



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월13일

(11) 등록번호 10-2589295

(24) 등록일자 2023년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/59 (2017.01) A61K 47/60 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 15/117 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/59 (2017.08)
A61K 47/60 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2022-7041535(분할)

(22) 출원일자(국제) 2015년05월14일

심사청구일자 2022년12월22일

(85) 번역문제출일자 2022년11월25일

(65) 공개번호 10-2022-0163536

(43) 공개일자 2022년12월09일

(62) 원출원 특허 10-2016-7033997

원출원일자(국제) 2015년05월14일

심사청구일자 2020년05월13일

(86) 국제출원번호 PCT/IL2015/050514

(87) 국제공개번호 WO 2015/173824

국제공개일자 2015년11월19일

(30) 우선권주장

61/993,110 2014년05월14일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2004045491 A2

(73) 특허권자

타르그이문 테라퓨틱스 아게

스위스, 바젤 4057, 호히베르게스트라제 60체

(72) 발명자

레비츠키 알렉스

이스라엘 9371411 예루살렘 나요트 예후다 브를라
스트리트 11/6

조우브란 살림

이스라엘 7151062 로드 모란 스트리트 7

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 22 항

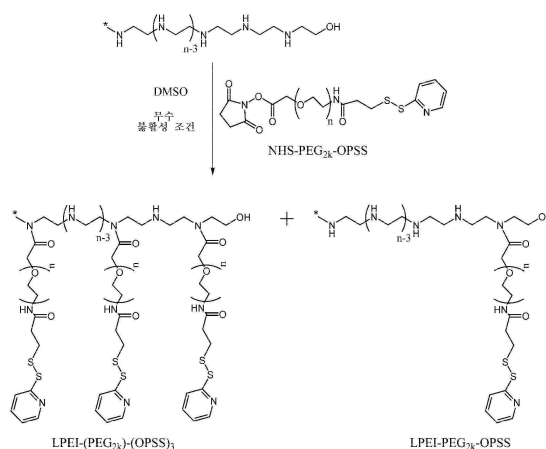
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 개선된 폴리에틸렌이민 폴리에틸렌글리콜 벡터

(57) 요약

이중 가닥 RNA 및 중합체 콘쥬게이트의 폴리플렉스가 제공되며, 여기서 중합체 콘쥬게이트는 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 부분에 공유결합된 선형 개선된 폴리에틸렌이민으로 구성되고, 각 PEG 부분은 암 항원에 결합할 수 있는 표적 부분에 링커를 통하여 콘쥬게이트된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 15/117 (2013.01)

C12N 2310/17 (2013.01)

C12N 2310/351 (2013.01)

C12N 2310/53 (2013.01)

(72) 발명자

쉬르 알렉세이

이스라엘 9781207 예루살렘 쉬무엘 타미르 스트리트 7/7

지글러 마야

이스라엘 9085000 네베 일란 네베 일란 71

탈하미 알라

이스라엘 20128 피.오.박스 301 마그하르 빌리지 크리스티안 스트리트 5

란구트 야엘

이스라엘 3499609 하이파 하임 하자즈 스트리트 3

명세서

청구범위

청구항 1

이중가닥 RNA(dsRNA) 및 중합체 콘주게이트의 폴리플렉스(polyplex)로서,

상기 중합체 콘주게이트는 하나 또는 세개의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 부분에 공유결합된 선형 폴리에틸렌이민(LPEI)으로 구성되고,

각 PEG 부분은 암 항원에 결합할 수 있는 표적 부분에 링커를 통하여 콘주게이트되며,

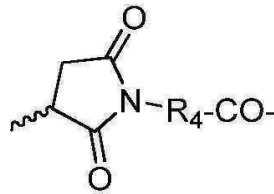
상기 암 항원은 전립선 표면 막 항원(PSMA)이고, 다만 상기 표적 부분은 마우스 EGF(mEGF) 또는 서열 YHWYGYTPQNV(GE11)(SEQ ID NO: 1)의 펩티드가 아니고, 및

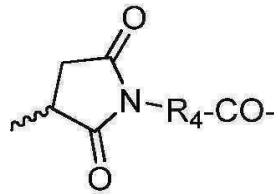
상기 링커는 $-CO-R_2-R_x-R_3$ 또는 펩티드 부분으로부터 선택되며, 상기 펩티드 부분은 머캅토기를 통하여 상기 표적 부분에 결합된, $-(NH-(CH_2)_7-CO)-Phe-Gly-Trp-Trp-Gly-Cys-$ (SEQ ID NO: 2) 또는 $-(NH-(CH_2)_7-CO)-Phe-Phe-(NH-CH_2-CH(NH_2)-CO)-Asp-Cys-$ (SEQ ID NO: 3)이고:

상기 식에서,

R_2 는 (C_1-C_8) 알킬렌, (C_2-C_8) 알켄일렌, (C_2-C_8) 알킨일렌, (C_6-C_{10}) 아릴렌-디일, 또는 헤테로아릴렌디일로부터 선택되고;

R_x 는 존재하지 않거나 또는 $-S-$ 이며;



R_3 는 존재하지 않거나 또는 화학식  이고;

R_4 는 (C_1-C_8) 알킬렌, (C_2-C_8) 알켄일렌, (C_2-C_8) 알킨일렌, (C_1-C_8) 알킬렌- (C_3-C_8) 시클로알킬렌, (C_2-C_8) 알켄일렌- (C_3-C_8) 시클로알킬렌, (C_2-C_8) 알킨일렌- (C_3-C_8) 시클로알킬렌, (C_6-C_{10}) 아릴렌-디일, 헤테로아릴렌디일, (C_1-C_8) 알킬렌- (C_6-C_{10}) 아릴렌-디일, 또는 (C_1-C_8) 알킬렌-헤테로아릴렌디일로부터 선택되고;

상기 (C_1-C_8) 알킬렌, (C_2-C_8) 알켄일렌, 또는 (C_2-C_8) 알킨일렌의 각각은 할로젠, $-COR_5$, $-COOR_5$, $-OCOR_5$, $-OCON(R_5)_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-SR_5$, $-OR_5$, $-N(R_5)_2$, $-CON(R_5)_2$, $-SO_2R_5$, $-SO_3H$, $-S(=O)R_5$, (C_6-C_{10}) 아릴, (C_4-C_4) 알킬렌- (C_6-C_{10}) 아릴, 헤테로아릴, 또는 (C_1-C_4) 알킬렌-헤테로아릴로부터 각각 독립적으로 선택된 하나 이상의 기에 의해 선택적으로 치환되고, 및 S, O 또는 N로부터 선택된 하나 이상의 동일하거나 또는 상이한 헤테로원자, 또는 $-NH-CO-$, $-CO-NH-$, $-N(R_5)-$, $-N(C_6-C_{10})$ 아릴-, (C_6-C_{10}) 아릴렌-디일, 또는 헤테로아릴렌디일로부터 각각 독립적으로 선택된 적어도 하나의 기에 의해 선택적으로 추가적으로 분단(interrupted)되며; 및

R_5 는 H 또는 (C_1-C_8) 알킬인, 폴리플렉스.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 dsRNA는 폴리이노신-폴리시티딜산 이중 가닥 RNA(폴리 I:C)인 폴리플렉스.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 PEG 부분은 각각 독립적으로 상기 LPEI와 함께 $-NH-CO-$ 결합 및 상기 링커와

함께 $-NH-CO-$, $-CO-NH-$, $-S-C-$, $-S-S-$, $-O-CO-$ 또는 $-CO-O-$ 로부터 선택된 결합을 형성하는 폴리플렉스.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 하나 이상의 PEG 부분의 각각은 상기 LPEI 및 상기 링커와 함께 $-NH-CO-$ 결합을 형성하는 폴리플렉스.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 링커는 상기 표적 부분과 함께 $-S-S-$, $NH-CO-$, $-CO-NH-$, $-S-C-$, $O-CO-$, $-CO-O-$ 또는 우레아 ($-NH-CO-NH-$) 결합을 형성하는 폴리플렉스.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, R_2 는 (C_1-C_8) 알킬렌으로부터 선택되며, 이들은 할로젠, $-COH$, $-COOH$, $-OCOOH$, $-OCONH_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-SH$, $-OH$, $-NH_2$, $-CONH_2$, $-SO_2H$, $-SO_3H$, $-S(=O)H$, (C_6-C_{10}) 아릴, (C_1-C_4) 알킬렌- (C_6-C_{10}) 아릴, 헤테로아릴, 또는 (C_1-C_4) 알킬렌-헤테로아릴로부터 각각 독립적으로 선택된 하나 이상의 기에 의해 경우에 따라 치환되고, S, O 또는 N로부터 선택된 하나 이상의 동일하거나 또는 상이한 헤테로원자, 및/또는 $-NH-CO-$, $-CO-NH-$, $-NH-$, $-N(C_1-C_8\text{알킬})-$, $-N(C_6-C_{10}\text{아릴})-$, (C_6-C_{10}) 아릴렌-디일, 또는 헤테로아릴렌디일로부터 각각 독립적으로 선택된 적어도 하나의 기에 의해 경우에 따라 추가로 분단(interrupted)되는, 폴리플렉스.

청구항 8

제1항에 있어서, R_2 는 (C_1-C_4) 알킬렌으로부터 선택되며, 이들은 할로젠, $-COH$, $-COOH$, $-OCOOH$, $-OCONH_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-SH$, $-OH$, $-NH_2$, $-CONH_2$, $-SO_2H$, $-SO_3H$, $-S(=O)H$, (C_6-C_{10}) 아릴, (C_1-C_4) 알킬렌- (C_6-C_{10}) 아릴, 헤테로아릴, 또는 (C_1-C_4) 알킬렌-헤테로아릴로부터 각각 독립적으로 선택된 하나 이상의 기에 의해 경우에 따라 치환되고, S, O 또는 N로부터 선택된 하나 이상의 동일하거나 또는 상이한 헤테로원자, 및/또는 $-NH-CO-$, $-CO-NH-$, $-NH-$, $-N(C_1-C_8\text{알킬})-$, $-N(C_6-C_{10}\text{아릴})-$, (C_6-C_{10}) 아릴렌-디일, 또는 헤테로아릴렌디일로부터 각각 독립적으로 선택된 적어도 하나의 기에 의해 경우에 따라 추가로 분단(interrupted)되는, 폴리플렉스.

청구항 9

제1항에 있어서, R_2 는 (C_1-C_8) 알킬렌으로부터 선택되는 폴리플렉스.

청구항 10

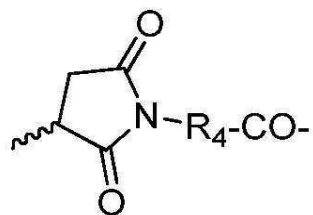
제1항에 있어서, R_2 는 (C_1-C_4) 알킬렌으로부터 선택되는 폴리플렉스.

청구항 11

제1항에 있어서, R_x 는 $-S-$ 인 폴리플렉스.

청구항 12

제1항에 있어서,



R₃은 부재하거나 또는 이고, 여기서

R₄는 (C₁-C₈)알킬렌-(C₃-C₈)시클로알킬렌인 폴리플렉스.

청구항 13

제1항에 있어서,



R₃은 부재하거나 또는 이고, 여기서

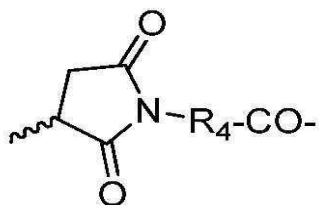
R₄는 (C₁-C₄)알킬렌-(C₅-C₆)시클로알킬렌인 폴리플렉스.

청구항 14

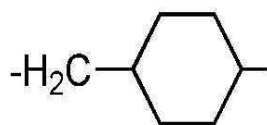
제1항에 있어서,

R₂는 -CH₂-CH₂- 이고;

R_x는 -S- 이며;



R₃은 부재하거나 또는 이며, 이때



R₄는 인, 폴리플렉스.

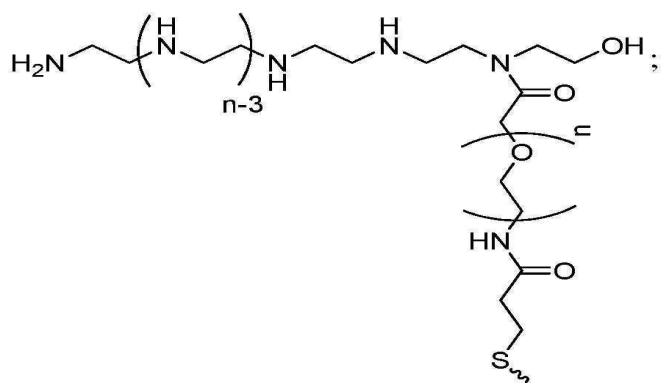
청구항 15

삭제

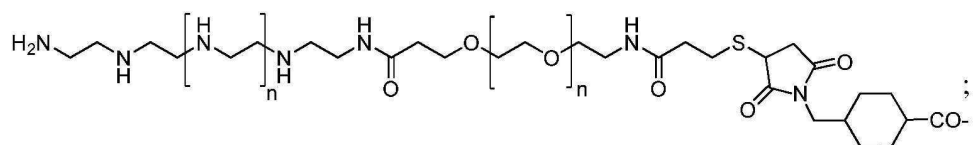
청구항 16

제1항에 있어서, 상기 중합체 콘주게이트는 상기 표적 부분/부분들에 결합된 화학식 (i) 내지 (viii)의 디콘주게이트인 폴리플렉스:

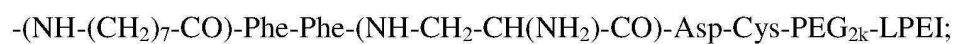
(i)



(ii)



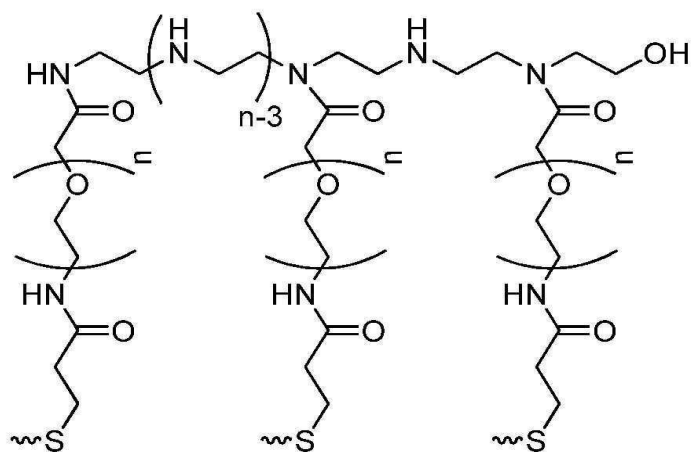
(iii)



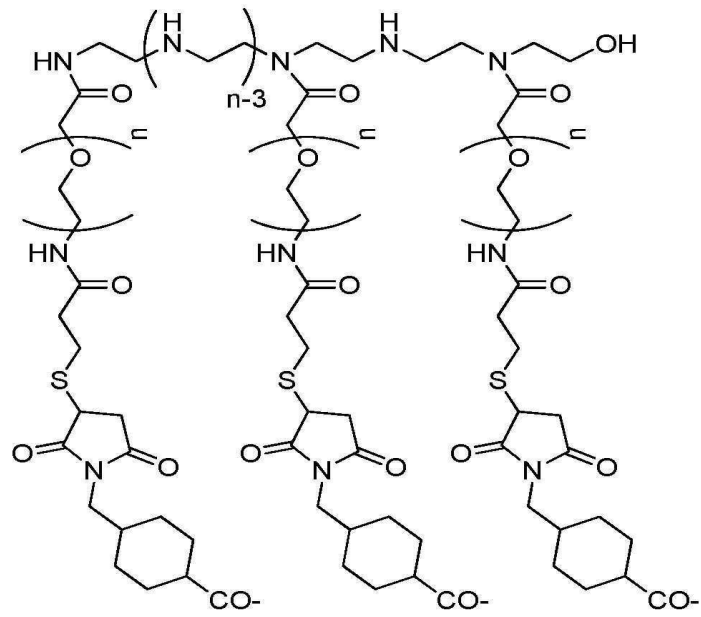
(iv)



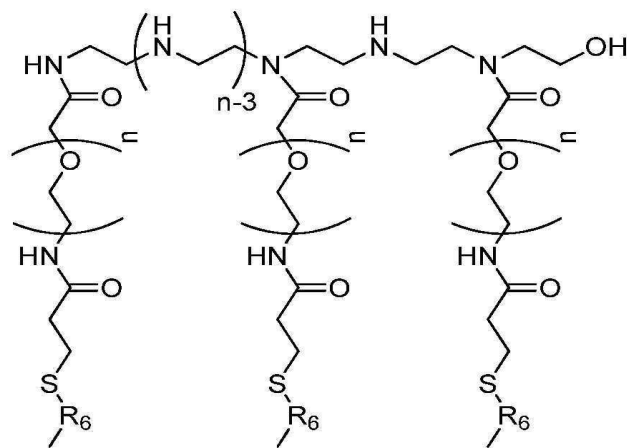
(v)



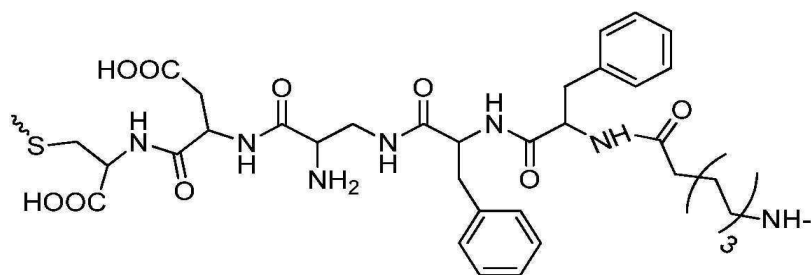
(vi)



(vii)

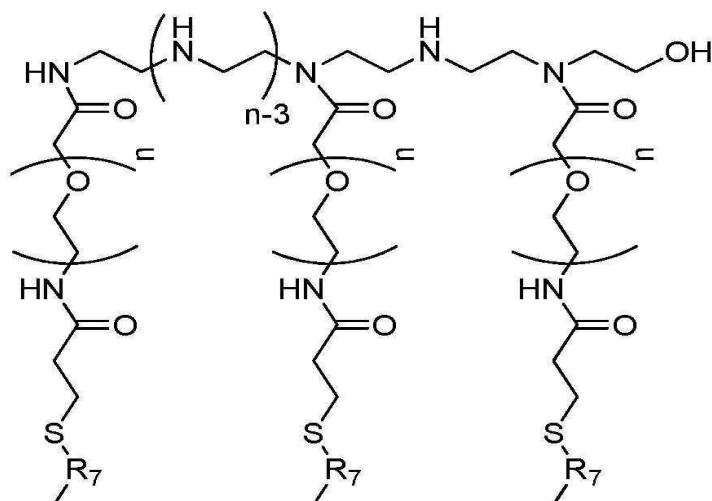


식 중,

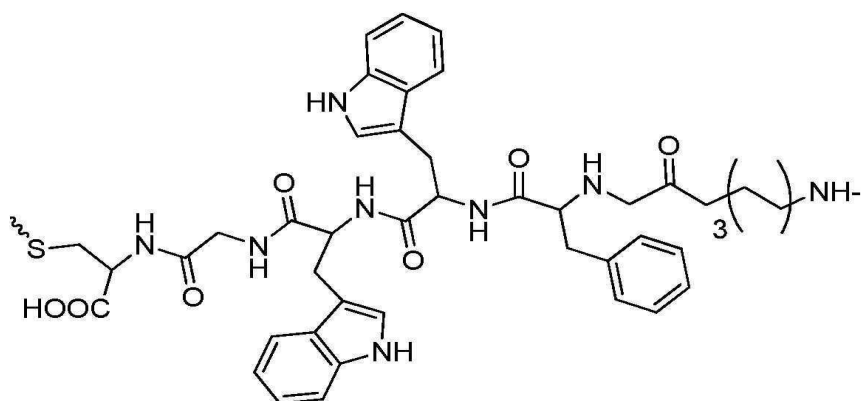
 R_6 은

입; 또는

(viii)



식 중,

 R_7 은

임.

청구항 17

제16항에 있어서,

- (a) 상기 표적 부분은 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-(DUPA 잔기)}$ 이고, 상기 중합체 콘
 주게이트는 상기 화학식 16(iii)임;
- (b) 상기 표적 부분은 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-(DUPA 잔기)}$ 이고, 상기 중합체 콘
 주게이트는 상기 화학식 16(vii)임;
- (c) 상기 표적 부분은 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-(DUPA 잔기)}$ 이고, 상기 중합체 콘
 주게이트는 상기 화학식 16(iv)임; 또는
- (d) 상기 표적 부분은 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-(DUPA 잔기)}$ 이고, 상기 중합체 콘주게
 이트는 상기 화학식 16(viii)인, 폴리플렉스.

청구항 18

약학적으로 허용되는 담체 및 제1항 내지 제5항, 제7항 내지 제14항, 제16항 및 제17항 중 어느 한 항에 따른 폴리플렉스를 포함하는, 암 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 암은 전립선암이고, 상기 폴리플렉스는 제17항 (a), 제17항 (b), 제17항 (c) 또는 제17항 (d)에 정의된 바와 같은, 폴리플렉스.

청구항 20

전립선암을 치료하기 위한, 약학적으로 허용되는 담체 및 제1항의 폴리플렉스를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 면역 세포와 조합하여 사용하기 위한 폴리플렉스.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 면역 세포가 종양-침윤성 T-세포(T-TIL), 종양 특이적 엔지니어링된 T-세포, 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)인 폴리플렉스.

청구항 23

제18항에 있어서, 면역 세포와 조합하여 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 면역 세포가 종양-침윤성 T-세포(T-TIL), 종양 특이적 엔지니어링된 T-세포, 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)인 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 항원에 결합할 수 있는 표적 부분(target moiety)에 콘쥬게이트된 비-바이러스성 폴리에틸렌이민 계 폴리플렉스(polyplex)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 분자 의약이 직면하는 장애점 중의 하나는 DNA 또는 RNA 분자와 같은 치료제의 표적 전달이다. 부상하고 있는 전략은 핵산에 결합하여 농축시키는 양이온성 중합체 및 양이온성 지질과 같은 비-바이러스성 벡터를 작성하는 것이다. 이들 비-바이러스성 양이온성 벡터는 비면역원성, 비발암성이고 합성하기 쉽기 때문에 바이러스 유전자 벡터에 비하여 많은 이점을 갖는다 [1-4]. 현재, 몇 개의 합성 폴리양이온성 중합체가 핵산 전달용으로 개발되고 있다. 이들 중에서, 폴리에틸렌이민(PEI)은 유전자 전달용으로 촉망받는 물질로 간주된다[5].

[0003] PEI는 선형 및 분기형 구조로서 입수가 가능한 수용성의 유기 거대분자이다[6]. PEI는, 이들의 주쇄에 있는 모든 세번째 원자가 양성자화(protonated)할 수 있는 아미노 질소이기 때문에 넓은 범위의 pH에 걸쳐 이들의 이온화도를 변경한다. PEI 중의 질소의 약 55%는 생리적 pH에서 양성자화된다[7]. 이들은 고 양이온성 전하 밀도를 보유하므로, 핵산과 비공유 착물(non-covalent complex)을 형성할 수 있다. 또한, 이들의 이화학적 및 생물학적 특성은 다양한 화학적 변형에 의해 바뀔 수 있다[8]. PEI-계 착물(폴리플렉스라고도 공지)은 많은 세포 유형에 의해 흡수될 수 있다[9]. 폴리플렉스의 내재화(internalization)에 이어, 엔도솜(endosome) 방출 및 고 효율 유전자 전달은 "양성자 스폰지 효과"에 의해 구동된다[10]. DNA를 농축하는 PEI의 능력은 대형 DNA 작제물을 다수의 세포 유형으로 전달하는데 있어 중요한 인자인 것으로 보인다.

[0004] PEI를 전달 캐리어로서 이용하는데 있어서 주요한 관심은, 이들의 높은 양의 표면 전하로 인한, 독성이며, 이는 비특이적 결합을 초래할 수 있다[11]. 비-바이러스성 벡터의 선택성 및 생체적합성을 개선하기 위하여 최근 몇

몇 시도가 행해지고 있다. 이는 PEI 입자를 차단하기 위하여 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 사용한 PEI 분자의 수식을 초래하였다[12]. 헤테로 이작용성 PEG 기를 PEI에 콘쥬게이트하는 것은 표적 리간드에 대한 PEI의 커플링을 용이하게 하므로, 인지(cognate) 수용체를 지니고 있는 세포로 효과적인 유전자 전달을 제공한다[12]. 본 발명자들은 표적화 벡터의 생성을 기재하였고, 표적화 벡터로서 EGF에 묶인 분기형 PEI(brPEI-EGF)와 선형 PEI(LPEI) 사이의 차이를 설명하였다[13, WO 2004/045491, WO 2010/073247]. 현재의 합성 방법은 불충분하게 균일한 생성물을 초래하는 점에서 불충분하다. 따라서 암 치료를 위한 방법에서 안정적으로 이용될 수 있는 균일한 배치의 생성물을 생산하도록 재현가능한 방식으로 LPEI-PEG에 표적 부분의 효율적인 콘쥬게이션을 제공할 수 있는 제조 방법이 강하게 요청되고 있다.

발명의 내용

발명의 요약

일 양태에서 본 발명은 이중가닥 RNA(dsRNA) 및 중합체 콘쥬게이트의 폴리플렉스에 관한 것으로, 상기 중합체 콘쥬게이트는 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 부분에 공유결합된 선형 폴리에틸렌이민(LPEI)으로 구성되고, 각 PEG 부분은 암 항원에 결합할 수 있는 표적 부분에 링커를 통하여 콘쥬게이트되며, 다만 상기 표적 부분은 마우스 EGF(mEGF) 또는 서열 YHWYGYTPQNVI(GE11)(SEQ ID NO: 1)의 펩티드가 아니다.

다른 양태에서, 본 발명은 약학적으로 허용되는 담체 및 본 명세서에 정의된 바와 같은 본 발명의 폴리플렉스를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

또 다른 양태에서, 본 발명은 EGFR-과발현 세포를 특징으로 하는 암, HER2-과발현 세포를 특징으로 하는 암 및 전립선암으로부터 선택된 암 치료에 사용하기 위한 본 명세서에 정의된 바와 같은 본 발명의 폴리플렉스, 또는 폴리플렉스를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

더욱 다른 양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체(subject)에게 본 명세서에 정의된 바와 같은 본 발명의 폴리플렉스를 투여하는 것을 포함하는, EGFR-과발현 세포를 특징으로 하는 암, HER2-과발현 세포를 특징으로 하는 암 및 전립선암으로 구성된 군으로부터 선택된 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

다른 양태에서, 본 발명은 EGFR-과발현 세포를 특징으로 하는 암, HER2-과발현 세포를 특징으로 하는 암 및 전립선암으로부터 선택된 암을 치료하기 위한 약학적으로 허용되는 담체 및 본 발명의 폴리플렉스를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 폴리플렉스는 면역 세포와 함께 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 LPEI(~22 kDa)와 NHS-PEG-OPSS(~2 kDa)의 콘쥬게이션으로 폐길화(PEGylation) 정도가 상이한 2개의 공중합체 네트워크를 주로 얻는다는 것을 도시한다. 공중합체 LPEI-(PEG_{2k}-OPSS)₃ ("디콘쥬게이트 1:3")은 평균 1 몰(mole)의 LPEI 및 3 몰의 PEG로 구성되는 반면에, 공중합체 LPEI-PEG_{2k}-OPSS ("디콘쥬게이트 1:1")는 평균 1 몰의 LPEI 및 1 몰의 PEG로 구성된다. (LPEI:PEG의 비는 ¹H-NMR 분석에 의해 결정되었다)

도 2는 2개의 디콘쥬게이트인 LPEI-PEG_{2k}-OPSS(디콘쥬게이트 1:1) 및 LPEI-(PEG_{2k}-OPSS)₃(디콘쥬게이트 1:3)의 ¹H-NMR 분석을 도시한다. LPEI에 대한 PEG 기의 커플링은 3.7 ppm에서 에틸렌 글리콜 수소(a)에 관련되고 또 ~3.0 ppm에서 에틸렌이민 수소(b)에 관련된 화학적 천이의 존재에 의해 표시되었다. 이들 피크의 적분 값은 LPEI에 대한 PEG의 몰비를 제공하며, 그로부터 디콘쥬게이트 1:1(A) 및 디콘쥬게이트 1:3(B)의 예시된 구조가 추론되었다.

도 3은 공중합체 네트워크(디콘쥬게이트 1:1 및 디콘쥬게이트 1:3)를 다이설파이드 교환을 통하여 애피바디(affibody)("Her-2")에 콘쥬게이트하여, 2개의 상이하게 폐길화된 트리콘쥬게이트 [20]의 생성을 초래하는 도식을 도시한다.

도 4는 정제된 애피바디, 디콘쥬게이트 및 트리콘쥬게이트의 DTT 부재하 및 존재하에서의 SDS/PAGE를 도시한다. DTT 존재하에서, 애피바디는 트리콘쥬게이트로부터 방출되고, 정제된 애피바디(10 kDa 약간 상회)와 함께 이동한다.

도 5는 HBG 완충액 pH 7.4에서 플라스미드 pGreenfire 1과 착화(complexed)된 LPEI, 디콘쥬게이트 및 트리콘쥬

게이트의 DLS 측정을 이용한 입자 크기를 도시한다.

도 6은 플라스미드 pGreenfire1와 착화된 LPEI, 디콘주게이트 및 트리콘주게이트의 ζ 전위 분포를 도시한다. 제타 전위는 DLS에 의해 측정하였고 또 스몰루로우스키(Smoluchowski) 방정식에 의해 산출하였다.

도 7a-b는 양쪽 폴리플렉스에 대해 HBG 완충액 pH 7.4에서 실시된 측정으로부터 얻은 원자력 현미경(AFM) 영상을 도시한다. (a) 트리콘주게이트 1:1 폴리플렉스, (b) 트리콘주게이트 1:3 폴리플렉스. 기준자는 1 μ m이다.

도 8은 상이하게 폐길화된 폴리플렉스가 DNase I 분해로부터 플라스미드 pGreenFire1를 보호함을 보여주는 한 친 겔을 도시한다. 1 μ g 플라스미드(pGreenFire1) 단독 또는 트리콘주게이트 폴리플렉스: 1:1 및 1:3을 DNase I(2 IU)를 사용하거나 사용하지 않고 처리하였다. 초나선 플라스미드(s.c.), 개방 환형 플라스미드(o.c.).

도 9a-c는 각각 1:1 및 1:3의 LPEI:PEG 비를 갖는 트리콘주게이트 1:1 폴리플렉스 및 트리콘주게이트 1:3 폴리플렉스를 사용한 pGFP-LUC의 Her-2 매개 유전자 전달을 도시한다. 10000 BT474 및 MDA-MB-231 유방암 세포/웰을 pGFP-LUC(1 μ g/ml)와 착화된 트리콘주게이트 1:1 및 1:3를 사용하여 48시간 동안 처리하여 2개의 폴리플렉스를 생성하였다. HBS에서 PEI 질소/DNA 포스페이트 비 6(N/P=6). (a) 루시페라제 활성의 측정은 BT474와 비교하여 MDA-MB-231 세포에서 현저히 감소된 pGreenFire1 전달을 나타내었고 또 트리콘주게이트 1:1와 비교하여 트리콘주게이트 1:3 폴리플렉스에 의해 매개된 감소된 유전자 전달을 나타내었다 (* $p < 0.001$). 루시페라제 활성은 48시간 후에 3회 반복하여 측정하고 상대적 루시페라제 단위(RLU)를 평균 \pm S.D로 한다. (b) 폴리플렉스에 의해 처리된 세포의 형광 영상. 영상은 x 10 배율로 나타내며 3회 실시된 실험의 대표이다. (c) 메틸렌 블루 에세이는 미처리(UT) 세포와 비교한 세포 생존 퍼센트를 나타낸다.

도 10은 폴리IC (PolyIC)와 착화된 PEI-PEG-Her2 애피바디(PPHA)가 Her2 과발현 유방암 세포 BT474를 억제함을 나타낸다. 착화된 벡터는 헤르셉틴/트라스투주맙 내성 세포를 비롯한, Her2 과발현 세포를 억제한다.

도 11은 누드 마우스에 주사된 Her2를 과발현하는 MCF7 세포의 억제를 도시한다.

도 12a-b는 (b) PPE의 효율과 비교한 (a) PEI-PEG-EGFR애피바디(PPEAffibody)의 효율을 도시한다.

도 13은 미처리(UT), pIC/PPE, pI/PPE, pI/PPEA 및 pIC/PPEA과 비교하여 생체 내 폴리IC/PPE애피바디의 활성이 낮음을 도시한다(착물 중 0.1 μ g/ μ l pIC)

도 14는 Schaffert D, Kiss M, Rodl W, Shir A, Levitzki A, Ogris M, Wagner E.(2011) Poly(I:C)-mediated tumor growth suppression in EGF-receptor overexpressing tumor using EGF-polyethylene glycol-linear polyethyleneimine as carrier. Pharm Res. 28:731-41. 에 기재된 폴리IC/mPPE(마우스)의 적용과 비교한 상이한 농도의 폴리IC/LPEI-PEG-hEGF 착물을 적용한 후 U87MG, U87MGwtEGFR 세포의 생존을 도시한다.

도 15는 PEI-PEG(PP)-DUPA(PPD)/폴리IC가 LNCaP 및 VCaP 세포에 대하여 아주 효과적이라는 것을 도시한다. 생존성은 96시간 노출한 후 측정하였다.

도 16a-b는 폴리IC/PPD에 의해 형질감염된 LNCaP 세포에 의한 사이토카인 (a) IP-10 및 (b) RANTES의 생산을 도시한다.

도 17은 LNCaP 세포에 의해 조절된 배지가 PBMC에서 사이토카인의 발현을 자극함을 도시한다. 24시간 배양 후 발현.

도 18은 폴리IC/PPD 처리된 LNCaP 세포를, PSMA를 발현하지 않는 PC3-루시페라제 세포와 함께 공동 배양하여 방관자 효과를 통하여 PC3-루시페라제 세포의 70%까지 치사를 초래함을 도시한다. 건강한 인간 PBMC의 부가는 상기 효과를 증가시켰고 PC3 세포의 90% 치사를 초래하였다.

도 19는 생체 내의 피하 LNCaP 종양 상에서 폴리IC/PPD의 효과를 도시한다. UT, 미처리.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 발명의 상세한 설명

[0014] 폴리양이온, 특히 PEI,는 유전자 형질감염용 약물로서 광범위하게 연구되고 있다. 최적 형질감염 효능은 중합체성 나노입자 착물이 전반적으로 양전하를 보유할 때 얻어지며, 이는 양전하들이 세포 표면 상의 음으로 하전된 heparin 설페이트 프로테오글리칸에 결합되게 한다 [28]. 이전의 연구들은 선형 PEI (LPEI)가 분기된 PEI(brPEI)에 비하여 유전자 형질감염에서 더욱 효과적이라는 것을 보여주었으나[29-31] [32, 33, WO 2010/073247],

LPEI는 더 높은 양전하를 지니고 있어 더 독성이 강하다. 양전하를 적게 하여 독성을 적게 하려는 노력의 일환으로 PEG [12], 폴리-(에틸렌 옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드)-폴리(에틸렌 옥사이드)(PEO-PP0-PEO) [18, 34] 및 폴리(에틸렌 옥사이드) [35]와 같은 다양한 차단 성분들이 양이온성 중합체에 콘쥬게이트되었다. 실제로, PEI를 다양한 길이의 PEG 기를 사용하여 차단하는 것은 형질감염 효율을 유지하면서 현저하게 독성을 낮추었다 [12, 13, 36].

[0015] LPEI를 PEG_{2k}와 콘쥬게이트하는 것은 PEG_{2k}에 대하여 다양한 비율의 LPEI를 포함하는 디콘쥬게이트 공중합체를 얻는 것을 본 발명에 의해 밝혀내었다. 이들 디콘쥬게이트는 전하에서의 차이로 인하여 양이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 서로 분리될 수 있었고, 이는 콘쥬게이트된 PEG_{2k} 기의 상이한 수를 반영한다. ¹H-NMR 분석으로 디콘쥬게이트는 LPEI 단위당 PEG_{2k} 단위의 평균 개수에서 서로 상이한 것이 확인되었고, 디콘쥬게이트 1:1는 LPEI:PEG_{2k} 비가 1:1이고 또 디콘쥬게이트 1:3은 LPEI:PEG_{2k} 비가 1:3이었다. 정제된 디콘쥬게이트의 각각에 대한 Her-2 표적화 세포바디의 콘쥬게이션은 적정 분자량의 트리콘쥬게이트 생성물, 즉 디콘쥬게이트 1:1로부터는 LPEI:PEG_{2k}:Her-2 가 1:1:1인 "트리콘쥬게이트 1:1" 을 얻었고 또 디콘쥬게이트 1:3으로부터는 비율이 1:3:3인 "트리콘쥬게이트 1:3" 을 얻었다. 이러한 프로토콜은 LPEI-PEG에 대한 표적화 세포바디의 거의 완전한 콘쥬게이션을 재현가능한 방식으로 가능하게 하여 균일 생성물을 수득할 수 있게 하였다.

[0016] 본 발명자들은 폐길화가 디콘쥬게이트 또는 트리콘쥬게이트와 플라스미드 DNA와의 착화시 얻어지는 폴리플렉스 입자의 크기에 강한 영향을 준다는 것을 관찰하였다. 디콘쥬게이트 1:3 및 트리콘쥬게이트 1:3 폴리플렉스 모두는 디콘쥬게이트 1:1 및 트리콘쥬게이트 1:1 폴리플렉스보다 큰 평균 입자 크기를 가졌다. 본 발명자들은 단일 양이온성 사슬에 대한 폐길화 양의 증가는 입체 장애를 초래하여, 중합체성 사슬이 플라스미드 압축을 방해하여 더 작은 입자로 만든다고 믿고 있다. 이는 네이키드(naked) LPEI 폴리플렉스가 가장 작은 입자를 가졌다는 발견과 일치한다. 또한, 트리콘쥬게이트 1:1 및 1:3은 착화된 플라스미드를 DNase I로부터 보호하는 한편, 트리콘쥬게이트된 1:3 폴리플렉스는 증가된 입체 장애로 인하여 더욱 우수한 보호를 제공하였다.

[0017] 이전의 연구들은 양이온성 중합체에 콘쥬게이트된 PEG 단위의 분자량 증가는 핵산과의 착화시 얻어지는 폴리플렉스의 표면 전하 감소를 초래함을 제시하였다 [13]. 본 발명자의 데이터는 유사한 분자량의 PEG 기의 수를 증가시키는 것은 ζ 전위 분포에 의해 정의되는 바와 같이 감소된 표면 전하를 초래함을 보여준다. 실제로, 최고 표면 전하는 플라스미드와 착화된 네이키드 LPEI에 의해 나타났다. 이들 결과는 더 많은 중성 성분이 화학 벡터에 존재할 수록, 표면 전하가 더 적다는 아이디어를 지지한다. 놀랍게도, 세포바디에 콘쥬게이트된 트리콘쥬게이트 폴리플렉스는 디콘쥬게이트 폴리플렉스에 비하여 더 낮은 표면 전하를 가졌고, Her-2 세포바디(그 자체가 약간의 양전하를 가짐)는 또한 입자의 표면전하를 감소시킴을 나타낸다. 본 발명자들은 Her-2 세포바디가 표면 상의 전하를 마스킹하는 더 많은 표적화 부분을 갖는 입자의 지형을 변경하여, 표면 전하 감소를 초래할 것이라고 상정하였다.

[0018] 폴리플렉스의 형상은 약물 전달 후보자로서 성능에 현저한 효과를 갖지만 [37, 38], 어떤 폴리플렉스 형상이 효과적인 약물 전달에 바람직한지는 아직 알려져 있지 않다. 폴리플렉스 형상에 대한 폐길화의 효과는 본 발명자가 아는 한 현재까지 연구되어 있지 않다. AFM 사진에서, 트리콘쥬게이트 1:1 폴리플렉스 - 유전자 전달에 더욱 효과적이었음-는 형상 균일성을 나타낸 반면, 트리콘쥬게이트 1:3은 더욱 이질적이었고, 다수의 비대칭, 타원형 입자를 나타낸다.


[0019] 양이온성 중합체를 사용한 선택적 유전자 전달은 주요한 도전으로 남아있다. 이전의 연구들은 EGF 또는 트랜스페린을 사용한 LPEI 및 LPEI-PEG 콘쥬게이트의 표적화가 시험관 내 및 생체 내에서 선택성을 증가시켰고 비특이적 상호작용을 감소시킴을 나타내었다 [39, 40]. 예컨대, Her-2 표적화 트리콘쥬게이트 1:1 및 1:3 폴리플렉스의 선택성을 연구하기 위하여, 본 발명자들은 Her-2를 상이하게 발현하는 2개의 유방암 세포를 이용하였다. 루시페라제 활성 및 GFP 발현으로 표시되는 바와 같은 유전자 전달은, 세포 표면 상에서 Her-2 수용체를 100배 적게 발현하는 MDA-MB-231 세포에 비하여, Her-2 수용체를 고도로 과발현하는 BT474 세포에서 현저하게 더 높았다. 따라서, 상기 데이터들은 트리콘쥬게이트 1:1 및 1:3가 Her-2 과발현 세포에 대해 매우 선택적이라는 것을 나타내었다(도 10).

[0020] 이전의 연구들은 고도의 폐길화가 유전자 형질감염 감소를 초래할 수 있음을 밝혀내었다[41]. 이들 결과는 루시페라제 활성 및 GFP 발현에 표시되는 바와 같이 고도로 폐길화된 트리콘쥬게이트 1:3 폴리플렉스가 적게 폐길화된 트리콘쥬게이트 1:1 폴리플렉스에 비교하여 유전자 전달에서 현저한 감소를 나타내는 본 발명자들의 관찰에 따른 것이다. 적게 폐길화된 트리콘쥬게이트 1:1 폴리플렉스에 의한 유전자 전달 증가는 더 높은 표면 전하로

인한 약간의 세포 독성을 동반하였다.

- [0021] 본 연구에 참여하기 전의 본 발명자들의 작업 가설은 LPEI 단위당 표적화 부분의 수의 증가가 유전자 전달 및/또는 선택성 개선을 초래할 것이라는 것이었다. 본 발명자들은 LPEI 몰당 콘쥬게이트된 3 몰의 Her-2 에피바딘 분자를 갖는 트리콘쥬게이트 1:3는 증가된 수용체-매개입자 내재화를 나타낼 것이라고 추정하였다. 그러나, 트리콘쥬게이트 1:3 폴리플렉스는 더 낮은 ξ 전위, 더 큰 입자 크기 및 이질성, 비 구형 형상을 나타내었고, 이들 모든 특징은 실제로 관측된 형질감염 효율 감소에 기여할 수 있다. 본 발명자들의 결과는 적게 폐길화된 트리콘쥬게이트 1:1가 더 많이 폐길화된 트리콘쥬게이트 1:3에 비하여 Her-2 과발현 세포로 선택적이고 효율적인 유전자 전달을 매개하는 점에서 더 우수하다.
- [0022] LPEI-계 폴리플렉스의 폐길화가 표면 전하 전하, 폴리플렉스 크기 증가 및 형상 이질성 증가를 초래하였고, 또 이들 특성은 표적화된 유전자 전달에 대하여 심오한 효과를 가질 수 있음이 본 발명에 따라 밝혀졌다. 본 발명자들의 간단화된 합성은 균질 생성물의 정제를 재현가능한 방식으로 허용하므로, 지금은 다양한 표적화 부분을 사용하여 상이한 트리콘쥬게이트를 생성하는데까지 확대될 수 있다.
- [0023] 상기 측면에서, 일 양태에서 본 발명은 이중가닥 RNA(dsRNA) 및 중합체 콘쥬게이트의 폴리플렉스를 제공하며, 상기 중합체 콘쥬게이트는 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 부분에 공유결합된 선형 개선된 폴리에틸렌아민(LPEI)으로 구성되며, 각 PEG 부분은 암 항원에 결합할 수 있는 표적 부분에 링커를 통하여 콘쥬게이트되며, 다만 상기 표적 부분은 mEGF 또는 서열 YHWYGYTPQNVI(GE11)(SEQ ID NO: 1)의 펩티드가 아니다.
- [0024] 특정 구체예에서, 암 항원은, 비제한적으로, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2), 전립선 표면 막 항원(PSMA), 인슐린-유사 성장 인자 1 수용체(IGF1R), 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR), 혈소판-유래 성장 인자 수용체(PDGFR) 또는 섬유아세포 성장 인자 수용체(FGFR)일 수 있다. 표적 부분은 고유의(native), 천연 또는 변형 리간드 또는 그의 파라로그(paralog)이거나, 또는 암 항원의 어떤 하나에 대한 항체, 단일-사슬 가변 단편(scFv), 또는 항체 모방제(에피바딘)와 같은 비고유(non-native) 리간드일 수 있다. 에피바딘은 단백질 A의 Z 도메인(면역글로불린 G 결합 도메인)을 기본으로 하며 또 양친 단백질 도메인의 결합 활성에 관여된 2개의 알파-헬릭스에 위치한 13개의 아미노산의 무작위화에 의해 독특한 결합 특성을 획득한다.
- [0025] 특정 구체예에서, dsRNA는 폴리이노신산-폴리시티딜산 이중 가닥 RNA(폴리 I:C)이고, 중합체 콘쥬게이트는 1개의 PEG 부분(LPEI-PEG 1:1)에 또는 3개의 PEG 부분(LPEI-PEG 1:3)에 공유결합된 LPEI로 구성되며, 암 항원은 EGFR, HER2 또는 PSMA이다.
- [0026] PEG의 분자량은 2 내지 8 kDa 범위, 특히 2 kDa일 수 있고; LPEI의 분자량은 10 내지 30 kDa 범위, 특히 22 kDa이고; 또 본 발명의 폴리플렉스의 폴리IC는 각각 적어도 22개, 바람직하게는 적어도 45개 리보뉴클레오타이드를 포함하는 RNA 가닥들로 구성될 수 있다. 특정 구체예에서, 각 가닥은 20 내지 300 범위 내의 다수의 리보뉴클레오타이드를 갖는다.
- [0027] 특정 구체예에서, 하나 이상의 PEG 부분은 각각 독립적으로 LPEI와 함께 -NH-CO- 결합 및 링커와 함께 -NH-CO-, -CO-NH-, -S-C-, -S-S-, -O-CO- 또는 -CO-O-로부터 선택된 결합을 형성한다. 특히, 하나 이상의 PEG 부분의 각각의 하나는 LPEI 및 링커와 함께 -NH-CO- 결합을 형성한다.
- [0028] 특정 구체예에서, 상기 링커는 표적 부분과 함께 -S-S-, NH-CO-, -CO-NH-, -S-C-, O-CO-, -CO-O- 또는 우레아(-NH-CO-NH) 결합을 형성한다. 상기 링커는 -CO-R₂-R_x-R₃ 또는 3 내지 7개 아미노산 잔기로 구성된 펩티드 부분으로부터 선택될 수 있고,
- [0029] R₂는 (C₁-C₈)알킬렌, (C₂-C₈)알켄일렌, (C₂-C₈)알킨일렌, (C₆-C₁₀)아릴렌-디일, 또는 헤테로아릴렌디일로부터 선택되고;
- [0030] R_x는 존재하지 않거나 또는 -S-이며;



[0031] R₃은 존재하지 않거나 또는 화학식  이고;

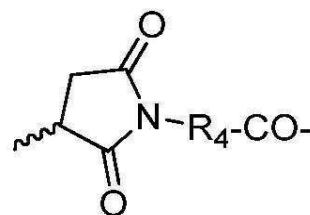
[0032] R₄는 (C₁-C₈)알킬렌, (C₂-C₈)알켄일렌, (C₂-C₈)알킨일렌, (C₁-C₈)알킬렌-(C₃-C₈) 시클로알킬렌, (C₂-C₈)알켄일렌-(C₃-C₈)시클로알킬렌, (C₂-C₈)알킨일렌-(C₃-C₈)시클로알킬렌, (C₆-C₁₀)아릴렌-디일, 헤테로아릴렌디일, (C₁-C₈)알킬렌-(C₆-C₁₀)아릴렌-디일, 또는 (C₁-C₈)알킬렌-헤테로아릴렌디일로부터 선택되고;

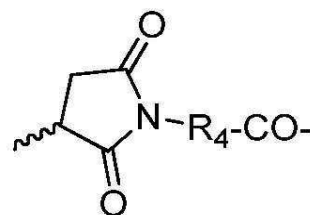
[0033] 상기 (C₁-C₈)알킬렌, (C₂-C₈)알켄일렌, 또는 (C₂-C₈)알킨일렌 각각은 할로젠, -COR₅, -COOR₅, -OCOOR₅, -OCON(R₅)₂, -CN, -NO₂, -SR₅, -OR₅, -N(R₅)₂, -CON(R₅)₂, -SO₂R₅, -SO₃H, -S(=O)R₅, (C₆-C₁₀)아릴, (C₄-C₄)알킬렌-(C₆-C₁₀)아릴, 헤테로아릴, 또는 (C₁-C₄)알킬렌-헤테로아릴로부터 각각 독립적으로 선택된 하나 이상의 기에 의해 경우에 따라 치환되고, 또 S, O 또는 N, 및/또는 -NH-CO-, -CO-NH-, -N(R₅)-, -N(C₆-C₁₀아릴)-, (C₆-C₁₀)아릴렌-디일, 또는 헤테로아릴렌디일로부터 각각 독립적으로 선택된 적어도 하나의 기로부터 선택된 하나 이상의 동일하거나 또는 상이한 헤테로원자에 의해 경우에 따라 추가적으로 중단(interrupted)되며; 또

[0034] R₅는 H 또는 (C₁-C₈)알킬이다.

[0035] 특정 구체예에서, R₂는 (C₁-C₈)알킬렌, 바람직하게는 (C₁-C₄)알킬렌으로부터 선택되며, 이들은 할로젠, -COH, -COOH, -OCOOH, -OCONH₂, -CN, -NO₂, -SH, -OH, -NH₂, -CONH₂, -SO₂H, -SO₃H, -S(=O)H, (C₆-C₁₀)아릴, (C₁-C₄)알킬렌-(C₆-C₁₀)아릴, 헤테로아릴, 또는 (C₁-C₄)알킬렌-헤테로아릴로부터 각각 독립적으로 선택된 하나 이상의 기에 의해 경우에 따라 치환되고, S, O 또는 N로부터 선택된 하나 이상의 동일하거나 또는 상이한 헤테로원자, 및/또는 -NH-CO-, -CO-NH-, -NH-, -N(C₁-C₈알킬)-, -N(C₆-C₁₀아릴)-, (C₆-C₁₀)아릴렌-디일, 또는 헤테로아릴렌디일로부터 각각 독립적으로 선택된 적어도 하나의 기에 의해 경우에 따라 추가로 분단된다. 특히, R₂는 (C₁-C₈)알킬렌, 바람직하게는 (C₁-C₄)알킬렌으로부터 선택된다.

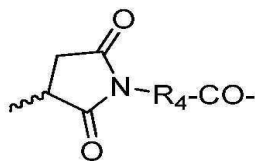
[0036] 특정 구체예에서, R_x는 -S-이다.



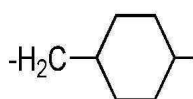
[0037] 특정 구체예에서, R₃은 부재하거나 또는  이고, 여기서

[0038] R₄는 (C₁-C₈)알킬렌-(C₃-C₈)시클로알킬렌, 바람직하게는 (C₁-C₄)알킬렌-(C₅-C₆)시클로알킬렌이다.

[0039] 특정 구체예에서, 상기 정의한 바와 같은 폴리플렉스에서, R₂는 -CH₂-CH₂- 이고; R_x는 -S- 이며; 또 R₃은 부재하



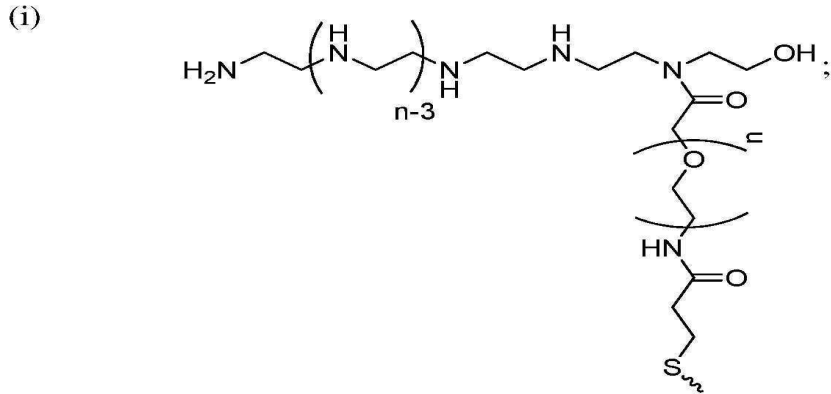
거나 또는  이며, 이때



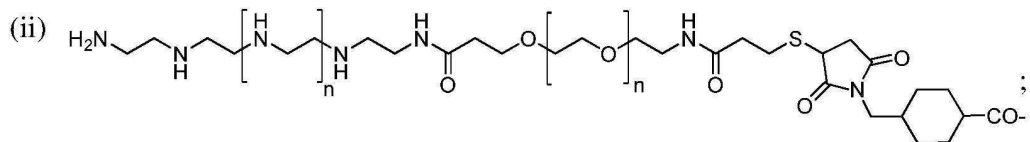
[0040] R₄는  이다.

[0041] 특정 구체예에서, 상기 링커는 페닐알라닌, 트립토판, 트립신 또는 호모페닐알라닌과 같은 적어도 하나, 특히 2 개 또는 3개의 방향족 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드 부분이다. 특정 구체예에서, 상기 펩티드 부분은 머캡 토기를 통하여 표적 부분에 결합된, $-(NH-(CH_2)_7-CO)-Phe-Gly-Trp-Trp-Gly-Cys-$ (SEQ ID NO: 2) 또는 $-(NH-(CH_2)_7-CO)-Phe-Phe-(NH-CH_2-CH(NH_2)-CO)-Asp-Cys-$ (SEQ ID NO: 3)이다.

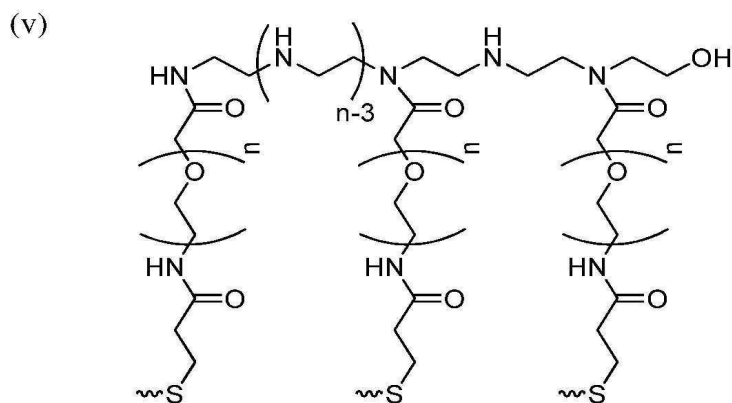
[0042] 특정 구체예에서, 상기 중합체 콘쥬게이트는 표적 부분/부분들에 결합된 화학식 (i) 내지 (viii)의 디콘쥬게이 트이다:



[0043]

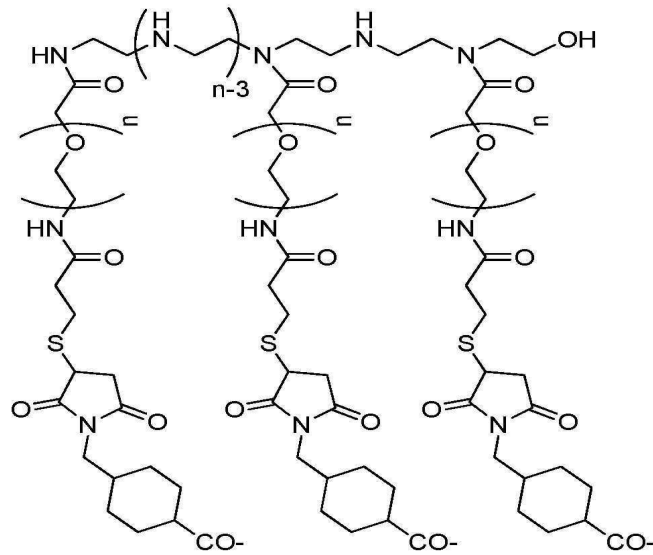


[0044]

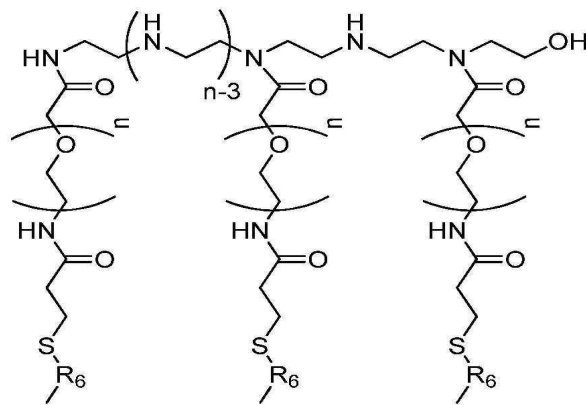


[0045]

(vi)



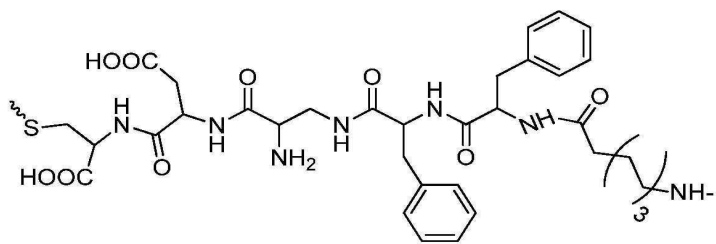
(vii)



[0046]

[0047]

식 중,

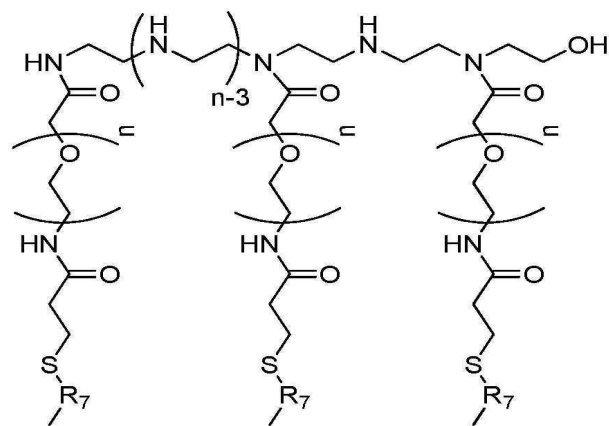


[0048]

R₆은

임; 또는

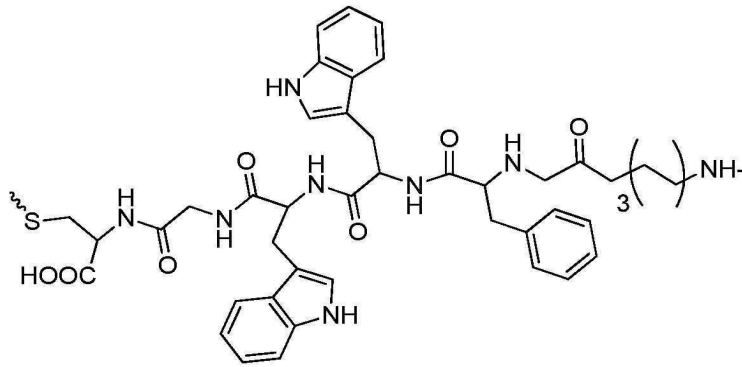
(viii)



[0049]

[0050]

식 중,



- [0051] R₇은 임.
- [0052] 특히 구체예에서, 폴리플렉스는 다음으로부터 선택된다:
- [0053] (a) 폴리플렉스, 여기서 표적 부분은 HER2 애피바디이고, 중합체 콘쥬게이트는 상기 화학식 (i)이며, 또 HER2 애피바디는 머캡토기를 통하여 연결되며, LPEI-PEG_{2k}-HER2라 칭함;
- [0054] (b) 폴리플렉스, 여기서 표적 부분은 HER2 애피바디이고, 중합체 콘쥬게이트는 상기 화학식(v)이며, 또 HER2 애피바디는 머캡토기를 통하여 연결됨, LPEI-(PEG_{2k}-HER2)₃라고도 칭함;
- [0055] (c) 폴리플렉스, 여기서 표적 부분은 EGFR 애피바디이고, 중합체 콘쥬게이트는 상기 화학식(i)이며, 또 EGFR 애피바디는 머캡토기를 통하여 연결됨, LPEI-PEG_{2k}-EGFR라고도 칭함;
- [0056] (d) 폴리플렉스, 여기서 표적 부분은 EGFR 애피바디이고, 중합체 콘쥬게이트는 상기 화학식(v)이며, 또 EGFR 애피바디는 머캡토기를 통하여 연결됨, LPEI-(PEG_{2k}-EGFR)₃라고도 칭함;
- [0057] (e) 폴리플렉스, 여기서 표적 부분은 인간 EGF(hEGF)이고, 중합체 콘쥬게이트는 상기 화학식(ii)이며, 여기서 hEGF는 아미노기를 통하여 연결됨, LPEI-PEG_{2k}-hEGF라고도 칭함;
- [0058] (f) 폴리플렉스, 여기서 표적 부분은 hEGF이고, 중합체 콘쥬게이트는 상기 화학식(vi)이며, 여기서 hEGF는 그의 아미노기를 통하여 연결됨, LPEI-(PEG_{2k}-hEGF)₃라고도 칭함;
- [0059] (g) 폴리플렉스, 여기서 표적 부분은 HOOC(CH₂)₂-CH(COOH)-NH-CO-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-(DUPA 잔기)이고, 또 중합체 콘쥬게이트는 상기 화학식(iii)임;
- [0060] (h) 폴리플렉스, 여기서 표적 부분은 HOOC(CH₂)₂-CH(COOH)-NH-CO-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-(DUPA 잔기)이고, 또 중합체 콘쥬게이트는 상기 화학식(vii)임;
- [0061] (i) 폴리플렉스, 여기서 표적 부분은 HOOC(CH₂)₂-CH(COOH)-NH-CO-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-(DUPA 잔기)이고, 또 중합체 콘쥬게이트는 상기 화학식(iv)임; 또는
- [0062] (j) 폴리플렉스, 여기서 표적 부분은 HOOC(CH₂)₂-CH(COOH)-NH-CO-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-(DUPA 잔기)이고, 또 중합체 콘쥬게이트는 상기 화학식(viii)임.
- [0063] 본 발명의 폴리플렉스에 의해 형성된 나노입자의 크기는 120 내지 150 nm 범위, 특히 135-148 nm, 또는 142nm일 수 있다.
- [0064] 본 발명에 사용된 중합체 콘쥬게이트의 제조를 위한 비제한적인 과정의 예는 이후의 실시예에서 설명한다.
- [0065] 특정 구체예에서, EGFR 애피바디는 SEQ ID NO:4에 기재된 아미노산 서열이고, HER2 애피바디는 SEQ ID NO: 5에 기재된 아미노산 서열이며 또 hEGF는 SEQ ID NO:6에 기재된 아미노산 서열이다.
- [0066] 다른 양태에서, 본 발명은 약학적으로 허용되는 담체 및 상기 정의한 바와 같은 폴리플렉스를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0067] 또 다른 양태에서, 본 발명은 EGFR-과발현 세포를 특징으로 하는 암, HER2-과발현 세포를 특징으로 하는 암 및 전립선암으로부터 선택된 암 치료에 사용하기 위한 본 명세서에 정의된 바와 같은 본 발명의 폴리플렉스, 또는

폴리플렉스를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

- [0068] 특정 구체예에서, EGFR-과발현 세포에 의해 특징화되는 암은 비-소세포-폐-암종, 유방암, 뇌교종, 머리 및 목 편평세포 암종, 대장암, 아테노암종, 난소암, 방광암 또는 전립선암, 및 그의 전이암으로부터 선택된다. 구체예에서, EGFR-과발현 세포에 의해 특징화되는 암 치료를 위한 폴리플렉스는 상기 정의된 (c), (d), (e) 또는 (f)의 폴리플렉스로부터 선택된다.
- [0069] 특정 구체예에서, HER2-과발현 세포를 특징으로 하는 암은 유방암, 난소암, 위암, 및 자궁 내막 암종과 같은 침습적 형태의 자궁암으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, Her2 과발현 세포는 헤르셉틴/트라스투주맙 (Herceptin/trastuzumab) 내성 세포이다. 따라서, 본 발명의 폴리플렉스는 헤르셉틴/트라스투주맙 내성 암, 즉, 헤르셉틴/트라스투주맙 노출에 대해 반응하지 않거나 적게 반응하는 세포를 포함하는 암의 치료에 사용할 수 있다.
- [0070] 특히, HER2-과발현 세포를 특징으로 하는 암의 치료를 위해 사용된 폴리플렉스는 상술한 폴리플렉스 (a), (b), (e) 또는 (f)로부터 선택된다.
- [0071] 특정 구체예에서, 상기 암은 전립선암이고 또 전립선암 치료에 사용된 폴리플렉스는 상기 정의된 (g), (h), (i) 또는 (j)로부터 선택된다.
- [0072] 더욱 다른 양태에서 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에게 본 명세서에 정의된 바와 같은 본 발명의 폴리플렉스를 투여하는 것을 포함하는, EGFR-과발현 세포를 특징으로 하는 암, HER2-과발현 세포를 특징으로 하는 암 및 전립선암으로 구성된 군으로부터 선택된 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0073] 다른 양태에서 본 발명은 EGFR-과발현 세포를 특징으로 하는 암, HER2-과발현 세포를 특징으로 하는 암 및 전립선암으로부터 선택된 암을 치료하기 위한 약학적으로 허용되는 담체 및 본 발명의 폴리플렉스를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0074] 또 다른 양태에서, 본 발명은 면역 세포와 함께 사용하기 위한 본 발명의 폴리플렉스, 본 발명의 방법 또는 본 발명의 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0075] 더 다른 양태에서, 본 발명은 상기 정의한 바와 같은 폴리플렉스에 관한 것이고, 여기서 dsRNA는 적절한 프로모터 및 터미네이터와 같은 요소를 제어하도록 제어가능하게 연결된(operably linked), 단백질-암호화 핵산 서열을 포함하는 플라스미드와 같은 DNA 분자에 의해 치환된다.
- [0076] 특정 구체예에서, 상기 면역 세포는 종양-침윤성(infiltrating) T-세포(T-TIL), 종양 특이적 엔지니어링된(specific engineered) T-세포, 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)이다.
- [0077] 본 발명에서 사용된 바와 같은 용어 "폴리플렉스"는 핵산과 중합체 사이의 착물을 지칭한다. 핵산은 비공유 또는 공유 결합, 특히 정전 결합을 통하여 중합체 결합된다. 용어 "폴리플렉스"는 벡터, 즉, 핵산을 세포로 전달하는데 유용한 비-바이러스성 벡터이다.
- [0078] 용어 "환자", "대상자", 또는 "개체"는 상호교환적으로 사용되며 인간 또는 비인간 동물을 지칭한다.
- [0079] 본 발명에서 사용된 바와 같은 용어 "(C₁-C₈)알킬"은 전형적으로 1-8개 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분기된 탄화수소 라디칼을 의미하며 또 예컨대 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, sec-부틸, 이소부틸, tert-부틸, n-펜틸, 2,2-디메틸프로필, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸, 등이다.
- [0080] 용어 "(C₁-C₈)알킬렌"은 1-8 개 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분기된 2가 탄화수소 라디칼을 지칭하며 예컨대, 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 부틸렌, 펜탄일렌, 헥산일렌, 헵탄일렌, 옥탄일렌, 등을 포함한다. 용어 "(C₂-C₁₂)알켄일렌" 및 "(C₂-C₈)알킨일렌"은 전형적으로 2-8 개 탄소 원자 및 하나 이상의 이중 또는 삼중 결합을 갖는 직쇄 또는 분기된 2가 탄화수소 라디칼을 각각 의미한다. 이러한 라디칼의 비제한적인 예는 에틸렌, 프로펜일렌, 1- 및 2-부텐일렌, 1- 및 2-펜텐일렌, 1-, 2- 및 3-헥센일렌, 1-, 2- 및 3-헵텐일렌, 1-, 2-, 3- 및 4-옥텐일렌, 에틴일렌, 프로핀일렌, 1- 및 2-부틴일렌, 2-메틸프로필렌, 1- 및 2-펜틴일렌, 2-메틸부틸렌, 1-, 2- 및 3-헥신일렌, 1-, 2- 및 3-헵틴일렌, 1-, 2-, 3- 및 4-옥틴일렌 등을 포함한다.
- [0081] 용어 "(C₆-C₁₀)아릴"은 비제한적으로, 페닐 및 나프틸과 같은 단일 고리 또는 축합된 복수의 고리로 구성된 6-10개 탄소 원자를 갖는 방향족 카보시클릭기를 의미한다; 용어 "(C₆-C₁₀)아릴렌-디일"은 비제한적으로, 페닐렌

및 나프틸렌과 같은 단일 고리 또는 축합된 복수의 고리로 구성된 6-10 개 탄소 원자를 갖는 2가 방향족 카보시클릭기를 의미한다.

[0082] 용어 “헤테로아릴”은 N, O, 또는 S로부터 선택된 1 내지 3개, 바람직하게는 1-2개의 헤테로원자를 함유하는 5-10-원 모노- 또는 폴리-시클릭 헤테로방향족 고리로부터 유래한 라디칼을 지칭한다. 모노-시클릭 헤테로아릴의 예는, 비제한적으로, 피롤릴, 푸릴, 티엔일, 티아진일, 피라졸릴, 피라진일, 이미다졸릴, 옥사졸릴, 이소옥사졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 피리딜, 피리미딘일, 1,2,3-트리아진일, 1,3,4-트리아진일, 및 1,3,5-트리아진일을 포함한다. 폴리시클릭 헤테로아릴 라디칼은 비제한적으로, 벤조푸릴, 이소벤조푸릴, 벤조티엔일, 인돌릴, 퀴놀린일, 이소퀴놀린일, 이미다조[1,2-a]피리딜, 벤즈이미다졸릴, 벤즈티아졸릴, 벤즈옥사졸릴, 피리도[1,2-a]피리미딘일 및 1,3-벤조디옥신일과 같은 2개 고리로 바람직하게 구성된다. 헤테로아릴은 할로젠, -OH, -COOH, -CN, -NO₂, -SH, 또는 -CONH₂로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기에 의해 경우에 따라 치환될 수 있다. 폴리시클릭 헤테로아릴이 치환되면, 그 치환은 카보시클릭 및/또는 헤테로시클릭 고리 중의 어느 것에 존재한다. 용어 “헤테로아릴렌디일”은 본 발명에 정의된 바와 같이 고리 원자의 어느 것으로부터 2개 수소 원자를 제거하는 것에 의해 “헤테로아릴”로부터 유래한 2가 라디칼을 의미한다.

[0083] 본 발명에서 사용된 바와 같은 용어 “할로젠”은 플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오드를 지칭한다.

[0084] 용어 “(C₃-C₈)시클로알킬렌”은 3 내지 8개 탄소원자를 함유하는 모노- 또는 바이-시클릭 포화 2가 시클릭 탄화수소 라디칼을 의미한다. 이러한 라디칼의 비제한적인 예는 1,2-시클로프로판-디일, 1,2-시클로부탄-디일, 1,3-시클로부탄-디일, 1,2-시클로펜탄-디일, 1,3-시클로펜탄-디일, 1,2-시클로헥산-디일, 1,3-시클로헥산-디일, 1,4-시클로헥산-디일, 1,2-시클로헵탄-디일, 1,3-시클로헵탄-디일, 1,4-시클로헵탄-디일, 1,2-시클로옥탄-디일, 1,3-시클로옥탄-디일, 1,4-시클로옥탄-디일, 1,5-시클로옥탄-디일 등을 포함한다.

[0085] 본 발명에서 사용된 바와 같은 용어 “아미노산 잔기”는 L- 및 D-입체이성질체 중의 천연 또는 합성, 즉, 비-천연, 아미노산 잔기를 지칭한다. 천연 아미노산은 전형적으로 단백질에서 생기는 20개 아미노산 잔기 중의 하나이며, 용어 합성/비-천연 아미노산은 임의 아미노산, 변형 아미노산 및/또는 20개 천연 아미노산의 하나가 아닌 그의 유사체이다. 천연 아미노산의 비제한적인 예는 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 리신, 발린, 페닐알라닌, 글루탐산, 아스파탐산, 아스파라긴, 글루타민, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 세린, 트립신, 메티오닌, 트레오닌, 및 트립토판을 포함한다. 비-천연 아미노산의 예는, 비제한적으로, 오르니틴, 호모리신, 2,4-디아미노부티르산(DABA), 2,3-디아미노프로피온산(DAP), 8-아미노옥탄산(EAO), 호모페닐알라닌, 호모발린, 호모류신 등을 포함한다.

[0086] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 사용하여 통상의 방법으로 제형화될 수 있다. 담체는 조성물의 성분과 상용성의 의미에서 “허용가능”해야 하고 또 그의 수용자에게 유해하지 않아야 한다.

[0087] 담체의 이하의 예, 투여 양식, 투여 형태, 등은 본 발명에 따라 담체, 투여 양식, 투여 형태, 등이 선택될 수 있는 만큼 당업자에게 공지되어 있다. 그러나, 당업자들은 소정 제형 및 투여 양식은 소망하는 결과를 달성하는지 여부를 결정하기 위해 먼저 시험되어야 함을 잘 이해할 것이다.

[0088] 투여 형태는, 비제한적으로, 비경구, 예컨대, 정맥내, 복강내, 근육내, 피하, 점막(예컨대, 경구, 경비, 볼, 질, 직장, 안구내), 척추강내, 국소 및 피내 경로를 포함한다. 투여는 전신적 또는 부분적일 수 있다. 특정 구제에서, 약학적 조성물은 뇌 내부 투여에 적합하다.

[0089] 용어 “담체”는 활성제와 함께 투여되는, 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클(vehicle)을 지칭한다. 약학적 조성물 중의 담체는 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈(폴리비돈 또는 포비돈), 검 트라가칸트, 젤라틴, 녹말, 락토오스 또는 락토오스 일수염과 같은 결합제; 알긴산, 옥수수 녹말 등과 같은 붕해제; 마그네슘 스테아레이트 또는 소듐 라우릴 설페이트와 같은 윤활제 또는 계면활성제; 및 콜로이드성 실리콘 다이옥사이드와 같은 활택제(glidant)를 포함할 수 있다.

[0090] 상기 조성물은 비경구 투여 주사에 의한, 예컨대, 볼루스(bolus) 주사 또는 지속주입에 의한 비경구 투여 주사용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 예컨대, 앰플 또는 보존제가 부가된 다수회투여 용기와 같은 단위 투여 형태로 제공될 수 있다. 상기 조성물은 오일성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있고 또 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형제를 함유할 수 있다. 다르게는, 활성 성분은 적합한 비히클, 예컨대 멸균성 무-파이로겐 물을 사용하여 사용하기 전에 구성하기 위한 분말 형태일 수 있

다.

[0091] 흡입에 의해 투여하는 경우, 예컨대 경비 투여의 경우, 본 발명에 따른 조성물은 예컨대, 다이클로로다이플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 다이클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적합한 가스와 같은 적합한 추진제를 사용하여 가압 팩 또는 네블라이저로부터 에어로졸 분무 제공 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투여 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공하는 것에 의해 결정될 수 있다. 흡입기 또는 취분기(insufflator)에 사용하기 위한 예컨대 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는 상기 화합물 및 락토오스 또는 녹말과 같은 적합한 분말 베이스의 분말 혼합물을 함유하여 제형화될 수 있다.

[0092] 특정 구체예에서, 상기 약학적 조성물은 상기 기재된 바와 같은 공지 방법에 의한 투여를 위해 제형화된다. 고려할 수 있는 특정 투여 형태는 정맥 및 뇌 내부(대뇌내) 투여일 수 있다.

[0093] 상기 정의된 구체예의 어느 하나에 따른 약학적 조성물은 정맥, 뇌 내부 (대뇌내), 경구, 피내, 근육내, 피하, 경피, 경점막, 경비 또는 안구내 투여를 위해 제형화된다.

[0094] 본 발명은 이하의 비제한적인 예에 의해 상세하게 설명될 것이다.

[0095] 실시예

[0096] 재료 및 방법(M&M)

[0097] 화학물질

[0098] 분자량 ~2 kDa의 NHS-PEG-OPSS(오르토-피리디다일설파이드-폴리에틸렌 글리콜-N-히드록시숙신이미드 에스테르), 별칭 PDP-PEG-NHS(PDP: 피리딜 디티오 프로피오네이트)는 Creative PEGworks (미국 윈스턴 소재)로부터 구입하였다. 폴리(2-에틸-2-옥사졸린), 평균 분자량(Mn) ~50 kDa, 및 무수 디메틸설폭사이드(DMSO)는 시그마 알드리치(이스라엘)로부터 구입하였다. 무수 에탄올은 로미칼(이스라엘)로부터 구입하였다. 모든 용매는 추가의 정제없이 사용하였다.

[0099] ~22 kDa LPEI(프리 베이스 형태)의 합성

[0100] 양이온성 중합체 선형 개선된 폴리에틸렌이민(LPEI)은 앞서 기재한 바와 같이 합성하였다[16]. 간단히, 8.0 g(0.16 mmols)의 폴리(2-에틸-2-옥사졸린)을 100 ml의 농축 HCl(37%)을 사용하여 가수분해시키고 또 48시간 동안 환류시켜, 백색 침전을 얻었다. 과량의 HCl을 감압하에서 제거하고 잔류하는 고형분은 50 ml의 물에 용해시키고 냉동건조시켰다(5 g, 78%, ¹H-NMR, D2O-d6, 400 MHz: 일중선 3.5 ppm). 생성한 LPEI 히드로클로라이드 염(4.5 g)은 수성 NaOH(3M)를 가하여 알칼리성으로 만들고, 생성한 백색 침전은 여과하고 중성으로 될 때까지 물로 세정하였다. 고형분을 물에 용해시키고 동결건조시켜 백색 고체를 수득하였다(2 g, 81%).

[0101] LPEI-PEG_{2k}-OPSS 디콘주게이트의 합성

[0102] 174 mg(8 μmol)의 LPEI를 2.7 ml의 무수 EtOH에 용해시키고 또 실온에서 15분간 교반하였다. 5배 물 과량의 OPSS-PEG_{2k}-CONHS(79 mg, 39.5 μmol)를 500 μl의 무수 DMSO에 용해시키고 또 소량씩 LPEI 혼합물에 도입하였다. 이 반응 혼합물을 주위 온도의 보르텍스 교반기 상에서 ~800 rpm으로 3시간 동안 교반하였다. 서로 다른 PEG-치환된 LPEI는 MacroPrep High S 수지(BioRad)가 충전된 HR10/10 컬럼을 이용하여 양이온-교환 크로마토그래피에 의해 분리하였다. 디콘주게이트의 용출 분획의 순도는 분석용 Vydac C-8 단량체성 5 μm 컬럼(300 Å, 4.6 x 150 mm)을 구비한 역상 HPLC를 이용하고, 5%-95% 아세토니트릴의 선형 구배를 이용하여 25 분간에 걸쳐 1 ml/min 유량으로 평가하였다. 95% 순도 또는 그 이상을 갖는 분획을 합쳤다. 합쳐진 분획은 20 mM HEPES pH 7.4에 대하여 투석시켰다. 디콘주게이트에서 LPEI에 콘주게이트된 PEG_{2k} 기의 비율은 ¹H-NMR에 의해 결정하였다. 폴리에틸렌 -(CH₂-CH₂-O)-으로부터 및 LPEI -(CH₂-CH₂-NH)-로부터 수소의 적산 값을 이용하여 2개 콘주게이트된 공중합체 사이의 비율을 결정하였다. 양이온 교환으로부터 얻은 다양한 생성물 중에서, 2개 생성물, LPEI-PEG_{2k}-OPSS(디콘주게이트 1:1, LPEI 대 PEG의 몰비 ~1:1) 및 LPEI-(PEG_{2k})₃-(OPSS)₃ (디콘주게이트 1:3, ~1:3의 몰비)를 트리콘주게이트 생성용으로 선택하였다. 구리 에세이(copper assay)를 이용하여 공중합체 농도를 평가하였다[17]. 간단히 말해, 공중합체를 CuSO₄ (100 ml의 아세테이트 완충액에 용해된 23 mg)와 함께 20분간 배양하고 이들의 285 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0103] **단백질의 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)**

[0104] 샘플(30 μ l) 100 mM DTT를 갖거나 갖지 않는 SDS 단백질 샘플 완충액에 희석시킨 다음 트리신(Tricine) 겔(13% 폴리아크릴아미드)에 적용하였다. 캐소드 완충액(0.1 M 트리스, 0.1 M 트리신 및 0.1% SDS pH 8.25) 및 애노드 완충액(0.21 M 트리스 pH 8.9)을 사용하여 전기영동을 실시하고, 단백질 밴드는 Instant블루™를 사용하여 염색하여 가시화하였다.

[0105] **애피바디 발현 및 정제**

[0106] Her-2 애피바디 유전자를 플라스미드 pET28a에 클로닝하여, N-말단 헥사히스티딘(His6) 태그 및 C 말단의 Cys 잔기에 융합된, Z:2891 애피바디를 암호화하는 벡터를 생성하였다. 상기 애피바디는 다음과 같이 대장균 E. coli BL21(DE3)에서 발현되었다: 세포를 OD600 ~ 0.7까지 37°C에서 성장시켰다. IPTG를 최종 농도 0.5 mM까지 부가한 다음, 30°C에서 4시간 동안 배양하였다. 세포 펠릿을 -80°C에서 저장하였다. 애피바디를 정제하기 위하여, 세포 펠릿을 완충액 A(20 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 10% 글리세롤, 10 mM 이미다졸 및 2 mM β -머캅도에탄올)에 재현탁시키고, 마이크로플루이다이저 프라세서(Microfluidizer Processor) M-110EHI를 이용하여 제조자의 지시에 따라 파쇄시켰다. 가용성 분획은 4°C에서 12,000 x g로 10분간 원심분리하는 것에 의해 회수하였다. 생성한 분획을 Ni 친화성 컬럼(Clontech, Mountain View, CA)에 로딩하였다. 컬럼을 14 컬럼 부피(cv) 동안 완충액 A를 사용하여 세정하였다. 이후, 증가하는 농도의 완충액 B(20 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 10% 글리세롤, 500 mM 이미다졸 및 2 mM β -머캅도에탄올); 5cv 동안 6% 완충액 B, 1.5cv 동안 10% 완충액 B, 2 cv 동안 30% 완충액 B)를 사용하여 단차 구배 용리를 실시하였다. 결합된 단백질은 5cv 동안 100% 완충액 B를 사용하여 용출시켰다(단백질 정제 시설, 이스라엘 윌프슨 센터). 용출된 분획은 아미콘 필터(Amicon filter)(3 kDa 컷오프)를 이용하여 농축시키고 또 겔 여과 컬럼 Superdex 30 prep 등급(120 ml)(GE 헬스케어) 상에 로딩하였다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE에 의해 더욱 분석하고 항-애피바디 항체(Abcam)를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 확인하였다. 순도는 앞서 기재한 바와 같은 역상 HPLC(Merck-Hitachi model L-7100)에 의해 더 평가하였다.

[0107] **PEI-PEG-리간드 애피바디(트리콘주게이트 1:1 및 1:3)의 합성**

[0108] 4.97 mg의 각 디콘주게이트(1:1 및 1:3)를 940 μ l 20 mM HEPES pH 7.4에 용해시켰다. 이어, HBS 중의 3.4 mg의 Her-2 애피바디를 반응에 적가하였다. 용해도 증가를 위해 4 ml의 20 mM HEPES와 700 μ l의 아세트니트릴(HPLC 등급)을 반응 혼합물에 도입하였다. A₃₄₃이 완전한 턴오버(turnover)를 나타낼 때까지 반응을 실온에서 더욱 보르텍스 처리(800 rpm)하였다. 생성한 트리콘주게이트는 MacroPrep High S 수지(BioRad)(20 mM HEPES pH 7.4 내지 3M NaCl 함유 20 mM HEPES의 3단계 구배 용리)가 충전된 HR10/10 컬럼 상에서 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 용출된 분획을 분석용 RP-HPLC에 도입하여 트리콘주게이트의 순도를 평가하고, 95% 이상의 순도를 갖는 분획을 합치고 -80°C에서 보관하였다. 트리콘주게이트의 농도는 구리 에세이(상술한 바와 같음)에 의해 결정하였다. 콘주게이트된 단백질의 양은 나노-Drop 2000을 이용한 A₂₈₀에 의해 결정하였다.

[0109] **표적화 단백질에 대해 콘주게이트된 화학적 벡터의 확인 및 순도**

[0110] 트리콘주게이트는 SDS-PAGE 상에서 전기영동처리하였고, 또 Instant블루™를 사용하여 염색하여 LPEI-PEG_{2k}에 대한 애피바디의 콘주게이션을 확인하였다. 트리콘주게이트의 순도는 분석용 Vydac C-8 단량체성 5 μ m 컬럼(300 Å, 4.6 x 150 mm)을 이용하는 역상 HPLC에 의해 220 nm에서 모니터링하면서 1 ml/분으로 확인하였다. 0.1% TFA를 함유하는 삼중 증류된 물(TDW)을 이동상으로 사용하여 25분간에 걸쳐 아세트니트릴, 5%-95%에 의한 구배 용리를 HPLC 분석에 사용하였다.

[0111] **폴리플렉스 형성**

[0112] 반디불이 루시페라제 및 GFP(System Biosciences, Inc)를 암호화하는 플라스미드 pGreenFire1를 대장균에서 증폭시키고, Qiagen 플라스미드 Maxi Kits(Qiagen, Valencia, CA, USA)에 의해 제조자의 지시에 따라서 정제하였다. 트리콘주게이트 1:1 또는 트리콘주게이트 1:3를 HEPES 완충액 글루코오스(LPEI로부터 N=질소 및 DNA로부터 P=포스페이트) 중에서 N/P=6 비율로 플라스미드와 착화하여 2개의 폴리플렉스를 생성하였다. 폴리플렉스 입자의 완전한 형성을 허용하기 위하여, 상기 샘플을 실온에서 30분간 배양하였다. 폴리플렉스 샘플에서 최종 플라스미드 농도는 100 μ g/ml이었던 반면에, DNase 보호 에세이 및 루시페라제 에세이의 경우, 플라스미드의 최종 농도는 10 μ g/ml이었다.

[0113] ζ-전위 및 크기 측정

[0114] HBG 완충액에 분산된 후 얻은 폴리플렉스 입자의 크기는 나노-ZS Zetasizer(Malvern, UK), 부피 분포 계산을 이용하는 다이나믹 광 산란에 의해 25℃에서 측정하였다. 상기 기구는 633 nm 레이저를 구비하며, 광 산란은 백(back) 산란 기술(NIBS, Non-Invasive Back-Scatter)에 의해 173°에서 검출되었다. 각 샘플은 3회 실험하였다. ζ 전위 측정은 Nano-ZS Zetasizer (Malvern, UK)를 이용하여 25℃에서 실시하였다. ζ 전위는 폴리플렉스 HBG 완충액(pH 7.4)에서 폴리플렉스를 배양한 후 평가하였다. 이동하는 입자로부터의 광 산란은 17°에서 검출하였고, 또 스몰루초우스키 모델(Smoluchowski Model)을 이용하여 헨리의 함수(Henry's function) 값을 결정하였다.

[0115] 원자력 현미경(AFM)

[0116] AFM 측정의 경우, 폴리플렉스를 새롭게 분쇄된 운모 디스크(V1 12mm, Ted Pella USA) 위에 위치시켰다. 영상처리는 HBG 완충액 중, 25℃에서 상업적 AFM인, NanoWizard® 3(JPK instrument, Berlin, Germany)를 이용하여 QI™ 모드로 실시하였다. 10 내지 30 pN nm⁻¹ 범위의 스프링 상수를 갖는 Si3N4 (MSNL-10 series, Bruker) 캔틸레버는 약 10%의 절대적 불확실성을 갖는 열적 변동 방법(AFM 소프트웨어에 포함됨)에 의해 계측하였다. QI™ 세팅은 다음과 같았다: Z-길이: 0.1 μm; 가해진 힘: 0.5 nN; 속도: 50 μm/s.

[0117] DNase 보호 에세이

[0118] DNase I 보호 에세이는 이전에 기재된 바와 같이 실시하였다[18]. 간단하게는, 1 μg의 pGreenFire1 DNA 단독을 폴리플렉스 1:1 또는 폴리플렉스 1:3와 HBS 용액 중에서 50 μl 최종 부피로 혼합하였다. 실온에서 30분간 배양한 후, 2 μL의 DNase I(2 단위) 또는 PBS를 10 μL의 각 샘플에 부가하였고 또 37℃에서 15분간 배양하였다. DNase I 활성은 실온에서 5 μL의 100 mM EDTA를 10분간 부가함으로써 종료되었다. 트리콘주게이트로부터 플라스미드를 분리하기 위하여, 10 μL의 5 mg/mL 헤파린(Sigma, St. Louis, MO)을 부가하고, 관들을 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 샘플을 0.8% 아가로오스 겔 상에 전기영동시키고 또 에티듐 브로마이드를 사용하여 염색하였다. Gel Doc EZ Imager(Bio Rad Laboratories, Inc)를 이용하여 영상을 얻었다.

[0119] 세포 배양

[0120] Her-2 과발현 BT474 세포는 10% 우태아 혈청(FBS), 10⁴ U/L 페니실린, 및 10 mg/L 스트렙토마이신이 보충된 RPMI 배지 중, 37℃에서 5% CO₂ 하에서 배양하였다. MDA-MB-231 인간 유방 암종 세포는 10% FBS, 10⁴ U/L 페니실린, 및 10 mg/L 스트렙토마이신이 보충된 Leibovitz L-15 배지 중, 37℃에서 CO₂ 없이 배양하였다. 세포주는 ATCC로부터 얻었고 또 세포 배양 시약은 바이올로지컬 인더스트리스(베트 햄메크, 이스라엘)로부터 입수하였다.

[0121] 루시페라제 에세이 및 공초점 현미경

[0122] 10000 BT474 및 MDA-MB-231 세포를 96-웰 플레이트에 플레이팅하는 것을 3회 반복하였다. 세포들을 플라스미드와 착화된 트리콘주게이트 1:1 및 트리콘주게이트 1:3과 48 시간 동안 처리하고, 처리한 후, 세포를 PBS로 세정하며 및 웰당 30 μl의 세포 용해 완충액(Promega, Mannheim, Germany)으로 용균시켰다. 루시페라제 활성은 루시페라제 에세이 시스템(Promega)을 이용하여 제조자의 추천에 따라서 용균물의 25 μl 샘플에서 측정하였다. Luminoskan™ Ascent 마이크로플레이트 루미노미터(Thermo Scientific)를 이용하여 측정을 실시하였다. 상대적 광 단위(RLU)에서의 값은 삼중 샘플의 루시페라제 활성의 평균 및 표준 편차로서 제공하였다. 공초점 현미경(FV-1200 Olympus)을 이용하여 GFP를 가시화하고, 이를 이용하여 플라스미드 pGreenFire1의 내재화를 반영하였다. 사진은 x10 배율로 찍었다.

[0123] 세포 생존성의 정량

[0124] 세포 생존성은 앞서 기재된 바와 같이 메틸렌 블루를 이용한 비색 에세이에 의해 측정하였다[19]. 간단하게는, 10000 BT474 및 MDA-MB-231 세포를 96-웰 플레이트에 플레이팅하는 것은 3회 실시하였다. 세포를 1 μg/ml pGreenFire1을 함유하는 폴리플렉스 1:1 및 1:3에 의해 처리하였다. 처리한 지 48 시간 후, 세포를 PBS(pH 7.4) 중의 1% 포름알데히드에 의해 고정시키고, DDW에 의해 세정한 다음 보레이트 완충액 중의 메틸렌 블루의 1%(wt/vol) 용액을 사용하여 염색하였다. 그후, 0.1 M HCl을 사용하여 염색을 추출하고 염색 용액의 광학 밀도를 마이크로플레이트 리더(ELx800 BIO-TEX instruments Inc.)로 630 nm에서 판독하였다.

[0125] 실시예 1 - 티올 반응성 공중합체의 합성

[0126] 3.1. 이전의 연구들은 LPEI의 폐길화 및 EGFR 표적화 부분에 대한 그의 콘쥬게이션을 나타내었다 [13]. 그러나, 단일 LPEI 사슬 상에서 폐길화의 양은 충분히 특징화되지 않았다. 상이하게 폐길화된 공중합체를 생성하기 위하여, LPEI 상의 이급 아민을 PEG 상의 보호기에 대해 직각인 말단 NHS 에스테르에 콘쥬게이트시켰다. N-히드록시숙신이미드(NHS) 에스테르는 LPEI의 골격 이급 아민과 자연히 반응성이어서, 효과적인 LPEI의 폐길화를 제공한다. 또한, NHS-PEG OPSS와 PEI의 아민과의 반응은 안정한, 비가역적 아마이드 결합의 형성을 초래한다(도 1).

[0127] 상기 폐길화 생성물은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 2개의 피크는 고농도의 NaCl에서 용출되었고, 하나는 120 mS/cm에서 또 나머지 하나는 132 mS/cm에서 용출되었다(테이터는 도시하지 않음). 2개 생성물은 LPEI:PEG 비율에서, 따라서 이들의 네트 양전하면에서 상이한 것으로 보여진다. ¹H-NMR 스펙트럼은 PEG(-CH₂-CH₂-O-) 상의 수소 원자의 상대적 적분 값(도 2) 및 LPEI(-CH₂-CH₂-NH-) 상의 수소 원자의 적분 값(도 2)을 이용하여 분석하였다. 이 분석은 제1 피크에서 용출된 물질은 각 물의 LPEI가 3몰의 PEG에 콘쥬게이트된 공중합체로 구성되어 있음을 나타내었다. 상기 생성물을 LPEI-(PEG_{2k})₃-(OPSS)₃ (“디콘쥬게이트 1:3”)이라 칭한다. 두 번째 피크는 동 물의 PEG가 LPEI에 콘쥬게이트된 공중합체로 구성되며, LPEI-PEG_{2k}-OPSS(“디콘쥬게이트 1:1”)(도 2)이라 칭한다.

[0128] 실시예 2. 트리콘쥬게이트, LPEI-PEG_{2k}-Her2 애포바디(트리콘쥬게이트 1:1) 및 LPEI-(PEG_{2k})₃-(Her2)₃ 애포바디(트리콘쥬게이트 1:3)의 합성

[0129] 본 연구의 주요 목적은 Her-2 과발현 종양 세포를 표적화할 양이온성 중합체를 개발하는 것이었다. Her-2는 “희귀 수용체”이기 때문에, Her-2 수용체(리간드 보다는)를 표적화하는 애포바디 분자를 사용하여 Her-2 표적화 트리콘쥬게이트를 생성하였다. 본 발명자들은 C-말단에 Cys 잔기를 갖는 Her-2 애포바디를 발현시키고 정제하여 더 콘쥬게이트되게 하였다. 티올 반응성 공중합체, 디콘쥬게이트 1:1 및 1:3을 말단 Cys 잔기를 통하여 Her-2 애포바디에 콘쥬게이트하여, 트리콘쥬게이트 1:1 및 1:3을 각각 생성하였다(도 3). 트리콘쥬게이트를 생성하기 위하여, 반응은 저농도의 애포바디(응집을 방지하기 위하여)를 이용하여 실시되어야 하며 또 용해도 증가를 위해 유기 극성 용매인 10% 아세토니트릴(ACN) 존재하에서 실시되어야 한다. 양쪽 트리콘쥬게이트 반응에 대한 반응 수율은 구리 에세이에 의해 결정되는 바와 같이 약 33%이었다. 디콘쥬게이트에 대한 애포바디의 콘쥬게이션을 확인하기 위하여, 트리콘쥬게이트 생성물은 DTT에 의해 환원시키고 또 SDS-PAGE 상에서 분리하였다. 코마씨 블루 염색은 환원된 트리콘쥬게이트가 애포바디를 방출하였음을 확인시켜 주었다(도 4). 트리콘쥬게이트에 존재하는 Her-2 애포바디의 양은 A₂₈₀ 을 측정하는 것에 의해 결정하였다. 구리 에세이를 이용하여, 본 발명자들은 LPEI를 정량하였다. 상술한 바와 같이, ¹H-NMR 분석은 정제된 디콘쥬게이트에서 LPEI:PEG의 비가 1:1 또는 1:3이라는 것을 나타내었다. Her-2 애포바디 및 LPEI의 물비를 비교하여, 본 발명자들은 트리콘쥬게이트 1:1 중에서 LPEI에 대한 Her-2 애포바디의 비율이 1:1이고 또 트리콘쥬게이트 1:3 중에서 상기 평균 비가 3:1이라는 것을 측정하였다. 따라서 본 발명자들은 LPEI-PEG에 대한 애포바디의 거의 완전한 콘쥬게이션을 달성한 것으로 판단하였다.

[0130] 폴리플렉스를 생성하기 위하여, 순수한 디콘쥬게이트 및 트리콘쥬게이트(1:1 및 1:3)는 재료 및 방법에서 기재한 바와 같이 플라스미드 DNA와 착화되었다(도 3).

[0131] 실시예 3. 폴리플렉스의 ζ 전위 및 크기

[0132] 본 발명자들은 다이나믹 광 산란(DLS)을 이용하여 폴리플렉스 크기 및 표면 전하에 대하여 특징화하였다. 폴리플렉스의 크기는 그의 전달 특성에 현저한 효과를 갖는다 [21]. 폴리플렉스의 크기에 대한 표적화 리간드의 효과를 조사하기 위하여, 디콘쥬게이트 1:1 및 1:3를 플라스미드와 착화시켜 이들의 크기를 측정하기로 결정하였다. 디콘쥬게이트 1:1은 115.2 ± 8.2 nm의 평균 입자 크기를 갖고 또 디콘쥬게이트 1:3는 253.1 ± 9.5 nm의 평균 입자 크기를 갖는다. 트리콘쥬게이트 1:1와 플라스미드로부터 생성된 폴리플렉스는 141 ± 5.8 nm의 평균 입자 크기를 가진 반면에, 플라스미드와 착화된 트리콘쥬게이트 1:3은 256 ± 24.2 nm의 평균 입자 크기를 가졌다(도 5). 가장 작은 입자(73.9 ± 3.0 nm)는 플라스미드를 LPEI 단독과 착화하는 것에 의해 생성한 폴리플렉스에서 얻어졌다. 디콘쥬게이트에 애포바디를 콘쥬게이트하는 것은 입자 크기에 대하여 최소의 효과를 가졌다. 그러나, PEG 기의 개수는 입자 크기에 영향을 주므로, PEG 기가 플라스미드 농축을 방해하는 입체 장애를 유발하는 것으로 추정된다.

[0133] 양성의 표면 전하는 음으로 하전된 세포 표면에 대한 폴리플렉스 결합을 촉진하지만, 과도한 양전하는 비특이적 결합 및 현저한 독성을 초래한다[12]. 도 6에 도시된 다양한 착물의 ξ 전위는 이전의 연구와 일치하며, 이는 PEG 단위 증가에 따른 ξ 전위 감소를 나타내었다 [13]. 본 발명자들의 화학적 벡터의 표면 전하에 대한 PEG 기의 효과를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 플라스미드 DNA와 전구체, 디콘주게이트 1:1 및 1:3, 및 트리콘주게이트 1:1 및 1:3와의 착화에 의해 형성된 폴리플렉스의 ξ 전위를 측정하였다. 디콘주게이트 폴리플렉스 1:1은 27.0 ± 0.1 mV의 평균 ξ 전위를 가졌고 또 디콘주게이트 폴리플렉스 1:3은 20.0 ± 1.0 mV의 평균 ξ 전위를 가졌다. 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:1은 평균 17.1 ± 0.7 mV의 ξ 전위를 가진 반면에, 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:3은 10.2 ± 0.44 mV의 ξ 전위를 가졌다(도 6). 크기와 달리, 폴리플렉스의 ξ 전위는 PEG 기의 개수 및 Her-2 애퍼바디의 콘주게이션에 의해 영향을 받는다. 가장 사이즈가 작지만, 대부분의 양으로 하전된 폴리플렉스는 네이키드 LPEI에 의해 얻어졌고, 이들 입자는 극히 독성이다[22]. 본 발명자들은 PEG 기 및 표적화 부분의 부가가 독성을 감소시킬 것이라 예상하였지만, 폴리플렉스는 여전히 비교적 크기가 소형이기 때문에, 본 발명자들은 핵산 전달 벡터로서의 이들의 효율은 상충되지 않을 것이라 희망하였다.

[0134] **실시예 4. 원자력 현미경을 이용한 폴리플렉스 형상의 평가**

[0135] 입자 형상 및 전달 특성에 대한 그의 영향에 대한 중요성이 인식되고 있다 [23]. 본 발명자들은 용액 중에 트리콘주게이트와 함께 얻어진 폴리플렉스의 형태를 원자력 현미경(AFM)을 이용하여 분석하였다. 트리콘주게이트 1:1 및 1:3 폴리플렉스의 직경은 나노-크기 범위(도 7a-b)였고, 이는 DLS에 의해 얻어진 결과와 일치하였다. 트리콘주게이트 1:1 폴리플렉스는 주로 타원형 입자를 나타내었다. 대부분의 입자들은 101 nm 내지 178 nm 범위의 직경을 갖고, 평균 입자 직경은 142 nm이었다. 일부 입자들은 >250 nm에 달하는 초대형이었다(도 7a). 트리콘주게이트 1:3 폴리플렉스는 더욱 이질적 형상이고, 또한 규정되지 않은 입자 형상을 갖는 대형 응집물을 얻었다(도 7b). 이들은 150 nm 내지 650 nm 길이이고, 평균 입자 길이는 312 nm이며 또 이들의 폭은 85 nm 내지 400 nm이었으며, 평균 폭은 175 nm이었다.

[0136] **실시예 5. DNase 보호 에세이.**

[0137] 성공적인 생체 내 유전자 전달은 뉴클레아제로부터 효과적인 보호에 따라 달라진다. 플라스미드를 분해로부터 보호하여 효과적인 유전자 전달을 가능하게 하는 트리콘주게이트의 능력을 결정하기 위하여, 폴리플렉스를 DNase I로 처리하고 겔 전기 영동을 이용하여 분석하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, 네이키드 플라스미드 pGreenFire1 DNA는 2 단위의 DNase I와 10분간 배양한 후 완전히 분해되었다. 대조적으로, 플라스미드를 트리콘주게이트와 혼합하는 것에 의해 폴리플렉스를 생성하였을 때, 플라스미드는 DNase I에 의한 분해로부터 보호되었다. 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:3에 대해 플라스미드의 완전한 보호가 관찰되는 한편, 플라스미드가 초나선(s.c.)으로부터 개방 환형(o.c.) 형태로 변동되는 것에 의해 나타나는 바와 같이 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:1에 대해서는 일부 니킹(nicking)이 일어나지 않았다. 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:3에 의해 전달된 DNase I로부터 더 강한 보호는 이들 착물에서 부가적 PEG-단백질 단위에 의해 제공된 입체 장해 증가에 기인한 것일 수 있다. 실제로, 이전의 연구들은 PEI의 폐길화가, 효소와 혈청 인자들과의 상호작용을 방해하는 것에 의해, 폴리플렉스를 안정화할 수 있고 또 혈액에서 순환을 증가시킬 수 있음을 밝혔다[24, 25].

[0138] **실시예 6. 표적화 트리콘주게이트 폴리플렉스의 생물학적 활성**

[0139] 폴리플렉스 크기 및 ξ 전위는 표적화된 DNA 전달 및 유전자 발현의 효율에 영향을 주지만, 크기의 효과는 특정 콘주게이트에 따라 달라지는 것으로 보인다 [2] [21]. 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:1 및 1:3의 형질감염의 특이성과 효율을 평가하기 위하여, Her-2를 상이하게 발현하는 2개의 유방암 세포주를 사용하였다. pGreenFire1을 사용하여 트리콘주게이트 1:1 및 1:3의 폴리플렉스를 형성하고 또 MDA-MB-231 세포(세포당 약 9×10^3 Her-2 수용체 발현[26]) 및 BT474 세포(세포당 약 1×10^6 Her-2 수용체 [27])에 형질감염시켰다. 형질감염된지 48시간 후 상이한 루시페라제 활성이 관찰되었다. 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:1 및 1:3는 MDA-MB-231에서보다 BT474 세포에서 300배 이상 더 높은 루시페라제 활성을 초래하였다(* $p < 0.001$)(도 9a). BT474에 대한 보다 효과적인 유전자 전달은 공초점 현미경에 의해 볼 수 있는 바와 같이 GFP 발현에 의해 확인되었다(도 9b). 이들 결과는 폴리플렉스 선택성이 Her-2 발현에 의존적이라는 것을 나타낸다.

[0140] 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:1에 의한 BT474 세포에 대한 표적화된 전달은, 트리콘주게이트 1:3가 더 많은 표적화 부분을 가지고 있지만, 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:3에 의한 전달에 비하여 10배 이상 효과적이었다(도 9a, b). 이는 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:1의 더 높은 ξ 전위 및 더 낮은 크기를 반영할 수 있다.

[0141] 양으로 하전된 LPEI-계 화학 벡터는 상당한 독성과 관련된다. 따라서, 본 발명자들은 트리콘주게이트 폴리플렉

스 1:1 및 1:3로 처리한 후 MDA-MB-231 및 BT474 세포의 생존을 시험하였다. 어떤 폴리플렉스도 메틸렌 블루 에세이에서 MDA-MB-231 세포에서의 세포독성 효과를 나타내지 않았다. 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:3로 처리된 BT474 세포에서 유사한 결과가 관찰되었다. 그러나, 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:1로 처리된 BT474에서 세포독성에서 약간의 증가가 관찰되었다(도 9c). 이들 결과는 모두 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:1의 소형 크기 및 높은 ζ 전위가 약간의 독성 증가만으로 효과적인 표적화된 전달 특성을 부여함을 나타낸다. 따라서, 트리콘주게이트 1:1의 폴리플렉스는 더 많이 차폐된(shielded) 트리콘주게이트 폴리플렉스 1:3에 비하여 유전자 전달에서 훨씬 우수하다.

[0142] **실시예 7. PEI-PEG-Her2에피바디의 항-종양 활성**

[0143] PolyInosine/PolyCytosine(폴리IC)과 함께 착화된 PEI-PEG-Her2에피바디(PPHA)는 강한 항-종양 활성을 갖는다. 유방암 세포주 과발현 Her-2는 PEI-PEG-Her2에피바디와 폴리IC의 착물에 의해 강하게 억제되는 것으로 밝혀졌다. 강한 억제는 트라스투주맵 내성 Her2 과발현 유방암 세포주에서 관찰되었다.

[0144] 도 10은 벡터/폴리플렉스가 헤르셉틴/트라스투주맵 내성 세포를 비롯한, Her2 과발현 세포를 억제함을 도시한다.

[0145] 0.5×10^6 MCF-7 HER-2 세포를 누드 마우스에 피하 주사하였다. 종양이 평균 100mm^3 에 도달한 후, 치료를 개시하였다. 1mg/kg pIC/PPHA를 24시간 마다 정맥 주사하였다. 트라스투주맵은 1주일에 한번씩 2 그룹의 마우스에 투여하였다(화살표로 표시). 1주일에 2회 종양 성장을 측정하였다. 착물 폴리IC/PPHA는 이들 세포주가 도 11에 예시된 바와 같이 누드 마우스에 이식된 마우스 모델에서 강한 항-종양 활성을 보유하는 것으로 밝혀졌다.

[0146] **실시예 8. LPEI-PEG-EGFR 에피바디의 합성**

[0147] 5 mg ($2 \times 10^{-4}\text{ mmol}$)의 LPEI-PEG_{2k}-OPSS (디콘주게이트 1:1)를 1 ml 20 mM HEPES pH 7.4에 용해시켰다. 이어, 3.4 mg ($3.8 \times 10^{-4}\text{ mmol}$, $\sim 2\text{ eq}$)의 EGFR 에피바디가 HBS에 용해된 것을 상기 반응에 적가하였다. 4 ml 의 20 mM HEPES 및 $700\text{ }\mu\text{l}$ 의 아세트니트릴(HPLC 등급)을, 용해도 증가를 위해, 반응 혼합물에 도입하였다. 이 반응을 실온 및 어두운 조건에서, A_{343} 이 완전한 턴오버를 나타낼 때까지, 보르텍스처리(800 rpm)하였다. 생성한 트리콘주게이트는 MacroPrep High S 수지(BioRad)가 충전된 HR10/10 컬럼 상에서 양이온 교환 크로마토그래피(20 mM HEPES pH 7.4에서 3 M NaCl을 함유하는 20 mM HEPES 까지 3단계 구배 용리를 이용)에 의해 정제하였다. 용출된 분획을 분석용 RP-HPLC에 도입하여 LPEI-PEG-EGFR 트리콘주게이트의 순도를 평가하며, 95% 이상의 순도를 갖는 분획을 합치고 -80°C 에서 보관하였다. 트리콘주게이트의 농도는 구리 에세이에 의해 결정하였다. 콘주게이트된 단백질의 양은 Nano-Drop 2000을 이용하여 A_{280} 에 의해 결정하였다.

[0148] **실시예 9. PEI-PEG-EGFR 에피바디의 항-종양 활성**

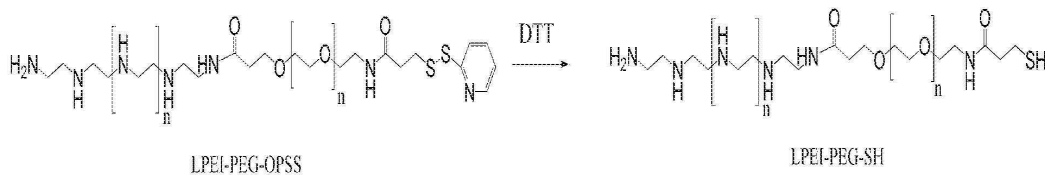
[0149] 폴리IC와 착화된 PEI-PEG-EGFR에피바디(PPEA)는 강한 항-종양 활성을 갖는다. EGFR을 과발현하는 다양한 세포주는 폴리이노신/폴리시토신 (폴리IC)과의 착물에서 PEI-PEG-EGFR에피바디(PPEA)의 착물에 의해 강하게 억제되는 것으로 밝혀졌다. PPEA의 효능은 PPE의 효능에 비하여 더 높은 것을 알 수 있다(도 12).

[0150] 착물 폴리IC/PPEA는 이들 세포주가 누드 마우스에 이식되어 있는 마우스 모델에서 강한 항-종양 활성을 보유하는 것으로 밝혀졌다.

[0151] 5주령의 65마리 자성 누드 마우스에 2백만 A431 세포를 주입하였다. 7일 후, 평균 부피 136 mm^3 의 종양을 성장시키고 마우스를 다음과 같이 6개 그룹(7-8 마리 마우스/그룹)으로 나누었다: UT; pIC/PPEA, 25 gr 마우스에 대해 $0.75\text{ mg/kg} = 250\mu\text{l}$ 의 pIC, 피내주사(IC), 6/주; pI/PPEA, 0.75 mg/kg 정맥내(IV), 6/주; pIC/PPEA 낮음, 25 gr 마우스에 대해 $0.1\text{ mg/kg} = 250\mu\text{l}$ 의 $0.01\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pf pIC 피내주사(IC), 6/주. pIC, pI 및 PPE 및 PPEA는 혼합하기 전에 희석하여 착물에서 pIC에 대한 보통 농도보다 더 낮은 농도($0.1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 얻었다. 도 13은 생체 내에서 폴리IC/PPE에피바디의 활성을 도시한다. 다시, PPEA/폴리IC의 효능은 폴리IC/PPE의 효능보다 더 높다.

[0152] **실시예 10. LPEI-PEG-h/mEGF의 합성**

[0153] 10.1. LPEI-PEG-SH 매개체의 합성



[0154]

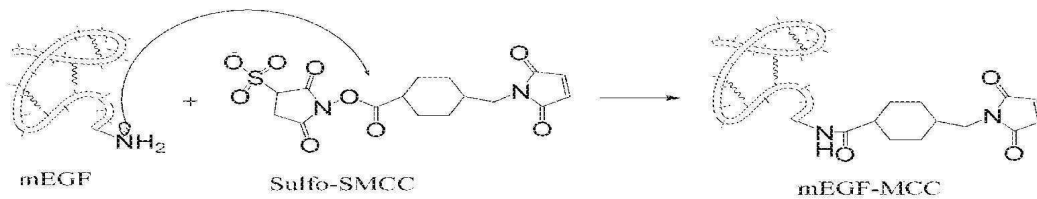
[0155] 5 ml의 20 mM HEPES(pH 7.4) 완충액 중의 5 mg의 LPEI-PEG-OPSS(0.2 μmol , 24000 g/mol에 따름)에 50-배 몰 과량의 디티오프레이톨(DTT; 0.1 mmol, 1.5 mg)을 부가하고 15 ml 플라스틱 원심분리관 중, 실온에서 20분간 보르텍스에 의해 혼합하였다. 환원된(reduced) 디콘주게이트는 5 ml 샘플 루프를 사용하여 Sephadex G-25 컬럼(20 ml, 4x5 ml) 상에서 분리하였고, 20 mM HEPES, pH 7.4를 사용하여 1.0 ml/min 유동속도로 용리를 실시하고, 상기 기재된 바와 동일한 조건 및 방법을 이용하여 HPLC에 의해 분석하였다.

[0156]

LPEI-PEG-SH 중간체 중의 설피하이드릴 기 농도를 평가하기 위하여 엘만 에세이(Ellman's assay)를 이용하였다. SH 기의 농도는 엘만 시약과 정량적으로 반응한 자유 티올에 의해 방출된 발색체 6-니트로-3-티옥소시클로헥산-1,4-디엔-1-카복실산의 농도에 직접적으로 비례한다. 상기 발색체는 샘플로부터 또는 엘만 시약으로부터 방해없이, 412 nm에서 흡광도를 통하여 측정하였다.

[0157]

10.2 m/hEGF-MCC 중간체의 합성



[0158]

[0159] **합성** **개요.** h/mEGF(인간/마우스 표피 성장 인자)를 h/mEGF-MCC(EGF-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실산; MCC)으로 변형시키고 또 나중에 사용되도록 LPEI-PEG-SH와 콘주게이션용으로 정제하였다. MCC 기를 부착하는 것에 의해 h/mEGF를 활성화하는 것은 DTT에 의한 단백질의 환원을 방해하여서 h/mEGF가 가혹한 조건에 노출되지 않게 한다. 이런 방식으로 콘주게이션 반응 효율이 개선되며, 또한 - EGF-MCC는 -80℃에서 수주간 저장될 수 있는 안정한 물질이다.

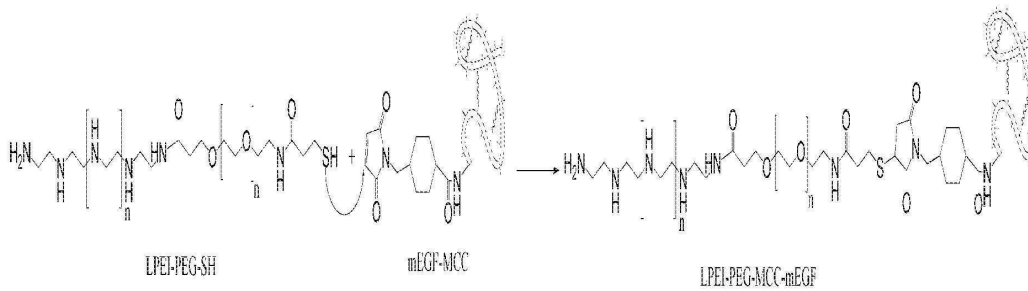
[0160]

hEGF-MCC의 합성: 0.5 ml 물에 1 mg의 hEGF(160 nmol)를 재구성시킨 다음, 아르곤을 사용하여 탈기시켰다. hEGF의 양은 Nano-drop 2000을 이용하여 280 nm에서 결정하였다. 상기 용액을 0.5 ml의 200 mM 소듐 아세테이트 완충액 pH 6.0, 및 60% 에탄올에 급격하게 혼합하면서 부가하였다. 상기 용액을 0.5 ml의 100 % 에탄올 중의 10 당량의 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실산 3-설포-N-히드록시숙신이미드 에스테르 소듐염(설포-SMCC)과 아르곤 하에서 혼합하였다. 약간 산성 pH의 반응 혼합물(pH 6)은 hEGF의 N-말단 아미노 기를 선택적으로 변형하는데 필요하다. 실온에서 4시간 후, 작용화된 펩티드를 HBS(100 mM)에 대해 투석 백(3.5k 컷오프)에 의해 1L로 1시간씩 3회 정제하였고, 이어 1 L로 철야로 정제하였다. hEGF-MCC는 HPLC-질량 스펙트럼(MS)을 이용하여 분석하였고 또 6435.7 g/mol의 분자량을 가졌고, 이는 hEGF에 대한 설포-SMCC의 1회 콘주게이션이 있음을 나타낸다. HPLC-MS 분석은 역상 C-18 컬럼(phenomenex, Aeris, 3.6 μm , 2.1 mm x 50 mm, 100 Å)를 구비한 Thermo SCIENTIFIC/LCQ FLEET를 이용하여 실시하였다.

[0161]

mEGF-MCC의 합성: 0.5 mg(0.088 μmol 총량)의 쥐의 EGF(PeproTech)를 2100 μL 의 20 mM HEPES 완충액에 용해시켜 투명한 점성 용액을 형성하였다. 1 mg의 설포-SMCC(30 당량, Ornat, IL)는 0.9 mL 무수 EtOH에 용해시키며 EGF 용액과 서서히 혼합하여 총 3.0 ml 부피 중 최종 농도 30% EtOH에 도달하였다. 잠시 혼합하여 투명 용액을 초래하였다. 반응 용기를 주위 온도에서 4시간 동안 진탕시켰다. 상기 시간 후, 용액은 투명하게 존재하였다. mEGF-MCC는 먼저 Sephadex G-25 컬럼(4x5 ml) 상에서 분리시키고 또 20 mM HEPES, pH 7.4를 사용하여 1.0 ml/min 유속으로 용리하고 또 LPEI-PEG-OPSS에 대해 상기 기재한 바와 같은 동일 조건 및 표준 방법을 이용하여 HPLC에 의해 더 정제하고 분석하였다.

10.3 LPEI-PEG-h/mEGF의 합성



1.5 당량의 hEGF-MCC 또는 mEGF-MCC를 1.0 당량의 LPEI-PEG-SH와 혼합하였다. 이 반응 혼합물을 실온에서 먼저 2시간 동안 진탕시킨 다음, +4℃에서 4일간 서서히 진탕시키면서 배양하였다. 반응 생성물(LPEI-PEG-hEGF 또는 LPEI-PEG-mEGF)은 A18 완충액 입구를 통하여 0.5 ml/min 유속으로 구매 펌프를 이용하고 또 용매 A: 20 mM HEPES pH 7.4 및 용매 B: 20 mM HEPES pH 7.4 NaCl 3.0 M를 사용하여 양이온-교환 크로마토그래피(10/1 cm Tricorn GE 헬스케어 컬럼 중의 7.8 cm MacroPrep High S 수지(BioRad))에 의해 분리하였다. 정제된 LPEI-PEG-hEGF 또는 LPEI-PEG-mEGF 트리콘주게이트는 HPLC에 의해 분석하고 또 “구리 에세이” 및 EGF 광도계 에세이에 의해 정량하여 [LPEI] 및 [EGF] 농도를 각각 측정하였다.

10.4 LPEI-PEG-hEGF의 생물학적 활성

세포 에세이를 이용하여 본 발명자들은 폴리IC/LPEI-PEG-hEGF 착물(PPEm)의 활성을 Schaffert D, Kiss M, Roedl W, Shir A, Levitzki A, Ogris M, Wagner E., 2011 (Poly(I:C)-mediated tumor growth suppression in EGF-receptor overexpressing tumors using EGF-polyethylene glycol-linear polyethylenimine as carrier. Pharm Res. 28:731-41에 기재된 폴리IC/mPPE(마우스)와 비교하였다. 신규 HEGF 콘주게이트는 EGFR 과발현 세포를 치사시키는데 더욱 효과적이라는 것을 알 수 있다(도 14). 표면 상에서 적당량의 EGFR 분자를 발현하는 세포(U87MG 세포는 세포당 80,000 EGFR를 발현한다)는 다량을 과발현하는 세포(U87MGwtEGFR 세포는 세포당 1,000,000 EGFR를 발현한다)에 비하여 처리에 덜 민감하다.

실시예 11. DUPA 유사체-DyLight 680의 합성

펩티드는 고상 지지체인 Fmoc-Cys(trt) wang 수지 상에서 표준 Fmoc 고상 펩티드 합성(SPPS) 과정을 이용하여 합성하였다. **평윤:** 상기 수지는 다이클로로메탄에서 적어도 2시간 동안 평윤시켰다. **Fmoc 제거:** 상기 수지를 디메틸포름아미드(DMF)(2 x 20 분) 중의 20% 피페리딘 용액으로 먼저 처리한 다음, DMF(5 x 2 분)으로 처리하였다. **Fmoc-Asp(OtBu)-OH의 커플링:** 3 당량의 Fmoc-Asp(OtBu)-OH, 3 당량의 (1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘 3-옥사이드 헥사플루오로포스페이트)(HATU)를 15 ml의 DMF에 용해시키고, 그 혼합물에 8 당량의 N,N-디이소프로필에틸아민(DIEA 또는 DIPEA)을 추가하였다. 상기 용액을 수지에 1시간 동안 부가하기 전에 실온에서 10분 동안 혼합(예비-활성화)하였다. 상기 커플링은 아스파탐산의 완전한 커플링을 보장하기 위하여 새로운 혼합물을 사용하여 2회 반복하였다. 완전한 커플링을 보증하도록 카이저 시험을 실시하였다. 상기 수지를 DMF(3 x 2 분) 및 다이클로로메탄(DCM)(2 x 2 분)을 사용하여 세정하였다. **캡핑(capping):** 상기 수지를 아세트산 무수물 (10 당량) 및 DIPEA(8 당량)이 DMF에서 용해된 용액으로 20분간 세정하고 또 DMF(3 x 2 분)에 의해 세정하였다. **Fmoc 제거:** 상기 수지를 20% 피페리딘이 DMF(2 x 20 분)에 용해된 용액으로 먼저 처리한 다음, DMF(5 x 2 분)으로 세정하였다. **Fmoc-디아미노프로피온(DAP)산의 커플링:** 3 당량의 Fmoc-디아미노프로피온(DAP)산, 3 당량의 HATU 및 8 당량의 DIEA를 15 ml의 DMF에 용해시켰다. 상기 용액은, 수지에 1시간 동안 부가하기 전에, 실온에서 10분간 혼합(예비-활성화)하였다. 완전한 커플링을 보증하도록 카이저 시험을 실시하였다. 상기 수지를 DMF(3 x 2 분) 및 DCM(2 x 2 분)으로 세정하였다. **펩티드 신장:** 다음 화합물을 하기 순서대로 수지에 커플링시켰다: (1) Fmoc-Phe-OH, (2) Fmoc-Phe-OH, (3) Fmoc-8-아미노옥탄(EAO)산, 및 (4) OtBu-Glu(Fmoc)-OH. **Fmoc 제거:** 상기 수지를 DMF(2 x 20 분)에 20% 피페리딘이 용해된 용액으로 처리한 다음, DMF(5 x 2 분) 및 DCM(3 x 2 분)으로 세정하였다. **DUPA 리간드의 커플링:** 0.9 ml의 트리에틸아민(6.6 mmol)을 15 mL DCM 중의 0.9 gr(3 mmol)의 L-글루탐산 디-tert-부틸 에스테르 히드로클로라이드와 조합하였다. 이 용액을 5 mL DCM 및 트리포스겐(0.35 g, 1.1 mmol)의 용액에 0℃에서 45분간 걸쳐 적가하였다. 부가적으로 50분간 교반한 후, 그 혼합물을 부가적 트리에틸아민 0.9 ml과 함께 수지에 부가하였다. 수지를 갖는 반응 혼합물을 3시간 동안 진탕시킨 다음 DMF(3 x 2 분)으로 세정하였다. **전체분해:** 상기 수지를 DCM(3 x 2 분)으로 세정하고 진공하에서 건조시켰다. 트리플루오로아세트산(TFA) 중에 2.5% TDW 및 2.5% 트라이소프로필실란이 용해된

용액을 0℃에서 부가하였다. 반응을 실온에서 4시간 동안 진행시키고, 여과하고, 에테르/헥산 1:1 냉각 용액으로 처리하며, 펩티드를 원심분리에 의해 침전시켰다. 조 펩티드를 아세토니트릴/TDW 1:1 용액에 용해시키고 동결건조시켰다. 조 생성물을 분취 역상(RP) HPLC에 의해 정제하였다. *DyLight 680* 커플링: 아르곤 분위기하에서, 1 mg의 DyLight™ 680(Life Technologies, Cat. No. 46418)를 50 당량의 무수 디이소프로필에틸아민을 함유하는 무수 디메틸 설펍사이드(DMSO; 100 μ l)에 용해시켰다. 무수 DMSO(100 μ l)에 용해된 2배 물과량의 DUP펩티드 링커를 상기 혼합물에 부가하고, 실온에서 교반하였다. 생성물의 형성은 액체 크로마토그래피-질량 분광계(LC-MS)에 의해 확인하였다. 조 DUPA 근적외선(NIR) 프로브는 분취 RP-HPLC에 의해 정제하였다.

[0169] **실시예 12. Dupa 유사체-약물 리드(Drug Lead)의 합성**

[0170] 고상 지지체로서 Fmoc-Cys(trt) wang 수지 상에서 표준 Fmoc SPPS 과정을 이용하여 펩티드를 합성하였다. *팽윤*: 상기 수지를 디클로로메탄에서 적어도 2시간 동안 팽윤시켰다. *Fmoc 제거*: 상기 수지를 DMF(2 x 20 분)에 20% 피페리딘이 용해된 용액으로 처리한 다음, DMF(5 x 2 분)으로 세정하였다. *Fmoc-Gly-OH의 커플링*: 3 당량의 Fmoc-Gly-OH, 및 3 당량의 HATU를 15 ml의 DMF에 용해시킨 다음, 8 당량의 DIEA를 부가하였다. 상기 용액을, 수지에 1시간 동안 부가하기 전에 실온에서 10분간 혼합(예비-활성화)하였다. 새로운 혼합물을 사용하여 상기 커플링을 2회 반복하였다. 완전한 커플링을 보증하도록 카이저 시험을 실시하였다. 상기 수지를 DMF(3 x 2 분) 및 DCM(2 x 2 분)으로 세정하였다. *캡핑*: 상기 수지를 무수 아세트산(10 당량) 및 DIPEA(8 당량)가 DMF에 용해된 용액으로 20분간 처리한 다음 DMF(3 x 2 분)로 세정하였다. *Fmoc 제거*: 상기 수지를 20% 피페리딘이 DMF(2 x 20 분)에 용해된 용액으로 처리한 다음, DMF(5 x 2 분)으로 세정하였다. *Fmoc-Trp(Boc)-OH의 커플링*: 3 당량의 Fmoc-Trp(Boc)-OH, 3 당량의 HATU 및 8 당량의 DIEA를 15 ml DMF에 용해시켰다. 이 용액을, 수지에 1시간 동안 부가하기 전에, 실온에서 10분간 혼합(예비-활성화)하였다. 완전한 커플링을 보증하도록 카이저 시험을 실시하였다. 상기 수지를 DMF(3 x 2 분) 및 DCM(2 x 2 분)으로 세정하였다. *펩티드 신장*: 이하의 화합물을 하기 순서대로 수지에 커플링하였다: (1) Fmoc-Trp(Boc)-OH, (2) Fmoc-Gly-OH, (3) Fmoc-Phe-OH, (4) Fmoc-8-아미노옥탄(EAO)산, 및 (5) OtBu-Glu(Fmoc)-OH. *Fmoc 제거*: 상기 수지를 20% 피페리딘이 DMF(2 x 20 분)에 용해된 용액으로 처리한 다음, DMF(5 x 2 분) 및 DCM(3 x 2 분)으로 세정하였다. *DUPA 리간드의 커플링*: 0.9 ml의 트리에틸아민(6.6 mmol)을 0.9 gr(3 mmol)의 L-글루탐산 디-tert부틸 에스테르 히드로클로라이드가 15 mL DCM에 용해된 용액과 혼합하였다. 이 용액을 5 mL DCM 및 트리포스젠(0.35 g, 1.1 mmol)의 용액에 0℃에서 45분간에 걸쳐 적가하였다. 부가적으로 50분간 더 교반한 후, 상기 혼합물을 부가적 0.9 ml의 트리에틸아민과 함께 수지에 부가하였다. 수지를 갖는 상기 반응 혼합물을 3시간 동안 진탕시킨 다음 DMF(3 x 2 분)으로 세정하였다. *전체 분해*: 상기 수지를 DCM(3 x 2 분)으로 세정하고 또 진공하에서 건조시켰다. 2.5% TDW 및 2.5% 트라이소프로필실란이 트리플루오로아세트산(TFA)에 용해된 용액을 0℃에서 부가하였다. 상기 반응을 실온에서 4시간 진행시키고, 여과하며, 에테르/헥산 1:1 냉각 용액으로 처리하고, DUPA 유사체 함유 펩티드를 원심분리에 의해 침전시켰다. 조 펩티드를 아세토니트릴/TDW 1:1 용액에 용해시키고 또 동결건조시켰다. 조 생성물을 분취 RP-HPLC에 의해 정제하였다. PEI-PEG-DUPA 유사체의 합성: $4.37 \text{ mg}(1.2 \times 10^{-4} \text{ mmol})$ 의 디콘주게이트 1:1 또는 1:3(상기 실시예 1에 설명된 바와 같이 제조)을 940 μ l의 20 mM HEPES pH 7.4에 용해시켰다. 이어, $1 \text{ mg}(9.1 \times 10^{-4} \text{ mmol}, \sim 5 \text{ eq})$ 의 DUPA 유사체를 2 ml의 아세토니트릴(ACN; HPLC 등급)/(20 mM HEPES pH 7.4) 내에 1:1 비율로 용해시키고, 상기 반응에 적가하였다. 이어, 반응에서 ACN의 전체 농도의 대략 ~10%에 도달하도록, 4 ml의 20 mM를 추가로 상기 반응 혼합물에 도입하였다. 이 반응물은, 파장 343에서 흡광도(A_{343})가 완전한 턴오버를 나타낼 때까지 실온의 암소에서 보르텍스 처리(800 rpm)하였다. 생성한 트리콘주게이트를 MacroPrep High S 수지(BioRad) (20 mM HEPES pH 7.4에서부터 3M NaCl을 함유하는 20 mM HEPES의 3단계 구배 용리를 이용)가 충전된 HR10/10 컬럼 상에서 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 용출된 분획을 분석용 RP-HPLC에 도입하여 트리콘주게이트의 순도를 평가하였다. 95% 이상의 순도를 갖는 분획을 조합하고 -80℃에서 저장하였다. 트리콘주게이트의 농도는 구리 에세이에 의해 결정하였다. 콘주게이트된 DUPA 유사체의 양은 발색체(Trp 아미노산)의 흡광에 의해 결정하였다.

[0171] **실시예 13. 폴리IC/LPEI-PEG-DUPA는 전립선암을 표적화한다**

[0172] 전립선 표면 막 항원(PSMA)은 전이성 전립선암에서 과발현된다. 대부분의 고형 종양의 신생혈관에서도 또한 발견된다. PSMA는 리간드 결합에 의해 내재화되므로, 본 발명자들은 이것을 표적으로 선택하여, 폴리IC PSMA 표적화 벡터를 디자인하여 합성하였다. 실제로, DUPA-DayLight680은 PSMA 과발현 세포(LNCaP)에는 내재화하지만, MCF7(과발현 Her2)(도시되지 않음)에는 내재화하지 않는다.

[0173] 도 15는 PEI-PEG-DUPA(PPD)/폴리IC가 LNCaP 및 VCaP 세포에 대해 매우 효과적이라는 것을 도시한다. 노출한지

96시간 후 생존성을 측정하였다. PPD는 또한 사이토카인의 생성을 유도한다(도 16). 도 17에서, LNCaP 세포에 의해 조절된 배지는 제어된 배지에서 성장한 PBMC에서 사이토카인 INF- γ , IL-2 및 TNF- α 의 발현을 자극함이 밝혀졌다. 또한, 폴리IC/PPD 처리된 LNCaP 세포를 PSMA를 발현하지 않는 PC3-루시페라제 세포와 함께 공동배향하면 방관자 효과를 통하여 PC3-루시페라제 세포의 70%까지 치사를 초래한다는 것이 또한 밝혀졌다. 건강한 인간 PBMC의 부가는 상기 효과를 강하게 증가시켜 PC3 세포의 90% 치사를 초래한다(도 18).

[0174] 실시예 14. 생체 내 암 치료

[0175] 폴리IC/PPD는, SCID 마우스에서 시험될 때 상당한 항-종양 효과를 갖는다(도 19). 종양 억제는 실험 마우스에서 면역계 결여로 인하여 완전하지 않다.

[0176] 참고자료

- [0177] 1. Boussif, O., et al., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(16): p. 7297-301.
- [0178] 2. Wagner, E., et al., Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(10): p. 4255-9.
- [0179] 3. Little, S.R., et al., Poly-beta amino ester-containing microparticles enhance the activity of nonviral genetic vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(26): p. 9534-9.
- [0180] 4. Davis, M.E., Z.G. Chen, and D.M. Shin, Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. 7(9): p. 771-82.
- [0181] 5. Remy, J.S., et al., Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopoly(아민)-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(5): p. 1744-8.
- [0182] 6. Jager, M., et al., Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application. *Chem Soc Rev*, 2012. 41(13): p. 4755-67.
- [0183] 7. Ziebarth, J.D. and Y. Wang, Understanding the protonation behavior of linear polyethylenimine in solutions through Monte Carlo simulations. *Biomacromolecules*, 2010. 11(1): p. 29-38.
- [0184] 8. Hobel, S., et al., Maltose- and maltotriose-modified, hyperbranched poly(ethylene imine)s (OM-PEIs): Physicochemical and biological properties of DNA and siRNA complexes. *J Control Release*, 2011. 149(2): p. 146-58.
- [0185] 9. Rejman, J., A. Bragonzi, and M. Conese, Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol Ther*, 2005. 12(3): p. 468-74.
- [0186] 10. Behr, J.P., The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia*, 1997. 51(1-2): p. 34-36.
- [0187] 11. Suh, J., H.J. Paik, and B.K. Hwang, Ionization of Poly(Ethylenimine) and Poly(Allyl(아민)) at Various Phs. *Bioorganic Chemistry*, 1994. 22(3): p. 318-327.
- [0188] 12. Ogris, M., et al., PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther*, 1999. 6(4): p. 595-605.
- [0189] 13. Schaffert, D., et al., Poly(I:C)-mediated tumor growth suppression in EGF-receptor overexpressing tumors using EGF-polyethylene glycol-linear polyethylenimine as carrier. *Pharm Res*, 2011. 28(4): p. 731-41.
- [0190] 14. Nilsson, B., et al., A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng*, 1987. 1(2): p. 107-13.
- [0191] 15. Lofblom, J., et al., Affibody molecules: engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. *FEBS Lett*, 2010. 584(12): p. 2670-80.

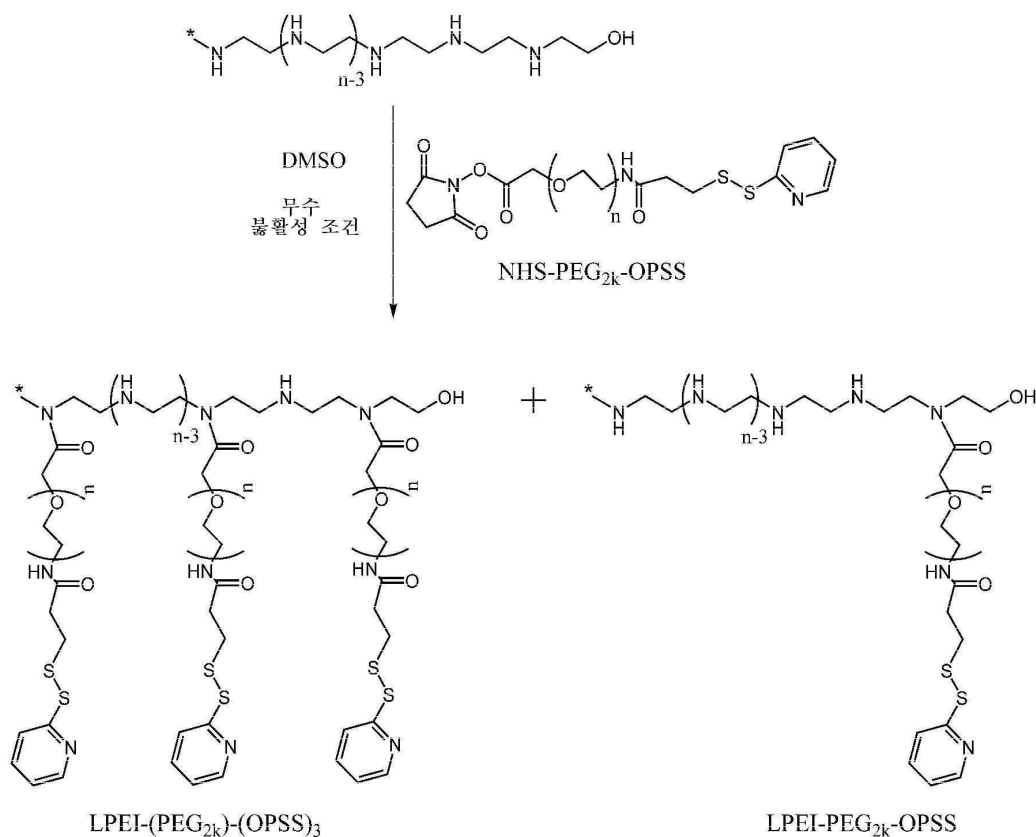
- [0192] 16. Brissault, B., et al., Synthesis, characterization, and gene transfer application of poly(ethylene glycol-b-ethylenimine) with high molar mass polyamine block. *Biomacromolecules*, 2006. 7(10): p. 2863-70.
- [0193] 17. Ungaro, F., et al., Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 2003. 31(1): p. 143-9.
- [0194] 18. Gebhart, C.L., et al., Design and formulation of polyplexes based on pluronic-polyethylenimine conjugates for gene transfer. *Bioconjug Chem*, 2002. 13(5): p. 937-44.
- [0195] 19. Dent, M.F., et al., The methylene blue colorimetric microassay for determining cell line response to growth factors. *Cytotechnology*, 1995. 17(1): p. 27-33.
- [0196] 20. Eigenbrot, C., et al., Structural basis for high-affinity HER2 receptor binding by an engineered protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(34): p. 15039-44.
- [0197] 21. Ogris, M., et al., The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther*, 1998. 5(10): p. 1425-33.
- [0198] 22. Chollet, P., et al., Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med*, 2002. 4(1): p. 84-91.
- [0199] 23. Champion, J.A., Y.K. Katare, and S. Mitragotri, Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of Controlled Release*, 2007. 121(1-2): p. 3-9.
- [0200] 24. Kleemann, E., et al., Nano-carriers for DNA delivery to the lung based upon a TAT-derived peptide covalently coupled to PEG-PEI. *J Control Release*, 2005. 109(1-3): p. 299-316.
- [0201] 25. Rudolph, C., et al., Nonviral gene delivery to the lung with copolymer-protected and transferrin-modified polyethylenimine. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1573(1): p. 75-83.
- [0202] 26. Aguilar, Z., et al., Biologic effects of heregulin/neu differentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells. *Oncogene*, 1999. 18(44): p. 6050-62.
- [0203] 27. Park, J.W., et al., Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(4): p. 1172-81.
- [0204] 28. Rabenstein, D.L., Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep*, 2002. 19(3): p. 312-31.
- [0205] 29. Seib, F.P., A.T. Jones, and R. Duncan, Comparison of the endocytic properties of linear and branched PEIs, and cationic PAMAM dendrimers in B16f10 melanoma cells. *J Control Release*, 2007. 117(3): p. 291-300.
- [0206] 30. Jeong, G.J., et al., Biodistribution and tissue expression kinetics of plasmid DNA complexed with polyethylenimines of different molecular weight and structure. *J Control Release*, 2007. 118(1): p. 118-25.
- [0207] 31. Kawakami, S., et al., Evaluation of proinflammatory cytokine production induced by linear and branched polyethylenimine/plasmid DNA complexes in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. 317(3): p. 1382-90.
- [0208] 32. Goula, D., et al., Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther*, 1998. 5(9): p. 1291-5.
- [0209] 33. Bragonzi, A., et al., Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs. *Gene Ther*, 1999. 6(12): p. 1995-2004.
- [0210] 34. Lee, K., et al., Pluronic/polyethylenimine shell crosslinked nanocapsules with embedded magnetite nanocrystals for magnetically triggered delivery of siRNA. *Macromol Biosci*, 2010. 10(3): p.

239-45.

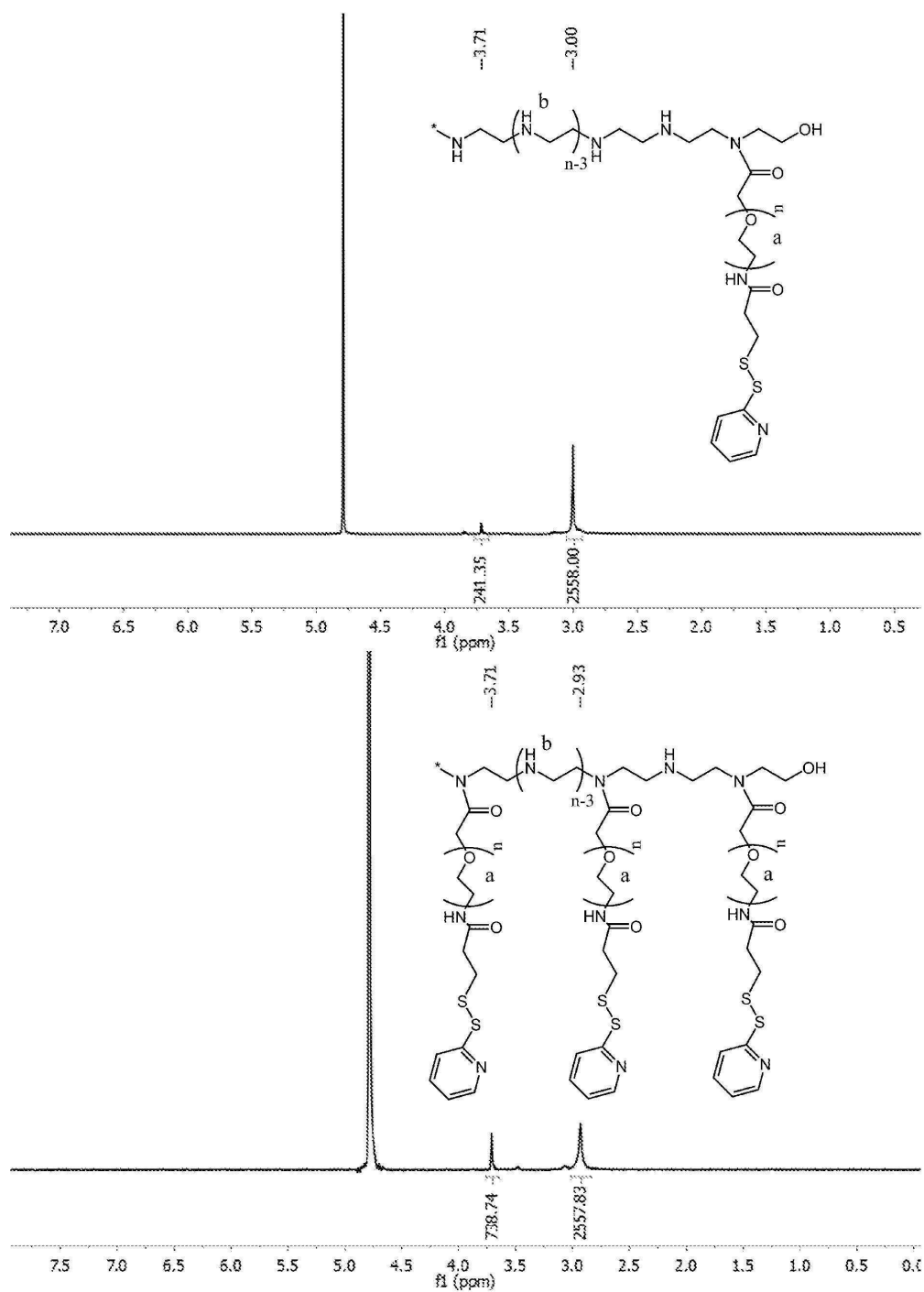
- [0211] 35. Zheng, M., et al., Poly(ethylene oxide) grafted with short polyethylenimine gives DNA polyplexes with superior colloidal stability, low cytotoxicity, and potent in vitro gene transfection under serum conditions. *Biomacromolecules*, 2012. 13(3): p. 881-8.
- [0212] 36. Petersen, H., et al., Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjug Chem*, 2002. 13(4): p. 845-54.
- [0213] 37. Champion, J.A., Y.K. Katare, and S. Mitragotri, Particle shape: a new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *J Control Release*, 2007. 121(1-2): p. 3-9.
- [0214] 38. Liu, Y., et al., The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery. *Ther Deliv*, 2012. 3(2): p. 181-94.
- [0215] 39. Kloeckner, J., et al., Photochemically enhanced gene delivery of EGF receptor-targeted DNA polyplexes. *J Drug Target*, 2004. 12(4): p. 205-13.
- [0216] 40. Kircheis, R., et al., Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther*, 2001. 8(1): p. 28-40.
- [0217] 41. Ogris, M., et al., DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS PharmSci*, 2001. 3(3): p. E21.

도면

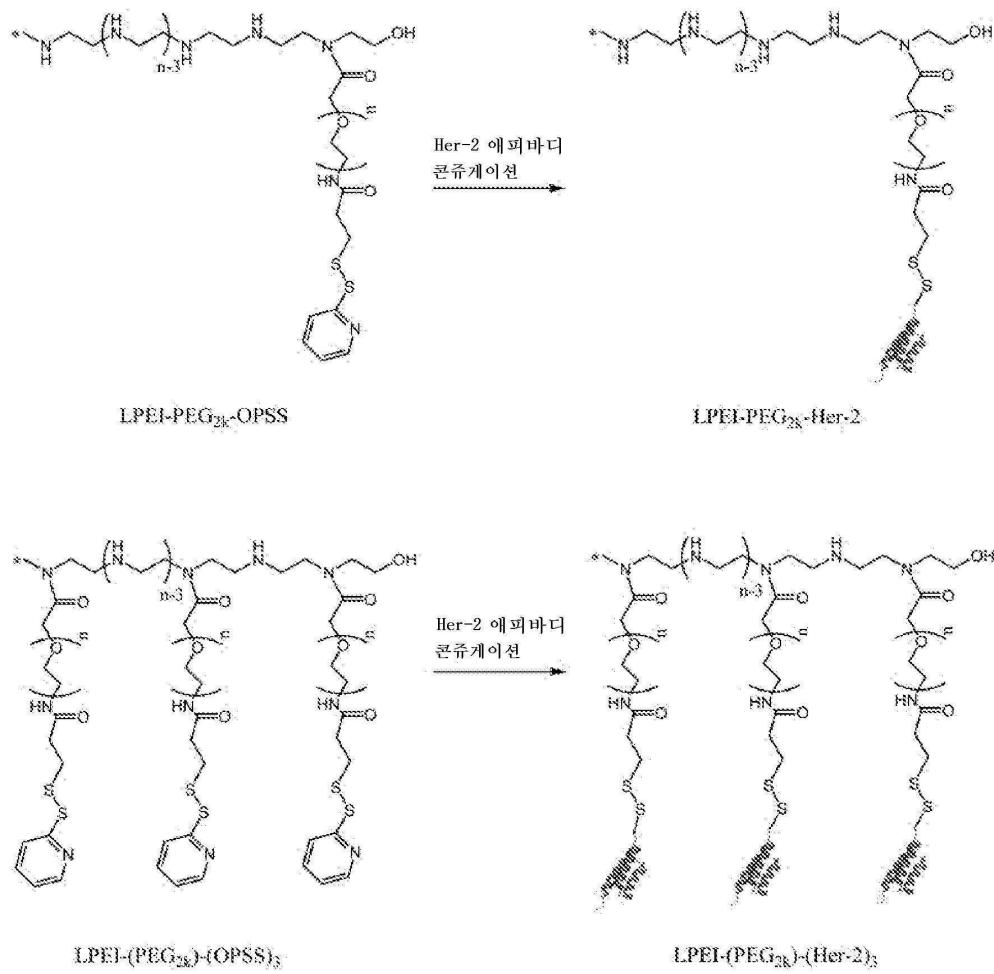
도면1



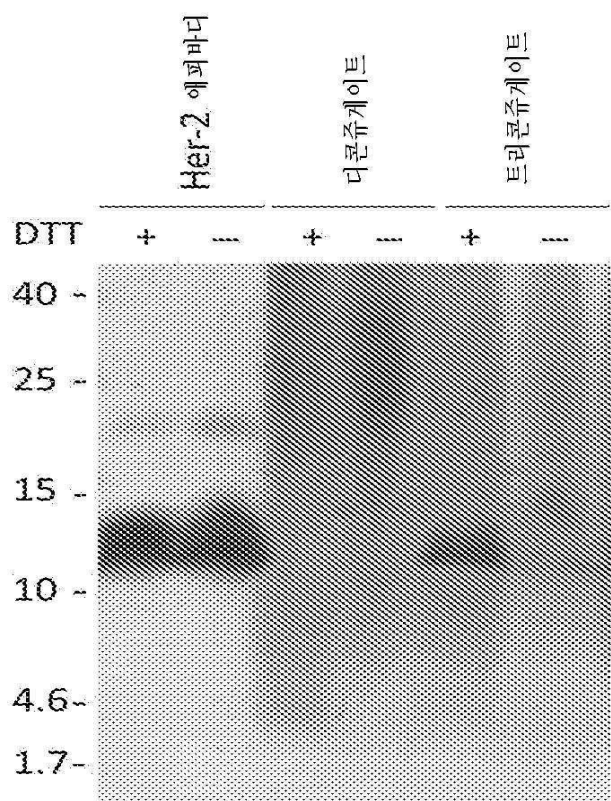
도면2



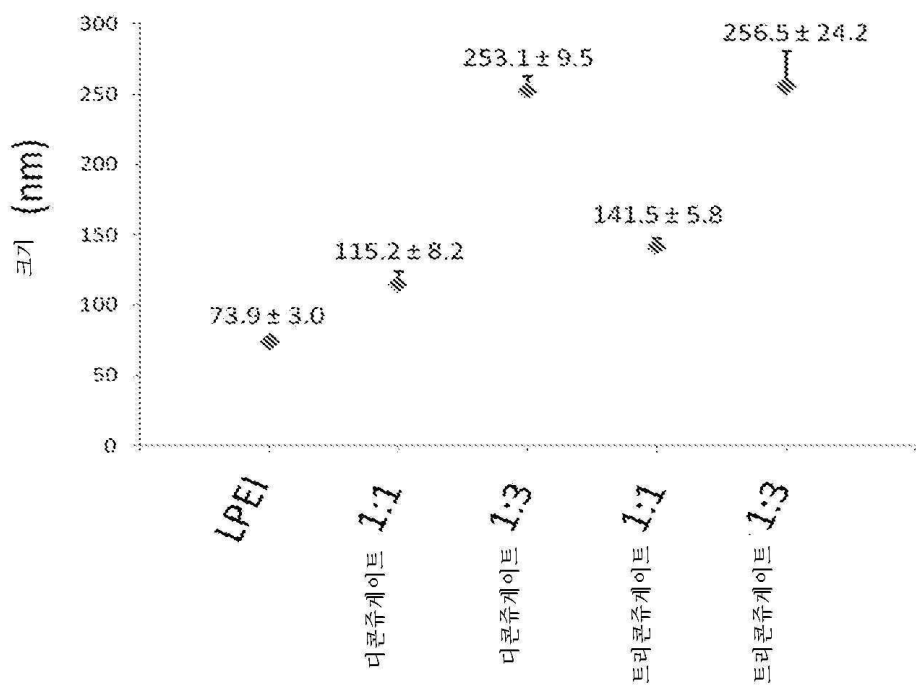
도면3



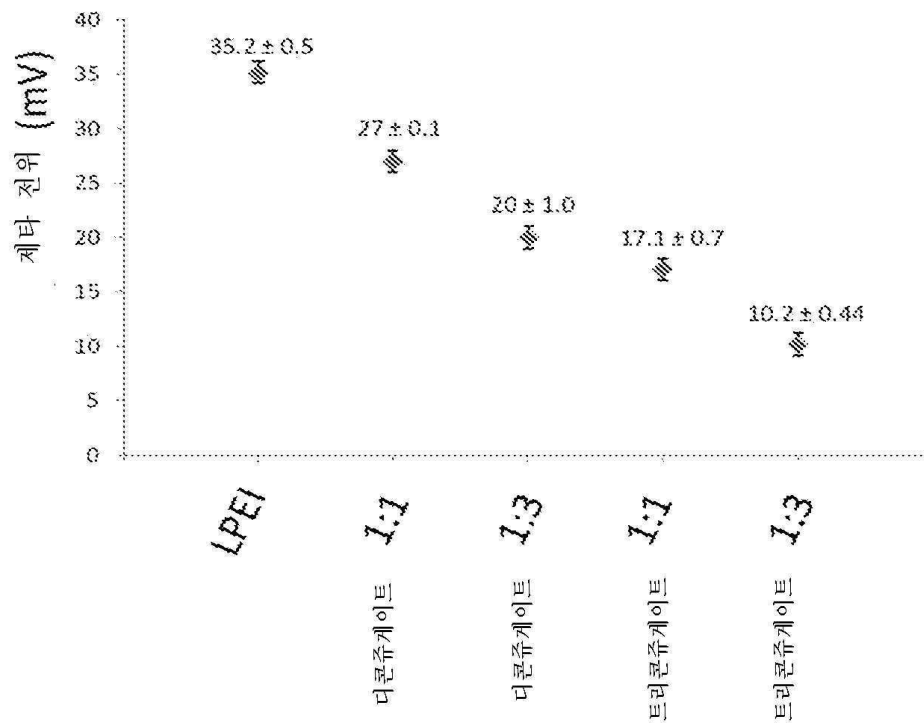
도면4



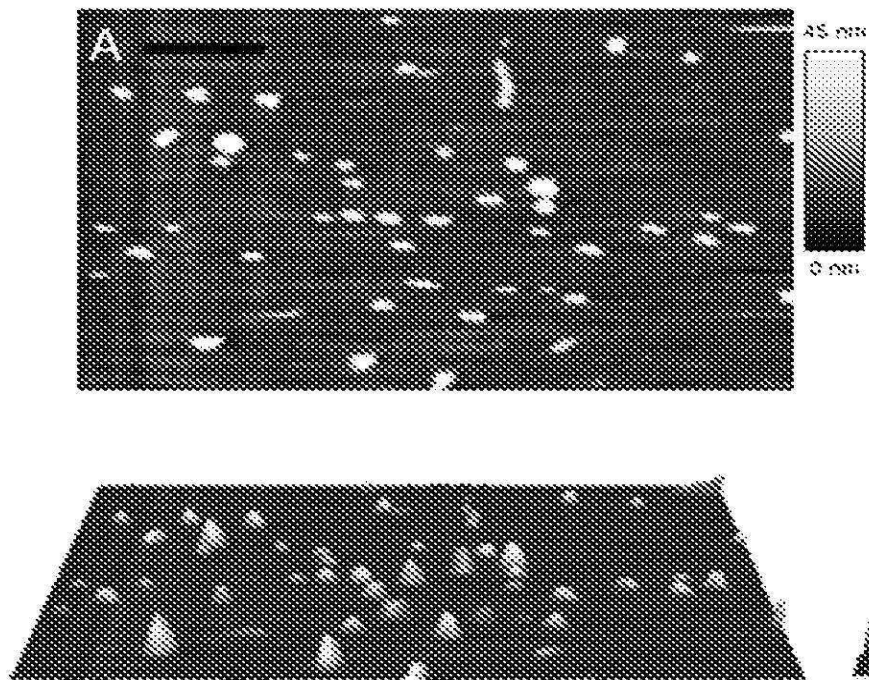
도면5



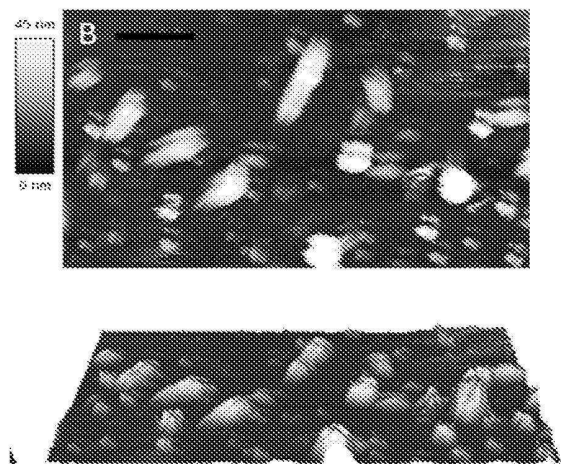
도면6



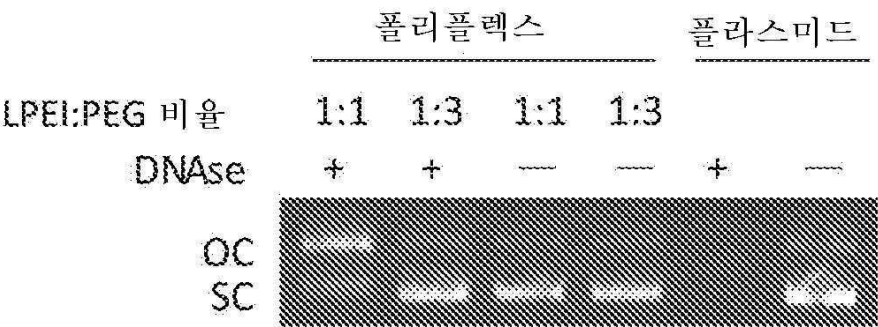
도면7a



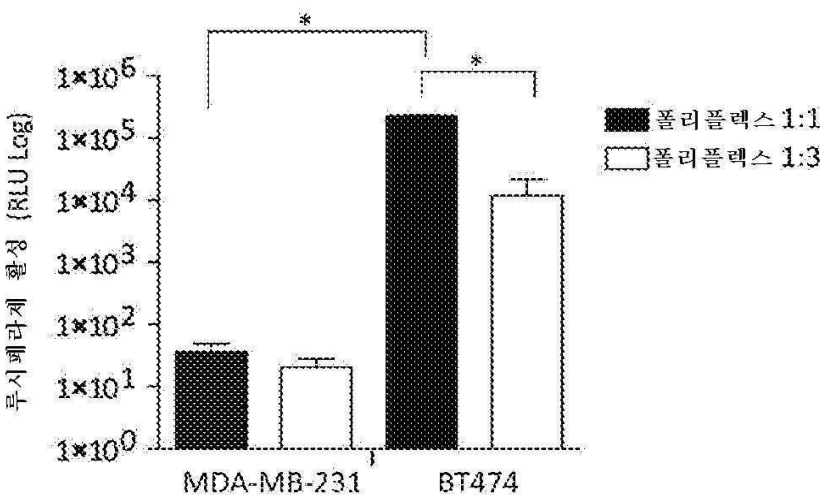
도면7b



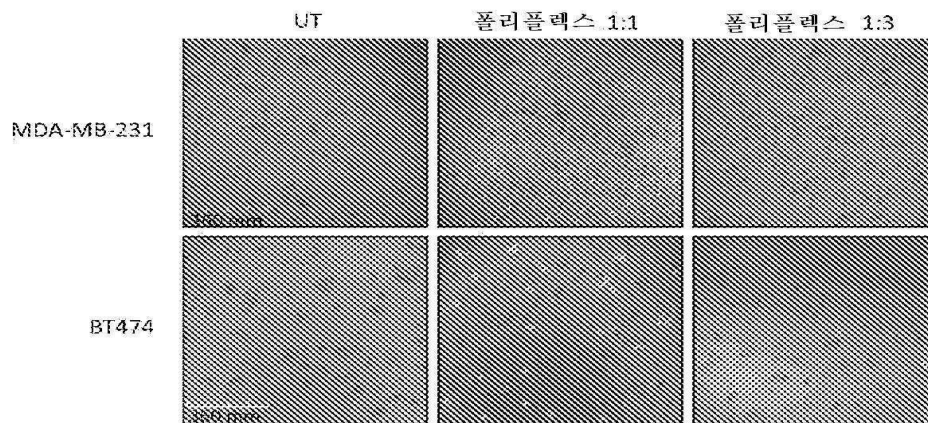
도면8



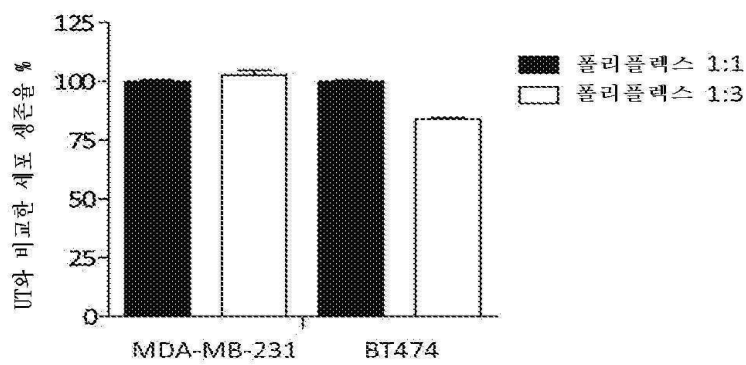
도면9a



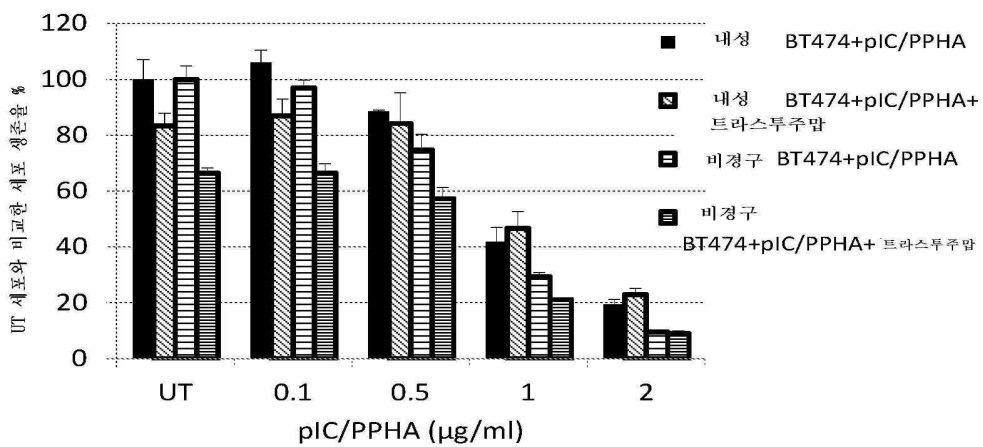
도면9b



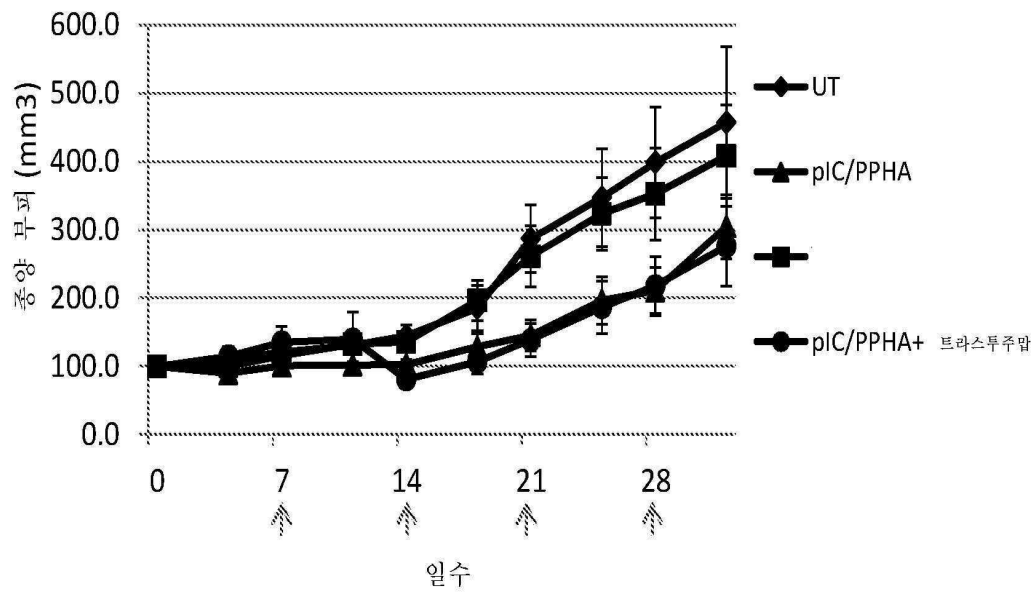
도면9c



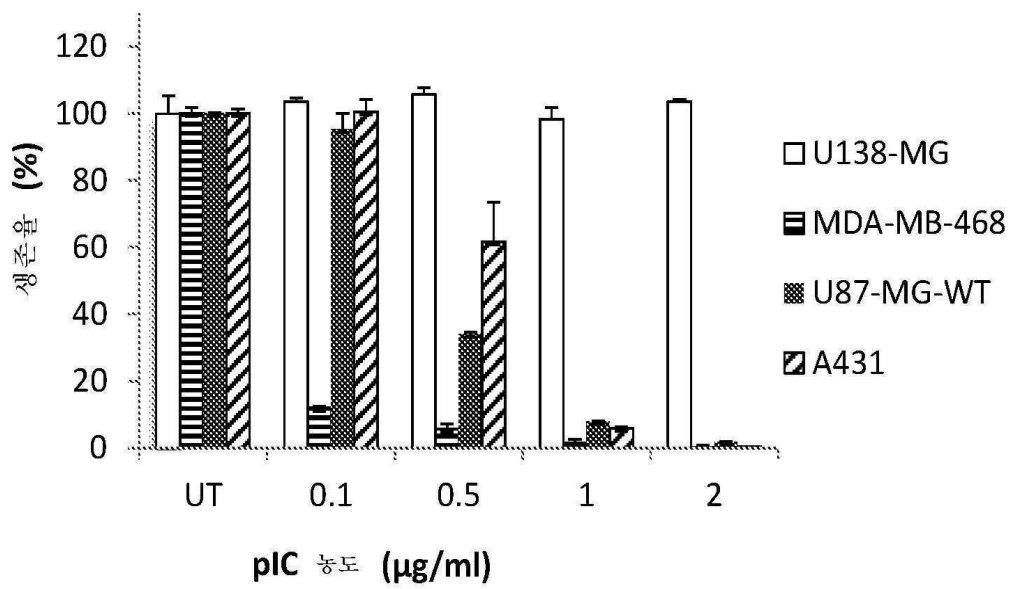
도면10



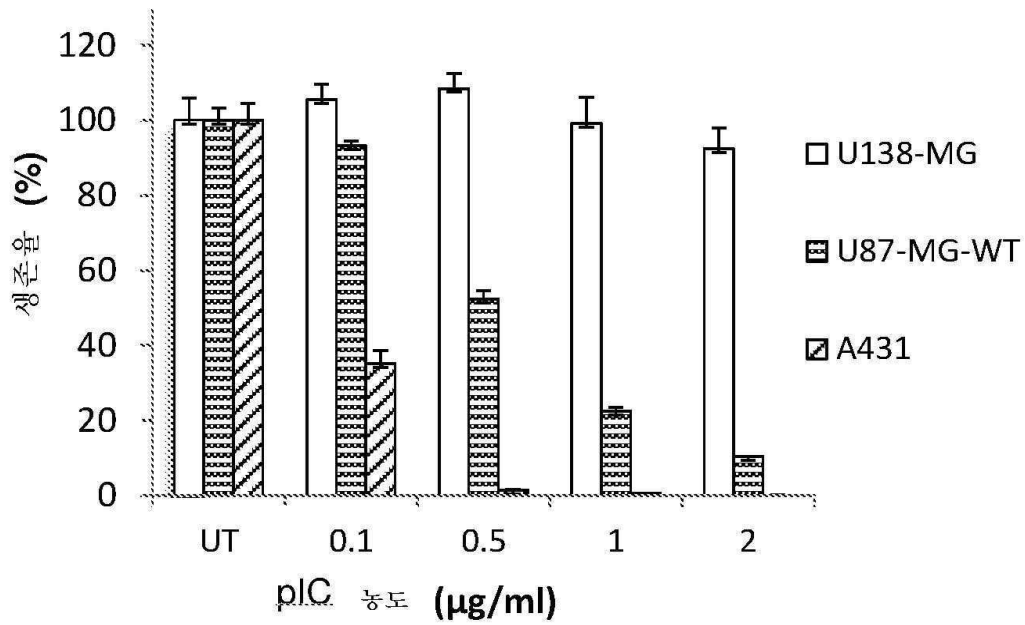
도면11



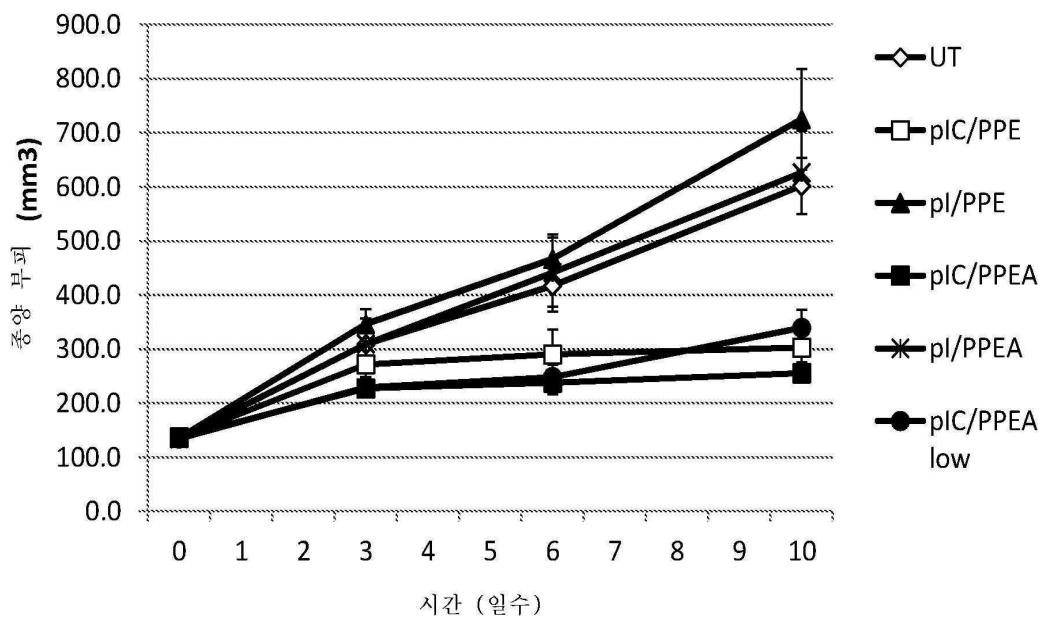
도면12a



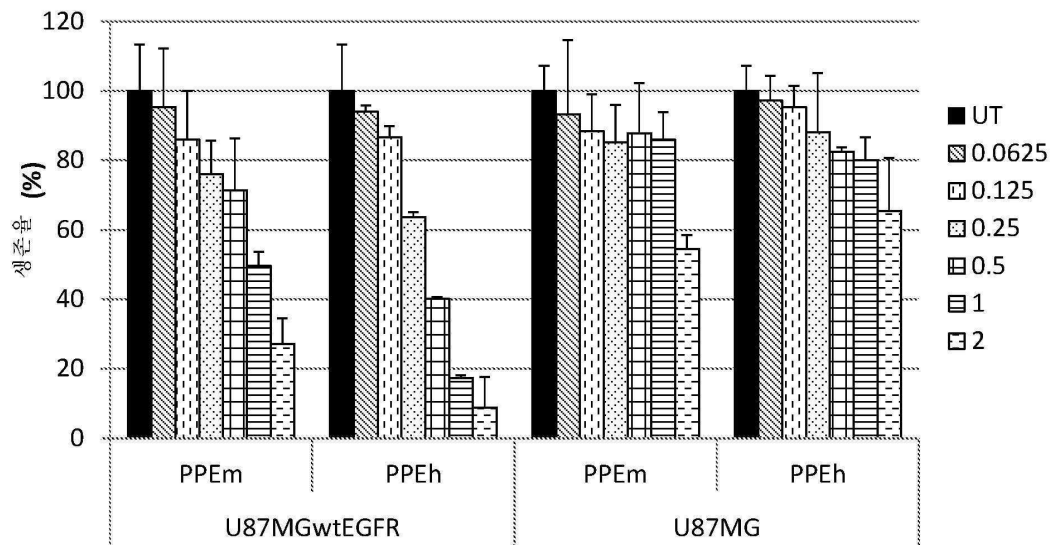
도면12b



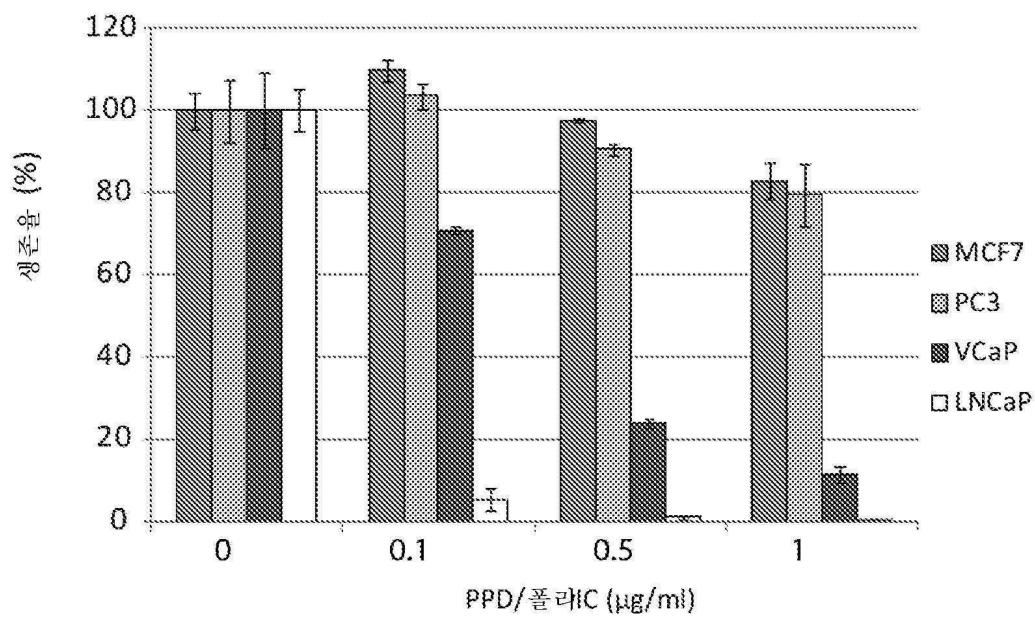
도면13



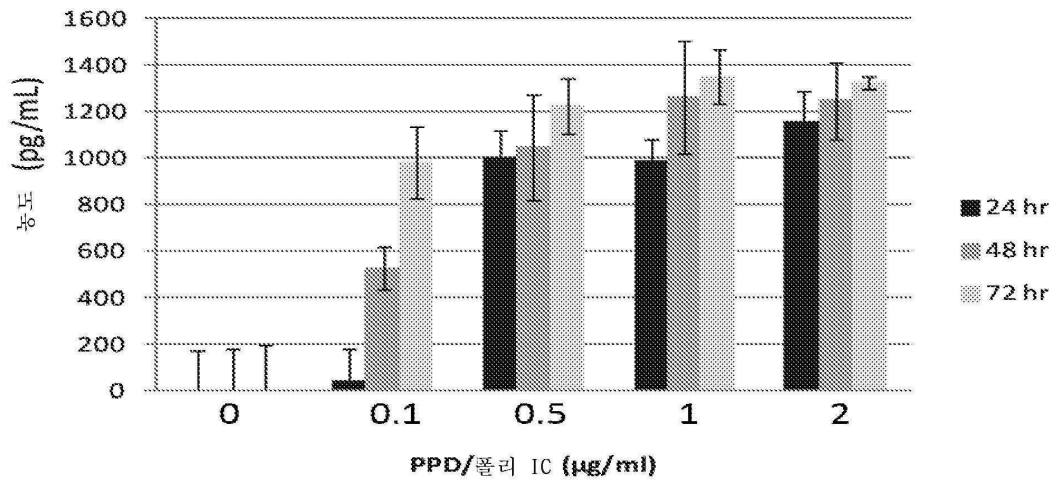
도면14



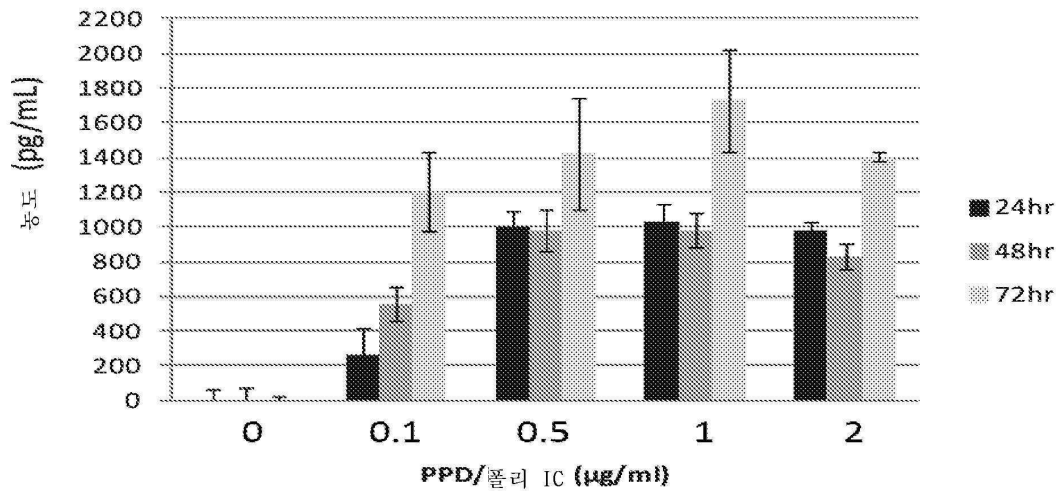
도면15



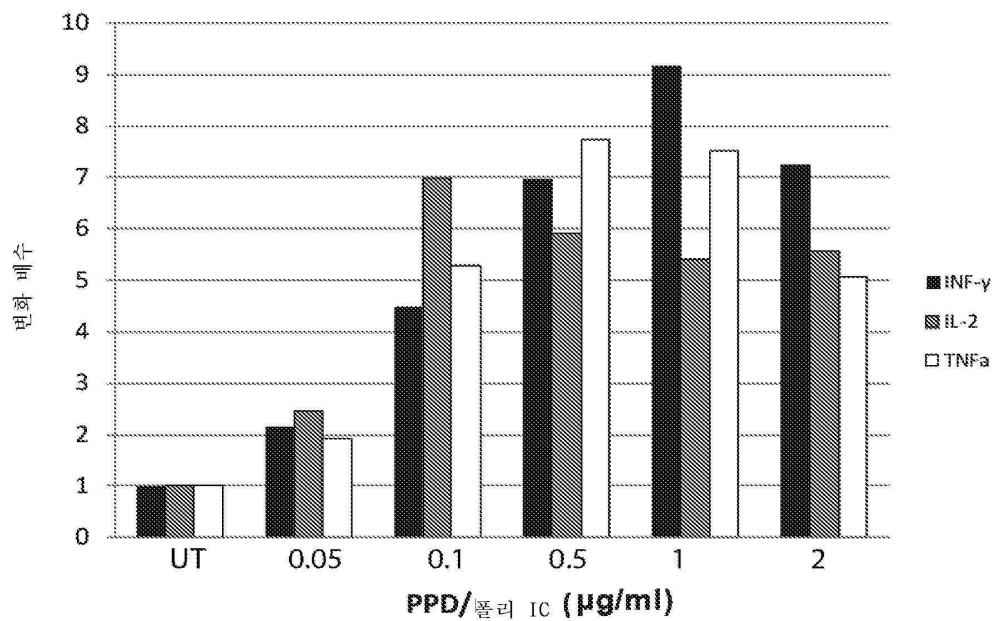
도면16a



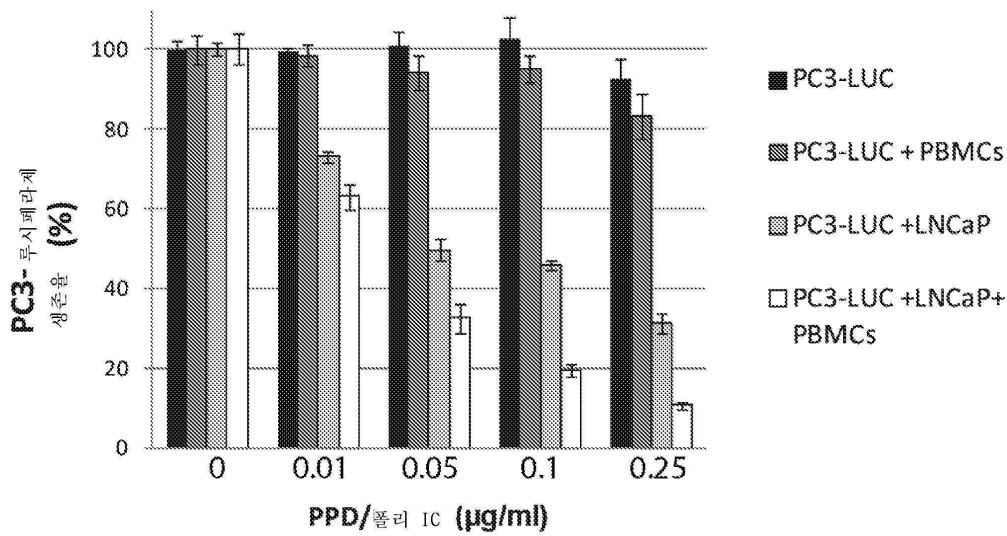
도면16b



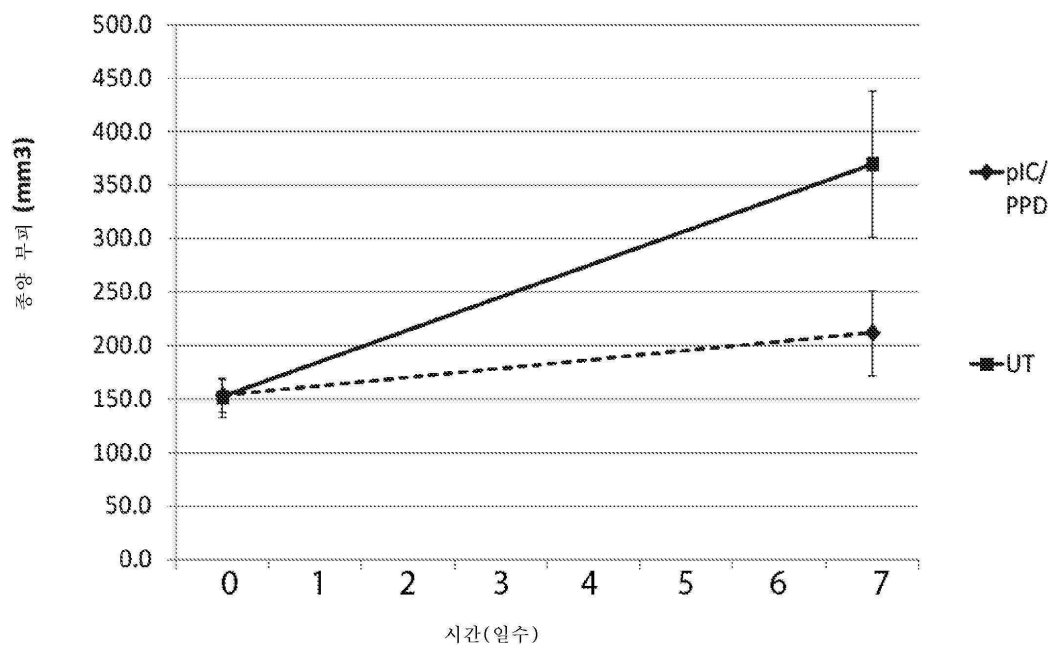
도면17



도면18



도면19



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Alex Levitzki management and holdings, Ltd

Levitzki, Alexander

Joubran, Salim

Shir, Alexei

Zigler, Maya

<120> IMPROVED POLYETHYLENEIMINE POLYETHYLENEGLYCOL VECTORS

<130> ALEX-003 PCT

<150> 61993110

<151> 2014-05-14

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Tyr His Trp Tyr Gly Tyr Thr Pro Gln Asn Val Ile

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> X is 8-aminooctanoic acid.

<222> (1)..(1)

<400> 2

Xaa Phe Gly Trp Trp Gly Cys

1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> X is 8-aminooctanoic acid

<222> (1)..(1)

<220><221> X is diaminopropionic acid

<222> (4)..(4)

<400> 3

Xaa Phe Phe Xaa Asp Cys

1 5

<210> 4

<211> 82

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro

1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Ala Glu Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Met

20 25 30

Trp Ala Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Thr Gly Trp

35 40 45

Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Lys Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser

50 55 60

Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro

65 70 75 80

Lys Cys

<210> 5

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro

1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Glu Ala Lys Tyr Ala Lys Met Arg Asn Ala

20 25 30

Tyr Trp Glu Ile Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg

35 40 45

Ala Phe Ile Arg Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu

50 55 60

Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Cys

65

70

75

<210> 6

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

 $\langle 400 \rangle$ 6

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His

1

5

10

15

Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn

20

25

30

Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys

35

40

45

Trp Trp Glu Leu Arg

50