



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0055012
(43) 공개일자 2017년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/30 (2017.01) A61K 47/36 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/30 (2013.01)
A61K 47/36 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0045098(분할)
(22) 출원일자 2017년04월07일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2015-0048982
원출원일자 2015년04월07일
심사청구일자 2015년04월07일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
서울시립대학교 산학협력단
서울특별시 동대문구 서울시립대로 163 (전농동, 서울시립대학교내)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
김현철
서울특별시 영등포구 63로 7 B동 501호(여의도동, 은하아파트)
박규형
경기도 성남시 분당구 내정로 185 205동 1801호
(수내동, 양지마을청구아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이준혁

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 망막질환 치료를 위한 효과 지속성(Long-term) siRNA 기반 나노메디슨 및 이의 제조방법

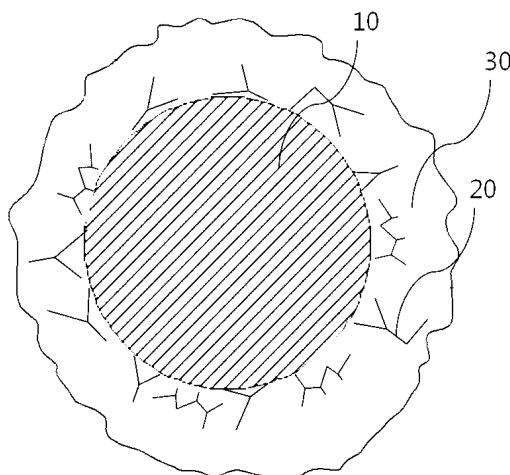
(57) 요약

본 발명은 자기조립되어 응축된 고분자량의 siRNA 코어입자와 외부를 양이온성 고분자와 히알루론산으로 순차적으로 코팅하여 망막내부로 다량의 siRNA를 효율적으로 전달하는 입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 코어에는 1×10^6 개 이상의 상기 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 안티센스 핵산(antisense nucleic

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



acids)을 포함하므로 종래에 비해 많은 양의 siRNA를 전달할 수 있다.

본 발명은 외곽(셀)을 (-) 전하를 띄는 히알루론산으로 코팅을 함으로서 (-) 전하를 띄고 있는 유리체 meshwork 구조물질들과 aggregation을 방지하고 망막의 inner limiting membrane 에 도달할 수 있다. 또한 히알루론산은 물리(Muller) 세포의 CD44 receptor와 결합하여 망막의 구조를 트랜스시토시스 기작으로 sub-retinal space 에 통과할 수 있다. 일부는 Muller 세포내에서 표적 유전자의 mRNA의 해석(translation)을 억제하고 많은 부분은 다시 retinal pigment epithelial(RPE) 세포막에 존재하는 CD44 receptor와 결합하여 세포내로 들어가 RPE 내에서 표적 유전자의 mRNA의 해석(translation)을 또한 억제한다.

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 2310/531 (2013.01)

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

서울대학교병원

서울특별시 종로구 대학로 101(연건동)

(72) 발명자

우세준

경기도 성남시 분당구 미금로 111 3동 104호 (구미동, 한양시티빌)

이지황

경기도 안양시 만안구 병목안로156번길 24-23 2층호

이중범

서울특별시 송파구 잠실로 62 트리지움아파트 301-904

홍혜경

경기도 성남시 분당구 불곡남로 13번길 4, 303호(정자동)

명세서

청구범위

청구항 1

유전자를 표적하는, 자기조립된 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 코어 ;

상기 코어를 둘러싸 응축시키는 양이온성 고분자층 ; 및

상기 양이온성 고분자층 외면에 코팅된 히알루론산 외곽층을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 입자는 크기가 50~350nm인 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 코어는 상기 양이온성 고분자층에 의해 직경이 500nm 이하로 수축되는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 코어는 복수개의 핵산분자를 포함하고, 상기 핵산분자들은 전부 동일한 핵산서열을 가지거나 적어도 하나 이상의 공통 핵산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 망막 질환을 유도하는 특정 유전자의 mRNA들을 표적하는 안티센스 RNA와 이에 상보적인 센스 RNA가 결합된 이중 가닥 RNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 망막 질환을 유도하는 특정 유전자의 mRNA를 표적하는 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 안티센스 핵산(antisense nucleic acids)로 분해되는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 코어는 작은 간섭 RNA(siRNA) 단위 서열 또는 안티센스 핵산(antisense nucleic acids) 단위 서열이 복제(copy)된 1×10^6 개 이상의 상기 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 안티센스 핵산(antisense nucleic acids)을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 코어 내의 상기 핵산 분자는 층상 시트(lamellar sheet)를 구비하는 결정 구조 내에 배열되는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 코어 내의 핵산 분자는 스템 루프(STEM-LOOP) 또는 선형 구조를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 히알루론산 외곽층은 히알루론산이 상기 양이온성 고분자층 외면에 정전기적 인력으로 코팅되어 (-) 전하를 나타내는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 입자는 그 외부가 (-)전하를 나타내는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 양이온성 고분자는 폴리에틸렌이민, 폴리아민 및 폴리비닐아민으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자.

청구항 13

안티센스 RNA와 이에 상보적인 센스 RNA가 포함된 환형 DNA를 증폭시켜 복수개의 이중 가닥 RNA를 제조하고, 상기 복수개의 이중 가닥 RNA들이 자기조립되어 구형 코어를 형성하는 단계 ;

상기 구형 코어에 양이온성 고분자를 혼합하여 이온 상호 작용으로 상기 코어를 응축시키는 단계 ; 및

상기 양이온성 고분자 외면에 정전기적 인력으로 히알루론산 외곽층을 코팅하는 단계를 포함하는 유전체 약물 전달용 입자 제조방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 방법은 상기 환형 DNA를 롤링 서클 증폭(RCA) 또는 롤링 서클 전사(RCT)를 사용하여 복수개의 이중 가닥 RNA를 형성하는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자 제조방법.

청구항 15

제 13항에 있어서, 상기 코어와 상기 양이온성 고분자의 중량비는 1 : 0.05 ~ 1 인 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자 제조방법.

청구항 16

제 13항에 있어서, 상기 히알루론산은 상기 응축된 코어 대비 중량비로 1 : 0.1 ~ 0.5(코어 : 히알루론산)인 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자 제조방법.

청구항 17

제 13항에 있어서, 상기 안티센스 RNA는 망막 질환을 유도하는 특정 유전자의 mRNA를 표적하여 이의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 유전체 약물 전달용 입자 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유전체 약물 전달용 입자 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 자세하게는, 자기조립되어 응축된 고분자량의 siRNA 코어입자와 외부로 양이온성 고분자와 음이온성 히알루론산을 이용하여 순차적으로 코팅하여 망막내부로 상기 siRNA를 효율적으로 전달하는 입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 나이관련 황반변성(age-related macular degeneration, AMD)은 성인 실명의 제일 원인으로 나이가 들 수고 유병률이 증가하는 안과 질환이다. 안구내 VEGF (vascular endothelial growth factor)의 증가와 이에 따른 맥락막 신생혈관 형성(Choroidal neovascularization(CNV))이 특징이다. AMD 환자수는 고령화 사회가 됨에 따라 더욱 증가하고 있으나 아직까지 완전한 AMD의 치료법은 개발되지 못하고 있는 실정이다. 현재는 광역학 치료(photodynamic therapy)와 anti-VEGF(혈관내피세포성장인자) 치료법이 사용되고 있는데, 광역학 치료는 피부에 빛에 반응하는 광감작제(광과민제)를 주입한 후 특정 파장의 빛을 쏘이면 질병세포에만 선택적으로 빛이 축적되어 치료적 효과를 갖는다. 이를 이용하여 황반변성에 동반된 CNV를 치료하기 위해 약을 정맥 내로 주입하고 레이저에 의해 눈 안에서 활성화되어 신생혈관의 생성을 막아준다. 그리고 anti-VEGF 치료법으로는 일반적으로 anti-VEGF 항체기반인 아바스틴(Avastin)과 루센티스(Lucentis) 및 융합 단백질인 에일리아(Eylea)를 사용하여

CNV를 치료하고 있다. 광역학요법은 CNV의 활성도는 억제할 수 있으나 시력개선 효과가 없음이 알려졌다. 현재 안구내 anti-VEGF 제제를 주사하는 것이 시력개선에 가장 효과적인 것으로 밝혀 졌으며 AMD의 표준 치료법으로 정착되었다. anti-VEGF 제제의 안구내 주사는 AMD 뿐 아니라 당뇨병망막병증, 망막정맥폐쇄, 근시성황반변성 등 VEGF 와 관련된 다양한 망막 질환에서 효과가 있음이 입증되어 활발히 사용되고 있다. 안구내 주입한 anti-VEGF 제제의 반감기는 3-7일 정도이며 약효의 지속을 위해서는 매달 안구내 투여가 필요하다.

[0003] 최근에는 황반변성 치료를 위해 유전자 치료가 새롭게 연구되고 있는데, mRNA, DNA가 여러 개의 단백질로 전사 될 수 있으므로 RNA, DNA를 이용한 유전자 치료가 유효한 치료 방법이 될 수 있다.

[0004] 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.

[0005] 그러나, siRNA의 효소 불안정성, 열악한 세포 투과성은 실제 임상치료에 적용하는데 있어서 큰 장애가 되어왔다. 또한 망막질환 치료에 있어서 siRNA 기반 약제의 큰 단점은 약효 지속 시간이 항체기반 단백질 약제들보다 짧아 더욱 빈번한 반복적인 유리체강내에 주입해야 할 필요가 있다. 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. 유리체강의 98%가 물이지만 1-2%가 음이온을 가지는 proteoglycan filaments 연결된 collagen fibrils로 구성된 well-ordered, 3-dimensional network 구조를 가지고 있다. 이러한 유리체강내에 양이온 성질을 가지는 RNA 나노복합체를 주입하면 유리체강 구조와 결합하고 망막에 도달하지 못하는 것으로 알려져 있다. 또한, 망막은 여러 세포층으로 구성된 조직으로서 가장 안쪽은 Inner limiting membrane 이라고 하여 평균적으로 13.43 nm pore 구조를 가지고 있는 fine three-dimensional meshwork 구조로 이루어져 있으며, outer plexiform layer와 photoreceptotr layer 사이에 external limiting membrane 이라는 pore 크기가 3-3.6 nm 의 tight junction 구조를 이루고 있는 구조가 있어, 일반적으로 나노전달체 (일반적으로 ~ 100 nm 이상)가 diffusion 기작으로 통과하여 맥락막 신생혈관을 치료하기 위한 Retinal pigment epithelium layer 와 맥락막까지 도달할 수 없는 구조이다.

[0006] 본 발명자는 siRNA를 RCT로 복제하여 자기조립한 siRNA-마이크로스폰지에 linear PEI로 코팅한 전달체를 제시한 바 있다(self-assembled RNA interference microsponges for efficient siRNA delivery(nature material, 2012. 11. 26 공개). 하지만, linear PEI로 코팅된 siRNA-마이크로스폰지는 양이온성을 띄고 생체내 독성을 보여 망막 내에 주입이 어려운 문제점이 있었다.

[0007] 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.

[0008] [참고특허]

[0009] 한국공개특허 10-2011-83919

[0010] 한국등록특허 10-806088

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 맥락막 신생혈관과 관련있는 노인성 황반변성을 포함하여 다양한 망막질환 치료를 위하여 유전

자 치료제인 siRNA를 다량으로 유리체강내 조직 및 망막 조직에 의한 전달 장애물들을 극복함으로써 효과적으로 retinal pigment epithelium 세포를 포함한 다양한 질병 관련 망막세포에 전달할 수 있는 망막질환 치료를 위한 유전자 약물 전달용 입자를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명은 망막 내로의 유전자 약물의 전달 효율이 높으면서 세포 독성이 낮은 유전체 약물 전달용 입자를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명은 RCT 공정에 의한 제작된 siRNA hydrogel 기반의 유전자 물질이 효소에 의해 분해되지 않고 또한 유리체 구조와 함께 망막구조를 투과하여 망막 내 세포에 도달할 수 있는 유전체 전달용 입자를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 하나의 양상은 유전자를 표적하는, 자기조립된 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 코어 ;

[0016] 상기 코어를 둘러싸 응축시키는 양이온성 고분자층 ; 및

[0017] 상기 양이온성 고분자층 외면에 코팅된 음이온성 히알루론산 외곽층을 포함하는 유전체 약물 전달용 입자에 관계한다.

[0018] 다른 양상에서 본 발명은 안티센스 RNA와 이에 상보적인 센스 RNA가 포함된 환형 DNA를 증폭시켜 복수개의 이중가닥 RNA를 제조하고, 상기 복수개의 이중가닥 RNA들이 자기조립되어 구형 코어를 형성하는 단계 ;

[0019] 상기 구형 코어에 양이온성 고분자를 혼합하여 이온 상호 작용으로 상기 코어를 응축시키는 단계 ; 및

[0020] 응축된 코어부 외면에 정전기적 인력으로 음이온성 히알루론산 외곽층을 코팅하는 단계를 포함하는 유전체 약물 전달용 입자 제조방법에 관계한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 코어에는 1×10^3 개 이상의 상기 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 안티센스 핵산(antisense nucleic acids)을 포함하므로 종래에 비해 많은 양의 siRNA를 전달할 수 있으며, 또한, siRNA를 장기간에 걸쳐 방출시킬 수 있으므로 약효의 지속성이 매우 크다.

[0022] 본 발명은 외곽(셸)을 (-) 전하를 띄는 히알루론산으로 코팅을 함으로서 (-) 전하를 띄고 있는 유리체 meshwork 구조물질들과 aggregation을 방지하고 망막의 inner limiting membrane 에 도달할 수 있다. 또한 히알루론산은 물러 세포의 CD44 receptor와 결합하여 망막의 구조를 트랜스시토시스(transcytosis) 기작으로 sub-retinal space 에 통과한 후, 다시 CD44 receptor-mediated endocytosis 기작에 의하여 retinal pigment epithelium 세포내로 효과적으로 들어가서 특정 mRNA 의 translation 기작을 막는다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 일구현예에 의한 유전체 전달용 나노입자의 개념도를 나타낸다.

도 2는 본 발명의 코어(siRNA-microsponge)를 제조하는 방법을 도시한다.

도 3은 siRNA-microsponge 코어, siRNA-microsponge 코어-branched PEI (b-PEI), 그리고 마지막으로 외곽층을 히알루론산으로 코팅한 본 발명의 나노볼의 사이즈 분포(A)와 나노볼의 TEM 이미지(B)를 나타낸다.

도 4는 siRNA-microsponge 용액과 히알루론산이 코팅된 본 발명의 나노볼 용액을 촬영한 것이다.

도 5는 제조된 나노입자의 생체 외 조건하 망막세포내로 전달되는 시험과 나노입자에 의해 전달된 anti-VEGF-A siRNA 가 VEGF-A 발현을 선택적으로 억제하는 PCR 결과를 나타낸다.

도 6은 제조된 나노입자를 laser를 이용하여 CNV를 유발한 mouse의 유리체강내 주입하여 2주와 6주동안 약효 지속성을 확인한 결과이다. 주입된 나노입자가 망막내 세포를 통해 맥락막에 전달되어 VEGF-A 발현을 제한하여, CNV를 억제하게 됨을 보여준다.

도 7과 도8은 제조된 나노입자를 Oxygen-induced retinopathy 모델의 유리체강내 주입하여 망막내 세포에서 VEGF-A 발현을 제한하여 혈관생성을 억제함을 보여준다.

도 9는 제조된 나노입자를 이용하여 독성 실험을 한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 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.
- [0025] 도 1은 본 발명의 일구현예에 의한 유전체 전달용 입자의 개념도를 나타낸다.
- [0026] 도 1을 참고하면, 본 발명의 유전체 전달용 나노입자는 코어(10), 양이온성 고분자층 (20) 및 히알루산으로 코팅된 외곽층 (30)을 포함한다.
- [0027] 상기 코어부(10)는 특정 유전자의 mRNA들을 표적하는 자기 조립된 하나 이상의 핵산(11) 분자를 포함한다. 상기 특정 유전자로는 망막 질병을 유발하는 모든 mRNA가 해당될 수 있다. 예를 들면, 상기 코어부는 황반형성(age-related macular degeneration, AMD), 녹내장 등 망막질환을 일으키는 유전자를 표적하는 핵산 분자를 포함한다.
- [0028] 상기 코어는 복수개의 핵산분자를 포함하고, 상기 핵산분자들은 전부 동일한 핵산서열을 가지거나 적어도 하나 이상의 공통 핵산 서열을 가질 수 있다. 상기 핵산분자는 하나 이상의 서열 단위 (sequence elements)를 포함하는 뉴클레오티드 서열(nucleotide sequence)을 가질 수 있다. 상기 코어 내의 상기 핵산분자는 이중가닥 또는 삼중가닥 구조를 가지는 뉴클레오티드 서열 (nucleotide sequence)을 포함할 수 있다. 상기 코어 내의 상기 핵산분자는 두 개 이상의 상보적 단위를 가지는 뉴클레오티드 서열 (nucleotide sequence)을 포함할 수 있다. 상기 코어 내의 핵산 분자는 스템 루프 (STEM-LOOP) 또는 선형 구조를 포함 할 수 있다. 예를 들면, 상기 상보적 단위는 하나 이상의 스템-루프 (STEM-LOOP) (예를 들면, 헤어핀 구조) 구조를 가질 수 있다. 또한 상기 코어 내의 상기 핵산분자는 단일 가닥으로 잔존하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열 (nucleotide sequence)을 포함할 수 있다.
- [0030] * 상기 핵산(11) 분자는 세포내로의 전달을 목적으로 하는 핵산, 예컨대 작은 간접 RNA (siRNA), 안티센스 핵산 (antisense nucleic acids) 또는 마이크로 RNA (microRNA, miRNA)일 수 있다. siRNA는 그의 센서 (sense) 가닥과 염기 서열이 동일한 메신저 RNA (messenger RNA, mRNA)와 결합하여 RNA 유도 침묵 복합체 (RNA induced silencing complex, RISC)가 결합된 mRNA를 분해시킴으로써 특정 단백질의 발현을 저해할 수 있다.
- [0031] 예를 들면, 상기 핵산 분자(11)는 망막의 혈관내피 성장인자(VEGF)를 표적하는 안티센서 RNA와 이에 상보적인 센스 RNA가 결합된 이중 가닥 RNA를 포함할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 상기 코어 내의 핵산 분자는 안정적인 3차원 구조로 접혀 자기조립이 될 수 있다. 전형적으로는, 핵산 내의 서로 다른 부분들이 비공유 상호 작용에 의해 자기조립될 수 있다. 상기 코어 내의 상기 핵산 분자는 층상 시트 (lamellar sheet)를 구비하는 결정 구조내에 배열될 수 있다.
- [0033] 코어는 하나 이상의 얹혀있는 핵산분자들로 이루어질 수 있다.
- [0034] 코어의 핵산분자는 분자량이 1×10^5 g/mol 이상일 수 있다.
- [0036] * 상기 코어는 작은 간접 RNA (siRNA) 단위 서열 또는 안티센서 핵산 (antisense nucleic acids) 단위 서열이 다수 개 복제(copy)된 핵산이 응집되어 형성될 수 있다.
- [0037] 상기 코어에는 매우 많은 양의 핵산을 탑재할 수 있다. 즉, 상기 코어에는 작은 간접 RNA(siRNA) 단위 서열 또는 안티센스 핵산(antisense nucleic acids) 단위 서열이 최소 1×10^3 이상 탑재될 수 있으며, $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{10}$ 개 범위 이상 복제되어 탑재될 수 있다.
- [0038] 예를 들면, 상기 핵산 분자는 망막 질환을 유도하는 특정 유전자(예를 들면, 망막의 혈관내피 성장인자 (VEGF))를 표적하는 작은 간접 RNA(siRNA) 또는 안티센스 핵산 (antisense nucleic acids)로 분해될 수 있다.
- [0039] 상기 핵산 분자는 적어도 하나 이상의 절단 가능한 부위 (cleavage site)를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 절단 가능 부위는 효소 (nuclease, dicer, DNAase, RNAase)에 의해 분리될 수 있다.
- [0040] 상기 양이온성 고분자(20)는 상기 코어를 둘러싸며 이온 상호 작용으로 상기 코어를 응축시킨다. 좀 더

구체적으로는, 강한 양전하를 가지는 branched PEI가 음전하의 코어를 둘러싸면서 응축 또는 압축하여 상기 코어부는 나노 파티클 형태가 될 수 있다. 상기 코어 외면에 강한 (+) 전하를 띄는 양이온성 고분자층이 코팅된다.

- [0041] 상기 양이온성 고분자(20)는 폴리에틸렌아민, 폴리아민 및 폴리비닐아민으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 독성이 상대적으로 낮거나 없는 branched PEI를 사용할 수 있다.
- [0042] 상기 코어에 상기 양이온성 고분자를 1 : 0.05 ~ 1 바람직하게는 1 : 0.1 ~ 0.5, 더욱 바람직하게는 1 : 0.2 ~ 0.25 중량비로 주입하여 양이온성 고분자층을 형성할 수 있다.
- [0043] 상기 외곽층(30)은 상기 양이온성 고분자층(20) 외면에 코팅된 히알루론산층이다.
- [0044] 상기 히알루론산 외곽층(30)은 상기 양이온성 고분자층(20) 외면에 정전기적 인력으로 코팅된다.
- [0045] 상기 히알루론산 외곽층은 (-) 전하를 나타내고, 따라서, 본 발명의 코어를 포함한 입자도 그 외부가 (-) 전하를 나타낸다.
- [0046] 본 발명의 목적에는 다양한 형태의 히알루론산이 가능하다. 특히, 분자량이 큰 것과 작은 히알루론산이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 5~10K, 더욱 바람직하게는 5K 히알루론산을 사용할 수 있다.
- [0047] 히알루론산(HA)은 기본단위로 디사카라이드 글루쿠로닌산-β(1-3) N-아세틸글루코즈-아민 β(1-4)이 최고 50,000쌍으로 구성된 큰 복합 올리고사카라이드이다. 이는 세포외매트릭스(extracellular matrix)의 주요 성분으로써 생체 내에서 발견된다. 이의 3차 구조는 직경이 약 50nm인 무작위(random) 코일 형태이다.
- [0048] 안구 내 유리체(vitreous) 공간은 98%가 물이지만 1-2%가 음이온을 가지는 proteoglycan filaments 연결된 collagen fibrils로 구성된 well-ordered, 3-dimensional network 구조를 가지고 있다. 이러한 공간에 branched PEI로만 코팅된 입자는 (+) 전하 및 (-) 전하의 상호 인력에 의해 유리체 구조를 통과하지 못하고 유리체 공간 내에서 뭉치게 (aggregation)된다. 본원 발명의 나노입자는 히알루론산이 외곽층으로 코팅되어 있어 전체적으로 (-) 전하를 띄게 되므로 입자들이 유리체 형성 물질과 뭉쳐서 이동이 방해되는 것을 막을 수 있다.
- [0049] 망막은 여러 세포층으로 구성되어 있는데 가장 안쪽은 Inner limiting membrane 이라고 하여 평균적으로 13.43 nm pore 구조를 가지고 있는 fine three-dimensional meshwork 구조로 이루어져 있으며, outer plexiform layer와 photoreceptor layer 사이에 external limiting membrane 이라는 pore 크기가 3-3.6 nm 의 tight junction 구조를 이루고 있는 구조의 physical barrier들을 가진다.
- [0050] 본원 발명의 상기 입자는 사이즈가 50~350nm, 바람직하게는 200~300nm, 더욱 바람직하게는 250~260nm 이다.
- [0051] 상기 나노입자는 크기만 고려하면 망막의 physical barrier들을 극복할 수 없지만, 나노입자의 외곽(셀)에 코팅된 히알루론산에 의해 Muller 세포의 CD44 receptor와 반응하여 트랜스시토시스(transcytosis)하여 망막을 통과할 수 있다. 즉, 본원발명의 나노입자는 히알루론산 외곽층을 구비함에 따라 외측 망막 (outer retina)에 효율적으로 도달할 수 있다.
- [0052] 상기 나노입자는 Muller 세포를 transcytosis 과정에서 일부 Muller 세포에 남아 Muller 세포에서의 표적 유전자 mRNA의 해석(translation)을 방해하여 표적 유전자 발현을 막을 뿐 아니라, 외측 망막에 도달한 나노입자는 다시 retinal pigment epithelium 세포내로 CD44 receptor 와 반응하여 엔도시토시스(endocytosis)하여 세포내로 들어가 표적 유전자의 mRNA의 해석(translation)을 방해하여 표적 유전자 발현을 막는다.
- [0053] 다른 양상에서 본 발명은 유전체 약물 전달용 나노입자를 제조하는 방법에 관계한다. 상기 방법은 코어 형성 단계, 코어 응축 단계 및 외곽층 코팅 단계를 포함한다.
- [0054] 상기 코어 형성 단계는 안티센스 RNA 와 이에 상보적인 센스 RNA가 포함된 환형 DNA를 증폭시켜 복수개의 이중 가닥 RNA를 제조하고, 상기 복수의 이중 가닥 RNA들이 자기 조립되어 구형 코어를 형성하는 단계이다. 상기 환형 DNA를 롤링 서클 증폭 (Rolling Cycle Amplification, RCA) 또는 롤링 서클 전사(Rolling Cycle Transcription, RCT)를 사용하여 복수개의 이중 가닥 RNA를 형성할 수 있다.
- [0055] 도 2에 상기 코어를 제조하는 방법이 도시되어 있다. 도 2를 참고하면, anti-VEGF siRNA의 안티센스와 이에 상보적인 센스서열을 인코딩한 긴 선형 단일가닥 DNA를 준비한다. 선형 DNA의 말단이 T7 프로모터 서열에 부분적으로 상보적이기 때문에, 긴 선형 가닥은 T7 프로모터 서열을 포함하는 짧은 DNA 가닥과 혼성화되어 환형

DNA를 형성한다. 환형 DNA의 nick은 화학적으로 T4 DNA ligase로 폐쇄된다. 폐쇄된 환형 DNA는 RCT를 통해 RNA 전사체를 생산하기 위해 사용된다. RCT를 이용하여 상기 환형 DNA로부터 안티-혈관생성인자 siRNA의 안티센스, 센스 가닥의 인코딩한 헤어핀 RNA 구조를 반복 단위로 생성한다. 상기 복수개의 헤어핀 구조는 자기조립되어 스폰지 형태의 코어를 형성할 수 있다. 즉, 본 발명은 상기 환형 DNA로부터 RCT를 이용하여 수많은, 예를 들면, 최소 1×10^3 이상의 작은 간섭 RNA (siRNA) 단위 서열 또는 안티센스 단위 서열을 가진 구형 코어를 제조할 수 있다.

[0056] 응축단계는 상기 구형 코어에 양이온성 고분자를 혼합하여 이온 상호 작용으로 상기 코어를 응축시키는 단계이다.

[0057] 상기 코어와 상기 양이온성 고분자의 중량비는 1 : 0.05 ~ 1 바람직하게는 1 : 0.1 ~ 0.5, 더욱 바람직하게는 1 : 0.2 ~ 0.25일 수 있다.

[0059] * 상기 응축단계는 상온에서 중성 pH 6.5~7.5 조건에서 반응시킨다.

[0060] 상기 코팅 단계는 양이온성 고분자 외면에 히알루론산 외곽층을 코팅하는 단계이다. 바람직하게는, 상기 방법은 양이온성 고분자의 (+)전하와 히알루론산의 (-) 전하와의 정전기적 인력으로 상기 외곽층을 코팅할 수 있다.

[0061] 상기 히알루론산은 상기 코어 대비 중량비로 1:0.1 ~ 0.5 (코어 : 히알루론산), 바람직하게는 1 : 0.2 ~ 0.25 일 수 있다.

[0062] 상기 코팅반응은 상온에서 중성pH(6.5~7.5) 조건에서 반응시킨다.

[0063] 상기 코팅단계에 대해서는 앞에서 상술한 내용을 참고할 수 있다.

[0064] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해 바람직한 실시예를 제시하지만, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065]

[0066] 실시예 1

[0067] 코어의 합성

[0068] 쥐의 혈관내피 성장 인자 (vascular endothelial growth factoer A (VEGF-A))의 센스는 5' - AUGUGAAUGCAGACCAAAGAA TT-3' 이고, 안티센스는 5' -UUCUUUGUCUGCAUUCA CAU TT-3' 이다. 도 2와 같이, 상기 센스 및 안티센스를 인코딩한 긴 선형 단일가닥 DNA를 제조하였다.

[0069] Ligase된 원형 DNA 템플릿을 T7 RNA 폴리머레이즈와 같이 37℃에서 20 시간 동안 반응버퍼 (8mM Tris-HCl, 0.4mM spermidine, 1.2mM MgCl₂, and 2mM dithiothreitol)에서 배양하였다. 생성된 용액을 여러 번 피펫 하고 5분 동안 초음파처리해서 입자를 분해하였다. 용액을 6,000rpm에서 6분 동안 원심분리하고 상층액을 제거 하였다. 그 후 RNase-free water를 첨가해 입자를 세척하였다. 용액을 1분 동안 다시 초음파처리하고 원심 분리 하였다. 세척단계를 세 번 더 반복해서 RCT 시약을 제거하여 RNA-microsponge 코어를 수득하였다. RNA-microsponge 코어의 농도는 Quant-iT RNA BR assay kits (Invitrogen)를 사용하여 측정하였다. 코어 제조는 본 발명자의 선행 논문을 참고하였다.(Self-assembled RNA interference microsponges for efficient siRNA delivery(nature material, 2012. 11. 26 공개))

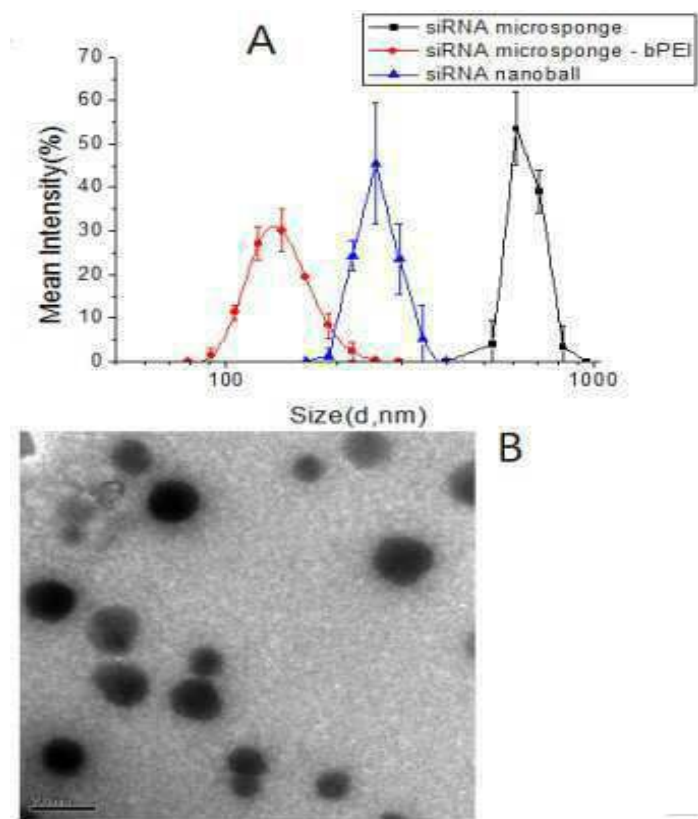
[0071] 나노볼(입자) 제조

[0072] siRNA microsponges 코어로부터 siRNA 나노볼(입자)을 제작하기 위해서, 합성된 1mg 의 siRNA microsponges를 100 마이크로리터의 nuclease-free water에 넣어 용해하고, 이를 branched PEI (bPEI) 용액 (1mg bPEI/ml 의 nuclease-free water)에 넣어 볼텍싱(vortexing)한 후, 상온에서 10분 동안 배양하였다. 이어 서, 히알루론산(HA)용액 (1mg HA/ml 의 nuclease-free water)을 상기 용액에 넣어 혼합 한 후 5분 동안 배양 하였다. 상기 용액을 13,200rpm으로 원심 분리하여 나노볼(입자)를 수득하였다.

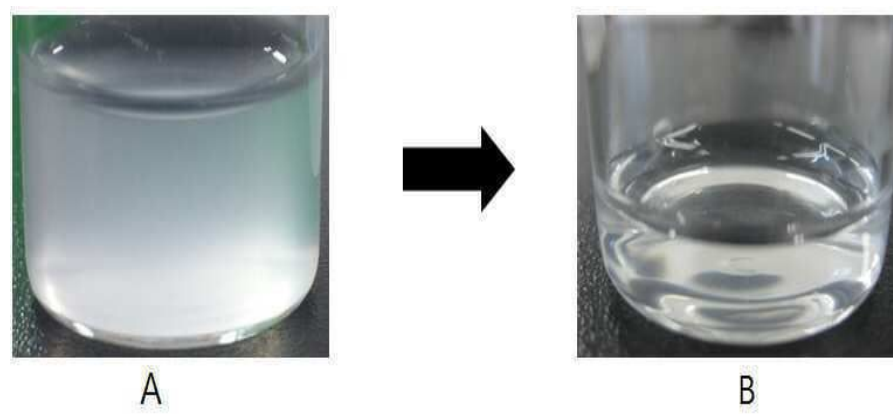
- [0074] 제조된 나노입자의 특성 측정
- [0075] 최종적으로 제조된 나노볼, siRNA-microsponge 코어, siRNA-microsponge 코어-bPEI 의 사이즈 분포를 도 3A에 나타내었다.
- [0076] siRNA-microsponge 코어는 $659.92 \pm 45.79\text{nm}$ (도 3A, 검정색), siRNA-microsponge-bPEI는 $141.68 \pm 19.38\text{nm}$ (도 3A, 빨간색)이고, 본 발명의 나노볼(입자)은 $259.82 \pm 33.35\text{nm}$ (도 3A, 파란색)이다. 도 3B는 최종적으로 제조된 나노볼(입자)이 구형이라는 것을 보여주는 전자현미경 사진이다.
- [0077] 도 4는 siRNA-microsponge 용액과 최종적으로 제조된 나노볼 용액을 촬영한 것이다. 도 4를 참고하면, siRNA-microsponge 용액은 sub-micro 또는 micro 사이즈이므로 탁도가 높지만, 본 발명의 나노볼 용액은 나노사이즈이기 때문에 매우 투명하다. 본 발명의 나노볼 용액은 매우 투명하다. 이것은 코팅에 의한 효과로, 입자의 size가 condense하여 투명도가 높아지는 것으로 코팅에 의한 입자 사이즈 축소를 간접적으로 확인할 수 있다.
- [0078] 세포배양
- [0079] B16F10 murine melanoma cells은 37°C 5% 이산화탄소 인큐베이터에 DMEM media(Welgene, Dalseogu, Daegu, South Korea)(10% FBS와 1% penicillin/streptomycin 혼합됨)에서 유지하였다. Human retinal pigment epithelial (ARPE-19) cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA)은 37°C 5% 이산화탄소 인큐베이터의 Dulbecco's modified Eagle's 배지 F-12 (DMEM/F-12, Life Technologies Korea, Seoul, South Korea)(10% FBS와 1% penicillin/streptomycin 혼합됨)에서 유지하였다.
- [0081] 세포 흡착 시험
- [0082] Human ARPE-19 cell 2×10^4 개를 12 well plate에 seeding 한 후에 24시간 동안 인큐베이팅시킨다. 각각의 well에 SYBR®Green I로 염색된 나노볼을 serum free medium과 섞어 $6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도로 넣어주었다. 이어서, 3시간, 12시간 후에 4% paraformaldehyde(PFA)로 고정시켜 DAPI 염색 후 형광 현미경으로 관찰하여 도 5A에 나타내었다.
- [0084] mRNA 발현 억제 시험
- [0085] 3×10^5 개의 B16F10 mouse melanoma cell을 6-well plate에 seeding 한 후, mono-siRNA (Mono), siRNA-microsponge (Sponge), no treatment (CTL, C), 상용화된 transfection agents인 (lipofectamine, Lipo), 그리고 본 발명의 나노입자(NP)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 cycler로 증폭시켜 mRNA의 수준을 확인하였으며, 같은 방법으로 정량적인 분석을 위해 real-time PCR로 확인하여 이를 도 5B, 도5C에 나타내었다.
- [0086] 도 5A를 참고하면, CTL의 경우 나노볼을 처리하지 않았기 때문에 붉은색 파장의 현광이 전혀 검출되지 않음을 확인하였다. 나노볼을 처리한 경우 시간에 따라 세포내로 나노볼이 유입되어 DAPI(파랑)으로 염색된 핵 주위에 위치하고 있음을 확인하였고, 12시간 후에는 나노볼로부터 siRNA-microsponge가 방출되어 나오는 것을 붉은 현광이 번지는 것으로 확인하였다.
- [0087] 도 5B를 참고하면, 상용화된 agent인 Lipo와 나노볼(NP) 그룹에서만 mouse VEGF-A mRNA가 나오지 않고 분해되었음을 보여준다. 즉, 나노볼이 mouse melanoma B16F10 cell의 mouse VEGF-A의 발현을 효과적으로 억제함을 알 수 있다. mouse beta actin은 각 sample이 같은 cDNA농도로 PCR실험이 진행되었음을 확인하는 데이터이다.
- [0088] 도 5C는 real-time PCR로 증폭시키면서 정량적인 분석을 한 데이터이다. 나노볼의 경우 mono, siRNA-microsponge가 VEGF-A mRNA를 거의 분해하지 못하는 것에 비해 26.5% 수준까지 VEGF-A 발현을 억제하는 것을 볼 수 있다.
- [0090] CNV 억제 시험과 정량화

- [0091] 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.
- [0092] laser를 조사한 쥐의 안구에서 CNV 현상이 일어나는데 laser 조사 하루 후에 나노볼을 해밀턴 주사기로 안구의 유리체강내 주입하여 치료효과를 본다. 2주후 안구적출 전에 쥐의 심장부분의 dextran-FITC를 주입하여 혈관을 염색하고 적출된 안구를 플랫마운팅(flat-mount)하여 현광현미경으로 관찰하였다. 또한 입자의 6주 동안의 지속 효과를 알아보기 위하여, 나노볼을 해밀턴 주사기로 안구의 유리체강내 주입하고 4주후에 laser를 조사하여 쥐의 안구에 CNV를 유발 하였다. 2주후 안구적출 전에 쥐의 심장부분의 dextran-FITC를 주입하여 혈관을 염색하고 적출된 안구를 플랫마운팅하여 현광현미경으로 관찰하였다. 2주차 샘플과 6주차 샘플에서 생성된 CNV 부분을 관찰하여 대표적인 이미지를 도 6A에 나타내었다. 도 6B는 Image J program을 사용하여 CNV 면적 분석 측정한 결과이다.
- [0093] 도 6A의 플랫마운트 CNV 이미지(좌측에서부터 control, 나노볼 주입후 2주차 샘플, 나노볼 주입후 6주차 샘플)를 보면 나노볼을 주입한 군들이 CNV가 control 군에 비하여 면적이 많이 줄었음을 정량적으로 알 수 있다. CNV를 일으키는 주요한 혈관이 모두 줄었음을 확인하였다.
- [0094] 도 6B를 살펴보면, CNV 유발 후 나노볼 주입 후 2주차 샘플을 보면 대조군(CTL)에 비해서는 약 1/4정도로 CNV 면적이 줄었음을 확인하였다. 또한 나노볼 주입 후 6주차 샘플의 경우 역시 대조군(CTL)에 비해 약 1/2정도로 CNV 면적이 줄어들어, 나노볼의 약효가 최소한 6주까지 지속되는 것을 알 수 있다.
- [0096] Oxygen-induced retinopathy(OIR) 모델에서 혈관억제 실험과 정량화
- [0097] 임신한 C57BL/6 mice를 사용하였다. 신생아 쥐가 태어난 후 7일부터 12일까지 75% Oxygen 탱크에 넣어 사육한다. 그 후, 신생아쥐에 마취와 산동제를 안구에 투여한 후, 나노볼을 해밀턴 주사기로 안구의 유리체강내에 주입하고 일반적인 조건의 동물 사육실에서 사육한다. 나노볼 주입 후 5일차(P17)와 12일차(P24)에 안구를 적출하고, 혈관을 염색할 수 있는 Lectin-FITC를 이용하여 staining 하고 플랫마운팅하여 현광현미경으로 관찰하였고 각 군의 대표적인 이미지를 도 7에 표시하였다.
- [0098] 또한 이러한 관찰된 이미지를 정량화하여 나노볼의 효과를 확인하기 위해 optic nerve로부터 1 mm 떨어진 부분에 $500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ 을 4군데를 임의로 선택하여 branched point를 단위면적당 계산하여, 각 군마다 비교하였고 이를 도 8A에 막대그래프로 표시하였다. 또한 각 이미지별로 Neovascularization area (NA)를 계산하여 각 군마다 비교하였고 이를 도 8B의 막대그래프로 표시하였다.
- [0099] 도 7을 관찰해보면, 대조군 (OIR CTL)에 비해 나노볼을 주입한 군이 혈관 생성이 억제되어 혈관의 굵기와 밀도가 줄어들고, NA 역시 줄어들음을 확인할 수 있다.
- [0100] 도 8은 도 7의 이미지를 정량화한 데이터로, 이를 통해 나노볼 주입 후 5일차와 12일차에 해당하는 군이 대조군 (OIR CTL)에 비해 혈관생성이 억제되고 NW가 억제됨을 확인할 수 있었다.
- [0101] 독성 실험
- [0102] MTT assay : Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide(MTT)를 PBS에 5mg/ml로 녹িয়ে solution 으로 만든다. MTT solution은 세포내의 미토콘드리아 내에서 반응하여 특정 파장대를 흡수는 발색물질을 만드는데 이를 통해 세포수로 간접적으로 알 수 있다. human ARPE-19 cell line은 CNV 억제를 통하여 황반변성을 치료하기 위하여 유전체입자가 전달해야 할 목표 세포 중 하나이다. 2×10^4 개의 ARPE-19 cell을 96 well plate에 seeding 한 후 24 시간 incubation 시킨다. 세포가 plate 내에 안착되면 serum free medium과 나노볼로 처리한 후에 24, 48, 72h 후에 DPBS로 washing 하고 MTT 시약으로 처리하여 6시간후에 DMSO 100 μl 씩 처리하여 plate reader기로 cell viability를 측정하였다.
- [0103] Hematoxylin and eosin stain : Hematoxylin and eosin stain (H&E stain)
- [0104] 널리 쓰이는 조직분석 방법으로, 조직을 paraffin에 담아 블록으로 만든 후에 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.

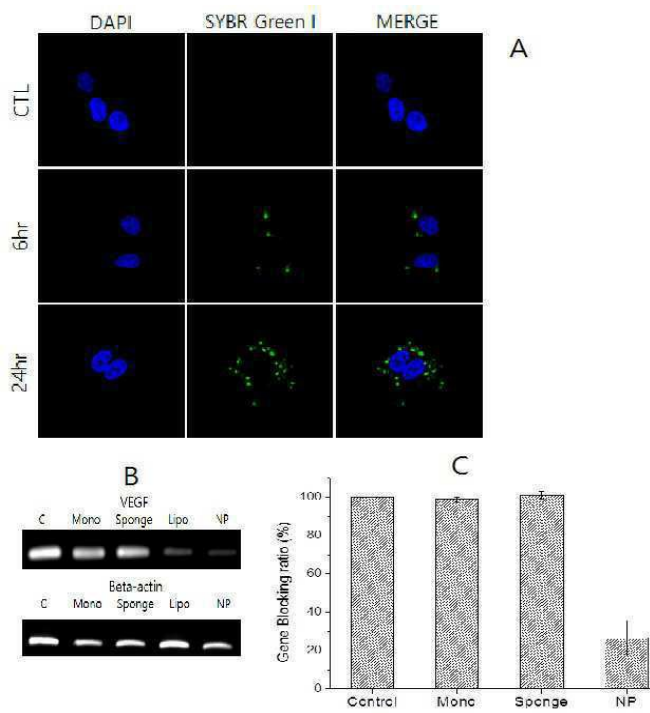
도면3



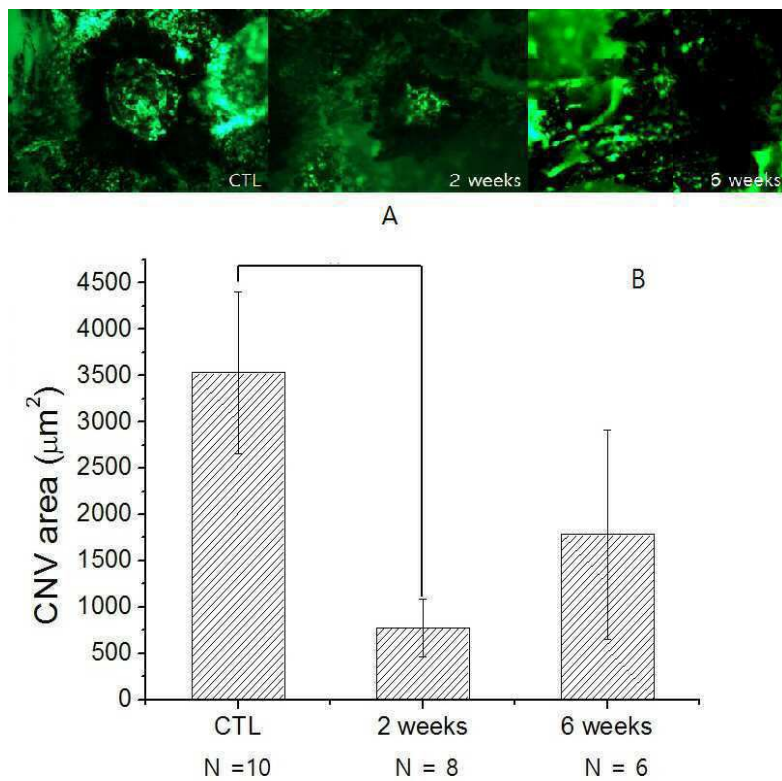
도면4



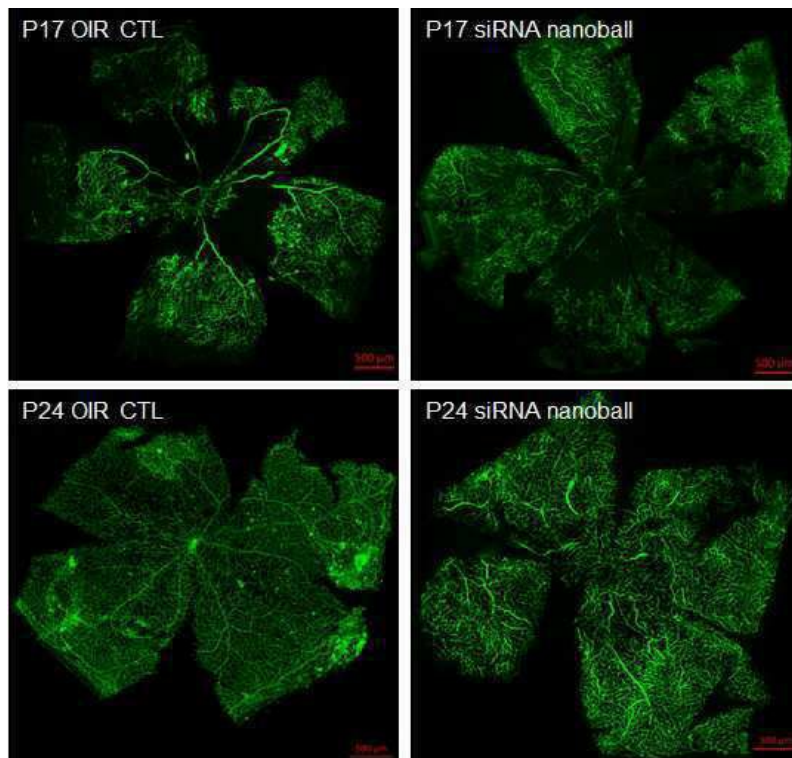
도면5



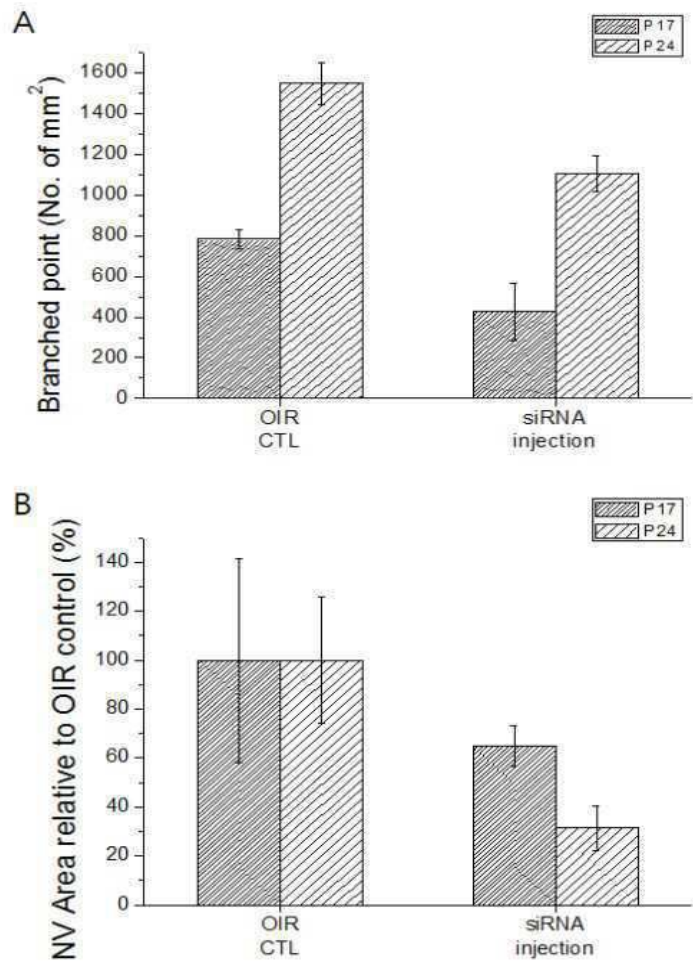
도면6



도면7



도면8



도면9

