명세서

발명의 명칭: 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 보툴리눔 독소의 안정성 개선에 효과가 있는 안정화 액상 조성물 및 이의 제조방법, 그리고 상기 안정화 액상 조성물을 포함하는 보툴리눔 독소의 안정성이 개선된 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[2] 본 출원은 2018년 11월 30일에 출원된 한국특허출원 제10-2018-0151983호 및 2019년 8월 20일에 출원된 한국특허출원 제10-2019-0101723호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

[3]

배경기술

[4] 클로스트리디움 속에는 형태 및 기능에 의하여 분류되는 127 종 이상이 속해있다. 혐기성, 그람 양성 박테리아 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)은 강력한 폴리펩타이드 신경독소인 보툴리눔 독소(이하, 본 명세서에서 "독소"도 같은 의미로 사용함)를 생성하는데, 이는 인간 및 동물에게 보툴리눔증(botulism)으로 알려진 신경마비성 병을 일으킨다. 보툴리눔 독소 중독의 증상은 보행장애, 연하장애 및 언어장애로부터 호흡기 근육의 마비 및 사망으로 이어질 수 있다.

[5] 보툴리눔 독소의 1 유닛(unit)은 각각 약 18-20g으로 계량되는 암컷 스위스 웹스터 마우스에게 복강내 주사시의 LD_{50}으로 정의된다. 보툴리눔 독소의 1 유닛은 암컷 스위스 웹스터 마우스 그룹의 50%를 죽이는 보툴리눔 독소의 양이다.

[6] 면역학적으로 구별되는 일곱 가지의 보툴리눔 신경독소 특징이 분석되었고, 이들은 각각 보툴리눔 신경독소 혈청형(serotype) A, B, C, D, E, F 및 G이며, 이들 각각은 유형-특이성 항체로 중화하여 구별된다. 보툴리눔 독소의 상이한 혈청형에 따라 이들이 영향을 미치는 동물 종 및 이들이 일으키는 마비의 중증도 및 지속기간에 차이가 있다. 보툴리눔 독소는 높은 친화성을 가지고 콜린작동성 모터 뉴런에 명백하게 결합하고, 뉴런으로 위치를 옮기며, 아세틸콜린의 시냅스전 방출을 차단한다.

[7] 보툴리눔 독소는, 예를 들어 활동항진성 골격근을 특징으로 하는 신경근육 장애의 치료를 위한 임상적 상황에서 사용되어 왔다. 보툴리눔 독소 A 형은 미국 식품의약국(FDA)에 의하여 12 세 이상 환자의 본태성 안검경련, 사시 및 반측안면 경련에 대하여 승인되었고, 경부 근긴장이상증, 미간 (안면) 주름의 치료 및 다한증 치료에 대하여 승인되었다. FDA는 또한 경부 근긴장이상증 및 미간 (안면) 주름의 치료에 대하여 보툴리눔 독소 B 형을 승인하였다.

[8] 보툴리눔 독소 A 형은 pH 4-6.8의 묽은 수용액에 용해성인 것으로 알려져 있다. 약 7 이상의 pH에서 안정화 비-독소 단백질이 신경독소로부터 분리되어, 그 결과 독성이 점진적으로 손실되는데, 특히 pH 및 온도가 상승함에 따라 그러하다. 효소가 일반적으로 그렇듯이, 보툴리눔 독소(이는 세포내 펩티데이즈임)의 생물학적 활성은 이의 삼차원 형상에 최소한 부분적으로 의존적이다. 독소의 양을 밀리리터당 밀리그램부터 수나노그램을 함유하는 용액으로 희석하는 것은, 예를 들어 독소가 표면에 부착되어 가용 독소의 양을 감소시키는 경향과 같은 상당한 어려움이 있다. 또한, 독소는 독소 함유 약제학적 조성물이 제제화된 지 수개월 또는 수년 후에 사용되기도 하는데, 단백질의 특성 상 쉽게 산화되거나 작은 단편으로 분해되는 문제가 있다. 이에, 안정화제로 독소를 안정화할 필요가 있다.

[9]

[10] 이에 종래에는, 상기의 문제를 해결하기 위하여 보툴리눔 독소 단백질의 약제화 과정에서 안정화제로 주로 알부민, 수크로오스, 트레할로오스 및/또는 젤라틴이 사용되어 왔다.

[11]

[12] 에컨대, 후술하는 바와 같이, 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물에는 안정화제로 알부민을 이용하고 있다.

[13] 상용화되어 입수 가능한 보툴리눔 독소 함유 약제학적 조성물은 캘리포니아, 어바인 소재의 Allergan, Inc로부터 상용화되어 입수 가능한 상표명 BOTOX (보툴리눔 독소 A 형 정제된 신경독소 복합체)로 판매된다. 각각의 BOTOX 의 100 유닛 바이알은 약 5 ng의 정제된 보툴리눔 독소 A 형 복합체, 0.5 mg 인간 혈청 알부민, 및 0.9mg 염화나트륨으로 구성되고 진공-건조 형태이며, 보존제 없이(0.9% 염화나트륨 주입) 멸균 생리식염수로써 복원되도록 제조된다. 다른 상용화되어 입수 가능한 보툴리눔 독소-함유 약제학적 조성물에는 Dysport (보툴리눔 독소 약제학적 조성물 중에 락토오스 및 인간 혈청 알부민을 가지는 클로스트리디움 보툴리눔 A 형 독소 헤마글루티닌 복합체, 영국, 버크셔 소재의 Ipsen Limited로부터 상용화되어 입수 가능, 사용 전에 0.9% 염화나트륨로써 복원되어야 하는 분말), 및 MyoBloc ™(보툴리눔 독소 B 형, 인간 혈청 알부민, 숙신산나트륨, 및 염화나트륨을 포함하는 약 pH 56 주사 용액, 캘리포니아, 샌 디에고 소재의 Solstice Neurosciences로부터 상용화되어 입수 가능)이 포함된다. 신경독성 성분(150 kDa 독소 분자) 및 보툴리눔 독소 복합체(300 kDa 내지 900 kDa)는, 예를 들어 캘리포니아, 캠벨 소재의 List Biological Laboratories, Inc; 영국, 포턴 다운 소재의 the Centre for Applied Microbiology and Research; Wako (일본, 오사카), 또한 미주리, 세인트 루이스 소재의 Sigma Chemicals로부터 입수될 수 있다.

[14]

[15] 상술한 바와 같이 주로 알부민이 많이 이용되는 이유는, 알부민은 약제학적

조성물에서 단백질 활성성분을 안정화할 수 있을 뿐만 아니라, 사람 환자에게 주사되는 경우 면역원성이 무시할 수 있을 정도라는 장점이 있기 때문이다. 그러나 알부민과 같은 혈액 제품은 환자가 혈액 유래 병원균 또는 전염성 미생물에 감염되는 잠재적인 위험성을 초래할 수 있고, 특히 바이러스의 감염이나 단백질에 의해 전달되는 크로이츠펠트-야곱 병과 같은 질병의 매개를 완전히 배제할 수 없으며, 지금까지 알려지지 않은 병원물질에 감염될 위험성 조차 있다. 이에, 상술한 알부민을 안정화제로 사용하는 경우, 이러한 감염물질의 전염의 위험을 감소시키기 위해 제조공정 중에서 공여자나 공여부위의 선별이 시행됨과 더불어 감염물질의 제거 및/또는 불활성화 시키는 과정이 포함되어야 한다.

[16] 이외에, 젤라틴을 이용하는 경우도 있으나 이 역시 동물에서 얻어지는 단백질이기 때문에 알부민과 마찬가지로 질병을 매개할 수 있고, 약제화 과정에서 사용하지 않는 것이 권고된다.

[17]

[18] 보툴리눔 독소 단백질의 약제화 과정에서 동물 소스로부터 유래하지 않는 안정화제를 이용하는 기술로서 대한민국 등록특허공보 제10-0799400호에는 효모에서 생산되는 재조합 알부민(rSA)을 약제화에 이용하는 방법이 개시되어 있으나, 재조합 알부민(rSA)의 생산 및 분리 회수 과정에서 새로운 항원성 구조인 네오에피토프(Neoepitope)가 발생하여 약제의 수용자에게 면역반응을 유발할 가능성을 완전히 배제할 수 없다.

[19] 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-0665469호에는 보툴리눔 독소, 다당류(히드록시에틸 전분 포함), 및 아미노산으로서 리신, 글리신, 히스티딘, 또는 아르기닌을 포함하는 약제학적 조성물이 개시되어 있다. 그러나 상기 특허의 약제학적 조성물은 동결건조형태의 제형을 위한 조성물이고, 보관조건도 냉동 또는 냉장으로 한정되어 있다. 동결건조형태의 보툴리눔 독소는 사용 직전 동결된 제형을 녹이거나 희석하는 과정이 필요하고, 이 과정에서 오차가 발생할 수 있다. 아울러 동결건조형태의 보툴리눔 독소는 사용상의 불편함이 따르며 프리필드 시린지 형태(prefilled syringe type)로 개발하는 것이 불가능하다는 문제점이 존재한다.

[20] 보툴리눔 독소를 안정화시키기 위한 조성물과 관련하여 미국공개 특허공보 제2007-0134199호에는 폴리솔베이트를 포함한 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로서 글루타민과 글루탐산 또는 아스파라긴과 아스파르트산을 포함하는 조성물이 개시되어 있다. 상기 특허의 액상 조성물에 보툴리눔 독소를 희석하여 냉장조건인 4℃에서 보관하는 경우 8개월이 지나도 안정하였지만, 상온인 37℃에서 보관하는 경우 1개월 이내에 활성이 감소하는 결과를 보여 상온에서 보툴리눔 독소를 포함하는 약제학적 액상 조성물을 안정화시키기에는 한계가 있다.

[21]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[22] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 동물 소스로부터 유래하지 않아 인체에 안전하고, 실온 조건에서도 보툴리눔 독소 활성이 유지되도록 보툴리눔 독소액의 안정성을 향상시키는 안정화 액상 조성물 및 안정성이 향상된 보툴리눔 독소액을 제공하는데 있다.

[23] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[24]

과제 해결 수단

[25] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여,

[26] 본 발명은 폴리솔베이트 80 및 세린을 유효성분으로 포함하는, 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물을 제공한다.

[27] 본 발명의 일 구현예로서, 폴리솔베이트 80 대비 세린의 조성비는 1 (mg/mL): 5 (mM) 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물을 제공한다.

[28] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 조성물은 메티오닌을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물을 제공한다.

[29] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 조성물에서 폴리솔베이트 80 : 세린 : 메티오닌의 조성비는 1 (mg/mL): 5 ~ 50 (mM) : 0.2 (mM) 인 것을 특징으로 하는, 조성물을 제공한다.

[30] 또한, 본 발명은 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물; 및 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함하는 액상제형의 약제학적 조성물을 제공한다.

[31] 본 발명의 일 구현예로서, 폴리솔베이트 80의 농도는 보툴리눔 독소 40 unit 당 0.001 mg 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물을 제공한다.

[32] 본 발명의 일 구현예로서, 세린의 농도는 보툴리눔 독소 40 unit 당 5mM 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물을 제공한다.

[33] 본 발명의 일 구현예로서, 메티오닌의 농도는 보툴리눔 독소 40 unit 당 0.5mM 미만인 것을 특징으로 하는, 조성물을 제공한다.

[34] 본 발명의 일 구현예로서, 보툴리눔 독소는 보툴리눔 A형, B형, C형, D형, E형, F형, 및 G형으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는, 조성물을 제공한다.

[35] 바람직하게, 상기 보툴리눔 독소는 복합체화 단백질을 함유하지 않는 형태 또는 복합체화 단백질을 함유하는 복합체 형태인 것을 특징으로 하는, 조성물을 제공한다.

[36] 또한, 본 발명은 폴리솔베이트 80 및 세린을 포함하는 액상 조성물을 보툴리눔

독소에 혼합하는 단계를 포함하는, 보툴리눔 독소의 안정화 방법을 제공한다.

[37] 또한, 본 발명은 폴리솔베이트 80 및 세린을 포함하는 액상 조성물의 보툴리눔 독소 안정화 용도를 제공한다.

[38] 또한, 본 발명은 보툴리눔 독소 안정화를 위해 사용되는 약제를 생산하기 위한 폴리솔베이트 80 및 세린의 용도를 제공한다.

[39]

발명의 효과

[40] 본 발명은 동물 소스로부터 유래하지 않는 안정화제를 이용하므로, 보툴리눔 독소 약제학적 조성물을 투여받는 환자가 혈액 유래 병원균 또는 전염성 미생물에 감염되는 잠재적인 위험성으로부터 안정성을 보장받을 수 있다. 또한, 본 발명은 상온 조건에서도 장기간 보툴리눔 독소의 활성이 유지되므로 보관 및 유통 안정성이 확보될 수 있다. 또한, 동결건조 과정이 필요없어, 제조 편의성이 증대된 효과가 있다.

[41]

도면의 간단한 설명

[42] 도 1은 폴리솔베이트 80의 농도 변화에 따라 보툴리눔 독소액 투여시 사망률 변화를 개시한 그래프이다.

[43] 도 2는 세린의 농도 변화에 따라 보툴리눔 독소액 투여시 사망률 변화를 개시한 그래프이다.

[44] 도 3은 메티오닌 추가에 따른 세린의 농도 변화에 따라 보툴리눔 독소액 투여시 사망률 변화를 개시한 그래프이다.

[45]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[46] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[47]

[48] 본 발명은 폴리솔베이트 80 및 세린을 유효성분으로 포함하는, 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물; 그리고 상기 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물 및 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함하는 액상제형의 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[49] 또한, 본 발명은 폴리솔베이트 80 및 세린을 이용하여 보툴리눔 독소의 안정성을 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[50]

[51] 본 발명자들은 동물 유래의 단백질을 사용하지 않아 안전성이 보장되면서, 메티오닌과 폴리솔베이트 20 조합의 보툴리눔 독소 안정화 액상 조성물의 대체제로서 실온 조건 또는 냉장보관에서도 장기간 안정성을 갖는 안정화제를

확보하기 위한 실험을 진행하였다. 그 결과, 세린과 폴리솔베이트 80 의 조합이 실온 조건에서도 보툴리눔 독소의 활성을 장기간 유지함에 탁월한 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[52]

[53] 본 발명에 있어서, "안정성 또는 안정화"는 보툴리눔 독소의 활성이 유지되는 것을 의미하며, 예컨대 보툴리눔 독소 활성이 시험 전 또는 특정 조건 하에 있기 전과 비교하여 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 로 유지되는 것을 의미하며, 바람직하게 50% 이상, 가장 바람직하게 100% 로 유지되는 것을 의미한다. 예컨대, 보툴리눔 독소를 주입한 개체수를 비교하여, (보툴리눔 독소 주입한 개체 중 사망 개체수/보툴리눔 독소 주입 개체수) x 100의 값이 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 로 유지되는 것을 의미하며, 바람직하게 50% 이상, 가장 바람직하게 100% 로 유지되는 것을 의미한다. 보툴리눔 독소의 활성은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 측정될 수 있으며, 예컨대 PearceL.B.et al 1994. Measurement of Botulinum Toxin Activity: Evaluation of the Lethality Assay. Toxicology and Applied Pharmacology' 128: 69-77 ' 논문에 서술된 치사율 어세이 방법을 참고하여 독소의 활성을 측정하였다. 본 발명의 실험예에 따르면, 제조된 보툴리눔 독소 액상 조성물 0.1mL(3 또는 4유닛/0.1 mL/마우스)을 각각 4주령 ICR(Institute of Cancer Research, USA) 암컷 마우스 5 마리 혹은 10 마리에 복강 주사 후 72 시간 동안 관찰하여 사망률을 확인하였다. 또한, "안정성 또는 안정화"되는 조건은, 실온 조건에서의 보관 또는 유통 안정성을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적인 실시예에 따르면, 35 ~ 45℃/50 ~ 80% RH 조건, 바람직하게 40℃/70% RH 조건을 의미할 수 있다.

[54]

[55] 본 발명에 따른 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물은 폴리솔베이트 80 및 세린을 유효성분으로 포함한다.

[56] 또한, 본 발명에 따른 액상제형의 약제학적 조성물은 상기 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물 및 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함한다. 즉, 폴리솔베이트 80 및 세린; 및 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함한다.

[57]

[58] 본 발명에 있어서, "세린"은 화학식이 $HO_2CCH(NH_2)CH_2OH$인 화합물로서, 이의 입체이성질체를 포함한다. 상기 "세린"은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 수득할 수 있고, 화학적으로 합성하는 방법, 동물의 체내에서 합성된 세린을 분리하는 방법, 또는 상업적으로 유통되는 화합물을 입수하는 방법 등이 있으며, 예컨대 3-포스포하이드록시파이루베이트와 NADH(니코틴 아미드 아데닌 디뉴클레오티드)로부터 형성된 3-포스포글리세린산염의 산화과정에서 시작하여 글루탐산과의 아미노기 전이 반응으로 3-포스포세린과 인산기를

제거하는 방법으로 세린을 제조할 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 액상제형의 약제학적 조성물에 포함되는 세린의 농도는 보툴리눔 독소 40 unit 당 5mM 이상일 수 있고, 바람직하게 보툴리눔 독소 40 unit 당 5 ~ 100 mM 이며, 보다 바람직하게 보툴리눔 독소 40 unit 당 15 ~ 100 mM 이고, 가장 바람직하게 보툴리눔 독소 40 unit 당 15 ~ 50 mM 이다. 보툴리눔 독소 40 unit 당 5mM 이하의 농도에서는 장기간 보관시 세린에 의한 보툴리눔 독소의 안정화 효과가 일정 수준 이하로 나타날 수 있고, 100 mM을 초과하는 경우에는 초과에 따른 상승 효과가 더 이상 나타나지 않을 수 있으며, 비경제적일 수 있다.

[59]

[60] 본 발명에 있어서, "폴리솔베이트(Polysorbate) 80"은 화학식이 $C_{64}H_{124}O_{26}$인 화합물로서, 비이온성 계면활성제이고, 가용성이다.
모노올레인산폴리옥시에칠렌소르비탄, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트, 에마졸4130, Tween 80, 또는 트윈79 등으로 칭하고, 예컨대 가소제, 겔화제, 계면활성제, 기제, 당의제, 방수제, 부착방지제, 부형제, 분산제, 붕해제, 습윤제, 안정화제, 연화제, 완충제, 용제, 용해보조제, 유화제, 장용피제, 코팅제, 탈색제, 현탁화제 또는 활택제의 목적으로 식품 내지 화장품의 첨가제로 사용된다. 당업계 공지된 다양한 방법으로 제조될 수 있으며, 자연계에서 분리하거나 화학적으로 합성할 수 있다. 본 발명에 있어서, 액상제형의 약제학적 조성물에 포함되는 폴리솔베이트 80의 농도는 보툴리눔 독소 40 unit 당 0.001 mg 이상일 수 있고, 바람직하게 보툴리눔 독소 40 unit 당 0.1 ~ 5 mg 이며, 보다 바람직하게 보툴리눔 독소 40 unit 당 0.1 ~ 2 mg 이고, 가장 바람직하게 보툴리눔 독소 40 unit 당 0.5 ~ 2 mg 이다. 보툴리눔 독소 40 unit 당 0.001mg 이하의 농도에서는 장기간 보관시 폴리솔베이트 80에 의한 보툴리눔 독소의 안정화 효과가 일정 수준 이하로 나타날 수 있고, 5 mg을 초과하는 경우에는 초과에 따른 상승 효과가 더 이상 나타나지 않을 수 있으며, 비경제적일 수 있다.

[61]

[62] 본 발명의 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물에 있어서, 보툴리눔 독소 20 unit 당 폴리솔베이트 80 대비 세린의 조성비는 1 (mg/mL): 5 (mM) 이상일 수 있으며, 바람직하게 1 (mg/mL): 5 ~ 50 (mM) 일 수 있으며, 더욱 바람직하게 1 (mg/mL): 15 ~ 50 (mM) 일 수 있다. 폴리솔베이트 80 대비 세린의 조성비가 1 (mg/mL): 5 (mM) 미만의 경우에는 장기간 보관시 보툴리눔 독소의 안정화 효과가 일정 수준 이하로 나타날 수 있다.

[63]

[64] 본 발명에 있어서, "보툴리눔 독소"는 보툴리눔 A형, B형, C형, D형, E형, F형, 및 G형으로 이루어진 군에서 임의로 선택될 수 있고, 바람직하게 보툴리눔 A형일 수 있다. 상기 보툴리눔 독소는 복합체화 단백질을 함유하지 않는 형태 또는 복합체화 단백질을 함유하는 복합체 형태 모두를 포함할 수 있다.
자연적으로 형성하는 복합체화 단백질을 함유하지 않으며 A, B, C, D, E, F 또는

G형 클로스트리디움 보툴리눔으로부터 유래되는 보툴리눔 독소 단백질의 분자량은 대략 150 KDa이다. 하지만 클로스토리디움 보툴리눔 박테리아에 의해서 독소 단백질이 생산될 때 보툴리눔 독소 단백질은 보툴리눔 독소 단백질의 작용을 보조 및 보호하는 여러가지 헤마글루티닌(Hemagglutinin) 단백질 및 비헤마글루티닌 단백질과 다양한 복합체를 형성하여 생산된다. 자연적으로 형성하는 복합체화 단백질을 함유하는 보툴리눔 독소 A형은 대략 900kDa, 500kDa, 또는 300kDa의 분자량을 가진 복합체 형태이고, B형과 C형은 대략 500kDa의 분자량을 가진 복합체 형태이고, D형은 대략 300kDa, 또는 500kDa의 분자량을 가진 복합체 형태이며, E형과 F형은 대략 300kDa의 분자량을 가진 복합체 형태이다. 본 발명에 있어서, 보툴리눔 독소 1 유닛(Unit)은 체중이 18~20g인 암컷 스위스 웹스터 마우스 (Swiss Webster Mice)에 복강내 주사를 통한 사망률이 50%인 LD_{50}으로 정의할 수 있다.

[65]

[66] 본 발명에 따른 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물에 유효성분으로서, 세린 및 폴리솔베이트 80 외에, 메티오닌이 추가로 포함될 수 있다.

[67] 본 발명에 있어서, 액상제형의 약제학적 조성물에 포함되는 메티오닌의 농도는 보툴리눔 독소 40 unit 당 0.5mM 미만 일 수 있으며, 보다 바람직하게 보툴리눔 독소 40 unit 당 0.2 ~ 0.4mM 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[68]

[69] 본 발명의 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물에 있어서, 보툴리눔 독소 20 unit 당 폴리솔베이트 80 : 세린 : 메티오닌의 조성비는 1 (mg/mL): 2.5 ~ 50 (mM) : 0.2 (mM) 일 수 있으며, 바람직하게 1 (mg/mL): 5 ~ 50 (mM) : 0.2 (mM) 일 수 있으며, 더욱 바람직하게 1 (mg/mL): 7.5 ~ 30 (mM) : 0.2 (mM) 일 수 있으며, 더 더욱 바람직하게 1 (mg/mL): 7.5 ~ 25 (mM) : 0.2 (mM) 일 수 있다. 폴리솔베이트 80 : 세린 : 메티오닌의 조성비는 1 (mg/mL): 2.5 미만 50 초과 (mM) : 0.2 (mM)일 경우에는 장기간 보관시 보툴리눔 독소의 안정화 효과가 일정 수준 이하로 나타날 수 있다.

[70]

[71] 본 발명에 따른 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물 또는/및 이를 포함하는 액상제형의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성셀룰로스, 폴리비닐피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[72] 본 발명의 약제학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[73] 본 발명의 약제학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[74] 본 발명에 다른 약제학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 병용하여 투여되는 제제는 제한되지 않으며, 예컨대, 상기 제2의 조성물은 아미노글리코시드(Aminoglycoside)계 항생제 또는 근육·신경전달을 방해하는 약물(투보쿠라린계 근이완제)일 수 있다.

[75]

[76] 또한, 본 발명은 폴리솔베이트 80 및 세린을 포함하는 액상 조성물을 보툴리눔 독소에 혼합하는 단계를 포함하는, 보툴리눔 독소의 안정화 방법을 제공한다.

[77] 또한, 본 발명은 폴리솔베이트 80 및 세린을 포함하는 액상 조성물의 보툴리눔 독소 안정화 용도 및 보툴리눔 독소 안정화를 위해 사용되는 약제를 생산하기 위한 폴리솔베이트 80 및 세린의 용도를 제공한다.

[78]

[79] 또한, 본 발명에서 "개체"란 보툴리눔 독소의 투여를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[80] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 폴리솔베이트 80 및 세린을 포함하는 액상 조성물; 및 보툴리눔 독소를 제공하는 것을 의미한다.

[81]

[82] 본 발명에 따른 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물은 세린과 폴리솔베이트 80을 혼합하는 단계를 포함하여 제조된다.

[83] 또한, 본 발명에 따른 액상제형의 약제학적 조성물은 세린과 폴리솔베이트 80을 혼합하여 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물을 제조하는 단계; 및 상기 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물과 보툴리눔 독소를 혼합하는 단계를 포함하여 제조된다.

[84] 필요에 따라, 상기 단계 외에, 하나 이상의 단계가 추가되어 포함될 수 있으며, 순서는 무관하다. 예컨대, 상기 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물은 세린과 폴리솔베이트 80을 혼합하는 단계에 메티오닌을 추가로 혼합하는 단계가 포함될 수 있다.

[85]

[86] **<실시예>**

[87] **1. 보툴리눔 독소 액상 조성물의 제조**

[88] 적정 농도로 조정된 보툴리눔 독소 안정화 액상 조성물을 이용하여 보툴리눔 독소액을 희석하고 최종적으로 보툴리눔 독소액의 농도를 적정 농도로 조절하여 보툴리눔 독소 액상 조성물을 제조하였다.

[89]

[90] **<실험예>**

[91] **1. 보툴리눔 독소 안정화 액상 조성물의 선별 시험**

[92] 클로스트리디움 보툴리튬 독소 A형의 안정화제를 선별하기 위하여 다양한 안정화제를 사용하여 보툴리눔 독소 안정화 액상 조성물의 조성을 선별하는 실험을 실시하였다.

[93] 하기 표 1에 기재한 바와 같은 조성의 보툴리눔 독소 안정화 액상 조성물을 이용해, 보툴리눔 독소액의 농도를 300 Unit/mL가 되도록 보툴리눔 독소액을 제조하였다.

[94] 대조군은 Innotox 특허 제형과 같이 20mM 메티오닌, 2mg/mL 폴리솔베이트 20을 10% saline에 녹여 제조하였다. 그리고 실험군(실시예 1 내지 실시예 7)은 2mg/mL 폴리솔베이트 80을 10% saline에 녹인 것과 각각의 20mM 안정화제를 Normal saline에 녹여 제조하였다.

[95] 제조된 보툴리눔 독소액을 40℃/70% RH 조건에서 안정성 챔버에 보관하면서 일정기간 마다 샘플링하였다. 샘플링된 보툴리눔 독소액 1mL에 주사용수(Normal Saline) 9mL를 넣어 10배로 희석하고, 희석된 샘플을 4주령 ICR(Institute of Cancer Research, USA) 암컷 마우스 5마리에 3 unit/0.1ml로 복강 주사하였다 (1 unit = LD_{50}). 복강 주사 후 72시간 동안 관찰하면서 사망한 마우스의 수 및 그에 따른 사망률을 확인하였다.

[96] 그 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이, 실시예 1, 4와 비교예 1 외에는, 안정성이 급격히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 실시예 1, 4와 비교예 1에서만 보툴리눔 독소의 활성이 장기간 유지되었다.

[97] 상기 결과로부터 세린과 폴리솔베이트 80의 조합이 메티오닌과 폴리솔베이트의 조합을 대체할 수 있는 안정화제임을 알 수 있었다.

[98]

[표1]

구분	보툴리눔 독소 안정화 액상 조성물		사망률 (%)			안정성
	안정화제(20 mM)	폴리솔베이트(2 mg/mL)	0주차	1주차	2주차	
대조군	Methionine	Tween 20	100%	100%	100%	O
실시예 1	Methionine	Tween 80	100%	100%	100%	O
실시예 2	Glycine	Tween 80	100%	100%	0%	X
실시예 3	Cysteine	Tween 80	100%	0%	0%	X
실시예 4	Serine	Tween 80	100%	100%	100%	O
실시예 5	Zn (50 mM)	Tween 80	100%	40%	0%	X
실시예 6	Leucine	Tween 80	80%	60%	0%	X
실시예 7	Vitamin C	Tween 80	80%	0%	0%	X

[99] 단, 본 안정성 실험은 살아있는 마우스를 대상으로 하였는바, 그 특성상 동일 조성의 보툴리눔 독소 액상 조성물을 가지고 안정성 실험을 진행하는 경우에도 마우스의 상태에 따라 다른 결과를 보일 수 있다.

[100]

[101] **2. 폴리솔베이트 80의 농도 변화에 따른 보툴리눔 독소의 안정성 시험**

[102] 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물의 조성으로 세린과 폴리솔베이트 80의 조합을 선별하고 폴리솔베이트 80의 농도 변화에 따른 보툴리눔 독소의 안정성 실험을 실시하였다.

[103] 하기 표 2에 기재한 바와 같은 조성의 보툴리눔 독소 안정화 액상 조성물을 이용해, 보툴리눔 독소액의 농도를 40 Unit/mL가 되도록 보툴리눔 독소액을 제조하였다. 실험군은 5mM 세린과 0.001 ~ 2mg/mL 폴리솔베이트 80을 10% Normal saline에 녹여 제조하였다. 구체적인 실험방법은 상기 실험예 1에 기재된 바와 동일하게 실시하였다. 단, 10마리의 마우스를 사용하였고, 복강 주사하는 농도는 4 unit/0.1ml로 하였다.

[104] 표 2 및 도 1에 폴리솔베이트 80의 농도 변화에 따른 보툴리눔 독소의 안정성 실험결과를 나타내었다. 폴리솔베이트 80의 농도가 0.1mg/mL 이상이면 모든 농도에서 어느 정도 이상의 안정성을 나타냈는바, 폴리솔베이트 80의 농도가 0.1mg/mL, 0.5mg/mL 및 2mg/mL인 경우 6주차까지 사망률이 50% 이상이며, 폴리솔베이트 80의 농도가 0.5mg/mL 및 2mg/mL인 경우 10주차까지도 10%의 사망률을 확인할 수 있었다.

[105]

[표2]

보툴리눔 독소액			사망률 (%)							
보툴리눔 독소 안정화 액상 조성물		독소(U/mL)	0주차	1주차	2주차	4주차	6주차	8주차	10주차	12주차
폴리솔베이트80 (mg/mL)	세린(mM)									
0.001	5	40	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0.01			100%	100%	80%	60%	0%	0%	0%	0%
0.1			100%	100%	90%	90%	60%	30%	0%	0%
0.5			100%	90%	80%	70%	100%	40%	10%	0%
2			100%	70%	100%	70%	70%	40%	10%	0%

[106]

[107] **3. 세린의 농도 변화에 따른 보툴리눔 독소의 안정성 시험**

[108] 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물의 조성으로 선별된 세린과 폴리솔베이트 80의 조합에서 세린의 농도 변화에 따른 보툴리눔 독소의 안정성 실험을 실시하였다.

[109] 하기 표 2에 기재한 바와 같은 조성의 보툴리눔 독소 안정화 액상 조성물을 이용해, 보툴리눔 독소액의 농도를 40 Unit/mL가 되도록 보툴리눔 독소액을 제조하였다. 대조군은 Innotox 특허 제형과 같이 20mM 메티오닌, 2mg/mL 폴리솔베이트 20을 10% saline에 녹여 제조하였다. 실험군은 0.1mg/mL 폴리솔베이트 80과 5 ~ 50mM 세린을 10% Normal saline에 녹여 제조하였다. 구체적인 실험방법은 상기 실험예 1에 기재된 바와 동일하게 실시하였다. 단, 10마리의 마우스를 사용하였으며 복강 주사하는 농도는 4 unit/0.1ml로 하였다.

[110] 표 3 및 도 2에 세린의 농도 변화에 따른 보툴리눔 독소의 안정성 실험결과를 나타내었다. 세린의 농도가 5mM, 15mM 및 50mM인 경우 6주차까지 사망률이 50% 이상인바, 보툴리눔 독소 활성이 유지됨을 알 수 있었다. 특히, 세린의 농도가 50mM인 경우 12주차까지도 사망률이 50% 이상인바, 20mM 메티오닌과 2mg/ml 폴리솔베이트 20의 조합과 비교해, 보다 장기간 보툴리눔 독소 안정성이

유지됨을 알 수 있었다.

[111] [표3]

보툴리눔 독소 안정화 액상 조성물		사망률 (%)							
세린(mM)	폴리솔베이트80 (mg/mL)	0주차	1주차	2주차	4주차	6주차	8주차	10주차	12주차
5	0.1	100%	90%	90%	100%	80%	20%	0%	0%
15		100%	90%	100%	100%	70%	40%	0%	20%
50		100%	80%	100%	80%	90%	70%	50%	50%
20mM 메티오닌,2mg/mL 폴리솔베이트20		100%	90%	80%	100%	90%	90%	20%	20%

[112]

[113] **4. 메티오닌 추가에 따른 보툴리눔 독소의 안정성 시험**

[114] 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물의 조성으로 선별된 세린과 폴리솔베이트 80의 조합에서 메티오닌 추가에 따른 보툴리눔 독소의 안정성 실험을 실시하였다.

[115] 하기 표 4에 기재한 바와 같은 조성의 보툴리눔 독소 안정화 액상 조성물을 이용해, 보툴리눔 독소액의 농도를 40 Unit/mL가 되도록 보툴리눔 독소액을 제조하였다. 대조군은 Innotox 특허 제형과 같이 20mM 메티오닌, 2mg/mL 폴리솔베이트 20을 10% saline에 녹여 제조하였다. 실험군은 2mg/mL 폴리솔베이트 80, 5 ~ 50mM 세린과 0.4mM 메티오닌을 10% Normal saline에 녹여 제조하였다. 구체적인 실험방법은 상기 실험예 1에 기재된 바와 동일하게 실시하였다. 단, 10 마리의 마우스를 사용하였으며 복강 주사하는 농도는 4 unit/0.1ml로 하였다.

[116]

[표4]

보툴리눔 독소액				사망률(%)							안정성
보툴리눔 독소 안정화 액상 조성물			독소(U/mL)	0주차	2주차	4주차	6주차	8주차	10주차	12주차	
메티오닌(mM)	세린(mM)	폴리솔베이트80(mg/mL)									
0.4	5	2	40	100	100	70	70	80	70	70	△
0.4	15	2		100	100	80	90	80	80	70	△
0.4	50	2		100	100	80	80	90	80	80	○
메티오닌 20mM, 폴리솔베이트 20 2mg/mL				100	100	80	90	80	60	60	△

[117] 그 결과, 표 4 및 도 3에 나타낸 바와 같이, 대조군 대비, 모든 제형의 메티오닌, 세린과 폴리솔베이트 80의 조합에 의해 보툴리눔 독소액의 안정성이 향상됨을 알 수 있었다.

[118]

[119] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

[120]

산업상 이용가능성

[121] 본 발명에 따른 폴리솔베이트 80 및 세린은 액상 보툴리눔 독소의 안정성 향상 및 투여의 용이성을 위한 조성물 등으로 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

[122]

청구범위

[청구항 1] 폴리솔베이트 80 및 세린을 유효성분으로 포함하는, 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 폴리솔베이트 80 대비 세린의 조성비는 1 (mg/mL): 5 (mM) 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 메티오닌을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 조성물에서 폴리솔베이트 80 : 세린 : 메티오닌의 조성비는 1 (mg/mL): 5 ~ 50 (mM) : 0.2 (mM) 인 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 보툴리눔 독소의 안정화 액상 조성물; 및 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함하는 액상제형의 약제학적 조성물.

[청구항 6] 제5항에 있어서,
폴리솔베이트 80의 농도는 보툴리눔 독소 40 unit 당 0.001 mg 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 7] 제5항에 있어서,
세린의 농도는 보툴리눔 독소 40 unit 당 5mM 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 8] 제5항에 있어서,
메티오닌의 농도는 보툴리눔 독소 40 unit 당 0.5mM 미만인 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 9] 제5항에 있어서,
상기 보툴리눔 독소는 보툴리눔 A형, B형, C형, D형, E형, F형, 및 G형으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 10] 제5항에 있어서,
상기 보툴리눔 독소는 복합체화 단백질을 함유하지 않는 형태 또는 복합체화 단백질을 함유하는 복합체 형태인 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 11] 폴리솔베이트 80 및 세린을 포함하는 액상 조성물을 보툴리눔 독소에 혼합하는 단계를 포함하는, 보툴리눔 독소의 안정화 방법.

[청구항 12] 폴리솔베이트 80 및 세린을 포함하는 액상 조성물의 보툴리눔 독소 안정화 용도.