(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 10 월 4 일 (04.10.2012)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/133997 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 31/047* (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/005955

(22) 국제출원일: 2011 년 8 월 12 일 (12.08.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2011-0027201 2011 년 3 월 25 일 (25.03.2011) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **서울대학교 산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울특별시 관악구 신림동 산 56-1, 151-742 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **조명행 (CHO, Myung Haing)** [KR/KR]; 서울특별시 서초구 우면동 473-1, 137-901 Seoul (KR). **조 종 수 (CHO, Chong Su)** [KR/KR]; 서울특별시 용산구 이촌 1 동 한가람아파트 211 동 501 호, 140-728 Seoul (KR).

(74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 서울 강남구 삼성동 159-9 도심공항타워 6 층 한얼국제특허사무소, 135-973 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

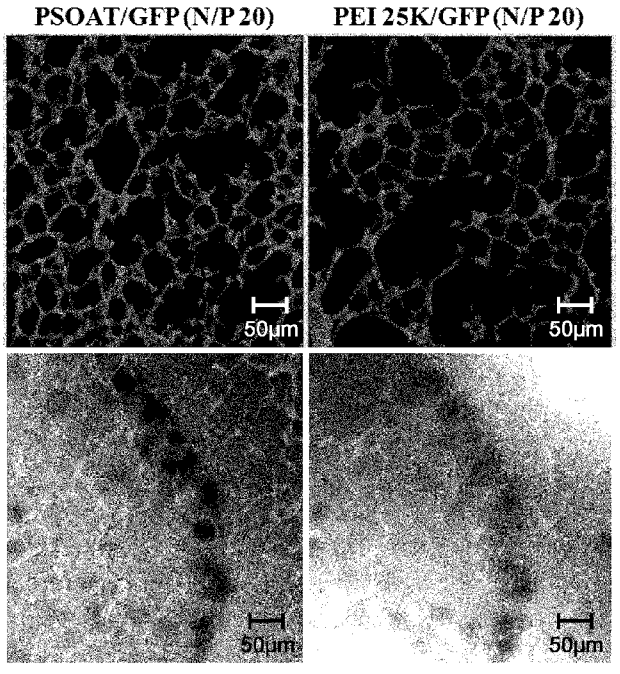
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: POLYSORBITOL-BASED OSMOTICALLY ACTIVE TRANSPORTER AND GENE THERAPY USING SAME

(54) **발명의 명칭** : 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체 및 이를 이용한 유전자 치료

[Fig. 11]



(57) **Abstract**: The present invention relates to a biodegradable polysorbitol-based osmotically active transporter and gene therapy using the same as a gene carrier. The biodegradable polysorbitol-based osmotically active transporter of the invention imparts osmotic pressure to a cell membrane since it includes a sorbitol skeleton, thereby exhibiting a transduction efficiency which is substantially improved through the increase of membrane permeability. Additionally, the biodegradable polysorbitol-based osmotically active transporter of the invention exhibits a high DNA-binding ability and physicochemical properties suitable for use as a gene carrier, and effectively protects DNA from nucleases. Furthermore, the biodegradable polysorbitol-based osmotically active transporter can be used as a transporter for gene therapy due to low cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*.

(57) **요약서**: 본 발명은 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체 및 이를 유전자 전달체로 이용하는 유전자 치료에 관한 것이다. 본 발명의 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체는 소르비톨 골격을 포함하고 있어 세포막에 삼투압을 부여함으로써 막 투과도의 증가를 통해 현저히 향상된 형질도입 효율을 나타낸다. 또한 본 발명의 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체는 DNA 에 높은 결합능을 나타내고 핵산분해효소로부터 DNA 를 효과적으로 보호하며 유전자 전달체로 사용하기에 적합한 물리화학적 특성을 나타낼 뿐만 아니라, 시험관 내 및 생체 내에서 세포독성이 매우 낮아 유전자 치료를 위한 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2012/133997 A1

규칙 4.17 에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체 및 이를 이용한 유전자 치료

기술분야

[1] 본 발명은 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(polysorbitol-based osmotically active transporter, PSOAT) 및 이를 유전자 전달체로 이용하는 유전자 치료에 관한 것이다. 본 발명의 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체는 소르비톨 골격에 의한 삼투압 활성 및 폴리에틸렌이민(PEI) 골격에 의한 양성자 스폰지 효과(proton sponge effect)에 의해 효율적인 세포 내 유입을 유도하여 현저히 향상된 형질도입 효율을 나타낼 뿐만 아니라, DNA에 높은 결합능을 나타내고 핵산분해효소로부터 DNA를 효과적으로 보호하며, 유전자 전달체로 사용하기에 적합한 물리화학적 특성 및 매우 낮은 세포독성을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체는 유전자 치료를 위한 안전하고 효과적인 유전자 전달체로 유용하게 사용될 수 있다.

[2]

배경기술

[3] 유전자 치료(gene therapy)는 치료 유전자를 체내의 원하는 장기로 전달하여 세포 내에서 새로운 단백질이 발현되도록 하여 질병을 치료하는 것으로, 질병의 증상을 치료하는 것이 아니고 질병의 원인을 치료하여 제거하는 방식이다. 유전자 치료는 일반적인 약물에 의한 치료에 비해서 우수한 선택성을 가질 수 있고 다른 치료법으로는 조절하기 힘든 질병의 치료율 및 치료 속도를 개선하여 오랜 기간 동안 적용할 수 있다. 치료 유전자로서 DNA는 생체 내 효소에 의한 가수분해에 취약하고 세포 내로 유입되는 효율이 낮기 때문에, 효과적인 유전자 치료를 위해서는 치료 유전자를 원하는 표적세포로 안전하게 전달하여 높은 발현효율의 달성을 가능케 하는 유전자 전달체(gene carrier)의 개발이 필수적이다.

[4] 유전자 전달체는 매우 독성이 낮거나 없어야 하며, 유전자를 선택적이고 효과적으로 원하는 세포에 전달할 수 있어야 한다. 이러한 유전자 전달체는 크게 바이러스성과 비바이러스성으로 나눌 수 있다. 최근까지 임상 실험에는 유전자 전달체로 형질도입 효율이 높은 바이러스성 벡터(viral vector)가 사용되었다. 그러나, 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 아데노바이러스와의 복합체(adeno-associated virus)와 같은 바이러스성 벡터는 제조과정이 복잡할 뿐만 아니라, 면역원성, 감염 가능성, 염증 유발, 비특이적 DNA의 삽입 등의 안전성 문제와 수용할 수 있는 DNA의 크기가 제한적이라는 문제로 인해 인체에 적용하기엔 한계가 많다. 이에 현재는 비바이러스성

벡터(non-viral vector)가 바이러스성 벡터의 대용으로 각광을 받고 있다.

[5] 비바이러스성 벡터는 최소한의 면역반응으로 반복 투여할 수 있고, 특정 세포로의 특이적 전달이 가능하며, 저장 안정성이 우수하고, 대량 생산이 용이하다는 장점을 가지고 있다. 이러한 비바이러스성 벡터의 예로는 양이온성 리포좀(liposome) 계열로서 N-[1-(2,3-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), 알킬암모늄(alkylammonium), 양이온성 콜레스테롤 유도체(cationic cholesterol derivatives), 그라미시딘(gramicidin) 등이 있다.

[6] 최근 비바이러스성 벡터 중 양이온성 고분자가 음전하를 띠는 DNA와 이온결합을 통한 복합체를 형성할 수 있기 때문에 많은 관심을 불러일으키고 있다. 이러한 양이온성 고분자에는 폴리-L-라이신(PLL), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르), 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리[α-(4-아미노부틸)-L-글리콜산], 폴리아미도아민 덴드리머, 폴리[N,N'-(다이메틸아미노)에틸]메타크릴레이트(PDMAEMA) 등이 포함된다. 이들은 DNA를 압축하여 나노입자를 형성함으로써 효소분해로부터 DNA를 보호하고, 빠르게 세포 내로 침투하여 엔도좀(endosome)에서 빠져나올 수 있도록 도와준다. 대부분의 비바이러스성 벡터는 바이러스성 벡터에 비해 생분해성, 낮은 독성, 비면역원성, 사용상의 간편함 등의 장점을 가지나, 상대적으로 낮은 형질도입 효율, 제한적인 입자 크기 등의 문제점을 가지고 있다.

[7] 특히, 비바이러스성 벡터로 사용되는 대부분의 양이온성 고분자는 혈청 농도가 낮은 환경인 시험관 내에서는 높은 형질도입 효율을 나타내지만, 생체 내 환경에서는 혈청에 존재하는 각종 인자에 의하여 양이온성 고분자/유전자 복합체의 형질도입 효율이 심각하게 저해되어 유전자의 세포 내 유입이 원활하지 않다는 문제점이 있다. 이는 생체 내에서는 양이온성 고분자/유전자 복합체의 표면에 과도한 양전하가 발생하여 혈장 단백질 및 혈액 구성성분과의 비특이적 상호작용이 유발되기 때문이다. 따라서, 시험관 내의 무혈청 배지 또는 혈청이 매우 낮은 농도로 존재하는 환경이 아닌, 다량의 혈청이 존재하는 생체 내에서는 양이온성 고분자의 형질도입 효율이 현저히 저하되며, 이를 생체 내에 그대로 적용하는 경우에는 폐, 간 및 비장에서의 응집, 축적과, 나아가 망상내피계에 의한 옵소닌화(opsonization) 및 제거를 유발할 수 있기 때문에, 상기 양이온성 고분자의 치료적 적용은 크게 제한되지 않을 수 없다. 비바이러스성 벡터로서 가장 광범위하게 연구되고 있는 폴리에틸렌이민(PEI) 역시 생체 내 형질도입 효율이 현저히 떨어지며, 높은 세포독성 및 낮은 혈액 적합성으로 인한 유전자의 낮은 발현효율 등의 문제점을 갖고 있다.

[8] 따라서, 기존의 비바이러스성 벡터의 장점은 그대로 유지하면서 형질도입 효율을 증강시킨 유전자 전달체의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[9] 이에 본 발명자들은 세포독성은 낮으면서 높은 형질도입 효율을 나타내는

유전자 전달체를 개발하기 위해 예의 연구 노력한 결과, 폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI)과 소르비톨계 유도체(sorbitol-based derivative)의 마이클 부가반응(Michael addition)에 의해 제조한 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(polysorbitol-based osmotically active transporter, PSOAT)가 시험관 내 및 생체 내에서 매우 낮은 세포독성을 나타내면서 소르비톨 골격에 의한 삼투압 활성 및 폴리에틸렌이민 골격에 의한 양성자 스폰지 효과에 의해 현저히 향상된 형질도입 효율을 나타냄을 발견하고, 상기 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체가 유전자 치료를 위한 유전자 전달체로 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 따라서, 본 발명의 목적은 유전자 전달체로서 세포독성을 나타내지 않으면서 형질도입 효율이 현저히 향상된 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체를 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 상기 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체에 치료 유전자를 결합시킨 유전자 전달 복합체를 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자 전달 복합체를 유효성분으로 함유하는 유전자 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[15]

과제 해결 수단

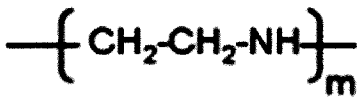
[16] 상기 목적을 달성하기 위하여, 하나의 양태로서, 본 발명은 폴리에틸렌이민(PEI)과 소르비톨계 유도체의 공중합체인 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)를 제공한다.

[17] 본 발명에 따른 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 폴리에틸렌이민과 소르비톨계 유도체의 마이클 부가반응에 의해 제조될 수 있다.

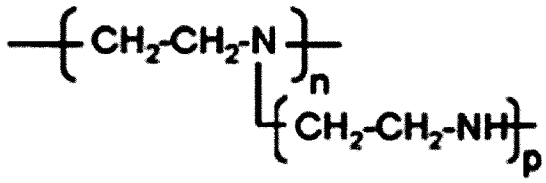
[18] 본 발명에서 용어, "폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI)"은 일차, 이차 및 삼차 아미노기를 갖고, 1,000 내지 100,000 g/mol의 몰 질량을 갖는 양이온성 고분자이다. 폴리에틸렌이민은 플라스미드 DNA를 효과적으로 압축하여 콜로이드 입자로 만들며, pH 반응성의 완충능력으로 인한 높은 형질도입 효율을 가져 시험관 내 및 생체 내에서 유전자를 다양한 세포에 효과적으로 전달할 수 있다. 본 발명에서 폴리에틸렌이민은 하기 화학식 1로 표시되는 선형(linear) 또는 하기 화학식 2로 표시되는 분지형(branched)일 수 있으며, 그 분자량은 세포독성을 고려하여 저분자량, 바람직하게는 50 내지 10,000 Da이다.

폴리에틸렌이민은 물, 알코올, 글리콜, 다이메틸포름아마이드, 테트라하이드로퓨란, 에스테르류 등에 용해되고, 고분자량의 탄화수소류, 올레산(oleic acid), 다이에틸에테르에는 용해되지 않는다.

[19] 화학식 1



[20] 화학식 2



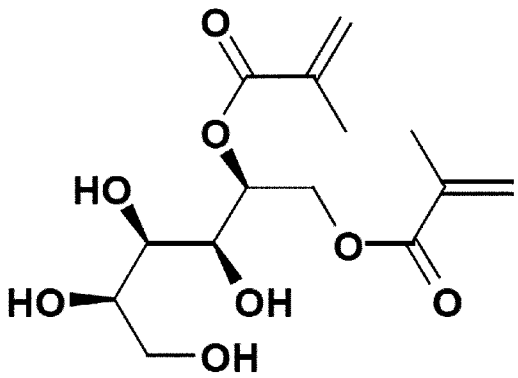
[21]

[22] 본 발명에서 폴리에틸렌이민은 소르비톨계 유도체와의 마이클 부가반응에서 마이클 공여체(Micheal donor)로 작용하고, 그 결과로서 합성된 공중합체에 높은 형질도입 효율, 낮은 세포독성 및 양성자 스폰지 효과를 부여하는 역할을 담당한다.

[23] 본 발명에서 용어, "소르비톨계 유도체"는 소르비톨 당알코올 골격을 포함하고 상기 당알코올 골격에 아크릴레이트기 또는 메타크릴레이트기를 갖는 임의의 모든 화합물로서, 폴리에틸렌이민에 수식되어 최종적으로 수득되는 공중합체에 소르비톨 골격을 부여할 수 있는 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명에서 소르비톨계 유도체는 폴리에틸렌이민과의 마이클 부가반응에서 마이클 수용체(Micheal acceptor)로 작용하고, 그 결과로서 합성된 공중합체에 친수성, 생분해성 및 삼투압 활성을 부여하고, 혈청 내 및 동결-건조 후 안정성을 증가시키는 역할을 담당한다.

[24] 본 발명에 적합한 소르비톨계 유도체로는 소르비톨 다이아크릴레이트(sorbitol diacrylate, SDA), 소르비톨 다이메타크릴레이트(sorbitol dimethacrylate, SDM), 소르비톨 트라이아크릴레이트(sorbitol triacrylate, STA), 소르비톨 트라이메타크릴레이트(sorbitol trimethacrylate, STM), 소르비톨 테트라아크릴레이트(sorbitol tetracrylate, STEA), 소르비톨 테트라메타크릴레이트(sorbitol tetramethacrylate, STEM), 소르비톨 펜타아크릴레이트(sorbitol pentacrylate, SPA), 소르비톨 펜타메타크릴레이트(sorbitol pentamethacrylate, SPM) 등이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 하기 화학식 3으로 표시되는 소르비톨 다이메타크릴레이트(분자량 318 Da)가 사용될 수 있다.

[25] 화학식 3

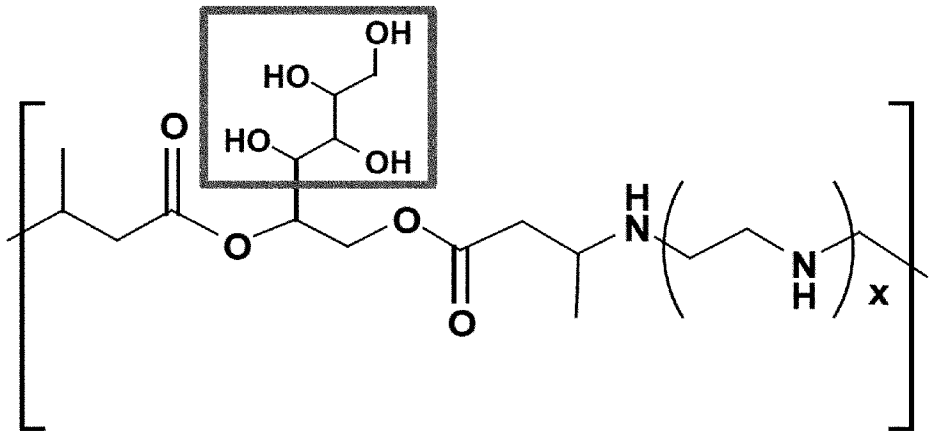


[26]

[27] 본 발명에서 용어, "폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)"는 폴리에틸렌이민의 아민기와 소르비톨계 유도체의 아크릴레이트기 또는 메타크릴레이트기 사이의 마이클 부가반응에 의해 형성된 공중합체를 지칭한다. 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 0.1 내지 0.9분자의 소르비톨계 유도체에 0.9 내지 0.1분자의 폴리에틸렌이민이 결합된 형태가 반복된 구조를 갖는다. 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 소르비톨 골격에 의한 삼투압 활성 및 폴리에틸렌이민(PEI) 골격에 의한 양성자 스폰지 효과로 인해 세포 내 유입이 효율적으로 유도되어 현저히 향상된 형질도입 효율을 나타내고, 세포독성이 매우 낮아 유전자 전달체로서 유전자 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 효과적인 유전자 전달을 위해 1,000 내지 100,000 Da 범위의 분자량을 갖는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 1 내지 50 mV 범위의 제타 전위(zeta potential)를 갖는 것이 효과적인 유전자 전달을 위해 바람직하다. 상기 범위의 물리화학적 특성을 나타낼 때, 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 유전자 전달체로서 세포의 엔도좀(endosome) 내에 효과적으로 유입될 수 있다.

[28] 발명의 구체적인 실시양태로서, 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 하기 화학식 4로 표시될 수 있다.

[29] 화학식 4



[30] 상기 화학식 4에서, x는 1 내지 200 사이의 정수이고, n은 1 내지 500 사이의 정수이다.

[31]

[32] 상기 화학식 4의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 상기 화학식 1로 표시되는 선형의 폴리에틸렌이민의 아민기와 화학식 3으로 표시되는 소르비톨 다이메타크릴레이트의 아크릴레이트기 또는 메타크릴레이트기 사이의 마이클 부가반응에 의해 제조된 공중합체이다.

[33]

[34] 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 폴리에틸렌이민과 소르비톨계 유도체 사이의 마이클 부가반응에 의해 공중합체를 형성하는 단계를 포함하는, 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 제조방법을 제공한다.

[35] 본 발명의 제조방법은,

[36] 1) 폴리에틸렌이민과 소르비톨계 유도체 각각을 반응용매에 용해시키는 단계;

[37] 2) 소르비톨계 유도체 용액을 폴리에틸렌이민 용액에 첨가하여 마이클 부가반응을 수행하는 단계; 및

[38] 3) 반응물로부터 형성된 공중합체를 분리하여 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)를 수득하는 단계를 포함할 수 있다.

[39]

[40] 구체적으로, 단계 1)은 마이클 공여체로서 폴리에틸렌이민과 마이클 수용체로서 아크릴레이트기 또는 메타크릴레이트기 함유 소르비톨계 유도체 사이의 마이클 부가반응을 위해, 폴리에틸렌이민과 소르비톨계 유도체 각각을 반응용매에 용해시켜 반응용액을 제조하는 단계이다. 본 발명에 적합한 소르비톨계 유도체로는 아크릴레이트기 또는 메타크릴레이트기를 함유하는 것이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 이러한 소르비톨계 유도체에는 소르비톨 다이아크릴레이트(SDA), 소르비톨 다이메타크릴레이트(SDM), 소르비톨 트라이아크릴레이트(STA), 소르비톨 트라이메타크릴레이트(STM), 소르비톨 테트라아크릴레이트(STEA), 소르비톨 테트라메타크릴레이트(STEM), 소르비톨 펜타아크릴레이트(SPA), 소르비톨 펜타메타크릴레이트(SPM) 등이 포함된다. 본

발명의 바람직한 실시예에서는 소르비톨 다이메타크릴레이트(분자량 318 Da)를 사용한다. 본 발명에 적합한 폴리에틸렌이민은 50 내지 10,000 Da의 저분자량을 갖는 선형 또는 분지형인 것이 사용될 수 있다. 본 발명에 사용가능한 반응용매는 폴리에틸렌이민과 소르비톨계 유도체와 반응하거나 이들을 분해하지 않으면서 이들을 용해시킬 수 있는 것이라면 임의의 반응용매를 적절히 선택하여 채용할 수 있다. 이러한 반응용매의 예로는 다이메틸설폭사이드, 무수 메틸알코올, 에틸알코올, 다이메틸포름아마이드, 다이옥산 등을 들 수 있다.

[41] 단계 2)는 단계 1)에서 제조된 폴리에틸렌이민 반응용액을 교반하면서 소르비톨계 유도체 반응용액을 첨가하여 폴리에틸렌이민의 아민기와 소르비톨계 유도체의 아크릴레이트기 사이의 마이클 부가반응을 수행하는 단계이다. 이 단계에서 마이클 부가반응은 40 내지 100℃에서 1 내지 24시간 동안 수행하는 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 마이클 부가반응에서 폴리에틸렌이민과 소르비톨계 유도체의 반응 몰비(N/P ratio)는 1:0.1 내지 1:10의 범위, 바람직하게는 1:1이다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는, 4℃에서 2시간 동안 교반 하에 4 M의 폴리에틸렌이민 반응용액에 1 M의 소르비톨 다이메타크릴레이트 반응용액을 서서히 첨가한 후 80℃에서 12시간 동안 반응시켜 마이클 부가반응을 수행한다.

[42] 단계 3)은 단계 2)의 마이클 부가반응에 의해 형성된 공중합체를 분리하는 단계로, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 수득된 반응물을 4℃에서 24시간 동안 증류수에 대해 투석(MWCO = 3500)을 수행하여 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)를 분리한다. 이렇게 분리된 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 동결-건조되어 -25℃에 보관될 수 있는데, 동결-건조는 통상적으로 사용되는 동결-건조 방법 또는 동결-건조기를 사용하여 수행될 수 있고, 그 결과 부산물이 제거된 점성을 갖는 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)를 얻을 수 있다.

[43] 본 발명의 방법에 따라 제조된 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)를 겔 투과 크로마토그래피로 분석한 결과, PSOAT 공중합체의 분자량은 11,180 Da이고, ^{1}H NMR로 분석한 결과, 상기 공중합체 내 폴리에틸렌이민 및 소르비톨 다이메타크릴레이트의 화학적 조성은 각각 65.88 및 34.12 mol%인 것으로 나타났다(표 1 참고). 또한, 수득된 공중합체 내 폴리에틸렌이민의 양성자에 대한 피크는 δ=2.22-2.55 ppm에서, 소르비톨 다이메타크릴레이트의 양성자에 대한 피크는 δ=5.8-6.8 ppm에서 검출되었다(도 2 참고). 상기 결과는 폴리에틸렌이민과 소르비톨 다이메타크릴레이트 사이의 마이클 부가반응에 의해 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)가 효과적으로 합성되었음을 나타내는 것이다.

[44]

[45] 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적

활성 전달체(PSOAT)에 치료 유전자가 결합된 유전자 전달 복합체를 제공한다. 본 발명의 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)에 결합될 수 있는 치료 유전자의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 본 발명의 목적에 따라 원하는 표적에 전달되어 원하는 치료효과를 발휘할 수 있는 어떠한 유전자도 본 발명의 범위에 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와의 복합체 형태로 전달이 가능한 유전자로는 질병과 관련된 치료 유전자의 정상 유전자, 표적 단백질의 발현 억제 유전자, 안티센스 폴리뉴클레오티드를 포함하는 크고 작은 폴리뉴클레오티드, 라이보자임이나 siRNA를 포함하는 임의의 RNA 형태의 유전자가 포함될 수 있다.

[46] 본 발명에 따른 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)에 결합될 수 있는 치료 유전자는 DNA, 단일 가닥 RNA, 이중 가닥 RNA, 리보자임, DNA-RNA 혼성체 및 안티센스 DNA(예컨대, 안티센스 올리고뉴클레오티드)일 수 있으며, 그 중에서도 siRNA가 바람직하다.

[47] 본 발명에 따른 유전자 전달 복합체의 효과적인 형성을 위해 치료 유전자와 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)를 1:0.5 내지 1:100, 바람직하게는 1:5 내지 1:30의 몰비로 반응시키는 것이 바람직하다.

[48] 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 치료 유전자에 대한 응축능(condensation capability)을 조사하기 위해 다양한 몰비로 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체와 DNA를 반응시킨 결과, 이들의 몰비가 1:0.5 이상인 경우에 상기 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체와 DNA의 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)가 가장 효과적으로 형성되고(도 3a 참고), 핵산분해효소에 의한 공격으로부터 유전자 전달 복합체 내 DNA가 효과적으로 보호되며(도 3b 참고), 형성된 유전자 전달 복합체가 구형 모양의 압축된 구조를 가짐을 확인하였다(도 4a 참고). 또한, 본 발명에 따른 유전자 전달 복합체는 평균 150 내지 250 nm의 상대적으로 균일한 입자 크기 분포(PDI:2.5e-003)를 나타내어(도 4b 참고) 유전자 전달체로 사용되기에 적합한 입자 크기를 가질 뿐만 아니라, 표면 전하가 15 내지 35 mV의 양성 제타 전위(zeta potential)를 나타내어(도 4c 참고) 음이온 세포 표면에 효과적으로 결합할 수 있음을 확인하였다.

[49] 또한, 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 형질도입 효율을 조사하기 위해 다양한 몰비로 DNA와 반응시켜 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)를 형성한 후 루시퍼라제(luciferase) 활성 분석을 통해 형질도입 효율을 조사하였다. 그 결과, DNA와 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 몰비가 1:5 내지 1:20까지는 몰비의 증가에 따라 유전자 전달 복합체의 형질도입 효율이 증가하고, 1:30 이상의 몰비에서는 비슷한 수준의 높은 형질도입 효율을 나타내었다. 특히, 본 발명의 유전자 전달 복합체는 비교군으로 사용된 폴리에틸렌이민(PEI 25K) 처리군에 비해 수 배 내지 수백 배

이상 높은 형질도입 효율을 나타내었고(도 5a 내지 5c 참고), 혈청의 존재 하에서도 형질도입 효율이 급격히 감소한 리포펙타민에 비해 안정적으로 높은 형질도입 효율을 유지함을 확인하였다(도 6 참고). 상기 결과는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)가 DNA에 대한 결합능이 우수하여 효과적으로 나노 크기의 유전자 전달 복합체를 형성하고, 그로 인해 높은 형질도입 효율을 나타낼 뿐만 아니라, 이러한 형질도입 효율이 혈청의 존재 하에서도 안정적으로 높게 유지되어 생체 내 적용에 유리하게 사용될 수 있음을 의미하는 것이다. 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 이렇게 높은 형질도입 효율은 공중합체의 완충능(buffering capacity)에 기인한 것이다.

[50] 이에 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 형질도입 기작을 규명하기 위해, 엔도솜 양자 펌프 억제제(endosome proton pump inhibitor)인 바필로마이신 A1(bafilomycin A1)을 이용하여 상기 공중합체의 완충능을 조사한 결과, 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 형질도입 효율은 바필로마이신 A1 처리 후 급격하게 감소하였다(도 7a 참고). 이는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)가 양성자 스폰지 효과에 의해 엔도솜으로부터 세포질 내로 효과적으로 방출될 수 있음을 나타내는 것이다.

[51] 한편, 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 삼투압적 활성 소르비톨 골격을 포함하고 있어 세포막에 삼투압을 부여하여 세포막을 순화시킴으로써 막 투과도의 개선에 의한 세포 재흡수를 촉진시킬 수 있다. 이를 확인하기 위하여, 본 발명의 PSOAT 공중합체 처리에 의한 압축 세포 용적(packed cell volume, PCV) 변화를 측정한 결과, 소르비톨 골격을 갖는 PSOAT/DNA 복합체가 순수 소르비톨 처리에 의해 야기된 것과 동일한 방식으로 PCV를 감소시킴을 확인하였다(도 7b 참고). 또한, 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 형질도입 효율에 미치는 삼투압 활성의 효과를 분석하기 위해 삼투압 억제제를 처리하였다. 그 결과, 삼투압 억제제의 처리 농도가 증가할수록 본 발명의 PSOAT/GL3 복합체의 형질도입 효율이 현저히 감소하였다(도 8a 내지 8c 참고). 상기 결과로부터 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)가 소르비톨 골격에 의한 삼투압 활성으로 인해 더욱 향상된 형질도입 효율을 나타내는 것임을 알 수 있다.

[52] 또한, 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 세포독성을 다양한 세포주를 대상으로 조사한 결과, 비교군으로 사용된 폴리에틸렌이민(PEI 25K)보다 현저히 낮은 세포독성을 나타내었다(도 9a 내지 9c 참고).

[53] 또한, 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 생체 외(in vitro) 형질도입 효율을 확인하기 위하여, PSOAT와 녹색 형광 단백질(green

fluorescent protein, GFP) 유전자를 20:1의 몰비로 혼합하여 유전자 전달 복합체(PSOAT/GFP)를 제조한 후 이를 세포에 형질감염시키고 유세포측정(flow cytometry)으로 분석하였다. 그 결과, 비교군인 폴리에틸렌이민과 GFP의 복합체(PEI 25K/GFP) 처리군에 비해 본 발명에 따른 유전자 전달 복합체(PSOAT/GFP) 처리군에서 현저히 증가된 GFP 신호가 검출되었고, 모든 처리군에서 어떠한 세포독성도 나타나지 않음을 확인하였다(도 10 참고).

[54] 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 생체 내(in vivo) 형질도입 효율을 조사하기 위하여, 상기와 같이 제조된 유전자 전달 복합체(PSOAT/GFP)를 정상 마우스의 폐에 에어로졸 투여한 후, 마우스로부터 적출된 폐에서 GFP 신호를 형광현미경으로 관찰한 결과, 본 발명의 유전자 전달 복합체(PSOAT/GFP)가 투여된 모든 마우스에서 GFP 신호가 검출되었고, 특히 폴리에틸렌이민과 GFP의 복합체(PEI 25K/GFP)에 비해 높은 GFP 신호가 검출되었다(도 11 참고).

[55] 따라서, 본 발명의 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 DNA에 높은 결합능을 나타내고 핵산분해효소로부터 DNA를 효과적으로 보호하며 유전자 전달체로 사용하기에 적합한 구형의 균일한 입자 크기의 유전자 전달 복합체를 형성할 수 있을 뿐만 아니라, 시험관 내 및 생체 내에서 매우 낮은 세포독성을 나타내고 형질도입 효율이 매우 높아 유전자 치료를 위한 유전자 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다.

[56]

[57] 이에 본 발명은, 발명의 다른 양태로서, 상기 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)에 치료 유전자가 결합된 유전자 전달 복합체를 유효성분으로 함유하는 유전자 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[58] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 투여될 수 있으며, 경구 투여 시에는 상기 유효성분 이외에 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 추가로 포함할 수 있다. 주사제의 경우에, 본 발명의 약학적 조성물은 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있다. 또한 국소 투여 시에 본 발명의 조성물은 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[59] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같이 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약앰플 또는 다중 투약형태로 제조할 수 있다. 기타 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[60] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트,

프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[61] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 장관, 설하 또는 국소 투여가 가능하다. 이와 같은 임상 투여를 위해 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 기술을 이용하여 적합한 제형으로 제제화할 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 불활성 희석제 또는 식용 담체와 혼합하거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나 또는 정제로 압형하여 투여할 수 있다. 경구 투여용의 경우, 유효성분은 부형제와 혼합되어 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 또한, 주사용, 비경구 투여용 등의 각종 제형은 당해 기술 분야의 공지된 기법 또는 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다.

[62] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[63]

[64] 발명의 구체적인 실시양태로서, 본 발명은 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)에 치료 유전자가 결합된 유전자 전달 복합체를 에어로졸 전달을 통해 표적 부위에 전달하도록 제제화된 상기 약학적 조성물의 에어로졸 제형을 제공한다.

[65] 흡입(inhalation)을 통한 약물 전달은 비침습적(non-invasive) 방법 중 하나로, 특히 폐 질환의 광범위한 치료에 에어로졸 전달을 통한 유전자 전달이 유리하게 이용될 수 있다. 이는 폐의 해부학적 구조 및 위치가 즉각적이고 비침습적인 접근을 가능케 하고, 다른 기관에는 영향을 미치지 않으면서 유전자 전달 시스템의 국소 적용을 받을 수 있기 때문이다. 따라서, 본 발명의 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)에 치료 유전자로서 폐 질환, 특히 폐암과 관련된 유전자를 결합시킨 유전자 전달 복합체를 에어로졸 방식으로 폐에 전달하면, 상기 질환에 대한 예방 또는 치료효과를 기대할 수

있다.

[66] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 전달 방법에는 경구 흡입 및 비내 흡입 방법, 안면 마스크 또는 경구용 튜브에 의한 방법 및 산소를 투여하기 위해 사용되어 온 어린이용 산소 후드에 의한 방법이 포함될 수 있다. 일반적으로, 소립자 에어로졸은 분무화 공정에 의해서 창출되고, 이러한 분무화 공정은 제트 분무기에 의해 수행된다.

[67] 본 발명의 약학적 조성물은 수성 분산제를 개인 또는 동물의 기도에 에어로졸 전달하도록 제조할 수 있다는 것을 특별히 고려해야 한다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 과도한 실험 없이 에어로졸 제형의 적당한 투여량을 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 표적화된 유전자 치료요법을 위해 생체 내에서 사용된 경우, 본 발명의 약학적 조성물은 치료학적 유효량, 즉 치료 유전자를 효율적으로 발현시킴으로써 해당 질환을 없애거나 완화시키는 양으로 환자 또는 동물에게 투여된다. 용량 및 투여량 섭생은 질환의 종류, 특정한 폴리소르비톨계 공중합체/DNA 복합체의 특징, 예를 들면, 이의 치료학적 지수, 환자, 환자의 병력 및 기타 요인들에 좌우될 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 전형적으로 약 0.01 내지 약 0.1 g/체중 kg일 것이다. 당해 조성물 및 제형은 미량의 첨가제, 예를 들면, 등장성 및 화학적 안정성을 증진시키는 물질(예: 완충제, 방부제 등)을 함유할 수 있다.

[68]

[69] 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)에 치료 유전자가 결합된 유전자 전달 복합체를, 상기 치료 유전자의 전달에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 질환 또는 증상을 갖는 대상에게 치료학적 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 치료 유전자 관련 질환 또는 증상을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[70] 본 발명에서 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 유전자 전달 복합체의 투여로 목적하는 질환 또는 증상의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[71] 본 발명에서 용어, "치료"란 본 발명에 따른 유전자 전달 복합체의 투여로 목적하는 질환 또는 증상의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[72] 본 발명에서 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 활성성분을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 활성성분이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 소정의 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비강내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 에어로졸 형태로 투여될 수 있다.

[73] 본 발명에서 "대상"은 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니픽을 포함하나 이에 한정되지 아니하는 동물을 의미하고, 일 실시예에서는 포유류를, 또 다른 실시예에서는 인간을

의미한다.

[74] 본 발명에서 활성성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환 또는 증상을 치료 또는 예방하는데 유효한 지속형 글루키곤 결합체의 양을 의미한다.

[75]

발명의 효과

[76] 본 발명의 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 삼투압적 활성 소르비톨 골격을 포함하고 있어 세포막에 삼투압을 부여함으로써 막 투과도의 증강을 통해 세포 재흡수를 촉진시켜 현저히 향상된 형질도입 효율을 나타낸다. 또한 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 DNA에 높은 결합능을 나타내고, 핵산분해효소로부터 DNA를 효과적으로 보호하며, 유전자 전달체로 사용하기에 적합한 물리화학적 특성을 나타낼 뿐만 아니라, 시험관 내 및 생체 내에서 매우 낮은 세포독성을 나타내므로, 유전자 치료를 위한 유전자 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다.

[77]

도면의 간단한 설명

[78] 도 1은 본 발명에 따른 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 제조방법을 도식적으로 나타낸 것이다.

[79] 도 2는 본 발명에 따라 제조된 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 조성을 ^{1}H-NMR로 분석한 결과이다.

[80] 도 3a는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 DNA를 다양한 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)의 이동성을 아가로스 겔 전기영동으로 분석한 결과이다.

[81] 도 3b는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 DNA를 다양한 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)가 핵산분해효소로부터 DNA를 효과적으로 보호할 수 있음을 나타내는 결과이다. 도 3b에서 레인 1은 DNA 마커, 레인 2는 DNase I 무처리 플라스미드 DNA(pGL3-대조군), 레인 3은 DNase I 처리 플라스미드 DNA(pGL3-대조군), 레인 4는 DNase I 무처리 PSOAT/pGL3 복합체, 및 레인 5는 DNase I 처리 PSOAT/pGL3 복합체를 나타낸다.

[82] 도 4a는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 DNA를 다양한 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)의 형태를 투과 전자현미경(Transmission Electron Microscopy, TEM)으로 분석한 결과이다(막대는 200 nm를 나타냄).

[83] 도 4b는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 DNA를 다양한 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)의 입자 크기를 혈청의 존재 유무에 따라 분석한 결과이다.

[84] 도 4c는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 DNA를 다양한 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT-/DNA)의 제타 전위를 측정한 결과이다.

[85] 도 5a 내지 5c는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 DNA를 다양한 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)의 형질도입 효율을 무혈청 배지에서 다양한 세포주를 대상으로 조사한 결과이다(n=3, 오차막대는 표준편차를 나타냄). 도 5a는 A549 세포주; 도 5b는 HeLa 세포주; 및 도 5c는 H322 세포주에 대한 결과이고, 도면에서 RLU는 'relative light unit'의 약자로 발광 정도를 나타낸다.

[86] 도 6은 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 DNA를 20:1의 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)의 형질도입 효율을 혈청 존재 하에서 HepG2 세포주를 대상으로 조사한 결과이다(n=3, 오차막대는 표준편차를 나타냄).

[87] 도 7a는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 DNA를 다양한 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)의 완충능(buffering capacity)을 바필로마이신(bafilomycin) A1의 처리를 통해 조사한 결과이다.

[88] 도 7b는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 DNA를 20:1의 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)의 삼투압적 활성을 압축 세포 용적(packed cell volume, PCV) 변화를 측정하여 확인한 결과이다.

[89] 도 8a 내지 8c는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 형질도입 효율에 미치는 삼투압 활성의 효과를 조사한 결과로, 도 8a는 삼투압 억제제 처리 1시간 경과 후, 도 8b는 2시간 경과 후, 및 도 8c는 4시간 경과 후의 결과이다.

[90] 도 9a 내지 9c는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 세포독성을 다양한 농도에서 다양한 세포를 대상으로 조사한 결과로, 도 9a는 A549 세포주; 도 9b는 HeLa 세포주; 및 도 9c는 H322 세포주에 대한 결과이다.

[91] 도 10은 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 GFP(green fluorescent protein)를 20:1의 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/GFP)를 A549 세포에 형질감염시킨 후 상기 세포에서의 GFP 발현을 유세포측정으로 분석한 결과이다(n=3, 오차 막대는 표준편차를 나타냄).

[92] 도 11은 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 GFP를 20:1의 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/GFP)를 마우스의 폐에 에어로졸 투여한 후 생체 내 GFP 발현을 분석한 결과이다(배율: 200×, 스케일 바는 50 ㎛를 나타냄).

[93]

발명의 실시를 위한 형태

[94] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는다.

[95]

[96] **실시예 1: 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체의 제조**

[97] 본 발명에 따른 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 문헌(Arote RB, et al., Bioconjug. Chem. 2009, 20(12): 2231-41)에 보고된 방법을 약간 변형한 마이클 부가반응에 따라 합성하였다(도 1).

[98] 간략히 설명하면, 0.01 M의 저분자량 폴리에틸렌이민(LMW-PEI)(MW: 423 Da, Sigma-Aldrich)과 0.01 M 소르비톨 다이메타크릴레이트(SDM)(MW: 318.32 Da, Monomer-Polymer & Dajac Labs, Inc.)를 각각 4℃에서 무수 다이메틸설폭사이드에 용해시킨 후, 제조된 PEI 용액을 4℃에서 2시간 동안 교반하면서 제조된 SDM 용액에 서서히 첨가하고 80℃에서 12시간 반응시켰다. 이로부터 수득된 공중합체를 투석막(Spectra/Por, MWCO = 3500)을 사용하여 4℃에서 24시간 동안 증류수에 대해 5회 투석을 수행하여 미반응물을 제거하였고, 분리된 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)를 -20℃에서 동결-건조하였다.

[99] 동결-건조된 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 조성을 ^{1}H-핵자기 공명(^{1}H-nuclear magnetic resonance, ^{1}H-NMR)(Avance 600, Bruker, Germany)으로 분석하였다. ^{1}H-NMR 분석을 위해 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)를 증류수에 10 ㎎/㎖의 농도로 용해시켰다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 소르비톨 다이메타크릴레이트의 양성자에 대한 피크가 δ=5.8-6.8 ppm에서, 폴리에틸렌이민의 양성자에 대한 피크가 δ=2.22-2.55 ppm에서 검출되어 폴리에틸렌이민과 소르비톨 다이메타크릴레이트의 공중합체가 효과적으로 합성되었음을 확인하였다.

[100] 상기와 같이 합성된 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 특성을 하기 표 1에 정리하였다.

[101] 표 1

[Table 1]

구분	반응물(중량%)		몰비 SDM:PEI(mol/mol)	PEI 조성(mol-%)[a]	SDM 조성(mol-%)[a]	분자량(Da)[b]
	SDM	PEI				
SDM/PEI 423	318.32	423	1:1	65.88	34.12	11,180

[102] [a] ^{1}H NMR 측정값

[103] [b]겔 투과 크로마토그래피(GPC) 측정값

[104]

[105] **실시예 2: 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체/DNA 복합체의 특성 분석**

[106] **<2-1> 폴리에틸렌이민 공중합체의 DNA 응축능**

[107] 유전자 전달체의 가장 중요한 특징 중 하나는 플라스미드 DNA와 상호작용하여 이를 응축시킬 수 있는 능력이다. 이에 상기 실시예 1에서 제조된 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 DNA 응축능을 아가로스 겔 전기영동 분석으로 확인하였다. 먼저, PSOAT 용액에 pGL3 플라스미드(5.3 kb, Promega)를 0.5, 1, 3, 5 및 10의 다양한 몰비(N/P ratio)로 혼합한 후 가볍게 볼텍싱(vortexing)해주고 실온에서 30분간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 각 반응용액을 1% 아가로스 겔에 전기영동을 수행하고 자외선 하에서 DNA 이동성을 관찰하였다. 이때, 대조군으로는 본 발명의 PSOAT와 반응시키지 않은 pGL3 플라스미드 단독을 사용하였다.

[108] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 플라스미드 DNA에 대한 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 몰비가 1:0.5 이상인 경우에 DNA의 이동성이 완전히 지연되었는데, 이는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체가 플라스미드 DNA를 효과적으로 응축시켜 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)를 형성하였음을 나타내는 것이다. 대조군인 비반응 플라스미드 DNA는 아무런 지연 없이 겔을 통과하여 이동하였다. 상기 결과로부터 유전자 전달 복합체의 효과적인 형성을 위해서는 플라스미드 DNA와 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)를 1:0.5 이상의 몰비로 혼합하는 것이 바람직함을 알 수 있다.

[109]

[110] **<2-2> 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체/DNA 복합체의 DNA 보호효과**

[111] 효과적인 유전자 발현을 위해서는 핵산분해효소와 같은 생체 내 효소 공격으로부터 유전자 전달 복합체 내의 DNA가 적절히 보호되어야 한다. 이러한 DNA 보호효과를 확인하기 위해, 상기 실시예 <2-1>에서 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 DNA를 10:1의 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA) 용액 4 ㎕ 또는 비반응 플라스미드 DNA 용액 4 ㎕에 DNase I 1 ㎕(2 유닛) 또는 PBS(phosphate-buffered saline) 함유 DNase/Mg^{2+} 분해 완충액(50 mM TrisCl, pH 7.6 및 10 mM $MgCl_2$) 1 ㎕를 첨가하고 37℃에서 30분간 100 rpm으로 교반하면서 인큐베이션하였다. 효소 반응을 중지시키기 위해, 모든 반응용액에 4 ㎕의 EDTA(250 mM)를 10분간 처리한 후, 1% 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate, pH 7.2)를 혼합하여 최종 부피를 15 ㎕로 맞추고 25℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 반응용액을 트리스-아세테이트-EDTA 완충액(running buffer)을 이용해 1% 아가로스 겔에서 1시간 동안 50 V로 전기영동을 수행하였다.

[112] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, 대조군인 비반응 플라스미드 DNA는 DNase

I에 의해 완전히 분해된 반면(레인 3), 본 발명의 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA) 내의 DNA는 DNase I의 분해로부터 효과적으로 보호되었음을 알 수 있다(레인 6). 이러한 결과는 본 발명의 유전자 전달 복합체가 핵산분해효소의 공격으로부터 DNA를 보호하면서 효과적으로 세포 내로 전달할 수 있음을 나타내는 것이다.

[113]

[114] **<2-3> 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체/DNA 복합체의 형태학적 분석**

[115] 상기 실시예 <2-1>에서 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체와 DNA를 20:1의 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)의 형태를 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM)(LIBRA 120, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였다. 또한, 상기에서 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)를 동결-건조한 후 이의 형태를 TEM으로 관찰하였다.

[116] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)는 비교군으로 사용된 PEI 25K/DNA 복합체에 비해 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 플라스미드 DNA가 효과적으로 응축되어 균일한 구형의 압축된 구조를 가지고 있음을 확인하였다(상부 패널). 또한, 동결-건조 후 비교군으로 사용된 PEI 25K/DNA 복합체는 입자들의 응집 현상이 야기되는 것과는 달리, 본 발명의 PSOAT/DNA 복합체는 동결-건조 후에도 구조적 완전성(integrity) 및 안정성을 그대로 유지하였는데(도 4a의 하부 패널), 이는 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT) 내 소르비톨 골격에 의한 동결방지(cryoprotective) 기능에 의한 것이다.

[117] 유전자 전달 복합체의 입자 크기는 복합체가 표적 부위에 접근하고 이를 통과하는 데 중요한 요소로 복합체의 세포 내 유입에 필수적이다. 대부분의 유전자 전달 복합체는 세포 내 이입(endocytosis) 또는 포액작용(pinocytosis)에 의해 세포 내로 유입되기 때문에, 최적의 세포 내 유입을 위해서는 복합체의 크기가 일정 수준 이하인 것이 요구된다. 이에 동적 광 산란 분광 광도계(dynamic light scattering spectrophotometer, ELS8000, Otsuka Electronics, Osaka, Japan)를 이용하여 무혈청 조건에서 다양한 몰비로 제조된 유전자 전달 복합체와, 다양한 농도의 혈청 존재 하에서 20:1의 몰비로 제조된 유전자 전달 복합체의 입자 크기를 측정하였다. 이때, 산란각도(scattering angle)는 90° 및 20°로 설정하였다.

[118] 그 결과, 도 4b에 나타난 바와 같이, 몰비 1:1, 10:1, 20:1 및 30:1에서 본 발명의 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)는 혈청의 유무에 상관없이 평균 150 내지 250 nm의 상대적으로 균일한 입자 크기 분포(PDI: 2.5e-003)를 나타내어, 유전자 전달체로 사용하기에 적합한 입자 크기를 가짐을 확인하였다.

[119]

[120] **<2-4> 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체/DNA 복합체의 표면 전하 측정**

[121] 또한, 유전자 전달 복합체의 양성 표면 전하는 음이온 세포 표면에 결합하는데

필수적이고, 이는 복합체의 세포 내 유입을 용이하게 한다. 이에 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 플라스미드 DNA를 다양한 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체(PSOAT/DNA)의 제타 전위(zeta potential)를 동적 광 산란 분광 광도계(ELS8000, Otsuka Electronics, Osaka, Japan)를 이용하여 측정하였다.

[122] 그 결과, 도 4c에 나타난 바와 같이, 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 플라스미드 DNA를 5:1의 몰비로 반응시켜 제조한 유전자 전달 복합체가 가장 높은 양성의 제타 전위를 나타내었고, 그 값은 몰비가 증가할수록 감소하였으나 모두 양성값을 나타내었다. 이처럼 표면 전하가 양전하를 띤다는 것은 음전하를 띠는 DNA가 유전자 전달 복합체 내부에 완전히 둘러싸여 있음을 의미하고, 양성의 표면 전하는 유전자 전달 복합체의 세포 내로의 유입을 용이하게 할 뿐만 아니라, 입자들 사이에 정전기적 반발력을 일으켜 입자들끼리의 응집현상을 감소시키는 장점이 있다.

[123]

[124] **실시예 3: 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체의 형질도입 효율**

[125] **<3-1> 무혈청 조건 하의 형질도입 효율 분석**

[126] 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 형질도입 효율을 조사하기 위하여, 무혈청 조건에서 시험관 내 루시퍼라제 활성 분석(in vitro luciferase activity assay)을 수행하였다.

[127] 먼저, 24-웰 플레이트에 10% FBS(HyClone), 100 ㎍/㎖ 스트렙토마이신 및 100 U/㎖ 페니실린이 함유된 RPMI 1640(Gibco BRL) 배지를 첨가하고 A549 세포, HeLA 세포 및 H322 세포를 1.5×10^5 개/웰의 밀도로 접종하여 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 18시간 동안 배양하였다. 아울러, 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT) 용액에 SV40 프로모터 및 인핸서에 의해 발현이 유도되는 루시퍼라제 유전자를 포함하는 pGL3 발현벡터(5.3 kb, Promega)를 5, 10, 20 및 30의 몰비로 혼합한 후 가볍게 볼텍싱 해주고 실온에서 30분간 인큐베이션하여 유전자 전달 복합체(PSOAT/GL3)를 제조하였다. 상기 웰 플레이트의 배지를 무혈청 배지 또는 제조된 유전자 전달 복합체(PSOAT/GL3) 1 ㎍를 함유하는 배지로 교체하고 4시간 동안 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 이때, PEI 25K(25 kDa, Sigma-Aldrich) 및 리포펙타민(Lipofectamine)을 동일한 농도로 처리한 세포 배양액을 비교군으로 사용하였다. 그 후, 웰 플레이트의 배지를 신선한 10% FBS 함유 DMEM 배지로 교체하고 다시 48시간 동안 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 이어서, 배지를 제거한 후, 각 웰에 세포 용해 완충액(cell lysis buffer)을 100 ㎕씩 첨가하고 -20℃에서 24시간 동안 방치한 후 배양액을 이-튜브(e-tube)로 옮겨 담고 10,000 rpm에서 15분간 원심분리를 수행하여 상층액을 수득하였다. 수득된 상층액의 루시퍼라제 활성을 루시퍼라제 분석 키트(luciferase assay kit, Promega)로 측정하여 형질도입 효율을 1 ㎎ 단백질의 상대적 발광도(relative light

unit, RLU)로 나타내었다.

[128] 그 결과, 도 5a 내지 5c에 나타난 바와 같이, DNA와 PEI 25K의 반응 몰비가 증가할수록 형성된 유전자 전달 복합체의 형질도입 효율이 감소하는 반면, 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 DNA와의 반응 몰비가 증가하여도 PEI 25K보다는 높고, 리포펙타민과는 유사한 수준의 형질도입 효율을 나타남을 확인하였다. 이는 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)가 DNA에 대한 결합능이 우수하여 효과적으로 나노 크기의 유전자 전달 복합체를 형성하고, 그로 인해 높은 형질도입 효율을 나타냄을 의미하는 것이다. 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 이렇게 높은 형질도입 효율은 공중합체의 완충능(buffering capacity)에 기인한 것이다.

[129]

[130] **<3-2> 혈청 존재 하의 형질도입 효율 분석**

[131] 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 pGL3 발현벡터의 반응 몰비를 1:20으로 하고 배지 내 혈청 농도를 0, 10, 20 및 30%로 달리하는 것을 제외하고는 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 PSOAT/GL3 복합체를 제조한 후, 이의 루시퍼라제 활성을 분석하였다.

[132] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 혈청 존재 하에서 PEI 및 리포펙타민의 형질도입 효율이 현저히 감소하는 것과는 달리, 본 발명에 따른 PSOAT/GL3 복합체는 혈청 농도와 상관없이 높은 수준의 형질도입 효율을 유지하였다. 일반적으로 양이온성 고분자를 이용해 생체 내에 유전자를 전달하는 경우, 이들의 유전자 전달 복합체는 양이온성으로 인해 혈액 중에 존재하는 혈청단백질과 결합하게 되고, 그로 인해 크기가 커진 유전자 전달 복합체는 혈관의 막힘 또는 유전자 발현효율의 저하와 같은 문제점을 야기한다. 그러나, 본 발명에 따른 PSOAT/GL3 복합체는 혈청 존재 하에서도 응집체를 형성하지 않으므로 혈관의 막힘 또는 유전자 발현효율의 감소를 유발하지 않는 것으로 확인되었다.

[133]

[134] **실시예 4: 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체의 형질도입 기작 분석**

[135] **<4-1> 완충능 분석**

[136] 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 형질도입 기작을 규명하기 위해, 상기 공중합체의 완충능을 조사하였다. 상기 실시예 <3-1>에서와 같이 웰 플레이트에서 배양된 A549 세포에 DMSO에 희석된 바필로마이신 A1(bafilomycin A1, specific inhibitor of vacuolar type H+ ATPase, 200 nM)을 첨가하여 10분간 배양한 후, 상기와 동일한 방법으로 형질도입 효율을 측정하였다. 이때, 본 발명에 따른 유전자 전달 복합체는 DNA와 PSOAT가 1:20 및 1:30의 몰비로 제조된 것을 사용하였고, 비교군으로 DNA와 PEI 25K가 1:5의 몰비로 제조된 유전자 전달 복합체를 사용하였다.

[137] 그 결과, 도 7a에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 형질도입 효율은 바필로마이신 A1 처리 후 급격하게 감소하였는데, 이는 본 발명의 PSOAT가 높은 완충능을 가지고 있으며, 따라서 양성자 스폰지 효과에 의해 엔도솜으로부터 신속하게 방출되어 세포질 내로 유입될 수 있음을 나타내는 것이다.

[138]

[139] **<4-2> 삼투압 활성 측정**

[140] 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 삼투압 활성 소르비톨 골격을 함유하는 생분해성 유전자 전달체이다. 이에 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)가 높은 삼투압에 대한 반응으로 형질도입 효율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 압축 세포 용적(packed cell volume, PCV) 변화를 측정하였다.

[141] 먼저, 293T 세포를 10% FBS 함유 DMEM 배지에 현탁한 후, 상이한 농도(0.01, 0.03, 0.05, 1 및 5 중량%)의 소르비톨 또는 중합체 골격에 다양한 소르비톨 함량(0.01, 0.03 및 0.05 중량%)을 갖는 PSOAT/DNA 복합체를 첨가하였다. 상기 배양 혼합물을 37℃에서 5분간 인큐베이션한 후, 세포를 1분간 미니-PCV 튜브에서 원심분리하여 세포의 용적 변화를 측정하였다.

[142] 그 결과, 도 7b에 나타난 바와 같이, DMEM 중 1 중량% 소르비톨에 노출된 세포에서 PCV의 20% 감소가 관찰되었고, 0.01, 0.03 및 0.05 중량%의 소르비톨을 함유한 PSOAT/DNA 복합체 역시 순수 소르비톨 처리에 의해 야기된 것과 동일한 양상으로 PCV를 감소시켰다. 본 발명에 따른 PSOAT/DNA 복합체 존재하의 PCV 감소는 PSOAT 중의 소르비톨 골격이 세포막에 삼투압을 부여하여 세포막을 순화시킴으로써 막 투과도를 개선시키고, 그로 인해 세포 재흡수가 촉진된다는 가설에 의해 설명될 수 있다.

[143]

[144] **<4-3> 삼투압 활성 의존적 형질도입 효율 확인**

[145] 삼투압 활성이 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 형질도입 효율에 미치는 영향을 조사하기 위해, PSOAT에 삼투압 억제제를 처리하여 형질도입 효율의 변화를 조사하였다.

[146] 이를 위한 삼투압 억제제로 배양 세포 내 유기 삼투질(osmolyte)의 축적을 방지하는 SC58236(COX-2 억제제, Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 먼저, 실시예 <3-1>에서와 같이 A549 세포를 배양하여 24-웰 플레이트에 10×10^4 세포/웰의 농도로 분주하였다. 상기 웰 플레이트의 배지를 PSOAT/GL3(1:20) 및 PEI 25K/GL3(1:5) 복합체를 100 ㎍/㎖의 농도로 함유하는 무혈청 배지로 교체한 후 다시 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 이어서, 처음에는 DMSO에 용해시키고 나중에는 무혈청 배지에 희석하여 다양한 농도(0, 5, 10 및 30 μM/ℓ)로 준비한 SC58236를 상기 웰 플레이트에 처리한 후 이를 1, 2 및 4시간 동안 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 배지를 제거한 후, 각 웰에 세포

용해 완충액(cell lysis buffer)을 100 ㎕씩 첨가하고 -20℃에서 24시간 동안 방치한 후 배양액을 이-튜브(e-tube)로 옮겨 담고 10,000 rpm에서 15분간 원심분리를 수행하여 상층액을 수득하였다. 수득된 상층액의 루시퍼라제 활성을 루시퍼라제 분석 키트(luciferase assay kit, Promega)로 측정하여 형질도입 효율을 1 ㎎ 단백질의 상대적 발광도(RLU)로 나타내었다.

[147] 그 결과, 도 8a 내지 8c에 나타난 바와 같이, 삼투압 억제제인 SC58236의 처리 농도가 증가할수록 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 형질도입 효율이 현저히 감소하였다. 30 μM/ℓ의 SC58236 처리 시, 모든 분석 시점(1, 2 및 4시간 경과)에서 본 발명에 따른 PSOAT/GL3 복합체의 형질도입 효율은 플라스미드 pGL3의 형질도입 효율과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 이는 고농도 삼투압 억제제의 처리에 의해 본 발명에 따른 PSOAT의 형질도입 효율이 완전히 소실됨을 나타내는 것이다. 한편, PEI 25K의 형질도입 효율은 삼투압 억제제의 고농도 처리에도 불구하고 모든 분석 시점에서 별다른 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다.

[148] 상기 결과로부터, 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 형질도입 효율이 삼투압적 활성 소르비톨의 존재로 인한 높은 삼투압 활성에 기인한 것임을 확인하였다.

[149]

[150] **실시예 5: 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체의 세포독성**

[151] 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 세포독성을 조사하기 위해, 실시예 <3-1>에서와 같이 DNA와 PSOAT의 다양한 몰비로 제조된 유전자 전달 복합체를 다양한 세포에 처리한 후 세포 증식 분석(Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)을 수행하여 세포 생존능을 조사하였다.

[152] 먼저, A549(human lung adenocarcinoma cell, ATCC) 및 H322(human lung cancer cell, ATCC) 세포는 RPMI 1640(Gibco BRL, Paris, France) 배지에, HeLa(human cervical carcinoma cell, ATCC) 세포는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco BRL) 배지에 접종하여 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 이때, 모든 배지에는 10%의 우태아혈청(FBS, HyClone, Logan, UT, USA), 100 ㎍/㎖의 스트렙토마이신 및 100 U/㎖의 페니실린을 첨가하였다.

[153] 배양된 A549, 및 HeLa 및 H322 세포를 1×10^4 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 접종하고 18시간 동안 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 상기 웰 플레이트의 배지를 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)를 각각 5, 10, 20, 50 및 100 ㎍/㎖의 농도로 함유하는 무혈청 배지로 교체한 후 다시 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 이때, PEI 25K(25 kDa, Sigma-Aldrich)를 동일한 농도로 처리한 세포 배양액을 비교군으로 사용하였다. 그 후, 웰 플레이트의 배지를 20 ㎕의 세포 역가 측정 시약(Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent)을 포함하는 성장 배지(growth

medium)로 교체하였다. 3시간 동안 배양 후, ELISA 플레이트 판독기(GLR 1000, Genelabs Diagnostics, Singapore)를 사용하여 590 nm에서 웰 플레이트의 흡광도를 측정하여 세포의 대사 활성도(metabolic activity)를 조사하였다.

[154] 그 결과, 도 9a 내지 9c에 나타난 바와 같이, 대조군과 비교하여 본 발명의 PSOAT/DNA 복합체를 처리한 세포에서는 PSOAT의 몰비가 증가하여도(최대 30:1) 모든 세포에서 60% 이상의 세포 생존율이 나타난 반면, PEI 25K를 처리한 세포의 세포 생존율은 PEI의 몰비가 증가함에 따라 급격하게 감소하였다. 상기 결과로부터 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 세포독성이 매우 낮아 생체적합성이 우수함을 확인하였다.

[155]

[156] **실시예 6: 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체의 시험관 내 및 생체 내 형질도입 효율 분석**

[157] **<6-1> 유세포측정에 의한 시험관 내 형질도입 분석**

[158] 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 시험관 내 형질도입 효율을 조사하기 위해, 293T 세포에서 PSOAT의 GFP 발현을 유세포측정(flow cytometry)으로 분석하였다.

[159] 먼저, 본 발명의 PSOAT와 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)을 발현하는 플라스미드 pcDNA3.1/CT-GFP(6.1 kb, Invitrogen)를 20:1의 몰비로 혼합하여 유전자 전달 복합체(PSOAT/GFP)를 제조하였다. 이때, PEI 25K(25 kDa, Sigma-Aldrich)와 상기 pcDNA3.1/CT-GFP 플라스미드를 동일한 몰비로 혼합하여 제조한 유전자 전달 복합체(PEI 25K/GFP)를 비교군으로 사용하였다. A549 세포를 PSOAT/GFP 및 PEI 25K/GFP 복합체로 각각 형질감염시킨 후 PBS로 세척하고 트립신을 처리하였다. FACS 캘리버 시스템(Calibur System)(Becton-Dickinson, San Joes, CA)을 이용하여 상기 세포로부터 발현된 GFP의 비율(%)을 기록하여 형질도입 효율을 평가하였다. 상기 실험을 3회 반복 수행하였고, 20개의 세포를 각 실험에서 계수하였다.

[160] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, PEI 25K/GFP 복합체 처리군에서는 형광 세포가 약 15%에 불과한 반면, 본 발명의 PSOAT/GFP 복합체 처리군에서는 약 30% 이상의 형광 세포가 검출되어 PEI 25K보다 본 발명의 PSOAT가 더욱 우수한 형질도입 효율을 나타냄을 확인하였다.

[161]

[162] **<6-2> 에어로졸 전달에 의한 생체 내 형질도입 효율 분석**

[163] 본 발명에 따른 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)의 에어로졸에 의한 생체 내 유전자전달 효율을 확인하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

[164] 먼저, 상기 실시예 <6-1>과 같이 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)와 GFP를 발현하는 플라스미드 pcDNA3.1/CT-GFP(6.1 kb, Invitrogen)를 20:1의 몰비로 혼합하여 유전자 전달 복합체(PSOAT/GFP)를 제조하였다.

[165] 6주령의 수컷 C57BL/6 마우스(Breeding and Research Center)를 온도 23±2℃ 및 상대습도 50±20%에서 12시간 밤/낮 주기를 유지하여 실험실 동물시설에 보관하였다. 본 연구의 모든 실험 절차는 서울대학교의 동물보호 및 사용위원회(Animal Care and Use Committee at Seoul National University, SNU-101211-2)에 의해 승인되었다. 에어로졸을 통한 유전자 전달 효율성을 확인하기 위해 마우스의 코 부위만 노출시키는 챔버(NOEC; Dusturbo, Seoul, Korea)를 사용하였고, 4마리의 마우스를 다음과 같이 무작위로 2개 군(각 군당 2마리)으로 나누었다: PEI 25K/GFP 복합체 처리군; 및 PSOAT/GFP 복합체 처리군. 상기 각 군의 마우스에 1 mg의 DNA가 전달되도록 문헌에 사용된 방법에 근거하여 에어로졸에 노출시켰다(H.L. Jiang 등, *Biomaterials* 30: 5844-5852, 2009).

[166] 에어로졸 노출 2일 후, 각 군의 마우스를 희생시키고 폐를 적출하였다. 적출된 폐를 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)에 담가 12시간 동안 고정한 후 30% 수크로스 용액에 담가 4℃에서 48시간 동안 보관하였다. 고정된 폐를 -20℃ 이하의 온도에서 OCT 화합물(Tissue-Tek OCT, Sakura)로 포매(embedding)한 후 마이크로톰(microtome)으로 절단하여 10 ㎛ 두께의 폐 조직 절편을 제조하였다. 조직병리학적 분석을 위해, 준비된 폐 조직 절편을 헤마톡실린과 에오신(H&E)으로 염색한 후 공초점 현미경(confocal microscope, Zeiss LSM510, Carl Zeiss)으로 GFP 신호를 관찰하였다.

[167] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, PEI 25K/GFP 복합체 처리군에 비해 본 발명의 PSOAT/GFP의 복합체 처리군에서 강한 GFP 신호가 검출되어 에어로졸 전달 효율이 매우 우수함을 알 수 있다.

[168]

산업상 이용가능성

[169] 본 발명의 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 삼투압적 활성 소르비톨 골격을 포함하고 있어 세포막에 삼투압을 부여함으로써 막 투과도의 증강을 통해 세포 재흡수를 촉진시켜 현저히 향상된 형질도입 효율을 나타낸다. 또한 본 발명의 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)는 DNA에 높은 결합능을 나타내고, 핵산분해효소로부터 DNA를 효과적으로 보호하며, 유전자 전달체로 사용하기에 적합한 물리화학적 특성을 나타낼 뿐만 아니라, 시험관 내 및 생체 내에서 매우 낮은 세포독성을 나타내므로, 유전자 치료를 위한 유전자 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 폴리에틸렌이민(PEI)과 소르비톨계 유도체의 공중합체인 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT).

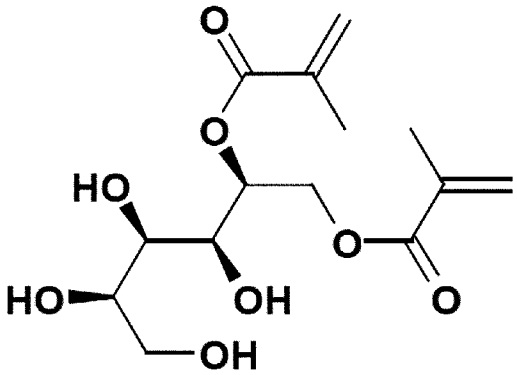
[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌이민(PEI)이 50 내지 10,000 Da 범위의 분자량을 갖는 선형 또는 분지형인 것인 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT).

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 소르비톨계 유도체가 소르비톨 당알코올 골격을 포함하고 상기 당알코올 골격에 아크릴레이트기 또는 메타크릴레이트기를 갖는 것인 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT).

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 소르비톨계 유도체가 소르비톨 다이아크릴레이트(sorbitol diacrylate, SDA), 소르비톨 다이메타크릴레이트(sorbitol dimethacrylate, SDM), 소르비톨 트리아크릴레이트(sorbitol triacrylate, STA), 소르비톨 트리메타크릴레이트(sorbitol trimethacrylate, STM), 소르비톨 테트라아크릴레이트(sorbitol tetracrylate, STEA), 소르비톨 테트라메타크릴레이트(sorbitol tetramethacrylate, STEM), 소르비톨 펜타아크릴레이트(sorbitol pentacrylate, SPA) 및 소르비톨 펜타메타크릴레이트(sorbitol petamethacrylate, SPM)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT).

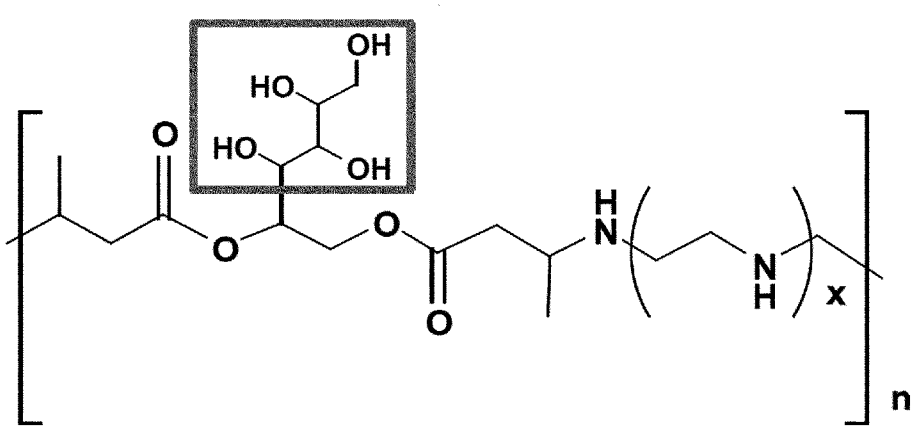
[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 소르비톨계 유도체가 하기 화학식 3으로 표시되는 소르비톨 다이메타크릴레이트(SDM)인 것인 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT):

<화학식 3>



[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 전달체가 하기 화학식 4로 표시되는 것인 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT):

<화학식 4>



상기 식에서, x는 1 내지 200 사이의 정수이고, n은 1 내지 500 사이의 정수임.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 전달체가 1,000 내지 100,000 Da 범위의 분자량을 갖는 것인 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT).

[청구항 8] 1) 소르비톨계 유도체와 폴리에틸렌이민(PEI) 각각을 반응용매에 용해시키는 단계;

2) 폴리에틸렌이민(PEI) 용액을 소르비톨계 유도체 용액에 첨가하여 마이클 부가반응을 수행하는 단계; 및

3) 반응물로부터 형성된 공중합체를 분리하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)를 제조하는 방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 단계 1)에서 반응용매가 다이메틸설폭사이드, 무수 메틸알코올, 에틸알코올, 다이메틸포름아마이드 및 다이옥산으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

[청구항 10] 제8항에 있어서, 단계 2)에서 마이클 부가반응이 40 내지 100℃에서 1 내지 24시간 동안 수행되는 것인 방법.

[청구항 11] 제8항에 있어서, 단계 2)에서 소르비톨계 유도체와 폴리에틸렌이민(PEI)의 반응 몰비(N/P ratio)가 1:0.1 내지 1:10인 것인 방법.

[청구항 12] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)에 치료 유전자가 결합된 유전자 전달 복합체.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 치료 유전자와 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)가 1:0.5 내지 1:100의 몰비로 결합되는 것인 유전자 전달 복합체.

[청구항 14] 제12항에 있어서, 치료 유전자가 DNA, 단일가닥 RNA, 이중가닥 RNA, 라이보자임(ribozyme), DNA-RNA 혼성체(hybrid) 및

안티센스 DNA로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 유전자 전달 복합체.

[청구항 15] 제14항에 있어서, 치료 유전자가 siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것인 유전자 전달 복합체.

[청구항 16] 제12항에 있어서, 상기 유전자 전달 복합체가 150 내지 250 nm의 평균 입자 크기를 갖는 것인 유전자 전달 복합체.

[청구항 17] 제12항에 있어서, 상기 유전자 전달 복합체가 1 내지 50 mV 범위의 제타 전위를 나타내는 것인 유전자 전달 복합체.

[청구항 18] 제12항 내지 제17항 중 어느 한 항의 유전자 전달 복합체를 유효성분으로 포함하는 유전자 치료용 약학적 조성물.

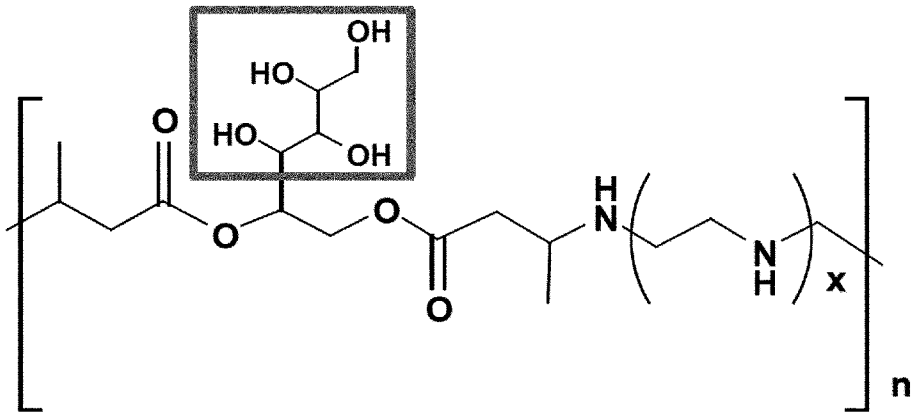
[청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 유전자 전달 복합체가 에어로졸 전달에 의해 표적 부위에 전달되도록 제형화된 약학적 조성물.

[청구항 20] 생분해성 폴리소르비톨계 삼투압적 활성 전달체(PSOAT)에 치료 유전자가 결합된 제12항 내지 제17항 중 어느 한 항의 유전자 전달 복합체를, 상기 치료 유전자의 전달에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 질환 또는 증상을 갖는 대상에게 치료학적 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 치료 유전자 관련 질환 또는 증상을 예방 또는 치료하는 방법.

[청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 투여가 에어로졸 전달에 의한 것인 방법.

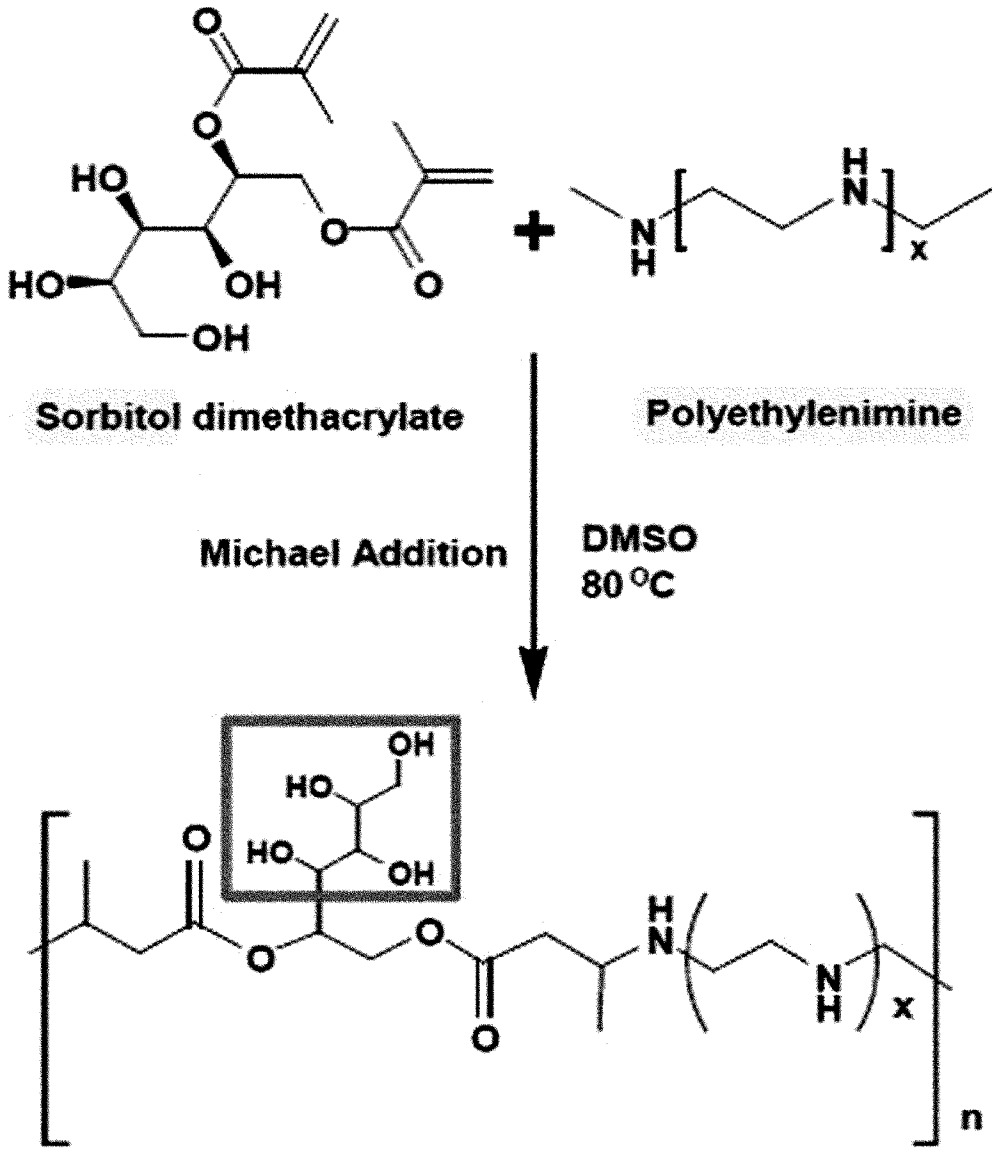
[청구항 22] 하기 화학식 4로 표시되는 폴리에틸렌이민(PEI)과 소르비톨계 유도체의 공중합체:

<화학식 4>

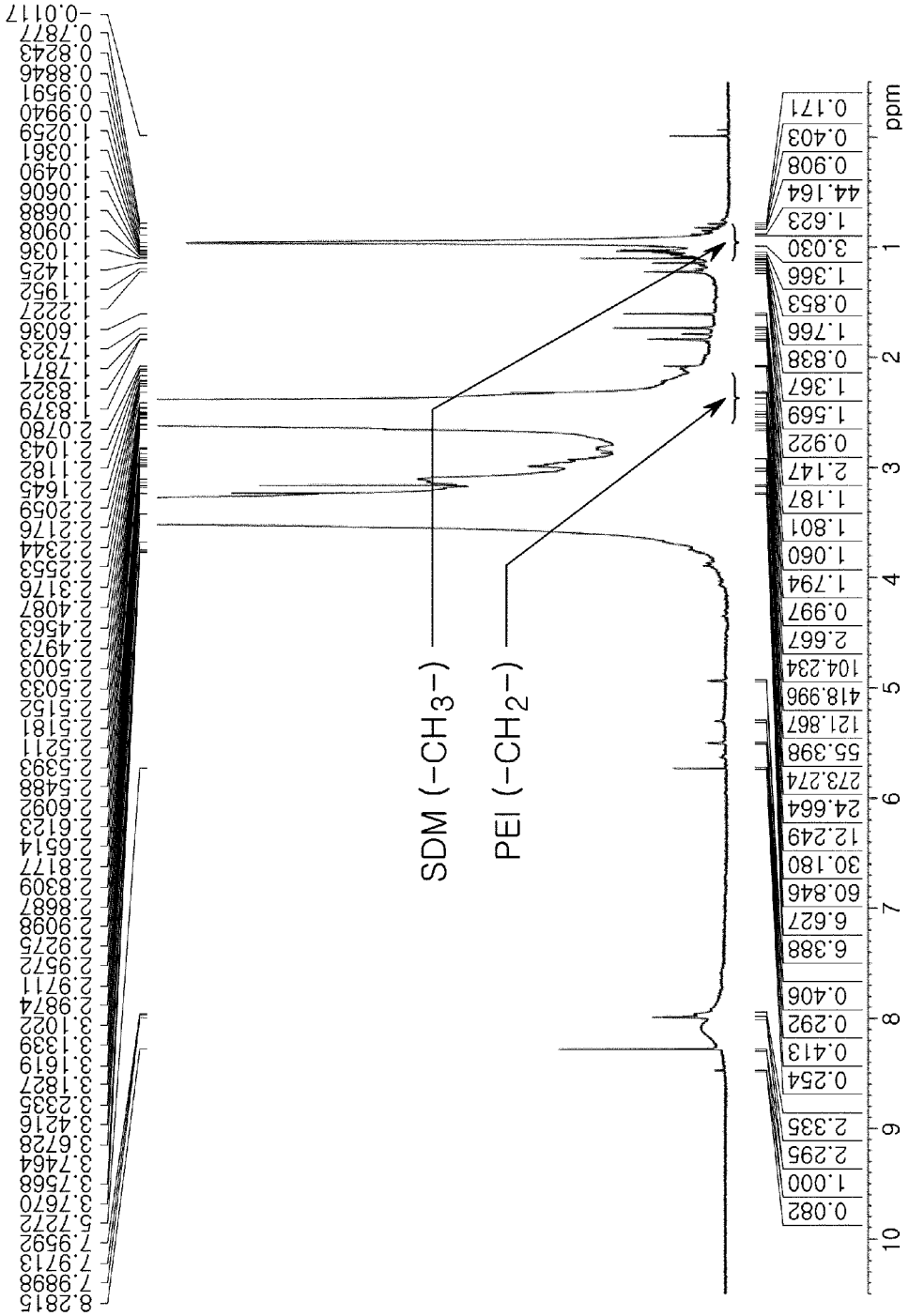


상기 식에서, x는 1 내지 200 사이의 정수이고, n은 1 내지 500 사이의 정수임.

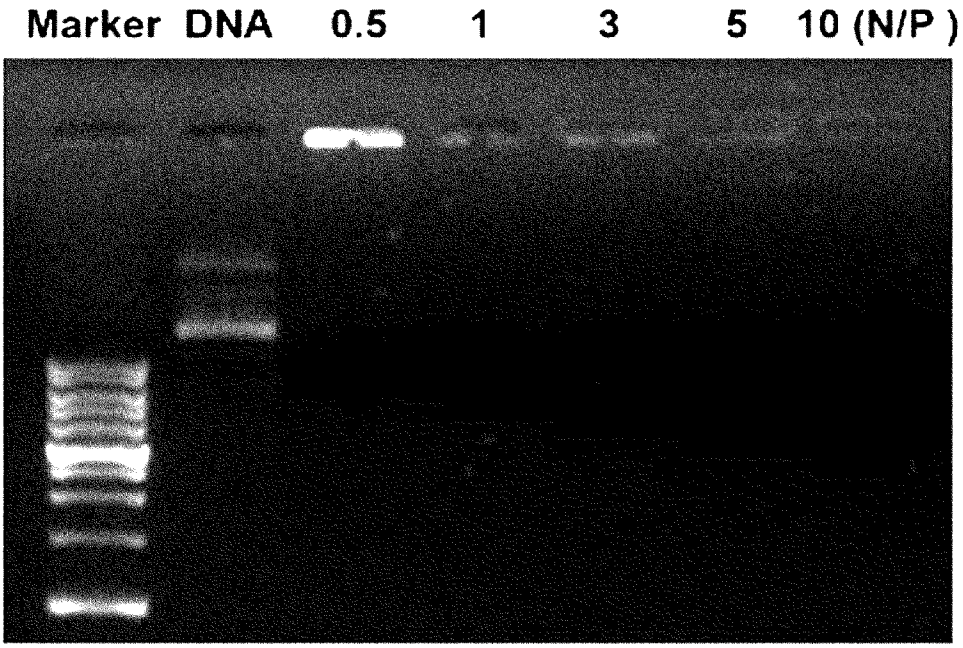
[Fig. 1]


Sorbitol dimethacrylate
Polyethylenimine
Michael Addition
DMSO
80 °C
PAE as PSOAT prepared from SDM and PEI

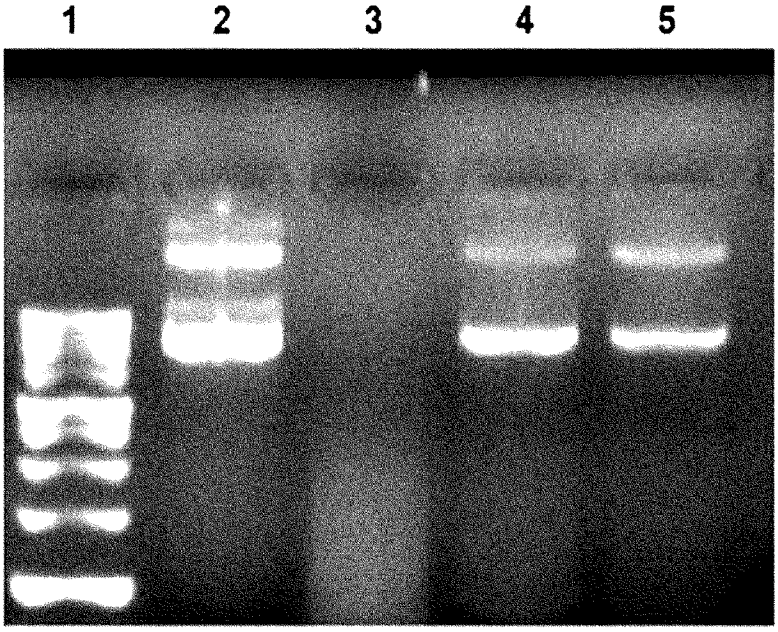
[Fig. 2]



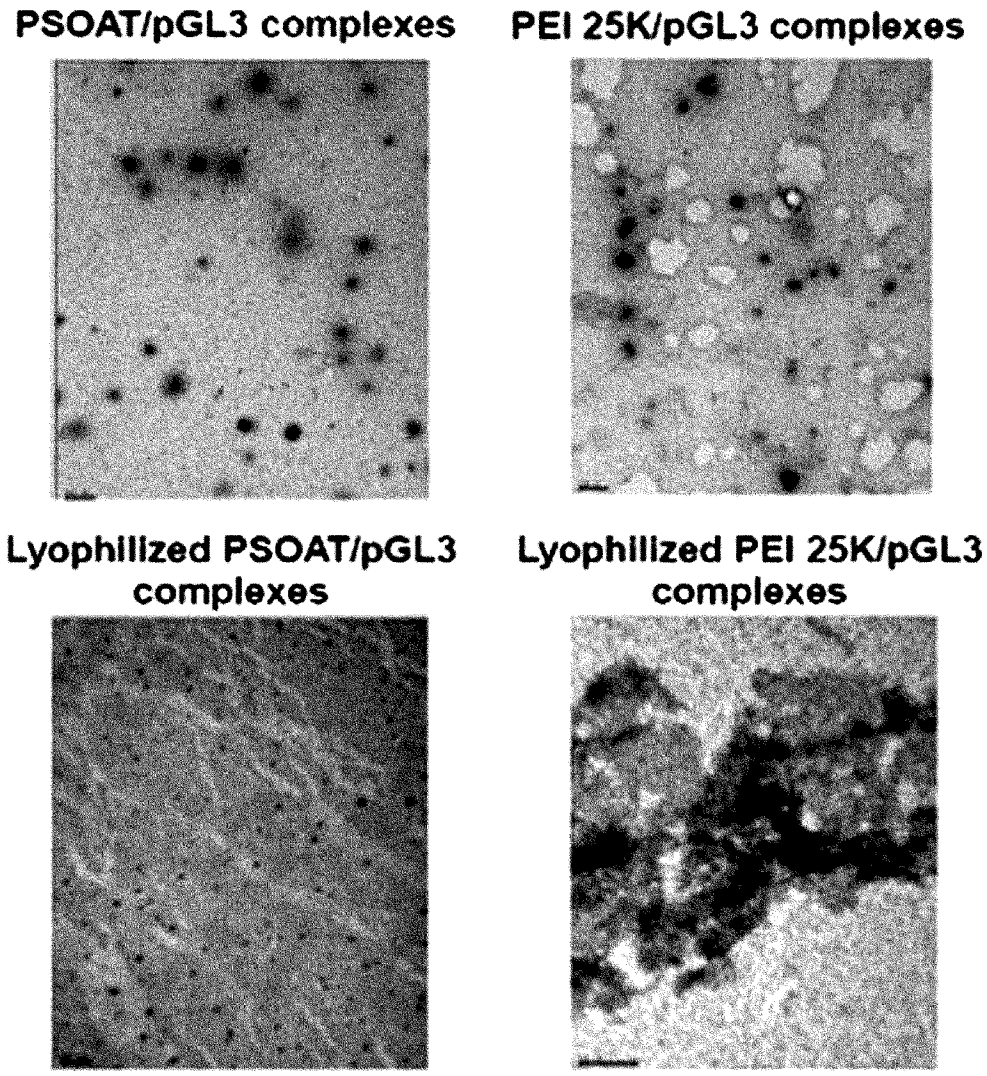
[Fig. 3a]



[Fig. 3b]

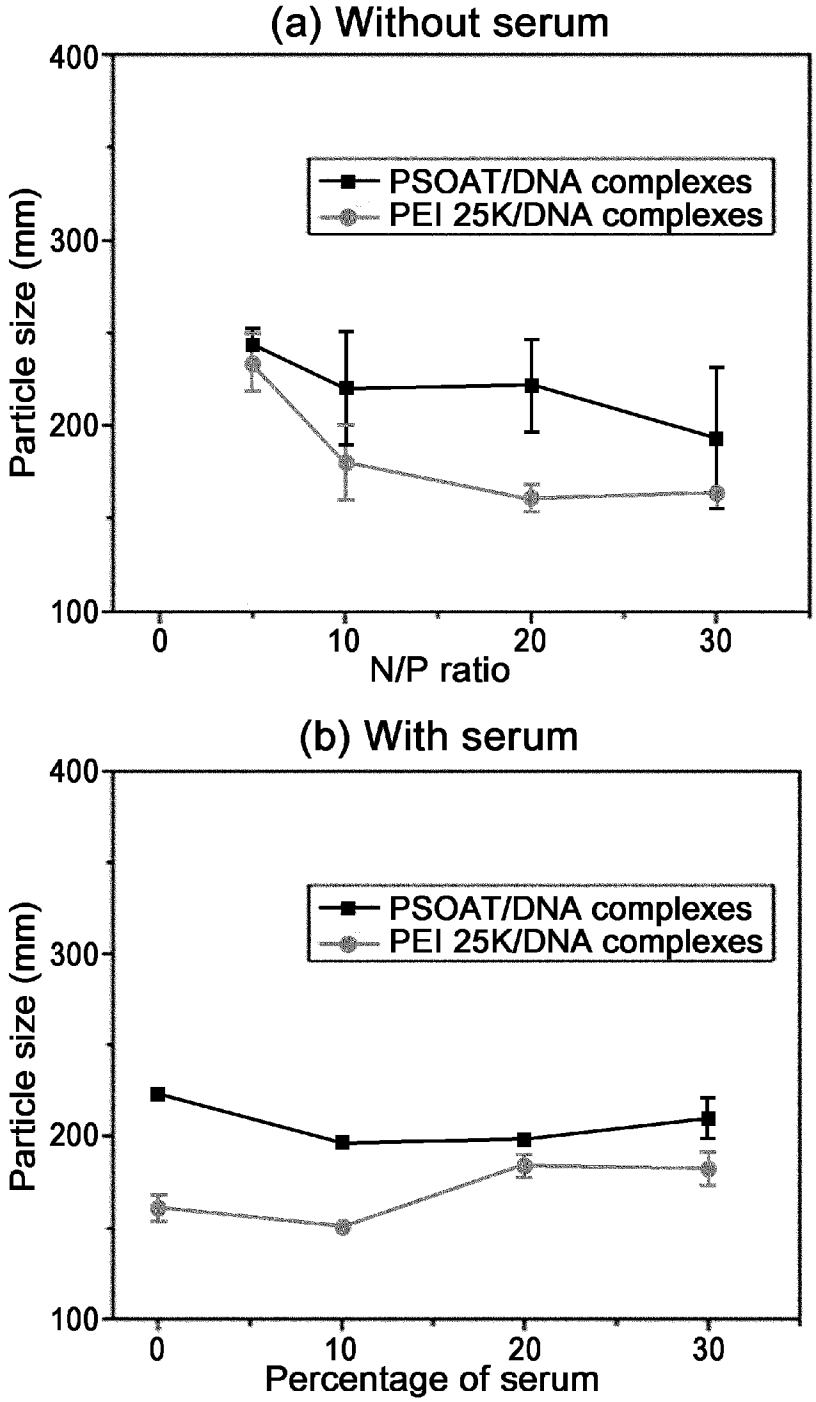


[Fig. 4a]

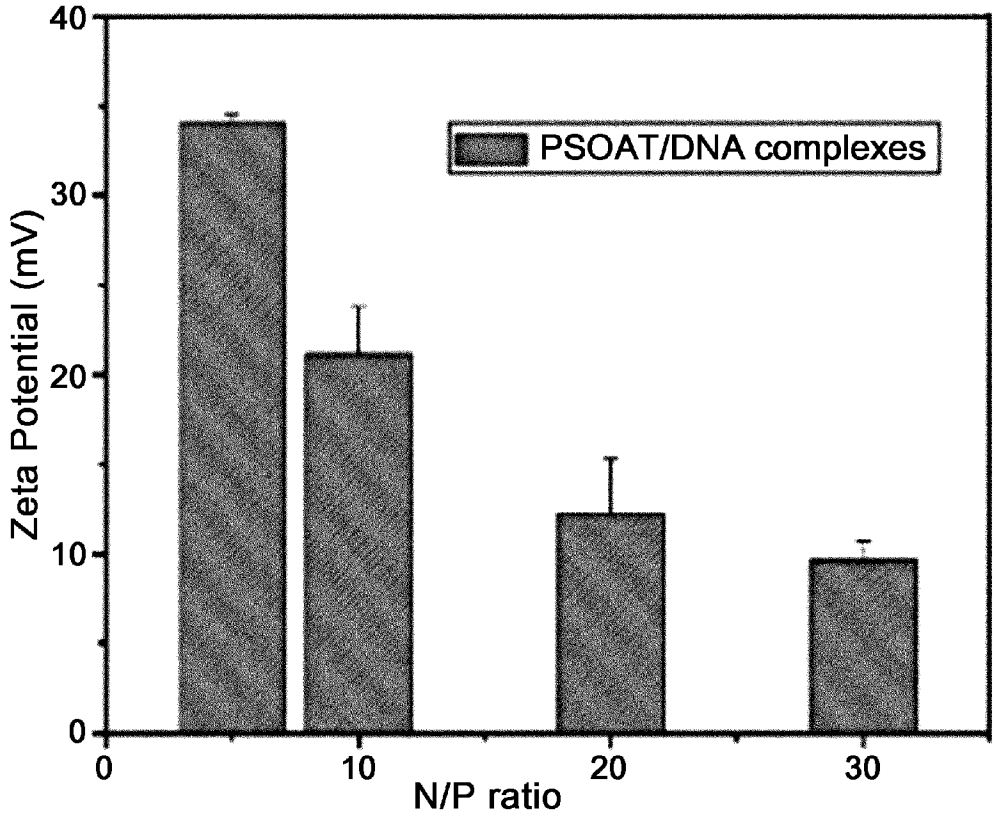


TEM images (N/P 20)

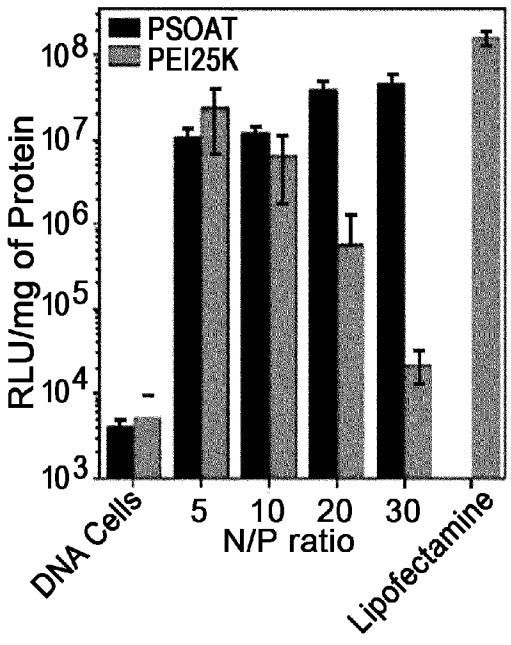
[Fig. 4b]


(a) Without serum
Particle size (mm)
400
300
200
100
0
10
20
30
N/P ratio
PSOAT/DNA complexes
PEI 25K/DNA complexes
(b) With serum
Particle size (mm)
400
300
200
100
0
10
20
30
Percentage of serum
PSOAT/DNA complexes
PEI 25K/DNA complexes

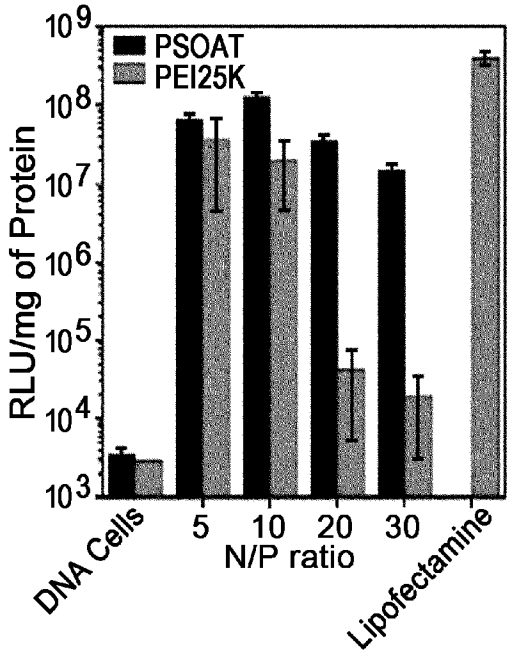
[Fig. 4c]


PSOAT/DNA complexes
Zeta Potential (mV)
40
30
20
10
0
0
10
20
30
N/P ratio

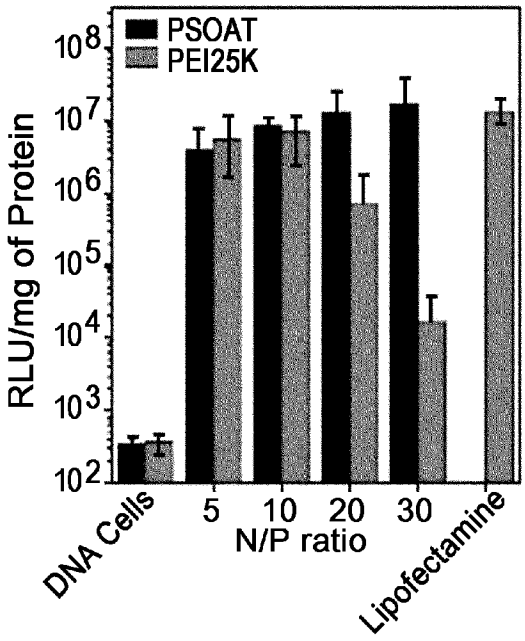
[Fig. 5a]


PSOAT
PEI25K
RLU/mg of Protein
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
DNA Cells
5
10
20
30
N/P ratio
Lipofectamine

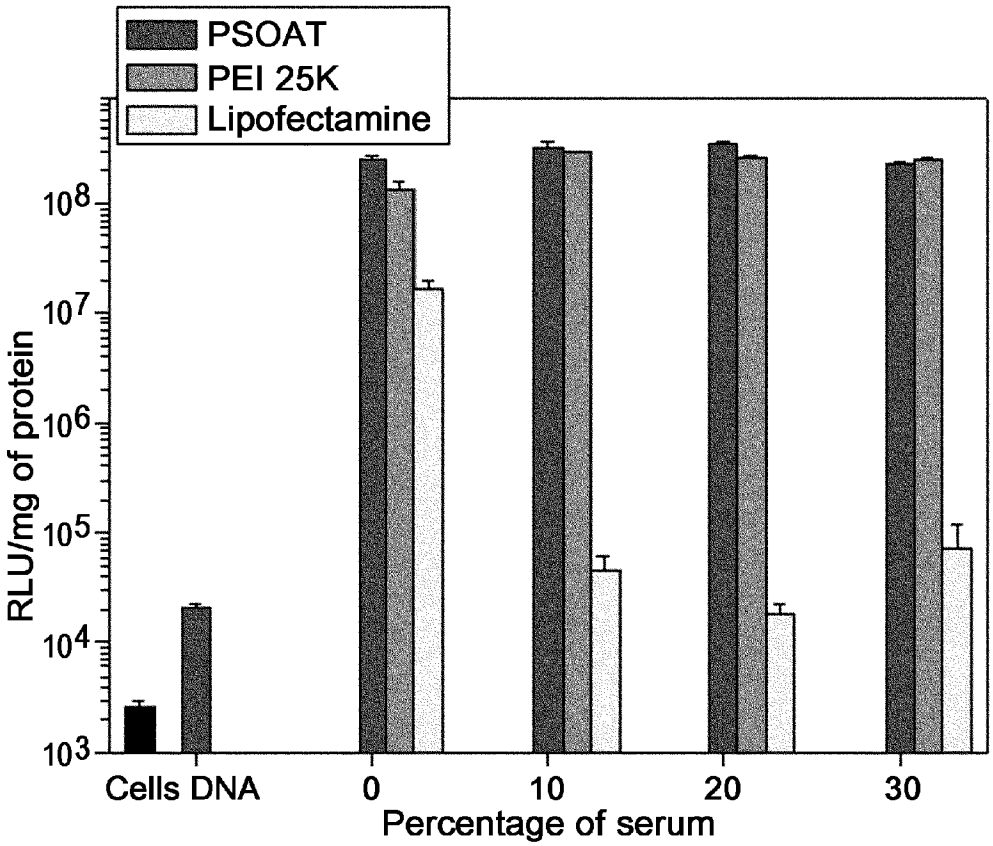
[Fig. 5b]


PSOAT
PEI25K
RLU/mg of Protein
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
DNA Cells
5
10
20
30
N/P ratio
Lipofectamine

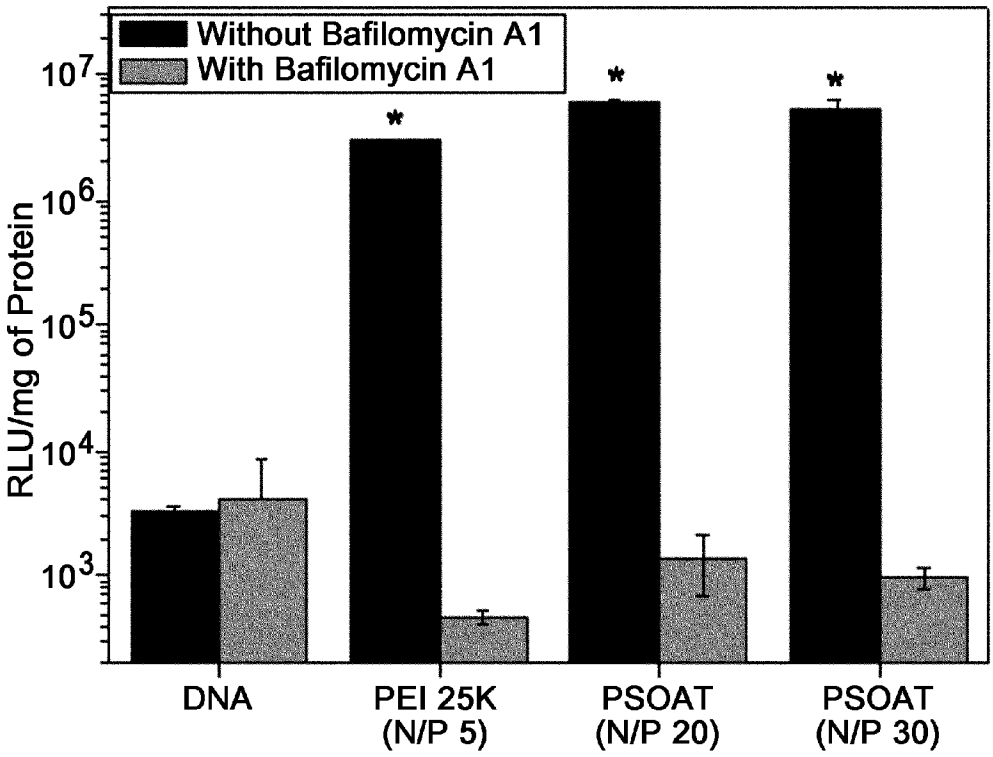
[Fig. 5c]


PSOAT
PEI25K
RLU/mg of Protein
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
DNA Cells
5
10
20
30
N/P ratio
Lipofectamine

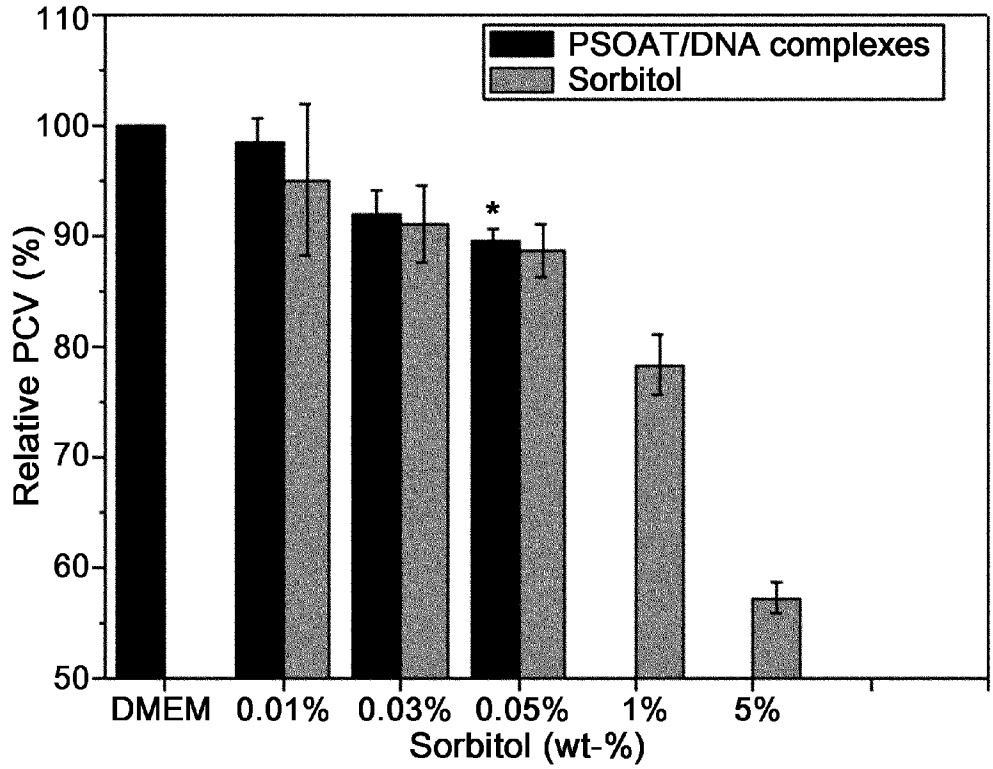
[Fig. 6]


PSOAT
PEI 25K
Lipofectamine
RLU/mg of protein
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
Cells DNA
0
10
20
30
Percentage of serum

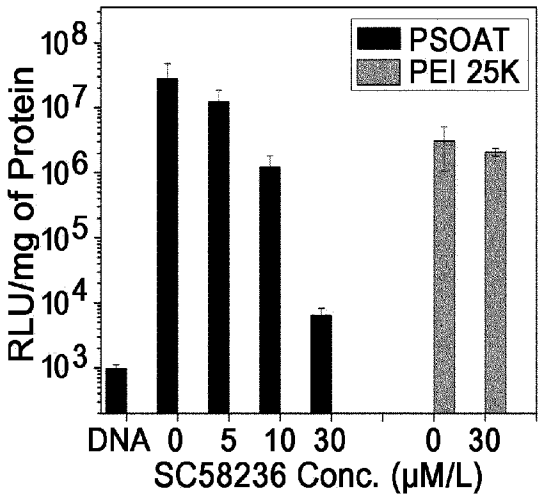
[Fig. 7a]


Without Bafilomycin A1
With Bafilomycin A1
RLU/mg of Protein
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
*
*
*
DNA
PEI 25K (N/P 5)
PSOAT (N/P 20)
PSOAT (N/P 30)

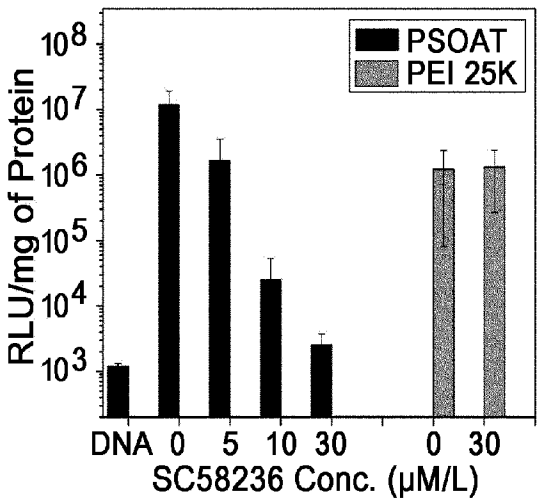
[Fig. 7b]



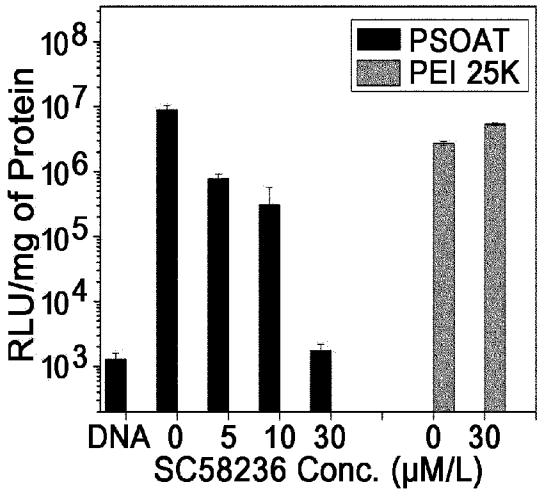
[Fig. 8a]



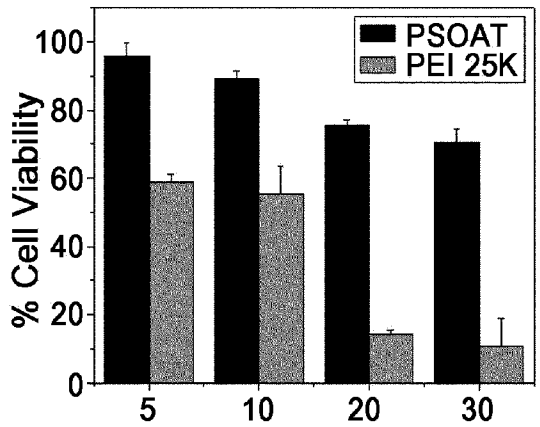
[Fig. 8b]



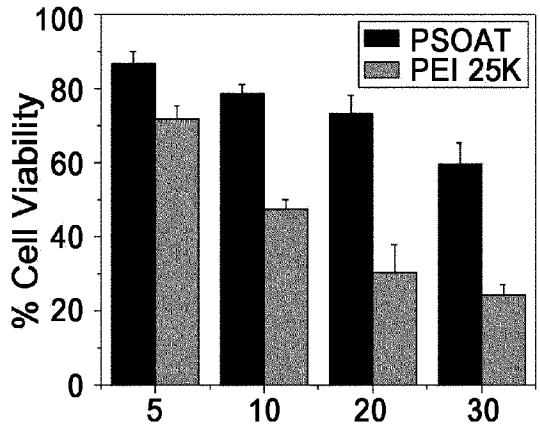
[Fig. 8c]



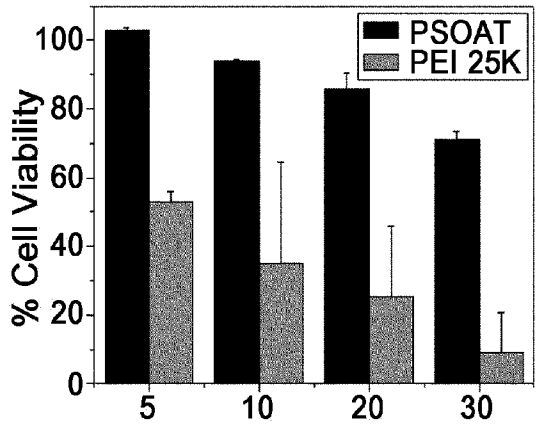
[Fig. 9a]



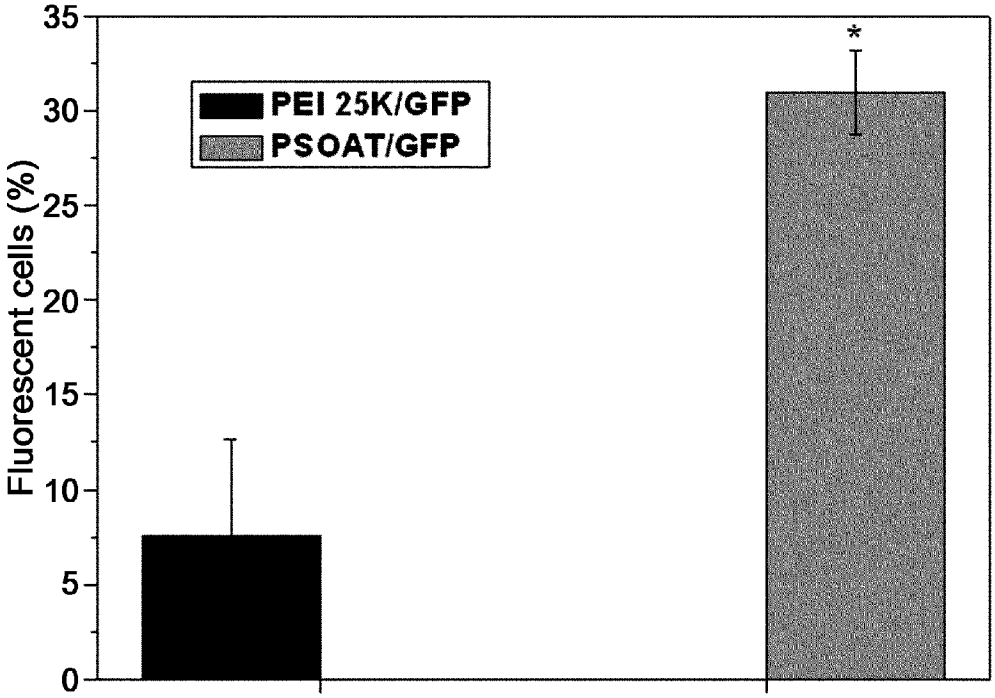
[Fig. 9b]



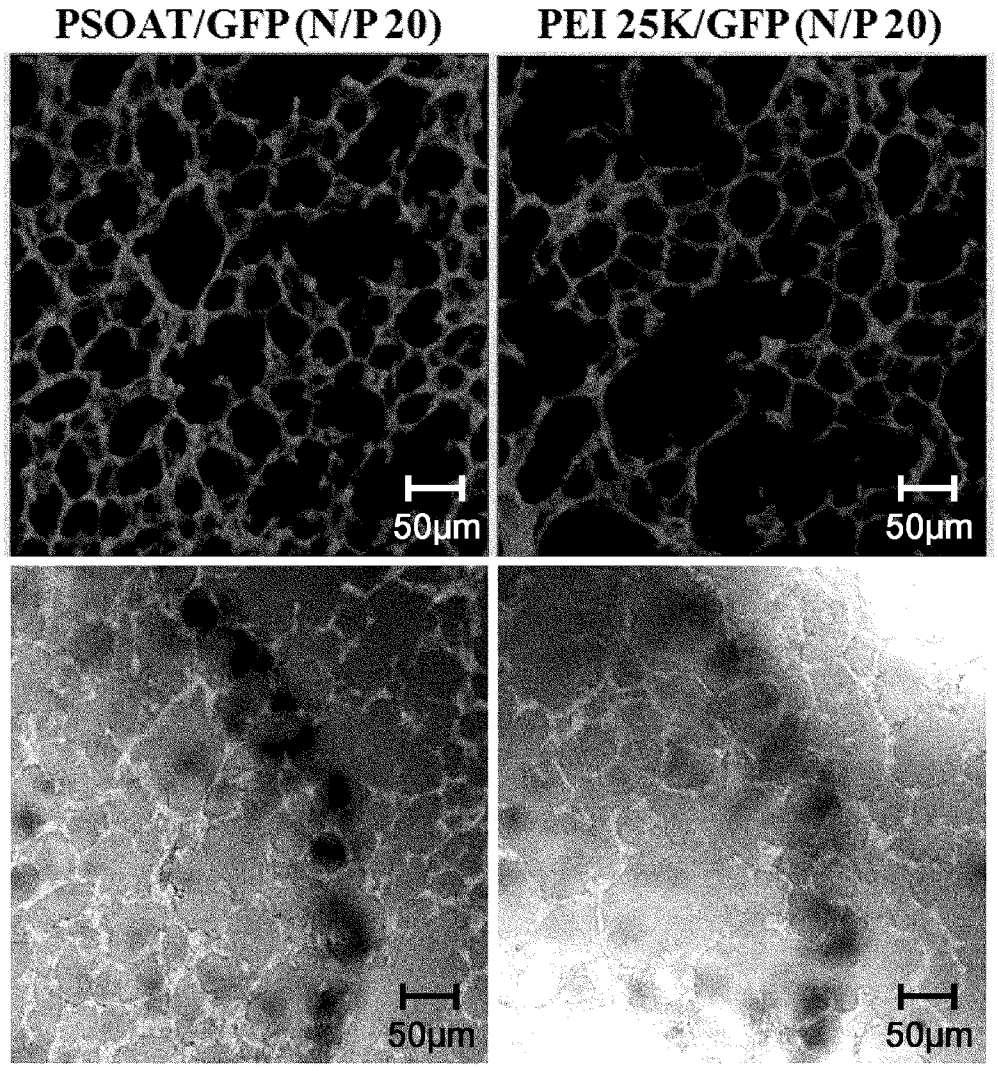
[Fig. 9c]



[Fig. 10]


35
30
25
20
15
10
5
0
Fluorescent cells (%)
PEI 25K/GFP
PSOAT/GFP
*

[Fig. 11]


PSOAT/GFP (N/P 20)
PEI 25K/GFP (N/P 20)
50μm
50μm
50μm
50μm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2011/005955

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/48(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i, A61K 31/047(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 47/48; C09D 11/00; C08K 3/34; C08F 8/00; C03C 17/00; A61K 9/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), PubMed, JPO, USPTO, Google & Keywords: polyethyleneimine, sorbitol acrylate, copolymer, osmotic pressure

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005-0020729 A1 (WALTER L. RENZ et al.) 27 January 2005 See the entire document.	1-19,22
A	KR 10-2003-0096380 A (3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY) 24 December 2003 See the entire document.	1-19,22
A	KR 10-2009-0040289 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 23 April 2009 See the entire document.	1-19,22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 MARCH 2012 (22.03.2012)	**23 MARCH 2012 (23.03.2012)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2011/005955

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **20,21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 20 and 21 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/KR2011/005955

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2005-0020729 A1	27.01.2005	AU 2002-361426 A1	09.07.2003
		AU 2002-366738 A1	09.07.2003
		CA 2467678 A1	03.07.2003
		CA 2467737 A1	03.07.2003
		CN 1604917 A	06.04.2005
		CN 1604917 C0	22.08.2007
		CN 1606574 A	13.04.2005
		CN 1606574 C0	28.03.2007
		EP 1456250 A2	15.09.2004
		EP 1456250 B1	14.01.2009
		EP 1458769 A1	22.09.2004
		EP 1458769 B1	31.12.2008
		JP 04-101762 B2	18.06.2008
		JP 04-326957 B2	19.06.2009
		JP 2005-512863 A	12.05.2005
		JP 2005-513212 A	12.05.2005
		KR 10-2004-0068328 A	30.07.2004
		KR 10-2004-0069180 A	04.08.2004
		US 2005-0019507 A1	27.01.2005
		US 2007-0160780 A1	12.07.2007
		US 7572843 B2	11.08.2009
		WO 03-054029 A1	03.07.2003
		WO 03-054030 A2	03.07.2003
		WO 03-054030 A3	03.07.2003
KR 10-2003-0096380 A	24.12.2003	CA 2446106 A1	21.11.2002
		CN 1509164 A	30.06.2004
		CN 1509164 C0	30.06.2004
		EP 1387665 A2	11.02.2004
		JP 2004-534030 A	11.11.2004
		JP 2008-150396 A	03.07.2008
		US 2002-0187181 A1	12.12.2002
		WO 02-092049 A2	21.11.2002
		WO 02-092049 A3	21.11.2002
KR 10-2009-0040289 A	23.04.2009	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2011/005955

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류**(IPC)**)

A61K 47/48(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i, A61K 31/047(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 47/48; C09D 11/00; C08K 3/34; C08F 8/00; C03C 17/00; A61K 9/70

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), PubMed, JPO, USPTO, Google & 키워드: 폴리에틸렌이민, 소르비톨 아크릴레이트, 공중합체, 삼투압

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2005-0020729 A1 (WALTER L. RENZ 외 5명) 2005.01.27 전체 문헌 참조.	1-19,22
A	KR 10-2003-0096380 A (쓰리엠 이노베이티브 프로퍼티즈 캄파니) 2003.12.24 전체 문헌 참조.	1-19,22
A	KR 10-2009-0040289 A (플라멜 테크놀로지스) 2009.04.23 전체 문헌 참조.	1-19,22

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2012년 03월 22일 (22.03.2012)	**2012년 03월 23일 (23.03.2012)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
정부대전청사
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
김문경
전화번호 82-42-481-5610

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2011/005955

제**2**기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 **2**의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 20,21
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 20,21항은 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(IV)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제**3**기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 **3**의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2011/005955

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2005-0020729 A1	2005.01.27	AU 2002-361426 A1	2003.07.09
		AU 2002-366738 A1	2003.07.09
		CA 2467678 A1	2003.07.03
		CA 2467737 A1	2003.07.03
		CN 1604917 A	2005.04.06
		CN 1604917 C0	2007.08.22
		CN 1606574 A	2005.04.13
		CN 1606574 C0	2007.03.28
		EP 1456250 A2	2004.09.15
		EP 1456250 B1	2009.01.14
		EP 1458769 A1	2004.09.22
		EP 1458769 B1	2008.12.31
		JP 04-101762 B2	2008.06.18
		JP 04-326957 B2	2009.06.19
		JP 2005-512863 A	2005.05.12
		JP 2005-513212 A	2005.05.12
		KR 10-2004-0068328 A	2004.07.30
		KR 10-2004-0069180 A	2004.08.04
		US 2005-0019507 A1	2005.01.27
		US 2007-0160780 A1	2007.07.12
		US 7572843 B2	2009.08.11
		WO 03-054029 A1	2003.07.03
		WO 03-054030 A2	2003.07.03
		WO 03-054030 A3	2003.07.03
KR 10-2003-0096380 A	2003.12.24	CA 2446106 A1	2002.11.21
		CN 1509164 A	2004.06.30
		CN 1509164 C0	2004.06.30
		EP 1387665 A2	2004.02.11
		JP 2004-534030 A	2004.11.11
		JP 2008-150396 A	2008.07.03
		US 2002-0187181 A1	2002.12.12
		WO 02-092049 A2	2002.11.21
		WO 02-092049 A3	2002.11.21
KR 10-2009-0040289 A	2009.04.23	없음	