



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년08월31일
A61K 39/08 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0753765
	(24) 등록일자	2007년08월23일

(21) 출원번호	10-2002-7010146	(65) 공개번호	10-2002-0084115
(22) 출원일자	2002년08월07일	(43) 공개일자	2002년11월04일
심사청구일자	2004년09월14일		
번역문 제출일자	2002년08월07일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2001/003641	(87) 국제공개번호	WO 2001/58472
국제출원일자	2001년02월05일	국제공개일자	2001년08월16일

(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 안티구와바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리제, 캐나다, 스위스, 리히텐슈타인, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카, 알제리, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그라나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 남아프리카, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 모잠비크, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 터키,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 기니 비사우, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 09/500,147 2000년02월08일 미국(US)

(73) 특허권자 알레간 인코포레이티드
미합중국 캘리포니아 어빈 듀폰 드라이브 2525(우:92612)

(72) 발명자 헌트,테렌스제이.
미합중국캘리포니아주92807,아나해임힐스,#302,5815이.라팔마

(74) 대리인 최경준

(56) 선행기술조사문헌
국제특허공보 제9735604호

심사관 : 박정민

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 보툴리눔 독소 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명에 따르면, 혈액 유래 알부민이 없고, 보툴리눔 독소, 염화나트륨 또는 물, 및 히드록시에틸 전분과 같은 다당류 및/또는 아미노산을 함유하며, 사람 환자에게 치료적으로 투여하기에 적합한 보툴리눔 독소 약제학적 조성물이 제공된다. 이와 달리, 다당류 및 아미노산은 재조합 알부민에 의해 대체될 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

삭제

청구항 12.

삭제

청구항 13.

삭제

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

청구항 16.

삭제

청구항 17.

삭제

청구항 18.

삭제

청구항 19.

삭제

청구항 20.

삭제

청구항 21.

삭제

청구항 22.

삭제

청구항 23.

삭제

청구항 24.

삭제

청구항 25.

삭제

청구항 26.

삭제

청구항 27.

삭제

청구항 28.

삭제

청구항 29.

삭제

청구항 30.

삭제

청구항 31.

삭제

청구항 32.

삭제

청구항 33.

삭제

청구항 34.

삭제

청구항 35.

삭제

청구항 36.

삭제

청구항 37.

삭제

청구항 38.

삭제

청구항 39.

삭제

청구항 40.

삭제

청구항 41.

삭제

청구항 42.

삭제

청구항 43.

(a) 보틀리눔 독소, 및;

(b) 재조합으로 생산된 알부민을 포함하여 이루어지는 약제학적 조성물.

청구항 44.

제 43 항에 있어서,

아세틸트립토판네이트 및 이의 염 및 유도체를 더욱 포함하여 이루어지는 약제학적 조성물.

청구항 45.

삭제

청구항 46.

삭제

청구항 47.

삭제

청구항 48.

삭제

청구항 49.

삭제

명세서

기술분야

본 발명은 약제학적 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 보툴리눔 독소를 함유하는 약제학적 조성물 및 이러한 약제학적 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

약제학적 조성물은 사람 환자에게 투여하여 원하는 진단결과 또는 치료효과를 달성하기에 적합한, 하나 이상의 활성 성분과, 하나 이상의 부형제, 캐리어, 안정화제 또는 증량제(bulking agent)를 포함하는 제제이다.

저장 안정성 및 취급 용이성을 위하여, 약제학적 조성물은, 환자에 투여하기 전에, 염수(saline) 또는 물로 재구성(reconstitute)할 수 있는, 동결건조 또는 진공건조된 파우더로 제조할 수 있다. 이와달리, 약제학적 조성물은 수용액으로 제조할 수 있다. 약제학적 조성물은 단백질의(proteinaceous) 활성 성분을 포함할 수 있다. 불행하게도, 단백질은 안정화하는 것이 매우 어려울 수 있으므로, 그 결과, 제조, 재구성(필요한 경우)하는 동안, 그리고, 약제학적 조성물을 함유하는 단백질을 사용하기 전에 저장하는 동안, 단백질의 손실 및/또는 단백질 활성의 손실을 가져올 수 있다. 단백질의 변성, 분해, 다imer화 및/또는 폴리머화 반응때문에 안정화하는 데 문제가 생길 수 있다. 알부민 및 젤라틴과 같은, 다양한 부형제가, 정도를 달리하여, 약제학적 조성물 중에 존재하는 단백질 활성 성분을 안정화하는데 사용된다. 또한, 동결건조시 동결조건 하에서의 단백질 변성을 감소시키기 위하여 알콜과 같은 한랭방위제(cryoprotectants)가 사용된다.

알부민

알부민은 작은 크기의, 풍부한 혈장 단백질이다. 사람 혈청 알부민은 약 69 킬로달톤(kD)이며, 약제학적 조성물 중에 존재하는 어떤 단백질 활성 성분에 대한 벌크 캐리어 및 안정화제의 역할을 할 수 있는 경우에, 약제학적 조성물에서 비활성 성분으로 사용된다.

약제학적 조성물에서 알부민의 안정화 작용은, 약제학적 조성물의 멀티스텝 제조 동안, 그리고, 이후 제조된 약제학적 조성물의 재구성시에 제공될 수 있다. 그러므로, 알부민에 의해서, 예를 들어, (1) 단백질 활성 성분이, 실험실 유리제품이나 용기의 표면과 같은 표면, 약제학적 조성물이 재구성되는 바이알, 및 약제학적 조성물을 주사하는 데 사용되는 주사기 안쪽 표면에 부착되는 것을 감소시킴으로써, (단백질 활성 성분의 표면 부착은 활성 성분의 손실 및 남아있는 단백질 활성 성

분의 변성을 가져올 수 있으며, 이는 모두 약제학적 조성물 중에 존재하는 활성 성분의 전체 활성을 감소시킨다); 그리고, (2) 활성 성분의 희석 용액의 제조에서 나타날 수 있는 활성 성분의 변성을 감소시킴으로써, 약제학적 조성물의 단백질의 활성 성분에 안정성이 주어진다.

약제학적 조성물에서 단백질 활성성분을 안정화할 수 있을 뿐아니라, 알부민은 또한 사람 환자에 주사되는 경우, 일반적으로 면역원성 (immunogenicity)이 무시할 수 있을 정도라는 장점이 있다. 감지할 수 있을 정도의 면역원성을 가지는 화합물은 그에 대한 항체의 생성을 유발할 수 있으며, 이로 인해, 과민반응 (anaphylactic reaction) 및/또는 약물 내성이 나타나, 치료하려는 질환 또는 장애를 면역성 구성성분을 가지는 약제학적 조성물로는 치료하기 어렵게 될 가능성이 있다.

불행히도, 안정화 효과가 알려져 있음에도 불구하고, 약제학적 조성물에 알부민을 사용하는 데는 심각한 문제가 있다. 예를 들어, 알부민은 값이 비싸고, 점점 입수하기가 어려워지고 있다. 게다가, 환자에 투여할 경우, 알부민과 같은 혈액 제품은 환자가 혈액 유래 병원균 또는 전염성 미생물에 감염되는 잠재적인 위험성을 초래할 수 있다. 즉, 약제학적 조성물 중에 알부민이 존재함으로써, 의도하지 않게 감염성 요소들이 약제학적 조성물 중에 포함될 수 있는 가능성이 있다고 알려져 있다. 예를 들어, 알부민을 사용하여 약제학적 조성물 내로 프리온을 이동시킬 수 있다고 보고 되었다. 프리온(prion)은 단백질의 감염성 입자로서, 정상 단백질을 만드는 동일한 핵산 서열로부터 비정상적인 구조의 이성질체(isoform)로서 나타난다는 가설이 있다. 또한, 번역후 단계(post translation level)에서 프리온 단백질 이성질체에 대한 정상적인 이성질체 단백질의 "보충 반응 (recruitment reaction)"에 감염성이 있다는 가설이 있다. 정상적인 내재성 세포 단백질이 병원성 프리온 구조로 잘못 접히는 것(misfold)을 유도하는 것으로 여겨진다. 심각하게는, 알부민이 제조되는 풀(pool)의 혈액 공여자가 크로이츠펠트-야콥 병으로 진단되었고, 다수의 사람 혈청 알부민의 배포가 철회되었다.

크로이츠펠트-야콥 병(때때로 빠른 진행에 있어서 알츠하이머 병과 같은 특성을 나타냄)은 사람의 전염성 해면양뇌증인 희귀한 신경변성 질환으로, 전염물질은 프리온 단백질의 비정상적인 이성질체로 여겨진다. 크로이츠펠트-야콥 병에 걸린 개체는, 명백히 완전했던 건강이 6개월 내에 무동무언증으로 악화될 수 있다. 크로이츠펠트-야콥 병의 의원성(iatrogenic) 감염 가능성이 보고 되었으며, 혈액 세포 요소들을 처리하여, 60°C에서 10 시간동안 가열하는 것을 포함하는, 보통의 알부민 제조 방법으로는 크로이츠펠트-야콥 병 감염에 대한 충분한 방어가 제공되지 않는 것으로 추정된다. 따라서, 혈청 알부민과 같은 사람 혈장 단백질 농축물을 함유하는, 약제학적 조성물의 투여로 인해, 크로이츠펠트-야콥 병과 같은, 프리온 매개 질환을 얻게 될 잠재적인 위험성이 존재할 수 있다.

젤라틴은 몇몇 단백질 활성 성분 약제학적 조성물에 알부민 대체물질로서 사용되어 왔다. 특히, 젤라틴은 동물 유래 단백질이므로, 알부민에 의해서 나타날 수 있는 잠재적인 전염성에 대해 동일한 위험성을 야기한다. 따라서, 혈액 분획이 아닌 알부민 대체물질을 찾아내는 것이 요구되며, 이러한 알부민 대체물질은 젤라틴도 아니고, 어떠한 동물 소스로부터 유래하는 것도 아닌 것이 바람직하다.

보툴리눔 독소

혐기성, 그람 양성 박테리아인 *클로스트리디움 보툴리눔*(*Clostridium botulinum*)은 강력한 폴리펩티드 신경독인, 보툴리눔 독소를 생성하며, 이 독은 사람 및 동물에서 보툴리즘이라는 신경마비 질환을 유발한다. 클로스트리디움 보툴리눔 및 이의 포자는 보통 토양에서 발견되며, 이 박테리아는 집에서 통조림할 때 제대로 살균되지 않고 밀봉된 식품 용기에서 배양될 수 있어, 이러한 것들이 많은 경우 보툴리즘의 원인이 된다. 보툴리즘 증상은 전형적으로 클로스트리디움 보툴리눔 배양물 또는 포자에 감염된 음식을 먹은 후 18 내지 36시간이 지나서 나타난다. 보툴리눔 독은 독성이 감소되지 않은채로 장 내막을 통과하여 말초 운동 뉴런을 공격할 수 있는 것으로 보인다. 보툴리눔 독소 중독의 증상은 보행장애, 연하장애 및 언어장애로부터 호흡근육의 마비 및 죽음으로 진행될 수 있다.

보툴리눔 독소 타입 A는 사람에게 알려진 가장 치명적인 천연 생물학제이다. 마우스에서 보툴리눔 독소(정제된 신경독 복합체) 타입 A의 LD₅₀은 약 50 피코그램이다. 흥미롭게도, 물을 기준으로 할때, 보툴리눔 독소 타입 A는 디프테리아보다 18억배, 시안화 나트륨보다 6억배, 코브로톡신(cobrotoxin)보다 3천만배, 그리고, 콜레라보다 1천2백만배 더 치명적이다. Singh, *Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins*, page 63-84(chapter 4) of *Natural Toxins II*, edited by B.R.Singh et al., Plenum Press, New York(1976)(보툴리눔 독소 타입 A의 상기한 LD₅₀ 0.3ng이 1U과 동일하다는 것은 약 0.05ng의 BOTOX®가 1유닛이라는 사실에 의해 보정된다). 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. 7개의 면역학적으로 구별되는 보툴리눔 신경독은, 타입-특이적인 항체로 중화하여 구별되는, 각각 보툴리눔 신경독 세로타입(serotype) A, B, C₁, D, E, F 및 G로 특징지어진다. 상이한 세로타입의 보툴리눔 독소는 작용하는 동물 종 및 일으키는 마비의 정도 및 지속시

간에 따라 차이가 있다. 예를 들어, 래트에서 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 독소들은 콜린성 운동 뉴런에 강한 친화도를 가지고 결합하고, 뉴런으로 들어가 아세틸콜린의 시냅스전 방출을 억제하는 것으로 여겨진다.

보툴리눔 독소는 활동항진성 골격근을 특징으로 하는 신경근 장애의 치료를 위해 임상 세팅에 사용되고 있다. 보툴리눔 독소 타입 A는 1989년 미국 식품의약청에 의해서, 12세 이상 환자에서의 본태성 안검경련, 사시 및 반측안면 경련의 치료에 사용되는 것이 허가되었다. 말초 근육내 주사된 보툴리눔 독소 타입 A의 임상 효과는 보통 주사 후 1주 내에 나타난다. 일회 보툴리눔 독소 타입 A의 근육내 주사에 의한 증상 구제(즉, 이완 근육 마비)의 전형적인 지속시간은 약 3개월이다.

모든 보툴리눔 독소 세로타입이 신경근 접합부에서 신경전달물질 아세틸콜린의 방출을 억제하는 것으로 여겨지지만, 이들은 상이한 신경분비성 단백질에서 작용하며, 및/또는 이 단백질을 상이한 부위에서 절단한다. 보툴리눔 독소 A는 특이적으로 세포내, 소포(vesicle) 관련 단백질 SNAP-25의 펩티드 결합을 가수분해할 수 있는, 아연 엔도펩티다아제이다. 보툴리눔 독소 타입 A와 비교할 때, 보툴리눔 타입 E가 또한 25kD 시냅토폴 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 선택신 및 SNAP-5를 모두 절단하는 것으로 보인다. 이러한 작용 메커니즘의 상이성은 여러 보툴리눔 독소 세로타입들의 작용에 의한 상대적인 효력 및/또는 지속시간에 영향을 미칠 것이다.

보툴리눔 독소 단백질 분자의 분자량은, 알려진 보툴리눔 독소 세로타입 7가지 모두에서, 약 150kD이다. 흥미롭게도, 보툴리눔 독소는 클로스트리디움계 박테리아에 의해서, 관련된 비독성 단백질과 함께 150kD 보툴리눔 독소 단백질을 포함하는 복합체(complex)로서 방출된다. 그러므로, 보툴리눔 독소 타입 A 복합체는 클로스트리디움계 박테리아에 의해서, 900k, 500Dk 및 300kD 형으로 생성될 수 있다. 보툴리눔 독소 타입 B 및 C₁은 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 비독성 단백질(보툴리눔 독소 분자와 함께 관련 신경독 복합체를 구성할 수 있는)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. 독소 복합체를 pH 7.3에서 적혈구 세포로 처리하여, 복합체를 독소 단백질 및 적혈구응집소 단백질로 분리할 수 있다. 적혈구응집소 단백질의 제거시, 독소 단백질은 현저한 불안정성을 가진다.

클로스트리디움 보툴리눔 박테리아에서 생성된 보툴리눔 독소 세로타입은 모두 비활성 단일사슬 단백질이며, 신경활성을 가지려면 프로테아제로 절단하거나 닉(nick)을 내어야만 한다. 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 절단한다. 닉을 내지 않은 분자에 대한 닉을 낸 분자의 정확한 비율은 배양시간 및 배양물의 온도에 따라 다르다. 그러므로, 아마도 알려진대로 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.

클로스트리디움 보툴리눔의 홀 A 종(Hall A strain)으로부터 $\geq 3 \times 10^7$ U/mg이고, A_{260}/A_{278} 이 0.60 이하이고, 겔 전기영동에서 독특한 밴드 패턴을 보이는 특징을 가지는, 질 높은 결정형 보툴리눔 독소 타입 A를 얻을 수 있다. Shantz, E.J. et al., *Properties and use of Botulinum toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine*, Microbiol Rev. 56:80-99 (1992)에 기재된 바와 같은, 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. 황산으로 침전시키고, 한외여과로 농축시켜, 정제하지 않은 독소(raw toxin)를 수확할 수 있다. 산 침전물을 염화칼슘 중에 용해시켜 정제할 수 있다. 그리고 나서, 독소를 차가운 에탄올로 침전시킬 수 있다.

이 침전물은 인산 나트륨 버퍼용액 중에 용해시키고, 원심분리할 수 있다. 그리고나서 건조하면, 특이적인 효력이 3×10^7 LD₅₀ U/mg 이상인, 약 900kD의 결정형 보툴리눔 독소 타입 A 복합체를 얻을 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, 비독성 단백질들로부터 순수한 보툴리눔 독소들을 분리하여 얻는데 사용할 수 있다.

약제학적 조성물 제조에 사용하기에 적합한, 미리 제조 및 정제된 보툴리눔 독소 및 독소 복합체를 List Biological Laboratories, Inc., Campbell, California; the Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, U.K.; Wako(Osaka, Japan), 및 Sigma Chemicals of St Louis, Missouri.로부터 입수할 수 있다.

순수한 보툴리눔 독소는 불안정하므로, 약제학적 조성물의 제조에 사용하는 데에는 한계가 있다. 게다가, 독소 타입 A 복합체와 같은 보툴리눔 독소 복합체는 또한 표면 변성, 열 및 알칼리 조건으로 인한 변성에 극히 민감하다. 비활성화 독소는, 면역원성일 수 있는 독소이드 단백질을 형성한다. 이렇게 얻어진 항체는 환자에 대한 독소 주사를 어렵게 한다.

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 굽힘 및 표면 건조에 의해서 독성이 제거될 수 있다. 또한, 공지의 배양, 발효 및 정제에 의해 얻어진 독소 복합체를 아주 아주 낮은 농도의 독소로 희석하여 약제학적 조성물 제제에 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 안정화제를 사용하여 안정화하여야만 한다. 이러한 목적을 위한 성공적인 안정화제로는 동물 유래 단백질 알부민 및 젤라틴이 유일하게 사용되어 왔다. 상기한 바와 같이, 최종 제제 중에 동물 유래 단백질이 존재하면, 공여자로부터 운송된 어떤 안정한 바이러스, 프리온 또는 다른 감염성 또는 병원성 화합물이 독소를 오염시킬 수 있다는 잠재적인 문제를 야기한다.

게다가, 독소 함유 약제학적 조성물을 선적 및 저장 형태(즉시사용 또는 의사가 재구성)의 독소로 동결건조 또는 진공건조하는 데 필요한, 가혹한 pH, 온도 및 농도 범위 조건 중 어느 하나로 인해 독소에서 독성이 제거될 수 있다. 그러므로, 젤라틴이나 혈청 알부민과 같은 동물 유래 또는 공여자 풀(pool) 단백질이, 다소 성공적으로 보툴리눔 독소를 안정화하는데 사용되어 왔다.

상업적으로 입수가 가능한 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물은 BOTOX[®](Allergan, Inc., of Irvine, California로부터 입수가 가능)라는 상표로 시중에 유통되고 있다. BOTOX[®]는 정제 보툴리눔 독소 타입 A 복합체, 알부민 및 염화나트륨으로 구성되어, 살균, 진공건조 형태로 포장된다. 보툴리눔 독소 타입 A는, N-Z 아민 및 효모 추출물을 함유하는 배지에서 배양된 클로스트리디움 보툴리눔 홀 종(Hall strain)의 배양물로부터 제조한다. 보툴리눔 독소 타입 A 복합체를 배양물 용액으로부터 일련의 산 침전을 통하여, 활성 고분자량 독소 단백질 및 관련 적혈구응집소 단백질로 구성되는 결정형 복합체로 정제한다. 결정형 복합체를 염수 및 알부민에 재-용해하고, 살균 여과(0.2미크론)한 후, 진공건조한다. 근육내 주사 전에, BOTOX[®]는 살균된, 방부제없는 염수로 재구성(reconstitute)될 수 있다. 각각의 BOTOX[®] 바이알은 방부제없는, 살균된, 진공-건조 형태로서, 약 100 유닛(U)의 클로스트리디움 보툴리눔 독소 타입 A 복합체, 0.5 밀리그램의 사람 혈청 알부민 및 0.9 밀리그램의 염화나트륨을 함유한다.

진공-건조된 BOTOX[®]를 재구성하기 위해서, 방부제없는, 살균된 일반 염수; 0.9% 염화 나트륨 주사액을 사용하여, 적정량의 희석제를 알맞은 크기의 주사기에 넣는다. BOTOX[®]는 거품내기 또는 유사한 격렬한 교반에 의해서 변성되므로, 희석제는 서서히 바이알에 주입한다. BOTOX[®]는 재구성 후 4시간 내에 투여하여야 한다. 이 기간 동안, 재구성된 BOTOX[®]는 냉장고(2 내지 8℃)에 보관한다. 재구성된 BOTOX[®]는 맑고 무색이며, 입자 물질이 없다. 진공-건조된 제품은 5℃ 이하의 냉동고에 보관한다. BOTOX[®]는 냉동고에서 바이알을 꺼내어 재구성한 후 4시간 내에 투여한다. 이 4시간 동안은, 재구성된 BOTOX[®]를 냉장고(2 내지 8℃)에 보관할 수 있다.

보툴리눔 독소 안정화제로서 알부민을 대체할 안전한 대체물질로 또다른 단백질 또는 이와달리 저분자량 화합물(단백질이 아닌)이 보고되어 왔다. Carpender et al., *Interactions of Stabilizing Additive with Proteins During Freeze-Thawing and Freeze-Drying*, International Symposium on Biological Product freeze-Drying and Formulation, 24-26 October 1990; Karger(1992), 225-239.

약제학적 조성물에서 보통 캐리어 및 증량제로 사용되는 많은 물질들이, 신경독 함유 약제학적 조성물 중에서 알부민 대체 물질로서는 불안정하다는 것이 입증된 바 있다. 예를 들어, 이당류 셀로비오스는 본 독소의 안정화제로서는 불안정하다는 것이 판명되었다. 즉, 알부민 및 염화 나트륨과 함께, 부형제로서 셀로비오스를 사용하면, 이러한 부형제가 있는 결정형 보툴리눔 독소 타입 A의 동결건조 후 독성(10% 회복)은, 알부민만 있는 것의 동결건조 후 독성(>75% 내지 >90% 회복)과 비교할 때 훨씬 낮아진다고 알려져 있다. Goodnough et al., *Stabilization of Botulinum Toxin Type A During Lyophilization*, App & Envir. Micro. 58(10)3426-3428(1992).

게다가, 다당류를 포함하는 당류는 일반적으로 단백질 안정화제로서는 별로 좋지 않다. 즉, 단백질 제제가 당류(글루코오스 또는 글루코오스의 폴리머와 같은) 또는 탄수화물을 포함하여 이루어지는 경우에는, 단백질과 글루코오스가 서로 상호작용하여 잘 알려진 마이알 반응(Millard reaction)을 하는 것으로 알려져 있기 때문에, 즉, 글루코오스 및 글루코오스 폴리머의 성질을 환원시키므로, 단백질 활성 성분을 함유하는 약제학적 조성물은 원래 불안정하다고 알려져 있다. 예를 들어, 수분의 감소 또는 비-환원당의 사용 등, 이러한 단백질-당류 반응을 방지하려는 많은 시도들이 대부분 성공하지 못했다. 두드러지게, 마이알 반응의 분해 경로로 인해, 단백질 활성 성분이 치료학적으로 불충분하게 된다. 그러므로, 단백질 및, 글루코오스 폴리머와 같은, 환원당류, 탄수화물 또는 당을 함유하는 약제학적 조성물은 원래 불안정하며, 장기간 보관 시 활성성분 단백질의 바람직한 생물학적 활성이 상당히 손실된다.

현저하게, 약제학적 조성물에서 사람 혈청 알부민이 단백질 활성 성분의 안정화제로서 효과적으로 작용할 수 있는 이유 중의 하나는 단백질인 알부민은 약제학적 조성물의 단백질 활성 성분과 마이알 반응을 하지 않는다는 점이다. 따라서, 다른 단백질들 중에서 알부민의 대체물질을 찾을 수 있을 것으로 기대되었다.

알부민은 약제학적 조성물에서 단순한 증량제 이상으로 사용되는 것으로 여겨지기 때문에, 약제학적 조성물에서 보툴리눔 독소의 안정화제로서 적합한 알부민 대체물질을 찾는 것은 어려우며 문제가 있다. 즉, 알부민은 보툴리눔 독소와 상호작용하여 신경독의 효력을 향상시킬 수 있을 것으로 보인다. 예를 들어, 소 혈청 알부민은, 보툴리눔 독소 타입 A에 대한 SNAP-25 신경내 기질과 닮은 합성 펩티드 기질의 촉매반응의 속도를 가속하기 때문에, 소 혈청 알부민은 보툴리눔 독소 타입 A에 대해서 단순한 안정화 부형제 이상으로 작용할 수 있는 것으로 알려져 있다. A Schmidt, et al., *Endoproteinase Activity of Type A Botulinum Neurotoxin Substrate Requirements and Activation by Serum Albumin*, J. of Protein Chemistry, 16(1), 19-26(1997). 그러므로, 알부민은 독소의 기질에서 보툴리눔 독소의 세포내 단백질 가수분해 작용이 일어나는 동안, 동력학 속도(kinetic rate)에 영향을 미쳐 상승효과를 나타내게 될 것이다. 이러한 상승효과는 보툴리눔 독소가 표적 뉴런으로 엔도시토시스하는 동안, 알부민이 독소와 함께 이동하기 때문일 수도 있고, 또는, 이러한 상승효과는 보툴리눔 독소가 엔도시토시스하기 전에, 뉴런 단백질 내에 이미 세포질 알부민 존재하기 때문일 수도 있다.

보툴리눔 독소 타입 A의 단백질가수분해 활성에 대한 소 혈청 알부민의 동력학 속도 자극 효과가 존재한다는 것이 알려졌고, 이러한 점이 특히 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물에 적합한 알부민 대체물질을 찾는 데 문제가 되었다. 즉, 적어도 소 혈청 알부민에 대해서는 이 두가지 특성(독소 안정화 및 독소 기질 촉매반응 상승)이 동일한 알부민 부형제에서만 고유한 것으로 여겨지므로, 바람직한 독소 안정화 특성을 가지는 알부민 대체물질은 독소에 의한 기질 촉매반응의 속도에 대해 공지되지 않은, 해로울 수도 있는 효과를 나타낼 것이다. 알부민의 상승효과는 제제 내에서 알부민이 단순히 부형제로만 작용하는 것이 아니라 하는 것을 나타내는 것이기 때문에, 적합한 알부민 대체물질을 찾는 것이 더욱 어려워진다.

또한, 보툴리눔 독소 및 적합한 약제학적 조성물 제제는 독특한 많은 특성들을 가지기 때문에, 현재 보툴리눔 독소 함유 약제학적 제제에 사용되는 알부민을 대체할 물질을 찾는 데 더욱 문제가 된다. 이러한 독특한 특성의 예를 4가지 하기에 기재하였다. 첫째, 약제학적 조성물에 포함시키기에는 보툴리눔 독소는 비교적 큰 단백질이므로(보툴리눔 독소 타입 A 복합체의 분자량은 900kD), 본래 깨지기 쉬우며 불안정하다. 이러한 독소 복합체의 크기때문에, 독소 복합체는 더 작고, 덜 복잡한 단백질에 비해서 부서지기 쉽고 불안정하며, 이로 인해 독소의 안정성이 유지될 수 없는 경우, 제제 조성 및 취급이 용이하지 않다. 그러므로, 알부민 대체물질은 변성되거나, 쪼개지거나 또는 독소 분자의 독성을 제거하거나, 독소 복합체에 존재하는 비독성 단백질의 분리를 야기하지 않는 방법으로 독소와 상호작용할 수 있어야만 한다. 둘째, 공지된 것 중 가장 치명적인 생물학적 생성물이기 때문에, 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물 제조의 모든 단계에서, 특별한 안정성, 정밀함 및 정확성이 요구된다. 그러므로, 바람직한 가능한 알부민 대체물은 그 자체로 독성이 없고, 취급이 용이하여야만 하고, 그렇지 않아도 지극히 엄격한 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물 제조 요건을 강화시켜서는 안된다.

셋째, 보툴리눔 독소는 미생물 독소로는 맨 처음으로 사람 질병의 치료에 주사하도록 허가되었기 때문에, 보툴리눔 독소의 배양, 벌크 생산, 약제학적 조성물 제조 및 용도에 대하여 특이적인 프로토콜이 개발 및 허가되었다. 중요하게 고려해야 할 점은 독소의 순도 및 주사 투여량이다. 혼적량이라도 최종 제품을 오염시키거나, 환자에서 예기치 못한 반응을 야기할 수 있는 어떠한 기질에도 독소가 노출되지 않도록, 배양 및 정제에 의한 생산이 이루어져야만 한다. 이러한 제한으로 인해, 동물 고기 제품이 사용되지 않은 단순 배지에서 배양하고, 합성 용매 또는 수지를 포함하지 않는 방법으로 정제하는 것이 요구된다. 크로마토그래피 칼럼 및 합성 용매에 존재하는 것과 같은, 효소, 다양한 교환기를 사용한 독소의 정제는 오염을 일으킬 수 있으므로, 바람직한 제조방법에서 제외된다. 게다가, 보툴리눔 독소 타입 A는 40°C 이상의 온도에서 쉽게 변성되고, 공기/액체 계면에서 거품형태인 경우 독성이 손실되며, 질소 또는 이산화탄소의 존재하에 변성된다.

넷째, 타입 A는 분자량이 약 150kD인 독소가 분자량이 750kD인 비독성 단백질과 비공유 결합되어 구성되기 때문에, 보툴리눔 독소 타입 A를 안정화하는 데는 특별한 어려움이 있다. 비독성 단백질은 독성에 영향을 미치는 2차 및 3차 구조를 보존하거나 안정화하는 것을 도와줄 것으로 여겨진다. 단백질이 아닌 것들 또는 비교적 더 작은 단백질을 안정화하는 데 적용할 수 있는 방법 또는 프로토콜은, 900kD 보툴리눔 독소 타입 A 복합체와 같은 보툴리눔 독소 복합체를 안정화해야 하는 문제에 근본적으로 적용할 수 없다. 즉, pH 3.5 내지 6.8인 경우에는 타입 A 독소 및 비독성 단백질이 비공유적으로 결합하며, 약한 알칼리인 조건 (pH>7.1)에서는 매우 불안정한 독소가 독소 복합체에서 분리된다. 이러한 불안정성 때문에, 순수한 독소는 의학적으로 투여하는 데 사용할 수 없거나 사용이 제한된다.

보툴리눔 독소의 독특한 성질 및 상기한 요구조건들의 관점에서, 현재 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물에서 사용되는 알부민을 대체할 적합한 알부민 대체물질을 찾아낼 수 있는 확률은 현실적으로 거의 제로에 가깝다고 볼 수 있다. 본 발명에 전에는, 동물 유래 단백질 알부민 및 젤라틴만이 약제학적 조성물에 존재하는 보툴리눔 독소의 적합한 안정화제로 사용될 수 있는 것으로 알려져 있었다. 그러므로, 알부민이, 그 자체로, 또는 인산나트륨이나 시트르산나트륨과 같은 하나 또는 추가의 기질들과 함께, 동결건조 후의 보툴리눔 독소 타입 A의 독성을 높게 회복할 수 있게 하는 것으로 알려져 있다. 불행히도, 이미 상기한 바와 같이, 알부민은 풀 혈액 제품(pooled blood product)이기 때문에, 약제학적 조성물에 존재하는 경우, 적어도 잠재적으로나마, 전염성 또는 질환유발 요소들을 옮길 수 있다. 사실, 젤라틴과 같은 모든 동물 제품 또는 단백질은 또한 잠재적으로 환자에게 주사될 때 역반응을 야기할 수 있는 발열물질 또는 다른 기질들을 포함한다.

중국 특허출원 CN 1215084A에는, 젤라틴, 동물 유래 단백질을 사용하여 알부민이 없는 보툴리눔 독소 타입 A를 제조하는 것이 개시되어 있다. 그러나, 이러한 제제에서는 동물 단백질 유래 요소들 또는 수반되는 전염성 요소들이 옮겨지는 위험성이 제거되지 않았다.

히드록시에틸 전분

다당류는 서로 글리코사이드(에테르) 결합으로 연결되는 수백 또는 적어도 수천개의 단당류 유닛으로 구성될 수 있다. 두 가지 중요한 다당류로서 셀룰로오스와 전분이 있다. 셀룰로오스는 식물에 단단함과 형태를 제공하는, 식물 구조형태에 있어 가장 중요한 물질이다. 전분은 식물의 예비 양분 공급물을 구성하고, 주로 다양한 씨앗 및 괴경(tuber)에서 발견된다.

전분은, 전분을 얻는 식물에 따라 특징적인 크기 및 모양을 가지는 과립으로서 존재한다. 일반적으로 전분의 80%는 아밀로펙틴이라고 하는 불용성 부분이다. 아밀로펙틴은 D-글루코오스(글루코피라노오스로서) 유닛들의 사슬들(여기서, 각 유닛은 알파 글리코사이드 결합에 의해 다음 글루코오스 유닛의 C-4에 연결된다)로 구성된다. 전분과 마찬가지로, 셀룰로오스 역시 D-글루코오스 유닛들의 사슬들로 구성되며, 여기서 각 유닛은 글리코사이드 결합에 의해 다음 유닛의 C-4에 연결된다. 그러나, 전분과는 달리, 셀룰로오스에서의 글리코사이드 결합은 베타 결합이다. 셀룰로오스를 황산 및 아세트산 무수물로 처리하면 이당류 셀로비오스를 얻는다. 상기한 바와 같이, 셀로비오스를 사용하여 보툴리눔 독소를 안정화하려는 시도는 성공적이지 못했었다.

전분을 피리딘 및 에틸렌 클로로하이드린으로 처리하여 얻을 수 있는 특정한 전분 유도체가 2-히드록시에틸 전분이다(헤타스타치라고도 한다). 미국 특허 4,457,916에는 종양 괴사 인자(TNF)의 수용액을 안정화하기 위한, 비이온성 계면활성제와 히드록시에틸 전분의 혼합물이 개시되어 있다. 또한, 2-히드록시에틸 전분(헤타스타치)(HESPAN[®]이라는 상표명으로, Du Pont Pharma, Wilmington, Delaware에서 입수 가능, 0.9% 염화나트륨 주사액 중의 6% 헤타스타치)의 6% 수용액이 공지되어 있다. 알부민은 환자에 정맥투여되면 혈장증량제로서 작용하는 것으로 알려져 있다. HESPAN[®]도 역시 환자에 투여되어 혈장증량 효과를 나타내며, 이러한 점에서, 정맥투여되는 HESPAN[®]은 정맥투여되는 알부민을 대체할 수 있을 것으로 여겨진다.

헤타스타치(hetastarch)는 거의 전부가 아밀로펙틴으로 구성되는 전분으로부터 유도된 인공 콜로이드이다. 헤타스타치는 전분의 글루코오스 유닛에 히드록시에틸 에테르기를 도입한 다음, 얻어진 물질을 가수분해하여, 혈장증량제로 사용하기에 적합한 분자량을 가지는 생성물을 수득하여 얻을 수 있다. 헤타스타치는 몰 치환도(molar substitution) 및 분자량에 의해서 특징지어진다. 몰 치환도는 약 0.75으로, 이는 헤타스타치의 글루코오스 유닛 100개당 평균적으로 약 75 히드록시에틸 치환기가 존재하는 정도로 헤타스타치가 에테르화되었다는 것을 의미한다. 헤타스타치의 분자량은 450kD 내지 800kD 범위로, 평균 분자량은 약 670kD이며, 적어도 80%의 폴리머 유닛이 20kD 내지 2,500kD 범위에 속한다. 히드록시에틸기는 에테르 결합에 의해서 주로 글루코오스 유닛의 C-2에 결합되며, 그보다 낮은 정도로 C-3 및 C-6에 결합된다. 폴리머는 글리코젠과 유사하며, 중합된 D-글루코오스 유닛은 주로 α -1,4 결합에 의해서 연결되며, 이따금 α -1,6 가지 결합(branching linkage)에 의해서 연결된다. 가지결합의 비율은 약 1:20으로, 이는 평균적으로 글루코오스 모노머 유닛 20개당 약 한개의 α -1,6 가지가 있다는 것을 의미한다. 헤타스타치는 90% 이상의 아밀로펙틴으로 구성된다.

HESPAN[®]에 의해 제공되는 혈장증량제는 알부민을 사용하여 얻은 것과 유사하다. 분자량이 50kD 이하인 헤타스타치 분자는 신장배설에 의해 신속히 제거되므로, 1회 투여량인 약 500ml의 HESPAN[®](약 30g)은 투여된 HESPAN[®]의 약 33%가 24시간 내에 소변을 통해 제거된다. 히드록시에틸 전분의 히드록시에틸기는 *in vivo*에서는 분리되지 않고 그대로 남아 있으므로, 배설시에는 글루코오스 유닛에 결합되어 있다. 히드록시에틸화 반응이 작은 히드록시에틸 전분 폴리머의 완전한 대사를 방해하므로, 다량의 글루코오스가 생성되지는 않는다.

이와 유사하게, 셀룰로오스도 히드록시에틸 셀룰로오스로 전환될 수 있다. 2-히드록시에틸 셀룰로오스(셀룰로오스의 2-히드록시에틸 에테르)의 평균 분자량은 약 90kD이다. 불행히, 히드록시에틸 전분과 달리, 히드록시에틸 셀룰로오스는 반응성이 크기 때문에, 약제학적 조성물에서 단백질 활성 성분의 안정화제로 사용하기에 부적합하다.

그러므로, 신경독 함유 약제학적 조성물에 사용되는 동물 유래 단백질 또는 공여자 풀 알부민 안정화제를 대체할 적합한 대체물질이 요구된다.

발명의 상세한 설명

요약

본 발명은 이러한 요구를 충족시키며, 약제학적 조성물에 존재하는 보툴리눔 독소를 안정화시킬 수 있는 화합물로서, 약제학적 조성물에 존재하는 알부민을 대체하는 대체물질을 제공한다. 알부민 대체 화합물은 사람 환자에게 주사되었을 때, 낮은, 바람직하게는 무시할 수 있을 정도인, 면역원성을 가지는 특징이 있다. 또한, 바람직한 알부민 대체물은 약제학적 조성물의 주사 후에 체내에서 빠른 속도로 제거된다.

정의

본 명세서에서 사용할 때, 하기한 단어 및 용어들은 다음과 같이 정의된다.

"약"이라는 단어는 한정된 아이템, 파라미터 또는 기간이, 언급한 아이템, 파라미터 또는 기간의 상하로 \pm 10%의 범위에 포함됨을 의미한다.

"아미노산"이라는 단어는 폴리아미노산을 포함한다.

"다당류"라는 단어는 동일하거나 상이한 2개 이상의 당 분자 모노머의 중합체를 의미한다.

"약제학적 조성물"이라는 용어는 활성 성분, 클로스트리디움 신경독과 같은 신경독인 제제를 의미한다. "제제"라는 단어는 약제학적 조성물 내에 신경독 활성 성분 외에 적어도 하나의 추가 성분이 있다는 것을 의미한다. 그러므로, 약제학적 조성물은 진단 또는 치료를 위해 사람 환자에게 투여(즉, 근육 또는 피하주사를 통해)하기에 적합한 제제이다. 약제학적 조성물은 동결건조 또는 진공건조된 상태; 동결건조 또는 진공건조된 약제학적 조성물을 염수 또는 물로 재구성한 후의 용액; 또는, 재구성이 필요없는 용액일 수 있다. 신경독 활성 성분은 보툴리눔 독소 세로타입 A, B, C₁, D, E, F 또는 G, 또는 테타니 독소 중 어느 하나일 수 있으며, 이들은 모두 클로스트리디움계 박테리아에서 생성된다.

"치료 제제"라는 용어는 제제가, 말초 근육의 활동향진상태(즉, 경련성)를 특징으로 하는 장애 또는 질환과 같은, 장애 또는 질환을 치료하여 완화시키는 데에 사용될 수 있음을 의미한다.

"안정화하는", "안정화시키다" 또는 "안정화"라는 단어는, 약 -2°C 이하에서 6개월 내지 4년간 저장되어 있던 동결건조 또는 진공건조된 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물을 염수 또는 물로 재구성한 용액, 또는 약 2 내지 8°C 에서 6개월 내지 4년간 저장되어 있던 수용액 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물에 있어서, 생물학적으로 활성인 보툴리눔 독소가 약제학적 조성물 중에 포함되기 전의 독성에 대하여, 재구성된 또는 수용액 약제학적 조성물 중에 존재하는 보툴리눔 독소의 독성이 약 20% 이상 약 100% 이하인 것을 의미한다.

본 발명의 범주에 속하는 약제학적 조성물은, 신경독 및 다당류를 함유할 수 있다. 다당류는 신경독을 안정화시킨다. 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 재구성되거나 주사될 때, pH가 약 5 내지 7.3 사이이다. 다당류의 이당류 유닛의 평균 분자량은 약 345D 내지 약 2,000D인 것이 바람직하다. 더욱 바람직한 실시형태에서, 다당류의 이당류 유닛의 평균 분자량은 약 350D 내지 약 1,000D이고, 가장 바람직한 실시형태에서는 약 375D 내지 약 700D이다. 또한, 다당류는 적어도 약 70%의 아밀로펙틴을 포함할 수 있다. 또한, 다당류 자체의 평균 분자량은 약 20kD 내지 약 2,500kD이다.

다당류의 실질적으로 모든 이당류 유닛은 에테르 결합된 글루코피라노오스 분자를 포함하는 것이 바람직하다. 다당류에서 각각 10개의 글루코피라노오스에 존재하는 평균적으로 약 4 내지 약 10개의 히드록실기가, 에테르 결합을 통하여, 화학식 $(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$ 의 화합물로 치환된다. 여기서, n 은 1 내지 10의 정수일 수 있다. n 은 1 내지 3이 더욱 바람직하다.

특히 바람직한 실시형태에서, 다당류에서 각각 10개의 글루코피라노오스에 존재하는 평균적으로 약 6 내지 약 9개의 히드록실기가, 에테르 결합을 통하여, 화학식 $(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$ 의 화합물로 치환된다. 여기서, n 은 1 내지 10의 정수일 수 있다. 가장 바람직한 실시형태에서, 다당류에서 각각 10개의 글루코피라노오스에 존재하는 평균적으로 약 7 내지 약 8개의 히드록실기가, 에테르 결합을 통하여, 화학식 $(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$ 의 화합물로 치환된다. 여기서, n 은 1 내지 10의 정수일 수 있다.

본 발명의 상세 실시형태로서, 보툴리눔 독소, 및 다당류를 포함하는, 사람 환자에게 주사하기에 적합한 약제학적 조성물이 제공될 수 있다. 다당류는 다수의 결합된 글루코피라노오스 유닛을 포함하여 이루어질 수 있으며, 각각의 글루코피라노오스 유닛은 다수의 히드록실기를 가지고, 각각 10개의 글루코피라노오스에 존재하는 평균적으로 약 6 내지 약 9개의 히드록실기가, 에테르 결합을 통하여, 화학식 $(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$ 의 화합물로 치환된다. 여기서, n 은 1 내지 4의 정수일 수 있다. 상기 다당류는 에틸 에테르 치환된 다당류일 수 있다.

본 약제학적 조성물은 치료효과를 얻기 위하여 사람 환자에 투여하기에 적합하며, 신경독은 보툴리눔 독소 세로타입 A, B, C₁, D, E, F 및 G 중 하나일 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 약제학적 조성물은 보툴리눔 독소, 및 히드록시에틸 전분을 포함하여 이루어진다.

본 발명의 또다른 실시형태는 보툴리눔 독소, 및 아미노산 또는 폴리아미노산을 함유하는 약제학적 조성물을 포함할 수 있다.

본 약제학적 조성물이, 신경독 활성 성분 외에, 다당류 안정화제만, 아미노산 안정화제만, 또는 다당류와 아미노산 안정화제를 모두 포함하는 어떤 경우라도, 약 -1°C 내지 약 -15°C 사이의 온도에서 보관되는 경우, 6개월, 1년, 2년, 3년 및/또는 4년 동안 약제학적 조성물의 효력에는 실질적으로 변화가 없다. 또한, 상기 약제학적 조성물은 재구성시에 약 20% 내지 약 100%의 % 회복률 또는 효력을 나타낼 수 있다. 이와 달리 또는 그에 덧붙여, 본 약제학적 조성물은 재구성시 효력이 약 20U/mg인 것과 같이, 재구성시에 약 10U/mg 내지 약 30U/mg의 효력을 나타낼 수 있다. 특히, 본 약제학적 조성물은 어떠한 알부민도 포함하지 않는다. 그러므로, 본 약제학적 조성물은 실질적으로 어떠한 비독성 복합체 단백질도 포함하지 않을 수 있다. 특히, 아미노산은 보툴리눔 독소 100유닛 당 아미노산 약 0.5mg 내지 약 1.5mg의 양으로 존재할 수 있다.

다당류는 히드록시에틸 전분과 같은 전분일 수 있으며, 약제학적 조성물이 보툴리눔 독소 약 100 유닛을 포함하여 이루어지는 경우, 약 500 μg 내지 약 700 μg 의 히드록시에틸 전분을 포함할 수 있다. 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 타입 A가 바람직하고, 아미노산이 존재하는 경우, 아미노산은 리신, 글리신, 히스티딘 및 아르기닌으로 구성된 그룹에서 선택되는 것이 바람직하다.

본 발명의 더욱 상세한 실시형태로서, 안정하고, 효력이 높고, 발열원이 없는 진공건조 보툴리눔 독소 타입 A 약제학적 조성물이 제공될 수 있으며, 이 조성물은 보툴리눔 독소 타입 A 복합체, 다당류, 및 아미노산 또는 폴리아미노산을 포함하여 이루어진다. 본 약제학적 조성물은 알부민을 포함하지 않을 수 있으며, -5℃에서 1년의 저장수명을 가지고, 염수 또는 물로 재구성한 당시에는 약 90%의 효력을 나타낼 수 있고, 재구성 후 2℃에서 보관하여 72시간이 지나면 약 80%의 효력을 나타낼 수 있다. 또한, 본 약제학적 조성물은 재구성시 적어도 약 18U/mg의 특이적인 독성을 가질 수 있다.

본 발명은 또한 주로 고분자량 다당류 및 보툴리눔 독소로 구성되는 동결건조 또는 진공건조된 약제학적 조성물을 포함한다. 여기서, 보툴리눔 독소는 고분자량 다당류에 의해서 안정화된다. 고분자량 다당류는 히드록시메틸 전분, 히드록시에틸 전분, 히드록시프로필 전분, 히드록시부틸 전분, 및 히드록시펜틸 전분으로 구성되는 그룹에서 선택될 수 있고, 보툴리눔 독소는 보툴리눔 독소 타입 A, B, C₁, D, E, F 및 G로 구성되는 그룹에서 선택될 수 있다.

상기 다당류는 본 약제학적 조성물에서, 보툴리눔 독소 유닛 당 다당류 약 1×10^{-9} 몰 내지 보툴리눔 독소 유닛 당 다당류 약 2×10^{-12} 몰의 양으로 존재할 수 있다.

본 발명은 또한 (a) 보툴리눔 독소, 및 공유 결합된 반복되는 모노머(여기서, 모노머의 평균분자량은 약 350D 내지 약 1,000D이다)를 포함하여 이루어지는, 다당류의 혼합물을 제조하는 단계를 포함하여 이루어지는 약제학적 조성물의 제조 방법, (b) 클로스트리디움계 신경독을, 다당류를 함유하는 안정화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하여 이루어지는, 변성이나 응집되지 않도록 클로스트리디움계 신경독을 안정화하는 방법을 포함한다. 상기 두번째 방법에서, 접촉시키는 단계는 클로스트리디움계 신경독을 함유하는 수용액 또는 동결건조나 진공건조된 파우더에 효과적인 양의 다당류를 첨가하는 단계를 포함하여 이루어질 수 있다.

본 발명의 다른 관점에서, 보툴리눔 독소 및 재조합적으로 생산된 알부민을 포함하여 이루어지는 약제학적 조성물이 제공된다. 이 조성물은 아세틸트립토판네이트 및 이의 염과 유도체를 또한 포함하는 것이 바람직하다.

또다른 본 발명의 실시형태에서는, 첫번째 챔버는 보툴리눔 독소가 채워져 있고, 두번째 챔버는 희석제나 버퍼용액이 채워져 있는, 미리 채워진 이중 챔버 주사기를 포함하여 이루어지는, 약제학적 조성물 주사 장치를 제공한다.

본 발명의 또다른 실시형태에서, 치료효과를 얻기 위해서, 보툴리눔 독소, 다당류 및 아미노산을 포함하여 이루어지는 약제학적 조성물을 환자에게 국부 투여하는 단계를 포함하여 이루어지는, 약제학적 조성물을 사용하는 방법이 제공된다.

특히, 본 발명은 또한 보툴리눔 독소, 및 아미노산을 포함하여 이루어지는 약제학적 조성물을 포함한다. 본 발명은 또한 본질적으로 보툴리눔 독소, 그리고 아미노산으로 구성되는 안정한 약제학적 조성물을 포함한다. 이러한 약제학적 조성물은 알부민이나 다당류를 포함하지 않을 수 있으며, -5℃에서 1년의 저장수명을 가지고, 염수 또는 물로 재구성하면 적어도 약 90%의 효력을 나타낼 수 있고, 재구성 후 2℃에서 보관하여 72시간이 지나면 약 80%의 효력을 나타낼 수 있다.

상세한 설명

본 발명은 동물 유래 단백질 또는 공여자 풀 알부민을 사용하지 않고, 약제학적 조성물에 다당류 및/또는 아미노산을 첨가하여, 안정한 신경독 함유 약제학적 조성물을 제조할 수 있다는 것을 알아낸 것에 기초한다. 특히, 본 발명은 종래의 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물에 존재하는 공여자 풀 알부민을 대체하여, 전분에서 유도된 고분자량 다당류 및/또는 특정한 활성 아미노산들을 사용함으로써, 치료 효과를 위해서 사람 환자에 투여하기에 적합한 안정한 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물을 제조할 수 있다는 것을 알아낸 것에 기초한다.

놀랍게도, 본 발명자는 적합한 알부민 대체물질이 다른 단백질도 아니고, 저분자량 비단백질 화합물도 아닌 화합물이라는 것을 알아내었다. 즉, 본 발명자는 특별한 고분자량 다당류가 약제학적 조성물에서 신경독 안정화제로서 작용할 수 있다는 것을 알아내었다. 이와달리, 하기와 바와 같이, 아미노산이 또한 약제학적 조성물의 안정성 및 유효 저장 수명을 향상시키기 위해서, 약제학적 조성물에 첨가될 수 있다.

본 발명에서 사용되는 다당류는, (1) 본 약제학적 조성물이 재구성되는, 실험실 유리용기, 용기 및 바이알의 표면 및 본 약제학적 조성물을 주사하는 데 사용되는 주사기 내부 표면과 같은 표면에 대한, 보툴리눔 독소의 표면 부착성(보통, "점착성(stickiness)"이라고 함)을 감소시킴으로써, 보툴리눔 독소와 같은, 본 약제학적 조성물에 존재하는 신경독 활성 성분에 안정성을 부여할 수 있다. 보툴리눔 독소의 부착성은 보툴리눔 독소의 손실 및 남아있는 보툴리눔 독소의 변성을 야기할 수

있으며, 이것은 모두 약제학적 조성물에 존재하는 보툴리눔 독소의 독성을 감소시킨다. (2) 보툴리눔 독소가 변성되거나 및/또는 보툴리눔 독소 복합체에 존재하는 다른 비독성 단백질로부터 보툴리눔 독소가 분리되는 것을 감소시킴으로써 안정성을 부여할 수 있다. 약제학적 조성물(즉, 동결건조 또는 진공건조 전) 및 재구성된 약제학적 조성물에 존재하는 보툴리눔 독소가 물에 희석되면, 변성 및/또는 분리 활성이 나타날 수 있다. (3) 약제학적 조성물의 제조, 처리 및 재구성동안 발생하는 적지않은 pH 및 농축 동안, 보툴리눔 독소의 손실(즉, 복합체의 비독성 단백질로부터 변성 또는 분리되어 야기되는)을 감소시킴으로써 안정성을 부여할 수 있다.

다당류에 의해서 제공되는 이러한 3가지 타입의 보툴리눔 독소 안정화로 인해, 약제학적 조성물의 주사 전에 보툴리눔 독소가 본래의 독성을 가지도록 독소를 유지 및 보존한다.

본 약제학적 조성물에 사용하기에 바람직한 다당류는 다수의 글루코오스 모노머(분자량 180)를 포함하여 이루어지며, 대부분의 글루코오스는 하나 이상의 치환체를 갖는다. 따라서, 분자량 범위가 약 20kD 내지 약 800kD 사이인 다당류가 바람직하다. 놀랍게도, 이러한 다당류는 약제학적 조성물 내의 신경독 성분을 안정화시킬 수 있다. 평균 분자량이 20kD 이하인 이당류 올리고당류는 본 발명의 범주에서 제외시켰다. 또한, 사이클로덱스트린과 같은 사이클릭 폴리머도 본 발명의 범주에서 제외시켰다. 이러한 화합물들을 본 발명의 범주에서 제외시킨 이유는, 바람직한 다당류에서 기대되는 안정화 특성이 나타나려면 비교적 큰 분자량 화합물(즉, 분자량이 20kD을 초과하는 분자)이 요구되므로, 이러한 작은 분자는 필요없고, 본 발명의 바람직한 다당류에 의해 안정화되는 신경독의 크기보다 사이클로덱스트린 친유성 공동의 크기가 매우 작아서, 실제로 사이클로덱스트린의 작은 친유성 공동(lipophilic cavity)의 특성은 소용없기 때문이다. 또한, 사이클로덱스트린은 단지 약 6 내지 8 글루코오스 모노머를 포함하여 이루어지는 분자량이 작은 화합물이다.

본 발명은 또한 다당류와 함께 클로스트리디움계 독소를 함유하는 약제학적 조성물의 안정화 방법을 포함한다. 안정화 효과는 클로스트리디움계 독소를 다당류와 접촉시켜 얻을 수 있다. 본 발명의 범주에 속하는 적합한 다당류의 예로는 특정한 전분 및 전분 유도체가 포함된다. 주지한 바와 같이, 다당류는 클로스트리디움계 독소에 대하여 안정화 효과를 나타낸다. 게다가, 아미노산을 첨가함으로써 클로스트리디움계 독소를 안정화하는 다당류의 효과를 향상시킬 수 있다.

뜻밖에도, 본 발명자는 2-히드록시에틸 전분이 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물을 안정화하는 독특한 성능을 나타내어, 젤라틴과 같이 사람 혈액 또는 혈액 분획 공여자 풀 또는 동물 유래 단백질로부터 유래하는 전염가능한 질환이 잠복할 가능성이 없는 약제학적 조성물을 제공한다는 것을 알아내었다.

즉, 본 발명자는 특정 고분자량 다당류, 히드록시에틸 전분이 제조, 건조, 보관 및 재구성 동안 독소를 안정화할 수 있음을 알아내었다. 단백질 활성 성분을 더욱 안정화하기 위해서, 다당류 함유 제제에 아미노산을 더욱 포함시키는 것이 바람직하다.

본 약제학적 조성물 중의 다당류는 보툴리눔 독소 1 유닛당 다당류 약 $1\mu\text{g}$ 내지 보툴리눔 독소 1 유닛당 다당류 $10\mu\text{g}$ 으로, 클로스트리디움계 신경독과 혼합하는 것이 바람직하다. 본 약제학적 조성물 중의 다당류는 보툴리눔 독소 1 유닛당 다당류 약 $4\mu\text{g}$ 내지 보툴리눔 독소 1 유닛당 다당류 $8\mu\text{g}$ 으로, 클로스트리디움계 신경독과 혼합하는 것이 더욱 바람직하다. 가장 바람직한 실시형태에서, 다당류는 히드록시에틸 전분이고, 약제학적 조성물 중의 히드록시에틸 전분은 보툴리눔 독소 1 유닛당 히드록시에틸 전분 $5\mu\text{g}$ 내지 보툴리눔 독소 1 유닛당 히드록시에틸 전분 $7\mu\text{g}$ 으로, 보툴리눔 독소 타입 A 복합체와 혼합되는 것이 바람직하다. 약제학적 조성물 중의 히드록시에틸 전분은 보툴리눔 독소 1 유닛당 히드록시에틸 전분 $6\mu\text{g}$ 으로, 보툴리눔 독소 타입 A 복합체와 혼합되는 것이 가장 바람직하다. BOTOX[®]는 바이알 당 약 100 유닛의 보툴리눔 독소 타입 A 복합체를 함유하고, 히드록시에틸 전분의 평균 분자량은 일반적으로 약 20kD 내지 2,500kD으로 여겨지기 때문에, 히드록시에틸 전분의 가장 바람직한 농도는 보툴리눔 독소 1 유닛당 약 1×10^{-9} 몰(M/U) 내지 보툴리눔 독소 1 유닛당 약 2×10^{-12} 몰(M/U)이다. 또다른 바람직한 실시형태에서는, 100U 보툴리눔 독소 타입 A 복합체 약제학적 조성물에 대하여, 약 $600\mu\text{g}$ 의 히드록시에틸 전분, 및 약 1mg의 아미노산(리신, 글리신, 히스티딘 또는 아르기닌과 같은)을 제제 중에 포함한다. 즉, 본 발명은 약제학적 조성물 중의 신경독 활성 성분을 안정화하기 위하여 다당류 및 아미노산 또는 폴리아미노산을 모두 사용하는 방법을 포함한다.

또한, 본 발명은 제제 중에 다당류의 존재 또는 부재 하에, 충분한 양의 적합한 아미노산을 사용하여 약제학적 조성물 중의 단백질 활성 성분을 안정화하는 방법을 포함한다. 즉, 본 발명자는 놀랍게도 신경독 함유 약제학적 조성물에 특정 아미노산을 첨가하면, 이러한 종류의 약제학적 조성물의 유효 저장 수명이 연장될 수 있다는 것을 알아내었다. 즉, 본 발명은 아미노산을 함유하는 신경독 함유 약제학적 조성물 및 이러한 약제학적 조성물의 용도를 포함한다. 이론적인 뒷받침을 바라지는 않지만, 보툴리눔 독소와 같은 신경독은 독소 복합체 내에 디설파이드 결합이 있어서 산화에 민감하기 때문에, 산화 가능한 아미노산을 첨가하면, 퍼옥사이드나 유리 라디칼과 같은 산화제가 신경독과 반응할 수 있는 가능성을 감소시킬 것

이라고 가정할 수 있다. 즉, 산화제 화합물의 스캐빈저인, 산화제 싱크로서 작용할 수 있는 아미노산을 첨가하면, 산화가능한 신경독 디설파이드 결합이, 피옥사이드나 유리 라디칼과 같은 산화제에 의해서 산화될 수 있는 가능성을 감소시킬 수 있다. 적합한 아미노산은 산화될 수 있는 아미노산이다. 바람직한 아미노산의 예로는 메티오닌, 시스테인, 트립토판 및 티로신이 있다. 특히 바람직한 아미노산은 메티오닌이다.

본 발명의 바람직한 실시형태는 또한 둘 이상의 아미노산을 단독으로 또는 다당류와 함께 사용하여 약제학적 조성물 중의 단백질 활성 성분을 안정화하는 방법을 포함한다. 즉, 100 U 보툴리눔 독소 타입 A 함유 약제학적 조성물에 대하여, 약 500 μ g 내지 약 700 μ g의 헤타스타치와 함께 또는 헤타스타치 없이, 약 0.5mg의 리신 및 약 0.5mg의 글리신을 사용할 수 있다.

따라서, 상기한 바와 같이, 본 발명은 다당류를 포함하는, 단백질 함유 약제학적 조성물을 포함한다. 다당류는 약제학적 조성물 중의 단백질 활성 성분을 안정화하는 작용을 한다. 또한, 본 발명은 다당류 및 아미노산을 포함하는, 단백질 함유 약제학적 조성물을 포함한다. 놀랍게도, 본 발명자는 특정 아미노산을 탄수화물을 함유하는, 신경독 함유 약제학적 조성물 제제에 첨가하면, 이러한 약제학적 조성물의 유효 저장 수명이 연장될 수 있다는 것을 알아내었다. 즉, 본 발명은 다당류 및 아미노산을 함유하는, 신경독 함유 약제학적 조성물 및 이러한 약제학적 조성물의 용도를 포함한다. 또한, 본 발명은 어떠한 다당류도 없이 아미노산만을 사용한 단백질 활성 성분이 있는 약제학적 조성물을 포함한다.

당, 다당류 및/또는 탄수화물(이하, '반응성 화합물'이라 칭함)을 또한 포함하는 단백질 함유 약제학적 조성물은, 단백질과 3 가지 반응성 화합물 중 하나가 앞서 설명한 마이알 반응을 할 수 있다는 사실 때문에, 본래 불안정하다고 알려져 있다. 수분을 감소시키거나, 제제에 비-환원당을 사용하여, 이러한 (예를 들어) 단백질-다당류 마이알 반응의 빈도 및 범위를 감소시키려는 연구가 광범위하게 실시되었으나, 성과가 없었다. 본 발명은 고농도의 반응성이 큰 아미노산이, 안정화제인 다당류와 첨가된 아미노산 사이에서 일어나는 마이알 반응을 촉진한다는 것을 알아낸 것에 기초한다. 탄수화물이 반응할 수 있는 풍부한 아민 소스를 제공함으로써, 단백질 약품(즉, 보툴리눔 독소 활성 성분)이 마이알 반응할 가능성이 감소되고, 이에 따라, 단백질 활성 성분이 변성하는 이러한 경로가 감소되어, 이러한 방법으로, 약제학적 조성물 중의 단백질 활성 성분이 안정화된다.

바람직하게, 1차 또는 2차 아민을 포함하는 모든 화합물이 이러한 목적으로 사용될 수 있다. 리신, 글리신, 아르기닌과 같은 아미노산이 가장 바람직하다. 폴리리신과 같은 폴리아미노산이 또한 적합하다. 리신과 같은 양이온성 아미노산은 이온성 인력을 작용하여, 산성 단백질(예를 들어, 보툴리눔 독소)과 결합함으로써, 활성 단백질이 당과 접촉하지 못하게 차폐할 수 있다. 폴리리신은 크기가 커서 차폐작용이 더 잘 일어날 뿐 아니라, 항균작용을 하는 부가적인 장점도 제공한다.

본 발명의 또다른 관점에서는, 당과 아미노산 배합 성분에 활성 단백질 성분(보툴리눔 독소)를 가하기 전에, 당과 아미노산 성분을 미리 반응시켜 가능한 마이알 반응이 모두 일어나게 함으로써, 활성 단백질이 마이알 반응에 노출되는 것을 실질적으로 제한한다.

따라서, 본 발명은 전분, 당 및/또는 다당류를 함유하는, 단백질(즉, 보툴리눔 독소) 약품 제제에서 마이알 반응 억제제로서 아미노산 및 폴리아미노산을 사용하는 약제학적 조성물 및 아미노산 및 폴리아미노산을 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.

본 발명은 안정화제인 전분, 당 또는 다당류 또는 이들의 조합, 및 리신과 같은 아미노산과 조합된 활성 단백질(예를 들어, 보툴리눔 독소) 제제를 포함한다.

특히, 히드록시에틸 전분을 다른 다당류 또는 탄수화물들과 비교할 때, 히드록시에틸 전분은 보툴리눔 독소와 같은 단백질과 마이알 반응하지 않거나 반응하는 속도 및 수준이 크게 떨어진다는 것을 알아내었다. 또한, 아미노산을 첨가하면, 아마도 경쟁 억제제로 작용하여, 즉, 마이알 반응 반응성 당에 대하여 독소와 경쟁하므로, 히드록시에틸 전분의 보존효과가 향상된다는 것을 알아내었다. 이러한 목적을 위해서는, 리신, 글리신, 아르기닌 및 히스티딘과 같은 아미노산이 바람직한 아미노산이다. 바람직한 경쟁 억제제로 작용하는, 폴리리신과 같은 폴리아미노산을 또한 사용할 수 있다. 특히, 상술한 아미노산 및 폴리아미노산은 또한 항균성을 가지므로, 약제학적 조성물의 박테리아성 오염을 감소시키는 부가적인 장점이 있을 수 있다.

글루코오스 및 글루코오스 폴리머와 같은 환원당은 단백질과 마이알 반응한다. 비록 가끔 오염물이나 변성물을 통해서지만, 만니톨과 같은 당알코올조차도 반응할 수 있다. 그러므로, 저장 안정성을 감소시키는 화학반응이 일어나는 시간 동안만큼은, 다당류가 독소를 안정화시킬 수 있어야 한다. 다당류의 선택이 중요하다는 것은 자명하다. 본 발명자는 히드록시에틸 전분이 마이알 반응에 참여하는 비율이 매우 낮다는 것을 알아내었다. 또한, 본 발명자는 모델 시스템에서, 히드록시

에틸 셀룰로오스가 리신과 빠르게 반응할 수 있다는 것을 알아내었기 때문에, 히드록시에틸 셀룰로오스는, 히드록시에틸 전분과 구조상 유사하지만, 안정화제로 사용하기에는 부적합하다는 것을 알 수 있었다. 이것은 히드록시에틸 전분이 다른 당(예를 들어, 다당류) 안정화제보다 명백한 장점을 가진다는 것을 의미할 뿐 아니라, 히드록시에틸 셀룰로오스와 같이 히드록시에틸 전분과 유사한 부형제 조차도 약제학적 조성물의 단백질 활성 성분의 안정화제로 사용하기에 부적합할 수 있다는 것을 의미한다.

주의할 것은, 히드록시에틸 전분이, 마이알 반응에 적어도 약간 정도는 참여할 수 있다는 것이다. 따라서, 상기한 바와 같이, 다당류만으로는 독소를 최적으로 안정화하기에 충분하지 않을 수 있다. 이에, 본 발명자는 아미노산을 첨가하면 경쟁 억제제로 작용하는 잇점이 있다는 것을 알아내었다. 이론적인 뒷받침을 바라지는 않지만, 독소에 비하여 높은 농도로, 또 다른 아민 소스를 제공함으로써, 독소에서 일어날 수 있는 마이알 반응의 확률이 작아져, 독소를 안정화할 수 있다는 가설이다. 모든 아미노산을 사용할 수 있으나, 반응성이 높은 리신이 바람직하다.

본 발명은 또한 아연 이온 소스를 첨가한 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물을 포함한다. 금속, 특히 2가 양이온은, 형성되는 얼음의 격자구조 등의 다양한 저온-특성(cryo-properties)으로 인해, 동결건조 제제의 성공여부에 크게 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 구리 또는 철 종류와 같은 외래 금속은 라디칼 산화되기 쉬워, 일반적으로 사용하지 않는다. 더욱 특이적으로, 보툴리눔 타입 A 독소의 활성은 구속 아연(bound zinc)에 의존적이다. 제안된 많은 부형제 또는 부형제의 반응 생성물이 금속과 킬레이트 반응할 것이다. 그로인해, 불안정한 얼음 및/또는 비활성화 독소가 형성될 수 있다. 제제에 아연을 풍부하게 제공함으로써, 바람직한 2가 양이온의 존재가 보장되며, 독소에 의한 아연 손실 가능성이 감소되어, 안정성이 향상된다. 이것은 보툴리눔 독소 약제학적 조성물에 $ZnSO_4$ 를 첨가함으로써 달성할 수 있다.

메틸로트로픽 효모 피키아 파스토리스(methylotrophic yeast *Pichia pastoris*) 종의 발현을 사용하여, 재조합 사람 혈청 알부민(rHSA) 제품을 고생산성으로 제조하는 방법이 공지되어 있다. 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물은 rHSA를 안정화제로서 함유하여 제조될 수 있다. 유전학적으로 선택된 효모 숙주 세포에 의해서 발현된 rHSA는 혈장 유래 HSA와 1차 아미노산 서열이 동일하지만, 다른 특성들에서 상이하다. 따라서, 진핵성, 효모지만, 포유류에서 발견되는 많은 세포내 프로세스가 결여되어 있다. 또한, pHSA(혈장 유래 사람 혈청 알부민)은 비-글리코실레이트된 형태로 만들어지며, 글루코오스가 세포밖에서 비-효소적으로 첨가된다. 그리고, pHSA 및 rHSA의 탄수화물 잔기는 상이하다. 게다가, rHSA 중에 존재하는 팔미트산 및 스테아르산의 양은 pHSA에서보다 훨씬 더 작다. 이러한 차이점은 rHSA 및 pHSA사이에, 특히 리간드 결합, 구조적 안정성 및 분자 전하에서 차이를 나타낼 것으로 예상할 수 있다. 그러므로, rHSA가 보툴리눔 독소를 안정화할 수 있다는 것을 알아낸 것은, 특히, 보툴리눔 독소에 대한 공지된 pHSA의 동력학 속도 효과의 관점에서, 놀라운 일이다. rHSA의 장점은 혈액 유래 병원체가 없다는 것이다. 따라서, 또다른 관점에서 본 발명은 혈액 유래 사람 혈청 알부민이 rHSA로 대체된 약제학적 조성물을 포함한다. 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물에는 하기한 바와 같이, 아세틸트립토판과 파네이트와 함께 rHSA이 존재하는 것이 바람직하다.

상업적으로 입수가능한 사람 혈청 알부민은 사람 혈액 플로부터 유래하는 잠재적인 전염성 물질을 제거하기 위하여, 10시간 동안 60°C에서 가열된다. 심각한 변성을 방지하기 위하여, 처리과정 동안 2가지 안정화제: 소듐 아세틸트립토판과 소듐 카프릴레이트가 첨가된다. rHA에 대해서는, 질병 위험성이 없으므로, 이러한 성분을 첨가할 필요가 없고, 가열 단계가 필요하지 않다. 본 발명자는 rHA에 소듐 아세틸트립토판과 파네이트를 첨가하면, 소듐 카프릴레이트의 농도를 두 배로 할 때 조차도, 소듐 카프릴레이트만 단독으로 사용할 때에 비하여 열안정성이 향상된다는 것을 알아내었다. 이론적인 뒷받침을 바라지는 않지만, 소듐 아세틸트립토판과 파네이트는 두개의 부위에 결합하는 반면에, 카프릴레이트는 한 부위에만 결합하기 때문일 것으로 여겨진다. 두개의 부위에 결합함으로써, 열적 불안정성을 방지하는 것이 향상될 것으로 여겨진다. 또한, 소듐 아세틸트립토판과 파네이트를 첨가하면, 아마도 독소와 결합하는, 열역학적으로 유리한 분자구조를 유지하거나, 사람 혈청 알부민 자체의 변성을 방지하는 등의 방법으로, 보툴리눔 독소 제제의 안정성이 향상될 수 있을 것으로 가정할 수 있다.

본 발명은 또한 희석제 또는 제제 자체에서, 저장성을 연장시킬 수 있는 방부제를 첨가하는 것을 포함한다. 바람직한 방부제는 방부성 염수 함유 벤질 알콜이다.

액제가 유리할 수 있다. 사용자가 단일단계로 준비(예를 들어, 이중챔버 주사기)할 수 있는, 단일단계 제조물(예를 들어, 미리 채워진 주사기) 또는 제품 구성은 재구성 단계가 없어 편리하게 사용할 수 있다. 동결건조는 복잡하고, 고가이며, 어려운 과정이다. 흔히, 액제는 생산하기에 쉽고, 값이 싸다. 다른 한편으로, 액제는 동적 시스템이므로, 동결건조 제제에 비하여 부형제 상호작용, 빠른 반응, 박테리아 성장 및 산화에 더 민감하다. 함께 사용가능한 방부제를 필요로 할 수 있다. 이러한 많은 화합물들이 퍼옥사이드를 함유하거나 생성하기 때문에, 특히 흡착을 감소시키기 위해서 계면활성제가 사용되는 경우, 메티오닌과 같은 항-산화제를 또한 스캐빈저로서 사용할 수 있다. 동결건조 제제에 사용될 수 있는 안정화제 부형제

(예를 들어, 히드록시에틸 전분 또는 리신과 같은 아미노산)는 모두 흡착을 감소시키고, 독소를 안정화하는 것을 돕도록, 액체에 사용할 수 있게 변경될 수 있다. 인슐린을 위해 개발된 것과 유사한 현탁액을 또한 사용할 수 있다. 또한, pH 7 이상에서는 독소가 불안정한 것으로 보고되고 있기 때문에, 액체 비히클 중의 보툴리눔 독소를 안정화하려면 낮은 pH의 비히클이 필요하다. 이러한 산성도는 주사시에, 타는 듯하고 찌르는 듯한 느낌을 줄 수 있다. 이중 주사기를 사용할 수 있다. 저장하는 동안에는 낮은 pH로 독소를 유지하는 반면에, pH를 생리학적 수준으로 올리기에 충분한 공-투여 완충용액(co-dispensed buffer)을 첨가하면, 낮은 pH로 인한 주사 불편감을 완화시킬 수 있다. 또다른 이중 챔버 주사기 옵션은 사용시에만 혼합되는, 희석제 및 분리된 동결건조 물질을 분리 챔버에 포함할 수 있다. 이러한 옵션은 재료나 시간의 추가 없이, 액체의 장점을 제공한다.

따라서, 보툴리눔 독소는 낮은 pH에서 제조하고, 투여시에 pH를 생리학적 pH로 올리는 완충용액과 함께 투여할 수 있다. 2 챔버 또는 이중 주사기는 제 1 챔버(플런저 옆)에 pH 3 내지 6(예를 들어, pH4.0)인 보툴리눔 독소 액체를 가진다. 제 2 챔버(주사바늘 옆)는 pH가 높은(즉, pH 7.0) 인산염 완충된 염수와 같은 적합한 완충용액이 들어있을 수 있다. 이와 달리, 제 1 챔버는 염수 희석제로 채울 수 있고, 제 2 챔버는 동결건조된 신경독 제제로 채울 수 있다. 용액이 바늘에서 또는 바늘 근처에서 혼합되어, 최종 용액을 생리학적 pH에서 수송하는 수단으로서, 두개의 챔버가 조합되고, 완충 성분이 선택될 수 있다. 상기한 목적을 위해 미리 채워진 주사기로 사용하기 위한 안정한 2 챔버 주사기는 Vetter Pharma-Fertigung of Yardley, Pennsylvania에서 입수할 수 있다.

낮은 pH에서 보툴리눔 독소를 제조하면 뚜렷한 장점이 있다. 보툴리눔 독소는 낮은 등전점(pI)를 가지며, 단백질을 안정화하기 위해서 이러한 pI 근처에서 단백질을 제조하는 방법이 공지되어 있다. 또한, 보툴리눔 독소는 매우 낮은 농도에서 사용하므로, 표면 흡착이 문제가 된다. 낮은 pH 용액을 사용하면 표면과 상호작용하기 쉬운 독소 부위의 이온화를 억제할 수 있다. 주사기 및 플런저 재질은 독소의 표면 흡착을 감소시키는 재질이다. 폴리프로필렌과 같은 재질이 적합하다.

실시예

실시예 1

보툴리눔 독소 약제학적 조성물

상기한 바와 같이, 보툴리눔 독소 타입 A 복합체는 N-Z 아민 및 효모 추출물을 함유하는 배지에서 배양된 클로스트리디움 보툴리눔의 홀 종(Hall strain)의 배양물로부터 얻을 수 있다. 보툴리눔 독소 타입 A 복합체는, 배양액으로부터, 일련의 산 침전을 통하여, 활성 고분자량 독소 단백질 및 관련 적혈구응집소 단백질로 구성된 결정형 복합체로서 정제한다. 그리고 나서, 결정형 복합체를 염수 및 알부민을 함유하는 용액으로 재용해하고, 살균 여과(0.2 미크론)한 후, 진공건조한다. 그리고 나서, BOTOX®를 살균된, 방부제 없는 염수로 재구성한 다음, 근육주사한다. BOTOX®의 각 바이알은 약 100유닛(U)의 클로스트리디움 보툴리눔 독소 타입 A 복합체, 0.5mg의 사람 혈청 알부민 및 0.9mg의 염화나트륨을, 방부제 없이, 살균, 진공건조된 형태로 포함하였다. 이와 달리, 사람 혈청 알부민을 재조합 제조된 알부민으로 대체할 수 있다.

실시예 2

2-히드록시에틸 전분을 함유하는 보툴리눔 독소 약제학적 조성물

0.5mg의 알부민을 500 μ g 또는 600 μ g의 헤타스타치로 대체하는 것을 제외하고는 실시예 1에 기재한 방법과 동일한 방법으로, 보툴리눔 독소 타입 A의 정제된 신경독 복합체 약제학적 제제를 제조하였다. 헤타스타치 함유 제제의 제조시에, 효력이 완전히 유지되는 것으로 측정되었다. 즉, 헤타스타치 함유 제제를 사용한, 알부민이 없는 헤타스타치 함유 조성물의 활성이, 동결건조된 100U(\pm 20U) 보툴리눔 독소 타입 A 복합체를 재구성하여 측정한 결과, 96 내지 128 유닛이었다. 3개의 별도의 헤타스타치, 보툴리눔 독소 타입 A 복합체 약제학적 조성물의 효력이, 재구성시, 각각 105,111 및 128유닛으로 측정되었다. 효력은, 마우스 표준 투여 독소 효력 검정을 사용하여 측정하였다.

실시예 3

글리신을 함유하는 보툴리눔 독소 약제학적 조성물

0.5mg의 알부민을 500 μ g 또는 600 μ g의 헤타스타치로 대체하는 것을 제외하고는, 실시예 1에 기재한 방법과 동일한 방법으로, 보툴리눔 독소 타입 A의 정제된 신경독 복합체 약제학적 제제를 제조하였다. 추가하여, 1mg의 글리신을 제제에 가

하였다. 그리고 나서, 동결건조된, 알부민이 없는, 헤타스타치 + 글리신, 100U 보툴리눔 독소 타입 A 복합체, 약제학적 조성물을 -5℃에서 7개월간 보관하였다. 이 7개월이 지났을 때, 헤타스타치 + 글리신 독소 제제의 효력을 마우스 투여 검정을 사용하여 측정하였다. 효력에는 본질적으로 변화가 없었다(즉, 효력이 원래 효력에 대하여 5% 미만으로 변화하였다).

실시예 4

리신을 함유하는 보툴리눔 독소 약제학적 조성물

0.5mg의 알부민을 600 μ g의 헤타스타치로 대체하는 것을 제외하고는, 실시예 1에 기재한 방법과 동일한 방법으로, 100U 보툴리눔 독소 타입 A의 정제된 신경독 복합체 약제학적 제제를 제조하였다. 추가로, 1mg의 리신을 제제에 가하였다. 그리고 나서, 동결건조된, 알부민이 없는, 헤타스타치 + 리신, 100U 보툴리눔 독소 타입 A 복합체, 약제학적 조성물을 -5℃에서 1년간 보관하였다. 이 1년이 지났을 때, 헤타스타치 + 리신 독소 제제의 효력을 마우스 투여 검정을 사용하여 측정하였다. 효력에는 본질적으로 변화가 없었다(즉, 효력이 원래 효력에 대하여 5% 미만으로 변화하였다).

실시예

히스티딘을 함유하는 보툴리눔 독소 약제학적 조성물

0.5mg의 알부민을 600 μ g의 헤타스타치로 대체하는 것을 제외하고는, 실시예 1에 기재한 방법과 동일한 방법으로, 100U 보툴리눔 독소 타입 A의 정제된 신경독 복합체 약제학적 제제를 제조하였다. 추가로, 1mg의 히스티딘을 제제에 가하였다. 그리고 나서, 동결건조된, 알부민이 없는, 헤타스타치 + 히스티딘, 100U 보툴리눔 독소 타입 A 복합체, 약제학적 조성물을 -5℃에서 1년간 보관하였다. 이 1년이 지났을 때, 헤타스타치 + 히스티딘 독소 제제의 효력을 마우스 투여 검정을 사용하여 측정하였다. 효력에는 본질적으로 변화가 없었다(즉, 효력이 원래 효력에 대하여 5% 미만으로 변화하였다).

실시예 6

아르기닌을 함유하는 보툴리눔 독소 약제학적 조성물

0.5mg의 알부민을 600 μ g의 헤타스타치로 대체하는 것을 제외하고는, 실시예 1에 기재한 방법과 동일한 방법으로, 100U 보툴리눔 독소 타입 A의 정제된 신경독 복합체 약제학적 제제를 제조하였다. 추가로, 1mg의 아르기닌을 제제에 가하였다. 그리고 나서, 동결건조된, 알부민이 없는, 헤타스타치 + 아르기닌, 100U 보툴리눔 독소 타입 A 복합체, 약제학적 조성물을 -5℃에서 1년간 보관하였다. 이 1년이 지났을 때, 헤타스타치 + 아르기닌 독소 제제의 효력을 마우스 투여 검정을 사용하여 측정하였다. 효력에는 본질적으로 변화가 없었다(즉, 효력이 원래 효력에 대하여 5% 미만으로 변화하였다).

실시예 7

아미노산을 함유하는 보툴리눔 독소 약제학적 조성물

0.5mg의 알부민을 리신, 글리신, 히스티딘 또는 아르기닌과 같은 아미노산 1mg으로 대체하는 것을 제외하고는, 실시예 1에 기재한 방법과 동일한 방법으로, 보툴리눔 독소 타입 A의 정제된 신경독 복합체 약제학적 제제를 제조하였다. 그리고 나서, 동결건조된, 다당류가 없고, 알부민이 없는, 글리신, 100U 보툴리눔 독소 타입 A 복합체, 약제학적 조성물을 -5℃에서 1년간 보관하였다. 이 1년이 지났을 때, 효력에는 본질적으로 변화가 없었다(즉, 효력이 원래 효력에 대하여 5% 미만으로 변화하였다).

실시예 8

보툴리눔 독소 약제학적 조성물의 용도

경부 디스톨니아(cervical dystonia)와 같은 근육 경련 상태로 진단된 48세 남자에게, 600 μ g의 헤타스타치, 및 리신과 같은 아미노산 1mg을 함유하는 약 10^{-3} U/kg 내지 약 35 U/kg의 보툴리눔 독소 타입 A 약제학적 조성물을 근육 주사하였다. 1-7일 내에, 근육 경련 상태의 증상이 완화되었고, 증상완화는 적어도 약 2달 내지 약 6달 동안 지속되었다.

본 명세서에 설명한, 본 발명의 약제학적 조성물은 다음을 포함하는 많은 장점을 가진다.

1. 본 약제학적 조성물은 알부민과 같은 혈액 제품이 전혀 없이 제조될 수 있으므로, 프리온과 같은 혈액 제품의 전염성 요소가 전혀 없다.
2. 본 약제학적 조성물은 현재 입수가 가능한 약제학적 조성물들에서 얻어지는 것과 대등하거나 더 나은 안정성 및 높은 % 회복 독성 효력을 가진다.

본 발명을 특정한 바람직한 방법에 준하여 상세히 설명하였으나, 본 발명의 범주내에서, 다른 실시형태, 변형 및 수정이 가능하다. 예를 들어, 안정화제 다당류 및 아미노산의 다양한 변형이 본 발명의 범주 내에 속한다.

따라서, 하기 청구범위의 진의 및 범주가 상기한 바람직한 실시형태의 설명에 제한되어서는 안된다.