



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월11일
(11) 등록번호 10-2794108
(24) 등록일자 2025년04월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/48 (2006.01) A61F 2/00 (2025.01)
A61K 8/64 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/4893 (2013.01)
A61F 2/0059 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7014681
(22) 출원일자(국제) 2016년10월28일
심사청구일자 2021년10월28일
(85) 번역문제출일자 2018년05월24일
(65) 공개번호 10-2018-0077202
(43) 공개일자 2018년07월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/059492
(87) 국제공개번호 WO 2017/075468
국제공개일자 2017년05월04일
(30) 우선권주장
62/248,255 2015년10월29일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2010078242 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
레반스 테라퓨틱스, 아이엔씨.
미국 캘리포니아 94560 뉴어크 게이트웨이 블레바드 7555
(72) 발명자
루에그 커티스 엘.
미국 캘리포니아 94062 레드우드 시티 셰퍼드 웨이 826
와프 제이콥 엠.
미국 캘리포니아 94301 팔로 알토 브라이언트 스트리트 555 넘버 817
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

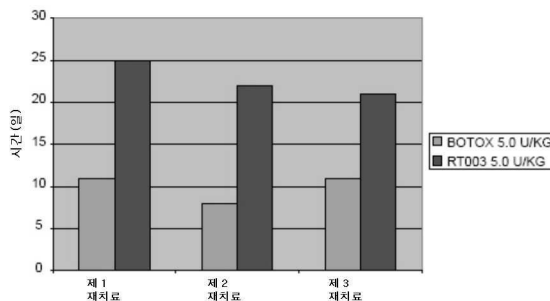
심사관 : 이동욱

(54) 발명의 명칭 주사용 보툴리눔 독소 제제 및 긴 지속기간의 치료적 또는 미용적 효과를 갖는 이를 이용한 방법

(57) 요약

본 발명은 다양한 치료적, 심미적 및/또는 미용적 목적을 위해 개체에게 투여될 수 있는 보툴리눔 독소를 포함하는 신규한 주사용 조성물을 제공한다. 본 발명에 의해 수용되는 주사용 조성물은 기존의 보툴리눔 독소 제제 대비, 감소된 항원성, 주사 후 원치않는 국소화된 확산을 겪는 경향의 감소, 임상적 효능의 증가된 지속기간, 또는 강화된 효능, 임상적 효과의 보다 빠른 개시 및/또는 개선된 안정성을 포함한 하나 이상의 장점을 보인다. 본 발명에 따라, 기재된 치료 방법으로 제공되는, 주사에 의한 조성물의 단일 치료는 치료를 받는 개체에서 유의한 임상적 반응 및 적어도 6-개월 효과의 지속기간을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/64 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A61K 2800/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

개체에서 연장된 지속기간의 미용적 효과를 달성하는 방법으로서,

상기 방법은 조성물 투여 후 미용적 효과를 달성하기 위해 투여가 필요한 개체의 영역에 멸균 주사용 조성물의 유효량을 주사 투여하는 단계를 포함하고;

상기 개체에게 주사 투여되는 조성물의 상기 유효량은, 적어도 6개월 동안 효과의 지속기간을 갖는 연장된 지속기간의 미용적 효과를 달성하는 것이고;

상기 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 주사제에 적합한 희석제;

150 kDa의 분자량을 갖는 혈청형 A 보툴리눔 독소 성분; 및

아미노산 서열 RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR 을 갖는 양으로 하전된 담체 성분을 포함하고;

상기 보툴리눔 독소 성분은 40 U의 유효량으로 개체에게 투여되고;

상기 양으로 하전된 담체는 상기 보툴리눔 독소 성분과 비-공유결합으로 결합되는 것인 방법.

청구항 2

필요로 하는 개체에서 주름, 선 (line), 또는 고랑 (furrow)을 감소시키기 위한 멸균 주사 제형의 미용 조성물로서,

상기 조성물의 투여방법은 상기 개체에게 조성물을 단일 용량 주사로서 투여하는 단계를 포함하고;

상기 조성물의 단일 용량 주사는 적어도 6 개월 동안 개체에게 주름, 선, 또는 고랑을 감소시키는 효과의 지속기간을 갖는 단일 투여를 제공함으로써, 개체에 대한 투여 간격 기간을 연장시키고;

상기 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 주사제에 적합한 희석제;

150 kDa의 분자량을 갖는 혈청형 A 보툴리눔 독소 성분; 및

아미노산 서열 RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR을 갖는 양으로 하전된 담체 성분을 포함하고;

상기 보툴리눔 독소 성분은 40 U의 유효량으로 개체에게 투여되고;

상기 양으로 하전된 담체는 보툴리눔 상기 보툴리눔 독소 성분과 비-공유결합으로 결합되는 것인 미용 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

청구항 2에 있어서, 상기 조성물은 개체의 안면에 있는 미간 주름 (glabellar line)을 감소시키는 것인 미용 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

청구항 2에 있어서, 상기 조성물은 주사 후 주사 부위로부터 국소적으로 확산되지 않는 것인 미용 조성물.

청구항 9

청구항 2에 있어서, 상기 투여 효과의 지속기간은 적어도 6 개월 내지 9 개월인 것인 미용 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

필요로 하는 개체에게 주름, 선, 또는 고랑을 감소시키기 위한 미용 조성물로서,

상기 조성물의 투여 방법은 효과의 연장된 지속기간 및 각 투여 간격 사이의 연장된 지속기간을 갖는 다수의 투여 간격을 갖는 투여 과정을 포함하고,

상기 투여 과정은

상기 조성물로 초기 투여 후 미용적 효과를 필요로 하는 개체의 영역에 평균 주사용 조성물의 초기 유효량을 주사로 투여하는 단계로서;

상기 조성물은 주사를 위해 적합한 약학적으로 허용가능한 희석제;

150 kDa의 분자량을 갖는 혈청형 A 보툴리눔 독소 성분; 및

RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR의 아미노산 서열을 갖는 양으로 하전된 담체 성분을 포함하고;

상기 보툴리눔 독소 성분은 40 U의 유효량으로 개체에게 투여되고;

상기 양으로 하전된 담체는 상기 보툴리눔 독소 성분과 비-공유결합으로 결합되고;

상기 개체에게 주사로 투여되는 상기 조성물의 초기 유효량은 적어도 9 개월 동안 지속되는 미용적 효과의 지속을 제공하는 것인 단계; 및

상기 초기 유효량 후 및 각 후속 유효량 사이에 6 개월 이상 내지 적어도 10 개월의 지속기간을 포함하는 투여 간격으로 개체에게 주사로 상기 조성물의 후속 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 것인 미용 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

청구항 2 또는 12에 있어서, 상기 투여 효과의 지속은 7 개월 초과, 8 개월 초과, 또는 9 개월 초과를 포함하는 것인 미용 조성물.

청구항 17

청구항 2 또는 12에 있어서, 상기 양으로 하전된 담체 성분은 보툴리눔 독소 성분의 1-200 ng/U의 비율로 상기 조성물에 존재하는 것인 미용 조성물.

청구항 18

청구항 2 또는 12에 있어서, 상기 양으로 하전된 담체 성분은 보툴리눔 독소 성분의 10-100 ng/U의 비율로 상기 조성물에 존재하는 것인 미용 조성물.

청구항 19

청구항 2 또는 12에 있어서, 상기 양으로 하전된 담체 성분은 보툴리눔 독소 성분의 1-1000 ng/U의 비율로 조성물에 존재하는 미용 조성물.

청구항 20

청구항 1에 있어서, 상기 미용적 효과가 미간 주름의 감소인 것인 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 양으로 하전된 담체 성분은 보툴리눔 독소 성분의 1-200 ng/U의 비율로 조성물에 존재하는 것인 방법.

청구항 22

청구항 20에 있어서, 상기 양으로 하전된 담체 성분은 보툴리눔 독소 성분의 1-1000 ng/U의 비율로 조성물에 존재하는 것인 방법.

청구항 23

청구항 20 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 투여 효과의 지속기간이 적어도 6개월 내지 9개월인 것인 방법.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

- 청구항 32
삭제
- 청구항 33
삭제
- 청구항 34
삭제
- 청구항 35
삭제
- 청구항 36
삭제
- 청구항 37
삭제
- 청구항 38
삭제
- 청구항 39
삭제
- 청구항 40
삭제
- 청구항 41
삭제
- 청구항 42
삭제
- 청구항 43
삭제
- 청구항 44
삭제
- 청구항 45
삭제
- 청구항 46
삭제
- 청구항 47
삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다양한 치료적, 심미적 및/또는 미용적 목적을 위해 개체에게 투여될 수 있는 보툴리눔 독소를 포함하는 신규한 주사용 조성물에 관한 것이다. 상기 주사용 조성물 및 이러한 조성물이 이용되는 방법은 높은 반응 비율 및 효과의 긴 지속기간, 예를 들어, 20 내지 24 주 이상 동안 효과의 지속기간을 초래하는 장점이 있는 치료를 제공한다.

배경 기술

[0002] 피부는 외부의 환경적 위협으로부터 신체의 기관을 보호하고 체온을 유지하기 위한 자동온도조절장치(thermostat)로서 작용한다. 피부는 수개의 상이한 층들로 구성되며, 각 층은 특화된 기능을 갖는다. 주요 층들은 표피(epidermis), 진피(dermis) 및 피하조직(hypodermis)을 포함한다. 표피는 결합 조직으로 구성되는 진피를 덮는 상피 세포들의 겹층(stratifying layer)이다. 표피 및 진피는 모두 지방 조직의 내부 층인 피하조직에 의해 더 지지된다.

[0003] 피부의 최상층인 표피는 그 두께가 0.1 내지 1.5 밀리미터에 불과하다 (Inlander, Skin, New York, NY:

People's Medical Society, 1-7 (1998)). 표피는 각질형성세포 (keratinocyte)로 구성되며 그들의 분화 상태에 근거하여 수개의 층들로 분류된다. 표피는 각질층 (stratum corneum) 및 과립 (granular) 세포, 유극 (melphigian) 세포 및 기저 (basal) 세포로 구성된 생 표피층 (viable epidermis)으로 더 분류될 수 있다. 각질층은 수분을 흡수하며 그 유연성 및 부드러움을 유지하기 위해 10 중량% 이상의 수분을 필요로 한다. 흡습성 (hygroscopicity)은 부분적으로 케라틴의 수분-보유 능력에서 기인한다. 각질층이 그의 부드러움 및 유연성을 상실하면, 이는 거칠고 부서지기 쉬워져서, 건조한 피부를 초래한다.

[0004] 표피 바로 하부에 존재하는 진피는 그 두께가 1.5 내지 4 밀리미터이다. 진피는 피부의 세 층들 중에서 가장 두껍다. 진피는 한선 및 유선 (면포(comedos), 또는 모공이라 불리는 피부의 개구부들을 통해 물질들을 분비함), 모낭, 신경 말단 및 혈관 및 림프관을 포함한 피부의 구조물들의 대부분이 존재하는 곳이다 (Inlander, Skin, New York, NY: *People's Medical Society*, 1-7 (1998)). 그러나, 진피의 주요 성분들은 콜라겐 및 엘라스틴이다.

[0005] 피하조직은 피부의 최심부 층이다. 피하조직은 체온 유지를 위한 절연층 및 기관 보호를 위한 충격 흡수층으로 작용한다 (Inlander, Skin, New York, NY: *People's Medical Society*, 1-7(1998)). 또한, 피하조직은 에너지 저장을 위해 지방을 저장한다. 피부의 pH는 일반적으로 5와 6 사이이다. 피부의 산성은 피지선의 분비물로부터 유래한 양쪽성 (amphoteric) 아미노산, 젖산, 및 지방산의 존재 때문이다. "산성 맨틀 (acid mantle)"이라는 용어는 피부의 대부분의 영역 상에 있는 수용성 물질들의 존재를 의미한다. 피부의 완충 (buffering) 능력은 부분적으로는 피부의 각질층에 저장된 이 분비물들에서 기인한다.

[0006] 노화의 자명한 징후들 중 하나인 주름은 피부에 대한 환경적 손상으로부터 축적되는 생화학적, 조직학적, 및 생리적 변화들에 의해 유발될 수 있다 (Benedetto, *International Journal of Dermatology*, 38: 641-655(1999)). 또한, 안면 주름의 특징적인 접힘 (fold), 골 (furrow), 및 구겨짐 (crease)을 유발할 수 있는 다른 이차 인자들이 있다 (Stegman et al., *The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery*, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)). 이와 같은 이차 인자들은 피부에 대한 중력의 지속적인 인력, 빈번하고 지속적인 위치적 압력 (positional pressure) (예를 들어, 수면 동안), 및 안면 근육의 수축에 의해 유발되는 반복적인 안면 운동을 포함한다 (Stegman et al., *The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery*, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)).

[0007] 노화의 징후들 중 일부를 잠재적으로 완화시키기 위해 상이한 기법들이 이용되고 있다. 이 기법들은 알파 히드록시산 및 레티놀을 함유하는 안면 보습제에서 외과적 수술 및 신경독소의 주사에 이르기까지 다양하다. 예를 들어, 1986년에, 안과성형 전문의 및 피부과 전문의로 구성된 부부인 Jean 및 Alastair Carruthers는 미간 영역에 있는 운동과 연관된 주름들의 치료를 위해 A형 보툴리눔 독소를 사용하는 방법을 개발했다 (Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) *Biomedical Aspects of Botulinum*, New York: Academic Press, 143-150(1981)). Carruther 부부에 의한 주름의 치료를 위한 A형 보툴리눔 독소의 이용은 1992년에 이 방식의 중요한 발표로 이어졌다 (Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) *Biomedical Aspects of Botulinum*, New York : Academic Press, 143-150(1981)). 1994년까지, 동일한 팀은 안면에서 다른 운동-연관된 주름들에 대한 경험을 보고했다 (Scott, *Ophthalmol*, 87: 1044-1049(1980)). 이는 뒤이어 A형 보툴리눔 독소를 이용한 미용 치료의 시대의 탄생을 가져왔다.

[0008] A형 보툴리눔 독소는 인간에게 알려진 가장 치명적인 천연 생물학적 작용제인 것으로 보고된다. 클로스트리디움 보툴리눔 (*C. botulinum*)의 포자는 토양에서 발견되고 부적절하게 멸균되고 밀봉된 식품 용기에서 성장할 수 있다. 치명적일 수 있는 보툴리누스 중독증이 상기 박테리아의 섭취로 인해 유발될 수 있다. 보툴리눔 독소는 신경근 접합부 (neuromuscular junction)를 통한 아세틸콜린의 방출을 억제하는 것에 의해 시냅스 전달 (synaptic transmission)을 방지하여 의해 근육의 마비를 초래하도록 작용하고 또한 다른 방식으로도 작용하는 것으로 사료된다. 그들의 작용은 통상적으로 근육 경련 또는 수축을 유발하는 신호를 본질적으로 차단하여, 마비를 초래한다. 최근 10년 동안, 보툴리눔 독소의 근육-마비 효과는 치료적 효과를 위해 이용되고 있다. 보툴리눔 독소의 제어 투여가 다양한 의학적 상태, 예를 들어, 과다활성의 골격근을 특징으로 하는 신경근 질환을 치료하기 위한 근육 마비를 제공하기 위해 이용되고 있다. 보툴리눔 독소에 의해 치료된 상태는 반측안면경련, 성인 발병 경련성 사경 (adult onset spasmodic torticollis), 열향, 안검경련, 뇌성마비, 경부 근긴장 이상증 (cervical dystonia), 편두통, 사시, 측두하악관절장애 (temporomandibular joint disorder), 및 다양한 종류의 근육 경련 및 발작을 포함한다. 보다 최근에는, 보툴리눔 독소의 근육-마비 효과가 주름, 찡그린 주름 (frown lines), 및 안면 근육의 경련 또는 수축의 다른 결과들의 치료와 같은 치료적 및 미용학적 안면 적용에서 이용되었다.

- [0009] A형 보툴리눔에 대하여, 그람-양성 박테리아인 클로스트리디움 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*)에 의해 생성되는, 혈청학적으로 (serologically) 구별되는 7종의 다른 보툴리눔 독소가 있다. 이 8종의 혈청학적으로 구별되는 보툴리눔 독소 중에서, 마비를 유발할 수 있는 7종이 보툴리눔 독소 혈청형 (serotype), A, B, C, D, E, F 및 G로 지정되었다. 이들 각각은 종류-특이적 항체 (type-specific antibody)에 의한 중화에 의해 구별된다. 보툴리눔 독소 단백질 각각의 분자량은 약 150 kD이다. 보툴리눔 독소의 분자 크기 및 분자 구조 때문에, 보툴리눔 독소는 각질층 및 하부 피부 구조 (underlying skin architecture)의 다중층을 통과할 수 없다. 보툴리눔 독소의 상이한 혈청형은 효과 및 그들이 상이한 동물 중에서 유발하는 마비의 중증도 및 지속기간이 다양하다. 예를 들어, 랫트에서, A형 보툴리눔 독소는 생성된 마비율에 의해 측정된 바와 같이, B형 보툴리눔 독소보다 500 배 더 강력한 것으로 확인되었다. 또한, B형 보툴리눔 독소는 A형 보툴리눔 독소의 영양류 LD₅₀의 약 12 배인, 480 U/kg의 투여량에서 영양류에서 무독성인 것으로 확인되었다.
- [0010] 클로스트리디움 보툴리눔 박테리아에 의해 분비되는, 보툴리눔 독소는 결합된 비-독소 단백질 (non-toxin protein)과 함께 약 150 kD의 보툴리눔 독소 단백질 분자를 함유하는 독소 복합체의 성분이다. 이 내생 비-독소 단백질은 헤마글루티닌 단백질의 패밀리 뿐만 아니라 비-헤마글루티닌 단백질을 포함하는 것으로 여겨진다. 상기 비-독소 단백질은 독소 복합체에서 보툴리눔 독소 분자를 안정화시키고, 변성 (denaturation)으로부터, 예를 들어, 독소 복합체가 섭취되는 경우, 소화 산 (digestive acid)에 의한 변성으로부터 이를 보호하는 것으로 보고되었다. 따라서, 상기 독소 복합체의 비-독소 단백질은 보툴리눔 독소의 활성을 보호하고, 그에 의해, 상기 독소 복합체가 위장관을 통해 투여되는 경우 전신 투과 (systemic penetration)를 증가시킨다. 또한, 비-독소 단백질의 일부는 혈액 내의 보툴리눔 독소 분자를 특이적으로 안정화시키는 것으로 여겨진다.
- [0011] 상기 독소 복합체 내에서 비-독소 단백질의 존재는 상기 독소 복합체가 전술된 바와 같이, 약 150 kD인 보툴리눔 독소 분자 자체의 분자량보다 더 큰 분자량을 갖게 한다. 예를 들어, 클로스트리디움 보툴리눔 박테리아는 약 900 kD, 500 kD 또는 300 kD의 분자량을 갖는 A형 보툴리눔 독소 복합체를 생성할 수 있다. B형 및 C형 보툴리눔 독소는 약 700 kD 또는 약 500 kD의 분자량을 갖는 복합체로서 생성되는 것으로 보인다. D형 보툴리눔 독소는 약 300 kD 또는 500 kD의 분자량을 갖는 복합체로 생성된다. E형 및 F형 보툴리눔 독소는 약 300 kD의 분자량을 갖는 복합체로서 생성된다.
- [0012] 보툴리눔 독소에 추가적인 안정성을 제공하기 위해, 통상적으로 제조 동안 보툴리눔 독소 복합체를 알부민과 조합하는 것에 의해 독소 복합체를 안정화시킨다. 예를 들어, BOTOX[®] (Allergan, Inc., Irvine, CA)은 부속 단백질 (accessory protein), 0.5 밀리그램의 인간 알부민, 및 0.9 밀리그램의 염화나트륨을 가진 A형 보툴리눔 독소 100 U를 함유하는 보툴리눔 독소-함유 제제이다. 상기 알부민은 제조, 수송, 보관, 및 투여와 연관된 환경을 포함한, 이질적인 환경에서 독소 복합체에 결합하여 이를 안정화시키는 작용을 한다.
- [0013] 전형적으로, 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 복합체와 알부민을 함유하는 조성물의 세심한 제어 주사 (controlled injection)에 의해 환자에게 투여된다. 그러나, 이 접근방법과 관련된 여러 문제들이 있다. 주사가 고통스러울 뿐 아니라, 전형적으로 독소의 대형 피하 웰 (subdermal well of toxin)이 원하는 치료 또는 미용 효과를 달성하기 위해, 주사 부위 주위에 국소로 형성된다. 보툴리눔 독소는 이 피하 웰로부터 이동하여 신체의 주변 영역에서 원치않는 마비를 유발할 수 있다. 이 문제는 치료대상 영역이 크고 다수의 주사가 요구되는 경우 심각해진다. 또한, 주사된 독소 복합체는 보툴리눔 독소를 안정화시키고 독소-단백질의 분자량을 증가시키는 비-독소 단백질 및 알부민을 함유하기 때문에, 상기 독소 복합체는 체내에서 긴 반감기를 가지며, 환자에서 바람직하지 않은 항원성 반응을 유발할 수 있다. 예를 들어, 일부 환자는 시간의 경과에 따라 현재의 시판 제제에서 안정화제를 이용되는 알부민에 대한 알레르기를 발병할 것이다. 또한, 독소 복합체는 환자의 면역계가 중화 항체 (neutralizing antibody)를 형성하도록 유도할 수 있어서, 동일한 효과를 달성하기 위해, 후속 투여에서 보다 많은 양의 독소가 요구된다. 이 상황이 발생하는 경우, 이들이 환자의 혈류 내로 치명적인 전신 중독 (systemic poisoning)을 초래하는 다량의 독소를 배출하지 않도록, 후속 주사는 조심스럽게 배치하며, 이는 특히, 무독성 단백질 및 알부민이 혈액 중의 보툴리눔 독소를 안정화시키기 때문이다.
- [0014] 현재의 보툴리눔 독소 제제와 연관된 단점을 고려할 때, 효과적이고 안정하나, 감소된 항원성 및 주사 후 국소로 확산되는 보다 낮은 경향을 보이는 주사용 보툴리눔 독소 제제를 갖는 것이 매우 바람직할 것이다. 또한, 다양한 치료적, 심미적 및/또는 미용적 목적을 위해 그와 같은 보툴리눔 독소 제제를 이용하는 것이 바람직할 것이다.

발명의 내용

- [0015] 일 양상에서, 본 발명은 양으로 하전된 담체 분자와 비-공유결합에 의해 (non-covalently) 결합된 보툴리눔 독소를 포함하는 주사용 조성물을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 기존의 상업적인 주사용 보툴리눔 독소 제제, 예를 들어, BOTOX[®] 또는 MYOBLOC[®]에 비해 하나 이상의 장점을 갖는다. 예를 들어, 어떤 구체예에서, 상기 조성물은 기존의 보툴리눔 독소 제제 대비, 감소된 항원성, 주사 후 주변 조직 내로의 확산을 받는 감소된 경향, 임상적 효능의 증가된 지속기간, 또는 기존의 보툴리눔 독소 제제에 비하여 강화된 효능, 임상적 효능의 보다 빠른 개시, 및/또는 개선된 안정성을 포함한 하나 이상의 장점을 보일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 양상은 특정한 비-원형 (non-native) 분자 (즉, 클로스트리디움 보툴리눔 박테리아로부터 수득된 보툴리눔 독소 복합체에서 발견되지 않는 분자)가 조직을 통한 독소 확산을 개선하기 위해, 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체, 및 특히, (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 감소된 보툴리눔 독소 복합체에 첨가될 수 있다는 인식이다. 상기 비-원형 분자는 상기 독소와 비-공유결합에 의해 결합하고 주사 후 상기 독소가 표적 구조에 도달하는 능력을 개선하는 침투 촉진제 (penetration enhancer)로 작용한다. 더욱이, 상기 비-원형 분자는 주사 전 및 후에 상기 독소의 안정성을 증가시킬 수 있다. 예로서, 상기 침투 촉진제는 내재된 보툴리눔-독소-유사 활성을 갖지 않고, 또한 본 명세서에 기재된 하나 이상의 단백질 형질도입 도메인 (protein transduction domain)을 함유하는, 양이온성 펩티드와 같은 양으로 하전된 담체일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 양상은 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체 (또는 150 kD 신경독소 자체, 또는 원형 복합체 단백질의 전부는 아닌, 일부를 포함하는 신경독소를 포함한, 감소된 단백질의 보툴리눔 독소 복합체) 및 양으로 하전된 담체를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0018] 다른 양상에서, 본 발명은 또한 치료를 필요로 하는 개체 또는 환자에게 본 발명의 조성물의 유효량, 바람직하게는 치료적인 유효량을 주사하는 것에 의해 생물학적 (biologic) 효과를 생성하는 방법에 관한 것이다. 상기 생물학적 효과는 예를 들어, 근육 마비, 과다분비 또는 발한의 감소, 신경 통증 또는 편두통의 치료, 비염 또는 부비동염의 관리, 과민성 방광의 치료, 근육 경련의 경감, 여드름의 치료 또는 경감, 면역 반응의 경감 또는 강화, 주름, 잔주름 (fine lines), 특히 안면에서, 찡그린 주름 (frown lines)으로도 알려진, 미간 주름 (glabellar line)의 감소, 또는 다양한 기타 질환의 예방 또는 치료를 포함할 수 있다.
- [0019] 다른 양상에서, 본 발명은 치료를 피로로 하는 개체 또는 환자에게 주사로 투여 후, 오래-계속되는, 지속된 효능, 예를 들어, 긴 지속기간의 반응 비율을 제공하는 본 발명의 조성물의 유효량 및 양을 제공한다. 그러한 용량 및 양은 바람직하게는 상기 용량 및 양이 투여되는 개체에서 바람직한 치료적 또는 미용적 효과를 생성하거나 초래하는 치료적 또는 미용적으로 유효한 용량 및 양이다. 일 구체예에서, 안면의 주름 및 선, 특히 미간 주름의 감소 효과는, 필요로 하는 개체 또는 환자에게 단일 치료로서 주사로 투여된 본 발명의 조성물의 용량에 의해 제공될 경우, BOTOX[®] 미용 주사와 같은 기존의 치료와 비교하여 수주 내지 수개월 동안 지속되었다. 특정 구체예에서, 및 본 명세서의 실시예에 기재된 바와 같이, 보툴리눔 독소 A와 같은 보툴리눔 독소 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 양으로 하전된 담체를 포함하는, 20 U 내지 60 U의 치료적인 유효량으로, 본 발명의 조성물을 사용한 개체 또는 환자의 단일 치료는 기존의 BOTOX[®] 주사와 비교하여, 적어도 20 주, 적어도 24 주, 또는 약 6 내지 10 개월, 또는 심지어 더 긴 기간 동안 주름 및 안면 선의 반응 비율을 제공한다. 더욱이, 본 발명의 조성물은 주사 후 주사 부위로부터의 확산 (diffusion) 또는 분산 (spread)이 감소되는 속성을 제공함으로써, 독소 및 그의 효과를 바람직한 곳에 국한시키고 치료한 주사 부위로부터 떨어진 부위 또는 위치에서 독소의 비특이적이거나 원하지 않는 효과를 감소시킨다.
- [0020] 본 발명의 조성물, 예를 들어, 실시예 5의 RT002에 의해 제공되는 효과의 지속기간 뿐만 아니라 기재된 치료 방법 및 용도는 당업계에 비해 상당한 장점을 제공한다. 예로서, 보툴리눔 독소를 함유하는 조성물로 심미적 치료와 같은 치료를 받는 개체는 치료 후 효과의 지속기간을 그들에게 매우 중요한 것으로 생각한다. 본 발명의 제품, 예를 들어, RT002의 유효량의 단일 치료로도 달성되는 그러한 길고, 지속된 효과의 지속기간은 개체에게 매우 중요하여 치료 과정 당 개체에게 더 적은 주사를 가능하게 한다. 본 명세서에 기재된 발명의 조성물 및 방법에 의해 제공되는 바와 같이, 명확한 효능 및 안전성을 갖는 제품을 사용한 단일 치료로부터의 연장된 지속기간의 효과는 치료 과정 중의 개체에 대한 적은 불편함, 적은 비용 및 더 많은 편의성을 제공한다. 게다가, 개체에게 제품의 단일 주사용 치료 후 적어도 20 또는 24 주의 기간, 또는 적어도 6-개월의 기간, 또는 6-개월의 기간을 초과하여 지속되는 유의하고 지속적인 효과를 나타내는 제품은 의사 (practitioner) 및 환자 모두를 위한 당업계의 충족되지 못한 요구에 대한 해결책을 제공한다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법은 너무 빈번한 치료의 문제점에 대한 해결책을 제공하고 환자의 전반적인 건강 (well-being)을 개선한다. 그러한 활동의 연장된 지

속기간은 전체 치료 과정에서 더 적은 치료를 제공한다.

[0021]

다른 양상에서, 본 발명은 개체에서 연장된 지속기간의 치료적 또는 미용적 효과를 달성하기 위한 보툴리눔 독소의 투여 방법으로서, 상기 방법은 조성물로 제1 치료 후 치료적 또는 미용적 효과를 달성하기 위한 치료가 필요한 개체의 영역에 멸균 주사용 조성물의 제1 치료 용량을 주사하는 단계를 포함하고; 상기 조성물은 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체, 또는 감소된 보툴리눔 독소 복합체 (reduced botulinum complex) 성분 및 $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRQR}-(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRQR}-(\text{gly})_q$, 또는 $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRQR}-(\text{gly})_q$ 의 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 양으로 하전된 효능기 (efficiency group)에 공유 결합된 양으로 하전된 폴리리신 백본 (backbone)을 포함하는 양으로 하전된 담체 성분으로서, 상기 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수인 것을 포함하고; 상기 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체, 또는 감소된 보툴리눔 독소 복합체 성분은 20 U 내지 60 U의 치료 용량으로 개체에게 투여되고; 및 상기 양으로 하전된 담체는 보툴리눔 독소 성분과 비-공유결합 (non-covalently)에 의해 결합되어 있고; 및 주사에 적합한 약학적으로 허용가능한 희석제; 및 상기 상기 개체에서 주사로 투여되는 조성물의 상기 제1 치료 용량은 선택적으로 제2 또는 후속 치료 용량이 투여되기 전에 적어도 약 6개월 내지 약 10개월 동안 효과의 지속기간을 갖는 연장된 지속기간의 치료적 또는 미용적 효과를 달성하는 것인 방법을 제공한다.

[0022]

다른 양상에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에게 주름, 선, 또는 고량을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체, 또는 감소된 보툴리눔 독소 복합체 및 $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRQR}-(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRQR}-(\text{gly})_q$, 또는 $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRQR}-(\text{gly})_q$ 의 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 양으로 하전된 효능기에 공유 결합된 양으로 하전된 폴리리신 백본을 포함하는 양으로 하전된 담체 성분으로서, 상기 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수인 것인 담체 성분; 및 주사를 위해 약학적으로 허용가능한 희석제; 상기 보툴리눔 독소 성분은 20 U 내지 60 U의 치료 용량으로 개체에게 투여되는 것이고; 상기 양으로 하전된 담체는 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체, 또는 감소된 보툴리눔 독소 복합체 성분 비-공유결합으로 결합된 것이고; 및 상기 조성물의 단일 용량 주사는 적어도 약 6 개월 내지 약 10 개월 동안 개체에게 주름, 선, 또는 고량을 감소시키는 효과의 지속기간을 갖는 단일 치료를 제공함으로써, 개체에 대한 치료 간격 기간을 연장시키는 것을 포함하는 조성물을 단일 용량 주사로서 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 상기 조성물은 개체의 안면에 있는 미간 주름을 감소시키거나, 또는 그 중증도를 감소시킨다.

[0023]

다른 양상에서, 본 발명은 20 U, 40 U, 또는 60 U로부터 선택된 투여량의 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체, 또는 감소된 보툴리눔 독소 복합체; 및 $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRQR}-(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRQR}-(\text{gly})_q$, 또는 $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRQR}-(\text{gly})_q$ 의 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 양으로 하전된 효능기 (efficiency group)에 공유 결합된 양으로 하전된 폴리리신 백본을 포함하는 양으로 하전된 담체 성분으로서, 상기 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수인 것인 담체 성분; 및 주사를 위한 약학적으로 허용가능한 희석제; 상기 양으로 하전된 담체는 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체, 또는 감소된 보툴리눔 독소 복합체 성분과 비-공유결합으로 결합되어 있고; 및 상기 조성물은 상기 주사용 조성물의 유효량으로 개체를 치료 후 적어도 20 내지 24 주 동안, 또는 적어도 6 개월 동안, 또는 적어도 6개월을 초과하여, 예를 들어, 약 6 개월 내지 약 10 개월 동안 지속되는 미용적 또는 치료적 효과를 제공하는 것을 포함하는 멸균 주사용 조성물을 제공한다.

[0024]

상기 방법 및 조성물의 일부 구체예에서, 상기 조성물은 혈청형 A의 보툴리눔 독소, 바람직하게는 150 kDa의 분자량을 갖는 혈청형 A 보툴리눔 독소를 포함한다. 일 구체예에서, 상기 양으로 하전된 담체는 아미노산 서열 $\text{RKKRRQRQRG}-(\text{K})_{15}\text{-GRKKRRQRQR}$ 를 갖는다. 일 구체예에서, 보툴리눔 독소는 20 U의 투여량으로 조성물 중에 존재한다. 일 구체예에서, 보툴리눔 독소는 40 U의 투여량으로 조성물 중에 존재한다. 일 구체예에서, 보툴리눔 독소는 60 U의 투여량으로 조성물 중에 존재한다. 일 구체예에서, 상기 조성물은 조성물의 주사로 단일 치료를 받는 개체의 미간 주름의 중증도를 감소시킨다. 어떤 구체예에서, 치료 효과의 지속기간은 6 개월 초과; 7 개월 초과; 8 개월 초과; 9 개월 초과; 또는 적어도 6개월 내지 10 개월을 포함한다.

[0025]

다른 양상에서, 본 발명은 주사용 보툴리눔 독소로 치료를 필요로 하는 개체의 치료 방법으로서, 상기 치료 방법은 각 치료 간격 사이 효과의 장기적인 지속기간 및 지속기간 시간으로 다수의 치료 간격을 갖는 치료 과정을 포함하고, 상기 치료 과정은 조성물로 초기 치료 후 치료적 또는 미용적 효과를 달성하기 위해 치료를 필요로 하는 개체의 영역에 멸균 주사용 조성물의 초기 치료 용량을 주사로 투여하는 단계로서; 상기 조성물은 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체, 또는 감소된 보툴리눔 독소 복합체 성분 및 $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRQR}-(\text{gly})_q$,

(gly)_p-YGRKKRRQRRR-(gly)_q, 또는 (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q의 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 양으로 하전된 효능기에 공유 결합된 양으로 하전된 폴리리신 백본을 포함하는 양으로 하전된 담체 성분으로서, 상기 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수인 것을 포함하고; 및 주사를 위해 적합한 약학적으로 허용가능한 희석제; 상기 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체, 또는 감소된 보툴리눔 독소 복합체 성분은 20 U 내지 60 U의 치료 용량으로 개체에게 투여되고; 상기 양으로 하전된 담체는 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체, 또는 감소된 보툴리눔 독소 복합체 성분과 비-공유결합으로 결합되고; 상기 개체에게 주사로 투여되는 조성물의 초기 치료 투여는 적어도 약 10 개월 동안 지속되는 치료적 또는 미용적 효과의 지속을 제공하고; 및 초기 치료 투여 후 및 각 후속 치료 투여 사이에 3 개월 이상 약 10 개월 이하의 지속기간을 포함하는 치료 간격으로 개체에게 주사로 조성물의 후속 치료 용량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0026] 상기-기재된 치료 방법의 구체예에서, 상기 치료적 또는 미용적 효과는 주름, 선, 또는 고랑의 치료 또는 감소이다. 일 구체예에서, 상기 치료적 또는 미용적 효과는 개체의 안면에서 미간 주름의 감소이다. 일 구체예에서, 상기 조성물은 혈청형 A의 보툴리눔 독소, 바람직하게, 150kDa의 분자량을 갖는 혈청형 A 보툴리눔 독소를 포함한다. 일 구체예에서, 상기 양으로 하전된 담체는 아미노산 서열 RKKRRQRRR-(K)₁₅-GRKKRRQRRR을 갖는 양으로 하전된 펩티드이다. 일 구체예에서, 상기 조성물은 주사 후 주사의 부위로부터 국소적으로 확산되지 않는다. 특정 구체예에서, 상기 보툴리눔 독소는 20 U의 양, 또는 40 U의 양, 또는 60 U의 양으로 개체에게 투여된다. 일 구체예에서, 상기 치료적 효과는 편측안면연축(hemifacial spasm), 성인 발병성 연축 사경(adult onset spasmodic torticollis), 항문 열창(anal fissure), 안검연축(blepharospasm), 뇌성마비, 두통, 사시, 턱관절 장애(temporomandibular joint disorder), 신경 통증(neurologic pain), 과민성 방광, 비염, 부비동염(sinusitis), 여드름, 근육긴장이상, 근육긴장이상성 수축(dystonic contraction), 다한증, 및 콜린성 신경계에 의해 제어되는 선(gland)의 과다분비로 구성된 군으로부터 선택된 질환과 관련된 증상의 감소이다. 어떤 구체예에서, 상기 치료 간격의 지속기간은 3 개월 초과; 4 개월 초과; 5 개월 초과; 6 개월 초과; 7 개월 초과; 8 개월 초과; 9 개월 초과; 또는 적어도 6 개월 내지 10 개월을 포함한다.

[0027] 본 발명은 또한 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체, 또는 감소된 보툴리눔 독소 복합체 및 양으로 하전된 담체를 함유하는 제제 또는 조성물, 또는 차례로 그와 같은 제제 또는 조성물을 생산하기 위해 사용될 수 있는 프리믹스(premix)를 준비하기 위한 키트를 제공한다. 또한, 보툴리눔 독소 복합체 (또는 150 kD 신경독소 자체 또는 일부 원형(native) 복합체 단백질인 신경독소를 포함하는 감소된 보툴리눔 독소 복합체) 및 양으로 하전된 담체를 순차적으로 투여하기 위한 수단을 함유하는 키트가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0028] **도 1**은 RT003 또는 BOTOX[®]의 반복된 투여 후 기준 (baseline) 디지털 외전 수치 (digit abduction score: DAS) 값(0.4)으로의 복귀에 필요한 시간을 나타내는 막대 그래프를 제시한다.

도 2A 및 도 2B: **도 2A**는 측부-내지-중심선 (lateral-to-midline) 주사에 의해 영향받은 마우스의 비복근의 부분을 표시하기 위해 진한 염료 (dark dye)가 주사된 마우스의 후지 (hind leg)를 나타낸다. **도 2B**는 중심선 주사에 의해 영향받은 마우스의 비복근의 부분을 표시하기 위해 진한 염료가 주사된 마우스의 후지를 나타낸다.

도 3은 RT003, RTT150, 또는 BOTOX[®]의 마우스의 비복근 근육의 측부-내지-중심선 또는 중심선 일부로의 주사 후 시간의 함수로 측정된 디지털 외전 수치 (DAS)를 제시한다.

도 4A 및 4B는 본 명세서 실시예 5에 기재된 임상 시험으로부터 다양한 치료군에서의 반응 지속기간을 나타내는 카플란-마이어 곡선 (Kaplan-Meier Curve)을 제시한다. 상기 카플란-마이어 곡선은 임상 시험의 1 차 유효성 분석으로부터의 결과를 나타내며 지정된 치료군에서 연구자 종합 평가-안면의 주름 중증도 (Investigator Global Assessment-Facial Wrinkle Severity: IGA-FWS) 평가를 위한 기준으로부터 1-점 이상 개선된 반응 지속기간을 보여준다. **도 4A**는 위약 (Placebo) 치료군, VISTABEL[®]/BOTOX[®] 20 U 치료군, 및 RT002 40 U 치료군에 대한 카플란-마이어 곡선을 제시한다. **도 4B**는 위약 치료군, VISTABEL[®]/BOTOX[®] 20 U 치료군, RT002 20 U 치료군, RT002 40 U 치료군, 및 RT002 60 U 치료군에 대한 카플란-마이어 곡선을 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명은 보툴리눔 독소, 보툴리눔 독소 복합체, 또는 감소된 보툴리눔 독소 복합체를 포함하는 신규한 주사용

조성물에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 상기 조성물은 독소를 안정화시키거나 또는 주사 후 조직을 통한 독소의 수송 또는 전달을 가능하게 하여, 상기 독소가 외생(exogenous) 알부민에 결합된 종래의 상업적 보툴리눔 독소 복합체(예를 들어, BOTOX[®] 또는 MYOBLOC[®])에 비해, 감소된 항원성, 보다 우수한 안전성 프로파일, 증가된 효능(potency), 임상적 유효성의 보다 신속한 개시 및/또는 임상적 유효성의 보다 긴 지속시간을 갖는다. 본 발명의 조성물은 본 명세서에 기재된 바와 같은, 다양한 치료적, 심미적 및/또는 미용적 목적을 위해, 개체에 보툴리눔 독소를 제공하기 위한 주사 응용물(application)로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 보툴리눔 독소의 전달을 위한 다른 조성물 및 방법에 비해 개선된 안전성 프로파일을 갖는다. 또한, 이러한 조성물은 보툴리눔 독소에 대한 면역 반응의 유익한 경감을 제공할 수 있다. 구체예에서, 본 발명의 주사용 조성물은 그러한 조성물, 특히 20 U 이상의 양의 보툴리눔 독소를 포함하는 조성물로 미간 주름과 같은 주름 및 안면 선의 치료를 위한 주사로 투여되는 개체에서, 예를 들어, 적어도 20 주, 적어도 24 주, 적어도 6 개월, 또는 6 개월 초과, 예를 들어, 약 10 개월까지의 길게 지속되는 유효성을 제공한다.

[0030] 본 명세서에서 사용된 용어 "보툴리눔 독소(botulinum toxin)"는 박테리아 또는 재조합 기법에 의해 생성되는지 여부에 관계없이 임의의 공지된 종류의 보툴리눔 독소(즉, 클로스트리디움 보툴리눔의 상이한 혈청형과 관련된 150 kD 보툴리눔 독소 단백질 분자) 뿐만 아니라, 새로 발견된 혈청형, 및 조작된 변이체 또는 융합 단백질을 포함하는, 나중에 발견될 수 있는 종류의 보툴리눔 독소를 의미한다. 상술된 바와 같이, 현재 7 종류의 면역학적으로 구별되는 보툴리눔 신경독소, 각각 종류-특이적 항체에 의한 중화에 의해 구별되는, 보툴리눔 신경독소 혈청형 A, B, C, D, E, F 및 G가 특정지어졌다. 보툴리눔 독소 혈청형은 예를 들어, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 및 Metabiologics, Inc. (Madison, WI), 뿐만 아니라 기타 출처로부터 상업적으로 구매가능하다. 보툴리눔 독소의 상이한 혈청형은 그들이 영향을 미치는 동물 종 및 그들이 유발하는 마비의 중증도 및 지속기간이 다양하다. 적어도 두 종류의 보툴리눔 독소인, A형 및 B형은 특정한 상태의 치료를 위한 제제로 상업적으로 구매가능하다. 예를 들어, A형은 상표 BOTOX[®]를 갖는 알레르간(Allergan) 및 상표 DYSPORT[®]를 갖는 입센(Ipsen)의 제제에 함유되고, B형은 상표 MYOBLOC[®]을 갖는 엘란(Elan)의 제제에 함유된다.

[0031] 본 발명의 조성물에서 사용되는 용어 "보툴리눔 독소(botulinum toxin)"는 대안적으로 보툴리눔 독소 유도체, 즉, 보툴리눔 독소 활성을 가지나, 자연적으로 발생 또는 재조합 원형(recombinant native)인 보툴리눔 독소에 대해 임의의 부분 또는 임의의 아미노산 사슬 상에 하나 이상의 화학적 또는 기능적 변형을 함유하는 화합물을 의미할 수 있다. 예를 들어, 보툴리눔 독소는 원형(native form)에 비해 결실, 변형 또는 치환된 하나 이상의 아미노산을 갖는 신경독소인 변형된 신경독소일 수 있거나, 또는 상기 변형된 신경독소는 재조합기법으로 생산된 신경독소 또는 이의 유도체 또는 단편일 수 있다. 예를 들어, 보툴리눔 독소는 그의 특성을 강화하거나 또는 바람직하지 않은 부작용을 감소시키나, 여전히 바람직한 보툴리눔 독소 활성을 유지하는 예와 같은 방식으로, 변형된 보툴리눔 독소일 수 있다. 대안적으로, 본 발명에서 사용된 보툴리눔 독소는 재조합 또는 합성 화학적 기법을 사용하여 제조된 독소, 예를 들어, 상이한 보툴리눔 독소 혈청형의 서브유닛 또는 도메인으로부터 제조된 예를 들어, 재조합 펩티드, 융합 단백질, 또는 하이브리드 신경독소(예를 들어, 미국특허 제 6,444,209호 참조)일 수 있다. 보툴리눔 독소는 또한 필요한 보툴리눔 독소 활성을 갖는 것으로 입증된 전체 분자의 일부일 수 있고, 그와 같은 경우에 그 자체로서, 또는 조합 또는 컨주게이트 분자, 예를 들어, 융합 단백질의 일부로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 보툴리눔 독소는 그 자체로 비-독성일 수 있는 보툴리눔 독소 전구체, 예를 들어, 단백질분해성 절단시 독성을 갖게 되는 비-독성 아연 프로테아제(zinc protease)의 형태일 수 있다.

[0032] 본 명세서에서 사용된 용어 "보툴리눔 독소 복합체(botulinum toxin complex)" 또는 "독소 복합체(toxin complex)"는 결합된 내생의 비-독소 단백질(즉, 클로스트리디움 보툴리눔 박테리아에 의해 생산된 헤마글루티닌 단백질 및 비-독소 비-헤마글루티닌 단백질)을 갖는, 대략 150 kD의 보툴리눔 독소 단백질 분자(보툴리눔 독소 혈청형 A-G 중 임의의 하나에 속함)를 의미한다. 그러나, 보툴리눔 독소 복합체는 하나의 단일 독소 복합체(unitary toxin complex)로서 클로스트리디움 보툴리눔 박테리아로부터 유래될 필요가 없다는 것에 유의한다. 예를 들어, 보툴리눔 독소 또는 변형된 보툴리눔 독소가 먼저 재조합으로 제조되고 나서 나중에 비-독소 단백질과 조합될 수 있다. 재조합 보툴리눔 독소는 또한 구매되고(예를 들어, List Biological Laboratories, Campbell, CA로부터) 그후 비-독소 단백질과 조합될 수 있다.

[0033] 본 발명은 또한 하나 이상의 외생(exogenous) 안정화제의 첨가, 내생 안정화제의 제거, 또는 이들의 조합을 통한 보툴리눔 독소 분자의 안정성의 조절을 고려한다. 예를 들어, 본 발명은 보툴리눔 독소 복합체가 클로스트리디움 보툴리눔 박테리아에 의해 생성된 보툴리눔 독소 복합체에서 자연적으로 발견되는 양에 비해 감소된 양의 비-독소 단백질을 갖는 것인 "감소된 보툴리눔 독소 복합체(reduced botulinum toxin complex)"를 고려한다.

일 구체예에서, 감소된 보툴리눔 독소 복합체는 클로스트리디움 보툴리눔 박테리아로부터 유래된 보툴리눔 독소 복합체로부터 헤마글루티닌 단백질 또는 비-독소 비-헤마글루티닌 단백질의 분획을 추출하기 위한 임의의 통상적인 단백질 분리 방법을 사용하여 제조된다. 예를 들어, 감소된 보툴리눔 독소 복합체는 보툴리눔 독소 복합체를 pH 7.3에서 적혈구 세포에 노출을 통한 분리시킴으로써 생성될 수 있다 (참조로서 본 명세서에 포함된, EP 1514556 A1 참조). 단백질로부터 단백질을 추출하기 위한 HPLC, 투석, 컬럼, 원심분리, 및 기타 방법이 사용될 수 있다. 대안적으로, 감소된 보툴리눔 독소 복합체가 합성에 의해 생산된 보툴리눔 독소를 비-독소 단백질과 조합시키는 것에 의해 생산되는 경우, 천연 보툴리눔 독소 복합체에 존재하는 것보다 적은 양의 헤마글루티닌 또는 비-독소, 비-헤마글루티닌 단백질을 상기 조합에 첨가할 수 있다. 본 발명에 따른 감소된 보툴리눔 독소 복합체 중 임의의 비-독소 단백질 (예를 들어, 헤마글루티닌 단백질 또는 비-독소 비-헤마글루티닌 단백질 또는 둘다)은 독립적으로 임의의 양만큼 감소될 수 있다. 어떤 예시적인 구체예에서, 하나 이상의 비-독소 단백질은 보툴리눔 독소 복합체 중 일반적으로 발견되는 양에 비하여 적어도 약 0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 감소된다. 상술된 바와 같이, 클로스트리디움 보툴리눔 박테리아는 7개의 상이한 혈청형의 독소를 생성하고 상이한 상대적 양의 비-독소 단백질과 함께 (즉, 상이한 양의 독소 복합체) 상업적인 제제로 제조된다. 예를 들어, MYOBLOC™은 0.05% 인간 혈청 알부민, 0.01 M 숙신산 나트륨, 및 0.1 M 염화나트륨과 함께 ml 당 5000 U의 B형 보툴리눔 독소를 갖는다. DYSPORT™는 125 mcg 알부민 및 2.4 mg 락토스와 함께 500 U의 A형 보툴리눔 독소-헤마글루티닌 복합체를 갖는다. 어떤 구체예에서, 클로스트리디움 보툴리눔 박테리아로부터 유래된 보툴리눔 독소 복합체에서 일반적으로 발견되는 실질적으로 모든 비-독소 단백질 (예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%를 초과하는 양의 헤마글루티닌 단백질 및 비-독소 비-헤마글루티닌 단백질)이 보툴리눔 독소 복합체로부터 제거된다. 또한, 일부 경우에 내생 비-독소 단백질이 동일한 양만큼 감소될 수 있으나, 본 발명은 또한 각각의 내생 비-독소 단백질을 상이한 양으로 감소시키는 것 뿐만 아니라 내생 비-독소 단백질 중 하나 이상을 감소시키나 나머지는 감소시키지 않는 것을 고려한다.

[0034] 상술된 바와 같이, 외생 안정화제 (예를 들어, 알부민)는 전형적으로 보툴리눔 독소 제제를 안정화시키기 위해 첨가된다. 예를 들어, BOTOX®의 경우, 100 U의 A형 보툴리눔 독소 복합체 당 0.5 mg의 인간 알부민이 상기 복합체를 안정화시키기 위해 첨가된다. 일반적으로, 본 발명에 따른 조성물을 안정화시키기 위해 첨가될 수 있는 외생 안정화제의 양은 구체적으로 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, 첨가되는 안정화제의 양은 본 발명의 양으로 하전된 담체가 그 자체로 안정화제로 작용하는 능력 때문에, 통상적으로 첨가되는 양보다 더 낮을 수 있다. 예를 들어, 첨가된 외생 알부민의 양은 통상적인 1000-배 과량의 외생 알부민보다 더 작은 양일 수 있고, 본 발명의 어떤 예시적인 구체예에서, 100 U의 보툴리눔 독소 당 약 0.25, 0.20, 0.15, 0.10, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.00001, 0.000005, 0.000001, 또는 0.0000001 mg에 불과하다. 일 구체예에서, 외생 알부민이 본 발명의 조성물에 안정화제로 첨가되지 않으며, 따라서, 알부민-없는 (free) 보툴리눔 독소 조성물을 생성한다.

[0035] 본 발명의 바람직한 조성물은 단백질성 부형제 없이, 특히 동물성 단백질-유래된 부형제 없이 안정화된 액체, 보툴리눔 독소-함유 조성물이다. 그러한 액체 조성물은 보툴리눔 독소, 바람직하게는 혈청형 A의 보툴리눔 독소, 양으로 하전된 담체 (예를 들어, 펩티드) 비-환원된 (non-reducing) 이당류 또는 비-환원된 삼당류, 비-이온성 계면활성제, 및 pH를 4.6 내지 7.5 사이로 유지하기 위한 생리학적으로 호환가능한 완충액을 포함한다. 액체 조성물 중 비-환원 당류의 농도는 10% 내지 40% (w/v)의 범위이고 비-이온성 계면활성제의 농도는 0.005% 내지 0.5% (w/v)의 범위이다. 바람직한 조성물은 단일 주사에 의한 치료 후 긴 지속기간 효과를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 보툴리눔 독소 A는 150 kDa의 분자량 (MW)을 갖는다. 상기 바람직한 조성물은 보툴리눔 독소, 바람직하게는 보툴리눔 독소 A, 보다 바람직하게는 150 kDa MW의 보툴리눔 독소, 본 명세서에 기재된 양으로 하전된 담체 (예를 들어, 펩티드), 수크로스과 같은 비-환원성 (non-reducing) 이당류, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 80, 또는 소르비탄 에스테르와 같은 비-이온성 계면활성제, 및 시트르산, 아세트산, 숙신산, 타르타르산, 말레산, 및 히스티딘과 같은 생리학적으로 호환가능한 완충액을 포함하고; 4.6 내지 7.5의 범위의 pH를 갖는다.

[0036] 본 발명에 따르면, 본 명세서에 기재된 바와 같은, 단백질 형질도입 도메인 또는 효능기를 갖는 양으로 하전된 담체 분자는 보툴리눔 독소의 수송 시스템으로서 적합하여, 독소가 근육 및/또는 기타 피부-연관 구조와 같은 표적 구조로의 개선된 침투율로 주사될 수 있게 하는 것으로 확인되었다. 수송은 보툴리눔 독소의 공유결합으로 변형 없이 일어난다. 보툴리눔 독소의 침투 향상 외에, 본 발명의 양으로 하전된 담체는 어떤 바람직한 구체예에서, 보툴리눔 독소를 분해로부터 안정화시킨다. 그와 같은 구체예에서, 일반적으로 보툴리눔 독소를 안정화시키기 위해 존재하는 헤마글루티닌 단백질 및 비-독소, 비-독소, 비-헤마글루티닌 단백질은 감소되거나 또는 완전히 생략될 수 있다. 유사하게, 제조 동안 일반적으로 첨가되는 외생 알부민이 생략될 수 있다.

[0037] 용어 "담체 (carrier)"와 관련하여 용어 "양으로 하전된 (positively charged)" 또는 "양이온성 (cationic)"의 사용에 의해, 상기 담체는 적어도 일부 용액-상 (solution-phase) 조건 하에서, 보다 바람직하게는 적어도 일부 생리학적으로 호환가능한 (physiologically compatible) 조건 하에 양 전하를 갖는다는 것을 의미한다. 보다 구체적으로, 본 명세서에서 사용된 "양으로 하전된" 및 "양이온성"은 해당 작용기가 모든 pH 조건 하에서 하전된 관능기, 예를 들어, 사차 아민을 포함하거나, 또는 일차 아민의 경우의 pH 변화와 같은 어떤 용액-상 조건 하에서, 양전하를 얻을 수 있는 관능기를 함유한다는 것을 의미한다. 보다 바람직하게는, 본 명세서에서 사용된 "양으로 하전된" 또는 "양이온성"은 생리학적으로 호환가능한 조건에서 음이온과 결합하는 습성을 갖는 작용기들을 의미한다. 다수의 양으로-하전된 모이어티를 갖는 중합체는 당업자에게 자명한 바와 같이, 단일중합체 (homopolymer)일 필요는 없다. 양으로 하전된 모이어티의 기타 예들은 당업자에게 자명한 바와 같이, 종래 기술에서 잘 알려져 있고, 용이하게 채택될 수 있다.

[0038] 일반적으로, 양으로 하전된 담체 ("양으로 하전된 백본 (positively charged backbone)"으로도 지칭됨)는 전형적으로 생리학적 pH에서 양 전하를 갖는 사슬 중의 작용기를 갖거나, 또는 백본으로부터 연장되는 곁사슬에 결합된 양 전하를 갖는 작용기를 갖는, 원자들의 사슬이다. 어떤 바람직한 구체예에서, 양으로 하전된 백본은 양이온성 펩티드이다. 본 명세서에서 사용된, 용어 "펩티드 (peptide)"는 아미노산 서열을 의미하나, 상기 아미노산 서열 내의 아미노산 잔기의 갯수에 대한 암시를 포함하지 않는다. 따라서, 용어 "펩티드"는 또한 폴리펩티드 및 단백질을 포괄할 수 있다. 어떤 바람직한 구체예에서, 양으로 하전된 백본 자체는 정해진 효소적 또는 치료적 생물학적 활성을 갖지 않을 것이다. 어떤 구체예에서, 상기 백본은, 일부 구체예에서 질소, 산소, 황, 실리콘 및 인으로부터 선택된 헤테로원자에 의해 중단되는, 선형 탄화수소 백본이다. 백본 사슬 원자의 대부분은 보통 탄소이다. 추가적으로, 상기 백본은 종종 반복 단위의 중합체 (예를 들어, 아미노산, 폴리(에틸렌옥시), 폴리(프로필렌아민), 폴리알킬렌아민 등)일 것이나, 헤테로중합체일 수 있다. 일 군의 구체예에서, 양으로 하전된 백본은 아민 질소 원자의 다수가 양전하를 갖는 암모늄기 (테트라-치환된)로 존재하는 것인 폴리프로필렌아민이다. 다른 구체예에서, 양으로 하전된 백본은 폴리알킬렌아민, 예를 들어, 약 10,000 내지 약 2,500,000, 바람직하게는, 약 100,000 내지 약 1,800,000, 가장 바람직하게는 약 500,000 내지 약 1,400,000의 분자량을 갖는, 폴리에틸렌아민 또는 폴리프로필렌아민과 같은 헤테로-중합체 또는 호모-중합체일 수 있는 비펩티드성 (nonpeptidyl) 중합체이다. 다른 군의 구체예에서, 상기 백본은 양으로 하전된 작용기 (예를 들어, 암모늄기, 피리디늄기, 포스포늄기, 술포늄기, 구아니디늄기, 또는 아미디늄기)를 포함하는 다수의 곁사슬 모이어티를 갖는다. 이 군의 구체예에서 곁사슬 모이어티는 거리 (separation)가 일정하거나 가변적인, 백본에 따른 간격 (spacing)으로 배치될 수 있다. 추가적으로, 곁사슬의 길이는 유사하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 일 군의 구체예에서, 곁사슬은 1 내지 20개의 탄소 원자를 가지며, 원위 말단 (백본으로부터 떨어진 말단)에서 상기-연속된 양으로 하전된 작용기 중 하나로 종료되는 직쇄형 또는 분지형 탄화수소 사슬일 수 있다. 양으로 하전된 담체와 보툴리눔 독소 사이 결합은 비-공유결합성 상호작용에 의하며, 그 예는 이온성 상호작용, 수소 결합, 반데르 발스 힘 (van der Waals force), 또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0039] 일 군의 구체예에서, 상기 양으로 하전된 백본은 다수의 양으로 하전된 곁사슬 작용기 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 오르니틴, 호모아르기닌 등)을 갖는 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 상기 폴리펩티드는 약 100 내지 약 1,500,000, 보다 바람직하게는 약 500 내지 약 1,200,000, 가장 바람직하게는 약 1000 내지 약 1,000,000의 분자량을 갖는다. 당업자는 아미노산이 본 발명의 이의 부분에서 사용될 경우, 곁사슬은 결합 중심 (center of attachment)에서 D- 또는 L-형태 (R 또는 S 배열)을 가질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 어떤 바람직한 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 약 500 내지 약 5000, 보다 바람직하게는 약 1000 내지 약 4000, 보다 바람직하게는 약 2000 내지 약 3000의 분자량을 갖는다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 10 내지 20 아미노산, 또는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 아미노산, 바람직하게는 폴리리신을 포함한다.

[0040] 대안적으로, 상기 백본은 아미노산 유사체 및/또는 합성 아미노산을 포함할 수 있다. 상기 백본은 또한 펩토이드 (peptoid)와 같은 폴리펩티드의 유사체일 수 있다. 예를 들어, Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32:543 (1993); Zuckermann et al. *Chemtracts-Macromol. Chem.* 4:80 (1992); 및 Simon et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:9367 (1992))을 참조한다. 요약하면, 펩토이드는 곁사슬이 α -탄소 원자가 아니라, 백본 질소 원자에 결합된 것인 폴리글리신이다. 상기와 같이, 곁사슬의 일부는 전형적으로 양으로 하전된 백본 성분을 제공하기 위해 양으로 하전된 작용기로 종결될 것이다. 펩토이드의 합성은 예를 들어, 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 포함된, 미국특허 제 5,877,278 호에 기재된다. 본 명세서에서 사용된 상기 용어와 같이, 펩토이드 백본 구조를 갖는 양으로 하전된 백본은 알파-탄소 위치에 천연 곁사슬을 갖는 아미노산으로 구성되지 않기 때문에 "비-펩티드 (non-peptide)"로 간주된다.

[0041] 다양한 다른 백본들, 예를 들어, 펩티드의 아마이드 결합이 에스테르 결합, 티오아미드 (--CSNH--), 역전 티오아미드(reversed thioamide) (--NHCS--), 아미노메틸렌 (--NHCH₂--) 또는 역전 메틸렌아미노 (--CH₂NH--)기, 케토-메틸렌 (--COCH₂--)기, 포스피네이트 (--PO₂RCH₂--), 포스폰아미데이트 및 포스폰아미데이트 에스테르 (--PO₂RNH--), 역전 펩티드 (--NHCO--), 트랜스-알켄 (--CR=CH--), 플루오로알켄 (--CF=CH--), 디메틸렌 (--CH₂CH₂--), 티오에테르 (--CH₂S--), 히드록시에틸렌 (--CH(OH)CH₂--), 메틸렌옥시 (--CH₂O--), 테트라졸(CN₄), 술폰아미도 (--SO₂NH--), 메틸렌술폰아미도 (--CHR₂SO₂NH--), 역전 술폰아미드 (--NHSO₂--)와 같은 대리물(surrogate)로 치환된 것인 폴리펩티드의 입체 또는 전자적 유사체(mimics), 및 말로네이트 및/또는 겐-디아미노-알킬 서브유닛(gem-diamino-alkyl subunit)을 갖는 백본, 예를 들어, Fletcher et al. ((1998) Chem. Rev. 98:763)에 의해 검토되고, 그에 인용된 참조문헌에 의해 상세하게 설명된 백본이 사용될 수 있다. 전술된 치환의 다수는 α-아미노산으로부터 형성된 백본에 대하여 거의 등전자인(isosteric) 중합체 백본을 초래할 것이다.

[0042] 상기 제공된 백본의 각각에, 양으로 하전된 작용기를 갖는 결사슬 작용기가 부착될 수 있다. 예를 들어, 술폰아미드-결합 백본 (--SO₂NH-- 및 --NHSO₂--)은 질소 원자에 결합된 결사슬 작용기를 가질 수 있다. 유사하게, 히드록시에틸렌 (--CH(OH)CH₂--) 결합은 히드록시 치환기에 결합된 결사슬을 가질 수 있다. 당업자는 표준 합성 방법을 이용하여 양으로 하전된 결사슬기를 제공하기 위해 다른 결합 화학을 용이하게 개조할 수 있다.

[0043] 일 구체예에서, 양으로 하전된 백본은 단백질 형질도입 도메인(효능기로도 지칭됨)을 갖는 폴리펩티드이다. 본 명세서에서 사용된, 효능기 또는 단백질 형질도입 도메인은 양으로 하전된 백본의 조직 또는 세포의 막을 통한 이동(translocation)을 촉진하는 작용제(agent)이다. 단백질 형질도입 도메인 또는 효능기의 비-한정적인 예는 (gly)_{n1}-(arg)_{n2}, HIV-TAT 또는 이의 단편, 안테나페디아(Antennapedia)의 단백질 형질도입 도메인(PTD), 또는 이의 단편이고, 상기 아래첨자 n1은 0 내지 20의 정수이고, 보다 바람직하게는 0 내지 8의 정수이고, 훨씬 더 바람직하게는 2 내지 5의 정수이며, 상기 아래첨자 n2는 독립적으로 약 5 내지 약 25의 홀수, 보다 바람직하게는 약 7 내지 약 17의 홀수, 가장 바람직하게는 약 7 내지 약 13의 홀수이다. 일부 구체예에서, HIV-TAT 단편은 디설피드 응집과 연관된 문제를 최소화하기 위해, HIV-TAT 분자의 시스테인-풍부(cystein-rich) 영역을 함유하지 않는다. 바람직하게는, HIV-TAT 및 안테나페디아 단백질 형질도입 도메인의 단편은 전체 단백질의 단백질 형질도입 활성을 보유한다. HIV-TAT 단편은 아미노산 서열 (gly)_p-RGRDDRRQRRR-(gly)_q, (gly)_p-YGRKKRRQRRR-(gly)_q 또는 (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q로서, 상기 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수이거나, 상기 p 및 q는 각각 독립적으로 정수 1인 것인 구체예가 또한 바람직하다. 다른 구체예에서, 상기 단편 또는 효능기는 단편 또는 효능기의 아미노산 서열의 C-말단 또는 N-말단을 통해 백본에 결합된다. 어떤 바람직한 구체예에서, p는 1이고, q는 0이거나, 또는 p는 0이고 q는 1이다. 바람직한 HIV-TAT 단편으로서, 상기 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 8, 보다 바람직하게는 0 내지 5의 정수인 것인 단편이다. 다른 바람직한 구체예에서, 양으로 하전된 결사슬 또는 분지형(branching) 작용기는 안테나페디아(Antp) 단백질 형질도입 도메인(PTD), 또는 활성을 보유한 이의 단편이다. 이들은 예를 들어, Console et al., J. Biol. Chem. 278:35109 (2003)로부터, 당업계에서 알려져 있고, 본 발명에 의해 고려되는 안테나페디아 PTD의 예는 아미노산 서열 SGRQIKIWFQNRMRKWKKC를 갖는 PTD 이지만, 이에 한정되지 않는다. 다른 구체예에서, 양으로 하전된 담체는 본 발명의 조성물 및 방법에서의 사용을 위한 아미노산 서열 RKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RKKRRQRRR를 갖는 양으로 하전된 펩티드; 또는 아미노산 서열 YGRKKRRQRRR-G-(K)₁₅-G-YGRKKRRQRRR를 갖는 양으로 하전된 펩티드; 또는 아미노산 서열 RGRDDRRQRRR-G-(K)₁₅-G-RGRDDRRQRRR를 갖는 양으로 하전된 펩티드이다.

[0044] 바람직하게는, 양으로 하전된 담체는 총 담체 중량의 백분율로, 적어도 약 0.01%의 양, 바람직하게는 약 0.01 내지 약 50 중량%, 보다 바람직하게는 약 0.05 내지 약 45 중량%, 및 가장 바람직하게는 약 0.1 내지 약 30 중량%로 결사슬에 양으로 하전된 단백질 형질도입 도메인 또는 양으로 하전된 효능기를 포함한다. 식 -(gly)_{n1}-(arg)_{n2}를 갖는 양으로 하전된 단백질 형질도입 도메인에 대하여, 바람직한 범위는 약 0.1 내지 약 25%이다.

[0045] 다른 구체예에서, 백본 부분은 폴리리신이고 양으로 하전된 단백질 형질도입 도메인은 리신 결사슬 아미노기 또는 C- 또는 N-말단에 결합된다. 일부 바람직한 구체예에서, 상기 폴리리신은 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 또는 6000 D 이상, 및 약 2,000,000, 1,000,000, 500,000, 250,000, 100,000, 75,000, 50,000, 및 25,000 D 미만의 분자량을 가질 수 있

다. 100 내지 2,000,000 D의 범위 내에서, 하한 및/또는 상한 범위는 개별적으로, 100 만큼 증가되거나 또는 감소될 수 있는 것으로 고려되고, 각각의 결과적인 하위-범위(sub-range)는 구체적으로 고려된 본 발명의 구체예이다. 일부 예시적인 구체예에서, 상기 폴리리신은 약 1,000 내지 약 1,500,000 D, 약 2,000 내지 약 800,000 D, 또는 약 3,000 내지 약 200,000 D의 분자량을 갖는다. 다른 예시적인 구체예에서, 상기 폴리리신은 약 100 내지 약 10,000 D, 약 500 내지 약 5,000 D, 약 1,000 내지 약 4,000 D, 약 1,500 내지 약 3,500 D 또는 약 2,000 내지 약 3,000 D의 분자량을 갖는다. 10 내지 20 리신을 갖는, 폴리리신 폴리펩티드, 보다 바람직하게는, 15 리신이 바람직하다. 일부 구체예에서, 본 발명에 의해 고려되는 폴리리신은 상업적으로 이용가능한 (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA) 폴리리신, 예를 들어, 70,000보다 큰 MW를 갖는 폴리리신, 70,000 내지 150,000의 MW를 갖는 폴리리신, 150,000 내지 300,000의 MW를 갖는 폴리리신 및 MW > 300,000인 폴리리신일 수 있다. 적절한 폴리리신의 선택은 조성물의 나머지 성분들에 의존적이고, 조성물의 전체 순 양 전하를 제공하고, 바람직하게는 음으로 하전된 성분의 전체 길이의 1배 내지 4배인 길이를 제공하기에 충분할 것이다. 바람직한 양으로 하전된 단백질 형질도입 도메인 또는 효능기는 예를 들어, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg (-Gly₃Arg₇) 또는 HIV-TAT를 포함한다.

[0046] 다른 바람직한 구체예에서 양으로 하전된 백본은 폴리알킬렌아민이고, 그의 예는 폴리에틸렌아민, 폴리프로필렌아민, 및 폴리부틸렌아민을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 어떤 구체예에서, 폴리알킬렌아민은 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 또는 6000 D 이상, 및 약 2,000,000, 1,000,000, 500,000, 250,000, 100,000, 75,000, 50,000, 및 25,000 D 미만의 분자량을 갖는다. 100 내지 2,000,000 D의 범위 내에서, 하한 및/또는 상한 범위는 개별적으로, 100 만큼 증가되거나 또는 감소될 수 있는 것으로 고려되고, 각각의 결과적인 하위-범위는 구체적으로 고려된 본 발명의 구체예이다.

[0047] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 담체는 비교적 짧은 폴리리신 또는 폴리에틸렌아민 (polyethyleneimine: PEI) 백본 (직쇄거나 분지쇄일 수 있음)이며 양으로 하전된 분지형 작용기를 갖는다. 이론에 의한 제약 없이, 그러한 담체는 치료적 조성물에서 수송 효율성의 급격한 감소를 유발하는, 백본 및 보툴리눔 독소의 제어되지 않은 응집을 최소화하기 위해 유용한 것으로 여겨진다. 상기 담체가 비교적 짧은 직쇄 폴리리신 또는 PEI 백본인 경우, 백본은 75,000 D 미만, 보다 바람직하게는 30,000 D 미만, 및 가장 바람직하게는 25,000 D 미만의 분자량을 가질 것이다. 그러나, 상기 담체가 비교적 짧은 분지형 폴리리신 또는 PEI 백본인 경우, 백본은 60,000 D 미만, 보다 바람직하게는 55,000 D 미만, 및 가장 바람직하게는 50,000 D 미만의 분자량을 가질 것이다.

[0048] 하나의 특히 흥미로운 구체예에서, 비-원형 분자는 내재된 보툴리눔-독소-유사 활성을 갖지 않고 또한 본 명세서에 기재된 하나 이상의 단백질 형질도입 도메인을 갖는 양이온성 펩티드이다. 임의의 특정 과학적 이론에 의해 한정 없이, 상기 펩티드는 주사 후 복합체로 결합된 분자들의 조직 침투를 증가시키고, 피부 내에서 및 시험관 내에서 보툴리눔 독소 안정화를 증가시키는 것으로 여겨진다. 이 펩티드에 의해 제공된 증가된 조직 침투는 외생 알부민에 결합된 통상적인 상업용 보툴리눔 독소 복합체 (예를 들어, BOTOX[®] 또는 MYOBLOC[®])에 비해, 특히 감소된 항원성, 보다 우수한 안전성 프로파일, 증가된 효능, 임상적 유효성의 보다 신속한 발생, 또는 임상적 유효성의 보다 긴 지속기간을 제공하는 것으로 여겨진다.

[0049] 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 조성물 중 양으로 하전된 담체의 농도는 예를 들어, 운동 신경 판 (motor nerve plate)과 같은 분자 표적으로의 보툴리눔 독소의 전달을 증가시키기에 충분하다. 또한, 이론에 의해 한정 없이, 침투 비율 (penetration rate)은 수용체-매개 동역학을 따르므로, 조직 침투는 수송 비율이 일정해지는 포화점 (saturation point)까지 침투-촉진-분자의 양 증가에 따라 증가하는 것으로 여겨진다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 첨가된 침투-촉진-분자의 양은 포화 직전에 침투 비율을 극대화시키는 양과 동일하다. 본 발명의 주사용 조성물 중 양으로 하전된 담체 (또는 담체 펩티드)에 대한 유용한 농도 범위는 본 명세서에 기재된 바와 같이 보툴리눔 독소 (0.1 pg/U)의 단위 (unit: U) 당 담체의 약 0.1 pg 내지 보툴리눔 독소의 단위 당 (mg/U) 약 1.0 mg이다. 본 발명의 국소 조성물 중 양으로 하전된 담체 (또는 담체 펩티드)에 대한 유용한 농도 범위는 보툴리눔 독소의 약 1.0 pg/U 내지 0.5 mg/U (담체의 양/보툴리눔 독소의 단위)이다. 다른 구체예에서, 양으로 하전된 담체 (또는 담체 펩티드)는 본 발명의 주사용 조성물 중 예를 들어, 보툴리눔 독소의 10 ng/U 내지 200 ng/U의 범위에서, 또는 보툴리눔 독소의 1 ng/U 내지 1000 ng/U의 범위에서; 또는 0.1 ng/U 내지 10,000 ng/U의 범위에서 존재한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 주사용 조성물에 존재하는 보툴리눔 독소의 단위에 대한 양으로 하전된 담체 (또는 담체 펩티드)의 양은 예로서, 보툴리눔 독소의 단위 당 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 ng의 담체

(ng/U)이지만, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게, 상기 보툴리눔 독소는 혈청형 A이고, 특히 혈청형 A 보툴리눔 독소의 150 kDa 형태이다.

[0050] 일반적으로, 보툴리눔 독소의 활성, 즉, 보툴리눔 독소의 활성의 단위 (U)를 측정하기 위한 방법 및 절차는 당업자에게 공지되어 있으며 실시되고 있다. 간단하게, 마우스 중 중앙 치사율 분석 (median lethality assays: LD₅₀ assay)은 고도의 정밀도로 보툴리눔 독소의 단위 수를 추정하는데 통상적으로 사용된다. 모든 상업적으로 이용가능한 보툴리눔 독소의 용량은 생물학적 활성의 단위의 용어로 표시된다. 예로서, 보툴리눔 독소의 일 단위는 암컷 스위스-웹스터 (Swiss-Webster) 마우스에서 계산된 중앙 복강내 치사량 (LD₅₀)에 상응한다. 참조로 당업계의 치사율 분석인 Hoffman, R.O. et al., 1986, *Int. Ophthalmol. Clin.*, 26:241-50, 뿐만 아니라 DePass, L.R., 1989, *Toxicol. Letters*, 49:159-170; 및 Pearce, L.B. et al., 1994, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 128:69-77에 기재되어 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 조성물의 보툴리눔 독소 성분에 대한 보툴리눔 독소 단위를 결정하기 위한 적합한 방법은 다음과 같다: 무게가 17 내지 23 g인 48 마리의 암컷 CD-1 마우스는 무작위로 용량 군 당 8 마리의 동물로, 시험 물품 (1.54, 1.31, 1.11, 0.95, 0.80, 및 0.68 U/0.5 mL)의 6 가지 용량으로 배정된다. 상기 시험 물품은 분석 또는 시험되는 보툴리눔 독소 제제 또는 시료를 의미한다. 상기 동물은 케이지 (cage) 당 8 마리 보관되고 시험 물품으로 투여 후 24시간 이내에 무게를 잰다. 투여 당일에, 시험 물품 (0.9% NaCl)은 등장성 식염수에서 적절한 농도로 희석된다. 각 동물은 희석된 0.5 mL의 시험 물품으로 복강내 주사를 통해 투여된다. 주사 후, 마우스를 케이지로 돌려놓고 사망자를 3일 동안 매일 기록한다. 치사율은 주사 후 72 시간에 점수를 매기고 프로빗 (probit) 또는 로지스틱 (logistic) 분석으로 결과를 분석하여 동일한 투약 요법을 사용하여 평가된 참조 표준에 대한 LD₅₀ 값을 유도한다. 예로서, 상기 참조 표준은 시험 물품의 상대적인 효능을 유도하기 위한 비교를 위해 사용되는 본 발명의 동일한 조성물의 구체적으로 검증되고 (qualified) 보정된 (calibrated) 로트 (lot)이다. 결정된 LD₅₀ 값은 그리고 나서 순수한 (희석되지 않은) 시험 물품에 대한 상대적 효능 값을 할당하기 위해 수행된 누적되는 희석에 대해 정정된다.

[0051] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 개체 또는 환자 (즉, 특정한 치료를 필요로 하는 인간 또는 다른 포유동물)의 피부 또는 상피로 주사될 수 있는 제형으로 존재한다. 용어 "필요로 하는 (in need)"은 약학적 또는 건강-관련 필요성 (예를 들어, 바람직하지 않은 안면 근육 경련을 포함하는 상태를 치료할 필요성), 및 미용적 및 주관적 필요성 (예를 들어, 안면 조직의 외형을 변형시키거나 또는 개선할 필요성)을 모두 포함하는 것을 의미한다. 바람직한 구체예에서, 조성물은 보툴리눔 독소 (결합된 비-독소 단백질 또는 감소된 양의 결합된 비-독소 단백질을 포함함)와 양으로 하전된 담체, 및 보통 하나 이상의 추가적인 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 혼합하는 것에 의해 제조된다. 그들의 가장 간단한 형태에서, 그들은 완충 염수 (예를 들어, 인산염 완충 염수)와 같은, 수성의 약제학적으로 허용가능한 희석제를 함유할 수 있다. 그러나, 상기 조성물은 그들이 적용될 조직과 용화될 수 있는 피부학적으로 또는 약학적으로 허용가능한 담체, 비히클 또는 매질을 포함한, 주사용 약학적 또는 미용약학적 (cosmeceutical) 조성물에서 전형적으로 발견되는 다른 성분들을 함유할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "피부학적으로 또는 약학적으로 허용가능한 (dermatologically or pharmaceutically acceptable)"은 그렇게 기재된 조성물 또는 이의 성분이 일반적으로, 과도한 독성, 비호환성 (incompatibility), 불안정성, 알레르기 반응 등 없이 이러한 조직과 접촉에서의 사용 또는 환자에서의 사용을 위해 적합하다는 것을 의미한다. 적합한 경우, 본 발명의 조성물은 고려되는 분야 및 특히, 미용학 및 피부학 분야에서 통상적으로 사용되는 임의의 성분을 포함할 수 있다.

[0052] 그들의 형태 측면에서, 본 발명의 조성물은 용액, 에멀전 (마이크로에멀전 포함), 현탁액, 겔, 분말, 또는 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 근육 및 기타 조직으로의 주사를 위해 사용되는 기타 전형적인 고체 또는 액체 조성물을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 주사기에 의한 주사를 위해 적합한, 저-점도, 멸균 제제로 존재한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 조성물 및 제제라는 용어는 본 발명에 따른 조성물 및 제제를 언급할 때 기본적으로 상호교환가능하다. 본 발명의 조성물은 주사 전에 약학적으로 허용가능한 액체 희석제를 이용하여 재구성되는 동결건조된 분말의 형태일 수 있다. 어떤 구체예에서, 상기 동결건조된 분말은 약 0.1 내지 약 2000 cP, 보다 바람직하게는 약 0.2 내지 약 500 cP, 훨씬 더 바람직하게는 약 0.3 내지 약 50 cP, 및 훨씬 더 바람직하게는 약 0.4 내지 약 2.0 cP의 점도를 갖는 주사용 제제를 형성하기 위해 액체 희석제로 재구성된다. 본 발명의 조성물은 보툴리눔 독소 및 양으로 하전된 담체에 추가하여, 그와 같은 제품에서 전형적으로 이용되는 다른 성분들, 예를 들어, 항균제 (antimicrobial), 수화제, 조직 확장제 (tissue bulking agent) 또는 조직 충전제, 보존제, 유화제 (emulsifier), 천연 또는 합성 오일, 용매, 계면활성제, 디터전트 (detergent), 겔화제, 향산화제, 충전제 (filler), 증점제 (thickner), 분말, 점도 조절제 및 물을 함유하고, 선택적으로 마취제, 항-소양증제 (anti-itch actives), 식물 추출물, 컨디셔닝제 (conditioning

agent), 미네랄, 폴리페놀, 실리콘 또는 이의 유도체, 비타민, 및 약용식물 (phytomedicinal)을 함유할 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 주사용 조성물은 시간의 경과에 따라 제어되는 방식으로 피부로 방출되도록 캡슐화되거나 또는 물질 내에 담긴 보툴리눔 독소 및 양으로 하전된 담체를 포함하는 제어-방출형 (controlled-release) 조성물 또는 지속-방출형 (sustained-release) 조성물의 형태일 수 있다. 보툴리눔 독소 및 양으로 하전된 담체를 포함하는 조성물은 매트릭스, 리포솜, 소포 (vesicle), 마이크로캡슐, 미소구체 (microsphere) 등에 함유되거나, 또는 고체 입자형 물질 (solid particulate material) 내에 함유되고, 이들 모두는 시간의 경과에 따라 보툴리눔 독소의 방출을 제어하도록 선택되고 및/또는 구축될 수 있다. 보툴리눔 독소 및 양으로 하전된 담체는 함께 (즉, 동일한 캡슐 내에) 또는 별개로 (즉, 별개의 캡슐에) 캡슐화될 수 있다.

[0054] 구체예에서, 본 발명의 조성물은 본 명세서에 기재된 보툴리눔 독소, 본 명세서에 기재된 바와 같은 양으로 하전된 담체 (또는 펩티드), 비-환원성 이당류 또는 비-환원성 삼당류, 비-이온성 계면활성제, 및 pH 4.5 내지 pH 7.5, 또는 pH 4.5 내지 pH 6.8, 또는 pH 4.5 내지 pH 6.5의 범위의 pH와 같은 적합한 pH를 유지할 수 있는 생리학적으로 호환가능한 완충액을 포함하는 액체 (수성) 조성물 (또는 제제)를 포함한다. 적합한 pH는 또한 예를 들어, pH 6.5 또는 pH 7.5 범위의 하한 및 상한 값의 pH를 포함한다는 것을 이해해야 한다. 액체 조성물 중 비-환원성 당류의 농도는 10% 내지 40% (w/v)의 범위이고 비-이온성 계면활성제의 농도는 0.005% 내지 0.5% (w/v)의 범위이다. 액체 조성물은 안정화된 고체 조성물을 제조하기 위해 바람직하게 동결건조에 의해 건조될 수 있으며, 그 후 예를 들어, 멸균 식염수 또는 기타 공지된 생리학적 및 약학적으로 허용되는 희석제, 부형제, 또는 비히클, 특히 주사용 제제에서 사용을 위해 공지된 것들을 사용하여 재구성될 수 있다. 바람직하게, 건조된, 예를 들어, 동결건조된, 고체 조성물은 비결정성 및 비정질 고체 조성물이고, 예를 들어, 분말 형태일 수 있다. 또한, 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 알부민과 같은 동물 단백질-유래 제품을 포함하지 않는다. 본 발명에 적합한 조성물은 또한 미국 출원 공보 제 US 2010/0330123호에 기재되어 있으며, 전체 내용은 본 명세서에서 참조로 포함된다. 특정 구체예에서, 조성물은 혈청형 A의 보툴리눔 독소를 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 조성물은 150 kDa의 분자량을 갖는 혈청형 A의 보툴리눔 독소를 포함한다.

[0055] 어떤 구체예에서, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 이당류인, 비-환원성 당류를 함유하고, 이의 예는 트레할로스, 이의 무수물 및 수화물 형태를 포함하거나, 또는 수크로스 뿐만 아니라 이의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, 트레할로스의 수화 형태인, 트레할로스-이수화물 (dihydrate)이 바람직하다. 다른 구체예에서, 상기 조성물은 삼당류를 함유하고, 이의 예로 라피노스 (raffinose)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일반적으로, 본 발명의 조성물 중 비-환원성 당류, 바람직하게는 이당류, 예를 들어, 수크로스의 농도는 10% 내지 40% (w/v), 바람직하게는 10% 내지 25% (w/v), 보다 바람직하게는 15% 내지 20% (w/v)이다. 일부 바람직한 구체예에서, 비-환원성 당류, 바람직하게는 이당류, 예를 들어, 수크로스의 농도는 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20% (w/v)이다.

[0056] 일반적으로, 본 발명의 조성물은 보툴리눔 독소를 안정화시키는 기능을 가지고 약학적인 사용에 적합한 임의의 비-이온성 계면 활성제를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 비-이온성 계면활성제는 비한정적인 예로서, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 및 폴리소르베이트 80과 같은 폴리소르베이트이다. 다른 구체예에서, 비-이온성 계면활성제는 소르비탄 에스테르이고, 이 예로 SPAN[®] 20, SPAN[®] 60, SPAN[®] 65, 및 SPAN[®] 80를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 비-이온성 계면활성제 Triton[®] X-100 또는 NP-40도 사용될 수 있다. 추가하여, 상이한 비-이온성 계면활성제의 조합이 사용될 수 있다. 어떤 바람직한 구체예에서, 비-이온성 계면활성제는 폴리소르베이트, 폴록사머 및/또는 소르비탄이고; 폴리소르베이트 및 소르비탄이 특히 바람직하다. 구체예에서, 본 발명의 조성물 중 비-이온성 계면활성제는 상한 및 하한 값을 포함하여 0.005% 내지 0.5%의 범위로, 또는 0.01% 내지 0.2%의 범위로, 또는 0.02% 내지 0.1%의 범위로, 또는 0.05 내지 0.08%의 범위로 존재한다. 추가하여, 본 발명의 조성물은 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%, 0.08%, 0.09%, 0.10%, 0.11%, 0.12%, 0.13%, 0.14%, 또는 0.15%의 양으로 비-이온성 계면활성제를 함유할 수 있다.

[0057] 일반적으로 본 발명의 조성물의 경우, 상기 범위의 pH를 유지할 수 있는 임의의 생리학적으로 호환가능한 완충액이 사용에 적합하다. 그러한 완충액의 예는 시트르산, 아세트산, 숙신산, 타르타르산, 말레산, 및 히스티딘을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 적합한 완충액 농도의 예는 0.400% 내지 0.600%; 0.450% 내지 0.575%, 또는 0.500% 내지 0.565%의 범위의 완충액 농도를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 조성물은 또한 완충액 염의 혼합물을 포함하고, 이의 예는 시트르산염/아세트산염, 시트르산염/히스티딘염, 시트르산염/타르타르산염, 말레산염/히스티딘염, 또는 숙신산염/히스티딘염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 단일 주사

로 투여 후에 긴 지속기간 효과를 제공하는 본 발명의 조성물은 본 명세서에 기재된 바와 같은, 150 kDa MW의 보툴리눔 독소 A 또는 보툴리눔 독소 A와 같은 보툴리눔 독소, 본 명세서에 기재된 바와 같은 양으로 하전된 담체 (또는 펩티드), 수크로스와 같은 비-환원성 이당류, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 80, 또는 소르비탄 에스테르와 같은 비-이온성 계면활성제, 및 pH 4.5 내지 pH 6.5의 범위, 또는 pH 4.5 내지 pH 7.5의 범위의 pH와 같은 적합한 pH를 유지할 수 있는 시트르산, 아세트산, 숙신산, 타르타르산, 말레산, 및 히스티딘과 같은 생리학적으로 호환가능한 완충액을 본 명세서에 기재된 w/v 양으로 포함한다.

[0058] 본 발명의 특정 조성물은 보툴리눔 독소, 바람직하게는 혈청형 A의 보툴리눔 독소 또는 150 kDadml 분자량을 갖는 보툴리눔독소 A; 양으로 하전된 전하 (예를 들어, 펩티드); 10% 내지 40% (w/v)의 범위로 존재하는, 비-환원성 이당류 또는 비-환원성 삼당류, 바람직하게는 이당류; 0.05% 내지 0.5% (w/v)의 범위로 존재하는, 비-이온성 계면활성제, 바람직하게는 폴리소르베이트 또는 소르비탄 에스테르; 및 pH를 4.5 내지 7.5로 유지하기 위한, 0.400% 내지 0.600%; 0.450% 내지 0.575%, 또는 0.500% 내지 0.565%의 범위로 존재하는, 시트르산, 아세트산, 숙신산, 타르타르산, 말레산, 또는 히스티딘과 같은 생리학적으로 호환가능한 완충액을 포함하는 알부민-없는, 액체 (수성) 조성물이다.

[0059] 본 발명에 따른 보툴리눔 독소 제제는 피부 아래의 근육 또는 피부 내의 선 구조 (glandular structure)로 (전형적으로 주사기를 사용한) 주사에 의해 마비를 일으키고, 이완을 초래하며, 수축을 경감시키거나, 경련을 예방 또는 경감하거나, 선 분비량 (glandular output)을 감소시키거나 또는 기타 바람직한 효과를 생성하기에 유효한 양으로 전달될 수 있다. 이 방식에서의 보툴리눔 독소의 국소 전달은 주사 또는 이식용 물질 대비, 투여량 저하를 가능하게 하고, 독성을 저하시키며 바람직한 효과를 위해 보다 정확한 투여량 최적화를 가능하게 할 수 있다.

[0060] 본 발명의 조성물은 보툴리눔 독소의 유효량, 바람직하게는 치료적 또는 미용적 유효량이 전달되도록 투여된다. 본 명세서에서 사용된 용어 "유효량 (effective amount)" 또는 "치료적 또는 미용적 유효량 (therapeutically or cosmetically effective amount)"은 원하는 근육 마비 또는 다른 생물학적 또는 심미적 효과를 생성하기에 충분하나, 내재적으로 안전한 양, 즉, 심각한 부작용을 방지할 정도로 충분히 낮은 양인, 상기 정의된 바와 같은 보툴리눔 독소의 양을 의미한다. 바람직한 효과는 예를 들어, 미세 라인 (fine lines) 및/또는 주름, 특히 안면의 미세 라인 및/또는 주름을 감소시키거나, 또는 눈을 넓히거나, 구각 (corner of the mouth)을 높이거나 또는 윗 입술로부터 전개되는 라인을 평탄화하는 것과 같은 다른 방식으로 안면의 외형을 조정하거나, 또는 근육 긴장의 전반적인 완화 (general relief)를 목적으로 한 일부 근육의 이완을 포함한다. 마지막으로-언급된 효과인, 근육 긴장의 전반적인 완화는 안면 또는 그 외의 부위에서 일어날 수 있다.

[0061] 본 발명의 조성물은 단일-투여 치료로서의 적용을 위한 보툴리눔 독소의 적합한 유효량을 포함하거나, 또는 투여 장소에서 회석을 위해, 또는 다수 적용으로의 사용을 위해 보다 농축된 것일 수 있다. 본 발명의 양으로 하전된 담체의 사용을 통해, 보툴리눔 독소는 주름, 바람직하지 않은 안면 근육 또는 다른 근육 경련, 다한증, 여드름과 같은 상태 또는 근육통 또는 경련의 완화가 바람직한 신체 내의 부위에서의 상태를 치료하기 위해 개체에 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 특히 안면 잔 주름, 및 개체의 안면에서 "쨍그린 주름 (frown lines)"으로도 알려진 미간 주름과 같은 잔 주름의 치료에 적합하다. 보툴리눔 독소는 근육 또는 기타 피부-관련 표적 구조, 또는 기타 표적 조직 구조로 주사에 의해 투여된다. 투여는 예를 들어, 다리, 어깨 등 (허리 포함), 겨드랑이, 손바닥, 발, 목, 얼굴, 서혜부 (groin), 손등 또는 발등, 팔꿈치, 상완, 무릎, 상지 (upper leg), 둔부, 몸체 (torso), 골반, 또는 보툴리눔 독소의 투여가 바람직한 신체의 기타 부위로 이루어질 수 있다.

[0062] 본 발명의 주사용 보툴리눔 독소-함유 조성물의 투여는 또한 아세틸콜린의 시냅스 전달 (synaptic transmission) 또는 분비의 억제가 치료 효과를 갖는 것인 상태를 포함한 다른 상태들을 치료하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 조성물에 의해 치료될 수 있는 상태는 신경 통증, 편두통 또는 기타 두통, 과민성 방광, 비염, 부비동염, 여드름, 근긴장 이상증, (자각적 또는 임상적) 근긴장 이상성 수축, (자각적 또는 임상적) 다한증, 및 콜린성 신경계에 의해 제어되는 하나 이상의 선의 과다분비를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 조성물은 또한 면역 반응을 감소 또는 향상시키기 위해, 또는 주사에 의한 보툴리눔 독소의 투여가 제안되거나 또는 수행되는 다른 상태의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0063] 가장 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 의사 또는 기타 의료 전문가에 의해 또는 그들의 지시 하에 투여된다. 그들은 단일 치료로 또는 시간의 경과에 따라 일련의 치료로 투여될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명에

다른 조성물은 보툴리눔 독소와 관련된 효과가 바람직한 위치 또는 위치들에서 주사된다. 그 속성 때문에, 보툴리눔 독소는 바람직하게는, 부작용 또는 바람직하지 않은 결과를 생성하지 않으면서 바람직한 결과를 생성할 양, 적용 비율 (application rate) 및 빈도로 투여된다. 예를 들어, 어떤 구체예에서, 본 발명의 조성물은 피부 표면의 cm^2 당 약 1 U 내지 약 20,000 U, 및 보다 바람직하게는 약 1 U 내지 약 10,000 U 보툴리눔 독소의 비율로 적용된다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 제어 방출 물질과 함께 보툴리눔 독소가 투여되는 것인 상태에서 이 범위 내 보다 높은 투여량이 이용될 수 있다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 보툴리눔 독소 제제는 주사당 1 U 내지 400 U, 바람직하게는 10 U 내지 300 U, 바람직하게는 10 U 내지 350 U, 바람직하게는 30 U 내지 250 U, 및 바람직하게는 50 U 내지 200 U의 보툴리눔 독소를 제공하도록 투여된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 보툴리눔 독소-함유 조성물은 주사로 치료를 받는 개체에서 10 U 내지 100 U, 또는 20 U 내지 100 U, 또는 20 U 내지 80 U, 또는 20 U 내지 60 U, 또는 적어도 20 U; 적어도 40 U, 또는 적어도 60 U, 또는 10 U, 20 U, 30 U, 40 U, 50 U, 60 U, 70 U, 80 U, 90 U, 또는 100 U의 보툴리눔 독소, 바람직하게는 혈청형 A의 보툴리눔 독소, 또는 150 kDa의 분자량을 갖는 혈청형 A의 보툴리눔 독소를 제공하도록 투여된다. 구체예에서, 본 발명의 조성물의 유효 용량으로의 단일 치료는 보툴리눔 독소에 의해 치료 가능한 징후, 예를 들어, 주름, 선 및 고랑의 치료를 위한 치료 과정 동안과 같은 긴 지속기간의 효과를 제공하고, 개체는 예를 들어, 적어도 6 개월, 또는 6 개월 초과, 즉, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 또는 10 개월을 포함한 그 이상의 시간의 연장된 기간 동안 지속되고 수반되는 효과와 함께, 보다 적은 주사, 및 어쩌면 단지 단일 주사, 또는 단일 치료 기간 동안 일련의 주사를 필요로 한다. 보다 긴 지속기간의 적용은 치료 목표 및 효과를 유지하기 위해 다수의 치료법이 사용되는 치료법들 사이에 보다 긴 간격 또는 시간 간격 (time period)을 제공한다. 일 구체예에서, 20 U 내지 100 U, 또는 20 U 내지 60 U, 또는 20 U, 40 U, 또는 60 U의 보툴리눔 독소를 제공하는 본 발명의 조성물로 개체에 투여한 후 조성물의 보다 긴 효과의 지속기간, 예를 들어, 그 사이를 포함하는, 7, 8, 9, 또는 10 개월과 같은, 적어도 6 개월 또는 6 개월 초과와 같은 기간은 본 발명에 따른 양으로 하전된 담체 (또는 펩티드)를 함유하지 않는 보툴리눔 독소-함유 조성물 또는 제품의 효과의 지속기간과 관련이 있다. 일부 경우에서, 본 발명의 양으로 하전된 담체 (또는 펩티드) 없이 보툴리눔 독소를 함유하는 조성물 또는 제품은 3 개월, 4 개월과 같은 6 개월 미만 동안 유효하다.

[0064] 어떤 구체예에서, 보툴리눔 독소 및 본 명세서에 기재된 하나 이상의 공유결합으로 결합된 양으로 하전된 효능기와 함께 양으로 하전된 중합체 백본을 포함하는 양으로 하전된 담체를 포함하는 본 발명의 조성물은 특히 안면에 있어서, 주름, 선, 또는 고랑의 치료를 위한 주사 당 20 U 내지 60 U, 또는 적어도 20 U 내지 적어도 60 U의 보툴리눔 독소를 제공하는 용량 또는 양으로 개체 또는 환자에게 단일 주사로 투여된다. 본 발명에 따라, 개체 또는 환자의 치료 중 단일 주사 후에, 치료 효과, 즉, 미간 주름과 같은 주름, 선, 또는 고랑의 감소는 수주 또는 수개월, 적어도 20 주 동안, 적어도 24 주 동안, 또는 적어도 6 개월 동안, 또는 6 개월 초과와 같은 기간, 예를 들어, 6, 7, 8, 9, 또는 10 개월, 또는 그 이상 동안 지속된다. 구체예에서, 보툴리눔 독소는 혈청형 A, B, C, D, E, F, 또는 G이다. 일 구체예에서, 보툴리눔 독소는 혈청형 A이다. 일 구체예에서, 혈청형 A 보툴리눔 독소는 150kDa의 분자량을 갖는다. 일 구체예에서, 혈청형 A 보툴리눔 독소는 수프라 (*supra*)로 기재된 고 분자량 복합체의 제형이다. 바람직한 구체예에서, 150 kDa 보툴리눔 독소 또는 상기 독소의 고 분자량 제형은 알부민-없는 제제이다. 일 구체예에서, 양으로 하전된 중합체 백본은 폴리리신 또는 폴리에틸렌이민이다. 일 구체예에서, 하나 이상의 양으로 하전된 효능기는 $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ 를 포함하고, 상기 아래첨자 $n1$ 은 0 내지 20, 보다 바람직하게는 0 내지 8, 훨씬 더 바람직하게는 2 내지 5의 정수이고, 상기 아래첨자 $n2$ 는 독립적으로 약 5 내지 약 25, 보다 바람직하게는 약 7 내지 약 17, 가장 바람직하게는 약 7 내지 약 13의 홀수이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 양으로 하전된 효능기는 $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$ 또는 $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ 의 아미노산 서열을 갖고, 상기 아래첨자 p 및 q 는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수이다. 어떤 바람직한 구체예에서, p 는 1 및 q 는 0, 또는 p 는 0 및 q 는 1이다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 아래첨자 p 및 q 는 각각 독립적으로 0 내지 8, 보다 바람직하게는 0 내지 5의 정수이다. 특정 구체예에서, 양으로 하전된 담체는 $\text{RKKRRQRRR-(K)}_{15}\text{-GRKKRRQRRR}$ 의 아미노산 서열을 갖는다. 다른 구체예에서, 하나 이상의 양으로 하전된 효능기는 효능기 즉, 아미노산 서열의 C-말단 또는 N-말단을 통해 양으로 하전된 백본에 결합된다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 양으로 하전된 효능기는 양으로 하전된 담체의 양으로 하전된 폴리리신 백본의 각 말단, 또는 양 말단에 결합된다. 특정 구체예에서, 양으로 하전된 백본은 폴리리신이고 보툴리눔 독소는 혈청형 A이다. 다른 특정 구체예에서, 혈청형 A 보툴리눔 독소는 150 kDa의 분자량을 갖고, 양으로 하전된 백본은 폴리리신이고 하나 이상의 공유결합으로 결합된 양으로 하전된 효능기는 $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-}$

(gly)_q or (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q의 아미노산 서열을 갖고, 상기 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20, 또는 각각 독립적으로 상기에 나타낸 값의 정수인 것이고; 또는 상기 양으로 하전된 담체는 RKKRRQRRR-(K)₁₅-GRKKRQRRR의 아미노산 서열을 갖는다. 구체예에서, 상기 조성물은 주사 당 20 U 또는 적어도 20 U; 30 U 또는 적어도 30 U; 40 U 또는 적어도 40 U; 50 U 또는 적어도 50 U; 60 U 또는 적어도 60 U; 70 U 또는 적어도 70 U; 80 U 또는 적어도 80 U; 90 U 또는 적어도 90 U; 또는 100 U 또는 적어도 100 U의 보툴리눔 독소를 제공하는 양 또는 용량의 주사로 투여된다. 전술한 양 또는 용량 간의 양 또는 용량도 예를 들어, 25 U 또는 적어도 25 U; 35 U 또는 적어도 35 U; 45 U 또는 적어도 45 U 등이 고려된다. 특정 구체예에서, 상기 조성물은 20 U; 40 U; 또는 60 U의 보툴리눔 독소를 제공하는 양중 단일 치료 용량으로 주사로 투여되고 반응 또는 효과, 예를 들어, 미간 주름과 같은 주름 및 안면 선의 감소는 긴 지속기간, 예를 들어, 적어도 20 주, 적어도 24 주, 적어도 6 개월, 또는 6 개월 초과, 예를 들어, 6, 7, 8, 9, 또는 10 개월 동안 달성되고 유지된다. 특정 구체예에서, 기재된 양으로 하전된 담체 및 40 U 투여 용량의 150 kDa 보툴리눔 독소 A를 함유하는 본 발명의 조성물의 단일 용량은 미간 주름을 치료하는 긴 지속기간 예를 들어, 적어도 6 개월 및 그 이상 동안 효과를 제공한다. 예를 들어, 도 4B 참조.

[0065] 한정됨 없이, 치료 과정에서, 본 명세서에 기재된 발명의 조성물 및 방법의 치료적 및 미용적 유효량에 의해 주어질 연장된 효과의 지속기간에 기초하여 본 발명의 조성물은 초기 치료 투여 후 덜 빈번한 간격으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 필요로 하는 개체에게 1 년에 2 번 (약 매 6개월), 또는 매 7 개월, 8 개월, 9 개월, 또는 10 개월, 또는 그 이상마다, 본 발명의 방법의 실시로 투여 (또는 복용) 될 수 있다. 특정 구체예에서, 개체에게 1 년에 2 번 본 발명의 조성물의 용량으로 투여된다. 투여 사이 중간 지속기간은 치료적 또는 미용적 치료 및/또는 치료를 받는 개체에 의해 결정되는 바람직한 치료에 따라 6 개월, 적어도 6 개월, 또는 6 개월 초과일 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물을 사용하는 개체의 투여는 초기 투여 후에, 1 년에 2 번 또는 1 년에 2 번 보다 길게, 및, 예를 들어, 최초 투여 후 매 6, 7, 8, 9, 또는 10 개월에 할 수 있다. 본 발명의 조성물은 적절한 간격으로 조성물 당 20 U 내지 100 U, 보다 바람직하게는, 20 U 내지 60 U, 및 보다 바람직하게는, 20 U, 40 U, 또는 60 U의 보툴리눔 독소로 투여될 수 있다.

[0066] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 보툴리눔 독소-함유 조성물을 피부를 통해 주사하기 위한 다양한 전달 장치의 이용을 고려한다. 이러한 장치는 주사 바늘과 주사기를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 상기 조성물을 분배할 수 있고 그의 분배를 모니터링할 수 있고, 선택적으로 하나 이상의 양상에서 개체의 상태를 모니터링 (예를 들어 배된 물질에 대한 개체의 반응을 모니터링함)하기 위한 보다 정교한 장치를 포함할 수 있다.

[0067] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 미리-제제화되고 및/또는 그와 같은 장치에 미리-장착될 수 있다. 본 발명은 또한 조성물이 하나 이상의 성분을 나머지 성분들과 별도로 보관하는 키트로 제공되는 것인 구체예를 고려한다. 예를 들어, 어떤 구체예에서, 본 발명은 적용 시 또는 적용 전에 조합하기 위해 보툴리눔 독소와 양으로 하전된 담체를 별개로 보관하는 키트를 제공한다. 양으로 하전된 담체의 양 또는 보툴리눔 독소 대비 이 분자들의 농도 비는 해당 조성물에서 사용하기 위해 선택된 담체에 따라 결정될 것이다. 주어진 경우에서 담체 분자의 적절한 양 또는 비는 예를 들어, 하기에 기재된 바와 같은 하나 이상의 실험을 수행하는 것에 의해, 용이하게 결정될 수 있다.

[0068] 일반적으로, 본 발명은 또한 필요로 하는 개체 또는 환자에게 보툴리눔 독소 (바람직하게는 보툴리눔 독소 복합체 또는 감소된 보툴리눔 독소 복합체로서)를 투여하는 방법으로서, 보툴리눔 독소의 유효량이 본 명세서에 기재된 바와 같은, 양으로 하전된 담체와 함께 투여되는 것인 방법을 고려한다. "함께 (in conjunction with)"는 두 성분들 (보툴리눔 독소 및 양으로 하전된 담체)이 병용 과정으로 투여된다는 것을 의미하며, 병용 과정은 그들을 개체에 대한 투여 전에 조합하거나 또는 별도로 투여하나, 그들이 유효량의 치료 단백질의 필요한 전달을 제공하기 위해 함께 작용하는 방식으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 양으로 하전된 담체를 포함하는 조성물이 개체의 피부에 먼저 투여되고, 뒤이어 보툴리눔 독소를 포함하는 피부 패치, 주사기 또는 다른 장치가 적용될 수 있다. 보툴리눔 독소는 주사기 또는 다른 분배 장치 (dispensing device)에 건조된 형태로 저장될 수 있고 양으로 하전된 담체는 상기 독소의 적용 전에 주사되어, 상기 두 성분들이 함께 작용하여 원하는 조직 침투 촉진을 가져올 수 있다. 이 의미에서, 두 물질들(양으로 하전된 담체 및 보툴리눔 독소)은 조합되어 작용하거나 또는 인 시투(in situ)로 조성물 또는 배합을 형성하기 위해 상호작용한다. 따라서, 본 발명은 또한 피부를 통해 보툴리눔 독소를 분배하는 장치 및 양으로 하전된 담체를 포함하고 개체의 피부 또는 표적 조직에 적용하기에 적합한 액체, 젤 등을 포함하는 키트를 포함한다. 의료 전문가의 지시에 따라 또는 환자 또는 개체에 의해 본 발명의 조성물을 투여하기 위한 키트는 또한 그 목적에 적합한 맞춤형 애플리케이션 (custom

applicator)를 포함할 수 있다.

[0069] 본 발명의 조성물은 약 4.5 내지 약 6.3 범위의 pH를 갖는 생리적 환경에서 사용하기에 적합하고 따라서 그와 같은 pH를 가질 수 있다. 그러나, 약 4.5 내지 약 7.5 범위의 pH를 갖는 조성물은 또한 본 명세서에 기재된 발명에 의해 수용된다. 본 발명에 따른 조성물은 실온 또는 냉장 조건 하에서 보관될 수 있다.

[0070] 일부 구체예에서, 치료를 받는 환자는 65세, 적어도 65세, 또는 65세 초과이다. 예를 들어, 환자는 65, 66, 68, 70, 75, 80세, 또는 그 이상일 수 있다.

[0071] 하기의 실시예 및 본 명세서에 기재된 구체예는 예시적인 목적을 위한 것이고 이에 근거한 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 암시되고 이는 본 출원의 원리 및 범위와 첨부된 청구항의 범위 내에 포함될 것이다.

[0072] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원 공보는 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본 명세서에 포함된다.

[0073] **실시예**

[0074] **실시예 1**

[0075] **마우스 모델에서 국소 근육 마비의 지속기간**

[0076] 본 실시예는 RT003 또는 BOTOX[®]를 주사한 마우스에서 국소 근육 마비의 지속시간을 비교한다. RT003은 A형 보툴리눔 독소 (모든 내생 비-독소 단백질을 제거하기 위해 정제된 독소) 및 서열 RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR을 갖는 양으로 하전된 담체를 포함하는 본 발명에 따른 예시적인 주사용 제제이다. BOTOX[®]도 A형 보툴리눔 독소를 함유하나, A형 보툴리눔 독소 분자를 안정화시키기 위해 외생 알부민이 첨가된다.

[0077] 근육 마비는 "A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice", *Toxicon* 2001;39(12):1815-1820에서 Aoki, K.R.에 의해 보고된 DAS (digit abduction score) 분석을 이용하여 측정하였다. DAS 분석에서, 마우스에 그의 후지 (hind limb)를 신장하고 그의 뒷 발가락 (hind digit)을 벌리는 것인 특징적인 놀람 반응 (startle response)을 유발하기 위해 마우스를 단시간 동안 (briefly) 그의 꼬리에 의해 부유 (suspend)하게 한다. 마우스가 이 놀람 반응을 보일 수 있는 정도를 5점 척도 (0 내지 4)로 평가하고, 0점은 정상적인 놀람 반응을 나타내며, 4점은 발가락 벌림 (digit abduction) 및 다리 신장 (leg extension)의 최대 감소를 나타낸다. 상기 점수는 대상 마우스가 신경독소로 치료된 정도에 대한 지식을 갖지 않는 관찰자에 의해 평가된다. DAS 분석을 이용한 기준 점수는 미치료 동물 집단에 대하여 0.4로 결정되었다.

[0078] 본 실시예에서 보고된 연구는 10마리의 동물을 포함했다 (RT003 그룹의 5 마리의 마우스 및 BOTOX[®] 그룹의 5마리의 마우스). 각 동물에 개별적인 보툴리눔 독소 (즉, RT003 또는 BOTOX[®])를 3회 주사하고, 각 투여 간에 40일 기간을 두었다. 주사 후에, 각 테스트 그룹의 모든 동물들이 DAS 분석의 0.4 기준보다 높았던 일자의 수를 계수하였다. 도 1에 나타난 결과는 RT003-치료군의 DAS 분석 점수는 각각 1번째 치료, 2번째 치료 및 3번째 치료 후 25일, 22일 및 21일 동안 0.4 기준 값보다 높았다는 것을 나타낸다. 대조적으로, BOTOX[®]-치료군의 DAS 분석 점수는 각각 1번째 치료, 2번째 치료 및 3번째 치료 후 11일, 18일, 및 11일 동안 0.4 기준값보다 높았다.

[0079] 이 DAS 분석 데이터는 RT003 제제에 의해 유발된 국소 근육 마비가 BOTOX[®]에 의해 유발된 국소 근육 마비의 거의 2배 기간 동안 지속된다는 것을 나타낸다. 이 결과는 RT003 및 본 발명에 따른 다른 주사용 보툴리눔 독소-함유 화합물의 치료적 용도에 대해 중요한 영향을 갖는다. 특히, 본 발명에 따른 주사용 조성물을 이용하는 것에 의해, 보툴리눔 독소에 의해 유발된 특정한 미용 또는 치료 효과를 유지하기 위해 요구되는 후속 주사의 빈도를 상당히 감소시킬 수 있다. 결과적으로, 적용의 감소된 빈도는 개체가 보툴리눔 독소에 대한 항체를 생성하는 경향을 감소시키기 때문에 보다 우수한 장기적 유효성 (long-term efficacy)를 가져올 수 있다.

[0080] **실시예 2**

[0081] **개선된 안전성 프로파일을 갖는 주사용 보툴리눔 독소 제제**

[0082] 지난 수십 년 동안, 보툴리눔 독소는 주름, 다한증, 및 근육 경련을 포함한 다양한 상태를 치료하기 위한 치료제로서의 용도로 알려졌다. 그러나, 보툴리눔 독소는 인간에게 알려진 가장 강력한 천연 독소이므로, 상기 독소의 부적합한 투여는 매우 위험할 수 있다. 예를 들어, 보툴리눔 독소의 우발적인 전신 전달은 마비, 호흡 곤란,

및 심지어 사망을 초래할 수 있다. 더욱이, 보툴리눔 독소가 치유적 치료의 일부로 신체의 국소 영역에 적절하게 전달되는 경우에도, 상기 독소는 시간의 경과에 따라 자연적으로 확산되는 경향을 가져서, 이에 의해 신체의 다른 부위에서 원치않는 마비를 유발할 위험을 증가시킨다. 예를 들어, 보툴리눔 독소가 주름을 치료하기 위해 눈의 주위에 주사되는 경우, 상기 독소는 안검의 운동을 조절하는 근육까지 확산될 수 있다. 이 확산이 일어나는 경우, 안검 근육은 부분적으로 마비되어, 안검이 부분적으로 닫혀서 정상적인 시각을 방해하는 것인 "안검하수 (eyelid droop)"로 알려진 상태를 초래할 수 있다.

[0083] 본 발명의 일 양상은 현재 이용가능한 상업적인 보툴리눔 독소 제제에 비해 개선된 안전성 프로파일을 갖는 주사용 보툴리눔 독소 제제를 제공하는 것이다. 바람직한 구체예에서, 상기 주사용 보툴리눔 독소 제제는 주사 후 감소된 확산 경향을 갖는다. 이러한 방법에서, 본 발명의 어떤 바람직한 제제는 보툴리눔 독소의 보다 정확한 전달을 가능하게 하고, 보툴리눔 독소의 제어되지 않는 국소 확산과 연관된 원치않는 부작용을 현저하게 감소시킨다.

[0084] 본 실시예는 주사 후 확산되는 다양한 제제 중 보툴리눔 독소의 경향의 비교 연구를 보고한다. 본 연구는 3종의 보툴리눔 독소 제제를 포함했다: (1) BOTOX[®]; (2) RT003, 식 RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR을 갖는 양으로 하전된 담체와 비-공유결합으로 결합된 150 kD A형 보툴리눔 독소 분자를 함유하는 완충되고, 안정화된 용액; 및 (3) RT003에 존재하는 양으로 하전된 담체를 함유하지 않는 것을 제외하고는, RT003 제제와 동일한, RTT150.

[0085] 본 연구에서 시용된 각 마우스의 비복근에 근육의 측부-내지-중심선 부분(도 2A), 또는 근육의 중심선 부분(도 2B)에 전술된 보툴리눔 독소 제제 중 하나를 주사하였다. 각각의 제제의 보툴리눔 독소가 비복근으로부터 마우스의 뒷발을 향해 확산되는 경향을 보이는지 여부를 결정하기 위해 보툴리눔 독소의 주사 후 4일 동안 각 마우스를 대상으로 DAS 분석을 수행했다. DAS 분석으로부터, 테스트 동물에서 뒷발가락을 벌리는 능력의 감소를 보툴리눔 독소 확산의 표시로 해석하였다.

[0086] 도 3은 상기 기재된 상이한 보툴리눔 독소 제제를 테스트 동물에 주사한 후 수행된 DAS 분석의 결과를 나타낸다. DAS (digital abduction score)는 주사가 비복근의 중심선 또는 측부-내지-중심선 부분에서 이루어졌는지에 따라, 두 개의 클러스터로 분류된다는 것에 유의한다. 측부-내지-중심선 주사에 대한 DAS 점수에 비해, 중심선 주사에 대한 보다 낮은 DAS 점수는 테스트 동물의 뒷발에서 마비의 정도가 전반적으로 중심선 주사 후에 더 낮다는 것을 나타낸다. 이론에 의해 한정되기를 원하지 않으면서, 이 작용은 측부-내지-중심선 주사에 비해, 중심선 주사 후 테스트 동물의 뒷발가락에 도달하기 위해 보툴리눔 독소가 이동해야 하는 보다 긴 거리로부터 초래된 것으로 여겨진다. 보툴리눔 독소에 의한 보다 긴 요구되는 이동 거리가 뒷 발가락의 마비 가능성을 감소시키는 것으로 여겨진다.

[0087] 도 3은 RT003 제제의 중심선 주사 후 4일 내내 동안 0의 DAS 점수를 나타낸다. 이 결과는 RT003 제제 중의 보툴리눔 독소가 주사 후 비복근의 중심선 부분에 국재화되고 실험 기간 동안 마비-유발 확산이 일어나지 않는다는 것을 나타낸다. 대조적으로, RTT150 및 BOTOX[®] 제제의 주사 후 0.4의 DAS 기준 점수보다 높은 DAS 점수가 관찰되고, 평균 DAS 점수는 BOTOX[®] 제제보다 더 높다. RTT150 및 BOTOX[®] 제제의 DAS 결과는 이 제제들의 중심선 주사 후 테스트 동물의 뒷발가락 마비가 관찰되며, BOTOX[®] 제제의 주사 후 보다 높은 정도의 마비가 관찰된다는 것을 나타낸다. 이러한 데이터는 RTT150 및 BOTOX[®] 제제 중의 보툴리눔 독소 분자가 주사 후 국소로 확산될 수 있고, BOTOX[®] 제제 중의 보툴리눔 독소 분자에 대해 보다 높은 정도의 국소 확산이 관찰된다는 것을 암시한다.

[0088] 도 3은 또한 특정한 보툴리눔 독소 제제에 관계없이, 측부-내지-중심선 주사 후 모든 테스트 동물에서 뒷발가락 마비가 관찰된다는 것을 나타낸다. 상기에 검토된 바와 같이, 중심선 주사에 비해, 측부-내지-중심선 주사 후 보다 높은 정도의 마비는 보툴리눔 독소의 테스트 동물의 뒷발까지의 보다 짧은 거리와 관련된 것으로 사료된다. 그러나, 3개의 보툴리눔 독소 제제가 모두 측부-내지-중심선 주사 후 마비-유발 확산을 보이나, RT003을 주사한 테스트 동물에서 마비의 정도는 실험기간 동안 평균적으로 RTT150 및 BOTOX[®] 제제에 대해 관찰된 마비의 정도보다 더 낮다. 따라서, 측부-내지-중심선 주사에 해당하는 DAS 분석 데이터가 RTT150 및 BOTOX[®]에 비해, RT003 제제의 보툴리눔 독소의 국소 확산에 대한 감소된 경향을 보인다는 점에서 중심선 주사의 데이터와 정성적으로 유사하다.

[0089] 중심선 주사 및 측부-내지-중심선 주사 후 국소 확산 비율의 비교는 하기 식 (1)에 따라 정의된, "확산 지수

(diffusion index)"로 불리는 파라미터를 고려하는 것에 의해 이루어질 수 있다:

$$\text{확산지수} = \frac{\text{중심선 DAS 점수}}{\text{측부-내지 중심선 DAS 점수}} \times 100 \quad (1).$$

[0090]

[0091]

DAS 점수는 0 내지 4의 범위일 수 있고, 측부-내지-중심선 DAS 점수는 (상기 검토된 바와 같이) 중심선 DAS 점수보다 더 높을 것으로 예상되므로, 확산 지수 값은 통상적으로 0 내지 100의 범위일 것이다. 100에 접근하는 확산 지수 값은 중심선 DAS 점수와 측부-내지-중심선 DAS 값의 비가 1에 접근한다는 것을 나타낸다. 주사 후 확산의 비율이 충분히 높아서 중심선 주사 및 측부-내지-중심선 주사 후 보툴리눔 독소가 테스트 동물의 뒷발가락에 도달하여 마비시키기 위한 확산 시간이 유사하거나 거의 동일한 경우, 이러한 상황이 일어날 수 있다. 다른 극단에서, 0에 접근하는 확산 지수 값은 중심선 DAS 점수와 측부-내지-중심선 DAS 점수의 비가 0에 접근한다는 것을 나타낸다. 측부-내지-중심선 주사 후 마비가 관찰되더라도, 중심선 주사 후 보툴리눔 독소의 확산이 너무 낮아서 테스트 동물의 뒷 발가락에서 마비를 유발하기에 불충분한 경우 이 상황이 일어날 수 있다.

[0092]

하기 표 1은 도 3에 상응하는 실험에서 보고된 바와 같이, BOTOX[®], RT003, 및 RTT150의 중심선 또는 측부-내지-중심선 주사 후 DAS 점수를 이용하여 계산된 확산 지수를 나타낸다. 실험기간 동안, BOTOX[®] 제제의 주사에 해당하는 확산 지수 값이 RTT150 및 RT003 제제에 대해 관찰된 값 보다 더 높다. 이는 BOTOX[®] 제제의 주사의 경우, RTT150 및 RT003 제제에 대해 관찰된 값들에 비해, 중심선 DAS 값 및 측부-내지-중심선 DAS 값의 비가 1에 더 가깝다는 것을 나타낸다. 보툴리눔 독소는 중심선 주사 후 테스트 동물의 뒷발가락 마비를 유발하기 위해 더 멀리 확산되어야 하므로, BOTOX[®] 주사 후 중심선 DAS 점수와 측부-내지-중심선 DAS 점수의 비가 1에 더 가깝다는 관찰은 BOTOX[®]의 중심선 주사 후 보툴리눔 독소 확산 비율이 측부-내지-중심선 주사 후 비율에 비해 상당히 크다는 것을 시사한다. 다시 말해서, 중심선 주사와 연관된 증가된 확산 경로 길이가 뒷발가락 마비 유발에 대한 장벽은 아니다.

[0093]

대조적으로, RT003에 대한 확산 지수 값은 실험의 4 일 기간에 대해 모두 0이다. 이 결과는 RT003의 중심선 주사 후 마비-유발 확산이 관찰되지 않는다는 것을 나타낸다. 다시 말해서, 양으로 하전된 담체와 비-공유결합에 의해 결합된 A형 보툴리눔 독소를 포함하는 RT003 제제가 주사된 A형 보툴리눔 독소의 증가된 국제화를 가능하게 한다. 이 방식으로, RT003 제제는 BOTOX[®]의 안전성 프로파일에 비해 개선된 안전성 프로파일을 제공하고 원치 않는 마비를 최소화한다.

[0094]

RT003의 경우에서와 같이 0이 아니나, RTT150에 대한 관찰된 확산 지수 값은 BOTOX[®] 제제에 대해 관찰된 값들보다 여전히 더 낮다. 표 1을 참조한다. 이 결과는 실험의 4일 동안 관찰가능한 뒷발가락 마비를 생성하기 위해 충분한 보툴리눔 독소 확산이 일어나지만, 보툴리눔 독소의 마비-유발 확산을 위해 필요한 시간은 중심선 주사 후 상대적으로 더 길다는 것을 나타낸다.

표 1

RTT150, BOTOX[®] 및 RT003에 대한 보툴리눔 독소 확산 지수 측정값

	치료 후 일자				
	0	1	2	3	4
BOTOX [®]	NA	42	38	38	9
RT003	NA	0	0	0	0
RTT150	NA	20	20	27	17

[0095]

[0096]

실시예 3

[0097]

감소된 항체 생성 경향을 갖는 주사용 보툴리눔 독소 제제

[0098] 보툴리눔 독소가 주름과 같은 원치않는 상태를 치료하기 위해 환자에게 주기적으로 투여되는 경우, 보툴리눔 독소의 효과의 지속기간이 동일하게 유지될 수 있으나, 보툴리눔 독소의 효과가 연속적인 주사에 따라 감소된다는 것이 종종 관찰된다. 이 현상은 환자의 면역계에 의한 보툴리눔 독소에 대한 항체의 형성의 결과인 것으로 사료된다. 치료 관점에서, 점차 더 많은 투여량의 보툴리눔 독소가 동일한 효과를 달성하기 위해 요구되고, 이는 안전성 및 비용과 관련된 심각한 문제를 제기하기 때문에, 환자에 의한 보툴리눔 독소에 대한 항체의 형성은 바람직하지 않다.

[0099] 어떤 구체예에서, 본 발명은 현재 이용가능한 상업적인 주사용 보툴리눔 독소 제제에 비해, 항체 형성을 유도하는 감소된 경향을 갖는 주사용 보툴리눔 독소 제제를 제공한다. 따라서, 이러한 구체예에서, 보툴리눔 독소 제제는 시간이 지남에 따라 동일한 효과를 달성하기 하면서 보다 적은 양의 독소를 사용하도록 허용함으로써 보툴리눔 독소와 연관된 위험을 최소화하는데 기여한다.

[0100] 이 실시예에서, 실시예 2에 기재된 바와 같이 반복된 RT003 및 BOTOX[®] 주사 후 수득된 DAS 분석 데이터를 동일한 테스트 동물로의 반복된 투여시 이러한 두가지 제제의 효과의 변화를 결정하기 위해 시간의 함수로 분석하였다. 일반적으로, 각 제제의 반복 투여 후, 보툴리눔 독소와 연관된 효과의 지속기간은 동일했다. 그러나, 반복 투여 후 근육 마비의 정도는 제제에 따라 상이했다. 근육 마비 정도의 변화를 정량하기 위해, RT003 또는 BOTOX[®]의 주사 후 DAS 점수의 퍼센트 변화를 식 (2)에 따라 결정했다:

$$\text{DAS의 \% 변화} = \frac{\text{n번째 치료동안 DAS} - \text{1번째 치료동안 DAS}}{\text{1번째 치료동안 DAS}} \times 100\% \quad (2).$$

[0101]

[0102] 식 (2)의 분자는 n번째 치료 및 1번째 치료에 대해 측정된 DAS 점수 간의 차이이므로, n번째 치료에 대해 측정된 DAS 점수가 1번째 치료에 대해 측정된 DAS 점수보다 더 낮은 경우, DAS의 퍼센트 변화는 음수일 것이다. 다시 말해서, 1번째 치료에 비해 n번째 치료 후 보다 낮은 정도의 마비가 관찰되는 경우, DAS의 퍼센트 변화는 음수이다. 표 2는 실시예 2에 기재된 절차에 따라 RT003 및 BOTOX[®] 제제의 반복 투여 후 측정된 DAS 값의 퍼센트 변화를 보여준다.

표 2

RT003 및 BOTOX[®]의 반복 투여 후 DAS 값의 퍼센트 변화

	1 번째 치료	1 번째 재치료	2 번째 재치료
RT003	0%	0%	-30%
BOTOX [®]	0%	-44%	-67%

[0103]

[0104] 표 2에 나타난 바와 같이, 1번째 재치료 후, BOTOX[®] 제제에 대한 DAS 점수의 퍼센트 변화는 -44%였고, 이는 효과의 상당한 감소를 시사한다. 대조적으로, RT003 제제에 대한 DAS 점수의 퍼센트 변화는 0이었고, 이는 2번째 재치료 후 DAS 점수가 최초 투여 및 1번째 재치료 후 DAS 점수와 동일하다는 것을 나타낸다. 이 결과는 RT003의 1번째 재치료 후 관찰된 마비의 정도가 1번째 투여 후 마비의 정도와 동일하고 1번째 재치료 후에도 테스트 동물에서 미량의 중화 항체의 형성이 일어났다는 것을 나타낸다. RT003 및 BOTOX[®]의 2번째 재치료 후, RT003 제제의 DAS 값의 퍼센트 변화의 크기가 BOTOX[®]에 대해 결정된 값의 절반이나, 두 제제 모두에 대해 DAS 값의 계산된 퍼센트 변화는 음수였다. BOTOX[®]에 대해 관찰된 DAS 값의 보다 큰 음수의 퍼센트 변화는 RT003에 비해, 테스트 동물이 보다 높은 비율의 BOTOX[®]에 대한 항체 생성을 갖는다는 것을 암시한다. 따라서, 이 데이터는 RT003과 같은, 본 발명에 의해 고려된 제제가 보툴리눔 독소의 효과를 중화시키는 항체의 형성을 유도하는 보다 낮은 경향을 가질 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서, 이 결과는 본 발명에 의해 고려된 제제를 이용하는 것에 의해, 시간의 경과에 따라, 동일한 치료 효과를 달성하기 위해 보다 적은 양의 보툴리눔 독소를 사용할 수 있다는 것을 암

시한다.

[0105] **실시예 4**

[0106] **개선된 안전성을 갖는 주사용 보툴리눔 독소 제제**

[0107] 본 실시예는 본 발명의 주사용 보툴리눔 독소 제제에서 사용된 양으로 하전된 담체 분자가 제제의 안전성 프로파일을 개선하고 (실시예 2), 또한 그들의 안정성을 개선한다는 것을 나타낸다. 표 3은 다양한 시간 간격 동안 RT003 및 RTT150 제제가 4°C (RT003 단독) 및 40°C (RT003 및 RTT150 모두)에서 노화되는 것인 노화(aging) 실험의 결과를 나타낸다. 특정된 시간 동안 특정된 온도에서의 노화 후에, RT003 및 RTT150 제제의 효능을 일련의 마우스 IP LD₅₀ 분석을 통해 측정했다. 표 3에 요약된 결과들은 RT003의 효능이 6개월 후에도, 4 °C에서의 노화 후에 본질적으로 변하지 않는다는 것을 나타낸다. 게다가, 제제가 마우스 IP LD₅₀ 분석에서 표적 동물을 살상하는 제제의 능력에 의해 측정된 RT003 제제의 효능은 RT003 제제가 6개월 동안 상승된 온도(40°C)에서 노화된 경우에도, 낮은 정도로만 감소된다. 대조적으로, RTT150 제제는 40°C에서 단 1개월의 노화 후 효능의 유의성 있는 감소를 보였다. RT003 및 RTT150 제제는 RT003 제제가 식 RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR을 갖는 양으로 하전된 담체 분자를 포함한다는 것을 제외하고는 동일하기 때문에, 이 데이터는 RT003 제제에서 양으로 하전된 담체 분자가 보툴리눔 독소의 안정성을 개선한다는 것을 나타낸다.

표 3

다양한 조건에서 RT003 및 RTT150의 노화 후 마우스 IP LD₅₀ 분석의 결과

	조건 (°C)	시간 (개월)	타겟 %
RT003	4	0	100%
	4	6	118%
	40	6	93%
RTT150	40	1	<50%

[0108]

[0109] **실시예 5**

[0110] **미간 주름의 치료에 긴-지속되는 기간 효과를 나타내는 주사용 보툴리눔 독소 제제**

[0111] 이 실시예는 보툴리눔 독소 A 및 RT002로 불리는, 공유결합으로 결합된 하나 이상의 양으로 하전된 효능기를 갖는 양으로 하전된 폴리리신 폴리펩티드를 포함하는 양으로 하전된 담체를 함유하는 본 발명의 주사용 조성물의 안전성, 유효성 및 효과의 지속기간을 평가하기 위한 24 주째의 결과의 임상 시험 및 중간 분석을 기술한다. RT002 제품은 보조 단백질 또는 동물-유래 성분을 함유하지 않고, 식 RKKRRQRRRG-(K)₁₅-GRKKRRQRRR을 갖는 양으로 하전된 담체 펩티드와 공유결합으로 결합되지 않고, 150 kD A형 보툴리눔 독소 분자를 함유하는, 주사용 조성물이며, 중도 내지 중중도의 미간 주름의 치료를 위한 시험에 사용된다.

[0112] 임상 시험은 2상, 무작위배정, 이중-맹검 (double-blind), 광범위 용량 (dose ranging), 활성 및 위약-대조군, 다중-센터 시험으로 계획되었고 성인에서 미간 주름의 외관을 일시적으로 개선하기 위한 RT002의 주사로 단일 (1 회성) 치료의 안전성 및 유효성 및 효과의 지속기간을 평가하기 위해 수행되었다. 3가지 용량인, 20 U, 40 U 및 60 U의 RT002는 활성 즉, VISTABEL[®]/BOTOX[®] (근육내 주사로 20 U 용량) 및 위약 대조군 (근육내 주사)과 비교하여 평가되었다. 주사는 단일 근육내 주사로 치료되었다. VISTABEL[®]/BOTOX[®] Cosmetic 대비 3가지 용량 수준의 RT002의 단일 치료의 효과의 지속기간을 평가하였다.

[0113] RT002 제품은 정제된 RTT150으로 언급되는, 150 kDa 보툴리눔 신경독소로 이루어진, 동결건조 분말로 제형화되었다. 비임상 시험에서, RT002는 보툴리눔 신경 독소 A (BoNTA)의 다른 형태 보다 덜 확산되는 것을 나타내었고 주변 근육으로 독소가 멀리 퍼져나가기 때문에 부작용이 적은 표적 부위에 보다 많은 영향을 줄 수 있다. 추가하여, RT002를 첨가하지-않은 보툴리눔 독소 A형 제제는 제제에 존재하는 비-활성 단백질이 없기 때문에 면역원성 잠재력을 보다 적게 부여하는 능력을 가진다. 추가하여, RT002는 마우스에서 50 U/kg 까지의 용량으로 근육내 반복 투여된 후에 잘 견디어 졌다.

[0114] **투여 요법 및 주사 기법:** 본 시험에 대한 RT002의 투여 요법은 치료를 받는 개체의, 눈썹 사이의 이마의 5 개의

주사 부위 각각에 0.1 mL씩 근육내 주사로 (총 0.5 mL), RT002 (20 U, 40 U, 또는 60 U), 위약, 또는 개체 당 20 U로 투여된 VISTABEL®/BOTOX®의 단일 치료였다. 모든 치료는 훈련된 의사에 의해 근육내 주사로 투여되었다. 보다 구체적으로, 시험 피험자는 5 개의 주사 부위에 주사 당 0.1mL의 단일 치료를 받았다: 각 추미근 (corrugator) 근육에 2 개의 주사, 및 눈살근 (procerus) 근육에 1개의 주사. 연구자, 현장 관리자, 피험자, 및 스폰서는 치료군 과제에 대하여 맹검 (blind)되었다. 여성 및 남성 피험자, 30 내지 65세의 연령, 양호하고 일반적인 건강태에서, 중도 내지 중등도의 미간 주름을 가진, 대략 250명의 성인이 임상 시험에 등록되었다.

[0115] 안면의 미간 주름은 안면에서 측면 추미근 및 수직 눈살근 근육으로부터 발생한다. 이는 환자를 최대한으로 쪼그리게 한 동안 근육 덩어리를 촉진하여 용이하게 식별될 수 있다. 추미근은 긴장된 근육의 용기 부분 (즉, 쪼그린 주름)으로 둘러싸인, 수직 선, 즉 고랑에서 생성된 피부를 압박한다. 근육의 위치, 크기 및 사용이 개인마다 현저하게 다르기 때문에, 주사용 부툴리눔 독소를 투여하는 의사는 관련된 영역의 적절한 해부학 및 이전 수술 과정으로 인한 임의의 해부학적인 변화를 이해해야 한다. 처짐 (ptosis)의 위험을 감소시키기 위해, 다음 단계가 최적으로 수행된다: (i) 특히 이마 억제근(brow depressors)이 보다 커진 환자의 경우, 안검거근 (levator palpebrae superioris)이나 가까운 부위의 주사를 피해야 하고; (ii) 내측 추미근 주사는 뼈의 상안와용기 (supraorbital ridge) 위 보다 적어도 1 센티미터 떨어져야 하고; (iii) 주사 된 부피/투여량을 정확하게 보장해야 하고; 및 (iv) 독소는 중심 눈썹 보다 1 센티미터 더 가까이 주사되면 안된다. 보툴리눔 독소는 상안 내측 궤도 가장자리 (superior medial orbital rim)에 손가락 압력을 가하여 바늘을 피부를 통해 아래 근육으로 전진 시킴으로써 주사된다.

[0116] 시험을 위해, 피험자의 미간 주름의 중증도는 연구자 및 피험자에 의해 평가되었다. 연구자의 평가를 위해, 연구자 종합 평가-안면의 주름 중증도 (IGA-FWS) 평가 점수 시스템을 하기와 같이 사용하였다: (0)의 IGA-FWS 평가 점수는 안면 주름 중증도가 없음을 나타내고; (1)의 IGA-FWS 평가 점수는 안면 주름 중증도가 가벼움을 나타내고; (2)의 IGA-FWS 평가 점수는 안면 주름 중증도가 중도임을 나타내고; 및 (3)의 IGA-FWS 평가 점수는 안면 주름 중증도가 중증도임을 나타낸다. 숙련된 전문가에 의해 평가된 바와 같이, 사진 가이드는 참조 및 조사자를 위하여 사용된 주름 중증도의 등급을 나타낸다.

[0117] **환자 얼굴의 주름 중증도 (Patient Facial Wrinkle Severity : PFWS) 평가:** 환자 얼굴의 주름 중증도 (PFWS)는 그/그녀의 주름의 중증도에 대한 피험자의 평가를 위하여 사용되었다. 피험자는 스크리닝 방문, 치료 방문 (0 일째) 전-치료, 추적관찰 (Follow-up) 방문 (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 주차), 및 시험-종료 방문 (24, 28, 32 또는 적절한 경우 36 주차) 또는 해당되는 경우, 조기 중단 방문시에 미간 주름의 중증도를 평가하기 위하여 최대한 쪼그린 표정으로 환자 얼굴의 주름 중증도 (PFWS)를 수행하였다. 평가 양식은 제공된 손 거울 (handheld mirror)을 사용하여 미간 주름을 검토하는 동안 완료할 수 있도록 직접 피험자에게 제공되었다. PFWS의 평가 점수 시스템은 다음과 같다: (0)의 PFWS 평가 점수는 "주름 없음 (no wrinkles)"의 설명과 관련되어, 주름 중증도가 없음을 나타내고; (1)의 PFWS 평가 점수는 "매우 얇은 주름 (very shallow wrinkles)"의 설명과 관련되어, 가벼운 주름 중증도를 나타내고; (2)의 PFWS 평가 점수는 "중도의 주름 (moderate wrinkles)"의 설명과 관련되어, 중도의 주름 중증도를 나타내고; 및 (3)의 PFWS 평가 점수는 "깊은 주름 (deep wrinkles)"의 설명과 관련되어, 중증도의 주름 중증도를 나타낸다. 본 시험에 따라, 피험자의 미간 주름에 대한 (2) 중도 또는 (3) 중증도의 IGA-FWS 및 PFWS 평가는 시험에 등록될 피험자를 위해 필요하였다.

[0118] 피험자를 하기 표 4에 제시된 치료 중 하나로 1 : 1 : 1 : 1 : 1 무작위배정 하였다.

표 4

치료군의 설명

치료군	시험 물품 및 용량	피험자의 수
1	RT002 20 U	50
2	RT002 40 U	50
3	RT002 60 U	50
4	위약	50
5	활성 비교군 (VISTABEL®/BOTOX® 20 U)	50

[0119]

- [0120] 이 시험에 등록된 피험자들은 스크리닝 및 치료 방문 및 추적관찰 36 주까지 동안 시험 전반에 걸친 안전성 및 유효성 평가가 있었다. 피험자 일기는 치료 반응의 시작을 기록하기 위해 초기 2 주 기간 동안 제공되었다. 피험자는 1 주차에 전화 통화로 평가 받았고 시험의 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 및 36 주차에 방문으로 평가 되었다. 모든 피험자는 치료-후 적어도 24 주 동안 추적되었다. 최대의 찌푸림에서 24 주차 및 36 주차 방문 사이의 기준치로 되돌아가면, 그 점수가 기록되는 방문을 피험자에 대한 시험 종료 방문으로 간주하였다.
- [0121] 시험 지속기간은 시험의 38 주차 까지이며, 단일 치료 후에 이은 2 주차의 스크리닝 기간, 및 치료-후 36 주까지의 추적 관찰 기간이 포함된다. 모든 피험자는 치료-후 적어도 24 주 동안 추적 관찰되었다. 주사 부위는 스크리닝 방문, 치료 방문 (0 일째), 치료-전 및 -후 (임상시험용 제품에 대한 즉각적인 반응이 있었는지를 결정하기 위해), 추적 관찰 방문 (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 주차), 및 시험 종료 (24, 28, 32 또는 적절한 경우, 36 주차) 또는 해당되는 경우, 조기 중단 방문시에 평가되었다. 본 평가는 5 가지 주사 부위에 대한 전반적인 평가로 이루어졌으며, 주제에 기술된 바와 같이 흥반, 부종, 타는듯한 또는 찌르는 느낌, 및 가려움증을 평가했다.
- [0122] 추가하여, 뇌 신경 II-VII은 연구자에 의해서 치료-전 치료 방문 (0 일째), 추적 관찰 방문 (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 주차), 및 시험 종료 (24, 28, 32 또는 적절한 경우, 36 주차) 또는 해당되는 경우, 조기 중단 방문시에 평가되었다. 뇌 신경 평가를 위한 점수는 다음과 같이 수집되었다: "정상 (Normal)"에 해당하는 (1)의 평가 (rating); "임상적으로 유의하지 않은, 비정상 (Abnormal, not clinically significant)"에 해당하는 (2)의 평가; "임상적으로 유의한, 비정상 (Abnormal, clinically significant)"에 해당하는 (3)의 평가; "측정되지 않은 (Not assessed)"에 해당하는 (4)의 평가. 이러한 평가를 위하여, 뇌 신경 II는 시신경이고; 뇌 신경 III는 안구 운동 신경이고; 뇌 신경 IV는 송골 신경이다; 뇌 신경 V는 삼차 신경이다; 뇌 신경 VI은 외전 신경이고 뇌 신경 VII은 안면 신경이다. 수반운동 (synkinesis) 및 타겟 및 인접한 근육의 신경을 통하게 하는 안면 신경 (VII)의 4 가지 주요 분지를 평가하기 위해 The Regional House-Brackmann Facial Nerve Grading System (Yen, T.L. et al., 2003, *Otol. Neurotol.*, 24(1):118-122)가 계획되었다. 연구자는 치료-전 치료 방문 (0 일째), 추적 관찰 방문 (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 주차), 및 시험 종료 (24, 28, 32 또는 적절한 경우, 36 주차) 또는 해당되는 경우, 조기 중단 방문시에 안면 신경 (VII)의 기능성을 평가하였다.
- [0123] 안면의 근육의 강도는 MRC (Medical Research Council Scale for Assessment of Muscle Power)를 사용하여 평가되었다. MRC는 근육 약화를 평가하기 위한 신뢰할 만하고 검증된 척도이며 말초 신경 손상의 조사를 돕는다 (Paternostro-Sluga, 2008). 안면의 각면에 있는 안륜근 (orbicularis oculi) (눈꺼풀), 이마 측면의 솟은근육 (lateral brow elevators), 및 관골근 측면 돌레 (lateral orbicularis zygomaticus) 근육을 평가하였다. 근력 평가를 위한 MRC 척도에서, "움직임 없음 (no movement)"에 해당하는 (0)의 평가; "근육에서 감지할 수 있는 깜박임 (flicker perceptible in the muscle)"에 해당하는 (1)의 평가; "중력이 없을 때만 움직임 (movement only is gravity is eliminated)"에 해당하는 (2)의 평가; "중력에 대항하여 사지를 움직일 수 있음 (can move limb against gravity)"에 해당하는 (3)의 평가; "중력 및 시험자에 의해 가해지는 약간의 저항에 대항하여 움직일 수 있음 (can move against gravity and some resistance exerted by examiner)"에 해당하는 (4)의 평가; 및 "정상 근력 (normal power)"에 해당하는 (5)의 평가.
- [0124] 독소의 먼 확산에 대한 질문은 치료-전 치료 방문 (0 일째), 추적 관찰 전화 통화 (1 주차), 추적 관찰 방문 (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 주차), 및 시험 종료 (24, 28, 32 또는 적절한 경우, 36 주차) 또는 해당되는 경우, 조기 중단 방문시에 평가되었다. 추가하여, 이상 반응 (Adverse events: AEs)도 같은 시간 시점에 평가되었다. 한정됨 없이, AEs의 예는 복시 (double vision), 눈꺼풀 마비, 근육 약화, 극도의 피곤함 및 연하, 호흡 및 말하기의 곤란을 포함한다.
- [0125] 유효성 평가는 미간 주름 중증도 및 미간 주름의 개선 척도의 연구자 평가, 피험자의 설문지를 포함한 미간 주름 중증도 및 개선도의 피험자 평가, 및 미간 주름 피험자 일기에 의해 평가된 효과의 발생을 포함한다. 유효성 평가는 피험자가 앉은 자세로 수행된다. 평가 동안 일정한 눈의 위치를 유지하기 위하여, 연구자는 피험자에게 실험실의 고정된 지점에 초점을 맞추게 요구한다. 평가는 적절한 오버헤드 조명 (실험 조명은 사용되지 않아야 함) 또는 창문으로부터의 자연광 (직사광선이 아님)이 있는 방에서 수행되어야 한다. 각 임상적 방문시, 미간 주름의 시각적 외관 (최대 찡그림 및 최대 찡그림 이후의 휴식)은 안면의 주름 중증도 점수를 위한 목적을 위해 맞는 (fit-for-purpose) 4점의 IGA-FWS 척도/평가 점수를 사용하여 연구자에 의해, 하기와 같이 평가된다: 안면의 주름이 없음에 해당하는 (0)의 평가; 가벼운 안면의 주름에 해당하는 (1)의 평가; 중도의 안면의 주름에

해당하는 (2)의 평가; 및 중증도의 안면의 주름에 해당하는 (3)의 평가. 평가는 각 주어진 시간-시점에서 주름의 중증도를 나타내고 치료-전 수준과의 비교를 기초로 하지 않았다. 평가는 동일한 연구자에 의해 및 가능한 각 방문 일자의 동일한 시간에 가까운 시간에 최적으로 수행되었다. 연구자의 주름 중증도의 평가를 표준화하기 위해, 주름 중증도의 등급을 보여주는 일련의 훈련 사진이 연구자 교육에 사용되었다. 연구자의 평가를 돕기 위해 각 시험 장소에 사진 지침 (guide)이 제공되었다.

[0126] **환자의 전반적 심미적 개선 척도 (GAIS):** 연구자 및 피험자는 하기 표 5에 나타난 7 점 중증도의 환자의 전반적 심미적 개선 척도 (Global Aesthetic Improvement Scale:GAIS)를 사용한 기준치 조건으로부터 미간 주름 개선의 시각적 외관 (최대 쥘그림 및 최대 쥘그림 후 휴식 시)을 측정하였다. 시험 피험자는, 추적 관찰 방문 (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 주차), 및 시험 종료 방문 (24, 28, 32, 또는 적절한 경우, 36) 또는 해당하는 경우, 조기 중단 방문시에 기준치 조건으로부터 미간 주름 개선의 시각적 외관을 측정하기 위해, 최대 쥘그림 및 최대 쥘그림 후 휴식 시에 환자의 전반적 심미적 개선 척도를 완료하였다. GAIS 평가 양식은 제공된 손 거울을 사용하여 치료된 영역을 검토하는 동안 완료할 수 있도록 직접 피험자에게 제공되었다. 콘택트 렌즈를 사용하는 피험자는 그들의 콘택트 렌즈를 착용한 동안 그들의 미간 주름을 최적으로 관찰하였다. 안경을 쓰는 피험자는 가능하다면 안경 없이 미간 주름을 관찰할 것을 권고받았다. 만일 피험자가 그들의 미간 주름을 보는데 안경이 필요하다면, 평가를 위해 안경을 썼다. 상기 피험자 평가는 연구자가 IGA-FWS 평가를 완료하기 전에 완료되었다.

표 5

전반적 심미적 개선 척도

평가 점수	주름 개선
-3	훨씬 많이 악화됨
-2	많이 악화됨
-1	악화됨
0	변화 없음
1	개선됨
2	많이 개선됨
3	훨씬 많이 개선됨

[0127]

[0128] 각 임상적 방문시, 피험자는 환자-안면의 주름 중증도 (하기 표 6)의 피험자의 평가를 위한 하기의 목적을 위해 맞는 4점의 척도를 사용하여 미간 주름의 시각적 외관 (최대 쥘그림에서)을 측정하였다. 평가 양식은 제공된 손 거울을 사용하여 미간 치료 영역을 검토하는 동안 완료할 수 있도록 직접 피험자에게 제공되었다. 상기 GAIS 평가를 위하여, 콘택트 렌즈를 사용하는 피험자는 그들의 콘택트 렌즈를 착용한 동안 그들의 미간 주름을 최적으로 관찰하였다. 안경을 쓰는 피험자는 가능하다면 안경 없이 미간 주름을 관찰할 것을 권고받았다. 만일 피험자가 그들의 미간 주름을 보는데 안경이 필요하다면, 평가를 위해 안경을 썼다. 상기 피험자 평가는 연구자가 IGA-FWS 평가를 완료하기 전에 완료되었다. 평가는 각 주어진 시간-시점에서 주름의 중증도를 나타내고 치료-전 수준과의 비교를 기초로 하지 않았다. 평가는 피험자에 의해 가능한 각 방문시 동일한 시간에 가까운 시간에 최적으로 수행되었다.

표 6

환자-안면의 주름 중증도 (PFWS)

평가 점수	주름 중증도	설명
0	없음	주름 없음
1	가벼움	매우 얇은 주름
2	중등	중도의 주름
3	중증	깊은 주름

[0129]

[0130]

시험 중 추가적인 피험자 평가는 심미적 치료 (치료 방문 (0 일째)시 제공됨)의 선택; 치료 결과에 대한 만족도를 평가하는 설문지 형태로 - 피험자는 안면의 치료 영역의 외관에 대해 얼마나 만족했는지 불만족했는지를 질문받는 치료 결과에 대한 피험자의 만족도 평가 (4주차 방문시); 및 치료 효과의 지속기간에 대한 만족도의 평가 (시험 종료 방문 (24, 28, 32, 또는 적절한 경우, 36주차) 또는 해당되는 경우 조기 중단 방문시에, 효과의 지속기간의 중요성을 평가하는 것을 포함한다.

[0131]

치료 영역의 디지털 사진은 치료-전 치료 방문 (0 일째), 추적 관찰 전화 통화 (1 주차), 추적 관찰 방문 (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 주차), 및 시험 종료 (24, 28, 32 또는 적절한 경우, 36 주차) 또는 해당되는 경우, 조기 중단 방문시 촬영하였다. 디지털 사진은 제어되고 표준화된 방식으로 촬영하였다. 참고 사진 및 적절한 훈련이 현장 관리자 및 연구자에게 제공되었다. 피험자는 눈 또는 안면에 임의의 종류의 화장을 하지 않는 것이 최적이었다. 피부로부터의 빛 반사를 최소화하기 위해, 치료 영역을 알코올 패드로 닦아주고 임의의 사진 촬영 전에 건조시켜 피부 기름기를 제거하였다. 사진은 최대 찌푸림 시 및 최대 찌푸림 이후의 휴식시에 피험자의 정면 모습을 포함하였다.

[0132]

통계 분석 : 모든 통계 프로그래밍 및 분석은 SAS 버전 9.3 이상을 사용하여 수행되었다. 이 시험이 0.05 수준에서 치료군 사이의 통계적으로 유의미한 차이를 감지하기 위한 능력이 없기 때문에 하기에 기재된 다양한 테스트에서 수득한 p-값은 통계적 경향을 확립할 것으로 예상된다. 테스트의 다양성에 대한 조정은 이루어지지 않았다. 인구통계적 (Demographic) 및 기준 특징은 치료 의향 (intent-to-treat: ITT), 프로토콜-해당 (per-protocol: PP) 및 안전성 집단을 위하여 요약되었다. 기술 통계는 치료군 뿐만 아니라 지역/인구에 대해서 모든 시간-지점에서 제공되었다. 유효성 분석은 ITT 및 PP 집단에 대해 수행되었다. 안전성 분석은 안전성 집단에 대해 수행되었다.

[0133]

집단: 무작위배정되고 치료를 받은 모든 피험자는 치료 의향 (ITT) 집단에 포함되었다. 무작위 배정되고, 치료를 받고, 적어도 한번의 치료-후에 안전성 평가를 제공한 모든 피험자는 안전성 집단에 포함되었다. 프로토콜 해당 (PP) 집단은 ITT 집단으로부터 프로토콜에 대한 주요 위반사항 (violation)이 없는 24-주차 평가를 완료한 피험자를 포함하였다. 피험자는 임의의 하기의 이유로 인하여 PP 집단으로부터 제외되었다: (i) 피험자가 선정/제외 기준 (inclusion/exclusion criteria)을 위반한 경우; (ii) 피험자가 24 주차 방문을 놓친 경우; (iii) 피험자가 금지된 약물을 사용한 경우; (iv) 피험자의 24 주차 방문이 예정보다 5 일이상 벗어난 경우 (예정된 방문 일자의 허용된 편차를 벗어남).

[0134]

안전성 군 및 유효성 비교를 위하여, 피험자는 5가지 치료군으로 무작위배정되었다 (RT002 20 U; RT002 40 U; RT002 60 U; 위약; 활성 비교군). 1 차 유효성 비교는 각각 RT002 용량 및 활성 비교군; 각 RT002 용량 및 위약; 뿐만 아니라 위약에 대한 활성 비교군 사이에서 수행되었다. 위험-대비-이익 (risk-to-benefit) 비율을 평가하여 주요 시험 평가 (6 개월차 반응자의 비율 및 36 주차 까지 측정된 반응의 지속 기간; AE의 빈도)에서 활성 비교군 대비 RT002 용량 중 적어도 하나의 유리한 경향을 조사하였다.

[0135]

각 치료군 내에서, ITT 집단에 대한 IGA-FWS, PFWS, 및 GAIS의 누락 점수는 반응자의 비율에 기초한 분석을 위한 마코프 체인 몬테 카를로(Markov Chain Monte Carlo: MCMC)의 다중 대체법에 의해 입력되었다. 1차 평가변수 (primary endpoint)에 대한 민감도 분석은 앞선 방법에 따른 마지막 관찰에 기초한 대체법을 사용하여 수행되었다.

[0136] 기술 통계는 인구통계적 특징 (예를 들어, 나이, 성별, 인종 등) 및 배경적 특징 (예를 들어, IGA-FWS, PFWS 등)을 요약하는데 사용되었다. 과거 또는 현재 진행중인 병력, 시험 방문의 준수, 및 사전 및 병용 약물 사용은 모든 피험자에 대하여 요약되었고 피험자에 의해 목록으로 제공되었다.

[0137] **유효성:** 유효성을 위하여, 1 차 임상적 유효성은 IGA-FWS를 사용하여 피험자의 최대 썸그립시 미간 주름의 중증도의 등급을 나누는 맹검 평가자에 의해서 평가되었다. 반응자는 IGA-FWS가 기준치 대비 1 점 이상 개선되고 평가 시점에 기준치 IGA-FWS로 복귀하지 않은 피험자로 정의된다. 1 차 분석의 목적을 위해, 반응자의 비율은 24 주차에 각 RT002 용량 및 활성 비교군 사이에 비교되었다. 각 RT002 치료군은 위약 및 활성 비교군과 별도로 비교되었다. 활성 비교군은 또한 각 방문시에 위약과 비교되었다. 비교는 기초 IGA-FWS에 의해 계층화된 (stratified) 코크란-멘텔-헨젤 (Cochran-Mantel-Haenszel: CMH) 검정으로 이루어졌다.

[0138] 1 차 분석의 목적을 위해, 반응의 지속기간 (Duration of Response)은 카플란 마이어 (Kaplan-Meier) 방법을 사용하여 각 RT002 용량과 활성 비교군 사이에서 비교되었다. 반응의 지속기간은 주사 시간부터 IGA-FWS를 기초로 맹검 연구자에 의하여 측정된 피험자가 기준치 중증도로 되돌아가는 시점까지 측정되었다. 피험자가 IGA-FWS에 의한 기준치으로부터 4 주차 또는 그 이전에 1 점 개선을 달성하지 못하면, 반응의 지속기간은 0으로 간주되었다. 피험자가 IGA-FWS를 기초로 4 주 또는 그 이전에 적어도 1 점의 개선을 달성하였지만, 36 주차 (마지막 시점)까지 피험자의 기준치로 되돌아가지 않았다면, 36 주차 (마지막 평가 일자)에 그러한 피험자는 분석에서 검열되었다. 로그-순위 검정 (log-rank test)은 RT002 및 활성 비교군 사이의 반응의 지속기간을 비교하는데 사용되었다. 각 치료군에 대해 계산된 위험-대비-이익 비율은 치료와 관련된 이상 반응의 수의 합을 치료군에서 피험자에 대한 반응 일자의 지속기간의 합으로 나눈 값과 같았다. IGA-FWS를 기초로 4 주차 또는 그 이전에 피험자가 적어도 1 점의 개선을 달성하였지만, 36 주차 (마지막 시점)까지 피험자의 기준치로 되돌아 갔다면, 이익의 합 대한 기여도는 기준선 및 마지막 방문 일자 사이의 날짜 수로 하였다.

[0139] 2 차 분석에 대하여, 2 차 평가변수는 하기에 정의된다:

[0140] (1) 12 주차 및 24 주차 평가에 중점을 둔 2 주차 및 4-36 주차에서 반응자의 비율. 치료군 사이의 비교는 가능한 경우 분석된 변수의 기준치 중증도에 의해 계층화된 CMH 테스트를 기초로 하였다. 각 치료군은 성공을 위해 필요한 개선을 가능하게할 수 있는 기준치 중증도를 가진 피험자에 대하여 위약과 비교되고 개별로 활성 비교군과 비교되었다. 활성 비교군 또한 각 방문 시에 위약과 비교되었다. 반응자는 몇가지 정의에 기초하여 평가되었다: (i) 기준치 대비 IGA-FWS에 기초하여 적어도 2 점을 개선한 자; (ii) 기준치 대비 IGA-FWS에 기초하여 적어도 1 점을 개선한 자; (iii) IGA-FWS 점수가 0 또는 1인 자; (iv) PFWS 기초로 적어도 1 점 개선한 자; (v) PFWS 기초로 적어도 2 점 개선한 자; (vi) GAIS 척도에서 적어도 1 점의 점수를 가진 자;

[0141] (2) 반응의 지속기간의 다양한 정의에 기초한 2 차 평가변수. 4 주차 까지 하기의 각 정의에 구체화된 대로 개선을 달성하지 못한 피험자에게는 0 지속기간이 부여되었고; 하기 정의된 대로 개선을 달성하였으나, 36 주차 까지 기준치로 되돌아가지 않은 피험자는 36 주차 (마지막 평가 일자)에 검열되었다. 치료군은 로그-순위 검정을 사용하여 비교되었다. 각 정의 및 치료군을 위해, 위험 대비 이익 비율은 상기 기재된 바와 같이 계산되었다. 반응의 지속기간에 대한 정의는 (i) GAIS에서 적어도 1의 반응자 정의를 위한 주사에서 1 미만의 GAIS 점수까지의 시간; (ii) IGA-FWS에서 적어도 2 점 개선의 반응자 정의를 위한 주사에서 기준치로의 복귀까지의 시간; (iii) PFWS에서 적어도 1 점 개선의 반응자 정의를 위한 주사에서 기준치로의 복귀까지의 시간; (iv) PFWS에서 적어도 2 점 개선의 반응자 정의를 위한 주사에서 기준치로의 복귀까지의 시간; (v) 치료를 위한 기간, 기준치 중증도, 및 기준치 중증도 상호작용에 의한 치료가 있는 비례 위험 모형 (proportional hazards model)을 사용하여 IGA-FWS에서 적어도 1 점 개선의 반응자 정의를 위한 주사에서 기준치로의 복귀까지의 시간; 및 (vi) 치료를 위한 기간, 기준치 중증도, 및 기준치 중증도 상호작용에 의한 치료가 있는 비례 위험 모형을 사용하여 PFWS에서 적어도 1 점 개선의 반응자 정의를 위한 주사에서 기준치로의 복귀까지의 시간을 포함한다. 탐색적인 분석은 1- 및 2-점 변경 둘다에 대한 PFWS를 기초로 하는 반응자 비율과 함께 피험자의 GAIS 평가 점수를 연관시키기 위하여 수행되었다. 적절한 경우, 상관관계 분석 (Correlation analyses) 및 로지스틱 (logistic) 회귀분석이 사용되었다.

[0142] **미간 주름의 치료를 위한 중간 분석 및 시험 결과**

[0143] 1 차 변수의 중간 분석은 피험자의 100%가 12 주차 방문을 완료했을 때 (이거나 이전에 중단했을 때) 수행되었다. 분석은 1 차 평가변수에서 정의된 반응자의 비율을 위하여 95% 신뢰 구간을 갖는 점 추정치 (point estimates)를 제공하였다. 95% 신뢰 구간을 갖는 점 추정치는 또한 활성 비교군 (치료군 5) 및 각 활성 치료군인 RT002 20 U, RT002 40 U 및 RT002 60 U (치료군 1, 2 및 3) 사이의 응답자 비율의 차이를 위하여 제공되었

다. 2 차 유효성 평가변수에 대한 중간 분석은 피험자의 75%가 이러한 방문을 개별적으로 완료한 때, 12 주차 및 24 주차 방문에 대하여 수행되었다. 중간 분석은 24 주차 방문을 완료했거나, 이전에 중단했던 피험자의 적어도 75% (실제 100 %)가 포함된 안전성 및 유효성에 대하여 24 주차에 수행하였다. 상기 분석은 또한 1 차 및 2 차 유효성 평가변수 (최대 썸그림시에) 및 안전성 데이터를 포함하였다. 중간 분석 시점에서, 관리자 및 피험자는 맹검을 유지하였다. 그 결과는 본 명세서의 하기에 요약된다.

[0144] **유효성** : RT002는 29-일째에 모든 투여군에서 IGA-FWS 상 1-점 개선의 1 차 유효성 평가변수를 100% 반응 비율로 달성하였다. (환자의 성공을 위한 플레이스홀더(Placeholder)). RT002 용량은 BOTOX[®] Cosmetic보다 1-점 더 오래 유지하였다. RT002는 BOTOX[®] Cosmetic보다 주름이 없거나 경미한 환자의 백분율이 높게 측정되는 방식으로 실시되었다. 16 주차에 BOTOX[®] Cosmetic으로 치료한 경우와 비교하여 RT002 40U 및 60U로 치료한 피험자의 2 배 이상이 주름이 없거나 경미하게 (IGA-FWS 점수 시스템에 따른) 유지하였다 (P <0.5). 주름이 없거나 경미한 피험자의 퍼센트는 (IGA-FWS 점수 시스템에 따른) 16주차에 BOTOX[®] Cosmetic과 비교하여 3 가지의 RT002 투여군 모두에서 통계적으로 높았다. 주름이 없거나 경미한 피험자의 퍼센트는 (IGA-FWS 점수 시스템에 따른) 16주차 이후 모든 시점에서 BOTOX[®] Cosmetic 치료군과 비교하여 RT002 40 U 투여 군에서 통계적으로 높았다.

[0145] **환자 데이터**: 환자가 보고한 결과는 RT002 치료의 지속기간 및 유효성에 대한 연구자의 결과를 뒷받침하였다. 24 주차시 (6 개월), 40U RT002 투여는 피험자의 전반적 심미적 개선 척도 (GAIS)에서 적어도 1 점의 평균 점수를 갖는 BOTOX[®] Cosmetic-치료한 피험자의 31% 대비 RT002 40U-치료한 피험자의 46.3% 로 임상적으로 의미있는 보다 높은 반응 비율을 계속하여 제공하였다. 16 주차시, 라벨 정보에 기초한, BOTOX[®] Cosmetic의 "120 일 까지 (up to 120 days)"의 지속기간과 비교하여, RT002 40U 투여는 환자의 주름 중증도 (PWS) 척도에서 적어도 1-점의 개선 및 피험자의 전반적 심미적 개선 척도에서 적어도 1-점 평균로 측정된 통계적으로 유의한 보다 높은 반응 비율을 달성하였다. 76.9%의 RT002 40U로 치료한 피험자는 58.5%의 BOTOX[®] Cosmetic으로 치료한 환자 와 비교하여 PWS에서 적어도 1-점의 개선을 유지하였다. 추가하여, 89.7%의 RT002 40U로 치료한 피험자는 70.7%의 BOTOX[®] Cosmetic으로 치료한 환자와 비교하여 GAIS에서 적어도 1-점의 점수를 유지하였다.

[0146] **안전성**: RT002 제품은 BOTOX[®] Cosmetic과 매우 유사한 안전성 및 효능 프로파일을 나타냈다. 이상 반응 (adverse event: AE)은 일반적으로 경미하였으며, 주로 주사 자체로부터의 영향과 관련이 있었다. 모든 RT002 용량 군은 대개 중증도에서 국소화되고, 일시적이며, 가벼운 정도인 AEs를 갖는 탁월하고 전반적인 안전성 프로파일을 나타냈다. 어떠한 활성 치료군군에서도 심각한 AE가 발생하지 않았다. 20 U 및 40 U RT002 용량 군은 처짐을 일으키는 것과 관련하여 BOTOX[®] 보다 더 내성적으로 (tolerated) 및 임상적으로 우수했다. 추가하여, RT002는 20 U 및 40 U 용량에서 하향 확산이 보다 적음을 나타냈다. 20 U 및 40 U 용량 둘다 1.9%의 BOTOX[®] Cosmetic 치료군과 비교하여, 임의의 시점에서 RT002의 용량으로 치료한 임의의 피험자에서 처짐이 발생하지 않는다. RT002 60 U 치료군의 피험자에서 처짐 비율이 5.7%로 관찰되었다. 이는 OsTOX[®] 치료에서 전형적으로 보이는 것처럼, 사실상 일시적이었다. RT002의 감소된 확산은 비임상 및 선행 시험과 일치하며, 보툴리눔 독소 A와 같은 보툴리눔 독소, 및 RT002와 같은 본 명세서에 기재된 하나 이상의 양으로 하전된 효능기와 공유 결합으로 결합된, 폴리리신과 같은 백분을 포함하는 양으로 하전된 담체를 함유하는 본 발명의 조성물로 치료되는 피험자에서 독소의 감소된 확산이 관찰된 것을 지지한다.

[0147] **투여량 및 효과의 지속기간**: 제한됨 없이, 중간 분석 결과는 높은 반응 비율, 효과의 지속기간 및 긍정적인 안전성 프로파일에 기초하여, 본 발명의 조성물을 함유하는 보툴리눔 독소를 사용한 단일 치료를 위한 최적의 용량으로 40 U의 용량 선별을 지지한다. 추가하여, RT002와 같은, 본 발명의 조성물은 피험자에게 주사로 투여 후에, 지속되고 긴 효과의 지속기간 예를 들어, 적어도 6 개월의 기간을 갖는다. 시험 결과의 중간 분석으로부터 결정된 바와 같이, RT002 제품을 사용한 피험자의 미간 주름의 치료는 BOTOX[®] Cosmetic을 사용한 피험자에서의 미간주름의 치료와 비교할 때 우수한 효과 지속기간을 달성하였다. 실제로, RT002 40U 용량 군 (23.6 주차)에서 IGA의 1-점 개선의 평균 지속기간은 Kaplan Meier 분석 방법을 기초로 한 BOTOX[®] Cosmetic (p =.020)을 사용한 피험자에서 18.8 주의 지속기간인 것 대비, 5.9-개월이었음이 밝혀졌다. (예를 들어, 도 4A 및 4B 참조). 주의 할 점은, 6 개월 시, 상당수의 RT002-치료된 피험자는 여전히 반응자였기 때문에 지속기간의 중간 분석으로부터

검열되었다는 것이다. 6 개월 시, BOTOX[®] Cosmetic 치료군에서 피험자의 12%인 것 대비, RT002 40U 치료군에서 피험자의 거의 3분의 1 (~33%)은 단일 치료 (p =.041) 후 주름이 없거나, 거의 없었다. 또한, 고 용량 군은 반응의 지속 기간을 평가하기 위해 치료-후 32 주 동안 추적되었고 연구자 및 피험자 평가 둘다를 기초로 29.4 주 또는 7.3 개월의 평균 지속기간을 달성했다.

[0148] RT002와 같은, 본 발명의 조성물에 의해 제공되는 효과의 지속기간뿐만 아니라 이의 치료 방법 및 용도는 치료 후 효과의 지속기간이 심미적 치료를 위해 그들에게 매우 중요하다고 여기는, 치료를 받는 피험자에게 이점을 제공한다. 단일 또는 1-회 주사 용량의 제품, 즉, RT002에 의해 특히 달성되는, 그러한 길고 지속되는 효과의 지속기간은 피험자의 안락함, 편리함 및 전반적인 건강에 중요하도록, 피험자에 대한 치료 과정 당 보다 적은 주사를 가능하게 한다. 피험자에게 제품의 주사에 의한 단일 치료 용량 후에 적어도 6-개월 동안 유지되는 유의하고 지속되는 효과를 제공하는 제품은 의사 및 환자 둘다에게 당업계의 충족되지 못한 요구에 대한 해결책을 제공한다.

[0149] **중간 결과의 요약:** 상기 결과는 RT002 제품에 의해 대표되는 본 발명의 조성물이 IGA-FWS 및 상기 기재된 IGA-FWS 점수 시스템에 따라 주름이 없거나 경미한 주름을 달성하고 유지한 환자의 퍼센트에서 1-점 및 2-점 개선의 평균 효과의 지속기간 및 반응자 비율로 측정된 바와 같이, BOTOX[®] Cosmetic 보다 더 우수함이 입증된 것이 밝혀졌다. 상기 시험은 28 일자 IGA-FWS에서 1-점 개선의 1 차 유효성 평가변수에 대해 통계적으로 유의한 결과를 얻었다. 24 주차 중간 분석으로 BOTOX[®] Cosmetic으로 주사한 것 대비 RT002 주사된 용량을 사용한 피험자의 단일 치료로 제공된 결과에서 임상적으로 의미있는 차별성을 입증하였다.

[0150] 또한 중간 분석에 의해 결정된 바와 같이, RT002는 반응 비율이 높은 대략 6-개월 효과의 지속기간을 달성하였다. RT002는 BOTOX[®] Cosmetic과 비교하여 우수한 효과의 지속기간을 달성하였고, 카플란 메이어 분석법에 기초한 BOTOX[®] Cosmetic (p =.020)에 대해 18.8 주인 것 대비, 40 U 용량 군에서 연구자 종합 평가-안면의 주름 중증도 (IGA-FWS) 척도에 기초한 미간 주름의 1-점 개선 평균 (median) 지속기간이 5.9-개월임을 입증하였다. 24 주차 시 (6 개월), 40 U 및 60 U의 용량에서 RT002는 개별적으로, 19%의 BOTOX[®] Cosmetic-치료된 피험자의 19%인 것 대비, 1-점 개선을 유지하면서, 35.9% 및 29.3%의 피험자에게 임상적으로 의미있는 높은 반응비율을 계속 제공하였다. RT002는 28 일째 연구자 척도 (IGA-FWS)에서 뿐만 아니라 환자가 보고 한 결과에서 적어도 1-점 개선의 1 차 유효성 평가 변수를 달성했다. RT002는 연구자 종합 평가-안면의 주름 중증도 척도 (IGA-FWS)에서 1-점 개선의 1 차 유효성 평가변수를 28-일째에 모든 용량 군에서 100% 반응 비율로 달성하였다. RT002는 환자의 안면 주름 척도에서 1-점 개선의 1 차 유효성 평가변수를 28-일째에 모든 용량 치료군에서 97%의 반응 비율 이상으로 달성하였다. 유효성 데이터는 96%의 피험자가 임상 연구자 평가에 의해 치료-후 4 주째 최대 썸그림에서 없음 또는 경미한 주름 중증도로 평가되었고, 83%의 피험자는 그들 자신을 동일한 시점에서 최대 썸그림에서 없음 또는 경미한 주름을 달성한다고 평가했다는 것을 나타냈다. RT002는 더 내성이 있었으며 심각한 이상 반응은 발견되지 않았다. RT002 20U 또는 40U 용량 치료군에서 피험자의 안검하수가 발생하지 않았다. 이 시험에서 용량 반응이 관찰되었고; RT002의 40U 용량을 투여받은 피험자는 특히 높은 반응 비율을 나타냈다.

[0151] 전반적으로, 주사용 닥시보툴리눔독소 (Daxibotulinum) A는 임의의 전신 또는 국소 안전 문제 또는 확산된 증상 없이 모든 용량 수준에서 내성이 우수하였다. 주사용 RTT150은 임의의 용량에서 치료 부위를 넘어서 확산된 증상 없이 임상 시험에서 더 내성이 있었다. RT002-CL001, 공개 임상 시험 (open label clinical trial), 1/2 상의 용량-상승에서, 부작용은 일반적으로 경미하고 국소적이며 일시적이었다. 관찰된 가장 흔한 이상 반응은 두통 및 주사 부위 반응이었다. 임의의 코호트 (cohort)에서 처짐을 겪은 피험자는 없었다. 심각한 이상 반응은 없었으며 이상 반응 비율은 빈도, 중증도, 또는 증가된 용량을 사용한 유형에서 변화하지 않았다. 34 명의 피험자는 131 AE를 보고하였다. 보고된 가장 흔한 이상 반응은 두통 (31 건; 17명 피험자), 주사 부위 소양증 (34 건; 8 명 피험자), 주사 부위 통증 (타는듯한) (14 건; 6 명 피험자), 및 안 질환 (14 사건; 5 명 피험자)이었다. 이상 반응 이외에, RT002-CL001 시험에서 안전성 평가는 임상 실험실 검사 (혈액학, 화학성, 소변검사, 및 프로트롬빈 시간), RTT150 독소 및 RTP004 펩티드에 대한 혈청 항체, 뇌 신경 II-VII 및 안면 근육 강도의 평가, 가임기 여성에 대한 병용(concomitant) 요법 약물 및 소변 임신 검사를 포함하였다. 임의의 용량에서 치료 부위를 넘어서 확산된 증상은 없었으며 임상 실험 결과 및 신체 평가에 기초한 임의의 전신 노출 (exposure)의 증상은 없었다. 모든 피험자는 독소 및 펩티드 둘다에 대한 항체가 음성이었다.

[0152] **실시예 6**

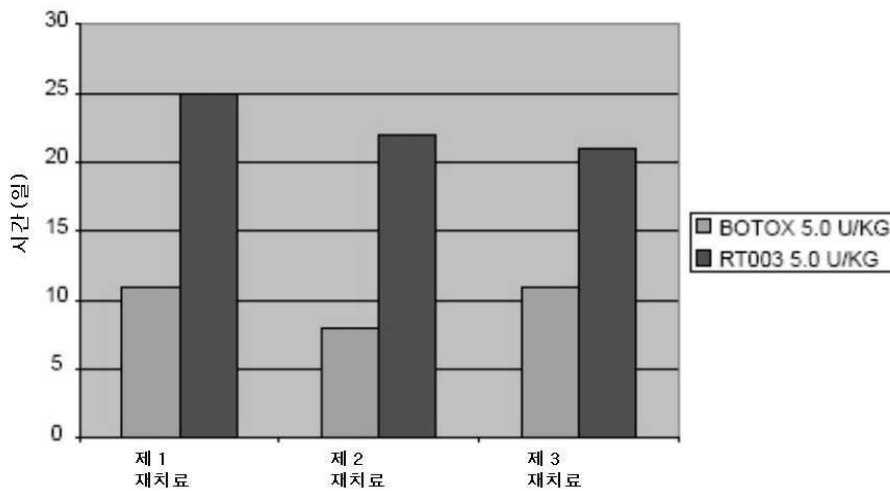
[0153] 미간 주름의 치료에 긴-지속적인 지속기간 효과를 나타내는 주사용 보툴리눔 독소 제제에 대한 추적 관찰 연구

[0154] RT002는 성인의 중등도 내지 중증도의 미간 주름의 치료를 위한 단일 투여의 안전성, 유효성 및 지속기간을 평가하기 위하여, 캐나다에서, 2상, 용량-범위 (ranging), 활성 및 위약 대조 임상 시험에서, RT002-CL002를 평가하였다. 상기 시험은 20, 40, 또는 60 U의 RT002, 20 U의 BOTOX Cosmetic, 또는 위약으로 치료받은 268 명의 피험자 (치료군 당 50 명 이상)가 등록되었다. 미간 주름의 치료를 위해, 임상 시험에서 제안된 투여 요법은 피험자 당 20, 40, 또는 60 유닛의 단일 치료 및 이마의 5 개 주사 부위 각각에 0.1 mL 근육 주사였다. 현재의 식염수 효능 방법 (이전의 젤라틴 인산 완충제 효능 방법에서 25, 50, 75 및 100 U에 해당함)에 기초한 16, 32, 48, 또는 64 U의 용량은 1/2상 임상 시험에서 더 내성이 있었다 (RT002-CL001 시험; 치료군 당 12 명 피험자; 총 48 명 피험자).

[0155] 중간 테이터는 RT002가 4 주차 3 회 용량 모두에 대해 1 차 유효성 측정을 달성했다는 것을 보여주었다. 이 시험은 연구자 종합 평가-안면의 주름 중증도 척도에서 최대 찌푸림에서의 미간 주름의 적어도 1-점 개선에 기초한 6-개월의 RT002 효과의 평균 지속기간을 밝혔다. 피험자-보고 결과는 RT002의 지속기간 및 유효성에 대한 연구자의 결과와 일치했다. 모든 코호트에서, RT002는 일반적으로 안전하고 더 내성이 있는 것으로 보였다. 이상 반응은 일반적으로 경미하고, 국소적 및 일시적이었다. 평가된 3 가지 용량 중 어떤 것에서도 심각한 이상 반응이나 전신 노출의 증상은 없었다.

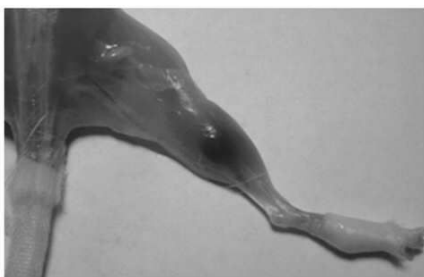
도면

도면1



도면2

A



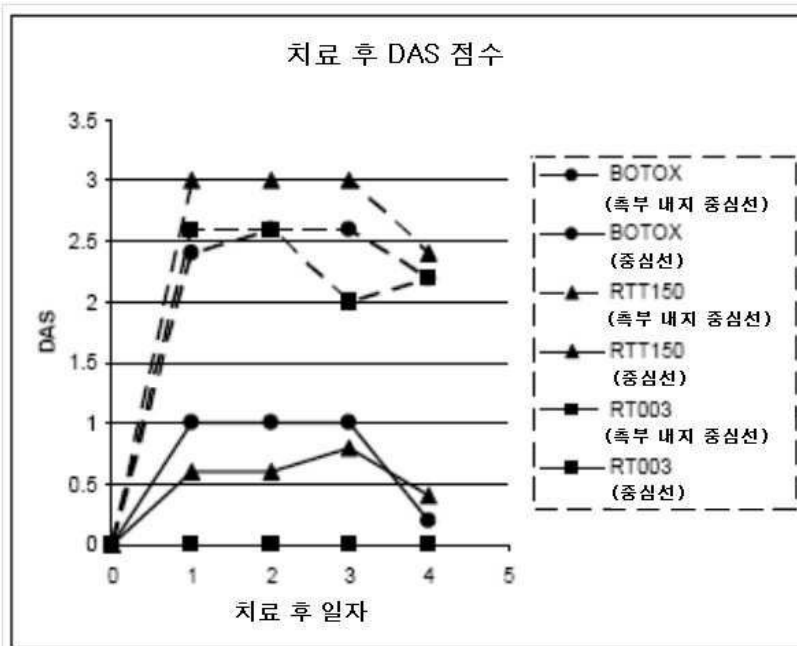
측부 내지 중심선 주사

B

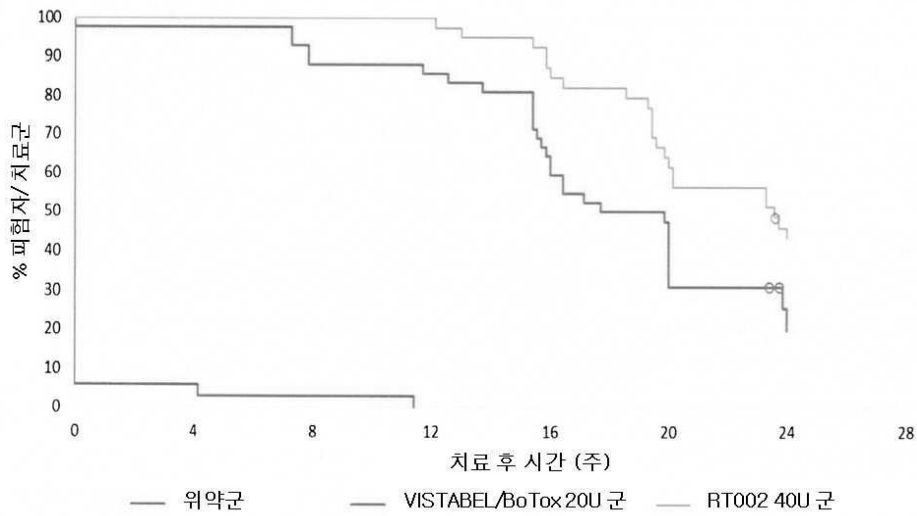


중심선 주사

도면3



도면4a



도면4b

