



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0105791
(43) 공개일자 2019년09월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/15 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/15 (2019.01)

G01N 33/5044 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0026318

(22) 출원일자 2018년03월06일

심사청구일자 2018년03월06일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

권순조

인천광역시 남구 인하로 100(용현동) 인하대학교 공과대학 생명공학과

김동주

인천광역시 계양구 갈개언덕길 9, 406호(작전동, 남진아파트)

김영효

인천광역시 남동구 은봉로 288, 707동 201호(논현동, 새터마을신일해피트리아파트)

(74) 대리인

김순웅

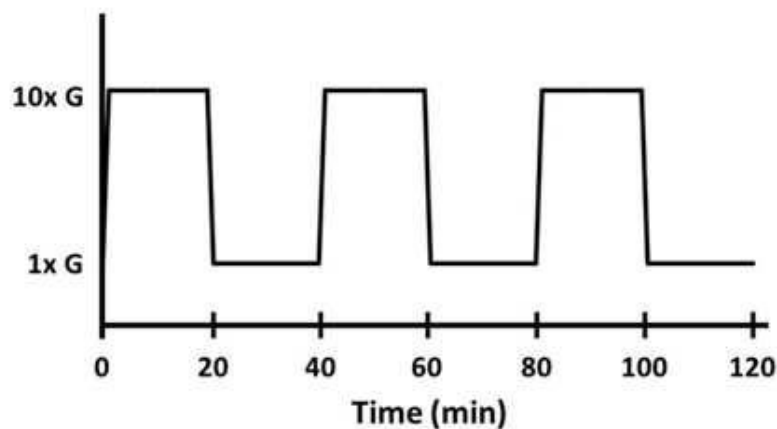
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 고중력을 이용한 비강 내 약물전달 효율 향상법

(57) 요약

본 발명은 고중력을 이용한 비강 내 약물 전달 효율 향상 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 (a) 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; (b) 상기 세포를 고중력 조건 하에 노출시키는 단계; (c) (b) 단계 이후, 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; 및 (d) (a) 단계 및 (c) 단계에서 측정한 세포 주위 투과도를 비교하는 단계; 를 포함하는 비강 내 약물 전달 효율을 시험하기 위한 생체 외 약물 전달 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 고중력을 이용한 비강 내 약물 전달 효율 향상 방법은 극성, 비극성 또는 세포막 수용체 친화성과 같은 서로 다른 성질 및 다른 분자량을 갖는 다양한 약물의 약물전달 효율 증진을 시험하는데 활용될 수 있어 투약 및 약물 개발 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2503/00 (2013.01)

C12N 2525/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345264906

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)

연구과제명 비강점막 조직상의 약물전달 효율성 증진 연구를 위한 물리적 및 전기적 자극 시스템

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계;
- (b) 상기 세포를 고중력 조건 하에 노출시키는 단계;
- (c) (b) 단계 이후, 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; 및
- (d) (a) 단계 및 (c) 단계에서 측정한 세포 주위 투과도를 비교하는 단계; 를 포함하는 비강 내 약물 전달 효능을 시험하기 위한 생체 외 약물 전달 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 고중력 조건은

- i) 세포를 5 내지 15 xg 로 10분 내지 30분 간 고중력 환경에 노출하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 (b) 단계의 고중력 조건은

- ii) 상기 i) 단계를 거친 세포를 0.5 내지 1.5 xg로 10분 내지 30분 간 방치하는 단계; 및
- iii) 상기 i) 및 ii) 단계를 순서대로 1 내지 10회 반복하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포는 배양 배지에서 배양되는 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 타겟 분자는 극성 분자, 비극성 분자 및 세포막 수용체 친화성 분자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 분자인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 세포는 RPMI 2650 세포 또는 코점막 상피세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

- (a) 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계;
- (b) 상기 세포를 고중력 조건 하에 노출시키는 단계;
- (c) (b) 단계 이후, 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계;
- (d) (a) 단계 및 (c) 단계에서 측정한 세포 주위 투과도를 비교하는 단계; 및

(e) 비강 내 약물 전달 효능을 결정하는 단계를 포함하는 비강 내 약물 전달 효능을 평가하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고중력을 이용한 비강 내 약물 전달 효율 향상 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 (a) 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; (b) 상기 세포를 고중력 조건 하에 노출시키는 단계; (c) (b) 단계 이후, 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; 및 (d) (a) 단계 및 (c) 단계에서 측정한 세포 주위 투과도를 비교하는 단계; 를 포함하는 비강 내 약물 전달 효능을 시험하기 위한 생체 외 약물 전달 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 중추 신경계의 혈관-뇌 장벽(Blood-Brain Barrier, BBB)은 외부 물질의 침입을 막아주는 1차 방어벽으로 기능하여 우리 몸의 건강을 유지하는데 도움을 준다. 그러나, 혈관 내피 세포 등이 밀집해있고 뇌를 균일한 상태로 유지하기 위해 외부 물질들이 뇌 환경 안으로 침투되지 않도록 차단하는 역할을 수행하여, 병리적 상황에서는 치료에 어려움을 주는 장애물로 작용한다.

[0004] 혈관-뇌 장벽을 우회하여 효율적으로 약물 전달을 위한 비침습적 방법으로서 비강 내 투약(intranasal administration)에 관한 흥미가 급속하게 진전되고 있다. 비강 점막(nasal mucosa)은 약물 전달을 위한 표적조직으로서 전달을 위한 넓은 표면적, 빠른 약효, 중추신경계까지 전달할 수 있는 잠재력, 초회통과 대사 작용(first-pass metabolism)이 없는 점 등의 여러 가지의 이득을 주고 있다. 또한, 상당히 다양한 치료 복합물들이 비강 내 투약으로 전달될 수 있고, 침투 촉진제가 같이 처리되는 경우에는 상대적으로 큰 분자인 펩티드와 단백질도 비강 내로 투약될 수 있다. 비강 내 약물투여는 구강투여 다음으로 좋은 약물전달 방법으로 여겨지며, 편리하고 안전하면서도 적은 투약으로 높은 치료 효율을 나타낼 수 있어 약물 조제 및 의학 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

[0005] 다만, 비강 내 약물전달 양상에 관하여 심도 있는 연구는 많이 이루어진 바 없으며, 특히 비강 내 약물전달 효율을 높이기 위하여 고중력 범위를 선별한 연구는 아직까지 진행된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명자들은 비강 세포를 특정 고중력 조건에 노출시키는 경우 세포 장벽기능 변화로 약물 전달 효율이 증가됨을 확인하고, 서로 다른 성질(극성, 비극성, 세포막 수용체 친화성) 및 다른 분자량을 갖는 물질 별로 세포 투과도를 가장 증진시키는 고중력 범위를 선별하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 비강 내 약물 전달 효능을 시험하기 위한 생체 외 약물 전달 방법을 제공하는 데에 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 비강 내 약물 전달 효능을 평가하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; (b) 상기 세포를 고중력 조건 하에 노출시키는 단계; (c) (b) 단계 이후, 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; 및 (d) (a) 단계 및 (c) 단계에서 측정한 세포 주위 투과도를 비교하는 단계; 를 포함하는 비강 내 약물 전달 효능을 시험하기 위한 생체 외 약물 전달 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (a) 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; (b) 상기 세포를 고중력 조건 하에 노출시키는 단계; (c) (b) 단계 이후, 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; (d) (a) 단계 및 (c) 단계에

서 측정된 세포 주위 투과도를 비교하는 단계; 및 (e) 비강 내 약물 전달 효능을 결정하는 단계를 포함하는 비강 내 약물 전달 효능을 평가하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 고중력을 이용한 비강 내 약물 전달 효율 향상 방법은 극성, 비극성 또는 세포막 수용체 친화성과 같은 서로 다른 성질 및 다른 분자량을 갖는 다양한 약물의 약물전달 효율 증진을 시험하는데 활용될 수 있어 투약 및 약물 개발 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 실시예에서 사용한 고중력 실험 프로토콜을 도식화한 것이다.
 도 2는 고중력 실험 프로토콜에 따른 세포 증식 정도를 분석한 결과를 나타낸 도이다.
 도 3은 고중력 노출에 따른 세포 장벽 기능 변화를 분석하기 위하여 RPMI 2650 세포층을 횡단하는 TEER 값의 분석 결과를 나타낸 도이다.
 도 4는 고중력 노출에 따른 세포골격 구조 변화를 분석하기 위한 면역형광 염색 결과를 나타낸 도이다. 별표 (*)로 표시한 부분은 재배열 또는 변형된 세포골격구조를 의미한다.
 도 5는 고중력 노출에 의한 RPMI 2650 세포의 접합 단백질 및 β -액틴 유전자 발현 정도를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명은 비강 내 약물 전달 효능을 시험하기 위한 생체 외 약물 전달 방법을 제공한다.

[0019] 보다 구체적으로, 본 발명은 (a) 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; (b) 상기 세포를 고중력 조건 하에 노출시키는 단계; (c) (b) 단계 이후, 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; 및 (d) (a) 단계 및 (c) 단계에서 측정된 세포 주위 투과도를 비교하는 단계; 를 포함하는 비강 내 약물 전달 효능을 시험하기 위한 생체 외 약물 전달 방법을 제공한다.

[0020] 비강의 점막은 후각신경세포와 연결되어 있고 후각신경세포는 뇌에서 직접 지시하는 바 비강을 통한 약물 전달은 비침습적이면서도 타겟 부위로 약물을 보다 많이 투여할 수 있고, 뇌신경 또는 척수신경 관련 질환 치료적 효과가 높은 특징이 있다. 이는 기존의 직접 주입, I.P 또는 I.V. 투여방법에 비해 훨씬 비침습적이고 뇌신경 또는 척수신경 관련 질환에 치료적 효과가 높다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 고중력 조건은 i) 세포를 5 내지 15 xg 로 10분 내지 30분 간 고중력 환경에 노출하는 단계; 를 포함할 수 있으며, 상기 고중력 환경 노출은 바람직하게는 8 내지 12 xg 로 15분 내지 25분 조건, 보다 바람직하게는 10 xg로 20분 조건으로 수행될 수 있다.

[0022] 상기 고중력 환경 노출은 원심분리기를 사용하여 수행할 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명에 있어서, (b) 단계의 고중력 조건은 ii) 상기 i) 단계를 거친 세포를 0.5 내지 1.5 xg로 10분 내지 30분 간 방치하는 단계; 및 iii) 상기 i) 및 ii) 단계를 순서대로 1 내지 10회 반복하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 방치 단계는 바람직하게는 0.8 내지 1.2 xg로 15분 내지 25분 조건, 보다 바람직하게는 1 xg로 20분 조건으로 수행될 수 있으며, 상기 반복 단계는 최소 1회를 수행하고, 바람직하게는 1 내지 10회, 보다 바람직하게는 3회 내지 5회로 수행될 수 있다. 또한, 세포를 고중력 조건 하에 노출 시 마지막으로 고중력 조건에 노출시킨 후에는 추가적인 방치 단계를 두지 않을 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 배양 배지에서 배양된 것일 수 있으며, 상기 배양 배지는 동물 세포를 기르는데 필요한 영양소가 들어 있는 고체 또는 액체의 배양 기질을 제한 없이 포함한다. 바람직하게는, 일반적으로 세포 배양에 사용하는 DMEM을 사용할 수 있고, 세포 배양에 통상적으로 사용되는 혈청을 포함할 수 있다. 상기 혈청은 0.1 내지 20%의 우태아혈청(FBS)을 첨가할 수 있고, 추가적으로 항생제를 첨가할 수 있다. 항생제로는

페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin) 또는 폰지존(fungizone) 등의 통상 세포 배양에 사용되는 항생제를 사용할 수 있다.

- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 타겟 분자는 작은 극성 분자, 큰 극성 분자, 비극성 분자 및 세포막 수용체 친화성 분자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 상기 작은 극성 분자는 이온(H^+ , Na^+ , HCO_3^- , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Mg^{2+} 등), 아미노산(알라닌, 발린, 시스테인, 글라이신, 세린, 트레오닌, 히스티딘, 라이신, 아스파르트산, 글루탐산 등), 작은 펩타이드(카르노신, 엔서린, 아스파탐, 글루타티온, 엔케팔린, 엔지오텐신 II 등), 당당류(글루코스, 프룩토스, 갈락토스 등), 이당류(수크로오스, 말토스, 락토스 등) 및 올리고당류(라피노스, 스타키오스, 갈락토올리고당, 프룩토올리고당, 말토텍스트린 등) 중 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0027] 상기 큰 극성 분자는 긴 펩타이드(아미노산 20개 이상), 단백질(글루카곤, 멜리틴, 인슐린, 면역글로불린 G 등) 및 다당류(텍스트란, 키틴, 셀룰로오스, 녹말, 글리코젠 등) 중 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0028] 상기 세포막 수용체 친화성 분자는 각종 독소(toxins), 예를 들어, 콜레라 독소, 디프테리아 독소, 리친(ricin), 콘카나발린 A, 바이러스(아데노바이러스, 라우스 육종 바이러스(rous sarcoma virus) 등), 성장 호르몬, 프로락틴, 성장 인자(표피성장인자, 인터페론, 신경성장인자 등), 수송 단백질 및 항체(트랜스페린, 지질단백질, 면역글로불린 E, 중합체형 면역글로불린 A, 면역글로불린 G 등) 중 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 타겟 분자의 분자량은 1 내지 100kDa일 수 있으며, 평균 분자량 1,000Da 미만인 경우 작은 분자로, 1,000Da 이상인 경우 큰 분자로 분류될 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 RPMI 2650 세포 또는 코점막 상피세포(human primary nasal epithelial cell 또는 SV-40 바이러스를 이용한 immortalized nasal epithelial cell)일 수 있다.
- [0031] 상기 (a) 단계 및 (c) 단계에서 측정된 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 비교한 결과, 세포 주위 투과도가 10 내지 30% 증가된 경우 (b) 단계에서 설정한 고중력 조건에서 타겟 분자(약물)가 생체 외 효율적인 전달이 가능하다고 판단할 수 있다. 이에 따라, 본 발명에 의하면 서로 다른 성질 및 다른 분자량을 가진 타겟 분자(약물)에 적합한 고중력 조건에 관한 정보 제공이 가능하다.
- [0032] 또한, 본 발명은 (a) 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; (b) 상기 세포를 고중력 조건 하에 노출시키는 단계; (c) (b) 단계 이후, 타겟 분자의 세포 주위 투과도를 측정하는 단계; (d) (a) 단계 및 (c) 단계에서 측정된 세포 주위 투과도를 비교하는 단계; 및 (e) 비강 내 약물 전달 효능을 결정하는 단계를 포함하는 비강 내 약물 전달 효능을 평가하는 방법을 제공한다.
- [0033] 상기 비강 내 약물 전달 효능을 평가하는 방법의 또 다른 일례로는, 상기 세포를 고중력 조건 하에 노출시키는 단계; 및 상기 세포에서 발현된 접합 단백질 또는 β -액틴 유전자의 발현 수준을 분석하는 단계를 포함할 수 있으며, 상기 단백질 또는 유전자 발현 수준은 웨스턴 블롯(western blot), ELISA, FACS, RT-PCR, RT-qPCR, 노던 블롯(northern blot), DNA 칩, RNA 칩 또는 단백질 칩 분석 등을 포함하여 당업자에게 널리 알려진 다양한 방법으로 분석할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 방법에 의해 약물 전달 효능이 평가된 약물은 중추신경계를 타겟으로 한 약물 치료에 유용하게 사용될 수 있고, 예를 들면, 비강을 통한 약물 투약으로 알츠하이머, 치매, 뇌졸중, 뇌종양, 파킨슨병, 감정장애, AIDS, 바이러스성 및 세균성 뇌막염과 같은 뇌질환 치료에 이용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0036] (1) 본 발명은 서로 다른 성질(극성, 비극성, 세포막 수용체친화성) 및 다른 분자량을 갖는 물질(약물)의 세포 투과도를 시험할 수 있는 방법론을 제시한다.
- [0037] (2) 본 발명에 따르면, 고중력 자체가 약물 전달물에 미치는 영향을 배제하면서, 고중력에 의한 세포 장벽기능 변화에 따른 약물 투과도 변화를 측정하여 약물의 투과성을 증진시키기 위한 고중력 범위를 선별할 수 있다.
- [0039] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 한편, 제시된 모든 측정치는 적어도 3회 이상 독립적으로 반복되었으며, 결과는 평균값의 평균 $\pm$ 표준 오차로 나타내었다. 고중력 노출군 및 정적 대조군 간 통계학적 유의성 검

정은 student' s *t*-test를 사용하여 결정하였다.

[0041] **실시예 1. 세포 배양**

[0042] **1-1. RPMI 2650 세포의 배양**

[0043] RPMI 2650 세포는 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. RPMI 2650 세포는 37℃에서 5% CO₂ 조건으로 T75 플라스크에서 배양하였다. 10% FBS(Gibco) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco)으로 보충된 DMEM(Dulbeco' s modified Eagle' s medium; Gibco, Carlsbad, CA, USA) 배지를 배양 배지로 사용하였다.

[0044] 고중력 노출을 위해 RPMI 2650 세포(passage 48)를 T75 플라스크에서 트립신(Trypsin) 처리한 후 300,000개 세포/웰의 밀도로 24mm 트랜스웰 필터 인서트(CT3450, Corning, NY, USA)에 시딩(seeding)하였다. 이를 4일 동안 액체-액체 경계면(liquid-liquid interface)에서 배양한 후, tight barrier를 형성하기 위하여 3일 동안 기체-액체 경계면(air-liquid interface)에서 배양하였다. 상기 기체-액체 경계면 배양방법은 세포의 한쪽 면을 공기와 직접 맞닿게 하여 표피세포가 극성을 띠게 함으로써 실제 생체 환경과 유사한 장벽 기능을 모사하기 위한 것이다. 액체-액체 경계면 배양을 위하여 1.5mL 및 2.6mL의 배양 배지(culture media)를 첨부(apical)와 기저측부(basolateral)에 각각 첨가하였다. 기체-액체 경계면 배양의 경우, 첨부에서 배지를 제거하였다. 배양 배지는 이틀에 한번 교체하였다.

[0046] **1-2. hNE 세포의 배양**

[0047] 만성 비염으로 인해 코선반 절제술(turbinectomy)을 시행한 환자들로부터 비강의 하 비갑개 조직(nasal inferior turbinate tissue) 샘플을 얻었다. 모든 방법은 관련 지침 및 규정에 따라 수행되었으며 모든 실험 프로토콜은 인하대학교 기관생명윤리위원회(INHAUH 2017-03-018-001)의 승인을 받아 수행하였다.

[0048] 일차 체외 이식 기술(primary explant technique)을 사용하여 조직 샘플로부터 hNE 세포(사람 코점막 상피세포)를 분리하고, 반복적인 스크래핑(scraping) 및 트립신 처리를 통해 섬유아세포를 제거하였다. 분리된 hNE 세포를 타입 I 콜라겐(Gibco)으로 코팅된 T25 플라스크에서 37℃에서 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. BPE(bovine pituitary extract, Gibco) 30 µg/mL, 재조합 인간 상피세포 성장인자(Gibco) 5 ng/mL 및 겐타마이신(gentamicin; Sigma, St Louis, MO, USA) 5 µg/mL을 함유하는 K-SFM(Keratinocyte serum-free medium) 배지를 배양 배지로 사용하였고, 이틀에 한번 교체하였다.

[0049] 고중력 노출을 위해 hNE 세포(passages 3 및 4)를 트립신 처리한 후 30,000개 세포/cm²의 밀도로 4.55 cm² 세포 배양 슬라이드(SPL Life Science, Gyeonggi-do, Korea)에 시딩(seeding)하고 이를 1-2일 동안 배양하였다.

[0051] **실시예 2. 고중력 노출**

[0052] 상기 실시예 1에 따라 배양한 RPMI 2650 세포 및 hNE 세포를 사용하여 다음과 같은 고중력 노출 실험을 수행하였으며, 세포에 10 × g의 중력 조건을 적용하기 위하여 원심분리기(Fleta 5, Hanil, Seoul, Korea)를 사용하였다. 먼저, RPMI 2650 세포는 고중력 조건에 20분간 총 3회 노출시켰고, 고중력 조건에 노출 후 중간에 1 x g에서 20분의 휴식 시간을 두었다. 이와 같은 고중력 자극 프로토콜을 도 1에 나타내었다. RPMI 2650 세포는 투과도 분석을 제외하고는 고중력 자극 동안 기체-액체 경계면으로 유지되었다. hNE 세포 역시 동일한 고중력 자극 프로토콜로 고중력 조건에 노출시켰으나, 마지막 20분의 휴식 시간은 두지 않았다. 대조군 세포들은 고중력 조건에 노출시키지 않고 별도로 배양하였다.

[0054] **실시예 3. 고중력 노출에 따른 세포 증식 분석**

[0055] 고중력 노출에 따른 세포 증식 정도를 분석하기 위하여 Cell counting kit-8(CCK-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 사용하여 하기의 실험을 수행하였다. 2시간 동안의 고중력 자극 프로토콜 완료 후, 기저측부의 배양 배지를 제거하고 CCK-8 용액 100 µL를 첨부에 첨가하여 37℃ 인큐베이터에서 1시간 동안 배양하였다.

배양 후 배양 배지만 건어서 96-웰 플레이트에 옮겨 마이크로 플레이트 리더(Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 O.D값을 450nm에서 측정하였다. 고중력 노출 군의 흡광도 값을 대조군의 흡광도 값으로 표준화하여 상대적인 세포 증식 정도를 분석하였다. 상대적인 세포 증식률은 대조군(n=3)에 대한 고중력 노출군의 흡광도를 표준화하여 계산하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0056] 도 2에 나타낸 바와 같이, 대조군에 비하여 고중력 노출 군에서 세포 증식이 통계적으로 유의하게 감소함을 확인하였다. 실험군의 대사 활성 역시 대조군에 비하여 6.5% 감소함을 확인하였다(p<0.01).

[0058] 실시예 4. 고중력 노출에 따른 TEER 측정

[0059] 세포의 밀착 연결(tight junction)에 의해 형성된 저항을 측정하는데 사용하는 TEER(Transepithelial electrical resistance) 측정을 수행하였다. TEER 값은 고중력 노출에 따른 세포 장벽 기능 변화를 분석하기 위하여 막에 의한 전기저항을 나타내는 값을 의미한다.

[0060] Voltohmmeter(Millicell-ERS, EMD Millipore, Billerica, MA, USA)에 연결된 Endohm-24 조직 저항 측정 챔버(WPI, Sarasota, FL, USA)를 이용하여 RPMI 2650 세포층을 횡단하는 TEER를 측정하였다. TEER 값은 세포 장벽 기능의 존재를 확인하기 위하여 7일 동안 매일 측정하였다. 또한, 세포 장벽 기능의 변화(perturbation)에 있어서 고중력이 미치는 영향을 확인하기 위하여 고중력 조건 노출 전후로 TEER를 측정하였다. 기체-액체 경계면에서 TEER를 측정하기 위하여, 1.5mL 배양 배지를 챔부에 첨가하고 TEER 측정 직후에 제거하였다. RPMI 2650 세포층에서 측정된 TEER 값은 보정된 TEER 값을 얻기 위하여 세포가 없는 트랜스웰 인서트(cell-free transwell insert)의 TEER 값으로 뺐다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0061] 도 3의 A에 나타낸 바와 같이, 기체-액체 경계면은 시딩 4일 후 형성되었고, 고중력 자극 프로토콜은 기체-액체 경계면 형성 3일 후 수행하였다. 이 때, TEER 값은 액체-액체 경계면 조건에서 $20 \Omega \times \text{cm}^2$ 까지 증가하지만, 기체-액체 경계면에서 급격히 증가하여 $50 \Omega \times \text{cm}^2$ 에 도달함을 확인하였다. 또한, 도 3의 B에 나타낸 바와 같이, 고중력 조건 노출 전 대조군 및 실험군의 TEER 값은 각각 45.4 및 $45.7 \Omega \times \text{cm}^2$ 였으며, 2시간의 고중력 자극 프로토콜 완료 후에는 실험군의 경우 TEER 값이 $39.7 \Omega \times \text{cm}^2$ (p<0.001)로 유의하게 감소한 반면, 대조군은 통계적으로 유의한 변화를 보이지 않음을 확인하였다.

[0063] 실시예 5. 고중력 노출에 따른 세포 투과도 분석

[0064] 고중력 노출에 따른 작은 극성 분자, 큰 극성 분자 및 세포막 수용체 친화성 분자의 세포 주위 투과도(paracellular permeation)를 분석하기 위하여 NaFI(Sigma), FD-4(평균 분자량 4000 Da; Sigma) 및 fluorescein-labeled jacalin(FL-1151, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 각각 마커로 사용하였다. 고중력 자체가 마커 분자의 이동 속도에 미치는 영향을 배제하기 위하여 마커 분자가 포함된 donor 용액을 챔부 대신 기저측부에 첨가하였다.

[0065] 고중력 조건에 노출시키기 전에, NaFI(25 $\mu\text{g/mL}$), FD-4(500 $\mu\text{g/mL}$) 및 fluorescein-labeled jacalin(20 $\mu\text{g/mL}$) 2.6mL를 기저측부에 첨가하였고, 챔부에 1.5mL 배양 배지를 첨가하였다. 2시간 동안의 고중력 자극 프로토콜 완료 후, 챔부에서 100 μL 샘플을 얻었다. 챔부에 침투한 NaFI, FD-4 및 fluorescein-labeled jacalin의 양은 형광 플레이트 리더 (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 NaFI 및 FD-4의 경우 460/515 nm, fluorescein-labeled jacalin의 경우 495/520 nm의 여기/방출 파장을 사용하여 측정하였다. Apparent permeation coefficient(P_{app})는 다음 식(1)에 따라 계산하였다:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} / (C_0 \times A) \quad (1)$$

[0067] 여기서 dQ/dt 는 RPMI 2650 세포층을 횡단하는 각 물질의 흐름($\mu\text{g/s}$), C_0 는 초기 donor 농도($\mu\text{g/mL}$) 및 A는 표면적(cm^2)이다. 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Target marker	Control	Hypergravity	Blank filter
NaFI	5.429 ± 0.081	6.465 ± 0.108 ($p = 0.00154$)	15.356 ± 0.348
FD-4	2.093 ± 0.010	2.427 ± 0.058 ($p = 0.00471$)	7.942 ± 0.300
Fluorescein-labeled jacalin	0.756 ± 0.091	0.774 ± 0.158	2.572 ± 0.016

표 1에 나타난 바와 같이, NaFI 및 FD-4의 경우 고중력 조건에 따라 RPMI 2650 세포층에 대한 투과속도가 변화하였음을 확인하였다. 대조군의 평균 P_{app} 는 NaFI가 $5.429 \times 10^{-6} \pm 0.081 \times 10^{-6}$ cm/s 이고 FD-4가 $2.093 \times 10^{-6} \pm 0.010 \times 10^{-6}$ cm/s으로 나타난 반면, 고중력에 노출된 실험군의 경우 NaFI가 $6.465 \times 10^{-6} \pm 0.108 \times 10^{-6}$ cm/s ($p < 0.01$) 이고 FD-4가 $2.427 \times 10^{-6} \pm 0.058 \times 10^{-6}$ cm/s($p < 0.01$)로 현저히 증가함을 확인하였다. 한편, Fluorescein-labeled jacalin의 경우 대조군 ($0.756 \times 10^{-6} \pm 0.091 \times 10^{-6}$ cm/s) 및 실험군 ($0.774 \times 10^{-6} \pm 0.158 \times 10^{-6}$ cm/s) 사이에 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않음을 확인하였다. 이를 통해, 본 발명에서 설정한 고중력 범위에 노출되는 경우 비강 내에서 작은 극성 분자 및 큰 극성 분자의 투과성이 증진될 수 있음을 확인하였다.

실시예 6. 고중력 노출에 따른 세포골격 구조 변화 분석

고중력 노출에 따른 세포골격(cytoskeleton) 구조 변화를 분석하기 위하여 형광 현미경을 사용하여 hNE 세포의 세포골격 변화를 관찰하였다. 2시간 동안의 고중력 자극 프로토콜 완료 후, 배양 배지를 제거하고 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline; Gibco)로 hNE 세포를 씻어주었다. 다음으로, 4% 파라포름알데하이드(Sigma)로 상기 세포들을 고정시키고 Triton X-100을 사용하여 세포투과(permeabilization)시켰다. 상기 hNE 세포를 AlexaFluor 488 conjugated phalloidin (ab176753, Abcam, Cambridge, UK)과 함께 1시간 동안 배양하였다. 염색된 세포를 DPBS로 두 번 더 세척하고 대조 염색을 위해 DAPI가 함유된 마운팅 용액(Vectashield H-1200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 고정시켰다. CCD 카메라(DP80, 올림푸스)와 함께 도립형 현미경 (CKX 53, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 형광 이미지를 얻고 이를 cellSens 소프트웨어(Olympus)를 사용하여 처리하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

도 4의 A 및 B에 나타난 바와 같이, 액틴 필라멘트는 핵을 둘러싸고 있으며, 고중력에 노출된 세포(B)보다 대조군 세포(A)에서 액틴 필라멘트가 더 뚜렷이 관찰됨을 확인하였다. 이를 통해 2시간 동안의 고중력 자극에 따라 세포골격 구조 배열이 변경되고 면역형광 강도 역시 감소함을 확인하였다.

실시예 7. 고중력 노출에 따른 접합 단백질 및 β-액틴 유전자 발현 분석

접합 단백질과 β-actin의 유전자 발현에 대한 고중력 노출 효과를 분석하기 위하여 RT-qPCR을 수행하였다. 2시간 동안의 고중력 자극 프로토콜 완료 후, TRIzol 시약(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 제조 회사의 프로토콜에 따라 총 RNA를 추출 하였다. 추출된 RNA의 농도는 마이크로 분광 광도계(microspectrophotometer, DS-11, DeNovix, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 측정하였다. 각 RNA 샘플(1 μg)은 PrimeScript RT 시약 키트(Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 cDNA로 역전사되었다. RT-qPCR은 PerfeCTa SYBR Green SuperMix(QuantaBiosciences, Beverly, MA, USA)와 함께 CFX96 detection system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 타겟 유전자는 밀착연접(tight junction)관련 유전자인 claudin-1 (CLDN-1), occludin (OCLN), zonula occludens-1 (zo-1), cadherin-1 (CDH-1) 및 β-액틴이었으며, GAPDH를 하우스 키핑 유전자로 사용하였다. 타겟 유전자에 대한 각각의 프라이머를 하기 표 2에 나타내었다(a: base pair, b: 녹는점(°C)).

표 2

Target gene	Size (bp ^a)	Sequences	T _m ^b
GAPDH	120	F: GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG R: GAGCCCCAGCCTTCTCCATG	61.23 62.62
CLDN-1	92	F: TGGTCAGGCTCTCTTCACTGG R: AGGTTGTTTTTCGGGGACAGG	61.44 60.75
OCLN	115	F: CTTCATTAACCTTCGCCTGTGGR: TCTTTGACCTTCCTGCTCTTCC	59.58 59.96
ZO-1	76	F: ACAGCCAGCCGTTAGTCACCR: GTATGGGAGTTGGGGTTCATAGG	62.45 60.18
CDH-1	78	F: GCTGGACCGAGAGAGTTTCCR: GTTGTGCTTAACCCCTCACC	60.11 58.76
β-actin	122	F: GTCATTCCAAATATGAGATGCGTTGR: TGCTATCACCTCCCCTGTGT	59.09 60.25

[0078] 상대적인 mRNA 발현 수준은 $2^{(-\Delta \Delta CT)}$ 방법을 사용하여 계산하였다. 용융 곡선 분석은 프라이머 이량체와 같은 원치 않는 PCR 산물의 형성을 확인하기 위해 수행되었다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

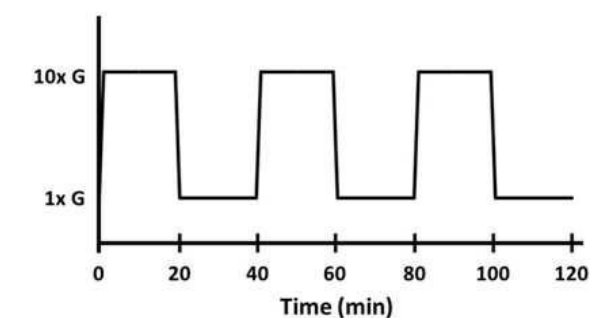
[0079] 도 5에 나타난 바와 같이, 밀착연접 관련 유전자 중 CLDN-1 유전자는 대조군 보다 고중력 노출 실험군에서 1.36 배 높게 발현됨을 확인하였다($p < 0.01$). OCLN 유전자 역시 발현이 27% 증가하였으나, 통계적으로 유의한 증가는 아닌 것으로 확인하였다. ZO-1 유전자의 경우 발현에 변화가 전혀 나타나지 않음을 확인하였다. 세포 부착에 중요한 역할을 하는 CDH-1 유전자의 경우, 고중력 노출 후에도 발현 수준에 변화가 없음을 확인하였다. 반면, β-액틴 유전자는 고중력 노출 후 발현이 49%로 현저히 증가함을 확인하였다($p < 0.05$). 이를 통해 고중력 노출에 따라 일부 접합 단백질과 β-액틴의 유전자 발현이 상향 조절됨을 확인하였다.

[0081] 상기 실시예를 통하여, 본 발명에서 설정한 고중력 범위에 노출되는 경우 비강 내에서 작은 극성 분자 및 큰 극성 분자의 투과성이 증진되고, 세포골격 구조 배열이 변경되며, 일부 접합 단백질과 β-액틴의 유전자 발현이 상향 조절됨을 확인하였다. 즉, 비강 점막을 통한 약물 투여에 있어서 본 발명에서 선별한 고중력 범위를 사용하면 서로 다른 성질 또는 크기를 가진 약물의 세포 투과도를 손쉽게 시험할 수 있고, 이를 통해 생체 외에서 비강 내 약물 전달 효능을 평가하여 보다 효율적인 약물 전달 시스템 개발에 널리 활용될 수 있음을 확인하였다.

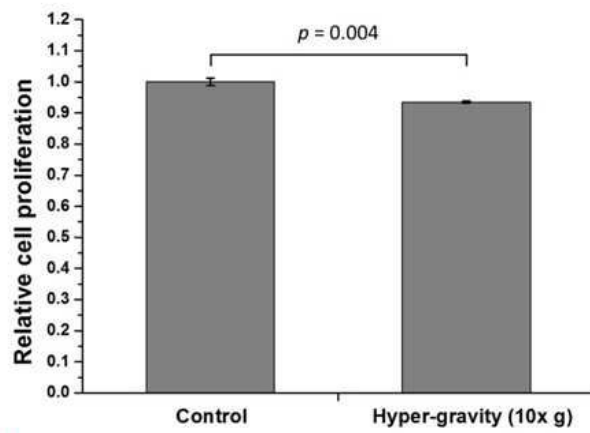
[0083] 이상, 본 발명의 바람직한 실시 예에 대하여 상세히 설명하였으나, 본 발명의 기술적 범위는 전술한 실시 예에 한정되지 않고 특허청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이다. 이때, 이 기술분야에서 통상의 지식을 습득한 자라면, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않으면서도 많은 수정과 변형이 가능함을 고려해야 할 것이다.

도면

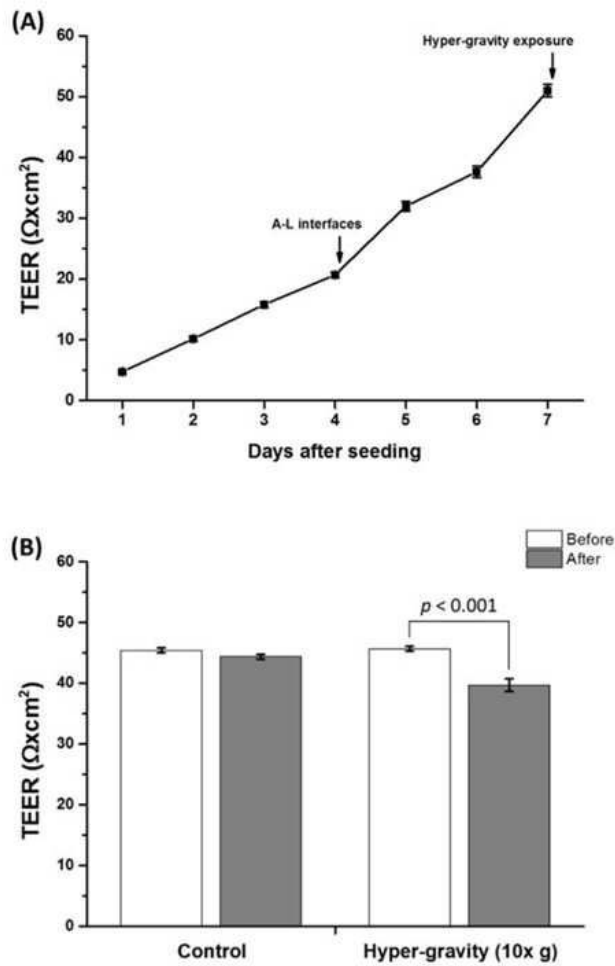
도면1



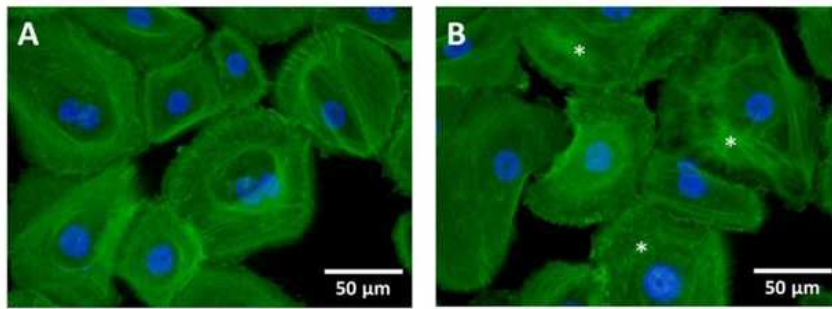
도면2



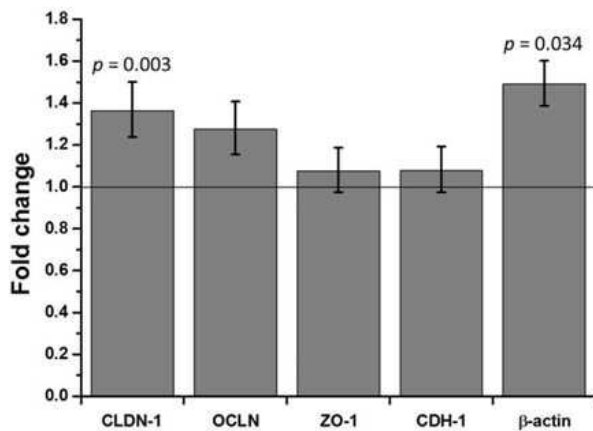
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Inha University Research and Business Foundation
- <120> METHOD FOR ENHANCING NASAL DRUG DELIVERY EFFICIENCY USING
HYPERGRAVITY
- <130> INHA1-248
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GAPDH forward primer
- <400> 1
- gaaatcccat caccatcttc cagg
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH reverse primer

<400> 2

gagccccagc cttctccatg 20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CLDN-1 forward primer

<400> 3

tggtcaggct ctcttcactg g 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CLDN-1 reverse primer

<400> 4

aggttggtttt tcggggacag g 21

<210> 5

<211>

> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OCLN forward primer

<400> 5

cttcattaa cttcgctgt gg 22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OCLN reverse primer

<400> 6

tctttgacct tctgctctt cc 22

<210> 7

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZO-1 forward primer
 <400> 7
 acagccagcc gttagtcacc 20

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZO-1 reverse primer
 <400> 8
 gtatgggagt tggggttcatt agg 23

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDH-1 forward primer
 <400> 9
 gctggaccga gagagtttcc 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDH-1 reverse primer
 <400> 10
 gttgtgctta acccctcacc 20

<210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta-actin forward primer
 <400> 11

gtcattccaa atatgagatg cgttg	25
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> beta-actin reverse primer	
<400> 12	
tgctatcacc tcccctgtgt	20