



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0110402
(43) 공개일자 2007년11월16일

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01) A61K 39/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7022413

(22) 출원일자 2007년10월01일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2007년10월01일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/007830

국제출원일자 2006년03월03일

(87) 국제공개번호 WO 2006/094263

국제공개일자 2006년09월08일

(30) 우선권주장

60/658,434 2005년03월03일 미국(US)

(71) 출원인

레반스 테라퓨틱스

미국 캘리포니아 94043 마운틴 뷰 베이쇼어 파크
웨이 2400 스위트 100

(72) 발명자

데이크 마이클 디.

미국 캘리포니아 94305 스탠포드 게로나 로드 665

위 제이콥 엠.

미국 캘리포니아 94040 마운틴 뷰 엘 카미노 리얼
#1116 4020

(74) 대리인

리앤목특허법인

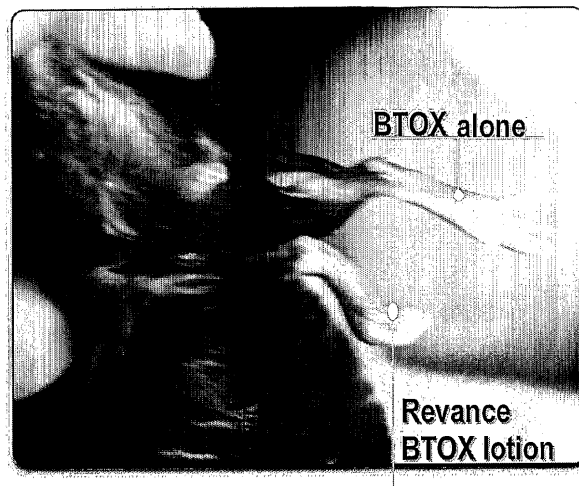
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 보툴리눔 독소의 국소 적용 및 경피 전달을 위한 조성물 및방법

(57) 요약

본 발명은 보툴리눔 독소의 경피 전달을 위한 개선된 제제(formulation)에 관한 것이다. 상기 제제는 예를 들면, 분지성 기(branching group) 또는 효능 기(efficacy group)를 갖는 양전하로 하전된 백본과 비-공유결합에 의해 결합된 보툴리눔 독소를 포함한다. 상기 제제는 또한 분획제(partitioning agent), 올리고-다리(oligo-bridge), 다가 음이온 다리(polyanion bridge)를 포함하고, 선택적으로, 점도 변형제를 포함할 수 있다. 상기 제제는 환자의 피부 상으로의 국소 적용용으로 설계되었으며 주름, 다한증 및 기타 건강-관련 문제를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 투여용 키트도 개시된다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

보툴리눔 독소,

양전하로 하전된 백본, 및

분획제(partitioning agent), 올리고-다리(oligo-bridge), 및 다가 음이온 다리(polyanion bridge)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 구성물을 포함하는 제제로서, 상기 보툴리눔 독소는 상기 양전하로 하전된 백본과 비-공유 결합에 의해 복합체를 형성하는 것인 제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 백본은 분지성 기(branching group)를 더 포함하는 것인 제제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 백본은 21,000 미만의 분자량을 갖는 것인 제제.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 백본은 폴리라이신 또는 PEI인 것인 제제.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 분지성 기는 보호된 올리고아르기닌(protected oligoarginine) 또는 TAT 도메인인 것인 제제.

청구항 6

제1항에 있어서, 점도 변형제를 더 포함하는 것인 제제.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 점도 변형제는 히드록시프로필셀룰로오스 또는 세타필(Cetaphil)인 것인 제제.

청구항 8

제1항에 따른 제제를 포함하는, 보툴리눔 독소의 경피 전달용 키트.

청구항 9

환자의 피부 부위에 제1항에 따른 제제를 적용하는 단계, 및 선택적으로, 그 후 폐색제(occlusion agent)를 적용하는 단계를 포함하는 것인 주름 치료 방법.

청구항 10

환자의 피부 부위에 제1항에 따른 제제를 적용하는 단계, 및 선택적으로, 그 후 폐색제를 적용하는 단계를 포함하는 것인 다한증 치료 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 피부 부위는 얼굴, 이마, 목, 손 및 발로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 피부 부위는 액와, 이마, 등, 가슴, 손바닥, 손등, 발등, 또는 발바닥으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

명세서

기술분야

- <1> 본 출원은 2005년 3월 3일에 출원된 미국 임시 특허출원 제60/658,434호에 기초한 우선권을 주장한다. 미국특허출원 제60/658,434호는 참조에 의해 그 전체가 본 명세서에 포함된다.
- <2> 본 발명은 보툴리눔 독소를 포함하는 신규한 조성물, 보다 상세하게는 피부 또는 상피를 통한 보툴리눔 독소의 수송 또는 전달(또한, "경피 전달(transdermal delivery)"이라고 지칭됨)을 가능하게 하고, 따라서 본 명세서에 기재된 바와 같이 다양한 치료, 심미 및/또는 미용 목적을 위해, 대상자에게 보툴리눔 독소를 제공하는 국소적 적용으로 이용될 수 있는 그와 같은 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- <3> 피부는 외부의 환경적 위협으로부터 신체의 기관을 보호하고 체온을 유지하기 위한 온도조절장치(thermostat)로 작용한다. 피부는 여러 개의 상이한 층들로 구성되고, 각 층은 특화된 기능을 갖는다. 주요한 층들은 표피층(epidermis), 진피층(dermis) 및 피하층(hypodermis)을 포함한다. 표피층은 진피층을 덮는 상피 세포들의 중층이고, 진피층은 결합 조직으로 구성된다. 표피층과 진피층은 모두 지방 조직의 내층(internal layer)인 피하층에 의해 더 지지된다.
- <4> 피부의 최상층인 표피층은 그 두께가 0.1 내지 1.5 밀리미터에 불과하다 (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). 표피층은 케라티노사이트로 구성되고 그들의 분화 상태에 근거하여 여러 층으로 분리된다. 표피층은 각질층(stratum corneum)과 생 표피층(viable epidermis)로 더 분류될 수 있으며, 상기 생 표피층은 과립(granular) 세포, 유극(melphigian) 및 기저 세포로 구성된다. 각질층은 흡습성이며 그 유연성 및 부드러움을 유지하기 위해 중량 기준으로 10% 이상의 수분을 필요로 한다. 흡습성은 부분적으로는 케라틴의 보습 능력(water-holding capacity)에 근거한다. 각질층(horny layer)이 부드러움 및 유연성을 잃는 경우, 각질층은 거칠고 부서지기 쉬워지며, 건조한 피부를 초래한다.
- <5> 표피층의 바로 아래에 위치한 진피층은 두께가 1.5 내지 4 밀리미터이다. 표피층은 피부의 세 층 중 가장 두껍다. 또한, 진피층은 한선(sweat gland) 및 지방 분비선(oil gland)(면포(comedo) 또는 세공(pore)이라 불리는 피부의 개구부를 통해 물질을 분비함), 모낭(hair follicle), 신경 말단부(nerve ending), 및 혈관 및 림프관을 포함한다. 대부분의 피부 구조가 존재하는 부위이다(Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). 그러나, 진피층의 주요 성분들은 콜라겐 및 엘라스틴이다.
- <6> 피하층은 피부의 가장 심부층이다. 피하층은 체온 유지를 위한 절연 층(insulator) 및 기관 보호를 위한 충격 흡수층(shock absorber)으로 작용한다 (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). 또한, 피하층은 에너지 보존을 위해 지방을 저장한다. 피부의 pH는 정상적으로 5 내지 6이다. 이 산성도는 피지선의 분비로부터 유래된 양쪽성 아미노산, 락트산 및 지방산의 존재 때문이다. "산 맨틀(acid mantle)"이라는 용어는 피부의 대부분의 영역 상에서 수용성 물질의 존재를 의미한다. 피부의 완충 능력은 부분적으로는 피부의 각질층에 저장된 이 분비물 때문이다.
- <7> 피부의 주요한 기능들 중 하나는 정상적인 항상성(homeostasis)에 잠재적으로 유해한 물 및 물질의 이동에 대한 장벽을 제공하는 것이다. 신체는 단단한, 반투과성 피부가 없다면 빠르게 탈수될 것이다. 피부는 유해한 물질의 신체로의 유입을 방지할 수 있게 한다.
- <8> 노화의 두드러진 징후들 중 하나인 주름은 환경적 손상으로부터 축적된 생화학적, 조직학적, 및 생리학적 변화들에 의해 유발될 수 있다(Benedetto, International Journal of Dermatology, 38:641-655 (1999)). 또한, 안면 주름의 특징적인 접힘(fold), 깊은 골(furrow), 및 구겨짐(crease)을 유발할 수 있는 기타 이차적인 인자들이 있다(Stegman et al., The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5- 15 (1990)). 이와 같은 이차적인 인자들은 피부에 대한 중력의 지속적인 인력, 빈번하고 지속적인 위치 압력(즉, 수면 동안), 및 안면 근육의 수축에 의해 유발된 반복적인 안면 운동을 포함한다 (Stegman et al., The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)).
- <9> 잠재적으로 노화의 일부 증후를 완화시키기 위해 상이한 기법들이 이용되고 있다. 이와 같은 기법들은 알파 히드록시 산 및 레티놀을 포함하는 얼굴 보습제(moisturizer)로부터 외과수술 절차 및 신경독소(neurotoxin)의 주사까지 다양하다. 예를 들면, 1986년에 안과성형 전문의 및 피부과 전문의로 구성된 남편과 아내의 팀인 Jean

Carruther와 Alastair Carruther는 미간(glabella) 영역에서 운동-관련 주름의 치료를 위해 A형 보툴리눔 독소의 미용적 용도를 발전시키기 시작했다(Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, New York: Academic Press, 143-150 (1981)). Carruther 부부에 의한 A형 보툴리눔 독소의 주름 치료를 위한 사용은 1992년에 이 방법에 대한 중요한 발표로 이어졌다(Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, New York: Academic Press, 143-150 (1981)). 1994년까지, 동일한 팀은 안면 상의 다른 운동-관련 주름에 대한 경험을 보고했다(Scott, Ophthalmol, 87:1044-1049 (1980)). 뒤이어 이는 A형 보툴리눔 독소에 의한 미용 치료의 시대의 개막을 가져왔다.

<10> A형 보툴리눔 외에, 혈청학적으로(serologically) 연관되나, 별개인 7종의 다른 보툴리눔 독소가 있다. 일반적으로, 보툴리눔 독소(보툴린 독소 또는 보툴리눔 신경독소로도 알려짐)는 그람-양성 세균인 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)에 의해 생성되는 신경독소이다. 보툴리눔 독소는 신경근 접합부(neuromuscular junction)를 통한 아세틸콜린의 시냅스 전달(synaptic transmission) 또는 방출을 방지하는 것에 의해 근육의 마비를 초래하도록 작용하고 또한 다른 방식으로도 작용하는 것으로 사료된다. 그들의 작용은 통상적으로 근육 경련 또는 수축을 유발하여, 마비를 초래할 신호를 본질적으로 차단한다.

<11> 8종의 혈청학적으로 연관된 보툴리눔 독소 중에서, 7종, 즉, 보툴리눔 신경독소 혈청형, A형, B형, C형, D형, E형, F형 및 G형은 마비를 유발할 수 있다. 이들 각각은 혈청형-특이적 항체(type-specific antibody)에 의한 중화에 의해 구별된다. 그림에도 불구하고, 이와 같은 7종의 활성 보툴리눔 독소 혈청형의 경우, 보툴리눔 독소 단백질 분자의 분자량은 약 150 kD이다. 세균에 의해 방출될 때, 보툴리눔 독소는 비-독소 단백질(non-toxin protein)과 결합된 150 kD의 특정한 보툴리눔 독소 단백질 분자를 포함하는 복합체이다. A형 보툴리눔 독소 복합체는 클로스트리디아 세균에 의해 900 kD, 500 kD 및 300 kD 형태로 생성된다. B형 보툴리눔 독소 및 C형 보툴리눔 독소는 외관상으로는 700 kD 또는 500 kD 복합체로서만 생성된다. D형 보툴리눔 독소는 300 kD 및 500 kD 복합체로서 생성된다. E형 보툴리눔 독소 및 F형 보툴리눔 독소는 약 300 kD 복합체로서만 생성된다. 복합체(즉, 약 150 kD보다 큰 분자량)는 비-독소 헤마글루티닌(non-toxin hemagglutinin) 단백질 및 비-독소 및 무독성 비-헤마글루티닌(non-toxic nonhemagglutinin) 단백질을 포함하는 것으로 사료된다. 이와 같은 두 개의 비-독소 단백질(보툴리눔 독소 분자와 함께 관련된 신경독소 복합체를 구성함)은 독소가 섭취될 때, 보툴리눔 독소 분자에 변성(denaturation)에 대한 안정성 및 소화성 산(digestive acid)에 대한 보호를 제공하기 위해 작용할 수 있다. 추가적으로, 보다 큰(약 150 kD보다 큰 분자량) 보툴리눔 독소 복합체는 보툴리눔 독소 복합체의 근육 내 주사 부위로부터 보툴리눔 독소의 보다 느린 확산 속도를 초래할 수 있다.

<12> 보툴리눔 독소의 상이한 혈청형은 그들이 작용하는 동물 종 및 그들이 유발하는 마비의 심각도 및 지속기간이 다양하다. 예를 들면, A형 보툴리눔 독소는 랫트에서 생성된 마비율에 의해 측정된 바와 같이, B형 보툴리눔 독소보다 500배 더 강력하다. 또한, B형 보툴리눔 독소는 A형 보툴리눔 독소의 영양류 LD₅₀의 약 12배인, 480 U/kg의 투여량에서 영양류에서 무독성인 것으로 확인되었다. 보툴리눔 독소의 분자 크기 및 분자 구조 때문에, 보툴리눔 독소는 각질층 및 그 하부의 피부 구조의 복수 층들을 통과할 수 없다.

<13> 전신적인 보툴리눔 독소 노출로부터 초래된 중독 상태(toxic condition) (보툴리누스 중독증(botulism)으로 지칭됨)는 고대 이래로 유럽에서 존재해왔다. 1895년에, Emile P. van Ermengem가 벨기에에서 보툴리누스 중독증으로 사망한 희생자의 사후(post-mortem)조직으로부터 수득된 염장된 날(raw) 돼지고기로부터 최초로 혐기성 포자-형성 바실러스를 분리하였다. Van Ermengem은 자신이 바실러스 보툴리누스(*Bacillus botulinus*)라 부른 세균에 의해 생산된 세포외 독소에 의해 보툴리누스 중독증이 유발된다는 것을 발견했다(Van Ermengem, Z Hyg Infektionskr, 26:1-56; Rev Infect (1897)). 그 명칭은 1922년에 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)으로 변경되었다. 클로스트리디움이라는 명칭은 상기 미생물의 혐기성 및 또한 그의 형태학적 특징을 반영하기 위해 이용되었다(Carruthers and Carruthers, Can J Ophthalmol, 31:389-400 (1996)). 1920년대에, 식중독의 추가적인 발생 후에 A형 보툴리눔 독소의 비정제 제형(crude form)이 분리되었다. 샌프란시스코, 캘리포니아 대학의 Dr. Herman Sommer는 상기 신경독소를 정제하는 최초의 시도들을 수행하였다(Borodic et al., Ophthalmic Plast Reconstr Surg, 7:54-60 (1991)). 1946년에, Dr. Edward J. Schantz 및 그의 동료들은 결정질 제형으로 상기 신경독소를 분리하였다(Schantz et al., In: Jankovi J, Hallet M (Eds) Therapy with Botulinum Toxin, New York, NY: Marcel Dekker, 41-49 (1994)). 1949년까지, Burgen 및 그의 동료들은 보툴리눔 독소가 신경근 접합부를 통한 자극(impulse)을 차단한다는 것을 입증할 수 있었다(Burgen et al., J Physiol, 109:10-24 (1949)). Allan B. Scott는 1973년에 원숭이에 최초로 A형 보툴리눔 독소(BTX-A)를 사용하였다. Scott는 3개월간 지속되는 가역적인 눈 근육 마비를 보여주었다(Lamanna, Science, 130:763-772 (1959)). 뒤이어, BTX-A는 인간의 사시, 안검경련, 및 경련성 사경의 성공적인 치료제로 보고되었다(Baron et

al., In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM (Eds), Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology, St. Louis, MO: Mosby Year Book, 504-523 (1994); Carruthers and Carruthers, Adv Dermatol, 12:325-348 (1997); Markowitz, In: Strickland GT (Eds) Hunters Tropical Medicine, 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 441-444 (1991)). A형 보툴리눔 독소는 인간에게 알려진 가장 치명적인 천연 생물학적 작용제인 것으로 언급된다. 클로스트리디움 보툴리눔의 포자는 토양에서 발견되고 부적절하게 멸균되고 밀봉된 식품 용기에서 성장할 수 있다. 이 세균의 섭취는 치명적일 수 있는 보툴리누스 중독증을 유발할 수 있다.

<14> 동시에, 보툴리눔 독소의 근육-마비 효과는 치료적 효과를 위해 이용되고 있다. 보툴리눔 독소의 제어 투여가 증상, 예를 들면, 과다활성의 골격근을 특징으로 하는 신경근 질환을 치료하기 위한 근육 마비를 제공하기 위해 이용되었다. 보툴리눔 독소에 의해 치료된 증상들은 안면 경련증, 성인 발병 경련성 사경(adult onset spasmodic torticollis), 열항, 안검경련, 뇌성마비, 경부 근긴장 이상증(cervical dystonia), 편두통, 사시, 측두하악관절장애(temperomandibular joint disorder), 및 다양한 종류의 근육 경련 및 발작을 포함한다. 보다 최근에는, 보툴리눔 독소의 근육-마비 효과가 주름, 찡그린 선(frown lines)과 같은 치료적 및 미용학적 적용, 및 안면 근육의 경련 또는 수축의 다른 결과들에서 이용되었다.

<15> 보툴리눔 독소의 치료적 효과에 대한 잠재성 및 그 독성을 고려할 때, 상기 독소의 안전한 적용을 위한 조성물 및 방법을 개발하는 것이 바람직할 것이다. 보툴리눔 독소의 국소 적용은 그 적용의 무통증 속성, 적용될 수 있는 보다 넓은 치료 표면적, 보툴리눔 치료제의 적용에 필요한 훈련의 감소, 원하는 효과의 생성에 필요한 보다 작은 투여량, 및 치료적 임상 효과에 도달하기 위해 독소의 큰 웰에 대한 요건의 부재 때문에, 보다 안전하고 보다 바람직한 치료법의 대안을 제공할 것이다. 따라서, 보툴리눔 독소의 경피 전달의 유효한 수단 및 주사를 요하지 않는 다수의 증상을 치료 또는 예방하기 위해 보툴리눔 독소를 제공하는 효과적인 수단이 매우 바람직하다.

발명의 상세한 설명

<16> 본 발명은 보툴리눔 독소를 포함하는 신규한 조성물, 보다 상세하게는 피부 또는 상피를 통한 보툴리눔 독소의 수송 또는 전달(또한, "경피 전달(transdermal delivery)"이라고 지칭됨)을 가능하게 하고, 따라서 본 명세서에 기재된 바와 같이 다양한 치료, 심미 및/또는 미용 목적을 위해, 대상자에게 보툴리눔 독소를 제공하는 국소적 적용으로 이용될 수 있는 그와 같은 조성물에 관한 것이다.

<17> 본 발명의 일 양태는 보툴리눔 독소 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 담체는 양전하로 하전된 분지성 기(branching group)가 결합된 중합체 백본(polymeric backbone)을 갖는다. 상기 담체와 상기 보툴리눔 독소 간의 결합은 비-공유결합성이다.

<18> 본 발명은 또한 유효량의 담체와 함께 보툴리눔 독소를 대상자의 피부 또는 상피에 국소적으로 적용하는 단계를 포함하는 것인 보툴리눔 독소를 대상자에게 투여하는 방법을 제공한다. 상기 담체는 양전하로 하전된 분지성 기를 갖는 중합체 백본을 가지며, 상기 보툴리눔 독소와 비-공유적으로 결합한다.

<19> 본 발명의 또 다른 양태는 보툴리눔 독소, 양전하로 하전된 백본 및, 분획제(partitioning agent), 올리고-다리(oligo-bridge), 및 다가 음이온 다리(polyanion bridge)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 구성물을 포함하고, 상기 보툴리눔 독소는 상기 양전하로 하전된 백본과 비-공유결합에 의해 복합체를 형성하는 것인 제제(formulation)를 제공한다. 이 제제는 상기 제제를 피부의 부위에 적용하는 단계에 의해 주름을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 원하는 경우, 상기 제제의 적용 후에 폐색제(occlusion agent)가 적용될 수 있다.

<20> 본 발명의 제제는 또한 다한증을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명에 의해 고려되는 치료방법은 본 발명의 제제를 피부의 부위에 적용하는 단계 및 선택적으로, 그 후에 폐색제를 적용하는 단계를 포함한다.

<21> 본 발명의 또 다른 양태는 대상자에게 보툴리눔 독소를 투여하기 위한 키트를 제공하는 것이다. 상기 키트는 보툴리눔 독소의 경피 전달을 위한 유효량으로 존재하는 보툴리눔 독소, 양전하로 하전된 분지성 기가 결합된 중합체 백본을 갖는 담체를 포함한다. 상기 담체와 상기 보툴리눔 독소 간의 결합은 비-공유결합성이다.

<22> 본 발명의 또 다른 양태는 대상자에게 보툴리눔 독소를 투여하기 위한 키트를 제공하는 것이다. 상기 키트는 상기 보툴리눔 독소를 피부로 전달하기 위한 장치 및, 아래첨자 n1은 0 내지 약 20의 정수이고, 아래첨자 n2는 독립적으로 약 5 내지 약 25의 홀수인 것인 $-(gly)_{n1}-(arg)_{n2}$, HIV-TAT 및 그의 단편, 및 안테나페디아(Antennapedia) PTD로부터 선택된 양전하로 하전된 분지성 기가 부착된 중합체 백본을 갖는 담체를 포함하는 조

성물을 포함한다.

- <23> 일 양태에서, 본 발명은 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 보툴리눔 독소 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 양전하로 하전된 분지성 기 또는 "효능(efficiency)" 기를 갖는 양전하로 하전된 "백본"을 포함하는 담체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 가장 바람직하게는, 상기 양전하로 하전된 담체는 장쇄(long-chain)의 양전하로 하전된 폴리펩티드 또는 양전하로 하전된 비-펩티드(nonpeptidyl) 중합체, 예를 들면, 폴리알킬렌이민이다. 본 발명은 또한 그와 같은 조성물의 유효량을 국소적으로, 바람직하게는 치료를 필요로 하는 대상자 또는 환자의 피부에 적용하는 것에 의해, 근육 마비, 과다분비 또는 발한의 감소, 신경학적 통증 또는 편두통의 치료, 근육 경련 저하, 여드름 예방 또는 완화, 또는 면역 반응의 감소 또는 증강과 같은 생물학적 효과를 생성하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 심미적 또는 미용적 효과를 생성하는 방법, 예를 들면, 보툴리눔 독소를 안면 근육으로의 주사 대신, 보툴리눔 독소의 안면으로의 국소 적용에 의해 심미적 또는 미용적 효과를 생성하는 방법에 관한 것이다.
- <24> 본 발명은 또한 사용가능한 제제 또는 그와 같은 제제를 생산하기 위해 이용될 수 있는 프리믹스(premix)를 생성하기 위해 필요한 추가적인 항목 및, 상기 담체 및 상기 보툴리눔 독소를 포함하는 조성물을 제조 또는 제제화하는 방법을 제공한다. 대안적으로, 상기 키트는 별개로 그러나 조합하여(in conjuncton) 상기 보툴리눔 독소 및 상기 담체를 대상자에게 투여하는 수단을 포함한다.
- <25> 발명의 상세한 설명
- <26> 본 발명은 적합한 제제의 국소 적용에 의해 보툴리눔 독소의 전달, 특히 경피 전달을 위한 조성물 및 방법을 제공한다.
- <27> 본 발명에 따르면, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 효능 기를 갖는 양전하로 하전된 담체 분자가 보툴리눔 독소의 수송 시스템으로 적합하여, 상기 독소가 근육 및/또는 다른 피부-관련 구조에 경피적으로 투여될 수 있게 한다는 것이 발견되었다. 상기 수송은 보툴리눔 독소의 공유결합성 변형 없이 일어난다.
- <28> 본 명세서에서 "양전하로 하전된(positively charged)"은 담체가 하나 이상의 용액-상(solution-phase) 조건, 보다 바람직하게는 하나 이상의 생리학적으로 용화가능한(physiologically compatible) 조건 하에서 양전하를 갖는다는 것을 의미한다. 보다 상세하게는, 본 명세서에서 사용된 "양전하로 하전된"은 대상이 되는 작용기가 모든 pH 조건 하에서 하전될 수 있는 작용기, 예를 들면, 4차 아민을 포함하거나, 또는 특정한 용액-상 조건, 예를 들면, 일차 아민의 경우 pH 변화와 같은 조건 하에서 양전하를 얻을 수 있는 작용기를 포함한다. 보다 바람직하게는, 본 명세서에서 사용되는 "양전하로 하전된"은 생리학적으로 용화가능한 조건에서 음이온과 결합하는 거동을 갖는 작용기를 의미한다. 복수의 양전하로 하전된 모이어티(moiety)를 갖는 중합체는 반드시 단일 중합체(homopolymer)일 필요는 없으며, 이는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 명확할 것이다. 양전하로 하전된 모이어티의 다른 예들은 종래 기술에서 공지되어 있으며 용이하게 채택될 수 있고, 이는 당업자에게 명확할 것이다.
- <29> 일반적으로, 양전하로 하전된 담체(또한, "양전하로 하전된 백본(positively charged backbone)"으로도 지칭됨)는 통상적으로 원자로 구성된 직쇄이고, 생리학적 pH에서 양전하를 갖는 기를 상기 사슬 내에 갖거나, 또는 양전하를 갖는 기가 상기 백본으로부터 연장되는 결사슬에 결합된다. 바람직하게는, 양전하로 하전된 백본 자체는 정의된 효소적 또는 치료적인 생물학적 활성을 갖지 않을 것이다. 선형 백본은 일부 구체예에서, 질소, 산소, 황, 규소 및 인으로부터 선택된 헤테로원자에 의해 중단된(interrupted) 탄화수소 백본이다. 대부분의 백본 사슬 원자들은 통상적으로 탄소이다. 추가적으로, 백본은 종종, 반복 단위의 중합체일 것이나(예를 들면, 아미노산, 폴리(에틸렌옥시), 폴리(프로필렌아민), 폴리알킬렌이민, 및 그 등가물) 이종중합체(heteropolymer)일 수 있다. 일군의 구체예에서, 양전하로 하전된 백본은, 다수의 아민 질소 원자가 양전하를 갖는 (테트라-치환된) 암모늄 기로 존재하는 것인 폴리프로필렌아민이다. 또 다른 구체예에서, 양전하로 하전된 백본은 비-펩티드 중합체이고, 이는 폴리알킬렌이민, 예를 들면, 약 10,000 내지 약 2,500,000, 바람직하게는 약 100,000 내지 약 1,800,000, 및 가장 바람직하게는 약 500,000 내지 약 1,400,000의 분자량을 갖는, 폴리에틸렌이민 또는 폴리프로필렌이민과 같은 이종중합체 또는 단일중합체이다. 또 다른 군의 구체예에서, 백본은 양전하로 하전된 작용기(예를 들면, 암모늄 기, 피리디늄 기, 포스포늄 기, 술포늄 기, 구아니디늄 기, 또는 아미디늄 기)를 포함하는 복수의 결사슬 모이어티를 결합한다. 이 군의 구체예에서 결사슬 모이어티들은 백본을 따라 분리가 일정하거나 또는 가변적인 간격(spacing)으로 배치될 수 있다. 추가적으로, 결사슬의 길이는 유사하거나 또는 상이할 수 있다. 예를 들면, 일군의 구체예에서, 결사슬은 1개 내지 20개의 탄소 원자를 갖고, 전술된 양전하로 하전된 기들 중 하나에서 (백본으로부터 떨어진) 원위 말단(distal end)에서 종료되는 것인 선형 또는 분지형 탄화수소

사슬일 수 있다. 본 발명의 모든 양태에서, 담체와 생물학적 활성제 간의 결합은 비-공유결합성 상호작용이고, 그의 비-한정적인 예는 이온성 상호작용, 수소결합, 반 데르 바알스 힘(van der Waals force), 또는 그의 조합을 포함한다.

<30> 일군의 구체예에서, 양전하로 하전된 백본은 복수의 양전하로 하전된 결사슬 기(예를 들면, 라이신, 아르기닌, 오르니틴, 호모아르기닌, 및 그 등가물)를 갖는 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 약 10,000 내지 약 1,500,000, 보다 바람직하게는 약 25,000 내지 약 1,200,000, 가장 바람직하게는 약 100,000 내지 약 1,000,000의 분자량을 갖는다. 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명의 이 부분에서 아미노산이 이용되는 경우, 결사슬은 결합의 중심(the center of attachment)에서 D 또는 L형(R 또는 S 배열)을 가질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 대안적으로, 백본은 펩토이드(peptoid)와 같은 폴리펩티드의 유사체일 수 있다. 예를 들면, Kessler, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32:543 (1993); Zuckermann et al. Chemtracts-Macromol. Chem. 4:80 (1992); 및 Simon et al Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:9367 (1992))을 참조한다. 요약하면, 펩토이드는 결사슬이 α-탄소 원자보다는 백본 질소 원자에 결합된 폴리글리신이다. 전술된 바와 같이, 결사슬의 일부분은 양전하로 하전된 백본 성분을 제공하기 위해 통상적으로 양전하로 하전된 기에서 종료될 것이다. 펩토이드의 합성은 예를 들면, 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 포함된, 미국특허 제5,877,278호에 기재된다. 그 용어가 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 펩토이드 백본 작제물(peptoid backbone construction)을 갖는 양전하로 하전된 백본은 α-탄소 원자 위치에서 자연적으로 일어나는 결사슬을 갖는 아미노산으로 구성되지 않기 때문에, "비-펩티드(non-peptide)"로 간주된다.

<31> 다양한 다른 백본들, 예를 들면, 펩티드의 아미드 결합이 에스테르 결합, 티오아미드(-CSNH-), 역전된 티오아미드(reversed thioamide)(-NHCS-), 아미노메틸렌(-NHCH₂-) 또는 역전된 메틸렌아미노(-CH₂NH-) 기, 케토-메틸렌(-COCH₂-) 기, 포스피네이트(-PO₂RCH₂-), 포스폰아미데이트 및 포스폰아미데이트 에스테르(-PO₂RNH-), 역 펩티드(reverse peptide)(-NHC0-), 트랜스-알켄(-CR=CH-), 플루오로알켄(-CF=CH-), 디메틸렌(-CH₂CH₂-), 티오에테르(-CH₂S-), 히드록시에틸렌(-CH(OH)CH₂-), 메틸렌옥시(-CH₂O-), 테트라졸(CN₄), 술폰아미도(-SO₂NH-), 메틸렌술폰아미도(-CHRSO₂NH-), 역전된 술폰아미드(-NHSO₂-)로 치환된 것인 입체적 또는 전자적 모사체(steric or electronic mimics), 및 말로네이트 및/또는 겐(gem)-디아미노-알킬 서브유닛을 갖는 백본, 예를 들면, Fletcher 등 ((1998) Chem. Rev. 98:763)에 의해 검토되고 상기 검토에서 인용된 참고문헌들에 의해 상세히 기술된 바와 같은 백본을 이용한 백본들이 이용될 수 있다.

<32> 전술된 각각의 백본에서, 양전하로 하전된 기를 갖는 결사슬 기가 부착될 수 있다. 예를 들면, 술폰아미드-결합된 백본(-SO₂NH- 및 -NHSO₂-)은 질소 원자에 결합된 결사슬 기를 가질 수 있다. 유사하게, 히드록시에틸렌(-CH(OH)CH₂-) 결합은 히드록시 치환기에 결합된 결사슬 기를 가질 수 있다. 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 표준 합성 방법을 이용하여 양전하로 하전된 결사슬 기를 제공하기 위해 다른 결합 화학(linkage chemistry)을 용이하게 개조할 수 있다.

<33> 일 구체예에서, 양전하로 하전된 백본은 분지성 기(또한 효능 기라고도 지칭됨)를 갖는 폴리펩티드이다. 본 명세서에서 사용되는, 효능 기 또는 분지성 기는 양전하로 하전된 백본의 조직 또는 세포막을 통한 전위(translocation)를 촉진하는 효과를 갖는 임의의 작용제이다. 분지성 기 또는 효능 기의 비-한정적인 예는 -(gly)_{n1}-(arg)_{n2}, HIV-TAT 또는 그의 단편, 또는 안테나페디아의 단백질 형질도입(transduction) 도메인 또는 그의 단편을 포함하고, 상기에서 아래첨자 n1은 0 내지 20, 보다 바람직하게는 0 내지 8, 훨씬 더 바람직하게는 2 내지 5의 정수이고, 아래첨자 n2는 독립적으로 약 5 내지 약 25, 보다 바람직하게는 약 7 내지 약 17, 가장 바람직하게는 약 7 내지 약 13의 홀수이다. 훨씬 더 바람직한 것은, HIV-TAT 단편이 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수인 식 (gly)_p-RGRDDRRQRRR-(gly)_q, (gly)_p-YGRKKRRQRRR-(gly)_q 또는 (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q를 가지며, 상기 단편은 상기 단편의 C-말단 또는 N-말단을 통해 상기 백본에 결합되는 것인 구체예이다. 바람직한 HIV-TAT 단편은 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 8, 보다 바람직하게는 2 내지 5의 정수인 것인 단편이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 양전하로 하전된 결사슬 또는 분지성 기는 안테나페디아(Antp) 단백질 형질도입 도메인(PTD), 또는 활성을 보유한 그의 단편이다. 바람직하게는, 양전하로 하전된 담체는 전체 담체 중량 대비 백분율로서, 약 0.05% 이상, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 45 중량%, 및 가장 바람직하게는 약 0.1 내지 약 30 중량%의 양으로 결사슬의 양전하로 하전된 분지성 기(side-chain positively charged branching group)를 포함한다. 식 -(gly)_{n1}-(arg)_{n2}를 갖는 양전하로 하전된 분지성 기의 경우, 가장 바

람직한 양은 약 0.1 내지 약 25%이다.

- <34> 또 다른 구체예에서, 백본 부분은 폴리라이신이고 양전하로 하전된 분지성 기는 상기 라이신 결사슬 아미노기에 결합된다. 폴리라이신은 약 10,000 내지 약 1,500,000, 바람직하게는 약 25,000 내지 약 1,200,000, 및 가장 바람직하게는 약 100,000 내지 약 1,000,000의 분자량을 가질 수 있다. 폴리라이신은 예를 들면, MW > 70,000의 분자량을 갖는 폴리라이신, MW 70,000 내지 150,000의 분자량을 갖는 폴리라이신, MW 150,000 내지 300,000의 분자량을 갖는 폴리라이신 및 MW > 300,000의 분자량을 갖는 폴리라이신과 같은, 상용으로 입수가 가능한(Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) 임의의 폴리라이신일 수 있다. 적합한 폴리라이신의 선택은 조성물의 나머지 성분들에 의존적이고 조성물에 전체의 순 양전하를 제공하기에 충분하며 바람직하게는 음전하로 하전된 성분들의 합쳐진 총 길이의 1배 내지 4배의 길이를 제공한다. 바람직한 양전하로 하전된 분지성 기 또는 효능 기는 예를 들면, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg(-Gly₃Arg₇) 또는 HTV-TAT를 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 양전하로 하전된 백본은 폴리에틸렌이민과 같은 장쇄의 폴리알킬렌이민, 예를 들면, 약 1,000,000의 분자량을 갖는 폴리알킬렌이민이다.
- <35> 전술된 바와 같은 분지성 기를 갖는, 폴리펩티드 또는 폴리알킬렌이민을 포함하는 양전하로 하전된 백본 또는 담체 분자는 신규한 화합물이고 본 발명의 일 양태를 형성한다.
- <36> 본 발명의 일 구체예에서, 양전하로 하전된 분지성 기를 갖는 양전하로 하전된 담체만이 보툴리눔 독소의 경피 전달을 위해 필요하다. 일부 구체예에서, 양전하로 하전된 담체는 전술된 바와 같이, 복수의 양전하로 하전된 결사슬 기를 갖는 폴리펩티드(예를 들면, 라이신, 아르기닌, 오르니틴, 호모아르기닌, 및 그 등가물)이다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 약 10,000 이상의 분자량을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 양전하로 하전된 담체는 약 100,000 이상의 분자량을 갖는 복수의 양전하로 하전된 결사슬 기를 갖는 폴리알킬렌이민과 같은 비-펩티드 중합체이다. 그와 같은 폴리알킬렌이민은 폴리에틸렌이민 및 폴리프로필렌이민을 포함한다. 어느 경우에도, 경피 전달을 위한 유일한 필수 작용제로서의 용도를 위해, 상기 양전하로 하전된 담체 분자는 아래첨자 n₁은 0 내지 20, 보다 바람직하게는 0 내지 8, 훨씬 더 바람직하게는 2 내지 5의 정수이고, 아래첨자 n₂는 독립적으로 약 5 내지 약 25, 보다 바람직하게는 약 7 내지 약 17, 및 가장 바람직하게는 약 7 내지 약 13의 홀수인 것인 -(gly)_{n₁}-(arg)_{n₂}, HIV-TAT 또는 그의 단편, 또는 안테나페디아 PTD 또는 그의 단편을 포함하는 양전하로 하전된 분지성 기 또는 효능 기를 포함한다. 바람직하게는, 결사슬 또는 분지성 기는 전술된 바와 같은 일반식 -(gly)_{n₁}-(arg)_{n₂}를 갖는다. 다른 바람직한 구체예들은 분지성 기 또는 효능 기는 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수인 식 (gly)_p-RGRDDRRQRQR-(gly)_q, (gly)_p-YGRKKRRQRQR-(gly)_q, 또는 (gly)_p-RKKRRQRQR-(gly)_q를 갖는 HIV-TAT 단편이고 상기 단편은 상기 단편의 C-말단 또는 N-말단을 통해 상기 담체 분자에 결합되는 것인 구체예이다. 결사슬 분지성 기(side branching group)는 결합의 중심에서 D- 또는 L-형(R 또는 S 배열)을 가질 수 있다. 바람직한 HIV-TAT 단편은 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 8, 보다 바람직하게는 2 내지 5의 정수인 단편들이다. 다른 바람직한 구체예는 상기 분지성 기가 안테나페디아 PTD 기 또는 상기 기의 활성을 보유한 단편인 것인 구체예이다. 이들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서, 예를 들면, Console et al., J. Biol. Chem. 278:35109 (2003)로부터 공지되어 있다. 바람직하게는, 양전하로 하전된 담체는 전체 담체 중량 대비 백분율로서 약 0.05% 이상, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 45 중량%, 및 가장 바람직하게는 약 0.1 내지 약 30 중량%의 양으로 결사슬 양전하로 하전된 분지성 기를 포함한다. 식 -(gly)_{n₁}-(arg)_{n₂}를 갖는 양전하로 하전된 분지성 기의 경우, 가장 바람직한 양은 약 0.1 내지 약 25%이다.
- <37> 또 다른 구체예에서, 담체는 라이신 결사슬 아미노기에 결합된 양전하로 하전된 분지성 기를 갖는 폴리라이신이다. 이 특정한 구체예에서 이용되는 폴리라이신은 예를 들면, MW > 70,000의 분자량을 갖는 폴리라이신, MW 70,000 내지 150,000의 분자량을 갖는 폴리라이신, MW 150,000 내지 300,000의 분자량을 갖는 폴리라이신 및 MW > 300,000의 분자량을 갖는 폴리라이신과 같은, 상용으로 입수가 가능한(Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) 임의의 폴리라이신일 수 있다. 그러나, 바람직하게는 폴리라이신은 약 10,000 이상의 분자량을 갖는다. 바람직한 양전하로 하전된 분지성 기 또는 효능 기는 예를 들면, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg(-Gly₃Arg₇), HIV-TAT 또는 그의 단편, 및 안테나페디아 PTD 또는 그의 단편이다.
- <38> 본 발명의 다른 구체예에서, 담체는 양전하로 하전된 분지성 기를 갖는 비교적 짧은 폴리라이신 또는 폴리에틸렌이민(PEI) 백본(선형 또는 분지형)이다. 그와 같은 담체는 수송 효율성의 급격한 저하를 유발하는, 치료용 조성물에서 상기 백본과 보툴리눔 독소의 제어되지 않는 응집(agggregation)을 최소화하기 위해 유용하다. 담체가 비교적 짧은 선형 폴리라이신 또는 PEI 백본인 경우, 상기 백본은 75,000 미만, 보다 바람직하게는 30,000

미만, 및 가장 바람직하게는 25,000 미만의 분자량을 가질 것이다. 그러나, 담체가 비교적 짧은 분지형 폴리라이신 또는 PEI 백본인 경우, 상기 백본은 60,000 미만, 보다 바람직하게는 55,000 미만, 및 가장 바람직하게는 50,000 미만의 분자량을 가질 것이다. 그러나, 본 명세서에 기재된 바와 같은 분획제가 조성물에 포함되는 경우, 분지형 폴리라이신 및 PEI 백본의 분자량은 최대 75,000일 수 있고, 반면에 선형 폴리라이신 및 PEI 백본의 분자량은 최대 150,000일 수 있다.

<39> 본 명세서에서 사용되는 용어 "보툴리눔 독소(botulinum toxin)"는 세균에 의해 생산되거나 또는 재조합 기법에 의해 생산되는지 여부에 관계없이, 임의의 공지된 종류의 보툴리눔 독소, 및 조작된 변이체(engineered variant) 또는 융합 단백질을 포함한, 뒤이어 발견될 수 있는 종류의 보툴리눔 독소를 의미하도록 의도된다. 전술된 바와 같이, 현재, 7종의 면역학적으로 별개인 보툴리눔 신경독소, 즉, 각각 타입-특이적 항체에 의한 중화로 구별되는, 보툴리눔 신경독소 혈청형 A형, B형, C형, D형, E형, F형 및 G형이 파악되었다. 보툴리눔 독소 혈청형은 Sigma-Aldrich 및 Metabologics, Inc.(Madison, Wisconsin) 및 기타 출처로부터 입수가능하다. 보툴리눔 독소의 상이한 혈청형은 그들이 영향을 미치는 동물 종 및 그들이 유발하는 마비의 심각도 및 지속기간이 다양하다. 적어도 두 종의 보툴리눔 독소, A형 및 B형이 특정한 증상의 치료를 위한 제제로서 상용으로 입수가능하다. 예를 들면, A형은 보톡스(BOTOX)®라는 상표를 갖는 알레르간(Allergan) 및 디스포트(DYSFORT)®라는 상표를 갖는 입센(Ipsen)의 제제에 포함되고, B형은 마이오블록(MYOBLLOC)®이라는 상표를 갖는 엘란(Elan) 제제에 포함된다.

<40> 본 발명의 조성물에서 사용되는 보툴리눔 독소는 대안적으로 보툴리눔 독소 유도체, 즉, 보툴리눔 독소 활성을 가지나 천연 또는 재조합의 원형 보툴리눔 독소에 비해 하나 이상의 화학적 변형 또는 기능적 변형을 포함하는 화합물일 수 있다. 예를 들면, 보툴리눔 독소는 변형된 신경독소(예를 들면, 원형의, 또는 재조합에 의해 생성된 신경독소, 그의 유도체 또는 단편에 비해, 하나 이상의 아미노산 결실, 변형 또는 치환을 갖는 신경독소)일 수 있다. 예를 들면, 보툴리눔 독소는 그의 특성을 강화하거나 또는 그의 바람직하지 않은 부작용을 감소시키나, 여전히 바람직한 보툴리눔 독소 활성을 보유하는 방식으로 변형된 보툴리눔 독소일 수 있다. 대안적으로, 보툴리눔 독소는 재조합 또는 합성 화학 기법을 이용하여 제조된 독소일 수 있다(예를 들면, 상이한 보툴리눔 독소 혈청형의 서브유닛 또는 도메인으로부터 제조된, 재조합 펩티드, 융합 단백질, 또는 하이브리드 신경독소(예를 들면, 미국특허 제6,444,209호 참조)). 보툴리눔 독소는 또한 필요한 보툴리눔 독소 활성을 갖는 것으로 입증된 전체 분자의 일부분일 수 있고, 그와 같은 경우에, 그 자체로 또는 조합 또는 컨주게이트(conjugate) 분자, 예를 들면, 융합 단백질의 일부로서 이용될 수 있다. 또한, 보툴리눔 독소는 그 자체로 무독성일 수 있는 보툴리눔 독소의 전구체, 예를 들면, 단백질 가수분해에 의한 분해시 독성이 될 수 있는 무독성 징크 프로테아제(zink protease)의 형태일 수 있다.

<41> 본 발명은 또한 보툴리눔 독소의 조합 및 혼합물의 일반적인 용도를 고려하나, 그들의 상이한 속성 및 특성 때문에, 현재 보툴리눔 독소 혈청형의 혼합물은 의료 또는 미용 분야에서 일반적으로 투여되지 않는다.

<42> 본 발명의 조성물은 바람직하게는 대상자 또는 환자, 즉, 특정한 치료를 필요로 하는 인간 또는 다른 포유동물의 피부 또는 상피에 적용되는 제품의 형태이다. 용어 "필요로 하는(in need)"은 약학적 또는 건강-관련 필요를 의미하고, 예를 들면, 원치않는 안면 근육 경련을 포함하는 증상을 치료하는 것 및 미용적 및 주관적인 필요, 예를 들면, 안면 조직의 외형을 변화시키거나 개선시키는 것을 포함하도록 의도된다. 일반적으로, 조성물은 보툴리눔 독소를 담체, 및 통상적으로 하나 이상의 추가적인 약학적으로 허용가능한 수성 담체 또는 부형제와 혼합하는 것에 의해 제조된다. 그들의 가장 단순한 형태에서, 그들은 완충된 염수와 같은, 단순한 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 그러나, 조성물은 피부학적으로 또는 약학적으로 허용가능한 담체, 비히클 또는 매질(media)(즉, 적용될 조직과 용화가능한 담체, 비히클 또는 매질)을 포함한 국소 약학적 또는 미용약학적 조성물에서 전형적인 다른 성분들을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어, "피부학적으로 또는 약학적으로 허용가능한(dermatologically or pharmaceutically acceptable),"은 전술된 바와 같은 조성물 또는 그의 성분은 이 조직들과의 접촉에서의 용도에 적합하거나 또는 전반적으로 과다한 독성, 부적합성(incompatibility), 알레르기 반응 등 없이 환자에서의 용도에 적합하다는 것을 의미한다. 적합한 경우, 본 발명의 조성물은 고려 대상인 분야, 특히 미용 및 피부학 분야에서 통상적으로 이용되는 임의의 성분을 포함할 수 있다. 조성물은 또한 다량의(a quantity) 작은 음이온, 바람직하게는 다가 음이온, 예를 들면, 포스페이트, 아스파테이트, 또는 시트레이트를 포함할 수 있다.

<43> 그들의 제형 측면에서, 본 발명의 조성물은 용액, 유제(미세유제(microemulsion) 포함), 현탁액, 크림, 로션, 젤, 분말 또는 본 조성물이 이용될 수 있는 피부 및 기타 조직으로의 적용을 위해 이용되는 다른 전형적인 고체 조성물 또는 액체 조성물을 포함할 수 있다. 그와 같은 조성물은 보툴리눔 독소 및 담체 외에, 그와 같은 제품

에서 통상적으로 사용되는 다른 성분들, 예를 들면, 향균제, 보습제 및 수화제, 침투제(penetration agent), 보존제, 유화제, 천연 또는 합성 오일, 용매, 계면활성제, 디터전트(detergent), 연화제, 항산화제, 방향제, 충전제(filler), 증점제(thickener), 왁스, 약취 흡수제, 염료, 착색제, 분말 및 선택적으로, 마취제, 항-소양 첨가제(anti-itch additive), 식물 추출물, 컨디셔닝제(contitioning agent), 흑화제(darkening agent) 또는 미백제(lightening agent), 글리터(glitter), 습윤제(humectant), 운모(mica), 미네랄, 폴리페놀, 실리콘 또는 그의 유도체, 자외선차단제(sunblock), 비타민, 및 약용식물(phytomedicinal)을 포함하는 다른 성분들을 포함할 수 있다.

<44> 특히 바람직한 구체예에서, 조성물은 겔화제 및/또는 점도-변형제를 포함한다. 이 작용제들은 일반적으로 조성물의 점도를 증가시키기 위해 첨가되어, 조성물의 적용을 보다 용이하고 보다 정확하게 한다. 또한, 이 작용제들은 보툴리눔 독소의 활성 감소를 유발하는 경향이 있는 보툴리눔 독소/담체 수용액의 건조를 방지하는데 기여한다. 특히 바람직한 작용제는 전하를 띠지 않고 보툴리눔 독소의 활성 또는 피부를 통과하는 독소-담체 복합체의 효율성을 방해하지 않는 작용제들이다. 겔화제는 예를 들면, 히드록시프로필셀룰로오스(HPC)와 같은, 특정한 셀룰로오스-기반 겔화제일 수 있다. 일부 구체예에서, 보툴리눔 독소/담체 복합체는 2-4% HPC를 갖는 조성물로 제제화된다. 대안적으로, 보툴리눔 독소/담체 복합체를 포함하는 용액의 점도는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 첨가하는 것에 의해 변화될 수 있다. 다른 구체예에서, 보툴리눔 독소/담체 용액은 세타필(Cetaphil)® 보습제와 같은 사전-혼합된 점도제(pre-mixed viscous agent)와 혼합될 수 있다.

<45> 본 발명의 조성물은 선택적으로 분획제를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는, "분획제(partitioning agent)"는 보툴리눔 독소와 본 발명의 담체의 원치않는 또는 제어되지 않는 응집을 방지하거나 또는 최소화하는 특성을 갖는 임의의 물질이다. 분획제는 예를 들면, 농축된 보툴리눔 독소 용액이 용적 제한(volume constraint) 때문에 사용되어야 하는 경우, 유용할 수 있다. 이와 같은 경우에, 분획제는 보툴리눔 독소가 분산되어 유지될 수 있게 하여, 분획제가 없는 경우 일어났을 독소의 응집을 방지한다. 일반적으로, 분획제는 (1) 무자극성(non-irritating)이고, (2) 보툴리눔 독소를 파괴하지 않으며, (3) 투과성의 증가를 부여하지 않고, (4) 신뢰할 수 있는 안정적인 입자 크기를 제공하고, (5) 전하를 띠지 않으며, (6) 독소와 경피용 담체(transdermal carrier)의 복합체를 방해하지 않는다. 적합한 분획제의 예는 에탄올(EtOH)이다. 바람직한 구체예에서, 에탄올은 조성물의 20% 미만이고, 가장 바람직하게는 조성물의 5% 미만이다.

<46> 예로서, 용적 제한 때문에 2.5 ml가 아닌, 0.5 ml 용액에 100 U 보툴리눔 독소를 재구성하는 것이 요구되는 경우, 일반적으로 보툴리눔 독소는 바람직하지 않은 응집 및 따라서 활성 감소를 보일 것이라는 것을 안다. 그러나, 분산제로서 1% EtOH을 첨가하는 것에 의해, 활성은 이 농도로 24시간 후에도 완전하게 유지된다. 또 다른 예로서, 1.0 ml의 0.9% NaCl에서 재구성된 보톡스®는 완전한 활성을 가지며, 1% 및 5% EtOH + 0.9% NaCl에서의 재구성은 완전한 활성을 갖는 용액을 생성한다.

<47> 본 발명의 특정한 구체예에서, 보툴리눔 독소와 양전하로 하전된 백본 담체의 복합체화(complexation)를 제고하기 위해 올리고-다리(oligo-bridge) 또는 다가 음이온(polyanion) 다리가 보툴리눔 독소 조성물에 첨가된다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지된 바와 같이, 보툴리눔 독소는 실제로 일부는 양전하로 하전되고, 일부는 음전하로 하전된 것인 상이한 단백질들의 복합체이다. 상기 독소의 성분들의 정확한 분포(distribution)는 독소의 기원(source)에 따라 상이하기 때문에, 특정한 기원으로부터의 보툴리눔 독소는 본 명세서에 기재된 양전하로 하전된 백본과의 복합체화에 대해 보다 낮은 경향을 가질 수 있다. 그러나, 본 발명의 일 양태는 그와 같은 보툴리눔 독소에 올리고- 또는 다가 음이온 다리를 첨가하는 것에 의해, 국소 조성물의 효율성 및 효능이 현저하게 증가된다는 발견이다. 그와 같은 올리고-/다가 음이온 다리의 적합한 예들은 인산 나트륨(5%), PBS, 또는 5% 폴리-L-아스파테이트(예를 들면, 분자량 3000의 폴리-L-아스파테이트)를 포함한다.

<48> 본 발명에 따른 조성물은 보툴리눔 독소와 담체가 시간의 경과에 따라 제어된 방식으로 피부 상으로 방출될 수 있도록 캡슐화되거나 물질 내에 함유된 것인 제어 방출형(controlled-release) 또는 지속-방출형(sustained-release) 조성물의 제형일 수 있다. 보툴리눔 독소 및 담체는 시간의 경과에 따라 보툴리눔 독소의 방출을 제공하도록 선택되거나 및/또는 작제된 매트릭스(matrix), 리포솜, 소포(vesicle), 마이크로캡슐(microcapsule), 미세구(microsphere) 및 그 등가물 내에, 또는 고체 입자형 물질 내에 함유될 수 있다. 보툴리눔 독소 및 담체는 함께 (예를 들면, 동일한 캡슐 내에) 또는 별개로 (별개의 캡슐 내에) 캡슐화될 수 있다.

<49> 본 명세서에 기재된 조성물을 이용하여, 보툴리눔 독소는 피부 하부의 근육 또는 피부 내부의 선 구조(glandular structure)로 마비를 생성하거나, 이완을 생성하거나, 수축을 경감시키거나, 경련을 방지 또는 경감시키거나, 내분비(glandular output)를 감소시키거나 또는 다른 원하는 생성하기 위한 유효량으로 전달될 수 있

다. 이와 같은 방식에 의한 보툴리눔 독소의 국소 전달은 주사형 또는 이식형 물질에 비해 투여량 감소를 제공하고, 독성을 감소시키며 원하는 효과를 위한 보다 정확한 투여량 최적화를 가능하게 한다.

<50> 본 발명의 조성물은 유효량의 보툴리눔 독소를 투여하기 위해 적용될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어, "유효량(effective amount)"은 원하는 근육 마비 또는 다른 생물학적 또는 미용적 효과를 생성하기에 충분하나, 내재적으로 안전한 양, 즉, 심각한 부작용을 방지할 정도로 충분히 낮은 양인 앞서 정의된 바와 같은 보툴리눔 독소의 양을 의미한다. 원하는 효과는 예를 들면, 미세한 선 및/또는 주름, 특히 얼굴에서 미세한 선 및/또는 주름을 감소시키거나, 또는 눈을 확대하거나, 입 꼬리를 위로 올리거나(lift) 또는 윗입술로부터 전개되는 선들을 평탄하게 하는 것과 같은 방식으로 얼굴의 외형을 조정하는 것을 목적으로 하는 특정 근육의 이완 또는 근육 긴장의 전반적인 이완을 포함한다. 마지막에 언급된 효과, 근육 긴장의 전반적인 제거는 얼굴 등에서 이루어질 수 있다. 본 발명의 조성물은 단일-투여량 치료제로서의 적용을 위한 보툴리눔 독소의 적합한 유효량을 포함할 수 있고, 투여 장소에서의 회석을 위해, 또는 복수 적용에서의 용도를 위해 보다 농축될 수 있다. 본 발명의 양전하로 하전된 담체의 이용을 통해, 보툴리눔 독소는 원치않는 안면 근육 또는 다른 근육 경련, 다한증, 여드름과 같은 증상, 또는 근육통 또는 경련의 경감이 요구되는 신체의 다른 부위에서의 증상을 치료하기 위해 대상자에게 경피로 투여될 수 있다. 보툴리눔 독소는 근육 또는 다른 피부-관련 구조들로의 경피 전달을 위해 국소적으로 투여된다. 투여는 예를 들면, 보툴리눔 독소의 투여가 요구되는 다리, 어깨, 등(허리 포함), 액와, 손바닥, 발, 목, 사타구니, 손등 또는 발등, 팔꿈치, 상박, 무릎, 엉덩이, 몸통, 골반, 또는 신체의 다른 부위로 이루어질 수 있다.

<51> 본 발명에 따른 보툴리눔 독소 제제의 투여는 신경학적 통증의 치료, 편두통 또는 기타 두통의 예방 또는 경감, 여드름의 예방 또는 경감, 긴장이상증(dystonia) 또는 긴장이상성 수축(자각적 또는 임상적)의 예방 또는 경감, 자각적 또는 임상적 다한증과 연관된 상태의 예방 또는 경감, 고혈압 또는 발한의 경감, 면역 반응의 경감 또는 강화, 또는 주사에 의한 보툴리눔 독소의 투여가 제한되거나 수행되는 다른 상태들의 치료를 포함한 상태를 치료하기 위해 수행될 수 있다.

<52> 보툴리눔 독소 또는 본 명세서에 기재된 다른 치료용 단백질의 투여는 또한 면역화(immunization)-관련 목적을 위해 수행될 수 있다. 놀랍게도, 본 명세서에 기재된 보툴리눔 독소의 투여는 면역 반응을 감소시키기 위해 수행될 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명은 보툴리눔 독소가 변화된 투여 경로에 의해 전달될 수 있어서, 이에 의해 상기 작용제의 복잡한 항원 제시(antigen presentation)를 변화시킨다. 이 방식으로, 본 발명은 보툴리눔 독소의 항원에 대한 면역 반응을 감소시키고, 활성의 면역-관련 감소 없이 반복 투여를 촉진하기 위해 유용할 수 있다. 대안적으로, 면역 반응을 강화하기 위해, 예를 들면, 주사 없이 유년기 면역화(childhood immunization)를 위해 다양한 단백질에 대한 면역화를 제공하기 위해, 복합체가 제조되고 국소적으로 적용될 수 있다. 면역-관련 활성과 관련된 용도를 위해, "유효량(effective amount)"은 투여 또는 일련의 투여 후에 대상자가 보툴리눔 독소에 대한 면역반응을 일으킬 수 있게 하기 위해 충분한 보툴리눔 독소의 양을 의미한다.

<53> 가장 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 의사 또는 다른 의료 전문가에 의해 또는 그들의 지휘 하에 투여된다. 그들은 단일 치료로 또는 시간의 경과에 따라 일련의 정기적인 치료로 투여될 수 있다. 전술된 목적을 위한 보툴리눔 독소의 경피 전달을 위해, 전술된 바와 같은 조성물은 그 효과가 요구되는 위치 또는 위치들에서 피부에 국소적으로 적용된다. 보툴리눔 독소/담체 수용액이 피부에 직접 투여되는 구체예에서, 독소 활성의 감소를 가져오는 상기 용액의 건조를 방지하기 위해 치료된 영역을 (예를 들면 세타필® 보습제로) 뒤덮거나 또는 치료된 영역을 차단제(예를 들면, 텔파(Telfa))로 폐색시키는 것이 바람직하다. 그 속성 때문에, 가장 바람직하게는, 적용되는 보툴리눔 독소의 양은 부작용 또는 원치않는 효과를 생성하지 않으면서 원하는 효과를 생성할 적용 비율 및 적용 빈도로 주의깊게 적용되어야 한다. 따라서, 예를 들면, 본 발명의 국소 조성물은 피부 표면 1 cm² 당 약 1U 내지 약 20,000U, 바람직하게는 약 1U 내지 약 10,000U 보툴리눔 독소의 비율로 투여되어야 한다. 이 범위 내에서 보다 높은 투여량은 바람직하게는 제어 방출형 물질들과 함께 채택될 수 있고, 또는 제거 전에 피부 상에서 보다 짧은 체류 시간(dwell time)이 허용될 수 있다.

<54> 보툴리눔 독소/담체 용액의 효능을 유지하기 위해 보툴리눔 독소/담체 조성물의 적용 전에 피부 표면의 적합한 준비가 중요하다. 예를 들면, 적용 전에 피부 상에서 표면 기름을 세정하기 위해 피부 표면상으로 계면활성제를 도입하면 놀랄 정도로 역효과를 초래하는데, 이는 계면활성제가 보툴리눔 독소의 활성을 파괴하는 것으로 보이기 때문이다. 보툴리눔 독소/담체 용액의 적용 전에, 세정에 뒤이어 피부가 수회 물로 세척되어도 이 역효과는 일어난다. 유아용 세정제(baby wipe)에서 발견되는 것과 같은 매우 순한 계면활성제도 이 현상을 유발하는 것으로 보인다. 따라서, 본 발명의 조성물을 투여하는 바람직한 방법에서, 피부는 물만을 이용하여 사전에 세정

된다. 물 단독에 의한 세척은 또한 보툴리눔 독소의 경피 전달을 적절하게 개선하는 것으로 보인다.

<55> 또한, 보툴리눔 독소/담체 복합체의 적용 전에 진피층을 감소시키기 위해 피부는 벗겨질 수 있다(strip). 원칙적으로, 피부를 벗겨내는 과정은 보툴리눔 독소의 경피 전달의 증가된 효율성을 가져온다. 그러나, 피부를 벗겨내기 위해 이용되는 방법이 중요하다. 예를 들면, 인간 또는 동물에서 각질층의 아세톤-매개 감소는 뒤이어 적용된 보툴리눔 독소의 활성을 감소시키는 것으로 보인다. 대조적으로, 테이프 스트리핑(tape stripping)(즉, 피부의 표면에 테이프를 적용하고 그 후 테이프를 제거하는 방법)은 마우스 모델 및 인간에서 모두 보툴리눔 독소의 보다 심부로의 침투 및 투여량 감소를 가능하게 하는 것으로 보인다. (예를 들면, 연마용 패드의 이용을 통한) 피부 표면의 찰상(abrasion)은 테이프 스트리핑과 유사한 효과를 유발할 것으로 추정된다.

<56> 본 발명은 또한 보툴리눔 독소 및 본 명세서에 정의된 바와 같은 분지성 기가 결합된 양전하로 하전된 백본을 갖는 담체를 포함하는 조성물의 경피 전달용 장치를 포함한다. 그와 같은 장치는 피부 패치와 같은 작제물과 같이 간단할 수 있고, 또는 조성물의 분배 수단 및 상기 조성물의 분배를 모니터링하는 수단, 및 선택적으로 대상자의 상태를 모니터링(예를 들면, 분배되는 물질에 대한 대상자의 반응을 모니터링)하는 수단을 포함하는 보다 복잡한 장치일 수 있다.

<57> 상기 장치의 구축을 위한 물질의 선택이 중요하다는 것에 유의해야 한다. 전달 장치의 구축을 위해 바람직한 물질은 장치의 표면에 보툴리눔 독소의 분해 또는 보툴리눔 독소의 원치않는 흡착을 통한, 보툴리눔 독소/담체 용액의 활성의 상실을 초래하지 않는 것들이다. 그와 같은 원치않는 거동은 예를 들면, 수용액에 담긴 보툴리눔 독소/담체가 폴리프로필렌 표면을 접촉하는 경우에 관찰되나, 보툴리눔 독소/담체 용액이 폴리비닐 클로라이드(PVC) 표면을 접촉하는 경우에는 관찰되지 않는다.

<58> 일반적으로, 조성물은 장치에서 미리-제제화(pre-formulated)되거나 및/또는 미리-장착(pre-installed)되거나 또는 예를 들면, 두 성분(보툴리눔 독소 및 담체)을 별도로 수용하나, 적용 시 또는 적용 전에 그들을 조합하는 수단을 제공하는 키트를 이용하여 나중에 제조될 수 있다. 담체 분자의 양, 보툴리눔 독소에 대한 담체의 비는 대상이 되는 조성물에서 사용되기 위해 선택된 담체에 의존적일 것이다. 특정 경우에, 담체 분자의 적합한 양 또는 비는 예를 들면, 하기에 기재된 바와 같이, 하나 이상의 실험을 수행하는 것에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

<59> 일반적으로, 본 발명은 또한 치료를 필요로 하는 대상자 또는 환자에게 보툴리눔 독소를 투여하는 방법을 포함한다. 본 발명의 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같이, 양전하로 하전된 분지성 기가 부착된 양전하로 하전된 백본을 갖는 담체와 함께 유효량의 보툴리눔 독소를 국소적으로 투여하는 단계를 포함한다. "함께(in conjunction with)"는 두 성분들(보툴리눔 독소 및 담체)이 대상자에게 투여될 조성물로 조합되는 단계를 포함하는 배합(combination) 절차로 투여되거나 또는 두 성분들이 별개로, 그러나 유효량의 치료용 단백질의 필요한 전달을 제공하기 위해 함께 작용하는 방식으로 투여된다는 것을 의미한다. 예를 들면, 담체를 포함하는 조성물이 먼저 대상자의 피부에 적용되고, 뒤이어 보툴리눔 독소를 포함하는 피부 패치 또는 다른 장치가 적용된다. 보툴리눔 독소는 피부 패치 또는 다른 분배 장치에 건조 제형으로 포함될 수 있고, 반면에 양전하로 하전된 담체는 상기 패치의 적용 전에 피부 표면에 적용되어 상기 두 물질이 함께 작용하여 원하는 경피 전달이 이루어질 수 있다. 따라서, 상기 두 물질(담체 및 보툴리눔 독소)이 조합되어 작용하거나 또는 인 시투(in situ)로 조성물 또는 조합을 형성하기 위해 상호작용한다. 따라서, 본 발명은 또한 피부를 통해 보툴리눔 독소를 분배하는 장치 및 담체 또는 백본을 포함하고, 대상자의 피부 또는 상피로 적용하기에 적합한 액체, 젤, 크림 또는 그 등가물을 모두 포함하는 키트를 포함할 수 있다. 의료 전문가의 지시 하에, 또는 환자 또는 대상자에 의해 본 발명의 조성물을 투여하기 위한 키트는 또한 그 목적에 적합한 맞춤형 애플리케이터(custom applicator)를 포함할 수 있다.

<60> 본 발명의 조성물, 키트 및 방법은 보다 높은 비활성(specific activity) 및 잠재적으로 개선된 약동학(pharmacokinetics)을 갖는 보다 순수한 보툴리눔 독소의 전달을 가능하게 한다. 또한, 담체는 외래의 보조 단백질(foreign accessory protein)(예를 들면, 400-600 mg 범위의 인간 혈청 알부민 또는 250-500 mg 범위의 재조합 혈청 알부민)에 대한 필요를 감소시키는 안정화제, 및/또는 폴리스카라이드 안정화제로 작용할 수 있고, 보툴리눔 독소에 대한 면역 반응의 유용한 감소를 제공할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 약 4.5 내지 약 6.3 범위의 pH를 갖는 생리학적 환경에서의 용도에 적합하고, 따라서, 그와 같은 pH를 가질 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 실온 또는 냉장 조건에서 저장될 수 있다.

<61> 하기에 본 발명의 대표적인 실시예가 기재된다. 그들은 전달될 신경독소의 공유결합에 의한 변형 없이 기능적인 보툴리눔 신경독소 복합체의 피부를 통한 전달을 보여준다.

실시예

실시예 1

레반스 펩티드 담체를 이용한

보툴리눔 독소의 인 비보 수송.

본 실험은 대조구 대비 단회 투여 후 완전한(intact) 피부를 통해 완전한 표지된 단백질 보툴리눔 독소를 포함하는 대형 복합체를 수송하기 위한 펩티드 담체의 용도를 보여주었다.

백본 선택:

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

치료제:

본 실험을 위해 A형 보툴리눔 독소의 보톡스® 브랜드(알레르간)를 선택했다. 이 제품은 약 150,000의 분자량을 갖는다.

시료의 준비

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

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

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

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

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

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

비오틴 시각화는 다음과 같이 수행하였다. 요약하면, 각 섹션을 1시간 동안 NeutrAvidin® 완충 용액에 침지시켰다. 알칼리 포스파타아제 활성을 시각화하기 위해, 단편들을 식염수로 4회 세척하고 NBT/BCIP(Pierce

Scientific)에 1시간 동안 침지시켰다. 그 후, 섹션들을 식염수로 세정하고 플랜-아포크로마트(plan-apochromat) 렌즈들로 Nikon E600 현미경 상에서 그 전체를 촬영했다.

<96> 데이터 처리 및 통계 분석:

<97> 전체 포지티브 염색은 Image Pro Plus 소프트웨어(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)를 이용한 배치 이미지 분석(batch image analysis)를 통해 맵검 관찰자에 의해 결정하고, 각각에 대해 포지티브 염색의 퍼센트를 결정하기 위해 총 단면적으로 정규화시켰다. 뒤이어 Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용하여 일원 ANOVA의 반복된 측정에서 95% 신뢰 수준에서 유의성 분석으로 각 군에 대해 평균 및 표준 오차를 결정했다.

<98> 결과:

<99> KNR("EB-Btox") 또는 K("nl")와 함께 Btox-b의 1회 국소 적용 후 비오틴티닐화된(biotinylated) 보툴리눔 독소에 대해 양성인 평균 단면적을 총 면적 대비 퍼센트로 기록하였다. 결과들을 다음 표 1에 표시하고 도 1에 도시하였다. 도 1에서, Btox-b 및 펩티드 담체 KNR을 포함하는 "EB-Btox" 및 대조구로서 다가 양이온 K와 함께 Btox-b를 포함하는 "nl"에 의한 3일간의 1일 1회 처리 후 표지에 대해 양성인 면적을 총 면적 대비 퍼센트로 결정했다. 각 군에 대해 평균 및 표준 오차를 표시했다.

<100> 표 1. KNR(JMW-7) 또는 K(JMW-8)과 함께 Btox-b의 30분간 1회 국소 투여 후 총 단면의 퍼센트로 나타낸 표지된 보툴리눔 독소 영역에 대한 평균 및 표준 오차.

<101>

군	평균	표준 오차(Std. Error)
JMW-7	33	5.333334
JMW-8	8.666667	0.333334

<102> $P=0.0001$ (99%에서 유의성 있음)

<103> 실시예 2.

<104> 펩티드 담체를 갖는 국소용

<105> 보툴리눔 독소 제제의 치료적 효능.

<106> 실시예 1은 펩티드 경피 담체가 완전한 피부를 갖는 쥐과(murine) 모델에서 국소 투여 후 보툴리눔의 효율적인 이동을 가능하게 한다는 것을 보여주었다. 그러나, 이 실험은 복합 단백질 보툴리눔 독소가 피부를 통한 전위(translocation) 후 기능적 형태로 방출되는지 여부는 나타나지 않았다. 따라서 보툴리눔 독소가 이 펩티드 담체(역시, 단백질의 공유결합성 변형 없이)를 이용하는 국소용 작용제로서 완전한 피부를 통해 치료적으로 전달될 수 있는지 여부를 평가하기 위해 하기의 실험을 수행하였다.

<107> 폴리라이신(MW 112,000)에 18%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실기를 통해 라이신 결사슬의 유리 아민에 -Gly₃Arg₇을 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 18개가 -Gly₃Arg₇에 접합됨). 변형된 백본은 "KNR"로 표시했다. 대조구 다가 양이온(polycation)은 동일한 로트(lot)로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 폴리라이신("K"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이었다.

<108> "JMW-9"로 표지된 군: 4:1의 계산된 MW 비로 분량당 2.0 유닛의 보툴리눔 독소(즉, 총 60U) 및 펩티드 담체 KNR을 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 세타필 로션과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

<109> "JMW-10"으로 표지된 군: 4:1의 MW 비로 분량당 2.0 유닛의 보툴리눔 독소(즉, 총 60U) 및 K를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 세타필 로션과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

<110> "JMW-11"로 표지된 군: 다가 양이온 없이 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 60U)을 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 세타필 로션과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

<111> 펩티드 담체 및 보툴리눔 독소에 의한 1회 처리 후 치료적 효능을 결정하기 위한 동물 실험:

<112> 치료의 적용 동안 동물들을 이소플루란의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취시킨 후, C57 블랙 6 마우스들(군 당 n=4)에 발끝에서 대퇴 중간 부위(mid thigh)까지 균일하게 적용된 적합한 치료제의 정량된 400 마이크로리터 투여량의 국소 적용을 시행했다. 양쪽 사지에 치료를 시행하고 양쪽 중 한쪽에 무작위로 치료를 적용하였다. 동물들은 탈모를 겪지 않았다. 초기 치료 후 30분 경과 시, 보툴리눔 독소 투여 후 발 운동성(foot mobility)에 대해 발표된 디지털 외향 스코어(digital abduction score)에 따라 디지털 외향 능력(digital abduction capability)에 대해 마우스들을 평가했다[Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. Toxicol. 2001 Dec; 39 (12): 1815-20]. 또한 마우스의 운동성을 주관적으로 평가했다.

<113> 데이터 처리 및 통계 분석:

<114> 두 명의 맹검 관찰자가 독립적으로 디지털 외향 스코어(Digital abduction score)를 표로 작성하였다. 뒤이어, Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용한 일원 ANOVA 반복 측정으로 95% 신뢰 수준에서의 유의성 분석으로 각 군에 대한 평균 및 표준 오차를 결정했다.

<115> 결과:

<116> KNR("JMW-9"), K("JMW-10") 또는 다가 양이온 없는 희석제("JMW-11")와 함께 보툴리눔 독소의 1회의 국소 투여 후 평균 디지털 외향 스코어를 표 2에 표시하고 하기의 도 2에 대표적인 현미경 사진을 도시한다. 펩티드 담체 KNR은 양 대조구들에 비해 보툴리눔 독소의 통계적으로 유의성 있는 기능적 전달을 제공했고, 양 대조구들에 대한 결과들은 상호 간에 유사했다. 본 실험의 추가적인 독립적인 반복들(총 3회의 실험에서 KNR과 함께 투여된 국소 보툴리눔 독소로부터 통계적으로 유의성 있는 마비가 관찰되나, 대조구들에 대해서는 마비가 관찰되지 않는 동일한 결과를 얻음)은 본 발견을 확인했고 K의 존재 또는 부재(즉, 2 개의 대조구들)에 따른 국소 보툴리눔 독소 간에는 유의성 있는 차이를 보여주지 않았다. 흥미롭게도, 마우스들은 일관되게 마비된 사지 쪽으로 향하여 이동했다(처리된 동물들의 경우는 100% 발생했고, 대조군들에서는 0% 발생함). 도 2에 나타난 바와 같이, 보툴리눔 독소 + 대조구 다가 양이온 폴리라이신 또는 다가 양이온 없이 보툴리눔 독소("독소 단독")로 처리된 사지는 발가락들을 움직일 수 있으나(집혔을 때 방어 메카니즘으로서), 보툴리눔 독소 + 펩티드 담체 KNR("레반스 보툴리눔 제제")로 처리된 사지는 움직일 수 없었다.

<117> 표 2: 펩티드 담체 KNR("JMW-9"), 대조구 다가 양이온 K("JMW-10")와 함께, 또는 단독으로("JMW-11") 투여된 보툴리눔 독소의 1회 국소 적용 30분 후 디지털 외향 스코어들.

<118>

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

<119> $P=0.0351$ (95%에서 유의성 있음)

<120> 결론:

<121> 본 실험은 펩티드 경피 담체가 치료제의 공유결합성 변형 없이 피부를 통한 보툴리눔 치료제의 치료적 유효량을 수송할 수 있다는 것을 보여준다. 본 실험은 또한 보툴리눔 독소가 대조구에서 국소적으로 적용되었을 때 기능을 발휘하지 않는다는 것을 확인한다.

<122> 실시예 3.

<123> 비펩티드 담체를 포함하는 국소용 보툴리눔 독소 제제의

<124> 치료적 효능

<125> 이 실험은 본 발명에서 비-펩티드 담체의 성능을 보여준다.

<126> 방법:

<127> 백본 선택:

<128> 30%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실을 통해 PEI 결사슬의 유리 아민으로 -Gly₃Arg₇을 폴리에틸렌이민(PEI)

MW 1,000,000에 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 30개가 -Gly₃Arg₇에 접합됨). 변형된 백본은 대형 비-펩티드 담체를 나타내기 위해 "PEIR"로 표시했다. 대조구 다가 양이온(polycation)은 동일한 로트(lot)로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 PEI("PEI"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)였다. 실시예 1에서와 동일한 보툴리눔 독소 치료제를 이용했다.

<129> 제조업체의 설명서에 따라 보툴리눔 독소를 재구성했다. 각 경우에, 높은 음전하를 띤 대형 뉴클레오타이드 복합체의 전달에서와 같이 과량의 양전하를 갖는 최종 복합체를 조립하기 위해 과량의 다가 양이온을 채택했다. 순 중성 전하 또는 양성 전하는 높은 음전하의 세포 표면 프로테오글리칸 및 세포외 매트릭스로부터 단백질 복합체의 반발을 방지한다. 모든 군들에 대해 보툴리눔 독소 투여량을 표준화하고, 국소적으로 적용될 조성물의 최종 용량 및 최종 pH도 표준화했다. 시료들은 다음과 같이 준비했다:

<130> "AZ"로 표시된 군: 5:1의 계산된 MW 비로 분량당 2.0 유닛의 보툴리눔 독소(즉, 총 60U) 및 초 순수 형태의 비-펩티드 담체 PEIR을 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 세타필과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

<131> "BA"로 표시된 군: 5:1의 전하 비(charge ratio)로 분량당 2.0 유닛의 보툴리눔 독소(즉, 총 60U) 및 PEI를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 세타필과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

<132> 1회 치료 후 치료적 효능을 결정하기 위한 동물 실험:

<133> 치료의 적용 동안 동물들을 이소플루란의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취시킨 후, C57 블랙 6 마우스들(군 당 n=3)에 발끝에서 대퇴 중간 부위까지 균일하게 적합한 치료제의 정량된 400 마이크로리터 투여량의 국소 적용을 시행했다. 양쪽 사지에 치료를 시행하고 양쪽 중 한쪽에 무작위로 치료를 적용하였다. 동물들은 탈모를 겪지 않았다. 초기 치료 후 30분 경과 시, 보툴리눔 독소 투여 후 발 운동성(foot mobility)에 대한 발표된 디지털 외향 스코어(digital abduction score)에 따라 디지털 외향 능력(digital abduction capability)에 대해 마우스들을 평가했다[Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. Toxicon. 2001 Dec; 39 (12): 1815-20]. 또한 마우스의 운동성을 주관적으로 평가했다.

<134> 데이터 처리 및 통계 분석:

<135> 두 명의 맹검 관찰자가 독립적으로 디지털 외향 스코어(Digital abduction score)를 표로 작성하였다. 뒤이어, Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용한 일원 ANOVA 반복 측정으로 95% 신뢰 수준에서의 유의성 분석으로 각 군에 대한 평균 및 표준 오차를 결정했다.

<136> 결과:

<137> 초순수(ultrapure) PEIR("AZ"), 또는 대조구 다가 양이온 PEI("BA")와 함께 보툴리눔 독소의 1회의 국소 투여 후 평균 디지털 외향 스코어를 표 3에 표시하고 반복은 표 4(본 실험에 대한 1회 독립 반복)에 표시했다. 비-펩티드 담체 PEIR은 대조구들에 비해 보툴리눔 독소의 통계적으로 유의성 있는 기능적 전달을 제공했다. 이전의 경우에서와 같이, 동물들은 마비된 사지들을 향해 원을 그리며 걷는 것으로 관찰되었다.

<138> 표 3. 초순수 PEIR("AZ"), 또는 대조구 다가 양이온 PEI("BA")와 함께 투여된 보톡스의 1회 국소 적용 30분 후 디지털 외향 스코어들. 평균 및 표준 오차를 표시한다.

<139>

군	평균	표준 오차
BA	0.833	0.307
AZ	3.917	0.083

<140> $P=0.0002$ (99%에서 유의성 있음)

<141> 표 4. 초순수 PEIR("AZ1"), 또는 대조구 다가 양이온 PEI("BA1")와 함께 투여된 보톡스의 1회 국소 적용 40분 후 디지털 외향 스코어들. 평균 및 표준 오차를 표시한다.

<142>

군	평균	표준 오차
BA1	0.333	0.211
AZ1	3.833	0.167

<143> $P=0.0001$ (99%에서 유의성 있음)

<144> 결론:

<145> 이 실험은 비-펩티드 경피 담체가 보툴리눔 독소의 사전 공유결합성 변형(prior covalent modification) 없이 피부를 통해 치료적 투여량의 보툴리눔 독소를 수송할 수 있다는 것을 보여주었다. 이와 같은 발견은 펩티드 이동 작용제(peptidyl transfer agent)의 경우들을 보완한다. 치료 효과를 달성하기 위해 비-펩티드 담체 또는 펩티드 담체를 이용하는 옵션은 특정 상황들, 환경들 및 적용 방법들에 따라 맞춤화할 수 있게 하며 본 발명의 경피 전달 플랫폼의 영역에 더해진다.

<146> **실시예 4**

<147> **펩티드 담체를 포함하는 국소용 보툴리눔 독소 제제의**

<148> **이마 다한증 및 주름에 대한 치료적 효능**

<149> 이 실험은 사람 대상자의 이마 다한증 및 주름의 치료를 위해 보툴리눔 독소가 이 펩티드 담체를 이용한 국소용 작용제로서 완전한 피부를 통해 치료적으로 전달될 수 있다는 것을 보여주었다.

<150> 이마 다한증 및 주름 연구에 대한 실험 절차:

<151> Nikon TTL Macro-speedlight SB29s 플래쉬(Nikon, Inc. USA)를 갖춘 Nikon D70 카메라를 이용하여 청색 배경 상에서 대상자의 이마의 기준(baseline) 및 치료-후 사진을 촬영했다.

<152> Sony Digital Handycam 캠코더를 이용하여 청색 배경 상에서 대상자의 이마의 기준 및 치료-후 비디오를 촬영했다.

<153> 10% 국소용 포비돈 요오드 용액(Walgreen Co., Deerfield, Illinois) 및 Kingsford's 100% 옥수수 전분(ACH Food Companies, Inc., Memphis, Tennessee)을 이용하여 땀 생성을 시각화하기 위해 Minor의 전분/요오드 테스트를 수행하였다. 대상자의 이마에 멸균 솜(Johnson & Johnson Consumer Product Company, Skillman, New Jersey)을 이용하여 요오드 용액을 바르고, 완전히 건조시켰다. 그 영역에 멸균 솜을 이용하여 전분 분말을 가볍게 뿌렸다. 실온에서 신체적 활동을 통해 땀을 유도했다. 땀이 요오드를 용해시키고 전분 분말과 반응하면서 검정색 스팟들이 나타났다. Nikon TTL Macro-speedlight SB29s 플래쉬(Nikon, Inc. USA)를 갖춘 Nikon D70 카메라를 이용하여 청색 배경 상에서 요오드-전분 테스트의 기준(baseline) 및 치료-후 사진을 촬영했다. 대상자의 이마를 70% 에탄올로 닦고 뒤이어 탈이온수로 닦았다.

<154> 치료의 적용 전에 각질층에 대한 비-침습적(non-invasive) 테이프 스트립핑 방법에 의해 대상자의 이마에 소정의(predefined) 치료 영역을 준비했다. 미리 절단한 테이프를 강한 압력으로 수초간 치료 영역에 적용했다. 테이프의 한쪽 끝을 당기는 것에 의해 빠르게 테이프를 제거했다. 두번째 테이프를 첫번째 테이프를 제거한 직후 동일한 영역에 조심스럽게 적용했다. 테이프-스트립핑을 3-5회 반복했다.

<155> 치료제 준비:

<156> 멸균된 0.9% 염화나트륨의 보톡스 재구성 용액(Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) + 5% EtOH + A-3C(Donlar BioPolymer, Inc. Bedford Park, Illinois)로 표지된 5% 단쇄 폴리아스파테이트 용액을 준비했다 (즉, 1.0 밀리리터 용액당, 멸균된 0.9% 염화나트륨 용액 900 마이크로리터 + 100% 에탄올 50 마이크로리터 + 단쇄 폴리아스파테이트 용액 50 마이크로리터). 0.9% 염화나트륨 용액 + 5% 에탄올로 Kn21T를 1mg/ml 농도로 준비했다(즉, 500 마이크로리터의 Kn21T를 분주하고 25 마이크로리터의 100% 에탄올을 첨가함). 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, Kn21T는 21,000의 분자량 및 TAT 분지성 기들을 갖는 양전하로 하전된 폴리라이신 백본을 의미한다. 100 유닛의 보톡스(Allergan, Irvine, CA)를 18₆11/2을 갖춘 멸균된 3ml 라텍스 불포함 주사기(Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey)를 이용하여 1.0 밀리리터의 재구성 용액으로 재구성하였다. 재구성된 Botox를 조심스럽게 8회 역전(inversion)에 의해 혼합했다. 각 대상자에 대해 200 유닛의 Botox를 이용했다. 200 유닛의 Botox 및 Kn21T + 5% 에탄올로 레반스 보툴리눔 제제를 준비하고(즉, 2.0 밀리리터의 보톡스를 500 마이크로리터의 Kn21T + 25 마이크로리터의 100% 에탄올에 첨가함) 복합체가 형성되도록 5분간 실온에서 방치했다.

<157> 재구성 용액 및 Kn21T + 5% 에탄올로 대조구 용액을 준비하고(즉, 2.0 ml의 재구성 용액을 500 마이크로리터의

Kn21T + 25 마이크로리터의 100% 에탄올에 첨가함) 실온에서 방치했다.

<158> 치료 적용:

<159> 대상자를 테이블에 눕히고, 눈, 얼굴 및 상체를 보호용 덮개(protective covering)로 덮었다. 치료제를 피펫을 이용하여 대상자의 이마에 골고루 적용하고 분말-불포함, 니트릴 글로브(powder-free, nitril gloves)를 착용한 손가락으로 원운동으로 마사지하면서 피부에 스며들게 하였다. 치료 영역을 세타필® 수분 크림(Galderma, Fort Worth, TX)의 얇은 막으로 뒤덮고 60분간 방치했다. 60분 방치 후에, 치료제를 멸균된 거즈 패드로 제거했다. 거즈 패드 및 글로브를 바이오해저드(biohazard) 백에 넣어 버렸다.

<160> 결과:

<161> 도 3은 펩티드 담체 및 보툴리눔 조합의 국소 적용 후 주름의 길이, 깊이 및 폭의 상당한 감소를 나타낸다. 이 실험은 경피 담체와 조합되는 경우, 국소적으로 적용된 보툴리눔 독소는 미용 효과를 위해 상당한 근육 마비를 제공할 수 있다는 것을 확인한다. 도 4는 치료된 피부(A) 대 치료되지 않은 피부(B)의 마이크로실 캐스트이다. 치료되지 않은 피부의 캐스트 상에서 주름들을 볼 수 있다.

<162> 도 5 및 도 6은 Minor의 전분/요오드 테스트의 결과를 보여준다. 도 5는 적용 2분 후에 촬영된 사진들을 보여주며, 패널 (A)는 레반스 보툴리눔 제제로 치료된 쪽에 해당하고, 패널 (B)는 Kn21T 담체만 포함하는 대조구 로션으로 치료된 쪽에 해당한다. 도 6은 적용 4분 후에 촬영되었다는 것을 제외하고는 도 5의 경우와 동일하다. 대조구 로션을 적용한 쪽의 보다 두드러진 착색에 주목하면, 이는 그 면의 피부가 땀을 더 많이 분비했다는 것을 의미한다. 또한, 치료되지 않은 쪽에서 발한이 보다 조기에 시작된다는 것에 주목한다.

<163> 결론:

<164> 본 실시예는 국소적으로 적용된 보툴리눔 독소의 복합체들은 미세한 주름 및 굵은 주름을 감소시키는데 있어서 유의성 있는 심미적 효과들을 제공할 수 있다는 것을 보여준다. 이와 같은 경상피(transepithelial) 효과는 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 보툴리눔 독소 복합체의 국소 적용 후 적합한 담체들에 의해 근육 마비가 일어날 수 있다는 것을 확인한다. 본 실시예는 보툴리눔 독소의 국소 적용은 안검경련 또는 사경과 같은 근육 경련의 제거 및 요통과 같은 근육 경련-관련 통증의 제거를 가져올 수 있다는 것을 의미한다.

실시예 5

펩티드 담체를 갖는 국소용 보툴리눔 독소 제제의

액와 다한증 대한 치료적 효능.

<168> 이 실험은 사람 대상자의 액와 다한증 치료를 위해 보툴리눔 독소가 이 펩티드 담체를 이용한 국소용 작용제로서 완전한 피부를 통해 치료적으로 전달될 수 있다는 것을 보여주었다(군당 n=10개의 액와, 무작위 이중-맹검 방식으로 환자당 한쪽 액와는 치료되고 다른 한쪽은 대조구임).

<169> 액와 다한증 연구의 대상자 기준

- <170> · 연령: 18세 이상
- <171> · 건강한 지원자
- <172> · 지원자에 의해 서명되고 제출된 고지에 입각한 동의서
- <173> · 대상자는 지시를 따르고 후속 방문들에 응하고자 함.
- <174> · 대상자는 사전에 존재하는 자각적인 다한증을 가짐.
- <175> · 대상자는 임신 상태가 아니거나 또는 향후 3개월 내에 임신 계획이 없어야 함.
- <176> · 대상자는 샌프란시스코 또는 연구 지역 인근에 거주하고 및/또는 근무함.
- <177> · 대상자는 최근 6개월 내에 액와 발한(underarm sweating)에 대한 치료를 받은 바 없음.
- <178> · 대상자는 향후 3개월 내에 액와 발한에 대해 치료를 받을 계획이 없음.

<179> 중량 측정(gravimetric measurement) 절차:

<180> 중량 측정 절차의 일부로서, 대상자들을 먼저 테스트 지역에 적응케 하였다. 구체적으로, 각 대상자를 편한 자

세로 72-77° F의 실온에서 15분간 앉아있게 했다.

<181> **액와 준비:** (하기의 절차들을 위해 분말-불포함, 니트릴 글로브를 착용했다.) 대상자는 1회용 망토 및 브라(여성인 경우)를 착용하거나 또는 상의를 모두 벗어서(남성인 경우) 양쪽 겨드랑이(액와)가 완전히 노출되게 하였다. 투여 영역은 각 겨드랑이의 액모가 있는 영역 + 그 액모가 있는 피부로부터 1cm 벗어난 영역으로 사전에 결정했다. 투여 영역을 50ml 원뿔형 튜브로부터 꺼낸 미리-적신 멸균 거즈의 한 면을 이용하여 상부로부터 하부까지 동일한 방향으로 5회의 긴 스크로크로 닦아서 세정했다. 피부에 자극을 주거나 피부가 벗겨지지 않도록 주의하면서 깨끗한 미리-적신 거즈로 이 단계를 3회 더 반복했다. 거즈 패드들은 휴지통에 버렸다. 동일한 세정 절차를 다른 쪽 겨드랑이에 대해 반복했다. 피부에 자극을 주거나 피부가 벗겨지지 않도록 주의하면서 건조된 멸균 거즈로 겨드랑이의 상부로부터 하부까지 강한 패딩(firm padding) 모션을 이용하여 겨드랑이를 건조시켰다. 그 후, 겨드랑이의 접힌 부분들(crease) 아래에 여과지를 끼고 5분 정도 테스트 부위에 방치하여 겨드랑이를 더 건조시키고 중량측정에 의한 평가를 수행하였다. 환자는 편한 자세로 자신의 신체에 팔을 붙인 채 앉았다. 여과지를 휴지통에 버렸다. 1차 중량 측정 전에 대상자를 겨드랑이에 대한 조작 없이 1분간 쉬게 하였다.

<182> **땀 생성 측정(중량 측정):** (이 측정 전에 새로운 쌍의 분말-불포함, 니트릴 글로브를 착용했다.) 대상자는 부분적으로 누워서(약 45도), 겨드랑이를 완전히 노출시키기 위해 팔을 머리의 뒤에서 깎지 끼웠다. 미리 중량이 측정된 여과지를 원뿔형 보관 튜브에서 꺼내어 여과지의 끝이 겨드랑이 주름 라인과 정렬되게 하여 대상자의 겨드랑이 아래에 끼웠다. 대상자는 팔을 긴장을 풀어 신체의 측부에 놓고 여과지는 손가락을 이용하여 제 위치에 있게 했다. 대상자는 양팔을 몸통에 단단하게 고정한 채 5분간 앉아있었다. 여과지가 양쪽 겨드랑이 아래에 안정적으로 배치되었을 때부터 시간을 측정했다. 양쪽 겨드랑이를 동시에 측정했다. 5분 후에, 여과지를 겨드랑이로부터 제거하고 동일한 개별적인 원뿔형 튜브에 다시 넣었다. 먼저 배치된 여과지를 먼저 제거하였다. 튜브로부터 땀의 증발을 방지하기 위해 원뿔형 튜브의 뚜껑을 단단하게 돌려 닫았다. 땀 생성 측정을 1분 간격으로 2회 더 반복하였다.

<183> Minor의 전분/요오드 테스트:

<184> 대상자는 겨드랑이를 완전히 노출시키기 위해 양손을 머리 뒤쪽에서 깎지끼어 잡았다. 전술된 바와 같이 사전에 결정된 겨드랑이의 영역에 멸균 거즈 패드로 요오드 용액을 바르고 자연-건조시켰다. 요오드 용액이 완전히 건조되었을 때, 숨으로 요오드가 도포된 영역 위에 얇은 전분층을 형성했다. 위양성(false positive) 및 백크라운드를 감소시키기 위해 전분의 적용 전에 요오드를 자연 건조시켰다. 그 후, 대상자는 양팔을 자신의 몸통에 단단하게 고정한 채 앉았다. 5분 후에, 대상자는 겨드랑이를 완전히 노출시키기 위해 자신의 팔을 들어 머리 뒤쪽에서 양손을 맞잡았다. 좌측 및 우측 겨드랑이 및 날짜가 명확하게 표기된 사진들을 촬영했다. 겨드랑이를 70% 에탄올로 세정하고 뒤이어 멸균된 탈이온수로 세정했다.

<185> 치료제 준비:

<186> 염수 + 5% 에탄올로 Kn21pr을 1mg/ml 농도로 준비했다(즉, 500 마이크로리터의 Kn21pr을 분주하고 25 마이크로리터의 100% 에탄올을 첨가함). 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, Kn21pr은 21,000의 분자량 및 보호된 올리고아르기닌을 포함하는 분지성 기들을 갖는 양전하로 하전된 폴리라이신 백본을 의미한다. 100 유닛의 보톡스®(Allergan, Irvine, CA)를 18g11/2을 갖춘 멸균된 3ml 라텍스 불포함 주사기(Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey)를 이용하여 0.75 밀리리터의 0.9% 염화나트륨 용액(Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois)으로 재구성하였다. 재구성된 보톡스®를 조심스럽게 8회 역전(inversion)에 의해 혼합했다. 각 대상자에 대해 200 유닛의 Botox®를 이용했다. 200 유닛의 Botox® 및 Kn21pr + 5% 에탄올로 치료 용액을 준비하고(즉, 1.5 밀리리터의 Botox®를 500 마이크로리터의 Kn21pr + 25 마이크로리터의 100% 에탄올에 첨가함) 복합체가 형성되도록 5분간 실온에서 방치했다. 5분의 방치 기간 후에, 약 1.0 밀리리터의 4% HPC(히드록시프로필셀룰로오스)(1% 에탄올과 함께)를 첨가하고 소형 금속제 스패츨러(spatula)로 적절하고 완전하게 혼합했다. 균일한 치료 용액을 주사기 팁 캡이 장착된 3 ml 주사기(3ml syringe and syringe tip cap)(Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey)로 옮겼다.

<187> 0.9% 염화나트륨 용액 및 Kn21pr + 5% 에탄올로 대조군 용액을 준비하고(즉, 1.5 밀리리터의 0.9% 염화나트륨 용액을 500 마이크로리터의 Kn21pr + 25 마이크로리터의 100% 에탄올에 첨가함) 실온에서 5분간 방치했다. 방치 후에, 약 1.0 밀리리터의 4% HPC(1% 에탄올과 함께)를 첨가하고 소형 금속제 스패츨러로 적절하고 완전하게 혼합했다. 균일한 치료 용액을 주사기 팁 캡이 장착된 3 ml 주사기로 옮겼다.

<188> 치료 적용(분말-불포함, 니트릴 글로브 착용):

<189> 대상자는 겨드랑이를 완전히 노출시키기 위해 머리 뒤쪽에서 양손을 깎지끼었다. 그 후, 대상자는 약 45도의 각도로 의자에 누웠다. 도 7에서 보는 바와 같이, 적용을 위해 투여 영역을 시각적으로 맵핑하였다(즉, 액모가 있는 피부로부터 1cm 초과한 영역). 투여 영역의 건조 여부를 확인했다. 좌측은 "L"로 표시하고, 우측은 "R"로 표시한 표지된 주사기로부터 주사기 팁 캡을 제거하여 대상자의 겨드랑이에 적용하기 위해 준비했다. 치료 용액을 주사기로 투여 영역에 고르게 퍼지게 하고 손가락으로 1분간 마사지하면서 피부에 스며들게 하였다. 그 후, 대상자는 팔을 신체의 측부를 따라 내려뜨리고 60분간 기다렸다(incubation). 60분 인큐베이션 후에, 치료 용액을 멸균된 거즈 패드로 닦아냈다. 거즈 패드 및 글로브를 바이오-해저드 백에 넣어 폐기했다. 대상자를 귀가시켰다.

<190> 결과:

<191> 레반스 국소 보툴리눔 제제는 발한을 65% 감소시켰고 이는 도 8a에서 Kn21pr 백본 단독(대조구) 또는 Kn21pr 백본 + 200U 보톡스로 치료(양쪽 겨드랑이 중 치료가 적용되는 쪽은 무작위로 정함)후 4주차의 땀 생성량(기준 대비 비율)에 예시된다. NPSS를 이용하여 Wilcoxon signed ranks(부호 순위)에 의한 통계적 분석을 수행하여 P는 표시된 바와 같았고, P<0.05로 유의성이 있었다. [n=10 명의 대상자].

<192> **2차 비교:** 도 8b는 기준 vs. 4주차의 대조군 대비 치료군의 비를 보여준다. 상기 도면은 Kn21pr 백본 단독(대조구) 또는 Kn21pr 백본 + 200 U 보톡스로 겨드랑이의 치료(양쪽 겨드랑이 중 치료가 적용되는 쪽은 무작위로 정함)후 4주차에 땀 생성량(5분당 mg)을 보여준다. NPSS를 이용하여 Wilcoxon signed ranks(부호 순위)에 의한 통계적 분석을 수행하여 P는 표시된 바와 같았고, P<0.05로 유의성이 있었다. (Pr T p=0.0217) [n=10].

<193> 도 9는 액와 다한증의 치료를 위해 레반스 보툴리눔 제제를 국소적으로 적용하는 치료의 전 및 후에 수행된 Minor의 전분/요오드 테스트를 보여주는 사진을 나타낸다. 대상자 #12에 대해 우측 겨드랑이는 레반스 보툴리눔 제제(a 및 c)로 처리되고 좌측 겨드랑이는 대조구(b 및 d)로 처리된 경우의 기준 vs. 2주차의 전분/요오드 테스트가 도시된다. 이 사진들은 담체+보톡스에 의한 치료 후 전분-요오드에서 관찰되는 통상적인 효과들을 보여준다. 대조군에서 일부 교차점(crossover)이 관찰되나(중량 데이터에서의 25% 감소와 일치), 유의성 있는 감소는 치료군에서 제공된다(처리된 쪽에 대한 중량 데이터에서의 65% 감소와 일치됨).

<194> 결론:

<195> 본 실시예는 본 명세서에서 개시된 본 발명에 따라 형성된 보툴리눔 복합체들의 국소 적용이 자각적인 또는 정량적인 다한증을 갖는 일단의 환자들에서 발한의 감소에 있어서 치료적 효과를 제공한다는 것을 확인한다. 발한을 감소시키는 이 효과는 또한 전술된 이마 다한증 및 체류 시간(dwell time) 동안 제제의 퍼짐(spread)을 제한하기 위해 글로브와 조합되는 경우 손바닥/발바닥 적용에서도 제공되었다. 치료적 효과를 위한 보툴리눔 독소 복합체의 경상피 전달은 이 방법이 방광 장애 또는 경련, 위장관 적용, 또는 냄새 감소를 위한 피지선 분비 또는 여드름 예방/치료와 같은 SNAP 기능 또는 아세틸콜린 신호들이 결정적인 다른 경우들에도 확대될 수 있다는 것을 더 확인한다.

<196> 실시예 6

<197> **와이프-온 레반스 보툴리눔 제제(Wipe-on Revance's botulinum formulation) 파일럿 실험**

<198> 목적:

<199> 쥐 모델(murine model)에서 와이프-온 디스포트(Dysport)의 수술 효율성 및 펩티드 경피용 담체(백본)의 성능을 결정한다.

<200> 방법:

<201> 연구 설계: 19-20g 중량의 C57BL/6, 암컷 마우스(Charles River, Wilmington, MA)를 사용하였다. 이소플루란을 이용하여 동물들을 마취시키고 마우스의 뒷다리(hind limb) 상에 "레반스 디스포트 용액(Revance Dysport solution)"(표 5)의 국소 적용을 수행하였다. 회복 후에, 뒷다리 근육 약화를 DAS(Digit Abduction Score) 값을 이용하여 기록하였다.

<202> 표 5. 테스트 화합물 및 펩티드 경피용 담체(백본)의 기술.

<203>

군	테스트 화합물	백본
CL	30U 디스포트(Dysport)(제제1)	Kn21T

CM	30U 디스포트(제제1)	Kn21Pr
CN	30U 디스포트(제제1)	KnR
CO	30U 디스포트(제제2)	Kn21T
CP	30U 디스포트(제제2)	Kn21Pr
대조구	염수	N/A

- <204> 테스트 화합물 준비: 멸균된 0.9% 염화나트륨의 디스포트 재구성 용액(Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois)을 준비하였다. 백본은 0.9% 염화나트륨을 이용하여 1 밀리그램/밀리리터의 농도로 준비하였다. 500 유닛의 디스포트(입센)를 18g 1/2을 갖는 멸균된 3 ml 라텍스 불포함 주사기(Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey)를 이용하여 2.5 밀리리터의 재구성 용액으로 재구성하였다. 재구성된 디스포트를 8회 역전(inversion)에 의해 조심스럽게 혼합했다. 미세원심분리기(microcentrifuge) 튜브에서 30 유닛의 디스포트 및 백본(즉, 150 마이크로리터의 디스포트를 75 마이크로리터의 레반스 담체에 첨가함)으로 레반스 보툴리눔 제제를 제조하고 복합체가 형성되도록 실온에서 5분간 방치하였다.
- <205> 국소 적용: 동물들을 산소와 혼합된 1.5% 이소플루란으로 마취시키고 0.05 ml의 설치류 마취 칵테일(rodent anesthetic cocktail)(3.75 ml의 100 mg/ml 케타민, 3.00 ml의 20 mg/ml 실라진, 및 23.25 ml의 염수)을 복강 내에 주사하였다. 마취시킨 후, C57BL/6 암컷 마우스(군당 n=3)를 무작위로 분리하고 치료를 위해 준비시켰다. 동물들을 대상으로 아세톤-스트립(acetone-strip)을 3회 수행하였다. 피펫을 이용하여 "레반스 디스포트 용액"을 마우스의 뒷다리에 적용하고 니트릴 장갑을 끼고 피부로 흡수되도록 마사지했다. 저체온증을 예방하기 위해 동물들을 제어된 온도(controlled heat) 환경에서 회복시켰다. 기준(baseline) 및 치료후 사진, 동물의 회복을 보여주는 비디오 및 DAS(Digital Abduction Score) 값을 기록하였다.
- <206> 통계적 분석:
- <207> 뒤이어, Statview® 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용하여 각 군에 대한 통계 분석값을 결정하고 평균 및 표준 오차로 표현하였다. 모든 비교의 통계적 유의성은 일원 ANOVA 반복 측정 및 95% 신뢰 수준에서의 Fisher PLSD 사후 검정(post-hoc testing)을 이용하여 결정하였다.
- <208> 결과:
- <209> 0점은 정상적인 발가락 외향(digit abduction)(근육 약화 없음)을 나타내고 4점은 발가락 외향의 최대 감소(최대 근육 약화)를 나타내는 것인 DAS 값을 이용하여 발 운동성 점수(Foot Mobility Score)를 표로 정리하였다 [Aoki, K.R. A Comparison of the Safety Margins of Botulinum Neurotoxin Serotypes A, B, and F in mice. Toxicon. 2001;39:1815-1820].
- <210> 통계적 분석은 세 개의 상이한 비교에 의해 결정하였고 그 결과는 표 6-8 에 제시된다. 평균 DAS 값은 "레반스 디스포트 용액"의 1회의 국소 투여 후 치료군과 대조군 간의 통계적으로 유의성 있는 근육 약화/마비를 보여주었다. 표 6은 대조군 대비 각 군에 대해 국소 디스포트에 의한 통계적으로 유의성 있는 마비를 보여주고 (P=0.0001), 표 7은 대조구 대비 모든 치료군의 통계적으로 유의성 있는 마비를 상세하게 기술한다(P=0.0013). 표 8은 제제 1 또는 제제 2로 치료된 군들에서 군들 간 및 대조구 대비 통계적으로 유의성 있는 마비를 상세하게 기술한다 (P=0.0024).
- <211> 회복 후에, 동물들이 마비된 다리 쪽을 향해 원형으로 걷는 것을 관찰하였다.

표 6. 발 운동성 점수- DAS 값. 처리 후 30분 경과시 각 군에 대한 평균 및 표준 오차가 제시된다.

군	평균	표준 오차
CL	2.500	0.267
CM	1.000	0.189
CN	0.375	0.183
CO	0.250	0.164
CP	0.500	0.189
대조구	0.333	0.333

$P=0.0001$ (95%에서 유의성 있음)

표 7. 발 운동성 점수- DAS 값. 대조구 대비 모든 치료군의 평균 및 표준 오차가 제시된다.

군	평균	표준 오차
CL-CP	0.900	0.240
대조구	0.000	0.000

$P=0.0013$ (95%에서 유의성 있음)

표 8. 발 운동성 점수- DAS 값. 대조구 대비 제제 1 또는 제제 2에 의한 치료군의 평균 및 표준 오차가 제시된다.

군	평균	표준 오차
CL-CN	1.400	0.400
CO, CP	0.400	0.163
대조구	0.000	0.000

$P=0.0024$ (95%에서 유의성 있음)

결론:

이 실험은 펩티드 경피용 담체가 치료제의 공유결합성 변형 없이 디스포트 보틀리눔 치료제의 치료적 유효량을 피부를 통해 수송할 수 있다는 것을 입증한다.

실시예 7

마우스 뒷발 모델에서 국소용

보틀리눔 독소에 의한 발한 억제

목적:

쥐 모델에서 펩티드 담체 + 보틀리눔 독소(레반스 보틀리눔 제제)의 국소 적용에 의한 발한 억제를 결정한다.

방법:

연구 설계: 19-21g 중량의 암컷 C57BL/6 마우스(Charles River, Wilmington, MA)를 사용하였다. 산소와 혼합된 1.5% 이소플루란을 이용하여 동물들을 마취시키고 연구의 진행 동안 마취상태를 유지시켰다. 보톡스를 마우스 발당 2 유닛의 투여량으로 국소 적용시켰다(표 9). 콜린 작용제(cholinergic drug) 필로카르핀에 의해 발한을 유도하였다. [Kaszynski, E and Frisch SB. Mouse Foot Screen for the Inhibition of Sweating by

Anticholinergic Drugs. (1974) Journal of Investigative Dermatology, 62:510-513]. 땀은 Minor의 전분-요오드 테스트에 의해 확인하였다.

표 9: 테스트 화합물 및 펩티드 경피용 담체(백본)의 기술.

군	테스트 화합물	백본
BO	2U 보톡스	N/A
BP	2U 보톡스	KNR
BQ	2U 보톡스	KNT

테스트 화합물 준비: 주사 24시간 전에 필로카르핀 용액(Sigma Aldrich, Cat No. P0472)을 제조하였다. 필로카르핀 용액은 0.9% 염화나트륨에 의해 1 밀리그램/밀리리터 농도로 제조하고 2분간 볼텍싱(vortexing)에 의해 잘 혼합하였다. 필로카르핀 용액을 PURADISC 25 TF 1회용 필터 장치(Whatman, 25 mm Dia. Catalog No. 6784-2504) 및 대형 주사기에 의해 멸균된 바이알로 여과시켜 멸균시켰다. 그 후, 상기 용액을 호일(foil)로 감쌌다. 70% 에탄올에 용해된 2% 요오드 용액(Sigma Aldrich, Cat No. 266426)을 제조하고 볼텍싱에 의해 잘 혼합하였다. 그 후, 상기 요오드 용액을 15분간 초음파 처리하고 다시 볼텍싱하였다.

백본은 탈이온수로 1 밀리그램/밀리리터의 농도로 준비하였다. 100 유닛의 보톡스(Allergan, Irvine, CA)를 18g 1/2을 갖는 멸균된 3 ml 라텍스 볼포함 주사기(Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey)를 이용하여 1.0 밀리리터의 0.9% 염화나트륨으로 재구성하였다. 상기 재구성된 보톡스를 8회 역전에 의해 조심스럽게 혼합하였다. 미세원심분리기 튜브에서 7 유닛의 보톡스 및 백본(즉, 70 마이크로리터의 보톡스를 35 마이크로리터의 KNR 또는 KNT에 첨가하고 35 마이크로리터의 PBS로 희석함)으로 치료 용액을 제조하고 복합체가 형성되도록 실온에서 5분간 방치하였다. 대조 용액은 보톡스 및 PBS로 제조하였다(즉, 70 마이크로리터의 보톡스를 70 마이크로리터의 PBS에 첨가함).

국소 적용: 동물들을 산소와 혼합된 1.5% 이소플루란으로 마취시키고 0.07 ml의 설치류 마취 콕테일(rodent anesthetic cocktail)(3.75 ml의 100 mg/ml 케타민, 3.00 ml의 20 mg/ml 실라진, 및 23.25 ml의 염수)을 복강 내에 주사하고 필요한 경우 이소플루란을 보충하였다. 마취시킨 후, C57BL/6 암컷 마우스(군당 n=6)를 무작위로 테스트 군으로 분리하였다. 20 마이크로리터의 치료 용액 또는 대조 용액을 정해진 뒷발에 적용하였다. 발바닥을 완전히 충분히 용액으로 코팅시켰다. 피펫 팁을 이용하여 발에 테스트 용액의 얇고 균일한 코팅을 도포하였다. 저체온증을 예방하기 위해 동물들을 제어된 온도(controlled heat) 환경에서 회복시켰다. 열 램프(heat lamp)를 2분간 이용하여 용액을 완전히 건조시키고, 5분간 자연건조시켰다. 그 후, 뒷발을 약 50 마이크로리터의 세타필(Cetaphil) 크림으로 코팅시켰다.

전분-요오드 테스트: 기준시점 및 치료후 1주차에 땀의 분포를 시각화하기 위해 Minor의 전분 요오드 테스트를 수행하였다. 뒷발을 2% 요오드 용액에 담가 용액에 용액을 적용하기 전에 동물들을 10분간 안정적인 바이탈(vital) 하에 완전히 마취시켰다. 3분 동안 열 램프를 이용하여 요오드 용액을 완전히 건조시키고, 그 후 5분간 자연건조시켰다. 뒤이어 전분 분말을 적용하고 분말-불포함(powder-free) 장갑을 끼고 손가락으로 문질렀다. 과량의 전분 분말을 소형의 페인트 솔로 제거하고 균일성을 높이기 위해 밀집된 벨루어 패드(compact velour pad)로 전분 분말을 느슨하게 도포시켰다. 기준 및 처리 후 사진을 필로카르핀 주사 후 10분, 20분 및 60분에 기록하였다.

결과:

동물의 발의 땀을 Minor의 전분-요오드 테스트에 의해 시각화시켰다. 땀은 검청색(blue-black) 착색에 의해 표시되었다. [Kuttner, C et al. Treatment of Gustatory Sweating with Botulinum toxin A. (2001) Int Poster J Dent Oral Med. 3:3:poster 82].

검청색의 양성 스팟들은 일반적으로 필로카르핀 주사 후 50-60분 경과시점에서 가장 잘 관찰되었다. 전분-요오드 테스트는 도 10a-d의 대표적인 사진에 도시되는 바와 같이, 대조구에 비해 현저하게 약한 검청색 양성 스팟을 가졌다.

실시예 8

레반스 보툴리눔 제제의 국소 적용 후

근력 생성 평가

- <241>
- <242> 목적:
- <243> 쥐 모델에서 근육 수축력 생성에 의해 B형 보툴리눔 독소의 국소 적용 후 신경근 차단(neuromuscular blockade)의 효과를 평가한다.
- <244> 방법:
- <245> 연구 설계: 27-33g 중량의 수컷 CD1 마우스(Charles River, Wilmington, MA)를 이용하였다. 마우스를 군당 5마리씩 수용하고 치료 전에 사료 및 물에 원하는 만큼 접근할 수 있게 허용하였다. 동물들을 산소와 혼합된 1.5% 이소플루란으로 마취시키고 연구 진행 동안 마취 상태로 유지시켰다. 각 마우스의 뒷다리의 투여 부위를 Andis Edger II 무선 충전형 트리머(trimmer)(Andis, Sturtevant, WI)로 조심스럽게 제모하였다. 디스포트를 마우스 다리당 25 유닛의 투여량으로 국소 적용하였다. 동량의 (독소 불포함) 기본 제제를 국소로 적용한 처리 동물 및 무처리 동물이 대조구로 작용하였다. 국소 적용 후 2-3.5 시간 경과시에 근육 수축력을 측정하였다.
- <246> 테스트 화합물 준비: 5% EtOH 및 5% 폴리아스파테이트 용액을 포함하는 멸균된 0.9% 염화나트륨의 디스포트 재구성 용액(Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois)을 제조하였다. 백본은 0.9% 염화나트륨을 이용하여 1 밀리그램/밀리리터의 농도로 준비하였다. 500 유닛의 디스포트(입센)을 18g 1/2을 갖는 멸균된 3 ml 라텍스 불포함 주사기(Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey)를 이용하여 2.5 밀리리터의 재구성 용액으로 재구성하였다. 재구성된 디스포트를 8회 역전에 의해 조심스럽게 혼합했다. 미세원심분리기 튜브에서 25 유닛의 디스포트 및 백본(즉, 전술된 실험 전에 125 마이크로리터의 디스포트를 62.5 마이크로리터의 전유의 단쇄 펩티드 백본에 첨가함)으로 레반스 보툴리눔 제제를 제조하고 복합체가 형성되도록 실온에서 5분간 방치하였다(생존 동물 n=2). 대조구는 염수(saline)를 유일한 활성 물질로 사용했다(동물 n=4).
- <247> 국소 적용: 피펫을 이용하여 대조구 용액 또는 레반스 보툴리눔 제제를 마우스의 뒷다리에 적용하고 니트릴 장갑을 끼고 피부로 흡수되도록 마사지했다. 디스포트 및 백본을 4℃에서 보관하였다. 저체온증을 예방하기 위해 동물들을 제어된 온도 환경에서 회복시켰다. 국소 치료 후 2-3.5 시간 경과시에 근육 수축력을 측정하였다
- <248> 근 수축력 생성: 움직임을 방지하기 위해 대퇴골 및 경골을 통해 K-와이어를 이용하여 나무 탁자에 사지를 묶어서 고정시켰다. 장딴지근(gastrocnemius)은 인 시투(in situ)로 두었다. 와이어 봉합(wire suture)을 아킬레스건의 원위 단부(distal end) 주위로 묶었다. 그 후, 건을 봉합에서 떨어진 쪽으로 절개하고, 봉합을 힘 변환기(force transducer)(model FT03, Grass, West Warwick, RI)에 부착시켰고, 상기 힘 변환기는 힘 변환기 증폭기(force transducer amplifier)(model 13-G4615-50, Gould, Cleveland, OH)에 연결되었다. 디스포트 처리된 쪽으로부터의 좌골 신경을 최대 등척성 단일-수축력(maximum isometric single-twitch force)이 수득될 때까지, 전압을 증가시키면서 직접적으로 자극하였다(SD9 stimulator, Grass, West Warwick, RI). 그 후, 자극 주파수를 최대 강직력(maximum tetani force)이 생성될 때까지 증가시켰다. 일 모터 단위(one motor unit)의 자극에 의해 단일 경련(twitch)이 생성되고, 강직(tetanus)은 초최대 자극(supermaximal stimulation)에 의해 모든 모터 유닛의 가중을 적용하는 것에 의해 생성된다. 대조구 사지에 대해 동일한 절차를 반복하였다. 힘 변환기에 연결된 조정된 기록 진동(calibrated recording oscillation)(RS 3800, Gould, Cleveland, OH)으로 반응을 기록하였다. [Ma J, Elsaidi GA, Smith TL, et al. Time course of recovery of juvenile skeletal muscle after botulinum toxin A injection. Am. J. Phys. Med. Rehabil. 2004; 83(10):774-780].
- <249> 결과
- <250> A형 보툴리눔 독소의 주사에 의한 이전의 연구에서 C57BL/6 마우스의 근력 생성의 정상값(normal value)은 60 ± 15 그램의 평균 단일-수축력 및 240 ± 30 그램의 평균 강직력(tetanus force)을 가졌다. 이 파일럿 전임상(preclinical) 연구에서, 유사하게 54 ± 2 그램의 평균 단일 수축력 및 241 ± 20 그램의 평균 강직력을 확인하였다.
- <251> Kn21Pr + 국소 디스포트의 근력 생성을 평가한 경우, Kn21Pr을 포함하는 국소용 레반스 보툴리눔 제제의 1회 투여로 처리된 동물에서 반응을 보이지 않고, 기록된 대조구값 대비 단일 수축 및 강직 반응의 약 100% 감소를 초래했고, KnT를 포함하는 국소용 레반스 보툴리눔 제제의 단회 투여로 처리된 동물에서 하한에 대한 대조구 대비 약 58%의 단일 수축 감소 및 약 61%의 강직 감소를 보였다. 표 10 및 표 11은 각각 단일 수축 테스트 및 강직 테스트에 대한 평균 및 표준 오차를 표시한다.

표 10. 근력 생성 - 단일 수축 테스트. 치료군과 대조군의 평균 및 표준 오차가 제시된다.

동물 군	평균	표준 오차
치료군	19	10.97
대조군	45*	0.00

*하한

표 11. 근력 생성 - 강직(tetanus) 테스트. 치료군과 대조군의 평균 및 표준 오차가 제시된다.

동물 군	평균	표준 오차
치료군	81	46.765
대조군	210*	0.00

*하한

결론:

본 연구는 마우스의 발 당 25 유닛의 디스포트의 국소 적용이 효과적으로 운동력(motor force) 생성을 감소시킨다는 것을 입증하며 치료적 효능의 증거를 보여주었다.

실시에 9

레반스 보툴리눔 제제의 국소 적용 후

근력 생성 평가

목적:

쥐 모델에서 근육 수축력 생성에 의해 A형 보툴리눔 독소의 국소 적용 후 신경근 차단(neuromuscular blockade)의 효과를 평가한다.

방법:

연구 설계: 27-33g 중량의 수컷 CD1 마우스(Charles River, Wilmington, MA)를 이용하였다. 마우스를 군당 5마리씩 수용하고 치료 전에 사료 및 물에 원하는 만큼 접근할 수 있게 허용하였다. 동물들을 산소와 혼합된 1.5% 이소플루란으로 마취시키고 연구 진행 동안 마취 상태로 유지시켰다. 각 마우스의 뒷다리의 투여 부위를 Andis Edger II 무선 충전형 트리머(Andis, Sturtevant, WI)로 조심스럽게 제모하였다. 보톡스를 마우스 다리당 10 유닛의 투여량으로 적용하였다. 동량의 (독소 불포함) 기본 제제를 국소로 적용한 처리 동물 및 무처리 동물이 대조군으로 작용하였다. 국소 치료 후 2-3.5 시간 경과시에 근육 수축력을 측정하였다.

테스트 화합물 준비: 5% EtOH 및 5% 폴리아스파테이트 용액을 포함하는 멸균된 0.9% 염화나트륨의 보톡스 재구성 용액(Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois)을 제조하였다. 백본은 0.9% 염화나트륨을 이용하여 1 밀리그램/밀리리터의 농도로 준비하였다. 100 유닛의 보톡스(Allergan, Irvine, CA)를 18g 1/2을 갖는 멸균된 3 ml 라텍스 불포함 주사기(Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey)를 이용하여 1.0 밀리리터의 재구성 용액으로 재구성하였다. 재구성된 보톡스를 8회 역전에 의해 조심스럽게 혼합했다. 미세원심분리기 튜브에서 10 유닛의 보톡스 및 백본(즉, 전술된 실험에 근거하여 100 마이크로리터의 보톡스를 50 마이크로리터의 전유의(proprietary) 짧은 펩티드 백본에 첨가함)으로 "레반스 보톡스 용액"을 제조하고 복합체가 형성되도록 실온에서 5분간 방치하였다(생존 동물 n=2). 대조군은 염수를 유일한 활성 물질로 사용했다(동물 n=4).

절차: 피펫을 이용하여 대조군 용액 또는 "레반스 보톡스 용액"을 마우스의 뒷다리에 적용하고 니트릴 장갑을 끼고 피부로 흡수되도록 마사지했다. 보톡스 및 백본을 4°C에서 보관하였다. 저체온증을 예방하기 위해 동물들을 제어된 온도 환경에서 회복시켰다. 국소 적용 후 2-3.5 시간 경과시에 근육 수축력을 측정하였다

근 수축력 생성: 움직임을 방지하기 위해 대퇴골 및 경골을 통해 K-와이어를 이용하여 나무 탁자에 사지를 묶어서 고정시켰다. 장딴지근은 인 시투(in situ)로 두었다. 와이어 봉합(wire suture)을 아킬레스 건의 원위 단부 주위로 묶었다. 그 후, 건을 봉합에서 떨어진 쪽으로 절개하고, 봉합을 힘 변환기(model FT03, Grass, West Warwick, RI)에 부착시켰고, 상기 힘 변환기는 힘 변환기 증폭기(model 13-G4615-50, Gould, Cleveland, OH)에

연결되었다. 보톡스 처리된 쪽으로부터의 좌골 신경을 최대 등척성 단일-수축력(maximum isometric single-twitch force)이 수득될 때까지, 전압을 증가시키면서 직접적으로 자극하였다(SD9 stimulator, Grass, West Warwick, RI). 그 후, 자극 주파수를 최대 강직력이 생성될 때까지 증가시켰다. 일 모터 단위(one motor unit)의 자극에 의해 단일 경련이 생성되고, 강직(tetanus)은 초최대 자극(supermaximal stimulation)에 의해 모든 모터 유닛의 가중을 적용하는 것에 의해 생성된다. 대조구 사지에 대해 동일한 절차를 반복하였다. 힘 변환기에 연결된 조정된 기록 진동(RS 3800, Gould, Cleveland, OH)으로 반응을 기록하였다. [Ma J, Elsaïdi GA, Smith TL, et al. Time course of recovery of juvenile skeletal muscle after botulinum toxin A injection. Am. J. Phys. Med. Rehabil. 2004; 83(10):774-780].

<270> 결과

<271> 본 실험에서 수행된 바와 같이, C57BL/6 마우스의 근력 생성의 정상값은 60 ± 15 그램의 평균 단일-수축력 및 240 ± 30 그램의 평균 강직력(tetanus force)을 가졌다. 이 과일롯 전임상 연구에서, 유사하게 54 ± 2 그램의 평균 단일 수축력 및 241 ± 20 그램의 평균 강직력을 확인하였다.

<272> Kn21Pr + 국소 보톡스의 근력 생성을 평가한 경우, Kn21Pr을 포함하는 국소용 "레반스 보톡스 용액"의 단회 투여로 처리된 동물에서 반응을 보이지 않고, 기록된 대조구값 대비 단일 수축 및 강직 반응의 약 100% 감소를 초래했고, KNP를 포함하는 국소용 "레반스 보톡스 용액"의 단회 투여로 처리된 동물에서 대조구 대비 약 90%의 단일 수축 감소 및 100%의 강직 감소(반응 없음)를 보였다. 표 12는 각각 단일 수축 테스트 및 강직 테스트에 대한 평균 및 표준 오차를 표시한다. 표 13은 평균 근력 생성 및 단일 수축 및 강직의 백분율 감소의 요약을 표시한다.

<273> 표 12. 근력 생성 - 강직 테스트. 치료군과 대조군의 평균 및 표준 오차가 제시된다.

동물 군	평균	표준 오차
치료군	4.667	4.667
대조군	45	0

<275> *하한

<276> 표 13. 실시예 8 및 실시예 9의 근력 생성 연구 요약. 치료군과 대조군의 평균값 및 % 감소가 제시된다.

치료제	담체	근력 생성	평균 결과(g)	평균 % 감소
보톡스 (Botox)	Kn21T(2)/Kn21pr(1)	단일 수축(single twitch)	5	90%
		강직(tetanus)	0	100%
디스포트 (Dysport)	Kn21T/Kn21pr	단일 수축	19	58%
		강직	81	61%
대조구	N/A	단일 수축	45*	0%
		강직	210*	0%

<278> *하한

<279> 결론:

<280> 본 연구는 마우스의 발당 25 유닛의 디스포트 및 10 유닛의 보톡스의 국소 적용이 모두 효과적으로 운동력 생성을 감소시킬 수 있다는 것을 입증하며 치료적 효능의 증거를 보여준다.

<282> 실시예 10

<283> 돼지 피부를 통한 A형 보툴리눔 독소의 인 비트로 담체-매개

<284> 경피 전달 - Pt. 1 유통(flow-through) 분석

<285> 목적:

<286> 피부 장벽을 통한 A형 보툴리눔 독소(BoNTA)의 전달에서 본 발명의 담체의 효율성을 평가한다.

방법:

독소의 비오틴화: 10 마이크로그램의 A형 보툴리눔 독소(List Biological Laboratories, Campbell, CA)를 pH 7.4의 PBS 100 마이크로리터에 재현탁시켰다. 술포-NHS-LC-비오틴(Pierce, Rockford, IL)을 20배 과량의 몰량으로 첨가하고, 상기 반응 용량을 1 밀리리터로 맞추었다. 반응을 실온에서 1시간 방치하고, 10K MWCO Slide-A-Lyzer Dialysis Casette (Pierce, Campbell, CA)를 이용하여 밤새 PBS에 대해 투석시켰다.

피부 채취: 수컷 및 암컷 돼지의 복부로부터 완전한(intact) 피부를 채취하였다(Lychron LLC, Mountain View, CA). 수술 동안, 피부를 PBS, 10 유닛/밀리리터 페니실린, 및 10 마이크로그램/밀리리터 스트렙토마이신을 포함하는 얼음조에 침지시켰다. 상피층과 진피층을 0.8 mm 두께로 설정된 Dermatome(Padgett Instruments, Plainsboro, NJ)을 이용하여 분리하였다. 액체 질소로 피부를 순간-동결(snap-frozen)시키고 사용할 때까지 -80 °C에서 보관하였다.

테스팅: 모든 실험 조건은 삼배수로(triplicate) 테스트하였다. 각 시료에 대해, 적합한 양의 담체 및 독소를 첨가하고(표 14) 용량을 PBS로 200 밀리리터로 맞추었다.

표 14: 테스트 시료 조성물의 기술

독소 (μg)	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	1	1	1
담체	K30T	K30T	K30T	K30T	K30T	K30T	K30T	K30	불포함
담체 (μg)	0.025	0.05	0.1	0.05	0.1	0.2	1	1	-

피부를 사용 직전에 37°C 수조에서 해동시키고, 1.5 cm x 1.5 cm 정사각형으로 자르고, 변형된 프란츠 챔버 장치(PermeGear, Bethlehem, PA) 내부에 배치하였다. Haake DC10 순환 수조(circulating water bath)(Thermo Electron, Karlsruhe, Germany)를 37°C로 설정하였다. 시료를 피부 표면에 적용하고 IPC Ismatec 연동 펌프(IDEX, Wertheim-Mondfeld, Germany)를 이용하여 유통 속도(flow-through rate)를 8.02 마이크로리터/분으로 설정하였다. 유통 분획을 Retriever IV 분획 수집기(Teledyne Isco, Lincoln, NE)를 이용하여 수집하고, ATM10 Indexing Controller (PermeGear, Bethlehem, PA)를 이용하여 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-6, 6-8, 8-12, 및 12-20 시간 분획들을 풀링하였다(pooling). 장치 셋업은 도 12를 참조한다.

시료 분석: 표준 곡선을 작성하기 위해 비오틴화된 독소 용액의 연속 희석을 수행하였다. 플레이트를 200 마이크로리터의 유통 시료로 코팅하고 2시간 동안 실온에서 방치하였다. 그 후, 상기 플레이트를 PBS에 담긴 0.1% 트윈 20(Tween 20)(PBST)로 3회 세척하였다. 200 마이크로리터의 블로킹(blocking) 완충액/웰(PBST에 담긴 20% FBS)을 첨가하고 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 그 후, 블로킹 완충액을 제거하였다. PBST에 담긴 2% FBS로 1:1000으로 희석된 스트렙타비딘-HRP 100 마이크로리터를 각 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 그 후, 상기 플레이트를 PBST로 5회 세척하였다. 각 웰에 100 마이크로리터의 OptEIA 기질(BD Biosciences)을 각 웰에 첨가하고 현상을 위해 실온에서 10분간 방치하였다. 50 마이크로리터의 1N H₂SO₄를 첨가하여 상기 반응을 퀀칭(quench)하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과:

레반스 담체는 독소 전달의 증가를 보였다(도 13 참조). 독소 농도 및 담체:독소 중량비의 최적화는 대조구 대비 독소 전달의 통계적으로 유의성 있는(R0.05) 증가를 가져왔다.

실시예 11

돼지 피부를 통한 A형 보툴리눔 독소의 인 비트로 담체-매개

경피 전달 - Pt. 1 유통 분석

목적:

변형된 프란츠 챔버를 이용한 돼지 피부 모델에서 피부 장벽을 통한 A형 보툴리눔 독소 및 CIP(Calf Intestinal Phosphatase)의 전달에서 레반스 담체의 효율성을 평가한다.

방법:

<303> 독소의 비오틴화: 10 마이크로그램의 A형 보툴리눔 독소(List Biological Laboratories, Campbell, CA)를 pH 7.4의 PBS 100 마이크로리터에 재현탁시켰다. 술포-NHS-LC-비오틴(Pierce, Rockford, IL)을 20배 과량의 물량으로 첨가하고, 상기 반응 용량을 1 밀리리터로 맞추었다. 결합(coupling)을 위해 7-9 범위의 pH를 확보하기 위해 pH를 확인하였다. 반응을 실온에서 1시간 방치하고, 10K MWC Slide-A-Lyzer Dialysis Casette (Pierce, Campbell, CA)를 이용하여 밤새 PBS에 대해 투석시켰다.

<304> 피부 채취: 수컷 및 암컷 돼지의 복부 및 어깨로부터 완전한 피부를 채취하였다(Lychron LLC, Mountain View, CA). 수술 동안, 피부를 PBS, 10 유닛/밀리리터 페니실린, 및 10 마이크로그램/밀리리터 스트렙토마이신을 포함하는 얼음조에 침지시켰다. 0.8 mm 두께로 설정된 Dermatome(Padgett Instruments, Plainsboro, NJ)을 이용하여 피부 이식편(상피층과 진피층을 포함하는 전층(full thickness)) 분리하였다. 액체 질소로 피부 이식편을 순간-동결(snap-frozen)시키고 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다.

<305> 테스트: 모든 실험 조건은 삼배수로 테스트하였다. 세 개의 페이로드(payload) 군 및 6개의 상이한 담체가 있었다. 각 시료에 대해, 적합한 양의 담체 및 독소를 첨가하였다(표 15). 페이로드 및 담체를 하기의 농도로 준비하였다: Kn8 담체(Kn8, Kn8R 및 Kn8T)는 10 밀리그램/밀리리터로 준비하고; Kn21T 담체는 1 밀리그램/밀리리터로 준비했으며; K30T 및 Kn21pR 및 A형 보툴리눔 독소(List Labs and Sigma toxins)는 0.1 밀리그램/밀리리터로 준비하고; CIP는 100 유닛/밀리리터로 준비하였다.

<306> 표 15: 테스트 시료 조성물의 기술

시료	페이로드 (Payload)	페이로드량 (uL)	담체	담체량 (uL)	PBS (uL)
1	CIP	100	Kn8	100	0
2	CIP	100	Kn8R	100	0
3	CIP	100	Kn8T	100	0
4	CIP	100	Kn21T	2.86	97.14
5	List 순수 신경독소	100	K30T	10	90
6	List 순수 신경독소	100	Kn21pR	10	90
7	Sigma 신경독소 + 락토오즈	100	K30T	10	90
8	Sigma 신경독소 + 락토오즈	100	Kn21pR	10	90

<307> <308> 피부를 사용 직전에 37℃ 수조에서 해동시키고, 1.5 cm x 1.5 cm 정사각형으로 자르고, 변형된 프란츠 챔버 장치(PermeGear, Bethlehem, PA) 내부에 배치하였다. Haake DC10 순환 수조(circulating water bath)(Thermo Electron, Karlsruhe, Germany)를 37℃로 설정하였다. 시료를 피부 표면에 적용하고 IPC Ismatec 연동 펌프(IDEX, Wertheim-Mondfeld, Germany)를 이용하여 유통 속도(flow-through rate)를 8.02 마이크로리터/분으로 설정하였다. 유통 분획을 Retriever IV 분획 수집기(Teledyne Isco, Lincoln, NE)를 이용하여 수집하고, ATM10 Indexing Controller (PermeGear, Bethlehem, PA)를 이용하여 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-6, 6-8, 8-12, 및 12-20 시간 분획들을 풀링하였다.

<309> 시료 분석: 표준 곡선을 작성하기 위해 비오틴화된 독소 용액의 연속 희석을 수행하였다. 플레이트를 200 마이크로리터의 유통 시료로 코팅하고 2시간 동안 실온에서 방치하였다. 그 후, 상기 플레이트를 PBS에 담긴 0.1% 트윈 20(Tween 20)(PBST)로 3회 세척하였다. 200 마이크로리터의 블로킹 완충액/웰(PBST에 담긴 20% FBS)을 첨가하고 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 그 후, 블로킹 완충액을 제거하였다. PBST에 담긴 2% FBS로 1:1000으로 희석된 스트렙타비딘-HRP 100 마이크로리터를 각 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 그 후, 상기 플레이트를 PBST로 5회 세척하였다. 각 웰에 100 마이크로리터의 OptEIA 기질(BD Biosciences)을 첨가하고 현상을 위해 실온에서 10분간 방치하였다. 50 마이크로리터의 1N H₂SO₄를 첨가하여 상기 반응을 퀀칭하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<310> CIP: CIP에 대해 유사한 절차를 이용하였다. CIP는 보툴리눔 독소와 매우 유사하기 때문에 대안으로 선택되었다. CIP는 160 kD의 유사한 분자량을 갖는 구형 단백질이다. CIP는 덜 비싸며 높은 비활성(specific activity)을 갖는다.

<311> 결과:

표 16: 효율성 요약. 평균 효율성 및 표준 오차가 백분율로 표시된다.

페이로드(Payload)	담체	효율성 (%)	표준 오차 (%)
CIP	Kn8	0.19	n/a
CIP	Kn8R	0.26	n/a
CIP	Kn8T	0.34	n/a
CIP	Kn21T	0.66	0.18
List 순수 신경독소	K30T	9.17	1.36
List 순수 신경독소	Kn21pR	3.56	0.41
Sigma 신경독소 + 락토오즈	K30T	5.44	0.19
Sigma 신경독소 + 락토오즈	Kn21pR	4.61	0.59

표 16에 표시된 바와 같이, 상이한 담체는 상이한 복합체에 대해 깊이 및 친화성(tropism)에 영향을 미친다. 보다 짧은 백본(Kn8 계열)은 보다 표면에 위치하므로 덜 용이하게 유통된다. 주어진 백본 길이에 대해 TAT는 올리고아르기닌보다 깊이 침투한다. CIP와 같은 보다 덜 하전된 중들은 유효한 입자들을 형성하지 않기 때문에 그만큼 깊이 침투하지 않는다. 락토오스와 같은 복잡한 성분들은 담체 선호도(carrier preference)를 변경시킬 수 있다(또는 안정한 입자를 형성하기 위한 전략을 필요로 한다).

실시예 12

돼지 피부를 통한 A형 보툴리눔 독소의 인 비트로 담체-매개

경피 전달 - Pt. 3 유통분석

목적:

변형된 프란츠 챔버를 이용한 돼지 피부 모델에서 피부 장벽을 통한 A형 보툴리눔 독소의 전달에서 레반스 담체의 효율성을 평가한다.

방법:

피부 채취: 수컷 및 암컷 돼지의 어깨 및 복부로부터 완전한 피부를 채취하였다(Lychron LLC, Mountain View, CA). 수송 동안, 피부를 PBS, 10 유닛/밀리리터 페니실린, 및 10 마이크로그램/밀리리터 스트렙토마이신을 포함하는 얼음 상에서 유지시켰다. 0.8 mm 두께로 설정된 Dermatome(Padgett Instruments, Plainsboro, NJ)을 이용하여 피부 이식편(상피층과 진피층을 포함하는 전층(full thickness)) 분리하고, 액체 질소로 피부 이식편을 순간-동결(snap-frozen)시키고 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

독소의 비오틴화: 10 μ g의 A형 보툴리눔 독소(List Biological Laboratories, Campbell, CA)를 pH 7.4의 PBS 100 μ l에 재현탁시켰다. 술포-NHS-LC-비오틴(Pierce, Rockford, IL)을 100배 과량의 물로 첨가하고, 상기 반응 용량을 PBS로 1 ml로 맞추었다. 결합(coupling)을 위해 7-9 범위의 pH를 확보하기 위해 pH를 확인하였다. 반응을 실온에서 2시간 방치하고, 10K MWCO Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Pierce, Campbell, CA)를 이용하여 밤새 PBS에 대해 투석시켰다. 다음 날, 비오틴화된 독소를 분주하고(100 μ l/튜브) 4°C에서 보관하였다.

프란츠 챔버를 위한 스킨 제조: 피부를 사용 직전에 37°C 수조에서 해동시키고, 1.5 cm x 1.5 cm 정사각형으로 자르고, 변형된 프란츠 챔버 장치(PermeGear, Bethlehem, PA) 내부에 배치하였다. Haake DC10 순환 수조(circulating water bath)(Thermo Electron, Karlsruhe, Germany)를 37°C로 설정하였다. 시료를 피부 표면에 적용하고 IPC Ismatec 연동 펌프(Idex, Wertheim-Mondfeld, Germany)를 이용하여 유통 속도(flow-through rate)를 8.02 μ l/분으로 설정하였다. 유통 분획을 Retriever IV 분획 수집기(Teledyne Isco, Lincoln, NE)를 이용하여 수집하고, ATM10 Indexing Controller (PermeGear, Bethlehem, PA)를 이용하여 0-1, 1-2, 2-3, 3-4 시간 분획들을 풀링하였다.

제제: 각 시료에 대해, 적합한 양의 담체 및 독소를 첨가하였다. 모든 실험 조건은 4배수로 테스트하였다. 치료군은 레반스 담체를 포함한 비오틴화된 독소였고 대조군은 비오틴화된 독소 단독이었다. 독소 농도 및 독소:담체 중량비를 최적화하기 위해 담체와 A형 보툴리눔 독소를 상이한 질량비로 제조하였다.

ELISA (단백질 정량 분석): 표준 곡선을 작성하기 위해 비오틴화된 독소 용액의 연속 희석(1:3 및 1:2)을 수

행하였다. 플레이트를 200 마이크로리터의 유통 시료로 코팅하고 2시간 동안 실온에서 방치하였다. 2시간 후에, 시료 및 표준을 버리고 상기 플레이트를 각 웰에 300 μL 의 슈퍼블록(superblock) 블록킹 완충액으로 실온에서 1 분간 블록킹시키고 이를 2회 반복하였다. 블록킹 완충액을 제거하고 PBST에 담긴 2% FBS로 1:1000으로 희석된 스트렙타비딘-HRP 100 μL 를 각 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 그 후, 상기 플레이트를 300 μL (웰 당)의 PBST(PBS + 0.1% 트윈-20)로 실온에서 5분간 세척하고 이를 2회 반복하였다. 세척 후에, 각 웰에 100 μL 의 OptEIA 기질(BD Biosciences)을 각 웰에 첨가하고 현상을 위해 실온에서 10분간 방치하였다. 50 μL 의 1N H_2SO_4 를 첨가하여 상기 반응을 퀀칭하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과:

레반스 담체는 대조구에 비해 독소 전달의 증가를 보였다(도 14a-f 참조).

실시예 13

돼지 피부를 통한 A형 보툴리눔 독소의

인 비트로 담체-매개 경피 전달

목적:

변형된 프란즈 챔버를 이용한 돼지 피부 모델에서 피부 장벽을 통한 A형 보툴리눔 독소의 전달에서 레반스 담체의 효율성을 평가한다.

방법:

독소의 비오틴화: 10 마이크로그램의 A형 보툴리눔 독소(List Biological Laboratories, Campbell, CA)를 pH 7.4의 PBS 100 마이크로리터에 재현탁시켰다. 술포-NHS-LC-비오틴(Pierce, Rockford, IL)을 20배 과량의 물량으로 첨가하고, PBS로 상기 반응 용량을 1 밀리리터로 맞추었다. 결합(coupling)을 위해 7-9 범위의 pH를 확보하기 위해 pH를 확인하였다. 반응을 실온에서 1시간 방치하고, 10K MWCO Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Pierce, Campbell, CA)를 이용하여 밤새 PBS에 대해 투석시켰다.

피부 채취: 암컷 돼지 어깨로부터 완전한 피부를 채취하였다(Lychron LLC, Mountain View, CA). 수송 동안, 피부를 PBS, 10 유닛/밀리리터 페니실린, 및 10 마이크로그램/밀리리터 스트렙토마이신을 포함하는 얼음조에 침지시켰다. 0.8 mm 두께로 설정된 Dermatome(Padgett Instruments, Plainsboro, NJ)을 이용하여 피부 이식편(상피층과 진피층을 포함하는 전층(full thickness)) 분리하였다. 액체 질소로 피부 이식편을 순간-동결(snap-frozen)시키고 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

테스팅: 모든 실험 조건은 삼배수로 테스트하였다. 두 개의 테스트 군이 있었다. 치료군은 비오틴화된 독소 + 레반스 K30Ts 담체였고 대조군은 비오틴화된 독소 단독이었다. 각 시료에 대해, 적합한 양의 담체 및 독소를 첨가하였다(표 17). 담체 및 A형 보툴리눔 독소를 0.1 밀리그램/밀리리터의 농도로 준비하였다.

표 17: 테스트 시료 조성물의 기술

시료	페이로드	페이로드 량 (μL)	담체	담체량 (μL)	PBS (μL)
1	List 독소	100	K30Ts	10	90
2	List 독소	100	K30Ts	10	90
3	List 독소	100	K30Ts	10	90
4	List 독소	100	n/a	N/A	90
5	List 독소	100	n/a	N/A	90
6	List 독소	100	n/a	N/A	90

피부를 사용 직전에 37°C 수조에서 해동시키고, 1.5 cm x 1.5 cm 정사각형으로 자르고, 변형된 프란즈 챔버 장치(PermeGear, Bethlehem, PA) 내부에 배치하였다. Haake DC10 순환 수조(circulating water bath)(Thermo Electron, Karlsruhe, Germany)를 37°C로 설정하였다. 시료를 피부 표면에 적용하고 IPC Ismatec 연동 펌프(IDEX, Wertheim-Mondfeld, Germany)를 이용하여 유통 속도(flow-through rate)를 8.02 마이크로리터/분으로 설정하였다. 유통 분획을 Retriever IV 분획 수집기(Teledyne Isco, Lincoln, NE)를 이용하여 수집하고, ATM10 Indexing Controller (PermeGear, Bethlehem, PA)를 이용하여 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-6, 6-8, 8-12, 및 12-20

시간 분획들을 폴링하였다.

<340> 스트렙타비딘 염색: 순간-동결된 피부를 절개하고 PBS에 담긴 0.1% 트윈 20(PBST)로 수화시켰다. 상기 절편들을 블로토(Blotto) 블로킹 완충액으로 실온에서 2시간 동안 블로킹시키고 5분 간격으로 3회 PBST로 세정하였다. PBST에 담긴 2% FBS로 1:1000으로 희석된 스트렙타비딘-HRP를 첨가하고 상기 절편들을 5분 간격으로 3회 PBST로 세정하였다. OptEIA 기질(BD Biosciences)을 첨가하고 상기 절편들을 현상을 위해 실온에서 3분간 방치하였다. 상기 절편들을 PBST로 세척하고 커버슬립을 덮었다.

<341> 결과:

<342> 사진: 염색된 절편들을 4X 확대 플랜-아포크로마트(plan-apochromat) 대물 렌즈를 장착한 니콘(Nikon) E600 현미경 상에서 레티나(Retina) 1300B 카메라(Imaging, Burnaby, BC, Canada)로 촬영하였다(도 15).

<343> 실시예 14

<344> **A형 보툴리눔 독소의 근육 마비 유발 유효성(effectiveness)**

<345> 목적:

<346> 근력 생성 테스트에 의해, 레반스 보툴리눔 제제의 독소의 국소 적용 후 근육 마비를 유발하는 A형 보툴리눔 독소의 유효성을 연구한다.

<347> 재료 및 방법:

<348> 보툴리눔 독소:

<349> 뉴로독스(Neuronox)(Medy-Tox, Inc., Korea) Lot#NNX0502, 100 U/바이알;

<350> 0.9% NaCl(보존제 불포함, Abbott Laboratories, North Chicago, IL)

<351> 폴리라이신 펩티드(담체):

<352> K15T2

<353> 테스트 군 - 10 U 독소/마우스, n=4

	K15T2 담체	담체 불포함
신경독소(NNX)	x	x

<355> 폴리라이신 펩티드/독소 복합체 제제:

<356> 표적 담체(target carrier): 알부민/독소 중량비 = 1.1:1

<357> 뉴로독스 제제: (0.5 mg 알부민/100 U 독소)

<358> 미세원심분리기 튜브에서 0.9% NaCl로 1.1 mg/ml의 K15T2 담체 스톱 용액을 제조하고 볼텍싱에 의해 혼합하였다. 100 U(1 바이알)의 NNX를 0.9% NaCl을 바이알의 측벽(side wall)로 서서히 주사하고 가벼운 역전에 의해 혼합하여 0.5 ml의 0.9% NaCl로 재구성하였다. (농도는 100 U 독소/0.5 ml였다.) 0.5 ml의 재구성된 독소로부터 0.5 ml 담체 스톱 용액을 서서히 주입하고 담체/독소 바이알을 조심스럽게 10회 역전시키고 바이알을 똑바로 세운 상태로 실온에서 5분간 방치하고 투여 전에 다시 가볍게 역전시켰다. (농도는 100 U 독소/1.0 ml였다.) 100 μ l의 상기 혼합물을 주사 바늘이 장착된 1 ml의 주사기로 취했다. 적용 전에 상기 바늘을 제거하였다. (최종 농도는 10 U 독소/100 μ l였다).

<359> 연구 설계: 22-26 g 중량의 수컷 CD1 마우스(Charles River, Wilmington, MA)를 치료군으로 이용하고 28-31 g 중량의 수컷 CD1 마우스를 대조군으로 이용하였다. 마우스를 군당 5마리씩 수용하고 치료 전에 사료 및 물에 원하는 만큼 접근할 수 있게 허용하였다. 동물들을 산소와 혼합된 1.5% 이소플루란으로 마취시키고 30분의 체류 시간(dwell time)으로 연구 진행 동안 마취 상태로 유지시켰다. 각 마우스의 뒷다리의 투여 부위를 Andis Edjer II 무선 충전형 트리머(Andis, Sturtevant, WI)로 조심스럽게 제모하였다. NNX를 마우스 다리당 10 유닛의 투여량으로 적용하였다. 동량의 국소로 적용된 펩티드 담체를 포함하지 않는 독소가 대조군으로 작용하였다. 적용 후 4일차에 근육 수축력을 측정하였다.

<360> 국소 적용:

<361> 동물들을 산소와 혼합된 1.5% 이소플루란으로 마취시켰다. 주사 바늘이 장착되지 않는 1 ml 주사기를 이용하여 100 μ l(10 유닛)의 담체/독소 혼합물을 무작위로 선택된 마우스의 (제모된) 뒷다리에 적용하여 퍼지게 하였다. 다른 쪽 다리에는 대조구 혼합물을 처리하였다. 니트릴 장갑을 끼고 상기 혼합물을 뒷다리로 마사지 시키고, 마우스가 마취 상태에 있는 동안 30분간 방치하고, 그 후, 투여 부위를 물로 세척하고 투여 부위에서 잔류 독소를 제거하기 위해 종이 타월로 닦았다. 국소 적용 및 세척 후에, 수용을 위해 마우스를 다시 케이지(cage)로 복귀시키고 온도 제어 환경에서 마취로부터 회복시켰다. 감소된 호흡률, 가쁜 호흡, 안검 하수증 및 동공확대 또는 근육 마비와 같은 전신성 독성의 행동적 징후를 매일 관찰하였다. 처리 후 4일차에 근력 생성을 측정하였다.

<362> 근 수축력 생성:

<363> 움직임을 방지하기 위해 대퇴골 및 경골을 통해 K-와이어를 이용하여 나무 탁자에 사지를 묶어서 고정시켰다. 장딴지근(gastrocnemius)은 인 시투(in situ)로 두었다. 와이어 봉합(wire suture)을 아킬레스 건의 원위 단부(distal end) 주위로 묶었다. 그 후, 건을 봉합에서 떨어진 쪽으로 절개하고, 봉합을 힘 변환기(model FT03, Grass, West Warwick, RI)에 부착시켰고, 상기 힘 변환기는 힘 변환기 증폭기(model 13-G4615-50, Gould, Cleveland, OH)에 연결되었다. NNX 처리된 쪽으로부터의 좌골 신경을 최대 등척성 단일-수축력(maximum isometric single-twitch force)이 수득될 때까지, 전압을 증가시키면서 직접적으로 자극하였다(SD9 stimulator, Grass, West Warwick, RI). 그 후, 자극 주파수를 최대 강직력(maximum tetani force)이 생성될 때까지 증가시켰다. 강직(tetanus)은 초최대 자극(supermaximal stimulation)에 의해 모든 모터 유닛의 가중을 적용하는 것에 의해 생성된다. 대조구 사지에 대해 동일한 절차를 반복하였다. 힘 변환기에 연결된 조정된 기록 진동(calibrated recording oscillation)(RS 3800, Gould, Cleveland, OH)으로 반응을 기록하였다. [Ma J, Elsaidi GA, Smith TL, et al. Time course of recovery of juvenile skeletal muscle after botulinum toxin A injection. Am. J. Phys. Med. Rehabil. 2004; 83(10):774-780].

<364> 결과:

<365> 국소 NNX + 펩티드 담체 시스템의 근력 생성을 평가했을 때, 단회 국소 투여로 처리된 동물에서 강직 반응의 약 55% 감소를 가져오는 근력 생성의 감소를 보였고, 이는 NNX + K15T2 (치료군)의 경우, 평균 128 $\pm$ 11 그램이었고, 담체 불포함의 NNX(대조군)의 경우, 286 $\pm$ 16 그램이었다 (표 18). 각 자극 주파수에 대한 평균 근력 감소 백분율, 평균 및 표준 오차의 요약이 표 19에 표시된다. 도 16은 NNX + K15T2(치료군), 담체 불포함 NNX(대조군) 및 NNX 주사에 대한 근육 감소 백분율을 보여준다.

<366> 표 18: 근력 생성 - 강직 테스트. 치료군과 대조군의 평균 및 표준 오차가 제시된다.

동물 군	평균	표준 오차
치료군	128	11
대조군	286	16

<368> 표 19: 자극 주파수 요약 근력 감소 백분율, 평균 및 표준 오차가 제시된다.

자극 주파수 (Hz)	최대 힘 그램	강직 25 Hz 그램	강직 40 Hz 그램	강직 60 Hz 그램	강직 100 Hz 그램	강직 150 Hz 그램	강직 200 Hz 그램
X+ 담체 군(10U/마우스)							
내부 대조군 대비 근력 감소							
표준오차 평균		14%	15%	5%	6%	14%	18%
		49%	34%	20%	30%	32%	39%
평균	24	30	70	116	128	125	109
표준 오차	8	8	16	7	11	25	33
X 단독- 담체 불포함 군 U/마우스)							
내부 대조군 대비 근력 감소							
표준오차 평균		14%	14%	19%	12%	9%	4%
		3%	21%	3%	1%	-2%	-2%
평균	63	76	155	233	284	283	267
표준 오차	9	14	30	28	16	10	6

<369>

결론:

본 연구는 전유의(proprietary) 담체 시스템에 담긴 레반스 보툴리눔 제제의 A형 보툴리눔 독소가 단회 국소 적용 후 마우스에서 근육 마비를 유발하는 데 효과적이라는 것을 보여주었다.

실시예 15

인간 파일롯 연구: 표정(expression)의 기능적 손상 없이

이마 주름을 감소시키는 A형 보툴리눔 독소.

국소 보툴리눔 독소 제제 및 적용:

대상자 1: 1차 치료 - 4 μ g의 K15T2 레반스 담체를 (EtOH 불포함의 0.9% NaCl에 담긴)15% 폴록사머 2.0 ml에 용해시키고 역전에 의해 혼합하였다. 1.0 ml의 폴록사머-담체 혼합물을 이용하여 일련의 단계로 400 U의 보톡스 (Allergan, Irvine, CA)를 재구성하고 역전에 의해 혼합하였다. 독소 대비 담체의 최종 농도는 0.5 mg 담체 /100U 독소였다. 상기 국소용 독소 용액을 실온에서 5분간 방치하였다. 주사기를 이용하여 1.0 ml의 최종 용량을 이마에 적용하였다. 30분의 방치 후에, 처리된 이마 영역을 5장의 젖은 종이 타월로 닦고, 이때, 각 종이 타월은 한번에 한 방향으로만 이마를 닦았다. 처리-전(기준) 및 처리-후를 사진으로 기록하였다.

대상자 2: 1차 치료- 10 μ g의 A형 보툴리눔 독소(List Biological Laboratories, Inc., Campbell, CA, product #130A)를 1 ml의 0.9% 염화나트륨으로 재구성하고 5ng/100 μ l의 최종 농도까지 더 희석시켰다. 재구성된 독소를 역전에 의해 혼합하였다. 레반스 담체를 1ng/20 μ l의 농도로 준비하였다. 1ng의 담체를 0.9% NaCl(EtOH 불포함)에 담긴 15% 폴록사머 900 μ l에서 혼합하였다. 그 후, 100 ml의 독소를 920 μ l의 폴록사머에 첨가하여 1:10의 독소:희석제 비가 되게 하였다. 주사기를 이용하여 1.02 ml의 총 용량을 이마에 적용하였다. 30분 방치 후에, 처리된 이마 영역을 대상자 1의 경우와 동일한 방식으로 5장의 젖은 종이 타월로 세척하였다. 처리-전(기준) 및 처리-후를 사진으로 기록하였다.

결과:

도 17은 처리 전 및 후에 촬영된 사진을 보여준다. 사진은 A형 보툴리눔 독소의 국소 적용 후 감소된 이마 주름을 보여준다. 처리-전(기준) 및 처리-후의 인간 대상자 1(상단) 및 인간 대상자 2(하단)의 사진을 도시한다.

실시예 16

다한증 연구 - 인간 대상자에서 과도한 발汗을 치료하기 위한

레반스 국소용 보툴리눔 제제

목적:

레반스 보툴리눔 제제의 국소 적용에 의한 발汗 억제 가능성에 결정한다.

제제: 1 mg/ml의 각각의 KNR 및 P6R-B 백본을 별개의 튜브에서 탈이온수로 제조하고 불텍싱하여 잘 혼합하였다. 보톡스® - 100 유닛(Allergan, Irvine, CA)을 1.0 ml의 탈이온수(대상자 1) 또는 0.5 ml의 0.9% NaCl(대상자 2 및 3)로 재구성하고 역전에 의해 혼합하였다. 하기의 표에 기재된 성분들을 1.7 ml 미세원심분리기 튜브에 첨가하고, 90초간 불텍싱하고, 실온에서 5분간 방치하여 복합체가 형성되게 하는 것에 의해 치료제의 스톱 용액을 제조하였다. 원뿔형 튜브를 우측에 대해 R로 표지하고 좌측에 대해서는 L로 표지하였다. 1.0 ml의 스톱 용액을 정해진 원뿔형 튜브로 옮기고, 4.0 ml의 세타필(GaldermaJFort Worth, TX)을 첨가하여 1:5 희석을 제조하고 금속 스페츨러(spatula)를 이용하여 잘 혼합하였다.

대상	보톡스(U)	담체	비(독소:희석제)	총 용량
1	20	KNR	5:8	1.3 ml
2	50	KNR	1:1	1.5 ml

중량측정 평가(Gravimetric Assessment): 절차의 각 단계는 니트릴 (또는 분말 불포함) 장갑을 끼고 수행하였다. 세 층의 여과지를 준비하고 핀셋을 이용하여 여과지가 원뿔형 튜브의 스크류 표시된 상부(screwed top)에 인접하게 위치하도록 배치하였다. 상기 튜브의 스크류 표시된 상부를 저울 팬(balance pan)의 중앙에 배치하여 튜브에 담긴 상기 여과지의 중량을 미리 측정하였다. 대상자 당 3 세트의 여과지를 준비하고 그 중량을

미리 측정하였다. 여과지를 동시에 각 거드랑이에 배치하였다. 대상자는 그들의 팔이 옆에 놓이고 손은 신체 앞에서 접은 상태로 편한 자세로 앉았다. 대상자들은 난방된 방에서 채취기간 동안 정지상태로 있었다. 각 10분의 채취기간 후에, 여과지를 제거하고 튜브에 다시 넣었다. 여과지를 찢지 않도록 주의하면서 핀셋을 이용하여 펼치고 스크류 표시된 상부 근처에 놓이도록 원래의 위치에 배치하였다. 기준(baseline) 땀 측정값을 10분 간격으로 3회 수집하였다. 상기 여과지를 스크류 표시된 상부가 저울 팬의 중심에 놓이도록 튜브를 배치하여 다시 중량을 측정하고 그 중량을 기록하였다.

<388> 약물 적용 절차: 니트릴 글로브를 끼고, 테스트 물질 또는 대조구 5.0 ml(대상자 1) 및 1.5 ml(대상자 2)를 금속 스패츨러(대상자 1) 또는 회전식 애플리케이션(rolling applicator)(대상자 2에 대해 상하 운동 및 뒤이은 원 운동으로 적용)을 이용하여 거드랑이에 국소로 적용하였다. 대상자 2의 경우, 각 거드랑이를 소형 스패츨러를 이용하여 약 4 ml의 세타필로 코팅시키고 실온(72-77° F)에서 1시간 동안 방치하여 치료제가 흡수될 수 있게 하였다. 거드랑이를 닦고 클린싱 형겔(Johnson& Johnson)으로 세정하였다.

<389> 관찰: 액모(hair on axillae)는 온전했다. 적용 전에 확성을 수행하지 않았다. 대상자는 통증이나 불편이 없다고 말했다. 양쪽 거드랑이는 저린 느낌(tingling sensation)을 가졌다. 자극(irritaiton)의 징후 및 피부 색소의 변화는 없었다.

<390> 결과

<391> 중량측정 분석(인간 대상자 1): 인간 대상자 1에 대해 각 거드랑이에 레반스 펩티드 담체와 함께 또는 상기 담체 없이 20 U의 보툴리눔 독소(보톡스)의 국소 적용 후 최초 7일간 가능성 테스트에서 분석하였다. 표준 조건 하에서 10분당 생성된 땀의 양(mg) ($p=0.0043$).

	보툴리눔 단독(대조구)	레반스 보툴리눔 제제
% 단면	20.5	13.4

<393> 중량측정 분석(인간 대상자 2): 인간 대상자 2에 대해 각 거드랑이에 레반스 펩티드 담체와 함께 또는 상기 담체 없이 50 U의 보툴리눔 독소(보톡스)의 국소 적용 후 최초 7일간 가능성 테스트에서 분석하였다. 표준 조건 하에서 10분당 생성된 땀의 양(mg) ($p=0.0117$). 도 18은 한쪽 거드랑이에는 본 발명에 따른 보툴리눔 독소 제제를, 다른 쪽 거드랑이에는 대조구 제제를 적용한 후의 대상자 2의 사진을 보여준다.

	보툴리눔 단독(대조구)	레반스 보툴리눔 제제
% 단면	201	157

도면의 간단한 설명

<62> 도 1은 펩티드 백본을 포함하는 본 발명의 조성물을 이용한 보툴리눔 독소의 경피 전달의 효율성을 입증하는 실험의 결과를 나타낸다.

<63> 도 2는 한쪽 다리의 영역이 본 발명의 조성물로 처리되고 다른 쪽 다리의 영역은 본 발명에 따른 담체를 포함하지 않는 또 다른 보툴리눔 독소-함유 조성물로 처리된 것인 마우스의 뒷다리(hind limb)의 상태를 도시하는 사진이다.

<64> 도 3은 레반스(Revance) 보툴리눔 제제를 국소적으로 치료하기 전 및 후의 대상자의 이마 상의 주름을 도시하는 사진이다.

<65> 도 4는 레반스 보툴리눔 제제에 의한 주름의 국소 치료 후의 이마(A) 및 처리 전의 이마(B)의 마이크로실 캐스트(Mikrosil cast)를 보여준다. 실제 대상의 사진 촬영에서 초래될 수 있는 인위적 결과(artifact)를 최소화하기 때문에 유용한 이 마이크로실 캐스트는 처리되지 않은 면이 보다 깊은 주름을 갖는다는 것을 명확하게 보여준다.

<66> 도 5: 도 5는 처리 전에 대상자의 이마 상에서 수행된 Minor의 전분/요오드 테스트를 도시하는 사진을 보여준다.

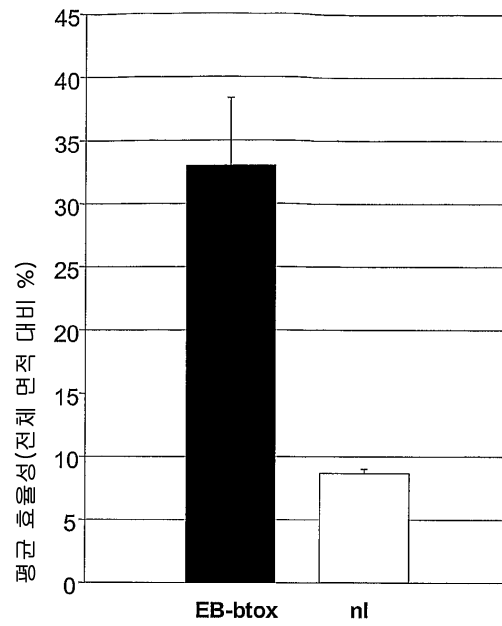
<67> 도 6: 도 6a는 레반스 보툴리눔 제제(A) 및 대조구 제제(B)의 적용 후 5일차에 수행된 Minor의 전분/요오드 테스트를 도시하는 사진을 보여준다. 대조구 제제는 약 21,000의 분자량을 가지며 TAT 분지성 기를 갖는 양전하로 하전된 폴리라이신 백본을 포함했다. 이 사진들은 적용 후 2분 경과시에 촬영되었다. 도 6b는 적용 후 4분 경과

시에 촬영된 점을 제외하고는 도 6a와 동일하다.

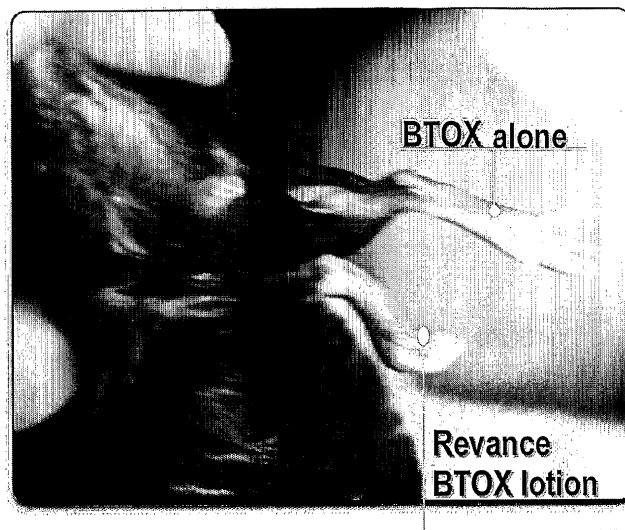
- <68> 도 7: 도 7은 액와 다한증 연구에서 이용된 투여 영역을 보여준다. 투여 영역은 액모(axillary hair)로 뒤덮인 피부의 영역보다 1 센티미터 외부로 확장된다는 것에 주목한다.
- <69> 도 8: 도 8a는 인간 대상자에서 액와 다한증의 치료를 위해 짧은 펩티드 담체를 이용한 국소 작용제로서 온전한 피부를 통해 치료적으로 전달된 보툴리눔 독소의 효율성을 보여주는 실험의 결과를 나타낸다. 그래프는 보톡스 + 짧은 펩티드 담체 또는 담체 단독에 의한 처리 후 4주 경과시 중량에 의해(gravimetrically) 측정된 땀의 양(5분 당 mg)의 상당한 감소를 도시한다. 결과들은 동일한 군에 대한 기준 값(baseline value) 대비 4주차 값의 비이며, 유의성은 $P < 0.05$ 에 의한 윌콕슨(Wilcoxon) 분석으로 결정되었다. 환자수 $N=10$ 이었다. 도 8b는 인간 대상자에서 액와 다한증의 치료를 위해 짧은 펩티드 담체를 이용한 국소 작용제로서 온전한 피부를 통해 치료용으로 전달된 보툴리눔 독소의 효율성을 보여주는 실험의 결과를 나타낸다. 그래프는 보톡스 + 짧은 펩티드 담체 또는 담체 단독에 의한 처리 후 4주 경과시 중량에 의해 측정된 땀의 양(5분 당 mg)의 상당한 감소를 도시한다. 결과들은 두 시점에 대한 대조군 값 대비 치료군 값의 비이며, 유의성은 $P < 0.05$ 에 의한 윌콕슨(Wilcoxon) 분석으로 결정되었다. 환자수 $N=10$ 이었다.
- <70> 도 9는 액와 다한증의 치료를 위한 레반스 보툴리눔 제제의 국소적인 처리 전 및 후의 Minor의 전분/요오드 테스트를 도시하는 사진을 보여준다. 대상자 #12에 대해 우측 겨드랑이는 레반스 보툴리눔 제제로 처리하고(a 및 c), 좌측 겨드랑이는 대조군으로 처리된(b 및 d) 기준 대비 2주차의 전분/요오드 테스트가 도시된다. 이 사진들은 전분 요오드 테스트에서 담체+보톡스에 의한 처리 후 관찰되는 전형적인 잇점을 예시한다. 대조군 쪽에서 일부 교차점(crossover)이 관찰되나(중량에 의한 측정 데이터에서 25% 감소와 일치됨), 유의성 있는 감소는 치료에 의해 제공된다(테스트된 쪽에 대한 중량에 의한 측정 데이터에서의 65% 감소와 일치됨).
- <71> 도 10: 두 마리의 상이한 동물에서 담체를 포함하지 않는 보툴리눔 독소의 국소 적용(a 및 c) 또는 KNR과 함께 보툴리눔 독소의 국소 적용(b 및 d) 후 7일차에 수행된 요오드-전분 염색(검청색(blue-black) 양성)에 의해 가시화된 마우스 발 땀 생성을 보여준다.
- <72> 도 11: 도 11(a)는 수컷 CD1 마우스에 대한 대조군 제제의 적용 후 근력 생성을 도시한다. 도 11(b)는 국소 "레반스 보톡스 용액"의 적용 후 근력 생성을 도시한다.
- <73> 도 12: 변형된 프란쯔(Franz) 챔버, (a) 저장기(reservoir), 순환 수조(circulating water bath), 인라인 연동 펌프(inline peristaltic pump), 인라인 프란쯔 챔버, 및 분획 수집기(fraction collector)를 포함하는 장치 셋업, (b) 유입 및 유출 배관(tubing), 피부 막, 및 공여체 화합물 배치를 보여주는 개별적인 프란쯔 챔버의 단면도.
- <74> 도 13: 대조군 대비 K30T를 사용한 흐름(flux) 증가, (a) K30T vs. 폴리-라이신 (b) K30T vs. 담체 불포함.
- <75> 도 14: 돼지 피부 모델에서 피부 장벽을 통한 A형 보툴리눔 독소 전달에서 레반스 담체의 효율성이 변형된 프란쯔 챔버를 이용하여 평가되었다. 국소 적용 후 독소의 증가된 흐름이 도시된다(도 13a-f). 각 도면은 다양한 담체:독소 중량비에 의한 돼지 피부를 통한 국소 독소 전달의 평균 및 표준오차 백분율을 도시한다.
- <76> 도 15: 담체를 포함하지 않는, 비오틴화(biotinylated) 보툴리눔 독소(대조군, a-c); 또는 K30T 담체와 함께 비오틴화된 보툴리눔 독소(치료군, d-f)의 국소 적용 후 스트렙타비딘 염색(청색 양성)을 도시하는 현미경 사진이다(photomicrograph).
- <77> 도 16: 이 도면은 K15T2 + NNX(치료군), 담체 불포함 NNX(대조군), 및 NNX 주사에 의한 NNX에 대한 근육 감소 백분율을 도시한다.
- <78> 도 17: A형 보툴리눔 독소의 국소 적용 후, 이마 주름의 감소를 보여주는 사진이다. 인간 대상자 1은 상단에 표시되고 대상자 2는 하단에 표시된다. 사진은 처리-전(기준) 및 처리-후를 보여준다.
- <79> 도 18: 대조군 제제 대비 본 발명에 따른 제제를 비교하는 인간 액와 다한증 연구이다.

도면

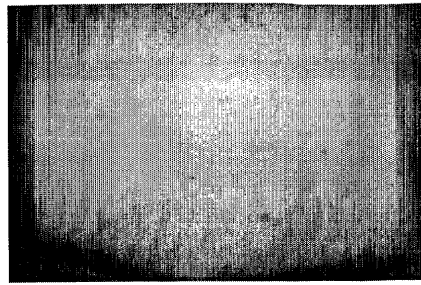
도면1



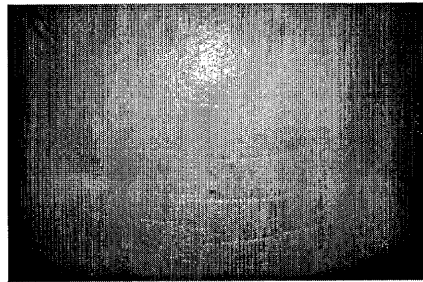
도면2



도면3



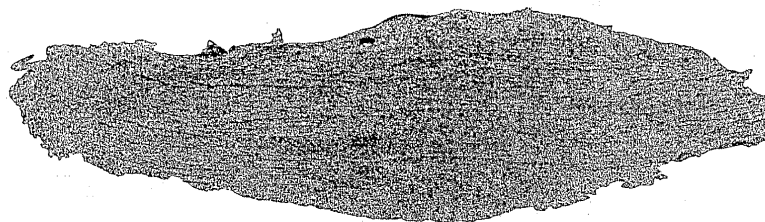
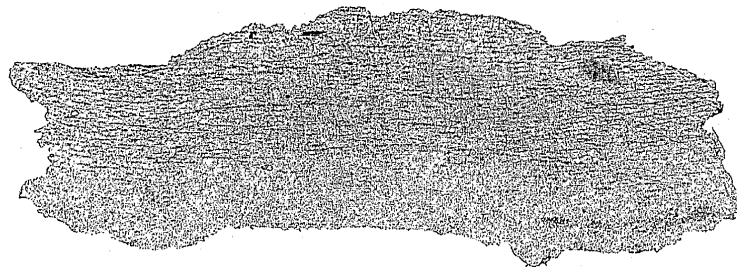
레반스(Revanse) 보틀리눔 제제



기준

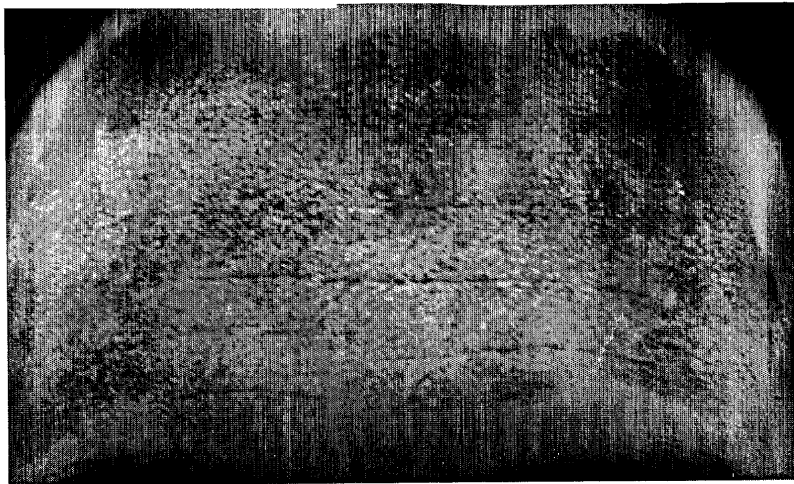
도면4

레반스 보틀리눔 제제

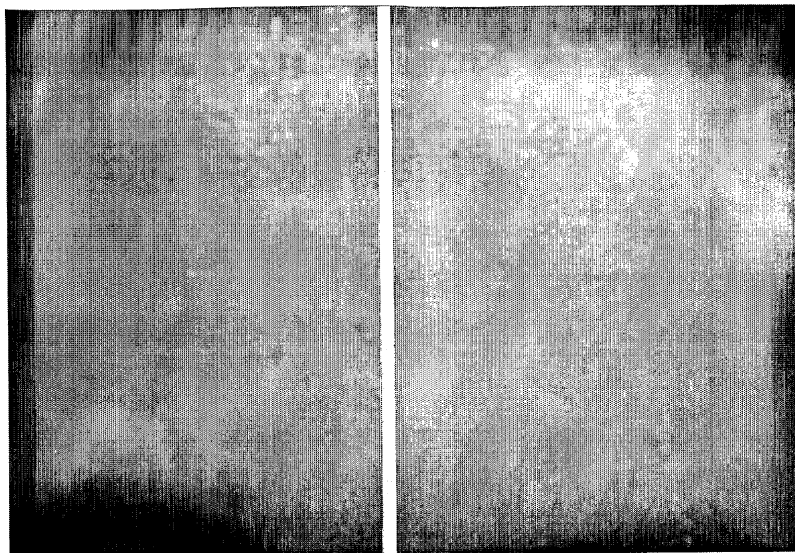


기준

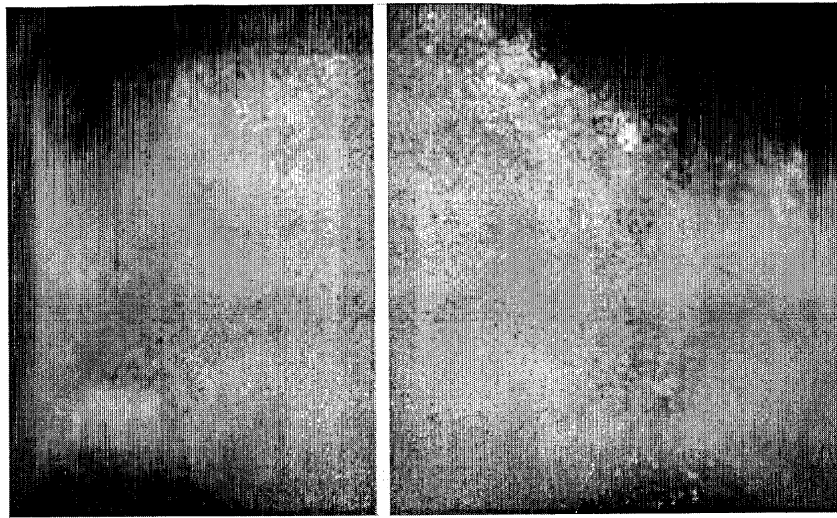
도면5



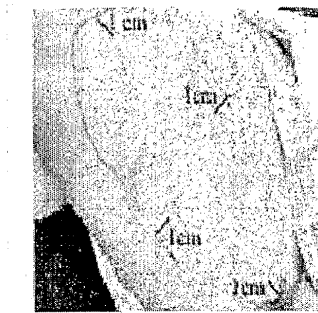
도면6a



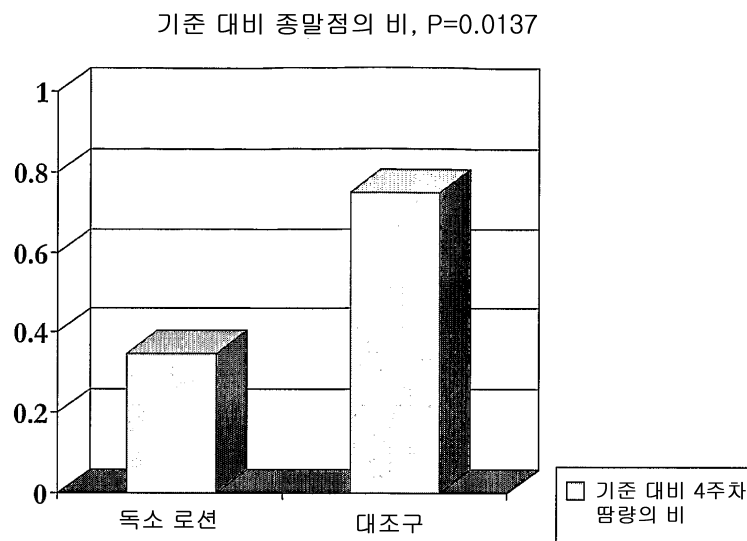
도면6b



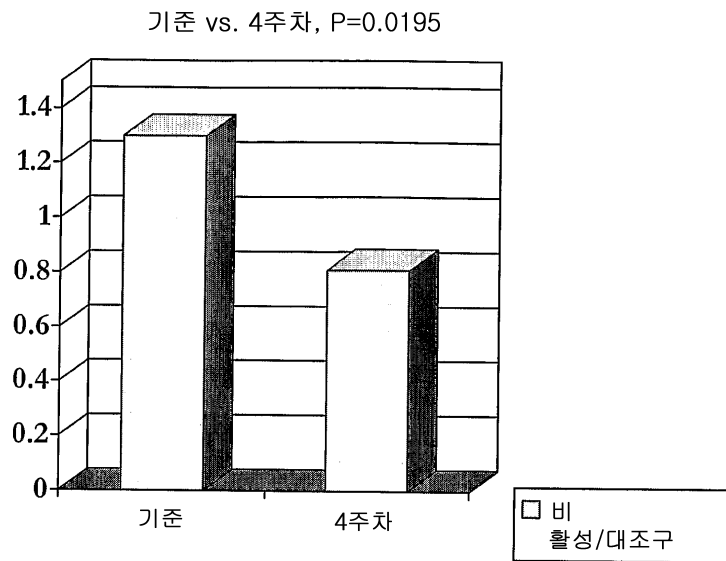
도면7



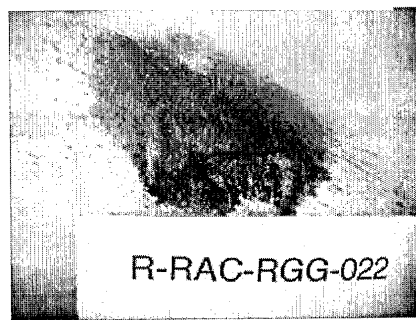
도면8a



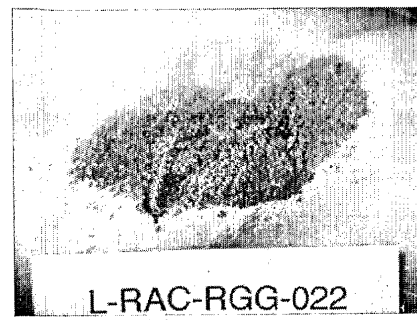
도면8b



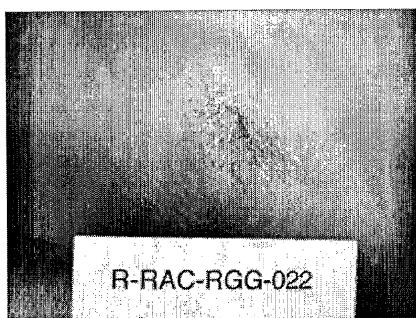
도면9



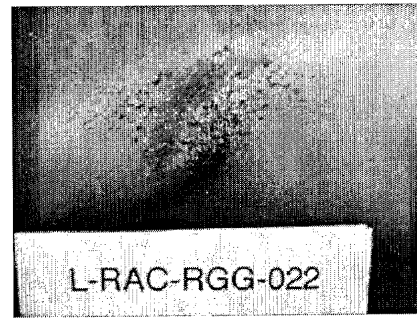
(A)



(B)

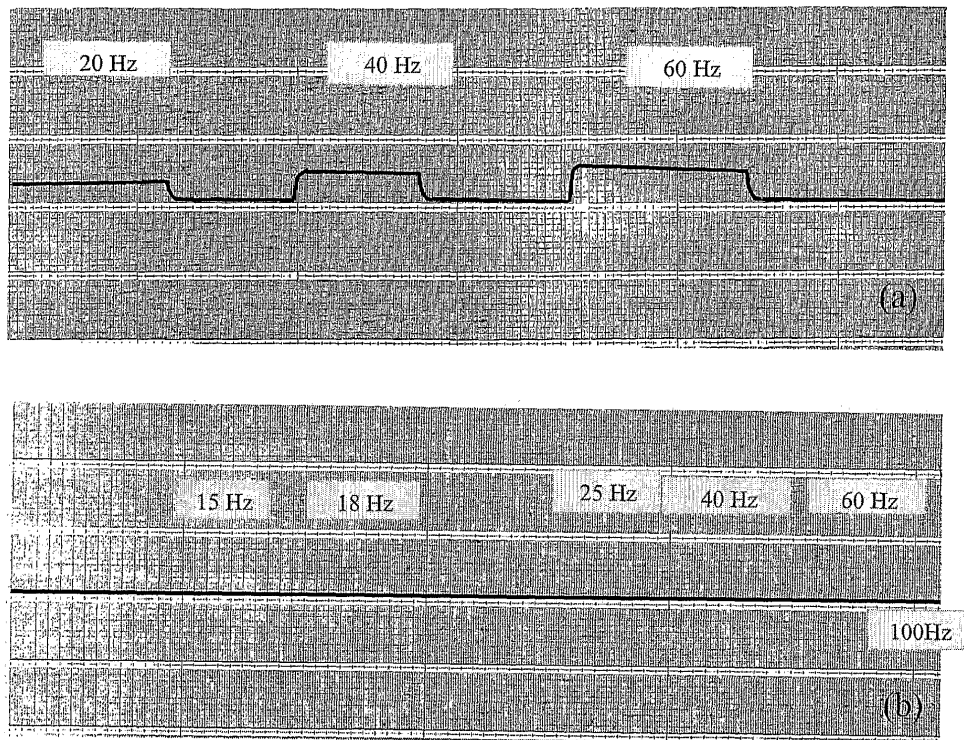


(C)

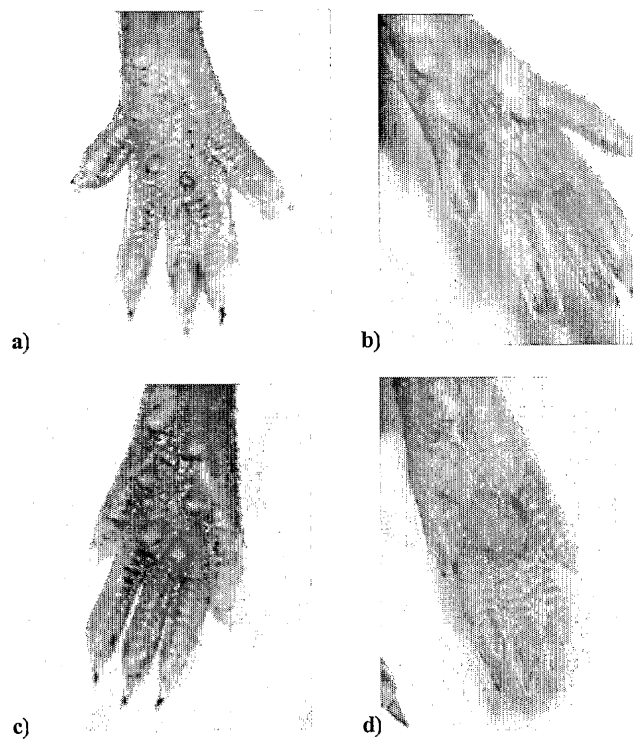


(D)

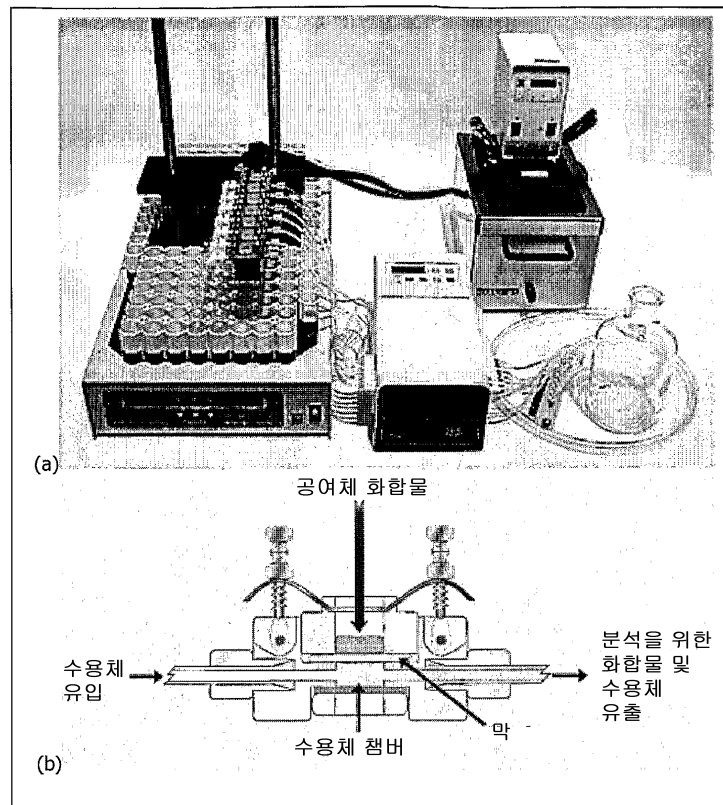
도면10



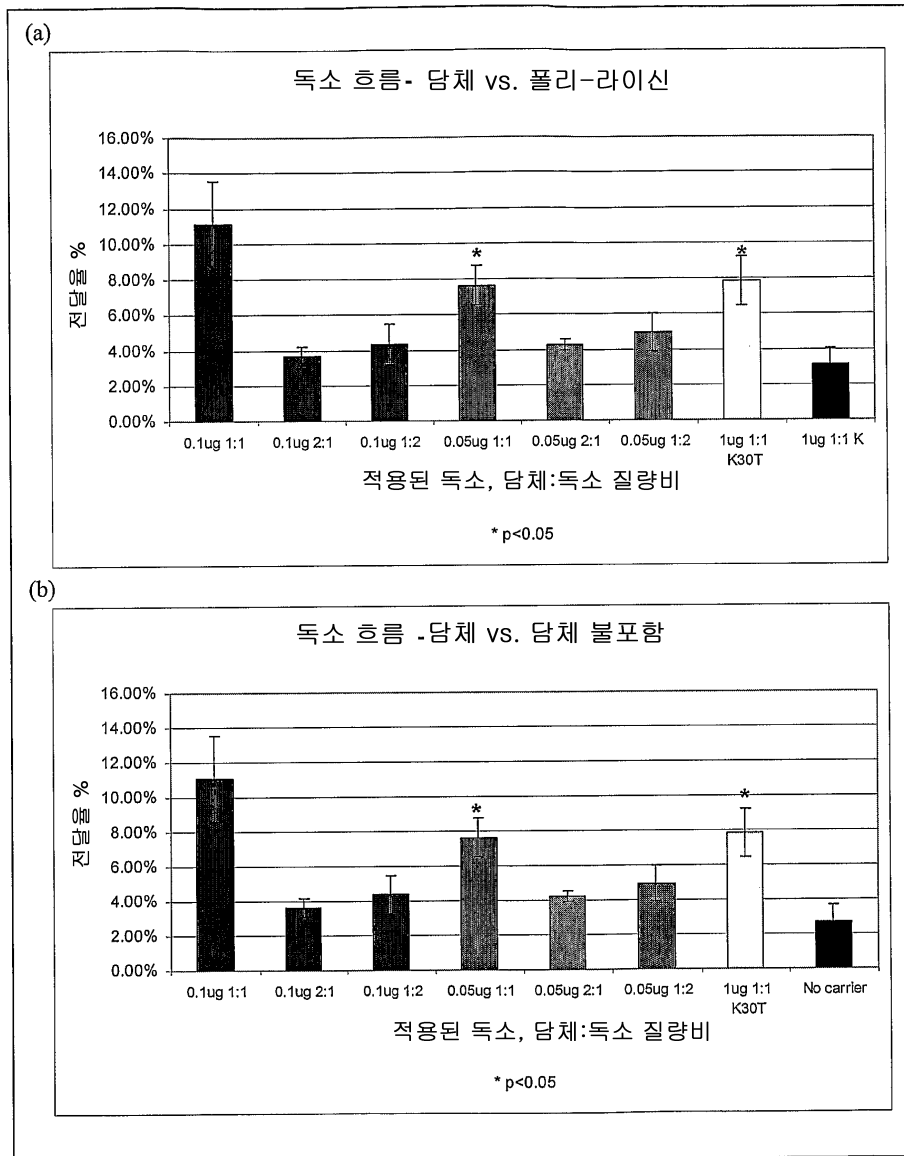
도면11



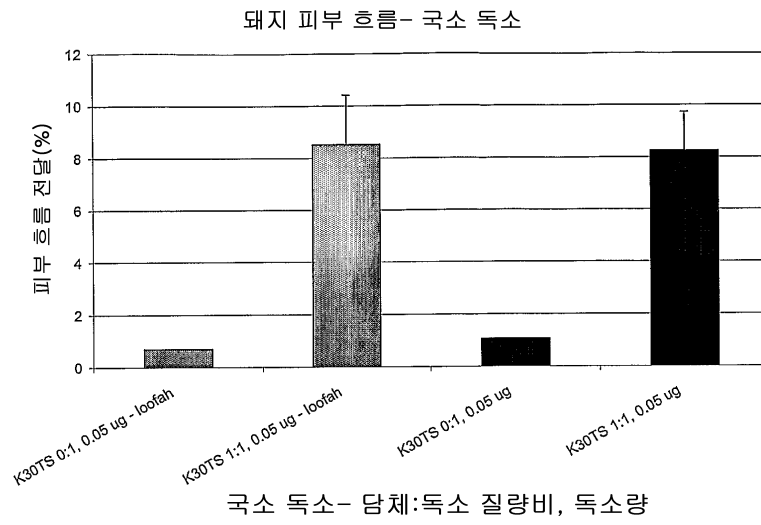
도면12



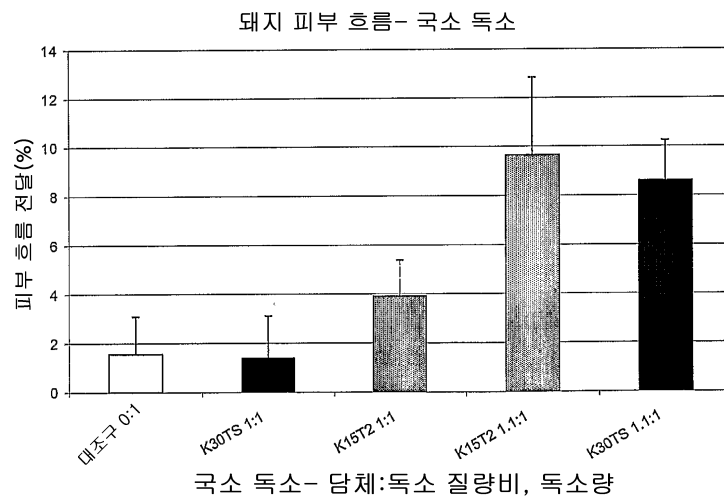
도면13



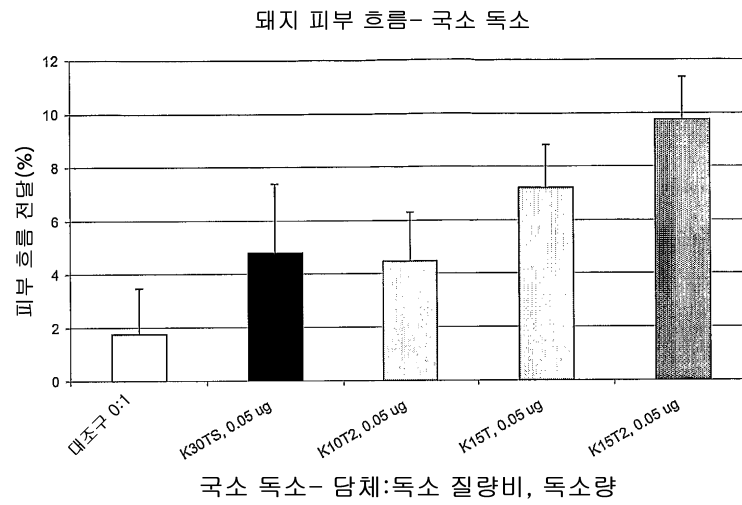
도면14a



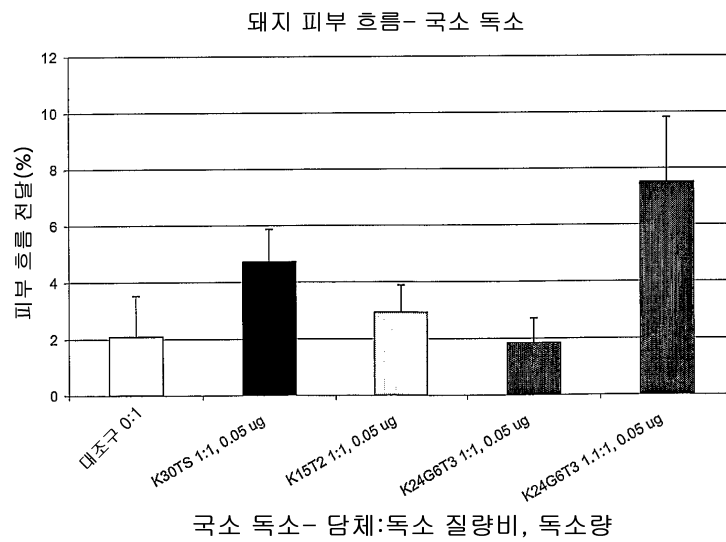
도면14b



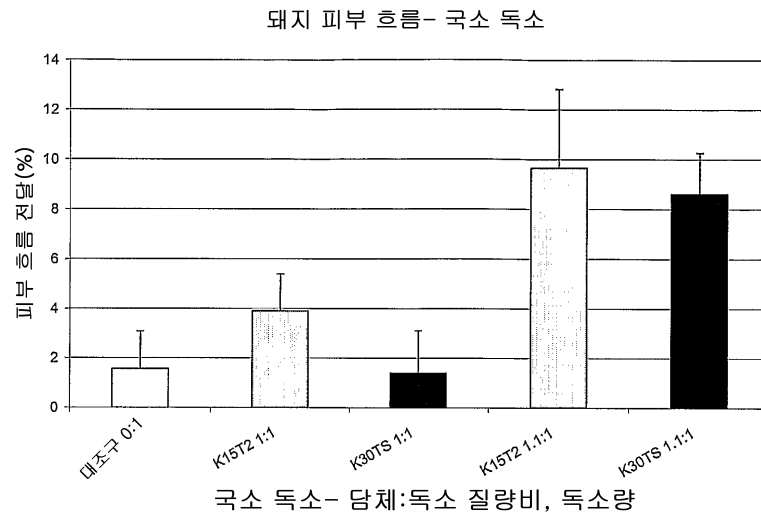
도면14c



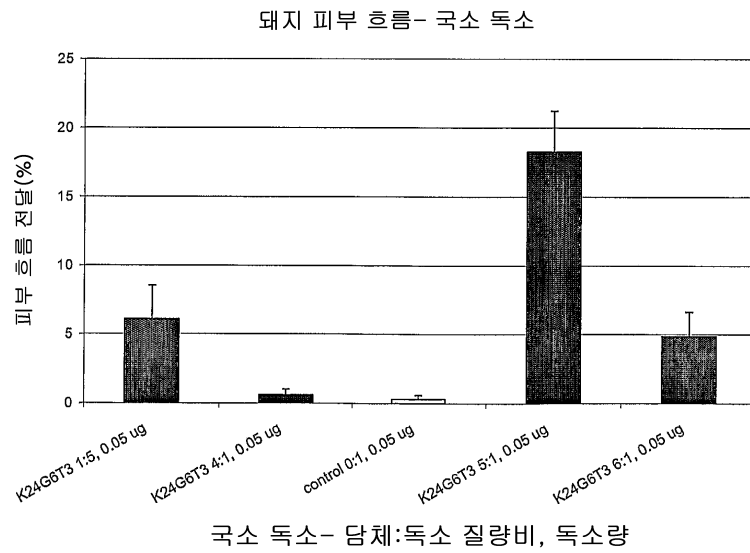
도면14d



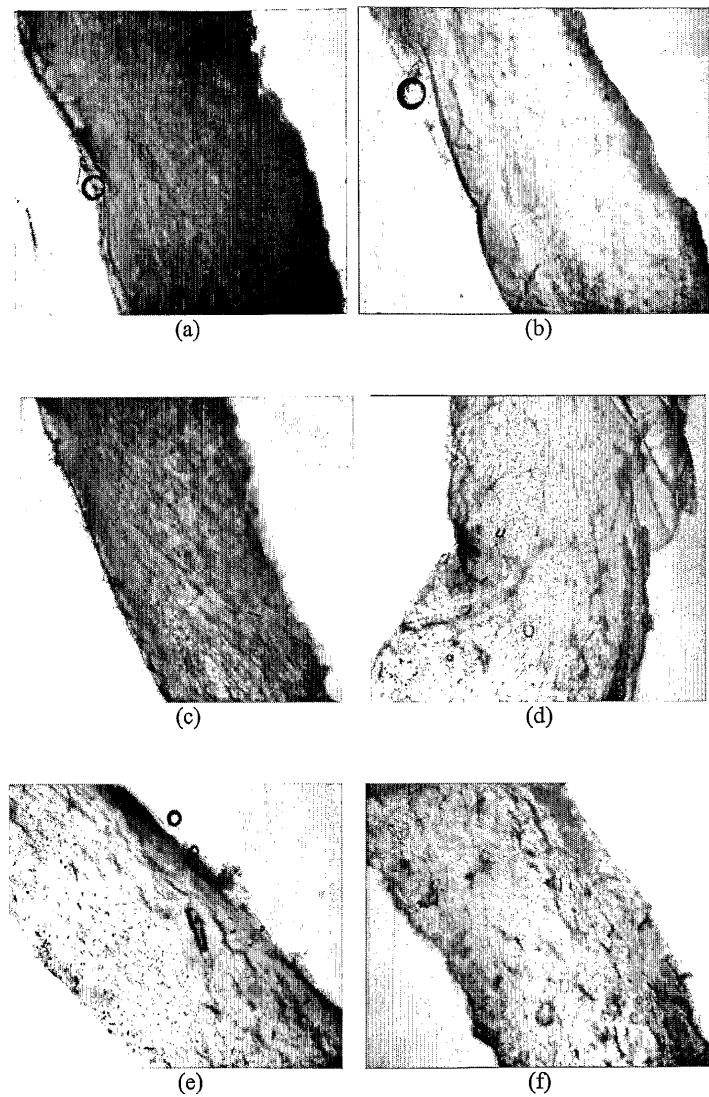
도면14e



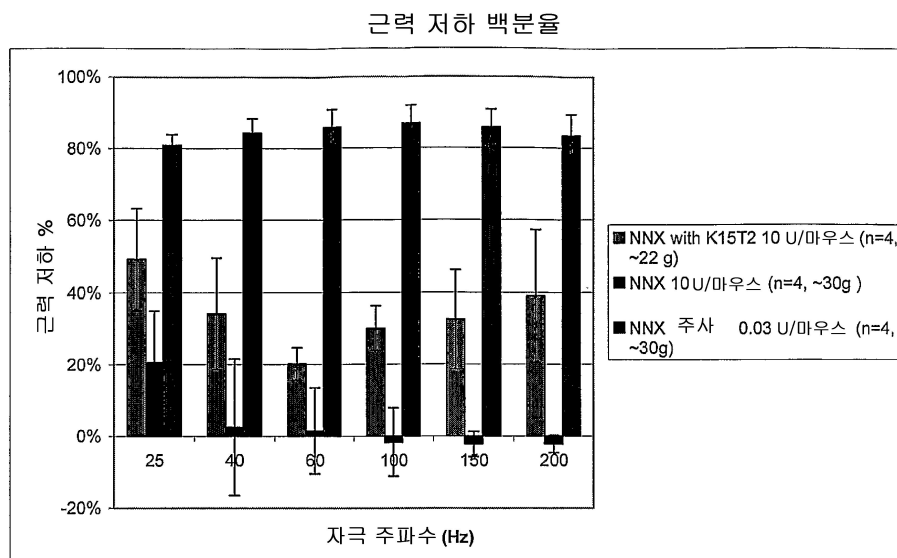
도면14f



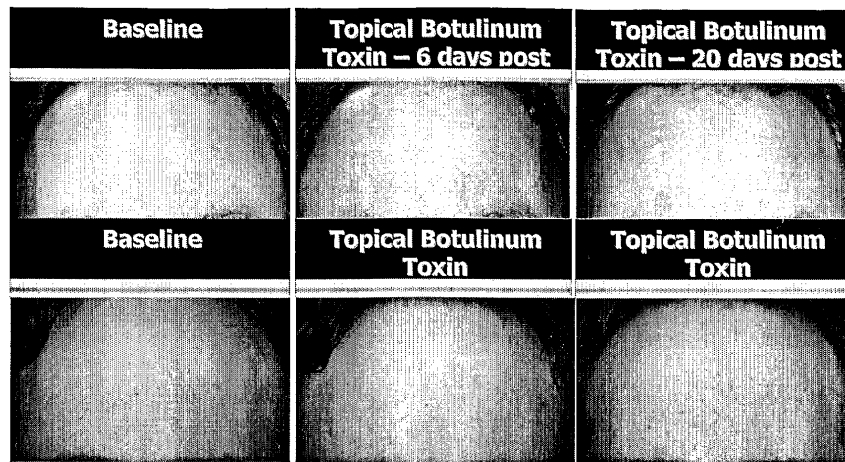
도면15



도면16



도면17



도면18

