



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0019014
(43) 공개일자 2008년02월29일

(51) Int. Cl.

A61K 47/36 (2006.01) A61K 47/40 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7029819

(22) 출원일자 2007년12월20일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2007년12월20일

(86) 국제출원번호 PCT/ES2006/000322

국제출원일자 2006년06월01일

(87) 국제공개번호 WO 2006/128937

국제공개일자 2006년12월07일

(30) 우선권주장

P200501331 2005년06월02일 스페인(ES)

(71) 출원인

유니버시다데 데 산티아고 데 콤포스텔라

스페인, E-15782 산티아고 데 콤포스텔라, 캠퍼스 수르, 에디피시오 각투스

(72) 발명자

알론소 페르난데스, 엠에이 호세

스페인, E-15782 산티아고 데 콤포스텔라, 캠퍼스 유니버시타리오 수르, 에디피시오 각투스

가르시아 푸엔테스, 마르코스

스페인, E-15782 산티아고 데 콤포스텔라, 캠퍼스 유니버시타리오 수르, 에디피시오 각투스

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김용준, 배윤정

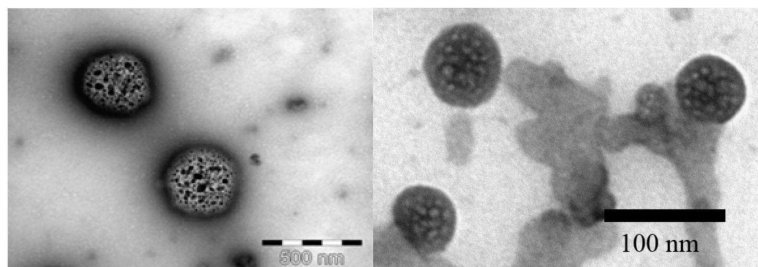
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 키토산 및 사이클로덱스트린을 포함하는 나노입자

(57) 요약

본 발명은 생물학적으로 활성인 분자들의 방출을 위해 설계된, 나노입자들을 포함하는 시스템에 관한 것으로, 여기에서 상기 나노입자들은 다음을 포함한다: (a) 적어도 40중량%의 키토산 또는 그의 유도체, 및 (b) 60중량% 미만의 사이클로덱스트린 또는 그의 유도체, 여기에서 상기 두 성분들 a) 및 b) 모두, 그들 사이의 공유결합 없이 혼합된다. 이러한 본 발명의 시스템은 생물학적으로 활성인 분자의 효과적인 연합, 및 적합한 생물학적 환경 중에서 그의 순차적인 방출을 가능하게 한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

마에스트렐리, 프란세스카

스페인, E-15782 산티아고 데 콤포스텔라, 캠퍼스
유니버시타리오 수르, 에디피시오 각투스

무라, 파올라

스페인, E-15782 산티아고 데 콤포스텔라, 캠퍼스
유니버시타리오 수르, 에디피시오 각투스

특허청구의 범위

청구항 1

생물학적으로 활성인 분자들의 방출을 위한, 나노입자들을 포함하는 시스템에 있어서, 상기 나노입자들이 a) 적어도 40중량%의 키토산 또는 그의 유도체 및 b) 60중량% 미만의 사이클로덱스트린 또는 그의 유도체를 포함하며, 상기 두 성분 a) 및 b)가, 그들 사이에 어떤 공유결합도 없이, 혼합된 시스템.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 나노입자들이, 나노 구조체들의 형태의 키토산을 이온적으로 가교결합할 수 있는 음이온성 염을 더 포함하는 시스템.

청구항 3

제 1 항 및 제 2 항에 있어서, 키토산 또는 그의 유도체의 비가 적어도 40중량% 내지 95.5중량% 인 시스템.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항에 있어서, 사이클로덱스트린 또는 그의 유도체의 비가, 키토산에 대해, 0.5중량% 내지 60중량% 미만인 시스템.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항에 있어서, 키토산의 중합도, 또는 키토산 또는 그의 유도체를 형성하는 단량체 단위의 수가 5 내지 5,000, 바람직하게는 30 내지 600인 시스템.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항에 있어서, 키토산 또는 그의 유도체가 1 내지 2,000 kDa, 바람직하게는 5 내지 500 kDa, 보다 바람직하게는 5 내지 200 kDa의 분자량을 갖는 시스템.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항에 있어서, 키토산 또는 그의 유도체가 30% 내지 95%, 바람직하게는 50% 내지 95%의 탈아세틸화도를 갖는 시스템.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항에 있어서, 사이클로덱스트린이 천연 사이클로덱스트린 (알파, 베타 또는 감마), 히드록시프로필 사이클로덱스트린, 카르복시메틸사이클로덱스트린, 술포부틸사이클로덱스트린, 아미노사이클로덱스트린, 디메틸사이클로덱스트린, 사이클로덱스트린 포스페이트, 히드록시에틸사이클로덱스트린, 아세틸-사이클로덱스트린, 에틸사이클로덱스트린, 트리메틸사이클로덱스트린, 카르복시에틸사이클로덱스트린, 글루코실사이클로덱스트린, 6-O- α -말토실사이클로덱스트린, 부틸-사이클로덱스트린, 술페이트 사이클로덱스트린, N,N-디에틸아미노에틸사이클로덱스트린, tert-부틸실릴사이클로덱스트린, 실릴[(6-O-tert-부틸디메틸)-2,3,-디-O-아세틸]-사이클로덱스트린, 숙시닐-(2-히드록시프로필)-사이클로덱스트린, 숙시닐-사이클로덱스트린, 술포프로필-사이클로덱스트린, 폴리사이클로덱스트린으로부터 선택된 시스템.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 사이클로덱스트린이 히드록시프로필- α -사이클로덱스트린, 히드록시프로필- β -사이클로덱스트린, 술포부틸에틸- β -사이클로덱스트린 또는 그의 혼합물인 시스템.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항에 있어서, 사이클로덱스트린이 4.2 내지 7의 평균 치환도를 나타내는 시스템.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항에 있어서, 추가적으로, 저분자량 약물, 다당류, 단백질, 펩티드, 지질, 올리고뉴클레오

티드, 핵산 및 이들의 조합에 의해 형성된 군으로부터 선택된 생물학적으로 활성인 분자를 포함하는 시스템.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항에 있어서, 생물학적으로 활성인 분자가, FDA에 의해 채택된 생약학적 분류 시스템의 정의에 따라, 클래스(class) 2, 3 또는 4 약물이며, 바람직하게는 클래스 4 약물인 시스템.

청구항 13

제 2 항에 있어서, 가교제가 폴리포스페이트 염으로, 바람직하게는 나트륨 트리폴리포스페이트인 시스템.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항에 있어서, 나노입자들의 평균 크기가 1 내지 999nm, 바람직하게는 100 내지 800 nm 인 시스템.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항에 있어서, 1mM KCl 에서 측정된 전하가 (Z 전위) 0 내지 +60 mV 인 시스템.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 정의된 것과 같은 시스템 및 질병을 예방, 완화 또는 치료할 수 있는 생물학적으로 활성인 분자를 포함하는 약학 조성물.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 경구, 구강, 설하, 국소, 경피, 눈, 코, 질 또는 비경구 경로에 의한 투여되는 조성물.

청구항 18

제 16 항 및 제 17 항에 있어서, 생물학적으로 활성인 분자가 다당류, 단백질, 펩티드, 지질, 핵산-기체 분자 및 그의 조합으로부터 선택된 조성물.

청구항 19

제 16 항 내지 제 18 항에 있어서, 생물학적으로 활성인 분자가, FDA에 의해 채택된 생약학적 분류 시스템의 정의에 따라, 클래스 2, 3 또는 4 약물인 조성물.

청구항 20

제 16 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적으로 활성인 분자가 트리클로산, 푸로세미드(furosemide), 인슐린, 헤파린 또는 핵산으로 구성된 분자들인 조성물.

청구항 21

제 1 항 내지 제 10 항 및 제 13 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 정의된 것과 같은 시스템 및 미용적으로 활성인 분자를 포함하는 미용 조성물.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 미용적으로 활성인 분자가, 향여드름제, 향진균제, 향산화제, 데오도란트(deodorants), 발한억제제, 비듬억제제, 피부 미백제, 태닝 로션(tanning lotions), UV 흡수제, 효소, 미용용 살생제(cosmetic biocide)로부터 선택된 미용 조성물.

청구항 23

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 정의된 것과 같은 생물학적으로 활성인 분자의 방출을 위한 시스템 및 항원을 포함하는 백신.

청구항 24

제 23 항에 있어서, 항원이 단백질, 다당류 및 DNA 분자로부터 선택된 백신.

청구항 25

다음 단계들을 포함하는, 제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 따른, 생물학적으로 활성인 분자의 제어된 방출을 위해 설계된 시스템의 수득 방법:

- a) 수성 매질 중 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중의, 키토산 또는 그의 유도체의 용액 제조;
- b) 수성 매질 중 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중의, 사이클로덱스트린 또는 그의 유도체, 및 임의로 가교제의 용액 제조; 및
- c) 키토산-사이클로덱스트린의 나노입자들이 자발적으로 수득되도록 단계 a) 및 b)의 용액들을 교반 하에 혼합, 또는, 임의로:
 - a) 수성 매질 중 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중의, 키토산 또는 그의 유도체 및 사이클로덱스트린 또는 그의 유도체의 용액의 제조;
 - b) 수성 매질 중 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중의, 가교제 용액의 제조;
 - c) 키토산-사이클로덱스트린의 나노입자들이 자발적으로 수득되도록 단계 a) 및 b)의 용액들을 교반 하에 혼합.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 가교제가 트리폴리포스페이트, 바람직하게는 나트륨 트리폴리포스페이트인 나노입자의 수득 방법.

청구항 27

제 25 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적으로 활성인 분자가 단계 a) 또는 b)에서 미리 용해되거나, 또는 a) 또는 b)에 첨가되는 다른 수상 또는 유기상 중에 용해되는 방법.

청구항 28

제 25 항에 있어서, 생물학적으로 활성인 분자가 다당류, 단백질, 펩티드, 지질, 핵산-기재 분자들 및 그들의 조합으로부터 선택된 방법.

청구항 29

제 25 항 및 제 28 항에 있어서, 생물학적으로 활성인 분자가, FDA의 생약학적 분류 시스템에 따라, 클래스 2, 3 또는 4 의 약물이고, 바람직하게는 클래스 4 의 약물인 방법.

청구항 30

제 28 항 및 제 29 항에 있어서, 생물학적으로 활성인 분자가 트리클로산, 푸로세미드, 인슐린, 헤파린 또는 DNA 플라스미드인 방법.

청구항 31

제 1 항 내지 제 15 항에 기재된 것과 같은 시스템의, 유전자 치료 약물의 제조에의 용도.

명세서

기술 분야

<1> 본 발명은 생물학적으로 활성인 분자들의 방출을 위해 설계된 나노입자 시스템에 관한 것이다. 특히적으로, 본 발명은, 생물학적으로 활성인 분자가 위치될 수 있는, 중합체 키토산 및 사이클로덱스트린의 혼합물로 구성된 나노입자 시스템, 및 그의 수득 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 중합성 나노입자들은, 그들의 안정성 개선 및 약물의 신체 특정 부위로의 이송 및 제어된 방출을 촉진하여, 상

피 장벽의 제한된 투과성과 연관된 문제들을 극복하는 가능성으로 인해, 특히 주목을 받고 있다. 생분해성 중합체들 중, 키토산은 그의 점막 접착제(C.-M. Lehr, J. A. Bouwstra, E. H. Schacht, 및 H. E. Junginger, *Int. J. Pharm.*, 1992, 78, 43-48) 및 흡수 촉진제(P. Artursson, T. Lindmark, S. S. Davis, 및 L. Illum, *Pharm. Res.*, 1994, 11, 1358-1361)로서의 성질로 인해, 최근 몇 년 동안 큰 주목을 받아왔다. 또한, 과학적 연구들은, 키토산을 허용가능한 독성학적 프로파일을 갖는 물질로서 인정하며(S. B. Rao 및 C. P. Sharma, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997, 34, 21-28), 이는 FDA에 의해 동물 음식물예의 첨가제로서 이미 허용된 것이다(J. D. McCurdy, *Advances in Chitin and 키토산*, Elsevier Applied Science, London, 1992, pp. 757-764). 키토산 [α (1-4) 2-아미노-2-데옥시- β -D-글루칸]은 키토의 탈아세틸화의 결과로 수득되는 천연 다당류이다. 그러나, 실제로, 영양 보충제로서 또는 의약적 적용에 사용되는 키토산은 아세틸화 단량체 및 탈아세틸화 단량체의 임의 중합체이다.

- <3> 키토산의 나노입자는 다수의 치료성 분자들의 경점막(transmucosal) 투여를 위한 담체로서 널리 연구되어 왔다(A. M. De Campos, Y. Diebold, E. L. Carvalho, A. Sanchez, 및 M. J. Alonso, *Pharm. Res.*, 2004, 21, 803-810; R. Fernandez-Urrusuno, P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J. L. Vila-Jato, 및 M. J. Alonso, *Pharm. Res.*, 1999, 16, 1576-1581; A. Prokov, E. Kozlov, G. W. Newman, 및 M. J. Newman, *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 78, 459-466; A. Vila, A. Sanchez, K. Janes, I. Behrens, T. Kissel, J. L. Vila-Jato, 및 M. J. Alonso, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 57, 123-131). 이들 입자 시스템들의 주목할만한 특징은 저투과성 분자들의 흡수 특성을 개선시키는 능력이다(R. Fernandez-Urrusuno, P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J. L. Vila-Jato, 및 M. J. Alonso, *Pharm. Res.*, 1999, 16, 1576-1581; A. Vila, A. Sanchez, K. Janes, I. Behrens, T. Kissel, J. L. Vila-Jato, 및 M. J. Alonso, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 57, 123-131). 키토산의 나노입자들이 친수성 약물과 효과적으로 연합할 수 있음이 밝혀졌지만, 이들 시스템은 대개 소수성 약물들, 특히 낮은 수용성을 지닌 것들의 연합에 대한 제한을 나타낸다. 현재, 매우 낮은 수용성 약물과 키토산 나노입자의 사용에 관해서는 단지 하나의 참조문헌만을 발견할 수 있었지만(A. M. De Campos, A. Sanchez, 및 M. J. Alonso, *Int. J. Pharm.*, 2001, 224, 159-168), 상기 연구에서도 유기 용매의 이용을 요구하는 제조 방법이 필수적이었다.
- <4> 한편, 사이클로덱스트린은 저용해도 분자에 대한 착화제 및 활성제들의 투여를 위한 담체로서 알려져 있다. 그들 중, 화학적으로 개질된 사이클로덱스트린은 현재, 그의 큰 화학적 용통성으로 인해, 약학 기술에서 가장 널리 사용되고 있다. 예로서, 히드록실의 메틸, 히드록시프로필 또는 카르복시메틸기에 의한 치환은 분자에 보다 큰 수가용성 및 더 나은 독성 특성을 부여한다. 다른 사이클로덱스트린은 착화합물에 제한된 용해성(서방성 시스템의 제형에 사용됨) 또는 온도-의존성 용해성을 부여하는 것을 가능하게 한다.
- <5> 최근, 사이클로덱스트린의 약학 부형제로서의 기타 잠재적인 이용성이 증명되어 왔다. 따라서, 사이클로덱스트린에서의 착화반응은 특정 불안정한 약물의 분해 동역학 또는 인슐린과 같이 불활성 펩티드 응집체를 형성하는 경향을 감소시킬 수 있는 것으로 입증되었다. 또한, 어떤 사이클로덱스트린은, 그의 지질의 착화 반응의 결과로서 세포막에서 약간의 구조해체를 일으킨다는 사실로 인하여, 약물의 흡수를 증진시키는 능력을 갖는 것으로 나타났다.
- <6> 사이클로덱스트린 및 키토산의, 용액 중 중합체, 겔 또는 고체 거대(macrosopic) 매트릭스로서의 공동 사용을 개시하는 다양한 문헌들이 있다(US2002150616, US5476654, US5330764, US6677346, US6497901, US5849327). 미국 특허 출원 US2002150616은 저용해성 약물, 사이클로덱스트린 및 친수성 중합체로 이루어지는 혼합물을 제안한다. EP0730869는 중합체 및 사이클로덱스트린의 혼합물들로 구성된 약물 방출 시스템을 개시한다.
- <7> 문헌 US5843347, US5840341 및 US5639473은 용액 형태, 거대 입자들 또는 마이크로입자들 형태의 중합체 조성물을 개시한다. 입자들의 형성에 대해 설명된 방법들, 예컨대 사출(US5843347) 또는 유중수(water-in-oil) 에멀션의 형성(US5639473)은 수 마이크로미터 보다 더 작은 입자들의 제조를 가능하게 하지 못한다.
- <8> WO9961062 호는 사이클로덱스트린을 이용한 중합성 마이크로입자들의 제조에 관한 것으로, 상기 사이클로덱스트린은, 중합체 매트릭스와의 잠재적으로 바람직하지 않은 상호작용으로부터 약물을 보호하는 기능을 갖는다. 특허 US6630169 호는 경점막 경로에 의한 백신 담체로서 미세구조의 형성을 개시한다.
- <9> 특허 US5639473 호는 이황(disulphur)기와의 가교결합에 의한 친수성 중합체(예컨대, 키토산) 또는 올리고당류(예컨대, 사이클로덱스트린)의 변형에 관한 것이다. 상기 발명의 설명에 따르면, 제안된 방법으로 0.1 내지 20 마이크로미터의 입자 시스템이 얻어진다.

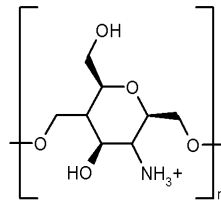
- <10> W003027169 호는 사이클로텍스트린이 공유결합된 친수성 중합체 유도체의 형성 및 약학 시스템 (마이크로- 및 나노입자 포함)의 형성을 위한 그의 용도를 개시한다.
- <11> 특허 US619757 호는 매트릭스를 구성하는 다당류 또는 올리고당류의 에멀션 중의 가교결합을 포함하여, 이들 분자들 간의 에테르형 결합을 생성하는 제조 방법을 개시한다.
- <12> 특허 US5700459 및 US6649192 호는 약학적 적용을 위한 키토산의 나노입자들의 형성 방법을 개시한다. 두 특허들 모두에서, 나노입자들은 다양이온(polycation) (예컨대, 키토산)의 다음이온 (polyanion) (예컨대, 트리폴리 포스페이트)와의 상호작용에 의해 형성된다. US5700459 호는 특정 사이클로텍스트린 (아미노사이클로텍스트린)의, 키토산과 같은 또다른 잠재적인 다양이온에 대한 치환 물질로서의 이용 가능성을 언급한다.
- <13> W09704747 호는 나노 하이드로겔 매트릭스 중의 약물 또는 약물-사이클로텍스트린 착화물의 캡슐화를 제안하며, 이는 이어서 리소솜 및/또는 점막접착 보조제로 코팅될 수 있다. 상기 제안된 방법은, 유기상으로부터 수상으로의 중합체의 침전을 요구하며, 상기 사이클로텍스트린을 함유하는 약물은 수상 중에 첨가되며, 여기에서 상기 중합체는 침전되지만, 그와 함께 침전되지는 않는다. 이 방법 중에서 이러한 인자는 특정 약물을 효율적이지 않게 캡슐화할 수 있다.
- <14> 마이크로입자의 형성을 위해 설계된 마이크로캡슐화 기술이 나노입자의 형성을 위해 설계된 나노기술과 일반적으로 상이하다는 점은 강조할 가치가 있다. WO 9804244 호는 키토산의 나노입자의 형성을 개시한다.

발명의 상세한 설명

- <15> 본 발명자들은 키토산의 나노입자들 및 사이클로텍스트린으로 구성된 시스템이 생물학적으로 활성인 분자들의 효율적인 연합 뿐만 아니라 그들의 적합한 생물학적 환경 내에서의 순차적인 방출을 가능하게 한다는 것을 발견하였다. 이들 나노입자들은, 사이클로텍스트린이 없는 키토산의 나노입자들에 비해, 소수성 약물을 캡슐화 또는 연합하는데 있어 개선된 능력을 나타낸다. 나아가, 사이클로텍스트린은 상기 나노입자 시스템에, 새로운 특징들, 예컨대 연합된 생물학적으로 활성인 분자의 더 나은 보호 및 특히 저투과성 분자에 대해 보다 큰 흡수 촉진능을 제공한다. 이에 따라, 본 발명의 시스템의, 코 점막과의 상호작용, 부가적으로 코 상피를 횡단함에 의한, 상피세포 장벽을 통한 저투과성 약물들의 이송 능력이 생체 내 연구로 입증되었다.
- <16> 본 발명의 시스템 중에 존재하는 나노입자에 의해 나타나는 추가적인 특징은, 세포 배양 매질 중 및 보다 현저하게는, 모의된 장액(intestinal fluid) 중에서의 그들의 높은 안정성으로, 여기에서 상기 나노입자의 이화학적 성질은 적어도 4 시간 동안 변화하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 성질로, 이들 시스템은 적합한 생물학적 환경에서 약물 방출을 허용하는, 상이한 투여 경로, 특히 경구투여용에서의 이용에 적합하다. 또한, 상이한 약물들을 이용한 방출 연구는, 나노입자들이 활성 원소들을 제어된, 점진적인 속도로 방출하는 것을 가능하게 한다는 것을 증명하였다.
- <17> 한편, DNA 플라스미드와 같은 핵산 기재의 거대분자를 통합 및 방출하는 가능성은, 시험관 내 연구에 의해, 나노입자들이 세포 배양물을 매우 효율적인 방식으로 형질감염시키는 능력을 관찰하는 것을 가능하게 하였으며, 이에 의해 본 발명의 시스템은 유전자 치료에의 이용에 잠재적으로 적합하다.
- <18> 따라서, 본 발명의 한 목적은 생물학적으로 활성인 분자의 방출을 위해 설계된 나노입자를 포함하는 시스템에 관한 것으로, 여기에서 상기 나노입자는 a) 적어도 40 중량%의 키토산 또는 그의 유도체 및 b) 60 중량% 미만의 사이클로텍스트린 또는 그의 유도체를 포함하며, 상기 두 성분 a) 및 b)는 모두 공유결합 없이 혼합된다.
- <19> 임의로, 상기 나노입자들은 나노 구조 형태의 키토산의 겔화를 허용하는, 이온성 가교제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- <20> 본 발명의 두 번째 측면은, 추가적으로, 생물학적으로 활성인 분자를 포함하는 상기 정의된 것과 같은 나노입자 시스템에 관한 것이다.
- <21> 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 것과 같은 나노입자 시스템 및 질병을 예방, 완화, 또는 치료할 수 있는 생물학적으로 활성인 분자를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 또한, 펩티드, 단백질 또는 다당류는 그 자체로서는 활성의 생물학적 분자인 것으로 여겨지지 않지만, 나노구조체 내에 트랩되어 (trapped) 투여 시스템의 효능에 기여할 수 있다는 것을 발견할 수 있다.
- <22> 본 발명의 또 다른 측면은 상기 정의된 것과 같은 나노입자 시스템 및 항원을 포함하는 백신이다. 바람직한 측면에서, 상기 조성물 또는 백신은 경점막 투여를 위해 설계된다.

- <23> 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 것과 같은 나노입자 시스템을 포함하는 미용 조성물에 관한 것이다.
- <24> 본 발명의 또 다른 측면은, 정의된 것과 같은 생물학적으로 활성인 분자의 방출을 위해 설계된 시스템의 수득 방법으로, 다음 단계들을 포함한다:
- <25> a. 수성 매질 중 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중의, 키토산 또는 그의 유도체의 용액 제조;
- <26> b. 수성 매질 중 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중의, 사이클로텍스트린 또는 그의 유도체 및 임의로, 가교제의 용액 제조; 및
- <27> c. 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들이 자발적으로 수득되도록, 상기 a) 및 b) 단계의 용액들을 교반 하에 혼합.
- <28> 또는, 임의로:
- <29> a. 수성 매질 중 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중의, 키토산 또는 그의 유도체 및 사이클로텍스트린 또는 그의 유도체의 용액의 제조;
- <30> b. 수성 매질 중 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중의, 가교제 용액의 제조;
- <31> c. 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들이 자발적으로 수득되도록, 상기 a) 및 b) 단계의 용액들을 교반 하에 혼합.
- <32> 생물학적으로 활성인 분자는 상기 단계 a) 또는 b)의 용액에 직접 포함될 수 있다; 그러나, 상기 방법의 변형에서, 상기 활성 분자는 단계 a) 또는 b) 에의 첨가 전에, 수성 매질 중에 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중에 용해될 수 있다.
- <33> 본 발명의 마지막 측면은 상기 기재된 것과 같은 시스템의 유전자 치료 약물의 제조에의 이용에 관한 것이다.
- <34> 본 발명의 시스템은 수성 매질 중에 분산된 나노입자들을 포함하며, 상기 나노입자들은 키토산 및 사이클로텍스트린을 포함하는 구조를 가지고, 여기에 생물학적으로 활성인 분자가 포함될 수 있다. 상기 구조는 두 성분들 간의 정전기적 상호작용에 의하여, 그들 사이의 어떤 공유결합도 없이, 결합된다.
- <35> 선택적으로, 상기 나노입자들은 추가로 이온성 가교제를 포함할 수 있으며, 이는 이온성 겔화에 의한 키토산의 가교결합을 허용하여, 나노입자들의 자발적인 형성을 촉진한다.
- <36> "나노입자" 라는 용어는 키토산과 사이클로텍스트린 간의 정전기적 상호작용에 의해 형성된 구조인 것으로 이해되어야 하며, 여기에서 상기 구조는, 추가적으로, 가교제로서의 역할을 하는 다음이온 염이 시스템에 첨가된 경우, 가교결합될 수 있다. 그 결과, 상이한 나노입자들 간의 정전기적 상호작용 및 임의로, 가교제의 첨가에 의한 키토산의 가교결합은 특징적이고 독립적인, 관찰가능한 물리적 실체를 생성하며, 그의 평균 크기는 1 μm 미만, 즉 평균 크기가 1 내지 999 nm 사이이다.
- <37> "평균 크기"는, 수성 매질 중에서 함께 움직이는 키토산 및 사이클로텍스트린에 의해 구성된 나노입자들의 군의 평균 직경인 것으로 이해되어야 한다. 이들 시스템의 평균 크기는 본 기술 분야의 숙련자에게 공지된 표준 절차들에 의해 측정될 수 있으며, 이는 예로서 하기 실험 부분에서 설명된다.
- <38> 본 발명에서 설명된 나노입자들은, 1 μm 미만의 평균 입자 크기를 나타내고, 바람직하게는 1 내지 999 nm 사이, 바람직하게는 10 내지 800 nm의 평균 입자 크기를 갖는 것으로 특징지어진다. 입자들의 평균 크기는, 일차적으로 사이클로텍스트린에 대한 키토산의 비율, 키토산의 탈아세틸화 정도 및 입자 형성 조건(키토산의 농도, 사이클로텍스트린의 농도, 존재시, 가교제 농도, 및 그들 간의 비율)에 의해 영향을 받는다.
- <39> 한편, 나노입자들은 전하를 띌 수 있으며 (CLK 를 희석 매질로서 사용하여, Z 전위에 의해 측정), 그의 크기는 상기 언급된 변수들에 따라, 0 mV 에서 + 60 mV 까지 다양할 수 있다. 나노입자들의 양전하는, 생물학적 표면, 특히 음으로 하전되는 점막 표면과 그들의 상호작용을 촉진하는데 중요할 수 있다. 그러나, 중성 하전이 그의 비경구 투여에 보다 더 적합할 수 있다.
- <40> 상기 정의된 생물학적으로 활성인 분자의 방출을 위해 설계된 나노입자들을 포함하는 시스템은 40중량% 보다 큰 혼합물 중 키토산 함량을 가지며, 바람직하게는 이는 적어도 40중량% 내지 95.5중량% 이다. 한편, 혼합물 중 사이클로텍스트린 함량은 60중량% 미만이며, 바람직하게는 0.5중량% 내지 60중량% 미만이다.
- <41> 키토산

<42> 키토산은 키틴(폴리-N-아세틸-D-글루코사민)으로부터 유도된 천연 중합체로, 여기에서 N-아세틸기들의 상당 부분이 가수분해에 의해 제거된다. 탈아세틸화 정도는 바람직하게는 30 내지 95%, 보다 바람직하게는 50 내지 95%의 범위이고, 이는 아미노기의 5% 내지 50%가 아세틸화되어 있다는 것을 나타낸다. 따라서, 이는 아미노당류 구조 및 양이온성 성질을 나타낸다. 이는 화학식 (I)의 단량체 단위의 반복을 포함한다:



(I)

<43>

<44>

<45> 식 중, n 은 정수이고, 추가적으로 m 단위에서 아미노기는 아세틸화되어 있다. n+m의 합은 중합도, 즉 키토산 사슬 중의 단량체 단위의 수를 나타낸다.

<46> 본 발명의 나노캡슐을 제조하는데 사용된 키토산은 1 내지 2,000 kDa, 바람직하게는 5 내지 500 kDa, 보다 바람직하게는 5 내지 200 kDa 의 분자량을 갖는다. 사용될 수 있는 상용 키토산의 예로는 UPG 113, UP CL 213 및 UP CL113이 있으며, 이는 NovaMatrix, Drammen, 노르웨이,로부터 구할 수 있다.

<47> 나노입자들을 제조하는데 사용된 키토산을 구성하는 단량체 단위들의 수는 5 내지 5000 단량체이며, 바람직하게는 60 내지 600 단량체이다.

<48> 키토산에 대한 대체로서, 그의 유도체가 사용될 수도 있으며, 그들도 키토산인 것으로 이해하며, 여기에서 하나 이상의 히드록실기들 및/또는 하나 이상의 아미노기들은, 키토산의 용해도를 증가시키기 위해 또는 그의 부착 성질을 증가시키기 위하여, 변형되었다. 이러한 유도체들은 그 중, 아세틸화, 알킬화 또는 술폰화된 키토산, 티올레이트 (thiolated) 유도체를 포함하며, 이는 Roberts, *Chitin Chemistry*, Macmillan, 1992, 166에 기재된 바와 같다. 바람직하게는, 유도체가 사용되는 경우, 0-알킬 에테르, 0-아실 에스테르, 트리메틸키토산, 폴리에틸렌 글리콜로 변형된 키토산 등으로부터 선택된다. 기타 가능한 유도체들은, 시트레이트, 니트레이트, 락테이트, 포스페이트, 글루타메이트 등과 같은 염이다. 어떤 경우에서도, 당업자는 최종 제형의 안정성 및 상업적 실용성에 영향을 주지않고 키토산 상에 수행될 수 있는 변형들을 확인할 수 있다.

<49> 사이클로텍스트린

<50> 사이클로텍스트린은 구조적으로, α(1-4) 글리코시드 결합에 의해 연결된 6, 7 또는 8 단위의 D-글루코피라노실로 이루어지며, 이는 각각 α, β 또는 γ로 불리운다. 이들 올리고당들 중의 가장 안정한 3차원 구조는 환상면체 (toroid)이며, 여기에서 일차 및 이차 히드록실기들은 용매쪽으로 향한다. 이러한 원자 배열에서, 상기 환상면체 중에 형성된 구멍은 높은 소수성을 나타내며, 이는 반데르발스 힘 및 수소 결합과 함께, 사이클로텍스트린 및 약물 사이의 착화물 봉입(inclusion)의 형성에 대한 원인이 된다.

<51> 사이클로텍스트린 유도체는 사이클로텍스트린 또는 그의 혼합물로 이해되어야 하며, 여기에서 글루코스의 2-, 3- 및 6- 위치에서 히드록실기의 일부 또는 전부의 수소(들)은 디히드록시알킬기, 사카라이드 잔기, 히드록시알킬기, 술포네이트기, 술포알킬기, 알킬기, 알카노일기, 아세틸기 또는 벤조일기와 같은 다른 관능기(들)에 의해 치환된다.

<52> 본 발명에 사용되는 사이클로텍스트린 또는 그의 유도체들은 상용으로 구입 가능할 수 있거나, 또는 그 자체로 알려진 방법에 의해 합성될 수 있다. 사이클로텍스트린 및 그의 유도체들의 예는 천연 사이클로텍스트린 (알파, 베타 또는 감마), 히드록시프로필 사이클로텍스트린, 카르복시메틸사이클로텍스트린, 술포부틸사이클로텍스트린, 아미노사이클로텍스트린, 디메틸사이클로텍스트린, 사이클로텍스트린 포스페이트, 히드록시에틸사이클로텍스트린, 아세틸-사이클로텍스트린, 에틸사이클로텍스트린, 트리메틸사이클로텍스트린, 카르복시에틸사이클로텍스트린, 글루코실사이클로텍스트린, 6-O-α-말토실사이클로텍스트린, 부틸-사이클로텍스트린, 술포에이트 사이클로텍스트린, N,N-디에틸아미노에틸사이클로텍스트린, tert-부틸실릴사이클로텍스트린, 실릴[(6-O-tert-부틸디메틸)-2,3,6-트리아세틸]-사이클로텍스트린, 숙시닐-(2-히드록시프로필)-사이클로텍스트린, 숙시닐-사이클로텍스트린, 술포프로필-사이클로텍스트린, 폴리사이클로텍스트린을 포함한다. 본 발명의 특정 구현예에서, 상기 사이클로텍스트린은 히드록시프로필-α-사이클로텍스트린, 히드록시프로필-β-사이클로텍스트린, 술포부틸

에틸-β-사이클로텍스트린 또는 그의 혼합물들이 포함된다. 이들 중 임의의 것을 본 발명의 시스템에 사용할 수 있다.

- <53> 평균 치환도 (DS)는 사이클로텍스트린 단위 당 치환된 히드록실의 평균 수를 의미하며, 반면 몰 치환도 (MS)는 무수글루코스 단위 당 히드록실기의 수를 의미한다. 본 발명에서, 사용된 사이클로텍스트린은 4.2 내지 7 범위의 평균 치환도를 나타내지만, 상기 범위를 벗어나는 DS의 사이클로텍스트린도 사용될 수 있다.
- <54> 본 발명의 나노입자 시스템은, 키토산 및 임의로 사이클로텍스트린을 포함하는 다양이온성 상과, 사이클로텍스트린에 의해 또는 가교제에 의해 또는 이들 둘 모두의 조합에 의해 형성될 수 있는 다음이온성 상과의 혼합에 따른 나노입자들의 자발적인 침전에 의해, 형성된 것을 특징으로 한다. 두 상들이 모두 수성이어서, 이에 따라 본 발명의 시스템의 제조에서 유기 용매의 이용을 피하거나 또는 최소화하는 것이 중요하다.
- <55> 가교제는 키토산의 가교를 허용하여, 나노입자들의 자발적인 형성을 촉진시키는 음이온성 염이다. 본 발명에서, 상기 가교제는 폴리포스페이트 염으로, 나트륨 트리폴리포스페이트 (TPP)의 이용이 바람직하다.
- <56> 사이클로텍스트린이 음이온성인 경우, 그 자체만으로 음이온성 상을 형성할 수 있어, 상기 TPP의 존재가 필요하지 않은데, 이는 나노입자들이 음으로 하전된 사이클로텍스트린과 양으로 하전된 키토산 간의 정전기적 상호작용에 의해 형성되기 때문이다. 그러나, TPP의 첨가는 음이온성 사이클로텍스트린과 더불어, 일부 경우에는서는 가교 밀도를 변경하여 나노입자의 안정성을 촉진할 수 있다. 한편, 음이온성 전하가 없는 (어떤 전하도 없거나 또는 양의 전하가 있는) 사이클로텍스트린의 경우, 키토산을 가교시키고, 나노입자들의 형성을 허용하기 위하여, 다음이온성 상 중에 TPP를 포함시키는 것이 필요하다.
- <57> 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들은 생활성 분자들과 연합하는 능력이 높은 시스템이다. 이러한 연합능은 포함된 분자의 유형 및 특정 제형 파라미터들에 따라 달라진다. 본 발명에서, 나노 입자들의 이러한 유형은 소수성 활성 분자들, 및 소수성 또는 친수성에 상관없이, 저-투과성 활성 분자들을 연합하는 것을 특히 목적으로 한다. 따라서, 본 발명의 제 2 측면은, 추가적으로, 생물학적으로 활성인 분자를 포함하는, 상기 정의된 것과 같은 나노입자 시스템이다.
- <58> "생물학적으로 활성인 분자" 라는 용어는, 질병의 치료, 처치, 예방 또는 진단에 사용되거나 또는 인간 및 동물의 신체 및 정신적 안녕을 개선하는데 사용되는 어떤 물질을 의미한다. 이들 생물학적으로 활성인 분자들은 저분자량 약물에서 다당류, 단백질, 펩티드 및 지질 유형의 분자, 및 핵산 기재 분자 및 그의 조합까지 포함할 수 있다.
- <59> 특정 구현예에서, 상기 생물학적으로 활성인 분자들은, FDA 규정에 따른, 클래스 II (비-투과성 수용성), 클래스 III (투과성 소수성) 및 바람직하게는 클래스 IV (비-투과성 소수성)에 속하는 약물들이다.
- <60> 본 발명의 시스템과 사용될 수 있는 생물학적으로 활성인 분자들은, 다른 것들 중, 하기를 포함한다: 클래스 II 분자들: 다나졸(Danazol); 케토코나졸(Ketoconazole); 메페남산(mefenamic acid); 니솔디핀(Nisoldipine); 니페디핀(Nifedipine); 니카르디핀(Nicardipine); 펠로디핀(Felodipine), 아토바쿠온(Atovaquone), 그리세오폴빈(Griseofulvin), 트로글리타존(Troglitazone), 글리벤클라마이드(Glybenclamide), 카르바마제핀(Carbamazepine); 클래스 III 분자들: 아시클로버(Acyclovir); 네오마이신 B; 캡토프릴(Captopril); 에날라프릴레이트(Enalaprilate); 알렌드로네이트(Alendronate), 아테놀롤(Atenolol), 시메티딘(Cimetidine), 라니티딘(Ranitidine); 클래스 IV 분자들: 클로로티아지드(Chlorothiazide); 푸로세미드(Furosemide); 토브라마이신(Tobramycin), 세푸록심(Cefuroxime), 이트라코나졸(Itraconazole), 시클로스포린(Cyclosporin).
- <61> 바람직한 구현예에서, 상기 생물학적으로 활성인 분자는 트리클로산이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 생물학적으로 활성인 분자는 푸로세미드이다.
- <62> 다른 특정 구현예에서, 상기 생물학적으로 활성인 분자들은 펩티드, 다당류, 또는 단백질 유형 또는 핵산 기재 (올리고뉴클레오타이드, DNA, siRNA)의 거대분자들이다.
- <63> 바람직한 구현예에서, 상기 생물학적으로 활성인 분자는 인슐린이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 생물학적으로 활성인 분자는 헤파린이다. 다른 바람직한 구현예에서, 상기 생물학적으로 활성인 분자는 DNA 이다.
- <64> 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 정의된 나노입자 시스템 및 항원을 포함하는 백신이다. 나노입자들로 구성된 시스템에 의한 항원의 투여는 면역 반응을 달성하는 것을 가능하게 한다. 상기 백신은 단백질, 다당류를 포함할 수 있거나, 또는 이는 DNA 백신일 수 있다. 엄격히 말하자면, DNA 백신은 면역 반응을 일으키는 항원의 발

현을 암호화하는 DNA 분자이다.

- <65> 생물학적으로 활성인 분자의 연합은, 봉입 착화합물을 형성하는, 활성 분자와 중합체간의 비-공유결합성 상호작용 또는 활성 분자의 사이클로텍스트린과의 연합, 및 이 착화합물과 중합체 매트릭스와의 비공유결합성 상호작용을 포함하는 조합된 과정에 의해 일어날 수 있다.
- <66> 활성 분자-사이클로텍스트린 착화 방법을 사용하여, 생물학적으로 활성인 분자를 키토산의 나노입자들에게 적절히 포함시키기 위해서는, 먼저 적당한 양의 활성 분자를, 이의 사이클로텍스트린과의 착화로 인해, 용해시키고, 이어서 충분한 양의 상기 착화합물을 나노입자 구조 내로 캡슐화시키는 것이 필요하다.
- <67> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 정의된 나노입자 및 질병을 예방, 완화, 또는 치료할 수 있는 생물학적으로 활성인 분자를 포함하는 약학 조성물이다.
- <68> 약학 조성물의 예는, 경구, 구강 또는 설하(sublingual) 경로에 의한 투여를 위한 임의의 액체(나노입자들의 현탁액) 또는 고체(동결건조 또는 분무된 나노입자들, 과립, 정제 또는 캡슐을 제조하는데 사용될 수 있는 분말을 형성) 조성물, 또는 경피, 눈, 코, 질 또는 비경구 경로에 의한 투여를 위한 액체 또는 반고체 형태를 포함한다. 비경구 경로의 경우, 피부 또는 점막과 상기 나노입자들의 접촉은, 상기 입자들에, 상기 언급된 음으로 하전된 표면과 나노입자들의 상호작용을 촉진하는 현저한 양전하를 부여함에 의해 개선될 수 있다. 비경구 경로의 경우, 보다 특이적으로 정맥 투여의 경우, 이들 시스템은 그와 연합될 수 있는 약물 또는 분자들의 생체 내 분포를 조절하는 가능성을 제공한다.
- <69> 바람직한 측면에서, 약학 조성물은 경점막 경로에 의해 투여된다. 상기 키토산-사이클로텍스트린 혼합물의 양전하는, 점막 및 음으로 하전된 상피세포들의 표면과 약물의 상호작용을 통해 점막 표면에서 약물의 보다 나은 흡수를 제공한다.
- <70> 나노입자들에 포함된 활성 성분의 비는, 시스템의 총 중량에 대해 40중량%에 이를 수 있다. 그러나, 적절한 비는 포함되는 활성 성분, 설계된 지후 및 방출 효율에 따라, 각각의 경우에서 상이할 것이다.
- <71> 본 발명의 나노입자 시스템은, 치료 효과를 나타내지는 않지만 미용 조성물이 되도록 하는 미용적으로 활성인 분자도 포함할 수 있다. 이들 미용 조성물은 국소 적용을 위한 임의의 액체 조성물(나노입자들의 현탁액) 또는 에멀션을 포함한다. 상기 나노입자들에 포함될 수 있는 미용적으로 활성인 분자들 중, 다른 것들 보다, 향여드름제, 향진균제, 향산화제, 데오도란트(deodorants), 발한억제제, 비듬억제제, 피부 미백제, 태닝 로션(tanning lotions), UV 흡수제, 효소, 미용용 살생제(cosmetic biocide)를 언급할 수 있다.
- <72> 본 발명의 또 다른 측면은 상기 정의된 것들과 같은 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들의 제조방법에 관한 것으로, 다음을 포함한다:
- <73> a) 수성 매질 중 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중의, 키토산 또는 그의 유도체의 용액 제조;
- <74> b) 수성 매질 중 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중의, 사이클로텍스트린 또는 그의 유도체, 및 임의로 가교제의 용액 제조; 및
- <75> c) 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들이 자발적으로 생성되도록 단계 a) 및 b)의 용액들을 교반 하에 혼합, 또는 임의로:
- <76> a. 수성 매질 중 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중의 키토산 또는 그의 유도체 및 사이클로텍스트린 또는 그의 유도체의 용액의 제조;
- <77> b. 수성 매질 중 또는 물과 극성 용매의 혼합물 중의, 가교제 용액의 제조;
- <78> c. 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들이 자발적으로 생성되도록 단계 a) 및 b)의 용액들을 교반 하에 혼합.
- <79> 극성 용매로서 비독성 용매가 사용될 수 있으며, 그들 중, 아세토니트릴, 알코올 및 아세톤을 포함한다. 유사하게, 사용된 수성 매질은 상이한 유형의 염들을 함유할 수 있다.
- <80> 상기 방법의 변형에서, 생성된 키토산/사이클로텍스트린/가교제 질량비는 4/4/1 내지 4/80/1 이다. 그러나, 사용된 사이클로텍스트린의 유형에 따라, 사이클로텍스트린 또는 가교제에 대해, 보다 높은 비율의 키토산 사용도 가능하다. 따라서, 중성 사이클로텍스트린 (예컨대 HP β CD)의 경우, 사이클로텍스트린의 존재는 나노입자들의 형성 과정에 영향을 미치지 않은 것으로 보인다.
- <81> 생물학적으로 활성인 분자는 단계 a) 또는 b)의 용액에 직접 포함되어, 상기 생물학적으로 활성인 분자를 함유

하는 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들이 자발적으로 생성되도록 할 수 있다. 그러나, 상기 방법의 변형에서, 상기 분자는 이전 단계에서 수상 중 또는 수상과 극성 용매의 혼합물 중에 용해되어, 입자들의 제조 전 (단계 c)에 단계 a) 또는 b)에 포함될 수 있다. 그러나, 저용해성 약물의 경우, 활성 분자가 사이클로텍스트린과 함께 동일한 단계에서 용해되는 경우, 보다 높은 농도가 달성된다.

<82> 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들의 제조방법은 추가의 단계도 포함할 수 있으며, 여기에서 상기 나노입자들은 동결건조된다. 약학적 관점에서, 동결건조된 형태의 나노입자들이 유용하도록 하는 것은, 저장 동안 이들의 안정성을 개선하고, 취급될 생성물의 부피를 감소시키기 때문에 중요하다. 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들은, 1중량% 내지 5중량% 범위의 농도의 글루코스, 사카로스 또는 트레할로스와 같은 항동결제 존재 하에서 동결건조될 수 있다. 실제로, 본 발명의 나노입자들은, 동결건조 전 및 후의 입자 크기가 크게 영향을 받지 않는다는 추가의 장점을 갖는다. 즉, 상기 나노입자들은 그의 물리적 성질에서 어떤 변경도 겪지않고 동결건조 및 재현탁되는 장점을 갖는다.

<83> 본 발명의 시스템은, 상피세포와 상호작용하고, 세포 중 폴리뉴클레오티드의 형질감염을 촉진하는 데 있어서 매우 효과적인 담체인 것으로 밝혀졌다. 본 시스템 중에 포함되는 나노입자들은 유전 물질을 세포 중에 포함시킬 수 있으며, 예컨대 핵산-기재 분자, 올리고뉴클레오티드, siRNA 또는 폴리뉴클레오티드, 바람직하게는 목적의 단백질을 암호화하는 DNA 플라스미드가 있고, 이는 본 시스템이 유전자 치료 요법에의 이용에 잠재적으로 적당하도록 한다. 특정 구현예에서, 상기 DNA 플라스미드는 pEGFP 이다.

<84> 시험관 내 시험으로, DNA 플라스미드가 매우 효율적인 방출되어, 현저한 수준의 세포 형질감염을 달성하는 것을 관찰하였다. 결과적으로, 본 발명의 다른 측면은 유전자 치료 요법 약물 제조에의 본 발명의 나노입자 시스템의 이용에 관한 것이다. 특정 측면에서, 이는 치료될 환자의 세포 중에서 그 자신을 기능적으로 발현할 수 있는 유전자를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

<85> 이러한 점에서, 본 발명의 시스템을 사용하여 치료될 수 있는 질병들의 일부 예들은 항-VEGF 안티센스 약물과 함께 황반 변성, 수포성 표피 박리증 및 낭포성 섬유증이 있다. 이는 일시적 형질전환 계획을 이용한 상처의 치료에도 사용될 수 있다.

<86> 최종적으로, 그들의 높은 형질감염능으로 인해, 합성 또는 천연 폴리뉴클레오티드를 함유하는 본 발명의 시스템 및 조성물들은, 타겟 세포들, 바람직하게는 종양 또는 "정상" 포유류 세포들 뿐만 아니라, 줄기세포 또는 세포 주들의 형질감염에 사용될 수 있다. 또한, 이는 세포의 유전적 조작을 위한 유용한 도구이다. 이와 관련하여, 본 발명은, 본 발명의 시스템의, 세포의 유전적 조작 용도에도 관한 것이다. 바람직하게는, 이는 시험관 내 또는 생체 외 핵산의 방출에 사용된다. 이러한 방출은, 포유류 세포와 같은 진핵세포들, 세포주들을 포함하여, 시험관 내 또는 생체 외 세포 형질감염 또는 형질전환을 이끌 수 있는 타겟 세포들을 목표로 한다. 따라서, 본 발명은 진핵 세포들의 형질감염을 위해 설계된 키트에도 관한 것으로, 이는 본 발명의 시스템 및 세포 세척을 위한 적절한 희석제 및/또는 버퍼들을 포함한다.

<87> 이하에서, 본 발명자들은 본 발명의 예시적인 실시예들을 기재한다; 하지만, 이들 실시예들이 본 발명을 제한하는 것으로서 이해되어서는 안된다.

실시예

<97> 상이한 조성물들 및 상이한 중합체 비를 갖는 제형들의 이화학적 성질을, 광자상관분광법(photon correlation spectroscopy (PCS)) 및 레이저-도플러 풍력장치 (laser-Doppler anemometry) 기술을 사용하여 특징화하였다. 나노입자들의 형태학은 투과 전자 현미경 (TEM) 및 주사 전자 현미경(SEM)을 사용하여 연구되었다. 원소 분석 기술을 사용하여, 제조된 나노입자들의 조성을 연구하였다. 이 연구는 상기 나노입자 매트릭스 중의 키토산-사이클로텍스트린 혼합물의 존재를 입증하였다.

<98> **실시예 1.**

<99> 키토산 유형 및 TTP 농도의 함수로서, 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들의 특징 평가

<100> 히드록시프로필-β-사이클로텍스트린(HPβCD)의 고정 농도(6.29mM) 용액 (3 ml)을 상이한 키토산들 (CS) (0.2% w/w)을 이용하여 제조하였다. 이들 용액을 자석 교반 하에 24 시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 0.45μm 필터로 여과하고, 1.25 mg/ml 또는 2 mg/ml 농도의 트리폴리포스페이트를 상이한 부피로 첨가하여 가교결합시켜, 4:1 의 키토산/트리폴리포스페이트 질량비가 항상 유지되도록 하였다. 나노입자들을 16000xg 에서 원심분리하여 단리하고, 물에 재현탁하였다. 나노입자들의 크기를, 광자상관분광법 (PCS)을 사용하여 결정하였다. 사용

된 키토산의 분자량 및 가교제로서 사용된 트리폴리포스페이트의 농도의 함수로서 나노입자들의 평균 크기 및 다중분산 인덱스(polydispersion index)에 관련된 결과들을 표 1에 나타내었다.

표 1

<101> 나노입자들의 평균 크기 및 다중분산에 대한, 키토산 (CS Mw)의 분자 크기, HPβCD의 존재 및 가교제 트리폴리포스페이트 (TPP)의 농도의 영향 (평균±표준편차, n=3).

CS Mw (KDa)	HPβCD 농도 (mM)	TPP 농도 (mg/ml)	크기 (nm)	다중 분산 인덱스 (P.I.)
110	0	1.25	484±32	0.3
110	6.29	1.25	454±19	0.3
110	0	2.0	578±1	0.3
110	6.29	2.0	590±1	0.2
272	0	2.0	887±5	0.5
272	6.29	2.0	808±0	0.5

실시예 2.

<103> 사이클로텍스트린의 유형 및 농도의 함수로서 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들의 특성 평가 (TTP 농도 = 2 mg/ml)

<104> 키토산, 특이적으로 키토산 염산염 (Protasan C1110)의 0.2% (w/w) 용액 (3 ml)을, 상이한 양의 히드록시프로필 사이클로텍스트린 (α- 또는 β-) (0 내지 25 mM)을 사용하여 제조하였다. 상기 용액들을 자석 교반 하에 24 시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 0.45μm 공극 크기를 통해 여과시키고, 2 mg/ml의 농도의 0.75 ml 트리폴리포스페이트의 첨가에 의해 가교결합시켰다. 나노입자들을 16000xg 에서 원심분리하여 단리하고 물에 재현탁하였다. 결과의 입자들의 크기 및 그의 다중 분산을, 광자상관분광법 (PCS)을 사용하여 특징화하고, 레이저-도플러 풍력장치에 의해 제타 전위를 특징화하고, 단리된 나노입자들의 샘플의 건조 잔류물을 칭량함에 의해 제조 수율을 특징화하였다. 결과들을 표 2에 나타내었다.

<105> 도 1 (좌측 이미지) 및 도 2는, TEM 및 SEM을 각각 사용하여 분석된 25mM 의 HPβCD 로부터 제조된 입자들의 형태학을 나타내며, 구형의 나노입자들의 형성을 확인하였다.

표 2

<106> 키토산-사이클로텍스트린 나노입자들의 특징들 (크기, 다중 분산, 제타 전위 및 제조 수율)에 대한 히드록시프로필 사이클로텍스트린의 유형 및 농도의 영향 (평균±표준편차, n=3).

HPCD 농도 (mM)	HPCD 유형	크기(nm)	다중분산 인덱스 (P.I.)	제타 전위 (mV)
0	-	686±1	0.5	+33.8±3.4
3.14	α	625±4	0.6	+34.7±2.3
	β	590±1	0.3	+35.3±3.8
6.29	α	645±7	0.6	+33.8±0.5
	β	624±0	0.3	+36.2±0.5
25	α	690±3	0.4	+35.3±3.8
	β	670±4	0.6	+33.1±3.3

실시예 3.

<108> 사이클로텍스트린의 유형 및 농도의 함수로서 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들의 특징의 평가 (TPP 농도 =1.25 mg/ml)

<109> 상이한 양의 히드록시프로필 사이클로텍스트린 (α- 또는 β-) (0 내지 25 mM)을 사용하여 0.2% (w/w) 키토산 (Protasan C1110) 용액 (3 ml)들을 제조하였다. 상기 용액들을 자석 교반 하에 24 시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 0.45μm 공극 크기를 통해 여과시키고, 1.25 mg/ml의 농도의 트리폴리포스페이트를 1.2 ml 첨가하여 가교 결합시켰다. 상기 나노입자들을 16000xg 에서 원심분리하여 단리하고 물에 재현탁하였다. 결과의 입자들의 크

기 및 그의 다중 분산을, 광자상관분광법 (PCS)을 사용하여 특징화하고, 레이저-도플러 풍력장치에 의해 제타 전위를 특징화하고, 단리된 나노입자들의 샘플의 건조 잔류물을 칭량함에 의해 제조 수율을 특징화하였다. 결과들을 표 3에 나타내었다.

도 1 (우측 이미지)은 TEM에 의해 분석된 25 mM 의 HPβCD 부터 제조된 입자들의 형태학을 나타낸다.

표 3

키토산-사이클로덱스트린 나노입자들의 특징들 (크기, 다중 분산, 제타 전위 및 제조 수율)에 대한 히드록시프로필 사이클로덱스트린의 유형 및 농도의 영향 (평균±표준편차, n=3).

HPCD 농도 (mM)	HPCD 유형	크기(nm)	다중분산 인덱스 (P.I.)	제타 전위 (mV)	제조 수율(%)
0	-	484±32	0.3	+37.6±0.9	42±7
3.14	α	410±29	0.2	+36.9±0.6	45±6
	β	456±37	0.3	+34.2±1.0	51±6
6.29	α	398±14	0.2	+35.9±3.8	48±7
	β	454±19	0.3	+34.8±3.2	54±4
25	α	361±18	0.2	+35.8±1.7	65±9
	β	443±27	0.5	+29.8±2.9	74±3

실시에 2 및 3에서 수득된 결과들은, 사이클로덱스트린의 봉입이 결과의 나노입자들의 크기에 영향을 미치지만, 그의 값을 과도하게 변경시키지는 않는다는 것을 보여준다. Z 전위와 관련해, 사이클로덱스트린 존재 하에 제조된 나노입자들은 매우 유사한 값들을 나타낸다. 이 데이터는, 사이클로덱스트린이 나노입자들의 형성 과정에 간섭하지 않으며, 또한 이들이 반드시 그들과 연관되지는 않음을 추론할 수 있게 하여준다.

한편, 사이클로덱스트린의 농도가 증가시, 제조 수율은 현저히 증가된다.

실시에 4.

세포 배양물 중에서 키토산의 나노입자 및 사이클로덱스트린의 안정성

술포부틸에테르-β-사이클로덱스트린의 수용액 (SBE-CD) 또는 카르복시메틸-β-사이클로덱스트린의 수용액 (CM-CD)을, 가교제 TPP 존재 하에서 자석 교반 하에 키토산 수용액 (CS)과 함께 혼합함에 의해, 상이한 성분들 간의 비가:

CS/SBE-CD/TPP: (4/3/0.25)

CS/CM-CD)/TPP: (4/4/0.25)

가 되도록 하여, 두 유형의 사이클로덱스트린을 사용하여 키토산의 나노입자들을 제조하였다.

이어서, 상기 나노입자들을 원심분리에 의해 단리하고, 이후 이들을 헹크스 염 용액 (HBSS) 중, 37℃ 에서 인큐베이션하였다. 이 버퍼화된 용액 (무기염 및 글루코스 함유)은 세포 배양과 관련된 시험 분야에서 아마도 가장 널리 사용되는 것으로, 이는 세포들을 생리학적 pH 및 삼투압에서 유지하는 것을 가능하게 하여, 세포들의 성장을 촉진하지 않으면서 단기간 동안 이들을 생육 상태로 보존하기 때문이다. 나노입자들의 크기에서의 변화를 측정함에 의해 안정성 연구를 수행하였다.

도 3에 나타낸 바와 같이, 키토산 및 사이클로덱스트린의 나노입자들은 시험 조건 하에서 안정하였다.

실시에 5.

모의된 장액 중의 키토산 및 사이클로덱스트린 나노입자들의 안정성

키토산 및 카르복시메틸-β-CD의 나노입자들을, 이온성 겔화에 의해, TPP 존재 및 부재 하에, 실시에 4에 기재된 바와 같이 제조하였다. 이들 나노입자들의 안정성을 pH=6.6 및 37℃ 의 모의된 장액 중에서 평가하였다. 이 매질은 소장의 조건을 재생하는 것이지만, 나노입자들의 코 점막에 대한 안정성을 반영할 수도 있다. 상기 나노입자들은, 도 4에 나타난 바와 같이, 4 시간에 걸쳐 안정한 것으로 입증되었으며, 이러한 이유로 이들은 상이한 투여 경로에 적합한 시스템들인 것으로 보인다.

실시예 6.

키토산 및 사이클로텍스트린의 나노입자들 내로의 인슐린의 캡슐화능의 평가

키토산 및 카르복시메틸-β-CD의 나노입자들을, 상이한 농도의 사이클로텍스트린 및 TPP를 사용하여 실시예 4 또는 5에 기재된 바와 같이 제조하였으며, 일부 경우들에서는 0.24% 농도의 인슐린을 초기 수용액들에 포함시켰다. 이어서, 상기 나노입자들을 원심분리에 의해 분리하였다. 표 4는, 인슐린이 부하되거나 또는 부하되지 않은 상기 나노입자들의 이화학적 특징들을 나타낸다.

표 4

인슐린이 부하되거나 또는 부하되지 않은 CS/CM-CD/TPP 나노입자들의 이화학적 특징들. (*) 인슐린이 부하된 나노입자들

CS/CM-CD/TPP	크기 (nm)	다중분산 인덱스	제타 전위 (mV)
4/3/0	200±13	0.11-0.16	+2.0±1.4
4/4/0	238±16	0.08-0.10	+27.0±2.4
4/3.5/0 (*)	482±33	0.04-0.19	+29.6±0.8
4/2/0.5	299±25	0.36-0.46	+32.0±0.3
4/3/0.25	264±18	0.23-0.37	+27.0±0.6
4/4/0.25 (*)	436±34	0.10-0.23	+25.9±1.8
4/3/0.5 (*)	555±119	0.02-0.52	+31.4±1.4
4/2/0.75 (*)	631±153	0.29-0.41	+31.2±1.5
4/1.5/0.75 (*)	613±124	0.11-0.58	31.0±1.5
4/0/1 (*)	454±120	0.22-0.31	37.1±1.3

관찰되는 바와 같이, 부하된 나노입자들의 크기는 430 내지 635 nm의 범위로, 상기 크기는 인슐린이 부하되지 않은 나노입자들의 크기보다 2 배 이상에 이르는 크기이다.

한편, 표 5는 나노입자들 내의 인슐린의 부하능을 나타낸다. 인슐린이 상기 나노입자들에 매우 효율적으로 포함되어질 수 있음을 관찰할 수 있으며, 85% 가 넘는 연합 효율을 나타낸다.

표 5

CS/CM-CD/TPP 나노입자들 내의 인슐린 캡슐화 효율 (인슐린 농도 0.24%).

CS/CM-CD/TPP	부하능 (%)	연합 효율 (%)	수율(%)
4/3.5/0	68.4±0.5	85.5±0.4	22.6
4/4/0.25	46.7±0.8	88.6±0.8	33.0
4/3/0.5	38.5±0.4	92.6±0.6	41.7
4/2/0.75	33.1±0.1	94.7±0.2	57.3
4/1.5/0.75	38.7±0.5	93.3±0.7	50.9
4/0/1	34.7±0.3	91.4±0.4	69.3

또한, 인슐린이 부하된 CS/CM-CD/TPP의 나노입자들의 안정성을, 실시예 5에 기재된 것과 같이, pH 6.8 및 37℃ 중의 모의된 장액에서 평가하였다. 상기 나노입자들의 크기는, 최초 2 시간 내의 초기 크기에 대해, 증가하지 않았다 (도 5).

실시예 7

사이클로텍스트린의 유형 및 농도의 함수로서, 트리클로산의 용해도, 캡슐화 효율 및 그의 나노입자들 중의 부하.

용액을 과포화시키기 위하여 초기 용액들에 충분한 양의 트리클로산 약물을 첨가한 것을 제외하고는, 실시예 2의 방법에 따라 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들을 수득하였다. 사이클로텍스트린-중합체 혼합물에 의해 용해되지 않은 약물은, 이온성 (ionotropic) 가교결합에 의해 중합체를 가교결합하기 전에 수행되는 여과 공정 (0.45μm 통과) 동안 폐기되었다 (실시예 2 참조). 표 6은 입자들의 형성을 위해 사용된 초기 용액들 중에서 트

리클로산에 대해 달성된 용해도, 나노입자들 중의 트리클로산의 캡슐화 효율 및 이들 나노입자들 중에 달성된 트리클로산의 부하를 나타낸다. 트리클로산은 분광광도법에 의해 측정하였다 ($\lambda=280\text{ nm}$).

<136> 상기 캡슐화 효율 (EE)은, 나노입자들의 제조 과정 중 첨가된 약물의 양에 대해, 키토산-사이클로텍스트린 중에 트랩된 약물의 백분율을 의미한다. 상기 약물 부하는 나노입자들의 현탁 매질 중에 용해된 채로 남아있는 비-캡슐화된 약물을 계산하여 간접적으로 결정된다. 이 값과 이론적 약물 함량 간의 차이가 나노입자들 중에 부하된 약물의 양으로 간주된다. 표에 나타나는 약물 부하 백분율은, 100mg 의 나노입자 중에 캡슐화된 약물의 양에 대한 백분율이다.

표 6

<137> 트리클로산의 가용화에 사용된 사이클로텍스트린의 유형 및 농도의 영향, 결과의 캡슐화 효율(EE) 및 최종 나노입자들 중에서의 그의 부하 (평균±표준편차, n=3).

HPCD 유형	HPCD 농도 (mM)	트리클로산 용해도(mg/l)	트리클로산 EE (%)	트리클로산 부하 (%)
---	0	68±17	12.5±8	0.8±0.3
β	3.14	211±24	5.2±7	1.1±0.2
β	6.29	588±18	4.8±3	2.2±0.1
β	25	1120±13	5.5±5	3.1±0.1
α	25	870±59	4.6±4	2.0±0.1

<138> 실시예 8

<139> 사이클로텍스트린의 유형 및 농도의 함수로서, 푸로세미드의 용해도, 캡슐화 효율 및 그의 나노입자들 중의 부하의 평가

<140> 용액을 과포화시키기 위하여 초기 용액들에 충분한 양의 푸로세미드 약물을 첨가한 것을 제외하고, 실시예 3 에 기재된 방법에 따라 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들을 제조하였다. 사이클로텍스트린-중합체 혼합물에 의해 용해되지 않은 약물은, 중합체의 가교결합 전에 수행된 여과 공정 (0.45μm 통과) 동안 폐기되었다 (실시예 3 참조). 표 7은 입자들의 형성을 위해 사용된 초기 용액들 중에서 푸로세미드에 대해 달성된 용해도, 나노입자들 중의 푸로세미드의 캡슐화 효율 및 이들 나노입자들 중에 달성된 푸로세미드의 부하를 나타낸다. 푸로세미드는 분광광도법에 의해 측정하였다 ($\lambda=230\text{ nm}$). 캡슐화된 푸로세미드의 양을 결정하기 위하여, 그의 단리에 이어, 입자들의 상층액 중의 트리클로산의 양 (비-연합된 양)을 결정하고, 그 차이를 계산하였다.

표 7

<141> 푸로세미드의 가용화에 사용된 사이클로텍스트린의 유형 및 농도의 영향, 결과의 캡슐화 효율 (EE) 및 최종 나노입자들 중의 그의 부하 (평균±표준편차, n=3).

HPCD 유형	HPCD 농도 (mM)	푸로세미드 용해도 (mg/l)	푸로세미드 EE (%)	푸로세미드 부하 (%)
---	0	7.8±1.3	22.3±1.4	0.23±0.07
β	3.14	42.3±2.4	17.1±3.0	0.89±0.04
β	6.29	95.4±10.1	12.1±1.3	1.43±0.24
β	25	387.3±10.3	7.2±3.1	2.39±0.72
α	25	253.5±9.8	8.8±2.7	1.92±0.55

<142> 실시예 9

<143> 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들로부터의 트리클로산 또는 푸로세미드 약물의 방출

<144> 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들을 트리클로산 및 푸로세미드를 사용하여 제조하였다. 트리클로산을 갖는 제형을 제조하기 위하여, 실시예 7에 기재된 방법을 따랐으며(25 mM HPCD α 또는 β의 제형), 푸로세미드의 제형에 대해서는, 실시예 8 에 기재된 방법을 따랐다 (25 mM HPCD α 또는 β의 제형). 상기 나노입자들을 단리하고, 아세트이트 버퍼 (pH 6.0, 저이온 강도)중에 재현탁하였다. 상기 나노입자들을 이 매질 중에서 수평

교반 (100 rpm)하에 37℃에서 인큐베이션하였다. 여러 시간대에서 (0.5, 1.5 및 4.5 시간), 상기 인큐베이션 매질로부터 샘플을 취하여, 약물을 용액으로 분리하고 (200000xg 에서 30 분 동안 원심분리), 분광광도 수단으로, 실시예 7 및 8에 기재된 것과 같이 평가하였다. 제조된 제형들의 약물 방출 프로파일을 도 6에 나타내었다.

<145> 실시예 10

<146> 사이클로덱스트린의 유형 및 농도의 함수로서, 트리클로산의 용해도, 캡슐화 효율 및 그의 나노입자들 중의 부하의 평가

<147> 80% 물 및 20% 에탄올의 혼합물 중에, 키토산 (Protasan C1110, 0.2%), HPβCD (0, 1.28 및 2.56 mM) 및 트리클로산의 용액들 (3 ml)을, 용액을 과포화시키기에 충분한 양으로 제조하였다. 이들 용액들을 자석 교반 하에 24 시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 0.45-μm 필터를 통해 여과하고, 80%의 물 및 20%의 에탄올의 혼합물 중에 1.25mg/ml의 농도로 용해된 1.2 ml의 트리폴리포스페이트를 첨가함에 의해 가교결합시켰다. 상기 나노입자들을 16000xg 에서 원심분리하여 분리하고 물에 재현탁하였다. 결과의 입자들의 크기 및 그의 다중분산을 광자상관분광법 (PCS)에 의해 특징화하였다. 캡슐화된 약물의 양을, 키토사나제 (Chitosanase-RD, Pias Co, 일본) 효소로 재현탁된 나노입자들의 분액을 분해함에 의해 결정하고, 그 평가를 분광광도법에 의해 수행하였다 (λ=280 nm). 결과를 표 8에 나타내었다.

표 8

<148> 나노입자들의 제조에 사용된 상에서 트리클로산의 가용화에 사용된 사이클로덱스트린의 농도, 나노입자들의 결과의 캡슐화 효율 (EE) 및 나노입자들 중의 최종 부하의 영향 (평균±표준편차, n=3).

HPβCD 농도 (mM)	크기 (nm)	용해된 트리클로산 (mg/l)	트리클로산 EE(%)	트리클로산의 부하 (%)
0	499±33	719±79	22.3±1.4	2.2±0.9
1.28	568±25	2536±283	37.7±7.3	7.4±1.3
2.56	517±14	3521±213	33.5±2.7	8.7±0.2

<149> 실시예 11

<150> 사이클로덱스트린의 유형의 함수로서, 플라스미드 DNA가 있거나 또는 없는 키토산-사이클로덱스트린의 나노입자들의 크기 및 다중분산의 평가

<151> 다음 용액들을 제조하였다: (A) 메틸-β-사이클로덱스트린 (Me-β-CD) (7.4 mM), 트리폴리포스페이트 (1.25 mg/ml) 및 녹색 형광 단백질을 암호화하는 플라스미드 (pGFP) (0.5 mg/ml); 및 (B) 술포부틸-β-사이클로덱스트린 (0.18 mM) (SB-β-CD) 및 녹색 형광 단백질을 암호화하는 플라스미드 (pGFP) (0.5 mg/ml). 두 용액들을 모두 교반 하에 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 0.24-ml 부피의 용액 A 또는 B를 자석 교반 하에 1.2 ml의 0.1% (w/w) 키토산에 첨가하여, 나노입자들을 형성하였다. 결과의 입자들의 크기 및 다중분산을 광자상관분광법 (PCS)을 사용하여 특징화하였다. 결과를 표 9에 나타내었다.

표 9

<152> 사이클로덱스트린의 유형의, 플라스미드 DNA가 있거나 또는 없는 키토산-사이클로덱스트린의 크기 및 다중분산에 대한 영향 (평균±표준편차, n=3). * 일정 범위의 값으로서 나타냄.

사이클로덱스트린 유형	DNA 농도 (mg/ml)	입자 크기 (nm)	다중분산 인덱스 (P.I.)*
SB-β-CD	0	170.8±24	0.1-0.2
SB-β-CD	0.5	157±32	0.1-0.2
Me-β-CD	0	232±15	0.2-0.3
Me-β-CD	0.5	182.8±40	0.1-0.2

<153> DNA를 이용한 키토산-술포부틸사이클로덱스트린의 나노입자들의 제형을, 그의 분리 전에 아가로스 겔에서의 전기영동에 투입하였다. 대조구들은, 용액 중 플라스미드, 플라스미드가 없는 제형 및 키토사나제(Chitosanase-

RD, Pias Co, 일본)로 분해된 플라스미드를 가진 제형을 포함하였다. 결과를 도 7에 나타내었다.

<154> 실시예 12

<155> 세포 배양물의 형질감염의 효능의 시험관 내 연구

<156> 실시예 11에 기재된 것과 같은 나노입자들의 제형을 제조하였다. 제형을 원심분리 (16000xg, 30 분)에 의해 분리하고, 낮은 이온강도의 pH 6.0 버퍼 중에 재현탁하였다. 1 또는 2 μ g의 DNA를 함유하는 양의 제형을 세포 배양물과 함께 인큐베이션하였다. 달성된 세포 형질감염 결과들을 도 8에 나타내었다. 형광 이미지는, 나노입자-pGFP 시스템에 의한 형질감염의 결과로서 녹색 형광 단백질을 발현하는 세포 콜로니들을 보여준다. 담체 없는 플라스미드는 세포들을 형질감염하는 능력을 나타내지 못하였으며, 즉 형광 세포 콜로니들이 관찰되지 않았다.

<157> 실시예 13

<158> 사이클로텍스트린의 유형 및 나노입자 시스템들의 최종 조성에서 키토산, 사이클로텍스트린 및 트리폴리포스페이트간의 질량비의 영향

<159> 키토산-HP β CD 및 키토산-SB β CD의 나노입자들을 실시예 3 및 11에서와 같이 각각 제조하였다. 나노입자들을 제조하는데 사용되는 초기 용액들에서 상이한 양의 사이클로텍스트린을 사용하였다. 그의 단리에 이어 나노입자들의 실제 조성 (% 키토산, % 사이클로텍스트린, % 카운터이온들)을, 원소 분석 기술에 의해 결정하였다 (질소-탄소 또는 질소-황 비를 고려). 샘플들의 습윤 정도를, 열중량 분석에 의해 결정하였다.

표 10

<160> 사이클로텍스트린의 유형 및 제조된 시스템의 최종 조성에서 키토산 (CS), 사이클로텍스트린 (CD) 및 트리폴리포스페이트 (TPP)간의 질량비의 영향 (건조 중량%). (평균 $\pm$ 표준편차, n=3). * 거의 0.

사이클로텍스트린 유형	초기 CS/CD/TPP 질량비	% CS	사이클로텍스트린 %	카운터이온 % (TPP, Na, Cl)
HP β CD	4/2/1	70 $\pm$ 1	2.8 $\pm$ 1.1	27 $\pm$ 0.5
HP β CD	4/4/1	72 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.5	24 $\pm$ 0.5
HP β CD	4/8/1	70 $\pm$ 2	10.1 $\pm$ 2.5	20 $\pm$ 0.8
SB- β -CD	4/2/0.5	58 $\pm$ 2	31.7 $\pm$ 1.0	10.5 $\pm$ 1.9
SB- β -CD	4/3/0.5	46 $\pm$ 3	37.1 $\pm$ 7.9	16.7 $\pm$ 0
SB- β -CD	4/4/0	41 $\pm$ 0.2	58.6 $\pm$ 0.7	---*

<161> 실시예 14

<162> 키토산-사이클로텍스트린의 나노입자들의 쥐의 코 점막을 통한 이송의 연구.

<163> 본 발명의 나노입자 시스템의 약물 투여를 위해 설계된 담체로서의 능력을 평가하기 위하여, 상기 나노입자들이 코 상피세포를 통과하는 능력을 시험하였다. 성분들의 상이한 비율을 이용하여, 두 개의 특이적 제형들, 키토산/술포부틸에틸- β -사이클로텍스트린 (CS/SBE- β -CD) 및 키토산/카르복시메틸- β -사이클로텍스트린 (CS/CM- β -CD)으로 본 연구를 수행하였다. 상기 키토산을 플루오레세인으로 미리 표지하였다 (FI-CS). 카르보디이미디의 EDAC와의 반응에 의해 표지 과정을 수행하였으며, 이는 형광 표지물의 키토산 분자들에 의한 공유 결합을 가능하게 하며, 이는 *Pharm. Res.*, 2004, 21, 803-10에 기재된 바와 같다. 표 11은 플루오레세인으로 표지된 평가된 나노입자들의 이화학적 특징들을 나타낸다.

표 11

<164> 플루오레세인으로 표지된 평가된 나노입자들의 이화학적 특징들

사이클로텍스트린, CD의 유형	FI-CS/CD	크기 (nm)	다중분산 인덱스	수율 (%)
SBE- β -CD	4/3	219	0.09	22
	4/4	239	0.07	43
CM- β -CD	4/5	311	0.22	13
	4/6	309	0.41	24

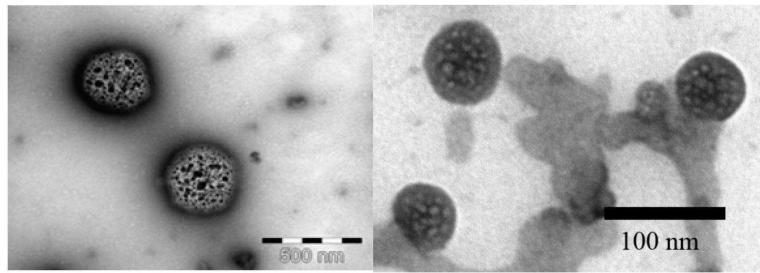
<165> 이들 나노입자들의 현탁액 (이의 안정성은 5% w/w 트레할로스 이송 매질 중에서 미리 평가되었다, 도 9)을 비강 내 경로에 의해 투여하여 쥐들을 완전히 깨워놓았다. 미리 정해진 시간이 경과한 후 (구체적으로, 투여 후 10 분), 쥐들을 경추탈골에 의해 살생시키고 코 점막을 파라포름알데히드로 고정하고, 절제한 후, 이어서 공초점 현미경으로 488 nm에서 관찰하였다 (CLSM, Zeiss 501, Jena, 독일). 관찰된 이미지들은, 이들 나노입자들이 코 점막과의 현저한 상호작용을 나타내었음을 보여주었다.

도면의 간단한 설명

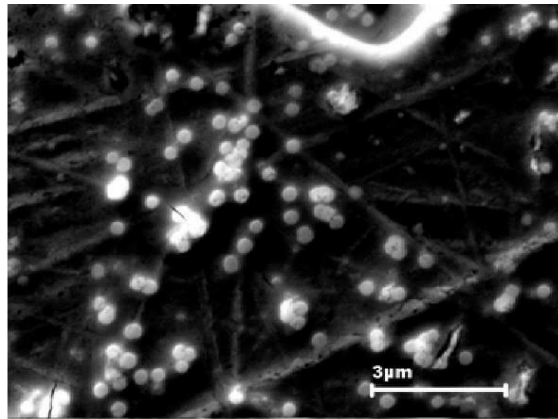
- <88> **도 1:** 키토산-(히드록시프로필-β-사이클로덱스트린)제형의 TEM 이미지. 25 mM 의 히드록시프로필-β-사이클로덱스트린 및 2 mg/ml (좌측 이미지) 또는 1.25 mg/ml (우측 이미지)의 트리폴리포스페이트를 사용하여 제조된 제형.
- <89> **도 2:** 키토산-(히드록시프로필-β-사이클로덱스트린)제형의 SEM 이미지. 25 mM 의 사이클로덱스트린 및 2 mg/ml 의 트리폴리포스페이트로부터 제조된 제형.
- <90> **도 3:** pH 6.4, 37℃의, HBSS 중의 키토산 및 사이클로덱스트린의 나노입자들의 안정성 (평균±표준편차, n=3). CS:키토산; SBE-CD: 술포부틸에테르-사이클로덱스트린; CM-CD: 카르복시메틸-사이클로덱스트린; TPP: 나트륨 트리폴리포스페이트; HBSS: 헹크스 염 균형 용액(Hank's balanced salt solution).
- <91> **도 4:** pH=6.8, 37℃의, 모의된 장액 중의 키토산 및 사이클로덱스트린의 나노입자들의 안정성 (평균±표준편차, n=3). (□) CS/CM-CD/TPP=4/5.5/0; (·) CS/CM-CD/TPP=4/4.5/0.25. CS:키토산; SBE-CD: 술포부틸에테르-β-사이클로덱스트린; CM-CD: 카르복시메틸-β-사이클로덱스트린; TPP: 나트륨 트리폴리포스페이트.
- <92> **도 5:** pH 6.8 및 37℃의, 모의된 장액 중의 키토산 및 카르복시메틸-β-사이클로덱스트린의 나노입자들의 안정성 (평균±표준편차, n=3). (□) CS/CM-CD/TPP=4/3/0.5; (·) CS/CM-CD/TPP= 4/1.5/0.75. CS:키토산; CM-CD: 카르복시메틸-β-사이클로덱스트린; TPP: 나트륨 트리폴리포스페이트.
- <93> **도 6:** 키토산-(히드록시프로필 사이클로덱스트린) 제형으로부터의 트리클로산 및 푸로세미드(furosemide) 약물의 방출 프로파일. 제형: TRIC HP α CD (히드록시프로필-α-사이클로덱스트린과트리클로산의 제형), TRIC HP β CD (히드록시프로필-β-사이클로덱스트린과 트리클로산의 제형), FUR HP α CD (히드록시프로필-α-사이클로덱스트린과 푸로세미드의 제형), FUR HP β CD (히드록시프로필-β-사이클로덱스트린과푸로세미드의 제형) (평균±표준편차, n=3).
- <94> **도 7:** 키토산-술포부틸사이클로덱스트린 나노입자들의 아가로스 겔. 선들: (1) 분자량 마커, (2) 용액 중 DNA, (3) DNA가 없는 나노입자, (4) DNA를 가진 나노입자들, (5) 키토산나제(chitosanase)로 분해된 DNA를 가진 나노입자. 인큐베이션 시간 30 분.
- <95> **도 8:** 키토산-술포부틸사이클로덱스트린의 나노입자들 중의 1μg pGFP 플라스미드로 형질감염된 세포들의 형광 이미지. 48 시간째에 달성된 형질감염 수준.
- <96> **도 9:** 트레할로스 (5%) 중의 플루오레세인-사이클로덱스트린으로 표지된 키토산의 나노입자들의 안정성. (◆) FI-CS/SBE-CD 4/4; (□) FI-CS/CM-CD 4/6. FI-CS: 플루오레세인-표지된 키토산; SBE-CD: 술포부틸에테르-β-사이클로덱스트린; CM-CD: 카르복시메틸-β-사이클로덱스트린; TPP: 나트륨 트리폴리포스페이트.

도면

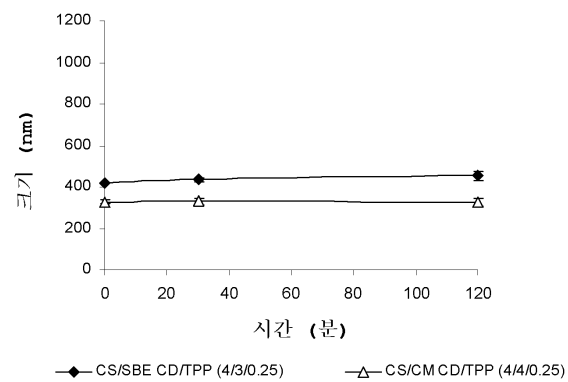
도면1



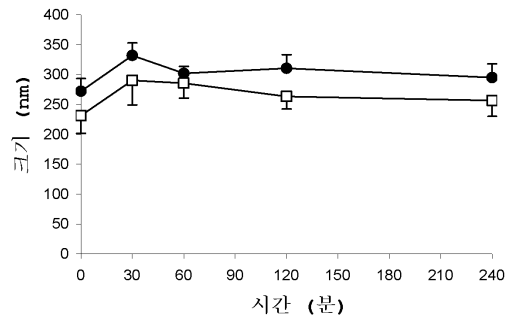
도면2



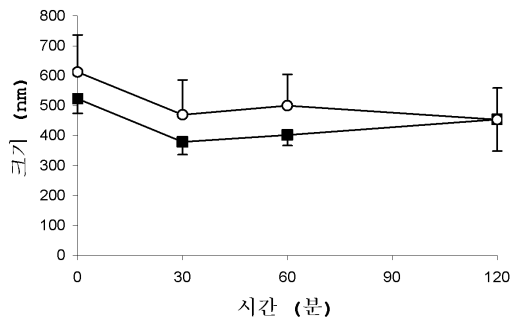
도면3



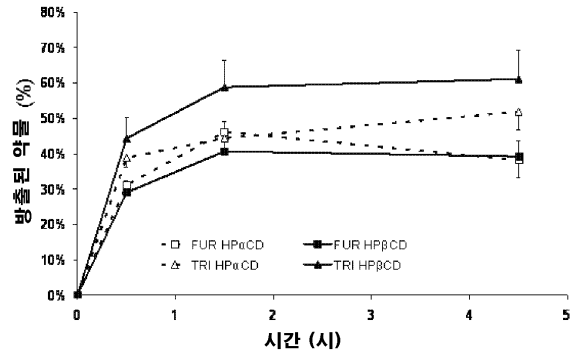
도면4



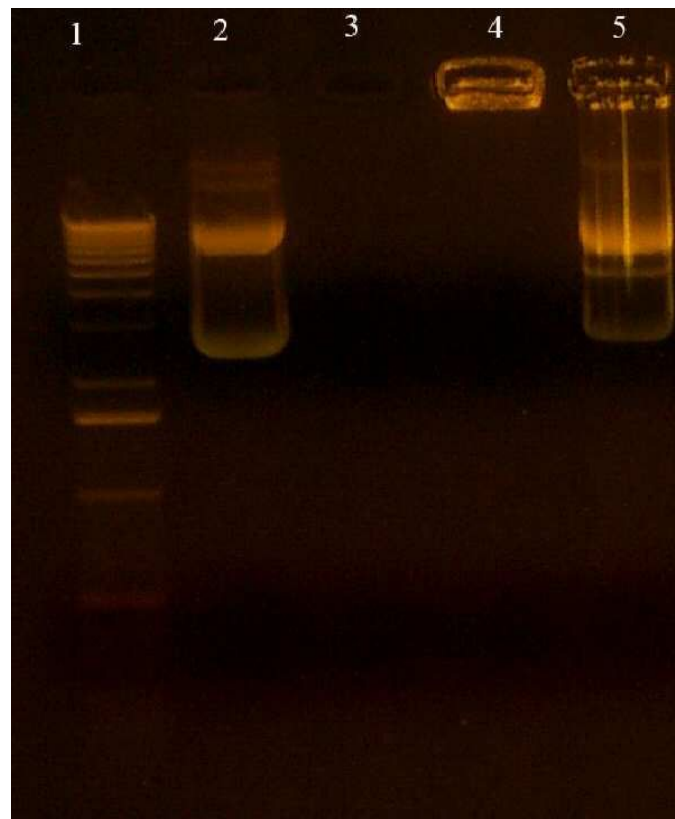
도면5



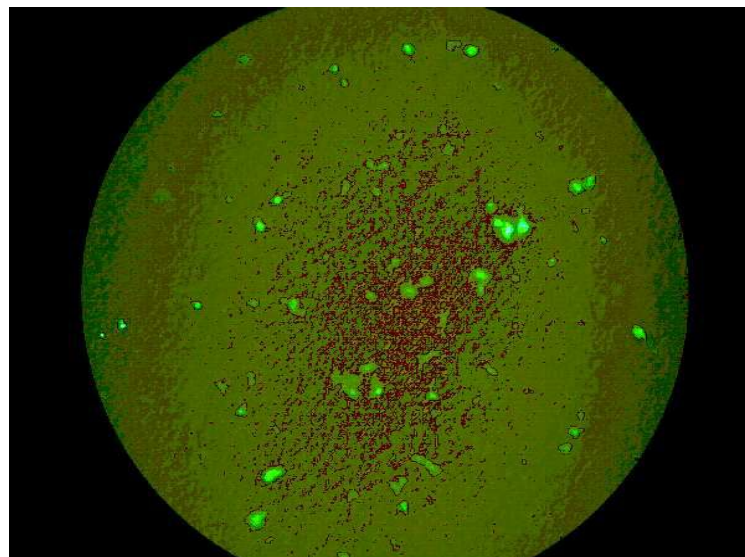
도면6



도면7



도면8



도면9

