



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월31일
 (11) 등록번호 10-1741998
 (24) 등록일자 2017년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 47/02* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C01B 33/20* (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 47/02 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0178855
 (22) 출원일자 2015년12월15일
 심사청구일자 2015년12월15일
 (56) 선행기술조사문헌
 Yang, L. et al. International Journal of
 Nanomedicine 2013:8 4147-4155

(73) 특허권자
세종대학교 산학협력단
 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
동국대학교 산학협력단
 서울특별시 중구 필동로1길 30 (필동3가, 동국대학교)
 (72) 발명자
임수정
 서울특별시 용산구 이태원로27다길 11 (이태원동)
한효경
 서울특별시 강남구 압구정로29길 69, 202동 705
 호(압구정동, 현대아파트)
 (74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **바이러스 벡터의 유전자 전달 증진을 위한 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트의 용도**

(57) 요약

본 발명은 바이러스 벡터의 유전자 전달 증진을 위한 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트를 바이러스 벡터와 함께 사용함으로써 소량의 바이러스 벡터로도 높은 유전자 발현을 달성할 수 있게 되며, 따라서 고용량의 바이러스를 투여할 때 발생하는 세포 독성, 면역원성 및 간독성의 위험성을 줄일 수 있다. 그러므로, 본 발명에 따른 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트는 바이러스 벡터의 유전자 전달 효율을 향상시킬 수 있는 보조제로서 유용하게 사용할 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 48/0008 (2013.01)

C01B 33/20 (2013.01)

C12N 11/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711025307

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 효과적인 염증성 장질환 치료를 위한 대식세포 형질전환 유도능 구현 오메가썸형 약물전달 시스템 개발

기여율 1/2

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015062685

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 생체 친화적 유무기 하이브리드 약물전달시스템 개발 및 생체내 거동 특성 규명

기여율 1/2

주관기관 동국대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

아미노프로필마그네슘필로실리케이트(amionopropyl magnesium phyllosilicate, AMP) 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트(aminopropyl calcium phyllosilicate, ACP)를 포함하는 바이러스 벡터의 유전자 전달능 증진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트는 바이러스 벡터를 포함한 전체 조성물에 0.1 mg/mL 내지 10 mg/mL 의 농도로 포함되는 것인 바이러스 벡터의 유전자 전달능 증진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 추가로 생리학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것인 바이러스 벡터의 유전자 전달능 증진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

바이러스 벡터는 아데노바이러스(adenovirus) 벡터, 아데노 부속 바이러스(adeno-associated virus) 벡터, 레트로바이러스(retrovirus) 벡터, 렌티바이러스(lentivirus) 벡터, 바큘로바이러스(baculovirus) 벡터, 파르보바이러스(parvovirus) 벡터, 세밀리키포레스트바이러스(semilikiforestvirus) 벡터, 카나리폭스바이러스(canarypoxvirus) 벡터, 백신시아바이러스(vaccinia virus) 벡터, 계두바이러스(fowl pox virus) 벡터, 신드비스바이러스(sindbis virus) 벡터, 피코나바이러스(picornavirus) 벡터 및 알파바이러스(alphavirus) 벡터로 이루어진 군에서 선택된 것인 바이러스 벡터의 유전자 전달능 증진용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 in vitro에서 바이러스 벡터와 함께 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 바이러스 벡터의 세포 내로의 유전자 전달능을 증진시키는 방법.

청구항 6

아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트에 바이러스 벡터가 도입되어 있는 필로실리케이트-바이러스 복합체.

청구항 7

제6항에 있어서,

바이러스 벡터는 아데노바이러스(adenovirus) 벡터, 아데노 부속 바이러스(adeno-associated virus) 벡터, 레

트로바이러스(retrovirus) 벡터, 렌티바이러스(lentivirus) 벡터, 바큘로바이러스(baculovirus) 벡터, 파르보 바이러스(parvovirus) 벡터, 세밀리키포레스트바이러스(semilikiforestvirus) 벡터, 카나리폭스바이러스(canarypoxvirus) 벡터, 백신시아바이러스(vaccinia virus) 벡터, 계두바이러스(fowl pox virus) 벡터, 신드비스 바이러스(sindbis virus) 벡터, 피코나바이러스(picornavirus) 벡터 및 알파바이러스(alphavirus) 벡터로 이루어진 군에서 선택된 것인 필로실리케이트-바이러스 복합체.

청구항 8

아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트; 및 표적세포에 도입하고자 하는 유전자를 포함하는 바이러스 벡터를 포함하는 유전자 전달용 조성물.

청구항 9

아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트; 표적세포에 도입하고자 하는 유전자를 포함하는 바이러스 벡터; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 유전자 치료용 의약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트를 포함하는 바이러스 벡터의 유전자 전달용 증진용 조성물, 즉 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트의 바이러스 벡터의 유전자 전달 증진을 위한 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 유전자를 세포 내로 전달하기 위한 벡터는 크게 비-바이러스성 벡터와 바이러스성 벡터의 두 영역으로 나뉜다. 안전성에 대한 우려는 남아있지만 유전자 재조합 기술의 발전으로 인해 그 해결책이 제시되고 있고 비-바이러스성 벡터에 비해 훨씬 우수한 유전자 전달능으로 인해 바이러스성 벡터는 바이오 의료 연구 및 산업 분야에서 중요한 유전자 전달체로 자리매김 하고 있다.

[0004] 바이러스 벡터의 진행세포로의 유입은 세포막에 존재하는 수용체와 해당 바이러스의 특이적 결합으로부터 시작된다. 따라서 유전자재조합 바이러스를 이용하여 특정 세포로 유전자를 도입하려고 할 때, 세포막 중 이러한 수용체의 부재는 바이러스의 세포 내로의 유입을 어렵게함으로써 결국 유전자 도입 효율을 현저히 감소시키는 원인이 된다.

[0005] 아데노바이러스는 각 세포 분열 단계에 있는 다양한 종류의 세포를 감염시킬 수 있어 특히 유전자 전달용 바이러스 벡터로서 각광받는데, 이때 유전자 재조합 아데노바이러스에 의한 유전자 전달율은 대상 세포의 콕사키바이러스-아데노바이러스 수용체(Coxsackievirus and Adenovirus receptor, CAR)의 막발현 정도에 의해 역시 영향을 받게 된다. 이는 아데노바이러스의 fiber knob이 일단 CAR에 결합하여야 인접 인테그린 수용체의 활성화를 거쳐 바이러스 입자가 엔도시토시스(endocytosis)되며, 엔도시토시스된 바이러스 입자는 바이러스 단백질 자체의 고유한 성질에 의해 엔도솜으로부터 빠져나와 세포질을 거쳐 핵내로 들어가 유전자를 발현하게 되기 때문이다. 또한, 생체 내로 투여한 후에는 항바이러스 항체의 사전 존재 여부, 바이러스 벡터의 반복 투여시 유도되는 항바이러스 항체의 생성 정도 및 바이러스 입자와 혈액 응고 인자의 결합에 의한 바이러스 입자의 간 축적이 초래하는 간 독성 등도 아데노바이러스를 매개로 하는 유전자 전달의 제약 요인이 된다.

[0006] 아데노바이러스 표면 단백질에 폴리에틸렌글리콜 등의 고분자를 부착시키면 아데노바이러스의 간으로의 축적 및 항바이러스 항체와의 결합에 의한 중화(무력화)가 억제됨으로써 아데노바이러스 벡터를 이용한 유전자 치료의 한계 극복에 효과적임이 보고된 바 있다. 그러나, 바이러스 단백질의 화학적 변형은 바이러스의 생산 효율 감소 및 정제를 어렵게 하거나 세포 유입 후의 세포 내 이동을 방해할 수 있다. 한편, 양이온성 지질 또는 고분자를 아데노바이러스 입자 표면의 음성 하전을 이용하여 단순히 섞어줌으로써 정전기적 결합에 의해 복합체를 형성시

키는 방법은 세포막과 바이러스 간의 정전기적 반발력을 감소시켜 바이러스-세포막 간의 상호 작용을 용이하게 함으로써 아데노바이러스에 의한 유전자 발현 효율을 증진시키며, 특히 CAR 수용체를 가지고 있지 않은 세포의 경우 이 효과가 크게 나타났다. 따라서, 이러한 복합체 시스템은 화학적 공유결합이 없이 간단한 제조방법으로 바이러스 벡터의 유전자 전달 효율을 증진시키고, 따라서 더 소량의 바이러스 벡터로도 유사한 정도로 유전자 전달을 가능케 하며 간독성을 감소시켜 준다는 점에서 유용하다.

[0007] 그러나, 양이온성 지질 또는 고분자와의 복합체 형성에 의한 바이러스 벡터의 유전자 전달 증진은 세포 독성을 함께 초래하며, 이 때 세포독성의 정도는 바이러스와 복합체를 형성한 운반체 중의 양이온성 지질 또는 고분자의 농도와 비례하여 나타났다.

[0008] 한편, 천연클레이는 우수한 생체적합성에도 불구하고 물에 잘 분산되지 않아 바이오 의료 분야에서 이용에 한계가 있는 문제점이 있었다. 이러한 문제점을 개선하기 위해 물에 분산될 수 있는 클레이 소재를 합성하기 위한 연구들이 진행되어 왔으며, 그 중 마그네슘필로실리케이트의 표면에 아미노프로필기를 공유결합시켜 매우 간단하며 고수율, 저비용의 공정으로 아미노프로필마그네슘필로실리케이트를 합성하는 방법이 공지되어 있다(비특허 문헌 1). 이러한 아미노프로필마그네슘필로실리케이트는 물에 쉽게 분산될 수 있고 생체 축적성이 없어(비특허 문헌 2), 최근에는 난용성 약물의 흡수 증진을 위한 약물 전달체 등으로 응용된 바 있다(특허문헌 2).

[0009] 따라서, 본 발명자들은 이러한 천연 클레이 소재를 이용하여 유전자 발현 보조능이 우수하고, 세포독성이 낮으며 생체 적합성이 있는 유전자 전달 운반체를 연구하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2015-0004859호
 (특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2014-0043587호

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Mann et al., Journal of materials Chemistry, 1998, 8(8), 1927-32
 (비특허문헌 0002) Yang et al., J Materials Chemistry B., 2014, 2, 7567-7574

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 이에, 본 발명자들은 유전자 전달 운반체로 바이러스 벡터와 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트를 함께 사용함으로써 소량의 바이러스 벡터로도 높은 유전자 발현을 달성할 수 있고, 세포 독성, 면역원성 및 간독성의 위험성을 줄일 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0014] 따라서, 본 발명의 목적은 유전자 발현 보조능이 우수하고 세포 독성이 낮으며 생체적합성이 우수한 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트를 포함하는 바이러스 벡터의 유전자 전달능 증진용 조성물, 즉 바이러스 벡터의 유전자 전달 증진을 위한 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트를 포함하는 바이러스 벡터의 유전자 전달능 증진용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 in vitro에서 바이러스 벡터와 함께 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 바이러스 벡터의 세포 내로의 유전자 전달능을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트에 바이러스 벡터가 도입되어 있는 필로실리케이트-바이러스 복합체를 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트; 및 표적세포에 도입하고자 하는 유전자를 포함하는 바이러스 벡터를 포함하는 유전자 전달용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한, 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트; 표적세포에 도입하고자 하는 유전자를 포함하는 바이러스 벡터; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 유전자 치료용 의약 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따르면 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트를 바이러스 벡터와 함께 사용함으로써 동일량의 바이러스 벡터를 단독으로 사용할 때에 비해서 높은 유전자 발현을 달성할 수 있게 되며, 따라서 보다 적은 용량의 바이러스에 의해 생체 내에서의 목적 유전자 발현이 가능해짐으로써 생체에 고용량의 바이러스를 투여할 때 발생하는 간독성의 위험성 및 재투여시의 면역원성에 의한 유전자 발현 효능 감소의 부작용을 줄일 수 있다. 또한 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트를 보조제로 사용한 경우와 양이온성 지질이나 고분자를 보조제로 사용한 경우를 비교하면 상기 필로실리케이트를 보조제로 사용한 경우에 유전자발현 증진능이 더 우수하면서도 세포독성은 거의 없는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트는 바이러스 벡터의 배양세포 및 생체 내에서의 유전자 전달 효율을 향상시킬 수 있는 보조제로서 유용하게 사용할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0025] 본 발명은 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트를 포함하는 바이러스 벡터의 유전자 전달능 증진용 조성물을 제공한다.

[0026] 구체적으로 상기 조성물에서 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트는 전체 조성물에 0.1 mg/mL 내지 10 mg/mL의 농도로 포함되는 것일 수 있으나, 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트에 의한 세포 독성이 나타나지 않는 범위라면 농도 범위의 상한은 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 생리학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 생리학적으로 허용가능한 담체는 후술되는 약제학적으로 허용가능한 담체와 동일하게 적용될 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, 바이러스 벡터는 생체 내의 모든 생리 현상을 조절하는 생물학적 활성을 갖는 기능 조절 물질을 합성하는 유전자를 전달하는 바이러스로서, 전달하고자 하는 유전자를 운반할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 아데노바이러스(adenovirus) 벡터, 아데노 부속 바이러스(aden-associated virus) 벡터, 레트로바이러스(retrovirus) 벡터, 렌티바이러스(lentivirus) 벡터, 바쿨로바이러스(baculovirus) 벡터, 파르보바이러스(parvovirus) 벡터, 세밀리키포레스트바이러스(semiliki forestvirus) 벡터, 카나리폭스바이러스(canarypoxvirus) 벡터, 백신시아바이러스(vaccinia virus) 벡터, 계두바이러스(fowl pox virus) 벡터, 신드비스바이러스(sindbis virus) 벡터, 피코나바이러스(picornavirus) 벡터 및 알파바이러스(alphavirus) 벡터로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 한 구체예에서, 유전자 전달을 위해 사용할 수 있는 바람직한 바이러스 벡터는 아데노바이러스 또는 아데노 부속 바이러스일 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 바이러스 벡터 내에 포함될 수 있는 유전자의 종류는 특별히 제한되지 않는다. 상기 유전자는 표적세포 내에 도입하기를 원하는 유전자이면 어떠한 것이든 가능하다. 예를 들어, 유전자 치료를 위해 적합한 것으로 알려져 있는 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 항원, 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene), 자살 유전자(suicide gene), 항혈관형성인자(anti-angiogenic factor), 전구약물 활성화 유전자 (prodrug activating gene), 면역자극 유전자(immunostimulatory gene) 및 세포분화조절 유전자 (cellular differentiation regulatory gene)로 이루어진 군에서 선택되는 유전자 등이 바이러스 벡터 내에 포함될 수 있다.

[0031] 본 발명은 또한, in vitro에서 상기 조성물을 바이러스 벡터와 함께 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 바이러스 벡터의 유전자 전달능을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0032] 한 구체예에서, 바이러스 벡터 및 유전자에 대하여 위에서 기술한 모든 내용이 그대로 적용 또는 준용될 수 있다.

- [0034] 본 발명은 또한, 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트에 바이러스 벡터가 도입되어 있는 필로실리케이트-바이러스 복합체를 제공한다.
- [0035] 본 발명에 따른 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트는 바이러스 단독 또는 바이러스-리포좀 복합체의 형태로 유전자 전달을 시도할 경우에 비해 현저히 높은 유전자 발현능 증진 효과를 나타낼 수 있도록 함으로써, 결과적으로 표적세포에 대해 처리하여야 하는 바이러스의 양 자체를 줄일 수 있다.
- [0037] 본 발명에서, 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트를 바이러스 벡터에 결합함에 의해서, 우수한 유전자 발현능을 보이면서 세포 독성은 낮고 생체 적합성이 있는 운반체를 제공할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트는 바이러스 벡터의 유전자 전달 증진을 위한 보조제로서 사용자에게 의해 직접 바이러스 벡터를 혼합하여 사용할 수 있는 형태로 제공될 수 있지만, 사용자의 요청 혹은 상업적인 필요에 따라 본 발명에 따른 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트에 유전자를 포함하고 있는 바이러스 벡터가 이미 도입되어 있는 필로실리케이트-바이러스 복합체의 형태로 제공할 수도 있다. 본 발명에 따른 필로실리케이트-바이러스 복합체는 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트와 바이러스의 단순 혼합을 통해 형성할 수 있다.
- [0039] 상기 복합체는 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트의 층 사이 또는 표면에 바이러스 벡터를 포함함으로써, 수상에 분산 시 양이온성 표면을 가지는 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트와 음성 하전의 바이러스 입자가 상호 작용하여 정전기적 인력에 의해 복합체를 형성할 수 있다.
- [0040] 한 구체예에서, 바이러스 벡터 및 유전자에 대하여 위에서 기술한 모든 내용이 그대로 적용 또는 준용될 수 있다.
- [0041] 이러한 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트 및 바이러스 벡터의 복합, 예를 들어, 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트 및 표적세포에 도입하고자 하는 유전자를 포함하는 바이러스 벡터를 포함하는 조성물 등은 연구용 또는 의료용으로 활용될 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명은 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 아미노프로필칼슘필로실리케이트; 표적세포에 도입하고자 하는 유전자를 포함하는 바이러스 벡터; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 유전자 치료용 의약 조성물로서 제공된다. 이 경우, 바이러스 벡터를 통해 유전자를 전달하고자 하는 표적세포는 암세포, 줄기세포, 신경세포 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 의약 조성물의 투여 경로는 적합한 모든 투여 경로가 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 필로실리케이트-바이러스 복합체는 양전하를 띠고 있으므로 세포 또는 조직막의 음전하와 인력이 작용하여 세포 또는 조직막에 부착, 즉 접촉하여 엔도사이토시스(endocytosis)에 의해 세포 내부로 유입될 수 있다.
- [0045] 본 발명에 따른 의약 조성물은 인 비보 또는 엑스 비보에서 필로실리케이트-바이러스 복합체가 표적세포와 접촉할 수 있도록 처리된다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 필로실리케이트-바이러스 복합체와 표적세포와의 접촉은 생체 내, 생체 외, 혹은 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내(intradermal), 점막 내 또는 흡입(inhale) 등의 경로에 의해 필로실리케이트-바이러스 복합체가 표적세포와 접촉하는 것을 의미하며, 이에 의하여 바이러스 벡터가 표적세포의 세포질 혹은 핵 내로 전달된다.
- [0047] 본 발명의 의약 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용가능한 담체는 예를 들어 하나 이상의 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 이러한 조성물은 투여 후 활성 성분의 빠른 방출, 또는 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 제제화 될 수 있다.
- [0048] 약제학적으로 허용가능한 담체는 당업자에게 잘 알려진 여러 가지 인자에 따라 제조될 수 있는데, 예를 들면 이용된 특정 생리활성물질, 이의 농도, 안정성 및 의도된 생체이용성; 치료하고자 하는 질환 및 질병 또는 상태; 치료받을 개체, 나이, 크기 및 일반적인 상태; 조성물을 투여하는데 이용되는 경로, 예를 들어 비강, 구강, 안구, 국소, 경피 및 근육 등의 요인을 고려해야 하나, 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로 경구 투여 경로 이외의 생리활성물질 투여에 이용되는 약제학적으로 이용가능한 담체에는 D5W, 텍스트로즈 및 생리학적 염을 용적의

5% 이내로 포함하는 수용액을 포함한다. 또한 약제학적으로 허용가능한 담체에는 보존제 및 항산화제와 같은 활성 성분들의 안정성을 보장시킬 수 있는 추가 성분들을 포함할 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명의 의약 조성물의 투여량은 의도하는 치료에 유효한 용량으로 투여된다. 특정의 의학적 질환을 치료하거나 또는 이의 진행을 억제시키는데 요구되는 치료상 유효량은 의학 분야에 공지된 예비임상 연구 및 임상 연구를 이용하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명에서 상기 사용된 용어, "치료상 유효량"은 임상의 또는 연구자가 목적하는, 특정 조직, 시스템, 및 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응을 유발시키는 활성 성분의 양을 말한다.

[0052] 이하, 본 출원을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 출원을 예시하는 것일 뿐 본 출원의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0054] [실시예 1 내지 5] 아미노프로필마그네슘필로실리케이트와 바이러스 벡터의 복합체 제조

[0055] 아미노프로필마그네슘필로실리케이트는 마그네슘 염화물(0.84 g, 8.82mmol)을 에탄올 (20g)에 녹이고, 상온에서 이 용액에 아미노프로필트리에톡시실란(1.3mL, 5.63mmol)을 한 방울씩 첨가하였다. 5분 후 얻은 흰 슬러리를 하룻밤 동안 교반하고 원심분리를 통해 침전물을 얻어 에탄올(50 ml)로 세척하였고, 40℃ 에서 건조하여 아미노프로필마그네슘필로실리케이트를 합성하였다. 합성한 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 200mg을 5%의 D-glucose 1ml에 용해시킨 후 여러 번의 볼텍싱(vortexing) 이후 100 와트 내지 280 와트에서 30분간 초음파 처리를 하여 수용액을 제조하였다. 제조된 수용액과 세포 내로 전달하고자 하는 목적 유전자로 GFP 유전자를 포함하는 아데노바이러스(복제불활성화 아데노바이러스 제5형, Ad-GFP) 를 하기 표 1 및 2의 비율로 섞어 상온에서 20 분 내지 30분간 방치하여 아미노프로필마그네슘필로실리케이트-바이러스 복합체를 형성하였다. 각 실시예의 바이러스와 아미노프로필마그네슘필로실리케이트의 함량을 하기 표 1 및 2에 나타내었다.

표 1

[0056]

	실시예 1-1	실시예 1-2	실시예 1-3	실시예 1-4	실시예 1-5	실시예 1-6	실시예 1-7
아데노바이러스(pfu)	8X10 ⁷	8X10 ⁷	8X10 ⁷	8X10 ⁷	8X10 ⁷	8X10 ⁷	8X10 ⁷
아미노프로필마그네슘필로실리케이트 (ug)	50	100	250	500	1,000	2,000	3,000

표 2

[0057]

	실시예 2	실시예 3	실시예 4-1	실시예 4-2	실시예 5
아데노바이러스(pfu)	1X10 ⁷	3.2X10 ⁶	1.6X10 ⁶	1.6X10 ⁶	1X10 ⁶
아미노프로필마그네슘필로실리케이트 (ug)	500	500	200	500	500

[0060] [비교예 1 내지 6]

[0061] 아데노바이러스 벡터 Ad-GFP 대신 플라스미드 벡터 pEGFP-C1(Clontech)를 사용하거나 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 대신 리포펙타민 2000(Thermofischer Scientific)을 사용하는 것을 제외하고는 실시예와 동일한 방법으로 비교예 1 내지 6을 제조하였다. 각 비교예의 바이러스 벡터, 플라스미드, 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 및 리포펙타민 2000의 함량을 하기 표 3 및 4에 나타내었다.

표 3

[0063]

	비교예 1	비교예 2-1	비교예 2-2	비교예 2-3	비교예 2-4
아데노바이러스(pfu)	-	8X10 ⁷	1X10 ⁷	8X10 ⁶	1.6X10 ⁶
pEGFP 플라스미드(ug)	-	-	-	-	-
아미노프로필마그네슘필로실리케이트 (ug)	-	-	-	-	-
리포펙타민(ul)	-	-	-	-	-

표 4

[0065]

	비교예 3-1	비교예 3-2	비교예 4	비교예 5	비교예 6
아데노바이러스(pfu)	8X10 ⁷	8X10 ⁷	-	-	-
pEGFP 플라스미드(ug)	-	-	2	2	2
아미노프로필마그네슘필로실리케이트(ug)	-	-	-	500	-
리포펙타민(ul)	20	40	-	-	10

[0067]

[실험예 1] 유전자 도입 방법에 따른 유전자 발현을 측정

[0068]

마우스 흑색종 세포주 B16-F10를 12 웰(well) 플레이트에 1X10⁵개 접종하였다. 하룻밤 방치 후 인산완충식염수(PBS)로 세포를 세척하고 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지 400 μl를 첨가한 후, 상기 실시예 및 비교예에서 제조한 바이러스 복합체를 첨가하였다. 37°C의 5% CO₂ 세포 배양기에서 4시간 배양한 후 PBS로 세포를 세척해 복합체를 제거하고 10% 혈청이 포함되어 있는 배지 1 ml를 다시 첨가하여 30시간을 추가적으로 배양하였다. 30 시간 뒤, 플레이트에서 배지를 제거하고 PBS로 세포를 세척한 후, 긁개(Scraper)로 세포를 걷어내 1.75 ml 튜브에 각각 세포 펠렛을 얻어 PBS으로 세포를 분산하여 2번 세척한 후 1ml의 세포 배양액에 재분산시켰다. 이것을 원심분리 하여 배지를 걷어 낸 후 30분간 1% 파라포름알데히드 용액 1 ml로 세포를 고정, 다시 원심분리 하여 상층액을 제거하고 고정된 세포를 PBS에 분산시켰다. 분산된 세포에서의 GFP 발현도는 유동세포 분석법 (flow cytometer method)을 이용해 530 nm에서 표본 당 만개의 형광 수를 측정하였다. 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0070]

	아데노 바이러스(pfu)	아미노프로필마그네슘필로실리케이트 (ug)	리포펙타민(ul)	평균값(GFP 발현 세포, %)	표준편차
실시예 1-1	8X10 ⁷	50	-	19.8	3.3
실시예 1-2	8X10 ⁷	100	-	21.1	1.0
실시예 1-3	8X10 ⁷	250	-	44.4	9.4
실시예 1-4	8X10 ⁷	500	-	91.3	4.6
실시예 1-5	8X10 ⁷	1,000	-	98.3	0.5
실시예 1-6	8X10 ⁷	2,000	-	96.6	3.5
실시예 1-7	8X10 ⁷	3,000	-	96.6	1.8
비교예 1	-	-	-	2.4	0.6
비교예 2-1	8X10 ⁷	-	-	6.5	0.8
비교예 3-1	8X10 ⁷	-	20	32.0	3.5
비교예 3-2	8X10 ⁷	-	40	51.4	1.2

[0072]

상기 표 5에 따르면, GFP 유전자의 발현율은 바이러스 벡터와 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 500ug 를 결합하여 복합체를 이루었을 때(실시예 1-4)부터 현저히 높아짐을 확인할 수 있었다. 즉, 실시예1-4와 비교예 2-1 를 비교해보면, 바이러스 벡터와 아미노프로필마그네슘필로실리케이트의 복합체에 의한 GFP유전자 발현율은 바이러스 벡터를 단독으로 이용했을 때보다 약 15배 증진되었음을 확인할 수 있다.

[0074]

[실험예 2] 세포주에 따른 유전자 전달 증진 효과 확인

[0075] 혈관 내피 세포주 EY.hy926, 폐암 세포주 H460 및 대장암 세포주 HCT116을 12 웰(well) 플레이트에 1×10^5 개 접종하였다. 하룻밤 방치 후 인산완충식염수(PBS)로 세포를 세척하고 EY.hy926은 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지 400 μ l, H460과 HCT116은 혈청이 포함되지 않은 RPMI 1640 배지 400 μ l 를 첨가한 후, 상기 실시예 및 비교예에서 제조한 바이러스 복합체를 첨가하였다. 37°C의 5% CO₂ 세포배양기에서 4시간 배양한 후 PBS로 세포를 세척해 복합체를 제거하고 10% 혈청이 포함되어 있는 배지 1 ml를 다시 첨가하여 30시간을 추가적으로 배양하였다. 30 시간 뒤, 플레이트에서 배지를 제거하고 PBS로 세포를 세척한 후, 긁개(Scraper)로 세포를 걷어내 1.75 ml 튜브에 각각 세포 펠렛을 얻어 PBS으로 세포를 분산하여 2번 세척한 후 1ml의 세포배양액에 재분산시켰다. 이것을 원심분리 하여 배지를 걷어 낸 후 30분간 1% 파라포름알데히드 용액 1 ml로 세포를 고정, 다시 원심분리 하여 상층액을 제거하고 고정된 세포를 PBS에 분산시켰다. 분산된 세포에서의 GFP 발현도는 유동세포 분석법 (flow cytometer method)을 이용해 530 nm에서 표본 당 만개의 형광 수를 측정하였다. 그 결과를 하기 표 6 내지 8에 나타내었다.

표 6

[0077]

세포주		아데노 바이러스 (pfu)	아미노프로필 마그네슘필로 실리케이트 (ug)	리포 펩타민 (ul)	평균값 (GFP 발현 세포, %)	표준편차
EY.hy926	실시예 2	1×10^7	500	-	89.8	2.8
	비교예 1	-	-	-	1.8	0.4
	비교예 2-1	8×10^7	-	-	65.2	2.4
	비교예 2-2	1×10^7	-	-	21.2	0.4

표 7

[0079]

세포주		아데노 바이러스 (pfu)	아미노프로필 마그네슘필로 실리케이트 (ug)	리포 펩타민 (ul)	평균값 (GFP 발현 세포, %)	표준편차
H460	실시예 3	3.2×10^6	500	-	95.2	0.2
	실시예 4-1	1.6×10^6	200	-	66.9	2.9
	실시예 4-2	1.6×10^6	500	-	66.3	1.6
	실시예 5	1×10^6	500	-	93.1	2.5
	비교예 1	-	-	-	2.9	1.3
	비교예 2-1	8×10^7	-	-	99.5	0.1
	비교예 2-4	1.6×10^6	-	-	21.0	0.8

표 8

세포주		아데노 바이러스 (pfu)	아미노프로필 마그네슘필로실리케이트 (ug)	리포펙타민 (ul)	평균값 (GFP 발현 세포, %)	표준편차
HCT116	실시예 4-2	1.6X10 ⁶	500	-	74.5	3.5
	비교예 1	-	-	-	1.8	0.5
	비교예 2-1	8X10 ⁷	-	-	96.6	0.7
	비교예 2-3	8X10 ⁶	-	-	71.3	0.6
	비교예 2-4	1.6X10 ⁶	-	-	32.6	0.6

[0083] 상기 표 6에 따르면, EY.hy926 세포주의 경우, 비교예 2-1과 실시예 2를 비교해보면 바이러스의 양이 1/8로 줄었음에도 아미노프로필마그네슘필로실리케이트를 처리한 경우에 훨씬 높은 유전자 발현율을 보임을 알 수 있다.

[0084] 상기 표 7에 따르면, H460 세포주의 경우, 실시예 3과 비교예 2-1를 비교해보면, 바이러스 벡터를 1/25만 써도 유사한 유전자 전달 효율을 보이는 것을 확인할 수 있다.

[0085] 상기 표 8에 따르면, HCT116 세포주의 경우, 유전자 발현율이 71 내지 75%의 범위를 만족하는 비교예 2-3과 실시예 4-2를 비교해보면 비교예 2-3의 1/5의 바이러스 양으로도 유사한 수준의 발현율을 나타냄을 확인할 수 있다.

[0086] 따라서, 세포주 고유의 수용체 발현도의 차이 등에 의한 바이러스 유입 정도에 따른 아미노프로필마그네슘필로실리케이트의 유전자 전달능 증진 효과는 차이가 있으나, 여러 세포주에서 아미노프로필마그네슘필로실리케이트의 바이러스 벡터 유전자 전달능 증진 효과는 공통적으로 나타나는 것을 확인할 수 있다.

[0088] [실험예 3] 세포 독성 확인

[0089] 양이온성 지질은 세포 내로 유입 시 세포 독성을 야기하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 실험예에서는 아미노프로필마그네슘필로실리케이트가 우수한 유전자 발현 보조능을 보이면서도 양이온성 지질에 비해 세포 독성은 감소시킬 수 있는지 확인하고자 하였다. 이를 위해, 마우스 흑색종 세포주 B16-F10를 12 웰(well) 플레이트에 1 X 10⁵개 접종하였다. 하룻밤 방치 후 PBS로 세포를 세척하고 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지 400 μl를 첨가한 후, 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 또는 리포펙타민을 각각 첨가하였다. 37℃의 5% CO₂ 세포배양기에서 4시간 배양한 후 PBS로 세포를 세척해 복합체를 제거하고 10% 혈청이 포함되어 있는 배지 1 ml를 다시 첨가하여 30시간을 추가적으로 배양하였다. 30시간 뒤, 세포 생존을 측정기법(MTT assay)을 위해 플레이트에서 배지를 제거하고 PBS로 세포를 세척한 후, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)(0.25 g/50 ml in PBS) 용액이 10% 가 되게 DMEM배지로 희석하여 1ml씩 첨가하고 4시간동안 배양한다. 배양 이후, MTT가 포함되어있는 배지를 걷고 PBS로 세포를 세척한 후 DMSO 1ml을 첨가하고 피펫으로 DMSO용액을 흡입과 분출을 반복하여 세포에 생긴 formazan crystal이 잘 용해되도록 한다. 용해된 DMSO용액을 96웰(well) 플레이트에 100 ul씩 옮겨 담고 분광학적인 방법 (Spectroscopic method)으로 540nm에서 흡광도를 측정했다. 세포 성장율을 분석하고 그 결과를 하기 표 9 및 10에 나타내었다.

표 9

리포펙타민		Well 당 ul	세포성장율(%)	표준편차
	비교예 1	0	100	1.6
	비교예 1-1	1	94.5	3
	비교예 1-2	5	91.9	2.5
	비교예 1-3	10	84.6	1.5
	비교예 1-4	20	83.6	0.7
	비교예 1-5	40	77.3	1.4
	비교예 1-6	80	67.3	2.6

표 10

아미노프로필마그네슘 필로실리케이트		Well 당 ug	세포성장율(%)	표준편차
	비교예 1	0	100	1.6
	실시예 6-1	50	96.8	0.3
	실시예 6-2	100	94.6	2.1
	실시예 6-3	300	97.5	0.8
	실시예 6-4	500	93.3	1.6
	실시예 6-5	800	88.8	0.3
	실시예 6-6	1200	81.7	2
	실시예 6-7	2000	84.3	2.8

[0093]

[0096]

[0097]

[0099]

[0100]

상기 표 9에 따르면, 리포펙타민 40 uI을 처리한 경우(비교예 1-5) 세포 성장율은 77.3%로 세포 성장을 약 23% 억제시킨 반면에, 아미노프로필마그네슘필로실리케이트 500ug을 처리한 경우(실시예 6-4) 세포 성장율은 93.3%로, 세포 성장을 6.7% 억제시킨 것을 확인할 수 있었다.

따라서, 본 발명의 아미노프로필마그네슘필로실리케이트는 양이온성 리포좀인 리포펙타민과 비교하여 세포 독성이 현저히 낮음을 알 수 있다.

[실험예 4] 벡터의 종류에 따른 유전자 전달 증진 효과 확인

본 실험예에서는 벡터의 종류(바이러스 또는 비-바이러스 벡터)에 따른 아미노프로필마그네슘필로실리케이트의 유전자 발현 보조능의 차이를 확인하고자 하였다. 이를 위해, 실시예 및 비교예의 함량으로 아미노프로필마그네슘필로실리케이트-바이러스 복합체 및 아미노프로필마그네슘필로실리케이트-플라스미드 복합체를 제조한 후 각각을 마우스 흑색종 세포주 B16-F10에 처리하여 GFP 발현도를 분석하고 아미노프로필마그네슘필로실리케이트가 벡터의 유전자전달효능에 미치는 영향을 확인하였다. 비교를 위하여 리포펙타민-플라스미드 복합체에 의한 GFP 발현도도 분석하였다. 그 결과를 하기 표 11에 나타내었다.

표 11

	아데노바이러스 (pfu)	pEGFP 플라스미드 (ug)	아미노프로필마그네슘필로실리케이트 (ug)	리포펙타민 (uI)	평균값 (%)	표준편차
실시예 1-4	8X10 ⁷	-	500	-	91.3	4.6
비교예 1	-	-	-	-	2.4	0.6
비교예 2-1	8X10 ⁷	-	-	-	6.5	0.8
비교예 3-2	8X10 ⁷	-	-	40	51.4	1.2
비교예 4	-	2	-	-	5.5	0.1
비교예 5	-	2	500	-	9.8	1.7
비교예 6	-	2	-	10	59.6	0.9

[0102]

[0104]

[0105]

상기 표 11에 따르면, 바이러스 벡터에 아미노프로필마그네슘필로실리케이트를 처리한 실시예 1-4에서는 91.3%의 GFP 유전자 발현율을 나타내어 바이러스 벡터를 단독으로 처리한 경우 (비교예 2-1)에 비교하여 약 14배 증가되었으나 바이러스 벡터에 리포펙타민을 처리한 비교예 3-2에서는 유전자 발현율이 약 7.9배 증가하였다. 한편, 비-바이러스성 벡터인 플라스미드 벡터의 경우, 플라스미드 벡터를 단독으로 처리한 경우와 비교하여 리포펙타민을 섞어 처리한 경우(비교예 6)는 유전자 발현율이 약 11배 증가되었으나, 아미노프로필마그네슘필로실리케이트를 처리한 경우(비교예 5)는 약 1.8배 만이 증가하였다.

따라서, 리포펙타민에 의한 유전자 발현능 증진 효과는 플라스미드(pEGFP)와 아데노바이러스 벡터 두 경우에 모두 나타나나, 아미노프로필마그네슘필로실리케이트에 의한 유전자 발현능 증진 효과는 아데노바이러스 벡터의

경우에 특이적으로 나타남을 알 수 있다.