



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월28일
(11) 등록번호 10-2470291
(24) 등록일자 2022년11월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/50 (2006.01) A61K 47/54 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/5036 (2013.01)
A61K 47/542 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2017-7014951
- (22) 출원일자(국제) 2015년10월30일
심사청구일자 2020년06월26일
- (85) 번역문제출일자 2017년05월31일
- (65) 공개번호 10-2017-0125793
- (43) 공개일자 2017년11월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/058375
- (87) 국제공개번호 WO 2016/070082
국제공개일자 2016년05월06일
- (30) 우선권주장
62/073,588 2014년10월31일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020120120712 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
유니버시티 오브 유타 리서치 파운데이션
미국, 유타 84112, 솔트레이크 시티, 룸 201 사우스 프레지던츠 서클 201
- (72) 발명자
배유한
미국 유타주 84108 솔트레이크 시티 디븐서 드라이브 1479
- 이용규
대한민국 369-900 충북 청평 중동 84-3
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 16 항

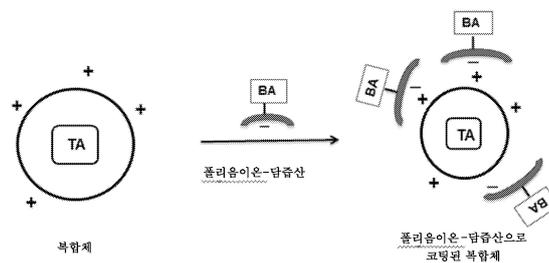
심사관 : 최원철

(54) 발명의 명칭 **담즙산 입자를 위한 조성물 및 방법**

(57) 요약

치료제 및 담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유하는 치료학적 조성물이 개시된다. 상기 조성물은 장간순환을 통해 흡수될 수 있다. 상기 조성물은 정전기적 상호작용을 통해 커플링되어 있는 양이온성 모이어티와 음이온성 중합체를 포함한다. 상기 치료학적 조성물은 질환 또는 장애의 치료를 위해 사용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/554 (2017.08)

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 9/1629 (2013.01)

A61K 9/5169 (2013.01)

(72) 발명자

누른나비 엠디

대한민국 380-702 충북 충주 대학로 50

황희숙

미국 유타주 84108 솔트레이크 시티 유니버시티 빌
리지 761

곽동섭

서울특별시 마포구 토정로17길 26-8

명세서

청구범위

청구항 1

치료제 및 양이온성 중합체를 포함하는 코어 복합체로서, 상기 코어 복합체는 pH 5에서 순 양전하 (net positive charge)를 갖는 외표면을 갖는, 코어 복합체; 및

히알루론산, 콘드로이틴 설페이트 또는 헤파린을 포함하는 음이온성 중합체에 공유 결합된 콜산을 포함하는 치료학적 조성물로서,

상기 음이온성 중합체가 중성 pH에서 순 음전하 (net negative charge)를 갖고; 상기 음이온성 중합체가 상기 코어 복합체의 외표면에 정전기적으로 커플링되어 있는, 치료학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치료제가 핵산을 포함하는, 치료학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 핵산이 유전자를 포함하는, 치료학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 유전자가 GLP-1 또는 엑센딘 4 (Exendin 4)를 암호화하는, 치료학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 치료제가 펩타이드를 포함하는, 치료학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 펩타이드가 인슐린인, 치료학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 치료제가 소분자인, 치료학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 소분자가 독소루비신인, 치료학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 치료제가 백신 또는 바이러스를 포함하는, 치료학적 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 양이온성 중합체가 폴리에틸렌이민, 프로타민 또는 폴리(라이신) 중 적어도 하나로부터 선택되는, 치료학적 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 콜산이 콜산, 케노콜산, 테옥시콜산, 리토콜산, 우르소테옥시콜산, 케노테옥시콜산, 타우로콜산, 글리코콜산, 타우로테옥시콜산, 글리코테옥시콜산, 타우로케노테옥시콜산, 또는 글리코케노테옥시콜산으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 콜산을 포함하는, 치료학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 콜산이 타우로콜산인, 치료학적 조성물.

청구항 16

경구 투여되는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 치료학적 조성물을 포함하는, 치료제를 세포에 전달하기 위한, 치료학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 치료학적 조성물이 위장관 내 담즙산 수송체를 통해 흡수되고, 상기 치료학적 조성물이 장간순환계로 진입하는, 치료학적 조성물.

청구항 18

경구 투여되는 제1항 내지 제3항, 제5항 및 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 치료학적 조성물을 포함하는, 암을 치료하기 위한 치료학적 조성물로서, 상기 치료제가 항암제인, 치료학적 조성물.

청구항 19

경구 투여되는 제1항 내지 제6항 및 제9항 중 어느 한 항의 치료학적 조성물을 포함하는, 대사 장애를 치료하기 위한 치료학적 조성물로서, 상기 치료제가 GLP-1, 엑센딘 4 또는 인슐린 중 적어도 하나로부터 선택되는, 치료학적 조성물.

청구항 20

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2014년 10월 31일자 출원된 미국 가특허출원 제62/073,588호를 우선권으로 주장하며, 이는 이의 모든 교시에 관해서 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본원에 제공된 발명은 담즙산을 함유하고 환자에게 경구 투여되어 장간순환을 통해 흡수될 수 있는 치료학적 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 정전기적 상호작용에 의해 커플링되어 있는 양이온성 모이어티(moiety)와 음이온성 모이어티를 포함한다. 상기 조성물은 유전자, 단백질 또는 소분자와 같은 치료제를 함유한다.

배경 기술

[0005] 특정 치료제들의 경구 전달은 불량한 장 투과성, pH 또는 온도 불안정성으로 인한 치료제의 분해 및 단백질분해 효소 분해에 기인한 낮은 생체이용율을 포함하는 많은 요인들에 의해 제한된다. 치료제의 생체이용율을 향상시킬 수 있는 조성물 및 전달 방법이 요구되며, 이는 더 높은 환자 순응도, 환자 집단들 간의 더 많은 재현성, 낮은 투여량, 광범위한 치료 범위(therapeutic window) 및 다양한 질환 또는 장애의 더 낮은 전체 치료 비용을 야기할 수 있다.

발명의 내용

- [0006] 요약
- [0007] 본 발명은 pH 5에서 순 양전하(net positive charge)를 갖는 외표면을 갖고 치료제로 제조된 코어 복합체를 함유하고, 또한 음이온성 중합체에 공유 결합되어 있는 담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유하는 치료학적 조성물을 제공한다. 상기 음이온성 중합체는 중성 pH에서 순 음전하를 갖고, 상기 음이온성 중합체는 또한 상기 코어 복합체의 외표면에 정전기적으로 커플링된다.
- [0008] 본 발명은 또한 pH 5에서 순 양전하를 갖는 외표면을 갖고 치료제로 제조된 코어 복합체를 함유하고, 음이온성 중합체에 공유 결합되어 있는 담즙산 또는 담즙산 접합체를 또한 함유하는 치료학적 조성물의 경구 투여를 통해 치료제를 세포로 전달하는 방법을 제공한다. 상기 음이온성 중합체는 중성 pH에서 순 음전하를 갖고, 상기 음이온성 중합체는 또한 상기 코어 복합체의 외표면에 정전기적으로 커플링된다.
- [0009] 치료제는 위장관 내에서 담즙산 수송체를 통해 피험자 또는 환자에 의해 흡수될 수 있고, 이로 인해 치료제는 장간순환계로 진입한다. 치료학적 조성물은 항암제를 포함할 수 있고 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 치료학적 조성물은 또한 대사 질환 또는 장애를 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 양상들은 상세한 설명 및 첨부된 도면을 고려함으로써 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 본 특허 또는 특허출원 파일은 컬러로 작성된 적어도 하나의 도면을 함유한다. 컬러 도면을 갖는 본 특허 또는 특허출원 공개의 복사본은 필요한 요금을 지불하면서 요청하면 관청에 의해 제공될 것이다.
- 하기 도면은 본원에 제공된 상세한 설명 및 실시예의 이해를 돕기 위해 제공된다.
- 도 1a 내지 1c는 예시적 치료학적 조성물의 도식적 실례이다.
- 도 2는 예시적 복합체(좌측) 및 예시적 조성물(우측)의 투과 전자현미경(TEM) 영상을 도시한다.
- 도 3은 2가지 pH 조건 하에서 예시적 복합체 및 예시적 조성물에 대한 입자 크기에 따른 입자 크기의 그래프이다.
- 도 4a 내지 4b는 예시적 조성물의, (도 4a) 복합체 대 접합체의 비가 변화함에 따른 입자 크기 및 제타 전위의 그래프 및 (도 4b) 시간 경과에 따른 입자 크기 및 제타 전위의 그래프이다.
- 도 5a 내지 5b는 (도 5a) EaHy926 세포 및 (도5b) HepG2 세포에서의, 복합체 대 접합체의 비가 변화함에 따른 예시적 복합체 및 조성물의 독성의 그래프이다.
- 도 6a 내지 6b는 (도 6a) HepG2 세포 및 (도6b) EaHy926 세포에서 eGFP에 대한 유전자를 함유하는 예시적 복합체 및 조성물 중의 eGFP의 발현을 나타내는 형광 영상들이다. 축적 막대는 20 μ m이다.
- 도 7a는 TCA가 양자점의 외부에 어떻게 연결되는가를 나타내는, 타우로콜산-연결된 양자점(QD-TCA)의 도식이다.
- 도 7b는 QD-TCA로 처리한 후의 다양한 무린 장기들의 생체의 광학 영상화 프로파일이다.
- 도 8은 마우스를 QD-TCA로 처리한 후 다양한 조직들 내 QD-TCA 존재를 나타내는 일련의 TEM 영상들이다. QD-TCA는 화살표로 표시되어 있다. 상단 영상들은 위, 십이지장 및 공장(空腸)로부터의 조직을 도시하고; 하단 영상들은 회장, 간 및 비장으로부터의 조직을 도시한다.
- 도 9는 예시적 조성물의 IV 및 경구 투여 후 특정 무린 장기들에서 eGFP로부터 발생한 형광의 상대량을 도시하는 막대 그래프이다.
- 도 10은 마우스에게 예시적 조성물을 IV 투여(상단 열) 및 경구 투여(하단 열)한 후 특정 장기들에 존재하는 eGFP의 양을 도시한다.
- 도 11은 5가지 예시적 제형의 투여 후 다양한 무린 장기들에 존재하는 eGFP의 양을 나타내는 일련의 공초점 영상들을 도시한다.
- 도 12는 도 11의 영상들 중 한 열을 확대시킨 것이다.

- 도 13은 다양한 뮤린 장기들에서 예시적 제형의 투여 후의 상대적 형광의 그래프이다.
- 도 14는 예시적 조성물을 마우스에게 IV 및 경구 투여한 후, 시간 경과에 따른 엑센딘-4(Exendin-4)의 혈장 농도를 나타내는 그래프이다.
- 도 15a 내지 15c는 예시적 조성물로 처리된 동물들의 혈당 수준의 그래프를 도시한다.
- 도 15d 내지 15e는 예시적 조성물로 처리된 동물의 체중 그래프를 도시한다.
- 도 15f는 예시적 조성물로 처리된 동물들의 시간 경과에 따른 식품 소비량의 그래프를 도시한다.
- 도 15g는 예시적 조성물의 투여 후 다양한 동물 장기들에 존재하는 GLP-1의 양을 나타내는 일련의 영상들이다.
- 도 16a 내지 16b는 (16a) 콘드로이틴 설페이트 및 (16b) 타우로콜산에 공유 결합된 콘드로이틴 설페이트의 양성자 NMR 스펙트럼이다.
- 도 17은 예시적 제형들의 입자 크기 및 제타 전위의 그래프이다.
- 도 18a 내지 18b는 다양한 예시적 제형들의 UV-VIS 스펙트럼이다.
- 도 19a 및 19b는 예시적 제형들의, (도 19a) 시간 경과에 따른 입자 직경의 그래프 및 (도 19b) 다양한 pH 값들에서의 입자 직경의 그래프이다.
- 도 20a 내지 20b는 예시적 제형들에 대한, (도 20a) pH 7.4 및 (도 20b) pH 5.0에서 시간 경과에 따른 약물 방출의 그래프이다.
- 도 21은 HepG2 세포에서 예시적 담즙산-연결된 폴리사카라이드의 독성을 반영하는 그래프이다.
- 도 22a 내지 22c는 HepG2 세포에서 예시적 제형들의 독성을 나타내는 그래프이다.
- 도 23a 내지 23c는 예시적 제형들에 대한 효능의 그래프이다.
- 도 24는 예시적 조성물들의 투여 후 중앙-보유 마우스에서의 독소루비신 생체분포를 나타내는 그래프이다.
- 도 25는 A, B, C 및 D로 표지된 4가지 성분들로 제조된 예시적 리포솜 치료학적 조성물의 일반적 구조의 도식적 실례이다.
- 도 26은 리포솜에 치료제를 로딩(loading)시키고 후속적으로 폐쇄된 리포솜을 음이온성 중합체에 공유 결합된 담즙산 또는 담즙산 접합체로 코팅시키는 과정의 도식이다.
- 도 27은 부분적으로 개방된 리포솜 형성의 도식이다.
- 도 28은 3가지 예시적 리포솜 조성물의 평균 크기 및 제타 전위를 나타내는 그래프이다.
- 도 29는 pH 7.4 및 pH 1.2에서, 시간 경과에 따른 3가지 예시적 리포솜 조성물로부터 방출되는 인슐린 양의 그래프이다.
- 도 30은 예시적 리포솜 조성물에 노출된 후 세포들에 존재하는 Ce6-표지된 인슐린의 양을 나타내는 일련의 영상이다.
- 도 31은 예시적 리포솜 조성물로 경구 처리된 동물에 대한 형광 계수 및 세포 수를 나타내는 그래프이다.
- 도 32는 예시적 리포솜 조성물을 경구 투여한 후 살아있는 마우스에 존재하는 Ce6-표지된 인슐린의 양 및 위치를 나타내는 일련의 영상이다.
- 도 33은 예시적 리포솜 조성물을 경구 투여한 후 마우스의 각종 장기들에 존재하는 Ce6-표지된 인슐린의 양을 나타내는 일련의 영상이다.
- 도 34는 도 33에 도시된 각 장기에 존재하는 인슐린의 그래프이다. 열거된 각 장기에 있어, 막대(좌측에서 우측으로)는 유리 인슐린으로의 처리, DDO로의 처리, DD1-CS로의 처리 및 DD1-CST로의 처리에 대한 것이다.
- 도 35는 예시적 리포솜 조성물을 경구 투여한 후 동물에 대한 시간 경과에 따른 혈장 인슐린 농도의 그래프이다.
- 도 36은 예시적 리포솜 조성물을 경구 투여한 후 동물에 대한 시간 경과에 따른 혈청 수준의 그래프이다.

도 37은 예시적 리포좀 조성물로 처리된 동물에서 시간 경과에 따른 중앙 체적의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 38은 예시적 리포좀 조성물로 처리된 동물에서 시간 경과에 따른 상대적 체중을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 치료학적 조성물의 경구 전달은 불량한 장 투과성, pH 또는 온도 불안정성으로 인한 치료제의 분해 및 단백질분해 효소 분해를 포함하여 이의 사용을 제한할 수 있는 수많은 도전과제들을 해결해야 한다. 경구 제형의 개발은 치료제의 용해도, 안정성, 용해율 및 위장(GI)관내에서의 투과성을 포함하는, 치료제의 생체이용율에 영향을 미치는 다수의 요인들을 고려한다. 일반적으로, 치료제의 경구 투여형은 GI관 내에서의 치료제의 반감기 및 대사작용을 저하시키고 이에 따라 치료제의 생체이용율을 최대화하기 위해 신속한 용해율 및 높은 흡수율을 가져야 한다. 경구 생체이용율이 높은 치료제는 생체이용율이 낮은 치료제보다 더 높은 환자 순응도, 환자 집단들 간의 더 많은 재현성, 더 낮은 투여량 및 더 광범위한 치료 범위(therapeutic window)를 제공하여 질환 또는 질병의 더 낮은 전체 치료 비용을 유도할 수 있다.
- [0013] 치료제의 효능을 방해하는 하나의 양상은 위장관 벽의 상피 내벽(epithelial lining)으로부터의 장 흡수를 제한하는 장벽에서 기인한다. 간에서 분비된 담즙산이 장의 상피 세포를 통해 말단 회장(回腸)으로 재흡수되고 간문맥을 경유하여 다시 간으로 수송되기 때문에, 담즙산 수송체는 치료제의 전달에 대한 흥미로운 표적이다. 따라서, 높은 담즙산 재순환비는 담즙산의 장간순환이 매우 효율적인 과정이 되도록 만들며, 간 및 말단 회장에서 주로 발견되는 담즙산 수송체에게 유익하다.
- [0014] 타우로콜산(TCA)은 인간 장액의 약 45%를 차지하는 것으로 추정되는 풍부한 담즙산이다. TCA는 말단 회장에 주로 존재하는 정단 나트륨 담즙산 수송체(apical sodium bile acid transporter; ASBT)를 통한 장내 세포횡단 흡수(transcellular absorption)를 최대화함으로써 치료제의 운반체로서 사용될 수 있다. 따라서, 말단 회장에서부터 간문맥으로 그리고 체순환으로의 치료제의 수송은 TCA와 같은 담즙산 운반체에 의해 촉진될 수 있다.
- [0015] 본원에서는 음이온성 모이어티에 공유 결합되어 있는 담즙산에 정전기적으로 연결되어 있는 치료제와 양이온성 모이어티의 복합체를 함유하는 치료학적 조성물이 개시된다. 상기 조성물은 크기가 약 20nm 내지 약 5000nm의 범위인 직경을 갖고 위장관(GIT), 주로 회장에서부터 혈중으로 흡수되는 입자를 형성한다. 일부 실시형태에서, 입자의 직경은 약 20nm 내지 5000nm, 약 50nm 내지 1000nm이고, 크기가 적어도 약 20nm, 적어도 약 50nm, 적어도 약 100nm 또는 약 5000nm 이하 또는 약 1000nm 이하이다. 치료학적 조성물은 적어도 하나의 담즙산에 공유 결합되어 있는 음이온성 모이어티, 상기 음이온성 모이어티와 정전기적으로 상호작용하는 양이온성 모이어티를 함유하고 적어도 하나의 치료제를 포함한다. 특정 실시형태에서, 조성물은 1가지 초과 치료제 또는 적어도 2가지의 치료제를 포함할 수 있다.
- [0016] 이론에 국한시키고자 하는 것은 아니지만, 경구 투여 후 GIT에 의한 조성물 흡수의 주요 기작은, 소화 담즙산을 GIT로부터 간으로 재순환시키는 담즙산의 장간순환계를 통한 것으로 여겨진다. 담즙산-장식된(decorated) 조성물은 담즙산 재순환 경로를 이용하며 치료제가 혈류로 운반되도록 한다. 음이온성 모이어티는 생체이용율을 제공하고, 입자 응집 및 입자의 GIT로부터의 비특이적 흡수 둘 다를 방지한다.
- [0017] 본원에 기재된 치료학적 조성물은 치료제가 담즙산 없이 제공되었을 경우보다 높은 생체이용율로 치료제를 피험자에게 제공할 수 있다. 담즙산의 혼입은 치료제가 환자에게 경구 투여될 수 있도록 한다. 조성물은 독소루비신을 포함하는 항암제와 같이 현재 경구 투여되는 치료제에 대한 향상된 생체이용율을 제공할 뿐만 아니라, 통상 경구 투여되는 것으로 사료되지 않는 치료제도 투여될 수 있도록 한다. 이러한 치료제는 DNA, RNA, 유전자 또는 올리고뉴클레오타이드 치료제뿐만 아니라 단백질, 폴리펩타이드, 백신, 벡터 또는 바이러스를 포함한다. 본 발명의 조성물은 불량한 장 투과성, pH 또는 온도 불안정성으로 인한 치료제의 분해 및 효소적 분해의 과제를 극복할 수 있는 원천 기술을 제공한다.
- [0018] 구체적으로, pH 5에서 순 양전하를 갖는 외표면을 갖고 치료제로 제조된 코어 복합체를 함유하는 치료학적 조성물이 기재된다. 상기 조성물은 또한 음이온성 중합체에 공유 결합되어 있는 담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유한다. 상기 음이온성 중합체는 중성 pH에서 순 음전하를 갖고, 상기 음이온성 중합체는 또한 상기 코어 복합체의 외표면에 정전기적으로 커플링된다. 이들 치료학적 조성물의 디자인의 실례는 도 1에 도시되어 있으며, 여기서 치료제(TA)를 함유하고 양이온성 표면을 갖는 복합체는 음이온성 중합체에 공유 결합되어 있는 담즙산 또는 담즙산 접합체(BA)로 형성된 모이어티와 커플링된다. 생성된 조성물은 BA-폴리음이온 모이어티로 코팅되어 있는 코어 복합체를 갖고, 여기서 상기 코어 복합체의 양이온성 표면은 음이온성 중합체와 정전기적으로 커플링되어,

안정한 별개의 미립자 조성물을 형성한다.

[0019] 치료제는 일반적으로 핵산, 유전자, 단백질, 펩타이드, 바이러스, 백신 또는 소분자를 포함하는 어떠한 유형의 것이라도 될 수 있다. 특정 실시형태에서, 치료제는 GLP-1 또는 엑센딘-4를 암호화하는 유전자와 같은 유전자, 선형 DNA, 플라스미드 DNA, RNA, RNAi 또는 mRNA이다. 치료제는 인슐린, 성장 호르몬 또는 에리트로포이에틴과 같은 단백질 또는 펩타이드일 수 있거나, 치료제는 칼시토닌 또는 LHRH와 같은 펩타이드일 수 있다. 이는 독소 루비신, 시스플라틴 또는 파클리탁셀을 포함하는 항암 약물과 같은 소분자 약물일 수 있다. 이는 또한 인플루엔자 바이러스 또는 종양분해성(oncolytic) 아데노바이러스와 같은 바이러스일 수 있다.

[0020] 코어 복합체는 단일 양이온성 치료제 또는 다수의 양이온성 치료제들을 포함할 수 있거나, 코어 복합체는 외표면이 pH 5에서 순 양전하를 갖도록 연합되는 2가지 이상의 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 외표면은 약 1 내지 약 8의 임의의 pH에서 순 양전하를 갖거나 중성 pH에서 순 양전하를 갖는다. 코어 복합체는 폴리에틸렌이민, 프로타민 또는 폴리(라이신)과 같은 양이온성 중합체를 포함할 수 있다. 양이온성 중합체는 pH 5에서 순 양전하를 갖는, 핵산 또는 DNA의 부분일 수 있다. 일부 실시형태에서, 코어 복합체는 양이온성 리포좀 또는 양이온성 지질, 또는 지질들의 혼합물을 포함한다.

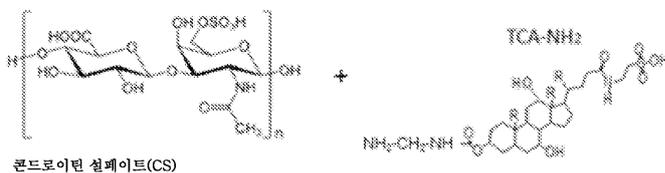
[0021] 폴리음이온 또는 음이온성 중합체는 적어도 하나의 설포네이트, 카복실레이트, 포스페이트 또는 설포아미드 그룹을 포함하는 중합체와 같은, 중성 pH에서 순 음전하를 갖는 중합체이다. 폴리음이온의 pKa는 10 미만의 값을 가질 수 있거나, 폴리음이온의 pKa는 8 미만일 수 있다. 폴리음이온은 텍스트란 설페이트, 헤파린, 헤파린 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 히알루론산 또는 알긴산을 포함하는 폴리사카라이드; RNA, siRNA, mRNA 및 ODN을 포함하는, 핵산 또는 DNA의 부분; 또는 알부민과 같은 단백질과 같은 천연 중합체일 수 있다. 이는 폴리비닐 설포, 폴리(2-아실아미도-2-메틸-1-프로판 설포산(폴리AMPS), 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 폴리(에틸아크릴산), 폴리(프로필아크릴산), 폴리(스티렌 설포네이트), 폴리(설포아미드), 폴리(포스페이트), 폴리(2-메타크릴로일옥시에틸 포스포릴콜린) 또는 상기한 중합체들 중 임의의 것의 임의의 혼합물 또는 공중합체와 같은 합성 중합체일 수 있다. 중합체는 랜덤, 블록, 그래프트 또는 교호 중합체일 수 있다. 폴리음이온은 천연 또는 합성 중합체, 또는 2가지 이상의 임의의 유형의 중합체의 혼합물일 수 있다.

[0022] BA 모이어티는 담즙산 또는 담즙산 접합체, 콜산 또는 케노콜산과 같은 1차 담즙산, 데옥시콜산, 리토콜산, 우르소데옥시콜산 또는 케노데옥시콜산과 같은 2차 담즙산, 또는 임의의 유형의 담즙산 염일 수 있다. 특정 실시형태에서, 담즙산 또는 담즙산 접합체는 타우로콜산, 글리코콜산, 타우로데옥시콜산, 글리코데옥시콜산, 타우로케노데옥시콜산, 글리코케노데옥시콜산, 또는 ASBT와 같은 담즙산 수송체와 연관된 단백질에 결합하는 임의의 변형된 담즙산이다. BA 모이어티는 상기 열거된 예시적 성분들 중 임의의 것의 혼합물일 수 있거나 단일 실체일 수 있다.

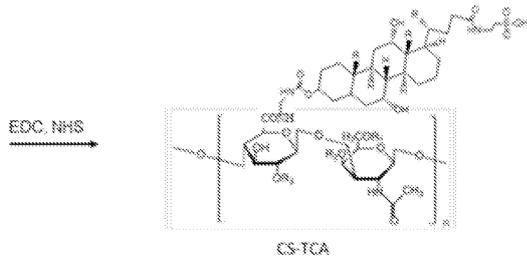
[0023] 도 1a의 일반적 계획의 기타 실시형태들은 도 1b 및 1c에 도시되어 있다. 도 1b는 플라스미드 DNA일 수 있는 모이어티 A의 도식적 표현으로, 상기 모이어티 A는 양이온성 중합체와 같은 모이어티 B와 연합하여 외부 양이온성 표면을 갖는 코어 복합체를 형성한다. 코어 복합체는 BA 모이어티에 공유 결합되어 있는 음이온성 중합체와 정전기적으로 결합하여 외부 표면에 BA를 갖는 치료학적 조성물을 형성한다. 일 실시형태에서, B 모이어티는 bPEI이고, A 모이어티는 pEeGFP-N1, pGLP-1, 또는 p엑센딘-4와 같은 플라스미드 DNA이고, 폴리음이온-담즙산 접합체 모이어티는 헤파린-TCA이다. 도 1c에는, 음이온성 중합체에 공유 결합된 담즙산 또는 담즙산 접합체로 랩핑된(wrapped) 코어 복합체를 포함하는 제형의 각종 성분들이 상세히 기재되어 있다.

[0024] 담즙산 또는 담즙산 접합체와 음이온성 중합체 간의 연결은 공유 결합을 통한 것이다. 이러한 연결된 생성물을 형성시키는 데 사용되는 담즙산 및 음이온성 중합체의 예는 음이온성 중합체로서 콘드로이틴 설페이트가 있으며 담즙산으로서 타우로콜산이 있다. 이들 화합물을 공유 연결시켜 본원에 개시된 조성물에서 사용되는 음이온성 중합체-담즙산 모이어티를 형성시키기 위해 사용될 수 있는 일반적 반응 경로는 CS-TCA의 합성을 위한 하기 반응식 1에 제시되어 있다.

[0025] [반응식 1]



[0026]



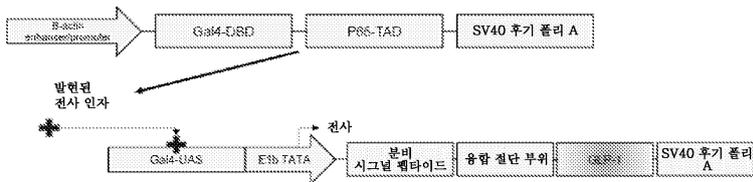
- [0027]
- [0028] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "담즙산 접합체"는 타우린 또는 글리신을 포함하는 담즙산 염을 포괄하는 담즙산 염을 의미한다. 용어 "담즙산"은, 달리 주지되지 않는 한, 담즙산 접합체를 포함한다.
- [0029] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "복합체"는 적어도 하나의 모이어티를 의미하며 서로 연합되어 있는 2가지 이상의 모이어티를 포함할 수 있다. 복합체가 2가지 이상의 모이어티로 구성되는 실시형태에서, 모이어티들은 정전기적 상호작용, 이온성 상호작용, 수소-결합, π 결합 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 공유 또는 비공유 결합을 통해 서로 연합될 수 있다.
- [0030] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "소분자" 또는 "소-분자"는 약 1000 달톤 이하의 분자량을 갖는, 생물체제가 아닌 것으로 고려되는 화학적 화합물을 의미한다. 상기 용어는 일반적으로 이러한 유형의 치료제를 단백질 또는 핵산-함유 제제와 구별하기 위해 사용된다.
- [0031] 개시된 조성물의 사용은 치료제의 생체이용율을 향상시켜 광범위한 치료제의 경구 전달을 가능케 함으로써, 보다 낮은 투여량 및 보다 광범위한 치료 범위를 통해 다수의 질환들을 치료하고 잠재적으로 약물 치료의 안정성을 향상시킬 수 있다. 이러한 향상은 치료 방식 및 효능을 향상시킴으로써 환자에게 유익할 수 있고, 전통적으로 경구 투여될 수 없다고 사료되었던 치료제의 전달을 위한 새로운 길을 열 수 있다.
- [0032] 본 발명의 임의의 실시형태를 상세히 설명하기 전에, 본 발명이 이의 적용에 있어 하기 설명에서 진술되거나 하기 도면들에서 예시된 구성요소들의 구성 및 배열의 상세사항들로 제한되지 않음이 이해될 것이다. 본 발명은 다른 실시형태가 가능할 수 있고 다양한 방식으로 실시될 수 있거나 수행될 수 있다. 또한, 본원에서 사용되는 어법 및 용어는 설명을 위한 것이며 제한으로서 간주되지 않아야 한다는 것이 이해되어야 한다. "포괄하는", "포함하는" 또는 "갖는" 및 이의 변형어들의 사용은 이후 열거되는 항목들 및 이들의 등가물뿐만 아니라 추가의 항목들을 포괄하고자 한다.
- [0033] 또한, 본원에서 언급되는 임의의 수치 범위는 하한치부터 상한치까지의 모든 값들을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들면, 농도 범위가 1% 내지 50%로서 언급될 경우, 2% 내지 40%, 10% 내지 30% 또는 1% 내지 3% 등과 같은 값들은 본 명세서에서 명백하게 열거된 것으로 의도된다. 이들은 단지 구체적으로 의도되는 것의 예시이며, 열거된 최저치와 최고치 사이에 있고 이들 값을 포함하는 수치 값들의 모든 가능한 조합이 본 출원에 명백하게 언급되어 있는 것으로 간주되어야 한다.
- [0034] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 용어 "대략"의 동의어인 것으로 이해되어야 한다. 설명적으로, 용어 "약"의 사용은 어떤 값이 언급된 값을 약간 벗어난 값들을 포함한다는 것을 나타낸다. 변동은 실험 오차, 제작 허용오차 및 평형 조건의 변동과 같은 조건 때문일 수 있다. 일부 실시형태에서, 용어 "약"은 언급된 값에 10%를 더하거나 뺀 값을 포함한다. 모든 경우에, 용어 "약"이 값을 설명하기 위해 사용되었을 때, 이 개시는 정확한 값을 또한 뒷받침하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0035] 본 명세서 전반에 걸쳐서 "일 실시형태", "실시형태", "양상" 또는 유사 용어의 언급은 그 실시형태와 연관되어 설명된 특정한 특징, 구조 혹은 특성이 본원에 제공된 발명의 적어도 하나의 실시형태에 포함되었음을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전반에 걸쳐서 나타난 "일 실시형태에서", "실시형태에서", "양상에서" 및 유사 용어는 모두 동일한 실시형태를 의미할 수 있지만, 반드시 그런 것은 아닐 수 있다.
- [0036] 게다가, 본원에 제공된 방법 및 조성물의 기재된 특징, 구조 혹은 특성들은 하나 이상의 실시형태에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다. 하기 설명에서는, 본 발명의 실시형태에 대한 철저한 이해를 위해 수많은 특정 세부사항들이 제공된다. 그러나, 당업계의 숙련가들은 실시형태들이 구체적 세부사항들 중 하나 이상 없이도 또는 다른 방법, 구성성분 또는 재료들을 가지고 실시될 수 있음을 인지할 것이다. 다른 사례로서, 익히 공지된 구조, 재료 또는 조작용 실시형태들의 양상을 흐리는 것을 피하기 위해 상세히 도시하거나 설명되지 않는다.

- [0037] 본 명세서의 예시적 실시형태들은 하기 실시예에서 제공된다. 실시예는 본원에 개시된 본 발명을 설명하고 당업계의 숙련자들이 동일한 것을 제조 및 이용하는 것을 돕기 위해 제시된다. 이들은 예시이며 본원에 개시된 본 발명의 범주를 어떠한 방식으로도 달리 제한하기 위함이 아니다.
- [0038] 실시예 1. 유전자 전달.
- [0039] 치료학적 유전자, 또는 플라스미드 DNA, 미니 서클 DNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, RNAi, siRNA, shRNA 및 miRNA와 같은 별개의 핵산은, 비정상적 또는 질환-유발 유전자를 영구적으로 또는 일시적으로 복구 또는 대체할 수 있거나 특정 세포를 표적화하기 위해 하향 조절되는 유전자를 공급할 수 있는 가능성으로 인해 기존의 치료 접근법보다 수많은 이점들을 갖는다. AIDS, 간염, 암, 섬유증 및 당뇨병과 같은 질환의 치료는 단백질 발현을 변형시키거나 비정상적 유전자를 침묵화(silencing)시키는 치료학적 핵산을 전달하여 질환을 예방하거나 이의 중증도를 감소시킴으로써 가능할 수 있다. 연구원들이 질환 치료를 위해 핵산을 세포로 전달하는 비-바이러스성 벡터의 사용을 최적화시킬 수 있었고, 활성의 증거가 몇몇 비-바이러스성 전달 전략을 이용했을 때 관찰되었지만, 임상 시험의 진행은 효과적이지 않았다.
- [0040] 각종 상이한 병리학적 및 생물학적 조건 하에 안정하고 높은 경구 흡수 프로파일을 갖는 비-바이러스성 운반체를 사용하는 경구 유전자 전달은 도전과제이다. 이러한 유전자 전달은 비침습성 전달 및 환자 순응도와 같은 수많은 이점들이 있을 수 있다. 그러나, 위(胃) 내의 매우 산성인 유체는 유전자를 분해할 수 있고, 점막 유체는 유전자에 부착하고 GI관 막과의 직접적 상호작용을 저해할 수 있거나, 유전자는 흡수되지 않고 GI관을 통과할 수 있다. 따라서, GI관에서의 흡수를 통해 효과를 얻기 위해 인간 생리계와 양립가능한 최적화된 디자인이 요구된다. 추가로, 차폐(shielding) 또는 랩핑(wrapping) 전략은 유전자를 보호할 수 있고 또한 소장 막을 통한 흡수를 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라 정단 나트륨 의존적 담즙산 수송체(ASBT) 및 Ost 알파/베타 수송체와 같은 담즙산 수송체 둘 다를 통한 흡수를 촉진시킬 수 있다.
- [0041] 최소한의 독성으로 효능을 달성하기 위해, GI관에서의 표적 특이적 전달을 위한 변형된 표면 및 최적화된 벡터/운반체 시스템을 갖는 양이온성 복합체를 디자인하였다. 따라서, 음이온성 유전자와 양이온성 중합체의 복합체를 전하-전하 상호작용을 사용하여 제조하였고, 복합체를 차폐하여 GI관으로부터 보호하는 생체적합성 및 생체 분해성 폴리사카라이드로 복합체를 랩핑하였다.
- [0042] 본원에서는 폴리에틸렌민 및 헤파린과 복합체화된 유전자를 함유하는 치료학적 조성물이 기재된다. 상기 조성물의 외부 표면은, 소장내 회장의 ASBT 및 Ost 알파/베타 수송체를 포함하는 담즙산 수송체를 통한 경구 흡수를 증진시키기 위해 헤파린과 공유 연결된 타우로콜산으로 장식되었다.
- [0043] 재료. 저분자량 헤파린(LMWH, 평균 MW 5,000kDa)은 메디플렉스(Mediplex Co., Ltd)(한국 서울)로부터 입수하였다. 타우로콜산 나트륨 염(TCA), 분지형 폴리에틸렌민(25 kDa), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 하이드로클로라이드(EDAC), 4-니트로페닐 클로로포름에이트(4-NPC), 트리에틸아민(TEA), N-하이드록시석신이미드(HOSu), 4-메틸모르폴린(MMP), 1,4-디옥산, 2% 닌하이드린 시약 및 트립신-EDTA는 시그마 알드리치(Sigma Aldrich Co.)(미주리주 세인트 루이스)로부터 입수하였다. N,N-디메틸포름아미드(DMF), 에틸렌디아민, 포름아미드, HEPES 완충액 및 아세트온은 시그마 케미칼사(Sigma Chemical Co.)(미주리주 세인트 루이스)로부터 구입하였다.
- [0044] 3가지 유전자의 경구 투여를 연구하였다; 원리 증명 연구를 위한 eGFP의 리포터 플라스미드 유전자, 및 2가지 치료학적 유전자, 즉 2형 당뇨병용으로 시판되는 치료학적 펩타이드이자 글루카곤-유사 펩타이드 1(GLP-1)의 효능제인 엑센딘-4을 암호화하는 유전자 및 GLP-1을 암호화하는 유전자. 꼬리 정맥 및 경구 투여 후 혈장 수준을 측정하기 위해 엑센딘-4 유전자를 이용하여 추가의 연구를 수행하였다.
- [0045] 상기 유전자들을 pH 5에서 순 양전하를 갖는 분지형 폴리에틸렌민(bPEI)과 복합체화시켰다. 한 연구에서는, 복합체를 키토산(대조 샘플로서) 또는 헤파린-타우로콜산(TCA) 모이어티(H-TCA 또는 HTCA)로 코팅시켰다. 이러한 일반적 계획은 도 1b 및 1c에 도시되어 있으며, 상기 도면들은 TCA가 이의 친수성 특성으로 인해 조성물의 외부 표면에 위치함을 나타내는 헤파린-TCA 랩핑된 복합체(양이온성 중합체와 유전자 복합체)의 도식적 표현이다. 도 1b에서, bPEI는 B 모이어티이고, 유전자는 A 모이어티이다. B는 DNA 축합제일 수 있고 pH 5에서 양전하를 가질 수 있다. A는 pEeGFP-N1, pGLP-1, 또는 pEx-4와 같은 플라스미드 DNA일 수 있다. 폴리음이온-담즙산 접합체 모이어티는 헤파린-TCA일 수 있고, BA 모이어티는, 예를 들면, 콜산 또는 데옥시콜산과 같은 담즙산일 수 있거나, 이는 타우로콜산 또는 글리코콜산과 같은 담즙산 접합체일 수 있다. 도 1c에는, 음이온성 중합체(여기서, 음이온성 중합체는 헤파린이고, 담즙산 접합체는 타우로콜산이다)에 공유 결합된 담즙산 또는 담즙산 접

합체로 랩핑되어 있는 코어 복합체를 포함하는 제형의 다양한 성분들이 상세히 기재되어 있다.

[0046] 녹색 형광 단백질 플라스미드(pAcGFP1-N1, 4.7 kb) 벡터는 클론텍(Clontech)(미국 캘리포니아주)으로부터 입수하였다. 엑센딘-4 유전자는 클론텍(미국 캘리포니아주)으로부터 입수하여 판매업자에 의해 제공된 프로토콜에 따라서 증폭시켰다.

[0047] 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1 cDNA)을 화학적으로 합성하고 KpnI 및 XbaI 부위들에서 pβ 벡터 내로 삽입시켰다. 분비 SP를 암호화하는 DNA 단편을 화학적으로 합성하고 KpnI 부위에서 pβ-GLP-1 내로 삽입시켜 pβ-SP-GLP-1을 생성시켰다. GLP-1을 암호화하는 플라스미드를 위해 사용되는 GLP-1 유전자 구조의 지도는 하기 제시한다.



[0048]

[0049] 활성화된 TCA를 수득하기 위해, 1 mol의 타우로콜산(TCA) 나트륨 염을 0℃에서 DMF(4.6 mL)에 용해시킨 다음, TEA(6 mol) 및 4-NPC(5 mol)를 플라스크에 첨가하였다. 상기 용액을 동일한 조건 하에 1시간 동안 반응시키고, 이어서 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 이어서, 용액을 원심분리하고 무수 에탄올(EtOH)(20 mL) 및 DI 물(20 mL)을 이용하여 분리 깔때기로 추출하였고, 이 과정을 3회 반복하였다. 분리된 용액을 회전 증발기에 위치시켜 유기 용매를 증발시키고 마지막으로 48시간 동안 동결 건조시켜 TCA-NPC 분말을 수득하였다. 상기 TCA-NPC 분말(1 mol)을 DMF(5 mL)에 용해시키고, 4-MMP(2 mol)를 첨가하였다. 상기 반응을 50℃에서 1시간 동안 지속시켰다. 1시간 후, EDC(100 mol)를 한 방울씩 상기 용액에 첨가하고, 실온에서 16시간 동안 교반을 지속하였다. 결정화된 부분을 여과하고 진공 건조기를 이용하여 건조시켰다. HTA 접합체를 합성하기 위해, 1mol의 헤파린을 온화하게 가열하면서 증류수에 용해시키고 0.1M의 HCl을 첨가하여 pH를 5.5 내지 6의 범위에서 유지시켰다. EDC(5 mol)를 헤파린 용액에 첨가하고, 이를 5분 동안 교반한 다음, NHS(7 mol)를 첨가하고 다시 30분 동안 교반하였다.

[0050] 이러한 방식으로, TCA의 말단 하이드록실 그룹을 아민 그룹을 도입하도록 변형시키고 이를 아마이드 그룹을 통해 헤파린의 카복실 그룹과 접합시킴으로써 헤파린 및 TCA를 함께 공유 커플링시켰다. 공급 몰비(feed mole ratio) 및 반응 조건을 최적화시키고 제어함으로써, 커플링 비를 헤파린의 각 몰에 대해 4몰의 TCA가 되도록 최적화시켰다. 헤파린-TCA 모이어티를 투석에 의해 정제하고 H-NMR 및 FT-IR에 의해 특징 규명하여 공유 결합을 확인하였다. NMR 분석에 의해 7.2 ppm에서 새로운 양성자 피크가 관찰됨으로써 TCA와 헤파린 사이의 결합이 확인되었다.

[0051] (bPEI/pDNA) 복합체 및 담즙산 코팅은 다음과 같이 제조하였다. 분지형 폴리에틸렌민(bPEI, 25K, 10mM)을 100 mL HEPES 완충액에 용해시키고, 용액이 청정하고 투명해질 때까지 와류시켰다. 별도의 바이알에서, 필요량의 pDNA를 HEPES 완충액(10mM)과 혼합하여 1mg/mL의 농도를 제공하였다. 유전자 함유 용액을 온화한 와류 하에 1/1, 2/1, 5/1 및 10/1의 N/P 비로 bPEI 용액에 적가하였고, 여기서 N은 중합체 내의 이온화 가능한 양이온성 그룹을 나타내고, P는 유전자 내의 포스페이트 그룹을 나타낸다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 보관하여 전하-전하 상호작용을 통해 복합체가 형성되도록 하였다. 5/1의 N/P 비에서, 복합체의 제타 전위 값을 약 +10 mV에서 측정하였다. 음으로 하전된 헤파린-TCA 모이어티를 별도의 팔콘 튜브에서 HEPES(1mg/mL)에 용해시켰다. 이전에 제조된 양이온성 (bPEI/pDNA) 복합체를 1:1(v/v)의 비로 헤파린-TCA 용액에 적가하였다. 최종 제형을 실온에서 30분 동안 보관하여 헤파린-TCA 코팅된 복합체를 형성시켰다. 최종 조성물을 2일에 걸쳐서 냉동건조에 의해 동결건조시켰다.

[0052] 양이온성 (bPEI/pDNA) 복합체 및 헤파린-TCA 랩핑된 조성물의 형태학 및 크기를 각각 TEM 및 DLS에 의해 조사하였다. 양이온성 중합체, 유전자 및 헤파린-TCA의 비를 최적하기 위해 제타 전위 측정을 수행하여 표면 특성들을 관찰하였다. DLS 및 제타 분석기에 의해 측정하기 전에, 제형을 와류를 이용하여 증류수(1mg/mL)에 용해시켰다.

[0053] 도 2는 2가지 샘플들의 크기 및 형태학에 대한 정보를 제공하는 투과 전자현미경(TEM) 영상이다. 양이온성 (bPEI/pDNA-N1) 복합체의 샘플은 도 2의 좌측 영상에 도시되어 있으며, 헤파린-TCA로 랩핑된 양이온성 (bPEI/pDNA-N1) 복합체의 샘플은 도 2의 우측 영상에 도시되어 있으며, 여기서 샵도는 HTCA 코팅을 갖는 나노입

자를 확대시킨 것을 도시한다. 알 수 있는 바와 같이, 복합체의 크기는 대략 100nm이고, 랩핑된 조성물은 대략 200nm이다.

- [0054] 음으로 하전된 eGFP 유전자 및 양으로 하전된 bPEI는 HEPES 완충액에 용해될 경우에 서로 접촉하고, 양이온성 중합체와 음이온성 유전자 간의 정전기적 유인으로 인해 전하-전하 상호작용을 통해 복합체를 형성한다. 복합체의 크기는 유전자(N) 및 bPEI(P)의 N/P 비에 의존한다. 유전자와 중합체 간의 복합체의 형성은 크기 분포 분석 및 겔 전기영동에 의해 확인하였다.
- [0055] 양이온성 (bPEI/pDNA-N1) 복합체의 특징 규명은 5/1 및 10/1의 N/P 비를 갖는 복합체들이 DLS 및 TEM에 의해 측정된 유사한 제타 값 및 크기, 대략 +12 mV 및 대략 100nm의 직경을 갖는 양이온성 표면을 가짐을 보여준다. 5/1의 N/P 비를 갖는 복합체를 음이온성 헤파린-TCA로의 코팅을 위해 선택하였다.
- [0056] 중성 전하 및 최소 크기의 측면에서 최적의 조성물을 제형화하기 위해 양이온성 (bPEI/pDNA) 복합체 및 헤파린-TCA의 5가지 상이한 중량비를 연구하였다. 분지형 폴리에틸렌이민(bPEI, 25 K, 10mM)을 100 mL HEPES 완충액에 용해시키고, 청정항 용액이 관찰될 때까지 와류시켰다. 별도의 바이알에서, 적당한 용적의 pDNA를 10mM HEPES 완충액으로 용해시켜 1mg/mL의 최종 용적을 수득하였다. N/P 비가 상이한, 즉 1:1, 1:2, 1:5 및 1:10인 유전자 제형들을, 희석된 유전자 제형들을 온화한 와동하에 bPEI에 첨가하여 합성하였다. 샘플을 실온에서 30분 동안 약하게 교반하여 정전기적으로 커플링된 bPEI-유전자 복합체를 안정화시켰다. 헤파린-TCA 접합체(1mg/mL)를 초기에 형성된 복합체에 1:1 용적 비로 적가하고 실온에서 30분 동안 보관하여 안정한 헤파린-TCA 코팅된 조성물을 수득하였다. 상기 조성물을 2일 동안 동결건조시켰다.
- [0057] 도 3은 2가지 pH 값을 갖는 완충액들 중에서 시간 경과에 따른 입자 크기의 안정성을 도시한다. 데이터는 평균 \pm SD, n = 5로서 제시한다. 제형은 pDNA-N1을 이용하여 제조하였고 2일 동안 동결건조시켰다. 분말을 포스페이 트 완충 용액에 재분산시키고, HCl(1N)을 첨가하여 pH를 조정하였다(pH 3). 제형 제조 및 제형의 분석을 실온에서 수행하였다. 크기 및 제타 전위 값을 수용액 중에서 최대 6일 동안 측정하여 양이온성 복합체 및 헤파린-TCA 랩핑된 복합체 둘 다의 안정성을 관찰하였다. 측정된 제타 전위 값은 약 -20 내지 약 10 mV의 범위 내에 있었다. 크기의 변화가 유의적이지 않고 제타 값이 최적의 범위에서 유지되었기 때문에, 이러한 데이터는 입자가 안정하다는 것을 확인시켜 준다.
- [0058] 도 4a는 양이온성(bPEI/pDNA-N1) 복합체 및 담즙산 커플링된 헤파린의 양의 비가 변화함에 따른 입자 크기 및 제타 전위의 그래프이다. 연구된 HTCA/양이온성 복합체 비(모두 중량 기준)는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1이었다. 데이터는 평균 \pm SD, n = 5로서 제시한다. 헤파린-TCA 랩핑된 복합체(0.2 w/w 비를 가짐)의 크기 및 제타 안정성을 pH 3에서 16시간 동안 관찰하였고 이는 도 4b에 도시되어 있다.
- [0059] 시험된 가장 높은 헤파린-TCA 비(1/1)는 보다 큰 크기 분포 프로파일과 함께 큰 음의 제타 전위 값(-35 mV 초과)을 나타낸다. 도 4a에 도시된 데이터로 알 수 있는 바와 같이, 복합체가 약 100nm이고 헤파린-TCA 랩핑된 복합체 입자가 약 250 및 600nm의 직경일 때, 복합체/담즙산 입자의 크기는 약 150 내지 500nm의 직경만큼 증가하였다. 동일한 시간에 걸쳐서, 제타 전위는 음의 값이 되었고, 이는 양이온성 복합체의 표면이 음이온성 헤파린-TCA로 랩핑되었음을 시사한다. 헤파린-TCA 랩핑된 복합체 입자를 제타 전위에 대해 분석하였고, 이는 이들 복합체 입자가 매우 음성(-20 내지 25 mV)이었음을 나타냈다.
- [0060] 시험관내 독성 연구 발현 연구. 양이온성 (bPEI/pDNA-N1) 복합체 및 헤파린-TCA 랩핑된 조성물의 세포독성을 조사하기 위해, 이들을 24시간 동안 EaHy926 및 HepG2 세포와 함께 공동배양하였다. 헤파린-TCA 코팅의 존재 또는 부재 하에 상이한 N/P 비(2/1, 5/1, 10/1, 20/1 및 30/1)를 갖는 양이온성 (bPEI/pDNA-N1) 복합체를 EaHy926 및 HepG2 세포주와 함께 24시간 동안 항온배양하여 시험관내 세포독성을 관찰하였다. 세포 생존성을 MTT 검정으로 평가하였다. 도 5a의 그래프는 EaHy926 세포에서의 세포독성 결과를 도시하고, 도 5b의 그래프는 HepG2 세포에서의 세포독성 결과를 도시한다. 데이터는 평균 \pm SD, n = 5로서 제시한다.
- [0061] 도 5a 및 5b에 도시된 결과는 EaHy926 세포주와 HepG2 세포주 간의 세포 생존성 프로파일의 차이를 나타낸다. 일반적으로, 제형은 HepG2 세포보다 EaHy926에 대해 약간 더 독성이다. 그러나, 일반적으로 헤파린-TCA 랩핑된 조성물보다 양이온성(bPEI/pDNA) 복합체에 대해 더 적은 세포 생존성(즉, 보다 큰 독성)이 두 세포주 모두에서 관찰되었다. 이는 특정 시간 기간에 걸쳐서 bPEI의 방출을 방지함으로써 bPEI의 독성으로부터 세포를 보호하는 외부 헤파린-TCA 랩핑에 기인할 수 있다. 5/1의 N/P 비를 갖는 제형은 헤파린-TCA 코팅이 존재하던지 부재하던지 간에 두 세포주 모두에서 큰 독성을 나타내지 않는다. 그러나, 10/1, 20/1 및 30/1의 N/P 비를 갖는 제형들은 HepG2와 비교해 EaHy926 세포주에서 보다 더 독성을 나타내지만, 생체적합성 담즙산으로 랩핑된 후, 모든 제

형의 세포 생존성은 증가하였다.

- [0062] eGFP의 비교 발현 프로파일을 조사하기 위해 EaHy926 세포주 및 HepG2 세포주 각각을 염수, 유리 eGFP 유전자, 양이온성 복합체 및 헤파린-TCA 랩핑된 조성물의 샘플들과 항온배양하였다. 세포들을 2 μ g/웰의 eGFP 농도로 24 시간 동안 항온배양하였고, 핵을 DAPI로 염색시켜 세포내 수준에서 발현 수준을 측정하였다. eGFP의 2 μ g/웰로 24시간 동안 항온배양한 결과는 HepG2 세포주에 대해서는 도 6a에 도시되어 있고 EaHy926 세포주에 대해서는 도 6b에 도시되어 있다. EGFP는 유리 유전자를 나타내고, PP는 양이온성 복합체를 나타내고, HTCA/PP는 헤파린-TCA 랩핑된 양이온성 조성물을 나타낸다. 헤파린-TCA 랩핑된 양이온성 조성물은 덜 세포독성이었으며 IV 또는 경구 투여 후에 동물에게 어떠한 급성 문제도 유발하지 않았다.
- [0063] GFP 발현을 24시간의 항온배양 후에 공초점 현미경에 의해 직접적으로 관찰하였다. 세포의 공초점 현미경 영상은, 헤파린-TCA 랩핑된 조성물이 최대의 발현을 나타내고 양이온성 복합체가 헤파린-TCA 랩핑된 조성물보다 더 낮은 발현을 나타내지만 유리 eGFP보다는 더 높은 발현을 나타냄을 입증한다. 유리 eGFP의 발현은, 직접적 영상화로 입증되는 바와 같이, 세포로 축적되는 소량의 유리 유전자에 기인한다.
- [0064] 담즙산 경구 흡수 및 생체분포의 실시간 모니터링. 유전자 체형의 경구 전달을 연구하기 전에, 마우스에서 경구 흡수 프로파일을 실시간으로 조사하기 위해 실험을 타우로콜산(TCA)과 연결된 광학 영상화 조영제 양자점(QD)을 이용하여 수행하였다. 카복실화된 QD를 커플링제 EDC 및 NHS의 존재 하에 TCA-NH₂와 접합시켰다. 확인 피크 (confirmation peak)가 양성자 NMR 스펙트럼에 나타남에 따라 특정 규명에 의해 QD 및 TCA가 아마이드 결합을 통해 연결되었음이 확인되었다. 화합물을 물(MWCO-1000)에 대해 투석하여 미결합된 TCA를 제거하고 동결건조를 위해 냉동 건조시켰다. 생성된 분말을 완충액에 분산시키고 경구 섭식(oral gavage)에 의해 동물에게 투여하였다. 마우스는 투약 전에 12시간 동안 절식시켰고, 경구 투여는 2.5mg/kg의 투여량으로 수행하였으며, 이때 각 그룹은 5마리의 마우스를 함유하였다. TCA-연결된 QD가 투약된 마우스를 광학 영상화 모니터링 시스템을 사용하여 수시간 동안 영상화하였다.
- [0065] 도 7a는 TCA-연결된 QD의 구조의 도식이다. 도 7b는 QD-TCA로 처리된 마우스의 5개 장기의 생체의 광학 영상화 프로파일을 도시한다. 도 7b에 도시된 바와 같이, QD-TCA는 간과 공장에 주로 국소화되어 있다. 이러한 생체분포 및 장기 국소화 측면의 정량적 실시간 관찰을 위해, QD 기술이 사용되었다. 마우스를 QD-TCA 제형을 경구 투여한지 24시간 후에 희생시키고 해부하였다. 정량적 비교 분석 및 정성적 비교 분석 둘 다에서, QD의 관찰 및 국소화를 위해 선택된 장기들을 15 μ m 두께로 절단하고 TEM 그리드에 포매시켰다.
- [0066] 도 8은 위, 십이지장 및 공장(상단 영상), 및 회장, 간 및 비장(하단 영상)의 TEM 영상이며, 이는 QD-TCA의 경구 투여 후 마우스의 회장과 간 내에 상당한 수의 QD의 존재를 나타낸다.
- [0067] 경구 전달, 생체분포 및 광학 영상화. (bPEI/pDNA-N1, 5/1) 양이온성 복합체 및 (복합체/HTCA 1/0.2) 헤파린-TCA 랩핑된 조성물의 경구 흡수 가능성 연구를 마우스(C57BL6)에서 실시하였다. 각각 평균 체중이 17 g인 대략 6주령의 5마리 마우스를 시몬슨 바이오(Simonson Bio)(미국 유타주)로부터 구입하였다. 제형을 경구 투여하기 동물들을 밤새 절식시켰다. 제형은 2.5 및 5mg/kg(200 μ l)의 용량으로 투여하였다. 경구 투여한지 24시간 및 48 시간 후, 동물들을 해부하고 장기들을 단리시켰다.
- [0068] 소장(공장, 십이지장 및 회장), 폐, 간, 심장, 신장 및 비장인 특정 장기들을 모으고, 저온-절단(cryo-sectioning)용으로 준비하였다. 단리 후, 마우스로부터의 장기를 파라핀 포매 전에 파라포름알데히드 용액(4%)으로 고정시켰다. 파라핀 블록으로부터의 15 μ m 두께 조직을 유리 슬라이드(관찰을 수행하기 전에 진공 오븐에서 건조시킴)상에 위치시키고 분석하였다. eGFP의 발현을 관찰하기 위해 488nm 여기 필터에 의해 스캐닝하여 공초점 현미경으로 영상을 촬영하였다.
- [0069] 광학 영상화 연구를 위해, 각각 평균 체중이 25 g인 대략 6주령의 5마리의 누드 마우스를 대한 바이오링크(Dae Han Bio-link)(한국)로부터 구입하였다. 마우스를 양이온성 복합체 및 헤파린-TCA 랩핑된 조성물을 경구 투여하기 전에 24시간 동안 절식시켰다. 빛의 정량적 분석을 위해, 광자를 또한 형광(FL) 분석기(Varioskan Flash, Thermo Scientific)(미국 캘리포니아)에 의해 측정하였다. 단리된 장기들을 완충액으로 세척하고 액체 질소 중에서 즉시 냉동시켰다. 다음 날, 장기들을 해동시키고 얼음 위에서 저장하였다. 칭량 후, 모든 장기들을 얼음 위에서 0.5 mL의 리포터 용해 완충액 중에서 조직 균질화기를 사용하여 20초 동안 균질화시켰다. 이어서, 생성된 조직 균질화물을 1시간 동안 얼음 위에서 정치시켰다. 조직 용액을 20초 동안 와류시키고 이어서 10분 동안 13,000 g로 원심분리하였다. 투여한지 24시간 후, 마우스들을 해부하고 장기들을 단리시켰다. 장기들을 파라핀 블로킹(paraffin blocking)에 의해 박편화하고, eGFP의 발현을 관찰하기 위해 공초점 현미경으로 영상을 촬영하

였다. 주사 레이저 여기 및 방사 필터는 각각 488nm 및 510nm이었다.

- [0070] 마우스에서 투여 24시간 후의 eGFP pDNA의 비교 생체분포 프로파일을 관찰하기 위해 4가지 제형을 제조하고 연구하였다. 5가지 제형은 (1) 담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유하지 않는 양이온성 (bPEI/eGFP) 복합체(경구 투여); (2) 담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유하지 않는 키토산 랩핑된 음이온성 eGFP 제형(경구 투여); (3) 담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유하지 않는 헤파린 랩핑된 양이온성 (bPEI/eGFP) 복합체(경구 투여); 및 (4) 복합체/키토산, 헤파린 및 HTCA의 비가 모두 1/0.2(w/w)인, 담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유하지 않는 헤파린-TCA 랩핑된 (bPEI/eGFP) 복합체(IV 및 경구 둘 다로 투여)였다.
- [0071] 도 9는 경구 및 정맥내 투여된, 헤파린-TCA로 차폐된 eGFP-플라스미드 DNA(제형 4)의 상대적 생체분포 분석을 나타내는 막대 그래프이다. 데이터는 평균 \pm SD, n = 4를 나타낸다. 특정 장기들에 존재하는 eGFP로부터 발생한 형광의 상대량은 마우스에게 IV 투여(흰색 막대) 및 경구 투여(검은색 막대)한 후 분석하였다.
- [0072] 도 10은 헤파린-TCA로 차폐된 eGFP-플라스미드 DNA(제형 4)의 IV 투여(상단 열) 및 경구 투여(하단 열) 후, GFP 발현이 직접적으로 관찰될 때의 마우스의 상이한 장기들의 광학 영상화를 도시한다.
- [0073] 도 11은 표지된 바와 같은 4가지 제형의 투여 후 8개 장기들의 공초점 영상들을 도시한다. 영상의 첫번째 컬럼은 담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유하지 않는 양이온성 (bPEI/eGFP) 복합체(제형 1, "폴리플렉스")의 경구 투여 후의 것이며; 영상의 두번째 컬럼은 담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유하지 않는 키토산 eGFP 제형(제형 2, "키토산-pp")의 경구 투여 후의 것이며; 영상의 세번째 컬럼은 담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유하지 않는 헤파린 랩핑된 양이온성 (bPEI/eGFP) 복합체(제형 3, "헤파린-pp")의 경구 투여 후의 것이며; 영상의 네번째 컬럼은 헤파린-TCA 랩핑된 (bPEI/eGFP) 복합체(제형 4, "htca-pp (경구)")의 경구 투여 후의 것이며; 영상의 다섯번째 컬럼은 헤파린-TCA 랩핑된 (bPEI/eGFP) 복합체 (제형 4, "htca-pp(iv)")의 정맥내(IV) 투여 후의 것이다. 영상의 첫번째 열은 위 내의 형광을 도시하고, 두번째 줄은 십이지장에 대한 형광이며, 세번째 열은 공장에 대한 형광이며, 네번째 열은 회장에 대한 형광이며, 다섯번째 열은 간에 대한 형광이며, 여섯번째 열은 폐에 대한 형광이며, 일곱번째 열은 비장에 대한 형광이며, 여덟번째 줄은 신장에 대한 형광이다.
- [0074] 도 12은 도 11의 간에 대한 5가지 영상(다섯번째 열)의 확대된 보기이다. 적색 막대는 100nm에 상응한다. 도 13은 9가지 장기에서의 각 제형에 대한 상대적 형광의 그래프로서, 도 11 및 12에 도시된 영상들의 정량적 값을 제공한다.
- [0075] eGFP 발현의 증거가 직접적 영상화 또는 FL 분석(도 11의 컬럼 3)으로 거의 관찰되지 않았으므로, 영상들은 담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유하지 않는 헤파린 랩핑된 양이온성 (bPEI/eGFP) 복합체(제형 3)가 동물들로 유의적으로 흡수되지 않았음을 보여준다. 따라서, 상기 제형의 경우에 어떠한 장기에서도 eGFP 발현이 모니터링되지 않았다. 도 11은 제형 1(담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유하지 않는 양이온성 (bPEI/eGFP) 복합체)의 일부 분 및 보다 높은 양의 제형 2(담즙산 또는 담즙산 접합체를 함유하지 않는 키토산 eGFP 제형)가 위 및 소장을 통해, 특히 십이지장에서 비특이적으로 흡수되었음을 도시한다.
- [0076] 헤파린-TCA 랩핑된 (bPEI/eGFP) 복합체(제형 4)는, eGFP의 발현이 직접적 영상화 및 FL 분석 둘 다에 의해 회장에서 강력하게 관찰되었기 때문에, 회장을 통해 특이적으로 흡수되었다. 회장은 GI관의 다른 부분들보다 유의적으로 더 많은 담즙산 및 Ost 알파/베타 수송체를 함유하고, 다른 제형들과 비교해 담즙산 연결된 제형의 증가된 흡수를 나타낼 것이다.
- [0077] 헤파린-TCA 랩핑된 (bPEI/eGFP) 조성물(제형 4)의 IV 투여는 간에서 가장 높은 생체이용률 및 축적을 나타낸다. 헤파린-TCA 운반체는 상이한 장기들에서 유의적인 발현과 함께 담즙산 수송체-매개 특이적 흡수를 나타낸다.
- [0078] 정량적 및 정성적 발현 비교 데이터는 eGFP의 발현이 운반체 및 투여 경로에 따라 다르고 발현 정도가 장기마다 다르다는 것을 입증한다. 특히, 조직내 높은 수준의 녹색 강도로 나타난 바와 같이 eGFP의 최대 축적이 간에서 발견되었으므로, 헤파린-TCA 랩핑된 (bPEI/eGFP) 조성물(제형 4)의 경구 전달로부터의 결과는 회장 및 간에서 담즙산 수송체 및 Ost 알파/베타 수송체를 통해 발생하는 흡수와 일치한다.
- [0079] 마우스(C57BL6)에서의 생체내 엑센딘-4 방출. 전술한 과정에 따라서, 헤파린-TCA 랩핑된 엑센딘 4-pDNA를, 12시간 동안 절식시킨 후, 마우스에게 상이한 투여량(2.5, 5 및 10mg/kg)으로 경구 투여하였다. 제형을 제조하기 위해, 엑센딘-4를 5/1의 비로 bPEI에 첨가하고 30분 동안 항온배양하여 복합체가 형성되도록 하였다. 이어서, 상기 복합체를 1/0.2의 비로 헤파린-TCA로 랩핑시켰다. 제형을 제타 및 DLS로 특징 규명하여 각각 제타 전위 값 및 유체역학적 크기 분포를 측정하였다. 실온에서 30분 동안 항온배양한 후, 제형을 2일에 걸쳐서 동결건조시켰다. 계산된 양의 분말을 10mM HEPES 완충액(200 μ l)에 용해시키고 실온에서 30분 동안 항온배양하여 균일한 분산

액을 제조하였다. IV 투여된 마우스는 주사 전에 절식시키지 않았다. 경구 및 IV 투여한 후 12시간, 24시간 및 36시간째에 꼬리 정맥으로부터 채혈하였다. 혈중 엑센딘-4의 발현/방출을 엑센딘-4 검정 키트(엑센딘-4(Heloderma suspectum)-EIA 키트, Phoenix pharmaceuticals, INC. 미국 캘리포니아주)에 의해 분석/측정하였다.

- [0080] 마우스(C57BL6)에서의 엑센딘-4 방출. 도 14는 마우스에게 헤파린-TCA 랩핑된 엑센딘-4-pDNA 조성물을 2가지 투여량(5 및 10mg/kg의 엑센딘-4-플라스미드 DNA)으로 IV 및 경구 투여한 후 시간 경과에 따른 혈장 엑센딘-4 농도의 그래프이다. 데이터는 평균 ± SD, n = 5를 나타낸다.
- [0081] 도 14는 엑센딘 4의 방출이, 조성물의 경구 투여 및 IV 투여 둘 다에 있어, 투여된 투여된 용량에 정비례함을 도시한다. IV 투여 후의 엑센딘 4의 발현 및 방출은 초기에는 동일한 투여량을 경구 투여한 후의 엑센딘 4의 발현 및 방출보다 높다. 그러나, 투여 후 36시간째에, IV 그룹은 혈장 농도 하강을 나타낸 반면에, 경구 그룹에 대한 혈장 수준은 상승하였다. 그래프는 경구 투여 그룹에 대한 T_{max} 및 C_{max} 값을 획득하기 위해 보다 긴 관찰 시간이 필요함을 시사한다. 그러나, 10mg/kg의 IV 투여의 경우 가장 높은 농도는 24시간째에 관찰되었다(T_{max} = 약 24 hr 및 C_{max} = 약 6500 ng/mL).
- [0082] pGLP-1 제형의 투여 후 II형 당뇨병 모델에서의 글루코스 수준 모니터링. 6주령인 암컷 주커 당뇨병만(Zucker Diabetic Fatty; ZDF) 래트를 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있도록 하면서 금속 케이지에 사육하였다. ZDF 래트는 어린 연령에서 비만과 인슐린 저항성이 발생하고 노화에 따라 점차적으로 고혈당증이 발생한다. ZDF 래트의 고혈당증은 췌장 β-세포 기능의 손상, 췌장 β-세포 질량의 감소 및 인슐린 및 글루코스의 작용에 대한 간 및 간의 조직의 반응성 감소와 연관된다. ZDF 래트의 혈당 수준은 휴대용 혈당 모니터링 장치(Accu-chek, Roche Diagnostics, 스위스 바젤)에 의해 측정된 바에 의하면 >300mg/dL이었다. 래트를 두 그룹으로 나누었다: 한 그룹은 오직 유전자, 즉 유리 pGLP-1만을 함유하는 pGLP-1 유전자 제형을 투여받았고(3마리 래트), 나머지 그룹은 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 조성물 제형을 투여받았다(5마리 래트). 제형을 제조하기 위해, GLP-1 유전자를 bPEI(5/1의 N/P 비를 가짐)와 혼합하고 30분 동안 항온배양하여, 정전기적 상호작용을 통해 복합체가 형성되도록 하였다. 화합물을 HEPES 완충액에 용해시키고 실온에서 30분 동안 항온배양함으로써 복합체를 음이온성 헤파린-TCA로 랩핑하였다. 이어서, 제형을 2일에 걸쳐서 냉동 건조에 의해 동결건조시키고 경구 및 IV 전달을 위해 HEPES 완충 용액에 재분산시켰다.
- [0083] 유리 pGLP-1 유전자 제형 그룹과 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 조성물 제형 그룹 둘 다의 래트를, 각각 100μg의 유리 pGLP-1 유전자 또는 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 조성물 제형 중의 100μg의 pGLP-1 유전자를 제공하는 양의 경구 섭취 전달 전에 밤새(12시간) 절식시켰다. 계산된 양의 건조된 제형(100μg의 GLP-1 유전자에 상당함)을 경구/IV 투여 전에 100μl HEPES 완충액에 용해시키고 세포 항온배양기(37°C)에서 30분 동안 항온배양하였다.
- [0084] 상이한 연구에서, BALB/c 마우스들을 스트렙토키나제로 처리하여 이들의 췌장의 β-세포를 손상시켜 췌장에 염증을 일으켰다. 마우스를 음식과 먹이에 자유롭게 접근하도록 하면서 금속 케이지에서 사육하고 지속적으로 모니터링하였다. 마우스의 혈당 수준은 스트렙토키나제 처리 후에 2주에 걸쳐서 약 300μg/dL까지 증가하였다. 마우스를 두 그룹, 경구(7마리 마우스) 및 IV(7마리 마우스)로 나누고, 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 제형(100μg의 pGLP-1 유전자를 제공하는 양)을 경구 및 정맥내 투여하였다.
- [0085] 동물의 체중을 정기적으로 모니터링하였다. 계산된 양의 건조된 제형(100μg의 GLP-1 유전자에 상당함)을 경구/IV 투여 전에 100μl HEPES 완충액에 용해시키고 세포 항온배양기(37°C)에서 30분 동안 항온배양하였다.
- [0086] 조직화학. 21일 동안 관찰한 후, 면역조직화학 염색을 통해 GLP-1 발현을 관찰하기 위해 래트의 특정 장기들(십이지장, 공장, 회장, 신장 및 간)을 단리시켰다. 래트를 이들의 혈당 수준을 관찰한 후 해부하고, 선택된 장기들을 단리시켰다. 조직을 10% 포르말린 중에 고정시키고 파라핀에 포매시켜 조직을 15μm 두께 절편으로 절단하였다. 상기 절편을 면역 염색을 위해 간접 면역조직화학 방법에 적용시켰다. 마우스 모노클로날(8G9) 1차 항체를 GLP-1(Abacam ab26278)의 분석을 위해 사용하였고, 판매업자가 제공한 조직화학 검정 키트의 설명서에 따라서 과정을 수행하였다.
- [0087] GLP-1 발현은 공초점 현미경에 의해 직접적으로 관찰한 반면에(도 15g에서 녹색), 세포의 핵은 DAPI로 염색하였다(도 15g에서 청색). 조직을 단리시키고, 극히 일부분을 스테인레스 강 캐스케이드(stainless steel cascade)로 성형된 파라핀에 포매시켰다. 조직을 15μm 두께 절편으로 절단하고, 각각 핵 및 세포에서의 GLP-1 발현을 육안으로 관찰하기 위해 유리 슬라이드상에 포매시키고 DAPI와 Abacam ab26278 둘 다로 염색시켰다.
- [0088] 동결건조된 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 제형(100μg GLP-1 유전자에 상당하는 양)을 100μl HEPES 완충액에 용해시

키고 밤새 절식시킨 II형 당뇨병 모델 ZDF 래트에게 경구 투여하였다. 또한, 유리 GLP-1 유전자 제형을 대조 연구로서 다른 동물 그룹에게 전달하였다. 모니터링된 혈당 수준은 절식 기간 동안 약 60mg/dL으로 낮았다. 본 제형들과 GI관에서 흡수를 저해할 수 있는 음식 간의 어떠한 상호작용이라도 피하기 위해, 본 제형들을 경구 투여한 후 6시간째에 동물에게 음식을 제공하였다.

[0089] 도 15a 내지 15c는 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 제형으로 처리된 동물의 혈당 수준의 그래프이다. 도 15a에서 알 수 있는 바와 같이, 유리 GLP-1 유전자 제형으로 처리된 ZDF 래트(흰색 사각형)는 21일의 연구 기간에 걸쳐서 약 300 내지 350mg/dL의 혈당 수준을 유지하였으며, 경구 투여 당일에는 단기 저수준이었다. 대조적으로, 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 조성물 제형으로 처리된 ZDF 래트(검은색 원)는 경구 투여 후 약 100 내지 150mg/dL의 혈당 수준을 나타냈으며, 이는 21의 연구 기간 동안 유지되었다.

[0090] 도 15b는 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 조성물 제형의 투여 후 2주에 걸친 경구 투여 그룹의 각 BALB/c 마우스의 비공복 혈당 수준을 도시한다. 일반적으로, 혈당 수준은 약 100 내지 약 150mg/dL의 범위였다. 도 15c는 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 조성물 제형의 투여 후 2주에 걸친 IV 투여 그룹의 각 BALB/c 마우스의 비공복 혈당 수준을 도시한다. 일반적으로, 혈당 수준은 약 100 내지 약 150mg/dL의 범위였다.

[0091] 도 15d 내지 15e는 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 조성물 제형으로 처리된 각 BALB/c 마우스의 체중의 그래프를 도시한다. 도 15d는 경구 투여된 그룹에 대한 데이터를 도시하고, 도 15e는 IV 투여된 그룹에 대한 데이터를 도시한다.

[0092] 도 15f는 경구 그룹(검은색 원) 및 IV 그룹(흰색 원)에 대한, 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 조성물 제형의 투여 후 2주에 걸쳐 소비된 음식량의 그래프이다. 경구 그룹은 일반적으로 약 1주 후에 IV 그룹보다 더 많은 마우스당 음식을 소비하였고, IV 그룹의 음식 소비량은 약 3일째 후에 약 4 g/마우스로 비교적 일정하게 유지되었지만, 경구 그룹의 음식 소비량은 약 7일째 후까지 약 6 g/마우스로 안정화되지 않았다.

[0093] 도 15g는 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 조성물의 투여 후 다양한 래트 장기들에 존재하는 GLP-1의 양을 도시하는 일련의 영상들이다. 상기 영상들은 GLP-1 발현이 신장에서 가장 높았지만 GLP-1 발현이 DAPI로 염색된 조직의 공초점 영상에 나타난 바와 같이 십이지장, 공장, 회장 및 간에서도 관찰되었음을 도시한다.

[0094] 데이터(도 15a)는, 일단 래트들이 제형의 경구 투여 후 6시간째에 음식에 접근하면, 이들의 혈당 수준이 상승하기 시작함을 도시한다. 유리 GLP-1 제형으로 처리된 동물들의 경우, 수준은 투여 후 1일 이내에 약 60mg/dL로부터 약 300 내지 350mg/dL로 복귀되었다. 그러나, 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 제형이 투여된 래트들의 혈당 수준은 100 μ g의 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 제형의 단일 경구 투약 후 최대 21일 동안 약 100 내지 150mg/dL에서 유지되었다.

[0095] 본 결과들은 헤파린-TCA 랩핑된 GLP-1 제형으로 처리된 래트에서 유의적 혈당 저하 효과의 증거를 제공하며, 그 효과는 단일 경구 용량 투여 후 장기기간 동안 지속된다. I형 당뇨병 모델에서는, 마우스들에게 유전자의 동일한 투여량에서 헤파린-TCA 랩핑된 GLP-1 유전자 제형을 경구 및 정맥내 투여하였다. 14일의 혈당 모니터링 동안, 경구 전달 및 IV 전달은 스트렙토키나제에 의해 췌장 세포가 손상된 마우스에서 조사된 바와 유사한 혈당 수준 프로파일을 나타냈다. 혈당 모니터링의 전체적 결과는, 헤파린-TCA 랩핑된 pGLP-1 조성물의 제형이, 혈당 수준을 감소시키고 혈당 수준을 정상 혈당 범위 내에서 유지시키는 충분한 정도로 적절히 경구 흡수됨을 나타낸다. 놀랍게도, 단일 경구 투여량만이 혈당 수준을 2주 동안 정상 범위에서 유지시켰다.

[0096] 결론. 시험관내 세포독성 및 세포 형질감염 연구에서, HepG2(간세포) 및 EaHy926(상피) 세포주를 상이한 시간 간격으로 모니터링하였고, 그 데이터는 eGFP가 세포질뿐만 아니라 세포의 핵 주변에 위치함을 입증한다. 마우스에서 헤파린-TCA 랩핑된 eGFP 조성물로 실시된 경구 흡수 및 약력학적 연구는 육안으로 및 정성적으로 관찰된 간에서의 발현 증거를 나타냈다. 유전자와 양이온성 모이어티의 복합체(그러나 담즙산 코팅은 없음)은 위, 십이지장, 공장 및 기타 내부 장기들에서 장세포를 비특이적으로 형질감염시켰고, 담즙산 코팅된 복합체는 담즙산을 능동적으로 흡수하는 원위 소장 및 회장을 형질감염시켰고, 유의적 eGFP 발현은 간, 폐 및 신장에서 관찰되었다.

[0097] 헤파린-TCA 랩핑된 엑센딘-4 조성물로 처리된 마우스에서의 혈장 엑센딘-4 수준은, 5 내지 10mg 유전자/kg 투약 후, 대략 수백 ng/mL인 치료학적 엑센딘-4 수준보다 대략 10,000배 더 높았다. 치료 효능은 또한 I형 및 II형 당뇨병 모델 둘 다에서 각각 2주 및 3주 동안 헤파린-TCA 랩핑된 GLP-1 조성물을 이용하였을 때도 관찰되었다.

[0098] 요약하면, 3가지 상이한 유전자를 이용한 실험 결과는 이들의 경구 흡수 증진이라는 개념을 뒷받침한다. 주목할 만하게도, 연구된 유전자들 중 2가지는 당뇨병을 치료하기 위한 잠재적 치료제(엑센딘-4 및 GLP-1)이며 인간 질

환의 마우스 모델과 래트 모델 둘 다에서 유효성이 검사되었다. 본원에 제시된, 유전자의 경구 흡수 기작, 장기 발현 및 치료 효능에 관한 시험관내 및 생체 정량적 및 정성적 데이터 둘 다는, 담즙산 연결된 음이온성 중합체가 유전자 복합체의 안정성을 증진시킬 수 있고 소장에서 담즙산 및 Ost 알파-Ost 베타 수송체를 통한 경구 흡수를 자극할 수 있음을 뒷받침한다. 간에서의 유전자의 높은 축적 및 발현 수준도 또한, 본 조성물이 간 세포에서 과발현되는 이들 수용체와 능동적으로 결합함을 나타낸다.

- [0099] 실시예 2. 단백질 전달.
- [0100] 양이온성 입자가 그 자체가 양이온성인 치료학적 단백질로 형성될 수 있거나, 단백질이 프로타민과 같은 양이온성 중합체와 함께 복합체화될 수 있다. 예시적인 치료학적 단백질은 인슐린이다. 이어서, 양이온성 복합체는 음이온성 중합체에 공유 결합되어 있는 담즙산 또는 담즙산 접합체로부터 제조된 모이어티로 코팅될 수 있다. 이러한 모이어티의 예는 헤파린-TCA이다. 생성된 치료학적 조성물은 약 10nm 내지 약 10 μ m의 크기를 가질 것으로 예상될 수 있다. 수득된 조성물은 음이온성일 수 있으며, 혈당 수준을 감소시키기 위해 동물 또는 인간 피험자에게 경구 투여될 수 있다.
- [0101] 실시예 3. 소분자 전달을 위한 담즙산 및 담즙산 접합체.
- [0102] 낮은 경구 생체이용율을 야기하는 약물의 불량한 장 투과성으로 인해 독소루비신(DOX)을 포함하는 많은 약물의 경구 투여는 도전과제이다. 약물의 경구 제형은 위장(GI)관 내에서의 약물의 용해도, 안정성, 용해율 및 투과성을 고려하며, 이것들 모두는 약물의 경구 생체이용율에 영향을 미친다. 이들 약물의 경구 투여형은 GI관에서의 반감기 및 대사작용을 저하시키고 경구 생체이용율을 최대화하기 위해 신속한 용해율과 높은 흡수율을 가져야 한다. 약물, 특히 항암 약물의 효능을 향상시키기 위해, 경구 제형은 GI관 벽의 상피 내벽(epithelial lining)을 통한 이의 흡수에서 장벽을 극복해야 한다.
- [0103] DOX는 림프종, 육종, 유방암, 난소암 및 폐암의 치료용으로 널리 사용되어 온 항암 약물이다. DOX는 DNA의 염기에 층간삽입(intercalating)함으로써 DNA를 손상시키고, 이는 토포이소머라제 II 효소 활성을 저해하고 DNA 전사에 간섭한다. DOX는 양호한 용해도를 갖지만 불량한 투과성 및 낮은 경구 생체이용율(약 5%)을 갖는 BCS 분류 III의 약물이다. 그러나, DOX 사용에 대한 중요한 임상적 제한은 산화적 스트레스 발생에 기인하는 심장독성, 및 신장독성, 골수억제 및 다제내성의 발생을 포함하는 기타 부작용 - 모두 협소한 치료 범위를 초래한다 - 때문이다. 따라서, 불량한 장 투과성 및 경구 생체이용율을 향상시키기 위해 신규한 제형 전략이 요구된다.
- [0104] 간에서 분비된 담즙산이 장 상피세포를 통해 말단 회장으로 재흡수되고 간문맥을 경유하여 다시 간으로 수송되기 때문에, 담즙산 수송체는 약물 전달을 위한 잠재적 표적이다. 높은 담즙산 재순환비는 담즙산의 장관순환이 매우 효율적인 과정이 되도록 만들며, 간 및 말단 회장에서 주로 발현되는 담즙산 수송체에게 유익하다. 타우로콜산(TCA)은 풍부한 담즙산이며 인간 장액에 대략 45%로 존재한다.
- [0105] TCA는 음이온성 중합체에 공유 부착시킴으로써 약물 운반체로서 사용할 수 있으며, 이어서 경구 투여를 통해 전달할 수 있다. 상기 음이온성 중합체의 표면에 존재하는 TCA는 소장 내의 담즙산 수송체와 상호작용하여 약물의 장 투과성뿐만 아니라 약물의 생체이용율을 향상시킬 수 있다. DOX의 경우, 이의 친수성 양이온성 특성은 이것이 주로 세포사이 경로(paracellular pathway)를 통해 장 상피세포를 횡단할 수 있도록 한다. 그러나, DOX 표면상의 TCA 코팅은 말단 회장에 주로 존재하는 Na⁺-의존적 정단 나트륨 담즙산 수송체(ASBT)를 통한 장내 세포횡단 흡수(transcellular absorption)를 최대화하여, 말단 회장에서 문맥으로의 DOX 수송을 촉진하고 DOX를 재순환으로 도입시킬 수 있다.
- [0106] 본원에서는, 헤파린(H) 및 콘드로이틴 설페이트(CS)가 생체적합성, 수용해도 및 생분해성이 높기 때문에, 예시적 음이온성 중합체 골격으로서 선택되었다. 이들 폴리사카라이드는 다량의 생체적합성을 제공하는 천연 중합체이다. H-TCA 및 CS-TCA는 DOX의 표면을 코팅시킬 수 있으며 위장(GI)관 내에서 이의 안정성을 증가시킬 수 있으며 GI 환경으로부터 DOX를 보호할 수 있다. 또한, H-TCA 및 CS-TCA는 DOX와 함께 복합체화되어 마이크론 크기의 입자보다 더 효율적으로 흡수될 수 있는 소형 입자를 형성할 수 있다. 본원에 개시된 입자는 약 10nm 내지 약 10 μ m의 범위이다. 이러한 제형 전략은 비특이적으로 흡수되는 양을 감소시키고 특이적 장내 흡수를 향상시켜, DOX의 생체이용율을 향상시킬 수 있다. 또한, 장관순환을 통한 효율적 TCA 재순환은 간 암종을 표적으로 하는 항암 화학요법에 유익할 수 있다.
- [0107] 재료. 독소루비신 하이드로클로라이드, 전단된 연어 정자 DNA(Trevigen, 메릴랜드), 디메틸 설펝사이드(DMSO), 4-(2-하이드록시-에틸)-1-피페라진(HEPES), 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT), D-글루코스, 중탄산나트륨, 재조합 인간 인슐린, 헥스트(Hoechst) 33342, RPMI 1640 배지 둘베코 포스페이티브 완

충 염수(Dulbecco's phosphate buffered saline; DPBS), 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified eagle's medium; DMEM), 카보다이미드(EDC), N-하이드록시석신이미드(NHS)는 판매처로부터 구입하였으며, 달리 주지되지 않는 한, 받은 그대로 사용하였다.

- [0108] DOX-로딩된 입자의 제조 및 특징 규명. DOX와 같은 생체이용율이 불량한 약물의 투과성 증가 가능성을 평가하기 위해, 담즙산 또는 담즙산 집합체(본원에서는 타우로콜산 또는 TCA)를 음이온성 중합체(본원에서는 폴리스카라이드 헤파린 및 콘드로이틴 설페이트가 연구된다)에 부착시켜 경구 전달에 적합한 조성물을 제공한다.
- [0109] 1 mol의 TCA 나트륨 염을 0°C에서 DMF에 용해시킨 다음, 6 mol의 트리에틸아민 및 5 mol의 4-니트로페닐 클로로포르메이트(NPC)를 첨가하여, 헤파린-결합된 타우로콜산(H-TCA)을 제조하였다. 이어서, 상기 용액을 에탄올 및 DI 물로 3회 추출하였다. 회전 증발기를 사용하여 유기 용매를 제거하고, 샘플을 냉동-건조시켜 TCA-NPC를 수득하였다. 1 mol의 TCA-NPC를 2 mol의 4-메틸모르폴린을 이용하여 DMF에 용해시키고, 100 mol의 에틸렌 디아민을 적가하고, 생성물을 건조시켜 TCA-NH₂를 수득하였다.
- [0110] TCA를 헤파린(H) 또는 콘드로이틴 설페이트(CS)에 부착시키기 위해, 1 mol의 폴리스카라이드를 DI 물에 용해시키고, EDC(5 mol) 및 NHS(5 mol)를 용액에 첨가하고 RT에서 12시간 동안 교반하였다. 동일한 몰비의 TCA-NH₂를 헤파린 및 콘드로이틴 설페이트 각각에 첨가하여 동일한 커플링 양의 TCA를 수득하였고, 몰비는 1:4(1 mol의 폴리스카라이드 대 4 mol의 TCA)였다. 1일 후, 용액을 MWCO 1000 투석 막 내에 위치시키고 물에 대해 투석시켰다. 최종 생성물을 동결건조시키고 D₂O에서의 이의 ¹H-NMR 스펙트럼으로 확인하였다.
- [0111] 도 16a는 TCA-NH₂와의 반응 전의 콘드로이틴 설페이트의 양성자 NMR 스펙트럼을 도시한다. 도 16b는 투석 후 TCA-NH₂와의 콘드로이틴 설페이트 커플링으로부터의 생성물의 양성자 스펙트럼을 도시하며, 이는 공유 결합을 확인시켜 준다.
- [0112] DOX-로딩된 입자의 형성 및 재구성. DOX-로딩된 입자를 양이온성 DOX와 음이온성 TCA 복합체 CS-TCA 및 H-TCA의 정전기적 커플링을 통해 형성시켰다. DOX는 경구 투여를 위해 정전기적 상호작용을 통해 CS-TCA 또는 H-TCA로 코팅시켰다.
- [0113] CS-TCA를 1:2 비(w/w)로 DOX와 직접 혼합하였다. 용액을 볼텍스(vortex)를 사용하여 혼합하고 20 진폭에서 10초 동안 초음파처리 한 다음, RT에서 30분 동안 항온배양하였다.
- [0114] H-TCA 복합체의 경우, DOX를 먼저 전단된 연어 정자 DNA와 혼합하여, DNA/DOX 복합체의 표면상에 음의 표면 전하를 수득하였다. 이어서, DOX/DNA 복합체를 ε-폴리-L-라이신(ε-PLL)과 혼합하여, 양으로 하전된 표면을 갖는 복합체를 수득하였다. 따라서, 전단된 DNA를 사용하여 DOX와 연합시켜 음이온성 DNA/약물("DD") 복합체를 형성시키고, 이어서 ε-PLL을 사용하여 DNA/약물 복합체를 코팅시켜 양이온성 표면을 갖는 DNA/약물/중합체 복합체("DDP")를 수득하였다. 마지막으로, H-TCA를 사용하여 양이온성 DDP 복합체를 코팅시켜 최종 치료학적 조성물을 수득하였다.
- [0115] 특정 실시형태에서, 소분자 치료제는 그 자체로 양이온성일 수 있고, 따라서 코어 복합체를 형성시키기 위해 기타 성분들(DNA 및/또는 폴리-라이신)을 첨가할 필요가 없을 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 코어 복합체는 양이온성 소분자 치료제를 포함한다.
- [0116] 각각의 제조를 위해, 용액을 볼텍스를 사용하여 혼합하고 20 진폭에서 10초 동안 초음파처리 한 다음, RT에서 30분 동안 항온배양하였다. H-TCA로 코팅된 DDP의 최종 제형을 2.8:2.4의 DDP 대 H-TCA 비로 제조하였다. DDP/H-TCA 조성물의 경우, DOX:DNA 비는 1:1이었고, (DOX/DNA) 모이어티:ε-PLL 비는 2:0.8이었고, DDP:H-TCA 비는 2.8:2.4이었으며, 모든 비는 중량을 기준으로 계산하였다(w/w).
- [0117] 약물 대 담즙산-중합체의 비가 상이한 2가지 DOX 제형을 제조하였다; 1:2 w/w 비의 DOX/CS-TCA 및 2.8:2.4의 w/w 비의 DDP/H-TCA.
- [0118] 최종 조성물은 입자를 형성하였으며, 이를 추가로 평가하였다. 구체적으로는, DOX 입자의 입자 크기 및 표면 전하를 HEPES 완충액(20mM, pH 7.4)으로 희석시켜 평가한 다음, 입자의 수력학적 입자 크기 및 제타 전위를 실온(25°C)에서 677nm의 파장 및 90°의 정각(constant angle)에서 제타사이저(Zetasizer) 3000 (Malvern Instruments, 영국)을 사용하여 동적 광 산란(DLS)에 의해 모니터링하였다.
- [0119] 샘플을 냉동건조시킨 후, 입자를 DI 물에 재구성시키고, 샘플을 DLS 측정 직전에 20 진폭에서 약 10초 동안 초

음과 처리하였다. 동결건조된 분말을 사용할 때까지 -20℃에서 저장하였다.

- [0120] 양이온성 DOX와 음이온성 TCA 복합체 간의 정전기적 상호작용의 분석은 DOX-TCA 입자가 형성되었음을 시사한다. 도 17은 갓 제조되고 재구성된 DOX-TCA 입자의 입자 크기 및 제타 전위의 그래프이다. 데이터는 평균 \pm SD, n = 10로서 제시한다.
- [0121] 실온 항온배양 전에, 입자를 20 진폭에서 10초 동안 초음파 처리하였고, 좁은 다분산도 지수(PDI)를 갖는 입자 크기의 감소가 관찰되었다. 초음파 처리는 용액 중에서 고력으로 충격파를 생성시키는 음향 공동화를 유도한다. 그 결과, 입자들은 서로 충돌하며 응집물은 분해되며, 이는 입자 크기 및 PDI의 전체적 감소를 초래한다.
- [0122] 도 17에 도시된 바와 같이, 새로운 DOX/CS-TCA 및 DDP/H-TCA 입자의 수력학적 직경은 각각 약 200nm 및 약 230nm이었다. DDP/H-TCA의 경우, 담즙산-랩핑된 복합체 내의 성분들의 다수 층이 크기를 증가시켰다. 새로운 DOX/CS-TCA 입자의 제타 전위는 -42.7 mV였고, 새로운 DDP/H-TCA 입자의 제타 전위는 -30.2 mV였다. 이들은 폴리사카라이드 골격 내의 카복실 그룹의 존재 때문에 둘 다 음으로 하전되었다.
- [0123] DOX-로딩된 입자의 직경은 냉동건조 전의 샘플의 직경과 비교해 재구성 후에 다소 증가되었다. 재구성 후의 DOX-로딩된 입자는 DOX/CS-TCA의 경우 대략 201nm의 입자 크기 및 DDP/H-TCA의 경우 대략 312nm의 입자 크기를 나타냈지만, 이들의 제타 전위의 유의적 변화는 없었다.
- [0124] DDP 복합체의 H-TCA 코팅은 넓은 다분산도 지수(PDI)를 갖는 비교적 큰 입자 크기를 산출한 것으로 밝혀졌다. 반대로, CS-TCA의 단일 코팅은 제조된 1:2(w/w) 비에서 좁은 PDI를 갖는 보다 작은 입자 크기를 산출하였다. DOX/CS-TCA 및 DDP/H-TCA 입자들은 냉동건조 후 탈이온수로 재구성될 수 있었고, 일반적으로 이들의 크기 및 제타 전위를 유지하였다.
- [0125] DOX 캡슐화의 스펙트럼 측정. 자외선-가시선(UV-Vis) 분광분석법(SpectraMax, 미국)을 사용하여 DOX-로딩된 입자의 흡광도 변화를 유리 DOX와 비교하여 모니터링하였다. DOX의 샘플(0.1 mL 샘플, 샘플당 DOX 25 μ g)을 제조하고 0.9 mL DI 물에 희석시켜 1.0 mL의 총 용적을 제공하였고 석영 큐벳에 로딩하였다. 유리 DOX의 UV-vis 흡수 스펙트럼은 232 및 490nm에서 피크를 나타냈고, DOX-로딩된 담즙산 입자의 스펙트럼을 유리 DOX 대조 샘플의 스펙트럼과 비교하였다.
- [0126] 도 18a 및 18b는 이들 샘플의 UV-Vis 스펙트럼을 도시한다. 도 18a는 유리 DOX(실선), DOX/DNA(점선), DOX/DNA/ ϵ -PLL(점선-파선) 및 DDP/HTCA 조성물(파선)의 스펙트럼을 도시한다. 도 18b는 유리 DOX(실선) 및 DOX/CS-TCA 조성물(파선)의 스펙트럼을 도시한다.
- [0127] 도 18a에서 알 수 있는 바와 같이, 어떠한 운반체도 없는 DOX는 232nm 및 490nm에서 2개의 주요 피크를 나타냈다. DOX가 TCA-연결된 폴리사카라이드 헤파린 및 콘드로이틴 설페이트와 커플링된 경우, UV-Vis 스펙트럼에서 이들 피크의 유의적 감소가 있었다. DDP/H-TCA 샘플 및 DOX/CS-TCA 샘플 둘 다는 CS-TCA 입자의 단일 코팅 또는 H-TCA 입자의 다중 코팅 후에 2개의 DOX 피크의 완전한 부재를 나타냈으며, 이는 DOX와 TCA 연결된 폴리사카라이드 간의 상호작용을 시사한다. 스펙트럼의 변화는 또한 두 제형 모두에서 DOX의 로딩이 성공적이었음을 시사한다. 입자 내에서, DOX는 높은 로딩 효율로 캡슐화될 수 있다.
- [0128] 이들 DOX-함유 제형이 장기간 저장 후에 이들의 특성을 보유할 수 있는지 여부를 측정하기 위해, 이들 DOX-함유 제형의 장기 저장 가능성을 평가하였다. DOX/CS-TCA 및 DDP/H-TCA 조성물의 입자 크기를 도 19a에 도시된 바와 같이 7일의 기간에 걸쳐서 측정하였다.
- [0129] 도시된 바와 같이, 7일간 저장 후, DOX/CS-TCA 제형은 단지 크기가 약간 변화하였을 뿐 약 190nm의 입자 직경을 유지하면서 일반적으로 안정하게 유지되었다. DDP/H-TCA의 경우, 입자 크기는 시간 경과에 따라 약 270nm에서 약 340nm로 약간 증가하였다. 이러한 입자 크기의 점진적 증가는, 다중 코팅이 단일 코팅에 비해서 불안정할 수 있고, 따라서 CS-TCA 입자의 단일 코팅이 다중 DDP/H-TCA 입자보다 우수한 입자 크기와 관련된 안정성을 제공할 수 있음을 제시하였다.
- [0130] 시험관내 안정성 연구. DOX-로딩된 입자의 안정성을 0.1M Tris HCl 완충액 중에서 3가지 상이한 pH 값(pH 1.5, 5, 및 7)에서 시험하였다. 상기 입자의 평균 직경을 도 19b(평균 \pm SD, n = 3)에 도시된 바와 같이, 최대 7일 동안 매일 동적 광 산란에 의해 모니터링하였다.
- [0131] 1.5의 산성 pH에서, 두 폴리사카라이드 조성물 모두의 입자 크기는 보다 높은 pH 값에서의 입자 크기와 비교해 감소하였으며, 감소치는 DOX-CS-TCA 입자의 경우보다 DDP/H-TCA 입자의 경우에 더 컸다. DOX는 약 7.2 내지 8.0의 pKa를 갖고, 이로써 이는 아미노 그룹의 양성자화에 의해 pH 7.4에서 부분적으로 이온화된다. 따라서, DOX는

더 낮은 pH에서 보다 잘 양성자화되고, 그 결과 DOX와 음이온성 CS-TCA 및 짧은 DNA 조각 간에 보다 강력한 정전기적 상호작용이 확립될 수 있고, 이는 입자 크기의 감소에 기여할 수 있다. 낮은 pH에서의 더 작은 입자 크기는 또한 DOX-로딩된 입자가 위 내 pH 값에서 안정하고 이는 DOX를 분해로부터 보호할 수 있음을 제시한다. pH 1.5에서의 약 200nm부터 pH 7에서의 약 220nm에 이르는, 상이한 pH 값에서의 DOX/CS-TCA 입자에 대한 작은 크기 차이는, 단일 코팅을 갖는 입자가 DDP/H-TCA 입자와 비교하여 일반적으로 보다 안정하고 시험된 광범위한 pH 값에 걸쳐서 유사한 크기를 유지함을 시사하였다. DDP/H-TCA 입자는 pH가 증가함에 따라 다소 커졌으며, 크기가 pH 1.5에서의 약 260nm의 크기부터 pH 7에서의 약 300nm에 이른다.

[0132] DOX 로딩 및 캡슐화 연구. 각 제형의 약물 로딩량 및 로딩 효율을 490nm에서 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 사용하여 측정하고 표준화된 곡선으로부터 계산하였다. 입자로부터의 DOX 방출을 투석 방법을 사용하여 pH 7.4 및 pH 5 포스페이트 완충액(PBS) 중에서 검사하였다.

[0133] 각각의 pH에 대해, 1ml의 DOX/CS-TCA 입자 또는 DDP/H-TCA 입자 (샘플 당 250µg의 DOX)를 제조하고 투석 막에 로딩(MWCO 3500 g/mol)하였다. 투석 백(dialysis bag)을 20 mL의 완충액 중에 위치시키고, 상기 완충액을 37 °C에서 130 rpm으로 교반하였다. 미리 결정된 시점에서, 1 mL의 외부 완충액을 제거하고, 동일한 용적의 새로운 완충액을 첨가하였다.

[0134] 외부 완충액에 샘플에 존재하는 DOX의 양은 방출된 DOX를 나타냈고, 그 양은 490nm에서의 샘플의 흡광도를 측정하고 수치를 표준 보정 곡선과 비교함으로써 계산하였다. 이어서, 약물 로딩 및 효율의 퍼센트를 하기 수식을 사용하여 계산하였다.

[0135]
$$\text{약물 로딩}(\%) = \frac{\text{나노입자내 DOX의 중량}}{\text{나노입자의 중량}} \times 100$$

[0136]
$$\text{약물 효율}(\%) = \frac{\text{나노입자에 존재하는 DOX의 중량}}{\text{사용된 DOX의 중량}} \times 100$$

[0137] DOX/CS-TCA 및 DDP/H-TCA의 로딩 효율은 각각 약 61.6% 및 약 77.8%인 것으로 계산되었다. DOX/CS-TCA 및 DDP/H-TCA의 로딩 함량은 각각 약 30.8% 및 약 18.5%인 것으로 측정되었다. DDP/H-TCA 제형에 존재하는 다수의 층들은 DOX/CS-TCA 제형과 비교해 보다 높은 약물 로딩 능력 및 보다 높은 로딩 효율을 제공하는 것으로 보인다. 그러나, 두 제형 모두에서 약물의 높은 로딩 수준 및 높은 로딩 효율이 달성되었다.

[0138] 2가지 입자 제형으로부터의 약물 방출 데이터는 도 20a 및 20b에 도시되어 있다. 상기 데이터는 평균 ± SD, n = 3으로서 제시한다. 도 20a는 DOX/CS-TCA 제형(사각형 기호를 갖는 상단 선) 및 DDP/H-TCA 제형(원형 기호를 갖는 하단 선)에 대한 시간 경과에 따른 pH 7.4에서의 DOX 방출 데이터이다. 도 20b는 DOX/CS-TCA 제형(사각형 기호를 갖는 상단 선) 및 DDP/H-TCA 제형(원형 기호를 갖는 하단 선)에 대한 시간 경과에 따른 pH 5에서의 DOX 방출 데이터이다.

[0139] 데이터는, 24시간 이내의 비교적 신속한 DOX 방출이 pH 7.4에서의 DOX/CS-TCA 제형에서 나타났으며 그 시간에 약물의 대략 75%가 방출되었음을 시사한다. DDP/H-TCA 제형들로부터의 DOX 방출은 더 느렸으며, 48시간째에 DOX의 대략 50%가 방출되었다. 이는 단일 코팅이 입자로부터의 보다 신속한 약물 방출을 유도할 수 있음을 시사한다. 다층 DDP/H-TCA 입자는, 이것이 DOX/CS-TCA 단일 코팅된 입자의 방출속도와 비교해 보다 느린 방출속도를 나타냈기 때문에, 마치 DOX 방출을 지연시킬 수 있는 확산 장벽을 함유하는 것처럼 작용할 수 있다. DOX/CS-TCA의 방출 프로파일은 DOX/CS-TCA가 DDP/H-TCA 조성물보다 신속하게 DOX를 방출하였음을 시사하였다.

[0140] pH 5에서, 제형으로부터 DOX의 방출속도는 pH 7에서의 방출속도와 비교해 지연되었다. pH 5에서, DOX/CS-TCA 제형은 48시간째에 대략 65%의 DOX 방출을 나타냈고, DDP/H-TCA는 48시간째에 DOX의 약 40%를 방출하였다. 이러한 관찰은 산성 환경에서 DOX 내의 다우노사민 그룹의 고도의 양성자화 때문일 수 있다. 따라서, DOX-로딩된 제형은 pH 5(엔도리소좀(endolysosome)의 pH에 상응한다)에서 보다 느린 방출 및 DOX의 보다 높은 양성자화를 나타낼 수 있지만, pH 7.4에서는 가속화된 DOX 방출을 나타낼 수 있다. pH가 7.4일 때 핵은 DOX의 표적 부위이기 때문에, DOX는 핵 내에서 보다 신속하게 방출되고 핵 내의 DNA에 중간삽입할 수 있게 된다. 이러한 조사결과들은 DOX-로딩된 제형으로부터의 DOX 방출이 부분적으로 pH-제어됨을 시사한다.

[0141] DOX-로딩된 입자의 시험관내 세포독성. 중합체 및 DOX-로딩된 입자의 세포독성을 평가하기 위해, 샘플을 용량-의존적 방식으로 형질감염시키고 HepG2 세포를 사용하는 MTT-기반 세포 생존성 검정에 의해 평가하였다. 세포 배양: HepG2 세포(인간 간암 세포주)를 10% FBS 및 D-글루코스(4.5 g/L)가 보충된 DMEM에서 배양하였다. 세포를

37°C에서 5% CO₂를 함유하는 가습된 공기 하에 성장 및 유지시켰다. 세포 생존성: MTT 검정을 사용하여 담즙산-연결된 중합체 및 DOX-로딩된 입자의 세포 생존성을 평가하였다. HepG2 세포를 100μl 배지 중에서 5×10³ 개 세포/웰의 세포 밀도로 96웰 플레이트에 접종시켰다. 24시간 후, 상이한 농도 범위(0.01 내지 100μg/mL)의 DOX 및 DOX-로딩된 제형을 추가로 24시간 동안 상기 세포들에 노출시켰다. 이어서, MTT(10μl; 5mg/mL) 용액을 상기 웰에 첨가하고 4시간 동안 항온배양하였다. 모든 나머지 배지를 흡입시키고, DMSO(100μl)를 첨가하여, 37°C에서 10분 동안 항온배양하여 살아있는 세포들로부터 생성된 포르마잔 결정을 용해시켰다. 세포의 흡광도를 570nm에서 측정하고, 이들의 세포 생존성을 계산하였다.

[0142] 도 21은 H-TCA 복합체(상단 선, 사각형 기호) 및 CS-TCA 복합체(하단 선, 원형 기호)에 노출된 후의 HepG2 세포 생존성을 도시한다. 데이터는 평균 ± SD, n = 6으로서 제시한다. 이들 샘플에는 DOX가 존재하지 않았다. 담즙산-연결된 중합체의 MTT 검정은, 세포를 CS-TCA 또는 H-TCA와 항온배양한 후에 본래 세포 생존성의 약 90% 및 60%가 각각 0.01μg/mL 및 100μg/mL 농도에서 유지되었음을 보여주었다. 이것은 이들 중합체의 무시해도 될 정도의 세포독성을 시사하였다.

[0143] 유리 DOX, DOX/CS-TCA 입자 및 DDP/H-TCA 입자의 세포 생존성을 또한 24시간, 48시간 및 72시간의 항온배양 후 HepG2 세포에서 조사하였다. 그 결과는 도 22a 내지 22c에 도시되어 있다. 데이터는 평균 ± SD, n = 6으로서 제시한다. 도 22a는 24시간, 48시간 및 72시간 후 5가지 농도(0.01, 0.1, 1, 10 및 100 ug/mL)에서의 유리 DOX에 대한 세포 생존성을 도시한다. 도 22b도 또한 24시간, 48시간 및 72시간 후 동일한 5가지 농도에서의 DOX/CS-TCA 제형에 대한 세포 생존성을 도시한다. 도 22c도 또한 24시간, 48시간 및 72시간 후 동일한 5가지 농도에서의 DDP/H-TCA 다층 제형에 대한 세포 생존성을 도시한다.

[0144] 데이터는 유리 DOX가 아마도 세포에 대해 보다 독성인 DOX의 양이온성 특성으로 인해 가장 높은 용량-의존적 세포독성을 나타냈음을 시사한다. DOX/CS-TCA 제형 및 DDP/H-TCA 제형의 경우, DOX-로딩된 입자는 유리 DOX와 비교해 보다 낮은 독성을 나타냈고, DOX/CS-TCA 제형은 DDP/H-TCA 제형보다 다소 낮은 독성을 나타냈다. CS-TCA 또는 H-TCA 음이온성 중합체 코팅은 DOX에 의해 유도되는 세포독성을 향상시켰고(즉, 세포 생존성을 증가시켰고), 따라서 DOX-로딩된 제형으로부터 보다 낮은 세포 독성이 관찰되었다. 그러나, 다층의 코팅된 DDP/H-TCA 복합체는 단일-코팅된 DOX/CS-TCA 제형보다 다소 높은 독성을 나타냈다. 이러한 결과들은 DOX를 코팅하고 있는 최대 3가지의 상이한 중합체들의 존재 때문일 수 있다.

[0145] 종양 보유 동물 모델에서의 생체내 효능. 유리 DOX 및 DDP/H-TCA 조성물의 생체내 항암 효능을 HepG2 이종이식 마우스 모델에서 평가하였다. 경구 투여 및 정맥내 투여 둘 다를 통해 전달되는 유리 DOX로 처리된 동물들을 대조군으로서 사용하였고, DDP/H-TCA 조성물을 최대 18일 동안 매 3일마다 4mg DOX/kg의 투여량으로 경구 투여하였다.

[0146] 100μl PBS 중의 HepG2 세포(5×10⁶ 개 세포/mL)를 각 마우스의 등에 피하 주사하였다. 종양 크기가 대략 100 내지 150 mm³에 도달하였을 때, 각 마우스에게 PBS, 4mg/kg DOX 또는 DDP/H-TCA 조성물 중의 4mg/kg DOX를 매 3일마다 1회 경구 투여하였다. 또한, 동량의 독소루비신을 대조 그룹에서 정맥내(IV) 투여하였다. 종양을 매 3일마다 디지털 캘리퍼(digital caliper)를 사용하여 측정하고, 종양 체적을 하기 제시된 수식을 사용하여 계산하였다.

[0147]
$$\text{종양체적} = \text{길이} \times \frac{\text{폭}^2}{2}$$

[0148] 비교적 높은 농도를 달성하기 위해, DDP/H-TCA 입자의 동결건조된 분말을 생체내 투여 직전에 DI 물에 재구성하였다. 먼저, 담즙산-코딩된 DOX-로딩된 입자의 종양 성장 억제 효능을 마우스 이종이식 모델에서 조사하였다. 4mg/kg의 투여량의 독소루비신(DOX), 또는 DDP/H-TCA 입자로서 제형화된 동량의 DOX를 제조하고, 최대 18일 동안 매 3일마다 IV 또는 경구 투여를 통해 전달하여, 종양 진행을 모니터링하였다. TCA의 종양 저해 효능을 평가하기 위해, 담즙산이 없는(즉, TCA가 없는) DOX-로딩된 입자도 또한 비-표적화된 대조 제형으로서 시험하였다. PBS 대조 그룹의 종양은 매우 공격적이었고 대략 18일째에 동물 체중의 10%를 초과하였기 때문에, 18일째에 모든 처리를 종료하고 모든 마우스를 희생시켰다.

[0149] 통계학적 분석. 스튜던트 t-검정(Student's t-test)을 사용하여 두 그룹을 비교하고, 1원 ANOVA와 본페로니 사후 분석(bonferroni post-hoc analysis)를 사용하여 3개 이상의 그룹을 비교하였고, 이때 p < 0.05를 통계학적

으로 유의적인 것으로 고려하였다.

- [0150] 도 23a 내지 23c는 제형들의 항종양 효능을 도시한다. 모든 처리 그룹은 시간 경과에 따라 종양 체적의 증가를 나타냈다. 그러나, 처리를 위해 사용된 제형에 따라서 전체 종양 체적 변화 및 종양 성장속도의 유의적 차이가 있었다. 데이터는 평균 \pm SEM, n = 3으로서 제시한다.
- [0151] 도 23a는 연구에서 사용된 7가지 제형에 대한 시간 경과에 따른 마우스에서의 종양 체적의 변화%를 도시한다; PBS 대조군; IV 투여된 유리 DOX; 경구 투여된 유리 DOX; DDP/헤파린 복합체(담즙산 없음); DOX/콘드로이틴 설페이트 복합체(담즙산 없음); 및 2가지 담즙산 랩핑된 DOX 조성물(DDP/H-TCA 및 DOX/CS-TCA).
- [0152] 도 23a에 도시된 바와 같이, 유리 DOX IV 그룹(역삼각형을 갖는 파선)에서 종양 체적은 종양 성장의 가장 큰 저해를 나타냈다. 그러나, 다른 경구 대조군의 종양 성장 억제와 비교해 보다 큰 양의 종양 성장 억제는 담즙산-랩핑된 DOX 입자(사각형을 갖는 점선 및 표식이 있는 다이아몬드를 갖는 긴 파선)로 처리된 마우스에서 관찰되었다. 담즙산-랩핑된 DOX 그룹의 종양 체적은 유리 경구 DOX가 투여된 마우스(검은색 다이아몬드를 갖는 긴 파선)의 종양 체적보다 유의적으로 더 작았다($p < 0.05$). 유리 경구 DOX 그룹의 종양은 체적이 거의 1400% 증가된 반면에, DDP/H-TCA 그룹 및 DOX/CS-TCA 그룹의 종양은 각각 체적의 400% 및 600% 증가만을 나타냈다. DOX/CS-TCA 그룹의 종양은 DDP/H-TCA 그룹의 종양보다 약간 더 큰 종양 체적 증가를 나타냈으며, 이러한 결과는 DDP/H-TCA 복합체와 비교해 DOX/CS-TCA 복합체로부터의 보다 신속한 DOX 방출에 의해 야기될 수 있다. 반대로, 비-담즙산 DOX-폴리사카라이드 복합체로 처리된 종양(삼각형을 갖는 짧은 점선 및 원형을 갖는 점선-파선)은 종양 성장의 유의적 저해가 없었으며 일반적으로 유리 경구 DOX 그룹과 비교해 종양 성장 속도의 현저한 변화를 나타내지 않았다. 유리 DOX 경구 그룹과 비-TCA 그룹 간에 종양 체적의 유의차는 없었다.
- [0153] 도 23b는 처리된 마우스에서 종양 부하(tumor burden)의 변화%를 도시한다. 별표(*) 값(가장 우측 막대의 a 및 b)으로 표시된 변화는 경구 유리 DOX와 비교해 $p < 0.05$ 를 갖는다. 2가지 담즙산 랩핑된 DOX 조성물(즉, DDP/H-TCA 표지된 막대 및 DOX/CS-TCA 표지된 막대)은 비-TCA DOX 복합체(즉, DDP/H 표지된 막대 및 DOX/CS 표지된 막대)로 처리된 마우스와 비교해 종양 성장 감소에서 보다 효과적이었다. 2개의 담즙산 랩핑된 DOX 그룹들에서 나타난 종양 퇴행은 HepG2 이종이식 암 모델에서 2가지 담즙산 랩핑된 DOX 제형들에 대한 강력한 항종양 효과를 제시한다. 18일째에 측정된 종양 부하는, 도 23b에 도시된 바와 같이, 유리 경구 DOX 그룹에서의 종양 부하와 비교해 DOX-TCA 입자가 투여된 동물 그룹에서의 종양 부하의 상당한 감소를 나타냈다.
- [0154] 처리로부터 유도된 독성을 평가하기 위해 처리 전반에 걸쳐서 마우스의 체중을 또한 측정하였다. 이러한 데이터는 시간 경과에 따른 처리 그룹의 상대적 체중 백분율의 그래프인 도 23c에 도시되어 있다.
- [0155] 도 23c에서 볼 수 있는 바와 같이, PBS 및 2개의 DOX 대조 그룹뿐만 아니라 비-TCA 처리된 그룹(즉, DDP/H 그룹 및 DOX/CS 그룹)은 처리 초반에 유의적 체중 감소를 나타내지 않았고, 마우스의 적은 체중 증가가 시간 경과에 따라 관찰되었는데, 이는 처리로 인한 심각한 독성이 없음을 시사하였다. 그러나, DDP/H-TCA 그룹의 동물들에서 약간의 체중 손실이 나타났지만, 느린 체중 증가가 연구가 종료될 무렵에 관찰되었다.
- [0156] 생체분포. 생체분포 연구는 HepG2 종양-보유 NOD/SCID 마우스에서 수행하였다. 주요 장기들 및 각 마우스의 장관을 제형들을 투여한 후 4시간째에 수거하였다. 각 마우스의 간, 신장, 심장, 위, 십이지장, 공장 회장을 포함한 소장 및 종양을 수거하고 0.3N HCl을 이용하여 70% 에탄올에 현탁시켰다. 이어서, 샘플을 균질화하여 독소루비신을 추출한 다음, 샘플을 24시간 동안 냉장시키고 원심분리하여 상청액을 수거하였다. 분석을 위해, 200 μ l의 상청액을 검은색의 불투명한 플레이트에 로딩하고, DOX 형광을 플레이트 리더를 사용하여 측정하였으며, 여기서 여기 파장 및 방사 파장은 각각 470 및 590nm였다.
- [0157] 생체분포 연구의 결과는 도 24에 도시되어 있다. 데이터는 평균 \pm SEM, n = 3으로서 제시한다. DOX의 농도를 DOX 형광 강도를 측정함으로써 각 마우스의 주요 장기들 및 장에서 측정하였고, 그 결과는 조직 g당 DOX μ g로서 제시한다. 주목할 만하게도, 경구 투여된 그룹들 중 어느 그룹에서보다 유리 DOX의 IV 주사 후에 더 높은 농도의 DOX가 심장 및 간 조직에서 나타났다.
- [0158] 데이터는, 경구 제형의 경우 가장 높은 양의 DOX가 2가지 담즙산 랩핑된 DOX 조성물로 처리된 샘플들(즉, DDP-HTCA 막대 및 DOX/CS-TCA 막대)의 회장에서 관찰되었음을 시사한다. 이들 2가지 조성물로 처리된 마우스의 회장내 DOX 함량은 유리 DOX 경구 그룹 또는 비-TCA 그룹에서의 DOX 함량보다 대략 3배 내지 4배 더 높았다. 회장내 DOX 측정량은 담즙산 랩핑된 DOX 조성물의 표적화된 흡수를 보여주는 지표이며, 회장에 존재하는 담즙산 수송체에 의한 담즙산 랩핑된 DOX 조성물의 효과적 흡수를 제시한다. 게다가, 종양 부위에서의 향상된 축적도 관찰되었다. 이러한 결과들은 경구 담즙산-매개 DOX 흡수가 경구 유리 DOX의 투여 후의 혈류중 DOX 농도와 비교해 더

높은 혈류중 DOX 농도를 유도한다는 것을 제시한다. 그 결과, 혈류중 비교적 높은 축적은 유리 DOX 경구 투여에 비해 중앙 진행을 늦추는 데(우수한 DOX 효능) 기여할 수 있다.

- [0159] 결론적으로, 담즙산 랩핑된 독소루비신 조성물로 처리된 동물들에서는, 현저한 체중 감소 없이 통계학적으로 유의적인 중앙 성장 억제제가 나타났다. 또한, 생체분포 분석은 담즙산 랩핑된 독소루비신 조성물로 경구 처리된 동물들이 유리 독소루비신으로 경구 처리된 동물들보다 더 높은, 회장으로부터의 독소루비신 흡수를 보였음을 제시하였다. 동물 데이터는 담즙산 코팅이 독소루비신의 독성을 감소시켰을 뿐만 아니라 장, 특히 회장 내 독소루비신 흡수를 증진시켰음을 나타냈다. 이러한 조사결과들은, 담즙산 랩핑된 독소루비신 조성물의 장간순환이 DOX의 전신 수준을 상승시키고 DOX 혈장 수준을 증가시키는 것으로 보이고 이로써 경구 생체이용률 증진 및 중앙 성장 감소가 유도됨을 시사한다.
- [0160] 담즙산 랩핑된 독소루비신 입자들은 냉동건조시 안정성의 변화를 나타내지 않았으며, 이는 장기간 저장 가능성을 시사하였다. 담즙산 코팅은 또한 유리 DOX와 비교해 무시해도 될 정도의 세포독성을 나타냈으며, 높은 약물 로딩 효능 및 pH-의존적 약물 방출을 제공하였다. 중요하게도, 생체내 결과는 담즙산 랩핑된 독소루비신 조성물이 중앙 성장을 유의적으로 지연시켰음을 보여주었다. 생체분포 연구도 또한 장의 회장에서의 담즙산 랩핑된 독소루비신 입자로부터의 독소루비신의 향상된 흡수를 입증하였다. 종합하면, 경구 투여된 담즙산 함유 제형들은 유리 DOX 및 담즙산 비함유 제형보다 높은 고체 중앙에 대한 치료 효능을 나타냈다. 이는 담즙산-매개 표적화 전달이 담즙산 수송체를 이용함으로써 독소루비신의 치료 성능을 증진시켰고 이로써 독소루비신의 경구 흡수의 증진이 유도됨을 시사한다. 따라서, 담즙산은 독소루비신의 경구 전달을 위한 입증된 효과적인 운반체이다. 또한, 이러한 신규 제형들은 특정한 항암 또는 화학치료 약물의 투여 경로를 정맥내 투여에서 경구 투여로 전환할 수 있는 가능성을 허용할 수 있다.
- [0161] 실시예 4. 담즙산 및/또는 담즙산 접합체, 리포좀 및 치료제를 포함하는 치료학적 조성물.
- [0162] 표면에 담즙산 또는 담즙산 접합체를 갖는 코어 복합체를 함유하는 본원에 개시된 치료학적 조성물은 리포좀과 같은 지질 또는 지질 층을 또한 함유할 수 있다. 리포좀은 코어 복합체의 외표면을 형성할 수 있고 천연에서 양이온성일 수 있다. 따라서, 본 발명의 특정 조성물은 양이온성 표면을 갖는 리포좀 내에 완전히 또는 부분적으로 포함되어 코어 복합체를 형성하는 치료제로 제조될 수 있다. 이러한 리포좀 코어 복합체는 담즙산 또는 담즙산 접합체에 공유 결합되어 있는 음이온성 중합체와 정전기적으로 상호작용할 수 있다. 이러한 리포좀 조성물의 일 실시형태는 도 25에 예시되어 있으며, 여기서 A는 단일 양이온성 지질, 또는 중성 지질과 양이온성 지질의 혼합물을 함유할 수 있지만 pH 5에서 순 양전하를 갖는 표면을 갖는 양이온성 리포좀 조성물(인지질 이중층으로서 도시됨)이고; B는 단백질, 펩타이드, DNA, 유전자 또는 소분자 약물을 포함하는 치료제이고; C는 헤파린, 콘드로이틴 설페이트 및 히알루론산을 포함하는, 생분해성이고/이거나 주사가 가능할 수 있고 중성 pH에서 순 음전하를 갖는 음이온성 중합체이고; D는 음이온성 중합체 C에 공유 결합되어 있는 담즙산 또는 담즙산 접합체(BA)이다.
- [0163] 도 25에 도시된 조성물은 각 층이 내부 코어를 완전히 포함하는 구체로서 예시되어 있다. 특정 실시형태에서, 각 층은 코어 및/또는 내부 층을 완전히 감싸지 않으며, 조성물은 구체가 아니다.
- [0164] DNA-기반, 단백질 및 통상의 소분자 약물을 포함하는 각종 상이한 치료제용으로 사용될 수 있는 전달 접근법의 성공적 디자인은 작용화된 리포좀의 사용을 포함할 수 있다. 이러한 접근법은 목적하는 특성들을 달성하기 위해 마이크로미터 크기 구조물의 조립의 정교한 제어를 필요로 한다. 본원에서, 담즙산 또는 담즙산 접합체에 공유 결합된 음이온성 중합체로 랩핑된 약물-로딩된 리포좀의 사용이 조사되었다.
- [0165] 치료제를 리포좀 내로 로딩하기 위해, 수많은 계획들이 구상될 수 있다. 한 가지 계획은 치료제의 존재 하에 리포좀 이중층을 구축함으로써 형성될 수 있는 이중층 내로 치료제를 완전히 또는 부분적으로 혼입시키는 것이다. 다른 계획은 치료제를 리포좀의 내부에 완전히 혼입시켜 인지질 이중층과 유의적으로 상호작용하지 않도록 하는 것이다. 이러한 계획에서 치료제를 리포좀 내로 로딩하기 위해, 치료제의 존재하에 리포좀을 구축하고 리포좀 이중층이 치료제 주위에서 자가-조립하도록 할 수 있다. 대안으로, 리포좀을 치료제와 별도로 형성시킬 수 있고, 치료제를 리포좀 내의 일시적 구멍을 통해 첨가할 수 있고, 인지질의 측면 확산에 의해 리포좀이 자발적으로 봉합되도록 할 수 있다. 이러한 접근법은 본원에 기재된 실험에서 사용되며 도 26에 도식으로 제시되어 있다.
- [0166] 따라서, 고밀도 초상자성 Fe₃O₄ 나노입자를 리포좀에 분산시켰고, 높은 로드를 특정한 방향으로 리포좀 막에 적용하여 개방된 지질 이중층 구멍을 생성시켰다. 디자인된 실험 조건으로 리포좀 막 내에 하나 또는 다수의 개방

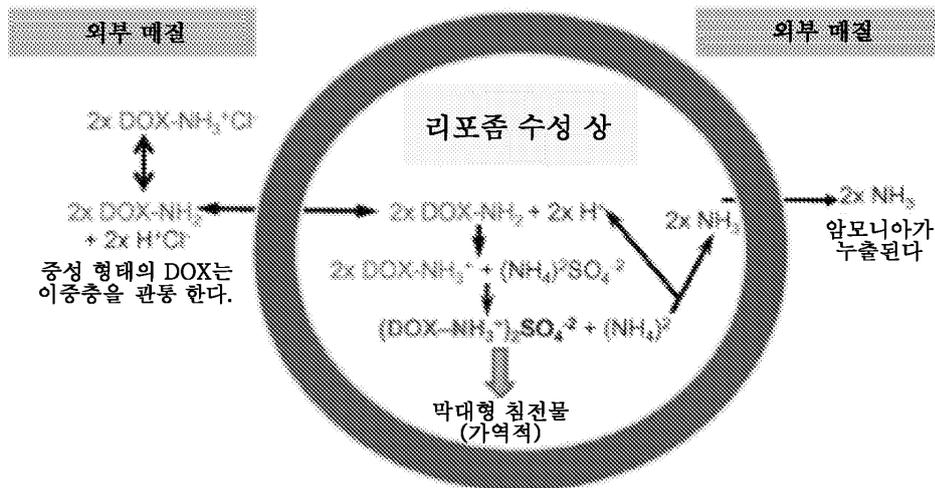
기공 부위를 형성시킬 수 있었다. 리포솜 막 내의 개방 지질 이중층 구멍은 지질 이중층 구멍의 천연적 복구(즉, 폐쇄) 전에 치료제(유전자, 단백질 또는 소분자 약물을 포함)를 리포솜 내로 삽입하기 위한 출입구로서 사용되었다.

- [0167] 적합한 친수성/친지성 특성을 갖는 지질은 수용액 중에서 소포성 지질 이중층으로 자가 조립될 수 있다. 친수성 또는 친지성 생물활성 중은 각각 친수성 내부 코어 또는 지질 이중층 쉘에 함유될 수 있다. 화학적 또는 생물학적 분자 후보를 위한 리포솜-기반 전달 시스템은 생의학 및 기타 분야에서 다양한 가능성들을 제공한다.
- [0168] 융합, 분열 및 형상 변형을 포함하는 지질 이중층의 동적 특성들은 다양한 실험 조건에 의해 영향을 받을 수 있다. 통상의 지질 이중층 구조부터 발전하는 구조-변형된 리포솜의 생성은 고효율적 리포솜 약물 운반체의 디자인 수단을 대표한다. 본원에서는, 매우 조밀한 초상자성 Fe_3O_4 나노입자 및 맞춤형 자석을 갖는 자성 임펠러를 사용하는, 개방된 지질 이중층 구멍을 갖는 리포솜(이하, 부분 개방 리포솜(partially uncapped liposome) 또는 "UCL"로서 언급함)의 형성 방법이 개시된다. 자성 전단응력 하에, 리포솜에 분산된 Fe_3O_4 나노입자들은 강력한 자기장을 통해 지질 막의 특정 위치에 응력을 가하고, 그 결과로서 자성 전단응력이 리포솜 표면을 압착시키고 이를 찢어서 개방 지질 이중층 구멍이 형성된다. 이는 도 27에 도식으로 예시되어 있다.
- [0169] 이러한 방법은 음이온성 중합체(콘드로이틴 설페이트)에 공유 결합된 담즙산 또는 담즙산 접합체로 코팅된, 인슐린 및 독소루비신이 로딩된 리포솜을 제조하는 데 사용되었다.
- [0170] 재료 및 방법. 화학물질 및 용매는 달리 주지되지 않는 한 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)(미국)로부터 입수하였다. Fe_3O_4 나노입자(평균 7nm의 직경, 200°C에서 2시간 동안 및 300°C에서 1시간 동안 벤질 에테르 중에서 철(III) 아세틸아세토네이트, 1,2-헥사데칸디올, 올레산 및 올레일아민의 화학적 반응 후 제조됨)를 문헌[Lee et al, Int. J. Pharm.471, (2014), 166-172]에 설명되어 있는 바와 같이 합성하였다.
- [0171] (I) 리포솜성 인슐린
- [0172] 리포솜의 3개 세트를 제조하고, 표지된 인슐린을 이들 리포솜 내로 삽입시켰다. 상기 세트들 중 하나는 콘드로이틴 설페이트(CS)로 코팅시키고, 한 세트는 실시예 1에서 설명한 바와 같이 제조한 타우로콜산에 공유 결합된 콘드로이틴 설페이트(CS-TCA)로 코팅시켰다. 커플링에서 사용된 CS:TCA의 물비는 1:4이고, 이의 제조는 반응식 1에 도시되어 있다.
- [0173] 단백질 치료제 연구를 위한 리포솜 제조. 리포솜은 일반적으로 문헌[Kwag et al, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 135 (2015), 143-149]에 설명되어 있는 바와 같이 제조하였다. 클로로포름(5 mL)에 용해된 디메틸 디옥타데실 암모늄 브로마이드("DD")(20mg), 테옥시콜산("DOCA")(5mg) 및 Fe_3O_4 나노입자(0.5mg)를 환저 플라스크에 첨가하였다. 환저 플라스크 내의 용매를 회전 증발로 제거하여 플라스크의 표면에 박막을 형성시켰다. 상기 박막을 25°C에서 초음파발생기(5분 동안 60 Hz)를 사용하여 150M PBS(pH 7.4, 20 mL) 중에서 재수화시켰다. 수득된 리포솜을 도 27에 도시된 바와 같이 2개의 1/4원 부채꼴(반경 30 mm 및 2 mm 두께)로 형성된 맞춤형 자석을 갖는 자성 임펠러를 사용하여 천천히 혼합하였다. 상기 자석에 부착된 리포솜을 1500 rpm에서 맞춤형 자석을 갖는 자성 임펠러를 사용하여 25°C에서 1분 동안 다시 교반하였다. 리포솜 용액을 자기적으로 교반한 후, 링 형상의 네오디뮴 희토류 자석(10 mm의 반경 및 10 mm 두께)을 플라스크의 바닥에 즉시 부착시켜, 리포솜으로부터 누출된 유리 Fe_3O_4 나노입자를 제거하였다.
- [0174] 리포솜의 대조 또는 "블랭크(blank)" 세트를, 전술한 바와 같은 동일한 비의 디메틸 디옥타데실 암모늄 브로마이드 및 테옥시콜산을 사용하여, 통상의 막 재수화 방법에 따라서 Fe_3O_4 나노입자 없이 제조하였다.
- [0175] 리포솜의 추가 세트를 상기와 같이 제조하되, 테옥시콜산("DOCA")을 용액에 첨가하지 않았다. 따라서, 이들 리포솜은 리포솜 이중층 내에 오직 디메틸 디옥타데실 암모늄 브로마이드("DD")만을 함유하였다.
- [0176] Ce6-인슐린 제조 및 로딩. 인슐린이 NIR 형광 분광분석기로 검출될 수 있도록 하기 위해 인슐린을 Ce6로 표지하였다. Ce6 내의 카복실산 그룹이 인슐린에 부착하는 데 사용되었다. Ce6(0.1mM)을 10 mL의 탈이온수 중의 EDC(5mM) 및 NHS(5mM)의 존재 하에 실온에서 3일 동안 과량의 인슐린(10mM)과 반응시켜 Ce6-접합된 인슐린을 생성시켰다. 이어서, 생성된 용액을 새로운 탈이온수에 대해 Spectra/Por MWCO 3.5K 막을 사용하여 투석시켜(2일) 정제함으로써 임의의 미커플링된 시약을 제거하였다. 이어서, 용액을 2일 동안 냉동건조시켰다.
- [0177] "블랭크" 리포솜에 인슐린을 로딩한 바와 같이, 단지 디메틸 디옥타데실 암모늄 브로마이드("DD")로 제조된 리포솜 및 DD와 DOCA로 제조된 리포솜에 표지된 인슐린을 로딩하였다. 적절한 리포솜(20mg)을 150mM PBS(pH 7.4,

슬린 안정성을 평가하였다(n=3).

- [0188] pH 7.4에서 3가지의 단백질-로딩된 리포솜에 대한 시간 경과에 따른 인슐린 방출량은 도 29에 도시되어 있다. pH 1.2에서의 단일 데이터 포인트(2시간 후)도 마찬가지로 도시되어 있다. 도 29의 그래프에서 볼 수 있는 바와 같이, pH 7.4에서 리포솜에 의해 방출된 총(누적) 인슐린량은, 24시간 후 비-코팅된 리포솜에서의 총 약 75% 방출부터 CS-코팅된(담즙산 없음) 리포솜을 이용했을 때의 동일한 시간 기간 동안의 약 70% 방출 및 약 CS-TCA 코팅된 리포솜에서의 55% 방출에 이르기까지 다양하다. 모든 리포솜들은 8시간 이내에 대부분의 인슐린을 방출하였다. 모든 리포솜들이 오직 소량(약 5 내지 15%)의 인슐린만을 방출함을 보여주는 pH 1.2에서의 데이터는, 위 내에서와 같은 낮은 pH의 환경에 노출될 경우, 리포솜들이 일반적으로 안정하고 이들이 보유한 단백질 치료제의 상당량을 손실하지 않음을 시사한다.
- [0189] 시험관내 세포내 흡수. 인간 상피 결장직장 선암종 세포(caco-2 세포)를 5% CO₂ 대기를 갖는 가습된 표준 항온 배양기 내에서 37°C에서 1% 페니실린-스트렙토마이신 및 10% FBS를 함유한 돌베코 변형 이글 배지(DMEM)에서 유지시켰다. 시험 전에, 단층으로서 성장한 세포(1×10⁵ 개 세포/mL)를 0.25%(wt/vol) 트립신/0.03%(wt/vol) EDTA 용액을 사용한 트립신처리를 통해 수거하였다. DMEM에 현탁된 caco-2 세포를 시험관내 세포 시험 전에 각 웰 플레이트에 접종시키고 24시간 동안 배양하였다. 리포솜(10µg/mL의 인슐린-Ce6 농도에 상당하는 양으로 제공됨)의 세포내 흡수를 FACSCalibur 유세포분석기(Becton Dickinson, 미국)에 의해 모니터링하였다. 또한, 리포솜의 국소화를 공초점 레이저 주사 현미경을 사용하여 인슐린-Ce6 로딩된 리포솜의 형광에 의해 검사하였다.
- [0190] 본 연구의 결과는 도 30에 도시되어 있으며, 상기 도는 리포솜에 노출된 후의 염색된 세포의 일련의 현미경 사진이며, 여기서 첫번째 열은 염색된 리포솜을 도시하며, 두번째 열은 Ce6-표지된 인슐린으로부터의 형광 시그널을 도시하며, 마지막 열은 열 1 및 2의 오버레이(overlay)를 도시한다. 마지막 열로부터, 대조군 샘플(비-리포솜 인슐린으로 처리된 세포) 및 DDO 리포솜으로 처리된 세포에는 비교적 표지된 인슐린이 거의 존재하지 않는다는 것이 명백하다. 반대로, 콘드로이틴 설페이트 및 CS-TCA 코팅된 리포솜으로 처리된 세포에는 표지된 인슐린이 존재한다. 리포솜을 함유한 세포의 분석은 도 31에 도시되어 있다.
- [0191] 생체내 장기 추적. 6주령 내지 8주령의 암컷 BALB/c 마우스로 생체내 연구를 수행하였다. Ce6으로 태그된 인슐린을 함유하는 3가지 유형의 리포솜을 50 IU/kg의 인슐린에 상당하는 용량으로 마우스에게 경구 투여하였다. 마우스의 상이한 코호트(cohort)에게 유리 인슐린(리포솜 없음)을 동일한 용량으로 투여하였다. C 마운트 렌즈 및 장과장 방사 필터(600 내지 700nm)를 구비한 12비트 CCD 카메라(Image Station 4000 MM; Kodak, 미국 코네티컷 주 뉴헤이븐)를 사용하여 투여시(t = 0)부터 24시간까지의 마우스의 실시간 발광(photo-luminescent) 영상을 획득하였다.
- [0192] 1시간, 2시간, 4시간, 8시간 및 24시간에서의, 유리 인슐린(첫번째 컬럼) 또는 3가지 리포솜 인슐린 제형(표지된 바와 같은 컬럼 2 내지 4)으로 처리된 살아있는 마우스의 현미경 사진은 도 32에 도시되어 있다. 상기 사진들에서 볼 수 있는 바와 같이, CS-TCA 코팅된 리포솜으로 처리된 마우스는 최대의 형광 시그널을 나타냈으며, 이는 가장 많은 양의 표지된 인슐린이 상기 동물들에 존재함을 시사하며, CS-코팅된 리포솜에서는 더 적은 시그널이 나타났고, 나머지 두 그룹에서는 상당히 더 적은 시그널이 나타났다.
- [0193] 생체의 형광 연구. 주사 후 4시간째에, 마우스의 서브셋을 희생시키고(n= 5), 절제된 장기들을 조사하였다(심장, 폐, 간, 신장, 비장, 십이지장, 공장 및 회장). 장기들의 현미경 사진은 도 33에 도시되어 있다. 수거하고 0.3N HCl를 이용하여 70% 에탄올에 현탁시킨 후, 장기들을 균질화시켜 태그된 인슐린을 추출하였다. 원심분리 후, 상청액 중의 Ce6 형광(410nm에서 여기, 670nm에서 방사)을 형광 플레이트 리더를 사용하여 측정하였다. 형광 수준은 도 34에 도시되어 있다.
- [0194] 도 33은 표지된 인슐린이 CS 및 CS-TCA 코팅된 리포솜으로 처리된 마우스의 십이지장 및 공장에 주로 존재함을 도시한다. 도 34는 분포를 요약한 것이며, CS 코팅된 리포솜(각 세트에서 우측 막대에서 세 번째)보다 CS-TCA 코팅된 리포솜(각 세트에서 가장 우측의 막대)으로 처리된 마우스에 유의적으로 더 많은 인슐린이 존재함을 도시한다.
- [0195] 혈장 농도. 심장 천자를 통해 채혈하고 혈액을 EDTA를 함유하는 마이크로테이너(microtainer) 튜브에 보관하고 원심분리하여 혈장을 획득하였다. 혈장 샘플을 냉동건조시킨 후, 이를 0.3N HCl을 이용하여 70% 에탄올에 용해시켜 Ce6 표지를 추출하였다. 상청액 중의 Ce6 형광의 강도를 이미 설명한 바와 같이 측정하였다(n = 5). Ce6 형광은 온전한 인슐린 또는 Ce6 표지를 함유하는 인슐린 단편(분해 후)으로부터 기원한 것일 수 있다.

- [0196] 혈장 데이터는 도 35에 도시되어 있다. CS-TCA 코팅된 리포솜으로 처리된 마우스로부터의 혈장(최상단 선, 사각형 기호)은 가장 높은 인슐린 수준을 나타내며 투여 후 약 8시간째에 최고조에 달한다. 상기 데이터는 비-코팅된 리포솜(DDO - 원형 기호 및 유리 인슐린- 흰색 기호)보다 CS 코팅된 리포솜(최상단에서 두번째 선, 역삼각형 기호)로 처리된 마우스에 더 많은 표지된 인슐린에 존재함을 보여준다.
- [0197] 비변형된 리포솜 인슐린의 약리학적 활성을 또한 연구하였다. 암컷 BALB/c 마우스(각각 대략 20 내지 30mg)를 3 일 동안 75mg/체중 kg의 용량으로 스트렙토토신(STZ, pH 4.5에서 10 mm 시트레이트 완충액에 용해됨)을 매일 복강내 주사하여 당뇨병 상태가 되도록 하였다. 마우스들은 이들의 공복 혈당 수준이 350mg/dL보다 높은 경우에 당뇨병인 것으로 고려되었으며, 이는 STZ 처리 후 약 1주째에 발생하였다. 인슐린 투여 전에, 혈액 샘플을 투여 후 상이한 시간 간격으로 마우스의 꼬리 정맥으로부터 모았다. 혈당 수준을 혈당 측정기(ACCU-CHEK Active, Roche Diagnostics)를 사용하여 즉시 측정하였고, n = 5이다.
- [0198] 마우스를 경구 투여에 의해 정상 인슐린 50 IU/마우스 kg 또는 1 IU/마우스 20gm으로 처리하였다. 시간 경과에 따른 마우스의 혈청 글루코스 수준은 도 36에 도시되어 있다. 최저의 가장 일정한 수준은 CS-TCA 코팅된 리포솜으로 처리된 마우스(가장 하단의 선, 사각형 기호)에서 나타나며, 투여 후 1시간 이내에 약 100mg/dL로 저하되며 일반적으로 24시간 동안 유지되었다. CS 코팅된 리포솜으로 처리된 마우스(중간 선, 역삼각형 기호)는, 초기에 처음 1시간 안에 약 150mg/dL로 저하되었지만, 다시 약 150mg/dL로 저하되기 전에, 다음 3시간 동안 거의 약 300mg/dL로 다시 상승하였고, 24시간까지 약 200mg/dL로 점차 상승한 혈청 글루코스 수준을 나타냈다. DDO 처리된 마우스(최상단 선, 원형 기호)는 약 250mg/dL로 약간 저하되었고 CS-코팅된 리포솜과 유사한 방식으로 변화하며 약 250 내지 300mg/dL에서 유지된 혈청 글루코스 수준을 나타냈다.
- [0199] (II) 리포솜성 독소루비신.
- [0200] 소분자 치료제 연구를 위한 리포솜 제조. 디메틸 디옥타데실 암모늄 브로마이드("DD")를 클로로포름에 용해시키고, 용매를 회전 증발에 의해 제거하여 플라스크의 표면에 박막을 형성시켰다. 상기 박막을 120mM 황산암모늄 중에서 재수화시키고 30분 동안 초음파 처리하였다. 유리 황산암모늄을 순수(純水)에 대해 투석하여(MWCO 1000) 제거하였다.
- [0201] DD 리포솜에 독소루비신(DOX)을 로딩하기 위해, 하기 도식으로 나타낸 바와 같이 황산암모늄 농도 구배를 생성시켰다.



- [0202]
- [0203] 농도 구배 생성 후, 리포솜 용액 및 독소루비신(DOX) 용액을 혼합하고 60°C에서 항온배양하였다. 과량의 유리 DOX를 물에 대해 투석하여(MWCO 1000) 제거하였다. 최종 DOX-로딩된 리포솜을 동결건조시켰다. DOX 농도를 490nm에서 UV-Vis에 의한 측정에 기초하여 계산하고, 로딩 효율을 다음 수식을 사용하여 계산하였다:

[0204] 로딩 효율(%) = 100s $\frac{\text{(입자에 존재하는 DOX의 중량)}}{\text{(사용된 DOX의 중량)}}$

- [0205] 경구 제형을 위해, DOX-로딩된 리포솜을 60°C에서 PBS를 함유하는 폴록사머(40mg/mL)에 용해시켰다. 리포솜을 100nm 막을 통해 압출하기 전에, 압출기를 60°C로 온도조절하였다. 샘플을 막을 통해 10회 압출하였다. 압출

후, 리포솜을 경구 투여를 위해 CS-TCA(1:1.5 w/w %)로 코팅하였다.

[0206] 리포솜 DOX 입자를, 공유 결합된 콘드로이틴 설페이트 - 담즙산 모이어티로 코팅하기 전과 후에, 리포솜 인슐린 제형에 대해 설명한 바와 같이 입자 크기 및 제타 전위 분석에 의해 특징 규명하였다. 데이터는 하기 표 3에 제시한다.

표 3

리포솜 독소루비신 제형에 대한 특징 규명 데이터

	평균 입자 크기(nm)	PDI	평균 제타 전위(mV)
DOX- 리포솜	377.6	0.425	17.7
CS-TCA-코팅된 DOX 리포솜	220.8	0.237	-39

[0207]

[0208] 종양 보유 동물 모델에서의 생체내 치료 효능. 유리 DOX, 담즙산 코팅이 없는 양이온성 DOX-로딩된 리포솜 ("DOX-리포솜") 및 CS-TCA 코팅을 갖는 음이온성 DOX-로딩된 리포솜("DL/CS-TCA")의 생체내 항암 효능을 이종 마우스 모델에서 평가하였다. HT-29 세포(마우스당 1×10^7 개 세포)를 NOD/SCID 마우스의 등에 피하 주사하였다 (n = 3). 종양 크기가 대략 100 내지 150 mm³에 도달하였을 때, 각 마우스에게 PBS, 10mg/kg 유리 DOX, DOX-리포솜 조성물 중의 10mg/kg DOX 또는 DL/CS-TCA 조성물 중의 10mg/kg DOX를 매 2일마다 1회 경구 투여하였다. 종양 크기 및 체중을 2일마다 측정하였다. 종양 체적을 디지털 캘리퍼로 측정하고, 종양 체적을 하기 제시한 수식을 사용하여 계산하였다.

[0209] 종양 체적 = (길이×폭²)/2

[0210] 각 처리에 대한 종양 체적의 변화는 도 37에 도시되어 있다. 12일째에서 가장 위의 선(검은색 원)은 PBS 대조군이다. 12일째에서 그 다음 아래의 선(사각형 기호)은 유리 DOX이다. 이러한 결과들은 종양 체적을 감소시키는데 있어서 유리 경구 DOX가 완충액보다 유의적으로 우수하지 않음을 시사한다. 가장 아래 선(흰색 원)은 CS-TCA 코팅("DL/CS-TCA")을 갖는 음이온성 DOX-로딩된 리포솜으로 처리된 동물에 대한 종양 체적의 변화%이며, 이는 일반적으로 단일 경구 투약 후 12일에 걸쳐서 종양 체적의 변화를 나타내지 않는다. 가장 아래에서 두번째 선(다이아몬드)은 담즙산 코팅이 없는 양이온성 DOX-로딩된 리포솜("DOX-리포솜")으로 처리된 동물에 대한 종양 체적의 변화%이며, 이들 종양은 12일에 걸쳐서 약 200%까지 증가한다.

[0211] 도 38은 처리된 동물의 상대적 체중의 변화를 도시한다. 유리 DOX 그룹의 체중은 12일에 걸쳐서 약간 감소하는 것으로 보이지만, 나머지 처리 그룹들은 상기 시간에 걸쳐서 체중을 유지하거나 약간 증가한다.

[0212] 본원에 개시된 실험들은 마우스에서 경구 투여에 의해 증강된 녹색 형광 단백질(eGFP), 엑센딘-4 및 GLP-1을 암호화하는 플라스미드 DNA를 전달하는 것을 포함한다. 플라스미드 DNA를 먼저 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(bPEI)와 복합체화시켜 양이온성 복합체를 획득하였다. 이어서, 복합체를 헤파린에 공유 결합된 타우로콜산(TCA)으로 코팅하여 약 100 내지 약 200nm의 크기를 갖는 입자를 제공하였다. DNA를 함유하는 입자의 경구 투여는 동물에서 DNA의 생성물을 발현하는 것으로 나타났다.

[0213] DNA 이외에도, 양이온성 입자를 프로타민과 같은 양이온성 중합체와 커플링된, 인슐린과 같은 단백질로부터 형성시킬 수 있다. 양이온성 입자를 헤파린-TCA로 코팅하여 크기가 대략 수 마이크로인 입자를 획득할 수 있다. 이러한 입자는 음이온성일 수 있고, 혈당 수준을 감소시키는 데 사용될 수 있다.

[0214] 경구 투여 후에 뚜렷하게 생체이용성이 아닌 소분자 약물인 독소루비신의 전달은 담즙산-랩핑된 입자로서의 이의 제형화에 의해 달성되었다. 독소루비신을 콘드로이틴 설페이트와 복합체화시켜 형성시킨 음이온성 입자를 ε-폴리(L-라이신)으로 코팅하여 양이온성 복합체를 생성시켰다. 이어서, 입자를 헤파린-TCA로 코팅하였다. 경구 투여된 입자는 정상 마우스에서 상당한 혈장 독소루비신 농도를 나타냈다. 또한, 담즙산-함유 제형에서의 리포솜의 사용을 2가지 예시적 치료제, 즉 소분자 약물(독소루비신) 및 단백질(인슐린)을 이용하여 유효성을 검증하였다.

[0215] **참조문헌**

Thanki K, Gangwal RP, Sangamwar AT, Jain S. Oral delivery of anticancer drugs: challenges and opportunities. *J. Control. Release*, 2013;170(1):15-40.

Mei L, Zhang Z, Zhao L, Huang L, Yang XL, Tang J, Feng SS. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013;65(6):880-890.

Da Rocha AB, Lopes RM, Schwartzmann G. Natural products in anticancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2001;1(4):364-369.

[0216]

Mohan P, Rapoport N. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking. *Mol. Pharm.* 2010;7(6):1959-1973.

Swarnakar NK, Thanki K, Jain S. Bicontinuous cubic liquid crystalline nanoparticles for oral delivery of doxorubicin: implications on bioavailability, therapeutic efficacy, and cardiotoxicity. *Pharm. Res.* 2014;31(5):1219-1238.

Wang J, Li L, Du Y, Sun J, Han X, Luo C, Ai X, Zhang Q, Wang Y, Fu Q. Improved oral absorption of doxorubicin by amphiphilic copolymer of lysine-linked ditocopherol polyethylene glycol 2000 succinate. *Mol. Pharm.* 2015;12(2):463-473.

Dayton A, Selvendiran K, Meduru S, Khan M, Kuppusamy ML, Naidu S, Kalai T, Hideg K, Kuppusamy P. Amelioration of doxorubicin-induced cardiotoxicity by an anticancer-antioxidant dual-function compound, HO-3867. *J. Pharm. Exp. Ther.* 2011;339(2):350-357.

Li Q, Lv S, Tang Z, Liu M, Zhang D, Yang Y, Chen X. A co-delivery system based on paclitaxel grafted mpeg-b-plg loaded with doxorubicin: preparation, in vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 2014;471(1-2):412-420.

Kim JE, Cho HJ, Kim JS, Shim CK, Chung SJ, Oak MH, Yoon IS, Kim DD. The limited intestinal absorption via paracellular pathway is responsible for the low oral bioavailability of doxorubicin. *Xenobiotica.* 2012;43(7):579-591.

Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008;7(8):678-693.

Alrefai WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm. Res.* 2007;24(10):1803-1823.

Dawson PA, Lan T, Rao A. Bile acid transporters. *J. Lipid Res.* 2009;50(12):2340-2357.

Yin Win K, Feng SS. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials.* 2005;26(15):2713-2722.

Holm R, Müllertz A, Mu H. Bile salts and their importance for drug absorption. *Int. J. Pharm.* 2013;453(1):44-55.

Khatun Z, Nurunnabi M, Reeck GR, Cho KJ, Lee Yk. Oral delivery of taurocholic acid linked heparin-docetaxel conjugates for cancer therapy. *J. Control. Release.* 2013;170(1):74-82.

[0217]

Alam F, Al-Hilal TA, Chung SW, Seo D, Mahmud F, Kim HS, Kim SY, Byun Y. Oral delivery of a potent anti-angiogenic heparin conjugate by chemical conjugation and physical complexation using deoxycholic acid. *Biomaterials*. 2014;35(24):6543-6552.

Tran TH, Nguyen CT, Kim DP, Lee Yk, Huh KM. Microfluidic approach for highly efficient synthesis of heparin-based bioconjugates for drug delivery. *Lab Chip*. 2012;12(3):589-594.

Oprea AM, Profire L, Lupusoru CE, Ghiciuc CM, Ciolacu D, Vasile C. Synthesis and characterization of some cellulose/chondroitin sulphate hydrogels and their evaluation as carriers for drug delivery. *Carbohydr Polym*. 2012;87(1):721-729.

Zhang Y, Chan HF, Leong KW. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Adv Drug Deliv. Rev*. 2013;65(1):104-120.

He C, Yin L, Tang C, Yin C. Size-dependent absorption mechanism of polymeric nanoparticles for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials*. 2012;33(33): 8569-8578.

Kang HC, Bae YH. Co-delivery of small interfering RNA and plasmid DNA using a polymeric vector incorporating endosomolytic oligomeric sulfonamide. *Biomaterials*. 2011;32(21):4914-24.

Kang HC, Kang HJ, Bae YH. A reducible polycationic gene vector derived from thiolated low molecular weight branched polyethyleneimine linked by 2-iminothiolane. *Biomaterials*. 2011;32(4):1193-1203.

Kang HC, Samsonova O, Kang SW, Bae YH. The effect of environmental pH on polymeric transfection efficiency. *Biomaterials*. 2012;33(5):1651-62.

Hu J, Miura S, Na K, Bae YH. pH-responsive and charge shielded cationic micelle of poly (l-histidine)-block-short branched PEI for acidic cancer treatment. *J. Control. Release*. 2013;172(1):69-76.

Kim D, Gao ZG, Lee ES, Bae YH. In vivo evaluation of doxorubicin-loaded polymeric micelles targeting folate receptors and early endosomal pH in drug-resistant ovarian cancer. *Mol. Pharm*. 2009;6(5):1353-1362.

Jafari V, Allahverdi A, Vafaei M. Ultrasound-assisted synthesis of colloidal nanosilica from silica fume: Effect of sonication time on the properties of product. *Adv Power Technol*. 2014;25(5):1571-1577.

Tallesi M, Iman M, Varkouhi AK, Rijcken CJ, Schiffelers RM, Etrych T, Ulbrich K, van Nostrum CF, Lammers T, Storm G. Core-crosslinked polymeric micelles with

[0218]

controlled release of covalently entrapped doxorubicin. *Biomaterials*. 2010;31(30):7797-7804.

C.R. Safinya, K.K. Ewert, *Nature* 489 (2012) 372-374.

C. Oerlemans, R. Deckers, G. Storm, W.E. Hennink, J.F. Nijsen, *J. Control. Release* 168 (2013) 327-333.

J.P. Motion, J. Nguyen, F.C. Szoka, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (2012) 9047 - 9051.

Y. Yoshizaki, E. Yuba, N. Sakaguchi, K. Koiwai, A. Harada, K. Kono. *Biomaterials* 35 (2014) 8186- 8196.

A. Napoli, M. Valentini, N. Tirelli, M. Muller, J.A. Hubbell, *Nat. Mater.* 3 (2004) 183-189.

A. Saitoh, K. Takiguchi, Y. Tanaka, H. Hotani, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 95 (1998) 1026-1031.

M. Przybylo, J. Procek, M. Hof, M. Langner, *Chem. Phys. Lipids* 178 (2014) 38-44.

U.Y. Lee, N.M. Oh, D.S. Kwag, K.T. Oh, Y.T. Oh, Y.S. Youn, E.S. Lee, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (2012) 7287- 7291,

E.S. Lee, D. Kim, Y.S. Youn, K.T. Oh, Y.H. Bae, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 2418-2421.

W.L. Haisler, D.M. Timm, J.A. Cage, H. Tseng, T.C. Killian, CR Souza, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 1940-1949.

U.Y. Lee, Y.T. Oh, D. Kim, E.S. Lee, *Int J. Pharm.* 471 (2014) 166-172

O.O. Krylova, P. Pohl, *Biochemistry* 43 (2004) 3696-3703.

A. Taluja, Y.H. Bae, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1517-1526.

D.S. Kwag, K.T. Oh, E.S. Lee, *J. Control. Release* 187 (2014) 83 - 90.

D. S. Kwag, K. Park, Y. S. Youn, E. S. Lee, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 135 (2015), 143-149.

Kang et al, *Mol. Pharmaceutics*, 2015, 12 (8), 2845-2857.

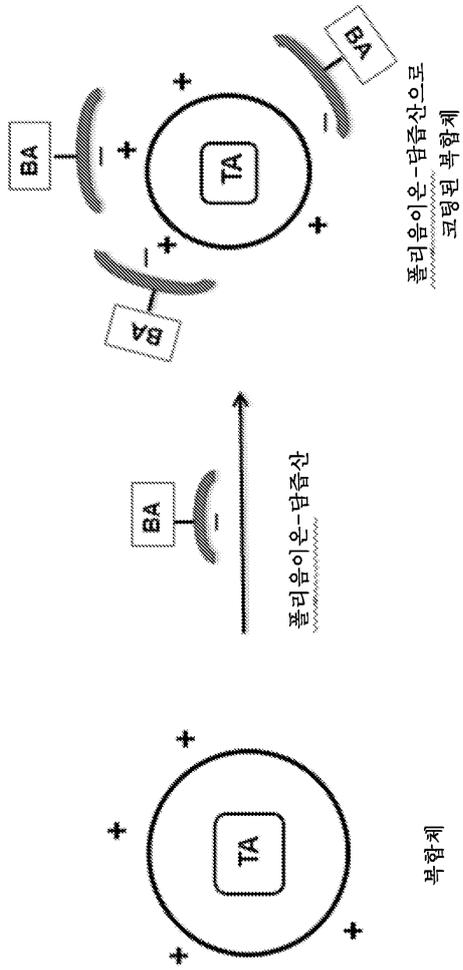
[0219]

[0220]

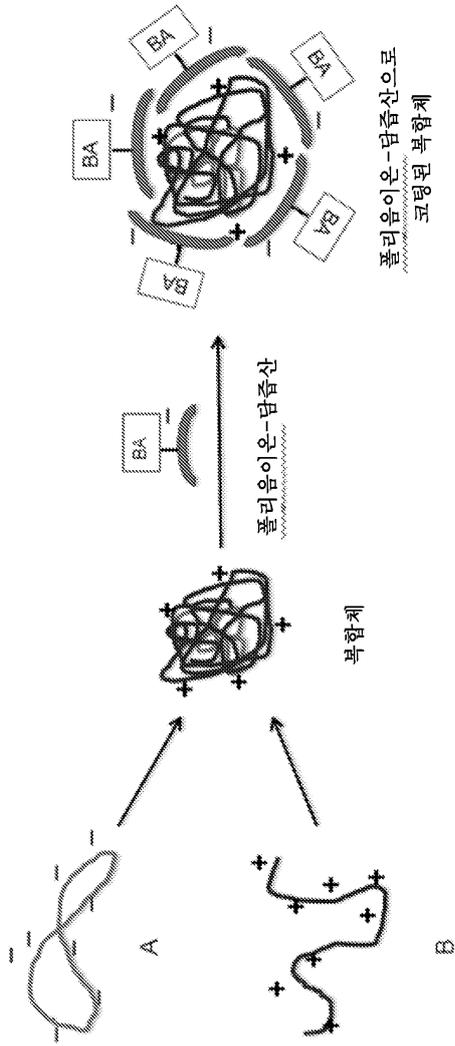
본 발명의 다양한 특징들 및 이점들은 하기 청구범위에 제시되어 있다.

도면

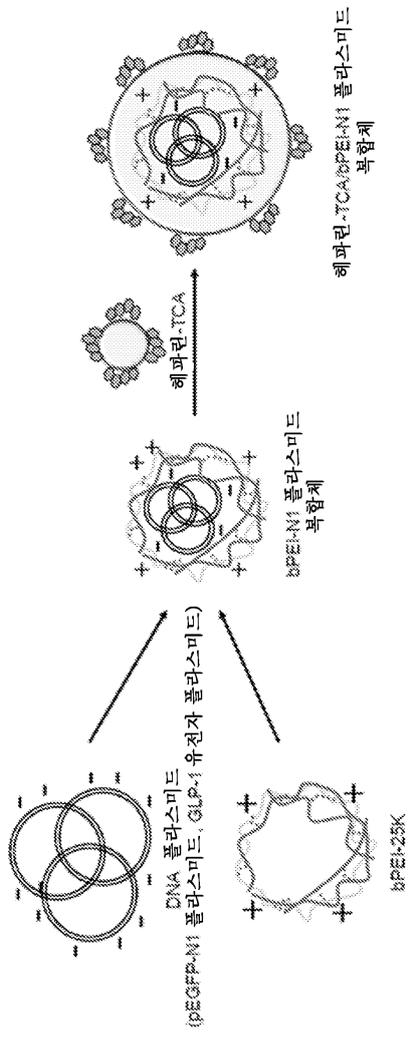
도면1a



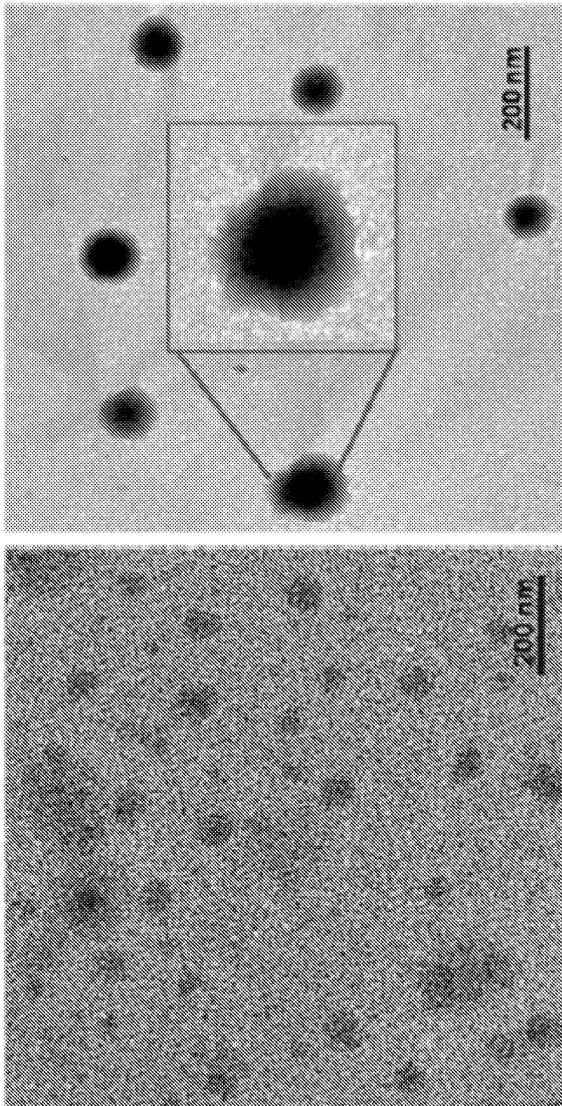
도면1b



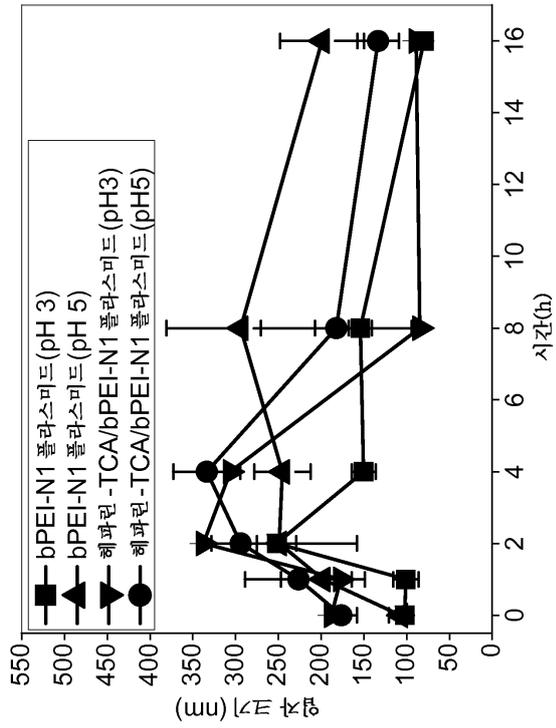
도면1c



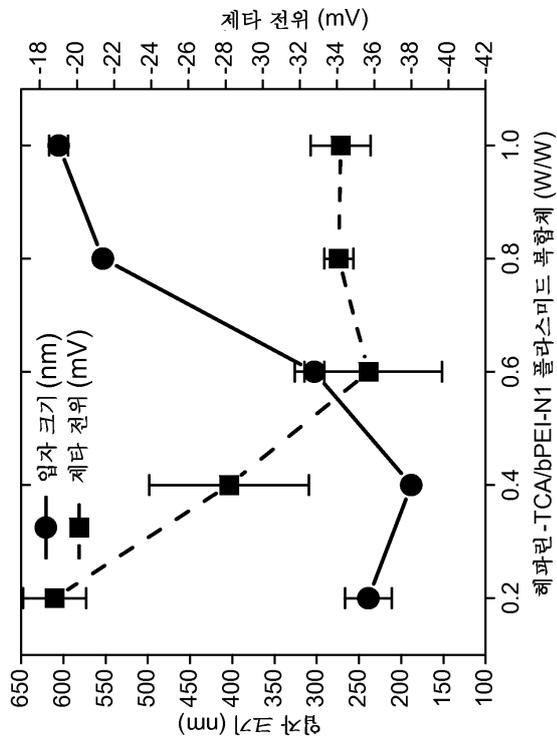
도면2



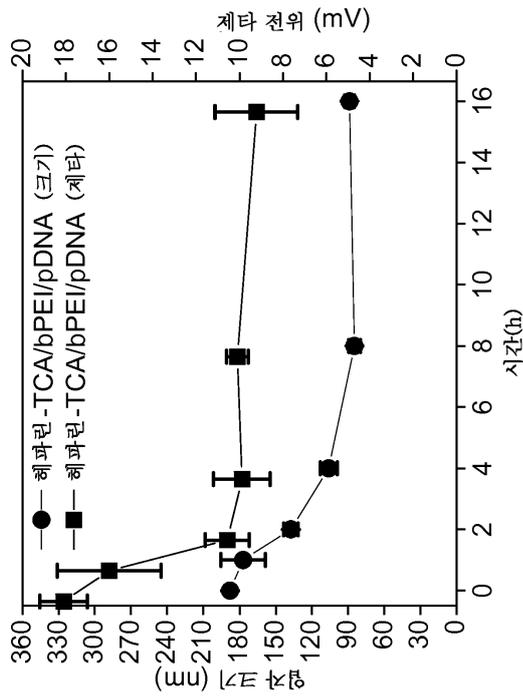
도면3



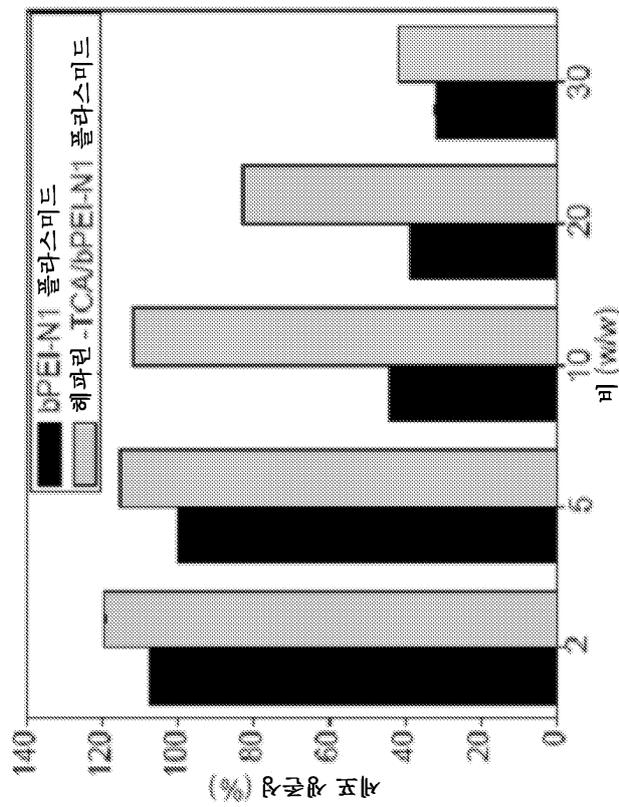
도면4a



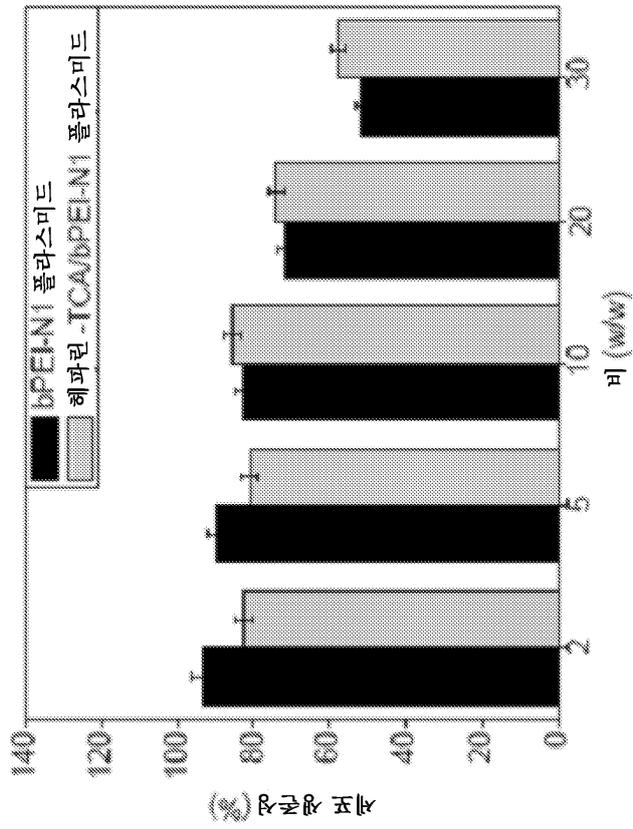
도면4b



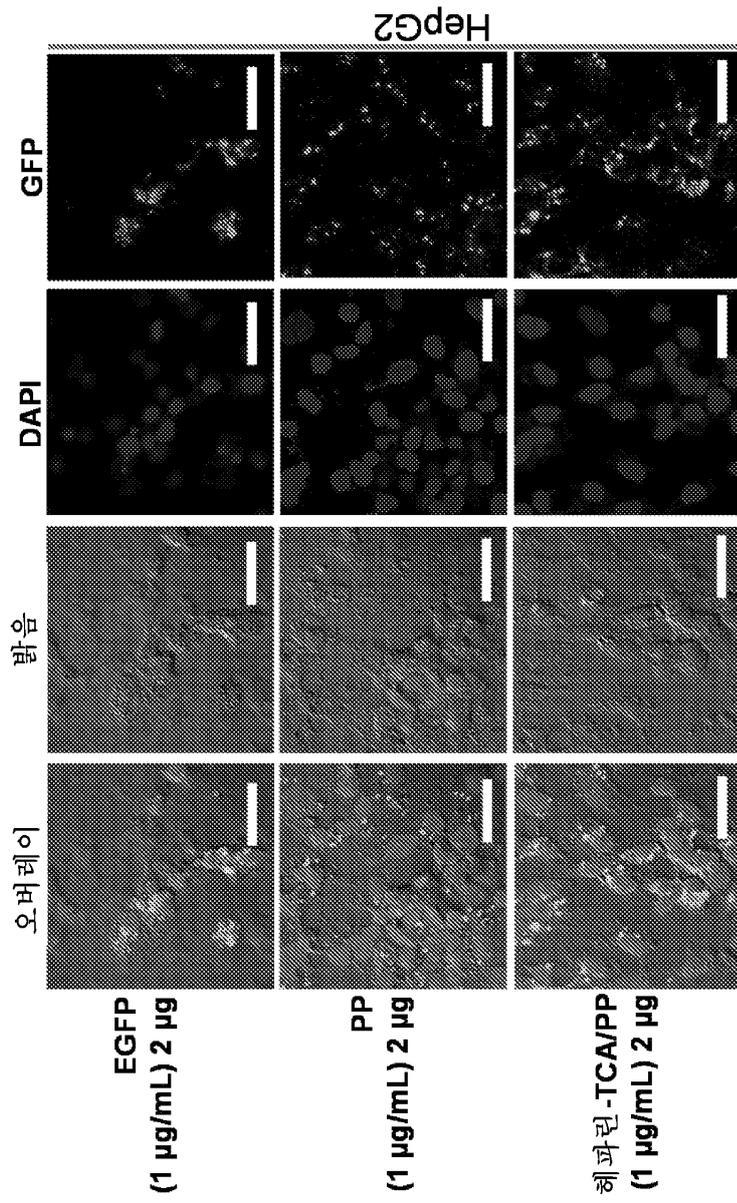
도면5a



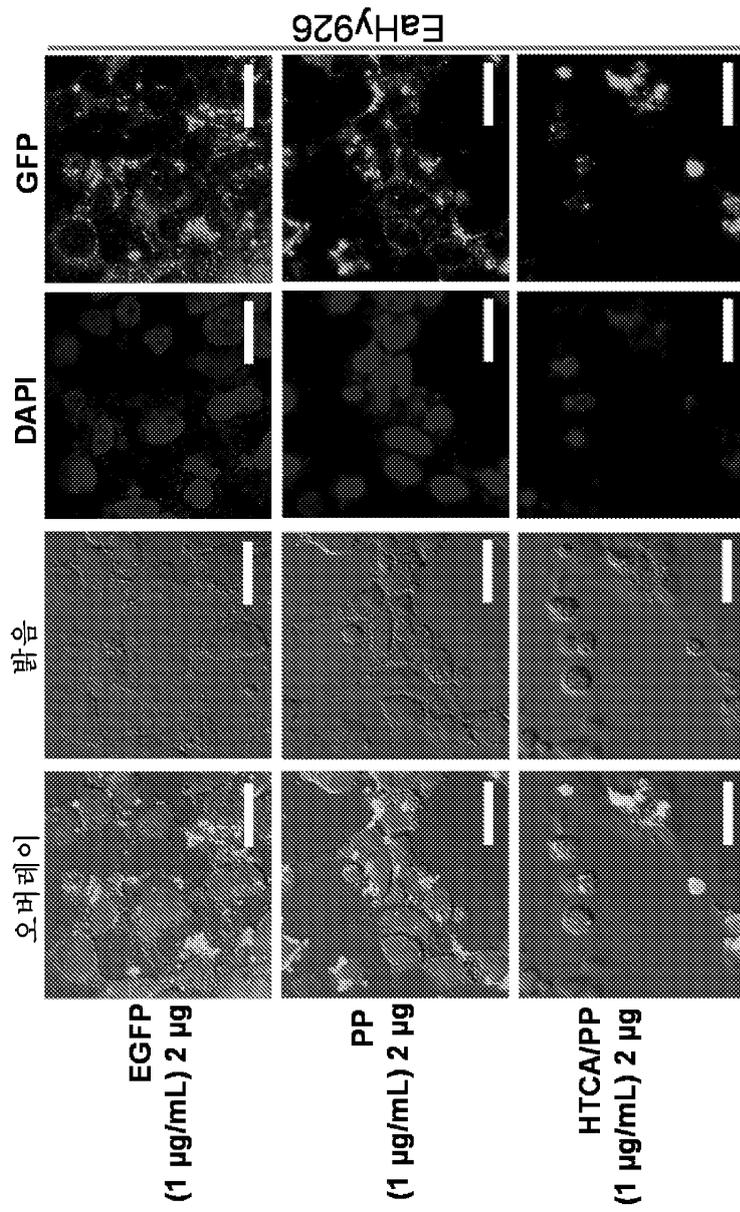
도면5b



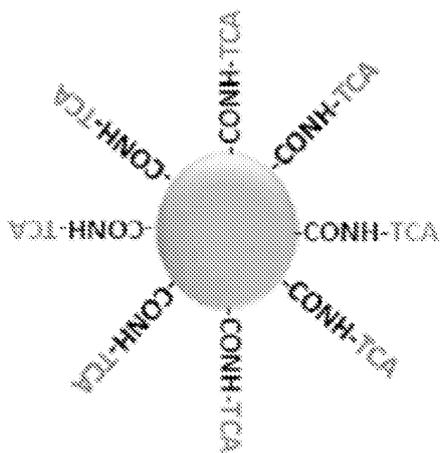
도면6a



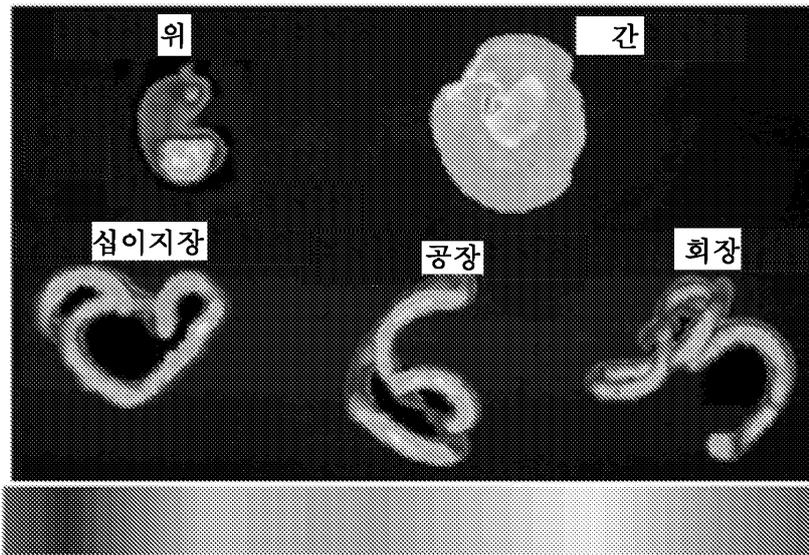
도면6b



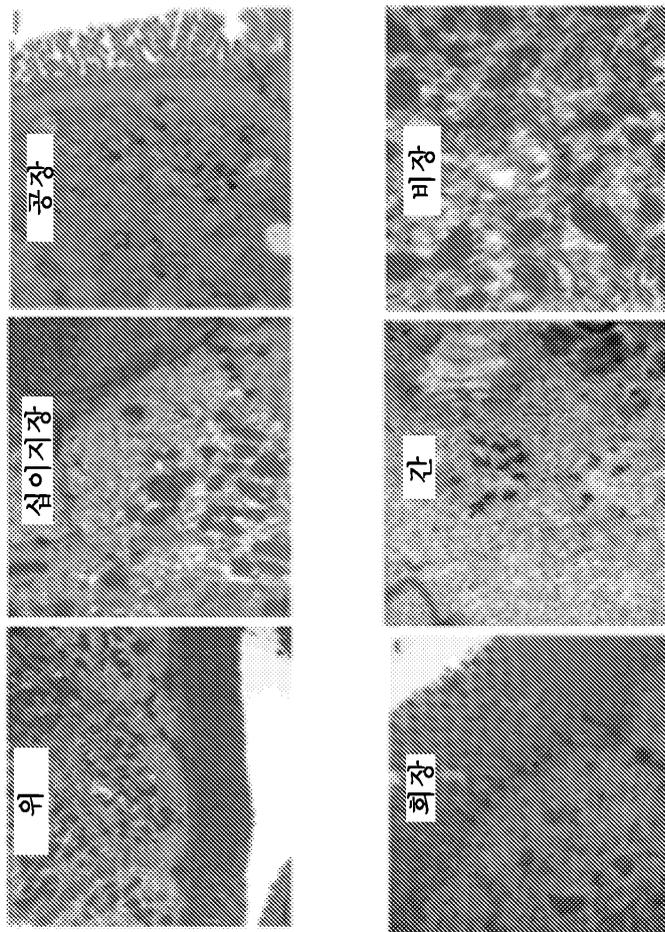
도면7a



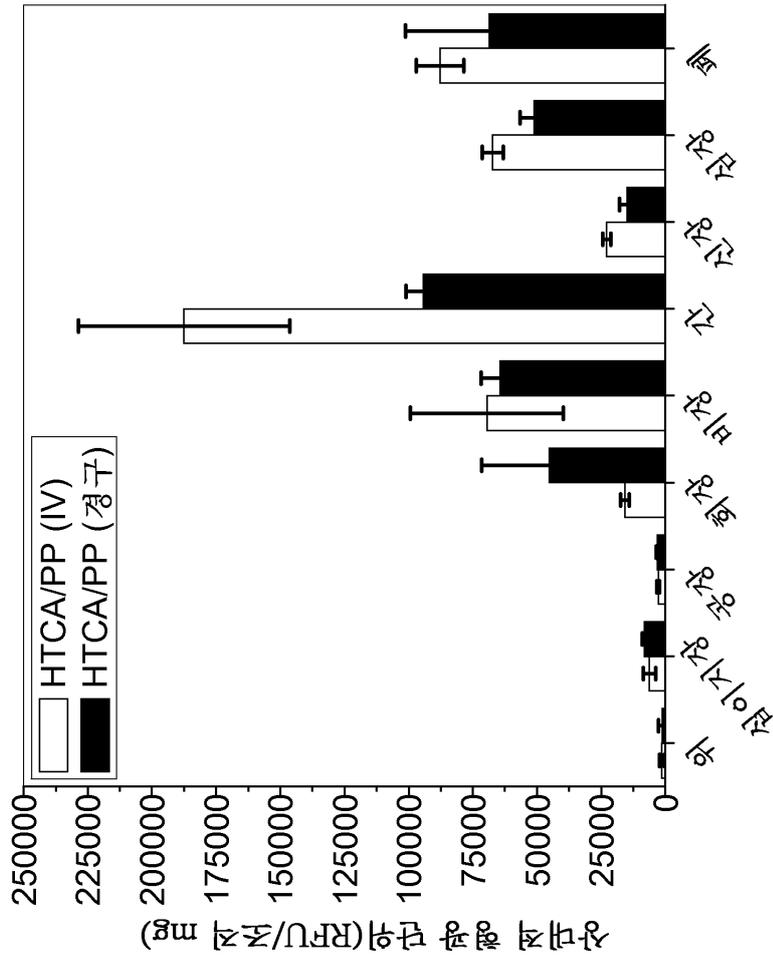
도면7b



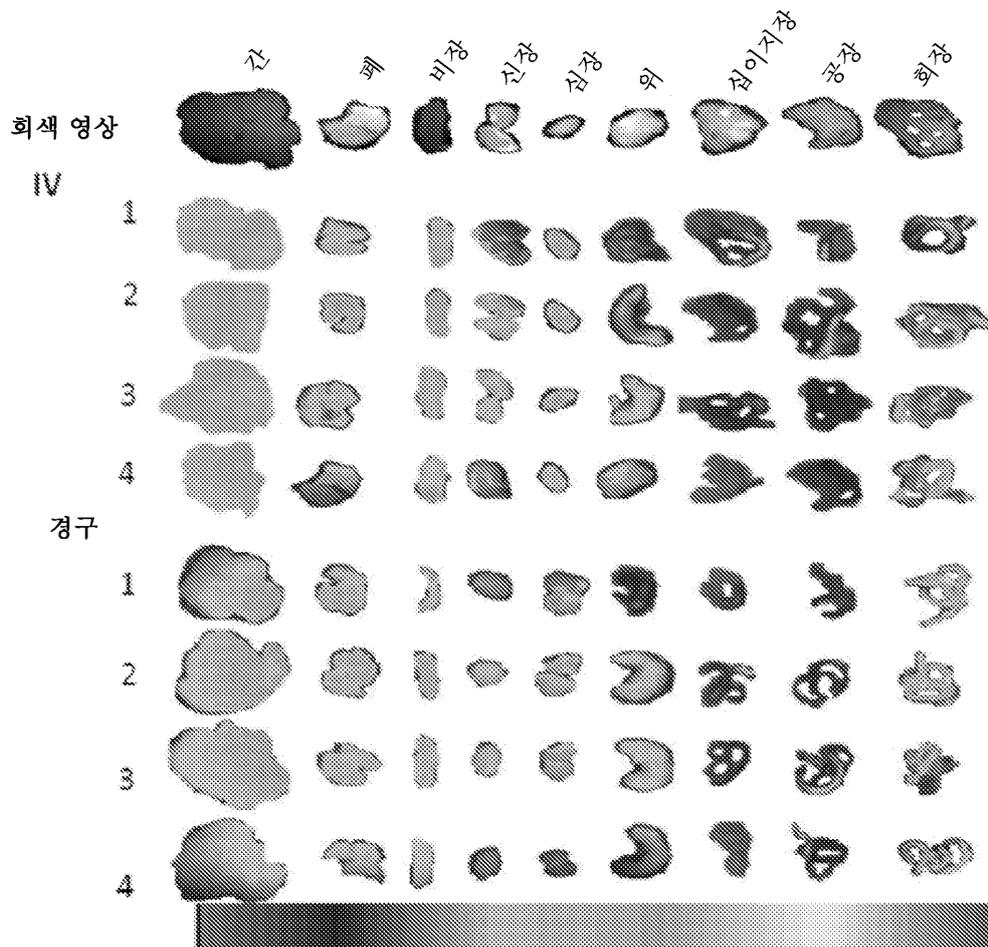
도면8



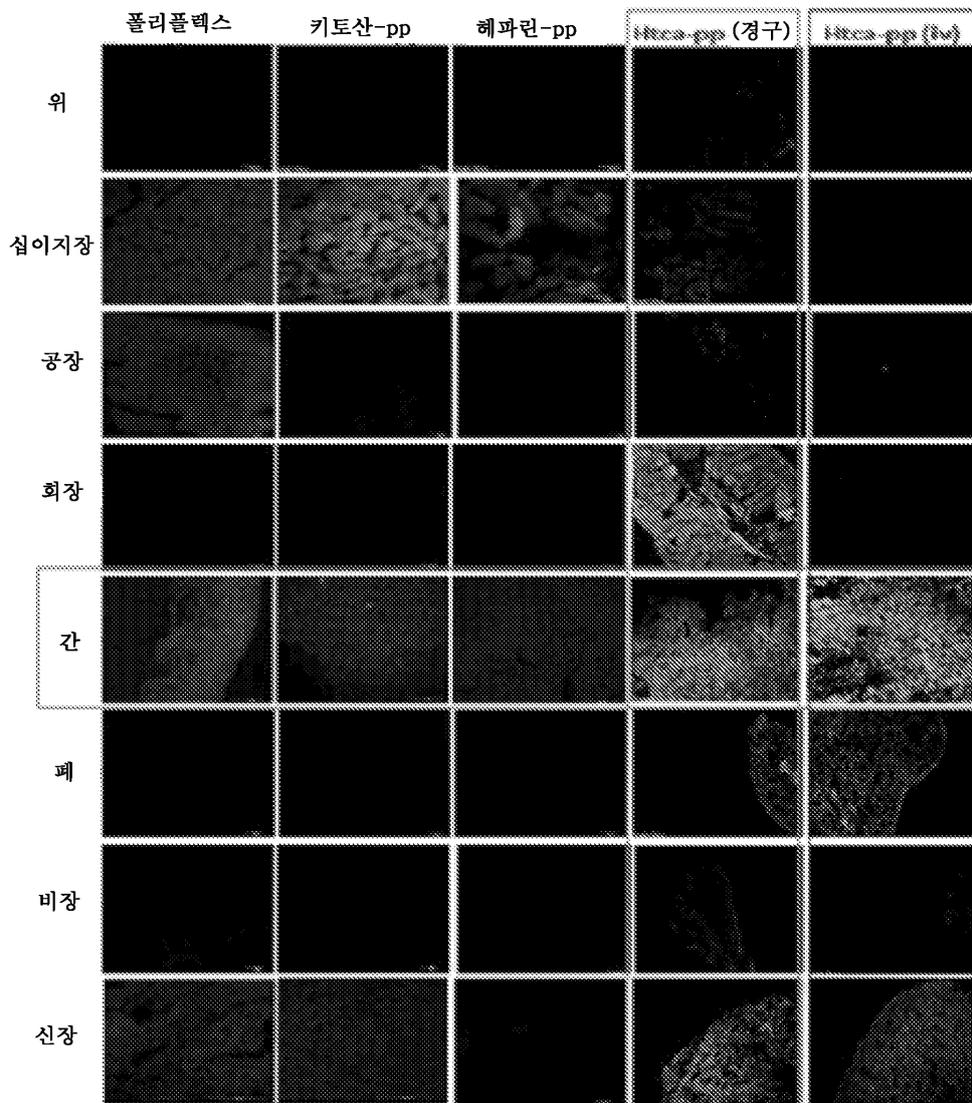
도면9



도면10



도면11

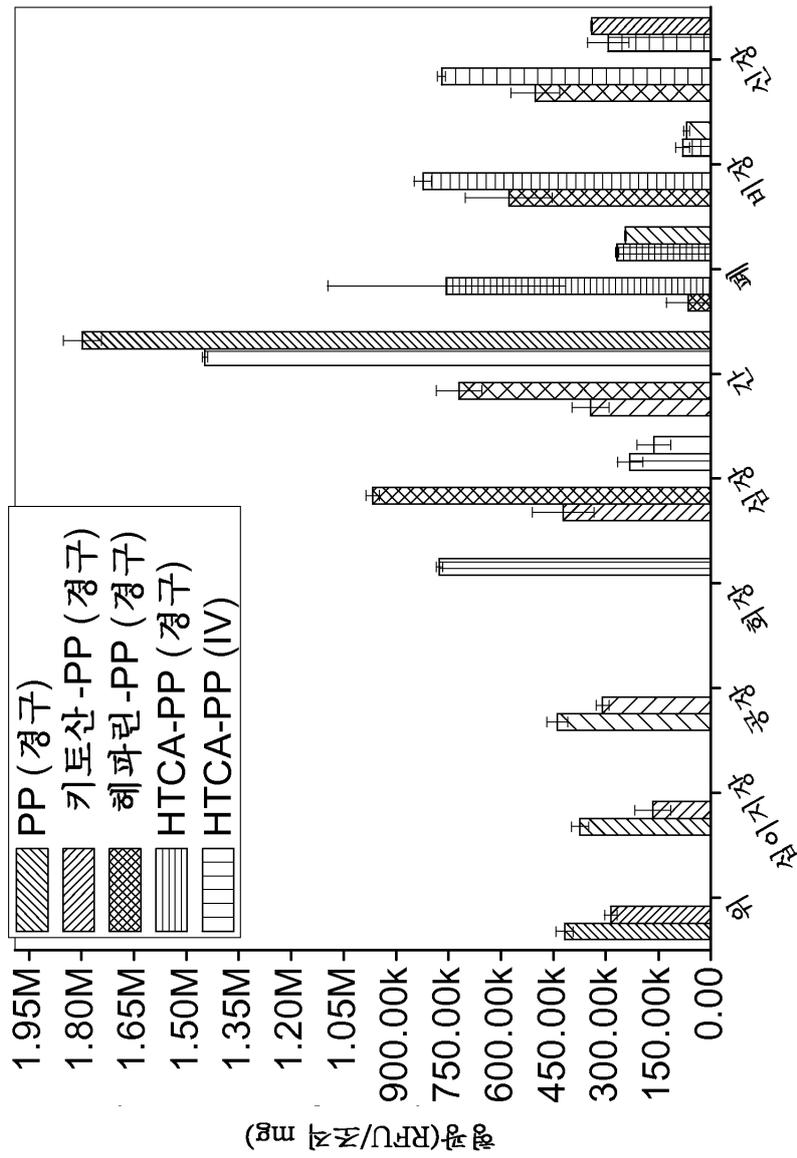


도면12

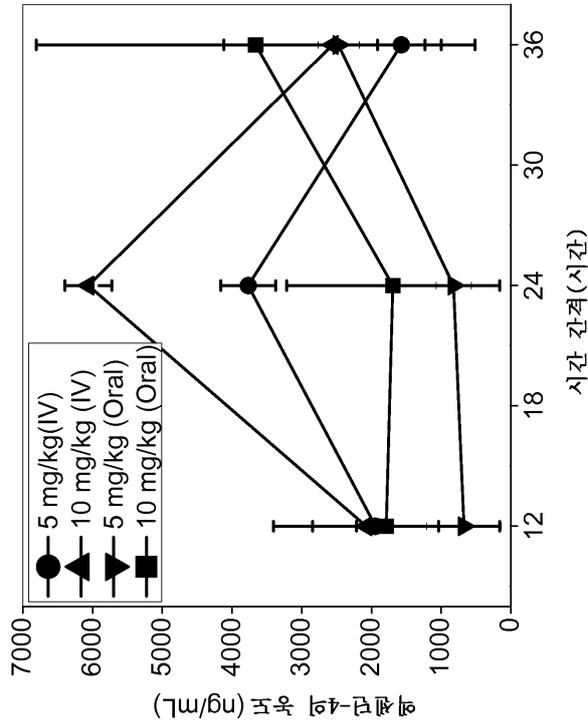
간



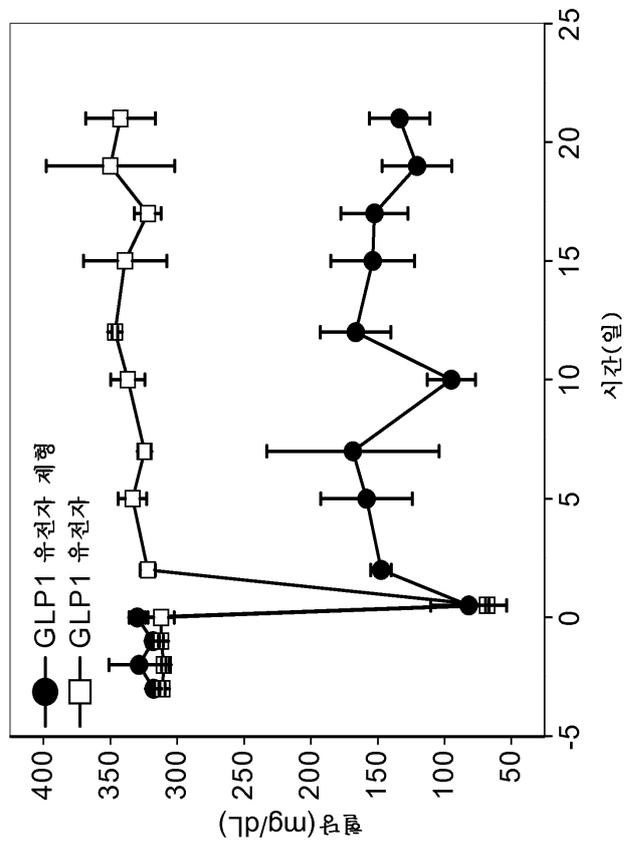
도면13



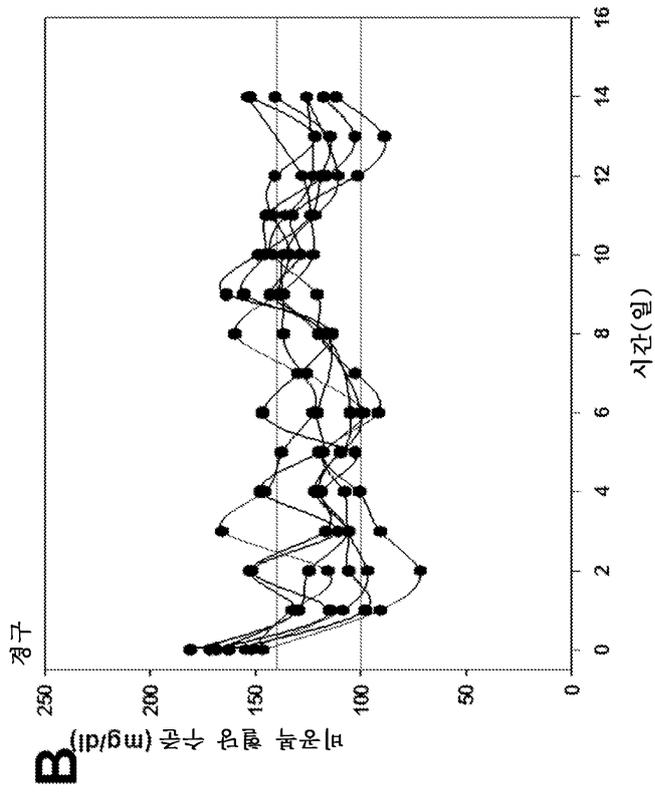
도면14



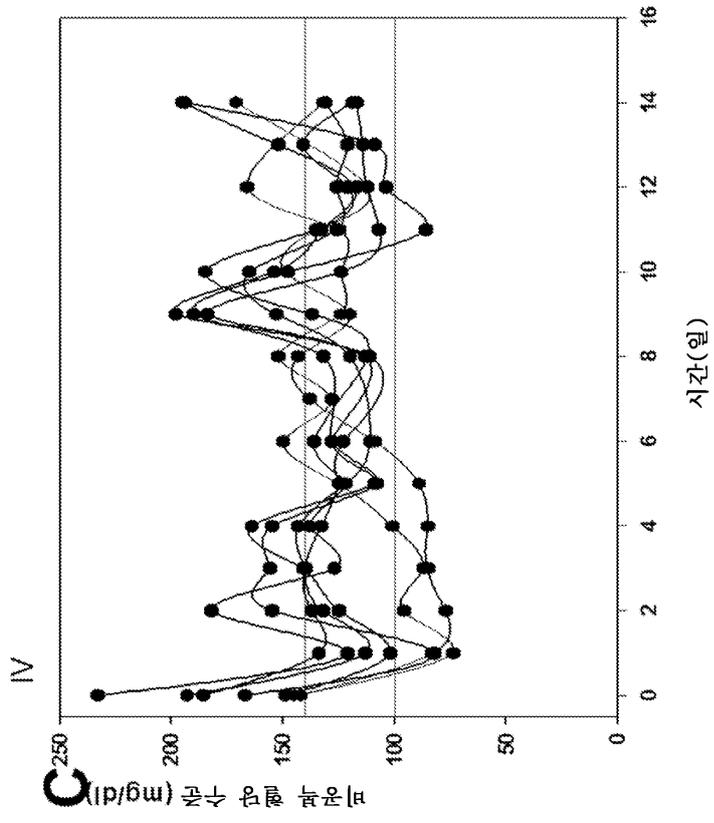
도면15a



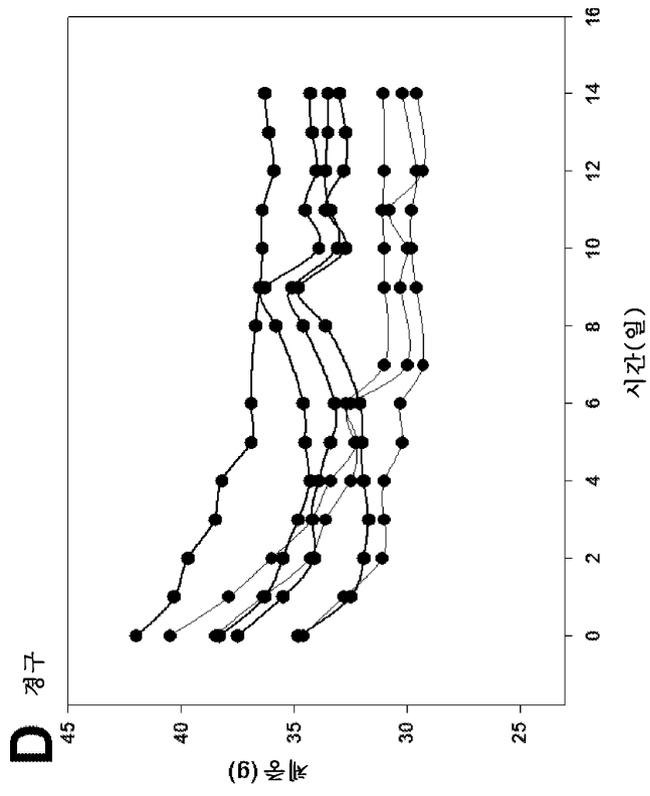
도면15b



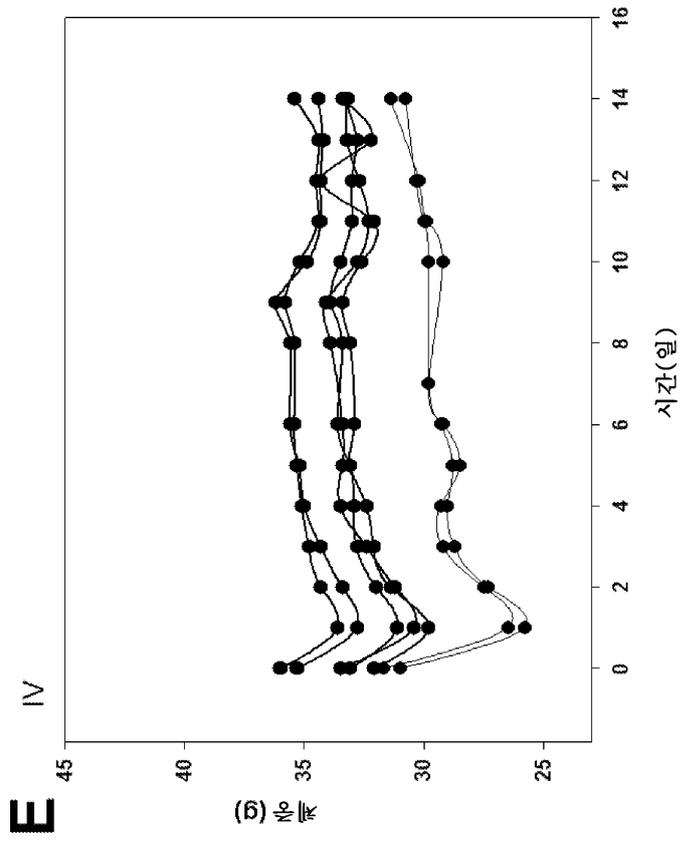
도면15c



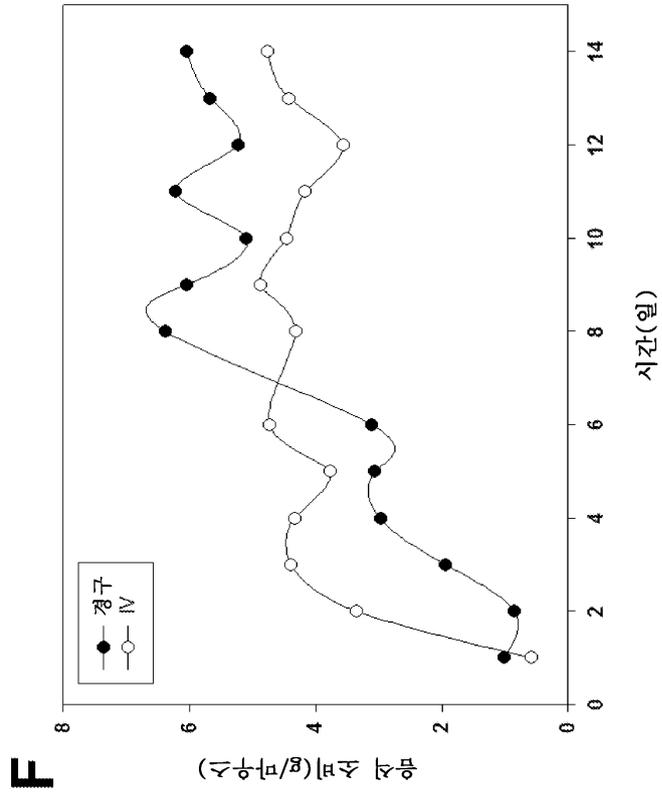
도면15d



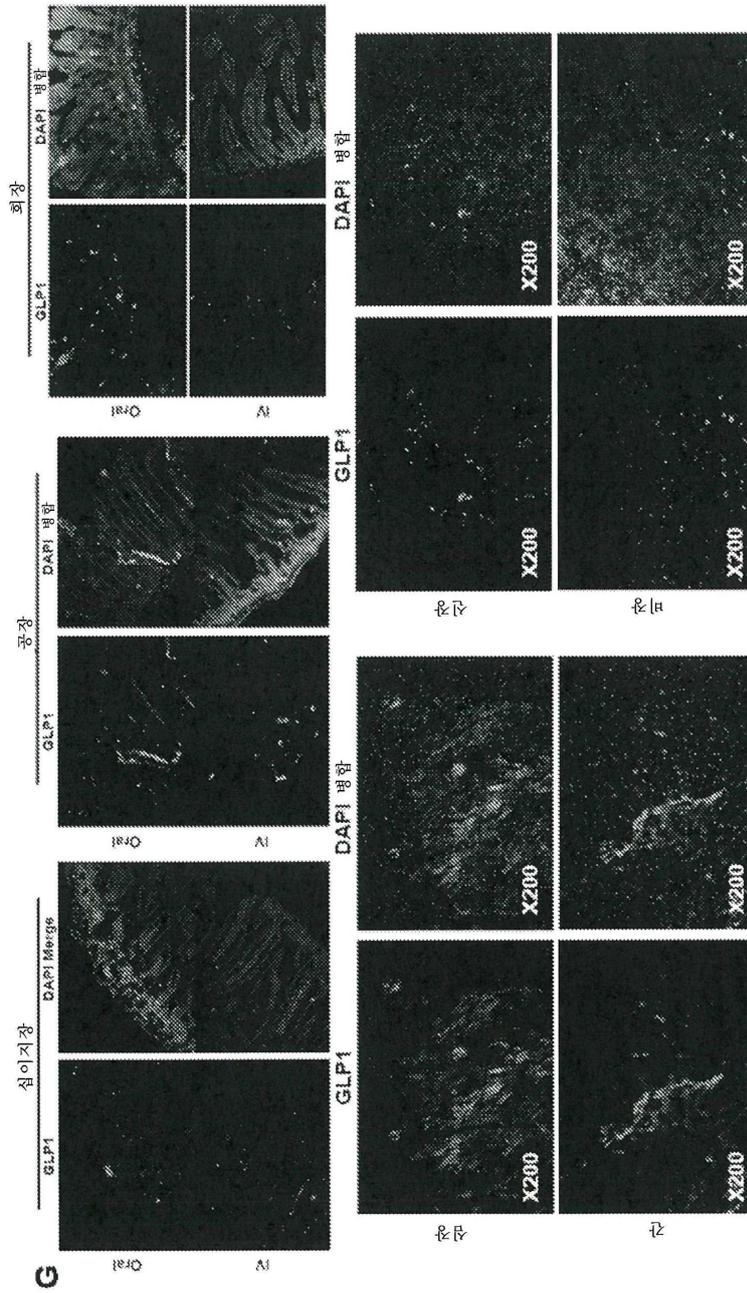
도면15e



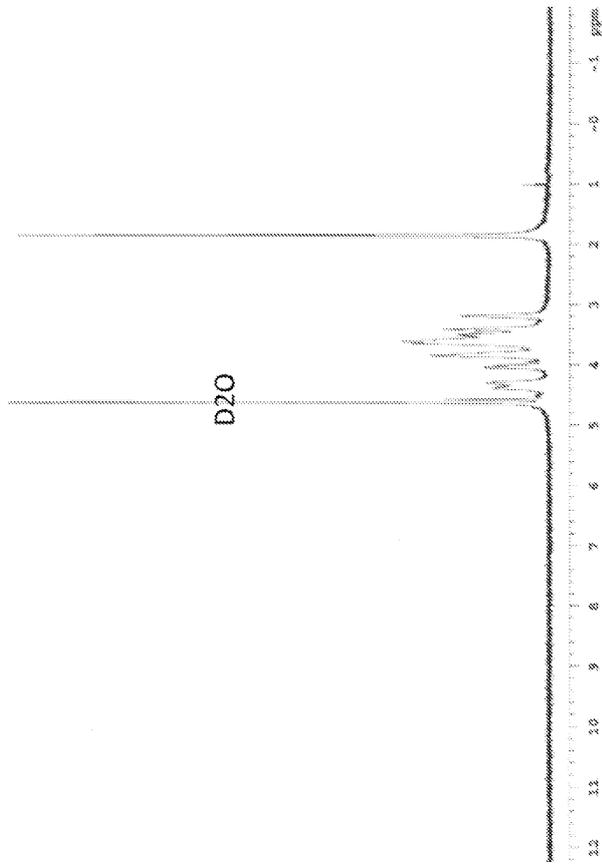
도면15f



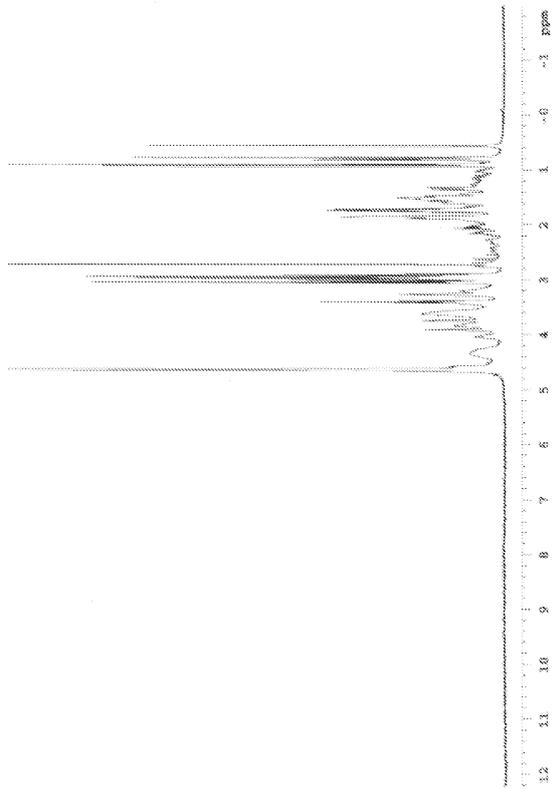
도면15g



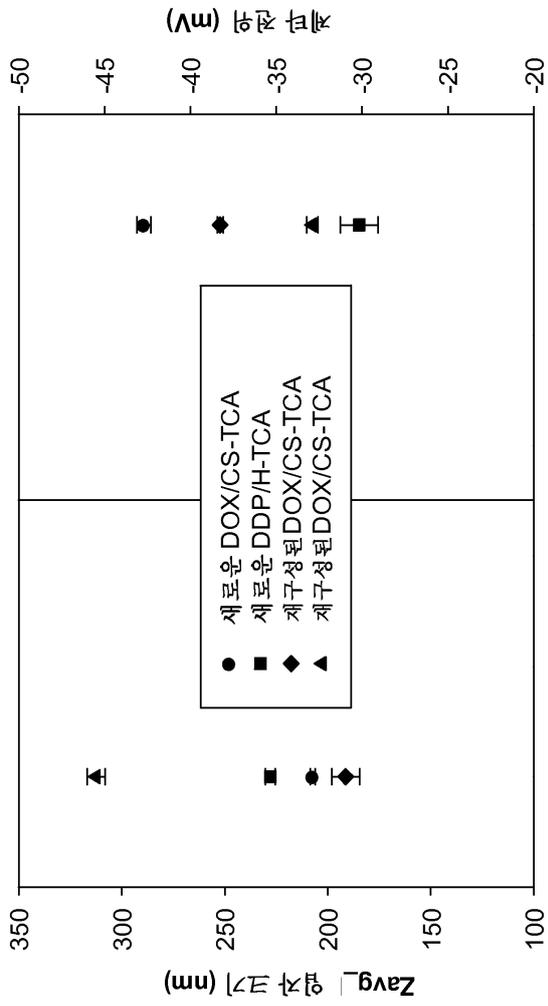
도면16a



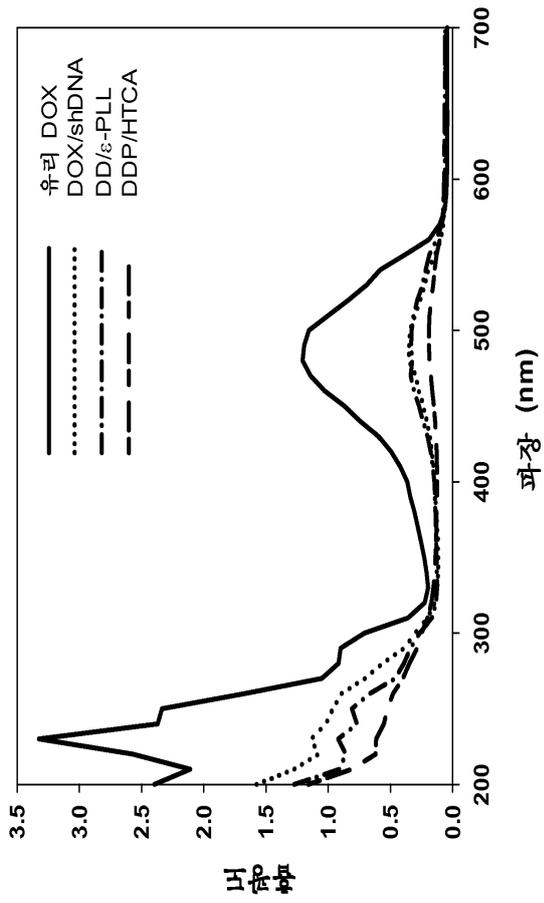
도면16b



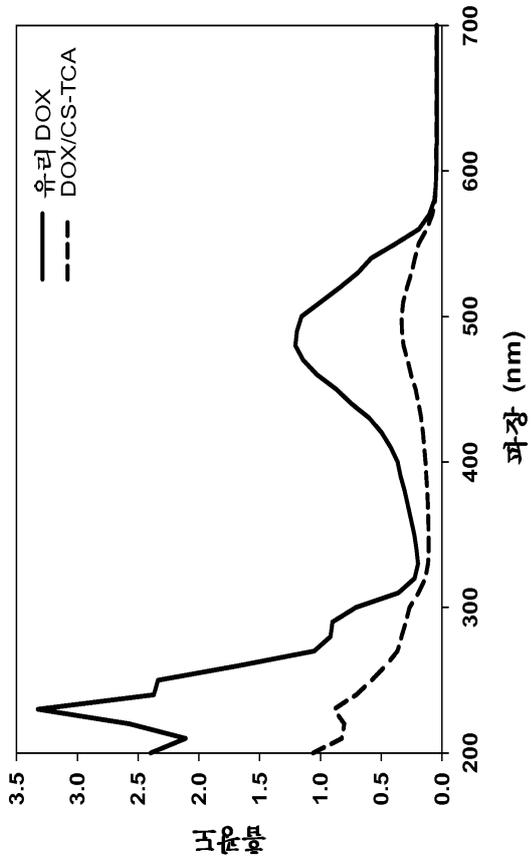
도면17



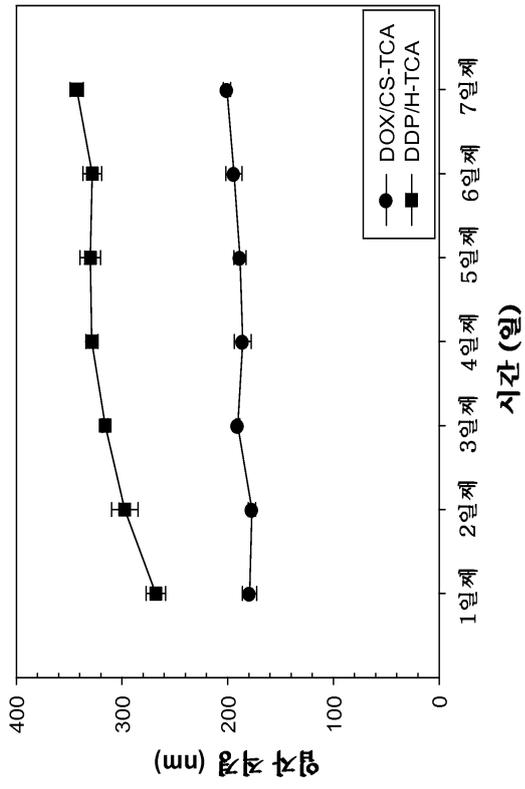
도면18a



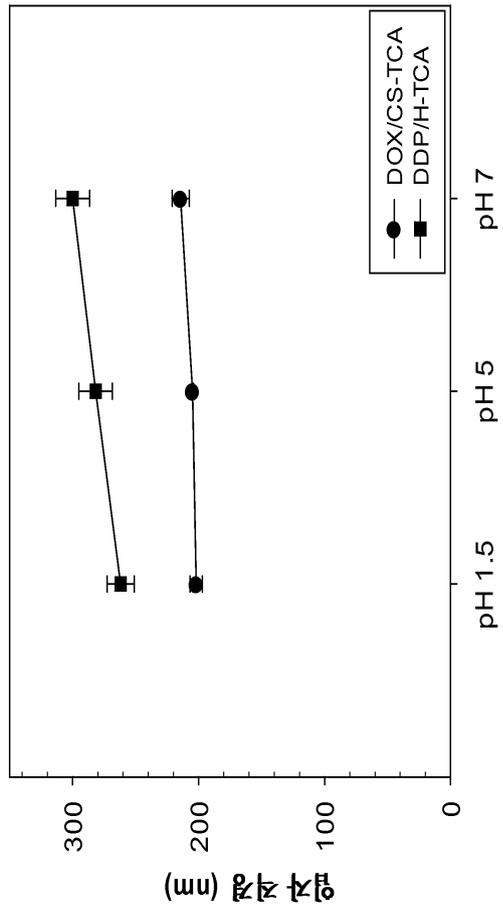
도면18b



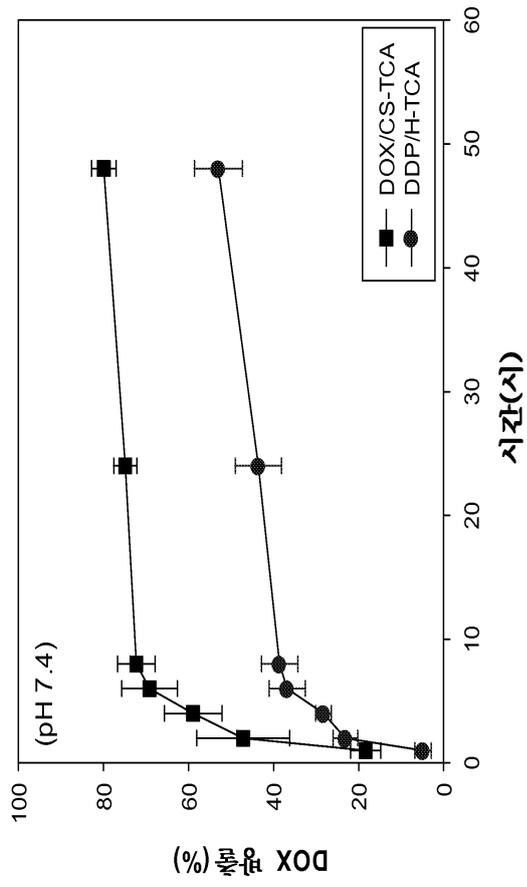
도면19a



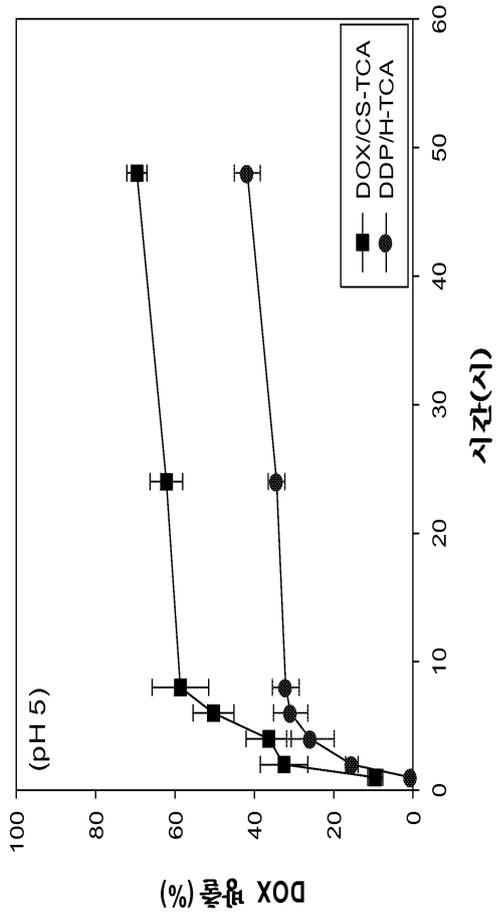
도면19b



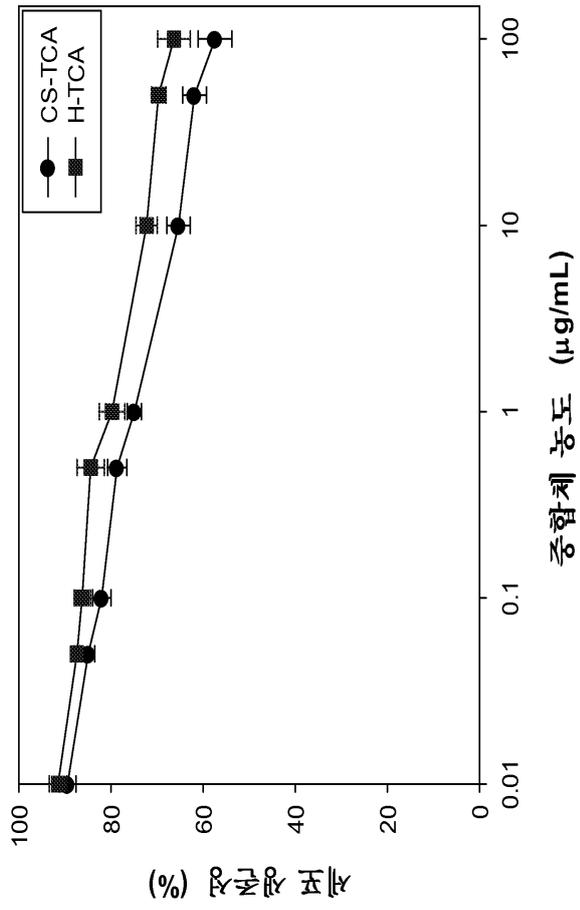
도면20a



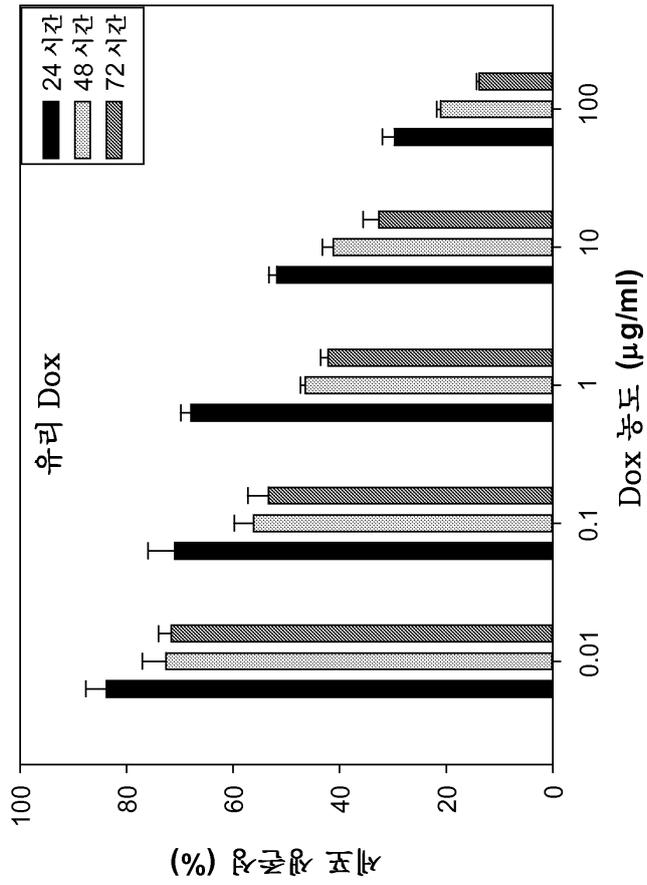
도면20b



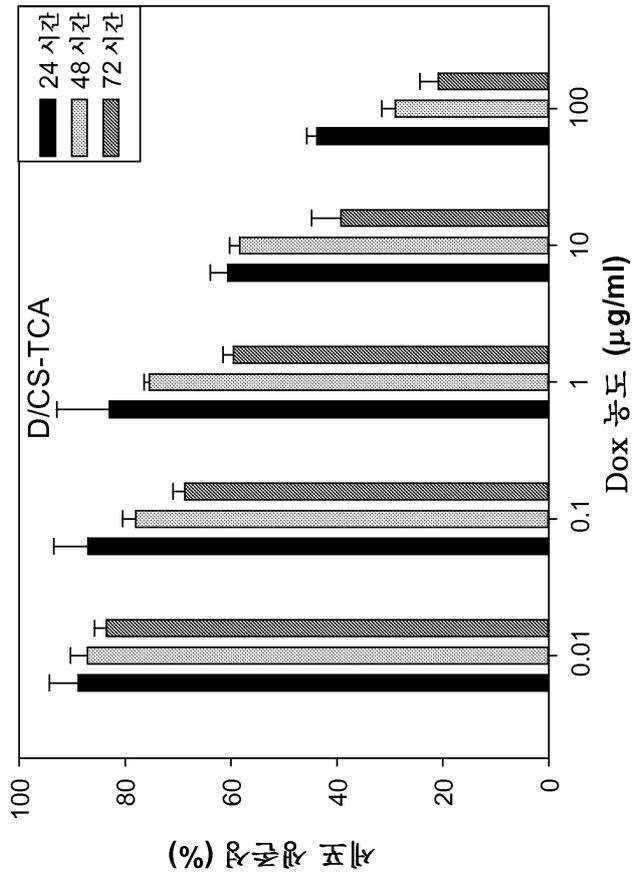
도면21



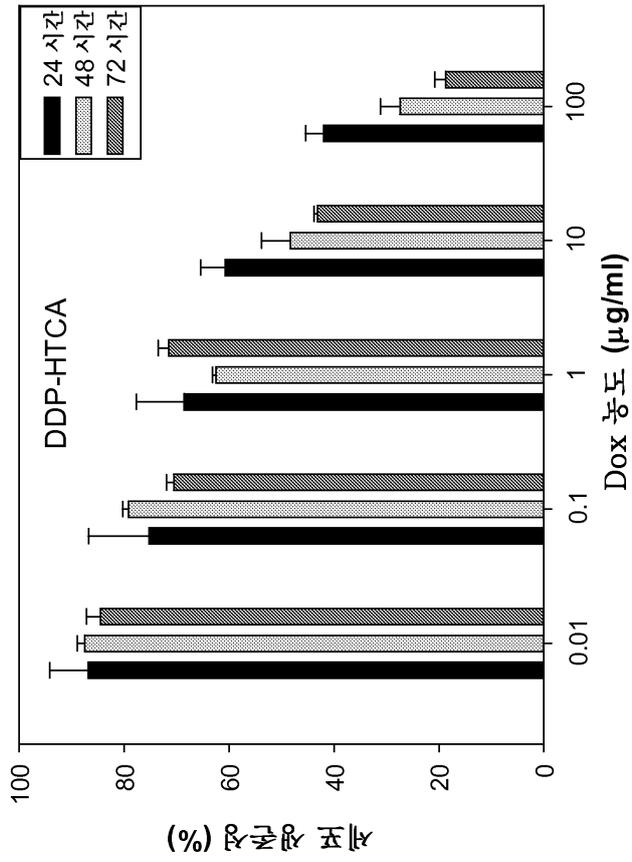
도면22a



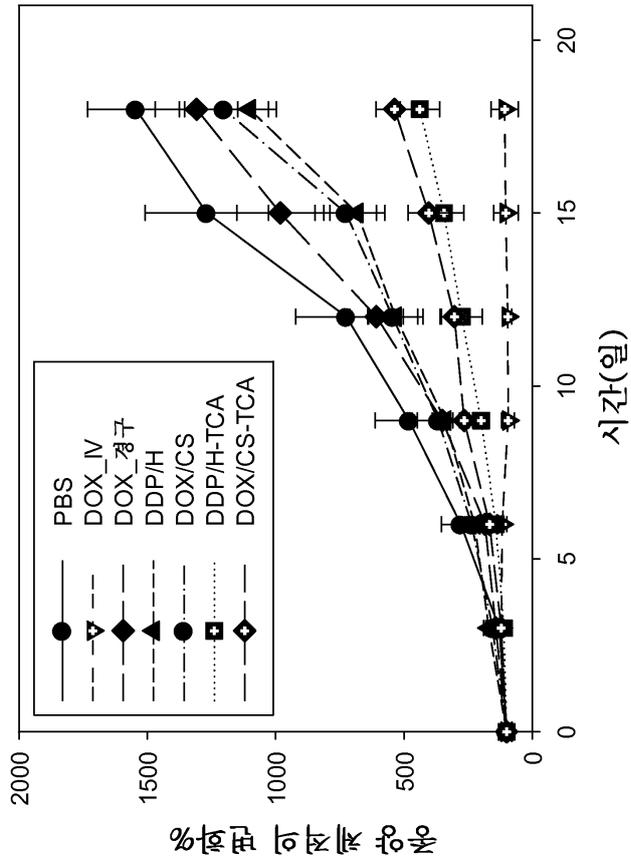
도면22b



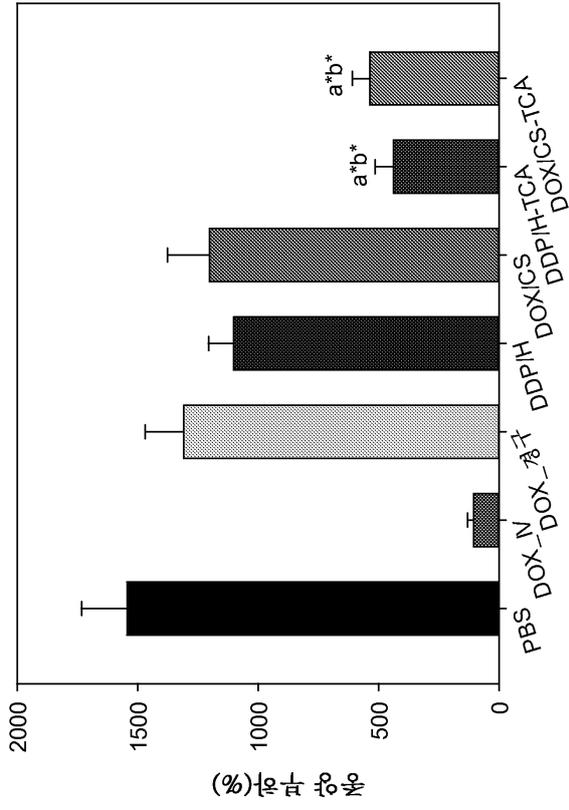
도면22c



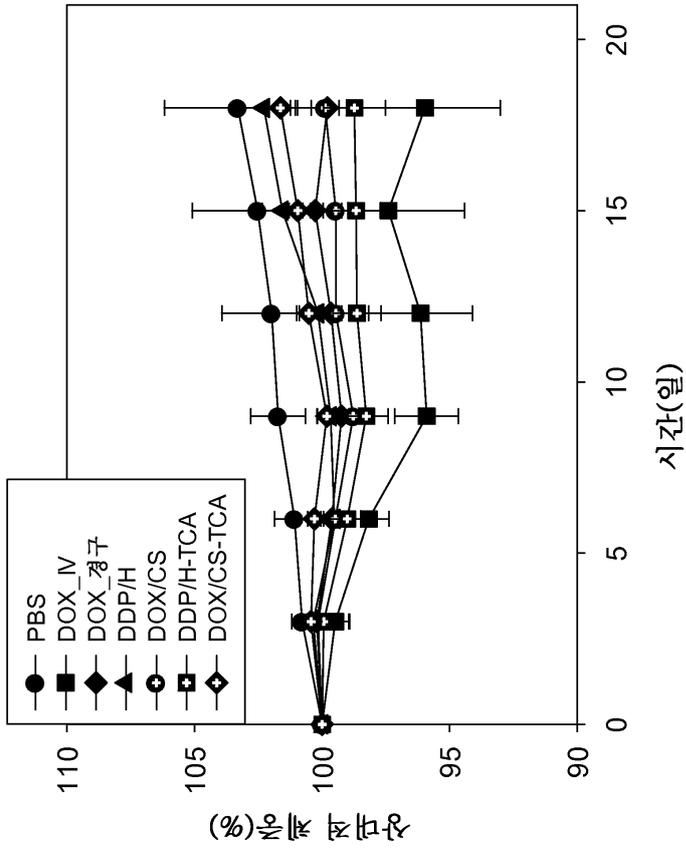
도면23a



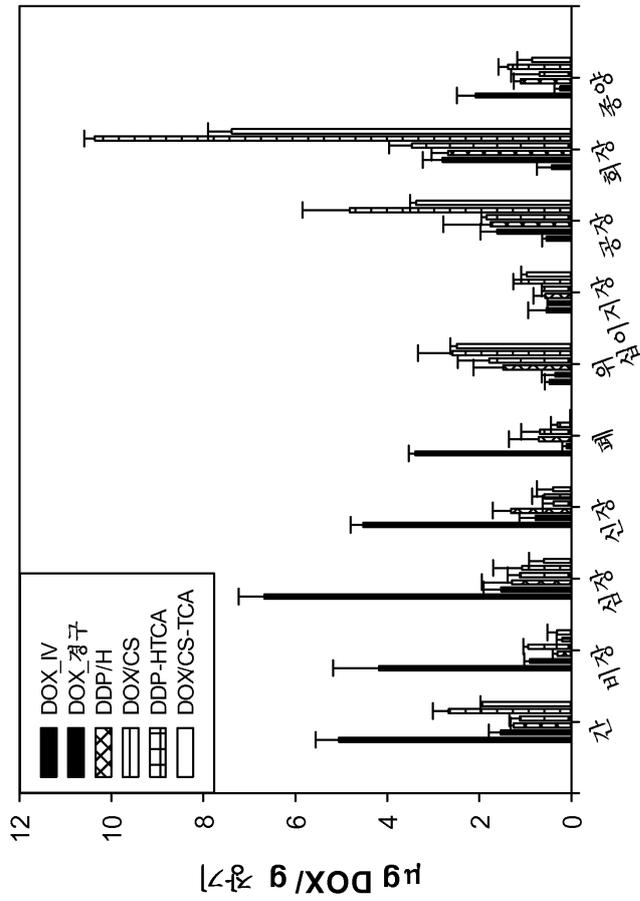
도면23b



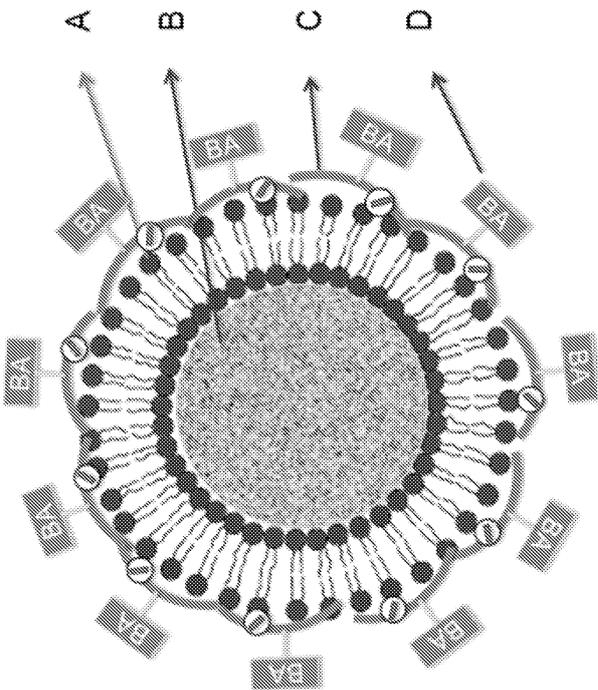
도면23c



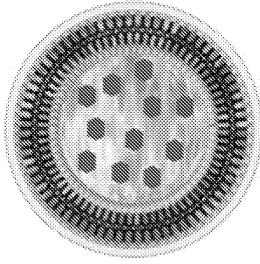
도면24



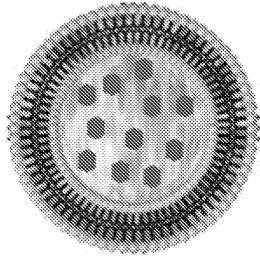
도면25



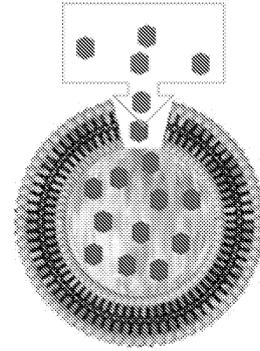
도면26



CS-TCA 접합체
증합체로의 코팅

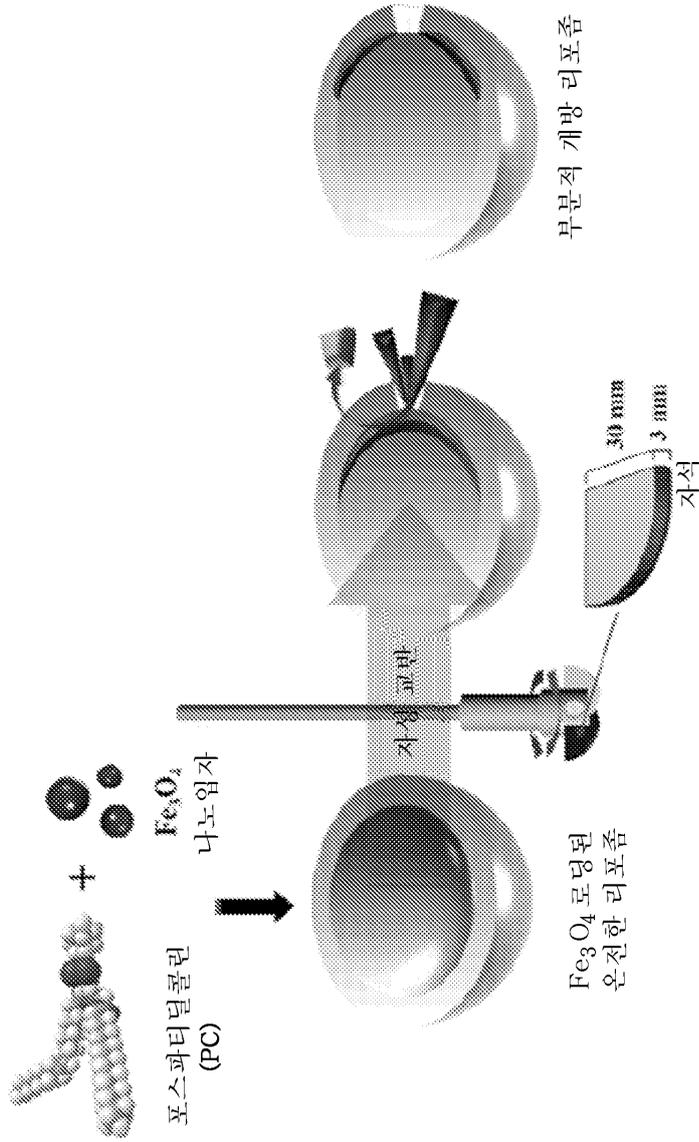


인지질의 출면 기공
인화산에 의한 불용

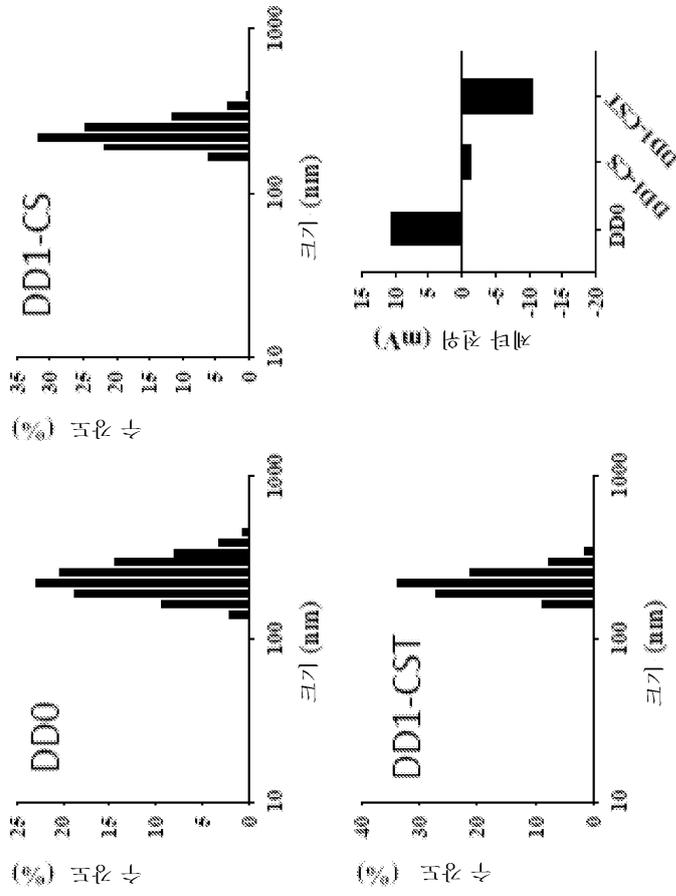


구멍을 통한
생체 거대분자
확산

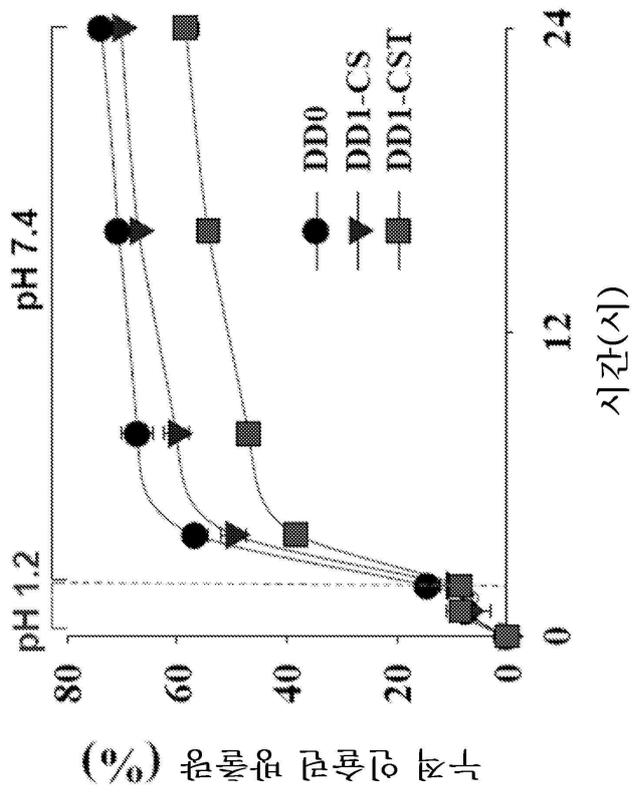
도면27



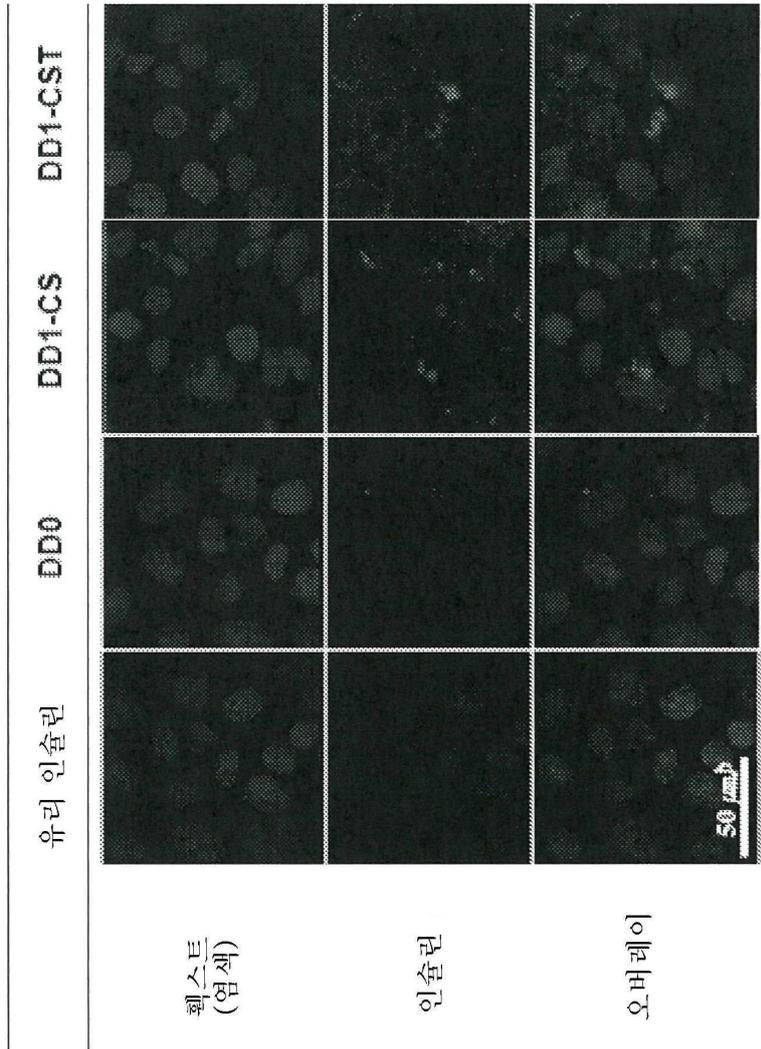
도면28



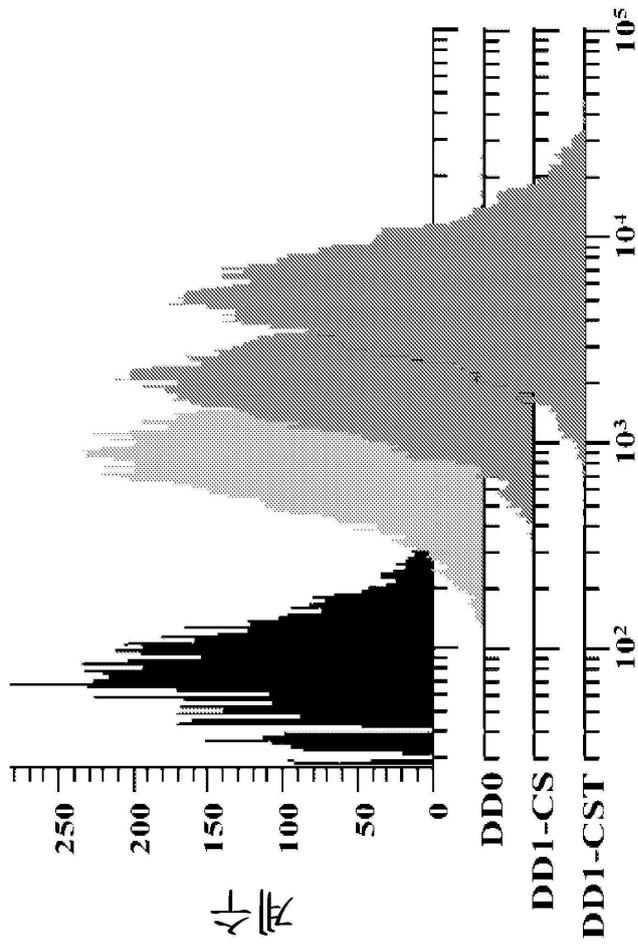
도면29



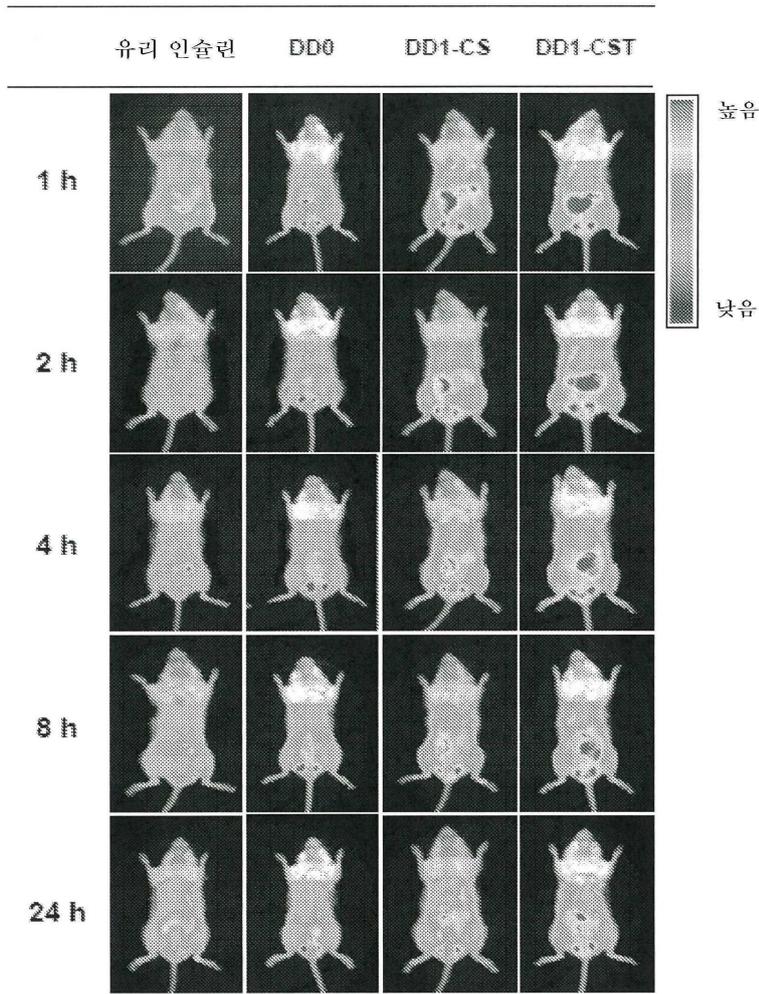
도면30



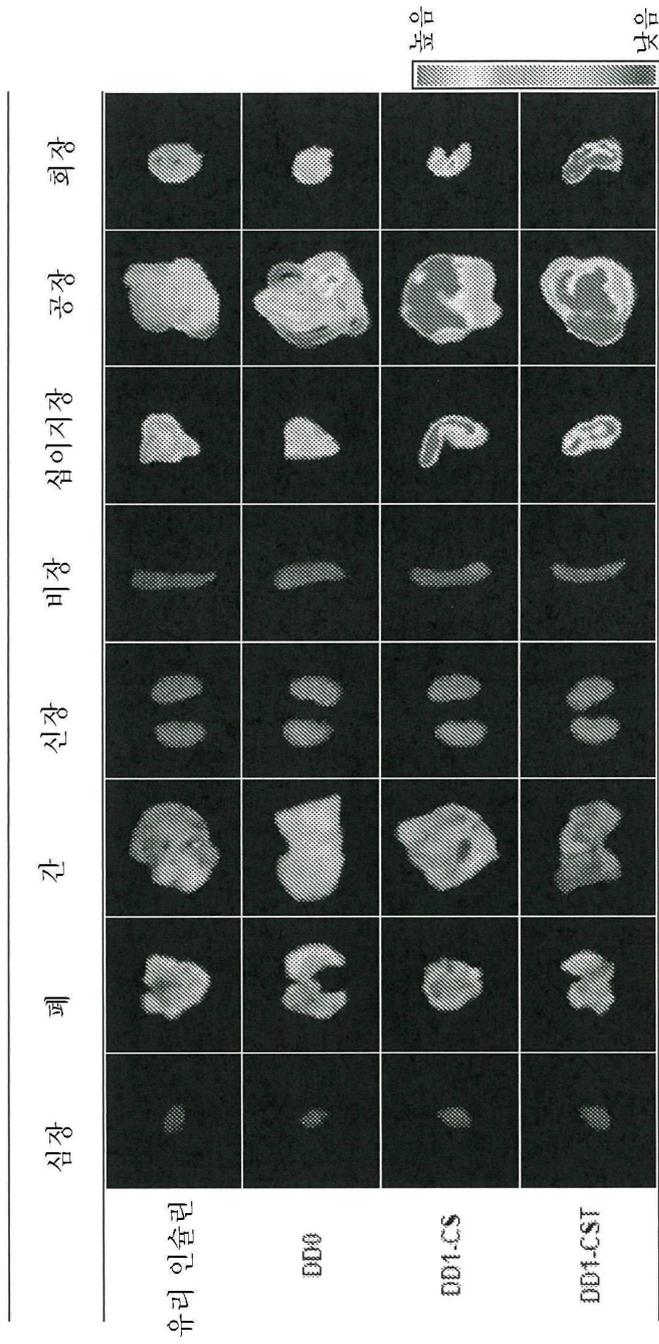
도면31



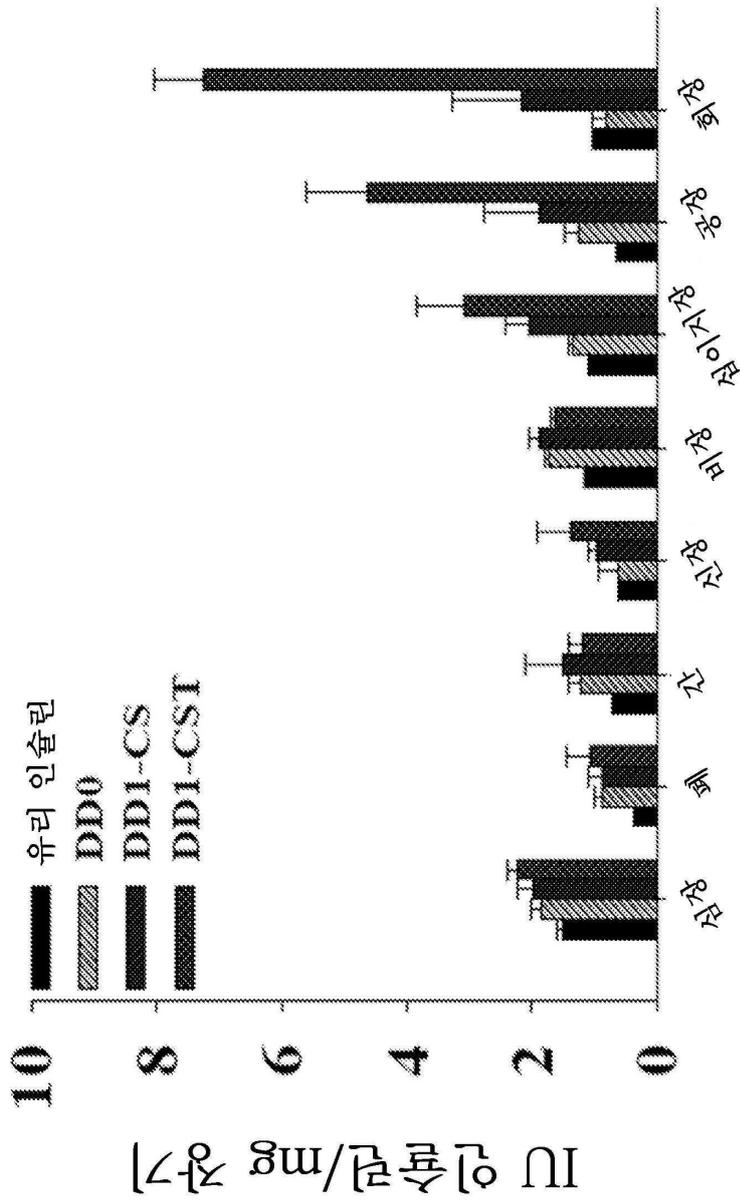
도면32



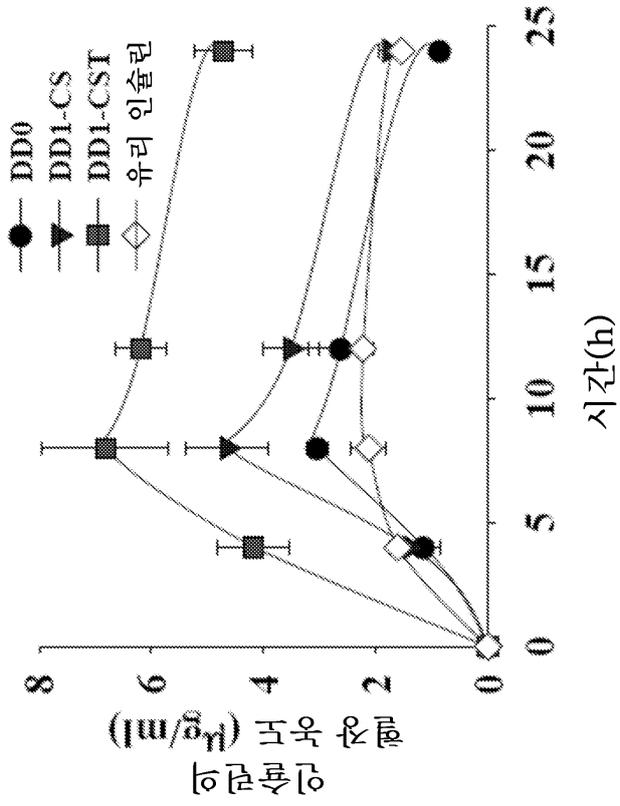
도면33



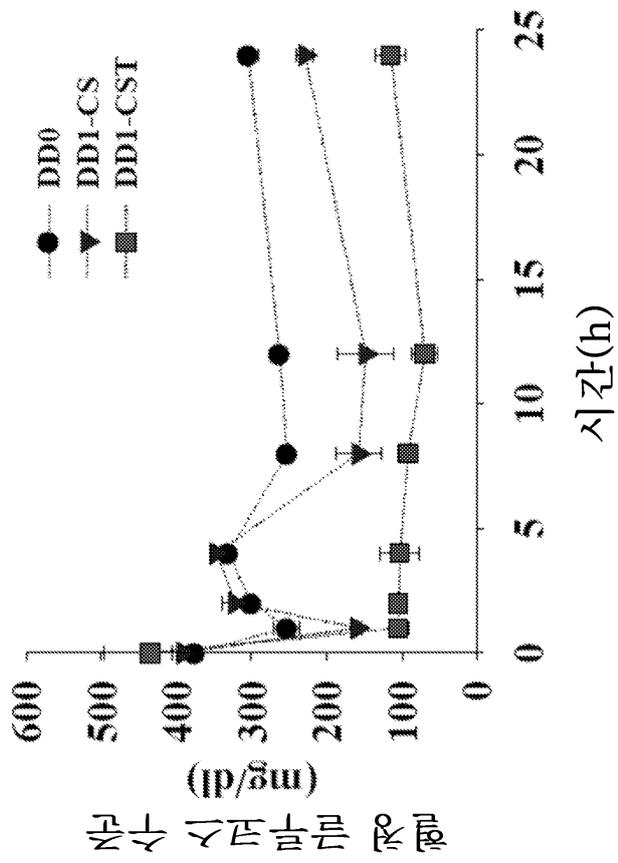
도면34



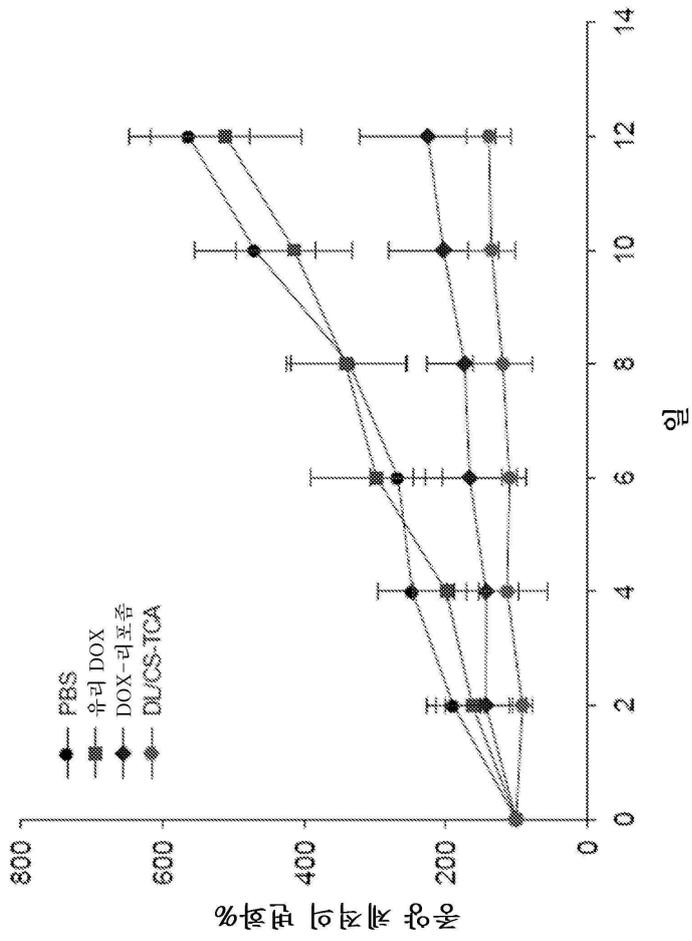
도면35



도면36



도면37



도면38

