



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월14일

(11) 등록번호 10-2110379

(24) 등록일자 2020년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/107 (2006.01) A61K 38/48 (2006.01)

A61K 47/14 (2017.01) A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/1075 (2013.01)

A61K 38/4893 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7027453(분할)

(22) 출원일자(국제) 2006년12월01일

심사청구일자 2018년10월19일

(85) 번역문제출일자 2018년09월20일

(65) 공개번호 10-2018-0108891

(43) 공개일자 2018년10월04일

(62) 원출원 특허 10-2017-7025073

원출원일자(국제) 2006년12월01일

심사청구일자 2017년09월29일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/046236

(87) 국제공개번호 WO 2008/045107

국제공개일자 2008년04월17일

(30) 우선권주장

60/741,139 2005년12월01일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20030224020 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

유니버시티 오브 메사추세츠 로웰

미국 메사추세츠 01854 로웰 유니버시티 예비뉴 1

(72) 발명자

에델슨 조나단

미국 뉴욕주 10583 스카르스데일 마마로넥 로드 212

니콜로시 로버트

미국 뉴햄프셔주 03062 나슈아 31 채드윅크 씨클 아파트먼트 1 베이 리지 오브 나슈아

(74) 대리인

김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 31 항

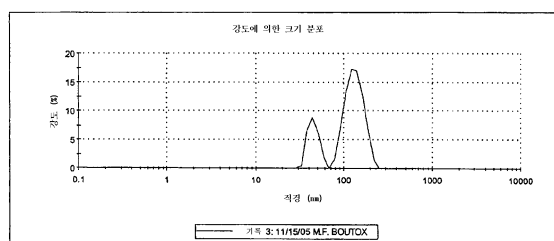
심사관 : 김용원

(54) 발명의 명칭 보툴리눔 나노에멀전

### (57) 요약

본원에 기술된 구체에는 보툴리눔 독소를 포함하는 나노에멀전에 관한 것이다. 일 구체예에 있어서, 나노에멀전은 고압 마이크로유동화에 의해 제조되고, 전적으로 10 내지 300 nm의 입경 분포를 포함한다. 본 발명에 의해 고려되는 나노에멀전은 근육 구축 상태의 미용학적 및 의학적인 치료에 유용하다. 예를 들어, 보툴리눔 독소는 피부 주름이 좀 더 매끄러워 지고 눈에 덜 띄도록 안면 근육을 이완시킬 수 있다. 또한, 본 발명은 예를 들어, 자기 집에서 의사 지시없이 비밀리에 자가 투여할 수 있는 미용학적 체제를 고려한 것이기도 하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 47/14* (2013.01)

*A61K 9/0019* (2013.01)

*A61K 9/0021* (2013.01)

*A61K 9/703* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

50% 초과와 입자가 10 내지 300 나노미터의 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 나노에멀전을 포함하는, 경피적 투여를 위해 제제화된 조성물로서, 상기 나노에멀전은 보툴리눔 독소(botulinum toxin)를 포함하고, 상기 조성물은 투여되어 신경근육 접합부에서 아세틸콜린의 방출을 억제하는 것인 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 나노에멀전은 보툴리눔 독소가 피부로 전달되어 대상에서 질환, 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상을 부분적으로 또는 전체적으로 완화하거나, 개선하거나, 경감시키거나, 억제시키거나, 이의 발병을 지연시키거나, 이의 중증도를 감소시키거나, 또는 이의 발생률을 감소시키는 양의 보툴리눔 독소를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 3

50% 초과와 입자가 10 내지 300 나노미터의 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 나노에멀전을 포함하는, 경피적 투여를 위해 제제화된 조성물로서, 상기 나노에멀전은 보툴리눔 독소를 포함하고, 상기 조성물은 투여되어 신경근육 접합부에서 아세틸콜린의 방출을 포함하는 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 것인 조성물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 질환, 장애 또는 병태는 근육 경련 및/또는 근육 구축을 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 질환, 장애 또는 병태는 주름, 안면 주름, 목 주름, 안면 마비, 안검 경련, 안면 구축, 근긴장 이상, 반얼굴 연축, 떨림, 경직, 안와후 근육을 포함하는 병태, 안과적 병태, 전립선 비대증, 다한증, 변비, 뇌졸중 후 팔 다리 경직, 또는 편두통인 것인 조성물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 나노에멀전은 입자가 10 내지 200 나노미터의 평균 입자 크기를 갖는 것을 특징으로 하는 것인 조성물.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 나노에멀전은 40% 미만의 입자가 250 나노미터 초과와 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 것인 조성물.

#### 청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 나노에멀전은 수성 매질 내에 분산된 오일성 입자를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 수성 매질은 물, 식염수, 인산염 완충 염수, 단쇄 알콜, 5% 텍스트로즈, 링거액, 유산 첨가 링거 주사액, 유산 첨가 링거+5% 텍스트로즈 주사액, 아실화 링거 주사액, 및 이의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인 조성물.

#### 청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 나노에멀전은 계면활성제 및 오일을 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 오일 및 계면활성제는 0.5:1 내지 2.0:1의 비(w/w)로 존재하는 것인 조성물.

#### 청구항 12

제10항에 있어서, 오일의 비율은 나노에멀전의 1% 내지 30%(w/w)인 것인 조성물.

#### 청구항 13

제10항에 있어서, 계면활성제는 포스포글리세리드; 포스파티딜콜린; 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC); 디올레일포스파티딜 에탄올아민(DOPE); 디올레일옥시프로필트리에틸암모늄(DOTMA); 디올레오일포스파티딜콜린; 콜레스테롤; 콜레스테롤 에스테르; 디아실글리세롤; 디아실글리세롤숙시네이트; 디포스파티딜 글리세롤(DPPG); 헥산데칸올; 폴리에틸렌 글리콜(PEG); 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르; 팔미트산 또는 올레산; 지방산; 지방산 모노글리세리드; 지방산 디글리세리드; 지방산 아마이드; 소르비탄 트리올레에이트 글리코콜레이트; 소르비탄 모노라우레이트; 폴리소르베이트 20; 폴리소르베이트 60; 폴리소르베이트 65; 폴리소르베이트 80; 폴리소르베이트 85; 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트; 서팍틴; 폴록소머; 소르비탄 트리올레에이트; 레시틴; 리소레시틴; 포스파티딜세린; 포스파티딜이노시톨; 스펅고미엘린; 포스파티딜에탄올아민(세팔린); 카디올리핀; 포스파티드산; 세레브로시드; 디세틸포스페이트; 디팔미토일포스파티딜글리세롤; 스테아릴아민; 도데실아민; 헥사데실아민; 아세틸팔미테이트; 글리세롤 리시놀레이트; 헥사데실 스테아레이트; 이소프로필 미리스테이트; 티록사폴; 폴리(에틸렌 글리콜)5000-포스파티딜에탄올아민; 폴리(에틸렌 글리콜)400-모노스테아레이트; 포스포리피드; 고 계면활성제 성질을 띠는 합성 및/또는 천연 세정제; 테옥시콜레이트; 시클로텍스트린; 카오토로픽(chaotropic) 염; 이온쌍화제; 및 이의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인 조성물.

#### 청구항 14

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 보툴리눔 독소가 연마제 또는 파괴제의 사용 없이 인간 피부를 관통할 수 있는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 연마제 또는 파괴제는 화학적 침투 증진제, 기계적 침투 증진제, 전기적 침투 증진제, 및 전자기적 침투 증진제로 이루어지는 군에서 선택되는 것인 약학 조성물.

#### 청구항 16

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 보툴리눔 독소는 A형, B형, C1형, C2형, D형, F형 및 G형으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인 조성물.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 보툴리눔 독소는 A형 보툴리눔 독소인 것인 조성물.

#### 청구항 18

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 복합체인 것인 조성물.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 보툴리눔 독소 복합체는 비독소 적혈구 응집소(non-toxin hemagglutinin) 단백질 및 비독성 비적혈구 응집소(non-toxic non-hemagglutinin) 단백질을 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 20

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 보툴리눔 독소는 알부민 매트릭스 내에 포함되는 것인 조성물.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 알부민은 인간 알부민인 것인 조성물.

#### 청구항 22

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 보툴리눔 독소는 정제된 보툴리눔 독소 단백질 또는 1 이상의 생물학적 활성을 보유하는 이의 단편인 것인 조성물.

#### 청구항 23

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 보툴리눔 독소는 다른 단백질로부터 분리된 또는 실질적으로 분리된 것인 조성물.

#### 청구항 24

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 보툴리눔 독소는 비독소 단백질로부터 분리된 또는 실질적으로 분리된 것인 조성물.

#### 청구항 25

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 보툴리눔 독소는 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)으로부터 분리된 것인 조성물.

#### 청구항 26

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 보툴리눔 독소는 화학적으로 합성되거나 또는 재조합적으로 생산된 것인 조성물.

#### 청구항 27

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 보툴리눔 독소는 i) 입자 내에 캡슐화되거나; ii) 입자의 표면에 흡착되거나; 및/또는 iii) 입자 계면과 회합되는 것인 조성물.

#### 청구항 28

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 나노에멀전은 피부 상층을 침투할 수 있는 것인 조성물.

#### 청구항 29

제28항에 있어서, 피부 상층은 각질층, 진피 소공 또는 진피선의 표면인 것인 조성물.

#### 청구항 30

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 1 내지 20,000 유닛의 투여량으로 투여를 위해 제제화되는 것인 조성물.

#### 청구항 31

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 로션, 연고, 젤, 크림, 패치, 스프레이, 오일, 에몰리언트(emollient), 폼(foam) 또는 이의 조합으로 제제화되는 것인 조성물.

#### 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

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 출원은 2005년 12월 1일자로 출원된 USSN 60/741,139('139 출원)에 관한 것으로, 35 USC 119(e) 하에 상기 '139 출원을 우선권 주장의 기초 출원으로 하며, 상기 '139 출원의 전체 내용은 본 명세서에 참고 인용되어 있다.

### 배경 기술

[0002] 보툴리눔 독소(botulinum toxin)는 각종 피부 증상 및 질환을 치료하기 위해 미용 피부학에서 사용되고 있다. 예를 들어, 보툴리눔 독소는 주름(예: 과운동성 안면 주름선), 넓은 목근 띠(platysma band), 데콜레 띠(décolleté band), 다한증 및 특정의 신경근육 질환을 치료하는 데 사용되어 오고 있다. 전형적으로, 보툴리눔 독소는 해당 부위 내로(즉, 주름 또는 띠 형성에 관여하는 관련 근육군 내로; 땀샘 함유 피부 내로, 기타 내로) 주사함으로써 전달된다.

[0003] 유감스럽게도, 현행 보툴리눔 독소 전달 방법은 다수의 부작용을 초래한다. 예를 들어, 부적절한 주사 기법은 조직을 손상시킬 수 있고/있거나, 보툴리눔 독소를 의도하지 않는 위치 및/또는 원치 않는 위치로 전달할 수 있다. 눈 주위 영역에서, 눈꺼풀 및 눈썹 처짐(lid and brow ptosis)이 중요한 부작용이다. 통증, 혈종, 반상 출혈 및 타박상(bruising)이 또한 발생할 수도 있다.

[0004] 특정의 부작용을 최소화할 수 있는 기법(예를 들어, 통증, 혈종, 반상 출혈 및 타박상을 줄이기 위해 주입 전에 피부를 냉각시키는 기법)이 개발되어 있지만, 보툴리눔 독소를 전달하기 위한 개선된 시스템 및/또는 체제를 개발할 여지는 여전히 남아 있다.

### 발명의 내용

[0005] 발명의 개요

[0006] 본 발명은 보툴리눔 독소를 함유하는 나노입자 조성물(예: 나노에멀전)을 제공한다. 이 조성물은, 예를 들어 다양한 미용학적 및 의학적 용도에서 유용하다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 나노입자 조성물은 주름을 펴는데 사용된다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 나노입자 조성물은 다한증을 치료하는데 사용된다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 나노입자 조성물은 근육 구축 및/또는 과활동을 치료하는데 사용된다. 그밖의 다른 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물의 용도는 본원에 기술되어 있고/되어 있거나, 해당 기술 분야의 당업자에게 명백히 이해될 수 있을 것이다.

[0007] 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 나노입자 조성물은 고 전단력 노출로 제조된다; 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 나노입자 조성물은 마이크로유동화로 제조된다; 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 나노입자 조성물은 고압 균질화로 제조된다

[0008] 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물은 경피적 수단 및 주사(예: 정맥내, 피하 또는 근육내 주사)를 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 이용가능한 수단으로 투여될 수 있다. 본 발명은 특정의 보툴리눔 독소 나노입자 조성물이 피부 구조의 변화 또는 변경없이 경피적으로 전달될 수 있다는 발견을 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 보툴리눔 독소의 경피적 전달을 이루기 위해 연마제, 또는 피부 표면층을 침식시키거나 약화시키는 제제가 필요치 않다. 요컨대, 많은 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소의 경피적 전달은 피부에 상당한 자극없이 달성된다.

[0009] 본 발명에 따라, 경피적 전달은 임의의 각종 형식으로 이루어질 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물은 크림을 피부에 도포하여 보툴리눔 독소가 대상에 투여되도록 크림내에 혼입된다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물은 보툴리눔 독소가 패치로부터 대상에 투여되도록 경피 패치내에 혼입된다,

- [0010] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물은 최대 직경과 최소 직경간의 차이가 약 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50 또는 그 미만의 nm를 넘지않는 최대 및 최소 직경의 입자군을 함유하는 예멸전이다.
- [0011] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)는 직경이 약 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 130, 120, 115, 110, 100, 90, 80 nm 또는 그 미만보다 작다.
- [0012] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)는 직경이 약 10 내지 약 600 나노미터 범위내이다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자는 직경이 약 10-300, 10-200, 10-150, 10-130, 10-120, 10-115, 10-110, 10-100 또는 10-90 nm 범위내이다.
- [0013] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)는 평균 입경이 약 300, 250, 200, 150, 130, 120, 또는 115, 110, 100, 또는 90 nm 아래이다. 일부 구체예에 있어서, 평균 입경은 약 10-300, 50-250, 60-200, 65-150, 70-130 nm 범위내이다. 일부 구체예에 있어서, 평균 입경은 약 80-110 nm이다. 일부 구체예에 있어서, 평균 입경은 약 90-100 nm 이다.
- [0014] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 조성물내 대다수 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)는 직경이 제시된 크기보다 작거나, 제시된 범위내에 든다. 일부 구체예에 있어서, 대다수는 조성물중 입자가 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 그 이상을 초과한다.
- [0015] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물은 실질적으로 직경이 약 120 나노미터보다 큰 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)를 갖지 않는다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)는 직경이 약 30 내지 약 115 나노미터 범위내이다. 일부 구체예에 있어서, 조성물내 대부분의 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)는 직경이 상기 범위내이다; 일부 구체예에 있어서, 이러한 조성물은 실질적으로 직경이 약 115 나노미터보다 큰 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)를 갖지 않는다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)는 직경이 약 30 내지 약 70 나노미터 범위내이다. 일부 구체예에 있어서, 이러한 조성물내 대부분의 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)는 직경이 상기 범위내이다; 일부 구체예에 있어서, 조성물은 실질적으로 직경이 약 70 나노미터보다 큰 입자를 갖지 않는다.
- [0016] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물은 적어도 두개의 상이한 입자군을 갖는다. 예를 들어, 일부 이러한 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물내 대다수 입자는 직경이 약 30-70 nm 범위내인 반면, 제2 입자군은 직경이 70-120 nm 범위이다. 일부 이러한 구체예에 있어서, 조성물은 직경이 120 nm 보다 큰 입자로 오염되어 있지 않다.
- [0017] 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소는 부분적으로 또는 전적으로 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물중 나노입자내에 존재한다; 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소는 본 발명의 보툴리눔 조성물중의 나노입자 표면에 흡착된다; 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소는 나노입자와 분산 매질 사이의 계면과 회합되어 있다. 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소는 나노입자 조성물내 2 이상의 이들 위치에서 발견된다.
- [0018] 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소는 A형, B형, C<sub>1</sub>형, C<sub>2</sub>형, D형, F형 및 G형으로 구성된 군 중에서 선택된다. 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소는 분리된 단백질로서 존재한다; 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소는 단백질 복합체 부분으로서 존재한다.
- [0019] 본 출원은 다양한 특허 공보들을 인용하고 있으며, 이들은 모두 본 원에 참고로 포함된다.
- [0020] 정의
- [0021] *마멸*: 본 원에서 사용된 용어 "마멸"이란 피부 상층을 변경, 파괴, 제거 또는 파괴하는 임의의 수단을 의미한다. 일부 구체예에 있어서, 마멸은 피부 상층을 변경, 파괴, 제거 또는 파괴하는 기계적 수단을 의미한다. 일부 구체예에 있어서, 마멸은 피부 상층을 변경, 파괴, 제거 또는 파괴하는 화학적 수단을 의미한다. 몇가지 예를 들자면, 박리제, 미립자(예: 마그네슘 또는 알루미늄 입자), 산(예: 알파-히드록시산 또는 베타-히드록시산), 알콜 등의 제제가 마멸을 야기할 수 있다. 일반적으로, 예를 들어, Donovan(예: US 공개 제2004/009180호 및 제2005/175636호, 및 PCT 공개 제WO 04/06954호), 및 Graham(예: US 특허 제6,939,852호 및 US 공개 제 2006/093624호) 등에 기술된 바와 같은 침투 증진제가 마멸을 초래할 것으로 예상된다. 물론, 당업자들이라면 특정 제제가 일 농도로 존재하거나, 또는 하나 이상의 다른 제제와 배합된 경우 마멸을 일으킬 수

있으나, 상이한 상황에서는 마멸을 일으키지 않을 수도 있음을 알고 있을 것이다. 따라서, 특정 물질이 "연마제"인지의 여부는 정황에 따른다. 마멸은 예를 들어, 피부의 발적 또는 자극 관찰 및/또는 각질층의 변경, 파열, 제거 또는 침식을 보이는 피부의 조직학적 검사에 의해 당업자들이 용이하게 평가할 수 있다.

[0022] 투여: 본 원에서 사용된 용어 "투여"란 본 발명의 나노입자 조성물을 대상에 전달하는 것을 의미하며, 임의의 특정 경로에 한하지 않고, 그 보다는 의학계에서 적절하다고 받아들이는 임의의 경로를 일컫는다. 예를 들어, 본 발명은 경피, 근육내 또는 피하를 포함하나 이들에 한정되지 않는 전달 또는 투여 경로를 대상으로 한다. 특정의 본 발명의 구체예에 있어서, 투여는 경피적인 것이다.

[0023] 생물학적 활성제: 본 원에서 사용된 문구 "생물학적 활성제"란 생체계 및/또는 유기체에서 활성을 가지는 임의의 물질을 의미한다. 예를 들어, 유기체에 투여시 그 유기체에 생물학적 효과를 가지는 물질이 생물학적으로 활성인 것으로 간주된다. 특정 구체예에 있어서, 단백질 또는 폴리펩티드가 생물학적으로 활성인 경우, 단백질 또는 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 공유하는 단백질 또는 폴리펩티드 부분은 전형적으로 "생물학적 활성" 부분으로 칭해진다. 보툴리눔 독소는 본 발명에 따른 생물학적 활성제이다.

[0024] 보툴리눔 나노입자 조성물: 본 원에서 사용된 용어 "보툴리눔 나노입자 조성물"이란 적어도 하나의 나노입자가 보툴리눔 독소를 포함하는 임의의 나노입자 조성물을 의미한다. 보툴리눔 독소는 나노입자내, 나노입자 표면상 및/또는 나노입자를 한정하는 미셀막내에 존재할 수 있다.

[0025] 보툴리눔 독소: 본 원에서 사용된 용어 "보툴리눔 독소"란 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)에 의해 생산된 임의의 신경 독소를 말한다. 달리 언급이 없으면, 이 용어는 적절한 활성(예: 근육 이완 활성)을 보유하는 상기 신경 독소의 단편 또는 부분(예: 경쇄 및/또는 중쇄)을 포괄한다. 본 원에서 사용된 "보툴리눔 독소"란 문구는 보툴리눔 독소 혈청형 A, B, C, D, E, F 및 G를 포함한다. 본 원에서 사용된 보툴리눔 독소는 또한 보툴리눔 독소 복합체(즉, 예를 들어, 300, 600, 및 900 kD 복합체) 뿐 아니라 정제된(즉, 예를 들어 분리된) 보툴리눔 독소(즉, 예를 들어 약 150 kD)도 포함한다. "정제된 보툴리눔 독소"는 보툴리눔 독소 복합체에 대한 단백질을 포함하여 기타 다른 단백질로부터 분리되거나 실질적으로 분리된 보툴리눔 독소로서 정의된다. 정제된 독소는 95% 이상 순수, 바람직하게는 99% 이상 순수할 수 있다. 당업자들이라면 본 발명이 보툴리눔 독소의 임의의 특정 공급원으로 한정되지 않음을 알 수 있을 것이다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용하기 위한 보툴리눔 독소는 클로스트리듐 보툴리눔으로부터 분리할 수 있거나, 화학적으로 합성할 수 있거나, 재조합적으로 생산할 수 있거나(즉, 숙주 세포또는 클로스트리듐 보툴리눔 이외의 유기체에서), 그밖에 달리 얻을 수 있다.

[0026] 약용 화장품: 본 원에서 사용된 용어 "약용 화장품(cosmeceutical)"이란 미용학적 및 약제학적 성질을 모두 갖는 임의의 약제(예: 예를 들어, 벤조일 퍼옥사이드 또는 레티놀)를 의미한다. 약용 화장품은 일반적으로 안색 또는 전체적인 외관을 개선하기 위해 외부 적용에 유용하다. 약용 화장품은 크림, 오일, 포뮼, 스프레이, 액체 등이 예시되나 이로만 한정되지 않는 조성물로서 적용될 수 있다. 몇가지 예를 들자면, 카로티노이드, 페놀 화합물 및/또는 수용성 항산화제가 약용 화장품으로서 작용할 수 있다.

[0027] 미용학적 제제: 본 원에서 사용된 용어 "미용학적 제제"란 미용성을 지닌 하나 이상의 약제를 함유하는 국소적으로 적용되는 조성물을 의미한다. 몇가지 예를 들자면, 미용학적 제제는 피부 연화제, 영양 로션 타입 에멀전, 클린징 로션, 클린징 크림, 스킨 밀크, 에몰리언트 로션, 마사지 크림, 에몰리언트 크림, 메이크업 베이스, 립 스틱, 페이스 팩 또는 페이스 젤, 세정 제제, 예를 들어 샴푸, 린스, 보디 클린저, 헤어 토닉 또는 비누, 및/또는 피부과 조성물, 예를 들어 로션, 연고, 젤, 크림, 패치 및/또는 스프레이일 수 있다.

[0028] 크림: 본 원에서 사용된 용어 "크림"이란 전형적으로 피부 적용용으로 제제화된 바를 수 있는 조성물을 의미한다. 크림은 전형적으로 오일 및/또는 지방산을 기초로 한 매트릭스를 함유한다. 본 발명에 따라 제제화된 크림은 나노입자를 함유할 수 있고, (예를 들어 이 나노입자가) 경피 투여시 피부를 통해 실질적으로 완전히 침투될 수 있다. 이러한 크림은 또한 도입 물질(예: 보툴리눔 독소)을 위한 담체로서 작용할 수도 있다.

[0029] 분산 매질: 본 원에서 사용된 용어 "분산 매질"이란 입자(예: 나노입자)가 분산되는 액체 매질을 의미한다. 일반적으로, 분산물은 적어도 2종의 불혼화성 물질이 배합되는 경우 형성된다. "수중유" 분산물은 유성 입자가 수성 분산 매질내에 분산된 것이다. "유중수" 분산물은 수성 입자가 유성 분산 매질내에 분산된 것이다. 당업자들이라면 분산물이 임의의 두 불혼화성 매질로부터 형성될 수 있고, 수성 및 유성 매질의 배합으로만 엄격히 제한되는 것으로 한정되지 않을 것임을 이해할 것이다. 따라서, "분산 매질"이란 용어는 "수성" 및 "유성" 범주로 언급되는 것이 통상적이기는 하지만, 포괄적으로 어떤 분산 매질에도 적용된다.

- [0030] 캡슐화: 본 원에서 사용된 용어 "캡슐화"(또한 "캡슐화하다" 또는 "캡슐화하는")는 캡슐화되는 실체가 다른 물질로 완전히 포위된 것을 의미하기 위해 이용된다. 몇가지 예를 들자면, 생물학적 활성제(예: 보툴리눔 독소)는 본 발명의 에멀전중 나노입자내에 캡슐화될 수 있다. 이러한 캡슐화는, 예를 들어 나노입자 조성물(예: 나노에멀전)의 형성, 예를 들어 마이크로유동화중에 이루어질 수 있다.
- [0031] ~과 함께: 본 원에서 사용된 문구 "~과 함께"는 2 이상의 물질을 공동 전달하는 것을 의미한다. 특히, 본 발명에 따라 이 문구는 본 발명의 나노입자 및/또는 나노입자 조성물과 함께 생물학적 활성제를 전달하는 것을 말한다. 물질 또는 약제는, 물질 또는 약제가 나노입자 및/또는 나노입자 조성물과 배합되고; 나노입자에 의해 캡슐화 또는 완전 포위되고; 나노입자 계면과 회합되고; 및/또는 나노입자의 외표면에 흡착되는 경우, 나노입자와 함께 전달된다. 나노입자 및/또는 나노입자 조성물과 함께 전달될 물질 또는 약제는 나노입자 및/또는 나노입자 조성물에 공유적으로 결합되거나 결합되지 않을 수 있다. 나노입자 및/또는 나노입자 조성물과 함께 전달될 물질 또는 약제는 흡착력에 의해 나노입자 및/또는 나노입자 조성물에 부착되거나 부착되지 않을 수 있다. 본 발명의 많은 구체예에 있어서, 나노입자 및/또는 나노입자 조성물과 함께 전달되는 생물학적 활성제는 보툴리눔 독소이다.
- [0032] 마이크로유동화: 용어 "마이크로유동화(microfluidized)"는 일반적으로 본 원에서 고 전단력에 노출되는 조성물을 나타내기 위해 사용된다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 조성물은 "마이크로유동화기"로 알려져 있는 장비 또는 장치로 처리된다. 그러나, 그의 가장 넓은 의미로, 마이크로유동화라는 용어는 임의의 수단에 의해 고 전단력에 노출되는 임의의 조성물을 포괄한다. 예를 들어, 고 전단력은 캐비테이션(cavitation) 또는 고압 균질화에 의해 시행될 수 있다. 선택적으로 또는 추가적으로, 고 전단력은 고압, 예를 들어 약 15,000 psi의 노출로 시행될 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 이러한 고압은 약 18,000 내지 약 26,000 psi의 범위내이다; 일부 구체예에 있어서, 이는 약 20,000 내지 25,000 psi의 범위내이다. 제시한 바와 같이, 고 전단력은 예를 들어, Microfluidizer<sup>®</sup> 처리 장치(Microfluidics Corporation/MFIC Corporation) 또는 다른 유사 장치와 같은 장비에 통과시켜 시행할 수 있다. Microfluidizer<sup>®</sup> 처리 장치는 생산물을 나노스케일 범위로 크기가 감소되도록 마이크로채널을 통해 고속으로 가속화함으로써 고압 및 그에 따른 고전단 속도를 제공한다. 유체는 둘로 분리되고 고속(50-300 m/s 범위)에서 75 미크론 정도의 전형적인 치수로 마이크로채널을 통해 추진된다. 유체는 마이크로채널로부터 유출될 때, 반대 마이크로채널로부터의 제트와 상충하는 제트를 형성한다. 채널에서 유체는 통상의 기술보다 높은 차수인 고 전단( $10^7$  1/s 이하)을 겪게 된다. 제트 상충은 서브미크론 수준의 혼합이 일어나게 한다. 따라서, 고 전단 및 충격은 Microfluidizer<sup>®</sup> 기술에서 입경 축소 및 다중상 유체의 혼합에 관여한다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 샘플은 약 10 분 미만의 시간동안 고 전단력 노출을 통해 "마이크로유동화"된다. 일부 구체예에 있어서, 시간은 약 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 분 미만이다. 일부 구체예에 있어서, 시간은 약 1 내지 2 분 이하이다; 일부 구체예에 있어서, 시간은 약 30 초이다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 샘플은 고 전단력의 단일 노출을 통해 "마이크로유동화"된다; 이러한 구체예는 본 원에서 "단일 패스(single pass)" 마이크로유동화로 언급된다.
- [0033] 나노에멀전: 에멀전은 당업계에서 "유화제의 존재 또는 부재하에 보통 콜로이드 크기보다 큰 소적으로 불혼화성 액체중에 분산된 액체로 구성된 ... 시스템으로서" 관례적으로 정의된다. [Medline Plus Online Medical Dictionary, Merriam Webster (2005)]. 본 원에서 사용된 용어 "나노에멀전"은 적어도 일부 소적(또는 입자)의 직경이 나노미터 크기 범위인 에멀전을 의미한다. 당업자들이 이해하고 있는 바와 같이, 나노에멀전은 마이크로에멀전 소적 또는 입자보다 수천배 작은 소적 또는 입자로 특정화된다.
- [0034] 나노입자: 본 원에서 사용된 용어 "나노입자"는 직경이 1000 나노미터(nm) 미만인 임의의 입자를 의미한다. 일부 구체예에 있어서, 나노입자의 직경은 국립 과학 재단(National Science Foundation)에서 규정하고 있는 바와 같이 300 nm 미만이다. 일부 구체예에 있어서, 나노입자의 직경은 국립 과학 재단에서 규정하고 있는 바와 같이 100 nm 미만이다. 당업자들이라면, 본 원에 사용된 용어 "나노입자"가 분산물 또는 에멀전중의 분산상을 나타내기 사용됨을 알 것이다.
- [0035] 나노입자 조성물: 본 원에서 사용된 용어 "나노입자 조성물"은 적어도 하나의 나노입자를 포함하는 임의의 조성물을 의미한다. 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 나노입자의 균일한 집합물이다. 본 원에 개시된 나노입자 조성물은 전형적으로 에멀전 또는 분산물이다. 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 안정하다. 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 나노입자와 함께 전달될 하나 이상의 생물학적 활성제를 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 나노에멀전이다. 당업자들은 나노입자 조성물이, 예를 들어 화학적 또는

기계적 수단을 포함하여 임의의 이용가능한 수단에 따라 제조될 수 있음을 인식할 것이다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 샘플을 마이크로유동화하여 제조된다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 독성 용매의 사용없이 제조되고/되거나 독성 용매를 실질적으로 포함하지 않는다.

[0036] ~로 오염되지 않은: "~로 오염되지 않은"이란 문구가 본 원에서 나노입자 조성물과 관련하여 사용되는 경우, 이는 "실질적으로 포함하지 않는"과 동일한 의미를 가지며, 예시된 물질을 약 50% 이하로 함유하는 나노입자 조성물을 나타낸다. 예를 들어, 나노입자 조성물이 정해진 범위의 직경을 벗어나는 입자를 "실질적으로 포함하지 않는다" 라고 언급되면, 그 조성물내에 상기 범위를 벗어난 직경을 갖는 입자는 약 50% 이하이다. 일부 구체예에 있어서, 25% 이하의 입자가 범위를 벗어난다. 일부 구체예에 있어서, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 이하 또는 그 미만의 입자가 상기 제시된 범위를 벗어나는 직경을 갖는다.

[0037] 약제학적으로 허용되는: 본 원에서 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는"이란 정상적인 의학적 판단 범위내에서 적당한 유익/유해 비율로 과다 독성, 자극, 알러지 반응 또는 다른 문제나 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 약제를 의미한다.

[0038] 예비혼합물: 본 원에서 사용된 용어 "예비혼합물(premix)"은 후속적으로 나노입자 조성물을 생성하는 데 사용되거나, 본 발명에 따라 사용되는 임의 성분들의 배합물을 의미한다. 예를 들어, 예비혼합물은 고 전단력에 적용되는 경우, 발명에 따른 나노입자를 생성하는 임의 성분들의 집합체이다. 일부 구체예에 있어서, 예비혼합물은 고 전단에 적용되는 경우, 균일한 나노입자 조성물과 같은 나노입자를 생성하는 성분들의 집합체이다. 예비혼합물은 종종 액체 분산 매질 및 분산 매질내에 나노입자를 생성하기에 충분한 다른 성분들을 함유한다. 본 발명에 따라, 보툴리눔 독소가 또한 예비혼합물에 포함될 수도 있다. 예비혼합물은 또한 하나 이상의 계면활성제 및/또는 기타 제제를 포함할 수도 있다. 일부 구체예에 있어서, 예비혼합물은 용액을 구성한다. 예비혼합물이 보툴리눔 독소 및/또는 다른 생물학적 활성제를 포함하는 일부 특정 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소(및/또는 다른 생물학적 활성제)는 고 전단력이 예비혼합물에 인가되기 전에 용액 상태이다.

[0039] 불응: 본 원에서 사용된 용어 "불응(refractory)"은 활동중인 의료인이 통상적으로 관찰한 바, 생물학적 활성제 또는 약제학적 조성물의 전달 후 기대하는 임상적 효능으로 반응하지 않는 임의의 대상을 의미한다.

[0040] 자가-투여: 본 원에서 사용된 용어 "자가-투여"는 대상이 조성물을 의사 지시의 필요없이 스스로 투여할 수 있는 상황을 의미한다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 자가-투여는 임상적 환경을 벗어나 수행될 수 있다. 일례를 들자면, 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 폐이설 미용 크림이 대상의 집에서 대상에 의해 투여될 수 있다.

[0041] 소형 분자: 일반적으로, "소형 분자"는 당업계에서 크기가 약 5 킬로달톤(Kd) 미만인 유기 분자인 것으로 이해하고 있다. 일부 구체예에 있어서, 소형 분자는 약 3 Kd, 2 Kd 또는 1 Kd 미만이다. 일부 구체예에 있어서, 소형 분자는 약 800 달톤(D), 600 D, 500 D, 400 D, 300 D, 200 D 또는 100 D 미만이다. 일부 구체예에 있어서, 소형 분자는 비중합체이다. 일부 구체예에 있어서, 소형 분자는 단백질, 펩티드 또는 아미노산이 아니다. 일부 구체예에 있어서, 소형 분자는 핵산 또는 뉴클레오티드가 아니다. 일부 구체예에 있어서, 소형 분자는 사카라이드 또는 폴리사카라이드가 아니다.

[0042] 안정한: 본 원에서 용어 "안정한"이 나노입자 조성물에 적용되는 경우, 이는 조성물이 그의 물리적인 구조(예: 입자의 크기 범위 및/또는 분포)의 하나 이상의 특징을 일정 기간 유지하고 있음을 의미한다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 안정한 나노입자 조성물은 평균 입경, 최대 입경, 입경 범위 및/또는 입경 분포(즉, 지정된 크기를 초월하고/하거나 지정된 크기 범위를 벗어나는 입자 비율)가 일정 기간 유지되는 것이다. 일부 구체예에 있어서, 기간은 적어도 약 1 시간이다; 일부 구체예에 있어서 기간은 약 5 시간, 10 시간, 일(1) 일, 일(1) 주, 이(2) 주, 일(1) 개월, 이(2) 개월, 삼(3) 개월, 사(4) 개월, 오(5) 개월, 육(6) 개월, 팔(8) 개월, 십(10) 개월, 십이(12) 개월, 이십사(24) 개월 또는 그 이상일 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 기간은 약 일(1) 일 내지 이십사(24) 개월, 이(2) 주 내지 십이(12) 개월, 이(2) 개월 내지 오(5) 개월 등의 범위내이다. 예를 들어, 나노에멀전 입자군이 장기 저장, 온도 변화 및/또는 pH 변화에 놓여 지고, 군내 대다수 나노입자가 지정된 범위내에서(즉, 예를 들어, 약 10 내지 120 nm 사이) 직경을 유지하면, 나노에멀전은 안정하다. 일부 이들 군에서, 대다수는 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 그 이상을 초과한다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물이 보툴리눔 독소 및/또는 적어도 하나의 다른 생물학적 활성제를 함유하는 경우, 생물학적 활성제(예: 보툴리눔 독소)의 농도가 지정된 조건하에서 조성물중에 지정된 기간에 걸쳐 유지된다면 나노입자 조성물은 안정한 것으로 사료된다.

- [0043] **대상:** 본 원에서 용어 "대상"이란 본 발명의 나노입자 조성물이 전달되거나 투여될 수 있는 임의의 동물을 의미한다. 예를 들어, 대상은 인간, 개, 고양이, 소, 돼지, 말, 마우스, 래트, 게르빌루스 쥐, 햄스터 등일 수 있다. 본 발명의 많은 구체예에 있어서, 대상은 인간이다.
- [0044] **증상이 감소된다:** 본 발명에 따라, 특정 질환, 장애 또는 상태의 하나 이상의 증상에 대한 크기(예: 강도) 또는 빈도가 감소되는 경우, "증상이 감소된다". 명확히 하기 위해, 특정 증상의 발현 지연은 이러한 증상의 빈도를 줄이는 일 형태로 고려된다. 몇가지 예를 들자면, 해당 상태가 안면 주름인 경우, 선택한 영역에서 하나 이상의 주름의 깊이 및/또는 심도가 감소되면 그 상태의 증상이 감소된다. 해당 상태가 근육 구축인 경우, 근육이 덜 긴장되고 보다 이완이 되면 증상이 감소된다. 본 발명이 증상이 제거된 경우로만 제한되도록 의도하는 것은 아니다. 본 발명은 구체적으로 하나 이상의 증상이 비록 완전히 제거되지는 않았으나, 감소(및 그에 따라 대상의 상태가 "개선")되도록 하기 위한 치료를 대상으로 한다.
- [0045] **치료적 유효량:** 본 원에서 사용된 용어 "치료적 유효량"은 질환, 장애 및/또는 상태로 고통받거나 이에 감수성인 개체에 투여되는 경우, 상기 질환, 장애 및/또는 상태를 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 당업자들이라면 "치료적 유효량"이라는 용어가 실제로 특정 개체에서 성공적인 치료가 이루어지는 것을 필요로 하지 않음을 알 것이다. 그 보다, 치료적 유효량은 치료를 요하는 상당수의 대상에 투여되거나 전달되었을 때 목적으로 하는 특정 약리학적 반응을 제공하는 양일 수 있다. 특히, 특정 대상은 사실상 "치료적 유효량"에 "불응"일 수도 있는 것으로 이해하여야 한다. 일례를 들자면, 불응 대상은 임상적 효능이 얻어질 수 없도록 낮은 생체이용성을 지닐 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 치료적 유효량은 하나 이상의 특정 조직에서 측정된 양일 수 있다.
- [0046] **독성 용매:** 본 원에서 사용된 용어 "독성 용매"란 동물 조직을 변경, 파괴, 제거 또는 파괴시킬 수 있는 임의의 물질을 의미한다. 당업자들이 이해하고 있는 바와 같이, 동물의 조직은 생 세포, 사멸 세포, 세포의 기질, 세포 접합체, 생물학적 분자 등을 포함할 수 있다. 몇가지 예를 들자면, 독성 용매는 디메틸 설펜사이드, 디메틸 아세트아미드, 디메틸 포르마미드, 클로로포르름, 테트라메틸 포르마미드, 아세톤, 아세테이트 및 알칸올을 포함한다.
- [0047] **치료:** 본 원에서 사용된 용어 "치료"(또는 "치료하다" 또는 "치료하는")란 특정 질환, 장애 및/또는 상태(예: 안면 주름)의 하나 이상의 증상 또는 특색의 발현을 부분적으로 또는 완전히 경감, 개선, 소생, 억제, 지연하고, 중증성을 감소시키고/시키거나 발생을 감소시키는 생물학적 활성제의 임의의 투여를 의미한다. 이러한 치료는 관련 질환, 장애 및/또는 상태의 징후를 나타내지 않는 대상 및/또는 질환, 장애, 및/또는 상태의 초기 징후만을 나타내는 대상에 해당할 수 있다. 선택적으로 또는 추가적으로, 이러한 치료는 관련 질환, 장애 및/또는 상태의 하나 이상의 확립된 징후를 나타내는 대상에 해당할 수 있다.
- [0048] **균일한:** 용어 "균일한"이 본 원에서 나노입자 조성물과 관련하여 사용되는 경우, 이는 개별 나노입자가 특정 범위의 입경 크기를 가지는 나노입자 조성물을 의미한다. 예를 들어, 일부 구체예에 있어서, 균일한 나노입자 조성물은 최소 직경과 최대 직경간의 차이가 약 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50 또는 그 미만의 nm를 넘지 않는 것이다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 균일한 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자(예를 들어 보툴리눔 독소 함유 입자)의 직경은 약 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 130, 120, 115, 110, 100, 90, 80 nm 또는 그 미만보다 작다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 균일한 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자(예를 들어 보툴리눔 독소 함유 입자)의 직경은 약 10 및 약 600 나노미터 범위내이다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 균일한 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자의 직경은 약 10-300, 10-200, 10-150, 10-130, 10-120, 10-115, 10-110, 10-100 또는 10-90 nm 범위내이다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자(예를 들어 보툴리눔 독소 함유 입자)의 평균 입경은 약 300, 250, 200, 150, 130, 120, 또는 115, 110, 100, 또는 90 nm 아래이다. 일부 구체예에 있어서, 평균 입경은 약 10-300, 50-250, 60-200, 65-150, 70-130 nm 범위내이다. 일부 구체예에 있어서, 평균 입경은 약 80-110 nm 이다. 일부 구체예에 있어서, 평균 입경은 약 90-100 nm 이다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 균일한 나노입자 조성물내 대다수 입자(예를 들어 보툴리눔 독소 함유 입자)는 특정 크기 이하 또는 특정 범위내의 직경을 가진다. 일부 구체예에 있어서, 대다수는 조성물중 입자가 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 그 이상을 초과한다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 균일한 나노입자 조성물은 샘플의 마이크로유동화로 이루어진다.
- [0049] **특정의 바람직한 구체예의 설명**
- [0050] 본 발명은 미용 및 의과적 치료에 유용한 보툴리눔 독소 나노에멀전 조성물에 관한 것이다. 무엇보다도, 본 발명은 보툴리눔 독소를 함유하는 나노입자 조성물을 생성하기 위한 시스템 및 이러한 조성물을 다양한 상황에 사용하는 방법을 제공한다. 일 구체예에 있어서, 의과적 치료는 근육 구축 및/또는 과활동을 완화시킨다; 다른 구

체예에 있어서, 의과적 치료는 다한증을 완화시킨다. 일 구체예에 있어서, 미용 치료는 피부 주름을 펴 준다. 일 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소 나노에멀전은 마이크로유동화로 제조된다. 보툴리눔 독소 나노에멀전의 투여는 근육내 주사 또는 경피 국소 적용을 포함하나 이들에 한정되지 않는 방법으로 수행될 수 있다.

[0051] 보툴리눔 독소 생물학

[0052] 보툴리눔 독소(BTX) BTX는 실제로 혐기성 그람 양성균인 클로스트리듐 보툴리눔에 의해 생산되며, 강력한 폴리펩티드 신경 독소이다. 그 중에서도 특히, BTX는 인간 및 동물에서 보툴리눔 독소증으로 칭해지는 신경마비 질병을 일으킨다. BTX는 장 내층을 통해 거주하지 않고 통과하여 말초 운동 신경세포를 공격하는 것이 분명하다. 보툴리눔 독소의 중독 증상은 보행, 삼키기 및 발음 곤란으로부터 호흡근 마비로 이어져 사망에 이르게 된다.

[0053] BTX-A는 인간에게 알려진 가장 치명적인 천연 생물학적 제제이다. 상용화 BTX-A를 위한 암컷 스위스 웹스터 마우스(18 내지 20 g)에서 LD<sub>50</sub>은 약 50 피코그램이며; 이 양은 BTX-A의 1 유니트로 정의된다. 물을 기준으로 하였을 때, BTX-A는 디프테리아보다 약 18억배, 시안화나트륨보다 약 6 억배, 코브라 독보다 약 3천만배 및 콜레라보다 약 1천 2백만배 더 치명적이다(Singh, *et al*, ed., "Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins" *Natural toxins II*, pp. 63-84, Plenum Press, New York, 1996).

[0054] 상이한 혈청형의 보툴리눔 독소는 이들이 침범한 동물종과, 이들이 일으키는 마비의 중증성 및 기간이 다르다. 예를 들어, BTX-A는 래트에서 제공된 마비 속도로 측정한 경우, BTX-B 보다 500 배 더 강력한 것으로 판명되었다. 또한, BTX-B는 BTX-A에 대한 영양류 LD<sub>50</sub>의 약 12 배인 480 U/kg의 용량에서 영양류에 비독소인 것으로 입증되었다. 더욱이, 보툴리눔 독소 B형은 근육내 주사시에 동일한 용량 수준에서 BTX-보다 활성 기간이 더 짧고 덜 효능적인 것으로 알려졌다.

[0055] 보툴리눔 독소는 명백히 콜린성 운동 신경세포에 고 친화성으로 결합하며, 뉴런으로 이동하여 아세틸콜린의 방출을 차단한다.

[0056] 보툴리눔 독소는 특정 신경근육 질환을 치료하기 위한 임상적 환경에서 사용되고 있다. 특히, BTX-A는 안검 경련, 사시 및 반얼굴 연축의 치료를 위해 미국 식품 의약국으로부터 승인되어 있다. 비 A형 보툴리눔 독소 혈청형은 명백히 BTX-A에 비해 낮은 효능 및/또는 짧은 활성 기간을 가진다. 말초 근육내 BTX-A의 임상적 효과는 보통 주사 1 주내에 관찰된다. BTX-A를 단일 근육내 주사하고 증상이 경감되는 전형적인 기간은 평균 약 3 개월이다.

[0057] 모든 보툴리눔 독소 혈청형이 명백히 신경근육 접합부에서 신경 전달물질인 아세틸콜린의 방출을 억제하기는 하지만, 이들은 상이한 신경 분비 단백질에 영향을 미치고/미치거나 상이한 부위에서 이들 단백질을 절단함으로써 그와 같이 작용한다. 예를 들어, 보툴리눔 A 및 E형은 둘 다 25 킬로달톤(kD)의 시냅토크스민 관련 단백질(SNAP-25)을 절단하지만, 이들은 이 단백질내의 상이한 아미노산을 표적으로 한다. 보툴리눔 독소 B, D, F 및 G형은 소포-관련 단백질(VAMP, 시냅토프레빈으로도 칭해짐) 상에 작용하며, 각 혈청형은 상이한 부위에서 단백질을 절단한다. 마지막으로, 보툴리눔 독소 C<sub>1</sub>형은 선택신 및 SNAP-25 둘 다를 절단하는 것으로 증명되었다. 이러한 작용 기전의 차이는 다양한 보툴리눔 독소 혈청형의 상대 효능 및/또는 작용 기간에 영향을 미칠 수 있다. 유의적으로, 이자섬 B 세포의 세포질액은 적어도 SNAP-25(Biochem J 1;339 (pt 1): 159-65 (April 1999)) 및 시냅토프레빈(Mov Disord 1995 May; 10(3): 376)을 함유하는 것으로 알려졌다.

[0058] 공지된 7개의 모든 보툴리눔 독소 혈청형에 대한 보툴리눔 독소 단백질 분자의 분자량은 약 150 kD 이다. 흥미롭게도, 보툴리눔 독소는 관련 비독소 단백질과 함께 150 kD 보툴리눔 독소 단백질 분자를 포함하는 복합체로서 방추형(*Clostridial*) 박테리아에 의해 방출된다. 요컨대, BTX-A 복합체는 방추형 박테리아에 의해 900 kD, 500 kD 및 360 kD 형태로 생성될 수 있다. 보툴리눔 독소 B 및 C<sub>1</sub>형은 명백히 500 kD 복합체로만 생성된다. 보툴리눔 독소 D형은 300 kD 및 500 kD 복합체 양자로 생성된다. 마지막으로, 보툴리눔 독소 E 및 F형은 약 300 kD 복합체로만 생성된다.

[0059] BTX 복합체(즉, 분자량이 약 150 kD를 초과하는 조성물)는 비독소 적혈구 응집소 단백질 및 비독소 및 비독성 비적혈구 응집소 단백질을 함유하는 것으로 여겨진다. 이들 두개의 비독소 단백질(보툴리눔 독소 분자와 함께 관련 신경 독소 복합체를 포함함)은 보툴리눔 독소 분자에 대한 변성 안정성 및 독소가 섭취된 경우 소화산에 대한 보호를 제공하도록 작용할 수 있다. 또한, 보다 큰(약 150 kD 분자량 초과) 보툴리눔 독소 복합체는 보툴리눔 독소 복합체의 근육내 주사 부위로부터 떨어진 곳으로 보툴리눔 독소의 확산 속도를 저하시킬 수 있는 것이 가능하다.

- [0060] BTX 단백질 또는 BTX 복합체가 본 발명에 따라 이용될 수 있다. 실제로, 당업자들은 적절한 활성을 보유한 BTX 단백질 또는 복합체의 임의의 부분 또는 단편이 본 원에 기술된 바와 같이 이용될 수 있음을 인식할 수 있을 것이다.
- [0061] 시험관내 조사에서, 보툴리눔 독소가 뇌줄기 조직의 일차 세포 배양물로부터 아세틸콜린 및 노르에피네프린 둘 모두의 칼륨 양이온 유도 방출을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 보툴리눔 독소는 척수 뉴런의 일차 배양물에서 글리신 및 글루타메이트의 유발 방출을 억제하고 뇌 시냅소솜에서 제제의 보툴리눔 독소가 신경 전달물질인 아세틸콜린, 도파민, 노르에피네프린, CGRP 및 글루타메이트의 각 방출을 억제하는 것으로 보고되었다.
- [0062] 상기 논의한 바와 같이, 보툴리눔 독소 공급원은 본 발명에서 중요치 않다. 그러나, 완벽을 기하기 위해, 본 발명자들은 특정의 보툴리눔 독소 제제에 대해 상업적 공급원을 비롯하여 각종 공급원이 용이하게 이용가능함을 밝히고자 한다.
- [0063] 예를 들어, BTX 또는 BTX 복합체는 발효기에서 클로스트리듐 보툴리눔의 배양물을 성립하여 증식시킨 후, 발효 혼합물을 공지된 절차에 따라 수거 및 정제하여 얻을 수 있다. 모든 보툴리눔 독소 혈청형은 먼저 프로테아제로 절단 또는 니킹되어(nicked) 신경 활성적으로 되는 불활성 단일 사슬 단백질로서 합성된다. 따라서, 보툴리눔 독소 혈청형 A 및 G가 내인성 프로테아제 및 혈청형 A 및 G를 지니도록 하는 박테리아 균주는 박테리아 배양물로부터 주로 그의 활성형으로 회수할 수 있다. 이에 반해, 보툴리눔 독소 혈청형 C<sub>1</sub>, D 및 E는 비단백질 분해 균주에 의해 합성되며, 따라서, 전형적으로는 배양물로부터 회수된 경우 불활성이다. 혈청형 B 및 F는 단백질 분해 및 비단백질 분해 균주 둘 다에 의해 합성되며, 따라서, 활성 또는 불활성 형태 모두로 수거할 수 있다. 그러나, 예를 들어, BTX-A 혈청형을 제공하는 단백질 분해 균주 조차도 전형적으로 생성된 독소의 일부만을 절단한다. 니킹 분자 대 비니킹 분자의 정확한 비율은 인큐베이션 길이 및 배양 온도에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 예를 들어, BTX-A 독소의 임의 제제의 특정 비율은 불활성일 가능성이 있다. 임상적 제제내 비활성 보툴리눔 독소 분자의 존재는 제제의 전체 단백질 적제에 기여할 것이며, 일부 시판 보툴리눔 독소 제제에서 그의 임상적 효능의 기여없이 항원성을 증가시키는데 관여하게 된다.
- [0064] 고급 결정성 보툴리눔 독소 A형은  $\geq 3 \times 10^7$  U/mg, 0.60 미만의  $A_{260}/A_{278}$  및 겔 전기영동상에 상이한 밴드 패턴의 특성을 갖는 클로스트리듐 보툴리눔의 홀(Hall) A 균주로부터 생성될 수 있다. 공지된 샐츠(Schantz) 방법을 이용하여 A형을 포함한 결정성 보툴리눔 독소를 얻을 수 있다(Shantz *et al*, 1992, *Microbiol. Rev.*, 56:80).
- [0065] 일반적으로, 보툴리눔 독소 복합체는 클로스트리듐 보툴리눔(예: A형)을 적절한 배지에서 배양함으로써 혐기성 배양으로 분리 및 정제할 수 있다. 비독소 단백질의 분리시 순수한 보툴리눔 독소, 예를 들어 특이적 효능이  $1-2 \times 10^8$  LD<sub>50</sub> U/mg 이상인 약 150 kD 분자량의 정제된 보툴리눔 독소 A형; 특이적 효능이  $1-2 \times 10^8$  LD<sub>50</sub> U/mg 이상인 약 156 kD 분자량의 정제된 보툴리눔 독소 B형; 및 특이적 효능이  $1-2 \times 10^7$  LD<sub>50</sub> U/mg 이상인 약 155 kD 분자량의 정제된 보툴리눔 독소 F형을 얻기 위해 공지된 방법을 이용할 수 있다.
- [0066] 선택적으로 또는 추가적으로, 기 제조된 정제된 보툴리눔 독소 및 독소 복합체를 예를 들어, 회사[(List Biological Laboratories, Inc., Campbell, Calif.; the Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, U.K.; Wako (Osaka, Japan) 및 Sigma Chemicals(St Louis, Mo. 소재)]로부터 입수할 수 있다.
- [0067] 순수한 보툴리눔 독소는 자유 용액으로 투여시에 불안정하여, 일반적으로 약제학적 조성물을 제조하는 데에는 사용되지 않는다. 또한, 독소 A형 복합체와 같은 보툴리눔 독소 복합체는 표면 변성, 열 및 알칼리 조건으로 인한 변성에 감수성일 수 있다. 일부 경우에 있어서, 비활성 독소는 면역원성일 수 있는 독소이드 단백질을 형성한다. 생성된 항체는 환자가 독소 주사에 불응일 수 있게 한다.
- [0068] 일부 구체예에 있어서, 본 발명은 현재 투여되고 있는 자유 용액에 비해 보툴리눔 독소의 안정성이 향상된 보툴리눔 독소 나노입자 조성물(예: 나노에멀전)을 제공한다. 즉, 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물에 존재하는 보툴리눔 독소는 적어도 부분적으로 열, 알칼리 조건, 산성 조건, 분해 효소, 숙주 유기체 항체 등의 적어도 하나의 불리한 조건으로부터 보호된다. 선택적으로 또는 추가적으로, 본 발명의 나노입자 조성물에 존재하는 보툴리눔 독소는 자유 용액중의 필적할만한 보툴리눔 독소 제제 보다 표면 변성을 덜 나타낼 수 있다. 특정 일례를 들자면, 본 발명에 따른 마이크로유동화 나노에멀전내 50 피코그램의 보툴리눔 독소가 표면 변성을 초래할 수 있는 특성의 약조건 등으로부터 보호될 것이다.
- [0069] 실제로, 본 발명의 일 측면은 보툴리눔 독소가 나노입자 조성물로 도입됨으로써 안정화될 수 있다는 견해를 포

함한다. 당업자들이라면 본 발명의 일 측면에 따른 나노입자 조성물이 임의의 이용가능한 수단으로 제조될 수 있음을 인정할 것이다.

[0070] 본 발명은 또한 현재 투여되고 있는 자유 용액에 비해 보툴리눔 독소의 피부 침투능이 향상된 보툴리눔 독소 나노입자 조성물(예: 나노에멀전)을 제공한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 마이크로유동화 나노에멀전내에 도입된 보툴리눔 독소는 상기 자유 용액에 비해 막 침투성이 향상되었다. 일 구체예에 있어서, 투여와 세포내 축적 간의 최소 시간은 투여 방법의 효능을 증가시키고 부작용을 감소시키게 된다.

[0071] 또한, 본 원에서 입증된 바와 같이, 본 발명은 보툴리눔 독소가 피부 구조를 변경 또는 파괴할 필요없이 피부를 관통할 수 있는 보툴리눔 독소 나노입자 조성물을 제공한다. 예를 들어, 생물학적 활성제의 국소 투여를 위한 상용화 기술은 관례적으로 적어도 피부 외층의 화학적, 물리적, 전기적 또는 다른 파괴를 필요로 한다. 이러한 파괴는 자극, 바람직하지 않은 의학적 부작용 및/또는 원치않는 미용적 결과를 야기할 수 있다. 본 발명은 피부에 투여시 피부를 상당한 수준 또는 현저하게 자극하지 않고/않거나 각질층을 침식시키지 않으면서 보툴리눔 독소를 피부에 침투시켜 생물학적 효과를 제공하도록 하는 보툴리눔 독소 나노입자 조성물을 제공한다.

[0072] 단백질과 마찬가지로, 일반적으로 보툴리눔 독소(세포내 펩티다제임)의 생물학적 활성은 세가지 치수 구조의 변화로 영향을 받을 수 있다. 요컨대, 보툴리눔 독소 A형은 열, 다양한 화학약품, 표면 연신 및 표면 건조에 의해 탈독소화될 수 있다. 또한, 공지된 배양, 발효 및 정제로 수득한 독소 복합체를 약제학적 조성물 제제에 사용되는 독소보다 훨씬 더 낮은 농도로 희석하는 것이 적절한 안정화제가 존재하지 않는 한 독소를 신속히 탈독소화시킬 수 있는 것으로 알려졌다. 밀리그램 양으로부터 밀리리터당 나노그램을 함유하는 용액으로의 독소의 희석은, 이와 같이 상당히 희석하는 경우 특정 독소가 급속히 손실되기 때문에, 상당한 난제를 부과한다. 독소는 독소 함유 약제학적 조성물이 제형화된 후, 수 개월 또는 수 년간 사용될 수 있기 때문에, 독소의 액체 제제는 알부민과 같은 안정화제와 함께 제형화되어야 한다.

[0073] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 보툴리눔 독소의 안정화된 제제를 제공한다. 본 발명의 제제 자체로 부여될 수 있는 추가의 안정성에도 불구하고, 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 추가의 안정화제의 사용이 구상된다. 예를 들어, 일부 구체예에 있어서, 적어도 하나의 추가의 단백질이 보툴리눔 독소와 함께 사용된다. 일부 구체예에 있어서, 이러한 추가의 단백질은 알부민을 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 이러한 추가의 단백질은 보툴리눔 독소 복합체에서 자연적으로 발견되는 하나 이상의 단백질을 포함한다. 실제로, 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 완전한 보툴리눔 독소 복합체가 사용된다. 이러한 일부 구체예에 있어서, 알부민이 또한 사용된다. 따라서, 일부 구체예에 있어서, 본 발명은 알부민을 포함하는 보툴리눔 마이크로유동화 나노에멀전을 제공한다.

[0074] 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 사용된 보툴리눔 독소는 BOTOX<sup>®</sup>이다. BOTOX<sup>®</sup>은 멸균 진공 건조 형태로 패키징된 정제된 보툴리눔 독소 A형 복합체, 알부민 및 염화나트륨으로 구성된다.

[0075] BOTOX<sup>®</sup>에 존재하는 보툴리눔 독소 A형은 N-Z 아민 및 효모 추출물을 함유하는 배지에서 증식시킨 클로스트리듐 보툴리눔 홀 균주의 배양으로 제조된다. 보툴리눔 독소 A형 복합체는 배양 용액으로부터 고 분자량 활성 독소 단백질 및 관련 적혈구 응집소 단백질로 이루어진 결정성 복합체로의 일련의 산 침전으로 정제된다. 결정성 복합체는 식염수 및 알부민을 함유하는 용액중에 재용해되어 진공 건조전에 멸균 여과(0.2 미크론)된다. BOTOX<sup>®</sup>은 근육내 주사전에 멸균 비보존 식염수로 재구성될 수 있다. 각 바이알의 BOTOX<sup>®</sup>은 약 100 유닛(U)의 클로스트리듐 보툴리눔 독소 A형 정제 신경 독소 복합체, 0.5 밀리그램의 인간 혈청 알부민 및 0.9 밀리그램의 염화나트륨을 보존제없이 멸균 진공 건조 형태로 함유한다.

[0076] 현재, BOTOX<sup>®</sup>은 보통 주사로 투여하기 위해 0.9% 염화나트륨으로 재구성된다. BOTOX<sup>®</sup>은 기포화 또는 유사한 심한 요동으로 변성될 수 있기 때문에, 희석제는 바이알에 서서히 주입된다. 자유 용액으로서 BOTOX<sup>®</sup>은 재구성 후 4 시간내에 투여할 것을 권장한다. 또한, 재구성과 주사 사이에, 재구성된 BOTOX<sup>®</sup>을 냉장고(즉, 예를 들어, 2 내지 8 °C)에서 보관할 것도 권장한다. 재구성된 BOTOX<sup>®</sup>은 투명하고 무색이며 특정 물질을 갖지 않는다.

[0077] BOTOX<sup>®</sup>은 다음과 같이 임상적 환경에서 사용된다고 보고되었다:

[0078] (1) 경부 근긴장 이상을 치료하는 경우, 근육내 주사(다발성 근육)당 BOTOX<sup>®</sup> 약 75 내지 125 유닛;

- [0079] (2) 미간 사이 주름(이마 주름)을 치료하는 경우, 근육내 주사당 BOTOX<sup>®</sup> 5 내지 10 유닛(눈살근으로 5 유닛 근육내 주사 및 각 눈썹 주름근으로 10 유닛 근육내 주사);
- [0080] (3) 두덩골 창자근의 조음근내 주사에 의해 변비를 치료하는 경우, BOTOX<sup>®</sup> 약 30 내지 80 유닛;
- [0081] (4) 상안검의 외측 검관전부 눈둘레근 및 하안검의 외측 검관전부 눈둘레근에 주사하여 안검 경련을 치료하는 경우, 근육당 근육내 주사되는 BOTOX<sup>®</sup> 약 1 내지 5 유닛;
- [0082] (5) 사시 치료를 위해, 바깥 눈근육에 약 1 내지 5 유닛의 BOTOX<sup>®</sup>이 근육내로 주사되며, 주사량은 주사될 근육의 크기와 소정 근육 마비 정도(즉, 소정 디옵터 교정량)에 따라 달라진다.
- [0083] (6) BOTOX<sup>®</sup>을 다섯군데의 상이한 팔 굽힘근에 근육내 주사하여 뇌졸중후 팔 경직을 치료하기 위해 다음 사항을 수행한다:
- [0084] (a) 깊은 손가락 굽힘근: 7.5 U 내지 30 U
- [0085] (b) 얇은 손가락 굽힘근: 7.5 U 내지 30 U
- [0086] (c) 자쪽 손목 굽힘근: 10 U 내지 40 U
- [0087] (d) 노쪽 손목 굽힘근: 15 U 내지 60 U
- [0088] (e) 위팔 두갈래근: 50 U 내지 200 U.
- [0089] 제시된 다섯개의 각 근육은 동일한 치료적 만남으로 주사하여 각 치료 만남에서 환자의 팔 굽힘근 근육에 90 U 내지 360 U의 BOTOX<sup>®</sup>을 근육내 주사한다.
- [0090] (7) 편두통을 치료하기 위해, 두개골막 주입된(미간근, 이마근 및 측두근에 전신적으로 주입) 25 U의 BOTOX<sup>®</sup> 주사는 25 U를 주사하고 3 개월 경과후 편두통 빈도, 최대 중증성, 수반 구토 및 급성 약물치치의 척도 감소로 측정된 바와 같이, 편두통의 예방적 치료로서 비히클에 비해 상당한 이점을 나타낸다.
- [0091] 본 발명은 BOTOX<sup>®</sup>을 함유하는 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물이 독소의 경피적 전달을 위해 피부에 도포되는 크림에 혼입되는 경우, 대략 동일한 BOTOX<sup>®</sup>을 함유하는 보툴리눔 독소 용액을 주사하여 조직학적으로 관찰한 것에 견줄만 한 생물학적 결과(즉, 주름 감소)를 이루는 것으로 증명되었다.
- [0092] 보툴리눔 독소 A형의 호의적인 임상적 반응은 다른 보툴리눔 독소 혈청형에 관심을 이끌어 냈다. 두개의 상용화된 보툴리눔 A형 제제(BOTOX<sup>®</sup> 및 DYSPORT<sup>®</sup>) 및 보툴리눔 독소 B 및 F형 제제(둘 다 Wako Chemicals(Japan)로부터 입수가가능)에 대해 국소 근 약화 효능, 안정성 및 항원성 잠재성을 결정하기 위한 조사가 이루어졌다. 보툴리눔 독소 제제를 우측 장딴지근 상위(0.5 내지 200.0 유닛/kg)에 주사하고, 마우스 발가락 외전 점수화(DAS) 분석을 이용하여 근 약화를 평가하였다. 용량 반응 곡선으로부터 ED<sub>50</sub> 값을 계산하였다.
- [0093] 추가의 마우스에 LD<sub>50</sub> 용량 결정을 위해 근육내 주사를 행하였다. 치료 지수를 LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>으로 계산하였다. 상이한 마우스군의 뒷다리에 BOTOX<sup>®</sup>(5.0 내지 10.0 유닛/kg) 또는 보툴리눔 독소 B형(50.0 내지 400.0 유닛/kg)을 주사하고, 근 약화 및 수분 소비량 증가에 대해 조사하였는데, 후자는 구강 건조에 대한 잠정 모델이다. 토끼에 매 달 근육내 주사하여 항원 잠재성을 평가하였다(보툴리눔 독소 B형에 대해서는 1.5 또는 6.5 ng/kg 또는 BOTOX<sup>®</sup>에 대해서는 0.15 ng/kg). 근 약화 및 기간 피크는 모든 혈청형에 있어서 용량 관련적이었다.
- [0094] DAS ED<sub>50</sub> 값(유닛/kg)은 다음과 같다: BOTOX<sup>®</sup>: 6.7, DYSPORT<sup>®</sup>: 24.7, 보툴리눔 독소 B형: 27.0 내지 244.0, 보툴리눔 독소 F형: 4.3. BOTOX<sup>®</sup>은 보툴리눔 독소 B형 또는 보툴리눔 독소 F형보다 작용 기간이 더 길었다. 치료 지수값은 다음과 같다: BOTOX<sup>®</sup>: 10.5, DYSPORT<sup>®</sup>: 6.3, 보툴리눔 독소 B형: 3.2. 수분 소비량은 보툴리눔 독소 B형이 근 약화에 덜 효과적일지라도, BOTOX<sup>®</sup>이 주입된 경우보다 보툴리눔 독소 B형이 주입된 마우스에서 더 컸다. 주입하고 4 개월 후, 4 마리중 2 마리(1.5 ng/kg로 처리됨) 및 4 마리중 4 마리(6.5 ng/kg로 처리됨)의

토끼에서 보툴리눔 독소 B형에 대한 항체가 생성되었다. 별도의 조사에서, 9 마리의 BOTOX<sup>®</sup> 처리된 토끼에서 보툴리눔 독소 A형에 대한 항체가 입증된 것은 없었다. DAS 결과는 보툴리눔 독소 A형의 상대 피크 효능이 보툴리눔 독소 F형과 동등하고, 보툴리눔 독소 F형이 보툴리눔 독소 B형 보다 크다는 것을 제시한다. 효과 기간에 있어서, 보툴리눔 독소 A형은 보툴리눔 독소 B형보다 길고, 보툴리눔 독소 B형의 효과 기간은 보툴리눔 독소 F형 보다 길다. 치료 지수값으로부터 알 수 있는 바와 같이; 보툴리눔 독소 A형의 두가지 상용화 제제(BOTOX<sup>®</sup> 및 DYSPORT<sup>®</sup>)는 상이하다. 보툴리눔 독소 B형을 뒷다리에 주사한 후 관찰된 수분 소비량 증가 행태는 이러한 혈청형의 임상적으로 유의적인 양이 묶린 전신 순환계로 유입된 것으로 나타났다. 결과는 또한 보툴리눔 독소 A형에 견줄만 한 효능을 이루기 위해서는, 조사한 다른 혈청형의 용량을 증가시키는 것이 필요하다는 것도 제시한다. 그러나, 용량 증가는 안정성을 해칠 수 있다. 또한, 토끼에서, B형은 BOTOX<sup>®</sup> 보다 항원성인데, 이는 아마도, 보툴리눔 독소 B형의 유효한 용량을 이루기 위해 주입된 고 단백질 적제량 때문인 것으로 보인다. [*Eur J Neurol* 6(Suppl 4):S3-S10 (1999)].

[0095] 본 원에서 제시한 바와 같이, 본 발명은 임의 혈청형의 보툴리눔 독소의 용도를 대상으로 한다. 당업자들이라면 특정 용도를 위한 특정 혈청형의 적절성을 용이하게 평가할 수 있을 것이며, 본 원의 기술에 따라, 이러한 보툴리눔 독소를 함유하는 나노입자 조성물을 제조할 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명은 보툴리눔 독소 단백질만을 함유하는 조성물 및 하나 또는 기타 단백질을 함유하는 조성물을 비롯하여, 임의 혈청형의 보툴리눔 독소를 함유하는 나노입자 조성물을 제공한다. 일부 구체예에 있어서, 이러한 기타 단백질은 알부민을 포함하거나 이로 구성되고; 일부 구체예에 있어서는, 보툴리눔 독소 복합체가 사용된다.

[0096] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 상업적으로 입수가능한 보툴리눔 독소의 공급원은 BOTOX<sup>®</sup>, DYSPORT<sup>®</sup>(인간 혈청 알부민 및 락토스를 함유한 클로스트리듐 보툴리눔 A형 독소 적혈구 응집소 복합체; Ispen Limited, Berkshire U.K.) 및/또는 MYOBLOC<sup>®</sup>(보툴리눔 독소 B형, 인간 혈청 알부민, 숙신산나트륨 및 염화나트륨으로 구성된 주사용 용액(pH 5.6), Elan Pharmaceuticals, Dublin, Ireland) 등을 포함하나, 이들로만 한정되지 않는다.

[0097] 나노입자 조성물

[0098] 본 원에 개시된 바와 같이, 본 발명은 특히, 보툴리눔 독소를 함유하는 나노입자 조성물을 비롯한 나노입자 조성물인 조성물을 제공한다.

[0099] 일반적으로, 나노입자 조성물은 적어도 하나의 나노입자를 포함하는 임의의 조성물이다. 보툴리눔 나노입자 조성물은 보툴리눔 독소를 함유하는 나노입자 조성물이다. 보툴리눔 독소는 캡슐화되거나 또는 하나 이상의 나노입자로 완전히 포위되며; 나노입자 계면과 화합되고/되거나; 하나 이상의 나노입자의 외면상에 흡착될 수 있다. 보툴리눔 독소는 나노입자 및/또는 나노입자 조성물에 공유적으로 결합되거나 결합되지 않을 수 있다; 보툴리눔 독소는 흡착력에 의해 나노입자 및/또는 나노입자 조성물에 부착되거나 부착되지 않을 수 있다.

[0100] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물은 나노입자의 균일한 집합체이다. 예를 들어, 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물내 나노입자의 최소 직경과 최대 직경간의 차이는 약 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50 또는 그 미만의 nm를 넘지 않는다.

[0101] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)의 직경은 약 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 130, 120, 115, 110, 100, 90, 80 nm 또는 그 미만보다 작다.

[0102] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)의 직경은 약 10 내지 약 600 나노미터 범위내이다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자의 직경은 약 10-300, 10-200, 10-150, 10-130, 10-120, 10-115, 10-110, 10-100, 또는 10-90 nm 범위내이다.

[0103] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물내 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)의 평균 입경은 약 300, 250, 200, 150, 130, 120, 또는 115, 110, 100, 또는 90 nm 아래이다. 일부 구체예에 있어서, 평균 입경은 약 10- 300, 50-250, 60-200, 65-150, 70-130 nm 범위내이다. 일부 구체예에 있어서, 평균 입경은 약 80-110 nm 이다. 일부 구체예에 있어서, 평균 입경은 약 90-100 nm 이다.

[0104] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 조성물내 대다수 입자(예: 보툴리눔 독소 함유 입자)는 직경이 제시된 크기보다 작거나, 제시된 범위내에 든다. 일부 구체예에 있어서, 대다수는 조성물중 입자가 50%, 60%, 70%, 75%, 80%,

85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 그 이상을 초과한다.

- [0105] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물은 실질적으로 직경이 120 nm를 초과하는 입자를 갖지 않는다. 특히, 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물에서 나노입자의 50% 미만이 120 nm를 초과하는 직경을 갖는다. 일부 구체예에 있어서, 입자의 25% 미만이 120 nm를 초과하는 직경을 갖는다. 일부 구체예에 있어서, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 이하 또는 그 미만의 입자가 120 nm를 초과하는 직경을 갖는다. 또한, 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물중의 나노입자는 직경이 10-120 nm 범위내이다.
- [0106] 영 전위(Zeta potential)는 전단면에서 전기 전위의 척도이다. 전단면은 고체 표면(예를 들어, 본 발명의 나노입자의 표면)에 결합된 액체의 박층을 분리하고, 정상적인 점성 거동을 나타내는 나머지 액체(예: 액체 분산 매질)로부터의 탄성 거동을 보여주는 가상면이다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자는 영 전위가 -50 mV 내지 +50 mV 범위이다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자는 영 전위가 -25 mV 내지 +25 mV 범위이다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자는 영 전위가 -10 mV 내지 +10 mV 범위이다.
- [0107] 본 발명의 나노입자 조성물은 전형적으로 에멀전 또는 분산물이다. 일부 구체예에 있어서, 조성물은 "수중유" 분산물(즉, 유성 입자가 수성 분산 매질내에 분산된 분산물)이며; 일부 구체예에 있어서, 조성물은 "유중수" 분산물(즉, 수성 입자가 유성 분산 매질내에 분산된 분산물)이다.
- [0108] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물은 독성 용매를 필요로 하지 않는다. 이에 반해, 조성물중에서 나노입자의 형성을 유도하기 위한 대부분의 통상적인 방법은 독성(전형적으로 유기) 용매를 사용한다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물은 중합체를 필요로 하지 않는다. 이에 반해, 나노입자 구조물을 함유하는 조성물을 제조하기 위한 대부분의 통상적인 방법은 중합체를 필요로 한다.
- [0109] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물은 다른 나노입자 조성물 보다 조직 흡수성이 더 좋고/종거나 생체적합성이 더 좋다. 예를 들어, 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물은 하나 이상의 독성(예: 유기) 용매를 사용하고/하거나 하나 이상의 중합체를 사용하는 균일하지 않은 나노입자 조성물 보다 조직 흡수성이 더 좋고/종거나 생체적합성이 더 좋다.
- [0110] 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물(예: 보툴리눔 나노입자 조성물)은 안정하다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 안정한 나노입자 조성물은 평균 입경, 최대 입경, 입경 범위 및/또는 입경 분포(즉, 지정된 크기를 초월하고/하거나 지정된 크기 범위를 벗어나는 입자 비율)가 일정 기간 유지되는 것이다. 일부 구체예에 있어서, 기간은 적어도 약 1 시간이다; 일부 구체예에 있어서 기간은 약 5 시간, 10 시간, 일(1) 일, 일(1) 주, 이(2) 주, 일(1) 개월, 이(2) 개월, 삼(3) 개월, 사(4) 개월, 오(5) 개월, 육(6) 개월, 팔(8) 개월, 십(10) 개월, 십이(12) 개월, 이십사(24) 개월 또는 그 이상일 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 기간은 약 일(1) 일 내지 이십사(24) 개월, 이(2) 주 내지 십이(12) 개월, 이(2) 개월 내지 오(5) 개월 등의 범위내이다. 예를 들어, 나노에멀전 입자군이 장기 저장, 온도 변화 및/또는 pH 변화에 놓이게 되고, 군내 대다수 나노입자가 지정된 범위 내에서(즉, 예를 들어, 약 10 내지 120 nm 사이) 직경을 유지하면, 나노입자 조성물은 안정하다. 일부 이들 군에서, 대다수는 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 그 이상을 초과한다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물이 보툴리눔 독소 및/또는 적어도 하나의 다른 생물학적 활성제를 함유하는 경우, 생물학적 활성제(예: 보툴리눔 독소)의 농도가 지정된 조건하에서 조성물중에 지정된 기간에 걸쳐 유지된다면 나노입자 조성물은 안정한 것으로 사료된다.
- [0111] 본 원에 설명된 바와 같이, 본 발명의 나노입자 조성물은 다양한 의료, 미용 및 기능 식품 응용에 유용하다. 이러한 조성물은 대상에 주사, 경구 전달, 경피적 전달 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 임의의 이용가능한 경로로 전달될 수 있다. 특정 구체예에 있어서, 조성물은 주사로 전달된다. 특정의 구체예에 있어서, 조성물은 경피적으로 전달된다.
- [0112] 주목해야 할 것은 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물이 설명된 다른 보툴리눔 독소 함유 조성물과 용이하게 구별이 가능하다는 것이다. 예를 들어, 도노반(Donovan)은 보툴리눔 독소가 경피적 전달을 위해 지질 소포에 혼입된 체제를 개시하였다(US 공개 제2004/0009180호). 이러한 소포는 또한 피부를 통한 보툴리눔 독소의 흡수를 촉진하기 위해 증진제, 예컨대 알콜의 도입을 필요로 한다. 도노반은 또한 지질 및 막 연화제를 함유하는 변형성 담체인 트랜스페로솜에 도입된 신경 독소를 개시하였다(Hofer *et al*, 2000, *World J. Surg.*, 24:1187; 및 US 특허 제6,165,500호). 도노반은 특히 포스파티딜 콜린+보툴리눔 독소가 함유된 소듐 콜레이트 리포솜의 체제를 개시하였다.

- [0113] 수반프란코른 등(Suvanprakorn et al.)은 또한 분리된 마크로-비드중에 리포솜-캡슐화된 물질의 현탁액을 개시 하였으며; 사실상 캡슐화 개량된 것으로 말할 수 있는 수백 화합물중 하나가 "BOTOX<sup>®</sup>"(US 공개 제2004/0224012 호)이다. 이들 다중관 소포 리포솜의 제조를 대상으로 하는 방법에는 동결건조/재수화 및 유기 용액 탈수/수성 재수화가 포함된다. 이들 리포솜의 통상적인 제조방법은 마이크로입자 크기의 소포를 제공할 것으로 기대된다.
- [0114] 나노입자 조성물의 제조방법
- [0115] 일반적으로, 본 발명의 나노입자 조성물(예: 보툴리눔 나노입자 조성물)은 임의의 이용가능한 방법으로 제조될 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 화학적 수단으로 제조된다. 그러나, 화학적 수단은 독성(전형적으로 유기) 용매를 필요로 하는 경우가 빈번하다; 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 본 발명에 따라 이러한 용매를 사용하지 않고 제조된다.
- [0116] 본 발명의 특정 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 예비혼합물을 제조하고, 이 예비혼합물을 고 전단력에 적용함으로써 제조된다. 본 원에서 사용된 용어 "전단력"은 물질면에 수직인 힘에 대립되는 물질면과 평행한 힘을 의미한다.
- [0117] 당업계에서 임의의 방법이 고 전단력을 생성하기 위해 이용될 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 캐비테이션이 고 전단력을 생성하기 위해 이용된다. 본 발명에 따라, 기계 에너지(즉, 고 전단력)의 이용은 값비싸고/비싸거나 독성인 화학 용매를 사용하기 위한 임의의 요건을 대체 또는 최소화할 수 있고; 나노입자 조합 속도를 증가시킬 수 있으며; 특정 성분 믹스에서 발생한 나노입자의 수율을 증가시킬 수 있고/있거나, 나노에멀전 조성물을 제조 하는데 드는 총 비용을 상당히 감소시킬 수 있다. 또한, 생물학적 활성제(예: 보툴리눔 독소)와 같은 약제가 본 발명의 나노입자 조성물에 도입되는 구체예에 있어서, 고 전단력의 사용은 나노입자를 형성하는 종래 방법에 비해 나노입자의 적재 용량을 증가시킬 수 있다. 종래 방법에서, 나노입자내 또는 그 표면에 약제의 적재는 전형적으로 나노입자내 및/또 표면으로의 약제의 확산에 좌우된다. 본 발명에 따라 고 전단력을 사용함으로써 나노입자 조성물중에 보다 소형인(예: 평균적으로) 입자의 제조 및/또는 보다 좁은 입경 분포가 가능해 진다.
- [0118] 일부 구체예에 있어서, 고 전단력은 고압 노출, 예를 들어 고압, 예컨대 약 15,000 psi에서 연속 난류로 이루어 진다. 일부 구체예에 있어서, 이러한 고압은 약 18,000 내지 약 26,000 psi의 범위내이다; 일부 구체예에 있어서, 이는 약 20,000 내지 25,000 psi의 범위내이다.
- [0119] 일부 구체예에 있어서, 고 전단력 또는 고압은 캐비테이션 또는 고압 균질화로 적용될 수 있다.
- [0120] 일부 구체예에 있어서, 고 전단력은 예를 들어, Microfluidizer<sup>®</sup> 처리 장치(Microfluidics Corporation/MFIC Corporation) 또는 다른 유사 장치와 같은 장비에 통과시켜 시행할 수 있다. Microfluidizer<sup>®</sup> 처리 장치는 생산물을 나노스케일 범위로 크기가 감소되도록 마이크로채널을 통해 고속으로 가속화함으로써 고압 및 그에 따른 고전단 속도를 제공한다. 유체는 둘로 분리되고 고속(50-300 m/s 범위)에서 75 미크론 정도의 전형적인 치수로 마이크로채널을 통해 추진된다. 유체는 마이크로채널로부터 유출될 때, 반대 마이크로채널로부터의 제트와 상충 하는 제트를 형성한다. 채널에서 유체는 통상의 기술보다 높은 차수인 고전단( $10^7$  1/s 이하)을 겪게 된다. 제트 상충은 서브미크론 수준의 혼합을 일어나게 한다. 따라서, 고 전단 및 충격은 Microfluidizer<sup>®</sup> 기술에서 입경 축소 및 다중상 유체의 혼합에 관여한다.
- [0121] 보다 일반적으로, 마이크로유동화기는 단일 작용 증압 펌프의 동력을 공급하는 임의의 장치일 수 있다. 증압 펌프는 수압을 채택한 수준으로 증폭시키며, 차례로 산출 스트림에 압력을 부여하게 된다. 펌프가 그의 압력 행정을 통해 이동함에 따라, 산물은 상호작용하는 챔버를 통해 일정압으로 추진된다. 상호작용하는 챔버내에 산물 스트림이 고속으로 가속화되어 고 전단 및 충격력이 창출됨으로써 고속 산물 스트림이 자체 및 내마모성 표면에 충돌함에 따라 균일한 나노입자 조성물(예: 나노에멀전)을 생성할 수 있는 고정된 기하구조의 마이크로채널이 특수 설계된다.
- [0122] 증압 펌프가 그의 압력 행정을 끝마치게 되면, 반전하여 새로운 용적의 산물을 유인하게 된다. 흡기 행정끝에, 이는 다시 반전하여 일정 압력으로 산물을 유인함으로써 과정을 반복하게 된다.
- [0123] 상호작용하는 챔버로부터 유출된 산물은 소정 온도로 산물을 조절하는 탑재된 열 교환기를 통해 유동한다. 이 때, 산물은 추가의 처리를 위해 시스템을 통해 재순환되거나, 공정 다음 단계로 외부로 향할 수 있다(US 특허 제4,533,254호; 및 4,908,154호).

- [0124] 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 샘플은 약 10 분 미만의 기간동안 고 전단력 노출을 통해 "마이크로유동화"된다. 일부 구체예에 있어서, 기간은 약 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 분 미만이다. 일부 구체예에 있어서, 기간은 약 1 내지 2 분 이하이다; 일부 구체예에 있어서, 기간은 약 30 초이다.
- [0125] 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 샘플은 고 전단력의 단일 노출을 통해 "마이크로유동화"된다; 이러한 구체예는 본원에서 "단일 패스" 마이크로유동화로 언급된다.
- [0126] 본 발명은 예비혼합물을 고 전단력에 적용하는 것이 나노입자 조성물, 및 특히 균일한 나노입자 조성물을 생성할 수 있다는 견해를 포함한다.
- [0127] 일반적으로, 고 전단력 인가를 통해 본 발명의 나노입자 조성물이 제조되는 예비혼합물은 적어도 2종의 불혼화성 물질을 함유하는 것으로 예상되며, 이중 하나는 분산 매질[즉, 입자(예: 나노입자)가 최종 나노입자 조성물 내에 분산되어 있는 액체 매질]을 구성한다. "수중유" 분산물은 유성 입자가 수성 분산 매질 내에 분산되어 있는 것이다. "유중수" 분산물은 수성 입자가 유성 분산 매질 내에 분산되어 있는 것이다. 당업자들이라면 분산물이 임의의 두 불혼화성 매질로부터 형성될 수 있으며, 수성 및 유성 매질의 배합으로만 엄격히 제한되는 것으로 한정되지 않음을 이해할 것이다. 따라서, "분산 매질"이란 용어는 "수성" 및 "유성" 범주로 언급되는 것이 통상적이지는 않지만, 포괄적으로 어떤 분산 매질에도 적용된다.
- [0128] 따라서, 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 예비혼합물은 수성 분산 매질과 분산 매질중에 나노입자 형태로 분산되기 시작하는 유성 매질을 함유할 것이다; 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 예비혼합물은 유성 분산 매질과 유성 분산 매질중에 나노입자 형태로 분산되기 시작하는 수성 매질을 함유한다.
- [0129] 당업자들은 본 발명에 따라 분산될 매질 또는 분산 매질로서 사용될 수 있는 적절한 수성 매질을 알 수 있을 것이다. 이와 같은 수성 매질로서 대표적인 것으로는 예를 들어, 물, 식염수(인산염 완충 염수를 포함함), 주사용수, 단쇄 알콜, 5% 텍스트로즈, 링거액(유산 첨가 링거 주사액, 유산 첨가 링거+5% 텍스트로즈 주사액, 아실화 링거 주사액), 노모솔-M(Normosol-M), 이솔리트 E(Isolyte E) 등 및 이들의 배합물을 포함한다.
- [0130] 당업자들이라면 또한 본 발명에 따라 분산될 매질 또는 분산 매질로서 사용될 수 있는 적절한 유성 매질도 알 수 있을 것이다. 이와 같은 유성 매질로서 대표적인 것으로는 예를 들어, 포화 및 불포화 아몬드, 살구 핵(apricot kernel), 아보카도, 바바수 야자, 베르가못, 블랙 커런트(black current) 씨, 보리지(borage), 케이드(cade), 카모밀, 캐놀라, 캐러웨이(caraway), 카나우바, 캐스터(castor), 신나몬, 코코아 버터, 코코넛, 대구간, 커피, 옥수수, 목화 씨, 에뮤(emu), 유칼립투스, 달맞이꽃, 어류, 아마인, 게라니올, 호리병박(gourd), 포도 씨, 헤이즐 너트, 히습(hyssop), 호호바, 쿠쿠이 너트, 라반딘, 라벤더, 레몬, 리치아 쿠베바(litsea cubeba), 메카데미아 너트(macademia nut), 맬로우(mallow), 망고 씨, 메도우폼 씨(meadowfoam seed), 밍크, 육두구(nutmeg), 올리브, 오렌지, 오렌지 러피(orange roughy), 팜, 팜 핵, 복숭아 핵, 땅콩, 양귀비 씨, 호박 씨, 평지씨, 쌀겨, 로즈마리, 홍화, 백단, 사스쿠아나(sasquana), 세이버리(savoury), 시 벉톤(sea buckthorn), 참깨, 쉐어 버터(shea butter), 실리콘, 대두, 해바라기, 티 트리(tea tree), 엉겅퀴, 추바키(tsubaki), 벤티버(vetiver), 월넛 및 맥아유; 부틸 스테아레이트; 카프릴산 트리글리세리드; 카프르산 트리글리세리드; 시클로메티콘; 디에틸 세바케이트; 디메티콘 360; 이소프로필 미리스테이트; 광유; 옥틸도데칸올; 올레일 알콜; 실리콘 오일; 및 이들의 배합물이 포함된다.
- [0131] 2종의 불혼화성 매질외에, 본 발명에 따른 예비혼합물은 예를 들어, 하나 이상의 생물학적 활성제(예: 보툴리눔 독소) 및/또는 하나 이상의 계면활성제 또는 유화제를 포함할 수 있다. 이러한 계면활성제 또는 유화제로 적합한 것으로는 포스포글리세리드; 포스파티딜콜린; 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC); 디올레일포스파티딜 에탄올아민(DOPE); 디올레일옥시프로필트리에틸암모늄(DOTMA); 디올레일포스파티딜콜린; 콜레스테롤; 콜레스테롤 에스테르; 디아실글리세롤; 디아실글리세롤숙시네이트; 디포스파티딜 글리세롤(DPPG); 헥산데칸올; 지방 알콜, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG); 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르; 계면 활성 지방산, 예컨대 팔미트산 또는 올레산; 지방산; 지방산 모노글리세리드; 지방산 디글리세리드; 지방산 아미드; 소르비탄 트리올레에이트(Span 85) 글리코콜레이트; 소르비탄 모노라우레이트(Span 20); 폴리소르베이트 20(Tween-20); 폴리소르베이트 60(Tween-60); 폴리소르베이트 65(Tween-65); 폴리소르베이트 80(Tween-80); 폴리소르베이트 85(Tween-85); 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트; 서파틴; 폴록소머; 소르비탄 지방산 에스테르, 예컨대 소르비탄 트리올레에이트; 레시틴; 리소레시틴; 포스파티딜세린; 포스파티딜이노시톨; 스펅고미엘린; 포스파티딜에탄올아민(세팔린); 카디올리핀; 포스파티드산; 세레브로시드; 디세틸포스페이트; 디팔미토일포스파티딜글리세롤; 스테아릴아민; 도데실아민; 헥사데실아민; 아세틸 팔미테이트; 글리세롤 리시놀레에이트; 헥사데실 스테아레이트; 이소프로필 미리스테이트; 티록사폴; 폴리(에틸렌 글리콜)5000-포스파티딜에탄올아민; 폴리(에틸렌 글리콜)400-모노스테아

레이트; 포스포리피드; 고 계면활성제 성질을 띠는 합성 및/또는 천연 세정제; 테옥시콜레이트; 시클로텍스트린; 카오토로픽(chaotropic) 염; 이온 쌍화제; 및 이들의 배합물을 들 수 있으나 이들로만 한정되지 않는다. 계면활성제 성분은 상이한 계면활성제의 혼합물일 수 있다. 이들 계면활성제는 천연 재료로부터 추출 및 정제될 수 있거나, 실험실에서 합성적으로 제조될 수 있다. 바람직한 구체예에 있어서, 계면활성제는 시판되는 것이다.

[0132] 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 최종 나노입자 조성물중에 존재하는 모든 성분들은 예비혼합물에 존재하며, 나노입자 조성물을 생성하기 위해 고 전단력에 적용된다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 최종 나노입자 조성물중에 존재하는 성분중 하나 이상이 예비혼합물로부터 배제되고/되거나 최종 나노입자 조성물에서 보다 예비혼합물에 소량으로 존재한다. 즉, 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 예비혼합물이 고 전단력에 적용된 후, 하나 이상의 물질이 나노입자 조성물에 첨가된다.

[0133] 본 발명의 특정 구체예에 있어서, 예비혼합물은 고 전단력 적용전에 용액으로 제조된다. 특히, 적어도 하나의 생물학적 활성제(예: 보툴리눔 독소)를 포함하는 나노입자 조성물의 경우, 고 전단력 적용전에 생물학적 활성제를 예비혼합물에 용해시키는 것이 바람직한 경우가 종종 있다. 요컨대, 많은 구체예에 있어서, 생물학적 활성제는 적어도 하나의 매질(또는 예비혼합물에 사용된 매질의 배합물)에 가용성이다. 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 이러한 용해는 가열을 필요로 하며; 다른 구체예에 있어서는 행해지지 않는다.

[0134] 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 예비혼합물 성분은 고 전단력 적용전에 입자로 조립될 수 있다. 이러한 입자의 적어도 일부는 마이크로입자 또는 심지어 나노입자일 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 나노입자 조성물은 예비혼합물로부터 제조되며, 이 예비혼합물은 현탁액 또는 마이크로에멀전을 포함하는 군 중에서 선택된다. 그러나, 일부 구체예에 있어서, 입자 구조물은 고 전단력 적용전에 예비혼합물에서 형성되지 않는다.

[0135] 본 발명의 특정 구체예에 있어서, 예비혼합물 성분들의 상대적인 양은 소정 특성을 지니는 나노입자를 생성하도록 선택되거나 조정된다. 일부 구체예에 있어서, 예비혼합물은 오일 및 계면활성제를 0.5 내지 10 범위의 비로 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 오일 대 계면활성제의 비는 약 0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 또는 10:1 이다. 일부 구체예에 있어서, 계면활성제 대 오일의 비는 약 0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 또는 10:1 이다. 일부 구체예에 있어서, 예비혼합물은 오일 및 계면활성제를 0.5 내지 2 범위의 비로 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 오일 대 계면활성제의 비는 약 0.5:1, 1:1, 또는 2:1 이다. 일부 구체예에 있어서, 계면활성제 대 오일의 비는 약 0.5:1, 1:1 또는 2:1 이다. 특정의 구체예에 있어서, 오일 대 계면활성제의 비는 약 1:1 이다.

[0136] 일부 구체예에 있어서, 예비혼합물내 오일의 비율은 0% 내지 30% 범위이다. 일부 구체예에 있어서, 예비혼합물내 오일의 비율은 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% 또는 30% 이다. 일부 구체예에 있어서, 오일의 비율은 약 8% 이다. 일부 구체예에 있어서 오일의 비율은 약 5% 이다.

[0137] 일부 구체예에 있어서, 예비혼합물내 계면활성제의 비율은 0% 내지 30% 범위이다. 일부 구체예에 있어서 예비혼합물내 계면활성제의 비율은 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% 또는 30% 이다. 일부 구체예에 있어서 계면활성제의 비율은 약 8% 이다. 일부 구체예에 있어서 계면활성제의 비율은 약 5% 이다.

[0138] 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 2 이상의 오일을 함유하지 않는다. 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 2 이상의 오일을 포함할 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 2 이상의 계면활성제를 함유하지 않는다. 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 2 이상의 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0139] 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 필수적으로 물, 오일, 계면활성제 및 보툴리눔 독소로 구성된다. 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 필수적으로 물, 오일, 계면활성제, 적어도 하나의 보툴리눔 독소 및 나노입자 조성물을 생성 및/또는 보존하기 위한 적어도 하나의 물질(예: 단백질, 염 등)로 구성된다.

[0140] 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 물, 오일, 계면활성제 및 보툴리눔 독소로 구성된다. 일부 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 물, 오일, 계면활성제, 적어도 하나의 보툴리눔 독소 및 나노입자 조성물을 생성 및/또는 보존하기 위한 적어도 하나의 물질(예: 단백질, 염 등)로 구성된다.

[0141] 나노입자 조성물의 투여방법

[0142] 본 발명은 예를 들어, 미용학적, 기능 식품학적 및 의학적 응용을 비롯하여 다양한 응용을 위해 나노입자 조성

물(예: 보툴리눔 나노입자 조성물)을 전달하는 방법을 제공한다. 이러한 나노입자 조성물은 하나 이상의 생물학적 활성제를 포함할 수 있다. 많은 구체예에 있어서, 나노입자 조성물은 보툴리눔 독소를 포함한다.

[0143] 일부 구체예에 있어서, 본 발명은 경피, 근육내 또는 피하 투여 경로를 들 수 있으나 이들로만 한정되지 않는 본 발명의 나노입자 조성물의 전달 방법을 대상으로 한다. 이러한 투여 경로는 특히 국소 효과를 노리는 제제(예: 특정의 보툴리눔 독소 나노입자 조성물)에 유리하다. 그러나, 이후, 제제에 있는 성분이 조직 흡수된다고 반드시 장담할 수는 없다.

[0144] 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 제제는, 예를 들자면 세포로의 유입을 촉진하기 위해, 예를 들어, 지질을 기반으로 하는 담체를 이용하여 캡슐화될 수 있다. 그러나, 지질을 기반으로 하는 담체의 효능은 i) 지질 조성(즉, 예를 들어, 분자 크기 및 전하); ii) 임의의 생물학적 활성제 또는 조성물에 포함된 다른 실체의 구조(예: 분자 크기 및 pH 이온화); 및 iii) 대상의 종합적인 건강상태에 따라 달라질 수 있다. 본 발명은 두 지질을 기반으로 하는 담체를 포함하여 약용 화장품(즉, 예를 들어, 보툴리눔 독소)의 생체이용성을 향상시키는 균일한 마이크로유동화 나노에멀전과 관련한 조성물 및 방법을 대상으로 한다.

[0145] 본 발명은 구체적으로 다양한 장애, 질환 또는 상태 치료를 위해 보툴리눔 독소 및 특히 보툴리눔 독소 나노입자 조성물을 투여하는 방법을 제공한다. 보툴리눔 독소의 말초 주사(즉, 근육내 또는 피하) 또는 국소 적용되는 경피 투여의 임상 효과는 보통 1 주내에 나타난다. 보툴리눔 독소 A형의 단일 근육내 주사로부터 전형적인 증상 완화(즉, 예를 들어, 이완성 근육 마비) 기간은 최대 4 개월 또는 그 이상으로 존재할 수 있다; 본 발명에 따른 보툴리눔 독소의 경피 투여후 임상 효과 기간은 개별 대상의 특성 및/또는 본 발명의 보툴리눔 나노입자 제제의 특정 제형에 따라 최대 4 개월 또는 그 이상으로 존재할 수 있다.

[0146] 당업자들은 보툴리눔 독소가 현재 거의 예외없이 주사, 특히 보통 동결건조된 제제로부터 재구성되는 액체 식염수 주사로 투여되는 것으로 알고 있다. 본 원에서 이미 검토한 바와 같이, 이러한 제제의 환경에서 보툴리눔 독소는 특히 불안정한 상태로 되기가 쉬워 단백질의 손실 및/또는 단백질 활성의 손실을 초래할 수 있다. 이러한 불안정성은 단백질 변성, 분해, 이량화 및/또는 중합의 결과로 여겨진다. 보툴리눔 안정화 효과를 갖는 것으로 알려진 가장 일반적인 제제는 인간 알부민이다. 인간-유래 알부민의 가능한 면역학적 결과가 최근에 검토되었다(US 공개 제2005/0238667호). 이 공개문헌은 재조합 알부민, 사카라이드에 기초한 안정화제 및 항산화제 아미노산이 천연 알부민 제제에 비해 개선된 효능을 지니는 보툴리눔 독소를 제공할 수 있다고 제안하였다.

[0147] 본 원에서 이미 검토한 바와 같이, BOTOX<sup>®</sup>(멸균 진공 건조 형태로 패키징된 정제된 클로스트리듐 보툴리눔 독소 A형 복합체, 인간 혈청 알부민 및 염화나트륨)은 현재 멸균 식염수(0.9% 염화나트륨, 주사급)로 보존제 없이 주사용으로 재구성된다. 구체적으로, 표준 주사 프로토콜은 적절한 양의 희석제를 적당한 크기의 주사기로 뽑아내는 것을 포함한다. BOTOX<sup>®</sup>은 기포화 또는 유사한 심한 요동으로 변성될 수 있기 때문에, 희석제는 정해진 양의 동결건조된 OTOX<sup>®</sup>을 함유하는 바이알에 서서히 주입된다. 무균성으로 인해, 표준 주사 프로토콜은 BOTOX<sup>®</sup> 수용액을 재구성 후 4 시간내에 투여하는 것을 포함한다.

[0148] 이용가능한 보툴리눔 독소 제제와 관련한 문제(안정성 문제, 무균성 문제 등)가 익히 알려졌으나, 개선된 제제는 몇개 개발되지 않았다. 더욱이, 일반적으로 환자 불쾌감 등으로 인해 침습 기술이 바람직하지 않음에도 불구하고, 주사는 보툴리눔 독소를 전달하는 표준적 접근방식을 따르고 있다.

[0149] 본 발명은 개선된 보툴리눔 독소 조성물(예를 들어 보툴리눔 독소 나노입자 조성물)을 제공하고, 보툴리눔 독소를 전달하는 개선된 방법을 더 제공한다. 특히, 본 발명은 보툴리눔 나노입자 조성물을(임의의 이용가능한 경로에 의해) 전달하는 방법을 제공하고, 주사 이외의 경로로 보툴리눔 독소를 전달하는 방법을 더 제공한다

[0150] 일반적으로, 본 발명의 보툴리눔 나노에멀전 조성물은 비경구, 경구, 경피, 구강, 안구, 질내, 직장내 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 임의의 이용가능한 수단으로 투여될 수 있다. 그러나 특정 구체예에 있어서, 조성물은 주사; 일부 구체예에 있어서 피하 주사, 일부 구체예에 있어서는 근육내 주사, 일부 구체예에 있어서는 정맥내 주사 등에 의해 투여된다. 특정의 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물은 경피적으로 투여된다.

[0151] 특정 구체예에 있어서, 본 발명은 보툴리눔 독소를 경피적으로 투여하는 방법을 제공한다. 인간 피부는 진피 및 표피를 포함한다. 표피는 다수의 조직층, 즉 각질층, 투명층, 과립층, 유극층 및 기저층(피부의 외면으로부터 내향 순서대로 정렬)을 가진다.

[0152] 각질층은 보통 약물처리, 및 아마도 특히 보툴리눔 독소의 경피적 전달에 있어서 가장 심각한 장애를 준다. 각

질층은 전형적으로 두께가 약 10 내지 15  $\mu\text{m}$  이며, 수개의 층으로 배열된 납작한 각질화 세포(각질 세포)로 이루어진다. 각질 세포 사이의 세포간 공간은 지질 구조물이 차 있으며, 피부를 통해 물질을 침투시키는데 중요한 역할을 담당할 수 있다(Bauerova *et al*, 2001, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 26:85).

- [0153] 각질층 아래 나머지 표피는 두께가 약 150  $\mu\text{m}$  이다. 진피는 두께가 약 1 내지 2 mm 이며, 표피 아래에 위치해 있다. 진피는 다양한 모세관 및 신경세포 과정에 의해 자극을 받는다.
- [0154] 약제의 경피 투여는 일반적으로 주사 및 경구 전달과 관련한 바람직하지 않은 결과없이 약의 또 다른 투여 경로를 제공하기 위해 시도되는 조사 대상이다. 예를 들어, 바늘은 종종 국부 통증을 일으키며, 주사받은 환자가 혈액 감염성 질환에 노출될 잠재성이 있다. 경구 투여는 환자의 위 환경이 매우 산성적이기 때문에 약의 생체이용성이 좋지 않은 경우가 빈번하다.
- [0155] 비침습적 투여를 제공함으로써 이러한 결점들을 해소하기 위해 특정 약제에 대해 경피적 투여 기술을 개발하기 위한 노력이 있어 왔다. 일반적으로는 환자의 피부 손상을 줄이기 위해 경피 투여가 바람직하다. 요컨대, 약의 경피 투여는 주사와 관련한 통증을 감소시키거나 없앨 수 있고, 혈액 오염을 감소시킬 수도 있으며, 전신적으로 도입된 약물의 생체이용성을 개선시킬 수 있다.
- [0156] 종래 약의 경피 투여를 위한 시도는 각질층의 침투성을 증가시키는데 초점을 맞추었다. 몇몇 시도는 피부를 통해 분자의 침투성을 증가시키는 화학적 증진제의 사용을 포함한다. 몇몇 시도는 각질층 부분을 바이패스하거나 제거하기 위해 기계적 장치의 사용을 포함한다. 또한, 다수의 시도는 피부를 통해 약제의 침투를 촉진하기 위해 초음파 또는 이온삼투 요법의 사용을 포함한다. 대부분의 경우에는, 전형적으로 약제가 진피내 모세 혈관계를 통과할 수 있도록 피부를 통한 약제, 전형적으로 소형 분자를 목표로 하고 있으며, 이 경우 약제는 치료 효과를 이루기 위해 대상에 전신적으로 도입될 수 있다.
- [0157] 소형 분자가 경피적 투여 기술의 주된 초점이지만, 대형 분자, 예컨대 폴리펩티드 및 단백질 복합체가 또한 경피 투여될 수 있는 것으로 나타난 것에 주목하는 것이 중요하다. 약 48 kD인 에리스로포이에틴이 또한 초음파의 도움으로 성공적으로 경피 투여되고 있다(Mitragotri *et al*, 1995, *Science*, 269:850; 및 US 특허 제 5,814,599호 및 6,002,961호).
- [0158] 본 발명은 특히, 연마제 또는 다른 파괴제(화학적, 기계적, 전기적, 전자기적 등에 상관없이)의 사용을 필요로 하지 않는, 보툴리눔 독소를 경피적으로 투여하는 방법을 제공한다. 정확히 말해, 본 발명의 발명자들은 놀랍게도, 본 발명의 나노입자 조성물에 도입된 보툴리눔 독소가 각질층을 침투하거나 파괴하는 추가의 단계없이 경피적으로 효과적으로 전달된다는 사실을 발견하였다. 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물과 함께 이러한 약제 또는 단계의 사용은 본 발명의 모든 구체예에서 반드시 제외하겠다는 것이 아니라 필요치 않다는 것이다.
- [0159] 따라서, 본 발명은 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물을 국소적으로 적용하여 보툴리눔 독소를 투여하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물은 표피층을 통해 흡수되도록 피부에 직접 적용된다. 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 나노입자 조성물은 화학적 또는 기계적 피부 침투 증진제 또는 마멸을 초래하는 다른 약제의 사용없이, 각질층, 진피 소공 및/또는 진피선을 포함하는 피부 상층을 관통할 수 있다.
- [0160] 당업자들은 국소 투여하기 위한 본 발명의 조성물이 미용학적 제제, 예컨대 피부 연화제, 영양 로션 타입 에멀전, 클린징 로션, 클린징 크림, 스킨 밀크, 에몰리언트 로션, 마사지 크림, 에몰리언트 크림, 메이크업 베이스, 립스틱, 페이스 팩 또는 페이스 젤, 세정 제제, 예컨대 샴푸, 린스, 보디 클린저, 헤어 토닉 또는 비누, 또는 피부과적 조성물, 예컨대 로션, 연고, 젤, 크림, 패치 또는 스프레이 형태일 수 있음을 인정할 것이다.
- [0161] 국소 투여하기 위한 본 발명의 조성물은 약  $10^{-3}$  U/kg 내지 10 U/kg의 보툴리눔 독소의 양이 환자의 피부를 통해 통과하도록 제형화 및/또는 투여될 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 조성물은 약  $10^{-2}$  U/kg 내지 1 U/kg이 환자의 피부를 통해 경피적으로 통과하도록 제형화 및/또는 투여된다. 일부 구체예에 있어서, 조성물은 약  $10^{-1}$  U/kg 내지 1 U/kg이 환자의 피부를 통해 통과하도록 제형화 및/또는 투여된다. 일부 구체예에 있어서, 조성물은 약 0.1 내지 약 5 유닛이 환자의 피부를 통해 피하 목적지에 도달하도록 제형화 및/또는 투여된다.
- [0162] 당업자들이라면 본원에서 유닛이 보툴리눔 독소의 상업적 제조업자에 의해 정의된 유닛과 생물학적 또는 생물활성적으로 등가적임을 알 것이다.

- [0163] 본 발명에 따라 투여된 보툴리눔 독소의 치료 효과는 주입 용액의 효과가 있는 한 지속될 수 있다. 이러한 주입 용액의 효과는 최대 약 4 개월까지 지속될 수 있다. 또한, 서서히 방출될 수 있도록 보툴리눔 독소를 보유할 수 있는 합성 중합체 담체를 사용한다면 최대 약 5 년까지 장기 효과를 발휘할 수 있다(US 특허 제6,312,708호).
- [0164] 일 구체예에 있어서, 본 발명은 전신적 독성 또는 보툴리눔 독소중 중독을 포함하나 이들로 한정되지 않는 잠재적인 합병증을 방지할 수 있는 보툴리눔 독소의 국소 제제를 제공한다. 일 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소(A, B, C, D, E, F 또는 G형 포함)의 투여량은 최소의 부작용 위험으로, 약 1 유닛의 하한에서 약 20,000 유닛의 상한 범위를 가질 수 있다. 특정 투여량은 치료 증상 및 이용되는 치료 요법에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 피하 과활동성 근육의 치료는 보툴리눔 독소의 높은 경피 투여량(예를 들어, 1000 유닛 내지 20,000 유닛)을 필요로 할 수 있다. 이에 반해, 신경 염증 또는 과활동성 땀샘의 치료는 비교적 낮은 보툴리눔 독소의 경피 투여량(예를 들어, 약 1 유닛 내지 1,000 유닛)을 필요로 할 수 있다.
- [0165] 본 발명의 일 구체예는 인간 환자에 경피적으로 전달하기 위한, 안정화된 보툴리눔 독소를 함유하는 약제학적 조성물을 대상으로 한다. 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F 및 G형, 분리 및/또는 정제된(즉, 약 150 kD) 보툴리눔 독소, 및 천연 또는 재조합적으로 합성된 보툴리눔 독소로 구성된 군 중에서 선택될 수 있다. 조성물은 약 1 내지 약 20,000 유닛의 보툴리눔 독소를 포함할 수 있으며, 조성물은 1 개월 내지 5 년간 지속되는 치료 효과를 이루기에 충분한 양의 보툴리눔 독소를 포함할 수 있다.
- [0166] 일부 구체예에 있어서, 본 발명은 상당량이 혈관을 통해 침투되는 일 없이 보툴리눔 독소가 대상의 피부를 통해 침투할 수 있도록 하는(예를 들어 보툴리눔 나노입자 조성물의) 보툴리눔 독소의 국소용 제제를 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 국소 및/또는 경피용 제제의 적용시, 약제학적 조성물중에 존재하는 약 25% 미만, 또는 심지어 약 5% 미만의 보툴리눔 독소가 혈관으로 침투된다.
- [0167] 당업자들은 보툴리눔 독소의 경피적 투여를 이루는 본 발명의 조성물이 장치, 예컨대, 이를테면 패치에 도입될 수 있음을 인식할 것이다.
- [0168] 각종 경피 패치 구조가 당업계에 알려졌다; 당업자들이라면 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물이 이러한 임의의 각종 구조물에 용이하게 도입될 수 있음을 알 것이다. 일부 구체예에 있어서, 경피 패치는 피부에 적용되는 패치의 한 측으로부터 연장된 다수의 바늘을 더 포함할 수 있으며, 이때 바늘은 피부의 각질층을 통해 돌출되도록 패치로부터 연장된다. 일부 구체예에 있어서, 바늘은 혈관을 봉괴시키지 않는다.
- [0169] 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소(예: 보툴리눔 나노입자 조성물)는 패치에 압력을 가하면 보툴리눔 독소가 패치(임의로 바늘을 통해)로부터 각질층으로 향하도록 패치내 데포에 제공될 수 있다.
- [0170] 본 발명의 일부 구체예에 있어서, 경피 패치는 접착제를 포함한다. 접착 패치의 일부 예가 널리 알려졌다(참조 예: US 특허 Des. 296,006호; 6,010,715호; 5,591,767호; 5,008,110호; 5,683,712호; 5,948,433호; 및 5,965,154호). 접착 패치는 일반적으로 사람의 피부에 적용될 접착층, 약제를 유지하기 위한 데포 또는 저장소 및 데포로부터 약제가 누출되는 것을 방지하는 외면을 갖는 것을 특징으로 한다. 패치의 외면은 전형적으로 비접착성이다.
- [0171] 본 발명에 따라, 신경 독소는 신경 독소가 장기간동안 안정하게 유지되도록 패치로 도입된다. 예를 들어, 신경 독소는 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물중에 존재할 수 있다. 선택적으로 또는 부가적으로, 신경 독소는 신경 독소를 안정화하고, 기질 및 패치로부터 신경 독소를 확산시키는 중합 매트릭스로 혼입될 수 있다. 신경 독소는 또한 패치가 피부에 적용되면, 신경 독소가 피부를 통해 확산될 수 있도록 패치의 접착층으로 도입될 수도 있다. 일 구체예에 있어서, 접착층은 열 활성화될 수 있는데, 이 경우에는 약 37 °C의 온도가 접착제를 서서히 액화하여 신경 독소가 피부를 통해 확산된다. 접착제는 37 °C 미만으로 저장되는 경우 점착성으로 존재할 수 있으며, 일단 피부에 적용되면, 접착제는 액화함에 따라 그의 점착성을 상실한다. 독소의 투여는 패치가 피부에 더 이상 들러 붙지 않으면 완료된다.
- [0172] 당업자들은 경피 패치가 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물이 투여될 수 있는 장치의 일례임을 인식할 것이다. 다른 몇가지 예를 들자면, 장치는 바람직하지 않은 손가락 마비를 일으킬 수 있어서 먼저 손가락에 조성물을 적용하는 일 없이 조성물을 적용할 수 있도록 사용될 수 있다. 적합한 장치는 스파툴라, 면봉, 바늘을 갖추지 않은 주사기 및 접착 패치를 들 수 있다. 스파툴라 또는 면봉 등의 사용은 조성물을 함유하는 컨테이너에 삽입되는 장치를 필요로 할 수 있다. 주사기의 사용은 주사기에 조성물을 채움으로써 이를 수 있다. 이어서, 조성물은 스파툴라 또는 면봉에 의해 국소적으로 퍼 발라지거나, 주사기로부터 사람의 피부상에 방출될 수

있다.

- [0173] 본 발명의 많은 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소의 전달을 의도하는 전달 영역으로만 제한하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 이러한 제한적인 전달은 본 발명의 조성물이 피부의 비표적 부위의 영역에 적용되지 않고 피부상의 표적 부위로 적용될 수 있도록 하는 적용 장치에 보툴리눔 나노입자 조성물을 사용하여 이를 수 있다. 명백히, 경피 패치가 이 목적으로 이용될 수 있다. 선택적으로 또는 추가적으로, 보툴리눔 독소가 선택된 영역에만 국소적으로 적용되는 경우, 다른 영역은 썩어지거나 예비처리되거나, 또는 다른 방식에 의해 노출로부터 보호될 수 있다.
- [0174] 보툴리눔 독소의 치료 용도
- [0175] 본 원에 설명된 바와 같이, 본 발명의 많은 구체예들은 나노입자 조성물 환경의 보툴리눔 독소를 대상에 전달하는 것을 포함한다. 이러한 전달은 특히, 특정의 미용 및 의학적 응용을 포함하여 각종 환경에 유용하다. 이하, 이러한 특정의 응용에 대해 보다 상세히 설명한다.
- [0176] 미용학적 용도
- [0177] 보툴리눔 독소 A(BTXA)는 미용 피부학에서 널리 이용되고 있는 약물이다. 미용적으로 사용하는 것과 관련하여 BTXA에서 관찰되는 부작용은 환자 순응성에 상당한 타격을 준다는 것이다. 현재, BTXA는 BTXA가 주사로 투여되어 훈련받은 요원을 필요로 하고 BTXA에 의한 부작용을 방지하기 위한 주요 도구는 지식 및 숙련된 솜씨가 있어야 하기 때문에, 의료인에 의해 임상적 환경에서 투여되고 있다. 대부분의 원치않는 효과는 부정확한 기술에 의해 수반되기 때문에, 정확한 주사 기술의 사용은 필수적이다. 인간 해부학(예를 들어, 안면 및 안면외 근육) 지식은 최적의 용량, 시간 및 기법을 선택하는데 의사들에게 중요하다.
- [0178] BTXA를 투여하기 위한 현 절차의 가장 흔한 부작용은 통증 및 혈종이다. 예를 들어, BTXA 용액이 주사에 의해 눈주위 영역에 투여되는 경우, 눈꺼풀 및 눈썹 처짐이 흔한 부작용이다. 부작용, 예컨대 통증, 혈종, 반상 출혈 및 타박상이 또한 상안면, 하안면 및 안면의 부위에서 발생할 수 있다. 다른 가능한 부작용으로는 두통 및 동반 약과의 가능한 상호작용을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 희석, 저장 및 주사의 적절한 기법을 이용할 뿐 아니라 임의의 금기사항을 지닌 환자를 주의하여 제외하는 것이 가장 원치않는 부작용을 방지하기 위해 제안되었다. 통증, 혈종, 반상 출혈 및 타박상은 BTXA 주사 전 후에 피부를 냉각하여 방지할 수 있다. 위 눈꺼풀 처짐은 아프라클로니딘 또는 페닐에프린 점안제를 사용함으로써 부분적으로 교정될 수 있다(Wollina et al, 2005, *Am. J. Clin. Dermatol.*, 6:141). 그러나, 현재의 방식에는 심각한 부작용이 여전히 남아 있다.
- [0179] 이에 반해, 본 발명은 보툴리눔 독소를 유해 부작용을 최소화하는 방식으로 안전하고 효과적으로 투여하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 일 구체예에 있어서, 본 발명은 예컨대 마이크로유동화 나노에멀전과 같이 나노입자 조성물을 포함하는 조성물로서 국소 및/또는 국부적으로 전달되는 보툴리눔 투여 방법을 대상으로 한다. 일 구체예에 있어서, 조성물은 크림, 연고, 오일, 포움, 스프레이 또는 젤로 제형화된다.
- [0180] 당업자들이라면 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물이, 예컨대 액체, 크림, 에멀전, 젤, 농후 로션 또는 분말과 같이 미용 제제에서 임의의 각종 미용적으로 허용되는 매질과 함께 제형화될 수 있음을 알 것이다; 이들은 물 및 또한 임의의 미용적으로 허용되는 용매, 특히 모노알콜, 예컨대 탄소원자수 1 내지 8의 알칸올(에탄올, 이소프로판올, 벤질 알콜 및 페닐에틸 알콜 등), 폴리알콜, 예컨대 알킬렌 글리콜(글리세린, 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜 등) 및 글리콜 에테르, 예컨대 모노-, 디- 및 트리-에틸렌 글리콜 모노알킬 에테르, 예를 들어, 에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르 및 디에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르를 단독으로 또는 혼합하여 함유할 수 있다. 이러한 성분들은, 예를 들어 전체 조성물의 중량에 대해 최대 70 중량% 정도의 많은 비율로 존재할 수 있다.
- [0181] 본 발명의 보툴리눔 나노입자 조성물을 포함하는 미용학적 제제는 매트한(matte) 생성물을 얻기 위해 특히 개개인이 매끄러운 피부를 갖도록 하는데 바람직한 적어도 하나의 충전제를 포함할 수 있다. 용어 "충전제"는 실온 및 대기압에서 고체이고, 단독으로 또는 조합하여 사용되며, 조성물의 다양한 성분들과 화학적으로 반응하지 않고, 이들 성분이 실온보다 높은 온도, 특히 이들의 연화점 또는 이들의 용점에 적용되는 경우에 조차, 이들 성분에 용해되지 않는 임의의 입자를 의미한다. 이러한 불활성 충전제는 전형적으로 적어도 170 °C 초과 및 보다 좋게는 200 °C 초과 용점을 가진다.
- [0182] 충전제는 흡착성 또는 비흡착성일 수 있으며, 즉 특히 조성물의 오일 및 피부에 의해 분비되는 생물학적 물질도 흡착할 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 충전제는 미립자이며, 겉보기 직경(apparent diameter)이 0.01 내지 150 μm, 바람직하게는 0.5 내지 120 μm, 및 보다 좋게는 1 내지 80 μm 이다. 겉보기 직경은 요소 입자가 그

의 가장 작은 치수를 따라 내접된 원의 직경에 상당한다(박판 두께).

[0183] **주름 치료**

[0184] 이마, 미간, 피부 주름(rhytid) 및/또는 안와주위 영역을 포함하는 안면 주름은 보편적인 미적 문제가 있으며, 근본적인 얼굴 근육의 과활동과 관련이 있는 것으로 판단된다. 예를 들어, 미간 주름의 발생은 적어도 일부 기본 눈살근, 눈썹 주름근 및 눈둘레근의 역학과 관련이 있다. 안면 주름선은 노화된 외관을 나타내기 때문에 문제시 되는 것으로 여겨진다. 일부의 경우에, 이들은 또한 부정적인 감정(예를 들자면, 화, 근심, 슬픔), 피로 또는 스트레스의 표현으로 오해받을 수도 있다.

[0185] 최근들어, 보툴리눔 독소 용액의 주사가 과도한 안면 주름의 가장 대중적인 치료 요법중 하나로 각광받고 있다. 주사 후, 독소는 얼굴의 표정근을 무력화하고 약화시키는 작용을 한다. 이는 외관상 주름 외양을 감소시키거나 제거한 것 처럼 보인다. [Sadick NS., "The cosmetic use of botulinum toxin type B in upper face" Clin Dermatol. 22(1):29-33 (2004)].

[0186] 보툴리눔 독소 용액의 최초 미용적인 이용은 이마의 찌푸린 주름선을 치료하기 위한 것이었다(Carruthers *et al*, 1992, *J. Dermatol. Surg Oncol*, 18:17). 또한, 넓은 목근으로 BTX 용액의 주입은 입술을 들어 올리는 것으로 주목을 받았다(Brandt *et al*, 1998, *Dermatol. Surg.*, 24:1232). 아래턱 지점에 BTX 용액을 주사하는 것이 현저한 턱끝 주름을 치료하기 위해 또한 행해지고 있다(Carruthers *et al*, "Cosmetic Uses of Botulinum A Exotoxin," pp. 325-48, *Advances in Dermatology*, James, *et al*, eds., Mosby-Yearbook, Chicago, 1997).

[0187] 본 발명은 안면 주름 및/또는 보기 흉한 안색(예컨대 근본적인 얼굴 근육의 과활동으로 인한)을 치료하기 위한 나노입자 조성물을 제공한다. 물론, 안면 주름 및/또는 안색의 치료와 관련된 원리 및/또는 조성물은 신체 다른 곳(예: 목선 등)에서 근육 활동으로 인한 바람직하지 않은 선 또는 주름에도 마찬가지로 적용될 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 주름 치료에 사용하기 위한 본 발명의 나노입자 조성물은 하나 이상의 신경마비 독소를 포함한다; 일부 구체예에 있어서 이 독소는 얼굴 근육 활동성을 봉쇄할 수 있다; 일부 구체예에 있어서, 이 독소는 보툴리눔 독소(BTX)를 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명은 마이크로유동화 보툴리눔 독소 나노에멀전을 안면 주름에 투여하는 것을 대상으로 한다.

[0188] 최근에, 보툴리눔 A형 독소 치료제를 반복 주사하여 장기간 사용함으로써 안면 주름 및/또는 주름선의 발생이 지연될 수 있음이 제안되었다(Binder, 2006, *Arch. Facial Plast. Surg.*, 8:426). 그러나, 반복적인 주사는 환자에게는 고통스러운 일이며, 의도하지 않은 근육군에 주입되어 유해 부작용(예: 처짐)을 일으킬 위험이 따른다. 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 나노에멀전은 얼굴(또는 목)의 주름선 또는 주름의 발생을 지연시키기 위해 얼굴 및/또는 목에 장기간 적용된다. 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 나노에멀전은 얼굴의 주름선 또는 주름의 발생을 지연시키기 위해 얼굴 및/또는 목에 장기간 규칙적인 간격으로 적용된다. 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소는 얼굴의 주름선 또는 주름의 발생을 지연시키기 위해 얼굴 및/또는 목에 6 개월을 초과한 기간에 걸쳐 규칙적인 간격으로 적용된다. 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소는 얼굴의 주름선 또는 주름의 발생을 지연시키기 위해 얼굴 및/또는 목에 1 년을 초과한 기간에 걸쳐 규칙적인 간격으로 적용된다. 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소는 얼굴의 주름선 또는 주름의 발생을 지연시키기 위해 얼굴 및/또는 목에 5 년을 초과한 기간에 걸쳐 규칙적인 간격으로 적용된다. 일부 구체예에 있어서, 보툴리눔 독소는 얼굴의 주름선 또는 주름의 발생을 지연시키기 위해 얼굴 및/또는 목에 10 년을 초과한 기간에 걸쳐 규칙적인 간격으로 적용된다.

[0189] **과운동성 안면 주름**

[0190] 보툴리눔 독소 B형(BTX-B)의 주사가 과도한 안면 주름의 관리에 대해 평가되었다. 예를 들어, 24 명의 환자의 추미근, 눈둘레근 또는 이마근을 400 내지 800 유니트의 BTX-B로 처리하였다. 주름 개선 점수(WIS) 및 수치적으로 등급화한 운동선 스케일(Rated Numeric Kinetic Line Scale: RNKLS)을 이용하여 안면 주름선 개선을 평가할 수 있다. 효과 개시가 72 시간내에 개시된다고 보고한 조사가 있다. 모든 부위에 대한 WIS 및 RNKLS는 치료 후 통계적으로 더 나아졌으며, 이 효과는 8 주간 지속되었다. 일반적으로, 환자는 WIS에 대해 보통 정도의 개선(2 등급) 및 RNKLS에서는 2-점 개선을 나타내었다(Ramirez *et al*, 2002, *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 126:459).

[0191] 일부 구체예에 있어서, 본 발명은 보툴리눔 나노입자 조성물, 예컨대 마이크로유동화 보툴리눔 독소 나노에멀전을 과운동성 안면 주름에 투여하는 것을 대상으로 한다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명은 보툴리눔 나노입자 조성물을 주름 형성전에 전형적으로 주름이 발생하는 얼굴 영역에 투여하는 것을 대상으로 한다. 반복된 이러한 투여는 종국에는 발생할 수 있는 주름의 발생을 지연시키고/시키거나 주름의 강도 또는 중증성을 감소시킬 수

있다(Binder, 2006, *Arch. Facila Plast. Surg.*, 8:426).

- [0192] **넓은 목근 띠**
- [0193] 넓은 목근은 얼굴 근육 군에 속하는 얇은 근막 바로 아래 목의 각 면상에 위치한 넓게 퍼진 얇은 근육층으로서, 얼굴 신경의 분포를 발달시키고, 아래 입술 및 구각을 측하로 당기며, 강하게 움직이면 목을 확장시키고 그의 피부를 위쪽으로 당긴다.
- [0194] 보툴리눔 독소 Z의 주사는 아래로 처진 비대한 넓은 목근 띠(즉, 전형적으로 나이든 목으로 칭해짐)를 치료하기 위해 보고되었다. 가로 목주름, 넓은 목근 띠 및 피부 이완에 기초한 분류 계통(I 내지 IV)은 변형도를 범주화 할 수 있고, 보툴리눔의 제안량의 지침으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 타입 II는 경증 가로 목주름, 가볍고 얇은 넓은 목근 이완성 및 가벼운 피부 이완을 의미하고, 타입 III은 중등 정도의 가로 목주름, 두꺼운 보통의 넓은 목근 이완성 및 중간 정도의 피부 이완을 의미한다(Matarasso *et al*, 1999, *Plast. Reconstr. Surg.*, 103:645).
- [0195] 일 구체예에 있어서, 본 발명은 보툴리눔 나노입자 조성물, 예컨대 마이크로유동화 보툴리눔 독소 나노에멀전을 넓은 목근 띠에 투여하는 것을 대상으로 한다.
- [0196] *의학적 용도*
- [0197] **신경근육 질환**
- [0198] 클로스트리듐 보툴리눔 박테리아에 의해 생산된 BTX는 준치사량으로 투여되는 경우 가로무늬근을 가역적으로 마비시킨다. BTX는 각종 형태의 마비, 안면 구축, 근긴장 이상, 반얼굴 연축, 떨림, 경직(예컨대 다발성 경화증에 기인한 것), 안와후 근육 및 그밖의 다른 각종 안과적 증상을 포함하는 근 경련 및/또는 구축을 비롯한 다수의 신경근육 질환 및 증상 치료에 이용되고 있다(Carruthers *et al*, 1996, *J Am. Acad. Dermatol.*, 34:788).
- [0199] **안면 마비**
- [0200] 환자 얼굴의 한쪽 근육 군에 BTX의 주사는 얼굴 신경 마비에 의한 안면 협동 운동 및 수직 비대칭을 치료하기 위해 사용되고 있다고 보고되었다(Armstrong *et al*, 1996, *Clin. Otolaryngol.*, 21:15). 후 절차에서, 처리하지 않은 얼굴 면상의 신경 마비 효과에 대한 보상으로 환자 얼굴의 전체적인 수직 비대칭에 영향을 주기 위해 환자 얼굴의 정상적인 면에 있는 눈에 관련된 각종 근육과 함께, 입에 관련된 입꼬리 올림근, 큰 광대근, 입꼬리 당김근 및 입꼬리 내림근이 모두 하나의 군으로 처치되었다.
- [0201] 일 구체예에 있어서, 본 발명은 보툴리눔 나노입자 조성물, 예컨대 마이크로유동화 보툴리눔 독소 나노에멀전을 경직된 얼굴 근육에 투여하는 것을 대상으로 한다.
- [0202] **안검 경련**
- [0203] 안검 경련은 눈꺼풀 근육의 반복적이면서 율동적인 수축 반응(즉, 눈꺼풀 연축으로도 알려져 있음)으로 진단된다. 일부 경우에 있어서는, 눈꺼풀이 감기고(또는 거의 감기고), 다시 떠지는 것이 반복될 수 있다. 이러한 상태의 기인은 보통 피로, 스트레스 및/또는 카페인에 의해 일어날 수 있다. 그러나, 연축이 시작되면, 이들은 수일간 불규칙적으로 계속될 수 있다.
- [0204] 눈꺼풀이 완전히 감길 수 있는 보다 심한 수축이 일어날 수도 있다. 이러한 악화된 상태는 눈 표면(각막) 또는 눈꺼풀 내막(결막)의 자극에 기인할 수 있다. 이러한 형태의 눈꺼풀 단일 수축은 보다 장기간 지속되고, 종종 매우 불편하기도 하며, 또한 눈꺼풀을 완전히 감기게 할 수도 있다.
- [0205] 안검 경련의 증상으로는 눈꺼풀(보통 위꺼풀)의 반복적이면서 제어할 수 없는 단일 수축 또는 연축, 광 감수성 또는 흐린 시력을 들 수 있으나, 이들로만 한정되지 않는다.
- [0206] 일부 구체예에 있어서, 본 발명은 보툴리눔 나노입자 조성물, 예컨대 마이크로유동화 보툴리눔 독소 나노에멀전을 눈꺼풀 근육에 투여하는 것을 대상으로 한다.
- [0207] **뇌성 마비**
- [0208] 뇌성 마비는 운동성 상실 또는 다른 신경 기능의 상실을 특징으로 하는 1군의 장애를 포함한다. 이러한 장애는 태아 발달중이나 분만 초기에 일어나는 뇌 손상에 기인한다. 뇌성 마비는 대뇌(고도의 지능, 감각 및 수의근 활동성에 관여하는 뇌의 가장 넓은 영역) 손상에 기인할 수 있다.

- [0209] 대뇌 손상은 광범하게 상이한 영역에서 신경 기능의 상실로 이어질 수 있다. CP의 전형적인 소견은 한쪽 팔 다리, 신체 한 쪽(경직 반마비), 양 다리(경직성 양측 마비) 또는 양 팔 및 다리(경직성 사지마비)에 영향을 끼칠 수 있는 경직(근육 긴장 증가)이다. 또한, 부분적이거나 완전한 운동성 상실(마비), 감각 이상 및 청각과 시각 결함이 있을 수 있다. 언어 이상이 보편적이며, 발작이 일어날 수도 있다.
- [0210] CP 환자의 지능적인 기능은 지극히 약한 정상에서부터 심한 정신 지체에 이르기까지 범위가 다양할 수 있다. 증상은 보통 2세 전에 분명해지며, 심함 경우에는 3 개월 초기에도 나타날 수 있다. 뇌성 마비는 비진행성 타입의 뇌병증(뇌 손상)이며, 질환으로 직접 야기되는 증상은 악화되지 않는다.
- [0211] 뇌성 마비 분류에는 경직, 운동장애, 조화운동 불능 및 혼합형을 포함한다. 경직성 뇌성 마비가 사례의 약 50%를 차지한다. 운동장애(무정위 운동) 뇌성 마비는 약 20%에 영향을 미친다. 이는 이상 운동(비틀림, 격동 또는 다른 운동성)의 발생을 포함한다. 조화운동 불능 뇌성 마비는 떨림, 불안 보행, 협조 상실 및 이상 운동을 포함한다. 이는 약 10%에 영향을 미친다. 나머지 20%는 상기 증상이 임의로 조합된 혼합형으로 분류된다.
- [0212] 뇌성 마비 증상으로는 발작, 근육 수축, 빨기 또는 섭취 곤란, 불규칙한 호흡, 운동 기능 발달 지연, 예컨대 손 뻗음, 앉기, 구르기, 네발기기, 걷기, 운동 정신 지체, 정신 지체, 언어 이상(말더듬증), 시각 이상, 청각 이상, 경직, 진행성 관절 구축, 운동 범위 제한 또는 정형치를 들 수 있으나 이들로만 한정되는 것은 아니다.
- [0213] 보툴리눔 독소는 변형을 감소시키고, 기능을 촉진하고, 운동 조절능을 향상시키고, 짧아진 근육을 신장시킴으로써 뇌성 마비 및 다른 과다근육 긴장증을 지닌 소아를 치료하는데 효과적이다. 초점 과다근육 긴장증 소아의 경우, 보툴리눔 독소는 재활에 영향을 미치는 현저하지만 일시적인 반복성 변화를 제공한다. 조사는 장애 및 기능 제한에 대한 독소의 긍정적인 효과를 신속히 포착하였다. 보툴리눔 독소의 장기간 사용 및 소아 과다긴장 장애를 지닌 인간의 수명동안 발휘되는 독소의 역할은 이미 밝혀졌다(Gaebler-Spira *et al*, 2003, *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.*, 14:703).
- [0214] 일 구체예에 있어서, 본 발명은 보툴리눔 나노입자 조성물, 예컨대 마이크로유동화 보툴리눔 독소 나노에멀전을 과다근육 긴장증 증상을 나타내는 환자에 투여하는 것을 대상으로 한다. 일 구체예에 있어서, 과다근육 긴장증은 뇌성 마비를 포함한다. 일 구체예에 있어서, 환자는 소아이다.
- [0215] **사시**
- [0216] 사시는 한쪽 눈의 정렬이 다른 쪽에 비해 편위되는 것을 포함하며, 크로스 아이(crossed eye), 내사시, 외사시, 사팔 또는 월아이(walleye)로도 칭해진다. 사시는 눈 사이의 협조능 부족으로 야기되는 것으로 판단된다. 그 결과, 눈은 상이한 방향을 바라보게 되며, 동시에 단일 점에 초점을 맞추지 못한다.
- [0217] 대부분의 소아 사시는 원인을 알 수 없다. 이들 사례중 반 이상에서, 출산 직후에 문제가 발생한다(선천성 사시). 두 눈이 동일 이미지에 초점을 맞추지 못하면, 뇌는 한쪽 눈으로 입력되는 것을 무시하게 된다. 이것이 지속적으로 되면, 뇌가 무시하는 눈은 결코 잘 보이지 않게 될 것이다. 이러한 시각 상실은 약시로 불리워지며, 사시와 관련되는 경우가 빈번하다.
- [0218] 성인에서 후천성 사시는 폐쇄성 두부 손상 및 뇌졸중을 포함하는 눈 또는 뇌의 안와 손상에 기인할 수 있다. 당뇨가 있는 사람들은 후천성 마비 사시를 초래하는 순환계가 손실되는 경우가 빈번하다. 임의의 원인으로부터 초래되는 한쪽 눈의 시각 상실은 일반적으로 눈을 점차적으로 바깥쪽으로 틀어지게 할 것이다(외사시). 성인의 뇌는 이미 시각 발달이 되었기 때문에, 뇌가 한쪽 눈에 입력된 것을 무시하는 약시와 관련된 문제는 성인 사시에 서 일어나지 않는다.
- [0219] 사시의 증상은 교차되어 보이는 눈, 동일한 방향으로 정렬되지 않는 눈, 비협조성 눈 운동, 이중 시야 또는 거리 인지 상실로 한쪽 눈으로만 보는 것을 포함하나 이로만 한정되는 것은 아니다.
- [0220] 후천성 내사시 환자에서 보툴리눔 치료의 장기 결과는 보고된 바 있다. 후천성 내사시를 지닌 68 명의 소아(연령대 8 내지 64 개월)를 전향 연구에 참여시켰다. 보툴리눔 독소 A를 두 내직근에 주입하였다. 운동 및 감각 상태를 최종 주사 후 1 및 2 주; 3, 6 및 12 개월; 및 매 년 평가하였다.
- [0221] 최종 주입으로부터 평균 4.8 년 추적 조사한 후, 운동 성공이 한 번의 주입으로 36 명의 소아(52.9%)에게서 관찰되고, 각각 2 및 3회 주입후에는 48 명(70.6%) 및 60 명(88.2%)으로 증가한 것으로 나타났다. 58 명(70.6%)의 환자는 적어도 주변 융합을 가졌고(범주 1의 양안성), 32 명(47.1%)은 적어도 400 초 호상의 입체시력을 가졌다(범주 2의 양안성). 고도 원시, 보다 경증의 약시 및 소각 내사시는 운동 성공의 가장 훌륭한

예측변수이다. 최저 약시 및 유리한 운동 정렬은 보다 나은 양안성 결과를 수반하였다.

[0222] 보툴리눔 독소는 후천성 내사시의 효과적인 장기 치료제일 수 있다. 이는 특히 고도 원시, 최저 약시 및 작은 내사시 편위를 지닌 소아에 유용하다(Tejedor *et al*, 2001, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42:2542).

[0223] 일 구체예에 있어서, 본 발명은 보툴리눔 나노입자 조성물, 예컨대 마이크로유동화 보툴리눔 독소 나노에멀전을 사시 증상을 나타내는 환자에 투여하는 것을 대상으로 한다. 일 구체예에 있어서, 환자는 소아이다.

#### [0224] 근긴장 이상

[0225] 근긴장 이상은 느린 불수의 비틀림 운동을 포함하는 의학적 상태이다. 제어되지 않거나 느린 운동은 두부, 팔 다리, 몸통 또는 목의 느린 불수의 수축(즉, 경부 근긴장 이상)을 야기하는 근육 긴장 장애(보통 큰 근육 군에서)로 정의된다. 근육의 느린 파상 비틀림 운동(무정위 운동) 또는 지속적인 근육 수축(근긴장 이상)은 뇌성 마비, 뇌염, 약물 부작용, 간성 뇌병증 및 헌팅턴 무도병(Huntington's chorea)을 비롯한 다수의 증상으로 야기될 수 있다. 운동 이상은 잠자는 동안 감소되거나 사라질 수 있으나, 감정적인 스트레스로 악화된다. 비정상적이면서 가끔은 괴상한 자세가 이러한 운동의 발현일 수 있다.

[0226] 일 구체예에 있어서, 본 발명은 보툴리눔 나노입자 조성물, 예컨대 마이크로유동화 보툴리눔 독소 나노에멀전을 근긴장 이상 증상을 나타내는 환자에 투여하는 것을 대상으로 한다.

#### [0227] 전립선 비대증

[0228] 보툴리눔 독소 주사는 양성 전립선 비대증이 있는 남성에게 효과적일 수 있다. 양성 전립선 비대증이 있는 남성 30 명을 무작위 위약 대조 시험에 참여시켰다. 베이스라인 평가 후, 각 참여자에게 용액 4 mL를 전립선에 주입하였다. 대조군 환자에게는 식염수를 투여하고, 처리군 환자에는 200 U의 보툴리눔 독소 A를 투여하였다. 증상 점수, 혈청 전립선-특이 항체 농도, 전립선 부피, 배뇨후 잔뇨 부피 및 피크 뇨 유량을 비교하여 각 군의 결과를 평가하였다.

[0229] 2 개월 후, 처리군에서 13 명의 환자 및 대조군에서 3 명이 증상 완화를 자각하였다( $P = 0.0007$ ). 보툴리눔 독소를 투여받은 환자에서, 증상 점수는 베이스라인 값에 비해 65% 감소되었으며, 혈청 전립선-특이 항원 농도는 베이스라인 값으로부터 51% 감소하였다. 식염수를 투여받은 환자에서, 증상 점수 및 혈청 전립선-특이 항원 농도는 베이스라인 값 및 1 개월 값에 비해 유의적인 변화가 없었다. 평균 19.6 +/- 3.8 개월간 추적 조사하였다(Maria *et al*, 2003, *Urology* 62:259).

[0230] 일 구체예에 있어서, 본 발명은 보툴리눔 나노입자 조성물, 예컨대 마이크로유동화 보툴리눔 독소 나노에멀전을 전립선 비대증 증상을 나타내는 환자에 투여하는 것을 대상으로 한다.

#### [0231] 다한증

[0232] 다한증은 예측할 수 없을 정도로 과도하게 땀을 흘리는 의학적 상태이다. 다한증인 사람은 기온이 서늘하고 휴식 상태에서조차도 땀을 흘린다. 발한은 신체가 시원하게 유지되도록 도와 주며, 완벽하게 자연적인 현상이다. 사람들은 기온이 더울 때, 운동할 때, 또는 초조하게 하거나, 화가 나게 하거나, 난처하게 하거나, 무섭게 만드는 상황에 반응시 땀을 더 많이 흘리게 된다.

[0233] 그러나, 과다 발한은 이러한 유발없이 일어난다. 다한증인 사람은 과활동성 땀샘을 지니는 것으로 나타났다. 제어할 수 없는 발한은 신체적으로나 감정적으로 상당히 불쾌한 상태에 이를 수 있다. 과다 발한이 손, 발 및 겨드랑이에서 일어나는 경우, 이는 일차성 또는 국소 다한증으로 불린다. 일차성 다한증은 인구의 2 내지 3%에 영향을 주고 있지만, 이 증상을 갖고 있는 환자의 40% 미만만이 의사 상담을 받고 있다. 대부분의 일차성 다한증 사례에서 원인을 밝히지 못하고 있다. 이는 가족력인 것으로 보인다. 다른 의학적 상태로 인해 발한이 일어나는 경우, 이는 이차성 다한증으로 불린다. 발한은 신체 모든 부위에서 일어날 수 있거나, 어떤 한 영역에 국한될 수 있다. 이차성 다한증을 야기하는 증상으로는 말단비대증, 갑상선 항진증, 글루코스 조절 장애, 크롬 친화 세포증, 카시노이드 증후군, 암, 결핵, 감염, 폐경기, 척수 손상, 뇌졸중, 파킨슨씨병, 심장 또는 폐 질환, 약물처치, 약물 남용 또는 불안 증상을 들 수 있으나, 이들로만 한정되지 않는다. 다한증의 일차 증상은 축축하게 젖는 것이다.

[0234] 보툴리눔 독소 A형(BOTOX<sup>®</sup>)은 일차성 겨드랑이 다한증으로 불리는 증상인 심한 겨드랑이 밑의 발한 치료를 위해 2004년에 FDA로부터 승인을 받았다. 겨드랑이 밑에 주입된 소량의 정제된 보툴리눔 독소는 발한을 자극하는 신

경을 일시적으로 봉쇄한다. 부작용은 주사 부위 통증 및 독감 유사 증상이다. 손바닥 발한용으로 사용되는 BOTOX<sup>®</sup>은 일시적인 경증의 허약 및 격통을 야기할 수 있다.

[0235] 일 구체예에 있어서, 본 발명은 보툴리눔 나노입자 조성물, 예컨대 마이크로유동화 보툴리눔 독소 나노에멀전을 다한증 증상을 나타내는 환자에 투여하는 것을 대상으로 한다.

### 도면의 간단한 설명

[0236] 도 1은 마이크로유동화된 보툴리눔 독소 나노에멀전의 입경 분포 일례를 나타낸다.

도 2는 균질화된 보툴리눔 독소 마이크로에멀전의 입경 분포 일례를 나타낸다.

도 3은 보툴리눔 나노입자 조성물을 포함하는 본 발명의 조성물의 국소 투여 전(패널 A) 및 2 주 후(패널 B)의 최대 눈썹 들어 올리기를 시도한 환자를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### 예증

[0238] 하기 실시예는 본 발명에서 대상으로 하는 특정 구체예를 설명할 목적으로만 의도된 것이다. 실시예는 어떤 방식으로든 제한하고자 하지 않는다.

#### 실시예 1 : 보툴리눔 나노에멀전 제제

[0240] 본 실시예는 마이크로유동화에 의해 제조된 보툴리눔 독소(즉, 예를 들어, BOTOX<sup>®</sup>)를 포함하는 나노에멀전의 일 구체예를 예시한다.

[0241] 마이크로유동화 제제는 다음과 같이 제조되었다:

[0242] 1. 5 g의 대두유 및 5 g의 Tween 80을 필요에 따라 가열하면서(전형적으로는 필요치 않음) 혼합하여 혼합물을 유화시킨다.

[0243] 2. 인간 알부민 기질(Allergan, Irvine CA) 내에 도입된 100 유닛의 BOTOX<sup>®</sup>을 100 mL의 탈이온수/증류수에 첨가하고, 균일하게 혼합될 때까지 교반하였다.

[0244] 3. 단계 1의 제제를 단계 2의 제제에 첨가하고, 균일하게 혼합될 때까지 교반하였다.

[0245] 4. 제제를 1 분동안 균질화시켰다(표 1 및 도 1에서 얻은 입자 분포 참조).

[0246] 5. 24,000 psi에서 단일 패스 마이크로유동화 절차를 Microfluidizer<sup>®</sup> 처리 장치를 이용하여 수행하였다.

[0247] 얻은 나노에멀전에 대해 약 0.6 내지 6000 nm의 입자를 크기별로 분류할 수 있는 Malvern Nano S 입자 선별기를 이용하여 입경을 평가하였다. BOTOX<sup>®</sup> 나노에멀전 제제는 95.33 nm의 평균 입경을 가지는 두개의 입경 피크를 나타내었다(표 2 및 도 2).

### 표 1

균질화 BOTOX<sup>®</sup> 마이크로에멀전의 입경 분포

|              |      | 직경(nm) | 강도(%) | 폭(nm) |
|--------------|------|--------|-------|-------|
| Z-평균: 3391   | 피크 1 | 1512   | 100   | 76.6  |
| PDI: 0.341   | 피크 2 | 0      | 0     | 0     |
| 인터셉트: 0.5852 | 피크 3 | 0      | 0     | 0     |

### 표 2

마이크로유동화 BOTOX<sup>®</sup> 마이크로에멀전의 입경 분포

|             |      | 직경(nm) | 강도(%) | 폭(nm) |
|-------------|------|--------|-------|-------|
| Z-평균: 95.33 | 피크 1 | 134.2  | 76.49 | 31.03 |

|              |      |       |       |      |
|--------------|------|-------|-------|------|
| PDI: 0.252   | 피크 2 | 44.97 | 23.51 | 6.34 |
| 인티셉트: 0.9659 | 피크 3 | 0     | 0     | 0    |

[0252] 실시예 2: 주입된 BOTOX<sup>®</sup> 나노에멀전의 근육 이완 효과

[0253] 본 실시예는 식염수로서 자유 용액 BOTOX<sup>®</sup> 주사와 필적할 만한 효능을 가지는 BOTOX<sup>®</sup> 나노에멀전의 일 구체예를 예시한다.

[0254] 실험적 설계를 다음의 두 BOTOX<sup>®</sup> 제제로 비교하였다:

[0255] 1) 실시예 1에 따라 제조된 BOTOX<sup>®</sup> 나노에멀전을 스위스 웹스터 암컷 마우스의 뒷다리(장딴지근 근육)에 근육내(IM) 주사로 주입하였다.

[0256] 2) BOTOX<sup>®</sup> 식염수를 스위스 웹스터 암컷 마우스의 뒷다리 장딴지근 근육에 근육내(IM) 주사로 주입하였다.

[0257] 발가락 외전 점수(DAS) 분석을 이용하여 국부 근육 약화 효능(Aoki, 1999)을 결정하였다. DAS 값을 다음과 같이 배정하였다: (0) 편평 발, 대조군의 다리와 동일한 발가락 펼침; (1) 편평 발, 대조군의 발과 비교해 발가락 외전폭이 차이거나, 두개의 발가락이 접촉해 있고, 나머지 발가락은 완전히 펼쳐짐; (2) 편평 발, 모든 발가락 끝에 약간의 공간이 열려 있거나, 세개의 발가락이 접촉해 있음; (3) 발이 편평하면 다섯개의 발가락이 접촉하고, 발이 굽으면 네개의 발가락이 함께 접촉함; (4) 구부러진 발, 다섯개의 모든 발가락이 함께 접촉함.

[0258] BOTOX<sup>®</sup> 나노에멀전 및 BOTOX<sup>®</sup> 식염수의 IM 주사를 단순 맹검법 프로토콜하에 DAS로 7 일 평가하였다. DAS 점수 1-2가 양 보툴리눔 독소 나노에멀전(3.96 U/5  $\mu$ l) 및 보툴리눔 독소 식염수(3.96 U/5  $\mu$ l) 둘 다에서 관찰되었다. 나노에멀전 블랭크인 대조군은 DAS (0)을 가졌다. 각 군(보툴리눔 독소 나노에멀전, 식염수 및 대조군)은 다섯마리(5)의 동물로 구성되었다.

[0259] 상기 정보는 비-마이크로유동화 보툴리눔 독소 식염수의 주입으로 입증된 바와 같이 마이크로유동화 기술이 보툴리눔 독소의 기능적 특성을 파괴하지 않고, 보툴리눔 독소 나노에멀전이 기능적으로 효과적임을 증명한다.

[0260] 실시예 3: 경피용 BOTOX<sup>®</sup> 나노에멀전의 근육 이완 효과

[0261] 본 실시예는 경피적으로 적용된 보툴리눔 나노에멀전(즉, 예를 들어, BOTOX<sup>®</sup> 나노에멀전)의 치료적 효능을 입증한다.

[0262] 실시예 1에 따라 제조된 BOTOX<sup>®</sup> 나노에멀전(9.9 U/100  $\mu$ l)을 다섯마리(5)의 스위스 웹스터 암컷 마우스의 뒷다리 장딴지근 근육에 국소적으로 투여하였다. 다섯마리(5)의 스위스 웹스터 암컷 마우스에는 BOTOX<sup>®</sup>을 생략한 것을 제외하고는 동일하게 제조된 나노에멀전을 투여하였다. 치료 후 7 일동안, 실시예 2에 준하여 점수가 매겨진 1 내지 2의 DAS 점수가 보툴리눔 독소 나노에멀전 처리군에서 관찰되었으나, 대조군에서는 관찰되지 않았다. 피부 약화(예: 자극, 발적 등)는 치료 후 어느 시점에서도 관찰되지 않았다. 데이터는 보툴리눔 독소 나노에멀전이 통상적으로 투여되는 보툴리눔 독소 주사와 유사한 방식으로 경피 투여되는 경우 생물학적으로 활성적임을 보여준다.

[0263] 실시예 4: 보툴리눔 나노에멀전 투여에 의한 근육 이완 효과: 마우스에서 표준 주사된 보툴리눔 대 국소용 보툴리눔 나노에멀전의 제어 비교

[0264] 본 실시예는 본 발명의 국소용 보툴리눔 나노에멀전의 적용이 표준 주사된 보툴리눔 제제(나노에멀전이 아님)와 동등한 근육 이완 효과를 유도할 수 있음을 입증하기 위한 제어 실험을 제공한다.

[0265] 방법

[0266] 체중 약 20 g인 35 마리의 스위스 웹스터 마우스를 Charles River로부터 구매하였다. 도착하면, 모든 동물을 그 의 우리에서 1 주일간 길들이고(이하 정의되는 바와 같이 그룹당 우리마다 5 마리의 마우스가 1 군으로 수용됨), 바닥에 표준 우리 깔개를 깔고, Purina 5001 고형 사료를 공급하였다. 1 주 후, 발가락 외전 점수(DAS)를 이용하여 실시예 1에 따라 제조된 BOTOX<sup>®</sup> 나노에멀전의 적용 후 국부 근육 기능을 결정하였다. DAS 분석에서,

동물이 그의 뒷다리를 뻗어 그의 뒷다리 발가락을 와전하는 특징적인 놀람 반응을 유도하기 위해 마우스의 꼬리를 잠시(10 초) 들어 올렸다. 이 분석은 3 주동안 주 1회로 수행되었다.

[0267] 마우스의 세 처리군에 대해 다음과 같은 세가지 치료 제제를 제조하였다: 1) 주사용 식염수중 BOTOX<sup>®</sup>, 2) BOTOX<sup>®</sup>을 함유하는 나노에멀전 및 3) BOTOX<sup>®</sup>을 제외하고는 BOTOX<sup>®</sup> 나노에멀전의 모든 성분을 함유하고 BOTOX<sup>®</sup>을 함유하는 나노에멀전과 동일한 방식으로 마이크로유동화기 처리 장치를 통해 또한 처리된 "블랭크(blank)" 나노에멀전.

[0268] *치료 패러다임*

[0269] 군 1(IM)의 15 마리 마우스에 식염수에 현탁시킨 BOTOX<sup>®</sup>을 체중 1 kg당 10 U/5  $\mu$ l로 마우스 뒷다리의 장딴지근 근육에 주입하여 처리하였다.

[0270] 군 2(국소용)의 15 마리 마우스에 체중 1 kg당 10 U/100  $\mu$ l의 BOTOX<sup>®</sup>을 뒷다리 장딴지근 근육 위에 있는 마우스 피부에 적용하여 국소 처리하였다.

[0271] 군 3(대조)의 15 마리 마우스에 나노에멀전 BOTOX<sup>®</sup>을 함유하지 않는 블랭크를 뒷다리 장딴지근 근육 위에 있는 마우스 피부에 적용하여 국소 처리하였다.

[0272] *평가*

[0273] 주사 및/또는 경피 적용 1 주 후, DAS 분석을 이용하여 치료의 잠재적인 국부 근육 약화 효과를 결정하였다. 이 분석은 차후 3 주동안 주 1회 수행되었다. BOTOX<sup>®</sup> 또는 대조 제제의 주사 및/또는 경피 적용 후, 치료에 참여하지 않은 관찰자가 발가락 와전의 변화도를 5 점 스케일(0 = 정상 내지 4 = 발가락 와전 및 다리 신전의 최대 감소)로 점수를 매겼다.

[0274] *결과 및 결론*

[0275] 치료 1 주 후, 블랭크 나노에멀전으로 처리된 대조군 마우스(군 #3)가 아오키 스케일(Aoki scale)에서  $0.5 \pm 0.3$ 을 획득한 것에 비해 국소용 보툴리눔 나노에멀전 제제로 처리된 마우스 군(군 #2)은 상기 아오키 스케일에서  $2.8 \pm 0.3$  점을 획득하였다( $P < 0.001$ ). 이에 반해, 식염수중 보툴리눔을 주입한 마우스(군 #1)는  $3.5 \pm 0.3$  점을 획득하였다. 치료 3 주 후, 국소용 보툴리눔 나노에멀전 제제로 처리된 마우스 및 식염수중 보툴리눔을 주입한 마우스 양 군은 주사 보툴리눔에 대한 공개 문헌으로부터 기대되는 제어 수준의 아오키 점수를 획득하였다. (마우스에서 이와 같은 아오키 스케일의 감소는 보툴리눔으로 반복적으로 관찰되지만, 인간에서 치료 용량으로 사용되는 경우에는 수 개월동안 주름 방지 효과가 나타났다). 또한, 피부 약화(예: 자극, 발적 등)는 치료 후 어떤 시점에서도 관찰되지 않았다.

[0276] 요약하면, 이러한 제어 데이터는 국소용 보툴리눔 나노에멀전 제제가 주사 보툴리눔에 필적할 만한 생물학적 효과를 전달한다는 것을 강력히 시사한다.

[0277] **실시예 5: 주름 완화를 위해 인간 대상에 보툴리눔 나노입자 조성물의 투여**

[0278] 본 발명의 국소용 보툴리눔 나노에멀전을 제조하고, 주름이 발생한 이마 근육의 완화 효과가 있는지를 알아보기 위하여(근육에 주입되는 단순 식염수에 현탁시킨 보툴리눔의 투여로 예상되는 것과 상당히 동일한 방식으로), 이마 주름이 심한 인간에 적용하였다.

[0279] *방법*

[0280] 보툴리눔 나노에멀전을 다음 단계를 이용하여 제조하였다:

[0281] 1. 800 mg의 대두유 및 800 mg의 Tween 80을 무균 바이얼에서 5 분동안 교반하였다.

[0282] 2. 8.4 mL의 0.9% 식염수를 4500 유니트의 승인받은 보툴리눔 A형 독소 약제와 함께 첨가하였다. 20 분동안 교반하였다.

[0283] 3. 샘플을 1 분동안 균질화하였다.

[0284] 4. 샘플을 20 분동안 교반하였다.

- [0285] 5. 23,000 psi로 한 번 마이크로유동화시켰다.
- [0286] 나노에멀전을 동 부피의 피부 크림(베이스 PCCA 바니싱 크림 라이트)에 첨가하고, 균일한 크림으로 와동시켰다.
- [0287] 이마근의 과활동으로 이마위에 가로 주름이 심한 환자를 선별하여 치료하였다. 이 환자는 보툴리눔 제품 또는 피부용 필러 제품으로 치료된 적이 전혀 없었다. 치료전에, 정식 면허가 있는 성형외과 의사가 4 점 주름 스케일["1" 점은 "무 주름"에 해당하고, "4" 점은 주름이 심한 것에 해당함]을 이용하여 환자를 평가하였다. 환자를 이마가 "휴식시" 및 그의 눈썹을 최대한 위로 들어 올림("최대 눈썹 들어 올림")으로써 이마근을 수축하여 최대 주름을 만들려고 시도하려고 할 때, 상기 스케일을 이용하여 평가하였다.
- [0288] 이 환자는 휴식시 4 점을 획득하였고, 눈썹을 최대한으로 들어 올렸을 때 4 점을 획득하였다. 이 환자는 이마근을 수축할 수 있는 움직임이 우수한 것으로 판명되었다. 환자를 휴식시 및 이마를 최대한으로 들어 올린 상태에서 디지털 SLR 카메라로 사진을 찍고, 디지털 비디오로 촬영하였다(도 3A, 치료전 최대 눈썹 들어 올림).
- [0289] 치료 일에 환자에게 진료실에 오기 전 아이보리 비누로 세수를 하고 어떠한 얼굴 메이크업 또는 선스크린제를 사용하지 말아 달라고 부탁하였다. 진료실에서 성형외과 의사가 이마근이 분포하는 환자의 이마에 0.6 CC의 나노에멀전 크림(실시예 1에서 제조된 것과 같음)을 적용하였다. 의사가 피펫을 이용하여 크림을 환자의 이마 피부에 적용하고, 손가락(수술용 장갑 착용)을 이용하여 의사의 눈에 크림이 더 이상 보이지 않을 때까지 피부에 문질렀다. 환자를 진료실에서 3 시간동안 관찰하였다. 환자에게 12 시간동안 그의 이마를 만지지 말 것과, 그 후에 아이보리 비누 및 물로 씻어 내라고 요청하였다. 환자를 1 일 후 및 이어서 1, 2, 4, 8 및 12 주에 추적 관찰하였다. 추적 조사 방문시에, 휴식시와 눈썹을 최대한으로 들어 올렸을 때 환자의 주름을 의사가 평가하였다. 마찬가지로, 의사는 사진 및 비디오로 표준화된 디지털 작업을 반복하였다.
- [0290] **결과**
- [0291] 치료 후 첫 1 주일째에, 환자는 그의 눈썹을 최대한으로 들어 올리라고 요청받았을 때 그의 눈썹을 들어 올릴 수 없었으므로 그의 이마 근육을 수축할 수 없었다(도 3B). 그의 주름 점수는 휴식시에 2 점이었었고, 눈썹을 최대한으로 들어 올렸을 때 2 점이었다. 의사는 다른 환자에게 보툴리눔 독소를 유사 치료 영역에 주사하여 수행한 치료와 동등하게 상기 치료가 처리 근육의 완전 마비를 유도하였다고 임상 평가하였다. 환자는 8 주째 이마 움직임이 약간 복구되었으나, 관찰 12 주에 그의 이마 움직임에 상당한 감소가 지속적으로 이어졌다.
- [0292] 환자는 처리되지 않은 피부 영역 아래에 있는 그의 얼굴 근육을 움직일 수 있었으며, 성형외과 의사는 치료 직후 또는 또는 임의의 추적 조사 방문시에 피부 변화가 없는 것을 비롯하여 부작용을 관찰할 수 없었다. 마찬가지로, 환자도 치료후 어느 시점에도 임의의 피부 변화(예: 자극, 발적 등)를 비롯한 부작용을 호소하지 않았다.
- [0293] **결론**
- [0294] 즉, 상기 실험은 국소용 보툴리눔 나노에멀전 제제가 환자에 주사된 보툴리눔(단순 식염수중의)의 표준 치료후 예상되는 것과 임상적 효능에 필적할 만한 유의적인 생물학적 및 임상적 효과[성형외과 의사에 의해 평가됨]를 전달한다는 것을 강력히 시사한다.
- [0295] **실시예 6: 추가의 보툴리눔 나노입자 조성물 제제**
- [0296] 일부의 경우, 사용한 장비, 인가 압력, 첨가한 보툴리눔의 양 및 제조된 나노입자 조성물의 부피가 상이한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 각종 상이한 보툴리눔 나노입자 조성물을 제조하였는데, 이는 크기 변동성이 관찰된 이유를 설명해 줄 수 있다. 하기 평균 입경 및 분포가 관찰되었다(표 3):

[0297] 표 3: 마이크로유동화 BOTOX<sup>®</sup> 나노에멀전의 입경 분포

|            | 평균 입경 (nm) |      |      |      |      |       |          |
|------------|------------|------|------|------|------|-------|----------|
|            | 76.8       | 91.5 | 94.2 | 95.3 | 97.9 | 112.4 | 평균<br>95 |
| 분포 한계 (nm) |            |      |      |      |      |       |          |
| 120% 초과    | 36.4       | 48.6 | 47.6 | 54.7 | 50.7 | 53.8  | 49       |
| 130% 초과    | 21.0       | 37.8 | 35.5 | 37.3 | 40.8 | 45.2  | 36       |
| 150% 초과    | 9.1        | 27.4 | 24.8 | 20.3 | 31.4 | 36.8  | 25       |
| 200% 초과    | 2.8        | 16.1 | 10.3 | 1.5  | 15.7 | 21.7  | 11       |
| 300% 초과    | 0.0        | 0.6  | 4.5  | 0.0  | 3.6  | 9.6   | 3        |

[0298]

[0299] 실시예 7: 인가 압력과 획득한 평균 입경 간의 관계

[0300] 예비혼합물 제제를 실시예 1과 같이(보툴리눔 독소가 존재하지 않는 것을 제외하고) 제조하고, 100 ml 4 분취물 A 내지 D로 분배한 뒤, 각각 Microfluidizer<sup>®</sup>에 상이한 압력으로 통과시켜 하기 표 4에 나타난 바와 같이, 평균 입경이 상이한 결과를 얻었다,

[0301] 표 4: 상이한 압력에서 마이크로유동화된 BOTOX<sup>®</sup> 나노에멀전의 입경

| 제제 | 압력 (psi) | 평균 입경 (nm) |
|----|----------|------------|
| A  | 3,500    | 142 nm     |
| B  | 10,000   | 107 nm     |
| C  | 17,000   | 94 nm      |
| D  | 24,000   | 89 nm      |

[0302]

# [0303] 균등 범위 및 영역

[0304] 상기에 제한적이지 않은 본 발명의 바람직한 특정 구체예가 설명되었다. 당업자들은 본 원에 기술된 본 발명의 특정 구체예에 일상적인 실험을 벗어나지 않는 다양한 균등 범위가 있을 수 있음을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 당업자들은 하기 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 취지 또는 영역을 벗어나지 않고 상기 설명에 다양한 변화 및 변경이 행해질 수 있음을 인정할 것이다.

[0305] 청구범위에서, 단수는 달리 언급이 없거나 그 문맥으로부터 명확하다면, 복수의 개념도 의미할 수 있다. 군의 하나 이상의 멤버 사이에 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 설명은 달리 언급이 없거나 그 문맥으로부터 명확하다면, 군 멤버중 하나, 복수개 또는 전부가 주어진 산물 또는 공정에 존재하거나 사용되거나 또는 다르게 관련되는 경우 만족되는 것으로 간주된다. 본 발명은 정확히 하나의 군 구성원이 주어진 산물 또는 공정에 존재하거나 사용되거나 또는 다르게 관련되는 구체예를 포함한다. 본 발명은 또한 복수개 또는 모든 군 구성원이 주어진 산물 또는 공정에 존재하거나 사용되거나 또는 다르게 관련되는 구체예도 포함한다. 또한, 본 발명이 하나 이상의 청구항 또는 또는 관련 설명 부분으로부터 하나 이상의 제한, 구성 요소, 조항, 기술 용어 등이 다른 청구항에도 도입되는 모든 변형, 조합 및 치환을 포함한다고 이해하여야 한다. 예를 들어, 다른 청구항에 종속된 임의의 청구항은 동일한 기본항에 종속된 임의의 다른 청구항에 있는 하나 이상의 제한을 포함하도록 변경될 수 있다. 또한, 청구항이 구성물을 인용하고 있는 경우, 달리 언급이 없거나 당업자들에게 모순 또는 불일치가 발생하는 것이 명백하지 않다면, 본 원에 개시된 임의의 목적을 위한 구성물의 사용방법이 포함되고, 본 원에 개시된 임의의 제조 방법 또는 당업계에 공지된 다른 방법에 따른 구성물의 제조방법이 포함되는 것으로 이해하여야 한다. 또한, 본 발명은 본 원에 개시된 임의의 구성물의 제조방법에 따라 제조된 구성물을 포함한다.

[0306] 구성 요소가, 예를 들어 마커쉬 타입으로 열거된 경우, 구성 요소의 각 하위군이 또한 밝혀졌고, 임의의 구성 요소(들)가 군으로부터 생략될 수 있는 것으로도 이해하여야 한다. 용어 "포함하는"은 개방적인 것임을 의도하는 것이며, 추가의 구성 요소 또는 단계를 포함할 수 있음에 또한 주의하여 주기 바란다. 일반적으로, 본 발명 또는 본 발명의 측면이 특정 구성 요소, 특징, 단계 등을 언급하고 있는 경우, 본 발명의 특정 구체예 또는 본

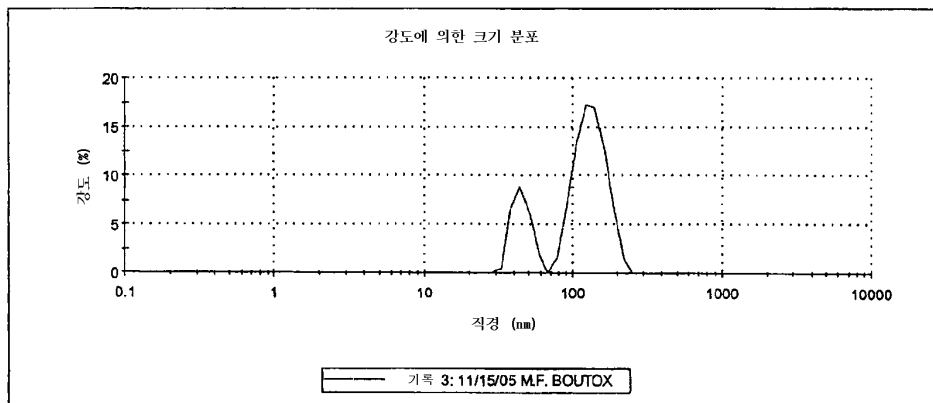
발명의 측면은 이러한 구성 요소, 특징, 단계 등으로 구성되거나 필수적으로 구성되는 것으로 이해하여야 할 것이다. 간소화할 목적으로, 구체예는 본 원에서 그대로 명확히 기술되지는 않았다. 즉, 하나 이상의 구성 요소, 특징, 단계 등을 포함하는 본 발명의 각 구체예의 경우, 본 발명은 또한 이들 구성 요소, 특징, 단계 등으로 구성되거나 필수적으로 구성된 구체예도 제공한다.

[0307] 범위가 주어진 경우, 끝점이 포함된다. 또한, 달리 언급이 없거나 그 문맥으로부터 명확하고/하거나, 당업자들이 파악하고 있다면, 범위로 표현된 값은 본 발명의 상이한 구체예에서 제시된 범위내 임의의 특정 값을 달리 명시하 없으면 범위의 하한 단위의 십분의 일까지 취할 수 있는 것으로 이해하여야 한다. 또한, 달리 언급이 없거나 그 문맥으로부터 명확하고/하거나, 당업자들이 파악하고 있다면, 범위로 표현된 값은 제시된 범위내 임의의 준범위를 취할 수 있으며, 이때 준범위의 끝점은 범위의 하한 단위의 십분의 일과 동일한 정확도로 표현된다 고 이해하여야 한다.

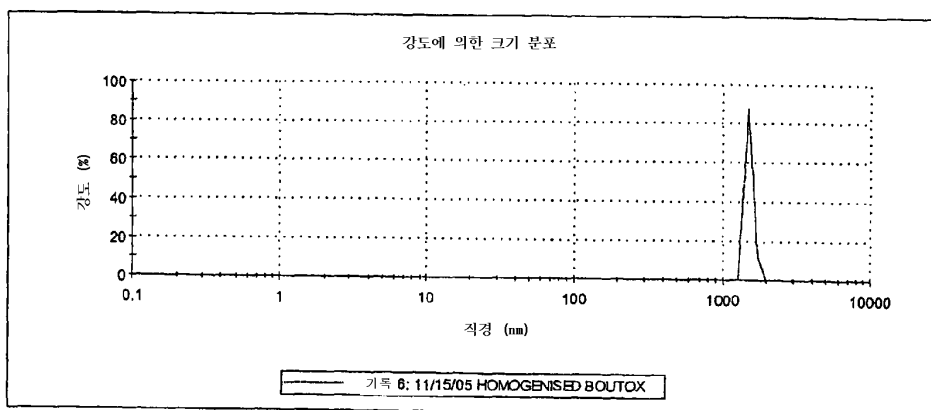
[0308] 또한, 임의의 하나 이상의 청구항으로부터 본 발명의 임의의 특정 구체예가 명백히 배제될 수 있는 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 조성물 및/또는 방법의 임의의 구체예, 구성 요소, 특징, 적용 또는 측면(예컨대 임의의 보툴리눔 독소, 임의의 오일, 임의의 계면활성제, 임의의 분산 매질, 임의의 나노입자, 임의의 나노입자를 포함하는 조성물, 나노입자의 임의의 제조방법, 임의의 투여 경로 또는 위치, 조성물을 투여하는 임의의 목적 등)이 임의의 하나 이상의 청구항으로부터 배제될 수 있다. 간결화를 위해, 하나 이상의 구성 요소, 특징, 목적 또는 측면이 배제된 모든 구체예가 본 원에 명확히 기술되지는 않았다.

## 도면

### 도면1

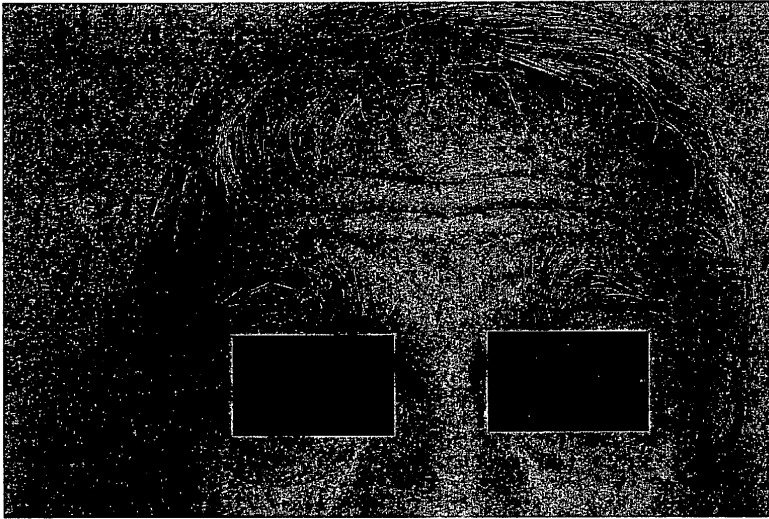


### 도면2



도면3

3A:



3B:

