



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0091133
(43) 공개일자 2014년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0002031
(22) 출원일자 2013년01월08일
심사청구일자 2013년01월08일

(71) 출원인
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
남윤성
대전 유성구 대학로 291, 신소재공학과 (구성동,
한국과학기술원)
이정유
대전 유성구 대학로 291, 신소재공학과 (구성동,
한국과학기술원)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
노철호

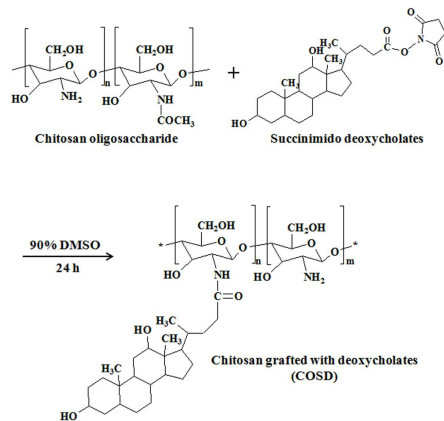
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 친수성 핵산 유전자를 유기용매에 가용화시키고, 이를 소수성 미립자에 봉입한 제어방출형 유전자 전달용 복합체와 이의 제조방법

(57) 요약

친수성 핵산 유전자를 유기용매에 가용화시키고, 이를 소수성 미립자에 봉입한 제어방출형 유전자 전달용 복합체와 이의 제조방법이 개시된다. 본 발명의 일 실시예에 따른 유전자 전달용 복합체는 소수성 분자로 그래프트된 양이온성이며 친수성 고분자; 및 유전자가 유기용매 혼합물 상에서 결합되어 형성되는 유전자 복합체가 유기용매 상에 분산되어 나노입자 내로 용이하게 봉입되는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

오미화

대전 유성구 대학로 291, 신소재공학과 (구성동, 한국과학기술원)

김지선

대전 유성구 대학로 291, 신소재공학과 (구성동, 한국과학기술원)

이수현

대전 유성구 대학로 291, 신소재공학과 (구성동, 한국과학기술원)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A111552

부처명 보건복지부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 광역학적으로 타겟팅되는 항종양 치료제의 전달 시스템 개발

기여율 1/1

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2011.11.01 ~ 2014.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

소수성 분자로 그래프트된 양이온성 고분자; 및 유전자가 결합되어 형성되는 유전자 복합체를 포함하고, 상기 양이온성 고분자 및 유전자가 코어에 위치하고, 상기 소수성 분자가 셀에 위치하는 역 마이셀 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 유전자 복합체가 내부에 봉입되고, 소수성을 갖는 미립자를 더 포함하는 유전자 전달용 복합체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 소수성 분자는 탄화수소 사슬을 갖는 분자, 환상 구조를 갖는 분자, 난용성 약물, 물에 용해되지 않는 고분자 또는 지질을 사용하며, 상기한 탄화수소 사슬을 갖는 분자는 헥사노익에시드(hexanoic acid), 데칸산(decanoic acid), 리놀산(linolenic acid), 스테아르산(stearic acid), 리놀렌산(linolenic acid), 팔미트산(palmitic acid), 올레산(oleic acid) 또는 헥사데칸올(hexadecanol)이고, 상기한 환상구조를 갖는 분자는 디옥시콜산(deoxycholic acid), 콜레스테롤(cholesterol), 리소콜산(lithocholic acid), N-아세틸 히스티딘(N-acetyl histidine) 또는 5β-콜란산(5β-cholanic acid)이고, 상기한 난용성 약물은 독소루비신(doxorubicin) 또는 파클리탁셀(paclitaxel)이고, 상기한 물에 용해되지 않는 고분자는 폴리(메틸메타크릴레이트)(poly(methyl methacrylate)), 폴리(카프로락톤)(polycaprolactone), 플루로닉(Pluronic) 또는 폴리(이소부틸시아노아크릴레이트)(poly(isobutyl cyanoacrylate))인 유전자 전달용 복합체.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 양이온성 고분자는 키토산, 재조합 키토산, 키토산 유도체, 키토산 유사체, 폴리(알릴아민)(poly(allylamine)), 폴리(아미도아민) 계열 텐드리머, 폴리(비닐아민)(poly(vinylamine)), 폴리디알릴메틸 암모니움 클로라이드, 폴리에틸렌이민(polyethylenimine), N-하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide), 아텔로콜라겐(atelocollagen), 디에틸아미노에틸 셀룰로스(deethylaminoethyl cellulose), 폴리(L-라이신)(poly(L-lysine), β-시클로덱스트린(β-cyclodextrin), 폴리(N-에틸-4-비닐피리디늄브로마이드)(poly(N-ethyl-4-vinylpyridiniumbromide), 폴리(디메틸아미노에틸메타크릴레이트)(poly(dimethylaminoethyl methacrylate), 풀루란(pullulan), 재조합 헤파린, 헤파린 유도체, 헤파린 유사체, 시조필란(schizophyllan), 알부민 유도체 및 알부민 유사체로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나 이상인 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 유전자는 플라스미드 유전자, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA(소간섭 리보핵산), rRNA(리보솜 리보핵산), RNA(리보핵산), DNA(디옥시리보핵산), cDNA(상보성 디옥시리보핵산), mRNA(전령 리보핵산) 및 tRNA(운반 리보핵산)로 이루어진 군로 이루어진 군에서 선택되는 1종이거나, 2종 이상이 복합적으로 혼합된 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 유전자 복합체는 상기 유전자를 기준으로 상기 소수성 분자로 그래프트된 양이온성 고분자가 1 내지 1,000의 중량비로 결합되는 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체.

청구항 7

청구항 2에 있어서,

상기 미립자는 PLGA, 폴리(카프로락톤)(poly(caprolactone), 폴리(비닐아세테이트)(poly(vinylacetate), 폴리(비닐시나메이트)(poly(vinyl cinnamate)), 폴리(우레탄)(poly(urethane), 메타크릴레이트(methacrylate), 폴리(프로필렌카보네이트)(poly(propylene carbonate)), PEG, 폴리(L-락트산)(poly(L-lactic acid), 폴리(글리콜산)(poly(glycolic acid), 폴리(메틸메타크릴레이트)(poly(methyl methacrylate)) 및 폴리(아크릴산)(poly(acrylic acid))으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 것으로 형성되는 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7중 어느 한 항에 따른 유전자 전달용 복합체를 제조하기 위한 유전자 전달용 복합체 제조방법이고,

상기 소수성 분자로 그래프트된 양이온성 고분자와 상기 유전자를 제1 유기 용매 상에서 결합시켜 유전자 복합체를 형성하는 1단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체 제조방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

제2 유기 용매 상에 용해되고 소수성을 갖는 미립자에 상기 유전자 복합체를 혼합하여, 상기 유전자 복합체를 상기 미립자 내부에 봉입시키는 2단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체 제조방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 제1 유기 용매 및/또는 제2 유기 용매는 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide), 아세톤(acetone), 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 1-프로판올(1-propanol), N,N-디메틸포름아마이드(N,N-dimethylformamide), N-메틸피롤리돈(N-methyl pyrrolidone), 다이옥산(dioxane), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸에틸케톤(methylethylketone) 및 아세토니트릴(acetonitrile)로 이루어진 군에서 적어도 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체 제조방법.

청구항 11

숙신이미도 디옥시콜레이트를 키토산 올리고당과 반응시켜 디옥시콜산으로 그래프트된 키토산을 형성하는 1단계; 및

제1 유기 용매에 용해된 상기 디옥시콜산으로 그래프트된 키토산에, 물에 용해된 siRNA를 혼합하여 유전자 복합체를 형성하는 2 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체 제조방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 2단계의 유전자 복합체는 상기 키토산 및 siRNA가 코어에 위치하고, 상기 디옥시콜산이 셸에 위치하는 역마이크 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체 제조방법.

청구항 13

청구항 11 또는 청구항 12에 있어서,

상기 2단계의 유전자 복합체는 상기 siRNA를 기준으로, 상기 디옥시כול산으로 그래프트된 키토산이 1 내지 1,000의 중량비로 결합되는 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체 제조방법.

청구항 14

청구항 11 또는 청구항 12에 있어서,

상기 2단계 이후에, 제2 유기 용매에 용해되고 소수성을 갖는 미립자를 추가적으로 혼합하여 상기 유전자 복합체를 상기 미립자 내부에 봉입하는 3단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 복합체 제조방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 제1 유기 용매 및/또는 제2 유기 용매는, 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide), 아세톤(acetone), 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 1-프로판올(1-propanol), N, N-디메틸포름아마이드(N, N-dimethylformamide), N-메틸피롤리돈(N-methyl pyrrolidone), 디옥산(dioxane), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸에틸케톤(methylethylketone) 및 아세토니트릴(acetonitrile)로 이루어진 군에서 적어도 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체 제조방법.

청구항 16

청구항 14에 있어서,

상기 미립자는 PLGA, 폴리(카프로락톤)(poly(caprolactone), 폴리(비닐아세테이트)(poly(vinylacetate), 폴리(비닐시나메이트)(poly(vinyl cinnamate)), 폴리(우레탄)(poly(urethane), 메타크릴레이트(methacrylate), 폴리(프로필렌카보네이트)(poly(propylene carbonate)), PEG, 폴리(L-락트산)(poly(L-lactic acid), 폴리(글리콜산)(poly(glycolic acid), 폴리(메틸메타크릴레이트)(poly(methyl methacrylate)) 및 폴리(아크릴산)(poly(acrylic acid))으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 것으로 형성되는 것을 특징으로 하는 유전자 전달용 복합체 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 유기용매 상에서 분산가능한 핵산 유전자 복합체를 함유하는 미립자 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 양이온성 고분자와 친수성 핵산 유전자의 정전기적 상호작용을 이용한 복합체를 형성시켜, 유전자를 유기용매 상에서 균일하게 용해 또는 분산시킨 뒤에, 이를 소수성을 갖는 미립자 내부에 봉입하여 친수성 유전자의 제어방출을 유도하는 유전자 전달용 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일반적으로, 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA, 이하 siRNA로 명명한다)는 19 내지 23개의 핵산으로 구성되는 짧은 이중나선 구조를 가지며, 센스 가닥과 동일한 염기서열을 갖는 메신저 RNA(messenger RNA, 이하 mRNA)를 표적으로 삼아 RNA유도침묵복합체(RNA induced silencing complex, RISC)가 결합된 상기 mRNA를 분해함으로써 해당 유전자의 발현을 저해하는 것으로 알려져 있다 (Hamilton A., Baulcombe D. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants, *Science* 286, 950-2. ; Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., and Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8). 이러한 siRNA는 적은 양으로도 정확하게 표적 mRNA 발현을 억제하는 효과를 지니므로, siRNA를 유전자 관련 질병치료에 이용하고자 하는 시도가 매우 활발히 진행되고 있는 실정이다.

[0003] 그러나, siRNA는 생체 내에서의 안정성이 매우 낮아 쉽게 분해되므로 화학적/생물학적으로 불안정성을 가지고 있을 뿐만 아니라, 음이온성을 지니므로 세포막을 투과하기가 어려워 실제 임상치료에 적용이 어렵다는 문제가 있다.

[0004] 상술한 문제점을 해결하기 위하여, 종래에는 siRNA를 양이온 펩타이드, 양이온성 지질 분자, 또는 양이온성 고분자와 같은 양이온성 유전자 전달체와 이온 결합시켜 나노 크기의 이온복합체를 형성시키는 방법이 이용되어

왔다 (De Paula D., Bentley MV, Mahato RI. (2007) Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting, *RNA* 13 431-56.; Urban-Klein B., Werth S., Abuharbeid S., Czubayko F., Aigner A., (2005) RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo, *Gene Ther* 12, 461-6; 핵산 전달용 양이온성 인지질 나노입자 조성물, 등록특허, 10-07944490000). 이는 siRNA를 분해 효소로부터 보호하고 음이온성을 갖는 세포막과 상호작용하게 함으로써, 세포 내 전달 효율성을 효과적으로 증가시키기 위함이다. 그러나, siRNA는 낮은 분자량을 가지고 있을 뿐만 아니라(대략, 15000 달톤 이하) 짧고 뾰족한 이중가닥 구조를 가지고 있으므로, 상기 이온복합체 형성을 위해서는 강한 양이온성 유전자 전달체를 사용하여야만 하였고 이는 비특이적인 세포 독성을 증가시키는 문제점을 야기하였다 (Gary D. J., Puri N., Won Y. Y. (2007) Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J Control Release* 121, 64-73).

[0005] 따라서, 이러한 siRNA와 같은 유전자를 전달하는 유전자 전달용 복합체를 세포에 안정적으로 전달함으로써 유전자 발현을 효과적으로 억제시킬 수 있는 방안이 모색되고 있는 실정이다. 일반적으로 음이온성 유전자인 siRNA와 양이온성 유전자 전달체 사이의 이온 결합체의 안정성을 높이는 방법으로써 각각의 전하 밀도를 높이는 연구가 많이 진행되고 있다. 양이온성 고분자나 지질의 분자량을 늘리거나 강한 양이온을 띠는 그룹을 도입하여 음이온을 띠는 유전자와 강한 이온 결합을 시키고자 하는 방법이 있다. 그러나 이러한 방법은 유전자 전달 효율은 증가시키나, 유전자 전달체의 강한 양이온으로 인해 비특이적인 세포 독성도 증가시켜 임상 적용에 어려움이 있다. 또한, 생체 내에 존재하는 단백질 등과 결합하여 그 이온결합이 끊어져서 복합체의 구조가 변형될 수 있는 문제점도 있으며, pH의 변화, 생체분자들과의 상호작용으로 인하여 생체 내에서 유전자의 방출을 제어하는 것이 매우 어렵다는 근본적인 문제점을 갖고 있다.

[0006] 이를 해결하기 위해 제안된 기존의 방법으로는, 양이온성 고분자와 생체적합성을 지닌 폴리에틸렌글리콜 (poly(ethylene) glycol, 이하 PEG라고 명명한다)을 접합시키는 방법, 폴리락틱-글리콜릭산 중합체 (poly(D,L-lactic-co-glycolic acid), 이하 PLGA로 명명한다) 등의 소수성 고분자로 제조한 미립구를 이용하는 방법 등이 있었다. 전자의 경우에는, 친수성 고분자를 수용액에서 상기와 같은 전달체와 결합시켜 복합체를 만드는 것이 일반적이며, PEG에 의해 생체분자와의 상호작용을 억제하는 효과는 있으나, 생체 내에서 유전자의 제어방출을 조절하기 어려운 문제는 해결할 수 없다 (Panyam J., Zhou W. J., Prabha S., Sahoo S. K., Labhasetwar V., (2002) Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery, *FASEB J* 16, 1217-26.; Mok H., Park T. G., (2008) Direct plasmid DNA encapsulation within PLGA nanospheres by single oil-in-water emulsion method, *Eur J Pharm Biopharm* 68, 105-11). 후자의 경우에는, PLGA 등의 소수성 고분자의 특성을 조절하여 유전자의 제어방출을 가능하게 할 수 있으나, 유전자가 수용액에 용해되어 있는 상태로 소수성 미립구 안에 봉입하는 과정에서, 대부분의 유전자가 손실되는 근본적인 문제점을 지니고 있다. 또한, 미립구의 크기가 작아질수록 이러한 문제가 더욱 심각하기 때문에, 현재의 기술 수준으로 수십 마이크로 미터 이상의 고분자 미립구에만 이 기술이 적용되는 한계가 있다. 보다 작은 미립구에 적용되지 못하는 것은, 이 기술의 치명적인 약점으로 혈관 내 주사나 세포 안으로 미립구를 전달시키지 못하는 문제로 인해, 그 사용이 매우 제한될 수 밖에 없다. 수백 나노미터 이하의 크기로 이 기술을 개발한다면, 위와 같은 문제를 해결하여 획기적인 기술향상을 예상할 수 있지만, 이러한 문제를 해결할 수 있는 기술적 방법이 아직까지는 보고된 바 없다.

[0007] 이에 본 발명은 상기한 문제점들을 근본적으로 해결할 수 있는 매우 간단한 방법론을 제시하고자, 소수성 유기 용매 상에서 균일하게 용해 또는 분산가능한 핵산 유전자 복합체를 제조하였으며, 이렇게 유기용매 상에서 용해 또는 분산시킨 유전자 복합체와 소수성 분자 또는 양친매성 분자를 균일하게 혼합시킨 뒤, 이를 이용하여 매우 높은 봉입효율로 유전자를 소수성을 갖는 수십 나노미터에서 수백 마이크로미터 크기의 미립자 내부에 봉입함으로써, 친수성 유전자의 제어방출을 유도하는 새로운 유전자 전달용 시스템을 제시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 치료용 유전자를 안정적이고 효율적으로 세포 내에 전달시킬 수 있는 유기 용매에 분산 가능한 소수성 유전자 복합체를 형성하는 것과, 이를 내부에 소수성 환경을 갖는 미립구 안에 봉입시켜 제어방출이 가능한 유전자 전달시스템을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 한 측면에 따르면, 소수성 분자로 그래프트된 양이온성 고분자; 및 유전자가 결합되어 형성되는 유전자 복합체를 포함하고, 상기 양이온성 고분자 및 유전자가 코어에 위치하고, 상기 소수성 분자가 쉘에 위치하는 역 마이셀 구조를 갖는 유전자 복합체가 제공될 수 있다.
- [0010] 또한, 상기 유전자 복합체가 내부에 봉입되고, 소수성을 갖는 미립자를 더 포함할 수 있다. 이 때, 상기 소수성 분자는 탄화수소 사슬을 갖는 분자, 환상 구조를 갖는 분자, 난용성 약물, 물에 용해되지 않는 고분자, 지질 등을 사용할 수 있다.
- [0011] 상기한 탄화수소 사슬을 갖는 분자로는 헥사노익에시드(hexanoic acid), 데칸산(decanoic acid), 리놀산(linolenic acid), 스테아르산(stearic acid), 리놀렌산(linolenic acid), 팔미트산(palmitic acid), 올레산(oleic acid), 헥사데칸올(hexadecanol) 및 이와 유사한 구조를 갖는 분자들이 가능하다.
- [0012] 상기한 환상구조를 갖는 분자로는 디옥시콜산(deoxycholic acid), 콜레스테롤(cholesterol), 리소콜산(lithocholic acid), N-아세틸 히스티딘(N-acetyl histidine), 5β-콜란산(5β-cholanic acid) 및 이와 유사한 구조를 갖는 분자들이 가능하다.
- [0013] 상기한 난용성 약물로는 독소루비신(doxorubicin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 이와 유사한 구조를 갖는 분자들이 가능하다.
- [0014] 상기한 물에 용해되지 않는 고분자로는 폴리(메틸메타크릴레이트)(poly(methyl methacrylate)), 폴리(카프로락톤)(polycaprolactone), 플루로닉(Pluronic), 폴리(이소부틸시아노아크릴레이트)(poly(isobutyl cyanoacrylate) 및 이의 공중합체나 유사한 구조를 갖는 고분자들이 가능하다.
- [0015] 또한, 상기 양이온성 고분자는 키토산, 재조합 키토산, 키토산 유도체, 키토산 유사체, 폴리(알릴아민)(poly(allylamine)), 폴리(아미도아민) 계열 덴드리머, 폴리(비닐아민)(poly(vinylamine)), 폴리디알릴메틸 암모니움 클로라이드, 폴리에틸렌이민(polyethylenimine), N-하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide), 아텔로콜라겐(atelocollagen), 디에틸아미노에틸 셀룰로스(deethylaminoethyl cellulose), 폴리(L-라이신)(poly(L-lysine), β-시클로덱스트린(β-cyclodextrin), 폴리(N-에틸-4-비닐피리디늄브로마이드)(poly(N-ethyl-4-vinylpyridiniumbromide), 폴리(디메틸아미노에틸메타크릴레이트)(poly(dimethylaminoethyl methacrylate), 풀루란(pullulan), 재조합 헤파린, 헤파린 유도체, 헤파린 유사체, 시조필란(schizophyllan), 알부민 유도체 및 알부민 유사체로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0016] 또한, 상기 유전자는 플라스미드 유전자, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA(소간섭 리보핵산), rRNA(리보솜 리보핵산), RNA(리보핵산), DNA(디옥시리보핵산), cDNA(상보성 디옥시리보핵산), mRNA(전령 리보핵산) 및 tRNA(운반 리보핵산)로 이루어진 군로 이루어진 군에서 선택되는 1종이거나, 2종 이상이 복합적으로 혼합된 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, 상기 유전자를 기준으로, 상기 소수성 분자로 그래프트된 양이온성 고분자가 1 내지 1,000의 중량비로 결합되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0017] 한편, 상기 소수성 분자로 그래프트된 양이온성 고분자 및 유전자는 하나 이상의 유기 용매 상에서 결합되는 것을 특징으로 한다. 이 때, 상기 유기 용매는 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide), 아세톤(acetone), 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 1-프로판올(1-propanol), N,N-디메틸포름아마이드(N,N-dimethylformamide), N-메틸피롤리돈(N-methyl pyrrolidone), 다이옥산(dioxane), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸에틸케톤(methylethylketone) 및 아세토니트릴(acetonitrile)로 이루어진 군에서 적어도 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 한편, 상기 양이온성 고분자 및 유전자가 코어에 위치하고, 상기 소수성 분자가 쉘에 위치하는 역 마이셀 구조를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명의 일 측면에 따른 유전자 전달용 복합체를 내부에 함유하는 나노입자가 제공될 수 있다. 이 때, 상기 나노입자는 PLGA, 폴리(카프로락톤)(poly(caprolactone), 폴리(비닐아세테이트)(poly(vinylacetate), 폴리(비닐시나메이트)(poly(vinyl cinnamate)), 폴리(우레탄)(poly(urethane), 메타크릴레이트(methacrylate), 폴리(프로필렌카보네이트)(poly(propylene carbonate)), PEG, 폴리(L-락트산)(poly(L-lactic acid), 폴리(글리콜산)(poly(glycolic acid), 폴리(메틸메타크릴레이트)(poly(methyl methacrylate)) 및 폴리(아크릴산)(poly(acrylic acid))으로 형성되는 것을 특징으로 할 수 있다. 이때, 상기

미세입자는 에멀전 용매증발법(emulsion solvent evaporation), 에멀전 중합법(emulsion polymerization), 분무건조법(spray dry), 전기분무법(electrospray) 등으로 제조될 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 숙신이미도 디옥시콜레이트를 키토산 올리고당과 반응시켜 디옥시콜산으로 그래프트된 키토산을 형성하는 1단계; 및 물에 용해된 siRNA를 유기 용매에 용해된 상기 디옥시콜산으로 그래프트된 키토산과 혼합하는 2 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 소수성 유전자 전달용 복합체 제조방법이 될 수 있다. 이 때, 상기 siRNA를 기준으로, 상기 디옥시콜산으로 그래프트된 키토산이 1 내지 1,000의 중량비로 결합되는 것을 특징으로 할 수 있다. 한편, 상기 유기 용매는 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide), 아세톤(acetone), 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 1-프로판올(1-propanol), N,N-디메틸포름아미드(N,N-dimethylformamide), N-메틸피롤리돈(N-methyl pyrrolidone), 다이옥산(dioxane), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸에틸케톤(methylethylketone) 및 아세토니트릴(acetonitrile)로 이루어진 군에서 적어도 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, 상기 유기 용매에 용해된 상기 디옥시콜산으로 그래프트된 키토산은 상기 키토산이 코어에 위치하고, 상기 디옥시콜산이 셸에 위치하는 역 마이셀 구조를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, 상기 2단계 이후에, 유기 용매에 용해된 PLGA 나노입자를 추가적으로 혼합하는 3단계를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 실시예들에서는 양이온성 고분자 코어와 소수성 분자 셸을 갖는 역 마이셀 구조를 갖는 유전자 전달용 복합체를 제공함으로써, 친수성의 유전자(예를 들면, siRNA)를 안정적이고 효율적으로 세포 내에 전달할 수 있다. 또한, 소수성 표면 특성을 갖는 유전자 전달용 복합체를 제공 가능하므로, 생적합성, 생분해성 및 지속 방출 능력이 우수한 PLGA에 용이하게 혼합 가능하다.

[0022] 따라서, 유전자 전달용 복합체가 세포에 안정적으로 전달될 수 있으므로, 유전자 발현을 효과적으로 억제시키고, 상대적으로 장시간 동안 지속적으로 유전자 침묵 활성을 보일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 디옥시콜산으로 그래프트된 키토산의 반응식이다.
- 도 2는 실시예 및 비교예의 분배 실험을 촬영한 사진이다.
- 도 3은 실시예 및 비교예의 겔 지연 분석 사진이다.
- 도 4는 실시예 및 비교예의 유전자 침묵 효율 분석 그래프이다.
- 도 5 및 도 6은 실시예의 유전자 침묵 효율 및 세포 생존율 그래프이다.
- 도 7은 실시예들의 AFM 사진이다.
- 도 8은 실시예들의 세포 흡수를 공초점 레이저 주사 현미경으로 촬영한 사진이다.
- 도 9a 및 도 9b는 실시예들의 유전자 침묵 효율 분석 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은 유전자 전달용 복합체에 관한 것으로, 소수성 분자로 그래프트된 양이온성 고분자 및 유전자가 유기 용매에서 결합함으로써 복합체의 표면 특성이 소수성을 가지도록 하는 것을 일 특징으로 한다. 따라서, 친수성의 유전자를 안정적으로 전달 가능하므로 효과적으로 세포내로 전달 가능하다.

[0025] 이 때, 상기 소수성 분자는 탄화수소 사슬을 갖는 분자, 환상 구조를 갖는 분자, 난용성 약물, 물에 용해되지 않는 고분자, 지질 등을 사용할 수 있다.

[0026] 상기한 탄화수소 사슬을 갖는 분자로는 헥사노익에시드(hexanoic acid), 데칸산(decanoic acid), 리놀산(linolenic acid), 스테아르산(stearic acid), 리놀렌산(linolenic acid), 팔미트산(palmitic acid), 올레산(oleic acid), 헥사데칸올(hexadecanol) 및 이와 유사한 구조를 갖는 분자들이 가능하다.

[0027] 상기한 환상구조를 갖는 분자로는 디옥시콜산(deoxycholic acid), 콜레스테롤(cholesterol), 리소콜산(lithocholic acid), N-아세틸 히스티딘(N-acetyl histidine), 5β-콜란산(5β-cholanic acid) 및 이와 유사한 구조를 갖는 분자들이 가능하다.

- [0028] 상기한 난용성 약물로는 독소루비신(doxorubicin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 이와 유사한 구조를 갖는 분자들이 가능하다.
- [0029] 상기한 물에 용해되지 않는 고분자로는 폴리(메틸메타크릴레이트)(poly(methyl methacrylate)), 폴리(카프로락톤)(polycaprolactone), 플루로닉(Pluronic), 폴리(이소뷰틸시아노아크릴레이트)(poly(isobutyl cyanoacrylate) 및 이의 공중합체나 유사한 구조를 갖는 고분자들이 가능하다.
- [0030] 상기 양이온성 고분자는 키토산, 재조합 키토산, 키토산 유도체, 키토산 유사체, 폴리(알릴아민)(poly(arylamine)), 폴리(아미도아민) 계열 덴드리머, 폴리(비닐아민)(poly(vinylamine)), 폴리디알릴메틸 암모니움 클로라이드, 폴리에틸렌이민(polyethylenimine), N-하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide), 아텔로콜라겐(atelocollagen), 디에틸아미노에틸 셀룰로스(deithylaminoethyl cellulose), 폴리(L-라이신)(poly(L-lysine), β -시클로덱스트린(β -cyclodextrin), 폴리(N-에틸-4-비닐피리디늄브로마이드)(poly(N-ethyl-4-vinylpyridiniumbromide), 폴리(디메틸아미노에틸메타크릴레이트)(poly(dimethylaminoethyl methacrylate), 풀루란(pullulan), 재조합 헤파린, 헤파린 유도체, 헤파린 유사체, 시조필란(schizophyllan), 알부민 유도체 및 알부민 유사체로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고 생체적합성을 갖는 것이면 특별한 제한 없이 사용 가능하다. 한편, 상기 양이온성 고분자의 분자량은 1,000 내지 100,000일 수 있다.
- [0031] 한편, 상기 소수성 분자로 그래프트된 양이온성 고분자는 하기 [식 1]과 같이 표시될 수 있다.
- [0032] [식 1]
- [0033] A-(X)_n
- [0034] 여기에서, 상기 A는 직선형 또는 가지상의 양이온성 고분자이고, 상기 X는 고분자 사슬 A에 도입된 소수성 분자이다. 상기 n은 고분자 사슬 A의 한 분자당 도입된 기능기 X의 개수로서 1 내지 10,000의 정수일 수 있다.
- [0035] 상기 유전자는 플라스미드 유전자, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA(소간섭 리보핵산), rRNA(리보솜 리보핵산), RNA(리보핵산), DNA(디옥시리보핵산), cDNA(상보성 디옥시리보핵산), mRNA(전령 리보핵산) 및 tRNA(운반 리보핵산)로 이루어진 군에서 선택되는 1종이거나, 2종 이상이 복합적으로 혼합된 것일 수 있으며 상기 열거된 것들로 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 이 때, 상기 유전자를 기준으로, 상기 소수성 분자로 그래프트된 양이온성 고분자는 1 내지 1,000의 중량비로 결합될 수 있다. 상기 유기 용매는 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 아세톤(acetone), 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 1-프로판올(1-propanol), N,N-디메틸포름아마이드(N,N-dimethylformamide), N-메틸피롤리돈(N-methyl pyrrolidone), 다이옥산(dioxane), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸에틸케톤(methylethylketone) 및 아세토니트릴(acetonitrile)로 이루어진 군에서 적어도 하나 이상 선택될 수 있으나, 극성 유기 용매면 되고 상기 열거된 것으로 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 상술한 것과 같은 유전자 전달용 복합체는, 복합체의 표면 특성이 소수성을 가지므로, 생적합성, 생분해성 및 지속 방출 능력이 우수한 PLGA에 용이하게 봉입 가능하게 되어 유전자 발현을 효과적으로 억제 가능하다.
- [0038] 종래 치료용 수용성 고분자들의 전달체로는 양이온성 고분자와 생체적합성을 지닌 PEG를 접합시키는 방법, PLGA 등의 소수성 고분자를 이용한 마이크로스피어를 이용하는 방법 등이 있었다. 이 때, 친수성 고분자들은 수용액에서 상기와 같은 전달체와 결합시켜 복합체를 만들거나 수용액 상태에서 상기 전달체에 봉입시키는 것이 일반적이었다. 그러나, 본 발명의 실시예들에 따른 유전자 전달용 복합체는 양이온성 고분자와 소수성 분자를 이용하여 유기용매에 나노 크기로 분산되도록 하였고, 유전자가 결합된 상태에서도 유기용매 상에 안정적으로 분산되도록 한 점이 특징이다.
- [0039] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 구체적으로 설명하고자 한다. 다만, 하기의 실시예는 오직 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위는 하기 실시예들로 제한되지 않는다.
- [0040] 본 명세서에서, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 있지 않는 한, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 액체/액체는 (부피/부피)%임을 밝혀둔다.
- [0041] 본 명세서에서 언급된 주요 물질들의 제조사들은 다음과 같다.
- [0042] PLGA: PLGA7510, 분자량 10 kDa, Wako Chemical社(일본)

- [0043] 디옥시콜산(Deoxycholic acid), N-히드록시숙신이미드(NHS; N-hydroxysuccinimide), 헤파린(heparin), Pluronic F-127: Sigma-Aldrich社 (미국)
- [0044] 수용성 키토산 올리고당(water-soluble chitosan oligosaccharide): 분자량 3~5 kDa, Kitto life社(한국)
- [0045] 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide; 이하, DMSO), 테트라히드로퓨란(Tetrahydrofuran; 이하, THF), 아세톤: Junsei社(일본)Quant-iT™ RiboGreen® RNA 시약: Invitrogen社(미국)GFP(green fluorescence protein) 표적 siRNA: Genolution Pharmaceuticals社(한국)
- [0046] 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 3' 말단에서 Cy5.5로 개질된 GFP 표적 siRNA: Bioneer社(한국)
- [0047] FBS(Fetal bovine serum) 및 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium): Invitrogen社(미국)
- [0048] GFP 발현 MDA-MB-435 세포,MDA-MB-435-GFP 세포: 삼양사(한국)
- [0049] 한편, siRNA 및 각각의 프라이머 서열들을 하기와 같다.
- [0050] GFP siRNA 센스: 5'-AAC UUC AGG GUC AGC UUG C-3'
- [0051] GFP siRNA 안티센스: 5'-GCA AGC UGA CCC UGA AGU U-3'
- [0052] 실시예
- [0053] 실시예 및 비교예의 준비
- [0054] 1) 디옥시콜산으로 그래프트된 키토산(COSD)의 합성
- [0055] 디옥시콜산(200 mg, 0.5 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드(76 mg, 0.67 mmol)를 무수 THF(20 mL)에 용해시켰다. 다음으로, 1,3-디시클로헥실카르보디이미드(1,3-dicyclohexylcarbodiimide; 136 mg, 0.67 mmol)를 첨가하고, 용액을 섭씨 4도에서 6시간 동안 교반하였다. 다음으로, 요소 부산물들을 여과하여 제거하였고, 여과물은 차가운 n-헥산(120 mL)에 부운 후에 침전물은 진공에서 건조시켰다.
- [0056] 다음으로, 제조된 숙신이미도 디옥시콜레이트(succinimido deoxycholates)를 카르보디이미드 짝 반응(carbodiimide couple reaction)을 통해 키토산 올리고당(chitosan oligosaccharide; 이하 COS 라 명명한다)의 일차 아민기들과 반응시켜 디옥시콜산으로 그래프트된 키토산(chitosan grafted with deoxycholates; 이하 COSD라 명명한다)을 형성하였다. 이와 관련하여, 도 1에서는 디옥시콜산으로 그래프트된 키토산의 반응식을 나타내었다.
- [0057] 상기 반응은 COS(80 mg)를 DMSO와 탈이온수(deionized water)의 9/1(v/v) 혼합물에 용해시키고, 숙신이미도 디옥시콜레이트(49.8 mg)을 첨가함으로써 이루어졌다. 반응 혼합물들은 상온에서 12시간 동안 자성 교반(magnetically stirred)되었다. 생성된 용액들은 과량의 아세톤 속으로 침전되었다. 침전물들은 2000 rpm의 속도로 5시간동안 원심분리되어 회수되었고, 아세톤으로 2회 세척하고 진공에서 건조시켰다.
- [0058] 2) 디옥시콜산으로 그래프트된 폴리에틸렌이민의 합성
- [0059] 디옥시콜산(200 mg, 0.5 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드(76 mg, 0.67 mmol)를 무수 THF(20 mL)에 용해시켰다. 다음으로, 1,3-디시클로헥실카르보디이미드(1,3-dicyclohexylcarbodiimide; 136 mg, 0.67 mmol)를 첨가하고, 용액을 4℃에서 6시간 동안 교반하였다. 다음으로, 요소 부산물들을 여과하여 제거하였고, 여과물은 차가운 n-헥산(120 mL)에 부운 후에 침전물은 진공에서 건조시켰다.
- [0060] 다음으로, 제조된 숙신이미도 디옥시콜레이트(succinimido deoxycholates)를 카르보디이미드 짝 반응(carbodiimide couple reaction)을 통해 폴리에틸렌이민(poly ethylene imine; 이하 PEI라 명명한다)의 일차 아민기들과 반응시켜 디옥시콜산으로 그래프트된 PEI(이하 PEID라 명명한다)를 형성하였다.
- [0061] 상기 반응은 PEI(80 mg)를 DMSO와 탈이온수(deionized water)의 9/1(v/v) 혼합물에 용해시키고, 숙신이미도 디옥시콜레이트(49.8 mg)을 첨가함으로써 이루어졌다. 반응 혼합물들은 상온에서 12시간동안 자성 교반되었다. 생성된 용액들은 과량의 아세톤 속으로 침전되었다. 침전물들은 2000 rpm의 속도로 5시간동안 원심분리되어 회수되었고, 아세톤으로 2회 세척하고 진공에서 건조시켰다.
- [0062] 3) 콜레스테롤로 그래프트된 폴리에틸렌이민의 합성
- [0063] 콜레스테롤(193 mg, 0.5 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드(76 mg, 0.67 mmol)를 무수 THF(20 mL)에 용해시켰다.

다음으로, 1,3-디시클로헥실카르보디이미드(1,3-dicyclohexylcarbodiimide; 136 mg, 0.67 mmol)를 첨가하고, 용액을 4°C에서 6시간 동안 교반하였다. 다음으로, 요소 부산물들을 여과하여 제거하였고, 여과물은 차가운 n-헥산(120 mL)에 부운 후에 침전물은 진공에서 건조시켰다.

[0064] 다음으로, 제조된 숙신이미도 콜레스테롤(succinimido deoxycholates)을 카르보디이미드 짝 반응을 통해 PEI의 일차 아민기들과 반응시켜 콜레스테롤로 그래프트된 PEI(이하 PEIC라 명명한다)를 형성하였다.

[0065] 상기 반응은 PEI(80 mg)를 DMSO와 탈이온수(deionized water)의 9/1(v/v) 혼합물에 용해시키고, 숙신이미도 디옥시콜레이트(49.8 mg)을 첨가함으로써 이루어졌다. 반응 혼합물들은 상온에서 12시간동안 자성 교반되었다. 생성된 용액들은 과량의 아세톤 속으로 침전되었다. 침전물들은 2000 rpm의 속도로 5시간동안 원심분리되어 회수되었고, 아세톤으로 2회 세척하고 진공에서 건조시켰다.

[0066] 4) siRNA/고분자 복합체 제조

[0067] 실시예는 물(0.5 mL)에 용해된 siRNA(13µg, 1 nmol)를 DMSO(0.5 mL)에 용해된 COSD(39, 78, 156, 312, 624 또는 1248µg)와 혼합하였다. 다음으로, 상기 혼합물들을 4°C에서 15분동안 50 % DMSO에서 배양하여 siRNA/고분자 복합체를 제조하였다.

[0068] 한편, 비교예는 물(0.5 mL)에 용해된 siRNA(13µg, 1 nmol)를 물(0.5 mL)에 용해된 고분자(39, 78, 156, 312, 624 또는 1248µg)와 혼합하였다.

[0069] 다음으로, 상기 혼합물들을 4°C에서 15분동안 물에서 배양하여 siRNA/고분자 복합체를 제조하였다.

[0070] 즉, 실시예와 비교예를 비교하면 하기 [표 1]과 같다.

표 1

[0071]

	내용
실시예 1	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 DMSO에 용해된 39µg의 COSD를 혼합하고, 50 % DMSO에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조
실시예 2	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 DMSO에 용해된 78µg의 COSD를 혼합하고, 50 % DMSO에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조
실시예 3	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 DMSO에 용해된 156µg의 COSD를 혼합하고, 50 % DMSO에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조
실시예 4	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 DMSO에 용해된 312µg의 COSD를 혼합하고, 50 % DMSO에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조
실시예 5	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 DMSO에 용해된 624µg의 COSD를 혼합하고, 50 % DMSO에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조
실시예 6	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 DMSO에 용해된 1248µg의 COSD를 혼합하고, 50 % DMSO에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조
실시예 7	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 아세톤에 용해된 39µg의 COSD를 혼합하고, 50 % 아세톤에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조
실시예 8	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 아세톤에 용해된 78µg의 COSD를 혼합하고, 50 % 아세톤에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조
실시예 9	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 아세톤에 용해된 156µg의 COSD를 혼합하고, 50 % 아세톤에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조
실시예 10	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 아세톤에 용해된 312µg의 COSD를 혼합하고, 50 % 아세톤에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조
실시예 11	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 아세톤에 용해된 624µg의 COSD를 혼합하고, 50 % 아세톤에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조
실시예 12	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 아세톤에 용해된 1248µg의 COSD를 혼합하고, 50 % 아세톤에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조
실시예 13	물에 용해된 1 nmol의 siRNA와 에탄올에 용해된 39µg의 PEID를 혼합하고, 50 % 에탄올에서 배양하여 siRNA/PEID 복합체 제조
실시예 14	물에 용해된 1 nmol의 DNA와 에탄올에 용해된 78µg의 PEID를 혼합하고, 50 % 에탄올에서 배양하여 siRNA/PEID 복합체 제조
실시예 15	물에 용해된 1 nmol의 DNA와 에탄올에 용해된 156µg의 PEID를 혼합하고, 50 % 에탄올에서 배양하여 siRNA/PEID 복합체 제조
실시예 16	물에 용해된 1 nmol의 DNA와 에탄올에 용해된 312µg의 PEID를 혼합하고, 50 % 에탄올에서 배양하여 siRNA/PEID 복합체 제조
실시예 17	물에 용해된 1 nmol의 DNA와 에탄올에 용해된 624µg의 PEID를 혼합하고, 50 % 에탄올에서 배양하여 siRNA/PEID 복합체 제조

실시에 18	물에 용해된 1 nmol의 DNA와 에탄올에 용해된 1248 μ g의 PEID를 혼합하고, 50 % 에탄올에서 배양하여 siRNA/PEID 복합체 제조
비교예	물에 각각 용해된 siRNA 및 COSD를 혼합하고, 물에서 배양하여 siRNA/COSD 복합체 제조

[0072] 실시예 5 및 비교예의 형태 및 표면 특성 분석

[0073] 실시예 5 및 비교예에 해당하는 siRNA/COSD 복합체의 유체역학적 직경들을 동적 광 산란법(DLS, dynamic light scattering)을 이용하여 20 $^{\circ}$ C에서 0.1 mg mL⁻¹의 농도로 측정하였다(Zeta-Plus, Brookhaven, NY). 또한, 원자현미경(PSIA XE-100AFM)을 이용하여 실시예 및 비교예에 해당하는 siRNA/COSD 복합체의 형태를 관찰하였다. 비교예의 경우, 물에 용해된 COSD는 소수성 디옥시폴레이트 코어와 친수성 키토산 셸을 갖는 구형 마이셀을 형성하였고, siRNA/COSD 복합체의 평균 유체역학적 직경은 269.9 \pm 30.1 nm이었다.

[0074] 그러나, 실시예 5의 경우, DMSO에 용해된 COSD는 친수성 키토산 코어와 소수성 디옥시폴레이트 셸을 갖는 역 나노구조체를 형성하였고, siRNA/COSD 복합체의 평균 유체 역학적 직경은 123.9 \pm 56.8 nm이었다. 이와 같은 결과에서, 실시예 5에 해당하는 siRNA/COSD 복합체의 경우에, siRNA가 더욱 효율적으로 축합될 수 있음을 알 수 있었다. 하기 [표 2]에서는 실시예들의 평균 유체 역학적 직경을 정리하였다.

표 2

	평균직경(nm)		평균직경(nm)
실시예 1	134.5 \pm 23.3	실시예 10	351.2 \pm 74.5
실시예 2	154.7 \pm 45.8	실시예 11	346.9 \pm 78.1
실시예 3	164.2 \pm 84.3	실시예 12	331.1 \pm 65.5
실시예 4	146.9 \pm 32.5	실시예 13	299.4 \pm 55.1
실시예 5	123.9 \pm 56.8	실시예 14	249.5 \pm 46.2
실시예 6	145.2 \pm 11.9	실시예 15	288.6 \pm 34.8
실시예 7	291.2 \pm 41.1	실시예 16	300.7 \pm 71.1
실시예 8	215.2 \pm 98.7	실시예 17	348.5 \pm 45.2
실시예 9	255.2 \pm 71.1	실시예 18	378.7 \pm 13.2

[0076] 한편, 실시예 5 및 비교예의 표면 특성을 분배 실험(partitioning experiment)을 통해 관찰하였다. 이와 관련하여, 도 2에서는 실시예 및 비교예의 분배 실험을 촬영한 사진이다.

[0077] 도 2를 참조하면, 실시예 5에 해당하는 siRNA/COSD 복합체는 디클로로메탄에 용이하게 용해되고, 상기 혼합물을 격렬하게 혼합한 이후에 유기상으로 분할됨을 확인하였다. 이에 반하여, 비교예에 해당하는 siRNA/COSD 복합체는 자발적으로 수상(water phase)으로 이동함을 확인하였다. 이는 실시예 5에 해당하는 siRNA/COSD 복합체에서 소수성 셸을 갖는 마이셀 구조가 형성됨을 보여준다.

[0078] 도 3은 실시예 및 비교예의 겔 지연 분석(Gel retardation assay) 사진이다. 도 3을 참조하면, 실시예가 비교예에 비하여 겔 내에서 현저하게 뒤쳐진 이동을 보여주고 있음을 확인할 수 있는데, 이로부터 실시예가 비교예보다 siRNA 및 COSD가 보다 강력하게 결합되었음을 알 수 있다.

[0079] 5) siRNA/COSD 복합체가 로드된 PLGA 나노입자들의 제조

[0080] DMSO(4 mL)에 용해된 PLGA(3.2 mg)을 4 $^{\circ}$ C에서 상기 siRNA/COSD 복합체(실시예)와 완전히 혼합하였다(siRNA/COSD 복합체를 기준으로 48 중량비).

[0081] 혼합된 용액은 1 중량 %(wt%)의 Pluronic F-127 용액에 천천히 적하하고, 1500 rpm의 속도로 5분 동안 균질화하였다(PowerGen700, Fisher Scientific社, 미국). 다음으로, 상기 용액을 탈이온수(분자량 컷오프=10 kDa)에 대하여 투석하여 DMSO를 제거하였다.

[0082] 유전자 침묵 효율 분석

[0083] 도 4는 실시예 및 비교예의 유전자 침묵 효율 분석(Gene silencing efficiency) 그래프이다.

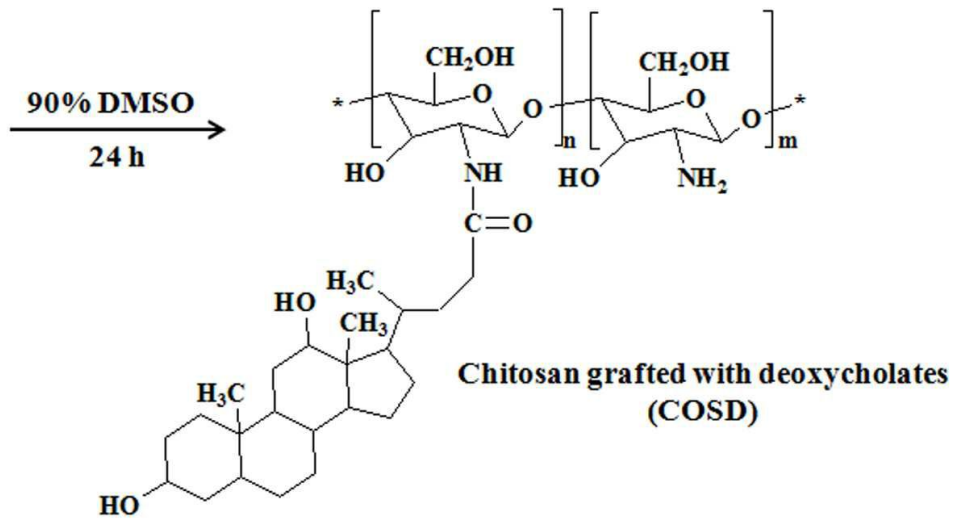
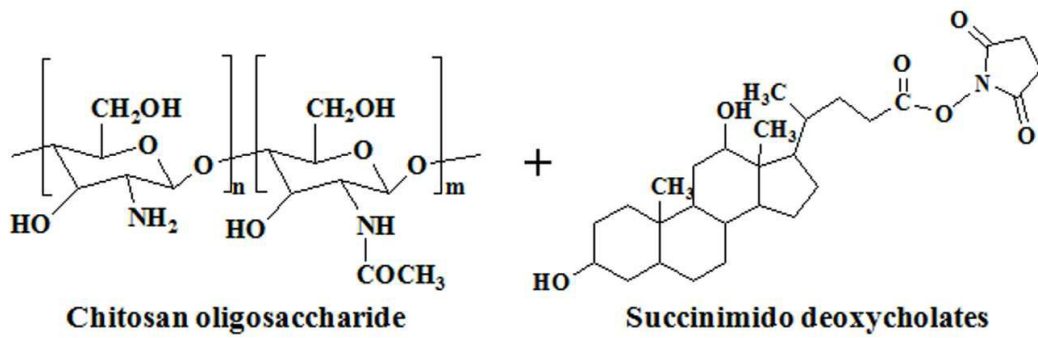
- [0084] 48의 중량비로 제조된 실시예 및 비교예, 그리고, siRNA, COSD를 각각 MDA-MB-435-GFP 세포와 함께 48시간 동안 배양하였다. 구체적으로는 실시예 및 비교예를 각각 50 pmole로 10% FBS로 보충한 DMEM 내에서 5시간 동안 PLGA 캡슐화처리하거나 또는 비처리하고, 48시간 더 배양하였다. 다음으로, PBS에서 1 wt%의 Triton X-100을 사용하여 용해하였으며, 14,000 rpm의 속도로 5분 동안 원심분리를 통해 잔해물들을 제거하였다. 상청액에서의 GFP 세기는 각각 488 nm 및 520 nm의 여기 파장 및 방출 파장에서 분광형광광도계(spectrofluorophotometer)를 이용하여 측정하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0085] 도 4를 참조하면, 실시예는 표적 유전자를 약 60 % 유전자 발현으로 효과적으로 억제하는 반면에, 비교예는 80 % 유전자 발현을 보임을 확인하였다. 이로부터 실시예가 비교예들에 대하여 세포 흡수에 더욱 효과적임을 알 수 있다. 한편, siRNA/COSD 비율 및 siRNA 농도가 GFP 유전자 침묵 효율에 미치는 영향을 측정하였다. 우선, 실시예에 대하여 siRNA 농도를 동일하게 맞추고($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), siRNA에 대하여 COSD의 중량비를 6, 12, 24, 48, 96으로 변화시켜 가며 GFP 세기 및 세포 생존율을 측정하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5를 참조하면, 48 및 96의 중량비에서 실시예는 GFP 발현을 각각 56.5 % 및 47.4 %로 억제하였다. 세포 생존율(cell viability)의 경우 96 중량비에서 91.7 %로 감소되었으나 우려할 수준의 저하가 나타나지 않았다.
- [0086] 다음으로, siRNA/COSD 중량비를 48로 고정시키고, siRNA 농도를 각각 $0.25, 0.5, 1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ 로 변화시켜 가며 GFP 세기 및 세포 생존율을 측정하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0087] 도 6을 참조하면, 유전자 침묵 효율은 siRNA 농도 증가에 대응하였으며, GFP 발현 수준은 $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ 의 siRNA 농도에서 약 37.3 %이었다. 이로부터 실시예에 해당하는 siRNA/COSD 복합체가 표적-특이성 siRNA의 세포 내 전달용으로 생체적으로 적합할뿐만 아니라 효과적인 전달체로 기능함을 알 수 있다.
- [0088] 실시예에 해당하는 siRNA/COSD 복합체 및 이를 포함하는 나노입자 분석
- [0089] 본 발명의 일 실시예에 해당하는 siRNA/COSD 복합체를 PLGA 나노입자 내에서 캡슐화하였다. 이에 대해서는 상술하였으므로 중복 설명은 생략하기로 한다. PLGA 나노입자는 생적합성, 생분해성 및 지속 방출 능력을 가지고 있어 세포내 전달용으로 효과적이거나, siRNA의 높은 친수성으로 인하여 소수성 PLGA 매트릭스 내에서 효율적으로 혼입될 수 없었다. 그러나, 본 발명의 일 실시예에 해당하는 siRNA/COSD 복합체는 소수성 표면을 갖는 50 ~ 300 나노미터 크기의 콜로이드성 구조를 취하고 있으므로, 같은 유기 용매 상에서 PLGA 나노입자와 용이하게 혼합가능하다는 장점이 있다.
- [0090] 또한, 상기 siRNA/COSD 복합체의 표면은 약하게 양으로 대전되므로(제타 전위= $+3.7 \pm 1.4 \text{ mV}$), 상기 siRNA/COSD 복합체들이 정전기 인력을 통해 음으로 대전된 PLGA 매트릭스 내에서 안정화될 수 있다.
- [0091] 50% DMSO 내에서 상기 siRNA/COSD 복합체(직경 $123.9 \pm 56.8 \text{ nm}$)은 90 % DMSO 내의 PLGA(직경 $123.9 \pm 56.8 \text{ nm}$)와 혼합되고 수중에서 분산되었을 때, 효율적으로 캡슐화되었다. 이들의 형태를 AFM(atomic force microscope)으로 촬영한 이미지를 도 7에 나타내었다.
- [0092] 도 7을 참조하면, siRNA/COSD 복합체가 직경 $137.0 \pm 37.9 \text{ nm}$ (표본 크기, $n = 100$)의 균질하고 잘 분산된 구형 구조를 가짐을 알 수 있다(좌측 사진). 또한, 상기 siRNA/COSD 복합체가 봉입된 PLGA 나노입자는 크기가 $280.2 \pm 103.8 \text{ nm}$ (표본 크기, $n = 60$)으로 다소 증가하였으나 마찬가지로 균질하고 잘 분산된 구형 구조를 가짐을 알 수 있다(우측 사진).
- [0093] 세포내 흡수 및 유전자 침묵 효과 측정
- [0094] MDA-MB-435-GFP 세포들을 5 % CO_2 가습 대기하에서(37°C) 10 % FBS, 페니실린 100 단위 mL^{-1} 및 스트렙토마이신 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 로 보충한 DMEM 내에서 유지하였다. 다음으로, siRNA/COSD 복합체가 봉입된 PLGA 나노입자의 세포 흡수를 조사하기 위하여, 상기 세포들을 5×10^4 세포/웰의 밀도로 4-웰 챔버 슬라이드에 파종하고 24 시간 동안 배양하였다. 다음으로, Cy-5.5 라벨링된 siRNA/COSD 복합체들을 제조하여 cy-5.5 라벨링된 siRNA/COSD 복합체가 봉입된 PLGA 나노입자들과 세포 흡수의 안정성 및 수준을 비교하였다.
- [0095] 구체적으로, Cy-5.5 라벨링된 siRNA(40 pmole)를 48의 중량비로 COSD와 복합화한 이후에 PLGA 나노입자들로 혼입하였다. 상기 세포들을 10 % FBS로 보충한 DMEM 내에서 상기 나노입자들로 5 시간 동안 처리하였다. 매질 교환을 수행한 이후에, 상기 세포들을 37°C 에서 48 시간 동안 배양하였다. PBS로 3 회 세척한 이후에, 상기 세포들을 PBS 내에서 4 % 포름알데히드로 상온에서 20 분 동안 고정하였고 LSM 510 공초점 레이저 주사 현미경(Carl

Zeiss, 독일)을 이용하여 관찰하였다.

- [0096] 도 8은 실시예들의 세포 흡수를 공초점 레이저 주사 현미경으로 촬영한 사진이다. 좌측 사진이 siRNA/COSD 복합체이고, 우측 사진이 siRNA/COSD 복합체가 봉입된 PLGA 나노입자의 사진이다. 또한, 도 9a 및 도 9b에서는 실시예들의 유전자 침묵 효율 분석 그래프를 나타내었다.
- [0097] 도 8을 참조하면, siRNA/COSD 복합체들은 세포 표면에 흡착된 듯이 보이는 이질의 마이크로급 응집체를 형성하였다. 반면에, siRNA/COSD 복합체가 봉입된 PLGA 나노입자는 상기 siRNA/COSD 복합체와 비교하여 균일한 세포 흡수 및 더 높은 수준의 유전자 침묵을 보였다.
- [0098] 48 시간 배양 이후에, GFP 발현은 siRNA/COSD 복합체가 봉입된 PLGA 나노입자들에 대하여 약 40 %로 놀랄 정도로 감소하였는데, 이는 siRNA/COSD 복합체들이 PLGA 나노입자들로부터 천천히 방출되어 생물학적 활성 siRNA 단편으로 해리되었다는 것을 나타내는 것이다.
- [0099] 한편, 도 9a 및 도 9b를 참조하면, 도 9a는 5시간 배양 이후 유전자 침묵 효율 분석 그래프를 나타내고, 도 9b는 48시간 배양 이후 유전자 침묵 효율 분석 그래프를 나타낸 것이다. siRNA/COSD 복합체가 봉입된 PLGA 나노입자들은 5 시간 및 48 시간 배양 이후에, 각각 61.3 ± 13.1 % 및 36.5 ± 9.2 %의 유전자 침묵 수준을 보였다. 비변형(naked) siRNA, 플라시보(placebo) PLGA 나노입자들 및 COSD가 봉입된 PLGA 나노입자들로 처리된 세포들에서는 GFP 발현에 있어서 현저한 변화가 없었다.
- [0100] 한편, siRNA/COSD 복합체들은 초기에 현저한 유전자 침묵을 보이지 않았지만, 48 시간 배양 이후에 GFP 발현을 68.1다음으로, siRNA/COSD 복합체가 봉입된 PLGA 나노입자의 세포 흡수를 조사하기 위하여, 상기 세포들을 5×10^4 세포/웰의 밀도로 4-웰 챔버 슬라이드에 파종하고 24 시간 동안 배양하였다. 다음으로, Cy-5.5 라벨링된 siRNA/COSD 복합체들을 제조하여 cy-5.5 라벨링된 siRNA/COSD 복합체가 봉입된 PLGA 나노입자들과 세포 흡수의 안정성 및 수준을 비교하였다. 7.2 %까지 억제하였다. 이에 반하여, siRNA/COSD 복합체가 봉입된 PLGA 나노입자들은 혈청 존재하에 우수한 분산 안정성으로 인하여 세포 속으로 신속하게 전위될 수 있었으며, PLGA 매트릭스의 지속 방출 특성은 혼입된 siRNA의 생물학적 활성을 연장할 수 있음을 확인하였다.
- [0101] 이상, 본 발명의 일 실시예에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다고 할 것이다.

도면

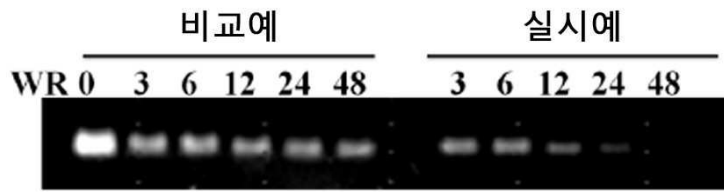
도면1



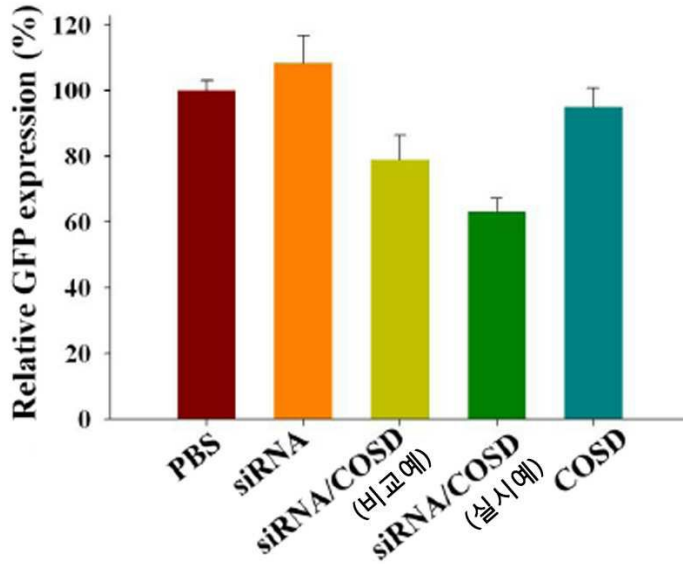
도면2



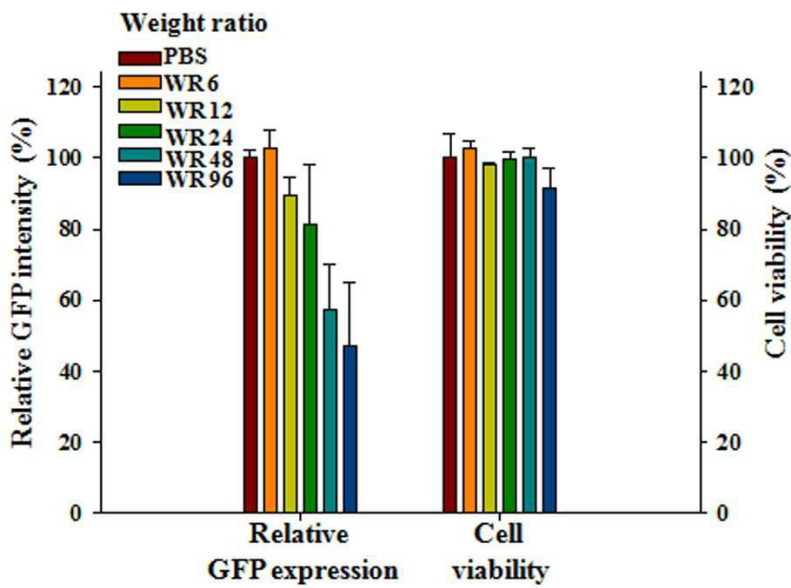
도면3



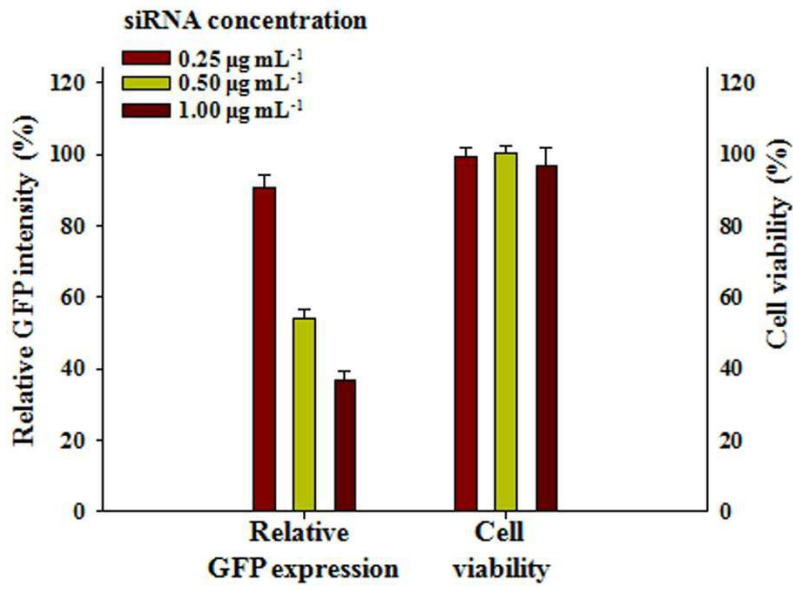
도면4



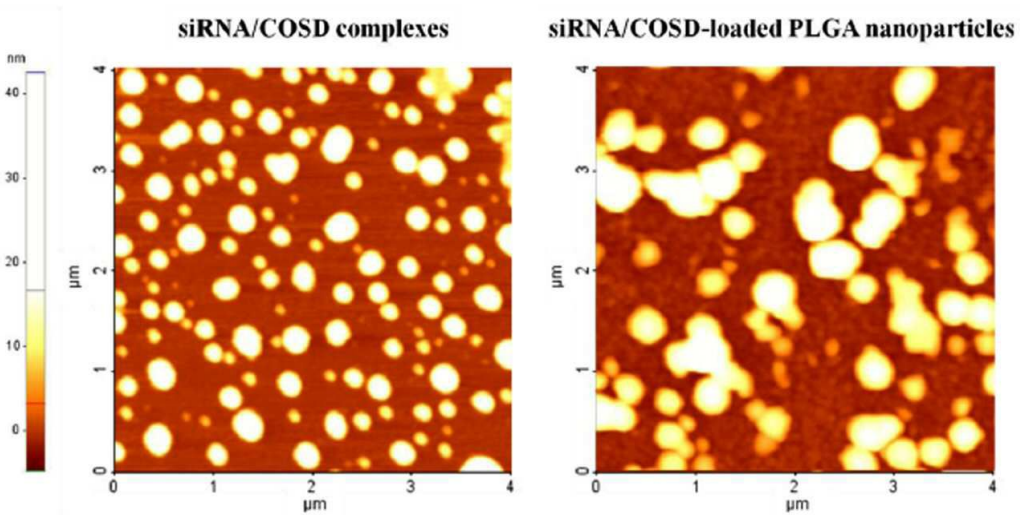
도면5



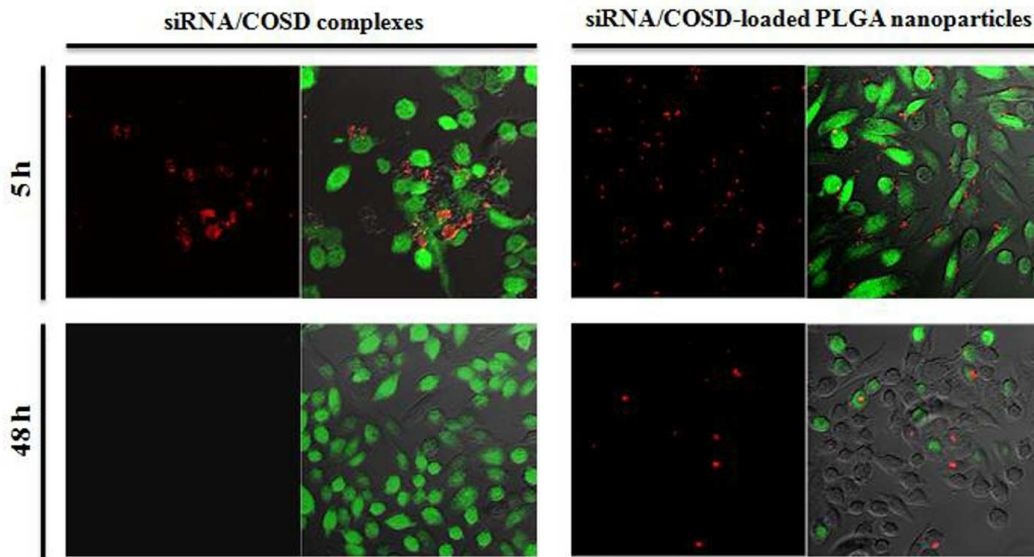
도면6



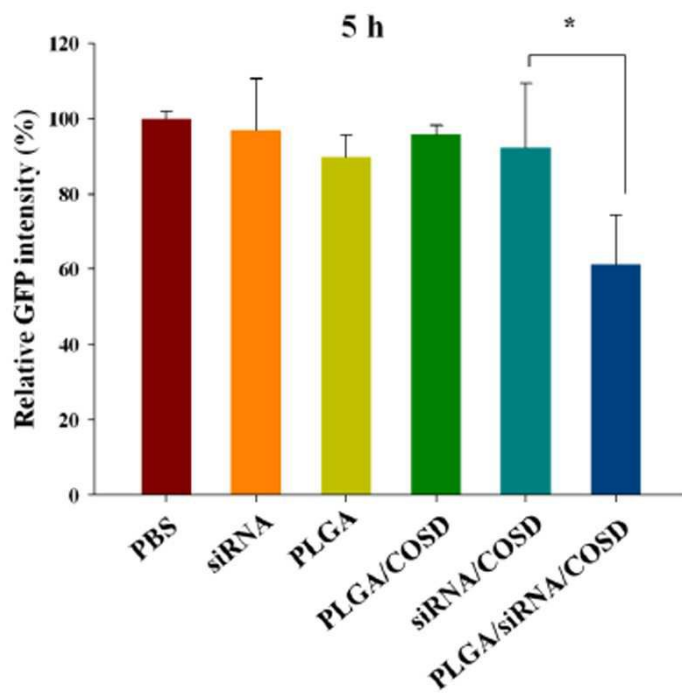
도면7



도면8



도면9a



도면9b

