(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년12월08일
(11) 등록번호 10-0930326
(24) 등록일자 2009년11월30일

(51) Int. Cl.
A61K 31/722 (2006.01) *A61K 31/203* (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0038844
(22) 출원일자 2009년05월04일
심사청구일자 2009년05월04일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020070072301 A

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
오유경
서울특별시 도봉구 도봉2동 삼환아파트 4-405
노상명
서울특별시 강동구 성내2동 112-55호
한수은
경기도 용인시 수지구 동천동 동천마을현대홈타운 아파트 206-1706
(74) 대리인
특허법인다나

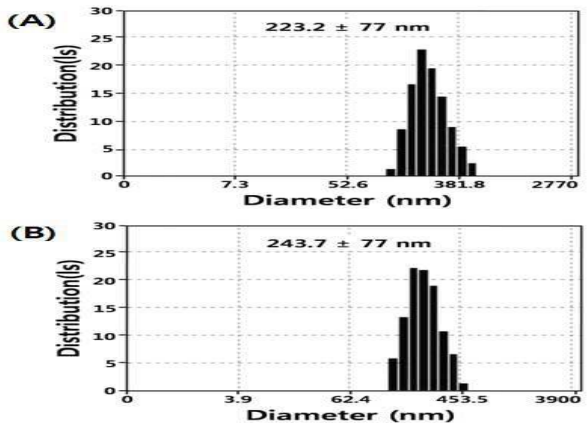
전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 박정웅

(54) 지용성 비타민 및 그 유도체로 유도된 신규한 양이온성 키토산, 그의 제조 방법 및 그를 포함하는 약물 전달체

(57) 요 약

본 발명은 키토산 또는 그 유도체가 지용성 비타민 또는 그 유도체와 결합된 양이온성 키토산 유도체, 그의 제조 방법 및 이를 포함하는 약물 전달체에 관한 것으로서, 본 발명의 양이온성 키토산 유도체는 세포 내로 전달하고자 하는 약제학적 유효성분을 세포 내로 수송하는 효율을 현저히 증강시킬 뿐만 아니라, 세포 독성을 감소시켜 약제학적 유효성분의 치료 효능을 증강시키는 용도로 유용하게 사용된다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

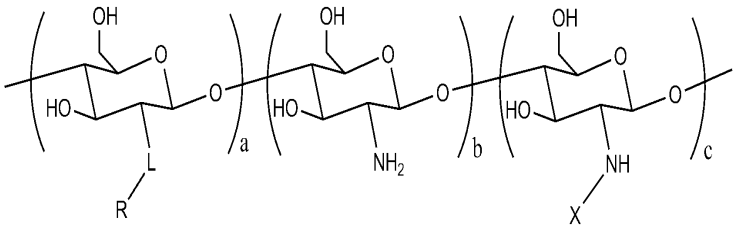
과제고유번호	F104AA01000308A010100310
부처명	과학기술부
연구사업명	뉴프론티어연구사업
연구과제명	유전자/세포치료제의 표적전달 시스템 개발
주관기관	한국과학기술연구원
연구기간	2008년 07월 31일 ~ 2009년 07월 30일

특허청구의 범위

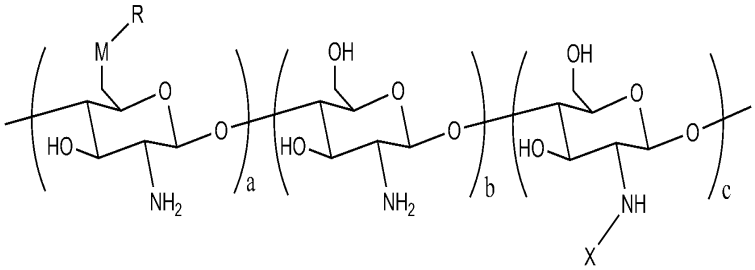
청구항 1

하기 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 가지는 양이온성 키토산 유도체:

[화학식 1]



[화학식 2]



상기 식에서 R은 레티놀(retinol), 9-시스-레티놀산(9-cis-retinoic acid), 13-시스-레티놀산(13-cis-retinoic acid), 올-트랜스-레티놀산(all-trans-retinoic acid), 에르고칼시페롤(ergocalciferol, vitamin D2), 비타민 D2 (6,19,19-d3)(Vitamin D2 (6,19,19-d3)), 콜레칼시페롤(cholecalciferol, vitamin D3), 비타민 D3 (6,19,19-d3)(vitamin D3 (6,19,19-d3)), (±)-알파-토코페롤((±)-α-tocopherol), (+)-알파-토코페롤((+)-α-tocopherol), (+)-베타-토코페롤((+)-β-tocopherol), 감마-토코페롤((+)-γ-tocopherol), 델타-토코페롤((+)-δ-tocopherol), 알파-토코페롤 숙시네이트(D-α-tocopherol succinate), 알파-토코페롤 폴리에틸렌글리콜(D-α-tocopherol polyethylene glycol), 알파-토코트리엔올(D-α-tocotrienol), (+)-베타-토코트리엔올((+)-β-tocotrienol), 델타-토코트리엔올(D-δ-tocotrienol), 및 감마-토코트리엔올(D-γ-tocotrienol)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 비타민 또는 그 유도체로부터 유도된 유기기를 나타내며,

L은 -CONH- 또는 -NHCOO-을 나타내고,

M은 -COO- 또는 $-O(CH_2)_2O-$를 나타내며,

X는 아세틸기, 메틸글리콜기, 갈락토실기, 락토실기 또는 말토실기를 나타내고,

a 및 b는 각각 독립적으로 1 내지 150의 정수를 나타내며,

c는 0 내지 50의 정수를 나타낸다.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서

c는 0인 양이온성 키토산 유도체.

청구항 5

제1항에 있어서,

c는 1 내지 50이고, X는 갈락토실, 락토실 또는 말토실을 나타내는 양이온성 키토산 유도체.

청구항 6

제1항에 있어서,

a와 b의 합이 2 내지 50이고,

R은 9-시스-레티놀산(9-cis-retinoic acid), 13-시스-레티놀산(13-cis-retinoic acid), 올-트랜스-레티놀산(all-trans-retinoic acid), (±)-알파-토코페롤((±)-α-tocopherol), 알파-토코페롤 숙시네이트(D-α-tocopherol succinate), (+)-알파-토코페롤((+)-α-tocopherol), 알파-토코페롤 폴리에틸렌글리콜(D-α-tocopherol polyethylene glycol), 및 알파-토코트리엔올(D-α-tocotrienol)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 비타민 또는 그 유도체로부터 유도된 유기기를 나타내는 양이온성 키토산 유도체.

청구항 7

용매의 존재 하에, 커플링제(coupling agent) 또는 보호기를 사용하여 키토산을 지용성 비타민과 반응시키는 단계를 포함하는 제1항의 양이온성 키토산 유도체의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

커플링제(coupling agent)는 EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide), DCC(Dicyclohexylcarbodiimide), DIC(diisopropylcarbodiimide), CDI(1,1'-Carbonyldiimidazole), 숙신이미딜 포밀벤조산(SFB, succinimidyl 4-formylbenzoate), C6-숙신이미딜 포밀벤조산(C6-SFB, C6-succinimidyl 4-formylbenzoate), 디숙신이미딜 글루탐산(DSG, Disuccinimidyl glutarate), 디숙신이미딜 수베르산(DSS, Disuccinimidyl suberate), 비스설포숙신이미딜 수베르산(BS3, Bis[sulfosuccinimidyl] suberate), HOBt(N-Hydroxybenzotriazole), 무수숙신산(succinic anhydride), NHS(N-hydroxysuccinimide) 및 sulfo-NHS로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상인 양이온성 키토산 유도체의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

보호기는 무수프탈산인 것을 특징으로 하는 양이온성 키토산 유도체의 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

반응은 친핵성 촉매의 존재 하에 진행되는 양이온성 키토산 유도체의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

친핵성 촉매는 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine)인 양이온성 키토산 유도체의 제조방법.

청구항 12

약제학적 유효성분; 및

제1항의 양이온성 키토산 유도체를 포함하는 약물 전달체.

청구항 13

제12항에 있어서,

약제학적 유효성분은 핵산인 약물 전달체.

청구항 14

제13항에 있어서,

핵산은 올리고 핵산인 약물 전달체.

청구항 15

제13항에 있어서,

핵산은 플라스미드 데옥시리보핵산 (plasmid DNA), 리보핵산(RNA), 작은 간섭 리보핵산(siRNA), 안티센스 올리고핵산(antisense oligonucleotide), 마이크로 리보핵산 (microRNA), 잠금형 핵산 (locked nucleic acid) 및 핵산 앱타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 약물 전달체.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

제12항에 있어서,

약물 전달체는 리포좀, 미셀, 에멀젼, 또는 나노입자의 제형을 가지는 약물 전달체.

청구항 19

제12항의 약물 전달체; 및

약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 의약 조성물.

청구항 20

기재;

상기 기재 상에 코팅된 제1항의 양이온성 키토산 유도체; 및

상기 양이온성 키토산 유도체와 결합된 핵산 앱타머를 포함하는 진단 키트.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 키토산 또는 그 유도체가 지용성 비타민 또는 그 유도체와 결합된 양이온성 키토산 유도체, 그의 제조 방법 및 이를 포함하는 약물 전달체에 관한 것으로서, 본 발명의 양이온성 키토산 유도체는 세포 내로 전달하고자 하는 약제학적 유효성분을 세포 내로 수송하는 효율을 현저히 증강시킬 뿐만 아니라, 세포 독성을 감소시켜 약제학적 유효성분의 치료 효능을 증강시키는 용도로 유용하게 사용된다.

배 경 기 술

<2> 유전 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, 또는 폴리아미도아민(polyamidoamine) (미국특허 제6,020,457호) 등이 유전자의 수송체로 연구되어 왔다. 그러나 이를 이용한 수송체 경우에는 세포 표면의 수용체를 통하여 효과적으로 수송되는 바이러스성 수송체에 비하여 체내 세포 내로의 수송 효율이 낮다는 문제점이 지적되어 왔다.

<6> 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).

<7> 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 종류로 구분될 수도 있다.

<8> 비바이러스성 벡터 중 양이온성 고분자는 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.

<9> 그러나, 종래에 개시된 여러 핵산 전달용 양이온성 고분자들은 합성 방법, 세포 독성 및 세포내 핵산 전달 효율 면에서 아직 보완되어야 할 점이 많다. 그러므로 합성 공정이 짧고, 세포 독성이 낮으면서도 세포 내로 효율적으로 핵산 물질들을 전달하는 전달체의 개발이 절실히 요구된다.

<10> 이에 본 발명자들은 세포에 대한 낮은 독성과 우수한 약제학적 유효성분, 특히 핵산의약물 전달 효율을 가지는 전달체를 개발하기 위하여 양전하를 가지는 키토산과 지용성 비타민 중 대표적인 레티놀 및 레티놀 유도체와 에르고칼시페롤 및 에르고칼시페롤 유도체, 콜레칼시페롤 및 콜레칼시페롤 유도체, 토코페롤 및 토코페롤 유도체, 토코트리엔올 및 토코트리엔올 유도체를 이용하여 신규한 지용성 비타민 및 그 유도체 비타민들을 수식한 신규한 양이온성 키토산을 합성하였으며 이 양이온성 키토산을 포함한 핵산 전달체의 경우 사람의 암 세포주 및 쥐의 세포주에서 약제학적 유효성분의 전달 효율을 현저히 증가시킬 뿐만 아니라 세포 독성도 현저하게 감소시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<11> 본 발명의 목적은 세포 내로 약제학적 유효성분의 전달을 증강시키는데 사용될 수 있는 키토산 또는 그 유도체가 지용성 비타민 또는 그 유도체와 결합된 양이온성 키토산 유도체 및 그의 제조 방법을 제공하는 것이다.

<12> 본 발명의 다른 목적은

<13> 약제학적 유효성분; 및

<14> 키토산 또는 그 유도체가 지용성 비타민 또는 그 유도체와 결합된 양이온성 키토산 유도체를 포함하는 약물 전달체를 제공하는 것이다.

<15> 본 발명의 또 다른 목적은

<16> 본 발명에 따른 상기 약물 전달체; 및

<17> 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 의약 조성물을 제공하는 것이다.

<18> 본 발명의 또 다른 목적은

<19> 기재;

<20> 상기 기재 상에 코팅된 본 발명에 따른 양이온성 키토산 유도체; 및

<21> 상기 양이온성 키토산 유도체와 결합된 핵산 앱타머를 포함하는 진단 키트를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

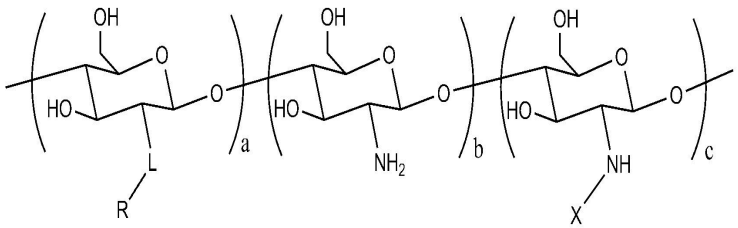
<22> 본 발명은 키토산 또는 그 유도체가 지용성 비타민 또는 그 유도체와 결합된 양이온성 키토산 유도체에 관한 것이다.

<23> 본 발명에 의한 상기 양이온성 키토산 유도체는 미셀, 나노입자 등의 형태로 제제화되어 전달하고자 하는 약물의 사용 목적에 따라 어떠한 동물 세포로도 약물 전달이 가능할 뿐만 아니라, 목적하는 약물의 수송 효율을 현저히 증강시킬 수 있으며 세포에 대한 독성 역시 감소시킨다.

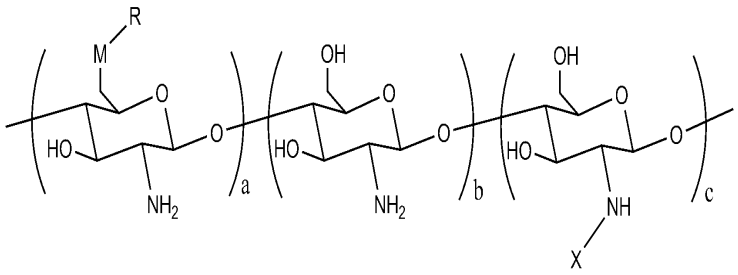
<24> 본 발명에 의한 양이온성 키토산 유도체는 키토산 또는 그 유도체가 지용성 비타민 또는 그 유도체와 결합한 것은 모두 포함된다. 여기서 사용된 용어 "결합"이란 화학적 공유 결합을 의미하는 것으로서, 보다 구체적으로 키토산 또는 그 유도체에 존재하는 하이드록시기(-OH) 또는 아민기(-NH_2)와 같은 관능기가 비타민 또는 그 유도체에 존재하는 하이드록식(-OH) 또는 카르복실기(-COOH)와 같은 관능기와 화학적 반응을 통하여 결합한 것을 의미한다.

<25> 일 구체예에서 상기 양이온성 키토산 유도체는 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 구조로 표현될 수 있다.

<26> [화학식 1]

<27> 

<28> [화학식 2]

<29> 

<30>

<31> 상기 식에서 R은 지용성 비타민 또는 그 유도체로부터 유도된 유기기를 나타내고,

<32> L은 -CONH- 또는 -NHCOO-을 나타내고,

<33> M은 -COO- 또는 -O(CH_2)$_2$O-를 나타내며,

<34> X는 아세틸기, 메틸글리콜기, 갈락토실기, 락토실기 또는 말토실기를 나타내고,

<35> a 및 b는 각각 독립적으로 1내지 150의 정수를 나타내며,

<36> c는 0내지 50의 정수를 나타내고,

<37> n은 1 내지 4의 정수를 나타낸다.

<38> 일 구체 예에서 상기 R은 레티놀(retinol), 9-시스-레티놀산(9-cis-retinoic acid), 13-시스-레티놀산(13-cis-retinoic acid), 올-트랜스-레티놀산(all-trans-retinoic acid), 에르고칼시페롤(ergocalciferol, vitamin D2), 비타민 D2 (6,19,19-d3)(Vitamin D2 (6,19,19-d3)), 콜레칼시페롤(cholecalciferol, vitamin D3), 비타민 D3 (6,19,19-d3)(vitamin D3 (6,19,19-d3)), (±)-알파-토코페롤((±)-α-tocopherol), (+)-알파-토코페롤((+)-α-tocopherol), (+)-베타-토코페롤((+)-β-tocopherol), 감마-토코페롤((+)-γ-tocopherol), 델타-토코페롤((+)-δ-tocopherol), 알파-토코페롤 숙시네이트(D-α-tocopherol succinate), 알파-토코페롤 폴리에틸렌 글리콜(D-α-tocopherol polyethylene glycol), 알파-토코트리엔올(D-α-tocotrienol), (+)-베타-토코트리엔올((+)-β-tocotrienol), 델타-토코트리엔올(D-δ-tocotrienol), 및 감마-토코트리엔올(D-γ-tocotrienol)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 비타민 또는 그 유도체로부터 유도된 유기기를 나타내나 이에 제한되지 않는다.

<39> 다른 구체 예에서 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은 c가 0인 화합물을 포함한다.

<40> 또 다른 구체 예에서 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은 c는 1내지 50이고, X는 갈락토실, 락토실 또는 말토실을 나타내는 화합물을 포함한다.

<41> 또 다른 구체 예에서 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은

<42> a와 b의 합이 2내지 50이고,

<43> R은 9-시스-레티놀산(9-cis-retinoic acid), 13-시스-레티놀산(13-cis-retinoic acid), 올-트랜스-레티놀산(all-trans-retinoic acid), (±)-알파-토코페롤((±)-α-tocopherol), 알파-토코페롤 숙시네이트(D-α-tocopherol succinate), (+)-알파-토코페롤((+)-α-tocopherol), 알파-토코페롤 폴리에틸렌글리콜(D-α-tocopherol polyethylene glycol), 및 알파-토코트리엔올(D-α-tocotrienol)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 비타민 또는 그 유도체로부터 유도된 유기기를 나타내는 화합물을 포함한다.

<44> 본 발명은 또한 용매의 존재 하에, 커플링제(coupling agent) 또는 보호기를 사용하여 키토산 또는 그 유도체를 지용성 비타민 또는 그 유도체와 반응시키는 단계를 포함하는 양이온성 키토산 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

<45> 상기 커플링제(coupling agent)는 특별히 제한되지 않으며, 결합시키고자 하는 관능기의 종류에 따라 사용 가능한 커플링제의 종류는 공지되어 있다. 예를 들어 EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide), DCC(Dicyclohexylcarbodiimide) DIC(diisopropylcarbodiimide), CDI(1,1'-Carbonyldiimidazole), 숙신이미딜 포밀벤조산(SFB, succinimidyl 4-formylbenzoate), C6-숙신이미딜 포밀벤조산(C6-SFB, C6-succinimidyl 4-formylbenzoate), 디숙신이미딜 글루탐산(DSG, Disuccinimidyl glutarate), 디숙신이미딜 수베르산(DSS, Disuccinimidyl suberate), 비스설포숙신이미딜 수베르산(BS3, Bis[sulfosuccinimidyl] suberate), HOBt(N-Hydroxybenzotriazole), 무수숙신산(succinic anhydride), NHS(N-hydroxysuccinimide) 및 sulfo-NHS로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.

<46> 또한 상기 보호기 역시 특별히 제한되지 않으며, 보호시키고자 하는 관능기의 종류에 따라 사용 가능한 보호기의 종류는 공지되어 있다. 예를 들어 무수프탈산을 사용할 수 있다.

<47> 또한 상기 반응은 필요에 따라 친핵성 촉매의 존재 하에 진행될 수 있다. 상기 친핵성 촉매 역시 당업계에 공지되어 있으며 예를 들어 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine)을 사용 할 수 있다.

<48> 본 발명은 또한 약제학적 유효성분; 및

<49> 키토산 또는 그 유도체가 지용성 비타민 또는 그 유도체와 결합된 양이온성 키토산 유도체를 포함하는 약물 전달체에 관한 것이다.

<50> 본 발명에 따른 약물 전달체는 다양한 세포들에서 약물의 세포내 수송도를 증가시킬 뿐만 아니라 세포 독성도 현저하게 감소시키므로, 예를 들어 올리고 핵산 의약을 포함하는 약물을 이용한 치료요법 등에 효과적으로 사용 가능하다.

<51> 또한 본 발명의 약물 전달체는 양하전을 띠게 되므로, 약물 전달체의 양하전과 음전하로 하전된 의약물의 단순한 혼합(mix)에 의해 정전기 결합을 통해 약물 전달체와 의약물 간의 복합체를 효율적으로 형성할 수 있다.

<52> 상기 약제학적 유효성분은 화학요법제, 단백질 의약 또는 핵산의약을 포함한다. 상기 약제학적 유효성분은 바람

직하게는 음전하로 하전된 것이거나 음하전으로 유도될 수 있는 것을 포함한다.

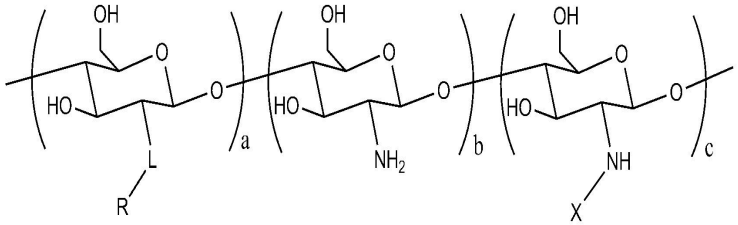
<53> 상기 화학요법제는 임의의 질환에 대한 약리 효과를 나타내는 유기 화합물을 의미한다. 이러한 화학요법제의 대표적인 예로는 항암 화학요법제를 들 수 있다. 공지의 항암 화학요법제로는 예를 들어, 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 독소루비신 (doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 발루비신(valubicin), 미토산트론(mitoxantrone), 커큐민(curcumin), 제피티닙(gefitinib), 에를로티닙(erlotinib), 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine) 등이 있다.

<54> 상기 단백질 의약 또는 핵산의약은 예를 들어, 특정 수용체에 특이적으로 결합하여 신호 전달을 차단하거나 억제하는 펩타이드, 특정 유전자의 발현을 저해하는 siRNA 등이 이에 해당된다.

<55> 상기 핵산은 올리고 핵산을 포함한다. 보다 구체적으로 플라스미드 디옥시리보핵산(plasmid DNA), 리보핵산(RNA), 작은 간섭 리보핵산(siRNA), 안티센스 올리고핵산(antisense oligonucleotide), 마이크로 리보핵산(microRNA), 잠금형 핵산 (locked nucleic acid), 또는 핵산 앱타머(aptamer) 등을 포함한다.

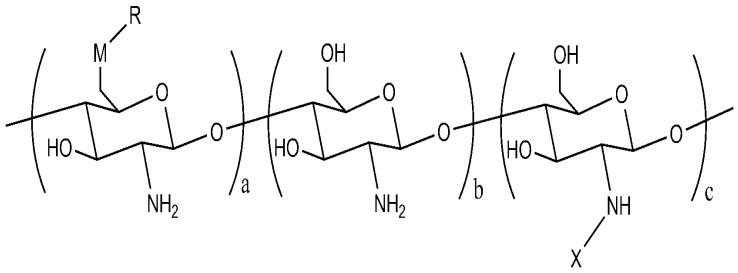
<56> 또한 본 발명의 약물 전달체의 양이온성 키토산 유도체는 예를 들어 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 가지는 화합물을 포함한다.

<57> [화학식 1]



<58>

<59> [화학식 2]



<60>

<61> 상기 식에서 R은 지용성 비타민 또는 그 유도체로부터 유도된 유기기를 나타내고,

<62> L은 -CONH- 또는 -NHCOO-을 나타내고,

<63> M은 -COO- 또는 $-O(CH_2)_2O-$를 나타내며,

<64> X는 아세틸기, 메틸글리콜기, 갈락토실기, 락토실기 또는 말토실기를 나타내고,

<65> a 및 b는 각각 독립적으로 1내지 150의 정수를 나타내며,

<66> c는 0내지 50의 정수를 나타내고,

<67> n은 1 내지 4의 정수를 나타낸다.

<68> 일 구체 예에서 상기 R은 레티놀(retinol), 9-시스-레티놀산(9-cis-retinoic acid), 13-시스-레티놀산(13-cis-retinoic acid), 올-트랜스-레티놀산(all-trans-retinoic acid), 에르고칼시페롤(ergocalciferol, vitamin D2), 비타민 D2 (6,19,19-d3)(Vitamin D2 (6,19,19-d3)), 콜레칼시페롤(cholecalciferol, vitamin D3), 비타민 D3 (6,19,19-d3)(vitamin D3 (6,19,19-d3)), (±)-알파-토코페롤((±)-α-tocopherol), (+)-알파-토코페롤((+)-α-tocopherol), (+)-베타-토코페롤((+)-β-tocopherol), 감마-토코페롤((+)-γ-tocopherol), 델타-토코페롤((+)-δ-tocopherol), 알파-토코페롤 숙시네이트(D-α-tocopherol succinate), 알파-토코페롤 폴리에틸렌

글리콜(D-α-tocopherol polyethylene glycol), 알파-토코트리엔올(D-α-tocotrienol), (+)-베타-토코트리엔올((+)-β-tocotrienol), 델타-토코트리엔올(D-δ-tocotrienol), 및 감마-토코트리엔올(D-γ-tocotrienol)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 비타민 또는 그 유도체로부터 유도된 유기기를 나타내나 이에 제한되지 않는다.

<69> 다른 구체 예에서 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은 c가 0인 화합물을 포함한다.

<70> 또 다른 구체 예에서 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은 c는 1내지 50이고, X는 갈락토실, 락토실 또는 말토실을 나타내는 화합물을 포함한다.

<71> 또 다른 구체 예에서 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은

<72> a와 b의 합이 2내지 50이고,

<73> R은 9-시스-레티놀산(9-cis-retinoic acid), 13-시스-레티놀산(13-cis-retinoic acid), 올-트랜스-레티놀산(all-trans-retinoic acid), (±)-알파-토코페롤((±)-α-tocopherol), 알파-토코페롤 숙시네이트(D-α-tocopherol succinate), (+)-알파-토코페롤((+)-α-tocopherol), 알파-토코페롤 폴리에틸렌글리콜(D-α-tocopherol polyethylene glycol), 및 알파-토코트리엔올(D-α-tocotrienol)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 비타민 또는 그 유도체로부터 유도된 유기기를 나타내는 화합물을 포함한다.

<74> 본 발명에 따른 약물 전달체의 형태는 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 리포좀, 미셀, 에멀젼, 또는 나노입자의 제형을 가질 수 있다.

<75> 본 발명은 또한

<76> 본 발명에 따른 약물 전달체; 및

<77> 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 의약 조성물에 관한 것이다.

<78> 상기 약물 전달체는 종양, 관절염, 심혈관계, 내분비계 질환 등을 포함하는 병인성 단백질의 과다발현으로 야기되는 각종 질환들의 치료를 위해 세포 내로 도입될 수 있다.

<79> 본 발명의 약물 전달체는 핵산전달 효율이 우수할 뿐만 아니라 세포 독성이 낮으므로 병인성 단백질의 세포내 과다 발현을 억제하여 우수한 질환 치료 효과를 거둘 수 있다.

<80> 본 발명의 의약 조성물을 통해 in vivo 또는 ex vivo 상에서 세포 내부로 목적하는 약물을 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.

<81> 본 발명에 있어서, 상기 약물 전달체의 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 약물 전달체를 예컨대 1일 1회 투여시 0.001 ㎎/kg ~ 100 ㎎/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

<82> 본 발명에 따른 상기 조성물에 사용되는 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조성물은 또한 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

<83> 본 발명의 약학제학적 조성물은 경구 투여용 제형 또는 주사제와 같은 비경구 투여용 제형으로 제조할 수 있다.

<84> 경구 투여용 제형의 예로서는 정제, 트로치제, 로젠지, 수용성 또는 유성 현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀젼, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제(elixirs)를 들 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제하기 위해서 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 마니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아질 푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유가 함유될 수 있다. 또한 캡슐

제형의 경우에는 상기에서 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 함유할 수 있다.

<85> 경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 포함된다. 비수성용제, 현탁 용제는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 또는 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

<86> 한 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소디움 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.

<87> 본 발명의 조성물의 다른 바람직한 양태는 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들면 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예를 들면 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일은 그 어느 것도 사용할 수 있다.

<88> 본 발명은 또한 기재;

<89> 상기 기재 상에 코팅된 본 발명에 따른 양이온성 키토산 유도체; 및

<90> 상기 양이온성 키토산 유도체와 결합된 핵산 앱타머를 포함하는 진단 키트에 관한 것이다.

<91> 예를 들면 진단용 플레이트의 표면(기재)를 지용성 비타민 및 그 유도체 비타민들을 수식한 신규한 양이온성 키토산으로 코팅하고 이 코팅 면 위에 앱타머를 결합시킬 경우 시료 중 앱타머와 선택적으로 반응하는 물질의 존재를 진단하는데 이용 가능하다.

효 과

<92> 상술한 바와 같이, 본 발명의 지용성 비타민 및 그 유도체 비타민들을 수식한 신규한 양이온성 키토산 유도체는 제조 및 정제 공정이 간편하여 대량 생산시의 경제성이 높다. 또한, 본 발명의 지용성 비타민 및 그 유도체 비타민들을 수식한 신규한 양이온성 키토산을 포함하는 약물 전달체는 목적하는 약제학적 활성성분, 예를 들어 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

<93> 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.

<94> 하기 실시 예에서는 상기 핵산 전달체의 종양세포(사람의 자궁경부암 상피 세포인 HeLa 세포주, 케라틴 분비형 자궁경부암 세포 KB 세포주, 폐암 세포인 A549 세포주, 흑색종인 WM266.4 세포주, 백혈병 세포인 K562세포주와 TF-1 세포주, 쥐의 간암 세포주인 Hepa 1-6 세포주)로의 핵산 전달 효율을 평가하였다.

<95> 형광 표식이 붙어있는 Block IT (Invitrogen, USA) 작은 간섭 리보핵산을 사용하여 지용성 비타민 및 그 유도체 비타민들을 수식한 신규한 양이온성 올리고 키토산을 함유하는 다양한 복합체를 형성시켜 세포 내에 전달하고 이를 형광 현미경으로 관찰하면 상기 지용성 비타민 및 그 유도체 비타민들을 수식한 신규한 양이온성 키토산의 세포 내로 전달되는 핵산 수송 능력을 구체적으로 측정하였다.

<96> 또한 본 발명의 핵산 전달체의 세포 독성은 tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide을 이용한 발색 방법 (MTT)을 사용하여 평가하였다.

<97> [신규 키토산 유도체의 합성]

<98> 비교예 1. 기존에 판매되고 있는 양이온성 리포좀

<99> 기존의 핵산 전달 실험용으로 시판되고 있는 리포좀 제형인 리포펙타민(LipofectAMINE)TM 2000(Invitrogen, USA)을 구입하여 사용하였으며, 제조사의 지침을 따라서 수행하였다.

<100> <실시예>

<101> 실시예 1. 레티닐 키토산 유도체 (Retinyl chitosan derivatives)의 합성

<102> 분자량 1kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 레티놀(retinol, 0.017g, sigma, USA)을 첨가한 후 80℃에서 12시간 정도 교반하였다. 반응 후 얻어진 생성물을 미반응 물질과 불순물을 제거하기 위해 투석막을 사용하여 물에서 투석한 후 동결 건조하였다. 얻어진 키토산 유도체는 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<103> 실시예 2. 레티닐 키토산 유도체 (Retinyl chitosan derivatives)의 합성

<104> 분자량 30kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 레티놀(retinol, 0.17g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<105> 실시예 3. 레티닐 키토산 유도체 (Retinyl chitosan derivatives)의 합성

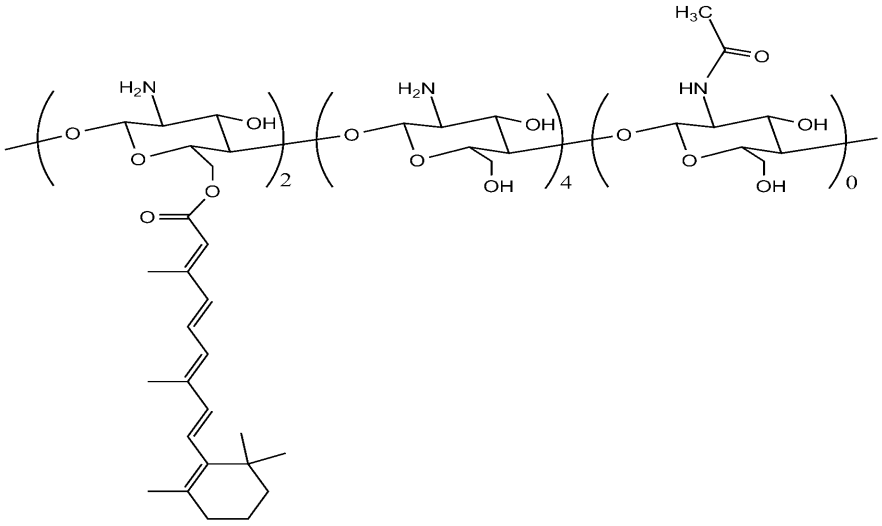
<106> 분자량 50kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)과CDI(1,1'-Carbonyldiimidazole, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 레티놀(retinol, 0.52g, sigma, USA)을 첨가한 후 12시간 정도 교반하였다. 반응 후 얻어진 생성물을 미반응 물질과 불순물을 제거하기 위해 투석막을 사용하여 물에서 투석한 후 동결 건조하였다. 얻어진 키토산 유도체는 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<107> 실시예 4. 레티노일 키토산 유도체 (Retinoyl chitosan derivatives)의 합성

<108> 분자량 1kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)과EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 레티놀산(retinoic acid, 0.54g, sigma, USA)을 첨가한 후 상온에서 12시간정도 교반하였다. 반응 후 얻어진 생성물을 미반응 물질과 불순물을 제거하기 위해 투석막을 사용하여 물에서 투석한 후 동결 건조하였다. 얻어진 키토산 유도체는 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다. NMR 그래프를 도 1에 도시하였다.

<109> ^{1}H NMR of retinoyl chitosan(500 MHz, D_2O): 1.2 ppm (CH_3 from retinoic acid); 1.3-1.5 ppm (CH_2 from retinoic acid); 1.7-2.2 ppm (CH_3 from retinoic acid); 2.9 ppm (CH_3 from retinoic acid); 6.8 ppm (*H* from retinoic acid); 1.9 ppm CH_3CO from chitosan); 3.0-4.3 ppm (C*H* from chitosan); 4.7 ppm (O*H* from chitosan); 5.2-5.4 ppm (C*H* from chitosan); 8.0 ppm (CON*H* from retinoyl chitosan).

<110> 실시예 5. 레티노일 키토산 유도체 (Retinoyl chitosan derivatives)의 합성 에스터

<111> 

<112> 분자량 30kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)과 과량의 무수프탈산(excess phthalic anhydride)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 120℃에서 약 8시간정도 교반하였다. 반응 종료 후 미반응 물질을 제거하기 위해 얼음물을 부어 침전시킨 후 메탄올(methanol)로 씻어준다. 얻어진 물질에 레티놀산(retinoic aicd, 0.18g, sigma, USA), DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)을 첨가한 후 80℃에서 12시간정도 교반하였다. 반응 종료 후 100℃에서 하이드라진 (hydrazine hydrate)첨가하여 보호기를 제거한다. 반응 후 얻어진 생성물을 미반응 물질과 불순물을 제거하기 위해 투석막을 사용하여 물에서 투석한 후 동결 건조하였다. 얻어진 키토산 유도체는 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<113> 실시예 6. 콜레칼시페릴 키토산 유도체 (Cholecalciferyl chitosan derivatives)의 합성

<114> 분자량 1kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 콜레칼시페롤(cholecalciferol, 0.69g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<115> 실시예 7. 콜레칼시페릴 키토산 유도체 (Cholecalciferyl chitosan derivatives)의 합성

<116> 분자량 10kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 콜레칼시페롤(cholecalciferol, 0.077g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<117> 실시예 8. 콜레칼시페릴 키토산 유도체 (Cholecalciferyl chitosan derivatives)의 합성

<118> 분자량 30kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)과CDI(1,1'-Carbonyldiimidazole, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 콜레칼시페롤(cholecalciferol, 0.014g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 3과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<119> 실시예 9. 알파-토코페릴 키토산 유도체 (α-Tocopherol formylbenzoyl chitosan derivatives)의 합성

<120> 알파-토코페롤(α-tocopherol, 100mg, sigma, USA)을 DMF에 녹인 후, DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.01g, Fluka, USA), SFB(succinimidyl 4-formylbenzoate, 0.086, Fisher Scientific Inc., USA)를 첨가한 후, 60℃에서 12시간정도 반응시켰다. 반응 후 감압농축하고 에틸아세테이트(Ethyl acetate), 과포화 염화나트륨 수용액으로 씻어준 후 건조시켰다. 분자량 10kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), 얻어진 중간유도체인 알파-토코페롤 포밀벤조산(α-tocopherol formylbenzoate, 0.026g)을 첨가한 후 상온에서12시간동안 교반하여 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<121> 실시예 10. 알파-토코페릴 키토산 유도체 (α-Tocopherol formylbenzoyl chitosan derivatives)의 합성

<122> 분자량 50kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)에 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), 실시예 9와 같이 합성한 알파-토코페롤 포밀벤조산(α-tocopherol formylbenzoate, 0.47g)을 첨가한 후 실시예 9와 동일한 방법으로 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<123> 실시예 11. 감마-토코페릴 키토산 유도체 (γ-Tocopheryl chitosan derivatives)의 합성

<124> 분자량 1kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 감마-토코페롤(γ-tocopherol, 0.78g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<125> 실시예 12. 감마-토코페릴 키토산 유도체 (γ-Tocopheryl chitosan derivatives)의 합성

<126> 분자량 10kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)과CDI(1,1'-Carbonyldiimidazole, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 감마-토코페롤(γ-tocopherol, 0.026g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 3과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<127> 실시예 13. 감마-토코페릴 키토산 유도체 (γ-Tocopheryl chitosan derivatives)의 합성

<128> 분자량 50kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 감마-토코페롤(γ-tocopherol, 0.26g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<129> 실시예 14. 델타-토코페릴 키토산 유도체 (δ-Tocopheryl chitosan derivatives)의 합성

<130> 분자량 30kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 감마-토코페롤(δ-tocopherol, 0.78g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<131> 실시예 15. 델타-토코페릴 키토산 유도체 (δ-Tocopheryl chitosan derivatives)의 합성

<132> 분자량 50kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-

(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 델타-토코페롤(δ-tocopherol, 0.026g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법 (FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<133> 실시예 16. 알파-토코트리엔오일 키토산 유도체 (α-Tocotrienoyl chitosan derivatives)의 합성

<134> 분자량 1kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 알파-토코트리엔올(α-tocotrienol, 0.75g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<135> 실시예 17. 알파-토코트리엔오일 키토산 유도체 (α-Tocotrienoyl chitosan derivatives)의 합성

<136> 분자량 50kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)과CDI(1,1'-Carbonyldiimidazole, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 알파-토코트리엔올(α-tocotrienol, 0.025g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 3과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<137> 실시예 18. 감마-토코트리엔오일 키토산 유도체 (γ-Tocotrienoyl chitosan derivatives)의 합성

<138> 분자량 30kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydridee, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 감마-토코트리엔올(γ-tocotrienol, 0.74g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법 (FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<139> 실시예 19. 감마-토코트리엔오일 키토산 유도체 (γ-Tocotrienoyl chitosan derivatives)의 합성

<140> 분자량 50kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 감마-토코트리엔올(γ-tocotrienol, 0.25g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법 (FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<141> 실시예 20. 델타-토코트리엔오일 키토산 유도체 (δ-Tocotrienoyl chitosan derivatives)의 합성

<142> 분자량 10kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 델타-토코트리엔올(δ-tocotrienol, 0.025g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법 (FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<143> 실시예 21. 델타-토코트리엔오일 키토산 유도체 (δ-Tocotrienoyl chitosan derivatives)의 합성

<144> 분자량 30kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 델타-토코트리엔올(δ-tocotrienol, 0.25g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법

(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

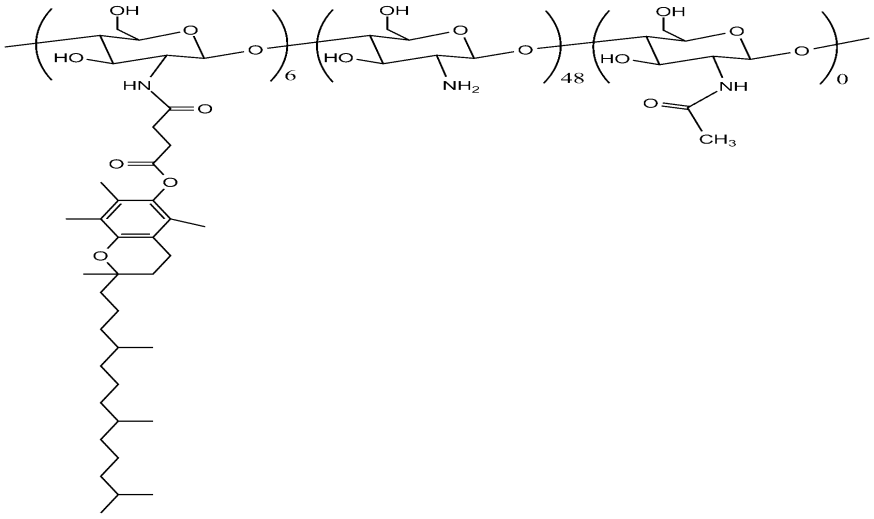
<145> 실시예 22. 에르고칼시페릴 키토산 유도체 (Ergocalciferyl chitosan derivatives)의 합성

<146> 분자량 10kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 에르고칼시페롤(ergocalciferol, 0.24g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<147> 실시예 23. 에르고칼시페릴 키토산 유도체 (Ergocalciferyl chitosan derivatives)의 합성

<148> 분자량 50kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 에르고칼시페롤(ergocalciferol, 0.72g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<149> 실시예 24. 알파-토코페릴 키토산 유도체 (α-Tocopheryl chitosan derivatives)의 합성

<150> 

<151> 분자량 10kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)과EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 알파-토코페롤 숙시네이트(α-tocopherol succinate, 0.032g, supelco, USA)를 첨가한 후 실시예 4와 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하고 이를 도 2에 도시하였다.

<152> 실시예 25. 알파-토코페릴 키토산 유도체 (α-Tocopheryl chitosan derivatives)의 합성

<153> 분자량 50kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)과EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 알파-토코페롤 숙시네이트(α-tocopherol succinate, 0.32g, supelco, USA)를 첨가한 후 실시예 4와 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<154> 실시예 26. 알파-토코페릴 키토산 유도체 (α-Tocopheryl chitosan derivatives)의 합성 아미드

<155> 분자량 30kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)과EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g,

sigma-aldrich, USA), 알파-토코페롤 숙시네이트(α-tocopherol succinate, 0.32g, supelco, USA)을 첨가한 후 실시예 4와 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<156> 실시예 27. 토코페롤 폴리에틸렌글리콜릭 키토산 유도체 (Tocopherol polyethylene glycolic chitosan derivatives)의 합성

<157> 분자량 1kDa 키토산(chitosan, 1g, sigma, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)과 CDI(1,1'-Carbonyldiimidazole, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 알파 토코페롤 폴리에틸렌글리콜(α-tocopherol polyethylene glycol, 0.69g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 3과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<158> 실시예 28. 토코페롤 폴리에틸렌글리콜릭 키토산 유도체 (Tocopherol polyethylene glycolic chitosan derivatives)의 합성

<159> 분자량 30kDa 키토산(chitosan, 1g, aldrich, USA)을 실시예 5와 동일한 방법으로 합성한 물질에 알파 토코페롤 폴리에틸렌글리콜(α-tocopherol polyethylene glycol, 0.32g, supelco, USA), DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA)를 첨가한 후 실시예 5와 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<160> 실시예 29. 레티노일 메틸글리콜 키토산 유도체 (Retinoyl methylglycol chitosan derivatives)의 합성

<161> 메틸글리콜 키토산(methylglycol chitosan, 1g, sigma, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 레티놀산(retinoic aicd, 0.018g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 4와 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA) 및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<162> 실시예 30. 콜레칼시페릴 갈락토실 키토산 유도체 (Cholecalciferyl galactosyl chitosan derivatives)의 합성

<163> 갈락토실 키토산(galactosyl chitosan, 1g, sigma, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 콜레칼시페롤(cholecalciferol, 0.077g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<164> 실시예 31. 델타-토코트리엔오일 갈락토실 키토산 유도체 (δ-Tocotrienoyl galactosyl chitosan derivatives)의 합성

<165> 갈락토실 키토산(galactosyl chitosan, 1g, sigma, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 델타-토코트리엔올(δ-tocotrienol, 0.25g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<166> 실시예 32. 알파-토코페릴 갈락토실 키토산 유도체 (α-Tocopheryl galactosyl chitosan derivatives)의 합성

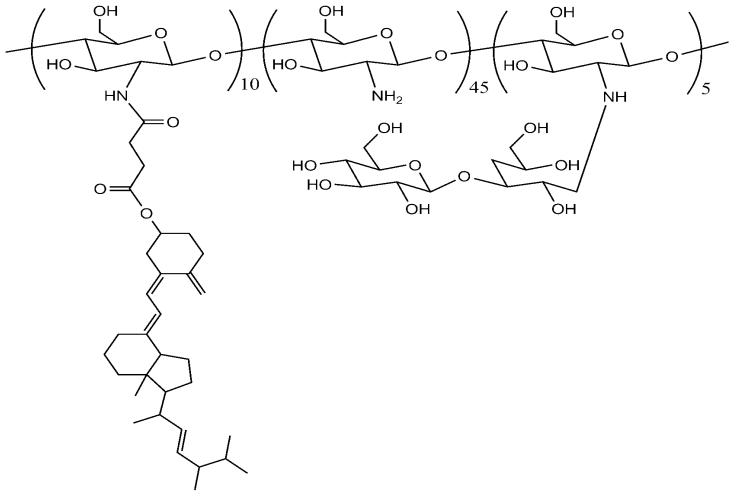
<167> 갈락토실 키토산(galactosyl chitosan, 1g, sigma, USA)을 실시예 5와 동일한 방법으로 합성한 물질에 DMAP(4-

(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), 알파-토코페롤 숙시네이트(α-tocopherol succinate, 0.032g, supelco, USA)를 첨가한 후 12시간정도 교반한 후 실시예 5와 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<168> 실시예 33. 레티닐 락토실 키토산 유도체 (Retinyl lactosyl chitosan derivatives)의 합성

<169> 락토실 키토산(lactosyl chitosan, 1g, sigma, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), CDI(1,1'-Carbonyldiimidazole, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 레티놀(retinol, 0.017g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 3과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<170> 실시예 34. 에르고칼시페릴 락토실 키토산 유도체 (Ergocalciferyl lactosyl chitosan derivatives)의 합성



<171>

<172> 락토실 키토산(lactosyl chitosan, 1g, sigma, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 에르고칼시페롤(ergocalciferol, 0.24g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<173> 실시예 35. 알파-토코페릴 락토실 키토산 유도체 (α-Tocopheryl lactosyl chitosan derivatives)의 합성

<174> 락토실 키토산(lactosyl chitosan, 1g, sigma, USA)을 실시예 5와 동일한 방법으로 합성한 물질에 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)과EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 알파-토코페롤 숙시네이트(α-tocopherol succinate, 0.96g, supelco, USA)를 첨가한 후 상온에서 12시간정도 교반한 후 실시예 5와 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<175> 실시예 36. 감마-토코트리엔오일 말토실 키토산 유도체 (γ-Tocotrienoyl maltosyl chitosan derivatives)의 합성

<176> 말토실 키토산(maltosyl chitosan, 1g, sigma, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 감마-토코트리엔올(γ-tocotrienol, 0.025g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<177> 실시예 37. 레티노일 말토실 키토산 유도체 (Retinoyl maltosyl chitosan derivatives)의 합성

<178> 말토실 키토산(maltosyl chitosan, 1g, sigma, USA)을 실시예 5와 동일한 방법으로 합성한 물질에 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)과EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 레티놀산(retinoic acid, 0.54g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 5와 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<179> 실시예 38. 에르고칼시페릴 글리콜 키토산 유도체 (Ergocalciferyl glycol chitosan derivatives)의 합성

<180> 글리콜 키토산(glycol chitosan, 1g, sigma, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), CDI(1,1'-Carbonyldiimidazole, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 에르고칼시페롤(ergocalciferol, 0.72g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 3과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<181> 실시예 39. 델타-토코페릴 글리콜 키토산 유도체 (δ-Tocopheryl glycol chitosan derivatives)의 합성

<182> 글리콜 키토산(glycol chitosan, 1g, sigma, USA)을 DMF/H2O=95/5에 녹인 후 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA), EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA)와 무수숙신산(succinic anhydride, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 델타-토코페롤(δ-tocopherol, 0.026g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<183> 실시예 40. 레티노일 글리콜 키토산 유도체 (Retinoyl glycol chitosan derivatives)의 합성

<184> 글리콜 키토산(glycol chitosan, 1g, sigma, USA)을 실시예 5와 동일한 방법으로 합성한 물질에 DMAP(4-(Dimethylamino)pyridine, 0.1g, Fluka, USA)과 EDC(N-(2-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 0.1g, sigma-aldrich, USA), 레티놀산(retinoic aicd, 0.018g, sigma, USA)을 첨가한 후 실시예 5와 동일한 방법으로 키토산 유도체를 합성하였다. 반응 여부는 핵자기공명법 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance, varian, Inc., USA)및 적외선 흡수 스펙트럼 분석법(FT-IR, Infrared absorption spectroscopy, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)으로 확인하였다.

<185> <실험예>

<186> [세포배양]

<187> 사람의 자궁경부암 상피 세포인 HeLa 세포주, 사람의 폐암 세포인 A549 세포주, 사람의 피부 흑색종 세포인 WM 266.4 세포주, 케라틴 분비형 자궁경부암 세포인 KB세포주, 사람의 혈액성 백혈병 세포인 K562 세포주, 사람의 골수성 백혈병 세포인 TF-1세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 쥐의 간암 세포인 Hepa 1-6 세포주는 DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. HeLa, A549, K562, TF-1 세포주는 RPMI(Gibco, USA), Hepa 1-6 세포주는 DMEM(Dulbecco's modified eagles medium, Gibco, USA), WM266.4, KB 세포주는 MEM(Minimum Essential Medium, Gibco, USA)에 10% 우태아 혈청 w/v (HyClone laboratories Inc, USA)과 100 unit/ml 페니실린 또는 100㎍/ml 스트렙토마이신을 포함하여 배양하였다.

<188> [실험예 1] 작은 간섭 리보핵산과 핵산 전달체의 복합체 형성여부 측정

<189> 200 나노그램의 작은 간섭 리보핵산과 본 발명의 핵산 전달체의 복합체를 형성하기 위해 작은 간섭 리보핵산과 본 발명의 핵산 전달체 (실시예 2, 12, 26)의 무게비를 달리하여 (1:1~1:60) 혼합한 후 실온에서 20분간 방치한 후 아가로즈 젤에 전기영동 하여 확인하였다. 핵산은 EtBr로 염색하여 아가로스 젤 상에서의 위치를 확인 하였다.

<190> 본 실험 수행결과, 도 3[실시예 2-(A), 실시예 12-(B), 실시예 26-(C)]에서 보는 바와 같이 본 발명의 핵산 전달체의 양이 증가할수록 작은 간섭 리보핵산과 핵산 전달체의 복합체의 양이 증가하여 결합체를 형성하지 않는 작은 간섭 리보핵산의 양이 감소하는 결과를 확인 할 수 있었다.

<191> [실험예 2] 작은 간섭 리보핵산과 본 발명의 핵산 전달체의 복합체의 입자크기 측정

<192> 200 나노그램의 작은 간섭 리보핵산과 본 발명의 핵산 전달체 (실시예 16, 23)의 무게비를 1:40으로 하여 실온에서 20분간 복합체를 형성한 후 3 밀리리터의 인산 완충용액을 첨가한 후 동적광산란 장비 (ELS-8000)를 이용하여 복합체의 입자경을 측정하였다.

<193> 본 실험 수행결과, 도 4[실시예 16-(A), 실시예 23-(B)]에서 보는 바와 같이 작은 간섭 리보핵산과 본 발명의 핵산 전달체의 복합체 실시예 16의 경우 입자경은 223 나노미터의 크기를 갖는 것으로 확인되었으며, 실시예 23의 경우에는 핵산 전달체의 복합체 크기가 243 나노미터의 크기를 갖는 결과를 확인 할 수 있었다.

<194> [실험예 3] 형광마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산을 이용한 핵산 전달 효율 평가

<195> 3-1. HeLa 세포주에서의 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 평가

<196> HeLa 세포주를 실험 전날 48 웰 플레이트에 웰 당 2.5×10^4 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 Block-iT (Invitrogen, USA) 5pmole씩과 비교예 1 (LipofectamineTM2000, Invitrogen, USA)과 실시예 7, 21에서 제조된 핵산 전달체 용액을 무게비가 1:60이 되도록 각각 첨가하였다.

이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 가하여 37℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배약액을 제거한 후 200 ㎕씩 새로운 배양액으로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 리보핵산 전달 효율을 관찰하였다.

<197> 도 5는 비교예 1[(A) 및 (B)]과 실시예 7[(C) 및 (D)], 21[(E) 및 (F)]로부터 제조된 핵산 전달체의 핵산 전달 효율을 형광 현미경(DMIL, Leica, Germany)과 위상차 현미경으로 관찰한 것으로 도 5의 A, C, E 사진은 위상차 현미경 사진이고, 도 5의 B, D, F는 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산의 세포내 전달을 보여주는 형광 현미경 사진이다. 본 실험 수행 결과, 도 5에서 보는 바와 같이 실시예 7, 21로부터 제조된 핵산 전달체의 HeLa 세포주에 대한 핵산 전달 효율이 비교예 1 보다 향상된 작은 간섭 리보핵산의 전달효율을 갖는 다는 사실을 알 수 있다.

<198> 3-2. Hepa 1-6 세포주에서의 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 평가

<199> Hepa 1-6 세포주를 실험 전날 48 웰 플레이트에 웰 당 2.5×10^4 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 Block-iT (Invitrogen, USA) 5pmole씩과 비교예 1 (LipofectamineTM2000, Invitrogen, USA)과 실시예 25, 33에서 제조된 핵산 전달체 용액을 무게비가 1:60이 되도록 각각 첨가하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 가하여 37℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배약액을 제거한 후 200㎕씩 새로운 배양액으로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 리보핵산 전달 효율을 관찰하였다.

<200> 도 6은 비교예 1[(A) 및 (B)]과 실시예 25[(C) 및 (D)], 실시예 33[(E) 및 (F)]으로부터 제조된 핵산 전달체의 핵산 전달 효율을 형광 현미경(DMIL, Leica, Germany)과 위상차 현미경으로 관찰한 것으로 도 6의 A, C, E사진은 위상차 현미경 사진이고, 도 6의 B, D, F 사진은 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산의 세포내 전달을 보여주는 형광 현미경 사진이다. 본 실험 수행 결과, 도 6C와 6D에서 보는 바와 같이 실시예 25로부터 제조된 핵산 전달체의 Hepa 1-6 세포주에 대한 핵산 전달효율이 비교예 1 (도 6A, 6B) 보다 향상된 핵산 전달효율을 갖는 다는 사실을 알 수 있었다. 또한, 실시예 33으로부터 제조된 핵산 전달체의 경우 도 6E와 도 6F에서 나타난 바와 같이 Hepa 1-6 세포주에 대한 핵산 전달 효율이 비교예 1 (도 6A, 6B)보다 향상된 작은 간섭 리보핵산의 전달효율을 갖는 다는 사실을 알 수 있다.

<201> 3-3. WM266.4 세포주에서의 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 평가

<202> WM266.4 세포주를 실험 전날 48 웰 플레이트에 웰 당 2.5×10^4 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 Block-iT (Invitrogen, USA) 5pmole씩과 비교예 1 (LipofectamineTM2000, Invitrogen, USA)과 실시예 5, 19에서 제조된 핵산 전달체 용액을 무게비가 1:50이 되도록 각각 첨가하였다.

이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 가하여 37℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배약액을 제거한 후 200 ㎕씩 새로운 배양액으로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 리보핵산 전달 효율을 관찰하였다.

<203> 도 7은 비교예 1[(A) 및 (B)]과 실시예 5[(C) 및 (D)]와 실시예 19 [(E) 및 (F)]로부터 제조된 핵산 전달체의

핵산 전달 효율을 형광 현미경(DMIL, Leica, Germany)과 위상차 현미경으로 관찰한 것으로 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산의 세포내 전달을 보여주는 위상차 현미경 및 형광 현미경 사진이다. 본 실험 수행 결과, 도 7C와 7D에서 보는 바와 같이 실시예 5로부터 제조된 핵산 전달체의 WM266.4 세포주에 대한 핵산 전달 효율이 비교예 1 (도 7A, 7B)보다 향상된 작은 간섭 리보핵산의 전달효율을 갖는다는 사실을 알 수 있다. 또한, 도 7E와 7F에서 보는 바와 같이 실시예 19로부터 제조된 핵산 전달체의 전달효율을 확인한 결과 비교예 1 (도 7A, 7B)보다 향상된 작은 간섭 리보핵산의 전달효율을 갖는다는 사실을 알 수 있다.

<204> [실험예 4] 형광 유세포 분석법 (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)을 이용한 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 측정

<205> 4-1. A549 세포주에서의 형광 유세포 분석법 (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)을 이용한 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 측정

<206> A549 세포주를 실험 전날 48 웰 플레이트에 웰 당 2.5×10^4 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 Block-iT (Invitrogen, USA) 5pmole씩과 비교예 1(LipofectamineTM2000, Invitrogen, USA)과 실시예 29에서 제조된 핵산 전달체 용액을 무게비가 1:60이 되도록 각각 첨가하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 가하여 37℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배약액을 제거한 후 200㎕씩 인산 완충용액으로 교체하여 준 후 배양된 세포를 수집하였으며, 세포를 수집한 후 인산 완충용액으로 2번 세척하였다. 형광 표지된 작은 간섭 리보핵산이 들어간 세포들을 형광 유세포 분석기인 BD FACS CALIBUR (BD Bioscience, USA)를 사용하여 형광 강도 피크의 이동에 의한 세포내 전달 효율을 분석하였다. 이를 도 8에 나타내었다.

<207> 도 8의 도면에서 세포에 아무 처리하지 않은 미처리군 (도 8A)은 대조군으로 리보핵산이 세포 내로 전달되지 않아 피크가 거의 이동하지 않았고 (1.12% 이동함), 도 8B의 비교예 1을 사용한 실험군에서는 형광이 표지된 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율이 77.59%인 것으로 확인 되었다. 한편, 본 발명의 실시예 29 (도 8C)의 처리군의 경우 각각 91.74%를 나타내어 비교예 1 처리군에 비하여 향상된 세포내 전달효율을 갖는 것으로 확인되었다.

<208> 따라서 본 발명의 실시예 29에서 제조된 핵산 전달체가 비교예 1 보다 우수한 리보핵산 전달 효율을 가짐을 알 수 있었다.

<209> 4-2. KB 세포주에서의 형광 유세포 분석법 (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)을 이용한 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 측정

<210> KB 세포주를 실험 전날 48 웰 플레이트에 웰 당 2.5×10^4 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 Block-iT (Invitrogen, USA) 5pmole씩과 비교예 1 (LipofectamineTM2000, Invitrogen, USA)과 실시예 39에서 제조된 핵산 전달체 용액을 무게비가 1:60이 되도록 각각 첨가하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 가하여 37℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배약액을 제거한 후 200㎕씩 인산 완충용액으로 교체하여 준 후 배양된 세포를 수집하였으며, 세포를 수집한 후 인산 완충용액으로 2번 세척하였다. 형광 표지된 작은 간섭 리보핵산이 들어간 세포들을 형광 유세포 분석기인 BD FACS CALIBUR (BD Bioscience, USA)를 사용하여 형광 강도 피크의 이동에 의한 세포내 전달 효율을 분석하였다. 이를 도 9에 나타내었다.

<211> 도 9의 도면에서 세포에 아무 처리하지 않은 미처리군 (도 9A)은 대조군으로 리보핵산이 세포 내로 전달되지 않아 피크가 거의 이동하지 않았고 (0.22% 이동함), 도 9B의 비교예 1을 사용한 그래프에서는 형광이 표지된 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율이 80.79%인 것으로 확인 되었다. 한편, 본 발명의 실시예 39의 처리군의 경우 95.38%를 나타내어 비교예 1 (도 9B)의 처리군에 비하여 보다 향상된 세포내 전달효율을 갖는 것으로 확인되었다.

<212> 따라서 본 발명의 실시예 39(도 9C)에서 제조된 핵산 전달체가 비교예 1 보다 우수한 리보핵산 전달 효율을 가짐을 알 수 있었다.

<213> 4-3. K562 세포주에서의 형광 유세포 분석법 (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)을 이용한 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 측정

<214> K562 세포주를 실험 전날 48 웰 플레이트에 웰 당 2.5×10^4 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 Block-iT (Invitrogen, USA) 5pmole씩과 비교예 1(LipofectamineTM2000, Invitrogen, USA)과 실시예 13에서 제조된 핵산 전달체 용액을 무게비가 1:80이 되도록 각각 첨가하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 가하여 37℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 수집한 후 인산 완충용액으로 2번 세척하였다. 형광 표지된 작은 간섭 리보핵산이 들어간 세포들을 형광 유세포 분석기인 BD FACS CALIBUR (BD Bioscience, USA)를 사용하여 형광 강도 피크의 이동에 의한 세포내 전달 효율을 분석하였다. 이를 도 10에 나타내었다.

<215> 도 10의 도면에서 세포에 아무 처리하지 않은 미처리군 (도 10A)은 대조군으로 리보핵산이 세포 내로 전달되지 않아 피크가 거의 이동하지 않았고 (0.38%), 도 10B의 비교예 1을 사용한 처리군의 경우 형광이 표지된 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율이 48.21%인 것으로 확인 되었다.

<216> 한편, 도 10C의 결과에서 나타나듯이 본 발명의 실시예 13 (도 10C)의 처리군의 경우 83.67%를 나타내어 비교예 1의 처리군에 비하여 향상된 세포내 전달효율을 갖는 것으로 확인되었다.

<217> 따라서 본 발명의 실시예 13에서 제조된 핵산 전달체가 비교예 1보다 우수한 리보핵산 전달 효율을 가짐을 알 수 있었다.

<218> 4-4. TF-1 세포주에서의 형광 유세포 분석법 (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)을 이용한 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 측정

<219> TF-1 세포주를 실험 전날 48 웰 플레이트에 웰 당 2.5×10^4 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 Block-iT (Invitrogen, USA) 5pmole씩과 비교예 1 (LipofectamineTM2000, Invitrogen, USA)과 실시예 15에서 제조된 핵산 전달체 용액을 무게비가 1:80이 되도록 각각 첨가하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 가하여 37℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 수집한 후 인산 완충용액으로 2번 세척하였다. 형광 표지된 작은 간섭 리보핵산이 들어간 세포들을 형광 유세포 분석기인 BD FACS CALIBUR (BD Bioscience, USA)를 사용하여 형광 강도 피크의 이동에 의한 세포내 전달 효율을 분석하였다. 이를 도 11에 나타내었다.

<220> 도 11의 도면에서 세포에 아무 처리하지 않은 미처리군 (도 11A)은 대조군으로 리보핵산이 세포 내로 전달되지 않아 피크가 거의 이동하지 않았고 (1.03% 이동함), 도 11B의 비교예 1을 사용한 그래프에서는 형광이 표지된 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율이 57.73%인 것으로 확인 되었다. 한편, 본 발명의 실시예 15의 처리군의 경우 도 11C에서 확인할 수 있듯이 87.82%를 나타내어 비교예 1의 처리군에 비하여 향상된 세포내 전달효율을 갖는 것으로 확인되었다.

<221> 따라서 본 발명의 실시예 15에서 제조된 핵산 전달체가 비교예 1 보다 우수한 리보핵산 전달 효율을 가짐을 알 수 있었다.

<222> [실험예 5] 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 작은간섭 리보핵산 전달 효능 평가

<223> 5-1. HeLa 세포에서 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 작은간섭 리보핵산 전달 효능 평가

<224> HeLa 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 세포를 5×10^4 씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 50㎕씩을 넣고, 서바이빈을 타겟하는 siRNA 20 pmole을 비교예 1 (LipofectamineTM2000과 siRNA 복합체 처리군)과 실시예 9과 실시예 22에서 제조된 핵산 전달체 용액을 무게비가 1:60이 되도록 각각 첨가하였다. 서바이빈 (survivin) 유전자(Gene bank accession number: NM_001168)의 발현 억제를 유도하기 위한 siRNA는 삼천리제약 (Samchully Pharmaceuticals, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 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 메신저 리보핵산 (mRNA)을 분리하였으며, 이 mRNA는 AccuPowerRT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사 하였다. 서바이빈(survivin)에 특이적인 프라이머의 서열은 5'-GGACCACCGCATCTCTACAT-3'(정

방향), 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 밴드를 비교군으로 사용하여 정량적인 발현의 변화량을 측정하였다.

<225> 도 12는 미처리군과 비교예 1과 실시예 9와 22를 사용한 복합체를 처리한 경우 HeLa 세포내에서 타겟 유전자인 서바이빈의 전사체 발현을 비교한 것이다. 대조군은 미처리군과 비교예 1을 사용하였다.

<226> 미처리 대조군에 비해 실시예 9와 22를 사용한 복합체 처리군의 경우 서바이빈 유전자의 발현양이 각각 16.3%와 12.8%와 같이 현저히 낮은 것으로 확인되어 비교예 1에서 나타난 37.6% 발현양에 비해 서바이빈을 타겟하는 작은간섭 리보핵산의 전달효율이 우수한 것으로 확인되었다.

<227> 이와 같은 결과에서 알 수 있듯이, 실시예 9와 22에서 제조된 핵산 전달체가 HeLa 세포 내로 작은간섭 리보핵산 물질을 비교예 1 보다 우수한 효율로 전달하여 표적유전자의 발현을 선택적으로 억제시킴을 알 수 있었다.

<228> 5-2. WM 266.4 세포에서 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 작은간섭 리보핵산 전달 효능 평가

<229> WM 266.4 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 세포를 5×10^4 씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 50㎕씩을 넣고, 서바이빈을 타겟하는 siRNA 20 pmole을 비교예 1 (LipofectamineTM2000과 siRNA 복합체 처리군)과 실시예 18과 실시예 36에서 제조된 핵산 전달체 용액을 무게비가 1:60이 되도록 각각 첨가하였다.

<230> 서바이빈 (survivin) 유전자(Gene bank accession number: NM_001168)의 발현 억제를 유도하기 위한 siRNA는 삼천리제약 (Samchully Pharmaceuticals, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 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 메신저 리보핵산 (mRNA)을 분리하였으며, 이 mRNA는 AccuPowerRT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사 하였다.

<231> 도 13은 미처리군과 비교예 1과 실시예 18과 36을 사용한 복합체를 처리한 경우 WM 266.4 세포내에서 타겟 유전자인 서바이빈의 전사체 발현을 비교한 것이다. 대조군은 미처리군과 비교예 1을 사용하였다.

<232> 미처리 대조군에 비해 실시예 18과 36을 사용한 복합체 처리군의 경우 서바이빈 유전자의 발현양이 각각 4.6%와 5.7% 같이 현저히 낮은 것으로 확인되어 비교예 1에서 나타난 20.3% 발현양에 비해 서바이빈을 타겟하는 작은간섭 리보핵산의 전달효율이 우수한 것으로 확인되었다.

<233> 이와 같은 결과에서 알 수 있듯이, 실시예 18과 36에서 제조된 핵산 전달체가 WM 266.4 세포 내로 작은간섭 리보핵산물질을 비교예 1 보다 우수한 효율로 전달하여 표적유전자의 발현을 선택적으로 억제시킴을 알 수 있었다.

<234> 5-3. KB 세포에서 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 작은간섭 리보핵산 전달 효능 평가

<235> KB 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 세포를 5×10^4 씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 50㎕씩을 넣고, 서바이빈을 타겟하는 siRNA 20 pmole을 비교예 1 (LipofectamineTM2000과 siRNA 복합체 처리군)과 실시예 24와 실시예 38에서 제조된 핵산 전달체 용액을 무게비가 1:60이 되도록 각각 첨가하였다.

<236> 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 메신저 리보핵산 (mRNA)을 분리하였으며, 이 mRNA는 AccuPowerRT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사 하였다.

<237> 도 14는 미처리군과 비교예 1과 실시예 24와 38을 사용한 복합체를 처리한 경우 KB 세포내에서 타겟 유전자인 서바이빈의 전사체 발현을 비교한 것이다. 대조군은 미처리군과 비교예 1을 사용하였다.

<238> 미처리 대조군에 비해 실시예 24와 38을 사용한 복합체 처리군의 경우 서바이빈 유전자의 발현양이 각각 19.2%와 10.3% 같이 현저히 낮은 것으로 확인되어 비교예 1에서 나타난 44.2% 발현양에 비해 서바이빈을 타겟하는 작은간섭 리보핵산의 전달효율이 더 우수한 것으로 확인되었다.

<239> 이와 같은 결과에서 알 수 있듯이, 실시예 24와 38에서 제조된 핵산 전달체가 KB 세포 내로 작은간섭 리보핵산 물질을 비교예 1 보다 더 우수한 효율로 전달하여 표적유전자의 발현을 선택적으로 억제시킴을 알 수 있었다.

<240> 5-4. K562 세포에서 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 작은간섭 리보핵산 전달 효능 평가

<241> K562 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 세포를 5×10^4 씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때, 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 50㎕씩을 넣고, 서바이빈을 타겟하는 siRNA 20 pmole을 비교예 1 (LipofectamineTM2000과 siRNA 복합체 처리군)과 실시예 4와 실시예 32에서 제조된 핵산 전달체 용액을 무게비가 1:60이 되도록 각각 첨가하였다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하고 이렇게 제조된 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 세포 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포 내에 존재하는 전체 메신저 리보핵산 (mRNA)을 분리하였으며, 이 mRNA는 AccuPowerRT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사 하였다.

<242> 도 15는 미처리군과 비교예 1과 실시예 4와 32를 사용한 복합체를 처리한 경우 K562 세포내에서 타겟 유전자인 서바이빈의 전사체 발현을 비교한 것이다. 대조군은 미처리군과 비교예 1을 사용하였다.

<243> 미처리 대조군에 비해 실시예 4와 32를 사용한 복합체 처리군의 경우 서바이빈 유전자의 발현양이 각각 52.6%와 48.1% 같이 낮은 것으로 확인되어 비교예 1에서 나타난 95.3% 발현양에 비해 서바이빈을 타겟하는 작은간섭 리보핵산의 전달효율이 더 우수한 것으로 확인되었다.

<244> 이와 같은 결과에서 알 수 있듯이, 실시예 4와 32에서 제조된 핵산 전달체가 K562 세포 내로 작은간섭 리보핵산 물질을 비교예 1 보다 더 우수한 효율로 전달하여 표적유전자의 발현을 선택적으로 억제시킴을 알 수 있었다.

<245> [실험예 6] 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)을 사용한 세포독성 평가

<246> 6-1. WM 266.4 세포주에서의 세포독성 평가

<247> 본 발명의 핵산 전달체의 세포 독성에 관한 평가를 하기 위하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다. WM 266.4 세포에 대조군으로 미처리군과 비교예 1 (LipofectamineTM2000과 siRNA 복합체 처리군)을 사용하였으며, 작은 간섭 리보핵산과 실시예 11과 실시예 30에서 제조한 핵산 전달체의 복합체 무게비가 1:60이 되도록 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.

<248> 세포를 웰 당 2.5×104 세포가 되도록 48 웰(well)에 분주 (seeding)하고 12시간 배양한 후 핵산 전달체와 siRNA의 복합체 조성을 처리하였다. 24시간 경과 후 각각 MTT 용액을 배지의 10%가 되도록 가하고, 3시간 더 배양한 다음 상층액을 제거하고 0.04 N 염산 이소프로판올 용액을 첨가한 후에 엘라이져 리더 (ELISA reader, Sunrise-Basic TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 570 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

<249> 도 16으로부터 실시예 11과 실시예 30에서 제조된 본 발명의 핵산 전달체는 사람의 피부 흑색종 세포에 대해 비교예 1 보다 더 낮은 독성을 갖는다는 사실을 알 수 있다.

<250> 6-2. HeLa 세포주에서의 세포독성 평가

<251> 본 발명의 핵산 전달체의 세포 독성에 관한 평가를 하기 위하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다. HeLa 세포에 대조군으로 미처리군과 비교예 1 (LipofectamineTM2000과 siRNA 복합체 처리군)을 사용하였으며, 작은 간섭 리보핵산과 실시예 14와 34에서 제조한 핵산 전달체의 복합체 무게비가 1:60이 되도록 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.

<252> 세포를 웰 당 2.5×104 세포가 되도록 48 웰(well)에 분주 (seeding)하고 12시간 배양한 후 핵산 전달체와 siRNA의 복합체 조성을 처리하였다. 24시간 경과 후 각각 MTT 용액을 배지의 10%가 되도록 가하고, 3시간 더 배양한 다음 상층액을 제거하고 0.04 N 염산 이소프로판올 용액을 첨가한 후에 엘라이져 리더 (ELISA reader, Sunrise-Basic TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 570 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

<253> 도 17로부터 실시예 14와 실시예 34에서 제조된 본 발명의 핵산 전달체는 사람의 자궁 경부암 상피세포에 대해

비교예 1 보다 낮은 독성을 갖는다는 사실을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

<254> 도 1는 핵자기 공명법 (NMR)을 사용하여 본 발명의 핵산 전달체의 합성 여부를 확인한 결과를 보여준다.

<255> 도 2은 적외선 흡수 스펙트럼 분석법 (FT-IR)을 사용하여 본 발명의 핵산 전달체의 합성 여부를 확인한 결과를 보여준다.

<256> 도 3은 작은 간섭 리보핵산을 사용하여 본 발명의 핵산 전달체와 결합체를 형성하는지 여부를 아가로즈 젤 전기영동 방법을 이용하여 확인한 결과이다.

<257> 도 4는 작은 간섭 리보핵산을 사용하여 본 발명의 핵산 전달체와 결합체를 형성한 후 결합체의 크기를 동적광산란 장비를 이용하여 측정한 결과이다.

<258> 도 5은 형광 표식이 붙어있는 작은 간섭 리보핵산을 사용하여 사람의 자궁경부암 세포인 HeLa에서 본 발명의 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율을 보여주는 사진이다.

<259> 도 6는 형광 표식이 붙어있는 작은 간섭 리보핵산을 사용하여 쥐의 간암 세포인 Hepa 1-6에서 본 발명의 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율을 보여주는 사진이다.

<260> 도 7는 형광 표식이 붙어있는 작은 간섭 리보핵산을 사용하여 사람의 피부 흑색종 세포인 WM 266.4에서 본 발명의 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율을 보여주는 사진이다.

<261> 도 8은 형광 표식이 붙어있는 작은 간섭 리보핵산을 사용하여 사람의 폐암 세포인 A549 세포에서 본 발명의 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율 정도를 형광 유세포분석기 (FACS)를 사용해 분석한 결과이다.

<262> 도 9는 형광 표식이 붙어있는 작은 간섭 리보핵산을 사용하여 사람의 케라틴 분비형 자궁경부암 세포인 KB세포에서 본 발명의 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율 정도를 형광 유세포분석기 (FACS)를 사용해 분석한 결과이다.

<263> 도 10은 형광 표식이 붙어있는 작은 간섭 리보핵산을 사용하여 사람의 혈액성 백혈병 세포인 K562세포에서 본 발명의 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율 정도를 형광 유세포분석기 (FACS)를 사용해 분석한 결과이다.

<264> 도 11은 형광 표식이 붙어있는 작은 간섭 리보핵산을 사용하여 사람의 골수성 백혈병 세포인 TF-1세포에서 본 발명의 핵산 전달체의 세포내 핵산 전달 효율 정도를 형광 유세포분석기 (FACS)를 사용해 분석한 결과이다.

<265> 도 12는 본 발명의 핵산 전달체를 이용하여 서바이빈 발현 억제 작은 간섭 리보핵산에 의해 매개된 서바이빈 전사체 발현 억제 효능을 사람의 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에서 역전사 중합효소 연쇄반응으로 확인한 결과를 보여준다.

<266> 도 13은 본 발명의 핵산 전달체를 이용하여 서바이빈 발현 억제 작은 간섭 리보핵산에 의해 매개된 서바이빈 전사체 발현 억제 효능을 사람의 피부 흑색종 세포인 WM 266.4 세포에서 역전사 중합효소 연쇄반응으로 확인한 결과를 보여준다.

<267> 도 14는 본 발명의 핵산 전달체를 이용하여 서바이빈 발현 억제 작은 간섭 리보핵산에 의해 매개된 서바이빈 전사체 발현 억제 효능을 사람의 케라틴 분비형 자궁경부암 세포인 KB세포에서 역전사 중합효소 연쇄반응으로 확인한 결과를 보여준다.

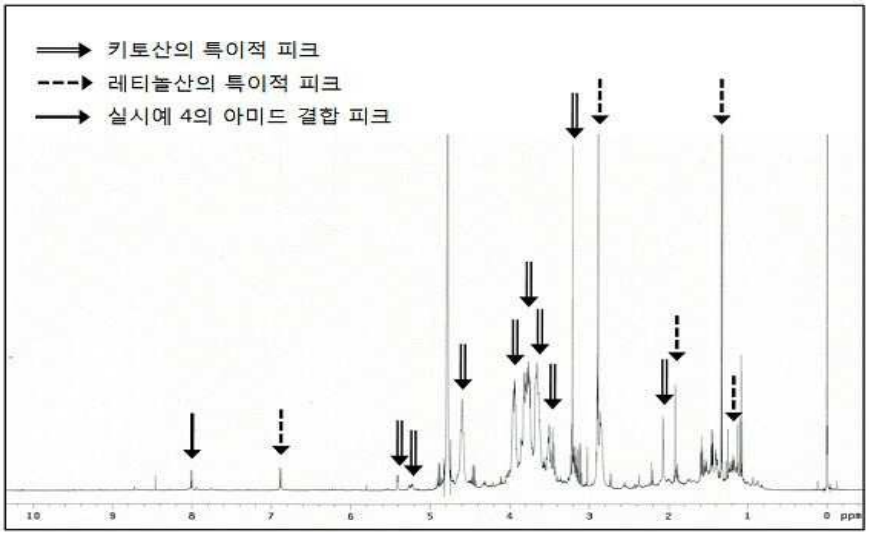
<268> 도 15는 본 발명의 핵산 전달체를 이용하여 서바이빈 발현 억제 작은 간섭 리보핵산에 의해 매개된 서바이빈 전사체 발현 억제 효능을 사람의 혈액성 백혈병 세포인 K562세포에서 역전사 중합효소 연쇄반응으로 확인한 결과를 보여준다.

<269> 도 16은 MTT 염색법을 사용하여 본 발명의 핵산 전달체의 세포독성을 사람의 피부 흑색종 세포인 WM 266.4에서 확인한 결과를 보여준다.

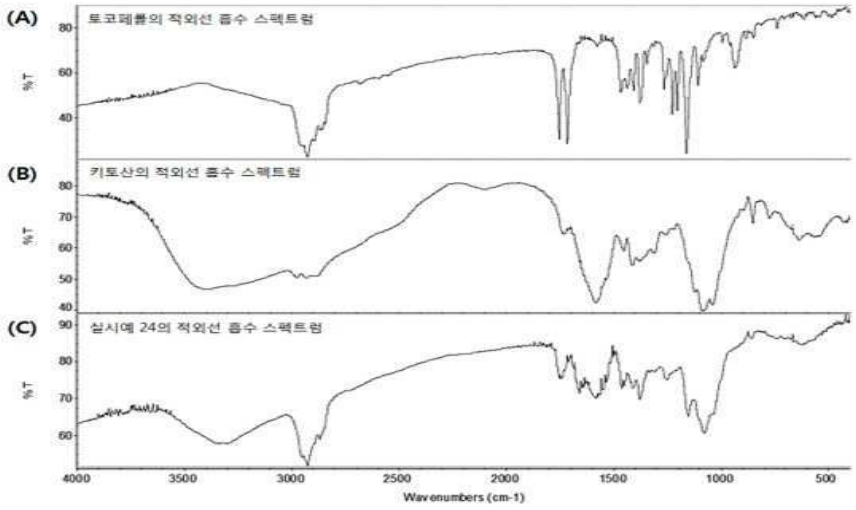
<270> 도 17은 MTT 염색법을 사용하여 본 발명의 핵산 전달체의 세포독성을 사람의 자궁경부암 세포인 HeLa에서 확인한 결과를 보여준다.

도면

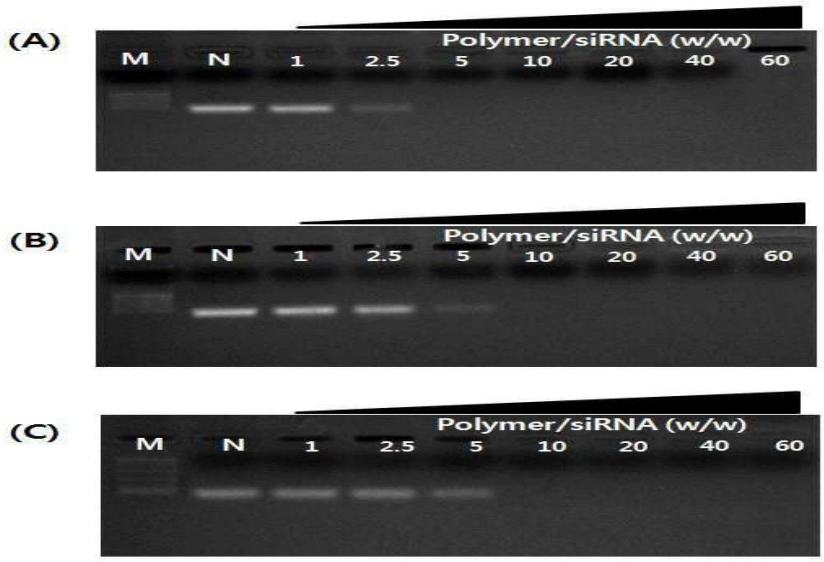
도면1


키토산의 특이적 피크
레티놀산의 특이적 피크
실시예 4의 아미드 결합 피크
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0 ppm

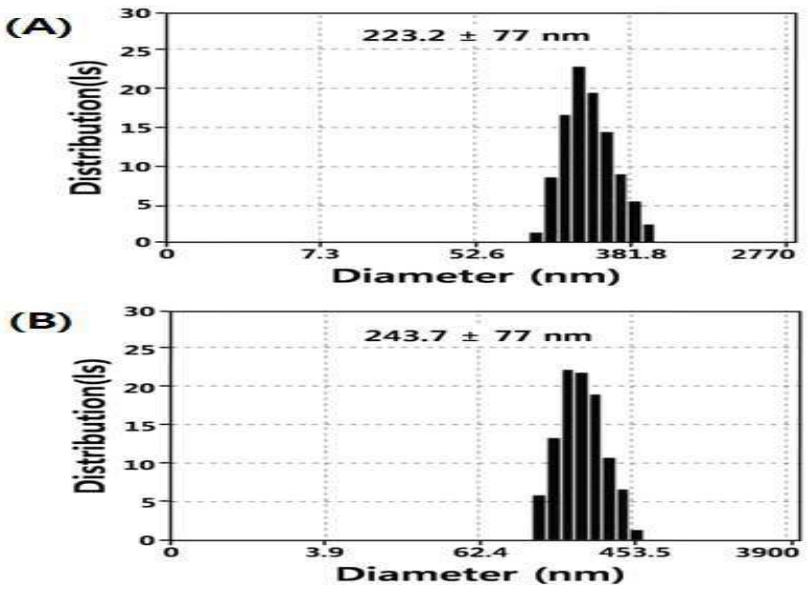
도면2


(A)
토코페롤의 적외선 흡수 스펙트럼
%T
(B)
키토산의 적외선 흡수 스펙트럼
%T
(C)
실시예 24의 적외선 흡수 스펙트럼
%T
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumbers (cm-1)

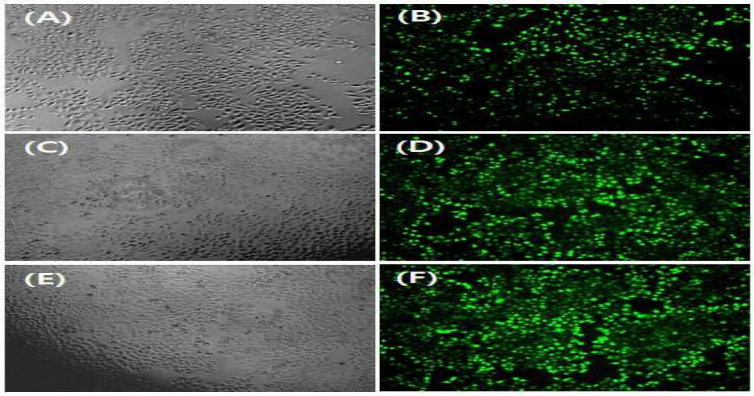
도면3


(A)
Polymer/siRNA (w/w)
M
N
1
2.5
5
10
20
40
60
(B)
Polymer/siRNA (w/w)
M
N
1
2.5
5
10
20
40
60
(C)
Polymer/siRNA (w/w)
M
N
1
2.5
5
10
20
40
60

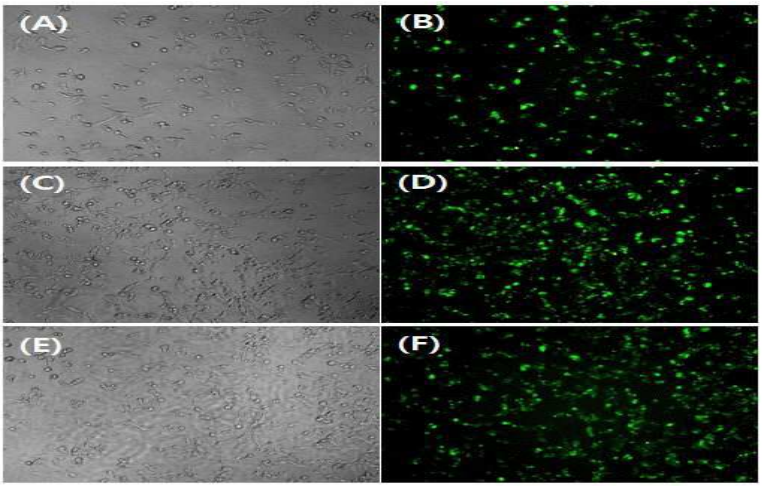
도면4


(A)
223.2 ± 77 nm
Distribution(ls)
30
25
20
15
10
5
0
0
7.3
52.6
381.8
2770
Diameter (nm)
(B)
243.7 ± 77 nm
Distribution(ls)
30
25
20
15
10
5
0
0
3.9
62.4
453.5
3900
Diameter (nm)

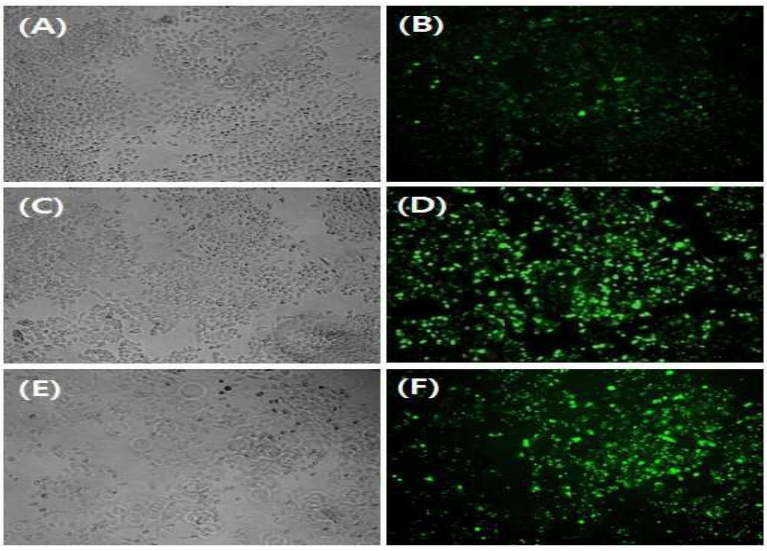
도면5



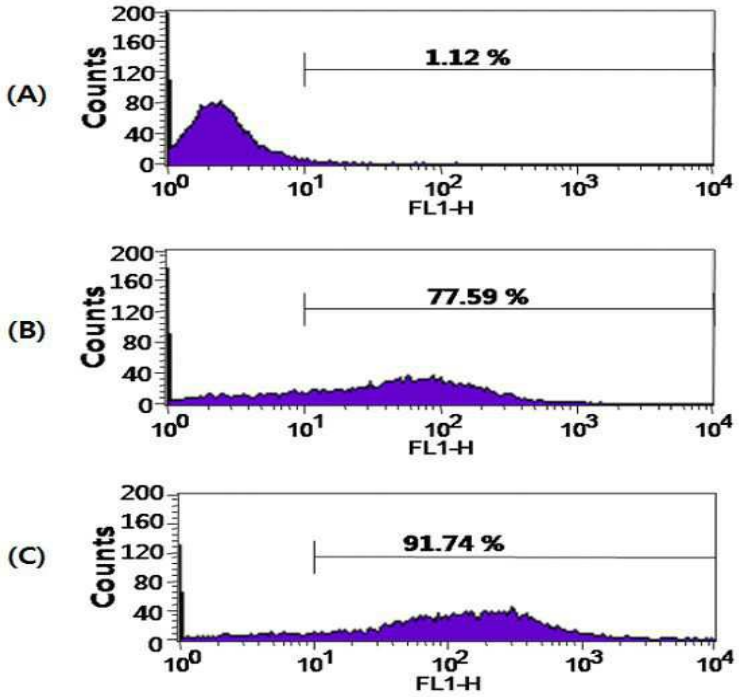
도면6



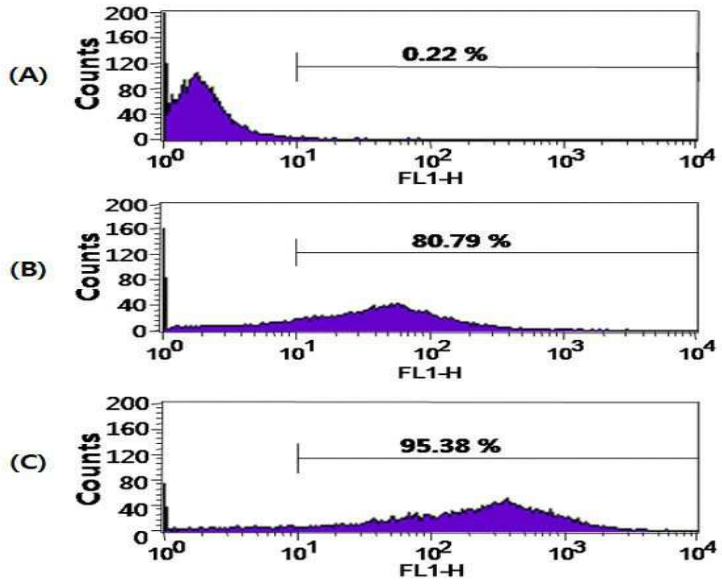
도면7



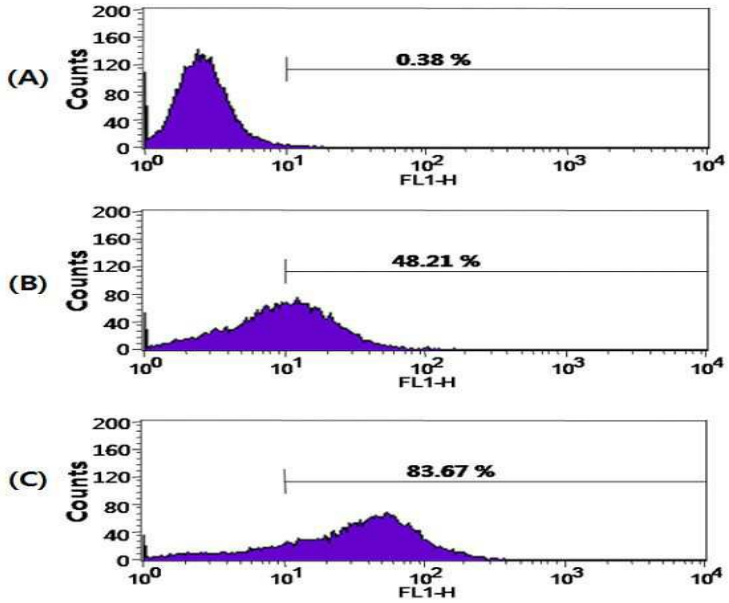
도면8


(A)
Counts
1.12 %
FL1-H
(B)
Counts
77.59 %
FL1-H
(C)
Counts
91.74 %
FL1-H

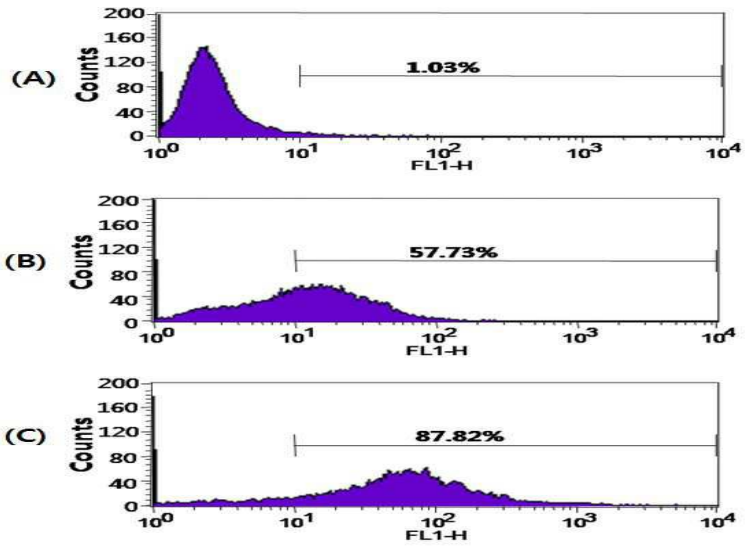
도면9


(A)
Counts
0.22 %
FL1-H
(B)
Counts
80.79 %
FL1-H
(C)
Counts
95.38 %
FL1-H

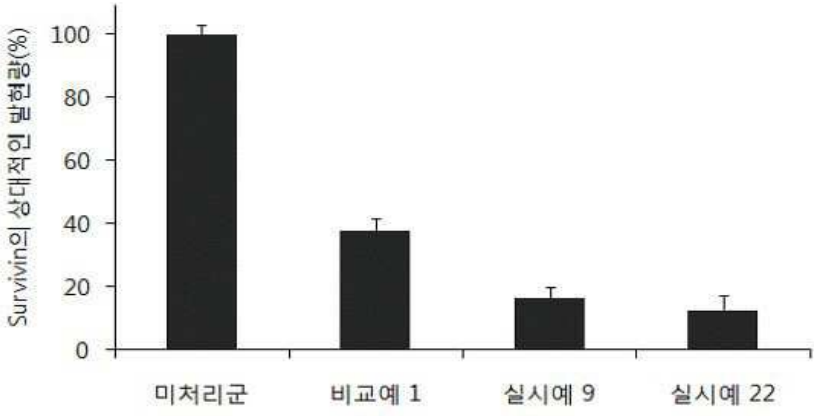
도면10


(A)
Counts
0.38 %
FL1-H
(B)
Counts
48.21 %
FL1-H
(C)
Counts
83.67 %
FL1-H

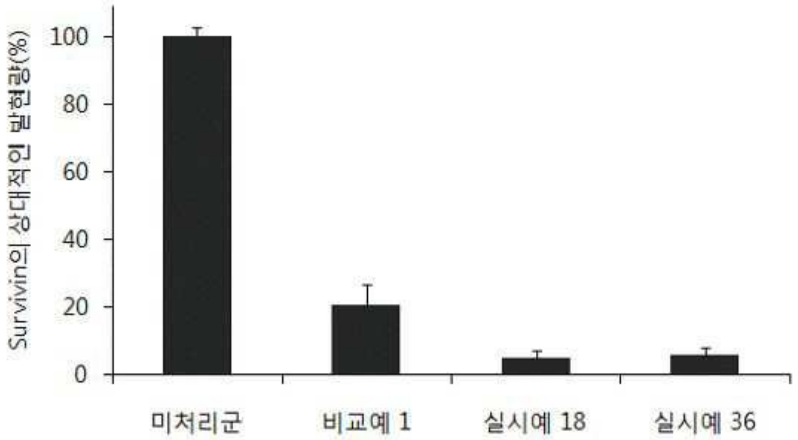
도면11


(A)
Counts
1.03%
FL1-H
(B)
Counts
57.73%
FL1-H
(C)
Counts
87.82%
FL1-H

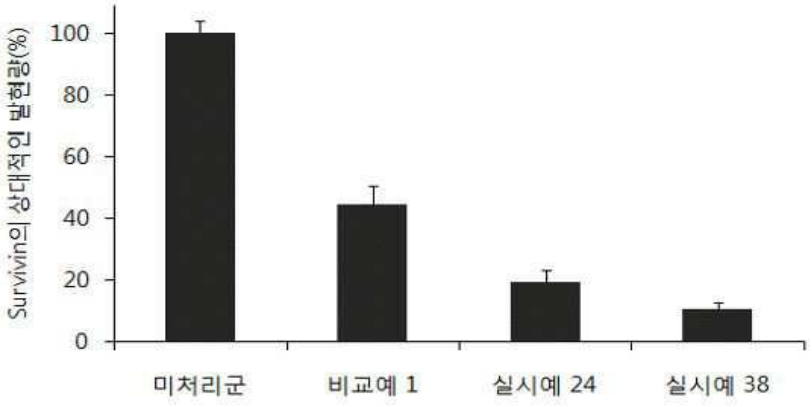
도면12



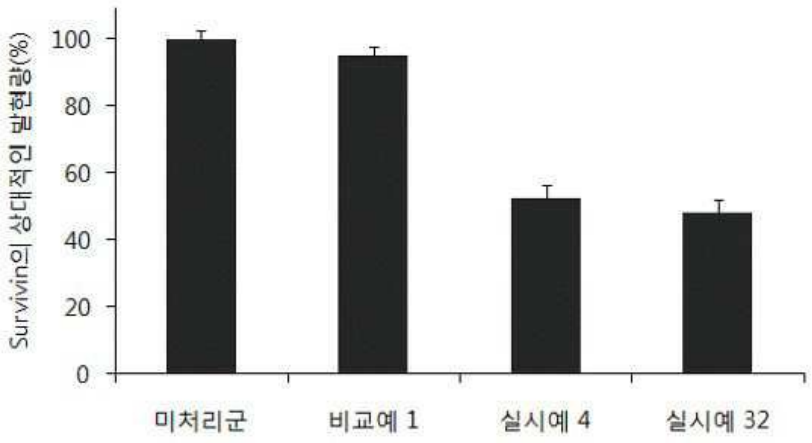
도면13



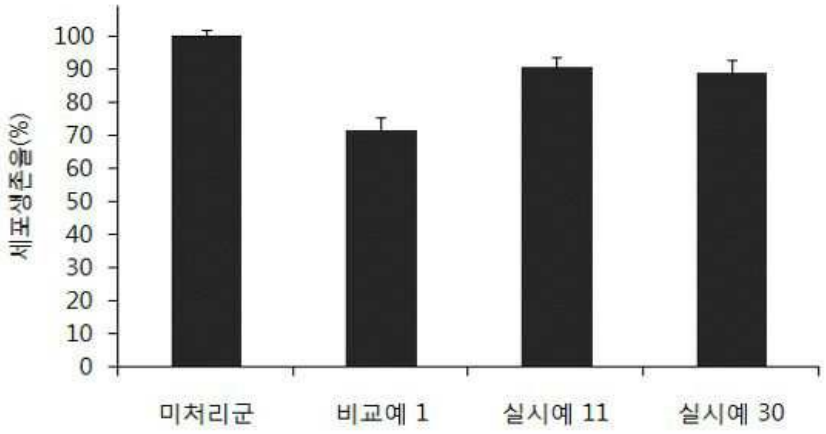
도면14



도면15



도면16



도면17

