



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년02월28일
(11) 등록번호 10-0806601
(24) 등록일자 2008년02월18일

(51) Int. Cl.

C12N 11/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-0074489

(22) 출원일자 2004년09월17일

심사청구일자 2005년11월08일

(65) 공개번호 10-2006-0025711

(43) 공개일자 2006년03월22일

(56) 선행기술조사문헌

Bioconjugate Chem., Vol. 14, pp. 222-231 (2003)

WO 2003/046185 A1

KR 1020030043780 A

KR 1020030070449 A

전체 청구항 수 : 총 10 항

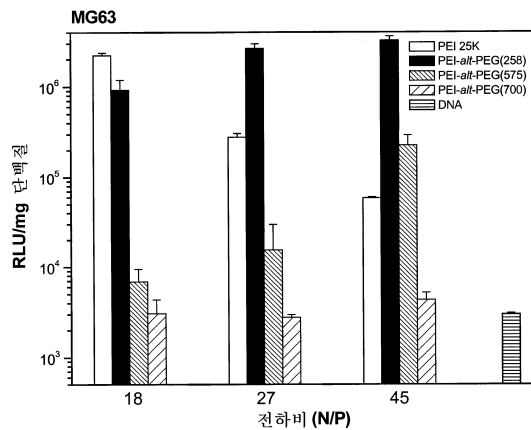
심사관 : 조영균

(54) 생분해성인 선형폴리에틸렌이민과 폴리에테르의 공중합체를 이용한 새로운 유전자 전달체

(57) 요약

본 발명은 생분해성인 폴리에틸렌이민과 폴리에테르의 공중합체를 주요 구성성분으로 하는 유전자 전달체에 관한 것이다. 본 발명의 유전자전달체는, 유전자 전달효율은 높으나 그의 세포독성때문에 실제 적용에 한계점을 갖고 있는 PEI 25K를 대신할 수 있는 우수한 유전자전달체로서 그 역할이 기대되며, 아울러 그의 이러한 생분해성과 낮은 세포독성, 높은 유전자전달효율로 인하여 안전한 유전자 전달체로서 적용 가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

대표도 - 도9c



(72) 발명자

국승은

서울 노원구 공릉1동 566-13

한기욱

서울 강남구 도곡2동 개포4차 우성 아파트 7동 80
7호

조명행

서울 양천구 목1동 현대아파트 101동 1004호

특허청구의 범위

청구항 1

선형폴리에틸렌이민과 폴리에테르 디아크릴레이트와의 공중합체이고 선상인 교대공중합체를 주요 구성성분으로 하는 유전자 전달체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 선형폴리에틸렌이민의 분자량이 100 내지 10100인 것인 유전자 전달체.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 폴리에테르 디아크릴레이트 중 폴리에테르의 분자량이 100 내지 10000인 것인 유전자 전달체.

청구항 4

제 1항에 있어서, 선형폴리에틸렌이민과 폴리에테르 디아크릴레이트의 반복단위몰비가 1:0.5~1.5인 것인 유전자 전달체.

청구항 5

제 4항에 있어서, 선형폴리에틸렌이민과 폴리에테르 디아크릴레이트의 반복단위몰비가 1:0.9~1.1인 것인 유전자 전달체.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 폴리에테르 디아크릴레이트 중 폴리에테르가 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜-폴리프로필렌글리콜 또는 폴리에틸렌글리콜-폴리프로필렌글리콜-폴리에틸렌글리콜인 것인 유전자 전달체.

청구항 7

제 1항의 유전자 전달체와 DNA 용액을 혼합하여 제조된 것인 유전자 전달 복합체.

청구항 8

제 7항에 있어서, 유전자 전달체와 DNA의 전하비가 1:5~50인 것인 유전자 전달 복합체.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 유전자 전달 복합체를 동물세포 및 동물조직에로의 유전자 전달 목적으로 적용하는 것을 특징으로 하는 유전자 전달 복합체.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 유전자 전달 복합체를 근육세포 및 근육조직에로의 유전자 전달 목적으로 적용하는 것을 특징으로 하는 유전자 전달 복합체.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<12> 본 발명은 생분해성인 폴리에틸렌이민과 폴리에테르의 공중합체를 이용한 새로운 유전자 전달체에 관한 것이다.

- <13> 유전자 치료는 특별한 세포 또는 조직으로의 선택적인 전달이나 재조합유전자의 발현조절 같은 몇가지 고려해야 할 어려운 점들이 있으나, 유전자 차원에서 근본적인 난치병치료가 가능하다는 점에서 매우 매력적인 치료법이다 (G.J. Nabel, Genetic, cellular and immune approaches to disease therapy: past and future, Nature Medicine 10(2) (2004) 135-141). 유전자치료를 위한 600건 이상의 임상시험이 시작되거나 완료되었으며, 이 중 바이러스성 벡터가 비바이러스성 벡터보다 높은 유전자 전달효율을 가지기 때문에 많은 부분을 차지하고 있으나 (C. Woffendin, U. Ranga, Z. Yang, L. Wu, G.J. Nabel, Expression of a protective gene prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 2889-2894.) 안전성 문제로 사람에의 적용은 매우 제한되어 있다.
- <14> 최근 바이러스성 벡터보다 더 안전한 대안으로 비바이러스성 벡터가 많이 각광받고 있다. 이들 가운데 폴리에틸렌이민(PEI)은 플라스미드 DNA를 효과적으로 압축하여 콜로이드 입자로 만들며, pH반응성의 완충능력으로 인한 높은 유전자효율을 가져 인비트로와 인비보 상에서 유전자를 다양한 세포에 효과적으로 전달하는 것으로 잘 알려져 있다 (O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J.P. Behr, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7297-7301 ; and W.T. Godbey, K.K. Wu, A.G. Mikos, Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery, J. controlled Release 60 (1999)149-160). 그러나 생분해성, 세포독성, 응집과 인비보 상에서 혈류에서의 짧은 순환시간등의 문제점들이 아직 남아있어서, 이를 해결하기 위한 많은 연구들이 진행되고 있다. Ahn 등은 저분자량의 PEI와 생분해성 연결부위를 가진 PEG의 공중합체를 합성하였다 (C.H. Ahn, S.Y. Chae, Y.H. Bae, S.W. Kim, Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery, J. Controlled Release 80 (2002) 273-282.)
- <15> 비록 공중합체가 생분해성 결합을 가지고 있고, 세포 생존률이 80%이상 유지되었지만, 유전자전달효율은 PEI 25K보다 매우 낮았다. Gosselin 등은 역반응이 가능한 교차된 저분자량의 PEI를 사용한 유전자 전달방법을 보고하였는데 (M.A. Gosselin, W. Guo, R.J. Lee, Efficient gene transfer using reversibly cross-linked low molecular weight polyethylenimine, Bioconjugate Chem. 12(2001) 989-994.), 낮은 세포독성을 나타내었으나, 유전자 발현은 PEI 25K보다 낮았다. Forrest 등은 저분자량의 PEI 800-Da 과 diacrylate의 반응으로 에스테르기를 가진 PEI유도체를 합성하였다 (M.L. Forrest, J.T. Koerber, D.W. Pack, A degradable polyethylenimine derivative with low toxicity for high efficient gene delivery, Bioconjugate Chem. 14 (2003) 934-940.). 합성한 고분자는 PEI 25K보다 세포독성은 없으면서 더 효율적인 유전자 발현을 나타내었다.
- <16> PEI의 세포독성을 줄이기 위하여 dextran sulfate, human serum albumin, PEG등으로 개질하는 방법이 많이 시도되었으나, 개질된 PEI는 그렇지 않은 것보다 낮은 유전자전달 효율을 보였다. Erbacher등은 polyplex 표면의 PEG부분으로 "brush" layer에 의한 공간적 안정효과 로 혈류순환시간을 증가시켰으나, 이역시 유전자전달효율은 개질하지 않은 것 보다 매우 낮았다 (P. Erbacher, T. Bettinger, P. Belguise-Valladier, S. Zou, J.L. Coll, J.P. Behr, J.S. Remy, Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimine (PEI), J. Gene. Med. 1 (1999) 210-222.).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <17> 본 발명은 낮은 세포독성과 생분해성을 가지면서 높은 유전자 전달효율을 가지는 새로운 유전자 전달체를 제공하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

- <18> 본 발명은 생분해성인 폴리에틸렌이민과 폴리에테르의 공중합체를 주요 구성성분으로 하는 유전자 전달체에 관한 것이다.
- <19> 상기 폴리에틸렌이민(polyethylenimine)은 선형 (linear) 또는 가지형 (branch) 일 수 있으며 그 분자량은 바람직하게는 100 내지 10100이다. 분자량이 100 미만일 경우 생성된 유전자 전달체가 유전자와 잘 결합할 수 없으며, 분자량이 10100보다 높을 경우 신장을 통해 몸밖으로 배출되기 힘들기 때문이다.
- <20> 상기 폴리에테르(polyether)의 분자량은 바람직하게는 100 내지 10000이다. 분자량이 100 미만일 경우 생성된

유전자 전달체가 유전자와 잘 결합할 수 없으며, 분자량이 10100보다 높을 경우 신장을 통해 몸밖으로 배출되기 힘들기 때문이다.

- <21> 본 발명의 유전자 운반체중 상기 폴리에틸렌이민과 폴리에테르의 반복단위몰비는, 폴리에틸렌이민이 선형일 경우 1:0.5~1.5이고 폴리에틸렌이민이 가지형일 경우 1:0.05~1인 것인 바람직하다. 더욱 바람직하게는 각각 1:0.9~1.1이고 1:0.09~0.11이다.
- <22> 본 발명의 유전자 운반체중 상기 폴리에테르로서는 폴리에틸렌글리콜 [Poly(ethylene glycol)], 폴리에틸렌글리콜-폴리프로필렌글리콜 [Poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol)] 또는 폴리에틸렌글리콜-폴리프로필렌글리콜-폴리에틸렌글리콜 [Poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol)- poly(ethylene glycol)]가 바람직하다.
- <23> 본 발명의 또다른 태양은 상기 유전자 전달체와 DNA 용액을 혼합하여 제조된 것인 유전자 전달 복합체에 관한 것이다. 상기 유전자 전달체와 DNA의 전하비는 바람직하게는 1:5~50이다. 상기 수치범위보다 작으면 유전자 발현이 어려워지고 더 크면 세포독성이 커서 적용하기 어려워진다.
- <24> 상기의 전하비는 폴리에틸렌이민 중 아민기의 몰수/DNA 중 포스페이트기 (phosphate group)의 몰수의 비로서 하기 실시예 1에서 제조된 PEI-*alt*-PEG의 경우 대략 전하비 5가 무게비 1에 해당한다.
- <25> 상기 유전자 전달 복합체를 동물세포 및 동물조직에서의 유전자 전달 목적으로 적용할 수 있다. 본 발명에 따른 유전자 전달 복합체는 비면역원성, 비독성, 비감염성이며, 레트로바이러스 또는 아데노바이러스와 같은 벡터 유기체의 DNA가 패키징되어 있지 않기 때문에 플라스미드 크기에 제한을 받지 않는다. 따라서, 어떠한 실용적인 크기의 재조합 유전자 발현 구조물에도 사용될 수 있다.
- <26> 이와같이 본 발명에 따른 유전자 전달 복합체를 이용하여 근육으로의 이식 또는 근육내 직접주사에 의한 DNA의 생체내 발현으로 유전자의 전달을 수행할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 유전자 전달 복합체는 그 효용이 단지 근육조직에만 그치지 않으며, 종양이나 내부장기 등 일반적인 생체내 유전자 전달과 배양세포 등 시험관내 유전자 전달에도 충분히 확대 적용될 수 있다.
- <27> 이상적인 유전자전달체는 안전성과 높은 유전자전달효율을 모두 갖추어야 한다. 폴리에틸렌이민(PEI)은 높은 유전자전달효율을 가진 양이온성고분자로서 잘 알려져 있으나 많은 세포에서 독성을 나타내며, 생분해가 되지 않는다. 따라서 그 실제 적용에 커다란 제한점을 가지고 있다.
- <28> 본 발명에서는 새로운 유전자 전달체로서 새로이 합성한 폴리에틸렌이민과 폴리에테르의 공중합체(PEI-co-Polyether)는 생분해성이다. 본 발명의 공중합체는 예를들면 저분자량의 PEI에 교차매개체인 polyether 다이아크릴레이트 (polyetherDA)를 더하여 만들어질 수 있다. 본 발명의 유전자 전달체는 전하비 조절등에 의하여 쉽게 플라스미드 DNA와 같은 유전자와 복합체를 형성시킬 수 있다. 광산란 광도계, 아가로스겔 전기영동, 원자현미경으로 각각 복합체의 크기와 복합체 형성능력, 복합체의 모양을 확인할 수 있다. 본 발명의 공중합체들은 생리화적인 조건에서 잘 분해되며, 상기 공중합체와 DNA와의 복합체 즉 본 발명에 따르는 유전자 전달 복합체는 공중합체가 분해되기 전까지는 DNase I 으로부터 DNA의 분해를 막아준다.
- <29> 또한 본 발명의 공중합체는 PEI 25K와 비교해 볼 때 고농도에서도 세포독성을 나타내지 않는다. 반면에 그 유전자 전달 효율은 세포의 종류에 따라 다소 차이가 있지만 대체적으로 PEI25K 보다 훨씬 높거나 유사하다.
- <30> 이하 본 발명을 실시예 및 실험예에 의거하여 상세하게 설명하지만 본 발명이 다음 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <31> **하기의 실시예 및 실험예에서 사용된 재료**
- <32> 선형의 폴리에틸렌이민 (Polyethyleneimine: 이하 PEI라 칭함) (Mn: 423), 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트 [Poly(ethyleneglycol) diacrylate: 이하 PEGDAs라 칭함] (Mn: 258, 575 및 700), PEI 25K, 무수성의 메칠렌클

로라이드, 염 형태의 소 흡선 DNA는 시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 특히 염 형태의 소 흡선 DNA는 상품번호 D-1501 를 사용하였다.

<33> AFM실험에 필요한 마이카 (mica)는 서울대학교 생물자원공학부에서 제공 받았다.

<34> 세포생존률 검사를 위한 셀 타이터 96 어큐어스 원 솔루션 시약 (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent)과 인비트로 상에서의 유전자 전달효율 검사를 위한 루시퍼라제 리포터 1000 분석계 (Luciferase Reporter 1000 Assay System)와 SV-40 프로모터 (promoter)와 화이어플라이 (firefly: Photinus pyralis) 루시퍼라제를 암호화하는 인헨서 (enhancer)를 가진 pGL3-컨트롤 벡터 (control vector) 는 프로메가 (Promega, Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 특히 pGL3-컨트롤 벡터는 상품번호 E1741을 사용하였다. CMV 얼리 프로모터 (early promoter)와 인헨스드 그린 플루오레센트 단백질 (enhanced green fluorescent protein gene: 이하 EGFP 유전자라 칭함)을 가진 pEGFP-N2는 클론테크 (Clontech, Palo Alto, CA, USA)에서 구입하였다. 특히 pEGFP-N2는 상품번호 6081-1을 사용하였다. 플라스미드 DNA는 컴피넨트 대장균 균주 (competent Escherichia coli strain) 인 JM109에서 증식시켰고, QIAGEN (Chatsworth, CA, USA) 키트로 분리하였다. 얻은 DNA의 순도와 농도는 260과 280 nm에서 UV 흡광도로 결정하였다.

<35> **실시예 1. 공중합체의 합성**

<36> 공중합체는 Lynn등의 방법을 응용하여 합성하였다 (D.M. Lynn, R. Langer, Degradable poly(-amino esters): synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA, J. Am. Chem. Soc. 125 (2000) 10671-10768 ; and D.M. Lynn, D.G. Anderson, D. Putnam, R. Langer, Accelerated discovery of synthetic transfection vectors: Parallel synthetic transfection vectors: Parallel synthesis and screening of a degradable polymer library, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 8155-8156). 간략하게 설명하면, PEI 423-Da (2g, 0.788mM) 와 PEGDAs (Mn: 258, 575, 700) (0.788mM) 를 각각 무수성의 메칠렌 클로라이드 3ml이 포함된 유리병에 넣어 녹인 후, PEI용액을 교반하면서 PEGDA용액을 더했다. 유리병들은 용매저항성 뚜껑으로 잘 잠근 후 45°C에서 48시간 동안 흔들면서 반응시켰다. 반응 후 유리병들은 실온에서 식힌 후 5일동안 진공상태로 건조시켰다. 얻어진 고분자들은 증류수에 녹인 후 Spectra/Por® membrane (MWC0=6000-8000)을 이용하여 4°C에서 24시간 동안 투석하였고, 이를 동결건조하였다. 반응설계는 도 1에 나타내었다.

<37> 실시예 1에서는 PEG 다이아크릴레이트(PEGDA)가 상업적으로 이용가능할 뿐만 아니라 반응이 간단한 장점이 있기 때문에 미카엘형 부가반응 (Michael-type addition reaction) (D.M. Lynn, R. Langer, Degradable poly(-amino esters): synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA, J. Am. Chem. Soc. 125 (2000) 10671-10768 ; and D.M. Lynn, D.G. Anderson, D. Putnam, R. Langer, Accelerated discovery of synthetic transfection vectors: Parallel synthetic transfection vectors: Parallel synthesis and screening of a degradable polymer library, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 8155-8156.) 을 선택하여 PEI-*alt*-PEG 공중합체를 합성하였다. 그러나 본 발명의 공중합체를 합성할 수 있는 방법이라면 어느 것이라도 적용가능하다.

<38> 도 1에 나타낸 것과 같이, PEI-*alt*-PEG 공중합체는 선형의 PEI (423-Da) 와 다양한 분자량(258, 575, 및 700-Da)의 PEGDA를 중합시켜 만들었다. 도 1의 화학식에서 ℓ 은 약 9.43에 해당되는 것을 사용하였으며, m 은 약 3, 10 및 13.5에 해당하는 것을 각각 사용하였다. 본 발명의 범위에 해당하는 것으로서는 ℓ 은 2~233의 범위가 바람직하며 m 은 1~225의 범위가 바람직하다. 합성한 공중합체의 특징은 표 1에 나타내었다. PEI에 대한 PEG의 비는 대략 1로, 이러한 결과는 합성한 공중합체가 고대공중합체임을 나타내고 있다. 공중합체의 분자량은 일반적으로 유전자전달에 사용되는 PEI보다 작았다.(10~70 kDa) (D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.P. Elsasser, T. Kissel, A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity, Pharm. Res. 16 (1999) 1273-1279 ; T. Bieber, H.P. Elsasser, Preparation of a low molecular weight polyethylenimine for efficient cell transfection, Biotechniques, 30 (2001) 74-81; J.S. Remy, B. Abdallah, M.A. Zanta, O. Boussif, J.P. Behr, B. Demenix, Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines, Adv. Drug Deliv. Rev. 30 (1998) 85-95 ; and W.T. Godbey, K.K. Wu, A.G. Mikos, Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle, J. Biomed. Mater. Res. 45 (1999) 268-275.)

표 1

PEI-*alt*-PEG의 특징

시료	초기분자량		초기농도 (mol/l)		PEI에 대한 PEG의 비율 ^a	공중합체의 분자량 ^b
	PEI(Da)	PEGDA	PEI	PEGDA		
1	423	258	0.788	0.788	1.06	7,982
2	423	575	0.788	0.788	1.03	12,860
3	423	700	0.788	0.788	1.17	8,707

^a NMR로 알아냄

^b SEC-MALS 로 측정

<39>

<40>

실험예 1-1. 공중합체의 특성

<41>

합성된 공중합체의 조성은 1H 핵자기공명법 (NMR) (Avance™ 500, Bruker, Germany)으로 추정하였다. 공중합체의 분자량은 크기배제크로마토그래피/광산란검출장비 (SEC-MALS) (Dawn Eos, Wyatt, USA) 로 690nm 레이저 파장에서 측정하였다.

<42>

실험예 1-2. 공중합체의 분해도

<43>

실시에 1에서 제조한 3가지 공중합체에 대하여, 공중합체의 분해도는 공중합체의 분자량을 측정하여 추정하였다. 간략히 설명하면, 각각의 공중합체 1g을 0.1M phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) 2ml에 녹인 후 37℃에서 100rpm으로 흔들면서 일정한 시간별로 놓아두었다. 다음에 공중합체 용액을 동결건조한 후 시료의 분자량을 690nm 레이저 파장에서 SEC-MALS로 측정하였다.

<44>

인비보 상에서 중합체의 분해는 안전성과 효율적인 유전자전달 측면에서 매우 중요하다. 중합체의 적절한 분해는 인비보 상에서 작은 분자량으로 인한 독성의 감소와 배설경로를 통한 제거가 가능하게 한다. 또한 복합체를 해체시켜 DNA를 방출하게 하여 핵으로의 전달을 촉진시킨다 (M.L. Forrest, et al., 2003; and D. Fischer, et al., 1999). 반면에 일반적으로 사용되는 PEI 25K는 많은 세포주에 독성이 있으며, 인비보 상에서 비분해성 또는 배설 경로를 통한 배출의 불가능으로 잠재적인 세포독성을 일으킬 수 있다 (D. Fischer, et al., 1999). 공중합체에서 에스테르결합은 생리화학적 환경에서 PEG와 끝부분에 산을 가지는 저분자량의 PEI로 가수분해된다.

<45>

공중합체의 분해도는 도 2에 나타내었다. 공중합체는 생리화학적 환경에서 급격히 분해되었으며, 특히 초기에 그러하였다. 합성한 공중합체의 분자량은 72시간 후에 약 4000정도로 일정하게 유지되었으며, PEI-*alt*-PEG(575)는 8시간 후에, 그리고 PEI-*alt*-PEG(258)와 PEI-*alt*-PEG(700)는 25시간 후에 초기 분자량의 절반으로 감소하였으며 이러한 감소유형은 Forrest 등의 결과와 유사하였다. (M.L. Forrest, et al., 2003)

<46>

실시에 2. 공중합체/DNA 복합체의 준비

<47>

실시에 1에서 제조한 3가지 공중합체에 대하여, 이들 각각과 DNA와의 복합체를 제조하였다. 모든 공중합체와 DNA 복합체는 사용하기 직전에 준비하였다. 복합체는 소용선 DNA (복합체의 크기와 표면전하 측정용) 또는 pGL3-control 용액 (기타 모든 실험용)에 동일한 부피의 공중합체 용액을 더한 후 실온에 30분 동안 놓아두어 형성시켰으며, pH 7.4의 10mM NaCl(원자현미경(AFM) 관찰) 또는 pH7.4의 PBS(기타 다른 실험)에서 만들었다.

<48> **실험예 2-1. 아가로스 겔 전기영동 분석**

<49> 실시예 2에서 제조한 3가지 복합체에 대하여, 공중합체가 DNA와의 복합체 형성능력이 있는지 전기영동 분석 방법으로 확인하였다. 복합체 형성은 1부터 30까지 다양한 전하비 (N/P)에서 유도시켰으며, loading dye를 포함한 최종 부피를 13 μ l로 맞추었다. 복합체들을 EtBr (0.1 μ g/ml)이 포함된 0.8% agarose gel 에 로딩한 후 100V에서 40분 동안 Tris-acetate (TAE) buffer하에서 전기영동장치를 작동시켰다. 복합체 형성은 UV 빛을 조사하여 관찰하였다.

<50> 유전자 전달체로서 필수조건 중의 하나는 DNA를 압축하는 능력이다. 합성한 공중합체 / DNA의 복합체 형성을 확인하기 위하여 아가로스겔 전기영동 분석을 하였으며, DNA의 이동이 감소하는 것을 확인하였다. 모든 공중합체는 도 3에서 보여지는 것과 같이 약 11.7의 비교적 높은 전하비에서 복합체가 형성되기 시작하였다. 이것은 공중합체의 작은 분자량과 공중합체에서 교대로 있는 PEG 부분 때문일 것이다. 실제로, PEI 423-Da 단독은 전하비 50에서도 복합체가 전혀 형성되지 않았다.

<51> **실험예 2-2. 복합체의 크기와 표면전하 측정**

<52> 실시예 2에서 제조한 3가지 복합체에 대하여, 각각의 크기와 표면전하를 측정하였다. 공중합체 / DNA 복합체의 크기와 표면전하는 각각 90° 와 20° 산란각도에서 전기영동 광산란 광도계 (ELS 8000, Otsuka Electronics, Osaka Japan)를 이용하여 측정하였다.

<53> 유전자 전달체의 목표세포로의 이동은 센티미터(혈액에서의 순환)부터 나노미터범위(세포 내)의 다양한 장벽의 통과를 필요로 한다 (K. Kostarelos, Rational design and engineering of delivery systems for therapeutics: biomedical exercises in colloid and surface science, Adv. Colloid Interface Sci. 106 (2003) 147-168.).

<54> 효율적인 엔도시토시스와 유전자전달을 위하여 복합체는 반드시 작아야 하며(150nm 이하) 잘 압축되어 있어야 한다 (G. Liu, M. Molas, G.A. Grossmann, M. Pasumarthy, J.C. Perales, M.J. Cooper, R.W. Hanson, Biological properties of poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation, J. Biol. Chem. 276 (2001) 34379-34387 ; and J. Guy, D. Drabek, M. Antoniou, Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy, Mol. Biotechnol. 3 (1995) 237-248.).

<55> 도 4(a)는 PBS상에서 다양한 전하비에서 준비된 공중합체/DNA 복합체의 크기를 보여주고 있다. 복합체의 크기는 전하비와 PEGDA의 분자량이 증가할수록 감소하였다. 대표적인 크기분포도로서 전하비 45에서의 PEI-*alt*-PEG(258)/DNA 복합체를 도 4(b)에 나타내었다. 도 4(b)에서 보여지는 것과 같이 복합체의 크기는 150nm보다 작았으며, 균일한 분포를 나타내었다. 복합체의 크기는 전하비와 PEG의 분자량이 증가할수록 감소하였으며 PEI-*alt*-PEG(700)의 경우 전하비 45에서 최소 75nm의 크기를 가졌다.

<56> 흥미롭게도, 도 4(a)에서 보여지는 것과 같이 PEI-*alt*-PEG(700)은 직경 75 에서 95nm 로 작은 입자를 형성하였는데, 이것은 공중합체의 긴 PEG 사슬이 생리학적인 염의 농도하에서 복합체의 응집을 막아주었기 때문으로 생각된다. 중합체/DNA 복합체의 염으로 인한 응집을 막는 PEG의 안정효과는 이미 보고되어 있다 (M. Ogris, S. Brunner, S. Schuller, R. Kircheis, E. Wagner, PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery, Gene Ther. 6 (1999) 595-605 ; and D. Needham, T.J. McIntosh, D.D. Lasic, Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes, Biochim. Biophys. Acta. 1108 (1992) 40-48 ; and W.T. Collard, Y. Yang, K.Y. Kwok, Y. Park, K.G. Rice, Biodistribution, metabolism, and in vivo gene expression of low molecular weight glycopeptide polyethylene glycol peptide DNA condensates, J. Pharm. Sci. 89 (2000) 499-512.).

<57> **실험예 2-3. AFM 관찰**

<58> 실시예 2에서 제조한 3가지 복합체 중 PEI-*alt*-PEG(258)/DNA 복합체에 대하여, 그의 모양과 크기를 원자현미경(주사탐침현미경) (Autoprobe CPTM, PSIA, USA)으로 관찰하였다. 시료는 전하비 45의 복합체 용액을 반대전하를 띤 마이카 위에 떨어뜨리고 1분동안 놓아둔 다음 마이카를 증류수로 씻은 후 실온에서 말려서 준비하였다. 이미

지는 non-contact mode에서 얻었으며, silicon pyramidal tip을 가진 V-shaped cantilever를 이용하였다. 복합체 크기는 50개의 복합체를 측정하여 평균하여 얻었다.

<59> 복합체의 모양을 AFM으로 관찰한 결과는 도 5에 나타내었다. 공중합체/DNA 복합체는 구형으로 잘 압축된 모양을 보여주었으며, AFM으로 측정한 평균 복합체의 크기는 144nm로, 전기영동 광산란 광도계로 측정한 결과와 유사하였다.

<60> **실험예 2-4. 복합체의 표면전하**

<61> 공중합체/DNA 복합체의 표면전하는 세포내로의 흡수와 밀접하게 관련되어 있다 (H. Petersen, P.M. Fechner, A.L. Martin, K. Kunath, S. Stolnik, C.J. Roberts, D. Fischer, M.C. Davies, T. Kissel, Polyethylenimine-graft-Poly(ethylene glycol) Copolymers: Influence of Copolymer Block Structure on DNA Complexation and Biological Activities as Gene Delivery System, Bioconjugate Chem. 13 (2002) 845-854 ; and K.A. Mislick, J.D. Baldeschwieler, Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 12349-12354.).

<62> 또한, 복합체의 강한 양전하는 종종 세포독성을 나타낸다. 강한 양전하로 인한 세포사를 감소시키기 위한 접근 방법중 하나로 PEGylation이 알려져 있다 (D. Putnam, A.N. Zelikin, V.A. Izumrudov, R. Langer, Polyhistidine-PEG:DNA nanocomposites for gene delivery, Biomaterials, 24 (2003) 4425-4433.)

<63> 실시예 2에서 제조한 3가지 복합체의 표면전하는 도 6에 나타내었다. 전하비 0.9에서는 복합체가 형성되지 않아 공중합체/DNA 복합체의 표면전하는 음전하를 나타내는데 전하비 9까지는 전하비가 증가함에 따라 표면전하가 급격히 증가하였으며, 반면에 전하비 9에서 45까지는 천천히 증가하였다. 그리고 높은 전하비에서는 PEG의 shielding effect가 강해져, PEG 사슬이 길수록 낮은 표면전하를 보였다.

<64> **실험예 2-5. DNA 보호와 방출**

<65> 실시예 2에서 제조한 3가지 복합체에 대하여, 복합체에서 DNA의 보호와 방출을 Gebhart 등의 방법에 따라 전기영동으로 확인하였다 (C.L.Gebhart, S. Sriadibhatla, S. Vinogradov, P. Lemieux, V. Alakhov, A.V. Kabanov, Design and formulation of polyplexes based on pluronic-polyethylenimine conjugates for gene transfer, Bioconjugate Chem. 13 (2002) 937-944.).

<66> 간략하게 설명하면, DNase I 2unit 또는 PBS 4 μ l를 DNase/Mg²⁺ digestion buffer (50mM, Tris-Cl, pH 7.6 and 10mM MgCl₂)에 더하여 이를 플라스미드 DNA 또는 polyplexes solution 3 μ l에 더한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 100rpm으로 30분 동안 흔들어주었다. DNase의 불활성화를 위해 모든 시료에 EDTA (250mM) 3 μ l를 넣고 10분동안 놓아둔 후, 0.1N NaOH (pH 7.2) 에 녹인 sodium dodecyl sulfate (SDS)를 최종부피(20 μ l)의 1%가 되도록 섞는다. 최종 시료는 실온에서 2시간 동안 놓아두었으며, 0.8% agarose gel을 사용하여 TAE running buffer하에서 50V, 1시간 동안 전기영동을 하여 관찰하였다.

<67> 유전자 전달체에서 DNA는 효소로부터 보호되어야 하며, 유전자가 발현되기 위하여 방출되어야 한다. 따라서 우리는 공중합체가 DNase I 으로부터 DNA 분해를 막을 수 있는지, DNA가 원래대로 방출되는지 알아보았다. 도 7에서 보여지는 것과 같이, 공중합체는 낮은 전하비인 18에서도 DNase I 으로부터 DNA를 잘 보호하였으며, DNA는 복합체로부터 분리될 수 있음을 확인하였다.

<68> **실험예 2-6. 세포 생존률 검사**

<69> (1) 세포주와 세포배양

<70> 사람의 골아세포 (MG63), 사람의 자궁경부암 세포 (HeLa) 사람의 간암세포(HepG2)를 10% FBS, 스트렙토마이신 100 μ g/ml, 페니실린 100U/ml가 포함된 DMEM에서 배양하였다. 모든 세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다.

<71> (2) 세포 생존률 검사

- <72> 상기 3가지 세포들에 대한, 실시예 2에서 제조한 3가지 복합체 각각의 인비트로 상 세포독성을 MTS법에 의하여 검사하였다. 먼저 세포들을 0.2ml의 배지에 초기농도가 1×10^4 (HeLa and MG63) or 2×10^4 (HepG2) cells/well 이 되게 하여 96-well plate에 넣은 후 20시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 다양한 양의 고분자들이 포함되어 있는 혈청이 없는 배지로 갈아주었다. 48시간 동안 추가로 배양한 후에 셀 타이터 96 어큐어스 원 솔루션 시약 $20 \mu\text{l}$ 가 포함된 배지로 갈아주고 3시간 후에 세포의 대사활성을 측정하기 위하여 ELISA plate reader (GLR 1000, Genelabs Diagnostics, Singapore)를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존률(%)은 다음의 식에 따라 계산하였다:
- <73> 세포 생존률 (%) = (OD 570(실험군)/OD 570(대조군)) \times 100
- <74> 고분자량의 PEI 가 저분자량의 PEI보다 상당히 많은 독성이 있는 것은 이미 보고되어 있다 (D. Fischer, et al., 1999; and M.A. Gosselin, W. Guo, R.J. Lee, Efficient gene transfer using reversibly cross-linked low molecular weight polyethylenimine, Bioconjugate Chem. 12(6) (2001) 989-994.).
- <75> 도 8은 다양한 농도와 세포주에서 공중합체의 세포독성을 보여주고 있다. PEI 25K의 세포생존률이 농도가 상승함에 따라 급격히 감소하는 반면 합성한 공중합체는 모든 세포주에서 80%이상의 생존률을 보였다. 독성의 감소는 PEI 25K와 비교하여 볼 때 분해성 PEI의 확실치 중요한 장점이며, 아마 공중합체의 분해와 PEG부분과 직결되어 있을 것이다. 그러나 비록 Lynn등이 가수분해된 에스테르 기가 기본적으로 독성이 없다고 보고하였으나 (D.M. Lynn, et al., 2000), 공중합체 분해산물의 독성은 반드시 체크되어야 한다.
- <76> **실험예 2-7. 인비트로 상에서의 루시퍼라아제 활성측정**
- <77> 실시예 2에서 제조한 3가지 복합체에 대하여 하기의 실험을 실시하였다. 배지 1ml에 세포의 초기농도가 1×10^5 (HeLa and MG63) or 2×10^5 (HepG2) cells/well가 되도록 하여 24-well plate에 넣은 후 18시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 다양한 전하비의 공중합체/pGL3-control ($1 \mu\text{g}$)가 들어간 혈청이 없거나 혈청이 10% 포함된 배지로 교환해 준 후 6시간 동안 추가로 배양한다. 다음에 혈청이 포함된 새 배지로 갈아준 후 48시간 동안 37°C 인큐베이터에 놓아둔다. 루시퍼라아제 활성 측정은 제조업자의 방법대로 수행하였다. relative light unit (RLU)은 화학발광분석기 (Autolumat LB953, EG&G Derthold, Germany)를 이용하여 측정하였다. RLU 는 세포 추출물의 단백질의 농도로 나누어 이용하였으며, 단백질 정량은 BCA 방법을 이용하였다 (P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenano, E.K. Fukimoto, N.M. Geoke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurment of protein using bicinchonic acid, Anal Biochem. 150 (1985) 76-85.).
- <78> 모든 실험은 세번 반복하여 수행하였다.
- <79> 공중합체의 전하비에 따른 유전자 전달효율을 조사하기 위하여 세포생존률 검사에 사용한 것과 동일한 세포주들을 이용하여 인비트로 상에서 루시퍼라아제 활성을 측정하여 도 9에 나타내었다. 사용된 중합체들의 유전자 전달 효율은 세포주, PEG 분자량과 전하비에 따라 다르게 나타났다. HeLa세포주에서 공중합체의 유전자전달효율은 PEG의 분자량이 증가할수록 그리고 전하비가 감소할수록 감소하였고, 반면에 PEI 25K는 전하비를 45까지 올려도 크게 달라지지 않았다. 특히, 공중합체의 유전자전달 효율은 PEG의 분자량이 증가할수록 급격하게 감소하였는데, 이는 공중합체에서 PEG가 증가함에 따라 PEG의shielding effect도 증대하여 복합체의 세포로의 부착을 감소시켰기 때문이다. HeLa 세포주에서는 공중합체의 유전자 전달효율이 PEI 25K 보다 다소 낮았다. HepG2에서는 비록 PEI-*alt*-PEG(575)와 PEI-*alt*-PEG(700)이 PEI 25K보다 유전자 전달효율이 낮았으나, PEI-*alt*-PEG(258)은 높은 전하비에서 PEI 25K보다 높은 유전자 전달효율을 보여주었다. 흥미롭게도, MG63세포주에서는 높은 전하비인 27 과 45에서 PEI-*alt*-PEG(258)의 유전자 전달 효율이 PEI 25K보다 높았다. 이는 그림 9(c)에서 보여지는 것과 같이 MG63이 전하비가 상승함에 따라 독성에 민감하기 때문으로 생각된다.
- <80> 결론적으로 유전자 전달 효율은 세포의 종류에 따라 다소 차이가 있어 HeLa에서는 PEI25K 보다 약간 낮았으나, HepG2와 MG63에서는 PEI25K 보다 훨씬 높거나 유사한 결과를 얻을 수 있었다.
- <81> 혈청이 공중합체의 유전자 전달효율에 미치는 영향은 도 10에 나타내었다. PEI-*alt*-PEG(258)과 PEI-*alt*-PEG(575)가 PEG의 도입에도 불구하고 혈청이 있으면 유전자 전달 효율이 떨어진 것에 반하여 PEI-*alt*-PEG(700)의 유전자 전달효율은 크게 변하지 않았다. 이러한 결과는 PEI-*alt*-PEG(258)과 PEI-*alt*-PEG(575)의 PEG 길이가 생체적인 환경에서 복합체로부터 혈청 내의 알부민의 흡착을 막기에 불충분함을 나타낸다. 반면에

PEI 25K의 혈청존재하에서의 유전자 전달효율은 높은 전하비에서 증가하였는데 이는 혈청에 의하여 세포독성이 감소되었기 때문이다.

<82> 실험예 2-8. 인비트로 상에서의 GFP발현 관찰

<83> 도입한 유전자의 발현을 GFP 유전자를 사용하여 알아보았다. MG63세포주를 콜라겐이 코팅된 유리덮개가 포함된 24-well plate (Iwaki Glass Co., Tokyo, Japan)에 5×10⁴ cells/well의 농도로 넣은 후 18시간 동안 배양하였다. 다음, 전하비 45의 공중합체 / pEGFP-N2 (1μg) 복합체가 포함된 혈청이 없는 배지로 갈아준 후 6시간 동안 배양하였다. 사용된 공중합체는 PEI-*alt*-PEG(258)이었다. 배양 후 배지를 혈청이 포함된 배지로 갈아준 후 18시간 동안 추가로 배양하였다. 세포를 PBS로 두번 워싱한 후 2% glutaraldehyde solution 200μl를 넣어 고정하였다. 고정 후 PBS로 한번 더 씻은 후 세포가 붙어있는 유리덮개를 슬라이드글라스에 글리세롤로 붙인 후 공초점 레이저주사현미경 (CLSM) (Micro Systems LSM 410, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

<84> 도 11은 전하비 45에서 PEI 25K/DNA (a) 와 PEI-*alt*-PEG(258)/DNA (b) 의 MG63에서의 GFP발현을 공초점레이저 주사현미경으로 관찰한 사진이다. 비록 PEI 25K에서 일부 손상된 세포가 보였으나, 공중합체와 PEI 25K 모두 비슷한 발현정도를 보였다.

발명의 효과

<85> 본 발명의 유전자전달체는 분해성, DNA와의 복합체 형성능력, 유전자 전달을 위한 적절한 물리화학적 특징들을 보여주었다. 본 발명의 유전자전달체는 세포독성이 없었으며 HepG2와 MG63에서 PEI 25K보다 높은 유전자전달 효율을 보여주었다. 따라서 본 발명의 유전자전달체는, 유전자 전달효율은 높으나 그의 세포독성때문에 실제 적용에 한계점을 갖고 있는 PEI 25K를 대신할 수 있는 우수한 유전자전달체로서 그 역할이 기대되며, 아울러 그의 이러한 생분해성과 낮은 세포독성, 높은 유전자전달효율로 인하여 안전한 유전자 전달체로서 적용 가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

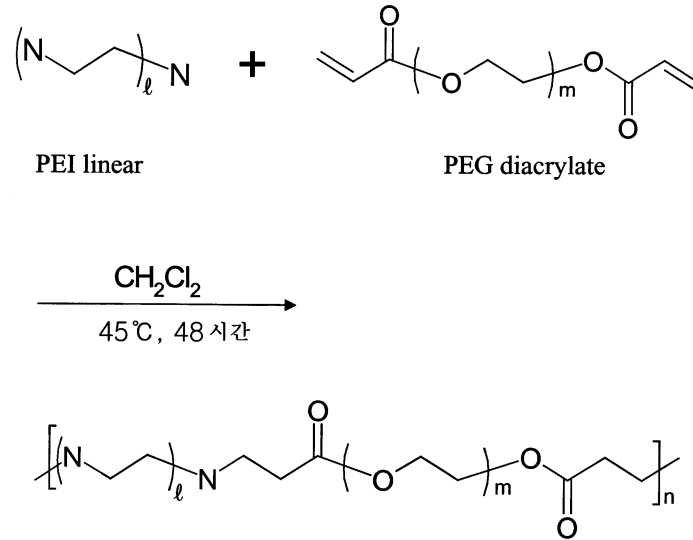
도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 실시예 1의 생분해성 PEI-*alt*-PEG 공중합체를 제조하는 반응모식도이다.
- <2> 도 2는 PEI-*alt*-PEG 공중합체의 인비트로 상에서의 시간에 따른 생분해도를 나타낸 그래프이다.
- <3> 도 3은 다양한 전하비 (N/P)에 따른 PEI-*alt*-PEG 공중합체/DNA 복합체를 나타내는 전기영동 사진이다. 각각의 도는 (a) PEI-*alt*-PEG(258), (b) PEI-*alt*-PEG(575), 그리고 (c) PEI-*alt*-PEG(700)이다.
- <4> 도 4(a)는 다양한 전하비에 따른 PEI-*alt*-PEG 공중합체/DNA 복합체의 입자크기를 나타내며, 와 도 4(b)는 전하비 45에서 PEI-*alt*-PEG(258)의 입자크기 분포도를 나타내는 그래프이다.
- <5> 도 5는 전하비 45에서 PEI-*alt*-PEG(258)/DNA complex의 형태를 나타내는 AFM 사진이다.
- <6> 도 6은 다양한 전하비에서 PEI-*alt*-PEG 공중합체/DNA 복합체의 표면전하를 나타내는 그래프이다.
- <7> 도 7은 PEI-*alt*-PEG 공중합체/DNA 복합체에 (전하비 18) PBS 및 DNase I 을 처리하고 1% SDS를 처리하였을때 DNA의 해리정도와 DNase I 에 대한 방어능력을 나타내는 전기영동 사진이다. (a) PBS, 그리고 (b) DNase I 에 대한 결과이며 각각의 도에서 기호들은 1: plasmid DNA alone, 2: PEI-*alt*-PEG(258), 3: PEI-*alt*-PEG(575), 및 4: PEI-*alt*-PEG(700)를 나타낸다.
- <8> 도 8은 다양한 농도와 세포에서 PEI-*alt*-PEG 공중합체의 세포독성을 나타낸 그래프이다. 각각의 도는 (a) HeLa, (b) HepG2, 그리고 (c) MG63이다.
- <9> 도 9는 다양한 전하비와 세포에서 PEI-*alt*-PEG 공중합체의 유전자 전달효율을 나타낸 그래프이다. 각각의 도는 (a) HeLa, (b) HepG2, 그리고 (c) MG63이다.
- <10> 도 10은 MG 63 세포에서 PEI-*alt*-PEG 공중합체의 유전자 전달효율에 혈청이 미치는 영향을 나타내는 그래프이다. 각각의 도는 (a) 혈청을 처리하지 않은 것, 그리고 (b) 혈청을 처리한 것이다.
- <11> 도 11은 전하비 45에서 공중합체/DNA 복합체의 MG63 세포에서의 GFP 발현을 보여주는 공초점 주사 현미경 사진

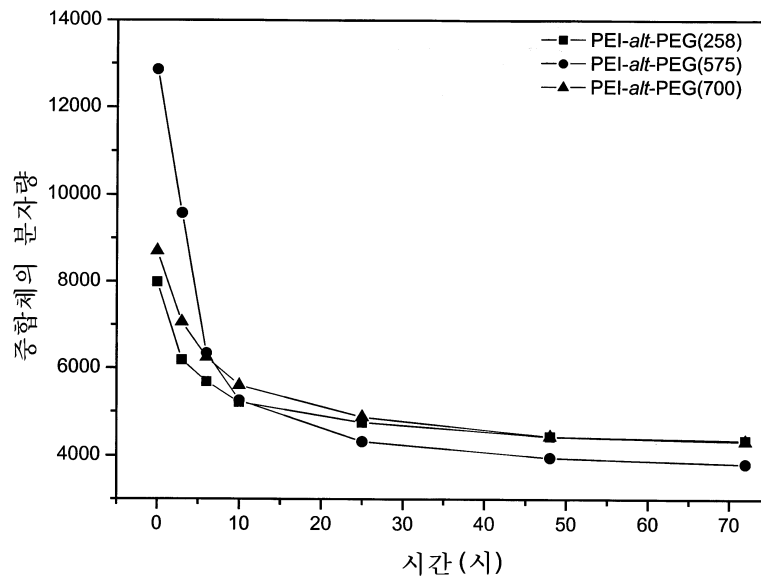
이다. 각각의 도는 (a) PEI 25K, 그리고 (b) PEI-*alt*-PEG(258)이다.

도면

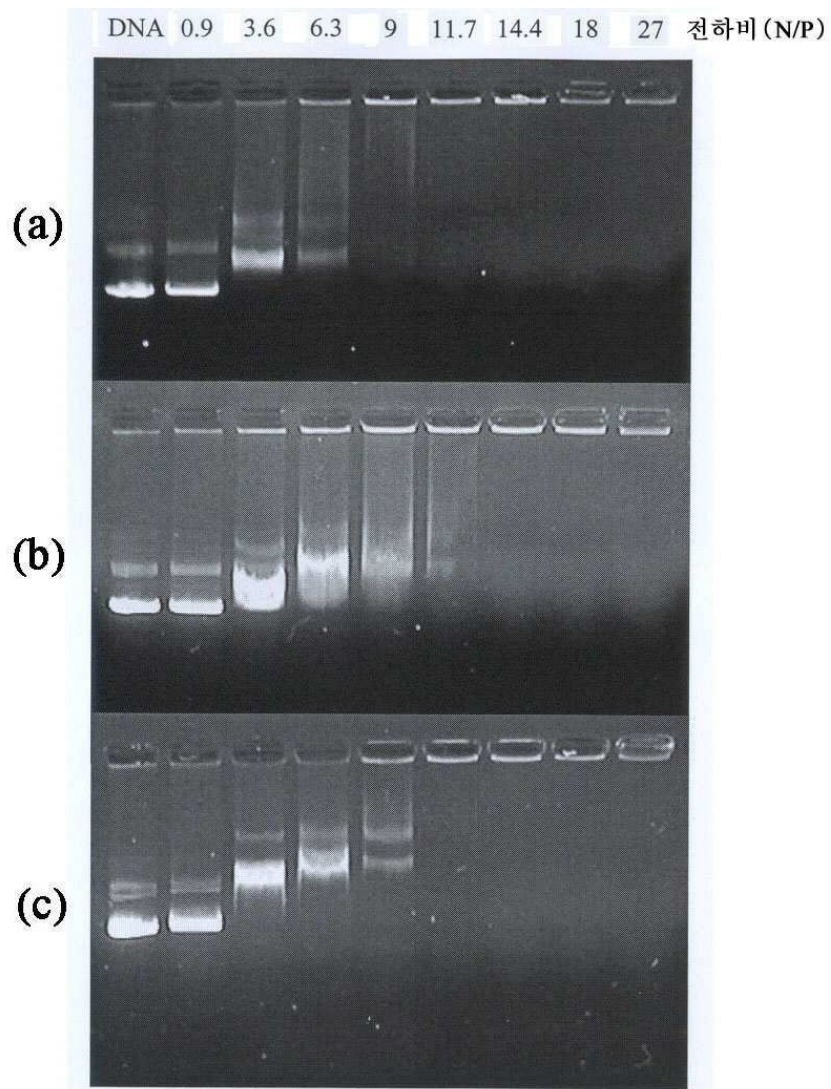
도면1



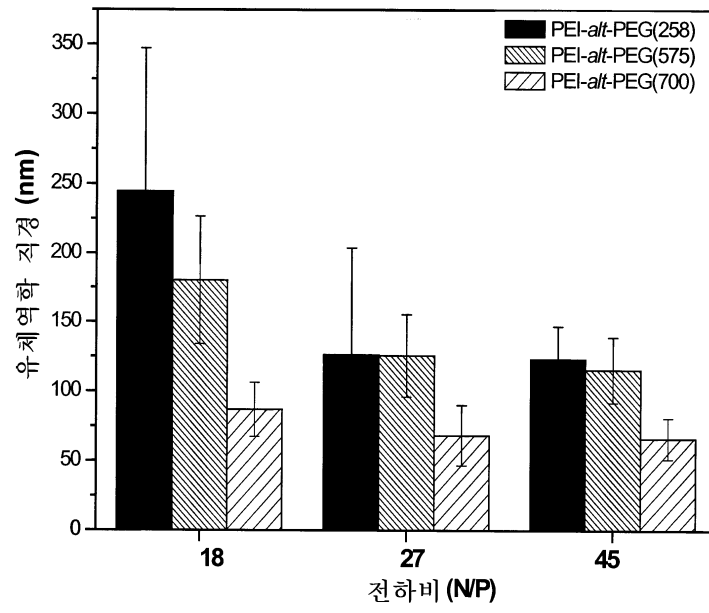
도면2



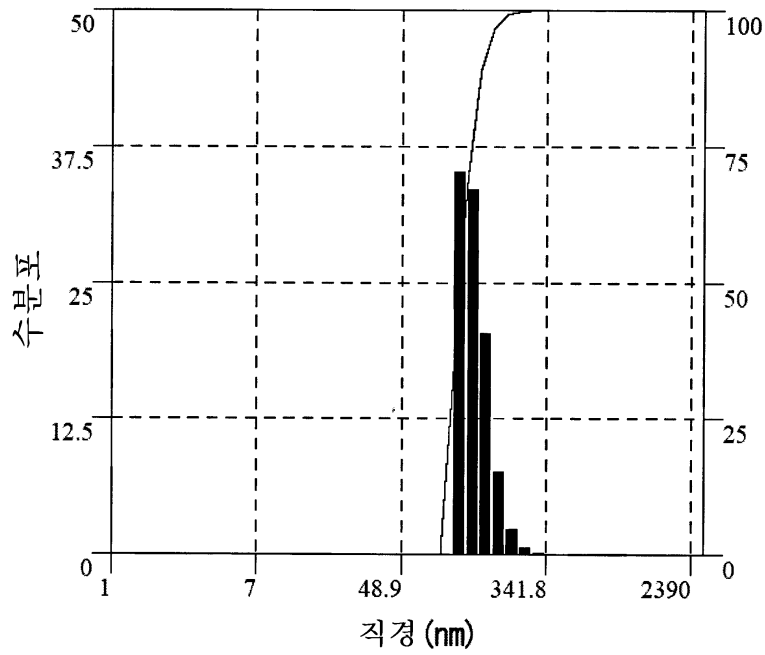
도면3



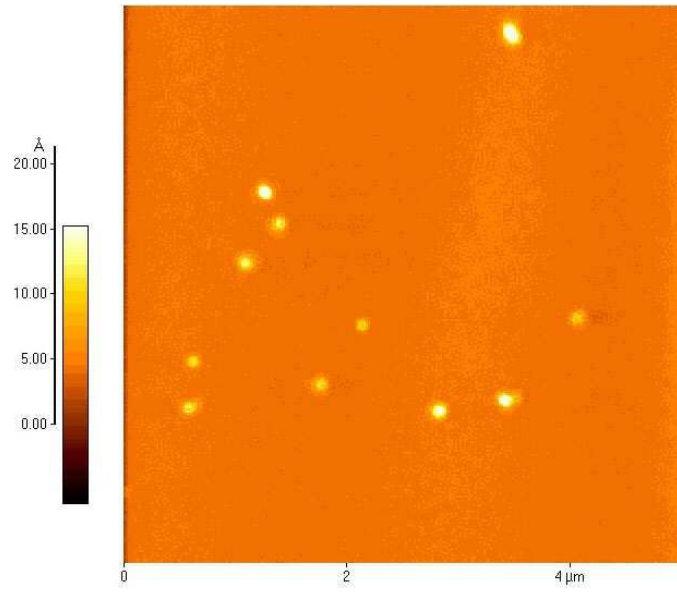
도면4a



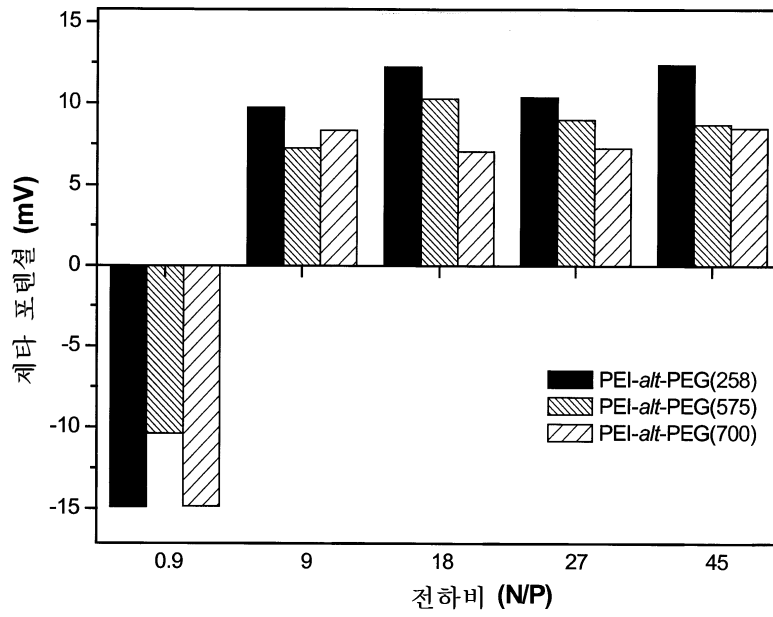
도면4b



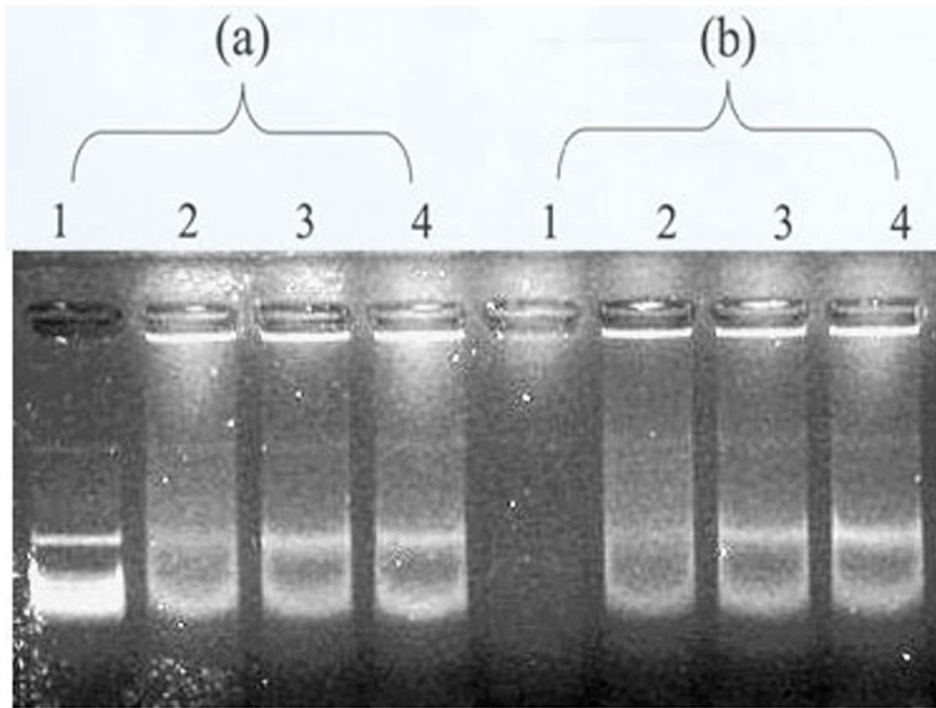
도면5



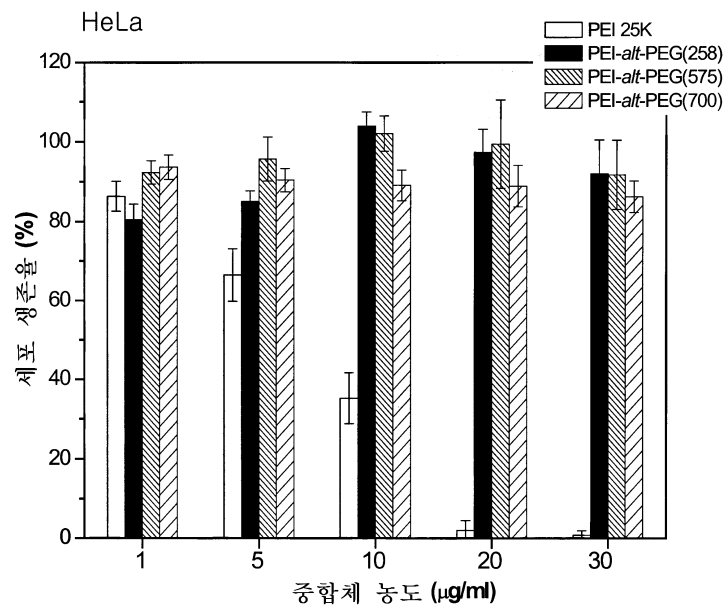
도면6



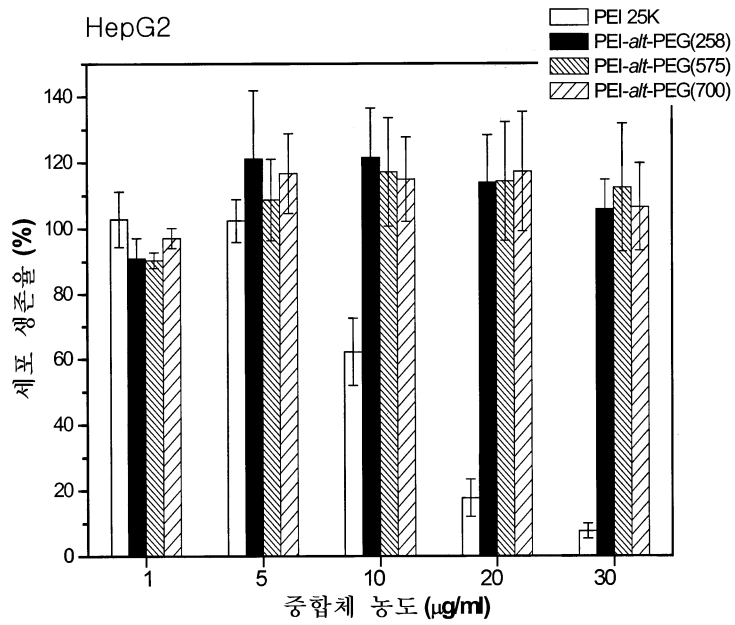
도면7



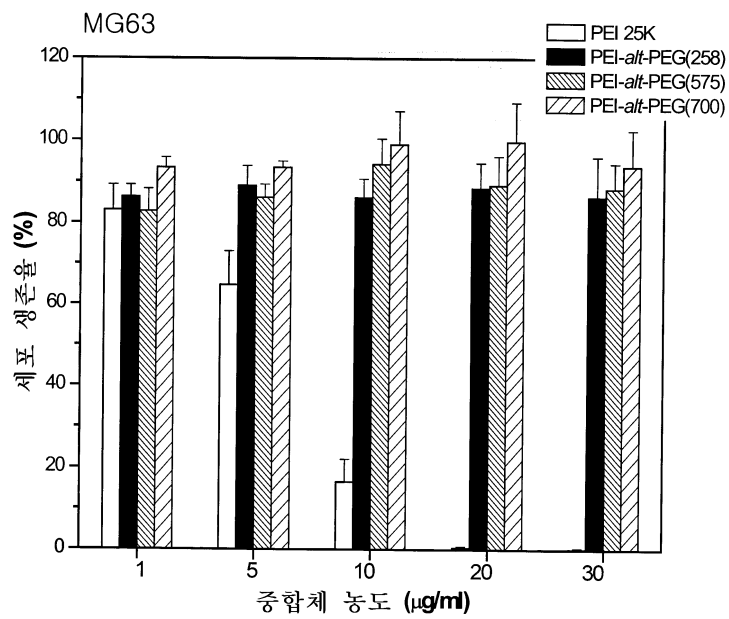
도면8a



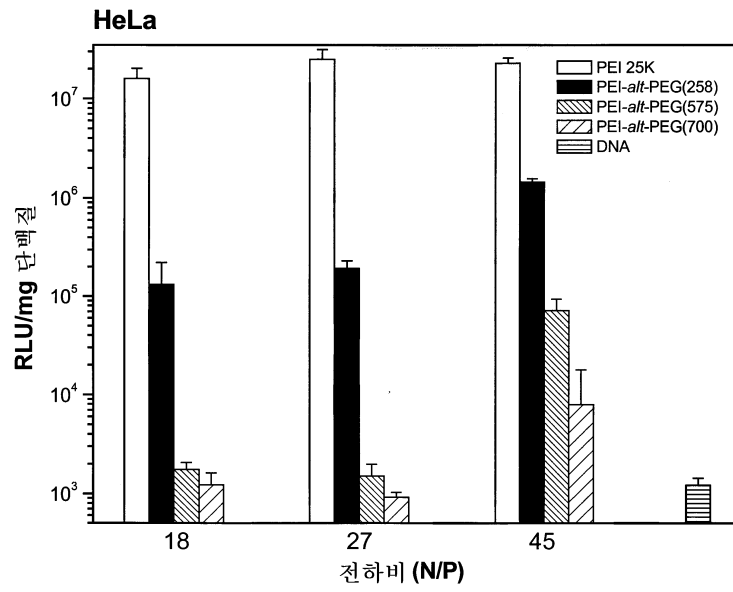
도면8b



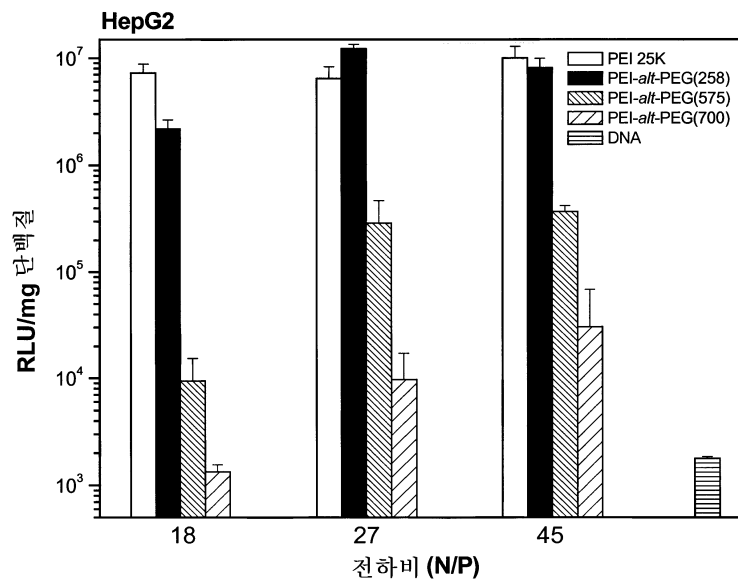
도면8c



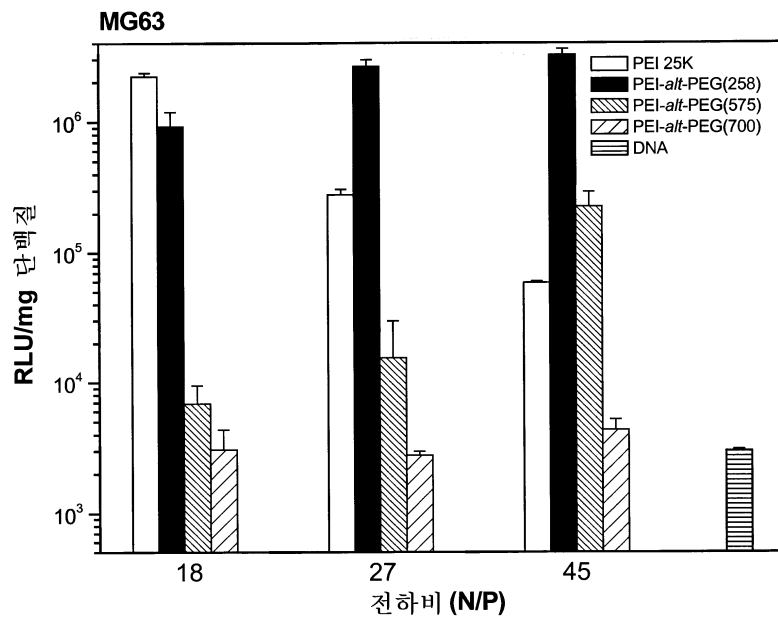
도면9a



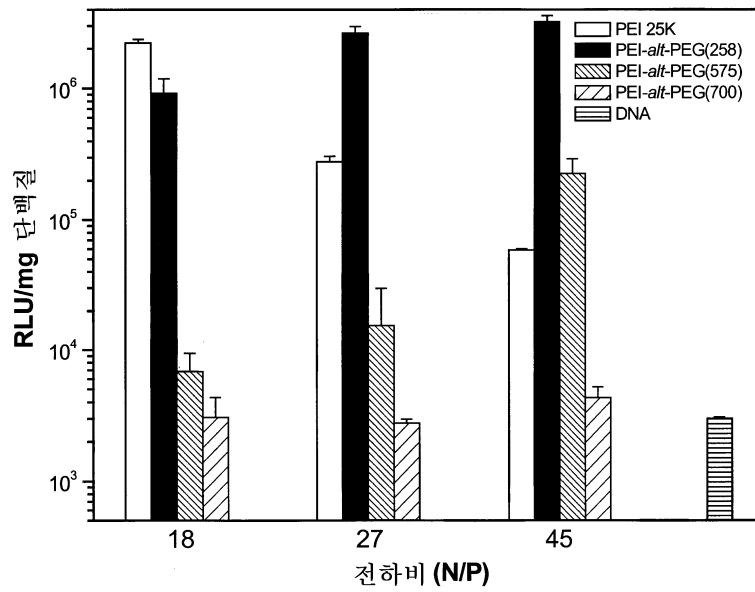
도면9b



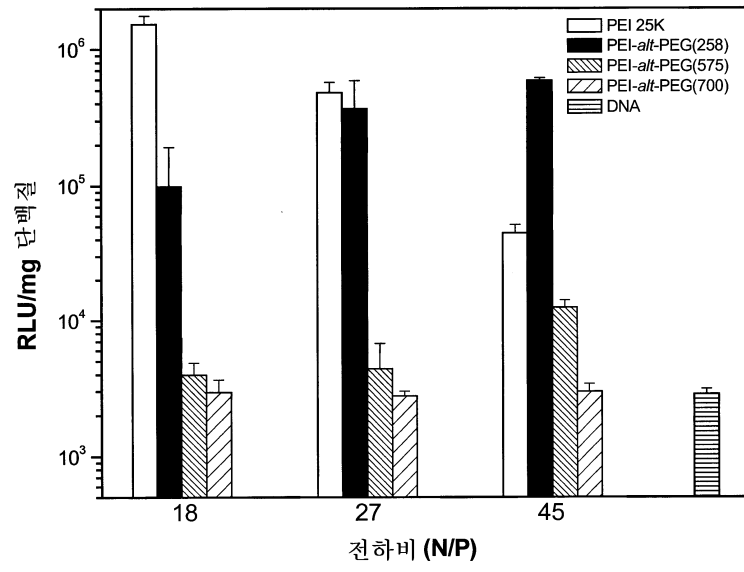
도면9c



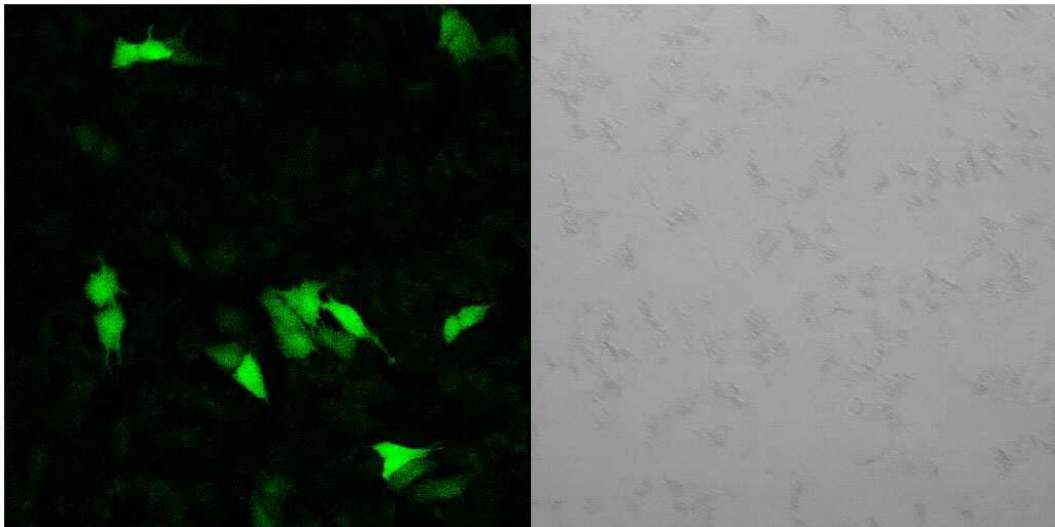
도면10a



도면10b



도면11a



도면11b

