

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0024326 (43) 공개일자 2013년03월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/87 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)		(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(21) 출원번호 10-2011-0087711		(72) 발명자
(22) 출원일자 2011년08월31일		최준식
심사청구일자 2012년08월30일		대전광역시 서구 청사로 281, 샘머리아파트 201동 704호 (둔산동)
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도		유광식
		충청남도 천안시 서북구 성정로 75, 주공아파트 118동 403호 (성정동)
		배윤미
		충청남도 논산시 연무읍 동산리 기산아파트 102-1808호
		(74) 대리인
		특허법인 충정

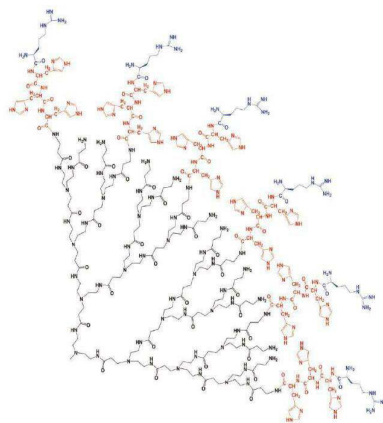
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 전달용 PAMAM 유도체**

(57) 요약

본 발명은 세포 내로 핵산을 전달할 수 있는 비 바이러스성 벡터에 관한 것으로, 보다 상세하게는 완충 능력(Buffering capacity)이 향상되고 세포독성을 가지지 않으면서 트랜스펙션 효율을 현저히 개선시킨, PAMAM 덴드리머 기반의 세포내 핵산 전달용 PAMAM 유도체 및 이와 핵산이 결합한 복합체에 관한 것이다. 이는 유전자 트랜스펙션 효율을 개선하고, 이미다졸의 양성자 완충 효과가 복합체의 내구성을 향상시킬 뿐만 아니라 복합체의 세포포질, 핵 내로의 위치화(localization)를 강화시킨다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100021647

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자 지원사업

연구과제명 유전자치료용 바이오소재 및 펩티드핵산 유도체 연구 및 개발

주관기관 한국연구재단

연구기간 2010.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

폴리아미도아민(PAMAM), 히스티딘(His) 및 양이온성 화합물로 이루어진 핵산 전달용 PAMAM 유도체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 양이온성 화합물은 라이신, 아르기닌, 또는 구아니딘인 것을 특징으로 하는 PAMAM 유도체.

청구항 3

제1항에 있어서,

폴리아미도아민(PAMAM) 표면은 히스티딘(His) 잔기가 결합되어 있는 양이온성 화합물로 그래프트(grafted) 되어 있는 것을 특징으로 하는 PAMAM 유도체.

청구항 4

제1항에 있어서,

폴리아미도아민 (PAMAM)은 덴드라이트형(dendrite)의 덴드리머(dendrimer)인 것을 특징으로 하는 PAMAM 유도체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 폴리아미도아민 (PAMAM) 덴드리머는 10세대(generation) 이하인 것을 특징으로 하는 PAMAM 유도체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 히스티딘(His)은 양이온성 화합물 당 1~5개로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 PAMAM 유도체.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 PAMAM 유도체는 PAMAM G4-His(n)-Arg[n=1~3의 정수]의 구조식을 가지는 것을 특징으로 하는 PAMAM 유도체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 유도체는 산성 조건에서 양성자 완충 능력(proton buffer capacity)을 증가시키는 것을 특징으로 하는 PAMAM 유도체.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 유도체의 양성자 완충 능력은 pH 3~6의 범위에서 히스티딘 잔기 수에 비례하여 증가하는 것을 특징으로 하는 PAMAM 유도체.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 핵산은 DNA, RNA 또는 PNA인 것을 특징으로 하는 PAMAM 유도체.

청구항 11

제1항의 PAMAM 유도체와 핵산이 결합되어 형성된 세포 내 핵산 전달용 복합체.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 핵산은 pDNA인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 복합체는 PAMAM 유도체의 질소/pDNA의 인산 비율(N/P 비율)이 1:1 내지 4:1인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 복합체는 100~200nm의 크기를 가지고, 30~50 mV의 제타 포텐셜 값을 가지는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 15

제1항의 PAMAM 유도체를 이용하여 핵산을 세포 내로 전달하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

핵산이 전달되는 세포 내 장소는 세포질(cytoplasm) 및 핵(nucleus)인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 세포 내로 핵산을 전달할 수 있는 비 바이러스성 벡터에 관한 것으로, 보다 상세하게는 완충 능력(Buffering capacity)이 향상되고 세포독성을 가지지 않으면서 트랜스펙션 효율을 현저히 개선시킨, PAMAM 덴드리머 기반의 세포내 핵산 전달용 PAMAM 유도체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 효과적이고 안전한 유전자 운반 매개체의 개발은 유전자 치료를 가능케 하는 가장 중요한 요소 중의 하나가 되었다. 지난 10년 간, 수많은 연구들이 인간의 유전자 치료를 위해 치료적인 유전자를 세포 안으로 운반하는 효율적인 트랜스펙션 방법들을 개발시켜 왔다. 바이러스에 또는 바이러스에 의하지 않은 매개체 시스템이 세포 안으로 유전적인 물질을 이동시키는 가장 대표적인 두 가지 시스템이다.

[0003] 대부분의 진행 중인 유전치료 임상 실험에서는 아데노 바이러스와 RNA 종양 바이러스 등의 바이러스 매개 시스템을 이용한다. 바이러스에 의한 매개 시스템은 효율적인 트랜스펙션과 높은 유전자 발현 효율과 같은 매력적인 장점들이 있다. 그러나 면역원성, 강한 독성 그리고 인간 게놈의 파괴적인 병합의 가능성 등의 단점이 존재한다.

[0004] 그래서 이러한 바이러스성 매개체 시스템을 대신할만한 다른 시스템, 즉 비바이러스 매개 시스템에 대한 요구가 증가했다. 바이러스 매개체보다 낮은 트랜스펙션 효율성에도 불구하고, 비바이러스성 매개체는 상대적으로 크기가 더 큰 DNA를 세포 안으로 운반할 수 있으며, 세포 독성이 더 낮고 면역원성이 훨씬 적다.

[0005] 비바이러스적인 방법으로 유전자를 세포 안으로 이동시키는 데는 갖가지 방법들이 사용된다. 물리적인 방법으로는 유전자 총, 전기천공법, 수력학-초음파 간접 주사 등이 있다. 이러한 물리적인 운반 기술은 플라스마 세포 막에 일시적인 충격을 유도해서 유전적 물질이 주입되도록 하여준다. 물리적 방법뿐만 아니라, 화학적 방법을 사용하는 것 또한 연구되어 왔다. 일례로, 양이온 지방질은 인산염으로 이루어진 코어때문에 음극으로 대전되어 있는 pDNA를 농축시킨다. 이와 유사하게, 양이온성 폴리머도 정전기 상호작용을 이용하여 음극화된 pDNA를 효과적으로 농축시키고 세포에 의한 흡수를 용이하게 한다. 이러한 양이온성 폴리머에는 PEI, PAMAM 덴드리머, 치토

산, 텍스트렌, 프로타민, 폴리(L-lysine) 등이 있다.

[0006] 바이러스성 벡터와 비교하여 비바이러스성 유전자 전달 시스템이 가지는 주요한 문제 중 하나는 이들의 낮은 효율이다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 세포특이적 리간드 및 TAT 유래 펩타이드 또는 올리고 아르기닌 유도체와 같은 올리고펩타이드를 연결하거나, 또는 컨쥬게이션하는 방법이 시도되어졌다(대한민국등록특허 제1035364호 및 대한민국등록특허 제0345250호 참조). 최근 단백질 트랜스фек션 부위(PTD) 또는 막 전달신호(MTS)라고 알려진 몇몇 염기성 펩타이드가 확인되고, 특성이 밝혀졌으며, 약물, 단백질, 올리고 뉴클레오타이드 및 플라스미드 DNA 전달을 위한 다양한 치료방법에 도입되어졌다. 흥미롭게도, 이러한 서열은 대개 양이온으로 전하를 띤 아미노산 잔기 예를 들어 아르기닌, 라이신을 함유하는 것으로 알려지고 있다. 실제 기작은 명확하지 않고, 세포막으로의 진입이 내포경로(endocytic pathway) 또는 비내포경로 또는 직접적인 막투과에 의하는지에 대한 논쟁이 있지만, 많은 연구 그룹에 의해 세포내로의 전달이 증가되는 현상이 보고되고 있다.

[0007] 전달을 위한 대부분의 실험은 핵산을 신호펩타이드에 공유적으로 결합하는 것에 의해 수행되었고, 몇몇 실험은 정전기적 인력에 의한 단순한 복합체 형성에 의해 수행되었으나, 아직까지 그 어떠한 수단도 만족할 만한 효율 및 안전성을 제공하지는 못하고 있다. 따라서, 트랜스펙션 효율이 높으면서 세포독성이 낮은 유전자 전달체 개발이 필요한 실정이다.

[0008] 이에 본 발명자들은 이온화 가능한 이미다졸 그룹의 히스티딘의 특성을 PAMAM-Arg에 도입하여 보다 높은 양자 완충력과 높은 유전자 표출 능력을 기대하고 히스티딘과 아르기닌 잔여물을 PAMAM 덴드리머에 컨쥬게이션하여 새로운 PAMAM G4 유도체를 합성하였다. 결과적으로 합성된 PAMAM 유도체는 증가된 양성자 완충능력과 현저한 트랜스펙션 효율을 나타냄을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 폴리아미도아민(PAMAM), 히스티딘(His) 및 아르기닌(Arg)으로 이루어진 핵산 전달용 PAMAM 유도체 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 PAMAM 유도체를 이용하여 높은 효율로 유전자를 세포 내로 트랜스펙션(transfection)하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 해결하기 위하여 본 발명은 폴리아미도아민(PAMAM), 히스티딘(His) 및 양이온성 화합물로 이루어진 핵산 전달용 PAMAM 유도체를 제공한다. 상기 폴리아미도아민(PAMAM) 표면은 히스티딘(His) 잔기가 결합되어 있는 아르기닌으로 그래프트(grafted)되어 있는 구조를 가진다.

[0012] 이 때, 상기 양이온성 화합물은 라이신, 아르기닌, 또는 구아니딘일 수 있고, 특히 아르기닌인 것이 바람직하다. 또한, 히스티딘(His)은 양이온성 화합물 당 1~5개로 결합되어 있다.

[0013] 상기 폴리아미도아민(PAMAM)은 덴드라이트형(dendrite)의 덴드리머(dendrimer)인 것이 바람직하고, 상기 폴리아미도아민(PAMAM) 덴드리머는 10세대(generation) 이하인 것이 바람직하다. 일 구체예에서는 4세대(G4)의 PAMAM을 사용하였다. 따라서, 본 발명의 일 구체적인 태양으로, PAMAM G4-His(n)-Arg[n=1~3의 정수]의 구조식을 가지는 것을 특징으로 하는 PAMAM 유도체를 제공한다.

[0014] 그리고, 상기 PAMAM 유도체는 산성 조건에서 양성자 완충 능력(proton buffer capacity)을 증가시키고, 이러한 유도체의 양성자 완충 능력은 pH 3~6의 범위에서 히스티딘 잔기 수에 비례하여 증가하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 PAMAM 유도체는 DNA, RNA, PNA 등의 핵산 전달을 목적으로 한다. 특히, 본 발명의 일 구체예에서는 pDNA 전달에 사용하였다.

[0016] 그러므로, 본 발명은 다른 태양으로, 상기 PAMAM 유도체와 핵산이 결합되어 형성된 세포 내 핵산 전달용 복합체를 제공한다.

[0017] 특히, 전달하는 핵산이 pDNA인 경우, 상기 복합체는 PAMAM 유도체의 질소/pDNA의 인산 비율(N/P 비율)이 1:1 내

지 4:1로 PAMAM 유도체와 pDNA가 결합될 수 있다.

[0018] 이 때, 상기 복합체는 100~200nm의 크기를 가지고, 30~50 mV의 제타 포텐셜 값을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0019] 또한, 본 발명의 또 다른 태양으로, 상기 PAMAM 유도체를 이용하여 핵산을 세포 내로 전달하는 방법을 제공한다. 특히, 핵산이 전달되는 세포 내 장소로는 세포질(cytoplasm) 및 핵(nucleus)일 수 있다.

[0020] 이처럼, 본 발명은 높은 트랜스펙션 효율, 낮은 세포독성, 증가된 완충 능력을 가지는 세포 내 핵산 전달체로서의 PAMAM-His(n)-양이온성 화합물 구조를 가지는 PAMAM 유도체 및 이를 이용하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 폴리아미도아민 (PAMAM) 덴드리머(dendrimer) 표면에 아르기닌(Arg)을 그래프트(graft)시키고, 상기 아르기닌에 히스티딘(His) 잔기를 결합시킨 PAMAM 유도체를 고안함으로써 DNA의 트랜스펙션 효율의 현저한 증가 및 양성자 완충 능력의 향상시키는 바, 효과적인 비바이러스성 유전자(핵산) 전달 시스템으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 PAMAM G4-His_(1,2,3)-Arg의 전체 합성과정을 나타낸 도식이다.

도 2는 합성된 PAMAM G4-His_(1,2,3)-Arg의 구조의 일부(1/4 부분)를 나타낸 구조식이다.

도 3은 PAMAM G4 유도체에 의한 pDNA의 아가로스 겔 전기영동 지연 분석결과(A) 및 PAMAM G4 유도체 Native PAGE 분석 결과이다.

도 4는 다양한 폴리머와 pDNA와 결합한 복합체의 평균 직경(A) 및 제타 포텐셜 값(B)을 나타낸 그래프이다.

도 5는 다양한 폴리머들의 산-염기 적정 프로파일을 나타낸 것이다.

도 6은 HepG2 세포(A), 293세포(B), NIH3T3(C), HeLa 세포(D)에 대한 세포독성 분석 결과이다.

도 7은 공초점 현미경 분석 결과 이미지이다[(A) HeLa 단독; (B) HeLa- pDNA; (C) PEI25KD/pDNA; (D) PAMAM G4/pDNA; (E) PAMAM G4-Arg/pDNA; (F) PAMAM G4-His₁-Arg/pDNA; (G)PAMAM G4-His₂-Arg/pDNA; 및 (H) PAMAM G4-His₃-Arg/pDNA 복합체].

도 8은 HepG2 세포(A), 293세포(B), NIH3T3(C), HeLa 세포(D)에 상에서의 PAMAM G4 유도체의 트랜스펙션 효율을 분석한 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[0024] "핵산"은 임의의 DNA 또는 RNA, PNA 예를 들어, 조직 샘플에 존재하는 염색체, 미토콘드리아, 바이러스 및/또는 세균 핵산을 포함하는 의미이다. 이중가닥 핵산 분자의 하나 또는 두개 모두의 가닥을 포함하고, 무순상 핵산 분자의 임의의 단편 또는 일부를 포함한다.

[0025] "유전자"는 단백질 코딩 또는 전사시에 또는 다른 유전자 발현의 조절시에 기능적 역할을 갖는 임의의 핵산 서열 또는 그의 일부를 의미한다. 유전자는 기능적 단백질을 코딩하는 모든 핵산 또는 단백질을 코딩 또는 발현하는 핵산의 일부만으로 이루어질 수 있다. 핵산 서열은 엑손, 인트론, 개시 또는 종료 영역, 프로모터 서열, 다른 조절 서열 또는 유전자에 인접한 특유한 서열 내에 유전자 이상을 포함할 수 있다.

[0026] "덴드리머(dendrimer)"는 분자의 사슬이 일정한 규칙에 따라 중심에서 바깥 방향으로 규칙적으로 3차원으로 퍼진 형태의 분자를 의미한다. 분자의 외관이 배구공이나 럭비공모양이고, 또한 그 분자사슬이 나무(덴드론)와 유사하기 때문에 이러한 명칭이 붙여졌다.

[0027] "그래프트(graft)" 또는 "그래프트 중합(graft polymerization)"은 뼈대가 되는 고분자 물질에 임의의 고분자

가지를 붙여 주는 혼성중합을 의미한다. 생성물은 별 모양과 같은 형의 구조를 가진다. 합성법으로는 A중합체에 B중합체를 붙이는 방법, A중합체 위에 B단위체를 중합시키는 방법이 있으나 둘째 방법이 많이 이용된다.

[0028] "트랜스펙션(transfection)"은 배양동물 세포에 핵산(DNA, PNA 등)을 직접 도입하여 세포 내에서 유전형질을 발현시키는 방법을 의미한다. 도입한 핵산은 목적으로 하는 유전자를 플라스미드 등의 매개체에 넣어 도입하는 것이 일반적인 방법이다. 도입한 유전자가 세포에서 안정화된 경우는 염색체에 끼어들어간 경우가 많았다. 핵산을 도입한 세포를 형질도입체라고 한다. 형질주입 효율이 매우 낮기 때문에 효율을 높이기 위해서 여러 가지 방법을 개발되었다. 그 중에서도 인산칼슘공침법, DEAE-텍스트라치리법, 전기천공법, 재분포법(리포솜이라는 인공막과 DNA복합체를 만들게 하는 세포와 융합시키는 방법) 등이 있다.

[0029] "제타 포텐셜(zeta potential)"이란 대전된 입자표면에 붙어 있는 불가동수분과 입자로부터 쉽게 떨어져 나갈 수 있는 가동수분의 확산 이중층에서의 양전하 밀도차이에서 유래되는 전기역학적인 전위차를 의미한다. 세포표면과 주변 배양액 사이의 전기적 전위차 또는 제타전위로 나타내기도 한다.

[0030] "완충 능력(buffer capacity)"은 완충 용량, 완충지수, 완충치, 완충계수라고도 하며, 용액의 완충작용의 크기를 보이는 척도이다. 정의적으로는 $\beta = dB/d\text{pH}$ 로 나타내어지고, 약산과 그 염으로 이루어지는 완충액에서는, $\beta = 2.303Kac[H+]/(Ka+[H+])^2$ 로 된다. 여기서, β 는 완충능, dB (그람당량/l)은 완충액에 가해진 산(부부호) 또는 염기(정부호)의 양, Ka 는 약산의 해리정수, c 는 그 총농도이다. 완충능은 1pH 단위 움직이는 데 어느 만큼의 산 또는 염기가 필요한가를 나타내게 되기 때문에, 이 값이 클수록 완충작용이 크다. 충분한 완충능이 기대되는 것은 $\text{pH}=\text{pKa}\pm 1$ 로부터 $\text{pH}=\text{pKa}\pm 2$ 정도까지이다. 또한, 완충액의 농도가 높을수록 완충능은 높다.

[0031] "양성자(proton)"란 원자핵의 구성 요소의 하나인 양성자 혹은 수소원자에서 전자가 상실되어 형성되는 수소 양이온을 의미하며, 분자 내의 수소원자가 양이온으로서 탈리하거나 혹은 분자 내의 다른 원자로 이행하는 경우 양이온이 된 수소, 즉, H^+ 이온(양성자, proton)을 내는 물질을 산(acid)이라 일컫는다.

[0032] "적정(Titration)"이란 어떤 수용액에 존재하는 산의 양을 정량하기 위해서 이미 농도를 알고 있는 염기의 용액을 이용하는 방법으로서, pH meter로 측정하면서 산이 중화될 때 까지 염기의 양을 조금씩 증가시켜서 후에 첨가된 염기의 양과 농도로부터 수용액에 존재하는 산의 농도를 측정하는 방법을 말한다.

[0033] "유전자 치료(gene therapy)"는 돌연변이를 일으킨 유전자를 정정하여 유전병을 치료하려는 것을 말한다. 즉 환자의 세포에 외부에서 정상유전자를 이식하여 그 세포의 표현형을 변화시킴으로써 병을 치료하는 방법이다. 현재 사람의 정자, 난자, 수정란에 대한 유전자치료는 전 세계적으로 윤리문제가 제기되고 있으나, 1993년대에 「유전자치료 임상연구에 관한 지침」을 지정한 후부터 유전자치료시대로 돌입하였다. 유전자 치료에는 체내에 유전자를 도입하는 유전자 벡터, 시스템의 연구가 필수적이다.

[0034] "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0035] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.

[0036] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0037] PAMAM 유도체

[0038] 본 발명은 핵산(nucleic acid)의 세포 내 전달(transfection)에 관한 것이다.

[0039] 일 관점에서 폴리(아미도아민) (PAMAM), 히스티딘(His) 및 양이온성 화합물로 이루어진 핵산 전달용 PAMAM 유도체에 관한 것이다.

[0040] PAMAM은 1차 아민 말단기를 갖는 선형 및 분지형 중합체 또는 덴드리머를 포함한, 폴리(아미도아민)을 뜻한다. 본 발명에 사용되어질 수 있는 PAMAM은 제한은 없으나, 측쇄형(branched)보다는 덴드라이트형(dendrite)이 바람직하다. 즉, PAMAM 덴드리머(dendrimer)를 사용한다.

[0041] PAMAM은 특별히 한정되지는 않으나, 예를 들어 세대 10 이하, 바람직하게는 G3~G6를 사용한다(G는 세대수를 뜻

한다). 일 실시예에서는 G4의 PAMAM를 사용하였다.

[0042] PAMAM 덴드리머의 말단 아미노기는 정전기적 수단에 의해 DNA에 결합하여 양이온적으로 하전된 배위체를 형성하며, 상기 배위체는 식균작용(endocytosis)에 의해 흡수된다. DNA는 표면의 1차 아민과만 반응하고, 내부의 3차 아민을 남겨두어 덴드리머-유전자 배위체의 엔도솜 탈출을 보조하기 때문에, 별 모양의 폴리머는 많은 장점을 가진다.

[0043] 본 발명의 PAMAM 유도체는 PAMAM의 표면에 존재하는 1차 아민기 위치에 히스티딘 잔기가 도입된(결합된)- 라이신, 아르기닌, 또는 구아니딘 등의 양이온성 화합물로 그래프트되어 있는 구조를 지닌다(도 2). 이 때, 상기 양이온성 화합물들은 단독물질로서 그래프트되어져도 좋으며, 2 성분 이상의 물질이 경쟁적으로 그래프트 되어져도 좋으나, 바람직하게는 단독으로 사용한 형태가 좋다. 특히 아르기닌으로 그래프트 되어지는 것이 바람직하다.

[0044] 히스티딘(His)은 염기성 α -아미노산의 하나로서, PAMAM 유도체에 히스티딘의 도입은, 히스티딘의 6.0의 pKa를 갖는 이미다졸 링 그룹의 존재로 인해 산성 환경에 대해 완충용량을 늘릴 수 있게 한다. 특히, 히스티딘 폴리머 매개체 시스템의 결합(conjugation)은 복합체 형성 능력을 향상시키는데 장점이 있을 뿐 아니라, 양자 스폰지 효과를 통한 산성 환경에 맞서 싸우는 물리화학적 힘을 향상시키는 데에도 장점이 있다. 따라서, 이러한 히스티딘은 본 발명의 유도체에서 양자 완충 물질로서의 기능을 발휘한다.

[0045] 이와 같이, 본 발명은 세포내 요구되는 물질(핵산)을 효율적으로 전달하기 위한 신규 고분자 비바이러스성 벡터로서, 특히 PAMAM 덴드리머를 기본으로 하면서 표면에 히스티딘(His) 잔기가 결합된 양이온성 화합물(예를 들어 아르기닌(Arg))을 그래프트 시킨, 「PAMAM-His(n)-양이온성 화합물」 구조의 PAMAM 유도체를 제공한다. 이 때 상기 n은 1~5의 정수인 것이 바람직하고, 1~3의 정수인 것이 더욱 바람직하다.

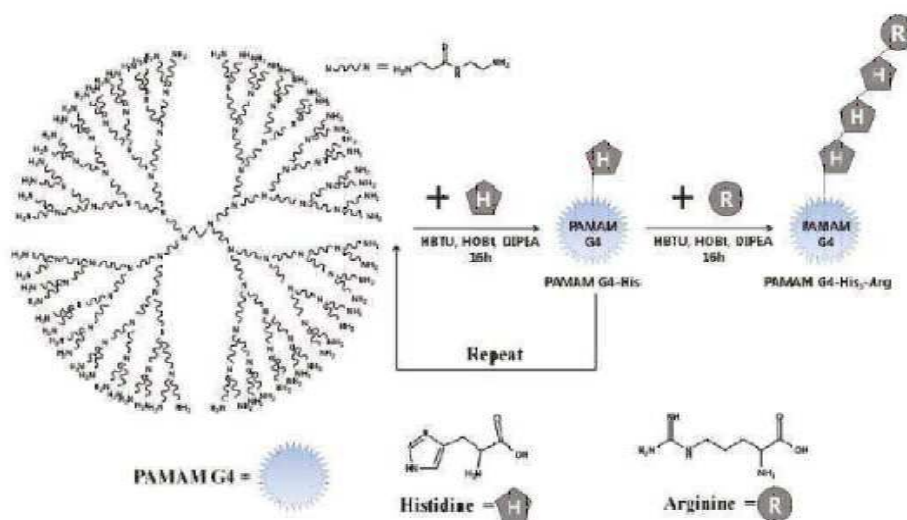
[0046] 본 발명의 가장 대표적인 PAMAM 유도체는 상기 양이온성 화합물이 아르기닌(Arg)인 경우로서, 「PAMAM-His(1~5)-Arg」 구조를 가진다. 본 발명의 PAMAM-His(n)-Arg 구조의 PAMAM 유도체에서, His(n)-Arg은 PAMAM의 표면에 존재하는 전체 1차 아민기의 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상에 걸쳐 그래프트되어져 있다.

[0047] PAMAM 유도체 제조방법

[0048] 한편, 본 발명은 다른 관점에서 상기 PAMAM 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

[0049] 본 발명에 따른 PAMAM 유도체는 다음과 같은 과정(반응식 1)에 의해 제조되어질 수 있다.

[0050] [반응식 1]



[0051]

- [0052] 일 구체예로서, 보호된 히스티딘 및 보호된 아르기닌 화합물을 PAMAM에 아미노산 커플링 반응시킨 다음, 반응에 사용된 보호기를 제거하고 유기용매에 침전시켜 수세한 후 얻어진 결과물을 물에 녹여 순수에 투석시키는 과정을 통해 획득할 수 있다.
- [0053] 일 실시예에서는 4당량의 HOBt, HBTU, Fmoc-His(trt)-OH와 8 당량의 DIPEA을 실온에서 무수 DMF 용액에 혼합하여 수행한 후, Fmoc기 및 trt기를 탈보호하고, 이를 반복하여 His 잔기를 신장(elongation)시킨 후, 4당량의 HOBt, HBTU, Fmoc-Arg(pbf)-OH와 8 당량의 DIPEA을 실온에서 무수 DMF 용액에 혼합, 반응 및 Fmoc기 및 pbf기를 탈보호하여 본 발명의 유도체를 제조한다.
- [0054] 양이온성 화합물이 라이신 또는 구아니딘이 사용되는 경우에도 전체적인 공정은 위 아르기닌의 예에서와 동일하지만, 구체적인 보호기를 달리할 수 있다 (예를 들면, 위 pbf 보호기는 라이신의 경우 Boc 일 수 있다. 이 경우 탈보호제는 아르기닌에서 사용된 것과는 다른 것이 사용될 수 있다(예를 들어, TFA 단독사용). 이와 같이 제조 과정에서 요구되는 양이온성 화합물의 보호기는 다른 것이 일반적이지만, 조건에 따라서는 동일한 것을 사용할 수도 있으며, 이 경우 단일 공정에 의해 2이상의 양이온성 화합물을 그래프트시킬 수도 있다. 그리고 이러한 공정은 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자가 적절히 수행할 수 있을 것이다.
- [0055] 이러한 과정을 통해 제조되어지는 본 발명의 PAMAM 유도체는 세포내로 핵산을 전달시키는 벡터의 용도로서 사용되어질 수 있다.
- [0056] 본 발명에 따른 PAMAM 유도체는 수용액에서 양성 전하를 띠게되어, 수용액에서 음성 전하를 띠는 물질인 핵산들과 정전기적 인력에 의해 결합하여 복합체(폴리플렉스, polyplex)를 형성할 수 있다.
- [0057] 이와 같은 특성은 본 발명의 PAMAM 유도체가 세포내 핵산 전달용 벡터로서 사용되어질 수 있음을 암시한다. 예를 들어 유전자 치료를 위해서는 세포내부(세포핵)에서 DNA가 가진 유전자정보를 이용하여 치료용 단백질로 발현시켜야 하지만(세포형질전환, transfection), DNA 단독으로는 세포 내부로 침투되기 어렵기 때문에, DNA 자체로는 세포형질전환이 어렵다. 그 이유는 세포막이 전체적으로 음성전하를 띠기 때문에, 전기적 반발력으로 음성 전하를 띤 DNA가 세포 내부로 들어가기 어렵기 때문이다.
- [0058] 본 발명의 PAMAM 유도체는 아르기닌 유닛상 양성적으로 대전된 아민기를 가지고 있어, 음성적으로 대전된 pDNA 포스페이트 백본과 상호작용할 수 있다. 그러므로, 본 발명에 따른 양성 전하를 띠는 PAMAM 유도체는 음전하를 띠는 DNA를 포함한 다양한 핵산들과 복합체(폴리플렉스)를 형성하여 전체적으로 중성 또는 양이온성을 띠게 하여 세포 내부로의 침투를 용이하게 한다.
- [0059] 따라서, 다른 관점에서 본 발명은 상기 PAMAM-His(n)-양이온성 화합물, 바람직하게는 PAMAM-His(n)-Arg 유도체와 핵산이 결합되어 있는, 세포 내 핵산 전달 위한 복합체에 관한 것이다.
- [0060] 상기 핵산으로는 단일사슬 또는 이중사슬의 DNA 또는 RNA 및 플라스미드를 포함한다. DNA 또는 임의의 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드, RNA일 수 있으며 RNA는 mRNA, tRNA, rRNA 뿐만 아니라 임의의 세포의 타겟 DNA, RNA 서열과 상보적인 안티센스 RNA 및 리보자임(Rybozyme)을 포함한다. 상기 단백질을 코딩하는 유전자로는 질병의 치료 또는 진단과 관련된 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함한다. 상기 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩타이드에는 각종 호르몬, 조직접합성 항원, 세포부착단백질, 사이토카인, 각종 항체, 세포 수용체, 세포내 또는 세포외 효소 및 이들의 절편 등을 포함하는 것이 바람직하다. 또한 유전자 발현조절인자, 예를 들면 전사프로모터, 인핸서, 사일렌서, 오퍼레이터, 터미네이터, 어테뉴에이터 및 기타 발현조절인자 등을 포함할 수 있다. 특히 본 발명의 일실시예에서는 pDNA(plasmid DNA)의 전달에 사용하였다.
- [0061] 상기 핵산 이외에 본 발명에 따른 PAMAM 유도체를 이용하여 세포내로 전달되어질 수 있는 물질로는, 예를 들어, 저분자화합물, 펩타이드, 단백질의 군에서 선택되는 1종의 물질일 수 있다. 저분자 화합물의 예를 들면, 5-플루오로우라실, 이부프로펜, 파크리탁셀, 키큐민, 클로람페니콜, 악티노마이신, 독소루비신 등이 있다. 펩타이드는 p53 펩타이드, p16 펩타이드, p21 펩타이드, Smac 펩타이드, VHL 종양억제펩타이드, 메를린, MAK19 등이 있다. 단백질의 예를 들면, α -인터페론, β -인터페론, 에리스로포이에틴, 인슐린, 인터루킨-2, 인간성장인자(HGF), 신경성장인(NGF), 혈관내피성장인자(VEGF) 등이 있다.
- [0062] 본 발명에 따른 PAMAM 유도체는 유전자 이외의 상기 저분자, 펩타이드나 단백질 등의 생기능성 혹은 약물 분자를 전달하는 방식은 다음과 같다.

- [0063] 1) 호스트-게스트 방식
- [0064] 상기 방식은 본 발명에 따른 PAMAM 유도체 내부(host)에 생성되는 공간에 저분자 물질(guest)을 끼워 들어가게 해서 세포 내로 전달하는 모든 방식을 포함하는 것으로, 예를 들어 수용액상에 잘 녹지 않는 약물 분자와 수용성인 PAMAM 유도체가 서로 용해되는 유기 용매상에서 혼합된 후 유기용매를 증발시킨 뒤 남은 침전물을 수용액상에 용해시키는 방법으로 복합체를 만드는 방식이 있다. 또다른 방법으로 물에 섞이는 유기용매에 둘을 용해시킨 후 수용액상에 분산시키는 방법으로 복합체를 만들 수도 있을 것이다. 이러한 방법을 통하면 수용액상에서 극도로 용해도가 낮은 약물 분자를 높은 용해도로 수용액상에 용해시킬 수 있어 생화학 또는 의학학적인 응용이 가능해진다. 끼워 들어가는 약물분자의 크기는 PAMAM유도체의 내부공간에 따라 제한되며 그 약물의 특성에 따라 농도, 용매로 쓰이는 유기용매의 종류나 수용액의 pH, 조성 등은 변화될 수 있다.
- [0065] 2) 화학 결합 방식
- [0066] 본 방식은 본 발명에 따른 PAMAM 유도체의 표면에 생기능성 분자 등을 화학적으로 결합하여 일종의 프로드러그(prodrug) 형태로 세포 내로 전달하는 방식이다. 상기 방식은 크게 다음의 두 가지로 나눌 수 있다.
- [0067] ① 생체 내에서 안정한 결합
- [0068] 상기 결합방식은 본 발명에 따른 PAMAM 유도체와 생체 내에서 안정한 아마이드 결합이나 -C-N- 결합 등을 통하여 생기능성 분자를 생접합하는 모든 방식을 포함한다. 우선 PAMAM 유도체의 표면은 pKa 값이 다른 일차 아민과 구아니딘 작용기가 노출되어 있으므로 일차 아민만을 이용해 결합시키기 위한 완충액 조건이 필요하다. 예를 들어 PAMAM 유도체의 일차 아민의 친핵성 반응을 이용해 결합시키기 위해서는, 전달 물질의 결합 부위 작용기가 -COOH 작용기나, 각종 할로젠 분자 등과 같은 이탈기(leaving group)로 활성화된 작용기로 화학적 처리를 통해 변형되어야 하며 PAMAM 유도체와 전달 물질간의 직접적인 반응이나 커플링제를 이용한 반응을 통해 결합시킨다.
- [0069] ② 생분해성 결합
- [0070] 본 방식은 상기 ①번 방식과 유사하나 결합을 생체내 안정한 결합이 아닌 생분해성 결합으로 대체하는 모든 방식을 포함한다. 이 방식에는 예를 들어 가수분해를 통해 분해되는 에스테르 결합, 엔도솜 환경의 낮은 pH에서 분해되는 오르토-에스테르, 아세탈, 하이드라존 결합, 세포내 환원 전위에서 분해되는 다이설파이드 결합 등을 이용할 수 있다.
- [0071] 세포 내 물질을 전달하기 위한 본 발명의 PAMAM 유도체는, 구체적인 일 태양으로, 기존의 아르기닌 그래프트된 PAMAM 구조를 변형하여 His 잔기를 아르기닌에 추가로 결합시키는 구조를 가짐으로써 다음과 같은 장점을 가진다.
- [0072] (1) 본 발명의 "PAMAM G4-His-Arg"은 양성자 완충 능력(proton buffer capacity)을 강화시킨다.
- [0073] 히스티딘의 이미다졸기는 pKa 6.0의 값을 가지므로 생리적 pH(약 pH 7.3)에서 일차 아민기보다 훨씬 덜 양자화되므로, 본 발명의 PAMAM 유도체 상의 히스티딘 유닛의 증가는 산성 pH에서 완충 능력을 증가시키는데 중요한 역할을 한다. 즉, 산성 조건에서 이미다졸 링의 양자화를 통하여 PAMAM G4-His_(1,2,3)-Arg 유도체의 양성자 완충 능력(proton buffering capacity)이 크게 증가함을 알 수 있다. 특히 pH 3.5~6 범위에서 히스티딘 수가 증가함에 따라 유도체의 완충 능력도 증가한다.
- [0074] (2) 본 발명의 "PAMAM G4-His-Arg"은 유전자의 트랜스펙션 효율(transfection efficiency)을 현저히 향상시킨다.
- [0075] 본 발명의 PAMAM G4 유도체는 native PAMAM G4 및 통상적으로 사용되는 양이온 담체 PEI와 비교하여 훨씬 높은 트랜스펙션 효율을 가진다. 그리고, 상기 트랜스펙션 효율은 His 잔기의 개수 및/또는 전하비율(charge ratio)에 의존적인 것을 특징으로 한다. 특히, 일 구체예에서 본 발명의 유도체는 기존의 PAMAM G4-Arg와 비교하여 전하비율 8:1에서 유전자 발현 수준을 10배까지 증가시킨다.
- [0076] 또한, 세포질 및 핵으로의 핵산 전달능이 우수하다. 히스티딘 신장 개수가 증가할수록 핵 내부로 전달되는 핵산 양도 많아진다. 그러므로 본 발명의 PAMAM 유도체는 핵에 대한 세포 흡수능이 우수할 뿐만 아니라 핵 내부로의 위치화(localization) 능력도 뛰어나다.
- [0077] (3) 본 발명의 "PAMAM G4-His-Arg"은 세포독성이 낮다.

- [0078] 통상의 고분자 양이온 담체 PEI 등과 비교하여, 본 발명의 PAMAM 유도체는 생체 내 유용할 수 있을 정도로 세포 독성이 낮다
- [0079] (4) 본 발명의 "PAMAM G4-His-Arg"은 핵산과 결합하여 나노 사이즈 크기의 복합체를 형성하고 높은 제타 포텐셜 값을 가진다.
- [0080] 히스티딘이 도입된 PAMAM 유도체는 예를 들어, pDNA와 결합하는 경우, 상대적으로 낮은 N/P 비율(polymer nitrogen(+)/pDNA phosphate(-))에서 전정기적 상호작용에 의해 보다 효과적으로 pDNA를 농축하는 장점이 있다. 즉, 아르기닌의 구아니딘 그룹 및 히스티딘의 이미다졸 그룹이 각각 pKa 12.0 및 6.0을 가지기 때문에 His-Arg 결합된 PAMAM 유도체는 중성 조건에서 양성 전하를 나타내어 효과적으로 pDNA를 나노크기 사이즈로 농축할 수 있고(약 100~200 nm), 30~50 mV 범위(예를 들어, 약 35mV)의 제타 포텐셜을 가질 수 있다.
- [0081] 이처럼, 본 발명은 높은 트랜스펙션 효율, 낮은 세포독성, 증가된 완충 능력을 가지는 세포 내 핵산 전달체로서의 PAMAM-His(n)-양이온성 화합물(예를 들어, PAMAM G4-His(n)-Arg) 구조를 가지는 PAMAM 유도체 및 이를 이용하는 방법을 제공한다. 따라서, 효과적인 비바이러스성 유전자 전달 시스템으로 사용될 수 있다.
- [0082] 한편, 생체분자 운반의 결과는 상이한 방법에 의해 분석될 수 있다.
- [0083] 유전자 트랜스펙션과 안티센스 핵산 운반의 경우에, 표적 유전자 발현 수준은 녹색 형광 단백질(GFP) 유전자, 루시페라제 유전자, 또는 베타-갈락토시다제 유전자 발현과 같은 리포터 유전자에 의해 검출될 수 있다. GFP의 신호는 현미경하에 직접 관측될 수 있으며, 루시페라제의 활성은 발광기(luminometer)로 검출될 수 있고, β -갈락토시다제에 의해 촉매화된 청색물이 현미경하에 관측되거나 마이크로플레이트 판독기에 의해 측정될 수 있다. 본 기술분야에 숙련자들은 이들 리포터가 어떻게 기능하며 이들이 유전자 운반 시스템에 도입될 수 있는지 친숙하다.
- [0084] 핵산과 그의 생성물, 혹은 여기에 기술된 방법에 따라 운반된 다른 생체분자와 이들 생체분자에 의해 매개된 표적은 면역형광 검출 또는 효소 면역세포화학, 자기방사기록법, 혹은 인사이투(in situ) 하이브리드화와 같은 각종 방법에 의해 측정될 수 있다. 만약 면역형광법이 부호화된 단백질의 발현을 검출하는데 사용될 경우, 표적 단백질과 결합하는 형광라벨 항체가 사용된다(예컨대, 항체의 단백질의 대한 결합을 위한 적절한 조건하에 슬라이드에 첨가). 단백질을 함유한 세포는 이후 형광 신호를 검출함으로써 확인된다. 만약 운반된 세포가 유전자 발현을 매개할 수 있다면, 표적 유전자 발현 수준은 또한 자기방사기록법, 인사이투 하이브리드화 및 인사이투 PCR과 같은 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0085] 그러나, 확인 방법은 운반된 생체분자, 그의 발현물, 그에 의해 매개된 표적, 및/또는 생체분자의 운반으로부터 수득된 최종 생성물의 특성에 의존한다.
- [0086] [실시예]
- [0087] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0088] 실험 준비 및 실험방법

[0089] 1. 재료준비

[0090] PAMAM 4세대(G4), N,N-diisopropylethylamine(DIPEA), ammonium persulfate (APS), N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine (TEMED), 및 N,N-dimethylformamide(DMF)를 Sigma-Aldrich (Seoul, South Korea)로부터 구입하였다. N-Hydroxybenzotriazole (HOBt), 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HBTU), 및 Fmoc-His(trt)-OH는 Anaspec (San Jose, CA, USA)로부터, 그리고 Fmoc-Arg-(pbf)-OH는 Novabiochem (San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 및 100 x antibiotic-antimycotic agent는 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구

입하였다. 루시페라제 발현 플라스미드는 공지의 방법으로 제조하였고[Lee, M. J. et al., Intraperitoneal gene delivery mediated by a novel cationic liposome in a peritoneal disseminated ovarian cancer model. Gene Ther. 9, 859-866. 2002], 루시페라제 분석 키트는 Promega (Madison, WI, USA)로부터 구입하였다. Micro BCA Protein Assay Kit는 Pierce (Rockford, IL, USA)로부터 수득하였다.

2. 아가로오스 젤 지연 분석 및 동적 광산란(Dynamic Light Scattering) 분석

다양한 전하 비율 조건에서 플라스미드 DNA를 가진 PAMAM 유도체의 복합체 형성을 분석하고자 하였다. 폴리머와 서로 다른 전하 비율을 가진 플라스미드 DNA를 함유한 복합체들을 HEPES buffer(25 mM, pH 7.4) 안에서 배양함으로써 준비하고, 일정량의 플라스미드 DNA와 서로 다른 전하 비율을 가진 HEPES buffer를 상온에서 30분 동안 혼합 시켰다. 각 복합체 샘플을 에티디움 브로마이드를 포함한($0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ gel) 0.7% 아가로오스 겔로 분석했다. 아가로오스 전기이동법은 보통 100V에 30분을 필요로 한다. 복합체들의 크기 분포와 제타 포텐셜(제타 전위)를 Zetasizer Nano-Zs(Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.)를 통해 측정하였다.

3. PAGE

PAMAM 유도체의 Native 아크릴아미드 젤 전기이동 실험을 Mini-Protein Tetra Cell System(Biorad, Hercules, CA, USA)으로 수행하였다. 시트르산 버퍼(pH3.0, 0.1M)가 완충 시스템으로 사용되었고, 6% T 젤(T= g acrylamide + g N,N'-methylenebisacrylamide/100 mL solution)이 APS, TEMED, 및 Tris-HCl buffer (pH7.5)와 함께 30% 아크릴아미드 혼합 용액(Biorad)으로 준비되었다.

APS와 TEMED를 첨가하기 전에 폴리머에 양자를 가하고 좁은 band를 만들기 위해 5 N HCl을 이용하여 6% T 겔을 산성화시켰다(pH 2). 역극성 시스템(음극이 젤 밑부분으로 가게 하는)이 양성적으로 대전된 PAMAM 유도체를 분석하기 위해 사용되었다. Native PAGE는 보통 100 V에 50분을 요구되어졌다.

폴리머 샘플($1 \mu\text{g}$)들이 준비되었고 로딩(loading)을 위한 샘플에 1 μL 의 tracking dye를 첨가하였다. 겔들은 40% 메탄올 및 7% 아세트산 수용액에서 0.025% Coomassie Blue R-250로 밤새 염색되었다. 상기 염색 공정 후, 수 중 10% (v/v) 메탄올 및 10% 아세트산으로 겔들을 탈염색화하였다.

4. 산-염기 적정 분석.

PAMAM 유도체의 양자화 능력은 산-염기 적정 방법에 의해 측정되었다. PEI25KD(2mg , $8 \times 10^{-8} \text{ mol}$) 및 동일 당량의 PAMAM G4, PAMAM G4-Arg, 및 PAMAM G4-His_(1,2,3)-Arg를 0.1 N HCl, NaCl(150 mM)으로 적정하였고 대조군으로서 H₂O를 적정하였다. pH값은 pH미터(pH211microprocessor pH meter, HANA Instruments, Seoul, South Korea)로 결정되어졌다.

각 적정 샘플은 같은 당량의 샘플($8 \times 10^{-8} \text{ mol}$)을 4 mL의 150 mM NaCl에 첨가함으로써 제조하였고, 100 μL 의 1 N NaOH을 샘플 용액에 첨가하였다. pH 3.0이 될 때까지 0.1N HCl의 aliquot(20 μL)을 첨가함으로써 샘플들을 적정하였다.

5. 세포독성 분석

PAMAM 유도체의 세포독성을 WST-1 방법에 기초한 EZ-Cytox 시약(Daeil Lab Service, Seoul, South Korea)을 이용하여 평가하였다.

HepG2, 293, NIH 3T3 세포들을, 96-well 플레이트에 2×10^4 cells/well 밀도로, HeLa 세포들은 1×10^4 cells/well의 밀도로 씨딩하고, 10% FBS를 함유한 100 μL 의 DMEM에서 배양하였다. 1일 배양 후, 세포들을 다양한 농도의 PEI25KD, PAMAM G4, PAMAM 유도체들로 처리하고, 24시간 더 배양시킨 다음, 10 μL 의 EZ-Cytox 시약을 각 well에 첨가하고 4시간 더 추가로 배양하였다. 450nm에서 VESAmix microplate reader(VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

[0103] **6. 공초점 현미경 관찰**

[0104] HeLa 세포들을(5×10^3 cells/well) 배양 슬라이드에 씨딩하고 37℃에서 배양하였다. 24시간 배양 후, Alexa Fluor 532-표지된 pDNA 및 다양한 폴리머로 이루어진 복합체를 처리하였다. Alexa Fluor 532-표지된 pDNA는 제조사의 설명서에 따라 준비되었다. 24시간을 더 추가로 배양한 후, 오래된 배지를 제거하고 세포들을 PBS로 세척시켰다. 세포들을 4% 파라포름알데히드로 10분 동안 고정시키고 세포핵을 10 µg/mL bisbenzimidazole (Hoechst 33342)로 7분간 염색한 다음 PBS로 수차례 세척하였다. 유리 슬라이드 위의 플라스틱 챔버를 분리시키고, 세포들을 마운팅 배지(mounting medium; Dako, Carpinteria, CA, USA)로 처리한 후 커버슬립으로 덮었다. Zeiss LSM 5 Live 공초점 레이저 현미경을 이용하여 형광성의 신호를 분석하였다.

[0105] **7. 세포 배양 및 트랜스펙션 분석**

[0106] 인간의 간세포의 간 암종 HepG2 세포들, 인간 태아의 신장 293 세포들, 쥐의 섬유세포 NIH3T3 세포들, 인간 상피 암종 HeLa 세포들이 37℃ 배양기(5% CO₂, 95% 상대 습도)에서 유지되었다. 모든 세포들을 10% FBS와 1% 항생제가 보충된 DMEM을 이용하는 T25 플라스크에 유지시키고, 세포 밀집도가 70-90%에 다다랐을 때 0.25% 트립신/에틸렌디아민테트라아세트산 용액을 이용하여 부-배양(subculture)하였다.

[0107] 트랜스펙션 실험을 위해, 세포들을 24-well 플레이트에 2×10^5 cells/well 밀도로, HeLa 세포들은 1×10^5 cells/well의 밀도로 씨딩하고, 24시간 동안 배양하여 세포 밀집도가 70-80%에 이르도록 하였다. 그리고, 트랜스펙션 복합체는 1 µg의 플라스미드 DNA와, 10% FBS를 함유하는 다양한 양의 PAMAM 유도체를 상온에서 30분간 혼합함으로써 제조하였다.

[0108] 트랜스펙션의 효율을 비교하기 위해, PEI25KD/pDNA(polymer nitrogen+)/pDNA phosphate(-)[N/P 비율]: 7/1, 최적 조건) 및 PAMAM G4/pDNA복합체(N/P 비율: 4/1, 최적 조건)를 대조군으로 준비하고, PAMAM G4 유도체는 N/P 비율 4:1 내지 8:1로 준비하여 전하 비율 관점에서 결과를 비교하였다.

[0109] 세포들을 상기 복합체 용액으로 처리하고 37℃에서 24시간동안 배양하였다. 오래된 배지를 제거하고 세포들을 DPBS로 세척한 후 리포터 용해 버퍼를 이용하여 30분 동안 용해(lysis)시켰다. Lumat LB 9507(Berthold Technology, Bad Wildbad, Germany)을 이용하여 루시페라제 활성을 측정하고 Micro BCA 단백질 분석시험 키트(Pierce)를 이용하여 단백질 함량을 측정하였다.

[0110] **8. 통계학적 분석**

[0111] Unpaired Student's t-test (GraphPad Prism 5)를 이용하여 통계학적 분석을 수행하였다. 그룹간 차이는 P < 0.05 (*), P < 0.01 (**), 및 P < 0.001 (***)에서 통계학적으로 유의하게 나타났다.

[0112] **실시예 1: PAMAM G4-His(1,2,3)-Arg의 합성**

[0113] 4세대 PAMAM을 16시간동안 상온에서 무수의 DMF 용액 안에서 4 당량의 Fmoc-His(trt)-OH, HOBt, 및 HBTU와 반응시켰다. 그리고 과량의 차가운 에틸 에테르로 중간 생산물을 침전시켰다. 침전된 중간물을 30% 피페리딘 용액(v/v)으로 용해시켰고 히스티딘 개체의 Fmoc 그룹을 탈보호 하기 위해 1시간 동안 화학반응시켰다. 탈보호 과정 후 그 중간 생산물을 차가운 에틸 에테르로 침전시켰다. 추가의 히스티딘 신장(elongation)은 위에 언급한 합성 절차를 반복하여 수행하였다.

[0114] 히스티딘 개체의 신장(늘림) 이후에 4 당량의 Fmoc-Arg(pbf)-OH, HOBt, 및 HBTU와 8 당량의 DIPEA를 위에 언급한 방법과 똑같은 방법으로 중간생산물과 반응시켰다. 차가운 에틸 에테르로 침전시킨 후에 아르기닌 개체의 Fmoc 그룹을 제거하기 위해 30% 피페리딘 용액과 중간생산물을 1시간동안 화학반응시켰다. 그리고, 세척하고 차가운 에틸 에테르 용액으로 침전시켰다. 그 침전 생산물을 탈보호 시약(95:2.5:2.5, trifluoroacetic acid/triisopropylsilane/H₂O, v/v)에 용해시키고 각 아미노산 개체의 pbf와 trt 그룹을 탈보호하기 위해 상온에서 6시간 동안 교반하였다. 그리고 정제되어지지 않은 생산물을 화학반응이 되지 않은 아미노산이나 커플링 시약으로부터 정제시키기 위해 24시간 동안 투석 세포막(dialysis membrane(MWCO 3,500, Spectra/por)을 이용,

증류수로 투석시켰다. 투석 후 최종 생산물을 동결 건조시켰다. PAMAM 컨쥬게이트의 합성에 대한 전체적인 계획은 도 1에 나타나 있다.

[0115] 합성된 PAMAM G4-His_(1,2,3)-Arg의 ¹H NMR(nuclear magnetic resonance) 분광계 분석 결과는 이하와 같다.

[0116] PAMAM G4에 컨쥬게이션된 히스티딘 및 아르기닌 유닛의 수는 ¹H NMR 데이터를 기초하여 계산되었다. 아르기닌 유닛은 1.5 ppm 및 3.76 ppm에서 특징적 피크를 가지는 반면, 히스티딘 유닛은 4.5 ppm, 6.8 ppm, 및 7.6 ppm에서 피크를 나타냈다. 이러한 결과로부터, 60 이상의 히스티딘 및 아르기닌 유닛이 PAMAM G4의 표면 일차 아민에 컨쥬게이션되어 있음을 알 수 있다. 이는 표면 아민의 95% 이상이 His_(1,2,3)-Arg 펩타이드로 덮여 있음을 의미한다.

[0117] 반응식 1 및 도 1에 PAMAM G4-His_(1,2,3)-Arg의 전체 합성과정을 나타낸 도식을 나타냈고, 도 2에 합성된 PAMAM G4-His_(1,2,3)-Arg의 구조의 일부를 나타냈다.

[0118] 실시예 2 : 아가로스 겔 지연(Agarose Gel Retardation) 분석

[0119] 아가로스 겔 지연분석으로 PAMAM 유도체와 pDNA의 복합체형성을 확인하였다.

[0120] PAMAM 유도체는 아르기닌 유닛상 양성적으로 대전된 아민기를 가지고 있어, 음성적으로 대전된 pDNA 포스페이트 백본과 상호작용할 수 있다. 각 PAMAM 유도체는 1:1 내지 4:1의 N/P 비율의 양으로 pDNA와 복합체를 형성하였다.

[0121] 도 3A에 나타나 있는 바와 같이, PAMAM G4-His₁-Arg, PAMAM G4-His₂-Arg이 N/P 비율 1:1에서 pDNA를 지연시켰고, PAMAM G4-His₃-Arg은 N/P 비율 2:1에서 완전한 지연을 나타냈다.

[0122] His₁ 및 His₂에 비해 PAMAM G4-His₃-Arg의 증가된 비율은 분자량의 증가 및 전하 밀도(charge density)의 감소 때문으로 생각되어진다. 다중 양이온성 폴리머(polycationic polymer)의 분자량 및 전하밀도는 성숙한 복합체(mature polyplex)를 형성시키는 데 있어 가장 중요한 요소이다. 높은 전하 밀도를 가지는 양이온성 담체는 pDNA를 효과적으로 농축시킨다.

[0123] 또한, DNA 포스페이트 백본 및 양이온성 분자 사이의 거리 역시 복합체 형성에 중요한 요소이다. 히스티딘의 이미다졸기의 pKa는 약 6.0이므로 이 그룹은 생리적 환경(pH 7.4)에서 매우 약하게 양자화된(protonated). 따라서 작용기 말단에서 아르기닌 잔기와 복합체를 형성하는 것이 히스티딘 잔기의 경우보다 자주 일어났다.

[0124] 이는 양자화된 히스티딘의 오직 작은 부분이 복합체 형성에 관여하고 표면의 아르기닌이 pDNA와의 복합체 형성에 주요하게 제공된다는 것을 의미한다.

[0125] 비록 PAMAM G4 덴드리머 및 L-아르기닌 사이에 그래프트된 히스티딘 유닛은 복합체 형성에 주요한 역할을 하는 것은 아니지만, 이러한 히스티딘-아르기닌 펩타이드가 컨쥬게이트된 PAMAM 유도체는 상대적으로 낮은 N/P 비율에서 정전기적 상호작용에 의해 보다 효과적으로 pDNA를 농축한다.

[0126] 실시예 3: 복합체의 크기 측정 및 제타 포텐셜 분석

[0127] DNase 같은 효소 활성, pDNA의 큰 사이즈 등은 naked 플라스미드 DNA의 세포 내 전달을 방해한다.

[0128] 본 실험에서는 최적 전하 비율에서 각 복합체의 평균 지름 및 제타 포텐셜값을 측정하였다. PEI25KD의 전하 비율은 7:1로 하였고, PAMAM G4 및 유도체는 8:1의 전하비율에서 측정하였다.

[0129] 도 4A에 도시한 바와 같이, naked pDNA의 평균직경은 약 900 nm이었다.

[0130] PEI25KD/pDNA 복합체는 평균 직경이 201.4 ± 4.86 nm, native PAMAM G4 polyplex는 169.53 ± 49.92 nm이었다. 놀랍게도, 아르기닌-그래프트된 PAMAM G4 polyplex는 평균 직경이 102.64 ± 11.12 nm를 나타냈다.

PAMAM G4-His₁-Arg, PAMAM G4-His₂-Arg, 및 PAMAM G4-His₃-Arg 복합체의 크기는 각각 100.83 ± 22.81 nm, 111.83 ± 1.85 nm, 및 125.9 ± 11.52 nm 였다.

- [0131] 이러한 결과로부터, PEI25KD 및 native PAMAM G4를 포함하는, 합성된 PAMAM 유도체는 나노크기-사이즈의 복합체를 효과적으로 형성함을 알 수 있다.
- [0132] 도 4B에 도시한 바와 같이, PAMAM 유도체의 제타 포텐셜값은 히스티딘의 신장에 따라 증가하였고, PEI25KD는 높게 양성적으로 대전된 제타 포텐셜 30.6 ± 4.60 mV 을 나타냈고 PAMAM G4는 21.73 ± 0.93 mV을 보였다. 아르기닌- 및 히스티딘-결합된 PAMAM 유도체는 상기 native PAMAM G4와 비교하여 증가된 제타 포텐셜을 나타냈다. PAMAM G4-Arg에 대한 제타 포텐셜값은 24.93 ± 2.03 mV이었고, 복합체의 표면 전하 증가로부터 이 값도 증가하였다. PAMAM G4-His_(1,2,3)-Arg는 제타 포텐셜값을 각각 31.17 ± 3.46 mV, 33.73 ± 1.56 mV, and 37.47 ± 3.50 mV로 나타났다.
- [0133] 아르기닌의 구아니딘 그룹 및 히스티딘의 이미다졸 그룹이 각각 pKa 12.0 및 6.0을 가지기 때문에 His_(1,2,3)-Arg 결합된 PAMAM 유도체는 중성 조건에서 양성 전하를 나타낸다. 이는 PAMAM 유도체가 효과적으로 pDNA를 나노크기 사이드로 농축할 수 있고(약 100nm), 약 35mV의 제타 포텐셜을 가질 수 있음을 의미한다.
- [0134] 각 복합체의 실제 크기 및 모양을 AFM(atomic force microscopy)을 이용하여 관찰하였다.
- [0135] PEI25KD는 대부분 구형상을 나타냈고 일부 큰 복합체가 관찰되었다. 특히, PAMAMG4-Arg는 매우 치밀한 입자 사이즈를 가졌고(<100 nm), native PAMAM G4와 비교하여 좁은 크기의 분포(narrow size distribution)를 보였다.
- [0136] PAMAM G4 및 His₃-Arg-결합된 PAMAM G4는 대부분 동일 크기의 분포를 나타냈고(100-200 nm), 이는 DLS(dynamic light scattering) 결과보다 약간 큰 것이었다. 이러한 DLS 및 AFM images 사이의 크기 분포의 차이는, AFM images 이미지가 통상적으로 염이 존재하는 버퍼가 아닌 탈이온화된 물에서 제조된 탈수된 복합체(dehydrated complex)로부터 획득되기 때문으로 생각된다. 이는 DLS 실험에 비해 비자연적인(unnatural) 조건이다.

[0137] 실시예 4 : Native PAGE 분석

- [0138] 도 3B는 각 합성된 PAMAM 유도체의 상대적인 크기 분포를 보여준다.
- [0139] PAMAM 유도체의 양이온성 성질때문에 역극성 시스템(reverse polarity system)을 이용하였다.
- [0140] 양자화되는 시료에 대해 필수적인 산성 환경을 위해, 0.1M 시트르산 용액을 완충 시스템으로 사용하였고, 샘플을 폴리아크릴아미드 겔 상에 옮겼다.
- [0141] PEI25KD는 높은 다분산성 특성(polydispersity nature) 때문에 넓은 밴드를 보였고(레인 1), 레인 2, 3 및 4는 각각 PAMAM G4, PAMAM G5, 및 PAMAM G4-Arg를 나타낸다. 이들을 대조군 그룹으로 표시하였다. 레인 5, 6 및 7은 각각 PAMAM G4-His₁-Arg, PAMAM G4-His₂-Arg, 및 PAMAM G4-His₃-Arg를 나타낸다.
- [0142] PAGE 결과는 다른 크기 분포들이 히스티딘 컨쥬게이션 수 증가에 따라 나타남을 보여주었다. PAMAM G4-His₃-Arg는 다른 낮은 분자량의 유도체보다 덜 이동되었다. 이러한 PAGE 결과는 PAMAM 유도체간 크기분포 비교 및 정량적 접근에 도움이 된다.

[0143] 실시예 5 : PAMAM G4 유도체의 적정

- [0144] 히스티딘의 이미다졸기는 pKa 6.0의 값을 가지므로 생리적 pH에서 일차 아민기보다 훨씬 덜 양자화된다. 따라서, PAMAM 유도체 상의 히스티딘 유닛의 증가된 수는 산성 pH에서 완충 능력을 증가시키는데 중요한 역할을 한다. 이는 양성자 스폰지 효과의 관점에서, His_(1,2,3)-Arg 결합된 PAMAM G4 유도체가 PAMAM G4 및 PAMAM G4-Arg보다 현저히 높은 완충력을 가지는 이유가 된다.
- [0145] His_(1,2,3)-Arg 결합된 PAMAM G4 유도체의 산-염기 적정 프로파일을 도 5에 도시하였다.
- [0146] PEI25KD이 가장 강한 완충능력을 보였고, native PAMAM G4는 덜한 완충 능력을 보였다. PAMAM G4 덴드리머에 아

르기닌이 그래프트될 때 완충 능력의 전체적인 감소가 나타났으나, pH 6~7 범위에서 완충 효과가 복구되었다. 그리고 pH 3.5~6 범위에서 히스티딘 수의 증가에 따라 완충 능력의 증가가 관찰되었다.

[0147] His_(1,2,3)-Arg 결합된 PAMAM G4 유도체가 상대적으로 PEI25KD보다 낮은 완충 능력을 보였지만, 약산성의 pH 범위에서는 히스티딘 잔기의 증가에 따라 완충 능력이 증가됨을 확인하였다. 또한, His_(1,2,3)-Arg 펩타이드의 컨쥬게이션이 양성자 완충 능력에 현저히 영향을 미쳤다.

[0148] 이러한 결과를 통해, 산성 조건에서 이미다졸 링의 양자화를 통하여, PAMAM G4-His_(1,2,3)-Arg 유도체의 양성자 완충 능력이 크게 증가함을 알 수 있다.

[0149] 실시예 6 : 세포독성(Cytotoxicity) 분석

[0150] PAMAM G4 유도체의 세포독성을 WST-1 분석에 기초하는 EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit를 이용하여 확인하였다.

[0151] WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate)은 포유동물 세포상에서 세포 독성 효과를 관찰하는데 이용된다. MTT 분석과 유사하게, WST-1는 미토콘드리아 숙신산-테트라졸리움 환원제와 반응하여 수용성 포마잔 염색이 이루어진다. MTT는 수-불용성 포마잔 염색을 형성하므로 WST-1 사용이 추가의 가용화 단계를 생략할 수 있어 더욱 편리하다.

[0152] 폴리머 벡터의 세포독성을 측정하기 위하여, HepG2, 293, NIH3T3, 및 HeLa 세포에서, 다양한 농도에서 PEI25KD, native PAMAM G4, 및 PAMAM G4-Arg를 PAMAM 유도체와 비교하였다(도 6).

[0153] 각 세포주는 폴리머 양을 증가시키면서 48시간 동안 배양하였다.

[0154] 그 결과, PEI25KD는 모든 세포에서 높은 독성을 나타냈고, PAMAM 유도체는 독성이 덜하였다. 이는 앞선 실험결과, 즉 유전자 전달 담체의 증가된 전하 밀도가 일반적으로 세포독성을 생산한다는 것과 일치한다.

[0155] 293 및 HeLa 세포에서 폴리머의 농도가 증가함에 따라 PAMAM G4-His₂-Arg는 약한 세포 독성을 보였지만, His_(1,2,3)-Arg 결합된 PAMAM 유도체는 모든 농도 수준에서 PEI25KD보다 훨씬 낮은 세포독성을 보였다.

[0156] 실시예 7 : 복합체(Polyplexes)의 세포 내 분포

[0157] 적절한 전하 비율에서 PAMAM G4 유도체를 Alexa Fluor 532-표지된 pDNA와 결합시키고(복합체 형성) HeLa 세포 내로 트랜스펙션시켜 복합체의 세포 내 분포를 분석하였다.

[0158] 37°C 하 24시간 배양 후, 복합체의 세포 내 분포를 공초점 현미경을 통해 확인하였다.

[0159] 도 7에 도시한 바와 같이 (- pDNA/- polymer) 샘플 그룹의 세포로부터는 아무런 신호를 획득하지 못했고, 이는 형광적으로 표지된 pDNA를 전달하는 폴리머의 결핍 때문이었다(A). 폴리머 벡터 없는 pDNA 전달 역시 세포질 또는 핵에서 아무런 신호가 나타나지 않았다(B). PEI25KD 복합체는 pDNA의 규칙적인 패턴을 보였으나, PAMAM G4 및 이의 유도체는 스팟의 pDNA 신호 패턴을 보였다(C, D). 이는 PEI25KD가 높은 양성자 완충 능력을 가지고 있어서 복합체가 엔도솜으로부터 세포질까지 쉽게 탈출할 수 있기 때문으로 생각된다. 그러나, PAMAM G4 및 이의 유도체는 이보다 덜한 양성자 완충 능력을 가지고 있기 때문에, PEI25KD 보다 엔도솜에 많이 위치하는 것으로 생각된다. 이러한 양성자 완충 능력차이 때문에, 24시간 트랜스펙션 후 세포에서 다른 위치에 자리하고 있는 것이다.

[0160] 또한, 도 7의 F,G,H에 도시하고 있는 바와 같이, 세포질 및 핵에서의 pDNA 신호는 히스티딘 신장 개수 증가에 따라 함께 증가한다. 가장 강한 pDNA 신호는 3개의 His 유닛과 결합되어 있는 PAMAM G4 덴드리머에서 나타났다(H). 그리고, 히스티딘 신장 개수에 따라 핵 내부의 pDNA 신호도 증가하였다.

[0161] 이러한 결과를 통해, PAMAM G4-Arg에 도입된 히스티딘 유닛이 핵에 대하여 세포 흡수 및 복합체의 위치화(localization)를 증가시킴을 알 수 있다.

[0162] **실시예 8 : 다른 세포주에서의 트랜스펙션 효율**

[0163] HepG2, 293, NIH3T3, 및 HeLa 세포들을 다양한 전하 비율에서 PAMAM G4 유도체와 배양하여 합성된 PAMAM G4 유도체의 트랜스펙션 효율을 측정하였다. 트랜스펙션 효율은 10% 혈청 존재 하 전체 세포성 단백질에 의해 나눈 발현된 루시페라제 활성으로 평가하였다.

[0164] PEI25KD, native PAMAM G4, 및 PAMAM G4-Arg를 대조군으로 사용하였다.

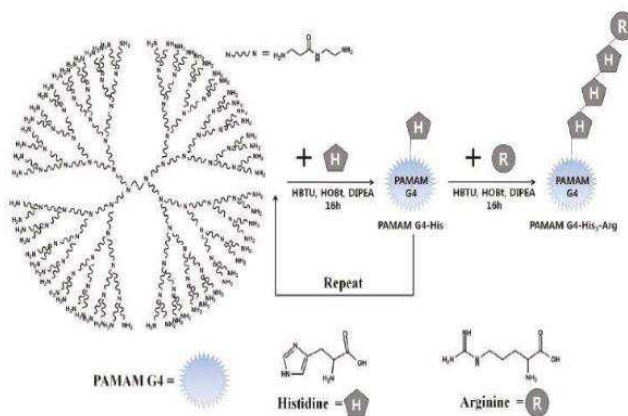
[0165] 도 8에 도시한 바와 같이, PAMAM G4 유도체는 대부분 native PAMAM G4 및 PEI25KD (N/P 비율 7:1)보다 높은 트랜스펙션 효율을 보였다.

[0166] 또한, PAMAM G4 유도체의 트랜스펙션 효율은 히스티딘 개수 및 전하 비율에 의존적임을 나타냈다. 가장 높은 트랜스펙션 효율은 HeLa 세포 중 N/P 비율 4:1에서 나타났고, HepG2, 293, 및 NIH3T3 세포에서는, PAMAM G4 유도체는 히스티딘 개수 및 전하 비율이 증가함에 따라 높은 유전자 발현을 보였다. 유전자 발현 주순에서 유의한 증가는 His_(1,2,3)-Arg 결합된 PAMAM G4 유도체에서 나타났다. 상기 유전자 발현 수준은 전하비율 8:1에서 PAMAM G4-Arg와 비교하여 10배까지 증가하였다.

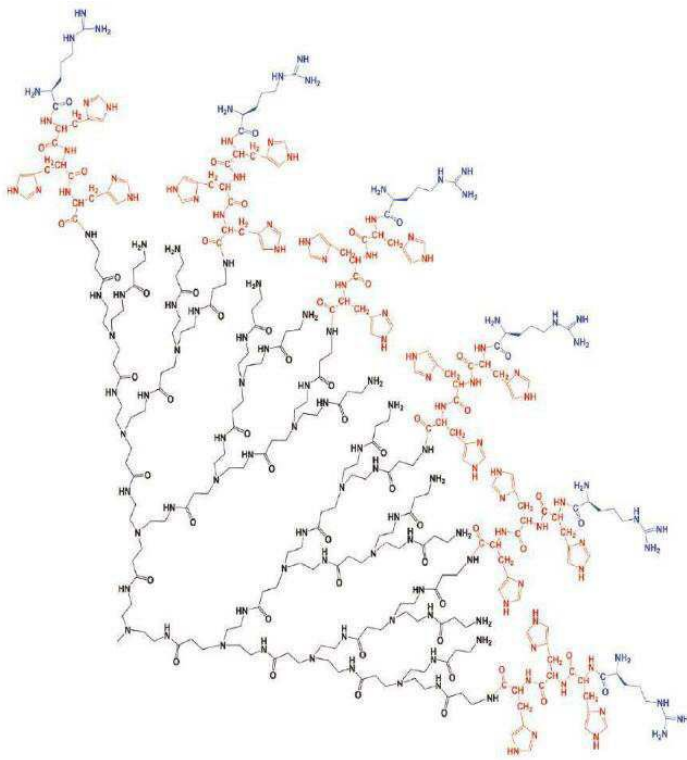
[0167] 이러한 결과들을 통해 His_(1,2,3)-Arg 결합된 PAMAM G4 덴드리머는 유전자 트랜스펙션 효율을 개선하고, 이미다졸의 양성자 완충 효과가 복합체의 내구성을 향상시킬뿐만 아니라 복합체의 세포질, 핵 내로의 위치화를 강화시킬 수 있다.

도면

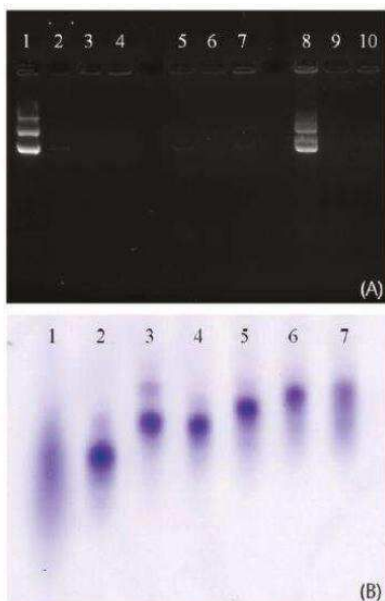
도면1



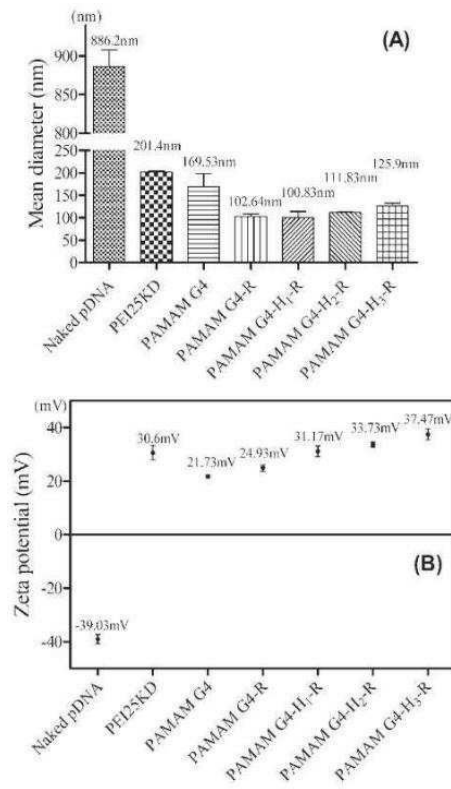
도면2



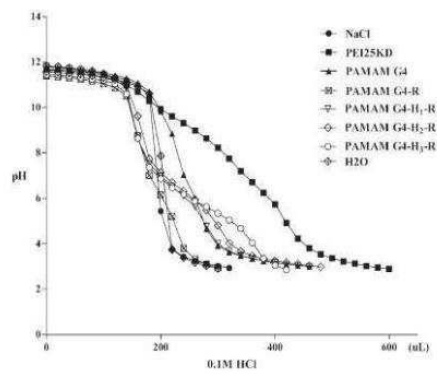
도면3



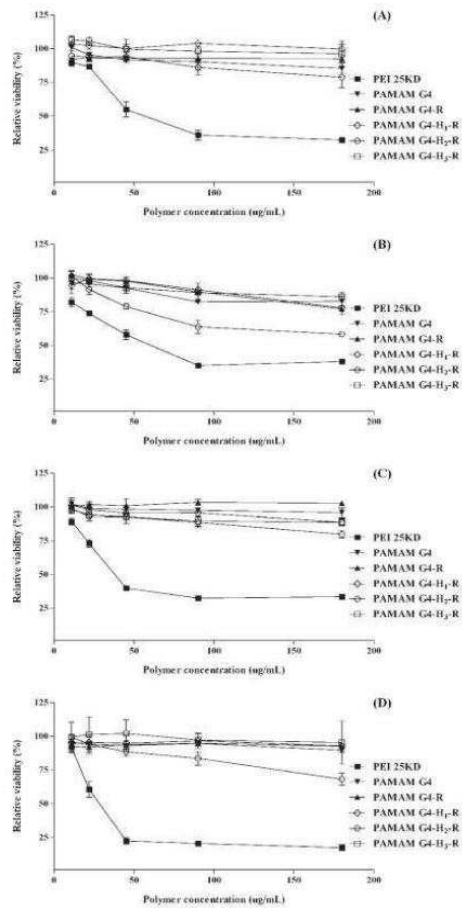
도면4



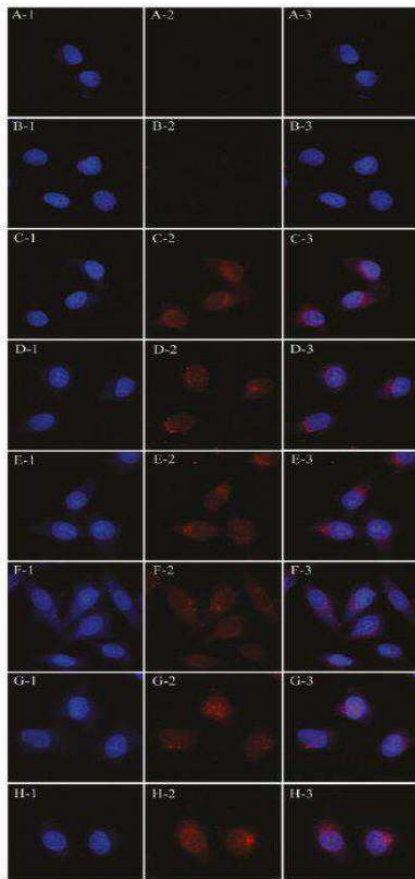
도면5



도면6



도면7



도면8

