(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0088614
(43) 공개일자 2012년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/573 (2006.01) *A61K 31/57* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0059244(분할)
(22) 출원일자 2012년06월01일
심사청구일자 2012년06월01일
(62) 원출원 특허 10-2008-0110851
원출원일자 2008년11월10일
심사청구일자 2009년11월13일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
한양대학교 산학협력단
서울 성동구 행당동 17 한양대학교 내
(72) 발명자
이민형
경기도 과천시 별양동 주공아파트 507동 702호
최준식
대전광역시 서구 둔산동 샘머리아파트 201동 704호
김현아
서울특별시 강서구 화곡4동 788-20
(74) 대리인
남호현

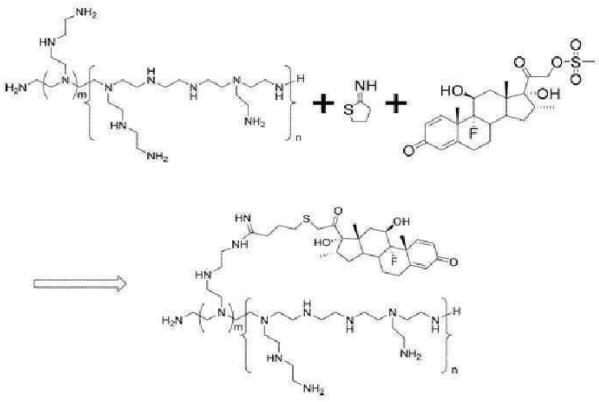
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **항염증성 글루코코르티코이드와 양이온성 고분자의 접합체를 포함하는 염증성 질환 치료용 유전자 전달체**

(57) 요 약

본 발명은 양이온성 고분자를 포함하는 비바이러스성 유전자 전달체에 관한 것이다. 항염증성 글루코코르티코이드와 양이온성 고분자의 접합체를 포함하는 염증성 질환 치료용 유전자 전달체를 제공한다. 본 발명에 따르는 항염증성 유전자 전달체는 유전자 전달과 동시에 항염증 약제가 작용하여 기존 유전자 전달체로 유전자치료를 하는 것 보다 더 우수한 항염증 치료 효과를 얻을 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	CR070027
부처명	서울시정개발연구원
연구사업명	기술기반구축(핵심)사업
연구과제명	나노바이오 하이브리드 재료기반 치료제제 및 진단영상기술 개발
주관기관	한양대학교산학협력단
연구기간	2007.08.01 ~ 2008.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

5kDa 이하 분자량의 폴리에틸렌이민 및 덱사메타손이 결합되어 상승된 항염증능을 가지는 접합체를 함유하는, 염증성 질환 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 항염증성 유전자 DNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 치료용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 조성물은 덱사메타손 또는 항염증성 유전자 DNA 단독 사용에 비교하여 유전자 전달 효율 및 항염증능이 증가하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 치료용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 폴리에틸렌이민에서의 질소(N)/DNA에서의 인(P)의 비율이 1:8 내지 1:15인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 염증성 질환은 급성 폐손상인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 치료용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비바이러스성 유전자 전달체에 관한 것이며, 더 구체적으로 염증성 질환 치료용 항염증성 비바이러스성 유전자 전달체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] DNA 재조합 기술의 발달로 외래의 핵산을 세포 내 또는 시험관 내에서 발현시키는 기술이 상용화되었으며, 이 같은 기술을 이용하여 세포 제어의 관찰, 재조합 단백질의 대량 생산, 유전자의 클로닝, 결실되거나 존재하지 않는 유전자의 교체 또는 세포 제어의 저해나 활성화 등 다양한 활용이 가능하게 되었다.

[0003] 그 중에서도 환자가 가진 특정 유전자의 이상으로 인한 질병의 치료를 위하여 환자의 특정 세포 내에 있는 유전자를 조작하는 치료법인 유전자 치료는 질병의 새로운 치료 방법으로서 제시되어 지난 십 수년간 다양한 방법의 유전자 전달 수단의 연구가 이루어지고 있다. 유전자 치료를 위한 다양한 방법들이 저명한 저널에서 제시되어 있다. (예를 들어, Mountain, Trends in Biotech., 18:119-128, 2000; Romano et al. Stem Cells, 18:19-39, 2000 등 참조)

[0004] 유전자 치료의 핵심적인 요소는 치료 효과를 나타내는 치료 유전자와 치료 유전자를 안전하고 효율적으로 인체에 전달해 줄 수 있는 유전자 전달체 (또는 전달 물질 또는 시스템)이다. 유전자 전달 시스템의 선택은 치료 유전자를 표적기관에 효과적으로 전달하는 문제와 그 유전자가 적당한 세포에 거부반응 없이 받아들여져 발현을 일으켜 목적하는 치료 효과를 거두는 문제에 관한 것이다. 실제로 유전자 치료의 성공을 위하여 새로운 전달 시스템을 개발하는 것이 유전자 치료 분야에서 주요 문제로 인식되어 있다. (예를 들어, Wilson et al. Nature, 365, 691, 1993; Rolland, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 15:143-198, 1998 등 참조) 이러한 유전자 전달체 또는 시스템은 경우에 따라 '벡터'라는 용어를 사용하여 지칭되기도 한다.

[0005] 숙주에 대한 감염성이 그 속성인 바이러스를 변형하여 병원성을 제거하고 전달 유전자를 삽입하여 제조되는 바이러스성 벡터는 그 모체가 되는 바이러스의 종류에 따라, 아데노 바이러스, 레트로바이러스, AAV (adeno-associated virus) 벡터 등이 있다. 이들 바이러스성 벡터는 바이러스의 속성이 감염성이기 때문에 유전자를 전달하는 효율은 우수하지만, 전달할 수 있는 유전자 크기가 제한된다는 점, 숙주의 염색체 내에 삽입되었을 때

돌연변이 유발 가능성이 높고, 따라서 감염성 바이러스의 생성 가능성 및 숙주 내 염증 반응 유발 가능성이 있다는 점, 면역반응을 유발의 위험성, 바이러스 유전자의 재조합에 의한 암유발유전자의 활성화의 가능성 등의 위험요소가 많아 그 사용이 제한적이다. (예를 들어, Kremer et al., British Medical Bulletin 51:31-44, 1995; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807-838, 1995 참조) 더욱이, 생산과정이 복잡하여 상업화를 위한 높은 생산 단가 등의 해결하기 쉽지 않은 문제가 많이 있기 때문에 임상에 사용되기까지는 많은 문제점들이 있다.

[0006] 이 같은 문제점을 극복하기 위하여 바이러스성 벡터에 대한 대안으로 개발되어 온 비바이러스성 유전자 전달 시스템은 면역반응 및 유전자재조합에 의한 암유발유전자의 활성화 등의 문제점으로부터 자유롭고, 전달할 수 있는 유전자의 크기에도 제한이 없고 여러 가지형태로의 변형이 가능하며 제작 비용의 낮은 단가 등의 여러 장점을 가지고 있다. 그러나, 비바이러스성 벡터는 바이러스성 벡터와 비교하면 유전자 전달 효율이 낮다는 문제점이 있다.

[0007] 이 같은 비바이러스성 벡터들은 물리적 전달 방법에 의하여 유전자를 전달하며, 사용되는 재료에 따라 리포좀 전달체 및 고분자 전달체로 대별되며, 각각 양이온성 리포좀 및 양이온성 고분자를 포함한다. 가장 일반적인 유전자 치료 물질인 DNA 전달의 경우, 벡터의 높은 양전하는 음전하를 띠는 DNA와의 전기적 결합을 용이하게 하여 벡터-DNA 복합체 (complex)를 형성하며 이 복합체가 DNA를 세포 안으로 들어가도록 한다.

[0008] 최근에는 비바이러스성 벡터가 특정 질병 또는 장기 특이적으로 유전자를 전달할 수 있는 고효율의 전달체가 될 수 있도록하기 위하여 여러 종류의 펩타이드, 리간드 등과 접합시켜 변형시킨 다양향 벡터의 개발이 활발하다.

[0009] 한편, 글루코코르티코이드(glucocorticoids: GC)는 세포 내 리셉터의 일종인 글루코코르티코이드 리셉터(glucocorticoid receptor: GR)에 결합하는 능력을 가진 일군의 스테로이드 호르몬 부류로 정의된다. GR이 관여하는 유전자 발현 조절은 핵 리셉터를 통하여 유전적으로 매개되는 느린 경우 또는 막 결합 리셉터 특정 리간드를 통하여 비유전적으로 매개되는 빠른 경우 둘 모두 존재 한다. 전자의 경우에는 글루코코르티코이드 리셉터와 리간드가 결합하여 복합체를 형성하여 핵 안으로 이동한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 종래의 양이온성 유전자 전달체는 단순히 유전자 전달 기능을 수행하는 수단으로만 인식되었고, 질병 또는 특정 표적에 대한 선택성을 높이려는 방향의 개발은 활발한 반면, 전달 기능에 더하여 유전자 치료의 효율을 높일 수 있는 기능은 특별히 제시되지 않고 있다.

[0011] 특히, 염증성 질환의 유전자 치료에 있어서, 유전자 전달과 병용하여 필요 약물 치료를 동시에 할 수 있는 전달체가 없어 상대적으로 유전자 치료의 효율성이 떨어져 임상 이용에 어려움이 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 이에, 본 발명자들은 리간드-리셉터 매개 이동에 의하여 비바이러스성 벡터의 전달 효율을 높이는 동시에, 접합된 항염증성 글루코코르티코이드는 항염증 약으로서의 기능도 할 수 있다는 가설 하에 염증성 질환의 치료제로서 사용될 수 있는 항염증성 글루코코르티코이드를 양이온성 고분자에 접합하여 비바이러스성 벡터를 제작하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0013] 따라서, 한 양태에서 본 발명은 글루코코르티코이드와 양이온성 고분자의 접합체를 포함하는 염증성 질환 치료용 항염증성 유전자 전달체를 제공한다. 본 발명에 따라 글루코코르티코이드가 갖는 항염증 효과와 양이온성 고분자의 유전자 전달 효과를 동시에 가지는 항염증성 유전자 전달체를 제공할 수 있으며, 이로써 염증성 질환의 더 효과적인 유전자 치료 방법을 제공한다.

[0014] 한 양태에서 본 발명의 항염증성 유전자 전달체에 포함되는 양이온성 고분자는 비바이러스성 유전자 전달체로서 일반적으로 사용되는 어떤 양이온성 천연 또는 합성 고분자 중에 바람직하게 선택될 수 있다. 비바이러스성 벡터의 구성물질로 주로 사용되는 양이온성 고분자는 직선형 고분자와 분지형 고분자가 있는데, 직선형 고분자의 예로는 PLL(poly-L-lysine), PVP(poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium bromide), 직선형 폴리에틸렌이민(PEI)(linear polyethyleneimine), 키토산, 폴리(디메틸아미노에틸 메틸아크릴레이트)(PDMAEMA: poly(dimethylaminoethyl methylacrylate)) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 분지형 고분자의 예로는 폴리에틸렌이민 (PEI: polyethyleneimine), 폴리아미도아민 (PAMAM: polyamidoamine), 파단된(fractured) PAMAM 등

이 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명의 다른 양태에서, 우수한 항염증 기능과 함께 고 효율의 유전자의 전달을 위하여 본 발명의 항염증성 유전자 전달체에 포함되는 양이온성 고분자는 폴리에틸렌이민 (PEI), 파단된 PAMAM 등이 특히 바람직하다.

[0016] 또한, 본 발명의 항염증성 유전자 전달체에 사용되는 양이온성 고분자는 생체 내에서 분해가 용이한 고분자일 수 있다. 비바이러스성 벡터에서 양이온성 고분자로 널리 사용되는 폴리에틸렌이민을 사용하는 경우, 폴리에틸렌이민의 생체 내 독성을 감소시키기 위하여 분해가 용이한 저분자량의 폴리에틸렌이민을 사용할 수 있다. 분자량이 10 kDa 이하, 바람직하게는 5 kDa 이하의 저분자량 폴리에틸렌이민을 본 발명에서 바람직하게 사용할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서 저분자량 폴리에틸렌이민은 2 kDa이다.

[0017] 본 발명의 항염증성 유전자 전달체에 포함되는 항염증성 글루코코르티코이드는 대표적인 천연 글루코코르티코이드인 코르티졸로 알려진 하이드로코르티손과 같은 천연 글루코코르티코이드 뿐 아니라 글루코코르티코이드 리셉터와 결합능이 있고 동시에 항염증 효능을 나타내는 어떤 합성 및 천연 글루코코르티코이드를 포함한다.

[0018] 코르티졸(Cortisol)은 사람에게 가장 중요한 천연 글루코코르티코이드인데, 생존에 필수적이며, 다양한 심혈관, 대사, 면역 및 항상성과 관련된 기능을 조절하고 보조한다. 인체에서 코르티졸의 다양하고 중요한 기능 때문에 종종 이와 관련된 질병 치료에서 중요성이 크며, 이와 같은 의약적 필요에 의하여 다양한 합성 글루코코르티코이드가 개발되었다.

[0019] 본 발명의 한 양태에서 항염증성 유전자 전달체에 포함되는 글루코코르티코이드는 하이드로코르티손, 덱사메타손, 베타메타손, 프레드니손, 프레드니졸론, 메틸프레드니졸론, 트리암시놀론, 비클로메타손, 및 코르티손아세테이트로 구성된 군으로부터 바람직하게 선택될 수 있다. 가장 바람직하게는 항염증성 글루코코르티코이드로서 덱사메타손을 사용할 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 양태에서는 본 발명의 항염증성 유전자 전달체 및 전달 유전자를 포함하는 항염증성 유전자 전달 복합체를 제공한다. 본 발명의 유전자 전달체가 전달하는 유전자의 종류는 한정되지 않는다. 본 발명의 목적에 따라 원하는 표적에 전달될 수 있는 어떠한 유전자도 본 발명의 범위에 있다.

[0021] 본 발명의 한 구체예에서 독성이 거의 없는 저분자량 폴리에틸렌이민(polyethylenimine: PEI)과 글루코코르티코이드 계열의 덱사메타손을 접합시켜 제조된 항염증성 유전자 전달체는 고효율의 유전자 전달을 수행하는 것으로 확인되었다. 또한 덱사메타손을 양이온성 고분자에 접합하여 하나의 전달체로 만든 후에도 덱사메타손 본래의 항염증 약효를 가지고 있는 것을 확인하였다.

[0022] 따라서, 본 발명의 일 구체예로서, 5kDa 이하 분자량의 폴리에틸렌이민 및 덱사메타손이 결합되어 상승된 항염증능을 가지는 접합체를 함유하는, 염증성 질환 치료용 조성물을 들 수 있다. 상기 조성물은 덱사메타손 또는 항염증성 유전자 DNA 단독 사용에 비교하여 유전자 전달 효율 및 항염증능을 현저히 증가시킨다.

[0023] 그러므로, 염증성 질병의 유전자 치료에 있어서 본 발명의 유전자 전달체를 사용하는 경우, 유전자 전달과 동시에 항염증 약제가 작용하여 기존 유전자 전달체로 유전자치료를 했을 때 보다 더 좋은 치료 효과를 얻을 수 있다. 또한 항염증 약물의 추가적인 투여로 인한 번거로움을 경감할 수 있는 큰 장점이 있다. 유전자 치료 자체가 환자에게는 매우 번거로운 경우가 대부분이므로 추가적 투여의 부담에서 벗어나는 것은 중요하다.

[0024] 게다가, 이러한 다기능성 유전자 전달체의 성질을 갖는, 항염증성 글루코코르티코이드와 양이온성고분자의 접합체는 다양한 약물 또는 표적지향적 리간드와 접합시켜 변형시켜 응용 할 수 있으며, 고효율의 항염증 유전자 치료에 응용할 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명은 유전자 전달의 기능과 항염증 효과를 동시에 가지는 항염증성 유전자 전달체를 제조하여, 염증성 질환의 보다 효과적인 유전자치료 수단을 제공한다.

[0026] 글루코코르티코이드가 접합된 양이온성 고분자 유전자 전달체는 비바이러스성 전달체가 가지는 면역반응으로부터의 안전성, 효율대비 낮은 가격등의 장점을 가지는 동시에, 염증반응 억제 약물 효과를 얻을 수 있는 고효율의 유전자 전달체로서 각종 다양한 염증성 질환의 유전자 치료에 응용할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명의 유전자 전달체는 다른 종류의 고분자, 약물 등을 연결하여 변형시킬 수 있으므로 장기 또는 세포 선택적 유전자 전달체 등 보다 개선된 유전자 치료 방법에 사용할 수 있고 여러 염증성 질병에 응용할 수 있

다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 폴리에틸렌이미-덱사메타손 (PEI-Dexa) 접합체 합성 반응식이다.

도 2는 본 발명에 따르는 PEI-Dexa 접합체의 트랜스펙션 효율을 확인하기 위하여 PEI-Dexa 접합체 또는 대조군 전달체를 사용하여 루시퍼라제 DNA 트렌스펙션을 수행한 후 루시퍼라제 활성을 측정하여 표시한 그래프이다. 도 2a는 N(PEI 중의 질소)/P (DNA 중의 인) 비율의 변화에 따른 트렌스펙션 효율을 나타낸다. 도 2b는 저분자량(2 kDa) PEI 및 고분자량(25 kDa) PEI과 본 발명의 PEI-Dexa를 전달체로 사용하는 경우의 트렌스펙션 효율을 비교하여 나타낸다.

도 3은 본 발명에 따르는 유전자 전달체의 한 양태인 PEI-Dexa의 세포독성 유무를 실험한 MTT 검정 결과를 나타내는 그래프이다. 대조군으로서는 유전자 전달체 없는 DNA 단독, 저분자량(2 kDa) PEI 및 고분자량(25 kDa) PEI를 사용하였다.

도 4는 폐 상피조직 세포에서 PEI-Dexa의 항염증 효과를 나타내는 막대그래프이다. 염증반응에 관여하는 사이토카인 중 도 4a는 TNF-α 도 4b는 IL-6, 도 4c는 IL-1b에 대한 ELISA를 수행한 결과이다.

도 5는 동물모델을 사용하여 PEI-Dexa 접합체의 유전자 전달 효율을 확인하기 위하여 마우스에서 PEI-Dexa 접합체 또는 대조군 전달체를 사용하여 루시퍼라제 DNA 트렌스펙션을 수행한 후 루시퍼라제 활성을 측정하여 표시한 그래프이다. 도 5a는 본 발명의 PEI-Dexa와 DNA의 N(PEI 중의 질소)/P (DNA 중의 인) 비율의 변화에 따른 트렌스펙션 효율을 나타낸다. 도 5b는 저분자량(2 kDa) PEI 및 고분자량(25 kDa) PEI과 본 발명의 PEI-Dexa를 전달체로 사용하는 경우의 트렌스펙션 효율을 비교하여 나타낸다.

도 6은 급성폐손상 마우스 모델에서의 PEI-Dexa의 항염증 효과를 염증관련 사이토카인인 TNF-α(도 6a 및 6b) 및 IL-6 (도 6c 및 6d)의 ELISA에 의하여 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하의 실시예를 통하여 본 발명의 특정 구체예를 설명한다.

[0030] 본 명세서에서 사용된 용어는 일반적, 사전적 의미로 한정하여 해석되어서는 안되며 본 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위하여 특정 용어의 개념을 적절한 범위 내에서 정의할 수 있다. 본 명세서 또는 당업계 종래 기술을 고려하면 여기에서 개시하는 본 발명의 범위 내에 있는 다양한 균등 또는 변형된 구체예들 또한 당업자에게 자명하다. 이하에 기재하는 구체예는 예시적인 목적으로 기술된 것일 뿐이며, 본 발명의 범위는 오직 특허청구범위에 의하여만 한정된다.

[0031] <실시예>

[0032] <u>실시예 1: 덱사메타손이 접합된 polyethylenimine (PEI-Dexa)의 합성</u>

[0033] 저분자량 폴리에틸렌 이민(PEI)과 덱사메타손(dexamethasone: Dexa)의 접합체를 다음과 같이 합성하였다. 저분자량 폴리에틸렌이민(PEI)을 2배 분자량의 트라우츠 시약(Traut's reagent)과 덱사메타손-21-메실레이트(dexamethasone-21-mesylate)가 들어있는 1.8 mL의 무수 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 녹였다. 교차결합의 부수 반응을 최소화하기 위하여 무수 DMSO를 사용하였으며, 반응과정의 습도를 최소화하였다. 4시간 동안 실온에서 반응 후, 과량의 차가운 에틸아세테이트로 반응을 중단시켰다. 이 과정에서 생산된 산물을 물에 녹인 후 투석막을 이용하여 하룻동안 투석하였다. 이것을 동결건조하여 하얀색 가루형태의 최종 산물을 얻었다. 60%의 수득률을 나타내었다.

[0034] <u>실시예 2: 폐 조직세포로의 유전자 전달 효과확인</u>

[0035] 제조된 유전자 전달체의 효과를 확인하기 위하여 폐 상피조직 세포주인 L2 세포로 트랜스펙션(transfection)을 실시하고, 최적의 트랜스펙션 효율을 보여주는 전달체/DNA 복합체 비율을 조사하였다. 게다가, 본 실시예에서 PEI-Dexa의 기본 구성 성분으로 사용한 2kDa PEI와 업계에서 통상적으로 사용되고 있는 비바이러스성 유전자 전달체인 25kDa PEI의 트랜스펙션 효율을 비교하였다.

[0036] (1) 최적의 트랜스펙션 복합체 성분비 결정

[0037] 구체적으로, 핵산 전달 효율은 리포터 유전자인 루시퍼라아제 DNA(pCMV-Luc)를 포함한 상기 복합체를 세포에 처리한 후, 발현된 루시퍼라아제의 양을 검출함으로써 측정하였다. 구체적으로, 복합체를 처리하기 약 24 시간 전에 페니실린, 스트렙토마이신 1%, 10% 혈청이 첨가된 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양한 L2 세포 $1x10^5$개를 12-웰 플레이트(well plate)의 각 웰에 분주하고, 플레이트의 약 70% 정도로 세포가 자랄 때까지 37℃ 및 5% CO_2의 조건하에서 약 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 웰로부터 배지를 제거하고, 혈청이 첨가되지 않은 배지 1ml을 분주하여 세척한 다음, 같은 배지 1 ml을 각 웰에 분주하여, 상기 핵산 전달 복합체 인 PEI-Dexa와 DNA를 비율별로 (도 2) 첨가하여 4 시간 동안 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 4 시간 후에 1% 페니실린, 스트렙토마이신, 10% 혈청 함유 배지 1mℓ을 각 웰에 주입하여 24시간 동안 37℃ 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 다음날 각 웰로부터 배지를 제거하고 세포를 인산 완충액 (PBS, pH 7.4) 1mℓ로 2번 세척한 다음, 120㎕의 1 X 용균 완충액(lysis buffer)으로 세포를 용균(lysis) 시켰다. 각각의 샘플을 잘 혼합한 후에 원심분리를 (13000rpm로 5분) 행하여, 상층액만 수집하였다. 이어서, 상기 상층액 50 ㎕를 첨가하여 가볍게 혼합한 후, 루시퍼라아제 기질용액 (Promega, 미국) 50 ㎕를 가한 후, 형광 루미노미터 (luminometer, Detection System GmbH, Pforzheim, Germany)를 사용하여 루시퍼라아제 활성을 측정하였다. 그 결과, 핵산 전달시 양이온 성폴리머:DNA의 최적 전달 효율를 알 수 있었다. PEI-Dexa 가 DNA를 세포 내로 전달하는 효율은 N/P 비율이 6/1일 때 가장 높아 이때의 비율을 선정하여 후술하는 2KDa PEI, 25KDa PEI 와의 핵산 전달 효율비교 및 독성실험을 하였다.

[0038] (2) 다른 전달체와의 트랜스펙션 효율 비교

[0039] 상기 (1) 절에서 제시한 실험방법과 동일한 조건에서 2KDa PEI, 25KDa PEI 와 핵산 전달 효율을 비교하였다. PEI-Dexa는 위와 같은 조건으로 행하였으며 2KDa PEI는 N/P 비율이 20/1 지점일 때를 기준으로, 25KDa PEI는 N/P 비율이 5/1 지점일 때를 기준으로 하여 DNA와 혼합하여 L2 세포 내로 전달하였다.

[0040] 그 결과 도 2(a)와 같이 6/1 N(PEI 중의 질소)/P (DNA 중의 인) 비율 1:6 지점에서 가장 트랜스펙션 효율이 높음을 확인하였다. 도 2(b)와 같이 2kDa PEI-Dexa의 트랜스펙션 효율은 상대적으로 독성이 더 강한 25kDa PEI와 거의 비슷하며, 2kDa PEI와 비교하면 트랜스펙션 효율이 1000배 정도나 높아 실용적으로 유의한 양의 유전자를 전달하여 유전자를 발현시킴을 알 수 있었다.

[0041] <u>실시예 3: PEI-Dexa의 독성 조사</u>

[0042] PEI-Dexa의 독성은 MTT 검정(Tetrazolium-based colorimetirc Assay)으로 확인하였다. PEI-Dexa의 독성을 확인하기 위하여 PEI-Dexa와 DNA 간의 복합체, 그리고 대조구로서 2kDa의 PEI와 DNA 간 복합체와 25kDa의 PEI와 DNA 간 복합체를 준비한 후, 이를 배양한 폐 상피조직 세포에 분주한 후 24시간 뒤에 MTT 검정을 수행하여 PEI-Dexa의 독성을 확인하였다.

[0043] 구체적으로, 1% 페니실린, 스트렙토마이신, 10% 혈청이 첨가된 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양한 L2 세포 $1x10^4$개를 24-웰 플레이트(well plate)의 각 웰에 분주하고, 플레이트의 약 70% 정도 컨플루언시로 세포가 자랄 때까지 37℃, 5% CO_2의 조건하에서 약 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 웰로부터 배지를 제거하고 , 혈청이 첨가되지 않은 배지 0.5ml을 분주하여 세척한 다음, 같은 배지 0.5 ml을 각 웰에 분주하여, N/P 비율을 PEI-Dexa와 DNA (6/1), 2 KDa PEI와 DNA (20/1) 그리고 25 KDa PEI와 DNA (5:1) 첨가하여 4 시간 동안 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 4 시간 후에 1% 페니실린 , 스트렙토마이신, 10% 혈청 함유 배지 0.5mℓ을 각 웰에 주입하여 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 배양 시작한지 24 시간 경과 후 2mg/ml의 MTT 용액을 주입한 후, 37℃에서 4 시간 동안 반응시켰다. 4 시간 후, MTT 용액이 첨가된 배지를 제거하고, DMSO를 750 ㎕ 주입한 후 5분 정도 50℃에서 반응시켰다. 그 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 하기 식에 따라 세포생존율을 구하였다.

[0044] 세포생존율 (%) = OD_{570}(샘플)/ OD_{570}(대조구) x 100

[0045] 도3과 같이 분자량 25 kDa인 PEI는 세포 생존율이 현저히 낮아지는 반면 본 발명의 PEI-Dexa는 유전자 전달 효율은 양호하면서 독성은 상대적으로 낮은 것으로 나타났다.

[0046] 실시예 4: PEI-Dexa의 항염증 효능

[0047] PEI-Dexa의 항염증 효능을 확인하기 위하여 배양한 대식세포에 염증을 유도하는 리포폴리사카라이드(Lipopolysscaride,LPS)를 분주한 후 PEI-Dexa와 DNA 복합체, 대조구로 2kDa PEI와 DNA 복합체를 준비하여 LPS를 분주했던 대식세포에 분주하고 24 시간 경과 후에 염증반응에 관여하는 대표적인 사이토카인인 TNF-α, IL-6, IL-1β의 ELISA 를 수행하여 PEI-Dexa의 항염증 효능을 확인하였다.

[0048] 도 4와 같이 PEI-Dexa와 DNA 복합체를 분주한 세포에서는 대조구인 2kDa PEI 보다 염증관련 사이토카인이 현저하게 낮은 양으로 측정되었다.

[0049] 실시예 5: 동물모델에서의 유전자 전달 효율 확인

[0050] 동물모델에서의 유전자 전달 효율을 확인하기 위하여 6주령 balb/c 수컷 마우스를 이용한 실험을 수행하였다. 전달체/DNA 복합체는 기도삽관을 통하여 폐로 전달하였으며, 최적의 유전자 전달 효율을 보여주는 PEI-Dexa/DNA 복합체 비율을 조사하였다. 뿐만 아니라 2kDa PEI/DNA복합체와 25kDa PEI/DNA복합체의 유전자 전달 효율을 비교하였다. 복합체 삽입 후 24시간 후에 폐 조직을 적출하여 루시퍼라제 분석(luciferase assay) 방법으로 전달효율을 확인하였다.

[0051] 그 결과 도 5의 (a)와 같이 1:8지점에서 유전자 발현 효율이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다.

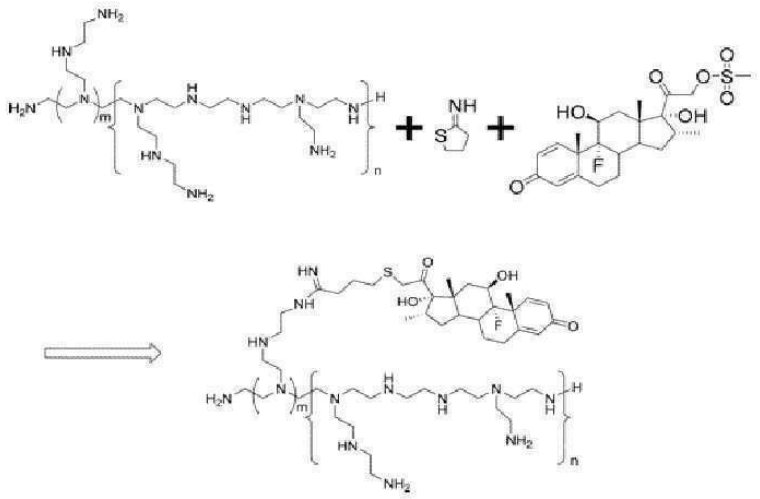
[0052] 도 5의 (b)와 같이 PEI-Dexa가 대조구와 비교하여 유전자 전달 효율이 가장 높음을 확인하였다.

[0053] 실시예 6: 동물모델에서의 PEI-Dexa의 항염증 효능 확인

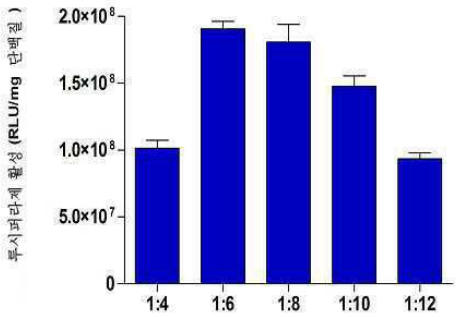
[0054] 동물모델에서 PEI-Dexa의 항염증 효능을 확인하기 위하여 6주령 balb/c 수컷 마우스를 사용하였으며 기도삽관 방법을 이용하여 LPS 10 마이크로그램을 폐로 전달 하여 급성 폐 손상을 만들었다. 그 후 PEI-Dexa와 DNA 복합체, 대조구로 2kDa PEI와 DNA 복합체를 준비하여 기도삽관 방법으로 폐로 전달하였으며, 24시간 뒤에 폐기관지세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)과 폐 조직을 채취한 후 염증반응에 관여하는 사이토카인 TNF-α, IL-6 의 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)를 수행하여 PEI-Dexa의 항염증 효능을 확인하였다. 도 6에서와 같이 PEI-Dexa와 DNA 복합체를 삽입한 급성폐손상 마우스 모델의 기관지세척액과 폐 조직에서 대조구인 2kDa PEI 보다 염증관련 사이토카인 TNF-a와 IL-6가 현저하게 낮은 양으로 측정되었다.

도면

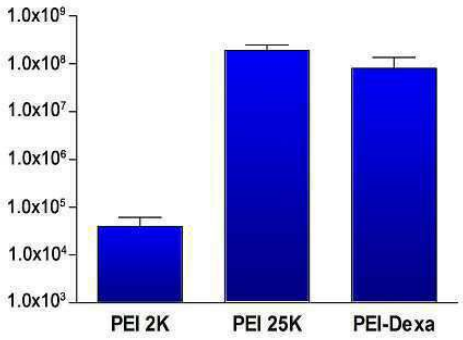
도면1



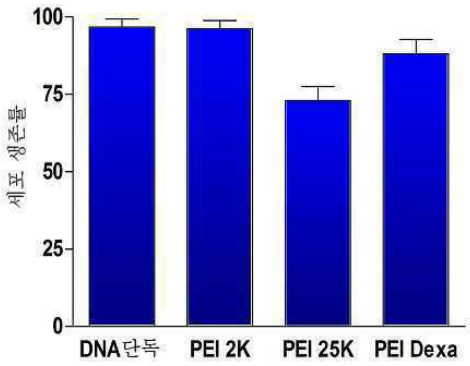
도면2a



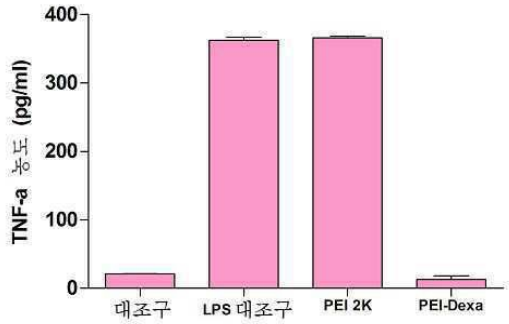
도면2b



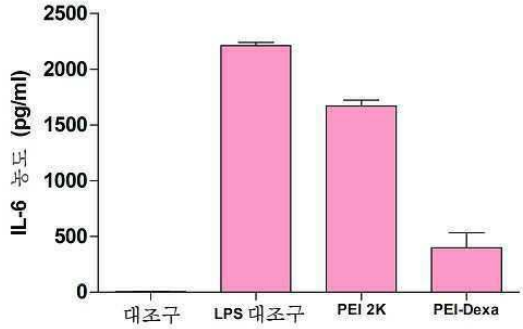
도면3



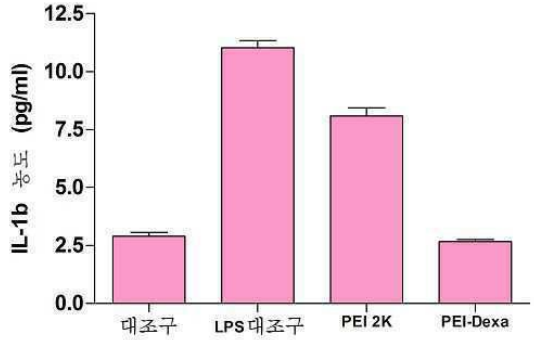
도면4a



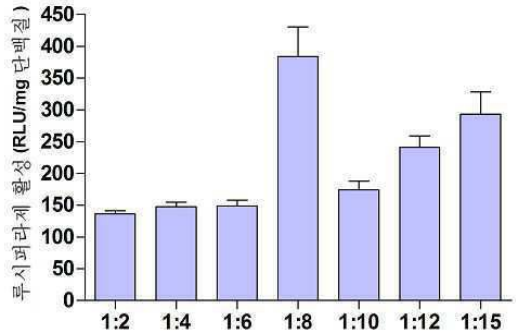
도면4b



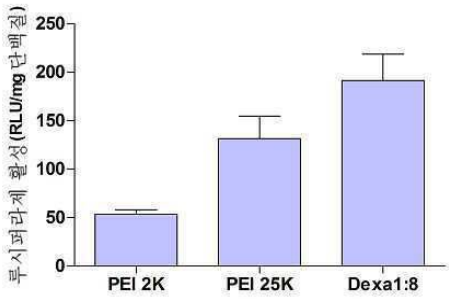
도면4c



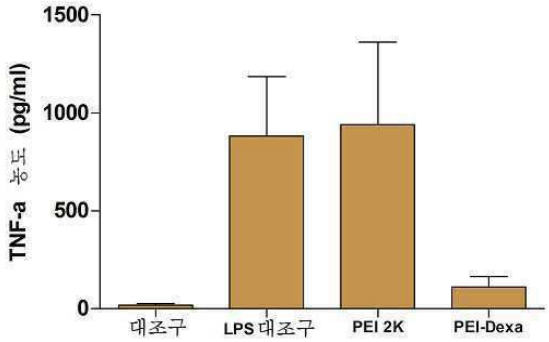
도면5a



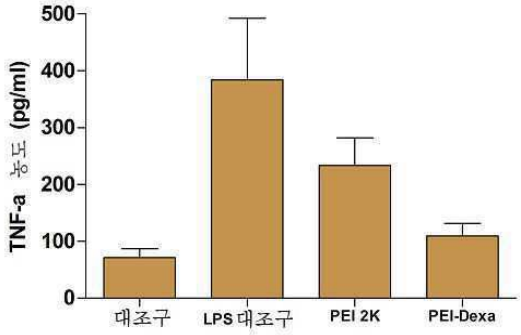
도면5b



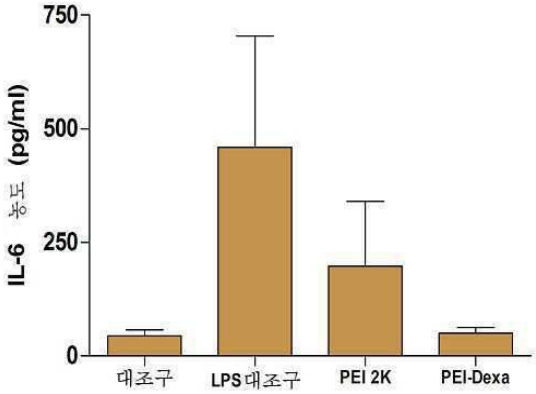
도면6a



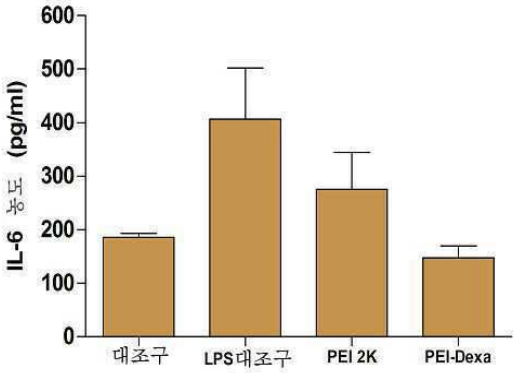
도면6b



도면6c


750
500
250
0
IL-6 농도 (pg/ml)
대조구
LPS대조구
PEI 2K
PEI-Dexa

도면6d


600
500
400
300
200
100
0
IL-6 농도 (pg/ml)
대조구
LPS대조구
PEI 2K
PEI-Dexa