



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월28일
(11) 등록번호 10-1322433
(24) 등록일자 2013년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/42 (2006.01) A61K 9/38 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7012049(분할)
(22) 출원일자(국제) 2005년03월03일
심사청구일자 2012년06월08일
(85) 번역문제출일자 2012년05월09일
(65) 공개번호 10-2012-0091198
(43) 공개일자 2012년08월17일
(62) 원출원 특허 10-2006-7020210
원출원일자(국제) 2005년03월03일
심사청구일자 2010년03월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/007524
(87) 국제공개번호 WO 2005/084410
국제공개일자 2005년09월15일
(30) 우선권주장
60/550,015 2004년03월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20030229034 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
레반스 테라퓨틱스, 아이엔씨.
미국 캘리포니아 94560 뉴어크 게이트웨이 블레바드 7555
(72) 발명자
데이크 마이클 디.
미국 캘리포니아 94305 스탠포드 제로나 로드 665
워 제이콥 엠.
미국 캘리포니아 94040 마운틴 뷰 엘 카미오 리얼 #1116 4020
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 62 항

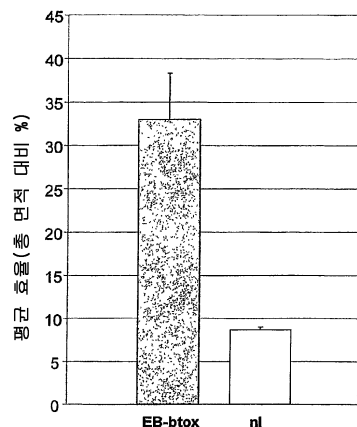
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 보툴리눔 독소의 국소 적용 및 경피 전달을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

보툴리눔 독소(보툴리눔 독소 유도체 포함)의 국소 적용을 위한 조성물은 보툴리눔 독소 및 양전하로 하전된 분지형 또는 "효능(efficiency) 기"가 부착된 긴-사슬 폴리펩티드 또는 비-펩티드 폴리머를 포함하는 담체를 포함한다. 본 발명은 또한 유효량의 보툴리눔 독소 및 담체를 대상자의 피부 또는 상피에 국소적으로 적용하여 근육 마비 및 보툴리눔 독소로 치료될 수 있는 다른 증상들, 특히, 피하 근육, 가장 특별하게는, 안면 근육의 마비를 경감하는 방법에 관한 것이다. 투여용 키트도 또한 기재된다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

약제학적 조성물로서, 상기 약제학적 조성물은

보툴리눔 독소,

양전하로 하전된 효능 기가 부착된 양전하로 하전된 폴리머성 백본을 포함하는 양전하로 하전된 담체, 및

분산제를 포함하고,

상기 보툴리눔 독소와 상기 양전하로 하전된 담체는 비-공유결합성 복합체를 형성하며,

상기 보툴리눔 독소와 상기 양전하로 하전된 담체는 보툴리눔 독소의 유효량을 경피로 전달하기 위한 양으로 함께 존재하며, 및

상기 양전하로 하전된 담체가 상기 보툴리눔 독소의 경피 전달을 위한 유일한 작용제인 것인 약제학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 보툴리눔 독소는 재조합 보툴리눔 독소를 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 보툴리눔 독소는 융합 단백질을 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 혈청형 A, B, C, D, E, F 및 G로부터 선택되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 A형인 것인 약제학적 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 B형인 것인 약제학적 조성물.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 C형인 것인 약제학적 조성물.

청구항 9

청구항 5에 있어서, 상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 D형인 것인 약제학적 조성물.

청구항 10

청구항 5에 있어서, 상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 E형인 것인 약제학적 조성물.

청구항 11

청구항 5에 있어서, 상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 F형인 것인 약제학적 조성물.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 G형인 것인 약제학적 조성물.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 양전하로 하전된 담체는 아래첨자 n_1 은 0 내지 20의 정수이고 아래첨자 n_2 는 독립적으로 5 내지 25의 홀수인 것인 $-(\text{gly})_{n_1}-(\text{arg})_{n_2}$, 아래첨자 n_3 은 3 내지 5의 정수이고 아래첨자 n_4 는 7 내지 17의 홀수인 것인 $-(\text{gly})_{n_3}-(\text{arg})_{n_4}$, $\text{gly}_3-\text{arg}_7$, HIV-TAT, 안테나페디아 PTD, 아래첨자 p 및 q 는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수인 것인 식 $(\text{gly})_p-\text{RGRDDRRQRRR}-(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p-\text{YGRKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$, 또는 $(\text{gly})_p-\text{RKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$ 를 갖는 HIV-TAT 단편, 및 GGRKKRRQRRR로부터 선택되는 양전하로 하전된 효능 기를 갖는 폴리펩티드를 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 아래첨자 n_1 은 0 내지 8의 정수인 것인 약제학적 조성물.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 아래첨자 n_1 은 2 내지 5의 정수인 것인 약제학적 조성물.

청구항 16

청구항 13에 있어서, 상기 아래첨자 n_2 는 7 내지 17의 홀수인 것인 약제학적 조성물.

청구항 17

청구항 13에 있어서, 상기 아래첨자 n_2 는 7 내지 13의 홀수인 것인 약제학적 조성물.

청구항 18

청구항 1에 있어서, 상기 양전하로 하전된 효능 기는 상기 양전하로 하전된 담체 총 중량의 0.05 중량% 이상을 구성하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 19

청구항 1에 있어서, 상기 양전하로 하전된 효능 기는 상기 양전하로 하전된 담체 총 중량의 0.5 중량% 내지 45 중량%를 구성하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 20

청구항 1에 있어서, 상기 양전하로 하전된 효능 기는 상기 양전하로 하전된 담체 총 중량의 0.1 중량% 내지 30 중량%를 구성하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 21

청구항 1에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 양전하로 하전된 폴리펩티드를 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 양전하로 하전된 폴리라이신을 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 폴리라이신은 25,000 미만의 분자량을 갖는 것인 약제학적 조성물.

청구항 24

청구항 22에 있어서, 상기 폴리라이신은 10,000 내지 1,500,000의 분자량을 갖는 것인 약제학적 조성물.

청구항 25

청구항 22에 있어서, 상기 폴리라이신은 25,000 내지 1,200,000의 분자량을 갖는 것인 약제학적 조성물.

청구항 26

청구항 22에 있어서, 상기 폴리라이신은 100,000 내지 1,000,000의 분자량을 갖는 것인 약제학적 조성물.

청구항 27

청구항 1에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 양전하로 하전된 비-펩티드(nonpeptidyl) 담체를 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 양전하로 하전된 폴리알킬렌이민을 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 상기 폴리알킬렌이민은 폴리에틸렌이민인 것인 약제학적 조성물.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 상기 폴리에틸렌이민은 10,000 내지 2,500,000의 분자량을 갖는 것인 약제학적 조성물.

청구항 31

청구항 29에 있어서, 상기 폴리에틸렌이민은 100,000 내지 1,800,000의 분자량을 갖는 것인 약제학적 조성물.

청구항 32

청구항 29에 있어서, 상기 폴리에틸렌이민은 500,000 내지 1,400,000의 분자량을 갖는 것인 약제학적 조성물.

청구항 33

청구항 1에 있어서, 4.5 내지 6.3의 pH를 갖는 것인 약제학적 조성물.

청구항 34

청구항 1에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 실온 또는 냉장 조건 하에서 보관될 때 안정한 것인 약제학적 조성물.

청구항 35

청구항 1에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 제어 방출형(controlled release) 조성물인 것인 약제학적 조성물.

청구항 36

청구항 1에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 액체 조성물인 것인 약제학적 조성물.

청구항 37

청구항 1에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 겔 조성물인 것인 약제학적 조성물.

청구항 38

청구항 1에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 크림, 로션 또는 연고인 것인 약제학적 조성물.

청구항 39

청구항 1에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 국소로 적용되고, 염수를 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 40

청구항 1에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 국소로 적용되고, 염수 및 pH 완충 시스템을 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 맞춤형 애플리케이터(custom applicator)를 이용하여 국소로 적용되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 상기 맞춤형 애플리케이터는 의료 전문가에 의한 사용을 위해 설계된 것인 약제학적 조성물.

청구항 43

청구항 41에 있어서, 상기 맞춤형 애플리케이터는 개체에 의한 자가-투여를 위해 설계된 것인 약제학적 조성물.

청구항 44

청구항 40에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 상기 보툴리눔 독소 및 상기 양전하로 하전된 담체를 포함하는 사전에 조제된(pre-formulated) 조성물인 것인 약제학적 조성물.

청구항 45

청구항 41에 있어서, 상기 보툴리눔 독소는 상기 보툴리눔 독소를 피부를 통해 개체에게 투여하기 위한 장치에 담겨있는 것인 약제학적 조성물.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 상기 장치는 피부 패치인 것인 약제학적 조성물.

청구항 47

청구항 1에 있어서, 상기 양전하로 하전된 담체는 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수인 것인 $(gly)_p$ -RGRDDRRQRRR- $(gly)_q$, $(gly)_p$ -YGRKKRRQRRR- $(gly)_q$, 또는 $(gly)_p$ -RKKRRQRRR- $(gly)_q$, 및 GGGRKKRRQRRR로 구성된 군으로부터 선택된 양전하로 하전된 효능 기가 부착된 폴리펩티드를 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 48

청구항 47에 있어서, 상기 양전하로 하전된 담체는 식 $(gly)_p$ -RGRDDRRQRRR- $(gly)_q$ 를 갖는 양전하로 하전된 효능 기가 부착된 것인 약제학적 조성물.

청구항 49

청구항 47에 있어서, 상기 양전하로 하전된 담체는 식 $(gly)_p$ -YGRKKRRQRRR- $(gly)_q$ 를 갖는 양전하로 하전된 효능 기가 부착된 것인 약제학적 조성물.

청구항 50

청구항 47에 있어서, 상기 양전하로 하전된 담체는 식 $(gly)_p$ -RKKRRQRRR- $(gly)_q$ 를 갖는 양전하로 하전된 효능 기가 부착된 것인 약제학적 조성물.

청구항 51

청구항 47에 있어서, 상기 양전하로 하전된 담체는 식 GGGRKKRRQRRR을 갖는 양전하로 하전된 효능 기가 부착된 것인 약제학적 조성물.

청구항 52

청구항 1에 있어서, 상기 조성물의 점도를 증가시키기 위한 겔화제 및 점도-조절제 중 하나 이상을 더 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 53

청구항 1에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제 중 하나 이상을 더 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 54

청구항 1에 있어서, 상기 보툴리눔 독소의 결집을 방지하기 위한 양의 분산제를 더 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 55

청구항 1에 있어서, 상기 분산제는 에탄올인 것인 약제학적 조성물.

청구항 56

청구항 55에 있어서, 에탄올은 상기 조성물 중에 조성물의 20% 미만의 양으로 존재하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 57

청구항 55에 있어서, 에탄올은 상기 조성물 중에 조성물의 5% 미만의 양으로 존재하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

청구항 1에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 21,000 미만의 분자량을 갖는 것인 약제학적 조성물.

청구항 61

청구항 60에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 폴리라이신 또는 폴리에틸렌이민인 것인 약제학적 조성물.

청구항 62

청구항 1에 있어서, 상기 효능 기는 보호된 올리고아르기닌 또는 TAT 도메인인 것인 약제학적 조성물.

청구항 63

청구항 52에 있어서, 상기 점도-조절제는 히드록시프로필셀룰로오스 또는 세타필인 것인 약제학적 조성물.

청구항 64

청구항 1에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 주름, 다한증, 여드름, 및 근육 경련으로 구성된 군으로부터 선택된 상태의 치료를 위해 이용되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 65

보툴리눔 독소의 경피 전달을 위한 키트로서, 상기 키트는 청구항 1에 따른 약제학적 조성물을 포함하는 것인 키트.

명세서

기술분야

- [0001] 본 출원은 2004년 3월 3일에 제출된 미국 가출원 제60/550,015호에 기초한 우선권 이익을 주장한다. 미국 가출원 제60/550,015호는 그 전체가 원용에 의해 본 출원에 포함된다.
- [0002] 본 발명은 보툴리눔 독소를 포함하는 신규한 조성물에 관한 것이며, 보다 상세하게는 보툴리눔 독소의 피부 또는 상피를 통한 수송 또는 전달("경피 전달"로도 지칭됨)을 가능하게 하고 따라서 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 다양한 치료, 심미 및/또는 미용 목적을 위해 대상자에게 보툴리눔 독소를 제공하기 위해 국소 적용으로 이용될 수 있는 조성물들에 관한 것이다.

배경기술

- [0003] 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.
- [0004] 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 케라티노사이트로 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.
- [0005] 표피 바로 하부에 존재하는 진피는 그 두께가 1.5 내지 4 밀리미터이다. 진피는 피부의 세 층들 중에서 가장 두껍다. 또한, 진피는 또는 한선 및 유선(면포 또는 모공이라 불리는 피부의 개구부들을 통해 물질들을 분비함), 모근, 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.
- [0006] 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 정상 상태에서 5와 6 사이이다. 피부의 산성은 피지선의 분비물로부터 유래한 양성(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.
- [0007] 노화의 자명한 징후들 중 하나인 주름은 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 이차적인 인자들은 피부에 대한 중력의 지속적인 인력, (즉, 수면 동안) 빈번하고 지속적인 위치적 압력(positional pressure), 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)). 노화의 징후들 중 일부를 잠재적으로 완화시키기 위해 상이한 기법들이 이용되고 있다. 이 기법들은 알파 히드록시산 및 레티놀을 포함하는 안면 보습제에서 외과적 수술 및 신경 독소의 주사에 이르기까지 다양하다.
- [0008] 피부의 주요 기능들 중 하나는 정상적인 항상성에 잠재적으로 유해할 수 있는 물질들 및 물의 수송에 대한 장벽을 제공하는 것이다. 신체는 단단하고, 반-투과성인 피부가 없다면 빠르게 탈수될 것이다. 피부는 유해한 물질들의 신체로의 침입을 방지하도록 돕는다. 대부분의 물질들은 장벽을 침투할 수 없으나, 다양한 성공율로 피부의 투과성을 선택적으로 증가시키기 위한 다수의 전략들이 개발되었다.
- [0009] 보툴리눔 독소(보툴린 독소 또는 보툴리눔 신경 독소로도 알려짐)는 그람 양성균인 클로스트리디움 보툴리눔

(*Clostridium botulinum*)에 의해 생성되는 신경독소이다. 보툴리눔 독소는 신경근 접합부(neuromuscular junction)를 통한 아세틸콜린의 시냅스 전달 또는 방출을 막아서 근육의 마비를 가져오도록 작용하며, 또한 다른 방식으로도 작용하는 것으로 생각된다. 그들의 작용은 정상적으로 근육 경련 또는 수축을 유발하는 신호들을 본질적으로 차단하여, 마비를 초래한다.

[0010] 보툴리눔 독소는 혈청학적으로 관련되어 있으나(serologically related), 구별되는 8가지 신경 독소로 분류된다. 이들 중에서, 7종, 즉, 보툴리눔 신경 독소 혈청형 A, B, C, D, E, F 및 G는 마비를 유발할 수 있다. 이들 각각은 혈청형-특이적(type-specific) 항체들에 의한 중화(neutralization)에 의해 구별된다. 그럼에도 불구하고, 이와 같은 7종의 활성 보툴리눔 독소 혈청형 모두에 대해, 보툴리눔 독소 단백질의 분자량은 약 150 kD이다. 그 세균에 의해 분비되는 보툴리눔 독소는 대상인 150 kD 보툴리눔 독소 단백질 분자와 함께 관련된 비-독소(non-toxin) 단백질을 포함하는 복합체들이다. 보툴리눔 독소 A형 복합체는 클로스트리디아 세균에 의해 900 kD, 500 kD 및 300 kD 형태로 생성될 수 있다. 보툴리눔 독소 B형 및 C형은 외견상으로는 700 kD 또는 500 kD 복합체로만 생성된다. 보툴리눔 독소 D형은 300 kD 및 500 kD 복합체로서 생성된다. 보툴리눔 독소 E형 및 F형은 약 300kD 복합체로만 생성된다. 복합체들(즉, 약 150 kD을 초과하는 분자량)은 비-독소인 헤마글루티닌 단백질 및 비-독소(non-toxin)이고 무독성인 헤마글루티닌이 아닌 단백질(non-toxin and non-toxic nonhematoglutinin)을 포함하는 것으로 생각된다. (보툴리눔 독소 분자와 함께 관련된 신경 독소 복합체를 구성하는) 이와 같은 2종의 비-독소 단백질은 독소가 섭취된 경우, 보툴리눔 독소 분자에 변성에 대한 안정성 및 소화성 산(digestive acid)에 대한 보호를 제공하기 위해 작용할 수 있다. 또한, 보다 큰(분자량이 약 150 kD보다 큰) 보툴리눔 독소 복합체는 보툴리눔 독소 복합체의 근육내 주사 부위로부터 보툴리눔 독소의 확산 속도를 보다 느리게 할 수 있다.

[0011] *보툴리눔 독소의 상이한 혈청형들은 그들이 영향을 미치는 동물 종들 및 그들이 유발하는 마비의 심각도 및 지속 기간의 측면에서 상이하다. 예를 들면, 보툴리눔 독소 A형은 쥐에서 일으키는 마비율에 의해 측정하면 보툴리눔 독소 B형보다 500배 더 강력하다. 또한, 보툴리눔 독소 B형은 A형에 대한 영장류의 LD₅₀의 약 12배인 480 U/kg의 투여량에서 영장류에 무-독성인 것으로 확인되었다. 보툴리눔 독소의 분자 크기 및 분자 구조 때문에, 보툴리눔 독소는 각질층 및 피부 피부 아키텍처(underlying skin architecture)의 복수 층들을 통과할 수 없다.

[0012] 보툴리눔 독소에 대한 전신 노출에 의한 특징적인 복합 증후군(symptom complex)인 보툴리누스 중독증(Botulism)은 유럽에서 고대 이래로 존재해왔다. 1895년에, Emile P. van Ermengem은 벨기에에서 보툴리누스 중독증으로 사망한 희생자의 사후(post-mortem) 조직으로부터 얻은 염장 생돈육으로부터 혐기성 포자-형성 바실러스를 최초로 분리했다. Van Ermengem은 그 질병이 자신이 바실러스 보툴리누스(*Bacillus botulinus*)라 명명했던 균에 의해 생성된 세포의 독소에 의해 유발된다는 것을 발견했다(Van Ermengem, Z Hyg Infektionskr, 26: 1-56; Rev Infect (1897)). 그 명칭은 1922년에 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)으로 변경되었다. 클로스트리디움이라는 명칭은 해당 미생물의 혐기성 및 그의 형태적 특징을 반영하기 위해 이용되었다(Carruthers and Carruthers, Can J Ophthalmol, 31: 389-400(1996)). 1920년대에, 정제되지 않은 보툴리눔 독소 A형이 식중독의 추가적인 발생 후에 분리되었다. 샌프란시스코, 캘리포니아 대학의 Dr. Herman Sommer는 신경 독소를 정제하기 위한 최초의 시도들을 수행하였다(Borodic et al., Ophthalmic Plast Reconstr Surg, 7: 54-60 (1991)). 1946년에, Dr. Edward J. Schantz 및 그의 동료들은 신경 독소를 결정질 형태로 분리했다(Schantz et al., In: Jankovi J, Hallet M (Eds) Therapy with Botulinum Toxin, New York, NY: Marcel Dekker, 41-49(1994)). 1949년까지 Burgen 및 그의 동료들은 보툴리눔 독소가 신경근육 접합부 전체에 걸쳐 충격들(impulses)을 차단한다는 것을 입증할 수 있었다(Burgen et al., J Physiol, 109: 10-24(1949)). Allan B. Scott은 1973년에 최초로 보툴리눔 독소 A형(BTX-A)을 원숭이에서 이용했다. Scott은 3개월간 지속되는 가역적 안근 마비를 보였다(Lamanna, Science, 130: 763-772(1959)). 그 후 뒤이어, BTX-A는 사람에서 사시, 안검경련 및 경련성 사경의 성공적 치료제로 보고되었다(Baron et al., In Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM(Eds), Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology, St. Louis, MO: Mosby Year Book, 504-523(1994); Carruthers and Carruthers, Adv Dermatol, 12: 325-348 (1997); Markowitz, In: Strickland GT (Eds) Hunters Tropical Medicine, 7th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 441-444 (1991)). 1986년에, 안과성형 전문의 및 피부과 전문의로 구성된 부부인 Jean 및 Alastair Carruthers는 미간 영역에 있는 운동과 연관된 주름들의 치료를 위해 BTX-A의 미용적 용도를 개발하기 시작했다(Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, New York: Academic Press, 143-150(1981)). Carruther 부부에 의한 주름의 치료를 위한 BTX-A의 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 미용 목적 BTX-A 치료의 시대의 탄생을 가져왔다.

[0013] 보툴리눔 독소 A형은 사람에게 알려진 가장 치명적인 천연 생물학적 작용제로 불린다. C. 보툴리눔의 포자는 토양에서 발견되고 부적절하게 멸균되고 밀봉된 식품 용기들에서 자랄 수 있다. 그 세균의 섭취는 치명적일 수 있는 보툴리누스 중독증을 유발할 수 있다. 동시에, 보툴리눔 독소의 근육-마비 효과는 치료적 효과들을 위해 이용되고 있다. 보툴리눔 독소의 제어된 투여는 증상들, 예를 들면, 지나치게 과민한 골격근을 특징으로 하는 신경근육성 장애를 치료하기 위한 근육 마비를 제공하기 위해 이용되고 있다. 보툴리눔 독소로 치료되고 있는 증상들은 안면 경련, 성인 발병성 연축 사경, 열항, 안검경련, 뇌성마비, 경부 근긴장이상, 편두통, 사시, 악관절 장애, 및 다양한 종류의 근육 경련 및 발작을 포함한다. 보다 최근에는, 보툴리눔 독소의 근육-마비 효과가 주름, 찌푸린 주름(frown lines), 및 기타 안면 근육의 경련 또는 수축의 치료와 같은 치료 및 안면 성형 응용들에서 활용되고 있다.

[0014] 시술의 무고통 속성, 적용 대상이 될 수 있는 보다 넓은 치료 표면 영역, 보다 높은 특이성을 갖는 순수한 독소를 제조할 수 있는 능력, 보툴리눔 치료법을 시술하기 위해 필요한 감소된 훈련, 원하는 효과를 가져오기 위해 필요한 보다 작은 투여량, 및 치료적 임상 결과에 도달하기 위한 보다 큰 독소 웰들에 대한 요구의 부재 때문에 보툴리눔 독소의 국소 적용은 보다 안전하고 보다 바람직한 치료 대안을 제공할 것이다. 따라서, 다수의 증상들을 치료 또는 예방하기 위해 보툴리눔 독소를 투여하기 위한 주사를 요구하지 않는 효과적인 수단뿐 아니라, 보툴리눔 독소의 경피 전달을 위한 효과적인 수단이 매우 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 보툴리눔 독소를 포함하는 신규한 조성물에 관한 것이며, 보다 상세하게는 보툴리눔 독소의 피부 또는 상피를 통한 수송 또는 전달("경피 전달"로도 지칭됨)을 가능하게 하고 따라서 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 다양한 치료, 심미 및/또는 미용 목적을 위해 대상자에게 보툴리눔 독소를 제공하기 위해 국소 적용으로 이용될 수 있는 조성물들에 관한 것이다.

[0016] 본 발명의 일 양태는 보툴리눔 독소 및 담체를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다. 담체는 양전하로 하전된 분지형 기(positively charged branching groups)들이 부착된 폴리머성 백본을 갖는다. 담체와 보툴리눔 독소 간의 결합은 비-공유 결합성(non-covalent)이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 양태는 보툴리눔 독소를 대상자에게 투여하기 위한 키트를 제공하는 것이다. 그 키트는 경피 전달을 위한 유효량으로 존재하는 보툴리눔 독소, 및 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 폴리머성 백본을 갖는 담체를 포함한다. 담체와 보툴리눔 독소 간의 결합은 비-공유 결합성이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 양태는 보툴리눔 독소를 대상자에게 투여하기 위한 키트를 제공하는 것이다. 그 키트는 보툴리눔 독소를 피부에 전달하기 위한 장치 및 아래 첨자 n1은 0 내지 약 20 사이의 정수이고, 아래첨자 n2는 독립적으로 약 5 내지 약 25 사이의 홀수인 것인 $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT 및 그의 단편들, 및 안테나페디아(Antennapedia) PTD로부터 선택되는 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 폴리머성 백본을 갖는 담체를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0019] 본 발명은 또한 대상자의 피부 또는 상피에 유효량의 담체와 함께 보툴리눔 독소를 국소적으로 적용하는 단계를 포함하는, 대상자에게 보툴리눔 독소를 투여하는 방법을 제공한다. 담체는 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 폴리머성 백본을 가지며, 보툴리눔 독소와 비-공유적으로 결합한다.

[0020] 일 양태에서, 본 발명은 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 보툴리눔 독소 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 양전하로 하전된 분지형 또는 "효능(efficiency)"기를 갖는 양전하로 하전된 "백본(backbone)"을 포함하는 담체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 보다 바람직하게는, 양전하로 하전된 담체는 긴-사슬의 양전하로 하전된 폴리펩티드 또는 양전하로 하전된 비-펩티드성(non-peptidyl) 폴리머, 예를 들면, 폴리알킬렌아민이다. 본 발명은 또한 치료를 필요로 하는 대상자 또는 환자의, 바람직하게는 피부에 그와 같은 조성물의 유효량을 국소적으로 적용하여 근육 마비와 같은 생물학적 효과를 생성하거나, 과다 분비 또는 발汗을 감소시키거나, 신경병적 통증 또는 편두통을 치료하거나, 근육 경련을 완화시키거나, 여드름을 예방 또는 완화시키거나, 또는 면역 반응을 감소 또는 강화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 예를 들면, 보툴리눔 독소를 안면 근육으로의 주사 대

신에 국소적으로 적용하여 심미 또는 미용 효과를 생성하는 방법에 관한 것이다.

[0021] 본 발명은 또한 담체 및 보틀리눔 독소, 및 유용한 제제 또는 그와 같은 제제를 생산하기 위해 이용될 수 있는 프리믹스(premix)를 생산하기 위해 필요한 추가적인 요소들(items)을 포함하는 조성물을 제조 또는 조제하기 위한 키트를 제공한다. 대안적으로, 그 키트는 대상자에게 보틀리눔 독소와 담체를 별개로 그러나, 연결하여(in conjunction) 투여하기 위한 수단을 포함한다.

과제의 해결 수단

[0022] 본 발명은 적절한 제제의 국소 적용에 의해 보틀리눔 독소의 전달, 특히, 경피 전달을 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명에 따르면, 본 명세서에 기재된 바와 같은 효능 기들(efficiency groups)을 갖는 양전하로 하전된 담체 분자는 보틀리눔 독소가 근육 및/또는 다른 피부-관련 구조들로 경피적으로 투여될 수 있게 하는 보틀리눔 독소용 수송 시스템으로 적합한 것으로 파악되었다. 수송은 보틀리눔 독소의 공유결합성 변형(covalent modification)없이 일어난다.

[0024] "양전하로 하전된(positively charged)"은 담체가 적어도 일부 용액-상 조건들에서, 보다 바람직하게는 적어도 일부 생리적으로 양립가능한 조건들에서 양전하를 갖는다는 것을 의미한다. 보다 상세하게는, 본 명세서에서 사용되는 "양전하로 하전된"은 대상이 되는 기(group)가 예를 들면, 4차 아민과 같이 모든 pH 조건들에서 하전된 작용기들(functionalities)을 포함하거나 또는 일부 용액-상 조건들에서, 예를 들면, 일차 아민의 경우, pH 변화와 같은 조건들에서 양전하를 얻을 수 있는 작용기를 포함하는 것을 의미한다. 보다 바람직하게는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "양전하로 하전된"은 생리적으로 양립가능한 조건들에서 음이온과 결합하는 행동을 갖는 기들을 의미한다. 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들에게 자명한 바와 같이, 양전하로 하전된 복수 개의 모이어티(moiety)를 갖는 폴리머들이 단일 중합체(homopolymer)일 필요는 없다. 양전하로 하전된 모이어티의 다른 예들은 종래 기술에서 잘 알려져 있고 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들에게 자명한 바와 같이, 용이하게 채택될 수 있다.

[0025] 일반적으로, 양전하로 하전된 담체(또한, "양전하로 하전된 백본(positively charged backbone)"이라고도 지칭됨)는 통상적으로 생리적 pH에서 양전하를 갖는 기들 또는 백본으로부터 신장되는 결사슬에 부착된 양전하를 갖는 기들을 갖는 원자들의 직쇄이다. 바람직하게는, 양전하로 하전된 백본 자체는 정의된 효소 또는 치료적 생물학적 활성을 갖지 않을 것이다. 직선형 백본은 탄화수소 백본으로, 일부 구체예들에서는 질소, 산소, 황, 규소 및 인으로부터 선택되는 이종원자들이 백본에 개입된다. 백본 사슬을 구성하는 원자들의 대부분은 통상적으로 탄소이다. 또한, 백본은 반복 단위로 구성된 폴리머(예를 들면, 아미노산, 폴리(에틸렌옥시), 폴리(프로필렌아민), 폴리알킬렌아민, 등)이나, 이종중합체(heteropolymer)일 수 있다. 일 군의 구체예들에서, 양전하로 하전된 백본은 다수의 아민 질소 원자들이 양전하를 갖는 (테트라-치환된) 암모늄 기로서 존재하는 폴리프로필렌아민이다. 또 다른 구체예에서, 양전하로 하전된 백본은 비-펩티드성 폴리머이고, 이는 폴리알킬렌아민과 같은 이종중합체 또는 단일 중합체, 예를 들면, 약 10,000 내지 약 2,500,000의 분자량, 바람직하게는 약 100,000 내지 약 1,800,000 및 가장 바람직하게는 500,000 내지 약 1,400,000의 분자량을 갖는 폴리에틸렌아민 또는 폴리프로필렌아민일 수 있다. 또 다른 일 군의 구체예들에서, 백본은 양전하로 하전된 기들(예를 들면, 암모늄 기들, 피리디늄 기들, 포스포늄 기들, 술포늄 기들, 구아니디늄 기들, 또는 아미디늄 기들)을 포함하는 복수 개의 결-사슬 모이어티들을 부착한다. 이 군의 구체예들에서 결사슬 모이어티들은 백본을 따라 간격(spacing)이 일정하거나 또는 가변적인 위치들에 배치될 수 있다. 또한, 결사슬의 길이는 유사하거나 또는 상이할 수 있다. 예를 들면, 일군의 구체예들에서, 결사슬은 하나 내지 20개의 탄소 원자들을 갖고 (백본으로부터 멀리 위치한) 말단부에 있는 전술된 양전하로 하전된 기들에서 종결되는 직선형 또는 분지형 탄화수소 사슬일 수 있다. 본 발명의 모든 양태들에서, 담체와 생물학적 활성제 간의 결합은 비-공유결합성 상호작용에 의하며, 비-공유결합성 상호작용의 비-한정적인 예들은 이온성 상호작용, 수소 결합, 반 데르 발스 힘, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0026] 일군의 구체예들에서, 양전하로 하전된 백본은 복수 개의 양전하로 하전된 결사슬 기들(예를 들면, 라이신, 아르기닌, 오르니틴, 호모아르기닌, 등)을 갖는 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 약 10,000 내지 약 1,500,000, 보다 바람직하게는 약 25,000 내지 약 1,200,000, 가장 바람직하게는 약 100,000 내지 약 1,000,000의 분자량을 갖는다. 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 아미노산들이 본 발명의 이 부분에서 이용되는 경우, 결사슬들은 부착 센터(center of attachment)에서 D- 또는 L-형(R 또는 S 구조)을 가질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 대안적으로, 백본은 펩토이드(peptoid)와 같은 폴리펩티드의 유사체일 수 있다. 예를

들면, 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. 간단히 말하면, 펩토이드는 결사슬이 α -탄소 원자가 아닌 백본 질소 원자들에 부착된 폴리글리신이다. 전술된 바와 같이, 결사슬들의 일부는 양전하로 하전된 백본 성분을 제공하기 위해 통상적으로 양전하로 하전된 기에서 종료될 것이다. 펩토이드의 합성은 예를 들면, 원용에 의해 그 전체가 본 명세서에 포함된, 미국특허 제5,877,278호에 기재된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 펩토이드 백본 구조를 갖는 양전하로 하전된 백본들은 α -탄소 위치들에 천연(naturally occurring) 결사슬을 갖는 아미노산들로 구성되지 않기 때문에 "비-펩티드(non-peptide)"로 간주된다.

[0027] 펩티드의 아미드 결합(linkage)이 에스테르 결합, 티오아미드(-CSNH-), 역전된 티오아미드(-NHCS-), 아미노메틸렌(-NHCH₂-) 또는 역전된 메틸렌아미노(-CH₂NH-)기들, 케토-메틸렌(-COCH₂-) 기들, 포스포네이트(-PO₂RCH₂-), 포스포아미데이트 및 포스포아미데이트 에스테르(-PO₂RNH-), 역전된 펩티드(-NHCO-), 트랜스-알켄(-CR=CH-), 플루오로알켄(-CF=CH-), 디메틸렌(-CH₂CH₂-), 티오에테르(-CH₂S-), 히드록시에틸렌(-CH(OH)CH₂-), 메틸렌옥시(-CH₂O-), 테트라졸(CN₄), 술폰아미도(-SO₂NH-), 메틸렌술폰아미도(-CHRSO₂NH-), 역전된 술폰아미도(-NHSO₂-)와 같은 대용기(surrogate)에 의해 치환된 폴리펩티드의 입체적 또는 전자적 모방체들(mimics) 및 말로네이트 및/또는 겐-디아미노-알킬 서브유닛들을 갖는 백본들, 예를 들면, Fletcher et al.((1998) Chem. Rev. 98: 763)에 의해 검토되고 본 명세서에 인용된 참고문헌들에 의해 상술된 것들을 채택하는 다양한 다른 백본들이 이용될 수 있다. 전술된 치환기들의 다수는 α -아미노산으로부터 형성되는 백본들에 대해 등입체성(isosteric) 폴리머 백본들을 초래할 것이다.

[0028] 전술된 백본들 각각에서, 양전하로 하전된 기를 갖는 결사슬 기들이 부착될 수 있다. 예를 들면, 술폰아미드-결합된 백본들(-SO₂NH- 및 -NHSO₂-)은 질소 원자에 부착된 결사슬 기들을 가질 수 있다. 유사하게는, 히드록시에틸렌(-CH(OH)CH₂-) 결합은 히드록시 치환기에 부착된 결사슬 기를 가질 수 있다. 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 표준 합성 방법을 이용하여 양전하로 하전된 결사슬 기들을 제공하기 위해 다른 화학적 특성을 갖는 결합들(linkage chemistry)을 용이하게 개조할 수 있다.

[0029] 일 구체예에서, 양전하로 하전된 백본은 분지형 기들(효능 기(efficiency group)로도 지칭됨)을 갖는 폴리펩티드이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 효능 기 또는 분지형 기는 조직 또는 세포막을 통해 양전하로 하전된 백본의 전위(translocation)를 촉진하는 효과를 가지는 임의의 작용제(agent)이다. 분지형 또는 효능 기의 비-한정적인 예들은 아래첨자 n₁은 0 내지 20의 정수, 보다 바람직하게는 0 내지 8, 훨씬 더 바람직하게는 2 내지 5의 정수이고, 아래첨자 n₂는 약 5 내지 약 25 사이의 홀수, 보다 바람직하게는 약 7 내지 약 17 사이의 홀수, 가장 바람직하게는 약 7 내지 약 13 사이의 홀수인 것인, -(gly)_{n1}-(arg)_{n2}, HIV-TAT 또는 그의 단편, 또는 안테나페디아의 단백질 변환 도메인(protein transduction domain), 또는 그의 단편을 포함한다. HIV-TAT 단편이 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20 사이의 정수인 식 (gly)_p-RGRDDRRQRRR-(gly)_q, (gly)_p-YGRKKRRQRRR-(gly)_q 또는 (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q을 가지며, 상기 단편은 그 단편의 C-말단 또는 N-말단을 통해 백본에 부착되는 것인 구체예들이 훨씬 더 바람직하다. 바람직한 HIV-TAT 단편들은 아래첨자 p 및 q가 각각 독립적으로 0 내지 8, 보다 바람직하게는 2 내지 5 사이의 정수인 것들이다. 또 다른 구체예에서, 양전하로 하전된 결사슬 또는 분지형 기는 안테나페디아(Antp) 단백질 변환 도메인(PTD), 또는 활성을 유지하는 그의 단편이다. 바람직하게는 양전하로 하전된 담체는 총 담체 중량 대비 백분율로서, 약 0.05% 이상의 양, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 45 중량% 및 가장 바람직하게는 약 0.1 내지 약 30 중량%의 양으로 결-사슬이 양전하로 하전된 분지형 기들을 포함한다. 식 -(gly)_{n1}-(arg)_{n2}를 갖는 양전하로 하전된 분지형 기에 대해, 가장 바람직한 양은 약 0.1 내지 약 25%이다.

[0030] 또 다른 구체예에서, 백본 부분은 폴리라이신이고 양전하로 하전된 기들은 라이신 결사슬 아미노 기들에 부착된다. 폴리라이신은 약 10,000 내지 약 1,500,000, 바람직하게는 약 25,000 내지 약 1,200,000 및 가장 바람직하게는 약 100,000 내지 약 1,000,000의 분자량을 가질 수 있다. 폴리라이신은 예를 들면, 70,000을 초과하는 분자량을 갖는 폴리라이신, 70,000 내지 150,000의 분자량을 갖는 폴리라이신, 150,000 내지 300,000의 분자량을 갖는 폴리라이신 및 300,000을 초과하는 분자량을 갖는 폴리라이신과 같은 상업적으로 입수 가능한(Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) 임의의 폴리라이신일 수 있다. 적합한 폴리라이신의 선택은 조성물의 다른 성분들에 의존적이며 조성물의 전체 순 양전하를 제공하고 바람직하게는 음전하로 하전된 성분들의

총 길이의 1배 내지 4배의 길이를 제공하기에 충분할 것이다. 바람직한 양전하로 하전된 분지형 기 또는 효능 기들은 예를 들면, $-\text{gly}-\text{gly}-\text{gly}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}(-\text{Gly}_3\text{Arg}_7)$ 또는 HIV-TAT를 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 양전하로 하전된 백본은 폴리에틸렌이민, 예를 들면, 약 1,000,000의 분자량을 갖는 폴리에틸렌이민과 같은 긴 사슬 폴리알킬렌이민이다.

[0031] 전술된 분지형 기들을 갖는, 폴리펩티드 또는 폴리알킬렌이민을 포함하는 양전하로 하전된 백본 또는 담체 분자들은 신규한 화합물이고 본 발명의 일 양태를 형성한다.

[0032] 본 발명의 일 구체예에서, 보툴리눔 독소의 경피 전달을 위해 양전하로 하전된 분지형 기들을 갖는 양전하로 하전된 담체만 요구된다. 일부 구체예들에서, 양전하로 하전된 담체는 전술된 바와 같이, 복수 개의 양전하로 하전된 결-사슬 기들을 갖는 폴리펩티드(예를 들면, 라이신, 아르기닌, 오르니틴, 호모아르기닌, 등)이다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 약 10,000 이상의 분자량을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 양전하로 하전된 담체는 약 100,000 이상의 분자량을 갖는 복수 개의 양전하로 하전된 결-사슬기들을 갖는 폴리알킬렌이민과 같은 비펩티드 성 폴리머이다. 그와 같은 폴리알킬렌이민은 폴리에틸렌이민 및 폴리프로필렌이민을 포함한다. 어느 경우이나, 경피 전달을 위해 유일하게 필요한 작용제로서의 용도를 위해, 양전하로 하전된 담체 분자는 아래첨자 n_1 은 0 내지 20, 보다 바람직하게는 0 내지 8, 훨씬 더 바람직하게는 2 내지 5의 정수이고 아래첨자 n_2 는 독립적으로 약 5 내지 약 25 사이, 보다 바람직하게는 약 7 내지 17 사이, 및 가장 바람직하게는 약 7 내지 약 13 사이의 홀수인 $-(\text{gly})_{n_1}-(\text{arg})_{n_2}-$, HIV-TAT 또는 그의 단편들, 또는 안테나페디아 PTD 또는 그의 단편을 포함하는 양전하로 하전된 분지형 기 또는 효능 기를 포함한다. 바람직하게는, 결-사슬 또는 분지형 기들은 전술된 바와 같은 일반식 $-(\text{gly})_{n_1}-(\text{arg})_{n_2}-$ 를 갖는다. 다른 바람직한 구체예들은 분지형 또는 효능 기들이 아래첨자 p 및 q 는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수인, 식 $(\text{gly})_p-\text{RGRDDRRQRRR}-(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p-\text{YGRKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$, 또는 $(\text{gly})_p-\text{RKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$ 를 갖는 HIV-TAT 단편들이고 상기 단편은 상기 단편의 C-말단 또는 N-말단을 통해 담체 분자들에 부착되는 경우들이다. 결 분지형 기들(side branching groups)은 부착의 센터에서 D- 또는 L-형(R 또는 S 구조)이다. 바람직한 HIV-TAT 단편들은 아래첨자 p 및 q 가 각각 독립적으로 0 내지 8, 보다 바람직하게는 2 내지 5인 단편들이다. 다른 바람직한 구체예들은 분지형 기들은 안테나페디아 PTD 기 또는 그 기의 활성을 유지하는 그의 단편들인 경우들이다. 이들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 예를 들면, Console 등, J. Biol. Chem. 278: 35109 (2003)에 공지되어 있다. 바람직하게는, 양전하로 하전된 담체는 결-사슬 양전하로 하전된 분지형 기들을 총 담체 중량의 백분율로, 약 0.05% 이상, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 45 중량%, 및 가장 바람직하게는 약 0.1 내지 약 30 중량%의 양으로 포함한다. 식 $-(\text{gly})_{n_1}-(\text{arg})_{n_2}$ 를 갖는 양전하로 하전된 분지형 기들의 경우, 가장 바람직한 양은 약 0.1 내지 약 25%이다.

[0033] 또 다른 구체예에서, 담체는 라이신 결-사슬 아미노 기들에 부착된 양전하로 하전된 분지형 기들을 갖는 폴리라이신이다. 이 특정한 구체예에서 이용된 폴리라이신은 예를 들면, 70,000을 초과하는 분자량을 갖는 폴리라이신, 70,000 내지 150,000의 분자량을 갖는 폴리라이신, 150,000 내지 300,000의 분자량을 갖는 폴리라이신 및 300,000을 초과하는 분자량을 갖는 폴리라이신과 같은 상업적으로 입수 가능한(Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) 임의의 폴리라이신일 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 폴리라이신은 약 10,000 이상의 분자량을 갖는다. 바람직한 양전하로 하전된 분지형 기들 또는 효능 기들은 예를 들면, $-\text{gly}-\text{gly}-\text{gly}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}-\text{arg}(-\text{Gly}_3\text{Arg}_7)$, HIV-TAT 또는 그의 단편들, 및 안테나페디아 PTD 또는 그의 단편들을 포함한다.

[0034] 본 발명의 다른 구체예들에서, 담체는 양전하로 하전된 분지형 기들을 갖는 (선형 또는 분지형일 수 있는) 상대적으로 짧은 폴리라이신 또는 폴리에틸렌이민(PEI) 백본이다. 그와 같은 담체들은 치료용 조성물에서 수송 효율을 급격한 감소를 유발하는 백본과 보툴리눔 독소의 제어되지 않은 결집(aggregation)을 최소화하기에 유용하다. 담체가 상대적으로 짧은 선형 폴리라이신 또는 PEI 백본인 경우, 백본은 75,000 미만, 보다 바람직하게는 30,000 미만, 및 가장 바람직하게는 25,000 미만의 분자량을 가질 것이다. 그러나, 담체가 상대적으로 짧은 분지형 폴리라이신 또는 PEI 백본인 경우, 백본은 60,000 미만, 보다 바람직하게는 55,000 미만, 및 가장 바람직하게는 50,000 미만의 분자량을 가질 것이다. 그러나, 본 명세서에 기재된 바와 같은, 분산제(partitioning agent)가 조성물에 포함되는 경우, 분지형 폴리라이신 및 PEI 백본의 분자량은 75,000까지 될 수 있고, 반면에 선형 폴리라이신 및 PEI의 분자량은 150,000까지 될 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 사용되는 "보툴리눔 독소(botulinum toxin)"라는 용어는 세균에 의해 또는 재조합 기술에 의해 생성되거나 또는 조작된 변이체들 또는 융합 단백질을 포함한 그에 뒤이어 발견될 수 있는 것인지 여부에 관계

없이 임의의 공지된 종류의 보툴리눔 독소를 의미하도록 의도된다. 전술된 바와 같이, 7가지의 면역학적으로 구분되는 보툴리눔 신경독소, 즉, 타입-특이적 항체들에 의해 중화되는 것에 의해 구별되는 보툴리눔 신경독소 혈청형 A, B, C, D, E, F 및 G가 파악되었다. 보툴리눔 독소 혈청형들은 Sigma-Aldrich 및 Metabologics, Inc.(Madison, Wisconsin), 및 다른 출처로부터 입수 가능하다. 보툴리눔 독소의 상이한 혈청형들은 그들이 영향을 미치는 동물 종들 및 그들이 유발하는 마비의 심각도 및 지속 기간이 상이하다. 최소한 두 종류의 보툴리눔 독소, A형 및 B형은 특정 증상들의 치료용 제제로서 상업적으로 입수 가능하다. A형은 예를 들면, BOTOX®라는 상표를 갖는 Allergan의 제제 및 DYSPORT®라는 상표를 갖는 Ipsen의 제제에 들어있고, B형은 MYOBLOC®이라는 상표를 갖는 Elan의 제제에 들어있다.

[0036] 본 발명의 조성물에서 이용되는 보툴리눔 독소는 대안적으로 보툴리눔 독소 유도체, 즉, 보툴리눔 독소 활성을 가지나 천연 또는 재조합 보툴리눔 독소를 기준으로 임의의 부분 또는 임의의 사슬 상에 하나 이상의 화학적 또는 기능적 변형을 갖는 화합물일 수 있다. 예를 들면, 보툴리눔 독소는 변형된 신경독소(천연 또는 재조합 신경독소 또는 그의 유도체 또는 단편에 대비해 그 아미노산들 중 하나 이상이 결실, 변형 또는 치환된 신경독소)일 수 있다. 예를 들면, 보툴리눔 독소는 그의 특성을 강화하거나 또는 원치않는 부작용을 감소시키나, 원하는 보툴리눔 독소의 활성은 보유하는 방식으로 변형된 것일 수 있다. 보툴리눔 독소는 전술된 바와 같이 세균에 의해 생성된 보툴리눔 독소 복합체일 수 있다. 대안적으로, 보툴리눔 독소는 재조합 또는 합성 화학 기법을 이용하여 제조된 독소일 수 있다(예를 들면, 재조합 펩티드, 융합 단백질, 또는 상이한 보툴리눔 독소 혈청형들의 서브유닛들 또는 도메인들로부터 제조된 하이브리드 신경독소(예를 들면, 미국특허 제6,444,209호 참조)). 보툴리눔 독소는 또한 필요한 보툴리눔 독소 활성을 가진 것으로 입증된 전체 분자의 일부분일 수 있고, 그와 같은 경우에, 그 자체로서 또는 조합(combination) 또는 접합(conjugation) 분자, 예를 들면 융합 단백질의 일부로서 이용될 수 있다. 또한, 보툴리눔 독소는 그 자체로는 무-독성인, 예를 들면, 단백질분해효소에 의한 절단(proteolytic cleavage)에 의해 독성을 갖게 되는 무독성의 아연 함유 단백질 분해효소(zinc protease)일 수 있는 보툴리눔 독소 전구체의 형태일 수 있다.

[0037] 본 발명은 또한 보툴리눔 독소들의 조합 및 혼합물들의 일반적인 용도를 고려하나, 그들의 상이한 속성 및 특성들 때문에, 일반적으로 보툴리눔 독소 혈청형들의 혼합물들은 현재 의료 또는 미용업계에서 투여되지 않는다.

[0038] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 대상자 또는 환자, 즉, 특정 치료를 필요로 하는 인간 또는 다른 포유동물의 피부 또는 상피에 적용되는 제품의 형태이다. "필요로 하는(in need)"이라는 용어는 약학적 또는 건강-관련 필요성, 예를 들면, 원치않는 안면근육 경련을 포함한 증상들을 치료하는 것과 미용 및 주관적 필요성, 예를 들면, 안면 조직의 외형을 변형하거나 개선하는 것을 모두 포함하도록 의도된다. 일반적으로, 조성물들은 보툴리눔 독소를 담체 및 통상적으로 하나 이상의 추가적인 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 혼합하는 것에 의해 제조된다. 가장 간단한 제형에서, 그들은 완충된 식염수와 같은 단순한 수성의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 그러나, 조성물들은 피부학적으로 또는 약학적으로 허용가능한 담체, 비히클 또는 매질(즉, 적용될 조직과 융합가능한(compatible) 담체, 비히클 또는 매질)을 포함한 국소용 약학적 또는 약용화장품(cosmeceutical)용 조성물들에서 통상적인 다른 성분들을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "피부학적으로 또는 약학적으로 허용가능한(dermatologically or pharmaceutically acceptable)"이라는 용어는 그와 같이 기재된 조성물들 또는 그의 성분들이 과다한 독성, 부적합성(incompatibility), 불안정성, 과민반응(allergic response) 등 없이 해당 조직들과의 접촉에서의 용도 또는 환자들에서의 용도에 적합하다는 것을 의미한다. 적합한 경우, 본 발명의 조성물들은 고려 대상인 분야, 특히 미용학(cosmetics) 및 피부학에서 통상적으로 이용되는 성분을 포함할 수 있다. 조성물들은 또한 다량의 소형 음이온, 바람직하게는 다가의 음이온(polyvalent anion), 예를 들면, 포스페이트, 아스파르테이트, 또는 시트레이트를 포함할 수 있다.

[0039] 그들의 제형의 측면에서, 본 발명의 조성물들은 본 조성물이 이용될 수 있는 피부 및 다른 조직들에의 적용을 위해 이용되는 용액, 유상액(마이크로에멀전 포함), 현탁액, 크림, 로션, 젤, 분말 또는 다른 통상적인 고체 또는 액체 조성물들을 포함할 수 있다. 그와 같은 조성물들은 보툴리눔 독소 및 담체 외에, 항진균제, 보습제 및 수화제, 침투제, 보존제, 유화제, 천연 또는 합성 오일, 용매, 계면활성제, 디터전트, 연화제(emollient), 향산화제, 방향제, 충전제, 점증제(thickener), 왁스, 탈취제(odor absorber), 염료, 착색제, 분말을 포함하고, 선택적으로 마취제, 항-소양증 첨가제(anti-itch additives), 식물 추출물, 컨디셔닝제(conditioning agent), 색소 침착제(darkening agent) 또는 미백제(lighening agent), 글리터(glitter), 습윤제, 돌비늘(mica), 미네랄, 폴리페놀, 실리콘 또는 그의 유도체, 자외선차단제, 비타민 및 약용식물을 포함하는, 그와 같은 제품들에서 통상적으로 이용되는 기타 성분들을 포함할 수 있다.

[0040] 특히 바람직한 구체예들에서, 조성물은 겔화제 및/또는 점도-조절제(viscosity-modifying agent)를 포함한다.

이와 같은 작용제들은 일반적으로 조성물의 점도를 증가시켜 조성물의 적용이 보다 용이하고 보다 정확하게 이루어질 수 있게 하기 위해 첨가된다. 또한, 이 작용제들은 보툴리눔 독소/담체 수용액이 건조되는 것을 방지하는데, 그 수용액이 건조되면 보툴리눔 독소의 활성을 감소키는 경향이 있다. 특별히 바람직한 작용제들은 피부를 통과할 때 변하지 않고, 보툴리눔 독소 활성 또는 독소-담체 복합체들의 효능을 방해하지 않는 것들이다. 겔 화제는 특성의 셀룰로오스-기반한 겔화제, 예를 들면, 히드록시프로필셀룰로오스(HPC)일 수 있다. 일부 구체예들에서, 보툴리눔 독소/담체 복합체는 2-4% HPC를 갖는 조성물로 조제될 수 있다. 대안적으로, 보툴리눔 독소/담체 복합체를 포함하는 용액의 점도는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 첨가하는 것에 의해 변할 수 있다. 다른 구체예들에서, 보툴리눔 독소/담체 용액은 Cetaphil® 모이스처라이저와 같은 프리-믹스된 점성 작용제와 조합될 수 있다.

[0041] 본 발명의 조성물은 선택적으로 분산제(partitioning agent)를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "분산제(partitioning agent)"는 보툴리눔 독소와 본 발명의 담체의 원치않는 또는 제어되지 않은 결집을 방지 또는 최소화하는 특성을 갖는 임의의 물질 또는 첨가제이다. 분산제는 예를 들면, 용량 제한 때문에 농축된 보툴리눔 독소 용액이 채택되어야만 하는 경우에 유용하다. 이와 같은 경우들에서, 분산제는 보툴리눔 독소가 분산된 상태로 있게 하여, 분산제가 없었다면 발생했을 독소의 결집을 방지한다. 일반적으로, 분산제는 (1) 무-자극성이고(non-irritating), (2) 보툴리눔 독소를 파괴하지 않으며, (3) 투과성의 증가를 부여하지 않고, (4) 신뢰할만하고 안정적인 입자 크기를 가지며, (5) 전하를 띠지 않고, (6) 독소 및 경피용 담체의 복합체들을 방해하지 않는다. 적합한 분산제의 예는 에탄올(EtOH)이다. 바람직한 구체예들에서, 에탄올은 조성물의 20% 미만이고, 가장 바람직하게는 조성물의 5% 미만이다.

[0042] 예로서, 용량 제한으로 인해, 2.5ml가 아닌 0.5ml의 용액으로 100U의 보툴리눔 독소를 재구성해야 하는 경우, 통상적으로 보툴리눔 독소는 바람직하지 못한 결집 및 이에 따라 저하된 활성을 보일 것이다. 그러나, 분산제로서 1% 에탄올을 첨가하면, 이 농도에서 24시간 이후에도 완전한 활성이 유지된다. 또 다른 예로서, 1.0 ml의 0.9% NaCl에 재구성된 Botox®는 완전한 활성을 가지며, 0.5 ml의 1% 및 5% 에탄올 + 0.9% NaCl에서의 재구성은 완전한 활성을 갖는 용액을 생성한다.

[0043] 본 발명의 특정 구체예들에서, 올리고- 또는 폴리음이온 다리들(polyanion bridges)을 보툴리눔 독소 조성물에 첨가하여 독소와 양전하로 하전된 백본 담체의 복합체화(complexation)을 개선한다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지된 바와 같이, 보툴리눔 독소는 실제로 상이한 단백질들의 복합체이며, 이들 단백질들의 일부는 양전하로 하전되고, 이들 중 일부는 음전하로 하전되어 있다. 독소의 성분들의 정확한 분포는 독소의 출처에 따라 다양하므로, 일부 출처로부터의 보툴리눔 독소는 본 명세서에 기재된 양전하로 하전된 백본들과의 복합체 형성에 대해 보다 낮은 성향을 가진다. 그러나, 본 발명의 일 양태는 그와 같은 보툴리눔 독소에 올리고- 또는 폴리음이온 다리를 첨가하는 것에 의해, 국소 투여의 효율 및 효능이 급격하게 증가된다는 발견이다. 그와 같은 올리고-/폴리음이온 다리들의 적합한 예들은 인산나트륨(5%), PBS 또는 5% 폴리-L-아스파르트레이트(예를 들면, 3000의 분자량을 가짐)이다.

[0044] 본 발명에 따른 조성물은 제어된-방출 또는 서방형(sustained-release) 조성물의 형태일 수 있고, 상기에서 보툴리눔 독소 및 담체는 시간의 경과에 따라 제어된 방식으로 피부에 방출될 수 있도록 물질 내에 캡슐화(encapsulate)되거나 담지(contain)된다. 보툴리눔 독소 및 담체는 매트릭스, 리포솜, 소포(vesicle), 마이크로캡슐, 미소 구체(microsphere) 등 또는 고체 입자형 물질에 담지될 수 있고, 이들은 시간의 경과에 따라 보툴리눔 독소의 방출을 제공하도록 선택 및/또는 구축된다. 보툴리눔 독소 및 담체는 함께(예를 들면, 동일한 캡슐 내에) 또는 별개로(별개의 캡슐들로) 캡슐화될 수 있다.

[0045] 본 명세서에 기재된 조성물들을 이용하여, 보툴리눔 독소는 피부 아래의 근육 또는 피부 내의 선 구조체들(glandular structures)에 마비를 일으키거나, 이완을 일으키거나, 수축을 완화하거나, 경련을 예방 또는 경감하거나, 선형 산출물(glandular output)을 감소시키거나 또는 다른 원하는 효과들을 위한 유효량으로 전달될 수 있다. 이와 같은 방식에 의한 보툴리눔 독소의 국소 전달은 투여량 감소를 가능하게 하고, 독성을 감소시키며, 주사용 또는 이식용(implantable) 물질에 비해 원하는 효과를 위한 보다 정확한 투여량 최적화를 가능하게 할 수 있다.

[0046] 본 발명의 조성물은 유효량의 보툴리눔 독소를 전달하도록 적용된다. 본 명세서에서 사용된 "유효량(effective amount)"이라는 용어는 원하는 근육 마비 또는 다른 생물학적 또는 심미 효과를 가져오기에 충분하나, 내재적으로 안전한 양, 즉, 심각한 부작용을 피할 수 있을 정도로 적은 양의 앞서 정의된 바와 같은 보툴리눔 독소의 양을 의미한다. 원하는 효과들은 예를 들면, 미세한 라인들 및/또는 주름들을 특히, 안면에서 감소시키거나, 또는

눈을 확장하고, 입 꼬리를 리프팅하고, 또는 윗입술로부터 전개된 라인들을 펴는 것과 같은 다른 방식으로 얼굴 외형을 조정하는 것을 목적으로 하는 특정 근육들의 이완 또는 근육 수축의 전반적인 제거를 포함한다. 마지막에 언급된 효과, 근육 수축의 전반적인 제거는 얼굴 또는 그 외의 부위들에서 이루어질 수 있다. 본 발명의 조성물은 단일-투여량 치료로서 적용을 위한 적합한 유효량의 보툴리눔 독소를 포함하거나, 또는 적용 시 희석을 위해 또는 복수회의 적용에 의한 용도를 위해 보다 농축될 수 있다. 본 발명의 양전하로 하전된 담체들의 이용을 통해, 보툴리눔 독소는 바람직하지 않은 안면 근육 또는 다른 근육성 경련, 다한증, 여드름, 또는 근육통 또는 경련의 제거가 필요한 신체에서의 증상들과 같은 증상들을 치료하기 위해 대상자에게 경피적으로 투여될 수 있다. 보툴리눔 독소는 근육 또는 다른 피부-관련 구조물들로 경피 전달을 위해 국소로 투여된다. 투여는 예를 들면, 다리, 어깨, 등(허리 포함), 겨드랑이, 손바닥, 발, 목, 살, 손등이나 발등, 팔꿈치, 상박, 무릎, 상지(upper legs), 둔부(buttocks), 몸통, 골반, 또는 보툴리눔 독소의 투여가 필요한 신체의 다른 부위에 이루어질 수 있다.

[0047] 보툴리눔 독소의 투여는 또한 신경병성 통증의 치료, 편두통 및 기타 두통의 예방 또는 경감, 여드름의 예방 또는 경감, 근긴장이상 또는 근긴장이상성 수축(주관적 또는 임상적)의 예방 또는 경감, 주관적 또는 임상적 다한증과 관련된 증상들의 예방 또는 경감, 분비과다 또는 발한의 감소, 면역반응의 완화 또는 경감, 또는 주사에 의한 보툴리눔 독소의 투여가 제안되거나 수행되었던 다른 증상들의 치료를 위해 수행될 수 있다.

[0048] 보툴리눔 독소 또는 본 명세서에 기재된 다른 치료용 단백질의 투여는 또한 면역화(immunization)-관련 목적들을 위해 수행될 수 있다. 놀랍게도, 본 명세서에 기재된 보툴리눔 독소의 투여는 면역 반응을 감소시키기 위해 수행될 수 있다. 보다 상세하게는, 본 발명은 보툴리눔 독소가 변형된 투여 경로에 의해 전달되어, 작용제의 복잡한 항원 제시(complex antigen presentation)를 변화시킬 수 있게 한다. 이 방식으로, 본 발명은 보툴리눔 독소에 대한 항원의 면역 반응을 감소시키고, 활성의 면역-관련 감소 없이 반복적인 투여를 진행시키기 위해 유용할 수 있다. 대안적으로, 면역 반응을 증진시키기 위해, 예를 들면, 다양한 단백질에 대한 면역화, 예를 들면, 접종 없이 유년기 면역화(childhood immunizations)를 제공하기 위해 복합체가 제조되어 국소적으로 적용될 수 있다. 면역-관련 활성과 관련된 용도를 위해, "유효량"은 대상자가 보툴리눔 독소의 적용 또는 일련의 적용들 후에 보툴리눔 독소에 대한 면역 반응을 일으키기에 충분한 보툴리눔 독소의 양을 의미한다.

[0049] 가장 바람직하게는, 조성물은 내과의사 또는 다른 의료 전문가에 의해 또는 이들의 지시 하에 투여된다. 그들은 단일 치료로 투여되거나 또는 시간의 경과에 따라 일련의 정기적인 치료들로 투여될 수 있다. 전술된 목적을 위한 보툴리눔 독소의 경피 전달의 경우, 전술된 조성물은 그 효과가 필요한 부위 또는 부위들의 피부에 국소적으로 적용된다. 보툴리눔 독소/담체 수용액이 피부에 직접 적용되는 구체예들에서, 용액이 건조되어 독소 활성의 감소를 초래하는 것을 방지하기 위해 치료된 영역을 (예를 들면, Cetaphil® 모이스처라이저로) 뒤덮거나 치료된 영역을 장벽(예를 들면, Telfa)으로 차단하는 것이 바람직하다. 그 속성 때문에, 가장 바람직하게는, 적용된 보툴리눔 독소의 양은 유해한 또는 원치않는 결과들을 야기하지 않으면서 원하는 결과를 생성할 수 있는 적용 비율 및 적용 빈도로 조심스럽게 적용되어야 한다. 따라서, 예를 들면, 본 발명의 국소 조성물은 단위 피부 표면 cm²당 약 1U 내지 20,000U, 바람직하게는 약 1U 내지 약 10,000U의 보툴리눔 독소의 비율로 적용되어야 한다. 이 범위들 내에서 보다 높은 투여량들은 바람직하게는 예를 들면, 제어된 방출형 물질들과 함께 채택되거나 또는 제거 전에 피부 상에서 보다 짧은 체류 시간을 갖도록 채택될 수 있다.

[0050] 보툴리눔 독소/담체 조성물의 적용 전에 용액의 효능을 유지하기 위해 피부 표면의 적합한 준비가 중요하다. 예를 들면, 적용 전에 피부 상의 피지(surface oil)를 닦아내기 위해 피부의 표면에 계면활성제를 도입하는 것은 놀랍게도 효능을 중화시키는데(counteractive), 이는 계면활성제가 보툴리눔 독소의 활성을 파괴하는 것으로 보이기 때문이다. 이는 피부를 뒤이어 보툴리눔 독소/담체 용액의 적용 전에 수회 물로 세척하는 경우에도 발생한다. 유아용 세정제(baby wipe)에서 발견되는 것들과 같은 매우 순한 계면활성제들조차도 이 현상을 유발하는 것으로 보인다. 따라서, 본 발명의 조성물을 투여하는 바람직한 방법들에서, 피부는 물만을 이용하여 사전에 세척된다. 물로만 세척하는 것은 보툴리눔 독소의 경피 수송을 적당히 향상시키는 것으로 보인다.

[0051] 또한, 피부는 보툴리눔 독소/담체 복합체의 적용 전에 각질층을 감소시키기 위해 벗겨질 수 있다. 원칙적으로, 피부를 벗겨내는 공정은 보툴리눔 독소의 경피 수송의 효율 증가를 가져올 것이다. 그러나, 피부를 벗겨내기 위해 이용되는 방법이 중요하다. 예를 들면, 사람 또는 동물에서 각질층의 아세톤-매개 감소는 뒤이어 적용된 보툴리눔 독소의 활성을 감소시키는 것으로 보인다. 대조적으로, 테이프 스트리핑(즉, 피부의 표면 상에 테이프를 적용하고 그 테이프를 제거하는 방법)은 마우스 모델 및 인간들에서 보툴리눔 독소의 보다 깊은 침투 및 투여량 감소를 가능하게 하는 것으로 보인다. 피부 표면의 찰상(abrasion)(예를 들면, 연마용 패드(abrasive pad)의

이용을 통한 찰상)은 테이프 스트립핑과 유사한 효과를 유발할 것으로 추정된다.

[0052] 본 발명은 또한 보툴리눔 독소 및 본 명세서에서 정의된 바와 같은 부착된 분지형 기들을 갖는 양전하로 하전된 백본을 갖는 담체를 포함하는 조성물의 경피 전달용 장치들을 포함한다. 그와 같은 장치들은 피부 패치와 같이 구조가 간단하거나, 또는 조성물의 분배용 수단 및 조성물의 분배를 모니터링하는 수단을 포함하고, 선택적으로 대상자의 증상을 모니터링하는 수단(예를 들면, 분배되는 물질들에 대한 대상자의 반응을 모니터링함)을 포함하는 보다 복잡한 장치일 수 있다.

[0053] 장치의 구축용 물질들의 선택이 중요하다는 것에 유의해야 한다. 전달 장치들의 구축을 위한 바람직한 물질들은 장치 표면상에서 보툴리눔 독소의 분해 또는 원치않는 흡수를 통한 보툴리눔 독소/담체 용액의 활성의 손실을 초래하지 않는 물질들이다. 수용액 중의 보툴리눔 독소/담체가 폴리프로필렌 표면들을 접촉하는 경우, 그와 같은 원치않는 행동이 관찰되었으나, 보툴리눔 독소/담체 용액이 폴리비닐 클로라이드(PVC) 표면들을 접촉하는 경우에는 관찰되지 않았다.

[0054] 일반적으로, 조성물들은 장치 내에서 사전에 조제되고 및/또는 사전에 적재되거나(pre-installed) 또는 나중에, 예를 들면, 두 개의 성분들(보툴리눔 독소 및 담체)을 별도로 보관하나 적용 시 또는 적용 전에 그들을 조합하는 수단을 제공하는 키트를 이용하여 제조될 수 있다. 담체 분자의 양 또는 보툴리눔 독소에 대한 담체 분자의 비율은 대상이 되는 조성물에서의 이용을 위해 선택되는 담체에 의존적이다. 주어진 경우에서 담체 분자의 적합한 양 또는 비율은 예를 들면, 이하에서 기술되는 바와 같은, 하나 이상의 실험들을 수행하는 것에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0055] 일반적으로, 본 발명은 또한 보툴리눔 독소를 이를 필요로 하는 대상자 또는 환자에게 투여하는 방법을 포함한다. 그 방법은 본 명세서에서 기술된 바와 같은 부착된 양전하로 하전된 분지형 기들을 갖는 양전하로 하전된 백본을 갖는 담체와 함께 유효량의 보툴리눔 독소를 국소적으로 투여하는 단계를 포함한다. "함께(in conjunction with)"는 두 성분들(보툴리눔 독소 및 담체)을 대상자에게 투여할 조성물로 조합하거나, 또는 개별적으로 투여하나, 그들이 치료용 단백질의 유효량의 원하는 전달을 제공하기 위해 함께 작용하는 방식으로 투여하는 단계를 포함하는 조합 절차로 투여된다는 것을 의미한다. 예를 들면, 담체를 포함하는 조성물을 먼저 대상자의 피부에 적용하고, 뒤이어 보툴리눔 독소를 포함하는 피부 패치 또는 다른 장치를 적용할 수 있다. 보툴리눔 독소는 피부 패치 또는 다른 분배 장치에 건조된 형태로 포함될 수 있고, 반면에, 양전하로 하전된 담체는 패치의 적용 전에 피부 표면에 적용되어 두 성분이 함께 작용하여, 원하는 경피 전달을 가져올 수 있다. 따라서, 두 물질들(담체 및 보툴리눔 독소)은 조합되어 작용하거나 또는 작용 부위에서(in-situ) 조성물 또는 조합을 형성하기 위해 상호작용한다. 따라서, 본 발명은 또한 피부를 통해 보툴리눔 독소를 분배하는 장치 및 담체 또는 백본을 포함하고 대상자의 피부 또는 상피에 적용하기에 적합한 액체, 젤, 크림 등을 모두 포함하는 키트를 포함한다. 의료 전문가의 지시 하에 또는 환자 또는 대상자에 의해 본 발명의 조성물을 투여하기 위한 키트는 또한 그 목적에 적합한 맞춤형 애플리케이터(custom applicator)를 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명의 조성물, 키트 및 방법은 보다 높은 특이적 활성 및 잠재적으로 개선된 약동학적 특성들(pharmacokinetics)을 갖는 보다 순수한 보툴리눔 독소의 전달을 가능하게 한다. 또한, 담체는 안정제로 작용하여, 외생의 부수적 단백질(foreign accessory protein)(예를 들면, 400-600mg의 인간 혈청 알부민 또는 250-500mg의 재조합 혈청 알부민) 및/또는 다당류 안정제에 대한 요구를 감소시키고, 보툴리눔 독소에 대한 면역 반응들의 유용한 감소를 제공할 수 있다. 또한, 조성물들은 약 4.5 내지 약 6.3 범위의 pH를 갖는 생리적 환경에서의 용도에 적합하고 따라서, 그와 같은 pH를 가질 수 있다. 본 발명에 따른 조성물들은 실온에서 또는 냉장 조건 하에 보관될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 펩티드 백본을 포함하는 본 발명의 조성물을 이용한 보툴리눔 독소의 경피 전달의 효율을 입증하는 실험의 결과를 나타낸다.

도 2는 한쪽 다리는 본 발명의 조성물로 처리되고 그 반대쪽의 영역은 본 발명에 따른 담체를 포함하지 않는 또 다른 보툴리눔 독소-함유 조성물로 치료된 마우스의 뒷 다리들(hind limbs)의 상태를 보여주는 사진이다.

도 3은 "Essentia Botox lotion"에 의한 국소적 치료 전 및 후에 대상자의 이마 상의 주름들을 보여주는 사진이다.

도 4는 "Essentia Botox Lotion"에 의한 주름의 국소 치료 후(A) 및 치료 전(B)의 이마의 Mikrosil 캐스트를

보여준다. 실제 대상을 찍는 것으로부터 초래될 수 있는 인위적 결과(artifact)를 최소화하기 때문에 유용한 Mikrosil 캐스트들은 치료되지 않은 면이 보다 깊은 주름들을 갖는다는 것을 명확하게 보여준다.

도 5는 "Essentia Botox Lotion"(A) 및 대조구 로션(B)의 적용 5일 후, 대상자의 이마에 대해 수행된 Minor's 전분/요오드 테스트를 묘사하는 사진을 보여준다. 대조구 로션은 약 21,000의 분자량을 가지며 TAT 분지형 기들을 갖는 양전하로 하전된 폴리라이신 백본을 포함했다. 이 사진들은 적용 2분 후에 찍었다.

도 6은 4분이 경과된 후 찍혔다는 것을 제외하고는 도 5의 경우와 동일하다.

도 7은 액와 다한증 연구들에서 이용된 투여 영역을 보여준다. 투여 영역은 액모(axillary hair)에 의해 뒤덮인 피부의 영역보다 1 센티미터 연장된다.

도 8a는 사람 대상자에서 액와 다한증의 치료를 위해 짧은 펩티드 담체를 이용하여 국소용 작용제로서 완전한 피부(intact skin)를 통해 치료적으로 전달된 보툴리눔 독소의 효율을 보여주는 실험의 결과를 나타낸다. 그래프는 Botox + 짧은 펩티드 담체 또는 담체 단독에 의한 치료 4주 후 중량에 의해 측정된 땀의 양(5분당 mg)의 유의성 있는 감소를 보여준다. 결과들은 동일한 군에 대한 기준값(baseline value) 대비 비율로서 4주차 값들이며, 그 유의성은 $P < 0.05$ 로 Wilcoxon 분석에 의해 결정했다. N=10명의 환자들이었다. 도 8b는 사람 대상자에서 액와 다한증의 치료를 위해 짧은 펩티드 담체를 이용하여 국소용 작용제로서 완전한 피부를 통해 치료적으로 전달된 보툴리눔 독소의 효율을 보여주는 실험의 결과를 나타낸다. 그래프는 Botox + 짧은 펩티드 담체 또는 담체 단독에 의한 치료 4주 후 중량에 의해 측정된 땀의 양(5분당 mg)의 상당한 감소를 보여준다. 결과들은 양 시점들에 대한 대조구 값에 대한 비율로서 치료군 값들(treatment values)이며, 그 유의성은 $P < 0.05$ 로 Wilcoxon 분석에 의해 결정했다. N=10명의 환자들이었다.

도 9는 액와 다한증의 치료를 위해 국소적으로 적용된 "Essentia Botox Lotion"에 의한 치료의 전 및 후의 Minor's 전분/요오드 테스트를 묘사하는 사진을 보여준다. 대상자 #12에 대해 우측 액와(겨드랑이)는 "Essentia Botox Lotion"로 처리되고(a 및 c), 좌측 액와는 대조구로 처리된 경우(b 및 d)에서 기준값 대비 2주차에서의 전분/요오드 테스트를 보여준다. 이 사진들은 전분 요오드에 담긴 담체+보톡스에 의한 처리 후에 관찰되는 통상적인 효과들을 보여준다. 일부 교차점(crossover)이 대조구 측에서 관찰되나(중량 데이터에서의 25% 감소와 일치됨), 상당한 감소는 치료에 의해 부여된다(치료군에 대한 중량 데이터에서의 65% 감소와 일치됨).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하는 본 발명의 대표적인 실시예들이다. 그들은 전달될 신경독소의 공유결합성 변형(covalent modification) 없이 기능적인 보툴리눔 신경독소 복합체들의 피부를 통한 전달을 보여준다.

[0059] 실시예 1.

[0060] 펩티드 담체를 이용한 생체 내 보툴리눔 독소의 수송.

[0061] 본 실험은 대조구 대비 단일 회 투여 후 완전한 피부를 통해 완전한 표지된 단백질 보툴리눔 독소를 포함하는 대형 복합체를 수송하기 위한 펩티드 담체의 용도를 보여주었다.

[0062] 백본 선택:

[0063] 폴리라이신(MW 112,000)에 18%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실을 통해 라이신 결사슬의 유리 아민에 -Gly₃Arg₇을 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 18개가 -Gly₃Arg₇에 접합됨). 변형된 백본은 "KNR"로 표시했다. 대조구 폴리아이온(polycation)은 동일한 로트(lot)로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 폴리라이신("K"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이었다.

[0064] 치료제:

[0065] 본 실험을 위해 보툴리눔 독소 A의 Botox® 브랜드(Allergan)를 선택했다. 이 제품은 약 150,000의 분자량을 갖

는다.

[0066] 시료의 준비

[0067] 제조업체의 설명서에 따라 보툴리눔 독소를 재구성했다. 단백질의 분량(aliquot)을 계산된 12배 물량을 초과하는 양(12-fold molar excess)의 술폰-NHS-LC 바이오틴(Pierce Chemical)으로 비오틴화시켰다. 표지된 생성물은 "Btox-b"로 표시했다.

[0068] 각 경우에, 높은 음전하를 띤 대형 뉴클레오타이드 복합체의 전달에서와 같이 과량의 양전하를 갖는 최종 복합체를 조립하기 위해 과량의 폴리양이온을 채택했다. 순 중성 전하 또는 양성 전하는 높은 음전하의 세포 표면 프로테오글리칸 및 세포의 매트릭스로부터 단백질 복합체의 반발을 방지한다. 모든 군들에 대해 Btox-b 투여량을 표준화하고, 국소적으로 적용될 조성물의 최종 용량 및 최종 pH도 표준화했다. 시료들은 다음과 같이 준비했다:

[0069] "JMW-7"로 표지된 군: 4:1의 계산된 MW 비로 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 20 U) 및 펩티드 담체 KNR을 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline)로 200 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 1.8ml의 Cetaphil® 로션과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0070] "JMW-8"로 표지된 군: 4:1의 MW 비로 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 20 U) 및 K를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 200 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 1.8ml의 Cetaphil로션과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0071] 펩티드 담체 및 표지된 Btox에 의한 1회 치료 후 경피 전달 효율을 결정하기 위한 동물 실험:

[0072] 치료의 적용 동안 동물들을 이소플루란의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취시킨 후, C57 black 6 마우스들(군 당 n=4)에 등 뒤쪽 피부의 두개 부분(cranial portion of dorsal back skin)(마우스가 입 또는 사지로 이 부분에 도달할 수 없기 때문에 선택됨)에 적용될 적합한 치료제의 정량된 200 마이크로리터 투여량의 국소 적용을 시행했다. 동물들은 탈모를 겪지 않았다. 초기 치료 후 30분 경과 시, 마우스들은 CO₂의 흡입을 통해 안락사시키고, 맹검 관찰자들(blinded observer)이 처리된 피부 세그먼트들을 전층(full thickness)으로 채취했다. 처리된 세그먼트들을 3개의 동일한 부분들로 나누었다; 두개 부분을 10% 중성의 완충액 처리된 포르말린(10% neutral buffered formalin)에 12-16시간 동안 고정하고 파라핀 포매(paraffin embedding)까지 70% 알코올에 보관하였다. 하기에 요약된 바와 같이 중앙부를 순간-동결(snap-frozen)시키고 맹검 관찰자가 바이오틴 시각화(biotin visualization)를 위해 직접 이를 이용했다. 처리된 꼬리 세그먼트는 용액화(solubilization) 연구들 위해 순간-동결시켰다.

[0073] 바이오틴 시각화는 다음과 같이 수행하였다. 요약하면, 각 섹션을 1시간 동안 NeutrAvidin® 완충 용액에 침지시켰다. 알칼리 포스파타아제 활성을 시각화하기 위해, 단편들을 식염수로 4회 세척하고 NBT/BCIP(Pierce Scientific)에 1시간 동안 침지시켰다. 그 후, 섹션들을 식염수로 세척하고 plan-apochromat 렌즈들로 Nikon E600 현미경 상에서 그 전체를 촬영했다.

[0074] 데이터 처리 및 통계 분석:

[0075] 전체 포지티브 염색은 Image Pro Plus 소프트웨어(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)를 이용한 배치 이미지 분석(batch image analysis)를 통해 맹검 관찰자에 의해 결정하고, 각각에 대해 포지티브 염색의 퍼센트를 결정하기 위해 총 단면적으로 정규화시켰다. 뒤이어 Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용하여 일원 ANOVA의 반복된 측정에서 95% 신뢰 수준에서 유의성 분석으로 각 군에 대해 평균 및 표준 오차를 결정했다.

[0076] 결과:

[0077] KNR("EB-Btox") 또는 K("n1")와 함께 Btox-b의 1회 국소 적용 후 바이오틴화된(biotinylated) 보툴리눔 독소에 대해 양성인 평균 단면적을 총 면적 대비 퍼센트로 기록하였다. 결과들을 다음 표 1에 표시하고 도 1에 도시하였다. 도 1에서, Btox-b 및 펩티드 담체 KNR을 포함하는 "EB-Btox" 및 대조구로서 폴리양이온 K와 함께 Btox-b를 포함하는 "n1"에 의한 3일간의 1일 1회 처리 후 표지에 대해 양성인 면적을 총 면적 대비 퍼센트로 결정했

다. 각 군에 대해 평균 및 표준 오차를 표시했다.

[0078]

표 1

KNR(JMW-7) 또는 K(JMW-8)과 함께 Btox-b의 30분간 1회 국소 투여 후 총 단면의 퍼센트로 나타낸 표지된 보툴리눔 독소 영역에 대한 평균 및 표준 오차.

군	평균	표준 오차
JMW-7	33	5.333334
JMW-8	8.666667	0.333334

[0079] P=0.0001(99%에서의 유의성)

[0080] **실시예 2.**

[0081] **펩티드 담체를 갖는 국소용**

[0082] **보툴리눔 독소 제제의 치료적 효능.**

[0083] 실시예 1은 펩티드 경피 담체가 완전한 피부를 갖는 쥐(murine) 모델에서 국소 투여 후 보툴리눔의 효율적인 이동을 가능하게 한다는 것을 보여주었다. 그러나, 이 실험은 복합 단백질 보툴리눔 독소가 피부를 통한 전위(translocation) 후 기능적 형태로 방출되는지 여부는 나타내지 않았다. 따라서 보툴리눔 독소가 이 펩티드 담체(역시, 단백질의 공유결합성 변형 없이)를 이용하는 국소용 작용제로서 완전한 피부를 통해 치료적으로 전달될 수 있는지 여부를 평가하기 위해 하기의 실험을 수행하였다.

[0084] 폴리라이신(MW 112,000)에 18%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실기를 통해 라이신 결사슬의 유리 아민에 -Gly₃Arg₇을 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 18개가 -Gly₃Arg₇에 접합됨). 변형된 백본은 "KNR"로 표시했다. 대조구 폴리양이온(polycation)은 동일한 로트(lot)로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 폴리라이신("K"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이었다.

[0085] "JMW-9"로 표지된 군: 4:1의 계산된 MW 비로 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 60U) 및 펩티드 담체 KNR을 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil로션과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0086] "JMW-10"으로 표지된 군: 4:1의 MW 비로 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 60U) 및 K를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil로션과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0087] "JMW-11"로 표지된 군: 폴리양이온 없이 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 60U)을 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil로션과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0088]

[0089] 펩티드 담체 및 보툴리눔 독소에 의한 1회 처리 후 치료적 효능을 결정하기 위한 동물 실험:

[0090] 치료의 적용 동안 동물들을 이소플루란의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취시킨 후, C57 블랙 6 마우스들(군 당 n=4)에 발끝에서 대퇴 중간 부위(mid thigh)까지 균일하게 적용된 적합한 치료제의 정량된 400 마이크로리터 투여량의 국소 적용을 시행했다. 양쪽 사지에 치료를 시행하고 양쪽 중 한쪽에 무작위로 치료를 적용하였다. 동물들은 탈모를 겪지 않았다. 초기 치료 후 30분 경과 시, 보툴리눔 독소 투여 후 발 운동성(foot mobility)에 대해 발표된 디지털 외향 스코어(digital abduction score)에 따라 디지털 외향 능력(digital abduction capability)에 대해 마우스들을 평가했다[Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. Toxicon. 2001 Dec; 39 (12): 1815-20]. 또한 마우스의 운동성을 주관적으로 평가했다.

[0091] 데이터 처리 및 통계 분석:

[0092] 두 명의 맹검 관찰자가 독립적으로 디지털 외향 스코어(Digital abduction score)를 표로 작성하였다. 뒤이어, Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용한 일원 ANOVA 반복 측정으로 95% 신뢰 수준에서의 유의성 분석으로 각 군에 대한 평균 및 표준 오차를 결정했다.

[0093] 결과:

[0094] KNR("JMW-9"), K("JMW-10") 또는 폴리양이온 없는 희석제와 함께 보툴리눔 독소의 1회의 국소 투여 후 평균 디지털 외향 스코어를 표 2에 표시하고 하기의 도 2에 대표적인 현미경 사진을 도시한다. 펩티드 담체 KNR은 양 대조구들에 비해 보툴리눔 독소의 통계적으로 유의성 있는 기능적 전달을 제공했고, 양 대조구들에 대한 결과들은 상호 간에 유사했다. 본 실험의 추가적인 독립적인 반복들(총 3회의 실험에서 KNR과 함께 투여된 국소 보툴리눔 독소로부터 통계적으로 유의성 있는 마비가 관찰되나, 대조구들에 대해서는 마비가 관찰되지 않는 동일한 결과를 얻음)은 본 발견을 확인했고 K의 존재 또는 부재(즉, 2 개의 대조구들)에 따른 국소 보툴리눔 독소 간에는 유의성 있는 차이를 보여주지 않았다. 흥미롭게도, 마우스들은 일관되게 마비된 사지 쪽으로 향하여 이동했다(처리된 동물들의 경우는 100% 발생했고, 대조군들에서는 0% 발생함). 도 2에 나타난 바와 같이, 보툴리눔 독소 + 대조구 폴리양이온 폴리라이신 또는 폴리양이온 없이 보툴리눔 독소("Botox 단독")로 처리된 사지는 발가락들을 움직일 수 있으나(집혔을 때 방어 메카니즘으로서), 보툴리눔 독소 + 펩티드 담체 KNR("Essentia Botox lotion")로 처리된 사지는 움직일 수 없었다.

[0095] 표 2

펩티드 담체 KNR("JMW-9"), 대조구 폴리양이온 K("JMW-10")와 함께, 또는 단독으로("JMW-11") 투여된 보툴리눔 독소의 1회 국소 적용 30분 후 디지털 외향 스코어들.

군	평균	표준 오차
JMW-9	3.333	0.333
JMW-10	0.333	0.333
JMW-11	0.793	0.300

[0096] $P=0.0351$ (95%에서의 유의성)

[0097] 결론:

[0098] 본 실험은 펩티드 경피 담체가 치료제의 공유결합성 변형 없이 피부를 통한 보툴리눔 치료제의 치료적 유효량을 수송할 수 있다는 것을 보여준다. 본 실험은 또한 보툴리눔 독소가 대조구에서 국소적으로 적용되었을 때 기능을 발휘하지 않는다는 것을 확인한다.

[0099] 실시예 3.

[0100] 비-펩티드 담체를 갖는 국소용

[0101] 보툴리눔 독소 제제의 치료적 효능.

[0102] 이 실험은 본 발명에서 비-펩티드 담체의 성능을 보여준다.

[0103] 방법:

[0104] 백본 선택:

[0105] 30%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실을 통해 PEI 결사슬의 유리 아민으로 -Gly₃Arg₇을 폴리에틸렌이민(PEI) MW 1,000,000에 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 30개가 -Gly₃Arg₇에 접합됨). 변형된 백본은 대형 비-펩티드 담체를 나타내기 위해 "PEIR"로 표시했다. 대조구 폴리양이온(polycation)은 동일한 로트(lot)로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 PEI("PEI"로 표시됨, Sigma

Chemical Co., St. Louis, MO)였다. 실시예 1에서와 동일한 보툴리눔 독소 치료제를 이용했다.

[0106] 제조업체의 설명서에 따라 보툴리눔 독소를 재구성했다. 각 경우에, 높은 음전하를 띤 대형 뉴클레오티드 복합체의 전달에서와 같이 과량의 양전하를 갖는 최종 복합체를 조립하기 위해 과량의 폴리양이온을 채택했다. 순 중성 전하 또는 양성 전하는 높은 음전하의 세포 표면 프로테오글리칸 및 세포외 매트릭스로부터 단백질 복합체의 반발을 방지한다. 모든 군들에 대해 보툴리눔 독소 투여량을 표준화하고, 국소적으로 적용될 조성물의 최종 용량 및 최종 pH도 표준화했다. 시료들은 다음과 같이 준비했다:

[0107] "AZ"로 표시된 군: 5:1의 계산된 MW 비로 분량당 2.0 유닛의 보툴리눔 독소(즉, 총 60U) 및 초 순수 형태의 비-펩티드 담체 PEIR을 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0108] "BA"로 표시된 군: 5:1의 전하 비(charge ratio)로 분량당 2.0 유닛의 보툴리눔 독소(즉, 총 60U) 및 PEI를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0109] 1회 치료 후 치료적 효능을 결정하기 위한 동물 실험:

[0110] 치료의 적용 동안 동물들을 이소플루란의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취시킨 후, C57 블랙 6 마우스들(군 당 n=4)에 발끝에서 대퇴 중간 부위까지 균일하게 적합한 치료제의 정량된 400 마이크로리터 투여량의 국소 적용을 시행했다. 양쪽 사지에 치료를 시행하고 양쪽 중 한쪽에 무작위로 치료를 적용하였다. 동물들은 탈모를 겪지 않았다. 초기 치료 후 30분 경과 시, 보툴리눔 독소 투여 후 발 운동성(foot mobility)에 대한 발표된 디지털 외향 스코어(digital abduction score)에 따라 디지털 외향 능력(digital abduction capability)에 대해 마우스들을 평가했다[Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. Toxicon. 2001 Dec; 39 (12): 1815-20]. 또한 마우스의 운동성을 주관적으로 평가했다.

[0111]

[0112] 데이터 처리 및 통계 분석:

[0113] 두 명의 맹검 관찰자가 독립적으로 디지털 외향 스코어(Digital abduction score)를 표로 작성하였다. 뒤이어, Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용한 일원 ANOVA 반복 측정으로 95% 신뢰 수준에서의 유의성 분석으로 각 군에 대한 평균 및 표준 오차를 결정했다.

[0114] 결과:

[0115] 초순수(ultrapure) PEIR("AZ"), 또는 대조구 폴리양이온 PEI("BA")와 함께 보툴리눔 독소의 1회의 국소 투여 후 평균 디지털 외향 스코어를 표 3에 표시하고 반복은 표 4(본 실험에 대한 1회 독립 반복)에 표시했다. 비-펩티드 담체 PEIR은 대조구들에 비해 보툴리눔 독소의 통계적으로 유의성 있는 기능적 전달을 제공했다. 이전의 경우에서와 같이, 동물들은 마비된 사지들을 향해 원을 그리며 걷는 것으로 관찰되었다.

[0116] **표 3**

초순수 PEIR("AZ"), 또는 대조구 폴리양이온 PEI("BA")와 함께 투여된 Botox의 1회 국소 적용 30분 후 디지털 외향 스코어들. 평균 및 표준 오차를 표시한다.

군	평균	표준 오차
BA	0.833	0.307
AZ	3.197	0.083

[0117] P=0.0002(99%에서의 유의성)

[0118] **표 4**

초순수 PEIR("AZ1"), 또는 대조구 폴리양이온 PEI("BA1")와 함께 투여된 Botox의 1회 국소 적용 30분 후 디지

털 외향 스코어들. 평균 및 표준 오차를 표시한다.

군	평균	표준 오차
BA1	0.333	0.211
AZ1	3.833	0.167

[0119] P=0.0001(99%에서의 유의성)

[0120] 결론:

[0121] 이 실험은 비-펩티드 경피 담체가 보툴리눔 독소의 사전 공유결합성 변형(prior covalent modification) 없이 피부를 통해 치료적 투여량의 보툴리눔 독소를 수송할 수 있다는 것을 보여주었다. 이와 같은 발견은 펩티드 이동 작용제(peptidyl transfer agent)의 경우들을 보완한다. 치료 효과를 달성하기 위해 비-펩티드 담체 또는 펩티드 담체를 이용하는 옵션은 특정 상황들, 환경들 및 적용 방법들에 따라 맞춤화할 수 있게 하며 본 발명의 경피 전달 플랫폼의 영역에 더해진다.

[0122] 실시예 4.

[0123] 이마 다한증 및 주름에 대한 펩티드 담체를 갖는

[0124] 국소용 보툴리눔 독소 제제의 치료적 효능

[0125] 이 실험은 사람 대상자의 이마 다한증 및 주름의 치료를 위해 보툴리눔 독소가 이 펩티드 담체를 이용한 국소용 작용제로서 완전한 피부를 통해 치료적으로 전달될 수 있다는 것을 보여주었다.

[0126] 이마 다한증 및 주름 연구에 대한 실험 절차:

[0127] Nikon TTL Macro-speedlight SB29s 플래쉬(Nikon, Inc. USA)를 갖춘 Nikon D70 카메라를 이용하여 청색 배경 상에서 대상자의 이마의 기준(baseline) 및 치료-후 사진을 촬영했다.

[0128] Sony Digital Handycam 캠코더를 이용하여 청색 배경 상에서 대상자의 이마의 기준 및 치료-후 비디오를 촬영했다.

[0129] 10% 국소용 포비돈 요오드 용액(Walgreen Co., Deerfield, Illinois) 및 Kingsford's 100% 옥수수 전분(ACH Food Companies, Inc., Memphis, Tennessee)을 이용하여 땀 생성을 시각화하기 위해 Minor's 전분/요오드 테스트를 수행하였다. 대상자의 이마에 멸균 솜(Johnson & Johnson Consumer Product Company, Skillman, New Jersey)을 이용하여 요오드 용액을 바르고, 완전히 건조시켰다. 그 영역에 멸균 솜을 이용하여 전분 분말을 가볍게 뿌렸다. 실온에서 신체적 활동을 통해 땀을 유도했다. 땀이 요오드를 용해시키고 전분 분말과 반응하면서 검붉은 스팟들이 나타났다. Nikon TTL Macro-speedlight SB29s 플래쉬(Nikon, Inc. USA)를 갖춘 Nikon D70 카메라를 이용하여 청색 배경 상에서 요오드-전분 테스트의 기준(baseline) 및 치료-후 사진을 촬영했다. 대상자의 이마를 70% 에탄올로 닦고 뒤이어 탈이온수로 닦았다.

[0130] 치료의 적용 전에 각질층에 대한 비-침습적(non-invasive) 테이프 스트리핑 방법에 의해 대상자의 이마에 소정의(predefined) 치료 영역을 준비했다. 미리 절단한 테이프를 강한 압력으로 수초간 치료 영역에 적용했다. 테이프의 한쪽 끝을 당기는 것에 의해 빠르게 테이프를 제거했다. 두번째 테이프를 첫번째 테이프를 제거한 직후 동일한 영역에 조심스럽게 적용했다. 테이프-스트리핑을 3-5회 반복했다.

[0131] 치료제 준비:

[0132] 멸균된 0.9% 염화나트륨의 Botox 재구성 용액(Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) + 5% EtOH + A-3C(Donlar BioPolymer, Inc. Bedford Park, Illinois)로 표지된 5% 단쇄 폴리아스파르테이트 용액을 준비했다(즉, 1.0 밀리리터 용액당, 멸균된 0.9% 염화나트륨 용액 900 마이크로리터 + 100% 에탄올 50 마이크로리터 + 단쇄 폴리아스파르테이트 용액 50 마이크로리터). 0.9% 염화나트륨 용액 + 5% 에탄올로 Kn21T를 1mg/ml 농도로 준비했다(즉, 500 마이크로리터의 Kn21T를 분주하고 25 마이크로리터의 100% 에탄올을 첨가함). 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, Kn21T는 21,000의 분자량 및 TAT 분지형 기들을 갖는 양전하로 하전된 폴리라이신 백본을 의미한다. 100 유닛의 Botox(Allergan, Irvine, CA)를 18g11/2을 갖춘 멸균된 3ml 라텍스 불포함 주사기(Becton

Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey)를 이용하여 1.0 밀리리터의 재구성 용액으로 재구성하였다. 재구성된 Botox를 조심스럽게 8회 역전(inversion)에 의해 혼합했다. 각 대상자에 대해 200 유닛의 Botox를 이용했다. 200 유닛의 Botox 및 Kn21T + 5% 에탄올로 "Essentia Botox 용액"을 준비하고(즉, 2.0 밀리리터의 Botox를 500 마이크로리터의 Kn21T + 25 마이크로리터의 100% 에탄올에 첨가함) 복합체가 형성되도록 5분간 실온에서 방치했다.

[0133] 재구성 용액 및 Kn21T + 5% 에탄올로 대조구 용액을 준비하고(즉, 2.0 ml의 재구성 용액을 500 마이크로리터의 Kn21T + 25 마이크로리터의 100% 에탄올에 첨가함) 실온에서 방치했다.

[0134] 치료 적용:

[0135] 대상자를 테이블에 눕히고, 눈, 얼굴 및 상체를 보호용 덮개(protective covering)로 덮었다. 치료제를 파이펫을 이용하여 대상자의 이마에 골고루 적용하고 분말-불포함, 니트릴 글로브(powder-free, nitril gloves)를 착용한 손가락으로 원운동으로 마사지하면서 피부에 스며들게 하였다. 치료 영역을 Cetaphil® 수분 크림(Galderma, Fort Worth, TX)의 얇은 막으로 뒤덮고 60분간 방치했다. 60분 방치 후에, 치료제를 멸균된 거즈 패드로 제거했다. 거즈 패드 및 글로브를 바이오해저드(biohazard) 백에 넣어 버렸다.

[0136] 결과:

[0137] 도 3은 펩티드 담체 및 보툴리눔 조합의 국소 적용 후 주름의 길이, 깊이 및 폭의 상당한 감소를 나타낸다. 이 실험은 경피 담체와 조합되는 경우, 국소적으로 적용된 보툴리눔 독소는 미용 효과를 위해 상당한 근육 마비를 제공할 수 있다는 것을 확인한다. 도 4는 치료된 피부(A) 대 치료되지 않은 피부(B)의 Mikrosil 캐스트이다. 치료되지 않은 피부의 캐스트 상에서 주름들을 볼 수 있다.

[0138] 도 5 및 도 6은 Minor's 전분/요오드 테스트의 결과를 보여준다. 도 5는 적용 2분 후에 촬영된 사진들을 보여주며, 패널 (A)는 Essentia Botox Lotion으로 치료된 쪽에 해당하고, 패널 (B)는 Kn21T 담체만 포함하는 대조구 로션으로 치료된 쪽에 해당한다. 도 6은 적용 4분 후에 촬영되었다는 것을 제외하고는 도 5의 경우와 동일하다. 대조구 로션을 적용한 쪽의 보다 두드러진 착색에 주목하면, 이는 그 면의 피부가 땀을 더 많이 분비했다는 것을 의미한다. 또한, 치료되지 않은 쪽에서 발한이 보다 조기에 시작된다는 것에 주목한다.

[0139] 결론:

[0140] 본 실시예는 국소적으로 적용된 보툴리눔 독소의 복합체들은 미세한 주름 및 굵은 주름을 감소시키는데 있어서 유의성 있는 심미적 효과들을 제공할 수 있다는 것을 보여준다. 이와 같은 경상피(transepithelial) 효과는 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 보툴리눔 독소 복합체의 국소 적용 후 적합한 담체들에 의해 근육 마비가 일어날 수 있다는 것을 확인한다. 본 실시예는 보툴리눔 독소의 국소 적용은 안검경련 또는 사경과 같은 근육 경련의 제거 및 요통과 같은 근육 경련-관련 통증의 제거를 가져올 수 있다는 것을 의미한다.

[0141] 실시예 5.

[0142] 액와 다한증 대한 펩티드 담체를 갖는

[0143] 국소용 보툴리눔 독소 제제의 치료적 효능.

[0144] 이 실험은 사람 대상자의 액와 다한증 치료를 위해 보툴리눔 독소가 이 펩티드 담체를 이용한 국소용 작용제로서 완전한 피부를 통해 치료적으로 전달될 수 있다는 것을 보여주었다(군당 n=10개의 액와, 무작위 이중-맹검 방식으로 환자당 한쪽 액와는 치료되고 다른 한쪽은 대조구임).

[0145] 액와 다한증 연구의 대상자 기준:

[0146] • 연령: 18세 이상

[0147] • 건강한 지원자

- [0148] · 지원자에 의해 서명되고 제출된 고지에 입각한 동의서
- [0149] · 대상자는 지시를 따르고 후속 방문들에 응하고자 함.
- [0150] · 대상자는 사전에 존재하는 주관적인 다한증을 가짐.
- [0151] · 대상자는 임신 상태가 아니거나 또는 향후 3개월 내에 임신 계획이 없어야 함.
- [0152] · 대상자는 샌프란시스코 또는 연구 지역 인근에 거주하고 및/또는 근무함.
- [0153] · 대상자는 최근 6개월 내에 액와 발한(underarm sweating)에 대한 치료를 받은 바 없음.
- [0154] · 대상자는 향후 3개월 내에 액와 발한에 대해 치료를 받을 계획이 없음.

- [0155] 중량 측정(gravimetric measurement) 절차:
- [0156] 중량 측정 절차의 일부로서, 대상자들을 먼저 테스트 지역에 적응케 하였다. 구체적으로, 각 대상자를 편한 자세로 72-77° F의 실온에서 15분간 앉아있게 했다.
- [0157] **액와 준비:** (하기의 절차들을 위해 분말-불포함, 니트릴 글로브를 착용했다.) 대상자는 1회용 망토 및 브라(여성인 경우)를 착용하거나 또는 상의를 모두 벗어서(남성인 경우) 양쪽 겨드랑이(액와)가 완전히 노출되게 하였다. 투여 영역은 각 겨드랑이의 액모가 있는 영역 + 그 액모가 있는 피부로부터 1cm 벗어난 영역으로 사전에 결정했다. 투여 영역을 50ml 원뿔형 튜브로부터 꺼낸 미리-적신 멸균 거즈의 한 면을 이용하여 상부로부터 하부까지 동일한 방향으로 5회의 긴 스크로크로 닦아서 세정했다. 피부에 자극을 주거나 피부가 벗겨지지 않도록 주의하면서 깨끗한 미리-적신 거즈로 이 단계를 3회 더 반복했다. 거즈 패드들은 휴지통에 버렸다. 동일한 세정 절차를 다른 쪽 겨드랑이에 대해 반복했다. 피부에 자극을 주거나 피부가 벗겨지지 않도록 주의하면서 건조된 멸균 거즈로 겨드랑이의 상부로부터 하부까지 강한 패딩(firm padding) 모션을 이용하여 겨드랑이를 건조시켰다. 그 후, 겨드랑이의 접힌 부분들(crease) 아래에 여과지를 끼고 5분 정도 테스트 부위에 방치하여 겨드랑이를 더 건조시키고 중량측정에 의한 평가를 수행하였다. 환자는 편한 자세로 자신의 신체에 팔을 붙인 채 앉았다. 여과지를 휴지통에 버렸다. 1차 중량 측정 전에 대상자를 겨드랑이에 대한 조작 없이 1분간 쉬게 하였다.
- [0158] **땀 생성 측정(중량 측정):** (이 측정 전에 새로운 쌍의 분말-불포함, 니트릴 글로브를 착용했다). 대상자는 부분적으로 누워서(약 45도), 겨드랑이를 완전히 노출시키기 위해 팔을 머리의 뒤에서 깎지 끼웠다. 미리 중량이 측정된 여과지를 원추형 보관 튜브에서 꺼내어 여과지의 끝이 겨드랑이 주름 라인과 정렬되게 하여 대상자의 겨드랑이 아래에 끼웠다. 대상자는 팔을 긴장을 풀어 신체의 측부에 놓고 여과지는 손가락을 이용하여 제 위치에 있게 했다. 대상자는 양팔을 몸통에 단단하게 고정한 채 5분간 앉아있었다. 여과지가 양쪽 겨드랑이 아래에 안정적으로 배치되었을 때부터 시간을 측정했다. 양쪽 겨드랑이를 동시에 측정했다. 5분 후에, 여과지를 겨드랑이로부터 제거하고 동일한 개별적인 원추형 튜브에 다시 넣었다. 먼저 배치된 여과지를 먼저 제거하였다. 튜브로부터 땀의 증발을 방지하기 위해 원추형 튜브의 뚜껑을 단단하게 돌려 닫았다. 땀 생성 측정을 1분 간격으로 2회 더 반복하였다.
- [0159] Minor's 전분/요오드 테스트:
- [0160] 대상자는 겨드랑이를 완전히 노출시키기 위해 양손을 머리 뒤쪽에서 깎지끼어 잡았다. 전술된 바와 같이 사전에 결정된 겨드랑이의 영역에 멸균 거즈 패드로 요오드 용액을 바르고 자연-건조시켰다. 요오드 용액이 완전히 건조되었을 때, 숨으로 요오드가 도포된 영역 위에 얇은 전분층을 형성했다. 위양성(false positive) 및 백그라운드를 감소시키기 위해 전분의 적용 전에 요오드를 자연 건조시켰다. 그 후, 대상자는 양팔을 자신의 몸통에 단단하게 고정한 채 앉았다. 5분 후에, 대상자는 겨드랑이를 완전히 노출시키기 위해 자신의 팔을 들어 머리 뒤쪽에서 양손을 맞잡았다. 좌측 및 우측 겨드랑이 및 날짜가 명확하게 표기된 사진들을 촬영했다. 겨드랑이를 70% 에탄올로 세정하고 뒤이어 멸균된 탈이온수로 세정했다.
- [0161] 치료제 준비:
- [0162] 염수 + 5% 에탄올로 Kn21pr을 1mg/ml 농도로 준비했다(즉, 500 마이크로리터의 Kn21pr을 분주하고 25 마이크로

리터의 100% 에탄올을 첨가함). 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, Kn21pr은 21,000의 분자량 및 보호된 올리고아르기닌을 포함하는 분지형 기들을 갖는 양전하로 하전된 폴리라이신 백본을 의미한다. 100 유닛의 Botox® (Allergan, Irvine, CA)를 18g11/2을 갖춘 멸균된 3ml 라텍스 볼포함 주사기(Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey)를 이용하여 0.7 밀리리터의 0.9% 염화나트륨 용액(Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois)으로 재구성하였다. 재구성된 Botox®를 조심스럽게 8회 역전(inversion)에 의해 혼합했다. 각 대상자에 대해 200 유닛의 Botox®를 이용했다. 200 유닛의 Botox® 및 Kn21pr + 5% 에탄올로 치료 용액을 준비하고(즉, 1.5 밀리리터의 Botox®를 500 마이크로리터의 Kn21pr + 25 마이크로리터의 100% 에탄올에 첨가함) 복합체가 형성되도록 5분간 실온에서 방치했다. 5분의 방치 기간 후에, 약 1.0 밀리리터의 4% HPC(히드록시프로필셀룰로오스)(1% 에탄올과 함께)를 첨가하고 소형 금속제 스패츨러(spatula)로 적절하고 완전하게 혼합했다. 균일한 치료 용액을 주사기 팁 캡이 장착된 3 ml 주사기(3ml syringe and syringe tip cap)(Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey)로 옮겼다.

[0163] 0.9% 염화나트륨 용액 및 Kn21pr + 5% 에탄올로 대조구 용액을 준비하고(즉, 1.5 밀리리터의 0.9% 염화나트륨 용액을 500 마이크로리터의 Kn21pr + 25 마이크로리터의 100% 에탄올에 첨가함) 실온에서 5분간 방치했다. 방치 후에, 약 1.0 밀리리터의 4% HPC(1% 에탄올과 함께)를 첨가하고 소형 금속제 스패츨러로 적절하고 완전하게 혼합했다. 균일한 치료 용액을 주사기 팁 캡이 장착된 3 ml 주사기로 옮겼다.

[0164] 치료 적용(분말-볼포함, 니트릴 글로브 착용):

[0165] 대상자는 거드랑이를 완전히 노출시키기 위해 머리 뒤쪽에서 양손을 깎지끼었다. 그 후, 대상자는 약 45도의 각도로 의자에 누웠다. 도 7에서 보는 바와 같이, 적용을 위해 투여 영역을 시각적으로 맵핑하였다(즉, 액모가 있는 피부로부터 1cm 초과한 영역). 투여 영역의 건조 여부를 확인했다. 좌측은 "L"로 표시하고, 우측은 "R"로 표시한 표시된 주사기로부터 주사기 팁 캡을 제거하여 대상자의 거드랑이에 적용하기 위해 준비했다. 치료 용액을 주사기로 투여 영역에 고르게 퍼지게 하고 손가락으로 1분간 마사지하면서 피부에 스며들게 하였다. 그 후, 대상자는 팔을 신체의 측부를 따라 내려뜨리고 60분간 기다렸다(incubation). 60분 인큐베이션 후에, 치료 용액을 멸균된 거즈 패드로 닦아냈다. 거즈 패드 및 글로브를 바이오-해저드 백에 넣어 폐기했다. 대상자를 귀가시켰다.

[0166] 결과:

[0167] Essentia 국소 BT는 발한을 65% 감소시켰고 이는 도 8a. Kn21pr 백본 단독(대조구) 또는 Kn21pr 백본 + 200U Botox로 치료(양쪽 거드랑이 중 치료가 적용되는 쪽은 무작위로 정함)후 4주차의 땀 생성량(기준 대비 비율)에 예시된다. NPSS를 이용하여 Wilcoxon signed ranks(부호 순위)에 의한 통계적 분석을 수행하여 P는 표시된 바와 같았고, $P < 0.05$ 로 유의성이 있었다. [n=10 명의 대상자].

[0168] **2차 비교:** 기준 vs. 4주차(도 8b 참조). Kn21pr 백본 단독(대조구) 또는 Kn21pr 백본 + 200 U Botox로 거드랑이의 치료(양쪽 거드랑이 중 치료가 적용되는 쪽은 무작위로 정함)후 4주차에 땀 생성량(5분당 mg)이 표 6에 제시된다. NPSS를 이용하여 Wilcoxon signed ranks(부호 순위)에 의한 통계적 분석을 수행하여 P는 표시된 바와 같았고, $P < 0.05$ 로 유의성이 있었다. (Pr T p=0.0217) [n=10].

[0169] 도 9는 액와 다한증의 치료를 위해 "Essentia Botox lotion"를 국소적으로 적용하는 치료의 전 및 후에 수행된 Minor's 전분/요오드 테스트를 보여주는 사진을 나타낸다. 대상자 #12에 대해 우측 거드랑이는 "Essentia Botox lotion"(a 및 c)로 처리되고 좌측 거드랑이는 대조구(b 및 d)로 처리된 경우의 기준 vs. 2주차의 전분/요오드 테스트가 도시된다. 이 사진들은 담체+보톡스에 의한 치료 후 전분-요오드에서 관찰되는 통상적인 효과들을 보여준다. 대조군에서 일부 교차점(crossover)이 관찰되나(중량 데이터에서의 25% 감소와 일치), 유의성 있는 감소는 치료군에서 제공된다(처리된 쪽에 대한 중량 데이터에서의 65% 감소와 일치됨).

[0170]

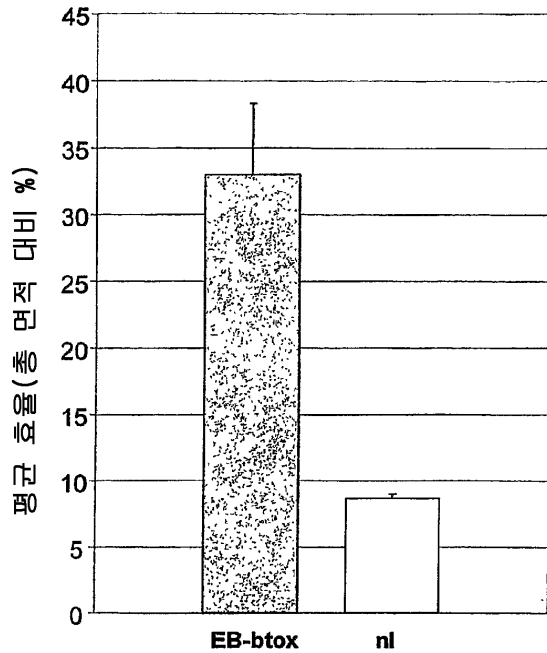
[0171] 결론:

[0172] 본 실시예는 본 명세서에서 개시된 본 발명에 따라 형성된 보툴리눔 복합체들의 국소 적용이 주관적인 또는 정량적인 다한증을 갖는 일단의 환자들에서 발한의 감소에 있어서 치료적 효과를 제공한다는 것을 확인한다. 발한

을 감소시키는 이 효과는 또한 전술된 이마 다한증 및 방치 시간(dwell time) 동안 제제의 퍼짐(spread)을 제한하기 위해 글로브와 조합되는 경우 손바닥/발바닥 적용에서도 제공되었다. 치료적 효과를 위한 보툴리눔 독소 복합체의 경상피 전달은 이 방법이 방광 장애 또는 경련, 위장관 적용, 또는 냄새 감소를 위한 퍼지션 분비 또는 여드름 예방/치료와 같은 SNAP 기능 또는 아세틸콜린 신호들이 결정적인 다른 경우들에도 확대될 수 있다는 것을 더 확인한다.

도면

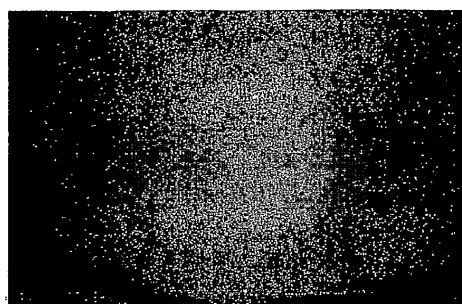
도면1



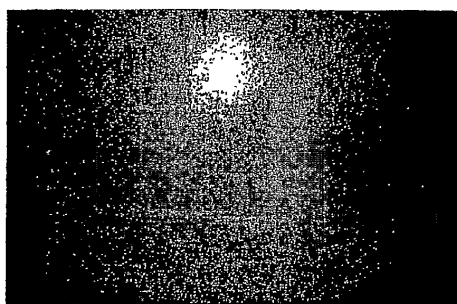
도면2



도면3

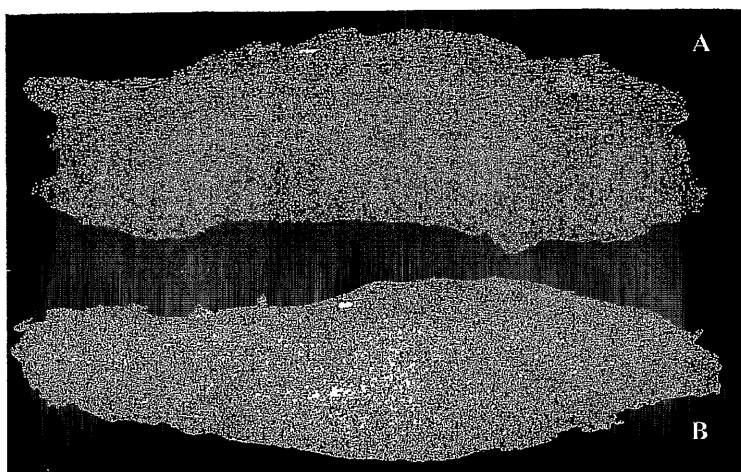


Essentia Botox Lotion

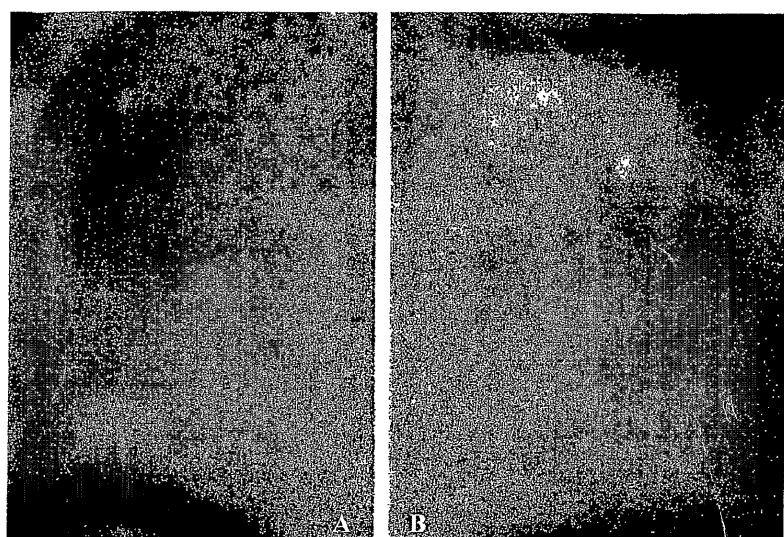


기준

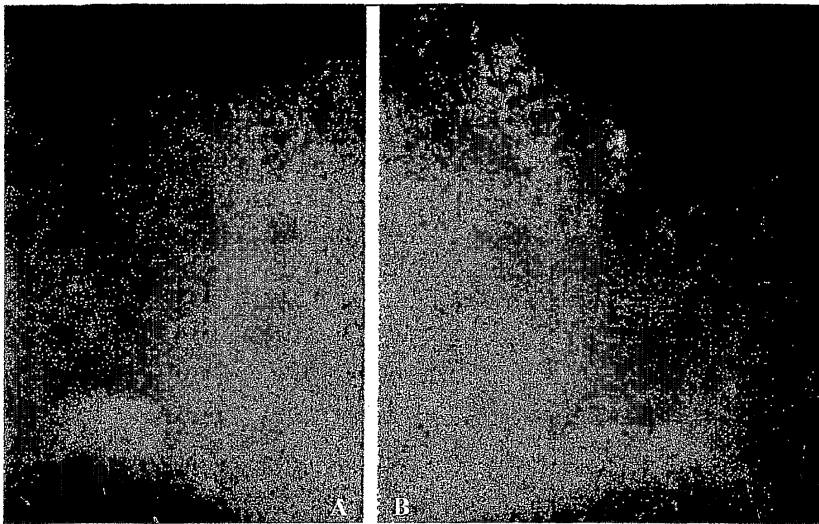
도면4



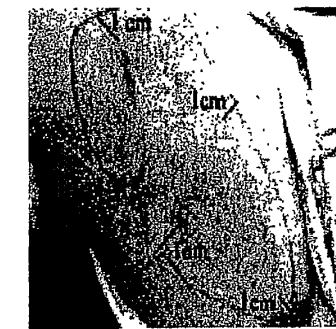
도면5



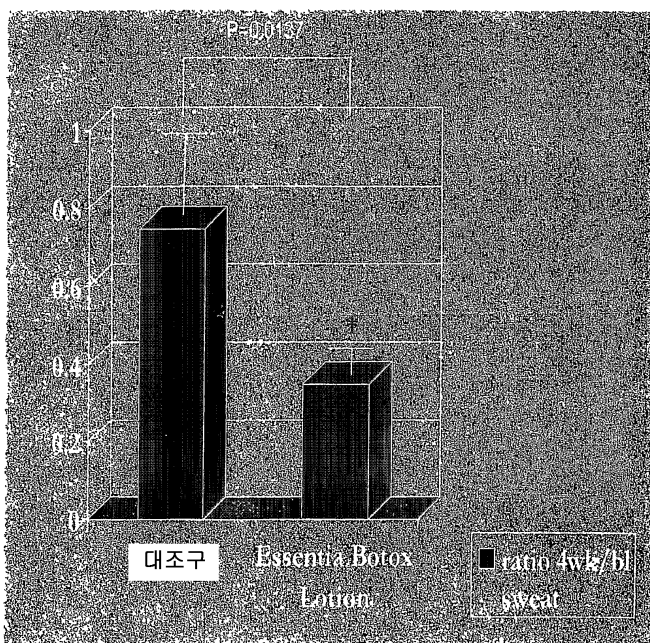
도면6



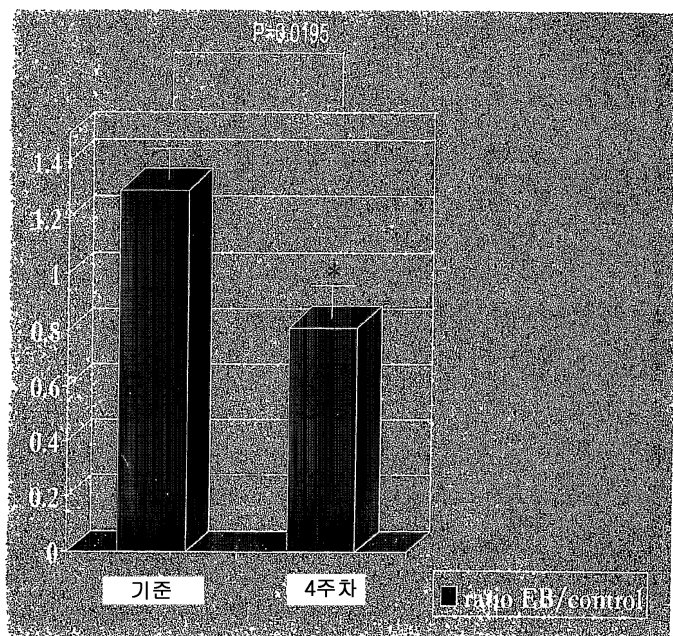
도면7



도면8a



도면8b



도면9

