



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0141340
(43) 공개일자 2024년09월26일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 9/00 (2006.01) A61K 38/38 (2006.01)
 A61K 38/48 (2006.01) A61K 47/42 (2017.01)
 A61K 8/44 (2006.01) A61P 13/06 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 A61K 9/0019 (2013.01)
 A61K 38/38 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7030641
 (22) 출원일자(국제) 2023년02월14일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2024년09월11일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2023/053647
 (87) 국제공개번호 WO 2023/156389
 국제공개일자 2023년08월24일
 (30) 우선권주장
 22156843.9 2022년02월15일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 22183172.0 2022년07월05일
 유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
 메르츠 파마 게엠베하 운트 코. 카가아
 독일연방공화국 60318 프랑크푸르트 암 마인 에켄하이머 란트스트라세 100</p> <p>(72) 발명자
 에이젤 칼-하인즈
 독일연방공화국 60318 프랑크푸르트 암 마인 에켄하이머 란트스트라세 100 씨/오
 핀크 클라우스
 독일연방공화국 60318 프랑크푸르트 암 마인 에켄하이머 란트스트라세 100 씨/오
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 유미특허법인</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **보툴리눔 독소 액체 제형 및 그 용도**

(57) 요약

본 발명은 (i) 보툴리눔 독소, (ii) 인간 혈청 알부민 (HSA), 및 선택적으로 (iii) 긴장성 물질 및/또는 (iv) 완충화제를 포함하는 액체 제형에 관한 것이다. 일 측면에서, 액체 제형은 매우 낮은 철 이온 농도를 특징으로 한다. 다른 측면에서, 액체 제형은 트립토판 및/또는 N-아세틸-트립토판이 없거나 또는 매우 낮은 농도인 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따르면, 액체 제형은 인간 혈청 알부민을 킬레이트제와 접촉시켜 혼합물을 수득하는 단계 및 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있다. 아울러, 본 발명은 치료학적 적응증 및 미용적 상태를 치료하기 위한 액체 제형의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/4893 (2013.01)

A61K 47/42 (2013.01)

A61K 8/44 (2013.01)

A61P 13/06 (2018.01)

(72) 발명자

테일러 해롤드 뷔.

독일연방공화국 60318 프랑크푸르트 암 마인 에켄
하이머 란트스트라세 100 씨/오

야츠크 클라우디아

독일연방공화국 60318 프랑크푸르트 암 마인 에켄
하이머 란트스트라세 100 씨/오

퀴바흐 카티아

독일연방공화국 60318 프랑크푸르트 암 마인 에켄
하이머 란트스트라세 100 씨/오

명세서

청구범위

청구항 1

액체 제형으로서,

- (i) 보툴리눔 독소, 및
- (ii) 인간 혈청 알부민

을 포함하고,

상기 액체 제형이 Fe^{3+} 이온을 1 μM 미만의 농도로, 바람직하게는 500 nM 미만, 더 바람직하게는 250 nM 미만의 농도로 함유하는, 액체 제형.

청구항 2

액체 제형으로서,

- (i) 보툴리눔 독소, 및
- (ii) 인간 혈청 알부민

을 포함하고,

상기 액체 제형이 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 함유하지 않거나 또는 50 μM 이하로 함유하는, 액체 제형.

청구항 3

액체 제형으로서,

- (i) 보툴리눔 독소, 및
- (ii) 인간 혈청 알부민

을 포함하고,

상기 액체 제형이 다음 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는, 액체 제형:

- (a) 인간 혈청 알부민을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 및 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계, 및
- (b) 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하는 단계.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 액체 제형이 다음 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는, 액체 제형:

- (a) 인간 혈청 알부민을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 및 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계, 및
- (b) 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하는 단계.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서,

단계 (a)에서 인간 혈청 알부민 출발 물질을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 출발 물질과 킬레이트제의 혼합물을 수득하고, 단계 (b)에서, 상기 혼합물에서 킬레이트제를 제거해 전처리된 인간 혈청 알부민 물질을 수득하고, 추가적인 단계 (c)에서, 보툴리눔 독소를 전처리된 인간 혈청 알부민 물질과 혼합하고, 상기 킬레이트제는 바람직하게는 투석, 여과, 교차 흐름 여과 또는 한외여과에 의해 제거되거나, 또는

단계 (a)에서, 보툴리눔 독소 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 프리-제형을 킬레이트제와 접촉시켜, 액체 프리-제형 및 킬레이트제의 혼합물을 수득하고, 단계 (b)에서 상기 혼합물로부터 킬레이트제를 제거해 액체 제형을 수득하고, 상기 킬레이트제가 바람직하게는 투석, 여과, 교차 흐름 여과 또는 한외여과에 의해 제거되는,

액체 제형.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 혈청 알부민이 액체 제형에 0.001-1.00% w/v의 함량으로 존재하는, 액체 제형.

청구항 7

제2항에 있어서 상기 액체 제형이 Fe^{3+} 이온을 1000 nM 미만, 바람직하게는 500 nM 미만, 더 바람직하게는 250 nM 미만의 농도로 함유하는, 액체 제형.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 액체 제형이 (iii) 긴장성 물질을 추가로 포함하거나, 또는

상기 액체 제형이 (iii) 긴장성 물질을 추가로 포함하되, 긴장성 물질이 액체 제형에 0.01-2.0% w/v의 함량으로 존재하거나, 또는 상기 긴장성 물질이 염화나트륨이거나, 또는 상기 긴장성 물질이 염화나트륨이고 액체 제형에 0.01-2.0% w/v의 함량으로 존재하는, 액체 제형.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 액체 제형이 (iv) 완충화제를 추가로 포함하거나, 또는

상기 액체 제형이 (iv) 완충화제를 추가로 포함하되, 상기 완충화제가 액체 제형에 1-100 mM의 농도로 존재하거나, 또는 상기 완충화제가 아미노산, 포스페이트 또는 이들의 혼합물이거나, 또는 상기 완충화제가 히스티딘이거나, 또는 상기 완충화제가 히스티딘, 포스페이트 또는 이들의 혼합물이고, 상기 히스티딘 및 포스페이트가 액체 제형에 1-100 mM의 농도로 존재하는, 액체 제형.

청구항 10

제2항, 제7항, 제8항 및 제9항 중 어느 한 항에 따른 액체 제형의 제조 방법으로서, 제2항에 따라, 상기 방법이 하기 단계를 포함하고:

- 인간 혈청 알부민 출발 물질을 정제해 정제한 인간 혈청 알부민 물질을 수득하는 단계,
- 수득한 정제한 인간 혈청 알부민을 보툴리눔 독소와 혼합하고, 선택적으로 추가의 구성성분과 혼합해, 액체 제형을 수득하는 단계,

또는

- 보툴리눔 독소 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 조성물을 정제해 정제한 액체 조성물을 수득하는 단계,
- 수득한 정제한 액체 조성물을 추가의 구성성분과 혼합해 액체 제형을 수득하는 단계,

상기 정제 단계가 바람직하게는 인간 혈청 알부민 출발 물질에 대해, 또는 보툴리눔 독소 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 조성물에 대해 투석, 정용여과, 한외여과, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 장-흐름 분획법 또는 석출 (예를 들어, 염 석출, 에탄올 석출)을 수행함으로써 이루어지는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 정제 단계가 다음과 같이 수행되거나, 또는 상기 정제 단계가 부가적으로 다음 단계를 포함하고:

- 인간 혈청 알부민 출발 물질을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 출발 물질과 킬레이트제를 포함하는 혼합물을 수득하는 단계, 및

- 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하여, 킬레이트제-처리된 정제된 인간 혈청 알부민 물질을 수득하는 단계,
또는

- 보툴리눔 독소 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 조성물을 킬레이트제와 접촉시켜 액체 조성물과 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계, 및

- 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하여, 킬레이트-처리된 정제된 액체 제형을 수득하는 단계,

방법 (i) 및 (ii)에서 접촉 단계는 바람직하게는, 혼합물 내 킬레이트제의 농도가 1 mM 내지 500 mM이 되도록 수행되거나, 및/또는 킬레이트제의 제거가 투석, 교차 흐름 여과 또는 한외여과를 통해 수행되는, 방법.

청구항 12

제3항 내지 제6항, 제8항 및 제9항 또는 제10항 또는 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 킬레이트제가 카르복시산 관능기를 3-6개 가진 아미노폴리카르복시산, 사이트레이트, 포르피린, N,N,N',N'-테트라키스(2-피리디닐메틸)-1,2-에탄다이아민 (TPEN), 트리에틸렌테트라민 (TETA) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고,

바람직하게는, 상기 킬레이트제가 일반식 (I)의 아미노폴리카르복시산이고:



상기 식에서, R은 카르복시산 기를 포함하지 않거나 또는 카르복시산 기를 1 또는 2개 포함하고,

상기 아미노폴리카르복시산은 바람직하게는 에틸렌다이아민테트라아세트산 (EDTA), 에틸렌글리콜-비스(β -아미노에틸에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA), 1,2-비스(α -아미노페녹시)에탄-N,N,N',N'-테트라아세트산 (BAPTA), 다이에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA), 트리에틸렌테트라민헥사아세테이트 (TTHA), 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 액체 제형 또는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 보툴리눔 독소가 보툴리눔 신경독소 복합체이거나, 상기 보툴리눔 독소가 복합체 형성 단백질 (complexing protein)이 없는 보툴리눔 신경독소이거나, 상기 보툴리눔 독소가 혈청형 A의 보툴리눔 독소이거나, 또는 상기 보툴리눔 독소가 복합체 형성 단백질이 없는 혈청형 A의 보툴리눔 신경독소이거나, 또는 상기 보툴리눔 독소가 혈청형 A이고 1-1000 U/ml의 농도로 존재하거나, 또는 상기 보툴리눔 독소가 복합체를 형성하는 단백질이 없는 혈청형 A의 보툴리눔 신경독소이고, 1-1000 U/ml의 농도로 존재하거나, 또는 상기 액체 제형의 pH가 5.0-8.0 범위인, 액체 제형 또는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제9항, 제12항 및 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에 이용하기 위한 것이고, 특히 신경근 질환, 통증, 타액과다증, 다한증, 비뇨기계 장애 및 신경계 장애를 치료하는데 이용하기 위한 것인, 액체 제형 또는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제9항, 제12항 및 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 미용적 상태를 치료하기 위한 것인, 액체 제형 또는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 (i) 보툴리눔 독소, (ii) 인간 혈청 알부민 (HSA), 및 선택적으로 (iii) 긴장성 물질 및/또는 (iv) 완충화제를 포함하는 액체 제형에 관한 것이다. 액체 제형은 매우 낮은 철 농도 및/또는 없거나 또는 매우 낮은 농도의 트립토판 및/또는 N-아세틸-트립토판을 특징으로 한다. 본 발명은 추가적으로 인간 혈청 알부민을 킬레이트제와 접촉시켜 혼합물을 수득하는 단계 및 혼합물에서 킬레이트제를 제거하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 액체 제형에 관한 것이다. 아울러, 본 발명은 치료학적 적응증 및 미용적 상태를 치료하기 위한 액체

[0001]

제형의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 보툴리눔 신경독소 (BoNT; 또는 보툴리눔 독소 (BT))는 점점 더 다양한 신경학적, 의학적 및 미용적 상태를 치료하기 위해 널리 사용되고 있는 박테리아 신경독소 계열이다. BoNT/A-H로 명명된 "고전적인" BoNT 혈청형 8종이 널리 알려져 있다. 혈청형 2종, 타입 A (BoNT/A)와 타입 B (BoNT/B)는 현재 임상적으로 사용되고 있다. BoNT는 클로스트리듐 spp. 특히 클로스트리듐 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*)에 의해 고 분자량 (최대 ~900 kDa) 복합체 형태로 만들어진다. 이러한 독소 복합체는 활성 150 kDa 신경독소와 수종의 복합체를 형성하는 단백질 (무독성 신경독소-관련 단백질, NAP)로 구성되어 있다.
- [0003] 150 kDa 신경독소는 비활성의 단쇄 폴리펩타이드 (~150 kDa)로 합성되며, 단백질 분해에 의해 절단되어 쇠간 이황화 결합에 의해 연결된 경쇄 (LC, ~50kDa)와 중쇄 (HC, ~100kDa)가 생성된다. HC는 수용체로의 결합을 매개하는 C-말단 도메인과 엔도솜 막을 가로질러 LC의 전위를 매개하는 N-말단 도메인을 함유하고 있다. LC는 뉴런에서 프로테아제로 작용하고, 뉴런의 SNARE 단백질을 절단한다. 이것은 시냅스 소낭이 원형질막에 융합하는 것을 차단하며, 그래서 선택 뉴런으로부터 신경전달물질의 방출을 저해한다.
- [0004] BoNT의 제형은 이의 구조적인 복잡성과 제품의 낮은 사용 농도로 인해, 매우 까다롭다. BoNT는 열 및 알칼리성 pH와 같은 다양한 조건에 매우 취약하다. 그래서, BoNT는 이의 구조가 온전한 경우에만 기능하며, 그래서 BoNT의 의학적인 투약 형태를 조절하는 것과 관련한 어려움은 제품의 생산, 보관 또는 사용 중에 생물학적 활성의 불활화 또는 일부 소실로부터 방지하는 조성물로 BoNT를 제형화하는 것이다. BoNT의 약학적 제형이 매우 강력한 독소 (인간 치사 용량 약 0.1 내지 1 ng/kg)를 바이얼 당 단지 약 1 ng 범위의 매우 소량으로 포함하는 것 역시 또 다른 문제이다. 이런 점은 표면 변성으로 인해 독소 활성의 저하 문제를 가중시킨다. 아울러, BoNT 제형은 여러가지 광범위한 용도로 사용되므로, 근육, 피부 여러 층 (예, 진피, 피하 조직) 또는 샘 (예, 침샘)과 같은 매우 다양한 유형의 조직에 주사하기 적합하여야 한다.
- [0005] 진술한 바에 비추어, 현재 이용가능한 주요 BoNT 제품들은 동결건조된 산제로, 즉 2-8°C 또는 심지어 실온 (Xeomin[®])에서 보관하는 경우에 장기간 안정적인 형태로 제공된다. BoNT/A 복합체의 동결건조된 형태는 1989년 (Botox[®], Allergan) 및 1991년 (Dysport[®], Ipsen)에 처음 출시되었다. 2005년에, 복합체를 형성하는 단백질이 없는 순수한 150 kDa BoNT/A 신경독소의 첫번째 안정한 투약 형태가 승인되었다 (Xeomin[®]; Merz Pharmaceuticals). 그러나, 이 동결건조된 제품은 사용하기 전 재구성해야 하며, 이 과정 중에 투여 실수 및 무균성 문제가 발생할 가능성이 있다. 따라서, 사용하기 더 편리하고 쉽게 투여할 수 있는 BoNT의 액체 제형을 개발하고자 많은 시도들이 수행되었다.
- [0006] BoNT의 첫번째 액체 제형은 2000년에 승인되었으며, 2001년에 유럽에서 Neurobloc[®]로 출시되었다. Neurobloc[®] (Eisai)는 다이소듐 숙시네이트, 염화나트륨, 인간 혈청 알부민 (HSA), 소듐 카프릴레이트 및 소듐 N-아세틸트립토판에이트를 함유한 완충제 중에 제형화된 BoNT/B 복합체의 무균 용액이다. 그러나, 이 제품은 이의 산성 pH로 인해 주사시 통증을 유발할 수 있다. BoNT/A에 대한 액체 제형은 지금까지 단 2종만 시판 승인되어 있다: Innotox[®] (Medytox)는 아시아 국내 시장 (예를 들어, 한국, 2013년에 승인)에서만 제한되어 있으며, Alluzience[®] (Ipsen/Galderma)는 2021년에 유럽에서 사용이 승인되었다. 이들 액체 제형 둘다 BoNT/A 독소 복합체를 함유하고 있으며, 물 외에도, 염화나트륨, 디터전트 (Innotox[®]: 폴리소르베이트 20; Alluzience[®]: 폴리소르베이트 80), 아미노산 (Innotox[®]: 메티오닌; Alluzience[®]: 히스티딘) 및 부가적인 부형제 (Innotox[®]: 완충제로서 소듐 포스페이트; Alluzience[®]: 수크로스)를 함유하고 있다.
- [0007] 보툴리눔 독소 액체 제형의 제조에 있어 이러한 진전에도 불구하고, 보툴리눔 독소의 안정한 액체 제형이 계속적으로 요구되고 있으며, 특히 수송 및 보관 중에 안정한, 보툴리눔 독소의 즉시 사용가능한 (ready-to-use) 액체 제형을 개발하기 위한 새로운 옵션이 여전히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명의 과제는 미용적 및 치료학적 용도로 이용하기 적합한 보툴리눔 독소의 안정한 액체 제형을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 EDTA와 같은 킬레이트와 인큐베이션한 다음 킬레이트제를 제거함으로써 전처리된 인간 혈청 알부민 (HSA)이 우수한 보관 안정성뿐만 아니라 월등하고 개선된 광 안정성을 나타내는 보툴리눔 독소의 액체 제형을 제조할 수 있게 한다는 놀라운 발견 사실을 기반으로 한다. 아울러, 본 발명은, 철 이온, 특히 Fe^{3+} 이온이 HSA를 함유한 보툴리눔 독소 액체 제형의 광 안정성에 유해한 효과를 미친다는 놀라운 발견 사실을 기반으로 한다.

[0010] 아울러, 본 발명은 트립토판 및 N-아세틸-트립토판이 인간 혈청 알부민 (HSA)을 함유한 보툴리눔 독소 액체 제형의 광 안정성을 감소시킨다는 놀라운 사실을 토대로 한다. 이러한 사실은, 시판 HSA 제품이 물 및 염화나트륨과 더불어 통상적으로 HSA를 고온에서 안정화하기 위해 소듐 카프릴레이트 및 N-아세틸-트립토판을 함유하고 있으며, 이러한 방식으로 보툴리눔 독소 제형에 첨가되므로, 매우 놀라웠다. 이는 또한 트립토판이 보툴리눔 독소에 대한 안정화 첨가제로 언급된 바 있어 (예를 들어, EP 3 679 946), 놀라운 결과였다.

[0011] 이에, 제1 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 액체 제형을 제공하며:

[0012] (i) 보툴리눔 독소, 및

[0013] (ii) 인간 혈청 알부민 (HSA),

[0014] 여기서, 액체 제형은 Fe^{3+} 이온을 1 μM 미만의 농도로, 바람직하게는 500 nM 미만, 더 바람직하게는 250 nM 미만, 가장 바람직하게는 100 nM 미만으로 함유한다.

[0015] Fe^{3+} 를 저 농도로, 예를 들어, 1 μM 미만으로 함유한 보툴리눔 독소 액체 제형은 (a) 인간 혈청 알부민을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민과 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계, 및 (b) 혼합물에서 킬레이트제를 제거하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0016] 제2 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 액체 제형을 제공하며:

[0017] (i) 보툴리눔 독소, 및

[0018] (ii) 인간 혈청 알부민 (HSA),

[0019] 여기서 액체 제형은 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 함유하지 않거나 또는 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 (Trp와 N-AcTrp의 전체 농도로서) 50 μM 이하, 바람직하게는 20 μM 이하, 더 바람직하게는 10 μM 이하, 보다 더 바람직하게는 1 μM 이하, 가장 바람직하게는 0 μM 로 함유한다.

[0020] 본 발명의 제1 측면 및 제2 측면에 따른 액체 제형은 바람직하게는 (iii) 긴장성 물질, 특히 염화나트륨, 및 (iv) 완충화제, 특히 히스티딘 완충제, 포스페이트 완충제 또는 이들의 혼합물을 추가로 포함한다. 트립토판 및 /또는 N-아세틸-트립토판이 없거나 또는 매우 낮은 농도로 함유된 보툴리눔 독소 액체 제형은 HSA 출발 물질을 투석과 같은 방법을 이용해 정제하고 정제된 HSA 물질을 본 발명의 액체 제형의 제형에 이용함으로써 제조할 수 있다.

[0021] 제3 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 액체 제형을 제공하며:

[0022] (i) 보툴리눔 독소, 및

[0023] (ii) 인간 혈청 알부민 (HSA),

[0024] 여기서, 인간 혈청 알부민은 다음 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다:

[0025] (a) 인간 혈청 알부민을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 및 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계, 및

[0026] (b) 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하는 단계.

[0027] 접촉 단계 (a)는 바람직하게는 킬레이트제 (예를 들어, EDTA)를 HSA 함유 조성물 (예를 들어, HSA 용액)에 첨가하고, 제조된 혼합물을 미리 지정된 시간 동안 인큐베이션함으로써, 선택적으로 이후 킬레이트제 (예를 들어, EDTA)를 함유한 완충제에 대해 투석함으로써, 이루어진다. 단계 (b)에서, 킬레이트제는 임의의 적절한 방법, 예

를 들어 투석에 의해 제거된다.

- [0028] 아울러, 본 발명의 제3 측면에 따른 액체 제형은 바람직하게는 (iii) 긴장성 물질, 특히 염화나트륨, 및/또는 (vi) 완충화제, 특히 히스티딘 완충제, 포스페이트 완충제 또는 이들의 혼합물을 추가로 포함한다.
- [0029] 제4 측면에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는, 본 발명의 제2 측면에 따른 액체 제형의 제조 방법에 관한 것이다:
- [0030] - 인간 혈청 알부민 출발 물질을 정제해, 예를 들어, 인간 혈청 알부민 출발 물질에 대해 투석, 정용여과, 한외여과, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 또는 장-흐름 분획 (field-flow fractionation), 바람직하게는 투석을 수행함으로써, 정제된 인간 혈청 알부민 물질을 수득하는 단계,
- [0031] - 수득한 정제된 인간 혈청 알부민을 보툴리눔 독소와 혼합하고, 선택적으로 추가의 구성성분과 혼합해, 액체 제형을 수득하는 단계,
- [0032] 본 발명의 제4 측면에 따른 대안적인 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0033] - 보툴리눔 독소 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 조성물을 정제해, 예를 들어 보툴리눔 독소 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 조성물에 대해 투석, 정용여과, 한외여과, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 또는 장-흐름 분획, 바람직하게는 투석을 실시함으로써, 정제된 액체 조성물을 수득하는 단계;
- [0034] - 수득한 정제된 액체 조성물을 추가의 구성성분과 혼합해 액체 제형을 수득하는 단계.
- [0035] 제5 측면에서, 본 발명은 요법에 이용하기 위한, 특히 신경근 질환, 통증, 타액과다증, 다한증, 비뇨기계 장애 및 신경계 장애의 치료에 이용하기 위한 본 발명에 따른 액체 제형에 관한 것이다.
- [0036] 제6 측면에서, 본 발명은 미용적 상태, 바람직하게는 피부 상태를 치료하기 위한, 특히 피부 선 또는 접힘 또는 주름을 치료하기 위한 본 발명의 액체 제형의 미용적 (미학적) 용도에 관한 것이다.
- [0037] 제7 측면에서, 본 발명은 본 발명의 액체 제형을 유효량으로 이를 필요로 하는 인간에게 투여하는 것을 포함하는 질환 또는 상태의 치료 방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명에 따른 액체 제형, 이의 용도 및 방법에 대한 바람직한 구현예들을 첨부된 청구항에 기술한다.
- [0039] 본 발명은 아래 본 발명의 상세한 설명 및 이에 포함된 실시예를 참조하여 더 쉽게 이해될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 본 발명은 보툴리눔 독소 액체 제형의 제형화에 전처리된 인간 혈청 알부민 (HSA)의 사용시 광 민감성 감소, 즉 광 안정성 개선이 달성된다는 예상하지 못한 발견 사실을 기반으로 한다. 아울러, 킬레이트 처리 후 투석에 의해 수득되는 매우 낮은 함량의 철 이온 (Fe^{3+} 이온)이 인간 혈청 알부민 (HSA)을 함유한 보툴리눔 독소 액체 제형의 광 민감성을 크게 증가시킨다는 것 역시 예상치 못하게도 발견하였다. 이는, 철이 비교적 흔하고 어디에나 존재하기 때문에 놀라운 점이었으며, 아울러 구리, 코발트 또는 니켈과 같은 다른 금속 이온은 이러한 불안정화 효과를 유발하지 않는다는 것 역시 확인되었다.
- [0041] 아울러, 본 발명은 트립토판 및/또는 N-아세틸-트립토판이 인간 혈청 알부민 (HSA)-함유 보툴리눔 독소 액체 제형의 광 안정성 (light stability 또는 photostability)을 손상시킨다는 예상치 못한 발견 사실을 토대로 한다. 특히, 일반적인 HSA 제품에 대한 킬레이트제 처리와 후속적인 투석을 통한 N-아세틸-트립토판의 제거가 개선된 광 안정성을 가진 HSA-함유 보툴리눔 독소 액체 제형을 구현하는 것으로 밝혀졌다.
- [0042] 본 발명의 액체 제형은 제형을 주사하기 전 재구성할 필요 없는 즉시 사용가능한 제품이며, 예를 들어 사전 충전된 주사기 형태로 이용할 수 있으므로, 분말 형태의 동결건조된 보툴리눔 독소 제제와 비교해, 유익하게는 개선된 안전성과 투약 정확성을 제공한다. 나아가, 액체 제형의 탁월한 안정성은 수송 및 보관이 용이할뿐 아니라 의사가 취급하기에도 용이하게 하고 단순화한다. 특히, 본 발명의 액체 제형의 탁월한 광 안정성은 제조 공정을 단순화하고, 제품을 광범위한 광 차단 없이도 충전 및 포장 가능하게 하며, 사용 전 진료소에서 광-노출 보관으로 인한 잠재적인 활성 저하를 감소시킨다. 아울러, 본 발명의 액체 제형은 주사 통증을 높이는 일부 물질을 함유하지 않아, 의사 및 환자가 특히 미학적 분야에서 제형의 수용도를 증가시킨다.

- [0043] 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 본 발명의 제형의 광 민감성은 보툴리눔 독소 액체 제형을 제조하는데 이용된 HSA에 함유된 N-아세틸-트립토판 및 Fe^{3+} 와 같은 물질과 관련 있는 것으로 보인다. 그러나, 이러한 물질의 제거가 보툴리눔 독소를 광 안정화하는 HSA의 능력을 증가시키는 정확한 기전은 여전히 불분명하다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포함하는", 유사 용어 "비롯하여" 및 "함유하는" 및 "포함한다", "망라한다" 및 "함유한다"와 같은 이에 대한 임의의 변형 형태는, 요소 또는 요소 목록을 포함하거나, 망라하거나 또는 함유하는 공정, 방법, 공정에 의한 생산물, 조성물 또는 제형이 이러한 요소만을 포함하지 않고, 이러한 공정, 방법, 공정에 의한 생산물, 조성물 또는 제형에 대해 명시적으로 열거되지 않은 기타 요소를 망라할 수 있도록, 비-독점적인 포함을 지칭하는 것으로 의도된다. 아울러, 본 발명의 체계에서, 용어 "포함한다", "포함하는", "망라한다", "비롯하여", "함유한다", "함유하는" 및 임의의 이의 변형 형태들 각각이 지정된 요소들의 독점적인 포함을 지칭하는 것으로 이해되는 용어 "이루어진다" 또는 "이루어진" 또는 임의의 이의 변형 형태 (예를 들어, "로 필연적으로 이루어진다")로 치환될 수 있는 것으로 의도된다.
- [0045] 용어 "a" 및 "an" 및 "the" 및 본 발명의 맥락에서 사용된 비슷한 언급은 단수 및 복수 둘다를 망라하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서 본원에서 달리 지시되거나 또는 문맥상 명확하게 상충하지 않은 한 "적어도 하나" 또는 "하나보다 많은"과 관련있을 수도 있다.
- [0046] 용어 "액체 제형" 또는 "보툴리눔 독소 액체 제형"은 본원에 사용된 바와 같이 일반적으로 수성 제형을 지칭하며, 전형적으로 수성 용액이다. 본원에서, 용어 "액체 제형"은 "액체 조성물"과 상호 호환적으로 사용될 수 있다. 액체 제형은 일반적으로 약제학적으로 허용가능한 액체 제형이거나, 또는 다시 말해 약학적 액체 제형이다. 본 발명의 액체 제형은 전형적으로 pH 범위가 5.0-8.0이고, 특히 5.5-7.5 범위이고, 바람직하게는 5.5-7.0 또는 6.0-7.5 범위이고, 더 바람직하게는 6.0-7.0 범위이고, 가장 바람직하게는 6.0-6.5 범위이다.
- [0047] 용어 "약제학적으로 허용가능한"은 본원에 사용된 바와 같이 액체 제형이 인간 환자 또는 개체에 투여할 경우 허용불가한 부정적인 부작용을 유발하지 않는다는 것을 의미하고, 즉 액체 제형이 인간에 사용하기 적합하다는 것을 의미한다. 수성 용액은 식염수가 첨가 또는 비-첨가된 완충 용액일 수 있으며, 완충 (예. 포스페이트 및/또는 히스티딘 완충) 생리 식염수 용액과 같은 생리 식염수 용액일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 액체 제형은 임의의 적합한 용기 시스템에서 보관할 수 있는 것으로 고려된다. 본 발명의 액체 제형을 보관하기에 적합한 용기 시스템은 밀봉될 수 있거나 또는 밀봉되고, 액체 제형을 수용하거나, 보관하거나 및/또는 수송하는데 이용될 수 있는, 부분적으로 또는 완전히 밀폐되는 공간을 가진 임의의 장치이다. 용기 시스템은 바람직하게는 유리 또는 플라스틱 (예를 들어, 유리 폴리머)로 제조되거나 또는 일부 이것으로 제조되거나 또는 주로 이것으로 제조된 밀폐된 (또는 밀봉된) 용기이며, 이는 예를 들어 (i) 주사기, (ii) 바이알, (iii) 카플 (carpule) 또는 (iv) 앰플 형태의 용기를 망라한다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 액체 제형은 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이 사전 충전된 주사기 형태로 주사기에 보관된다.
- [0049] 용어 "보툴리눔 독소"는 본원에 사용된 바와 같이 특별히 제한되지 않으며, 임의의 혈청형 (BoNT/A-G)의 보툴리눔 독소를 포함한다. 예를 들어, 보툴리눔 독소는 혈청형 A 또는 B (BoNT/A, BoNT/B)의 것일 수 있다. 바람직하게는, 보툴리눔 독소는 혈청형 A, 더 바람직하게는 혈청형 A1 (BoNT/A1), 가장 바람직하게는 클로스트리듐 보툴리눔 Hall 균주에 의해 생산되는 BoNT/A1의 것이다. 아울러, 보툴리눔 독소는 박테리아 클로스트리듐 보툴리눔 으로부터 수득가능한 천연 신경독소이거나 또는 재조합 기술 및 유전자 또는 화학적 변형을 비롯해 대안적인 소스로부터 수득가능한 보툴리눔 독소와 같은 임의의 기타 보툴리눔 독소일 수 있다.
- [0050] 아울러, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "보툴리눔 독소" ("BT")와 동의어로 사용되는 용어 "보툴리눔 신경독소" ("BoNT")는 순수한 보툴리눔 신경독소 및/또는 이의 임의의 복합체, 즉 순수한 보툴리눔 신경독소와 복합체 형성 단백질로 된 임의의 복합체 ("독소 복합체"로 언급됨)를 지칭하는 것으로 의도된다. 달리 언급되지 않거나 또는 문맥상 달리 지칭하지 않은 한, 바람직하게는, 본 발명의 체계에서, 보툴리눔 독소는 복합체 형성 단백질이 없는 보툴리눔 신경독소이고, 더 바람직하게는 혈청형 A의 복합체 형성 단백질이 없는 보툴리눔 신경독소이다.
- [0051] 용어 "순수한 보툴리눔 신경독소"는 본원에 사용된 바와 같이 복합체 형성 단백질이 없는 보툴리눔 신경독소 (때때로 "신경독소 구성성분"으로도 언급됨), 또는 보다 정확하게는 신경독소-관련 복합체 형성 단백질 (NAP)이 없는 보툴리눔 신경독소를 의미한다. 순수한 보툴리눔 신경독소는 궁극적으로 아세틸콜린 방출을 저해하는 (활성) 신경독성의 폴리펩타이드이다. 이것은 이황화 결합에 의해 함께 묶인 경쇄 (LC; 약 50 kDa)와 중쇄 (HC; 약 100 kDa)로 구성된 2-쇄 단백질이다. 활성 신경독성 폴리펩타이드는 따라서 본원에서 "150 kDa 신경독소", "클

로스트리디움 보툴리눔 신경독소 (150 kD)" 또는 "신경독성 구성성분"을 지칭하는 것일 수 있다.

[0052] 용어 "독소 복합체"는 본원에 사용된 바와 같이 복합체 형성 단백질 (NAP) 세트와 신경독성 구성성분으로 된 고-분자 복합체를 지칭한다. 특히, 용어 "독소 복합체"는 900 kDa, 500 kDa 및 300 kDa의 클로스트리디움 보툴리눔 타입 A 독소 복합체를 망라한다. 복합체 형성 단백질은 무독성의 비-헤마글루티닌 (NTNHA)이고, 혈청형 A-D의 균주의 경우에는 다른 헤마글루티닌 (HA)이다. 예를 들어, 900 kDa 복합체는 오나보툴리눔 독소 (onabotulinumtoxin) A (Botox[®]/Vistabel[®], Allergan, Inc., Irvine, CA, USA)에 포함된다. 또한, 활성 물질로서 독소 복합체가 Dysport[®] (Azzalure[®], Ipsen, Paris, France), Alluzience[®] (Ipsen/Galderma) 및 Innotox[®] (Medytox)에 함유되어 있다. 이것은 Botox[®], Dysport[®], Alluzience[®] 및 Innotox[®]에 함유된 독소 복합체이고, 본 발명의 의미에서 독소 복합체이며, 즉 본 발명에 따른 "보툴리눔 독소"이다. 본 발명에 따르면, 보툴리눔 독소는 본 발명의 액체 제형에 1-1000 U/ml 범위, 바람직하게는 10-200 U/ml 범위, 더 바람직하게는 20-150 U/ml 범위, 가장 바람직하게는 50 U/ml 내지 100 U/ml 범위로 존재할 수 있다.

[0053] 용어 "unit" 또는 "U"는 본원에 사용된 바와 같이 독소의 생물학적 활성 (생물학적 효능)을 지칭하며, 검사한 마우스의 50%에서 치명적인 용량 (LD₅₀)에 대한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명의 맥락에서, LD₅₀은 달리 언급되지 않은 한 마우스 생분석 (MBA)을 이용해 결정한다. MBA는 마우스에 복막내 주사한 후 독소/신경독소의 평균 치사 용량 (LD₅₀), 즉 마우스 군의 50%를 살상할 수 있는 독소/신경독소의 용량을 결정된다. 이를 토대로, 독소/신경독소 1 unit (U)은 본원에 사용된 바와 같이 마우스 1 LD₅₀ (1.0 LD₅₀ = 1.0 U)으로 정의된다.

[0054] LD₅₀ 마우스 생분석은 보툴리눔 독소에 대한 다양한 생물학적, 화학적 또는 면역학적 검출 방법들 중에서도 골드스탠다드로서, 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지되어 있다 (예, Pearce, L.B.; Borodic, G.E.; First, E.R.; MacCallum, R.D. Measurement of botulinum toxin activity: Evaluation of the lethality assay. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1994, 128, 69-77). 당해 기술 분야의 당업자라면 혈청형 및 의도한 용도에 따라 적절한 보툴리눔 독소 농도를 결정할 수 있을 것이다. 대안적으로, 또한 세포-기반의 분석을 이용해, WO 2009/114748, WO 2013/049508 또는 WO2014/207109에 기술된 바와 같이, 보툴리눔 독소 활성을 결정할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면 세포-기반의 분석으로 수득한 보툴리눔 독소 활성 결과를 LD₅₀ 기준 표준을 이용해 보정함으로써 마우스 LD₅₀ 분석에서 수득한 LD₅₀ 결과와 연관시킬 수 있을 것이다.

[0055] 상업용 보툴리눔 독소 제형의 제조사들이 이용하는 LD₅₀ 검사 차이로 인해, 이의 상업용 보툴리눔 독소 제형의 제조사들이 표시한 단위 효능은 독점적이고, 쉽게 비교할 수 없다. 따라서, 본 발명의 체계에서, 아래에 제시된 전환율을 이용해 인코보툴리눔 독소 A ("INCO"; Xeomin[®], Bocouture[®]; 보툴리눔 독소 혈청형 A, 복합체 형성 단백질 결여; Merz Pharmaceuticals GmbH), 오나보툴리눔 독소 A ("ONA"; Botox[®], Vistabel[®]; 혈청형 A의 보툴리눔 독소 복합체; Allergan Inc.), 아보보툴리눔 독소 A ("ABO"; Dysport[®], Azzalure[®]; 혈청형 A의 보툴리눔 독소 복합체; Medicis Pharmaceutical Corp., Galderma Lab.), 리마보툴리눔 독소 B ("RIM"; Myobloc[®], NeuroBloc[®]; 보툴리눔 독소 혈청형 B; Solstice Neurosciences Inc.) 및 PurTox[®] ("TBD"; 보툴리눔 독소 혈청형 A; Mentor Worldwide LLC)의 비교 효능을 확립한다. 본원에 이용하는 경우, ONA 및 INCO의 전환율은 1:1이다. ONA/INCO:ABO의 전환율은 1:2.5이다. ONA/INCO:RIM의 전환율은 1:50이고, ONA/INCO:TBD의 전환율은 1:1.5이다. 아울러, 본 발명의 맥락에서, 1 U INCO (Xeomin[®]) 및 1 U 오나보툴리눔 독소 A ("ONA"; Botox[®])는 상기 기술된 바와 같이 측정된 마우스 1 LD₅₀ (1.0 LD₅₀) 또는 1 U에 상응하는 것으로 간주될 것이다.

[0056] 용어 "인간 혈청 알부민" 또는 이의 약어 "HSA"는 본원에 사용된 바와 같이 도너 HSA (인간 혈액, 또는 더 정확하게는 인간 혈장으로부터 유래한 HSA), 재조합 HSA를 지칭하는 것으로 의도된다. 바람직하게는, 인간 혈청 알부민은 도너 HSA이다. 본 발명에서, 인간 혈청 알부민 (HSA)은 안정화 단백질로 작용한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "안정화 단백질"은 일반적으로 보툴리눔 독소의 안정성 증가를 달성하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 본 발명에 따르면, HSA는 액체 제형에 0.001-2.0% w/v의 함량, 바람직하게는 0.001-1.00% w/v의 함량, 더 바람직하게는 0.01-0.5% w/v의 함량, 보다 더 바람직하게는 0.02-0.3% w/v의 함량, 가장 바람직하게는 0.03-0.15% w/v의 함량으로 존재할 수 있다.

[0057] 제1 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 액체 제형에 관한 것으로:

[0058] (i) 보툴리눔 독소, 및

- [0059] (ii) 인간 혈청 알부민,
- [0060] 여기서, 액체 제형은 Fe^{3+} 이온을 1 μM 미만의 농도로 함유한다.
- [0061] 바람직하게는, 액체 제형 내 Fe^{3+} 농도는 1000 nM 미만, 750 nM 미만, 500 nM 미만 또는 250 nM 미만이고, 더 바람직하게는, 액체 제형 내 Fe^{3+} 농도는 200 nM 미만, 150 nM 미만 또는 100 nM 미만이고, 특히 바람직하게는, 액체 제형 내 Fe^{3+} 농도는 50 nM 미만 또는 10 nM 미만이고, 가장 바람직하게는 액체 제형 내 Fe^{3+} 농도는 1 nM 미만, 100 pM 미만, 10 pM 미만 또는 1 pM 미만이다.
- [0062] 금속 이온 (예를 들어, Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} 또는 Fe^{3+})의 농도는 원자 흡수 분광측정법 (AAS), 유도 결합 플라즈마 질량 분광 측정 (ICP-MS) 및 유도 결합 플라즈마 원자 방출 분광법 (ICP-AES)(유도 결합 플라즈마 광학 방출 분광법 (ICP-OES)이라고도 함)과 같이 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 방법으로 측정함으로써 결정할 수 있다. 바람직하게는, ICP-MS 또는 ICP-OES, 특히 ICP-OES를 금속 이온의 농도를 측정하는데 이용할 수도 있다 (Second Supplement to USP38-NF 33, Chemical Tests / <233> Elemental Impurities - Procedure 1 (ICP-OES) 및 Procedure 2 (ICP-MS), 2015 참조).
- [0063] 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니나, 본 발명의 액체 제형을 제조하는데 이용되는 HSA 물질, 특히 철 이온을 다량으로 함유한 인간 혈액으로부터 유래한 도너 HSA가, 비-정제된 (비처리된) HSA의 광 민감성-유도 특성에 대해 적어도 부분적으로 원인이 되는 Fe^{3+} 이온을 상당량 함유한 것으로 보인다.
- [0064] 본 발명의 이러한 측면은, 전술한 이점 외에도, 제조 공정 및 새로운 제형을 개발하는 데에도 유리하다. 예를 들어, 장치 (예, 용기) 및 물질 (예, 부형제)은 최종 제품에 가능한 철이 소량으로 존재하는 방식으로 선택될 수 있다.
- [0065] Fe^{3+} 농도가 낮은 본 발명의 보툴리눔 독소 액체 제형은 (a) 인간 혈청 알부민을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 및 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계, 및 (b) 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있다.
- [0066] 바람직하게는, 본 발명의 제1 측면에 따른 액체 제형의 제조 방법은 본 발명의 제3 측면에 대해 기술된 방법과 동일하다. 아울러, 본 발명의 제1 측면에 따른 액체 제형은 본 발명의 제3 측면에 따른 액체 제형의 구성과 동일한 구성을 가질 수 있다. 따라서, 본 발명의 제3 측면에 따른 액체 제형에 대해 제시된 모든 설명, 언급, 기술, 정의 등은 명확하게 달리 지칭되지 않은 한 본 발명의 제1 측면에 따른 액체 제형에도 동일하게 적용된다.
- [0067] 제2 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 액체 제형에 관한 것으로:
- [0068] (i) 보툴리눔 독소, 및
- [0069] (ii) 인간 혈청 알부민,
- [0070] 여기서, 액체 제형은 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 함유하지 않거나 또는 50 μM 이하로 함유한다.
- [0071] 본원에 사용된 바와 같이, 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 "함유하지 않는"다는 용어는 액체 제형에 트립토판 및 N-아세틸-트립토판이 없거나 또는 전혀 없다는 것을 의미한다. 구체적으로, 이는 제형이 첨가된 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 함유하지 않는다는 것을 의미한다. 대안적으로, 이는, 액체 제형 내 트립토판 및 N-아세틸-트립토판의 농도가 0 μM (즉, 일반적인 반올림 규칙에 따르면 < 0.5 μM), 특히 $\leq 0.1 \mu\text{M}$ 또는 $\leq 0.01 \mu\text{M}$ 또는 $\leq 0.001 \mu\text{M}$, 보다 구체적으로는 0 nM (즉, 일반적인 반올림 규칙에 따르면 < 0.5 nM)인 것을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 "이하로 함유한다"는 용어는 트립토판 및 N-아세틸-트립토판의 총 함량이 $\leq 50 \mu\text{M}$ 이고, 바람직하게는 $\leq 20 \mu\text{M}$ 이고, 더 바람직하게는 $\leq 10 \mu\text{M}$ 이고, 보다 더 바람직하게는 $\leq 1 \mu\text{M}$ 이고, 더욱 더 바람직하게는 $\leq 0.1 \mu\text{M}$ 이고, 가장 바람직하게는 $\leq 0.01 \mu\text{M}$ 또는 $\leq 0.001 \mu\text{M}$ 인 것을 의미한다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, "함유하지 않거나 또는 이하로 함유한다"는 용어는, 액체 제형 내 트립토판 및 N-아세틸-트립토판의 총 함량이 0 μM 내지 X이거나 또는 0 nM 내지 X이고, 여기서 X가 50 μM , 20 μM , 10 μM , 1 μM , 0.1 μM , 0.01 μM 및 0.001 μM 인 것을 의미한다.
- [0072] 아미노산 트립토판 및 N-아세틸-트립토판의 농도는 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 다양한 기법 (예를 들어, DC, HPLC, LC-MS, GC-MS, CE 등)으로 결정할 수 있다. 예를 들어, N-아세틸-트립토판은 Nelis et al. (Nelis et al., J. Chromatogr., 1985, 333(2):381-387)에 기술된 바와 같이 역상 컬럼에서 액체 크로마토그래

피 및 280 nm에서 UV 검출을 이용한 분리에 의해 또는 Yu and Finlayson (Yu, M. W. and Finlayson, J. S., J. Pharm. Sci., 1984, 73(1):82-86)에 기술된 바와 같이 단백질 석출 후 남아있는 산-용해성 분획에 대한 UV 분광측정법에 기반한 방법에 의해 결정할 수 있다. 트립토판은 예를 들어 Wentao et al. (Wentao et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 401:3249-3261)에 기술된 바와 같이 액체 크로마토그래피-텐덤 질량 분광 측정을 수반하는 방법을 이용해 정량적으로 결정할 수 있다.

[0073] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "트립토판"은 L-트립토판, D-트립토판 또는 L-트립토판과 D-트립토판의 혼합물 (D/L-트립토판)을 지칭한다. 마찬가지로, 본원에 사용된 바와 같이 용어 "N-아세틸-트립토판"은 N-아세틸-L-트립토판, N-아세틸-D-트립토판 또는 N-아세틸-L-트립토판과 N-아세틸-D-트립토판의 혼합물 (N-아세틸-D/L-트립토판)을 지칭한다.

[0074] 액체 제형을 제조하는데 사용되는 인간 혈청 알부민은 바람직하게는 트립토판 및 N-아세틸-트립토판이 50 mM 이하, 더 바람직하게는 20 mM 이하 또는 10 mM 이하, 보다 더 바람직하게는 1 mM 이하 또는 0.1 mM 이하, 가장 바람직하게는 0.01 mM 이하로 함유되거나 또는 0 mM인 인간 혈청 알부민 물질이다.

[0075] 상업적인 도너 HSA 제품들 모두 N-아세틸-트립토판을 상당한 양 (> 10 mM)으로 함유하는 것으로 지적된다. 이에, 이러한 제품은 N-아세틸-트립토판의 함량을 본 발명의 액체 제형을 제형화하는데 이용하기 전 요망하는 수준까지 낮추기 위해 정제할 필요가 있다. "정제된 HSA"를 제조하기에 적합한 방법은 본 발명의 제4 측면과 관련하여 아래에서 상세히 설명한다. 간략하게는, 트립토판 및 N-아세틸-트립토판이 없거나 또는 함유율이 낮은 인간 혈청 알부민 (본원에서 "정제된 HSA"로 언급됨)은 인간 혈청 알부민 출발 물질에 대해 투석, 정용여과, 한외여과, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 장-흐름 분획법 또는 석출 (예를 들어, 염 석출, 에탄올 석출)을 실시해, 트립토판 및/또는 N-아세틸-트립토판을 제거함으로써 수득할 수 있다.

[0076] 본 발명에 따르면, 본 발명의 액체 제형, 예를 들어, 본 발명의 제1 측면, 제2 측면 및/또는 제3 측면에 따른 액체 제형은 아래에서 보다 상세히 기술된, 특히 본 발명의 제3 측면에 따른 액체 제형과 관련하여 기술된, (iii) 긴장성 물질 및 (iv) 완충화제 중 하나 또는 둘다를 추가로 포함할 수 있다.

[0077] 아울러, 본 발명의 제2 측면에 따른 액체 제형은 바람직하게는 Fe^{3+} 이온을 농도 1000 nM 미만으로 함유하는 것으로 고려된다. 구체적으로, 액체 제형 내 Fe^{3+} 농도는 바람직하게는 750 nM 미만, 500 nM 미만 또는 250 nM 미만, 더 바람직하게는, 액체 제형 내 Fe^{3+} 농도는 200 nM 미만, 150 nM 미만 또는 100 nM 미만이고, 특히 바람직하게는 액체 제형 내 Fe^{3+} 농도는 50 nM 미만 또는 10 nM 미만이고, 가장 바람직하게는 액체 제형 내 Fe^{3+} 농도는 1 nM 미만, 100 pM 미만, 10 pM 미만 또는 1 pM 미만이다.

[0078] 전술한 바와 같이, Fe^{3+} 이온은 보툴리눔 독소의 광 안정성을 감소시키고, 따라서 트립토판 및 N-아세틸-트립토판의 불안정 효과를 높이는 것으로 또한 밝혀져 있다. 본 발명의 액체 제형을 제조하는데 사용되는 HSA 물질, 특히 인간 혈액으로부터 유래한 도너 HSA는 비-정제된 (무처리) HSA의 광 안정성을 낮추는 특성에 기여하는 Fe^{3+} 이온을 상당량 함유한 것으로 보인다. Fe^{3+} 농도를 가능한 낮추기 위해, 예를 들어 폴리프로필렌 또는 폴리카보네이트와 같은 철 비-함유 물질로 제작된 용기를 선택함으로써, 최종 제품에 가능한 철이 적게 존재하는 방식으로 장치 (예, 용기) 및 물질 (예, 부형제)을 선택하여야 한다.

[0079] 금속 이온 (예를 들어, Fe^{3+} 및 Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+})의 농도는 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지되고 상기에 개시된 방법으로 측정함으로써 결정할 수 있다.

[0080] 본 발명의 보툴리눔 독소 액체 제형의 낮은 Fe^{3+} 함량은 본 발명의 제4 측면과 관련하여 상세히 기술된 방법에 의해, 특히 인간 혈청 알부민을 킬레이트제와 접촉시킨 다음 본원에 기술된 바와 같이 킬레이트제를 제거하는 것을 포함하는 방법에 의해 달성할 수 있다.

[0081] 본 발명에 따르면, 액체 제형은 달리 언급되거나 또는 의도되지 않은 한 하나 이상의 부가적인 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 액체 제형은 글리세롤, 수크로스, 락토스, 만니톨, 텍스트란, 히알루론산, 폴리비닐-피롤리돈, 젯산, 구연산, 아미노산(들)(트립토판 및 N-아세틸-트립토판 이외의 것), 벤질 알코올, 리도카인, 젤라틴, 하이드록시에틸 전분 (HES), 폴리에틸렌 옥사이드 및 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80) 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 그의 적절한 약제학적으로

허용가능한 부형제로는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 것을 포함하며, 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania를 참조한다.

[0082] 그러나, 본 발명에서는, 본 발명의 액체 제형에는 특정 성분 (즉, 화합물, 재료 또는 물질), 예를 들어 킬레이트제 및/또는 포스페이트, 디터전트, 다당류, 아미노산, 안정화 펩타이드 등이, 이들의 임의의 조합을 비롯하여, 특별히 결여된 것으로 고려된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "디터전트"는 "계면활성제"와 동의어로 사용되고, 비-이온성 및 이온성 디터전트를 망라하는 것으로 의도된다. 용어 "안정화 펩타이드"는 본원에 사용된 바와 같이 일반적으로 아미노산 5-50개로 이루어진 펩타이드, 예를 들어 아미노산 10-40개 또는 15-30개로 된 펩타이드를 의미한다. 그래서, 용어 "안정화 펩타이드"는 HSA를 배제한다.

[0083] 일 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 디터전트를 함유하지 않으며, 특히 폴리소르베이트를 함유하지 않으며, 보다 구체적으로는 폴리소르베이트 20 및/또는 폴리소르베이트 80을 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 알기네이트를 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 숙시네이트를 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 아르기닌, 글루탐산, 메티오닌, 트립토판 및 세린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 하나 이상 (예를 들어, 2, 3, 4 또는 5)을 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 사카라이드, 예를 들어, 단당류, 올리고당 또는 다당류 또는 이들의 혼합물을 함유하지 않는다. 구체적으로, 본 발명의 액체 제형은 수크로스, 락토스, 말토스 및 트레할로스 중 하나 이상 (예를 들어, 2, 3 또는 4종)을 함유하지 않을 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 킬레이트제물, 특히 본 발명과 관련하여 본원에 기술된 것, 및/또는 포스페이트를 함유하지 않는다. 또한, 본 발명에서, 액체 제형에는 전술한 화합물들 중 2 이상 또는 전부 결핍된 것으로 고려된다.

[0084] 일 구현예에서, 본 발명의 액체 제형에는 (i) 디터전트 및 단당류, 올리고당 및 다당류, (ii) 디터전트 및 임의의 아미노산, 또는 디터전트, 및 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, (iii) 디터전트, 및 안정화 펩타이드, (iv) 단당류, 올리고당 및 다당류 및 임의의 아미노산, 또는 단당류, 올리고당 및 다당류 및 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, (v) 단당류, 올리고당 및 다당류 및 안정화 펩타이드, (vi) 임의의 아미노산 및 안정화 펩타이드, 또는 히스티딘을 제외한 모든 아미노산 및 안정화 펩타이드, (vii) 디터전트, 단당류, 올리고당 및 다당류 및 임의의 아미노산, 또는 디터전트, 단당류, 올리고당 및 다당류 및 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, (viii) 디터전트, 단당류, 올리고당 및 다당류, 및 안정화 펩타이드, (ix) 디터전트, 임의의 아미노산, 및 안정화 펩타이드, 또는 디터전트, 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, 및 안정화 펩타이드, (x) 단당류, 올리고당 및 다당류, 임의의 아미노산, 및 안정화 펩타이드, 또는 단당류, 올리고당 및 다당류, 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, 및 안정화 펩타이드, (xi) 디터전트, 단당류, 올리고당 및 다당류, 임의의 아미노산, 및 안정화 펩타이드, 또는 디터전트, 단당류, 올리고당 및 다당류, 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, 및 안정화 펩타이드가 결여된다.

[0085] 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 히스티딘 이외의 임의의 다른 아미노산을 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 임의의 단당류, 이당류 및 삼당류를 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 HSA 이외의 임의의 다른 안정화 펩타이드 또는 단백질을 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 포스페이트 완충제 형태와 같은 포스페이트를 함유하지 않는다.

[0086] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형에는 (i) 숙시네이트 및 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트), (ii) 숙시네이트 및 메티오닌, (iii) 숙시네이트 및 수크로스, (iv) 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트) 및 메티오닌, (v) 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트) 및 수크로스, (vi) 메티오닌 및 수크로스, (vii) 숙시네이트, 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트) 및 메티오닌, (xiii) 숙시네이트, 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트) 및 수크로스, (ix) 숙시네이트, 메티오닌 및 수크로스, (x) 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트), 메티오닌 및 수크로스, 및 (xi) 숙시네이트, 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트), 메티오닌 및 수크로스, (xii) 디터전트 (예, 폴리소르베이트) 및 히스티딘, (xiii) 디터전트 (예, 폴리소르베이트), 히스티딘 및 수크로스)가 결여된다.

[0087] 아울러, 하나 이상의 성분 (즉, 화합물, 재료 또는 물질)이 결여된 본 발명의 임의의 액체 제형에는 킬레이트제, 특히 본원에 기술된 킬레이트제 (예를 들어, EDTA), 및/또는 포스페이트가 추가로 결여될 수 있다.

[0088] 나아가, 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소, (ii) HSA, (iii) 긴장성 물질을 포함하고, 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μ M 이하로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01% w/v 내지 1.0% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.01% w/v 내지 2.0% w/v의 함량으로 포함하고, 그리고 트립토판

판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01% w/v 내지 0.5% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.1% w/v 내지 1.5% w/v의 함량으로 포함하고, 그리고 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.05% w/v 내지 0.25% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.6% w/v 내지 1.2% w/v의 함량으로 포함하고, 그리고 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01% w/v 내지 0.5% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질로서 염화나트륨을 0.9% w/v의 함량으로 포함하고, 그리고 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.05% w/v 내지 0.25% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질로서 염화나트륨을 0.9% w/v의 함량으로 포함하고, 그리고 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함한다.

[0089] 또한, 상기 단락 및 하기 단락에 기술된 바람직한 액체 제형 및 특히 바람직한 액체 제형에서, 트립토판 및 N-아세틸-트립토판 농도의 상한은 50 μM 미만, 바람직하게는 10 μM 미만, 더 바람직하게는 1 μM 미만, 보다 더 바람직하게는 0.1 μM 미만, 가장 바람직하게는 0.01 μM 미만 또는 0.001 μM 미만인 것으로 본 발명에서 고려된다. 아울러, 상기 단락 및 하기 단락에 기술된 바람직한 액체 제형 및 특히 바람직한 액체 제형은 Fe^{3+} 이온 농도가 1000 nM 미만 또는 500 nM 미만, 더 바람직하게는 250 nM 미만 또는 100 nM 미만, 가장 바람직하게는 10 nM 미만 또는 1 nM 미만인 것을 특징으로 할 수 있는 것으로 본 발명에서 추가로 고려된다.

[0090] 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소, (ii) HSA, (iii) 긴장성 물질, (iv) 완충화제를 포함하고, 그리고 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01% w/v 내지 1.0% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.01% w/v 내지 2.0% w/v의 함량으로, (iv) 완충화제를 1 mM 내지 100 mM의 농도로 포함하고, 그리고 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01% w/v 내지 0.5% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.01% w/v 내지 2.0% w/v의 함량으로, (iv) 완충화제를 1 mM 내지 100 mM의 농도로 포함하고, 그리고 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.05% w/v 내지 0.25% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.1% w/v 내지 2.0% w/v의 함량으로, (iv) 완충화제를 1 mM 내지 100 mM의 농도로 포함하고, 그리고 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.05% w/v 내지 0.25% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.6% w/v 내지 1.3% w/v의 함량으로, (iv) 완충화제를 2 mM 내지 50 mM의 농도로 포함하고, 그리고 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.05% w/v 내지 0.25% w/v의 함량으로, (iii) 염화나트륨을 0.9% w/v의 함량으로, (iv) 완충화제를 5 mM 내지 20 mM 농도로 포함하고, 그리고 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함한다.

[0091] 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소, (ii) HSA, (iii) 긴장성 물질로서 염화나트륨, (iv) 완충화제로서 히스티딘, 포스페이트 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 완충화제를 포함하고, 그리고 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함하며, 여기서 완충화제는 바람직하게는 히스티딘이다.

[0092] 특히 바람직한 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01% w/v 내지 1.0% w/v의 함량으로, (iii) 염화나트륨을 0.01% w/v 내지 2.0% w/v, 바람직하게는 0.9% w/v의 함량으로, (iv) 히스티딘, 포스페이트 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 완충화제를 1 mM 내지 100 mM의 농도로 포함하고, 여기서 완충화제는 바람직하게는 1 mM 내지 100 mM 농도의 히스티딘이고, 그리고 액체 제형은 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μM 이하로 포함한다.

[0093] 다른 특히 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를

0.01% w/v 내지 0.5% w/v의 함량으로, (iii) 염화나트륨을 0.9% w/v의 함량으로, (iv) 히스티딘, 포스페이트 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 완충화제를 1 mM 내지 100 mM의 함량으로 포함하고, 여기서 완충화제는 바람직하게는 1 mM 내지 100 mM 농도의 히스티딘이고, 그리고 액체 제형은 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μ M 이하로 포함한다.

[0094] 또 다른 특히 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10 U/ml 내지 200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.05% w/v 내지 0.25% w/v의 함량으로, (iii) 염화나트륨을 0.9% w/v의 함량으로, (iv) 히스티딘, 포스페이트 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 완충화제를 1 mM 내지 100 mM의 농도로, 바람직하게는 2 mM 내지 50 mM, 더 바람직하게는 5 mM 내지 20 mM의 농도로 포함하고, 여기서 완충화제는 바람직하게는 1 mM 내지 100 mM, 바람직하게는 2 mM 내지 50 mM, 더 바람직하게는 5 mM 내지 20 mM 농도의 히스티딘이고, 그리고 액체 제형은 트립토판 및 N-아세틸-트립토판을 포함하지 않거나 또는 50 μ M 이하로 포함한다.

[0095] 아울러, 상기 언급된 바람직한 액체 제형 및 특히 바람직한 액체 제형은 바람직하게는 6.0 내지 7.5, 더 바람직하게는 6.5 내지 7.0 범위의 pH를 가진다. 또한, 보툴리눔 독소는 바람직하게는 혈청형 A의 것이고, 더 바람직하게는, 혈청형 A의 신경독성 성분이다.

[0096] 본 발명의 바람직한 예시적인 액체 제형은 다음과 같다:

[0097] 제형 1:

[0098] 50 U/ml BoNT/A

[0099] 0.9% NaCl (9 mg/ml)

[0100] 0.085% HSA (정제된, 예를 들어, 투석 처리된) (0.85 mg/ml)

[0101] 0.155% 히스티딘 (1.55 mg/ml; ~10 mM)

[0102] Trp 및 N-AcTrp < 50 μ M

[0103] pH 6.0.

[0104] 예시적인 제형 1의 정제된 HSA는 본 발명의 제4 측면에 따른 방법과 관련하여 상세히 기술된 공정에 의해 제조할 수 있다.

[0105] 본 발명에 따르면, 본 발명의 액체 제형은 바람직하게는 본 발명의 제4 측면에 따른 방법에 의해 제조되거나 또는 수득가능하다. 이 방법은 보툴리눔 독소 액체 제형의 광 안정성을 해치는, N-아세틸-트립토판 등의 HSA 추출 물질 (예를 들어, 상업용 HSA 제품)에 함유된 물질의 제거를 가능하게 한다.,

[0106] 제3 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 액체 제형에 관한 것으로:

[0107] (i) 보툴리눔 독소, 및

[0108] (ii) 인간 혈청 알부민 (HSA),

[0109] 여기서, 액체 제형은 다음의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다:

[0110] (a) 인간 혈청 알부민을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 및 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계, 및

[0111] (b) 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하는 단계.

[0112] 본 발명의 액체 제형의 성분 (i)과 관련하여, 보툴리눔 독소는 특별히 제한되지 않으며, 임의의 혈청형 (예를 들어, BoNT/A-G)의 보툴리눔 독소를 포함한다. 바람직하게는, 보툴리눔 독소는 본원에서 상기 정의된 바와 같다.

[0113] 액체 제형의 성분 (ii)와 관련하여, "인간 혈청 알부민" 또는 "HSA"는 도너 HSA 및 재조합 HSA를 지칭하는 것으로 의도되고, 바람직하게는 본원에 상기에 정의된 바와 같은 도너 HSA이다. HSA는 액체 제형에 0.001-2.0% w/v의 함량으로, 바람직하게는 0.001-1.00% w/v의 함량으로, 더 바람직하게는 0.01-0.5% w/v의 함량으로, 보다 더 바람직하게는 0.02-0.3% w/v의 함량으로, 가장 바람직하게는 0.03-0.15% w/v의 함량으로 존재할 수 있다.

[0114] 본 발명에 따르면, 본 발명의 액체 제형은 적어도 단계 (a) 및 (b)를 포함하는 방법에 의해 제조되고, 제1 단계는 다음과 같다:

- [0115] (a) 인간 혈청 알부민을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 및 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계.
- [0116] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "접촉"은 성분 2 이상을 함께 있게 하는 것으로 광의적으로 해석되는 것으로 이해된다. 이는 용해, 혼합, 현탁, 블렌딩, 슬러리화, 교반, 유동화 (flowing), 흡착, 결합, 추출 등과 같은 다양한 여러가지 방법을 통해 달성할 수 있다. 전형적으로, 킬레이트제는 HSA를 포함하는 조성물 (예를 들어, HSA 용액)에 첨가한 다음 혼합해 균질한 혼합물을 수득하고, 선택적으로 추가로 가공 처리하는 단계 (예를 들어, 킬레이트제 함유 완충제에 대한 투석)를 거친다.
- [0117] 이에, "접촉"은 HSA 물질을, 예를 들어 수성 용액의 형태로 고정된 금속 친화성 수지 (IMAC) 상에 로딩함으로써 달성할 수 있는 것으로 또한 고려된다. 용어 "고정된 금속 친화성 수지" (IMAC)는 본원에 사용된 바와 같이 다 가 양이온과 결합 및 배위 결합할 수 있는 고정된 관능성 모이머티 (예를 들어, 이미노디아아세트산)를 함유한 수지, 예를 들어, 킬레이팅-세파로스, 프락토겔-EMD-킬레이트, POROS 20MC, Matrex Cellufine 킬레이트, TALON 및 Chelex 100 수지 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 이러한 고정된 금속 친화성 수지는 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 바와 같은 크로마토그래피 금속 친화성 컬럼의 형태로 일반적으로 사용된다. 아울러, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "접촉"은 또한 적절한 고정된 금속 친화성 수지를 이용한 배치 방식의 결합을 포함한다.
- [0118] 단계 (a)와 관련하여, 본 발명의 액체 제형의 제조 방법의 단계 (a)에서 적용되는 바와 같은, 용어 "인간 혈청 알부민" 및 "킬레이트제"는 HSA 및 킬레이트제와 혼합되거나 또는 이에 함유된 기타 물질 또는 화합물의 존재를 배제하거나 또는 이의 물리적 형태에 대한 어떠한 제한을 암시하는 것으로 의도되지 않는 것으로, 추가로 지적한다. 이는, 단계 (a)에서 킬레이제와 접촉되는 "인간 혈청 알부민"은 고체 또는 액체 (예를 들어, 수성 조성물 또는 수성 용액)의 형태와 같은 임의 형태로 존재할 수 있음을 의미한다. 마찬가지로, 단계 (a)에서 인간 혈청 알부민과 접촉되는 "킬레이트제"는 고체 또는 액체 (예를 들어, 수성 조성물 또는 수성 용액)의 형태와 같은 임의 형태로 존재할 수 있음을 의미한다. 아울러, "인간 혈청 알부민과 킬레이트제를 접촉시키는"이라는 표현은 (i) 인간 혈청 알부민이 최종 액체 제형에 함유되는 하나 이상의 부가적인 성분, 예를 들어 긴장성 물질 또는 완충화제를 함유한 조성물 (예를 들어, 고체 조성물 또는 액체 조성물, 특히 수성 조성물 또는 수성 용액) 형태이거나, 및/또는 (ii) 킬레이트제가 최종 액체 제형에 함유되는 하나 이상의 부가적인 성분, 예를 들어 긴장성 물질 또는 완충화제를 함유한 조성물 (예를 들어, 고체 조성물 또는 액체 조성물, 특히 수성 조성물 또는 수성 용액) 형태인 것을, 배제하진 않는다.
- [0119] 바람직하게는, 단계 (a)에서 수득되는 혼합물은 수성 혼합물이다. 이 수성 혼합물은 여러가지 방식으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 인간 혈청 알부민은 고체 형태 또는 액체 형태로, 예를 들어 킬레이트제의 수성 용액으로 존재할 수 있는 킬레이트제와 혼합된 수성 조성물, 예를 들어 수성 용액의 형태일 수 있다. 아울러, 인간 혈청 알부민은 킬레이트제 및 수성 용액과 또는 킬레이트제의 수성 용액과 혼합되는, 고체, 예를 들어 동결건조된 물질의 형태일 수 있다. 바람직하게는, 인간 혈청 알부민은 수성 조성물, 더 바람직하게는 수성 용액의 형태이고, 킬레이트제는 고체 또는 수성 조성물 (예를 들어, 수성 용액)이다.
- [0120] 특히, 단계 (a)에서 킬레이트제와 접촉되는 HSA는 적어도 5% w/v HSA, 더 바람직하게는 10-30% w/v HSA, 가장 바람직하게는 20% w/v HSA를 함유한 수성 용액의 형태일 수 있다. 아울러, 단계 (a)에서 수득한 혼합물의 pH는 pH 6.0-9.0, 바람직하게는 6.5-8.5, 더 바람직하게는 7.0-8.5, 가장 바람직하게는 7.0-8.0 범위로 적정될 수 있다.
- [0121] 아울러, 본 발명에 따른 액체 제형의 제조 방법에서 접촉 단계 (a)는 수개의 하위 단계들을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 접촉 단계 (a)는 킬레이트제 (예를 들어, EDTA) 및 인간 혈청 알부민을 혼합하는 단계, 혼합물을 지정된 시간 동안 인큐베이션하는 단계, 및 선택적으로, 킬레이트제를 함유한 완충제에 대해 혼합물을 투석하는 단계를 포함하거나 또는 (단지) 이들로 구성되고, 킬레이트제는 바람직하게는 인큐베이션 하위 단계에 사용되는 것과 동일하다. 다른 구현예에서, 이러한 혼합물은 인큐베이션하지 않고 (바로) 킬레이트제를 함유한 완충제에 대해 투석을 실시하고, 여기서 킬레이트제는 바람직하게는 킬레이트제 (예를 들어, EDTA)와 인간 혈청 알부민을 혼합하는 단계에 사용되는 것과 동일하다. 다른 구현예에서, 킬레이트제 및 인간 혈청 알부민은 투석하기 전 혼합하지 않는다. 이는, 접촉 단계 (a)가 킬레이트제를 함유한 완충제에 대해 상기 혼합물을 투석하는 단계를 포함하거나 또는 (단지) 이 단계로 구성될 수 있다는 것을 의미한다.
- [0122] 바람직하게는, 단계 (a)는 킬레이트제를 HSA를 포함하는 조성물 (예를 들어, HSA의 용액)에 첨가하거나 또는 킬레이트제를 HSA를 포함하는 조성물 (예, HSA 용액)과 혼합하는 단계를 포함하거나 또는 (단지) 이러한 단계로 구성된다. 제조된 혼합물은 일정 시간 동안 인큐베이션하고, 예를 들어 소정의 시간 동안 교반하거나 또는 교반

없이 소정의 시간 동안 정치한다.

[0123] 인큐베이션 시간은 특정한 범위로 제한되는 것은 않지만, 전형적으로 적어도 0.5시간, 특히 적어도 1시간, 보다 구체적으로 적어도 2시간이다. 인큐베이션 시간의 상한은 중요하지 않으며, 예를 들어 1시간, 2시간, 5시간 또는 10시간일 수 있다. 그래서, 인큐베이션 시간은 예를 들어 0.5-5시간, 또는 1-10시간일 수 있다. 마찬가지로, 인큐베이션 온도는 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 0-60℃ 범위 내일 수 있다. 바람직하게는, 온도는 0-30℃이다. 이는 실온 (20℃ 또는 25℃)이 본 발명에서 적절한 온도임을 의미한다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 온도는 반응 시간에 영향을 미친다. 일반적으로 인큐베이션 조건 (예를 들어, 시간 및 온도)는, 최종 조성물에 함유된 킬레이트제 (예를 들어, EDTA)의 잔류량이 100 μM 또는 그 미만, 바람직하게는 10 μM 또는 그 미만, 더 바람직하게는 1 μM 또는 그 미만이라도, 선택한다.

[0124] 선택적으로, 인큐베이션 단계 다음으로, 킬레이트제, 전형적으로 인큐베이션 단계에 사용된 것과 동일한 킬레이트제를 함유한 완충제에 대해 인큐베이션한 혼합물을 투석하는 것과 같은 추가적인 공정이 후속적으로 이루어진다. 이러한 선택적인 투석 단계에서 사용되는 킬레이트제는 바람직하게는 투석 완충제에 0.1 mM - 1000 mM, 더 바람직하게는 1 mM - 200 mM, 가장 바람직하게는 10 mM - 100 mM의 농도로 함유된다. 또한, 투석 단계에서 사용되는 완충제는 (i) pH 7.5 - 8.5이거나, (ii) 완충화제를, 바람직하게는 최종 조성물에 따른 완충화제를 추가로 포함하거나, 또는 (iii) 긴장성 물질을, 바람직하게는 염화나트륨을 0.9% w/v로 추가로 포함하거나, 또는 (i) 및 (ii), 또는 (i) 및 (iii), 또는 (ii) 및 (iii), 또는 (i) 및 (ii) 및 (iii)인 것이, 바람직하다.

[0125] 본 발명에서, 용어 "킬레이트제"는 본원에 사용된 바와 같이 금속 이온에 결합할 수 있는 한 특별히 제한되지 않는다. 용어 "킬레이트제"는 본원에 사용된 바와 같이 "킬레이터" 또는 "봉쇄제 (sequestering agent)"로 지칭될 수도 있다. 본 발명에 이용하기 위한 킬레이트제는 전형적으로 금속 이온-결합성 유기 화합물이다. 금속 이온은 일반적으로 여러 자리 리간드 (polydentate ligand)로서 작용하는 유기 킬레이트제와 복수의 배위 결합을 형성한다.

[0126] 본 발명에 이용하기 적합한 킬레이트제는, 비-제한적으로, 아미노폴리카르복시산 (예를 들어, 카르복시산 관능기를 3-6, 바람직하게는 4개 가진 아미노폴리카르복시산) 및 사이트레이트, 포르피린, TPEN (N,N,N',N'-테트라키스(2-피리디닐메틸)-1,2-에탄다이아민), TETA (트리에틸렌테트라민) 및 이들의 혼합물과 같은 기타 화합물을 포함한다. 예시적인 아미노폴리카르복시산으로는 NTA (니트릴로트리아세테이트), DOTA (1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세테이트), TED (에틸렌다이아미노트리아세테이트), EDTA (에틸렌다이아민테트라아세트산), EGTA (에틸렌글리콜-비스(β-아미노에틸에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산), BAPTA (1,2-비스(o-아미노페녹시)에탄-N,N,N',N'-테트라아세트산), DTPA (다이에틸렌트리아민펜타-아세트산) 및 TTHA (트리에틸렌테트라민헥사아세테이트)를 포함한다.

[0127] 본 발명에 이용하기 특히 바람직한 킬레이트제는 일반식 (I)의 화합물을 포함한다:

[0128] $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}-\text{R}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2(\text{I})$

[0129] 상기 식의 화합물은 카르복시산 관능기를 적어도 4개 가진 아미노폴리카르복시산 화합물이다. R 기는 특별히 제한되지 않으며, 카르복시산 관능기를 포함하지 않거나 또는 카르복시산 관능기를 1 또는 2개 포함할 수 있다. 바람직하게는, R 기는 카르복시산 관능기를 포함하지 않거나 또는 하나 포함하고, 가장 바람직하게는 카르복시산 관능기를 포함하지 않는다.

[0130] 일반식 (I)의 화합물에 대한 예로는 예를 들어 EDTA, EGTA, BAPTA, DTPA 및 TTHA를 포함한다. 본 발명에 이용하기 특히 바람직한 것은 EDTA, EGTA 및 DTPA이고, 더 바람직하게는 EDTA 및 DTPA이고, 가장 바람직하게는 EDTA이다. 전술한 임의의 킬레이트제들의 혼합물 역시 본 발명에서, 예를 들어 용액, 고체 또는 매트릭스에 커플링된 형태로 사용될 수 있다.

[0131] 단계 (a)에서, HSA는 바람직하게는, 킬레이트제가 액체 제형에 0.1 mM - 1000 mM 또는 0.1 mM - 500 mM, 더 바람직하게는 0.5 mM - 500 mM 또는 1 mM - 500 mM, 가장 바람직하게는 10 mM - 100 mM의 농도로 존재하도록, 소정량의 킬레이트제와 접촉된다.

[0132] 본 발명에 따르면, 액체 제형의 제조 방법은 하기 단계들을 추가로 포함한다:

[0133] (b) 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하는 단계.

[0134] 단계 (b)에서, 킬레이트제는 (투석 백, 역류 투석 등을 이용한 통상적인 투석을 비롯한) 투석, 역삼투, 여과,

교차 흐름 여과, 한외여과 및 크로마토그래피 방법 (예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피 또는 겔 여과 크로마토그래피)과 같은 임의의 적절한 기법에 의해 제거할 수 있다.

- [0135] 바람직하게는, 킬레이트제는 투석에 의해 제거한다. 투석은 전형적으로 0.5-48시간, 특히 1-24시간 또는 1-12시간 동안, 실온을 비롯한 온도 0℃ 내지 30℃, 특히 2℃ 내지 30℃ 또는 4℃ 내지 25℃에서 수행한다. 나아가, 투석은 전형적으로 인큐베이션한 HSA/킬레이트제 혼합물의 부피에 대해 10-1000배 부피의 투석 완충제로 수행하고, 투석 완충제를 통상적으로 적어도 1회 교체한다. 사용하는 투석 막은 분자량 컷 오프를, 예를 들어, 10 kDa의 컷 오프를 가질 수 있다.
- [0136] 일반적으로, 투석 조건 (예를 들어, 시간, 온도, 완충제 부피, 완충제 교체 횟수)은, 킬레이트제 (예를 들어, EDTA)의 잔류량이 100 μM 또는 그 미만, 바람직하게는 10 μM 또는 그 미만, 더 바람직하게는 1 μM 또는 그 미만의 농도로 최종 제품에 함유되도록, 선택한다.
- [0137] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, HSA 출발 물질을 먼저 킬레이트제와 접촉시킨 후 킬레이트제를 제거함으로써 전처리한다. 이렇게 수득한 전처리된 HSA를 이용해 본 발명의 보툴리눔 독소 액체 제형을 제조한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 혈청 알부민 출발 물질"은 상업적으로 또는 통상적으로 수득가능한, 즉 본원에 기술된 바와 같이 전처리를 거치지 않은, 도너 HSA 물질 (인간 혈액 또는 보다 정확하게는 인간 혈장으로부터 유래한 HSA) 또는 제조한 HSA 물질을 지칭하는 것으로 의도된다. 도너 HSA 물질과 제조한 HSA 물질의 혼합물 역시 본원에 사용되는 용어 "인간 혈청 알부민 출발 물질"에 포함된다.
- [0138] 보다 구체적으로, 이러한 바람직한 구현예에 따르면, (i) 보툴리눔 독소 및 (ii) 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 제형은 다음 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다:
- [0139] (a) 인간 혈청 알부민 출발 물질을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 출발 물질과 킬레이트제를 포함하는 혼합물을 수득하는 단계,
- [0140] (b) 혼합물에서 킬레이트제를 제거해 전처리된 인간 혈청 알부민 물질을 수득하는 단계, 및
- [0141] (c) 보툴리눔 독소를 전처리된 인간 혈청 알부민 물질과 혼합하는 단계.
- [0142] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 액체 프리-제형 (liquid pre-formulation)을 킬레이트제와 접촉시킨 후 킬레이트제를 제거해 액체 제형을 수득한다. 용어 "액체 프리-제형"은 본원에 사용된 바와 같이 적어도 성분 (i) 및 (ii) (즉, 보툴리눔 독소, 및 HSA)를 함유하고, 바람직하게는 최종 액체 조성물에 함유되는 모든 성분 및 물질, 특히 성분 (iii) 및 (iv)을 함유하는 액체 제형을 지칭한다. 후자의 경우, 킬레이트제의 처리 및 제거 시 최종 액체 제형이 수득된다.
- [0143] 보다 구체적으로, 바람직한 구현예에 따르면, (i) 보툴리눔 독소 및 (ii) 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 제형은 하기 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조된다:
- [0144] (a) 보툴리눔 독소 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 프리-제형을 킬레이트제와 접촉시켜, 액체 프리-제형과 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계, 및
- [0145] (b) 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하여 액체 제형을 수득하는 단계.
- [0146] 본 발명에 따르면, (본원에 기술된 임의 측면, 즉 제1 측면, 제2 측면 및 제3 측면에 따른) 액체 제형은 선택적으로 다음을 추가로 포함할 수 있다:
- [0147] (iii) 긴장성 물질.
- [0148] 용어 "긴장성 물질"은 본원에 사용된 바와 같이 제형을 생리학적 유체와 비슷한 삼투성 특징을 가지도록 주사용 제형에 첨가되는 물질을 지칭한다. 긴장성 물질은 또한 "삼투성 조절제"로도 언급할 수 있다. 긴장성 물질은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 당, 염, 폴리머 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0149] 예시적인 긴장성 물질로는 수크로스, 글루코스, 소듐 카보네이트, 아미노산, 폴리에틸렌글리콜 (PEG), 텍스트란, 사이클로텍스트린 및 콜로이드 (예를 들어, 콜로이드 다당류)를 포함한다. 전형적으로, 긴장성 물질의 농도는 0-2.0% w/v, 특히 0.01-2.0% w/v 또는 0.1-1.5% w/v, 보다 상세하게는 0.6-1.2% w/v 범위이다.
- [0150] 바람직하게는, 긴장성 물질은 염화나트륨 (NaCl)이다. 염화나트륨은 본 발명의 액체 제형에 0.01-2.0% w/v, 바람직하게는 0.1-1.5% w/v, 더 바람직하게는 0.5-1.2% w/v 또는 0.8-1.0 % w/v, 가장 바람직하게는 0.9% w/v의 함량으로 존재할 수 있다.

- [0151] 본 발명에 따르면, (본원에 기술된 임의 측면, 제1 측면, 제2 측면 및 제3 측면에 따른) 액체 제형은 선택적으로 다음을 추가로 포함할 수 있다:
- [0152] (iv) 완충화제.
- [0153] 용어 "완충화제"는 본원에 사용된 바와 같이 액체 제형의 pH를 허용가능한 범위 내에서 유지시키는 물질, 즉 제형의 pH를 통제할 수 있는 물질을 의미한다. 적합한 완충제는 원하는 pH 완충화 정도를 제공하기에 충분한 양으로 존재하는, 다른 성분과 화학적으로 반응성이 낮은 것이다. 이러한 완충제로는 예를 들어 아미노산, 아세트이트, 말산, 아스코르베이트, 사이트레이트, 타르트레이트, 푸마레이트, 숙시네이트, 포스페이트, 바이카보네이트, TRIS, 비스-트리스, ACES, MES, BES, MOPS, HEPES, TES, PIPES, 트리신 및 이미다졸을 포함한다.
- [0154] 바람직하게는, 완충화제는 포스페이트 (즉, 포스페이트 완충제), 아미노산 또는 이들의 혼합물이다. 용어 "포스페이트"는 본원에 사용된 바와 같이 일반적으로 비-양성화된 형태 및 양성자화된 형태 및 이들의 임의의 염을 의미한다. 아미노산은 아스파르테이트, 글리신, 글루타메이트, 히스티딘, 프롤린, 타우린, 메티오닌, 세린, 티로신, 트립토판 및 이들의 혼합물로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 히스티딘, 프롤린, 타우린, 메티오닌, 세린, 티로신, 트립토판 및 이들의 혼합물로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 아미노산은 히스티딘이다. 본 발명에서 이용하기에 가장 바람직한 완충화제는 히스티딘, 포스페이트 또는 이들의 혼합물이다.
- [0155] 본 발명의 액체 제형에서 완충화제의 농도는 바람직하게는 1-100 mM, 더 바람직하게는 2-50 mM, 가장 바람직하게는 5-20 mM이다. 만일 완충화제가 아미노산 (예를 들어, 히스티딘)이면, 이것은 액체 제형에 1-100 mM, 바람직하게는 2-50 mM, 더 바람직하게는 5-20 mM, 가장 바람직하게는 10 mM의 농도로 존재할 수 있다. 만일 완충화제가 포스페이트인 경우, 이것은 액체 제형에 1-100 mM, 바람직하게는 2-50 mM, 더 바람직하게는 5-20 mM, 가장 바람직하게는 10 mM의 농도로 존재할 수 있다.
- [0156] 아울러, 본 발명의 액체 제형은 달리 언급되거나 또는 의도되지 않은 한 하나 이상의 부가적인 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 액체 제형은 글리세롤, 수크로스, 락토스, 만니톨, 히알루론산, 폴리비닐-피롤리돈, 젯산, 구연산, 아미노산(들), 벤질 알코올, 리도카인, 젤라틴, 하이드록시에틸 전분 (HES), 폴리에틸렌 옥사이드 및 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80) 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 기타 적합한 약제학적으로 허용가능한 부형제는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 것을 포함하며, 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania를 참조한다.
- [0157] 한편, 본 발명에서는, 본 발명의 액체 제형에 특히 특정 성분 (즉, 화합물, 재료 또는 물질), 예를 들어 킬레이트제, 디터전트, 다당류, 아미노산, 안정화 펩타이드 등이, 이들의 임의 조합을 비롯하여, 결합된 것으로 고려된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "디터전트"는 "계면활성제"와 동의어로 사용되고, 비-이온성 및 이온성 디터전트를 망라하는 것으로 의도된다. 용어 "안정화 펩타이드"는 본원에 사용된 바와 같이 일반적으로 아미노산 5-50개로 이루어진 펩타이드, 예를 들어 아미노산 10-40개 또는 15-30개로 된 펩타이드를 의미한다. 그래서, 용어 "안정화 펩타이드"는 HSA를 배제한다.
- [0158] 일 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 디터전트를 함유하지 않으며, 특히 폴리소르베이트를 함유하지 않으며, 보다 구체적으로는 폴리소르베이트 20 및/또는 폴리소르베이트 80을 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 알기네이트를 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 숙시네이트를 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 아르기닌, 글루탐산, 메티오닌, 트립토판 및 세린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 하나 이상 (예를 들어, 2, 3, 4 또는 5)을 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 사카라이드, 예를 들어, 단당류, 올리고당 또는 다당류 또는 이들의 혼합물을 함유하지 않는다. 구체적으로, 본 발명의 액체 제형은 수크로스, 락토스, 말토스 및 트레할로스 중 하나 이상 (예를 들어, 2, 3 또는 4종)을 함유하지 않을 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 킬레이트제를, 특히 본 발명과 관련하여 본원에 언급된 킬레이트제를 함유하지 않는다. 또한, 본 발명에서, 액체 제형은 전술한 화합물들 중 2 이상 또는 전부 결합된 것으로 고려된다.
- [0159] 일 구현예에서, 본 발명의 액체 제형에는 (i) 디터전트 및 단당류, 올리고당 및 다당류, (ii) 디터전트 및 임의의 아미노산, 또는 디터전트, 및 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, (iii) 디터전트, 및 안정화 펩타이드, (iv) 단당류, 올리고당 및 다당류 및 임의의 아미노산, 또는 단당류, 올리고당 및 다당류 및 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, (v) 단당류, 올리고당 및 다당류 및 안정화 펩타이드, (vi) 임의의 아미노산 및 안정화 펩타이드, 또는 히스티딘을 제외한 모든 아미노산 및 안정화 펩타이드, (vii) 디터전트, 단당류, 올리고당 및 다당류 및 임

의의 아미노산, 또는 디터전트, 단당류, 올리고당 및 다당류 및 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, (viii) 디터전트, 단당류, 올리고당 및 다당류, 및 안정화 펩타이드, (ix) 디터전트, 임의의 아미노산, 및 안정화 펩타이드, 또는 디터전트, 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, 및 안정화 펩타이드, (x) 단당류, 올리고당 및 다당류, 임의의 아미노산, 및 안정화 펩타이드, 또는 단당류, 올리고당 및 다당류, 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, 및 안정화 펩타이드, (xi) 디터전트, 단당류, 올리고당 및 다당류, 임의의 아미노산, 및 안정화 펩타이드, 또는 디터전트, 단당류, 올리고당 및 다당류, 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, 및 안정화 펩타이드가 결합된다.

[0160] 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 히스티딘 이외의 임의의 다른 아미노산을 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 임의의 단당류, 이당류 및 삼당류를 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 HSA 이외의 임의의 다른 안정화 펩타이드 또는 단백질을 함유하지 않는다. 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형은 포스페이트 완충제 형태와 같은 포스페이트를 함유하지 않는다.

[0161] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 액체 제형에는 (i) 숙시네이트 및 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트), (ii) 숙시네이트 및 메티오닌, (iii) 숙시네이트 및 수크로스, (iv) 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트) 및 메티오닌, (v) 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트) 및 수크로스, (vi) 메티오닌 및 수크로스, (vii) 숙시네이트, 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트) 및 메티오닌, (xiii) 숙시네이트, 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트) 및 수크로스, (ix) 숙시네이트, 메티오닌 및 수크로스, (x) 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트), 메티오닌 및 수크로스, 및 (xi) 숙시네이트, 디터전트 (예를 들어, 폴리소르베이트), 메티오닌 및 수크로스, (xii) 디터전트 (예, 폴리소르베이트 및 히스티딘), (xiii) 디터전트 (예, 폴리소르베이트), 히스티딘 및 수크로스)가 결합된다.

[0162] 아울러, 하나 이상의 성분 (즉, 화합물, 재료 또는 물질)이 결합된 본 발명의 임의의 액체 제형은 킬레이트제, 특히 본원에 언급된 킬레이트제가 추가로 결합될 수 있다.

[0163] 나아가, 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소, (ii) HSA, 및 (iii) 긴장성 물질을 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01-1.0% w/v의 함량으로, 및 (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.01-2.0% w/v 함량으로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01-0.5% w/v의 함량으로, 및 (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.1-1.5% w/v의 함량으로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.05-0.25% w/v의 함량으로, 및 (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.6-1.2% w/v의 함량으로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01-0.5% w/v의 함량으로, 및 (iii) 긴장성 물질로서 염화나트륨을 0.9% w/v의 함량으로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.05-0.25% w/v의 함량으로, 및 (iii) 긴장성 물질로서 염화나트륨을 0.9% w/v의 함량으로 포함한다.

[0164] 또한, 본 발명에서, 상기 단락 및 하기 단락들에 기술된 바람직한 액체 제형들은 Fe^{3+} 이온 농도가 1 μM 미만, 바람직하게는 1000 nM 미만 또는 500 nM 미만, 더 바람직하게는 250 nM 미만 또는 100 nM 미만, 가장 바람직하게는 10 nM 미만 또는 1 nM 미만인 것을 특징으로 할 수 있는 것으로, 고려된다.

[0165] 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소, (ii) HSA, (iii) 긴장성 물질, 및 (iv) 완충화제를 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01-1.0% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.01-2.0% w/v의 함량으로, 그리고 (iv) 완충화제를 1-100 mM 농도로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01-0.5% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.01-2.0% w/v의 함량으로, 그리고 (iv) 완충화제를 1-100 mM의 농도로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.05-0.25% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.1-2.0% w/v의 함량으로, 그리고 (iv) 완충화제를 1-100 mM의 농도로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.05-0.25% w/v의 함량으로, (iii) 긴장성 물질, 바람직하게는 염화나트륨을 0.6-1.3% w/v의 함량으로, 그리고 (iv) 완충화제를 2-50 mM의 농도로 포함한다. 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.05-0.25% w/v의 함량으로, (iii) 염화나트륨을 0.9% w/v의 함량으로, 그리고 (iv) 완충화제를 5-20 mM의 농도로 포함한다. 또한, 이 단락에 기술된 바람직한 액체 제형은 Fe^{3+} 이온 농도가 1 μM 미만, 바람직하게는 1000 nM 미만 또는 500 nM

미만, 더 바람직하게는 250 nM 미만 또는 100 nM 미만, 가장 바람직하게는 10 nM 미만 또는 1 nM 미만인 것을 특징으로 할 수 있는 것으로, 고려된다.

[0166] 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소, (ii) HSA, (iii) 긴장성 물질로서 염화나트륨, 및 (iv) 완충제로서 히스티딘, 포스페이트 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 완충화제를 포함하고, 여기서 완충화제는 바람직하게는 히스티딘이다.

[0167] 특히 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01-1.0% w/v의 함량으로, (iii) 염화나트륨을 0.01-2.0% w/v, 바람직하게는 0.9% w/v의 함량으로, 그리고 (iv) 히스티딘, 포스페이트 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 완충화제를 1-100 mM의 농도로 포함하고, 여기서 완충화제는 바람직하게는 1-100 mM 농도의 히스티딘이다.

[0168] 다른 특히 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.01-0.5% w/v의 함량으로, (iii) 염화나트륨을 0.9% w/v의 함량으로, 그리고 (iv) 히스티딘, 포스페이트 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 완충화제를 1-100 mM의 농도로 포함하고, 여기서 완충화제는 바람직하게는 1-100 mM 농도의 히스티딘이다.

[0169] 또 다른 특히 바람직한 본 발명의 액체 제형은 (i) 보툴리눔 독소를 10-200 U/ml의 농도로, (ii) HSA를 0.05-0.25% w/v의 함량으로, (iii) 염화나트륨을 0.9% w/v의 함량으로, 그리고 (iv) 히스티딘, 포스페이트 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 완충화제를 1-100 mM, 바람직하게는 2 mM 내지 50 mM 또는, 더 바람직하게는 5 mM 내지 20 mM의 농도로 포함하고, 여기서 완충화제는 바람직하게는 1-100 mM, 바람직하게는 2 mM 내지 50 mM, 더 바람직하게는 5 mM 내지 20 mM 농도의 히스티딘이다.

[0170] 아울러, 상기 기술된 바람직한 액체 제형 및 특히 바람직한 액체 제형은 바람직하게는 6.0-7.5 범위의 pH를 가진다. 아울러, 보툴리눔 독소는 바람직하게는 혈청형 A이고, 더 바람직하게는, 혈청형 A의 신경독성 성분이다.

[0171] 본 발명의 바람직한 예시적인 액체 제형은 다음과 같다:

[0172] 제형 1:

[0173] 50 U/ml BoNT/A

[0174] 0.9% NaCl (9 mg/ml)

[0175] 0.085% HSA (EDTA-투석 처리됨) (0.85 mg/ml)

[0176] 0.155% 히스티딘 (1.55 mg/ml; ~10 mM)

[0177] pH 6.0

[0178] 예시적인 제형 1의 HSA (EDTA-투석 처리됨)는 다음의 단계를 비롯한 예시적인 공정에 의해 제조된다:

[0179] - Na₂-EDTA 37.2 mg을 20% HSA 용액 1 ml 당 교반하면서 첨가하고, NaOH로 pH 8.0로 적정하는 단계,

[0180] - 6시간 동안 실온에서 교반하면서 인큐베이션하는 단계,

[0181] - 100배 부피의 EDTA 완충제 (100 mM Na₂-EDTA; 10 mM 히스티딘; 0.9% NaCl pH 7.0)에서 실온 하에 16시간 동안 자기 교반기에서 서서히 교반하면서 투석 (투석 막의 MWCO 10 kDa)하는 단계,

[0182] - 100배 부피의 10 mM 히스티딘, 0.9% NaCl pH 6.0에서 실온 하에 24시간 동안 투석한 다음 투석 완충제를 신선한 완충제로 교체하여 다시 24시간 동안 투석하고, 이를 2회 더 반복하는 단계.

[0183] 예시적인 제형 1에서, EDTA는 선택적으로 EGTA, BAPTA 또는 DTPA와 같은 다른 킬레이터로 교체할 수 있다. HSA 용액에 교체 EDTA를 첨가하는 것에 대한 대안으로, EDTA 농축 용액 (예를 들어, 200 mM EDTA, pH 8.0)을 사용할 수도 있다. (EDTA 완충제에 대한) 1차 투석 단계는 또한 생략할 수도 있다. 교차 흐름 투석 또는 한외여과와 같은 다른 방법도 투석 대신 이용할 수 있다.

[0184] 또한, 본 발명은, 액체 제형을 4주간 40℃의 승온된 온도에서 보관하였을 때 독소 활성이 초기 독소 활성에 대해 20% 초과로 감소하지 않는, 보툴리눔 독소를 포함하는 액체 제형에 관한 것이다. 아울러, 본 발명은, 액체 제형을 7시간 동안 250 W/m²의 광원에 노출시켰을 경우 독소 활성이 초기 독소 활성에 대해 20% 초과로 감소하지 않는, 보툴리눔 독소를 포함하는 액체 제형에 관한 것이다. 바람직하게는, 광 안정성 검사에서, 즉 7시간 동

안 250 W/m²에 노출하는 경우, ID65 (indoor indirect daylight standard)에 해당하는 파장 범위 320-800 nm에서 스펙트럼 분포를 제공하기 위한 필터 세트가 장착된 SUNTEST CPS+ 장치 (ATLAS Material Testing Technology LLC)에서 ICH Q1B에 따른 윈도우 유리 필터를 이용해 ISO 10977에 따라 실시할 수 있다.

- [0185] 아울러, 본 발명은 추가적으로 본원에 언급된 성분들, 특히 성분 (i) 내지 (ii)를, 그리고 선택적으로 성분 (iii) 및 (vi) 중 하나 이상, 바람직하게는 성분 (i), (ii), (iii) 및 (iv)를 첨가하는 것을 포함하는, 본원에 기술된 보툴리눔 독소 액체 제형의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명의 액체 제형의 제조에는 특별한 제한이 없으며, 각각의 제형화 기법들은 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지되어 있다. 전술한 바와 같이, 보툴리눔 독소의 액체 제형은 일반적으로 수성 용액, 바람직하게는 식염수 용액, 더 바람직하게는 생리 식염수 용액, 가장 바람직하게는 완충 (예를 들어, 포스페이트 또는 히스티딘 완충) 생리 식염수 용액이다.
- [0186] 바람직하게는, 염을 먼저 용해한 다음 HSA를 첨가하고, 필요에 따라 pH를 적정하고, 마지막으로 보툴리눔 독소를 첨가한다. 이 순서는 강제 조건은 아니지만, BoNT의 최대 비활성을 안전하게 보존하기 위한 것으로 여겨진다. 바람직하게는, 보툴리눔 독소 액체 제형을 제조하는 방법은 분말 형태의 동결건조된 보툴리눔 독소 제제를 재구성하는 것을 포함하지 않는다.
- [0187] 나아가, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 인간 혈청 알부민 (HSA)을 보툴리눔 독소와 조합하는 것을 포함하는, 보툴리눔 독소 액체 제형의 안정화 방법에 관한 것이다:
- [0188] (a) 인간 혈청 알부민을 포함하는 조성물을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 및 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계, 및
- [0189] (b) 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하는 단계.
- [0190] 또한 나아가, 본 발명은 보툴리눔 독소를 포함하는 액체 조성물의 광 및/또는 온도 안정성을 높이기 위한, 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 인간 혈청 알부민 (HSA)의 용도에 관한 것이다:
- [0191] (a) 인간 혈청 알부민을 포함하는 조성물을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 및 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계, 및
- [0192] (b) 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하는 단계.
- [0193] 또한 나아가, 본 발명은 하기에 의해 수득가능한 인간 혈청 알부민 (HSA)에 관한 것이다:
- [0194] (a) 인간 혈청 알부민을 포함하는 조성물을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 및 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계, 및
- [0195] (b) 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하는 단계.
- [0196] 제4 측면에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 본 발명의 액체 제형의 제조 방법에 관한 것이다:
- [0197] - 인간 혈청 알부민 출발 물질을 정제해 정제한 인간 혈청 알부민 물질을 수득하는 단계,
- [0198] - 수득한 정제한 인간 혈청 알부민을 보툴리눔 독소와 혼합하고, 선택적으로 추가의 구성성분과 혼합해, 액체 제형을 수득하는 단계,
- [0199] 또는
- [0200] - 보툴리눔 독소 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 조성물을 정제해 정제한 액체 조성물을 수득하는 단계,
- [0201] - 수득한 정제한 액체 조성물을 추가의 구성성분과 혼합해 액체 제형을 수득하는 단계.
- [0202] 인간 혈청 알부민 출발 물질은 본원에서 상기에 정의된 바와 같이 정의된다. 바람직하게는, 이것은 적어도 5% w/v HSA, 바람직하게는 10% w/v 내지 35% w/v HSA, 더 바람직하게는 15% w/v 내지 30% w/v, 가장 바람직하게는 20% w/v 내지 25% w/v HSA를 함유한 수성 용액의 형태로 존재한다. 인간 혈청 알부민 출발 물질은 트립토판 및 N-아세틸-트립토판, 특히 N-아세틸-트립토판을 5 mM 초과와 함량, 10 mM 또는 그보다 높은 함량, 또는 20 mM 또는 그보다 높은 함량, 또는 30 mM 또는 그보다 높은 함량으로 함유할 수 있다. 아울러, 단계 (a)에서 수득한 혼합물은 pH 6.0 내지 9.0, 바람직하게는 6.5 내지 8.5, 더 바람직하게는 7.0 내지 8.5, 가장 바람직하게는 7.0 내지 8.0 범위로 pH를 적정할 수 있다.
- [0203] 바람직하게는, 본 발명의 방법에 대한 제1 대안으로, 정제 단계를 통해 트립토판 및/또는 N-아세틸-트립토판을 함유하지 않거나 또는 5 mM 이하, 바람직하게는 1 mM 이하, 더 바람직하게는 0.1 mM 이하, 가장 바람직하게는

0.001 mM 이하로 함유하는 정제된 인간 혈청 알부민 물질을 수득한다. 액체 제형을 제조하면, 정제된 인간 혈청 알부민 물질이 희석되어, 트립토판 및 N-아세틸-트립토판의 농도가 본원에 언급된 범위 내로, 예를 들어, 50 μ M 미만이 된다.

- [0204] 정제 단계는 인간 혈청 알부민 출발 물질 또는 보툴리눔 독소 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 조성물에 대해 투석, 정용여과 (교차 흐름 여과), 한외여과, 크로마토그래피 정제 기법, 예를 들어 이온 교환 크로마토그래피 (IEX), 친화성 크로마토그래피 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 장-흐름 분획법 또는 석출 (예를 들어, 염 석출, 에탄올 석출)을 실시함으로써 수행할 수 있다.
- [0205] 바람직하게는, 정제는 투석에 의해 이루어진다. 투석은 전형적으로 0.5 내지 48시간, 특히 1 내지 24시간 또는 1 내지 12시간 동안, 실온을 비롯한 0°C 내지 30°C, 특히 2°C 내지 30°C 또는 4°C 내지 25°C의 온도에서 수행된다. 나아가, 투석은 전형적으로 인큐베이션한 HSA 용액의 부피에 대해 10-1000배 부피의 투석 완충제에 대해 수행하고, 투석 완충제는 통상적으로 적어도 1회 교체한다. 사용하는 투석 막은 분자량 컷 오프, 예를 들어, 10 kDa의 분자량 컷 오프를 가질 수 있다.
- [0206] 예를 들어, 정제한 혈청 알부민은 하기 공정에 의해 수득할 수 있다:
- [0207] - 상업적으로 이용가능한 HSA 제품을 100배 부피의 투석 완충제 (10 mM 히스티딘, 0.9% NaCl, pH 6.0)에 대해 24시간 동안 실온 하에 자기 교반기에서 서서히 교반하면서, 투석하는 단계 (투석 막 MWCO 10 kDa),
- [0208] - 완충제를 신선한 투석 완충제로 교체해 실온에서 24시간 동안 투석하고, 이를 2회 이상 반복하는 단계.
- [0209] 상기한 방법에 대한 제1 대안, 즉 인간 혈청 알부민 출발 물질을 정제하고 수득한 정제된 인간 혈청 알부민을 보툴리눔 독소 및 선택적으로 추가의 성분과 혼합하는 공정이 본 발명 내에서 바람직하다. 혼합하여 본 발명의 액체 제형을 수득하는 단계는 특별히 제한되지 않으며, 성분 (i) 내지 (ii) 및 선택적으로 성분 (iii) 및 (vi) 중 하나 이상을 혼합하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 염을 먼저 용해한 다음 HSA를 첨가하고, 필요에 따라 pH를 적정하고, 마지막으로 보툴리눔 독소를 첨가한다. 이 순서는 강제 조건인 것은 아니지만, BoNT의 최대 비활성을 안전하게 보존하기 위한 것으로 여겨진다. 바람직하게는, 보툴리눔 독소 액체 제형을 제조하는 방법은 분말 형태의 동결건조된 보툴리눔 독소 제제를 재구성하는 것을 포함하지 않는다.
- [0210] 본 발명의 제1 측면과 관련하여 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에서, 본 발명의 액체 제형은, Fe^{3+} 이온이 또한 광 안정성에 대해 불안정화 효과를 발휘하므로, Fe^{3+} 이온 농도가 낮은 것으로 고려된다. 이에, 본 발명에 따르면, Fe^{3+} 이온을 제거하기 위해, 본 발명에 따른 방법의 정제 단계는 다음과 같이 수행하거나 또는 부가적으로 하기 단계를 포함한다:
- [0211] - 인간 혈청 알부민 출발 물질을 킬레이트제와 접촉시켜 인간 혈청 알부민 출발 물질과 킬레이트제를 포함하는 혼합물을 수득하는 단계, 및
- [0212] - 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하여, 킬레이트-처리된 정제한 인간 혈청 알부민 물질을 수득하는 단계,
- [0213] 또는
- [0214] - 보툴리눔 독소 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 조성물을 킬레이트제와 접촉시켜 액체 조성물과 킬레이트제의 혼합물을 수득하는 단계, 및
- [0215] - 혼합물로부터 킬레이트제를 제거하여, 킬레이트-처리된 정제한 액체 제형을 수득하는 단계.
- [0216] 접촉 단계에서, 인간 혈청 알부민 출발 물질 및 보툴리눔 독소 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 액체 조성물은 각각 바람직하게는, 킬레이트제가 혼합물에 0.1 mM 내지 1000 mM 또는 0.1 mM 내지 500 mM, 더 바람직하게는 0.5 mM 내지 500 mM 또는 1 mM 내지 500 mM, 가장 바람직하게는 10 mM 내지 100 mM의 농도로 존재하도록, 소정량의 킬레이트제와 접촉된다.
- [0217] 킬레이트제의 제거는 투석, 교차 흐름 여과 또는 한외여과에 의해 수행될 수 있다.
- [0218] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "접촉"은 성분 2 이상이 함께 있게 하는 것으로 광의적으로 해석되는 것으로 이해된다. 이는 용해, 혼합, 현탁, 블렌딩, 슬러리화, 교반, 유동화 (flowing), 흡착, 결합, 추출 등과 같은 다양한 여러가지 방법을 통해 달성할 수 있다. 전형적으로, 킬레이트제는 HSA를 포함하는 조성물 (예를 들어, HSA 용액)에 첨가한 다음 혼합해 균질한 혼합물을 수득하고, 선택적으로 추가로 가공 처리하는 단계 (예를 들어, 킬

레이트제 함유 완충제에 대한 투석)를 거친다.

- [0219] 이에, "접촉"은 HSA 물질을, 예를 들어 수성 용액의 형태로 고정된 금속 친화성 수지 (IMAC) 상에 로딩함으로써 달성될 수 있는 것으로 또한 고려된다. 용어 "고정된 금속 친화성 수지" (IMAC)는 본원에 사용된 바와 같이 다 가 양이온과 결합 및 배위 결합할 수 있는 고정된 관능성 모이어티 (예를 들어, 이미노다이아세트산)를 함유한 수지, 예를 들어, 킬레이팅-세파로스, 프락토겔-EMD-킬레이트, POROS 20MC, Matrex Cellufine 킬레이트, TALON 및 Chelex 100 수지 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 이러한 고정된 금속 친화성 수지는 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 바와 같은 크로마토그래피 금속 친화성 컬럼의 형태로 일반적으로 사용된다. 아울러, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "접촉"은 또한 적절한 고정된 금속 친화성 수지를 이용한 배치 방식의 결합을 포함한다.
- [0220] 접촉 단계와 관련하여, 용어 "인간 혈청 알부민 출발 물질" 및 "킬레이트제"는 HSA 및 킬레이트제와 혼합되거나 또는 이에 함유된 기타 물질 또는 화합물의 존재를 배제하거나 또는 이의 물리적 형태에 대한 어떠한 제한을 암시하는 것으로 의도되지 않는 것으로, 추가로 지적된다. 이는, 킬레이트제와 접촉되는 "인간 혈청 알부민 출발 물질"은 고체 또는 액체 (예를 들어, 수성 조성물 또는 수성 용액)의 형태와 같은 임의의 형태로 존재할 수 있음을 의미한다. 마찬가지로, 인간 혈청 알부민 출발 물질과 접촉되는 "킬레이트제"는 고체 또는 액체 (예를 들어, 수성 조성물 또는 수성 용액)의 형태와 같은 임의의 형태로 존재할 수 있음을 의미한다.
- [0221] 바람직하게는, 접촉 단계에서 수득되는 혼합물은 수성 혼합물이다. 이 수성 혼합물은 여러가지 방식으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 인간 혈청 알부민은 고체 형태 또는 액체 형태로, 예를 들어 킬레이트제의 수성 용액으로 존재할 수 있는 킬레이트제와 혼합되는 수성 조성물, 예를 들어 수성 용액의 형태일 수 있다. 아울러, 인간 혈청 알부민은 킬레이트제 및 수성 용액과 또는 킬레이트제의 수성 용액과 혼합되는, 고체, 예를 들어 동결건조된 물질의 형태일 수 있다. 바람직하게는, 인간 혈청 알부민은 수성 조성물, 더 바람직하게는 수성 용액의 형태이고, 킬레이트제는 고체 또는 수성 조성물 (예를 들어, 수성 용액)이다.
- [0222] 특히, 접촉 단계에서 킬레이트제와 접촉되는 HSA는 적어도 5% w/v HSA, 더 바람직하게는 10-35% w/v HSA, 더 바람직하게는 15% w/v 내지 30% w/v HSA, 가장 바람직하게는 20% w/v 내지 25% w/v HSA를 함유한 수성 용액의 형태일 수 있다. 아울러, 단계 (a)에서 수득된 혼합물의 pH는 pH 6.0-9.0, 바람직하게는 6.5-8.5, 더 바람직하게는 7.0-8.5, 가장 바람직하게는 7.0-8.0 범위로 적정될 수 있다.
- [0223] 아울러, 본 발명에 따른 액체 제형의 제조 방법의 접촉 단계는 수개의 하위 단계들을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 접촉 단계는 킬레이트제 (예를 들어, EDTA) 및 인간 혈청 알부민을 혼합하는 단계, 혼합물을 지정된 시간 동안 인큐베이션하는 단계, 및 선택적으로, 킬레이트제를 함유한 완충제에 대해 혼합물을 투석하는 단계를 포함하거나 또는 (단지) 이러한 단계로 구성되고, 킬레이트제는 바람직하게는 인큐베이션 하위 단계에 사용되는 것과 동일하다. 다른 구현예에서, 이러한 혼합물은 인큐베이션하지 않고 (바로) 킬레이트제를 함유한 완충제에 대해 투석을 실시하고, 여기서 킬레이트제는 바람직하게는 킬레이트제 (예를 들어, EDTA) 및 인간 혈청 알부민을 혼합하는 단계에 사용되는 것과 동일하다. 다른 구현예에서, 킬레이트제 및 인간 혈청 알부민은 투석하기 전 혼합하지 않는다. 이는, 접촉 단계 (a)가 킬레이트제를 함유한 완충제에 대해 상기 혼합물을 투석하는 단계를 포함하거나 또는 (단지) 이로 구성될 수 있다는 것이다.
- [0224] 바람직하게는, 접촉 단계는 킬레이트제를 HSA를 포함하는 조성물 (예를 들어, HSA의 용액)에 첨가하거나 또는 킬레이트제를 HSA를 포함하는 조성물 (예, HSA 용액)과 혼합하는 단계를 포함하거나 또는 (단지) 이로 구성된다. 제조한 혼합물은 이후 일정 시간 동안 인큐베이션하고, 예를 들어 소정의 시간 동안 교반하거나 또는 교반 없이 소정의 시간 동안 정치한다.
- [0225] 인큐베이션 시간은 특정한 범위로 제한되지 않지만, 전형적으로 적어도 0.5시간, 특히 적어도 1시간, 보다 구체적으로 적어도 2시간이다. 인큐베이션 시간의 상한은 중요하지 않으며, 예를 들어 1시간, 2시간, 5시간 또는 10시간일 수 있다. 그래서, 인큐베이션 시간은 예를 들어 0.5-5시간, 또는 1-10시간일 수 있다. 마찬가지로, 인큐베이션 온도는 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 0-60°C 범위 내일 수 있다. 바람직하게는, 온도는 0-30°C이다. 이는 실온 (20°C 또는 25°C)이 본 발명에서 적절한 온도임을 의미한다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 온도는 반응 시간에 영향을 미친다. 일반적으로 인큐베이션 조건 (예를 들어, 시간 및 온도)는, 최종 조성물에 함유된 킬레이트제 (예를 들어, EDTA)의 잔류량이 100 μ M 또는 그 미만, 바람직하게는 10 μ M 또는 그 미만, 더 바람직하게는 1 μ M 또는 그 미만이도록, 선택된다.
- [0226] 선택적으로, 인큐베이션 단계 다음으로, 킬레이트제, 전형적으로 인큐베이션 단계에 사용된 것과 동일한 킬레이

트제를 함유한 완충제에 대해 인큐베이션한 혼합물을 투석하는 것과 같은 추가적인 공정을 후속적으로 수행한다. 이러한 선택적인 투석 단계에 사용되는 킬레이트제는 바람직하게는 투석 완충제에 0.1 mM - 1000 mM, 더 바람직하게는 1 mM - 200 mM, 가장 바람직하게는 10 mM - 100 mM의 농도로 함유된다. 또한, 투석 단계에서 사용되는 완충제는 (i) pH 7.5 - 8.5이거나, (ii) 완충화제를, 바람직하게는 최종 조성물에 따른 완충화제를 추가로 포함하거나, 또는 (iii) 긴장성 물질을, 바람직하게는 염화나트륨을 0.9% w/v로 추가로 포함하거나, 또는 (i) 및 (ii), 또는 (i) 및 (iii), 또는 (ii) 및 (iii), 또는 (i) 및 (ii) 및 (iii)인 것이, 바람직하다.

[0227] 본원에 이용하기 적합한 킬레이트제는 본원에서 상기에 정의된 바와 같다. 전술한 임의의 킬레이트제들의 혼합물이 본 발명에서, 예를 들어 용액, 고체 또는 매트릭스에 커플링된 형태로 사용될 수 있다.

[0228] 본 발명에 따르면, 킬레이트제는 (투석 백, 역류 투석 등을 이용한 통상적인 투석을 비롯한) 투석, 역삼투, 여과, 교차 흐름 여과, 한외여과 및 크로마토그래피 방법 (예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피 또는 겔 여과 크로마토그래피)과 같은 임의의 적절한 기법에 의해 제거할 수 있다.

[0229] 바람직하게는, 킬레이트제는 투석에 의해 제거한다. 투석은 전형적으로 0.5-48시간, 특히 1-24시간 또는 1-12시간 동안, 실온을 비롯한 온도 0°C 내지 30°C, 특히 2°C 내지 30°C 또는 4°C 내지 25°C에서 수행한다. 나아가, 투석은 전형적으로 인큐베이션한 HSA/킬레이트제 혼합물의 부피에 대해 10-1000배 부피의 투석 완충제에 대해 수행하며, 투석 완충제는 통상적으로 적어도 1회 교체한다. 사용하는 투석 막은 분자량 컷 오프를, 예를 들어, 10 kDa의 컷 오프를 가질 수 있다.

[0230] 일반적으로, 투석 조건 (예를 들어, 시간, 온도, 완충제 부피, 완충제 교체 횟수)은, 킬레이트제 (예를 들어, EDTA)의 잔류량이 100 μ M 또는 그 미만, 바람직하게는 10 μ M 또는 그 미만, 더 바람직하게는 1 μ M 또는 그 미만의 농도로 최종 제품에 함유되도록, 선택된다.

[0231] 제5 측면에서, 본 발명은 요법에 이용하기 위한 본 발명의 액체 제형에 관한 것이다.

[0232] 특히, 본 발명의 액체 제형은 신경근 질환, 통증, 타액과다증, 다한증, 비뇨기계 장애 및 신경계 장애의 치료에 이용할 수 있다.

[0233] 예시적인 신경근 질환으로는 근육긴장이상증, 경부 근육긴장이상증, 경련, 뇌졸중 후 경직, 안검경련, 진전, 과운동성 운동 장애 및 뇌성마비를 포함한다. 비뇨기계 장애로는 특히 배뇨근 과활동성, 과민성 방광, 신경인성 방광 및 간질성 방광염을 특징으로 하는 병태, 외음부통증 및 만성 골반 통증의 치료, 양성 전립선 과형성증 (BPH) 및 배뇨근 괄약근 협동장애 (detrusor sphincter dyssynergia, DSD)를 포함한다. 예시적인 신경계 장애로는 만성 편두통, 삼차신경통, 말초 신경병증성 통증, 당뇨병성 신경병증성 통증 및 우울증을 포함한다.

[0234] 제6 측면에서, 본 발명은 미용적 상태에 대해 치료하기 위한 본 발명의 액체 제형의 미용적 용도에 관한 것이다.

[0235] 본 발명의 이러한 측면은 본 발명의 액체 제형의 순수한 미학적 용도에 관한 것이다. 치료할 바람직한 미용적 상태는 피부 상태, 특히 피부의 주름, 특히 얼굴 주름의 치료를 포함한다.

[0236] 용어 "주름"은 본원에 사용된 바와 같이 주름뿐만 아니라 선 (line), 주름살 (rhytid), 구김 (crease), 고랑 (frown) 및 접힘 (fold)을 망라하는 것으로 광의적으로 이해되어야 한다. 용어 "선", "주름", "주름살", "구김" 및 "접힘"은 유사한 정의를 공유하며, 따라서 종종 상호 호환적으로 사용된다. 본 발명에서, "선"은 일반적으로 "주름"과 상호 호환 가능하지만, 바람직하게는 "주름"보다 덜 깊게 피부가 패인 것을 지칭한다. "접힘"은 주름 및 선과 상호 호환 가능하며, 바람직하게는 선형적으로 패인 것이다. "구김"은 주름, 선 및 접힘과 상호 호환 가능하다. 이는 바람직하게는 경미한 주름 형태를 지칭하고, 이는 특정 위치에서의 특정한 주름을 설명할 수 있다. "주름살"은 본원에 사용된 바와 같이 본질적으로 주름과 동일한 의미를 가진다. 그러나, "주름살"은 바람직하게는 선들이 불규칙적으로 모여 형성된 피부 구조를 지칭한다. "고랑"은 피부에서의 깊은 접힘 또는 깊은 선이다.

[0237] 바람직하게는, 본 발명에 따라 치료되는 주름은 수평 이마 주름, 미간 주름, 안와주위 주름, 눈가 주름 (Crow's feet), 콧등 주름 (bunny line)(즉, 코 양옆에 세로로 잡힌 선), 팔자 주름 (nasolabial fold), 윗입술 세로 주름 (upper radial lip line), 아랫입술 세로 주름 (lower radial lip line), 입 꼬리 주름 (corner of the mouth line), 입옆 팔자 주름 (marionette line), 입 주위 입술 주름 (perioral lip line), 입꼬리 (oral commissures), 입술턱 주름 (labiomental crease) 및 자갈모양 턱 (cobblestone chin)을 비롯한, 얼굴 주름이다.

- [0238] 전술한 얼굴 주름을 치료하기 위해, 보툴리눔 독소는 통상적으로 다음과 같은 근육에 근육내 주사에 의해 투여된다: 이마 근육 (수평 이마 주름), 눈살근 (procerus) 및 눈썹주름근 (corrugator muscle)(미간 주름), 측면 눈둘레근 (lateral orbicularis oculi muscle)(눈가 주름/안와주위 주름), 코근, 횡비강근에 대한 눈살근 (procerus for transverse nasal muscle)(코등 주름), 윗입술 콧날개 올림근 (levator labii superioris alaeque nasi)(팔자 주름), 입둘레근 (orbicularis oris)(윗 및 아래 세포 입술 주름), 입꼬리 내림근 (depressor anguli oris)(입꼬리 주름, 입옆 팔자 주름, 입꼬리, 입술턱 주름), 및 턱끝근 (mentalis muscle)(입 주위 입술 주름, 자갈모양 턱).
- [0239] 본 발명의 액체 제형의 추가로 바람직한 미용적 용도는 얼굴 및/또는 신체의 피부 질의 개선 및/또는 원기회복을 포함하는 미용적 활용을 위한 용도에 관한 것이다.
- [0240] 제7 측면에서, 본 발명은 본 발명의 액체 제형을 유효량으로 이를 필요로 하는 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 질환 또는 상태를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0241] 질환 또는 상태는 치료학적 적응증 또는 미용적 적응증인지와는 무관하게, 본원에 전술한 질환 및 상태들 중 어느 하나일 수 있다. 이에, 일 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 액체 제형을 유효량으로 이를 필요로 하는 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 미용적 (미학적) 상태를 치료하는 (비-치료학적) 방법에 관한 것이다. 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 액체 제형을 유효량으로 이를 필요로 하는 인간에게 주사하는 것을 포함하는, 미용적 (미학적) 상태, 바람직하게는 피부 상태를 치료하는 (비-치료학적) 방법에 관한 것이다.
- [0242] 본 발명의 추가로 바람직한 방법은 본 발명의 액체 제형을 유효량으로 이를 필요로 하는 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 얼굴 및/또는 신체의 피부 질을 개선하거나 및/또는 원기회복하는 방법에 관한 것이다.
- [0243] 치료할 개체는 본 발명에 따라 치료 가능한 질환 또는 상태를 가진다는 것 이외에는 특별히 제한되지 않는다. 당해 기술 분야의 당업자는 주어진 치료학적 또는 미용적 적응증을 치료하는데 적절한 투약 용법을 결정할 수 있을 것이다. 구체적으로, 주사는 치료할 질환 또는 상태에 따라 진피내, 진피하 (피하) 또는 근육내일 수 있다.
- [0244] 전술한 내용과 별도로, 본 발명은 추가적으로 보툴리눔 독소와 인간 혈청 알부민 (HSA)을 조합하는 단계를 포함하고, HSA가 본 발명의 제4 측면과 관련하여 기술된 바와 같이 인간 혈청 알부민 출발 물질을 정제해 정제한 인간 혈청 알부민 물질을 수득함으로써 준비되는, 보툴리눔 독소의 액체 제형을 안정화하는 방법에 관한 것이다.
- [0245] 나아가, 본 발명은 보툴리눔 독소를 포함하는 광 및 온도에 안정한 액체 조성물을 제공하기 위한 인간 혈청 알부민 (HSA)의 용도에 관한 것으로, HSA는 본 발명의 제4 측면과 관련하여 기술된 바와 같이 인간 혈청 알부민 출발 물질을 정제해 정제한 인간 혈청 알부민 물질을 수득함으로써 준비한다.
- [0246] **실시예**
- [0247] **I. 실시예 1-3**
- [0248] 아래 실시예들은 본 발명에 따른 보툴리눔 독소 액체 제형 및 이의 제조 방법을 예시한다. 백분율은 달리 나타내지 않은 한 중량/부피 (w/v)이다.
- [0249] 보툴리눔 독소의 생물학적 활성은 WO 2014/207109에 기술된 바와 같이 세포 기반의 효능 분석 (CBA)를 이용해 결정하였다. 간략하게는, 뉴런 세포를 신경독소를 함유한 샘플 및 효능이 공지된 참조 표준 물질과 함께 인큐베이션하였다.
- [0250] 인큐베이션이 끝난 후, 세포를 세포용해 처리하고, 절단된 SNAP25 단백질의 양을 면역분석으로 결정하였다. 그런 후 샘플로 처리된 세포의 절단율을 참조 표준 물질로 처리된 세포의 것과 비교하여, 샘플의 생물학적 활성을 계산하였다.
- [0251] **실시예 1**
- [0252] 통상적인 투석으로 전처리된 HSA를 함유한 보툴리눔 독소 액체 제형의 광 및 보관 안정성 (본 발명에 따르지 않음)
- [0253] 초기 실험에서, 복합체 형상 단백질이 없는 150 kD 보툴리눔 신경독소 타입 A (본원에서 "150kDa BoNT/A"라고도 함)의 액체 제형의 생물학적 활성이, 광 (일광 또는 실내광) 노출 후 크게 감소하였으며, 광 민감성이 인간 혈청 알부민 (HSA) 농도 증가에 따라 증가함을, 관찰하였다. 추가적인 실험에서, 본 발명자들은 예상치 못하게도,

보툴리눔 독소 액체 제형의 광 안정성 및 40℃ 보관 안정성이 EDTA와 같은 복합체 형성 물질의 첨가에 의해, 심지어 EDTA가 이의 마그네슘, 칼슘 또는 아연 복합체의 형태로 존재하더라도, 현저하게 증가할 수 있다는 것을, 확인하였다 (결과는 도시 안함).

[0254] 이러한 발견 사실에 비추어, HSA 내 미확인 성분이 보툴리눔 독소의 광 민감성을 유발하고, 이 성분이 EDTA와 같은 킬레이트제에 의해 왓치 불활성화되거나 또는 은폐될 수 있다고, 추정하였다. 그러나, 본 발명자들이 수행한 추가적인 실험에서, 놀랍게도, EDTA가 주사 통증의 증가를 유발한다는 것을 알게 되었다. 이에, EDTA와 같은 킬레이트제를 제거하기 위해, 본 발명자들은 광 불안정성을 유발하는 HSA 내 미확인 성분을 투석에 의해 제거하고자 시도하였다.

[0255] 이러한 목적으로, HSA 농축 원액 (예를 들어, 20%)을 실온에서 10 mM 히스티딘, 0.9% NaCl, pH 6.0의 완충제에 대해 4 x 12시간 동안 (완충제 3회 교체, 샘플 부피에 대해 완충제 부피 약 100배) 광범위하게 투석해, "투석한 HSA"를 수득하였다. 투석한 HSA 및 비-투석 HSA를 이후 이용해, 다음과 같은 보툴리눔 독소 (복합체를 형성하는 단백질이 없는 150 kDa BoNT/A)의 액체 제형을 준비하였다:

[0256] 제형 1: 65 U/ml 보툴리눔 독소, 0.1% HSA (비-투석 처리), 10 mM 히스티딘, 0.9% NaCl, pH 6.0

[0257] 제형 2: 65 U/ml 보툴리눔 독소, 0.1% HSA (투석 처리), 10 mM 히스티딘, 0.9% NaCl, pH 6.0

[0258] 이들 제형 2종을 7시간 동안 250 W/m²의 광에 노출한 후 암 조건 하에 보관한 대조군 샘플과 비교해 상대적인 보툴리눔 독소 활성을 측정해, 이들 제형의 광 안정성을 결정하였다. 7시간 동안 250 W/m²의 광에 노출하기 위해, ID65 (indoor indirect daylight standard)에 해당하는 파장 범위 320-800 nm에서 스펙트럼 분포를 제공하기 위한 필터 세트가 장착된 SUNTEST CPS+ 장치 (ATLAS Material Testing Technology LLC)에서 ICH Q1B에 따른 윈도우 유리 필터를 이용해 ISO 10977에 따라 실시하였다. 그 결과는 표 1에 나타난다.

[0259] 표 1. 비-투석 처리 HSA 또는 투석 HSA를 함유한 보툴리눔 독소 액체 제형의 광 안정성 (7 h, 250 W/m²)

표 1

BoNT/A 제형	투석	상대적인 BoNT/A 활성 (대조군에 대한 %)
1	X	46%
2	0	56%

[0261] 표 1에서 확인되는 바와 같이, 비-투석 처리 HSA를 함유한 제형 1과 비교해, 투석 처리된 HSA를 함유한 제형 2에서는 광 안정성에 대해 단지 제한적인 영향만 관찰되었다.

[0262] 아울러, 40℃에서 2주 및 4주간 보관한 후, T0 (제형 1 및 2를 제조한 직후 측정) 대조군 샘플 대비, 상대적인 보툴리눔 독소 활성을 측정함으로써, 제형 1 및 제형 2의 보관 안정성을 결정하였다. 그 결과는 표 2에 나타난다.

[0263] 표 2. 비-투석 처리 HSA 또는 투석 처리된 HSA를 함유한 보툴리눔 독소 액체 제형의 40℃ 보관 안정성

표 2

BoNT/A 제형	투석	상대적인 BoNT/A 활성 (T0 대조군에 대한 %)	
		40℃에서 2주간 보관 후	40℃에서 4주간 보관 후
1	X	66%	52%
2	0	65%	51%

[0265] 알 수 있는 바와 같이, 투석은 보툴리눔 독소의 보관 안정성에 영향을 미치지 않는다.

[0266] 실시예 2

[0267] 복합체 형성제 및 투석으로 전처리된 HSA를 함유한 보툴리눔 독소 액체 제형의 광 및 보관 안정성

[0268] 실시예 1의 발견 사실 (즉, 광 안정성에 EDTA 또는 EDTA 복합체가 필요함; 투석 처리된 HSA는 광 및 보관 안정성을 유의하게 개선하지 않음)에도 불구하고, 본 발명자들은 EDTA와 같은 킬레이트제가 없음에도 광 및 보관시 안정한, 보툴리눔 독소 액체 제형에 대한 연구를 계속 진행하였다.

[0269] 먼저, EDTA를 HSA 농축 원액 (예를 들어, 20%)에 첨가하여 (100 mM = HSA pH 8.0 용액 ml 당 Na₂-EDTA 37.2 mg), 실온에서 6시간 동안 교반 하에 인큐베이션하였다. 그런 후, 인큐베이션한 혼합물을 EDTA가 첨가된 완충제 (100 mM EDTA, 10 mM 히스티딘, 0.9% NaCl, pH 7.0)에 대해 실온에서 16시간 동안 투석하였다. 사용한 투석 막은 MWCO 10 kDa의 막이고, 충전 부피는 투석 막 cm² 당 약 0.2 ml이었다. 투석 완충제의 부피는 샘플 부피에 대해 약 100배였다.

[0270] 그 후, 샘플 부피에 대해 약 100배 부피의 EDTA-결핍된 투석 완충제 (10 mM 히스티딘, 0.9% NaCl, pH 6.0)에 대해 실온에서 24시간 동안 투석하여 EDTA를 제거하였다. 그 후, 투석 완충제를 새로운 투석 완충제로 교체하여 다시 24시간 동안 투석하였다. 이를 2회 반복해, 전처리된 HSA ("EDTA-투석 처리된 HSA")를 수득하였다.

[0271] 이 전처리된 HSA를 이용해, 보툴리눔 독소 (복합체를 형성하는 단백질이 없는 150 kDa BoNT/A)의 액체 제형 3를 제조하였다:

[0272] 제형 1: 실시예 2의 제형 1과 동일 (65 U/ml 보툴리눔 독소, 0.1% HSA (비-투석 처리), 10 mM 히스티딘, 0.9% NaCl, pH 6.0)

[0273] 제형 3: 65 U/ml 보툴리눔 독소, 0.085% HSA (EDTA-투석 처리), 10 mM 히스티딘, 0.9% NaCl, pH 6.0

[0274] 7시간 동안 250 W/m²의 광에 노출한 후 암 조건 하에 보관한 대조군 샘플과 비교해 상대적인 보툴리눔 독소 활성을 측정해, 제형 1 및 제형 3의 광 안정성을 결정하였다. 그 결과는 표 3에 나타낸다.

[0275] 표 3. 비-투석 처리 HSA 또는 EDTA-투석 처리된 HSA를 함유한 보툴리눔 독소 액체 제형의 광 안정성 (7 h, 250 W/m²)

표 3

BoNT/A 제형	EDTA/투석	상대적인 BoNT/A 활성 (대조군에 대한 %)
1	X	46%
3	0	84%

[0277] 표 3에서 확인되는 바와 같이, EDTA-투석 처리된 HSA를 함유한 제형 3는 전처리되지 않은 HSA를 함유한 제형 1과 비교해 광 안정성의 상당한 개선을 나타내었다.

[0278] 아울러, 40℃에서 2주 및 4주간 보관한 후, T0 (제형 1 및 3를 제조한 직후 측정) 대조군 샘플 대비, 상대적인 보툴리눔 독소 활성을 측정함으로써, 보관 안정성을 결정하였다. 그 결과는 표 4에 나타낸다.

[0279] 표 4. 비-투석 처리 HSA 또는 EDTA-투석 처리된 HSA를 함유한 보툴리눔 독소 액체 제형의 40℃ 보관 안정성

표 4

BoNT/A 제형	EDTA-투석	상대적인 BoNT/A 활성 (T0 대조군에 대한 %)	
		2주간 40℃에서 보관 후	4주간 40℃에서 보관 후
1	X	66%	52%
3	0	94%	82%

[0281] 결과에 따르면, EDTA-처리되고 투석 처리된 HSA를 이용하면, 비처리 (투석 비처리) HSA를 함유한 제형 1과 비교해 현저하게 더 높은 생물학적 독소 활성이 수득되었다.

[0282] 요컨대, 본 실시예는, 킬레이트제 (예를 들어, EDTA)가, 만일 HSA를 킬레이트제로 전처리 후 예를 들어 투석으로 킬레이트제를 제거한다면, 액체 제형으로부터 예상치 못하게도 제거할 수 있음을 보여준다. 제조된 제형은 광 및 온도 (보관) 안정성 뿐 아니라 EDTA와 같은 킬레이트제를 함유한 액체 제형과 비교해 주사시 주사 통증 저하를 나타내었다.

[0283] 실시예 3

[0284] 보툴리눔 독소 액체 제형의 열 안정성에 대한 철 이온의 영향

[0285] 광 민감성에 대한 금속 이온의 영향을 조사하기 위한 추가적인 실험을 수행하였다. 이를 위해, 칼슘 (1 mM

Ca^{2+}), 코발트 (1 mM Co^{2+}), 구리 (1 mM Cu^{2+}), 니켈 (1 mM Ni^{2+}) 또는 철 (1 mM Fe^{3+})을, 50 U/ml 150 kDa BoNT/A, 0.085% 실시예 2에 따라 준비한 전처리된 HSA (즉, EDTA-처리 및 투석 처리된 HSA), 10 mM 히스티딘, 0.9% NaCl, pH 6.0을 함유한 액체 제형에 첨가하였다. 이 액체 제형은 고 순도의 물, 히스티딘 및 NaCl을 이용하고, 철 또는 강철 장비를 사용하지 않고 준비하였다. 제조한 제형은 광 (7시간 , 250 W/m^2)에 노출시키고, 암 조건 하에 보관한 대조군 제형과 비교하였다.

[0286] 칼슘 (1 mM Ca^{2+}) 첨가뿐 아니라 코발트 (1 mM Co^{2+}) 첨가는, 칼슘 및 코발트 비첨가 제형 (암 조건에서 보관한 대조군 제형과 비교해 잔류 독소 활성 79%)과 비교해 광 안정성에 효과가 없는 것으로 확인되었다 (암 조건에서 보관한 대조군 제형과 비교해 잔류 독소 활성 74% 및 77%). 구리 (1 mM Cu^{2+}) 및 니켈 (1 mM Ni^{2+})의 첨가는 광 안정성을 비교적 소폭 감소시켰다. 이와는 대조적으로, 철 (1 mM Fe^{3+})의 첨가는 광 안정성의 급격한 저하를 유발하였으며, 광 노출 (7시간 , 250 W/m^2) 후 잔류 독소 활성은 암 조건 하에 보관한 제형과 비교해 1% 에 불과하였다 (결과는 도시 안함).

[0287] 이러한 결과에 비추어, BoNT/A 액체 제형의 광 민감성에 대한 Fe^{3+} 이온의 영향을 10 pM 내지 $100 \text{ }\mu\text{M}$ 농도 범위에서 보다 면밀하게 조사하였다. 전술한 실험과 유사하게, 전처리된 HSA를 포함하는 동일한 제형 (50 U/ml 보툴리눔 독소, 0.085% 전처리된 HSA, 10 mM 히스티딘, 0.9% NaCl, pH 6.0)을 이용하였으며, Fe^{3+} 농도를 원액 ($50 \text{ mM Fe(NO}_3)_3$)을 이용해 원하는 최종 농도로 조정하였다. 7시간 동안 250 W/m^2 의 광에 노출시킨 후 측정한, 암 조건에서 보관한 각 샘플에서 측정한 생물학적 활성에 대한 %로서 나타낸, 생물학적 활성을 표 5에 나타낸다.

[0288] 표 5. 전처리된 HSA와 다양한 농도의 Fe^{3+} 를 함유하는 보툴리눔 독소 액체 제형의 광 안정성 (7 h , 250 W/m^2)

표 5

BoNT/A 제형	$[\text{Fe}^{3+}]$	상대적인 BoNT/A 활성 (암 조건 대조군에 대한 %)
1	$100 \text{ }\mu\text{M}$	0.4%
2	$1 \text{ }\mu\text{M}$	9%
3	316 nM	66%
4	100 nM	82%
5	32 nM	77%
5	10 nM	75%
4	100 pM	74%
5	10 pM	78%
6	0 pM	78%

[0290] 표 4에서 알 수 있는 바와 같이, 316 nM 농도에서 Fe^{3+} 이온은 BoNT/A 안정성에 유의한 영향을 미쳤으며, 안정성이 $>15\%$ 감소하였다. 농도 $1 \text{ }\mu\text{M}$ 에서, 광 안정성이 현저하게 감소하였으나; 여전히 $>1 \text{ }\mu\text{M}$ 농도에서보다 더 높았다. 농도 $1 \text{ }\mu\text{M}$ 이상에서, 첨가된 Fe^{3+} 이온은 광 영향 하에 액체 제형의 BoNT/A 안정성에 극히 부정적인 영향을 나타내었다.

[0291] 다른 실험에서, 전처리된 HSA를 함유한 보툴리눔 독소 액체 제형 (즉, 50 U/ml 보툴리눔 독소, 0.085% 전처리된 HSA, 10 mM 히스티딘, 0.9% NaCl, pH 6.0)을 스테인리스 스틸 비이커에서 48시간 동안 교반한 경우, 광 노출 (7시간 , 250 W/m^2) 후 상대적인 BoNT/A 활성은, 동일한 샘플을 폴리프로필렌 용기에서 48시간 동안 교반한 경우에 수득한 78% 와 비교해, 약 2% 에 불과한 것으로, 확인되었다. 이는, 아마도 스테인리스 스틸 비이커로부터 소량의 Fe^{3+} 이온이 보툴리눔 독소 액체 제형으로 누출됨으로써 초래된 매우 놀라운 결과였으며, 철 이온이 보툴리눔 독소 액체 제형을 제조하는 경우에 고려해야 하는 중요한 인자임을 보여준다.

[0292] II. 실시예 4-6

[0293] 하기 실시예 4-6에서는 본 발명에 따른 보툴리눔 독소 액체 제형의 광 안정성을 추가로 입증하였다. 이를 위해, 몇가지 보툴리눔 독소 액체 제형을 준비하고 (실시예 4), 준비한 제형 각각의 샘플을 7시간 동안 250 W/m^2 의 광에 노출하거나 또는 대조군으로서 7시간 동안 암 조건 하에 보관하였다. 그런 후, 광 노출 샘플 및 암 조건 하

에 보관한 샘플의 보툴리눔 독소 활성을 세포-기반의 효능 분석 (CBA)을 통해 측정하였다. 광 안정성은 암 조건 하에 보관한 샘플에서 측정된 보툴리눔 독소 활성의 평균에 대한, 광 노출 샘플에서 측정된 보툴리눔 독소 활성의 평균의 백분율로서 나타내었다.

[0294] 보툴리눔 독소의 생물학적 활성은 WO 2014/207109에 기술된 바와 같이 세포-기반의 효능 분석 (CBA)을 이용해 결정하였다. 간략하게는, 뉴런 세포를 신경독소를 함유한 샘플 및 효능이 공지된 참조 표준 물질과 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션이 끝난 후, 세포를 세포용해 처리하고, 절단된 SNAP25 단백질의 양을 면역분석으로 결정하였다. 그런 후 샘플로 처리된 세포의 절단율을 참조 표준 물질로 처리된 세포의 것과 비교하여, 샘플의 생물학적 활성을 계산하였다.

[0295] 7시간 동안 250 W/m²의 광에 노출시키기 위해, ID65 (indoor indirect daylight standard)에 해당하는 파장 범위 320-800 nm에서 스펙트럼 분포를 제공하기 위한 필터 세트가 장착된 SUNTEST CPS+ 장치 (ATLAS Material Testing Technology LLC)에서 ICH Q1B에 따른 원도우 유리 필터를 이용하여 ISO 10977에 따라 실시하였다.

[0296] 실시예 4

[0297] 여러가지 보툴리눔 독소 제형의 제조

[0298] 광 안정성에 대해 분석한 제형의 조성물을 표 6 및 7에 나타낸다. 사용한 보툴리눔 독소 (BoNT)는 NT101이었다.

[0299] 표 6. 비처리/전처리 HSA를 함유한 검사 제형

표 6

성분		제형			
		I	II	III	IV
BoNT (U/ml)		50	50	50	50
HSA (mg/ml)	비처리	1.0	-	1.0	-
	투석	-	1.0	-	-
	EDTA-투석	-	-	-	0.85
NaCl (mg/ml)		9	9	9	9
히스티딘 (mg/ml)		1.55	1.55	1.55	1.55
EDTA (mg/ml)		-	-	1.30	-
pH		6.0	6.0	6.0	6.0

[0301] 표 7. 트립토판 (Trp)/N-아세틸-트립토판 (N-AcTrp)을 함유한 검사 제형

표 7

성분		제형						
		1	2	3	4	5	6	7
BoNT (U/ml)		50	50	50	50	50	50	50
HSA EDTA-투석 (mg/ml)		0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
NaCl (mg/ml)		9	9	9	9	9	9	9
히스티딘 (mg/ml)		1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
Trp (mM)		-	-	-	-	10	0.08	-
N-AcTrp (mM)		10	2	0.4	0.08	-	-	-
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

[0303] "HSA-투석"의 제조. HSA 25% (CSL Behring) 10 ml를 투석 카세트 (Slide-A-LyzerTM, 10 kDa MWCO, 12-30 ml, Thermo Scientific/Pierce)에 넣었다. 투석 카세트를 1.55 g/l 히스티딘, 9 g/l, pH 6.0 용액 2 L에 광 차단 하에 넣어, 교반하였다 (150 rpm, 자기 교반기). 그런 후, 투석 완충제를 새로운 투석 완충제 (1.55 g/l 히스티딘, 9 g/l NaCl, pH 6.0) 2 L로 교체하였으며, 이 절차를 각각 약 12시간 동안 3회 더 반복하였다. 수득한 투석 카세트의 내용물을 HSA 투석 또는 "HSA-투석"으로 언급한다. 농도를 후술한 바와 같이 결정하였다.

[0304] HSA-EDTA-투석의 제조. HSA 25% (CSL Behring) 18 ml를 1 M Na₂EDTA, pH 8.0 2 ml과 혼합하였다. 수득한 용액을 약 6시간 동안 교반하였다. 그런 후, 용액 약 15 ml를 투석 카세트 (Slide-A-LyzerTM, 10 kDa MWCO, 12-30

mL, Thermo Scientific/Pierce)로 옮겼다. 투석 카세트를 1.55 g/l 히스티딘, 9 g/l NaCl, 37.2 g/l Na₂EDTA, pH 7.0의 용액 2 L에 넣어, 광 차단 하에 24시간 동안 교반하면서 투석하였다 (150 rpm, 자기 교반기).

[0305] 다음으로, 투석 완충제를 1.55 g/l 히스티딘, 9 g/l NaCl, pH 7.0 용액 2 L로 교체한 다음 약 12시간 동안 투석 사이클을 3회 수행하고, 투석 완충제를 새로운 투석 완충제로 교체하였다 (His/NaCl, pH 6.5에 의해 1차 완충제 교체, 그리고 His/NaCl, pH 6.0에 의해 2차 및 3차 완충제 교체). 수득한 투석 카세트의 내용물이 EDTA-투석 HSA 물질 (또는 "HSA-EDTA-투석")이다.

[0306] 투석 후 HSA 농도는 일반적으로 투석 중에 부피 증가로 인해 출발 HSA 용액의 농도 (25% w/v)보다 현저하게 낮았다. 높은 단백질 농도로 인해 상당한 소실은 예상되지 않으므로, HSA의 절대량은 변화가 없는 것으로 간주하였으며, 당업자에게 공지된 바와 같이 부피 변화를 토대로 농도를 계산하였다. 투석 후 HSA 농도는 약 8.1% w/v로 결정되었다.

[0307] 위약 벌크 용액의 제조. 표 6 및 7에 나타난 제형을 활성 물질 (BoNT) 없이 제조하기 위해 (본원에서 "위약 벌크 용액"으로 지칭됨), 출발 물질 HSA, NaCl 및 히스티딘의 무게를 칭량해 물 (Milli-Q)에 용해하였다. 50 mM 트립토판 (Trp) 및 N-아세틸-트립토판 (N-AcTrp) 원액을 준비하고 (각각 온수 중의 10.212 g/l 및 12.313 g/l), 원하는 최종 Trp 및 N-AcTrp 농도에 따라 투입하였다. 마지막으로, 1 M NaOH 또는 1 M HCl을 첨가해 pH 6.0으로 적정하고, 물로 최종 부피로 만든 다음 용액을 0.22 µm 필터를 통해 멸균 여과하였다.

[0308] BoNT 프리-회석의 제조. NT101 13.44 mg을 칭량해 멸균한 50 mL 단백질 결합 튜브에 넣고, 제형 7의 멸균 여과한 위약 벌크 용액 20.123 g과 혼합해, 25,000 U/mL BoNT를 함유한 프리-회석을 수득하였다.

[0309] 샘플 제조. BoNT 프리-회석 20.0 µL를 멸균한 15 mL 저 단백질 결합 튜브에 넣고, 각각의 위약 벌크 용액 9.98 mL을 첨가하였다. 용액을 10회 서서히 위아래 뒤집어, 혼합하였다. 그 후, 각 용액 3 x 1 mL을 1.5 mL 저 결합 튜브에 넣어, 7시간 동안 250 W/m²에 노출시켰다. 각 샘플 용액의 나머지는 알루미늄 호일로 덮고, 측정할 때까지 4°C에서 벌크 보관하였다 ("암 조건 대조군" 샘플).

[0310] 실시예 5

[0311] 여러가지 액체 BoNT 제형들의 광 안정성 비교

[0312] 7시간 동안 250 W/m²의 광에 노출하거나 또는 7시간 동안 암 조건 하에 보관한 표 6에 나타난 제형 I-IV의 샘플의 보툴리눔 독소 활성을 CBA (다중 측정)로 측정하였다. 그 결과는 암 조건에서 보관한 대조군 샘플에 대한 광 노출 샘플의 활성 %로, 표 8에 나타낸다.

[0313] 표 8. 여러가지 액체 BoNT 제형의 광 안정성 비교

표 8

No.	BoNT 제형	상대적인 BoNT 활성 (암 조건 대조군 샘플에 대한 %)
	HSA	
I	HSA-비처리	46
II	HSA-투석	56
III	HSA 비처리 + EDTA	80
IV	HSA-EDTA-투석	84

[0315] 표 8에서 알 수 있는 바와 같이, HSA 투석이 광 노출에 대한 BoNT의 안정성을 다소 증가시켰다 (제형 II vs. 제형 I 참조). 비처리 HSA에 EDTA를 첨가하면, 현저하게 더 큰 긍정적인 효과가 달성되었다 (제형 III 참조). 그러나, EDTA 첨가가 광 불안정화 효과로부터 완전한 보호를 제공하는 것은 아니었다. 최상의 광 안정성은 EDTA와 예비 인큐베이션한 다음 후속적인 EDTA-프리 히스티딘 완충제에 대한 투석한 경우에 달성되었다 (제형 IV 참조). 이는 관찰된 광 안정성이 금속 이온 단독으로 인한 것이 아니라 기타 비공지된 화합물로 인한 것임을 의미한다.

[0316] 실시예 6

[0317] 트립토판 및 N-아세틸-트립토판의 존재 및 부재시 BoNT 액체 제형의 광 안정성

[0318] 7시간 동안 250 W/m²의 광에 노출하거나 또는 7시간 동안 암 조건 하에 보관한 표 7에 나타난 제형 1-7의 샘플

의 보툴리눔 독소 활성을 CBA (다중 측정)로 측정하였다. 그 결과는 암 조건에서 보관한 대조군 샘플에 대한 광 노출 샘플의 활성 %로, 표 9에 나타난다.

[0319] 표 9. 트립토판 또는 N-아세틸-트립토판의 존재 또는 부재시 액체 BoNT 제형의 광 안정성 비교

표 9

No.	BoNT 제형		상대적인 BoNT 활성 (암 조건 대조군 샘플에 대한 %)
	N-AcTrp (mM)	Trp (mM)	
1	10	-	6
2	2	-	8
3	0.4	-	45
4	0.08	-	73
5	-	10	8
6	-	0.08	67
7	-	-	85

[0321] 알 수 있는 바와 같이, 트립토판 및 N-아세틸-트립토판 둘다 BoNT 액체 제형의 광 안정성에 대해 용량 의존적인 방식으로 현저한 부정적인 효과를 나타내었다. 더 고 농도 (각각 10 mM 및 2 mM)에서 광 안정성 저하 효과가 매우 현저하여, 상대적인 생물학적 활성이 예외적으로 낮았다 (<10%). Trp 또는 N-AcTrp 80 μ M 정도의 낮은 농도에서는 Trp- 또는 N-AcTrp-프리 대조군 제형과 비교해 광 노출 후 BoNT 생물학적 활성이 약 10% 감소하였다 (제형 4 및 6 vs. 제형 7).

[0322] N-아세틸-트립토판 농도 80 μ M은 25% w/v HSA 출발 물질 (20 mM N-AcTrp 함유)을 0.1% w/v 또는 1 mg/ml HSA로 희석한 것에 해당한다. 1 mg/ml HSA는 전형적으로 보툴리눔 독소 제형에 사용되는 농도 범위에 속하는 값이므로, 이러한 HSA 출발 물질의 이용시 BoNT/A 제형 내 N-아세틸-트립토판은 광 민감도를 높이는 농도가 된다. 그래서, 트립토판 및 N-아세틸-트립토판이 광 안정성에 부정적인 영향을 나타내는 농도 범위가 실제로 매우 중요하다.