



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0027498

(43) 공개일자 2016년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/107 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0114578

(22) 출원일자 2014년08월29일

심사청구일자 2014년08월29일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

임수정

서울특별시 용산구 이태원로27다길 11 (이태원동)

김수연

경기도 성남시 분당구 대왕판교로644번길 65 502동 310호

이상진

경기도 파주시 한빛로 70 캐슬엔칸타빌 아파트 520동 2102호

(74) 대리인

특허법인다나

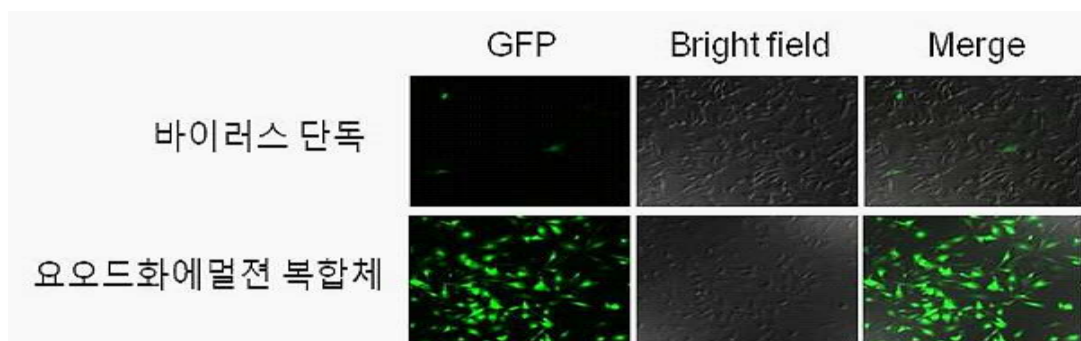
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **요오드화 오일을 함유하는 양이온성 에멀전 및 바이러스 벡터의 유전자 전달 증진을 위한 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 요오드화 오일을 함유하는 양이온성 에멀전 및 바이러스 벡터의 유전자 전달 증진을 위한 이의 용도, 양이온성 에멀전-바이러스 복합체 및 이를 포함하는 의약 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 바이러스와의 강한 결합을 통해 바이러스 표면 전하를 완벽히 차폐시키고, 바이러스와의 복합체를 안정화시켜, 바이러스 벡터의 세포와의 결합 및 유입을 증가시킴으로써 세포독성은 낮추면서 치료 유전자의 전달율은 현저히 증진시킨다. 따라서, 본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 바이러스 벡터의 유전자 전달 효율을 향상시킬 수 있는 보조제로서 유용하게 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 이러한 양이온성 에멀전과 바이러스 벡터의 복합체는 유전자 치료를 위한 의약 조성물로서 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345213075(2012R1A1A2042768)

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 오일 함유 리포솜 (오일로솜) 설계에 의한 난용성 약물 가용화 및 세포 유입 증진 전략

기 여 율 7/10

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 0645-20140001

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 동물 모델을 이용한 혈관 신생 및 전이 조절 in vivo 연구

기 여 율 3/10

주관기관 국립암센터

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

헬에 DOTAP(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane), 콜레스테롤(cholesterol) 및 DSPE-PEG(distearoylphosphatidyl-ethanolamine-poly(ethylene glycol))를 포함하고, 코어에 요오드화 오일을 포함하는 양이온성 에멀전.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 DOTAP, 콜레스테롤 및 DSPE-PEG는 1 내지 1.5: 1: 0.01 내지 0.05의 몰비로 포함되는 것인 양이온성 에멀전.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 요오드화 오일은 양이온성 에멀전 100 중량부에 대해 0.2 내지 1.8 중량부의 비율로 포함되는 것인 양이온성 에멀전.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 DOTAP 중 10 내지 50 몰%가 중성 인지질로 대체되어 있는 양이온성 에멀전.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 중성 인지질은 포스파티딜콜린인 양이온성 에멀전.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 양이온성 에멀전을 포함하는 바이러스 벡터의 치료 유전자 전달 증진용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 아데노부속바이러스, 바쿨로바이러스, 파르보바이러스, 카나리폭스(canarypox virus), 백신시아바이러스(vaccinia virus), 레트로바이러스, 피코나바이러스, 알파바이러스 또는 렌티 바이러스인 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 치료 유전자는 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 항원, 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene), 자살 유전자(suicide gene), 항혈관형성인자(anti-angiogenic factor), 전구약물 활성화 유전자(prodrug activating gene), 면역자극 유전자(immunostimulatory gene) 및 세포분화조절 유전자 (cellular differentiation regulatory gene)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 양이온성 에멀전은 바이러스 벡터의 폐 조직 특이적 치료 유전자 전달을 증진하기 위한 것인 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 양이온성 에멀전은 바이러스 10^7 pfu 당 1.75 내지 3.5 nmole의 비율로 혼합되는 것인 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 양이온성 에멀전에 치료 유전자를 포함하고 있는 바이러스 벡터가 도입되어 있는 양이온성 에멀전-바이러스 복합체.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 아데노부속바이러스, 바쿨로바이러스, 파르보바이러스, 카나리폭스(canarypox virus), 백신시아바이러스(vaccinia virus), 레트로바이러스, 피코나바이러스, 알파바이러스 또는 렌티 바이러스인 양이온성 에멀전-바이러스 복합체.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 치료 유전자는 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 항원, 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene), 자살 유전자(suicide gene), 항혈관형성인자(anti-angiogenic factor), 전구약물 활성화 유전자(prodrug activating gene), 면역자극 유전자(immunostimulatory gene) 및 세포분화조절 유전자 (cellular differentiation regulatory gene)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 양이온성 에멀전-바이러스 복합체.

청구항 14

제11항에 따른 양이온성 에멀전-바이러스 복합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 의약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

양이온성 에멀전-바이러스 복합체의 타겟 세포는 암세포 또는 줄기세포인 의약 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 양이온성 에멀전-바이러스 복합체는 폐 조직 특이적 치료 유전자 전달을 위한 것인 의약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 요오드화 오일을 함유하는 양이온성 에멀전 및 바이러스 벡터의 유전자 전달 증진을 위한 의의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 표적 세포에 치료 유전자를 고효율로 발현시킬 수 있는 우수한 성능의 유전자전달벡터의 부재는 현재 유전자 치료 및 줄기세포의 다분화능 연구 등에서 주요한 제약요인이 되고 있다.

[0003] 유전자전달벡터는 크게 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터로 구분되는데, 비록 안전성에 대한 우려는 있지만 바이러스성벡터는 비바이러스성 벡터에 비해 훨씬 우수한 유전자 전달능을 보인다.

[0004] 바이러스 벡터에 의한 유전자 도입-단백질 발현이 효율적으로 이루어지기 위해서는 i) 세포막에 바이러스가 결합하여 ii) 바이러스가 세포내 엔도솜 내로 포획되어 들어가고, iii) 이어서 엔도솜으로부터 세포질로 나와 핵으로 이행하는 과정이 선행되어야 하는데 바이러스-세포막 간의 전기적 반발력이 존재하기 때문에 바이러스 특이적 수용체가 없는 세포의 경우 i)의 과정이 일어나기 어려운 문제점이 있다.

[0005] 바이러스성벡터 중 재조합 아데노바이러스는 각 세포분열단계에 있는 다양한 종류의 세포를 감염시킬 수 있는 능력이 있어 벡터로서 각광받는다. 아데노바이러스가 세포 내로 유입되기 위해서는 1차적으로 세포막의 coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) 수용체에의 아데노바이러스 fiber knob의 결합을 필요로 한다. 그러므로, 아데노바이러스성 유전자전달벡터에 의한 유전자발현효율은 표적세포의 CAR수용체 발현 정도에 따라 영향 받게 된다. 이전의 여러 연구들은 암세포의 경우 CAR발현이 저해되어 있음을 보고한바 있으며 이는 아데노바이러스 벡터에 의한 유전자 발현을 저해하는 한 요인이 된다. 이외에도 아데노바이러스에 의한 유전자 치료의 임상예의 적용을 저해하는 요인으로서는 생체내 항바이러스 항체의 존재 및 바이러스의 고유한 성질인 blood coagulation factor에의 결합에 의한 간축적에 의한 간독성 등을 들 수 있다.

[0006] 아데노바이러스 표면단백질에 폴리에틸렌글리콜 등의 고분자를 부착시키면 아데노바이러스의 간으로의 축적 및 항바이러스 항체와의 결합에 의한 중화(무력화)가 억제됨으로써 아데노바이러스벡터를 이용한 유전자 치료의 한계 극복에 효과적임이 보고된바 있다. 그러나 바이러스 단백질의 화학적 변형은 바이러스의 생산 효율 감소 및 정제를 어렵게 하거나 세포유입후의 세포내 이동(intracellular trafficking)을 방해할 수 있다.

[0007] 한편, 양이온성 지질 또는 고분자를 아데노바이러스 입자의 표면의 음성 하전을 이용하여 단순히 섞어줌으로서 정전기적 결합에 의해 복합체를 형성시키는 방법은, (일반적으로 음성 하전을 띄는) 세포막과 (역시 음성의 표면하전을 띄는) 바이러스간의 정전기력 반발력을 감소시켜 바이러스-세포막간의 상호작용(interaction)을 용이하게 함으로써 결국 아데노바이러스에 의한 유전자발현 효율을 증진시키며, 특히 CAR 수용체를 가지고 있지 않은 세포의 경우 이 효과가 크게 나타나는 것으로 보고된 바 있다. 이 경우 역시 생체내의 아데노바이러스의 첫 번째 투여 후의 항체형성도 현저히 억제되는 것으로 보고되었다. 이러한 복합체 시스템은 제조방법이 간단하면서도 바이러스성 및 비바이러스성 벡터의 장점들을 더불어 가진다는 점에서 유용하나, 이 경우에도, 양이온성 지질 또는 고분자에 의한 세포 독성이 나타나는 문제점이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서, 본 발명은 바이러스 벡터에 의한 유전자 발현 효율을 증진시키면서 세포 독성은 최소화할 수 있는 최적화된 조성을 갖는 신규 양이온성 에멀전 및 이의 용도를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 이를 위해, 본 발명은 셀에 DOTAP(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane), 콜레스테롤(cholesterol) 및 DSPE-PEG(distearoylphosphatidyl-ethanolamine-poly(ethylene glycol))를 포함하고, 코어에 요오드화 오일을 포함하는 양이온성 에멀전, 상기 양이온성 에멀전을 포함하는 바이러스 벡터의 치료 유전자 전달 증진용 조성물, 상기 양이온성 에멀전의 바이러스 벡터의 치료 유전자 전달 증진을 위한 용도, 및 상기 양이온성 에멀전과 바이러스 벡터를 혼합하여 표적 세포에 처리하는 것을 포함하는 바이러스 벡터의 치료 유전자 전달 증진 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 요오드화 오일이 유상으로서 코어에 위치하는 수중유형(oil-in-water type)의 에멀전으로서, DOTAP, 콜레스테롤 및 DSPE-PEG를 필수구성으로 하는 것을 특징으로 한다. 본 발명자들은 실험 과정을 통해 이들 성분의 조합을 갖는 양이온성 에멀전이 바이러스 벡터에 포함되어 있는 유전자의 타겟 세포로의 전달 증진 효율을 최대화시키는 것을 밝혔다.

[0011] 본 발명에서, 요오드화 오일은 양귀비종자유 또는 대두유 등으로부터 추출한 지방산의 요오드화 에틸 에스터를 일컫는 것으로서, 리피도돌(lipidol) 또는 에티도돌(ethiodol)이라는 상품명으로 입수가 가능한 물질이다. 하기 실시예에 따르면, 요오드화 오일은 스쿠알렌, 대두유, 목화씨유, 참깨유, 옥수수유, 홍화유, 양귀비종자유 등의 다른 오일을 유상으로 사용할 때에 비해 에멀전의 응집으로 인한 불안정화의 문제가 일어나지 않고, 이에 따라

다른 오일에 비해 유전자 발현 효율을 가장 높일 수 있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명에서는 양이온성 에멀전의 코어를 이루는 유상으로서 요오드화 오일을 선택하였다.

[0012] 본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 코어에 요오드화 오일을 포함하는데, 이 때 요오드화 오일은 양이온성 에멀전 100 중량부에 대해 0.2 내지 1.8 중량부의 비율로 포함된다. 한 구체예에서, 요오드화 오일은 양이온성 에멀전 100 중량부에 대해 0.3 내지 1.5 중량부의 비율로 포함된다. 본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 단순히 요오드화 오일의 비중을 기초하여 유전자 전달능을 높인 것이 아니라, 적정 조성을 통해 에멀전-바이러스 복합체의 안정성을 증진시킨 것이므로, 에멀전 내에 포함되는 요오드화 오일의 비율이 높지 않다. 하기 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 아데노바이러스와 단순히 혼합하여 양이온성 에멀전-바이러스 복합체를 형성하는데, 아데노바이러스를 에멀전 내에 제조과정 중 완전 봉입하는 과정을 거치지 않았음에도 불구하고, 바이러스의 음성전하를 거의 완전히 차폐하였다. 나아가, 본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 혈청 존재하에서도 안정하여세포로의 uptake를 현저히 증진시켜 배양세포주에의 유전자 발현도 매우 효과적으로 증진시켰다. 흥미롭게도, 요오드화 오일의 함량을 1.5 중량% 이상으로 증진시키더라도 더 이상의 요오드화 오일 용량 의존적인 유전자 발현 증진은 없었다. 이는 요오드화 오일 함유 양이온성 에멀전의 유전자 발현 증진능이, 요오드화 오일 함유에 의한 에멀전의 비중 증대 효과에 의한 것이기 보다는 요오드화 오일 에멀전-바이러스 간의 강한 결합으로 인한 바이러스 표면전하의 완벽한 차폐, 생성된 복합체의 더 우수한 안정성에 의해 세포로의 결합 및 유입이 현저히 증진된 것에 의한 것으로 생각된다. 우수한 유전자 발현 증진 효과가 바닥부착성 세포주에만 국한되어 나타나지 않고, 부유성 세포주에도 공통적으로 나타남은 이를 뒷받침해 준다.

[0013] 또한, 본 발명에 따른 양이온성 에멀전의 유전자 전달 증진능은 세포배양액 중 혈청 존재 하 에서도 유지 또는 오히려 더 증진되어 나타나서 바이러스백터에 의한 세포 트랜스덕션 시 혈청이 든 배지를 일시적으로 제거하는 단계를 생략할 수 있는 장점을 나타낸다.

[0014] 한편, 양이온성 지질을 이용하여 양이온성 지질-바이러스 복합체를 형성시키는 방법은, 세포막과 바이러스 간의 정전기력 반발력을 감소시켜 아데노바이러스에 의한 유전자 발현 효율을 증진시키긴 하나, 양이온성 지질의 사용으로 인한 세포 독성의 문제가 있다.

[0015] 그러나, 본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 바이러스 단독 또는 바이러스-리포좀 복합체의 형태로 유전자 전달을 시도할 경우에 비해 현저히 높은 유전자 발현 증진을 가능하게 함으로써, 결과적으로 표적 세포에 대해 처리하여야 하는 바이러스의 양 자체를 줄일 수 있다.

[0016] 나아가, 추가로 세포 독성을 감소시키기 위해, 본 발명은 상기 양이온성 에멀전 내 양이온성 지질로서 사용된 DOTAP의 함량을 줄이고 그 줄어든 함량만큼 중성 인지질을 추가로 포함하는 양이온성 에멀전을 또한 제공한다.

[0017] 한 구체예에서, 상기 DOTAP 중 10 내지 50 몰%가 중성 인지질로 대체될 수 있다. 상기 범위 내에서는 양이온성 지질의 함량을 줄이고 중성 인지질로 대체하더라도 유전자 전달 증진능에는 별다른 영향이 없는 대신 세포 독성을 현저히 감소시킬 수 있다. 양이온성 지질의 함량을 대체할 수 있는 중성 인지질의 예로는 이에 제한되는 것은 아니나, 포스파티딜콜린 등을 들 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 바이러스 백터는 생체 내의 모든 생리 현상을 조절하는 생물학적 활성을 갖는 기능 조절 물질을 합성하는 유전자를 전달하는 바이러스로서, 구체적으로는 아데노바이러스, 아데노부속바이러스, 바쿨로바이러스, 파르보바이러스, 카나리폭스(canarypox virus), 백신시아바이러스(vaccinia virus), 레트로바이러스, 피코나바이러스, 알파바이러스, 렌티 바이러스 등 백터로서 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 한 구체예에서, 치료 유전자의 전달을 위해 사용할 수 있는 바람직한 바이러스 백터는 아데노바이러스 또는 아데노부속바이러스일 수 있다.

[0019] 본 발명에 따른 바이러스 백터 내에 포함될 수 있는 치료 유전자의 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 유전자 치료를 위해 적합한 것으로 알려져 있는 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 항원, 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene), 자살 유전자(suicide gene), 항혈관형성인자(anti-angiogenic factor), 전구 약물 활성화 유전자(prodrug activating gene), 면역자극 유전자(immunostimulatory gene) 및 세포분화조절 유전자 (cellular differentiation regulatory gene)로 구성되는 군으로부터 선택할 수 있다.

[0020] 하기 실시예에서 살펴볼 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 특히 바이러스 백터를 폐 조직 특이적으로 전달할 수 있다. 일반적인 바이러스 백터는 집중적으로 간에 축적되어 유전자의 간에서의 발현을 야기하는데, 본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 바이러스 백터의 폐 조직 특이적 전달을 통해 폐 표적성 유전자 치료에 효과적으로 사용할 수 있다.

- [0021] 본 발명에 따른 양이온성 에멀전을 이용하여 바이러스 벡터 내에 포함된 치료 유전자를 전달하고자 하는 타겟 세포는 특별히 한정되지 않는다. 본 발명에 따른 양이온성 에멀전을 사용하면 콕사키바이러스-아데노바이러스 수용체(Coxsackievirus and Adenovirus receptor; CAR)의 발현이 낮은 암세포 또는 줄기세포에도 효율적으로 유전자 전달이 가능하다. 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 양이온성 에멀전을 이용하면 폐 조직 특이적 전달이 가능하므로, 특히 폐암세포를 타겟으로 하는 것이 유리할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 따른 양이온성 에멀전을 바이러스 벡터의 치료 유전자 전달 증진을 위해 사용할 때, 양이온성 에멀전은 바이러스 10^7 pfu에 대해 1.75 내지 3.5 nmole의 비율로 혼합하여 사용될 수 있다. 양이온성 에멀전을 1.75 nmole보다 낮은 비율로 혼합할 경우 바이러스를 완전히 감싸지 못해 일부 바이러스가 노출되게 되며, 3.5 nmole을 초과하여 사용할 경우 잉여의 에멀전이 세포독성을 유발할 수 있으므로, 상기 범위 내에서 양이온성 에멀전과 바이러스 벡터가 혼합될 때 양이온성 에멀전-바이러스 복합체의 형성에 적절하다.
- [0023] 본 발명은 또한 상기 양이온성 에멀전에 치료 유전자를 포함하고 있는 바이러스 벡터가 도입되어 있는 양이온성 에멀전-바이러스 복합체를 제공한다. 즉, 본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 바이러스 벡터의 치료 유전자 전달 증진을 위한 보조제로서 사용자에게 의해 직접 바이러스 벡터를 혼합하여 사용할 수 있는 형태로 제공될 수 있지만, 사용자의 요청 혹은 상업적인 필요에 따라 본 발명에 따른 양이온성 에멀전에 치료 유전자를 포함하고 있는 바이러스 벡터가 이미 도입되어 있는 양이온성 에멀전-바이러스 복합체의 형태로 제공할 수도 있다. 본 발명에 따른 양이온성 에멀전-바이러스 복합체는 양이온성 에멀전과 바이러스의 단순 혼합을 통해 형성할 수 있다.
- [0024] 이러한 양이온성 에멀전-바이러스 복합체는 연구용 혹은 의료용으로 활용될 수 있다.
- [0025] 한 구체예에서, 상기 양이온성 에멀전-바이러스 복합체는 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 의약 조성물로서 제공될 수 있다. 이 경우, 바이러스 벡터를 통해 치료 유전자를 전달하고자 하는 타겟 세포는 암세포 또는 줄기세포일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 의약 조성물의 투여 경로는 적합한 모든 투여 경로가 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 양이온성 에멀전-바이러스 복합체는 양전하를 띠고 있으므로 세포 또는 조직막의 음전하와 인력이 작용하여 세포 또는 조직막에 부착, 즉 접촉하여 엔도사이토시스(endocytosis)에 의해 세포 내부로 유입될 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따른 의약 조성물은 인 비보 또는 엑스 비보에서 양이온성 에멀전-바이러스 복합체가 타겟 세포와 접촉할 수 있도록 처리된다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 양이온성 에멀전-바이러스 복합체와 타겟 세포와의 접촉은 생체 내, 생체 외, 혹은 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내 (intradermal), 점막 내 또는 흡입(inhale) 등의 경로에 의해 양이온성 에멀전-바이러스 복합체가 타겟 세포와 접촉하는 것을 의미하며, 이에 의하여 바이러스 벡터가 타겟세포의 세포질 혹은 핵 내로 전달된다.
- [0029] 본 발명의 의약 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 예를 들어 하나 이상의 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 이러한 조성물은 투여 후 활성 성분의 빠른 방출, 또는 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 제제화 될 수 있다.
- [0030] 약제학적으로 허용가능한 담체는 당업자에게 잘 알려진 여러 가지 인자에 따라 제조될 수 있는데, 예를 들면 이용된 특정 생리활성물질, 이의 농도, 안정성 및 의도된 생체이용성; 치료하고자 하는 질환 및 질병 또는 상태; 치료받을 개체, 나이, 크기 및 일반적인 상태; 조성물을 투여하는데 이용되는 경로, 예를 들어 비강, 구강, 안구, 국소, 경피 및 근육 등의 요인을 고려해야 하나, 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로 경구 투여 경로 이외의 생리활성물질 투여에 이용되는 약제학적으로 이용가능한 담체에는 D5W, 텍스트로즈 및 생리학적 염 용액의 5% 이내로 포함하는 수용액을 포함한다. 또한 약제학적으로 이용가능한 담체에는 보존제 및 항산화제와 같은 활성 성분들의 안정성을 보장시킬 수 있는 추가 성분들을 포함할 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 의약 조성물의 투여량은 의도하는 치료에 유효한 용량으로 투여된다. 특정의 의학적 질환을 치료하거나 또는 이의 진행을 억제시키는데 요구되는 치료상 유효량은 의학 분야에 공지된 예비임상 연구 및 임상 연구를 이용하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명에서 상기 사용된 용어, "치료상 유효량"은 임상의 또는 연구자가 목적하는, 특정 조직, 시스템, 및 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응을 유발시키는 활성 성분의 양을 말한다.

발명의 효과

[0032]

본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 바이러스와의 강한 결합을 통해 바이러스 표면 전하를 완벽히 차폐시키고, 바이러스와의 복합체를 안정화시켜, 바이러스 벡터의 세포에의 결합 및 유입을 증가시킴으로써 세포독성은 낮추면서 치료 유전자의 전달율은 현저히 증진시킨다. 따라서, 본 발명에 따른 양이온성 에멀전은 바이러스 벡터의 유전자 전달 효율을 향상시킬 수 있는 보조제로서 유용하게 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 이러한 양이온성 에멀전과 바이러스 벡터의 복합체는 유전자 치료를 위한 의약 조성물로서 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033]

도 1은 에멀전 중 오일의 종류가 바이러스와의 복합체 형성 후 유전자 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 2은 에멀전 중 오일의 종류가 에멀전-바이러스 복합체의 안정성에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 3은 혈청/염 존재하 리포솜 또는 요오드화 오일 함유 에멀전-바이러스 복합체의 시간에 따른 평균입자경 및 다분사도 지수의 변화를 보여주는 그래프이다.

도 4는 에멀전 중 요오드화 오일 함량이 바이러스벡터의 유전자 발현 효율에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 5는 바이러스 단독 처리군과 요오드화 오일 함유 에멀전-바이러스 복합체 처리군의 GFP 발현도를 보여주는 공초점 현미경 사진이다.

도 6은 부유성 세포에서의 요오드화 오일 함유 리포솜과 요오드화 오일 함유 에멀전의 바이러스벡터 유전자 발현 보조능을 보여주는 그래프이다.

도 7은 혈청 0, 25, 50% 조건에서의 요오드화 오일 함유 에멀전-바이러스 복합체에 의한 유전자 발현율을 비교한 그래프이다.

도 8은 리포솜 및 리피오돌 함유 에멀전의 시간(가) 및 용량(나)에 따른 배양세포주 B16-F10로의 유입정도를 비교한 그래프이다.

도 9는 바이러스 단독 또는 에멀전-바이러스 복합체를 쥐에 정맥주사 후 각 장기에서의 유전자 발현정도를 비교한 그래프이다.

도 10은 DOTAP 함량을 달리하는 요오드화 오일 함유 에멀전-바이러스 복합체에 의한 세포내 유전자 발현율(가) 및 세포독성(나)을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034]

본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0035]

[실시예]

[0036]

실시예 1. 에멀전의 제조

[0037]

3차 부틸 알코올에 DOTAP(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane)과 콜레스테롤(cholesterol), DSPE-PEG(distearoylphosphatidyl-ethanolamine-poly(ethylene glycol))를 몰비율 1:1:0.01로 혼합하여 녹였다. 이 혼합용액을 신속하게 영하 80도에서 얼린 후 동결건조기에서 동결 건조를 시행했다. 하룻밤 동안 동결건조 한 후에 얻은 고형물의 지질에 에멀전의 유상이 될 오일(하기 실시예에 따라, 스쿠알렌, 대두유, 목화씨유, 참깨유, 옥수수유, 홍화유, 요오드화 오일(리피오돌), 또는 양귀비종자유)을 11 μ l/ml의 농도로 넣어 준 후 5% 텍스트로스 용액이 녹아있는 증류수에 7 μ mole/ml의 농도가 되도록 수화시켰다. 수화된 지질 분산액을 짧게 불

텍싱하여 섞은 후 영상 37도에서 두 시간 동안 수조 형식의 초음파분산기에서 분쇄 및 균질화하여 양이온성 에멀전을 얻었다.

리포솜을 제조하는 경우는 위의 에멀전 제조 과정 중 오일을 넣는 과정을 생략하였으며, 초음파 분산기에서 분쇄 및 균질화 후 0.1~0.2 mm의 막을 장착한 extruder를 수회 통과시켜 균질도를 더욱 개선하였다.

실시에 2. 에멀전-바이러스 복합체의 형성 및 배양세포주에의 유전자발현 효율 분석

세포 내로 전달하고자 하는 목적유전자로 GFP 유전자를 포함하는 아데노바이러스와 실시예1의 방법으로 제조한 양이온성 에멀전을 바이러스 10^7 pfu당 에멀전 3.5 nmole (DOTAP:콜레스테롤:DSPE-PEG 총몰수로써 3.5 nmole에 해당하는 부피의 에멀전) 비율로 섞고 상온에서 20분간 방치하여 에멀전-바이러스 복합체를 형성하도록 했다. 마우스 흑색종 세포주B16-F10를 12 웰(well) 플레이트에 1×10^5 개 접종하였다. 하룻밤 방치 후 인산완충식염수 (PBS)로 세포를 세척하고 혈청이 25% 포함된 DMEM 배지 400 μ l를 첨가한 후, 바이러스-에멀전 복합체를 첨가하였다. 37℃의 5% CO₂ 세포배양기에서 4시간 배양한 후 PBS로 세포를 세척해 복합체를 제거하고 10% 혈청이 포함되어 있는 배지 1 ml를 다시 첨가하여 30시간을 추가적으로 배양하였다. 30 시간 뒤, 플레이트에서 배지를 제거하고 PBS로 세포를 세척한 후, 긁개(Scraper)로 세포를 긁어내 1.75 ml 튜브에 각각 세포 펠렛을 얻어 PBS으로 세포를 분산하여 2번 세척한 후 1ml의 세포배양액에 재분산시켰다. 이것을 원심분리 하여 배지를 걷어 낸 후 30 분간 1% 파라포름알데히드 용액 1 ml로 세포를 고정, 다시 원심분리 하여 상층액을 제거하고 고정된 세포를 PBS에 분산시켰다. 분산된 세포에서의 GFP 발현도는 유동세포 분석법 (flow cytometer method)을 이용해 530 nm에서 표본 당 만개의 형광 수를 측정하였다.

실시에 3. 에멀전 중 오일의 종류가 바이러스 벡터의 유전자발현능 증진도에 미치는 영향

일반적으로 수중유형 에멀전의 내부 유상이 될 오일의 성질이 에멀전의 안정성 및 에멀전-바이러스 복합체의 안정성에 영향을 미쳐 결국 바이러스벡터에 의한 유전자 발현 효율에 영향을 미친다. 이를 고찰하기 위하여 실시예 1의 방법으로, (단 DSPE-PEG 없이, DOTAP:Chol사용) 8종의 오일을 내부 유상으로 11 μ /ml 농도로 각각 함유하는 8종의 에멀전을 제조하고 이를 실시예 2의 방법으로 에멀전-바이러스 복합체를 형성시킨 후 마우스 흑색종 세포주 B16-F10에 투여하여 GFP발현도를 분석하였다.

도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 에멀전과의 복합체 형성에 의해 바이러스 단독 투여시 보다 GFP발현도가 현저히 증가하였으며 에멀전 중 특히 요오드화 오일인 리피오돌(lipiodol)을 내부에 함유하는 에멀전의 경우 GFP발현도가 가장 우수하였다.

실시에 4. 에멀전 중 오일의 종류가 에멀전-바이러스 복합체의 안정성에 미치는 영향

리피오돌, 스쿠알렌, 홍화유 또는 양귀비씨유를 포함하는 에멀전과 바이러스를 바이러스 2×10^9 pfu당 에멀전 중 지질 (DOTAP+Chol) 350 nmole의 비율로 섞어 실시예2에 따라 에멀전-바이러스 복합체를 형성시켰다. 각각의 복합체를 0.5% 혈청이 포함된 4 mM 인산염완충액 PBS (pH 7.4) 1 ml로 희석하고 37도에 방치하면서 시간에 따른 복합체 입자의 크기 변화를 FPAR-1000 (동적광산란법)로 측정하였다.

그 결과, 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 방치시간에 따라 복합체의 크기가 증가되어 나타나는 경향을 보였지만 이 중 요오드화 오일인 리피오돌을 함유하는 에멀전-바이러스 복합체의 경우 그 증가도가 가장 낮았다이는 요오드화 오일 함유 에멀전의 염/혈청의 환경에서의 우수한 안정성을 시사하는 것이다. 도2 중 홍화유의 경우는 복합체의 시간에 따른 급격한 응집으로 60 분에서의 입자경 측정이 불가능하였다. 도 2내 삽도는 에멀전-바이러스 복합체 형성 전 에멀전의 평균 입자경을 보여주는 그래프이다. 요오드화 오일 함유 에멀전은 그 자체로서의 입자경은 다른 오일 함유 에멀전에 비해 큰데 반해, 바이러스와의 복합체 형성 후에는 다른 오일 함유 에멀전에 비해 오히려 입자경이 작아진다. 이는 바이러스와 더 단단한 복합체를 형성하기 때문으로 여겨진다.

실시에 5. 요오드화 오일 함유 에멀전-바이러스 복합체의 표면 전하, 입자경, 안정성 등 물리화학적 성질 분석

및 리포솜 복합체와의 비교

[0048] 실시예1에 따라 요오드화 오일을 11 ul/ml의 농도로 넣고 DOTAP+Chol+DSPE-PEG로 제조한 양이온성 에멀전을 바이러스와 실시예2의 방법으로 에멀전-바이러스 복합체를 형성시킨 후 형성 전 후의 입자경 및 표면 전하의 변화를 분석하였다. 표면전하 평가를 위해서는 각 샘플을 탈이온수로 1 ml의 부피로 희석하여 제타전위 측정기(Zen 600 zetasizer)를 이용해 측정하였다.

[0049] 아데노바이러스 단독의 입자경은 105 nm, 표면 전하는 -18.5 mV였고, 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 내부에 유상 없이 에멀전과 똑같은 조성으로 제조한 리포솜의 경우 복합체의 표면전하가 리포솜-바이러스 결합에 의해 +54.7에서 +39.8로 감소되었지만 리피오돌 함유 에멀전-바이러스 복합체의 경우는 +64.2에서 +60.5 로 거의 변하지 않아 리피오돌 함유 에멀전이 바이러스 표면의 음성 하전을 거의 차폐할 정도로 강한 결합을 이루었음을 보여준다.

표 1

[0050] 아데노바이러스와 복합체 형성 전 후의 양이온성 지질 수송체들의 평균입자경, 다분산도 지수 및 표면전하.

	평균입자경 (nm)		다분산도 (Polydispersity index)		표면 전하 (mV)	
	바이러스(-)	바이러스(+)	바이러스(-)	바이러스(+)	바이러스(-)	바이러스(+)
리포솜	168±22	175±220	0.198±0.043	0.209±0.067	+54.7±2.1	+39.8±6.6
에멀전	182±37	197±19	0.207±0.026	0.308±0.039	+64.2±1.7	+60.5±1.5

[0051] 한편, 요오드화 에멀전-바이러스 복합체 및 리포솜-바이러스 복합체를 각각 실시예4의 방법으로 혈청/염 존재시의 복합체의 안정성 변화를 평균입자경 변화에 의해 분석하였다.

[0052] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 리포솜 복합체(L complex)의 경우에 비해 에멀전 복합체 (E complex)의 경우 혈청/염 존재시 시간에 따른 입자경 및 다분산도의 증가가 훨씬 적어서, 요오드화 오일 함유 에멀전-바이러스 복합체가 보다 안정함을 보여주었다.

실시예 6. 요오드화 오일 함유 에멀전 중 요오드화 오일 함량이 바이러스 벡터의 유전자 발현도에 미치는 영향

[0054] 요오드화 오일 함유 에멀전의 우수한 바이러스 보조능이 요오드화 오일 함량에 따른 비중 증가와 관련 있는지 확인하기 위하여 각각 0, 6, 11, 23 ul/ml의 리피오돌(0.72, 1.43, 2.86 중량%) 함유하는 에멀전을 실시예1의 방법으로 제조 후 실시예 2의 방법으로 GFP 발현도를 측정하였다.

[0055] 그 결과, 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 요오드화 오일 함량 11 ul/ml까지는 발현도가 증가하였으나 23 ul/ml에서는 오히려 다소 감소하여서 요오드화 오일 11 ul/ml 농도에서 바이러스 보조능이 최대에 달함을 알 수 있었다. 이는 요오드화오일 에멀전의 우수한 바이러스 벡터 보조능이 복합체의 비중 증가에 의한 것은 아님을 시사한다.

[0056] 도 5는 바이러스 단독 처리군과 요오드화 오일(리피오돌 11 ul/ml) 함유 에멀전-바이러스 복합체 처리군의 GFP 발현도를 보여주는 공초점 현미경 사진이다. 도 5로부터 요오드화 오일 함유 에멀전의 우수한 바이러스 보조능을 가시적으로 확인할 수 있다.

실시예 7. 부착성/부유성 세포주에서 요오드화오일 에멀전의 바이러스벡터 보조능 비교분석

[0058] 요오드화 오일 함유 에멀전의 우수한 바이러스벡터 보조능이 만일 비중 증가로 인해 야기되는 것이라면, 보조능은 부착성 세포주와는 달리 부유성 세포주에서는 리포솜과 유사하게 나타날 것이라는 점에 착안하여, 이를 고찰하기 위해 부유성 세포(HL-60)를 이용하여 요오드화 오일 함유 에멀전의 바이러스벡터 보조능을 분석하였다.

[0059] 요오드화 오일 존재 여부만 달리하고 동일한 DOTAP/CHOL/DSPE-PEG 조성으로 실시예1에 따라 제조한 에멀전과 리포솜을 각각 바이러스와 섞어서 동일조건(혈청 0%)에서 복합체를 형성시킨 후 세포주에의 GFP발현도를 실시예2의 방법으로 측정하였다. 그 결과, 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 요오드화오일 에멀전의 바이러스벡터 보조능은 부유성 세포주에서도 리포솜의 경우보다 우수하여서 리포솜 복합체, 에멀전 복합체를 형성한 경우 바이러스

스 단독을 사용한 경우보다 각각 4.8 배, 15.3 배 GFP발현 세포주 %가 증가하였다.

실시에 8. 혈청 존재 하 요오드화 오일 에멀전의 보조능 비교 분석

바이러스의 세포로의 uptake를 위한 세포막으로의 결합은 주변에 혈청 등 존재시 단백질등의 결합에 의해 저해되므로, 일반적으로 바이러스성 벡터를 이용한 유전자전달은 일시적으로 세포배양액 중 혈청을 제거한 후 시행하게 된다. 또한 바이러스를 다른 양이온성 보조제와 결합시킨 복합체를 사용하는 경우도 단백질 등에 의해 복합체의 응집 등이 일어나 혈청 존재시 세포로의 유전자전달효율은 매우 저해되어 나타나며, 이는 바이러스 단독 또는 복합체를 유전자치료용 벡터로 사용하기 위해 동물에 정맥투여 시 매우 낮은 유전자 전달율로 이어질 수 있다.

이에 본 실시예에서는 요오드화 오일 함유 에멀전이 다양한 혈청 조건에서 바이러스벡터 보조능이 어떻게 변화하는지 알아보고자 하였다. 이를 위해, 실시예1의 방법에 따라 제조된 DOTAP:CHOL:DSPE-PEG 조성의 리피오돌 11 ul/ml 함유 에멀전을, 바이러스 고정량과 섞어 에멀전-바이러스 복합체를 형성시켰다. 그런 다음, 상기 복합체를 B16-F10 세포주에 각각 혈청 0, 25, 50% 조건에서 트랜스фек션 시켰다.

그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 혈청을 함유하는 경우 오히려 GFP발현 세포주%가 증대되어 나타났다. 혈청을 50% 함유하는 배지는 in vivo 생리적 조건을 가장 근접한 것으로 알려져 있어 이 결과는 요오드화 오일 함유 에멀전이 in vivo 조건에서도 우수한 바이러스벡터 보조능을 보여줄 가능성을 시사한다.

실시에 9. 요오드화 오일 함유 에멀전의 세포로의 uptake 비교 분석

양이온성 지질 수송체 복합에 의한 바이러스벡터의 유전자 전달 증진은 양이온성 지질-음성 하전의 세포막 사이의 정전기적 인력에 의한 것으로 알려져 있다. 본 실시예에서는 요오드화 오일 함유 에멀전의 우수한 유전자 전달 증진능이 요오드화 오일을 함유하지 않는 리포솜의 경우보다 세포막으로의 결합/uptake가 더 우수하여 나타나는지 고찰하기 위하여 리포솜 및 리피오돌 함유 에멀전의 시간 및 용량에 따른 배양세포주 B16-F10로의 유입 정도를 비교하였다.

유입 정도의 비교를 위해 전체 지질의 0.5 mol%가 되게 형광물질인 로다민으로 표지된 인지질 phosphatidylamine (Rho-PE)을 다른 지질과 같이 섞어 실시예1의 방법으로 리포솜 또는 에멀전을 제조하였다. 12 웰(well) 플레이트에 1×10^5 개 접종한 후 하룻밤 방치한 B16-F116 세포주를 인산염 완충액으로 세척하였다. 이어서 혈청이 없는 DMEM 배지 400 μ l를 첨가한 후, DOTAP 기준으로 14 nmole의 리포솜 또는 에멀전을 세포에 처리하고 37℃의 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양했다. 10분, 1시간, 4시간 후 플레이트를 꺼내 실시예 2와 같이 로다민-PE가 uptake된 세포의 유동세포 분석을 위한 전처리를 한 후 543nm 여기 파장에서 세포로 로다민이 유입된 정도를 측정하여 이를 도 8(가)에 나타내었다. 또한 리포솜 또는 에멀전을 세포에 처리 후 배양시간을 4시간으로 고정하고 처리량을 DOTAP 기준으로 3.5, 7, 14 nmole로 늘려 로다민이 표지된 리포솜 또는 에멀전이 세포로 흡수된 값을 유세포분석기로 측정한 결과를 도 8(나)에 나타내었다. 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이, B16-F10세포로의 리포솜과 에멀전 uptake 증가는 시간, 용량 의존적으로 증가하였으며 특히 에멀전 uptake는 리포솜에 비해 동시간, 동량에서 더욱 높았다.

실시에 10. 동물에서의 요오드화 오일 함유 에멀전-바이러스 복합체의 유전자 발현능 분석

6주령 C57BL6 마우스 15마리를 무작위로 하기 세 군으로 분류 후 시료를 각 군의 쥐 꼬리에 정맥주사하였다.

실험군 I: 1×10^9 pfu의 바이러스 (Ad-luc, 루시페라아제 유전자를 지니는 아데노바이러스)를 100 ul로 희석하여 투여한 군

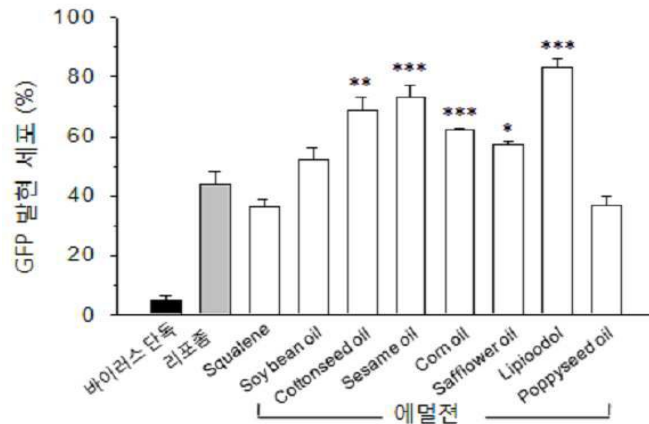
실험군 II: 실험군 I과 동량의 바이러스를 요오드화 오일 함유 에멀전 50 ul와 섞어 에멀전-바이러스 복합체를 형성시킨 후 부피를 100 ul로 희석하여 투여한 군

실험군 III: 인산염완충액 100 ul을 투여한 군

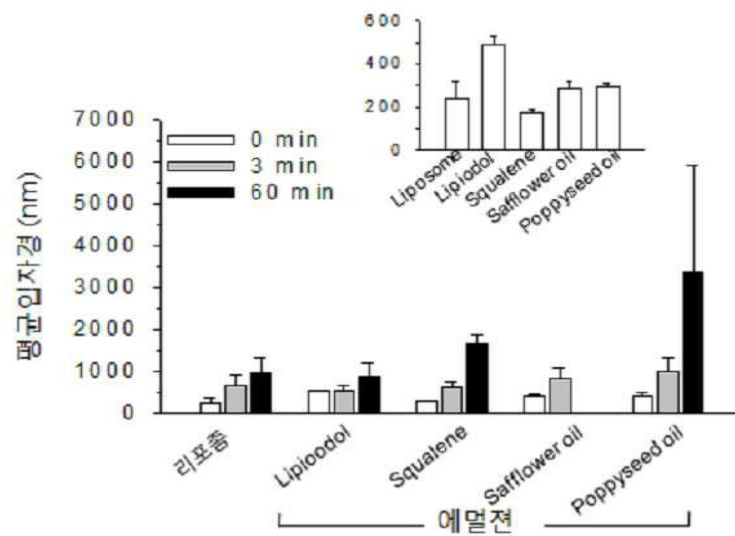
- [0072] 24 시간 후 쥐의 각 장기 (심장, 간, 폐, 비장 및 신장)를 취해 각 장기를 적당히 자른 후 액체 질소를 조금씩 끼얹으며 더 작게 분쇄하였다. 간 샘플을 각각 튜브로 옮겨 ice-cold Luciferase Cell Culture Lysis 2X Reagent (Promega Corp., Madison, WI)를 간의 경우 1 ml, 다른 장기의 경우 0.5 ml 넣은 후 조직분쇄기 (IKA-Werke, Stufen, Germany)로 갈았다. 원심분리 후, 상등액을 분리하여 상등액 중 존재하는 루시페라아제의 양을 luciferase의 활성으로 분석하기 위하여 상등액에 Luciferase Assay Reagent (Promega Corp., Madison, WI)를 가하고 시약제조자의 프로토콜에 따라 분석하였다. 분쇄한 조직 각 샘플 중 단백질 함량을 Bio-Rad protein Assay kit (Hercules, CA, USA)로 측정하여 각 샘플 간의 양 차이를 보정하였다.
- [0073] 실험 결과, 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, 에멀전 복합체 투여 후 루시페라아제가 가장 많이 발현된 장기는 폐였고 이어서 비장, 간, 심장 및 신장의 순이었다. 복합체 투여 후 폐의 루시페라아제 발현량은 바이러스 단독의 경우보다 62배 증가하였으며 간과 비장에는 오히려 16배 및 3배 감소하였다.
- [0074] 이러한 결과는 에멀전 복합체가 아데노바이러스의 집종적 간 축적에 의한 간에서의 발현을 억제하고 대신 폐에서의 발현을 촉진시켜서 간 독성 감소 효과와 함께 폐로의 표적성 유전자 치료에 효과적일 수 있음을 시사한다.
- [0075] **실시예 11. 요오드화 오일 함유 에멀전 내 양이온성 지질의 함량 최적화에 의한 세포독성의 감소**
- [0076] 양이온성 지질은 세포내로 유입 시 세포독성을 야기하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 실시예에서는 더 소량의 양이온성지질(DOTAP)을 함유하는 에멀전을 제작하고, 이러한 에멀전이 여전히 우수한 유전자발현보조능을 유지하면서도 세포독성은 더욱 감소시킬 수 있는지 확인하고자 하였다. 이를 위해, 실시예 1의 방법으로, DOTAP의 함유량만을 1.0, 0.7, 0.5 및 0.3 μmole 로 달리하되 대신 디미리스토일포스파티딜콜린(dimyristoylphosphatidylcholine, DMPC)을 0.03, 0.5, 0.7 μmole 함유하여 DOTAP+DMPC의 양은 1 μmole 로 고정된 4 종의 요오드화 오일 함유 에멀전(이하 DOTAP 1 에멀전, DOTAP 0.7 에멀전, DOTAP 0.5 에멀전, DOTAP 0.3 에멀전이라 함) 및 요오드화 오일을 함유하지 않는 DOTAP 0.5 리포솜 (DOTAP:DMPC:콜레스테롤:DSPE-PEG=0.5:0.5:1:0.01)을 제조하고, 이를 실시예 2의 방법으로 바이러스 고정량과 복합체를 형성 (바이러스 10^7 pfu당 DOTAP+PC :콜레스테롤:DSPE-PEG 3.5 nmole에 해당하는 양의 리포솜 또는 에멀전)시킨 후 마우스 흑색종 세포주 B16-F10에 처리하여 GFP발현도를 분석하였다.
- [0077] 도 10(가)에서 볼 수 있는 바와 같이, 바이러스 단독 및 DOTAP 0.5 리포솜 복합체 처리시 각각 2.3, 2.8%의 GFP 발현세포주가 관찰되었으나 DOTAP 0.5 에멀전을 처리시 약 78%의 세포주가 관찰되었고 이 정도는 DOTAP 1 에멀전을 투여한 경우와 유사하였다.
- [0078] 한편, 에멀전 또는 리포솜을 세포에 가해 48시간동안 배양 후 세포의 생존율을 측정한 결과, 도 10(나)에서 볼 수 있는 바와 같이, DOTAP 1 에멀전에 비하여 DOTAP 0.5 에멀전은 동량에서 현저히 감소된 세포 독성을 보였다. DOTAP 0.5 에멀전은 DOTAP 0.5 리포솜에 비해선 다소 증가된 세포독성을 보였는데 이는 요오드화 오일에 의해 세포독성 원인물질인 DOTAP의 세포내 유입량이 증가되었기 때문이라 생각된다.
- [0079] 종합하면, DOTAP:PC:CHOL:DSPE-PEG = 0.5:0.5:1:0.01의 비율로 된 혼합물로 안정화되고 내부에 11 $\mu\text{l/ml}$ 의 요오드화오일을 가지는 에멀전이 가장 우수한 보조능과 가장 적은 독성을 가지는 전달체로 평가되었다.

도면

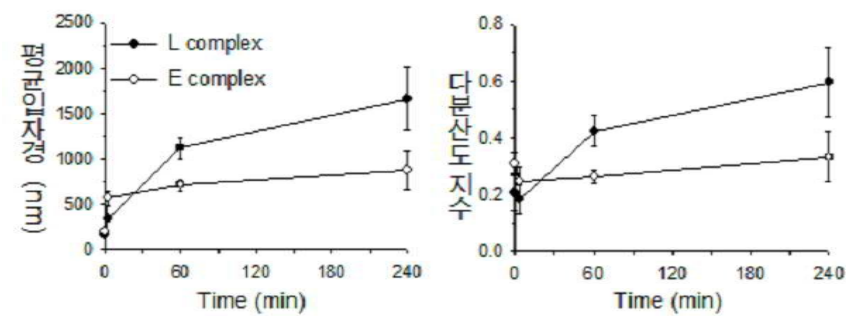
도면1



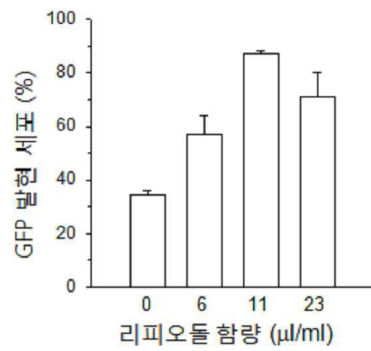
도면2



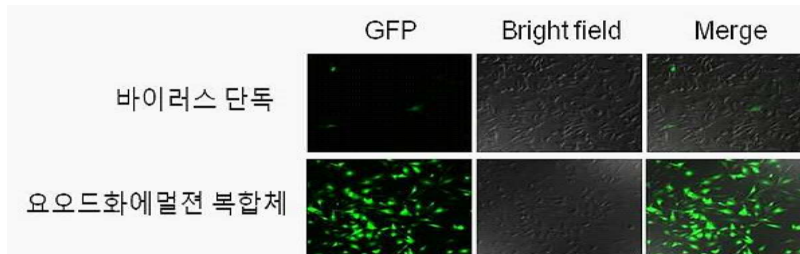
도면3



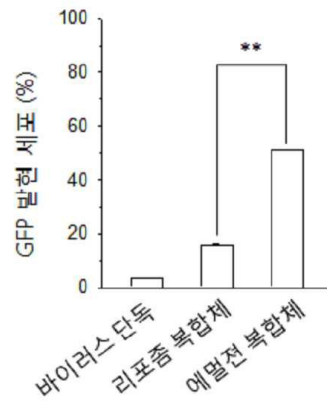
도면4



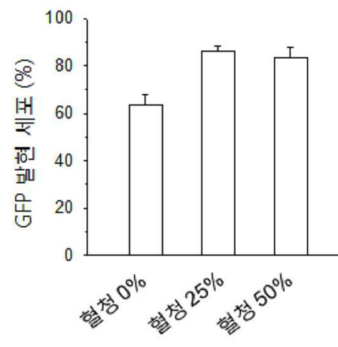
도면5



도면6

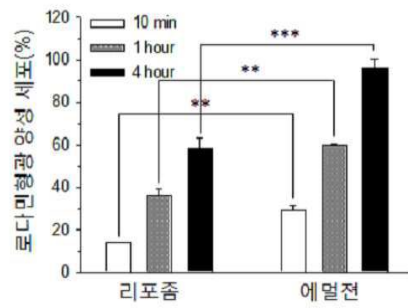


도면7

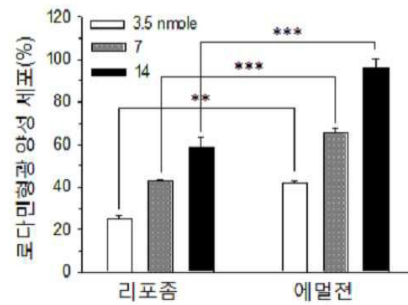


도면8

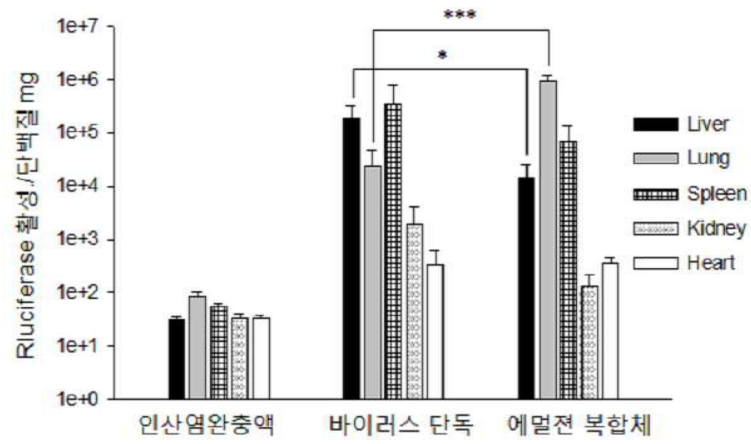
(가)



(나)



도면9



도면10

