(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년01월16일
(11) 등록번호 10-0794449
(24) 등록일자 2008년01월07일

(51) Int. Cl.
A61K 9/127 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0030730
(22) 출원일자 2007년03월29일
심사청구일자 2007년03월29일
(56) 선행기술조사문헌
JP03236325 A
JP08301782 A
US20020102297 A1
US6358523 B1

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
오유경
서울 도봉구 도봉동 삼환아파트 4동 405호
신혜정
서울 영등포구 신길3동 281-11
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

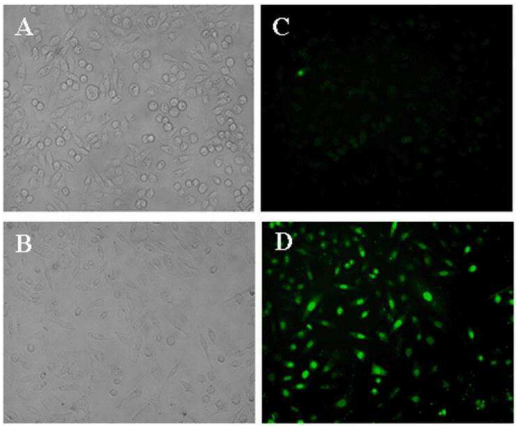
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 신영신

(54) 핵산 전달용 양이온성 인지질 나노입자 조성물

(57) 요 약

본 발명은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC), 3b-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바밀]콜레스테롤(3b-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-cabamyl]cholesterol, DC-콜레스테롤) 및 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPhPE)을 포함하는 양이온성 인지질 리포좀 조성물, 이와 복합체를 형성하는 리포좀-핵산 복합체 및 이를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 양이온성 인지질 리포좀은 30 내지 450nm 범위의 나노 입자경을 가지고 있으며, 종래의 리포좀에 비하여 세포 내 핵산 전달능 및 세포 독성의 감소에 효과적이므로 세포 내 핵산 도입에 의한 유전자 치료 등에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

서민성

경기 성남시 분당구 정자동 삼성아데나루체 B동 1301호

심가용

경기 용인시 수지구 죽전1동 GS자이아파트 103동 102호

특허청구의 범위

청구항 1

1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC), 3b-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바밀]콜레스테롤(3b-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]Cholesterol, DC-콜레스테롤) 및1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPhPE)을 포함하는 양이온성 인지질 리포좀 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE의 총질량을 기준으로 EDOPC 3 내지 45 중량%, DC-콜레스테롤 3 내지 45 중량% 및 DPhPE 10 내지 94 중량%의 비율로 포함된 것인 양이온성 인지질 리포좀 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 양이온성 인지질 리포좀은 30 내지 450nm 크기의 입자경을 가지는 것을 특징으로 하는 양이온성 인지질 리포좀 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 양이온성 인지질 리포좀 조성물 및 핵산이 결합한 리포좀-핵산 복합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 핵산은 유전자, DNA, RNA, 올리고뉴클레오티드, 앱타머, 플라스미드 및 작은 간섭 리보핵산(siRNA)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 리포좀-핵산 복합체.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 리포좀-핵산 복합체는 세레브로시드, 1,2-디스테아로일-sn-글리세롤-3포스포에탄올아민-N-[폴레이트(폴리에틸렌 글리콜)-2000], (1,2-디아실-sn-글리세롤-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)-1000] 및 (1,2-디스테아로일-sn-글리세롤-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000]으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 지질 유도체를 추가적으로 포함하는 리포좀-핵산 복합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 지질 유도체는 EDOPC, DC-콜레스테롤, DPhPE 및 제6항에서 선택 추가된 지질 유도체의 총 질량을 기준으로 1 내지 15 중량%의 비율로 포함된 것인 리포좀-핵산 복합체.

청구항 8

핵산을 세포 내로 전달하여 종양 또는 유전자 질환을 치료하기 위한, 제4항의 리포좀-핵산 복합체 및 약제학적으로 이용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 핵산은 유전자, DNA, RNA, 올리고뉴클레오티드, 앱타머, 플라스미드 데옥시리보핵산 및 작은 간섭 리보핵산(siRNA)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<15> 본 발명은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC), 3b-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바밀}콜레스테롤(3b-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-cabamyl]cholesterol, DC-콜레스테롤) 및 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPhPE)을 포함하는 양이온성 인지질 리포좀 조성물, 이와 복합체를 형성하는 리포좀-핵산 복합체 및 이를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

<16> 여러 가지 목적으로 동물이나 인간 피실험체의 몸에 핵산 물질을 도입하기 위한 방법들이 유전자 전달 기술 분야에 알려져 있다. 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 유전자 치료법이 암 처치를 위해 제안되고 있다.

<17> 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. 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, 제조 비용이나 시간에 있어서도 상업적으로 유리한 장점이 있다.

<18> 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).

<19> 또한, 당 분야에서 양이온성 인지질 리포좀을 대상으로 하여 유전자 전달 효율의 증가를 연구한 예가 다양한 세포주들을 대상으로 보고되어 왔다. 예를 들어 양이온성 인지질인 3b-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바밀]콜레스테롤(이하 DC-콜레스테롤)과 세포 융합성 인지질인 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(dioleoyl phosphatidylethanolamine, 이하 DOPE)의 조성으로 이루어진 양이온성 인지질 리포좀이 다양한 유전자들의 전달체로서 사용될 수 있음이 알려졌다(Aberle A.M. et al., Biochemistry 37, 6533-6540 (1998); Colosimo, A., et al., Biochim. Biophys. Acta 1419, 186, (1999); Villaret D. et al., Head & Neck 24, 661-669 (2002)). 이외에, 양이온성 지질을 함유하는 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA)의 경우 연구용으로 시판되고 있으며 transfection agent로서 당 분야에서 많이 사용되어왔다. 그러나, 이들 유전자 전달체는 세포 독성이나 세포 내 유전자 전달 효율 면에서 아직 보완되야 할 점이 많다. 따라서 비바이러스성 수송체를 사용하여 세포 독성이 작으면서도 세포내로 효율적으로 플라스미드 유전자나 작은 간섭 리보핵산 등의 핵산을 세포내로 전달하는 기술은 당 분야에서 절대적으로 필요한 기술이라 할 것이다.

<20> 이에 본 발명자들은 핵산 등의 세포 내 전달 효율을 증가시키기 위하여 다양한 조성의 양이온성 인지질 리포좀을 이용하여 예의 노력한 결과, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(EDOPC), 3b-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바밀]콜레스테롤(DC-콜레스테롤), 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DPhPE)의 일정 조성을 가지는 양이온성 인지질 리포좀 나노입자의 경우 사람 및 쥐의 종양 세포주에서 핵산의 전달 효율을 현저히 증가시킬 뿐만 아니라 세포 독성도 현저하게 감소시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<21> 본 발명의 하나의 목적은 세포들에서 독성을 감소시키고 세포 내로 목적하는 물질, 예를 들어 핵산의 전달을 증강시킬 수 있는 양이온성 인지질 리포좀의 조성물을 제공하는 것이다.

<22> 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 양이온성 인지질 리포좀 및 핵산이 결합된 리포좀-핵산 복합체를 제공하는 것이다.

<23> 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 리포좀-핵산 복합체 및 약제학적으로 이용가능한 담체를 포함하는 개체 내에 핵산을 전달하여 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

<24> 본 발명의 다른 하나의 목적은 (1) 상기 양이온성 인지질 리포좀을 제조하는 단계; (2) 상기 (1)단계에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀과 핵산을 결합하여 리포좀-핵산 복합체를 형성하는 단계; 및 (3) 상기 (2)단계의 리포좀-핵산 복합체를 동물의 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 핵산을 동물의 세포 내로 전달시키는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<25> 하나의 양태로서, 본 발명은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC), 3b-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바밀}콜레스테롤(3b-[N-(N',N'-dimethylaminoethan)-cabamyl]cholesterol, DC-콜레스테롤) 및 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPhPE)을 포함하는 양이온성 인지질 리포좀 조성물에 관한 것이다.

<26> 본 발명의 "리포좀"은 내부 수용성 공간을 둘러싸고 있는 외부 지질이 다중층(multilayer)을 형성하고 있는 밀폐된 구조를 말한다. 특히, 본 발명의 상기 리포좀은 이중막이 여러겹으로 중첩되어 있는 지질 다층형 소구체(multilamella vesicle) 형상을 가지고 있다. 또한, 본 발명의 상기 리포좀은 양이온성 인지질인 DC-콜레스테롤 및 DPhPE, 및 세포 융합성 인지질인 EDOPC가 다중층을 형성하고 있으며, 이로부터 본 발명의 리포좀은 양이온성 특성을 갖는 나노 소구체(nanoparticle)이다.

<27> 본 발명의 상기 리포좀은 당해 분야에서 잘 알려진 방법으로 제조할 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 지질 다층형 소구체는 지질-필름 수화 기술에 의하여 제조할 수 있다. 구체적으로, 상기 EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE를 각각 적당한 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 디메틸설폭시드, 클로로포름 또는 이들의 혼합물 등에 용해시킨 다음, 이들 유기 용매를 제거시켜 얇은 박막 필름을 형성한다. 상기 용매를 제거시키는 방법은 로터리 증발 및 질소 유출 등을 포함하나, 이에 국한되지 않는 임의 방법을 이용하여 제거할 수 있다.

<28> 이후 박막 필름에 수성 배지를 첨가하고 수화시켜 본 발명의 리포좀을 제조할 수 있다.

<29> 본 발명의 리포좀 조성물에 포함되는 EDOPC는 리포좀을 구성하는 인지질의 총 질량을 기준으로 3 내지 45 중량%, 바람직하게는 6 내지 35 중량%이며, DC-콜레스테롤은 3 내지 45 중량%, 바람직하게는 6 내지 35 중량%이며, DPhPE는 10 내지 94 중량%, 바람직하게는 30 내지 88 중량%이다. 본 발명자는 상기 EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE의 조성비가 상기와 같은 경우 본 발명의 목적을 가장 효과적으로 달성할 수 있음을 발견하였다.

<30> 본 발명의 리포좀은 하기에서 설명하는 바와 같이 리포좀을 이용한 동물세포로의 전달을 방해하지 않는 입자경이라면 어떠한 크기라도 가능하다. 일반적으로 리포좀의 크기는 약 10 nm 내지 500 nm, 바람직하게는 30nm 내지 450 nm의 입자 직경 (diameter) 범위 에서 실질적으로 균등한 크기를 갖는 나노입자 치수로 만들 수 있다. 본 발명의 리포좀에 대한 하나의 효과적인 치수화 방법은 30 nm 내지 200 nm, 일반적으로는 50 nm, 100 nm 또는 200 nm의 범위로 선택된 균일한 막공 크기(membrane pore size)를 갖는 일련의 폴리카보네이트 막을 통하여 리포좀의 수성 현탁액을 압출(extrusion) 시키는 것을 포함한다. 막공의 크기는 막을 통한 압출에 의해 생성된 평균 입도의 리포좀에 대략 상응하며, 특히 제조된 리포좀의 크기를 균질화 하기 위하여 동일한 막공 크기의 막여과지 (membrane filter)를 통하여 수회, 예를 들어 3회 이상 압출시킨다. 또한, 균질화 방법은 일정 크기 미만, 바람직하게는 300 nm 미만의 크기로 리포좀의 입자크기를 조절하는데 유용하게 사용할 수 있다(Martin, F.J., in SPECIALIZED DRUG DELIVERY SYSTEMS-MANUFACTURING AND PRODUCTION TECHNOLOGY, (P. Tyle, Ed.) Marcel Dekker, New York, pp. 267-316(1990)).

<31> 상기와 같이 구성되고 나노크기의 입자경을 가지는 본 발명의 리포좀은 본 발명의 또 다른 목적인 다양한 동물세포에 목적하는 물질, 바람직하게는 핵산을 효과적으로 전달하는데 이용할 수 있으며, 또한 세포의 독성이 감

소됨으로써 목적 물질, 바람직하게는 핵산의 세포 내 전달을 통한 유전자 치료 등에 효과적으로 사용할 수 있다.

<32> 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 리포좀 조성물과 핵산이 결합한 리포좀-핵산 복합체에 관한 것이다.

<33> 본 발명의 "핵산"은 유전자, DNA, RNA, 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide), 앱타머(aptamer), 플라스미드 및 작은 간섭 리보핵산 (siRNA) 등을 포함하는 의미한다. 또한 상기 핵산은 핵산 구조 중의 인산부, 에스테르부 등에 포함되는 산소 원자 등이, 예컨대 황 원자 또는 불소 원자 등의 다른 원자나 메틸기 등의 알킬기로 치환된 유도체를 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 상기 핵산은 플라스미드 및 작은 간섭 리보핵산(small interfering RNA, siRNA)이다.

<34> 본 발명의 리포좀-핵산 복합체와 관련하여 "결합한" 또는 "결합된"이란 용어는 한 개 또는 그 이상의 다가양이온과 음이온 하전의 핵산이 하전 상호작용 (charge-charge interaction)으로 연결된 상태를 말하는 것으로 핵산 가닥은 리포좀과의 복합체 형성에 의하여 보다 더 조밀하게 채워진 구조를 형성할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 상기 리포좀 조성물은 양이온성 특성을 가지고 있으며, 상기 핵산은 음이온성 특성을 가지고 있으므로, 상기 양이온성 인지질 리포좀의 양하전과 상기 핵산의 음이온성 하전에 의해 상기 리포좀과 상기 핵산은 단순한 혼합(mix)에 의해서도 정전기적 결합을 통하여 리포좀-핵산 복합체가 형성될 수 있다.

<35> 리포좀과 결합한 핵산은 리포좀 지질 마이크로몰당 적어도 0.5㎍ 수준에서 리포좀과 결합한다. 바람직하게는 마이크로몰당 1, 5, 10, 20, 40㎍ 수준일 수 있으며, 보다 바람직하게는 리포좀에 마이크로몰당 약 2 내지 약 20㎍의 핵산이 결합한다. 본 발명의 구체적 실시에서는, 작은 간섭 리보핵산 또는 플라스미드가 마이크로몰당 약 2 내지 10㎍이 리포좀과 복합체를 형성한다. 상기 복합체에 포함되는 핵산의 양은 본 발명의 상기 리보좀이 포함된 용액과 상기 핵산이 포함된 용액을 혼합하고 방치하는 시간에 따라 결정할 수 있으며, 바람직하게는 실온에서 약 10분 내지 1시간, 보다 바람직하게는 15분 내지 30분 방치함으로써 목적하는 핵산의 양을 결정할 수 있다.

<36> 상기한 바와 같이 제조된 본 발명의 리포좀-핵산 복합체는 목적 장소, 즉 핵산의 도입이 필요한 동물세포에 목적물질, 즉 핵산을 효과적으로 전달할 수 있다. 구체적 실시에서, 본 발명의 리포좀-핵산 복합체는 사람의 자궁경부암 상피 세포인 SiHa 및 HeLa 세포주, 사람의 자궁암 세포인 VK2 세포주, 쥐의 간암 세포주인 Hepa1-6 세포주, 사람의 간암 세포주인 Hep3B 및 Huh7 세포주에 효과적으로 핵산을 전달하고 있음을 확인할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 리포좀-핵산 복합체는 작은간섭 리보핵산(siRNA) 및 플라스미드 유전자를 종래의 리포좀 전달체에 비하여 약 15% 이상 세포 내 전달 효율을 증가시킨다(표 1 및 2 등 참조).

<37> 또한, 본 발명의 상기 리포좀-핵산 복합체는 동물 세포에 목적물질, 즉 핵산을 전달하면서 발생할 수 있는 세포 독성의 문제를 종래 시판되고 있거나 Aberle A.M. 등의 문헌(Aberle A.M. et al., Biochemistry 37, 6533-6540 (1998)) 등에 개시된 양이온성 인지질 리포좀에 비하여 현저히 감소시킴으로써 안전하게 사용할 수 있다.

<38> 당분야에서 핵산 전달체의 극복해야할 문제점 중의 하나는 세포주에 따라 핵산 전달 효율이 차이가 크다는 점이다. 이에 반하여 본 발명의 핵산과 복합체를 형성하는 리포좀은 기존의 핵산 전달체 들에 비하여 현저히 다양한 세포들에서 유전자 전달 효율을 범용적으로 증강시키는 특징을 나타내었다. 따라서, 핵산의 세포내 전달을 증진시킬 목적으로 기존에 사용되어 왔던 DC-콜레스테롤과 DOPE의 조성을 가진 양이온성 인지질 리포좀보다 다양한 종류의 세포들에 대하여 보편적으로 세포내 핵산 수송도를 증가시킬 뿐만 아니라 세포 독성도 현저하게 감소시키는 바, 핵산, 바람직하게는 작은 간섭 리보핵산(siRNA) 또는 플라스미드 유전자를 이용한 치료요법 등에 효과적으로 사용 가능하다.

<39> 또한, 본 발명의 상기 리포좀-핵산 복합체는 하기에서 설명하는 바와 같이 생체 내에서 특정 세포로의 표적화 능력을 증강시키기 위하여, 리포좀-핵산 복합체의 조성에 갈락토오스 지질 유도체, 만노오스 지질 유도체, 엽산 지질 유도체, 폴리에틸렌 글리콜 지질 유도체, 바이오틴 지질 유도체 등의 지질유도체를 하나 이상 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 지질유도체는 리포좀을 구성하는 지질의 전체 질량을 기준으로 약 0 내지 20 중량%, 바람직하게는 1 내지 15 중량%, 보다 바람직하게는 2 내지 10 중량% 포함할 수 있다.

<40> 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 리포좀-핵산 복합체 및 약제학적으로 이용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

<41> 본 발명에서 사용된 용어, "약제학적으로 이용가능한 담체"는 인간을 포함한 동물에 리포좀성 생리활성물질 조성물을 포함하는 지질 및 리포좀 투여와 관여하여 일반적으로 이용할 수 있는 매체를 말한다. 약제학적으로 이용가능한 담체는 당업자에게 잘 알려진 여러 가지 인자에 따라 제조될 수 있는데, 예를 들면 이용된 특정 생리

활성물질, 이의 농도, 안정성 및 의도된 생체이용성; 리포좀-핵산 복합체로 치료하고자 하는 질환 및 질병 또는 상태; 치료받을 개체, 나이, 크기 및 일반적인 상태; 조성물을 투여하는데 이용되는 경로, 예를 들어 비강, 구강, 안구, 국소, 경피 및 근육 등의 요인을 고려해야 하나, 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로 경구 투여 경로 이외의 생리활성물질 투여에 이용되는 약제학적으로 이용가능한 담체에는 D5W, 덱스트로즈 및 생리학적 염을 용적의 5% 이내로 포함하는 수용액을 포함한다. 또한 약제학적으로 이용가능한 담체에는 보존제 및 항산화제와 같은 활성 성분들의 안정성을 보강시킬 수 있는 추가 성분들을 포함할 수 있다.

<42> 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 경로는 적합한 모든 투여 경로가 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 의도하는 치료에 유효한 용량으로 투여된다. 특정의 의학적 질환을 치료하거나 또는 이의 진행을 억제시키는데 요구되는 치료학적 유효량은 의학 분야에 공지된 예비임상 연구 및 임상 연구를 이용하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명에서 상기 사용된 용어, "치료학적 유효량"은 임상의 또는 연구자가 목적하는, 특정 조직, 시스템, 및 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응을 유발시키는 활성 성분의 양을 말한다.

<43> 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (1) 본 발명의 상기 양이온성 인지질 리포좀을 제조하는 단계; (2) 상기 (1) 단계에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀과 핵산을 결합하여 리포좀-핵산 결합체를 형성하는 단계; 및 (3) 상기 (2)단계의 리포좀-핵산 복합체를 동물의 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 핵산을 동물의 세포 내로 전달시키는 방법에 관한 것이다.

<44> 상기 (1) 및 (2) 단계는 본 명세서의 상기에서 설명한 바와 같으며, 상기 접촉은 시험관 수준(in vitro) 또는 생체 내(in vivo)에서 리포좀-핵산 복합체로 구성된 조성물을 세포 주변에 있는 배양 배지에 첨가하는 경우 또는 시험관 수준(in vitro) 또는 생체 내(in vivo)에서 약제학적으로 이용가능한 담체로 구성된 약제학적 조성물에 상기 리포좀-핵산 복합체를 투여하고 이를 동물 또는 동물 세포에 투여하는 경우를 포함한다. 상기 동물은 인간 뿐만 아니라 포유동물을 포함하는 의미이다.

<45> 시험관 수준(in vitro) 또는 생체 내(in vivo)에서 전달체를 이용한 외래 핵산의 도입은 유전자의 발현 부족 또는 과다발현에 의한 세포의 여러 결함을 치유할 수 있고, 또는 세포 단백질 및 이들의 발현을 수정할 수 있다. 본 발명에서 제공하는 핵산과 복합체를 형성하고 있는 리포좀으로 세포에 핵산을 전달시키는 것은 비정상적인 또는 거의 존재하지 않는, 또는 부적절하게 낮은 또는 높은 단백질 발현으로 인한 질병 또는 질환으로 고통을 받는 동물을 치료하는데 이용할 수 있다. 이와 같은 질병 및 질환에는 다양한 암 및 유전자 결함 질환이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

<46> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<47> **비교예 1. 기존의 양이온성 리포좀 제조**

<48> 양이온성 인지질인 DC-콜레스테롤(Avanti Polar Lipid Inc., USA) 과 세포 융합성 인지질인 DOPE(Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후 몰비 1:1의 비율로 취해 파이렉스 10ml 유리 격막 바이얼에 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 (phosphate-buffered solution, PBS) 1ml을 첨가하고 바이얼을 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 인지질 리포좀은 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다.

<49> **비교예 2. 기존에 판매되고 있는 양이온성 리포좀**

<50> 기존의 핵산 전달 실험용으로 판매되고 있는 양이온성 리포좀인 리포펙타민(LipofectAMINE)™ 2000 (Invitrogen, USA)을 구입하여 사용하였다.

<51> **실시예 1. 양이온성 인지질 리포좀 제조**

<52> 양이온성 인지질인 EDOPC (Avanti Polar Lipid Inc., USA), DC-콜레스테롤 (Avanti Polar Lipid Inc., USA) 및 세포 융합성 인지질인 DPhPE (Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 각각 1ml의 클로로포름에 녹인 후, 구성 지질의 총 질량을 기준으로 각각 10%, 10% 및 80%의 질량 비율로 취해 파이렉스(PYREX, USA) 10ml 유리 격막 바이얼(glass septum vial)에 넣어 혼합한 후 질소 환경에서 모든 클로로포름이 증발될 때까지 낮은 속도로 회전 증발

(rotary evaporation) 시켜 지질 박막 필름으로 제조하였다. 지질 다층형 소구체 (multilamella vesicle)를 제조하기 위하여 이 박막필름에 PBS 1ml을 첨가하고 바이얼을 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 인지질 리포좀은 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다.

<53> **실시예 2. 양이온성 인지질 리포좀 제조**

<54> EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE를 총질량을 기준으로 15%, 15% 및 70%의 질량 비율로 취하여 파이렉스 유리 격막 바이얼에 넣어 혼합한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 양이온성 인지질 리포좀을 제조하였다.

<55> **실시예 3. 양이온성 인지질 리포좀 제조**

<56> EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE를 총질량을 기준으로 20%, 30% 및 50%의 질량 비율로 취하여 파이렉스 유리 격막 바이얼에 넣어 혼합한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 양이온성 인지질 리포좀을 제조하였다.

<57> **실시예 4. 양이온성 인지질 리포좀 제조**

<58> EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE를 총질량을 기준으로 10%, 30% 및 60%의 질량 비율로 취하여 실시예 1과 동일한 방법으로 양이온성 인지질 리포좀을 제조하였다.

<59> **실시예 5. 양이온성 인지질 리포좀 제조**

<60> EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE를 총질량을 기준으로 30%, 35% 및 35%의 질량 비율로 취하여 실시예 1과 동일한 방법으로 양이온성 인지질 리포좀을 제조하였다.

<61> **실시예 6. 양이온성 인지질 리포좀 제조**

<62> EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE를 총질량을 기준으로 35%, 15% 및 50%의 질량 비율로 취하여 실시예 1과 동일한 방법으로 양이온성 인지질 리포좀을 제조하였다.

<63> **실시예 7. 양이온성 인지질 리포좀 제조 : 갈락토오스 지질 유도체 함유**

<64> EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE를 총질량을 기준으로 15%, 10% 및 70%의 질량 비율로 취하고, 갈락토오스 지질 유도체 (cerebrosides, Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 5%의 질량 비율로 취하여 파이렉스(PYREX, USA) 10ml 유리 격막 바이얼에 넣어 혼합한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 양이온성 인지질 리포좀을 제조하였다.

<65> **실시예 8. 양이온성 인지질 리포좀 제조: 갈락토오스 지질 유도체 함유**

<66> EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE를 총질량을 기준으로 18%, 7% 및 65%의 질량 비율로 취하고, 갈락토오스 지질 유도체(Cerebrosides, Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 10%의 질량 비율로 취하여 파이렉스(PYREX, USA) 10ml 유리 격막 바이얼에 넣어 혼합한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 양이온성 인지질 리포좀을 제조하였다.

<67> **실시예 9. 양이온성 인지질 리포좀 제조: 엽산 지질 유도체 함유**

<68> EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE를 총질량을 기준으로 10%, 22% 및 60%의 질량 비율로 취하고, 엽산 지질 유도체(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[folate(polyethylene glycol)-2000], Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 8%의 질량 비율로 취하여 파이렉스(PYREX, USA) 10ml 유리 격막 바이얼에 넣어 혼합한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 양이온성 인지질 리포좀을 제조하였다.

<69> **실시예 10. 양이온성 인지질 리포좀 제조: 폴리에틸렌 글리콜 지질 유도체 함유**

<70> EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE를 총질량을 기준으로 30%, 20% 및 45%의 질량 비율로 취하고, 폴리에틸렌 글리콜 지질 유도체(1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N -[methoxy(polyethylene glycol)-1000], Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 5%의 질량 비율로 취하여 파이렉스(PYREX, USA) 10ml 유리 격막 바이얼에 넣어 혼합한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 양이온성 인지질 리포좀을 제조하였다.

<71> **실시예 11. 양이온성 인지질 리포좀 제조: 폴리에틸렌 글리콜 지질 유도체 함유**

<72> EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE를 총질량을 기준으로 27%, 35% 및 35%의 질량 비율로 취하고, 폴리에틸렌 글리콜 지질 유도체(1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-3000], Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 3%의 질량 비율로 취하여 파이렉스(PYREX, USA) 10ml 유리 격막 바이얼에 넣

어 혼합한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 양이온성 인지질 리포좀을 제조하였다.

<73> **실시예 12. 양이온성 인지질 리포좀 제조: 바이오틴 지질 유도체 함유**

<74> EDOPC, DC-콜레스테롤 및 DPhPE를 총질량을 기준으로 28%, 30% 및 40%의 질량 비율로 취하고, 바이오틴 지질 유도체(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (Ammonium Salt)], Avanti Polar Lipid Inc., USA)를 2%의 질량 비율로 취하여 파이렉스(PYREX, USA) 10ml 유리 격막 바이얼에 넣어 혼합한 후 실시예 1과 동일한 방법으로 양이온성 인지질 리포좀을 제조하였다.

<75> **실시예 13. 세포배양**

<76> SiHa, HeLa, Hepa1-6, VK2, Hep3B 및 Huh7 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)로부터 구입하여 사용하였다. SiHa, Hepa1-6, Hep3B, Huh7 세포주는 우태아 혈청 10% w/v (HyClone Laboratories Inc, USA)과 100 unit/ml 페니실린 또는 100 ㎍/ml 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified eagles medium, Gibco, USA)배지에 배양하였다. HeLa 세포주는 10 % 우태아 혈청과 페니실린, 스트렙토마이신을 포함하는 RPMI 1640(Gibco, USA)에서 배양하였다. VK2 세포주는 0.1 ng/ml 인간 재조합 상피세포성장인자 (Gibco, USA), 0.05 mg/ml 우태아 뇌하수체 추출물 (Gibco, USA)과 100 unit/ml 페니실린 또는 100 ㎍/ml 스트렙토마이신을 포함하는 케라티노사이트-SFM(Keratinocyte-SFM; Gibco, USA)배지에 배양하였다.

<77>

<78> **실시예 14. SiHa 세포주에서의 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 평가**

<79> SiHa 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 8×10^4 개씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배지를 웰 당 500 ㎕씩 첨가하였다. 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 50 ㎕씩을 넣고, 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산 물질인 Block-iT™ Fluorescent Oligo(20μmol, Invitrogen, USA) 2㎕씩과, 비교예 1 및 실시예 1에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀 10 ㎕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 배지를 웰 당 500 ㎕씩 새 배지로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 유전자 전달 효율을 관찰하였다.

<80> 도 1은 비교예(A, C)와 실시예 1(B, D)로부터 제조된 양이온성 인지질 리포좀의 유전자 전달 효율을 위상차 현미경과 형광 현미경으로 각각 관찰한 것으로 A는 비교예 1의 조성 처리시의 위상차 현미경 사진이고, B는 실시예 1의 조성 처리시의 위상차 현미경 사진이다. 또한 C는 비교예 1의 조성물과 복합체 형태로 처리시의 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산의 세포내 전달을 보여주는 형광 현미경 사진이고, D는 실시예 1의 조성물과 복합체 형태로 처리시의 형광 현미경 사진이다. 도 1로부터 실시예 1에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀이 비교예 1에서 제조된 공지 조성의 리포좀보다 SiHa 세포내에서 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율을 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다.

<81> **실시예 15. HeLa 세포주에서의 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 평가**

<82> HeLa 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 8×10^4 개씩 분주(seeding)하고 각 플레이트의 세포가 60-70% 정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배지를 웰 당 500 ㎕씩 첨가하였다. 실시예 14와 동일한 방법으로 비교예 1 및 실시예 3의 리포좀이 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산 물질인 Block-iT™ Fluorescent Oligo와 결합한 복합체를 제조하고 웰 플레이트에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 웰 당 500 ㎕씩 새 배지로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 유전자 전달 효율을 관찰하였다.

<83> 도 2는 비교예 1(A, C)과 실시예 3(B, D)으로부터 제조된 양이온성 인지질 리포좀의 유전자 전달 효율을 위상차 현미경과 형광 현미경으로 관찰한 것으로 A는 비교예 1 처리시의 위상차 현미경 사진이고, B는 실시예 3의 조성 처리시의 위상차 현미경 사진이다. 또한 C는 비교예 1 처리시의 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산의 세포내 전달을 보여주는 형광 현미경 사진이고, D는 실시예 3의 조성 처리시의 형광 현미경 사진이다. 도 2로부터 실시예 3에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀이 비교예 1에서 제조된 공지 조성의 리포좀보다 HeLa 세포내에서 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율을 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다.

<84> **실시예 16. Hepa 1-6 세포주에서의 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 평가**

<85> Hepa 1-6 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 8×10^4 개씩 분주(seeding)하고 각 플레이트의 세포가 60-70% 정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배지를 웰 당 500 ㎕씩 첨가하였다. 실시예 14와 동일한 방법으로 비교예 1 및 실시예 2와 Block-iT™ Fluorescent Oligo의 복합체를 제조하고 웰 플레이트에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 웰 당 500 ㎕씩 새 배지로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 유전자 전달 효율을 관찰하였다.

<86> 도 3은 비교예 1(A, C)과 실시예 2(B, D)로부터 제조된 양이온성 인지질 리포좀의 유전자 전달 효율을 위상차 현미경과 형광 현미경으로 관찰한 것으로 A는 비교예 1 처리시의 위상차 현미경 사진이고, B는 실시예 2의 조성 처리시의 위상차 현미경 사진이다. 또한 C는 비교예 1 처리시의 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산의 세포내 전달을 보여주는 형광 현미경 사진이고, D는 실시예 2의 조성 처리시의 형광 현미경 사진이다. 도 4로부터 실시예 2에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀이 비교예 1에서 제조된 리포좀보다 Hepa1-6 세포내에서 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율을 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다.

<87> **실시예 17. Hep3B 세포주에서의 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 평가**

<88> Hep3B 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 8×10^4 개씩 분주(seeding)하고 각 플레이트의 세포가 60-70 %정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배지를 웰 당 500 ㎕씩 첨가하였다. 실시예 14와 동일한 방법으로 비교예 1 및 실시예 4와 Block-iT™ Fluorescent Oligo 복합체를 제조하고 웰 플레이트에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 웰 당 500 ㎕씩 새 배지로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 유전자 전달 효율을 관찰하였다.

<89> 도 4는 비교예 1(A, C)과 실시예 4(B, D)로부터 제조된 양이온성 인지질 리포좀의 유전자 전달 효율을 위상차 현미경과 형광 현미경으로 관찰한 것으로 A는 비교예 1 처리시의 위상차 현미경 사진이고, B는 실시예 4의 조성 처리시의 위상차 현미경 사진이다. 또한 C는 비교예 처리시의 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산의 세포내 전달을 보여주는 형광 현미경 사진이고, D는 실시예 4의 조성 처리시의 형광 현미경 사진이다. 도 4로부터 실시예 4에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀이 비교예 1에서 제조된 리포좀보다 Hep3B 세포내에서 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율을 증가 시킨다는 사실을 알 수 있었다.

<90> **실시예 18. Huh7 세포주에서의 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 평가**

<91> Huh7 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 8×10^4 개씩 분주(seeding)하고 각 플레이트의 세포가 60-70 %정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배지를 웰 당 500 ㎕씩 첨가하였다. 실시예 14와 동일한 방법으로 비교예 1 및 실시예 5의 조성물과 형광 표지된 이중나선 리보핵산의 복합체를 제조하고 웰 플레이트에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 웰 당 500 ㎕씩 새 배지로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 유전자 전달 효율을 관찰하였다.

<92> 도 5는 비교예 1(A, C)과 실시예 5(B, D)로부터 제조된 양이온성 인지질 리포좀의 유전자 전달 효율을 위상차 현미경과 형광 현미경으로 관찰한 것으로 A는 비교예 1 처리시의 위상차 현미경 사진이고, B는 실시예 5의 조성 처리시의 위상차 현미경 사진이다. 또한 C는 비교예 처리시의 형광 마커로 표지된 작은 간섭 리보핵산의 세포내 전달을 보여주는 형광 현미경 사진이고, D는 실시예 5의 조성 처리시의 형광 현미경 사진이다. 도 5로부터 실시예 5에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀이 비교예 1에서 제조된 리포좀보다 Huh7 세포내에서 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율을 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다.

<93> **실시예 19. VK2 세포주에서의 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 평가**

<94> VK2 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 8×10^4 개씩 분주(seeding)하고 각 플레이트의 세포가 60-70 % 정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배지를 웰 당 500 ㎕씩 첨가하였다. 실시예 14와 동일한 방법으로 비교예 2 및 실시예 6의 조성물과 형광 표지된 이중나선 리보핵산의 복합체를 제조하고 웰 플레이트에 첨가하여 37 ℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 웰 당 500 ㎕씩 새 배지로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 유전자 전달 효율을 관찰하였다.

<95> 도 6은 전달체를 전혀 처리하지 않은 경우의 세포 모양을 위상차 현미경으로 관찰한 것(A)과 시판품인 비교예 2(B, D)와 실시예 6(C, E)으로부터 제조된 양이온성 인지질 리포좀의 유전자 전달 효율을 위상차 현미경과 형광 현미경으로 관찰한 것이다. 도 6으로부터 알 수 있는 바와 같이, 실시예 6에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀이 비교예 2에서 사용된 리포좀보다 VK2 세포내에서 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율을 증가켰다. 또한 위상차 현미경으로 관찰되는 세포의 형태 면에서도 도 6B에서 관찰되듯이 시판품인 리포펙타민 2000 조성을 처리한 경

우(비교예 2)의 세포 상태는 세포들이 모양이 수축된 형태가 대부분으로서 세포들의 상태가 건강하지 않은 것으로 보여지는 반면, 실시예 6 처리시의 세포상태는 도 6C에서 나타나듯이 아무것도 처리하지 않은 대조군 상태의 세포와 유사한 양상을 보여 세포 독성면에서 독성이 현저히 감소된 것을 알 수 있었다.

<96> **실시예 20. HeLa 세포주에서 플라스미드 데옥시리보핵산(plasmid DNA) 전달 효율 평가**

<97> HeLa 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 8×10^4 개씩 분주(seeding)하고 각 플레이트의 세포가 60-70 %정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배지를 웰 당 500 ㎕씩 첨가하였다. 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 50 ㎕씩을 넣고 녹색 형광 단백질이 발현되는 pEGFP-N2(Clontech)플라스미드(1.35 ㎍/㎕) 0.8 ㎍씩, 및 비교예 1과 2 및 실시예 7에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀을 각각 첨가하고 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하여 복합체를 형성시켰다. 이 복합체를 웰 플레이트에 첨가하여 36시간동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 웰 당 500 ㎕씩 새 배지로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 플라스미드 유전자 전달 효율을 관찰하였다.

<98> 도 7은 비교예 1(A, D)과 2(B, E) 및 실시예 7(C, F)로부터 제조된 양이온성 인지질 리포좀의 플라스미드 유전자 전달 효율을 위상차 현미경과 형광 현미경으로 관찰한 것으로 A는 비교예 1 처리시의 위상차 현미경 사진이고, B는 비교예 2 처리시의 위상차 현미경 사진이고, C는 실시예 7의 조성 처리시의 위상차 현미경 사진이다. 또한 D는 비교예 1 처리시의 형광 녹색 단백질의 유전정보를 가지는 플라스미드가 HeLa 세포내로 수송된 다음 녹색형광 단백질을 발현하는 것을 보여주는 형광 현미경 사진이고, E는 비교예 2의 조성 처리시의 형광 현미경 사진이고, F는 실시예 7의 형광 현미경 사진이다. 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, 실시예 7에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀이 비교예 1 및 2에서 사용된 리포좀보다 HeLa 세포내에서 플라스미드 유전자 전달 효율을 증가시켰음을 알 수 있었다.

<99> **실시예 21. Hepa1-6 세포주에서 플라스미드 데옥시리보핵산 전달 효율 평가**

<100> Hepa1-6 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 8×10^4 개씩 분주(seeding)하고 각 플레이트의 세포가 60-70 %정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배지를 웰 당 500 ㎕씩 첨가하였다. 실시예 20과 동일한 방법으로 제조된 pEGF-N2 플라스미드와 양이온성 리포좀의 복합체들을 웰 플레이트에 첨가하고 36시간동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 웰 당 500 ㎕씩 새 배지로 교체하여 준 후 형광 현미경으로 플라스미드 유전자 전달 효율을 관찰하였다.

<101> 도 8은 비교예 1(A, D)과 2(B, E) 및 실시예 11(C, F)로부터 제조된 양이온성 인지질 리포좀의 플라스미드 유전자 전달 효율을 위상차 현미경과 형광 현미경으로 관찰한 것으로 A는 비교예 1 처리시의 위상차 현미경 사진이고, B는 비교예 2 처리시의 위상차 현미경 사진이고, C는 실시예 11의 조성 처리시의 위상차 현미경 사진이다. 또한 D는 비교예 1 처리시의 형광 녹색 단백질의 유전정보를 가지는 플라스미드가 HeLa 세포내로 수송된 다음 녹색형광 단백질을 발현하는 것을 보여주는 형광 현미경 사진이고, E는 비교예 2의 조성 처리시의 형광 현미경 사진이고, F는 실시예 11의 형광 현미경 사진이다. 도 8에서 알 수 있는 바와 같이, 실시예 11에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀이 비교예 1 및 2에서 사용된 리포좀보다 Hepa1-6 세포내에서 플라스미드 유전자 전달 효율을 증가시켰음을 알 수 있었다.

<102> **실시예 22. 자궁암 세포주에서의 세포 독성 평가**

<103> 작은간섭 리보핵산(siRNA)또는 플라스미드의 세포 내 전달 효율성을 향상시키기 위하여 사용된 양이온성 인지질 리포좀으로 이루어진 복합체의 세포 독성에 관한 평가를 하기 위하여 다음과 같은 과정으로 실험을 수행하였다. 자궁암 세포(VK2)에 비교예 1 및 2, 및 실시예 2, 5 및 9의 양이온성 인지질 리포좀과 작은 간섭 리보핵산(siRNA)의 복합체 조성 및 작은간섭 리보핵산(siRNA) 유전자 자체 조성을 제조하고 세포 독성을 평가하였다. 독성 평가 방법으로는 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 방법을 사용하였다. 세포를 웰 당 1×10^4 cells이 되도록 96 well에 분주(seeding)하고 12시간 배양한 후, 비교예 2의 양이온성 인지질 리포좀 1 ㎕와 작은간섭 리보핵산(siRNA) 10 pmol의 복합체 조성, 비교예 1, 실시예 2, 5 및 9에서 제조한 양이온성 인지질 리포좀 4 ㎕씩과 작은간섭 리보핵산(siRNA) 40 pmol의 복합체 조성, 및 작은간섭 리보핵산(siRNA) 유전자 자체 40 pmol조성을 제조하고 첨가하였다. 복합체를 처리하고 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, Tecan 사, 스위스)를 이용하여 570 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 양이온성 인지질 리포좀과 유전자의 복합체를 처리하지 않은 세포가 사용되었다.

<104> 도 9는 비교예 1, 실시예 2, 5 및 9에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀 조성물 4 ㎕와 작은간섭 리보핵산

(siRNA)의 복합체와 비교예 2의 양이온성 인지질 리포좀 1 ㎕와 유전자의 복합체의 자궁 암 세포주 (VK2)에서 세포독성 실험을 수행한 결과로 비교예 1 및 2의 양이온성 인지질 리포좀과 작은 간섭 리보핵산의 복합체는 대조군에 비하여 큰 세포 독성을 나타내었고, 반면 실시예 2, 5 및 9의 양이온성 리포좀과 작은 간섭 리보핵산의 복합체는 적은 세포 독성을 나타내었다. 따라서 실시예 2, 5 및 9에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀이 비교예 1 및 2의 리포좀보다 자궁암 세포주에서 세포독성을 감소시킨다는 사실을 알 수 있었다.

<105> **실시예 23. HeLa 세포주에서 형광 유세포 분석법 (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)을 이용한 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 측정**

<106> HeLa 세포주를 실험 전날 6 웰 플레이트에 웰 당 3×10^5개씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70 %정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배지를 웰 당 800 ㎕씩 첨가하였다. 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 100 ㎕씩을 넣고 형광표지된 이중나선 리보핵산인 Block-iT™ Fluorescent Oligo (20μmol, Invitrogen, USA) 2 ㎕씩과 비교예 1과 실시예 1, 3 및 8에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀 10 ㎕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 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 도 10에 나타내었다. 또한 각 실험군에 의한 siRNA의 세포전달효율의 FACS 분석결과를 표 1에 정량적으로 나타내었다. 대조군 (A)는 세포를 siRNA로 처리하지 않은 미처리군이고, siRNA 단독처리군(B)는 siRNA를 전달체를 사용하지 않고 처리한 군이다. 대조군 (A)와 siRNA 단독 처리군 (B)는 유전자가 세포 내로 전달되지 않아 피크가 거의 이동하지 않았고, 비교예 1에서 제조된 공지 조성의 리포좀으로 처리한 세포군 (C)은 유전자가 71.1% 전달되었다. 반면, 본 발명의 실시예 1 처리군 (D), 실시예 3 처리군 (E), 및 실시예 8처리군 (F)의 경우 각각 89.31%, 88.90%, 87.15%를 나타내어 비교예1 처리군(C)에 비하여 세포내 전달효율이 증가되었다. 따라서 본 발명의 실시예에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀들이 비교예 1에서 제조된 리포좀보다 HeLa cell 내에서 유전자 전달 효율이 증가되었음을 알 수 있었다.

표 1

<107> HeLa 세포주에서 양이온성 인지질 리포좀의 작은간섭 리보핵산 전달효율

A	B	C	D	E	F
대조군	siRNA 단독처리군	비교예 1	실시예 1	실시예 3	실시예 8
0.07 %	2.54 %	71.10 %	89.31 %	88.90 %	87.15 %

<108> **실시예 24. SiHa 세포주에서 형광 유세포 분석법(FACS)을 이용한 작은 간섭 리보핵산의 전달 효율 측정**

<109> SiHa 세포주를 실험 전날 6 웰 플레이트에 웰 당 3×10^5개씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70 %정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배지를 웰 당 800 ㎕씩 첨가하였다. 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 100 ㎕씩을 넣고 Block-iT™ Fluorescent Oligo (20μmol, Invitrogen, USA) 2 ㎕씩과, 비교예 1, 실시예 4, 7 및 11에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀 10 ㎕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 세포를 수집한 후 PBS로 2번 세척하였다. 이후 Block-iT가 들어간 세포들을 BD FACS CALIBUR를 사용하여 형광 강도 피크의 이동에 의한 세포내 전달 효율을 분석하였다.

<110> 이에 대한 결과를 도 11에 나타내었으며, 또한 각 실험군에 의한 siRNA의 세포전달효율의 FACS 분석결과를 표 2에 정량적으로 나타내었다. 대조군 (A)는 세포를 siRNA로 처리하지 않은 미처리군이고, siRNA 단독처리군 (B)는 siRNA를 전달체를 사용하지 않고 처리한 군이다. 대조군 (A)와 siRNA 단독 처리군 (B)는 유전자가 세포 내로 전달되지 않아 피크가 거의 이동하지 않았고, 비교예 1에서 제조된 공지 조성의 리포좀으로 처리한 세포군 (C)은 유전자가 53.85% 전달되었다. 반면, 본 발명의 실시예 4처리군 (D), 실시예 7 처리군 (E) 및 실시예 11 처리군 (F)의 경우 모두 70% 이상으로 비교예1 처리군(C)에 비하여 세포 내로의 작은간섭 리보핵산의 전달효율이 증가하였다. 따라서 본 발명의 실시예에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀들은 비교예 1에서 제조된 리포좀

보다 SiHa cell 내에서 유전자 전달 효율을 증가시킴을 알 수 있었다.

표 2

<111> SiHa 세포주에서 양이온성 인지질 리포좀의 작은간섭 리보핵산 전달효율

A	B	C	D	E	F
대조군	siRNA 단독처리군	비교예 1	실시예 4	실시예 7	실시예 11
0.35 %	0.17 %	53.85 %	86.37 %	71.22 %	85.06 %

<112> **실시예 25. SiHa 세포주에서의 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 작은간섭 리보핵산 전달 효능 평가**

<113> SiHa 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 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배지를 웰(well) 당 250㎕ 씩 첨가하였다. 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 25㎕씩을 넣고, siRNA 30 pmol과 비교예 1, 실시예 2, 7 및 10에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀을 각각 10㎕씩 첨가하였다. 서바이빈 (survivin) 유전자(Gene bank accession number: NM_001168)의 발현 억제를 유도하기 위한 siRNA로는 siGENOME SMARTpool(Dahrmacon, Lafayette, CO, USA)을 사용하여 제작하였다. 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 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사 하였다. 서바이빈(survivin)에 특이적인 프라이머의 서열은 5'-GGACCACCG CATCTCTACAT-3'(정방향), 5'-CTTTCTCCGCAGTTTCCTCA-3'(역방향)이며 중합효소연쇄반응 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.

<114> 도 12는 각각의 조성을 처리한 경우 SiHa 세포내에서 타겟 유전자인 서바이빈의 전사체 발현을 비교한 것으로, A는 대조군, B는 작은간섭 리보핵산 단독처리군, C는 비교예 1 처리군, D는 비교예 2 처리군, E는 실시예 2 처리군, F는 실시예 7처리군, G는 실시예 10 처리군이다. 대조군(A)과 작은간섭 리보핵산 단독처리군(B)은 유전자가 세포 내로 전달되지 않아 서바이빈 유전자의 발현에 변화가 없었고, 비교예 1에서 제조된 리포좀은 실시예 2, 7 및 10에서 제조된 리포좀보다 서바이빈 유전자의 발현이 적게 감소하였다. 실시예 2, 7 및 10에서 제조된 리포좀은 그 세포 독성이 시판품인 비교예 2의 조성보다 적음에도 불구하고 서바이빈 유전자 발현의 감소를 효율적으로 나타내었다. 이와 같은 결과에서 알 수 있듯이, 실시예 2, 7 및 10에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀이 SiHa 세포 내로 작은간섭 리보핵산물질을 전달하여 표적유전자의 발현을 선택적으로 억제시킴을 알 수 있었다.

<115> **실시예 26. HeLa 세포주에서의 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 작은간섭 리보핵산 전달 효능 평가**

<116> HeLa 세포주를 실험 전날 24 웰 플레이트에 웰 당 8×10^4 개씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배지를 웰 당 250㎕씩 첨가하였다. 이후 실시예 25와 동일한 방법과 조건으로 실험을 수행하였다.

<117> 도 13은 각각의 조성을 처리한 경우 HeLa 세포내에서 타겟 유전자인 서바이빈의 전사체 발현을 비교한 것으로, A는 대조군, B는 작은간섭 리보핵산 단독처리군, C는 비교예 1 처리군, D는 비교예 2 처리군, E는 실시예 3 처리군, F는 실시예 5 처리군, G는 실시예 12 처리군이다. 대조군(A)과 작은간섭 리보핵산 단독처리군(B)은 유전자가 세포 내로 전달되지 않아 서바이빈 유전자의 발현에 변화가 없었고, 비교예 1에서 제조된 리포좀은 실시예 3, 5 및 12에서 제조된 리포좀보다 서바이빈 유전자의 발현이 적게 감소하였다. 실시예 3, 5 및 12에서 제조된 리포좀은 그 세포 독성이 시판품인 비교예 2의 조성보다 적음에도 불구하고 서바이빈 유전자 발현의 감소를 효율적으로 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 실시예 3, 5 및 12에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀이 HeLa 세포 내로 작은간섭 리보핵산물질을 전달하여 표적유전자의 발현을 선택적으로 억제시킴을 알 수 있다.

<118> **실시예 27. Hepa1-6 세포주에서의 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 작은간섭 리보핵산 전달 효능 평가**

<119> Mouse의 간암 세포주인 Hepa1-6 세포주를 실험 전날 24 웰 (well) 플레이트에 세포를 웰 당 8×10^4 개씩 분주(seeding)하였다. 각 플레이트의 세포가 60-70%정도 균일하게 성장했을 때 플레이트안의 배지를 제거하고 새 배

지를 웰 당 250㎕씩 첨가하였다. 에펜도르프 튜브에 혈청이 포함되지 않은 배지 25㎕씩 넣고, siRNA 30 pmol과 비교예 1, 실시예 6, 9 및 11에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀을 각각 10㎕ 첨가하였다. 서바이빈(survivin) 유전자(Gene bank accession number: NM_009689)의 발현 억제를 유도하기위한 siRNA서열은 삼천리제약(SamchullyPharm Inc., Seoul, Korea)에서 합성주문한 것을 사용하였다. 미디어에 포함된 siRNA의 최종 농도는 100 nM이 되게 맞추었다. 이들을 서서히 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하고, 이렇게 제조된 복합체를 세포에 첨가하여 37℃의 CO_2 세포 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포내에 존재하는 전체 리보핵산(RNA)를 분리하고 이 리보핵산은 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사 하였다. 서바이빈(survivin)에 특이적인 프라이머의 서열은 5'-ATCCACTGCCCTACCGAGAA-3'(정방향), 5'-CTTGGCTCTCTGTCTGTCCAGTT-3'(역방향)이며 중합효소연쇄반응 생성물의 크기는 200 염기쌍이었다. 서바이빈(survivin) 유전자 발현의 정도는 서바이빈 특이적인 연쇄반응 생성물의 밴드 밀도를 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 증폭하여 나타나는 밴드 밀도로 보정하여 정량적인 발현의 변화를 측정하였다.

<120> 도 14는 각각의 조성을 처리한 경우 Hepa1-6 세포내에서 타겟 유전자인 서바이빈의 전사체 발현을 비교한 것으로, A는 대조군, B는 작은간섭 리보핵산 단독처리군, C는 비교예 1 처리군, D는 비교예 2 처리군, E는 실시예 6 처리군, F는 실시예 9 처리군, G는 실시예 11 처리군이다. 대조군(A)과 작은간섭 리보핵산 단독처리군(B)은 유전자가 세포 내로 전달되지 않아 서바이빈 유전자의 발현에 변화가 없었고, 비교예 1에서 제조된 리포좀은 실시예 6, 9 및 11에서 제조된 리포좀보다 서바이빈 유전자의 발현이 적게 감소하였다. 실시예 6, 9 및 11에서 제조된 리포좀은 그 세포 독성이 시판품인 비교예 2의 조성보다 적음에도 불구하고 서바이빈 유전자 발현의 감소를 효율적으로 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 실시예 6, 9 및 11에서 제조된 양이온성 인지질 리포좀이 Hepa1-6 세포 내로 작은간섭 리보핵산물질을 전달하여 표적유전자의 발현을 선택적으로 억제시킴을 알 수 있었다.

발명의 효과

<121> 상술한 바와 같이, 본 발명의 핵산과 복합체를 형성하는 신규의 조성을 갖는 양이온성 인지질 리포좀은 종래의 양이온성 인지질 리포좀에 비하여 다양한 동물 세포에 목적 물질, 즉 핵산을 보다 우수하게 전달할 수 있으며, 또한 세포 독성이 현저히 감소하여 유전자 치료 등의 대상으로 목적하는 유전자를 효과적으로 세포 내로 수송하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 사용하여 비교예 1의 조성 (A,C)과 본 발명의 양이온성 인지질 리포좀(실시예 1)을 이용한 경우 (B,D)의 이중나선 리보핵산의 세포내 전달 정도를 SiHa 세포주에서 위상차 현미경(A,B)과 형광 현미경(C.D)을 이용하여 관찰한 사진이다.

<2> 도 2는 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 사용하여 비교예 1의 조성 (A,C)과 본 발명의 양이온성 인지질 리포좀(실시예 3)을 이용한 경우 (B,D)의 이중나선 리보핵산의 세포내 전달 정도를 HeLa 세포주에서 위상차 현미경(A,B)과 형광 현미경(C.D)을 이용하여 관찰한 사진이다.

<3> 도 3은 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 사용하여 비교예 1의 조성 (A,C)과 본 발명의 양이온성 인지질 리포좀(실시예 2)을 이용한 경우 (B,D)의 이중나선 리보핵산의 세포내 전달 정도를 Hepa1-6 세포주에서 위상차 현미경(A,B)과 형광 현미경(C.D)을 이용하여 관찰한 사진이다.

<4> 도 4는 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 사용하여 비교예 1의 조성 (A,C)과 본 발명의 양이온성 인지질 리포좀(실시예 4)을 이용한 경우 (B,D)의 이중나선 리보핵산의 세포내 전달 정도를 Hep3B 세포주에서 위상차 현미경(A,B)과 형광 현미경(C.D)을 이용하여 관찰한 사진이다.

<5> 도 5는 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 사용하여 비교예 1의 조성 (A,C)과 본 발명의 양이온성 인지질 리포좀(실시예 5)을 이용한 경우 (B,D)의 이중나선 리보핵산의 세포내 전달 정도를 Huh7 세포주에서 위상차 현미경(A,B)과 형광 현미경(C.D)을 이용하여 관찰한 사진이다.

<6> 도 6은 전달체를 전혀 처리하지 않은 경우의 세포모양을 위상차 현미경으로 관찰한 사진(A), 비교예 2(B,D) 및 본 발명의 양이온성 인지질 리포좀(실시예 6)을 이용한 경우 (C,E)의 이중나선 리보핵산의 전달 정도를 VK2 세포주에서 위상차 현미경 (B,C)과 형광 현미경 (D, E)을 이용하여 관찰한 사진이다.

<7> 도 7은 녹색 형광 단백질에 대한 유전정보를 가지는 pEGFP-N2 플라스미드 데옥시리보핵산(plasmid DNA)을 사용하여 비교예 1 (A,D), 비교예2 (B, E)와 본 발명의 양이온성 인지질 리포좀(실시예 7) (C, F)을 이용한 경우 복합체가 HeLa 세포내로 수송된 다음 녹색형광 단백질을 발현하는 것을 위상차 현미경 (A, B, C)과 형광 현미경 (D, E, F)을 이용하여 관찰한 사진이다.

<8> 도 8은 녹색 형광 단백질에 대한 유전정보를 가지는 pEGFP-N2 플라스미드 데옥시리보핵산 (plasmid DNA)을 사용하여 비교예 1 (A,D), 비교예2 (B, E)와 본 발명의 양이온성 인지질 리포좀(실시예 11) (C, F)을 이용한 경우 복합체가 Hepa1-6 세포내로 수송된 다음 녹색형광 단백질을 발현하는 것을 위상차 현미경 (A, B, C)과 형광 현미경 (D, E, F)을 이용하여 관찰한 사진이다.

<9> 도 9는 본 발명의 양이온성 인지질 리포좀 조성물(실시예 2, 5 및 9)이 비교예 1 및 2의 조성물에 비하여 세포독성이 작다는 것을 자궁암 상피세포주인 VK2 세포주에서 세포독성 실험을 수행한 결과이다.

<10> 도 10은 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 처리하지 않은 대조군 (A)과 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 전달체를 사용하지 않고 세포에 처리한 경우 (B), 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 비교예 1의 조성물 (C), 실시예 1의 조성물 (D), 실시예 3의 조성물 (E), 실시예 8의 조성물 (F)을 사용하여 각각 세포에 처리한 경우, 이중나선 리보핵산의 HeLa 세포내 전달 수송 효율 정도를 형광 유세포분석기 (FACS)를 사용해 분석한 사진이다.

<11> 도 11은 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 처리하지 않은 대조군 (A)과 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 전달체를 사용하지 않고 세포에 처리한 경우 (B), 형광 표식이 붙어있는 이중나선 리보핵산을 비교예 1의 조성물 (C), 실시예 4의 조성물 (D), 실시예 7의 조성물 (E), 실시예 11의 조성물 (F)을 사용하여 각각 세포에 처리한 경우, 이중나선 리보핵산의 SiHa 세포내 전달 수송 효율 정도를 형광 유세포분석기 (FACS)를 사용해 분석한 사진이다.

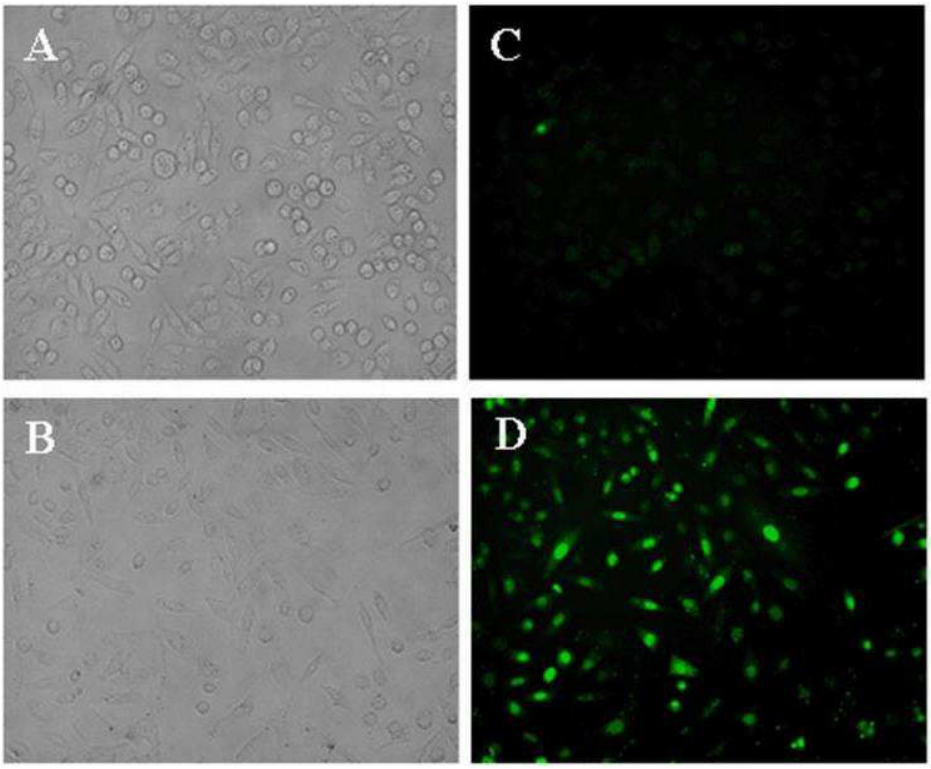
<12> 도 12는 이중 나선 리보핵산을 처리하지 않은 대조군 (A)과 타겟 유전자인 서바이빈의 발현을 특이적으로 간섭저해하는 이중 나선 리보핵산을 전달체를 사용하지 않고 처리한 경우 (B), 비교예 1의 조성물과 복합체를 형성하여 전달한 경우 (C), 비교예 2의 조성물과 복합체를 형성하여 전달한 경우 (D), 본 발명의 실시예 2의 조성물 (E), 실시예 7의 조성물 (F), 실시예 10의 조성물 (G)과 각각 복합체를 형성하여 세포에 처리한 경우의 이중나선 리보핵산의 SiHa 세포내 전달 효능을 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하여 타겟 유전자인 서바이빈의 전사체 발현 억제 여부로 비교한 사진이다.

<13> 도 13은 이중 나선 리보핵산을 처리하지 않은 대조군 (A)과 타겟 유전자인 서바이빈의 발현을 특이적으로 간섭저해하는 이중 나선 리보핵산을 전달체를 사용하지 않고 처리한 경우 (B), 비교예 1의 조성물과 복합체를 형성하여 전달한 경우 (C), 비교예 2의 조성물과 복합체를 형성하여 전달한 경우 (D), 본 발명의 실시예 3의 조성물 (E), 실시예 5의 조성물 (F), 실시예 12의 조성물 (G)과 각각 복합체를 형성하여 세포에 처리한 경우의 이중나선 리보핵산의 HeLa 세포내 전달 효능을 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하여 타겟 유전자인 서바이빈의 전사체 발현 억제 여부로 비교한 사진이다.

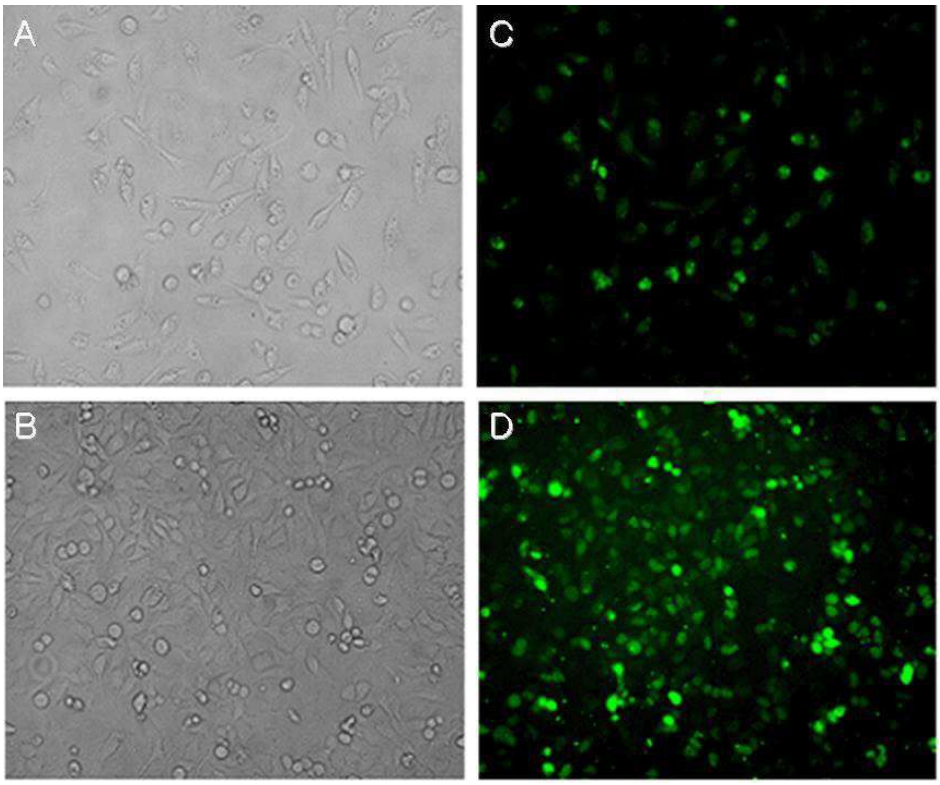
<14> 도 14는 이중 나선 리보핵산을 처리하지 않은 대조군 (A)과 타겟 유전자인 서바이빈의 발현을 특이적으로 간섭저해하는 이중 나선 리보핵산을 전달체를 사용하지 않고 처리한 경우 (B), 비교예 1의 조성물과 복합체를 형성하여 전달한 경우 (C), 비교예 2의 조성물과 복합체를 형성하여 전달한 경우 (D), 본 발명의 실시예 6의 조성물 (E), 실시예 9의 조성물 (F), 실시예 11의 조성물 (G)과 각각 복합체를 형성하여 세포에 처리한 경우의 이중나선 리보핵산의 Hepa1-6 세포내 전달 효능을 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하여 타겟 유전자인 서바이빈의 전사체 발현 억제 여부로 비교한 사진이다.

도면

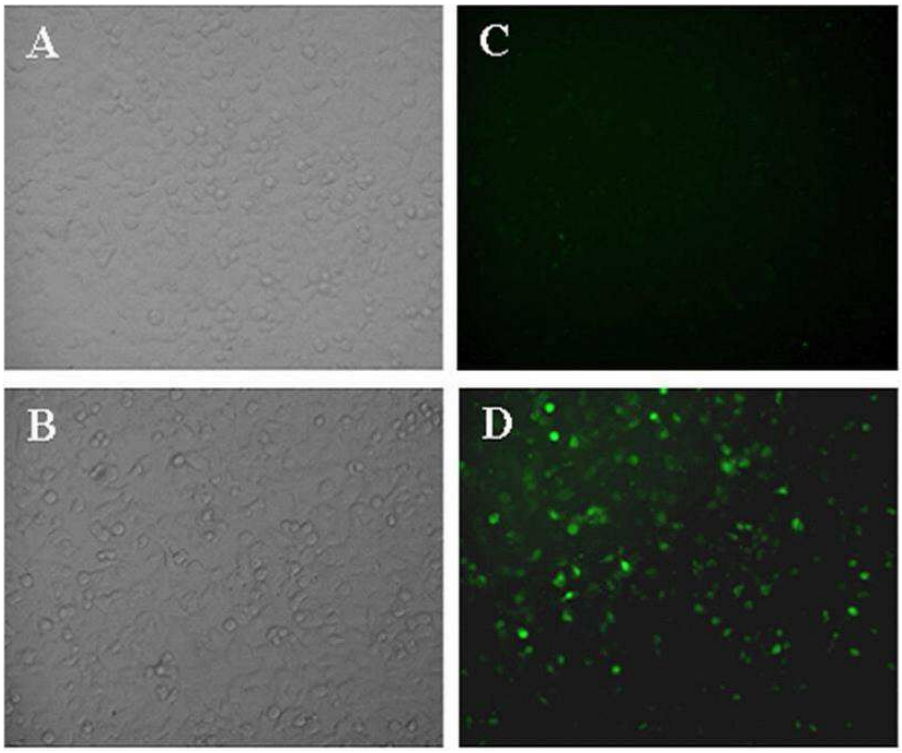
도면1



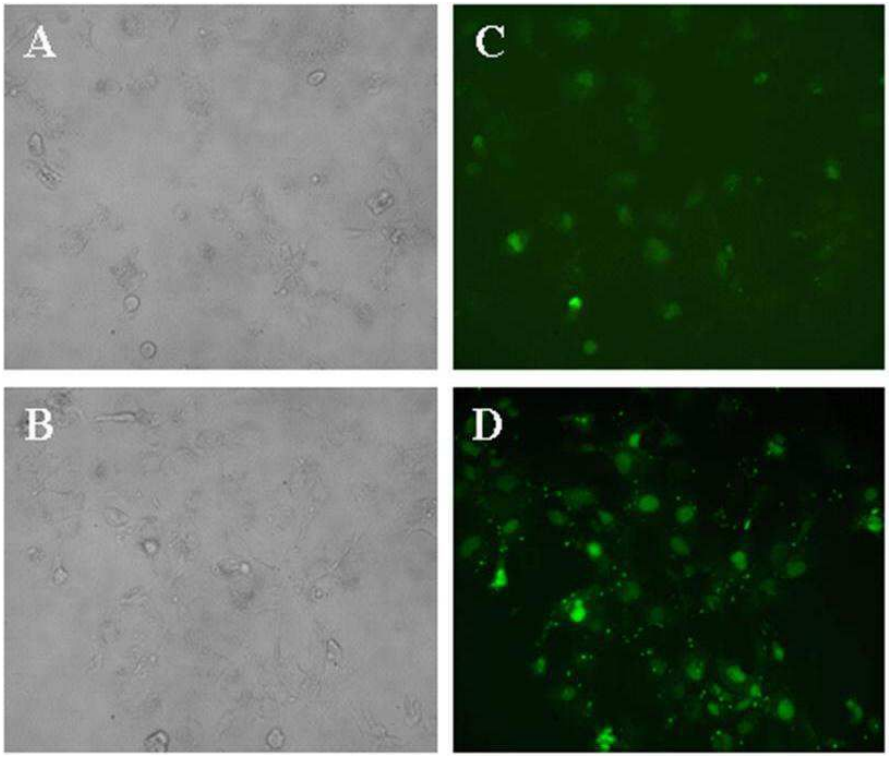
도면2



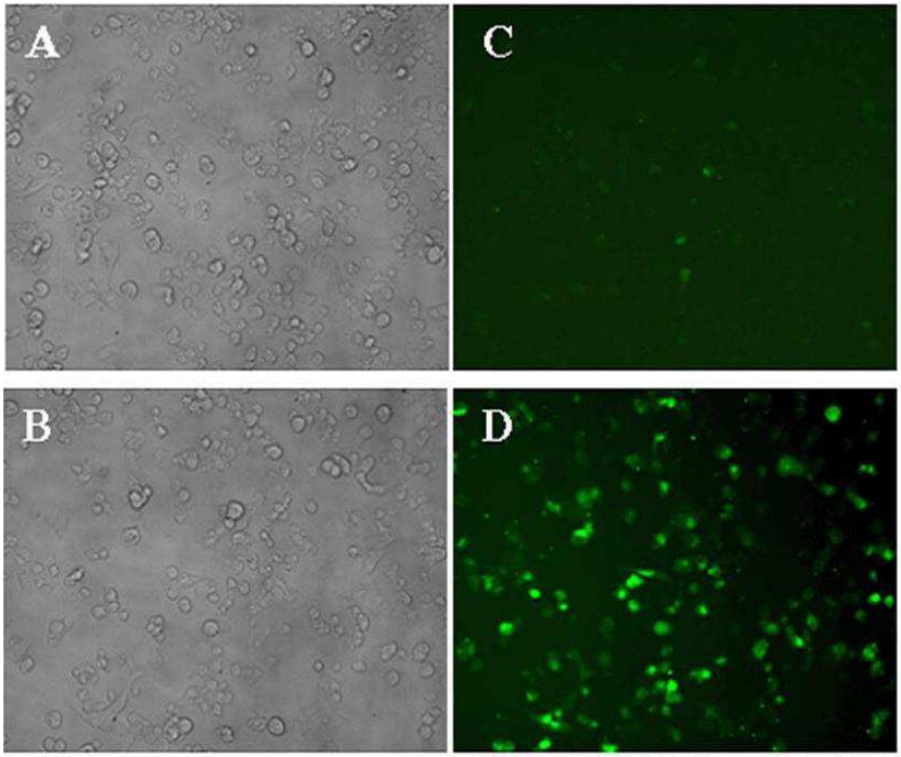
도면3



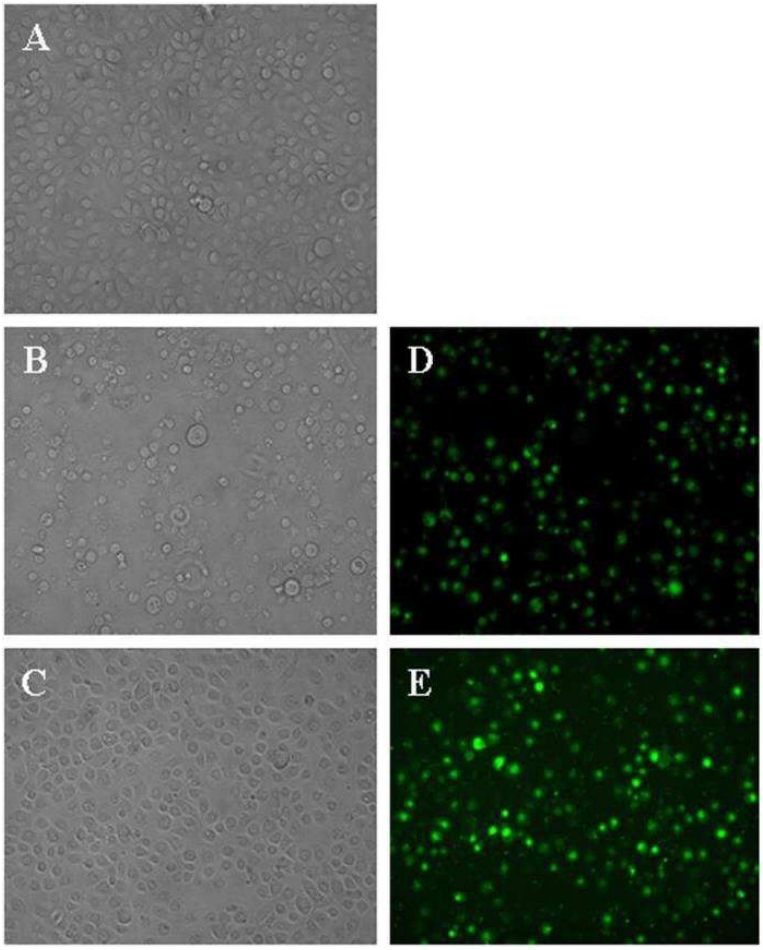
도면4



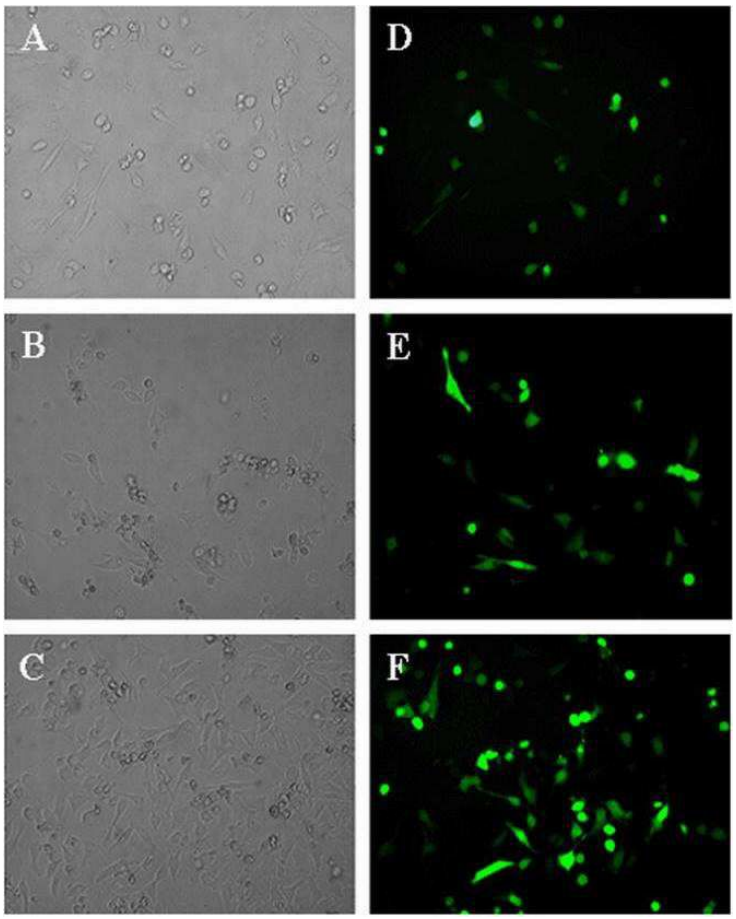
도면5



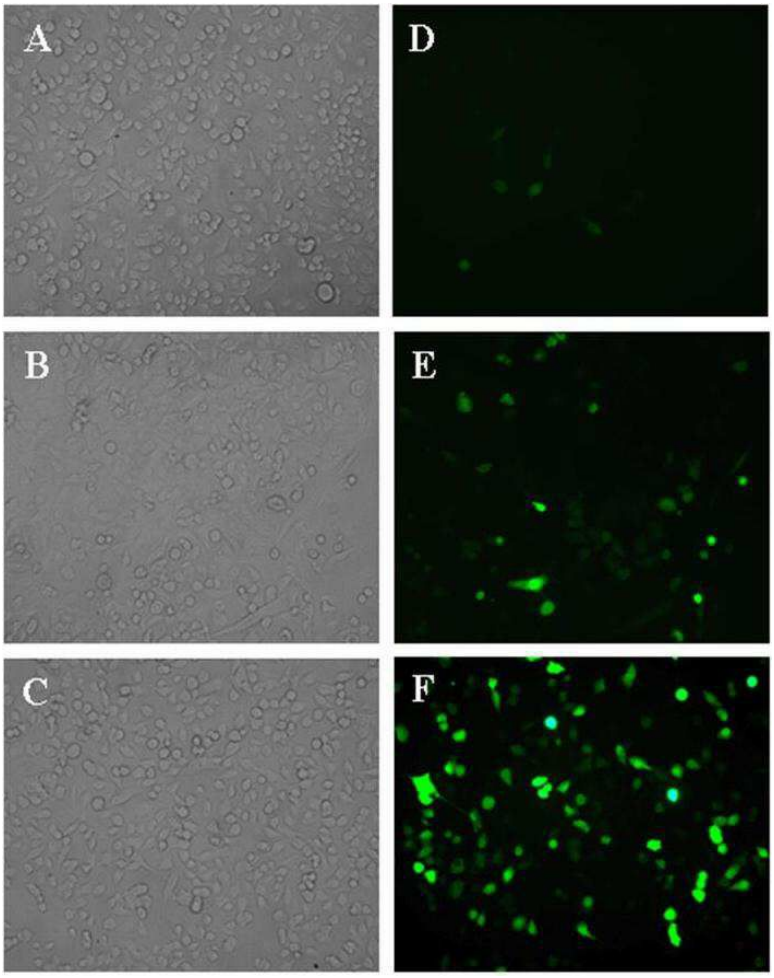
도면6



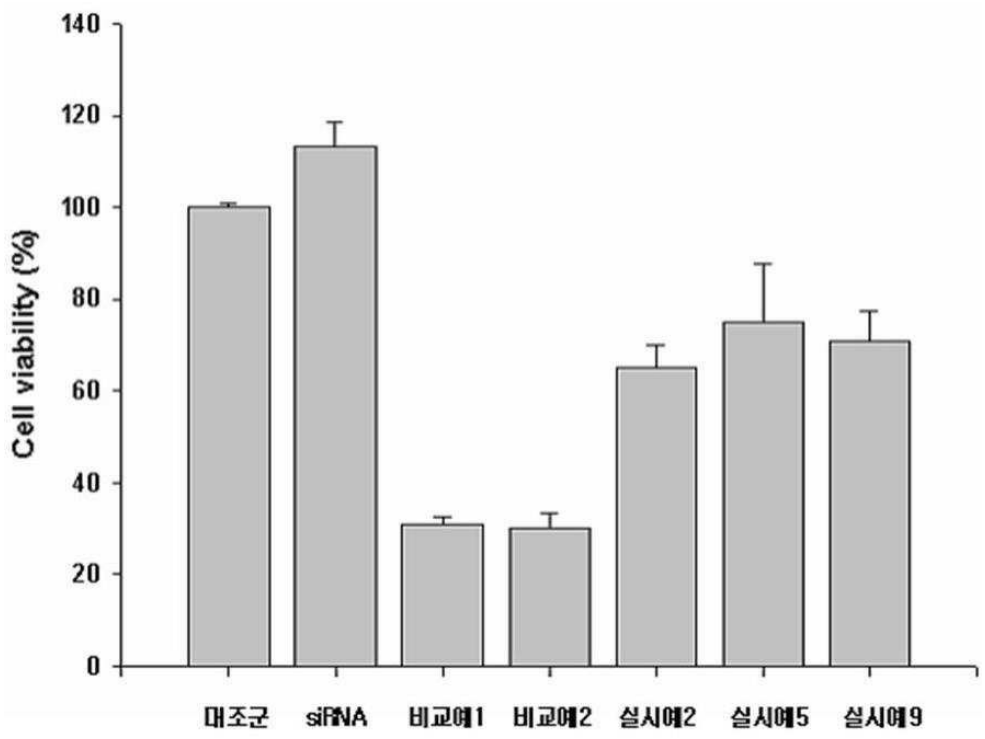
도면7



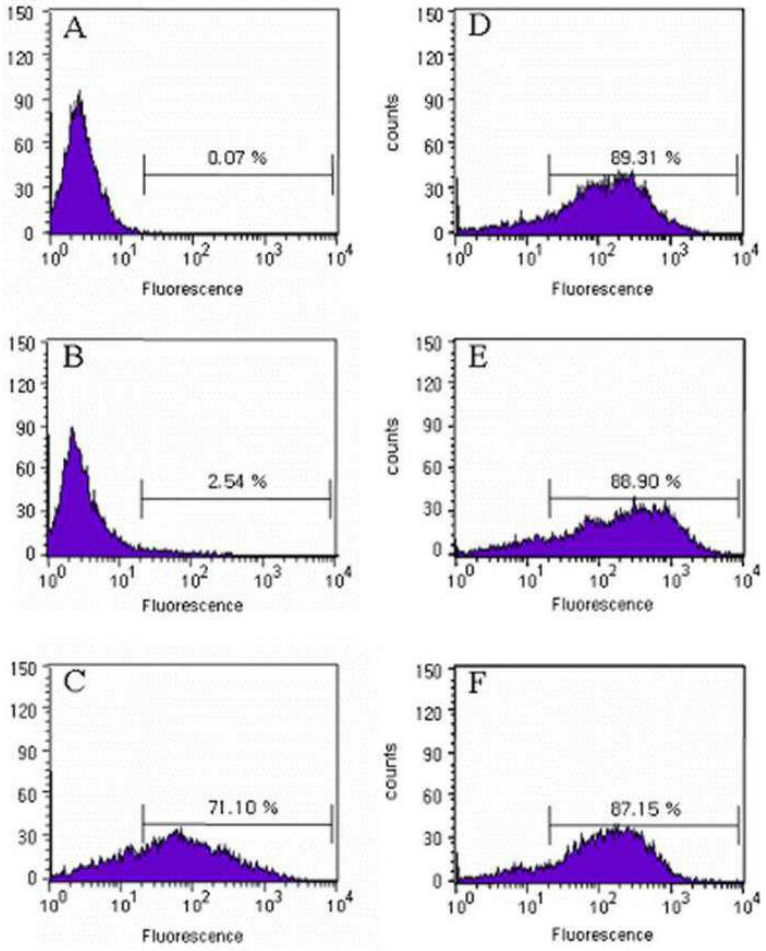
도면8



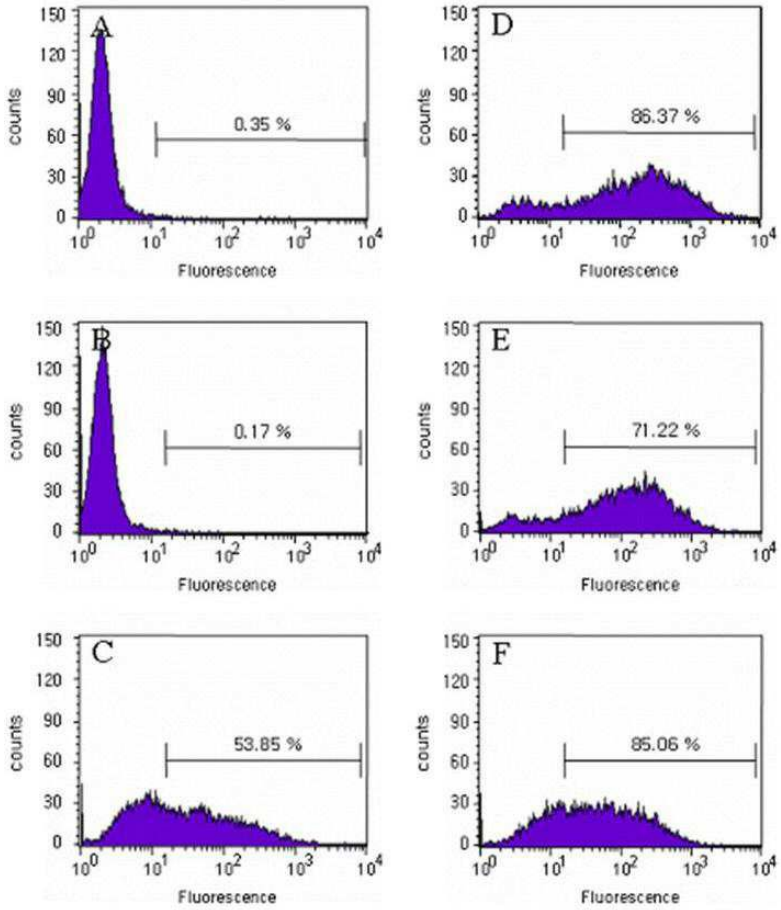
도면9


Cell viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
대조군
siRNA
비교예1
비교예2
실시예2
실시예5
실시예9

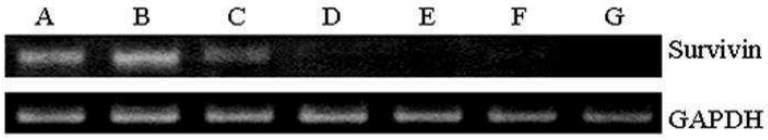
도면10



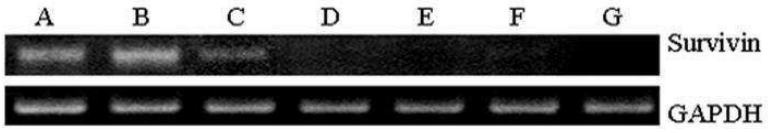
도면11



도면12



도면13



도면14

