

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
A61K 48/00

(45) 공고일자 2004년09월04일

(11) 등록번호 10-0431779

(24) 등록일자 2004년05월06일

(21) 출원번호	10-1997-0709840	(65) 공개번호	10-1999-0028522
(22) 출원일자	1997년 12월 29일	(43) 공개일자	1999년 04월 15일
번역문제출일자	1997년 12월 29일		
(86) 국제출원번호	PCT/JP1996/001824	(87) 국제공개번호	WO 1997/02047
(86) 국제출원일자	1996년 07월 02일	(87) 국제공개일자	1997년 01월 23일
(81) 지정국	국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 대한민국 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 케냐 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국		

(30) 우선권 주장 95/167744 1995년 07월 03일 일본(JP)

(73) 특허권자 가부시끼가이샤 고겐  
일본 도오교도 신주꾸꾸 시모오찌아이 3초메 5-18스미또모 세이야꾸 가부시끼가이샤

(72) 발명자 일본 오사까후 오사까시 쥬오꾸 도쇼마찌 2초메 2방 8고  
데라다 마사야끼  
일본 도오교도 네리마꾸 세끼마찌미나미 2초메 17방 14고  
오찌야 다카히로  
일본 도오교도 쥬오꾸 쓰끼지 5초메 1방 1고 고꾸리쯔 간센타 쓰끼지쥬꾸샤 218고지쯔  
미야따 데루오  
일본 도오교도 신주꾸꾸 시모오찌아이 3초메 6방 29고  
이또 히로시  
일본 도오교도 도시마꾸 죠시가야 3초메 3방 25고 1006  
(74) 대리인 특허법인코리아나

심사관 : 김경미

(54) 유전자제제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 의학 분야, 특히 유전자 치료에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 유전자를 함유하는 제제에 관한 것이다. 상기 제제는 생체 내로 투여되었을 때, 유전자 벡터(vector) 또는 유전자를 안정적으로 보유하며, 이를 점진적으로 방출하며, 그리고 장기간 치료 효과를 유지한다. 상기 제제는 알맞은 시기에 치료를 중지할 수 있도록 한다.

배경기술

<2> 유전자 치료는 활발한 연구 분야이며, 성공적인 치료에 대한 기대가 극도로 높다. 유전자 그 자체가 의학인 유전자 치료 접근에서, 질병에 대한 치료는 지정된 효소, 사이토킨 등의 유전자를 환자의 세포로 전이시킴으로써 수행된다. 이어서, 도입된 유전자는 환자의 몸 안에서 지정된 기질을 생산한다. 상기 유전자 치료는 두가지 유형으로 나눌 수 있다. 첫 번째 유형의 목적은 유전자를 환자의 게놈(genome)으로 통합하면서 지정된 유전자의 반영구적인 발현이다. 또 다른 유형의 목적은 게놈으로의 통합이 없는 유전자의 임시 발현이다. 후자의 유전자 치료 유형에서, 아데노바이러스(adenovirus)를 이용하는 방법 등이, 예를 들어 암세포에 대한 면역력을 증가시키는 사이토킨(cytokine)을 코딩하는 유전자를 환자에게 전이시키기 위한 방법으로서 종종 적용된다(Cardiovascular Research, 28, 445 (1994); Science, 256, 808 (1992); Gastroenterology, 106, 1076 (1994); TIBTECH, 11, 182 (1993); J. Biol Chem., 266, 3361 (1991); Nature Medicine, 1, 583, (1995); 및 그의 인용 참고).

<3> 바이러스 벡터를 사용한 경우에, 일반적으로 유전자 전이의 효율이 높을지라도, 면역 반응 때문

에, 반복 투여는 어렵다 (J. Biol. Chem., 269, 13695 (1994), Am. J. Respir. Cell Mol., 10, 369 (1994)).

- <4> 유기 화합물 또는 단백질 제제를 함유하는 의약을 점진적으로 방출하기 위한 콜라겐 사용 제제가 J. Controlled Release 33, 307-315 (1995) 등에 개시되어 있다. 그러나, 상기 개시된 통상의 의약 (예를 들면, 단백질 약물, 화학적으로 합성된 의약 등)은 예를 들면, 콜라겐 겔의 내부에 보유될 때, 약 1 내지 2 일 후에 용해된다.
- <5> 유전자 치료에 현재 사용되며, 유전자 벡터 (유전자 삽입 벡터) 또는 유전자를 직접적으로 투여하는 것을 포함하는 방법에서, 유전자 벡터 또는 유전자는 투여직후 세포에 접촉하고, 그 직후에, 유전자 전이가 시작되며, 한번에 완성된다. 또한 세포로 형질 전환된 유전자는 세포분열로 희석되거나(즉, 그 복제 수가 감소한다) 또는 세포 내 분해에 의해 감소된다. 그 결과 전이된 유전자의 발현은 충분한 치료를 수행하기에는 너무 짧은 수 주 동안만 유지될 수 있으며, 이는 상기 방법의 결점이다. 따라서, 유전자 벡터 또는 유전자의 반복 투여가 필요하다. 그러므로, 본 발명의 목적은 상기 단점을 극복하고, 유전자 벡터 또는 유전자를 점진적으로 방출할 수 있고, 치료 효과를 장기간 유지할 수 있는 제제를 제공하는 것이다.
- <6> 또한, 바이러스 벡터 등을 사용한 유전자 치료에서는 반복 투여가 어렵기 때문에 반복 투여를 가능하게 하는 방법이 기대된다. 따라서, 본 발명의 두 번째 목적은 바이러스 벡터 등을 사용한 유전자 치료에서 반복 투여를 가능하게 하는 유전자 제제를 제공하는 것이다.
- <7> 또한, 유전자가 단백질 제제를 위한 기간보다 장기간인 수 주 동안 발현되기 때문에, 생체 내의 유전자 발현은 안전성을 확인하기 위해 임의의 시간에 중지될 수 있을 것이 요망된다. 따라서, 본 발명의 세 번째 목적은 치료를 종료하고자 할 때, 유전자 전이를 신속하게 중지할 수 있는 유전자 제제를 제공하는 것이다.
- <8> 발명의 요약
- <9> 본 발명자는 유전자 벡터 또는 유전자를 점진적으로 방출하기 위한 다양한 제제를 시험해 왔으며, 유전자 또는 유전자가 삽입된 벡터가 생물학적으로 적합한 물질로 이루어진 담체에 결합되는 제제가 생체 내로 투여되었을 때, 유전자는 예상 외로 수 개월간 발현됨을 발견하였다. 본 발명자들은 또한 상기 제제가 생체로 반복 투여될 수 있음을 발견하였으며, 따라서 본 발명이 완성되었다.
- <10> 따라서, 본 발명의 특성은 하기와 같다.
- <11> (1) 유전자를 포함하며, 상기 유전자 또는 상기 유전자가 삽입된 벡터가 생물학적으로 적합한 물질로 이루어진 담체에 혼입된 유전자 제제.
- <12> (2) (1)에 있어서, 상기 생물학적으로 적합한 물질이 콜라겐, 젤라틴, 피브린, 알부민, 히알루론산, 헤파린, 콘드로이틴 술페이트, 키틴, 키토산, 알긴산, 펙틴, 아가로오스, 히드록시아파타이트, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리디메틸실록산, 글리콜산, 락트산 또는 아미노산의 중합체 또는 공중합체, 및 상기 생물학적으로 적합한 물질의 둘 이상의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자 제제.
- <13> (3) 유전자를 포함하며, 상기 유전자 또는 상기 유전자가 삽입된 벡터가 콜라겐을 함유하는 생물학적으로 적합한 물질로 이루어진 담체에 혼입된 유전자 제제.
- <14> (4) 유전자를 포함하며, 상기 유전자 또는 상기 유전자가 삽입된 벡터가 콜라겐으로 이루어진 담체에 혼입된 유전자제제.
- <15> (5) (1)에 있어서, 생체내에 투여되었을 때, 상기 유전자 제제 내의 상기 생물학적으로 적합한 물질의 함량이 0.01 내지 30 w/w % 인 유전자 제제.
- <16> (6) (1)에 있어서, 그 형태가 용액, 현탁액, 수-함유 겔, 필름, 스폰지, 막대 또는 구의 형태인 유전자 제제.
- <17> (7) (1)에 있어서, 상기 벡터가 바이러스 벡터, 리포솜 벡터 및 바이러스와 리포솜이 융합된 유전자융합성 (fusogenic) 리포솜 벡터로 구성되는 군에서 선택된 유전자 제제.
- <18> (8) (1)에 있어서, 상기 벡터가 바이러스 벡터인 유전자 제제.
- <19> (9) (1)에 있어서, 상기 벡터가 아데노바이러스 벡터인 유전자 제제.
- <20> (10) 유전자를 포함하며, 상기 유전자 또는 상기 유전자가 삽입된 벡터가 생물학적으로 적합한 물질로 이루어진 담체에 혼입되어 있으며, 상기 담체가 상기 유전자 또는 상기 유전자 벡터가 통과하여 침투할 수 있는 용기 내에 함유된 유전자 제제.

### 도면의 간단한 설명

- <21> 도 1은 시험예 1 및 비교예 1에서 시간경과에 따른 혈소판 수를 나타내는 그래프이다.
- <22> 도 2는 시험예 1 및 비교예 1에서 시간 경과에 따른 말초 혈액 내의 HST-1를 나타내는 그래프이다.
- <23> 도 3은 시험예 4 및 비교예 1에서 시간 경과에 따른 혈소판 수를 나타내는 그래프이다.
- <24> 도 4는 시험예 5에서 시간 경과에 따른 혈소판 수를 나타내는 그래프이다.
- <25> 도 5는 시험예 6에서 말초 혈액 내 HST-1 양에 대한 콜라겐 투여량의 의존성을 나타내는 그래프이다.

<26> 도 6 은 시험예 7 및 비교예 2 에서 시간 경과에 따른 혈소판 수를 나타내는 그래프이다.

### 발명의 상세한 설명

<27> 본 발명은 하기에 더욱 상세히 기술될 것이다.

<28> "유전자 삽입용 벡터" 는 유전자를 세포로 전이시킬 수 있는 임의의 벡터일 수 있으며, 예를 들면, 바이러스 벡터, 리포솜 벡터, 바이러스와 리포솜이 융합되어 있는 유전자융합성 리포솜 벡터 등을 포함한다. (Cardiovascular Research, 28, 445 (1994); Science, 256, 808 (1992); Gastroenterology, 106, 1076 (1994); TIBTECH, 11, 182 (1993); J.Biol. Chem., 266, 3361 (1991), Nature Medicine, 1, 583, (1995) 및 그의 인용 참조).

<29> 바이러스 벡터는 유전자 치료에서 통상적인 벡터로서 사용될 수 있으며, 예를 들면, 아데노바이러스, 아데노-조합 바이러스, 백신성 바이러스, 레트로 바이러스 (retrovirus), HIV 바이러스, 허피스 바이러스 (herpesvirus) 등을 포함하는 임의의 벡터일 수 있다. 유전자 벡터는 예를 들면, 상기에 참고로 기술한 통상의 방법에 따라 바이러스 벡터에 직접적으로 전이시키기 위해 유전자를 삽입함으로써 획득될 수 있다.

<30> 리포솜 벡터는 유전자 치료에서 통상적인 리포솜 벡터로서 사용될 수 있으며, 예를 들면, DOTMA, DOPE, DOGS 등을 혼합함으로써 획득한 리포솜 벡터를 포함한다. 양이온성 리포솜 벡터가 사용되면, 세포로의 전이 효율이 높다. 바이러스와 리포솜이 융합되어 있는 유전자융합성 리포솜 벡터의 예는 센다이 (Sendai) 바이러스 (HVJ : 일본의 적혈구 응집 바이러스)와 리포솜이 융합되어 있는 유전자융합성 벡터 등을 포함한다. 유전자 벡터는 예를 들면, 상기에 참고로 기재된 통상의 방법에 따라 리포솜 벡터나 유전자 융합성 리포솜 벡터로 전이시키기 위해 유전자를 둘러싸으로써 획득될 수 있다. 둘러싸인 유전자는 생체 내에서 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형태이며, 바람직하게는 플라스미드 (plasmid)등과 같이 생체 내에서 안정한 형태이다.

<31> 유전자 그 자체는 유전자를 세포로 전이하는 "유전자 삽입용 벡터" 로 삽입되지 않고 본 발명의 유전자 제제 내에 보유될 수 있다. 이 경우에, 유전자의 형태는 생체 내에서 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형태일 수 있다. 예를 들면, 유전자는 소위 발현 벡터라 불리는 것 등으로 삽입될 수 있다. 유전자의 형태는 바람직하게는 플라스미드 등과 같이 생체 내에서 안정한 형태이다.

<32> 전이를 위한 "유전자"는 유전자 치료에 사용될 수 있는 임의의 유전자일 수 있으며, 예를 들면, 아데노신 데아미나아제 (adenosine deaminase) 유전자, GM-CSF 유전자, 티미딘 키나아제 (thymidine kinase) 유전자 등을 포함한다.

<33> "생물학적으로 적합한 물질"은 바람직하게는 높은 생물학적 적합성을 갖는 물질이며, 생체 내에서 유전자 벡터 또는 유전자를 안정하게 보유할 수 있다. 생물학적으로 적합한 물질의 예는 콜라겐, 젤라틴, 피브린, 알부민, 히알루론산, 헤파린, 콘드로이틴 술페이트, 키틴, 키토산, 알긴산, 펩틴, 아가로오스, 히드록시아파티트, 폴리프로필렌, 폴리메틸실록산, 글리콜산, 락트산 또는 아미노산의 중합체 또는 공중합체, 상기 생물학적으로 적합한 물질의 둘 이상의 혼합물 등을 포함한다. 특히 바람직한 생물학적으로 적합한 물질은 콜라겐이다. 콜라겐과 상술한 기타생물학적으로 적합한 물질을 혼합하는 것 또한 바람직하다. 콜라겐은 임의의 콜라겐일 수 있으며, 예를 들면, 산 가용성 콜라겐, 효소 가용성 콜라겐 (예를 들면, 아텔로콜라겐 (atelocollagen) 등), 알칼리 가용성 콜라겐, 개질된 아미노산 측쇄를 갖는 콜라겐, 가교된 콜라겐, 유전자 공학에 의해 제조된 콜라겐 등을 포함한다. 개질된 아미노산 측쇄를 갖는 콜라겐은 예를 들면, 숙시닐 또는 메틸 콜라겐 등을 포함한다. 가교된 콜라겐은 예를 들면, 글루타르알데하이드, 핵사메틸렌디이소시아네이트 또는 폴리메톡시 화합물 등으로 처리된 콜라겐 등을 포함한다 (Fragrance J., 1989-12, 104-109, 일본특허 공고 (심사) No. 7 (1995)-59522).

<34> "첨가제" 는 유전자벡터 등을 안정화하거나, 세포 또는 핵으로의 유전자 전이를 촉진하거나, 또는 유전자 벡터의 방출을 조절하는 것 등을 위해서 필요에 따라 본 발명의 제제에 첨가될 수 있다. 첨가제는 상기 목적을 이룰 수 있는 임의의 첨가제일 수 있으며, 예를 들면, 수크로오스, 글리신, 콘드로이틴 술페이트, 젤라틴, 알부민, 사이토킨, 고 이동성 군단백질 HGM-1 과 HGM-2 의 혼합물 (High Mobility Group-1,-2 Mixture; Experimental Medicine, 12, 184 (1994), BIOTHERAPY, 8, 1265 (1994)), 클로로퀸, 폴리리신(Hepatology, 22, 847 (1995)), 트랜스펙탐 (상표명, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 등을 포함한다.

<35> 콜라겐이 기타 생물학적으로 적합한 물질 또는 첨가제와 혼합된 경우에, 콜라겐의 함량은 10 w/w % 이상, 바람직하게는 30 w/w % 이상, 더욱 바람직하게는 50 w/w % 이상, 그리고 가장 바람직하게는 70 w/w % 이상일 수 있다.

<36> 유전자 제제 내에서 생물학적으로 적합한 물질의 함량은 유전자 벡터 또는 유전자의 크기, 종류, 및 생물학적으로 적합한 물질의 종류 등에 따라 다양하다.

<37> 유전자 제제 내에서 생물학적으로 적합한 물질의 바람직한 함량은 유전자 제제가 생체 내에 존재하는 조건하에서, 0.01 내지 30 w/w %, 더욱 바람직하게는 0.05 내지 10 w/w %, 그리고 가장 바람직하게는 0.05 내지 5 w/w % 이다.

<38> 또한, 유전자 제제에서, 생물학적으로 적합한 물질의 함량은 특정 제제에 따라 다양하다. 예를 들면, 콜라겐이 생물학적으로 적합한 물질로서 사용되는 경우에, 함량의 바람직한 범위는 하기에 기술될 것이다.

<39> 제제가 겔 형태일 때, 콜라겐의 바람직한 함량은 0.01 내지 25 w/w %, 더욱 바람직하게는 0.05 내지 10 w/w %, 그리고 가장 바람직하게는 0.05 내지 5 w/w % 이다. 그러나, 콜라겐 함량이 2 % 이상이면, 첨가제가 콜라겐의 5 내지 900 w/w % 로 첨가되는 것이 바람직하다.

<40> 제제가 필름 형태일 때, 콜라겐의 바람직한 함량은 건조 전 함량으로서, 0.2 내지 30 w/w %, 더

육 바람직하게는 0.3 내지 5 w/w %, 가장 바람직하게는 0.4 내지 2 w/w % 이다. 그러나, 콜라겐 함량이 1 % 이상이면, 첨가제가 콜라겐의 5 내지 900 w/w % 로 첨가되는 것이 바람직하다.

- <41> 제제가 고형 막대 형태일 때, 콜라겐의 바람직한 함량은 10 내지 30 w/w % 이며, 첨가제가 콜라겐의 5 내지 100 w/w % 로 첨가되는 것이 바람직하다.
- <42> 본 발명의 유전자제제는 특정한 형태로 제한되지는 않는다. 상기 제제는 용액, 현탁액, 수-함유 겔, 필름 또는 스폰지일 수 있다. 고체 형태는 막대, 구 등으로 성형될 수 있다. 그러나, 비록 제제의 형태가 유전자 삽입용 벡터의 종류, 크기 등에 따라 다양하더라도, 바람직한 형태는 일반적으로 용액, 현탁액 또는 수-함유 겔이다.
- <43> 유전자 제제는 유전자 제제가 생체 내에 존재하는 조건 하에서, 유전자 제제 내의 생물학적으로 적합한 물질의 함량을 상기 바람직한 범위 내로 유지시킴으로써 수득된다.
- <44> 용액, 현탁액 또는 수-함유 겔 형태의 유전자제제의 제조방법의 예는 (1) 유전자 벡터 또는 유전자 (이하, '유전자 벡터 등' 이라 함)의 분말, 용액, 현탁액 또는 겔을 필요에 따라 첨가제가 첨가되는 용액 또는 겔 형태의 담체와 혼합하는 방법, (2) 유전자 벡터 등의 용액, 현탁액 또는 겔을 필요에 따라 첨가제가 첨가되는 분말 형태의 담체로 침투하도록 하는 방법, 또는 (3) 유전자 벡터 등의 용액, 현탁액 또는 겔 등을 필요에 따라 첨가제가 첨가되는 스폰지인 담체에 침투하도록 하고, 이들을 함께 반죽하는 방법을 포함한다. 본 발명의 유전자 제제를 제조하기 위한 방법은 이와 같은 방법에 한정되지 않는다.
- <45> 고체 형태의 유전자 제제의 제조를 위한 방법의 예는 (1) 유전자 벡터 등의 분말, 용액, 현탁액 또는 겔을 필요에 따라 첨가제가 첨가되는 용액이나 겔 형태의 담체와 혼합하고, 상기 혼합물을 건조시키는 방법, (2) 유전자 벡터 등의 분말, 용액, 현탁액 또는 겔을 필요에 따라 첨가제가 첨가되는 분말 형태의 담체와 혼합하고, 상기 혼합물을 건조시키는 방법, (3) 유전자 벡터 등의 용액, 현탁액 또는 겔을 필요에 따라 첨가제가 첨가되는 스폰지 형태의 담체로 침투하도록 하고, 상기 스폰지를 건조시키는 방법, (4) 유전자 벡터 등의 용액, 현탁액 또는 겔을 필요에 따라 첨가제가 첨가되는 스폰지 형태의 담체로 침투하도록 하고, 상기 스폰지를 방치된 채로 건조시키거나, 필요에 따라 물 등을 첨가한 후에, 상기 스폰지를 반죽하고, 건조시키는 방법, (5) (1) 내지 (4) 에 따른 방법에 의해 수득한 고체 생성물을 분쇄 및 압축 성형하는 방법, 또는 (6) 유전자 벡터 등의 분말을 필요에 따라 첨가제가 첨가되는 분말인 담체와 혼합하고, 상기 혼합물을 압축 성형하는 방법을 포함한다. 본 발명은 상기 방법에 한정되지는 않는다. 건조방법; 건조시 온도 및 습도; 혼합방법; 혼합시 온도 및 습도; 압축 성형 방법; 압축 성형시 온도, 습도 및 압축 압력; 담체 용액 및 유전자 벡터 용액의 용액 속도; 및 담체 및 유전자 벡터 용액의 혼합물의 용액 속도; 및 pH 는 통상의 방법과 동일할 수 있다.
- <46> 본 발명의 유전자 제제는 치료될 질병, 목적하는 기관 등에 따라 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 유전자 제제는 피하 또는 근육 내로 투여될 수 있으며, 또는 신장, 간, 폐, 뇌 등과 같은 질병의 목적하는 부위에 직접적으로 투여될 수 있다. 질병 부위로의 직접적인 투여는 기관 선택적 치료를 가능하게 한다.
- <47> 본 발명에 따라, 생물학적으로 분해 가능한 물질이 생물학적으로 적합한 물질로서 사용될 때, 투여 후에, 생물학적으로 적합한 물질을 생체외로 제거할 필요는 없다. 또한, 반복 투여가 가능하다.
- <48> 반면에, 유전자 전이의 중단이 질병의 종류 또는 조건에 따라 요구될 때, 유전자 제제를 그 상태 그대로 제거하여, 유전자 전이를 중단할 수 있다. 예를 들면, 유전자 제제가 고형일 때, 이는 외과 수술 등에 의해 제거될 수 있다. 유전자 벡터 등이 바이러스가 자유롭게 통과할 수 있는 세공을 갖는 용기 등 내에 보유되어 있는 유전자 제제를 사용하여, 유전자 치료가 수행될 때, 용기 등은 치료의 종료 후에 제거될 수 있다. 예를 들면, 유전자 치료는 일본 특허 출원 No. 3 (1991) - 120115 (국제 공개 번호 W092/20400)에 기술된 바와 같은 용기 (튜브) 를 사용하여 수행될 수 있다.
- <49> 본 발명의 유전자 제제는 유전자 벡터 등을 점진적으로 방출할 수 있으며, 동시에 지속적인 방출 동안 생체 내에 안정적으로 유전자가 삽입된 벡터 등을 보유할 수 있다. 따라서, 단일 투여 후의 효과적인 유전자 발현 시간은, 세포와 벡터 사이의 접촉을 지연시켜서 유전자의 세포로의 전이 기간을 조절함으로써 연장될 수 있다.
- <50> 본 발명의 유전자 제제는 또한, 다른 방법에서는 대상 내 상쇄하는 항체의 출현으로 인해 반복 투여하기 어려운 바이러스 벡터 등과 같은 유전자 벡터의 반복 투여를 가능하게 한다.
- <51> 또한, 본 발명의 유전자 제제는 치료의 종료가 의도되는 때에, 유전자 제제가 제거될 수 있기 때문에, 유전자 발현의 조절을 가능하게 한다.

## 실시예

- <52> **실시예 1**
- <53> 섬유아세포 성장 인자 HST-1 (FGF4) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 2980-2984 (1987) 에 따라 제조) 를 코딩하는 유전자가 삽입된 아데노바이러스 (Adex1 HST-1; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. **91**, 12368 (1994))  $10^9$  pfu (플라그 형성 단위) 를 함유하는 배양 배지 0.9 ml 와 아텔로콜라겐 중성 용액 (KOKEN 에 의해 제조된 아텔로콜라겐 이식편: 2 % 아텔로콜라겐 용액) 0.1 ml 을 혼합하여 유전자 제제를 제조하였다. 상기 아데노바이러스 (Adex1 HST-1) 는 J. Virol., **54**, 711-719 (1985) 또는 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 1320 (1996) 및 Cell, **13**, 181-188 (1978) 에 기술된 방법에 따라 아데노바이러스 5 형 (ATCC 카탈로그 No. VR-5) 의 E1A, E1B 및 E3을 제거하고; 섬유아세포 성장 인자 HST-1 의 유전자를 비증식형 아데노바이러스 유전자로 삽입함으로써 제조될 수 있다.
- <54> **실시예 2**
- <55> 2 % 아텔로콜라겐 중성 용액 0.1 ml 과 Adex1 HST-1  $10^9$  pfu 를 함유하는 배양 배지 0.9 ml 을

혼합한 다음, 혼합물을 37 °C 에서 유지함으로써 겔 형태의 유전자 제제를 제조한다.

<56> **실시예 3**

<57> 아텔로콜라겐 중성 용액을 동결건조함으로써 스폰지 (sponge)를 수득하고; 상기 스폰지를 약 5 mm<sup>2</sup> 으로 절단하고; 절단된 스폰지를 Adex1 HST-1 10<sup>9</sup> pfu 를 함유하는 배양 배지 1 ml 에 첨가하고; 그리고 스폰지를 방새 방지함으로써 유전자 제제를 제조한다.

<58> **실시예 4**

<59> 실시예 2 에서 제조된 겔 형태의 유전자 제제를 동결건조함으로써 유전자 제제를 제조한다.

<60> **실시예 5**

<61> 실시예 3 에서 수득된 유전자 제제를 다시 동결건조하고, 상기 동결건조된 스폰지를 막대형으로 압축함으로써 펠렛 형태 (막대 형태로 압축된 제품) 의 유전자 제제를 제조한다.

<62> **실시예 6**

<63> 섬유아세포 성장 인자 HST-1 (FGF4) 를 사이토메갈로바이러스 (CMV) 촉진제를 함유하는 발현 벡터 (pRc/CMV) 에 삽입함으로써 수득된 플라스미드 벡터와 리포솜 (DMRIE-C (GIBCO-BRL 제조)) 을 혼합한 다음, 리포솜을 함유한 용액을 아텔로콜라겐 중성 용액 동량과 혼합함으로써 유전자 제제를 제조한다.

<64> **실시예 7**

<65> Adex1 HST-1 10<sup>9</sup> pfu 를 함유하는 배양 배지 1 ml 과 1 % 알긴산 용액 1 ml 을 혼합하고; 벡터를 함유하는 알긴산 용액을 노즐을 통해 0.5 % 염화 칼슘 용액에 적가하여 직경 1 mm 의 비드를 수득하고; 원심분리에 의해 상기 비드를 수거함으로써 비드 형태의 유전자 제제를 제조한다.

<66> **실시예 8**

<67> Adex1 HST-1 10<sup>9</sup> pfu 를 함유하는 배양 배지 1 ml 과 45 °C 로 승온된 5 % 아가로오스 겔 용액 1 ml 을 혼합하고; 혼합된 용액을 노즐을 통해 10 °C 에서 포스페이트 완충 염수에 적가하여 직경 1 mm 의 비드를 수득하고, 원심분리에 의해 상기 비드를 수거함으로써 비드 형태의 유전자 제제를 제조한다.

<68> **실시예 9**

<69> 실시예 1 에서 수득한 유전자 제제를 폴리에스테르로 만든 백 (bag)(인공 혈관으로 제조됨) (Micron 상표명, INTERVASCULAR 제조) 내에 둘러싸으로써 유전자 제제를 제조한다.

<70> **실시예 10**

<71> 실시예 1 과 동일한 방법으로, Adex1 HST-1 10<sup>9</sup> pfu 를 함유하는 배양 배지와 아텔로콜라겐 중성 용액을 혼합하여 아텔로콜라겐 최종 농도가 0.1, 0.2, 0.4, 1.0 또는 2.0 w/w % 가 되도록 함으로써 유전자 제제 1 ml 를 제조하였다.

<72> **실시예 11**

<73> 73.25 µg/ml 의 농도로 플라스미드 p0G44 (Stratagene 으로부터 구입) 을 함유하는 수용액 5 ml 와 아텔로콜라겐 산 용액 (2 % 아텔로콜라겐 함유, pH 3.5) 5 g 을 혼합하고; 상기 혼합물을 동결건조하여 스폰지를 수득하고; 상기 스폰지에 증류수를 첨가하여 아텔로콜라겐 농도가 0.4, 2, 5, 10 또는 20 w/w % 가 되도록 함으로써 겔 형태의 유전자 제제를 제조한다.

<74> **실시예 12**

<75> 73.25 µg/ml 의 농도로 플라스미드 p0G44 를 함유하는 수용액 5 ml 와 아텔로콜라겐 산 용액 5 g 또는 2.5 g 을 혼합하고; 인간 혈청 알부민 수용액(80 mg/ml) 260 µl 또는 640 µl 을 상기 혼합물에 첨가하여 이를 혼합하고; 상기 혼합물을 동결건조하여 스폰지를 수득하고; 상기 스폰지에 증류수를 첨가하여 아텔로콜라겐 및 인간 혈청 알부민 총 농도가 10 w/w % 가 되도록 함으로써 겔 형태의 유전자 제제를 제조한다.

<76> **실시예 13**

<77> 실시예 11 에서 수득한 겔 형태의 유전자 제제를 유리 위에 넓게 펴고, 점진적으로 건조시킴으로써 필름 형태의 유전자 제제를 제조한다.

<78> **실시예 14**

<79> 실시예 11 또는 12 에서 수득한 겔 형태의 유전자 제제를 압착 성형하고, 점진적으로 건조시킴으로써 막대 형태의 유전자 제제를 제조한다.

<80> **비교예 1**

<81> Adex1 HST-1 10<sup>9</sup> pfu 를 함유하는 배양 배지 1 ml 를 마우스에 복강내 투여하였다. 그 다음에, 투여 후 약 12 일째에, 혈소판의 수가 약 2 배로 증가하였고, 상기 효과는 20 내지 30 일째까지 지속되었다. 또한, 말초 혈액 내의 HST-1 농도는 50 ng/ml 이었고, 투여 후 20 일째에 최대값이었다. 그러나, HST-1 의 농도는, 하기의 시험예 1 의 제제와 상이하게, 고정된 수준으로 유지되지 못했고, 투여 후 60 일째에는 혈액 내에서 HST-1 이 검출되지 않았다. 상기 결과를 도 1 및 도 2 에 나타낸다.

<82> **시험예 1**



- <83> 실시예 1 에서 제조된 유전자 제제 1.0 ml 을 마우스에 복강내 투여하였다. 그 다음에, 투여 후 약 12 일째에 혈소판의 수는 약 2 배로 증가하였고, 상기 효과는 50 일 이상 지속되었다. 또한, 말초 혈액 내의 HST-1 농도는 투여 후 80 일째 이후에 20 ng/ml 로 유지되었다. 상기 결과를 도 1 및 도 2 에 나타낸다.
- <84> **시험예 2**
- <85> 실시예 2 와 같이 제조된 유전자 제제 1.0 ml 을 마우스에 복강내 투여하였다. 그 다음에, 투여 후 약 12 일째에 혈소판의 수가 약 2 배로 증가하였고, 상기 효과는 투여 후 60 일 이상 지속되었다.
- <86> **시험예 3**
- <87> 실시예 3 과 같이 제조된 유전자 제제를 마우스에 복강 내 투여하였다. 그 다음에, 투여 후 약 12 일째에 혈소판의 수가 약 2 배로 증가하였고, 상기 효과는 투여 후 60 일 이상 지속되었다.
- <88> **시험예 4**
- <89> 실시예 1 에서 제조된 유전자 제제를 마우스에 복강 내 투여하고, 투여 후 3 일째에 상기 유전자 제제를 제거하였다. 그 결과, 투여 후 약 12 일째에 혈소판의 수가 약 2 배가 되었고, 이어서 감소하여, 투여후 약 25 일째에 정상 수준으로 되돌아갔다. 상기 결과를 도 3 에 나타낸다.
- <90> **시험예 5**
- <91> 실시예 1 에서 제조된 유전자 제제를 마우스에 복강 내 투여하고, 투여후 3 일째에 상기 제제를 제거하였다. 투여 후 20 일째에 실시예 1 에서 제조된 유전자 제제를 다시 투여하였다. 그 결과, 투여 후 약 12 일째에 혈소판의 수가 약 2 배로 된 다음 감소하고, 투여후 약 20 일째에는 정상 수준으로 되돌아왔다. 두 번째 투여 직후, 혈소판의 수는 다시 약 2 배로 증가하였고, 상기 효과는 첫 번째 투여 후 약 40 일 이상 지속되었다. 상기 결과를 도 4 에 나타낸다.
- <92> **시험예 6**
- <93> 실시예 10 에서 제조된 유전자 제제 각 5 개 또는 콜라겐이 전혀 없이 Adex1 HST-1  $10^9$  pfu 를 함유하는 배양 배지 1 ml 을 마우스에 복강내 투여하였다. 말초 혈액 내의 HST-1 단백질 농도를 투여 후 5 일째에 측정하였다. 상기 결과를 도 5 에 나타낸다. 데이터는 HST-1 단백질 혈청 농도가 제제 내의 콜라겐 농도가 증가함에 따라 감소함을 나타낸다.
- <94> **시험예 7**
- <95> Adex1 HST-1  $10^9$  pfu 를 함유하는 배양 배지 1 ml 를 마우스에 복강내 투여한 결과, 투여 후 12 일까지 혈소판 수가 약 2 배가 된 다음, 감소하여, 투여 후 약 35 일 때에는 정상 수준으로 되돌아갔다. 첫번째 투여 후 37 일째에 실시예 1 에서 제조한 아델로콜라겐 함유 유전자 제제 1 ml 을 다시 투여하였다. 투여 직후, 혈소판 수가 약 2 배로 증가하였고, 상기 효과는 남은 실험 기간 내내 지속되었다. 상기 결과를 도 6 에 나타낸다.
- <96> **비교예 2**
- <97> Adex1 HST-1  $10^9$  pfu 를 함유하는 배양 배지 1 ml 을 마우스에 복강내 투여하고, 첫 번째 투여 후 37 일째에 다시 투여하였다. 그 결과, 첫 번째 투여 후 약 12 일째에 혈소판의 수가 약 2 배가 된 다음, 감소하였고, 첫 번째 투여 후 약 35 일째에는 정상 수준으로 되돌아갔다. Adex1 HST-1 의 두 번째 투여 후에 혈소판은 증가하지 않았다. 상기 결과를 도 6 에 나타낸다.
- <98> 시험예 7 및 비교예 2 의 결과는, 본 발명에 따라 제형화되지 않은 아데노바이러스 벡터의 반복적인 투여로 수득된 결과와는 대조적으로, 실시예 1에서 제조된 유전자 제제를 반복적으로 투여하는 것이 가능함을 보여준다. 반복 투여를 불가능하게 하는 것은 상쇄하는 항체의 출현에 기인한다.

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1

유전자 또는 상기 유전자가 삽입된 벡터가 아델로콜라겐으로 만들어진 담체에 혼입된 것을 특징으로 하는, 목적 유전자가 함유된 유전자 제제.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 생체 내에 투여될 때, 상기 유전자 제제 중의 상기 아델로콜라겐의 함량이 0.01 내지 25 w/w % 인 것을 특징으로 하는 유전자 제제.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 그 형태가 용액, 현탁액, 수-함유 겔, 필름, 스폰지, 막대 또는 구의 형태인 것을 특징으로 하는 유전자 제제.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 벡터가 바이러스 벡터, 리포솜 벡터 및 바이러스와 리포솜이 융합된 유전자융합성 리포솜 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 유전자 제제.

### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 벡터가 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 유전자 제제.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 벡터가 아데노바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 유전자 제제.

#### 청구항 7

제 1 항, 및 제 2 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 첨가제를 더 함유하는 유전자 제제.

#### 청구항 8

제 7 항에 있어서, 첨가제가 수크로오스, 글리신, 콘드로이틴 술페이트, 젤라틴, 알부민, 클로로퀸, 및 폴리리신으로 이루어지는 군으로부터 선택된 유전자 제제.

#### 청구항 9

제 7 항에 있어서, 첨가제의 양이 아텔로콜라겐의 5~900 w/w% 인 유전자 제제.

#### 요약

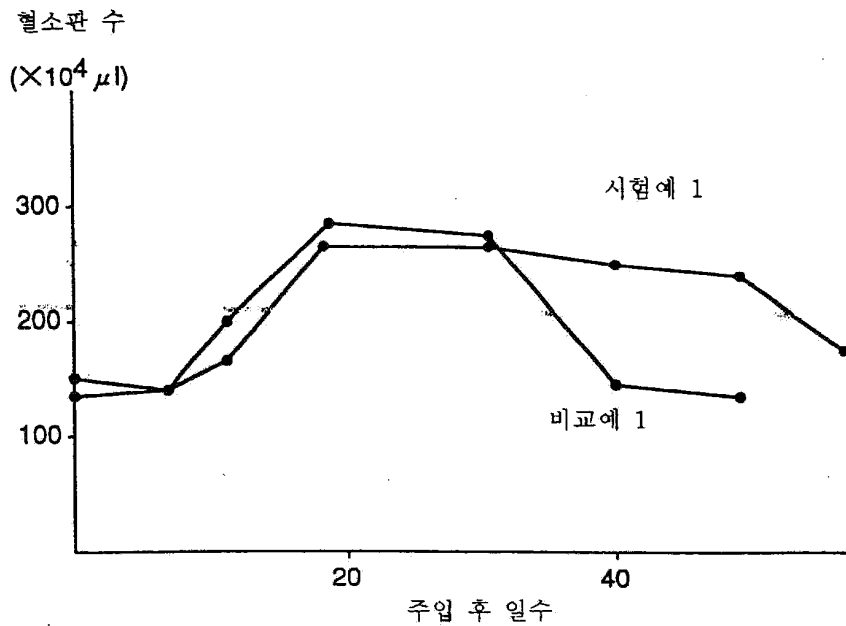
목적하는 유전자 또는 목적하는 유전자가 결합된 벡터 및 그를 지지하는 담체를 함유하는 유전자 제제.

#### 대표도

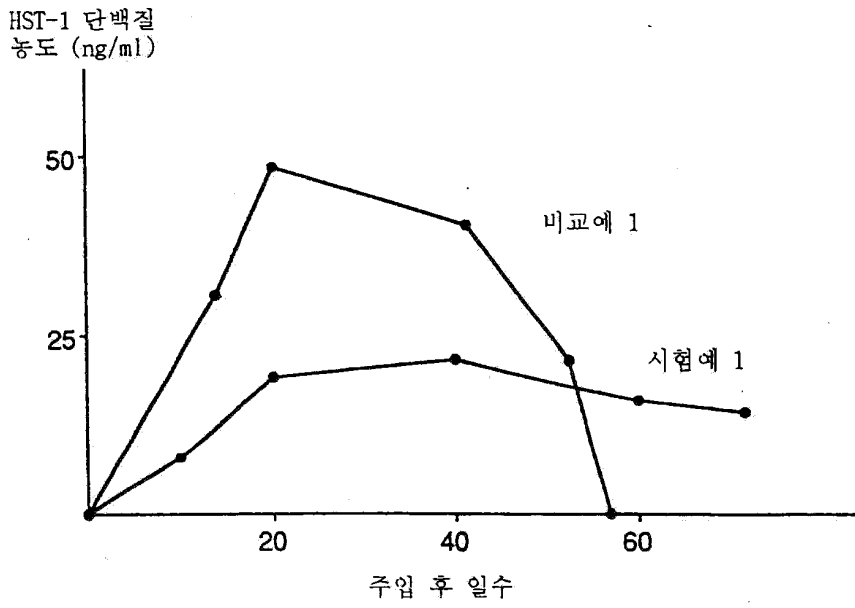
#### 도 1

#### 도면

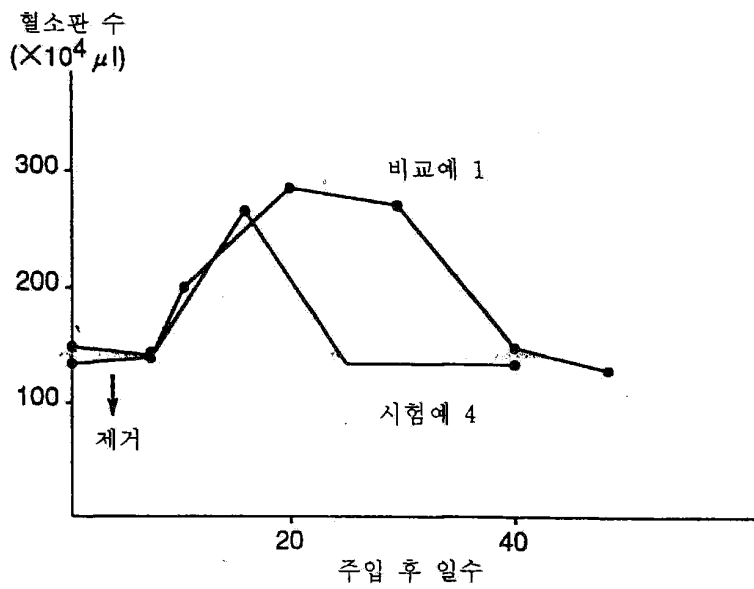
#### 도면 1



## 도면2

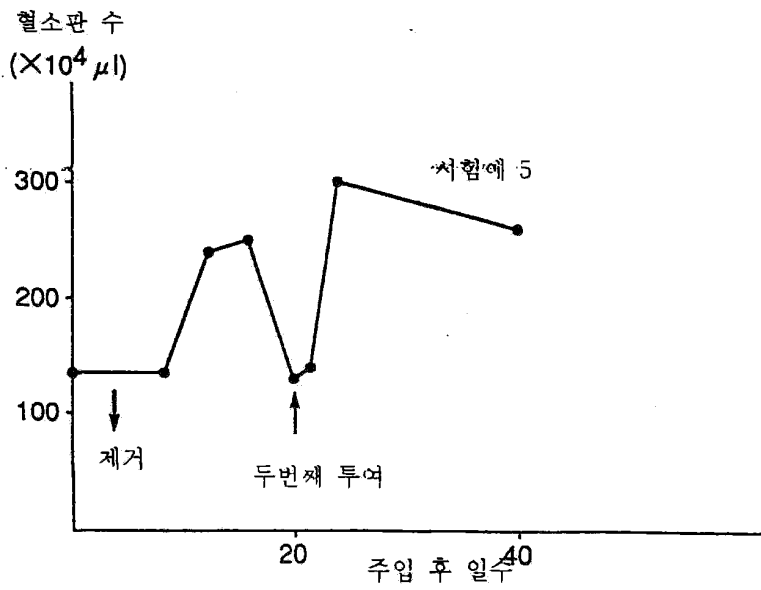


## 도면3



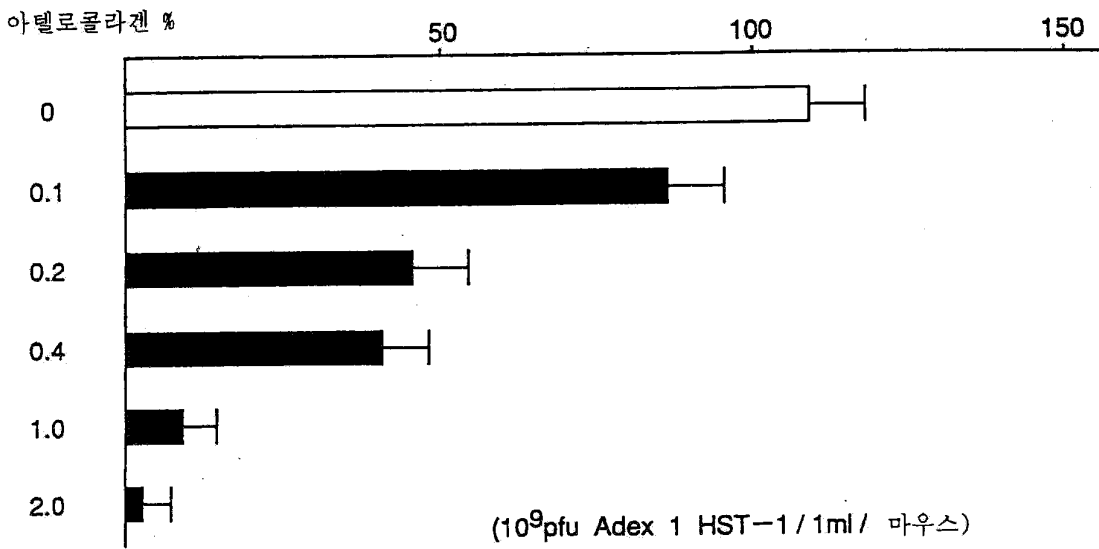


도면4



도면5

아텔로콜라겐 이식과 Adex 1 HST-1 의 전이  
주입 후 5 일째 혈청 HST-1 의 농도 (ng/ml)



## 도면6

아텔로콜라겐 이식으로 Adex 1 HST-1 의 반복 투여

