

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. (11) 공개번호 10-2006-0088896
A61K 9/127(2006.01) (43) 공개일자 2006년08월07일

| | | | |
|-------------|-------------------|-------------|----------------|
| (21) 출원번호 | 10-2006-7007176 | (87) 국제공개번호 | WO 2005/060934 |
| (22) 출원일자 | 2006년04월14일 | 국제공개일자 | 2005년07월07일 |
| 번역문 제출일자 | 2006년04월14일 | | |
| (86) 국제출원번호 | PCT/US2003/039317 | | |
| 국제출원일자 | 2003년12월10일 | | |

(30) 우선권주장 10/717,109 2003년11월19일 미국(US)

(71) 출원인 익스프레션 제네틱스, 인코퍼레이티드
미국, 알라바마 35801, 헌트스빌, 모크 로드 2215

(72) 발명자 마하토, 람 아이.
미국, 테네시 38108, 코르도바, 베이 올차드 레인 8589
한, 상-오
미국, 알라바마 35802, 헌츠빌레, 퀸스베리 드라이브 #1211
퍼거슨, 다린 와이.
미국, 노스캐롤라이나 27510, 카르보로, 비피더블유 클럽로드 #이10
180
안웨어, 쿠르씨드
미국, 알라바마 35758, 메디슨, 트워드 드라이브 109

(74) 대리인 강명구

심사청구 : 없음

(54) 생체적합성 유전자 전달체로서 이용되는 신규한 양이온성지질중합체

요약

본 발명은 폴리에틸렌이민(PEI), 지질, 생체적합성 친수성 중합체를 함유하는 생체분해성 양이온성 지질중합체에 관하는 데, 여기서 1) 상기 지질과 상기 생체적합성 친수성 중합체는 PEI 골격에 직접 연결되거나, 또는 2) 상기 지질은 상기 생체적합성 친수성 중합체를 통하여 PEI 골격에 연결된다. 본 발명의 양이온성 지질중합체는 국소 또는 전신 투여이후 핵산 또는 음이온화제(anionic agent)의 다양한 장기와 조직으로의 전달에 유용하다.

대표도

도 1

색인어

생체분해성 양이온성 지질중합체

명세서

기술분야

본 출원은 2000년 9월 4일자로 제출된 미국 특허 출원 09/662,511의 일부 계속 출원으로서 2002년 2월 25일자로 제출된 미국 특허 출원 10/083,861의 일부-계속 출원이다.

본 발명은 양이온성 지질중합체 및 이의 조제 방법에 관한다. 특히, 본 발명은 폴리에틸렌이민(PEI), 지질, 생체적합성 친수성 중합체를 함유하는 생체분해성 양이온성 지질중합체에 관한는데, 여기서 1) 상기 지질과 상기 생체적합성 친수성 중합체는 PEI 골격에 직접 연결되거나, 또는 2) 상기 지질은 상기 생체적합성 친수성 중합체를 통하여 PEI 골격에 연결된다. 본 발명의 양이온성 지질중합체는 핵산 또는 음이온화제(anionic agent)의 세포로의 전달에 유용하다.

배경기술

유전자 요법은 일반적으로, 유전자 결합성 질환의 치료에서 뿐만 아니라 암, 심혈관 질환, 류머티스 관절염과 같은 만성 질환의 치료와 예방을 위한 전략의 개발에도 유망한 방식으로 간주되고 있다. 하지만, 핵산 및 다른 다음이온(polyanionic) 물질은 수용액으로 전달되는 경우에, 특정 효소에 의해 급속하게 분해되고 불량한 세포 흡수를 보인다. 1950년대 중반 핵산을 조직이나 배양 세포로 전달하는 방법을 확인하려는 초기의 노력 이후, 기능성 DNA, RNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 시험관내와 생체내 전달에서 많은 개선이 지속적으로 달성되고 있다.

현재 이용되고 있는 유전자 담체에는 바이러스 시스템(레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련된 바이러스, 또는 단순 포진 바이러스), 또는 비-바이러스 시스템(리포솜, 중합체, 펩티드, 칼슘 인산염 침전, 전기천공)이 포함된다. 바이러스 벡터는 비-바이러스 벡터에 비하여 높은 트랜스펙션 효율을 보유하는 것으로 밝혀지긴 했지만, 생체내에서 이들의 이용은 여러 단점, 예를 들면, 세포 분화에 대한 의존, 숙주 계놈으로 무작위 DNA 삽입의 위험, 대형 치료 유전자의 낮은 운반 능력, 복제의 위험, 가능 숙주 면역 반응으로 인하여 극히 제한된다.

바이러스 벡터에 비하여, 비-바이러스 벡터는 제조가 용이하고, 면역 반응을 유발할 가능성이 낮다. 이에 더하여, 복제 반응이 요구되지 않는다. 양이온성 지질 또는 다양이온성 중합체인 안전하고 효율적인 비-바이러스 유전자 전달 벡터의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다. DNA와 상호작용하여 다이온성 복합체를 형성하는 다양이온성 중합체, 예를 들면, 폴리-L-리신, 폴리-L-오르니틴, 폴리에틸렌이민(PEI)이 유전자 전달용으로 도입되었다. 다양한 양이온성 지질은 또한, DNA와 지질-유전자 결합체(lipoplex)를 형성하고 다양한 진핵 세포의 트랜스펙션을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 다수의 상이한 양이온성 지질이 상업적으로 구입가능하며, 여러 양이온성 지질이 임상 환경에서 이미 사용되고 있다. 지질 트랜스펙션 기전은 아직 명확하진 않지만, DNA/지질 복합체에서 과량의 양전하를 통한 상기 복합체와 세포 표면의 결합 및 형성된 엔도솜으로부터 세포질로 DNA의 방출을 수반하는 것으로 생각된다. 아마도, 세포 표면 결합된 복합체는 내재화되고, DNA는 식세포 구획으로부터 세포의 세포질로 방출된다.

하지만, 시험관내 트랜스펙션 기술을 생체내 분야에 직접 적용하는 것은 가능하지 않다. 생체내 이용과 관련하여, 디에테르(diether) 지질, 예를 들면, N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸 암모늄 클로라이드(DOTMA) 또는 리포펙틴의 최대 단점은 이들이 신체의 자연 대사물질이 아니기 때문에 생분해되지 않는다는 점이다. 이들은 또한, 세포에 독성을 나타낸다. 이에 더하여, 양이온성 지질 트랜스펙션은 혈청에 존재하는 인자에 의해 저해되고, 따라서 생체내에서 유전 물질의 세포로의 도입에 무용한 것으로 보고되었다. 이에 더하여, 이들 양이온성 지질은 생체내 유전자 전달에서 효율이 떨어지는 것으로 입증되었다.

이상적인 트랜스펙션 시약은 세포 또는 조직의 기계적 또는 물리적 조작 없이도 높은 수준의 트랜스펙션 활성을 보여야 한다. 시약은 효과량에서 비-독성 또는 최소 독성이어야 한다. 처리된 세포에 대한 장기적인 부작용을 피하기 위하여, 시약은 또한 생체분해성이어야 한다. 유전자 담체가 생체내에서 핵산의 전달에 이용되는 경우에, 이들 유전자 담체는 자체로써 비-독성이어야 하고 비-독성 산물로 분해되어야 한다. 처녀 유전자 담체와 이의 분해 산물의 독성을 최소화시키기 위하여, 유전자 담체의 설계는 자연 발생 대사물질에 기초해야 한다.

U.S. 특허 5,283,185, Epanand et al.(이후, '185 특허)에서는 핵산의 세포로의 전달을 용이하게 하는 방법을 개시하는데, 상기 방법은 적절한 담체 용제에서 양이온성 지질, 3'[N-(N',N"-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DC-콜레스테롤)과 공동-지질(co-lipid)의 혼성 지질 분산액을 제조하는 단계를 포함한다. '185 특허에 개시된 방법은 리포솜 현탁액을 제조하는 과정에서 할로겐화된 용제의 사용을 수반한다. 제약학적 적용에서, 할로겐화된 용제의 잔류물은 도입된 이후 제조

물로부터 실질적으로 제거될 수 없다. U.S. 특허 5,753,262(이후, '262 특허)에서는 지질 3'[N-(N',N"-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DC-콜레스테롤)과 보조 지질(helper lipid), 예를 들면, 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(DOPE) 또는 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC)의 산성 염을 이용하여 시험관내에서 효율적인 트랜스펙션을 유도하는 공정을 개시한다.

마이크론 이하의 크기를 갖는 나노입자들은 계면 세포 흡수를 강화시켜 진정한 의미에서 “국소성 약리학적 약물 효과”를 달성하는 것으로 가정된다. 또한, 상응하는 유리 약물에 비하여 나노입자에 포함된 약물의 강화된 세포내 흡수(세포내이입)가 발생할 것으로 가정된다. 나노입자는 암 요법에서 치료제의 종양 위치 확인, 세포내 표적화(항바이러스제 또는 항균제), 면역학적 어쥬번트(경구와 피하 경로)로서 세망내피계로의 표적화(기생충 감염), 지속된 약물 작용을 나타내는 안구 전달, 연장된 전신 약물 요법을 위한 약물 담체 시스템으로서 연구되었다.

전술한 내용에 비추어, 생체분해성이고 나노입자, 리포솜 또는 미셀을 형성할 수 있으며 면역계를 회피하여 안전하고 효율적인 유전자 전달을 제공할 수 있는 유전자 담체를 제공하는 것이 바람직하다. 본 발명의 신규한 양이온성 지질중합체는 폴리에틸렌이민(PEI), 지질, 생체적합성 친수성 중합체를 포함하는데, 여기서 상기 지질은 직접적으로 또는 소수성 중합체 스페이서를 통하여 PEI 골격에 공유 결합되고, 상기 스페이서는 PEI의 일차 또는 이차 아민기에 공유 결합된다.

본 발명의 지질중합체는 핵산 또는 다른 음이온성 생물활성제, 또는 둘 모두의 전달을 위한 양이온성 미셀 또는 양이온성 리포솜을 제조하는데 유용하고, 세포로 통합된 이후 용이하게 대사 분해된다.

본 발명의 요약

인지하는 바와 같이, 감소된 생체내와 시험관내 세포 독성을 보유하는 핵산 전달 목적의 생체분해성 양이온성 지질중합체를 개발하는 것이 바람직하다. 본 발명의 지질중합체는 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, DNA와 RNA의 세포로의 안정적이고 일시적인 트랜스펙션을 효율적으로 수행할 수 있다.

본 발명의 더욱 구체적인 측면에서, 본 발명의 양이온성 지질중합체는 폴리에틸렌이민(PEI), 지질, 생체적합성 친수성 중합체를 포함하는데, 여기서 1) 상기 지질과 생체적합성 친수성 중합체는 PEI 골격에 직접 연결되거나, 또는 2) 상기 지질은 생체적합성 친수성 중합체를 통하여 PEI 골격에 연결된다. PEI는 가지형이나 선형이고, 100 내지 500,000 달톤 범위의 평균 분자량을 보유한다. PEI, 친수성 중합체, 지질 사이의 공유 결합은 가급적, 에스테르, 아마이드, 우레탄, 디-티올 결합에서 선택된다. 친수성 중합체는 가급적, 50 내지 20,000 달톤의 분자량을 보유하는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다. PEI 대 공액된 지질의 몰 비율은 가급적, 1:0.1 내지 1:500의 범위에 위치한다. 본 발명의 양이온성 지질중합체는 표적화 부분(targeting moiety)을 추가로 포함한다.

본 발명의 양이온성 지질중합체는 DOPE 또는 콜레스테롤과 같은 중성 지질과의 동시-조제(coformulation)에 따라, 리포솜 또는 수용성 미셀로서 제조될 수 있다. 가령, 중성 지질의 존재에서 지질중합체는 불수용성 리포솜을 형성하고, 중성 지질의 부재에서 지질중합체는 수용성 미셀을 형성한다.

본 발명의 양이온성 지질중합체는 핵산과의 분리된 나노미터-크기 입자를 자발적으로 형성할 수 있는데, 이들 입자는 리포펙틴(Lipofectin)과 폴리에틸렌이민에 의해 통상적으로 달성될 수 있는 것보다 더욱 효율적으로 포유동물 세포주로의 유전자 트랜스펙션을 촉진할 수 있다. 본 발명의 지질중합체는 동물 세포로의 통합이후 쉽게 대사 분해된다. 본 발명의 생체적합성 생체분해성 양이온성 지질중합체는 포유동물 세포의 트랜스펙션과 유전자 요법의 생체내 적용을 위한 일반 시약으로 이용되는 개선된 유전자 담체를 제공한다.

또한, 본 발명은 트랜스펙션 제형(formulation)을 제공하는데, 상기 제형은 생체내와 시험관내 트랜스펙션에 최적으로 유효하도록 적절한 전하 비율(지질중합체의 양전하/핵산의 음전하)로 선택된 핵산과 복합된 신규한 양이온성 지질중합체를 함유한다. 양이온성 지질중합체와 핵산의 N/P(중합체에서 질소 원자/DNA에서 인산염 원자) 비율은 가급적, 500/1 내지 0.1/1의 범위에 위치한다. 특히, 전신 전달의 경우, N/P 비율은 가급적, 1/1 내지 100/1이다; 국소 전달의 경우, N/P 비율은 가급적, 0.5/1 내지 50/1이다.

본 발명은 또한, 생체내와 시험관내에서 핵산을 포유동물 세포로 트랜스펙션하는 방법을 제시한다. 상기 방법은 이들 세포를 전술한 양이온성 중합체 또는 리포솜:핵산 복합체와 접촉시키는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 온혈 동물로의 국소 전달을 위하여 양이온성 지질중합체/DNA 복합체를 이용한다. 특히 바람직한 구체예에서, 상기 방법은 온혈 동물에서 양이온성 지질중합체/DNA 복합체의 고휘 종양으로의 국소 투여를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 양이온성 지질중합체 또는 리포솜:핵산 복합체의 온혈 동물로의 전신 투여를 이용한다. 바람직한 구체예에서, 상기 트랜스펙

선 방법은 양이온성 지질중합체 또는 리포솜:핵산 복합체의 온혈 동물로의 정맥내 투여를 이용한다. 특히 바람직한 구체예에서, 상기 방법은 수용성 지질중합체/pDNA, 지질중합체:DOPE 리포솜/pDNA 또는 지질중합체:콜레스테롤 리포솜/pDNA 복합체의 온혈 동물로의 정맥내 주입을 포함한다.

도면의 간단한 설명

도 1에서는 PEG-PEI 콜레스테롤(PPC)의 지질중합체를 제조하는 합성 전략을 도시하는데, 여기서 상기 지질(콜레스테롤)과 친수성 중합체(PEG)는 공유 결합을 통하여 PEI 골격에 직접 연결된다.

도 2에서는 가지형 PEI 1800, 콜레스테릴 클로로포름산염, PEG 550(도 2A) 또는 PEG 330(도 2B)으로 구성되는 PEG-PEI-콜레스테롤 지질중합체의 화학 구조의 ^1H NMR에 의한 결정을 도시한다.

도 3에서는 선형 PEI 25000, PEG 1000, 콜레스테릴 클로로포름산염으로 구성되는 PEG-PEI-콜레스테롤 지질중합체의 화학 구조의 ^1H NMR에 의한 결정을 도시한다.

도 4에서는 다양한 N/P 비율에 따른 PEG-PEI-콜레스테롤(1:1:1 비율)/pDNA 복합체의 겔 지체 검사를 도시한다; A: 나신 pDNA, B: WSLP2(N/P=20/1), C: WSLP0331(N/P=20/1), D: WSLP0405(N/P=20/1), E: PPC(N/P=10/1), F: PPC(N/P=15/1), G: PPC(N/P=17/1), H: PPC(20/1), I: PPC(N/P=30/1), J: PPC(40/1), K: PPC(0.2 몰 PEG, 1 몰 PEI, 1 몰 콜레스테롤로 구성됨)(N/P= 20/1).

도 5에서는 다양한 N/P 비율에서 PPC/pDNA 복합체의 물리화학적 특성(제타 전위(zeta potential)에 의한 표면 전하(좌측 막대) 및 입자 크기(우측 막대))을 도시한다.

도 6에서는 상이한 PEG 대 PEI 비율(1 - 2.5)에서 PPC/pDNA 복합체로 트랜스펙션이후, 배양된 인간 배아 신장 형질전환된 세포(293 T 세포)로의 루시페라제 유전자 전달을 도시한다.

도 7에서는 다양한 PEG 대 PEI 비율에서 PPC/pCMV-Luc 복합체로 트랜스펙션이후 피하 4T1 종양으로의 루시페라제 유전자 전달을 도시한다.

도 8에서는 BALB/c 생쥐에서 PPC/pDNA 복합체의 종양내 주입이후 피하 4T1 종양으로의 mIL-12 유전자 전달을 도시한다.

도 9에서는 정맥내 투여이후 PPC 리포솜/pDNA 복합체에 의한 생쥐 폐로의 루시페라제 유전자 전달을 도시한다.

도 10에서는 정맥내 투여이후 PPC 리포솜/mIL-12 pDNA 복합체에 의한 생쥐 폐종양의 저해를 도시한다.

발명의 상세한 설명

도면에 예시된 전형적인 구체예는 참조로 하며, 이를 설명하는데 특정 용어가 이용된다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 범위는 여기에 한정되지 않는다. 본 명세서에 예시된 본 발명의 변형과 추가적인 수정 및 본 명세서에 예시된 본 발명의 원리의 당업자에게 자명한 추가적인 적용은 본 발명의 범위에 속한다.

생물활성제의 운반을 위한 본 발명의 조성물과 방법을 설명하기에 앞서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 특정 모양, 공정 단계 및 재료에 국한되지 않고, 이와 같은 특정 모양, 공정 단계 및 재료는 다소간 변할 수 있다. 또한 본 명세서에 이용된 용어는 특정 구체예를 설명하기 위함이고 이에 국한되지 않는데, 그 이유는 본 발명의 범위가 첨부된 청구항 및 이의 등가물에 의해서만 한정되기 때문이다.

본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 단수 형태는 달리 명시하지 않는 한, 복수의 개념을 포함한다. 따라서, 가령, “결합”을 보유하는 중합체에 대한 참조는 2개 이상의 이와 같은 결합을 포함한다. 본 발명을 설명하고 청구하는데 있어, 다음의 용어는 하기에 기재된 정의를 따른다.

“트랜스펙션”은 세포 외부 환경으로부터 세포 내부 환경, 특히 세포질 및/또는 세포핵으로 핵산의 수송을 의미한다. 특정 이론에 한정됨 없이, 핵산은 하나 이상의 양이온성 지질/핵산 복합체의 형태로 전달되거나, 또는 하나 이상의 양이온성 지질

/핵산 복합체 내에 피포되거나 이들에 부착되거나 이들에 혼입된 이후 전달될 수 있다. 특정 트랜스펙션 경우는 핵산을 세포핵으로 전달한다. 핵산은 DNA와 RNA 및 이들의 합성 동종체(congener)를 포괄한다. 이런 핵산에는 미스센스, 안티센스, 난센스 뉴클레오티드; 온(on)과 오프(off)에서 단백질 생산 뉴클레오티드; 단백질, 펩티드, 핵산 생산을 조절하는 속도 제어 뉴클레오티드가 포함된다. 특히, 제한없이 이들은 자연이나 인공 기원의 게놈 DNA, cDNA, mRNA, tRNA, rRNA, 하이브리드 서열 또는 합성이나 반-합성 서열일 수 있다. 이에 더하여, 핵산은 올리고뉴클레오티드에서 크로모좀까지 다양한 크기로 존재할 수 있다. 이들 핵산은 인간, 동물, 식물, 박테리아, 바이러스 등으로부터 기원된다. 이들은 당업자에게 공지된 임의의 기술로 획득될 수 있다.

본 명세서에서, “생물활성제”, “약물”, 또는 임의의 다른 유사한 용어는 당분야에 공지된 방법 또는 본 발명에서 교시된 방법에 의한 투여에 적합한 임의의 화학적 또는 생물학적 물질이나 화합물을 의미하는데, 이들은 목적하는 생물학적 효과 또는 약리학적 효과를 유도한다. 이들 효과에는 (1) 생물체에 대한 예방 효과와 감염의 예방과 같은 원치않는 생물학적 효과의 예방; (2) 질환에 의해 유발되는 상태의 호전, 예를 들면, 질병의 결과로서 유발된 통증이나 염증의 완화; (3) 생물체로부터 질병의 완화, 감소, 또는 완전한 소멸이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이들 효과는 국소성, 예를 들면, 국소 마취 효과를 제공하거나, 또는 전신성이다.

본 명세서에서, “효과량”은 본 발명의 양이온성 지질중합체와 생체분해성 복합체를 형성하고 핵산 또는 음이온화제의 세포로의 전달을 가능하게 할 만큼 충분한 핵산 및/또는 음이온화제의 양을 의미한다.

본 명세서에서, “리포솜”은 수성 구획(aqueous compartment)을 둘러싸는 단일-이나 다중-층으로 구성된 현미경적 소포를 의미한다.

본 명세서에서 “투여” 및 유사한 용어는 치료 개체에 조성물을 전달하는 것을 의미하는데, 여기서 상기 조성물은 전신 순환하면서 표적 세포에 결합하고 세포내이입에 의해 흡수된다. 따라서, 조성물은 가급적 전신 투여, 전형적으로, 피하, 근육내, 정맥내 또는 복강내 주입에 의해 개체에 투여된다. 이런 용도의 주사 가능 물질은 액체 용액이나 현탁액과 같은 통상적인 형태, 또는 주입직전 액체에 녹인 용액이나 현탁액으로 또는 에멀션으로 제조하는데 적합한 고체 형태로 제조될 수 있다. 적당한 부형제에는 예로써 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등이 포함된다; 원하는 경우, 습윤제 또는 유화제, 완충액 등과 같은 소량의 보조제를 첨가될 수 있다.

유전자 요법의 성공을 위한 열쇠는 전신 투여에 안전하고 유효한 유전자 전달 운반체의 개발이다. 초기 임상 시험에 이용된 대부분의 양이온성 지질, 예를 들면, N[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA)와 3-β(N,N"-디메틸아미노에탄 카바모일 콜레스테롤)(DC-Chol)은 시험관내에서 효율적인 유전자 전달을 보이긴 하지만, 동물에서 유전자 전달에는 효율이 덜한 것으로 밝혀졌다(참조: Felgner PL et al. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7413-7417(1987); Gao, X. and Huang L. (1991) A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179: 280-285).

양이온성 지질의 전체 구조는 3가지 부분을 보유한다: (i) 소수성 지질 앵커(anchor), 이는 리포솜(또는 미셀 구조) 형성을 보조하고 세포막과 상호작용한다; (ii) 링커기(linker group); (iii) 양전하 머리기(head-group), 이는 플라즈미드와 상호작용하여 이의 농축을 결과한다. 단일 삼차 또는 사차 암모늄 머리기를 보유하거나, 또는 디알킬 지질이나 콜레스테롤 앵커에 연결된 양성자화가능 폴리아민을 보유하는 많은 화합물이 다양한 세포형으로의 트랜스펙션에 이용되고 있다. 지질 앵커와 관련하여 폴리아민 머리기의 방향은 트랜스펙션 효율에 많은 영향을 주는 것으로 밝혀졌다. T-형 양이온성 지질을 산출하는 이차 아민을 통한 카바메이트 결합에 의한 콜레스테롤 지질에 스페르민 또는 스페르민 머리기의 공액은 폐 조직에서 유전자 전달에 매우 유효한 것으로 밝혀졌다. 대조적으로, 스페르민 또는 스페르미딘을 콜레스테롤 또는 디알킬 지질에 공액함으로써 형성된 선형 폴리아민 지질은 유전자 전달 효율이 훨씬 덜하였다.

머리기에 3개의 양성자화가능 아민을 보유하는 양이온성 지질은 하나의 양성자화가능 아민을 보유하는 DC-콜레스테롤보다 훨씬 높은 활성을 보유하는 것으로 밝혀졌다. 양성자화가능 아민의 숫자에 더하여, 소수성 지질 앵커와 양이온성 머리기를 가교하는 링커기의 선택 역시 유전자 전달 활성에 영향을 주는 것으로 밝혀졌다. 카바메이트 링커를 요소, 아마이드 또는 아민으로 치환하면 트랜스펙션 활성이 현저하게 감소한다. PEI는 유전자 전달에 매우 유효한 것으로 밝혀졌는데, 유전자 전달은 이의 분자량과 전하비(charge ratio)에 좌우된다. 하지만, 고분자량 PEI는 세포와 조직에 강한 독성을 나타낸다.

본 발명의 양이온성 지질중합체는 폴리에틸렌이민(PEI), 지질, 생체적합성 친수성 중합체를 포함하는데, 여기서 상기 지질과 친수성 중합체는 PEI 골격에 공유 결합된다. 선택적으로, 지질은 친수성 중합체 스페이서를 통하여 PEI에 공유 결합될

수 있다. 적절하게는, 친수성 중합체는 50 내지 20,000 달톤의 분자량을 보유하는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다. 적절하게는, 지질은 콜레스테롤, 콜레스테롤 유도체, C₁₂ 내지 C₁₈ 지방산, 또는 C₁₂ 내지 C₁₈ 지방산 유도체이다. 본 발명의 지질중합체는 한가지이상의 지질과 친수성 중합체가 PEI 골격에 공액되는 것으로 특성화된다.

도 1에서는 본 발명의 지질중합체의 합성 전략을 도시한다. 상세한 합성 절차는 아래와 같다: 1 g의 가지형 폴리에틸렌이민(PEI) 1800 Da(0.56 mM)는 5 ml 클로로포름에 용해시키고 100 ml 둥근 바닥 플라스크에 위치시키며 실온에서 20분간 교반하였다. 380 mg의 콜레스테릴 클로로포름산염(0.85 mM)과 500 mg 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)(mw 550 Da)(0.91 mM)은 5 ml 클로로포름에 용해시키고 첨가 깔때기에 이전하며, 상기 깔때기는 PEI 용액을 보유하는 둥근 바닥 플라스크의 상부에 위치시켰다. 클로로포름에서 콜레스테릴 클로로포름산염과 PEG의 혼합물은 실온에서 5-10분간 PEI 용액에 천천히 첨가하고, 이후 실온에서 추가로 4시간동안 교반하였다. 회전 증발기로 반응 혼합물로부터 용제를 제거한 이후, 남아있는 점착성 물질은 교반하면서 20 ml 에틸 아세테이트에 용해시켰다. 생성된 산물은 20 ml의 n-헥산을 천천히 첨가함으로써 용제로부터 침전시키고, 이후 액체를 산물로부터 따라버렸다. 생성된 산물은 20 ml의 에틸 아세테이트/n-헥산(1/1; v/v) 혼합물로 2회 세척하였다. 액체를 따라버린 이후, 상기 물질은 10-15분간 질소 가스를 제거함으로써 건조시켰다. 상기 물질은 10 ml의 0.05N HCl에 용해시켜 아민기의 염 형태를 획득하였는데, 그 이유는 유리 염기 형태가 공기과 접촉하면 쉽게 산화되기 때문이다. 수용액은 0.2 μm 필터 페이퍼를 통하여 여과하고, 이후 냉동 건조시켜 최종 산물을 획득하였다.

최종 산물의 실체(콜레스테롤, PEG, PEI의 존재)는 ¹H-NMR(Varian Inc., 500MHz, Palo, Alto, CA)로 확증하였다. NMR 결과는 아래와 같다: ¹H NMR(500 MHz, 클로로포름-dl) δ~0.65ppm(콜레스테롤(a)로부터 CH₃의 3H); δ~0.85ppm(콜레스테롤로부터 (CH₂)₂의 6H); δ~0.95ppm(콜레스테롤로부터 CH₃의 3H); δ~1.10ppm(콜레스테롤로부터 CH₃의 3H); δ 0.70~2.50ppm(콜레스테롤로부터 CH₂-CH₂ 및 CHCH₂로부터 4H); δ~5.30ppm(콜레스테롤로부터 =CH-로부터 1H); δ 2.50~3.60ppm(PEI(b)로부터 N-CH₂-CH₂-N으로부터 176H); δ~3.7ppm(PEG(c)로부터 OCH₂CH₂-O로부터 23H). 각 물질의 대표적 피크((a), (b), (c))는 수소 개수로 나누고, 이후 공액비(conjugation ratio)를 고려함으로써 산정하였다(도 2A). 본 실험의 몰 비율은 3.0 몰 PEG와 1.28 몰 콜레스테롤이 1 몰의 PEI 분자에 공액되었음을 보였다.

PPC 합성의 두 번째 방식은 도 2B에 도시된 바와 같이, PEG 250 Da, PEI 1800, 콜레스테릴 클로로포름산염을 이용하여 1.0 몰의 PEI 분자당 0.85 몰의 PEG와 0.9 몰의 콜레스테릴 클로로포름산염을 보유하는 PPC를 획득하는 단계를 수반한다. 이는 넓은 분자량 범위의 PEG가 PPC 합성에 사용될 수 있음을 입증한다.

다른 공액 방식에는 선형 폴리에틸렌이민(LPEI)이 PPC 합성에 사용되었다. 가지형 PEI는 3가지 상이한 종류의 아민(대략 25% 일차 아민, 50% 이차 아민, 25% 삼차 아민)을 보유하는 반면, 선형 PEI는 이차 아민으로만 구성된다. 이런 이유로, 콜레스테롤 유도체와 PEG는 선형 PEI의 이차 아민에 공액되었다. 상세한 합성과 분석 방법은 아래와 같다. 500 mg의 LPEI (mw 25000 Da)(0.02 mM)는 65°C에서 30분간 30 ml 클로로포름에 용해시켰다. 5 ml 클로로포름에서 40 mg 콜레스테릴 클로로포름산염(0.09 mM)과 200 mg PEG(mw 1000 Da)(0.2 mM)은 3-10분간 PEI 용액에 천천히 첨가하였다. 생성된 용액은 65°C에서 추가로 4시간동안 교반하였다. 용제는 진공하에 회전 증발기로 제거하고, 남아있는 물질은 15 ml의 에틸 에테르로 세척하였다. 순수 질소로 건조시킨 이후, 상기 물질은 10 ml의 2.0N HCl과 2 ml의 트리플루오르아세트산의 혼합물에 용해시켰다. 생성된 용액은 매 12시간마다 새로운 물로 교체하면서 MWCO 15000 투석 튜브를 이용하여 48시간동안 탈이온수에서 투석하였다. 생성된 용액은 냉동 건조시켜 수분을 제거하였다.

산물 조성의 확증을 위하여, 최종 산물은 ¹H-NMR(Varian Inc., 500MHz, Palo, Alto, CA)로 분석하였다. 샘플은 NMR 측정을 위하여 산화중수소(deuterium oxide)에 용해시켰다. NMR 피크는 3가지 성분: 콜레스테롤, PEG, PEI의 존재를 특성화함으로써 분석하였다. NMR 결과는 아래와 같다: ¹H NMR(500 MHz, 클로로포름-dl) δ~0.65ppm(콜레스테롤로부터 CH₃의 3H); δ 2.50~3.60ppm(PEI로부터 N-CH₂-CH₂-N으로부터 2340H); δ~3.7ppm(PEG로부터 OCH₂CH₂-O로부터 91H). 각 물질의 대표적 피크는 수소 개수로 나누고, 이후 공액비(conjugation ratio)를 고려함으로써 산정하였다. 본 실험의 몰 비율은 12.0 몰 PEG와 5.0 몰 콜레스테롤이 1 몰의 PEI 분자에 공액되었음을 보였다(도 3).

신규한 지질중합체의 한가지 실험은 폴리[N-폴리(에틸렌 글리콜)-에틸렌이민]-폴리(에틸렌이민)-폴리(N-콜레스테롤)(이후, "PPC")이다. PPC에 포함된 PEI의 유리 아민은 적당한 DNA 농축을 위한 충분한 양전하를 제공한다. 극성 머리와 소수성 지질 사이의 결합은 생체분해성이지만 생물학적 환경을 견디낼 만큼 충분히 강하다. 콜레스테롤 지질과 폴리에틸

렌이민 사이의 에스테르 결합은 지질중합체의 생체분해성을 제공하고, 상대적으로 저분자량 PEI는 지질중합체의 독성을 현저하게 감소시킨다. 콜레스테롤 유래된 지질이 본 발명에서 선호되긴 하지만, 다른 친지성 부분, 예를 들면, C₁₂ 내지 C₁₈ 포화되거나 불포화된 지방산 역시 사용될 수 있다.

본 발명의 생체분해성 양이온성 중합체는 핵산과 같은 다음이온 화합물에 정전 부착된 아민기를 보유한다. 본 발명의 양이온성 지질중합체는 DNA를 예로써 압축 구조로 농축한다. 투여직후, 이와 같은 양이온성 지질중합체와 핵산의 복합체는 수용체 매개된 세포내이입을 통하여 세포로 내재화된다. 이에 더하여, 지질중합체의 친지성 기는 양이온성 친양쪽성체 (amphiphile)의 세포막으로의 삽입을 가능하게 하고, 세포 표면에 부착을 위한 양이온성 아민기에 대한 앵커로서 기능한다. 본 발명의 지질중합체는 고도로 하전된 양성 기와 친수성 기를 보유하는데, 이들은 유전자와 다른 생물활성제의 전달 동안 세포와 조직 흡수를 현저하게 강화시킨다.

생리 조건하에 농축된 핵산의 불안정성은 이들의 임상적 이용에서 주요한 장애물중 하나이다. 농축된 핵산의 생체내 이용에서 다른 주요한 한계는 이들이 혈청 단백질과 상호작용하여 정맥내 투여이후 세망내피 세포에 의한 불안정화와 급속한 제거가 발생한다는 점이다. 양이온성 지질중합체의 생체적합성과 용해성은 소수성 생체적합성 중합체, 예를 들면, 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)와의 공액으로 개선될 수 있다. PEG는 부착되는 분자의 면역원성을 억제하는 것으로 알려져 있는 FDA-승인된 중합체이다. PEG화(PEGylation)는 농축된 DNA 입자를 PEG의 “겉질”로 덮고 응집으로부터 핵산을 안정시키며 면역계에 의한 양이온성 지질중합체의 인식을 감소시키고 생체내 투여이후 뉴클레아제에 의한 이들의 분해를 지연시킨다.

PEI에서 아민기 역시 스페이스 분자를 통하여 표적화 부분에 공액될 수 있다. 지질중합체에 공액된 표적화 부분은 지질중합체-핵산/약물 복합체가 특정 표적 세포에 결합하고 이들 세포(종양 세포, 간 세포, 조혈 세포 등)에 침투하도록 한다. 표적화 부분은 세포내 표적화 요소일 수도 있는데, 이는 핵산/약물이 선호되는 특정 세포 구획(미토콘드리아, 핵 등)으로 전달될 수 있도록 한다. 바람직한 구체예에서, 표적화 부분은 아미노기에 결합된 당 부분일 수 있다. 이들 당 부분은 가급적, 모노-또는 올리고사카라이드, 예를 들면, 갈락토오스, 글루코오스, 푸코오스, 프럭토오스, 락토오스, 수크로오스, 만노오스, 셀로비오스, 트리오스, 텍스트로스, 트레할로스, 말토오스, 갈락토사민, 글루코사민, 갈락투론산, 글루쿠론산, 글루콘산이다. 적절하게는, 표적화 부분은 트랜스페린, 아사이알로당단백질, 항체, 항체 단편, 저밀도 지단백, 인터루킨, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, 줄기 세포 인자, 에리스로포이에틴, 상피 성장 인자(EGF), 인슐린, 아사이알로오소무코이드 (asialoorosomuroid), 만노오스-6-포스페이트, 만노오스, Lewis^X와 시알릴 Lewis^X, N-아세틸락토사민, 엽산염, 갈락토오스, 락토오스, 트롬보모듈린(thrombomodulin), 융합생성제(fusogenic agent)(가령, 폴리믹신 B와 헤마글루티닌 HA2), 라이소좀자극제(lysosomotrophic agent), 핵 위치 신호(nucleus localization signal, NLS)에서 선택된다.

당의 산 유도체와 양이온성 지질중합체의 공액이 가장 선호된다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 락토비온산(4-O- α ZD-갈락토피라노실-D-글루콘산)이 지질중합체에 결합된다. 락토오스의 갈락토실 단위는 이들 세포에서 갈락토오스 수용체의 높은 친화성과 결합활성(avidity)으로 인하여, 간세포에 대한 간편한 표적화 분자를 제공한다.

본 발명의 이점은 입자 크기와 전하 밀도가 쉽게 조절되는 유전자 담체를 제공한다는 점이다. 입자 크기의 조절은 유전자 전달 시스템의 최적화에 매우 중요한데, 그 이유는 입자 크기가 빈번하게 트랜스펙션 효율, 세포독성, 생체내에서 조직 표적화를 결정하기 때문이다. 일반적으로, 조직으로의 효율적인 침투를 가능하게 하기 위하여, 유전자 전달 입자의 크기는 세포 표면에서 클라스린(clathrin)-코팅된 구멍의 크기를 초과하지 않아야 한다. 본 발명에서, 지질중합체/DNA 복합체의 물리-화학적 특성, 예를 들면, 입자 크기는 중성 지질로 지질중합체를 조제하거나 PEG 함량을 변경시킴으로써 변화될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구체예에서, 입자 크기는 양이온성 지질중합체 조성 및 구성 요소의 혼합 비율에 따라 대략 40 내지 400 nm이다. 주입된 상이한 크기의 입자, 나노구, 미소구는 입자의 크기에 따라 신체의 다른 장기에 축적되는 것으로 알려져 있다. 가령, 150 nm 이하 직경의 입자는 간 상피의 시누소이드 천공(sinusoidal fenestration)을 통과하고 비장, 골수, 종양 조직에 내재화될 수 있다. 대략 0.1 내지 2.0 μ m 직경을 갖는 입자의 정맥내, 동맥내 또는 복강내 주입은 세망내피계의 대식세포에 의한 혈류로부터 입자의 급속한 제거를 유발한다. 본 발명의 신규한 양이온성 지질중합체는 본 명세서에 기술된 방식으로 장기-표적화될 수 있는 조절된 입자 크기의 분산액을 제조하는데 이용될 수 있다.

본 발명의 조성물은 세포내이입으로, 세포 표면에서 저밀도 지단백(LDL) 수용체에 의해 매개된 간세포로 선택된 핵산을 전달하는데 유효한 것으로 생각된다. 다른 세포로의 핵산 전달은 선택된 수용체를 보유하는 세포와 선택된 표적화 부분을

맞춤으로써 수행될 수 있다. 가령, 본 발명의 탄수화물-공액된 양이온성 지질은 대식세포를 트랜스펙션하기 위한 만노오스, T 세포를 트랜스펙션하기 위한 N-아세틸락토사민, 결장 암종 세포를 트랜스펙션하기 위한 갈락토오스로부터 제조될 수 있다.

본 발명의 한가지 실례는 폴리에틸렌아민(PEI), 지질, 생체적합성 친수성 중합체를 포함하는데, 여기서 상기 지질과 상기 친수성 중합체가 PEI 골격에 직접적으로 공유 결합하거나, 또는 특정 지질이 친수성 중합체 스페이서를 통하여 PEI에 공유 부착될 수 있다. PEI는 가지형 또는 선형 형태이다. 적절하게는, PEI의 평균 분자량은 100 내지 500,000 달톤의 범위에 위치한다. PEI는 가급적, 에스테르, 아마이드, 우레탄 또는 디-티올 결합으로 지질과 친수성 중합체에 공액된다. 생체적합성 친수성 중합체는 가급적, 50 내지 20,000 달톤의 분자량을 보유하는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다. 본 발명의 양이온성 지질중합체는 표적화 부분을 추가로 포함할 수 있다. PEI 대 공액된 지질의 몰 비율은 가급적, 1:0.1 내지 1:500의 범위에 위치한다. 반면, PEI 대 공액된 PEG의 몰 비율은 가급적, 1:0.1 내지 1:50의 범위에 위치한다.

본 발명의 수용성 양이온성 지질중합체는 물에 분산되고 양이온성 미셀을 형성하기 때문에, 고온 또는 극도의 pH를 이용할 필요없이, 그리고 폴리펩티드와 올리고뉴클레오티드와 같은 수용성 약물의 경우, 조제동안 이들 약물을 유기 용매에 노출시킬 필요없이 약물의 서방 제형을 제조하는데 사용될 수 있다. 이들 생체분해성 양이온성 지질중합체는 약물의 지속된 연속 방출 주사가 가능 제형의 제조에도 사용될 수 있다. 이들은 매우 효과적인 분산제로서 기능할 수 있고, 주입에 의해 투여되어 친지성 약물의 서방을 제공할 수 있다.

이에 더하여, 본 발명의 지질중합체는 인간이나 동물 신체의 특정 장기로의 유전자 전달을 위한 양이온성 리포솜 제형의 형태로 단독으로 또는 보조 지질(helper lipid)과의 혼합물로 사용될 수 있다. 중성 보조 지질의 이용은 N/P(중합체에서 아민 원자/DNA에서 인산염 원자) 비율이 낮은 경우에 특히 유리하다. 적절하게는, 보조 지질은 콜레스테롤, 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 올레오일팔미토일포스파티딜에탄올아민(POPE), 디피타노일포스파티딜에탄올아민(디피타노일 PE), 디스테로일-, -팔미토일-, -미리스토일포스파티딜에탄올아민 및 이들의 1- 내지 3-폴드(fold) N-메틸화된 유도체에서 선택된다. 적절하게는, 지질중합체 대 보조 지질의 몰 비율은 0.1/1 내지 500/1, 바람직하게는 0.5/1 내지 4/1, 더욱 바람직하게는 1/1 내지 2/1의 범위에 위치한다. 본 발명의 조성물의 트랜스펙션 효율을 최적화하기 위하여, 물을 부형제로 사용하고 디피타노일 PE를 보조 지질로 사용하는 것이 바람직하다. 이에 더하여, N/P 비율은 가급적, 500/1 내지 0.1/1, 특히, 전신 전달의 경우 100/1 내지 1/1 및 국소 전달의 경우 50/1 내지 0.5/1의 범위에 위치한다. 이런 비율은 사용된 중합체(도 4), 어쥬번트의 존재, 핵산, 표적 세포, 이용된 투여 방식에 따라, 당업자에 의해 변경될 수 있다.

리포솜은 다른 절차에 의한 트랜스펙션에는 통상적으로 저항하는 다양한 세포형의 트랜스펙션에 성공적으로 이용되고 있다. 리포솜은 유전자, 약물, 방사선치료제, 효소, 바이러스, 전사 인자, 다른자리입체성작동체(allosteric effector)를 다양한 배양된 세포주와 동물로 도입하는데 유용하게 사용되고 있다. 이에 더하여, 여러 연구에서, 리포솜의 이용은 전신 전달 이후 자가면역 반응, 독성 또는 생식선 국소화(gonadal localization)와 무관한 것으로 밝혀졌다(참조: Nabel et al. Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes, Human Gene Ther., 3:649-656, 1992b).

양이온성 리포솜과 미셀이 핵산 이외의 물질의 세포내 전달에 우수한 것으로 알려져 있기 때문에, 본 발명의 양이온성 지질중합체에 의해 형성된 양이온성 리포솜 또는 미셀은 핵산 이외의 물질, 예를 들면, 단백질 및 다양한 제약학적 또는 생물활성 작용제의 세포 전달에 사용될 수 있다. 이런 이유로, 본 발명은 다양한 질환 상태를 치료하는 방법을 제시하는데, 이런 치료는 물질의 세포로의 전달을 수반한다. 특히, 아래의 질병 상태: 암, 감염 질환, 염증 질환, 유전성 유전 질환의 치료가 본 발명의 범위에 속한다.

전달되는 생활성체의 개선된 세포 결합과 흡수를 보이는 본 발명의 양이온성 지질중합체는 상기한 바와 같은 공지의 양이온성 지질과 연관된 문제를 극복한다. 가령, 본 발명의 생체분해성 양이온성 지질중합체는 쉽게 가수분해되는데, 생성된 분해 산물은 신장으로 배출되고 유전자 발현을 위하여 요구되는 기간동안 불활성인 작은 비독성 분자이다. 분해는 단순 가수분해 반응 및/또는 효소 반응에 의해 수행된다. 효소 분해는 특정 세포 소기관, 예를 들면, 리소솜에서 현저하다. 분해에 요구되는 시간은 분자량 및 양이온성 지질에서 변형에 따라 수일에서부터 수개월까지 변한다.

더 나아가, 나노입자 또는 미소구 복합체는 단순한 혼합에 의해 본 발명의 양이온성 지질중합체 및 핵산 또는 다른 음으로 하전된 생물활성제로부터 형성될 수 있다. 본 발명의 양이온성 지질중합체의 친지성 기(콜레스테롤 유도체)는 양이온성 친양쪽성체의 세포막으로의 삽입을 가능하게 한다. 이는 세포 표면에 부착하는 양이온성 아민기에 대한 앵커로서 기능하고, 트랜스펙션되는 세포에 의한 양이온성 담체/핵산 복합체의 흡수를 강화시킨다. 이런 이유로, 본 발명의 양이온성 유전자 담체는 시험관내와 생체내 모두에서 트랜스펙션 효율을 개선하였다.

적절하게는, 콜레스테롤 부분은 친수성 중합체 스페이서를 통하여 직접적으로 PEI에 부착된 친지성 영역으로 이용되는데, 이는 이온화된 일차 아민기로 인하여 수성 환경에서 친수성 머리기로서 기능한다. 친수성 표면기로서, 중성 전하 PEG는 수성 환경에서 소수성 지질과 친수성 머리에 의해 형성된 안정성 미셀 복합체를 유지시킬 수 있고, 적혈구와 혈장 단백질로부터 PPC/pDNA 복합체를 보호하는 효과를 제공한다. 이에 더하여, 친수성 중성 중합체는 혈류에서 강화된 DNA 안정성에 필수적이다. 반면, 지질 부분은 특정 수용체-매개된 세포 흡수 기전에 의한 DNA 복합체의 세포 흡수를 강화시키는 데 이용될 수 있다. 세포 흡수는 소수성 지질 기와 세포막 사이의 긍정적인 상호작용에 의해 강화된다.

이에 더하여, PEG와 같은 중성 전하 친수성 중합체는 효율적인 트랜스펙션을 위한 다수의 이점, 예를 들면, 세포독성 감소, 수용액에서 용해도 개선, 지질중합체와 DNA 사이의 복합체 형성의 안정성 강화, 복합체와 혈액 단백질 사이의 상호작용 억제체를 제공한다. 이에 더하여, PEG는 복합체가 국소 부위로 주입될 때 복합체와 세포막 사이의 상호작용을 예방할 수 있다. 이런 이유로, 이들 복합체는 국소 부위로의 투여이후 쉽게 포획되지 않으면서 세포 전체에 골고루 분포될 수 있다.

본 발명의 수용성 지질중합체는 미셀을 형성하고, 핵산과의 복합체 형성에 이용되는 친수성 기(가령, PEI)와 소수성 기(가령, 콜레스테롤 또는 지방산) 사이에 미묘한 균형을 유지하는데 도움을 주는데, 이는 혈류에서 DNA/지질중합체 복합체를 안정화시키고 트랜스펙션 효율을 개선한다. 게다가, 수용성 지질중합체는 간세포 또는 고형 종양으로 핵산 전달에 적합한 작은 크기(40~150 nm)의 DNA 입자(도 5)를 형성한다. 이에 더하여, PPC/pDNA 복합체의 표면전하는 도 5에 도시된 N/P 비율에 따라 20~40 mV의 범위에 위치하였다. 양으로 하전된 입자는 음으로 하전된 세포 표면과 쉽게 상호작용할 수 있다. 하지만, 복합체에서 알짜 양성 전하에도 불구하고, PEG 사슬의 포함은 중합체/DNA 복합체와 세포막과의 상호작용을 감소시킴으로써, PEG 대 PEI의 몰 비율이 증가함에 따라 시험관내에서 낮아진 트랜스펙션 활성을 유발하였다. 하지만, PEG의 존재는 생물학적 환경에서 DNA 안정성을 개선하고, PPC의 트랜스펙션 효율에서 전반적인 개선을 유도한다. 도 6에 도시된 바와 같이, 배양된 293 T 세포에서 루시페라제 활성은 PEG/PEI 비율이 증가함에 따라 급격하게 감소되었다(도 7). PPC의 생체내 트랜스펙션 활성의 증가는 생물학적 환경에서 PPC/Luc 복합체의 증가된 안정성과 생물분포에 기인할 수 있다.

PPC/pmIL-12 복합체의 트랜스펙션이후, 분비된 mIL-12의 수준은 1.0, 2.0, 2.5, 3.5, 4.2의 공액 비율 중에서 3.5개의 PEG가 각 PPC에 공액되는 경우에 가장 높은 것으로 밝혀졌다(도 8). mIL-12의 결과를 도 7에서 루시페라제 활성과 비교하면, pDNA의 발현 수준은 pDNA 유형과 무관하지만 유전자 담체로서 PPC에서 PEG 비율과 관련되는 것으로 평가될 수 있다.

PPC/pDNA 복합체를 함유하는 조성물의 효과량은 트랜스펙션되는 일정한 숫자와 유형의 세포에 이용된 핵산의 유형과 농도에 좌우된다. 4T1 이하 종양을 보유하는 BALB/c 생쥐에 PPC/pmIL-12 복합체의 종양내 주입이후, 분비된 mIL-12의 수준은 이들 복합체가 1.0 몰 PEI와 1.0 몰 콜레스테롤에 공액된 3.5 몰의 PEG를 보유하는 PPC로 구성되는 경우에 높게 나타났다(도 8). PEG, PEI, 콜레스테롤 성분으로 구성되는 수용성 지질중합체는 전신과 국소 투여이후 세포와 조직에 대하여 최소의 독성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. PPC와 PPC/pDNA 복합체는 높아진 전하 비율에서도 배양된 CT-26 결장 암종 세포, 293 T 인간 배아 신장 세포, 뮤린 Jurkat T-세포주에 비-독성인 반면, PEI25000과 LipofectAMINE-기초된 제형은 이들 세포에 상당히 유독하였다.

PPC 리포솜은 200~400 nm의 DNA 입자를 형성하는데, 이들은 전신 투여이후 핵산의 폐로의 전달에 적합하다. 도 9에 도시된 바와 같이, PPC 리포솜/루시페라제 플라스미드 복합체는 전신 투여이후 PPC의 비-리포솜 제형에 비하여 폐 트랜스펙션에서 5~10배 강화를 유도하였다. PPC 리포솜의 트랜스펙션 효율은 생쥐 폐 전이 모형에서 중앙 결절의 증식을 저해하는 치료 수준의 IL-12를 유도할 만큼 충분하였다(도 10). 양이온성 지질중합체 대 콜레스테롤 또는 DOPE의 몰 비율은 지질-입자의 상 전이 및 지질중합체:중성 지질/pDNA 복합체의 표면 화학에 영향을 준다. 이는 핵산 흡수, 세포내 분해, 트래픽킹(trafficking)에 영향을 주고, 결과적으로 유전자 발현의 효율에 영향을 준다. 지질중합체와 중성 지질 사이의 최적 비율은 표적 부위에 따라, 1:1 내지 1:2의 범위에 위치하는 것으로 밝혀졌다.

아래의 실시예에서는 당업자가 본 발명을 실행하는 방법을 더욱 명확하게 이해할 수 있도록 한다. 본 발명이 바람직한 특정 구체예에 관련하여 기술되긴 했지만, 이는 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명을 결코 한정하지 않는다. 본 발명의 다른 측면은 본 발명에 평균적인 지식을 가진 자에게 명확하다.

실시예

다음은 실험에 사용된 모든 화학적 화합물과 시약의 출처를 개략적으로 개시한다.

600, 1200, 1800 Da의 가지형 폴리에틸렌이민(PEI), 1,000 Da, 선형 PEI 25000 Da는 Polysciences, Inc.(Warrington, PN)로부터 구입하였다. 선형 PEI 400, 가지형 PEI 800과 25000 Da, 콜레스테롤 클로로포름산염은 Aldrich, Inc. (Milwaukee, WI)로부터 구입하였다; 메틸-PEG-NHS 3400 Da, 메틸-PEG-NHS 1,000 Da, NH₂-PEG-COOH 3400 Da는 Nectar, Inc.(Huntsville, AL)로부터 구입하였다. 메틸-PEG-NHS 330, 메틸-PEG-NHS 650, 아미노 dPEG4TM 산은 Quanta Biodesign, Inc.(Powell, OH)로부터 구입하였다. 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)은 Avanti Polar Lipids(Alabaster, AL)로부터 구입하였다. 무수성 클로로포름, 에틸 에테르, 테트라하이드로푸란, 에틸 아세테이트, 아세톤은 Sigma(St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

실시예 1

PEG 550, 가지형 PEI 1800, 콜레스테릴 클로로포름산염으로 구성되는 PPC의 합성

본 실시예에서는 PEG 550, 가지형 PEI 1800, 콜레스테릴 클로로포름산염으로 구성되는 PPC의 제조를 설명한다.

1 g의 가지형 폴리에틸렌이민(PEI) 1800 Da(0.56 mM)는 5 ml 클로로포름에 용해시키고 100 ml 둥근 바닥 플라스크에 위치시키며 실온에서 20분간 교반하였다. 380 mg의 콜레스테릴 클로로포름산염(0.84 mM)과 500 mg 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)(mw 550 Da)(0.91 mM)은 5 ml 클로로포름에 용해시키고 첨가 깔때기에 이전하며, 상기 깔때기는 PEI 용액을 보유하는 둥근 바닥 플라스크의 상부에 위치시켰다. 클로로포름에서 콜레스테릴 클로로포름산염과 PEG의 혼합물은 실온에서 5-10분간 PEI 용액에 천천히 첨가하였다. 생성된 용액은 실온에서 추가로 4시간동안 교반하였다. 회전 증발기로 용제를 제거한 이후, 남아있는 점착성 물질은 교반하면서 20 ml 에틸 아세테이트에 용해시켰다. 생성된 산물은 20 ml의 n-헥산을 천천히 첨가함으로써 용제로부터 침전시켰다; 액체는 산물로부터 따라버렸다. 생성된 산물은 20 ml의 에틸 아세테이트/n-헥산(1/1; v/v) 혼합물로 2회 세척하였다. 액체를 따라버린 이후, 생성된 물질은 10-15분간 질소 가스를 제거함으로써 건조시켰다. 생성된 물질은 10 ml의 0.05N HCl에 용해시켜 아민기의 염 형태를 제조하였다. 수용액은 0.2 μm 필터 폐이퍼를 통하여 여과하였다. 이후, 냉동 건조시켜 최종 산물을 수득하였다.

확증을 위하여, 생성된 산물은 ¹H-NMR(Varian Inc., 500MHz, Palo, Alto, CA)로 분석하였다. 샘플은 NMR 측정을 위하여 클로로포름-d에 용해시켰다. NMR 피크는 3가지 성분: 콜레스테롤, PEG, PEI의 존재를 특성화함으로써 분석하였다. NMR 결과는 아래와 같다: ¹H NMR(500 MHz, 클로로포름-dl) δ~0.65ppm(콜레스테롤로부터 CH₃의 3H); δ~0.85ppm(콜레스테롤로부터 (CH₂)₂의 6H); δ~0.95ppm(콜레스테롤로부터 CH₃의 3H); δ~1.10ppm(콜레스테롤로부터 CH₃의 3H); δ 0.70~2.50ppm(콜레스테롤로부터 CH₂-CH₂ 및 CHCH₂로부터 4H); δ~5.30ppm(콜레스테롤로부터 =CH-로부터 1H); δ 2.50~3.60ppm(PEI로부터 N-CH₂-CH₂-N으로부터 176H); δ~3.7ppm(PEG부터 OCH₂CH₂-O로부터 23H). 각 물질의 대표적 피크는 수소 개수로 나누고, 이후 공액비(conjugation ratio)를 고려함으로써 산정하였다. 본 실시예의 물 비율은 3.0 몰 PEG와 1.28 몰 콜레스테롤이 1 몰의 PEI 분자에 공액되었음을 보였다.

실시예 2

PEG 330, 가지형 PEI 1800, 콜레스테릴 클로로포름산염으로 구성되는 PPC의 합성

본 실시예에서는 PEG 330, 가지형 PEI 1800, 콜레스테릴 클로로포름산염으로 구성되는 PPC의 제조를 설명한다.

180 mg의 가지형 PEI 1800 Da(0.1 mM)는 실온에서 30분간 4 ml 클로로포름에 용해시켰다. 70 mg의 콜레스테릴 클로로포름산염(0.14 mM)과 48 mg PEG 330(0.14 mM)은 1 ml 클로로포름에 용해시키고, 주사기를 이용하여 3-10분간 PEI 용액에 천천히 첨가하였다. 생성된 혼합물은 실온에서 4시간동안 교반하였다. 침전을 위한 10 ml의 에틸 아세테이트의 첨가 이후, 생성된 용액은 -20°C에서 하룻밤동안 인큐베이션하고, 이후 액체는 플라스크로부터 따라버렸다. 남아있는 물질은 5 ml의 에틸 아세테이트/n-헥산(1/1; v/v) 혼합물로 2회 세척하였다. 남아있는 물질은 10-15분간 질소 가스를 제거함으로써 건조시키고 10 ml의 0.05N HCl에 20분간 용해시키며, 이후 생성된 용액은 0.2 μm 필터 폐이퍼를 통하여 여과하였다. 생성된 수용액은 냉동 건조시켜 수분을 제거하였다.

확증을 위하여, 생성된 산물은 ¹H-NMR(Varian Inc., 500MHz, Palo, Alto, CA)로 분석하였다. 샘플은 NMR 측정을 위하여 클로로포름-d에 용해시켰다. NMR 피크는 3가지 성분: 콜레스테롤, PEG, PEI의 존재를 특성화함으로써 분석하였다.

^1H NMR(500 MHz, 클로로포름-dl) δ ~0.65ppm(콜레스테롤로부터 CH_3 의 3H); δ ~0.85ppm(콜레스테롤로부터 $(\text{CH}_2)_2$ 의 6H); δ ~0.95ppm(콜레스테롤로부터 CH_3 의 3H); δ ~1.10ppm(콜레스테롤로부터 CH_3 의 3H); δ 0.70~2.50ppm(콜레스테롤로부터 CH_2 - CH_2 및 CHCH_2 로부터 4H); δ ~5.30ppm(콜레스테롤로부터 =CH-로부터 1H); δ 2.50~3.60ppm(PEI로부터 N- CH_2 - CH_2 -N으로부터 176H); δ ~3.7ppm(PEG부터 OCH_2CH_2 -O로부터 12H). 각 물질의 대표적 피크는 수소 개수로 나누고, 이후 공액비(conjugation ratio)를 고려함으로써 산정하였다. 본 실시예의 몰 비율은 0.85 몰 PEG와 0.9 몰 콜레스테롤이 1 몰의 PEI 분자에 공액되었음을 보였다.

실시예 3

PEG 1000, 선형 PEI 25000, 콜레스테릴 클로로포름산염으로 구성되는 PPC의 합성

본 실시예에서는 PEG 1000, 선형 PEI 25000, 콜레스테릴 클로로포름산염으로 구성되는 PPC의 제조를 설명한다.

500 mg의 25000 Da 선형 PEI(0.02 mM)는 65°C에서 30분간 30 ml 클로로포름에 용해시켰다. 삼구 플라스크는 농축과 첨가 깔때기가 구비되었다. 5 ml 클로로포름에서 40 mg의 콜레스테릴 클로로포름산염(0.08 mM)과 200 mg PEG-NHS 1000 (0.2 mM)은 3-10분간 PEI 용액에 천천히 첨가하였다. 생성된 용액은 65°C에서 추가로 4시간동안 일정하게 교반하고, 이후 회전 증발기에서 부피를 대략 5 ml로 감소시켰다. 생성된 용액은 50 ml 에틸 에테르에서 침전시켜 유리 콜레스테롤을 제거하고, 액체는 플라스크로부터 따라버리고, 남아있는 물질은 20 ml의 에틸 에테르로 2회 세척하였다. 순수 질소로 건조시킨 이후, 생성된 물질은 10 ml의 2.0N HCl과 2 ml의 트리플루오르아세트산의 혼합물에 용해시켰다. 생성된 용액은 매 12시간마다 새로운 물로 교체하면서 MWCO 15000 투석 튜브를 이용하여 48시간동안 탈이온수에서 투석하였다. 생성된 용액은 냉동 건조시켜 수분을 제거하였다.

샘플은 NMR 측정을 위하여 산화중수소(deuterium oxide)에 용해시켰다. NMR 피크는 3가지 성분: 콜레스테롤, PEG, PEI의 존재를 특성화함으로써 분석하였다. NMR 결과는 아래와 같다: ^1H NMR(500 MHz, 클로로포름-dl) δ ~0.65ppm(콜레스테롤로부터 CH_3 의 3H); δ 2.50~3.60ppm(PEI로부터 N- CH_2 - CH_2 -N으로부터 2340H); δ ~3.7ppm(PEG로부터 OCH_2CH_2 -O로부터 91H). 각 물질의 대표적 피크는 수소 개수로 나누고, 이후 공액비(conjugation ratio)를 고려함으로써 산정하였다. 본 실시예의 몰 비율은 12.0 몰 PEG와 5.0 몰 콜레스테롤이 1 몰의 PEI 분자에 공액되었음을 보였다.

실시예 4

PEI 1800과 콜레스테릴 클로로포름산염으로 구성되는 불수용성 지질중합체의 합성

본 실시예에서는 불수용성 지질중합체의 제조를 설명한다.

1 g의 PEI(Mw:1200 달톤)는 15 ml 무수성 염화메틸렌과 100 μl 트리에틸아민(TEA)의 혼합물에 용해시켰다. 30분간 얼음 위에서 교반한 이후, 1.2 g의 콜레스테롤 클로로포름산염 용액을 PEI 용액에 천천히 첨가하고, 생성된 혼합물은 얼음 위에서 하룻밤동안 교반하였다. 결과의 산물은 에틸 에테르를 첨가하여 침전시키고 원심분리하며, 이후 추가의 에틸 에테르와 아세톤으로 세척하였다. 불수용성 지질중합체는 클로로포름에 용해시켜 0.08 g/ml의 최종 농도를 얻었다. 합성과 정제 이후, 불수용성 지질중합체는 MALDI-TOF MS와 ^1H NMR을 이용하여 특성화시켰다.

불수용성 지질중합체 1200의 NMR 측정은 아래의 결과를 보였다: ^1H NMR(200 MHz, CDCl_3), δ 0.6(콜레스테롤로부터 CH_3 의 3 H); δ 2.5(PEI의 골격으로부터 - NHCH_2CH_2 -의 230 H); δ 3.1(PEI의 측쇄로부터 =N- CH_2CH_2 - NH_2 의 72 H); δ 5.3(콜레스테롤로부터 =C=CH-C-의 1 H). δ 0.8, - δ 1.9에서 나타나는 다른 피크는 콜레스테롤이었다. PEI에 공액된 콜레스테롤의 양은 대략 40%인 것으로 결정되었다. 생성된 불수용성 지질중합체의 MALDI-TOF 질량 분광 분석에서, 이의 분자량은 대략 1600인 것으로 밝혀졌다. 피크는 800 내지 2700에서 나타났고, 대부분의 피크는 1600 근처에 중심적으로 위치하는데, 이는 1200 Da의 PEI와 414의 콜레스테롤(염화물의 제거)이 합성에 사용되었기 때문에 예상되었던 결과다. 상기한 결과는 비록 일부가 공액되지 않거나 2/1(콜레스테롤/PEI)의 몰 비율로 공액되긴 하지만, 합성된 PEACE 1200의 대부분이 콜레스테롤과 PEI의 1/1 몰 비율로 공액된다는 것을 암시한다.

실시예 5

일차 아민기를 이용한 PEI 1800과 콜레스테릴 클로로포름산염으로 구성되는 수용성 지질중합체의 합성

본 실시예에서는 PEI 1800과 콜레스테릴 클로로포름산염으로 구성되는 수용성 지질중합체의 제조를 설명한다.

3 g의 PEI(Mw:1800 달톤)는 얼음 위에서 10 ml 무수성 염화메틸렌과 100 μ l 트리에틸아민의 혼합물에 30분간 용해시켰다. 1 g의 콜레스테롤 클로로포름산염을 5 ml의 무수성 냉동 염화메틸렌에 용해시키고, 이후 PEI 용액에 30분간 천천히 첨가하였다. 생성된 혼합물은 얼음 위에서 12시간동안 교반하고, 결과의 산물은 회전 증발기에서 건조시켰다. 분말은 50 ml의 0.1 N HCl에 용해시켰다. 수용액은 100 ml의 염화메틸렌으로 3회 추출하고, 이후 유리 미세섬유 필터에 여과하였다. 생성된 산물은 용제 증발로 농축하고 과량의 아세톤으로 침전시키며 진공하에 건조시켰다. 생성된 산물은 MALDI-TOF MS와 ^1H NMR을 이용하여 분석하였다.

수용성 지질중합체 1800의 NMR 결과는 아래와 같다: ^1H NMR(500 MHz, MHz, D_2O + 1,4-디옥산- d_6), δ 0.8(콜레스테롤로부터 CH_3 의 2.9 H); δ 2.7(PEI의 골격으로부터 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ 의 59.6 H); δ 3.2(PEI의 측쇄로부터 $=\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 의 80.8 H); δ 5.4(콜레스테롤로부터 $=\text{C}=\text{CH}-\text{C}$ 의 0.4 H). δ 0.8, $-\delta$ 1.9에서 나타나는 다른 피크는 콜레스테롤이었다. PEI에 공액된 콜레스테롤의 양은 대략 47%인 것으로 결정되었다. PEACE의 MALDI-TOF 질량 분광 분석에서, 이의 분자량은 대략 2200인 것으로 밝혀졌다. 피크는 1000 내지 3500에서 나타났고, 대부분의 피크는 2200 근처에 중심적으로 위치하였다. 예상된 위치는 2400이고, 하나의 염화물(35)이 PEI 1800 + 콜레스테릴 클로로포름산염(449)으로부터 제거된다. 상기한 결과는 비록 일부가 공액되지 않거나 2/1(콜레스테롤/PEI)의 몰 비율로 공액되긴 하지만, 합성된 PEACE 1800의 대부분이 콜레스테롤과 PEI의 1/1 몰 비율로 공액된다는 것을 암시한다.

실시예 6

일차 아민기를 이용한 PEI 1800과 콜레스테릴 클로로포름산염으로 구성되는 지질중합체의 합성

본 실시예에서는 PEI에 콜레스테롤 공액을 위한 일차 아민기를 이용한 PEI 1800과 콜레스테릴 클로로포름산염으로 구성되는 지질중합체의 제조를 설명한다.

50 mg PEI 1800은 얼음 위에서 2 ml의 무수성 염화메틸렌에 용해시켰다. 이후, 200 μ l의 벤질 클로로포름산염을 반응 혼합물에 천천히 첨가하고, 생성된 용액은 얼음 위에서 4시간동안 교반하였다. 교반이후, 10 ml의 염화메틸렌을 첨가하고, 생성된 용액은 15 ml의 포화된 NH_4Cl 로 추출하였다. 수분은 황산마그네슘을 이용하여 염화메틸렌 상으로부터 제거하였다. 용액 부피는 진공하에 감소시키고, 산물(GBZ 보호된 PEI)은 에틸 에테르로 침전시켰다. 50 mg의 일차 아민 CBZ 보호된 PEI는 염화메틸렌에 용해시키고 10 mg의 콜레스테롤 클로로포름산염을 첨가하며, 생성된 용액은 얼음 위에서 12시간동안 교반하였다. 생성된 산물(CBZ 보호된 지질중합체)은 에틸 에테르로 침전시키고 아세톤으로 세척하며, 이후 수소 공여체로서 H_2 하에 팔라듐 활성화된 탄소를 촉매로서 함유하는 DMF에 용해시켰다. 생성된 혼합물은 실온에서 15시간동안 교반하고 Celite®로 여과하며 회전 증발기로 용액 부피를 감소시켰다. 최종 산물은 에틸 에테르를 이용한 침전으로 수득하였다.

실시예 7

PEG 스페이서를 통하여 PEI에 공액된 콜레스테롤의 합성

본 실시예에서는 본 발명의 PEG화된 지질중합체의 합성을 설명하는데, 여기서 NH_2 -PEG-COOH(mw 3400)는 콜레스테롤과 PEI 사이의 스페이서로서 이용되었다.

500 mg의 NH_2 -PEG-COOH 3400(0.15mM)은 실온에서 30분간 5 ml의 무수성 클로로포름에 용해시켰다. 1 ml의 무수성 클로로포름에 녹인 676 mg의 콜레스테롤 클로로포름산염(1.5mM) 용액은 PEG 용액에 천천히 첨가하고, 이후 실온에서 추가로 4시간동안 교반하였다. 생성된 혼합물은 얼음 위에서 1시간동안 500 ml의 에틸 에테르에 침전시키고, 이후 에틸 에테르로 3회 세척하여 비-공액된 콜레스테롤을 제거하였다. 질소 제거로 건조이후, 분말은 PEG에서 카복실기를 산성화시키기 위하여 5 ml의 0.05N HCl에 용해시켰다. 생성된 물질은 냉동 건조기로 건조시켰다. 100 mg의 PEI 1800(0.056mM), 50 mg의 DCC, 50 mg의 NHS는 실온에서 5 ml의 클로로포름에 용해시키고, 생성된 혼합물은 20분간 교반하

고, 이후 1 ml의 클로로포름에 녹인 380 mg의 chol-PEG-COOH 용액을 PEI 용액에 천천히 첨가하였다. 실온에서 6시간동안 교반한 이후, 회전 증발기로 유기 용제를 제거하였다. 남아있는 물질은 10 ml 탈이온수에 용해시키고 FPLC로 정제하였다.

실시예 8

본 실시예에서는 PPC에 공액된 당 기초된-표적화 부분의 합성을 설명한다.

PEG 550, PEI 1800, 콜레스테롤(0.05mM)로 구성되는 200 mg의 PPC는 DMF에 용해된 8 mg의 α-D-글루코피라노실 페닐이소티오시아네이트를 사용하여 글리코실화시켰다. 갈락토실화된, 만노실화된, 락토실화된 PPC를 합성하기 위하여, α-D-갈락토피라노실 페닐이소티오시아네이트, α-D-만노피라노실 페닐이소티오시아네이트, α-D-락토피라노실 페닐이소티오시아네이트를 각각 사용하였다. 생성된 용액은 1 M Na₂CO₃의 첨가로 pH 9로 조정하고, 이후 실온에서 12시간동안 배양하였다. 글루코실화된 PPC는 매 12시간마다 새로운 탈이온수로 교체하면서 2일동안 5 mM NaCl에서 투석하였다. 결과의 물질은 0.45 μm 필터 페이퍼를 통하여 여과하고, 이후 냉동 건조시켰다.

실시예 9

PPC에 공액된 엽산염의 합성

본 실시예에서는 PEI 1800, PEG 550, 콜레스테롤 클로로포름산염, 엽산염으로 구성되는 표적 부분 공액된 지질중합체의 제조를 설명한다.

200 mg의 PPC는 50 mg의 1,3-디사이클로헥실카르보디이미드(DCC)와 50 mg의 N-하이드록시숙신아마이드(NHS)를 보유하는 5 ml의 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해된 10 mg의 엽산으로 공액하였다. 12시간동안 교반한 이후, 산물(엽산염-PPC)은 100 ml의 에틸 에테르에 침전시키고, 이후 액체는 실온에서 1시간동안 방치한 이후 조심스럽게 따라버렸다. 남아있는 물질은 10 ml의 1N HCl에 용해시켰다. 생성된 용액은 매 12시간마다 새로운 탈이온수로 교체하면서 2일동안 탈이온수에서 투석하였다. 이들 용액은 0.45 μm 필터 페이퍼를 통하여 여과하고, 이후 냉동 건조시켰다.

실시예 10

RGD 공액된 PPC의 합성

본 실시예에서는 PEI 1800, PEG 550, 콜레스테롤 클로로포름산염, 표적화 부분으로 RGD 펩티드로 구성되는 RGD 펩티드 공액된 지질중합체의 제조를 설명한다.

환형 NH₂-Cys-Arg-Gly-Asp-Met-Phe-Gly-Cys-CO-NH₂는 N-말단을 갖는 RGD 펩티드로 이용하였다. RGD 펩티드는 F-moc 화학을 이용한 고품상 펩티드 합성 방법으로 합성하였다. 고리화는 pH 8.0에서 1 mM NH₄OAc에 녹인 0.01M K₃[Fe(CN)₆]을 사용하여 실온에서 하룻밤동안 수행하고, 이후 HPLC로 정제를 수행하였다. RGD 펩티드의 1 몰 N-말단 아민기는 DMSO에 녹인 2 몰 N-숙시니미딜 3 (2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP)와 반응시키고 에틸 에테르로 침전시켰다(RGD-PDP). 200 mg의 PPC는 실온에서 2시간동안 DMSO에 녹인 7 mg의 SPDP와 반응시켰다. 결과의 물질(PPC-PDP)은 0.1 M(-) 1,4-디티오-L-트레이톨(DTT)로 처리하고, 이후 바이오-스핀 칼럼에서 분리하였다. RGD-PDP는 DMF에 용해시키고, 이후 PPC-PDP 용액에 첨가하였다. 12시간동안 교반한 이후, 결과의 물질(RGD-PPC)은 FPLC로 정제하였다. 결과의 용액은 2일동안 탈이온수에 투석하고, 이후 회전 증발기로 부피를 감소시켰다. 최종 산물은 냉동 건조로 수득하였다.

실시예 11

플라스미드의 증폭과 정제

본 실시예에서는 실시예 1 내지 10에서 조제된 지질중합체와 복합되는 pDNA의 조제를 설명한다.

플라스미드 pCMV-루시페라제(pCMV-Luc)는 리포터 유전자로 이용하고, pmIL-12(뮤린 인터루킨-12, 또는 mL-12 유전자를 보유하는 플라스미드)는 치료 유전자로 이용하였다. mL-12의 p35와 p40 하위-단위는 2개의 독립된 전사체 단위로부터 발현되는데, 이들 전사체 단위는 내부 리보솜 부착 부위(internal ribosomal entry site, IRES)에 분리되고 단일 플라스미드 pCAGG에 삽입하였다. 생성된 벡터는 하이브리드 시토크로바이러스 유도된 인헨서(CMV-IE)와 병아리 β -액틴 프로모터의 제어하에 mL-12를 인코딩한다. 모든 플라스미드는 대장균(*E. coli*) DH5a 균주 세포에서 증폭하고, 이후 QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi 키트(Chatsworth, CA)로 분리하고 정제하였다. 플라스미드 순도와 완전성은 1% 아가로오스 겔 전기영동 및 브롬화 에티듐 염색을 순차적으로 수행함으로써 입증하였다. pDNA 농도는 260 nm에서 자외선(UV) 흡광도로 측정하였다.

실시예 12

리포좀의 제조

본 실시예에서는 지질중합체/pDNA 복합체의 제조를 설명하는데, 여기서 상기 지질중합체는 실시예 1-10을 따른다.

PPC는 둥근 바닥 플라스크에서 무수성 메틸 알코올에 용해시키고, 중성 지질(가령, 콜레스테롤, DOPE)은 1/1, 1/2, 2/1의 몰 비율로 첨가하였다. 생성된 혼합물은 투명 용액이 될 때까지 실온에서 대략 1 시간동안 교반하였다. 생성된 투명 용액은 둥근 바닥 플라스크의 표면에서 얇은 반투명 지질 필름이 형성될 때까지 회전 증발기에서 30°C에서 60분간 회전시켰다. 이들 플라스크는 진공된 파라필름으로 덮고, 상기 지질 필름을 진공하에 하룻밤동안 건조시켰다. 이들 필름은 5 mL의 무균수에서 수화시켜 PPC에 5 mM의 최종 농도를 제공하였다. 수화된 필름은 수분을 분산시키기 위하여 실온에서 10-20 분간 활발하게 와동시키고, 이후 분산된 물질은 실온에서 30분간 초음파 장치의 욕조에서 초음파처리로 더욱 분산시켰다. 분산된 용액은 450 nm 필터에 여과하고, 이후 200 nm 필터에 통과시켜 대형 입자를 제거하였다.

실시예 13

수용성 PPC/pDNA와 불수용성 PPC:DOPE/pDNA 복합체의 제조

본 실시예에서는 수용성 PPC/pDNA와 PPC:DOPE/pDNA 복합체의 형성을 설명한다.

수용성 PPC와 PPC:DOPE 리포좀 및 실시예 11에서 제조된 pDNA는 5% 락토오스로 각각 250 μ L 부피로 희석하고, 이 후 가벼운 와동하에 pDNA 용액을 상기 리포좀에 첨가하였다. 실온에서 30분간 복합체 형성을 진행시켰다. 효율적인 유전자 전달을 위한 전하 비율의 효과를 조사하기 위하여, 5/1 내지 50/1(N/P) 범위의 N/P 비율에서 수용성 PPC/pDNA와 PPC:DOPE 리포좀/pDNA 복합체를 조제하였다. 복합체 형성 이후, PPC:DOPE/pDNA 복합체의 삼투질 농도(osmolality)와 pH를 측정하였다.

여러 N/P 비율에서 제조된 수용성 PPC/pDNA와 PPC:DOPE 리포좀/pDNA 복합체는 이들 복합체의 입자 크기와 ζ 전위(제타 전위)를 측정하기 위하여 큐벳에서 5회 희석하였다. 샘플의 전기이동도(electrophoretic mobility)는 ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY)를 이용하여 37°C, pH 7.0, 677 nm 파장에서 15°의 일정 각도로 측정하였다. 제타 전위는 스몰루코브스키(Smoluchowski) 공식에 기초한 전기이동도로부터 산정하였다. 전기이동도의 측정 이후, 이들 샘플은 평균 입자 크기를 측정하였다.

수용성 PPC/pDNA 복합체의 평균 입자 크기는 90-120 nm인 PPC 조성물의 입자 크기와 동일한 범위에 위치하는 것으로 밝혀졌다.

이들 복합체의 제타 전위는 20 내지 40 mV의 범위에 위치하였는데, N/P 비율이 증가함에 따라 증가하였다(도 5). 이에 더하여, PPC/pDNA 복합체의 입자 크기는 80-120 nm의 직경 범위로 균일한 것으로 밝혀졌다. 입자 크기의 분포는 N/P 비율 변화에 의해 별다른 영향을 받지 않았다(도 5).

실시예 14

PPC/pDNA 복합체를 입증하기 위한 겔 지체 검사

본 실시예에서는 PPC와 pDNA 사이의 복합체화의 겔 지체 검사에 의한 확증을 설명한다.

간단히 말하면, 다양한 양의 PPC는 삼투질 농도를 290~300 mOsm으로 조정하는 5% 락토오스(w/v)의 존재하에, 10/1 내지 40/1의 N/P 비율에서 복합체화 능력을 평가하기 위하여 pDNA와 복합하였다. 이들 복합체는 1% 아가로오스 겔에서 전기영동하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, 양으로 하전된 PPC는 DNA의 당 골격에서 음으로 하전된 인산염 이온과 강한 복합체를 형성한다. 10/1 내지 40/1의 N/P 범위에서 스크린에 유리 DNA는 검출되지 않았다.

실시예 15

시험관내 트랜스펙션

본 실시예에서는 배양된 세포로 PPC/pDNA 복합체에 의한 유전자 트랜스펙션을 설명한다.

PPC/pCMV-Luc 복합체는 293 T 인간 배아 신장 형질전환된 세포주에서 트랜스펙션 효율을 평가하기 위하여 5%(w/v) 락토오스에서 상이한 N/P 비율로 조제하였다.

루시페라제 유전자의 경우에, 293 T 세포는 RPMI 1640 배지를 보유하는 10% FBS에서 4×10^5 세포/웰로 6개 웰 조직 배양 평판에 접종하였다. 이들 세포는 PEI 분자당 0.2 내지 2.5 몰 PEG 범위의 PPC를 보유하는 상이한 PEG 비율에서 조제된 수용성 PPC/pDNA 복합체로 트랜스펙션이후 24시간 이내에 80% 합류 수준을 달성하였다. 적하되는 DNA의 전체 양은 2.5 μg /웰로 일정하게 유지시켰고, 트랜스펙션은 혈청의 부재하에 수행하였다. 세포는 CO₂ 배양기에서 5시간동안 이들 복합체의 존재하에 배양하고, 이후 10% FBS를 보유하는 2 ml RPMI 1640의 교체 및 추가로 36시간동안 배양을 수행하였다. 세포는 차가운 PBS로 세척한 이후 1X 용해 완충액(Promega, Madison, WI)을 이용하여 용해시켰다. 전체 단백질 검사는 BCA 단백질 검사 키트(Pierce Chemical Co, Rockford, IL)를 이용하여 수행하였다. 루시페라제 활성은 96 웰 평판 화학발광측정기(Dynex Technologies Inc. Chantilly, VA)를 이용하여 상대적 발광 단위(relative light unit, RLU)로 측정하였다. 루시페라제의 최종 수치는 RLU/전체 단백질 mg으로 기록하였다. 나신 DNA와 처리되지 않은 배양액은 각각 양성 대조와 음성 대조로 이용하였다. 도 6과 7에 도시된 바와 같이, PPC의 트랜스펙션 효율은 PPC 분자당 PEG 양을 증가시키므로써 감소하였다. 하지만, 생체내에서 PEG의 포함은 트랜스펙션 활성을 증가시켰다(실시예 16).

실시예 16

PPC/DNA 복합체의 국소 투여에 의한 생체내 유전자 전달

본 실시예에서는 PPC/DNA 복합체에 의한 국소 종양 부위로 투여이후 유전자 발현을 설명한다.

PPC/pDNA 복합체는 물리-화학적 특성(가령, 입자 크기와 표면 전하)에 따라, 국소와 전신 유전자 전달에 이용될 수 있다. 전신 투여에 의한 원위 조직(가령, 폐, 간, 비장, 원위 종양)으로 유전자 표적화를 위하여, 트랜스펙션 복합체는 혈류에서 안정해야 하고 면역계에 의한 인식을 회피해야 한다.

본 실시예에서는 본 발명에 따른 PPC의 고휘 종양의 국소 유전자 전달을 위한 유전자 담체로서의 용도를 설명한다. 4T1 유방암 세포(1×10^6 세포)는 고휘 종양을 발생시키기 위하여 Balb/c 생쥐의 옆구리에 이식하였다. 이식이후 7-10일 시점에, 이들 종양에 0.6:1 - 18:1 범위에서 다양한 PEG 대 PEI 몰 비율로 PEI-Chol 또는 PPC와 복합된 30 μl (6 μg)의 루시페라제 플라스미드(0.2 mg/ml)를 주입하였다. 이들 플라스미드/중합체 복합체는 16.75의 N/P 비율에서 제조하였다. DNA 주입이후 24시간 시점에, 종양은 수거하고 균질화시키며, 상층액은 유전자 전달의 척도로서 루시페라제 활성을 분석하였다. 종양 유전자 전달 연구로부터 결과는 도 7에 도시한다. PEG의 추가는 PEI-Chol 중합체의 활성을 증가시켰다. 최대 유전자 전달 활성은 대략 2:1의 PEG:PEI 몰 비율에서 달성되었다. 다양한 PEG:PEI 몰 비율에서 PPC 중합체는 또한, 치료 유전자, IL-12로 검사하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, 4T1 종양으로 PPC IL-12 유전자 전달은 2-3.5의 PEG:PEI 비율에서 달성되었다.

실시예 17

PPC 리포솜/DNA 복합체의 전신 투여에 의한 생체내 유전자 전달

본 실시예에서는 전신 유전자 전달을 위한 PPC 리포솜의 적용을 설명한다.

콜레스테롤을 포함하는 PPC 리포솜은 실시예 12에 기술된 바와 같이 제조하고, 생쥐로의 꼬리 정맥 투여를 위하여 루시페라제 플라스미드와 복합하였다. 유전자 주입이후 24시간 시점에, 폐는 수거하고 생리 완충액에서 균질화시켰다. 폐 조직 상층액의 분량은 루시페라제 발현을 분석하였다. 대조 동물과 PPC 리포솜/DNA 주입된 동물에서 루시페라제 활성은 도 9에 도시한다. 중성 지질에 의한 PPC 활성의 강화는 엔도솜 막의 증가된 불안정화에 기인하는 것으로 추정된다. 별도의 실험에서, PPC 리포솜은 IL-12 플라스미드와 복합하여 정맥내 주입이후 폐 전이의 저해 활성을 검사하였다. 신장 암종 세포를 BALB/c 생쥐의 정맥내 주입하여 폐 전이를 유도하였다. 60 μ g의 mL-12 플라스미드를 보유하는 300 μ l의 PPC 리포솜/pMIL-12 복합체를 중앙 이식이후 6일과 13일에 꼬리 정맥에 주입하였다. 이들 동물은 24일에 희생시키고, 폐에서 종양 결절을 계산하였다. 도 10에서는 IL-12 플라스미드/PPC 리포솜 복합체의 정맥내 투여이후 폐 전이의 현저한 저해를 보여준다.

따라서, 다양한 구체예에서, 생물활성제의 막 수송을 조장함으로써 또는 생물학적 표면에 이들의 부착을 강화시킴으로써 이들 생물활성제, 예를 들면, DNA, RNA, 올리고뉴클레오티드, 단백질, 펩티드, 약물을 전달하는 신규한 양이온성 지질중합체를 함유하는 조성물 및 이의 이용 방법을 개시한다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 명백한 성격의 다양한 개변이 가능하며, 이와 같은 모든 개변은 첨부된 특허청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 간주된다.

상기한 내용은 본 발명의 원리를 설명하는 것을 목적으로 하며, 본 발명을 한정하지 않는다. 본 발명의 기술적 사상과 범위를 벗어나지 않는 다수의 개변이 고안될 수 있다. 본 발명은 명세서에 첨부된 도면에 도시되고 본 발명의 가장 선호되는 구체예를 통하여 충분히 기술되었기 때문에, 첨부된 특허청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 원리와 개념을 벗어나지 않는 다양한 개변이 가능할 것임은 당업자에게 명백하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

폴리에틸렌이민(PEI), 지질, 생체적합성 친수성 중합체 스페이서를 포함하는 생체적합성 양이온성 지질중합체에 있어서, 상기 지질은 공유 결합에 의해 생체적합성 친수성 중합체 스페이서를 통하여 PEI 골격에 부착되는 것을 특징으로 하는 생체적합성 양이온성 지질중합체.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 폴리에틸렌이민은 100-500,000 달톤의 분자량을 보유하는 선형이나 가지형 형태인 것을 특징으로 하는 생체적합성 양이온성 지질중합체.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 지질은 콜레스테롤, 콜레스테롤 유도체, C₁₂ 내지 C₁₈ 지방산, 또는 지방산 유도체인 것을 특징으로 하는 생체적합성 양이온성 지질중합체.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 직접적으로 또는 친수성 스페이서를 통하여 PEI 골격에 공유 부착된 표적화 부분을 추가로 포함하고, 상기 표적화 부분은 트랜스페린, 아사이알로당단백질, 항체, 항체 단편, 저밀도 지단백, 인터루킨, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, 줄기 세포 인자, 에리스로포이에틴, 상피 성장 인자(EGF), 인슐린, 아사이알로오로소무코이드(asialoorosomucoid), 만노오스-6-포스페이트, 만노오스, Lewis^X와 시알릴 Lewis^X, N-아세틸락토사민, 엽산염, 갈락토오스, 락토오스, 트롬보모듈린(thrombomodulin), 융합생성제(fusogenic agent), 라이소좀자극제(lysosomotrophic agent), 핵 위치 신호(nucleus localization signal, NLS)에서 선택되는 것을 특징으로 하는 생체적합성 양이온성 지질중합체.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 공유 결합은 에스테르, 아마이드, 우레탄, 또는 디티올 결합이고, 양이온성 지질중합체와 표적화 부분의 몰 비율은 1:0.1 내지 1:100의 범위에 위치하는 것을 특징으로 하는 생체적합성 양이온성 지질중합체.

청구항 6.

핵산 및 제 1항 내지 5항중 어느 한 항에 따른 생체적합성 양이온성 지질중합체 사이에 형성된 복합체에 있어서, N/P(중합체에서 질소 원자/DNA에서 인산염 원자) 비율이 0.1/1 내지 500/1의 범위에 위치하는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 7.

1:0.1 내지 1:500 범위의 몰 비율로 제 1항 내지 5항중 어느 한 항에 따른 생체적합성 양이온성 지질중합체 및 보조 지질(helper lipid)을 함유하는 리포좀.

청구항 8.

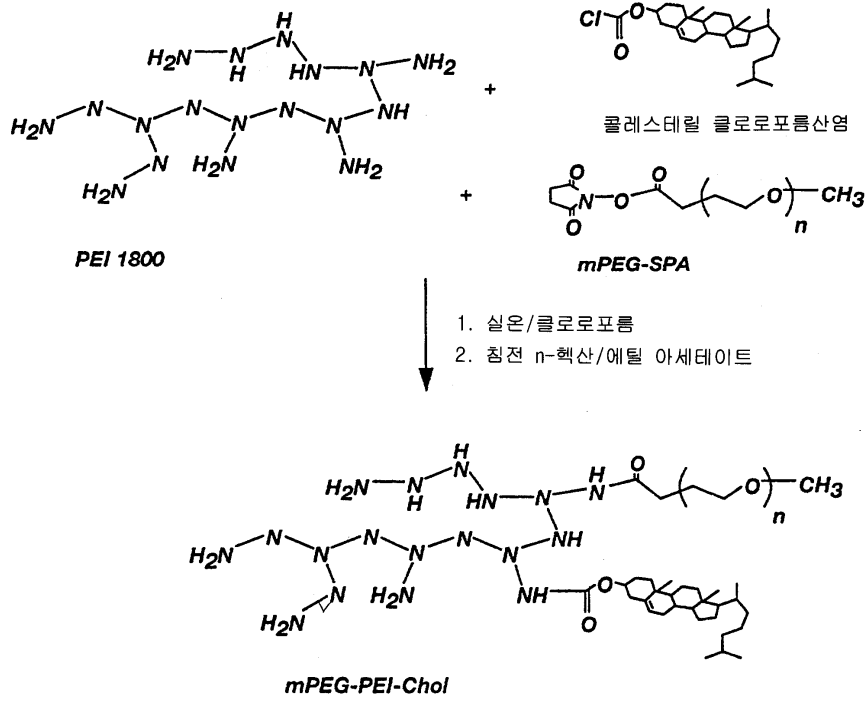
제 7항에 있어서, 보조 지질은 콜레스테롤, 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 올레오일팔미토일-포스파티딜에탄올아민(POPE), 디피타노일포스파티딜에탄올아민(디피타노일PE), 디스테로일-, -팔미토일-, -미리스토일포스파티딜에탄올아민, 1-내지 3-폴드(fold) N-메틸화된 유도체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 리포좀.

청구항 9.

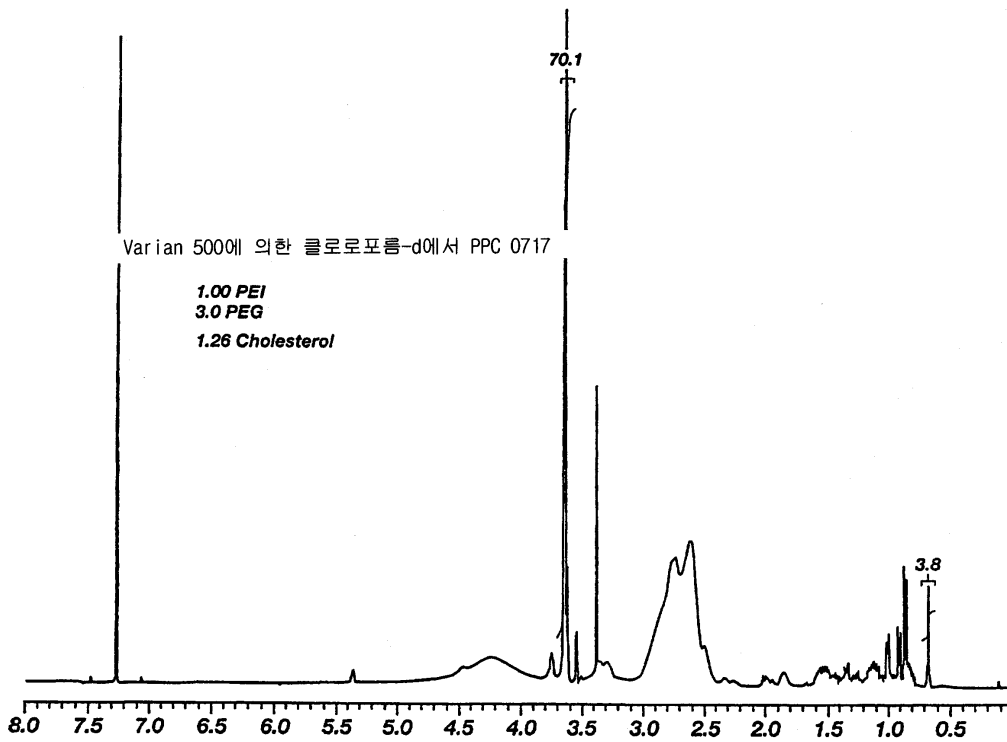
핵산 및 제 8항에 따른 양이온성 리포좀 사이에 형성된 복합체에 있어서, N/P(리포좀에서 질소 원자/DNA에서 인산염 원자) 비율이 0.1/1 내지 500/1의 범위에 위치하는 것을 특징으로 하는 복합체.

도면

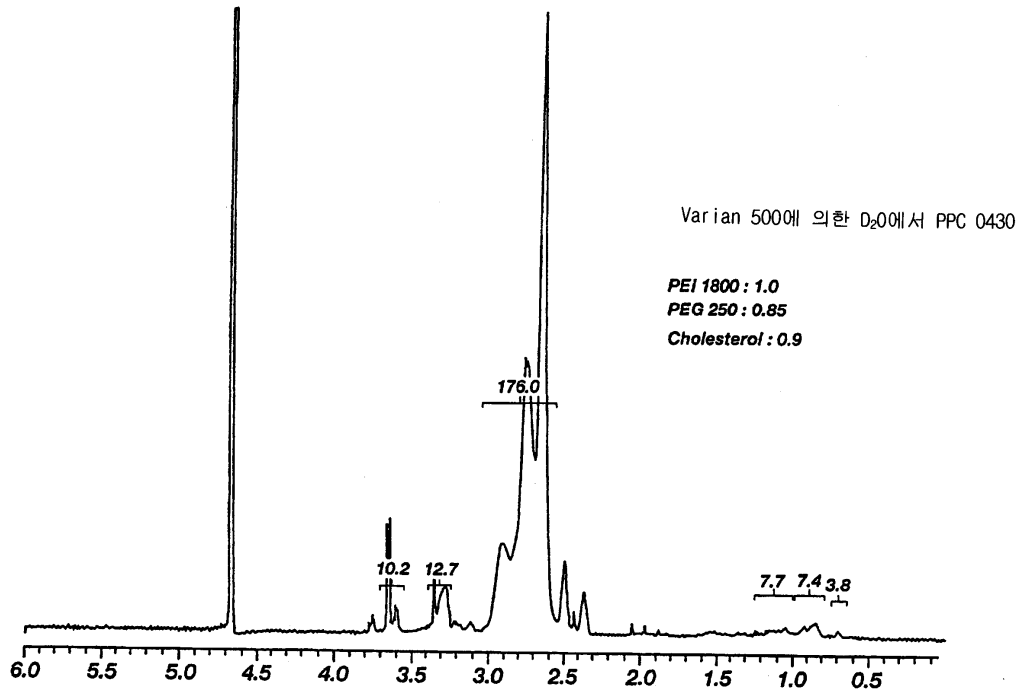
도면1



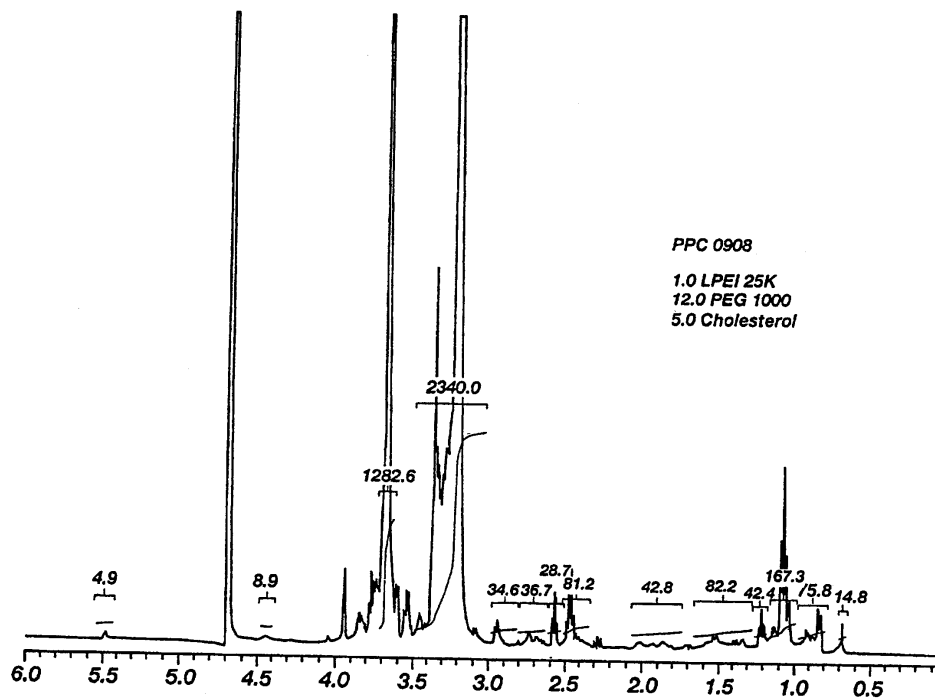
도면2a



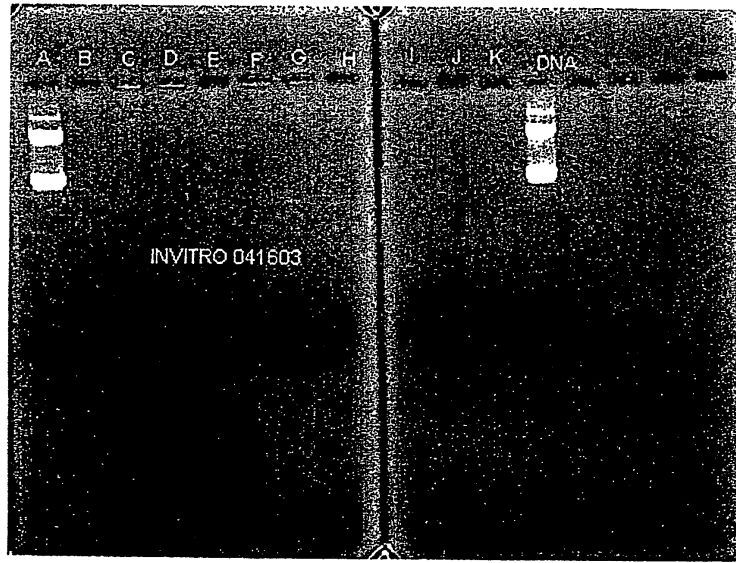
도면2b



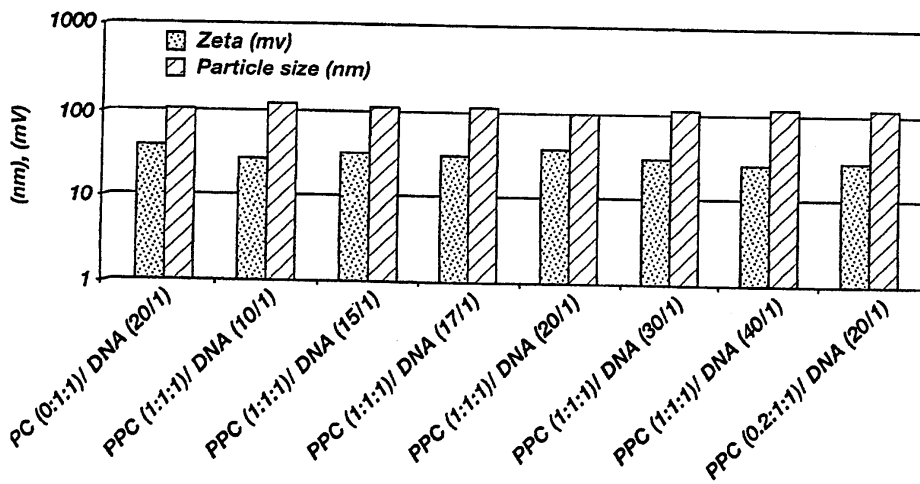
도면3



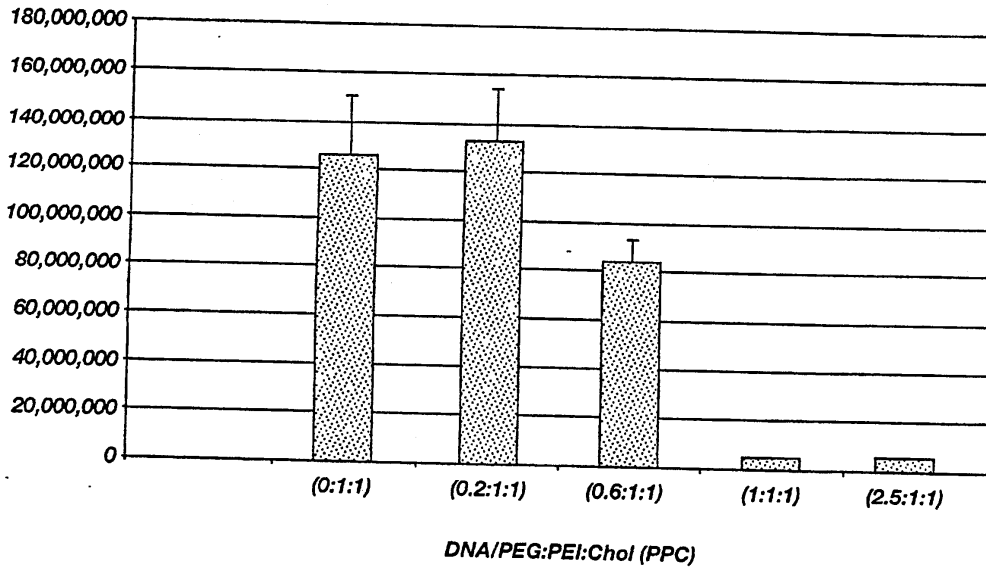
도면4



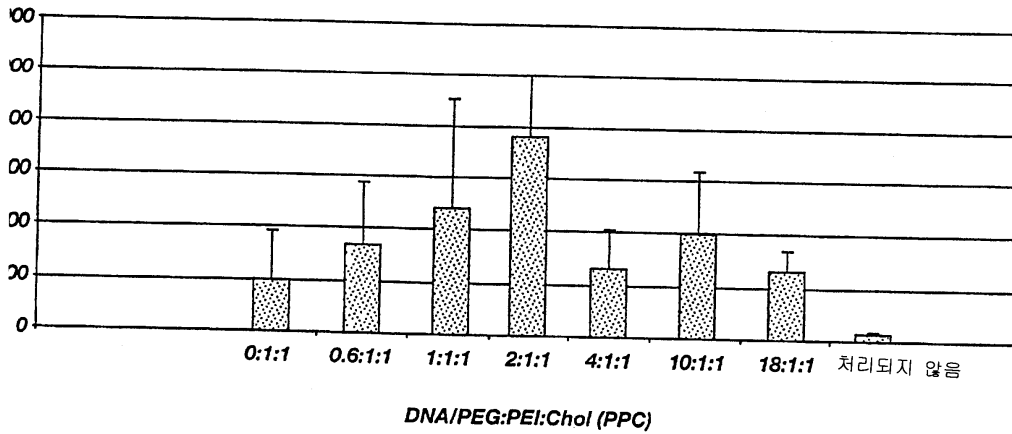
도면5



도면6

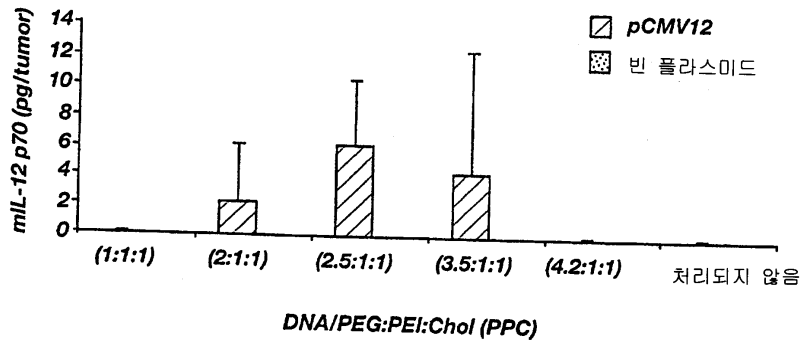


도면7

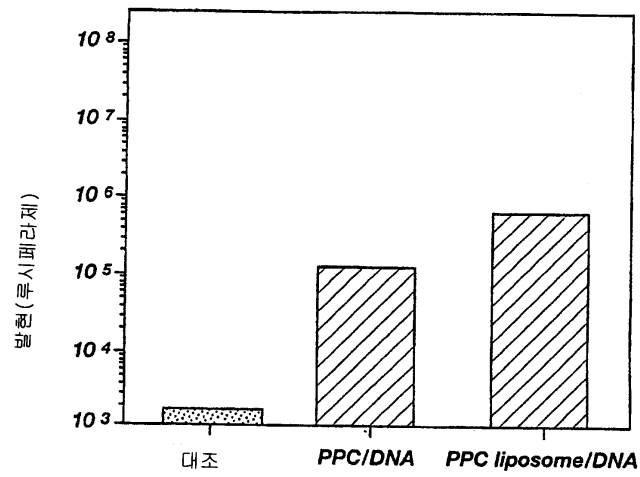


도면8

PPC에 의한 4T1 종양으로의 IL-12 유전자 전달



도면9



도면10

