

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 11월 19일 (19.11.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/174703 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 9/16 (2006.01) A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004684
- (22) 국제출원일: 2015년 5월 11일 (11.05.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0056221 2014년 5월 12일 (12.05.2014) KR
- (71) 출원인: 서강대학교 산학협력단 (SOGANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 121-742 서울시 마포구 백범로 35 (신수동) 서강대학교, Seoul (KR). 서울대학교병원(분사무소) (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY BUNDANG HOSPITAL) [KR/KR]; 463-707 경기도 성남시 분당구 구미로 173 번길 82 분당서울대학교병원, Gyeonggi-do (KR). 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 151-742 서울시 관악구 관악로 1 서울대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김현철 (KIM, Hyuncheol); 150-894 서울시 영등포구 63로 7B동 501호, Seoul (KR). 심창범 (SIM, Changbum); 138-041 서울시 송파구 풍납1동 88-35번지, Seoul (KR). 박규형 (PARK, Kyuhyung); 463-921 경기도 성남시 분당구 수내동 양지마을 청구아파트 205동 1801호, Gyeonggi-do (KR). 우세준 (WOO, Sejoon); 463-810 경기도 성남시 분당구 구미동 116번지 한양시티빌 3동 104호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 이준혁 (LEE, Junhyek); 463-400 경기도 성남시 분당구 판교역로 230 삼환하이텍 B-419, Gyeonggi-do (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: NANOPARTICLES FOR GENE DRUG DELIVERY, AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 유전체 약물 전달용 나노입자 및 이의 제조방법

(57) Abstract: The present invention relates to: nanoparticles for effectively delivering a gene drug to the retina by condensing a gene drug to particulate the same and coating the outside thereof with hyaluronic acid; and a preparation method therefor. The present invention relates to nanoparticles for gene drug delivery, having a structure comprising a core and an outside (shell) encompassing the same, and a nucleic acid is not easily degraded by an enzyme and can stably reach nerve cells in the retina since the core is formed by condensing a nucleic acid such as siRNA in the form of a polymer with a nontoxic cationic polymer. In addition, the nanoparticles can pass through the retina through transcytosis by coating the outside (shell) with hyaluronic acid which is negatively charged and reacts with Müller cells.

(57) 요약서: 본 발명은 유전체 약물을 응축시켜 입자화하고 외부를 히알루론산으로 코팅하여 망막에 유전체 약물을 효율적으로 전달하는 나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 코어와 이를 둘러싸는 외곽(셸) 구조를 가지는 유전체 약물 전달용 나노입자로서, siRNA 등 핵산을 폴리머 형태로 비독성의 양이온성 고분자와 응축시켜 코어를 형성함에 따라 핵산이 효소에 의해 쉽게 분해되지 않고 안정적으로 망막 신경 세포에 도달할 수 있으며, 또한, 외곽(셸)을 (-) 전하를 띠고 물러 세포와 반응하는 히알루론산으로 코팅하여 망막을 트랜스시토시스(transcytosis)하여 통과할 수 있다.

WO 2015/174703 A1

명세서

발명의 명칭: 유전체 약물 전달용 나노입자 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 유전체 약물 전달용 나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 자세하게는, 유전체 약물을 응축시켜 입자화하고 외부를 히알루론산으로 코팅하여 망막에 유전체 약물을 효율적으로 전달하는 나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 맥락막 신생혈관 형성(Choroidal neovascularization(CNV))은 나이 연관 황반형성(age-related macular degeneration, AMD)의 주요한 원인으로 실명을 초래하는 질병이다. AMD 환자는 고령화 사회가 됨에 따라 더욱 증가하고 있으나 아직까지 완전한 치료법은 개발되지 못하고 있는 실정이다. 현재는 광역동 치료(photodynamic therapy)와 anti-VEGF(혈관내피세포성장인자) 치료법이 사용되고 있는데, 광역동 치료는 피부에 빛에 반응하는 광감작제(광과민제)를 주입한 후 특정 파장의 빛을 쏘이면 질병세포에만 선택적으로 빛이 축적되어 치료적 효과를 갖는다. CNV를 치료하기 위해 약을 정맥 내로 주입하고 레이저에 의해 눈 안에서 활성화되어 신생혈관의 생성을 막아준다. anti-VEGF인 아바스틴(Avastin)과 루센티스(Lucentis)를 사용하여 CNV를 일반적으로 치료하고 있다.
- [3] 최근에는 CNV 치료를 위해 유전자 치료가 새롭게 연구되고 있는데, mRNA, DNA가 여러 개의 단백질로 전사될 수 있으므로 RNA, DNA를 이용한 유전자 치료가 유효한 치료 방법이 될 수 있다.
- [4] 작은 간섭 RNA(small interfering RNA (siRNA))는 19 ~ 22개의 핵산으로 구성된 이중나선 구조의 짧은 RNA로서, 그의 센스 가닥과 염기 서열이 동일한 메신저 RNA(messenger RNA, mRNA)와 결합되면 RNA 유도 침묵 복합체(RNA induced silencing complex, RISC)가 결합된 mRNA를 분해시킴으로써 특정 단백질의 발현을 저해하는 것으로 알려져 있다(Elbashir, S. M. et al., 2001, Nature 411, 494-8). 적은 양으로도 효과적이고 정확하게 서열이 동일한 mRNA의 발현을 억제하는 이러한 siRNA의 성질을 이용하여 유전자 관련 질병 치료에 다양한 가능성이 연구되어 왔으며 siRNA를 이용한 치료약 개발 시장은 그 규모가 해마다 비약적으로 증가하고 있다.
- [5] 그러나, siRNA의 효소 불안정성, 열악한 세포 투과성은 실제 임상치료에 적용하는데 있어서 큰 장애가 되어왔으며, 이를 해결하기 위해 다양한 전달체의 개발 및 siRNA 자체에 다양한 분자의 접합 등이 연구되고 있다. 효소에

직접적으로 노출되는 것을 예방하고 세포 투과성을 증가시키기 위해 음이온성의 siRNA에 양이온성 고분자 또는 지질 분자, 및 펩타이드를 전기적 인력으로 결합시켜 전체적으로 양이온 성질을 가지는 나노 크기의 복합체를 형성하여 siRNA를 효소로부터 보호하고 동시에 음이온 성질을 가지는 세포막과의 상호작용을 향상시켜 세포 내 전달 효율을 증가시키는 연구가 대표적이라 할 수 있다. 좀 더 구체적으로는, 2-dioeloyl-3-trimethylammonium (DOTAP), poly ethylenimine (PEI), Chitosan groups, and poly L-lysine (PLL)은 양전하 특성이 있어 높은 RNA 수용성과 세포 침투 효율을 가진다. 그러나 이들은 강한 양전하 전달특성으로 건강한 간이나 비장 세포를 타겟팅하거나 세포 독성을 나타내기도 한다.

- [6] 최근에는 글리콜 키토산이나 branched PEI와 같은 개질된 양이온 폴리머를 사용하여 양전하의 세기를 낮추어 세포 독성 문제를 해결하고자 하였으나, 양전하의 세기를 감소시키는 것은 RNA와 캐리어 사이의 결합력을 감소시켜 RNA가 혈액이나 혈청 내에서 효소들에 의해 쉽게 분해되는 또 다른 문제를 야기시킨다.

[7] [참고특허]

[8] 한국공개특허 10-2011-83919

[9] 한국등록특허 10-806088

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 망막 내로의 유전자 약물의 전달 효율이 높으면서 세포 독성이 낮은 약물 전달 시스템을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명은 유전자 물질이 효소에 의해 분해되지 않고 망막 신경 세포에 도달할 수 있는 유전체 전달 나노입자를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 본 발명의 하나의 양상은 유전자를 표적하는 핵산과 양이온성 고분자가 이온 상호 작용에 의해 응축된 코어부 ; 및 상기 코어부 외면에 코팅된 히알루론산 외곽층을 포함하는 유전체 약물 전달용 나노입자에 관계한다.
- [13] 다른 양상에서 본 발명은 유전자를 표적하는 핵산과 양이온성 고분자를 혼합하여 이온 상호 작용으로 응축시키는 단계 ; 및 응축된 코어부 외면에 정전기적 인력으로 히알루론산 외곽층을 코팅하는 단계를 포함하는 유전체 약물 전달용 나노입자 제조방법에 관계한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명은 코어와 이를 둘러싸는 외곽(셸) 구조를 가지는 유전체 약물 전달용 나노입자로서, 유리체강내 주입시 siRNA 등 핵산을 폴리머 형태로 비독성의 양이온성 고분자와 응축시켜 코어를 형성함에 따라 유리체내의 핵산이 효소에 의해 쉽게 분해되지 않으며, 또한 외곽(셸)을 (-) 전하를 띠는 히알루론산으로

코팅을 함으로서 (-) 전하를 띄고 있는 유리체 meshwork 구조물질들과 aggregation을 방지하고 망막의 inner limiting membrane 에 도달할 수 있다. 또한 히알루론산은 물러 세포의 CD44와 결합하여 망막의 구조를 트랜스시토시스 기작으로 sub-retinal space 에 통과할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 본 발명의 일구현예에 의한 유전체 전달용 나노입자의 개념도를 나타낸다.
- [16] 도 2는 본 발명의 일구현예에 의한 유전체 전달용 나노입자를 제조하는 방법을 도시한 것이다.
- [17] 도 3은 실시예 1에서 제조한 나노입자 및 코어의 사이즈 분포를 나타낸다.
- [18] 도 4는 실시예 1에 의해 제조된 나노입자를 촬영한 TEM 이미지이다.
- [19] 도 5는 제조된 나노입자의 망막세포내로 전달되는 시험과 나노입자에 의해 전달된 anti-VEGF-A siRNA 가 VEGF-A 발현을 선택적으로 억제하는 PCR 결과를 나타낸다.
- [20] 도 6은 제조된 나노입자의 유리체강내 주입 후 24시간 후에 망막에 도달함과 동시에 망막을 통과하여 sub-retinal space 에 도달함을 보여주는 공초점 현미경으로 안구를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- [21] 도 7은 제조된 나노입자를 이용하여 쥐의 안구에서 CNV 억제실험을 수행한 결과를 나타낸다.
- [22] 도 8은 제조된 나노입자를 이용하여 독성 실험을 한 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [23] 본 발명은 하기의 설명에 의하여 모두 달성될 수 있다. 하기의 설명은 본 발명의 바람직한 구체 예를 기술하는 것으로 이해되어야 하며, 본 발명이 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [24] 도 1은 본 발명의 일구현예에 의한 유전체 전달용 나노입자의 개념도를 나타낸다.
- [25] 도 1을 참고하면, 본 발명의 유전체 전달용 나노입자는 코어부(10) 및 외곽층(20)을 포함한다.
- [26] 상기 코어부(10)는 유전자를 표적하는 핵산(11)과 양이온성 고분자(12)가 이온 상호 작용에 의해 응축되어 형성된다.
- [27] 상기 핵산(11)은 세포내로의 전달을 목적으로 하는 핵산, 예컨대 작은 간섭 RNA(siRNA), 안티센스 핵산(antisense nucleic acids) 또는 핵산 앵타머(aptamer)일 수 있으며, 바람직하게는 작은 간섭 RNA(siRNA)일 수 있다. 상기 siRNA는 2~20 개, 바람직하게는 4~20개, 더욱 바람직하게는 10~14 개의 siRNA가 결합되어 고분자화된 siRNAs(poly-siRNA)를 사용할 수 있으며, 상기 고분자화된 siRNAs(poly-siRNA)는 RNA의 안정성을 높일 수 있어 효과적인 유전체의 전달이 가능하다. 예를 들면, 12개 정도의 siRNA를 디설파이드 결합으로 Poly-siRNAs를

형성할 수 있다.

- [28] 본 발명에 사용가능한 siRNA는 치료용 또는 연구용으로 사용되는 것이라면 특별히 한정되지는 않으며, 예를 들어 c-myc, c-myb, c-fos, c-jun, 서비빈(survivin), bcl-2, 또는 VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF 등 유전자 치료 또는 연구를 위해 사용되거나 사용될 가능성이 있는 어떠한 siRNA도 사용될 수 있다. 상기 siRNA가 망막의 혈관내피 성장인자(VEGF)를 표적하여 이의 발현을 억제시킬 수 있는 것이 바람직하다.
- [29] 상기 양이온성 고분자는 폴리에틸렌이민, 폴리아민 및 폴리비닐아민으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 독성이 상대적으로 낮은 branched PEI를 사용할 수 있다.
- [30] 상기 코어부는 상기 핵산(11)과 양이온성 고분자(12)를 혼합하여 이온 상호작용으로 응축시켜 형성할 수 있다. (-) 전하를 띄는 상기 핵산과 (+) 전하를 띄는 양이온성 고분자(12)가 서로 혼합되면 응축(condense)되어 입자화될 수 있다. 좀 더 구체적으로는, 강한 양전하를 가지는 branched PEI가 음전하의 poly-siRNA를 둘러싸면서 응축 또는 압축하여 상기 코어부는 나노 파티클 형태가 될 수 있다. 상기 코어부는 RNA가 음전하에도 불구하고 branched PEI에 의해 여전히 강한 (+) 전하를 나타낸다.
- [31] 상기 핵산과 양이온성 고분자의 중량비는 1 : 0.1~3, 바람직하게는 1 : 0.1~2, 더욱 바람직하게는 1 : 1 일 수 있다.
- [32] 상기 핵산은 중량평균 분자량이 3K ~ 30K 일 수 있으며, 양이온성 고분자는 중량평균 분자량이 10K 일 수 있다.
- [33] 상기 외곽층(20)은 상기 코어부(10) 외면에 코팅된 히알루론산층이다.
- [34] 상기 히알루론산 외곽층(20)은 상기 코어부(10) 외면에 정전기적 인력으로 코팅된다.
- [35] 상기 코어부를 둘러싸는 히알루론산 외곽층은 (-) 전하를 나타내고, 따라서, 상기 나노입자도 그 외부가 (-)전하를 나타낸다.
- [36] 본 발명의 목적에는 다양한 형의 HA가 적절하다. 특히, 분자량이 큰 것과 작은 HA가 이용될 수 있으며, 바람직하게는 5~ 10 K, 더욱 바람직하게는 5K HA를 사용할 수 있다.
- [37] 히알루론산(HA)는 기본단위로 디사카라이드 글루쿠로닌산- β (1-3) N-아세틸글루코즈-아민 β (1-4)이 최고 50,000쌍으로 구성된 큰 복합 올리고사카라이드이다. 이는 세포외매트릭스의 주요 성분으로써 생체 내에서 발견된다. 이의 3차 구조는 직경이 약 50nm인 무작위(random) 코일 형태이다.
- [38] 히알루론산(HA)는 전신 또는 국소적으로 인체의 질병과 질환을 치료하는데 사용되어 왔는데 그 이유는 질병 또는 질환이 있는 부위로 활성물질을 표적 제공하는 능력이 있기 때문이다(International Patent Publications No WO 91/041058 & WO 93/16733). 실험동물에서 손상된 경동맥(손상 안된 대측 동맥에 대해)과 칼로렉탈(colotectal) 종양에서 HA가 형성됨을 볼 수 있고 이와 같은

실험동물의 피부에 유지된다는 것이 알려져 있다.

- [39] 망막내 유리체(vitreous) 공간은 negative 성질의 물질로 이루어진 구조이므로, branched PEI로만 코팅된 입자는 (+)전하 및 (-) 전하의 상호 인력에 의해 유리체 구조를 통과하지 못하고 유리체 공간 내에서 뭉치게(agggregation)된다. 본원 발명의 나노입자는 히알루론산이 외곽층으로 코팅되어 있어 전체적으로 (-) 전하를 띄게 되므로 입자들이 유리체 형성 물질과 뭉쳐서 이동이 방해되는 것을 막을 수 있다.
- [40] 또한, 망막은 여러 세포층으로 구성되어 있는데 그 중 Inner limiting membrane의 경우 10~20nm의 pore 구조를 그리고 external limiting membrane의 경우 3~3.4 nm의 physical barrier를 가진다.
- [41] 본원 발명의 상기 나노입자는 입자 사이즈가 50~500nm, 바람직하게는 100~400nm, 더욱 바람직하게는 150~300nm이다.
- [42] 상기 나노입자는 크기만 고려하면 망막의 physical barrier를 극복할 수 없지만, 나노입자의 외곽(셸)에 코팅된 HA에 의해 muller 세포의 CD44 receptor와 반응하여 엔도시토시스 또는 트랜스시토시스하여 망막을 통과할 수 있다. 즉, 본원발명의 나노입자는 HA 외곽층을 구비함에 따라 외측 망막(outer retinal)에 효율적으로 도달할 수 있다.
- [43] 다른 양상에서 본 발명은 유전체 약물 전달용 나노입자를 제조하는 방법에 관계한다. 도 2는 본 발명의 일구현예에 의한 유전체 전달용 나노입자를 제조하는 방법을 도시한 것이다.
- [44] 상기 방법은 응축 단계 및 외곽층 코팅 단계를 포함한다.
- [45] 상기 응축단계는 유전자를 표적하는 핵산과 양이온성 고분자를 혼합하여 이온 상호 작용으로 응축시키는 단계이다.
- [46] 예를 들면, 상기 응축은 고분자화된 poly-siRNA(10mg/ml)을 10K branched PEI (bPEI, 1mg/ml)로 w/w (weight/weight) 1:1 비율로 섞은 후 상온에서 중성pH(6.5~7.5) 조건에서 반응시킨다.
- [47] 상기 핵산(예를 들면, poly-siRNA) 과 양이온성 고분자의 중량비는 1 : 0.1~3, 바람직하게는 1 : 0.1~2일 수 있다. w/w의 비가 1 : 1이 넘는 환경에서는 더욱 응축되다가 1 : 2 이상으로 양이온성 고분자가 추가될 경우나노 입자가 어그리게이션될 수 있다.
- [48] 상기 핵산은 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 안티센스 핵산(antisense nucleic acids)일 수 있다. 상기 핵산은 망막 내의 혈관내피 성장인자(VEGF)를 표적하는 유전자일 수 있다.
- [49] 상기 방법은 상기 응축단계 이전에 상기 핵산을 복수개 결합하여 고분자 형태의 핵산으로 제조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [50] 예를 들면, 12개 정도의 siRNA를 디설파이드 결합으로 Poly-siRNAs를 형성할 수 있다.
- [51] 상기 응축단계에 대해서 앞에서 상술한 나노입자의 내용을 참고할 수 있다.

- [52] 상기 코팅 단계는 응축된 코어부 외면에 히알루론산 외곽층을 코팅하는 단계이다. 바람직하게는, 상기 방법은 코어부의 (+)전하와 히알루론산의 (-)전하와의 정전기적 인력으로 상기 외곽층을 코팅할 수 있다.
- [53] 상기 히알루론산은 상기 핵산(예를 들면, poly-siRNA) 대비 중량비로 1:0.5~2(핵산 : 히알루론산), 바람직하게는 1 : 1 일 수 있다. poly-siRNA 기준으로 히알루론산을 1 : 1(w/w) 이상으로 사용할 수 있으나, 그 이상의 히알루론산의 추가로 특별히 코팅층이 증가되지 않는다. 상기 코팅반응은 상온에서 중성pH(6.5~7.5) 조건에서 반응시킨다.
- [54] 상기 코팅단계에 대해서는 앞에서 상술한 나노입자의 내용을 참고할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [55] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해 바람직한 실시예를 제시하지만, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [56] 실시예 1
- [57] 나노입자의 합성
- [58] 쥐의 혈관내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor A (VEGF-A))를 타겟팅 하는 siRNA를 먼저 합성하였다. VEGF 센스는 5'-AUGUGAAUGCAGACCAAAGAA TT-3'이고, 안티 센스는 5'-UUCUUUGGUCUGCAUUCA CAU TT-3'이다.
- [59] 상기 배열을 가진 siRNA(구입처 bioneer) 1mg, 0.0706 μ mol)을 증류수에 녹이고 DTT(dithiothreitol)를 넣어 5'말단에 -SH기를 붙였다.
- [60] 상기 용액을 동결건조하여 siRNA를 얻고, 이어서, siRNA를 10mM의 500 μ l HEPES 버퍼에 넣었다. 여기에 N,N,N,N-tetramethylazodicarboxamide (1mg, 5.8 μ mol)를 넣어 혼합하여 상온에서 하루 정도 반응시켜 poly-siRNA를 합성하였다.
- [61] 다음으로, 합성된 poly-siRNA 1mg을 100 μ l 증류수에 녹이고, 10K branched-PEI(Polyscience Asia Pacific) 1mg/ml 혼합하였다. 10분 동안 상온에서 인큐베이팅한 후에 응축된 코어입자(poly-siRNA/bPEI complex)를 수득하였다.
- [62] 100 μ l 증류수에 용해된 5K HA(Lifecore biomedical) 1mg(2mol)을 수득한 코어입자와 1(w/w)의 중량비로 혼합하였다. 혼합물을 5분 정도 인큐베이팅한 다음 원심분리기(Amicon Ultra-0.5)로 HA가 외곽에 코팅된 나노입자(siRNA-polyplex)를 수득하였다.
- [63] 제조된 나노입자의 특성 측정
- [64] 제조된 나노입자(siRNA-polyplex)와 HA 코팅하지 않은 코어입자(poly-siRNA/bPEI complex)의 사이즈 분포를 도 3에 나타내었다.
- [65] 코어입자의 사이즈 분포는 144.28 ± 15.19 nm이고, 나노입자(siRNA-polyplex)의 사이즈 분포는 260.7 ± 43.27 nm이다. 이들 간의 사이즈 차가 88.4~144.5nm에

해당하고, 상기 차이는 외곽에 코팅된 HA 층의 두께에 대응된다고 볼 수 있다.

- [66] 나노입자를 TEM 이미지 촬영하여 도 4에 나타내었다. 노란색 점선 안쪽이 코어입자(poly-siRNA/bPEI complex)를 나타내고, 화살표로 표시된 외곽층이 HA 층을 나타낸다.

[67] 세포 흡착 시험

- [68] Human ARPE-19 cell을 3×10^4 개를 12 well plate에 seeding 한후에 24시간 동안 인큐베이팅시킨다. 각각의 well에 TRITC로 염색된 실시예 1의 나노입자(siRNA-polyplex)를 serum free medium과 섞어 $6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도로 넣어주었다. 이어서, 3시간, 12시간 후에 4% PFA로 고정시켜 DAPI 염색 후 형광 현미경으로 관찰하여 도 5A에 나타내었다.

[69] mRNA 발현 억제 시험

- [70] 2×10^5 개의 B16F10 mouse melanoma cell을 6well plate에 seeding 한 후, mono-siRNA, poly-siRNA, no treatment (CTL), 상용화된 transfection agents인 (lipofectamine, Lipo), 그리고 본 발명의 나노입자(siRNA-polyplex)를 serum free medium과 섞어 처리하였다. 그 후에 cell들을 모두 걷어내어 mRNA를 추출하여 mouse vegf-a 와 mouse beta actin 에 대하여 cDNA를 만든 후, PCR cyclo로 증폭시켜 mRNA의 수준을 확인하였으며, 같은 방법으로 정량적인 분석을 위해 real-time PCR로 확인하여 이를 도 5B, 도 5C에 나타내었다.

[71]

- [72] 도 5A를 참고하면, CTL의 경우 나노입자(siRNA-polyplex)를 처리하지 않았기 때문에 붉은색 파장의 현광이 전혀 검출되지 않음을 확인하였다. 나노입자(siRNA-polyplex)를 처리한 경우 시간에 따라 세포내로 siRNA-polyplex가 유입되어 DAPI(파랑)으로 염색된 핵 주위에 위치하고 있음을 확인하였고, 12h 후에는 siRNA-polyplex로부터 siRNA가 release 되어 붉은 현광이 변하는 것을 확인하였다.

- [73] 5B를 참고하면, 상용화된 agent인 Lipo와 polyplex 그룹에서만 mouse VEGF-A mRNA가 나오지 않고 분해되었음을 보여준다. 즉, 나노입자(siRNA-polyplex)가 mouse melanoma B16F10 cell의 mouse VEGF-A의 발현을 억제함을 알 수 있다. mouse beta actin은 PCR과 mRNA - cDNA 합성이 잘 되었음을 확인하는 데이터이다.

- [74] 도 5C는 real-time PCR로 증폭시키면서 정량적인 분석을 한 데이터이다. 나노입자(siRNA-polyplex)의 경우 mono, poly-siRNA가 mRNA를 분해하지 못하는 것에 비해 6.4% 수준까지 VEGF-A 발현을 억제하는 것을 볼 수 있다.

[75] 안구 분산 실험

- [76] 6-8주의 C57BL/6J 쥐를 사용하였다. 쥐 안구에 TRITC 염색된 poly-siRNA로 만든 siRNA-polyplex를 해밀턴 주사기를 사용하여 주입한다. 3, 24h 후에 안구를 적출하여 OCT compound 안에 넣어 블록형태로 만든 후에 cryostat으로 안구 단면 슬라이스를 만들었다. 이어서, DAPI solution을 이용하여 24h 동안 세포 핵을

염색시킨 후에 동초점 현미경으로 관찰하여 이를 도 6에 나타내었다.

- [77] 도 6을 참고하면, 아무것도 주입하지 않은 CTL에 비하여 나노입자(siRNA-polyplex)를 주입한 retina에 깊게 형광이 관찰됨을 알 수 있다. 시간에 따라 retina를 투과하는 polyplex의 양이 많아 형광이 강해지며 이를 통해 우리는 siRNA-polyplex가 retina의 RPE cell layer까지 잘 도달됨을 확인하였다.
- [78] CNV 억제 시험
- [79] 6-8주의 C57BL/6J 쥐를 사용하였다. 마취와 산동제를 안구에 투여한 후, green Argon laser (532 nm) 장비명 : Lumenis Selecta Duet SLT (Lumenis, Santa Clara, CA, U.S.A)으로 RPE layer에 조사하였다. laser를 조사한 쥐의 안구에서 CNV 현상이 일어나는데 laser 조사 하루, 7일 후에 siRNA-polyplex를 해밀턴 주사기로 안구내 주입하여 치료효과를 본다. 14일 후 안구적출 전에 쥐의 심장부분의 dextran-fite를 주입하여 혈관을 염색하고 적출된 안구를 플랫마운팅하여 현광현미경으로 관찰하여 생성된 CNV 부분을 관찰하였다. 도 7은 image J program을 사용하여 CNV 면적 분석을 측정한 것이다.
- [80] 도 7A의 플랫마운트 CNV 이미지를 보면 siRNA-polyplex를 주입한 CNV가 다른 그룹 (mono-siRNA, poly-siRNA)에 비하여 크기가 많이 줄었음을 알 수 있다. CNV를 일으키는 주요한 혈관은 모두 줄었음을 확인하였다. 도 7A의 왼쪽 상단에서부터 아무것도 주입하지 않은 CTL, mono type의 siRNA를 주입한 mono, polymer type이지만 고분자와의 결합을 시키지 않은 순수한 polymer 상태의 siRNA인 poly, 마지막으로 poly-siRNA와 결합을 시킨 만들어진 siRNA-polyplex를 주입한 군이다.
- [81] CNV 넓이에 대한 정량적 분석을 위하여 image J program을 이용하여 CNV area를 측정한 결과 나노입자(siRNA-polyplex)가 CTL에 비해서는 약 반 정도로 줄었음을 확인하였다.
- [82] 독성 실험
- [83] MTT assay : Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide(MTT)를 PBS에 5mg/ml로 녹여 solution 으로 만든다. MTT solution은 세포내의 미토콘드리아 내에서 반응하여 특정과장대를 흡수는 발색물질을 만드는데 이를 통해 세포수로 간접적으로 알 수 있다. human ARPE-19 cell line은 사람의 retinal pigment epithelium cell의 준말로 본 유전체입자가 전달해야 할 목표 세포이다. 2×10^4 개의 ARPE-19 cell을 96 well plate에 seeding 한 후 24시간 incubation 시킨다. 세포가 plate 내에 안착되면 serum free medium과 HA, bPEI, siRNA-polyplex, PBS를 (siRNA-polyplex에 사용된 poly-siRNA 100nmol 농도 기준)으로 처리한후에 24, 48, 72h 후에 DPBS로 washing 하고 MTT 시약으로 처리하여 6시간후에 DMSO 100 μ l씩 처리하여 plate reader기로 cell viability를 측정하였다.
- [84] Hematoxylin and eosin stain : Hematoxylin and eosin stain (H&E stain)
- [85] 널리 쓰이는 조직분석 방법으로, 조직을 paraffin에 담아 블록으로 만든후에 적당한 크기로 슬라이스를 만들어 xylene 3-5회 washing으로 paraffin을 제거하고

Hematoxylin (세포핵 염색)으로 염색한다. 그 후 1% HCL 로 남아있는 Hematoxylin를 제거한다. 그 후 Eosin(세포질 염색)으로 염색한다. 이를 통해 안구의 단면 슬라이스의 각각의 세포층들이 입자를 주입했을 때 변하는지 관찰하였다.

- [86] 도 8의 A를 보면 siRNA-polyplex를 만들 때 사용되어진 고분자와 만들어진 siRNA-polyplex가 human ARPE cell에 독성이 적거나 없음을 알 수 있다. 24, 48, 72h 시간이 각각 경과 후에 MTT assay결과를 보면 아무것도 처리 하지 않은 CTL과 비교하였을 때 크게 차이가 없음을 확인하였다.
- [87] mouse 안구 내에 주입되어진 siRNA-polyplex역시 PBS (positive), 아무것도 주입하지 않은 군(negative)에 비해 안구조직내에 cell layer의 변화나 나 macrophage등의 면역반응에 의한 세포들이 관찰되지 않아 독성이 없었음을 알 수 있다.
- [88] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속하는 것으로, 본 발명의 구체적인 보호범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

산업상 이용가능성

- [89] 본 발명은 맥락막 신생혈관 형성(Choroidal neovascularization(CNV)) 등 안구 질환의 치료제로 사용할 수 있으므로 산업상 이용가능성이 있다.
- [90]
- [91]

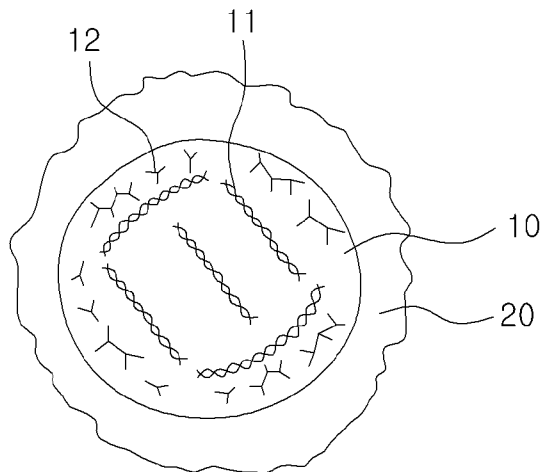
청구범위

- [청구항 1] 유전자를 표적하는 핵산과 양이온성 고분자의 이온 상호 작용에 의해 응축된 코어부 ; 및
상기 코어부 외면에 코팅된 히알루론산 외곽층을 포함하는 것을 특징으로 유전체 약물 전달용 나노입자.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 히알루론산 외곽층은 (-) 전하를 나타내는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 나노입자.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 나노입자는 그 외부가 (-)전하를 나타내는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 나노입자.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 히알루론산은 상기 코어부 외면에 정전기적 인력으로 코팅된 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 나노입자.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 코어부 외면은 전체적으로 (+) 전하를 띠는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 나노입자.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 나노입자는 입자의 크기가 50~500nm인 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 나노입자.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 상기 핵산은 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 안티센스 핵산(antisense nucleic acids)인 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 나노입자.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 siRNA는 2~20개의 siRNA가 결합된 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 나노입자.
- [청구항 9] 제 1항에 있어서, 상기 핵산은 망막의 혈관내피 성장인자(VEGF)를 표적하는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 나노입자.
- [청구항 10] 제 1항에 있어서, 상기 양이온성 고분자는 폴리에틸렌이민, 폴리아민 및 폴리비닐아민으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 나노입자.
- [청구항 11] 유전자를 표적하는 핵산과 양이온성 고분자를 혼합하여 이온 상호 작용으로 응축시키는 단계 ; 및
응축된 코어부 외면에 정전기적 인력으로 히알루론산 외곽층을 코팅하는 단계를 포함하는 유전체 약물 전달용 나노입자 제조방법.
- [청구항 12] 제 11항에 있어서, 상기 핵산과 양이온성 고분자의 중량비는 1 : 0.1~3인 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 나노입자 제조방법.
- [청구항 13] 제 11항에 있어서, 상기 히알루론산은 상기 응축된 코어부 대비 중량비로 1 : 0.5~2(코어부:히알루론산)인 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 나노입자 제조방법.
- [청구항 14] 제 11항에 있어서, 상기 핵산은 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 안티센스 핵산(antisense nucleic acids)으로서, 망막 내의 혈관내피 성장인자(VEGF)를 표적하는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용

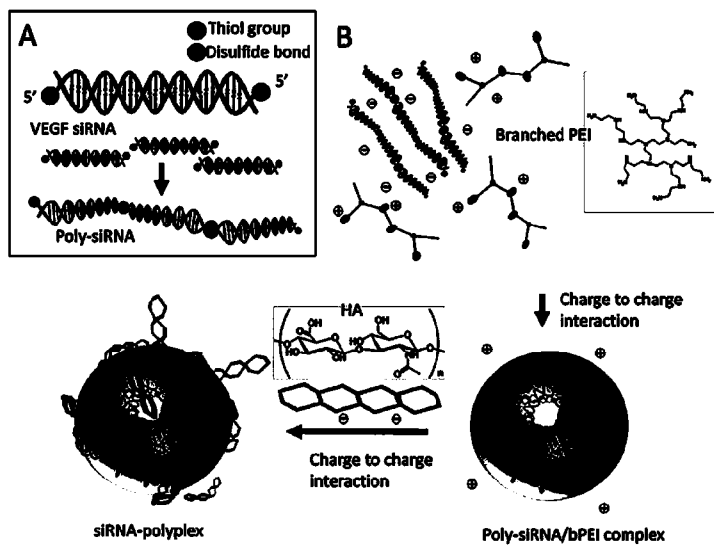
나노입자 제조방법.

- [청구항 15] 제 11항에 있어서, 상기 양이온성 고분자는 폴리에틸렌이민, 폴리아민 및 폴리비닐아민으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 나노입자 제조방법.

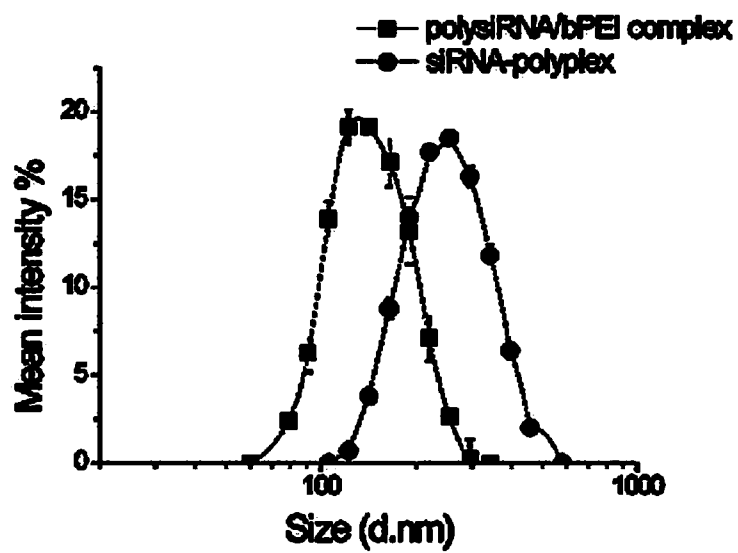
[도1]



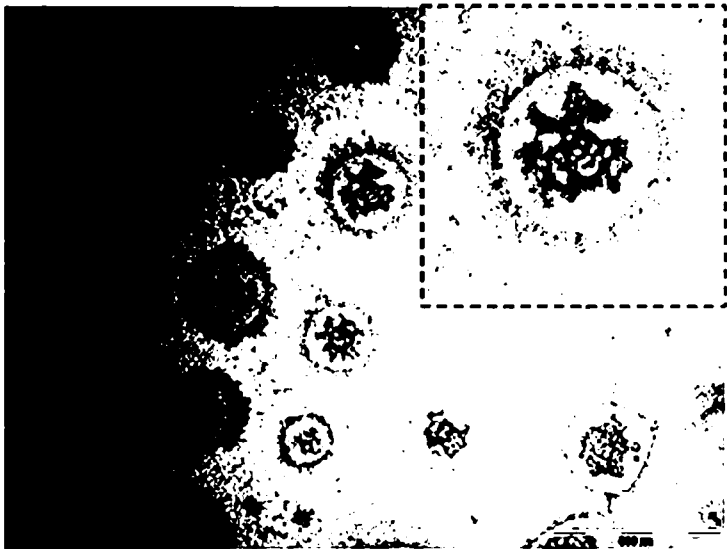
[도2]



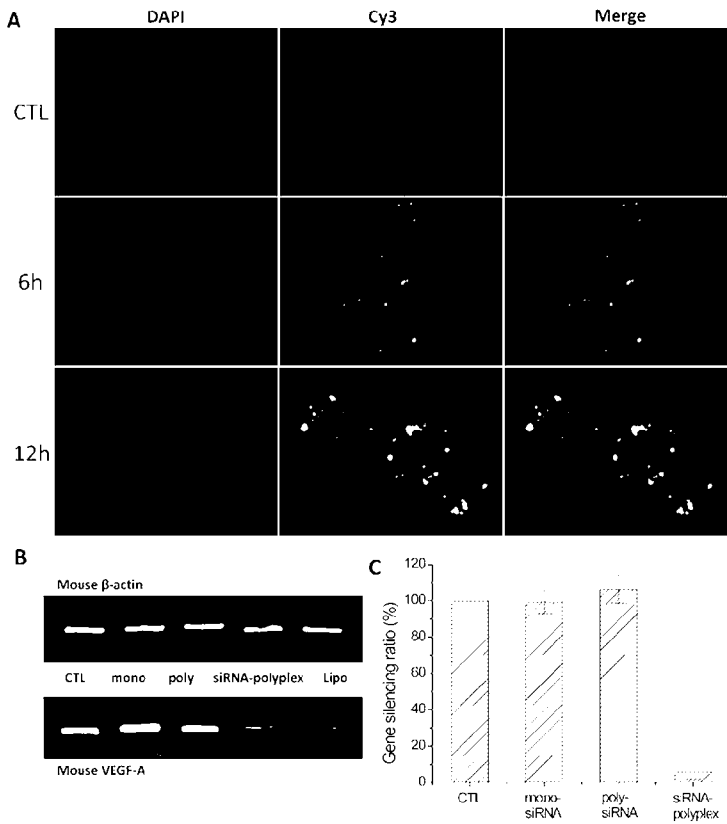
[도3]



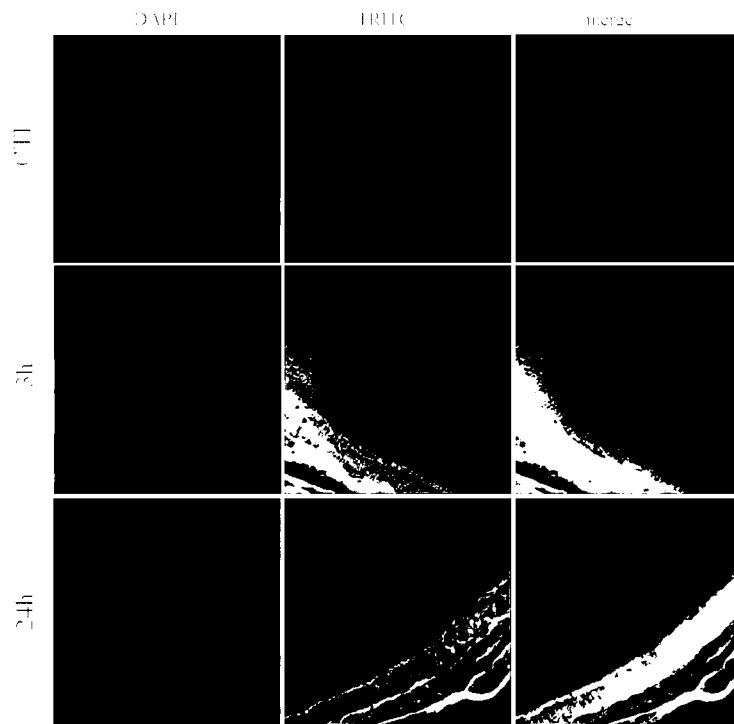
[도4]



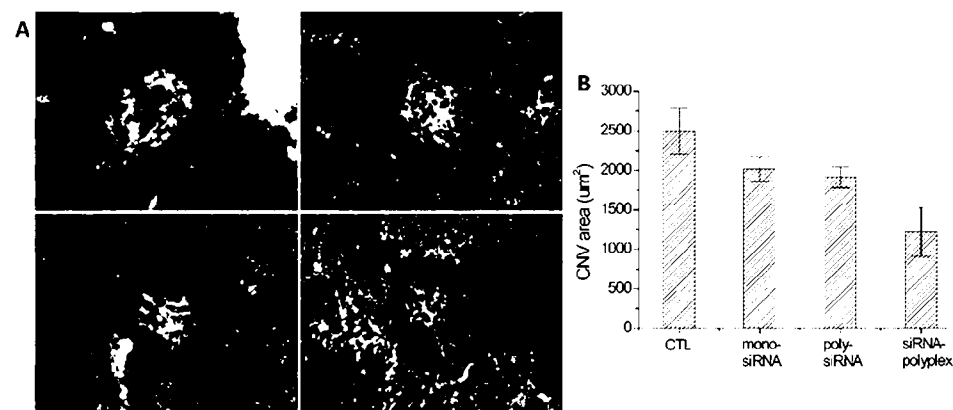
[도5]



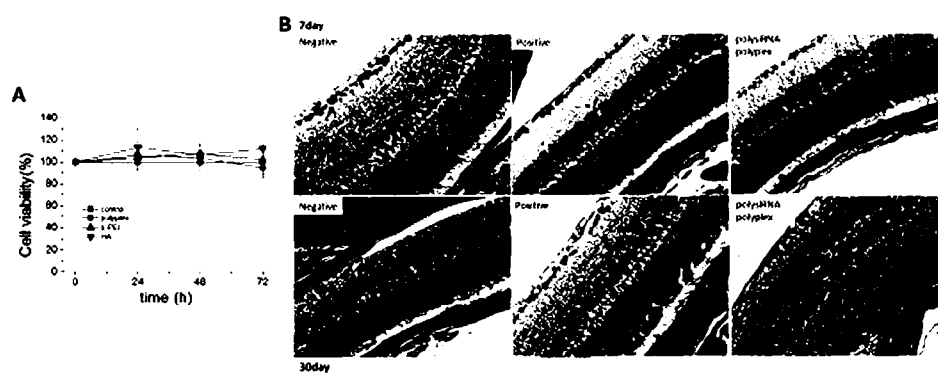
[도6]



[도7]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004684**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 9/16(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i, A61K 47/36(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 9/16; C07H 21/02; A61K 31/728; C12N 15/11; A61K 31/74; A61K 47/30; A61K 47/36; A61K 47/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: nucleic acid, siRNA, cationic polymer, coating, hyaluronic acid, nanoparticle, drug delivery

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ITO, T. et al., "Efficient in vivo gene transfection by stable DNA/PEI complexes coated by hyaluronic acid", Journal of Drug Targeting, 2008, vol. 16, no. 4, pages 276-281 See abstract, figures 1 and 3, pages 278 and 279.	1-15
Y	KR 10-2011-0083919 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 21 July 2011 See abstract, claims 1, 16 and 19, paragraphs [0129] and [0131].	1-15
A	KR 10-0806088 B1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 21 February 2008 See claims 1, 6, 8 and 11.	1-15
A	PARK, K. et al., "Target specific tumor treatment by VEGF siRNA complexed with reducible polyethyleneimine-hyaluronic acid conjugate", Biomaterials, 2010, vol. 31, pages 5258-5265 See abstract and figure 1.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 AUGUST 2015 (24.08.2015)

Date of mailing of the international search report

24 AUGUST 2015 (24.08.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/004684

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0083919 A	21/07/2011	NONE	
KR 10-0806088 B1	21/02/2008	US 2010-0144035 A1 US 8318856 B2 WO 2009-020270 A1	10/06/2010 27/11/2012 12/02/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 9/16(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i, A61K 47/36(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 9/16; C07H 21/02; A61K 31/728; C12N 15/11; A61K 31/74; A61K 47/30; A61K 47/36; A61K 47/48

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 핵산, siRNA, 양이온성 고분자, 코팅, 히알루론산, 나노입자, 약물 전달

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	ITO, T. 등, "Efficient in vivo gene transfection by stable DNA/PEI complexes coated by hyaluronic acid", Journal of Drug Targeting, 2008, 16권, 4호, 페이지 276-281 요약, 도 1 및 3, 페이지 278 및 279 참조.	1-15
Y	KR 10-2011-0083919 A (한국과학기술원) 2011.07.21 요약, 청구항 1, 16 및 19, 단락 [0129] 및 [0131] 참조.	1-15
A	KR 10-0806088 B1 (고려대학교 산학협력단) 2008.02.21 청구항 1, 6, 8 및 11 참조.	1-15
A	PARK, K. 등, "Target specific tumor treatment by VEGF siRNA complexed with reducible polyethyleneimine-hyaluronic acid conjugate", Biomaterials, 2010, 31권, 페이지 5258-5265 요약 및 도 1 참조.	1-15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 08월 24일 (24.08.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 08월 24일 (24.08.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



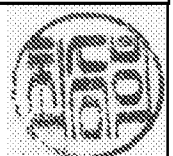
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

최승희

전화번호 +82-42-481-8738



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0083919 A	2011/07/21	없음	
KR 10-0806088 B1	2008/02/21	US 2010-0144035 A1 US 8318856 B2 WO 2009-020270 A1	2010/06/10 2012/11/27 2009/02/12