


|  |                                    |   |
|--|------------------------------------|---|
|                           | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2009-0058562<br>(43) 공개일자 2009년06월09일                      |
| (51) Int. Cl.<br>A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/722 (2006.01)<br>A61K 31/7088 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) |                                    | (71) 출원인<br>에프엠씨 바이오폴리머 아에스<br>노르웨이 엔-3013 드라멘 톰테그트. 36                 |
| (21) 출원번호 10-2009-7007646  |                                    | (72) 발명자<br>아투스 퍼 아터 스벤<br>스웨덴 에스-에스이-752 63 업프살라 노렌스<br>브이57           |
| (22) 출원일자 2009년04월14일<br>심사청구일자 없음<br>번역문제출일자 2009년04월14일  |                                    | 이사 모하메드 마흐무드<br>스웨덴 에스-에스이-754 24 업프살라 칸토르스가<br>탄 28 라그 200<br>(뒷면에 계속) |
| (86) 국제출원번호 PCT/EP2007/059740<br>국제출원일자 2007년09월14일  |                                    | (74) 대리인<br>김창세, 장성구  |
| (87) 국제공개번호 WO 2008/031899<br>국제공개일자 2008년03월20일   |                                    |   |
| (30) 우선권주장<br>60/844,729 2006년09월15일 미국(US)  |                                    |   |

전체 청구항 수 : 총 19 항

#### (54) 올리고뉴클레오타이드의 비-바이러스성 전달 시스템

#### (57) 요약

본 발명 siRNA를 나노크기의 입자에 자가-조립할 수 있고, 효소 분해에 대한 보호를 제공하고, 시험관 내에서 오랜 기간동안 안정한 유전자 침묵을 매개하는 저분자량 키토산 다량체를 제공한다. siRNA의 저분자량 키토산과의 착체를 형성하는데 있어 구조적 다양성을 조정하는 것은 시험관 내 및 생체 내에서 siRNA를 위한 효과적인 대안 전달 시스템을 제공한다.

(72) 발명자

스트랜드 새비나 프로차즈코바

노르웨이 엔-7075 틸러 란그달렌 28

바름 크젤 모르텐

노르웨이 엔-7033 트론드헤임 탐브스 리체스 베그  
2

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- (a) 30 내지 300 범위의 중합도(DPn)를 갖고, 탈아세틸화도가 90%를 초과하는 저분자량 키토산; 및
  - (b) 올리고뉴클레오타이드
- 의 복합체를 포함하는 조성물.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,  
저분자량 키토산이 화학적 또는 효소적 방법을 이용하여 고분자량 키토산으로부터 수득되는 조성물.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서,  
저분자량 키토산의 탈아세틸화도가 95%를 초과하는 조성물.

### 청구항 4

제 3 항에 있어서,  
저분자량 키토산의 탈아세틸화도가 99%를 초과하는 조성물.

### 청구항 5

제 1 항에 있어서,  
본질적으로 순(net) 양의 전하 비를 갖는 조성물.

### 청구항 6

제 1 항에 있어서,  
저분자량 키토산이 표적 리간드 및 안정화제로 유도체화된 조성물.

### 청구항 7

제 1 항에 있어서,  
올리고뉴클레오타이드가 숙주 세포로 도입되었을 때 그의 기능을 발현할 침묵 서열(silencing sequence)을 포함하는 조성물.

### 청구항 8

제 7 항에 있어서,  
올리고뉴클레오타이드가 RNA 분자, 안티센스 분자, 라이보자임 및 마이크로RNA로 구성된 군에서 선택되는 조성물.

### 청구항 9

제 8 항에 있어서,  
3.5 내지 8.0의 범위의 pH를 갖는 조성물.

### 청구항 10

제 9 항에 있어서,  
7.1 내지 7.6의 범위의 pH를 갖는 조성물.

#### 청구항 11

- (a) 저분자량 키토산을 수성 용매에 노출시키는 단계;
- (b) 단계 (a)의 수용액을 수성 용매 중의 올리고뉴클레오타이드와 혼합시키는 단계; 및
- (c) 조성물의 pH를 3.5 내지 8.0의 범위로 유지시키는 단계를 포함하는 제 1 항의 조성물의 제조 방법.

#### 청구항 12

제 11 항에 있어서  
단계 (b)에서 생성된 생성물 용액의 부피를 감소시켜 요망되는 농도의 조성물을 수득하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 13

제 1 항의 조성물을 포유동물에 도입하는 것을 포함하는, 핵산을 포유동물에 투여하는 방법.

#### 청구항 14

제 13 항에 있어서,  
폐, 코, 경구, 눈, 협측, 설하, 국소, 직장 또는 질 경로에 의해 점막 조직으로 투여함으로써 조성물을 포유동물에 도입하는 방법.

#### 청구항 15

제 13 항에 있어서,  
정맥내, 근육내, 피내(皮內), 두개내, 척추내, 피하 또는 심장내 투여인 비경구 경로에 의해 점막 조직으로, 또는 내부 기관, 혈관 또는 다른 신체 표면 또는 수술동안 노출되는 체강으로 투여함으로써 조성물을 포유동물에 도입하는 방법.

#### 청구항 16

조성물이 포유동물의 하나 이상의 세포의 내부에서 그의 기능을 발현할 수 있는 올리고뉴클레오타이드인 방법.

#### 청구항 17

포유동물의 예방적 또는 치료적 처치를 위해 제 1 항의 조성물을 포함하는 약제를 제조하는 것을 포함하는 제 1 항의 조성물을 이용하는 방법.

#### 청구항 18

생체 내 또는 시험관 내 진단 방법에서 사용하기 위한 진단 시약으로서 제 1 항의 조성물을 이용하는 방법.

#### 청구항 19

a) 폐, 코, 경구, 눈, 협측, 설하, 국소, 직장 또는 질 경로에 의해 점막 조직으로, b) 정맥내, 근육내, 피내, 두개내, 척추내, 피하 또는 심장내 투여인 비경구 경로에 의해 점막 조직으로, 또는 c) 내부 기관, 혈관 또는 다른 신체 표면 또는 수술동안 노출되는 체강으로 투여됨으로써 포유동물에 도입되는 것을 포함하는 약성  
종양, 자가면역 질환, 유전 질환, 병원성 감염 또는 다른 병리학적 질환의 예방적 또는 치료적 처치를 위한 유전자 치료, 안티센스 치료 또는 유전자 백신용 약제의 제조에 있어서 제 17 항의 조성물의 용도.

### 명세서

### 기술분야

<1> 본 발명은 일반적으로 핵산 전달 및 유전자 발현 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 올리고뉴클레오타이드,

특히 작은 간섭 RNA(siRNA)를 위한 신규한 비-바이러스성 전달 시스템에 관한 것이다.

## 배경 기술

<2> RNA 간섭(RNAi)은 이중 나선의 짧은 간섭 RNA(siRNA)에 의해 대상 유전자의 발현을 특이적으로 하향 조절시키는 것을 포함하는 자연적인 기작이다[1]. RNAi는 시험관 내 표적 스크리닝 및 확인, 및 기능성 게놈에서 점점 더 잘 확립된 수단이 되고 있다[2,3]. 보다 중요하게는 siRNA-계 약물의 개발은 복합 질병, 예를 들면 당뇨병, 암 및 바이러스 감염에 대한 치료제를 발견하는데 유망하다[4-7]. 플라스미드 DNA(pDNA)와 같은 다른 형태의 핵산의 경우, 열악한 혈청 안정성, 바람직하지 않은 생체 내 약물동력학 및 비효율적인 세포 흡수가 성공적인 유전자 침묵(gene silencing) 용도에 대한 주된 도전 과제로 남아있다. 이러한 문제점을 부분적으로 극복하기 위한 한가지 전략이 세포 흡수를 개선시킬 뿐 아니라 뉴클레아제 분해에 대한 저항을 나타내는 화학적으로 개질된 siRNA를 사용하는 것이다[9-11]. 다른 전략은 폴리양이온계 siRNA 배합물을 이용하는 것을 포함한다. 예를 들면, 양이온성 지질계 배합물은 siRNA의 시험관 내 및 생체 내 전달에 효과적인 것으로 보인다[12-15]. 이와는 대조적으로 양이온성 중합체는 초기에는 올리고뉴클레오타이드 전달에 부적합한 것으로 간주되었다[16]. 그러나, 최근의 연구는 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리아미도아민(PAMAM) 덴트라이머 및 폴리-L-라이신(PLL)과 같은 양이온성 중합체가 siRNA 전달에 사용될 수 있음을 보여주었다[17-19]. pDNA에 대해 최적화된 조건 하에서, 올리고뉴클레오타이드와 배합되어 전달하기 위한 전달 시스템으로서의 양이온성 중합체의 효율에 대한 모순적인 사항들이 고려되었다. 더욱이, 여러 보고서들에서는 상기 언급된 폴리양이온의 미래의 임상 용도를 방해할 수 있는 이의 생체 내 독성에 대한 우려가 증가되고 있다[20-22]. 따라서, 독성이 없고, 효과적인 siRNA 전달 벡터에 대한 동기가 부여된다.

## <3> 발명의 요약

<4> 본 발명은 (a) 30 내지 300 범위의 평균 중합도 수(DPn; Degree of Polymerization)를 갖는 저분자량 키토산(여기서, 저분자량 키토산의 탈아세틸화도는 90% 초과임) 및 (b) 올리고뉴클레오타이드의 복합체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 제1항의 조성물은 화학적 또는 효소적 방법을 이용하여 고분자량 키토산으로부터 수득된 저분자량 키토산을 포함한다. 저분자량 키토산의 탈아세틸화도는 95% 초과, 가장 바람직하게는 99% 초과이다. 또한, 조성물은 본질적으로 네트 양전하 비를 갖는다. 저분자량 키토산은 표적 리간드와 안정화제로 유도체화되어 있다. 올리고뉴클레오타이드는 숙주 세포에 도입되면 기능을 발현할 침묵 서열(silencing sequence)를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 RNA 분자, 안티센스 분자, 라이보자임 및 마이크로 RNA로 구성된 군에서 선택된다. 본 발명의 조성물은 3.5 내지 8.0의 범위, 보다 바람직하게는 7.1 내지 7.6의 범위의 pH를 갖는다. 본 발명은 또한 하기 단계를 포함하는 본 발명의 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다: (a) 저분자량 키토산을 수성 용매에 노출시키는 단계, (b) 단계 (a)의 수용액을 수성 용매중의 올리고뉴클레오타이드와 혼합시키는 단계, 및 (c) 조성물의 pH를 3.5 내지 8.0의 범위, 보다 바람직하게는 7.1 내지 7.6의 범위로 유지시키는 단계. 본 발명은 또한 단계 (b) 후에, 단계 (b)에서 생산된 생성물 용액의 부피를 감소시켜 바람직한 농도의 조성물을 수득하는 단계를 포함하는 조성물의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 개시된 조성물을 이용하고, 조성물을 포유동물에 도입함을 포함하는, 핵산을 포유동물에 투여하는 방법을 포함한다. 조성물을 포유동물에 도입하는 방법은 폐, 코, 경구, 눈, 협측, 설하, 국소, 직장 또는 질 경로에 의한 점막 조직으로의 투여에 의해 달성된다. 다르게는 조성물은 정맥내, 근육내, 피하, 두개내, 척추내, 피하 또는 심장내 투여인 비경구 경로에 의해 점막하 조직으로 투여되거나, 내부 기관, 혈관, 또는 다른 신체 표면 또는 수술 동안 노출된 체강으로 투여됨으로써 포유동물에 도입된다. 본 발명의 방법은 개시된 조성물을 포유동물에 투여하고, 이에 의해 올리고뉴클레오타이드가 포유동물의 하나 이상의 세포 내부에서 기능을 발현하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 포유동물의 예방적 또는 치료적 치료를 위한 약제로서 제조된 개시된 조성물의 이용 방법을 포함한다. 이들 용도는 유전자 치료, 안티센스 치료, 또는 악성 종양, 자가면역 질환, 유전적 질환, 병원균 감염 및 다른 병리학적 질병의 예방적 또는 치료적 치료용 유전자 백신을 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다. 또한, 본 발명은 생체 내 또는 시험관 내 진단 방법에서 사용하기 위한 진단 시약으로서 개시된 조성물을 이용하는 것을 포함한다.

## 발명의 상세한 설명

<12> 도 1은 siRNA 배합물의 물리적 안정성(A) 및 알엔에이즈(RNase) A 보호(B)를 보여준다. 선형 DPn85 키토산과 배합된 siRNA 복합체는 pH 값 둘 모두와 시험된 모든 전하 비에서 가장 높은 물리적인 안정성을 나타내었다. 모든 선택된 폴리양이온은 알엔에이즈 A에 의한 효소 분해로부터 siRNA를 보호할 수 있었다. 아가로즈 겔 전기영동의 경우, 100ng의 siRNA를 각각의 웰에 부하하였다. 키토산 DPn18 배합물의 경우 30:1(+/-) 및 60:1(+/-)

-)의 전하 비로 복합체를 배합하였다. PEI 배합물의 경우 15:1(+/-)의 전하 비를 이용한 반면, 리포펙타민 2000과의 siRNA의 복합체는 2:1(+/-)의 중량 비로 배합되었다. 3개의 독립적인 실험으로부터의 대표적인 겔을 도시한다.

<13> 도 2는 정상 HEK 293 세포(A)와 안정적으로 루시퍼라제를 발현하는 HEK 293 세포(293-Luc)(B,C)에서 siRNA의 시험관 내 전달을 보여준다. 처리하지 않은 대조군 세포와 비교하였을 때 특정한 siRNA-Luc를 pLuc(A) 또는 pGFP(C)로 공동 형질감염시켰을 때 상당한 루시퍼라제 침묵이 달성되었다. siRNA-Luc를 293-Luc 세포(B)로 단독으로 전달하였을 때 루시퍼라제 억제 효율이 감소되었다. 루시퍼라제 유전자 발현은 형질감염 48시간 후에 분석되었다. pDNA 전달에 대해 이전에 최적화된 키토산을 이용하여(분지된 DPn34)[27] 10:1의 전하 비로 배합된 siRNA와 복합체를 형성하였다. PEI 복합체의 경우 5:1(+/-) 전하 비를 이용하였고, LF2000과 siRNA의 복합체는 2:1(+/-)의 중량 비로 배합되었다. 유전자 발현 결과는 평균 값±S.D.; n=4로서 표현되었다.

<14> 도 3은 올리고뉴클레오타이드와 복합체를 형성한 선형(A) 및 분지(B) 키토산의 구조적 다양성이 293-Luc 세포에서 루시퍼라제 침묵 활성화에 미치는 영향을 보여준다. 34 단량체 단위 보다 긴쇄 길이를 갖는 선형 키토산(34 단량체 단위보다 더 높은 평균 중합도 수)을 이용하여 형성된 복합체의 경우쇄 길이와 전하 비가 결정적이지 않은 것으로 보이지만, 분지쇄 키토산 복합체에 의해 매개되는 효과적인 루시퍼라제 침묵에는 더 긴 키토산쇄 길이와 더 높은 전하 비의 측면에서 더 높은 전하 밀도가 요구된다. 150nM (100ng/웰)의 siRNA 농도가 이용되었다. 루시퍼라제 유전자 발현을 형질전환 48시간 후에 분석하였다. 30:1(+/-)의 전하 비에서 키토산 복합체를 배합하였다. 유전자 발현 결과는 평균 값±S.D.; n=4로서 표현되었다.

<15> 도 4는 선형 저분자량 키토산의 siRNA 농도 독립성과 상대적인 효율을 보여준다. 더 낮은 siRNA 농도에서(15 내지 30ng/웰, 22 내지 44nM/웰의 siRNA 농도에 상응함), 선형 DP<sub>n</sub>85 저 분자량 키토산이 대조군의 비처리된 293-Luc 세포의 72 내지 95%로 루시퍼라제 발현을 녹다운(knocking down)시킴으로써 가장 높은 효능을 나타내었다. 루시퍼라제 유전자 발현을 형질감염 48시간 후에 분석하였다. 30:1(+/-)의 전하 비에서 키토산 복합체를 배합하였다. 유전자 발현 결과는 평균 값±S.D.; n=4로서 표현되었다.

<16> 도 5는 루시퍼라제 침묵 활성화에 미치는 혈청의 효과를 도시한다. 시험된 다양한 폴리양이온 배합물 중에서, 모든 선형 키토산 및 분지된 DP<sub>n</sub>85는 형질감염된 매질 중의 10% 혈청의 존재 하에서 293-Luc 세포에서의 이들의 루시퍼라제 침묵 활성을 유지하였다. 150nM의 siRNA 농도를 이용하였다. 루시퍼라제 유전자 발현을 형질감염시킨지 48시간 후에 분석하였다. 저분자량 키토산 및 PEI의 경우, 각각 30:1 및 15:1(+/-)의 전하 비에서 siRNA를 배합하였다. KF2000과의 SiRNA 복합체를 2:1(+/-)의 중량 비에서 배합하였다. 유전자 발현 결과는 평균 값±S.D.; n=4로서 표현되었다.

<17> 도 6은 siRNA 배합물의 세포 독성을 도시한다. 세포내 데하이드로게나제 활성(세포 독성의 측정치)을 MTT 방법에 의해 직접 또는 다양한 SiRNA 배합물로 293-Luc 세포를 형질감염시킨지 24시간 후에 측정하였다. PEI 및 LF2000과는 대조적으로, 세포 형태학 및 세포내 데하이드로게나제 활성 둘 모두 선형 DP<sub>n</sub>85와 배합된 siRNA 복합체로 형질감염된 후에 유지되었다. LF2000 복합체는 형질감염된 직후에 상당한 독성을 나타내지만, 형질감염된지 24시간 후에 세포 생활성은 회복되었다. 150nM의 siRNA 농도를 이용하였다. 저분자량 키토산 및 PEI의 경우, 각각 30:1 및 15:1(+/-)의 전하 비에서 siRNA를 배합하였다. LF2000과의 SiRNA 복합체를 2:1(+/-)의 중량 비에서 배합하였다. 유전자 발현 결과는 평균 값±S.D.; n=4 내지 5로서 표현되었다.

<18> 도 7은 293-Luc 세포(A,B,C) 및 안정적으로 루시퍼라제를 발현하는 SKOV-3 세포에서 시험관 내 루시퍼라제 침묵의 시간 경과를 보여준다. 293-Luc 및 SKOV-3-Luc 세포 둘 모두에서 DP<sub>n</sub>85의 선형 키토산은 초기 개시 및 5일 동안 지속된 지속된 루시퍼라제 침묵(이는 손상되지 않은 siRNA의 세포내의 안정적인 방출을 제안한다)의 측면에서 가장 우수한 루시퍼라제 침묵 동역학을 나타내었다. 44nM(30ng/웰)의 siRNA 농도를 이용하였다. 저분자량 키토산 및 PEI의 경우, 각각 30:1 및 15:1(+/-)의 전하 비에서 siRNA를 배합하였다. LF2000과의 SiRNA 복합체를 2:1(+/-)의 중량 비에서 배합하였다. 유전자 발현 결과는 평균 값±S.D.; n=4로서 표현되었다.

#### <19> 서열 목록의 간단한 설명

<20> 서열 번호 1: siGL3(센스, 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3');;

<21> 서열 번호 2: 안티센스, 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3'는 메드프로브(Medprobe, 스웨덴 룬드 소재)에서 주문한 루시퍼라제 유전자(siRNA-Luc)를 목표로 하는 개질되지 않은 siRNA 듀플렉스(duplex)이다[28];

<22> 서열번호 3: 미스매칭(mismatching) siRNA; siCONTROL 비-목표 siRNA #1(siCON1; 센스,



5'-UAGCGACUAAACACAUCAAUU-3'; ),

- <23> 서열 번호 4, 안티센스, 5'-UGAUGUGUUUAGUCGCUAUU-3' 를 다마콘 리서치 인코포레이티드(Dharmacon Research, Inc.(CO, 라파에트)에서 주문하였다.
- <24> 발명의 상세한 설명
- <25> (1-4) 연결된 2-아미노-2-데옥시-β-D-글루코스(GlcN)와 N-아세틸화된 유사체 2-아세트아미노-2-데옥시-β-D-글루코스(GlcNAc)로 구성된 선형 이원 폴리사카라이드 패밀리는 생체 적합한 양이온성 중합체이고, 플라스미드 pDNA 유전자 전달에 적합한 것으로 보였다[23 내지 27]. 잘 확인된 분자량 분포의 선형 및 분지형 키토산 다량체를 이용하여 상당히 효과적인 시험관 내 및 생체 내 유전자 전달이 수득되었다[25, 27]. 키토산-다량체 복합체는 감소된 점도를 포함한 개선된 물성을 갖고, 응집에 대한 경향이 더 낮다. 이들 복합체는 또한 개선된 세포 흡수, 이른 개시 및 높은 생체 내 유전자 발현을 포함하는 개선된 효율을 갖는다.
- <26> 본 발명에서 신규한 siRNA 전달 시스템에서 강력한 저분자량(7 내지 17 kDa)의 본질적으로 완전 탈아세틸화된(99% 초과로 탈아세틸화된) 키토산이 실현된다. 리포펙타민 2000(LF2000)과 PEI(선형 및 분지형)를 대조군으로 이용하여, 저분자량 키토산과 배합된 siRNA 복합체의 알엔에이즈 분해에 대한 내성 및 물리적 안정성을 조사하였다. siRNA 전달에 대한 대부분의 보고서에서, 공동 형질감염 방법을 이용하여 생리학적으로 연관이 없는 목표 또는 무관한 pDNA를 siRNA 배합물에 혼입하였다. 따라서, 먼저 시험관 내에서 안정하게 루시퍼라제를 발현시키는 세포주에서 다양한 폴리양이온에 의한 siRNA 전달 효율에 이러한 혼입이 미치는 영향을 조사하였다. 그런 다음, siRNA 배합물과 저분자량 키토산의 복합체에서 배합 및 구조를 조사하였다. 보다 구체적으로, 저분자량 키토산(쇄 길이 및 분지)의 구조적 다양성의 역할, 배합 변수(전하 비, siRNA 농도) 및 혈청의 효과를 조사하고, 시험관 내에서의 유전자 침묵 활성 효율과의 연관성을 조사하였다. 다양한 siRNA 배합물의 세포 독성을 루시퍼라제 유전자 침묵의 시험관 내 동역학과 비교하였다.
- <27> 이 연구는 작은 간섭 RNA(siRNA)에 대한 신규한 전달 시스템으로서 저분자량 키토산의 가능성을 입증한다. 대조군으로 폴리에틸렌이민(PEI)과 리포펙타민 2000(LF2000)을 이용하여 다양한 쇄 길이의 키토산을 siRNA와 복합체를 형성하고, 이들의 물리적 안정성과 효소 분해에 대한 보호 효과를 시험하였다. 안정하게 루시퍼라제를 발현하는 293 세포(293-Luc)에서 siRNA 복합체의 세포 독성 및 루시퍼라제 유전자 침묵 활성을 시험관 내 조사하였다. 배합 변수 뿐 아니라 키토산 구조 변수가 siRNA 복합체의 루시퍼라제 침묵 활성에 미치는 효과 또한 연구하였다. 저분자량 키토산은 알엔에이즈 분해에 대해 보호를 제공하는 물리적으로 안정한 나노입자(34 내지 86nm)로 siRNA를 복합체 형성할 수 있다. 저분자량 키토산과 siRNA사이의 더 높은 전하 비 및/또는 더 긴 키토산 쇄에 의해 제공되는 양전하의 더 높은 수의 중요성은 시험관 내에서 더 높은 루시퍼라제 침묵 활성을 매개하기 위한 것으로 도시된다. PEI 및 LF2000과는 달리, 저분자량 키토산과 배합된 siRNA 복합체는 10% 혈청을 함유하는 형질감염 배지에서 이들의 루시퍼라제 침묵 활성을 유지시켰다. 저분자량 키토산은 또한 PEI 및 LF2000에 비해 최소한의 세포 독성을 나타내었다. 85 단량체 단위의 수평균 중합도(DPn)(DPn85)를 갖는 저분자량 키토산은 293-Luc 세포에서 5일동안 지지된 루시퍼라제 유전자 발현의 95%를 침묵시키기 위해 44nM 정도로 낮은 siRNA 농도를 요구하였다. 모두 합쳐서, 본 출원인의 발견은 저분자량 키토산이 siRNA를 위한 효율적인 대안적 전달 시스템임을 입증하였다. 본 출원인은 상당히 짧은 쇄 길이(18 내지 34 단량체 단위)의 본질적으로 완전히 탈아세틸화된 저분자량 키토산이 시험관 내 및 생체 내에서 pDNA의 전달에 최적이었음을 이전에 보고하였다[25, 27]. 본 연구에서는 본질적으로 완전히 탈아세틸화된 키토산 다량체의 시험관 내 siRNA 전달 시스템으로서의 구조-성질 관계에 대해 보고한다. 이 목적을 위해서, 다양한 쇄 길이의 선형 및 트라이사카라이드-치환된(분지된) 키토산 다량체를 선택하였다. 본 출원인은, pDNA 전달과는 달리, 34 단량체 단위보다 더 긴 선형 올리고뉴클레오타이드가 siRNA와 물리적으로 안정한 복합체를 형성하였고, 루시퍼라제-발현 HEK 293(293-Luc) 세포에서 시험관 내에서 가장 높은 루시퍼라제 침묵 활성을 매개함을 발견하였다. 명확하게, 구조-성질 연관성이 siRNA와 pDNA 사이에 상당히 상이하다. 이런 상이함은 siRNA 분자가 pDNA에 비해 더 짧고, 덜 가요성이며, 더 낮은 음전하 밀도를 갖는다는 점에 의해 설명될 수 있다. 따라서, 물리적으로 안정하고 효율적인 나노입자로의 siRNA의 복합체 형성은 폴리양이온과의 더 강한 이온 상호작용을 요구한다[18, 33].
- <28> 본 연구에서 본질적으로 완전히 탈아세틸화된 저분자량 키토산으로 배합된 siRNA 복합체의 입자 크기(100nm 미만)는 지질, PLL 및 고분자량 키토산(85% 탈아세틸화)에 대해 이전에 보고된 것에 비해 예상치 못하게도 훨씬 더 작았다[33, 34]. 이는 본질적으로 완전히 탈아세틸화된 키토산 주쇄상의 더 높은 전하 밀도에 기인할 수 있다. 또한, 저분자량 키토산의 개선된 용해성 및 감소된 점도는 siRNA 복합체의 작은 입자 크기에 기인할 수 있다[35]. 이전의 발견과 일치하도록, 단일 패키지로서 무관한 pDNA(pGFP)와 함께 siRNA-Luc를 공동 형질감염시

키먼 시험관 내에서 293-Luc 세포에서 상당한 루시퍼라제 침묵 활성이 생성된다. 그러나, 본 연구에서는, pDNA를 siRNA 배합물에서 배제시킬 경우, 유전자 침묵 활성이 상당히 손상됨을 보여주었다. 따라서, 본 출원인은, 높은 음전하 밀도를 갖는 거대 분자인 pDNA의 존재가 개선된 협동적 상호작용을 통해 다양한 폴리양이온과의 siRNA 복합체 형성 효율에 상당히 기여하는 것으로 결론내렸다.

<29> 본 출원인은 또한 더 긴 키토산 쇄 및/또는 더 높은 전하 비의 측면에서 높은 전하 밀도가 물리적으로 안정한 복합체 뿐만 아니라, 또한 시험관 내에서 가장 효율적인 유전자 침묵을 수득할 것임을 보여주었다. 본 출원인의 발견은 siRNA/덴드라이머 복합체에 의해 수득되는 더 우수한 복합체 형성 및 유전자 침묵 활성을 위해서는 더 높은 생성 수, 더 높은 전하 비 및 더 높은 siRNA 농도(100nM)가 요구된다는 PAMAM 덴드라이머에 대해 보고된 이전의 보고와 잘 일치한다[18]. LF2000계 배합물의 경우 유사한 높은 농도의 siRNA가 또한 권장되었다[12]. 본 발명에서, 가장 효율적인 저분자량 키토산(선형 DPn85)은 293-Luc 세포에서 루시퍼라제 유전자 발현을 95% 이상 침묵시키기 위해서는 44nM 정도의 낮은 siRNA 농도를 필요로 한다.

<30> 또한, 본 연구에서의 실험 조건 하에서, 긴, 선형 저분자량 키토산과 배합된 siRNA 복합체는 형질감염 배지 중의 10% 혈청의 존재하에서 그들의 루시퍼라제 침묵 활성을 유지하였다. 유지된 침묵 활성에 대한 가장 그럴듯한 이유는 이들 복합체가 PEI 및 LF2000과는 달리, 이런 비교적 높은 혈청 농도에서 응집에 대해 저항할 수 있다(이는 개선된 콜로이드 안전성에 반영된다)는 것이다. 더 짧고 분지된 키토산 다량체가 감소된 유전자 침묵 활성을 나타낸다는 발견은 전하 밀도가 감소되고 키토산 주쇄와 siRNA 사이의 전하 상호작용이 입체적으로 방해된 결과로서 siRNA 복합체 형성이 손상된 것으로 설명될 수 있다.

<31> 고분자량 키토산과 배합된 siRNA 복합체가 최소의 세포 독성을 갖는다는 보고와 일치하게, 본 출원인은 본 연구에서 높은 siRNA 농도(150nM)가 배합에 사용된 경우에조차 293-Luc 세포가 DPn85 저분자량 키토산으로 형질감염된 후에 그들의 세포내 데하이드로게나제(dehydrogenase) 활성을 유지함을 보여주었다[33]. 저분자량 키토산은 PAMAM 덴드라이머에 대해 이전에 공개된 결과에 비해 훨씬 더 낮은 세포 독성을 나타내었으며, 이전의 발표 결과는 50 내지 100nM의 siRNA 농도를 이용하면 세포 생존 능력이 상당히 감소(60 내지 50%)된다는 것이다.

<32> 최종적으로, 선형 저분자량 키토산과 함께 배합된 siRNA 복합체는 PEI에 대해 이전에 보고된 것[17]에 비해 더 이른 개시 및 지속적인 루시퍼라제 침묵 활성을 나타내었다. DPn85 키토산 올리고뉴클레오타이드의 개선된 동역학은 작은 나노-크기의 siRNA 복합체의 개선된 세포 흡수 및 손상되지 않은 siRNA의 세포 내의 지속적인 방출 결과로 추정된다.

## 실시예

### <33> 2. 재료 및 방법

#### <34> 2.1. 재료

<35> 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 개똥벌레 루시퍼라제(pLuc) 또는 녹색 형광 단백질(pGFP)를 함유하는 GMP-등급 플라스미드(gWiz™)를 미국 노쓰 다코다주 파고 소재의 알드브론(Aldevron)에서 구입하였다. 리포펙타민 2000(LF2000)을 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 구입하였다. 선형 PEI; ExGen 500(분자량: 22kDa)을 독일 페레멘타스(Fermentas)에서 구입하였다. 분지된 PEI(분자량: 25kDa)를 스웨덴 스톡홀름 소재의 알드리치 스웨덴(Aldrich Sweden)에서 구입하였다.

#### <36> 2.2 siRNA 듀플렉스

<37> 서열 번호 1: siGL3(센스, 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3');;

<38> 서열 번호 2: 안티센스, 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3' 는 메드프로브(스웨덴 룬드 소재)에서 주문한 루시퍼라제 유전자(siRNA-Luc)를 목표로 하는 개질되지 않은 siRNA 듀플렉스(duplex)이다[28];

<39> 서열번호 3: 미스매칭 siRNA; siCONTROL 비-목표 siRNA #1(siCON1; 센스, 5'-UAGCGACUAAACACAUAU-3');;

<40> 서열 번호 4, 안티센스, 5'-UUGAUGUGUUUAGUCGCUAUU-3' 를 다마콘 리서치 인코포레이티드(Dharmacon Research, Inc.(CO, 라파에트)에서 주문하였다.

#### <41> 2.3. 저분자량 키토산



<42> 다양한 쇠 길이의 완전히 탈-N-아세틸화된(탈아세트화도 >99.8%;  $F_A < 0.001$ ) 선형이고 7% 트라이사카라이드-치환된 저분자량 키토산(분지형 키토산)을 하기 개시된 바와 같이 준비하고 특성을 규명하였다[25,29]. 34, 50 및 85 단량체 단위의 수평균 중합도(DP<sub>n</sub>)를 갖는 저분자량 키토산을 전적으로 이용하였다. 다각 레이저 광 산란을 갖는 크기 배제 크로마토그래피(SEC-MALLS)에 의해 쇠 길이 분포를 분석하였다.

#### <43> 2.4. 세포

<44> 인간 배아 신장 세포주 HEK 293(293 세포)를 미국 메릴랜드주 록빌 소재의 ATCC에서 구입하였다. 개뿔벌레 루시페라제를 안정적으로 발현하는 HEK 293(293-Luc 세포)는 핀란드 쿠오피오 대학 약학과와 파보 혼카코스키(Paavo Honkakoski) 박사의 선물이었다[30]. 안정적으로 루시페라제를 발현하는 난소 암종 세포주(SKOV-3-Luc) 또한 독일 마버그 소재의 필립스 대학, 약물독성학과의 아힘 아이그너(Achim Aigner) 박사의 선물이었다. 모든 세포를 공급자의 추천에 따라 유지시켰다.

#### <45> 2.5. siRNA 복합체의 배합

<46> pH 6.2의 멸균된 MilliQ 물에 키토산을 용해시킨 후 멸균 여과하여 키토산 저장 용액(0.2mg/ml)을 준비하였다. [25]에 개시된 바와 같이 키토산, 그런 다음 siRNA 저장 용액 또는 siRNA/pDNA(공동 형질감염의 경우)를 와동 혼합기(스웨덴 스파가 소재의 케보 랩(Kebo Lab), 헤이돌프(Heidolph) REAX 2000, 레벨 4) 상에서 강하게 교반하는 동안 멸균 MilliQ 물에 첨가함으로써 키토산 복합체를 배합하였다. pDNA 또는 siRNA 1μg당 상이한 하기 양의 키토산을 이용하여 1:1(+/-)의 전하 비에서 키토산 복합체를 제조하였다: 0.58μg의 선형 키토산, 0.69μg의 7% A-A-M으로 치환된 키토산(분지형 키토산)[25, 27]. [31]에 개시된 바와 같이 와동 혼합기상에서 강하게 교반하는 동안 PEI 용액을 siRNA 저장 용액 또는 siRNA/pDNA(형질감염의 경우)에 첨가함으로써 PEI의 siRNA 복합체를 제조하였다. 형질감염시키기 전에, 배합물을 약 10분동안 실온에서 방치한다. LF2000 복합체를 형성하기 위해, 와동 혼합기에서 강하게 교반하는 동안 siRNA 저장 용액 또는 siRNA/pDNA(공동 형질감염의 경우)를 키토산 용액에 첨가하였다. siRNA 및 LF2000 용액 둘 모두 형질감염 배지 OptiMEM I로 희석시켰다. 형질감염시키기 전에, LF2000 복합체를 약 30분동안 실온에서 방치하였다. 예비 실험에 근거하여, PEI 복합체의 경우 15:1(+/-)의 전하 비 및 LF2000 복합체의 경우 2:1(+/-)의 중량 비를 선택하고, 전적으로 사용하였다(데이터는 도시되지 않음).

#### <47> 2.6. 겔 지연 분석

<48> 아가로스 겔 지연 분석법을 이용하여 siRNA 복합체의 물리적 안정성을 연구하였다. [25]에 개시된 바와 같이, 40mM TAE 완충액 중의 4% 아가로스(메타포(MetaPhor: 등록상표) 아가로스, 미국 메인주 록랜드 소재의 캄브렉스 바이오 사이언스 록랜드 인코포레이티드(Cambrex Bio Science Rockland Inc.))를 이용하였다. [18]에 개시된 바와 같이 복합체를 1.5U 알엔에이즈 A(영국 엠비온)와 함께 30 내지 90분동안 항온처리한 후, 효소 분해에 대해 복합체를 형성한 siRNA의 보호에 대해 연구하였다. 항온처리 후, 헤파린(5mg/ml)을 이용하여 복합체를 해리시키고, siRNA의 일체성을 아가로스 지연 분석을 이용하여 검사하였다. 저장 용액으로부터 수득된 siRNA를 대조용으로 이용하였다.

#### <49> 2.7. 키토산 폴리플렉스(polyplex)의 크기 측정

<50> [25]에 개시된 바와 같이 나노사이저(Nanosizer) ZS(영국 맬버른 맬버른 인스트루먼트즈(Malvern Instruments))를 이용하여 광자 상관성 분광계를 이용하여 복합체의 크기를 측정하였다. MilliQ 물 1ml당 5μg의 siRNA 농도에서 복합체를 제조하였다. 모든 측정은 25°C에서 수행되었다.

#### <51> 2.8. 시험관 내 형질감염 실험

<52> 형질감염 실험 24시간 전에, HEK 293(293, 293-Luc) 세포 및 SKOV-3-Luc 세포를 96웰 조직 배양 플레이트(영국 캄브릿지 소재의 코스타(Costar) 제품)에 시딩하여 형질감염일에 80 내지 90% 세포 컨플루언스(confluence)를 수득하였다. 혈청이 없는 배지(OptiMEM I Reduced Serum Media, 스웨덴 태비 소재의 킵코/BRL 라이프 테크놀로지스 에이비(Gibco/BRL Life Technologies AB) 또는 10% 혈청의 존재(FBS) 하에서 pH 7.4에서 형질감염을 수행하였다. 만니톨을 첨가함으로써 등장성(300mOsm/kg)을 수득하였다. 세포를 미리 가열시킨 OptiMeM으로 세척하고, 50μl의 siRNA 복합체 배합물을 각 웰에 첨가하였다. 공동 형질감염 실험에서, 웰당 0.33μg의 pDNA(pLuc 또는 pGFP)를 이용하였다. 미스매치(대조군) siRNA를 모든 시험관 내 실험에 포함시켰다. 5시간의 배양 후, 배합물을 제거하고, 0.2ml의 새로운 배양 배지를 첨가하였다. 이들을 초과하는 실험의 경우, 배지를 이틀마다 교환하였다. 형질감염 후 24 내지 120시간 범위인 미리 규정된 시점에서, 세포를 미리 가열된 PBS(pH 7.4)로

세척하고, 루시퍼라제 용균 완충액(위스콘신주 매디슨 소재 프로메가(Promega))으로 용균시켰다. 그런 다음, 루미노미터(오스트리아, 비엔나 소재의 메디에이터스 피에이치엘(Mediators PhL))을 이용하여 루시퍼라제 유전자 발현을 측정하였다. 개통별루 루시퍼라제(미주리주 루이스 소재의 시그마(Sigma))를 이용하여 제조된 표준 곡선으로부터 발현된 루시퍼라제의 양을 측정하였다.

## <53> 2.9. 세포내 데하이드로게나제 활성(MTT 방법)

<54> 293-Luc 세포에서 세포내 데하이드로게나제 활성(세포 독성의 척도)에 미치는 다양한 siRNA 배합물의 효과를 [32]에 개시된 바와 같은 MTT 방법에 의해 평가하였다. 간략하게, 293-Luc 세포를 상기 개시된 바와 같이 형질 감염시켰다. 형질감염시킨 지 5시간 후에, 염산염 완충된 염수(PBS) 중의 MTT (3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐 테트라졸륨 브로마이드)(독일 다이센호펜 소재의 시그마) 용액을 첨가하였다. 4시간 후에, 100 $\mu$ l의 산-아이소프로판올(아이소프로판올중의 0.04M HCl)을 첨가함으로써 포마잔 결정을 용해시켰다. 플레이트 판독기(테칸 사파이어(Tecan Safire), 오스트리아 그로디그 소재의 테칸 오스트리아 게엠베하(Tecan Austria GmbH))를 이용하여 570nm에서 흡광을 측정하고 690에서 바탕값 보정하였다. 동일한 방식으로 처리한 배양 배지를 이용하여 장치를 0 흡광으로 설정하였다 처리된 세포의 세포내 데하이드로게나제 활성을 대조군(비처리된) 세포의 활성과 연관시키고, 하기 식으로부터 계산하였다:

<55> 세포내 데하이드로게나제의 상대적 활성% =  $[A(\text{시험}) \times 100 / A(\text{대조군})]$

<56> 상기 식에서,

<57> A(시험) 및 A(대조군)는 각각 처리된 세포와 대조군 세포의 흡광 값이다.

<58> 다른 기구에서, 형질감염된 지 24시간 후에 세포가 배양 배지에서 성장하도록 하였다. 그런 다음, 이들을 MTT 시약으로 처리하여 다양한 배합물의 지연된 독성을 시험하였다.

## <59> 2.10. 데이터 분석

<60> 4개씩의 시료를 이용하여 최소 2회씩 실험을 수행하였다. 모든 자료를 평균 값 $\pm$ 표준 편차로 표현한다. 평균 값 사이의 통계적 차이를 ANOVA를 이용하여 조사하였다. 그룹 간의 차이는  $p < 0.05$ 에서 유의한 것으로 간주되었다.

## <61> 물리적 안정성 및 효소 보호

<62> 먼저, 다양한 쉘 길이의 선형 및 분지형 키토산 다형체가 siRNA와 안정한 복합체를 형성할 수 있는 능력을 겔 지연 분석에서 조사하였다. 더 높은 전하 비를 갖는 더 긴 선형 올리고뉴클레오타이드와 함께 배합된 복합체만이 pH 8.0(이는 전기영동 완충액에 흔히 이용되는 pH이다)에서 siRNA를 유지하였다(도 1A). 85 단량체 단위(DPn85)의 수평균 중합도(DPn)를 갖는 선형 저분자량 키토산은 시험한 모든 전하 비에서 가장 높은 물리적 안정성을 제공하였다. 이와는 대조적으로, 겔 완충액의 pH가 7.4로 낮아지는 경우, 시험된 모든 저분자량 키토산은 siRNA와 안정한 복합체를 형성할 수 있었다. 증가된 pH 값에서 분지되고 더 짧은 키토산 다량체의 siRNA 배합물의 물리적 안정성이 감소된 것은, 저분자량 키토산을 이용하여 배합된 이전에 최적화된 pDNA 복합체에 비해, 물리적으로 안정한 복합체를 형성하는데 더 높은 전하 밀도를 갖는 폴리양이온 및 siRNA와의 더 강한 상호작용이 요구된다는 것을 제안한다[25, 27].

<63> 효소 분해는 유전자 침묵 활성화에 대한 제한 인자일 수 있으므로, 알엔에이즈 A에 의한 효소 분해(30 내지 90분의 항온처리 기간을 이용하였다)로부터 siRNA를 보호하는 선택된 저분자량 키토산의 능력을 또한 조사하였다.

<64> 유전자 전달 요구조건에 따르면, 양의 대조군(PEI 및 LF2000) 뿐 아니라 시험된 모든 저분자량 키토산은 복합체를 형성하지 않은 siRNA(이는 알엔에이즈 A에 의해 완전히 분해되었다)에 비해 효소 분해로부터 보호를 제공하였다(도 1B). 선형 DPn85 및 LF2000으로 배합된 복합체를 파괴시키는데 헤파린을 이용한 더 긴 항온처리(2h)가 필요하다는 점은 다른 시험된 폴리양이온에 비해 개선된 물리적 안정성을 반영한다(자료는 도시되지 않음).

## <65> 입자 크기

<66> siRNA 배합물의 입자 크기가 이들의 조직 분포 및 세포 흡수에 크게 영향을 미칠 수 있기 때문에 저분자량 키토산으로 배합된 siRNA 복합체의 입자 크기를 조사하였다. 표 1은 저분자량 키토산이 siRNA와 자가 조립되어 나노크기 입자(34 내지 86nm)를 형성함을 보여준다. 생성된 입자의 크기는 성분들의 +/- 전하 비에 의존하였다. 10:1 (+/-)의 가장 낮은 전하 비에서 작은 입자 크기(34 내지 46nm)가 수득된 반면, 더 높은 전하 비를 사용하면 상대적으로 더 큰 입자 크기(61 내지 86nm)가 생성되었다. 입자 크기는 양자 상관 분광계에 의해 측정되었

다.

표 1

|               | A/P 10     | A/P 30     | A/P 60     |
|---------------|------------|------------|------------|
| DPn 18        | 38.1 ± 1.2 | 54.5 ± 0.1 | 62.5 ± 3.7 |
| DPn 34        | 37.7 ± 0.5 | 53.1 ± 0.9 | 68.2 ± 3.0 |
| DPn50         | 34.0 ± 0.5 | 51.7 ± 1.2 | 63.6 ± 1.1 |
| DPn85         | 37.4 ± 1.1 | 51.6 ± 3.3 | 61.0 ± 2.5 |
| DPn 34-AAM-7% | 38.5 ± 0.8 | 50.8 ± 0.4 | 68.9 ± 2.7 |
| DPn85-AAM-7%  | 46.0 ± 2.5 | 69.9 ± 1.7 | 86.1 ± 2.9 |

#### 공동 형질감염되고 안정하게 발현된 목표의 침묵 비교

대부분의 시험관 내 실험에서, siRNA는 그의 pDNA 목표와 동시에 전달(공동 형질감염)되기 때문에, 먼저 대조군으로 미스매치 (비-침묵) siRNA를 이용하여 동일한 리포터 서열을 목표로 하는 siRNA(siRNA-Luc)와 함께 개뿔벌레 루시페라제 리포터(pLuc)를 코딩하는 pDNA용 패키지를 전달하는 저분자량 키토산의 효율을 시험하였다. 형질감염은 pDNA 투여량의 최적화된 형질감염 조건, 가장 효율적인 저분자량 키토산 및 전하 비(이는 본 출원인의 실험실에서 pDNA 전달에 대해 최적화되었다[27])에서 (루시페라제 리포터를 발현하지 않는) 293 세포에서 수행되었다. 분지형 DPn34 키토산 다량체 또는 LF2000에 의해 전달된 siRNA-Luc는 대조군 배합물(pLuc 만)에 비해 루시페라제 발현의 유의한 녹다운(85 내지 90%)을 야기하였다(도 2A). 두가지 전달 시스템 모두 미스매치 siRNA를 이용한 경우 루시페라제 발현에서의 비-유의한 억제가 관찰되었다.

그러나, 선택된 폴리양이온에 의해 동일한 조건하에서 siRNA-Luc가 루시페라제를 안정적으로 발현하는 293-Luc 세포로 배타적으로 전달되는 경우(유전자 침묵 용도에 보다 적절한 케이스), 매우 낮은 루시페라제 침묵 활성이 수득되었고, 루시페라제 발현에서 유의한 침묵을 수득하기 위해 더 높은 siRNA 농도가 필요하였다(도 2B).

공동 형질감염 기법이 293-Luc 세포에서 유전자 침묵 활성에 영향을 미치는 지를 조사하기 위해, 무관한 플라스미드(pGFP)를 상기 시험된 것과 동일한 siRNA-Luc 배합물에 혼입시켰다. 293 세포에서 수득된 패턴과 유사하게, 분지형 키토산 다량체, PEI 및 LF2000은 가장 낮은 siRNA 농도(웰당 1 내지 30ng, 웰당 1.5 내지 40nM에 상응)에서도 루시페라제 발현의 유의한 녹다운(40 내지 85%)을 매개하였다(도 2C). siRNA 배합물(공동 형질감염)에서 pDNA의 혼입은 유전자 침묵 활성에 긍정적인 효과를 발휘하였다. 이러한 결과는 siRNA 전달에 대한 배합물 요구사항이 pDNA와는 상이하고, 시험관 내에서 폴리양이온에 의한 성공적인 siRNA 전달에 대해 특장화되는 중요한 변수가 있음을 제안한다.

#### 저분자량 키토산의 구조 변이성과 배합 변수가 유전자 침묵 활성에 미치는 영향

##### a) 쉘 길이, 주쇄 분지 및 전하 비

저분자량 키토산에 의한 siRNA 전달에 미치는 키토산 구조와 배합 변수의 영향을 조사하기 위해서, 먼저, 293-Luc 세포중의 siRNA 복합체에 의해 매개되는 루시페라제 발현의 침묵에 미치는 쉘 길이, 분지 및 전하 비의 영향을 시험관 내 시험하였다. 선형 키토산의 경우 34 단량체 단위보다 긴 쉘 길이를 갖는 키토산은 전하 비에 독립적으로 유의한 루시페라제 침묵을 매개하였다(도 3A). 분지형 키토산 다량체와 배합된 복합체에 의해 매개되는 루시페라제 침묵은 전하 비 및 쉘 길이 둘 모두에 의존적이다(도 3B). 더 긴 분지형 키토산 다량체의 경우, 더 높은 전하 비가 키토산 주쇄의 분지(치환)의 부정적인 영향을 보상할 수 있다. 이들 결과는 저분자량 키토산의 높은 전하 밀도가 물리적으로 안정한 복합체를 생성할 뿐 아니라, 시험관 내에서 효율적인 siRNA 배합물을 생성함을 강조한다.

##### b) siRNA 농도 및 선형 저분자량 키토산의 상대적 효율

다음 단계에서, 다양한 선형 저분자량 키토산(일정한 전하 비에서)으로 배합된 복합체의 루시페라제 침묵 활성에 미치는 siRNA 농도의 영향을 293-Luc 세포에서 조사하였다. 가장 낮은 siRNA 농도(웰당 15 내지 50ng, 웰당 22 내지 73nM에 상응)를 이용하여, 선형 DPn85 복합체는 대조군의 처리되지 않은 세포의 72 내지 95%로 루시페라제 발현을 녹다운시킴으로써 가장 높은 효능을 입증하였다(도 4). DPn18을 제외하고, 시험된 선형 키토산의

복합체는 siRNA 농도가 70 내지 300ng/웰(103 내지 440nM/웰)로 증가되었을 때 필적하는 루시페라제 침묵 프로파일을 보여주었다. 선형의 더 긴쇄의 저분자량 키토산과 배합된 복합체의 더 높은 효능은 가장 높은 유전자 침묵 활성을 달성하는데 있어 siRNA 배합물의 물리적 안정성의 역할을 지지한다.

<77> **혈청의 존재 하에서 시험관 내 형질감염**

<78> 더 높은 루시페라제 침묵 효율이 증가된 세포 독성의 결과가 아님을 확인하기 위해서, 비교적 높은 농도의 siRNA(150nM)와 배합된 다양한 폴리양이온 복합체가 세포 형태 및 세포내 데하이드로게나제 활성에 미치는 영향을 MTT 방법을 이용하여 조사하였다. 5시간의 형질감염 후에, 선형 DPn85와 배합된 siRNA 복합체가 세포 형태 및 세포내 데하이드로게나제 활성(세포 독성의 측정치)에 아무런 영향을 미치지 않는 것이 관찰되었다(도 6). 이와는 대조적으로, PEI 및 LF2000을 이용한 경우 유의한 독성 효과가 관찰되었고, 선형 PEI의 경우 독성이 가장 높았다. LF2000 복합체로 처리된 세포가 24시간 후에 세포내 데하이드로게나제 활성을 회복한 반면, PEI로 처리된 세포는 24시간 후에도 데하이드로게나제 활성이 추가로 감소되었다. 이들 결과는 선형 DPn85 저분자량 키토산의 급성 세포 독성이 상대적으로 높은 농도의 siRNA를 사용한 경우에 조차 PEI 및 LF2000보다 더 낮음을 입증하였다.

<79> **RNAi의 시험관 내 동역학**

<80> 최종적으로, siRNA-Luc를 293-Luc 세포로 전달한 후의 루시페라제 침묵의 시간 경과를 조사하였다. 34 내지 85 단량체 단위의 DP 값 범위를 갖는 저분자량 키토산, PEI 및 LF2000을 시험하였다. DPn18 키토산은 더 긴 키토산에 비해 덜 효과적이기 때문에 이들은 포함되지 않았다(도 4). 선형 DPn85와 배합된 siRNA 복합체는 루시페라제 침묵의 초기 개시를 매개하였고, 여기서 1일 후에 유의한 효과(70%)가 검출되고, 2일 후에 최대(92%)에 이르렀다(도 7A). 유전자 침묵 활성은 5일동안 지속되었고, 이는 손상되지 않은 siRNA가 세포내에서 안정하게 방출됨을 제안한다. 분지형 키토산 다량체는 이들의 선형 대응물에 비해 덜 효과적인 루시페라제 침묵 역할을 입증하였다(도 7B). LF2000 및 PEI는 저분자량 키토산에 의해 매개되는 것보다 더 낮은 유전자 침묵 효과를 보였다(도 7C). 다른 세포주인 SKOV-3-Luc에서의 루시페라제 침묵 동역학은 293-Luc 세포와 유사한 결과를 생성하였다(도 7D).

<81> 참고서류

- <82> [1] Meister G, Tuschl T, Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA, Nature. 431(7006) (2004) 343-9.
- <83> [2] Sachse C, Krausz E, Kronke A, Hannus M, Walsh A, Grabner A, Ovcharenko D, Dorris D, Trudel C, Sonnichsen B and others, High-throughput RNA interference strategies for target discovery and validation by using synthetic short interfering RNAs: functional genomics investigations of biological pathways, Methods Enzymol. 392(2005) 242-77.
- <84> [3] Dallas A, Vlassov AV, RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential, Med Sci Monit. 12(4) (2006) RA67-74.
- <85> [4] Cejka D, Losert D, Wacheck V, Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic?, Clin Sci (Lond). 110(1) (2006) 47-58.
- <86> [5] Burkhardt BR, LyLe R, Qian K, Arnold AS, Cheng H, Atkinson MA, Zhang YC, Efficient delivery of siRNA into cytokine-stimulated insulinoma cells silences Fas expression and inhibits Fas-mediated apoptosis, FEBS Lett. 580(2) (2006) 553-60.
- <87> [6] Devi GR, siRNA-based approaches in cancer therapy, Cancer Gene Ther, (2006).
- <88> [7] Nishitsuji H, Kohara M, Kannagi M, Masuda T, Effective Suppression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 through a Combination of Short- or Long-Hairpin RNAs Targeting Essential Sequences for Retroviral Integration, J Virol. 80(15) (2006) 7658-66.
- <89> [8] Sioud M, On the delivery of small interfering RNAs into mammalian cells, Expert Opin Drug Deliv. 2(4) (2005) 639-51.
- <90> [9] Elmen J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Orum H, Koch T and others, Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality,



Nucleic Acids Res. 33(1) (2005) 439-47.

- <91> [10] Chen X, Dudgeon N, Shen L, Wang JH, Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development, *Drug Discov Today*. 10(8) (2005) 587-93.
- <92> [11] Lorenz C, Hadwiger P, John M, Vornlocher HP, Unverzagt C, Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells, *Bioorg Med Chem Lett*. 14(19) (2004) 4975-7.
- <93> [12] Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC, Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications, *Methods*. 33(2) (2004) 95-103.
- <94> [13] Hassani Z, Lemkine GF, Erbacher P, Palmier K, Alfama G, Giovannangeli C, Behr JP, Demeneix BA, Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels, *J Gene Med*. 7(2) (2005) 198-207.
- <95> [14] Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Fisch G, Dames S, Loffler K, Fechtner M, Arnold W and others, A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium, *Gene Ther*. (2006).
- <96> [15] Pirollo KF, Zon G, Rait A, Zhou Q, Yu W, Hogrefe R, Chang EH, Tumor-targeting nanoimmunoliposome complex for short interfering RNA delivery, *Hum Gene Ther*. 17(1) (2006) 117-24.
- <97> [16] Jaaskelainen I, Peltola S, Honkakoski P, Monkkonen J, Urtti A, A lipid carrier with a membrane active component and a small complex size are required for efficient cellular delivery of anti-sense phosphorothioate oligonucleotides, *Eur J Pharm Sci*. 10(3) (2000) 187-93.
- <98> [17] Urban-Klein B, Werth S, Abuharbeid S, Czubayko F, Aigner A, RNAi- mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo, *Gene Ther*. 12(5) (2005) 461-6.
- <99> [18] Zhou J, Wu J, Hafdi N, Behr JP, Erbacher P, Peng L, PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing, *Chem Commun (Camb)*. 22) (2006) 2362-4.
- <100> [19] Leng Q, Scaria P, Zhu J, Ambulos N, Campbell P, Mixson AJ, Highly branched HK peptides are effective carriers of siRNA, *J Gene Med*. 7(7) (2005) 977-86.
- <101> [20] Regnstrom K, Ragnarsson EG, Koping-Hoggard M, Torstensson E, Nyblom H, Artursson P, PEI - a potent, but not harmless, mucosal immuno-stimulator of mixed T-helper cell response and FasL-mediated cell death in mice, *Gene Ther*. 10(18) (2003) 1575-83.
- <102> [21] Chen HT, Neerman MF, Parrish AR, Simanek EE, Cytotoxicity, hemolysis, and acute in vivo toxicity of dendrimers based on melamine, candidate vehicles for drug delivery, *J Am Chem Soc*. 126(32) (2004) 10044-8.
- <103> [22] Omid Y, Barar J, Akhtar S, Toxicogenomics of cationic lipid-based vectors for gene therapy: impact of microarray technology, *Curr Drug Deliv*. 2(4)(2005) 429-41.
- <104> [23] Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW, Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy, *Nat Med*. 5(4) (1999) 387-91.
- <105> [24] Koping-Hoggard M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Varum KM, Artursson P, Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure- property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo, *Gene Ther*. 8(14) (2001) 1108-21.
- <106> [25] Koping-Hoggard M, Varum KM, Issa M, Danielsen S, Christensen BE, Stokke BT, Artursson P, Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers, *Gene Ther*. 11(19) (2004) 1441-52.
- <107> [26] Zhang W, Yang H, Kong X, Mohapatra S, San Juan-Vergara H, Hellermann G, Behera S, Singam R, Lockey RF, Mohapatra SS, Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA

nanoparticles targeting the viral NSI gene, Nat Med. 11(1) (2005) 56-62.

- <108> [27] Issa MM, Koping-Hoggard M, Tommeraas K, Varum KM, Christensen BE, Strand SP, Artursson P, Targeted gene delivery with trisaccharide-substituted chitosan oligomers in vitro and after lung administration in vivo, J Control Release. (2006).
- <109> [28] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, Nature. 411(6836) (2001) 494-8.
- <110> [29] Tommeraas K, Koping-Hoggard M, Varum KM, Christensen BE, Artursson P, Smidsrod O, Preparation and characterisation of chitosans with oligosaccharide branches, Carbohydr Res. 337(24) (2002) 2455-62.
- <111> [30] Honkakoski P, Jaaskelainen I, Kortelahti M, Urtti A, A novel drug-regulated gene expression system based on the nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR), Pharm Res. 18(2) (2001) 146-50.
- <112> [31] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, Proc Natl Acad Sci U S A. 92(16) (1995) 7297-301.
- <113> [32] Lappalainen K, Jaaskelainen I, Syrjanen K, Urtti A, Syrjanen S, Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes, Pharm Res. 11(8) (1994) 1127-31.
- <114> [33] Howard KA, Rahbek UL, Liu X, Damgaard CK, Glud SZ, Andersen MO, Hovgaard MB, Schmitz A, Nyengaard JR, Besenbacher F and others, RNA Interference in Vitro and in Vivo Using a Novel Chitosan/siRNA Nanoparticle System, Mol Ther. (2006).
- <115> [34] Katas H, Alpar HO, Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery, J Control Release. (2006).
- <116> [35] Janes KA, Calvo P, Alonso MJ, Polysaccharaide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. Adv Drug Deliver Rev.47(1) (2001) 83-97.

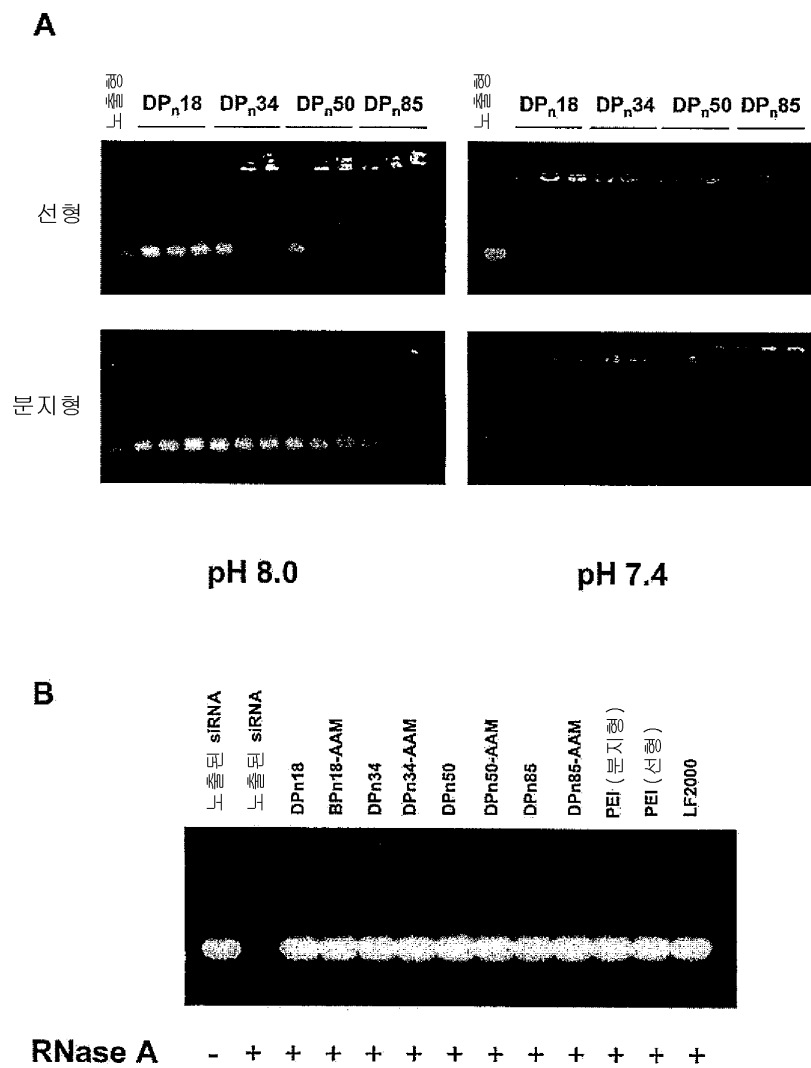
### 도면의 간단한 설명

- <5> 도 1은 siRNA 배합물의 물리적 안정성(A) 및 알엔에이즈(RNase) A 보호(B)를 보여준다.
- <6> 도 2는 정상 HEK 293 세포(A)와 안정적으로 루시퍼라제를 발현하는 HEK 293 세포(293-Luc)(B,C)에서 siRNA의 시험관 내 전달을 보여준다.
- <7> 도 3은 올리고뉴클레오타이드와 복합체를 형성한 선형(A) 및 분지형(B) 키토산의 구조적 다양성이 293-Luc 세포에서 루시퍼라제 침묵 활성화에 미치는 영향을 보여준다.
- <8> 도 4는 선형 저분자량 키토산의 siRNA 농도 독립성과 상대적인 효율을 보여준다.
- <9> 도 5는 루시퍼라제 침묵 활성화에 미치는 혈청의 효과를 도시한다.
- <10> 도 6은 siRNA 배합물의 세포 독성을 도시한다.
- <11> 도 7은 293-Luc 세포(A,B,C) 및 안정적으로 루시퍼라제를 발현하는 SKOV-3 세포에서 시험관 내 루시퍼라제 침묵의 시간 경과를 보여준다.

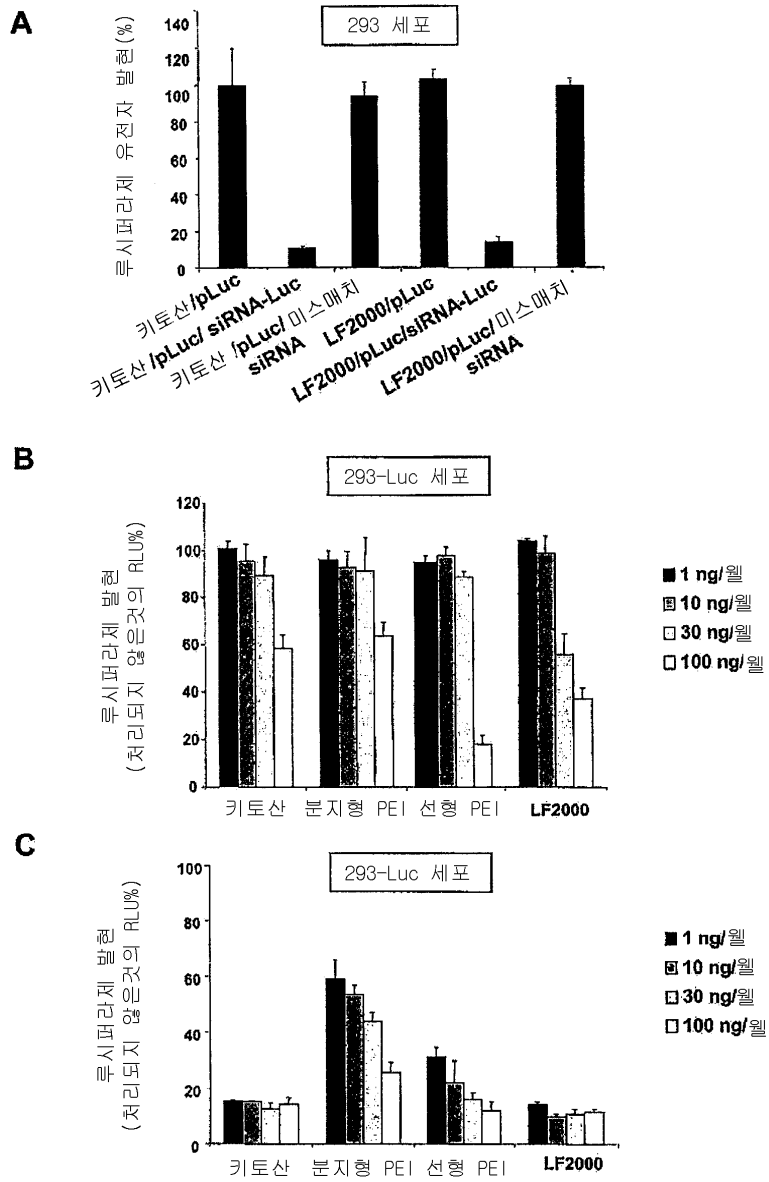


도면

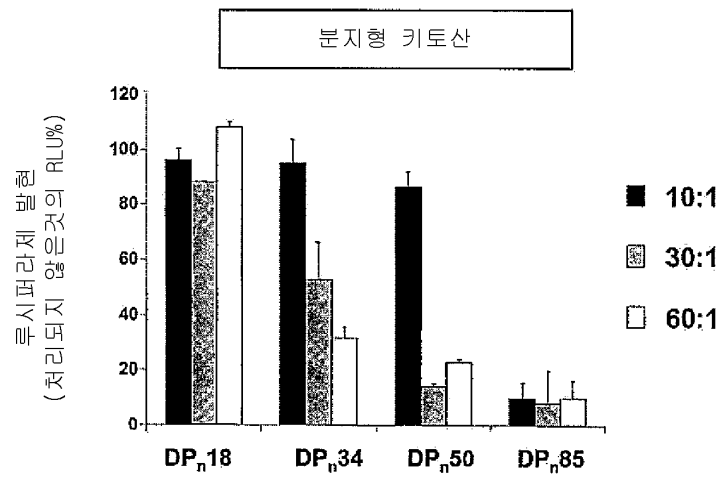
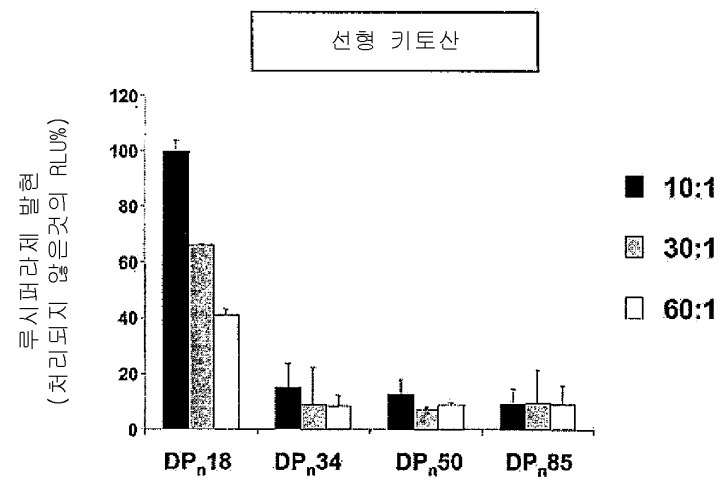
도면1



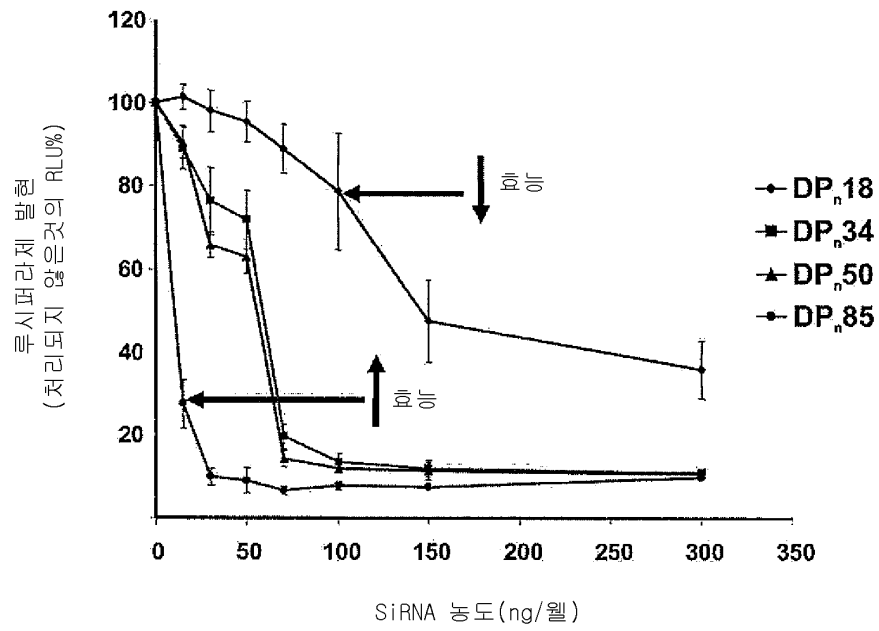
도면2



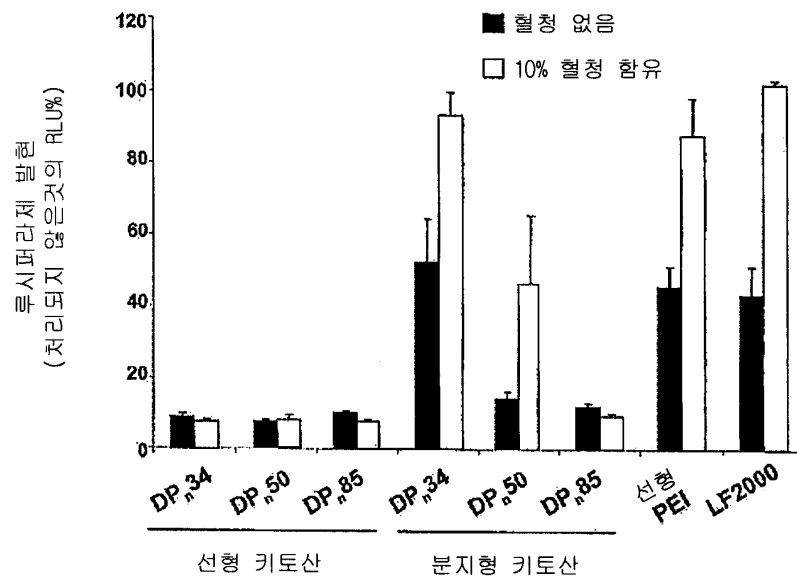
도면3



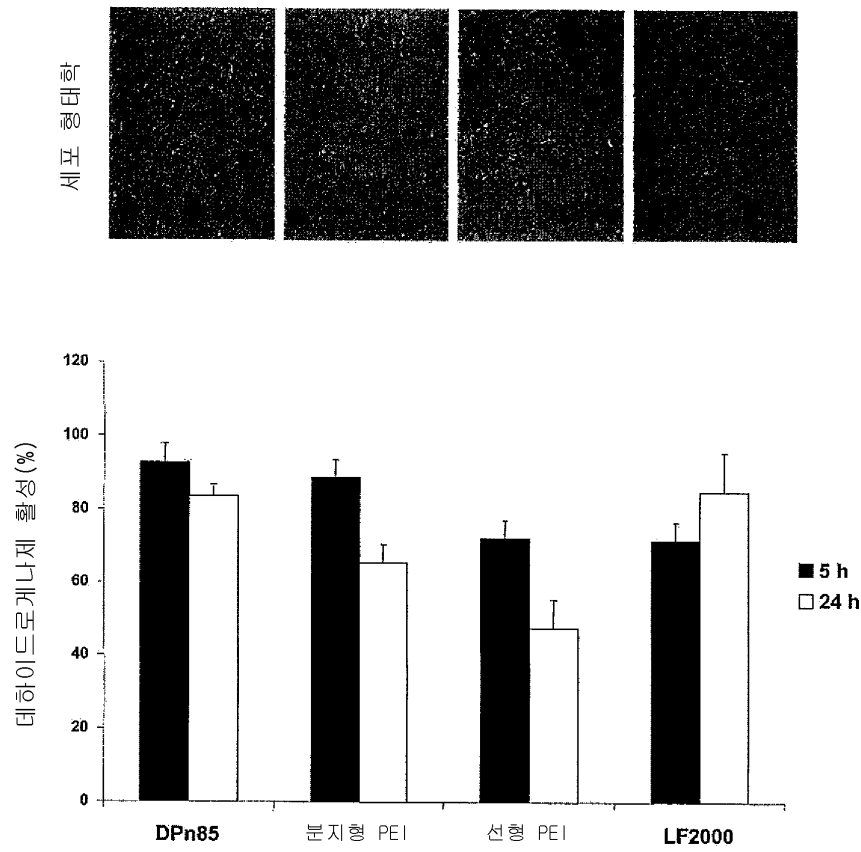
도면4



도면5



도면6



도면7

