

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(51) . Int. Cl. <sup>8</sup> <i>A61K 9/127 (2006.01)</i>	(45) 공고일자 2006년02월22일
	(11) 등록번호 10-0554344
	(24) 등록일자 2006년02월15일
(21) 출원번호 (22) 출원일자 번역문 제출일자 (86) 국제출원번호 국제출원일자	10-1999-7009723 1999년10월21일 1999년10월21일 PCT/US1998/008799 1998년04월30일
	(65) 공개번호 (43) 공개일자 (87) 국제공개번호 국제공개일자
	10-2001-0020161 2001년03월15일 WO 1998/48780 1998년11월05일
(81) 지정국	국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 가나, 감비아, 기니 비사우, 혼가리, 인도네시아, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 캐나, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 성가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크맨, 터키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨,
	AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 캐나, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨,
	EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,
	EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,
	OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,
(30) 우선권주장	60/045,122      1997년04월30일      미국(US)
(73) 특허권자	와이어쓰 미합중국 뉴저지 매디슨 파이브 지랄다-팜즈 (우편번호 07940-0874)
(72) 발명자	시카렐리리차드비. 미국펜실베니아19465포츠타운앨리사레인13  새티시챈드란씨. 미국펜실베니아19446-5678랜즈데일세퍼드드라이브605  페척캐더린제이. 미국펜실베니아19446노쓰웨일즈배링턴플레이스606
(74) 대리인	차윤근

심사관 : 신영신

## (54) 소포성 복합체와 이의 제조 및 사용방법

### 요약

국부 마취제 및 핵산 분자를 포함하는 라멜라 소포를 포함하는 조성물에 관해 기재. 이러한 조성물의 제조방법 기재. 단백질을 개체의 세포에 전달하는 방법 기재. 개체에서 면역 반응을 유도하는 방법 기재. 핵산 분자를 개체의 세포로 전달하는 방법 기재.

### 색인어

국부 마취제, 핵산 분자, 소포성 복합체

### 명세서

#### 기술분야

본 발명은 국부 마취제를 포함하는 분자 복합체, 이를 포함하는 약학 조성물, 및 이의 제조 및 사용방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

국부 마취제는 다수 부류의 화합물을 포함하는 거대 화합물 그룹이다. 생리학적으로 활성인 천연 또는 합성 화학물질 또는 생물물질 및 이들의 유도체는 생체내 또는 시험관내에서 세포막에/세포막안에서 작용하고/작용하거나 세포막/세포막안의 특이적 수용체 분자에/분자안에서 작용한다. 국부 마취제에 관해서는 본원에서 참조되는 문헌[참조: De-Paula, E.And S.Schreier(1996)Braz.J.Med.Res.29:877-894 and Ritchie, J.M.and N.M.Greene "Local Anesthetics", Chapter 15 302-321]에 기재되어있고, 국부 마취제 및 이의 용도에 관해 기술하고있다.

또한, 일반적으로 생체내 유전자 전달, 및 특히 보호 및 치료 백신접종 프로토콜, 및 유전자 요법과 안티센스 프로토콜을 위해 핵산 분자와 병행한 국부 마취제의 사용에 관해서는 본원에서 참조문헌으로 인용된 Weiner 등의 미국 특허 번호 5,593,972(1997년 1월 14일자에 발행) 및 PCT 출원 PCT/US94/00899에 기재되어있다. 본 출원은 1997년 4월 30일자에 출원된 미국 가출원 60/045,122에 대해 우선권을 주장하고 있으며, 이는 본원에서 참조문헌으로 인용된다.

#### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 요약

본 발명은 국부 마취제와 핵산 분자를 포함하는 라멜라 소포를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 몇몇 양태에서, 소포중의 국부 마취제:핵산의 비율은 0.01-2.5 중량/용적%(w/v)의 국부 마취제:1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -10mg/mL의 핵산이다. 몇몇 양태에서, 소포 중의 국부 마취제:핵산의 비율은 0.05-1.25 %(w/v)의 국부 마취제:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1mg/mL의 핵산이다. 몇몇 양태에서, 소포중의 국부 마취제:핵산의 비율은 0.1-0.5 %(w/v)의 국부 마취제:500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1500 mg/mL의 핵산이다. 몇몇 양태에서, 주사 전자 현미경으로 측정한 라멜라 소포의 직경은 약 200 nm에 이른다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 주사 전자 현미경으로 측정할 경우 50-150nm 직경이다. 몇몇 양태에서는, 주사 전자 현미경으로 측정할 경우 라멜라 소포의 50% 이상이 300 nm 이상의 직경을 하고있다. 몇몇 양태에서는, 주사 전자 현미경으로 측정할 경우 라멜라 소포의 50% 이상이 400 nm 직경 이하이다. 몇몇 양태에서, 국부 마취제는 부피바카인, 에티도카인, 테트라카인, 프로카인아미드, 클로로프로카인, 로피바카인, 프릴로카인, 메피바카인, 리도카인, 프로카인, 카보카인, 메틸 부피바카인 또는 코카인이다. 몇몇 양태에서, 핵산은 DNA이다. 몇몇 양태에서, 핵산은 플라스미드 DNA이다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 양이온 지질, 중성 지질, 음이온 지질, 양이온 계면활성제, 중성 계면활성제, 음이온 계면활성제, 양이온 세제, 중성 세제 및 음이온 세제로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1 이상의 화합물을 추가로 포함한다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 추가로 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 및 비단백성 약제/치료 화합물로 구성된 그룹으로부터 선택된 1 이상의 화합물을 포함한다. 몇몇 양태에서, 핵산은 면역원을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA이다.

본 발명은 추가로는 라멜라 소포를 포함하는 조성물의 제조방법에 관한 것이다. 본 방법은 pH 4-8.5에서 0-2M 염 존재하에 0.01-2.5%(w/v) 국부 마취제를 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -10mg/mL의 핵산과 합쳐 라멜라 소포를 형성하는 단계를 포함한다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 pH 6-7.5에서 0-500mM 염 존재하에 0.05-1.25%(w/v) 국부 마취제를 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1mg/mL의 핵산과 합쳐 형성된다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 pH 6-7.5에서 0-500mM 염 존재하에 0.1-0.5%(w/v) 국부 마취제를 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 핵산과 합쳐 형성된다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 pH 6-7.5에서 2M 이상의 염 존재하에 0.1-0.5%(w/v) 국부 마취제를 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 핵산과 합친 다음 염을 500 mM 이하로 제거하여 형성된다. 몇몇 양태에서, 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 또는 비-단백성 약제/치료 화합물도 국부 마취제 및 핵산과 합쳐져서 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 또는 비-단백성 약제/치료 화합물을 포함하는 라멜라 소포를 생성한다.

본 발명은 추가로 폴리펩티드 및 웨프티드를 포함하는 단백질을 개체의 세포로 전달하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 국부 마취제 및 핵산 분자를 포함하는 라멜라 소포를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 라멜라 소포는 조절 서열에 작동적으로 연결된 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 개체의 세포가 핵산 분자를 취한 다음 이를 발현시켜 단백질을 생성한다.

본 발명은 추가로 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 비-단백성 약제/치료 화합물, 온전한 바이러스 입자 또는 이의 단편, 또는 미생물을 개체의 세포에 전달하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 국부 마취제, 핵산 분자 및 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 또는 비-단백성 약제/치료 화합물을 포함하는 라멜라 소포를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

본 발명은 추가로 개체에서 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 국부 마취제 및 핵산 분자를 포함하는 라멜라 소포를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 라멜라 소포는 조절 서열에 작동적으로 연결된 면역원을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 개체의 세포는 핵산 분자를 취한 다음, 이를 발현시켜 면역원을 생성하고 개체는 면역원에 대해서 면역 반응을 일으킨다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 추가로 면역원성 단백질 또는 웨프티드를 포함한다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 추가로 생리학적으로 활성인 단백질을 포함한다.

본 발명은 추가로 개체의 세포로 핵산 분자를 전달하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 국부 마취제 및 핵산 분자를 포함하는 라멜라 소포를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 라멜라 소포는 조절 서열, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 라이보자임 또는 삼중나선 형성 핵산 분자에 작동적으로 연결된 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함한다.

## 발명의 상세한 설명

본 발명은 국부 마취제 및 핵산 분자를 포함하는 라멜라 소포를 제공한다. 이러한 라멜라 소포는 국부 마취제 용액과 핵산 분자가 특정 화학 조건하에 특정 비율로 화합할 경우 자발적으로 형성된다. 소포는 막 형성 성질이 알려진 추가 화합물, 예를 들면 지질, 계면활성제 및 세제를 포함할 수 있다. 또한, 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드 또는 비-단백성 약제/치료 화합물과 같은 추가 화합물도 소포내에 캡슐화될 수 있다.

본 발명의 라멜라 소포는 시험관내 및 생체내 세포로 물질을 전달하는데 유용하다. 이러한 물질은 핵산 분자 및, 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 및 비-단백성 약제/치료 화합물을 포함한다. 몇몇 양태에 따르면, 본 발명은 핵산 및/또는 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 및/또는 비-단백성 약제/치료 화합물을 개체의 세포로 전달하는 방법을 제공한다.

몇몇 양태에 따르면, 본 발명은 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 개체의 세포로 전달하는 방법을 제공하며, 여기서 핵산 분자의 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 단백질을 이러한 생체내 세포로 전달하기 위해 발현된다.

몇몇 양태에 따르면, 본 발명은 면역원성 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 개체의 세포에 전달하는 방법을 제공하며 핵산 분자의 면역원성 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 면역원성 단백질을 이러한 세포로 전달하기 위해 발현되며, 면역원성 단백질에 대한 면역 반응이 개체에서 유도된다. 몇몇 양태에서, 핵산 분자는 또한 면역조절 단백질을 암호화하며 여기서 면역조절 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 면역조절 단백질을 개체로 전달하고, 면역원성 단백질에 대해 유도된 면역 반응을 수행, 증진 또는 조절하기 위해 발현된다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 추가로 하나 이상의 면역조절 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 또는 비-단백성 약제/치료 화합물을 포함하고 있어 면역조절 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 또는 비-단백성 약제/치료 화합물을 개체로 전달하여 면역원성 단백질에 대해 유도된 면역 반응을 수행, 증진 또는 조절한다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 추가로 하나 이상의 면역원성 단백질 및/또는 웨프티드를 포함하고 있어 면역원성 단백질 또는 웨프티드를 개체로 전달하여 면역 반응이 유도될 수 있는 추가 효력을 제공한다. 몇몇 양태에서, 면역원성 단백질 또는 웨프티드는 핵산 분자에 의해 암호화된 면역원성 단백질과 일치하거나 이와 상관된다.

몇몇 양태에 따르면, 본 발명은 비-면역원성의 치료상 효과적인 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 개체의 세포로 전달하는 방법을 제공하고 있으며 여기서 비-면역원성의 치료상 효과적인 핵산 분자의 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 비-면역원성의 치료상 효과적인 단백질을 이러한 세포로 전달하기 위해 발현되며, 비-면역원성의 치료상 효과적인 단백질은 개체에 원하는 생리학적 효과를 제공한다. 몇몇 양태에서, 핵산 분자는 앞서 논의된 면역조절 단백질을 암호화한다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 추가로 1 이상의 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 또는 비-단백성 약제/치료 화합물을 포함하고 있어 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 또는 비-단백성 약제/치료 화합물을 핵산 분자상의 핵산 서열에 의해 암호화된 단백질의 전달과 함께 개체로 전달된다.

몇몇 양태에 따르면, 본 발명은 안티센스, 라이보자임 또는 삼중나선 형성 핵산 분자인 핵산 분자를 전달하는 방법을 제공한다.

몇몇 양태에 따르면, 본 발명은 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드 및/또는 비-단백성 약제/치료 화합물을 개체의 세포로 전달하는 방법을 제공하며, 여기서 라멜라 소포는 이러한 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 및/또는 비-단백성 약제/치료 화합물의 전달을 촉진시키고 전달 과정동안의 분해로부터 이들을 보호하기 위한 비히클/캐리어로 사용된다.

본 발명에 따르면, 미국 특허 번호 5,593,972 및 PCT/US94/00899에 기재된 바와같은 유전자 전달법에서 국부 마취제의 사용은 국부 마취제 및 핵산 분자를 포함하는 소포성 조성물을 이용하여 개선된다. 소포성 조성물은 국부 마취제 및 핵산 분자가 소포성 구조의 집합을 촉진하는 조건하에서 합쳐질 경우 형성된다. 소포성 조성물은 개선된 유전자 전달 및 이로인한 개선된 면역화, 유전자 요법, 안티센스와 라이보자임 투여법을 제공한다. 또한, 소포는 유전자를 암호화하는 전달 가능한 핵산 분자와 함께 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 및/또는 비-단백성 약제/치료 화합물의 공전달에 이용 및 적합화될 수 있다. 다르게는, 핵산 분자는 베타적으로 캐리어 핵산 분자, 즉, 전사 또는 해독되지 않는 핵산 분자로 사용되어, 캡슐화하여 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드, 및/또는 비-단백성 약제/치료 화합물에 대해 개선된 전달 비히클로 사용될 수 있는 소포를 형성한다. 따라서, 국부 마취제, 핵산 분자 및 기타 유형의 치료 또는 면역원성 물질, 예를 들면 약제, 호르몬 및 면역원을 포함하는 소포성 조성물도 본 발명에 따라 제조 및 사용될 수 있다.

국부 마취제는 항상 그렇지는 않지만, 전형적으로는 양성자화된 종의 형태로 양전하를 운반할 수 있는 분자의 한쪽 말단상에 3급 질소를 함유하는 고도의 친지성/소수성 분자이다. 이는 수용액에서 질소의 pKa 또는 그 이하(대부분의 국부 마취제의 경우 전형적으로  $pKa=7\sim9$  범위)에서 일어난다. 따라서, 국부 마취제는 중성 종( $pKa$  이상)으로서 극도의 소수성과  $pKa$  또는 그 이하에서 전하-분극화(즉, 양전하를 띤 말단과 소수성 말단을 가짐) 성질을 가진다. 본원에서 사용되는 용어 "국부 마취제"는 본 발명에 따른 라멜라 소포를 만드는데 유용한 국부 마취제를 나타내는 것으로 한다. 따라서, 본원에서 사용된 용어 "국부 마취제"는 양이온 질소를 함유하고, 약 7-9의  $pKa$ 를 가지며, DNA에 결합하고 소수성 그룹을 함유하는 국부 마취제를 말한다.

국부 마취제는 전형적으로 내부 아미드 링크(아미드-형 국부 마취제) 또는 내부 에스테르 링크(에스테르-형 국부 마취제)를 가진다. 아미드-형 국부 마취제의 예로는 부피바카인, 리도카인, 및 에티도카인이 포함되고; 에스테르-형 국부 마취제의 예로는 프로카인 및 테트라카인이 포함된다. 벤조카인은 3급 질소 말단을 가지지 않는 에스테르-형 국부 마취제의 예이다. 국부 마취제 구조의 예들은 본원에서 참조되는 문헌[참조: PCT/US94/00899; De-Paula, E. and S. Schreier, Supra; Ritchie, J.M. and N.M.Greene, Supra; and Strichartz et al.(1990), Anesth.Analg., 71:158-170]에 기재되어 있다.

국부 마취제는 중성 또는 전하를 띤 종 형태로 수용액에서부터 유기상중으로 분배하는 성질을 가진다[참조문헌: Strichartz et al., Supra and Schlieper P. and Steiner, R.(1983) Chemistry and Physics of Lipids, 34:81-92]. 부피바카인은 전하를 띤 종 및 중성 종 둘모두의 형태로 n-옥탄을중으로 분배할 수 있는 국부 마취제의 예이다. 지질, 지질 혼합물, 및 리포솜으로 분배하는 국부 마취제가 보고되고 있다.

생체내, 아미드-형 국부 마취제는 보다 긴 생물학적 반감기를 가지는데 이는 이들이 에스테르-형 국부 마취제와 같이 혈액내에서 빠르게 분해되지 않고 전형적으로 혈청 단백질, 특히 알파-1-글리코프로테인과 결합하여, 데포(depot) 효과를 나타내기 때문이다. 아미드-형 국부 마취제는 간에서 서서히 분해된다. 에스테르-형 국부 마취제는 혈액 또는 조직에서 혈청 에스테라제에 의해 빠르게 분해된다.

국부 마취제의 양전하 말단은 아민의 pKa보다 낮은 pH, 예를 들면 생리학적 pH에서 핵산 분자상의 음이온 그룹에 결합한다. 국부 마취제-핵산 복합체는 이러한 조건하에 좀더 중성, 소수성 및 친지성화되고 세포로 핵산을 전달하는 세포의 지질막으로/지질막을 통해 분배할 수 있다. 국부 마취제는 중성 종 형태로 보다 높은 지질 분배 계수를 가지는 것으로 나타났다.

본 발명의 몇몇 양태의 라멜라 소포는 부피바카인, 에티도카인, 테트라카인, 프로카인아미드, 클로로프로카인, 로피바카인, 프릴로카인, 메피바카인, 리도카인, 프로카인, 카보카인, 메틸 부피바카인 및 코카인으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1 이상의 국부 마취제를 포함한다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 라세미 혼합물 및 이의 순수한 이성체를 포함한, 단일종 국부 마취제를 포함한다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 둘이상의 상이한 국부 마취제 종을 포함한다.

본 발명의 몇몇 바람직한 양태에서, 1 이상의 상이한 양이온 소수성 국부 마취제는 핵산 분자와 복합체를 형성하여 소포 구조를 형성한다. 국부 마취제 또는 국부 마취제들에 의해 형성된 소포막은 "공-제제" 지질, 세제 및/또는 계면활성제 친양쪽성 분자를 포함할 수 있다. 소포는 몇몇 양태에서는, 추가로 소포 복합체 형성 화합물과 결합하는 "기타 제제" 또는 "활성제"를 포함할 수 있다. 이러한 기타 활성제는 단백질, 폴리펩티드, 웨პ티드, 또는 비-단백성 약제/치료 화합물을 포함한다. 양이온 친양쪽성 국부 마취제의 높은 무극성으로 인해, 국부 마취제는 단독 또는 지질, 양성친화제, 친지성/소수성 화합물, 계면활성제, 세제 및/또는 비타민 A, D 및 K와 같은 지용성 비타민("공-제제"로 언급됨)과 같은 기타 화합물과 함께 핵산 분자와 결합시 라멜라 시이트 및 소포를 포함하는 자가-집합체 구조를 형성할 수 있다. 문헌[참조: Radler, J.O. et al., (1997) Science 275, 810-814]에는 지질 자가-집합체 구조에 관해 논의되고 있다. 이러한 구조는 예를 들면 방향족 그룹간에, 강한 분자내 소수성 스태킹-형 상호작용에 의해 추가로 안정화될 수 있다. 본 발명의 몇몇 양태에서, 국부 마취제는 핵산 분자를 포함하는 라멜라 소포를 형성하는데 1 이상의 지질, 양성친화제, 친지성/소수성 화합물, 계면활성제, 및/또는 세제, 특히 양이온 또는 중성 지질, 양이온 또는 중성 양성친화제, 양이온 또는 중성 친지성/소수성 화합물, 양이온 또는 중성 계면활성제, 및/또는 양이온 또는 중성 세제와 함께 사용된다.

양이온 국부 마취제종의 무극성으로 인해, 공-제제와 국부 마취제의 혼합물을 사용하여 핵산 분자와 결합시 거대 자가-집합체 구조를 형성한다. 국부 마취제 단독 또는 이의 조합체 혼합물이 양이온, 중성, 또는 음이온 지질, 및 핵산 분자와 혼합되어 리포솜-형 구조를 형성한다. 소포는 양이온, 중성, 또는 음이온 지질중에서 선택된 1 이상의 화합물, 양이온, 중성, 또는 음이온 양성친화제, 양이온, 중성, 또는 음이온 친지성/소수성 화합물, 양이온, 중성, 또는 음이온 계면활성제, 및/또는 양이온, 중성, 또는 음이온 세제의 조합물과 함께 1 이상의 국부 마취제를 사용하여 형성될 수 있다. 일 양태에서, 부피바카인과 같은 양이온 국부 마취제는 DOTMA처럼 합성 화합물과 같은 상이한 양이온 양성친화제; 또는 DOPE와 같은 천연 합성 화합물 및/또는 콜레스테롤과 같은 천연 지질과 함께 화합된다. 또 다른 양태에서, 양이온 국부 마취제는 음이온 및/또는 중성 지질과 합쳐진다.

본 발명에 따른 라멜라 소포를 사용하여 조직 및 세포로 전달되도록 활성제를 캡슐화할 수 있다. 단백성 및 비-단백성 화합물을 포함한, 치료 및/또는 면역원성 및/또는 이매징제(본원에서 "활성제"로 언급됨)는 조직 및 세포 중으로 시험관내 또는 생체내 전달을 위해 이를 라멜라 구조와 결합되거나 이 구조내에서 캡슐화될 수 있다. 활성제 분자는 치료 및/또는 면역원성 단백질, 폴리펩티드 및 웨პ티드와 비-단백성 약제/치료 화합물을 포함한다. 기타 분자는 이를 구조와 결합하여 면역원성(예; PEG)을 감소시키거나, 취해진 후 세포에 융합되거나 세포내에서 엔도솜을 파괴하는 능력(푸조게닉-지질, -웨პ티드, -중합체)을 개선시킬 수 있다.

본 발명의 몇몇 양태에서, 핵산 분자는 DNA 백신인 플라스미드 DNA 유전자 작제물, 또는 면역원 또는 암호 서열이 소포성 복합체가 투여되는 개체내 세포에서 발현에 필요한 조절 요소에 작동적으로 연결되는 생물학적으로 활성이고, 치료적으로 바람직한 단백질을 암호화하는 유전자 치료 작제물일 수 있다(즉, DNA는 발현되는 단백질을 작동적으로 암호화함). DNA 작제물은 1997년 1월 14일자에 발행된 Weiner 등의 미국 특허 번호 5,593,972 및 PCT 출원 PCT/US94/00899에 기재되어있다. 중요하게도, 암호 서열이 전사 및 해독될 수 있다면, 이는 DNA 분자가 전달되는 세포에서 작용하는 조절 요소에 작동적으로 연결될 수 있어야 한다.

본 발명의 몇몇 측면은 유전 물질에 의해 암호화되는 단백질 및 웨პ티드에 대해 면역 반응을 유도하도록 개체의 세포 중으로 유전 물질을 도입하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 국부 마취제와, 최소 한가지 면역원성 웨პ티드 또는 단백질을 포함하는 1 이상의 바람직한 웨პ티드 또는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단일 종의 핵산 분자를 포함하는 라멜라 소포를 개체의 조직에 투여하는 단계를 포함한다. 추가로, 몇몇 양태에서는, 1 이상의 면역조절 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자가 제공된다. 핵산 분자(들)은 플라스미드 DNA의 형태로 제공될 수 있다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 추가로 1 이상의 면역조절 단백질, 폴리펩티드, 웨პ티드, 또는 비-단백성 약제/치료 화합물 및/또는 1 이상의 면역원성 단백질 또는 웨პ티드를 포함한다.

본 발명의 몇몇 측면에 따르면, 개체를 알레르겐, 병원체 또는 이상, 병리-관련 세포에 대해 예방 및/또는 치료적 차원에서 면역이 되게하는 조성물 및 방법이 제공된다. 유전 물질은 개체에서 알레르겐, 병원체 또는 이상 세포에 대해 면역 반응을 유도할 수 있는 면역원을 암호화한다.

유전 물질은 개체의 세포에 의해 발현되고 면역 반응을 유발시키는 면역원성 표적으로 작용한다. 결과적인 면역 반응은 폭넓게 기초하고 있으며; 체액성 면역 반응 이외에, 두 부류의 세포 면역 반응을 유발한다. 본 발명의 방법은 예방 및 치료 면역성을 제공하는데 유용하다. 따라서, 면역화 방법은 면역원에 대한 면역방법 및 예를 들어 병원체 침투, 또는 특정 세포의 생성 또는 증식으로부터 개체를 보호하는 방법, 및 병원체 감염, 과증식 질환 또는 자가면역 질환을 겪는 개체를 치료하는 방법 모두를 포함한다.

본원에서 사용된 용어 "면역원" 및 "표적 단백질"은 면역 반응을 위해 표적 단백질로 작용하는 본 발명의 유전자 작제물에 의해 암호화된 웨티드 및 단백질을 말하는 것으로 해석된다. 용어 "표적 단백질" 및 "면역원"은 상호 교환가능하게 사용되고 면역 반응이 유발될 수 있도록 하는 단백질을 말한다. 표적 단백질은 알레르겐, 또는 병원체 또는 종양 세포 또는 면역화가 필요한 자가면역 질환과 관련된 세포와 같은 바람직하지 않은 세포-형의 단백질과 적어도 하나의 에피토프를 공유하는 면역원성 단백질이다. 표적 단백질에 대한 면역 반응은 표적 단백질과 관련된 특정 감염 또는 질환에 대해 개체를 보호하고 이러한 경우 개체를 치료할 것이다.

본 발명은 표적 단백질, 즉, 병원체, 알레르겐 또는 개체 자신의 "이상" 세포와 특정 관련이 있는 단백질에 대해 광범위한 면역 반응을 유발하는데 유용하다. 본 발명은 병원체 및 유기체에 대해 개체를 면역화하는데 유용하여 병원성 단백질에 대한 면역 반응은 병원체에 대항해 보호 면역성을 제공한다. 본 발명은 특히 과증식 세포와 관련된 표적 단백질에 대해 면역 반응을 유발시켜 과증식 질환 및 암과 같은 이상질환을 퇴치하는데 유용하다. 본 발명은 특히 자가면역 증세에 수반된 세포와 관련된 표적 단백질에 대해 면역 반응을 유발시켜 자가면역 질환 및 이상질환을 퇴치하는데 유용하다.

본 발명의 몇몇 측면은 개체의 세포중으로 유전 물질을 도입시켜 유전 물질에 의해 암호화되는 비-면역원성 단백질 및 웨티드를 개체로 전달하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 국부 마취제, 및 개체에 대해 비-면역원성 생리학적 효과를 지닌 1 이상의 바람직한 비-면역원성, 생물학적 활성 웨티드, 폴리웨티드 또는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단일종의 핵산 분자를 포함하는 라멜라 소포를 개체의 조직에 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "생리학적 활성 단백질"은 개체에 대해 비-면역원성 생리학적 효과를 가지는 생물학적으로 활성인 웨티드, 폴리웨티드 또는 단백질을 말하는 것으로 한다. 몇몇 양태에서, 사이토킨, 혈액 응고 인자, 케모카인, 공자극 인자, 전사 인자, 호르몬, 생장 인자 및 치환 유전자로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1 이상의 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자가 제공된다. 사이토킨의 예로 IL-12, GM-CSF 및 에리트로포이에틴을 포함한다. 혈액 응고 인자의 예로는 인자 XIII 및 인자 IX를 포함한다. 치환 유전자의 예로는 디스트로핀(근 위축증 치료에 유용) 및 CFPR(낭포성 섬유증에 유용)을 포함한다. 호르몬의 예로는 렙틴을 포함한다. 핵산 분자(들)은 플라스미드 DNA 형태로 제공될 수 있다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 1 이상의 단백질, 폴리웨티드, 웨티드, 또는 비-단백성 약제/치료 화합물을 추가로 포함한다.

본 발명에 따르면, 면역원 또는 생리학적 활성 단백질을 암호화하는 DNA 또는 RNA는 발현되어, 면역원 또는 생리학적 활성 단백질을 생성하는 개체의 조직 세포로 도입된다. 면역원 또는 생리학적 활성 단백질을 암호화하는 DNA 또는 RNA 서열은 개체의 세포에서의 발현에 필요한 조절 요소에 연결된다. DNA 발현을 위한 조절 요소는 프로모터 및 폴리아데닐화 시그널을 포함한다. 또한, 코작 영역과 같은 기타 요소도 유전자 작제물에 포함될 수 있다.

본원에서 사용된 용어 "유전자 작제물"은 면역원 또는 생리학적 활성 단백질을 암호화하고 개체의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 시그널을 포함하는 조절 요소에 작동적으로 연결된 개시 및 종결 시그널을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한 DNA 또는 RNA 분자를 나타낸다. 몇몇 양태에서, 1 이상의 면역원 및/또는 1 이상의 생리학적 활성 단백질을 암호화하는 서열의 발현가능한 형태는 개체로 전달되는 동일한 핵산 분자상에서 발견된다. 몇몇 양태에서, 라멜라 소포는 1 이상의 상이한 면역원 및/또는 개체로 전달될 수 있는 1 이상의 상이한 생리학적 활성 단백질을 암호화하는 서열의 발현가능한 형태를 포함하는 2 이상의 상이한 핵산 분자종을 포함한다.

본원에서 사용된, 용어 "발현가능한 형태"는 면역원 또는 생리학적 활성 단백질을 암호화하는 암호 서열에 작동적으로 연결된 필수 조절 요소를 함유하는 유전자 작제물을 말하며, 개체의 세포에 존재하는 경우, 암호 서열이 발현될 것이다.

유전자 작제물은 유전자 발현에 필요한 조절 요소에 작동적으로 연결된 면역원 또는 생리학적 활성 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 세포에 의해 취해질 경우, 유전자 작제물(들)은 기능성 염색체외 분자 형태로 세포에 존재하고/존재하거나 세포의 염색체 DNA 중에 통합될 수 있다. DNA는 개개 유전 물질로서 플라스미드 또는 플라스미들

의 형태로 잔존하는 세포 중으로 도입될 수 있다. 달리, 염색체 중으로 통합될 수 있는 선형 DNA가 세포중으로 도입될 수 있다. DNA를 세포중으로 도입하는 경우, 염색체 중으로 DNA 통합을 촉진하는 제제가 포함될 수 있다. 통합 촉진에 유용한 DNA 서열도 DNA 분자에 첨가될 수 있다. 달리, RNA가 세포에 투여될 수 있다. 또한 유전자 작제물을 동원체, 말단 소립 및 복제 기원을 포함하는 선형 미니염색체 형태로 제공하는 것도 고려된다. 유전자 작제물은 세포중에 살아있는 감쇠된 라이브 미생물 또는 재조합 미생물 벡터에 유전 물질의 일부를 남길 수 있다. 유전자 작제물은 유전 물질이 세포의 염색체 중으로 통합되거나 염색체외에 잔존하는 재조합 바이러스 백신의 게놈 일부일 수 있다.

유전자 작제물은 핵산 분자의 유전자 발현에 필요한 조절 요소를 포함한다. 요소는 프로모터, 개시 코돈, 종결 코돈, 및 폴리아데닐화 시그널을 포함한다. 또한, 표적 단백질 또는 면역조절 단백질을 암호화하는 서열의 유전자 발현에 인핸서가 종종 필요하다. 이들 요소가 원하는 단백질을 암호화하는 서열에 작동적으로 연결되고 조절 요소가 투여되는 개체에서 작동성임이 필요하다.

개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 원하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주된다. 그러나, 이들 요소는 유전자 작제물이 투여되는 개체에서 기능할 필요가 있다. 개시 및 종결 코돈은 암호 서열을 지닌 프레임내에 존재해야 한다.

사용된 프로모터 및 폴리아데닐화 시그널은 개체의 세포내에서 작용해야 한다.

본 발명의 실시, 특히 인간을 위한 유전자 백신의 제조에 유용한 프로모터의 예로는 인간 프로모터, 허프스 바이러스, 폭스 바이러스, 파필로마, 파보바이러스 또는 간염 바이러스에서 유래된 것과 같은 바이러스 프로모터; 원숭이 바이러스 40 (SV40)의 프로모터, 마우스 유방암 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV 긴 말단 반복(LTR) 프로모터와 같은 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 몰로니 바이러스, ALV, CMV 즉시 초기 프로모터와 같은 사이토메갈로바이러스(CMV), 앱스타인 바 바이러스(EBV), 라우스 육종 바이러스(RSV) 및 인간 신장 인자 1A, 인간 액틴, 인간 마이오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 및 인간 메탈로티오나인과 같은 인간 유전자의 프로모터를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 실시, 특히 인간을 위한 유전자 백신의 제조에 유용한 폴리아데닐화 시그널의 예로는 소 생장 호르몬 폴리아데닐화 시그널, SV40 폴리아데닐화 시그널 및 LTR 폴리아데닐화 시그널을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 특히, SV40 폴리아데닐화 시그널로 불리는, pCEP4 플라스미드(캘리포니아 샌디에고의 Invitrogen)에 있는 SV40 폴리아데닐화 시그널이 사용된다.

DNA 발현에 필요한 조절 요소 이외에, 기타 요소들도 DNA 분자에 포함될 수 있다. 이러한 첨가 요소는 Mason-Pfizer 원숭이 바이러스의 구성성 수송 요소 및/또는 인핸서를 포함한다. 인핸서는 인간 액틴, 인간 마이오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 및 CMV, RSV 및 EBV와 같은 바이러스 인핸서(이에 한정되지 않음)를 포함하는 그룹 중에서 선택될 수 있다.

단백질 생성을 최대화하기 위해, 작제물이 투여되는 세포에서 유전자 발현에 매우 적합한 조절 서열이 선택될 수 있다. 또한, 세포에서 가장 효과적으로 전사되는 코돈이 선택될 수 있다. 당업자는 세포에서 기능하는 DNA 작제물을 생성할 수 있다.

본 발명은 바이러스, 원핵생물 및 병원성 진핵 유기체(예; 단세포 병원성 유기체 및 다세포 기생충)와 같은 모든 병원체에 대해 개체를 면역화하는데 이용될 수 있다. 본 발명은 바이러스, 및 원핵생물(예; 임균, 리스테리아 및 시겔라)과 같이 세포를 감염시키는 병원체에 대해 개체를 면역화하는데 특히 유용하다. 또한, 본 발명은 세포내 병원체가 존재하는 생활환 단계를 포함하는 원생동물 병원체에 대해 개체를 면역화하는데 유용하다. 본원에서 사용된, 용어 "세포내 병원체"는 재생식환 또는 생활환의 최소 일부동안, 숙주 세포내에 존재하고 병원성 단백질을 생성하거나 생성되도록 하는 바이러스 또는 병원성 미생물을 나타낸다. 표 1은 본 발명에 따른 백신을 제조할 수 있는 몇몇 바이러스 과 및 속에 관한 목록을 제공한다. 표에 실린 항원과 같은 병원체 항원상에 제시된 에피토프와 동일하거나 실질적으로 유사한 에피토프를 적어도 하나 포함하는 웹터드를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 작제물이 백신에 유용하다. 또한, 본 발명은 원핵 및 진핵 원생동물 병원체 및 표 2에 실린 것과 같은 다세포 기생충을 포함하는 기타 병원체에 대해 개체를 면역화하는데도 유용하다.

병원체 감염에 대한 보호용 유전자 백신의 제조를 위해, 보호 면역 반응이 일어날 수 있도록 하는 면역원성 단백질을 암호화하는 유전 물질은 표적에 대한 암호 서열 형태로 유전자 작제물에 포함되어야 한다. 병원체가 본 발명이 특히 유용하게 사용되는 세포내적 감염이든, 또는 세포외적 감염이든, 모든 병원체 항원이 보호 반응을 일으키지는 않는 것 같다. 본 발명은 다수의 병원체 항원을 이용한 백신접종을 허용한다. 유전자 백신에 사용되는 유전자 작제물은 다수의 병원체 항원을 암

호화하는 유전 물질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 다수의 바이러스 유전자는 다수의 표적을 제공하는 단일 작제물에 포함될 수 있다. 달리, 1 이상의 병원체 유전자를 포함하는 다수의 작제물은 화합되어 소포성 복합체의 제조에 사용되는 상이한 DNA 문자상에 포함될 수 있다.

표 1과 2는 몇몇 병원성 제제 및 유기체 목록을 포함하고 있으며, 이에 대한 유전자 백신은 이들에 의한 감염으로부터 개체의 세포를 보호하도록 제조될 수 있다. 몇몇 바람직한 양태에서, 병원체에 대해 개체를 면역화하는 방법은 인간 면역결핍 바이러스, HIV; 인간 T 세포 백혈병 바이러스, HTLV; 인플루엔자 바이러스; 간염 A 바이러스; 간염 B 바이러스; 간염 C 바이러스; 인간 파필로마 바이러스, HPV; 허프스 심플렉스 1 바이러스, HSV1; 허프스 심플렉스 2 바이러스, HSV2; 사이토메갈로바이러스, CMV; 앱스타인-바 바이러스, EBR; 리노바이러스; 코로나바이러스; 로타바이러스; 및 호흡기 합포체 바이러스에 대해 지향적이다.

본 발명의 또 다른 측면은 과증식 질환에 특징적인 과증식 세포에 대한 광범위 보호 면역 반응을 제공하는 방법 및 과증식 질환을 겪고 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 본원에서 사용된, 용어 "과증식 질환"은 세포의 과증식이 특징적인 이러한 질환 및 이상을 말한다. 과증식 질환의 예로는 임파종 또는 흑색종과 같은 모든 암 형태, 및 건선을 포함한다.

개체의 세포 중으로 면역원성 "과증식 세포"-수반 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 작제물을 도입하면 백신접종된 개체의 세포에서 이들 단백질을 생성함이 발견되고 있다. 본원에서 사용된, 용어 "과증식-수반 단백질"은 과증식 질환을 수반하는 단백질을 말한다. 과증식 질환에 대한 면역화를 위해서는, 과증식 질환이 수반된 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 작제물이 개체에 투여된다.

본 발명을 이용하여 1 이상의 다수의 암 형태에 대해 개체를 면역화시킬 수 있지만, 본 발명은 특정 암에 결리기 쉽거나 암을 가지고 있어 재발되기 쉬운 개체를 예방차원에서 면역화하는데 특히 유용하다. 유전학과 기술학 및 역학의 발전은 개체에서 암 발생의 확률 측정 및 이에 대한 위험도 평가를 가능케 한다. 유전자 선별 및/또는 가족 건강 내력을 이용하여, 특정 개인에서 다수 타입의 종양 중 하나가 발생할 확률을 예측할 수 있다.

유사하게는, 이미 암이 발생하였고 암 제거 치료를 하였거나 차도가 있는 개인들은 특히 재발과 재발생이 쉽다. 치료법의 일환으로, 이러한 개인들은 이들이 지녔던 것으로 진단되었던 암에 대해 재발되지 않도록 면역이 될 수 있다. 따라서, 일단 개체가 어떠한 타입의 암을 가지고 있고 재발 위험이 있는 것으로 알려진 경우, 이들은 장래 암의 출현에 대비하는 면역 시스템을 준비하도록 면역이 되어질 수 있다.

본 발명은 과증식 질환을 겪고 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법에서, 유전자 작제물의 도입은 면역치료제로 작용하는데, 이는 표적 단백질을 생성하는 과증식 세포를 퇴치하도록 개체의 면역 시스템을 지시 및 촉진한다.

본 발명은 "자가"-지시 항체를 생성하는 세포 수용체 및 세포들을 포함하는 자가면역을 수반하는 표적에 대해 폭넓게 기초한 보호 면역 반응을 부여함으로써 자가면역 질환 및 이상을 겪고 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다.

T 세포 매개 자가면역 질환은 류마티스성 관절염(RA), 다발성 경화증(MS), 쇼그렌증후군, 사르코이도시스, 인슐린 의존형 당뇨병(IDDM), 자가면역 갑상선염, 반발성 관절염, 강직성 척추염, 공피증, 다근염, 피부근염, 건선, 맥관염, 베그너 육아종증, 크론병 및 궤양성 대장염을 포함한다. 이들 각 질환은 내생성 항원에 결합하고 자가면역 질환이 수반된 염증성 캐스케이드를 개시하는 T 세포 수용체로 특징지워진다. T 세포의 가변 영역에 대한 백신 접종은 CTL을 포함하는 면역 반응을 유발시켜 이들 T 세포를 제거한다. T 세포 매개 자가면역 질환을 앓고 있는 환자, 특히 TCR의 가변 영역이 특징규명되어야 할 환자를 치료하기 위해서는, 활액 생체 조직 검사를 수행될 수 있다. T 세포의 샘플을 취하고 표준 기술을 이용하여 이들 TCR의 가변 영역을 확인할 수 있다. 유전자 백신은 이러한 정보를 이용하여 제조될 수 있다.

B 세포 매개 자가면역 질환은 낭창(SLE), 그레이브스병, 중증성근무력증, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 혈소판감소증, 천식, 한성글로불린혈증, 1차 담즙 경화증 및 악성 빈혈을 포함한다. 이들 각 질환은 내생성 항원에 결합하고 자가면역 질환이 수반된 염증성 캐스케이드를 개시하는 항체가 특징적이다. 항체의 가변 영역에 대한 백신 접종은 항체를 생성하는 B 세포를 제거하기 위해 CTL을 포함하는 면역 반응을 유도한다. B 세포 매개 자가면역 질환을 겪고 있는 환자를 치료하기 위해서는, 자가면역 활성에 수반된 항체의 가변 영역이 확인되어야 한다. 생체 조직 검사를 수행하고 염증 부위에 존재하는 항체 샘플을 취할 수 있다. 이들 항체의 가변 영역은 표준 기술을 사용하여 확인될 수 있다. 유전자 백신은 이러한 정보를 이용하여 제조될 수 있다.

몇몇 바람직한 양태에 따르면, 소포는 백신 제형이고 DNA는 항-병원체 면역 반응이 유도될 수 있는 면역원을 작동적으로 암호화하는 플라스미드 DNA이다. 바람직한 양태는 표 1과 2에서 설명된 병원체에 대해 면역 반응을 유도하는 면역원을

암호화하는 플라스미드를 포함한다. 몇몇 바람직한 양태에 따르면, 면역원은 병원체 항원이다. 몇몇 양태에서, 면역조절 단백질은 소포에 포함될 수 있고/있거나 플라스미드에 의해 암호화될 수 있다. 몇몇 바람직한 양태에서, 면역원성 단백질 및 웨티드, 특히 플라스미드에 의해 암호화된 면역원과 관련된 것들이 소포에 포함될 수 있다.

몇몇 바람직한 양태에 따르면, DNA는 면역조절 단백질과 같은 치료적으로 활성인 단백질 또는 생리학적으로 활성인 단백질을 작동적으로 암호화하는 플라스미드 DNA이다. 이러한 DNA를 개체로의 전달은 개체에서 활성인 단백질을 발현시킨다.

본 발명의 몇몇 양태에서, 핵산 분자는 기타 활성제를 운반하지만 소포 복합체가 투여되는 개체의 세포에서 발현될 수 있도록 단백질을 암호화하지는 않는 소포 복합체를 형성하는데 사용되는 캐리어 DNA일 수 있다. 캐리어 DNA의 예로는 플라스미드 DNA, 연어 정자 DNA, 인간 DNA, 박테리아 DNA, 및 파아지 DNA를 포함한다. 본 발명의 몇몇 양태에서, 핵산 분자는 RNA일 수 있다.

본 발명의 몇몇 양태에서, 기타 활성제는 단백질 폴리웨티드, 웨티드, RNA, 또는 치료 화합물/약제와 같은 기타 비-단백성 분자일 수 있다. 단백질의 예로는 원하는 면역 반응을 위한 표적인 항원/면역원, IL-12와 같은 사이토킨, GM-CSF, 공자극 인자, MCP-1 및 RANTES와 같은 케모카인, 전사 인자, 폴리머라제, 호르몬, 및 생장 인자를 포함한다. RNA의 예로는 안티센스 RNA, 라이보자임 및 삼중나선 형성 RNA를 포함한다. 단백질, 폴리웨티드 및 웨티드의 예로는 원하는 면역 반응을 위한 표적이 되는 항원/면역원성 단백질, 폴리웨티드 및 웨티드 및 소마토스탄틴 및 IGF-1과 같은 생물학적으로 활성인 웨티드를 포함한다. 치료 화합물/약제와 같은 비-단백성 분자의 예로는 타목시펜, 독시루비신, 택솔, 시스-플라틴과 같은 항암성 화합물; ddi 및 ddA와 같은 항바이러스성 화합물, NSAID와 같은 항염증성 화합물 및 스테로이드; 항진균성 및 항바이러스성 화합물과 같은 항생제 화합물, 및 클레스테를 저하 약제를 포함한다.

국부 마취제/핵산 복합체는 국부 마취제로부터 라멜라 구조를 생성한다. 핵산 분자는 국부 마취제의 친수성 부위와 상호작용하지만 친지성 부위는 막 구조를 형성한다. 복합체 형성은 국부 마취제와 핵산의 특정 몰비, 특정 염농도 및 특정 pH를 포함하는 특정 조건하에 일어난다. 추가로, 공정 단계에 따라, 상이한 거대분자 구조를 지닌 상이한 크기의 소포가 생성될 수 있다.

pH의 경우, pH는 아민 그룹이 양전하를 띠도록 국부 마취제의 pKa 이상이여 한다. 바람직한 양태에서, pH는 4-8.5이고, 좀더 바람직하게는 6-7.5이다.

염농도와 관련해서는, 염농도는 핵산의 포스페이트 그룹의 음전하와 국부 마취제의 양전하 복합체를 이루도록 충분히 낮아야 한다. 몇몇 양태에서, 국부 마취제/핵산 소포 제형의 염농도는 복합체 형성 후에 증가된다. 바람직한 양태에서, 염농도는 0-2 M이고, 좀더 바람직하게는 0-500 mM이다.

투여 경로는 비경구 및 국소 또는 점막 경로를 포함한다. 몇몇 양태에서, 소포는 근육내, 정맥내, 동맥내, 종양내, 피부내, 피하, 경피, 복강내, 국소, 비내, 장 보호 경구 전달을 포함한 경구적으로, 흡입에 의해, 또는 국소적으로 또는 세척에 의해 질, 직장, 요도, 불쪽 및 혀밑으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 점막 조직으로 전달된다. 본 발명 조성물은 전통적인 시린지, 무바늘 주사 장치, 또는 "미세투사 충격 유전자 건"을 포함(이에 한정되지 않음)하는 수단에 의해 투여될 수 있다. 1990년 7월 31일에 발행된 미국 특허 4,945,050에서 Sanford 등이 교시한 미세투사 입자 충격 과정은 본 발명 조성물을 개체에 투여하는데 적합할 수 있다.

본원에서 사용된, 용어 "약학 조성물" 및 "주사성 약학 조성물"은 당업자에 의해 충분히 인정되는 일상의 익히 이해되고 수용되는 의미를 가지는 것으로 해석된다. 약학 조성물의 형태로 환자에게 투여되는 조성물은 일반적으로 멸균되고, 무발열성 조성물이다. 주사에 적당한 약학 조성물, 즉, 주사성 약학 조성물은 멸균되고, 무발열적이면서 본질적으로 이물질이 존재하지 않고, 등장성 및 pH가 적절히 조절되면서 개체에 투여시 안전하고 효과적이어야 한다.

국부 마취제/핵산 비율과 관련해서는, 입자 복합체의 크기가 이 비율에 의존한다. 따라서, 입자 크기는 국부 마취제/핵산 비율을 조절하여 결정될 수 있다. 어떠한 세포 타입이 유전자 전달을 위해 표적이 되는지에 따라 상이한 입자 크기가 원해질 수 있다.

국부 마취제/핵산 소포의 크기 또는 이보다 큰 구조는 장쇄 지방산 타입의 지질이 사용되는 경우, 지질 및 국부 마취 성분상 모두의 소수성 쇄 길이, 및 국부 마취제와 지질 서로간의 정확한 비율을 포함한, 다수의 인자에 의해 조절될 수 있다. 또한, 핵산 전달에 사용되는 소포의 경우, 국부 마취제 농도 또는 국부 마취제와 양이온 지질의 농도 : 핵산 농도의 비율이 입자의 크기 및 구조에 중요하다. 입자 크기를 변화시키면(주사 전자 현미경으로 측정시 10 nm 내지 100  $\mu\text{m}$  직경) 상이한 조

직 분포 및 분포 동역학을 야기하며, 이는 또한 입자 주사 또는 전달 양식/방법에 의해 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, 주사 전자 현미경으로 측정시 혈관내 투여된 50-200 nm 직경의 입자는 우선적으로 간세포에 취해질 수 있다. 혈관내, 근육내, 피하 또는 피부내 주사된 0.1-10  $\mu\text{m}$ 의 입자는 우선적으로 쿠퍼 세포와 같은 식세포, 및/또는 랑게르ハン스 세포, 및 마크로파아지를 포함한 각종 타입의 수지상 세포와 같은 면역 시스템 세포에 의해 취해질 수 있다. 각종 크기(주사 전자 현미경으로 측정시 50 nm-100  $\mu\text{m}$  직경)의 입자는 경피 전달 기술, 또는 피부 또는 점막 표면으로의 국소 전달, 또는 경구 전달 단독 또는 정제, 캡슐 등의 기타 성분과 함께 취해질 수 있다.

몇몇 바람직한 양태에서, 국부 마취제는 최종 농도 0.01-2.5%(w/v), 좀더 바람직하게는 0.05-1.25%(w/v)으로 제공된다. 몇몇 바람직한 양태에서, 최종 농도는 0.25%(w/v)이다.

몇몇 바람직한 양태에서, 핵산은 최종 농도 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -10 mg/mL, 좀더 바람직하게는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -3 mg/mL로 제공된다. 몇몇 바람직한 양태에서, 최종 농도는 1 mg/mL이다.

몇몇 바람직한 양태에서, [핵산]:[국부 마취제]의 농도비는 [1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -10 mg/mL]:[0.01-2.5%(w/v)], 바람직하게는 [100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -3 mg/mL]:[0.05-1.25%(w/v)]이다. 몇몇 바람직한 양태에서, [핵산]:[국부 마취제] 농도비는 [800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]:[0.1-0.25%(w/v)]이다.

국부 마취제 소포는 핵산 분자와 결합시 자연스럽게 형성된다. 국부 마취제의 전하는 하전 형태를 선호하는 조건을 선택하여 결정될 수 있다. 몇몇 바람직한 양태에서, 국부 마취제는 양전하를 띠고 음으로 하전된 핵산, 몇몇 바람직한 양태에서는 DNA와 결합한다. 양으로 하전된 국부 마취제와 DNA의 결합은 소포 구조를 형성한다. 개개 소포 구조는 보다 크고, 보다 고차 구조로 응집될 수 있다. 몇몇 집합체는 각지 속 완두콩 형태로 조직된 개개 소포 구조, 즉 보다 거대한 라벨라 소포 구조에 캡슐화된 소포로 여겨지는 막대-형 구조를 나타낸다.

부피바카인과 같은 국부 마취제가 즉석 혼합에 의해 DNA와 같은 핵산과 직접 혼합한다면, 주사 전자 현미경으로 측정시 약 100-150 nm 직경의 소포 구조 형태는 보다 크고, 몇몇 경우에는, 주사 전자 현미경으로 측정시 300 nm 이상인 불규칙-형상을 한 구조로 집합될 수 있다. 느린 혼합 속도는 투석; 핵산 분자 용액 중으로 국부 마취제를 투석하거나 국부 마취제, 핵산 및 염을 합친 다음 염을 제거하는 투석법을 이용하여 달성될 수 있다. 국부 마취제의 농도에 대한 낮은 DNA 농도를 이용하는 투석법과 같은 느린 혼합 속도에 의한 국부 마취제와 핵산의 결합은 주사 전자 현미경으로 측정시 50-150 nm 직경의 보다 작은 구조 형성을 선호한다. 국부 마취제 농도에 대한 보다 높은 DNA 농도를 이용하는 국부 마취제와 핵산의 결합은 주사 전자 현미경으로 측정시 직경이 1 마이크론 이하 또는 그 이상의 보다 큰 구조 형성을 선호한다. 바람직한 느린 혼합 과정은 수 시간에 걸친 투석에 의해 제거된 높은 염의 존재하에 성분들과 합친다. 염이 제거되면, 조건은 자가 집합체 및 소포 구조 형성쪽으로 이동한다.

앞서 설명했듯이, 투석은 소포 형성 속도를 조절하는데 이용될 수 있다. 몇몇 공정에서, 국부 마취제와 핵산 분자는 높은 염 농도를 지닌 용액내의 투석막에서 합쳐진다. 막을 낮은 염 농도, 일반적으로 최종, 소포 함유 용액에 바람직한 농도를 함유하는 용기에 둔다. 막에서 용액내의 염은 주위 용액 중으로 막을 통해 이동하고 이에따라 막에서 염농도는 감소된다. 염농도가 감소함에 따라, 막내부의 용액은 소포 형성을 선호한다. 이 공정은 소포에 캡슐화될 수 있는 첨가제가 소수성인 경우에 특히 유용하다.

몇몇 공정에서, 핵산 분자는 투석막중의 용액내에 존재한다. 막은 소포 형성을 위한 농도, 일반적으로 소포 함유 용액의 최종 농도에서 국부 마취제를 함유하는 용기에 놓인다. 주변 용액중의 국부 마취제는 막을 통해 막내부의 용액중으로 이동한다. 막 내부의 용액중의 국부 마취제 농도가 증가함에 따라, 막내부의 용액은 소포 형성을 선호한다. 일반적으로, 10,000-100,000 kD의 크기 컷오프를 지닌 투석막을 이용하는 경우, 막 외부의 국부 마취제 농도와 일치하도록 하는 막 내부의 국부 마취제 농도의 평형 시간은 약 2-3시간이다. 3,000 kD의 크기 컷오프를 지닌 투석막을 이용할 경우, 막 외부의 국부 마취제 농도와 일치하도록 하는 막 내부의 국부 마취제 농도의 평형 시간은 약 5시간이다. 소포에 캡슐화될 수 있는 첨가제는 이러한 제제가 가용성인 경우 막내부의 핵산 용액에 포함될 수 있다.

일 양태에서, 부피바카인은 직접 혼합에 의해 100-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNA와 수용액에서 0.25%(w/v)의 최종 농도로 합쳐진다. pH는 8 이하, 바람직하게는 6.5-7이다. 염농도는 200 mM 이하이다. 주사 전자 현미경으로 측정시 약 100-150 nm 직경의 소포 구조가 형성되며 이는 주사 전자 현미경으로 측정시 300 nm 직경 이상의 보다 큰 구조를 형성하는 소포 집합체이다.

일 양태에서, 부피바카인은 0.25%(w/v)의 최종 농도로 클로로포름과 같은 유기 용매와 합쳐져 휘발에 의해 건조된다. 수용액 중의 DNA 100-1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 는 휘발물질과 혼합된다. pH는 8 이하, 바람직하게는 6.5-7이다. 염농도는 500 mM 이하이다. 주사 전자 현미경으로 측정시 약 100-150 nm 직경의 소포 구조가 형성되며 이는 주사 전자 현미경으로 측정시 직경이 300 nm 이상인 보다 큰 구조를 형성하는 소포 집합체이다.

일 양태에서, 부피바카인은 수용액에서 0.25%(w/v) 부피바카인의 최종 농도로 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 DNA와 혼쳐진다. pH는 8 이하, 바람직하게는 6.5-7이다. 염농도는 500 mM 이하이다. 주사 전자 현미경으로 측정시 약 50-150 nm 직경의 소포 구조가 형성된다.

일 양태에서, 부피바카인은 수용액에 0.25%(w/v) 부피바카인의 최종 농도로 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 DNA와 혼쳐진다. 두 물질은 1시간 이상에 걸쳐 투석에 의해 서서히 합쳐진다. pH는 8이하, 바람직하게는 6.5-7이다. 염농도는 2 M 이상이다. 염을 용액에서 추출하고 소포 자가 집합체를 염의 형태로 제거한다. 주사 전자 현미경으로 측정시 약 50-150 nm 직경의 소포 구조가 형성된다.  $\text{Ca}^{++}$  와 같은 양이온 또는  $\text{PO}_4$ 와 같은 음이온을 이용하여 최종 구조를 안정화시킬 수 있다.

또 다른 양태에서는, 높은 염에서 국부 마취제, 지질, 및 핵산의 혼합물을 투석시 서서히 소포로 자가 집합한다.

일 양태에서, 국부 마취제 및, 임의적인 지질은 앞서 기술한 바와같이 유기 용매에서 혼합된다. 용매는 표준 기술에 의해 휘발된다. 핵산 분자를 함유하는 수성 완충액은 혼합시 건조된 물질, 및 소포 자가-집합체에 첨가된다. 소수성 활성제의 전달을 위해, 활성제는 건조 이전에 용매중의 지질에 첨가될 수 있다. 단백질, 폴리펩티드, 웨프티드 및 비-단백성, 친수성 화합물은 핵산 분자를 함유하는 완충액에 포함될 수 있다. 이에따라 활성제가 캡슐화될 수 있다.

또 다른 양태에서, 양이온 소포는 이후에 첨가되는 핵산 분자없이 형성되는 것을 제외하고는 상술한 바와같이 제조될 수 있다. 예를 들어, 국부 마취제 및, 임의적인 지질은 상술한 바와같이 유기 용매에서 혼합된다. 용매는 표준 기술에 의해 휘발된다. 핵산 분자를 함유하지 않는 수성 완충액은 혼합시 건조 물질, 및 "빈" 소포 자가-집합체에 첨가된다. 핵산 분자를 함유하는 완충액은 재구성 후 제 2 단계에서 용액에 첨가된다. 이는 핵산의 경우에 특히 유용한데, 이는 보다 크고, 높은 수의 입자 멀티-라밸라 구조를 생성할 수 있다.

또 다른 예에서, 입자 또는 결정 형태로 핵산과 함께 침강하는 고형 소포는 국부 마취제의  $\text{pKa}$ 에 이르는 쪽으로 pH를 조절하여 혼합물에서 제조된다.

몇몇 양태에서, 국부 마취제:핵산 소포는 사이토킨 및/또는 면역원성 단백질 또는 웨프티드와 같은 단백질을 추가로 포함한다. 따라서, 면역조절 단백질은 핵산이 면역조절 단백질 및/또는 면역원성 단백질을 암호화하는 국부 마취제:핵산 복합체의 일부 형태로 투여될 수 있다. 몇몇 양태에서, 핵산은 유전자 백신이고 공-제제 단백질은 사이토킨, 예를 들면 GMCSF 또는 IL-12와 같은 면역조절 단백질이다. 몇몇 양태에서, 핵산은 유전자 백신이고 공-제제 단백질은 면역원성 단백질 또는 웨프티드이다. 이러한 양태에 따르면, 전달시의 백신은 동시 프라임/부스트 양이다.

소포를 합쳐 구조 1-5 마이크론을 포함하는 보다 큰 구조/복합체를 형성할 수 있다.

몇몇 양태에서, 소포는 주사 전자 현미경으로 측정시 400 nm 이상이다. 이러한 소포는 예를 들면, 정맥내 투여에 의해 개체로 투여시 물질을 폐로 전달하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물 및 방법은 의학 및 수의학 모든 분야에 유용하다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 개개 포유류, 조류 또는 어류를 치료적 및 예방적으로 치료할 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 인간, 소, 양, 돼지, 말, 개 및 고양이종을 포함하는 포유류종 각자를 치료하는 조성물 및 방법으로 특히 유용할 수 있다.

본 발명은 특정 이론에 제한되지 않는다. 하기에 제시된 실시예는 본 발명 측면의 몇몇 양태를 말한다. 실시예는 본 발명의 범위를 제한하기 보다는 예증적인 목적으로 작용한다. 당업자는 본 발명의 추가 측면 및 양태를 쉽게 이해할 수 있다.

### 실시예

본 발명의 몇몇 바람직한 양태에 따라, 국부 마취제 및 DNA를 합쳐 DNA를 지닌 국부 마취제 소포 형태로 전달하는 경우 국부 마취제 측면 DNA 백신에 의해 유도된 면역 반응을 개선시킬 수 있다.

본 발명에 따르면, 국부 마취제 촉진 DNA 백신에 의해 유도된 면역 반응은 국부 마취제를 공-제제 및 DNA와 합쳐 소포를 형성하는 경우에 개선될 수 있다.

DNA와 같은 음이온 분자는 자가-집합 구조의 양이온, 친수성 부위와 결합한다. 복합체는 세포와 결합하고 이의 높은 친지성은 세포중으로 흡입을 촉진한다. 용도는 유전자 요법 및 유전 면역반응을 포함한다.

몇몇 양태에서는, 음세포작용 또는 식세포작용과 관련된 메카니즘을 이용하여 세포가 입자 형태로 취할 수 있는 충분한 크기를 한 거대 소포를 제조한다. 이러한 거대 입자 소포는 면역반응 또는 면역요법에서의 백신 분야 또는 수지상 세포 또는 마크로파아지와 같은 항원 제시 세포를 발현하는 MHC-II와 같은 면역 시스템에서 세포의 표적화를 위한 유전자 요법 분야에 이용된다. 이러한 거대 복합체의 추가적인 이점은 국부 마취제가 세포내의 엔도솜 및 라이보솜으로부터의 방출을 촉진한다는 점이다.

몇몇 양태에서, 동결건조/건조된 국부 마취제/DNA 소포는 유전자 전달 및 유전 면역화를 위한 용도를 가진다. 예를 들면, 경구 DNA 전달을 위한 정제를 제조하거나, DNA 전달을 위해 나노입자 또는 마이크로입자를 제조하기 위해 이들을 단독 또는 기타 고형 성분과 함께 사용한다. 국부 마취제 복합체 또는 입자는 백신의 경구 전달 또는 유전자 요법에 이용되는데, 이는 이들이 위내부에서의 분해로부터 관련 활성 분자를 보호하고 소화기-관련 림프 조직중으로 흡수를 촉진하기 때문이다.

또 다른 예에서는, 소수성의, 난용성 약제를 소포 핵의 소수성 환경 내부로 캡슐화하지만, 약제의 용해도를 개선시키는 구조 표면은 양으로 하전된다. 양으로-하전된 종은 세포의 인지질이 풍부한, 음으로-하전된 표면과 자연스런 인력을 가진다. 인력 후, 구조의 높은 친지성은 세포막을 통한 전달을 촉진한다. 용도는 택솔 또는 빙크리스틴과 같은 난용성 또는 전신 유독성 항암제를 유방암 세포/종양으로 전달하는 것을 포함한다.

또 다른 실시예에서, 소포는 혈액내의 효소 분해, 또는 핵액 성분내의 비-보호 상호작용, 또는 비-보호 면역 반응으로부터 관련 생-분자를 보호한다. 이들 복합체에 사용된 아미드-형 국부 마취제는 혈액내에서 파괴되지 않기 때문에 에스테르-형 국부 마취제보다 특별한 이점을 가질 수 있다.

또 다른 실시예에서, 소포는 약제, DNA 등을 점막 부위로의 국소 전달 및 피부를 통한 전달을 위해 크림, 젤리, 로션, 연고 형태로 제형된다.

## 표 1

피코르나바이러스 과

속: 리노바이러스:(의학)일반 감기의 대략 50% 사례에 해당.

엔테로바이러스:(의학) 폴리오바이러스, 콕삭키바이러스, 에코바이러스,

스, 및 A형 간염 바이러스와 같은 인간 엔테로바이러스 포함.

압토바이러스:(수의학) 이들은 족부 및 구강 질환 바이러스임.

표적 항원: VP1, VP2, VP3, VP4, VPG

켈시바이러스 과

속: 바이러스의 노워크 그룹:(의학) 이들 바이러스는 유행성 위장염의

중요한 원인체임.

토가바이러스 과

속: 알파바이러스:(의학 및 수의학) 예들은 신드비스 바이러스, 로스

리버 바이러스 및 이스턴 & 웨스턴 말 뇌염 포함.

루비바이러스: (의학) 루벨라 바이러스.

플라리비리두 과 예들은 (의학) 뎅그열, 황열병, 일본 뇌염, 세인트 루이

스 뇌염 및 참진드기 매개 뇌염 바이러스를 포함함.

C형 간염 바이러스: (의학)이들 바이러스는 아직은 과에 속하는 것이 아니

라 토가바이러스 또는 플라비바이러스로 여겨짐. 토가

바이러스 과와 가장 유사함.

코로나바이러스 과: (의학 및 수의학)

감염성 기관지염 바이러스(가금)

돼지 전염성 위장염 바이러스(돼지)

돼지 혈구응집 뇌척수염 바이러스(돼지)

고양이 감염성 복막염 바이러스(고양이)

고양이 장 코로나바이러스(고양이)

개 코로나바이러스(개)

인간 호흡기 코로나바이러스는 일반 감기의 대략 40건

을 야기함. EX. 224E, OC43

주의-코로나바이러스는 비-A형, B형 또는 C형 간염을 야

기 할 수 있음.

표적 항원: E1 - M 또는 매트릭스 단백질로도 불림

E2 - S 또는 스파이크 단백질로도 불림

E3 - HE 또는 헤마글루틴-엘테로스 글리코프로테인으로도

불림(모든 코로나바이러스에 존재하지는 않음)

N - 뉴클레오캡시드

래브도바이러스 과

속: 베시큘로바이러스: 소포성 구내염 바이러스

리자바이러스: (의학 및 수의학) 광견병

표적 항원: G 단백질

N 단백질

필로비리두 과: (의학)

말부르그 및 에볼라 바이러스와 같은 출혈성 발열 바이러스

파라믹소바이러스 과:

속: 파라인플루엔자 바이러스 타입 1

파라인플루엔자 바이러스 타입 3

소 파라인플루엔자 바이러스 타입 3

루불라바이러스:(의학 및 수의학)

멈프스 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스 타입 2, 파라인플루

엔자 바이러스 타입 4, 뉴캐슬 질환 바이러스(치킨에서의 중요한

병원체)

모빌리바이러스: (의학 및 수의학)

홍역, 돼지 디스템퍼

뉴몬바이러스:(의학 및 수의학)

호흡기 합포체 바이러스

오르토믹소바이러스 과(의학)

인플루엔자 바이러스

번야바이러스 과

속: 번야바이러스: (의학) 캘리포니아 뇌염, 라크로스

플레보바이러스:(의학) 리프트 벨리 발열

한타바이러스: 푸레말라는 혜마하진 발열 바이러스임

나이로바이러스(수의학) 나이로비 양 질환

또한 다수의 미지정 번가바이러스

아레나바이러스 과(의학)

LCM, 라자 발열 바이러스

레오바이러스 과

속: 레오바이러스: 가능한 인간 병원체

로타바이러스: 아이들의 급성 위장염

오르비바이러스: (의학 및 수의학)

콜티바이러스: 콜로라도 참진드기 발열, 레봄보 (인간)

말 뇌증, 청색 혀

레트로바이러스 과

아파: 옹코리비리날:(수의학)(의학) 고양이 백혈병 바이러스,

HTLV VI 및 HTLV VII

렌티비리날: (의학 및 수의학) HIV, 고양이 면역결핍

바이러스, 말 감염, 빈혈 바이러스 스푸마비리날

파포바바이러스 과

아파: 폴리오마바이러스:(의학) BKU 및 JCU 바이러스

아파: 파필로마바이러스: (의학) 암 또는 파필로마의 악성 진행

을 수반하는 다수의 바이러스 타입

아데노바이러스(의학)

EX AD7, ARD., O.B. - 호흡기 질환 야기 - 275와 같은 몇몇

아데노바이러스는 장염을 유발함

파보바이러스 과 (수의학)

고양이 파보바이러스: 고양이 장염 유발

고양이 펜루코페니아바이러스

개 파보바이러스

돼지 파보바이러스

허프스바이러스 과

아파: 알파허프스비리두

속: 심플렉스바이러스(의학)

HSV I, HSV II

베리셀로바이러스: (의학-수의학) 위광견병-수두대상포진

아파 - 베타허프스비리두

속: 사이토메갈로바이러스(의학)

HCMV

뮤로메갈로바이러스

아파: 감마히프스비리두

속: 림포크립토바이러스(의학)

EBV-(부르키츠 림포)

라디노바이러스

폭스바이러스 과

아파: 코르도폭스비리두 (의학-수의학)

속: 오르토폭스바이러스

천연두(마마)

우두(종두증)

파라폭시바이러스 - 수의학

아우아폭스바이러스 - 수의학

카프리폭스바이러스

레포리폭스바이러스

수이폭스바이러스

아파: 엔테모폭스비리두

혜파드나바이러스 과: B형 간염 바이러스

비구분: 델타형 간염 바이러스

## 표 2

박테리아 병원체

병원성 그램-양성 코커스(구균)는 뉴모코커스; 스타필로코커스;

및 스트렙토코커스를 포함함. 병원성 그램-음성 코커스는 메닌고

코커스; 및 고노코커스를 포함함.

병원성 장 그램-음성 바실러스는 엔테로박테리아과; 슈도모나스,

애시네토박테리아 및 에이케넬라; 멜리오이도시스; 살모넬라; 시겔

로시스; 헤모필루스; 모락셀라; 칸크로이드; 부루셀로시스; 툴라레미아; 예르시니아(파스투우렐라); 스트렙토바실러스 모닐리포르미스 및 스피렐룸; 리스테리아 모노사이토게네스; 에리시펠로트릭스 루시오패티에; 디프테리아; 콜레라; 안트락스; 도노바노시스(그랜들로마 인귀날레); 및 바르토넬로시스를 포함함.

병원성 협기성 박테리아는 테타누스; 보툴리즘; 기타 클로스트리디아; 튜버클로시스; 레프로시; 및 기타 마이코박테리아를 포함함. 병원성 스피로헤타 질환은 매독; 트레포네마증; 매종, 핀타 및 지방 유행성 매독; 및 랩토스피라증을 포함함.

고등 병원체 박테리아 및 병원성 진균에 의해 야기된 기타 감염은 방선균증; 노카르디아증; 효모균증, 분아균증, 히스토플라스마병 및 콕시디오이데스증; 칸디다증, 아스페질러스병, 및 모균증; 스포로트리쿰증; 파라콕시디오이도미코제, 페트리엘리디오시스, 토룰롭소시스, 균종 및 색소효모균증; 및 피부사상균증을 포함함.

리케치아 감염은 리케치아 및 리케치아증을 포함한다.

마이코플라즈마 및 클라미디아균 감염의 예로는 마이코플라즈마 페렴; 서경립프육아종증; 앵무병; 및 분만시 클라미디아균 감염을 포함함.

병원성 진핵생물

병원성 프로토조아 및 연충 및 이예의한 감염은 아메바증; 말라리아; 리슈마니아증; 트리파노소마병; 톡소플라즈마병; 뉴모시스티스 카리니; 바베시오증; 지알디아증; 선모충병; 사상충증; 주혈흡충증; 선충류; 흡충류 또는 플루크; 및 조충류(춘충) 감염을 포함함.

#### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1.

국부 마취제 및 핵산 분자를 포함하고 있는 라멜라 소포를 포함하는 조성물로서, 국부 마취제:핵산의 비율은 0.01-2.5% w/v 국부 마취제:1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -10 mg/mL 핵산이고, 상기 국부 마취제는 양이온 질소를 함유하고 7-9의 pKa 값을 가지며 DNA에 결합하고 소수성 그룹을 함유하는 조성물.

## 청구항 2.

제 1 항에 있어서, 국부 마취제:핵산의 비율이 0.01-2.5% w/v 국부 마취제:1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -10 mg/mL 핵산인 조성물.

## 청구항 3.

제 1 항에 있어서, 국부 마취제:핵산의 비율이 0.05-1.25% w/v 국부 마취제:100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1 mg/mL 핵산인 조성물.

## 청구항 4.

제 1 항에 있어서, 국부 마취제:핵산의 비율이 0.1-0.5% w/v 국부 마취제:500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  핵산인 조성물.

## 청구항 5.

제 1 항에 있어서, 라멜라 소포가 50-150 nm 직경인 조성물.

## 청구항 6.

제 1 항에 있어서, 라멜라 소포의 50% 이상이 300 nm 이상인 조성물.

## 청구항 7.

제 1 항에 있어서, 라멜라 소포의 50% 이상이 400 nm 이하인 조성물.

## 청구항 8.

제 1 항에 있어서, 국부 마취제가 부피바카인인 조성물.

## 청구항 9.

제 1 항에 있어서, 핵산이 DNA인 조성물.

## 청구항 10.

제 9 항에 있어서, 핵산이 플라스미드 DNA인 조성물.

## 청구항 11.

제 1 항에 있어서, 라멜라 소포가 양이온 지질, 중성 지질, 음이온 지질, 양이온 계면활성제, 중성 계면활성제, 음이온 계면활성제, 양이온 세제, 중성 세제 및 음이온 세제로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1 이상의 화합물을 추가로 포함하는 조성물.

### 청구항 12.

제 1 항에 있어서, 라멜라 소포가 단백질, 폴리펩티드, 웨티드 및 비-단백성 화합물로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1 이상의 화합물을 추가로 포함하는 조성물.

### 청구항 13.

제 1 항에 있어서, 라멜라 소포가 면역원성 단백질 또는 웨티드를 추가로 포함하는 조성물.

### 청구항 14.

제 1 항에 있어서, 라멜라 소포가 사이토킨, 공자극 인자, 전사 인자, 호르몬, 및 생장 인자로 이루어진 그룹 중에서 선택된 생물학적 활성 단백질을 포함하는 조성물.

### 청구항 15.

제 1 항에 있어서, 라멜라 소포가 비-단백성 화합물을 추가로 포함하는 조성물.

### 청구항 16.

제 1 항에 있어서, 핵산이 병원체 항원을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA인 조성물.

### 청구항 17.

제 16 항에 있어서, 핵산이 바이러스 항원을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA인 조성물.

### 청구항 18.

제 1 항에 있어서, 핵산이 과증식 질환 수반 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA인 조성물.

### 청구항 19.

제 18 항에 있어서, 상기 과증식 질환은 암인 조성물.

### 청구항 20.

제 1 항에 있어서, 핵산이 자가면역 질환 수반 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA인 조성물.

### 청구항 21.

4~8.5의 pH에서 염의 존재하에, 양이온 질소를 함유하고 7~9의 pKa 값을 가지며 DNA에 결합하고 소수성 그룹을 함유하는 국부 마취제 0.01~2.5% w/v를 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10  $\text{mg}/\text{mL}$ 의 핵산과 조합시켜 라멜라 소포를 형성하는 단계를 포함하는, 국부 마취제 및 핵산 분자를 포함하는 라멜라 소포를 포함하는 조성물의 제조방법.

### 청구항 22.

제 21 항에 있어서, 라멜라 소포가 6~7.5의 pH에서 500 mM 이하의 염의 존재하에 0.05~1.25% w/v 국부 마취제를 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1  $\text{mg}/\text{mL}$ 의 핵산과 합쳐 형성되는 방법.

### 청구항 23.

제 21 항에 있어서, 라멜라 소포가 6~7.5의 pH에서 500 mM 이하의 염의 존재하에 0.1~0.5% w/v 국부 마취제를 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 핵산과 조합시켜 형성되는 방법.

### 청구항 24.

제 21 항에 있어서, 라멜라 소포가 6~7.5의 pH에서 2M 이상의 염 존재하에 0.1~0.5% w/v 국부 마취제를 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 핵산과 조합시킨 다음 500 mM 이하로 염을 제거시켜 형성되는 방법.

### 청구항 25.

제 21 항에 있어서, 라멜라 소포가 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 또는 비-단백성 약제/치료 화합물을 추가로 포함하고 라멜라 소포가 6~7.5의 pH에서 2M 이상의 염 존재하에 0.1~0.5% w/v 국부 마취제를 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 핵산 및 상기 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 또는 비-단백성 약제/치료 화합물과 조합시킨 다음 500 mM 이하로 염을 제거하여 형성되는 방법.

### 청구항 26.

삭제

### 청구항 27.

삭제

### 청구항 28.

삭제

### 청구항 29.

삭제

### 청구항 30.

삭제

### 청구항 31.

삭제

**청구항 32.**

제 1 항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 캐리어 또는 희석제를 더 포함하는 약학 조성물.

**청구항 33.**

제 32 항에 있어서, 약학 조성물이 주사성 약학 조성물인 약학 조성물.

**청구항 34.**

제 21 항에 있어서, 조합이 투석에 의해 수행되는 방법.

**청구항 35.**

제 34 항에 있어서, 투석이 2 또는 3 시간의 기간에 걸쳐 수행되는 방법.

**청구항 36.**

제 34 항에 있어서, 투석이 5 시간의 기간에 걸쳐 수행되는 방법.

**청구항 37.**

제 21항에 있어서, 염 농도는 200 mM 이하인 방법.