(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0110174
(43) 공개일자 2022년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/001 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7014303
(22) 출원일자(국제) 2020년10월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년04월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/054251
(87) 국제공개번호 WO 2021/067930
국제공개일자 2021년04월08일
(30) 우선권주장
62/910,760 2019년10월04일 미국(US)
62/915,450 2019년10월15일 미국(US)

(71) 출원인
서나오믹스, 인크.
미국 20879 메릴랜드주 게이더스버그 401 프로페셔널 드라이브 스위트 280
(72) 발명자
루 샤오용
미국, 메릴랜드 20879, 게이더스버그, 스위트 280, 401 프로페셔널 드라이브, 씨/오 서나오믹스, 인크.
루 패트릭 와이.
미국, 메릴랜드 20879, 게이더스버그, 스위트 280, 401 프로페셔널 드라이브, 씨/오 서나오믹스, 인크.
에반스 데이비드 엠.
미국, 메릴랜드 20879, 게이더스버그, 스위트 280, 401 프로페셔널 드라이브, 씨/오 서나오믹스, 인크.
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 64 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 치료제를 위한 종양-표적화 폴리펩티드 나노입자 전달 시스템**

(57) 요 약

표적화 기능을 보유하는 선형 히스티딘-리신-풍부 시스테인-함유 펩티드, 및 4개의 분지형 히스티딘 리신 풍부 폴리펩티드를 함유하는 신규한 핵산 전달 시스템이 제공된다. 상기 전달 시스템은 siRNA와 같은 핵산을 포함한다. 상기 성분은 siRNA의 포스페이트와 폴리펩티드의 히스티딘/리신 사이의 비공유 상호작용을 통해, 감소된 독성으로, 안정한 나노입자 복합체를 형성하고, 유전 물질을 세포에 선택저긍로 전달한다. 표적화 기능은 핵산 전달 및 형질감염의 효율성을 증진시킨다. 치료 분자를 특이적 세포에 전달할 수 있는 담체 분자가 제공된다. 담체 분자는 표적화될 세포 상에 특이적 수용체에 결합할 수 있는 표적화 리간드로 변형된다. 치료 분자는 siRNA, miRNA, 또는 기타 올리고뉴클레오티드이다. 표적화 모이어티는 표적화될 세포 상에 존재하는 수용체에 대한 친화도를 나타내는 소분자, 펩티드, 또는 단백질이다.

(52) CPC특허분류
A61K 47/551 (2017.08)
A61K 47/62 (2017.08)
A61K 47/6455 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 7/08 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

결합 도메인(binding domain) 및 세포-특이적 표적화 리간드(cell-specific targeting ligand)를 포함하는 펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 펩티드가 선형인 펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 펩티드가 분지형인 펩티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, C-말단 시스테인 및 히스티딘 및 리신 아미노산 풍부(rich) 서열 K(HHHK)4XC를 포함하고, 여기서 'X'는 말단 시스테인과 결합 도메인 사이의 합성 분자 링커(linker) 또는 펩티드 링커인 펩티드.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, C-말단 시스테인 및 히스티딘 및 리신 아미노산 풍부 서열 [KHHHKHHHHnKHHHKHHHK]2KXC (n= 0, 1)을 포함하고, 여기서 'X'는 말단 시스테인과 결합 도메인 사이의 합성 분자 링커 또는 펩티드 링커인 펩티드.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 'X'가 2-20개의 아미노산을 가진 선형 또는 분지형 펩티드 모티프(motif)를 포함하는 펩티드.

청구항 7

제6항에 있어서, 펩티드 모티프가 3-8개의 아미노산을 갖는 펩티드.

청구항 8

제1항에 있어서, HKC1, HKC2, 및 HK2C로 이루어진 군으로부터 선택되는 펩티드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 화학 반응을 통해 세포 특이적 표적화 리간드에 공유적으로 연결(covalently linking)되는 펩티드.

청구항 10

제9항에 있어서, 펩티드와 리간드 사이의 공유 연결이 황-탄소 결합을 포함하고 화학 반응이 시스테인/말레이미드 부가 반응을 포함하는 펩티드.

청구항 11

제9항에 있어서, 펩티드와 리간드 사이의 공유 연결이 질소-탄소 결합을 포함하는 펩티드.

청구항 12

제9항에 있어서, 펩티드와 리간드 사이의 공유 연결이 추가 스페이서 분자(spacer molecule), 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, Mn= 100-5000) 모이어티(moiety), 또는 또 다른 중합체를 포함하는 펩티드.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물 세포 내로 내재화될 수 있는 펩티드.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 특이적 표적화 리간드가 소분자, 펩티드, 단백질, 항체, 및 앱타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 펩티드.

청구항 15

제14항에 있어서, 소분자가 폴레이트(folate), 아니사미드(anisamide), 또는 갈락토스인 펩티드.

청구항 16

제14항에 있어서, 소분자 또는 표적화 펩티드의 수가 1 내지 4인 펩티드.

청구항 17

제14항에 있어서, 표적화 펩티드가 시클릭(cyclic)(c) RGD, APRPG, NGR, F3 펩티드, CGKRK, LyP-1, iRGD, iNGR, T7 펩티드 (HAIYPRH), MMP2-절단가능한 옥타펩티드 (GPLGIAGQ), CP15 (VHLGYAT), FSH (FSH-β, 33-53 아미노산), YTRDLVKDPARPKIQKTCTF), LHRH (QHTSYkcLRP), 가스트린-방출 펩티드 (GRP) (CGGNHWAVGHLM), 및 RVG (YTWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG)로 이루어진 군으로부터 선택되는 펩티드.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 펩티드, 및 히스티딘 (H) 및 리신 (K) 풍부 반복 단위를 가진 분지형 폴리펩티드를 포함하는 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 분지형 폴리펩티드가 K(HHHK)4, 또는 KHHHKHHHHKHHHKHHHK- 반복 단위의 4개의 분지를 포함하는 조성물.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 리신 및 히스티딘이 함께 결합 도메인으로서 작용하는 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 히스티딘 영역이 세포의 엔도솜 내에서 핵산의 방출을 촉진하는 조성물.

청구항 22

제18항에 있어서, 분지형 폴리펩티드가 HKP 및 HKP(+H)로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 23

핵산을 추가로 포함하는 제18항 내지 제22항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 핵산이 siRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 플라스미드, mRNA, RNA자임(RNAzyme), DNA자임(DNAzyme), 및 앱타머 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 25

제23항에 있어서, 핵산이 siRNA, miRNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물.

청구항 26

제23항에 있어서, 핵산이 siRNA를 포함하는 조성물.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, siRNA 분자가 16-27개 염기쌍(base pair)의 길이를 가진 이중-가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물.

청구항 28

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, siRNA 분자가 21-25개 염기쌍의 길이 및 1-3개 뉴클레오티드의 평활 말단(blunt end) 또는 오버행(overhang)을 가진 이중-가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물.

청구항 29

제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 핵산을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 제1 핵산 서열이 siRNA이고 제2 핵산이 siRNA, miRNA, 안티센스 올리고, 플라스미드, mRNA, RNA자임(RNAzyme), DNA자임, 또는 앱타머 서열인 조성물.

청구항 31

제23항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드, 폴리펩티드, 및 핵산이 나노입자로 자기-어셈블링(self-assembling)되는 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 펩티드, 폴리펩티드, 및 핵산이 수용액 중에서 혼합되는 경우 나노입자로 자기-어셈블링되는 조성물.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 나노입자가 6.0 - 8.0의 pH 범위를 가진 수성 완충제 중에서 제제화되는 조성물.

청구항 34

제31항 또는 제32항에 있어서, 나노입자가 혼합 조건에서 제어되는 w:w = 3:1 내지 15:1의 범위 (중량 대 중량 비)의 질소 대 포스페이트 (N:P) 비 (총 펩티드:siRNA)로 제제화되는 조성물.

청구항 35

제31항 또는 제32항에 있어서, 나노입자가 혼합 조건에서 제어되는 5:1:1, 4:1:1, 3:1:1, 3:2:1, 2:2:1)의 범위 (w:w:w)의 (N:P) 비 (HKP:HKC:siRNA)로 제제화되는 조성물.

청구항 36

제23항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 의약품(pharmaceutical drug)을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 의약품이 소분자 약물, 펩티드 약물, 또는 단백질 약물로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 38

제23항 내지 제37항 중 어느 한 항의 조성물을 세포에 전달하는 것을 포함하는, 핵산을 포유동물 세포에 전달하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 핵산이 시험관내에서 세포에 전달되는 방법.

청구항 40

제38항에 있어서, 핵산이 생체내에서 세포에 전달되는 방법.

청구항 41

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물 세포가 실험실 동물의 세포인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 실험실 동물이 설치류, 개, 고양이, 또는 인간이 아닌 영장류인 방법.

청구항 43

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물 세포가 인간 세포인 방법.

청구항 44

치료 유효량의 제23항 내지 제37항 중 어느 한 항의 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서의 유전자 요법의 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 포유동물이 실험실 동물인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 실험실 동물이 설치류, 개, 고양이, 또는 인간이 아닌 영장류인 방법.

청구항 47

제44항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 48

제23항 내지 제37항 중 어느 한 항의 조성물을 포유동물에 전달하는 것을 포함하는, 치료 화합물을 포유동물에 전달하는 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 포유동물이 실험실 동물인 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 실험실 동물이 설치류, 개, 고양이, 또는 인간이 아닌 영장류인 방법.

청구항 51

제48항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 52

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 펩티드를 제조하는 방법으로서, a) 상기 펩티드를 합성기(synthesizer)를 사용하여 합성하는 단계; b) 표적 리간드를 공유 결합을 통해 상기 펩티드에 연결하는 단계; c) 합성된 펩티드를 회수하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 펩티드를 제조하는 방법.

청구항 53

제23항의 조성물을 제조하는 방법으로서, a) 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 펩티드를 핵산과 혼합하여 복합체(complex)를 형성하는 단계, b) 제18항 내지 제23항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 정의된 비로 혼합물에 첨가하여 나노입자를 형성하는 단계, 및 b) 나노입자를 회수하는 단계를 포함하는, 제23항의 조성물을 제조하는 방법.

청구항 54

제52항 또는 제53항에 있어서, 폴리펩티드, 펩티드, 및 핵산이 수용액 중에서 혼합되는 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 폴리펩티드 및 핵산이 3 내지 10의 N:P 질량비로 혼합되는 방법.

청구항 56

제54항에 있어서, 펩티드 및 핵산이 1 내지 10의 N:P 질량비로 혼합되는 방법.

청구항 57

제54항에 있어서, 폴리펩티드 및 펩티드 비가 1 내지 10인 방법.

청구항 58

제54항에 있어서, 폴리펩티드 및 펩티드 비가 2, 3, 4 및 5인 방법.

청구항 59

제53항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 의약품을 폴리펩티드 및 핵산과 공동-혼합(co-mixing)하는 추가 단계를 포함하는 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 의약품이 소분자 약물, 펩티드 약물, 또는 단백질 약물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 61

제53항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 나노입자 크기가 50-300 nm인 방법.

청구항 62

제53항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 siRNA, miRNA, 안티센스 올리고, 플라스미드, mRNA, RNA자임, DNA자임, 또는 앱타머 서열인 방법.

청구항 63

제18항의 조성물을 제조하는 방법으로서, a) 상기 분지형 폴리펩티드를 합성기를 사용하여 합성하는 단계; b) 합성된 분지형 폴리펩티드를 회수하는 단계; c) 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 펩티드와 회수된 분지형 폴리펩티드를 혼합하는 단계; 및 d) 생성되는 조성물을 회수하는 단계를 포함하는, 제18항의 조성물을 제조하는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 단계 c)의 펩티드 및 폴리펩티드가 정의된 비로 혼합되는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. §119(e) 하에 2019년 10월 4일에 출원된 미국 가특허출원 일련번호 62/910,760, 및 2019년 10월 15일에 출원된 미국 가특허출원 일련번호 62/915,450을 우선권 주장하며, 이들 가출원의 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 핵산 분자의 표적화된 전달 또는 국소 전달을 위한 방법을 포함한, 핵산의 전달 시스템 및 사용 방법이 제공된다.

배 경 기 술

[0005] 치료제의 표적화된 전달은 효능 증가 및 부작용 감소를 통해 종양 치료를 개선시키는 데 큰 관심과 이점을 불러일으켰다. 종양에서 나노입자 (NP)의 축적은 증진된 투과성 및 체류 (EPR) 효과에 의한 것으로 여겨진다 (Maeda, *Bioconjugate Chemistry*, 21:797-802 (2010)). 따라서, 종양 전달은 입자를 종양-국소화 리간드로 코팅함으로써 개선시킬 수 있다. 리간드가 그의 카고(cargo) (예컨대 siRNA)의 항종양 효능을 증가시키는 메커니즘은 여전히 논쟁 중이다. 종양 표면 마커에 대한 증진된 결합은 비표적화된 조직의 것과 비교하여 종양에서 NP의 축적을 증가시킬 수 있다. 다른 연구자들은 종양 세포내에 표적화된 및 비표적화된 NP의 축적이 비슷하다고 주장하였다. 표적화된 NP의 증가된 효능은 증진된 수용체-매개 세포내이입 및 siRNA 치료제의 증가된 세포내 국소화에 의해 야기된 것으로 시사되었다. (Bartlett *et al.*, (2007): *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 104:15549-15554 (2007)). 가장 가능하게는, 두 메커니즘 모두 리간드-표적화된 요법 및 효능에서 필수적인 역할을 하였다.

[0006] 생체내 siRNA의 표적화된 전달은 혈청 뉴클레아제 및 빠른 클리어런스, 엔도솜 포집(endosomal entrapment), 및 나노입자 (NP)에 의한 선천 면역 시뮬레이션(innate immunity simulation)에 의한 그의 분해로 인해 도전과제가 되어 왔다. 최근, siRNA의 표적화된 전달을 위한 전임상 및 임상 시험에서 매우 제한된 방법이 개발되었다. 한 가지 접근법은 알닐람(Alnylam)이다. 이는 합성 트리안테나형(triantennary) *N*-아세틸갈락토사민-기반 리간드 (GaLNAc)를 화학적으로 변형된 siRNA에 접합시킨 GalNAc-siRNA 접합체를 개발하였다. 이것은 간세포로의 효율적인 ASGPR-매개 전달을 가능하게 하였다. (Maja *et al.*; *Nature Communications*, 9:723 (2018)). GalNAc는 간에서 간세포-특이적 아시알로당단백질 수용체(asialoglycoprotein receptor) (ASGPR)를 표적으로 한다. 예들 중 하나는 사노피 젠자임(Sanofi Genzyme)에 의한 혈우병 및 희귀 출혈 장애(rare bleeding disorder) (RBD)의 치료를 위한 피투시란(Fitusiran) (ALN-AT3, II상 임상시험, 알닐람)이다. 이는 피하 투여되며 RNAi 치료제는 안티트롬빈 (AT)을 표적으로 한다. 또 다른 경우에, 표적화 리간드는 다수의 성분이 siRNA와 함께 공동-어셈블리된 경우 리포솜 제제에 혼입되었다. 이러한 유형의 시스템은 대규모로 리포솜의 안정성, 생체적합성, 독성, 생성 및 장기간 보관의 면에서 많은 도전과제를 보유한다. (Leng *et al.*, *J. Drug Delivery*, ID6971297, (2017)). 가장 최근에, 폴리펩티드/중합체와 siRNA에 의해 형성된 나노입자는 siRNA를 생체내에서 효율적으로 전달하였고 이들 제품 중 일부는 초기 임상 시험에 진입하였다. 예를 들어, 히스티딘 (H)-리신 (K) 풍부 폴리펩티드는 이중 siRNA를 그의 표적에 안전하고 효과적으로 전달하여 치료 효능을 달성한다. 선두적인 약물 중 하나는 임상 IIa상 시험에서 연구되고 있다. 참조: Zhou *et al.*, *Oncotarget*, 8:80651-80665 (2017); WO2011/140285.

도면의 간단한 설명

[0007] **도 1. 종양 표적화 HKC/HKP 또는 HKP(+H) 폴리펩티드 나노입자 전달 시스템.** 그래프는 (A) 특이적 히스티딘/리신 서열을 가진 분지형 폴리펩티드 H3K4B (HKP) 또는 H3K(+H)4b 또는 (HKP(+H)), (B) 종양 표적화 리간드 예컨대 RGD, 폴레이트(folate), 또는 SmAb 등과 말단 시스테인을 통해 관능화된 선형 폴리펩티드 및 선택된 siRNA, 및 그의 HKC 폴리펩티드-siRNA 나노플렉스 형성 사이의 종양 표적화 폴리펩티드 나노입자의 형성을 나타낸다.

도 2. HKC-PEG-표적화 리간드 관능화된 폴리펩티드의 제조에 대한 일반적인 도식 (HKC =HKC1, HKC2 또는 HK2C 도 3 참조). HKC는 말단 시스테인을 보유하며 상기 시스테인은 온화한 조건 하에 티올/말레이미드 첨가 반응을 통해 말레이미드 관능화된 PEG 연결된 표적화 모티프(motif) 예컨대 (폴레이트, RGD, mAb 등)과 접합되었다.

도 3. H3K4b (약어로 HKP) 분지형 펩티드의 구조, 말단 부위에 1개의 시스테인을 가진 H3K4C (약어로 HKC1 또는 HKC)의 구조, 및 서열에 2개의 시스테인을 가진 HKC2의 구조. 서열 $[(KHHH)_4]_2KXC$를 가진 펩티드 HK2C를 함유하는 2개의 분지형 시스테인.

도 3B. HKC의 HPLC 크로마토그램, 역상 올티마(Alltima) TM 컬럼 C-18 (4.6 x 250 mm), RT = 15.196, 물 (0.065% TFA) 및 아세토니트릴 (0.05% TFA)의 구배에 의해 > 91%로 용리.

도 3C. 1335.6 $[M]^{2+}$에서 이중 하전된 분자 이온 피크에서 관찰된, HKC1 화합물의 질량 분광법 (ESI-MS, 양성).

도 4. HKC2-Peg_{1000}-폴레이트의 제조 경로를 나타낸다. HKC1을 염기성 조건 하에 티올/말레이미드 첨가 반응을 통해 말레이미드-PEG-폴레이트과 반응시켜 접합 생성물을 제공한다. 용매를 제거한 다음에 투석에 의해 정제하여, HKC1-Peg_{1000}-폴레이트를 수득하였다.

도 5. ^1H NMR에 의한 HKC2-PEG1k-폴레이트의 특성화, (상단) D_2O 중 HKC2, 및 (중간) DMSO-d_6 중 HKC2-PEG1k-폴레이트, 및 (하단) 폴레이트-PEG1k-Mal. HKC는 폴레이트-PEG1k-Mal과 공유적으로 커플링되었으며, 7.0 ppm에서 말레이미드 이중 결합의 특징적인 신호는 시스테인과 반응한 후 사라졌다.

도 6. 물 중 HKC2-PEG1k-폴레이트 (상단 적색 곡선) 및 폴레이트-PEG1k-Mal (하단 회색 곡선)의 UV/Vis (물, 25℃) 분광법을 나타낸다. 펩티드의 경우 220 nm 및 폴레이트의 경우 275 nm에서 특성 흡광도가 생성물 스펙트럼에서 관찰되었다.

도 7. HKC2-PEG1k-폴레이트의 MALDI-MS (양성) 분광법을 나타낸다. 4302 M^+ 주위의 분자 이온 피크는 커플링 반응으로부터 HKC2의 성공적인 전환을 나타낸다.

도 8. 두 단계로 HKC2-PEG2k-RGD의 제조를 나타낸다. 첫 번째 단계는 c(RGDfk)와 N-히드록시숙신이미드 (NHS) 및 말레이미드 (Mal) 관능기를 보유하는 이관능성 PEG 분자 사이의 커플링으로, 아민과 NHS 사이의 커플링을 통해 아미드 결합을 형성한다. 두 번째 단계에서, HKC 중의 티올을 RGD-PEG2000-Mal의 말레이미드와 반응시켜 RGD 부착 PEG 링커(linker) 폴리펩티드 HKC2-PEG2000-RGD를 제공하였다.

도 9. ^1H NMR (DMSO-$d6$, 25℃) 분광법에 의한 RGD-PEG2k-Mal 중간체의 특성화를 나타낸다. 8.5-7.2 ppm에서 RGD 신호 및 7.00 ppm에서 말레이미드 신호, ~ 3.5 ppm에서 PEG 에틸렌 넓은 피크를 관찰할 수 있다.

도 10. RGD 표적화 리간드를 사용한 ^1H NMR 분광법 HKC2 유도체화에 의한 HKC2-PEG-RGD의 특성화의 스택 플롯 (stack plot) 비교를 나타낸다.

도 11. HKC1과 말레이미드 (Mal) 관능기를 보유하는 3가 GalNAc-PEG 분자의 접합으로부터, 시스테인 상의 티올과 Mal 사이의 커플링을 통해 S-C 결합을 형성하는, HKC1-PEGn-GalNAc (n=6, 12, 24)의 제조를 나타낸다.

도 12. 나노입자의 형성 및 그의 크기 분포에서 HKC:HKP:TGFβ1의 제제화. HKC=HKC2 =$K(HHHK)_4CSSC$, HKP= H3K4b.

도 13. 나노입자의 형성 및 그의 다분산도 지수에서 HKC:HKP:TGFβ1의 제제화. HKC=HKC2 =$K(HHHK)_4CSSC$, HKP= H3K4b.

도 14. 인간 교모세포종(glioblastoma) T98G 세포 생존력에 대한 HKP 단독으로 또는 다양한 양의 HKP 및 HKC2와 조합하여 제제화된 세포 사멸 siRNA를 사용한 치료의 효과. HKC2 (160 ng/μL), HKP (320 ng/μL) 및 siRNA (80 ng/μL)의 수용액을 정의된 비로 혼합하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 형질감염 복합체(complex)를 OPTI-MEM으로 희석하고 신선한 배지가 공급된 100 μL 배지 중의 세포에 첨가하였다. 형질감염 배지를 6시간 후 10% FBS/DMEM 또는 EMEM으로 대체하였다. 형질감염 후 72시간에 생존 세포의 수를 셀티터-글로(CellTiter-Glo) 발광 세포 생존력 검정 (프로메가(Promega))으로 평가하였다. 비처리 세포 (블랭크)로부터 유래된 값을 100%로 설정하였다. 모든 값은 4회의 반복실험 NS-비침묵 siRNA, CD-세포 사멸 siRNA의 ±S.D의 평균을 나타낸다.

도 15. 인간 간세포 암종(hepatocellular carcinoma) HepG2 세포 생존력에 대한 HKP 단독으로 또는 다양한 양의 HKP 및 HKC2와 조합하여 제제화된 세포 사멸 siRNA를 사용한 치료의 효과. HKC2 (160 ng/μL), HKP (320 ng/μL) 및 siRNA (80 ng/μL) 혼합물의 수용액을 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 형질감염 복합체를 OPTI-MEM으로 희석하고 신선한 배지가 공급된 100 μL 배지 중의 세포에 첨가하였다. 형질감염 배지를 6시간 후 10% FBS/DMEM 또는 EMEM으로 대체하였다. 형질감염 후 72시간에 생존 세포의 수를 셀티터-글로 발광 세포 생존력 검정 (프로메가)으로 평가하였다. 비처리 세포 (블랭크)로부터 유래된 값을 100%로 설정하였다. 모든 값은 4회의 반복실험 NS-비침묵 siRNA, CD-세포사멸 siRNA의 ±S.D의 평균을 나타낸다.

도 16. HKC2-PEG1k-폴레이트, H3K4b (HKP) 및 siRNA 사이의 자기-어셈블리(self-assembly)를 통한 제제화 및 나노입자 형성. TGFβ1을 물 중 80 ng/μL로 사용하고 물 중에서 동일한 부피의 HKC 및 HKP와 혼합하였다.

도 17. HKC1-PEG-폴레이트, H3K4b (HKP) 및 siRNA 사이의 자기-어셈블리를 통한 나노입자 형성의 다분산도 지수. TGFβ1 (물 중 80 ng/μL)을 물 중에서 동일한 부피의 HKC 및 HKP와 혼합하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0008] 시험관내 및 생체내 전달을 위한 종양 표적화 핵산에 대한 신규한 접근법이 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, 히스티딘(H)-리신(K) 풍부 폴리펩티드 (HKP)를 사용하여 핵산 결합 도메인(binding domain)을 함유하고 비-세포 특이적 형질도입 기능 (예를 들어, 세포막을 비선택적으로 관통하는 능력)을 제공하는 4개의 분지형 반복 (H3K)4 단위를 가진 양전하를 띤 펩티드를 기재하였다. (Chou *et al., Biomaterials*, 35, 846-855 (2014)). H3K 4개의 반복 단위 및 말단 부위에 표적화 리간드를 가진 선형 펩티드 (HKC로 약칭)를 사용하였다. 이 펩티드는 핵산 결합 도메인과 세포-특이적 표적화 기능을 둘 다 포함하므로, 물질이 세포막을 관통하여 핵산(들)을 특이적 세포 유형으로 특이적으로 전달하는 것을 도울 수 있다.

[0009] 일부 실시양태에서, 핵산을 관심 표적 세포에 전달하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 분지형 폴리펩티드 (HKP) 및 선형 펩티드 (HKC)를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 이 조성물은 하나 이상의 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제약상 허용되는 담체를 포함한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 4개의 분지형 히스티딘-리신 풍부 폴리펩티드는, a) 하나 이상의 특정한 세포 유형에 대한 표적 핵산 및 b) 특정한 세포내 위치에 표적화된 핵산의 전달을 위한 효과적인 담체가 되는 특정 구조 및 기능적 특성을 갖는 선형 펩티드와 함께 제제화에 사용된다. 일부 실시양태에서, 선형 펩티드는 둘 다 핵산에 결합하고 핵산을 표적화된 세포의 세포질에 전달하는 것을 돕기 위한 세포 지시 및 수송 특성을 제공하는 양전하를 띤 선형 HKC 펩티드와 접합되는, 세포 특이적 표적화 리간드 (예를 들어, 소분자, 또는 시클릭(cyclic) 펩티드-기반 귀소 도메인)를 함유한다.

[0011] 다른 측면에서, 직접적인 공유 연결 전략에 의해 표적화 리간드를 전달 담체에 접합시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드 (예를 들어, 폴레이트, RGD 또는 펩티드)는 공유 결합의 형성에 의한 화학 반응을 통해 선형 히스티딘-리신 풍부 시스테인 함유 (HKC) 펩티드와 효과적으로 접합되었다. 이 방법은 표적 핵산을 보호하기 위한 전달 시스템에 다양한 표적 리간드를 도입하는 다목적 플랫폼을 제공한다. 양전하를 띤 펩티드 HKC와 리간드 사이의 화학적 접합은 이황화 결합, 티올/말레이미드로부터의 황-탄소 결합, 또는 히드라진 및 아미드와 같은 임의의 다른 공유 결합 또는 생분해성 결합일 수 있으나, 반드시 이 유형에 제한되는 것은 아니다.

[0012] 또 다른 측면에서, 폴리펩티드 (HKP), 표적화 리간드를 보유하는 선형 펩티드, 및 종양 표적화를 위한 siRNA의 나노입자 제제를 위한 신규한 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 세포 표적에 결합하는 모티프를 포함하는 표적화 선형 폴리펩티드 및 분지형 폴리펩티드를 포함하는 복합체로 전달된다. 상기 2개의 펩티드는 나노입자 형성에서 표적 핵산과의 혼합물로 정의된 비로 제제화된다. 일부 실시양태에서, 펩티드/핵산 복합체의 양전하 (예를 들어, 펩티드 및 폴리펩티드에서)에 대한 음전하 (예를 들어, 핵산으로부터)의 비는 복합체의 비-세포-특이적 형질도입 특성의 강도에 영향을 미칠 수 있다.

[0013] 다른 측면에서, 하나 이상의 핵산을 세포 표적에 전달하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 펩티드/핵산 복합체에서, 하나 이상의 핵산이 동시에 나노입자로 전달되었다. 일부 실시양태에서, 화학요법 약물은 나노입자 복합체 내에서 공동-제제화될 수 있다. 이것은 종양의 치료를 위한 조합 요법에서 장점 및 이점을 제공한다.

[0014] 따라서, 이들 및 다른 측면은 임의의 유형의 표적화 모티프를 도입하여 임의의 관심 세포를 표적화할 수 있는 시스템인 전달 플랫폼을 제공한다. 일부 실시양태에서, 링커 (예를 들어, 페그(peg) 또는 중합체)를 통해 표적 리간드를 펩티드에 접합시키는 단계적 방법이 개발되어 본 출원에 제시되었다. 다양한 표적화 리간드는 모든 유형의 관심 세포에 특이적 형질도입 특성을 제공한다. 일부 실시양태에서, HK 양성 반복 단위를 갖는 펩티드에서의 결합 도메인은 히스티딘과 포스페이트 사이의 수소 결합, 및 양성자화된 리신과 포스포네이트 사이의 이온-이온 상호작용을 통해 음전하를 띤 핵산에 결합한다. 핵산은 보호되고 관심 세포의 표적화된 영에 전달되었다.

[0015] 표적화 리간드의 면에서, 펩티드는 시클릭(c) RGD, APRPG, NGR, F3 펩티드, CGKRK, LyP-1, iRGD, iNGR, T7 펩

티드 (HAIYPRH), MMP2-절단가능한 옥타펩티드 (GPLGIAGQ), CP15 (VHLGYAT), FSH (FSH-β, 33-53 아미노산, YTRDLVKDPARPKIQKTCTF), LHRH (QHTSYkcLRP), 가스트린-방출 펩티드 (GRP) (CGGNHWAVGHLM), RVG (YTWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 리간드는 더 양호한 효능을 위해 하나의 시스템에서 2가 또는 3가의 동종- 또는 이종-펩티드 리간드 조합으로 혼입될 수 있다.

[0016] 따라서, 본 발명의 측면은 모듈식이고 임의의 핵산을 임의의 관심 세포에 전달하도록 적합화될 수 있는 전달 플랫폼을 제공한다. 일부 실시양태에서, 다가 펩티드 성분 및 siRNA, mRNA 또는 DNA를 함유하고 나노입자를 형성하는 조성물이 제공된다. 복합체 형성은 siRNA, mRNA, 또는 DNA를 효과적으로 보호하고 세포내로 전달한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 펩티드 담체와 가역적으로 회합되어, 그것이 종양 특이적 세포내로 침투하고 엔도솜으로부터 핵산을 방출하여 그의 표적 유전자에 도달가능하게 한다.

[0017] 본원에 기재된 바와 같은 siRNA 전달 담체의 생성은 분지형 폴리펩티드 (HKP), 선형 펩티드 (HKC) 및 siRNA를 조합함으로써 발생할 수 있고, (a) 양전하를 띤 선형 펩티드 예를 들어 표적화 기(group) 또는 다른 관능 모이어티(moiety) 연결을 위한 관능기를 갖는 펩티드 HKC를 제조하는 단계; (b) 공유 결합을 통해 표적 리간드를 선형 펩티드 HKC에 부착하고 생성물을 회수하는 단계; (c) 분지형 폴리펩티드 (HKP), 단계 (b)에서 표적화 리간드를 운반하는 선형 펩티드 HKC, 및 siRNA를 안정적으로 조합하여 균질한 나노입자를 생성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 이행될 수 있다. 상기 방법에서, 단계를 또한 동시에 이행할 수 있으므로, 바람직한 상호작용 및 나노입자 형성을 가능하게 한다. 이 방법에 의한 폴리메트릭(polymetric) 나노입자는 수용액 중에서 다양한 siRNA와 효과적으로 복합체를 형성하여 폴리나노입자를 형성하고, 이는 표적화 효과를 통해 구체적 질환에 선택적으로 축적될 수 있다. 바람직하게는, 본원에 기재된 바와 같은 폴리나노입자의 크기는 기재된 제조 방법을 기반으로 하여 10 nm 내지 3000 nm 범위일 수 있다. 전임상 연구에 따라, 바람직한 크기는 동적 광산란에 의해 결정된 바와 같은 40 - 300 nm이다.

[0018] 게다가, 본원에 기재된 HKC 폴리펩티드-핵산 전달 시스템은 제약 조성물의 유효 성분으로서 사용될 수 있다. 따라서, HKC 펩티드 및 핵산의 혼합 형태로 치료 유효량을 함유하는 제약 조성물이 제공된다. 이는 그의 투여 방법과 함께, 본원에 기재된 바와 같은 HKC 폴리펩티드 - 핵산 전달 시스템에 더하여, 제약 상용성(compatible) 중합체 또는 담체의 하나 이상의 종류를 포함할 수 있다.

[0019] 생성된 생성물은 분말, 액체, 고체 상태, 캡슐, 주사제 등과 같은 형태로 제제화될 수 있으며, 이는 식염수 용액, 완충제 용액, 또는 기타 상용성 성분과 같은 하나 이상의 유효 성분과 혼합되어 핵산- 펩티드 폴리나노입자의 안정성 및 유효성유지할 수 있다.

[0020] 본원에 기재된 바와 같은 제약 조성물은 경구 또는 비경구 투여를 포함하는, 표준 방법에 의해 투여될 수 있다.

[0021] **실시예:**

[0022] **실시예 1. 펩티드 HKC1 및 HKC2의 합성.**

[0023] HKC1의 설계된 펩티드 서열 (서열: KHHHKHHHKHHHKHHHKSSSC)은 도 3에 기재된 바와 같이 고체 상태 합성기(synthesizer)에 의해 합성하였다. 생성물은 물 (0.065% TFA) 및 아세토니트릴 (0.05% TFA)을 사용한 HPLC 및 도 3A에서의 HPLC의 크로마토그램에 의해 정제하였다. H3K4C (약어로 HKC1)의 구조는 말단 부위에 1개의 시스테인을 갖는다. 구조는 도 3B에 나타낸 바와 같이 질량 분광법에 의해 추가로 확인하였다.

[0024] HK2C의 두 번째 설계된 펩티드 서열 (서열: $(KHHHKHHHKHHHKHHH)_2$KCSSC)은 도 3B에 나타낸 바와 같이 고체 상태 합성기에 의해 유사한 방법으로 합성하였다.

[0025] HKC2의 세 번째 설계된 펩티드 서열 (서열: KHHHKHHHKHHHKHHHKCSSC)은, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,070,807, 7,163,695 및 7,772,201에 기재된 바와 같이 고체 상태 합성에 의해 합성하였다.

[0026] **실시예 2. 술피드 말레이미드 커플링 반응을 통한 HKC2 펩티드의 가교.**

[0027] 도 2는 커플링에 대한 일반적인 도식을 나타낸다. H3K4C-PEG-표적화 리간드 관능화된 폴리펩티드의 제조를 위해, 표적화 모티프를 가진 관능화된 PEG가 사용된다. 표적화 모티프 예컨대 폴레이트, RGD 및/또는 모노클로날 항체를 가진 이러한 PEG는 상업적으로 입수가능하거나 관련 기술분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 미리 제조할 수 있다. 말단 시스테인을 보유하는 HKC는 도 2에 나타낸 바와 같이 온화한 조건 하에 티올/말레이미드 첨가 반응을 통해 말레이미드 관능화된 PEG 연결된 표적화 모티프 예컨대 (폴레이트, RGD, mAb 등)과 접합되었다.

[0028] **실시예 3. HKC2 펩티드와 폴레이트의 가교.**

[0029] 표적 리간드는 커플링 반응에서 티올과 말레이미드 사이의 공유 결합 형성을 통해 HKC 펩티드 상에 설치되었다. 도 4는 HKC2-PEG1000-폴레이트를 제조하기 위한 도식을 나타낸다. 폴레이트-PEG1000-Mal (6.0 mg, 3.7 mmol)을 건조 DMF (2.0 mL)에 용해시킨 후에, 건조 DMF 중 트리메틸아민 (52 uL, 0.726 g/mL)을 첨가하였다. 초음파처리 및 교반에 의해 탈기된 물 (100 μL)과 DMF (300 μL)의 혼합물 중 HKC (10.0 mg, 3.7 mmol)를 25℃에서 질소 하에 혼합물에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 암실에서 25℃에서 질소 하에 15시간 동안 교반하였다. HPLC 분석은 출발 물질 폴레이트-PEG1000-Mal이 완전히 소모되었고 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 차가운 디에틸 에테르 용액에 부어 황색 침전물을 수득하였다. 혼합물을 4000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 상단의 투명한 상청액을 버렸다. 황색 침전물을 아세톤 (5.0 mL)으로 세척하고 다시 원심분리하여 상청액을 버린 후 생성물을 수집하였다. 생성물을 분취용 RP-HLPC 또는 물 중에서 투석하여 추가로 정제하여 순수한 생성물을 수득하였다. 생성물 용액을 동결건조시켜 생성물을 황색 분말로 수득하였다 (12 mg, 수율 75%).

[0030] **실시예 4. ^{1}H NMR에 의한 HKC2-PEG-폴레이트의 특성화.**

[0031] HKC2-PEG-폴레이트의 구조는 DMSO-d_6 중 ^{1}H NMR에 의해 특성화하였으며 결과는 도 5에 나타냈다. ~ 5 mg의 샘플을 D_2O 또는 DMSO-d_6에 용해시키고 nmr 스펙트럼을 400 mHz에서 기록하였다. 차이점을 명확하게 보기 위해 세 가지 스펙트럼을 겹쳐 놓았다. D_2O 중 HKC2가 상단에 있었고, DMSO-d_6 중 HKC2-PEG-폴레이트가 중간에 있었고, 폴레이트-Peg1000-Mal이 하단에 제시되었다. HKC는 폴레이트-Peg1000-Mal과 공유적으로 커플링되었으며, 7.0 ppm에서 말레이미드 이중결합의 특징적인 신호는 시스테인과 반응 후 사라졌다. PEG 기의 CH_2 양성자는 3.5 ppm 영역에 존재하고 펩티드 양성자는 HKC2-PEG-폴레이트에서 6.0 - 9.0 ppm에 위치한다.

[0032] **실시예 5. UV/Vis 분광법에 의한 HKC2-PEG-폴레이트의 특성화.**

[0033] HKC2-PEG-폴레이트의 구조는 UV/Vis 분광법에 의해 추가로 특성화하였으며 결과는 도 6에 나타냈다. HKC2-PEG-폴레이트 (상단 적색 곡선) 및 폴레이트-PEG-Mal (하단 회색 곡선)의 UV/Vis 분광법은 실온에서 물에서 측정하였다. 펩티드의 경우 220 nm 및 폴레이트의 경우 275 nm에서 특성 흡광도가 생성물 스펙트럼에서 관찰되었다.

[0034] **실시예 6. 질량 분광법에 의한 HKC2-PEG-폴레이트의 특성화.**

[0035] HKC2-PEG-폴레이트의 MALDI-MS (양성) 분광법을 브루커(Bruker) 오토플렉스 스피드(Autoflex Speed) 분광계를 사용하여 기록하였다. 4302 M^+ 부근의 분자 이온 피크의 존재는 커플링 반응으로부터 HKC1의 성공적인 전환을 나타낸다. 도 7 참조.

[0036] **실시예 7. HKC2-PEG2k-RGD로서 RGD 리간드를 함유하는 HKC2의 제조**

[0037] 첫 번째 단계: c(RGDfk)와 N-히드록시숙신이미드 (NHS) 및 말레이미드 (Mal) 관능기를 보유하는 이관능성 PEG 분자 사이의 커플링으로, 아민과 NHS 에스테르 사이의 커플링을 통해 아미드 결합을 형성한다. 도 8 참조. c(RGDfk) (5.0 mg, 8.28 μmol)를 건조 DMF (1 mL)에 용해시키고, 트리에틸아민 (10 μL)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N_2 하에 실온에서 30분 동안 교반한 후, Mal-PEG2k-NHS (10 mg, 8.28 μmol)를 한번에 첨가하고 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 차가운 디에틸 에테르 (20 mL)에 부었다. 혼합물을 5℃에서 10분 동안 4000 rpm에서 원심분리하고, 상단의 투명한 상청액을 버렸다. 백색 침전물을 아세톤에 재현탁시키고 차가운 디에틸 에테르 (10 mL)를 첨가하고 5분 동안 초음파처리하였다. 5℃에서 10분 동안 4000 rpm에서 다시 원심분리하여 백색 침전물을 수집하였다. 진공 하에 건조시켜 RGD-PEG2k-Mal (12 mg, 80% 수율)을 수득하였다. ^{1}H NMR 스펙트럼 (400 mHz, DMSO-d_6)은 7.0 ppm에서 말레이미드에 할당된 피크의 존재를 나타냈으나, NHS 에스테르 (2.8 ppm)에 대한 피크는 존재하지 않았다. 도 9 참조.

[0038] 이 물질은 HKC 중의 티올이 RGD-PEG2k-Mal의 말레이미드와 반응하여 RGD 부착 PEG 링커 폴리펩티드 HKC2-PEG2k-RGD를 제공하는 두 번째 단계에서 직접 사용되었다. HKC2 (5.4 mg, 2.0 μmol)를 DMF (0.6 mL)와 탈기된 물 (100 μL)의 혼합물에 용해시켰다. HKC2의 용액을 건조 DMF (1 mL)에 용해된 RGD-PEG2k-Mal (5.0 mg, 1.69 μmol)에 교반하면서 첨가하였다. 트리에틸아민 (100 uL, 건조 DMF 중 10 μg/μL)을 후속적으로 첨가하고 혼합물을 N_2 하에 25℃에서 15시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 차가운 디에틸 에테르 (20 mL)에 부었다.

혼합물을 5℃에서 10분 동안 4000 rpm에서 원심분리하고, 상단의 투명한 상청액을 버렸다. 조 생성물을 물에 대해 2일 동안 물을 변화시키면서 투석하였다. 진공 하에 건조시킨 후, 생성물 HKC2-PEG2k-RGD를 수득하였다 (7.1 mg, 75% 수율). 생성물은 ^{1}H NMR (도 10 참조) 및 질량 분석법을 포함한 분광법에 의해 특성화하였다.

[0039] **실시예 8. HKC-PEGn-GalNAc로서 3가 GalNAc 리간드를 함유하는 HKC의 제조.**

[0040] HKC1 ((KHHH)4KSSC), 18.0 mg, 6.75 μmol)을 유리 바이알에서 pH = 7.2 포스페이트 완충제에 용해시켰다. 건조 DMF (300 μL) 중의 GalNAc3-PEG6-Mal (29.3 mg, 1.56 μmol)을 5분에 걸쳐 HKC1 용액에 시린지(syringe) 바늘에 의해 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 대기 하에 16시간 동안 교반하였다. HPLC 모니터링이 출발 물질 GalNAc가 완전히 소모되었음을 나타낸 후, 조 생성물을 피어스(Pierce) 덱스트란(Dextran) 탈염 컬럼을 사용하여 정제하여 순수한 생성물 GalNAc3-PEG6-HKC1을 19 mg, 80% 수율의 백색 고체로서 생성하였다. 생성물은 (MALDI-TOF-MS 양성) m/z 4595.824 [M+H], 계산치 MW =4595.9로서 질량 분석법에 의해 특성화하였다. HPLC 분석은 순도 > 90%를 나타냈다. GalNAc-PEG12-HKC1 및 GalNAc-PEG24-HKC1은 GalNAc3-PEG6-Mal을 상응하는 GalNAc-PEG12-Mal 및 GalNAc-PEG24-Mal로 대체함으로써 유사한 방법으로 제조하였다. (도 11에 나타낸된 반응식).

[0041] **실시예 9. 나노입자 형성 및 그의 크기 분포에서 HKC:HKP:TGFβ1의 제제화. HKC =HKC2 =K(HHHK)$_4$CSSC. HKP= H3K4b. (도 13).**

[0042] HKC2, HKP 및 siRNA (TGFβ1)의 나노입자 형성을 다양한 비로 평가하였다. HKP/siRNA 제제에 HKC2를 첨가하면 대조군 HKP/siRNA (N:P 질량비=4:1)와 비교하여 유사한 나노입자 크기를 유지하였으나 다분산도 지수 (PDI)를 상당히 좁혔다. HKC2/HKP/siRNA를 0:4:1, 1:4:1, 1:3:1, 2:3:1, 2:2:1, 3:1:1의 질량비로 제제화하였다. HKC2 (160 ng/μL), HKP (320 ng/μL) 및 siRNA (80 ng/μL)의 수용액을 정의된 비로 혼합하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 생성된 샘플은 후속적으로 나노플러스(Nanoplus) 90을 사용하여 동적 광산란에 의해 측정하였다. 동적 반경 및 다분산도 지수를 기록하고 도 11 및 도 12에 나타냈다. 도 12로부터, 크기가 120 nm (HKP:siRNA =4:1)로부터 100 -113 nm (HKC2/HKP/siRNA = 1:4:1, 1:3:1, 2:3:1)로 약간 감소하였다. 상기 비가 2:2:1, 3:1:1로 증가한 경우, 나노입자 크기가 또한 140 및 180 nm로 증가하였다. 또 다른 관점에서, PDI는 0.22로부터 0.11-0.17로 감소하였으며, 이는 덮힌 표면을 채우는 HKC의 이점이다 (도 13 참조).

[0043] **실시예 10. 인간 교모세포종 T98G 세포 생존력에 대한 HKP 단독으로 또는 다양한 양의 HKP 및 HKC2와 조합하여 제제화된 세포 사멸 siRNA를 사용한 치료의 효과.**

[0044] HKC2 (160 ng/μL), HKP (320 ng/μL) 및 siRNA (80 ng/μL)의 수용액을 정의된 비로 혼합하고 (HKC2/HKP/siRNA를 0:4:1, 0:3:1, 1:3:1, 2:3:1, 0:2:1, 2:2:1의 질량비로 제제화하였음) 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 형질감염 복합체를 OPTI-MEM으로 희석하고 신선한 배지가 공급된 100 μL 배지 중의 세포에 첨가하였다. 형질감염 배지를 6시간 후 10% FBS/DMEM 또는 EMEM으로 대체하였다. 형질감염 후 72시간에 생존 세포의 수를 셀티터-글로 발광 세포 생존력 검정 (프로메가)으로 평가하였다. 비처리 세포 (블랭크)로부터 유래된 값을 100%로 설정하였다. 모든 값은 4회의 반복실험 NS-비침묵 siRNA, CD-세포사멸 siRNA의 ±S.D의 평균을 나타낸다. 리포펙타민 및 HKP/siRNA (4:1)를 양성 대조군으로서 사용하였다. 2:3:1 및 2:2:1의 제제화에 HKC2를 첨가하면 대조군 0:3:1 및 0:2:1과 비교하여 세포 생존력의 면에서 비슷하거나 훨씬 더 양호한 세포 사멸을 나타냈다 (도 14).

[0045] **실시예 11. 인간 간세포 암종 HepG2 세포 생존력에 대한 HKP 단독으로 또는 다양한 양의 HKP 및 HKC2와 조합하여 제제화된 세포 사멸 siRNA를 사용한 치료의 효과.**

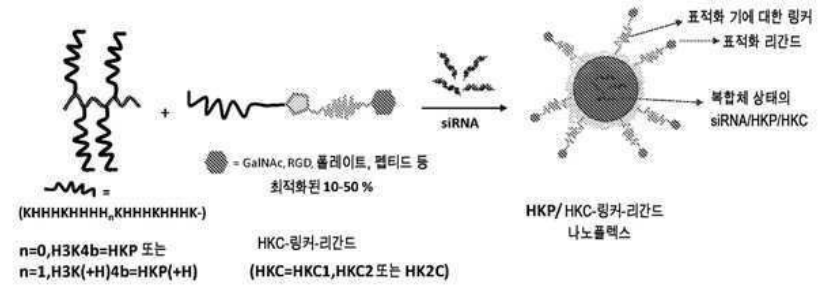
[0046] HKC2 (160 ng/μL), HKP (320 ng/μL) 및 siRNA (80 ng/μL)의 혼합물의 수용액을 정의된 비로 혼합하고 (HKC2/HKP/siRNA를 0:4:1, 0:3:1, 1:3:1, 2:3:1, 0:2:1, 2:2:1의 질량비로 제제화하였음) 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 형질감염 복합체를 OPTI-MEM으로 희석하고 신선한 배지가 공급된 100 μL 배지 중의 세포에 첨가하였다. 형질감염 배지를 6시간 후 10% FBS/DMEM 또는 EMEM으로 대체하였다. 형질감염 후 72시간에 생존 세포의 수를 셀티터-글로 발광 세포 생존력 검정 (프로메가)으로 평가하였다. 비처리 세포 (블랭크)로부터 유래된 값을 100%로 설정하였다. 모든 값은 4회의 반복실험 NS-비침묵 siRNA, CD-세포사멸 siRNA의 ±S.D의 평균을 나타낸다. 리포펙타민 및 HKP/siRNA (4:1)를 양성 대조군으로서 사용하였다 (도 15). 2:3:1 및 2:2:1의 제제화에 HKC2를 첨가하면, 전체 세포 생존력은 인간 교모세포종 T98G 세포주 연구보다 높긴 하지만, 대조군 0:3:1 및 0:2:1과 비교하여 세포 생존력의 면에서 비슷하거나 훨씬 더 양호한 세포 사멸을 나타냈다.

[0047] 허여된 특허 및 공개된 특허 출원을 포함한, 본원에서 확인된 모든 간행물, 및 url 주소 또는 수탁 번호에 의해 확인된는 모든 데이터베이스 항목은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

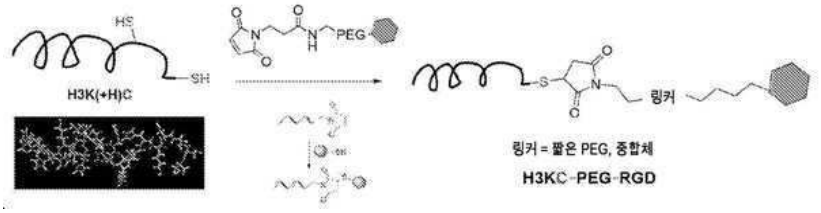
[0048] 본 발명이 그의 특정 실시양태와 관련하여 기재되고, 많은 세부사항이 예시의 목적으로 제시되었긴 하지만, 본 발명이 추가 실시양태가 가능하고 본원에 기재된 특정 세부사항이 본 발명의 기본 원리를 벗어나지 않고 변경될 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

도면

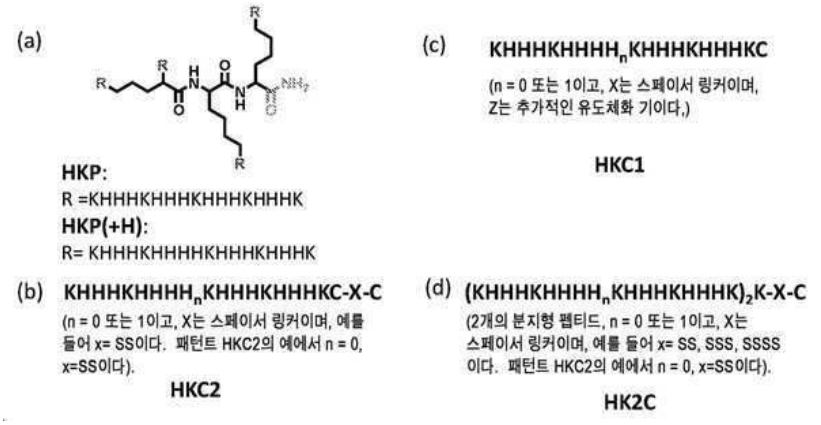
도면1



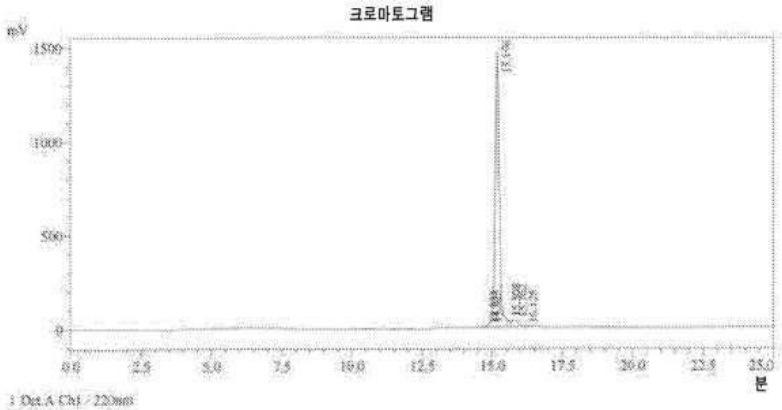
도면2



도면3



도면3b

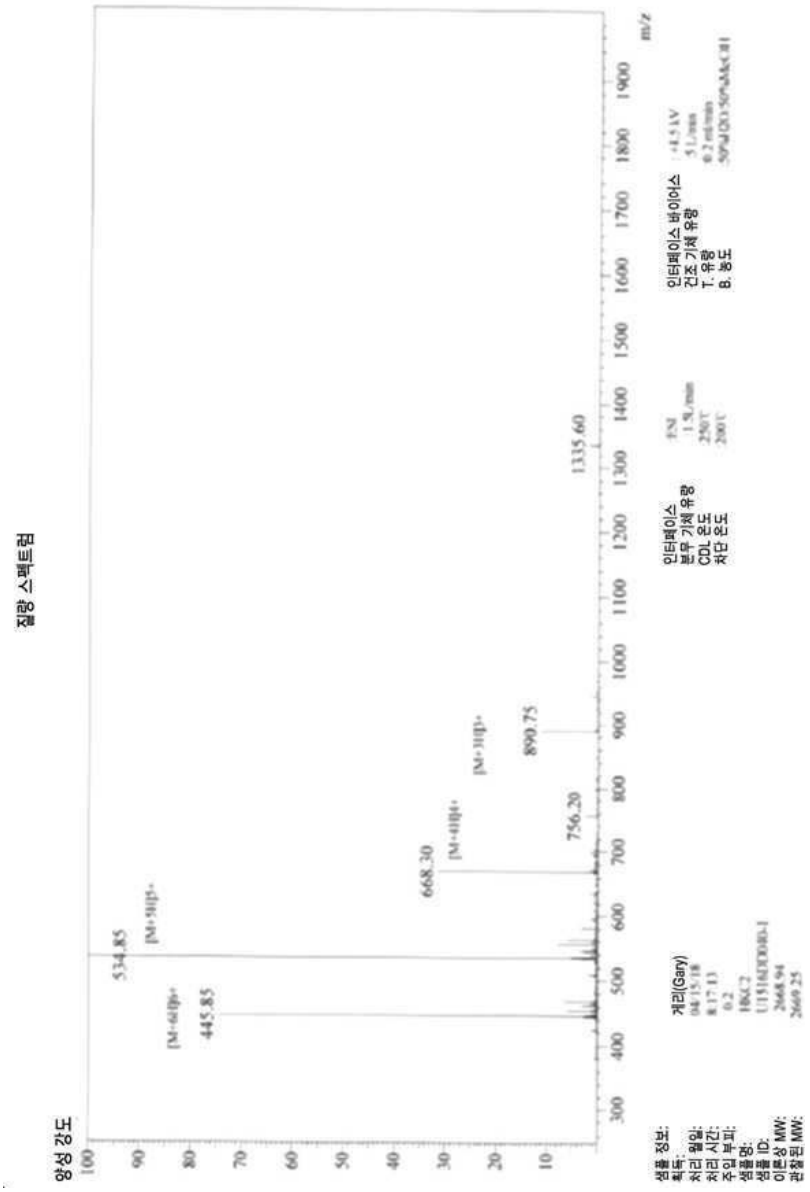


피크 표

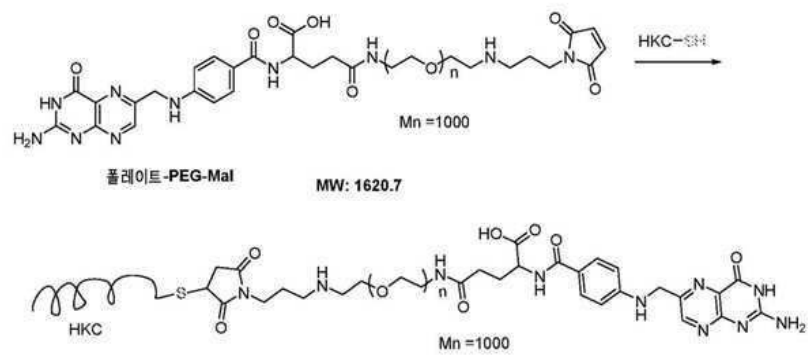
검출기 A Ch1 220nm

피크	체류 시간	면적	높이	면적 %
1	14.725	25758	2699	0.158
2	14.825	40635	9138	0.250
3	15.196	15212696	1461350	93.493
4	15.508	201337	41088	1.289
5	15.762	656035	37077	4.032
6	16.125	45119	5902	0.277
총계		16270630	1557254	100.000

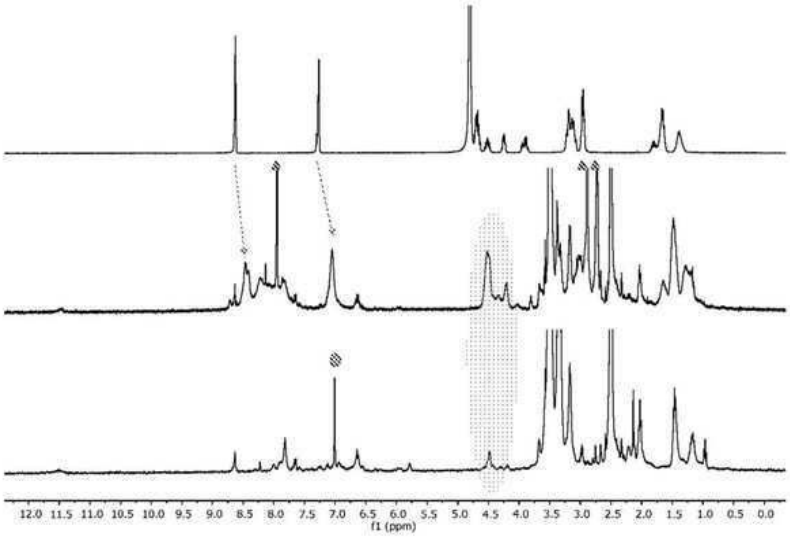
도면3c


질량 스펙트럼
양성 강도
534.85
445.85
668.30
756.20
890.75
1335.60
m/z

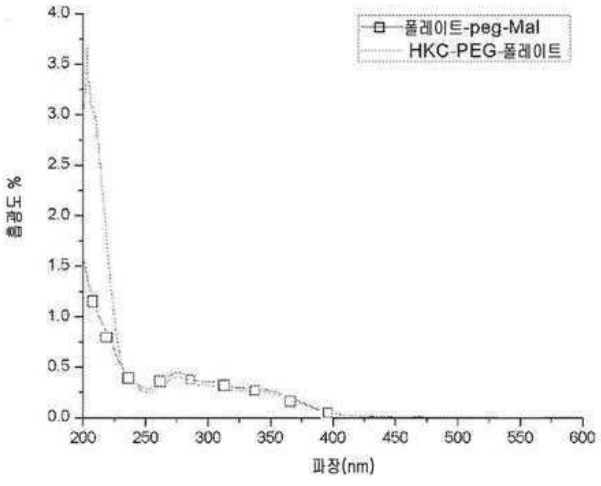
도면4


HKC-
Mn =1000
폴레이트-PEG-Mal
MW: 1620.7
HKC
Mn =1000

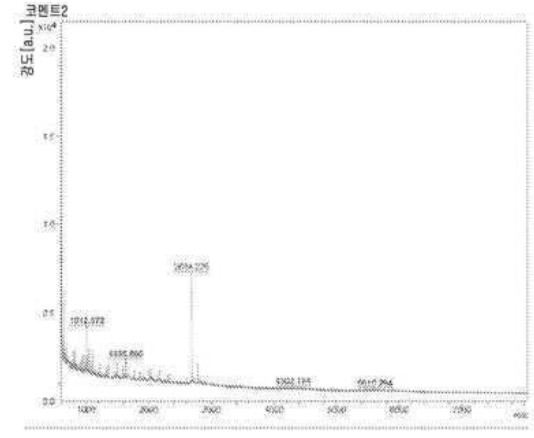
도면5


12.0 11.5 11.0 10.5 10.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
f1 (ppm)

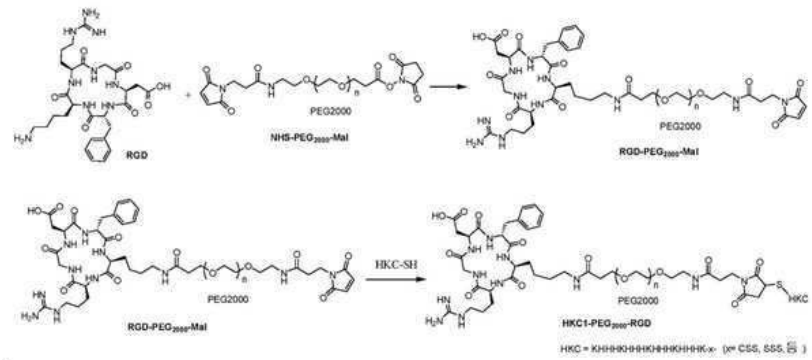
도면6


폴레이트-peg-Mal
HKC-PEG-폴레이트
흡광도 %
파장(nm)
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
250
300
350
400
450
500
550
600

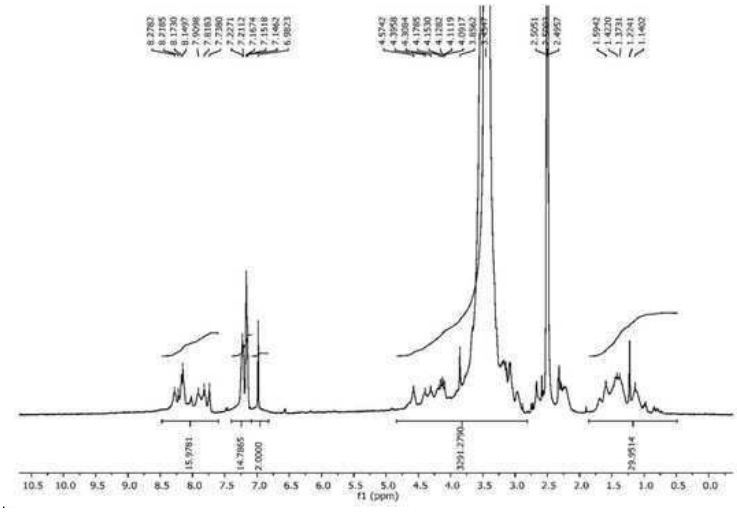
도면7


강도[a.u.]

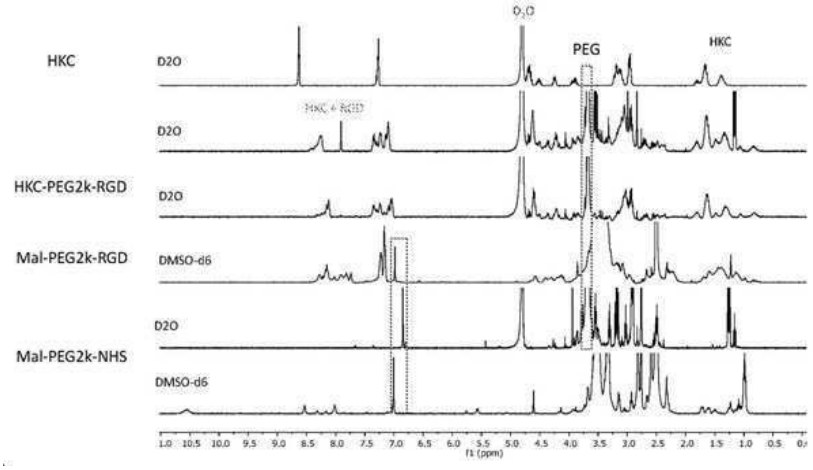
도면8


RGD
PEG2000
NHS-PEG2000-Mal
RGD-PEG2000-Mal
HKC-SH
HKC1-PEG2000-RGD
HKC

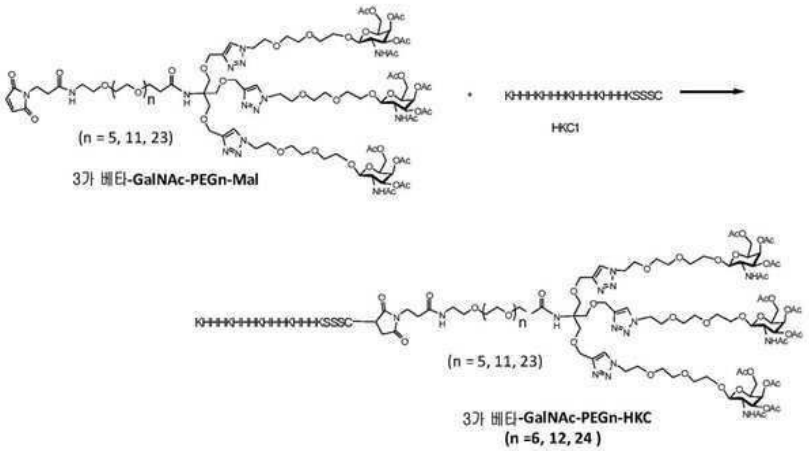
도면9


f1 (ppm)

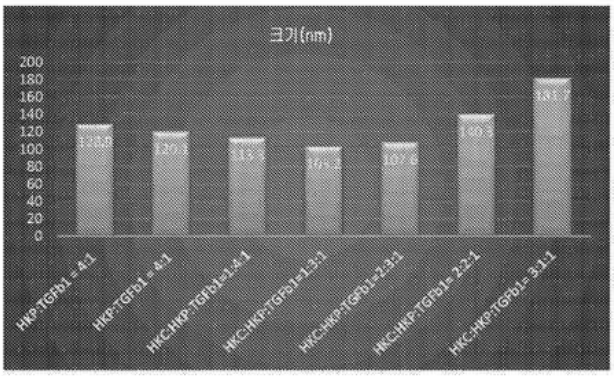
도면10


HKC
D2O
PEG
HKC
HKC-PEG2k-RGD
Mal-PEG2k-RGD
DMSO-d6
Mal-PEG2k-NHS
f1 (ppm)

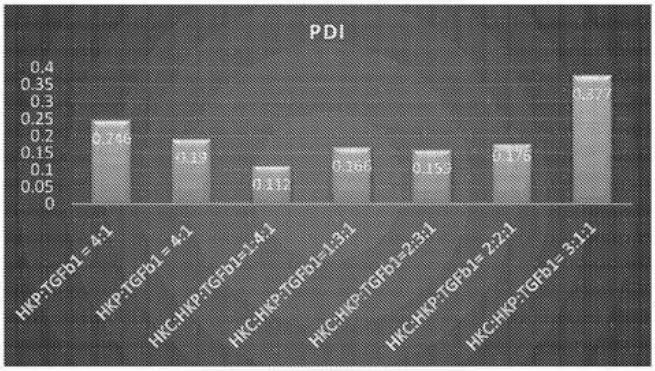
도면11



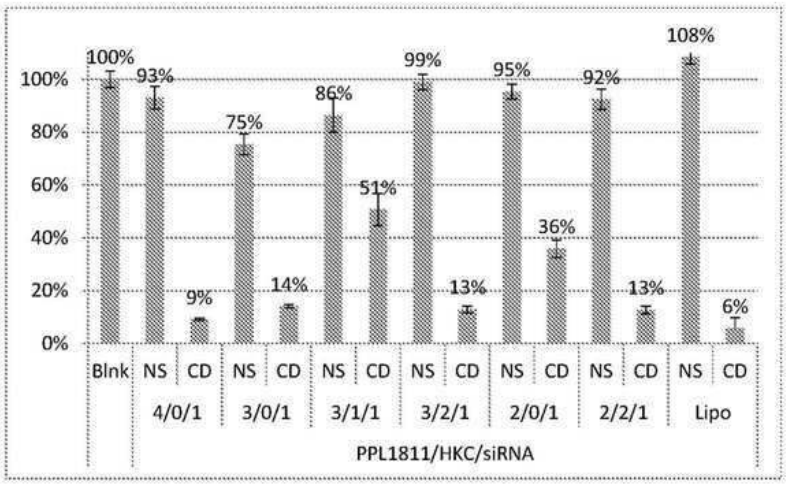
도면12



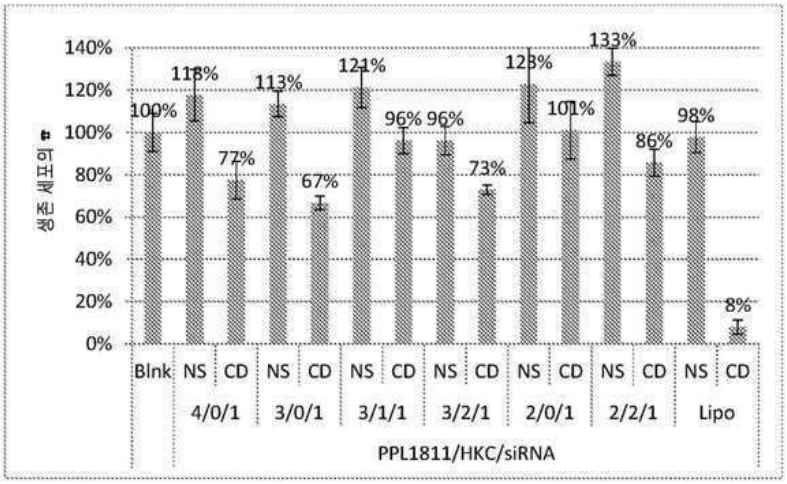
도면13



도면14

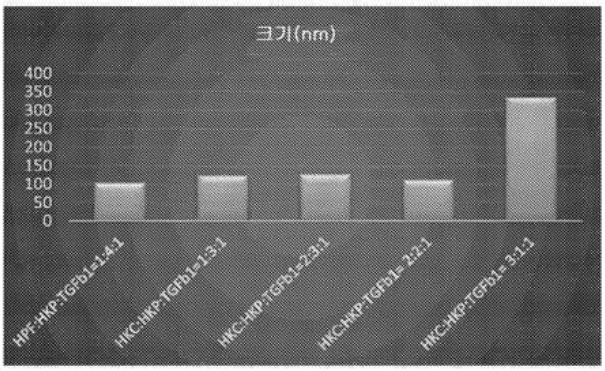


도면15

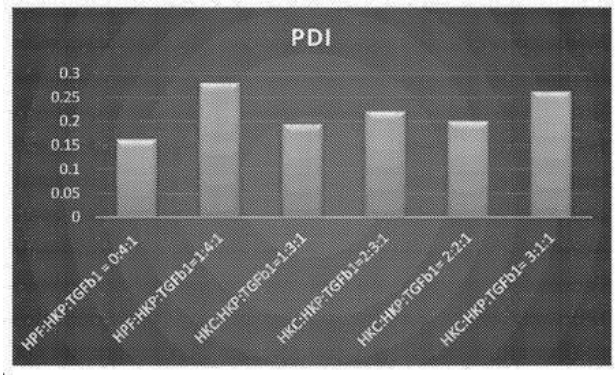


단독 또는 조합된 HKP로 제제화된 세포 사멸 siRNA를 사용한 치료의 효과

도면16



도면17


PDI
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
HPF:HKP-TGFb1 = 0:4:1
HPF:HKP-TGFb1=1:4:1
HKC:HKP-TGFb1=1:3:1
HKC:HKP-TGFb1=2:3:1
HKC:HKP-TGFb1= 2:2:1
HKC:HKP-TGFb1= 3:1:1