(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년07월29일
(11) 등록번호 10-0909786
(24) 등록일자 2009년07월21일

(51) Int. Cl.
C07C 237/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0111275
(22) 출원일자 2008년11월10일
심사청구일자 2008년11월10일
(56) 선행기술조사문헌
KR100807060 B1*
US04600526 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
오유경
서울 도봉구 도봉2동 삼환아파트 4- 405
이한영
경기도 광주시 도척면 도웅리 167-1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

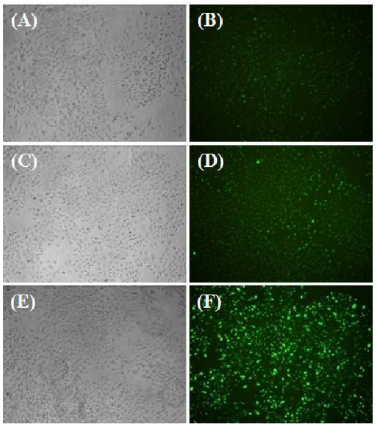
전체 청구항 수 : 총 26 항 심사관 : 최인선

(54) 올리고 펩티드를 수식한 신규한 양이온성 지질, 그의 제조 방법 및 그를 포함하는 전달체

(57) 요 약

본 발명은 올리고 펩티드를 수식한 신규한 양이온성 지질, 그의 제조 방법 및 그를 포함하는 핵산 전달체를 제공한다. 본 발명의 양이온성 지질은 핵산 전달체의 제조를 위해 사용된다. 본 발명의 양이온성 지질은 제조 및 정제 공정이 간편하여 대량 생산시의 경제성이 높다. 또한, 본 발명의 양이온성 지질을 포함한 핵산 전달체는 세포 내로 전달하고자 하는 리보핵산, 작은 간섭 리보핵산, 안티센스 올리고핵산, 핵산 앱타머(aptamer) 등의 올리고 핵산 의약을 세포 내로 수송하는 효율을 현저히 증강시킬 뿐만 아니라, 세포 독성을 감소시켜 핵산 의약의 치료 효능을 증강시키는 용도로 유용하게 사용된다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

한수은

경기도 용인시 수지구 동천동 동천마을현대홈타운 아파트 206-1706

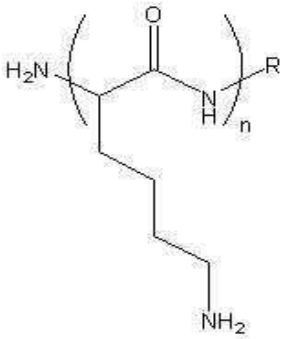
심가용

경기도 용인시 수지구 죽전1동 죽전GS자이아파트 3동 102호

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 (I)로 표시되는 양이온성 지질:



(I)

상기 식에서 n은 3 내지 6의 정수이며, R은 탄소수 12 내지 20인 불포화 탄화수소 라디칼이다.

청구항 2

제 1항에 있어, 상기 R은 올레일(oleyl), 또는 리놀레일(linoleyl)인 양이온성 지질.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 양이온성 지질을 포함하는 세포내로의 올리고핵산 전달체(oligonucleic acid delivery system).

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 올리고 핵산은 리보핵산, 작은 간섭 리보핵산(siRNA), 안티센스 올리고핵산(antisense oligonucleotide), 및 핵산 앱타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 올리고 핵산 전달체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 올리고 핵산 전달체의 제형은 리포좀, 미셀, 에멀젼, 및 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 올리고 핵산 전달체.

청구항 6

제4항에 있어서, 갈락토오스 지질 유도체, 만노오스 지질 유도체, 엽산 지질 유도체, 폴리틸렌 글리콜 지질 유도체, 및 바이오틴 지질 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것을 추가적으로 포함하는 올리고핵산 전달체.

청구항 7

제5항에 있어서, 세포 융합성 인지질을 추가적으로 포함하는 리포좀 제형의 올리고핵산 전달체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 세포 융합성 인지질은 디올레오일 포스파티딜 에탄올아민(dioleoylphosphatidylethanolamine; DOPE) 또는 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine)인 올리고핵산 전달체.

청구항 9

제5항에 있어서, 계면활성제를 추가적으로 포함하는 미셀 제형의 올리고핵산 전달체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 계면활성제는 트윈 20 (Tween 20), 폴리에틸렌글리콜 모노올레일 에테르(polyethylene glycol monooleyl ether), 에틸렌글리콜 모노도데실 에테르 (ethylene glycol monododecyl ether), 디에틸렌글리콜 모노헥실 에테르 (diethylene glycol monohexyl ether), 트리메틸헥사데실 암모늄 클로라이드 (trimethylhexadecyl ammonium chloride), 도데실트리메틸 암모늄 클로라이드 (dodecyltrimethyl ammonium bromide), 사이클로헥실 베타 말토사이드 (cyclohexylmethyl β-D-maltoside), 펜타에리스리틸 팔미테이트 (pentaerythrityl palmitate), 라우릴에메틸아민옥사이드 (lauryldimethylamine-oxide), 및 라우로살코신 소듐염(N-lauroylsarcosine sodium salt)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 올리고핵산 전달체.

청구항 11

제5항에 있어서, 계면활성제를 추가적으로 포함하는 에멀젼 제형의 올리고핵산 전달체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 계면활성제는 세틸 브롬화 트리메틸암모늄염(cetyl trimethylammonium bromide), 헥사데실 브롬화 암모늄염(hexadecyl trimethyl ammonium bromide), 도데실 베타인(dodecyl betaine), 도데실 디메틸 아민 산화물(dodecyl dimethylamine oxide), 디메틸팔미토일암모니오프로판 설포네이트(3-(N,Ndimethylpalmitylammonio) propane sulfonate), 트윈-20 (Tween 20), 트윈-80(Tween 80), 트리톤 X-100(Triton-X-100), 폴리에틸렌글리콜 모노올레일 에테르(polyethylene glycol monooleyl ether), 트리에틸렌글리콜 모노도데실 에테르 (triethylene glycol monododecyl ether), 옥틸 글루코사이드(octyl glucoside), 및 노나노일메틸글루카민 (N-nonanoyl-N-methylglucamine)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 올리고핵산 전달체.

청구항 13

제3항의 올리고핵산 전달체 및 올리고핵산의 복합체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 올리고핵산은 리보핵산, 작은 간섭 리보핵산, 안티센스 올리고핵산, 핵산 앱타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 올리고핵산 전달체와 올리고핵산의 복합체.

청구항 15

삭제

청구항 16

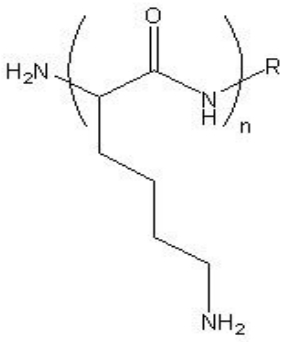
삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

하기 화학식 (I)로 표시되는 양이온성 지질을 포함하는 세포내로의 올리고핵산 전달체(oligonucleic acid delivery system):



(I)

상기 식에서 n은 3 내지 6의 정수이며, R은 탄소수 12 내지 20인 포화 탄화수소 라디칼이다.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 올리고 핵산은 리보핵산, 작은 간섭 리보핵산(siRNA), 안티센스 올리고핵산(antisense oligonucleotide), 및 핵산 앱타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 올리고 핵산 전달체.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 올리고 핵산 전달체의 제형은 리포좀, 미셀, 에멀젼, 및 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 올리고 핵산 전달체.

청구항 21

제19항에 있어서, 갈락토오스 지질 유도체, 만노오스 지질 유도체, 엽산 지질 유도체, 폴리틸렌 글리콜 지질 유도체, 및 바이오틴 지질 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것을 추가적으로 포함하는 올리고핵산 전달체.

청구항 22

제20항에 있어서, 세포 융합성 인지질을 추가적으로 포함하는 리포좀 제형의 올리고핵산 전달체.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 세포 융합성 인지질은 디올레오일 포스파티딜 에탄올아민(dioleoylphosphatidylethanolamine; DOPE) 또는 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine)인 올리고핵산 전달체.

청구항 24

제20항에 있어서, 계면활성제를 추가적으로 포함하는 미셀 제형의 올리고핵산 전달체.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 계면활성제는 트윈 20 (Tween 20), 폴리에틸렌글리콜 모노올레일 에테르(polyethylene glycol monooleyl ether), 에틸렌글리콜 모노도데실 에테르 (ethylene glycol monododecyl ether), 디에틸렌글리콜 모노헥실 에테르 (diethylene glycol monohexyl ether), 트리메틸헥사데실 암모늄 클로라이드 (trimethylhexadecyl ammonium chloride), 도데실트리메틸 암모늄 클로라이드 (dodecyltrimethyl ammonium bromide), 사이클로헥실 베타 말토사이드 (cyclohexylmethyl β-D-maltoside), 펜타에리스리틸 팔미테이트 (pentaerythrityl palmitate), 라우릴에메틸아민옥사이드 (lauryldimethylamine-oxide), 및 라우로살코신 소듐염(N-lauroylsarcosine sodium salt)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 올리고핵산 전달체.

청구항 26

제20항에 있어서, 계면활성제를 추가적으로 포함하는 에멀젼 제형의 올리고핵산 전달체.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 계면활성제는 세틸 브롬화 트리메틸암모늄염(cetyl trimethylammonium bromide), 헥사데실 브롬화 암모늄염(hexadecyl trimethyl ammonium bromide), 도데실 베타인(dodecyl betaine), 도데실 디메틸아민 산화물(dodecyl dimethylamine oxide), 디메틸팔미토일암모니오프로판 설포네이트(3-(N,Ndimethylpalmitylammonio) propane sulfonate), 트윈-20 (Tween 20), 트윈-80(Tween 80), 트리톤 X-100(Triton-X-100), 폴리에틸렌글리콜 모노올레일 에테르(polyethylene glycol monooleyl ether), 트리에틸렌글리콜 모노도데실 에테르 (triethylene glycol monododecyl ether), 옥틸 글루코사이드(octyl glucoside), 및 노나노일메틸글루카민 (N-nonanoyl-N-methylglucamine)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 올리고핵산 전달체.

청구항 28

제18항의 올리고핵산 전달체 및 올리고핵산의 복합체.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 올리고핵산은 리보핵산, 작은 간섭 리보핵산, 안티센스 올리고핵산, 핵산 앱타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 올리고핵산 전달체와 올리고핵산의 복합체.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 올리고 펩티드를 수식한 신규한 양이온성 지질, 그의 제조 방법 및 그를 포함하는 전달체에 관한 것이다

배 경 기 술

<2> 1960년대 중반에 불완전한 유전자 서열을 가지는 유전성 질환자들의 세포 내로 정상적인 유전자 서열을 삽입해서 유전성 질병을 처치하는데 사용할 수 있는 기술이 제안된 이후로 유전자 처치에 의한 다양한 유전적 장애를 치료하려는 시도들이 있어 왔다. 또한 최근에는 플라스미드 데옥시리보핵산 (plasmid DNA), 작은 간섭 이중나선 리보핵산(siRNA), 마이크로 리보핵산(micro RNA), 안티센스 올리고 핵산(antisense oligonucleotide) 등 각종 핵산 물질의 의약적 용도가 규명됨에 따라서 이들 핵산 물질들을 세포 내로 효율적으로 전달하는 핵산 전달 물질의 중요성도 증대되고 있다.

<3> 각종 세포내로 유전자를 전달하기 위하여 다양한 기술 및 운반체, 특히 벡터들이 제안되어 왔으나, 핵산의 전달 또는 발현을 위해 사용되는 기술은 크게 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터를 이용한 방법으로 구분할 수 있다. 특히, 상기 비바이러스성 벡터 중 양이온성 리포좀 또는 양이온성 고분자들은 구조적인 특징에 의한 양하전으로 유전자의 음이온성 하전과 결합하여 복합체를 형성하는 특징이 있어 유전자 전달체로서 연구되어 왔다.

<4> 이러한 합성 물질을 이용한 유전자 전달 방법은 렌티바이러스나 아데노 바이러스 등을 사용한 바이러스성 유전자 수송체에 비하여 제조방법이 간편하고, 전달하려는 유전자의 크기가 제한을 받지 않으며, 바이러스 캡시드 단백질에 의한 반복투여시의 면역부작용이 적고, 바이러스 자체가 소유하는 유전자에 의한 체내 안전성 문제가 제기되지 않으며, 제조비용이나 시간에 있어서도 상업적으로 유리한 장점이 있다.

<5> 양이온성 물질을 이용한 유전자 전달방법 중 양이온성 고분자 수송체의 경우 DEAE 덱스트란(dextran), 라이신 아미노산이 반복되는 구조의 폴리라이신, 에틸렌이민이 반복되는 구조의 폴리에틸렌이민, 폴리아미도아민(polyamidoamine) (미국특허 제6,020,457호) 등이 유전자의 수송체로 연구되어 왔다. 그러나 이들 양이온성 고분자를 이용한 수송체 경우에는 세포 표면의 수용체를 통하여 효과적으로 수송되는 바이러스성 수송체에 비하여 체내 세포 내로의 수송 효율이 낮다는 문제점이 지적되어 왔다. 한편 양이온성 인지질 수송체의 경우 인지질 조성에 양하전의 지질을 일정 비율로 혼합하여 양이온성 리포좀 (cationic liposome)과 같은 나노 크기의 입자를 제조하고 이 입자를 유전자와 혼합하여 양하전 인지질 입자와 유전자의 복합체를 세포주들에 처리하여 유전자의 발현을 증강시키는 방법이 사용되어 왔다(미국특허 제5,858,784호).

<6> 종래에 개발된 양이온성 지질들은 중성의 지방산 사슬에 1차 아민 (primary amine), 2차 아민(secondary amine), 3차 아민(tertiary amine), 또는 4급 암모늄염(quarternary ammonium salt) 등의 아민 보유 화합물을 결합시켜 양이온성을 부여하는 방법을 사용하였다. 초기 단계의 핵산 전달용 양이온성 지질로서는 1987년

Felgner 박사 연구진이 합성한 양이온성 4급 아미노 지질인 N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리에틸암모늄 클로라이드 (N-[1-(2,3-dioleyloxy) propyl]-N,N,Ntriethylammonium chloride; DOTMA)가 있다. DOTMA는 세포막 융합 활성을 가진 것으로 알려진 디올레오일 포스파티딜 에탄올아민(dioleoylphosphatidylethanolamine; DOPE)과 양이온성 리포좀을 형성하여 유전자 전달에 이용되고 있다. DOTMA의 소수성기는 이중결합을 갖는 탄소수 18개의 지방족 화합물 그룹 (aliphatic group)이며, 스페이서 아암(spacer arm)과 에테르 결합(ether linker bond)을 통하여 화학적으로 연결된 소수성기의 반대쪽에 4차 암모늄염이 결합되어 있다. DOTMA의 경우 유전자 전달효율은 비교적 높지만 세포 독성을 지니고 있으며, 여러 공정의 합성과정을 거쳐야 한다는 단점을 가지고 있다.

<7> DOTMA의 높은 독성을 해결하고 세포 내 핵산 전달 효율을 보다 높이기 위해 DOTMA의 다른 형태의 유도체인 1,2-디미리스틸옥시프로필-3-디메틸하이드록시에틸 암모늄 브로마이드(1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethyl ammonium bromide; DM RIE), N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 메틸 설페이트(N-[1-(2,3- dioleyloxy)propyl]-N,N,N- trimethylammonium methyl sulfate; DOTAP), 2,3-디올레일옥시-N-[2-(스퍼마인카복시아미드)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판 암모늄 트리플루오로아세테이트 (2,3-dioleyloxy-N-[2- sperminecarboxyamide)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propane ammonium trifluoroacetate; DOSPA) 등이 개발되었다.

<8> 또한, 콜레스테롤(cholesterol) 유도체인 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)carbamoyl] cholesterol; DC-Chol), 디메틸-디옥타데실 암모늄 브로마이드(dimethyl-dioctadecyl ammonium bromide; DDAB), N-(α-트리메틸암모니오아세틸)-디도데실-D-글루타메이트 클로라이드 (N-(α-trimethylammonioacetyl)- didodecyl-D-glutamate chloride; TMAC), 디옥타데실 아미도글리실스퍼민 (dioctadecylamidoglycylspermine; DOGS) 등이 합성되어 데옥시리보핵산 등의 핵산 물질 전달을 목적으로 이용되고 있다. 이들 양이온성 지질들은 4차 아민, 3차 아민, 또는 하이드록시 에틸화 4차 아민 등이 지질의 헤드 부분에 연결되어 한 개의 양전하를 제공하는 종류 (DC-Chol, DDAB, TMAC 등)와 스퍼민(spermine) 등의 다중 아민(polyamine) 물질이 연결되어 여러 개의 양전하를 제공하는 종류 (DOGS) 로 구분될 수도 있다.

<9> 핵산 전달에 사용되는 양이온성 지질의 또 다른 예는 4급 암모늄염(quarternary ammonium salt)인 계면활성제(detergent)이다. 이들은 단일사슬, 예를 들어, 세트리 메틸 암모늄 브로마이드(cetrimethylammonium bromide) 또는 이중사슬, 예를 들어, 디메틸 디옥타데실 암모늄 브로마이드(dimethyldioctadecyl ammonium bromide) 등의 계면 활성제이고, 모두 동물세포에 핵산 전달이 가능하다. 이들 4급 암모늄염 양이온성 지질의 경우 양친매성(amphiphile)에 속하는 아민기(amine group)는 4차이고, 스페이서 아암(spacer arm)이나 연결 결합(linker bond) 없이 지질의 단일사슬이 1차 아민기에 붙어있다. 그러나 이들 양친매성 계면활성제를 이용한 제형들 또한 일반적으로 세포 독성이 심각한 문제점을 가지고 있다. 또 다른 양친매성 물질들로는 DOTMA와 구조가 유사한 1,2-디올레오일-3-(4'-트리메틸암모니오)부타노일-글리세롤(1,2-dioleoyl-3-(4'-trimethylammonio)butanoyl-sn-glycerol), 콜레스테릴(4'-트리메틸암모니오)부타노에이트 (cholesteryl (4'-trimethylammonino)butanoate), 1,2-디올레오일-3-숙시닐-글리세롤 콜린 에스테르(1,2-dioleoyl-3-succinylsn-glycerol choline ester) 등이 있는데, 이들 양친매성 물질들은 세포내 핵산 전달효율(delivery efficiency)이 일반적으로 낮다.

<10> 비바이러스성 벡터 중 양이온성 지질은 렌티바이러스나 아데노 바이러스 등의 바이러스성 핵산 수송체에 비하여 제조방법이 간편하고, 바이러스 캡시드 단백질에 의한 반복투여시의 면역부작용이 적고, 바이러스 자체가 소유하는 유전자에 의한 체내 안전성 문제가 제기되지 않으며, 제조비용 또는 제조 공정에 있어서도 산업적으로 유리한 장점이 있다. 그러나, 종래에 개시된 여러 핵산 전달용 양이온성 지질들은 합성 방법, 세포 독성 및 세포 내 핵산 전달 효율 면에서 아직 보완되어야 할 점이 많다. 그러므로 합성 공정이 짧고, 세포 독성이 작으면서도 세포 내로 효율적으로 핵산 물질들을 전달하는 기술의 개발이 요구된다.

<11> 이에 본 발명자들은 핵산 등의 세포 내 전달 효율을 증가시키기 위하여 양전하를 가지는 올리고 펩티드를 이용하여 신규한 양이온성 지질을 합성하였으며 이 양이온성 지질을 포함한 핵산 전달체의 경우 사람의 암 세포주에서 핵산의 전달 효율을 현저히 증가시킬 뿐만 아니라 세포 독성도 현저하게 감소시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

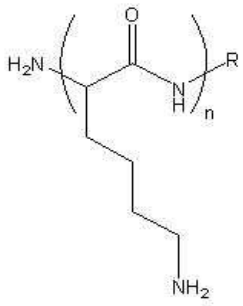
발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<12> 본 발명의 목적은 올리고 펩티드를 수식한 신규한 양이온성 지질, 그의 제조 방법 및 그를 포함하는 전달체를 제공하는 것이다. 본 발명의 양이온성 지질은 다양한 형태의 핵산 전달체로 제제화되어 세포 내로 목적하는 물질의 전달을 증강시키는데 사용될 수 있다.

과제 해결수단

<13> 본 발명은 하기 일반식 (I)의 양이온성 지질을 제공한다.



(I)

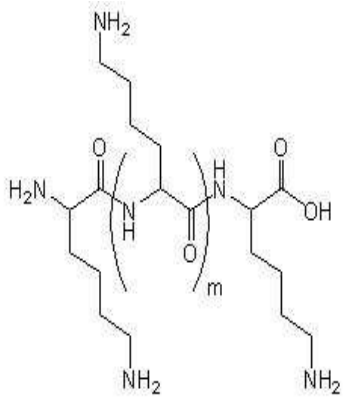
<14>

<15> 상기 식에서, n은 3내지 6의 정수이고,

<16> R은 탄소수 12 내지 20인 포화 또는 불포화 탄화수소 라디칼로, 바람직하게는 올레일(oleyl), 미리스틸(myristyl), 팔미틸(palmityl), 스테아릴(stearyl), 라우릴(lauryl), 리놀레일(linoleyl), 및 아라키딜(arachidyl)로 구성된 군으로부터 선택된다.

<17> 상기 일반식 (I)으로 표시되는 본 발명의 양이온성 지질은 양이온성을 띠는 아미노산 그룹, 바람직하게는 올리고라이신 그룹과, 소수성인 탄소수 12 내지 20의 포화 또는 불포화 지방산 아민 유도체가 결합되어 이루어진다. 본 발명의 양이온성 지질은 친수성인 아미노산 그룹과 소수성인 지방산 부위로 구성된 양친매성 화합물로서 아미노산의 카르복실 그룹(-COOH) 과 지방산 아민 유도체의 아민그룹(-NH_2)간의 아미드(amide) 결합으로 이루어진다. 본 발명의 양이온성 지질을 구성하는 아미노산 그룹으로는 양하전을 가지는 아미노산 중 라이신(Lysine, K)이 3개 내지 6개로 이루어진 올리고라이신이 바람직하다.

<18> 본 발명은 또한 하기 화학식 (II)로 표시되는 올리고라이신의 카르복실 그룹(-COOH)과



(II)

<19>

<20> 하기 화학식 (III)으로 표시되는 지방산 아민 유도체의 아민 그룹(-NH2)을

<21> H_2N-R (III)

<22> 아마이드 결합(amide bond)으로 연결하는 단계를 포함하는 화학식(I)의 양이온성 지질의 제조방법을 제공하는데, 상기 식에서 m은 1 내지 4의 정수, R은 탄소수 12 내지 20인 포화 또는 불포화 탄화수소 라디칼이다.

<23> 상기 화학식 (III)으로 표시되는 지방산 아민 유도체는 올레일아민(oleylamine), 미리스틸아민(myristylamine), 팔미틸아민(palmitylamine), 스테아릴아민(stearylamine), 라우릴아민(laurylamine), 리놀레일아민(linoleylamine), 및 아라키딜아민(arachidylamine)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

<24> 본 발명은 또한 상기 방법에 의해 제조된 양이온성 지질을 제공한다.

<25> 본 발명의 양이온성 지질은 생체 단백질의 구성성분인 아미노산을 사용하여 간단한 공정으로 높은 수율의 합성이 가능하다. 본 발명의 양이온성 지질의 경우, 정상적인 생체내 환경의 중성영역 pH에서 올리고 라이신의 아민기가 양하전의 형태로 존재하게 되므로 상기 일반식 (I)의 양이온성 지질은 전체적으로 세포내에서 양전하의 하전상태를 보유하게 된다. 상기 양이온성 지질의 양이온 하전은 중성영역 pH에서 음전하를 띠고 있는 각종 핵산 물질과 복합체를 형성하는 것을 가능하게 하고 또한 생체내에서 상대적으로 음전하를 보유하고 있는 표적 세포막과의 접촉을 증가시키는데 도움을 준다.

<26> 따라서 본 발명은 또한 상기 화학식 (I)의 양이온성 지질을 포함하는 세포내로의 핵산 전달체(nucleic acid delivery system), 바람직하게는 올리고핵산 전달체(oligonucleic acid delivery system)를 제공한다. 본 발명에 있어서, 핵산 전달체는, 음전하를 띤 핵산 서열과의 상호작용에 의해 통상적으로 핵산과 결합하여 세포 내로 유입될 수 있는 복합체를 형성할 수 있는 핵산 운반 매개체를 말한다.

<27> 본 발명에 있어서, 핵산은 리보핵산(RNA), 작은 간섭 리보핵산(small interfering RNA), 안티센스 올리고핵산(antisense oligonucleotide), 핵산 앱타머(aptamer) 등을 포함한다.

<28> 본 발명의 양이온성 지질은 세포내로의 핵산 전달을 위해 리포좀, 미셀, 에멀젼, 나노입자 등 다양한 형태의 핵산 전달체 제형(delivery formulation)으로 사용될 수 있다.

<29> 본 발명의 구체 예에서, 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체는 리보핵산(RNA), 작은 간섭 리보핵산(small interfering RNA), 안티센스 올리고핵산(antisense oligonucleotide), 핵산 앱타머(aptamer) 등을 포함하는 올리고 핵산의 세포 내로의 운반을 매개한다.

<30> 또한 상기 핵산 전달체는 본 발명의 양이온성 지질 성분 외에도 갈락토오스 지질 유도체, 만노오스 지질 유도체, 엽산 지질 유도체, 폴리틸렌 글리콜 지질 유도체, 바이오틴 지질 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것을 추가로 포함할 수 있다.

<31> 본 발명의 한 구체 예에서, 상기 핵산 전달체는 상기 양이온성 지질 및 세포 융합성 인지질을 함유하는 리포좀 제형으로 이루어진 것일 수 있다. 상기 세포 융합성 인지질은 예를 들어 디올레오일 포스파티딜에탄올 아민(dioleoylphosphatidylethanolamine; DOPE), 또는 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phospho ethanolamine) 등을 포함한다.

<32> 본 발명의 다른 구체 예에서, 상기 핵산 전달체는 상기 양이온성 지질에 계면활성제를 추가적으로 함유하는 미셀 제형으로 이루어진 것일 수 있다. 상기 미셀 제형에서 사용될 수 있는 계면활성제는 예를 들어 트윈 20 (Tween 20), 폴리에틸렌글리콜 모노올레일 에테르(polyethylene glycol monooleyl ether), 에틸렌글리콜 모노도데실 에테르 (ethylene glycol monododecyl ether), 디에틸렌글리콜 모노헥실 에테르 (diethylene glycol monohexyl ether), 트리메틸헥사데실 암모늄 클로라이드 (trimethylhexadecyl ammonium chloride), 도데실트리메틸 암모늄 클로라이드 (dodecyltrimethyl ammonium bromide), 사이클로헥실 베타 말토사이드 (cyclohexylmethyl β-D-maltoside), 펜타에리스리틸 팔미테이트 (pentaerythrityl palmitate), 라우릴에메틸아민옥사이드 (lauryldimethylamine-oxide), 또는 라우로살코신 소듐염(N-lauroylsarcosine sodium salt) 등을 포함한다.

<33> 본 발명의 다른 구체 예에서, 상기 핵산 전달체는 상기 양이온성 지질에 계면활성제를 추가적으로 함유하는 에멀젼 제형으로 이루어진 것일 수 있다. 에멀젼 제형에서 사용할 수 있는 계면활성제는 양이온성(cationic), 양쪽성(zwitterionic), 비이온성(nonionic) 등으로 분류된다. 양이온성 계면활성제로는 예를 들어 세틸 브롬화 트리메틸암모늄염(cetyl trimethylammonium bromide), 헥사데실 브롬화 암모늄염(hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 등을 사용할 수 있으며, 양쪽성 계면활성제로는 예를 들어 도데실 베타인(dodecyl betaine), 도데실 디메틸아민 산화물(dodecyl dimethylamine oxide), 디메틸팔미토일암모니오프로판 설포네이트(3-(N,N-dimethylpalmitylammonio)propane sulfonate) 등을 사용할 수 있으며, 비이온성 계면활성제로는 예를 들어 트윈-20 (Tween 20), 트윈-80(Tween 80), 트리톤 X-100 (Triton-X-100), 폴리에틸렌글리콜 모노올레일 에테르(polyethylene glycol monooleyl ether), 트리에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르 (triethylene glycol monododecyl ether), 옥틸 글루코사이드(octyl glucoside), 노나노일메틸글루카민 (N-nonanoyl-N-methyl glucamine)등을 사용할 수 있다.

<34> 본 발명에 의한 양이온성 리포좀, 미셀, 에멀젼, 나노입자 등의 제형으로 이루어진 핵산 전달체는 동물 세포 내

에 목적하는 핵산의 수송 효율을 현저히 증강시킬 수 있으며 세포에 대한 독성 역시 감소시킨다.

<35> 본 발명의 양이온성 지질을 함유한 핵산 전달체는 전달하고자 하는 핵산의 사용 목적에 따라 어떤 동물 세포로도 핵산 전달이 가능하다. 하기 실시예에서는 그 대표적인 예로 상기 핵산 전달체의 종양세포(사람의 자궁경부암 상피 세포인 HeLa 세포주, 폐암 세포인 A549 세포주, 간암 세포주인 Huh-7, 흑색종인 WM266.4, A375 세포주, 신경교종인 U87 세포주)로의 핵산 전달 효율을 평가하였다.

<36> 형광 표식이 붙어있는 Block IT (Invitrogen, USA) 이중 나선 리보핵산을 사용하여 양이온성 지질을 함유하는 다양한 제형과 복합체를 형성시켜 세포 내에 전달하고 이를 형광 현미경으로 관찰하면 상기 양이온성 지질의 세포 내로 전달되는 핵산 수송 능력을 구체적으로 측정할 수 있다. 또한 본 발명의 핵산 전달체의 세포 독성은 tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide을 이용한 발색 방법(MTT)을 사용하여 평가할 수 있다.

<37> 본 발명에서 기술된 양이온성 지질을 포함하는 리포좀, 미셀, 에멀젼, 나노입자 등의 핵산 전달체는 다양한 세포들에서 핵산의 세포내 수송도를 증가시킬 뿐만 아니라 세포 독성도 현저하게 감소시키는 바, 리보핵산, 작은 간섭 리보핵산, 안티센스 올리고핵산, 핵산 앱타머 (aptamer) 등의 올리고 핵산 의약을 이용한 치료요법 등에 효과적으로 사용 가능하다.

<38> 또한 본 발명은 상기 핵산 전달체와 핵산의 복합체를, 바람직하게는 올리고핵산 전달체와 올리고 핵산의 복합체를 제공한다. 리포좀, 미셀, 에멀젼 등의 제형을 갖는 본 발명의 핵산 전달체는 양이온성 지질로 인해 양하전을 띠게 되므로, 핵산 전달체의 양하전과 핵산의 음이온성 하전에 의해 단순한 혼합(mix)에 의해 정전기 결합을 통해 핵산 전달체와 핵산 간의 복합체를 효율적으로 형성할 수 있다.

<39> 상기 핵산 전달체와 핵산의 복합체는 종양, 관절염, 심혈관계, 내분비계 질환 등을 포함하는 병인성 단백질의 과다발현으로 야기되는 각종 질환들의 치료를 위해 세포 내로 도입될 수 있다. 본 발명의 핵산 전달체는 핵산전달 효율이 우수할 뿐만 아니라 세포 독성이 낮으므로 병인성 단백질의 세포내 과다 발현을 억제하여 우수한 질환 치료 효과를 거둘 수 있다.

<40> 따라서 본 발명은 또한 상기 핵산 전달체와 핵산의 복합체를 유효성분으로 포함하는 핵산 의약 치료제, 핵산 의약 치료제의 제조를 위한 상기 핵산 전달체와 핵산의 복합체의 용도 및 치료상 유효량의 상기 핵산 전달체와 핵산의 복합체를 대상체의 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 종양, 관절염, 심혈관계, 내분비계 질환 등을 포함하는 병인성 단백질의 과다발현으로 야기되는 각종 질환들의 치료 방법을 제공한다.

<41> 본 발명의 핵산 의약 치료제를 통해 in vivo 또는 ex vivo 상에서 세포 내부로 목적하는 핵산을 도입하게 되면 표적 단백질의 발현을 선택적으로 감소시키거나 표적 유전자에 생긴 변이를 수정하는 역할을 하여 병인성 단백질의 과다 발현으로 발생되는 질환이나 표적 유전자로 인해 발생한 질환 등을 치료할 수 있게 된다. 본 발명에 있어서, 상기 핵산 전달체와 핵산의 복합체의 치료상 유효량은 질환 치료 효과를 기대하기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 투여되는 핵산의 종류, 제형의 종류, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 치료 기간, 동시 사용되는 화학 항암제 등의 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인에게 상기 핵산 의약 치료제를 예컨대 1일 1회투여시 0.001 mg/kg ~ 100 mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

<42> 또한 본 발명의 양이온성 지질은 체외에서 핵산 앱타머를 이용한 진단 키트의 구성 성분으로서도 이용가능하다. 예를 들면 진단용 플레이트의 표면을 양이온성 지질로 코팅하고 이 코팅 면 위에 앱타머를 결합시킬 경우 시료 중 앱타머와 선택적으로 반응하는 물질의 존재를 진단하는데 이용 가능하다. 따라서 본 발명은 본 발명의 양이온성 지질로 코팅된 플레이트를 포함하는 진단 키트를 제공한다. 상기 진단 키트의 양이온성 지질 코팅 면에는 앱타머가 결합되어 있을 수 있다.

효 과

<43> 상술한 바와 같이, 본 발명의 양이온성 지질은 제조 및 정제 공정이 간편하여 대량 생산시의 경제성이 높다. 또한, 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체는 목적하는 리보핵산, 작은 간섭 리보핵산, 안티센스 올리고핵산, 핵산 앱타머 (aptamer) 등의 올리고 핵산 의약을 세포 내로 수송하는 효율을 현저히 증강시킬 뿐만 아니라, 세포 독성을 감소시켜 핵산 또는 단백질 소재 의약의 치료 효능을 증강시키는 용도로 유용하게 사용된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<44> 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

<45> **<신규 양이온성 지질의 합성>**

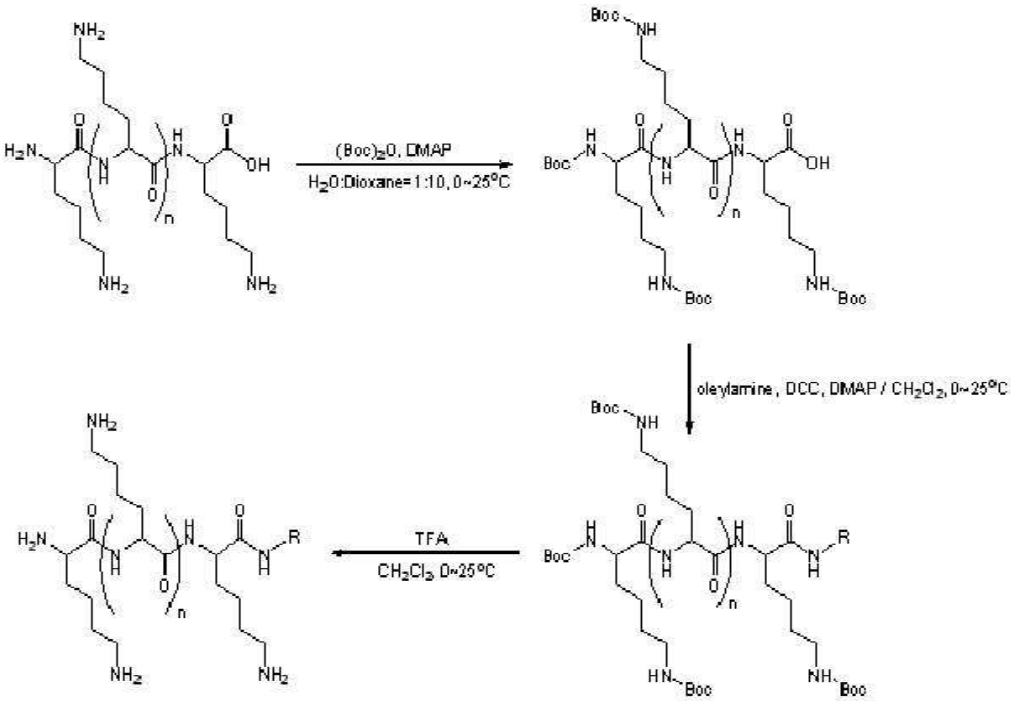
<46> **실시예 1. 올레일 트리라이신아미드 (oleyl trilysinamide)의 합성**

<47> 1-1). 트리라이신(1g, 2.48mmole, PEPTRON, Inc., Korea)을 H_2O:*p*-Dioxane(Sigma-Aldrich, USA)=1:10의 비율로 얼음물 중탕하에서 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine)(0.91g, 7.45mmole, FLUKA, USA), $(Boc)_2O$(Di-tert-butyl pyrocarbonate)(1.62g, 7.45mmole, FLUKA, USA)를 첨가한 후 12시간정도 교반한다. 반응 후 얻어진 생성물을 감압 농축하여 에틸아세테이트(ethylacetate, Sigma-Aldrich, USA)에 녹여 과포화 중탄산나트륨용액, 과포화 염화나트륨용액으로 각각 3회씩 세척하여 미반응 물질을 제거시키고, 여분의 수분을 무수황화마그네슘(Sigma-Aldrich, USA)으로 제거한 후 건조하여 흰색 고체생성물을 얻었다. 반응 여부는 박막층 크로마토그래피법 (TLC, thin layer chromatograpy, Merck & Co., Inc. USA)로 확인하였다.

<48> 1-2). 실시예 1-1에서 얻어진 반응 생성물을 디클로로메탄에 녹인 후, DCC(N,N′-Dicyclohexylcarbodiimide, FLUKA, USA), DMAP(4-(Dimethylamino) pyridine)를 각각 3당량씩 얼음물 중탕에서 1시간 정도 교반한다. 올레일아민(oleylamine, FLUKA, USA) 1.5당량을 무수디클로로메탄(Dichloromethane, Sigma-Aldrich, USA)에 녹여 천천히 적하한 후 상온에서 12시간 반응시킨다. 반응 후 디클로로메탄을 감압 농축하여 제거시킨 후, 얻어진 생성물을 에틸아세테이트(ethylacetate)에 녹여 과포화 중탄산나트륨용액, 과포화 염화나트륨용액으로 각각 3회씩 세척하여 미반응 물질을 제거시키고, 여분의 수분을 무수황화마그네슘으로 제거한 후 건조하여 무색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<49> 1-3). 실시예 1-2에서 얻어진 반응 생성물을 얼음물 중탕하에서 트라이플루오르아세트산(TFA, Trifluoreacetic acid, Sigma-Aldrich, USA):디클로로메탄=1:1을 천천히 적하한 후 약1시간 정도 교반한다. 반응 후 에틸아세테이트(ethylacetate)로 TFA를 제거한 후 건조하여 약간 노란색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<50> [반응식1]

<51> 

<52> 상기 반응식 1의 R은 탄소수 18의 불포화 탄화수소 라디칼로 올레일이다.

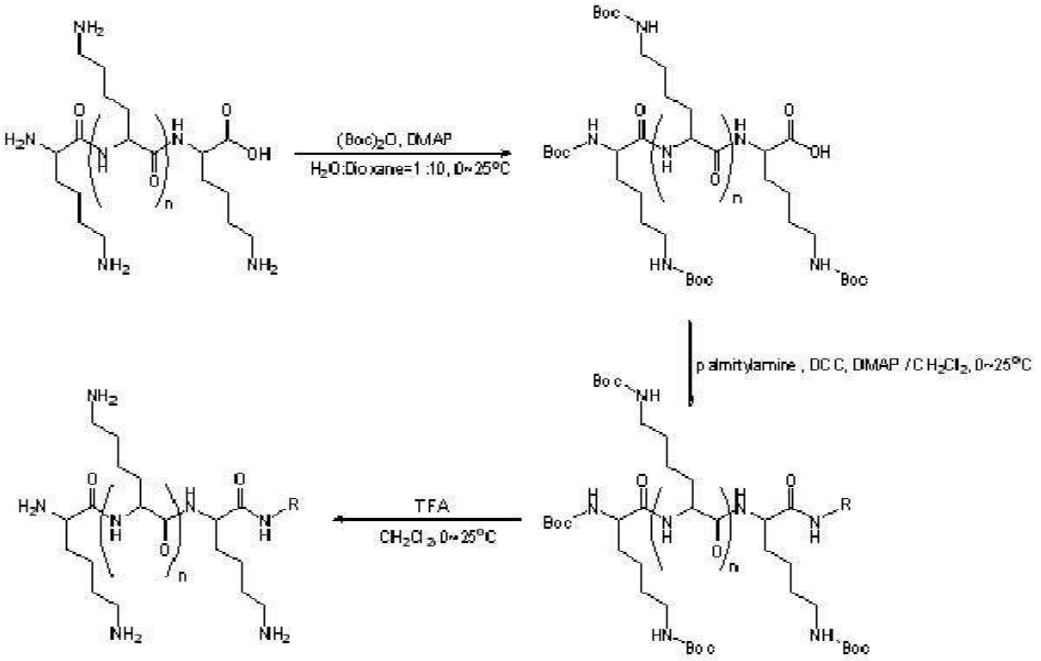
<53> **실시예 2. 팔미틸 테트라라이신아미드 (palmityl tetralysinamide)의 합성**

<54> 2-1) 테트라라이신(1g, 1.88mmole, PEPTRON, Inc., Korea)과 $(Boc)_2O$(3.08g, 14.13mmole) 실시예 1-1과 동일한 방법으로 반응시켜 라이신 유도체 생성물을 얻었다.

<55> 2-2) 실시예 2-1에서 얻어진 반응 생성물을 무수디클로로메탄에 녹인 후, 팔미틸아민(palmitylamine) 1.5당량을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방법으로 반응 후, 무색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<56> 2-3) 실시예 2-2에서 얻어진 반응 생성물을 실시예 1-3과 동일한 방법으로 반응후, 약간 노란색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<57> [반응식 2]



<58>

<59> 상기 반응식 2의 R은 탄소수 16의 포화 탄화수소 라디칼로 팔미틸이다.

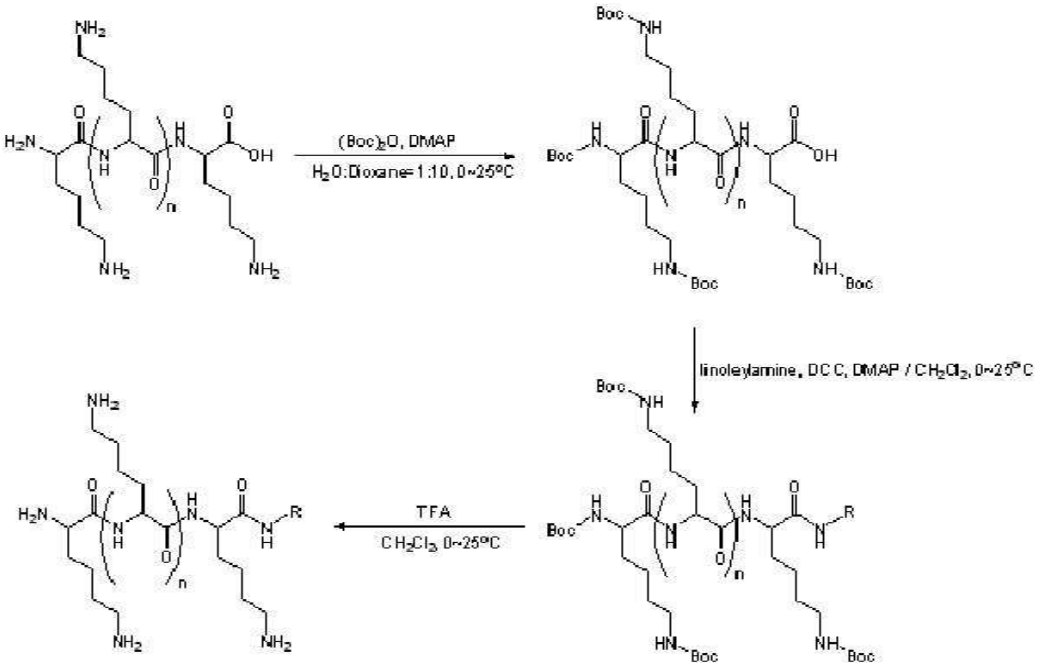
<60> **실시예 3. 리놀레일 펜타라이신아미드(linoleyl pentalysinamide)**

<61> 3-1) 펜타라이신(1g, 1.5mmole, Sigma-Aldrich, USA)과 $(Boc)_2O$(2.98g, 13.66mmole) 실시예 1-1과 동일한 방법으로 반응시켜 라이신 유도체 생성물을 얻었다.

<62> 3-2) 실시예 3-1에서 얻어진 반응 생성물을 무수디클로로메탄에 녹인 후, 리놀레일아민(linoleylamine) 1.5당량을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방법으로 반응 후, 무색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<63> 3-3) 실시예 3-2에서 얻어진 반응 생성물을 실시예 1-3과 동일한 방법으로 반응후, 약간 노란색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<64> [반응식 3]



<65>

<66> 상기 반응식 3의 R은 탄소수 18의 이중 불포화 탄화수소 라디칼로 리놀레일이다.

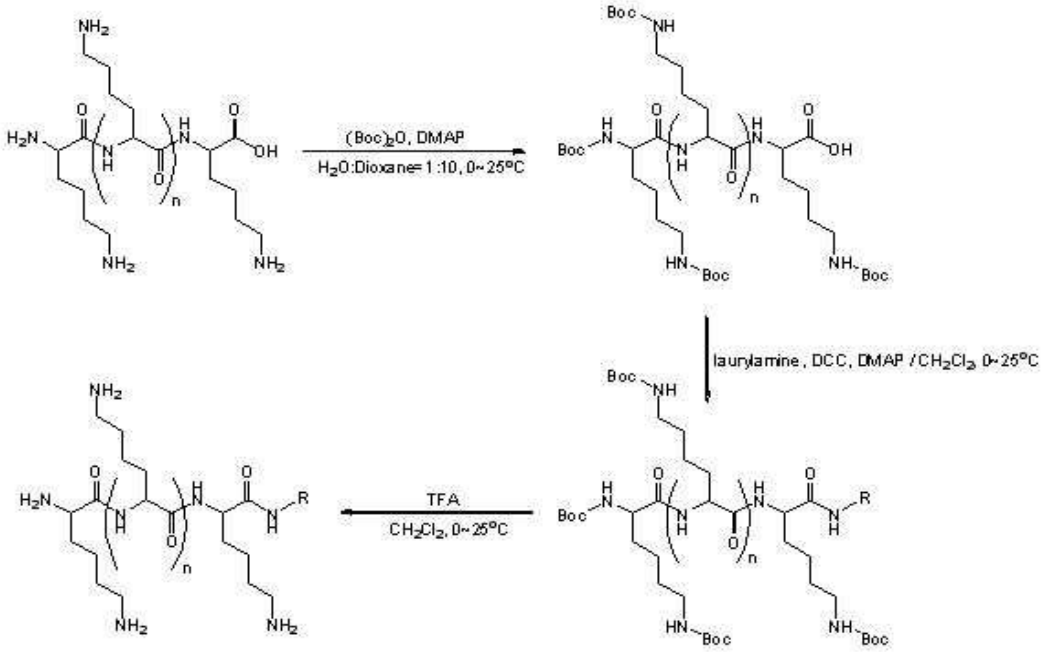
<67> **실시예 4. 라우릴 헥사라이신아미드(lauryl hexalysinamide)**

<68> 4-1) 헥사라이신(1g, 1.27mmole, PEPTRON, Inc., Korea)과 $(Boc)_2O$(2.77g, 12.7mmole) 실시예 1-1과 동일한 방법으로 반응시켜 라이신 유도체 생성물을 얻었다.

<69> 4-2) 실시예 4-1에서 얻어진 반응 생성물을 무수디클로로메탄에 녹인 후, 라우릴아민(laurylamine) 1.5당량을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방법으로 반응 후, 무색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<70> 4-3) 실시예 4-2에서 얻어진 반응 생성물을 실시예 1-3과 동일한 방법으로 반응후, 약간 노란색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<71> [반응식 4]



<72>

<73> 상기 반응식 4의 R은 탄소수 12의 포화탄화수소 라디칼로 라우릴이다.

<74> **비교예 1. 라우릴 라이신아미드(lauryl lysinamide)**

<75> 1-1) 라이신(1g, 6.84mmole, Sigma-Aldrich, USA)과 $(Boc)_2O$(4.48g, 20.5mmole) 실시예 1-1과 동일한 방법으로 반응시켜 라이신 유도체 생성물을 얻었다.

<76> 1-2) 비교예 1-1에서 얻어진 반응 생성물을 무수디클로로메탄에 녹인 후, 라우릴아민(laurylamine) 1.5당량을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방법으로 반응 후, 무색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<77> 1-3) 비교예 1-2에서 얻어진 반응 생성물을 실시예 1-3과 동일한 방법으로 반응후, 약간 노란색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<78> **비교예 2. 올레일 노나라이신아미드(oleyl nonalysinamide)**

<79> 2-1) 노나라이신(1g, 0.85mmole, PEPTRON, Inc., Korea)과 $(Boc)_2O$(2.79g, 12.8mmole) 실시예 1-1과 동일한 방법으로 반응시켜 라이신 유도체 생성물을 얻었다.

<80> 2-2) 비교예 2-1에서 얻어진 반응 생성물을 무수디클로로메탄에 녹인 후, 올레일아민(oleylamine) 1.5당량을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방법으로 반응 후, 무색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<81> 2-3) 비교예 2-2에서 얻어진 반응 생성물을 실시예 1-3과 동일한 방법으로 반응후, 약간 노란색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<82> **비교예 3. 스테아릴 데카라이신아미드(stearyl decalysinamide)**

<83> 3-1) 데카라이신(1g, 0.77mmole, PEPTRON, Inc., Korea)과 $(Boc)_2O$(3.56g, 15.3mmole) 실시예 1-1과 동일한 방법으로 반응시켜 라이신 유도체 생성물을 얻었다.

<84> 3-2) 비교예 3-1에서 얻어진 반응 생성물을 디클로로메탄에 녹인 후, 스테아릴아민(stearylamine, Sigma-Aldrich, USA) 1.5당량을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방법으로 반응 후, 무색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

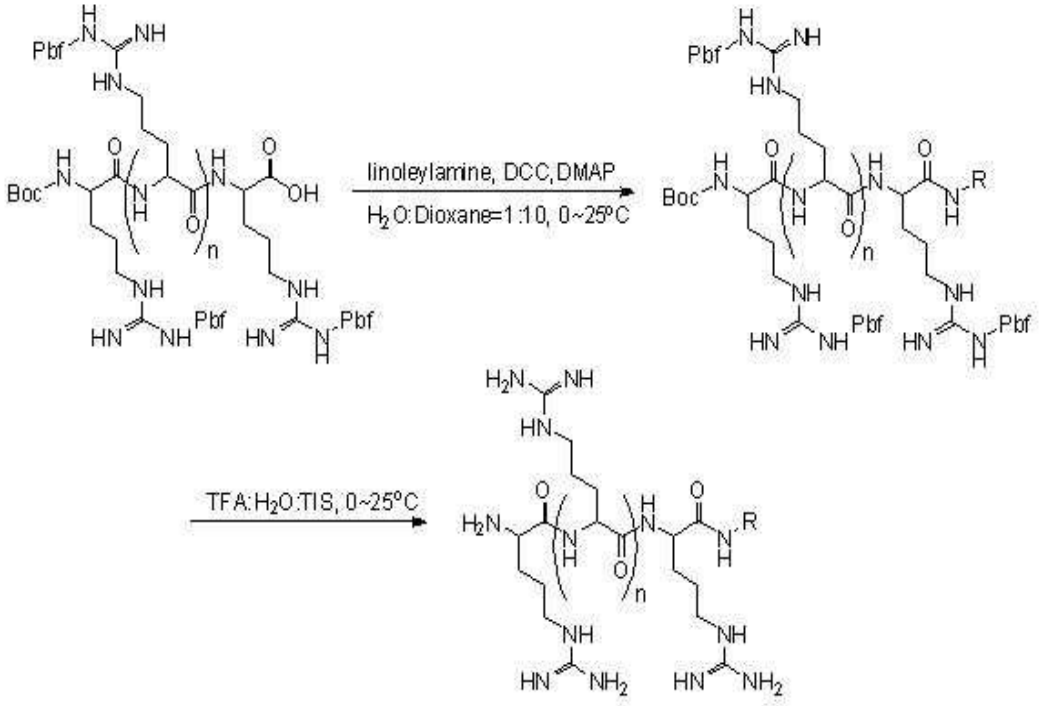
<85> 3-3) 비교예 3-2에서 얻어진 반응 생성물을 실시예 1-3과 동일한 방법으로 반응후, 약간 노란색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<86> **비교예 4. 리놀레일 아르기닌아미드(linoleyl argininamide)**

<87> 4-1) Boc-Arg(Pbf)-OH(1g, 1.89mmole, PEPTRON, Inc., Korea)를 무수디클로로메탄에 녹인 후, 리놀레일아민(linoleylamine) 1.5당량을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방법으로 반응 후, 무색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<88> 4-2) 비교예 4-1에서 얻어진 반응 생성물에 TFA:H_2O:TIS(triisopropyl silane, Sigma-Aldrich, USA)=90:5:5를 첨가 후, 2시간 동안 교반한다. 반응 후, 건조시켜 노란색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<89> [반응식 5]



<90>

<91> 상기 반응식 5의 R은 탄소수 18의 이중 불포화 탄화수소 라디칼로 리놀레일이다.

<92> **비교예 5. 미리스틸 펜타아르기닌아미드(myristyl pentaargininamide)**

<93> 5-1) 비교예 4-1과 같은 보호기가 있는 펜타아르기닌(1g, 0.46mmole, PEPTRON, Inc., Korea)을 무수디클로로메탄에 녹인 후, 미리스틸아민(myristylamine) 1.5당량을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방법으로 반응 후, 무색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<94> 5-2) 비교예 5-1에서 얻어진 반응 생성물에 TFA:H_2O:TIS(triisopropyl silane)=90:5:5를 첨가 후, 2시간 동안 교반한다. 반응 후, 건조시켜 노란색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<95> **비교예 6. 스테아릴 옥타아르기닌아미드(stearyl octaargininamide)**

<96> 6-1) 비교예 4-1과 같은 보호기가 있는 옥타아르기닌(1g, 0.29mmole, PEPTRON, Inc., Korea)을 무수디클로로메탄에 녹인 후, 스테아릴아민(stearylamine) 1.5당량을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방법으로 반응 후, 무색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<97> 6-2) 비교예 6-1에서 얻어진 반응 생성물에 TFA:H_2O:TIS(triisopropyl silane)=90:5:5를 첨가 후, 2시간 동안 교반한다. 반응 후, 건조시켜 노란색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<98> **비교예 7. 아라키딜 노나아르기닌아미드(arachidyl nonaargininamide)**

<99> 7-1) 비교예 4-1과 같은 보호기가 있는 노나아르기닌(1g, 0.26mmole, PEPTRON, Inc., Korea)을 무수디클로로메탄에 녹인 후, 아라키딜아민(arachidylamine) 1.5당량을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방법으로 반응 후, 무

색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<100> 7-2) 비교예 7-1에서 얻어진 반응 생성물에 TFA:H_2O:TIS(triisopropyl silane)=90:5:5를 첨가 후, 2시간 동안 교반한다. 반응 후, 건조시켜 노란색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<101> **비교예 8. 올레일 데카아르기닌아미드(oleyl dacaargininamide)**

<102> 8-1) 비교예 4-1과 같은 보호기가 있는 데카아르기닌(1g, 0.24mmole, PEPTRON, Inc., Korea)을 무수디클로로메탄에 녹인 후, 올레일아민(oleylamine) 1.5당량을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방법으로 반응 후, 무색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<103> 8-2) 비교예 8-1에서 얻어진 반응 생성물에 TFA:H_2O:TIS(triisopropyl silane)=90:5:5를 첨가 후, 2시간 동안 교반한다. 반응 후, 건조시켜 노란색의 액체생성물을 얻었다. 반응 여부는 TLC로 확인하였다.

<104> **<양이온성 지질을 함유하는 핵산 전달체의 제조>**

<105> **실시예 5. 실시예1의 올레일 트리라이신아미드 (oleyl trilysinamide)를 함유하는 양이온성 리포좀 제조**

<106> 실시예 1에서 제조한 양이온성 지질인 올레일 트리라이신아미드 (oleyl trilysinamide)와 세포 융합성 인지질인 DOPE(Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후 몰비 1:1의 비율로 취해 파이렉스 10ml 유리 격막 바이알에 넣어 혼합한 후 질소 환경에서 모든 클로로포름이 증발될 때까지 낮은 속도로 회전 증발시켜 지질 박막 필름으로 제조하였다. 지질 다층형 소구체 (multilamella vesicle)를 제조하기 위하여 이 박막필름에 인산완충용액 1ml을 첨가하고 바이알을 37℃로 하여 밀봉 후 3분간 교반(vortexing)하였다. 균일한 크기를 만들기 위해 이를 입자 균질화 제조기 (extruder, Northern Lipid Inc., Canada)를 사용하여 0.2㎛폴리카보네이트 막을 3번 통과시켜 제조하였다. 얻어진 양이온성 리포좀은 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다.

<107> **실시예 6. 실시예3의 리놀레일 펜타라이신아미드(linoleyl pentalysinamide)를 함유하는 양이온성 리포좀 제조**

<108> 실시예 3에서 제조한 양이온성 지질인 리놀레오일 펜타라이신아미드(linoleyl pentalysinamide)와 세포 융합성 인지질인 DPhPE(Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후 몰비 1:1의 비율로 취해 파이렉스 10ml 유리 격막 바이알에 넣어 혼합한 후 실시예 5와 동일한 방법으로 양이온성 리포좀을 제조하였다.

<109> **실시예 7. 실시예3의 리놀레일 펜타라이신아미드(linoloeyl pentalysinamide)를 함유하는 양이온성 미셀 제조**

<110> 실시예 3에서 제조한 양이온성 지질인 리놀레오일 펜타라이신아미드(linoleyl pentalysinamide)와 계면활성제인 폴리에틸렌글리콜 모노올레일 에테르를 1:1의 몰 비율로 취하여 혼합한 다음, 혼합액 대 인산완충용액을 1:10의 부피 비율로 혼합하고 수회 진탕혼합 (vortexing)한 다음 약 1분 동안 초음파 발생기를 사용하여 양이온성 미셀을 제조하였다.

<111> **실시예 8. 실시예2의 팔미틸 테트라라이신아미드 (palmityl tetralysinamide)를 함유하는 양이온성 미셀 제조**

<112> 실시예 2에서 제조한 양이온성 지질인 팔미틸 테트라라이신아미드 (palmityl tetralysinamide)와 계면활성제인 트윈 20을 1:1의 몰 비율로 취하여 혼합한 다음, 실시예 7과 동일한 방법으로 양이온성 미셀을 제조하였다.

<113> **실시예 9. 실시예4의 라우릴 헥사라이신아미드(lauryl hexalysinamide)를 함유하는 양이온성 에멀젼 제조**

<114> 실시예 4에서 제조한 양이온성 지질인 라우릴 헥사라이신아미드(lauryl hexalysinamide)와 트윈 80을 1: 0.1의 몰 비율로 혼합하고 혼합물을 인산 완충용액에 1:10의 부피 비율로 가한 다음, 균질기(homogenizer)를 이용하여 약 2분간 균질화 시켜 유상이 수상 내에 분산된 수중유형 (o/w형) 양이온성 에멀젼을 제조하였다.

<115> **실시예 10. 실시예2의 팔미틸 테트라라이신아미드 (palmityl tetralysinamide)를 함유하는 양이온성 에멀젼 제조**

<116> 실시예 2에서 제조한 양이온성 지질인 팔미틸 테트라라이신아미드 (palmityl tetralysinamide)와 트윈 20을 1: 0.1의 몰 비율로 혼합하고 혼합물을 인산 완충용액에 1:10의 부피 비율로 가한 다음, 실시예 9와 동일한 방법으로 양이온성 에멀젼을 제조하였다.

<117> **실시예 11. 실시예2의 팔미틸 테트라라이신아미드 (palmityl tetralysinamide) 및 엽산 지질 유도체를 함유하는 양이온성 리포좀 제조**

<118> 실시예 2에서 제조한 양이온성 지질인 팔미틸 테트라라이신아미드 (palmityl tetralysinamide), 세포 융합성 인

지질인 DOPE 및 엽산 지질 유도체인 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[folate (polyethylene glycol)-2000(Avanti Polar Lipid Inc., USA)을 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후 1:1:0.05의 몰 비율로 취하여 실시예 5와 동일한 방법으로 표면에 엽산 잔기 (folate moiety)가 존재하는 양이온성 리포좀을 제조하였다.

<119> **실시예 12. 실시예4의 라우릴 헥사라이신아미드(lauryl hexalysinamide) 및 폴리에틸렌글리콜 지질 유도체를 함유하는 양이온성 리포좀 제조**

<120> 실시예 4에서 제조한 양이온성 지질인 라우릴 헥사라이신아미드(lauryl hexalysinamide), 세포 융합성 인지질인 DPhPE 및 폴리에틸렌글리콜 지질 유도체인 1,2-diacyl-sn-glycero- 3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-3000(Avanti Polar Lipid Inc., USA)을 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후 1:1:0.05의 몰 비율로 취하여 실시예 5와 동일한 방법으로 표면에 폴리에틸렌글리콜 그룹이 존재하는 양이온성 리포좀을 제조하였다.

<121> **실시예 13. 실시예1의 올레일 트리라이신아미드 (oleyl trilysinamide) 및 갈락토오스 지질 유도체를 함유하는 양이온성 미셀 제조**

<122> 실시예 1에서 제조한 양이온성 지질인 올레일 트리라이신아미드 (oleyl trilysinamide)와 갈락토오스 지질 유도체인 세리브로사이드(cerebroside) (Avanti Polar Lipid Inc., USA) 및 계면활성제인 트리톤 X-100을 각각 1:0.05:1의 몰 비율로 취하여 혼합한 다음, 실시예 7과 동일한 방법으로 표면에 갈락토오즈 잔기 (galactose moiety)가 존재하는 양이온성 미셀을 제조하였다.

<123> **실시예 14. 실시예3의 리놀레일 펜타라이신아미드(linoleyl pentalysinamide)를 함유하는 양이온성 에멀젼 제조**

<124> 실시예 3에서 제조한 양이온성 지질인 리놀레일 펜타라이신아미드(linoleyl pentalysinamide)와 트윈 20을 1:0.1의 몰 비율로 혼합하고 혼합물을 인산 완충용액에 1:10의 부피 비율로 가한 다음, 실시예 9와 동일한 방법으로 양이온성 에멀젼을 제조하였다.

<125> **실시예 15. 실시예1의 올레일 트리라이신아미드 (oleyl trilysinamide) 및 폴리에틸렌글리콜 지질 유도체를 함유하는 양이온성 리포좀 제조**

<126> 실시예 1에서 제조한 양이온성 지질인 올레일 트리라이신아미드 (oleyl trilysinamide), 세포 융합성 인지질인 DPhPE 및 폴리에틸렌글리콜 지질 유도체인 1,2-diacyl-sn-glycero- 3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-3000(Avanti Polar Lipid Inc., USA)을 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후 1:1:0.05의 몰 비율로 취하여 실시예 5와 동일한 방법으로 표면에 폴리에틸렌글리콜 그룹이 존재하는 양이온성 리포좀을 제조하였다.

<127> **비교예 9. 기존에 판매되고 있는 양이온성 리포좀**

<128> 기존의 핵산 전달 실험용으로 시판되고 있는 양이온성 리포좀인 리포펙타민(LipofectAMINE)TM 2000(Invitrogen, USA)을 구입하여 사용하였다.

<129> **비교예 10. 비교예1의 라우릴 라이신아미드(lauryl lysinamide)를 함유하는 양이온성 리포좀 제조**

<130> 비교예 1에서 제조한 양이온성 지질인 라우릴 라이신아미드(lauryl lysinamide)와 세포 융합성 인지질인 DOPE(Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후 몰비 1:1의 비율로 취해 파이렉스 10ml 유리 격막 바이알에 넣어 혼합한 후 실시예 5와 동일한 방법으로 양이온성 리포좀을 제조하였다.

<131> **비교예 11. 비교예 5의 미리스틸 펜타아르기닌아미드(myristyl pentaargininamide)를 함유하는 양이온성 리포좀 제조**

<132> 비교예 5에서 제조한 양이온성 지질인 미리스틸 펜타아르기닌아미드(myristyl pentaargininamide)와 세포 융합성 인지질인 DPhPE(Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후 몰비 1:1의 비율로 취해 파이렉스 10ml 유리 격막 바이알에 넣어 혼합한 후 실시예 5와 동일한 방법으로 양이온성 리포좀을 제조하였다.

<133> **비교예 12. 비교예 6의 스테아릴 옥타아르기닌아미드(stearyl octaargininamide)를 함유하는 양이온성 리포좀 제조**

<134> 비교예 6에서 제조한 양이온성 지질인 스테아릴 옥타아르기닌아미드(stearyl octaargininamide)와 세포 융합성

인지질인 DPhPE(Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후 몰비 1:1의 비율로 취해 파이렉스 10ml 유리 격막 바이알에 넣어 혼합한 후 실시예 5와 동일한 방법으로 양이온성 리포좀을 제조하였다.

<135> **비교예 13. 비교예 2의 올레일 노나라이신아미드(oleyl nonalysinamide)를 함유하는 양이온성 리포좀 제조**

<136> 비교예 2에서 제조한 양이온성 지질인 올레일 노나라이신아미드(oleyl nonalysinamide)와 세포 융합성 인지질인 DPhPE(Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후 몰비 1:1의 비율로 취해 파이렉스 10ml 유리 격막 바이알에 넣어 혼합한 후 실시예 5와 동일한 방법으로 양이온성 리포좀을 제조하였다.

<137> **비교예 14. 비교예 4의 리놀레일 아르기닌아미드(linoleyl argininamide) 을 함유하는 양이온성 리포좀 제조**

<138> 비교예 4에서 제조한 양이온성 지질인 리놀레일 아르기닌아미드(linoleyl argininamide) 와 세포 융합성 인지질인 DOPE(Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후 몰비 1:1의 비율로 취해 파이렉스 10ml 유리 격막 바이알에 넣어 혼합한 후 실시예 5와 동일한 방법으로 양이온성 리포좀을 제조하였다.

<139> **비교예 15. 비교예 3의 스테아릴 데카라이신아미드(stearyl decalysinamide)를 함유하는 양이온성 미셀 제조**

<140> 비교예 3에서 제조한 양이온성 지질인 스테아릴 데카라이신아미드(stearyl decalysinamide)와 계면활성제인 트윈 20을 1:1의 몰 비율로 취하여 혼합한 다음, 실시예 7과 동일한 방법으로 양이온성 미셀을 제조하였다.

<141> **비교예 16. 비교예 7의 아라키딜 노나아르기닌아미드(arachidyl nonaargininamide)를 함유하는 양이온성 에멀젼 제조**

<142> 비교예 7에서 제조한 양이온성 지질인 아라키딜 노나아르기닌아미드(arachidyl nonaargininamide)와 트윈 80을 1: 0.1의 몰 비율로 혼합하고 혼합물을 인산 완충용액에 1:10의 부피 비율로 가한 다음, 실시예 9와 동일한 방법으로 양이온성 에멀젼을 제조하였다.

<143> **비교예 17. 비교예 8의 올레일 데카아르기닌아미드(oleyl dacaargininamide)를 함유하는 양이온성 에멀젼 제조**

<144> 비교예 8에서 제조한 양이온성 지질인 올레일 데카아르기닌아미드(oleyl dacaargininamide)와 트윈 20을 1: 0.1의 몰 비율로 혼합하고 혼합물을 인산 완충용액에 1:10의 부피 비율로 가한 다음, 실시예 9와 동일한 방법으로 양이온성 에멀젼을 제조하였다.

<145> **비교예 18. 비교예 4의 리놀레일 아르기닌아미드(linoleyl argininamide) 및 엽산 지질 유도체를 함유하는 양이온성 리포좀 제조**

<146> 비교예 4에서 제조한 양이온성 지질인 리놀레일 아르기닌아미드(linoleoyl argininamide), 세포 융합성 인지질인 DOPE 및 엽산 지질 유도체인 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[folate(polyethylene glycol)-2000(Avanti Polar Lipid Inc., USA)을 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후 1:1:0.05의 몰 비율로 취하여 실시예 5와 동일한 방법으로 표면에 엽산 잔기 (folate moiety)가 존재하는 양이온성 리포좀을 제조하였다.

<147> **비교예 19. 비교예 1의 라우릴 라이신아미드(lauryl lysinamide) 및 갈락토오스 지질 유도체를 함유하는 양이온성 미셀 제조**

<148> 비교예 1에서 제조한 양이온성 지질인 라우릴 라이신아미드(lauryl lysinamide)와 갈락토오스 지질 유도체인 세리브로사이드(cerebroside) (Avanti Polar Lipid Inc., USA) 및 계면활성제인 트리톤 X-100을 각각 1:0.05:1의 몰 비율로 취하여 혼합한 다음, 실시예 7과 동일한 방법으로 표면에 갈락토오즈 잔기 (galactose moiety)가 존재하는 양이온성 미셀을 제조하였다.

<149> **[실험예]**

<150> **세포 배양**

<151> 사람의 자궁경부암 상피 세포인 HeLa 세포주, 폐암 세포인 A549 세포주, 간암 세포주인 Huh-7, 흑색종인 WM266.4와 A375 세포주, 신경교종인 U87 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)로부터 구입하여 사용하였다. HeLa, A549 세포주는 RPMI(Gibco, USA), Huh-7, A375, U87 세포주는 DMEM(Dulbecco's modified eagles medium, Gibco, USA), WM266.4 세포주는 MEM(Minimum Essential Medium, Gibco, USA)에 10% 우태아 혈청 w/v (HyClone laboratories Inc, USA)와 100 unit/ml 페니실린 또는 100㎍/ml 스트렙토마이신을 포함하여 배양하였다.

<152> **[실험예 I] 형광마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산을 이용한 핵산 전달 효율 평가**

<153> **I-1. WM266.4 세포주에서의 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 평가**

<154> WM266.4 세포주를 실험 전날 48 웰 플레이트에 웰 당 3×10^4 개씩 분주(seeding)하고 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 50 ㎕씩을 넣고 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산 물질인 BlockiT(Invitrogen, USA) 5pmole씩과 비교예 10, 14와 실시예 5에서 제조된 양이온성 리포좀 2㎕를 각각 첨가하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 37℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 미디어를 웰 당 200㎕씩 새 미디어로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 리보핵산 전달 효율을 관찰하였다.

<155> 도1은 비교예 10, 14와 실시예 5로부터 제조된 양이온성 리포좀의 핵산 전달 효율을 위상차와 형광 현미경(DMIL, Leica, Germany)으로 관찰한 것으로 도1A와 C는 비교예 10, 14 처리시의 위상차 현미경 사진이고, 도1E는 실시예 5의 조성 처리시의 위상차 현미경 사진이다. 또한 도1B와 D는 비교예 10, 14 처리시의 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산의 세포내 전달을 보여주는 형광 현미경 사진이고, 도1F는 실시예 5의 조성 처리시의 형광 현미경 사진이다. 본 도면으로부터 실시예 5에서 본 발명의 양이온성 지질을 함유하여 제조된 양이온성 리포좀이 비교예 10 및 14에서 제조된 공지 조성의 리포좀보다 WM266.4 세포내에서 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율을 증가시킨다는 사실을 알 수 있다.

<156> **I-2. HeLa 세포주에서의 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 평가**

<157> HeLa 세포주를 실험 전날 48 웰 플레이트에 웰 당 3×10^4 개씩 분주(seeding)하고 각 플레이트의 세포가 60-70% 정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 50 ㎕씩을 넣고 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산 물질인 BlockiT 5pmole씩과 비교예 11, 13과 실시예 6에서 제조된 양이온성 리포좀 2㎕를 각각 첨가하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 37℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 미디어를 웰 당 200㎕씩 새 미디어로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 리보핵산의 전달 효율을 관찰하였다.

<158> 도2는 비교예 11, 13과 실시예 6으로부터 제조된 양이온성 리포좀의 핵산 전달 효율을 위상차 현미경과 형광 현미경으로 관찰한 것으로 도2A와 C는 비교예 11, 13 처리시의 위상차 현미경 사진이고, 도2E는 실시예 6의 조성 처리시의 위상차 현미경 사진이다. 또한 도2B와 D는 비교예 11, 13 처리시의 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산의 세포내 전달을 보여주는 형광 현미경 사진이고, 도2F는 실시예 6의 조성 처리시의 형광 현미경 사진이다. 본 도면으로부터 실시예 6에서 본 발명의 양이온성 지질을 함유하여 제조된 양이온성 리포좀이 비교예 11, 13에서 제조된 공지 조성의 리포좀보다 HeLa 세포내에서 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율을 증가시킨다는 사실을 알 수 있다.

<159> **I-3. U87 세포주에서의 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 평가**

<160> U87 세포주를 실험 전날 48 웰 플레이트에 웰 당 3×10^4 개씩 분주(seeding)하고 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 50 ㎕씩을 넣고 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산 물질인 BlockiT 5pmole씩과 비교예 12, 19와 실시예 13에서 제조된 양이온성 리포좀 및 미셀 2㎕를 각각 첨가하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 37℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 미디어를 웰 당 200㎕씩 새 미디어로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 리보핵산 전달 효율을 관찰하였다.

<161> 도3은 비교예 12, 19와 실시예 13로부터 제조된 양이온성 리포좀 및 미셀의 핵산 전달 효율을 위상차 현미경과 형광 현미경으로 관찰한 것으로 도3A와 C는 비교예 12, 19 처리시의 위상차 현미경 사진이고, 도3E는 실시예 13의 조성 처리시의 위상차 현미경 사진이다. 또한 도3B와 D는 비교예 12, 19 처리시의 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산의 세포내 전달을 보여주는 형광 현미경 사진이고, 도3F는 실시예 13의 조성 처리시의 형광 현미경 사진이다. 본 도면으로부터 실시예 13에서 본 발명의 양이온성 지질을 함유하여 제조된 양이온성 미셀이 비교예 12, 19에서 제조된 공지 조성의 리포좀 및 미셀보다 U87 세포내에서 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율을 증가시킨다는 사실을 알 수 있다.

<162> **[실험예 II] 형광 유세포 분석법 (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)을 이용한 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 측정**

<163> **II-1. A549 세포주에서의 형광 유세포 분석법 (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)을 이용한 작은 간**

섭 리보핵산의 전달 효율 측정

<164> A549 세포주를 실험 전날 6 웰 플레이트에 웰 당 3×10^5개씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 100㎕씩을 넣고 형광표지된 이중나선 리보핵산인 BlockiT 20pmole씩과 비교예 12, 15와 실시예 8에서 제조된 양이온성 미셀 또는 리포좀 6 ㎕를 각각 첨가하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다.

<165> 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 수집한 후 PBS로 2번 세척하였다. 형광표지된 이중나선 리보핵산이 들어간 세포들을 형광 유세포 분석기인 BD FACS CALIBUR(BD Bioscience, USA)를 사용하여 형광 강도 피크의 이동에 의한 세포내 전달 효율을 분석하였다. 이를 도4에 나타내었다. 도4A의 세포에 아무 처리하지 않은 미처리군은 대조군으로 리보핵산이 세포 내로 전달되지 않아 피크가 거의 이동하지 않았고, 도4B는 비교예 12에서 제조된 리포좀, 도4C는 비교예 15에서 제조된 공지 조성의 미셀로 처리한 세포군으로 도4B는 리보핵산이 44.79%, 도4C는 58.93% 전달되었다. 반면, 본 발명의 실시예 8 처리군의 경우 84.78% 을 나타내어 비교예 12, 15 처리군에 비하여 세포내 전달효율이 증가되었다.

<166> 따라서 본 발명의 실시예 8에서 제조된 양이온성 미셀이 비교예 12, 15에서 제조된 리포좀 또는 미셀보다 A549 세포 내에서 리보핵산 전달 효율이 증가되었음을 알 수 있었다.

<167> **II-2. A375 세포주에서의 형광 유세포 분석법 (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)을 이용한 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 측정**

<168> A375 세포주를 실험 전날 6 웰 플레이트에 웰 당 3×10^5개씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 100㎕씩을 넣고 형광표지된 이중나선 리보핵산인 BlockiT 20pmole씩과 비교예 14, 16과 실시예 9에서 제조된 양이온성 리포좀 또는 에멀젼 6 ㎕를 각각 첨가하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다.

<169> 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 수집한 후 PBS로 2번 세척하였다. 형광표지된 이중나선 리보핵산이 들어간 세포들을 형광 유세포 분석기인 BD FACS CALIBUR를 사용하여 형광 강도 피크의 이동에 의한 세포내 전달 효율을 분석하였다. 이를 도5에 나타내었다. 도5A의 세포에 아무 처리하지 않은 미처리군은 대조군으로 리보핵산이 세포 내로 전달되지 않아 피크가 거의 이동하지 않았고, 도5B는 비교예 14에서 제조된 공지조성의 리포좀으로 처리한 세포군이고, 도5C는 비교예 16에서 제조된 공지 조성의 에멀젼으로 처리한 세포군으로 도5B는 유전자가 55.59%, 도5C는 51.89% 전달되었다. 반면, 본 발명의 실시예 9 처리군의 경우 89.69% 을 나타내어 비교예 14, 16 처리군에 비하여 세포내 전달효율이 증가되었다.

<170> 따라서 본 발명의 실시예 9에서 제조된 양이온성 에멀젼이 비교예 14, 16에서 제조된 리포좀 및 에멀젼보다 A375세포 내에서 리보핵산 전달 효율이 증가되었음을 알 수 있었다.

<171> **II-3. Huh-7 세포주에서의 형광 유세포 분석법 (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)을 이용한 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 측정**

<172> Huh-7 세포주를 실험 전날 6 웰 플레이트에 웰 당 3×10^5개씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 100㎕씩을 넣고 형광표지된 핵산 앱타머와 비교예 10, 18과 실시예 15에서 제조된 양이온성 리포좀 6 ㎕를 각각 첨가하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다.

<173> 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 수집한 후 PBS로 2번 세척하였다. 형광표지된 이중나선 리보핵산이 들어간 세포들을 형광 유세포 분석기인 BD FACS CALIBUR를 사용하여 형광 강도 피크의 이동에 의한 세포내 전달 효율을 분석하였다. 이를 도 6에 나타내었다. 도6A의 세포에 아무 처리하지 않은 미처리군은 대조군으로 유전자가 세포 내로 전달되지 않아 피크가 거의 이동하지 않았고, 도6B는 비교예 10, 도6C는 비교예 18에서 제조된 공지 조성의 리포좀으로 처리한 세포군으로 도6B는 리보핵산이 42.08%, 도6C는 38.16% 전달되었다. 반면, 본 발명의 실시예 15 처리군의 경우 85.53% 을 나타내어 비교예 10, 18 처리군에 비하여 세포내 전달효율이 증가되었다.

<174> 따라서 본 발명의 실시예 15에서 제조된 양이온성 리포좀이 비교예 10, 18에서 제조된 리포좀보다 Huh-7세포 내

에서 리보핵산 전달 효율이 증가되었음을 알 수 있었다.

<175> **[실험예 III] 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 작은간섭 리보핵산 전달 효능 평가**

<176> **III-1. A375 세포주에서의 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 작은간섭 리보핵산 전달 효능 평가**

<177> A375 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 세포를 8×10^4 씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 25㎕씩을 넣고, siRNA와 비교예 9, 13, 16과 실시예 6에서 제조된 양이온성 리포좀 또는 에멀젼을 각각 4㎕씩 첨가하였다. 서바이빈(survivin) 유전자(Gene bank accession number: NM_001168)의 발현 억제를 유도하기 위한 siRNA는 삼천리제약(Samchully Pharmaceuticals, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 미디어에 포함된 siRNA의 최종 농도는 100nM이 되게 맞추었다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하고 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포내에 존재하는 전체 리보핵산 (RNA)을 분리하였으며, 이 RNA는 AccuPowerRT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사 하였다. 서바이빈(survivin)에 특이적인 프라이머의 서열은 5'-GGACCACCGCATCTCTACAT-3'(정방향), 5'-CTTTCTCCGCAGTTTCCTCA-3'(역방향)이며 중합효소연쇄반응은 95℃에서 5분 반응 후, 95℃에서 1분, 59℃에서 1분, 72℃에서 30초를 30번 반복한 후 72℃에서 5분 더 반응시켜주었다. 생성물의 크기는 347 염기쌍이었다. 서바이빈(survivin) 유전자 발현의 정도는 서바이빈 특이적인 연쇄반응 생성물의 밴드 밀도를 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 증폭하여 나타나는 밴드 밀도로 보정하여 정량적인 발현의 변화를 측정하였다.

<178> 도7은 각각의 조성을 처리한 경우 A375 세포내에서 타겟 유전자인 서바이빈의 전사체 발현을 비교한 것이다. 대조군은 유전자가 세포 내로 전달되지 않아 서바이빈 유전자의 발현에 변화가 없었고, 비교예 13에서 제조된 양이온성 리포좀, 비교예 16에서 제조된 양이온성 에멀젼과 시판품인 비교예 9는 실시예 6에서 제조된 양이온성 리포좀보다 서바이빈 유전자의 발현 감소 효능이 낮은 것으로 관찰되었다. 이와 같은 결과에서 알 수 있듯이, 실시예 6에서 제조된 양이온성 리포좀이 흑색종 세포 내로 작은간섭 리보핵산물질을 전달하여 표적유전자의 발현을 선택적으로 억제시킴을 알 수 있었다.

<179> **III-2. HeLa 세포주에서의 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 안티센스 올리고 핵산 전달 효능 평가**

<180> HeLa 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 세포를 8×10^4 씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 25㎕씩을 넣고, 안티센스 올리고핵산과 비교예 9, 11, 16에서 제조된 양이온성 리포좀 또는 에멀젼과 실시예 12에서 제조된 양이온성 리포좀을 각각 4㎕씩 첨가하였다. 비씨엘2(Bcl2) 유전자(Gene bank accession number: NM_000633)의 발현 억제를 유도하기 위한 안티센스 올리고핵산으로는 바이오니아(Bioneer, Deajeon, Korea)에서 합성 주문한 것(5'-TCT CCC AGC GTG CGC CAT-3')을 사용하였다. 미디어에 포함된 안티센스 올리고핵산의 최종 농도는 100nM이 되게 맞추었다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하고 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포내에 존재하는 전체 리보핵산 (RNA)을 분리하였으며, 이 RNA는 AccuPowerRT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사 하였다. 비씨엘2 (Bcl2)에 특이적인 프라이머의 서열은 5'-ATG GCG CAC GCT GGG AGA AC-3'(왼쪽), 5'-GCG GTA GCG GCG GGA GAA GT-3'(오른쪽)이며 중합효소연쇄반응은 95℃에서 5분 반응 후, 95℃에서 1분, 53℃에서 1분, 72℃에서 50초를 32번 반복한 후 72℃에서 5분 더 반응시켜주었다. 생성물의 크기는 327염기쌍이었다. 비씨엘2 (Bcl2) 전사체 발현의 정도는 비씨엘2 특이적인 연쇄반응 생성물의 밴드 밀도를 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 증폭하여 나타나는 밴드 밀도로 보정하여 정량적인 발현의 변화를 측정하였다.

<181> 도8은 각각의 조성을 처리한 경우 HeLa 세포내에서 타겟 유전자인 비씨엘2의 전사체 발현을 비교한 것이다. 대조군은 유전자가 세포 내로 전달되지 않아 비씨엘2 유전자의 발현에 변화가 없었고, 비교예 11에서 제조된 양이온성 리포좀, 비교예 16에서 제조된 양이온성 에멀젼과 시판품인 비교예 9는 실시예 12에서 제조된 양이온성 리포좀보다 비씨엘2 유전자의 발현억제 효능이 유의적으로 낮은 것이 관찰되었다. 이와 같은 결과에서 알 수 있듯이, 실시예 12에서 제조된 양이온성 리포좀이 자궁경부암 세포주 내로 안티센스 올리고핵산 물질을 전달하여 표적유전자의 발현을 선택적으로 억제시킴을 알 수 있었다.

<182>

<183> **III-3. A549 세포주에서의 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 작은간섭 리보핵산 전달 효능 평가**

<184> A549 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 세포를 8×10^4 씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 25㎕씩을 넣고, 서바이빈 siRNA와 비교예 9, 15, 19와 실시예 11에서 제조된 양이온성 리포좀 또는 미셀을 각각 4㎕씩 첨가하였다. 미디어에 포함된 siRNA의 최종 농도는 100nM이 되게 맞추었다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하고 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포내에 존재하는 전체 리보핵산 (RNA)을 분리하였으며, 이 RNA는 AccuPowerRT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사 하였다. 서바이빈(survivin) 유전자 발현의 정도는 서바이빈 특이적인 연쇄반응 생성물의 밴드 밀도를 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 증폭하여 나타나는 밴드 밀도로 보정하여 정량적인 발현의 변화를 측정하였다.

<185> 도9는 각각의 조성을 처리한 경우 A549 세포내에서 타겟 유전자인 서바이빈의 전사체 발현을 비교한 것이다. 대조군은 유전자가 세포 내로 전달되지 않아 서바이빈 유전자의 발현에 변화가 없었고, 비교예 15, 19에서 제조된 양이온성 미셀과 시판품 양이온성 리포좀인 비교예 9는 실시예 11에서 제조된 양이온성 리포좀보다 서바이빈 유전자의 발현 억제 효능이 유의적으로 낮은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과에서 알 수 있듯이, 실시예 11에서 제조된 양이온성 리포좀이 폐암 세포주 내로 작은간섭 리보핵산물질을 전달하여 표적유전자의 발현을 보다 효과적으로 억제시킴을 알 수 있었다.

<186> **[실험예 IV] 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)을 사용한 세포독성 평가**

<187> **IV-1. WM266.4 세포주에서의 세포독성 평가**

<188> 본 발명의 신규 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체의 세포 독성에 관한 평가를 하기 위하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다. WM266.4 세포에 실시예 7의 양이온성 미셀과 비교예 9, 12, 16에서 제조한 양이온성 리포좀 또는 에멀젼과 작은간섭 리보핵산의 복합체 조성을 처리하고 세포 독성을 평가하였다. 핵산 전달체만의 세포 독성을 명확히 평가하기 위하여 siRNA는 세포내에서 활성이 없는 스크램블 서열을 사용하였다. 세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 시약에 의한 방법으로 평가하였다.

<189> 세포를 웰 당 2×10^4 세포가 되도록 48 웰(well)에 분주 (seeding)하고 12시간 배양한 후 실시예 7의 양이온성 미셀과 비교예 9, 12, 16에서 제조한 양이온성 리포좀 또는 에멀젼과 siRNA의 복합체 조성을 처리하였다. 24시간 경과 후 각각 MTT 용액을 배지의 10%가 되도록 가하고, 4시간 더 배양한 다음 상층액을 제거하고 0.04 N 염산 이소프로판올 용액을 첨가한 후에 엘라이져 리더 (ELISA reader, Sunrise-Basic TECAN, M, Switzerland)를 이용하여 570 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 세포가 사용되었다. 도10은 실시예 7에서 제조된 양이온성 미셀과 siRNA 복합체의 세포독성 실험을 수행한 결과로 실시예 7의 양이온성 미셀과 siRNA의 복합체는 비교예 9, 12, 16의 양이온성 제형들과 비교하여 큰 세포 독성을 나타내지 않았고 따라서 도 10으로부터 실시예 7에서 제조된 본 발명의 양이온성 미셀은 사람의 흑색종 세포주에 대해 심각한 독성을 나타내지 않는다는 사실을 알 수 있고 또한, 본 발명의 양이온성 지질보다 수식하는 양이온성 아미노산의 개수가 많은 지질로 제조된 비교예 12 및 비교예 16의 경우 독성이 증가한다는 사실을 알 수 있다.

<190> **IV-2. Huh-7 세포주에서의 세포독성 평가**

<191> 본 발명의 신규 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체의 세포 독성에 관한 평가를 하기 위하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다. Huh-7 세포에 실시예 10과 비교예 9, 13, 17에서 제조한 양이온성 에멀젼 또는 리포좀과 작은간섭 리보핵산의 복합체 조성을 처리하고 세포 독성을 평가하였다. 핵산 전달체만의 세포 독성을 명확히 평가하기 위하여 siRNA는 세포내에서 활성이 없는 스크램블 서열을 사용하였다. 세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 시약에 의한 방법으로 평가하였다.

<192> 세포를 웰 당 2×10^4 세포가 되도록 48 웰(well)에 분주 (seeding)하고 12시간 배양한 후 실시예 10, 비교예 9, 13, 17에서 제조한 양이온성 제형 (formulations)들과 siRNA의 복합체 조성을 처리하였다. 24시간 경과 후 각각 MTT 용액을 배지의 10%가 되도록 가하고, 4시간 더 배양한 다음 상층액을 제거하고 0.04 N 염산 이소프로판올 용액을 첨가한 후에 엘라이져 리더 (ELISA reader)를 이용하여 570 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 세포가 사용되었다.

<193> 도11은 실시예 10에서 제조된 양이온성 에멀젼과 siRNA 복합체의 세포독성 실험을 수행한 결과로 실시예 10의

양이온성 에멀젼과 siRNA의 복합체는 비교예 9, 13, 17의 전달체들과 비교하여 큰 세포 독성을 나타내지 않았고 따라서 도 11로부터 실시예 10에서 제조된 본 발명의 양이온성 에멀젼은 사람의 흑색종 세포주에 대해 심각한 독성을 나타내지 않는다는 사실을 알 수 있다. 또한, 본 발명의 양이온성 지질보다 수식하는 양이온성 아미노산의 개수가 많은 경우 독성이 증가한다는 것을 비교예 13, 17의 독성 결과에서 알 수 있다.

<194> **IV-3. U87 세포주에서의 세포독성 평가**

<195> 본 발명의 신규 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체의 세포 독성에 관한 평가를 하기 위하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다. U87 세포에 실시예 14와 비교예 9, 13, 15에서 제조한 양이온성 에멀젼, 리포좀, 또는 미셀과 작은간섭 리보핵산의 복합체 조성을 처리하고 세포 독성을 평가하였다. 핵산 전달체만의 세포 독성을 명확히 평가하기 위하여 siRNA는 세포내에서 활성이 없는 스크램블 서열을 사용하였다. 세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 시약에 의한 방법으로 평가하였다.

<196> 세포를 웰 당 2×10^4 세포가 되도록 48 웰(well)에 분주 (seeding)하고 12시간 배양한 후 실시예 14과 비교예 9, 13, 15에서 제조한 양이온성 에멀젼, 미셀 또는 리포좀과 siRNA의 복합체 조성을 처리하였다. 24시간 경과 후 각각 MTT 용액을 배지의 10%가 되도록 가하고, 4시간 더 배양한 다음 상층액을 제거하고 0.04 N 염산 이소프로판올 용액을 첨가한 후에 엘라이져 리더 (ELISA reader)를 이용하여 570 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 세포가 사용되었다.

<197> 도12는 실시예 14에서 제조된 양이온성 에멀젼과 siRNA 복합체의 세포독성 실험을 수행한 결과로 실시예 14의 양이온성 에멀젼과 siRNA의 복합체는 비교예 9, 13, 15의 전달체와 siRNA의 복합체에 비교하여 큰 세포 독성을 나타내지 않았다. 따라서 도 12로부터 실시예 14에서 제조된 양이온성 에멀젼은 사람의 신경교종 세포주에 대해 심각한 독성을 나타내지 않는다는 사실을 알 수 있고 또한, 본 발명의 양이온성 지질보다 수식하는 양이온성 아미노산의 개수가 많은 지질로 제조된 비교예 13, 15의 경우 증가된 세포독성을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

<198> 도 1은 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 사용하여 사람의 흑색종 세포인 WM266.4에서 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율을 보여주는 사진이다.

<199> 도 2는 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 사용하여 사람의 자궁경부암 세포인 HeLa에서 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율을 보여주는 사진이다.

<200> 도 3은 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 사용하여 사람의 신경교종 세포인 U87에서 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율을 보여주는 사진이다.

<201> 도 4는 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 사용하여 사람의 폐암 세포인 A549에서 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율 정도를 형광 유세포분석기 (FACS)를 사용해 분석한 결과이다.

<202> 도 5는 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 사용하여 사람의 흑색종 세포인 A375에서 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율 정도를 형광 유세포분석기 (FACS)를 사용해 분석한 결과이다.

<203> 도 6은 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 사용하여 사람의 간암 세포인 Huh-7에서 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율 정도를 형광 유세포분석기 (FACS)를 사용해 분석한 결과이다.

<204> 도 7은 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체를 이용하여 서바이빈 발현 억제 siRNA에 의해 매개된 서바이빈 전사체 발현 억제 효능을 사람의 흑색종 세포주인 A375에서 역전사 중합효소 연쇄반응으로 확인한 결과를 보여준다.

<205> 도 8은 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체를 이용하여 비씨엘2 발현 억제 안티센스 올리고핵산에 의해 매개된 비씨엘2 전사체 발현 억제 효능을 사람의 자궁경부암 세포주인 HeLa에서 역전사 중합효소 연쇄반응으로 확인한 결과를 보여준다.

<206> 도 9는 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체를 이용하여 서바이빈 발현 억제 siRNA에 의해 매개된 서바이빈 전사체 발현 억제 효능을 사람의 폐암 세포주인 A549에서 역전사 중합효소 연쇄반응으로 확인한 결과

를 보여준다.

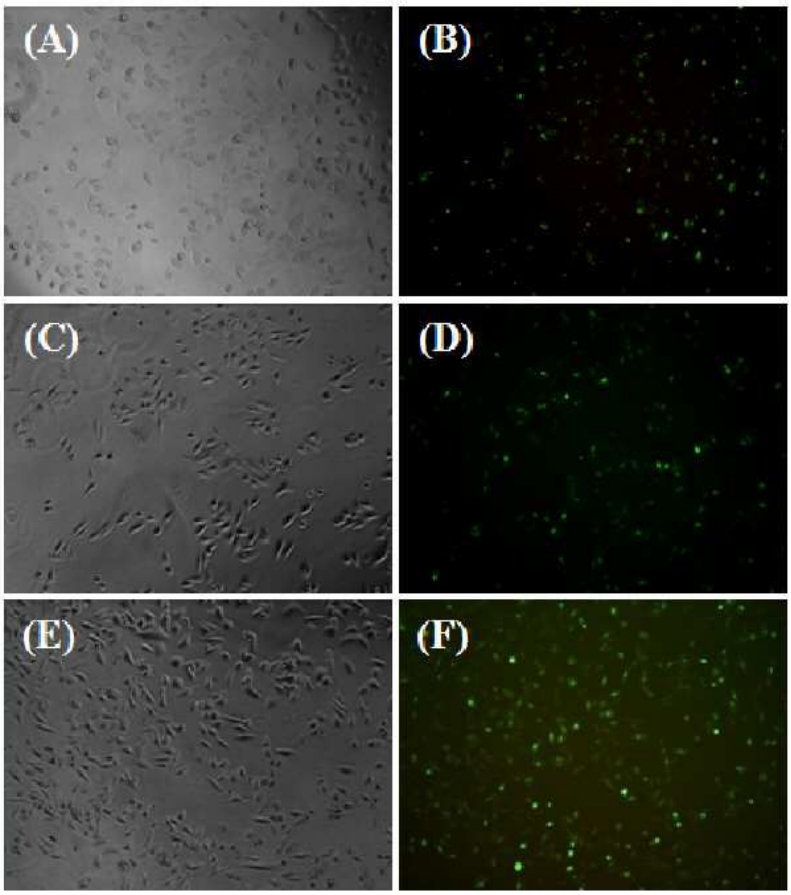
<207> 도 10은 MTT (tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium bromide) 염색법을 사용하여 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체의 세포독성을 사람의 흑색종 세포주인 WM266.4에서 확인한 결과를 보여준다.

<208> 도 11은 MTT (tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium bromide) 염색법을 사용하여 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체의 세포독성을 사람의 간암 세포주인 Huh-7에서 확인한 결과를 보여준다.

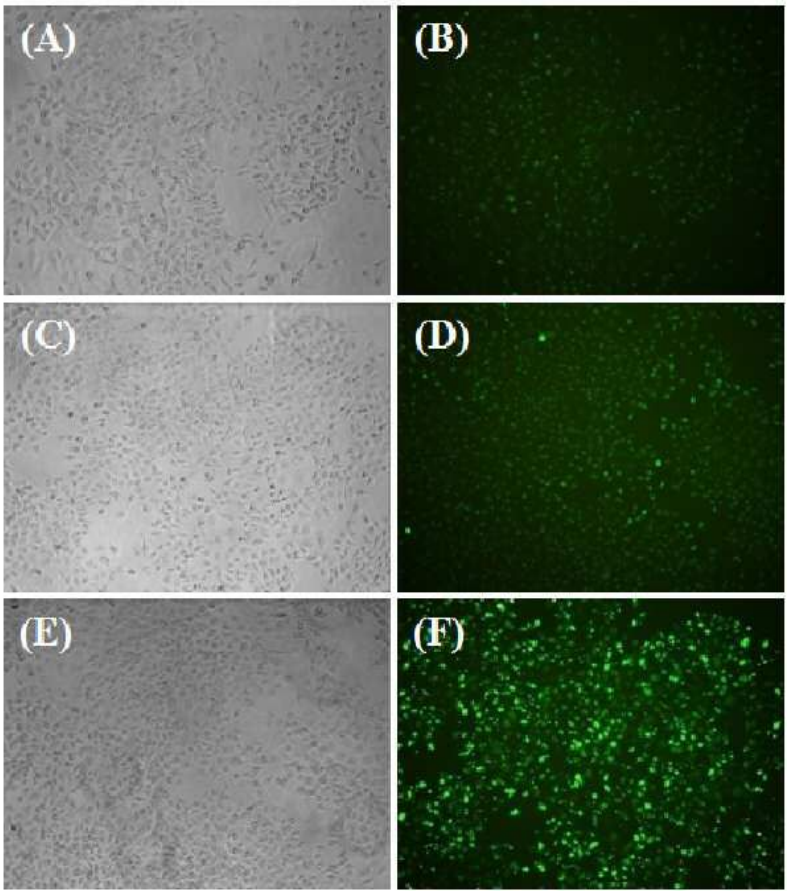
<209> 도 12는 MTT (tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium bromide) 염색법을 사용하여 본 발명의 양이온성 지질을 포함하는 핵산 전달체의 세포독성을 사람의 신경교종 세포주인 U87에서 확인한 결과를 보여준다.

도면

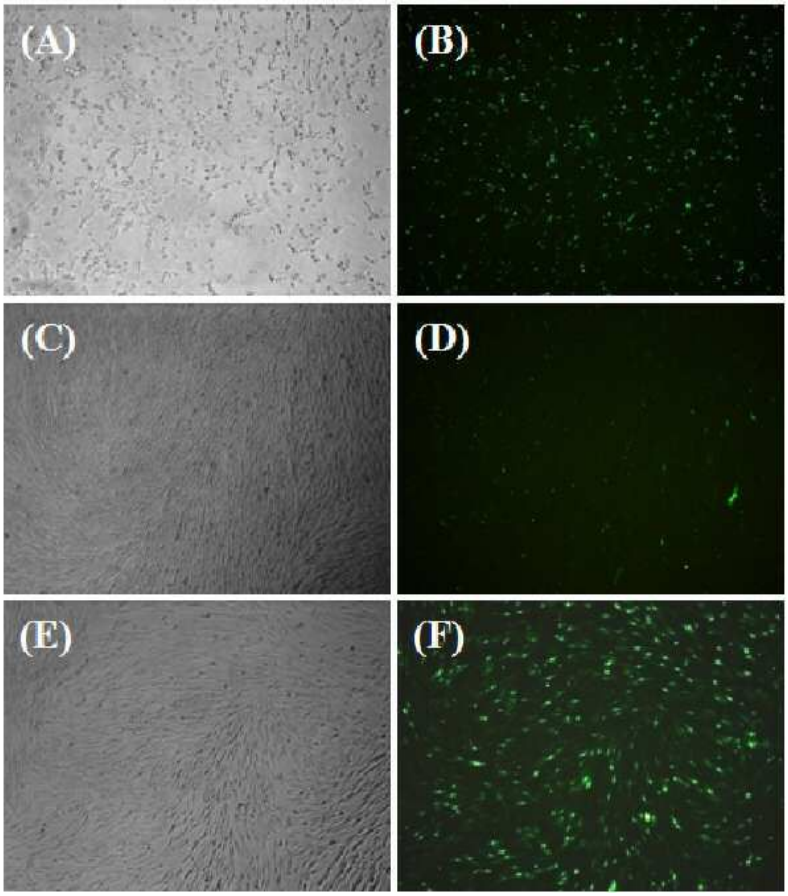
도면1



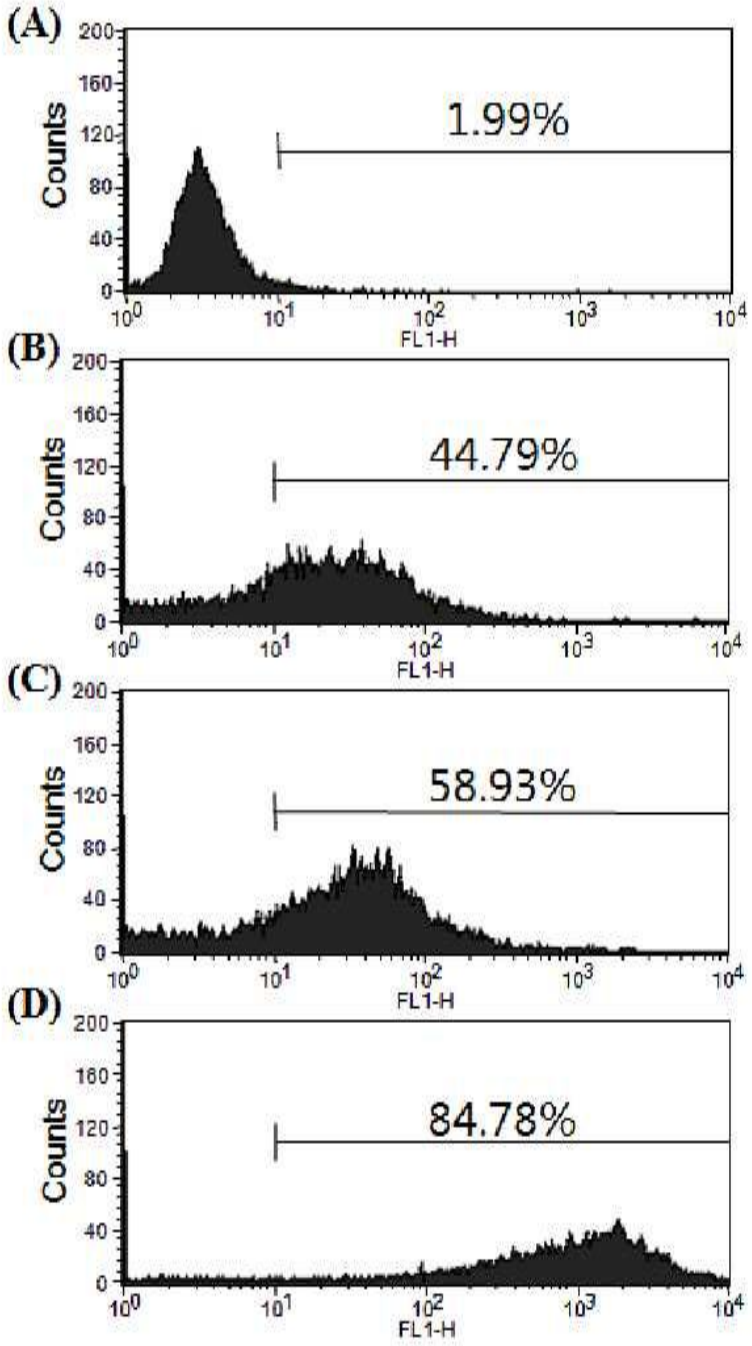
도면2



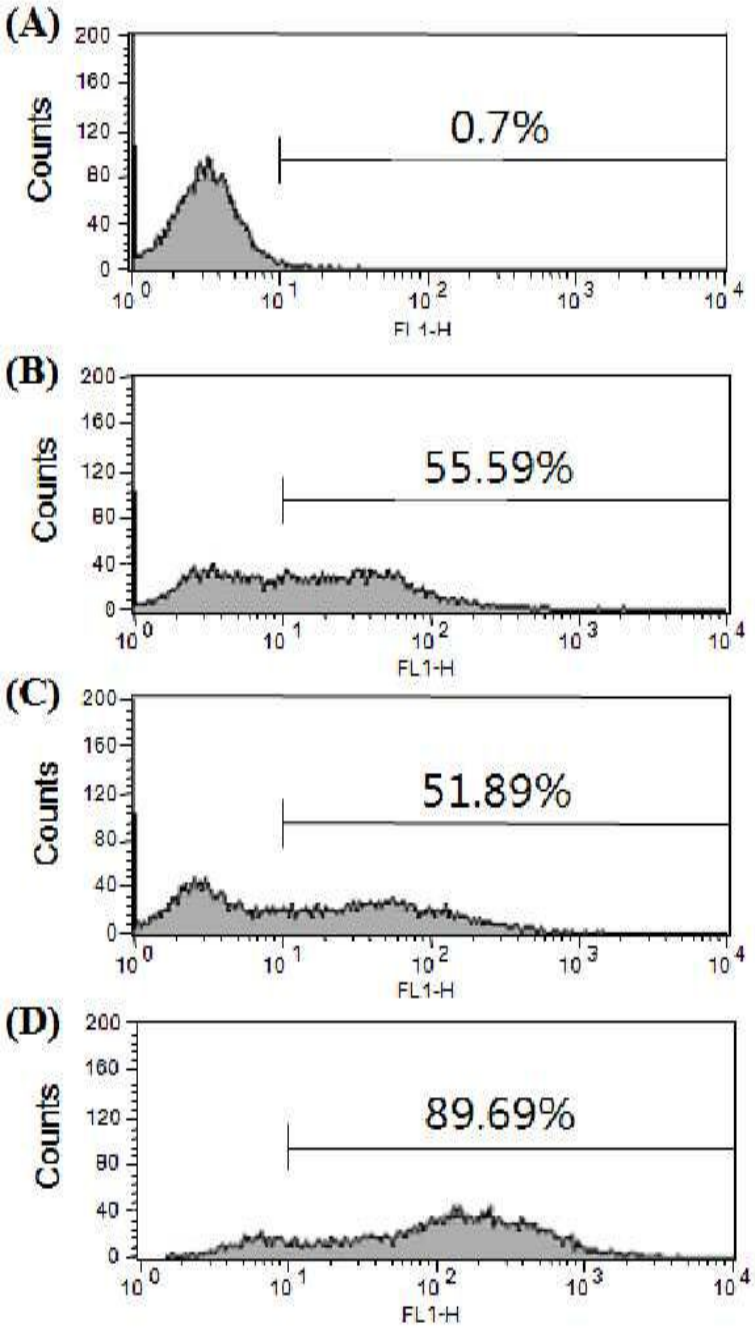
도면3



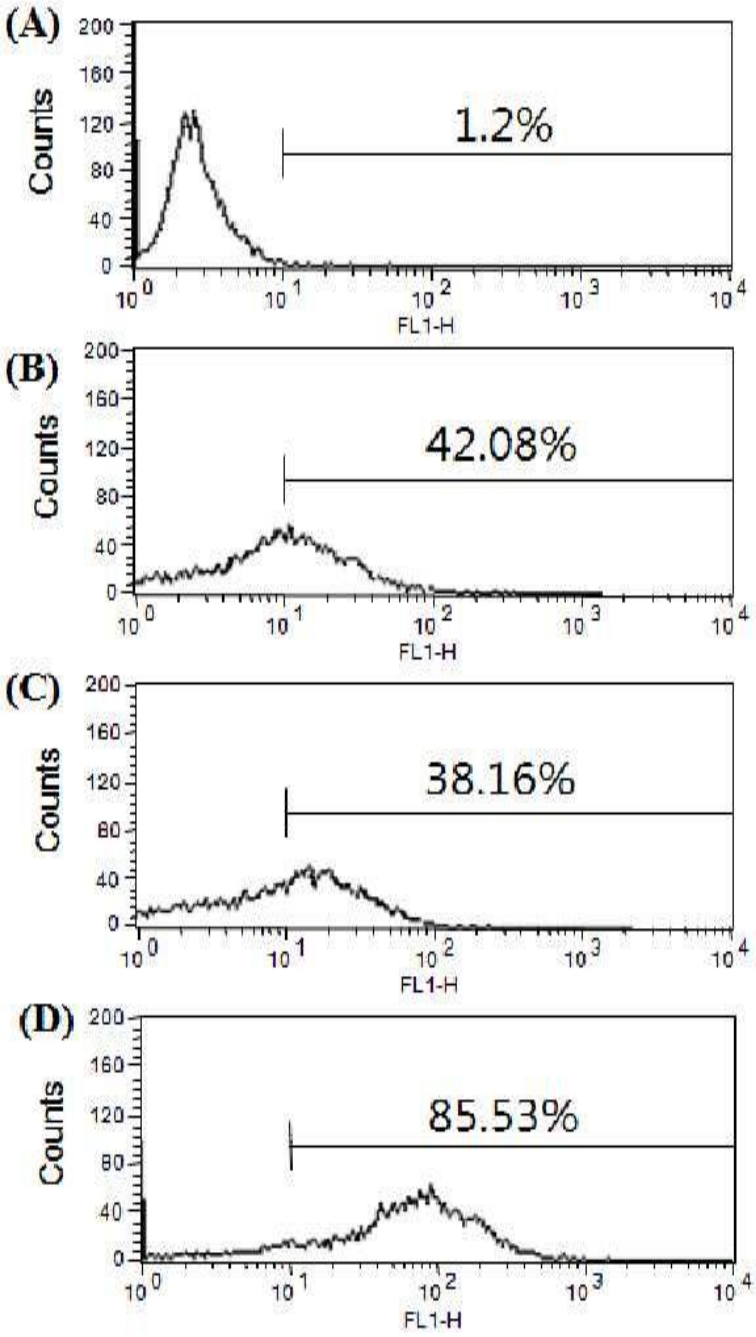
도면4


(A)
1.99%
Counts
FL1-H
(B)
44.79%
Counts
FL1-H
(C)
58.93%
Counts
FL1-H
(D)
84.78%
Counts
FL1-H

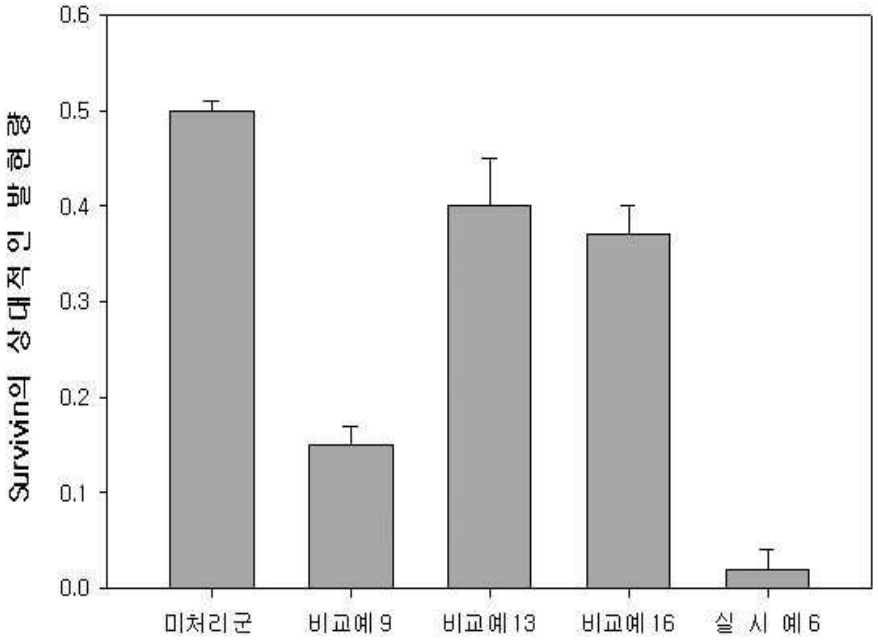
도면5


(A)
Counts
0.7%
FL1-H
(B)
Counts
55.59%
FL1-H
(C)
Counts
51.89%
FL1-H
(D)
Counts
89.69%
FL1-H

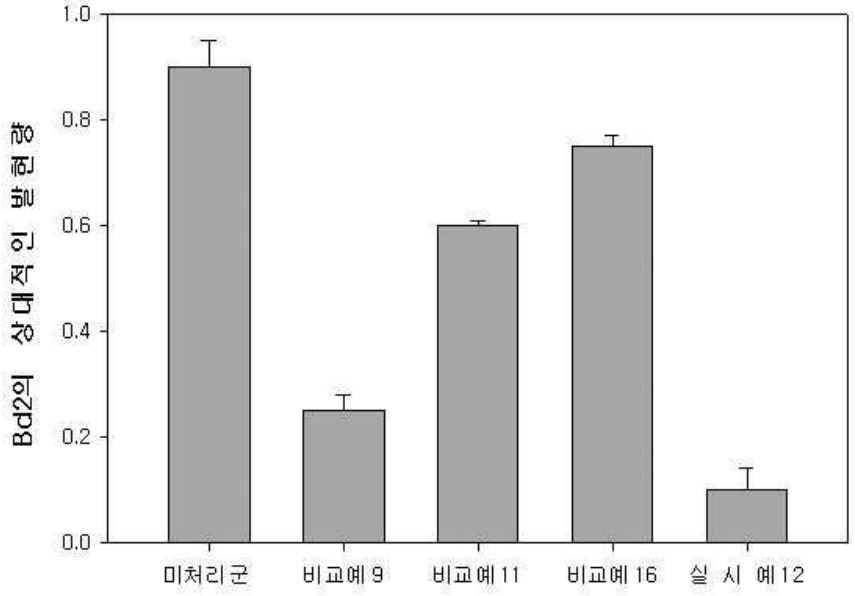
도면6


(A)
Counts
1.2%
FL1-H
(B)
Counts
42.08%
FL1-H
(C)
Counts
38.16%
FL1-H
(D)
Counts
85.53%
FL1-H

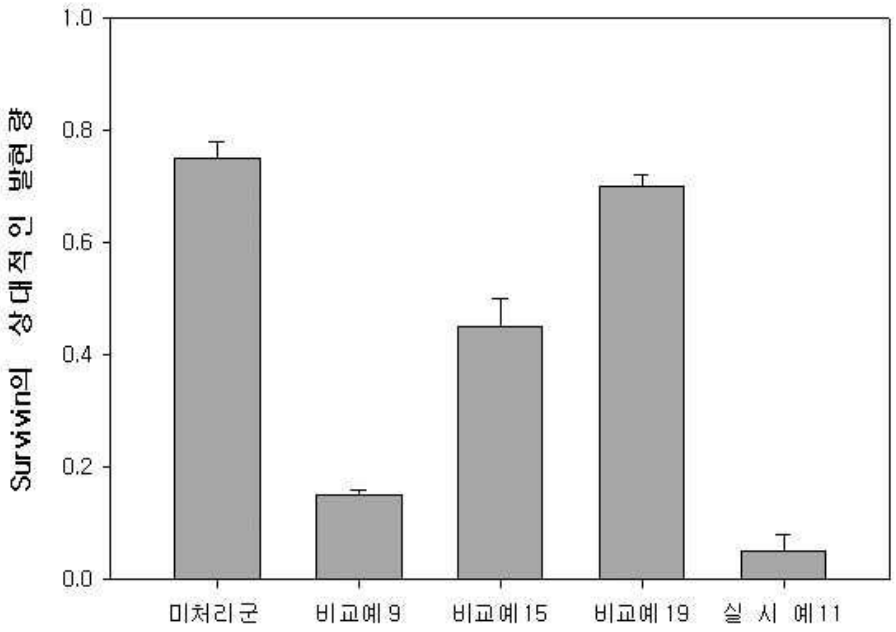
도면7


Survivin의 상대적인 발현량
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
미처리군
비교예 9
비교예 13
비교예 16
실 시 예 6

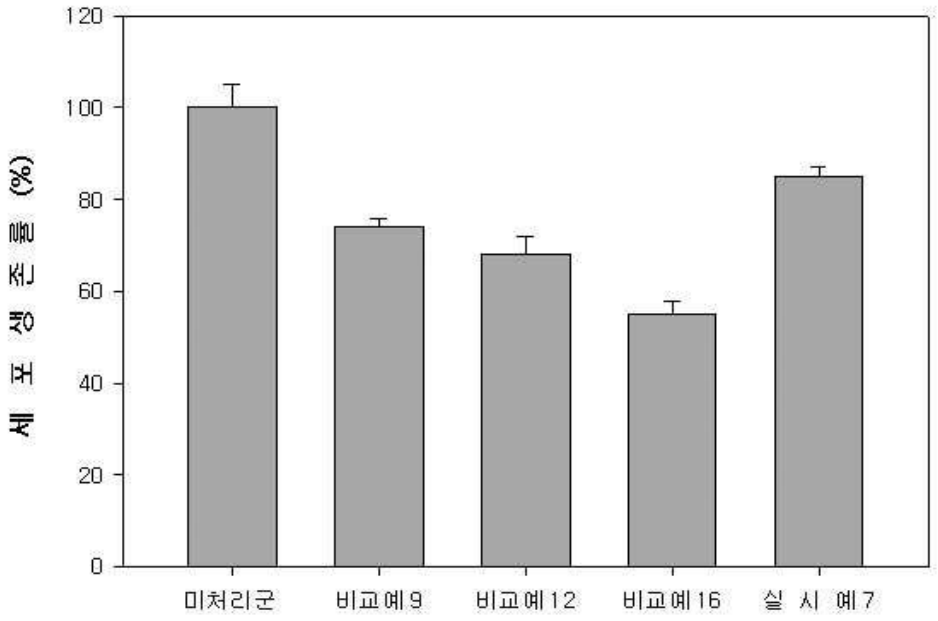
도면8


Bd2의 상대적인 발현량
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
미처리군
비교예 9
비교예 11
비교예 16
실 시 예 12

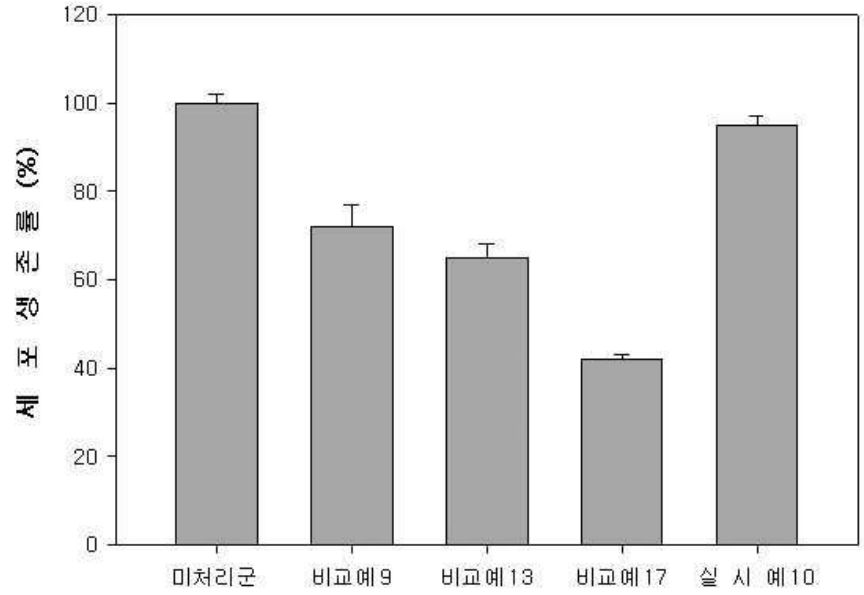
도면9


Survivin의 상대적인 발현량
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
미처리군
비교예9
비교예15
비교예19
실 시 예11

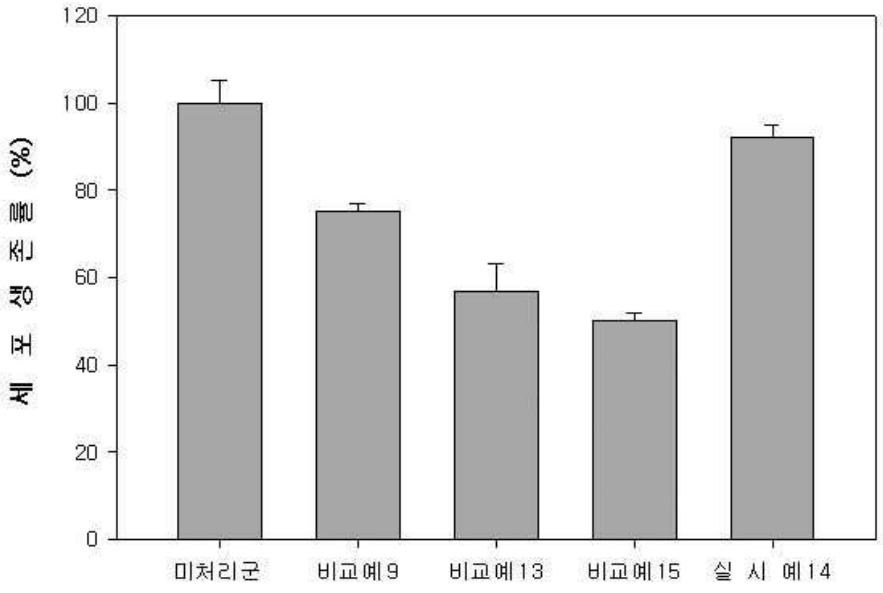
도면10


세포생존율 (%)
120
100
80
60
40
20
0
미처리군
비교예9
비교예12
비교예16
실 시 예7

도면11


세 포 생 존 률 (%)
120
100
80
60
40
20
0
미처리군
비교예9
비교예13
비교예17
실 시 예10

도면12


세 포 생 존 률 (%)
120
100
80
60
40
20
0
미처리군
비교예9
비교예13
비교예15
실 시 예14