



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0141070
(43) 공개일자 2017년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
A01K 2207/10 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0074074

(22) 출원일자 2016년06월14일
심사청구일자 2016년06월14일

(71) 출원인

경북대학교 산학협력단

대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)

(72) 발명자

안동국

대구광역시 수성구 공경로7길 7-1 (만촌동)

(74) 대리인

특허법인 정안

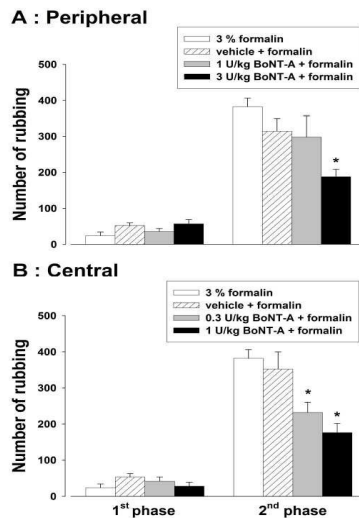
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 보툴리눔 독소를 중추에 투여한 악안면 감각 장애 동물모델

(57) 요약

상실된 치아를 인공치아로 대체하는 임플란트 시술은 의료기술의 발전에 따른 평균 수명 증가와 부드러운 음식을 주식으로 하는 식생활의 영향으로 시장이 점차 커지고 있다. 보다 개선된 인공치아의 개발을 위해 인공치아 전임상을 위한 동물 모델이 요구되고 있으나, 종래의 인공치아 전임상은 실험동물의 다리뼈(장골, iliac bone)에 인공치아를 이식하여 경과를 관찰하고 있는 실정이다. 본 발명은 보툴리눔 독소를 중추에 투여한 악안면 감각 장애 동물모델에 대한 것으로, 본 발명의 동물모델은 보툴리눔 독소를 중추에 투여하여 적은 농도의 보툴리눔 독소만으로도 효과적으로 안면 통증을 억제하였고, 악안면 근육의 운동 장애 없이 감각장애만을 유발하므로, 인공치아 개발을 포함한 악안면 질병 치료 연구에 크게 활용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01K 2267/03 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9B6055414
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 차세대응용오믹스사업
 연구과제명 통증신호조절에서 뉴런-글리아 상호작용의 광뇌용합연구
 기여율 1/2
 주관기관 경북대학교
 연구기간 2012.12.01 ~ 2017.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201520550000
 부처명 휴젤㈜
 연구관리전문기관 휴젤㈜
 연구사업명 산업체연구과제
 연구과제명 Botulinium toxin type A(BoNT-A)가 실허동물의 안면에서 발생하는 통증을 조절하는 기전
 기여율 1/2
 주관기관 경북대학교
 연구기간 2014.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

보툴리눔 독소를 투여하는 단계를 포함하는, 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 보툴리눔 독소의 투여는 개체를 마취하여 머리의 움직임을 고정된 상태로 투여하는 것을 특징으로 하는, 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 머리의 고정은 뇌정위고정인 것을 특징으로 하는, 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 보툴리눔 독소의 투여는 개체의 소뇌연수조, 환추후두막, 또는 경뇌막 낭내에 삽입한 관을 통해 투여하는 것을 특징으로 하는, 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 관은 폴리에틸렌관인, 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 A형 독소인, 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 보툴리눔 독소는 0.1 내지 2 U/kg의 농도로 투여되는, 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 감각 장애는 통증에 대한 민감도 저하인, 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 통증은 만성통증 또는 신경병증성 통증인, 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법.

청구항 10

개체의 소뇌연수조, 환추후두막, 또는 경뇌막 낭내로 보툴리눔 독소를 투여한, 악안면 감각 장애 동물모델.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 A형 독소인, 악안면 감각 장애 동물모델.

청구항 12

제 10항에 있어서,

상기 보툴리눔 독소는 0.1 내지 2 U/kg의 농도로 투여되는, 악안면 감각 장애 동물모델.

청구항 13

제 10항에 있어서,

상기 감각 장애는 통증에 대한 민감도 저하인, 악안면 감각 장애 동물모델.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 통증은 만성통증 또는 신경병증성 통증인, 악안면 감각 장애 동물모델.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 보툴리눔 독소를 중추에 투여한 악안면 감각 장애 동물모델에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 의료기술의 발전에 따른 평균 수명 증가와 부드러운 음식을 주식으로 하는 식생활의 영향으로 치과질환 환자가 큰 폭으로 증가하고 있다. 그 중, 상실된 치아를 인공치아로 대체하는 임플란트 기술은 2013년 세계 시장 규모가 약 36.1억 달러에 달했으며, 최근 7년간 연평균 4.1%로 성장하고 있는 추세이다. 인공치아 수요는 무치아(치아가 없는 상태) 발병률이 높은 고령 인구의 지속적인 증가와 개발도상국의 소득수준 향상으로 2020년까지 연평균 8.3%로 성장하고, 63.1억 달러 규모로 증가할 것으로 전망된다(한국보건산업진흥원 발행, 보건산업브리

프 의료기기, IT헬스 Vol.26).

- [0003] 그러나 현재 개발된 인공치아는 평균 수명이 이식 후 약 10년으로 영구적이지 못하거나, 생체적합성이 낮은 재료의 사용으로 환자에게 이식 후 이물결면역반응(foreign body reaction)을 야기하거나, 보철물 또는 매식체가 탈락 및 파손되거나, 치조골(alveolar bone)이 어느 정도 확보되어야지만 이식이 가능하다거나, 또는 인공치아 이식 후 지속적인 통증이나 부비동염, 부종 등이 발생하거나 하는 문제점이 있었다(의료기기정보기술지원센터 발생, 의료기기 안정성정보지, No.4, November, 2014).
- [0004] 이와 같은 문제의 해결을 위하여, 보다 개선된 인공치아의 개발을 위해 인공치아 전입상을 위한 동물 모델이 요구되고 있다. 그러나 인공치아를 동물의 치아에 식립할 시, 인공치아 식립으로 인한 통증 발생으로 실험동물이 입을 벌리지 않거나, 안면부 자극에 민감하게 반응하는 등의 문제가 발생하므로, 종래의 인공치아 전입상은 실험동물의 다리뼈(장골, iliac bone)에 인공치아를 이식하여 경과를 관찰하고 있는 실정이다(Qi M et al., Effect of zoledronate acid treatment on osseointegration and fixation of implants in autologous iliac bone grafts in ovariectomized rabbits. Bone. 2012 Jan;50(1):119-27., Cortes AR et al., Cone beam computed tomographic evaluation of a maxillary alveolar ridge reconstruction with iliac crest graft and implants. J Craniofac Surg. 2012 Jan;23(1):e12-4.). 이는 물론 구강 내외적 특성을 반영하지 못하는 조건이므로, 정확하고 안전한 인공치아 개발 시험이 아니라고 할 것이다. 따라서 실험동물의 구강 내 치아 위치에 정확하게 인공치아를 적용하여 시험할 수 있는 동물모델의 개발이 시급한 실정이다.
- [0005] 한편, 보툴리눔 독소란 보툴리누스균(Clostridium botulinum)이 생산하는 신경독소의 일종으로, 포유동물의 신경접합부의 절전(節前)신경종말에 작용하여 시냅시스소포의 세포외 배출작용을 억제한다. 이 독은 전달물질의 합성이나 저장 및 활동전위의 전도에는 영향을 주지 않는다. 100kDa의 중쇄와 50kDa의 경쇄로 구성되는데 하나의 S-S결합으로 접혀져있다. 중쇄는 이 독이 신경막과 특이적으로 결합하고, 경쇄는 세포 내로 들어가기 때문에 필요하다. 세포 내에서는 단백질분해효소에 의해 이분된 후 환원된 경쇄가 Zn^{2+} 을 동반하여 펩티드내부가수분해 효소로서 작용한다. 세포외 배출작용에는 세포 내에서 막의 융합에 관계하는 NSF-SNAP(N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein-soluble NSF attachment protein)복합체가 중개하며, 시냅시스소포와 세포막과의 결합이 필요한 것으로 추측하게 된다. 시냅시스소포 상의 수용체로 시냅토프레빈이 있고 세포막 측에는 선택신과 SNAP25가 있다. 이 독은 혈청형에 의해 A-G까지의 7개로 분류되는데, A, E는 SNAP25에, B, D, F는 시냅토프레빈에, 그리고 C는 선택신에 특이성이 있고, 이들이 분해되어 활성을 잃은 세포외 배출작용을 중지시키는 것이 밝혀졌다.
- [0006] 따라서 본 발명은 보툴리눔 독소를 중추에 투여한 악안면 감각 장애 동물모델에 대한 것으로, 본 발명의 동물모델은 보툴리눔 독소를 중추에 투여하여 적은 농도의 보툴리눔 독소만으로도 효과적으로 안면 통증을 억제하였고, 악안면 근육의 운동 장애 없이 감각장애만을 유발하므로, 인공치아 개발을 포함한 악안면 질병 치료 연구에 크게 활용될 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기와 같은 종래의 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 보툴리눔 독소를 중추에 투여한 악안면 감각 장애 동물모델에 관한 것이다.
- [0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른

예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0010] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0011] 본 발명의 일 구체예에서 “보툴리눔 독소(Botulinum Toxin)”란, 클로스트리디움 보툴리눔 세균이 만드는 신경독 단백질이다. 클로스트리디움 속은 127 종 이상이며, 형태 및 기능에 따라 구분된다. 혐기성, 그람 양성 박테리아 클로스트리디움 보툴리눔(Clostridium botulinum)은 사람 및 동물에서 보툴리즘이라는 신경마비 질환을 일으키는, 강력한 폴리펩티드 신경독인, 보툴리눔 독을 생산한다. 클로스트리디움 보툴리눔의 포자는 토양에서 발견되며, 제대로 살균되지 않고 밀봉된, 집에서 통조림된 식품 용기에서 배양될 수 있어, 이러한 것들이 많은 보툴리즘의 원인이 된다. 보툴리즘 증상은 전형적으로 클로스트리디움 보툴리눔 배양물 또는 포자에 감염된 음식을 먹은 후 18 내지 36시간이 지나서 나타난다. 보툴리눔 독소는 독성이 감소되지 않은 채로 장 내막을 통과할 수 있는 것으로 보이며 콜린성 운동 뉴런에 대해 높은 친화도를 나타낸다. 보툴리눔 독소 중독의 증상은, 보행 장애, 연하장애 및 언어장애, 호흡근육의 마비 및 죽음으로 증상이 진행될 수 있다.

[0012] 보툴리눔 독소 타입 A는 사람에게 알려진 가장 치명적인 천연 생물학제이다. 상업적으로 입수 가능한 보툴리눔 독소 타입 A(정제된 신경독 복합체)의 LD50은 약 50 피코그램이다(즉, 1 유닛). 홍미롭게도, 물을 기준으로 할 때, 보툴리눔 독소 타입 A는 디프테리아보다 18억배, 시안화 나트륨보다 6억배, 코브라 독(cobra toxin)보다 3천만배, 그리고, 콜레라보다 1천2백만배 더 치명적이다. 보툴리눔 독소 1 유닛(U)은, 체중이 각각 18-20g인 암컷 스위스 웹스터 마우스(Swiss Webster mice)에 복강내 주사를 통한 LD50로서 정의할 수 있다.

[0013] 일반적으로 면역학적으로 구별되는 7개의 보툴리눔 신경독은, 타입-특이적인 항체로 중화하여 구별되는 각각 신경독 세로타입(serotype) A, B, C1, D, E, F 및 G로 특징 지워진다. 상이한 세로타입의 보툴리눔 독소는 작용하는 동물 중 및 일으키는 마비의 정도 및 지속시간에 따라 차이가 있다. 예를 들어, 랫드에서 발생하는 마비율로 측정할 때, 보툴리눔 독소 타입 A는 보툴리눔 독소 타입 B에 비하여 500배 더 강력한 것으로 측정되었다. 또한, 보툴리눔 독소 타입 B는, 보툴리눔 독소 타입 A 영양류 LD50의 약 12배인 480U/kg을 영양류에 투여할 때도 독성이 없는 것으로 측정되었다. 보툴리눔 독소는 콜린성 운동 뉴런에 강한 친화도를 가지고 결합하고, 뉴런으로 들어가 아세틸콜린의 방출을 억제하는 것으로 여겨진다. 식세포작용 및 음세포작용에 의해서 뿐 아니라, 낮은 친화도 수용체를 통하여 추가로 흡수될 수 있다.

[0014] 세로타입에 관계없이, 독소 중독의 분자적 메카니즘은 유사하며, 적어도 3 단계로 구성되는 것으로 보인다. 이 과정의 첫 번째 단계에서는, 독소의 중쇄(H 사슬 또는 HC)와 세포 표면 수용체의 특이적인 상호작용에 의해서, 독소가 표적 뉴런의 시냅스 전 막에 결합하는 것이며, 이 수용체는 보툴리눔 독소 타입 및 파상풍 독소 타입 각각에 따라 다른 것으로 여겨진다. 세포 표면에 대한 독소의 표적화에는 중쇄의 카르복실 말단 단편, Hc이 중요한 것으로 여겨진다.

[0015] 두번째 단계에서는, 독소가 중독된 세포의 원형질막을 가로질러 통과한다. 일차로 보툴리눔 독소는 수용체-매개 엔도시토시스를 통하여 세포에 의해서 감싸져서, 독소를 포함하는 엔도솜이 형성된다. 그리고 나서, 독소는 엔도솜을 빠져나와 세포의 세포질로 들어간다. 이 단계는 약 pH 5.5 이하에서 독소의 구조 변경을 유발하는 중쇄의 아미노 말단 단편, HN에 의해서 매개되는 것으로 여겨진다. 엔도솜은 엔도솜 내부 pH를 감소시키는 양성자 펌프를 가지는 것으로 알려져 있다. 구조적 위치이동으로 인해 독소의 소수성 잔기가 노출되어, 독소가 엔도솜 막으로 둘러싸일 수 있게 된다. 그리고 나서, 독소(또는 최소한 경쇄)는 엔도솜 막을 통하여 시토졸로 전위된다.

[0016] 보툴리눔 독소 활성화 메카니즘의 마지막 단계는 중쇄와 경쇄를 연결하는 디설파이드 결합의 환원을 포함하는 것으로 여겨진다. 보툴리눔 및 파상풍 독소의 전체 독성 활성은 완전독(holotoxin)의 경쇄에 포함되며, 경쇄는 인식, 및 신경전달물질-함유 소포(vesicle)와 원형질 막의 세포질 표면과의 도킹, 및 원형질 막과 소포와의 용

함께 꼭 필요한 단백질을 선택적으로 절단하는 아연(Zn^{++}) 엔도캡티다아제이다. 과상풍 신경독, 보툴리눔 독소 타입 B, D, F 및 G는 시냅토프레빈(또는 소포-관련 막 단백질(VAMP)라 칭함), 시냅토크스 막 단백질의 분해를 야기한다. 시냅스 소포의 세포질 표면에 존재하는 VAMP은 대부분 이러한 분해작용 중 하나의 결과로 제거된다. 세로타입 A 및 E는 SNAP-25를 절단한다. 세로타입 C1은 원래 신택신을 절단하는 것으로 여겨졌으나, 신택신 및 SNAP-25를 절단하는 것으로 밝혀졌다. 동일한 결합을 절단하는 타입 B(및 과상풍 독소)를 제외하고는, 각각의 독소는 상이한 결합을 특이적으로 절단한다. 각각의 이러한 절단은 소포-막 도킹의 과정을 방해하여 소포 내용물의 엑소시토시스를 막는다.

[0017] 보툴리눔 독소는 활동향진성 골격근을 특징으로 하는 신경근육 장애(즉, 운동 장애)의 치료를 위해 임상에서 사용되고 있다. 1989년에, 보툴리눔 독소 타입 A 콤플렉스는 미국 식품의약청에 의해서, 본태성 안검경련, 사시 및 반측안면 경련의 치료에 사용되는 것이 승인되었다. 이어서, 보툴리눔 독소 타입 A는 또한 FDA로부터 경부 디스토니아의 처치 및 미간 주름의 처치에 대해 승인되었고, 보툴리눔 독소 타입 B도 경부 디스토니아의 처치에 대하여 승인되었다. 독소 타입 A 이외의 보툴리눔 세로타입들은 보툴리눔 독소 타입 A와 비교할 때, 활성에 있어서 더 낮은 효력 및/또는 더 짧은 지속시간을 가지는 것으로 보인다. 말초 근육내 주사된 보툴리눔 독소 타입 A의 임상 효과는 보통 주사 후 일주일 이내에 나타난다. 일회 보툴리눔 독소 타입 A의 근육 내 주사에 의한 증상 구제의 전형적인 지속시간은 평균 약 3 개월이나, 상당히 더 긴 기간 동안의 치료 활성이 보고되었다.

[0018] 모든 보툴리눔 독소 세로타입이 신경근육 접합부에서 신경전달물질 아세틸콜린의 방출을 억제하는 것으로 보인다 하더라도, 이들은 상이한 신경분비성 단백질에서 작용하며, 및/또는 이 단백질을 상이한 부위에서 절단한다. 예를 들어, 보툴리눔 타입 A 및 E는 모두 25kD 시냅토크스 관련 단백질(SNAP-25)을 절단하지만, 이 단백질의 상이한 아미노산 서열을 표적으로 한다. 보툴리눔 독소 타입 B, D, F 및 G는 소포 관련 단백질(VAMP, 소위 시냅토프레빈)에 작용하며, 각각의 세로타입은 이 단백질의 상이한 부위를 절단한다. 마지막으로, 보툴리눔 독소 타입 C1은 신택신 및 SNAP-25를 모두 절단하는 것으로 보인다. 이러한 작용 메커니즘의 상이성은 여러 보툴리눔 독소 세로타입들의 작용에 의한 상대적인 효력 및/또는 지속시간에 영향을 미칠 것이다. 특히, 보툴리눔 독소의 기질을 여러 상이한 세포 타입에서 발견할 수 있다.

[0019] 보툴리눔 독소 단백질 분자의 분자량은, 알려진 보툴리눔 독소 세로타입 7가지 모두에서, 약 150kD이다. 홍미롭계도, 클로스트리디움계 박테리아에 의해서, 보툴리눔 독소는 관련된 비독성 단백질과 함께 150kD 보툴리눔 독소 단백질 분자를 포함하는 복합체로서 방출된다. 그러므로, 보툴리눔 독소 타입 A 복합체는 클로스트리디움계 박테리아에 의해서, 900k, 500k 및 300kD 형으로 생성될 수 있다. 보툴리눔 독소 타입 B 및 C1은 700kD 또는 500kD 복합체로서만 생성되는 것으로 보인다. 보툴리눔 독소 타입 D는 300kD 및 500kD 복합체로서 생성된다. 마지막으로, 보툴리눔 독소 타입 E 및 F는 약 300kD 복합체로서만 생성된다. 이 복합체들(즉, 분자량이 약 150kD 보다 큰 것)은 비독성 적혈구응집소 단백질 및 비독소 및 비독성 비적혈구응집소 단백질을 포함하는 것으로 여겨진다. 이러한 두가지 비독소 단백질(보툴리눔 독소 분자와 함께 관련 신경독 복합체를 포함하는)은 보툴리눔 독소 분자 변성에 대한 안정성 및 독소가 섭취될 때 소화성 산에 대한 보호를 제공하는 데에 작용할 것이다. 또한, 보툴리눔 독소 복합체가 더 클수록(분자량이 약 150kD 이상), 보툴리눔 독소 복합체가 근육 주사된 부위로부터 보툴리눔 독소가 더 천천히 확산될 것이다.

[0020] 또한 in vitro 연구에서, 보툴리눔 독소가 뇌간 조직의 일차 세포 배양물로부터 아세틸콜린 및 노르에피네프린의 칼륨 양이온 유도 방출을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 보툴리눔 독소는 척수 뉴런의 일차 배양물에서 글리신 및 글루타메이트의 유발 방출을 억제하며, 뇌 시냅토크스 표본에서 신경전달물질 아세틸콜린, 도파민, 노르에피네프린, CGRP, 물질 P(substance P) 및 글루타메이트 각각의 방출을 억제하는 것으로 보고되었다. 따라서, 적당한 농도로 사용하는 경우, 보툴리눔 독소에 의해서 대부분의 신경전달물질의 자극-유발 방출이 억제된다.

[0021] 보툴리눔 독소 타입 A는 발효조에서 클로스트리디움 보툴리눔의 배양물을 만들어 배양한 다음, 발효 혼합물을 공지의 방법으로 수확 및 정제하여 얻을 수 있다. 처음에는 모든 보툴리눔 독소 세로타입이, 프로테아제에 의해 절단 또는 닉킹되어(nicked) 신경활성화되어야만 하는, 비활성 단일 사슬 단백질로서 합성된다. 보툴리눔 독소 세로타입 A 및 G를 생성하는 박테리아 균주는 내재성 프로테아제를 지니며, 따라서 세로타입 A 및 G는 박테리아 배양물로부터 주로 활성형으로서 회수될 수 있다. 이와 대조적으로, 보툴리눔 독소 세로타입 C1, D 및 E는 비단백분해성 균주에 의해 합성되므로, 배양물에서 회수될 때 전형적으로 비활성화된 상태이다. 세로타입 B 및 F는 단백질분해성 및 비단백분해성 균주 모두에 의해서 생성되므로, 활성 또는 비활성 형으로 회수될 수 있다. 그러나, 예를 들어, 보툴리눔 독소 타입 B 세로타입을 생성하는 단백질분해성 균주는 생성된 독소의 일부만을 절

단한다. 닉킹되지 않은 분자에 대한 닉킹된 분자의 정확한 비율은 배양시간 및 배양물의 온도에 따라 다르다. 그러므로, 이미 알려진 바와 같이, 보툴리눔 독소 타입 A에 비해 보툴리눔 독소 타입 B는 효력이 상당히 낮기 때문에, 예를 들어, 소정 백분율의 어떤 표본의 보툴리눔 독소 타입 B 독소도 비활성일 것이다. 임상 표본에서 비활성 보툴리눔 독소 분자의 존재는 표본의 총체적인 단백질 부하에 기여할 것이며, 이는 임상적인 효과에는 기여하지 않으면서 항원성의 증가와 연관된다. 또한, 동일한 투여량 레벨에서 보툴리눔 독소 타입 B는 보툴리눔 독소 타입 A에 비하여, 근육 주사시, 활성의 지속시간이 더 짧고 또한 효력이 떨어지는 것으로 알려져 있다.

[0022] 클로스트리디움 보툴리눔의 홀 A 종(Hall A strain)으로부터 $\geq 3 \times 10^7$ U/mg이고, A260/A278이 0.60 이하이고, 겔 전기영동에서 독특한 밴드 패턴을 보이는 특징을 가지는, 질 높은 결정형 보툴리눔 독소 타입 A를 얻을 수 있다. 공지의 산츠 프로세스(Shantz process)를 결정형 보툴리눔 독소 타입 A를 얻는데 사용할 수 있다. 일반적으로, 보툴리눔 독소 타입 A 복합체는 적절한 배지에서 클로스트리디움 보툴리눔 타입 A를 배양한 혐기성 발효물로부터 분리 및 정제될 수 있다. 이러한 공지의 프로세스는 또한, 예를 들어: 분자량이 약 150 kD이고, 특이적인 효력이 $1-2 \times 10^8$ LD50 U/mg 이상인 보툴리눔 독소 타입 A를 정제하거나; 분자량이 약 156 kD이고, 특이적인 효력이 $1-2 \times 10^8$ LD50 U/mg 이상인 보툴리눔 독소 타입 B를 정제하거나; 분자량이 약 155 kD이고, 특이적인 효력이 $1-2 \times 10^7$ LD50 U/mg 이상인 보툴리눔 독소 타입 F를 정제하는 등의, 비독소 단백질들로부터 순수한 보툴리눔 독소들을 분리하여 얻는데 사용할 수 있다.

[0023] 보툴리눔 독소 및/또는 보툴리눔 독소 복합체를 당업계에 공지된 화합물 제조업체로부터 상업적으로도 입수할 수 있으며, 순수한 보툴리눔 독소를 또한 약제학적 조성물을 제조하는 데 사용할 수 있다.

[0024] 일반적으로 효소에서 그렇듯이, 보툴리눔 독소들(이들은 세포내 펩티다아제임)의 생물학적 활성은, 적어도 일부분, 그들의 3차원적 구조에 따라 달라진다. 그러므로, 보툴리눔 독소 타입 A는 열, 다양한 화학물질, 표면 긁힘 및 표면 건조에 의해서 독성이 제거될 수 있다. 또한, 공지의 배양, 발효 및 정제에 의해 얻어진 독소 복합체를 아주 아주 낮은 독소 농도로 희석하여 약제학적 조성물 제조에 사용하는 경우, 적합한 안정화제가 없으면, 독소의 독성이 빠르게 제거된다는 것이 공지되어 있다. 대량으로 희석하면 특이적 독성이 빠르게 손실되기 때문에, 수 밀리그램 양의 독소를 밀리리터당 수 나노그램을 함유하는 용액으로 희석하는 것은 상당히 어렵다. 독소를 함유하는 약제학적 조성물을 제조한 후, 수개월 또는 수년동안 사용할 수 있기 때문에, 독소는 적합한 안정화제를 사용하여 안정화하여야만 한다. 따라서 본 발명과 같이, 보툴리눔 독소를 생체 내에서 서방형으로 방출 조절하기 위해서는 최적의 안정화제 기술의 개발이 필수적이라고 할 것이다.

[0025] 하기와 같이, 임상 세팅에서 보툴리눔 독소 타입 A를 사용하는 것이 보고되었다.

[0026] 생체 내에서 일회성으로 투여된 보툴리눔 독소에서 근육내 주사의 일반적인 지속시간은 전형적으로 약 3 내지 4 개월이다. 그러나 경우에 따라 A 아형은 12 개월 이상 효능을 지속할 수 있으며(European J. Neurology 6 (Supp 4): S111-S1150 : 1999), 다한증과 같은 선(gland)의 치료에 사용되는 경우, 어떤 상황에서는 27 개월 동안 지속될 수 있다.

[0027] 보툴리눔 독소는 말초 부위에서 약리학적 작용을 나타낼 뿐 아니라, 중추 신경계에서도 억제 효과를 나타낼 수 있다. Weigand 등의 연구, Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1976; 292,161-165, 및 Habermann, Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1974; 281,47-56는 보툴리눔 독소가 역행 수송에 의해서 척수 영역으로 거슬러 올라갈 수 있다는 것을 보여준다. 이와 같이, 말초 부위에 예를 들어, 근육내로 투여된 보툴리눔 독소는, 척수로 역행 수송될 수 있다.

[0028] 보툴리눔 독소는 또한 피부, 뼈 및 건의 상처(미국 특허 6,447,787호), 초내 통증(미국 특허 6,113,915 참조), 다한증을 포함하는 다양한 자율신경계 신경 기능장애(미국 특허 5,766,605호 및 Goldman(2000), Aesthetic Plastic Surgery Jul-Aug 24(4):280-282 참조), 긴장성 두통(미국 특허 6,458,365호), 편두통 통증(미국 특허 5,714,468호), 수술-후 통증 및 내장 통증(미국 특허 6,464,986호), 모발 성장 및 모발 유지(미국 특허 6,299.893호), 건선 및 피부염(미국 특허 5,670,484호), 손상된 근육(미국 특허 6,423,319호), 다양한 암(미국 특허 6,139,845호 및 6,063,768), 평활근 장애(미국 특허 5,437,291호), 신경 포착 증후군(미국 특허출원 2003 0224019), 좌창(WO 03/011333), 신경성 염증(미국 특허 6,063,768호), 안과질환(미국 특허 6,265,379 참조), 궤양질환(미국특허 6,143,306 및 6,261,572 참조); 전립선 비대증, 전립선 암 및 요실금을 포함하는 전립선 질환(미국 특허 6,365,164 및 6,667,041 및 Doggweiler R., et al Botulinum toxin type A causes diffuse and highly selective atrophy of rat prostate, Neurorol Urodyn 1998;17(4):363 참조); 섬유조직염(미국 특허

6,623,742호), 이상근 증후군(Childers et al. (2002), American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation, 81 :751-759 참조)을 치료하기 위하여 제안되었거나 시도되었다.

[0029] 미국 특허 제5,989,545호에는 특정 표적 잔기에 화학적으로 컨주게이트되거나, 재조합적으로 융합된 변형 클로스트리디움 신경독 또는 이의 단편, 바람직하게는 보툴리눔 독소를, 척수에 투여하여, 통증을 처치하는 데 사용될 수 있음이 개시되어 있다. 또한, 다양한 질환을 처치하는 데 있어서 표적화된 보툴리눔 독소(즉, 비-천연 결합 잔기를 가진)가 사용될 수 있다는 것이 개시되어 있다(WO 96/33273; WO 99/17806; WO 98/07864; WO 00/57897; WO 01/21213; WO 00/10598 참조).

[0030] 또한 보툴리눔 독소를 흉근에 주사하여 흉근경련을 조절하는 기술도 공지되었고(Senior M., Botox and the management of pectoral spasm after subpectoral implant insertion, Plastic and Recon Surg, July 2000, 224-225), 경피 보툴리눔 독소 투여(미국 특허출원 제 10/194,805호)의 경우와 같이, 제어 방출 독소 임플란트(미국특허 6,306,423 및 6,312,708 참조)가 공지되어 있다. 툴리눔 독소를, 입의 씹거나 무는(biting) 근육을 약화시켜 자신이 입히는 상처 및 얻어지는 궤양을 치료하고(Payne M., et al, Botulinum toxin as a novel treatment for self mutilation in Lesch-Nyhan syndrome, Ann Neurol 2002 Sep; 52(3 Supp 1):S157), 양성 담낭 손상 또는 종양을 치료하고(Blugerman G., et al., Multiple eccrine hidrocystomas: A new therapeutic option with botulinum toxin, Dermatol Surg 2003 May; 29(5):557-9), 치열을 치료하고(Jost W., Ten years' experience with botulinum toxin in anal fissure, Int J Colorectal Dis 2002 Sep; 17(5):298-302), 및 특정 형태의 아토피성 피부염을 치료하기 위하여(Heckmann M., et al. Botulinum toxin type A injection in the treatment of Lichen simplex: An open pilot study, J Am Acad Dermatol 2002 Apr; 46(4):617-9) 사용할 수 있다는 것이 알려져 있다.

[0031] 또한, 보툴리눔 독소 신경 저해가 상피 두께의 감소를 가져올 수 있다고 보고되어 있다(Li Y, et al., Sensory and motor denervation influences epidermal thickness in rat foot glabrous skin, Exp Neurol 1997; 147:452-462). 마지막으로, 과도한 발의 발한(Katsambas A., et al., Cutaneous diseases of the foot: Unapproved treatments, Clin Dermatol 2002 Nov-Dec; 20(6):689-699; Sevim, S., et al, Botulinum toxin-A therapy for palmar and plantar hyperhidrosis, Acta Neurol Belg 2002 Dec; 102(4): 167-70), 경직성 발가락(Suputtitada, A., A., Local Botulinum toxin type A injections in the treatment of spastic toes, Am J Phys Med Rehabil 2002 Oct; 81(10):770-5), 특발성 발가락 보행(Tacks, L., et al., Idiopathic toe walking: Treatment with botulinum toxin A injection, Dev Med Child Neurol 2002; 44(Suppl 91):6), 및 발 근긴장이상(Rogers J., et al., Injections of botulinum toxin A in foot dystonia, Neurology 1993 Apr; 43(4 Suppl 2))을 치료하기 위하여 발에 보툴리눔 독소를 투여하는 것이 알려져 있다.

[0032] 파상풍 독소(tetanus toxin)와, 이의 유도체(즉, 비-천연 표적 잔기를 가진), 단편, 하이브리드 및 키메라를 또한 치료에 사용할 수 있다. 파상풍 독소는 보툴리눔 독소와 많이 유사하다. 따라서, 파상풍 독소 및 보툴리눔 독소는 모두 가깝게 연관된 종의 클로스트리디움(각각, 클로스트리디움 테타니 및 클로스트리디움 보툴리눔)에 의해 생성되는 폴리펩티드이다. 또한, 파상풍 독소와 보툴리눔 독소는 모두, 단일 디설파이드 결합에 의해서 중쇄(분자량 약 100kD)에 공유 결합된 경쇄(분자량 약 50kD)로 구성된 2중 사슬 단백질이다. 그리고, 파상풍 독소 및 각각 7가지 보툴리눔 독소(비-복합체)의 분자량은 약 150kD이다. 또한, 파상풍 독소와 보툴리눔 독소 모두에서, 경쇄는 세포내 생물학적(프로테아제) 활성을 가지는 도메인을 포함하는 반면에, 중쇄는 수용체 결합(면역원성) 및 세포 막 전위 도메인을 포함한다.

[0033] 또한, 파상풍 독소와 보툴리눔 독소는 모두, 시냅스전 콜린성 뉴런 표면의 갱글리오사이드 수용체에 대하여 크고, 특이적인 친화도를 나타낸다. 말초 콜린성 뉴런에 의한, 파상풍 독소의, 수용체 매개 엔도시토시스로 인하여, 축삭돌기 역행수송, 중앙 시냅스로부터의 억제성 신경전달물질 방출 차단 및 경련성 마비가 나타난다. 이에 반하여, 말초 콜린성 뉴런에 의한, 보툴리눔 독소의 수용체 매개 엔도시토시스는 역행 수송, 중독된 말초 운동 뉴런으로부터의 아세틸콜린 엑소시토시스의 억제 및 이완성 마비를 거의 일으키지 않는다.

[0034] 끝으로, 파상풍 독소 및 보툴리눔 독소는 생합성 및 분자 구성 모두에 있어 서로 닮아있다. 따라서, 파상풍 독소와 보툴리눔 독소 타입 A는 단백질 서열이 전체에 걸쳐 34% 동일하며, 몇몇 기능성 도메인에서는 서열이 62%나 동일하다(Binz T. et al., The Complete Sequence of Botulinum Neurotoxin Type A and Comparison with Other Clostridial Neurotoxins, J Biological Chemistry 265 (16); 9153-9158: 1990).

- [0035] 본 발명의 일 구체예에서 “아세틸콜린”이란, 콜린과 아세트산의 에스테르로 처음으로 발견된 신경전달물질. 뉴런 전체에 분포하며 화학식은 $C_7H_{16}NO_2$, 분자량은 146.21 이다.
- [0036] 몇몇 신경조절물질이 동일한 뉴런에 의해 방출될 수 있는 것을 제시하는 증거가 있지만, 전형적으로 포유류 신경계에서는, 각각의 형태의 뉴런에 의해서 단일 형태의 작은 분자 신경전달물질만이 방출된다. 이 신경전달물질 아세틸콜린은 뇌의 여러 부위의 뉴런, 특히, 운동피질의 큰 피라미드 세포, 대뇌핵의 몇 가지 상이한 뉴런, 골격근에 분포하는 운동 뉴런, 자율신경계(교감신경계 및 부교감신경계 모두)의 신경절이전 뉴런, 근방추 섬유(bag 1 섬유, 부교감신경계의 신경절이후 뉴런 및 교감신경계의 신경절이후 뉴런 몇가지에 의해서 분비된다. 본래, 대부분의 교감신경계의 신경절이후 뉴런은 신경전달물질인 노르에피네프린을 분비하는데 비하여, 땀샘, 기모근 및 몇몇 혈관으로의 신경절이후 교감신경 섬유만이 콜린성이다. 대부분의 경우, 아세틸콜린은 흥분효과를 나타낸다. 그러나, 아세틸콜린이 몇몇 말초 부교감신경 말단에서는 억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(예를 들어, 미주신경에 의한 심장박동의 억제).
- [0037] 자율신경계의 원심성 신호는 교감신경계 또는 부교감신경계를 통하여 몸에 전달된다. 교감신경계의 신경절이전 뉴런은 척수의 중간외측각에 위치하는 신경절이전 교감 뉴런 세포체로부터 뻗어 나온다. 세포체로부터 뻗어 나온 신경절이전 교감신경 섬유는, 척추주위 교감 신경절 또는 척추전 신경절에 위치하는 신경절이후 뉴런과 시냅스를 이룬다. 교감신경계 및 부교감신경계의 신경절이전 뉴런은 모두 콜린성이므로, 신경절에 아세틸콜린을 적용하면 교감 및 부교감 신경절이후 뉴런을 흥분시킬 것이다.
- [0038] 아세틸콜린은 두가지 형태의 수용체, 무스카린성 수용체 및 니코틴성 수용체를 활성화시킨다. 무스카린성 수용체는 부교감신경계의 신경절이후 뉴런 및 교감신경계의 신경절이후 콜린성 뉴런에 의해서 자극된 모든 효과기(effector) 세포에서 발견된다. 니코틴성 수용체는 부신 수질뿐 아니라, 교감신경계 및 부교감신경계 모두의 신경절이전과 신경절이후 뉴런 사이의 시냅스에서 신경절이후 뉴런의 세포 표면에 있는 자율신경절 내에서 발견된다. 니코틴성 수용체는 또한 많은 비자율 신경말단, 예를 들어, 신경근육 접합부의 골격근 섬유의 막에서 발견된다.
- [0039] 아세틸콜린은, 작고 투명한, 세포내 소포가 시냅스전 뉴런성 세포막과 융합될 때, 콜린성 뉴런으로부터 방출된다. 부신수질(또한, PC12 세포라인) 및 췌장의 섬세포와 같은, 광범위한 비-뉴런성 분비 세포는 큰 고밀도 중심소포(large densecore vesicle)로부터 각각 카테콜아민 및 부갑상선 호르몬을 방출한다. PC12 세포라인은 교감신경부신 발달(sympathoadrenal development) 연구를 위한 조직 배양 모델로서 광범위하게 사용되는 랫드 크롬친화성세포종 세포의 클론이다. 탈신경된 세포에 독소를 투과 가능하게 하거나(전기충격법 등에 의해서), 직접 주사하면, 보툴리눔 독소는 in vitro에서 두 가지 세포종류 모두에서 두 가지 화합물 종류의 방출을 모두 억제한다. 보툴리눔 독소는 또한 피질의 시냅소솜 세포 배양물로부터 신경전달물질인 글루타메이트가 방출되는 것을 억제하는 것으로 알려져 있다.
- [0040] 신경근육 접합부는 근육세포의 주변 축색돌기에 의해서 골격근에서 형성된다. 신경계를 통하여 전달된 신호는 말단 축색돌기에서 작용 전위가 되고, 이온 채널을 활성화하며, 그 결과로 예를 들어, 신경근육 접합부의 운동 종판에서, 뉴런내 시냅소성 소포로부터 신경전달물질인 아세틸콜린이 방출된다. 아세틸콜린은 세포의 공간을 가로질러 근육 종판 표면의 아세틸콜린 수용체 단백질과 결합한다. 일단 충분히 결합되면, 근육 세포의 작용 전위가 특이적인 막 이온 채널 변화를 일으키고, 그 결과로 근육세포가 수축한다. 그리고 나서, 아세틸콜린은 근육세포로부터 방출되어, 세포의 공간에서 콜린에스테라아제에 의해서 대사된다. 대사생성물은 다시 아세틸콜린으로 재생하기 위해서 말단 축색돌기로 다시 회수된다.
- [0041] 본 발명의 일 구체예에서 “중추”란, 개체에 있어서 중추신경이 지나가는 통로로써, 본 명세서에 있어서 중추란 소뇌연수조, 환추후두막, 및 경뇌막을 의미한다.
- [0042] 본 발명의 일 구체예에서 “말초”란, 개체에 있어서 말초신경이 지나가는 통로로써, 본 명세서에 있어서 말초란 피하를 의미한다.
- [0043] 본 발명의 일 구체예에서 “소뇌연수조(cerebellomedullary cistern)”란, 소뇌의 아래쪽과 숨뇌의 뒤쪽 사이에 거미막밑 공간이 커져 있는 곳으로, “뿔소뇌 숨뇌 수조”라고도 명명한다. 지주막하강중 가장 넓다. 이 강

(腔)의 천정(天井)으로부터 외벽을 소뇌의 정상에서 연수미부(延髓尾部)로 뻗은 지주막이 만들고, 바닥은 제4뇌실의 맥락판의 연막으로 되어 있다. 이 조(槽)를 천자하여 뇌척수액을 채취한다(후두하천자).

[0044] 본 발명의 일 구체예에서 “환추후두막(atlanto-occipital membrane)”이란, 환추후두관절을 둘러싸고 있는 막으로 탄성섬유가 풍부하다. 환추후두관절은 제1경추와 후두골과 연결되어 있고 관절두는 후두골 대후두공의 양 외측에 있는 돌출이며 관절와는 환추의 상관절와이다. 형상은 과상관절(顆狀關節)이기 때문에 이 관절의 운동은 전후 및 측굴이 가능하다. 환추후두막은 전과 후로 구분하여 전환추후두막 및 후환추후두막으로 명명한다.

[0045] 본 발명의 일 구체예에서 “경뇌막(dure membrane)”이란, 뇌막의 일종이다. 뇌를 둘러싸고 있는 뇌막은 3층의 막으로 구성되는데, 경뇌막은 두개골 안에서 뇌의 바깥쪽을 둘러싸고 있다. 뇌경질막 또는 경막이라고도 명명한다. 두개강 안쪽으로 경질막 주름이 나와서 뇌를 몇 개의 구역으로 나누어준다. 일반적으로 경질막주름은 2겹의 경질막층으로만 구성되어 있다. 뇌경질막 주름으로는 대뇌넛, 소뇌천막, 소뇌넛, 안장가로막이 있다. 뇌경질막은 감각신경과 자율신경이 많이 분포해 있다. 감각신경은 3차신경과 제1~3경수신경 가지이며, 자율신경 대부분은 뇌막 혈관에 분포한다. 뇌 자체는 감각신경이 없어서 통증을 느끼지 못하므로 대부분의 두통은 뇌막이나 뇌혈관에 분포하는 신경으로부터 비롯한다.

[0046] 본 발명의 일 구체예에서 “뇌정위고정”이란, 뇌질환의 최소상처, 무혈 수술 등 두개골 및 뇌내의 정확한 위치를 찾기 위해 X, Y, Z 좌표가 새겨진 정위틀을 이용하여 머리를 고정시키는 것으로, 뇌정위수술(Framelink stereotatic surgery)을 위해 많이 이용된다. 뇌정위고정을 시행하고 CT, 또는 MRI를 촬영하면 필름에 병소의 크기와 위치 등이 3차원적으로 표시되므로, 집도의는 이 좌표를 토대로 병소까지 도달하는 가장 안전하고 효과적인 수술계획을 설계한 뒤 수술을 진행할 수 있다. 이러한 방법으로 뇌 속에 고인 핏물이나 고름 등은 대부분 개두술 없이 제거가 가능하다.

[0047] 본 발명의 일 구체예에서 “감각수용기(sensory receptor)”란, 감각신경 말단으로, 생명체 내·외부 환경의 자극에 반응하여 감각을 전달하는 일차적 수용기를 의미한다. 감각수용기는 감각에 의해 흥분시 동일한 세포나 인접한 세포 내에서 차등 전위나 활동 전위를 만들어 중추신경계로 자극을 전달한다. 감각수용기는 ①적합자극에 따라, ②위치에 따라, ③형태에 따라, 또는 ④적응 속도에 따라 분류한다.

[0048] 상세하게, ①적합자극에 따라, 압수용기(baroreceptor)는 혈관에 걸리는 압력에 반응하고, 화학수용기는 화학 자극에 반응하며, 전자기 방사선 수용기는 전자기파에 반응하며, 적외선 수용기는 적외선에 반응하며, 광수용기는 가시광선에 반응하며, 자외선 수용기는 자외선에 반응하며, 전기수용기는 전기장에 반응하며, 자기수용기(Magnetoreceptors)는 자기장에 반응하며, 기계수용기는 물리적인 부하나 변형에 반응하며, 통각수용기(nociceptor)는 신체 조직에 상처나 상처를 입히려는 위협에 반응하며, 삼투수용기는 용액의 삼투 농도에 반응하며, 고유수용기(proprioceptor)는 자세 감각에 반응하며, 온도수용기는 뜨겁거나 차가운 것에 반응한다.

[0049] ②위치에 따라, 피부에 존재하는 피부 수용기는 피부 기계수용기, 온도수용기, 통각수용기, 및 화학수용기를 포함하고, 피부 기계수용기는 루피니 소체, 마이스터 소체, 파치니 소체, 메르켈 원반 및 자유신경종말로 구성되며, 루피니 소체는 피부의 신장 자극을 받아들이고, 마이스터 소체는 느린 진동과 쓰다듬기, 질감 변화를 감지하며, 파치니 소체는 강한 압력과 빠른 진동을 감지하며, 메르켈 원반은 일정한 압력과 질감을 감지한다. 온도수용기는 크라우제 소체를 포함하고 온도 변화를 감지한다. 피부와 별개로 근육에는 골격근 반사에 관여하는 고유수용기가 있는데, 근방추는 대표적인 근육에 있는 기계수용기이다. 근육이 수축 또는 이완하면 근육 길이에 대한 정보를 척수와 뇌로 보낸다. 또한 골지 힘줄 기관은 제길이수축을 하는 근육 장력에 반응하며, 관절수용체는 뼈의 위치에 따라 변화하는 뒤틀림에 의해 활성화된다.

[0050] ③형태에 따라, 피부 표면 근처에 있는 체성 감각 수용기는 크게 두 부류로 나뉘는데, 뉴런의 끝부분이 탈수초화 상태인 자유신경종말과 피막이 있는 수용기이다.

[0051] ④적응 속도에 따라, 긴장성 수용기(tonic receptor)와 위상성 수용기(phasic receptor)로 구분할 수 있다. 긴장성 수용기는 자극에 느리게 적응하는 감각 수용기이다. 자극이 지속되는 동안 계속해서 활동 전위를 만들어내므로 자극의 지속 시간에 대한 정보를 전달할 수 있다. 어떤 긴장성 수용기는 항상 활성 상태이다. 통증

수용기, 관절낭, 근방추에 있는 수용기가 대표적인 긴장성 수용기이다. 위상성 수용기는 자극에 빠르게 적응하는 감각 수용기이다. 자극에 대해서 세포는 반응하고 금세 적응하므로 자극의 지속 시간에 대한 정보를 제공할 수 없다. 대신 빠르게 변화하는 자극의 강도와 속도 변화에 대한 정보를 전달할 수 있다. 위상성 수용기의 예로는 파치니 소체가 있다.

[0052] 본 발명의 일 구체예에서 “통증(pain)”이란, 실제적, 잠재적인 조직 손상 또는 피해, 악영향 등으로 서술될 수 있는 불쾌한 감각적 또는 감정적 경험을 의미한다. 통증은 우리로 하여금 잠재적인 위험 상황으로부터 피할 수 있도록 하며, 손상된 신체 부위가 회복될 때까지 보호하는 역할을 하고, 미래에 일어날 수 있는 상황을 회피할 수 있게 한다. 통증은 말초신경계에 위치한 감각수용기가 자극됨에 의해 시작되거나 말초신경계나 중추신경계의 손상 또는 기능 장애에 의해 비롯된다. 대부분의 통증은 자극이 사라지거나 신체의 손상이 회복됨과 동시에 사라지지만, 때로는 그 후까지도 지속되기도 한다. 또 어떤 자극도 없고 병적 원인이 없음에도 불구하고 고통이 생기는 경우도 있다. 다른 한편으로는 선천적으로 통증을 느끼지 못하는 사례가 보고되기도 한다. 통증은 많은 의학적 상태에서 나타나는 주된 증상이며 인간이 삶을 영위하고 기본적인 기능을 해가는 데 심각한 영향을 줄 수 있다.

[0053] 통증은 크게 체성적 통증, 정신적 통증, 및 환상통으로 분류할 수 있고, 체성적 통증은 신체적 변화에 의해서 유발되는 것을 의미하며 정신적 통증은 마음의 변화에 의해서 유발되는 것을 의미한다. 체성적 통증은 다시, 감각기관의 활성화로 인한 감각적 통증과 신경계로부터 유발되는 신경적 통증으로 나눌 수 있다. 감각적 통증은 감각수용기에 수용된 자극에 말초신경섬유가 반응하는 과정이다. 감각적 통증은 열에 의한 자극(뜨겁거나 차가움), 기계적 자극(부딪히거나 찢어짐) 또는 화학적 자극(상처 부위를 소독할 때나 눈에 고춧가루가 들어갔을 때)에 의해 유발된다. 신경적 통증은 신경계의 손상이나 기능장애로 인한 것으로, 크게는 말초신경계의 이상과 중추신경계의 이상으로 나뉜다. 신경적 통증은 하나의 병인이나 특정 부위의 손상만으로는 설명되지 않으며, 지속적으로 발생하는 감각장애나 역치 이하의 유해하지 않은 자극에도 통증을 느끼는 이질통(allodynia)과 같은 것을 말한다. 신경통은 오랜 시간동안 계속해서 지속되거나 전기 충격과 같이 간헐적으로 발생하기도 한다. 감각적 통증은 쑤시거나 아리는 느낌을 주는 반면, 신경통 환자들은 그 통증을 가려움, 저림, 무감각, 타는 듯한 느낌, 동통, 바늘로 찌르는 느낌으로 표현한다. 인구의 7% 내지 8%의 사람들이 이러한 통증을 호소하고 있으며 이중 5%는 매우 심각한 통증을 겪는 것으로 보고되어 있다. 특히 암 환자들의 경우 종양이 말초신경계를 압박하거나 화학요법, 방사선 치료, 수술의 부작용으로 이러한 통증을 겪는 경우가 많다. 정신적 통증은 정신성통증(psychalgia) 또는 신체형통증장애(somatiform pain)로 불리며, 정신적, 감정적, 행동적 요인으로 인해 통증이 유발되어 점차적으로 증가하고 지속됨에 따라 나타나는 통증이다. 때때로 두통, 요통, 복통과 같은 체성적 통증을 정신적 통증으로 인한 것으로 진단하기도 한다. 정신적 통증은 정신 질환을 앓는 환자들에게서는 오히려 드물게 나타나고, 현대인들에게서 더 많이 관찰되는데 사람들이 삶에서 사회적 소외감을 느끼거나 마음에 상처를 받는 경우, 슬픔을 느끼는 등의 감정적 사건들에서 더 자주 유발된다. 정신적 통증은 스트레스나 감정적 갈등을 표출하지 못함으로 인해서 생기며, 사회심리적 문제들 또는 다양한 정신적 문제에 의해서 유발된다. 몇몇 학자들은 이러한 통증이 분노가 무의식적으로 분출되는 것을 막기 위한 하나의 보호 과정이라고 해석하기도 한다. 오랜 기간 동안 통증을 겪은 사람들은 때때로 히스테리 증상이나 우울증, 건강염려증과 같은 정신적 장애를 갖게 되기도 한다. 이에 대해 학자들은 극심한 상해로 인한 신경증이 만성질환을 가져온다고 주장하기도 했는데, 실제로 보고된 바에 의하면 만성질환이 신경증을 가져올 수도 있다고 알려져 있다. 높은 신경증세척도(neurotic triad)와 불안감, 낮은 자존감과 같은 것들은 의학적 치료에 의해 만성질환이 회복되는 과정에서 점차로 감소하여 정상 수준으로 돌아가게 된다. 환상통은 신체의 일부가 존재하지 않거나 뇌가 더 이상 자극에 대한 신호를 받지 못함에도 불구하고 느끼게 되는 통증으로 일종의 신경적 통증이다. 환상통은 절단 환자에게서 흔히 나타나는 증상으로, 한 연구는 절단술 이후 8일 만에 환상통이 시작되었으며 72%의 절단 환자가 이러한 경험을 하고 있는 것으로 밝혔다. 6개월이 지나도 65%의 환자가 계속해서 환상통을 겪었다. 환상통은 쏘는 듯한 느낌, 으스러짐, 타는 느낌, 경련이 이는 느낌으로 묘사된다. 이러한 통증이 오랜 기간 지속될 경우에는 신체의 온전한 부분이 자극에 민감해질 수 있어, 만지는 것만으로도 환상통을 유발하며 배뇨나 배변을 유발할 수도 있다. 신경이나 절단 부위 인근의 민감한 부분에 국소 마취제를 투여함으로써 며칠, 몇 주로부터 영구적으로까지 통증을 경감시킬 수 있으나 이는 마취제의 효과가 지속되는 동안에 한해서만 가능하다.

[0054] 또한 통증은 신경 전달 기전에 따라 말초성 통증과 중추성 통증으로 분류할 수 있다. 말초성 통증은 대부분의 경우, 통증 자극은 특정 신경 섬유에 인접해 있는 조직에 부분적 손상이 일어남으로써 생긴다. 이러한 조직의 변화는 피부 내의 통각 섬유를 활성화시키는 화학 물질을 분비하여 신경 말단에 작용하도록 하는데,

신경펩티드, 세로토닌, 히스타민 등이 그러한 물질에 해당된다. 진통제 연구에서는 이 물질들이 매우 중요하게 여겨진다. 화학 물질의 결합으로 뉴런에서 발생된 활동 전위는 척수의 배각(dorsal horn)으로 연결되어, 척수에서 시냅스를 이루어 통증 섬유를 자극해 글루타메이트, P물질(Substance P)을 분비시킨다. 그리하여 뇌의 시상까지 통증에 관한 정보를 전달하게 된다. 통증 섬유는 액손(axon) 타입에 따라 미엘린 섬유로 둘러싸인 것(A α , A β , A δ)과 둘러싸이지 않은(C) 것의 크게 두 가지로 나뉘고, 이는 수용체 타입에 따라 차례로 골격근 수용기, 피부의 기계적 감각 수용기, 통증·온도 수용기, 통증·온도·가려움 수용기의 네 가지로 구분된다. 각각의 섬유는 자극의 종류에 따라 역할이 분화되어 있을 뿐 아니라 직경이나, 전도 속도, 역치 수준에서 다른 특징을 가지고 있다. 캡사이신(Capsaicin)에 관한 연구는 자극에 특성화된 통증섬유에 관한 이러한 이론을 뒷받침해 주고 있다. 고추를 먹었을 때 매운 맛을 느끼게 하는 성분인 캡사이신에 반응하는 수용체를 연구하던 학자들은, 이 수용체가 온도의 갑작스러운 상승에도 반응한다는 사실을 발견했다. 이 수용체를 vanilloid receptor 1(VR1)이라 부른다. VR1 수용체가 결핍된 쥐의 경우 기계적 자극에 의한 통증에는 반응을 보였으나, 열이나 캡사이신에 의한 자극에는 반응을 보이지 않았다. 이에 따르면, 매운 고추를 먹었을 때 뜨겁게 느껴지는 이유를 고추에 함유된 캡사이신이 VR1 수용체를 활성화시키기 때문으로 설명할 수 있다. 캡사이신을 피부에 흡수시킬 경우 관절의 통증을 완화시키기도 하는데, 이는 통증 섬유가 과활성화됨에 따라 신경전달물질이 일시적으로 소진되었기 때문일 것으로 풀이된다.

[0055] 중추신경계에서 발생하는 중추성 통증은 특수한 경로를 따라 통증이 전달된다. 신경 정보를 전달하는 말초신경의 구심성 섬유들은 글루타메이트와 같은 전달물질(transmitter)을 사용해 세포를 활성화시키는데, 이 때 신경 조절물질(neuromodulator)로 척수의 배각부에 있는 신경펩티드인 P물질이 함께 분비된다. 예를 들어 캡사이신을 피부 내로 주사할 경우 특정한 통증 자극이 유발됨에 따라 척수에서 P물질이 분비되고, 이것이 시냅스후뉴런의 수용체에 결합함에 따라 통증이 전달되는 것이다. 그 단계는 다음과 같다. ①통증 정보는 미엘린으로 감싸진 A δ 섬유에 의해 빠르게 전달되거나, 미엘린이 없는 C 섬유를 통해 느리게 전달되며, 척수에서 시냅스를 형성한다. ② 이후 배각부 뉴런의 축삭(axon)이 교차가 일어나고, 자극이 척수를 따라 연수, 뇌교를 거치며 올라가게 된다. ③뇌교에 다다른 통증 정보는 소리를 지르는 등 통증에 따른 행동을 조절하는 뇌간 지역에 전달된다. ④ 중뇌를 거친 통증 정보는 시상, 대뇌피질의 많은 지역에 전달된다. ⑤ 통증정보는 전뇌에서 다시 시냅스를 형성하여 전대상엽(cingulate cortex) 지역을 활성화시킨다.

[0056] 본 발명의 일 구체예에서 “악안면통증(Orofacial Pain)”이란, 구강, 턱 및 안면부에 발생하는 통증을 의미한다. 악안면통증은 흔한 증상이며, 치통 치수염 또는 치과 농양과 같은 치과적 원인에 의해 발생하는 경우, 턱 관절 장애에 의해 발생하는 경우, 또는 안면 신경장애로 인해 발생하는 경우 등이 있다.

[0057] 본 발명의 일 구체예에서 “NMDA(N-Methyl-D-aspartic acid)”란, N-메틸-D-아스파르트산염(N-methyl-D-aspartate)의 줄임말로 세포의 사멸과 정상세포 간의 신호전달을 조절하는 것으로 알려진 신경수용체를 자극하는 물질이다. 도파민 D1 수용체와 직접적인 상호작용을 하면서 상호작용의 결과에 따라 세포의 사멸을 조절하거나, 정상적인 세포 사이의 통신을 유도하는 기능을 한다. 이는 D1 수용체와 NMDA 수용체 사이에 일어나는 상호작용에 따라 세포의 사멸이 조절된다는 것을 의미하는 동시에, NMDA 수용체가 세포의 사멸에 직접적으로 관여한다는 것을 의미한다. 더욱이 NMDA 수용체가 D1 수용체와 상호작용할 때는 세포의 사멸과 세포 사이의 신호전달 조절기능이 서로 다른 기작을 통해 독립적으로 진행된다. 다시 말해 세포의 사멸과 세포 사이의 신호전달 기능이 다른 하나의 기능에는 영향을 미치지 않고, 서로 다른 기능만을 선택적으로 조절하면서 진행된다.

[0058] 통증전달경로에서의 NMDA를 보면, 흥분성 아미노산인 글루타민산염(glutamate), 아스파르트산염(aspartate), 및 신경전달 펩타이드인 물질 P(substance P)의 분비에 의해 시냅스후막의 NMDA 수용체가 활성화되어 이차적 전령인 Ca $^{2+}$ 의 유입이 증가되어 중추감작이 일어나는 것으로 알려져 있다. 특히 말초에서 염증이나 말초신경손상에 의해 발생하는 중추감작은 척수후각의 NMDA 활동성에 비례하며, NMDA 수용체 길항제를 전신적으로 투여하면 이러한 중추감작이 둔화되고 또한 중추감작에 따른 통증행동도 줄일 수 있다고 한다.

[0059] 본 발명의 일 구체예에서 “c-Fos”란, 전사를 조절하는 종양유전자로서 세포의 성장과 분화를 촉진하는 여러 가지 인자에 의해 발현된다. 세포가 특정 자극에 대해 매우 빠르게 발현하는 초기 유전자(immediateearly gene) 집단 가운데 하나이다. 주로 c-jun family와 결합하여 이형이분자체(heterodimers)를 형성하며 AP-1 조절 부위

를 가지는 유전자들의 전사를 조절하는 것으로 알려져 있다. 정상세포에서는 매우 낮게 발현되나, 부분 간 절제 후 재생과정에서 일시적으로 상승하며, 위암종과 폐, 유방, 간, 췌장, 대장등의 암종에서도 발현된다고 알려져 있다.

- [0060] 본 발명의 일 구체예에서 “약학조성물”이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물을 의미한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 약학조성물은 보툴리눔 독소를 저농도로 중추 신경계 또는 중추 신경이 발달한 해부학적 위치에 투여하는 것이며, 이에 관여하는 단백질 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기의 "약학적 허용될 가능한" 담체 또는 부형제는 정부의 규제부에 의해 승인된 것이나, 또는 척추 동물, 그리고 보다 특별하게는 인간에게 사용을 위한 정부 또는 기타 일반적으로 승인된 약전에서 리스트된 것을 의미한다.
- [0061] 비경구적인 투여에 적절한 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함하는 조성물은 유성 또는 수성 담체에 있는 현탁액, 용액 또는 에멀전의 형태로 될 수 있고, 고체 또는 반고체의 형태로 제조될 수 있으며, 현탁제, 안정화제, 용해제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 포함할 수 있다. 본 형태는 멸균될 수 있고, 그리고 액체일 수 있다. 이것은 제조 및 저장의 조건 하에서 안정할 수 있고 그리고 세균이나 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존될 수 있다. 대안적으로, 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함하는 조성물은 사용 전에 적절한 담체와 재구성을 위해 멸균 분말 형태일 수 있다. 약학적 조성물은 단위-복용량 형태로, 마이크로니들 패치에, 애플에, 또는 기타 단위-복용량 용기에, 또는 다-복용량 용기에 존재할 수 있다. 대안적으로, 약학적 조성물은 단지 멸균 액체 담체, 예를 들어 사용 바로 전에 주사용 물의 부가함을 요하는 동결-건조된(냉동건조) 상태로 보관될 수 있다. 즉시 주사용액 및 현탁액은 멸균 분말, 그레놀 또는 타블렛으로 제조될 수 있다.
- [0062] 몇몇 비 제한적인 실시형태에 있어서, 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함하는 조성물은 액체로 제형화되어 질 수 있고, 또는 액체 속에 미립구의 형태로 포함될 수 있다. 어떤 비 제한적인 실시형태에 있어서, 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함하는 조성물은 보툴리눔 독소, 또는 이들의 약학적으로 허용될 수 있는 화합물 및/또는 혼합물을 0.001 내지 100,000 U/kg 사이의 농도로 포함한다. 또한 어떤 비 제한적인 실시형태에 있어서, 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함하는 조성물에 적절한 부형제는 보존제, 현탁제, 안정화제, 염료, 완충제, 항균제, 항진균제, 및 등장화제, 예를 들어, 설탕 또는 염화나트륨을 포함한다. 여기서 사용된 것으로, 용어 "안정화제"는 보존 수명을 증가하기 위해 본 발명의 약학적 조성물에 선택적으로 사용된 화합물을 언급한다 비-제한적인 실시예에 있어서, 안정화제는 당, 아미노산, 또는 폴리머일 수 있다. 약학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용될 수 있는 담체를 포함할 수 있다. 담체는 용매 또는 분산 배지일 수 있다. 약학적으로 허용될 수 있는 담체의 비-제한적인 예는 물, 식염수, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜 (예, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜), 오일, 및 이들의 적절한 혼합물을 포함한다.
- [0063] 비경구용 제형은 멸균될 수 있다. 멸균 기술의 비-제한적인 예는 세균-억제 필터를 통한 여과, 터미날 멸균화, 멸균 제제의 합체, 방사선 조사, 멸균 가스 조사, 가열, 진공 건조 및 동결 건조를 포함한다.
- [0064] 본 발명의 일 구체예에서 “투여”란, 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함하는 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직강내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 본 발명의 경우, 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체의 중추 신경계 또는 중추 신경이 발달한 해부학적 위치에 투여하는 것이 바람직하다.
- [0065] 본 발명의 치료 방법은 상기 약학조성물을 약제학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명에서 유효량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0066] 본 발명의 일 구체예에서, 보툴리눔 독소를 투여하는 단계를 포함하는 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법을 제공하고, 상기 보툴리눔 독소의 투여는 개체를 마취하여 머리의 움직임을 고정된 상태로 투여하는 것을 특징으로 하는 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법을 제공하며, 상기 머리의 고정은 뇌정위고정인 것을 특징으로

하는 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법을 제공하며, 상기 보툴리눔 독소의 투여는 개체의 소뇌연수조, 환추후두막, 또는 경뇌막 낭내에 삽입한 관을 통해 투여하는 것을 특징으로 하는 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법을 제공하며, 상기 관은 폴리에틸렌관인 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법을 제공하며, 상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 A형 독소인 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법을 제공하며, 상기 보툴리눔 독소는 0.1 내지 2 U/kg의 농도로 투여되는 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법을 제공하며, 상기 감각 장애는 통증에 대한 민감도 저하인 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법을 제공하며, 상기 통증은 만성통증 또는 신경병증성 통증인 악안면 감각 장애 동물모델의 제조방법을 제공한다.

[0067] 본 발명의 다른 구체예에서, 개체의 소뇌연수조, 환추후두막, 또는 경뇌막 낭내로 보툴리눔 독소를 투여한 악안면 감각 장애 동물모델을 제공하고, 상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 A형 독소인 악안면 감각 장애 동물모델을 제공하며, 상기 보툴리눔 독소는 0.1 내지 2 U/kg의 농도로 투여되는 악안면 감각 장애 동물모델을 제공하며, 상기 감각 장애는 통증에 대한 민감도 저하인 악안면 감각 장애 동물모델을 제공하며, 상기 통증은 만성통증 또는 신경병증성 통증인 악안면 감각 장애 동물모델을 제공한다.

[0068] 이하 상기 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.

발명의 효과

[0069] 본 발명의 동물모델은 보툴리눔 독소를 중추에 투여하여 적은 농도의 보툴리눔 독소만으로도 효과적으로 안면 통증을 억제하였고, 악안면 근육의 운동 장애 없이 감각장애만을 유발하므로, 인공치아 개발을 포함한 악안면 질병 치료 연구에 크게 활용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 말초 또는 중추에 보툴리눔 독소를 투여한 쥐에게서 포르말린으로 안면 감각 장애 유발 효과를 시험한 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 말초 또는 중추에 보툴리눔 독소를 투여한 쥐에게서 NMDA로 안면 감각 장애 유발 효과를 시험한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 말초 또는 중추에 보툴리눔 독소를 투여한 쥐의 수질성 후각에서 c-Fos 양성 신경세포 수의 변화를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0072] 실시예 1. 보툴리눔 독소를 투여한 동물모델의 제조

[0073] 실험동물은 수컷 랫드(Sprague-Dawley, 230-280 g)를 사용하였고, 경북대학교 치의학전문대학원 동물실에서 일정한 온도와 12시간 주/야 빛 순환주기를 갖는 환경에서 실험동물용 사료와 물을 자유롭게 공급하여 사육하였다. 본 연구는 경북대학교 치의학전문대학원 실험동물위원회의 승인을 얻었으며, 의식이 있는 동물 실험에 관한 세계통증연구학회의 윤리적 규정을 준수하였다.

[0074] 실시예 1-1. 보툴리눔 독소를 중추에 투여한 동물모델의 제조

[0075] 약물을 안면부 감각정보가 투사되는 삼차신경핵군으로 주입하기 위하여 소뇌연수조, 환추후두막, 또는 경뇌막

부위의 중추로 투여하였다. 중추로 약물을 투입하기 위하여 실험동물에게 카테터(catheter)를 삽입하는 수술을 실시하였다. 실험동물을 케타민(ketamine) 40 mg/kg과 자일라진(xylazine) 4 mg/kg으로 마취하였고, 마취된 쥐는 뇌정위고정장치(David Kopf instruments, Tujunga, CA, USA)에 머리를 고정시키고 폴리에틸렌관(PE10)을 소뇌연수조, 환추후두막, 또는 경뇌막 부위의 중추 내로 삽관하였다. 폴리에틸렌관은 두개골 부위로 빼내어 금속 나사못과 치과용 레진(Dentsply Caulk, Milford, USA)을 사용하여 머리에 고정하였다. 수술 후 72시간 동안 실험동물을 회복시켰다.

[0076] 상기 삽관된 폴리에틸렌관으로 보툴리눔 독소(0.3 또는 1 U/kg)를 중추신경으로 주입하였다. 보툴리눔 독소는 A형(보툴렉스, (주)휴젤, 대한민국)를 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

[0077] **실시예 1-2. 보툴리눔 독소를 말초에 투여한 동물모델의 제조**

[0078] 신경말단에서 분비되는 신경전달물질을 차단하기 위하여 보툴리눔 독소(1 또는 3 U/kg)를 안면피부 피하조직으로 30 μ l를 주입하였다.

[0079] **실시예 2. 말초 또는 중추에 보툴리눔 독소를 투여한 동물모델에 대한 악안면 감각 장애 확인**

[0080] **실시예 2-1. 포르말린 테스트 결과**

[0081] 동물모델의 악안면 감각 장애를 염증성 통각 반응으로 평가하기 위하여, 포르말린 시험을 수행하였다. 포르말린 시험은 동물의 피하에 포르말린을 주사 시 특이적으로 나타나는 움찔거리는 행동(flinching behavior), 문지르는 행동(rubbing behavior), 또는 핥는 행동(licking behavior)등의 통증성 행동의 정도로 통증 정도를 평가하는 방법이다. 이때 통증성 행동이 나타나는 양상은 피하주사 후 초기 수분 동안 과격한 반응(제1기 반응)이 나타난 후 줄어들고, 약 10분 후부터 다시 지속적이고 강한 통증반응(제2기 반응)이 나타난다. 따라서 제1기 반응을 급성통증, 제2기 반응을 만성통증 또는 신경병증성 통증의 지표로 해석할 수 있다.

[0082] 실험동물의 안면 수염 부위(동물의 입가에 있는 강모(剛毛), vibrissa) 피하에 3% 포르말린 40 μ l를 주사하고, 문지르는 행동(rubbing behavior)을 5분 간격으로 9회, 총 45분간 관찰하였다. 이를 포르말린 주사 후 0 내지 10분간의 제1기 반응과, 11 내지 45분간의 제 2기 반응으로 구분하였다. 상기 결과를 도 1에 기재하였다.

[0083] 실험 결과, 말초에 보툴리눔 독소를 1 U/kg 투여한 랫드는 대조군에 비하여 통증 경감 효과가 없었으나, 3 U/kg 투여한 랫드는 제2기 반응이 유효하게 감소하는 것으로 나타났다. 중추에 보툴리눔 독소를 투여한 랫드의 경우에는 0.3 U/kg과 1 U/kg 투여한 랫드들이 모두 제2기 반응이 유효하게 감소하여, 중추에 보툴리눔 독소를 투여하는 것이 적은 농도의 보툴리눔 독소로도 충분히 안면 감각 장애를 유발하는 효과가 있음을 입증하였다.

[0084] **실시예 2-2. NMDA 테스트 결과**

[0085] NMDA는, N-메틸-D-아스파르트산염(N-methyl-D-aspartate)의 줄임말로 세포의 사멸과 정상세포 간의 신호전달을 조절하는 것으로 알려진 신경수용체(NMDA 수용체)를 자극하는 물질이다. NMDA 수용체 길항제를 전신적으로 투여하면 중추감각이 둔화되고 또한 중추감각에 따른 통증행동도 줄일 수 있다는 것이 보고되어 있다.

[0086] 실시예 1-1에서 소뇌연수조, 환추후두막, 또는 경뇌막 부위의 중추 내로 삽관된 폴리에틸렌관(PE10) 튜브를 통해서 실험동물에게 개체당 NMDA 0.5 μ g/7 μ l를 투여하였다. 이후 랫드가 자유롭게 이동하는 상태에서 안면을 문지르는 행동을 관찰하였다.

[0087] 실험 결과, 보툴리눔 독소 1 또는 3 U/kg가 말초로 투여된 랫드들과, 보툴리눔 독소 0.3 또는 1 U/kg가 중추로 투여된 랫드들이 모두 대조군에 비하여 안면 감각 장애를 유발하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 상기 결과를 도 2에 기재하였다.

[0088] **실시예 2-3. c-Fos 면역화학염색 결과**

[0089] 보툴리눔 독소가 투여된 실험동물에게서 전사조절 단백질 c-Fos의 발현량 차이를 알아보기 위하여, 랫드의 중추

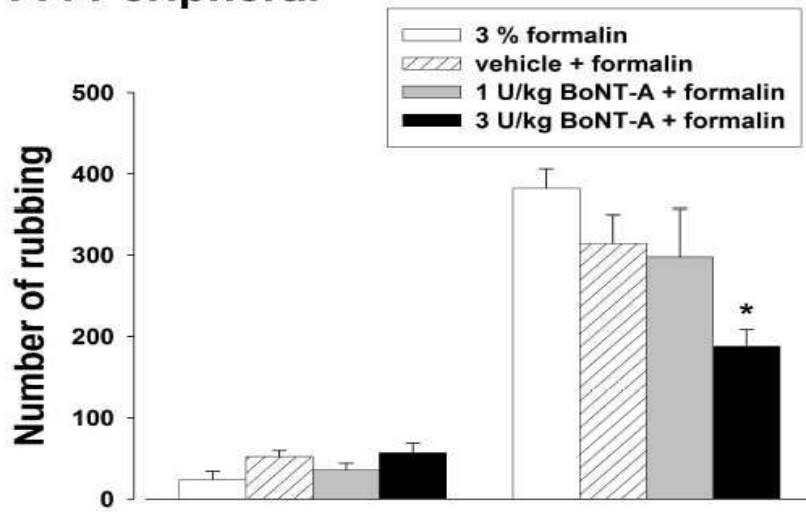
(소뇌연수조, 환추후두막, 또는 경뇌막 부위의 낭내, 1 U/kg) 또는 말초(안면 피하, 3 U/kg)로 보툴리눔 독소를 투여하였다(그룹당 n=5). 보툴리눔 독소 투여 3일 후에 NMDA를 추가로 투여하였다. 이 후, 랫드를 마취하고, 0.9% 식염수로 심장 관류하였고, 4% 파라포름알데하이드 용액(4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)로 관류 고정하였다. 미추 골수(caudal medulla)를 수득하여 동일한 고정액으로 4°C에서 2시간 동안 후고정하였고, 0.1 M 인산버퍼에 녹인 30 중량% 수크로오즈 용액에서 하룻밤 침투시켰다. 상기 조직을 동결블럭으로 만들고, 30 μ m 두께로 절편하였다. 부유 절편(Free-floating sections)을 PBS에 세척하여 2.5% 말혈청(horse serum, Vector Laboratories, Burlingame, CA)으로 실온에서 1시간 블록하고, 1:1000으로 희석한 c-Fos 항체(rabbit polyclonal anti-c-Fos antibody, Abcam, Cambridge, MA)로 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 이차 항체(peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG, Vector Laboratories)는 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 이후 시료를 세척하고, DAB 용액(diabenzidine and hydrogen peroxide, pH 7.5, Vector Laboratories)으로 1분간 반응시켰다. 시료의 염색된 결과를 광학현미경(BX 41 and U-RFL-T, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하면서, 수질성 후각(medullary dorsal horn) 표면의 층리I(laminae I) 및 층리II(laminae II)에 존재하는 c-Fos 양성으로 염색된 신경세포를 계수하였다.

[0090] 실험 결과, naive 또는 NMDA만 투여된 대조군 랫드에 비하여 중추 또는 말초로 보툴리눔 독소가 투여된 랫드들은 모두 c-Fos 양성 신경세포의 수가 감소하는 것으로 나타났다. 상기 결과를 도 3에 기재하였다.

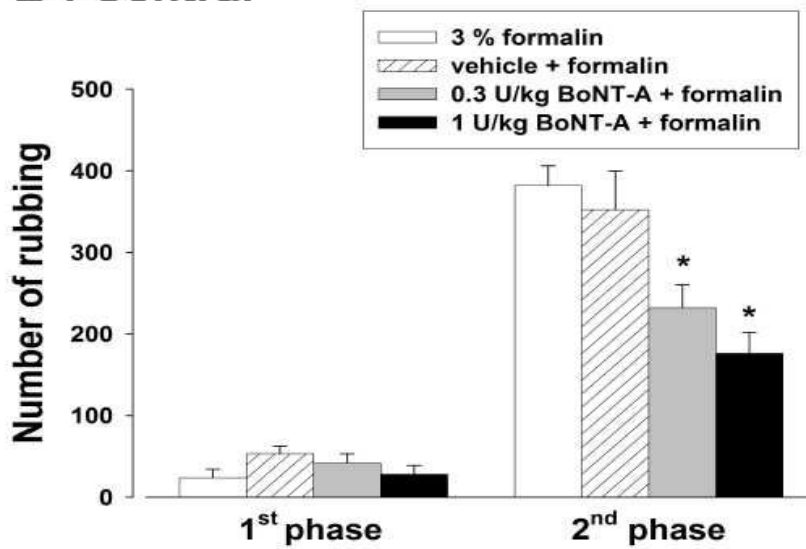
도면

도면1

A : Peripheral

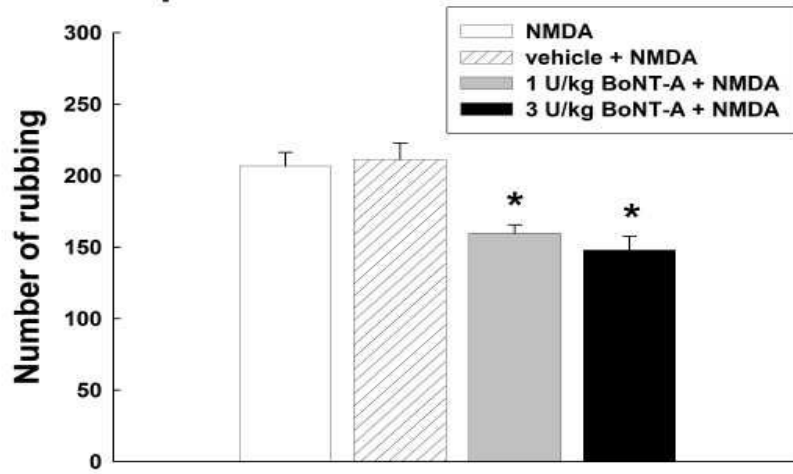


B : Central

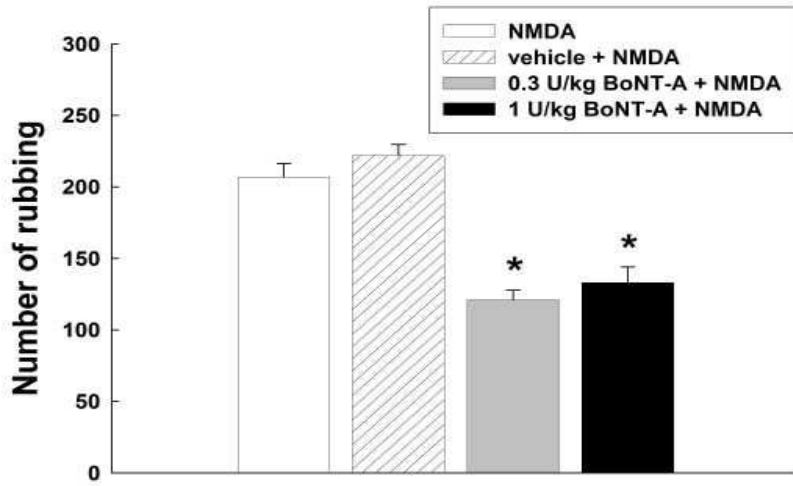


도면2

A : Peripheral



B : Central



도면3

