</sup>. В некоторых примерах осуществления жидкая композиция согласно изобретению (например, QM1114)

10 имеет более высокую удельную активность, чем другие клинические препараты, содержащие BoNT, которые хранят в сухом виде (например, в виде лиофилизированного порошка) и которые требуют восстановления для введения субъекту.

Жидкая композиция (например, QM1114) может включать буфер, который

15 включает ионы натрия, хлорид-ионы и/или фосфат-ионы. Добавление таких ионов обычно производят добавлением буферных солей. В некоторых примерах осуществления препарат может включать фосфатно-солевой буфер, и в некоторых примерах осуществления может не содержать вспомогательные вещества, полученные из организма человека или животного.

20 Например, жидкая композиция (например, QM1114) может включать по меньшей мере один источник хлорид-ионов, такой как хлорид натрия, хлорид калия или другой источник хлорид-ионов, в концентрации, составляющей от приблизительно 100 до приблизительно 300 мМ, такой как 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или 300 мМ,

25 или в концентрации, составляющей от приблизительно 1 до приблизительно 25 мМ, такой как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 мМ. В некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114) может включать более одного источника хлорид-ионов в одинаковых или в различных концентрациях, например, хлорид натрия или другой источник ионов

30 натрия или хлорид-ионов в концентрации, составляющей от приблизительно 100 до приблизительно 300 мМ, такой как 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или 300 мМ, и хлорид калия или другой источник хлорид-ионов в концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 25 мМ, такой как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

35 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 мМ. В некоторых примерах осуществления один или

более источников ионов натрия/хлорид-ионов могут присутствовать в одинаковых или в различных концентрациях, составляющих приблизительно от 0,1 до 10 мг/мл, таких как 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10 мг/мл или составляющих любое значение в промежутке между указанными величинами.

10 Дополнительно или в альтернативном случае жидкая композиция (например, QM1114) может включать по меньшей мере один источник фосфат-ионов, такой как фосфат натрия, фосфат калия, дигидрат гидрофосфата динатрия, дигидрат дигидрофосфата натрия или другой источник фосфат-ионов, в концентрации, составляющей от приблизительно 1 до приблизительно 50 мМ или от 15 приблизительно 5 до приблизительно 15 мМ, такой как 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, или 50 мМ. В некоторых примерах осуществления жидкая композиция может включать более одного источника фосфат-ионов в одинаковых или в различных концентрациях, например, фосфат натрия, фосфат калия, дигидрат гидрофосфата динатрия, дигидрат дигидрофосфата натрия или другой источник фосфат-ионов, в концентрации, составляющей от приблизительно 1 до приблизительно 50 мМ или от 15 приблизительно 5 до приблизительно 15 мМ, такой как 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мМ, и другой источник фосфат-ионов, выбранный из фосфата натрия, фосфата калия, дигидрат гидрофосфата динатрия, дигидрат дигидрофосфата натрия или другого источника фосфат-ионов в концентрации, составляющей от 25 приблизительно 1 до приблизительно 50 мМ или приблизительно от 5 до приблизительно 15 мМ, такой как 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мМ. В некоторых примерах осуществления один или более источников фосфат-ионов могут присутствовать в одинаковых или в различных концентрациях, составляющих приблизительно от 0,1 до 1,0 мг/мл, таких как 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг/мл или составляющих любое значение в промежутке между указанными величинами.

35 В некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114) может включать от 1 до 5 или более буферных агентов. Таким образом, жидкая композиция (например, QM1114) может включать 1, 2, 3, 4 или 5 или более буферных агентов, примеры которых включают, без ограничений, хлорид натрия,

хлорид калия, фосфат натрия, фосфат калия, дигидрат гидрофосфата динатрия или дигидрат дигидрофосфата натрия. Буферные агенты в количестве 1, 2, 3, 4 или 5 или более могут присутствовать в одинаковых или в различных концентрациях. Например, в некоторых примерах осуществления первый буферный агент

5 (например, хлорид натрия, хлорид калия, фосфат натрия, фосфат калия, дигидрат гидрофосфата динатрия или дигидрат дигидрофосфата натрия) может присутствовать в концентрации, составляющей от приблизительно 100 до приблизительно 300 мМ, такой как 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или 300 мМ, или в концентрации,

10 составляющей приблизительно от 0,1 до 10 мг/мл, такой как 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6,

15 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10 мг/мл, или составляющей любое значение в промежутке между указанными величинами. В некоторых примерах осуществления второй буферный агент (например, хлорид натрия, хлорид калия, фосфат натрия, фосфат калия, дигидрат гидрофосфата динатрия или дигидрат дигидрофосфата натрия) может присутствовать в

20 концентрации, составляющей от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ, такой как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 мМ, или в концентрации, составляющей приблизительно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл, такой как 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг/мл, или составляющей любое значение в промежутке между указанными величинами. В

25 некоторых примерах осуществления третий буферный агент (например, хлорид натрия, хлорид калия, фосфат натрия, фосфат калия, дигидрат гидрофосфата динатрия или дигидрат дигидрофосфата натрия) может присутствовать в концентрации, составляющей от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ, такой как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,

30 25 мМ, или в концентрации, составляющей приблизительно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл, такой как 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг/мл, или составляющей любое значение в промежутке между указанными величинами. В некоторых примерах осуществления четвертый буферный агент (например, хлорид натрия, хлорид калия, фосфат натрия, фосфат калия, дигидрат гидрофосфата динатрия или дигидрат дигидрофосфата натрия) может присутствовать в

35 концентрации, составляющей от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ,

такой как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 мМ, или в концентрации, составляющей приблизительно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл, такой как 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг/мл, или составляющих любое значение в промежутке между указанными величинами. В  
5 некоторых примерах осуществления пятой буферный агент (например, хлорид натрия, хлорид калия, фосфат натрия, фосфат калия, дигидрат гидрофосфата динатрия или дигидрат дигидрофосфата натрия) может присутствовать в концентрации, составляющей от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ, такой как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,  
10 25 мМ, или в концентрации, составляющей приблизительно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл, такой как 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг/мл, или составляющей любое значение в промежутке между указанными величинами.

Для повышения стабильности или улучшения других свойств композиции, в жидкую композицию также могут быть включены другие компоненты. Например,  
15 подходящие для применения стабилизаторы могут включать, без ограничений, аминокислоты (например, аланин, валин, лейцин, серин, треонин, лизин, гистидин, триптофан, аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту), гидросульфит натрия, цитрат натрия или другие цитраты и т.д. В некоторых примерах осуществления аминокислота может представлять собой аминокислоту с  
20 гидрофобной боковой цепью (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, тирозин и триптофан). В некоторых примерах осуществления аминокислота может быть в D изоформе, и в некоторых примерах осуществления аминокислота может быть в L изоформе. Таким образом, в некоторых примерах осуществления жидкая композиция может включать по  
25 меньшей мере одну D- или L-аминокислоту (например, аланин, валин, лейцин, серин, треонин, лизин, гистидин, триптофан, аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту) в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 до приблизительно 3,0 мг/мл, от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,5 мг/мл или от приблизительно 0,75 до приблизительно 2,25 мг/мл. В некоторых примерах  
30 осуществления жидкая композиция может включать по меньшей мере одну D- или L-аминокислоту (например, аланин, валин, лейцин, серин, треонин, лизин, гистидин, триптофан, аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту) в концентрации, составляющей 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3,0 мг/мл или  
35 составляющей любое значение в промежутке между указанными величинами. В

некоторых примерах осуществления жидкая композиция может включать по меньшей мере одну D- или L-аминокислоту (например, аланин, валин, лейцин, серин, треонин, лизин, гистидин, триптофан, аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту) в концентрации, составляющей приблизительно 0,1, 5 приблизительно 0,2, приблизительно 0,3, приблизительно 0,4, приблизительно 0,5, приблизительно 0,6, приблизительно 0,7, приблизительно 0,8, приблизительно 0,9, приблизительно 1,0, приблизительно 1,1, приблизительно 1,2, приблизительно 1,3, приблизительно 1,4, приблизительно 1,5, приблизительно 1,6, приблизительно 1,7, приблизительно 1,8, приблизительно 1,9, приблизительно 2,0, приблизительно 2,1, 10 приблизительно 2,2, приблизительно 2,3, приблизительно 2,4, приблизительно 2,5, приблизительно 2,6, приблизительно 2,7, приблизительно 2,8, приблизительно 2,9 или приблизительно 3,0 мг/мл или составляющей любое значение в промежутке между указанными величинами.

В некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, 15 QM1114) может дополнительно включать одно или более поверхностно-активных веществ (например, неионных поверхностно-активных веществ, таких как полисорбат (например, полисорбат 80 или полисорбат 20) или ноноксинолы; анионных поверхностно-активных веществ, таких как докузат; или катионных поверхностно-активных веществ, таких как четвертичные аммонийные соли). Таким 20 образом, в некоторых примерах осуществления жидкая композиция может включать неионное поверхностно-активное вещество, примеры которого включают, без ограничений, полисорбат (например, полисорбат 80 или полисорбат 20) или ноноксинол. В некоторых примерах осуществления жидкая композиция может включать анионное поверхностно-активное вещество, примеры которого включают, 25 без ограничений, докузат. В некоторых примерах осуществления жидкая композиция может включать катионное поверхностно-активное вещество, примеры которого включают, без ограничений, четвертичную аммонийную соль. В некоторых примерах осуществления поверхностно-активное вещество может присутствовать в концентрации, составляющей от приблизительно 0,01% (об./об.) до приблизительно 30 5,0% (об./об.), от приблизительно 0,05% (об./об.) до приблизительно 2,5% (об./об.) или от приблизительно 0,1% (об./об.) до приблизительно 1,5% (об./об.). В некоторых примерах осуществления по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество может присутствовать в концентрации, составляющей 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 35 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5,

3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0% (об./об.) или составляющей любое значение в промежутке между указанными величинами. В некоторых примерах осуществления по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество может присутствовать в концентрации, составляющей приблизительно

5 0,01, приблизительно 0,02, приблизительно 0,03, приблизительно 0,04, приблизительно 0,05, приблизительно 0,06, приблизительно 0,07, приблизительно 0,08, приблизительно 0,09, приблизительно 0,1, приблизительно 0,2, приблизительно 0,3, приблизительно 0,4, приблизительно 0,5, приблизительно 0,6, приблизительно 0,7, приблизительно 0,8, приблизительно 0,9, приблизительно 1,0,

10 приблизительно 1,1, приблизительно 1,2, приблизительно 1,3, приблизительно 1,4, приблизительно 1,5, приблизительно 1,6, приблизительно 1,7, приблизительно 1,8, приблизительно 1,9, приблизительно 2,0, приблизительно 2,1, приблизительно 2,2, приблизительно 2,3, приблизительно 2,4, приблизительно 2,5, приблизительно 2,6, приблизительно 2,7, приблизительно 2,8, приблизительно 2,9, приблизительно 3,0,

15 приблизительно 3,1, приблизительно 3,2, приблизительно 3,3, приблизительно 3,4, приблизительно 3,5, приблизительно 3,6, приблизительно 3,7, приблизительно 3,8, приблизительно 3,9, приблизительно 4,0, приблизительно 4,1, приблизительно 4,2, приблизительно 4,3, приблизительно 4,4, приблизительно 4,5, приблизительно 4,6, приблизительно 4,7, приблизительно 4,8, приблизительно 4,9 или приблизительно

20 5,0% (об./об.) или составляющей любое значение в промежутке между указанными величинами. В некоторых примерах осуществления жидкая композиция может включать по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество в концентрации, составляющей 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3,0 мг/мл или

25 составляющей любое значение в промежутке между указанными величинами. В некоторых примерах осуществления жидкая композиция может включать по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество в концентрации, составляющей приблизительно 0,1, приблизительно 0,2, приблизительно 0,3, приблизительно 0,4, приблизительно 0,5, приблизительно 0,6, приблизительно 0,7,

30 приблизительно 0,8, приблизительно 0,9, приблизительно 1,0, приблизительно 1,1, приблизительно 1,2, приблизительно 1,3, приблизительно 1,4, приблизительно 1,5, приблизительно 1,6, приблизительно 1,7, приблизительно 1,8, приблизительно 1,9, приблизительно 2,0, приблизительно 2,1, приблизительно 2,2, приблизительно 2,3, приблизительно 2,4, приблизительно 2,5, приблизительно 2,6, приблизительно 2,7,

35 приблизительно 2,8, приблизительно 2,9 или приблизительно 3,0 мг/мл или составляющей любое значение в промежутке между указанными величинами.

В некоторых примерах осуществления жидкая композиция может дополнительно включать один или более эмульгаторов (например, соевый лецитин), смачивающих агентов, наполнителей (лактозу, маннит, глюкозу, микрокристаллическую целлюлозу, коллоидный оксид кремния, крахмал и т.д.), связующие вещества (гидроксипропилцеллюлозу, поливинилпирролидон, метасиликат-алюминат магния и т.д.), дезинтегрирующий агент (крахмал, L-гидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, натрий-кроскармеллозу, целлюлозу-гликолят кальция и т.д.), скользящие вещества (стеарат магния и т.д.), агенты, вызывающие набухание (гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, карбопол, карбоксиметилцеллюлозу, поливиниловый спирт, ксантановую камедь и гуаровую камедь и т.д.), вспомогательные средства, вызывающие набухание (глюкозу, фруктозу, маннит, ксилит, эритрит, мальтозу, трегалозу, соли фосфаты, цитраты, силикаты, глицин, глутамат, аргинин и т.д.) и/или солюбилизующие агенты (полиэтиленгликоль, пропиленгликоль и т.д.).

В некоторых примерах осуществления жидкая композиция может включать от 1 до 5 или более буферных агентов (например, хлорид натрия, хлорид калия, фосфат натрия, фосфат калия, дигидрат гидрофосфата динатрия или дигидрат дигидрофосфата натрия); один или более стабилизаторов (например, аланин, валин, лейцин, серин, треонин, лизин, гистидин, триптофан, аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту); и одно или более поверхностно-активных веществ (например, неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат (например, полисорбат 80 или полисорбат 20) или ноноксинолы; анионные поверхностно-активные вещества, такие как докузат; или катионные поверхностно-активные вещества, такие как четвертичные аммонийные соли). В некоторых примерах осуществления жидкая композиция может включать: (i) первый буферный агент (например, хлорид натрия, хлорид калия, фосфат натрия, фосфат калия, дигидрат гидрофосфата динатрия или дигидрат дигидрофосфата натрия) в концентрации, составляющей от приблизительно 100 до приблизительно 300 мМ, или в концентрации, составляющей приблизительно от 0,1 до 10 мг/мл; (ii) второй буферный агент (например, хлорид натрия, хлорид калия, фосфат натрия, фосфат калия, дигидрат гидрофосфата динатрия или дигидрат дигидрофосфата натрия) в концентрации, составляющей от приблизительно 1 до приблизительно 25 мМ, или в концентрации, составляющей приблизительно от 0,1 до 1,0 мг/мл; (iii) третий буферный агент (например, хлорид натрия, хлорид калия, фосфат натрия, фосфат

калия, дигидрат гидрофосфата динатрия или дигидрат дигидрофосфата натрия) в концентрации, составляющей от приблизительно 1 до приблизительно 25 мМ, или в концентрации, составляющей приблизительно от 0,1 до 1,0 мг/мл; (iv) четвертый буферный агент (например, хлорид натрия, хлорид калия, фосфат натрия, фосфат калия, дигидрат гидрофосфата динатрия или дигидрат дигидрофосфата натрия) в концентрации, составляющей от приблизительно 1 до приблизительно 25 мМ, или в концентрации, составляющей приблизительно от 0,1 до 1,0 мг/мл; (v) один или более стабилизаторов (например, аланин, валин, лейцин, серин, треонин, лизин, гистидин, триптофан, аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту) в концентрации, составляющей приблизительно 0,1 до приблизительно 3,0 мг/мл; и (vi) одно или более поверхностно-активных веществ (например, неионных поверхностно-активных веществ, таких как полисорбат (например, полисорбат 80 или полисорбат 20) или ноноксинолы; анионных поверхностно-активных веществ, таких как докузат; или катионных поверхностно-активных веществ, таких как четвертичные аммонийные соли) в концентрации, составляющей от приблизительно 0,05% (об./об.) до приблизительно 2,5% (об./об.), или в концентрации, составляющей от приблизительно 0,1 до приблизительно 3,0 мг/мл. В некоторых примерах осуществления стабилизатор может представлять собой аминокислоту, и в некоторых примерах осуществления поверхностно-активное вещество может быть неионным поверхностно-активным веществом, таким как полисорбат. Следует понимать, что для целей настоящего изобретения лекарственный продукт QM1114 (в настоящей работе также называемый "QM1114-DP" или просто "QM1114") может включать любой из описанных выше примеров осуществления или любой из описанных далее примеров осуществления.

Величина pH жидкой композиции (например, QM1114) может составлять от 5,5 до 8. В некоторых примерах осуществления pH составляет от 6,0 до 7,5, например, 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. В некоторых примерах осуществления pH составляет от 6,6 до 6,9. Жидкая композиция предпочтительно включает водный разбавитель, более предпочтительно воду, например, стерильную воду, воду для инъекций, очищенную воду и стерильную воду для инъекций.

Для получения жидкого препарата, содержащего VoNT, который стабилен при хранении, в жидкую композицию могут быть включены (например, наряду с VoNT) следующие компоненты:

a. источник хлорид-ионов, выбранный из NaCl в концентрации от 100 мМ до 300 мМ и KCl в концентрации от 1 мМ до 25 мМ;

5 b. более одного источника фосфат-ионов, выбранного из фосфата натрия, фосфата калия, дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия, в концентрации от 1 мМ до 50 мМ;

c. неионное поверхностно-активное вещество в концентрации от 0,01% (об./об.) до 5% (об./об.); и

10 d. аминокислотный стабилизатор, выбранный из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, фенилаланина, тирозина и триптофана, в концентрации от 0,1 мг/мл до 3 мг/мл.

Жидкая композиция согласно изобретению может включать аминокислоту, которая представляет собой триптофан и/или тирозин. Не прибегая к какой-либо теории, можно предположить, что триптофан и/или тирозин могут предотвращать окисление активного белка, которое делает белок нефункционирующим. Действительно, полагают, что при добавлении аминокислоты в молярном избытке относительно количества нейротоксина в первую очередь будет окисляться аминокислота, а нейротоксин останется незатронутым. Также можно предположить, что триптофан или тирозин могут нейтрализовать реакционноспособные продукты разложения поверхностно-активных веществ, таких как полисорбаты. Предпочтительно, аминокислота представляет собой триптофан. Более предпочтительно, аминокислота представляет собой L-триптофан.

Концентрация аминокислоты может составлять от приблизительно 0,1 до 5 мг/мл, например, 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. Предпочтительно, концентрация аминокислоты (например, триптофана и/или тирозина) составляет более 0,5 мг/мл. Например, нижний предел концентрации аминокислоты может составлять более 0,5 мг/мл, и верхний предел концентрации аминокислоты может составлять 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 мг/мл. Предпочтительно, концентрация более 5 мг/мл может представлять собой минимальную концентрацию аминокислоты, при превышении которой стабилизирующее воздействие может быть особенно выраженным. См. раздел "Примеры" документа WO 2017/203038A1, содержание которого включено в настоящую работу посредством ссылки.

Жидкая композиция может быть стабильна в течение периода времени. Например, жидкая композиция может быть стабильна в течение 2 месяцев при температуре от 2°C до 8°C. Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция стабильна в течение 3 месяцев при температуре от 2°C до 8°C, например, при 5°C. Согласно одному из предпочтительных примеров осуществления, жидкая композиция стабильна в течение 6 месяцев при температуре от 2°C до 8°C, например, при 5°C. Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция стабильна в течение 12 месяцев при температуре от 2°C до 8°C, например, при 5°C. Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция стабильна в течение 18 месяцев при температуре от 2°C до 8°C, например, при 5°C. Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция стабильна в течение 24 месяцев при температуре от 2°C до 8°C, например, при 5°C. Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция стабильна в течение 36 месяцев при температуре от 2°C до 8°C, например, при 5°C. Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция стабильна в течение 3 месяцев при комнатной температуре, например, при 25°C. Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция стабильна в течение 6 месяцев при комнатной температуре, например, при от 25°C. Согласно одному из примеров осуществления, композиция стабильна в течение 2 месяцев при температуре 37°C.

Стабильность можно оценить посредством сравнения активности ботулинического нейротоксина в течение времени. Активностью ботулинического нейротоксина можно назвать способность ботулинического нейротоксина связываться с целевым рецептором, находящимся на клетке, транслоцировать в клетку легкую цепь и/или расщеплять целевой белок SNARE. Способы измерения активности ботулинического нейротоксина хорошо известны в данной области техники. Активность ботулинического нейротоксина может быть определена, например, в анализе летальности мышей (LD50), как описано выше, в анализе мышечной ткани, таком как анализ диафрагмального нерва купола диафрагмы у мышей (например, как описано в публикации Bigalke H., Rummel A., Toxins 7,12 (201S):489S-490S), в клеточном анализе (например, как описано в документах WO 201349508 или WO 2012166943) или в анализе внеклеточной протеолитической активности, таком как BoTest® (Набор для обнаружения ботулинического нейротоксина, поставляемый BioSentinel Inc.).

Предпочтительно, композиция согласно изобретению считается стабильной, если при выдерживании в течение заданного периода времени при заданной температуре снижение активности не превышает заданного значения, выраженного в процентах.

5 Согласно одному из примеров осуществления, композиция согласно изобретению считается стабильной, если снижение внеклеточной протеолитической активности при выдерживании в течение 3, 6, 12, 18, 24 или 36 месяцев при температуре от 2 до 8°C составляет не более 30%, например, снижение внеклеточной протеолитической активности в течение 6 месяцев при выдерживании  
10 при температуре 5°C составляет не более 30%. Предпочтительно, композиция согласно изобретению считается стабильной, если снижение внеклеточной протеолитической активности в течение 3 месяцев при выдерживании при температуре 5°C, более предпочтительно, при выдерживании в течение 6, 12, 18, 24 или 36 месяцев при температуре 5°C составляет не более 20%. Согласно другому  
15 примеру осуществления, композиция согласно изобретению считается стабильной, если снижение внеклеточной протеолитической активности при выдерживании в течение 3 месяцев при комнатной температуре, например, при 25°C, составляет не более 40%. Предпочтительно, композиция согласно изобретению считается стабильной, если снижение внеклеточной протеолитической активности при  
20 выдерживании в течение 3 месяцев при температуре 25°C, более предпочтительно в течение 6 месяцев при температуре 25°C, составляет не более 30%. Согласно другому примеру осуществления, композиция согласно изобретению считается стабильной, если снижение внеклеточной протеолитической активности при выдерживании в течение 2 месяцев при температуре 37°C, составляет не более  
25 50%. Внеклеточная протеолитическая активность может быть определена анализом BoTest®.

Согласно одному из примеров осуществления, композиция согласно изобретению считается стабильной, если снижение в единицах MLD50 (сокращенно от англ. "mouse lethal dose 50", то есть "летальная доза, приводящая к гибели 50%  
30 испытуемых мышей") при выдерживании в течение 2, 3, 6, 12, 18, 24 или 36 месяцев при температуре от 2 до 8°C составляет не более 30%, например, снижение в единицах MLD50 при выдерживании в течение 6 месяцев при температуре 5°C составляет не более 30%. Предпочтительно, композиция согласно изобретению считается стабильной, если снижение в единицах MLD50 при выдерживании в  
35 течение 2 месяцев при температуре 5°C, более предпочтительно при выдерживании

в течение 3, 6, 12, 18, 24 или 36 месяцев при температуре 5°C составляет не более 20%. Согласно другому примеру осуществления, композиция согласно изобретению считается стабильной, если снижение в единицах MLD50 при выдерживании в течение 2 или 3 месяцев при комнатной температуре, например, при 25°C, составляет не более 40%. Предпочтительно, композиция согласно изобретению считается стабильной, если снижение в единицах MLD50 при выдерживании в течение 3 месяцев при температуре 25°C, более предпочтительно в течение 6 месяцев при температуре 25°C составляет не более 30%. Согласно другому примеру осуществления, композиция согласно изобретению считается стабильной, если снижение в единицах MLD50 при выдерживании в течение 2 месяцев при температуре 37°C составляет не более 50%. Единицы MLD50 могут быть вычислены, как указано выше.

Жидкая композиция может быть пригодна для введения в виде инъекций пациенту, в частности, пациенту-человеку. Количество ботулинического нейротоксина обычно выражают в единицах летальной дозы LD50 для мышей, определяемой как средняя летальная доза для мышей при интраперитонеальном введении. Единица LD50 для мышей (англ. mouse lethal dose 50, сокращенно MLD50) для ботулотоксина не является стандартизированной единицей. Действительно, исследования, проводимые разными изготовителями поставляемых на рынок токсинов, различаются, в частности, выбором буфера разбавления. Например, в исследовании BOTOX® в качестве разбавителя применяли солевой раствор. Полагают, что желатиновые буферы защищают токсин при высоких степенях разбавления, используемых при определении LD50. Напротив, предполагается, что применение в качестве разбавителя солевого раствора приводит к некоторой потере активности.

В некоторых примерах осуществления буфер разбавления, применяемый для определения LD50 для мышей, представляет собой желатино-фосфатный буфер. Например, LD50 для мышей может быть определена, как описано в публикации Hambleton, P. с соавт. "Production, purification and toxoiding of Clostridium botulinum type A toxin (Получение, очистка и превращение в токсид обезвреженного токсина Clostridium Botulinum типа A)", изд. G. E. Jr Lewis, P. S. Angel. Academic Press, Inc., New York, USA, 1981, стр. 248. Вкратце, образцы ботулотоксина последовательно разбавляют в 0,2% (масс./об.) желатинового буфера, содержащего 0,07M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, с pH 6,5. Группам мышей (например, содержащим от 4 до 8 мышей в группе) с массой тела приблизительно 20 г интраперитонеально

5 вводят образец разбавленного токсина (например, 0,5 мл одному животному). Для определения дозы 50% летальности выбирают группы разбавления, например, 5 групп разбавления. За мышами наблюдают в течение периода, составляющего до 72 часов, и оценивают летальную дозу, приводящую к гибели 50% испытуемых мышей (MLD50).

10 Жидкая композиция согласно изобретению предпочтительно включает от 4 до 10000 единиц LD50 ботулинического нейротоксина на 1 мл, более предпочтительно от 10 до 200 единиц LD50 ботулинического нейротоксина на 1 мл, например, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200 единиц LD50 ботулинического нейротоксина на 1 мл. Количество ботулинического нейротоксина также может быть выражено в нг (нанограммах).

15 Жидкая композиция согласно настоящему изобретению имеет осмотическую концентрацию, составляющую от 200 до 400 мосмоль/кг, предпочтительно от 270 до 310 мосмоль/кг, например, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305 или 310 мосмоль/кг или составляющую любое значение в промежутке между указанными величинами.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- 20 - от 4 до 10000 LD50 единиц ботулинического нейротоксина в 1 мл,
- от 0,001 до 15% об./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,
- 25 имеет pH в диапазоне от 5,5 до 8 и является стабильной при выдерживании в течение 2 месяцев (например, 6 месяцев) при 5°C.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- 30 - от 4 до 10000 LD50 единиц ботулинического нейротоксина в 1 мл,
- от 0,001 до 15% об./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 дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия  
имеет рН в диапазоне от 5,5 до 8 и стабильна в течение 2 месяцев (например, 6 месяцев) при выдерживании при 5°C.

5 Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- от 10 до 2000 LD50 единиц ботулинического нейротоксина в 1 мл,
- от 0,005 до 2% об./об. полисорбата,
- от 0,1 до 5 мг/мл триптофана,

10 - от 25 до 300 мМ NaCl,  
- от 1 до 10 мМ KCl,  
- от 2 до 50 мМ фосфата натрия,

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

15 Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- от 10 до 2000 LD50 единиц ботулинического нейротоксина в 1 мл,
- от 0,005 до 2% об./об. полисорбата,
- от 0,1 до 5 мг/мл триптофана,

20 - от 25 до 300 мМ NaCl,  
- от 1 до 10 мМ KCl,  
- от 2 до 50 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия,

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

25

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- от 10 до 2000 LD50 единиц ботулинического нейротоксина в 1 мл,
- от 0,05 до 0,2% об./об. полисорбата 80,

30 - 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 рН в диапазоне от 6,0 и 7,5 и стабильна в течение 12 месяцев при температуре 5°C.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- 5
  - от 10 до 2000 LD50 единиц ботулинического нейротоксина в 1 мл,
  - от 0,05 до 0,2% об./об. полисорбата 80,
  - от 0,1 до 5 мг/мл триптофана,
  - от 25 до 300 мМ NaCl,
  - от 1 до 10 мМ KCl,
- 10
  - от 2 до 50 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия,

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

- Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:
- 15
    - ботулинического нейротоксина А,
    - 0,2% об./об. полисорбата 80,
    - 1 мг/мл триптофана,
    - 140 мМ NaCl,

- 20
  - 3 мМ KCl,
  - 10 мМ фосфата натрия,

где рН указанной композиции составляет приблизительно 6,6.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- 25
  - ботулинического нейротоксина А,
  - 0,2% об./об. полисорбата 80,
  - 1 мг/мл триптофана,
  - 140 мМ NaCl,
  - 3 мМ KCl,
- 30
  - 10 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия,

где рН указанной композиции составляет приблизительно 6,6.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 0,04% об./об. полисорбата 80,
- 5 - 1 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 10 мМ фосфата натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 6,9.

10 Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 0,04% об./об. полисорбата 80,
- 1 мг/мл триптофана,
- 15 - 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 10 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 6,9.

20 Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина В,
- 0,25% об./об. полисорбата 20,
- 4 мг/мл триптофана,
- 25 - 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 10 мМ фосфата натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 7,4.

30 Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина В,
- 0,25% об./об. полисорбата 20,

- 4 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 10 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия,

5

где pH указанной композиции составляет приблизительно 7,4.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 0,01% об./об. полисорбата 80,
- 0,25 мг/мл триптофана,
- 255 мМ NaCl,
- 2 мМ фосфата натрия,

10

где pH указанной композиции составляет приблизительно 7,2.

15

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 0,01% об./об. полисорбата 80,
- 0,25 мг/мл триптофана,
- 255 мМ NaCl,
- 10 мМ KCl,
- 50 мМ фосфата натрия,

20

где pH указанной композиции составляет приблизительно 6,3.

25

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 1% об./об. полисорбата 80,
- 0,25 мг/мл триптофана,
- 255 мМ NaCl,
- 50 мМ фосфата натрия,

30

где pH указанной композиции составляет приблизительно 6,3.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 1% об./об. полисорбата 80,
- 5 - 3 мг/мл триптофана,
- 255 мМ NaCl,
- 10 мМ KCl,
- 50 мМ фосфата натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 7,2.

10 Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 1% об./об. полисорбата 80,
- 3 мг/мл триптофана,
- 15 - 255 мМ NaCl,
- 10 мМ KCl,
- 50 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 7,2.

20 Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 0,1% об./об. полисорбата 80,
- 1,625 мг/мл триптофана,
- 25 - 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 10 мМ фосфата натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 6,75.

30 Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 0,1% об./об. полисорбата 80,

- 1,625 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 10 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия,

5

где pH указанной композиции составляет приблизительно 6,75.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 0,01% об./об. полисорбата 80,
- 1 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 10 мМ фосфата натрия,

10

где pH указанной композиции составляет приблизительно 6,75.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 0,01% об./об. полисорбата 80,
- 1 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 10 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия,

20

где pH указанной композиции составляет приблизительно 6,75.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 0,1% об./об. полисорбата 80,
- 1 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 10 мМ фосфата натрия,

30

где pH указанной композиции составляет приблизительно 6,75.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 5 - 0,1% об./об. полисорбата 80,
- 1 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 10 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата
- 10 натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 6,75.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 15 - 1% об./об. полисорбата 80,
- 1 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 10 мМ фосфата натрия,

20 где pH указанной композиции составляет приблизительно 6,75.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина А,
- 1% об./об. полисорбата 80,
- 25 - 1 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 10 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата
- натрия,

30 где pH указанной композиции составляет приблизительно 6,75.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина В,
- 15% об./об. полисорбата 20,
- 1 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 5 - 3 мМ KCl,
- 10 мМ фосфата натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 7,4.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- 10 - ботулинического нейротоксина В,
- 15% об./об. полисорбата 20,
- 1 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 15 - 10 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 7,4.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- 20 - ботулинического нейротоксина В,
- 15% об./об. полисорбата 20,
- 4 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 25 - 10 мМ фосфата натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 7,4.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина В,
- 30 - 15% об./об. полисорбата 20,
- 4 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,

- 10 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 7,4.

5 Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- ботулинического нейротоксина В,
- 0,25% об./об. полисорбата 20,
- 4 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 10 - 3 мМ KCl,
- 10 мМ фосфата натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 7,4.

Согласно одному из примеров осуществления, жидкая композиция согласно изобретению может включать или по существу состоять из:

- 15 - ботулинического нейротоксина В,
- 0,25% об./об. полисорбата 20,
- 4 мг/мл триптофана,
- 140 мМ NaCl,
- 3 мМ KCl,
- 20 - 10 мМ дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия,

где pH указанной композиции составляет приблизительно 7,4.

Ферментативная активность BoNT также может быть определена анализом BOTEST™ (например, с помощью набора для обнаружения ботулинического нейротоксина BOTEST™ Matrix A; номер по каталогу BioSentinel: A1015), который представляет собой исследование, позволяющее оценить протеолитическую активность BoNT в оптимизированном реакционном буфере. Предполагаемое применение BOTEST™ включает количественное обнаружение и получение характеристик фармацевтических препаратов, содержащих BoNT, обнаружение лекарственных средств, скрининг с высокой производительностью и различные обнаружения. BOTEST™ содержит репортер, который состоит из остатков 141-206 белка SNAP-25, природного субстрата BoNT/A и E. Этот субстрат заключен между двумя флуоресцентными белками, производным голубого флуоресцентного белка

(англ. cyan fluorescent protein, сокр. CFP) и производным желтого флуоресцентного белка (англ. yellow fluorescent protein, сокр. YFP). Частицы CFP и YFP образуют донорно-акцепторную пару для резонансного (Фёрстеровского) переноса энергии флуоресценции (англ. Förster Resonance Energy Transfer, сокр. FRET). Применение донорно-акцепторной пары FRET, разделенной субстратом для VoNT, позволяет обнаруживать протеолитическую активность VoNT. В отсутствие VoNT репортер остается неповрежденным, и частицы CFP и YFP располагаются близко друг к другу. Возбуждение CFP приводит к переносу энергии к YFP в результате явления FRET. Вследствие этого, эмиссия от CFP тушится, в то время как YFP испускает свечение флуоресценции, благодаря феномену FRET. В присутствии VoNT репортер расщепляется в результате протеолитического воздействия VoNT. Частицы CFP и YFP физически разделяются, то есть перенос FRET уже не может осуществляться. Эмиссия от CFP восстанавливается, а эмиссия от YFP уменьшается. Таким образом, в анализе BOTEST™ применяют флуоресцентные репортеры, которые создают ответную реакцию в виде соотношения при специфичном расщеплении под действием VoNT, что позволяет получать ответ в виде относительных флуоресцентных единиц (ОФЕ) или соотношения эмиссий. Полученные данные могут быть использованы для вычисления количества ботулинических единиц (то есть единиц ботулотоксина, сокращенно "БЕ", которые также могут быть названы ферментативными единицами "Е" или международными единицами "МЕ") в миллилитре или отношения БЕ/концентрация VoNT (например, мг). Другими словами, ферментативная активность VoNT также может быть определена, например, в первом клеточном анализе, в котором определяют протеолитическую активность VoNT в оптимизированном реакционном буфере. В этом первом клеточном анализе применяют репортер, который состоит из остатков 141-206 белка SNAP-25, природного субстрата VoNT/A и E. Этот субстрат заключен между двумя флуоресцентными белками, производным голубого флуоресцентного белка (CFP) и производным желтого флуоресцентного белка (YFP). Частицы CFP и YFP образуют донорно-акцепторную пару для резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Применение донорно-акцепторной пары FRET, разделенной субстратом для VoNT, позволяет обнаруживать протеолитическую активность VoNT. В отсутствие VoNT репортер остается неповрежденным, и частицы CFP и YFP находятся близко друг к другу. Возбуждение CFP приводит к переносу энергии к YFP в результате явления FRET. Вследствие этого, эмиссия от CFP тушится, в то время как YFP испускает свечение флуоресценции, благодаря феномену FRET. В присутствии VoNT репортер расщепляется в результате

протеолитического воздействия BoNT. Частицы CFP и YFP физически разделяются, то есть перенос FRET уже не может осуществляться. Эмиссия от CFP восстанавливается, а эмиссия от YFP уменьшается. Таким образом, в первом клеточном анализе применяют флуоресцентные репортеры, которые создают  
5 ответную реакцию в виде соотношения при специфичном расщеплении под действием BoNT, что позволяет получать ответ в виде относительных флуоресцентных единиц (ОФЕ) или соотношения эмиссий. Полученные данные могут быть использованы для вычисления количества ботулинических единиц ("БЕ", которые также могут быть названы ферментативными единицами "Е" или  
10 международными единицами "МЕ") в миллилитре или отношения БЕ/концентрация BoNT (например, мг).

В некоторых примерах осуществления активность или удельная активность препарата может быть установлена способом BOTEST™ с использованием набора для обнаружения ботулинического нейротоксина Matrix A (номер по каталогу  
15 BioSentinel: A1015). Набор для обнаружения ботулинического нейротоксина (BoNT) BOTEST™ Matrix A представляет собой набор для *in vitro* определения и количественного обнаружения BoNT серотипа А (BoNT/A) в комплексных матрицах, таких как сыворотка крови, кровь, пища, вода, жидкость от бактериального осадка и фармацевтические образцы. Набор BOTEST™ Matrix A состоит из двух первичных  
20 реагентов – Гранул (т.н. бусин) Matrix A и Репортера BOTEST™ A/E. На гранулах Matrix A улавливают, концентрируют и выделяют комплекс или голотоксин BoNT/A из комплексных матриц образцов объемом от 100 мкл до 50 мл. Затем с помощью репортера BOTEST™ A/E определяют количество захваченного BoNT/A, получая оценку активности и количества BoNT/A. В зависимости от состава матрицы и  
25 размера образца, в течение менее 3 часов может быть достигнута пикомолярная чувствительность, а фемтомолярная чувствительность может быть достигнута в течение 24 часов. Гранулы Matrix A состоят из запатентованного анти-BoNT/A антитела, ковалентно связанного с магнитными гранулами. Эти гранулы добавляют в образец, содержащий BoNT/A, и инкубируют, обеспечивая связывание с BoNT/A.  
30 Мешающие соединения, которые в противном случае могли бы затруднить определение активности BoNT/A, удаляют промывкой гранул Matrix A. Активность репортера BOTEST™ A/E моделируют в соответствии с натуральными субстратами протеолитического BoNT, что позволяет обнаруживать эндопептидазную активность BoNT/A. Репортер BoTest™ A/E содержит аминокислоты 141-206 белка SNAP-25,  
35 включающие участки связывания экзосайта (англ. exosite) и участок расщепления

BoNT/A. Репортер имеет высокое сродство к BoNT/A, и при инкубации с BoNT/A связывается с гранулами Matrix A, что позволяет быстро и с высокой чувствительностью обнаруживать протеолитическую активность BoNT/A. Описание одного из подходящих протоколов использования этого набора приведено ниже в разделе Примеры. Другими словами, активность или удельная активность препарата может быть установлена во втором клеточном анализе, подходящем, например, для определения и количественного обнаружения BoNT серотипа A (BoNT/A) в комплексных матрицах, таких как сыворотка крови, кровь, пища, вода, жидкость от бактериального осадка и фармацевтические образцы. Во втором клеточном анализе применяют два первичных реагента – гранулы (состоящие из анти-BoNT/A антитела, ковалентно связанного с магнитными гранулами) и репортер, который представляет собой полипептид, сконструированный подобно натуральным субстратам протеолитического BoNT, который позволяет обнаруживать эндопептидазную активность BoNT/A. На гранулах улавливают, концентрируют и выделяют комплекс или голотоксин BoNT/A из комплексных матриц образцов объемом от 100 мкл до 50 мл. Затем с помощью репортера определяют количество захваченного BoNT/A, получая оценку активности и количества BoNT/A. В зависимости от состава матрицы и размера образца, в течение менее 3 часов может быть достигнута пикомолярная чувствительность, а фемтомолярная чувствительность может быть достигнута в течение 24 часов. Как было отмечено выше, гранулы состоят из анти-BoNT/A антитела, ковалентно связанного с магнитными гранулами. Эти гранулы добавляют в образец, содержащий BoNT/A, и инкубируют, обеспечивая связывание с BoNT/A. Мешающие соединения, которые в противном случае могли бы затруднить определение активности BoNT/A, удаляют промывкой гранул. Активность репортера моделируют в соответствии с натуральными субстратами протеолитического BoNT, что позволяет обнаруживать эндопептидазную активность BoNT/A. Репортер BoTest™ A/E содержит аминокислоты 141-206 белка SNAP-25, включающие участки связывания экзосайта и участок расщепления BoNT/A. Репортер имеет высокое сродство к BoNT/A, и при инкубации с BoNT/A связывается с гранулами, что позволяет быстро и с высокой чувствительностью обнаруживать протеолитическую активность BoNT/A. Описание одного из подходящих протоколов использования этого набора приведено ниже в разделе Примеры.

Для целей настоящего изобретения жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь

ферментативную активность, составляющую по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99, по меньшей мере 100, по меньшей мере 101, по меньшей мере 102, по меньшей мере 103, по меньшей мере 104, по меньшей мере 105, по меньшей мере 106, по меньшей мере 107, по меньшей мере 108, по меньшей мере 109, по меньшей мере 110, по меньшей мере 111, по меньшей мере 112, по меньшей мере 113, по меньшей мере 114 или по меньшей мере 115 БЕ/мл, определяемую в анализе BOTEST™ (другими словами, определяемую в первом клеточном анализе), как описано выше и в разделе Примеры. В некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь ферментативную активность, составляющую приблизительно 95, приблизительно 96, приблизительно 97, приблизительно 98, приблизительно 99, приблизительно 100, приблизительно 101, приблизительно 102, приблизительно 103, приблизительно 104, приблизительно 105, приблизительно 106, приблизительно 107, приблизительно 108, приблизительно 109, приблизительно 110, приблизительно 111, приблизительно 112, приблизительно 113, приблизительно 114 или приблизительно 115 БЕ/мл, определяемую в анализе BOTEST™ (другими словами, определяемую в первом клеточном анализе). В некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь ферментативную активность, составляющую 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 или 115 БЕ/мл, определяемую в анализе BOTEST™ (другими словами, определяемую в первом клеточном анализе). В некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь ферментативную активность, составляющую приблизительно 95, приблизительно 96, приблизительно 97, приблизительно 98, приблизительно 99, приблизительно 100, приблизительно 101, приблизительно 102, приблизительно 103, приблизительно 104, приблизительно 105, приблизительно 106, приблизительно 107, приблизительно 108, приблизительно 109, приблизительно 110, приблизительно 111, приблизительно 112, приблизительно 113, приблизительно 114 или приблизительно 115 БЕ/мл, определяемую в анализе BOTEST™ (другими словами, определяемую в первом клеточном анализе). В некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь ферментативную активность, составляющую от 95 до 100, от 96 до 100, от 97 до 100, от 98 до 100, от

99 до 100, от 96 до 99, от 97 до 99, от 98 до 99 или от 97 до 98 БЕ/мл, определяемую в анализе BOTEST™ (другими словами, определяемую в первом клеточном анализе).

В некоторых аспектах ферментативная активность может быть  
5 нормализована по концентрации BoNT в данном препарате для учета относительного уровня активности различных ферментов BoNT (т.е. для вычисления удельной активности). Например, удельная активность или нормализованная активность может быть вычислена как отношение результатов BOTEST™ (например, с использованием набора для обнаружения ботулинического  
10 нейротоксина BOTEST™ Matrix A; номер по каталогу BioSentinel: A1015) к концентрации или количеству BoNT в испытуемом препарате. Например, удельная активность или нормализованная активность может быть вычислена как отношение результатов первого или второго клеточного анализа к концентрации или количеству BoNT в испытуемом препарате. В некоторых примерах осуществления  
15 жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь ферментативную активность, нормализованную по концентрации BoNT (т.е. удельную активность), составляющую по меньшей мере 0,98, по меньшей мере 0,99, по меньшей мере 1,00, по меньшей мере 1,01, по меньшей мере 1,02, по меньшей мере 1,03, по меньшей мере 1,04, по  
20 меньшей мере 1,05, по меньшей мере 1,06, по меньшей мере 1,07, по меньшей мере 1,08, по меньшей мере 1,09, по меньшей мере 1,10, по меньшей мере 1,11, по меньшей мере 1,12, по меньшей мере 1,13, по меньшей мере 1,14, по меньшей мере 1,15, по меньшей мере 1,16, по меньшей мере 1,17, по меньшей мере 1,18, по меньшей мере 1,19 или по меньшей мере 1,20 БЕ/ОБЕ (ботулинических  
25 единиц/относительных ботулинических единиц) BoNT. В некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь ферментативную активность, нормализованную по концентрации BoNT, составляющую  
30 приблизительно 0,98, приблизительно 0,99, приблизительно 1,00, приблизительно 1,01, приблизительно 1,02, приблизительно 1,03, приблизительно 1,04, приблизительно 1,05, приблизительно 1,06, приблизительно 1,07, приблизительно 1,08, приблизительно 1,09, приблизительно 1,10, приблизительно 1,11, приблизительно 1,12, приблизительно 1,13, приблизительно 1,14, приблизительно 1,15, приблизительно 1,16, приблизительно 1,17, приблизительно 1,18,  
35 приблизительно 1,19 или приблизительно 1,20 БЕ/ОБЕ BoNT. В некоторых примерах

осуществления жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь ферментативную активность, нормализованную по концентрации ВоNT, составляющую 0,98, 0,99, 1,00, 1,01, 1,02, 1,03, 1,04, 1,05, 1,06, 1,07, 1,08, 1,09, 1,10, 1,11, 1,12, 1,13, 1,14, 1,15, 1,16, 1,17, 1,18, 1,19 или 1,20 БЕ/ОБЕ ВоNT. Дополнительно или в альтернативном случае, в некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь ферментативную активность, нормализованную по концентрации ВоNT (т.е. удельную активность), составляющую по меньшей мере 0,12, по меньшей мере 0,13, по меньшей мере 0,14, по меньшей мере 0,15, по меньшей мере 0,16, по меньшей мере 0,17, по меньшей мере 0,18, по меньшей мере 0,19, по меньшей мере 0,20, по меньшей мере 0,21, по меньшей мере 0,22, по меньшей мере 0,23, по меньшей мере 0,24 или по меньшей мере 0,25 БЕ/пикограмм ВоNT. В некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь ферментативную активность, нормализованную по концентрации ВоNT, составляющую приблизительно 0,12, приблизительно 0,13, приблизительно 0,14, приблизительно 0,15, приблизительно 0,16, приблизительно 0,17, приблизительно 0,18, приблизительно 0,19, приблизительно 0,20, приблизительно 0,21, приблизительно 0,22, приблизительно 0,23, приблизительно 0,24 или приблизительно 0,25 БЕ/пикограмм ВоNT. В некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь ферментативную активность, нормализованную по концентрации ВоNT, составляющую 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24 или 0,25 БЕ/пикограмм ВоNT. Для нормализации активности по концентрации активность может быть определена анализом BOTEST™ и разделена на концентрацию ВоNT, которая может быть определена, например, ВоNT-специфическим анализом ELISA (например, BOLISA®).

Для обнаружения и количественного определения общей массы ВоNT в жидких матрицах с помощью традиционного сэндвич-варианта ELISA может быть применен анализ BOLISA® или сэндвич-вариант ELISA для ботулинического нейротоксина (сэндвич-вариант твердофазного иммуноферментного анализа). Для определения различных серотипов BioSentinel предоставляет несколько различных наборов BOLISA® (например, ВоNT/A, номер по каталогу: A1029; ВоNT/B, номер по каталогу: A1045; ВоNT/B4, номер по каталогу: A1048; ВоNT/C, номер по каталогу:

A1042; BoNT/E, номер по каталогу: A1034). В наборах BOLISA® (другими словами, наборах для BoNT-специфического ELISA) анти-BoNT антитело связано с твердым носителем, и образец, содержащий BoNT, вводят в контакт с носителем. BoNT, присутствующий в образце, связывается антителом, а все другие материалы удаляются или вымываются. Добавляют второе меченое для обнаружения антитело, которое связывает тот же серотип BoNT, и количество BoNT в образце может быть определено обнаружением или количественной оценкой выхода метки обнаружения (например, флуоресценции, ферментативной активности, колориметрического изменения и т.д.). Анализ BOLISA® (другими словами, BoNT-специфический ELISA) особенно подходит для вычисления удельной активности (т.е. отношения уровня активности токсина в препарате к концентрации BoNT в препарате). Результат анализа BOLISA® (другими словами, BoNT-специфического ELISA) может быть выражен в единицах массы на мл (например, мг, мкг или пикограмм/мл) или в относительных единицах BOLISA® (ОБЕ)/мл.

Относительная эффективность или ферментативная активность также может быть определена с помощью клеточных анализов эффективности (англ. cell-based potency assay, сокр. CBPA). В анализе CBPA можно оценить ключевые этапы воздействия BoNT: связывание рецептора, интернализацию-транслокацию и каталитическую активность, и, таким образом, этот анализ может быть применен вместо стандартного биоанализа на мышах, описанного выше. Например, один из особенно подходящих вариантов CBPA описан в документе PCT/IB 2021/056210 (WO 2022/009182) и включает (a) распределение приблизительно двух различных BoNT образцов по приблизительно двум контейнерам, содержащим клетки, экспрессирующие белок SNAP25, где первый образец BoNT представляет собой эталонный образец с известной эффективностью, а второй образец BoNT является испытуемым образцом с неизвестной эффективностью, (b) инкубацию клеток с BoNT в течение определенного периода времени, (c) определение отношения количества расщепленного белка SNAP25 к количеству нерасщепленного белка SNAP25 соответствующее эталонному образцу и испытуемому образцу, и (d) определение эффективности испытуемого образца по сравнению с эталонным образцом. Необязательно, в третий контейнер может быть помещен третий образец BoNT, образец контроля качества, имеющий известную эффективность, который используют как положительный контроль. В некоторых примерах осуществления этап (c) может включать количественное определение расщепленных и нерасщепленных белков SNAP25 с помощью анализа вестерн-блоттинг и

денситометрического анализа. В некоторых примерах осуществления период времени составляет приблизительно 6, 12, 16, 20, 24, 32, 40, 48 или 56 часов. В некоторых примерах осуществления каждый из приблизительно двух контейнеров включает совокупность лунок. В некоторых примерах осуществления

5 приблизительно два различных образца VoNT подвергают серийному разбавлению, распределяя по совокупности лунок. В некоторых аспектах приблизительно два контейнера представляют собой планшеты для культивирования тканей. В некоторых примерах осуществления приблизительно два контейнера представляют собой планшеты, содержащие 48, 96, 384 или 1536 лунок. В некоторых примерах

10 осуществления клетки прилипают или закрепляются в приблизительно двух контейнерах. В некоторых примерах осуществления клетки по своей природе экспрессируют SNAP25. В некоторых примерах осуществления клетки экспрессируют гетерологичный SNAP25. В некоторых примерах осуществления клетки не являются нервными клетками. В некоторых примерах осуществления

15 клетки генетически модифицированы. В некоторых примерах осуществления клетки являются нервными клетками. В некоторых примерах осуществления нервные клетки представляют собой двигательные нейроны. В некоторых примерах осуществления клетки обрабатывают агентом, подавляющим пролиферацию. В некоторых примерах осуществления агент, подавляющий пролиферацию,

20 ингибирует  $\gamma$ -секретазу. В некоторых аспектах агент, подавляющий пролиферацию, представляет собой DAPT (сокращение от англ. 2,4-diamino-5-phenylthiazole, 2,4-диамино-5-фенилтиазол). В некоторых примерах осуществления ингибитор протеазы добавляют в приблизительно два контейнера по завершении этапа (b). В некоторых примерах осуществления после инкубации клеток с VoNT клетки подвергают лизису.

25 В некоторых примерах осуществления клетки подвергают лизису посредством ультразвуковой обработки. В некоторых примерах осуществления клетки подвергают лизису посредством добавления лизирующего агента. В некоторых примерах осуществления лизирующий агент включает моющее средство (детергент). В этом анализе получают такие же результаты эффективности, как и в

30 применяемых в настоящее время анализах эффективности, с которых используют животных, однако, он позволяет не выполнять эксперименты по определению LD50 на мышах.

В другом потенциально подходящем анализе СВРА могут быть использованы индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (англ. human induced pluripotent stem cells, сокращенно hiPSC), полученные из двигательных нейронов, и

35

расщепление белка SNAP25, который обнаруживают в анализе вестерн-блоттинг. В другом примере в анализе СВРА для определения эффективности могут быть использованы дифференцированные клетки нейробластомы человека SiMa и применен сэндвич-вариант ELISA, в котором определяют BoNT/A-зависимое повышение межклеточной концентрации расщепленного SNAP25. Один из примеров такого анализа описан, например, в публикации Salas с соавт., *Botulinum neurotoxin serotype A specific cell-based potency assay to replace the mouse bioassay* (Специфический клеточный анализ эффективности ботулинического нейротоксина, серотипа А, способный заменить биоанализ с использованием мышей), PLOS ONE, 2012, 7(11):e49516.

В некоторых примерах осуществления относительная эффективность жидкой композиции (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может составлять приблизительно 115, приблизительно 116, приблизительно 117, приблизительно 118, приблизительно 119, приблизительно 120, приблизительно 121, приблизительно 122, приблизительно 123, приблизительно 124, приблизительно 125, приблизительно 126, приблизительно 127, приблизительно 128, приблизительно 129, приблизительно 130, приблизительно 131, приблизительно 132, приблизительно 133, приблизительно 134, приблизительно 135, приблизительно 136, приблизительно 137, приблизительно 138, приблизительно 139 или приблизительно 140 единиц СВРА, определенных по данным клеточного анализа (например, анализа на основе hiPSC или анализа на основе SiMa клеток, как описано выше). В некоторых примерах осуществления относительная эффективность жидкой композиции (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может составлять по меньшей мере 115, по меньшей мере 116, по меньшей мере 117, по меньшей мере 118, по меньшей мере 119, по меньшей мере 120, по меньшей мере 121, по меньшей мере 122, по меньшей мере 123, по меньшей мере 124, по меньшей мере 125, по меньшей мере 126, по меньшей мере 127, по меньшей мере 128, по меньшей мере 129, по меньшей мере 130, по меньшей мере 131, по меньшей мере 132, по меньшей мере 133, по меньшей мере 134, по меньшей мере 135, по меньшей мере 136, по меньшей мере 137, по меньшей мере 138, по меньшей мере 139 или по меньшей мере 140 единиц СВРА, определенных по данным клеточного анализа ELISA. В некоторых примерах осуществления относительная эффективность жидкой композиции (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может составлять 115,

116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140 единиц, определенных по данным клеточного анализа (например, анализа на основе hiPSC или анализа на основе SiMa клеток, как описано выше).

5 В некоторых аспектах для учета относительного уровня активности различных ферментов BoNT (т.е. для вычисления удельной активности) эффективность или активность может быть нормализована по концентрации BoNT в конкретном препарате. Например, в некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь нормализованную по концентрации BoNT

10 эффективность, составляющую по меньшей мере 1,20, по меньшей мере 1,21, по меньшей мере 1,22, по меньшей мере 1,23, по меньшей мере 1,24, по меньшей мере 1,25, по меньшей мере 1,26, по меньшей мере 1,27, по меньшей мере 1,28, по меньшей мере 1,29, по меньшей мере 1,30, по меньшей мере 1,31, по меньшей мере

15 1,32, по меньшей мере 1,33, по меньшей мере 1,34, по меньшей мере 1,35, по меньшей мере 1,36, по меньшей мере 1,37, по меньшей мере 1,38, по меньшей мере 1,39 или по меньшей мере 1,40 единиц СВРА/концентрация BoNT (например, мг). В некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь

20 нормализованную по концентрации BoNT эффективность, составляющую приблизительно 1,20, приблизительно 1,21, приблизительно 1,22, приблизительно 1,23, приблизительно 1,24, приблизительно 1,25, приблизительно 1,26, приблизительно 1,27, приблизительно 1,28, приблизительно 1,29, приблизительно 1,30, приблизительно 1,31, приблизительно 1,32, приблизительно 1,33,

25 приблизительно 1,34, приблизительно 1,35, приблизительно 1,36, приблизительно 1,37, приблизительно 1,38, приблизительно 1,39 или приблизительно 1,40 единиц СВРА/концентрация BoNT (например, мг). В некоторых примерах осуществления жидкая композиция (например, QM1114), подходящая для проведения лечения согласно изобретению, может иметь нормализованную по концентрации BoNT

30 эффективность, составляющую 1,20, 1,21, 1,22, 1,23, 1,24, 1,25, 1,26, 1,27, 1,28, 1,29, 1,30, 1,31, 1,32, 1,33, 1,34, 1,35, 1,36, 1,37, 1,38, 1,39 или 1,40 единиц СВРА/концентрация BoNT (например, мг). Для нормализации эффективности/активности по концентрации эффективность или активность могут быть определены клеточным анализом (например, клеточным анализом, описанным

в документе PCT /B2021/056210, как указано выше), и концентрация препарата может быть определена, например, анализом ELISA (например, BOLISA®).

### **III. Лечение**

Изобретение также относится к способам лечения межбровных морщин и/или боковых периорбитальных морщин, имеющих выраженность от умеренной до сильной, у субъекта-человека, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества жидкой композиции (например, QM1114 или "готовой к использованию жидкой композиции"), включающей ботулинический нейротоксин, что приводит к снижению выраженности межбровных морщин, имеющих выраженность от умеренной до сильной. Жидкая композиция может соответствовать любому из описанных выше в разделе II примеров осуществления.

Кроме применения "готовой к использованию" жидкой композиции (например, QM1114), которая не требует восстановления или дополнительного смешивания, лечение согласно изобретению дополнительно отличается от лечения с использованием BoNT тем, что жидкая композиция включает BoNT (например, BoNT/A), который более ферментативно активен, чем конкурирующие продукты (например, XEOMIN®, BOTOX®) с учетом нормализации по концентрации BoNT в препарате. Описанные в настоящей работе "конкурирующие продукты" могут представлять собой препараты BoNT, которые хранят в сухом виде (например, в виде лиофилизированного порошка) и которые требуют восстановления для введения субъекту. В результате жидкая композиция (например, QM1114) может включать меньшее количество BoNT, чем конкурирующие продукты, что делает ее в целом более безопасной и с меньшей вероятностью будет приводить к нежелательным явлениям или побочным явлениям, таким как опущение верхнего века. Соответственно, способы и области применения, рассмотренные в настоящей работе, могут включать этап выбора субъекта с риском развития опущения верхнего века, субъекта, у которого ранее наблюдалось опущение верхнего века, или субъекта, ранее проходившего лечение, например, GL, LCL или их комбинации препаратом BoNT и получившего опущение верхнего века. В некоторых примерах осуществления способы и области применения, рассмотренные в настоящей работе, могут включать этап выбора субъекта, ранее не проходившего лечение (например, GL, LCL или их комбинации) препаратом BoNT.

Более высокий уровень ферментативной активности в жидкой композиции (например, QM1114) также приводит к достижению более высокой относительной

эффективности (нормализованной по концентрации BoNT) по сравнению с конкурирующими продуктами (например, XEOMIN®, BOTOX®). Более высокая активность и более высокая эффективность в способах согласно изобретению позволяет быстрее достигнуть результата, который выражается в уменьшении GL и LCL, сохранять достигнутый результат в течение более длительного периода и снижать частоту возникновения побочных явлений (например, птоза) по сравнению с применением конкурирующих продуктов (например, XEOMIN®, BOTOX®).

Соответственно, настоящее изобретение относится к способам лечения GL и LCL с использованием BoNT, такого как QM1114, обеспечивающим большую безопасность и/или меньшее количество или менее выраженные побочные явления по сравнению с лечением конкурирующими продуктами (например, BOTOX COSMETIC®, XEOMIN® и JEUVEAU®). Настоящее изобретение также относится к способам лечения GL и LCL с использованием BoNT, такого как QM1114, где способы с меньшей вероятностью вызывают опущение верхнего века по сравнению с лечением конкурирующими продуктами (например, BOTOX COSMETIC®, XEOMIN® и JEUVEAU®). Настоящее изобретение также относится к способам лечения GL и LCL с использованием BoNT, такого как QM1114, где способы обеспечивают более раннее наступление терапевтического эффекта по сравнению с лечением конкурирующими продуктами (например, BOTOX COSMETIC®, XEOMIN® и JEUVEAU®). Настоящее изобретение также относится к способам лечения GL и LCL с использованием BoNT, такого как QM1114, где способы обеспечивают большую длительность поддержания терапевтического эффекта по сравнению с лечением конкурирующими продуктами (например, BOTOX COSMETIC®, XEOMIN® и JEUVEAU®).

Дополнительно или в альтернативном случае изобретение относится к способам лечения межбровных морщин (GL), боковых периорбитальных морщин (LCL) или их комбинации у субъекта-человека, нуждающегося в таком лечении, где способы отличаются пониженным риском опущения верхнего века, и способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества жидкой композиции, включающей ботулинический нейротоксин, что приводит к уменьшению выраженности GL, LCL или их комбинации, и где ферментативная активность ботулинического нейротоксина, нормализованная по концентрации ботулинического нейротоксина, составляет по меньшей мере 1,16 БЕ/BoNT. У субъекта-человека может быть риск развития или высокая вероятность развития опущения верхнего века при введении ботулинического нейротоксина (например, препарата,

содержащего ботулинический нейротоксин с ферментативной активностью, нормализованной по концентрации ботулинического нейротоксина, составляющей менее 1,16 БЕ/BoNT, или удельной активностью, составляющей менее приблизительно  $2,0 \times 10^8$  ед./мг, такого как Botox Cosmetic®, Xeomin® и Jeuveau®).

5 Субъект-человек также может страдать опущением верхнего века и/или иметь историю развития опущения верхнего века при введении ботулинического нейротоксина. В другом примере осуществления субъект-человек не является субъектом, который (i) не подвержен риску развития опущения верхнего века, (ii) не испытывает опущения верхнего века и/или (iii) не имеет истории развития опущения

10 верхнего века при введении ботулинического нейротоксина в любой дозе или с любой ферментативной активностью.

В частности, настоящее изобретение обеспечивает значительно более низкую частоту возникновения опущения верхнего века при использовании QM1114 по сравнению с частотой возникновения птоза при использовании других

15 конкурирующих продуктов. Например, при обзоре исследований, в которых суммарно участвовали более 8000 пациентов, было обнаружено, что частота возникновения блефароптоза составляла приблизительно 2,5%. В частности, опущение верхнего века наблюдали при применении препаратов Botox (частота возникновения – 3%) и Jeuveau (частота возникновения – 2%). Как показано в

20 Примере 1, в некоторых исследованиях процент случаев опущения верхнего века, наблюдаемый при лечении LCL/GL с использованием QM1114, составлял 0,9%. Соответственно, в некоторых примерах осуществления лечения согласно изобретению (LCL, GL или их комбинации) процент случаев возникновения птоза может составлять менее 2%, менее 1,9%, менее 1,8%, менее 1,7%, менее 1,5%,

25 менее 1,4%, менее 1,3%, менее 1,2%, менее 1,1%, менее 1,0% или даже может достигать 0,9%. В некоторых примерах осуществления лечения согласно изобретению (LCL, GL или их комбинации) процент случаев возникновения птоза может составлять приблизительно 2%, приблизительно 1,9%, приблизительно 1,8%,

30 приблизительно 1,7%, приблизительно 1,5%, приблизительно 1,4%, приблизительно 1,3%, приблизительно 1,2%, приблизительно 1,1%, приблизительно 1,0% или приблизительно 0,9%. В некоторых примерах осуществления лечения согласно изобретению (LCL, GL или их комбинации) процент случаев возникновения птоза может составлять 1,9%, 1,8%, 1,7%, 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0% или 0,9% или менее.

Дополнительно, в некоторых примерах осуществления настоящего изобретение относится к способам лечения у субъекта боковых периорбитальных морщин (LCL), где способы включают введение жидкой композиции, содержащей BoNT (например, QM1114), и при лечении этими способами процент пациентов с

5 положительным ответом на лечение LCL превышает процент пациентов с положительным ответом на лечение препаратом BOTOX COSMETIC® (то есть препаратом, содержащим BoNT, который хранят в сухом виде (например, в виде лиофилизированного порошка) и который требует восстановления для введения его субъекту).

10 В некоторых примерах осуществления субъекту вводят от 1 до 100 единиц ботулотоксина. В некоторых примерах осуществления субъекту вводят от 10 до 75 единиц ботулотоксина. В некоторых примерах осуществления субъекту вводят от 25 до 75 единиц ботулотоксина. В некоторых примерах осуществления субъекту вводят

15 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 единиц ботулотоксина. В некоторых примерах осуществления субъекту вводят от 50 до 250 единиц ботулотоксина. В некоторых примерах осуществления концентрация жидкой композиции, вводимой субъекту, составляет от 1 до 300 единиц ботулотоксина/мл, например, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75,

20 80, 85, 90, 95, 100, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295 или 300 единиц/мл.

В некоторых примерах осуществления композицию вводят посредством инъекции. В некоторых примерах осуществления инъекцию производят подкожно,

25 чрескожно (трансдермально), внутрикожно или внутримышечно. В некоторых примерах осуществления способ включает многократное введение инъекций в межбровную область. В некоторых примерах осуществления соседние участки, в которые вводят инъекции, расположены на расстоянии друг от друга, составляющем приблизительно от 0,5 до 10 см. В некоторых примерах осуществления соседние

30 участки, в которые вводят инъекции, расположены на расстоянии друг от друга, составляющем приблизительно от 1,5 до 3 см. В некоторых примерах осуществления инъекции могут быть произведены с одной стороны. В некоторых примерах осуществления инъекции могут быть произведены с двух сторон.

В некоторых примерах осуществления инъекции производят в мышцу гордецов и мышцы, сморщивающие бровь, на каждой стороне лица, и в некоторых примерах осуществления инъекции производят в определенном порядке, например, начиная с мышцы гордецов, и затем в мышцы, сморщивающие бровь, на каждой стороне лица, перемещаясь от середины к периферии. В некоторых примерах осуществления все инъекции производят в область, расположенную приблизительно на 1 см выше верхнего глазничного валика, и внутри области, ограниченной линиями, проходящими через середину зрачков.

В некоторых примерах осуществления все инъекции производят в область, расположенную по меньшей мере на 1 см выше центральной части надбровной дуги или остеоидной надбровной дуги.

В некоторых примерах осуществления композиция может быть введена для лечения, предотвращения ухудшения состояния или для улучшения состояния боковых периорбитальных морщин (LCL). В некоторых примерах осуществления лечение может включать приблизительно три инъекции (одна инъекция на одну точку ввода инъекции). Например, лечение может включать 1, 2, 3, 4 или 5 инъекций. Точки введения инъекций могут быть уточнены в соответствии с рисунком (расположением) LCL морщин конкретного субъекта. В зависимости от расположения морщин конкретных субъектов, если морщины в LCL области находятся выше и ниже латеральной спайки век, то инъекции вводят, как показано, например, на Фиг. 12А. В альтернативном варианте, если морщины в LCL области конкретного субъекта в основном расположены ниже латеральной спайки век, то инъекции вводят, как показано, например, на Фиг. 12В. В некоторых примерах осуществления точки инъекции могут располагаться в наружной части круговой мышцы глаза и, если это возможно, на расстоянии приблизительно 1-2 см от глазничного валика. Некоторые примеры осуществления могут включать введение трех инъекций равного объема (100 мкл) в каждую из сторон лица (т.е. всего шесть инъекций).

В некоторых примерах осуществления композиция может быть введена для лечения, предотвращения ухудшения состояния или для улучшения состояния одновременно и GL, и LCL. В некоторых примерах осуществления лечение может включать, например, 11 инъекций (одну инъекцию на одну точку ввода инъекции) равного объема (100 мкл), вводимых в область GL (пять инъекций) и область LCL (три инъекции в каждую из сторон лица). В некоторых примерах осуществления

одновременное лечение GL и LCL может включать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 или более инъекций. Например, при лечении GL пять точек ввода инъекций могут включать две инъекции в каждую мышцу, сморщивающую бровь, и одну инъекцию в мышцу гордецов, и при лечении LCL расположение инъекций может быть

5 отрегулировано в соответствии с расположением LCL морщин конкретного субъекта. В зависимости от расположения морщин конкретных субъектов, если морщины в LCL области находятся выше и ниже латеральной спайки век, то инъекции могут быть введены, как показано, на Фиг. 12A. В альтернативном варианте, если морщины в LCL области конкретного субъекта в основном

10 расположены ниже латеральной спайки век, то инъекции могут быть введены, как показано на Фиг. 12B. В некоторых примерах осуществления точки инъекций для лечения LCL могут располагаться в наружной части круговой мышцы глаза и, если это возможно, на расстоянии приблизительно от 1 до 2 см от глазничного валика.

В некоторых примерах осуществления для подавления повторного

15 проявления морщин способ повторяют через определенные промежутки времени, составляющие от приблизительно 3 месяцев до приблизительно 6 месяцев. В некоторых примерах осуществления для подавления повторного проявления морщин способ повторяют через определенные промежутки времени, составляющие приблизительно 4 месяца.

20 Осуществление способа согласно изобретению приводит к временному снижению выраженности межбровных морщин и/или боковых периорбитальных морщин у субъекта. Эффективность лечения может быть оценена способами, известными специалистам в данной области техники. Иллюстративные способы оценки приведены ниже и в Примерах.

25 а. *Оценка выраженности межбровных морщин на фотографическом изображении по 4-балльной шкале: Оценка Исследователем в реальных условиях (GL ILA)*

Обоснованная оценка выраженности межбровных морщин на фотографическом изображении по 4-балльной шкале включает две системы

30 оценивания: одну – оценку Исследователем в реальных условиях при максимальном нахмуривании, и одну – оценку Исследователем в реальных условиях в состоянии покоя. Согласно шкале, межбровные морщины имеют следующую выраженность: отсутствие (степень 0), средние (степень 1), умеренные (степень 2) и выраженные межбровные морщины (степень 3). Каждая степень также

запечатлена на индивидуальной фотографии и в описательном тексте. Исследователи обучаются оцениванию фотографического изображения по 4-балльной шкале. Исследователи используют оценку фотографического изображения по 4-балльной шкале для прямого сравнения с живым лицом субъекта во время отборочных визитов, при установлении исходного состояния (до начала лечения) и во время всех визитов по завершении лечения. Субъекты производят свое оценивание выраженности своих межбровных морщин независимо оценки исследователя. Субъектов просят оценить состояние собственных межбровных морщин при максимальном нахмуривании во время отборочных визитов, при установлении исходного состояния (до начала лечения) и во время всех визитов по завершении лечения по статичной категориальной 4-балльной шкале.

Степень	Выраженность межбровных морщин	Описание
0	Нет морщин	Гладкая кожа
1	Средние морщины	Достаточно гладкая кожа
2	Умеренные морщины	Межбровные морщины
3	Выраженные морщины	Глубокие межбровные морщины

*b. Шкала общего эстетического улучшения (англ. Global Aesthetic Improvement Scale, сокращенно GAIS))*

Субъекты оценивают общее эстетическое улучшение своих межбровных морщин при максимальном нахмуривании в сравнении с их выраженностью до начала лечения, используя следующую категориальную шкалу во время всех визитов по окончании лечения:

Категория
Очень заметные улучшения
Заметные улучшения
Улучшения
Без изменений
Ухудшение
Заметное ухудшение
Очень заметное ухудшение

Субъектов спрашивают: “Как бы Вы оценили изменения в выраженности Ваших межбровных морщин (морщин между бровями) при максимальном нахмурировании по сравнению с состоянием непосредственно до инъекции?”

5 Субъектов просят выбрать одну категорию, которая наилучшим образом описывает изменение выраженности их межбровных морщин при максимальном нахмурировании по сравнению с исходным состоянием. Для помощи в оценивании, субъект может посмотреть фотографию исходного состояния.

*с. Дневник пациента*

10 Субъектов просят записывать их оценку ответной реакции на исследуемое лечение в дневник пациента, начиная с суток после получения лечения (Сутки 1) до Суток 7 (визит 3 в рамках исследования). Их просят ответить “да” или “нет” на следующий вопрос: “Заметили ли Вы с момента введения инъекции улучшение внешнего вида Ваших межбровных морщин (морщин между бровями)?” Субъекты должны были ежедневно заполнять дневник пациента и вернуть дневник в 15 исследовательский центр во время визита в Сутки 7.

*d. FACE-Q*

20 FACE-Q – это инструмент для сбора информации от пациентов путем анкетирования, предназначенный для оценки опыта и результатов процедур по эстетической коррекции лица с точки зрения субъекта. FACE-Q состоит из более чем 40 шкал (анкет), относящихся к четырем областям (Удовлетворенность 25 внешним видом лица, Качество жизни, обусловленное состоянием здоровья, Неблагоприятные явления и Процесс ухода). В каждой области имеется одна или более независимо функционирующих шкал. Для целей настоящего исследования и с учетом состояния, подвергаемого лечению субъекта, была выбрана шкала Физиологических Функций, которую субъекты заполняли в моменты времени, указанные в Графике оценивания.

*e. Анкета удовлетворенности терапией лицевых морщин*

30 Указанные вопросы относятся к той области лица субъекта, которую обрабатывали в последней перед опросом процедуре. Субъекты выбирают ответ, который наилучшим образом отражает их согласие с приведенным утверждением. Пример анкеты представлен ниже. На каждый вопрос может быть дан только один ответ.

	Думая о той области моего лица, которую обрабатывали на последней процедуре ...	Абсолютно не согласен	Не согласен	Согласен	Абсолютно согласен
1	Я бы хотел снова пройти эту процедуру	1	2	3	4
2	Я бы рекомендовал это лечение другим	1	2	3	4
3	Результаты лечения соответствуют моим ожиданиям	1	2	3	4
4	Я чувствую, что это правильный выбор лечения для меня	1	2	3	4
5	Результаты лечения меня радуют	1	2	3	4
6	Мне нравится, как выглядит мое лицо, когда я смеюсь	1	2	3	4
7	Мне нравится, как выглядит мое лицо, когда я улыбаюсь	1	2	3	4
8	Мое лицо выражает мои эмоции	1	2	3	4
9	Мне нравится, как выглядит мое лицо, когда я выражаю свои эмоции	1	2	3	4
10	Мои лицевые морщины не очень заметны	1	2	3	4
11	Мои лицевые морщины сведены к минимуму	1	2	3	4
12	Я выгляжу моложе	1	2	3	4
13	Я выгляжу естественно	1	2	3	4
14	Я выгляжу прекрасно для моего возраста	1	2	3	4
15	Я выгляжу красиво	1	2	3	4
16	Я выгляжу расслабленно	1	2	3	4
17	Я выгляжу привлекательно	1	2	3	4
18	Я выгляжу хорошо отдохнувшим	1	2	3	4
19	Я выгляжу обновленным	1	2	3	4
В целом, думая о той области моего лица, которую обрабатывали на последней процедуре ...					
		Абсолютно не согласен	Не согласен	Согласен	Абсолютно согласен
20	Я удовлетворен результатом лечения	1	2	3	4
21	Я удовлетворен улучшением состояния моих лицевых морщин	1	2	3	4

*f. Анкета удовлетворенности состоянием морщин (УСМ)*

В исходном состоянии (до начала лечения) и при всех визитах по окончании лечения, субъектов просят заполнить обоснованную анкету УСМ, составленную

*г. Независимая оценка по фотографии (НОФ)*

В трех НОФ, ослепленных в отношении рандомизированного лечения субъектов, производят оценивание по фотографии GL каждого субъекта при максимальном нахмурировании в соответствии с обоснованной оценкой выраженности межбровных морщин по 4-балльной шкале на фотографическом изображении. 5  
Оценку НОФ всех субъектов производят в конце исследования. Для НОФ применяют шкалу для сравнения фотографий GL каждого субъекта в исходном состоянии при максимальном нахмурировании с аналогичными фотографиями во время каждого визита после проведенного лечения. Количество баллов НОФ определяют в виде 10  
среднего всех оценок, выставленных тремя экспертами. НОФ не включены в другие аспекты исследования.

ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пример 1

Эффективность и безопасность применения QM1114-DP для лечения межбровных морщин от умеренных до выраженных (Исследование 43QM1602) 15

Для оценки эффективности и безопасности лекарственного продукта QM1114-DP (где DP означает “лекарственный продукт”, от англ. “drug product”) при лечении межбровных морщин от умеренных до выраженных проводили многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое 20  
исследование с участием 300 субъектов в 10 городах США и Канады. QM1114-DP является примером жидкой композиции согласно изобретению, содержащей ботулинический нейротоксин (например, BoNT/A), включающей по меньшей мере 4 буферных агента, как описано выше. Таким образом, упоминание во всех примерах QM1114-DP относится к примеру “жидкой композиции, включающей ботулинический 25  
нейротоксин” согласно изобретению. Группа 1 (группа, получавшая лечение) состояла из 225 субъектов, которые на начальном уровне получали один сеанс лечения QM1114-DP (5 единиц). Группа 2 (группа плацебо) состояла из 75 субъектов, которые на начальном уровне получали один сеанс введения плацебо. Эффективность и безопасность лечения определяли во время визитов, 30  
назначаемых после лечения, на 7 сутки, 14 сутки и спустя 1, 2, 3, 4, 5 и 6 месяцев после введения.

Эффективность в первичной конечной точке определяли по параметру “комбинированная частота положительного ответа на лечение” межбровных

морщин. Комбинированную частоту положительного ответа на лечение межбровных морщин определяли по двум оценочным шкалам: по оценке исследователя в реальных условиях (ILA), определяемой по шкале оценки по 4 точкам на фотографическом изображении, и по собственной оценке субъекта (SSA), определяемой по категориальной шкале в статических условиях по 4 точкам при максимальном нахмуживании, спустя 1 месяц. “Субъектом с комбинированным положительным ответом на лечение” называют субъекта, который получил оценку выраженности межбровных морщин 0 или 1 и достиг улучшения по меньшей мере на 2 балла по сравнению с начальным уровнем по обеим шкалам ILA и SSA одновременно. На Фиг. 2 представлена оценочная матрица выраженности межбровных морщин.

В первичной конечной точке определения эффективности в этом исследовании было обнаружено, что 82,9% субъектов в группе, получавшей лечение (165/199), демонстрировали положительный комбинированный ответ на лечение, в то время как в группе плацебо (0% - 0/67) ни один из субъектов не демонстрировал положительный комбинированный ответ на лечение. Комбинированная оценка эффективности в первичной конечной точке спустя 1 месяц показала высоко статистически значимые результаты ( $p < 0,001$ ) по сравнению с плацебо.

В анализе вторичной эффективности определяли частоту положительного ответа на лечение с течением времени по оценке ILA. На Фиг. 3 представлена частота положительного ответа на лечение с течением времени по оценке ILA. В каждый из моментов времени в группе, получавшей лечение, отмечали значительно более высокий процент пациентов с ответом на лечение по оценке ILA по сравнению с группой плацебо ( $p < 0,001$ ). См. Фиг. 3.

Затем с участием субъектов проводили предварительный анализ эффективности, используя шкалу общего эстетического улучшения (GAIS). В этом анализе субъектами с положительным ответом на лечение считались субъекты, которые отмечали пункты “Улучшения”, “Заметные улучшения” или “Очень заметные улучшения” по шкале GAIS для субъектов. В этом примере субъекты отмечали высокую частоту положительного ответа на лечение по GAIS (большинство в течение 6 месяцев отмечали у себя улучшения). См. Фиг. 4. Субъекты в группе, получавшей лечение, указывали на то, что эффект проявлялся уже в Сутки 0. Средний срок появления эффекта в группе, получавшей лечение, составлял 2 суток.

*Безопасность:* Общая частота возникновения нежелательных явлений (НЯ) была сравнима с частотой их возникновения в группе плацебо. Было установлено, что все серьезные нежелательные явления (СНЯ) не были связаны с исследуемым медикаментом или процедурой введения инъекций. Все возникшие при проведении

5 лечения нежелательные явления (НЯСЛ – также называемые “нежелательными явлениями, связанными с лечением”) имели слабую или умеренную интенсивность, наиболее частым НЯСЛ были головная боль, опущение верхнего века и развитие гематомы. См. Фиг. 5. Ни один субъект не умер, и ни один субъект не испытывал НЯСЛ, которые приводили бы к досрочному прекращению исследования.

## 10 **Заключение**

Эффективность: применение QM-1114-DP привело к статистически значимой разности в уменьшении межбровных морщин субъектов по сравнению с плацебо в первичной конечной точке и вторичной конечной точке.

• Появление эффекта: субъекты группы, получавшей лечение, сообщали о

15 благоприятных изменениях уже в Сутки 0; и среднее время появления эффекта составило 2 суток.

• Безопасность: Общую безопасность применения QM-1114-DP оценивали в соответствии с профилем низкий риск/польза. В группе, получавшей лечение, отмечали очень малый процент случаев опущения верхнего века (0,9%).

## 20 Пример 2

### Эффективность и безопасность применения QM1114-DP для лечения боковых периорбитальных морщин от умеренных до выраженных (Исследование 43QM1901)

Для оценки эффективности и безопасности лекарственного продукта QM1114-DP при лечении боковых периорбитальных морщин от умеренных до

25 выраженных проводили многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование с участием 300 субъектов в 10 городах США и Канады. Группа 1 (группа, получавшая лечение) состояла из 225 субъектов, которые на начальном уровне получали один сеанс лечения QM1114-DP (5 единиц). Группа 2 (группа плацебо) состояла из 75 субъектов, которые на начальном уровне

30 получали один сеанс введения плацебо. Эффективность и безопасность лечения определяли во время визитов, назначаемых после лечения, на 7 сутки, 14 сутки и спустя 1, 2, 3, 4, 5 и 6 месяцев после введения.

Эффективность в первичной конечной точке определяли по параметру “комбинированная частота положительного ответа на лечение” боковых периорбитальных морщин. Комбинированную частоту положительного ответа на лечение боковых периорбитальных морщин определяли по двум оценочным шкалам: по оценке исследователя в реальных условиях (ILA), определяемой по шкале оценки по 4 точкам на фотографическом изображении, и по самостоятельной оценке субъекта, определяемой по категориальной шкале в статических условиях по 4 точкам при самой широкой улыбке, спустя 1 месяц. “Субъектом с комбинированным положительным ответом на лечение” называют субъекта, который получил оценку выраженности боковых периорбитальных морщин 0 или 1 и достиг улучшения по меньшей мере на 2 балла по сравнению с начальным уровнем по обеим шкалам ILA и SSA одновременно. На Фиг. 6 представлена оценочная матрица выраженности боковых периорбитальных морщин.

В первичной конечной точке определения эффективности в этом исследовании было обнаружено, что 51,8% субъектов в группе, получавшей лечение (106/204), демонстрировали положительный комбинированный ответ на лечение, в то время как в группе плацебо только 1,4% субъектов (1/69) демонстрировали положительный комбинированный ответ на лечение. Комбинированная оценка эффективности в первичной конечной точке спустя 1 месяц показала высоко статистически значимые результаты ( $p < 0,001$ ) по сравнению с плацебо.

В анализе вторичной эффективности определяли частоту положительного ответа на лечение с течением времени по оценке ILA. На Фиг. 7 представлена частота положительного ответа на лечение с течением времени по оценке ILA. В каждый из моментов времени в группе, получавшей лечение, отмечали а значительно более высокий процент пациентов с ответом на лечение по оценке ILA по сравнению с группой плацебо ( $p < 0,001$ ). См. Фиг. 7.

Затем у субъектов проводили предварительный анализ эффективности, используя шкалу общего эстетического улучшения (GAIS). В этом анализе субъектами с положительным ответом на лечение считались субъекты, которые отмечали пункты “Улучшения”, “Заметные улучшения” или “Очень заметные улучшения” по шкале GAIS для субъектов. В этом примере субъекты отмечали высокую частоту положительного ответа на лечение по GAIS (большинство отмечали у себя улучшения в течение 6 месяцев). См. Фиг. 8. Субъекты в группе,

получавшей лечение, указывали на то, что эффект проявлялся уже в Сутки 0. Средний срок появления эффекта в группе, получавшей лечение, составлял 2 суток.

*Безопасность:* Общая частота возникновения нежелательных явлений (НЯ) была сравнима с частотой их возникновения в группе плацебо. Было установлено, что все серьезные нежелательные явления (СНЯ) не были связаны с исследуемым медикаментом или процедурой введения инъекций. Все возникшие при проведении лечения нежелательные явления (НЯСЛ – также называемые “нежелательными явлениями, связанными с лечением”) имели слабую или умеренную интенсивность, наиболее частым НЯСЛ было развитие гематомы в месте инъекции. См. Фиг. 9. Ни один субъект не умер, и ни один субъект не испытывал НЯСЛ, которые приводили бы к досрочному прекращению исследования.

### **Заключение**

Эффективность: применение QM-1114-DP привело к статистически значимой разности в уменьшении боковых периорбитальных морщин субъектов по сравнению с плацебо в первичной конечной точке и вторичной конечной точке.

- Появление эффекта: субъекты группы, получавшей лечение, сообщали о благоприятных изменениях уже в Сутки 0; и среднее время появления эффекта составило 2 суток.

- Безопасность: Общую безопасность применения QM-1114-DP оценивали в соответствии с профилем низкий риск/польза. Наиболее частым НЯ, связанным с терапией, было развитие гематомы на участке инъекции (4,8% в группе, получавшей лечение, и 4,1% в группе плацебо).

### Пример 3

Эффективность и безопасность применения QM1114-DP для лечения боковых периорбитальных морщин и межбровных морщин от умеренных до выраженных (по отдельности или в комбинации) (Исследование 43QM1902)

Для оценки эффективности и безопасности лекарственного продукта QM1114-DP при лечении боковых периорбитальных морщин (LCL) от умеренных до выраженных и межбровных морщин (GL) (по отдельности или в комбинации) проводили многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование с участием 413 субъектов в 12 городах США и Канады. Группа А (группа только с LCL, получавшая лечение) состояла из 118

5 субъектов, которые на начальном уровне получали один сеанс лечения QM1114-DP (5 единиц) в области LCL и один сеанс введения плацебо в область GL. Группа В (группа только с GL, получавшая лечение) состояла из 118 субъектов, которые на начальном уровне получали один сеанс лечения QM1114-DP (5 единиц) в область  
5 GL и один сеанс введения плацебо в область LCL. Группа С (группа с комбинацией LCL/GL, получавшая лечение) состояла из 118 субъектов, которые на начальном уровне получали один сеанс лечения QM1114-DP (5 единиц) в области LCL и один  
10 сеанс введения плацебо в области GL. Наконец, Группа D (группа плацебо) состояла из 59 субъектов, которые на начальном уровне получали один сеанс введения плацебо в LCL и один сеанс введения плацебо в GL. Эффективность и безопасность лечения определяли во время визитов, назначаемых после лечения, на 7 сутки, 14 сутки и спустя 1, 2, 3, 4, 5 и 6 месяцев после введения.

15 Эффективность в первичной конечной точке определяли по параметру “комбинированная частота положительного ответа на лечение” межбровных морщин. Комбинированную частоту положительного ответа на лечение межбровных морщин определяли по двум оценочным шкалам: по оценке исследователя в реальных условиях (ILA), определяемой по шкале оценки по 4 точкам на фотографическом изображении, и по собственной оценке субъекта, определяемой  
20 по категориальной шкале в статических условиях по 4 точкам при максимальном нахмурировании, спустя 1 месяц. “Субъектом с комбинированным положительным ответом на лечение” называют субъекта, который получил оценку выраженности межбровных морщин 0 или 1 и достиг улучшения по меньшей мере на 2 балла по сравнению с начальным уровнем по обеим шкалам ILA и SSA одновременно. На  
25 Фиг. 2 представлена оценочная матрица выраженности межбровных морщин.

В конечной точке определения первичной эффективности в исследовании лечения межбровных морщин было обнаружено, что 71,1% субъектов в группе только с GL, получавшей лечение (75/106), и 72% субъектов в группе с комбинацией LCL/GL, получавшей лечение (78/108), демонстрировали положительный  
30 комбинированный ответ на лечение, в то время как в группе плацебо (0% - 0/55) ни один из субъектов не демонстрировал положительный комбинированный ответ на лечение. Комбинированная оценка эффективности в первичной конечной точке спустя 1 месяц показала высоко статистически значимые результаты ( $p < 0,001$ ) по сравнению с плацебо.

Первичную эффективность лечения боковых периорбитальных морщин в конечной точке определяли по параметру “комбинированная частота положительного ответа на лечение” боковых периорбитальных морщин. Комбинированную частоту положительного ответа на лечение боковых периорбитальных морщин определяли по двум оценочным шкалам: по оценке исследователя в реальных условиях (ILA), определяемой по шкале оценки по 4 точкам на фотографическом изображении, и по самостоятельной оценке субъекта, определяемой по категориальной шкале в статических условиях по 4 точкам при самой широкой улыбке, спустя 1 месяц. “Субъектом с комбинированным положительным ответом на лечение” называют субъекта, который получил оценку выраженности боковых периорбитальных морщин 0 или 1 и достиг улучшения по меньшей мере на 2 балла по сравнению с начальным уровнем по обеим шкалам ILA и SSA одновременно. На Фиг. 6 представлена оценочная матрица выраженности боковых периорбитальных морщин.

В первичной конечной точке определения эффективности лечения боковых периорбитальных морщин было обнаружено, что 45,1% субъектов в группе только с LCL, получавшей лечение (53/117), демонстрировали положительный комбинированный ответ на лечение, и 55% субъектов в группе с комбинацией LCL/GL, получавшей лечение (59/108), демонстрировали положительный комбинированный ответ на лечение, в то время как в группе плацебо ни один из субъектов (0% - 0/55) не демонстрировал положительный комбинированный ответ на лечение. Комбинированная оценка эффективности в первичной конечной точке спустя 1 месяц показала высоко статистически значимые результаты ( $p < 0,001$ ) по сравнению с плацебо.

В анализе вторичной эффективности лечения межбровных морщин определяли частоту положительного ответа на лечение с течением времени по оценке ILA. На Фиг. 10 представлена частота положительного ответа на лечение межбровных морщин с течением времени по оценке ILA. В каждый из моментов времени в группах, получавших лечение (как в группе только с GL, так и в группе с комбинацией GL/LCL, получавших лечение), выявляли значительно более высокий процент пациентов с положительным ответом по оценке ILA по сравнению с группой плацебо ( $p < 0,001$ ). См. Фиг. 10.

В анализе вторичной эффективности лечения боковых периорбитальных морщин определяли частоту положительного ответа на лечение с течением

времени по оценке IIA. На Фиг. 11 представлена частота положительного ответа на лечение боковых периорбитальных морщин с течением времени по оценке IIA. В каждый из моментов времени в группах, получавших лечение (как в группе только с GL, так и в группе с комбинацией GL/LCL, получавших лечение), выявляли  
5 значительно более высокий процент пациентов с положительным ответом по оценке IIA по сравнению с группой плацебо ( $p < 0,001$ ). См. Фиг. 11.

Затем у субъектов проводили предварительный анализ эффективности, используя шкалу общего эстетического улучшения (GAIS). В этом анализе субъектами с положительным ответом на лечение считались субъекты, которые  
10 отмечали пункты “Улучшения”, “Заметные улучшения” или “Очень заметные улучшения” по шкале GAIS для субъектов. В этом примере частота положительного ответа по шкале GAIS на лечение у субъектов групп с GL и LCL была высокой (большинство отмечали у себя улучшения в течение 5 месяцев) по сравнению с контрольной группой плацебо. См. Фиг. 12. Субъекты в группе, получавшей лечение,  
15 указывали на то, что эффект проявлялся уже в Сутки 0. Средний срок появления эффекта в группе, получавшей лечение, составлял 2-4 суток.

*Безопасность:* Общая частота возникновения нежелательных явлений (НЯ) была сравнима с частотой их возникновения в группе плацебо. Было установлено, что все серьезные нежелательные явления (СНЯ) не были связаны с исследуемым  
20 медикаментом или процедурой введения инъекций. Все возникшие при проведении лечения нежелательные явления (НЯСЛ – также называемые “нежелательными явлениями, связанными с лечением”) имели слабую или умеренную интенсивность, наиболее частым НЯСЛ были головная боль (4,3%), развитие гематомы на участке инъекции (2,6%) и опущение верхнего века (в группе только с GL, получавшей  
25 лечение, отмечали только 1,7% случаев птоза). Ни один субъект не умер, и ни один субъект не испытывал НЯСЛ, которые приводили бы к досрочному прекращению исследования.

#### Пример 4

Сравнение воздействия QM-114-DP и других ботулинических токсинов на  
30 межбровные морщины

В сравнительном исследовании QM-114-DP сравнивали с другими доступными продуктами, содержащими ботулинический токсин.

*Комбинированное улучшение состояния межбровных морщин на 2 балла:* применение QM-1114-DP приводило к достижению комбинированного улучшения состояния межбровных морщин на 2 балла на неделе 4 (Сутки 30) у большего процента субъектов, чем применение Daxi 40U (DaxibotulinumtoxinA) и Jeaveau EV-002 (PrabotulinumtoxinA). Вкратце, при введении QM-1114-DP комбинированное улучшение состояния межбровных морщин на 2 балла демонстрировали приблизительно 82,9% субъектов, в то время как эта доля для лечения Daxi 40U составила 73,8% и для лечения Jeaveau EV-002 – 70,4%. См. Фиг. 13.

*Оценка состояния межбровных морщин Исследователем:* оценка Исследователем выраженности межбровных морщин “от отсутствия до умеренных” после лечения QM-1114-DP была сравнима с оценкой, полученной после лечения Daxi 40U и Botox, и сохранялась в течение периода до 24 недель (150 суток). См. Фиг 14.

*Комбинированное улучшение состояния боковых периорбитальных морщин на 2 балла:* применение QM-1114-DP приводило к достижению комбинированного улучшения состояния боковых периорбитальных морщин на 2 балла на неделе 4 (Сутки 30) у большего процента субъектов, чем применение Botox. См. Фиг. 15.

*Оценка состояния межбровных морщин Исследователем:* оценка Исследователем выраженности межбровных морщин “от отсутствия до умеренных” после лечения QM-1114-DP была сравнима с оценкой, полученной после лечения Daxi 40U и Botox (OnabotulinumtoxinA), и сохранялась в течение периода до 24 недель (150 суток). Интересно отметить, что спустя 4 недели после лечения Daxi 40U и Botox ни у одного субъекта оценка состояния морщин Исследователем не достигала показателя “от отсутствия до умеренных”. См. Фиг. 16.

*Сравнение ферментативной активности:* Ферментативную активность определяли в анализе BoTest™ (см. Фиг. 17 и 18). Для исключения влияния вспомогательных веществ, в анализе BoTest™ (с помощью набора для обнаружения ботулинического нейротоксина BOTEST™ Matrix A; номер по каталогу BioSentinel: A1015) все токсины исследовали, применяя общий буфер, чтобы выявить только влияние токсина. Вкратце, образцы распределяли по лункам для микротитрования, и в каждый образец добавляли буфер связывания Matrix. В каждую лунку, содержащую образец, помещали ресуспендированные гранулы Matrix A, и планшеты инкубировали. Гранулы Matrix промывали буфером для промывки Matrix. Промывной буфер удаляли и заменяли на реакционный буфер BoTest™,

содержащий DTT (дителиотрейтол, англ. dithiothreitol). Добавляли реагент BoTest™ Master Stock, после чего планшеты закрывали крышками для инкубации, и затем производили считывание флуоресцентных сигналов. В обоих анализах наблюдали очень похожие картины ферментативной активности.

- 5 На Фиг. 18 представлены нормализованные значения (т.е. удельная активность) каждого продукта, которые вычисляли как отношение активности (ед./мл) к количеству BoNT в препарате, определяемому в BoNT-A-специфическом анализе ELISA (BOLISA®).

- 10 В приведенных ниже таблицах представлена ферментативная активность, вычисленная из результатов двух повторений одного эксперимента.

Эксперимент 2 (общий буфер)			
	<b>Botox</b>	<b>QM1114</b>	<b>Xeomin</b>
BoTEST (BoTest ед./мл)	93,2 ± 11,1	96,5 ± 0	85,7 ± 24,6
BoLisa (ОБЕ/мл)	154,1 ± 9,5	82,9 ± 1,2	88,5 ± 3,1
Удельная активность (BoTest, ед./ОБЕ)	0,61	1,16	0,97
Удельная активность (BoTest, ед./пикограмм BoNTA)	0,10	0,18	0,15
BoTest, 3 определения для одного образца (A;B,X); 2 определения (Q). A:UD0503; B: C6463C2; Q: партия 19395; X:030390. Отбор проб для анализа: 20210815			
Bolisa. 3 определения для одного образца (Q,X), 2 определения (A,B). A:UD0503; B: C6463C2; Q: партия 19395; X:030390. Отбор проб для анализа: 20210815/A/ALS			

Эксперимент 3 (общий буфер)			
	<b>Botox</b>	<b>QM1114</b>	<b>Xeomin</b>
BoTEST (BoTest ед./мл)	116,9 ± 14,5	96,6 ± 10,9	108,5 ± 21,8
BoLisa (ОБЕ/мл)	>165	92,7 ± 5,6	97,2 ± 4
Удельная активность (BoTest, ед./ОБЕ)	0,71	1,04	1,12
Удельная активность (BoTest, ед./пикограмм BoNTA)	0,11	0,16	0,18
BoTest, 4 определения (Q,B); 5 определений (X). B: C6463C2; Q: партия 19744; X:034161. Отбор проб для анализа: 20220407/A/ALS			
Bolisa. 4 определения для одного образца. B: C6463C2; Q: партия 19744; X:034161 Отбор проб для анализа: 20220414/A/KaVa			

*Сравнение относительной эффективности:* Авторы настоящего изобретения также определяли какое количество белка токсина находится в

QM1114-DP и в конкурирующих продуктах; для этой цели применяли клеточный анализ, в котором с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (hiPSC) оценивали BoNT/A-зависимое внутриклеточное повышение концентрации расщепленного белка SNAP25, который обнаруживали способом вестерн-блоттинг. В клеточных анализах использовали общий буфер. Количество ботулинического нейротоксина типа А определяли способом BoNT-A-специфического ELISA (также с использованием общего буфера). Можно отметить, что после нормализации активности и эффективности (делением величины активности и эффективности на количество токсина) QM1114-DP имеет наиболее высокую эффективность на одну молекулу токсина. Таким образом, QM1114-DP является гораздо более мощным токсином, чем другие токсины (например, на 90% мощнее Botox). См. Фиг. 19.

На Фиг. 19 представлена относительная эффективность, определенная в клеточном анализе, выполненном в общем буфере, и нормализованная по количеству белка в каждом продукте. Величина, выраженная в ед./пикограмм, была вычислена делением относительной эффективности на количество BoNT в препарате, где количество BoNT определяли в BoNT-A-специфическом анализе ELISA (BOLISA®).

### ***Заключение***

Препарат QM1114-DP превосходит по свойствам другие ботулинические токсины (например, Daxi 40U, Jeaveau EV-002 и Botox). В частности, по эффективности и активности QM1114-DP превосходит Xeomin и Botox. Например, применение QM1114-DP приводит к более высокой частоте положительного ответа на лечение LCL и GL, чем применение других ботулинических токсинов. Кроме того, QM1114-DP с меньшей вероятностью вызывает нежелательные побочные явления, такие как опущение верхнего века, или вызывает менее выраженное опущение верхнего века по сравнению с другими ботулиническими токсинами. В препарате QM1114-DP выше активность токсина, выраженная в единицах (ME), и поэтому при одинаковом количестве терапевтической композиции субъект получает меньшее количество QM1114-DP, что снижает вероятность или выраженность любых потенциальных нежелательных явлений. Наконец, эффект от введения QM1114-DP появляется быстрее и держится дольше, чем от введения других исследованных токсинов.

Пример 5QM1114-DP имеет высокую чистоту и не содержит комплексов

Чистоту белка в QM-1114-DP анализировали способами сверхэффективной жидкостной хроматографии – гель-проникающей хроматографии (СВЭЖХ-ГПХ) и SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия). Для анализа СВЭЖХ-ГПХ QM-1114-DP разделяли на колонке Water BEH™ SEC и анализировали поглощение (A280). Анализ SDS-PAGE проводили в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с окрашиванием Коллоидным Кумасси (Colloid Coomassie), что позволяло количественно обнаруживать загрязнения.

Как показано на Фиг. 20 и Фиг. 21, препарат QM-1114-DP имеет высокую чистоту и не содержит каких-либо комплексов, что подтверждается тем, что в анализе SDS-PAGE присутствуют лишь полосы, обусловленные BoNT-A.

Пример 6Лечение боковых периорбитальных морщин (LCL)

Было показано, что лечение межбровных морщин с использованием QM-1114-DP приводит к высокой комбинированной частоте положительного ответа на лечение с результатом не менее 2 баллов спустя 1 месяц (83%), полученный эффект сохраняется до шести месяцев, и появление эффекта у более чем одной трети субъектов наблюдается уже в Сутки 1. Таким образом, было проведено дополнительное исследование для оценки результата введения однократной дозы 60 единиц QM-1114-DP в сравнении с плацебо при лечении LCL от умеренных до выраженных.

Субъектов (N=303) с LCL от умеренных до выраженных рандомизировали в отношении 3:1 в группы введения 60 единиц QM-1114-DP или плацебо. Выраженность LCL оценивали по шкале Оценка LCL Исследователем в реальных условиях (LCL-ILA) по 4 точкам на фотографическом изображении, по шкале Личная оценка LCL субъектом (LCL-SLA) по 4 точкам на фотографическом изображении и по заявляемому Субъектом появлению эффекта и по удовлетворенности субъекта. Также отслеживали нежелательные явления. Первичной конечной точкой исследования был комбинированный положительный ответ на лечение с результатом 2 балла, который оценивали по шкалам LCL-ILA и LCL-SLA при самой широкой улыбке спустя 1 месяц. Комбинированный положительный ответ на лечение с результатом 2 балла определяли, если у субъекта отсутствовали (оценка

0) или присутствовали умеренно выраженные (оценка 1) LCL и наблюдали улучшение по меньшей мере на 2 балла по сравнению с начальным уровнем по шкале LCL-ILA и по шкале LCL-SLA при самой широкой улыбке.

5 Частота комбинированного положительного ответа на лечение LCL с результатом 2 балла была выше при введении relaBoNT-A, чем при введении плацебо (51,8% по сравнению с 1,4%,  $P < 0,001$ ) (Фиг. 22). Среднее время до появления эффекта составляло 2 суток, и 34% субъектов сообщали о появлении эффекта в Сутки 1 (Фиг. 23). Исследователи сообщали об отсутствии или умеренной выраженности морщин у 88% субъектов спустя 1 месяц, и этот эффект сохранялся у 10 23% субъектов спустя 6 месяцев (Фиг. 24). Спустя 1 месяц Исследователи сообщали об улучшении не менее 1 балла у 93% субъектов, и этот эффект сохранялся у 36% субъектов спустя 6 месяцев (Фиг. 25).

Дополнительно, одной поисковой конечной точкой было время до 15 возвращения к начальному уровню. Эту конечную точку определяли у тех субъектов, которые достигали оценки 0 или 1 по обеим шкалам оценки по 4 точкам на фотографическом изображении при самой широкой улыбке, т.е. шкале LCL-ILA и шкале LCL-SLA. Как показано на Фиг. 26, среднее время до возвращения к 20 начальному уровню одновременно по шкале ILA и шкале SLA составляло 173 суток (24,7 недель). Таким образом, QM-1114-DP обеспечивает более длительный эффект лечения LCL.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения межбровных морщин (GL), боковых периорбитальных морщин (LCL) или их комбинации у субъекта-человека, характеризующийся пониженным риском опущения верхнего века, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества жидкой композиции, включающей ботулинический нейротоксин, что приводит к уменьшению выраженности GL, LCL или их комбинации, причем ботулинический нейротоксин с меньшей вероятностью вызывает опущение верхнего века по сравнению с продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин с более низкой ферментативной активностью или более низкой специфической активностью.

2. Жидкая композиция, включающая ботулинический нейротоксин, для применения в способе лечения межбровных морщин (GL), боковых периорбитальных морщин (LCL) или их комбинации у субъекта-человека, обеспечивающая пониженный риск опущения верхнего века, где способ включает введение терапевтически эффективного количества жидкой композиции субъекту, что приводит к уменьшению выраженности GL, LCL или их комбинации, причем ботулинический нейротоксин с меньшей вероятностью вызывает опущение верхнего века по сравнению с продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин с более низкой ферментативной активностью или более низкой специфической активностью.

3. Способ по пункту 1 или жидкая композиция для применения по пункту 2, где у субъекта не возникает никаких серьезных нежелательных явлений.

4. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где субъект с меньшей вероятностью испытывает опущение верхнего века по сравнению с лечением содержащим ботулинический нейротоксин продуктом, выбранным из BOTOX COSMETIC<sup>®</sup>, XEOMIN<sup>®</sup> и JEUVEAU<sup>®</sup>.

5. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где содержащий ботулинический нейротоксин продукт с более низкой ферментативной активностью выбран из BOTOX COSMETIC<sup>®</sup>, XEOMIN<sup>®</sup> и JEUVEAU<sup>®</sup>.

6. Способ лечения межбровных морщин (GL), боковых периорбитальных морщин (LCL) или их комбинации у субъекта-человека, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества жидкой композиции,

включающей ботулинический нейротоксин, что приводит к уменьшению выраженности GL, LCL или их комбинации, где (i) активность жидкой композиции составляет по меньшей мере приблизительно 97 БЕ/мл (единиц ботулотоксина/мл) или более.

5           7. Жидкая композиция, включающая ботулинический нейротоксин, для применения в способе лечения межбровных морщин (GL), боковых периорбитальных морщин (LCL) или их комбинации у субъекта-человека, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества жидкой композиции, что приводит к уменьшению выраженности GL, LCL или их комбинации,  
10 и (i) активность жидкой композиции составляет по меньшей мере приблизительно 97 БЕ/мл или более.

8. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где специфическая BoNT активность жидкого препарата составляет приблизительно  $2,0 \times 10^8$  ед./мг общего белка, и специфическую  
15 активность (ед./мг) необязательно определяют как отношение эффективности LD50 для мышей, выраженной в ед./мл, к общему количеству белка, определяемому микроанализом с бицинхоновой кислотой (мг/мл).

9. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где ферментативная активность жидкого препарата, нормализованная по концентрации ботулинического нейротоксина, составляет по  
20 меньшей мере приблизительно 1,10 БЕ/ОБЕ (единиц ботулотоксина/относительных единиц ботулотоксина) или по меньшей мере приблизительно 0,17 БЕ/пикограмм, где ферментативную активность ботулинического нейротоксина необязательно определяют способом BOTEST™.

25           10. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где относительная эффективность жидкого препарата, нормализованная по концентрации ботулинического нейротоксина, составляет по меньшей мере приблизительно 1,35 СВрА единиц/BoNT (единицы клеточного анализа эффективности/BoNT), и ферментативную активность ботулинического  
30 нейротоксина определяют в клеточном анализе.

11. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где жидкий препарат не содержит вспомогательных веществ, полученных из организма человека или животного.

12. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где частота возникновения опущения верхнего века составляет менее 2%, менее 1,9%, менее 1,8%, менее 1,7%, менее 1,5%, менее 1,4%, менее 1,3%, менее 1,2%, менее 1,1%, менее 1,0% или достигает 0,9%.

5 13. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где опущение верхнего века у субъекта не происходит.

14. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где субъект с меньшей вероятностью будет испытывать опущение верхнего века по сравнению с лечением продуктом, содержащим ботулинический нейротоксин, выбранным из BOTOX COSMETIC®, XEOMIN® и JEUVEAU®.

10

15. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где GL, LCL или их комбинация имеют вид от умеренных до выраженных.

15 16. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где GL, LCL или их комбинация являются выраженными или сильно выраженными.

17. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где жидкая композиция, включающая ботулинический нейротоксин, не включает животных белков или сопутствующих белков.

20

18. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где субъект имеет GL.

19. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где субъект имеет LCL.

25 20. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где субъект имеет комбинацию GL и LCL.

21. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где лечение обеспечивает более высокий процент пациентов с положительным ответом, чем лечение BOTOX COSMETIC®.

22. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где жидкая композиция включает по меньшей мере 4 буферных агента.

5 23. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где жидкая композиция включает первый буферный агент, присутствующий в концентрации от приблизительно 100 мМ до приблизительно 300 мМ или в концентрации приблизительно от 0,1 мг/мл до 10 мг/мл.

10 24. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 23, где жидкая композиция включает второй буферный агент, присутствующий в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ или в концентрации приблизительно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл.

15 25. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 24, где жидкая композиция включает третий буферный агент, присутствующий в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ или в концентрации приблизительно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл.

20 26. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 25, где жидкая композиция включает четвертый буферный агент, присутствующий в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ или в концентрации приблизительно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл.

27. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 26, где жидкая композиция включает пятый буферный агент, присутствующий в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ или в концентрации приблизительно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл.

25 28. Способ или жидкая композиция для применения по любому из пунктов 22-27, где буферные агенты выбраны из группы, состоящей из хлорида натрия, хлорида калия, фосфата натрия, фосфата калия, дигидрата гидрофосфата динатрия и дигидрата дигидрофосфата натрия.

30 29. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где жидкая композиция включает по меньшей мере один стабилизатор, который необязательно представляет собой аминокислоту.

30. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 29, где аминокислота выбрана из группы, состоящей из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, фенилаланина, тирозина и триптофана.

5 31. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 29 или 30, где аминокислота находится в D изоформе или L изоформе.

32. Способ или жидкая композиция для применения по любому из пунктов 29-31, где аминокислота присутствует в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 3,0 мг/мл.

10 33. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где жидкая композиция включает по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество, которое необязательно представляет собой неионное поверхностно-активное вещество.

15 34. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 33, где неионное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от приблизительно 0,01% (об./об.) до приблизительно 5,0% (об./об.) или в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 3,0 мг/мл.

35. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где ботулинический нейротоксин выбран из группы, состоящей из ботулинического нейротоксина типа А, В, С, D, Е, F и G.

20 36. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 35, где ботулинический нейротоксин представляет собой ботулинический нейротоксин типа А.

37. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где рН жидкой композиции составляет от 6,6 до 6,9.

25 38. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где молекулярная масса ботулинического нейротоксина составляет приблизительно 150 кДа.

30 39. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где осмотическая концентрация жидкой композиции составляет от 270 мосмоль/кг до 310 мосмоль/кг.

40. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где субъекту вводят от 1 до 100 единиц ботулинического токсина.

5 41. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 40, где субъекту вводят от 10 до 75 единиц ботулинического токсина.

42. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 40, где субъекту вводят от 25 до 75 единиц ботулинического токсина.

43. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 40, где субъекту вводят 10, 25, 30, 45, 50, 60, 75 или 90 единиц ботулинического токсина.

10 44. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где жидкую композицию вводят посредством инъекции.

45. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 44, где инъекция представляет собой подкожную, трансдермальную, внутрикожную или внутримышечную инъекцию.

15 46. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 44 или 45, где субъекту вводят совокупность инъекций в межбровную область.

47. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 46, где соседние инъекции вводят на расстоянии друг от друга, составляющем от приблизительно 0,5 см до приблизительно 10 см.

20 48. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 46, где соседние инъекции вводят на расстоянии друг от друга, составляющем от приблизительно 1,5 см до приблизительно 3 см.

25 49. Способ или жидкая композиция для применения по любому из пунктов 46-48, где инъекции вводят в мышцу гордецов и мышцы, сморщивающие бровь, находящиеся на одной или на обеих сторонах лица.

50. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 49, где инъекции сначала делают в мышцу гордецов, а затем в мышцы, сморщивающие бровь, находящиеся на одной или на обеих сторонах лица, перемещаясь от середины к периферии.

51. Способ или жидкая композиция для применения по любому из пунктов 46-50, где все инъекции производят в область, расположенную приблизительно на 1 см выше верхнего глазничного валика, и внутри области, ограниченной линиями, проходящими через середину зрачков.

5 52. Способ или жидкая композиция для применения по любому из пунктов 46-51, где все инъекции производят в область, расположенную по меньшей мере на 1 см выше центральной части надбровной дуги или остеоидной надбровной дуги.

10 53. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 44 или 45, где субъекту вводят совокупность инъекций в область, расположенную ниже латеральной спайки век, в наружную часть круговой мышцы глаза и/или на расстоянии от 1 см до 2 см от глазничного валика.

15 54. Способ или жидкая композиция для применения по любому из пунктов 44-53, где субъекту дополнительно вводят совокупность инъекций в область ниже латеральной спайки век, в наружную часть круговой мышцы глаза и/или на расстоянии от 1 см до 2 см от глазничного валика.

55. Способ или жидкая композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где для подавления повторного проявления GL, LCL или их комбинации способ повторяют через определенные промежутки времени, составляющие от приблизительно 1 месяца до приблизительно 6 месяцев.

20 56. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 55, где способ повторяют через определенные промежутки времени, составляющие от приблизительно 3 месяцев до приблизительно 6 месяцев.

25 57. Способ или жидкая композиция для применения по пункту 56, где способ повторяют через определенные промежутки времени, составляющие приблизительно 4 месяца.

58. Жидкая композиция, включающая ботулинический нейротоксин, для применения в лечении межбровных морщин и/или боковых периорбитальных морщин у субъекта, как описано в настоящей работе.

30 59. Применение жидкой композиции, включающей ботулинический нейротоксин, для лечения межбровных морщин и/или боковых периорбитальных морщин, как описано в настоящей работе.

Шкала MAS выраженности межбровных морщин (GL) в состоянии покоя



0	1	2	3	4
Отсутствие межбровных морщин	Слабо выраженные межбровные морщины	Умеренно выраженные межбровные морщины	Выраженные межбровные морщины	Сильно выраженные межбровные морщины

Шкала MAS выраженности межбровных морщин (GL) в динамике

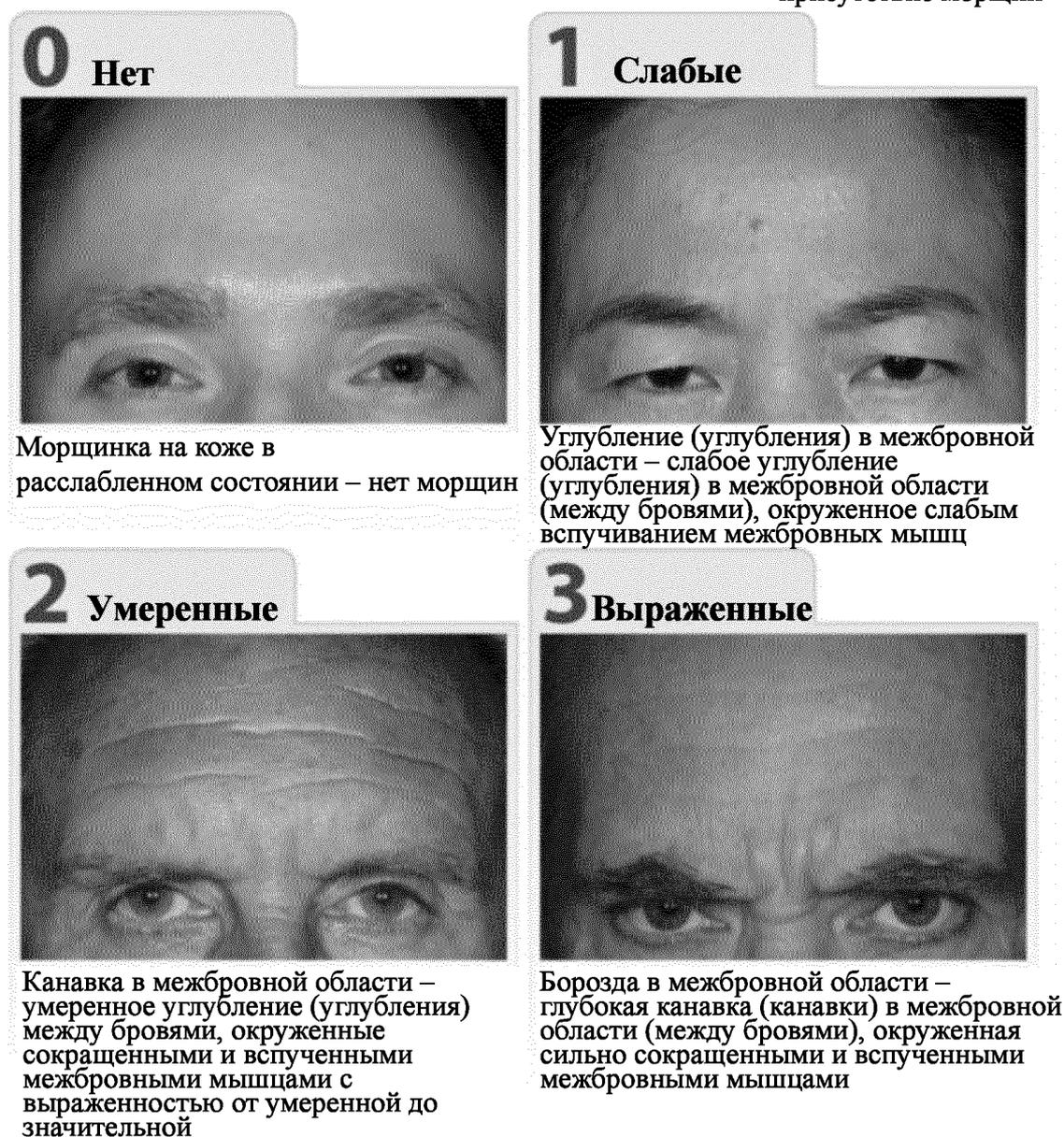


0	1	2	3	4
Отсутствие межбровных морщин	Слабо выраженные межбровные морщины	Умеренно выраженные межбровные морщины	Выраженные межбровные морщины	Сильно выраженные межбровные морщины

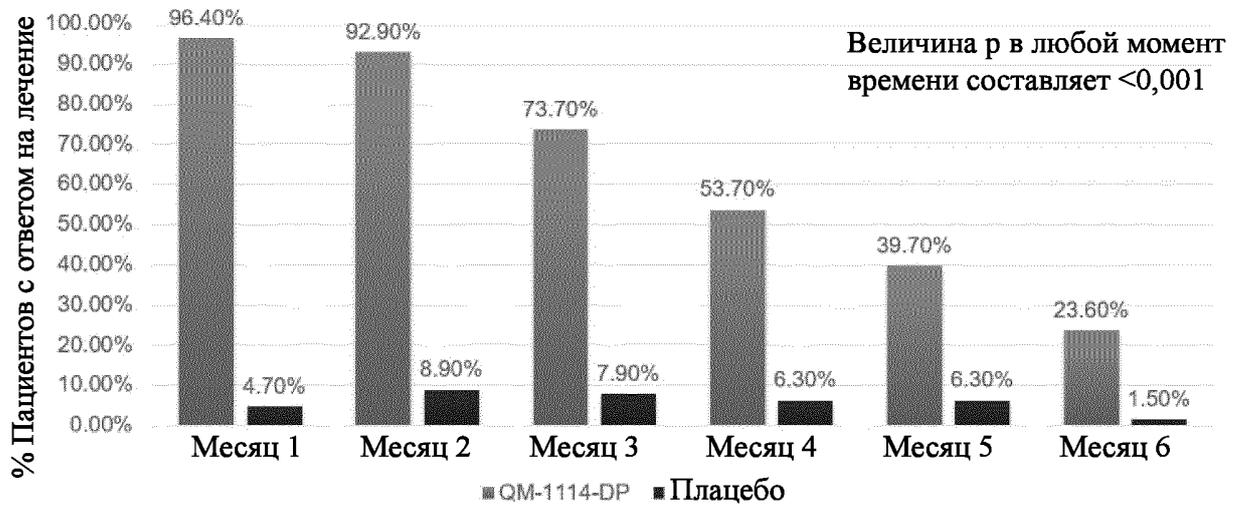
**ФИГ. 1**

## Морщины при максимальном нахмурировании

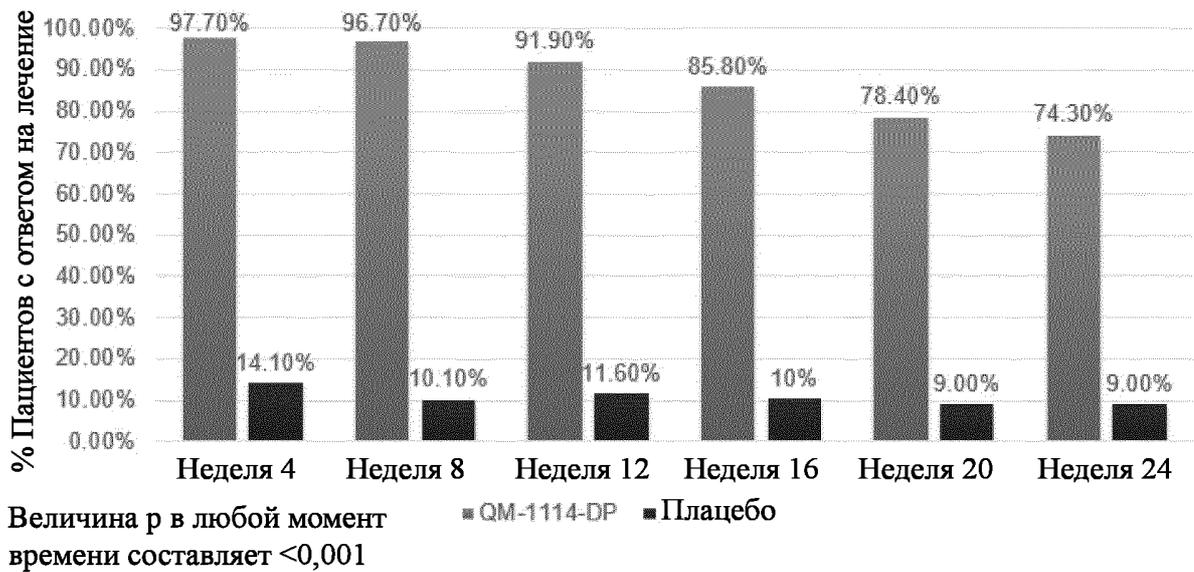
Межбровные морщины, образующиеся при максимальной сознательной мышечной активности, вносящей вклад в присутствие морщин



**ФИГ. 2**



ФИГ. 3



ФИГ. 4

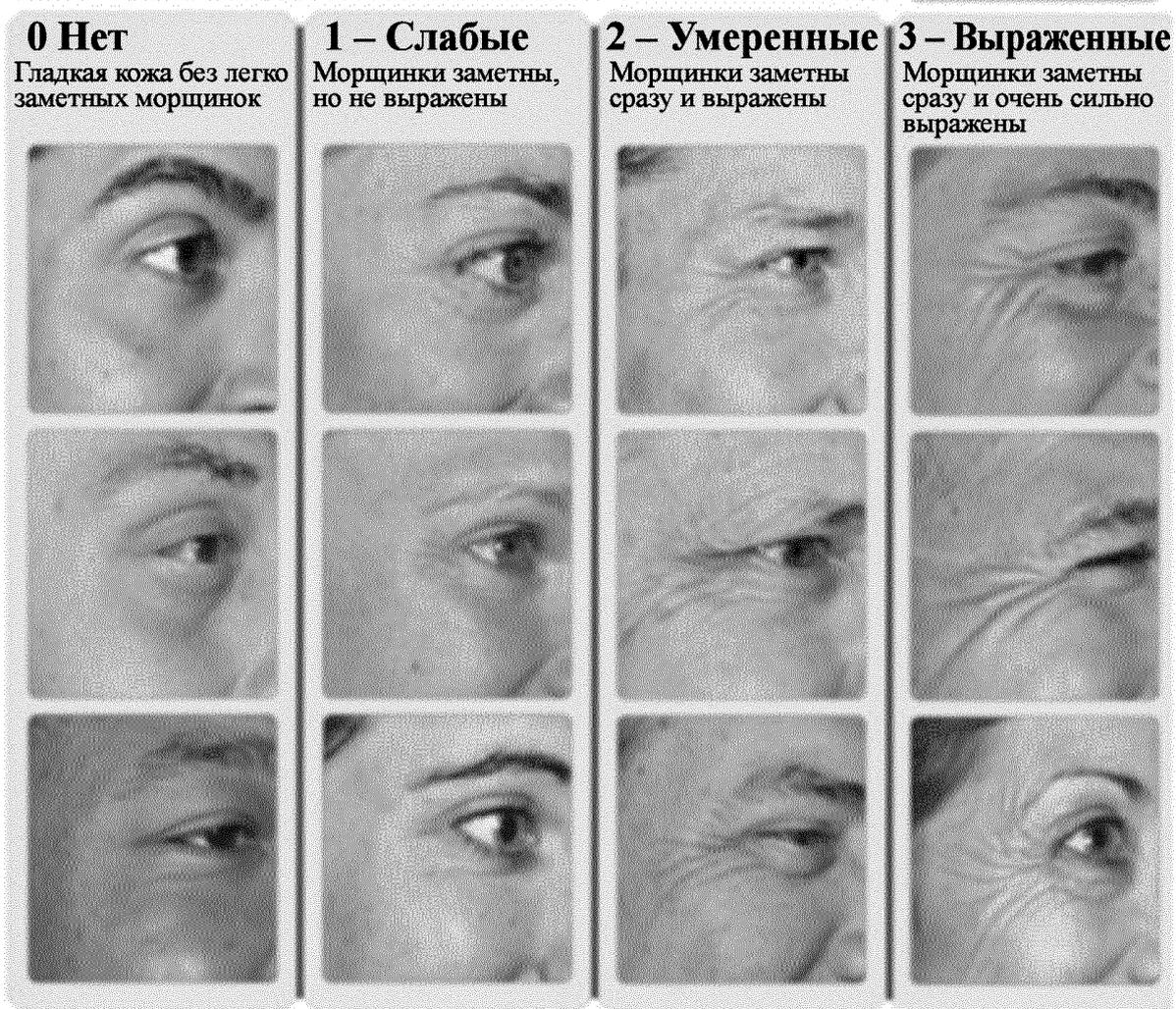
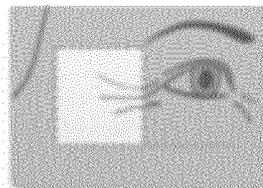
		QM-1114-DP (N = 222)	Плацебо (N = 75)
Предпочтительное наименование	Интенсивность	Субъекты/явления	Субъекты/явления
Головная боль	Всего	5 (2.3%) / 5	0 / 0
	Слабая	2 (0.9%) / 2	
	Умеренная	3 (1.4%) / 3	
	Сильная	0	
Блефароптоз	Всего	2 (0.9%) / 2	0 / 0
	Слабая	2 (0.9%) / 2	
	Умеренная	0	
	Сильная	0	
Гематома в месте инъекции	Всего	1 (0.5%) / 1	0 / 0
	Слабая	1 (0.5%) / 1	
	Умеренная	0	
	Сильная	0	

N = количество субъектов в выборке для определения безопасности

Не наблюдали нежелательных явлений, которые привели бы к досрочному прекращению исследования

**ФИГ. 5**

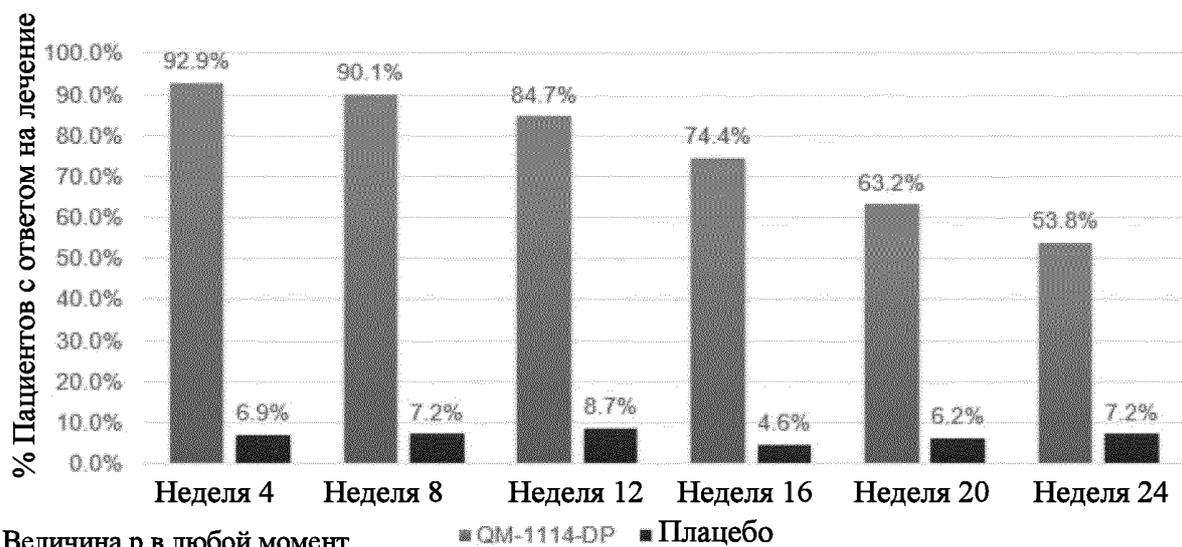
**Боковые периорбитальные морщины**  
**Оценка Исследователем в реальных условиях**  
**(LCL-ILA) в динамике**



**ФИГ. 6**



ФИГ. 7



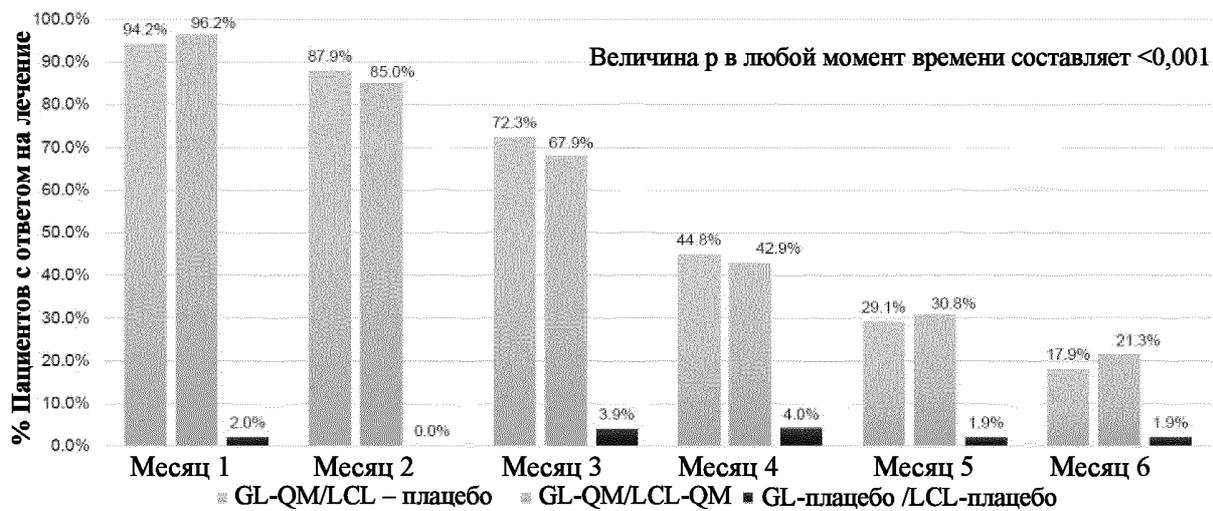
Величина р в любой момент времени составляет <0,001

ФИГ. 8

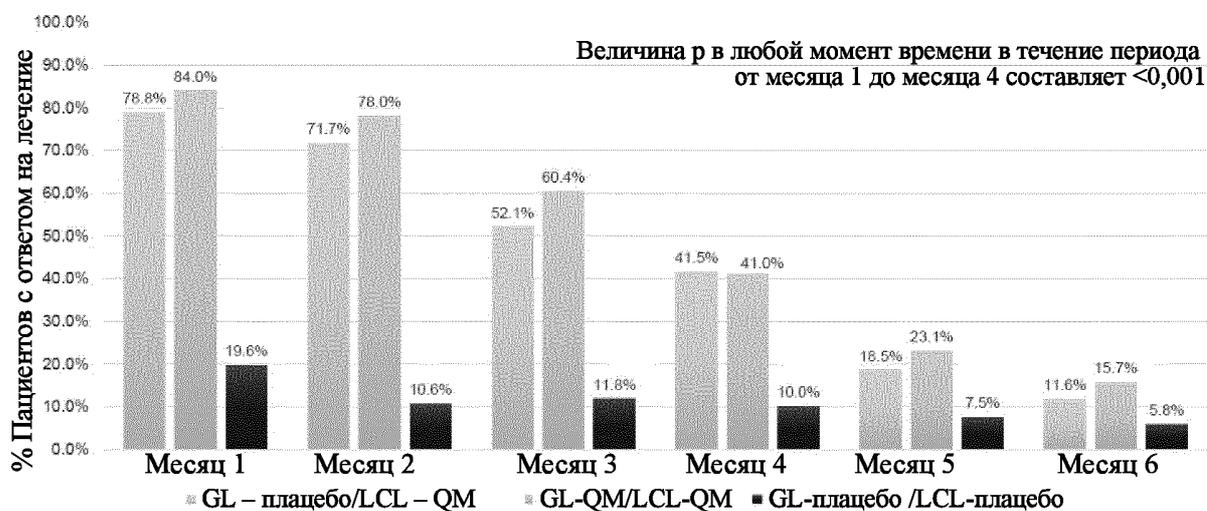
		QM-1114-DP (N = 230)	Плацебо (N = 73)
Предпочтительное наименование	Интенсивность	Субъекты/явления	Субъекты/явления
<b>Гематома в месте инъекции</b>	Всего	11 (4.8%) / 12	3 (4.1%) / 3
	Слабая	11 (4.8%) / 12	2 (2.7%) / 2
	Умеренная	0 / 0	1 (1.4%) / 1
	Сильная	0 / 0	0 / 0
<b>Боль в месте инъекции</b>	Всего	1 (0.4%) / 1	1 (1.4%) / 1
	Слабая	1 (0.4%) / 1	1 (1.4%) / 1
	Умеренная	0 / 0	0 / 0
	Сильная	0 / 0	0 / 0
<b>Головная боль</b>	Всего	1 (0.4%) / 1	1 (1.4%) / 1
	Слабая	1 (0.4%) / 1	1 (1.4%) / 1
	Умеренная	0 / 0	0 / 0
	Сильная	0 / 0	0 / 0
<b>Мышечная слабость</b>	Всего	1 (0.4%) / 1	0 / 0
	Слабая	1 (0.4%) / 1	0 / 0
	Умеренная	0 / 0	0 / 0
	Сильная	0 / 0	0 / 0

N = количество субъектов в выборке для определения безопасности

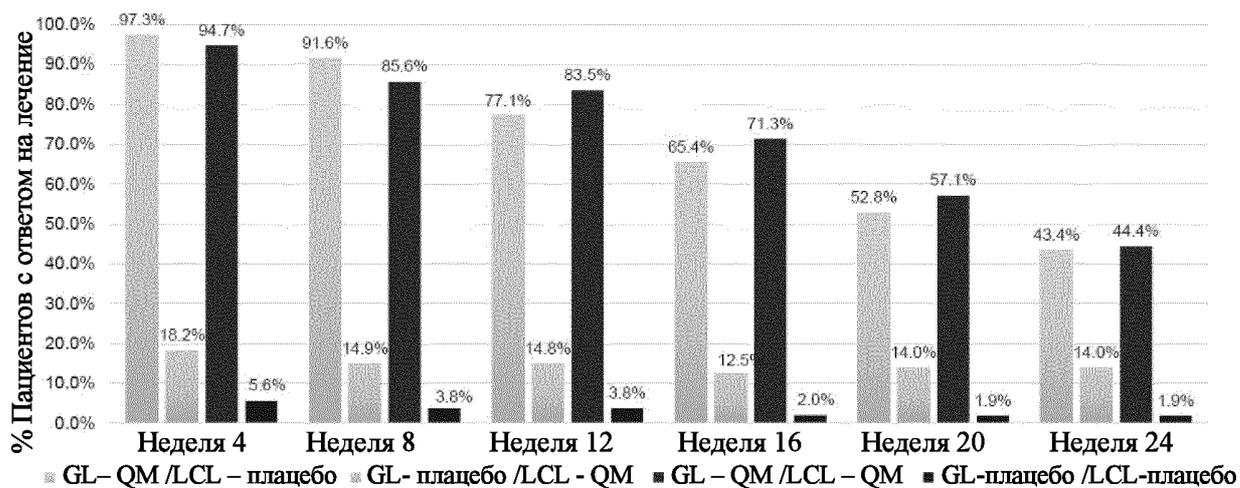
**ФИГ. 9**



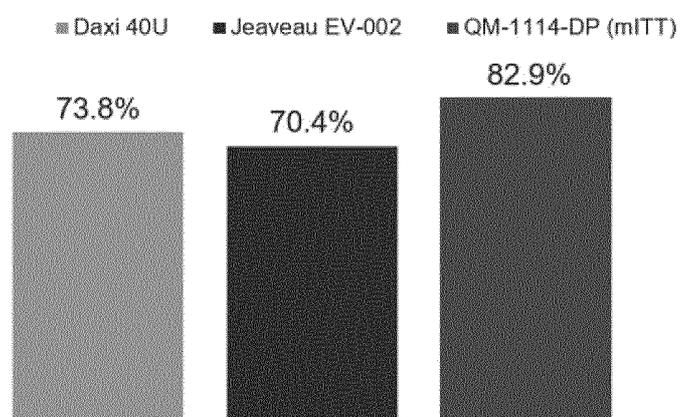
**ФИГ. 10**



ФИГ. 11

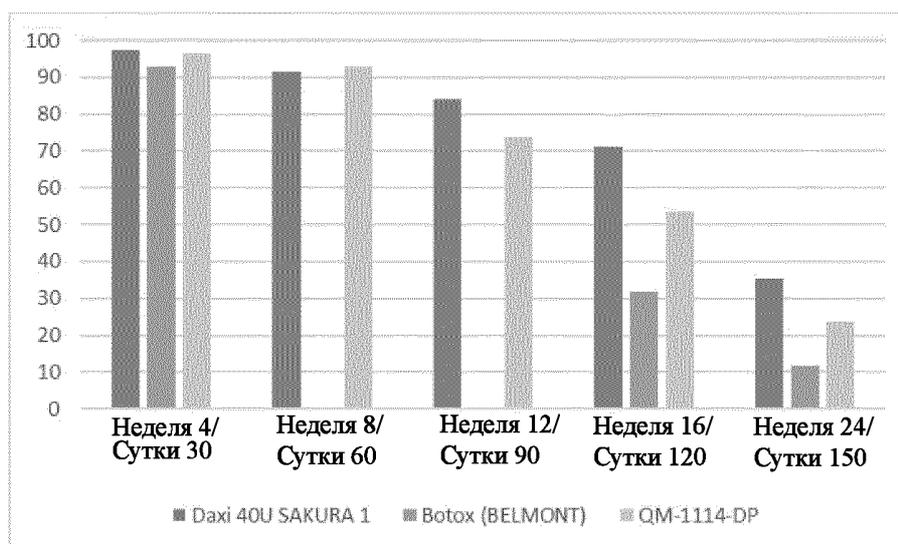


ФИГ. 12



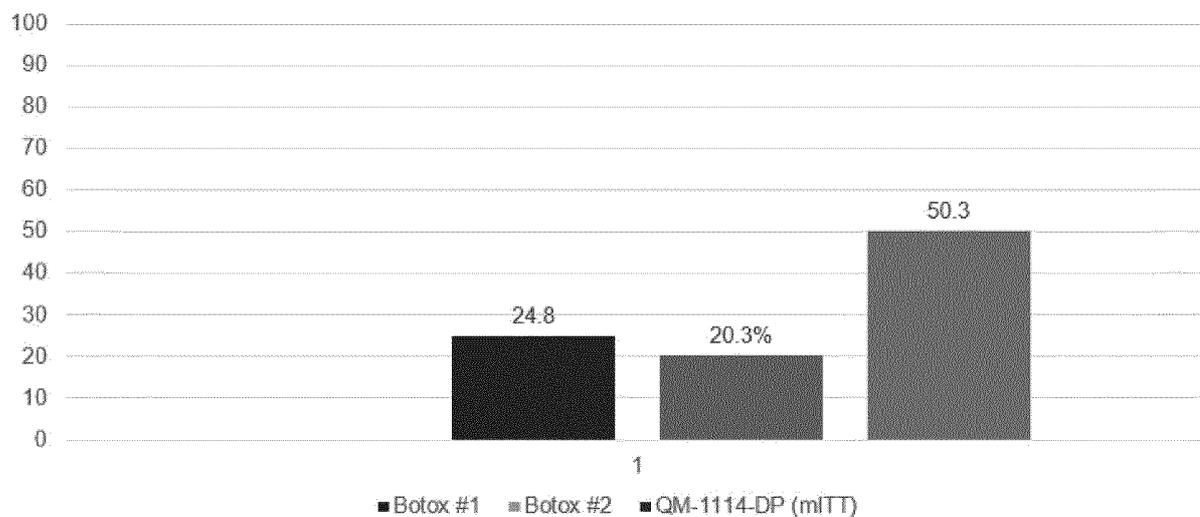
*mITT – модифицированная ITT-популяция, где ITT-популяция означает группу "все рандомизированные пациенты, получившие не менее одной дозы исследуемого препарата"*

**ФИГ. 13**



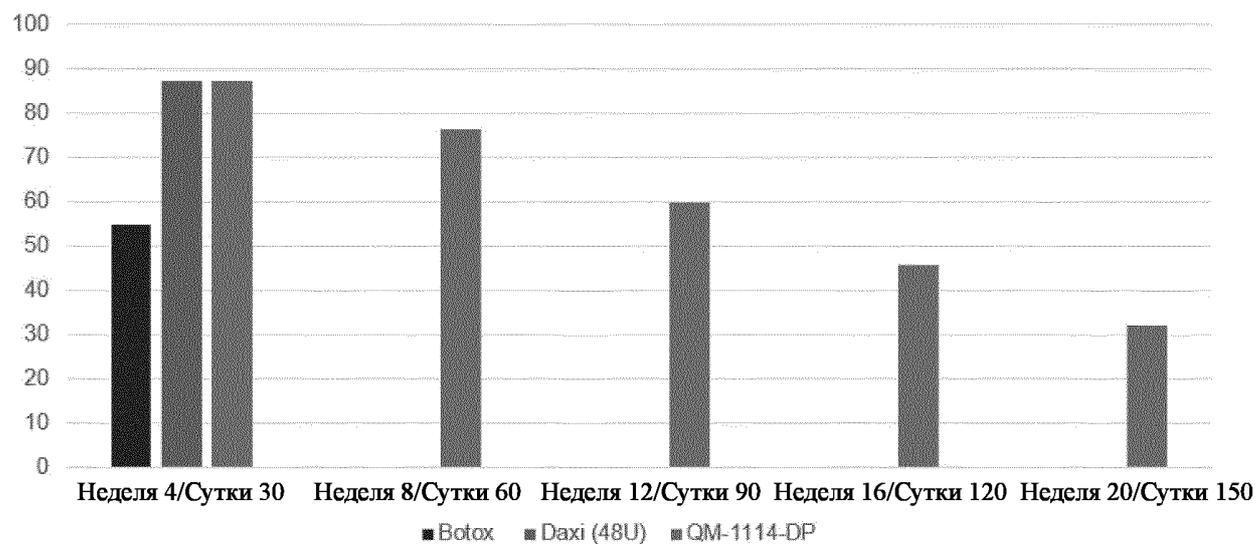
	Daxi 40U SAKURA 1	Botox (BELMONT)	QM-1114-DP
Неделя 4/ Сутки 30	97.5	92.9	96.4
Неделя 8/ Сутки 60	91.5		92.9
Неделя 12/ Сутки 90	84.1		73.7
Неделя 16/ Сутки 120	71.1	31.7	53.7
Неделя 24/ Сутки 150	35.4	11.9	23.6

**ФИГ. 14**

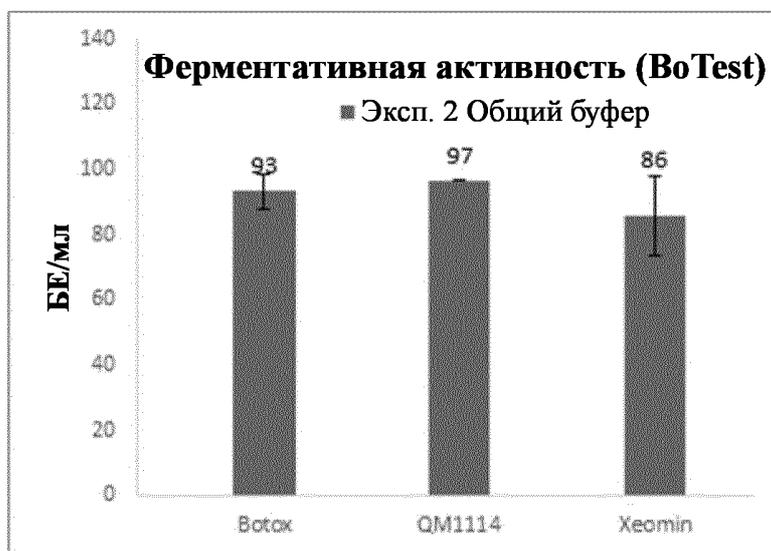


*mITT – модифицированная ITT-популяция, где ITT-популяция означает группу "все рандомизированные пациенты, получившие не менее одной дозы исследуемого препарата"*

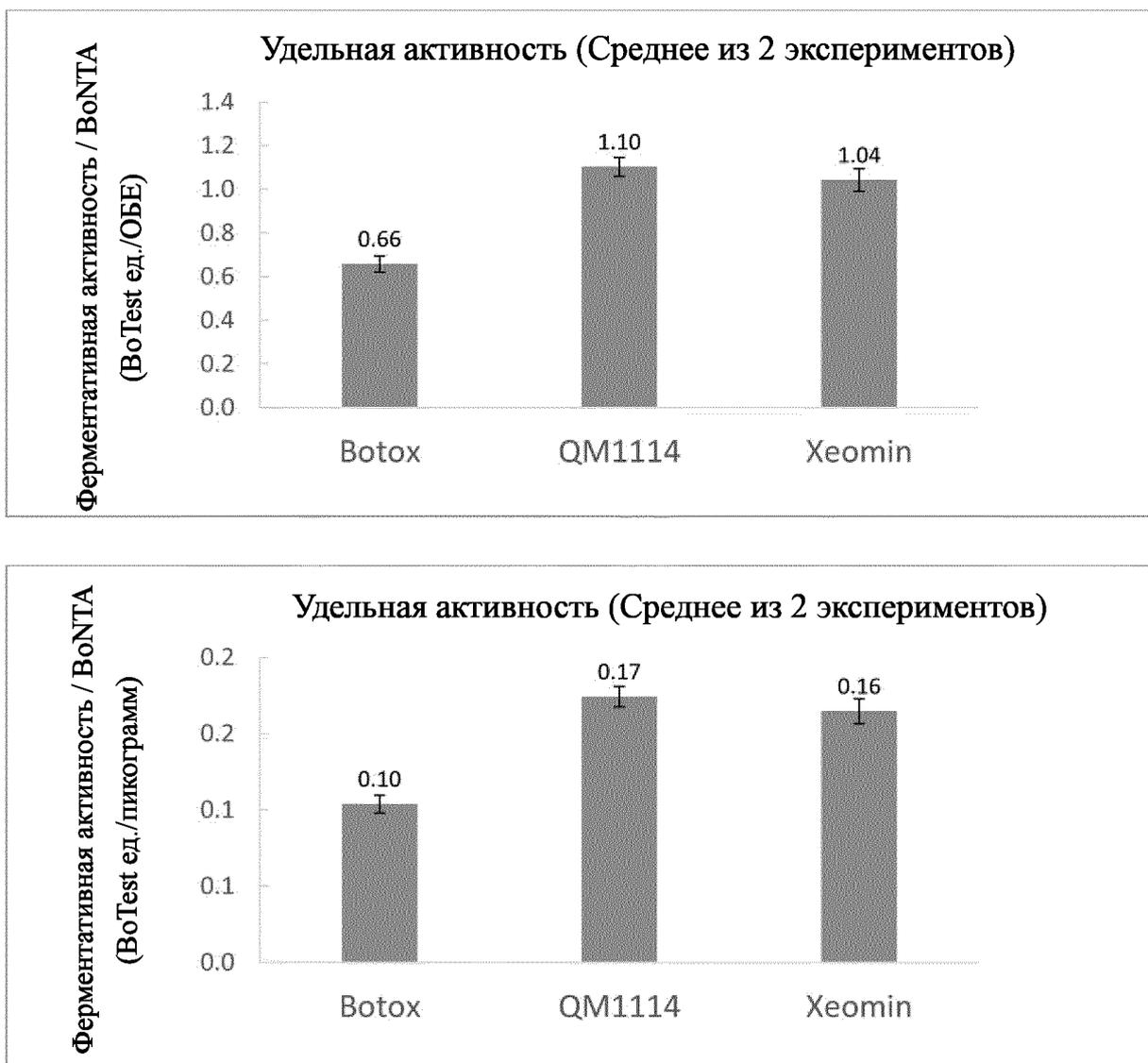
**ФИГ. 15**



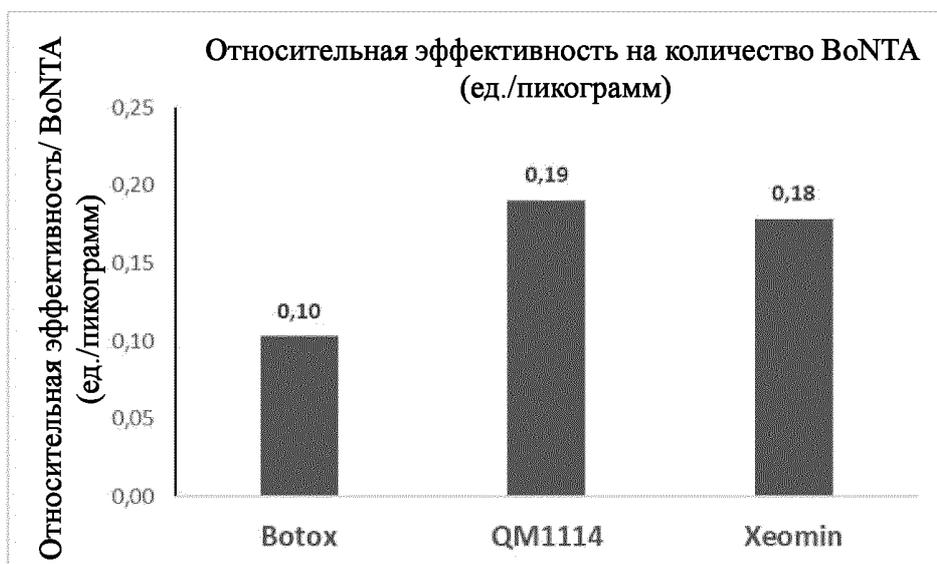
**ФИГ. 16**



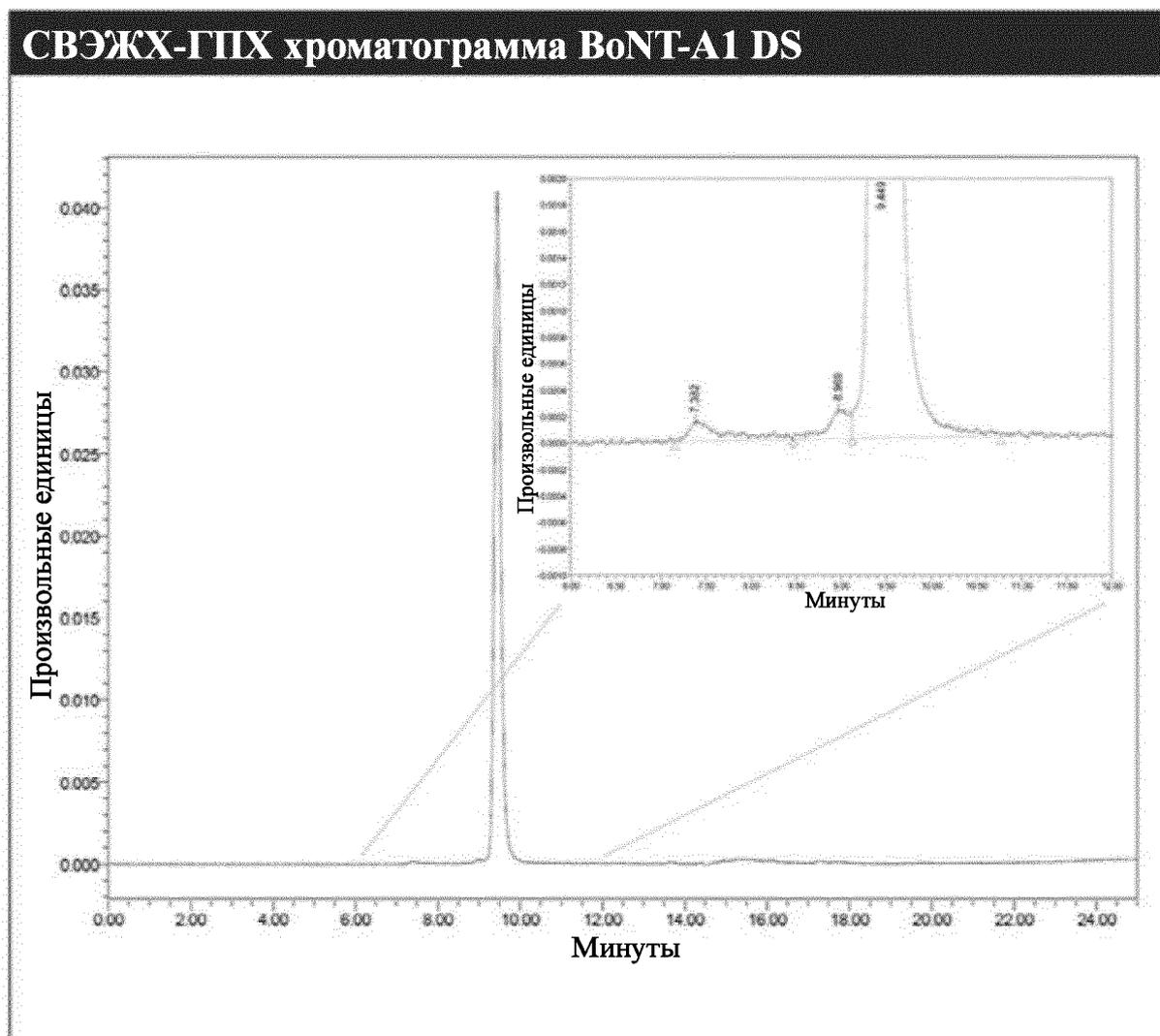
ФИГ. 17



ФИГ. 18

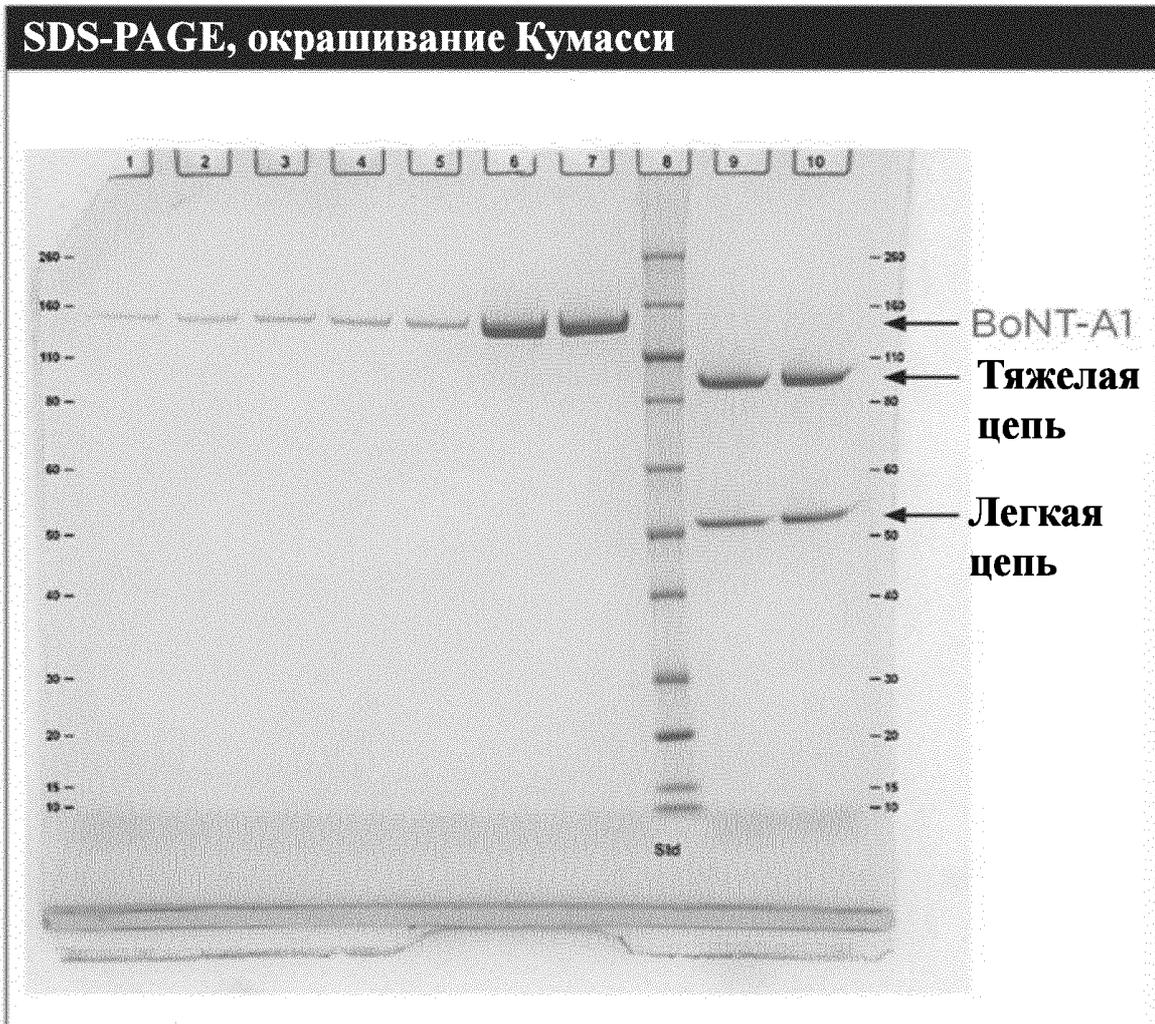


ФИГ. 19



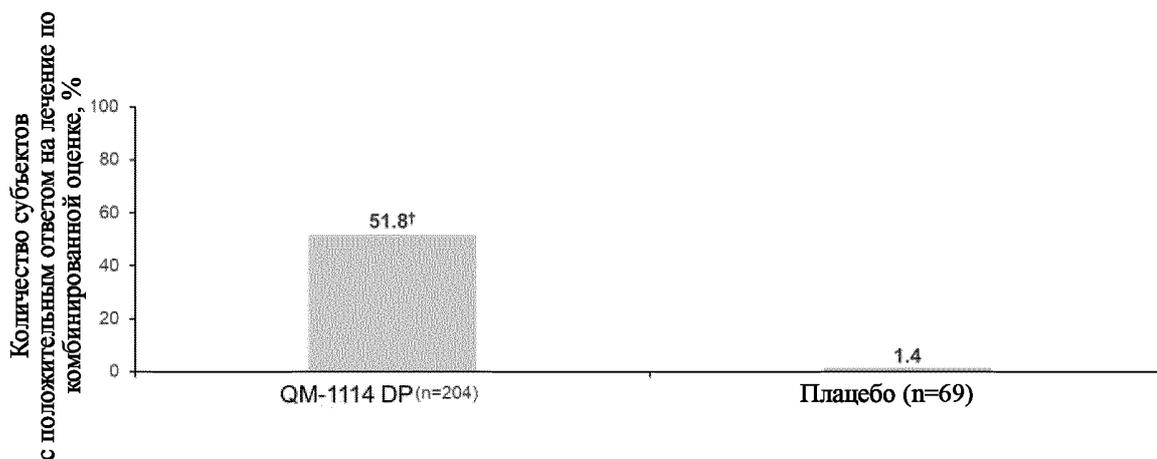
Вставка: увеличение отрезка хроматограммы с 6 по 12 минуту

**ФИГ. 20**



Дорожки 1-5: Стандарты; Дорожки 6-7: DS (в невосстанавливающих условиях); Дорожка 8: MW Novex Sharp неокрашенный; Дорожки 9-10: DS (в восстанавливающих условиях)

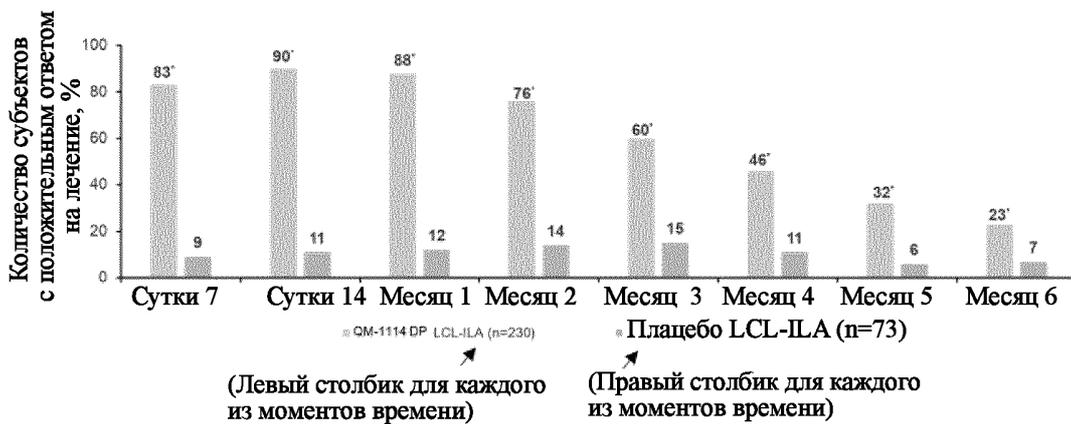
**ФИГ. 21**



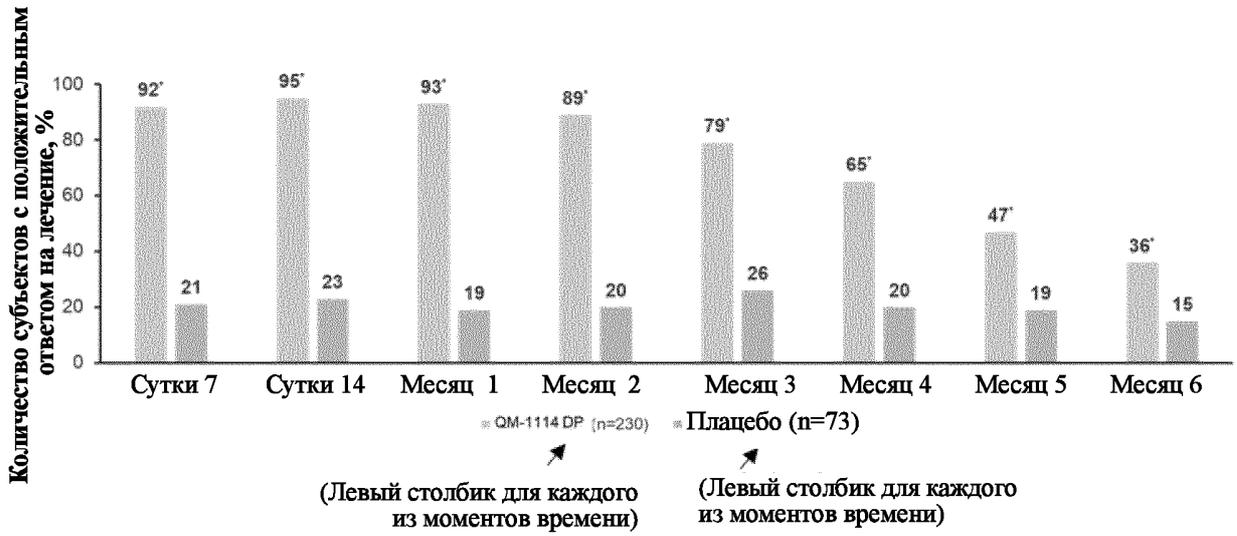
ФИГ. 22



ФИГ. 23



ФИГ. 24



ФИГ. 25



ФИГ. 26