



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년09월03일
(11) 등록번호 10-0980153
(24) 등록일자 2010년08월30일

- (51) Int. Cl.
C12N 15/87 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2003-7007253
(22) 출원일자(국제출원일자) 2001년11월29일
심사청구일자 2006년11월29일
(85) 번역문제출일자 2003년05월29일
(65) 공개번호 10-2003-0074632
(43) 공개일자 2003년09월19일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2001/005299
(87) 국제공개번호 WO 2002/44396
국제공개일자 2002년06월06일
- (30) 우선권주장
0029134.4 2000년11월29일 영국(GB)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
J Gene Med Vol.2(6):477-488. (2000.11.)*
W00054802 A2*
Hum Gene Ther. Vol.11(6):869-880
(2000.04.10.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
피씨아이 바이오테크 에이에스
노르웨이 엔-0377 오슬로 호프스베인 48
- (72) 발명자
베르그, 크리스티안
노르웨이엔-1389헤게달볼렌브엔.158
프라스믹카이테, 리나
노르웨이엔-0882오슬로브레켈리아3에
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 38 항

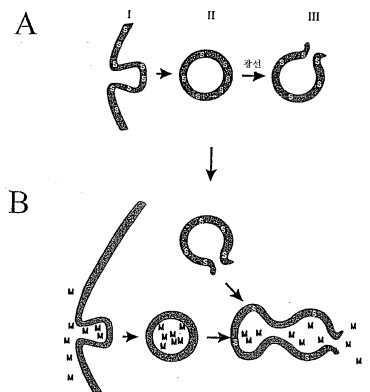
심사관 : 박영관

(54) 사이토졸 내로의 분자 전달을 위한 광화학적 내부이행

(57) 요약

본 발명은 세포를 광감작제와 접촉시키고, 세포를 광감작제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 광선으로 조사하고, 실질적으로 광선 조사와 동시에 또는 조사 후에 세포를 도입될 분자와 접촉시키는 것을 포함하는, 특히 암 치료, 유전자 요법 및 백신접종에 사용하기 위한, 분자를 세포의 사이토졸 내로 도입시키는 방법을 제공한다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

회그세,안테르스

노르웨이엔-0681오슬로트레스케브엔.32아

셀보,폴,크리스티안

노르웨이엔-0172오슬로프레드리케크밤스트.9

(81) 지정국

GM, AL, AM, AT(실용신안포함), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ(실용신안포함), DE(실용신안포함), DK(실용신안포함), EE(실용신안포함), ES, FI(실용신안포함), GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, SI, SK(실용신안포함), TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, AE, AG, CR, DM, DZ, MA, TZ, ZA, BZ, MZ, EC, PH, GH, GD, CO, HR, ID, SL, IN, YU, ZW, OM, ZM, AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG, SL, GH, GM, ZW, MZ, TZ, ZM), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, FI, CY, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG, GW, GQ), (30) 우선권주장

0029404.1 2000년12월01일 영국(GB)

0114695.0 2001년06월15일 영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

세포를 광감작제와 접촉시키고, 도입시킬 분자 (전달 분자)와 상기 세포를 접촉시키고 상기 세포를 광감작제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 광선으로 조사하는 것을 포함하며, 광선 조사 후의 시점에 세포를 전달 분자와 접촉시키고, 상기 전달 분자가 세포내 막-한정 구획에서 사이토졸 내로 쉽게 유리되지 못하는 것인, 분자를 시험관내, 생체외, 또는 인간을 제외한 동물의 생체내 세포의 사이토졸 내로 도입시키는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 세포를, 조사가 일어난 후 4시간 이내에 전달 분자와 접촉시키는 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 전달 분자를 30분 내지 6시간 동안 상기 세포와 접촉시키는 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 전달 분자가 단백질, 펩티드, 항체 또는 항원 또는 그의 단편인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 전달 분자, 또는 그의 일부분 또는 단편이 세포 표면 상에 제시 또는 발현되는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 세포가 항원 제시 세포인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 전달 분자가 세포독성 약물인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 전달 분자가 핵산 분자인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 핵산 분자가 벡터 분자 내에 혼입되는 것인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 광감작제가 TPPS₄, TPPS_{2a}, AIPcS_{2a} 및 다른 양친매성 광감작제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 광감작제가 5-아미노레볼린산 또는 5-아미노레볼린산의 에스테르 또는 그의 제약학상 허용되는 염 화합물인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 광감작제를 조사 전에 4 내지 24시간 동안 상기 세포와 접촉시키는 것인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 광감작제를 조사 전 1 내지 4시간 동안 상기 세포와 접촉시킨 후에 제거하는 것인 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 광감작제 및 전달 분자 중의 하나 또는 둘다가 하나 이상의 캐리어 분자, 표적화 분자 또는 벡터에 부착되거나, 결합되거나 또는 콘쥬게이트되는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 전달 분자가 부착되거나, 결합되거나 또는 콘쥬게이트되는 캐리어 분자, 표적화 분자 또는 벡터가 아데노바이러스, 폴리양이온, 양이온성 지질 또는 펩티드 또는 표적화된 벡터인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 전달 분자가 벡터에 부착되거나, 결합되거나 또는 콘쥬게이트되고, 상기 벡터가 캐리어 분자, 표적화 분자 또는 벡터에 부착되거나, 결합되거나 또는 콘쥬게이트되는 것인 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 폴리양이온이 폴리-L-리신, 폴리-D-리신 또는 슈퍼펙트 (SuperFect, 등록상표)인 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 양이온성 지질이 DOTAP인 방법.

청구항 24

제19항에 있어서, 상기 캐리어 분자가 리포솜 또는 지질 구조물인 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 분자가 도입되는 상기 세포의 50% 이상이 사멸되지 않는 방법.

청구항 26

제1항에 있어서, 조사 단계가 1 내지 10분인 방법.

청구항 27

전달 분자를 제1항에 정의된 방법에 따라서 시험관내, 생체의 또는 인간 제외 동물의 생체내의 하나 이상의 세포 내로 도입하고, 필요시에 상기 세포를 인간을 제외한 피검체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 피검체에서의 질병, 질환 또는 감염증을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 방법이 유전자 요법의 방법이고 상기 전달 분자가 핵산 분자인 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 방법이 백신접종의 방법이고 상기 전달 분자가 항원성 분자이고 상기 전달 분자, 그의 일부분 또는 단편이 세포 표면 상에 제시 또는 발현되는 방법.

청구항 30

제29항에 정의된 방법을 포함하는 면역 반응을 촉진시키는 방법.

청구항 31

제27항에 있어서, 상기 질병이 암인 방법.

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

전달 분자가 제1항에 정의된 방법에 따라 시험관내 또는 생체외의 하나 이상의 세포 내로 도입되는, 환자에서의 암을 치료 또는 예방하기 위한, 상기 하나 이상의 세포를 함유하는 조성물.

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

제34항에 있어서, 상기 전달 분자가 핵산 분자이고, 상기 조성물이 유전자 요법에 사용되는 조성물.

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

제34항에 있어서, 상기 전달 분자가 항원성 분자이고 상기 전달 분자, 그 일부분 또는 단편이 세포 표면 상에 제시 또는 발현되는, 백신접종에 사용되는 조성물.

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

제34항에 있어서, 면역 반응을 촉진시키기 위한 조성물.

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

제14항에 있어서, 상기 백터 분자가 아데노바이러스인 방법.

청구항 51

제17항에 있어서, 상기 광감작제가 조사 직전에 4 내지 24 시간 동안 상기 세포와 접촉되는 방법.

청구항 52

제21항에 있어서, 상기 백터 분자가 아데노바이러스인 방법.

청구항 53

제24항에 있어서, 상기 리포좀 또는 지질 구조물이 하나 이상의 양이온성 지질을 함유하는 것인 방법.

청구항 54

제21항에 있어서, 상기 폴리양이온이 폴리-L-리신, 폴리-D-리신 또는 슈퍼펙트 (SuperFect, 등록상표)인 방법.

청구항 55

제21항에 있어서, 상기 양이온성 지질이 DOTAP인 방법.

청구항 56

삭제

청구항 57

제27항에 있어서, 광감작제가 TPPS₄, TPPS_{2a}, AIPcS_{2a} 및 다른 양친매성 광감작제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 58

삭제

청구항 59

제34항에 있어서, 광감작제가 TPPS₄, TPPS_{2a}, AIPcS_{2a} 및 다른 양친매성 광감작제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 광감작제 및 그 광감작제를 활성화시키는데 효과적인 과정의 광선에 의한 세포의 조사를 이용하여 분자를 세포의 사이토졸 내로 도입시키는 개선된 방법에 관한 것이다.
- [0002] 대부분의 분자들은 세포막을 용이하게 투과하지 못한다. 분자를 생세포의 사이토졸 내로 도입시키는 방법은 생물학적 과정을 조작하고 연구하는데 유용한 도구이다. 오늘날 가장 통상적으로 이용되는 방법에는 미량주사, 적혈구 고스트-매개된 융합 (fusion) 및 리포솜 융합, 피노솜 (pinosome)의 삼투성 용해, 스크레이프 로딩 (scrape loading), 일렉트로포레이션 (electroporation), 인산칼슘 및 바이러스-매개된 트랜스펙션 (transfection)이 있다. 이들 기술은 많은 경우에 비실용적이고 시간이 걸리며 비효율적이거나, 상당한 세포사를 야기시킬 수 있지만, 이들은 배양물 중의 세포를 연구하는데 유용하다. 따라서, 이러한 기술은 세포가 생육 가능하고/하거나 기능적인 상태로 유지되는 것이 필요한 생물학적 또는 의학적인 연구에서 또는 치료법에서 사용하는데 최선의 것은 아니다.
- [0003] 포르피린 및 그밖의 다수의 다른 광감작성 화합물이 세포 및 조직에 대하여 세포독성 효과를 유도할 수 있다는 것은 잘 알려져 있다. 이들 효과는, 광감작성 화합물을 광선에 대해 노출시키면 독성이 될 수 있거나, 세포 및 세포 구조물의 막을 포함한 세포성 물질 또는 생체분자를 손상시키는 단일항 (singlet) 산소 또는 그밖의 다른 산화성 래디칼과 같은 독성 물질을 방출시킬 수 있으며, 이러한 세포 또는 막 손상은 결국 세포를 사멸시킬 수 있다는 사실에 근거한 것이다. 이들 효과는 특히 종양성 질병을 포함하는 다양한 비정상 상태 또는 질환의 치료에 이용되어 왔다. 이러한 치료는 광역학적 요법 (PDT)이라고 부르며, 신체의 병소 부위에 광감작제 (광화학 요법제)를 투여하고, 이어서 광감작제를 활성화시키고 그것을 세포독성 형태로 전환시키기 위해서 활성화 광선에 노출시킴으로써 병소 세포를 사멸시키거나 이들의 증식 잠재성을 감소시키는 것을 포함한다. 목적하는 표적 부위, 예를 들어 종양 또는 다른 병소에 우선적으로 또는 선택적으로 집적되는 광감작제가 공지되어 있다.
- [0004] 특히 프소랄렌, 포르피린, 클로린 및 프탈로시아닌을 포함하는 다양한 광감작제가 공지되어 있다. 이러한 약물은 광선에 노출되면 독성으로 된다.
- [0005] 광감작성 약물은 다양한 기전에 의해서 직접적으로 또는 간접적으로 그들의 효과를 나타낼 수 있다. 따라서, 예를 들어 특정 광감작제는 광선에 의해서 활성화되면 직접적으로 독성으로 되는 반면에, 다른 것은 세포성 물질 및 지질, 단백질 및 핵산과 같은 생체분자에 대해 매우 파괴적인 독성 물질, 예를 들어 단일항 산소 또는 그밖의 다른 산소계 자유 래디칼과 같은 산화제를 생성시키는 작용을 한다.
- [0006] 포르피린 광감작제는 독성 산소 성분의 생성을 통해 간접적으로 작용하며, PDT를 위한 특히 바람직한 후보물질인 것으로 간주된다. 포르피린은 헴 (heme)의 합성시에 천연적으로 발생하는 전구체이다. 특히, 헴은 효소인 페로킬레이타제 (ferrochelatase)의 작용에 의해서 철 (Fe^{3+})이 프로토포르피린 IX (PpIX) 내에 통합될 때 생산된다. PpIX는 매우 강력한 광감작제인 반면에 헴은 광감작 효과를 갖지 않는다. 다양한 포르피린계 또는 포르피린-관련 광감작제가 본 기술분야에서 공지되어 있으며 문헌에 기술되어 있다.
- [0007] PDT에 사용되는 대부분의 감작제의 세포독성 효과는 주로 광선에 대한 광감작제의 노출 시에 형성되는 단일항 산소를 통해서 매개된다. 이 반응성 중간체는 세포내에서 매우 짧은 수명을 갖는다 ($<0.04 \mu s$). 따라서, PDT의 일차적인 세포독성 효과는 광선 노출 중에 1O_2 의 형성 부위에 매우 인접해서 발휘된다. 1O_2 는 단백질 (히스티딘, 트립토판, 메티오닌, 시스테인, 티로신), DNA (구아닌), 불포화 지방산 및 콜레스테롤과 반응하여 이들을 산화시킨다. PDT의 이점 중의 한가지는 광선에 노출되지 않는 조직은 영향을 받지 않고 유지된다는 점, 즉 선택적 PDT 효과를 얻을 수 있다는 점이다. 원치 않는 세포 집단, 예를 들어 종양 세포를 파괴하기 위해서 PDT를 사용하는데 관한 다양한 문헌이 있다. 특히 문헌에는 단독으로 사용되거나 또는 표적화제 (targeting agent), 예를 들어 종양 세포 수용체 결합인자에 대해 지향되는 면역글로불린과 콘주게이트되어 더욱 세포 특이적인 복합체를 형성하는 다수의 광역학적 화합물이 기술되어 있다. 헤마토포르피린 유도체와 같은 특성의 광화학적 화합물은 더구나 악성 세포에 집적되는 고유의 능력을 갖는다. 이러한 방법 및 화합물은 노르웨이 특허 제173319호 및 노르웨이 특허 출원 제90 0731, 176 645, 176 947, 180 742, 176 786, 301 981, 30 0499 및 89 1491호에 기술되어 있다.
- [0008] WO 93/14142에는 항암제, 및 코폴리머성 캐리어에 부착된 광활성화제 (즉, 광감작제)를 함유하는 약물 전달 시스템이 기술되어 있다. 이 복합체는 투여한 후에 세포흡수작용 (pinocytosis) 또는 식작용 (phagocytosis)에 의해서 세포 내부로 유입되어 엔도솜 및 라이소솜 내부에 위치한다. 라이소솜 내에서 항종양제와 폴리머 사이

의 결합은 가수분해되어 전자는 라이소좀 막을 통해서 사이토졸 내로 수동적으로 확산할 수 있다. 따라서, 이 방법의 유용성은 라이소좀 막을 가로질러서 확산할 수 있는 작은 분자 화합물로 제한된다. 확산을 위한 시간 지체 후에, 적절한 파장 및 에너지의 광원을 이용하여 광활성화 화합물을 활성화시킨다. 항암제와 광활성화제의 효과가 합쳐져서 세포를 파괴시킨다. 따라서 상기한 바와 같은 그러한 PDT 방법은 세포 구조물의 파괴를 지시하여 세포사를 유도한다.

- [0009] 한편, WO 96/07432 및 WO 00/54802는 막-불투과성인 분자를 광범위한 세포 파괴 또는 세포사를 일으키지 않으면서 세포의 사이토졸 내로 도입시키는 기전으로서 광역학적 효과를 이용하는 방법에 관한 것이다. 이 방법에서, 내부이행될 분자 및 광감작성 화합물은 동시에 또는 순차적으로 세포에 가해지고, 이때에 광감작성 화합물 및 분자는 엔도솜, 라이소좀 또는 그밖의 다른 세포내 막으로 한정된 구획으로 세포내이입되거나 또는 다른 방식으로 전위된다.
- [0010] 세포의 세포내 구획으로 전위될 분자 및 광감작성 화합물은 함께 또는 순차적으로 세포에 가해져서 세포에 의해 함께 동일한 세포내 구획 내로 흡수된다 (즉, 공동-전위된다). 세포 내에 내부이행될 분자의 방출은, 그후에 광감작성 화합물을 활성화시키는데 적합한 파장의 광선에 세포를 노출시키고, 이는 다시 세포내 구획 막을 붕괴시키고 이어서 광감작제와 동일한 구획 내에 위치하는 분자를 사이토졸 내로 방출시키는 것으로 이루어진다. 이러한 방법은 "광화학적 내부이행 (internalization)" 또는 PCI라고 불리운다. 따라서, 이 방법에서 세포를 광선에 노출시키는 최종 단계는 당해 분자가 광감작제와 동일한 세포내 구획으로부터 방출되어 사이토졸 내에 존재하도록 한다.
- [0011] 이 방법을 효과적인 것으로 만들기 위해, 조사가 이루어질 때 광감작성 화합물 및 사이토졸 내로 방출될 분자 둘다가 동일한 세포내 구획 내에 존재하는 것이 필수적인 것으로 생각되었다.
- [0012] 이제 놀랍게도, 세포를 광선에 노출시키는 것이 반드시 최종 단계는 아니며 분자 및 광감작제가 광선 노출 시에 동일한 세포내 구획 내에 위치하는지에 좌우되지 않는 유사한 PCI 방법에 의해 분자가 세포의 사이토졸 내로 도입될 수 있음이 밝혀졌다. 그러한 방법에서는, 내부이행되어 사이토졸로 전달될 분자가 세포와 접촉하게 되기 전에 광감작제가 세포와 접촉되고 조사에 의해 활성화될 수 있다. 따라서, 내부이행될 분자 및 광감작제가 광선 노출시에 반드시 동일한 세포내 구획 내에 위치하는 것이 아니라는 사실에도 불구하고, 분자는 여전히 세포로 유입되고 사이토졸로 전달된다. 이러한 결과는 매우 놀라운 것이며 이러한 방법은 광선 조사가 최종 단계인 방법에 비해 상당한 이점을 나타낸다.
- [0013] 그러므로, 가장 일반적으로 본 발명은 세포를 광감작제와 접촉시키고, 상기 세포를 도입될 분자와 접촉시키고 상기 세포를 광감작제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 광선으로 조사하는 것을 포함하며, 상기 조사가 상기 분자의 상기 광감작제 함유 세포내 구획 내로의 세포성 흡수 전에, 바람직하게는 상기 분자의 임의의 세포내 구획 내로의 세포성 흡수 전에 행해지는, 분자를 세포의 사이토졸 내로 도입시키는 방법을 제공한다.
- [0014] 따라서, 한가지 별법에서, 상기 조사는 분자의 세포내 구획 내로의 세포성 흡수 후에 행해져서 내부이행될 상기 분자 및 광감작제가 광선 노출시에 동일한 세포내 구획 내에 위치하지 않을 수 있다. 그러나, 바람직한 실시태양에서 조사는 내부이행될 분자의 세포성 흡수 전에 행해진다.
- [0015] 본원에 사용된 "내부이행"은 분자의 사이토졸내 전달을 의미한다. 본 발명의 경우에, "내부이행"은 세포내/막 결합 구획으로부터 세포의 사이토졸 내로의 분자의 방출 단계를 포함한다.
- [0016] 본원에 사용된 "세포성 흡수" 또는 "전위"는 세포막 외부에 있는 분자들이, 예를 들어 세포내이입 또는 다른 적절한 흡수 기전에 의해 밖에 있는 세포막에 대해 내부에서 발견되도록 세포 내로, 예를 들면 내형질세망, 골지체, 라이소좀, 엔도솜 등과 같은 세포내 막으로 한정된 구획 내로 흡수되거나 또는 그와 결합되는 내부이행 단계 중의 하나를 의미한다.
- [0017] 특히, 바람직한 면에서 본 발명은 세포를 광감작제와 접촉시키고, 상기 세포를 광감작제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 광선으로 조사하고, 실질적으로 조사와 동시에 또는 조사 후에 상기 세포를 도입될 분자와 접촉시키는 것을 포함하는, 분자를 세포의 사이토졸 내로 도입시키는 방법을 제공한다.
- [0018] 바람직하게는, 세포는 조사가 일어난 후의 시점에서 도입 또는 내부이행될 분자 (이후에는, 전달 분자로서 칭함)와 접촉되거나, 또는 다른 말로 하면 세포와 광감작제의 접촉에 의한 세포의 광화학적 처리 및 그후의 조사가 실시된 후 분자가 세포에 첨가된다. 이 실시태양에서, 사이토졸 내로 도입될 분자는 광화학적 처리가 일어난 후의 임의의 시점에서 광화학적 처리된 세포와 접촉하게 되어 전달 분자가 여전히 세포 내로 흡수될 수 있게 된다. 분자가 세포와 접촉하게 되어 흡수될 수 있는 시간대는 예를 들어 세포 유형, 해당 특정 분자, 사용

되는 특정 광감작제 및 광처리 기간에 좌우될 수 있다. 이 시간대는 필요시에 특정 설정 조건에 대해 결정될 수 있다. 그러나, 바람직하게는 사이토졸로 전달될 분자는 광화학적 처리 후에 비교적 바로, 예를 들어 광화학적 처리 후에 24시간 내에, 더욱 바람직하게는 광화학적 처리 후에 처음 10시간 내에, 예를 들어 처음 5시간 내에 또는 더욱 바람직하게는 처음 1시간 내에 세포에 노출된다. 예를 들어, 시험관내 또는 생체외에서 전달 분자는 조사한 직후 또는 조사한 후 바로 투여를 시작하여 특정 기간, 예를 들어 30분 내지 24시간, 바람직하게는 1 내지 2시간 동안 투여될 수 있으며, 예를 들어 조사의 말기가 출발 시점으로서 간주된다면, 전달 분자는 0분 내지 24시간, 예를 들어 0 내지 4시간에 가해질 수 있다.

[0019] 전달 분자가 광선 조사한 지 상당한 시간 후에 세포와 접촉된다 하더라도, 세포 내로의 내부이행은 여전히 가능함이 관찰되었다. 예를 들어, 전달 분자는 조사한 지 1시간 이상 후에, 예를 들어 조사한 지 2, 4, 8, 10 또는 심지어는 12시간 이상 후에 가해질 수 있다.

[0020] 따라서, 바람직한 실시태양에서 상기 세포는 1 내지 2 또는 3시간 또는 그 이상의 기간 동안 조사한 지 0 내지 4시간, 예를 들어 적어도 0.5 내지 3시간 후에 상기 전달 분자와 접촉된다. 전달 분자가 투여되는 시간은 방법이 시험관내에서 수행되는지 또는 생체내에서 수행되는지에 따라서 변화될 것이다. 시험관내 방법의 경우, 전달 분자는 예를 들어 세포가 시험관내 배양물에서 성장되고 있어 분자가 적절한 시점에 세포와 접촉하기가 비교적 쉽다면, 일반적으로 모든 표적 세포와 동시에 접촉하게 될 수 있다. 그러나, 생체내 방법의 경우 표적 세포와 전달 분자의 접촉 단계는 분명히 더욱 복잡하고 투여 방식 및 표적 세포의 위치에 좌우될 것이다. 예를 들어, 전달 분자가, 예를 들어 국소 주입에 의해 표적 세포에 직접 투여될 수 있다면, 전달 분자는 비교적 신속하게, 예를 들어 투여한 지 수분 내지 수시간 후에 표적 세포 (또는 적어도 그의 일부분)와 접촉하게 될 것이다. 한편, 전달 분자가 멀리 있는 표적을 위해 정맥내 주입에 의해 투여된다면, 이들 분자는 표적 세포와 접촉하게 되는데 많은 시간이 걸릴 수 있다. 예를 들어, 그 분자는 표적 세포에 도달하는데 투여한 후 24 내지 96시간이 걸릴 수 있다. 이러한 "가능한 도착 시간 (journey time)"은 조사 시간 및 광감작제의 투여를 기준으로 전달 분자를 투여하는 적절한 시간을 결정하는데 고려되어야 할 것이다.

[0021] 본 발명의 별법의 실시태양에서는, 전달 분자가 광선 조사 후에 세포와 접촉하지 않고, 조사와 실질적으로 동시에 세포와 접촉하게 될 수 있다. 본원에 사용된 "실질적으로 동시에"는 정확히 동일한 시간에, 즉 동시성을 포함할 뿐만 아니라 분자를 조사 바로 전에, 예를 들어 조사 전 1 또는 2시간 내에 세포에 가하는 것을 포함하지만, 단 전달 분자의 세포성 흡수가 조사 시에 일어나지 않았고 조사 후에라도 일어날 수 있거나 또는 전달 분자의 세포성 흡수가 일어났다면 전달 분자 및 광감작제가 광선 노출 시에 동일한 세포내 구획에 집적되지 않는 것을 전제로 한다.

[0022] 상기한 바와 같이, 상기 목적하는 효과를 달성하기 위한 전사 분자 및 광감작제의 정확한 첨가 타이밍 및 조사 타이밍은 처리될 세포, 사용 제제 및 분자 및 특히 시험관내 또는 생체내 시스템이 해당되는지에 관한 세포의 환경을 비롯한 각종 인자를 고려할 필요가 있다. 적절한 타이밍에 대한 고려 사항은 쉽게 결정될 수 있다.

[0023] 일반적인 원리로서, 적절한 조건은 조사 단계가 전달 분자의 세포성 흡수 전에 (광감작제 자체는 세포내 구획 내로 흡수되었다고 가정됨) 또는 전달 분자 및 광감작제가 광선 노출 시에 동일한 세포내 구획 내에 위치하지 않는다면 전달 분자의 세포성 흡수 후에 일어나도록 결정된다. 후자의 시나리오에서, 전달 분자는 분명히 조사가 일어나기 전에 세포와 접촉하게 될 것이다. 이는 본 발명의 바람직한 실시태양 중의 하나를 제공한다.

[0024] 전달 분자 및 광감작제가 조사 전에 세포에 가해지는 이미 개시된 광화학적 내부이행 방법은 해당 분자가 광선 노출 전에 동일한 세포내 구획에 위치하여 광감작제의 광활성화에 의한 이들 구획의 세포용해 결과 분자 및 광감작제 둘다가 사이토졸 내로 방출되는 지에 좌우되었다. 이를 도시하는 개략도는 도 7에 나타내어져 있다.

[0025] 본 발명의 방법에서, 사이토졸 내로 도입될 전달 분자 및 광감작제는 광선 노출 시에 동일한 세포내 구획 내에 존재하지 않는데, 그 이유는 세포가 광선에 노출되기 바로 전에 또는 후에만 전달 분자가 세포에 가해지기 때문이다.

[0026] 본 발명의 방법의 작용 기전은 아직 알려져 있지 않으며 이 방법이 효과가 있다는 것은 사실은 실로 놀라운 일이다. 이론에 기초되길 바라는 것은 아니지만, 이러한 놀라운 발견에 대한 이유는 광화학적 손상된 소포와 새롭게 형성된 세포내이입된 소포의 융합이 일어나고 그후에 이어서 새롭게 세포내이입된 분자가 사이토졸 내로 방출되는 것일 수 있다. 이를 예시하는 개략도는 도 7에 나타내어져 있다. 별법으로, 라이소좀 효소 또는 후기 엔도솜과 같은 라이소좀 효소 함유 소포에 대한 광화학적 손상은 내부이행될 분자의 세포내 분해 속도를 감소시킬 수 있다. 이는 라이소좀 효소 함유 소포의 수송 또는 더 낮은 가수분해 활성을 갖는 세포포입성 소포

(endocytic vesicle)로의 수송 감소로 인한 것일 수 있다. 이런방식에서, 이들 분자는 라이소좀 분해 경로가 활성화될 때 보다 세포봉입성 구획화를 탈출하는데 더 많은 시간을 필요로 할 것이다. 또다른 대안적 설명은 세포의 광화학적 처리가 세포의 원형질 막에 대한 미약한 손상을 유도하여 세포막을 통한 거대분자의 투과 증가를 유도하게 되는 것일 수 있다. 그러나, 수행된 실험 (실시에 7 참조)은 이것이 대개는 그 이유가 아님을 제안한다.

[0027] 따라서, 본 발명은 임의의 분자를 시험관내 (즉, 배양물 내) 또는 생체내에서 생세포의 사이토졸 내로 수송 또는 트랜스펙션시켜서 그후에 분자가 사이토졸에서 이용가능하도록 하는 방법에 관한 것이다.

[0028] 이러한 방법은 세포의 내부로 분자 (또는 그의 일부분 또는 단편)를 전달하기 위해서 뿐만 아니라 어떤 상황에서는 세포 표면 상에 이들을 제시하거나 발현시키기 위해서도 사용될 수 있다. 따라서, 전달 분자들이 본 발명의 방법에 따라서 세포 사이토졸 내로 수송되어 방출된 이후에, 해당 세포(들)가 예를 들어 항원 제시 세포 (antigen-presenting cell)와 같은 특수 세포라면, 분자 또는 단편은 세포의 표면으로 수송될 수 있으며, 여기에서 그것은 세포의 외부 상에, 즉 세포 표면 상에 제시될 수 있다. 이러한 방법은 면역 반응을 유도하거나, 촉진시키거나 또는 보강시키기 위해서 백신 성분, 즉 항원 또는 면역원을 해당 세포의 표면 상에 제시하기 위해 세포에 도입시킬 수 있는 백신 접종의 분야에서 특별한 유용성을 갖는다. 세포 표면 상에 분자를 발현시킬 수 있는 유용성에 대한 더 상세한 것은 WO 00/54802에 기재되어 있다.

[0029] 본 발명의 방법을 이용하여 세포의 사이토졸 내로 도입될 수 있는 전달 분자는 세포막을 쉽게 투과하지 못하는 분자를 포함한다. 또한, 본 발명은 세포의 막 또는 세포내 소포의 막을 부분적으로만 투과할 수 있는 분자의 사이토졸 전달 및 활성을 증가시킬 수 있다. 전달 분자는 유기 화합물, 단백질 또는 단백질의 단편, 예를 들어 펩티드, 항체 또는 그의 항원 또는 단편일 수 있다. 본 발명에 따라 사용하기 위한 전달 분자의 다른 부류는 단백질 독소와 같은 세포독성 약물 또는 세포독성 유기 화합물, 예를 들어 블레오마이신이다. 적절한 전달 분자의 또다른 부류는 핵산이다.

[0030] 핵산은 예를 들어, 치료 단백질, 안티센스 RNA 분자, 리보자임, RNA 압타머 또는 트리플렉스 형성 올리고뉴클레오티드를 코딩하는 유전자의 형태로 사용될 수 있다. 별법으로, 핵산은 환자에서 특정 돌연변이를 복구하기 위해 비코딩 분자, 예를 들어 합성 DNA 또는 RNA 안티센스 분자, 리보자임, 압타머, 트리플렉스 형성 올리고뉴클레오티드, 펩티드 핵산 (PNA), 전사 인자 "디코이 (decoy)" DNA 또는 키메릭 올리고뉴클레오티드의 형태로 이용될 수 있다. 적절하다면, 핵산 분자는 벡터 분자 또는 물질, 예를 들어 플라스미드 벡터 또는 바이러스 입자 또는 박테리오파지 내로 선택적으로 통합되는 전유전자 또는 핵산 단편의 형태로 이용될 수 있다. 후자의 형태는 전달 분자가 유전자 요법의 방법에 사용되어야 할 때 특별한 이용성을 갖는다.

[0031] 본 발명에 따라 사용될 광감작제는 세포내 구획, 특히 엔도솜 또는 라이소솜에 집적되는 물질 중의 어떤 것이라도 될 수 있다. 이러한 광감작제의 종류는 본 기술분야에서 공지되어 있으며, WO 96/07432를 포함한 문헌에 기술되어 있다. 이에 관하여는 배양물에서 세포의 엔도솜 및 라이소솜 내에 위치하는 것으로 밝혀진 디- 및 테트라설펜화 알루미늄 프탈로시아닌 (예를 들어, AlPcS_{2a}), 설펜화 테트라페닐포르핀 (TPPS_n), 나일 블루, 클로린 e₆ 유도체, 유로포르피린 I, 필로에리트린, 헤마토포르피린 및 메틸렌블루가 언급될 수 있다. 이것은 대부분의 경우에 광감작제의 세포봉입성 흡수에 기인한 것이다. 따라서, 광감작제는 바람직하게는 라이소솜 또는 엔도솜의 내부 구획 내로 흡수되는 물질이다. 그러나, 다른 세포내 구획, 예를 들어 내형질세망 또는 골지체에 위치되는 다른 광감작제가 이용될 수도 있다. 또한, 광화학적 처리가 세포의 다른 성분 (즉, 막으로 한정된 구획 이외의 성분)에 대해 효과가 있는 기전이 이루어질 수도 있다. 따라서, 예를 들어 한가지 가능성은 광화학적 처리가 세포내 수송 또는 소포 융합에 중요한 분자를 파괴시키는 것일 수 있다. 이러한 분자는 반드시 막으로 한정된 구획에 위치할 수 있는 것은 아니지만, 이러한 분자의 광화학적 손상은 예를 들어 이러한 분자에 대한 광화학적 효과가 라이소솜과 같은 분해성 소포로 내부이행될 분자 (즉, 전달 분자)의 수송 감소를 유도하는 기전에 의해 전달 분자의 광화학적 내부이행을 유도하므로, 내부이행될 분자는 분해 전에 사이토졸로 탈출할 수 있게 된다. 반드시 막으로 한정된 구획에 위치하지는 않는 이러한 분자의 예는 다이네인 및 다이낙틴의 성분; 및 예를 들어 rab5, rab7, N-에틸말레이미드 감수성 인자 (NSF), 가용성 NSF 부착 단백질 (SNAP) 등과 같은 미세관 수송 시스템의 수개의 분자이다.

[0032] 따라서, 언급될 수 있는 적합한 광감작제의 부류에는 포르피린, 프탈로시아닌, 푸르푸린, 클로린, 벤조포르피린 나프탈로시아닌, 양이온성 염료, 테트라사이클린 및 라이소솜 지향성 약염기 또는 그의 유도체가 포함된다 (Berg et al., J. Photochemistry and Photobiology, 1997, 65, 403-409). 다른 적합한 광감작제는 텍사피린, 페오포르비드, 포르피센스, 박테리오클로린, 케토클로린, 헤마토포르피린 유도체 및 그의 유도체, 5-아미노레볼

린산 및 그의 유도체에 의해 유도된 내인성 광감작제, 광감작제 사이의 다이머 또는 다른 콘주게이트를 포함한다.

[0033] 바람직하게는, 광감작제는 임의의 다른 거대분자에 콘주게이트되지 않은 자유 형태이다. 그러나, 광감작제는 후술되는 캐리어 또는 다른 분자에 결합되거나, 부착되거나 또는 콘주게이트되고, 예를 들어 표적 항체에 부착되거나 또는 폴리리신과 같은 캐리어에 커플링될 수 있다.

[0034] 바람직한 광감작제는 TPPS₄, TPPS_{2a}, AIPcS_{2a} 및 다른 양친매성 광감작제를 포함한다. 바람직한 면에서, 본 발명은 사용될 수 있는 광감작제가 5-아미노레블린산 또는 5-아미노레블린산의 에스테르인 화합물 또는 그의 제약학상 허용되는 염인 방법을 제공한다.

[0035] 이러한 에스테르에서, 5-아미노기는 치환 또는 비치환될 수 있으며, 후자의 경우는 ALA 에스테르이다.

[0036] 더욱 상세하게는, 본 발명에 따라 사용하기 위한 ALA 에스테르는 5-아미노레블린산의 임의 치환된 알칸올과의 에스테르, 즉 알킬 에스테르 또는 치환된 알킬 에스테르이다.

[0037] 편리하게 사용될 수 있는 ALA 에스테르는 하기 화학식 I의 화합물 및 그의 염이다.

화학식 I



[0039] 여기서, R¹은 히드록시, 알콕시, 아실옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아미노, 아릴, 옥소 또는 플루오로기에 의해 임의로 치환되고 산소, 질소, 황 또는 인 원자에 의해 임의로 차단되는 알킬을 나타낼 수 있으며; 각각 동일하거나 또는 상이할 수 있는 R²는 수소 원자 또는 R¹ 기이다.

[0040] 치환된 알킬 R¹ 기는 일- 또는 다중 치환될 수 있다. 따라서, 적합한 R¹ 기는 예를 들어 비치환된 알킬, 알콕시알킬, 히드록시알콕시알킬, 폴리히드록시알킬, 히드록시 폴리 알킬렌옥시알킬 등을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "아실"은 카르복실레이트 및 카르보네이트기를 포함하며, 따라서 아실옥시 치환된 알킬 기는 예를 들어 알킬카르보닐옥시알킬을 포함한다. 이러한 기에서, 임의의 알킬렌 성분은 바람직하게는 하기 알킬 기에 대해 정의된 탄소 원자 함량을 갖는다. 바람직한 아릴 기는 페닐 및 모노시클릭 5-7원 헤테로방향족, 특히 페닐을 포함하며 이러한 기 자체는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0041] 대표적인 치환된 알킬 기 R¹은 알콕시메틸, 알콕시에틸 및 알콕시프로필 기 또는 아실옥시메틸, 아실옥시에틸 및 아실옥시프로필 기, 예를 들면 피발로일옥시메틸을 포함한다.

[0042] 본 발명에 따라 광감작제로서 사용하기 위한 바람직한 ALA 에스테르는 R¹이 비치환된 알킬기를 나타내고(내거나) 각 R²가 수소 원자를 나타내는 것을 포함한다.

[0043] 본원에 사용된 용어 "알킬"은 임의의 긴 또는 짧은 사슬, 직쇄 또는 분지쇄 지방족 포화 또는 불포화 탄화수소기를 포함한다. 불포화 알킬 기는 일- 또는 다중 불포화될 수 있고 알케닐 및 알키닐 기 둘다를 포함한다. 이러한 기는 40개 이하의 탄소 원자를 포함할 수 있다. 그러나, 10개 이하, 예를 들면 8개, 더욱 바람직하게는 6개 이하, 특히 바람직하게는 4개 이하의 탄소 원자를 함유하는 알킬기가 바람직하다.

[0044] 본 발명에 따라 사용하기 위한 바람직한 광감작제로는 특히 ALA-메틸에스테르, ALA-에틸에스테르, ALA-프로필에스테르, ALA-헥실에스테르, ALA-헵틸에스테르 및 ALA-옥틸에스테르 및 그의 염이 언급될 수 있다.

[0045] 광감작제는 반드시 조사 전에 세포와 접촉된다. 그러나, 전달 분자와 다르게, 이 성분은 조사 시에 상기 성분이 세포내 구획 내로 흡수되도록 조사 전에 충분히 투여되어야 한다. 따라서, 편리하게 상기 성분은 조사하기 1 내지 72시간 전에, 예를 들면 조사하기 4 내지 48시간, 예를 들면 4 내지 24시간 전에 가해진다. 다시, 전달 분자를 세포와 접촉시키는 단계와 관련하여 상기 논의된 바와 같이, 조사 시점을 기준으로 한, 표적 세포와의 접촉을 위한 광감작제의 투여 타이밍은 광감작제가 표적 세포에 도달하고 그에 의해 흡수되는데 걸리는 시간에 좌우될 것이다. 이 시간은 방법이 실시되는 곳이 시험관내인지 생체내인지 또는 투여가 표적 조직으로 향하는지 또는 원위 부위에서 이루어지는지에 따라 가변적이다. 모든 경우에, 조사가 일어나기 전에 광감작제가 흡수되는 것이 중요하다. 상기 광감작제는 조사에 이르기까지, 예를 들면 1 또는 4 내지 72시간, 바람직하게는 4

내지 24시간, 예를 들면 12 내지 20시간 동안 상기 세포와의 접촉을 유지할 수 있거나, 또는 조사 직전에 광감작제-비함유 배지에서, 예를 들면 5분 이상 동안, 예를 들면 10분 내지 8시간 동안, 예를 들면 1시간 내지 4시간 동안 접촉으로부터 제거될 수 있다.

[0046] 임의로, 세포로 도입될 전달 분자 및 광감작제 중의 하나 또는 다른 것 또는 둘다, 광감작제 또는 전달 분자의 흡수를 촉진시키거나 증가시키는 작용을 할 수 있거나 이들 물질을 특정 세포 유형, 조직 또는 세포내 구획으로 표적화하거나 전달하는 작용을 할 수 있는 하나 이상의 캐리어 분자, 표적화 분자 또는 벡터에 부착되거나, 결합되거나 또는 콘주게이트될 수 있다. 캐리어 시스템의 예는 폴리리신 또는 다른 폴리양이온, 텍스트란 설페이트, 다른 양이온성 지질, 리포솜, 재구성된 LDL-입자, 입체적으로 안정된 리포솜 또는 아데노바이러스 입자를 포함한다. 이들 캐리어 시스템은 일반적으로 전달 분자 및(또는) 광감작제의 약동학을 개선시키고 그들의 세포성 흡수를 증가시킬 수 있으며 또한 전달 분자 및(또는) 광감작제를 광화학적 내부이행에 특히 유리한 세포내 구획으로 향하게 할 수 있지만 일반적으로 전달 분자 및(또는) 광감작제를 특정 세포 (예를 들면, 암 세포) 또는 조직으로 표적화하는 능력은 갖지 않는다. 그러나, 이러한 특이적 또는 선택적인 표적화를 위해, 캐리어 분자, 전달 분자 및(또는) 광감작제는 전달 분자의 원하는 세포 또는 조직으로의 특이적 세포성 흡수를 촉진시킬 특정 표적화 분자에 결합되거나 또는 콘주게이트될 수 있다. 이러한 표적화 분자는 또한 전달 분자를 광화학적 내부이행에 특히 유리한 세포내 구획으로 향하게 할 수도 있다.

[0047] 문헌 (예를 들면, Curriel, D. T. (1999), *Ann. New York Acad. Sci.* 886,158-171; Bilbao, G. et al. (1998), in *Gene Therapy of Cancer* (Walden et al., eds., Plenum Press, New York), Peng K. W. and Russell S. J. (1999), *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 454-457, Wickham T. J. (2000), *Gene Ther.* 7, 110-114)에 기술된 바와 같은 많은 다른 표적화 분자가 이용될 수 있다.

[0048] 캐리어 분자 및(또는) 표적화 분자는 전달 분자에, 광감작제에 또는 둘다에 결합되거나, 부착되거나 또는 콘주게이트될 수 있고, 동일하거나 상이한 캐리어 또는 표적화 분자가 사용될 수 있다. 예를 들어, 아데노바이러스 입자가 캐리어로서 사용된다면, 전달 분자는 아데노바이러스 입자 내에 통합될 수 있다. 예를 들어, 해당 전달 분자가 단백질을 코딩하는 DNA 분자 또는 RNA 분자인 경우, DNA는 바이러스 벡터에 통합되고 광화학적 내부이행 후에 DNA 분자는 정확한 세포내 위치에 존재하여 코딩된 분자의 발현이 일어날 수 있게 된다.

[0049] 이러한 분자의 발현은 기술분야에 공지되고 문헌화된 방법으로 벡터를 설계함으로써 조절될 수 있다. 예를 들어, 조직 특이적 또는 조절가능한 프로모터와 같은 조절 인자는 조직 또는 질병 특이적 또는 조절가능한 발현을 이루는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 흑색종 특이적 티로시나제 프로모터와 같은 조직 특이적 프로모터가 사용될 수 있다. 테트라사이클린-조절된 프로모터와 같은 조절가능한 프로모터는 잘 알려져 있다. 본 발명에 이용될 수 있는 특이적 또는 조절된 프로모터의 또다른 예는 문헌 (Hart, I.R., 1996, *Semin. Oncol.* 23, 154-158; Hallahan, D.E. et al., 1995, *Nature Med.* 1, 786-791; Luna, M.C. et al. 2000, *Cancer Res.* 60, 1637-1644; Miller, N. and Whelan, J., 1997, *Hum. Gene Ther.*; Wickham, T.J., 2000, *Gene Ther.* 7, 110-114; Nettelbeck D.M. and Muller; J.V., 2000, *Trends Genet.* 16, 174-181; Clackson, T., 2000, *Gene Ther.* 7, 120-125; Freundlieb, S, et al., 1999, *J. Gene Med.* 1, 4-12; Spear M.A., 1998, *Anticancer Res.* 18, 3223-31, Harvey, D.M. and Caskey C.T., 1998, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 512-518; Clary, B.M. and Lysterly, H.K., 1998, *Surg. Oncol. Clin. North Am.* 7, 565-574; Luna, MC et al. *Cancer Res.* 60, 1637-1644; 그 안의 참고 문헌)에서 찾아볼 수 있다.

[0050] 상기한 바와 같이, 하나 이상의 캐리어 및(또는) 표적화 분자 또는 벡터가 동시에 사용될 수 있다. 예를 들어, 벡터가 캐리어에 제공될 수 있으며, 예를 들면 아데노바이러스와 같은 바이러스 벡터가 예를 들어 리포솜 또는 폴리양이온 구조물에 운반될 수 있다.

[0051] 본 발명에 사용하기 위한, 특히 전달 분자와 함께 사용하기 위한 바람직한 캐리어 및 벡터는 아데노바이러스, 폴리양이온, 예를 들면 폴리리신 (예를 들면, 폴리-L-리신 또는 폴리-D-리신), 폴리에틸렌이민 또는 덴드리머 (예를 들면, 슈퍼펙트 (SuperFect, 등록상표)와 같은 양이온성 덴드리머); DOTAP 또는 리포펙틴과 같은 양이온성 지질; 펩티드 및 표적화된 벡터, 예를 들면 트랜스페린 폴리리신 또는 표적화된 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 본 발명의 특히 바람직한 실시태양에서, 캐리어는 아데노바이러스이다.

[0052] 상기한 바와 같은 표적화 분자 또는 캐리어는 또한 전달 분자를 PCI의 이용에 특히 유리한 특정 세포내 구획, 예를 들면 라이소솜 또는 엔도솜으로 향하게 하는데 이용될 수도 있다.

[0053] 세포내 막으로 한정된 구획은 세포내에 존재하는 이러한 임의의 구획일 수 있다. 바람직하게는, 구획은 막 소

포, 특히 엔도솜 또는 라이소솜일 수 있다. 그러나, 세포내 구획은 또한 골지체 또는 내형질 세망을 포함할 수도 있다.

[0054] 광감작제를 활성화하는 광선 조사 단계는 기술분야에 공지된 기술 및 절차에 따라서 일어날 수 있다. 예를 들면, 광선의 파장 및 강도는 사용된 광감작제에 따라서 선택될 수 있다. 적합한 광원은 기술분야에 잘 알려져 있다. 본 발명의 방법에서 세포가 광선에 노출되는 기간은 가변적이다. 전달 분자의 사이토졸로의 내부이행의 효율은 광선 노출이 증가함에 따라 증가되는 것으로 나타났다. 조사 단계의 바람직한 기간은 광감작제, 표적 세포 또는 조직에 집적된 광감작제의 양 및 광감작제의 흡수 스펙트럼과 광원의 방출 스펙트럼 사이의 중첩에 좌우된다. 일반적으로, 조사 단계의 기간은 수분 내지 수시간 정도, 예를 들면 바람직하게는 60분 이하, 예를 들면 0.5 또는 1 내지 30분, 예를 들면 0.5 내지 3분 또는 1 내지 5분 또는 1 내지 10분, 예를 들면 3 내지 7분, 바람직하게는 약 3분, 예를 들면 2.5 내지 3.5분이다. 적절한 광선량 (light dose)은 기술분야의 숙련인에 의해 선택될 수 있으며 광감작제의 종류 및 표적 세포 또는 조직에 집적된 광감작제의 양에 좌우될 것이다. 예를 들면, 암을 광감작제 포토프린 및 프로토포르피린 전구체 5-아미노레블린산으로 광역학적 치료하는데 전형적으로 사용되는 광선량은 고통증을 피하기 위하여 200 mW/cm² 미만의 플루언스 범위에서 50-150 J/cm²의 범위에 있다. 광선량은, 가시 스펙트럼의 적색 영역에서 더 높은 흡광 계수를 갖는 광감작제가 사용될 때 일반적으로 더 낮다. 그러나, 더 적은 광감작제가 집적된 비암성 조직을 치료하는 경우에 필요한 광선의 총량은 암의 치료를 위한 경우 보다 실질적으로 더 높을 수 있다.

[0055] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 표적 분자의 적절한 투여량을 결정하는 것은 기술분야의 숙련인에 대해 통상적인 일이다. 전달 분자가 단백질 또는 펩티드인 경우, 시험관내 이용을 위해 전달 분자는 일반적으로 5 mg/ml 미만 (예를 들면, 0.1-5 mg/ml)의 양으로 사용될 것이며 생체내 이용을 위해 전달 분자는 일반적으로 5 mg/kg 미만 (예를 들면, 0.1-5 mg/kg)의 양으로 사용될 것이다. 전달 분자가 핵산인 경우, 시험관내 이용을 위한 전달 분자의 예시적인 양은 10⁴ 세포 당 약 0.1-50 μg 핵산일 것이며 생체내 이용을 위해서는 사람 주사 당 약 10⁻⁶-1 g 핵산일 것이다. 전달 분자가 아데노바이러스 캐리어와 결합된 경우, 시험관내 이용을 위한 예시적인 양은 세포 당 1-1 x 10⁵ 물리적 바이러스 입자, 예를 들면 1 x 10³ - 1 x 10⁵ 입자일 것이며 생체내 이용을 위해서 아데노바이러스 캐리어와 결합하여 도입될 분자는 생체내 이용하기 위한 최종 조성물에서 바이러스 입자 1 x 10⁻⁹ 내지 50%, 예를 들면 3 x 10⁻⁶ 내지 50%, 예를 들면 0.003 내지 30%, 예를 들면 0.2 내지 10% (w/w)의 농도로 존재할 수 있으며, 여기서 w/w는 최종 조성물의 중량을 기준으로 한 도입될 분자 이외의 바이러스 캐리어의 중량을 의미한다. 1 ml 주사액이 사용된다면, 이것은 약 10⁵ 내지 10¹⁵ 물리적 바이러스 입자의 투여량에 해당한다.

[0056] 본 발명의 방법은 광화학적 처리에 의해, 즉 광감작제의 작용을 통해 필연적으로 일부 세포 사멸을 일으킬 것이다. 그러나, 이러한 세포 사멸은 문제가 되지 않을 것이며 사실상 많은 용도 (예를 들면, 암 치료)에 유리할 수 있으며 본 발명의 방법은 광감작제의 농도와 관련하여 광선량을 선택함으로써 생존 세포의 분획 또는 비율이 조절되도록 변형될 수 있다. 이러한 기술도 역시 본 기술분야에서 공지되어 있다. 순수한 광화학적 처리에 의해 유도된 세포사의 양에 상관없이, PCI 효과가 입증되는 개개의 세포의 일부분이 순수한 광화학적 처리에 의해 사멸되지 않도록 (세포는 PCI 효과로 인해 계속하여 사멸될 수 있긴 하지만) 광선량이 조절되는 것이 중요하다.

[0057] 일부 용도에서는, PCI 처리 후에 더 많은 수의 생육가능한 세포를 유지하는 것이 적절할 수 있다. 예를 들면, 백신접종 및 일부 유전자 요법의 방법에서는 항원 제시 또는 단백질 발현을 가능하게 하는 생육가능한 세포가 중요하다. 그러한 용도에서, 세포의 집단 또는 다수의 세포, 실질적으로 모든 세포 또는 상당 부분 (예를 들어, 세포의 50% 이상, 더욱 바람직하게는 60, 70, 80 또는 90% 이상)이 사멸되지 않는 것이 적절하다. 이것은 물론 특히 PCI가 세포독성 전달 분자를 도입하는데 사용되고 추가의 세포 사멸이 불리하지 않을 때 항상 바람직한 것은 아니다. 그러나, 세포독성 효과는 또한 예를 들어, 치료 유전자가 본 발명의 방법에 의해 중앙 세포 내로 내부이행되어 예를 들어 이들 세포가 남아있는 암 세포의 국소 면역학적 사멸을 유도하거나 또는 중앙 세포에 대한 전신 면역 반응을 유도할 면역학적 활성 물질을 생산하게 되는 유전자 요법을 이용하여 이루어질 수도 있다. 이러한 경우에, 분명하게 PCI 처리 후에 일정 비율의 생육가능한 세포가 필요하다.

[0058] 기존의 방법에 비교된, 본 발명의 방법 및 처리 단계의 순서, 특히 전달 분자가 광선 조사 단계 후에 세포에 첨가되는 실시태양의 이점은 다음과 같다:

[0059] a) 전달 분자에 대한 광화학적 손상이 감소되고;

- [0060] b) 광화학적 처리가 병소의 수술 노출 후에 행해지고, 이어서 예를 들어 전달 분자의 종양내 주사 또는 기타 국소 투여가 이루어지므로 수술과 병행된 내부 병소의 PCI 처리가 간편하고;
- [0061] c) 방법이 정확한 처리 타이밍, 즉 조사 시점을 기준으로 한 세포에 의해 흡수될 분자의 첨가 타이밍에 좌우되지 않는다. 이는 처리를 위한 더 큰 "시간대"가 있음을 의미한다. 이것이 중요한 이유는, 치료 분자의 흡수가 다른 임상적 상황에서 광범위하게 변화될 수 있고 임상적 상황에서 개개의 병소에 대해 흡수를 평가하기가 어렵고, 따라서 그러한 큰 시간대가 아주 유리하게 되기 때문이며;
- [0062] d) 전달 분자의 사이토졸로의 신속한 전위가 일어남으로써 전달 분자의 라이소좀 분해 가능성이 실질적으로 감소된다.
- [0063] 이들 이점은 1) 분자가 표적 세포에 의해서 세포내이입될 수 있는 한은 사이토졸로 내부이행되고 전달될 분자의 크기에 대한 제한이 없고; 2) 방법이 세포 증식에 대한 의존적이지 않고; 3) 광선에 노출된 영역 만이 영향을 받는다는 점에서 방법이 부위 특이적이고; 4) 그것이 종양원성이 아니라, 분자의 내부이행의 공지된 PCI 방법과 관련된 이점 이외의 것이다.
- [0064] 세포를 광감작제 및 전달 분자와 "접촉시키는" 단계는 임의의 편리하거나 원하는 방식으로 수행될 수 있다. 따라서, 접촉 단계가 시험관내에서 수행되어야 한다면, 세포는 예를 들어 적절한 세포 배양 배지와 같은 수성 배지내에 유지될 수 있고 광감작제 또는 전달 분자는 적절한 시점에서 적절한 조건 하에서, 예를 들어 적절한 농도로 적절한 시간 동안 배지에 간단히 첨가될 수 있다.
- [0065] 광감작제는 통상의 기술을 이용하여 숙련인에 의해 쉽게 결정될 수 있고 사용된 특정 광감작제 및 세포 유형에 좌우될 적절한 농도로 적절한 시간 동안 세포와 접촉하게 된다. 광감작제의 농도는 일단 세포, 예를 들어 그의 세포내 구획 중의 하나 이상 내로 흡수되거나 그와 결합되고 조사에 의해 활성화되면, 하나 이상의 세포 구조물이 붕괴되도록, 예를 들면 하나 이상의 세포내 구획이 세포용해되거나 붕괴되도록 하는 정도이어야 한다. 본원의 실시예에 사용된 광감작제는, 예를 들면 10 내지 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용될 수 있다. 시험관내 용도의 경우, 그 범위는 훨씬 더 넓은 범위, 예를 들어 0.05-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 사용될 수 있다. 생체내 사람 치료의 경우, 광감작제는 전신 투여될 때 0.05-20 mg/kg 체중의 범위로 또는 국소 용도의 경우 용매 중의 0.1-20%로 사용될 수 있다. 더 작은 동물에서 농도 범위는 상이할 수 있으며 따라서 조정될 수 있다.
- [0066] 광감작제 존재하의 세포의 인큐베이션 시간 (즉, "접촉" 시간)은 수분 내지 수시간, 예를 들어 48시간 이하 또는 그 이상으로 가변적이다. 인큐베이션 시간은 광감작제가 적절한 세포에 의해 흡수될 수 있는 정도이어야 한다.
- [0067] 광감작제 존재하의 세포의 인큐베이션에 이어서, 임의로 세포가 광선에 노출되거나 전달 분자가 첨가되기 전에 광감작제-비함유 배지로 인큐베이션하는 기간이 있을 수 있다.
- [0068] 전달 분자는 상기한 바와 같은 임의의 분자일 수 있으며 적절한 농도로 적절한 시간 동안 세포와 접촉하게 된다. 놀랍게도, 조사한 지 수시간 후에도 접촉이 개시될 수 있음이 밝혀졌다. 적절한 농도는 해당 분자의 해당 세포로의 흡수 효율 및 세포에서 얻고자 하는 최종 농도에 따라 결정될 수 있다. 따라서, "트랜스펙션 시간" 또는 "세포성 흡수 시간", 즉 분자가 세포와 접촉하는 시간은 수분 또는 수시간 이하일 수 있으며, 예를 들면 10분에서 24시간까지, 예를 들어 30분에서 10시간까지 또는 예를 들면 30분에서 2시간 또는 6시간까지의 트랜스펙션 시간이 이용될 수 있다. 트랜스펙션 시간의 증가는 일반적으로 해당 분자의 흡수 증가를 일어나게 한다. 그러나, 더 짧은 인큐베이션 시간, 예를 들면 30분 내지 1시간은 분자의 흡수 특이성을 개선시키는 것으로 보인다. 따라서, 임의의 방법에 대해 트랜스펙션 시간을 선택하는데 있어서, 충분한 흡수 특이성을 유지하면서 충분한 분자 흡수를 얻는데 적절한 균형이 이루어져야 한다.
- [0069] 생체내에서 전달 분자 및 광감작제를 표적 세포와 접촉하게 하는 적절한 인큐베이션 방법 및 시간은 투여 방식 및 전달 분자와 광감작제의 유형에 좌우될 것이다. 예를 들면, 전달 분자가 치료될 종양에 주사된다면, 주사 지점 부근의 세포는 전달 분자와 접촉하게 될 것이며, 따라서 그 세포는 더 나중의 시점에 더 낮은 농도의 전달 분자와 접촉하게 되는, 주사 지점으로부터 더 먼 거리에 위치하는 세포 보다 더욱 신속하게 전달 분자를 흡수하는 경향이 있다. 또한, 정맥내 주사에 의해 제공되는 전달 분자는 표적 세포에 도달하는데 약간의 시간이 걸릴 수 있으며 따라서 충분한 양 또는 최적량의 전달 분자가 표적 세포 또는 조직에 집적되기 위해서는 더 긴 후-투여 시간, 예를 들면 수일이 걸릴 수 있다. 광감작제를 세포 내로 흡수하는데 필요한 투여 시간에도 물론 동일한 고려 사항이 적용된다. 생체내에서 개개의 세포에 필요한 투여 시간은 이들 및 다른 파라미터에 따라 변화될 수 있다.

- [0070] 생체내 상황이 시험관내 보다 더욱 복잡하긴 하지만, 분자가 표적 세포와 접촉하게 되는 시간이, 조사가 일어나기 전에 적절한 양의 광감작제가 표적 세포에 의해 흡수되고 또한 (i) 조사 전에 또는 도중에 전달 분자가 다른 세포내 구획 내로 흡수되었거나 또는 표적 세포와의 충분한 접촉 후에 흡수될 것이거나, 또는 (ii) 조사 후에 전달 분자가 그의 세포 내로의 흡수를 가능하게 하는 충분한 시간 동안 세포와 접촉하도록 하는 정도이어야 한다는 본 발명의 기본 개념은 여전히 동일하다. 전달 분자가 광감작제와 다른 세포내 구획 내로 흡수되기만 하면, 전달 분자는 조사 전 또는 후에 흡수될 수 있다.
- [0071] 용어 "세포"는 본원에서 모든 진핵 세포 (곤충 세포 및 진균 세포를 포함)를 포함하는 것으로 이용된다. 따라서, 대표적인 "세포"는 모든 유형의 포유 동물 및 비-포유 동물 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 진균 세포 및 원생 동물을 포함한다.
- [0072] 본 발명의 방법은 발생 부위에서의 처리 (예를 들어, 표적화 성분을 이용함으로써) 또는 생체의 처리에 이어서 처리된 세포를 체내에 투여함으로써 시험관내 또는 생체내에서 사용될 수 있다.
- [0073] 본 발명은 예를 들면, 암의 치료에 사용될 수 있다. 몇가지 광감작제는 종양 조직에 우선적으로 축적되며, 주위 조직에 비해 종양에 대한 선택성은 2-3의 배수이지만, 이 배수는 일부 경우에, 예를 들어 뇌 조직에 대해서는 30까지 더 높을 수 있다. 별법으로, 특정 광감작제는 상기 방법에 의해 특정 종양으로 표적화될 수 있다. 또한, 암 치료를 위해 임상적으로 중요하지만 사이토졸 내로의 흡수가 적거나 전혀 없는 것으로 제한되는 분자는 본 발명에 의해 사이토졸 내로 도입되어 특정 세포로 표적화될 수 있다. 아래에 예시되는 바와 같은 겔로닌 (gelonin)은 그러한 분자의 예이다. 결합 분자가 단독으로 또는 특정 세포로 내부이행될 분자를 표적화하는 다른 분자에 결합되어 사용될 수 있다 (예를 들면, 항체, 트랜스페린, 광감작제, 재구성된 LDL-입자 상의 아포B). 그러한 복합 치료의 이점은 다음과 같다: 1) 적은 양 및 독성이하량의 광선량으로 라이소솜 및 엔도솜을 충분히 붕괴시키므로 종양 조직의 더 깊은 층에서의 세포독성 효과가 증강되고; 2) PCI가 종양 부위에만 제공되므로 치료의 특이성이 증강된다.
- [0074] 본 발명의 방법은 세포 내로 도입될 분자의 선택에 의해 지시되는 바와 같이 각종 다른 질환, 예를 들면 류머티스성 관절염, 죽상경화증 및 기타 심혈관 질환, 바이러스 및 기타 감염, 건선, 일광 각화증, 창상 치유, 골절 치유, 사마귀 및 선천성 유전 질환, 예를 들면 낭포성 섬유증, 골린 증후군 및 혈관확장성 운동실조증을 치료하는데 이용될 수도 있다.
- [0075] 본 발명의 방법은 또한 유전자 요법, 즉 유전자를 환자의 세포로 치료적 전달하는데 사용될 수 있다. 유전자 요법은 암, 심혈관 질환, 바이러스 감염, 단일유전자 질환, 예를 들면 낭포성 섬유증 및 상기된 바와 같은 많은 기타 병증을 치료하는 방법으로서 가능하다. 오늘날 유전자 요법에 있어서 한가지 중요한 문제는 생체내에서 일어나야 하는 유전자 전달의 높은 효율 및 특이성이다. 통용되는 방법에서는, 유전자 요법에서 유전자 전달하는데 많은 다른 캐리어 또는 벡터가 사용된다. 폴리양이온성 화합물의 예로서, 양이온성 지질 및 바이러스 시스템이 언급될 수 있지만, 지금까지는 생체내 유전자 요법이 거의 성공되지 못하였다. 통용되는 방법의 많은 알려진 결점 중에는 벡터의 낮은 혈청 안정성, 유전자 전달에서의 제한된 특이성, 유전자 전달에서의 낮은 효율 등이다. 본 발명의 PCI 방법은 많은 합성 유전자 전달 벡터 및 몇몇 바이러스 시스템에 대해 효율 제한될 수 있는 엔도솜 방출 단계를 개선시킴으로써, 현재 유전자 요법에 이용되는 많은 유전자 전달 방법의 효율 및 특이성 둘다를 실질적으로 개선시키는 수단을 제공한다. PCI 방법의 특징인 광처리는 또한 유전자 전달 효율의 증가가 조사된 면에서만 일어날 것이므로, 체내에서 유전자 전달이 증강될 곳을 정확히 한정할 수 있도록 한다. 트랜스펙션은 시험관내, 생체내 또는 생체외에서 수행될 수 있다 (세포 또는 조직이 적절하게 환자에게 투여됨). 바람직하게는, 트랜스펙션에 적합한 캐리어 및 벡터는 아데노바이러스, 폴리양이온, 예를 들면 폴리리신 (예를 들면, 폴리-D-리신 또는 폴리-L-리신), 슈퍼펙트(등록상표), 폴리에틸렌이민 또는 덴드리머; 양이온성 지질, 예를 들면 DOTAP 또는 리포펙틴, 또는 DOPE와 같은 "헬퍼 지질"과 배합된 양이온성 지질; 펩티드 및 표적화된 벡터, 예를 들면 트랜스페린 폴리리신 또는 표적화된 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 본 발명의 바람직한 실시태양에서, 치료 유전자에 사용되는 캐리어는 아데노바이러스이다.
- [0076] 본 발명의 또다른 바람직한 면은 펩티드를 비롯한 양이온성 중합체 및 양이온성 지질과 같은 비-바이러스성 캐리어 시스템을 이용하는 것이다. 전형적인 중합체는 예를 들어 폴리아민, 염기성 폴리아미노산을 비롯한 폴리 아미노산, 합성 및 천연 양이온성 당 중합체, 메타크릴레이트 중합체, 덴드리머, 폴리알킬렌이민 및 약물 전달에 유용한 것으로 기술분야에 공지된 기타 중합체; 특히 유전자 전달에 유용한 중합체를 포함한다. 본 발명에 따라 유용한 전형적인 화합물은 폴리리신, 폴리아르기닌, 폴리-L-글루탐산, 폴리비닐피리딘, 키토산, 폴리에틸렌이민, 폴리(2-디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트, 히스톤, 프로타민, 폴리(L-오르니틴), 아비덴, 스페르민,

스페르미딘 및 그의 임의의 유도체를 포함한다. 본 발명의 바람직한 면에서, 본원에 기재된 중합체는 다른 중합체와 또는 다른 유전자 전달 시스템과 병용될 수 있다. 본 발명에 따른 유용한 비-바이러스성 유전자 전달 시스템은 예를 들면 문헌 (R.I. Mahato et al, in *Advances in Genetics*, Eds J.C. Hall et al., 1999, 41, 95-156)에 기재되어 있다. 양이온성 중합체는 또한 문헌 (M.C. Garnett in *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* (1999), 16, 147-207, K.A. Howard et al in *Biochimica et Biophysica Acta* (2000), 1475, 245-255, H.K. Nguyen et al in *Gene Therapy* (2000), 7, 126-138, A. Bragonzi et al in *J. Controlled Release* (2000), 65, 187-202, S.C. DeSmedt et al in *Pharmaceutical Research* (2000), 17, 113-126 and R.I. Mahato in *J. Drug Targeting* (1999), 7, 249-268)에 기술되어 있다.

[0077] 본 발명의 또다른 면은 비-바이러스성 캐리어 시스템으로서 리포솜 또는 기타 지질 구조물의 사용을 포함한다. 리포솜은 pH-감수성 리포솜 또는 비-pH 감수성 리포솜일 수 있다. pH-감수성 리포솜은 리포솜 막 내에 하나 이상의 pH-감수성 성분을 포함한다. 전형적인 화합물은 지방산, 예를 들면 올레산, 팔미토일호모시스테인, 콜레스테롤, 헤미숙시네이트 모르폴린 염 및 디엘오일숙시닐글리세롤을 포함한다. pH-감수성 성분 이외에도, 리포솜은 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE) 및(또는) 기타 유사한 포스포리피드를 포함할 수 있다.

[0078] 리포솜 또는 기타 지질 전달 시스템은 바람직하게는 하나 이상의 양이온성 지질을 함유한다.

[0079] 지질 전달 시스템은 각종 유형의 수성 제제로 존재할 수 있다. 문헌에서 이 제제에 대해 다음과 같은 각종 용어가 사용된다: 다층라멜라 리포솜, 단일라멜라 리포솜, pH-감수성 리포솜, 나노에멀전, 나노입자, 프로테오리리포솜, 비로솜, 키메라솜, 코킬레이트, 리포펙틴(등록상표) 및 리포플렉스. 유전자 전달에서의 양이온성 지질의 사용에 관해서는 문헌 (P.L. Felgner et al in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987), 84, 7413-7417; D.D. Lasic et al in *Adv. Drug Deliv Rev* (1996), 20, 221-266; L.G. Barron et al in *Gene Therapy* (1999), 6 1179-1183; S. Kawakami et al in *Pharmaceutical Research* (2000), 17, 306-313; N.S. Templeton et al in *Molecular Biotechnology* (1999), 11, 175-180; Y. Zou et al in *Cancer Gene Therapy* (2000), 7, 683-696; D.D. Stuart et al in *Biochemistry et Biophysica Acta* (2000), 1463, 219-229; R.I. Mahato et al in *Drug Deliv* (1997) 4 151 and R.J. Lee et al in *Crit Rev Drug Carrier Syst* (1997), 14, 173)을 참고할 수 있다.

[0080] 본 발명에 따라 유용한 지질은 예를 들면 US 6,120,751, US 6,056,938, US 6,093,816, US 6,039,936, US 6,034,137, US 6,034,135, US 6,020,526, US 5,980,935, US 5,958,935, US 5,935,936, US 5,877,220, US 5,830,430, US 5,777,153, US 5,705,693, US 5,459,127, US 5,334,761, US 5,264,618 및 그 안의 참고문헌에 기재되어 있다.

[0081] 양이온성 지질의 전형적인 예는 N [1-(2,3-디올레일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸-암모늄 클로라이드 (DOTMA), 1,2-디미리스틸-옥시프로필-3-디메틸히드록시에틸암모늄 브로마이드 (DMRIE), 1,2-비스(올레일옥시)-3-(트리메틸아미노)프로판 (DOTAP), 3β (N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일-콜레스테롤 (DC-Chol), 2,3-디올레일-옥시-N [2-스페르민카르복실-아미도]에틸-N,N-디메틸-1-프로판아미늄 트리플루오로아세테이트 (DOS PA), 3-β (N⁴-스페르민 카르바모일)-콜레스테롤, 3-β (N⁴-스페르미딘 카르바모일)-콜레스테롤 및 디옥타데실아미도글릴 스페르민 (DOGS)이다.

[0082] 상기한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 실시태양의 하나에서 캐리어는 양이온성 지질이다. 광화학적 처리는, 광선이 전달 분자 후에 제공될 때 양이온성 지질에 의해 매개된 트랜스펙션에 대해서 억제 효과를 갖는 것으로 이미 보고되어 있다 (Prasmickaite et al. (2000), *J. Gene Med.* 6, in press). 그러나, 이제 매우 놀랍게도 광선이 전달 분자 전에 제공될 때 PCI가 양이온성 지질에 의해 매개된 트랜스펙션에 대해 촉진 효과를 가질 수 있는 것으로 밝혀졌다 (실시예 9 참조).

[0083] 따라서, 본 발명의 또다른 면은 요법에 사용하기 위한 전달 분자 및 광감작제를 포함하는 조성물이 제공된다. 임의로, 조성물 내의 전달 분자 및(또는) 광감작제는 상기한 것과 같은 캐리어 분자와 결합될 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 암 요법 또는 유전자 요법에 사용된다. 유전자 요법의 경우, 바람직한 캐리어 분자는 아데노 바이러스이다. 다른 바람직한 캐리어는 양이온성 지질이다.

[0084] 또다른 면에서, 본 발명은 광감작제 및 개별적으로 전달 분자가 환자의 세포 또는 조직과 접촉되고, 상기 세포가 광감작제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 광선으로 조사되고 그 조사가 상기 전달 분자의 상기 광감작제 함유 세포내 구획 내로의 세포성 흡수 전에, 바람직하게는 상기 전달 분자의 임의의 세포내 구획 내로의 세포성 흡수 전에 행해지는, 요법에 사용하기 위한 의학의 제조를 위한, 본원에 기재된 전달 분자 및(또는) 광감작제의

용도를 제공한다. 이러한 방법을 포함하는 치료 방법은 본 발명의 또다른 면을 형성한다.

- [0085] 따라서, 본 발명은 전달 분자를 상기한 방법에 따라서 시험관내, 생체내 또는 생체외의 하나 이상의 세포 내로 도입하고, 필요시에 (즉, 트랜스펙션이 시험관내 또는 생체외에서 수행될 때) 상기 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자에서의 질병, 질환 또는 감염증을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0086] 본원에 정의된 "치료"는 치료될 질병, 질환 또는 감염증의 하나 이상의 증상을 치료 전의 증상에 비해 감소, 완화 또는 해소시키는 것을 의미한다. "예방"은 질병, 질환 또는 감염증의 증상의 개시를 지연 또는 방지하는 것을 의미한다.
- [0087] 이전에 언급된 바와 같이, 그러한 방법은 또한 백신접종 방법에 이용된다. 따라서, 본 발명의 다른 면은 항원성 분자 (전달 분자) 또는 그의 일부분을 세포, 바람직하게는 항원 제시 세포 표면 상에 발현 또는 제시하는, 이전의 정의된 단계들을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0088] 본 명세서에 사용된 "발현" 또는 "제시"는 해당 분자의 적어도 일부분이 해당 세포 주위의 환경에 노출되어 접근할 수 있도록 세포의 표면 상에 분자 또는 그의 일부분이 존재하는 것을 의미한다. 발현시키고자 하는 분자가 세포막 및(또는) 상기의 막에 존재하거나 또는 존재하도록 유도될 수 있는 성분과 접촉하고 있는 상태인 "표면" 상에서의 발현이 이루어질 수 있다.
- [0089] 이 방법은 시험관내 또는 생체내에서 실시될 수 있다. 그러나, 바람직하게는 그러한 항원 제시는 유리하게는 면역 반응, 바람직하게는 항원성 분자 또는 그의 일부분으로 이루어지거나 이들을 함유하는 물질에 의한 후속 공격에 대한 보호 작용을 부여하는 면역 반응의 촉진을 가져올 수 있으며, 따라서 본 발명은 백신접종 방법으로서 특별한 유용성을 가진다. 그러므로, 바람직하게는 본 발명은 상기 방법을 포함하는 백신접종 방법을 제공한다.
- [0090] 본 발명의 이러한 면에서, 본원에 정의된 전달 분자는 "항원성 분자"로서 불리운다. 항원성 분자는 해당 분자 또는 그의 일부분이 적절한 방식으로 면역 시스템에 대해 제시되었을 때 면역 반응을 촉진시킬 수 있는 임의의 분자일 수 있다. 따라서 유리하게는, 항원성 분자는 폴리펩티드 함유 물질과 같은 백신 항원 또는 백신 성분일 것이다.
- [0091] 다수의 이러한 항원 또는 항원성 백신 성분이 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 모든 양식의 세균성 또는 바이러스성 항원, 또는 그뿐만 아니라 원생동물 또는 더 고등 유기체를 포함한 모든 병원성 종의 항원 또는 항원성 성분을 포함한다. 전통적으로 백신의 항원성 성분은 전체 유기체 (살아있거나, 죽었거나 또는 약독화된 유기체)로 이루어져서, 즉 전세포 백신인 반면에, 또한 서브-유니트 백신, 즉 유기체의 특정한 항원성 성분, 예를 들어 단백질 또는 펩티드 또는 탄수화물까지도 기본으로 하는 백신도 광범위하게 연구되고 문헌에 보고되었다. 이러한 "서브-유니트"계 백신 성분은 모두 본 발명의 항원성 분자로서 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 펩티드 백신의 분야에서 특별한 유용성을 보인다. 따라서, 본 발명에 따른 바람직한 항원성 분자는 펩티드이다 (여기에서, 이 펩티드는 짧은 것과 긴 것 모두, 즉 펩티드, 올리고펩티드 또는 폴리펩티드, 및 단백질 분자 또는 그의 단편, 예를 들어 5 내지 500개의 아미노산, 예를 들어 15 내지 75개, 또는 8 내지 25개의 아미노산과 같이 10 내지 250개의 아미노산으로 된 펩티드를 포함하는 것으로 정의된다). 제시되거나 또는 발현된 항원성 분자의 일부분은 바람직하게는 세포내의 항원-처리 기구 (antigen-processing machinery)에 의해서 생성되는 부분을 함유한다. 그러나, 이 부분은 적절한 항원 디자인 (예를 들어, pH 감수성 밴드)에 의해서 또는 다른 세포 처리 수단을 통해서 달성될 수 있는 다른 수단에 의해서 생성될 수도 있다. 편리하게는, 이러한 부분은 면역 반응을 생성시키기에 충분한 크기, 예를 들어 펩티드의 경우에는 아미노산 5개 이상, 예를 들어 아미노산 10 또는 20개 이상의 크기를 갖는다.
- [0092] 예를 들어 AIDS/HIV 감염 또는 인플루엔자, 개의 파르보바이러스, 소의 백혈병 바이러스, 간염 등과 같은 바이러스성 질병 및 감염증의 치료에 있어서 다수의 펩티드 백신 후보물질들이 문헌에 제안되었다 (참조예: Phanuphak et al., Asian Pac. J. Allergy. Immunol. 1997, 15(1), 41-8; Naruse, Hokkaido Igaku Zasshi 1994, 69(4), 811-20; Casal et al., J. Virol., 1995, 69(11), 7274-7; Belyakov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95(4), 1709-14; Naruse et al., Proc. Natl. Sci. USA, 1994, 91(20), 9588-92; Kabeya et al., Vaccine 1996, 14(12), 1118-22; Itoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83(23) 9174-8). 마찬가지로, 세균성 펩티드가 사용될 수 있을 뿐 아니라, 다른 유기체 또는 종으로부터 유도된 펩티드 항원이 사용될 수도 있다.
- [0093] 병원성 유기체로부터 유도된 항원 이외에도 펩티드는 또한 암 또는 다발성 경화증과 같은 다른 질병에 대한 백

신으로서 사용하도록 제안되었다. 예를 들어, 돌연변이체 종양유전자 펩티드는 세포독성 T-림프구의 시뮬레이션 (simulation)에서 항원처럼 작용하는 암 백신으로서의 큰 가능성을 갖는다 (Schirmacher, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 1995, 121, 443-451; Curtis Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers, 1997, 17, 316-327). 합성 펩티드 백신이 또한 전이성 흑색종의 치료에 관하여 평가되었다 (Rosenberg et al., Nat. Med. 1998, 4(3), 321-7). 다발성 경화증의 치료를 위한 T-세포 수용체 펩티드 백신은 문헌 (Wilson et al., J. Neuroimmunol. 1997, 76(1-2), 15-28)에 기술되어 있다. 이러한 펩티드 백신 성분은 어떤 것이라도 본 발명의 항원성 분자로서 사용될 수 있을 뿐 아니라, 문헌에서 펩티드 백신으로서 기술되거나 제안된 펩티드 중의 어떤 것이라도 될 수 있다. 따라서, 펩티드는 합성된 것이거나, 유기체로부터 분리되거나 다른 식으로 유도된 것일 수 있다.

[0094] 본 발명의 이러한 면의 방법, 용도 등에 적용되는 세포는 그의 사이토졸 내로 투여되거나 수송된 분자를 그의 표면 상에 발현시키거나 제시할 수 있는 어떠한 세포라도 될 수 있다.

[0095] 본 발명의 이러한 면의 일차적인 유용성은 항원 제시 또는 백신접종에 있기 때문에, 세포는 편리하게는 면역 주효 세포, 즉 면역 반응에 연관된 세포이다. 그러나, 다른 세포도 또한 면역 시스템에 항원을 제시할 수 있으며, 이들도 또한 본 발명의 이러한 면의 범주 내에 포함된다. 따라서, 이러한 면에 따른 세포는 유리하게는 항원 제시 세포이다. 항원 제시 세포는 체액성 및 세포 매개된 면역성 둘다를 포함한 면역 반응의 모든 측면 또는 "갈래 (arm)", 예를 들어 항체 생산의 촉진, 또는 표면 상에 "이중" 항원을 발현하는 세포를 인식하고 파괴 (또는 다른 식으로는 제거)할 수 있는 세포독성 또는 살해 세포의 자극에 연관될 수 있다. 따라서, 용어 "면역 반응을 촉진"하는 것은 모든 형태의 면역 반응 및 이들을 촉진시키는 기전을 포함한다.

[0096] 세포독성 세포 또는 항체 생산 세포의 자극은 항원이 항원 제시 세포에 의해서 특별한 방식으로 자극되는 세포에 제시되는 것, 예를 들어 MHC 클래스 I 제시를 필요로 한다 (예를 들어, CD8⁺ 세포독성 T-세포의 활성화는 MHC-1 항원 제시를 필요로 한다).

[0097] 항원 제시 세포는 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 문헌에 기술되어 있고 예를 들어, 림프구 (T 및 B 세포 둘다), 수상돌기세포, 대식세포 등을 포함한다. 그밖의 다른 것으로는 예를 들어, 흑색종 세포와 같은 암 세포가 포함된다.

[0098] 항원 제시 세포에 의해 세포독성 T-세포 (CTL)에 대해서 항원 제시를 하기 위해서는 항원성 분자가 항원 제시 세포의 사이토졸 내에 유입되는 것이 필요하다 (Germain, Cell, 1994, 76, 287-299). 본 발명은 사이토졸 내로 항원성 분자를 전달하는 효율적인 수단을 제공한다.

[0099] 일단 광화학적 내부이행 과정에 의해서 세포 사이토졸 내에 방출된 항원성 분자는 세포의 항원 처리 기구에 의해서 처리되어 적절한 방식으로, 예를 들어 클래스 I MHC에 의해서 세포 표면 상에 제시될 수 있다. 이 처리 과정에는 항원의 분해, 예를 들어 단백질 또는 폴리펩티드 항원이 펩티드로 분해되는 것이 포함될 수 있으며, 이 펩티드는 그후에 제시를 위해 MHC의 분자와 복합체를 형성한다. 따라서, 본 발명에 따라서 세포의 표면 상에 발현되거나 제시된 항원성 분자는 세포에 흡수된 항원성 분자의 일부분 또는 단편일 수 있다.

[0100] 항원은 세포내이입에 의해서 항원 제시 세포에 의해 흡수되어 세포봉입성 소포 내에서 펩티드로 분해될 수 있다. 이들 펩티드는 엔도솜 내에서 MHC 클래스 II 분자에 결합하여 세포 표면으로 수송될 수 있으며, 여기에서 펩티드-MHC 클래스 II 복합체는 CD4⁺ T 헬퍼 세포에 의해 인식되어 면역 반응을 유도할 수 있다. 또다른 방식으로, 사이토졸 내의 단백질은 예를 들어, 프로테아좀에 의해서 그의 일부분으로 분해되어 TAP (항원 제시와 관련된 수송체 (transporter))를 이용하여 내형질세망 내로 수송될 수 있으며, 여기에서 도 1에 도시한 바와 같이 펩티드는 MHC 클래스 I 분자에 결합하여 세포 표면으로 수송될 수 있다 (Yewdell and Bennink, 1992, Adv. Immunol. 52 : 1-123). 펩티드가 이중 항원으로부터 유래한 것인 경우에, 펩티드-MHC 클래스 I 복합체는 CD8⁺ 세포독성 T-세포 (CTL)에 의해서 인식될 수 있다. CTL은 펩티드-MHC (HLA) 클래스 I 복합체에 결합하고, 이렇게 하여 활성화되고 증식하기 시작하여 CTL의 클론을 형성할 수 있다. 표적 세포 및 세포 표면 상에 동일한 펩티드-MHC 클래스 I 복합체를 갖는 그밖의 다른 표적 세포는 CTL 클론에 의해서 사멸될 수 있다. 충분한 양의 항원이 사이토졸 내로 도입될 수 있다면 이중 항원에 대한 면역성이 확립될 수 있다 (Yewdell and Bennink, 1992, 상기 참조; Rock, 1996, Immunology Today 17: 131-137). 이것은 특히 암 백신의 개발에 대한 기초가 된다. 가장 실제적인 문제 중의 하나는 충분한 양의 항원 (또는 항원의 일부분)을 사이토졸 내로 도입시키는 것이다. 이것은 본 발명에 따라서 PCI에 의해서 해결될 수 있다.

[0101] 본 발명의 조성물은 또한 요법, 특히 암 요법, 유전자 요법 및 백신접종에 사용하기 위한, 본 발명의 방법에 의

해 세포의 사이토졸 내로 내부이행된 전달 분자를 함유하는 세포를 포함할 수도 있다.

- [0102] 따라서, 본 발명의 또다른 면은 본 발명의 방법에 의해 얻어질 수 있는 세포의 사이토졸 내로 내부이행된 전달 분자를 함유하는 세포 또는 세포의 집단을 제공한다.
- [0103] 본 발명의 또다른 면은 요법, 바람직하게는 암 요법, 유전자 요법 및 백신접종에 사용하기 위한 조성물 또는 약제의 제조를 위한 그러한 세포 또는 세포의 집단의 용도를 제공한다.
- [0104] 본 발명은 또한 본 발명의 세포 또는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 환자의 치료 방법, 즉 해당 분자를 상기한 바와 같은 세포 내로 도입하는 단계 및 이렇게 제조된 상기 세포를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 방법은 암 치료에, 특히 유전자 요법 또는 백신접종을 위해 사용된다.
- [0105] 생체내에서는 본 기술분야에서 통상적이거나 표준 기술인 모든 투여 방식, 예를 들어 주사, 주입, 내부 및 외부 신체 표면 둘다에 대한 국소 투여 등이 사용될 수 있다. 생체내 사용의 경우에, 본 발명은 체액 위치 및 고상 조직을 포함한, 광감작제 및 전달 분자가 집적될 세포를 함유하는 임의의 조직과 관련하여 사용될 수 있다. 광감작제가 표적 세포에 의해서 흡수되고 광선이 적절하게 전달될 수 있는 한은 모든 조직이 처리될 수 있다.
- [0106] 따라서, 본 발명의 조성물은 예를 들어 하나 이상의 제약학상 허용되는 캐리어 또는 부형제를 사용하여, 제약학적 기술분야에서 공지되어 있는 기술 및 절차에 따라 편리한 임의의 방식으로 제제화될 수 있다. 본원에 사용된 "제약학상 허용되는"이란 조성물의 다른 성분과 상용성이 있을 뿐만 아니라 수용자에 대해 생리학적으로 허용되는 성분을 의미한다. 조성물 및 캐리어 또는 부형제 재료의 성질, 용량 등은 투여의 종류 및 원하는 경로, 치료 목적 등에 따라 통상적인 방식으로 선택될 수 있다. 용량은 마찬가지로 통상적인 방식으로 결정될 수 있으며, 분자의 성질, 치료 목적, 환자의 연령, 투여 방식 등에 따라 좌우될 수 있다. 광감작제와 관련하여서는, 광선 조사시에 막을 붕괴시키는 효능/능력도 또한 고려되어야 한다.
- [0107] 본 발명은 이제 첨부 도면을 참고로 하여 다음의 비제한적 실시예에 더욱 상세히 기술될 것이다.
- [0108] 도 1은 도면에 나타낸 바와 같이 세포가 광선에 노출되기 전 또는 후에 세포가 pEGFP-N1 폴리리신 복합체와 접촉되는, THX 세포의 pEGFP-N1 폴리리신 복합체에 의한 광-유도된 트랜스펙션을 나타낸다.
- [0109] 도 2는 도면에 나타낸 바와 같이 세포가 광선에 노출되기 전 또는 후에 세포가 pEGFP-N1 폴리리신 복합체와 접촉되는, HCT-116 세포의 pEGFP-N1 폴리리신 복합체에 의한 광-유도된 트랜스펙션을 나타낸다.
- [0110] 도 3은 도면에 나타낸 바와 같이 세포가 광선에 노출되기 전 또는 후에 세포가 겔로닌 분자와 접촉되는, THX 세포의 겔로닌에 의한 광-유도된 처리 및 그에 따른 단백질 합성의 감소를 나타낸다.
- [0111] 도 4는 광선 노출 직후에 또한 광선 노출 후 후기 시점에서 THX 세포가 pEGFP-N1 폴리리신 복합체와 접촉될 때의 THX 세포의 광-유도된 트랜스펙션의 효율에 대한 효과를 나타낸다.
- [0112] 도 5는 광선 노출 전후의 다양한 시점에서 THX 세포가 pEGFP-N1 폴리리신 복합체와 접촉될 때의 THX 세포의 광-유도된 트랜스펙션의 효율에 대한 효과를 나타낸다.
- [0113] 도 6은 광선 노출 후 다양한 시간 동안 THX 세포가 pEGFP-N1 폴리리신 복합체와 접촉될 때의 THX 세포의 광-유도된 트랜스펙션에 대한 효과를 나타낸다.
- [0114] 도 7은 본 발명이 작용할 수 있는 가능한 모델의 개략도를 나타낸다.
- [0115] A. I. 광감작제 S가 세포내이입되고 (I) 세포내 소포가 된다 (II). 이들 소포는 광선 노출 시에 파열된다 (III).
- [0116] B. A에서 기술된 바와 같이 광화학적 처리 후에, 세포는 세포내이입되고 세포내 소포가 되는 분자 M으로 처리된다. 이들 소포는 광화학적으로 손상된 소포와 융합되고 분자 M은 사이토졸 내로 방출될 것이다.
- [0117] 도 8은 pEGFP-N1 폴리리신 복합체에 의한 트랜스펙션에 대한 0 °C에서 세포 처리의 효과를 나타낸다.
- [0118] 도 9는 세포봉입성 소포에 주로 집적되지 않는 3-THPP가 광감작제로서 사용될 때 pEGFP-N1 폴리리신 복합체의 광-유도된 트랜스펙션을 나타낸다.
- [0119] 도 10은 양이온성 지질에 의한 세포의 트랜스펙션에 대한 광감작제 및 광 전처리의 병용 효과를 나타낸다.
- [0120] 도 11은 THX 세포의 아데노바이러스 형질도입에 대한 광화학적 처리의 효과를 나타낸다.

- [0121] 도 12는 FITC-텍스트란의 세포내 집적에 대한 광화학적 처리의 효과를 나타낸다. THX 세포는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AIPcS_{2a}와 18시간 동안 인큐베이션되고, 이어서 AIPcS_{2a}-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션되었다. 그후에, 세포는 4분 동안 광선에 노출되거나 (B,D) 어둠 속에서 유지된 (A,C) 후, 5 mg/ml FITC-텍스트란과 함께 3시간 동안 인큐베이션되었다. 형광 (A,B) 및 위상차 (C,D) 현미경사진.
- [0122] 도 13은 THX 및 HCT 116 세포에서의 겔로닌 독성에 대한 광화학적 처리의 효과를 나타낸다. "전 광선 노출" 방법의 경우에, 세포는 먼저 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AIPcS_{2a}와 18시간 동안 인큐베이션되고, 그후에 도면에 나타낸 바와 같이 광선 노출 전에 AIPcS_{2a}-비함유 배지에서 추가로 4시간 동안 인큐베이션되었다. 조사 후에, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 겔로닌이 첨가되고, 세포는 18시간 동안 인큐베이션되었다. "후 광선 노출" 방법의 경우에, 세포는 도면에 나타낸 바와 같이 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AIPcS_{2a} 및 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 겔로닌과 함께 18시간 동안 동시-인큐베이션된 후 광선 노출되었다. 대조군 세포는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 겔로닌 만으로 18시간 동안 처리되고 광선 노출되거나; 또는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AIPcS_{2a} 만으로 18시간 동안 처리되고, AIPcS_{2a}-비함유 배지에서 4시간 동안 추적되고 광선 노출되었다. 광처리한 다음날 단백질로의 [³H]-로이신 혼입이 측정되고 상대 단백질 합성으로 표시되었다. 데이터 표시점은 3회 반복의 평균 \pm 표준 오차 (S.E.)를 나타낸다.
- [0123] 도 14는 AdHCMV-1acZ으로 감염된 THX 세포에서의 β -갈락토시다제의 발현에 대한 광화학적 처리의 효과를 나타낸다. "전 광선 노출" 방법의 경우에, AIPcS_{2a}-전처리된 세포는 AIPcS_{2a}-비함유 배지에서 추가로 4시간 동안 인큐베이션된 후 3분 동안 광선 노출되었다. 조사 후에, 세포는 37 °C에서 30분 동안 AdHCMV-1acZ로 감염되었다 (MOI 1). 그후에, 2 ml의 배지가 첨가되고 세포는 2일 동안 인큐베이션된 후에 β -갈락토시다제 발현에 대해 분석되었다. "후 광선 노출" 방법의 경우에, AIPcS_{2a}-처리된 세포는 AIPcS_{2a}-비함유 배지에서 3시간 동안 인큐베이션된 후 30분 동안 AdHCMV-1acZ으로 감염되었다. 2 ml의 배양 배지가 첨가되고, 세포가 추가로 30분 동안 인큐베이션된 후에 3분 동안 조사되고, 2일 후에 β -갈락토시다제 발현에 대해 분석되었다.
- [0124] 도 15는 THX 및 HCT 116 세포에서 pEGFP/폴리리신에 의한 광-유도된 트랜스펙션의 효율에 대한 인큐베이션 시간의 효과를 나타낸다. AIPcS_{2a}-전처리된 세포는 세척되고 AIPcS_{2a}-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션된 후 3분 동안 (THX 세포) 또는 7분 동안 (HCT 세포) 광선 노출되었다. 광선 조사 후에, pEGFP-N1/폴리리신 복합체 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 플라스미드)가 첨가되고, 세포는 도면에 나타낸 바와 같이 다른 시간 동안 인큐베이션되었다. 복합체가 제거된 후에, 새로운 복합체-비함유 배지가 첨가되고 세포는 2일 동안 인큐베이션된 후 EGFP 발현에 대해 분석되었다.
- [0125] 도 16은 광감작제로서 TPPS_{2a}를 사용한 폴리-L-리신 매개된 THX 세포의 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과를, 각종 조사 시간을 이용하여 후 광선 노출 방법과 비교하여 나타낸다. PLL-L: pEGFP-N1/PLL 복합체 후에 조사. L-PLL: pEGFP-N1/PLL 복합체 전에 조사. 비음영 (unshaded) 막대 - 비-광선 노출, 음영 (shaded) 막대 - 70초 조사, 속이 찬 (solid) 막대 - 100초 조사.
- [0126] 도 17은 광감작제로서 TPPS₄를 사용한 폴리-L-리신 매개된 THX 세포의 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과를, 각종 조사 시간을 이용하여 후 광선 노출 방법과 비교하여 나타낸다. PLL-L: pEGFP-N1/PLL 복합체 후에 조사. L-PLL: pEGFP-N1/PLL 복합체 전에 조사. 비음영 막대 - 비-광선 노출, 수평 음영 막대 - 50초 조사, 수직 음영 막대 - 70초 조사, 속이 찬 막대 - 100초 조사.
- [0127] 도 18은 광감작제로서 TPPS_{2a}를 사용한 폴리-L-리신 매개된 HCT 116 세포의 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과를, 각종 조사 시간을 이용하여 후 광선 노출 방법과 비교하여 나타낸다. PLL-L: pEGFP-N1/PLL 복합체 후에 조사. L-PLL: pEGFP-N1/PLL 복합체 전에 조사. 비음영 막대 - 비-광선 노출, 음영 막대 - 70초 조사, 속이 찬 막대 - 100초 조사.
- [0128] 도 19는 광감작제로서 TPPS₄를 사용한 폴리-L-리신 매개된 HCT 116 세포의 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과를 나타낸다. PLL-L: pEGFP-N1/PLL 복합체 후에 조사. L-PLL: pEGFP-N1/PLL 복합체 전에 조사. 비음영 막대 - 비-광선 노출, 수평 음영 막대 - 1.5분 조사, 수직 음영 막대 - 2분 조사, 속이 찬 막대 - 3분 조사.
- [0129] 도 20은 광감작제로서 TPPS₄를 사용한, DOTAP 매개된 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과를, 각

중 조사 시간을 이용하여 후 광선 노출 방법과 비교하여 나타낸다. DOTAP-L: pEGFP-N1/DOTAP 복합체 후에 조사. L-DOTAP: pEGFP-N1/DOTAP 복합체 전에 조사. 비음영 막대 - 비-광선 노출, 음영 막대 - 70초 조사, 속이 찬 막대 - 100초 조사.

- [0130] 도 21은 광감작제로서 TPPS_{2a}를 사용한 슈퍼펙트(등록상표) 매개된 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과를, 다양한 조사 및 트랜스펙션 시간을 이용하고 트랜스펙션을 위한 DNA의 양을 변화시켜 나타낸다. ■ - 0.75 μg DNA로 1시간 동안 트랜스펙션; ▲ - 0.75 μg DNA로 4시간 동안 트랜스펙션; ; ○ - 1.5 μg DNA로 1시간 동안 트랜스펙션.
- [0131] 도 22는 광감작제로서 AIPcS_{2a}를 사용한 HCT 116 세포의 아데노바이러스 매개된 유전자 형질도입에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과를, 바이러스를 각종 시간대에 첨가하여 나타낸다. 바이러스가 다른 시점에서 첨가될 때 형질도입된 세포의 백분율은 실시예에 기재된 바와 같이 유동 세포계산에 의해 분석되었다. 바이러스 복합체의 첨가 시점은 도면에 나타내었다. Y-축의 좌측에 있는 시점은 조사 전의 바이러스 첨가를 나타내며, 우측에 있는 시점은 조사 후의 바이러스 첨가를 나타낸다. ■ - 1분 조사; □ - 조사하지 않음.
- [0132] 도 23은 광감작제로서 AIPcS_{2a}를 사용한, 폴리-D-리신에 의해 매개된 HCT 116 세포의 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과를 각종 조사 시간을 이용하여 나타낸다.
- [0133] 도 24는 광감작제로서 TPPS_{2a}를 사용한, 세포증식억제제 블레오마이신에 의한 세포 사멸에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과를 가변량의 블레오마이신, 조사 시간 및 트랜스펙션 시간을 이용하여 나타낸다. ◇ - 5 TPPS-, 1시간 = 5 μM 블레오마이신, TPPS_{2a} 없음, 1시간 인큐베이션; ◆ - 5 TPPS+, 1시간 = 5 μM 블레오마이신, TPPS_{2a} 있음, 1시간 인큐베이션; △ - 25 TPPS-, 1시간 = 25 μM 블레오마이신, TPPS_{2a} 없음, 1시간 인큐베이션; ▲ - 25 TPPS+, 1시간 = 25 μM 블레오마이신, TPPS_{2a} 있음, 1시간 인큐베이션; □ - 100 TPPS-, 1시간 = 100 μM 블레오마이신, TPPS_{2a} 없음, 1시간 인큐베이션; ■ - 100 TPPS+, 1시간 = 100 μM 블레오마이신, TPPS_{2a} 있음, 1시간 인큐베이션; ○ - 100 TPPS-, 4시간 = 100 μM 블레오마이신, TPPS_{2a} 없음, 4시간 인큐베이션; ● - 100 TPPS+, 4시간 = 100 μM 블레오마이신, TPPS_{2a} 있음, 4시간 인큐베이션.
- [0134] 도 25는 생체내 모델에서 마우스의 종양 치료를 위한 겔로닌에 의한 PCI의 효과를 나타낸다. 처리 그룹은 다음과 같다: (△) 겔로닌만 사용; (■) 조사를 병행한 인산염 완충 염수 (PBS) 주사의 위약 처리; (◇) 광화학적 처리만 실시 (즉, AIPcS_{2a} + 광선), 겔로닌 없음; (●) - 완전 겔로닌 PCI 처리 (즉, AIPcS_{2a} + 겔로닌 + 광선).

실시예

- [0135] 물질 및 방법
- [0136] 세포주
- [0137] 노르웨이 라디움 호스피탈 (Norwegian Radium Hospital; Aamdal et al., 1986., Int. J. Cancer, 37, 579)에서 전이성 악성 흑색종에 대해 치료된 환자의 종양 조직에서 인간 흑색종 세포주 THX를 만들고, 10% FCS (Gibco-BRL) 및 2mM 글루타민 (Gibco-BRL)으로 보충된 RPMI 1640 (Gibco-BRL)에서 성장시켰다. 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection) (ATCC no. CCL-247)로부터 사람 결장암 세포주 HCT 116을 얻어서 10% 태 송아지 혈청, 100 U/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신 및 2 mM 글루타민 (모두 Gibco-BRL, Paisley, UK)으로 보충된 RPMI 1640 배지에서 성장시켰다.
- [0138] 광선 조사
- [0139] 세포의 처리를 위해서 두개의 상이한 광원을 사용하였으며, 이들은 둘다 4개의 형광 튜브로 구성된다. TPPS₄, TPPS_{2a} 및 3-THPP (Porpyrin Products, Logan, UT)로 처리된 세포는 세포에 도달하는 광선 강도가 1.5 mW/cm²인 청색 광선 (모델 3026; Appl. Photophysics, London, UK)에 노출시키는 반면, AIPcS_{2a} (Porpyrin Products, Logan, UT)로 처리된 세포는 세포에 도달하는 광선 강도가 1.35 mW/cm²인, 시네모이드 (Cinemoid) 35 필터를 통해서 여과된 적색 광선 (Philips TL 20W/09)에 노출시켰다.
- [0140] 형광 현미경검사

- [0141] 세포는 문헌 (Berg. K., et al., Biochem. Biophys. Acta., 1370: 317-324, 1998)에 기술된 바와 같은 형광 현미경검사에 의해서 분석하였다. 플루오레세인-표지된 분자의 분석을 위해서는 현미경에 450-490 nm 여기 필터, 510 nm 이색성 비임 분할기 및 510-540 nm 밴드패스 방출 필터를 장치하였다.
- [0142] 플라스미드-pLys 복합체의 제조 및 세포의 처리
- [0143] 플라스미드-pLys 복합체 (충전 비율 1.7, Berg et al. (1999) Cancer Res. 59: 1180-83에 기재됨)는 HBS 75 μ l 중의 플라스미드 (pEGFP-N1; Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 5 μ g을 HBS 75 μ l 중의 pLys (MW 20700; Sigma, St. Louis, MO) 5.3 μ g과 부드럽게 혼합시킴으로써 제조하였다. 용액을 실온에서 30분 동안 인큐베이션하고, 배양 배지로 희석하여 세포에 첨가하였다.
- [0144] THX 세포를 AIPcS_{2a} 20 μ g/ml와 함께 37 °C에서 18시간 동안 인큐베이션하고, 세척하여, 감작제-비함유 배지에서 3시간 동안 인큐베이션한 후에 플라스미드-pLys 복합체와 함께 1시간 동안 인큐베이션하고 이어서 광선 노출하였다. 별법으로, AIPcS_{2a} 인큐베이션 후에, 세포를 세척하여 감작제-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션하고, 그후에 광선 노출하고 이어서 플라스미드-pLys 복합체와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 37 °C에서 2일 동안 인큐베이션한 후, 유동 세포계산에 의해서 GFP 발현을 분석하였다.
- [0145] HCT-116 세포는 AIPcS_{2a} 20 μ g/ml와 함께 18시간 동안 인큐베이션하고, 세척하여 AIPcS_{2a} 부재 하에 4시간 동안 인큐베이션한 후 광선 노출하였다. 세포를 광선 노출 직전 또는 직후에 pEGFP-N1 폴리리신 복합체로 4시간 동안 처리하였다. 2일 후에, 37 °C에서 인큐베이션한 후에 유동 세포계산에 의해서 GFP 발현을 분석하였다.
- [0146] 유동 세포계산 분석
- [0147] 세포를 트립신처리하고, 원심분리하여 400 μ l의 배양 배지 중에 재현탁시키고 50 μ m 메쉬 나일론 필터를 통해서 여과하였다. 그후, 세포를 FAC-칼리부르 (FACS-Calibur (Becton Dickinson)) 유동 세포계수기로 분석하였다. 각 시료에 대해 10000가지 결과를 모았다. 플루오레세인-형광 (예를 들면, 녹색 형광성 단백질 (GFP))은 488 nm로 설정된 아르곤 레이저 (200 mW)로 여기시킨 후에 510-530 nm 필터를 통해서 측정하였다. AIPcS_{2a}는 635 nm로 설정된 다이오드 레이저 (50 mW)로 여기시킨 후에 670 nm 롱패스 (longpass) 필터를 통해서 측정하였다. 세포 이중체 (doublet) 및 사멸 세포는 게이트로 제어하여 단일 생육가능한 세포로부터 구별하였다. 데이터는 CELLQuest 소프트웨어 (CELLQuest Software; Becton Dickinson)로 분석하였다.
- [0148] 실시예 1
- [0149] 광선량의 함수로서의 광-유도된 트랜스펙션
- [0150] THX 세포를 AIPcS_{2a} 20 μ g/ml로 18시간 동안 처리하고, 세척하여, 감작제-비함유 배지에서 3시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 pEGFP-N1/폴리리신 복합체 5 μ g와 함께 1시간 동안 인큐베이션한 후에 1, 2, 3 또는 4분 동안 광선 노출하였다. 별법으로, AIPcS_{2a} 인큐베이션 후에, 세포를 세척하여 감작제-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션한 후에 도 1에 나타낸 바와 같이 1, 2, 3 또는 4분 동안 광처리하고 이어서 pEGFP-N1/폴리리신 복합체와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 광선 노출한 지 48시간 후에 유동 세포계산에 의해서 GFP 발현을 분석하였다. pEGFP-N1/폴리리신 복합체에 대한 충전 비율은 1.7이었다.
- [0151] 그 결과를 도 1에 나타내었으며, 플라스미드-pLys 복합체 (즉, pEGFP-N1/pLys)가 광선 노출 전이 아니라 후에 세포에 첨가될 때 GFP의 트랜스펙션이 동일하게 효율적임을 알 수 있다. 또한, 두 경우 모두에서 트랜스펙션된 세포의 백분율이 세포가 광선에 노출되는 기간에 좌우되며 그 백분율이 약 2분에서 최대 수준에 도달하고 그후에 저하됨을 알 수 있다.
- [0152] 실시예 2
- [0153] HCT-116 세포에서의 GFP의 발현
- [0154] HCT-116 세포를 AIPcS_{2a} 20 μ g/ml와 함께 18시간 동안 인큐베이션하고, AIPcS_{2a} 부재 하에 4시간 동안 인큐베이션한 후에 광선 노출하였다. 세포를 도 2에 나타낸 바와 같이 광선 노출 직전 또는 직후에 pEGFP-N1/폴리리신 복합체로 4시간 동안 처리하였다. 광선 노출 2일 후에 유동 세포계산에 의해서 GFP 발현을 분석하였다.
- [0155] 그 결과를 도 2에 나타내었으며, 실시예 1의 THX 세포의 트랜스펙션과 유사한 방식으로, 플라스미드-pLys 복합체 (즉, pEGFP-N1/pLys)가 광선 노출 전이 아니라 후에 세포에 첨가될 때 GFP의 트랜스펙션이 동일하게 효율적

임을 알 수 있다. 역시, 트랜스펙션된 세포의 백분율이 세포가 광선에 노출되는 기간에 따라 변화된다.

[0156] 실시예 3

[0157] 광화학적 처리 전과 후의 겔로닌 첨가의 상승적 효과

[0158] 겔로닌은 세포의 사이토졸 내에 존재할 때 단백질 합성을 효율적으로 억제하는 식물 독소이다. THX 세포를 AIPcS_{2a} 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 함께 18시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 감작제-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션한 후에 광선 노출하였다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 그 세포를 AIPcS_{2a} 및 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 겔로닌으로 동시-처리하거나, 또는 광선 노출한 직후에 겔로닌 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 18시간 동안 첨가하고, 그후에 그것을 배지로부터 제거하였다. 광선 노출 24시간 후에 단백질 합성을 측정하였다.

[0159] 그 결과를 도 3에 나타내었으며, 겔로닌 부재하에 광화학적 처리 자체가 단백질 합성의 약간의 감소를 유도하긴 하지만, 광화학적 처리 전 또는 후의 겔로닌의 존재는 단백질 합성의 아주 현저한 억제를 유도함을 알 수 있다. 이 데이터는 겔로닌이 세포와 접촉되는 시기가 광화학적 처리 전이든 후이든 겔로닌이 세포내로 내부이행됨을 나타낸다.

[0160] 실시예 4

[0161] 광-유도된 트랜스펙션에 대한 추적 시간의 효과

[0162] THX 세포를 AIPcS_{2a} 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 18시간 동안 처리하고, 세척하여, 감작제-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션한 후에 3분 동안 광처리하였다. 그 세포를 도 4에 나타낸 시간 동안 성장 배지에서 인큐베이션한 후에 pEGFP-N1/폴리리신 복합체 (충전 비율 1.7)로 1시간 동안 처리하였다. 광선 노출한 지 48시간 후에 유동 세포 계산에 의해서 GFP 발현을 분석하였다.

[0163] 그 결과를 도 4에 나타내었으며, pEGFP-N1에 의한 트랜스펙션이 광선 노출 후 약 5시간의 반감기로 감소되므로, 최상의 결과를 위해서는 내부이행될 분자가 광화학적 처리 후에 비교적 바로 세포에 노출되어야 함을 알 수 있다.

[0164] 실시예 5

[0165] 광선 조사에 대한 트랜스펙션 펄스의 함수로서의 트랜스펙션의 효율

[0166] THX 세포를 AIPcS_{2a} 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 18시간 동안 처리하고, 세척하여, 감작제-비함유 배지에서 인큐베이션하였다. 세포에는 3분의 광선 노출 전에 (음의 가로좌표 값) 또는 후에 (양의 가로좌표 값) pEGFP-N1/폴리리신 복합체에 의한 처리의 펄스 (0.5 또는 1시간, 도 5에 있는 막대의 폭은 처리의 개시 및 종결을 반영함)가 제공되었다. 광선 노출한 지 48시간 후에 유동 세포계산에 의해서 GFP 발현을 분석하였다. 수회의 실험으로부터의 데이터는, 트랜스펙션이 광선 노출 바로 전 또는 바로 후에 수행될 때의 트랜스펙션의 효율을 100%로 하여 정규화되었다.

[0167] 그 결과를 도 5에 나타내었으며, 최상의 트랜스펙션 효율을 위해서는 세포가 광선 노출 직전 또는 직후에 내부이행될 분자에 노출되어야 함을 알 수 있다.

[0168] 실시예 6

[0169] 광-유도된 트랜스펙션 - pEGFP-N1/폴리리신 복합체와의 인큐베이션 시간에 대한

[0170] 의존도

[0171] THX 세포를 AIPcS_{2a} 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 18시간 동안 처리하고, 세척하여, 감작제-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션한 후 광선 노출시키고, 이어서 pEGFP-N1/폴리리신 복합체 (충전 비율 1.7)와 함께, 도 6A에 예시된 바와 같이 6시간 이하 동안 인큐베이션하였다. 광선 노출한 지 48시간 후에 유동 세포계산에 의해서 GFP 발현을 분석하였다. 그러한 처리 후에 GFP-발현 세포의 수를 도 6B에 나타내고 다른 처리의 특이성은 도 6C에 나타내었다.

[0172] 그 결과를 도 6에 나타내었으며, pEGFP-N1/폴리리신 복합체와의 인큐베이션 시간이 증가함에 따라 트랜스펙션된 세포의 수가 증가하긴 하지만 (도 6B), 트랜스펙션의 최고 특이성은 최단 인큐베이션 시간 후에 일어남 (도 6C)을 알 수 있다.

[0173] 실시예 7

- [0174] 0 °C에서 pEGFP-N1/폴리리신 복합체에 의한 처리
- [0175] 이 실험은, 광화학적 처리 후에 세포와 접촉하게 된 플라스미드가 원형질 막을 통해 누출될 수 있는지를 의미하는, 세포막에 대한 미소한 손상을 광화학적 처리가 유도하였는지를 시험하도록 설계되었다.
- [0176] THX 세포를 AIPcS_{2a} 20 µg/ml로 18시간 동안 처리하고, 세척하여, 감작제-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션한 후 광선 노출시키고, 바로 이어서 pEGFP-N1/폴리리신 복합체 (충전 비율 1.7)와 함께 0 °C에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 그후에, 세포를 A) 트립신처리하고 접종한 후 37 °C로 전이시키거나, 또는 B) 트립신처리 없이 37 °C로 전이시켰다. 세포를 도 8에 나타낸 바와 같이 광선 노출시켰다. GFP 발현을 광선 노출한 지 48시간 후에 유동 세포계산에 의해서 분석하였다.
- [0177] 세포를 pEGFP-N1/폴리리신 복합체와 함께 0 °C에서 45분 동안 인큐베이션한 후에, 복합체는 세포 표면에 접촉되지만 세포내이입되지는 않을 것이다. 그후에, THX 세포를 37 °C에서 플라스미드-비함유 배지에서 인큐베이션하거나 (도 8B) 또는 트립신처리하여 (도 8A) 표면으로부터 플라스미드를 제거하고 37 °C에서 새로운 디쉬에서 접종하였다. 이 실험은 플라스미드/폴리리신 복합체가 광화학적 처리 후에 원형질 막을 통해 누출되지 않음을 나타낸다.
- [0178] 실시예 8
- [0179] 3-THPP 및 광선 노출과 pEGFP-N1/폴리리신 복합체에 의한 처리의 병행
- [0180] THX 세포를 3THPP 0.25 µg/ml로 18시간 동안 처리하고, 세척하여, 감작제-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션한 후 광선 노출시키고, 바로 이어서 pEGFP-N1/폴리리신 복합체 (충전 비율 1.7)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 도 9에 나타낸 바와 같이 광선 노출시키고 GFP 발현을 광선 노출한 지 48시간 후에 유동 세포계산에 의해서 분석하였다.
- [0181] 3-THPP는 주요 위치가 엔도솜이나 라이소솜이 아닌 광감작제이다. 도 9에 나타낸 결과는 광선 조사 전의 3-THPP에 의한 세포의 처리가 광감작제 AIPcS_{2a}가 사용된 이전의 실시예에 나타낸 결과에 비해 GFP 발현의 미소한 증가만을 유도함을 보여준다. 이는 엔도솜 및 라이소솜에 위치하는 광감작제가 유리할 수 있음을 나타낸다.
- [0182] 실시예 9
- [0183] 광감작제 및 광선 전처리의 병행은 양이온성 지질을 이용한 세포의 트랜스펙션을 가능하게 한다
- [0184] HCT 116 세포는 실험 하루 전에 12-웰 플레이트에서 75000 세포/웰의 밀도로 접종되었다. 그 세포를 광감작제 AIPcS_{2a} (20 µg/ml)와 함께 18시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 광감작제-비함유 배지에서 7시간 추적하고, 적색 광선에 7분 동안 노출하였다. 그후에, 세포를 플라스미드 pEGFP-N1과의 DOTAP-복합체 (DOTAP는 Boehringer로부터 구입함)와 함께 3시간 동안 인큐베이션하고, 성장 배지로 세척하여 37 °C에서 21시간 동안 인큐베이션한 후 EGFP 발현을 물질 및 방법란에 기재된 바와 같이 유동 세포계산에 의해서 측정하였다. 대조군 세포는 광선에 노출시키지 않았으며, 그 이외의 처리는 동일하였다.
- [0185] 그 결과를 도 10에 나타내었으며, PCI 처리가 DOTAP/플라스미드 복합체에 의한 트랜스펙션 효율을 약 4배 증가시킬 수 있다.
- [0186] 실시예 10
- [0187] THX 세포의 아테노바이러스 형질도입에 대한 PCI의 효과
- [0188] 물질
- [0189] 플루오레세인 디-β-D-갈락토피라노시드 (FDG)를 몰레큘러 프로브 (Molecular Probes) (F-1179)로부터 구입하였다. 분말을 DMSO/에탄올의 1:1 혼합물에 용해시켜 20 mM 저장액을 제조하였다. 혼합물을 적절한 부피의 빙냉수에 서서히 첨가하여 8:1:1 H₂O/DMSO/에탄올 용액을 만들었다.
- [0190] 제조합 바이러스 AdCA17lacZ를 형성하고 10% FCS, 100 U/ml 페니실린 (Gibco-BRL), 0.1 mg/ml 스트렙토마이신 (Gibco-BRL) 및 2 mM 글루타민으로 보충된 MEM F-11 배지에서 유지된 Ad E1-형질전환된 배아 신장 세포주인 인간 세포주 293에서 증식시켰다.

- [0191] 재조합 바이러스의 제조
- [0192] 293 세포에서 pJM17 시스템을 이용한 동종 재조합에 의해 인간 CMV 프로모터의 제어하에 이. 콜리 lacZ 유전자를 코딩하는 재조합 아데노바이러스 AdCA17lacZ를 얻었다 (Addison et al., 1997, J. Gen. Virol., 78, 1653-1661). 재조합 벡터를 플라크 정제하고, 293 세포에서 고 역가로 성장시키고 이미 기술된 바와 같이 염화 세슘 밴딩에 의해 정제하였다 (Hitt et al., 1995, Methods in Mol. Genetics., 7, 15-30).
- [0193] 세포의 감염
- [0194] THX 세포 (4×10^5 세포)를 6 cm 디쉬에서 접종시키고 밤새 성장시켰다. 약 60% 융합으로, 성장 배지를 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AIPcS_{2a}로 보충된 2 ml 성장 배지로 교환하고 디쉬를 인큐베이터에 16 내지 18시간 동안 다시 넣었다. 그 후에 감각제 함유 배지를 흡인하고, 세포를 통상의 성장 배지에서 4시간 이상 인큐베이션시킨 후 광처리하고 바이러스 감염시켰다.
- [0195] 세포의 감염
- [0196] 트립신-EDTA를 사용하여 3개의 디쉬에서 세포를 분리하고 디쉬 내의 평균 세포수를 부르쉐르 (Buercher) 챔버 계수에 의해 계산하였다. 아데노바이러스 희석액을 감염시킬 세포의 수에 따라서 0.68 mM CaCl₂ 및 0.5 mM MgCl₂를 함유한 PBS에서 제조하였다. 일반적으로, 세포를 1 및 10의 MOI (감염도)로 감염시켰다.
- [0197] 바이러스를 첨가하기 전에, 세포를 3분 동안 적색 광선 (세포에 도달하는 광선 강도가 1.35 mW/cm²인, 시네모이드 35 필터를 통해서 여과된 필립스 TL 20W/09)에 노출시켰다. 이후에, 배지를 흡인하고 200 μl 바이러스 현탁액 (또는 바이러스로 처리되지 않은 대조군의 경우 0.68 mM CaCl₂ 및 0.5 mM MgCl₂를 함유한 PBS)을 각 디쉬에 첨가하였다. 37 °C에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 5 ml 통상의 성장 배지를 첨가하고 세포를 48시간 동안 성장시켰다.
- [0198] β -갈락토시다제 검정
- [0199] 세포를 트립신-EDTA에 의해 분리하고 5 ml 성장 배지에서 재현탁시켰다. 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리시킨 후에, 배지를 흡인하고, 세포 펠렛을 50 μl 성장 배지에 재현탁시키고 튜브를 37 °C 수조에 5분 동안 두었다. 이후에, 37 °C로 예열된 2 mM FDG-용액 50 μl 를 첨가하고 튜브를 수조에 1분 동안 다시 두었다. 마지막으로, 900 μl 성장 배지를 첨가하고 튜브를 얼음 위에서 30-60분 동안 인큐베이션시킨 후 상기한 바와 같은 유동 세포 계산에 의해 시료를 분석하였다.
- [0200] THX 세포를 AIPcS_{2a} (도 11에 PS로 표시됨) 및 아데노바이러스 (도 11에 "바이러스"로서 표시됨)로 처리하고, 물질 및 방법 란에 기재된 바와 같이 3 또는 4분 동안 광선 노출시키고 유동 세포계산에 의해 β -갈락토시다제 (β -gal) 활성을 측정하였다. β -gal 양성 세포 및 그의 β -gal 활성을 적분하여 총 β -gal 활성을 정량화하였다. β -gal 양성 세포의 수 및 평균 β -gal 활성은 모두 PCI 처리에 의해 증가되었다.
- [0201] 그 결과는 세포가 바이러스 단독 또는 바이러스 및 광감작제와 함께 인큐베이션될 때 THX 세포의 최소 감염이 일어나지만 광화학적 처리, 즉 광감작제에 대한 광선 추가는 세포의 형질도입을 상당히 증강시킴을 나타낸다 (β -gal 활성의 증가에 의해 보여짐).
- [0202] 실시예 11
- [0203] 세포내이입 마커 분자의 세포내 집적에 대한 광화학적 처리의 효과
- [0204] THX 세포를 팔콘 (Falcon) 3001 디쉬 (디쉬 당 2.5×10^4 세포)에 접종하고, 다음날 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AIPcS_{2a}로 18시간 동안 처리하고, AIPcS_{2a}로부터 세척하고 AIPcS_{2a}-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 세포를 4분 동안 광선 노출시킨 후 5 mg/ml의 세포봉입성 마커 FITC-텍스트란과 함께 3시간 동안 인큐베이션하였다. 비조사된 세포를 조사한 것을 제외하고는 유사한 방식으로 처리하였다. 비고정된 세포에서의 FITC-텍스트란의 세포내 집적은 63x 배율의 대물렌즈, 450-490 nm 밴드패스 여기 필터 및 510-540 nm 밴드패스 방출 필터를 사용하는 형광 현미경 (Zeiss Axioplan fluorescence microscope; Oberkochen, Germany)으로 관찰되었다. 형광 현미경사진은 냉각되는 전하 결합 소자 (CCD) 카메라 (Photometrics Inc., Tucson, AZ)를 이용하여 기록하였다.
- [0205] 그 결과 (도 12)는 형광 세포봉입성 마커 FITC-텍스트란 전에 제공된 광선에 의한 PCI가 이 마커의 위치를 세포

봉입성 소포 (비조사된 세포에 대해 패널 A에서 보여지는 스팟)로부터 사이토졸 (조사된 세포에 대해 패널 B에서 보여지는 확산 형광)로 이동시킴을 나타낸다. 거대분자가 내부이행되기 전에 광처리가 제공될 때 거대분자는 사이토졸로 매우 신속하게 전위되므로, 실질적으로 거대분자의 라이소솜 분해 가능성이 감소된다.

[0206] 실시예 12

[0207] THX- 및 HCT 116 세포에서의 켈로닌 독성에 대한 광화학적 처리의 효과

[0208] 켈로닌은 그것이 세포 사이토졸에 존재할 때 단백질 합성을 효율적으로 억제하는 식물 독소이지만, 그 자체로는 사이토졸에 도달할 수 없고, 따라서 온전한 세포에 대해서는 완전히 비독성이다. 켈로닌에 의한 처리의 경우, 웰 당 25×10^3 세포가 24-웰 플레이트 (Nunc, Denmark)에 접종된다. 다음날, AIPcS_{2a} 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하고, 세포를 37 °C에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. AIPcS_{2a} 첨가 후의 모든 절차를 간단한 광선에서 수행하였다. "전 광선 노출" 방법의 경우에는, 세포를 AIPcS_{2a}로부터 세척하고 AIPcS_{2a}-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 그후에, 세포를 광선에 노출시킨 후 (도면에 나타낸 바와 같이), 켈로닌 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 18시간 동안 처리하였다. "후 광선 노출" 방법의 경우에, 세포를 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AIPcS_{2a} 및 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 켈로닌과 함께 18시간 동안 동시-인큐베이션하고, 세척한 후 도면에 나타낸 바와 같이 광선 노출시켰다.

[0209] 비조사된 세포를, 조사한 것을 제외하고는 유사한 방식으로 처리하였다. 처리된 세포를 배양 배지로 한번 세척하고 새로운 배지를 첨가한 후 37 °C에서 인큐베이션하고 더 분석하였다. 단백질 합성의 억제는 광선 노출한 지 24시간 후에 단백질로의 [³H]-로이신 혼입에 의해 검정되었다. 광선 조사는 550-600 nm에서 컷 오프되는 롱패스 필터 및 4개의 광 튜브 (Philips TL 20W/09)가 있는 벤치로부터 수행하였다. 세포에 도달하는 광선 강도는 13.5 W/m²였다.

[0210] 이 실시예는 THX 세포 (도 13A) 및 HCT 116 세포 (도 13B) 둘다에서 "전 광선 노출" 방법이 "후 광선 노출" 방법 보다 더 잘 작용함을 입증한다. 따라서, THX-세포의 경우 최고 광선량에서 단백질 합성의 억제는 "후 광선 노출" 보다 "전 광선 노출"에 의한 것이 약 3배 더 강력하였다. 또한, 두 세포주에서 켈로닌 자체는 PCI 처리 없이는 독성 효과를 갖지 않으며, PCI 처리가 광화학적 처리에 의해 달성될 수 있는 독소 효과의 유도에 있어서의 효능 및 특이성을 나타냄을 알 수 있다.

[0211] 실시예 13

[0212] 아데노바이러스 매개된 유전자 형질도입의 광화학적 촉진

[0213] 웰 당 5×10^4 THX 세포를 6-웰 플레이트에 접종하였다. 다음날, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AIPcS_{2a}를 첨가하고, 세포를 37 °C에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. AIPcS_{2a} 첨가 후의 모든 절차를 간단한 광선에서 수행하였다. "전 광선 노출" 방법의 경우에는, 세포를 AIPcS_{2a}로부터 세척하고 AIPcS_{2a}-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 그후에, 세포를 광선에 3분 동안 노출시킨 후 30분 동안 1의 감염도 (MOI)로 아데노바이러스 벡터 AdHCMV-1acZ (실시예 10에 AdCA17lacZ으로서도 불리움)에 의해 처리하였다. 이 벡터는 유동 세포계산에 의해 발현이 분석될 수 있는 β -갈락토시다제 리포터 유전자를 함유한다 (하기 참조).

[0214] "후 광선 노출" 방법의 경우에, AIPcS_{2a}-처리되고 세척된 세포를 먼저 상기한 바와 동일한 농도로 동일한 시간 동안 아데노바이러스로 처리하고, 세척하고, 새로운 배양 배지를 첨가한 후에 광선 노출시켰다. 비조사된 세포를, 조사한 것을 제외하고는 유사한 방식으로 처리하였다.

[0215] 처리된 세포를 배양 배지로 한번 세척하고 새로운 배지를 첨가한 후 37 °C에서 인큐베이션하고 더 분석하였다. β -갈락토시다제 발현을 광선 노출한 지 2일 후에 유동 세포계산에 의해 분석하였다. 바이러스 (AdHCMV-1acZ 또는 AdCA17lacZ으로서 불리움)의 제조, 세포의 처리, 조사 및 β -갈락토시다제 발현의 분석에 대한 상세한 방법은 실시예 10에 기술되어 있다.

[0216] 그 결과 (도 14)는 "전 광선 노출" 방법을 이용한 광화학적 처리 (도 14의 우측에 있는 막대로 나타냄)는 β -갈락토시다제-발현 세포의 백분율을 이러한 실험 조건 하에서 2.5%에서 15%로 약 6배 증가시킴을 나타낸다. 또한, "전 광선 노출"방법에 의한 효과는 "후 광선 노출" 방법 (도 14의 좌측에 있는 막대로 나타냄)에 의해 얻어진 것과 거의 동일하였음을 알 수 있다.

- [0217] 실시예 14
- [0218] 광-유도된 트랜스펙션 효율에 대한 인큐베이션 시간의 효과
- [0219] 웰 당 5×10^4 THX 세포 또는 7.5×10^4 HCT 116 세포를 각각 6-웰 및 12-웰 플레이트에 접종하였다. 다음날, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AIPcS_{2a}를 첨가하고, 세포를 37 °C에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. AIPcS_{2a} 첨가 후의 모든 절차를 잔잔한 광선에서 수행하였다. 세포를 AIPcS_{2a}로부터 세척하고 AIPcS_{2a}-비함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 세포를 광선에 (THX 세포의 경우 3분 또는 HCT 116 세포의 경우 6분 동안) 노출시킨 후 도 15에 나타난 시간 동안 pEGFP-N1/폴리리신 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pEGFP-N1) 복합체로 처리하였다. 비조사된 세포를, 조사한 것을 제외하고는 유사한 방식으로 처리하였다. 처리된 세포를 배양 배지로 한번 세척하고 새로운 배지를 첨가한 후 37 °C에서 2일 동안 인큐베이션한 후 유동 세포계산 (물질 및 방법 참조)에 의해 EGFP 발현을 분석하였다. 광선 조사는 550-600 nm에서 컷 오프되는 롱패스 필터 및 4개의 광 튜브 (Philips TL 20W/09)가 있는 벤치로부터 수행하였다. 세포에 도달하는 광선 강도는 13.5 W/m²였다. pEGFP-N1 플라스미드 5 μg 를 물 75 μl 에 희석하고 폴리리신 5.3 μg 을 물 75 μl 에 희석하여 개별적으로 제조한 플라스미드 및 폴리리신 용액을 서서히 혼합하여 pEGFP-N1/폴리리신 복합체 (충전 비율 1.7)를 제조하였다. 그 용액들을 혼합하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션하고, 배양 배지로 1 ml까지 희석하고 세포에 첨가하였다.
- [0220] 그 결과 (도 15)는 THX 및 HCT 116 세포 둘다에서 DNA/폴리리신 복합체에 의한 트랜스펙션이 "전 광선 노출" 광 화학적 처리에 의해 강력하게 유도될 수 있음을 나타낸다. 트랜스펙션의 속진은 적어도 아래로는 30분에 이르기까지의, DNA에 의한 짧은 인큐베이션 시간 후에 이미 효율적임을 알 수 있다. 광-유도된 트랜스펙션은 인큐베이션 시간에 따라 증가하지만, DNA에 의한 약 2시간의 인큐베이션 후에는 그 수준이 저하되는 것으로 보인다.
- [0221] 실시예 15
- [0222] 광감작제로서 TPPS_{2a}를 이용한, 폴리-L-리신에 의해 매개된 THX 세포의 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과
- [0223] 테트라페닐포르핀 디술포네이트 (TPPS_{2a}), 로트 #04197은 포르피린 프로덕츠 (Porphyrin Products; UT, USA) 제품이었다. TPPS_{2a}는 DMSO에 용해되었다.
- [0224] 플라스미드 pEGFP-N1은 클론테크 라보라토리스 인크. (CA, USA; cat. no. 6085-1)로부터 구입하였다. ELIM 바이오파마슈티칼스, 인크. (ELIM Biopharmaceuticals, Inc.; CA, USA) 제품인 배치 (로트# EGFP-N1-1002)를 사용하여 멸균수에 5 mg/ml의 농도로 전달하였다. 0.5 mg/ml의 저장액은 멸균 TE-완충액 pH 7.4 (1 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)에서 만들어졌으며 -20 °C로 유지되었다.
- [0225] THX 인간 흑색종 세포를 10% FCS (태 송아지 혈청), 페니실린/스트렙토마이신 및 L-글루타민으로 보충된 RPMI 1640 배지에서 성장시켰다. 잔잔한 광선에서, 배지를 제거하고 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TPPS_{2a}를 함유하는 배지를 첨가하였다. 세포 (광선으로부터 보호됨)를 37 °C에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 배지로 3회 세척하고 PLL-L ("후 광선 노출") 시료의 경우, pEGFP-N1/폴리-L-리신 복합체를 함유하는 1 ml 배지를 첨가하였다. 그 복합체는 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pEGFP-N1을 함유하였고 DNA에 대한 폴리-L-리신 (PLL)의 1.7의 충전 비율을 가졌다. 어두운 곳에서 37 °C에서 추가의 4시간 인큐베이션 후에, 배지를 제거하고 세포를 배지로 한번 세척하였다. 1 ml 배지를 첨가하고 세포를 도 16에 나타내고 물질 및 방법 란에 기술된 바와 같이 청색 광선에 노출시켰다. L-PLL ("전 광선 노출") 시료의 경우, 처음 4시간 인큐베이션은 pEGFP-N1/PLL 복합체 없는 배지에서 이루어졌고, 그 복합체는 조사 직후에 첨가되고 추가의 4시간 인큐베이션 후에 제거되었다. 세포를 유동 세포계산에 의한 EGFP 발현 분석 전에 2일 동안 인큐베이션하였다 (여전히 광선으로부터 보호됨). 이 분석을 위하여, 세포를 트립신처리하고 (트립신-EDTA, Sigma, MO, USA), 400 μl RPMI 배지에서 재현탁시키고, 50 μm 메쉬 나일론 필터를 통해 여과시킨 후 FACS칼리부르 유동 세포계수기 (Becton Dickinson, CA, USA)로 분석하였다. EGFP를 488 nm에서의 여기 후에 510-540 nm 필터를 통해 측정하였다. 요오드화 프로피듐 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 사용하여 생육가능한 세포로부터 사멸 세포를 구별하고, 펄스-처리를 수행하여 단일 세포로부터 세포 이중체를 구별하였다. 각 시료에 대해 10000 가지 결과를 모으고, 데이터는 CELL퀘스트 소프트웨어 (Becton Dickinson, CA, USA)로 분석하였다.
- [0226] 결과

- [0227] 도 16로부터 알 수 있는 바와 같이, THX 세포의 폴리-L-리신 매개된 트랜스펙션의 경우 TPPS_{2a} 광감작제를 사용할 때 전달 분자의 "전 광선 노출" 첨가 방법은 "후 광선 노출"과 마찬가지로 잘 작용한다.
- [0228] 실시예 16
- [0229] 광감작제로서 TPPS₄를 이용한, 폴리-L-리신에 의해 매개된 THX 세포의 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과
- [0230] TPPS₄ 광감작제 (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 TPPS_{2a} 대신 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 15에 기술된 바와 같이 THX 세포를 성장시키고 처리하였다.
- [0231] 결과
- [0232] 도 17로부터 알 수 있는 바와 같이, THX 세포의 폴리-L-리신 매개된 트랜스펙션의 경우 TPPS₄ 광감작제를 사용할 때 "전 광선 노출" 방법은 "후 광선 노출" 보다 약간 더 우수하게 작용하지만, 두 방법은 여전히 트랜스펙션을 달성하였다.
- [0233] 실시예 17
- [0234] 광감작제로서 TPPS_{2a}를 이용한, 폴리-L-리신에 의해 매개된 HCT 116 세포의 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과
- [0235] 실시예 15에 기술된 바와 같이 HCT 116 세포를 성장시키고 처리하였다.
- [0236] 결과
- [0237] 도 18로부터 알 수 있는 바와 같이, HCT 116 세포의 폴리-L-리신 매개된 트랜스펙션의 경우 TPPS_{2a} 광감작제를 사용할 때 "전 광선 노출" 방법은 "후 광선 노출" 방법과 마찬가지로 잘 작용한다.
- [0238] 실시예 18
- [0239] 광감작제로서 TPPS₄를 이용한, 폴리-L-리신에 의해 매개된 HCT 116 세포의 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과
- [0240] TPPS₄ 광감작제 (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 TPPS_{2a} 대신 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 15에 기술된 바와 같이 THX 세포를 성장시키고 처리하였다.
- [0241] 결과
- [0242] 도 19는 THX 세포의 폴리-L-리신 매개된 트랜스펙션의 경우 TPPS₄ 광감작제를 사용할 때 "전 광선 노출" 방법이 "후 광선 노출" 방법과 마찬가지로 잘 작용함을 나타낸다.
- [0243] 실시예 19
- [0244] 광감작제로서 TPPS₄를 이용한, DODAP에 의해 매개된 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과
- [0245] HCT 116 세포를 10% FCS (태 송아지 혈청), 페니실린/스트렙토마이신 및 L-글루타민으로 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양시켰다. 잔잔한 광선에서, 배지를 제거하고 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TPPS₄를 함유하는 배지를 첨가하였다. 세포 (광선으로부터 보호됨)를 37 °C에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 배지로 3회 세척하고 DOTAP-L ("후 광선 노출") 시료의 경우, 1 μg pEGFP-N1 및 5 μg DOTAP의 복합체를 함유하는 1 ml 배지를 첨가하였다. 어두운 곳에서 37 °C에서 추가의 4시간 인큐베이션 후에, 배지를 제거하고 세포를 배지로 한번 세척하였다. 1 ml 배지를 첨가하고 세포를 도 20에 나타내고 "물질 및 방법" 란에 기술된 바와 같이 청색 광선에 노출시켰다. L-DOTAP ("전 광선 노출") 시료의 경우, 처음 4시간 인큐베이션은 pEGFP-N1/DOTAP 복합체 없는 배지에서 이루어졌고, 그 복합체는 조사 직후에 첨가되고 추가의 4시간 인큐베이션 후에 제거되었다. 세포를 실시예 15에 기술된 바와 같이 유동 세포계산에 의한 EGFP 발현 분석 전에 1일 동안 인큐베이션하였다 (여전히 광선으로부터 보호됨).
- [0246] 결과

- [0247] 도 20으로부터, 양이온성 지질 DOTAP에 의해 매개된 HCT 116 세포의 트랜스펙션의 경우 TPPS₄ 광감작제를 사용할 때 "전 광선 노출" 방법은 "후 광선 노출" 보다 실질적으로 더 우수하게 작용함이 관찰되었다. "전 광선 노출" 방법은 양이온성 지질에 의해 매개된 트랜스펙션에 대해 특히 유리한 것으로 보인다.
- [0248] 실시예 20
- [0249] 광감작제로서 TPPS_{2a}를 이용한, 슈퍼펙트(등록상표)에 의해 매개된 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과
- [0250] 슈퍼펙트(등록상표)는 QIAGEN AG로부터 구입한다.
- [0251] 플라스미드/슈퍼펙트(등록상표) 복합체의 제조
- [0252] 플라스미드/슈퍼펙트(등록상표) 복합체를 다음과 같이 제조하였다:
- [0253] (i) pEGFP-N1을 RPMI 1640 배지 (혈청, 단백질 및 항생물질 없음)로 희석하였다. (ii) 슈퍼펙트(등록상표) (μg DNA 당 $2 \mu\text{l}$)를 플라스미드 용액에 첨가하고 내용물을 10초 동안 흔들어서 혼합하였다. (iii) 용액을 실온에서 10-20분 동안 인큐베이션하여 복합체가 형성되도록 하였다. (iv) 세포 성장 배지 $400 \mu\text{l}$ (혈청 및 항생물질 있음)를 트랜스펙션 복합체를 함유하는 튜브에 첨가하고 내용물을 위아래로 2회 피펫팅하여 혼합하고 총 부피를 세포로 바로 전이시켰다.
- [0254] 세포의 처리
- [0255] HCT 116 세포 (75000 세포/웰, $1 \text{ ml}/\text{웰}$)를 12-웰 플레이트 (Costar Corning, NY, USA)에 접종하고 6시간 동안 부착되도록 두었다. $0.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ TPPS_{2a}를 함유한 1 ml 배지를 첨가하고, 세포를 18시간 동안 인큐베이션하였다 ($5\% \text{ v/v CO}_2$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$). 세포를 배지로 3회 세척하고 혈청 함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션하였다 ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ v/v CO}_2$). 세포를 420 nm 주위에서 최고 플루언스를 갖는 4개의 형광 튜브 (Osram 18W/67)에 노출시켜 광선 조사하였다. 플라스미드/슈퍼펙트(등록상표) 복합체를 광선 노출 직후에 첨가하고, 세포를 복합체와 함께 1 또는 4시간 동안 인큐베이션하였다. 그후에, 세포를 RPMI 배지에서 4회 세척하고, 1 ml 의 배지를 첨가한 후에 그것을 2일 동안 추가로 인큐베이션하였다. 그후에, EGFP의 발현을 실시예 15에 기술된 바와 같이 유동 세포계산에 의해 분석하였다.
- [0256] 결과
- [0257] PCI가 시험된 모든 조건 하에서 슈퍼펙트(등록상표) 트랜스펙션을 실질적으로 개선시킴을 알 수 있다 (도 21). 예를 들면, $0.75 \mu\text{g}$ DNA 및 1시간 트랜스펙션 시간의 경우 9배 개선이 관찰되었으며, $0.75 \mu\text{g}$ DNA 및 4시간 트랜스펙션 시간의 경우 10배 증가가 관찰되었다.
- [0258] 실시예 21
- [0259] 광감작제로서 TPPS_{2a}를 이용한, HCT 116 세포의 아데노바이러스 매개된 유전자 형질도입에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과
- [0260] HCT 116 세포를 10% FCS (태 송아지 혈청), 페니실린/스트렙토마이신 및 L-글루타민으로 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양시켰다. 잔잔한 광선에서, 배지를 제거하고 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ TPPS_{2a}를 함유하는 배지를 각 웰에 첨가하였다. 세포 (광선으로부터 보호됨)를 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 배지로 3회 세척하였다. 그후에, 세포를 조사 (항상 광감작제를 제거한 지 4시간 후임) 전 또는 후의 다른 시점에서 Ad-HCMV-LacZ 아데노바이러스로 감염시켰다. 세포를 실시예 10 (물질 및 방법)에 기술된 바와 같이 유동 세포계산에 의한 β -갈락토시다제 활성 분석 전에 2일 동안 추가로 인큐베이션하였다 (여전히 광선으로부터 보호됨).
- [0261] 결과
- [0262] 도 22는 아데노바이러스 매개된 유전자 형질도입 시의 PCI 효과에 대한 바이러스의 전달에 대한 광처리 타이밍의 효과를 나타낸다. "전 광선 노출" 방법의 경우에 (Y-축의 우측), PCI 조사가 13시간 이상 동안 유효하므로 바이러스가 광선 조사 후 13시간 이상까지 투여될 수 있어 형질도입에 대한 양성 PCI 효과가 여전히 유지됨을 알 수 있다. 이는 임상비가 치료법을 설계하고 그것을 환자가 받아들일 수 있는 다른 치료법으로, 예를 들면 수술상의 절차로 조정하는데 큰 유연성을 갖도록 하므로 임상적 관점에서 매우 중요하다.

- [0263] 실시예 22
- [0264] 광감작제로서 AlPcS_{2a}를 이용한, 폴리-D-리신에 의해 매개된 HCT 116 세포의 트랜스펙션에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과
- [0265] pEGFP-N1과의 복합체를 제조하는데 있어서 폴리-L-리신 대신에 폴리-D-리신을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 15에 기술된 바와 같이 HCT 116 세포를 성장시키고, 처리하고 분석하였다.
- [0266] 결과
- [0267] 도 23으로부터, 폴리양이온 폴리-D-리신이 트랜스펙션제로서 사용될 때 "전 광선 노출" 방법에 의한 PCI가 마찬가지로 잘 작용함이 관찰될 수 있다.
- [0268] 실시예 23
- [0269] 광감작제로서 TPPS_{2a}를 이용한, 세포증식억제제 블레오마이신에 의한 세포 사멸에 대한 광선 노출 우선 PCI 방법의 효과
- [0270] 테트라페닐포르핀 디술포네이트 (TPPS_{2a}), 로트 #04197은 포르피린 프로덕츠 (Porphyrin Products; UT, USA) 제품이었다. TPPS_{2a}는 DMSO에 용해되었다.
- [0271] 중국 햄스터 폐 섬유아세포 세포주 V-79를 이 연구에 이용하였다.
- [0272] MTT (3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드)를 시그마 (MO, USA; cat. no. M 2128)로부터 구입하고, 5 mg/ml의 농도로 PBS에 용해시키고, 멸균 여과시키고 4 °C에서 저장하였다.
- [0273] 블레오마이신 (ASTA Medica) 15000 IE/KY를 노르웨이 라디엄 호스피탈에 있는 약국에서 구입하였다. 1 IE는 블레오마이신 1 mg에 해당한다. 블레오마이신 분말을 2 mM의 최종 농도로 멸균 0.9% NaCl-용액에 용해시켰다.
- [0274] 세포 배양
- [0275] V-79 세포를 습윤 환경에서 37 °C 및 5% CO₂에서 10% 태 송아지 혈청, 100 U/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신 및 2 mM 글루타민 (모두 Gibco BRL, Paisley, Scotland)으로 보충된 RPMI 1640 배지 (Gibco)에서 배양시켰다.
- [0276] 세포의 처리
- [0277] 세포 (75000 세포/웰, 1 ml/웰)를 12-웰 플레이트 (Costar Corning, NY, USA)에 접종하고 6시간 동안 부착되도록 두었다. 웰의 일부에, 0.7 µg/ml TPPS_{2a}를 함유한 1 ml 배지를 첨가하고 (표 1 참조), 세포를 18시간 동안 인큐베이션하였다 (5% v/v CO₂, 37 °C). 세포를 배지로 3회 세척하였다. 그후에, 세포를 혈청 함유 배지에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 배지를 제거하고, 새로운 배지를 첨가하고 세포를 420 nm 주위에서 최고 플루언스를 갖는 4개의 형광 튜브 (Osram 18W/67)를 함유하는 박스로부터의 광선 노출에 의해 조사하였다.
- [0278] 다른 양의 블레오마이신을 즉시 첨가하였다. 블레오마이신과 함께 1 또는 4시간 인큐베이션한 후에, 세포를 RPMI 배지로 한번 세척하고, 1 ml 배지를 첨가하고 3일의 인큐베이션 후에, 세포 생존을 MTT 검정법으로 측정하였다. 이 방법은 살아있는 대사적 활성 세포에 존재하는 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 수용성 테트라졸륨 염 (MTT)을 보라색의 불용성 포르마잔 생성물로 환원시키는데 기초한 것이다. 0.25 µg MTT를 함유하는 1 ml 배지를 세포에 첨가하고, 이어서 4시간 동안 인큐베이션하였다 (37 °C, 5% v/v CO₂). 웰 당 200 µl 이소프로판올 (Sigma, MO, USA)을 첨가하여 결과의 포르마잔 결정을 용해시켰다. 용액을 570 nm 밴드패스 필터가 장치된 멀티스칸 (Multiskan) EX 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems, Finland)에 의해 판독되는 96 웰 플레이트에 옮겼다. 광처리를 받지 않은 대조군 세포의 백분율로서 세포 생존을 계산하였다.
- [0279] 결과
- [0280] 도 24는 "전 광선 노출" 방법에 의한 PCI가 저분자량의, 임상적으로 승인된 화학요법제 (블레오마이신)의 생물학적 효과를 증가시킬 수도 있음을 나타낸다. 따라서, 100 µM 블레오마이신 용량의 경우, 블레오마이신의 세포독성의 실질적인 광-유도된 증가가 관찰될 수 있음을 알 수 있다 (도 24에서 ■ 및 ●). 최저량의 블레오마이신에서의 효과의 부족은 (도 24에서 ◆), 이 시료가 세포 생존에 대한 관찰가능한 광-유도된 효과가 없는 100

μM 블레오마이신과 동일한 광화학적 처리를 받았으므로, 이러한 증가된 세포독성은 광화학적 처리 자체의 결과가 아님을 나타낸다.

[0281] 실시예 24

[0282] 생체내 모델에서 마우스의 종양의 치료를 위한 겐로닌에 의한 PCI

[0283] 동물

[0284] Balb/c (nu/nu) 누드 암컷 마우스를 암 연구 협회의 동물국에서 번식시켰다. 마우스를 특정 병원체가 없는 조건 하에서 사육하였다. 물 및 음식은 무제한으로 제공하였다. 마우스 사육을 비롯한 모든 절차를 동물 복지에 대한 국립 윤리 위원회 (National Ethical Committee's) 지침에 의해 관리되는, 노르웨이 라디엄 호스피탈에 있는 동물 보호 위원회에 의해 승인된 프로토콜에 따라서 실시하였다. 마우스는 실험 초기에 평균 20-25 g (5-8 주령)이었고 본 발명자는 실험 그룹 당 5마리 이상의 마우스를 사용하였다. 현재의 연구에 사용된 WiDr 인간 선암종을 Balb/c (nu/nu) 마우스로 계열 이식시켜 증식시켰다. 종양을 외과용 메스로 균일하게 잘게 썰고 20 μl의 용액을 각 마우스의 오른쪽 엉덩이 위에 피하 주사하였다. 종양 크기는 2개의 수직 직경을 측정하여 주당 2 또는 3회 측정되었다. 종양 부피는 다음 식을 이용하여 계산되었다.

[0285]
$$V = (W^2 \times L) / 2$$

[0286] 여기서, W는 측정된 종양 직경의 폭이고 L은 길이이다.

[0287] 처리

[0288] 마우스를 표 1 및 도 25에 나타낸 다른 그룹으로 무작위로 배분하였다. AIPcS_{2a}의 저장액을 PBS에서 1.25 mg/ml로 희석하고 종양 부피가 약 100 mm³가 되었을 때 10 mg/kg의 최종 농도까지 복강내 주사하였다. AIPcS_{2a} 주사한 후 48시간에, 종양을 적색 광선 (하기 참조)에 16분 동안 노출시켰다. 광선 노출 직후에 겐로닌 (2 mg/ml 용액 중의 50 μg 총량, 즉 25 μl)을 근육내 주사하였다. 마우스를 AIPcS_{2a}의 주사 후에 어두운 곳에 1주 동안 두었다.

[0289] 광처리

[0290] 종양을 150 mW/cm²를 방출하는 580 nm 롱패스 및 700 nm 숏패스 필터로 여과되는 150 W 할로겐 램프 (Xenophot HLX64640)로 조사하였다. 종양 직경 보다 2 mm 더 큰 직경의 구멍이 만들어진 알루미늄 호일로 동물의 종양 부위 위를 제외한 나머지 부분을 커버하였다. 종양을 145 J/cm²의 광선에 노출시켰다. 종양 부피는 상기한 바와 같이 주당 2 또는 3회 측정되었다. 종양의 직경이 약 20 mm가 되었을 때 마우스를 죽였다. 광선 조사 후 30일에 종양이 없는 마우스의 분율을 기록하고 (표 1), 각 처리 그룹에서의 평균 종양 부피를 기록하였다 (도 25).

[0291] 결과

표 1

[0292] 마우스를 상기한 바와 같이 처리하고 광선 조사한 지 30일 후에 종양의 발생을 기록하였다.

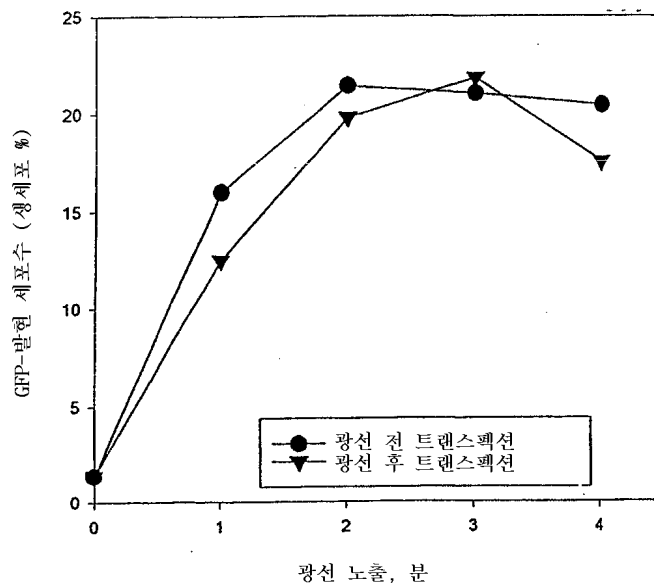
그룹 번호	처리	광선 조사 후 30일에 종양이 없는 마우스의 분율	광선 조사한 지 30일 후에 종양이 없는 마우스 %
1	비처리됨	1/8	13
2	PBS + 광선 노출	0/7	0
3	겐로닌	0/8	0
4	겐로닌 + "전 광선 노출"	0/5	0
5	AIPcS _{2a}	0/10	0
6	AIPcS _{2a} + 겐로닌	0/7	0
7	AIPcS _{2a} + 광선 노출	2/11	18
8	AIPcS _{2a} + 겐로닌 + "전 광선 노출"	4/5	80

[0293] 표 1로부터, "전 광선 노출" 방법을 이용한 겔로닌에 의한 PCI (그룹 8)가 마우스의 종양을 80% (5마리 중 4마리) 회복시켰음을 알 수 있다. 대조적으로, 추가의 광처리가 있든 (그룹 4) 없든 (그룹 3) 겔로닌 만으로는 효과를 나타내지 않았다. 광처리 없이 AIPcS_{2a}와 병용된 겔로닌 (그룹 6)은 어떠한 효과도 나타내지 않는다. 비처리된 동물 (그룹 1)에서 보이는 낮은 치료율은 아마도 자발적으로 사라지는 종양으로 인한 것일 수 있다. AIPcS_{2a} 및 광선 처리된 동물 (그룹 7)에 대해서는 겔로닌의 존재와 무관한 광역학적 요법 (PDT) 효과로 인해 역시 낮은 치료율이 관찰되었다. 그러나, 이러한 PDT 효과 (18% 치료)는 겔로닌에 의한 PCI 처리에 의한 효과 (80%, 그룹 8) 보다 상당히 더 낮았다. 겔로닌 자체만으로는 효과가 없으므로, PCI 그룹에서의 어떠한 높은 치료율도 PDT 및 겔로닌의 부가적 효과에 의해 설명될 수 없고 PCI 처리가 겔로닌의 독성 잠재성을 실현시키는 상승적 효과로 인한 것임에 틀림이 없다.

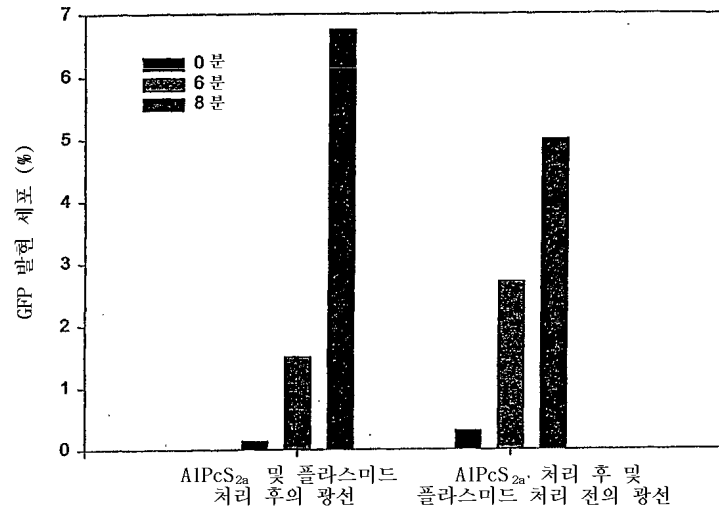
[0294] 도 25는 일부 처리 그룹에서의 평균 종양 부피에 대한 PCI 처리의 효과를 나타낸다. 겔로닌 만으로 처리된 그룹 (△)에서는 광선 조사와 함께 인산염 완충 염수 (PBS) 주사의 위약 처리된 동물 (■)에서 만큼 종양이 빠르게 자랐음을 알 수 있다. 겔로닌 없이 광화학적 처리만을 받은 동물 (◇)에서는 종양 성장이 지연되었지만, 종양은 조사한 지 약 15일 후에 다시 성장하기 시작하였다. 대조적으로, 완전한 겔로닌 PCI 처리된 동물 (●)의 경우, 평균 종양 부피의 증가가 조사한 지 33일 후에도 관찰되지 않았다.

도면

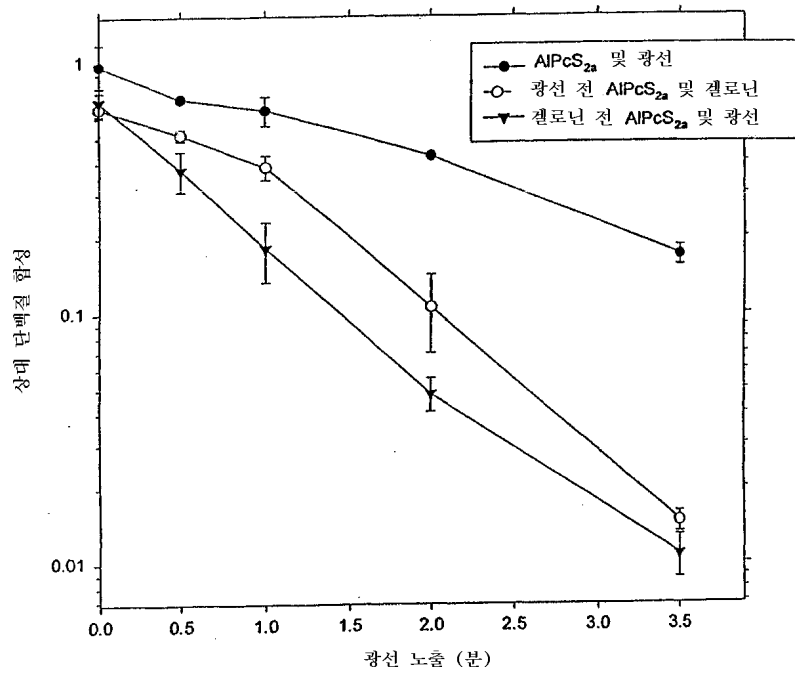
도면1



도면2

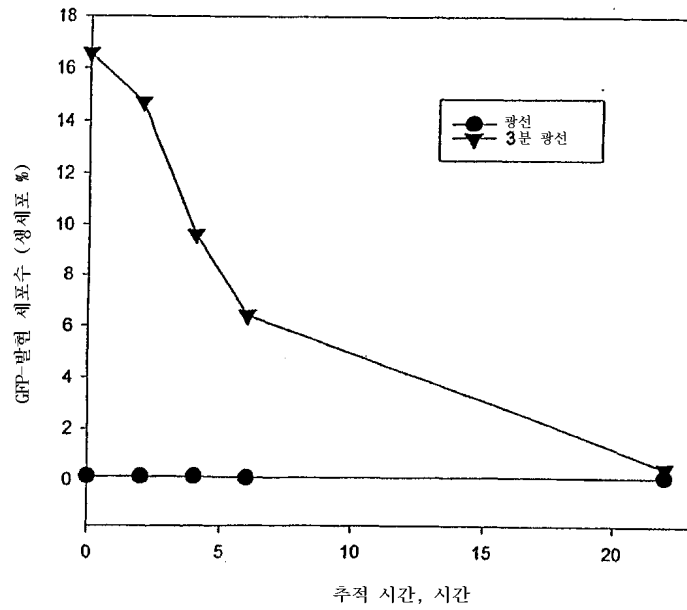
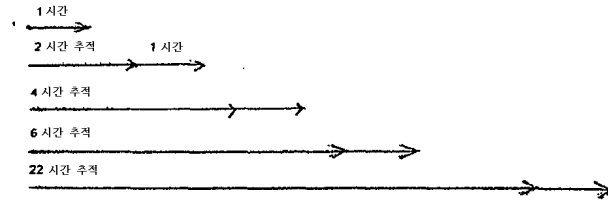


도면3

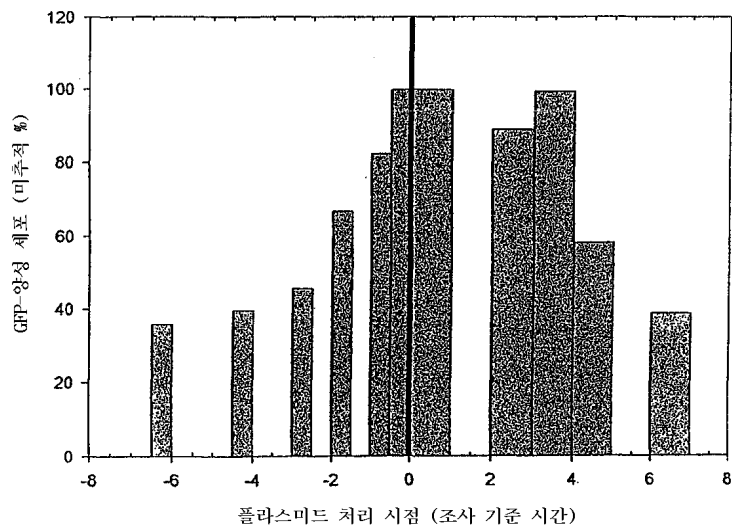


도면4

3분 광선

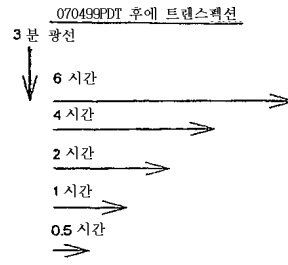


도면5

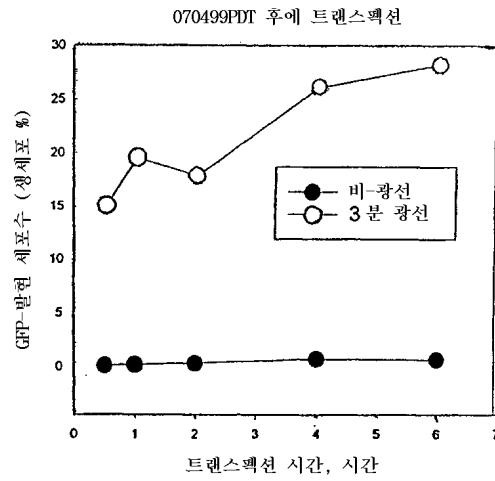


도면6

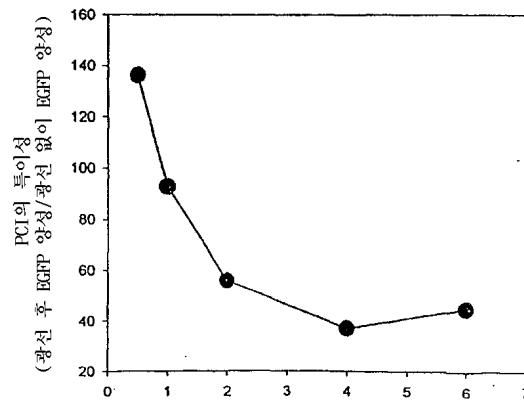
A



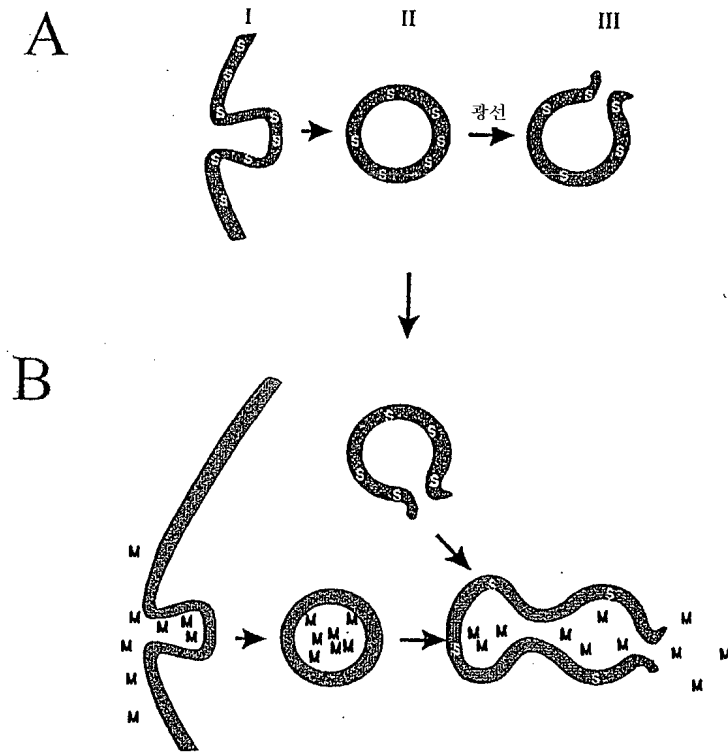
B



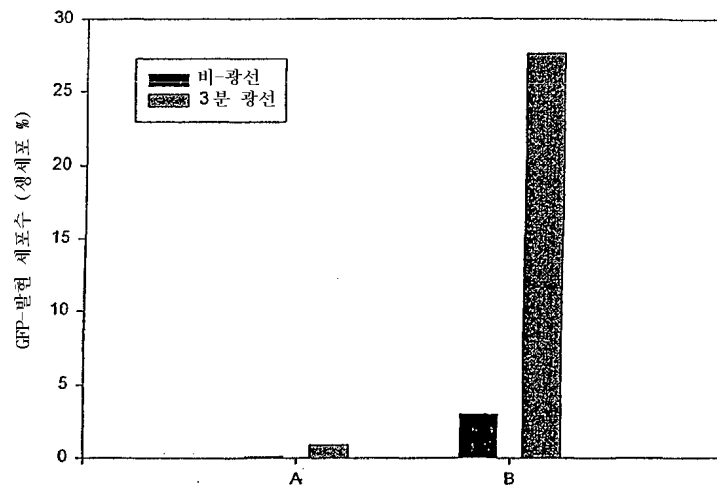
C



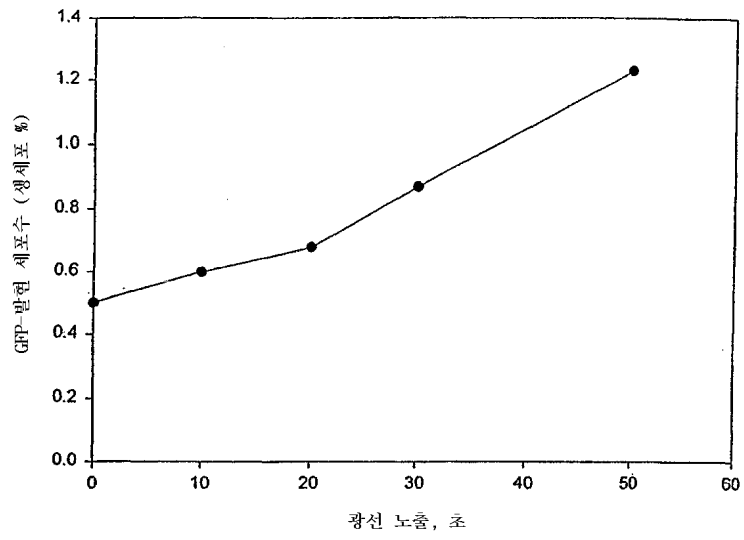
도면7



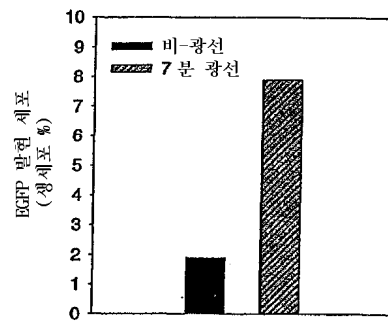
도면8



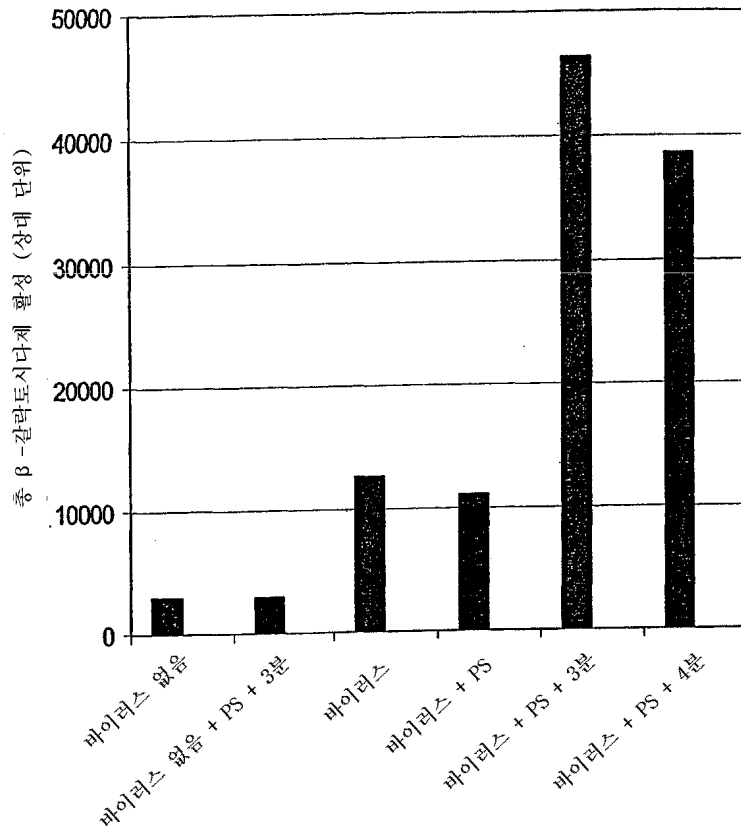
도면9



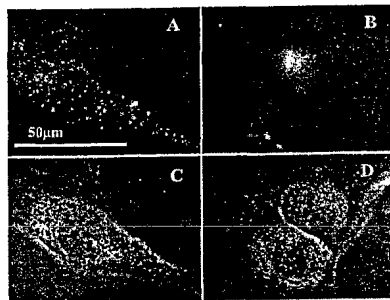
도면10



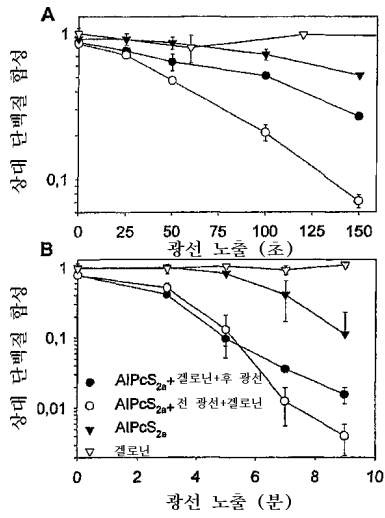
도면11



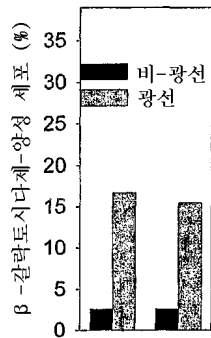
도면12



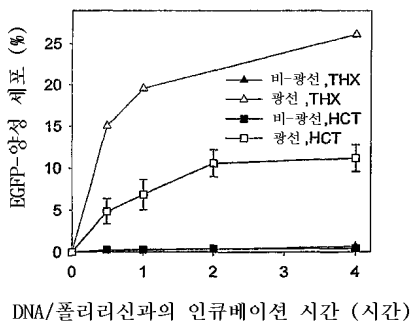
도면13



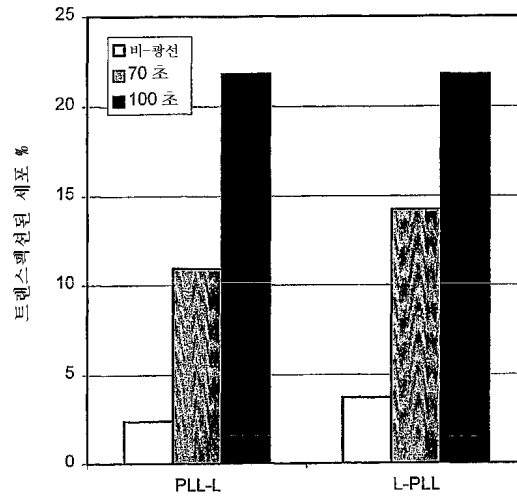
도면14



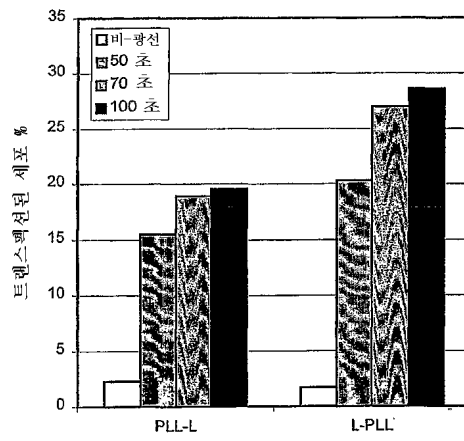
도면15



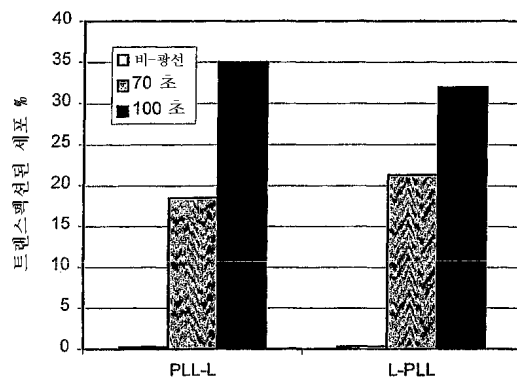
도면16



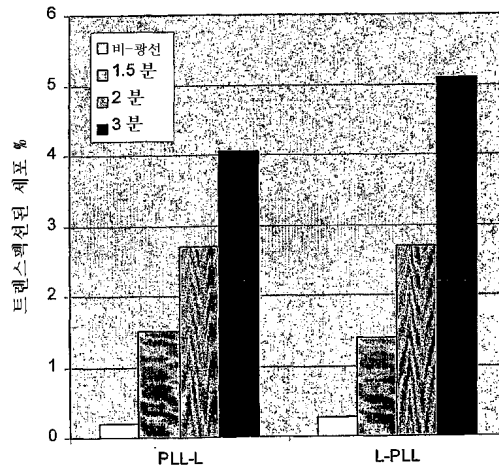
도면17



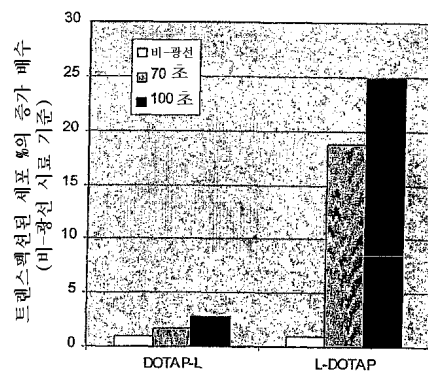
도면18



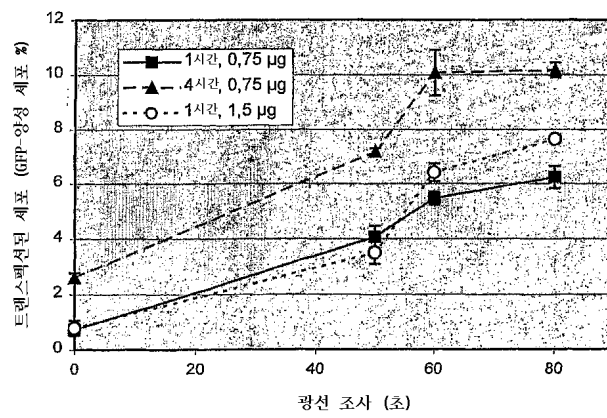
도면19



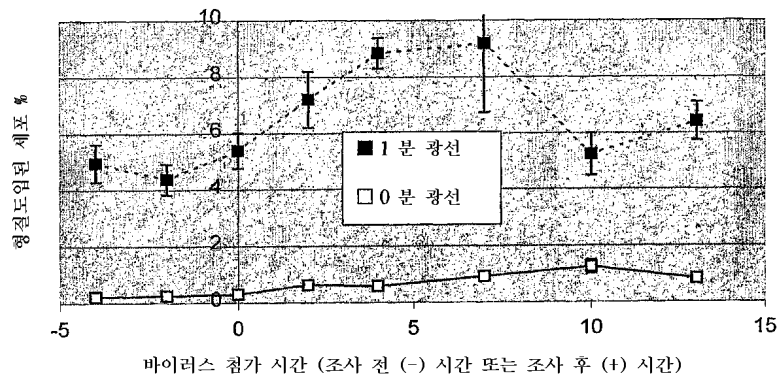
도면20



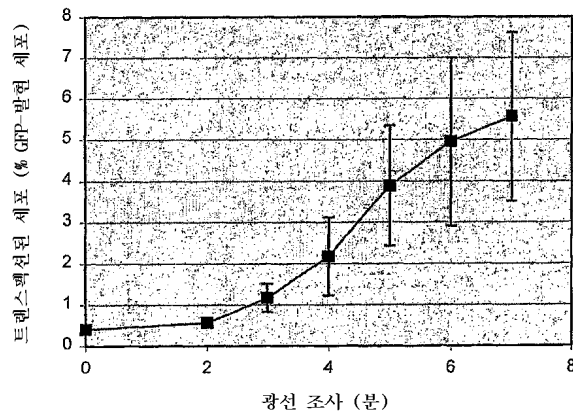
도면21



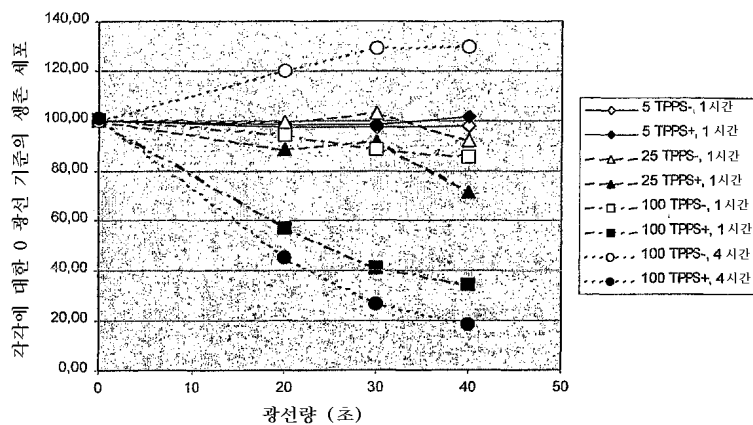
도면22



도면23



도면24



도면25

