



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월23일
(11) 등록번호 10-1284710
(24) 등록일자 2013년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/38 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7020211
(22) 출원일자(국제) 2005년03월03일
심사청구일자 2010년03월03일
(85) 번역문제출일자 2006년09월28일
(65) 공개번호 10-2007-0024502
(43) 공개일자 2007년03월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/006931
(87) 국제공개번호 WO 2005/120546
국제공개일자 2005년12월22일
(30) 우선권주장
60/550,014 2004년03월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US06696038 B1
US20030229034 A1
WO2003072049 A2

(73) 특허권자
레반스 테라퓨틱스, 아이엔씨.
미국 캘리포니아 94560 뉴어크 게이트웨이 블레바드 7555
(72) 발명자
데이크 마이클 디.
미국 캘리포니아 94305 스탠포드 제로나 로드 665
워 제이콥 엠.
미국 캘리포니아 94040 마운틴 뷰 엘 카미노 리얼 #1116 4020
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 56 항

심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 국소 진단제 및 치료제의 수송을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

단백질도 아니고 뉴클레오타이드도 아닌 치료제, 및 인슐린, 보툴리눔 독소, 항체 단편, 및 VEGF를 배제한 단백질-기반 치료제와 같은 생물학적 활성제의 경피 전달을 포함한, 전달에 유용한 조성물 및 방법이 제공된다. 본 발명의 조성물 및 방법은 특히, 항진균제 및 면역화에 적합한 항원성 작용제의 국소 전달에 특히 유용하다. 대안적으로, 본 발명의 조성물은 이미징 구성성분 외에 조성물의 전달을 표적으로 지향하기 위해 유용한 성분들로 제조될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

인슐린이 아닌 생물학적 활성 단백질, 및

$-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ (서열번호 1), $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR}-(\text{gly})_q$ (서열번호 2), $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$ (서열번호 3), $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$ (서열번호 4), 및 안테나페디아 단백질 전달 도메인(Antennapedia protein transduction domain: PTD)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열이 부착된 양전하로 하전된 폴리머성 백본을 포함하는 양전하로 하전된 담체를 포함하고,

상기 아래첨자 $n1$ 은 0 내지 20의 정수이고 아래첨자 $n2$ 는 독립적으로 5 내지 25의 홀수이고,

상기 아래첨자 p 및 q 는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수이고,

상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 상기 생물학적 활성 단백질의 경피 전달을 촉진하는 폴리펩티드이고,

상기 양전하로 하전된 담체는 상기 생물학적 활성 단백질의 경피 전달을 위하여 필요한 유일한 작용제 (sole agent)이고,

상기 생물학적 활성 단백질 및 상기 양전하로 하전된 담체는 유효량의 상기 생물학적 활성 단백질을 경피적으로 전달하기 위한 양으로 서로 함께 (in conjunction with) 존재하고,

상기 양전하로 하전된 담체와 상기 생물학적 활성 단백질은 비-공유 복합체를 형성하는 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생물학적 활성 단백질은 보툴리눔 독소, 혈관내피성장인자 (vascular endothelial growth factor: VEGF), 또는 항체 단편을 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 생물학적 활성 단백질은 혈당 수준을 치료적으로 변화시키지 않는 것인 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 생물학적 활성 단백질은 보툴리눔 독소를 배제하는 것인 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 생물학적 활성 단백질은 VEGF를 배제하는 것인 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 생물학적 활성 단백질은 항체 단편을 배제하는 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 담체의 부재 시의 상기 생물학적 활성 단백질에 비해 상기 생물학적 활성 단백질의 보다 많은 경피 전달을 제공하는 것인 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 생물학적 활성 단백질은 치료적 활성을 갖는 것인 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 생물학적 활성 단백질은 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 것인 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 10,000 내지 1,500,000의 분자량을 갖는 양전하로 하전된 폴리펩티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 25,000 내지 1,200,000의 분자량을 갖는 양전하로 하전된 폴리펩티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 100,000 내지 1,000,000의 분자량을 갖는 양전하로 하전된 폴리펩티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 양전하로 하전된 폴리라이신을 포함하는 것인 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 10,000 내지 1,500,000의 분자량을 갖는 양전하로 하전된 폴리라이신을 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 25,000 내지 1,200,000의 분자량을 갖는 양전하로 하전된 폴리라이신을 포함하는 것인 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 100,000 내지 1,000,000의 분자량을 갖는 양전하로 하전된 폴리라이신을 포함하는 것인 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 식 $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ (서열번호 1)를 갖는 기들로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 아래첨자 $n1$ 은 0 내지 8의 정수인 것인 조성물.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 아래첨자 $n1$ 은 2 내지 5의 정수인 것인 조성물.

청구항 28

제25항에 있어서, 상기 아래첨자 $n2$ 는 7 내지 17의 홀수인 것인 조성물.

청구항 29

제25항에 있어서, 상기 아래첨자 $n2$ 는 7 내지 13의 홀수인 것인 조성물.

청구항 30

삭제

청구항 31

제1항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 아래첨자 p 및 q 는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수인 것인 식 $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$ (서열번호 2), $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$ (서열번호 3), 또는 $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ (서열번호 4)를 갖는 것인 조성물.

청구항 32

제1항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 안테나페디아 단백질 전달 도메인(PTD) 기들인 것인 조성물.

청구항 33

제1항의 조성물을 대상자에게 투여하기 위한 키트로서, 상기 키트는

제1항의 조성물, 및

상기 조성물을 전달하는 장치를 포함하는 것인 키트.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 생물학적 활성 단백질은 보툴리눔 독소, VEGF, 또는 항체 단편을 포함하지 않는 것인 키트.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 조성물은 피부 또는 상피를 통해 상기 생물학적 활성 단백질을 대상자에게 투여하기 위한 장치에 담겨있는 것인 키트.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 장치는 피부 패치인 것인 키트.

청구항 37

생물학적 활성 단백질을 대상자에게 투여하기 위한 키트로서,

인슐린이 아닌 생물학적 활성 단백질,

양전하로 하전된 폴리머성 백본을 포함하는 양전하로 하전된 담체, 및

상기 생물학적 활성 단백질 및 상기 양전하로 하전된 담체를 피부 또는 상피에 전달하기 위한 장치를 포함하고,

상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 상기 생물학적 활성 단백질의 경피 전달을 촉진하는 폴리펩티드이고,

상기 양전하로 하전된 담체는 상기 생물학적 활성 단백질의 경피 전달을 위하여 필요한 유일한 작용제이고,

상기 생물학적 활성 단백질 및 상기 양전하로 하전된 담체는 유효량의 상기 생물학적 활성 단백질을 경피적으로 전달하기 위한 양으로 서로 함께 존재하고,

상기 양전하로 하전된 담체와 상기 생물학적 활성 단백질은 비-공유 복합체를 형성하고,

상기 양전하로 하전된 담체는 부착된 아미노산 서열을 갖고, 상기 아미노산 서열은 $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ (서열번호 1), $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRQRRR}-(\text{gly})_q$ (서열번호 2), $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$ (서열번호 3), $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$ (서열번호 4), 및 안테나페디아 PTD로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고,

상기 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수이고,

상기 아래첨자 n1은 0 내지 20의 정수이고 아래첨자 n2는 독립적으로 5 내지 25의 홀수인 것인 키트.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 장치는 피부 패치인 것인 키트.

청구항 39

인슐린이 아닌 면역화에 적합한 항원, 및

부착된 아미노산 서열을 갖는 양전하로 하전된 폴리머성 백본을 포함하는 양전하로 하전된 담체를 포함하는 조성물로서,

상기 아미노산 서열은 $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ (서열번호 1), $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRQRRR}-(\text{gly})_q$ (서열번호 2), $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$ (서열번호 3), $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$ (서열번호 4), 및 안테나페디아 PTD로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고,

상기 아래첨자 n1은 0 내지 20의 정수이고 아래첨자 n2는 독립적으로 5 내지 25의 홀수인 것이고,

상기 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수이고,

상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 상기 면역화에 적합한 항원의 경피 전달을 촉진하는 폴리펩티드이고,

상기 양전하로 하전된 담체는 상기 면역화에 적합한 항원의 경피 전달을 위하여 필요한 유일한 작용제이고,

상기 면역화에 적합한 항원 및 상기 양전하로 하전된 담체는 유효량의 상기 면역화에 적합한 항원을 경피적으로 전달하기 위한 양으로 서로 함께 존재하고,

상기 양전하로 하전된 담체와 상기 면역화에 적합한 항원은 비-공유 복합체를 형성하는 것인 조성물.

청구항 40

삭제

청구항 41

제39항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 10,000 내지 1,500,000의 분자량을 갖는 양전하로 하전된 폴리펩티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 42

제39항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 25,000 내지 1,200,000의 분자량을 갖는 양전하로 하전된 폴리펩티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 43

제39항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 100,000 내지 1,000,000의 분자량을 갖는 양전하로 하전된 폴리펩티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 44

제39항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 양전하로 하전된 폴리라이신을 포함하는 것인 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 10,000 내지 1,500,000의 분자량을 갖는 양전하로 하전된 폴리라이신을 포함하는 것인 조성물.

청구항 46

제44항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 25,000 내지 1,200,000의 분자량을 갖는 양전하로 하전된 폴리라이신을 포함하는 것인 조성물.

청구항 47

제44항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 100,000 내지 1,000,000의 분자량을 갖는 양전하로 하전된 폴리라이신을 포함하는 것인 조성물.

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

제39항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 아래첨자 n_1 은 0 내지 20의 정수이고 아래첨자 n_2 는 독립적으로 5 내지 25의 홀수인 것인 식 $-(\text{gly})_{n_1}-(\text{arg})_{n_2}$ (서열번호 1)을 갖는 것인 조성물.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 아래첨자 n_1 은 0 내지 8의 정수인 것인 조성물.

청구항 57

제55항에 있어서, 상기 아래첨자 n_1 은 2 내지 5의 정수인 것인 조성물.

청구항 58

제55항에 있어서, 상기 아래첨자 n_2 는 7 내지 17의 홀수인 것인 조성물.

청구항 59

제55항에 있어서, 상기 아래첨자 n_2 는 7 내지 13의 홀수인 것인 조성물.

청구항 60

삭제

청구항 61

제39항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 아래첨자 p 및 q 는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수인 것인 식 $(gly)_p$ -RGRDDRRQRRR- $(gly)_q$ (서열번호 2), $(gly)_p$ -YGRKKRRQRRR- $(gly)_q$ (서열번호 3), 또는 $(gly)_p$ -RKKRRQRRR- $(gly)_q$ (서열번호 4)를 갖는 HIV-TAT 단편들인 것인 조성물.

청구항 62

제39항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 안테나페디아 단백질 전달 도메인(PTD) 기들인 것인 조성물.

청구항 63

삭제

청구항 64

제39항에 있어서, 상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 폴리라이신, 폴리아르기닌, 폴리오르니틴 및 폴리호모아르기닌으로부터 선택된 폴리펩티드인 것인 조성물.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 폴리라이신인 것인 조성물.

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

제39항에 있어서, 1×10^{-10} 내지 49.9 중량%의 상기 면역화에 적합한 항원 및 1×10^{-9} 내지 50 중량%의 상기 양전하로 하전된 담체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 70

제39항에 있어서, 제어 방출형인 것인 조성물.

청구항 71

제39항에 있어서, 상기 면역화에 적합한 항원은 보툴리눔 독소, VEGF, 또는 항체 단편을 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 72

제39항에 있어서, 상기 면역화에 적합한 항원은 유년기 면역화(childhood immunization)에 적합한 것인 조성물.

청구항 73

면역화에 적합한 항원을 대상자에게 투여하기 위한 키트로서,

인슐린이 아닌 면역화에 적합한 항원,

양전하로 하전된 담체, 및

상기 면역화에 적합한 항원 및 상기 양전하로 하전된 담체를 피부 또는 상피에 전달하기 위한 장치를 포함하고,

상기 양전하로 하전된 담체는 부착된 아미노산 서열을 갖는 양전하로 하전된 폴리머성 백본을 포함하고,

상기 양전하로 하전된 폴리머성 백본은 상기 면역화에 적합한 항원의 경피 전달을 촉진하는 폴리펩티드이고,

상기 양전하로 하전된 담체는 상기 면역화에 적합한 항원의 경피 전달을 위하여 필요한 유일한 작용제이고,

상기 면역화에 적합한 항원 및 상기 양전하로 하전된 담체는 유효량의 상기 면역화에 적합한 항원을 경피적으로 전달하기 위한 양으로 서로 함께 존재하고,

상기 양전하로 하전된 담체와 상기 면역화에 적합한 항원은 비-공유 복합체를 형성하고,

상기 아미노산 서열은 $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ (서열번호 1), $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRQRRR}-(\text{gly})_q$ (서열번호 2), $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$ (서열번호 3), $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$ (서열번호 4), 및 안테나페디아 PTD로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고,

상기 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수이고,

상기 아래첨자 n1은 0 내지 20의 정수이고 아래첨자 n2는 독립적으로 5 내지 25의 홀수인 것인 키트.

청구항 74

면역화에 적합한 항원을 대상자에게 투여하기 위한 키트로서, 상기 면역화에 적합한 항원을 피부 또는 상피에 전달하는 장치 및 제39항의 조성물을 포함하는 것인 키트.

청구항 75

제73항에 있어서, 맞춤형 애플리케이션을 더 포함하는 것인 키트.

청구항 76

제73항에 있어서, 상기 면역화에 적합한 항원은 상기 면역화에 적합한 항원을 피부 또는 상피를 통해 대상자에게 투여하는 장치에 담겨있는 것인 키트.

청구항 77

제73항에 있어서, 상기 장치는 국소적으로 적용되는 것인 키트.

청구항 78

제73항에 있어서, 상기 장치는 피부 패치인 것인 키트.

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

청구항 181

삭제

청구항 182

삭제

청구항 183

삭제

청구항 184

삭제

청구항 185

삭제

청구항 186

삭제

청구항 187

삭제

청구항 188

삭제

청구항 189

삭제

청구항 190

삭제

청구항 191

삭제

명세서

기술분야

- [0001] 본 출원은 그 전체가 원용에 의해 본 출원에 포함된, 2004년 3월 3일에 제출된 미국 가출원 제60/550,014호에 기초한 우선권 이익을 주장한다.
- [0002] 본 발명은 특정 부위로의 전달을 최대화하기 위해 표적지향되거나 이미징될 수 있는 다양한 치료제 또는 미용 약제(cosmetical agent)의 조성물들에 광범위하게 적용될 수 있는 신규한 방법 및 조성물에 관한 것이다.
- [0003] 본 발명은 또한 인슐린, 보툴리눔 독소, 항체 단편 및 VEGF가 아닌 단백질-바람직하게는 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질의 경피 전달용 제제(formulation)에 관한 것이다.

배경기술

- [0004] 피부는 외부의 환경적 위협으로부터 신체의 기관을 보호하고 체온을 유지하기 위한 자동온도조절장치(thermostat)로서 작용한다. 피부는 수개의 상이한 층들로 구성되며, 각 층은 특화된 기능을 갖는다. 주요 층들은 표피(epidermis), 진피(dermis) 및 피하조직(hypodermis)을 포함한다. 표피는 결합 조직으로 구성되는 진피를 덮는 상피 세포들의 겹층(stratifying layer)이다. 표피 및 진피는 모두 지방 조직의 내부 층인 피하조직에 의해 더 지지된다.
- [0005] 피부의 최상층인 표피는 그 두께가 0.1 내지 1.5 밀리미터에 불과하다(Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). 표피는 케라티노사이트로 구성되며 그들의 분화 상태에 근거하여 수 개의 층들로 분류된다. 표피는 각질층(stratum corneum) 및 과립(granular) 세포, 유극(melphigian) 세포 및 기저(basal) 세포로 구성된 생 표피층(viable epidermis)으로 더 분류될 수 있다. 각질층은 수분을 흡수하며 그 유연성 및 부드러움을 유지하기 위해 10 중량% 이상의 수분을 필요로 한다. 흡습성(hygroscopicity)은 부분적으로 케라틴의 수분-보유 능력에서 기인한다. 각질층이 그의 부드러움 및 유연성을 상실하면, 이는 거칠고 부서지기 쉬워져서, 건조한 피부를 초래한다.
- [0006] 표피 바로 하부에 존재하는 진피는 그 두께가 1.5 내지 4 밀리미터이다. 진피는 피부의 세 층들 중에서 가장 두껍다. 또한, 진피는 또는 한선 및 유선(면포 또는 모공이라 불리는 피부의 개구부들을 통해 물질들을 분비함), 모근, 신경 말단 및 혈관 및 림프관을 포함한 피부의 구조물들의 대부분이 존재하는 곳이다(Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). 그러나, 진피의 주요 성분들은 콜라겐 및 엘라스틴이다.
- [0007] 피하조직은 피부의 최심부 층이다. 피하조직은 체온 유지를 위한 절연층 및 기관 보호를 위한 충격 흡수층으로 작용한다(Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7(1998)). 또한, 피하조직은 에너지 저장장을 위해 지방을 저장한다. 피부의 pH는 정상 상태에서 5와 6 사이이다. 피부의 산성은 피지선의 분비물로부터 유래한 양성(amphoteric) 아미노산, 젖산, 및 지방산의 존재 때문이다. "산성 맨틀(acid mantle)"이라는 용어는 피부의 대부분의 영역 상에 있는 수용성 물질들의 존재를 의미한다. 피부의 완충(buffering) 능력은 부분적으로는 피부의 각질층에 저장된 이 분비물들에서 기인한다.
- [0008] 노화의 자명한 징후들 중 하나인 주름은 환경적 손상으로부터 축적되는 생화학적, 조직학적, 및 생리적 변화들에 의해 유발될 수 있다(Benedetto, International Journal of Dermatology, 38: 641-655(1999)). 또한, 안면 주름의 특징적인 접힘(fold), 골(furrow), 및 구겨짐(crease)을 유발할 수 있는 다른 이차 인자들이 있다(Stegman et al., The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5- 15 (1990)). 이와 같은 이차적인 인자들은 피부에 대한 중력의 지속적인 인력, (즉, 수면 동안) 빈번하고 지속적인 위치적 압력(positional pressure), 및 안면 근육의 수축에 의해 유발되는 반복적인 안면 운동을 포함한다(Stegman et al., The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)). 노화의 징후들 중 일부를 잠재적으로 완화시키기 위해 상이한 기법들이 이용되고 있다. 이 기법들은 알파 히드록시산 및 레티놀을 포함하는 안면 보습제에서 외과적 수술 및 신경 독소의 주사에 이르기까지 다양하다.
- [0009] 피부의 주요 기능들 중 하나는 정상적인 항상성에 잠재적으로 유해할 수 있는 물질들 및 물의 수송에 대한 장벽을 제공하는 것이다. 신체는 단단하고, 반-투과성인 피부가 없다면 빠르게 탈수될 것이다. 피부는 유해한 물질들의 신체로의 침입을 방지하도록 돕는다. 대부분의 물질들은 장벽을 침투할 수 없으나, 다양한 성공율로 피부

의 투과성을 선택적으로 증가시키기 위한 다수의 전략들이 개발되었다.

[0010] 항진균제(antifungals)와 같은 단백질도 아니고 핵산도 아닌 치료제(non-protein non-nucleotide therapeutic agent)는 피부를 효율적으로 통과할 수 없기 때문에, 항진균제의 치료적 효과를 제공하기 위해 현재 피부로 주사되거나 또는 전신으로 투여되어야 한다. 미연방 식품의약청은 진균 감염(fungal infection)의 치료를 위해 그와 같은 시술(procedure)을 허가했다. 그와 같은 치료법에서, 항진균제는 모니터링된 주사 또는 투여량에 의해 투여된다. 그러나, 그와 같은 치료는 유해한 부작용을 유발할 수 있다. 항진균제의 국소 적용은 적용에 따른 무통증 속성, 항진균성 치료제를 적용하기 위한 수련의 감소, 치료적 임상 결과를 가져오고 이에 도달하기 위해 필요한 보다 적은 투여량 및 전신 전달과 통상적으로 관련되는 한정된 부작용 때문에 보다 안전하고 보다 바람직한 치료 대안을 위한 국소 적용을 제공한다.

[0011] 면역화에 적합한 항원성 작용제는 피부를 효율적으로 통과할 수 없기 때문에, 면역화에 적합한 항원성 작용제의 치료적 효과를 제공하기 위해, 현재 독소는 피부로 주사되어야 한다. 미연방 식품의약청은 예를 들면, 말라리아, 공수병, 탄저병, 결핵 또는 B형 간염, 디프테리아, 백일해, 과상풍, 헤모필루스 인플루엔자 타입 b, 불활성화된 폴리오바이러스, 홍역, 볼거리, 풍진, 수두, 폐렴구균, A형 간염 및 인플루엔자와 같은 유년기 면역(childhood immunization)과 관련된 질병의 치료를 위해 그와 같은 시술을 허가했다. 그와 같은 치료에서, 면역화를 위한 항원성 작용제는 모니터링된 주사에 의해 투여된다. 그러나, 그와 같은 치료는 불편할 수 있고, 보다 통상적으로는 일부 통증을 수반한다. 면역화를 위한 항원성 작용제의 국소 적용은 시술의 무통증 속성, 적용 대상이 될 수 있는 보다 넓은 치료 표면 영역, 치료제를 적용하기 위해 필요한 수련의 감소, 치료적 임상 결과를 도출하고 이에 도달하기 위해 필요한 보다 작은 투여량 때문에 보다 안전하고 보다 바람직한 치료 대안을 제공한다.

[0012] 다른 치료제들의 경피 투여도 예를 들면, 환자의 불편 감소 가능성, 치료제의 혈류로의 직접 투여, 및 특수하게 구축된 장치 및/또는 제어 방출형 제제 및 기법의 이용을 통한 모니터링된 전달의 기회 때문에, 큰 관심의 영역이다.

발명의 상세한 설명

[0013] 본 발명은 특정 부위의 전달을 최대화하기 위해 표적지향되거나 이미징될 수(imaged) 있는 다양한 치료제 또는 미용약제(cosmetical agent)의 조성물들에 광범위하게 적용될 수 있는 신규한 방법 및 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 인슐린, 보툴리눔 독소, 항체 단편 및 VEGF가 아닌 단백질-바람직하게는 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질의 경피 전달용 제제(formulation)에 관한 것이다. 그와 같은 단백질-기반 작용제는 예를 들면, 면역화에 적합한 항원을 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서 본 발명은 예를 들면, 일부 항진균제와 같은 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제(non-protein non-nucleotide therapeutic agent)의 경피 전달용 제제에 관한 것이다. "치료제(therapeutic)" 또는 "생물학적 활성 단백질(biologically active protein)"이라는 용어가 사용될 때, 본 발명은 구체적으로 인슐린, 보툴리눔 독소, VEGF 및 항체 단편들을 배제한다. 그러나, 면역화에 적합한 항원들은 면역 반응을 일으키는 것과 같은 다른 생물학적 활성들을 갖기 때문에, 이들은 본 발명의 적합한 양태들에 포함된다.

[0015] 본 발명은 또한 항진균제와 같은 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제의 경피 전달용 제제에 관한 것이다. 적합한 항진균제는 예를 들면, 암포테리신 B, 플루코나졸, 플루시토신, 이트라코나졸, 케토코나졸, 클로트리마졸, 에코노졸, 그리세오폴빈, 미코나졸, 니스타틴 또는 시클로피록스 등을 포함한다.

[0016] 본 발명은 또한 면역화에 적합한 항원성 작용제의 경피 전달용 제제에 관한 것이다. 면역화에 적합한 항원성 작용제들은 단백질-기반 항원들, 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 작용제 또는 그들의 하이브리드일 수 있다. 적합한 항원들은 예를 들면, 환경적 작용제, 병원균, 또는 바이오해저드(biohazard)에 관한 것들을 포함한다. 적합한 작용제는 바람직하게는 말라리아, 공수병, 탄저병, 결핵 또는 B형 간염, 디프테리아, 백일해, 과상풍, 헤모필루스 인플루엔자 타입 b, 불활성화된 폴리오바이러스, 홍역, 볼거리, 풍진, 수두, 폐렴구균, A형 간염 및 인플루엔자와 같은 유년기 면역에 관계된 항원들을 포함한다.

[0017] 그러나, 면역화에 적합한 항원들은 면역 반응을 일으키는 것과 같은 다른 생물학적 활성들을 갖기 때문에, 이들은 본 발명의 적합한 양태들에 포함된다. 피부를 용이하게 통과하지 않으나 실질적으로 예를 들면, 인슐린보다 작거나-가장 바람직하게는 20,000kD 미만의 작용제- 또는 상이한 물리화학적 특성들을 갖는 작용제들은 본 발명의 또 다른 양태를 통해 전달될 수 있다. 상세하게는, 면역화에 적합한 항원들은 본 발명을 통해 주사 없이 피부를 통해 수송될 수 있다. 결과는 유년기 면역화 또는 잠재적으로 중요한 바이오해저드 또는 환경적 해저드에

대한 무-주사(injection-free) 대안을 제공한다. 또한, 예를 들면, 일부 항진균제와 같은 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제, 특히, 조갑백선(onychomycosis) 또는 손톱 및 조체(nail plate)의 감염과 같은 진균성 감염에 대한 치료제는 불충분한 국소 투과를 특징으로 한다.

[0018] 따라서, 본 발명은 단백질, 특히, 20,000kD 미만의 분자량을 갖는 단백질 또는 다른 생물학적 활성제, 예를 들면, 일부 항진균제와 같은 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제 또는 대안적으로 면역화용 작용제를 포함하는 치료제 및 진단제(diagnostic substance)의 경피 전달용 국소 제제에 관한 것이다. 그러나, 면역화에 적합한 항원들은 면역 반응을 일으키는 것과 같은 다른 생물학적 활성들을 갖기 때문에, 이들은 본 발명의 적합한 양태들에 포함된다. 적합한 항진균제는 예를 들면, 암포테리신 B, 플루코나졸, 플루시토신, 이트라코나졸, 케토코나졸, 클로트리마졸, 에코노졸, 그리세오폴빈, 미코나졸, 니스타틴 또는 시클로피록스 등을 포함한다. 적합한 작용제는 바람직하게는 말라리아, 공수병, 탄저병, 결핵 또는 B형 간염, 디프테리아, 백일해, 파상풍, 헤모필루스 인플루엔자 타입 b, 불활성화된 폴리오바이러스, 홍역, 볼거리, 풍진, 수두, 폐렴구균, A형 간염 및 인플루엔자와 같은 유년기 면역에 관계된 항원들을 포함한다.

[0019] 본 발명은 생물학적 활성 단백질 및 담체를 갖는 조성물을 제공한다. 담체는 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 폴리머성 백본을 가지며 경피 전달을 위한 유효량으로 존재한다. 담체와 생물학적 활성 단백질 간의 결합은 비-공유결합성이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 생물학적 활성제 및 담체를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다. 담체는 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 폴리머성 백본을 가지며 경피 전달을 위한 유효량으로 존재한다. 담체와 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 생물학적 활성제 간의 결합은 비-공유결합성이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은 대상자에게 생물학적 활성 단백질을 투여하는 키트를 제공하는 것이다. 키트는 생물학적 활성 단백질을 대상자의 피부 또는 상피에 전달하는 장치 및 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 폴리머성 담체를 갖는 조성물을 포함한다. 양전하로 하전된 분지형 기들은 아래첨자 n1은 0 내지 약 20의 정수이고 아래첨자 n2는 독립적으로 약 5 내지 약 25의 홀수인 $-(gly)_{n1}-(arg)_{n2}$, HIV-TAT 및 그 단편 및 안테나페디아 PTD 및 그 단편으로부터 선택될 수 있다. 담체와 생물학적 활성 단백질 간의 결합은 비-공유결합성이다.

[0022] 본 발명은 또한 대상자에게 생물학적 활성 단백질을 투여하는 방법을 제공한다. 이 방법은 담체의 유효량과 함께 단백질을 대상자의 피부 또는 상피에 국소적으로 적용하는 단계를 포함한다. 담체는 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 폴리머성 백본을 포함한다. 담체와 생물학적 활성 단백질 간의 결합은 비-공유결합성이다.

[0023] 또한, 본 발명은 대상자에게 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 생물학적 활성제를 투여하는 방법을 제공한다. 이 방법은 담체의 유효량과 함께 생물학적 활성제를 대상자의 피부 또는 상피에 국소적으로 적용하는 단계를 포함한다. 담체는 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 폴리머성 백본을 포함할 수 있다. 담체와 생물학적 활성제 간의 결합은 비-공유결합성이다.

[0024] 본 발명의 하나의 목적은 면역화에 적합한 항원 및 담체를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다. 담체는 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 폴리머성 백본을 포함하고 경피 전달을 위한 유효량으로 존재한다. 담체와 항원 간의 결합은 비-공유결합성이다. 본 발명의 또 다른 목적은 대상자에게 면역화에 적합한 항원을 투여하기 위한 키트를 제공하는 것이다. 키트는 면역화에 적합한 항원을 피부 또는 상피에 전달하는 장치 및 담체를 갖는 조성물을 포함한다. 담체는 아래첨자 n1은 0 내지 약 20의 정수이고 아래첨자 n2는 독립적으로 약 5 내지 약 25의 홀수인 $-(gly)_{n1}-(arg)_{n2}$, HIV-TAT 및 그 단편, 및 안테나페디아 PTD로부터 선택되는 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 폴리머성 백본을 포함한다. 담체와 항원 간의 결합은 비-공유결합성이다.

[0025] 본 발명의 또 다른 목적은 대상자에게 면역화에 적합한 항원을 투여하는 방법을 제공하는 것이다. 이 방법은 담체의 유효량과 함께 면역화에 적합한 항원을 대상자의 피부 또는 상피에 국소적으로 적용하는 단계를 포함한다. 담체는 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 폴리머성 백본을 포함한다. 담체와 항원 간의 결합은 비-공유결합성이다.

[0026] 본 발명은 또한 이미징 모이어티 및/또는 표적지향 작용제 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 담체는 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 폴리머성 백본을 가지며 경피 전달을 위한 유효량으로 존재한다. 담체와 이미징 모이어티 또는 표적지향 작용제 간의 결합은 비-공유결합성이다.

[0027] 일 양태에서, 본 발명은:

- [0028] a) 양전하로 하전된 백본; 및
- [0029] b) 하기의:
- [0030] i) 복수 개의 부착된 이미징 모이어티(imaging moieties)를 갖는 제1의 음전하로 하전된 백본, 또는 복수 개의 음전하로 하전된 이미징 모이어티;
- [0031] ii) 복수 개의 부착된 표적지향 작용제(targeting agent)를 갖는 제2의 음전하로 하전된 백본, 또는 복수 개의 음전하로 하전된 표적지향 모이어티;
- [0032] iii) 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 생물학적 활성제;
- [0033] iv) 인슐린, 보툴리눔 독소, 항체 단편, 또는 VEGF가 아닌 치료용 단백질;로부터 선택되는 하나 이상의 구성성분의 비-공유결합성 복합체를 포함하는 조성물로서: 상기 복합체는 순 양전하를 갖는 것인 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 이 양태에서, 생물학적 작용제는 치료제 또는 미용약제일 수 있다. "치료제(therapeutic)" 또는 "생물학적 활성 단백질(biologically active protein)"이라는 용어가 사용될 때, 본 발명은 구체적으로 인슐린, 보툴리눔 독소, VEGF 및 항체 단편들을 배제한다. 그러나, 면역화에 적합한 항원들은 면역 반응을 일으키는 것과 같은 다른 생물학적 활성들을 갖기 때문에, 이들은 본 발명의 적합한 양태들에 포함된다. 대안적으로, 후보 작용제들이 이와 같은 비-공유결합성 복합체들에서 체내(in vivo) 효능을 결정하기 위해 이용될 수 있다.
- [0035] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 부착된 효능(efficiency) 기를 갖는 양전하로 하전된 백본과 분자 이미징(molecular imaging)용 작용제, 예를 들면, 광학적 이미징 작용제의 비-공유결합성 복합체를 포함하는 조성물을 제공한다. 가장 바람직하게는, 본 적용에서, 작용제는 진단 및/또는 치료 효과를 위한 특정 작용제를 표적으로 할 것이다. 예를 들면, 광학적 이미징 작용제는 흑색종의 표적지향 국소 진단을 위해 양전하로 하전된 백본 및 흑색종을 표적으로 삼는 구성성분과 결합될 수 있다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상자의 세포 표면으로 생물학적 작용제를 전달하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 대상자에게 전술된 바와 같은 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0036] 또 다른 양태에서, 본 발명은 약학적 또는 미용약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 순 양전하를 갖는 비-공유결합성 복합체를 형성하기 위해 양전하로 하전된 백본 성분과 하기의:
- [0037] i) 복수 개의 부착된 이미징 모이어티를 갖는 제1의 음전하로 하전된 백본, 또는 복수 개의 음전하로 하전된 이미징 모이어티;
- [0038] ii) 복수 개의 부착된 표적지향 작용제를 갖는 제2의 음전하로 하전된 백본, 또는 복수 개의 음전하로 하전된 표적지향 모이어티;
- [0039] iii) 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 생물학적 활성제;
- [0040] iv) 인슐린, 보툴리눔 독소, 항체 단편, 및 VEGF가 아닌 치료용 단백질;로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 약학적으로 또는 미용약학적으로 허용가능한 담체와 조합하는 단계를 포함한다.
- [0041] 또 다른 양태에서, 본 발명은 약학적 또는 미용약학적 전달 조성물(delivery composition)을 조제하기 위한 키트를 제공하며, 상기 키트는 전달 조성물을 조제하는 설명서와 함께, 양전하로 하전된 백본 성분 및 상기 성분들 i) 내지 iv)로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 포함한다.
- [0042] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은, 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질 및 다른 생물학적 활성제, 예를 들면, 일부 항진균제와 같은 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제 또는 대안적으로 면역화용 작용제 및 양전하로 하전된 분지형 또는 "효능(efficiency)" 기가 부착된 백본을 갖는 양전하로 하전된 담체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0043] 생물학적 활성제는 단백질-기반 치료제(예를 들면, 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질), 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제(예를 들면, 일부 항진균제), 또는 면역화용 항원일 수 있다. 적합한 항진균제는 예를 들면, 암포테리신 B, 플루코나졸, 플루시토신, 이트라코나졸, 케토코나졸, 클로트리마졸, 에코노졸, 그리세오폴빈, 미코나졸, 니스타틴 또는 시클로피록스 등을 포함한다. 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 면역화에 적합한 항원들은 혈당 수준을 치료적으로 변화시키지 않는 단백질-기반 항원, 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 작용제 또는 그 하이브리드일 수 있다. 따라서, 포함된 작용제들은 그 자체로 면역화에 적합한 항원들이다. 적합한 항원들은 예를 들면, 환경적 작용제, 병원균 또는 바이오헤르드에 관한 것들을 포함한다. 적합한 항원들

의 다른 예들은 말라리아, 공수병, 탄저병, 결핵 또는 B형 간염, 디프테리아, 백일해, 과상풍, 헤모필루스 인플루엔자 타입 b, 불활성화된 폴리오바이러스, 홍역, 볼거리, 풍진, 수두, 폐렴구균, A형 간염 및 인플루엔자와 같은 유년기 면역에 관계된 항원들을 포함한다.

[0044] 가장 바람직하게는, 양전하로 하전된 담체는 긴-사슬의 양전하로 하전된 폴리펩티드 또는 양전하로 하전된 비-펩티드 폴리머, 예를 들면, 폴리알킬렌이민이다. [동일한 작용제 및 본 발명의 담체들의 복합체에 비해] 피부 또는 상피를 정상적으로 용이하게 통과할 수 없고 혈당 저하에 대해 치료적 효과를 갖지 않는 단백질 및 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제는 예를 들면, 인슐린의 경피 전달을 제공했던 기법이 상기 단백질 및 비-단백질(non-protein) 치료제에 적용될 수 있는지 여부를 불확실하게 하는 매우 상이한 표면 및 물리화학적 특성들을 갖는다. 그러나, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 양전하로 하전된 분지형 기들을 갖는 양전하로 하전된 백본을 가진 본 발명의 담체들은 상당히 놀라운 정도로 단백질 및 비-단백질 치료제의 경피 전달을 제공할 수 있다.

[0045] 특정 단백질의 경피 전달에 적합한 특정 담체들은 실시예에 기재된 것들과 같은 테스트들을 이용하여 용이하게 확인될 수 있다. 그와 같은 단백질은 예를 들면, 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 소형 단백질일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는, 혈당의 측면에서 "치료적/치료용(therapeutic)"라는 용어는 예를 들면, 당뇨병 환자들에게서 고혈당증의 급성 증상들 또는 징후들을 경감시키기에 충분한 혈당 수준의 감소를 의미한다.

[0046] 본 발명은 또한 양전하로 하전된 폴리펩티드 또는 긴-사슬 폴리알킬렌이민과 같은 양전하로 하전된 비-펩티드 폴리머를 포함하는 담체(폴리펩티드 또는 비-펩티드 폴리머는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 양전하로 하전된 분지형 또는 "효능" 기들을 가짐)와 예를 들면, 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질과 같은 생물학적 활성제를 조합하는 단계를 포함하는, 약학적 또는 미용약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 대안적으로, 담체는 다른 생물학적 작용제, 예를 들면, 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제(예를 들면, 일부 항진균제) 또는 대안적으로 면역화용 작용제와 조합될 수 있다.

[0047] 본 발명은 또한 담체 및 치료적 물질, 및 유용한 제제 또는 그와 같은 제제를 생산하기 위해 이용될 수 있는 프리믹스(premix)를 생산하기 위해 필요한 추가적인 요소들(items)을 포함하는 조성물을 제조 또는 조제하기 위한 키트를 제공한다. 그와 같은 키트는 본 발명의 방법들에 따른 조성물들 또는 그 성분들의 적용을 위한 애플리케이터(applicator) 또는 기타 장치로 구성될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "장치(device)"라는 용어는 예를 들면, 본 발명의 방법에 따른 조성물을 전달, 혼합 또는 제조하기 위해 적합한 장치 또는 애플리케이터를 의미한다.

[0048] 본 발명은 또한 본 명세서에서 정의된 바와 같은 양전하로 하전된 분지형 기들 또는 "효능" 기들을 갖는 바람직하게는 짧은 사슬 내지 중간 사슬 길이의 폴리펩티드를 포함하는 담체 또는 다른 긴 사슬의 비-펩티드 폴리머성 담체를 포함하는 조성물 내에 담긴 생물학적 활성제의 경피 전달용 장치를 제공한다. 그와 같은 장치들은 피부 패치와 같이 구조가 간단할 수 있거나, 또는 조성물의 분배용 수단 및 조성물의 분배를 모니터링하는 수단을 포함하고, 선택적으로 하나 이상의 양태들에서 분배되는 물질들에 대한 대상자의 반응을 모니터링하는 수단을 포함하는 보다 복잡한 장치일 수 있다.

[0049] 본 발명의 또 다른 양태에서, 장치는 피부에 개별적으로 적용될 수 있는 치료용 생물학적 활성제 및 담체만을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명은 피부를 통한 분배용 장치 및 양전하로 하전된 담체 또는 백본을 포함하고 대상자의 피부 또는 상피에 적용하기에 적합한 물질을 포함하는 키트를 포함한다.

[0050] 일반적으로, 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은, 양전하로 하전된 분지형 기들을 갖는 폴리알킬렌이민과 같은 비-펩티드 폴리머 또는 양전하로 하전된 폴리펩티드와 함께 유효량의 생물학적 활성제를 국소적으로 투여하는 단계를 포함하는, 생물학적 활성제를 투여하는 방법을 포함한다.

[0051] "함께(in conjunction with)"는 두 성분을 대상자에게 투여할 조성물로 조합하거나, 또는 개별적으로 투여하나, 그들이 생물학적 활성제의 유효량의 원하는 전달을 제공하기 위해 함께 작용하는 방식으로 투여하는 단계를 포함하는 조합 절차로 투여된다는 것을 의미한다. 예를 들면, 양전하로 하전된 담체를 포함하는 조성물이 먼저 대상자의 피부에 적용되고, 뒤이어 생물학적 활성제를 포함하는 피부 패치 또는 다른 장치가 적용된다.

[0052] 본 발명은 또한 생물학적 활성제를 상피 피부 세포가 아닌 세포들, 예를 들면, 각막 상피세포 또는 위장관계(gastrointestinal system)의 세포들을 포함한 상피 세포들에 적용하는 방법에 관한 것이다.

[0053] 본 발명은 이미징 작용제 또는 기타 치료제의 선택적이고, 지속적인 전달을 위한 구성성분-기반 시스템(component-based system)을 제공한다. 조성물들의 개별적인 특성은 기반 제제(bedside formulations)에서 원

하는 성분들을 선정하는 것에 의해 선택될 수 있다. 또한, 일 양태에서, 이미징 모이어티 및 특정한 표적지향(targeting) 모이어티들이 양전하를 띤 백본(positive backbone)과 비-공유결합성(바람직하게는, 이온성) 복합체를 형성하기 위해 제공된다. 이와 같은 성분들을 복합체 내에 비-공유결합적으로 배치하는 것에 의해, 본 발명은 복잡성 및 비용을 증가시키고 입체적 한계 때문에 현재까지 성공적인 조합이 보고된 바 없을 정도로 효용성을 감소시키는 다른 전략들과 대조적으로, 양전하의 백본 상의 정확한 위치들에 구성성분들을 부착시켜야 하는 필요를 제거한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 일부 물질들은 음전하 백본을 포함시킬 필요없이, 양전하로 하전된 담체의 단독 사용에 의해 경피 전달될 수 있다. 이 경우들에서, 물질 또는 그의 유도체는 본 발명의 담체들과 비-공유결합적으로, 바람직하게는 이온 상호작용으로 결합되기에 충분한 작용기들을 갖는다. 이와 같은 상황에서 "충분한(sufficient)"이라는 용어는 구성성분 단독 대비 예를 들면 입자 크기 측정(particle sizing) 또는 기능적 분광분석법(spectrophotometry)의 변화에 의해 결정될 수 있는 결합(association)을 의미한다.

[0054] 본 발명의 추가적인 이해는 도 1을 참조하여 제공된다. 도 1에서, 구성성분들은 (1) 양전하로 하전된 기(착색된 막대에 부착된 착색된 원으로 표시된 효능 기로 불리기도 함), 예를 들면, $(\text{Gly})_{n1}-(\text{Arg})_{n2}$ (아래 첨자 $n1$ 은 3 내지 약 5의 정수이고 아래 첨자 $n2$ 는 약 7 내지 약 17 사이의 홀수임) 또는 TAT 도메인이 부착된 고휘 백본; (2) 이미징 모이어티(착색되지 않은(light) 막대에 부착된 열린 삼각형); (3) 표적지향 작용제; 및/또는 (4) 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제 또는 인슐린, 보툴리눔 독소, VEGF 및 항체 단편이 아닌 단백질-기반 치료제(착색되지 않은 막대에 부착된 열린 원)로 표시된다; 도 2는 성분들은 도 1에 제시된 것과 같이 표현된 복수성분 조성물들의 다양한 예들을 예시한다. 예를 들면, 도 2에서, 양전하로 하전된 백본이 이미징 성분, 표적지향 성분, 치료제와 결합된 제1의 복수-성분 조성물이 예시된다. 진단/예후 이미징을 위해 설계된 제2의 복수-성분 조성물이 예시된다. 이 조성물에서, 양전하로 하전된 백본은 예를 들면, 국소용 흑색종 검출 플랫폼을 형성하기 위해 광학적 이미징 성분 및 흑색종을 인식하는 표적지향 성분과 복합체를 형성한다. 이하에서 보다 상세하게 기재되는 본 발명은 치료 및 진단 프로그램에 유용한 다수의 추가적인 조성물들을 제공한다.

[0055] 조성물

[0056] 본 명세서에서 사용된 "생물학적 활성제(biologically active agent)"라는 용어는 질병을 치료하거나 건강-관련 문제(주관적으로 평가되거나 및/또는 비용과 관련된 건강-관련 문제 포함)를 완화하는 치료제를 의미한다. 예를 들면, 생물학적 활성제는 치료용 단백질일 수 있고, 일부 구체예들에서, 생물학적 활성제는 바람직하게는 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질이다. 그러나, "치료용(therapeutic)" 또는 "생물학적 활성 단백질(biologically active protein)"이라는 용어가 사용되는 경우, 본 발명은 구체적으로 인슐린, 보툴리눔 독소, VEGF 및 항체 단편들을 배제한다는 점에 유의한다. 그러나, 면역화에 적합한 항원들은 면역 반응을 일으키는 것과 같은 다른 생물학적 활성들을 가지기 때문에, 이들은 본 발명의 적합한 양태들에 포함된다. 본 발명의 다른 구체예들에서, 생물학적 활성제는 단백질도 아니고, 뉴클레오티드도 아닌 작용제(예를 들면, 일부 항진균제)일 수 있다. 적합한 활성제의 기타 비-한정적인 예들이 본 명세서에서 논의되는 바와 같이 제공된다.

[0057] 본 발명의 모든 양태들에서, 본 명세서에 기재된 담체와 생물학적 활성제 간의 결합은 예를 들면, 이온성 상호작용, 수소 결합, 반 데르 발스 힘, 또는 그들의 조합을 포함할 수 있는 비-공유결합성 상호작용에 의한다.

[0058] 특정한 구체예들에서, 본 발명은:

[0059] a) 양전하로 하전된 백본; 및

[0060] b) 하기의:

[0061] i) 복수 개의 부착된 이미징 모이어티를 갖는 제1의 음전하로 하전된 백본, 또는 복수 개의 음전하로 하전된 이미징 모이어티;

[0062] ii) 복수 개의 부착된 표적지향 작용제를 갖는 제2의 음전하로 하전된 백본, 또는 복수 개의 음전하로 하전된 표적지향 모이어티;

[0063] iii) 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 생물학적 활성제;

[0064] iv) 인슐린, 보툴리눔 독소, VEGF 및 항체 단편이 아닌 치료용 단백질;로부터 선택되는 하나 이상의 구성성분의 비-공유결합성 복합체를 포함하는 조성물로서: 상기 복합체는 순 양전하를 갖는 것인 조성물을 제공한다. 일 군의 구체예들에서, 상기 조성물은 구성성분 i) 내지 iv)로부터 선택되는 둘 이상의 성분들을 포함한다. 또 다른

군의 구체예들에서, 조성물은 구성성분 i) 및 ii)로부터의 하나 이상의 성분, 및 iii) 또는 iv)로부터 선택된 하나를 포함한다. 바람직하게는, 양전하로 하전된 백본은 구성성분 b)로부터의 성분들의 총 길이의 약 1배 내지 4배의 길이를 갖는다. 대안적으로, 양전하로 하전된 백본은 구성성분 b)로부터의 성분들의 총 전하의 약 1배 내지 4배의 전하 비를 갖는다. 일부 구체예들에서, 전하 밀도는 균일하고 길이의 비 및 전하의 비들은 거의 동일하다. 크기 대 크기(길이) 비들은 구성성분들의 분자적 연구에 기반하여 결정될 수 있고 또는 구성성분들의 중량들로부터 결정될 수 있다.

[0065] "양전하로 하전된(positively charged)"은 담체가 적어도 일부 용액-상 조건들에서, 보다 바람직하게는 적어도 일부 생리적으로 양립가능한 조건들에서 양전하를 갖는다는 것을 의미한다. 보다 상세하게는, 본 명세서에서 사용되는 "양전하로 하전된"은 대상이 되는 기(group)가 예를 들면, 4차 아민과 같이 모든 pH 조건들에서 하전된 작용기들(functionalities)을 포함하거나 또는 일부 용액-상 조건들에서, 예를 들면, 일차 아민의 경우, pH 변화와 같은 조건들에서 양전하를 얻을 수 있는 작용기를 포함하는 것을 의미한다. 보다 바람직하게는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "양전하로 하전된"은 생리적으로 양립가능한 조건들에서 음이온과 결합하는 행동을 갖는 기들을 의미한다. 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들에게 자명한 바와 같이, 양전하로 하전된 복수 개의 모이어티(moiety)를 갖는 폴리머들이 단일 중합체(homopolymer)일 필요는 없다. 양전하로 하전된 모이어티의 다른 예들은 종래 기술에서 잘 알려져 있고 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들에게 자명한 바와 같이, 용이하게 채택될 수 있다. 본 발명에 기재된 그 자체로는 치료 활성을 갖지 않는 양전하로 하전된 담체들은 예를 들면, 본 발명에 기재된 바와 같은 조성물 및 방법에서 유용성을 갖는 신규한 화합물들이다. 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 양전하로 하전된 분지형 기들이 부착된 양전하로 하전된 백본을 포함하고 그 자체로는 치료용 생물학적 활성을 갖지 않는 담체를 포함하는 이와 같은 신규한 화합물들을 상세히 설명한다. "치료용(therapeutic)" 또는 "생물학적 활성 단백질(biologically active protein)"이라는 용어가 사용되는 경우, 본 발명은 구체적으로 항체 단편들을 배제한다. 그러나, 면역화에 적합한 항원들은 면역 반응을 일으키는 것과 같은 다른 생물학적 활성들을 가지기 때문에, 이들은 본 발명의 적합한 양태들에 포함된다.

[0066] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 생물학적 활성제 및 양전하로 하전된 백본을 포함하는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 생물학적 활성제는 예를 들면, 단백질(특히, 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질), 단백질도 아니고 뉴클레오타이드도 아닌 치료제(예를 들면, 일부 항진균제) 또는 면역화용 작용제일 수 있다. 담체는 예를 들면, 양전하로 하전된 폴리펩티드 또는 폴리알킬렌아민과 같은 이종중합체 또는 단일중합체일 수 있는 비-펩티드 폴리머일 수 있다. 폴리펩티드 또는 비-펩티드 폴리머는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 양전하로 하전된 분지형 또는 "효능" 기들을 가질 수 있다. 각각의 단백질-기반 치료제 및 뉴클레오타이드도 아니고 단백질도 아닌 치료제는 전체 복합체의 특성들을 변화시키는 독특한 물리화학적 특성들을 갖는다. 그와 같은 양전하로 하전된 담체들은 이하에서 양전하로 하전된 백본들로 기재된 물질들에 포함된다.

[0067] 본 발명은 또한 생물학적 활성제의 치료적 유효량을 투여하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상자(사람 또는 포유 동물일 수 있음)의 피부 또는 상피에 생물학적 활성제 및 대상자에게 단백질의 경피 전달을 제공하기 위해 유효한 양의 분지형 기들을 갖는 양전하로 하전된 백본을 적용하는 단계를 포함한다. 이 방법에서, 단백질 및 양전하로 하전된 담체는 피부 또는 상피에 사전에-혼합된 조성물로서 적용되거나, 또는 개별적으로 적용될 수 있다. 예를 들면, 단백질은 피부 패치 또는 다른 장치에 담기고, 담체는 액체 또는 피부 패치의 적용 전에 피부에 적용되는 다른 종류의 조성물에 담길 수 있다.

[0068] 양전하로 하전된 백본

[0069] 일반적으로, 양전하로 하전된 백본(또한, 양전하로 하전된 "담체(carrier)"라고도 지칭됨)는 통상적으로 생리적 pH에서 양전하를 갖는 기들 또는 백본으로부터 신장되는 결사슬에 부착된 양전하를 갖는 기들을 갖는 원자들의 직쇄이다. 바람직하게는, 양전하로 하전된 백본 자체는 정의된 효소 또는 치료적 생물학적 활성을 갖지 않을 것이다. 직선형 백본은 탄화수소 백본으로, 일부 구체예들에서는 질소, 산소, 황, 규소 및 인으로부터 선택되는 이종원자들이 백본에 개입된다. 백본 사슬을 구성하는 원자들의 대부분은 통상적으로 탄소이다. 또한, 백본은 반복 단위들로 구성된 폴리머(예를 들면, 아미노산, 폴리(에틸렌옥시), 폴리(프로필렌아민), 폴리알킬렌아민, 등)이나, 이종중합체(heteropolymer)일 수 있다. 일 군의 구체예들에서, 양전하로 하전된 백본은 다수의 아민 질소 원자들이 양전하를 갖는 (테트라-치환된) 암모늄 기로서 존재하는 폴리프로필렌아민이다. 또 다른 구체예에서, 양전하로 하전된 백본은 비-펩티드성 폴리머이고, 이는 폴리알킬렌아민과 같은 이종중합체 또는 단일 중

합체, 예를 들면, 약 10,000 내지 약 2,500,000의 분자량, 바람직하게는 약 100,000 내지 약 1,800,000 및 가장 바람직하게는 500,000 내지 약 1,400,000의 분자량을 갖는 폴리에틸렌이민 또는 폴리프로필렌이민일 수 있다. 또 다른 일 군의 구체예들에서, 백본은 양전하로 하전된 기들(예를 들면, 암모늄 기들, 피리디늄 기들, 포스포늄 기들, 술포늄 기들, 구아니디움 기들, 또는 아미디늄 기들)을 포함하는 복수 개의 결-사슬 모이어티들을 부착한다. 이 군의 구체예들에서 결사슬 모이어티들은 백본을 따라 간격(spacing)이 일정하거나 또는 가변적인 위치들에 배치될 수 있다. 또한, 결사슬의 길이는 유사하거나 또는 상이할 수 있다. 예를 들면, 일군의 구체예들에서, 결사슬은 하나 내지 20개의 탄소 원자들을 갖고 (백본으로부터 멀리 위치한) 말단부에 있는 전술된 양전하로 하전된 기들에서 종결되는 직선형 또는 분지형 탄화수소 사슬일 수 있다. 본 발명의 모든 양태들에서, 담체와 생물학적 활성제 간의 결합은 비-공유결합성 상호작용에 의하며, 비-공유결합성 상호작용의 비-한정적인 예들은 이온성 상호작용, 수소 결합, 반 데르 바알스 힘, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0070] 일군의 구체예들에서, 양전하로 하전된 백본은 복수 개의 양전하로 하전된 결사슬 기들(예를 들면, 라이신, 아르기닌, 오르니틴, 호모아르기닌, 등)을 갖는 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 약 10,000 내지 약 1,500,000, 보다 바람직하게는 약 25,000 내지 약 1,200,000, 가장 바람직하게는 약 100,000 내지 약 1,000,000의 분자량을 갖는다. 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 아미노산들이 본 발명의 이 부분에서 이용되는 경우, 결사슬들은 부착 센터(center of attachment)에서 D- 또는 L-형(R 또는 S 구조)을 가질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0071] 대안적으로, 백본은 펩토이드(peptoid)와 같은 폴리펩티드의 유사체일 수 있다. 예를 들면, Kessler, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32:543 (1993); Zuckermann et al. Chemtracts-Macromol. Chem. 4: 80 (1992); 및 Simon et al. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89: 9367 (1992)을 참조한다. 간단히 말하면, 펩토이드는 결사슬이 α -탄소 원자가 아닌 백본 질소 원자들에 부착된 폴리글리신이다. 전술된 바와 같이, 결사슬들의 일부는 양전하로 하전된 백본 성분을 제공하기 위해 통상적으로 양전하로 하전된 기에서 종결될 것이다. 펩토이드의 합성은 예를 들면, 원용에 의해 그 전체가 본 명세서에 포함된, 미국특허 제5,877,278호에 기재된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 펩토이드 백본 구조를 갖는 양전하로 하전된 백본들은 α -탄소 위치들에 천연(naturally occurring) 결사슬을 갖는 아미노산들로 구성되지 않기 때문에 "비-펩티드(non-peptide)"로 간주된다.

[0072] 펩티드의 아미드 결합(linkage)이 에스테르 결합, 티오아미드(-CSNH-), 역전된 티오아미드(-NHCS-), 아미노메틸렌(-NHCH₂-) 또는 역전된 메틸렌아미노(-CH₂NH-)기들, 케토-메틸렌(-COCH₂-) 기들, 포스포네이트(-PO₂RCH₂-), 포스폰아미데이트 및 포스폰아미데이트 에스테르(-PO₂RNH-), 역전된 펩티드(-NHCO-), 트랜스-알켄(-CR=CH-), 플루오로알켄(-CF=CH-), 디메틸렌(-CH₂CH₂-), 티오에테르(-CH₂S-), 히드록시에틸렌(-CH(OH)CH₂-), 메틸렌옥시(-CH₂O-), 테트라졸(CN₄), 술폰아미도(-SO₂NH-), 메틸렌술폰아미도(-CHRSO₂NH-), 역전된 술폰아미도(-NHSO₂-)와 같은 대용기(surrogate)에 의해 치환된 폴리펩티드의 입체적 또는 전자적 모방체들(mimics) 및 말로네이트 및/또는 겐-디아미노-알킬 서브유닛들을 갖는 백본들, 예를 들면, Fletcher et al.((1998) Chem. Rev. 98: 763)에 의해 검토되고 본 명세서에 인용된 참고문헌들에 의해 상술된 것들을 채택하는 다양한 다른 백본들이 이용될 수 있다. 전술된 치환기들의 다수는 α -아미노산으로부터 형성되는 백본들에 대해 등입체성(isosteric) 폴리머 백본들을 초래할 것이다.

[0073] 전술된 백본들 각각에서, 양전하로 하전된 기를 갖는 결사슬 기들이 부착될 수 있다. 예를 들면, 술폰아미드-결합된 백본들(-SO₂NH- 및 -NHSO₂-)은 질소 원자에 부착된 결사슬 기들을 가질 수 있다. 유사하게는, 히드록시에틸렌(-CH(OH)CH₂-) 결합은 히드록시 치환기에 부착된 결사슬 기를 가질 수 있다. 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 표준 합성 방법을 이용하여 양전하로 하전된 결사슬 기들을 제공하기 위해 다른 화학적 특성을 갖는 결합들(linkage chemistry)을 용이하게 개조할 수 있다.

[0074] 일 구체예에서, 양전하로 하전된 백본은 분지형 기들(효능 기(efficiency group)로도 지칭됨)을 갖는 폴리펩티드이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 효능 기 또는 분지형 기는 조직 또는 세포막을 통해 양전하로 하전된 백본의 전위(translocation)를 촉진하는 효과를 가지는 임의의 작용제(agent)이다. 분지형 또는 효능 기의 비-한정적인 예들은 아래첨자 n₁은 0 내지 20의 정수, 보다 바람직하게는 0 내지 8, 훨씬 더 바람직하게는 2 내지 5의 정수이고, 아래첨자 n₂는 약 5 내지 약 25 사이의 홀수, 보다 바람직하게는 약 7 내지 약 17 사이의 홀수, 가장 바람직하게는 약 7 내지 약 13 사이의 홀수인 것인, -(gly)_{n1}-(arg)_{n2}, HIV-TAT 또는 그의 단편, 또는 안테나페디아의 단백질 전달 도메인(protein transduction domain), 또는 그의 단편을 포함한다. HIV-TAT 단편이 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20 사이의 정수인 식 (gly)_p-RGRDDRRQR-(gly)_q, (gly)_p-

YGRKKRRQRRR-(gly)_q 또는 (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q을 가지며, 상기 단편은 그 단편의 C-말단 또는 N-말단을 통해 백본에 부착되는 것인 구체예들이 훨씬 더 바람직하다. 바람직한 HIV-TAT 단편들은 아래첨자 p 및 q가 각각 독립적으로 0 내지 8, 보다 바람직하게는 2 내지 5 사이의 정수인 것들이다. 또 다른 구체예에서, 양전하로 하전된 결사슬 또는 분지형 기는 안테나페디아(Antp) 단백질 전달 도메인(PTD), 또는 활성을 유지하는 그의 단편이다. 바람직하게는 양전하로 하전된 담체는 총 담체 중량 대비 백분율로서, 약 0.05% 이상의 양, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 45 중량% 및 가장 바람직하게는 약 0.1 내지 약 30 중량%의 양으로 결-사슬이 양전하로 하전된 분지형 기들을 포함한다. 식 -(gly)_{n1}-(arg)_{n2}를 갖는 양전하로 하전된 분지형 기에 대해, 가장 바람직한 양은 약 0.1 내지 약 25%이다.

[0075] 또 다른 특히 바람직한 구체예에서, 백본 부분은 폴리라이신이고 양전하로 하전된 기들은 라이신 결사슬 아미노 기들에 부착된다. 폴리라이신은 약 10,000 내지 약 1,500,000, 바람직하게는 약 25,000 내지 약 1,200,000 및 가장 바람직하게는 약 100,000 내지 약 1,000,000의 분자량을 가질 수 있다. 폴리라이신은 예를 들면, 70,000을 초과하는 분자량을 갖는 폴리라이신, 70,000 내지 150,000의 분자량을 갖는 폴리라이신, 150,000 내지 300,000의 분자량을 갖는 폴리라이신 및 300,000을 초과하는 분자량을 갖는 폴리라이신과 같은 상업적으로 입수 가능한(Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) 임의의 폴리라이신일 수 있다. 적합한 폴리라이신의 선택은 조성물의 다른 성분들에 의존적이며 조성물의 전체 순 양전하를 제공하고 바람직하게는 음전하로 하전된 성분들의 총 길이의 1배 내지 4배의 길이를 제공하기에 충분할 것이다. 바람직한 양전하로 하전된 분지형 기 또는 효능 기들은 예를 들면, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg(-Gly₃Arg₇) 또는 HIV-TAT를 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 양전하로 하전된 백본은 폴리에틸렌이민, 예를 들면, 약 1,000,000의 분자량을 갖는 폴리에틸렌이민과 같은 긴 사슬 폴리알킬렌이민이다.

[0076] 전술된 분지형 기들을 갖는, 폴리펩티드 또는 폴리알킬렌이민을 포함하는 양전하로 하전된 백본 또는 담체 분자들은 신규한 화합물이고 본 발명의 일 양태를 형성한다.

[0077] 본 발명의 일 구체예에서, 보툴리눔 독소의 경피 전달을 위해 양전하로 하전된 분지형 기들을 갖는 양전하로 하전된 담체만 요구된다. 일부 구체예들에서, 양전하로 하전된 담체는 전술된 바와 같이, 복수 개의 양전하로 하전된 결-사슬 기들을 갖는 폴리펩티드(예를 들면, 라이신, 아르기닌, 오르니틴, 호모아르기닌, 등)이다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 약 10,000 이상의 분자량을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 양전하로 하전된 담체는 약 100,000 이상의 분자량을 갖는 복수 개의 양전하로 하전된 결-사슬기들을 갖는 폴리알킬렌이민과 같은 비펩티드 성 폴리머이다. 그와 같은 폴리알킬렌이민은 폴리에틸렌이민 및 폴리프로필렌이민을 포함한다. 어느 경우이나, 경피 전달을 위해 유일하게 필요한 작용제로서의 용도를 위해, 양전하로 하전된 담체 분자는 아래첨자 n1은 0 내지 20, 보다 바람직하게는 0 내지 8, 훨씬 더 바람직하게는 2 내지 5의 정수이고 아래첨자 n2는 독립적으로 약 5 내지 약 25 사이, 보다 바람직하게는 약 7 내지 17 사이, 및 가장 바람직하게는 약 7 내지 약 13 사이의 홀수인 -(gly)_{n1}-(arg)_{n2}-, HIV-TAT 또는 그의 단편들, 또는 안테나페디아 PTD 또는 그의 단편을 포함하는 양전하로 하전된 분지형 기 또는 효능 기를 포함한다. 바람직하게는, 결-사슬 또는 분지형 기들은 전술된 바와 같은 일반식 -(gly)_{n1}-(arg)_{n2}-를 갖는다. 다른 바람직한 구체예들은 분지형 또는 효능 기들이 아래첨자 p 및 q는 각각 독립적으로 0 내지 20의 정수인, 식 (gly)_p-RGRDDRRQRRR-(gly)_q, (gly)_p-YGRKKRRQRRR-(gly)_q, 또는 (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q를 갖는 HIV-TAT 단편들이고 상기 단편은 상기 단편의 C-말단 또는 N-말단을 통해 담체 분자들에 부착되는 경우들이다. 결 분지형 기들(side branching groups)은 부착의 센터에서 D- 또는 L-형(R 또는 S 구조)이다. 바람직한 HIV-TAT 단편들은 아래첨자 p 및 q가 각각 독립적으로 0 내지 8, 보다 바람직하게는 2 내지 5인 단편들이다. 다른 바람직한 구체예들은 분지형 기들은 안테나페디아 PTD 기 또는 그 기의 활성을 유지하는 그의 단편들인 경우들이다. 이들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 예를 들면, Console 등, J. Biol. Chem. 278: 35109 (2003)에 공지되어 있다.

[0078] 특히 바람직한 구체예에서, 담체는 라이신 결-사슬 아미노 기들에 부착된 양전하로 하전된 분지형 기들을 갖는 폴리라이신이다. 이 특정한 구체예에서 이용된 폴리라이신은 예를 들면, 70,000을 초과하는 분자량을 갖는 폴리라이신, 70,000 내지 150,000의 분자량을 갖는 폴리라이신, 150,000 내지 300,000의 분자량을 갖는 폴리라이신 및 300,000을 초과하는 분자량을 갖는 폴리라이신과 같은 상업적으로 입수 가능한(Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) 임의의 폴리라이신일 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 폴리라이신은 약 10,000 이상의 분자량을 갖는다. 바람직한 양전하로 하전된 분지형 기들 또는 효능 기들은 예를 들면, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg(-Gly₃Arg₇), HIV-TAT 또는 그의 단편들, 및 안테나페디아 PTD 또는 그의 단편들을 포함한다.

다.

- [0079] 기타 성분들
- [0080] 양전하로 하전된 백본 성분 외에, 본 발명의 복수-성분 조성물들은 하기의 성분들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분들을 포함한다:
- [0081] i) 복수 개의 부착된 이미징 모이어티를 갖는 제1의 음전하로 하전된 백본, 또는 복수 개의 음전하로 하전된 이미징 모이어티;
- [0082] ii) 복수 개의 부착된 표적지향 작용제를 갖는 제2의 음전하로 하전된 백본, 또는 복수 개의 음전하로 하전된 표적지향 모이어티;
- [0083] iii) 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 생물학적 활성제;
- [0084] iv) 인슐린, 보툴리눔 독소, VEGF 및 항체 단편이 아닌 치료용 단백질.
- [0085] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 관련된 양태에서, 본 발명의 일부 구체예들 또는 조성물들에서, 양전하로 하전된 백본 또는 담체는 특정 유형의 물질들의 경피 전달을 위해 단독으로 이용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 생물학적 활성제, 예를 들면, 항진균제와 같은 뉴클레오티드도 아니고 단백질도 아닌 치료제 또는 인슐린, 보툴리눔 독소, VEGF 및 항체 단편이 아닌 단백질(특히, 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질), 및 면역화에 적합한 항원들의 조합이 또한 이와 같은 조성물들에서 채용될 수 있다. 본 발명의 관련된 양태에서, 일부 구체예들 또는 조성물들은 자기 공명 이미징 또는 광학적 이미징에 적합한 작용제와 같은 이미징 작용제를 포함할 것이다. 이와 같은 구체예들 또는 조성물들은 예를 들면, 형색종을 위한 광학적 이미징 작용제의 국소 전달을 제공할 수 있다.
- [0086] 이미징 모이어티, 표적지향 모이어티 및 치료제를 운반하기 위해 이용될 때, 음전하로 하전된 백본들은 생리적 pH에서 음전하를 운반하는 복수 개의 기들을 갖는 다양한 백본들(전술된 백본들에 유사함)일 수 있다. 대안적으로, 충분한 표면 음전하로 하전된 모이어티들을 갖는 이미징 모이어티, 표적지향 모이어티 및 치료제는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들에게 용이하게 명백한 바와 같이, 양전하로 하전된 백본들과의 이온성 복합체를 형성하기 위해 추가적인 백본의 부착을 필요로 하지 않을 것이다. 이와 같은 상황에서 "충분하다(sufficient)"는 것은 전술된 양전하로 하전된 백본과의 이온성 결합을 가능하게 위해 적합한 밀도의 음전하로 하전된 기들이 이미징 모이어티, 표적지향 모이어티 또는 치료제의 표면상에 존재한다는 것을 의미한다. 이 경우들에서, 물질 또는 그의 유도체는 본 발명의 양전하로 하전된 담체들과 비-공유결합적으로 결합하기 위해 충분한 음전하를 갖는다. 대안적으로, 기타 하전되지 않은 모이어티들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들에게 명백한 바와 같이, 본 발명의 담체 백본들과의 비-이온성, 비-공유결합성 결합을 제공하기 위해 충분한 밀도로 채용될 수 있다. 본 명세서에서 이온성 또는 비-이온성 비-공유결합성 상호작용과 관련하여 "충분한(sufficient)"라는 용어는 구성성분들 단독에 대비해 예를 들면 입자 크기 계측 또는 기능적 분광분석법에서의 변화에 의해 결정될 수 있다. 적합한 음전하로 하전된 기들은 카르복시산, 포스핀산, 포스포산 또는 인산, 술폰산 또는 술포산 등이다. 다른 구체예들에서, 음전하로 하전된 백본은 올리고당(예를 들면, 텍스트란)이다. 또 다른 구체예들에서, 음전하로 하전된 백본은 폴리펩티드(예를 들면, 폴리 글루탐산, 폴리 아스파르트산, 또는 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기들이 전하를 띠지 않는 아미노산에 의해 개입되지 않는 폴리펩티드)이다. 이하에 보다 상세하게 기재된 모이어티들(이미징 모이어티, 표적지향 작용제 및 치료제)은 통상적으로 에스테르 결합들을 통해, 이 펜던트 기들을 갖는 백본에 부착될 수 있다. 대안적으로, 음전하로 하전된 아미노산들에 개입하거나 또는 음전하로 하전된 백본의 말단에 부착된 아미노산들은 예를 들면, (시스테인 잔기를 통한) 디설피드 결합들, 아마이드 결합들, (세린 또는 트레오닌 히드록실 기들을 통한) 에테르 결합들 등을 통해 이미징 모이어티 및 표적지향 모이어티를 부착하기 위해 이용될 수 있다.
- [0087] 이미징 모이어티 및 표적지향 모이어티는 그 자체로 음전하로 하전된 폴리머의 부재 시 소형 음이온들일 수 있다. 이미징 모이어티, 표적지향 모이어티 및 치료제들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 용이하게 명백한 바와 같이 양전하로 하전된 백본들과의 이온성 복합체를 위해 충분한 표면 음전하로 하전된 모이어티들을 제공할 수 있도록 공유결합적으로 변형될 수 있다. 이와 같은 양 경우들 모두에서, 물질 또는 그의 유도체는 본 발명의 양전하로 하전된 담체들과 비-공유결합적으로 결합하기 위해 충분한 음전하를 갖는다. 이와 같은 상황에서 "충분한(sufficient)"라는 용어는 구성성분들 단독에 대비해 예를 들면 입자 크기 계측(particle sizing) 또

는 기능적 분광분석법에서의 변화에 의해 결정될 수 있다.

[0088] 이미징 모이어티

[0089] 다양한 진단용 또는 이미징 모이어티들이 본 발명에서 유용하며 진단 또는 이미징될 증상, 투여 경로, 작용제의 민감도 및 작용제의 검출을 위해 이용되는 장치, 등에 의존적일 유효량으로 존재한다.

[0090] 적합한 이미징 또는 진단용 작용제들의 예들은 방사선 불투과성 콘트라스트 작용제(radiopaque contrast agents), 상자성 콘트라스트 작용제(paramagnetic contrast agents), 초상자성 콘트라스트 작용제(superparamagnetic contrast agents), 광학적 이미징 모이어티(optical imaging moieties), CT 콘트라스트 작용제 및 기타 콘트라스트 작용제들을 포함한다. 예를 들면, 방사선 불투과성 콘트라스트 작용제(X-선 이미징 용)는 무기 및 유기 요오드 화합물(예를 들면, 디아트리지오에이트), 방사선 불투과성 금속 및 그들의 염류(예를 들면, 은, 금, 백금, 등) 및 기타 방사선 불투과성 화합물들(예를 들면, 칼슘염, 바륨 술페이트와 같은 바륨염, 탄탈륨 및 탄탈륨 옥사이드)을 포함할 것이다. 적합한 상자성 콘트라스트 작용제(MR 이미징용)는 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA), 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N''-트리아세트산(D03A), 1,4,7-트리아자시클로노난-N,N',N''-트리아세트산(NOTA), 1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(TETA), 히드록시벤질에틸렌-디아민 디아세트산(HBED)과의 복합체들을 포함한 가돌리늄 디에틸렌트라이민펜타아세트산(Gd-DTPA) 및 그 유도체, 및 기타 가돌리늄, 망간, 철, 디스프로시움, 구리, 유로피움, 에르븀, 크롬, 니켈 및 코발트 복합체 등을 포함한다. 적합한 초상자성 콘트라스트 작용제(MR 이미징 용)는 자철광, 초상자성 철 산화물, 단결정성 철 산화물, 특히 음전하로 하전된 백본에 부착될 수 있는 이와 같은 작용제들 각각의 복합체화된(complexed) 형태를 포함한다. 기타 적합한 이미징 작용제들은 요오드화된(iodinated) 작용제 및 요오드화되지 않은(noniodinated) 작용제 및 이온성 및 비이온성 CT 콘트라스트 작용제 및 스핀-표지 또는 다른 진단학적으로 유효한 작용제들을 포함하는 콘트라스트 작용제들이다. 적합한 광학적 이미징 작용제들은 예를 들면, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, 오레곤 그린(Oregon green) 488, 오레곤 그린 500, 오레곤 그린 514, 그린 형광 단백질, 6-FAM, 텍사스 레드, Hex, TET, 및 HAMRA를 포함한다.

[0091] 진단용 작용제들의 다른 예들은 마커들을 포함한다. 방사선택종(radionuclides), 플루오르, 효소, 효소 기질, 효소 보조인자, 효소 억제제, 리간드(특히, 합텐), 등과 같은 다양한 마커들 또는 표지들이 채용될 수 있다. 다른 유용한 물질들은 ⁹⁹mTc 글루코헵토네이트와 같은 방사성 종들 또는 구성성분들로 표지된 물질들이다.

[0092] 이미징 모이어티를 음전하로 하전된 백본에 부착시키는 선택(election)은 다양한 조건들에 의존적일 것이다. 일부 이미징 작용제들은 생리적 pH에서 중성이고 바람직하게는 양전하로 하전된 담체와의 복합체를 형성하기 위해 음전하로 하전된 백본에 결합되거나 또는 충분한 음전하로 하전된 모이어티들을 포함하기 위해 공유결합적으로 변형될 것이다. 다른 이미징 작용제들은 음전하로 하전된 백본의 부재 시에도, 양전하로 하전된 담체와의 복합체를 형성하기 위해 충분한 음전하를 갖는다. 이와 같은 경우들에서, 물질 또는 그의 유도체는 본 발명의 양전하로 하전된 담체들과 비-공유결합적으로 결합하기 위해 충분한 음전하를 갖는다. 이 상황에서 "충분한(sufficient)"라는 용어는 구성성분들 단독에 대비해 예를 들면 입자 크기측정 또는 기능적 분광분석법에서의 변화에 의해 결정될 수 있다. 그와 같은 음전하로 하전된 음이온 이미징 모이어티의 예는 자기 공명 이미징에 유용한 포스페이트 이온이다.

[0093] 표적지향 작용제(Targeting agents)

[0094] 다양한 표적지향 작용제들이 본 명세서에 기재된 조성물들에서 유용하다. 통상적으로, 표적지향 작용제들은 전술된 이미징 모이어티들에 대해 기재된 바와 같이 음전하로 하전된 백본에 부착된다. 표적지향 작용제는 치료제 또는 조성물의 또 다른 성분의 특정 부위로의 전달을 지시하거나 또는 표적지향 작용제를 갖지 않는 복합체에 대비해 복합체의 굴성(tropism)을 변화시키는 것을 가능하게 하는 임의의 요소일 수 있다. 표적지향 작용제는 세포의 표적지향 작용제일 수 있다. 그와 같은 작용제는 또한 치료제가 특정한 세포내 구획(compartment)(예를 들면, 미토콘드리아, 핵 등)으로 향할 수 있게 하는 세포내 표적지향 작용제일 수 있다. 작용제는 가장 간단하게는 또한 소형 음이온일 수 있으며, 이는 그 자체로 또는 순 전하 분포를 변화시키는 것에 의해 복합체의 굴성을 보다 높은 음전하의 세포 표면 및 세포의 매트릭스 구성성분들로부터 보다 다양한 세포들로 또는 가장 높은

음전하의 표면들로부터 구체적으로 멀어지도록 변경한다.

[0095] 표적지향 작용제 또는 표적지향 작용제들은 바람직하게는 본 발명에 따른 음전하로 하전된 백본에 공유결합적으로 또는 비-공유결합적으로 연결된다. 본 발명의 바람직한 모드에 따르면, 표적지향 작용제는 음전하로 하전된 백본 성분으로 작용하는 폴리아스파르테이트, 술페이트화 또는 포스포릴레이트화된 텍스트란 등에 공유결합적으로, 바람직하게는 연결 기(linking group)를 통해 부착된다. 일 군의 구체예들에서, 표적지향 작용제는 세포의 트랜스페션을 촉진하는(즉, 조성물 또는 그의 다양한 요소들의 막들을 통한 통과를 촉진하거나, 또는 엔도솜으로부터의 배출, 또는 핵막을 통한 통과를 촉진하는) 융합성(fusogenic) 펩티드이다. 표적지향 작용제는 또한 세포의 표면에 존재하는 수용체에 대한 세포 수용체 리간드, 예를 들면, 당, 트랜스페린, 인슐린 또는 아시알로-오로소뮤코이드(asialo-orosomucoid) 단백질일 수 있다.

[0096] 다른 유용한 표적지향 작용제들은 당, 펩티드, 호르몬, 비타민, 시토킨, 소형 음이온, 지질 또는 그들의 상응하는 수용체와의 특이적 결합을 가능하게 하는 이와 같은 요소들로부터 유래된 서열 또는 분획을 포함한다. 바람직하게는, 표적지향 작용제들은 당 및/또는 펩티드, 세포 수용체 리간드 또는 그의 단편들, 수용체 또는 수용체 단편들, 등이다. 보다 바람직하게는, 표적지향 작용제들은 성장인자 수용체, 시토킨 수용체, 또는 세포 렉틴 수용체 또는 유착(adhesion) 단백질 수용체의 리간드들이다. 표적지향 작용제는 또한 아시알로글리코프로테인 수용체와 같은 렉틴을 표적으로 지향하는 것을 가능하게 하는 당일 수 있다.

[0097] 다른 구체예들에서, 표적지향 작용제는 음전하로 하전된 백본의 부재 하에 이용된다. 이 군의 구체예들에서, 표적지향 작용제는 전술된 양전하로 하전된 담체와의 이온성 복합체를 형성하기 위해 충분한 음전하로 하전된 모이어티를 가진다. 이와 같은 경우들에서, 물질 또는 그의 유도체는 본 발명의 양전하로 하전된 담체들과 비-공유결합적으로 결합하기 위해 충분한 음전하를 갖는다. 이와 같은 상황에서 "충분한(sufficient)"라는 용어는 구형성분들 단독에 대비해 예를 들면 입자 크기 계측 또는 기능적 분광분석법에서의 변화에 의해 결정될 수 있다. 이 군의 구체예들에 대해 적합한 음전하로 하전된 표적지향 작용제들은 생리적 pH에서 순 음전하를 갖는 단백질-기반 표적지향 작용제, 및 표적으로 지향되는 세포의 순 표면 전하에 기반하여 표적지향을 변화시킬 수 있는 소형 폴리음이온(polyanion)(예를 들면, 포스페이트, 아스파르테이트 및 시트레이트)과 같은, 특정 세포 표면으로의 유착(adhesion)을 촉진할 수 있는 표적지향 작용제이다.

[0098] 생물학적 활성제

[0099] 치료제 및 미용약제들을 포함한 다양한 생물학적 작용제들이 본 발명에서 유용하고 이들은 예방용인지 여부에 관계없이 치료대상인 증상, 투여 경로, 작용제의 효능 및 환자의 크기 및 치료제 투여방법(treatment regimen)에 대한 민감도에 의존적인 유효량으로 존재한다.

[0100] 전술된 바와 같이, "치료제" 또는 "생물학적 활성 단백질"이라는 용어가 이용될 때, 본 발명은 구체적으로 보툴리눔 독소, VEGF 및 항체 단편들을 배제한다. 또한, 본 발명은 구체적으로 인슐린과 같은, 혈당 수준(예를 들면, 고혈당증을 치료하기 위해)의 치료적 변화를 달성할 수 있는 치료용 단백질을 배제한다. 그러나, 면역화에 적합한 항원들은 (면역 반응을 일으키는 것과 같은) 다른 생물학적 활성들을 갖기 때문에, 이들은 본 발명의 적합한 양태들에 포함된다. 면역화에 적합한 항원성 작용제들은 혈당 수준을 치료적으로 변화시키지 않는 단백질-기반 항원들, 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 작용제 또는 그들의 하이브리드일 수 있다. 그러나, 항원들을 코딩하는 뉴클레오티드는 구체적으로 본 발명의 조성물에 적합하지 않다. 따라서, 포함된 작용제들은 그 자체가 면역화에 적합한 항원들이다. 적합한 항원들은 예를 들면, 환경적 작용제, 병원균, 또는 바이오해저드에 관한 것들을 포함한다. 적합한 작용제는 바람직하게는 말라리아, 공수병, 탄저병, 결핵 또는 B형 간염, 디프테리아, 백일해, 파상풍, 헤모필루스 인플루엔자 타입 b, 불활성화된 폴리오마바이러스, 홍역, 볼거리, 풍진, 수두, 페렴구균, A형 간염 및 인플루엔자와 같은 유년기 면역에 관계된 항원들을 포함한다.

[0101] 음전하로 하전된 백본에 부착될 수 있는 적합한 치료제들은 본질적으로 임의의 종류의 작용제들, 예를 들면, 진통제, 항천식제, 항생제, 항우울증제, 항당뇨병제, 항진균제, 진토제, 항고혈압제, 발기부전 치료제, 항염제, 항종양제(antineoplastic agent), 항-HIV제, 항바이러스제, 항불안제(anxiolytic agent), 피임제, 배란제(fertility agents), 항혈전제(antithrombotic agent), 혈전형성제(prothrombotic agent), 호르몬, 백신, 면역억제제, 비타민, 등에서 발견될 수 있다. 대안적으로, 전술된 양전하로 하전된 백본과의 이온성 복합체를 제공하기 위해 충분한 음전하로 하전된 기들이 치료제로 도입될 수 있다. 포스포릴화 또는 술페이트화(sulfation)과 같은 다수의 적합한 방법들이 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들에게 용이하게 명백할 것이다.

- [0102] 또한, 일부 작용제들은 그 자체로 전술된 양전하로 하전된 담체와 결합하기 위해 적합한 음전하로 하전된 모이머티들을 가지며 음전하로 하전된 백본으로의 부착을 요구하지 않는다. 이와 같은 경우들에서, 물질 또는 그의 유도체는 본 발명의 양전하로 하전된 담체들과 비-공유결합적으로 결합하기 위해 충분한 음전하를 갖는다. 이와 같은 상황에서, "충분한(sufficient)"라는 용어는 구성성분들 단독에 대비해 예를 들면 입자 크기계측 또는 기능적 분광분석법에서의 변화에 의해 결정될 수 있다.
- [0103] 적합한 미용약제는 예를 들면, 상피 성장 인자(EGF), 인간 성장 호르몬, 및 항산화제를 포함한다.
- [0104] 보다 상세하게는, 본 발명에서 유용한 치료제들은 리도카인, 노보카인, 부피바카인, 프로카인, 테트라카인, 벤조카인, 코카인, 메피바카인, 에티도카인, 프로파라카인, 로피바카인, 프릴로카인, 등과 같은 진통제; 아젤라스틴, 케토티펜, 트라사독스, 코르티코스테로이드, 크로몰린, 네도크로밀, 알부테롤, 비틀테롤, 메실레이트, 피르부테롤, 살메테롤, 테르부틸린, 테오필린 등과 같은 항천식제; 네오마이신, 스트렙토마이신, 클로람페니콜, 노르플록사신, 시프로플록사신, 트리메토프림, 술포메틸옥사졸, β -락탐 항생제, 테트라사이클린, 등과 같은 항생제; 네오팜, 옥시페르틴, 이미프라민, 트라자돈 등과 같은 항우울증제; 비구아니딘, 술폰일우레아, 등과 같은 항당뇨병제; 클로로프로마진, 플루페나진, 페르페나진, 프로클로르페라진, 프로메타진, 트리에틸페라진, 트리플루프로마진, 할로페리돌, 스코폴라민, 디페니돌, 트리메토펴자미드, 등과 같은 진정제 및 항정신병약; 아트라쿠리움, 미바쿠리움, 로쿠로니움, 숙시닐콜린, 독사쿠리움, 투보쿠라린과 같은 신경근 작용제; 암포테리신 B, 니스타틴, 칸디시딘, 이트라코나졸, 케토코나졸, 미코나졸, 클로트리마졸, 플루코나졸, 시클로피록스, 에코나졸, 나프티핀, 테르비나핀, 그리세오펜, 시클로피록스 등과 같은 항진균제; 프로파놀롤, 프로파페논, 옥시프로놀롤, 니페디핀, 레세르핀 등과 같은 항고혈압제; 산화 질소 공여체 등과 같은 발기부전 치료제; 코르티손, 히드로코르티손, 텍사메타손, 프레드니솔론, 프로드니손, 플루아자코르트 등과 같은 스테로이드계 항염제 및 인도메타신, 이부프로펜, 라미페니존, 프리옥시캄 등과 같은 비-스테로이드계 항염제를 포함한 항염제; 아드리아마이신, 시클로포스파미드, 액티노마이신, 블레오마이신, 두라노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 미토마이신, 라파마이신, 메토트렉세이트, 플루오로우라실, 카르보플라틴, 카르무스틴(BCNU), 시스플라틴, 에토포시드, 인터페론, 페네스테린, 탁솔(유사체 및 유도체 포함), 캄포테신 및 그 유도체, 빈블라스틴, 빈크리스틴 등과 같은 항종양제; 항-HIV제(예를 들면, 항단백질분해제(antiproteolytics)); 아만타딘, 메티사존, 이독슈리딘, 시타라빈, 아시클로비르, 팜시클로비르, 간시클로비르, 포르스카르네트, 소리부딘, 트리플루리딘, 발라시클로비르, 시도포비르, 디다노신, 스타부딘, 잘시타빈, 지도부딘, 리바비린, 리만타딘 등과 같은 항바이러스제; 단트롤렌, 디아제팜 등과 같은 불안 경감제; COX-2 억제제; 프로게스테론 등과 같은 피임제; GPIIb/IIIa 억제제, 조직 플라스미노겐 활성화제, 스트렙토키나아제, 우로키나아제, 헤파린 등과 같은 항 혈전제; 트롬빈, 인자 V, VII, VIII 등과 같은 혈전 형성제; 성장 호르몬, 프로락틴, EGF(상피 성장 인자) 등과 같은 호르몬; 시클로스포린, 아자티오프린, 미조로빈, FK506, 프레드니손 등과 같은 면역억제제; 비타민 A, D, E, K 등과 같은 비타민류; 및 다른 치료적 또는 약학적 활성제를 포함한다. 예를 들면, GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Ninth Ed. Hardman, et al., eds. McGraw-Hill, (1996) 참조.
- [0105] 가장 바람직한 구체예들에서, 생물학적 작용제는 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질 및 다른 생물학적 활성제, 예를 들면, 일부 항진균제와 같은 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제, 및 면역화를 위한 항원성 작용제로부터 선택된다. 본 발명의 모든 양태들에서와 같이, 적합한 예들은 구체적으로 인슐린, 보툴리눔 독소, VEGF 및 항체 단편들을 배제한다.
- [0106] 표적지향 작용제 및 이미징 작용제에 대해 전술된 바와 같이, 특정한 생물학적 또는 미용약학적 작용제들이 음전하로 하전된 백본의 부착 하에 이용될 수 있다. 그와 같은 생물학적 또는 미용약학적 작용제들은 양전하로 하전된 담체와의 복합체를 형성하기 위해 일반적으로 생리적 pH에서 순 음전하를 가진다. 예들은 통상적으로 단백질 또는 당단백질을 포함하는 면역화용 항원들, 및 다수의 항진균제, 및 내재된 치료적 활성을 갖거나 가지지 않는 흑색종의 표적지향된 이미징 작용제를 포함한다. 이와 같은 경우들에서, 물질 또는 그의 유도체는 본 발명의 양전하로 하전된 담체들과 비-공유결합적으로 결합하기 위해 충분한 음전하를 갖는다. 이와 같은 상황에서 "충분한(sufficient)"라는 용어는 구성성분들 단독에 대비해 예를 들면 입자 크기계측(particle sizing) 또는 기능적 분광분석법에서의 변화에 의해 결정될 수 있다.
- [0107] 이미징 모이머티, 표적지향 작용제 또는 치료제가 부착된 음전하로 하전된 백본
- [0108] 이미징 모이머티, 표적지향 작용제 및 치료제를 포함한 전술된 구성성분 군들 중 3개의 경우, 개별 화합물들이 음전하로 하전된 백본에 부착되거나, 음전하로 하전된 모이머티를 도입하기 위해 공유결합적으로 변형되거나,

또는 화합물이 전술된 양전하로 하전된 백본에 이온성 복합체를 형성할 수 있는 특성(complexation)을 부여할 정도로 충분한 음전하로 하전된 모이어티를 포함한다면 직접 채용될 수 있다. 필요한 경우, 통상적으로 부착은 작용제 및 백본에 존재하는 작용기들을 통해 특정한 작용제를 백본에 공유결합적으로 부착시키기 위해 연결 기를 통해 이루어진다. 다양한 연결 기들이 본 발명의 이 양태에서 유용하다. 예를 들면, Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, CA (1996); Wong, S.S., Ed., Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL(1991); Senter, et al., J. Org. Chem. 55: 2975-78 (1990);and Koneko, et al., Bioconjugate Chem. 2: 133-141 (1991) 참조한다.

[0109] 일부 구체예들에서, 치료제, 진단제 또는 표적지향 작용제는 연결 기에 부착될 작용기를 갖지 않고, 먼저 예를 들면, 히드록시, 아미노 또는 티올 치환기를 포함하기 위해 변형될 수 있다. 바람직하게는, 치환기는 작용제의 방해되지 않는 부분(non-interfering portion)으로 제공되고, 연결 기를 부착하기 위해 이용될 수 있으며, 작용제의 기능에 불리하게 영향을 미치지 않을 것이다.

[0110] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 부착된 효능 기를 갖는 양전하로 하전된 백본과의 비-공유결합성 복합체를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 이 양태에서, 양전하로 하전된 백본은 본질적으로 전술된 임의의 양전하로 하전된 백본일 수 있고, 또한 (상기의 선택된 백본들의 경우와 같이) 하나 이상의 효능 기를 포함할 것이다. 적합한 효능 기들은 예를 들면, 아래첨자 n_1 은 3 내지 5의 정수이고, 아래첨자 n_2 는 독립적으로 약 7 내지 약 17 사이의 홀수인 $(\text{Gly})_{n_1}-(\text{Arg})_{n_2}$, 또는 TAT 도메인을 포함한다. 예를 들면, TAT 도메인들은 아래첨자 p 및 q 는 각각 독립적으로 0 내지 20 사이의 정수인 식 $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$ 또는 $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ 의 식을 가지며, 상기 단편은 그 단편의 C-말단 또는 N-말단을 통해 백본에 부착될 수 있다. 결사슬 분지형 기들(side branching groups)은 부착 센터(center of attachment)에서 D- 또는 L-형(R 또는 S 구조)을 가질 수 있다. 바람직한 HIV-TAT 단편들은 아래첨자 p 및 q 가 각각 독립적으로 0 내지 8, 보다 바람직하게는 2 내지 5 사이의 정수인 것들이다.

[0111] 기타 분자들의 경피 전달

[0112] 전술된 바와 같은 양전하로 하전된 담체들은 단백질 및 기타 생물학적 활성제(예를 들면, 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질, 일부 항진균제와 같은 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 작용제, 또는 면역화용 항원성 작용제)의 경피 전달을 위해 이용될 수 있다. 양전하로 하전된 담체의 이용은 유효한 양 및 활성 형태로 단백질 또는 마커 유전자의 피부 세포들로의 또는 피부 세포들로부터의 수송 및 하부(underlying) 조직으로의 전달을 가능하게 한다. 이 방식에 의한 국소 전달은 주사용 또는 이식용 물질 대비, 특히 항진균제, 면역화에 적합한 항원성 작용제, 또는 예를 들면, 흑색종과 같은 피부 질환의 분자 이미징용 작용제의 경우에, 투여량 감소를 가능하게 하고, 독성을 감소시키며 원하는 효과를 위한 보다 정확한 투여량 최적화를 가능하게 할 수 있다. 본 구체예는 다량의 소형, 바람직하게는 다가인 음이온(예를 들면, 포스페이트, 아스파르테이트, 또는 시트레이트)을 포함할 수 있고, 또는 그와 같은 폴리음이온의 실질적인 부재 하에 수행될 수 있다.

[0113] 유사하게, "단백질(protein)"이라는 용어는 천연 출처로부터 추출된 단백질, 및 화학적 또는 제조합 수단을 통해 합성적으로 수득될 수 있는 단백질을 포함한다. 단백질은 또한 변형된 형태, 또는 예를 들면, 제조합 펩티드, 융합 단백질, 또는 하이브리드 분자와 같은 형태일 수 있다. 일부 경우들에서, 단백질은 필요한 활성을 보유하는 보다 큰 단백질의 일부일 수 있다. 바람직한 단백질은 20,000 kD 미만의 분자량을 갖고[예를 들면, 면역화용 항원과 같은, 경피 조성물 및 방법들에서 이용될 수 있는 단백질], 물리화학적 특성들이 매우 다양할 수 있는 단백질이다. 마찬가지로, 항진균제를 포함하는, 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제는 천연 출처로부터 수득되거나 합성될 수 있다.

[0114] 본 발명의 조성물들은 바람직하게는 대상자 또는 환자(즉, 특정 치료를 필요로 하는 사람 또는 다른 포유 동물)의 피부 또는 상피에 적용되는 제품의 형태이다. "필요로 하는(in need)"이라는 용어는 약학적 및 건강-관련 필요성 및 보다 미용적, 심미적, 또는 주관적인 경향의 필요성들을 모두 포함하도록 의도된다. 조성물들은 또한 예를 들면, 안면 조직의 외형을 변형하거나 개선하기 위해 이용될 수 있다.

[0115] 일반적으로, 조성물들은 투여대상인 단백질, 특히 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질 또는 다른 생물학적 작용제, 예를 들면, 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제 또는 대안적으로 면역화용 작용제를 양전하로 하전된 담체 및 통상적으로 하나 이상의 추가적인 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 혼합하는 것에 의해 제조된다. 가장 단순한 제형에서, 조성물들은 단순한 수성의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제, 예를

들면, 완충화될 수 있는(buffered) 염수를 포함할 수 있다. 그러나, 조성물들은 국소용 약학적 또는 미용약학적 조성물에 통상적인 다른 성분들, 즉, 피부학적으로 또는 약학적으로 허용가능한 담체, 비히클 또는 매질(즉, 적용될 조직과 융합가능한(compatible) 담체, 비히클 또는 매질)을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "피부학적으로 또는 약학적으로 허용가능한(dermatologically or pharmaceutically acceptable)"이라는 용어는 조성물들 또는 그의 성분들이 과다한 독성, 부적합성(incompatibility), 불안정성, 과민반응(allergic response) 등 없이 해당 조직들과의 접촉에서의 용도 또는 환자들에서의 용도에 적합하다는 것을 의미한다. 적합한 경우, 본 발명의 조성물들은 고려 대상인 분야, 특히 미용학(cosmetics) 및 피부학에서 통상적으로 이용되는 성분을 포함할 수 있다. 본 발명의 모든 양태들에서, 담체와 생물학적 활성제 간의 결합은 예를 들면, 이온성 상호작용, 수소 결합, 반 데르 바알스 힘, 또는 그의 조합을 포함할 수 있는 비-공유결합적 상호 작용에 의한다.

[0116] 조성물들은 사전에 조제되거나 또는 예를 들면, 투여 시 또는 투여 전 조립용 키트를 제공하는 것에 의해 투여 시에 제조될 수 있다. 대안적으로, 전술된 바와 같이, 치료용 단백질 및 양전하로 하전된 백본은 환자에게 예를 들면, 치료용 단백질을 포함하는 피부 패치 또는 다른 분배 장치 및 양전하로 하전된 담체(및 선택적으로 다른 구성성분들)를 포함하는 액체, 겔, 크림 등을 포함하는 키트를 제공하는 것에 의해 별개의 제형으로 투여될 수 있다. 그와 같은 특정한 구체예에서, 조합은 담체를 포함하는 액체 또는 다른 조성물을 피부에 적용하고, 뒤이어 피부 패치 또는 다른 장치를 적용하는 것에 의해 투여된다.

[0117] 본 발명의 조성물들은 유효량의 치료용 단백질 또는 이미징 작용제 또는 표적지향 작용제와 같은 다른 유용한 물질들을 투여하기 위해 적용된다. 경피 전달의 경우, "유효량(effective amount)"이라는 용어는 담체의 부제하의 작용제 대비 생물학적 활성제의 보다 많은 경피 전달을 제공하는 임의의 조성물 또는 방법을 의미한다. 항원의 경우, "유효량"은 항원의 투여 또는 일련의 투여 후에 대상자가 해당 항원에 대한 면역 반응을 일으키게 하기에 충분한 양을 의미한다. 항진균제의 경우, "유효량"은 진균성 감염의 증상 또는 징후를 경감시키기에 충분한 양을 의미한다. 혈당 수준을 치료적으로 변화시키지 않는 다른 생물학적 활성제의 경우, "유효량"은 상당한 독성을 유발하지 않으면서 예를 들면, Physicians' Desk Reference 등에 해당 작용제에 특징적인 것으로 정의된 생물학적 또는 치료적 효과를 도출하기에 충분한 양을 의미한다. 본 발명은 "치료적" 또는 "생물학적 활성 단백질(biologically active protein)"이라는 용어가 사용되는 경우, 항체 단편들을 배제한다. 그러나, 면역화에 적합한 항원들은 면역 반응을 일으키는 것과 같은 다른 생물학적 활성들을 갖기 때문에, 이들은 본 발명의 적합한 양태들에 포함된다.

[0118] 조성물들은 치료용 단백질 또는 생물학적 활성제를 단일-투여량 치료제(single-dose treatment)로서 적용을 위해 적합한 유효량으로 포함하거나 또는 투여시 희석 또는 복수회 적용들에서의 이용을 위해 보다 농축될 수 있다. 일반적으로, 단백질(특히, 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질) 또는 다른 생물학적 활성제를 포함하는 조성물은 약 1×10^{-20} 내지 약 25 중량%의 생물학적 작용제 및 약 1×10^{-19} 내지 약 30 중량%의 양전하로 하전된 담체를 포함할 것이다. 일반적으로, 단백질도 아니고 핵산도 아닌 치료제 또는 대안적으로 면역화용 작용제를 포함하는 조성물은 약 1×10^{-10} 내지 약 49.9 중량%의 항원 및 약 1×10^{-9} 내지 약 50 중량%의 양전하로 하전된 담체를 포함할 것이다. 담체 분자의 양 또는 생물학적 활성제에 대한 담체 분자의 비는 대상이 되는 조성물에서의 이용을 위해 선택되는 담체에 의존적일 것이다. 주어진 경우에서, 담체 분자의 적합한 양 또는 비는 예를 들면, 하기에 기재되는 바와 같은 하나 이상의 실험을 수행하는 것에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0119] 본 발명의 조성물들은 본 조성물이 이용될 수 있는 피부 및 다른 조직들에의 적용을 위해 이용되는 용액, 유상액(마이크로에멀전 포함), 현탁액, 크림, 로션, 겔, 분말 또는 다른 통상적인 고체 또는 액체 조성물들을 포함할 수 있다. 그와 같은 조성물들은 생물학적 활성제 및 담체 분자 외에, 항균제(antimicrobials), 보습제 및 수화제, 침투제, 보존제, 유화제, 천연 또는 합성 오일, 용매, 계면활성제, 디터전트, 겔화제, 연화제(emollient), 향산화제, 방향제, 충전제, 점증제(thickener), 왁스, 탈취제(odor absorber), 염료, 착색제, 분말, 점도-조절제 및 물을 포함하고, 선택적으로 마취제, 항-소양증 첨가제(anti-itch additives), 식물 추출물, 컨디셔닝제(conditioning agent), 색소침착제(darkening agent) 또는 미백제(lighening agent), 글리터(glitter), 습윤제, 돌비늘(mica), 미네랄, 폴리페놀, 실리콘 또는 그의 유도체, 자외선차단제, 비타민 및 약용식물을 포함하는, 그와 같은 제품들에서 통상적으로 이용되는 기타 성분들을 포함할 수 있다.

[0120] 본 발명에 따른 조성물은 제어된-방출 또는 서방형(sustained-release) 조성물의 형태일 수 있고, 상기에서 전달될 단백질 물질 및 담체는 시간의 경과에 따라 제어된 방식으로 피부에 방출될 수 있도록 물질 내에 캡슐화(encapsulate)되거나 담지(contain)된다. 전달될 물질 및 담체는 매트릭스, 리포솜, 소포(vesicle), 마이크로캡

술, 미소 구체(microspere) 등 또는 고체 입자형 물질에 담지될 수 있고, 이들은 시간의 경과에 따라 상기 물질 또는 물질들의 방출을 제공하도록 선택 및/또는 구축된다. 치료제 및 담체는 함께(예를 들면, 동일한 캡슐 내에) 또는 별개로(별개의 캡슐들로) 캡슐화될 수 있다.

[0121] 본 발명의 조성물의 대상자에 대한 투여는 물론 본 발명의 또 다른 양태이다.

[0122] 제어 방출 및/또는 모니터링과 함께 피부 패치 등에 의한 투여가 일반적인 방법일 것으로 보이며, 따라서 본 발명의 조성물은 피부 패치 또는 다른 장치에 담지되어(contain) 제공될 것이다. 면역화에 적합한 항원들의 경우, 가장 바람직하게는 조성물은 내과의사 또는 다른 의료 전문가에 의해, 또는 이들의 지시 하에 투여된다. 조성물들은 단일 치료로 투여되거나 또는 시간의 경과에 따라 일련의 정기적인 치료들로 투여될 수 있다. 전술된 목적을 위한 면역화에 적합한 항원의 경피 전달의 경우, 전술된 조성물은 피부 또는 조체(nail plate) 및 주변 피부에 국소적으로 적용된다. 마찬가지로, 항진균제와 같은 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 작용제의 경우, 바람직하게는 조성물은 내과의사 또는 다른 의료 전문가의 지시 하에 투여된다. 조성물들은 단일 치료로 투여되거나 또는 시간의 경과에 따라 일련의 정기적인 치료들로 투여될 수 있다. 치료용 단백질의 경피 전달을 위해, 전술된 바와 같은 조성물은 피부에 국소적으로 적용된다.

[0123] 의료 전문가의 지시 하에 또는 환자 또는 대상자에 의해 본 발명의 조성물을 투여하기 위한 키트는 또한 그 목적에 적합한 맞춤형 애플리케이터(custom applicator)를 포함할 수 있다. 손톱 조체 또는 발톱 조체 또는 주변 해부학적 구조에 대한 애플리케이터의 경우, 그와 같은 맞춤형 애플리케이터는 예를 들면, 인공 조체, 래커, 착색제를 포함한 네일 폴리시(nail polish), 겔, 또는 이들 중 일부 또는 모두의 조합을 포함할 수 있다.

[0124] 또 다른 양태에서, 본 발명은 전술된 양전하로 하전된 담체와 유효량의 생물학적 활성제(즉, 20,000 kD 미만의 분자량을 갖는 단백질, 면역화에 적합한 항원, 항진균제 또는 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 치료제)의 조합을 국소적으로 투여하는 방법에 관한 것이다. 전술된 바와 같이, 투여는 이 두 물질, 구체적으로 담체 및 생물학적 활성제의 적합한 종류들 및 양을 포함하는 본 발명에 따른 조성물의 이용에 의해 이루어질 수 있다. 그러나, 본 발명은 또한 반드시 동일한 조성물에 포함될 필요는 없으나, 조합된 이 두 물질의 투여를 포함한다. 예를 들면, 치료용 물질은 피부 패치 또는 다른 분배 장치에 건조된 형태로 통합되고 양전하로 하전된 담체는 상기 패치의 적용 전에 피부 표면에 적용되어 두 물질이 함께 작용하여, 원하는 경피 전달을 달성할 수 있다. 그와 같은 의미에서, 두 물질(담체 및 생물학적 활성제)는 조합으로 작용하거나 또는 투여 부위에서(in situ) 조성물 또는 조합을 형성하기 위해 상호작용한다.

[0125] 조성물 제조 방법

[0126] 또 다른 양태에서, 약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 양전하로 하전된 백본; 및 하기의:

[0127] i) 복수 개의 부착된 이미징 모이어티를 갖는 제1의 음전하로 하전된 백본, 또는 복수 개의 음전하로 하전된 이미징 모이어티;

[0128] ii) 복수 개의 부착된 표적지향 작용제를 갖는 제2의 음전하로 하전된 백본, 또는 복수 개의 음전하로 하전된 표적지향 모이어티;

[0129] iii) 단백질도 아니고 뉴클레오티드도 아닌 생물학적 활성제;

[0130] iv) 인슐린, 보툴리눔 독소, VEGF, 또는 항체 단편이 아닌 치료용 단백질;로부터 선택되는 하나 이상의 구성성분을 조합하는 단계를 포함한다.

[0131] 본 발명의 일부 구체예들에서, 양전하로 하전된 백본 또는 담체는 특정 종류의 물질들의 경피 전달을 제공하기 위해 단독으로 이용될 수 있다. 1×10^{-20} 내지 약 25 중량%의 생물학적 활성제 및 약 1×10^{-19} 내지 약 30 중량%의 양전하로 하전된 담체를 포함하는 조성물들 및 방법들이 바람직하다. 또한, 항진균제와 같은 단백질도 아니고 핵산도 아닌 치료제, 흑색종과 같은 피부 질환의 진단을 위한 선택적인 이미징 작용제, 또는 면역화에 적합한 항원을 포함하며 1×10^{-10} 내지 약 49.9 중량%의 항원 및 약 1×10^{-9} 내지 약 50 중량%의 양전하로 하전된 담체를 포함하는 것인 조성물들 및 방법들이 바람직하다.

[0132] 본 발명의 광범위한 응용성은 본 발명으로부터 다양한 약학적 조성물들이 제조될 수 있는 용이성에 의해 예시된다. 통상적으로, 대상이 되는 원하는 성분(예를 들면, 표적지향, 이미징 또는 치료용 구성성분)과 양전하로 하

전된 백본 성분을 가변적인 순 양전하를 갖는 조성물을 수득하기 위한 비율 및 순서로 혼합하는 것에 의해 조성물이 제조된다. 다수의 구체예들에서, 조성물들은 예를 들면, 조성물의 투여를 위해 약학적으로 허용가능한 담체들 및 희석제를 이용하여, 임상에서(at bedside) 제조될 수 있다. 대안적으로, 조성물들은 구성성분들의 적합한 혼합에 의해 제조되고 동결건조되어 사용 시까지 또는 적합한 전달 비히클로 조제될 때까지 (통상적으로 실온 또는 그 이하에서) 보관된다.

[0133] 조성물들은 다양한 투여 양식에 적합한 혼합물을 제공하기 위해 조제될 수 있으며, 투여 양식의 비 한정적인 예들은 국소, 피부, 경구, 직장, 질, 비경구, 비강내(intranasal), 정맥내, 근육내, 피하, 안구내, 및 경피 투여를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 바람직하게는 주사용 제제, 특히, 원하는 기관으로의 직접 주사, 또는 국소 투여(피부 및/또는 점막)를 위해 약학적으로 허용가능한 비히클을 포함한다. 약학적 조성물들은 특히, 멸균된, 등장 용액 또는 건조 상태의 조성물(예를 들면, 동결 건조된 조성물)일 수 있고, 건조된 조성물은 경우에 따라, 멸균수 또는 생리적 식염수의 첨가에 의해 주사용 용액으로 제조될 수 있다.

[0134] 대안적으로, 조성물이 국소적으로 적용될 때(예를 들면, 경피 전달이 바람직한 경우), 대상이 되는 성분 또는 성분들은 피부에 건조 제형으로(예를 들면, 피부 패치를 이용하여) 적용될 수 있고, 이 경우, 피부는 별도로 양전하로 하전된 백본 또는 담체로 처리된다. 이 방식으로, 전체 조성물은 본질적으로 투여 부위에서(in situ) 형성되어 환자 또는 대상자에 투여된다.

[0135] 조성물을 이용하는 방법

[0136] 전달 방법

[0137] 본 발명의 조성물은 다양한 방법들을 이용하여 체내(in vivo) 또는 체외(ex vivo)에서 대상자, 세포 또는 표적 부위로 전달될 수 있다. 실제로, 조성물을 치료대상 조직과의 궁극적인 접촉에 도입하기 위해 정상적으로 이용되는 모든 경로들이 이용될 수 있다. 바람직하게는, 조성물들은 약학적으로 허용가능한 담체들과 함께 투여될 것이다. 그와 같은 화합물들을 투여하는 적합한 방법들이 이용가능하며 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다. 특정한 조성물을 투여하기 위해 하나 이상의 경로가 이용될 수 있으나, 특정 경로가 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 반응을 제공할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체들은 부분적으로는 투여되는 특정한 조성물 및 조성물을 투여하기 위해 이용되는 특정 방법에 의해 결정된다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물의 광범위하게 다양한 적합한 제제들이 있다(예를 들면, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985 참조).

[0138] 투여는 예를 들면, 정맥내, 국소, 복강내, 피하, 경피, 근육내, 경구, 관절내(intra-joint), 비경구, 비강내, 또는 흡입에 의해 이루어질 수 있다. 적합한 투여 부위들은 따라서, 피부, 기관지, 위장관, 눈 및 귀를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 조성물들은 일반적으로 통상적인 약학적 담체 또는 부형제를 포함하나 추가적으로 다른 약제, 담체, 보조약(adjutant) 등을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 제제는 본 발명의 조성물의 약 5 중량% 내지 75 중량%이며, 나머지는 적합한 부형제로 구성될 것이다. 적합한 부형제들은 특정한 조성물 및 본 발명이 속하는 기술분야에서 공지된 투여 경로에 따라 맞춰질 수 있다(예를 들면, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)).

[0139] 제제들은 고체, 반-고체, 동결건조된 분말, 또는 액체 투여 제형, 예를 들면, 정제, 알약, 캡슐, 분말, 용액, 현탁액, 유상액, 좌약, 정제 관장제(retention enemas), 크림, 연고, 로션, 에어로졸 등의 제형을 취할 수 있다. 약학적 조성물이 알약, 정제 또는 캡슐의 제형을 취하는 구체예들에서, 제제는 생물학적 활성 조성물과 함께 다음 성분들을 포함할 수 있다: 락토오스, 수크로오스, 디칼슘 포스페이트 등과 같은 희석제; 전분 또는 그 유도체와 같은 붕해제(distintegrant); 스테아르산 마그네슘 등과 같은 윤활제; 및 전분, 아카시아 검, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 셀룰로오스 및 그 유도체와 같은 결합제. 조성물들은 앰플 또는 바이알과 같은 단일-투여량 또는 복수-투여량의 밀봉된 용기들로 제공될 수 있다. 환자에게 투여되는 투여량들은 시간의 경과에 따라 환자에서 유용한 치료 반응을 달성하기에 충분해야 한다.

[0140] 일부 구체예들에서, 서방형(sustained-release) 제제가 개체 또는 배양 내의 세포들에 투여되어 원하는 조성물을 운반할 수 있다. 서방형 조성물은 개체의 조직에, 예를 들면, 주사에 의해 투여될 수 있다. "서방형(sustained release)"은 조성물이 점도가 덜한 매질, 예를 들면, 식염수 용액에 담긴 조성물의 투여에 의해 달성되는 것보다 긴 시간 동안 주변 조직 또는 배양 내의 세포들에 의한 흡수(uptake)를 위해 이용될 수 있게 된다는 것을 의미한다.

- [0141] 조성물들은 단독으로 또는 다른 적합한 성분들과 함께, 흡입에 의해 투여될 에어로졸 제제(즉, "분무(nebulize)"될 수 있음)로 제조될 수 있다. 에어로졸 제제들은 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등과 같은, 가압된 허용가능한 추진제들로 배치될 수 있다. 흡입에 의한 전달을 위해, 조성물들은 또한 건조 분말로서 전달될 수 있다(예를 들면, Nektar).
- [0142] 비경구 투여에 적합한 제제들, 예를 들면, 정맥내, 근육내, 및 피하 경로에 의한 투여에 적합한 제제들은 수용성 및 비-수용성의, 등장 멸균 주사 용액을 포함하고, 이들은 항산화제, 완충용액, 세균발육억제제(bacteriostat) 및 제제가 의도된 대상자의 혈액과 등장이 되게 하는 용질, 및 현탁제, 가용화제, 점증제, 안정제 및 보존제를 포함할 수 있는 수용성 및 비-수용성 멸균 현탁액을 포함할 수 있다.
- [0143] 기타 투여 방법들은 혈관성형 풍선(angioplastic balloons), 카테터, 및 겔 제제를 이용한 투여를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 혈관성형 풍선, 카테터 및 겔 형성 전달을 위한 방법들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지되어 있다.
- [0144] 이미징 방법
- [0145] 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명의 조성물이 다양한 이미징 이용을 위해 맞춤화될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 일 구체예에서, 이미징을 위해 구성성분-기반 시스템을 이용하여 가상 결장경 검사(virtual colonoscopy)가 수행될 수 있다. 현재, 가상 결장경 검사는 콘트라스트를 결장에 주입하고 CT 상에서 이미지를 시각화하여, 3-D 이미지를 재구성하는 것을 포함한다. MR에 대해 유사한 기법들이 이용될 수 있다. 그러나, 배설물, 점액, 및 공기가 모두 콘트라스트 장벽들로 작용하고 결장 벽 재건에 인공 표면을 제공할 수 있다. 세포의 표적지향 콘트라스트의 첨가는 진정한 벽 재건을 제공하기 위해 이 장벽들을 극복하고 위-양성 및 위-음성을 모두 피할 수 있게 한다. 구성성분-기반 시스템이 적용될 수 있는 여러가지 방법들이 있다. 가장 간단하게는, 양이온성 효능 백본(cationic efficiency backbone)이 단일 콘트라스트 작용제, 예를 들면, CT, MR, 또는 광학 작용제와 함께 적용될 수 있다. 따라서, 세포 표면층이 시각화될 수 있고 임의의 불규칙 또는 장애가 이미지 재구축에서 상세하게 나타난다. 그러나, 구성성분-기반 시스템은 특정한 제2 작용제를 첨가하는 추가적인 옵션을 제공한다. 이 작용제는 양이온성 효능 백본, 상이한 이미징 모이어티, 및 표적지향 구성성분, 예를 들면, 결장암에 특징적인 두 개의 항원들을 표적으로 지향하는 성분들로 구성될 수 있다. 간단한 것부터 진단용에 이르는 이미징 모이어티들이 하나는 CT 콘트라스트이고 다른 하나는 MR 콘트라스트가 되도록, 또는 양자 모두가 MR 콘트라스트로서, 하나는 T2 작용제이고 다른 하나는 T1 작용제가 되도록 선택될 수 있다. 이 방식으로, 표면은 전과 같이 재구축될 수 있고, 중앙 항원에 특이적인 영역들이 시각화되고 원래의 재구축 상에 겹쳐질 수 있다. 또한, 치료제들은 표적지향된 진단 시스템으로 통합될 수 있다. 유사한 전략들이 국소성 장염(regional enteritis) 및 궤양성 대장염(ulcerative colitis)에 적용될 수 있다(또한 치료법과 조합됨). 대안적으로, 광학적 이미징 모이어티 및 검출 방법들이 예를 들면, 흑색종 진단 또는 관리의 경우에, 바람직하게는 형광 이미징 모이어티와 함께 이용될 수 있다. 이 구체예들에서, 검출은 시각적(visual), 이미지-보조형(image-aided)이거나 또는 예를 들면, 암시야 이미지 분석(darkfield image analysis)에 의한 전적인 이미지-기반(image-based)형일 수 있다.

실시예

- [0158] 실시예 1
- [0159] 본 실시예는 본 발명의 양전하로 하전된 백본 또는 담체를 이용하는, 매우 큰 복합체, 즉, 블루 형광 단백질(BFP) 형질전환 유전자를 포함하는 플라스미드의 경피 전달을 예시한다.
- [0160] 백본 선택:
- [0161] 폴리라이신 MW 150,000에 18%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실을 통해 라이신 결사슬의 유리 아민에 -Gly₃Arg₇을 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 18개가 -Gly₃Arg₇에 접합됨). 변형된 백본은 펩티드 담체의 제2 크기를 표시하기 위해 "KNR2"로 표시했다. 대조구 폴리양이온(polycation)은 동일한 로트(lot)로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 폴리라이신("K2"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이었다. 추가적인 대조구 폴리양이온, 활성화된 덴드리머-기반 작용제인

Superfect®(Qiagen)를 높은 체외 트랜스펙션율을 위한 기준(reference)으로서 선택했다(즉, 첨단 기술 효율성 (state-of-the art efficiency) vs. 체외 독성에 대한 양성 대조구이자 기준).

[0162] 치료제 선택:

[0163] 블루 형광 단백질(BFP)에 대한 전체 형질전환 유전자 및 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터에 의해 구동되는 부분적인 인접 서열들(flanking sequences)을 포함하는 8 킬로베이스의 플라스미드(pSport-기반 주형 (template), Gibco BRL, Gaithersburg, MD)을 이용했다. BFP는 트랜스펙션되어 그 유전자를 전사, 번역하는 세포들에 대한 확인 마커로서 작용하고 형광 현미경 하에서 직접 (즉, 추가적인 염색 없이) 시각화될 수 있다. 따라서, 복합체가 페이로드(payload) 전달 전에 원형질막 및 핵막 모두를 통과한 세포들만 형질전환 유전자 발현을 가질 수 있다. 이 특정한 플라스미드는 약 264만의 분자량을 가지며, 따라서, 이 복합체들을 통한 매우 큰 치료제들의 전달을 평가하기 위해 선택했다.

[0164] 시료 준비:

[0165] 각 경우에, 과량의 양전하를 갖는 최종 복합체를 조립하기 위해 과량의 폴리양이온을 채택했다. 전하 밀도의 증가는 크기를 증가시키거나(즉, 복합체 당 보다 많은 백본이 존재함), 복합체당 효능 인자(efficiency factor) 밀도의 증가는 이와 같은 변화들을 상쇄할 수 있다. 따라서, 최적점은 낮은 비율(즉, 크기 기준) 또는 높은 비율(즉, 효능-인자의 밀도 기준)에서 발생할 수 있고 양자는 모두 KNR2에 대해 평가하였다. K2 효능 및 Superfect 효능의 최적 비율들은 제조사의 권고 및 최대 효능에 대한 종래 보고서들에 근거하여 선택했다. 핵산-치료제 투여량을 모든 군들에 대해 표준화하고, 세포 배양에서 평가될 조성물의 총 용량 및 최종 pH도 표준화하였다.

[0166] 하기의 혼합물들을 제조하였다:

- [0167] 1) CMV 프로모터에 의해 구동되는 블루 형광 단백질을 발현하는 플라스미드의 0.5 mg/mL 용액 대비 4:1 전하 비 (charge ratio)의 K2.
- [0168] 2) CMV 프로모터에 의해 구동되는 블루 형광 단백질을 발현하는 플라스미드의 0.5 mg/mL 용액 대비 15:1 비의 KNR2.
- [0169] 3) CMV 프로모터에 의해 구동되는 블루 형광 단백질을 발현하는 플라스미드의 0.5 mg/mL 용액 대비 10:1 비의 KNR2.
- [0170] 4) CMV 프로모터에 의해 구동되는 블루 형광 단백질을 발현하는 플라스미드의 0.5 mg/mL 용액 대비 4:1 비의 KNR2.
- [0171] 5) CMV 프로모터에 의해 구동되는 블루 형광 단백질을 발현하는 플라스미드의 0.5 mg/mL 용액 대비 1.25:1 비의 KNR2.
- [0172] 6) CMV 프로모터에 의해 구동되는 블루 형광 단백질을 발현하는 플라스미드의 0.5 mg/mL 용액 대비 10:1 전하 비의 제조사의 권고에 따른 Superfect.

[0173] 세포 배양 프로토콜:

[0174] 모든 세포 배양 실험들은 치료군들의 정체에 대해 알지 못하는 관찰자들에 의해 수행되었다. 6-웰 플레이트 상에서, 1.0mL의 각 용액을 70% 합류점(confluent)의 HA-VSMC 일차 인간 대동맥 평활근 세포들(21 계대(passage 21); ATCC, Rockville, MD)에 첨가하고 37°C 및 10% CO₂에서 48시간 동안 10% 혈청을 포함하는 M-199에서 배양했다. 처리되지 않은 대조구 웰들도 평가하고 각 군은 군당 n=5개의 웰들로 평가되었다.

[0175] 효율 분석:

[0176] 맹검 관찰자가 BFP 필터 및 plan apochromat 렌즈를 갖춘 Nikon E600 에피-형광현미경을 이용하여 각 웰의 상부로부터 60도, 180도 및 200도에서 완전한 세포 플레이트들의 저배율 확대 사진(총 10X)을 얻었다. 전체 세포 영역에서 양성인 부분의 백분율을 결정하기 위해 Image Pro Plus 3.0 이미지 분석 세트(Media Cybernetics,

Silver Spring, MD)를 이용했다. 이 결과를 각각에 대해 전체 세포 영역으로 정규화하고, 유전자 전달의 효율로 보고하였다(검출가능한 수준들로 형질변환 유전자들을 발현하는 전체 세포들 대비 %).

[0177] 독성 분석:

[0178] 뒤이어 맵검 관찰자가 색소 배제 분석법(dye exclusion assay)으로 웰들을 평가하고(생존 세포들은 염색을 배제 하나, 비생존 세포들은 배제할 수 없음), 인산 완충 식염수에 담긴 0.4% SDS로 가용화했다. 트랜스펙션 작용제 독성의 직접적인 지표로서 비생존 세포들을 정량적으로 평가하기 위해 595nm(블루) 파장에서 Spectronic Genesys 5 UV/VIS 분광분석계로 시료들을 평가했다. OD595 측정 전에 농도를 상응하는 OD280 값들로 조정하여 시료들을 동일한 세포 수들로 표준화하였다.

[0179] 데이터 처리 및 통계 분석:

[0180] Image Pro Plus 소프트웨어(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)를 이용한 배치 이미지 분석(batch image analysis)을 통해 맵검 관찰자가 전체 양성 염색(total positive staining)을 결정하고 각각에 대해 양성 염색의 백분율을 결정하기 위해 총 단면적으로 정규화시켰다. 그 후, 각 군에 대해 Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용한 일원 ANOVA 반복 측정에서 95% 신뢰수준에서의 유의성 분석으로 평균 및 표준 오차를 결정하였다.

[0181] 결과:

[0182] 효율성:

[0183] 효율성의 결과는 다음과 같았다(평균 $\pm$ 표준 오차):

[0184] 1) 0.163 $\pm$ 0.106%

[0185] 2) 10.642 $\pm$ 2.195%

[0186] 3) 8.797 $\pm$ 3.839%

[0187] 4) 15.035 $\pm$ 1.098%

[0188] 5) 17.5746 $\pm$ 6.807%

[0189] 6) 1. 199 $\pm$ 0.573 %

[0190] #4 및 #5는 폴리라이신 단독 및 Superfect 대비 유전자 전달 효율성의 통계적으로 유의성 있는 증가를 보여주었다(Fisher PLSD 및 TUKEY-A posthoc 테스트에 의한 일원 ANOVA 반복 측정값들에서 $P < 0.05$).

[0191] 독성:

[0192] 평균 독성 데이터는 다음과 같았다(OD595에서 AU로 보고됨; 식염수 단독의 경우에서와 같이 낮은 값들은 낮은 독성과 상관되며, 반면에, 조건 1에서와 같은 보다 높은 값들은 높은 세포 독성을 나타낸다):

[0193] 식염수-0.057 A;

[0194] 1) 3.460 A;

[0195] 2) 0.251 A;

[0196] 3) 0.291 A;

[0197] 4) 0.243 A;

[0198] 5) 0.297 A;

- [0199] 6) 0.337 A.
- [0200] 결론:
- [0201] DNA 대비 KNR2의 비율 1.25 내지 4.0으로, 대조구, 심지어 현재의 절대 기준(gold standard)인 Superfect의 기준에 비해 독성이 덜하고, 보다 효율적인 유전자 전달이 이루어질 수 있다. 이 실험은 본 담체를 이용하여 상당히 큰 치료용 복합체들을 막들을 통해 전달할 수 있는 능력을 확인한다.
- [0202] 실시예 2
- [0203] 이 실시예는 단일 투여 후 본 발명의 담체에 의한 대형 핵산의 피부를 통한 수송을 예시한다.
- [0204] 백본 선택:
- [0205] 폴리라이신 MW 150,000에 18%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실을 통해 라이신 결사슬의 유리 아민에 -Gly₃Arg₇을 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 18개가 -Gly₃Arg₇에 접합됨). 변형된 백본은 이전과 같이 "KNR2"로 표시했다. 대조구 폴리양이온은 동일한 로트로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 폴리라이신("K2"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이었다. 추가적인 대조구 폴리양이온, 활성화된 덴드리머-기반 작용제인 Superfect(Qiagen)를 높은 체외 트랜스펙션율을 위한 기준으로서 선택했다(즉, 첨단 기술 효율성 vs. 체외 독성에 대한 양성 대조구이자 기준).
- [0206] 치료제 선택:
- [0207] 본 실험을 위해, 대장균 베타-갈락토시다아제(β gal)에 대한 전체 형질전환 유전자 및 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터에 의해 구동되는 부분적인 인접 서열들을 포함하는 8.5 킬로베이스의 플라스미드(pSport-기반 주형(template), Gibco BRL, Gaithersburg, MD)을 이용했다. 여기에서 β gal은 트랜스펙션되어 그 유전자를 전사, 번역하는 세포들에 대한 확인 마커로서 작용하고 외래 효소(foreign enzyme)에 대한 특이적 염색 후에 시각화될 수 있다. 따라서, 복합체가 페이로드 전달 전에 원형질막 및 핵막 모두를 통과한 세포들만 형질전환 유전자 발현을 가질 수 있다. 이 특정한 플라스미드는 약 2,805,000의 분자량을 가진다.
- [0208] 시료의 준비:
- [0209] 각 경우에, 과량의 양전하를 갖는 최종 복합체를 조립하기 위해 과량의 폴리양이온을 채택했다. K2 효능, KNR2 효능 및 Superfect 효능의 최적 비율들은 제조사의 권고 및 최대 효능에 대한 종래 보고서들에 근거하여 선택했다. 핵산-치료제 투여량을 모든 군들에 대해 표준화하고, 국소적으로 적용될 조성물의 총 용량 및 최종 pH도 표준화하였다. 시료들을 다음과 같이 준비하였다:
- [0210] AK1으로 표지된 군: 4:1의 전하 비로 최종 분량당 8 마이크로그램의 β gal 플라스미드(p/CMV-sport- β gal)(즉, 총 80 마이크로그램) 및 펩티드 담체 KNR2를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline)로 200 마이크로리터까지 희석했다. 체내(in vivo) 실험을 위해 결과물인 조성물을 1.8ml의 Cetaphil 모이스처라이저와 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.
- [0211] AL1으로 표지된 군: 4:1의 전하 비로 최종 분량당 8 마이크로그램의 β gal 플라스미드(p/CMV-sport- β gal)(즉, 총 80 마이크로그램) 및 K2를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 200 마이크로리터까지 희석했다. 체내 실험을 위해 결과물인 조성물을 1.8ml의 Cetaphil과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.
- [0212] AM1으로 표지된 군: 5:1의 전하 비로 최종 분량당 8 마이크로그램의 β gal 플라스미드(p/CMV-sport- β gal)(즉, 총 80 마이크로그램) 및 Superfect를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 200 마이크로리터까지 희석했다. 체내 실험을 위해 결과물인 조성물을 1.8ml의 Cetaphil과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩

분주했다.

[0213] 펩티드 담체 및 핵산 치료제에 의한 1회 치료 후 경피 전달 효율성을 결정하기 위한 동물 실험:

[0214] 치료의 적용 동안 동물들을 이소플루란의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취시킨 후, C57 블랙 6 마우스들(군당 n=4)에 등 뒤쪽 피부의 두뇌 부분(cranial portion of dorsal back skin)(마우스가 입 또는 사지로 이 부분에 도달할 수 없기 때문에 선택됨)에 적용되는 적합한 치료제의 정량된 200 마이크로리터 투여량의 국소 적용을 시행했다. 동물들은 탈모 처리(depilatory treatment)를 겪지 않았다. 동물들은 저체온증을 예방하기 위해 제어된 난방 환경(heat environment)에서 회복시키고, 일단 반응을 보이면, 밤새 식량과 물은 원하는 대로(ad libitum) 제공했다. 치료 후 24시간 경과 시, 마우스들은 CO₂의 흡입을 통해 안락사시키고, 맹검 관찰자들이 처리된 피부 세그먼트들을 완전한 두께로 채취했다. 처리된 세그먼트들을 3개의 동일한 부분들로 나누었다; 두뇌 부분을 10% 중성의 완충액 처리된 포르말린(10% neutral buffered formalin)에서 12-16시간 동안 고정하고 파라핀 포매(paraffin embedding)까지 70% 알코올에 보관하였다. 중앙부를 순간-동결(snap-frozen)시키고 전술된 바와 같은 섹션들 상에서 37°C에서 베타-갈락토시다아제 염색을 위해 직접 이를 이용했다(Waugh, J. M. , M. Kattash, J. Li, E.Yuksel, M. D. Kuo, M. Lussier, A. B. Weinfeld, R. Saxena, E. D. Rabinovsky, S. Thung, S. L. C. Woo, and S. M. Shenaq. Local Overexpression of Tissue Plasminogen Activator to Prevent Arterial Thrombosis in an in vivo Rabbit Model. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 96 (3): 1065-1070. Also: Elkins CJ, Waugh JM, Amabile PG, Minamiguchi H, Uy M, Sugimoto K, Do YS, Ganaha F, Razavi MK, Dake MD. Development of a platform to evaluate and limit in-stent restenosis. Tissue Engineering 2002. Jun;8 (3): 395-407). 처리된 꼬리 세그먼트는 용액화(solubilization) 연구들 위해 순간-동결시켰다.

[0215] 독성:

[0216] 효율성에 대해 분석된 것들에 대해 쌍을 이룬(paired) 섹션들 상에서 색소 배제에 의해 독성을 평가하였다. 섹션들은 효율성 또는 독성에 대한 염색만 거쳤는데, 이는 그 방법들이 확실하게 동시-채용될 수 없기 때문이다. 독성 분석들을 위해, 섹션들을 5분간 배제 색소에 침지하고 37°C, 10% CO₂에서 30분간 방치(incubation)하였다. 이 시간 동안 색소를 배제하지 않았던 세포들은 비-생존(non-viable) 세포로 간주하였다.

[0217] 데이터 처리 및 통계 분석:

[0218] 데이터 수집 및 이미지 분석은 맹검 관찰자에 의해 수행되었다. 전술된 바와 같이 염색된 섹션들을 plan-apochromat 렌즈를 갖춘 Nikon E600 현미경 상에서 그 전체로 촬영하였다. 결과물인 이미지에 대해 베타-갈락토시다아제 효소 활성(본 실시예에서 채용된 기질 방법에서는 블루) 또는 세포 독성에 대해 양성인 수(number positive)를 결정하기 위해 수동 확인과 함께 전술된 바와 같은 Image Pro Plus 소프트웨어를 이용하여 배치 이미지 분석을 수행했다. 각각에 대해 이 결과들을 뉴클리어 패스트 레드 염색(nuclear fast red staining)에 의해 총 단면 세포수로 정규화하고 단면 양성 염색의 퍼센트로 정리하였다. 뒤이어, 각 군에 대해, Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용하여 일원 ANOVA 반복 측정들에서 95% 신뢰수준에서의 유의성 분석으로 평균 및 표준 오차를 결정하였다.

[0219] 결과:

[0220] 결과들을 하기의 표에 요약하고 도 3에 예시한다. 양전하로 하전된 펩티드 경피 전달 담체는 K2(실질적으로 음성 대조구) 및 효율성에 대한 벤치마크 기준, Superfect 모두에 비해 전달 효율성 및 형질전환 유전자의 발현에 있어서 통계적으로 유의성 있는 증가를 달성했다. Superfect는 K2에 대해 통계적으로 유의성 있는 개선을 달성했으나, 이 모델 시스템에서 KNR2는 Superfect 대비 전달 효율성의 보다 큰 정도의 개선을 보였다.

[0221] 표 1: 치료군별 총 수에 대한 백분율로 표현된 베타-갈락토시다아제 양성 세포들의 평균 및 표준 오차.

군	평균	표준 오차
AK1	15.00	0.75

AL1	0.03	0.01
AM1	1.24	0.05

[0223] $P=0.0001$ (99%에서의 유의성)

[0224] 독성에 대한 결과들은 도 4에 제시되며, 도 4는 치료 후 24시간 경과시에 비생존 상태로 남은 면적의 총 면적 대비 백분율을 도시한다. 여기에서, K2가 전술된 바와 같이 낮은 전달 효율성을 갖는 투여량에서도, K2는 KNR2 또는 Superfect 대비 통계적으로 유의성 있는 세포 독성을 갖는다(Amabile, P.G., J.M. Waugh, T. Lewis, C.J. Elkins, T. Janus, M.D. Kuo, and M.D. Dake. Intravascular Ultrasound Enhances in vivo Vascular Gene Delivery. J. Am. Col. Cardiol. 2001 June; 37 (7): 1975-80).

[0225] 결론:

[0226] 펩티드 경피 담체는 피부를 통해 대형 복합체들을 특히, 전술된 형질전환 유전자 발현 및 전체 복합체 크기의 제한(constraints)를 고려할 때, 높은 효율성으로 수송할 수 있다. (1) 본 방법은 크게 단순화되고 이미지 분석에서 보다 큰 정확성을 가지며, (2) 효율성의 입증점이 II.B에서 결론적으로 이미 제시되었고, (3) 비세포성(noncellular) 성분들이 단면의 실질적인 부분을 차지하기 때문에, 면적 측정값들이 체내 결과들에서 보다 광범위한 이해 범위를 제공하며, 및 (4) 훨씬 큰 비펩티드 담체 복합체들에 대한 비교가 촉진되었기 때문에 양성인 수(positive number)가 아닌 양성인 면적을 분석대상으로 채용하였다.

[0227] 실시예 3

[0228] 이 실험은 7일간의 연속적인 일별 적용에서 본 발명의 양전하로 하전된 펩티드 담체를 이용한 대형 핵산-기반 치료제의 피부를 통한 경피 전달을 예시한다.

[0229] 백본 선택:

[0230] 폴리라이신 MW 150,000에 18%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실을 통해 라이신 결사슬의 유리 아민에 -Gly₃Arg₇을 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 18개가 -Gly₃Arg₇에 접합됨). 변형된 백본은 "KNR2"로 표시했다. 대조구 폴리양이온은 동일한 로트로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 폴리라이신("K2"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이었다.

[0231] 치료제 선택:

[0232] 본 실험을 위해, 대장균 베타-갈락토시다아제(β gal)에 대한 전체 형질전환 유전자 및 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터에 의해 구동되는 부분적인 인접 서열들을 포함하는 8.5 킬로베이스의 플라스미드(pSport-기반 주형(template), Gibco BRL, Gaithersburg, MD)을 이용했다. 이 특정한 플라스미드는 약 2,805,000의 분자량을 가지며, 따라서, 펩티드 담체를 통한 매우 큰 치료제의 피부를 통한 전달을 평가하기 위해 선택되었다.

[0233] 시료의 준비:

[0234] 각 경우에, 과량의 양전하를 갖는 최종 복합체를 조립하기 위해 과량의 폴리양이온을 채택했다. 실험 비율들은 이전의 실험에서 제시된 단일 투여량 실험들에 유사하게 선택했다. 핵산-치료제 투여량을 모든 군들에 대해 표준화하고, 국소적으로 적용될 조성물의 총 용량 및 최종 pH도 표준화하였다. 시료들을 다음과 같이 준비하였다:

[0235] AK1으로 표지된 군: 4:1의 전하 비로 최종 분량당 8 마이크로그램의 β gal 플라스미드(pCMV-sport- β gal)(즉, 총 240 마이크로그램) 및 펩티드 담체 KNR2를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 체내(in vivo) 실험을 위해 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0236] AL1으로 표지된 군: 4:1의 전하 비로 최종 분량당 8 마이크로그램의 β gal 플라스미드(p/CMV-sport- β gal)(즉, 총 240 마이크로그램) 및 K2를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 체내 실험을 위해 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0237] 펩티드 담체 및 핵산 치료제에 의한 7일간의 1일 1회 치료 후 누적 경피 전달 효율성을 결정하기 위한 동물 실험:

[0238] 치료의 적용 동안 동물들을 이소플루란의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취시킨 후, C57 블랙 6 마우스들(군 당 n=4)에 등 뒤쪽 피부의 두뇌 부분(cranial portion of dorsal back skin)(마우스가 입 또는 사지로 이 부분에 도달할 수 없기 때문에 선택됨)에 적용되는 적합한 치료제의 정량된 200 마이크로리터 투여량의 국소 적용을 시행했다. 동물들은 탈모 처리를 겪지 않았다. 동물들은 저체온증을 예방하기 위해 제어된 난방 환경에서 회복시키고, 일단 반응을 보이면, 밤새 식량과 물은 원하는 대로 제공했다. 이 절차를 7일간 하루 중 거의 동일한 시간에 1일 1회 반복하였다. 7일간의 치료 후, 마우스들은 CO₂의 흡입을 통해 안락사시키고, 맹검 관찰자들이 처리된 피부 세그먼트들을 완전한 두께로 채취했다. 처리된 세그먼트들을 3개의 동일한 부분들로 나누었다; 두뇌 부분을 10% 중성의 완충액 처리된 포르말린(10% neutral buffered formalin)에 12-16시간 동안 고정하고 파라핀 포매(paraffin embedding)까지 70% 알코올에 보관하였다. 중앙부를 순간-동결(snap-frozen)시키고 전술된 바와 같은 섹션들 상에서 37°C에서 베타-갈락토시다아제 염색을 위해 직접 이를 이용했다. 처리된 꼬리 세그먼트는 용액화 연구들 위해 순간-동결시켰다.

[0239] 데이터 처리 및 통계 분석:

[0240] 데이터 수집 및 이미지 분석은 맹검 관찰자에 의해 수행되었다. 전술된 바와 같이 염색된 섹션들을 plan-apochromat 렌즈를 갖춘 Nikon E600 현미경 상에서 그 전체로 촬영하였다. 결과물인 이미지에 대해 베타-갈락토시다아제 효소 활성에 대해 양성인 수(number positive)를 결정하기 위해 수동 확인과 함께 전술된 바와 같은 Image Pro Plus 소프트웨어를 이용하여 배치 이미지 분석을 수행했다. 각각에 대해 이 결과들을 총 단면적으로 정규화하고 단면 양성 염색의 퍼센트로 정리하였다. 뒤이어, 각 군에 대해, Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용하여 일원 ANOVA 반복 측정들에서 95% 신뢰수준에서의 유의성 분석으로 평균 및 표준 오차를 결정하였다.

[0241] 결과:

[0242] 결과들을 하기의 표에 요약하고 도 5에 예시한다. 펩티드 경피 전달 담체는 K2에 비해 전달 효율성 및 형질전환 유전자의 발현에 있어서 통계적으로 유의성 있는 증가를 달성했다.

[0243] 표 2. 치료군별 7일간의 1일 1회 적용 후 총 면적에 대한 백분율로 표현된 베타-갈락토시다아제의 누적 형질전환 유전자 발현의 평균 및 표준 오차.

[0244]

군	평균	표준 오차
AK	5.004	2.120
AL	0.250	0.060

[0245] P=0.0012 (99%에서의 유의수준)

[0246] 실시예 4(비-펩티드 담체).

[0247] 본 실시예는 7일간의 연속적인 일별 적용에서 본 발명의 양전하로 하전된 비-펩티드 담체를 이용한 대형 핵산-기반 치료제의 피부를 통한 경피 전달을 예시한다.

[0248] 백본 선택:

[0249] 폴리에틸렌이민(PEI, MW 1,000,000)에 30%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실을 통해 PEI 결사슬의 유리 아민에 $-Gly_3Arg_7$ 을 공유결합적으로 결합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기 중 30개가 $-Gly_3Arg_7$ 에 공유결합적으로 결합됨). 변형된 백본은 대형 비-펩티드 담체를 나타내기 위해 "PEIR"로 표시했다. 대조구 폴리양이온은 동일한 로트로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 폴리라이신("K2"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이었다.

[0250] 치료제 선택:

[0251] 본 실험을 위해, 대장균 베타-갈락토시다아제(β gal)에 대한 전체 형질전환 유전자 및 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터에 의해 구동되는 부분적인 인접 서열들을 포함하는 8.5 킬로베이스의 플라스미드(pSport-기반 주형(template), Gibco BRL, Gaithersburg, MD)을 이용했다. 이 특정한 플라스미드는 약 2,805,000의 분자량을 갖는다.

[0252] 시료의 준비:

[0253] 각 경우에, 과량의 양전하를 갖는 최종 복합체를 조립하기 위해 과량의 폴리양이온을 채택했다. 핵산-치료제 투여량을 모든 군들에 대해 표준화하고, 국소적으로 적용될 조성물의 총 용량 및 최종 pH도 표준화하였다. 시료들을 다음과 같이 준비하였다:

[0254] AS로 표지된 군: 5:1의 전하 비로 최종 분량당 8 마이크로그램의 β gal 플라스미드(pCMV-sport- β gal)(즉, 총 240 마이크로그램) 및 대조구 PEI를 균일해질 때까지 혼합하고 Tris-EDTA 완충용액으로 600 마이크로리터까지 희석했다. 체내(in vivo) 실험을 위해 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0255] AT로 표지된 군: 5:1의 전하 비로 최종 분량당 8 마이크로그램의 β gal 플라스미드(pCMV-sport- β gal)(즉, 총 240 마이크로그램) 및 복합 비-펩티드 담체 PEIR("PEIR")을 균일해질 때까지 혼합하고 Tris-EDTA 완충용액으로 600 마이크로리터까지 희석했다. 체내(in vivo) 실험을 위해 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0256] AU로 표지된 군: 5:1의 전하 비로 최종 분량당 8 마이크로그램의 β gal 플라스미드(pCMV-sport- β gal)(즉, 총 240 마이크로그램) 및 고도로 정제된 Essentia 비-펩티드 담체 PEIR("순수한 PEIR")을 균일해질 때까지 혼합하고 Tris-EDTA 완충용액으로 600 마이크로리터까지 희석했다. 체내(in vivo) 실험을 위해 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0257] 비-펩티드 담체 및 뉴클레오티드 치료제에 의한 7일간의 1일 1회 치료 후 누적 경피 전달 효율성을 결정하기 위한 동물 실험:

[0258] 치료의 적용 동안 동물들을 이소플루란의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취시킨 후, C57 블랙 6 마우스들(군당 n=3)에 등 뒤쪽 피부의 두뇌 부분(cranial portion of dorsal back skin)(마우스가 입 또는 사지로 이 부분에 도달할 수 없기 때문에 선택됨)에 적용되는 적합한 치료제의 정량된 200 마이크로리터 투여량의 국소 적용을 시행했다. 동물들은 탈모 처리를 겪지 않았다. 동물들은 저체온증을 예방하기 위해 제어된 난방 환경에서 회복시키고, 일단 반응을 보이면, 밤새 식량과 물은 원하는 대로 제공했다. 이 절차를 7일간 하루 중 거의 동일한 시간에 1일 1회 반복하였다. 7일간의 치료 후, 마우스들은 CO₂의 흡입을 통해 안락사시키고, 맹검 관찰자들이 처리된 피부 세그먼트들을 완전한 두께로 채취했다. 처리된 세그먼트들을 3개의 동일한 부분들로 나누었다; 두뇌 부분을 10% 중성의 완충액 처리된 포르말린(10% neutral buffered formalin)에 12-16시간 동안 고정하고 파라인 포매(paraffin embedding)까지 70% 알코올에 보관하였다. 중앙부를 순간-동결(snap-frozen)시키고 전술된 바와 같은 섹션들 상에서 37°C에서 베타-갈락토시다아제 염색을 위해 직접 이를 이용했다. 처리된 꼬리 세그먼트는 용액화(solubilization) 연구들 위해 순간-동결시켰다.

[0259] 데이터 처리 및 통계 분석:

[0260] 데이터 수집 및 이미지 분석은 맵검 관찰자에 의해 수행되었다. 전술된 바와 같이 얻어진 섹션들을 plan-apochromat 렌즈를 갖춘 Nikon E600 현미경 상에서 그 전체로 촬영하였다. 결과물인 이미지에 대해 베타-갈락토시다아제 효소 활성화에 대해 양성인 면적을 결정하기 위해 수동 확인과 함께 전술된 바와 같은 Image Pro Plus 소프트웨어를 이용하여 배치 이미지 분석을 수행했다. 각각에 대해 이 결과들을 총 단면적으로 정규화하고 단면 양성 염색의 퍼센트로 정리하였다. 뒤이어, 각 군에 대해, Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용하여 일원 ANOVA 반복 측정들에서 95% 신뢰수준에서의 유의성 분석으로 평균 및 표준 오차를 결정하였다.

[0261] 결과:

[0262] 결과들을 하기의 표에 요약하고 도 6에 예시한다. 비-펩티드 경피 전달 담체는-복합형 및 초순수형 모두- PEI에 비해 전달 효율성 및 형질전환 유전자의 발현에 있어서 통계적으로 유의성 있는 증가를 달성했다. PEIR의 초순수형은 시약의 보다 높은 계산된 특이적 활성화와 일치하여 표준형 PEIR 보다 높은 효율성의 경향을 보였다.

[0263] 표 3. 치료군별 7일간의 1일 1회 적용 후 총 면적에 대한 백분율로 표현된 베타-갈락토시다아제의 누적 형질전환 유전자 발현의 평균 및 표준 오차.

[0264]

군	평균	표준 오차
AS	0.250	0.164
AT	2.875	0.718
AU	3.500	0.598

[0265] P=0. 0058 (99%에서의 유의 수준)

[0266]

[0267] 결론:

[0268] 비-펩티드 경피 담체는 피부를 통해 대형 복합체들을 특히, 전술된 형질전환 유전자 발현 및 전체 복합체 크기의 제한(constraints)를 고려할 때, 높은 효율성으로 수송할 수 있다. 효율성들은 펩티드 담체와의 보다 작은 복합체들로부터 수득된 것들만큼 크지는 않으나, 상당한 증가가 이루어졌다. 주목할 것은, 대형 비-펩티드 복합체들을 이용한 형질전환 유전자 발현의 분포는 거의 전적으로 모낭(hair follicle)에 기반한 것이었고, 반면에 펩티드 담체에 대한 결과들은 단면 전체를 통해 널리 퍼져있었다. 따라서, 크기 및 백본 굴성이 전달의 나노-기계적 표적지향(nano-mechanical targeting)을 위해 이용될 수 있다.

[0269] 실시예 5

[0270] 본 실험은 대조구 대비 단일 회 투여 후 완전한(intact) 피부를 통해 완전한 표지된 단백질 보툴리눔 독소를 포함하는 대형 복합체를 수송하기 위한 펩티드 담체의 용도를 보여주었다. 보툴리눔 독소는 예를 들면, 면역화(immulation)용 작용제와 같은, 대형 단백질의 모델 시스템으로서 선택되었다.

[0271] 백본 선택:

[0272] 폴리라이신(MW 112,000)에 18%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실을 통해 라이신 결사슬의 유리 아민에 -Gly₃Arg₇을 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 18개 -Gly₃Arg₇에 접합됨). 변형된 백본은 "KNR"로 표시했다. 대조구 폴리양이온(polycation)은 동일한 로트(lot)로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 폴리라이신("K"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이었다.

[0273] 치료제:

[0274] 본 실험을 위해 보툴리눔 독소 A의 Botox® 브랜드(Allergan)를 선택했다. 이 제품은 약 150,000의 분자량을 갖는다.

[0275] 시료의 준비

[0276] 제조업체의 설명서에 따라 보툴리눔 독소를 재구성했다. 단백질의 분량(aliquot)을 계산된 12배 물량을 초과하는 양(12-fold molar excess)의 술폰-NHS-LC 바이오틴(Pierce Chemical)으로 비오틴화시켰다. 표지된 생성물은 "Btox-b"로 표시했다.

[0277] 각 경우에, 높은 음전하를 띤 대형 뉴클레오타이드 복합체의 전달에서와 같이 과량의 양전하를 갖는 최종 복합체를 조립하기 위해 과량의 폴리양이온을 채택했다. 순 중성 전하 또는 양성 전하는 높은 음전하의 세포 표면 프로테오글리칸 및 세포의 매트릭스로부터 단백질 복합체의 반발을 방지한다. 모든 군들에 대해 Btox-b 투여량을 표준화하고, 국소적으로 적용될 조성물의 최종 용량 및 최종 pH도 표준화했다. 시료들은 다음과 같이 준비했다:

[0278] "JMW-7"로 표지된 군: 4:1의 계산된 MW 비로 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 20 U) 및 펩티드 담체 KNR을 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 200 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 1.8ml의 Cetaphil과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0279] "JMW-8"로 표지된 군: 4:1의 전하 비로 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 20 U) 및 K를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 200 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 1.8ml의 Cetaphil로선과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0280] 펩티드 담체 및 표지된 Btox에 의한 1회 치료 후 경과 전달 효율을 결정하기 위한 동물 실험:

[0281] 치료의 적용 동안 동물들을 이소플루란의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취시킨 후, C57 블랙 6 마우스들(군 당 n=4)에 등 뒤쪽 피부의 두뇌 부분(cranial portion of dorsal back skin)(마우스가 입 또는 사지로 이 부분에 도달할 수 없기 때문에 선택됨)에 적용될 적합한 치료제의 정량된 200 마이크로리터 투여량의 국소 적용을 시행했다. 동물들은 탈모 처리를 겪지 않았다. 초기 치료 후 30분 경과 시, 마우스들은 CO₂의 흡입을 통해 안락사시키고, 맹검 관찰자들(blinded observer)이 처리된 피부 세그먼트들을 전층(full thickness)으로 채취했다. 처리된 세그먼트들을 3개의 동일한 부분들로 나누었다; 두개 부분을 10% 중성의 완충액 처리된 포르말린(10% neutral buffered formalin)에 12-16시간 동안 고정하고 파라핀 포매(paraffin embedding)까지 70% 알코올에 보관하였다. 하기에 요약된 바와 같이 중앙부를 순간-동결(snap-frozen)시키고 맹검 관찰자가 바이오틴 시각화(biotin visualization)을 위해 직접 이를 이용했다. 처리된 꼬리 세그먼트는 용액화(solubilization) 연구들 위해 순간-동결시켰다.

[0282] 바이오틴 시각화는 다음과 같이 수행하였다. 요약하면, 각 섹션을 1시간 동안 NeutrAvidin® 완충 용액에 침지시켰다. 알칼리 포스파타아제 활성을 시각화하기 위해, 단편들을 식염수로 4회 세척하고 NBT/BCIP(Pierce Scientific)에 1시간 동안 침지시켰다. 그 후, 섹션들을 식염수로 세정하고 plan-apochromat 렌즈들로 Nikon E600 현미경 상에서 그 전체를 촬영했다.

[0283] 데이터 처리 및 통계 분석:

[0284] 전체 포지티브 염색은 Image Pro Plus 소프트웨어(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)를 이용한 배치 이미지 분석(batch image analysis)을 통해 맹검 관찰자에 의해 결정하고, 각각에 대해 포지티브 염색의 퍼센트를 결정하기 위해 총 단면적으로 정규화시켰다. 뒤이어 Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용하여 일원 ANOVA의 반복된 측정에서 95% 신뢰 수준에서 유의성 분석으로 각 군에 대해 평균 및 표준 오차를 결정했다.

[0285] 결과:

[0286] KNR("EB-Btox") 또는 K("nl")와 함께 Btox-b의 1회 국소 적용 후 비오틴화(biotinylated) 보툴리눔 독소에 대해 양성인 평균 단면적을 총 면적 대비 퍼센트로 기록하였다. 결과들을 하기의 표 4에 표시하고 도 1에 도시하였다. 도 7에서, Btox-b 및 펩티드 담체 KNR을 포함하는 "EB-Btox" 및 대조구로서 폴리양이온 K와 함께 Btox-b를 포함하는 "nl"에 의한 3일간의 1일 1회 처리 후 표지에 대해 양성인 면적을 총 면적 대비 퍼센트로 결정했다. 각 군에 대해 평균 및 표준 오차를 표시했다.

[0287] 표 4. KNR(JMW-7) 또는 K(JMW-8)과 함께 Btox-b의 30분간 1회 국소 투여 후 총 단면의 퍼센트로 나타낸 표지된 보툴리눔 독소 영역에 대한 평균 및 표준 오차.

[0288]

군	평균	표준 오차
JMW-7	33.000	5.334
JMW-8	8.667	0.334

[0289] P=0.0001(99%에서의 유의성)

[0290] **실시예 6**

[0291] 실시예 5는 펩티드 경피 담체가 완전한 피부를 갖는 쥐(murine) 모델에서 국소 투여 후 보툴리눔의 효율적인 수송을 가능하게 한다는 것을 보여주었다. 그러나, 이 실험은 복합 단백질 보툴리눔 독소가 피부를 통한 전위(translocation) 후 기능적 형태로 방출되는지 여부는 나타내지 않았다. 따라서 보툴리눔 독소가 이 펩티드 담체(역시, 단백질의 공유결합성 변형 없이)를 이용하는 국소용 작용제로서 완전한 피부를 통해 치료적으로 전달될 수 있는지 여부를 평가하기 위해 하기의 실험을 수행하였다.

[0292] 폴리라이신(MW 112,000)에 18%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실을 통해 라이신 결사슬의 유리 아민에 -Gly₃Arg₇를 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 18개가 -Gly₃Arg₇에 접합됨). 변형된 백본은 "KNR"로 표시했다. 대조구 폴리양이온(polycation)은 동일한 로트(lot)로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 폴리라이신("K"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이었다.

[0293] "JMW-9"로 표지된 군: 4:1의 계산된 MW 비로 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 60U) 및 펩티드 담체 KNR을 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil로션과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0294] "JMW-10"으로 표지된 군: 4:1의 전하 비로 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 60U) 및 K를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil로션과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0295] "JMW-11"로 표지된 군: 폴리양이온 없이 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 60U)을 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil로션과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0296]

[0297] 펩티드 담체 및 보툴리눔 독소에 의한 1회 처리 후 치료적 효능을 결정하기 위한 동물 실험:

[0298] 치료의 적용 동안 동물들을 이소플루란의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취시킨 후, C57 블랙 6 마우스들(군 당 n=4)에 발끝에서 대퇴 중간 부위(mid thigh)까지 균일하게 적용되는 적합한 치료제의 정량된 400 마이크로리터 투여량의 국소 적용을 시행했다. 양쪽 사지에 치료를 시행하며 양쪽 중 한쪽에 무작위로 치료를 적용하였다. 동물들은 탈모를 겪지 않았다. 초기 치료 후 30분 경과 시, 보툴리눔 독소 투여 후 발 운동성(foot mobility)에 대해 발표된 디지털 외향 스코어(digital abduction score)에 따라 디지털 외향 능력(digital abduction capability)에 대해 마우스들을 평가했다[Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. Toxicon. 2001 Dec; 39 (12): 1815-20]. 또한 마우스의 운동성을 주관적으로 평가했다.

[0299] 데이터 처리 및 통계 분석:

[0300] 두 명의 맹검 관찰자가 독립적으로 디지털 외향 스코어(Digital abduction score)를 표로 작성하였다. 뒤이어, Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용한 일원 ANOVA 반복 측정으로 95% 신뢰 수준에서의 유의성 분석으로 각 군에 대한 평균 및 표준 오차를 결정했다.

[0301] 결과:

[0302] KNR("JMW-9"), K("JMW-10") 또는 폴리양이온 없는 희석제와 함께 보툴리눔 독소의 1회의 국소 투여 후 평균 디지털 외향 스코어를 하기의 표에 표시하고 하기의 도 8에 대표적인 현미경 사진을 도시한다. 펩티드 담체 KNR은 양 대조구들에 비해 보툴리눔 독소의 통계적으로 유의성 있는 기능적 전달을 제공했고, 양 대조구들에 대한 결과들은 상호 간에 유사했다. 본 실험의 추가적인 독립적인 반복들(총 3회의 실험에서 KNR과 함께 투여된 국소 보툴리눔 독소로부터 통계적으로 유의성 있는 마비가 관찰되나, 대조구들에 대해서는 마비가 관찰되지 않는 동일한 결과를 얻음)은 본 발견을 확인했고 K의 존재 또는 부재(즉, 2 개의 대조구들)에 따른 국소 보툴리눔 독소 간에는 유의성 있는 차이를 보여주지 않았다. 흥미롭게도, 마우스들은 일관되게 마비된 사지 쪽으로 향하여 이동했다(처리된 동물들의 경우는 100% 발생했고, 대조군들에서는 0% 발생함). 도 8에 나타난 바와 같이, 보툴리눔 독소 + 대조구 폴리양이온 폴리라이신 또는 폴리양이온 없이 보툴리눔 독소("Botox 단독")로 처리된 사지는 발가락들을 움직일 수 있으나(집혔을 때 방어 메카니즘으로서), 보툴리눔 독소 + 펩티드 담체 KNR("Essentia Botox lotion")로 처리된 사지는 움직일 수 없었다.

[0303] 표 5: 펩티드 담체 KNR("JMW-9"), 대조구 폴리양이온 K("JMW-10")와 함께, 또는 단독으로("JMW-11") 투여된 보툴리눔 독소의 1회 국소 적용 30분 후 디지털 외향 스코어들.

[0304]

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

[0305] $P=0.0351$ (95%에서의 유의성)

[0306] 결론:

[0307] 본 실험은 펩티드 경피 담체가 치료제의 공유결합성 변형 없이 피부를 통한 보툴리눔 치료제의 치료적 유효량을 수송할 수 있다는 것을 보여준다. 본 실험은 또한 보툴리눔 독소가 대조구에서 국소적으로 적용되었을 때 기능을 발휘하지 않는다는 것을 확인한다.

[0308] 실시예 7

[0309] 이 실험은 본 발명에서 비-펩티드 담체의 성능을 보여준다.

[0310] 백본 선택:

[0311] 30%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실을 통해 PEI 결사슬의 유리 아민으로 $-Gly_3Arg_7$ 을 폴리에틸렌이민(PEI) MW 1,000,000에 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 30개가 $-Gly_3Arg_7$ 에 접합됨). 변형된 백본은 대형 비-펩티드 담체를 나타내기 위해 "PEIR"로 표시했다. 대조구 폴리양이온(polycation)은 동일한 로트(lot)로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 PEI("PEI"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)였다. 실시예 1에서와 동일한 보툴리눔 독소 치료제를 이용했다.

[0312] 제조업체의 설명서에 따라 보툴리눔 독소를 재구성했다. 각 경우에, 높은 음전하를 띤 대형 뉴클레오타이드 복합체의 전달에서와 같이 과량의 양전하를 갖는 최종 복합체를 조립하기 위해 과량의 폴리양이온을 채택했다. 순 중성 전하 또는 양성 전하는 높은 음전하의 세포 표면 프로테오글리칸 및 세포외 매트릭스로부터 단백질 복합체의 반발을 방지한다. 모든 군들에 대해 보툴리눔 독소 투여량을 표준화하고, 국소적으로 적용될 조성물의 최종

용량 및 최종 pH도 표준화했다. 시료들은 다음과 같이 준비했다:

[0313] "AZ"로 표시된 군: 5:1의 계산된 MW 비로 분량당 2.0 유닛의 보툴리눔 독소(즉, 총 60U) 및 초 순수 형태의 비-펩티드 담체 PEIR을 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0314] "BA"로 표시된 군: 5:1의 전하 비(charge ratio)로 분량당 2.0 유닛의 보툴리눔 독소(즉, 총 60U) 및 PEI를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 600 마이크로리터까지 희석했다. 결과물인 조성물을 5.4ml의 Cetaphil과 균일해질 때까지 혼합하고 200 마이크로리터씩 분주했다.

[0315] 1회 치료 후 치료적 효능을 결정하기 위한 동물 실험:

[0316] 치료의 적용 동안 동물들을 이소플루란의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취시킨 후, C57 블랙 6 마우스들(군 당 n=4)에 발끝에서 대퇴 중간 부위까지 균일하게 적합한 치료제의 정량된 400 마이크로리터 투여량의 국소 적용을 시행했다. 양쪽 사지에 치료를 시행하며 양쪽 중 한쪽에 무작위로 치료를 적용하였다. 동물들은 탈모를 겪지 않았다. 초기 치료 후 30분 경과 시, 보툴리눔 독소 투여 후 발 운동성(foot mobility)에 대한 발표된 디지털 외향 스코어(digital abduction score)에 따라 디지털 외향 능력(digital abduction capability)에 대해 마우스들을 평가했다[Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. Toxicon. 2001 Dec; 39 (12): 1815-20]. 또한 마우스의 운동성을 주관적으로 평가했다.

[0317]

[0318] 데이터 처리 및 통계 분석:

[0319] 두 명의 맹검 관찰자가 독립적으로 디지털 외향 스코어(Digital abduction score)를 표로 작성하였다. 뒤이어, Statview 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용한 일원 ANOVA 반복 측정으로 95% 신뢰 수준에서의 유의성 분석으로 각 군에 대한 평균 및 표준 오차를 결정했다.

[0320] 결과:

[0321] 초순수(ultrapure) PEIR("AZ"), 또는 대조구 폴리양이온 PEI("BA")와 함께 보툴리눔 독소의 1회의 국소 투여 및 반복(본 실험에 대한 1회 독립 반복)을 하기의 표들에 표시했다. 비-펩티드 담체 PEIR은 대조구들에 비해 보툴리눔 독소의 통계적으로 유의성 있는 기능적 전달을 제공했다. 이전의 경우에서와 같이, 동물들은 마비된 사지들을 향해 원을 그리며 걷는 것으로 관찰되었다.

[0322] 표 6. 반복 1. 초순수 PEIR("AZ"), 또는 대조구 폴리양이온 PEI("BA")와 함께 투여된 보툴리눔 독소의 1회 국소 적용 후 30분 경과 시점의 디지털 외향 스코어들. 평균 및 표준 오차를 표시한다.

군	평균	표준 오차
BA	0.833	0.307
AZ	3.197	0.083

[0324] P=0.0002(99%에서의 유의성)

[0325] 표 7. 반복 2. 초순수 PEIR("AZ1"), 또는 대조구 폴리양이온 PEI("BA1")와 함께 투여된 보툴리눔 독소의 1회 국소 적용 후 30분 경과 시점의 디지털 외향 스코어들. 평균 및 표준 오차를 표시한다.

군	평균	표준 오차
BA1	0.333	0.211
AZ1	3.833	0.167

[0327] P=0.0001(99%에서의 유의성)

[0328] 결론:

- [0329] 이 실험은 비-펩티드 경피 담체가 보툴리눔 독소의 사전 공유결합성 변형(prior covalent modification) 없이 피부를 통해 치료적 투여량의 보툴리눔 독소를 수송할 수 있다는 것을 보여주었다. 이와 같은 발견은 펩티드 이동 작용제(peptidyl transfer agent)의 경우들을 보완한다. 치료 효과를 달성하기 위해 비-펩티드 담체 또는 펩티드 담체를 이용하는 옵션은 특정 상황들, 환경들 및 적용 방법들에 따라 맞춤화할 수 있게 하며 본 발명의 경피 전달 플랫폼의 영역에 더해진다.
- [0330] 이 실시예들에서, 담체를 갖지 않는 보툴리눔 독소 대비 펩티드 또는 비-펩티드 담체에 의한 보툴리눔 독소 투과는 면역화용 항원들, 특히, 보툴리눔과 같이 담체들을 이용하지 않으면 피부를 불충분하게 통과하는 항원들에 의한 면역화를 위한 경피 투과의 유용성을 정립한다. 기능성 보툴리눔 독소의 전달은 4개 이상의 별개의 에피토프들이 완전한 상태로 경피 전달되었다는 것을 확인하고; 실시예에서 기능성 보툴리눔 독소가 담체의 부재 하에는 전달되지 않았다는 사실은 담체의 부재 시의 작용제에 비해 담체는 상당한 면역화 능력(immunization potential)을 제공한다는 것을 확인한다. 면역화는 면역 반응을 일으키기 위해 항원들이 충분한 양으로 피부를 통과할 것을 요구하므로, 이 방법은 면역화를 위해 항원의 경피 전달을 가능하게 한다. 이 방법은 항원의 공유결합성 변형은 필요로 하지 않으며 바이러스 유전자 전달을 포함할 필요가 없기 때문에, 안전성, 안정성 및 효율성 측면에서 다수의 장점들을 갖는다.
- [0331] 실시예 8
- [0332] 이 실험은 TAT 효능 인자들을 갖는 펩티드 및 비-펩티드 담체의 생성 및 이와 같은 담체들과 보툴리눔 독소의 조립을 상세히 보여준다.
- [0333] 폴리에틸렌 이민(PEI)의 TAT 단편 GGGRKKRRQRRR로의 결합:
- [0334] 결사슬 보호기를 갖지 않는 TAT 단편 GGGRKKRRQRRR (6mg, 0.004 mmol, Sigma Genosys, Houston, TX)을 0.1M MES 완충용액 1ml에 용해시켰다. 이 용액에, EDC(3 mg, 0.016 mmol)를 첨가하고 뒤이어 물에 담긴 PEI 400k 분자량 50% 용액(w:v)(~0.02ml, $\sim 2.5 \times 10^{-5}$ mmol)을 첨가했다. pH는 테스트 페이퍼에 의해 7.5가 되게 했다. 새로운 1ml의 0.1M MES를 첨가하고 HCl을 첨가하여 pH를 ~5까지 조정했다. 새로운 분량의 EDC(5 mg, 0.026 mmol)를 첨가하고, pH~5의 반응액을 밤새 교반하였다. 다음날 아침, 반응 혼합물을 동결하고 동결건조시켰다.
- [0335] Sephadex G-25(Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ)의 컬럼(1cm 직경 x 14 cm 높이)을 멸균된 1x PBS로 현탁시켰다(slurry). 컬럼을 19kD의 분자량을 갖는 FITC 텍스트란(Sigma, St Louis, MO)의 용리에 의해 표준화시켰다. 5ml PBS에서 용리된 표준은 6ml에서 중간 피크를 가졌고 7 ml에서 점점 낮아졌다(tailed). 상기에서 동결건조된 반응 혼합물을 소량의 PBS에 용해시켜 컬럼에 적용하였다. 1ml PBS의 연속적인 적용에 의해 용리시켰다. 분획들을 수집했고, 첫번째 분획은 반응 용량을 포함하여 용리된 최초의 3 ml로 구성되었다. 이후의 분획들은 1ml였다.
- [0336] 용리된 분획들을 280nm에서 UV 흡광도에 대해 분석했다. 5-7ml에 해당하는 분획 3, 4, 및 5는 별로 크지 않은(modest) 흡광도 피크를 보였다. 모든 분획들을 동결건조시키고 IR 분광분석을 수행했다. TAT 단편의 특징적인 구아니딘 트리플 피크($2800 - 3000\text{cm}^{-1}$)가 분획 4-6에서 관찰되었다. 이 분획들은 또한 1700cm^{-1} 에서 아마이드 스트레치(stretch)를 보여, TAT 단편과 PEI의 접합체(conjugate)를 확인했다.
- [0337] TAT 단편 GGGRKKRRQRRR(11.6mg, 0.007 mmol)을 이용하여 반복 실험을 수행하였다. 이 양은 30개의 PEI 아민들 중 하나가 TAT 단편과 반응하는 것으로 예상되도록 계산하였다. 이는 전술된 원래의 폴리라이신-올리고아르기닌(KNR) 효능 인자의 조성물과 유사했다. TAT 단편의 PEI 아민으로의 성공적인 공유결합성 결합은 전술된 바와 같이 IR에 의해 확인되었다.
- [0338] 폴리라이신의 TAT 단편으로의 결합:
- [0339] 0.1M MES, pH~4.5 1ml에 용해된 폴리라이신(10 mg 1.1×10^{-4} mmol; Sigma)의 용액에 TAT 단편(4 mg, 0.003 mmol) 및 뒤이어 EDC (3.5 mg, 0.0183 mmol)을 첨가했다. 결과물인 반응 혼합물(pH~4.5)을 실온(RT)에서 교반하였다. 반응액을 -78°C 에서 밤새 동결시켰다. 다음날, 반응 혼합물을 실온까지 해동시키고 포화 탄화수소나트

를 용액의 첨가에 의해 pH를 ~8까지 조정하였다. 반응 혼합물을 전술된 바와 같은 구성되고 표준화된 Sephadex G-25 컬럼에 직접 적용하였다. 5ml 이후부터 7개의 1 ml 분획들을 용리시켰다. UV 280 흡광도를 측정하여, 분획 2, 3, 및 4에서 상대적인 피크를 확인했다. 동결건조된 분획들의 IR은 분획 1 내지 7에서 특징적인 구아니딘 피크(2800-3000cm⁻¹)를 보였다. 분획 1은 1730cm⁻¹에서 강한 피크를 보이고 1600cm⁻¹에서는 피크를 보이지 않았으나, 분획 2 내지 6에서는 그 반대였다. 따라서, TAT 단편의 펩티드 담체, 폴리라이신으로의 성공적인 공유결합성 부착을 확인했다.

[0340] 하기와 같이 비공유결합성 복합체를 형성하기 위해 공유결합적으로 결합된 TAT 단편과 PEI(PEIT) 및 공유결합적으로 결합된 TAT 단편과 폴리라이신(KNT)을 뒤이어 보툴리눔 독소와 혼합했다:

[0341] "JL-1"으로 표지된 군: 4:1의 전하 비로 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 20U) 및 PEIT를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 200 마이크로리터까지 희석했다.

[0342] "JL-2"로 표지된 군: 4:1의 전하 비로 분량당 2.0 유닛의 Btox-b(즉, 총 20U) 및 KNT를 균일해질 때까지 혼합하고 인산 완충 식염수로 200 마이크로리터까지 희석했다.

[0343] 비공유결합성 복합체 형성 후에, 입자들을 회전형 미량원심분리기(rotary microcentrifuge)로 12,000 x g로 5분간 원심분리하고 20 마이크로리터의 탈이온수에 재현탁하고 IR을 위해 게르마늄 감쇄전반사 셀(Germanium attenuated total reflectance cell) 상에서 증발시켰다. 이에 의해, 복합체 내의 Btox-b의 존재를 확인했다. 전반적으로, 이 실험은 합성 계획(scheme)이 다른 효능 인자들에 적용될 수 있고 결과물인 담체들은 올리고아르기닌 양전하로 하전된 분지형 또는 효능 기들을 갖는 담체를 이용한 이전의 실시예들에서와 같이, 생물학적 활성제-이 경우, 보툴리눔 독소-와 복합체를 형성할 수 있다는 것을 확인했다.

[0344] 실시예 9

[0345] 본 실험은 특정 항원의 이미징에 대한 펩티드 담체의 성능을 보여준다. 이 실시예에서, Essentia 펩티드 담체들 중 하나인 KNR2와 광학적 이미징 모이어티들 및 흑색종을 표적으로 지향하는 변형된 항체의 복합체가 흑색종의 국소 검출에 적합하다.

[0346] 백본 선택:

[0347] 폴리라이신(MW 150,000)에 18%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실을 통해 라이신 결사슬의 유리 아민에 -Gly₃Arg₇를 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 18개 -Gly₃Arg₇에 접합됨). 변형된 백본은 "KNR2"로 표시했다. 대조구 폴리양이온(polycation)은 동일한 로트(lot)로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 폴리라이신("K2"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이었다.

[0348] "Gang2Asp"로 표시된 유도체화된 항체를 생성하기 위해, 보존된 인간 흑색종 도메인, 갱글리오시드 2에 대한 쥐의 단일클론 항체 (IgG3, US Biologicals, Swampscott, MA)를 전술된 바와 같이 EDC 결합(coupling)을 통해 짧은 폴리아스파르트레이트 음이온 사슬(MW 3,000)에 공유결합적으로 부착시켰다. 또한, 음이온성 이미징 작용제를 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 폴리음이온으로 설계하였고, 그 서열은 "J"는 공유결합적으로 결합된 텍사스 레드 형광발색단(fluorophore)(Sigma Genosys, Woodlands, TX)을 의미하는 ATGC-J(이하에서, "ATGC-J"로 표시함)였다. 이 실험을 위해, 6.35 마이크로그램의 Gang2Asp를 0.1712 마이크로그램의 ATGC-J와 조합하고, 뒤이어 총 용량 200 마이크로리터의 탈이온수에서 17.5 마이크로그램의 KNR2와 복합체화하여 KNR2:ATGC-J:Gang2Asp의 5:1:1의 최종 비를 얻었다. 혼합물을 2분간 볼텍싱하였다. 결과물인 복합체를 수화된 CellTek Human Melanoma 슬라이드 및 대조구 CellTek Cytokeratin 슬라이드(SDL, Des Plaines, IL)에 적용하고 동일한 필드에서 흑색종 색소의 형광 분포 vs. 광시야(brightfield) 분포의 사진촬영에 의한 평가 전에 5분간 방치하였다. 또한, ATGC-J 또는 Gang2Asp가 없는 추가적인 대조구들을 채용했다.

[0349] 결과:

[0350] 비-공유결합성 복합체들은 항체의 부재 시의 복합체들의 분포보다는 항체 유도체의 굴성을 따르는 광학적 이미

징 작용제의 분포를 제공했다. 보다 주목할 것은, 복합체들이 도 9에 나타난 바와 같이, 염색된 흑색종 세포들의 분포에 조화되는 분포를 따른다는 것이다.

[0351] 결론:

본 실험은 피부를 통한 수술을 위한 생존가능한 복합체의 생성 및 국소 전달에 적합한 담체들을 이용하는 광학적 기법을 통한 흑색종의 가시화를 보여주었다. 그와 같은 방법은 예를 들면, 외과수술적 마진-세팅(margin-setting)과 관련하여 채용될 수 있거나 또는 일상적인 흑색종 검사(surveillance)에서 이용될 수 있다. 유사한 전략들이 다른 피부-관련 질환들의 국소 진단을 위해 용이하게 채용될 수 있고, 이는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들에게 명백할 것이다. 광학적 이미징 모이어터들의 매우 높은 민감성을 고려할 때, 이와 같은 비-공유결합성 복합체들을 통해 이 질환들의 개선된 검출에 대한 유의성 있는 전망이 제공될 수 있다.

[0353] 실시예 10

이 실험은 상이한 크기와 구조의 단백질 혼합물의 경피 전달에서 펩티드 담체의 침투 효율 및 깊이를 보여준다.

[0355] 방법:

레비티스(Revitix) 단백질[Organogenesis, Canton, MA]을 비오틴화하고 4℃에 보관하였다. 사용된 비오틴화된 레비티스 단백질의 농도는 10-15ng/μl였다. 본 연구에서 테스트 대상(test article) 및 비교 대조구는 표 8에 표시된다. 본 연구는 두 개의 대조구를 포함하며, 하나는 레비티스에 pH를 맞춘 탈이온수였고, 다른 하나는 레비티스 자체였다. 치료구의 테스트 대상은 펩티드 담체를 가진 레비티스였다.

표 8: 테스트 대상 및 비교 대조구들의 설명.

군	테스트 대상 및 비교 대조구	연구 기간
A	물, pH 7.0	2일
B	레비티스 단독	2일
C	레비티스 + 담체	2일
D	물, pH 7.0	9일
E	레비티스 단독	9일
F	레비티스 + 담체	9일

펩티드 담체 및 레비티스 단백질에 의한 1일 1회 치료의 2일 및 9일의 치료 후 누적 경피 전달을 결정하기 위한 동물 실험:

C57 블랙 6 암컷 마우스들(군당 n=5)을 이소플루란의 흡입을 통해 마취시키고 0.05ml의 설치류(rodent) 마취 각 테일(3.75 ml의 100 mg/ml 케타민, 3.00 ml의 20 mg/ml 자일라진, 및 23.25 ml의 염수)을 복강 내로 주사하였다. 각 마우스가 마취된 후, 제1일 치료제 투여의 2일 전에 각 마우스의 등 상에 있는 2.0 cm x 2.0 투여 부위를 이발기(Oster)로 조심스럽게 면도하였다. 동물들은 추가적인 탈모 처리를 겪지 않았다. 동물들을 Cetaphil 모이스처라이징 크림(Galderma, Fort Worth, TX)에 담긴 치료제의 적용 동안에만 이소플루란의 흡입을 통해 마취시키고, 정량된 200 마이크로리터의 적합한 투여제를 등 뒤쪽 피부의 뇌 부분(cranial portion of dorsal back skin)(마우스가 입 또는 사지로 이 부분에 도달할 수 없기 때문에 선택됨)에 적용하였다. 동물들은 2-5분간 마취상태로 있었고, 그동안 적합한 치료제를 손가락 커버(finger cover)로 문질러 피부 내로 침투시켰다. 동물들은 저체온증을 예방하기 위해 제어된 난방 환경에서 회복시키고, 일단 반응을 보이면, 밤새 식량과 물은 원하는 데로 제공했다. 이 시술을 2일 및 9일 동안 거의 동일한 시간에 1일 1회 반복하였다. 2일 및 9일 치료 후에, 마우스들은 CO₂의 흡입을 통해 안락사시키고, 마지막 치료제 적용 후 8시간 경과시 맹검 관찰자들이 처리된 피부 세그먼트들을 완전한 두께로 채취했다. 처리된 세그먼트들을 3개의 동일한 부분들로 나누고 두뇌 부분을 10% 중성의 완충액 처리된 포르말린(10% neutral buffered formalin)에서 12-16시간 동안 고정하고 파라핀 포

매(paraffin embedding)까지 70% 알코올에 보관하였다. 중앙부를 NeutrAvidin, Hematoxylin & Eosin, 및 클로로에스테라아제-특이적 염색에 이용하였다. 처리된 꼬리 세그먼트는 용액화 연구를 위해 순간-동결시켰다.

[0361] 데이터 처리 및 통계 분석:

[0362] 데이터 수집 및 이미지 분석은 맹검 관찰자에 의해 수행되었다. 전술된 바와 같이 염색된 섹션들을 plan-apochromat 렌즈를 갖춘 Nikon E600 현미경 상에서 Regita 1300B 카메라(QImaging, Burnaby, BC, Canada)로 촬영하였다. 양성 염색 여부는 맹검 관찰자가 Image Pro Plus 분석 소프트웨어(Media Cybernetics, Silver Springs, MD)를 이용하여 그린 채널 추출 및 경계값 설정(thresholding)으로 결정하고, 양성 픽셀로 표현했다. 뒤이어, 각 군에 대해, Statview® 소프트웨어(Abacus, Berkeley, CA)를 이용하여 통계 분석값을 결정하고, 평균 및 표준오차로 표현하였다. 모든 비교의 통계적 유의성은 일원 ANOVA 반복 측정들 및 Fisher PLSD 사후(post-hoc) 테스트를 이용하여 95% 신뢰 수준에서 결정하였다.

[0363] 결과:

[0364] 레비틱스 단백질을 바이오틴으로 표지하고 다양한 단백질에 대한 양호한 표식(labeling)을 보여주었다. 레비틱스 단백질의 경피 전달을 결정하기 위해 NeutrAvidin 염색을 이용하였다. 두 개의 상이한 확대배율에서의 대조구(패널 a 및 c)와 치료구(b 및 d 및 f)의 사진들이 도 10에 도시되며, 이때, a 및 b는 10X 확대이고, c 내지 f는 20X 확대이다. 양성 NeutrAvidin 염색의 평균을 비교를 위해 이용하였다. 레비틱스 + 백본에 대한 평균 양성 염색은 3일차에 물(50.297 ± 6.394 vs. 16.676 ± 2.749) 및 레비틱스 단독(50.297 ± 6.394 vs. 18.379 ± 6.394 ; $P = 0.0041$)보다 훨씬 높았다.

[0365] 표 9: 양성 NeutraAvidin 염색. 평균 및 표준 오차를 표시함 .

군	평균	표준 오차
A	16.676	2.749
B	18.379	6.394
C	50.297	6.394

[0367] $P=0.0041$ (95%에서의 유의성)

[0368] 결론:

[0369] 바이오틴-표지된 단백질의 겔 분석은 체외에서 표지의 확인을 가능하게 했다.

[0370] 흐름(flux)를 결정하기 위해 2일차 시점(2-day time-point)을 이용했다. 이 실험은 두 개의 대조구 대비 표지된 단백질의 경피 전달의 통계적으로 유의성 있는 증가를 확인했다. 신호의 깊이 및 양이 모두 대조구 대비 담체군에서 크게 증가했다. 흥미롭게도, 다양한 군의 단백질이 겔 전기영동 및 굴성의 공간적 평가에 의해 확인된 바와 같이, 이와 같은 사전-조립된(pre-assembled) 입자들과 함께 피부를 통해 수송되었다.

[0371] 실시예 11

[0372] 이 실험은 펩티드 담체 및 중앙 항원 항체의 이용에 의해 형광 프로브의 표적지향 경상피(transepithelial) 전달을 수행할 수 있는 신규한 분자 이미징 플랫폼을 보여준다.

[0373] 백본:

[0374] 폴리라이신(MW 150,000)에 18%의 포화도로 말단 글리신의 카르복실을 통해 라이신 결사슬의 유리 아민에 $-Arg_9$ 을 접합시키는 것에 의해 양전하로 하전된 백본을 조립했다(즉, 100개의 라이신 잔기당 18개가 $-Arg_9$ 에 접합

됨). 변형된 백본은 "KNR2"로 표시했다. 대조구 폴리양이온은 동일한 로트로부터 유래된 동일한 크기의 변형되지 않은 폴리라이신("K"로 표시됨, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이었다.

- [0375] 방법:
- [0376] 프로브 설계:
- [0377] 프로브는 정전기적 상호작용에 근거하여 자가-조립되는 복수-구성성분 시스템이다. 그와 같은 시스템은 기능성 모이어티들의 용이한 치환을 가능하게 한다. 중심 구성성분은 과량의 양전하 및 복수 개의 CPP가 부착된 담체 백본이다. 모든 적하물(cargo)은 음전하로 하전된 것이다. 최종 복합체는 수송 활성을 유지하기 위해 순 양전하를 갖는다.
- [0378] 체외 담체 독성:
- [0379] 하기의 담체 백본들을 독성에 대해 테스트하였다:
- [0380] 1. KNR
- [0381] 2. R9 겔사슬을 갖지 않는 폴리-L-라이신(K)
- [0382] 3. Superfect(Qiagen, Valencia, CA), 상용 트랜스펙션 작용제.
- [0383] 70% 합류점에서 배양된 HeLa 세포들(ATCC, Manassas, VA)을 혈청 불포함 배지에서 0.4mg의 담체(n=6개의 웰/군)와 함께 2시간 동안 배양하고 PBS로 세척하였다. 독성은 생존 세포들은 염색을 배제하나, 비생존 세포들은 색소를 배제하지 않는 표준 색소 배제 분석법을 이용하여 평가하였다. 색소 흡수는 595nm에서 분광분석기(spectrophotometer)(Spectronic Genesys 5 UV/VIS)를 이용하여 측정하였다. OD595 측정 전에 농도를 상응하는 OD280 값들로 조정하여 시료들을 세포 수들로 표준화하였다.
- [0384] 체내 리포터 유전자의 경피 전달:
- [0385] KNR 담체가 조직 장벽(피부)을 통해 생물발광(bioluminescence)의 형태인 큰 분자량의 적하물을 전달할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 다양한 담체 백본들과 함께 하기의 프로브를 테스트하였다.:
- [0386] 1. 백본: KNR; 대조구-K, Superfect, 담체 불포함
- [0387] 2. 적하물 및 이미징 모이어티: 블루 형광 단백질(BFP, 8kb, MW 260만)을 발현하는 플라스미드
- [0388] 이온성 상호작용(양이온성 백본-음이온성 DNA)을 통해 백본-플라스미드(8 μ g 플라스미드) 복합체를 형성하고 이를 7일간 매일 C57 블랙 6 마우스(군당 n=4)의 등쪽 피부에 적용하였다. 그 후, 치료된 피부 세그먼트들을 채취하고 형광 현미경에 의해 BFP 발현을 평가하였다. 유전자의 경피 전달 효율성은 진피층의 총 세포 대비 BFP 양성인 세포의 비율(% BFP 양성 세포/진피층의 총 세포)에 의해 결정하였다.
- [0389] 이미징 프로브의 종양 세포로의 표적 지향 전달:
- [0390] KNR 시스템이 결장암 항원으로 광학적 이미징 프로브의 표적지향 전달을 수행할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 다양한 표적지향 구성성분들과 함께 하기의 프로브들을 테스트하였다:
- [0391] 1. 백본: KNR
- [0392] 2. 이미징 모이어티: 플루오레세인 이소티오시아테이트(FITC, Molecular Probes)로 표지된 4-염기 올리고뉴클레오타이드(Sigma-Genosys)
- [0393] 3. 표적지향 모이어티: a) EDC 커플링을 통해 음이온성 폴리아스파르테이트(3K MW)에 공유결합에 의해 접합된 암배 항원(carcinoembryonic antigen)(CEA; clone CD66e, US Biological)에 대한 단일클론성 항체; b) 대조구-폴리아스파르테이트에 접합된 액틴(clone 3G1, US Biological)에 대한 단일클론성 항체
- [0394] KNR-이미징-표적지향 복합체의 형성 후, 공동 배양된 CEA를 과다발현하는 인간 결장암 세포(LS174T, ATCC) 및

대조구 마우스 섬유아세포(3T3, ATCC)를 혈청 불포함 배지에서 2시간 동안 복합체들과 함께 배양하였다. 뒤이어 세포들을 PBS로 3회 세척하였다. 표적지향 전달은 FITC로 표지된 LS174T 세포들 및 3T3 세포들의 계량된 백분율(quantifying percent)에 의해 평가하였다. 3T3 세포들 및 LS174T 세포들은 형태에 의해 식별하였다.

[0395] 결과:

[0396] KNR은 대조구에 비해 경피 전달 및 BFP의 형질전환 유전자 발현에 있어서 20배를 초과하는 효율을 달성하여($5\% \pm 2.12\%$ vs. $0.25\% \pm 0.06\%$, $P < 0.01$), 분자 이미징이 가능한 충분히 큰 복합체들의 국소 전달의 가능성을 입증하였다. 표적지향 전달의 평가에서, 플루오레신과 TR 신호들은 각각 복합체의 개별적인 성분이었으나, 결장암 세포의 픽셀의 40.2%에서 함께 발견되었다(co-localized)(phi 상관계수 0.74, $P < 0.001$). 대조구 섬유아세포들은 플루오레신 또는 TR로 미미하게 표지되었으나, 결장암 세포들의 $87.6\% \pm 8.3\%$ 은 형광 신호가 양성이었다. 담체 백분율의 상대적 독성은 표 11에 도시되고, 유전자의 경피 전달의 효율성은 도 12에 도시된다.

[0397] CEA-특이적 이미징 프로브의 적용 후 및 결장암(C) 및 섬유아세포(F, 방추형) 공동-배양의 광시야 이미지(패널 a) 및 섬유아세포가 아닌 결장암의 형광 표지를 보여주는 형광 이미지(패널 b)가 도 13에 도시된다.

[0398] 표 10: 이미징 프로브의 경피 전달 및 형질전환 유전자의 발현. 평균 및 표준 오차가 백분율(%)로 표시됨.

군	평균	표준 오차
BFP	5%	2.12%
대조구	0.25%	0.06%

[0400] $P < 0.01$ (99%에서의 유의성)

[0401] 결론:

[0402] 항원 분포와 병행하여, 광학적 프로브의 국소 적용 및 표적지향 전달 후 대형 복합체(BFP 유전자)의 경피 전달을 KNR을 이용하여 입증하였다. 이 연구들은 흑색종의 국소 검사(topical surveillance) 또는 결장암의 점막하 검출(submucosal detection)을 위해 이 시스템을 이용할 수 있는 가능성을 확인했다. 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 명확한 바와 같이, 이 플랫폼은 치료제, 진단제 또는 이들 양자의 조합의 표적지향 전달을 위해 이용될 수 있다. 또한, 이 플랫폼은 가상 결장경(virtual colonoscopy)과 같은 이미징 방법뿐 아니라, 결장경 또는 데마토스코피(dermatoscopy)(또는 직접적 가시화)를 통한 실시간 이미징을 위해 이용될 수 있다.

[0403] 본 명세서에 기재된 실시예들 및 구체예들은 예시 목적만을 위한 것이며 그에 대한 다양한 수정들 또는 변경들이 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들에 의해 제안될 것이며 이들은 본 출원의 원칙 및 영역 및 첨부된 청구항들의 범위 내에 속할 것이다. 본 명세서에서 인용된 모든 문헌, 특허 및 특허출원은 이로써 모든 목적들을 위해 그 전체가 참조에 의해 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0146] 도 1은 본 발명에서 이용된 구성성분들의 개략적 표현을 제공한다.

[0147] 도 2는 본 발명의 여러 구체예들의 개략적 표현을 제공한다.

[0148] 도 3 및 도 4는 실시예 2에 기재된 바와 같은 대장균(*E.coli*) 베타-갈락토시다아제에 대한 형질전환 유전자를 포함하는 플라스미드의 경피 전달의 결과를 나타낸다.

[0149] 도 5는 실시예 3에 기재된 바와 같은 대장균 베타-갈락토시다아제에 대한 형질전환 유전자를 포함하는 플라스미드의 경피 전달의 결과를 나타낸다.

[0150] 도 6은 실시예 4에 기재된 바와 같은 대장균 베타-갈락토시다아제에 대한 형질전환 유전자를 포함하는 플라스미드의 경피 전달의 결과를 나타낸다.

[0151] 도 7은 실시예 5에 기재된 바와 같은 보툴리눔 독소의 경피 전달의 결과를 나타낸다.

[0152] 도 8은 실시예 6에 기재된 바와 같은 보툴리눔 독소의 경피 전달의 결과를 보여주는 사진이다.

- [0153] 도 9는 두 개의 상이한 필드 및 두 개의 상이한 확대로 실시예 9의 이미징 복합체들이 형광 광학 이미징 작용제 (패널 b 및 d)를 갖는 흑색종 염색된 세포들에 대한 광시야(brightfield) 분포(패널 a 및 c)를 따른다는 것을 보여주는 사진이다(패널 a 및 b는 10X 확대 vs. 패널 b 및 d는 40X 확대).
- [0154] 도 10은 두 개의 상이한 확대로 실시예 10에 기재된 바와 같은 양성 NeutrAvidin 염색을 보여주는 사진이다. 도 10a의 (a) 및 (b)는 10X 확대이고 (c) 및 (d)는 20X 확대이다. 도 10(b)의 (e) 및 (f)는 반복 염색에 대한 20X 확대 사진이다.
- [0155] 도 11은 실시예 11에 기재된 바와 같은 담체 백본의 상대적 독성에 대한 결과를 나타낸다.
- [0156] 도 12는 실시예 11에 기재된 바와 같은 유전자의 경피 전달의 결과를 나타낸다.
- [0157] 도 13은 실시예 11에 기재된 바와 같은 결장암 및 섬유아세포 세포 공동-배양(co-culture)(패널 a)의 광시야 이미지 및 결장암의 형광 이미지를 보여주는 CEA-양성 세포들에 대한 광학적 이미징 프로브의 선택적 전달을 나타내는 사진이다.

도면

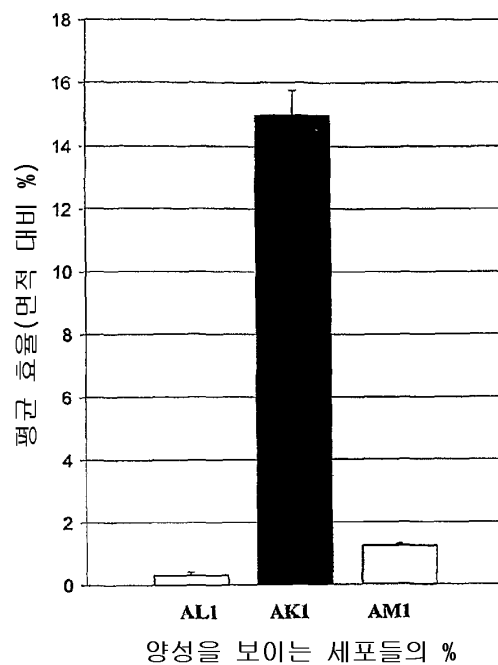
도면1



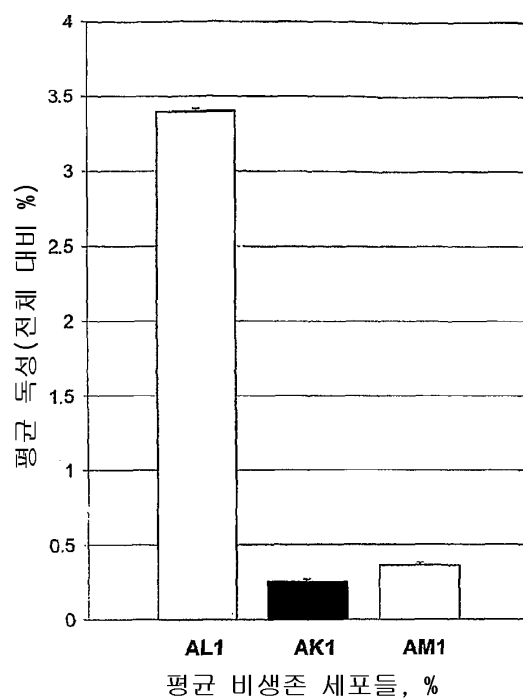
도면2



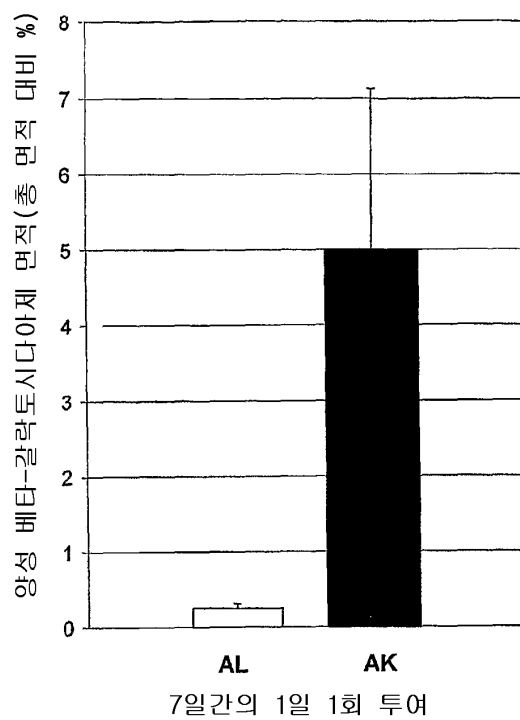
도면3



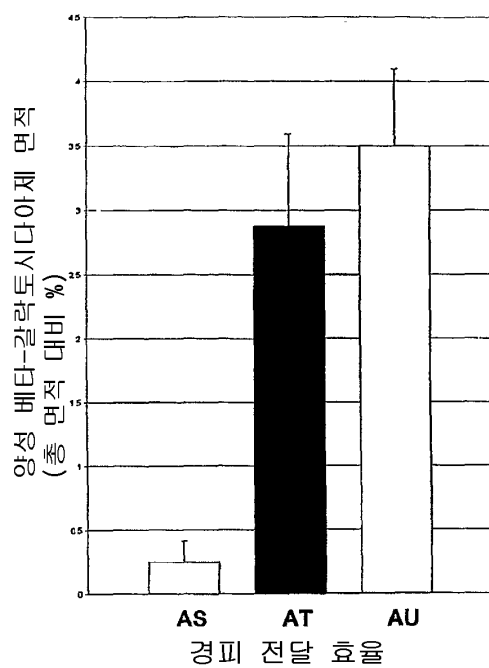
도면4



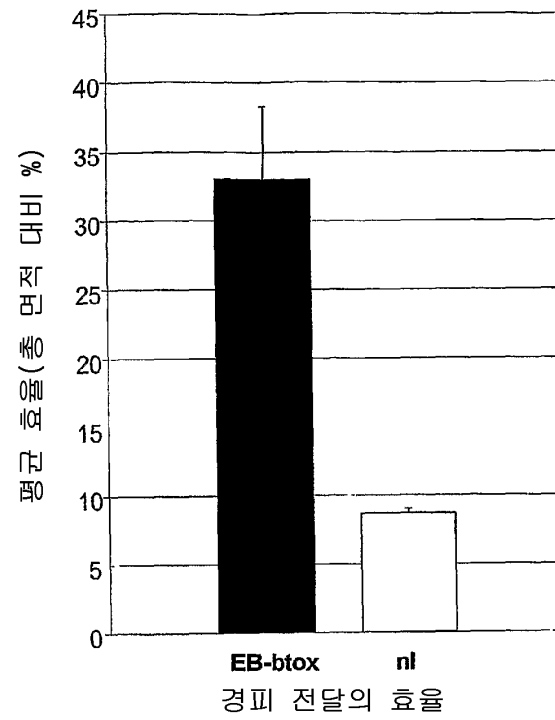
도면5



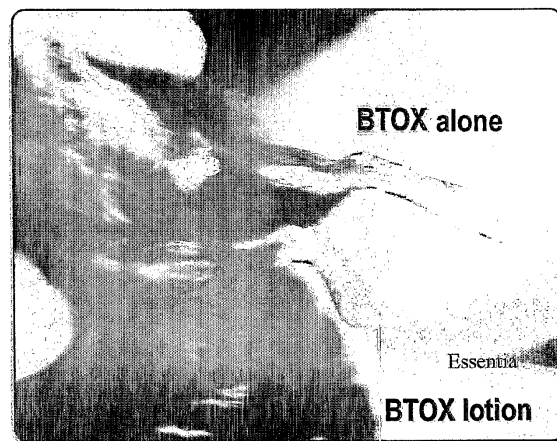
도면6



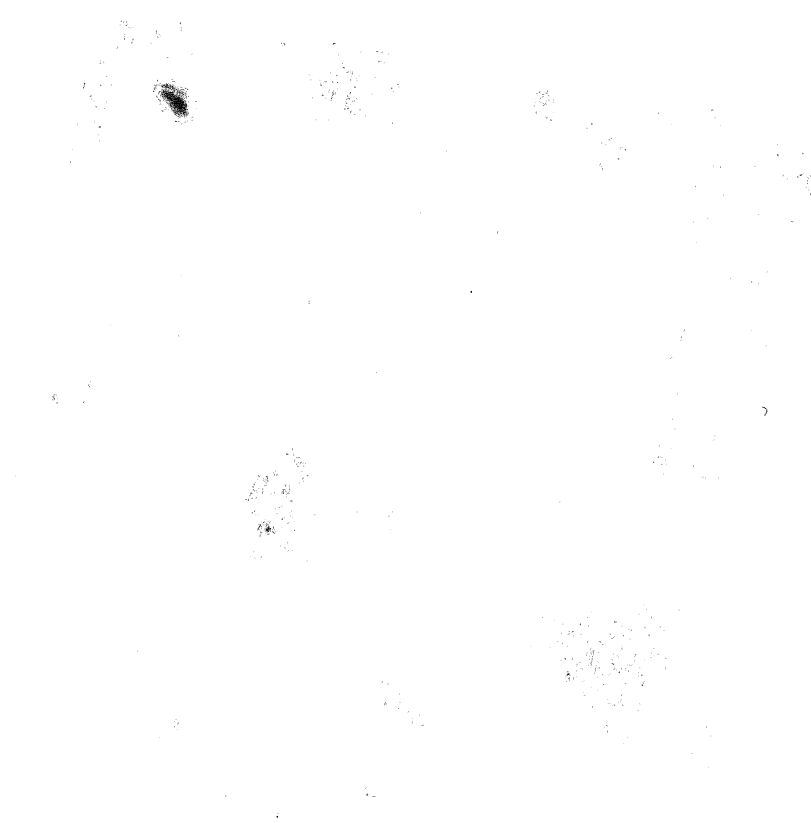
도면7



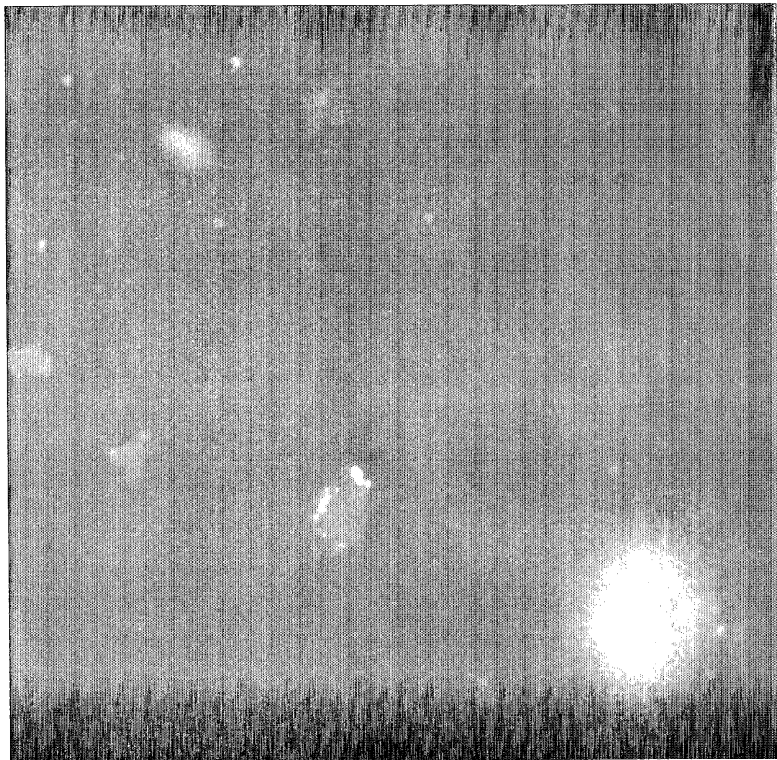
도면8



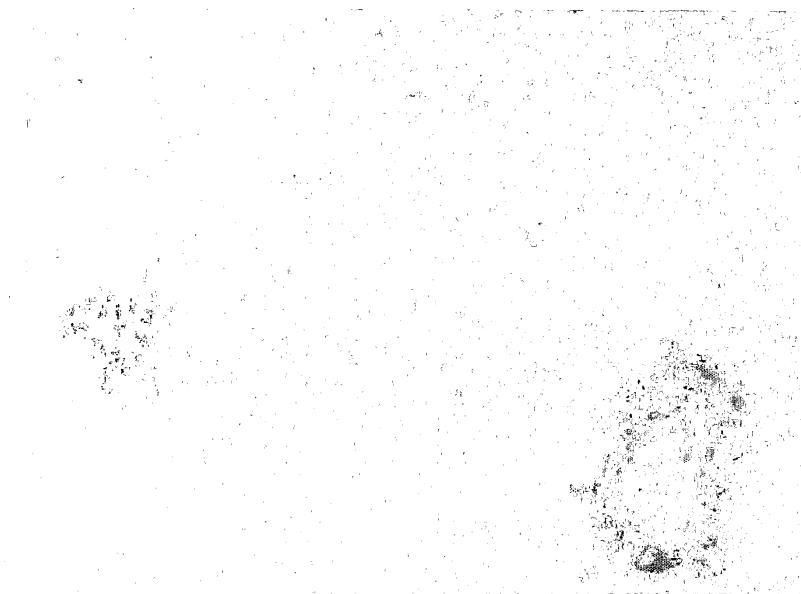
도면9a



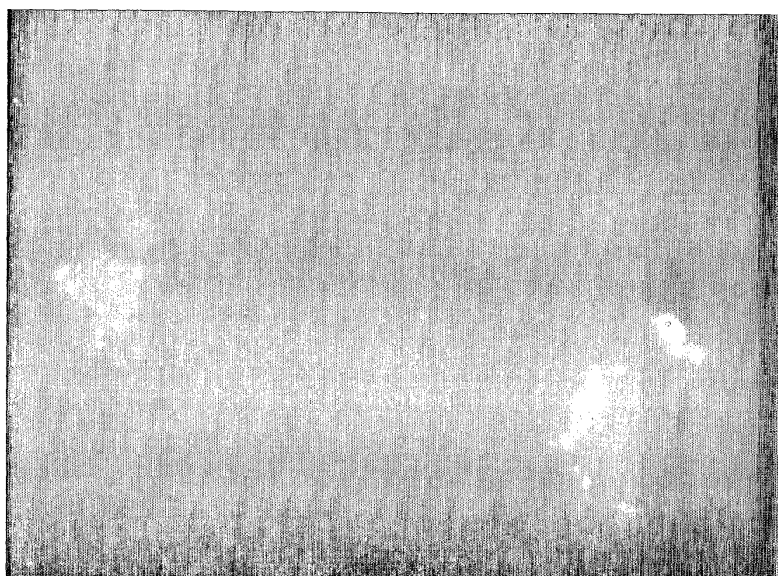
도면9b



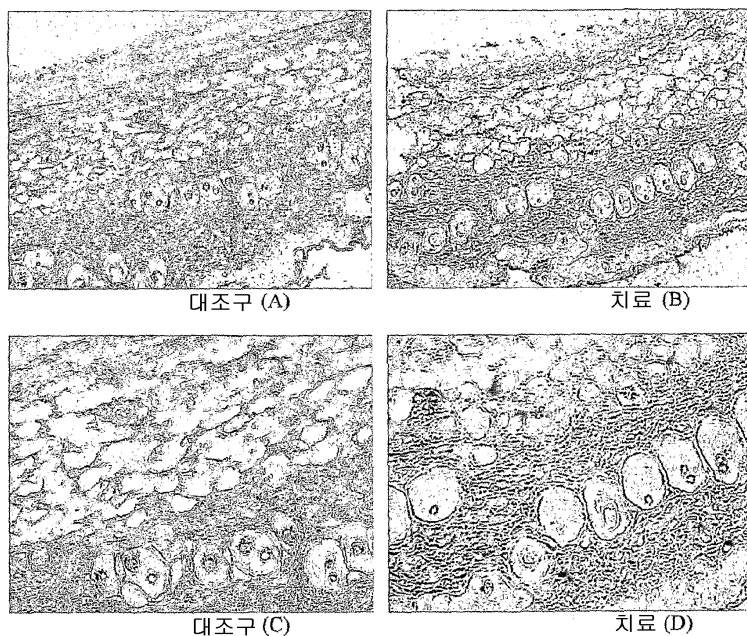
도면9c



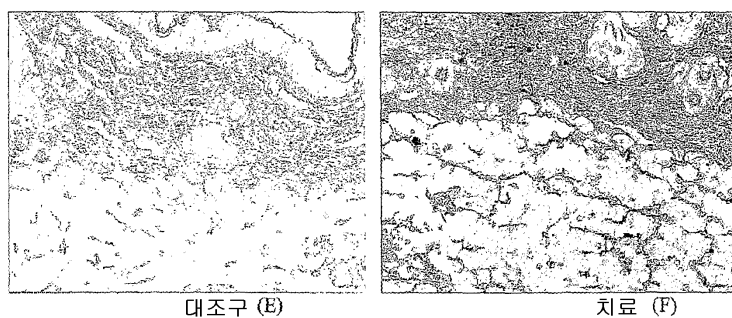
도면9d



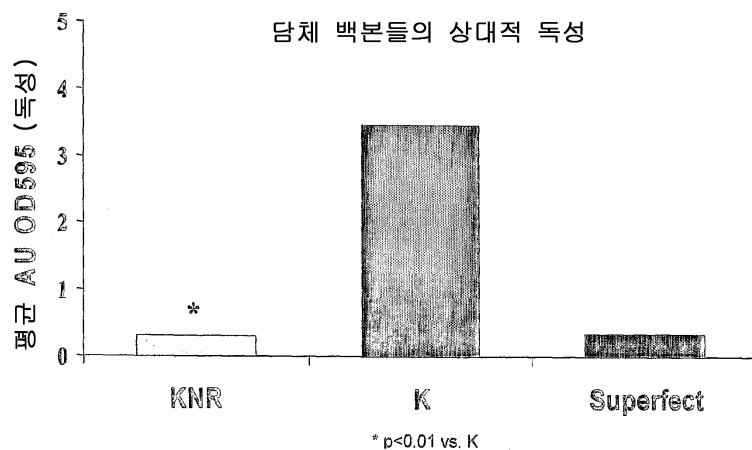
도면10a



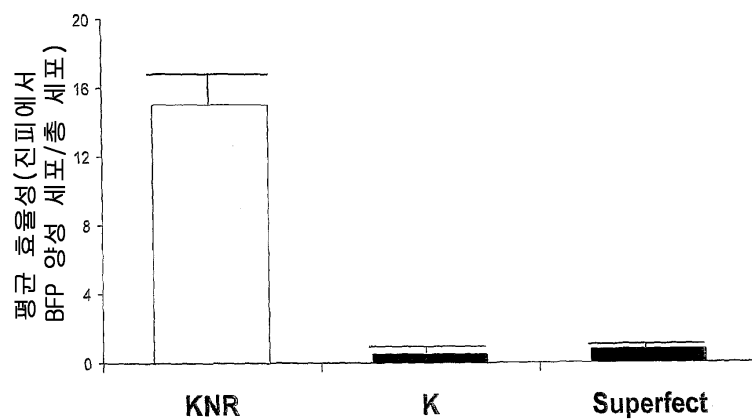
도면10b



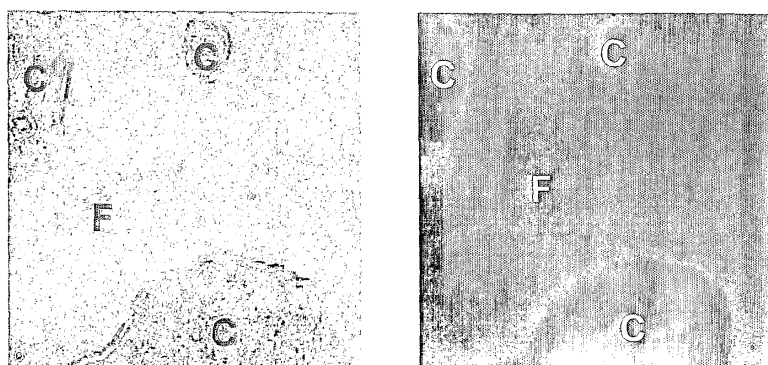
도면11



도면12



도면13



패널 A

패널 B

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Waugh, Jacob
Dake, Michael
- <120> Compositions and Methods for Topical Diagnostic and Therapeutic Transport
- <130> 13720-105068
- <140> US 11/073,307
- <141> 2005-03-03
- <150> US 60/550,014

<151> 2004-03-03

<160> 8

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(20)

<223> This region may encompass 0 to 20 Gly residues

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(45)

<223> See specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(45)

<223> This region may encompass an odd number of Arg residues from 5 to 25

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
35 40 45

<210> 2
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(51)
 <223> See specification as filed for detailed description of
 substitutions and preferred embodiments

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(51)
 <223> This region may encompass 0 to 20 residues

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(51)
 <223> This region may encompass 0 to 20 residues

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Arg Gly Arg Asp Asp Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Gly Gly
 50

<210> 3
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(20)
 <223> This region may encompass 0 to 20 Gly residues

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(51)
 <223> See specification as filed for detailed description of
 substitutions and preferred embodiments

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(51)
 <223> This region may encompass 0 to 20 Gly residues

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Gly Gly
 50

<210> 4
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(20)
 <223> This region may encompass 0 to 20 Gly residues

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(49)
 <223> See specification as filed for detailed description of
 substitutions and preferred embodiments

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(49)
 <223> This region may encompass 0 to 20 Gly residues

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 5

Gly Gly Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 6
 <211> 22
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(5)

<223> This region may encompass 3 to 5 Gly residues

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(22)

<223> See specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(22)

<223> This region may encompass an odd number of Arg residues from 7 through 17

<400> 6

Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
1				5				10					15		

Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
					20

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 7

Gly	Gly	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg
1				5				10			

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 8

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5