(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 47/36

(11) 공개번호 특2000-0023716
(43) 공개일자 2000년04월25일

(21) 출원번호	10-1999-7000176
(22) 출원일자	1999년01월11일
(30) 우선권주장	9614441.5 1996년07월10일 영국(GB)
	9614471.2 1996년07월10일 영국(GB)
(71) 출원인	웨스트 파머슈티컬 서비스 드러그 딜리버리 앤드 크리니컬 리써치 센터 리미티드
	영국 노팅검 엔지7 2티엔, 유니버시티 부러바드, 노팅검 사이언스 앤드 테크놀로지 파크, 알버트 아인슈타인센터
(72) 발명자	일럼 리스베쓰
	영국 노팅검 엔지7 1비에이, 더 파크, 19 카벤디쉬 크레센트노쓰
(74) 대리인	정태련, 조담, 한인열

심사청구 : 없음

(54) 상피세포로의 유전자전달에 적합한 조성물

요약

크기가 10㎚~1㎛이며 표면전하를 가지는 키토산 및 DNA의 미립복합체로 구성된 조성물

대표도

도2

명세서

기술분야

본 발명은, 양이온성 고분자, 키토산(폴리글루코사민),에 기초한 새로운 비바이러스성 벡터(non-viral vector)에 관한 것이다.

배경기술

유전자치료는 의학적 치료에 있어서 획기적인 기회를 제공한다. 시험관내 및 생체내 세포내로의 적절한 유전자삽입은 신체내에서 복잡한 약물들을 생성시키는 수단일 뿐 아니라 유전적인 질병치료에 유리하다. 유전자치료를 위한 다양한 응용은 그 주제에 대한 평론잡지들에 기술되어 있다(참고로 예를 들면 에반스 등(Evans et al),(1995) British Medical Bulletin 51, 226~234 및 월프(편집인) 유전자치료학, Methods

and Applications of Direct Gene Transfer. Birkhauser, 1994).

유전자치료에 있어서 주요문제는 DNA구조를 표적기관에 효과적으로 전달하는 것과 DNA가 적절한 세포에 받아들여져서 발현을 일으키는 것이다. 실제로 새로운 전달시스템에 대한 요구는 성공적인 유전자치료에 있어서 주요문제로 인식되었다. (참고로 예를 들면 윌슨 (1993) Nature 365, 691, Ledley (1994) Current Opinion in Biotechnology, 5 626~636). 이러한 유전자전달시스템을 때로는 벡터라고 부른다. 이러한 벡터들은 두가지 타입으로 대분될 수 있다 ; 바이러스성과 비바이러스성(참고로 예를 들면 쉬필드 및 카스키(1995) British, Medical Bulletin 51, 56-71)

매우 다양한 비바이러스성 벡터들이 선행기술에서 기술되어 있다. 양이온고분자뿐만 아니라 DOTMA (염소 N[1-(2,3-디오레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄과 같은 단양이온성지질이 여기에 포함된다. 유전자전달용으로 가장 공지된 고분자는 폴리리신이지만 독성이 있다고 알려져 있다. 덴드리머(dendrimer)와 같은 복잡한 구조를 포함한 기타 양이온성 고분자들이 기술되어 있다(헨슬러 및 스조카 (1993) Bioconjugate Chem 4, 372~379).

염증성대장질환을 포함한 장염치료를 위한 향상된 항염성 펩티드 발현 유전자치료모델이 기술되었다(피자로 (Pizarro), T1(1996) ; IBC Conference of Inflammatory Bowel Disease, June 3, 1996, Philadelphia USA). 위장병학에서의 유전자 치료법의 이용에 관하여는 단드하 및 레모인(Dandha and Lemoin (1996) Gut 38, 141~145)에 의해 검토되었다. 선행기술은 비바이러스성벡터를 이용한 위장관에 유전자생성물을 전달하기 위한 방법을 기술하고 있다. 직장주입되는 리포좀시스템(웨스트브룩 등(Westbrook et al), (1994) Human Molecular Genetics, 3, 2005~2010) 및 완만한 방출캡슐(WO93/19660)도 포함된다.

일반적으로 DNA를 상피표면에 전달시켜 발현하는 수준은 낮고 어떤 경우에는 적절하지 못한 리포터 유전자를 사용함에 따라 그 결과의 혼동이 있었다. 예를 들면 위장관에서의 베타-갈락토시다제의 발현은 그 효소의 내성수준(endogenous level) 및 그릇된 양성결과를 줄수 있는 기타 요인들로 인하여 크게 영향받을 수 있다. 표지 CAT(클로람페니콜 아세틸 트랜스페라제)가 세균성 기원때문에 발현의 좋은 리포터로 고려되어 진다.

본 발명자들은, 놀랍게도, DNA와 필수적인 키토산(폴리글루코사민)을 복합화함으로써 모델동물(토끼)의 상피조직에서의 발현수준을 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

생체막을 통과하는 펩티드와 저분자량 극성분자들의 향상된 흡수 및 이에 따른 향상된 치료효과를 위한 새로운 물질로써 키토산은 선행특허출원들에서 이미 기술된 바 있다 (참고로 일룸등(Illum et al), (1994) Pharmaceutical Research 11, 1186~1189, 알털손 등(Artursson et al, (1994) Pharmaceutic Research 11, 1358~1361). 키토산 및 폴리펩티드 약물과 같은 치료제와의 복합체 역시 기술된 바 있다 (PCT/GB90/00291). 항원(GB96/03019) 또는 약물(WO96/05810)로 작용하는 폴리펩티드발현을 위하여 DNA를 세포로 전달함에 있어서의 용도로 키토산 및 DNA와의 복합체가 기술되었다. 그러나, 달성된 발현수준은 충분히 특정되지 않았고, 복합체는 DNA전달 및 발현용으로 최적화 되지 않았다. WO96/05810에서 기술된 실시예는

교차결합되거나 또는 되지 않은 채, 스프레이건조, 에멀젼화, 용매증발 또는 알카리조건으로의 노출에 의한 침전에 의하여 조제되었다. 키토산 및 DNA로 구성된 미소입자조제방법은 GB96/03019에 상세히 기술되어 있지 않다.

요약하면, 이러한 선행기술방법들은, 나노입자형태이며, 따라서 상피세포와 같은 세포에 의해 용이하게 받아들여질 수 있는 DNA 및 키토산의 완전 혼합물로 구성된 조성물조제에는 이용될 수 없다.

다른 분자량들의 키토산들을 포함한 양이온성 고분자에 의한 플라스미드 DNA의 응축(Condensation)은 뭄퍼 등(Mumper et al in Proc. Intern. Symp. Control, Rel. Bioact. Mater., 22, 325 (1995))에 의해 기술되었다. 이들 연구는 치밀화된 DNA와 근육세포와의 상호작용에 중점을 둔 시험관내연구였다. 키토산-DNA 복합체의 생리화학적 평가는 근육(근세포) 세포계통의 시험관내 트렌스펙션이 약한 것으로 기술된다. 생체내에서의 데이타는 제시되지 않았다. 더 중요하게는, 키토산:DNA복합체는 상피세포의 트랜스펙션, 특히 점막면역 응답에 중요한 역할을 하는 세포 및 구조체의 트렌스펙션에 특히 유리할 수 있다는 것은 언급 또는 제안된 바 없다.

본 발명에서는, 핵산 및 키토산으로 구성된 미소구체가 이후 기술된 바와 같이 더이상의 처리를 요하지 않고 핵산 및 키토산을 함께 혼합하는 새로운 방법에 의하여 조제된다. 본 발명에서는, 키토산이 플라스미드 DNA를 10㎚~1㎛ 범위의 나노입자로 치밀화시키고 치밀화된 물질에 적절한 표면특성을 부여하여 그 입자를 표적세포표면에 충분히 부착시키고 이후 세포내이입을 통하여 암호화된 물질을 발현시킨다고 믿어진다.

본 발명자들은 위장관, 질, 직장, 비강, 폐 및 구강과 같은 상피조직에서의핵산발현을 향상시키기 위한 비바이러스성 벡터로써의 키토산복합체의 용도를 기술한다. "핵산"이라는 용어는 나선되거나 나선되지 않은, 100염기쌍 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함한 핵산, 특히 DNA, 이들의 플라스미드 또는 코스미드를 의미한다.

본 발명자들은, 놀랍게도, 여기에 기술된 키토산 복합체가 위장관의 장간막(mesentery) 림프절 및 코의 배농성 림프절에서 핵산의 발현을 향상시키는 것을 알 수 있었다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 첫번째 측면은 크기가 10㎚~1㎛이며 표면전하를 가진 키토산 및 핵산의 미립복합체로 구성된 조성물이다. 핵산이 DNA일때, DNA:키토산 비율이 1:6~1:6사이이면 표면전하가 +10㎷ 이상이고 그리고 기타 DNA:키토산 비율이면 +20㎷이상이 바람직하다.

핵산-키토산 복합체 크기는 10㎚~1㎛, 바람직하게는 20㎚~700㎚, 가장 바람직하게는 50㎚~500㎚이다

(유체역학적 직경, 광자상관분광법으로 측정).

"키토산"이라는 것은 폴리글루코사민 및 다른 분자량과 아세틸화도의 글루코사민물질의 올리고머를 의미한다. 특히 폴리에틸렌글리콜과 복합된 변경키토산은 이 정의내에 포함된다.

저점도 및 중점도 키토산(예를 들면 CL113, G210 및 CL110)는 프로노바 바이오폴리머사, 영국(Pronova Biopolymer, Ltd., UK); 사이기카구 아메리카사 (Seigagaku America Inc., MD, USA) ; 메론(인디아) Pvt 사 (Meron (India) Pvt, Ltd., India) ; 반손사(Vanson Ltd, VA, USA) ; 및 AMS 바이오테그노로지사 영국(AMS Biotechnology Ltd., UK)등으로부터 입수될 수 있다.

기술된 키토산-핵산 복합체는 다음 방법에 의해 조제될 수 있다. 조제방법은 두 성분의 혼합으로 이루어지며, 혼합속도, 출발용액의 상대농도, 두 성분의 비율, pH, 이온세기 및 온도가 요구되는 입자크기 및 전하를 얻을 수 있도록 비발명적으로 조절될 수 있다. 이하 설명된 바와 같은 기술에서의 숙련가에게 공지된 테크닉을 이용하여 입자크기 및 전하는 용이하게 결정될 수 있다. 혼합속도, 출발용액의 상대농도, pH, 이온세기 및 온도는, 예를 들면 이하 설명된 바와 같이, 입자크기를 조절하기 위한 표준실험설계의 일부분으로써 변경될 수 있다. 두 성분의 비율역시 크기 및 표면전하를 조절하기 위하여 이용될 수 있다. 핵산 및 키토산간의 중량비는 1:1～1:25일 수 있으며, 바람직하게는 1:2～1:20이며 가장 바람직하게는 1:5～1:6범위이다.

핵산-키토산 복합체의 크기 및 크기분포는 PCS100분광기가 있는 말번4700 초미세입자분석시스템(Malvern Instruments, UK)을 사용하여 광자상관분광법(PCS)으로 결정될 수 있다. 샘플은 증류수로 희석되고 90。산란각에서 25℃에서 측정된다. 크기분포는 다분산성지수(PI)로 결정된다.

본 발명자들은 키토산 분자량이 치밀화된 핵산복합체의 크기에 영향을 준다는 것을 알았고, 실제로 복합체 크기에 영향을 주도록 키토산분자량을 선택할 수 있다. 이러한 목적으로, 울펄트와 세이몰(Wolfert and Seymour (1996) Gene Therapy3, 269-273)에 의해 기술된 에티디움브롬 형광법을 이용하여 연구가 수행될 수 있다. 에티디움브롬은 핵산과 상호작용하여 강한 형광을 보인다. 복합화시키는 양이온성고분자가 첨가될 때, 에티디움브롬이 복합체로부터 빠져나와서 형광이 감소된다. 첨가된 고분자정량에 대한 형광 플롯(plot)은 치밀화과정(형광손실은 치밀화도의 지수)를 평가하는데 이용될 수 있으며, 따라서 복합화제 키토산종의 적절한 분자량을 선택하는데 이용될 수 있다. 형광은 예를 들면 펄킨-엘머 3000 형광분광기(Perkin-Elmer 3000 Fluorescence Spectrometer)를 이용하여 측정될 수 있다. 광학방출파장은 591㎚로 셋팅시키고 광학여기파장은 366㎚로 셋팅된다. 에티디움브롬(EtBr)이 큐벳(참조)중의 물에 첨가되고, 핵산용액 및 에티디움브롬이 두번째 큐벳(테스트)중의 물에 첨가된다. 참조큐벳의 형광도는 0으로 셋팅된다. 테스트큐벳에 대하여 얻어진 형광이 측정된다. 그후 매우 적은 양의 키토산 샘플을 일정하게 저으면서 테스트 큐벳에 첨가하고 형광측정을 3번하며, 각 측정간 키토산샘플을 빈셀로 되돌린다.

키토산 분자량은 바람직하게는 500～500,000달톤(Dalton)이고, 더 바람직하게는 700～250,000달톤이고 가장 바람직하게는 1,000～150,000 달톤이다.

다른 저분자량의 키토산은 키토산나제를 이용한 키토산 효소분해로 얻어지거나 또는 아질산을 첨가하여 얻어질 수 있다. 두 절차 모두 이 분야의 당업자에게 잘 알려져 있으며, 최근 간행물에 기술되어있다(리 등, Li et al, (1995) Plant Physiol ; 알란 및 페이론(Allan and Peyron), (1995) Carbohydrate Research 277, 257～272 ; 다마드 및 칼티어(Damard and Cartier), (1989) Int. J. Biol. Macromol. 11, 297～302).

복합체가 ＋1㎷이상의 표면전하를 가지는 것이 바람직하다. 더 바람직하게는 표면전하가 ＋2㎷～＋100㎷ 범위이고, 더 바람직하게는 ＋5㎷～＋60㎷이고, 특히 ＋20㎷～＋60㎷이다. 입자들의 표면전하는 제타전위로 표현된다. 이것은 pH 7.4와 0.01M이온세기에서 결정된다. 제타전위는 예를 들면 말번제타사이저 IV (Malvern Zeta Sizer IV (Malvern, UK))를 이용한 레이저 도플러 풍속법(LDA)로 측정된다. 레이저 도플러 풍속법은 인가된 전기장에서 움직이고 있는 입자들로부터의 산란레이저빛을 검출한다. 사용될 수 있는 장비는 예를 들면 말번제타사이저II(말번장비사)(Malvern ZetaSizer II(Malvern Instruments))일 수 있다.

전기영동이동도 측정은 핵산-키토산 복합체를 일정이온세기인 0.01M인 100㎍～1㎎인산염 또는 맥일베인(McIlvaine)완충용액 10㎖중에 분산시켜 이루어졌다. 100V 전압, 50㎜의 전극간극 및 78.54의 유전상수에서 PC4 와이드 모세셀을 이용하여 4번 측정된다.

핵산은 모두 핵산일 수 있다. 바람직하게는 DNA이다. 더 바람직하게는 100염기쌍이상의 DNA올리고뉴클레오티드 또는 플라스미드 또는 코스미드이고, 이들은 나선 또는 나선되지 아니될 수도 있다. 핵산은 발현될 수 있다. 예를 들면 요구되는 숙주세포에 의한 발현을 위하여 적당한 방향과 올바른 해독틀(reading frane)들에 삽입물(insert)를 가진 플라스미드와 같은 DNA발현벡타일 수도 있다. 이러한 DNA의 예는 진메디신, 휴스톤, 미국(GeneMedicine, Houston, USA)에서 제공되는 CMV프로모터에 의해 추진되는 리포터 유전자 플라스미드 pCAT-DNA이다.

핵산은 선천성 또는 후천성 질병에 대한 치료제로 작용될 수 있는 유전자 생성물을 암호화하며, 크론병(Crohn's disease), 궤양성결장염, 천식, 낭성섬유증 및 암과 같은 국부적인 병을 치료하기 위한 치료제도 포함될 수 있다.

예로는 항감염제, 항염제, 예방제, 및 체액 및 세포중재응답을 일으키는 항원, 즉 백신으로 예정된 항원물질이 포함된다. 핵산은 바이러스성, 세균성 또는기생체 단백질을 암호화 하고 따라서 파상풍, 디프테리아, 백일해 및 인플루엔자와 같은 질병에 대한 예방접종에 유용할 수 있다. 유전자생성물은, 이에 국한되는 것은 아니지만, 알파1-안티트립신, 성장호르몬 생성효소, 인자Ⅷ, 인자IX, TNF, 시토킨, 항원유전자(헤파티티스 B, 인플루엔자, 콜레라), 낭성섬유증 막횡단전도도조절인자 CTER, 암유전자(p53, K-ras, HS-Ek), 수크로즈-이소말타아제, 락타아제-플로리진 히드로라제 및 말타아제-글루코아밀라아제를 포함한다.

본 발명에서 기술하는 핵산-키토산제제는 내피표면 또는 조직, 특히 근육 또는 관절 및 폐(에어로졸화에

의해)와 같은 신체부위에 전달될 수 있다. 이들은 비강, 폐(폐의 모든 부위 포함), 질, 자궁 또는 위장관의 다른 부위(구강,식도, 위, 소장, 대장(결장), 소화관관련림프조직(파이에르샘(Peyer's patchs) 및 결장림프소절) 또는 직장의 상피표면과 같은 상피표면에 적용될 수 있다. 특히 상피표면은 비점막, 코관련림프조직(편도선 및 발다이어환, (Waldayer's ring))일 수 있고, 또한 상피표면은 눈(즉, 눈의 각막표면) 또는 내이일 수 있다.

당업자에게 친숙한 적당한 투여장치를이용하여 입자들을 전달시킬 수 있다. 예를 들면, 상업적으로 입수가능한 액상 및 분말 스프레이 시스템은 경비투여에 이용될 수 있고,예를 들어 경비용 계량투여스프레이(페이퍼, Pfeiffer) 및 모노스프레이-경비용 액상 단일투여(바로이스)(Valois)와 같은 액상시스템 ; 또는 모노파우더(바로이스)(Monopoudr(Valois)),리포도즈(바로이스)(Lyphodose(Valois)),나사렛(피손스)(Nasalet(Fisons)), 단일투여주입기(미아트, Miat), 툴부스핀(PH & T) 및 단위투여시스템(베스팩 Bespak)와 같은 분말시스템이다. 폐로의 투여를 위하여(추진장치, 건조분말시스템, 분무기(압출시스템뿐만 아니라 벤츄리 및 초음파시스템)를 포함한) 에어로졸시스템이 이용될 수 있다. 질로의 투여를 위하여 키토산-복합체제제는 젤로 제제될 수 있고, 주사기형장치를 이용하여 투여될 수 있다. 직장투여를 위하여는, 키토산-복합체는 좌약내로 제제되어 또는 관장제로 투약되는 현탁액으로 투여될 수 있다. 분말제제는 치밀화된 물질이 생체교합적이고 생분해성인 물질, 예를 들면 다당류, 녹말 또는 이의 변형물질, 알부민 또는 젤라틴으로 조제된 미소구체내에 또는 상에 제제되는 시스템을 포함할 수 있다.

제제는 즉시 또는 조절방출시스템으로써 투여될 수 있다. 점막과 접촉할 때 교질화되거나 환경조건변화에 따라 교질을 일으키는 시스템은 특히 관련이 있다고 인식된다. 예로는 젤라틴검, 잔탄, 알긴산염, 공역고분자(synergistic polymers)를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 부위특이전달은 당업자에게 공지된 델리버리시스템을 이용하여 달성될 수 있다. 예를 들면, 약물을 특이적으로 결장에 전달하는 제제는 본 발명자의 특허출원 WO91/11175 및 WO95/35100에 기술된 바 있다.

위장관(예를 들면, 펌브리아성 부착인자, 토마토렉틴)에서 알려진 다양한 렉틴중재프로세스를 이용한 코팅제의 첨가뿐만 아니라 티록사폴, N-아세틸시스테인(상피세포로의 접근을 용이하게 하기 위함)과 같은 점액용해제와의 공동투여에 의해 세포이용(uptake)효율을 향상시킬 수 있다. 인베신은 상피세포로의 복합체입자들의 부착과 이용을 돕는 첨가물질의 특수한 부류이다(참고, 예를 들어, A.T. Florence, Pharm. Res., 14, 259 (1997)).

복합체가 더 큰 미소구체에 결합되어 있다면 상피표면에 더 긴 잔류가 보장될 수 있다. "미소구체"라는 용어는 고상 매트릭스 미소구체 및 미소캡슐 모두를 포함하는 것으로 사용된다. 적당한 크기 및 표면전하밀도를 가진 생분해성 미소구체는 공유결합된 카르복시기를 가진 용해성녹말 및 이온화되어 양전하 DNA 복합체 및 생분해성 미소구체와의 상호작용이 가능하도록 하는 작용기를 가진 고분자와 같은 다종의 물질로부터 제제될 수 있다. 이러한 작용기는 바람직하게는 카르복시기 또는 황산염기이다. 이러한 고분자물질은 알긴산염, 헤파린 및 기타 황산화다당류염(카르복시메틸덱스트란, 카르복시덱스트란 및 덱스트란 황산염) 및 폴리락티드 코글리세리드 및 폴리젖산과 같은 생분해성합성고분자들이다. 유사하게, 미소구체로 변환되는 고분자들의 물리적인 혼합물이 이용될 수 있다. 예를 들면, 헤파린/알부민 미소구체는 이미 약물델리버리목적으로 기술된 바 있다 (퀀 등(Kwon et al), (1991) J. Colloid Interface Sci 143, 501 and Cremers et al, (1990) J. Controlled Release 11, 167). 이러한 물질들이 유전자 치료에서의 용도 또는 DNA 복합체 운반용도로 기술된 바는 없다. 따라서, 생분해성 미소구체는 교차결합된 용해성 녹말, 알부민, 젤라틴, 헤파린, 카르복시덱스트란, 덱스트란, 덱스트란 황산염, 알긴산염, 폴리락티드 또는 이들의 혼합물로부터 조제될 수 있다.

생분해성 미소구체는 바람직하게는 평균크기(광학현미경으로 측정된 평균 수 직경)가 5㎛이상이며, 더 바람직하게는 6~200㎛범위이며, 가장 바람직하게는 10~100㎛범위이며 더더욱 바람직하게는 12~50㎛범위이다. 여기서 언급된 생분해성 미소구체의 크기는 정맥내투여를 위하여 선택된 부형제중에서 팽창된 입자의 크기를 언급하는 것이다.

운반시스템의 특성은 상이한 분해율을 제공하도록 따라서 운반미소구체 및 상피표면간의 접촉시간을 제어하도록 설계될 수 있다. 상이한 분해율은 미소구체의 교차결합정도의 조절과 같은 당업자에게 공지된 방법으로 달성될 수 있다 ; 덜 교차결합된 미소구체는 고도로 교차결합된 미소구체보다 더 빨리 분해된다. 유사하게 일부 고분자의 경우에는 빠른 분해를 위하여 저분자량 고분자사슬을 선택하고 느린 분해를 위하여는 고분자량 고분자사슬을 선택하여 분해율을 조절할 수 있다. 열에 의해 교차결합되는 시스템에 있어서는, 교차결합정도 따라서 분해율은 가열시간과 온도에 따라 조절될 수 있다.

본 발명의 조성물을 이용하기 위한 적당한 미소구체들은 상업적으로 입수가능하며 녹말미소구체 (카도사머 (Cadoxamer(Perstorp)) 및 스페렉스 (Spherex (Pharmacia Upjohn)) , 덱스트란 미소구체(CM세파덱스)(CM Sephadex (Pharmacia Upjohn)) 및 SP 세파덱스 (Sephadex (Pharmacia Upjohn)) 및 아가로즈 미소구체(CM 세파로즈(Sepharose)(Pharmacia Upjohn)) 및 S 세파로즈(S Sepharose (Pharmacia Upjohn))를 포함한다. 알부민 및 젤라틴 미소구체는 당업자에게 잘 알려진 방법에 따라 조제될 수 있다.

DNA-키토산 제제를 토끼의 위장관에 투여하는 실시예가 제공된다. 이는 토끼의 개복술(복부에서의 외과적 절개) 및 회복을 포함한다. 연구가 진행되기전에 적당한 토끼의 복부부위털을 헤어클리퍼로 제거한다. 연구당일에 적당한 토끼들을 보이러스기구(Boyles Apparatus)/헬로세인마취제를 이용하여 마취시킨다. 절차가 진행되는 동안 마취상태가 유지된다. 복부를 노출시키기위하여 5~8㎝ 사이의 정중선 절개가 피부를 통하여 이루어진다. 복부강에 접근하기 위하여 토끼 복부아래로 수직되어 지나는 백색선(white-line)을 통하여(수술상의 출혈을 최소화하기 위하여) 5~8㎝범위의 두번째 정중성절개가 이루어진다. 장들이 노출되고 결장 및 소장의 상부위들은 장들을 약간 움직이면 확인된다. 소장 및 결장에 충분히 접근하여 투약하기 위해서는 장부위를 외부로 꺼내는 것이 필요하다.

소장에 투여하기 위하여, 투약은 위와의 연결부로부터 약 10㎝ 떨어진 소장의 상부위에 이루어진다. 결장투여를 위하여는, 투약은 맹장과의 연결부로부터 약 5㎝ 떨어진 결장에 이루어진다.

투약에 있어서는, 무균주사기 및 바늘을 이용하여 적당한 투여량을 위장관 적당부위의 내강에 직접 투여한다. 바늘을 빼낼때, 투약물이 새는 것을 방지하기 위하여 시아노아크릴접착제를 한 방울 떨어뜨려 조

직을 봉한다. 외부로 꺼내졌던 장들을 복부강내에 다시 배치하여 장들이 거의 제자리에 놓이기 전에 시아노아크릴접착제가 건조되는지를 확인하여야 한다. 복부강은 두 봉합층으로 봉합되며, 하나는 복부근육을 그리고 다른 하나는 피부를 거치는 것이다. 적당한 하우징룸에 토끼를 보내서 마취제 영향으로 부터 회복되도록 한다.

또 다른 실시예는 낭성섬유증을 치료하기 위하여 낭성섬유증 막횡단 전도도 조절인자(CFTR)을 생성하기 위한 DNA의 폐로의 전달이며 또는 염증과 같은 국부적인 질병치료, 아르레기 또는 HIV의 치료를 위한 치료제 또는 피임용 약제를 생성하기 의한 DNA의 비강 또는 질강으로의 전달이다.

본 발명의 다른 측면은 약제에 있어서 본 발명의 조성물 용도이다.

본 발명의 또 다른 측면은 백신용 약제제조에 있어서 핵산이 백신으로 예정된 항원물질을 암호화하는, 본 발명의 조성물용도이며, 복합체는 500㎚ 이하의 직경을 가진다.

본 발명의 또 다른 측면은 이당불내성증(disaccharide intolerance) 치료용 약제조제에 있어서 핵산이 수크로즈-이소말타아제, 락타아제-플로리진 히드라아제 또는 말타아제-글루코아밀라아제를 암호화하는, 본 발명의 조성물 용도이다.

본 발명의 또 다른 측면은 결장암치료용 약제제조에 있어서 DNA가 약물 또는 안티센스제를 암호화 하는, 본 발명의 조성물용도이다.

본 발명의 또 다른 측면은 장내감염에 대한 예방접종용 약제제조에 있어서, DNA가 바이러스성, 세균성 또는 기생체단백질을 암호화하는, 본 발명의 조성물용도이다.

또 다른 측면은 선택적으로 저이온세기완충액에 존재하며, 키토산용액과 DNA용액으로 구성된 부품키트이다. 선택적으로는 부품키트는 키토산 및 DNA의 냉동건조복합체와 투약부형제로 구성된다.

도면의 간단한 설명

본 발명은, 아래의 도면 및 실시예를 참조하여 더욱 상세히 기술될 것이다.

도 1 : 키토산으로 적정된 pCAT-DNA의 보정열흐름그래프.

도 2 : 여러 키토산제제로부터의 pCAT DNA를 이용하여 감염시킨 C6 세포계통에서 추출된 세포추출물에서의 CAT농도.

도 3 : 토끼의 위장관 상이부위들로부터의 조직추출물에서의 CAT농도

샘플조직 : 1 PP1 ; 2 PP2 ; 3 PP3 ; 4 EN1 ; 5 EN2; 6 EN3 ; 7 COL

실시예

실시예 1 : CAT 분석

재료

CMV프로모터에 의해 추진되는 리포터 유전자 pCAT-DNA는 진메디신, 휴스톤, 미국(GeneMedicine, Houston, USA)에서 입수되었다. pCAT-DOTMA (N[1-(2,3-디오레일옥시)-프로필] -N,N,N-트리메틸암모니움클로라이드) 복합체는 대조 물질로 이용되었다. 이것은 펠그너 등(Felgner et al, (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. (UA)84, 7415-7417)이 제시한 가이드에 의해서 조제되었다.

방법

대조 pCAT DNA 용액은 pCAT-DNA원액(0.811㎎/㎖)을 가압멸균된 PBS에서 희석하여 조제되었다. pCAT-DNA원액 0.863㎖에 가압멸균된 PBS 13.137㎖를 첨가하였다. 이것은 14.0㎖의 대조 pCAT-DNA용액(0.05㎎/㎖)를 만들고, 2㎖ 부피의 100㎍ pCAT-DNA를 여섯마리 토끼에게 투여하기에 충분하다. 용액은 4℃에서 보관되었고 토끼에게 투여 15분전에 실온으로 가온되었다.

동결건조된 분말 형태로 제공된 pCAT-DNA DOTMA는 무균수를 이용하여 연구가 진행되는 날 중에 원래대로 하였다. 생성된 액제제는 2㎖부피의 100㎍ pCAT-DNA를 투여량으로 하여 투여하기에 충분한 플라스미드 DNA농도를 함유하였다. 제제는 4℃에 저장되었고 토끼에게 투여 15분전에 실온으로 가온되었다.

CAT ELISA

세포 트렌스펙션(transfection)샘플과 동물조직에서의 CAT 분석을 위한 CAT ELISA 절차는 키트 제조업자(베링거 만하임, Boerhinger Mannheim)가 제공한 지침에 따라 설정되었다. 분석은 샌드위치 ELISA 원리에 기초하여 이루어지고, 이것은 안티-CAT 항체가 미량정량플레이트모듈에 예비결합되고, 트렌스펙션된 세포와 조직의 추출물에서의 CAT효소가 고정된 안티-CAT항체에 특이결합하고 CAT에 디곡소제닌 표지된 항체(안티-CAT-DIG)가 CAT효소에 결합하는 것이다. 검출항체, 페록시다아제 복합된 안티-디곡시제닌 항체(안티-DIG-POD)는 디곡시제닌에 결합한다. 최종단계에서 페록시다제기질(ABTS ; 2,2'-아지노비스[3-에틸벤즈티아조린 설포닌산])이 페록시다제에 의해 촉매화되어 기질향상제사용에 의해 향상될 수 있는 색체반응생성물을 생성한다. 이 색채의 흡광도는 표준물 및 추출물에 존재하는 CAT효소양에 직접 상관된다.

CAT ELISA의 검증

테스트샘플을 분석하기전에, CAT ELISA절차가 검증되었다. CAT를 함유하는 적당한 정성대조조직샘플을 입수할 수 없었으므로, 하루의(intra-day) 그리고 날마다의(inter-day) 변이 모두는 표준곡선을 이용하여 측정되었다. 이러한 곡선들은 CAT ELISA 키트에서 제공되는 CAT농도 0.0, 15.6, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500pg/㎖에서의 CAT표준물을 이용하여 만들어졌다. 하루의 변이는 3번 표준곡선을 만들어

결정되었다. 하루의 그리고 날마다의 변이 모두에 대하여 표준농도에서의 변이계수(%CV) 가 산출되었다.

조직추출절차의 검증

조직추출절차는 초기에 소장내나 결장내에 "생(naked)"플라스미드DNA가 투여된 두 마리의 대조토끼들로부터의 다양한 샘플들을 취하고, 이 조직샘플들을 세 부분으로 나눈 후, -80℃에서 각각 저장함으로써 설정되었다. 얼음냉각된 조직추출완충액 0.5㎖(10mM tris pH 7~8 ; 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% triton X-100, 100μM 루펜틴, 1.0μM 펩스타틴 및 0.25mM PMSE)를 조직샘플을 함유한 튜브에 넣고 미니비드비터(mini-bead beater)를 이용하여 4℃에서 다른 주기동안 4번(0.6, 1.2 또는 2.4분) 균질화하였다. 균질물을 살균된 마이크로퓨게튜브 (microfuge tube)(1.5㎖)에 옮기고 MSE마이크로퓨게에서 4℃에서 13,000rpm으로 20분동안 원심분리하였다. 상징액(즉, 조직추출물)을 살균된 마이크로퓨게튜브(1.5㎖)로 옮기고 얼음상에 방치하였다. 조직추출물의 부분표본은 PBS로 희석되었고(20 대 1), BCA 단백질분석법을 이용하여 단백질농도를 분석하였다. 각각의 샘플은 2번 분석되고, 조직추출물에서의 총단백질농도(㎎/㎖)를 얻기 위하여 희석에 대한 보정을 하였다.

CAT ELISA절차는 위장조직추출물에서의 CAT분석을 위하여 검증되었다. 첫 번째로, CAT ELISA절차를 이용하여 다양한 조직추출물에서의 CAT 농도에 대한 단백질농도의 영향이 평가되었다. 대조토끼들로부터의 조직샘플들(파이에르샘, 고위관장법, 결장조직 및 장간막림프절)이 상기한 바와 같은 얼음냉각조직추출용액(0.5㎖)에서 추출되었고, 1.5분동안(30초 3번 균질화 및 30초 방치) 균질화되었다. 단백질농도를 결정한 후, 조직추출물을 샘플버퍼(sample buffer(CAT ELISA 키트))로 희석하여 약 0.5, 1.0 및 2.0㎎/㎖ 단백질농도의 추출용액을 만들었다. 이들 희석추출물 각각을 CAT 표준물(CAT ELISA 키트)로 스파이크하여(spiked) 최종 CAT농도를 25 및 100pg/㎖로 하였다. 스파이크된 샘플들은 그 후 CAT농도를 위하여 2번 분석되었고 각 샘플에서의 CAT회복(recovery)비율이 산출되었다.

두 번째로, 다양한 조직에서의 CAT안정도에 대한 추출절차의 영향이 평가되었다. 이것은 상기 대조토끼들로부터의 조직샘플(결장조직, 파이에르샘 및 고위관장법)을 50 또는 200㎎/㎖의 CAT농도를 가진 추출완충액으로 추출함으로써 수행되었다. 단백질농도를 결정한 후에, 각 샘플추출물은 샘플버퍼로 희석되었다(2대1 또는 4대1). 희석된 각 샘플은 CAT농도를 위하여 2번 분석되었다. 희석에 대한 보정후, 각 조직추출물에서의 CAT회복비율이 산출되었다.

트렌스펙션된 세포의 분석

트렌스펙션된 세포들(RAW 264 대식세포와 C6 교세포)의 세포추출물은 냉동/해동방법을 이용하여 조제되었다. 세포들을 플레이트의 표면에서 떼어내어, 살균된 마이크로퓨게로 옮기고 예비냉각된 TEN 완충용액(40mM 트리스-HCl, 1mM EDTA, 150mM 염화나트륨, pH7.8) 400㎕로 잘 씻었다. 세포들은 MSE 마이크로퓨게에서 최대속도(13,000rpm)로 1분동안 원심탈수되었다. 상징액을 제거한 후에, 세포들을 150㎕ 트리스완충용액(250mM 트리스-HCl, pH 7.8)에서 재현탁시켰다. 세포들을 액화질소에서 5분간 냉동시킨 후, 물중탕으로 5분간 37℃에서 해동시켰다. 이 냉동/해동사이클은 4번 반복되었다. 세포현탁액을 MSE마이크로퓨게에서 최대속도 (13,000rpm)로 10분간 원심분리시켰다. 세포추출물(상징액)을 새로운 마이크로퓨게튜브로 옮겼다. 상징액의 부분표본은 BCA 단백질분석법을 이용하여 단백질농도에 대하여 분석되었다. 세포추출물은 0.5mM EDTA와 트라실올(Trasylol) 8㎍/㎖를 포함하는 샘플완충용액(CAT ELISA 키트)으로 희석되고(5 대 1), CAT 분석에 앞서 -80℃에서 보관되었다. 각각의 세포추출물희석액은 CAT 농도를 결정하기 위해 2번 분석되었다. 15pg/㎖보다 작은 수치는 0으로 가정하였고, 이 농도보다 높은 수치에 대하여는 세포추출물내에서 총 CAT 농도를 얻기 위하여 희석에 대한 적절한 보정이 이루어졌다. 각각의 세포추출물내에서의 총단백질의 농도가 다르기 때문에, 각각의 샘플내에서의 CAT 발현량은 총CAT농도를 총단백질농도로 나눔으로써 정규화되었다.

토끼 조직샘플의 분석

토끼조직의 추출물이 CAT에 대한 분석전에 조제되었다. 얼음냉각조직추출용액(1㎖)을 샘플함유튜브에 넣고 미니비드비터(mini-bead beater)를 이용하여 4℃에서 1.5분동안(30초 3번 균질화 및 30초 방치) 균질화하였다. 균질물을 살균 마이크로퓨게튜브(1.5㎖)에 옮기고 MSE 마이크로퓨게에서 4℃에서 13,000rpm으로 20분동안 원심분리하였다. 상징액(즉, 조직추출물)을 살균 마이크로퓨게튜브(1.5㎖)로 옮겨 얼음상에 방치하였다. 조직추출물의 부분표본은 PBS로 희석되었고(20 대 1), BCA 단백질분석법을 이용하여 즉시 단백질농도를 분석하였다. 각각의 샘플은 2번 분석되었고, 조직추출물에서의 총단백질농도(㎎/㎖)를 얻기 위하여 희석에 대한 보정을 하였다.

조직추출물의 부분표본을 샘플버퍼를 이용하여 적당히 희석하였고(2대1, 4대1 또는 3대1, 6대1), CAT 분석전에 -80℃에 저장하였다. 각각의 세포추출물희석액은 CAT농도를 결정하기 위해 2번 분석되었다. 15pg/㎖보다 작은 수치는 0으로 가정하였고, 이 농도보다 높은 수치에 대하여는 세포추출물내에서의 총 CAT농도를 얻기 위하여 희석에 대한 적절한 보정이 이루어졌다. 각각의 조직추출물내에서의 총단백질농도가 다르기 때문에, 각각의 조직에서의 CAT발현량은 총CAT농도를 총단백질농도로 나눔으로써
정규화되었다.

하루동안의 변이에 있어서, 모든 표준물에 대한 CV값이 수용한도(±10%)내에 있었다. 날마다의 변이에 있어서, CV값이 곡선(125~500pg/㎖)의 상단에서의 표준물에 대해서만 수용한도(±20%)내에 있었지만, 표준곡선의 평균상관계수는 0.996±0.002이었다. 표준곡선에서 관측된 하루동안의 변이성은 분석최종단계에서의 기질과의 잠복기에서의 작은 변화에 기인할 수 있고, 또한 서로 다른 키트들에서의 플레이트 다양성에 기인할 수 있었다. CAT의 최저검출가능농도는 15pg/㎖이었고, 분석의 최상한도는 150pg/㎖이었다.

각각의 조직샘플은 서로 다른 주기(0.6, 1.2, 2.4분)동안 추출한 후의 단백질농도와 비슷하였고, 이로써 샘플은 2.4분내에 충분히 균질화될 수 있음을 보였다.

0.5, 1.0 및 2.0㎎/㎖의 단백질농도에서 스파이크된 조직추출물로부터 CAT회복율이 83 내지 100%였다. 추출에 앞서 CAT로 스파이크된 조직으로부터 CAT회복율은, 서로 다른 조직형태에 따라 차이가 있으며, 균질물이 4㎎/㎖ 또는 그 이상의 단백질농도를 가질 때, 50% 또는 그 이하였다. 따라서, 높은 단백질농도는

테스트샘플내에서 CAT발현의 평가를 할 수 있었다. 이후 계속된 모든 측정은 이 결과를 염두에 두고 이루어졌다.

실시예 2

키토산복합체의 조제

키토산 CL113은 영국의 플로노바 바이오폴리머, 리미티드. (Pronova Biopolymer, Ltd., UK)에 의해 제공되었으며, 1:10 과 1:5(w/w)의 비율을 갖는 pCAT-DNA 키토산복합체는, 일정한 속도로 교반하면서 키토산 용액을 pCAT-DNA용액에 천천히 첨가함으로써 아래의 실시예 7에 기재된 방법에 따라 조제되었다. 생성입자의 크기는 100～200㎚(소) 및 300～460㎚(대)이었다. 키토산이 DNA 용액에 첨가되는 속도에 의해 입자의 크기가 결정되었으며 ; 속도가 빠르면 빠를수록, 입자의 크기는 작아진다. 1:10의 비율과 300～460㎚의 입자크기를 가지는 조제법이 동물연구에서의 평가를 위해 선택되었다. 제제에서의 pCAT-DNA 농도는 38.677㎍/㎖이었다.

pCAT-DNA 키토산복합체의 크기와 크기분포는, PCS 100 분광계가 있는 말번4700 초미세 입자분석시스템(Malvern Instrument, 영국)을 이용하는 광자상관분광법(Photon Correlation Spectroscopy)에 의해 결정되었다. 샘플들은 증류수로 희석되었으며, 90° 의 산란각에서 25℃에서 측정되었다. 크기분포는 다분산성 지수(PI) (표1)에 의해 특징지어졌다.

표 1 : pCAT 키토산 복합체의 특성

배치(batch)번호	pCAT : 키토산[1]	실제크기 (㎚)	PI[2]	평균제타전위 (㎷)
1	1:5, 소	138.3	0.186	28.7
2	1:5, 대	302.2	0.483	30.1
3	1:10, 소	172.5	0.214	39.4
4	1:10, 대	463.9	0.543	39.6

1. 입자크기측정에 의해 정의된 바와 같이, 소 100～200㎚, 대 300～500㎚

2. 다분산성 지수

pCAT-DNA 키토산복합체의 제타전위는 전기영동 레이져 도플러 분광법의 기술을 이용하여 결정되었다. 제타전위측정에 대한 매질은 1mM M pH 7.4 HEPES버퍼 또는 증류수였다. 샘플은 제타사이저(모델4, Malvern Instruments, 영국)(표1)를 이용하여 검사되었다. DNA가 키토산과 상호작용할 때 발생된 작용열은 열활성 모니터(TAM, Thermometric, 모델 2277, 스웨덴)를 이용하는 등온적정미량열량계 (Isothermal Titration Microcalorimetry)에 의해 측정되었다. 미량열량연구는 키토산용액(0.05～0.4%)을 정밀주사기(precision syringe)로부터 pCAT-DNA 용액(2㎖ ; 40.5㎍/㎖)으로 11분당 10㎕의 속도로 총 35회 주사하여 천천히 첨가함으로써 수행되었다. 대조물(control)로는, 적당한 키토산용액이 물에 첨가되었다. 적정제를 각각 첨가하면, 열의 방출(발열공정) 또는 흡수(흡열공정)를 보였다. 열전대열을 거쳐 전도되는 열은 일련의 피크로서 표시되었다. 대조물에 대하여 얻어진 값은 희석열(heat of dilution)을 빼는데 사용되었다.

키토산으로 적정된 pCAT-DNA의 보정열흐름그래프는 두 개의 열교환그룹을 나타내었다(도1). 첫 번째 그룹은 발열성이고, 두 번째 그룹은 흡열성이다. 첫번째 그룹에 대한 키토산에 대한 pCAT-DNA의 비율이 그들의 반대전하율단위가 1:1일 때의 키토산에 대한 pCAT-DNA의 비율에 아주 근접한 0.79±0.10(w/w)이기 때문에 첫번째 그룹은 양전하 키토산과 음전하 pCAT-DNA사이의 이온상호작용에 의한 것이다. 두번째 그룹은 복합체구조의 변화에 의거한 것이다.

양이온성 고분자에 의한 pCAT-DNA의 응축을 조사하기 위한 빠른 방법을 제공하는데 형광법이 이용되었다. 이것은 에티디움브롬(EtBr)을 큐벳(참조)중의 물에 첨가하고, pCAT-DNA 용액과 에티디움브롬을 두번째 큐벳(테스트)중의 물에 첨가함으로써 실시되었다. 펄킨-엘머(Perkin-Elmer)3000 형광분광기를 이용하여 참조큐벳의 형광도는 0으로 세팅되었다. 광학방출파장은 591㎚이었고, 광학여기파장은 366㎚이었다. 테스트 큐벳에 대하여 얻어진 형광이 측정되었다. 그 후 매우 적은 양의 키토산 샘플(C-110 과 C-210)을 일정하게 교반하면서 테스트 큐벳에 첨가하고, 형광측정은 세 번 이루어지며, 각 측정간 키토산샘플을 빈셀로 되돌린다. 3번의 평균값이 기록되었다. 8㎍의 pCAT-DNA가 각각의 치밀화연구(compaction study)에 사용되었다. 키토산에 의한 DNA치밀화는 표준 양이온성 고분자(폴리-L-리신)에 의한 것과 비교되었다.

1:5와 1:10의 비율을 갖는 pCAT 키토산 복합체들은 모두 양으로 하전되었다(표1). 키토산에 대한 pCAT-DNA 저비율(1:10)의 복합체는 대응되는 고비율(1:5)의 복합체보다 더욱 양으로 하전되는 것으로 관찰되었다. 이러한 관찰은 키토산이 양이온성 고분자이기 때문에 예상된 대로였고, 실제로 첨가 키토산이 증가될수록 제타전위(음에서 양으로)의 점진적인 증가가 관찰되었다.

실시예 3

세포 트렌스펙션 연구

사용된 세포계통은 마우스백혈병(Mouse Leukaemic) 단핵세포-대식세포 (RAW264)와 쥐 교세포 종양(C6)이었다. RAW264 세포들은 10% 태아소혈청(foetal bovine serum)(FBS)과 2mM 글루타민을 포함하는 덜베코변형이글배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 배양되었고, C6 세포들은 10% FBS와 2mM 글루타민을 포함하는 햄F12배지(Ham's F12 medium)에서 배양되었다. 두 세포계통은 75㎠ 포올컨(Falcon) 플라스크내의 적당한 배지 25㎖에서 37℃, 5% CO_2 에서 배양되었다. 세포들은 초융합된(ubconfluent) 후 통과되었다.

샘플제조

RAW264와 C6세포계를 트렌스펙트할 수 있는 능력에 관하여 이 연구에서 평가된 샘플은 다음과 같이 조제되었다.

1. 수용성 pCAT DNA (2㎍)은 OptiMEM으로 1㎖ 만들었다.

2. 수용성 pCAT DNA/리포펙타민(lipofectamine)(LF) 복합체 :

- C6 세포계통 : 2㎍ DNA를 포함하는 OptiMEM 20㎕를 1.2㎍ LF를 포함하는 OptiMEM 20㎕와 혼합하여 복합체를 형성할 수 있도록 30분간 실온에서 배양하였다. 트렌스펙션하기 바로 전에 OptiMEM을 이용하여 부피는 160㎕로 조절되었다.

- RAW 세포계통 : 2㎍ DNA가 포함된 OptiMEM 20㎕를 10㎍ LF가 포함된 OptiMEM 100㎕와 혼합하여 복합체를 형성할 수 있도록 30분간 실온에서 배양하였다. 트렌스펙션하기 바로 직전에 OptiMEM을 이용하여 부피를 1㎖로 조절하였다.

3. pCAT DNA 복합체를 완전배양배지(full culture media)(항생물질 없이) 1㎖에 재현탁시켰다.

4. 대조물로써는, 배양배지가 세포내에서 테스트되었다.

트렌스펙션 연구에서 사용된 네 개의 키토산복합체제제는 표2에 나타나있다. 모든 샘플들은 여기에 간단히 기술된 절차를 사용하여 각각의 세포계통에서 네 번 테스트되었다. 세포들은 위에 기술된 바와 같이 75㎠ 포올컨 플라스크내의 배지 25㎖에서 배양되어 초융합(sub-confluence)되었다. 24 웰(well) 배양판상의 각 웰에는 완전배양액에서의 세포현탁액 1㎖(5×10^5 cells/㎖)을 뿌려서, 약 80% 융합성이 되도록 밤새 37℃, 5% CO_2 에서 배양하였다. 배지흡인 후, 트렌스펙션 기질들을 세포단층에 천천히 첨가하고, 37℃, 5% CO_2 에서 5시간동안 배양하였다. 세포들을 미소입자로 트렌스펙팅할 때, 판은 30분마다 흔들어주었다. 트렌스펙션은 트렌스펙션 기질을 완전배양액 1㎖로 교체함으로써 종료되었다. 미소입자를 사용할 때, 단층이 입자로부터 자유롭게 될 때까지 세포들을 PBS로 완전히 세척하였다. 배양판은 CAT 분석을 위해 세포들을 추출시키기전에 판을 48동안 배양하였다.

표 2 : 트렌스펙션 연구에 사용된 키토산제제량

세포계통	제제 (CAT-DNA키토산비율)[1]	미소입자의 무게	세포에 투약된 DNA의 양(㎍)
C6 와 RAW 264	1:5, 소	14.81㎍	3
C6 와 RAW 264	1:5, 대	14.81㎍	3
C6 와 RAW 264	1:10, 소	29.63㎍	3
C6 와 RAW 264	1:10, 대	29.63㎍	3

1. 입자크기측정에 의해 정의된 바와 같이, 소 100~200㎚, 대 300~500㎚

도 2에서 나타낸 결과는 모든 키토산-DNA복합체가 세포를 트랜스펙션시켰음을 보여주였다. 다른 시스템 사이에 어떠한 차이도 없었다.

실시예 4 : 동물연구

토끼 위장관으로의 플라스미드 DNA제제의 투여는 토끼의 개복술(복부에서의 와과적 절개)과 회복을 포함하였다. 각각의 연구일이전에 헤어클리퍼를 이용하여 적당한 토끼의 복부부위털을 제거하였다. 연구당일에 보이러스기구(Boyles Apparatus)/핼로세인마취제(halotane anaesthesia)를 이용하여 토끼를 마취시켰다. 마취상태는 전 절차동안 유지되었다. 복부를 드로내도록 5 내지 8 ㎝의 정중선절개가 피부를 통과하여 이루어졌다. 복부강에 접근할 수 있도록 5 내지 8 ㎝의 정중선절개가 토끼의 복부아래로 수직되어 지나는 백선을 통과하여 이루어졌다(수술상의 출혈을 최소화하기 위하여). 장들이 노출되었고, 결장과 소장의 상부위가 장들을 약간 움직이면 확인되었다. 소장 및 결장에 충분히 접근하여 투약하기 위해서는 장부위를 외부로 꺼내는 것이 필요하였다.

소장에 투약하기 위해, 투약은 위와 연결부로부터 약 10㎝인 소장의 상부위에 이루어졌다. 결장에 투약하기 위해, 투약은 맹장과 연결부로부터 약 5㎝인 결장에 이루어졌다.

투여량을 투약하기 위해, 적당한 투여량은 무균 주사기 및 바늘을 이용하여 위장관의 적당부위의 내강에 직접 투약되었다. 바늘을 빼낼 때, 투약물이 누설되는 것을 막기 위해 시아노아크릴레이트 접착제를 한 방울 떨어뜨려 조직을 봉하였다.

노출된 장들이 복부강내에 다시 놓여져 장들이 거의 본래의 위치에 놓이기전에 시아노아크릴레이트 접착제가 건조되는 지를 확인하여야 한다. 복부강은 두 봉합층, 즉, 복부근육을 거치는 첫 번째 층과 피부를 거치는 두 번째층으로 봉합되었다. 토끼는 적당한 하우징룸(housing room)으로 다시 보내어져 마취로부터 회복되도록 하였다.

제제투여 약 72 또는 48시간 후에, 주변귀정맥(marginal ear vein)으로 펜토바비톤소듐(pentobarbitone sodium)(약 0.5㎖/kg)을 과다투약하여 토끼를 죽였다. 복부강의 내용물을 노출시키기위하여 복부에서의 정중선절개가 이루어졌다. 소장에서 직장에 이르는 소화관은, 위와의 연결부에 가까운 소장 및 항문에 가까운 직장을 거쳐 잘라냄으로써 복부강으로부터 제거되었다.

소장으로부터 조직의 채취

위(stomach)와의 연결부로부터 맹장까지 이르는 소장은 전·중간·후 구획부(segment)로 거의 동일한 길이의 세 영역으로 분류되었다. 소장에 투약된 각각의 토끼에 대하여 총 8개 조직샘플이 채집되었다.

- 창자간림프절(MLN) : 이 림프절들은 응집되어, 상부(upper)창자간동맥의 좌측을 덮는 치밀한 덩어리(compact mass)를 형성하였다. 이 응집된 림프절은 하나의 샘플내에서 채취되었다.

- 파이에르샘 (PP) : 파이에르샘은 다음과 같이 소장으로부터 채취되었다. : 투약부위에 가장 가까운 1샘(PP1), 중간구획부에서의 1샘(PP2), 후구획부에서의 1샘(PP3). 파이에르샘을 분리하기에 앞서 장의 관련 부분을 먼저 제거함으로써 각각의 파이에르샘은 채취되었다.

- 장조직(엔테로사이트, Enterocytes)(ENT) : 장조직은 파이에르샘이 없도록 채취되었다. 장의 부분(section)은 첫번째 파이에르샘의 채취위치에 가까운 곳(ENT1), 중간구획부(ENT2) 및 후구획부(ENT3)에서 채취되었다. 장의 각각의 부분으로부터, 조직샘플은 파이에르샘이 차지하는 것과 거의 같은 횡단면적을 갖도록 분리되었다.

- 결장조직(COL) : 조직 구획부는 결장으로부터 제거되고 조직샘플은 파이에르샘이 차지하는 것과 거의 같은 횡단면적을 갖도록 분리되었다.

결장으로부터의 조직 채취

결장, 즉 맹장과의 연결부로부터 직장까지는 전·후 구획부와 직장으로 설명되어지는 거의 동일한 길이의 세 영역으로 분류되었다. 직장내로 투약된 각각의 토끼로부터 총 4개의 조직샘플이 수집되었다.

- 창자간림프절(MLN) : 응집된 림프절들은 하나의 샘플내에서 채취되었다.

- 결장조직(COL) : 조직 구획부는 투약부위에 가까운 결장의 전구획부 (COL1), 중간구획부(COL2) 및 결장(COL3)로부터 제거되었다. 각각의 구획부에 대하여, 조직샘플은 파이에르샘이 차지하는 것과 거의 같은 횡단면적을 갖도록 분리되었다.

각각의 토끼로부터 조직샘플을 제거한 후, 상호-오염을 방지하기 위해 무균 0.9% 염화나트륨으로 장비를 씻어냈다. 제거된 조직샘플을 0.9% 염화나트륨으로 완전히 세척하여 패트리 접시에 놓아두었다. 각각의 조직샘플을 살균된 외과용 메스날을 사용하여 거의 같은 크기의 두 개의 샘플로 나누었고, 이들 각각의 샘플을 3~4조각으로 더 절단하였다. 2.5㎜ 실리카지르코늄 비드(bead) 약 250㎕을 포함하는 살균된 나사마개 튜브(1.5㎖)에 각각의 조직샘플로부터 절단된 조각들을 놓은 후, 액화질소로 즉시 냉동시켰다. CAT 분석을 위해 -80℃에서 저장하기에 앞서, 샘플들을 드라이아이스에 저장하였다.

서로 다른 제제, 즉 pCAT-DNA만의 용액, DOTMA 및 키토산-DNA 복합체로 제제된 pCAT-DNA용액으로부터 얻어진 상세한 결과는 표3에 주어져있다. 대조용액은 어느 조직에서도 발현시키지 않았음을 볼 수 있다. pCAT-DNA DOTMA 제제는 약간은 발현하게 하지만 모든 조직에서 발현하게 하지는 않았다. 놀랍게도 키토산-DNA 복합체는 거의 모든 조직에서 발현하게 하였다. 평균데이타가 도 3에 비교되어 있다. 키토산-복합체에서 볼 수 있는 놀라운 효과가 잘 입증되어 있다.

표 3 : 동물당 100㎍으로 pCAT-DNA를 위장관에 투약시킨 토끼로부터의

조직추출물의 CAT농도 요약(평균값들)

제제의 성분	결장샘플	CAT농도pg/㎎단백질	소장샘플	CAT농도pg/㎎단백질
pCAT-DNA용액	COL2	0.000	PP3	0.000
MLN	0.000	ENT1	0.000	
MLN	0.000			
pCAT:DOTMA	COL1	0.000	PP1	1.687
COL2	0.000	PP2	0.000	
COL3	0.000	PP3	3.919	
MLN	0.000	ENT1	2.533	
ENT2	0.000			
ENT3	0.000			
COL	1.185			
MLN	1.151			
pCAT:키토산	COL1	1.046	PP1	8.086
COL2	0.000	PP2	9.700	
COL3	0.000	PP3	13.143	
MLN	2.170	ENT1	4.605	
ENT2	4.824			
ENT3	8.274			
COL	1.652			

MLN 0.000

실시예 6 : 대조(control)연구

시험관내 및 생체내 모두에 충분한 트렌스펙션을 제공하는 키토산시스템 입자크기의 중요성은 아세트산에서의 키토산 CL 113 0.5% 용액을 사용한 분무건조법으로 조제된 키토산 미소구체를 이용하여 결정되었다. LabPlant SD05 분무건조기가 사용되었다. 일정교반하에, 10% 수용성 현탁액의 미소구체를 pCAT-DNA용액내로 첨가하여 pCAT-DNA를 이 입자들 표면에 흡착시켰다. 97% 흡착율이 얻어졌다. 제제에서의 pCAT-DNA 농도는 47.8㎍/㎖였다. C6 세포계통의 트렌스펙션은 실시예 2에서와 같이 이루어졌다. 이것은 세포에 약 1㎍의 DNA가 투약된 것이다. 입자 0.3㎎을 사용할 때 검출된 평균CAT농도는 약 100pg/㎎단백질이었다. 이들 미소구체의 평균 입자크기(평균 부피 직경)는 5.5미크론 이었다. 장 및 결장 투약을 위한 그룹당 4마리 동물을 이용하는 실시예 3에서와 같이 수행된 동물연구에서, 키토산-DNA 복합체들에 대해서보다 낮은 수준의 발현을 보였다.

실시예 7 : 쥐에게 경비투여한 후 키토산-pCAT DNA 복합체의 평가

이 연구에 있어서, 세포확대바이러스 프로모터(cytomegalovirus promoter)를 포함하는 클로람페니콜 아세틸 트랜스페라제(CAT)에 대한 리포터 유전자를 운반하는 플라스미드 DNA 구조(pCAT DNA)가 사용되었다. 쥐에게 경비투여한 후, 액제제에서의 키토산-pCAT DNA 및 리포펙틴®-pCAT DNA(Lipofectin®-pCAT DNA)복합체에 대한 평가를 하였다.

(1) 키토산-pCAT DNA 복합체의 조제

1A 자석교반기로 교반하면서 1㎖ 키토산(4㎎/㎖)을 10㎖ pCAT DNA용액(40㎍/㎖)에 첨가하여 키토산-pCAT DNA복합체를 조제하였다.

1B 1% mannitol (0.4㎖)용액을 키토산-pCAT DNA복합체에 첨가하고 냉동건조하였다.

1C 냉동건조된 복합체를 0.8㎖ 초순수에서 재현탁하였다. 제제에서 pCAT DNA의 최종농도는 0.5㎎/㎖였고, 키토산의 최종농도는 5㎎/㎖였다(즉, DNA : 키토산 = 1 : 10).

(2) 리포펙틴®-pCAT DNA(Lipofectin®-pCAT DNA)복합체의 조제

2A 교반하에, 리포펙틴®(Lipofectin®)(350㎕, 350㎍)을 220㎕ pCAT DNA(175㎍)에 한방울씩 첨가하였다.

2B 혼합액을 15분동안 실온에서 배양하였다.

2C pCAT DNA의 최종농도는 370㎎/㎖였고, 리포펙틴® 최종농도는 614㎍/㎖였다(즉, DNA : 리포펙틴® = 1 : 2).

(3) 쥐 연구

3A 상기(섹션 (1)과 (2))에 설명된 바와 같이 조제된 두 제제를 수컷 위스터(wistar)쥐 그룹에 경비투약하였다.

그룹 1 : 100㎕(콧구멍당 50㎕) 키토산-pCAT DNA복합체를 세 마리 쥐에 투약 ; (pCAT DNA 투여량 = 100㎍)

그룹 2 : 100㎕(콧구멍당 50㎕) 리포펙틴®-pCAT DNA복합체를 다섯 마리 쥐에 투약 ; (pCAT DNA 투여량 = 61.4㎍)

3B 투약하기에 앞서, 쥐들은 근육내로 0.4㎖/㎏ 히프놈(Hypnorm)을 투약하여 쥐들을 진정시켰다. 이것은 못움직이게 하려는 의도 및 투약하는 동안 동물이 받는 스트레스를 줄이기 위한 것이었다. 1~2시간동안 동물을 못움직이게 함으로써 액 투약물과 코막(nasal membrane)간에 적절한 접촉시간이 유지된다. 동물은 모든절차내내 따뜻하게(약 38℃) 유지하였다.

3C 진정시킨 후, 알맞는 길이의 폴리센 튜브(polythene tubing)에 부착된 바늘 및 해밀톤 주사기를 이용하여 먼저 왼쪽 콧구멍에 그리고 5분후 오른쪽 콧구멍에 제제 50㎕를 투약하였다. 복부표면을 위쪽으로 하여 동물을 60분동안 가열된 테이블상에 놓아 두었다.

(4) 쥐조직의 제거

투여 약 72시간후에, 정맥으로 펜토바비톤 소듐을 과다투여 하여 쥐를 죽였다. 하악림프절, 식도 및 폐를 제거하고, 이후 좌우의 코점막조직을 제거하였다. 각각의 조직샘플들을 등장염화칼륨용액으로 세척한 후, 액화질소로 즉시 냉동시켰다. 샘플들은 -80℃에 저장되었다.

(5) 조직의 추출

5A 추출에 앞서, 조직들을 재빨리 해동시켜, 300㎕ 지르코늄/실리카 비드(2.5㎜)를 포함하는 튜브로 옮겼다. 조직들을 0.5㎖추출완충용액(10mM 트리스 pH 7.8, 150mM 염화나트륨, 1mM EDTA, 0.5% 트리톤 X-100, 1.0μM 펩스타틴, 100μM 루펜틴 및 0.25mM PMSE)에서 미니비드비터(30초 3번 균질화 및 30초 방치)를 이용하여 균질화하였다.

5B 균질물을 마이크로퓨게튜브로 옮기고, 4℃에서 13,000rpm으로 20분동안 원심분리하였다. 상징액을 마이크로퓨게튜브로 옮겨서 얼음상에 임시보관하였다.

(6) 단백질 분석

인산염 완충염수(phosphate buffered saline)로 20 대 1로 조직추출물을 희석하고, 피어스(Pierce)BCA 단

백질분석법을 이용하여 단백질농도를 결정하였다. 각각의 조직추출물에서의 총단백질농도(mg/㎖)는 희석에 대한 보정후에 산출되었다.

(7) CAT 분석

7A 조제 당일, 조직추출물은 CAT ELISA 키트(제조업자, 베링거 만하임)에 제공된 샘플버퍼로 적당하게 희석되었다. 희석된 샘플들은 -80℃에 저장되었다.

7B 분석 당일, 샘플희석액을 재빨리 해동시켜, 제조업자에 의해 제공된 지침에 따라 CAT ELISA 키트 분석이 이루어졌다.

7C 각각의 조직추출물에서의 총CAT농도는 희석에 대한 보정후에 산출되었다(표 4).

7D 각각의 조직추출물에서의 CAT 발현량이 mg단백질당 pgCAT으로 표시되었다.

(8) 결과

8A 키토산-pCAT DNA의 경비투약후, CAT가 분석된 모든 조직에서 발현된다. 하악림프절과 코점막 조직은 식도와 폐보다 CAT를 더 잘 발현시키는 것으로 보인다.

8B 제제가 경비투여될 경우 폐에서의 CAT발현이 매우 높지 않더라도, 결과는 폐가 DNA로 트렌스펙트될 가능성이 있다는 점을 지적고 있다.

8C 리포펙틴®-pCAT DNA 제제가 효과적인 트렌스펙션을 제공하리라 예상되었으나, 이 제제의 경비투약은 여러 조직에서 매우 낮은 CAT 발현을 보인다는 것을 알았다. 식도와 폐조직에서 단지 약간의 CAT발현이 있었다. 이것은 DNA에 대한 리포펙틴®의 비율이 매우 낮았었기(즉, 2:1) 때문일 것이다.

(9) 결론

9A 이 연구로부터 코경로(nasal route)가 DNA 전달에 대한 가능성을 가지고 있다고 결론지을 수 있다.

9B 이 연구에서 폐에 도달된 제제량을 추정하는 것이 불가능하더라도, 폐조직에서의 CAT발현으로 보아, 코경로를 통한 또는 거의 직접적인 폐경로(pulmonary route)를 통한 DNA의 폐전달(pulmonary delivery)에 대한 가능성이 있음을 지적하고 있다.

표 4 : 동물당 100㎍으로 키토산-pCAT DNA 또는 61.4㎍으로

리포펙틴®-pCAT DNA를 경비투약한 쥐로부터의 조직추출물 CAT농도

CAT 농도(pg/mg 단백질)

	키토산-pCAT DNA (그룹 1)		리포펙틴®-pCAT DNA (그룹 2)	
샘플	평균	SD	평균	SD
코 점막 조직	9.38	8.39	0.00	0.00
하악림프절	13.72	21.24	0.00	0.00
식도	4.22	7.31	2.55	3.37
오른쪽 폐	4.32	4.95	0.37	0.82
왼쪽 폐	2.36	0.91	0.00	0.00

실시예 8

실시예 2에서 설명된 바와 같이 초기의 인간세포확대 바이러스성 주요 중재물(human cytomegaloviras major intermediate)제어하의 파상균독소(tetanus toxin)의 단편 C (Fragment C)를 포함하는 DNA플라스미드, DNA용액(4㎕/㎖)에 키토산(CL 113, 플로노바 바이오폴리머)용액(4mg/㎖)을 천천히 첨가하여, 1:10의 DNA:키토산 비율을 가지는 DNA 플라스미드 복합체를 제조한다. 100 내지 300㎚범위 크기의 입자를 얻도록 조제되었다. 입자는 5% 마니톨을 첨가한 후에 냉동건조되었다.

냉동건조복합체는 투약되기 바로 직전에 물에서 분산되었고, 탄력성을 부여할 경우 마니톨이 추가로 더 첨가될 수 있다. DNA 복합체의 농도는 100㎍/100㎕이다. 현탁액은 모노스프레이(monospray) (Valois)의 코스프레이(nasal spray)시스템에 채워지고, 100㎕투약량으로 환자의 비강에 투약된다. 필요시, 투약은 14일후에 반복 될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

크기가 10㎚～1㎛이며, 표면전하를 가지는, 키토산 및 핵산의 미립복합체로 구성된, 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 핵산이 DNA 일때, DNA : 키토산 비율이 1:1 ～ 1:6범위에 대하여는 표면전하가 +10㎷

이상이고, 기타 DNA : 키토산 비율범위에 대하여는 +20mV이상인, 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 핵산이 DNA인, 조성물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 있어서, 핵산이 발현될 수 있는, 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 핵산이 백신으로 예정된 항원물질을 암호화하는, 조성물.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 핵산이 항염제를 암호화하는, 조성물.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 핵산이 항감염제를 암호화하는, 조성물.

청구항 8

제 4 항에 있어서, 핵산이 수크로즈-이소말타아제, 락타아제-플로리진 히드로라제 또는 말타아제-글로코아밀라아제를 암호화하는, 조성물.

청구항 9

제 1 항 내지 제 4 항중 어느하나의 항에 있어서, 핵산이 약물 또는 안티센스제를 암호화하는, 조성물.

청구항 10

제 4 항에 있어서, 핵산이 바이러스성, 세균성 또는 기생체 단백질을 암호화하는, 조성물.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항중 어느하나의 항에 있어서, 복합체가 더 큰 미소구체 표면에 결합되는, 조성물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항중 어느하나의 항에 의한 조성물이 포유동물의 상피표면에 전달되는,
핵산전달방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상피표면이 위장관인, 핵산전달방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상피표면이 소장인, 핵산전달방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서, 상피표면이 결장인, 핵산전달방법.

청구항 16

제 13 항에 있어서, 상피표면이 소화관 관련 림프조직인, 핵산전달방법.

청구항 17

제 12 항에 있어서, 상피표면이 비점막인, 핵산전달방법.

청구항 18

제 12 항에 있어서, 상피표면이 코관련 림프조직인, 핵산전달방법.

청구항 19

제 12 항에 있어서, 상피표면이 질인, 핵산전달방법.

청구항 20

제 12 항에 있어서, 상피표면이 구강 또는 식도인, 핵산전달방법.

청구항 21

제 13 항에 있어서, 상피표면이 직장인, 핵산전달방법.

청구항 22

제 12 항에 있어서, 상피표면이 폐부위인, 핵산전달방법.

청구항 23

제 12 항에 있어서, 상피표면이 눈 또는 내이인, 핵산전달방법.

청구항 24

제 12 항에 내지 제 23 항중 어느한 항에 있어서, 점액용해제, 렉틴, 부착인자 또는 인베신(invasin)이 공동투약되는, 핵산전달방법.

청구항 25

약제에 있어서, 제 1 항 내지 제 11 항중 어느 하나의 항에 의한 조성물의 용도.

청구항 26

백신용 약제제조에 있어서, 복합체가 500㎚이하의 직경을 가지는 제 5 항에 의한 조성물의 용도.

청구항 27

이당 불내성증 치료용 약제제조에 있어서, 제 8 항에 의한 조성물의 용도.

청구항 28

결장암 치료용 약제제조에 있어서, 제 9 항에 의한 조성물의 용도.

청구항 29

장내감염에 대한 예방접종용 약제제조에 있어서, 제 10 항에 의한 조성물의 용도.

청구항 30

핵산 및 키토산의 혼합으로 구성된, 제 1 항 내지 제 11 항중 어느하나의 항에의한 미립복합체의 조제 방법.

청구항 31

상피표면으로의 핵산전달에 있어서, 제 1 항 내지 제 11 항중 어느하나의 항에 의한 조성물의 용도.

청구항 32

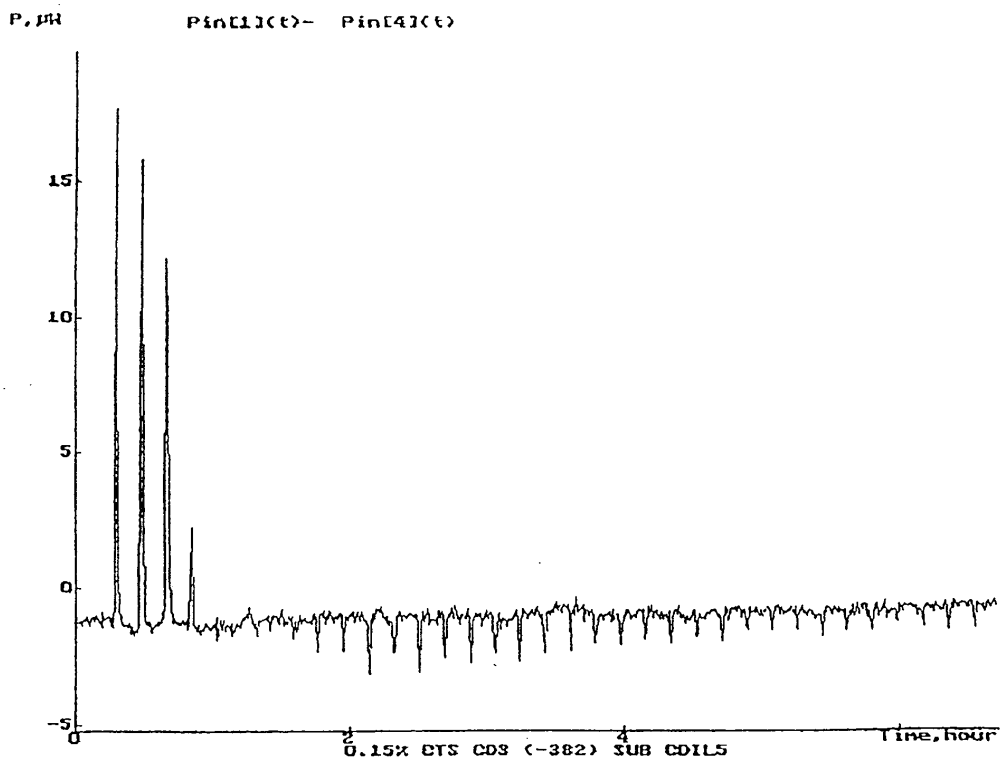
키토산용액 및 DNA용액으로 구성되며, 선택적으로는 저이온세기 완충액에서 존재하는 부품키트.

청구항 33

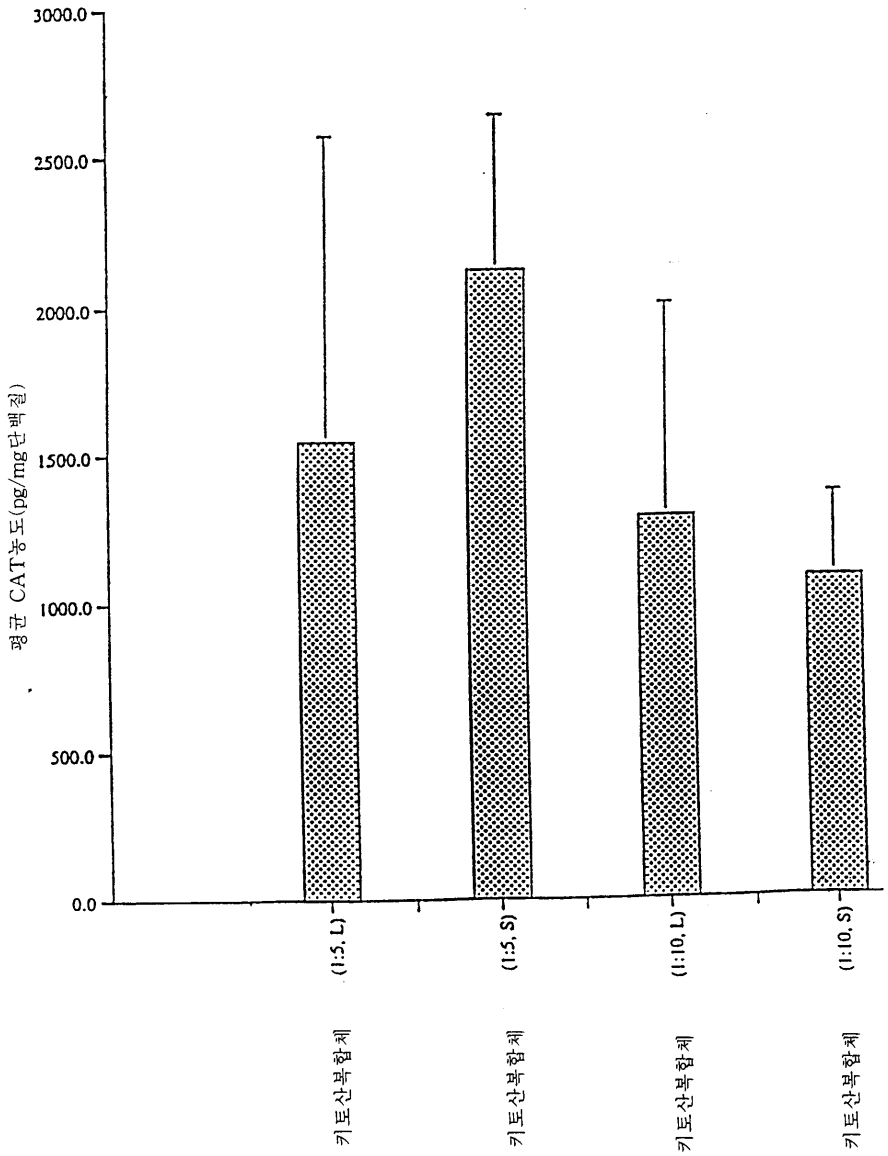
제 1 항 내지 제 11 항중 어느하나의 항에 의한 냉동건조 조성물 및 투약부형제로 구성된, 부품키트.

도면

도면1



도면2


3000.0
2500.0
2000.0
1500.0
1000.0
500.0
0.0
평균 CAT농도(pg/mg단백질)
(1:5, L)
(1:5, S)
(1:10, L)
(1:10, S)
키토산복합체
키토산복합체
키토산복합체
키토산복합체

도면3

