



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월21일
(11) 등록번호 10-1484441
(24) 등록일자 2015년01월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/16 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)

A61K 47/30 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0008387

(22) 출원일자 2014년01월23일

심사청구일자 2014년01월23일

(56) 선행기술조사문헌

J. Control. Release, vol. 144, pp.

134-143(2010)

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

최준식

대전광역시 유성구 엑스포로123번길 65-38, 203동 1102호(도룡동, 스마트시티 아파트)

이영화

대전광역시 유성구 배울1로 13, 205동 1601호(관평동, 테크노밸리)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 15 항

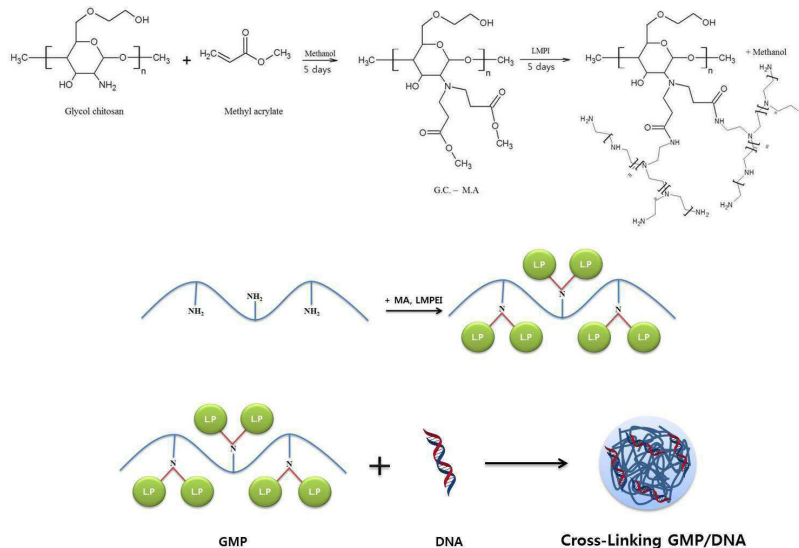
심사관 : 유준석

(54) 발명의 명칭 유전자 전달을 위한 GMP 나노입자

(57) 요약

본 발명은 비바이러스성 유전자 전달체 및 이의 용도에 대한 발명으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 트랜스펙션 효율이 높고 세포독성이 낮은 폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI) 기반의 양이온 중합체 GMP(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethyleneimine)를 이용하는, 비바이러스성 유전자 전달 시스템에 대한 발명이다. 본 발명에 따른 GMP(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethyleneimine)구조를 이루는 나노입자를 포함하는, 비바이러스성 핵산 전달용 중합체 및 이를 기반으로 하는 복합체는, 현저히 낮은 세포독성 및 높은 트랜스펙션 효율을 제공할 수 있어 효과적인 핵산 전달체로서 사용할 수 있으므로 세포 내 유전자 전달에 효율적인 바, 의학 산업상 매우 유용하다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0001496

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단

연구사업명 광역경제권선도산업육성사업

연구과제명 돼지 썩코 바이러스증과 폐렴 예방용 혼합백신 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)중앙백신연구소

연구기간 2012.06.01 ~ 2015.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

GC-MA-PEI(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethylenimine)구조를 이루는 GMP를 포함하는, 비바이러스성 핵산 전달용 중합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PEI는 PEI800D인 것을 특징으로 하는 비바이러스성 핵산 전달용 중합체.

청구항 3

(a) 메틸 아크릴레이트(methyl acrylate)와 글리콜 키토산(glycol chitosan)을 반응시키는 GC-MA(glycol chitosan-methyl acrylate) 합성단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 합성된 GC-MA(glycol chitosan-methyl acrylate)에 PEI(Polyethyleneimine)를 넣어 반응시키는 GC-MA-PEI(glycol chitosan-methyl acrylate-Polyethyleneimine) 합성단계;를 포함하는 GMP 합성방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 PEI는 PEI800D인 것을 특징으로 하는 GMP 합성방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 (a) 단계의 메틸 아크릴레이트는 메탄올과 실온에서 10분과 반응시킨 후, 증류수에 녹여진 상기 글리콜 키토산(glycol chitosan)을 첨가하는 것을 특징으로 하는 GMP 합성방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 (a) 단계는 상기 글리콜 키토산(glycol chitosan)을 첨가한 후, 반응용기 내부 기체를 질소 기체로 교환시키고, 교반 배양기에서 35~39℃, 150~200rpm으로 3~5일간 반응시키는 것을 특징으로 하는 GMP 합성방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 (a) 단계는 교반 배양기에서 반응 후, 메탄올을 증발기로 제거하고 투석한 후 동결건조하는 것을 특징으로 하는 GMP 합성방법.

청구항 8

제3항에 있어서,

상기 (b) 단계는 상기 (a) 단계에서 합성된 GC-MA(glycol chitosan-methyl acrylate)를 메탄올:증류수의 9:1(v:v) 혼합액에 용해시킨 후, 메탄올 30~70ml을 추가로 넣고 5~20분간 반응시키는 것을 특징으로 하는 GMP 합성방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 (b) 단계는 상기 메탄올을 추가로 넣고 반응시킨 GC-MAGlycol chitosan-methyl acrylate)에 PEI(polyethylenimine)을 넣고 반응 용기 내부 기체를 질소 기체로 교환시킨 후, 교반 배양기에서 35-39℃, 150-200rpm으로 4~6일간 반응시키는 것을 특징으로 하는 GMP 합성방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 (b) 단계는 교반 배양기에서 반응 후, 메탄올을 증발기로 제거하고 투석한 후 동결건조하는 것을 특징으로 하는 GMP 합성방법.

청구항 11

GC-MA-PEI(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethylenimine)구조를 이루는 GMP에 목적 유전자가 결합되어 있는 비바이러스성 핵산 전달용 복합체.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 목적 유전자는 DNA로 구성된 것을 특징으로 하는 비바이러스성 핵산 전달용 복합체.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 GMP:DNA 중량비는 0.5-20:1인 것을 특징으로 하는 비바이러스성 핵산 전달용 복합체.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 복합체는 100-800nm의 나노입자로 압축되는 것을 특징으로 하는 비바이러스성 핵산 전달용 복합체.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 PEI는 PEI800D인 것을 특징으로 하는 비바이러스성 핵산 전달용 복합체.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 비바이러스성 유전자 전달체 및 이의 용도에 대한 발명으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 트랜스펙션 효율이 높고 세포독성이 낮은 폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI) 기반의 양이온 중합체 GMP(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethyleneimine)를 이용하는, 비바이러스성 유전자 전달 시스템에 대한 발명이다.

배경기술

[0002]

유전자 치료(gene therapy)란 통상적인 방법으로는 치료가 곤란한 선천적 또는 후천적 유전자 이상을 유전공학적인 방법으로 치료하는 방법을 일컫는다. 보다 구체적으로, 유전자 치료는 선천적 또는 후천적 유전자 결함, 바이러스성 질병, 암 또는 심혈관계 질환 등과 같은 만성 질환의 치료와 예방을 위하여, DNA 및 RNA 등의 유전물질을 인체 내에 투여하여 치료 단백질을 발현시키거나 특정 단백질의 발현을 억제하도록 하는 치료 방법으로서, 질병의 원인을 유전자 차원에서 해석하여 근본적으로 치료할 수 있기 때문에 난치병의 극복은 물론 기존 의료 방식의 대체 수단으로 기대되고 있는 방법이다.

[0003]

이러한 유전자 치료가 일반적인 약물 치료와 다른 점은 유전자를 전달하는 수단인 유전자 전달체가 반드시 필요하다는 점이다. DNA 또는 RNA는 음전하를 띠고 있는 분자량이 큰 분자로서 생체 내에서 가수분해되기 쉬우며, 단독으로 세포 또는 조직 내로 투입되기가 용이하지 않으므로, 유전 물질의 세포 또는 조직 내로의 투입을 원활

하게 할 수 있는 전달 물질이 반드시 필요하기 때문이다. 따라서, 유전자 치료에서 가장 중요한 물질은 치료 유전자를 생체 내로 전달하는 유전자 전달체라 할 수 있다.

[0004] 이러한 유전자 전달 시스템은 크게 바이러스성 벡터-매개 시스템 및 비바이러스성 벡터-매개 시스템으로 분류될 수 있다.

[0005] 레트로바이러스(retrovirus) 또는 아데노바이러스(adenovirus) 등을 이용하여 만든 바이러스성 벡터는 세포 내로의 높은 형질 주입 (트랜스펙션(transfection)) 효율을 갖는다는 장점이 있으나, *in vivo* 에서 면역원성의 문제 및 유전자 재조합과 같은 내재적 문제점 등을 갖는다. 이러한 바이러스성 벡터의 안정성 문제를 극복하기 위하여, 다양한 중합체성 유전자 전달 시스템이 전통적인 바이러스성 벡터-기재 유전자 전달 방법에 대한 대안으로서 발달되어 왔다. 그러나, 중합체성 벡터는 엔도솜 탈출(endosomal escape) 및 핵 편재화(nuclear localization)와 같은 세포내 트래피킹(trafficking) 장벽을 갖는다는 문제점이 있다.

[0006] 양이온성 중합체는 유전자와 중합체-유전자 복합체를 형성하여 진핵세포의 트랜스펙션을 유도하게 된다. 그 구체적인 메커니즘은 중합체-유전자 복합체 표면의 양전하와 세포 표면의 음전하의 전기적 상호작용에 의하여 복합체가 세포 표면에 결합한 후 엔도솜으로부터 세포질로 유전자가 방출되는 것으로 고려된다. 이러한 양이온성 중합체의 구체적 예로서, 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리L-리신, 폴리아미노에스테르, 폴리아미도아민, 폴리프로필렌이민과 같은 양이온성 단일중합체 및 폴리에틸렌글라이콜(PEG)-블록-폴리L-리신 및 PEG-PEI 와 같이 상기의 단일중합체에 기초한 양이온성 블록 공중합체 또는 그래프트 공중합체 등을 들 수 있다.

[0007] 상기 중합체들은 플라스미드 DNA(pDNA)를 나노크기 입자로 응축시키고, pDNA 가 분해되지 않도록 이를 보호할 뿐만 아니라, 바람직하지 않은 상호 작용으로부터 pDNA 입자를 보호하고, 세포질 및 핵 내로의 세포내 전달을 강화시킬 수 있다는 장점이 있다. 그 중에서도, 폴리에틸렌이민(PEI)은 최근 유전자 치료 연구 분야에서 가장 광범위하게 사용되고 있는 비바이러스성 벡터라 할 수 있다.

[0008] 그러나, 중합체성 벡터는 엔도솜 탈출(endosomal escape) 및 핵 편재화(nuclear localization)와 같은 세포내 트래피킹(trafficking) 장벽이 있고, 세포 및 생체 독성이 크고 핵산 전달 효율이 낮다는 문제점이 있어왔다.

[0009] 이에, 본 발명자는 신규한 비바이러스성 유전자 전달체로서, 폴리에틸렌이민(PEI)을 기반으로 하여, 플라스미드 DNA(pDNA)를 효과적으로 압축하고 엔도솜에서 PEI/DNA 복합체를 신속하게 방출시킨다는 장점을 가지는 GC-MA-PEI(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethylenimine)의 신규 구조 복합체를 최초로 규명하고, 이러한 신규 복합체가 세포 독성 없이 유전자 전달 효율을 높일 수 있다는 점을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1035364호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 주요 목적은 유전자 전달 효율이 높고 세포 독성이 낮은, 우수한 비바이러스성 핵산 전달용 중합체 및 이의 용도를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 비바이러스성 핵산 전달용 중합체를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 비바이러스성 핵산 전달용 중합체가 핵산과 결합한 비바이러스성 핵산 전달용 복합체를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, GC-MA-PEI(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethylenimine)구조를 이루는 GMP를 포함하는, 비바이러스성 핵산 전달용 중합체를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PEI는 PEI800D일 수 있다.

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 또한, (a) 메틸 아크릴레이트(methyl acrylate)와 글리콜 키토산(glycol chitosan)을 반응시키는 GC-MA(glycol chitosan-methyl acrylate) 합성단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 합성된 GC-MA(glycol chitosan-methyl acrylate)에 PEI(Polyethyleneimine)를 넣어 반응시키는 GC-MA-PEI(glycol chitosan-methyl acrylate-Polyethyleneimine) 합성단계;를 포함하는 GMP 합성방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PEI는 PEI800D일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (a) 단계의 메틸 아크릴레이트는 메탄올과 실온에서 10분과 반응시킨 후, 증류수에 녹여진 상기 글리콜 키토산(glycol chitosan)을 첨가하는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (a) 단계는 상기 글리콜 키토산(glycol chitosan)을 첨가한 후, 반응용기 내부 기체를 질소 기체로 교환시키고, 교반 배양기에서 35~39℃, 150~200rpm으로 3~5일간 반응시키는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (a) 단계는 교반 배양기에서 반응 후, 메탄올을 증발기로 제거하고 투석한 후 동결건조하는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (b) 단계는 상기 (a) 단계에서 합성된 GC-MA(glycol chitosan-methyl acrylate)를 메탄올:증류수의 9:1(v:v) 혼합액에 용해시킨 후, 메탄올 30~70ml을 추가로 넣고 5~20분간 반응시키는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (b) 단계는 상기 메탄올을 추가로 넣고 반응시킨 GC-MA(glycol chitosan-methyl acrylate)에 PEI(polyethyleneimine)을 넣고 반응 용기 내부 기체를 질소 기체로 교환시킨 후, 교반 배양기에서 35~39℃, 150~200rpm으로 4~6일간 반응시키는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (b) 단계는 교반 배양기에서 반응 후, 메탄올을 증발기로 제거하고 투석한 후 동결건조하는 것일 수 있다.
- [0024] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 또한 GC-MA-PEI(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethyleneimine)구조를 이루는 GMP에 목적 유전자가 결합되어 있는 비바이러스성 핵산 전달용 복합체를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 목적 유전자는 DNA로 구성된 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 GMP:DNA 중량비는 0.5~20:1일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 복합체는 100~800nm의 나노입자로 압축될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PEI는 PEI800D일 수 있다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명에 따른 GMP(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethyleneimine)구조를 이루는 나노입자를 포함하는, 비바이러스성 핵산 전달용 중합체 및 이를 기반으로 하는 복합체는, 현저히 낮은 세포독성 및 높은 트랜스펙션 효율을 제공할 수 있어 효과적인 핵산 전달체로서 사용할 수 있으므로 세포 내 유전자 전달에 효율적인 바, 의학 산업상 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 GMP 나노입자 합성 반응을 나타내는 모식도이다.
- 도 2는 GC, GC-MA 및 GMP 나노입자의 ¹H NMR spectra 를 나타낸 것이다.
- 도 3은 GMP 나노입자와 플라스미드 DNA의 다양한 중량비에 따른 복합체 크기를 나타낸 것이다.
- 도 4는 GMP 나노입자와 플라스미드 DNA의 다양한 중량비에 따른 복합체의 제타 전위를 나타낸 것이다.
- 도 5는 GMP 나노입자와 플라스미드 DNA의 다양한 중량비에 따른 아가로스 겔 전기영동 결과이다.
- 도 6은 GMP 나노입자와 플라스미드 DNA의 다양한 중량비에 따른 피코그린 형광 정도를 나타낸 결과이다.
- 도 7은 HeLa 세포주(a), HEK293 세포주(b), HepG2 세포주(c)에서 GMP 나노입자의 세포독성을 나타낸 결과이다.

도 8은 HeLa 세포주(a), HEK293 세포주(b), HepG2 세포주(c)에서 GMP 나노입자의 트랜스펙션 효율을 나타낸 결과이다.

도 9는 HeLa 세포주에서 글리콜 키토산(대조군 1), PEI 25kD(대조군 2) 및 GMP 나노입자의 세포내 위치를 공초점 현미경을 이용하여 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

- [0032] "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.

- [0033] "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)" 또는 "핵산(nucleic acid)"이라는 용어는 리보뉴클레오티드 뿐만 아니라 디옥시리보뉴클레오티드 등 온갖 길이의 뉴클레오티드 중합체를 의미한다. 이 용어는 분자의 1차적 구조만을 의미하고, 따라서 이중 또는 단일 사슬의 DNA 또는 RNA를 의미한다. 이것은 또한 변형의 알려진 유형, 예를 들어 당해 분야에서 알려진 표지(label), 메틸화, "caps", 유사체의 하나 혹은 그 이상의 자연 발생의 뉴클레오티드 치환, 탈결합(예: methyl phosphonate, phosphotriester, phosphoamidate, carbamate, 등)과 결합(예: phosphorothioate, phosphorodithioate, 등), 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드(signal peptide), poly-Llysine, 등) 등의 부착물을 포함하는 것, 삽입물(예: 아크리딘, Psolalen, 등)을 가지는 것, 킬레이트(예: 금속원소, 방사성 금속원소, 붕소, 산화 금속원소, 등)를 가지는 것, 알킬화합물을 가지는 것, 변형된 결합(예: alpha anomeric 핵산, 등)을 가지는 것, 또한 폴리뉴클레오티드의 비변형을 포함한 뉴클레오티드 간 변형을 의미한다. 일반적으로, 본 발명에 의해 제공되는 핵산 부분은 지놈(genome)의 과편과 짧은 올리고뉴클레오티드 결합자 또는 일련의 올리고뉴클레오티드, 미생물 또는 바이러스 오페론(operon)이나 진핵세포 유전자로부터 유도된 조절인자(regulatory element)를 포함하는 재조합 전사 단위로 발현될 수 있는 합성 핵산을 제공하는 특유의 뉴클레오티드들로 구성될 것이다

- [0034] "벡터(vector)"라는 용어는 다른 핵산을 그것이 연관된 곳으로 운반할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. "발현 벡터(expression vector)"라는 용어는 벡터에 의해 운반된 각각의 재조합 유전자에 의해 암호화된 단백질을 합성할 수 있는 플라스미드, 코스미드(cosmid) 또는 파지(phage)를 포함한다. 바람직한 벡터는 연관된 핵산의 자가 복제와 발현이 가능한 것이다.

- [0035] "트랜스펙션(transfection)"은 배양동물 세포에 핵산(DNA, PNA 등)을 직접 도입하여 세포 내에서 유전형질을 발현시키는 방법을 의미한다. 본 발명에서는 상기 "트랜스펙션" 용어를, "형질감염", "세포내 전달" 등의 용어와 혼용하여 사용하고 있다. 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.

- [0036] "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.

- [0037] "루시페라아라제(luciferase)"는 루시페린의 산화를 촉진하여 화학에너지를 빛에너지로 전환시켜 광을 발산하게 하는 효소로, 생체 내에서 연속적, 실시간적으로 발현을 측정하고, 목적의 물질들에 대한 효과를 검증할 수 있게 하는 리포터 유전자(reporter gene) 기능을 한다. 반딧불이(firefly; 개똥벌레) 또는 딱정벌레(glow-worm)와 같은 곤충체로부터 직접 수득하거나 이러한 효소를 암호화하는 재조합 DNA 절편을 포함하는 미생물로부터의 발현에 의해 수득할 수 있다.

- [0038] "담체(carrier)"는, 생물체 내에 있는 활성물질이 다른물질과 결합하여 존재하는 경우, 또는 세포막을 통한 물질의 이동인 운반체수송을 담당하는 고분자 물질을 총칭한다. 담체의 예로는 비제한적으로 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산과 같은 완충제, 아스코르브산과 같은 항산화제, 저분자량 폴리펩티드(약 10 잔기 미만), 혈청 알부민, 젤라틴 또는 변역글로불린과 같은 단백질, 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 폴리머, 글리신 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산, 단당류, 이당류 및 글루코스, 만노스, 또는 텍스트

린을 포함하는 다른 탄수화물, EDTA와 같은 킬레이트화제, 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당알코올, 나트륨과 같은 염-형성 반대이온(salt-forming counterion), 및/또는 TWEEN, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 및 PLURONICS 같은 무이온 계면활성제를 포함한다.

- [0039] "치료"는 임상 결과를 포함하여 이로운 또는 원하는 결과를 수득하기 위한 접근법이다. 질환, 장애 또는 병태의 "치료" 또는 "완화"는, 장애를 치료하지 않는 것과 비교하여, 병태, 장애 또는 질환 상태의 정도 및/또는 바람직하지 않은 임상 징후가 적어지고/적어지거나 경시적인 진행 추이가 느려지거나 길어지는 것을 의미한다. 예를 들어, 비만 치료에서, 체중 감소, 예를 들어, 적어도 5%의 체중 감소는 바람직한 치료 결과의 예이다. 본 발명의 목적을 위하여, 이롭거나 바람직한 임상 결과는, 검출가능 또는 검출불능 여부와 상관없이, 1가지 이상의 증상의 경감 또는 개선, 질환 정도의 축소, 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 감속, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 진정(부분적 또는 전체적)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. "치료"는 치료를 받지 않은 경우에 예상되는 생존과 비교하여 생존을 연장시키는 것을 또한 의미할 수 있다. 또한, 치료는 1회 용량의 투여에 의해 발생할 필요가 없고, 일련의 용량의 투여 시에 종종 발생한다. 따라서, 치료상 유효량, 완화에 충분한 양, 또는 질환, 장애 또는 병태의 치료에 충분한 양이 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다.
- [0040] "질환(disorder)"이라는 용어는 본 발명의 유전자도입 동물 모델을 사용하여 동정되는 분자를 이용하여 치료하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 어떤 상태이다. 이것은 포유류를 의문의 질환에 걸리기 쉽게 하는 병리학적 조건들을 포함한 만성과 급성 질환들 또는 질병들을 포함한다.
- [0041] "치료상 유효량"은 치료될 장애의 증상의 경감이 포함되는, 연구원, 수의사, 의사 또는 기타 임상의학자에 의해 추구되는 조직, 시스템, 대상 또는 인간에서의 생물학적 또는 의학적 응답을 도출할 조성물 내의 활성 화합물의 양을 의미한다.
- [0042] "예방적 유효량"은 비만 또는 비만 관련 장애, 병태 또는 질환 위험이 있는 대상에서 비만 또는 비만 관련 장애, 병태 또는 질환의 발병을 방지하기 위해, 연구원, 수의사, 의사 또는 기타 임상의학자에 의해 추구되는 조직, 시스템, 대상 또는 인간에서의 생물학적 또는 의학적 응답을 도출할 조성물 내의 활성 화합물의 양을 의미한다.
- [0043] "유전자 치료(gene therapy)"는 돌연변이를 일으킨 유전자를 정정하여 유전병을 치료하거나, 유전자 혹은 RNAi를 이용하여 단백질 발현을 조절하여 질병을 치료하는 것을 말한다. 즉 환자의 세포에 외부에서 정상유전자를 이식하여 그 세포의 표현형을 변화시킴으로써 병을 치료하는 방법이다.
- [0044] "약(about)"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.
- [0045] 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.
- [0046] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0047] 본 발명은 핵산(nucleic acid)의 세포 내 전달(transfection)에 관한 것이다. 특히, 신규한 비-바이러스성 유전자 전달체로서, 트랜스펙션 효율이 높고 세포독성이 낮은, GC-MA-PEI(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethyleneimine) 구조를 이루는 GMP를 유전자 전달 담체로 이용하는 것을 주요한 특징으로 하고 있다.
- [0048] **GMP 중합체**
- [0049] 본 발명은 일 관점에서 GMP(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethyleneimine)를 기반으로 하는 유전자 전달체, 즉 유전자 전달 벡터에 관한 것이다.
- [0050] 비바이러스성 유전자 전달 벡터는 바이러스를 이용하지 않고 유전자를 세포내로 운반하는 캐리어를 총칭하는 의

미로서, 유전자를 구성하는 핵산이 음전하를 띠는 성질을 이용하여 양이온상의 양이온 부위와 핵산상의 음이온 부위의 전기적 상호작용을 이용하여 핵산을 코팅하는 형태의 벡터가 대표적인 예이다.

[0051] 본 발명의 양이온 중합체는 GMP(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethyleneimine)는, 폴리에틸렌이민(PEI)을 기반으로 하여 플라스미드 DNA(pDNA)를 효과적으로 압축하고 엔도솜에서 PEI/DNA 복합체를 신속하게 방출시킨다는 장점을 가지면서도, GC-MA-PEI의 신규 구조의 중합체를 형성함으로써 트랜스펙션의 효율을 높이고 세포 독성 또한 현저히 낮은 특성을 지닌다.

[0052] 본 발명의 GMP(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethyleneimine)는 GC와 PEI를 연결하기 위하여 MA를 이용할 수 있다. 보다 구체적인 GMP 합성 공정은 도 1에 도시하였다.

[0053] 이 때, 다양한 분자량 및 형태의 PEI가 사용될 수 있다.

[0054] 분지형인 경우, 백본 PEI 반복 단위의 분자량은 바람직하게 약 400 내지 50,000 달톤 범위, 더욱 특히 바람직하게 약 600 내지 2000 달톤 범위이다. 선형인 경우, 백본 PEI 반복 단위의 분자량은 바람직하게 약 200 내지 50,000 달톤 범위이다.

[0055] 또한, 사용하는 PEI에 따라 본 발명의 GMP의 중량 평균 분자량은 달라질 수 있다. 특정 양태에서, GMP의 중량평균 분자량은 약 500 달톤 내지 약 100,000 달톤 범위일 수 있다. 한 양태에서, 중량 평균 분자량은 약 800 달톤 내지 약 20,000 달톤 범위일 수 있다. 분자량은 당업자에게 공지된 방법, 예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피 또는 아가로스 겔 전기영동에 의해 측정될 수 있다. 바람직하게는 중량평균 분자량 약 800 달톤의 PMP를 사용한다.

[0056] 본 발명의 GMP는 전달 대상인 핵산, 특히 DNA의 응축을 효과적으로 촉진하여 안정한 복합체 및 DNA의 세포 내로의 내재화를 형성하고, 내재화 후에는 복합체가 이항화결합의 환원에 의하여 엔도솜으로부터 세포질 공간으로 탈출하도록 돕는다.

[0057] **GMP-핵산 복합체**

[0058] 또한, 본 발명은 다른 관점에서, 본 발명의 양이온 중합체 GMP와 전달 대상이 되는 유전자, 즉 핵산이 결합된 복합체 및 이의 이용에 관한 것이다.

[0059] 전달 대상이 되는 유전 물질인 핵산의 종류는 제한이 없으나, 바람직하게, 핵산은 DNA이고, 가장 바람직하게는 플라스미드 DNA(pDNA)이다. 상기 DNA는 또한 혼합된 RNA/DNA 분자 또는 혼합된 단백질/DNA 분자를 포함할 수 있다.

[0060] 이 때, GMP : DNA의 중량비는 0.1 ~ 10 : 1의 범위를 가지고, 본 발명의 일 실시예에서는 상기 중량비에서 약 20~30mV 안정기의 제타 포텐셜값을 나타냈다.

[0061] 특히, 세포 내 핵산을 전달하기 위한 본 발명의 유전자 전달체 및 복합체는 다음과 같은 장점을 가진다.

[0062] (1) 본 발명의 "GMP"은 DNA를 효과적으로 응축시킨다.

[0063] 본 발명의 GMP/핵산(예를 들어, DNA) 복합체의 입자 크기는 세포에 의한 전달 복합체의 내재화(internalization)에 영향을 미치므로, 트랜스펙션 효율에 영향을 끼친다.

[0064] 본 발명의 PMP는 DNA를 직경 500 nm 이하의 나노입자로 응축시켜 유전자 전달에 적합한 나노-크기를 가질 수 있게 한다.

[0065] 즉, DNA와 결합하는 경우, 상대적으로 낮은 N/P 비율(polymer nitrogen+)/pDNA phosphate(-)에서 전정기적 상호작용에 의해 보다 효과적으로 DNA를 응축하는 장점이 있다. 즉, 중성 조건에서 양성 전하를 나타내어 효과적으로 DNA를 나노크기 사이즈로 응축할 수 있고(약 500 nm 이하), 전하 비율 1 이상의 양(positive)의 제타 포텐셜을 가질 수 있다.

[0066] (2) 본 발명의 GMP는 양이온 유전자 담체의 우수한 양성자-완충 능력으로 트랜스펙션 효율에 기여한다. 코어로서 PEI에 대하여 외층으로서의 PEI 그래프트와의 결합으로 인해, 이차 및 삼차 아민의 증가에 따라 PMP의 완충 능력을 촉진시키기 때문에, 우수한 트랜스펙션 효율을 가질 수 있다.

[0067] (3) 본 발명의 GMP/DNA 복합체는 세포독성이 낮다.

- [0068] 통상의 고분자 양이온 담체 PEI 등과 비교하여, 본 발명의 PMP/DNA 복합체는 현저히 낮은 독성을 나타낸다.
- [0069] 이처럼, 본 발명의 GMP/DNA 복합체는 우수한 트랜스펙션 효율 및 낮은 세포독성을 가지므로, 세포 내에서 유전자의 발현율을 향상시키는 결과를 가져온다.
- [0070] **트랜스펙션**
- [0071] 그러므로, 본 발명은 상기 GMP/핵산 복합체의 세포 내로의 유입방법 및 이의 활용 또한 포함한다.
- [0072] 본원에 기술된 방법에 따른 용도에 적합한 세포들은 원핵생물, 효모, 또는 식물 및 동물 세포, 특히 포유류 세포를 포함한 고등 진핵 세포를 포함한다.
- [0073] 특정 양태에서, 세포는 암 세포이다. 특정 바람직한 양태에서, 암의 모델 시스템인 세포주, 예를 들어, 유방암 (MCF-7, MDA-MB-438 세포주), U87 교모세포종 세포주, B16F0 세포(흑색종), HeLa 세포 (자궁경부암), A549 세포 (폐암) 및 HepG2(간암) 세포 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 293세포, HeLa 세포 및 HepG2를 사용하였다.
- [0074] 트랜스펙션(형질감염)을 위한 세포의 배양은 당업계에서 알려진 통상의 지식을 활용하여 당업자가 적절히 수행할 수 있다. 일례로, L-글루타민 및 페니실린/스트렙토마이신(pen/strep)과 함께 10%의 열 불활성화된 소태아 혈청(FBS)을 함유하는 DMEM 배지 내 성장시킨다. 당업자는 특정 세포는 성장 인자 및 아미노산과 같은 특정 영양분을 필요로 하기 때문에 특정 배지에서 배양되어야 함을 이해할 수 있을 것이다. 세포의 최적 밀도는 세포 종류 및 실험 목적에 따라 달라진다. 또한, 세포 유형에 따라 적합한 조건(예: 37°C, 5-10% CO₂)에서 배양한다. 배양 시간은 실험 목적에 따라 달라진다. 일반적으로, 유전자 트랜스펙션 실험에서는 세포가 표적 유전자를 발현하도록 24 내지 48시간 동안 배양한다.
- [0075] 한편, 본 발명의 GMP에 따른 핵산 전달, 즉 트랜스펙션(형질감염) 결과는 상이한 방법으로 분석될 수 있다.
- [0076] 유전자 트랜스펙션 및 안티센스 핵산 전달의 경우, 표적 유전자 발현 수준이 리포터 유전자, 예를 들어 녹색 형광 단백질(GFP) 유전자, 루시페라제 유전자, β-갈락토시다제 유전자 발현 등에 의해 검출될 수 있다. 당업자는 이들 리포터가 작용하는 방법 및 이들 리포터가 유전자 전달계에 도입될 수 있는 방법에 친숙할 것이다. 핵산 및 이의 생성물, 단백질, 펩티드 또는 기타 바이오분자들이 본원에 기술된 방법에 의해 전달되며, 이들 바이오분자에 의해 조절되는 표적물이 다양한 방법, 예를 들어, 면역형광법, 효소 면역세포화학법, 오토라디오그래피 또는 동일반응계(in situ) 하이브리드화법에 의해 측정될 수 있다. 인코딩된 단백질의 발현을 검출하기 위해 면역형광법이 사용되는 경우, 표적 단백질에 결합하는 형광물질이 라벨링된 항체가 사용된다(예를 들어 단백질에 항체가 결합하기에 적합한 조건으로 슬라이드에 첨가됨). 이후 단백질을 함유하는 세포는 형광 시그널을 탐지함으로써 확인된다. 전달된 분자가 유전자 발현을 조절할 수 있다면, 표적 유전자 발현 수준이 또한 오토라디오그래피, 동일 반응계 하이브리드화, 및 동일 반응계 PCR과 같은 방법에 의해 측정될 수 있다. 그러나, 확인 방법은 전달된 바이오분자의 특성, 이의 발현 생성물, 이에 의해 조절되는 표적물 및/또는 바이오분자의 전달로 인해 생성되는 최종 생성물에 따라 달라질 수 있다.
- [0077] 또한, 본 발명은 다른 관점에서, GMP 및 목적 유전자를 함유하는 복합체를 함유하는 목적 질환의 치료용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.
- [0078] 즉, 본 발명의 복합체는 질환 치료제로서 투여될 수 있다. 질환 상태에서 발현이 억제되거나 비정상적으로 발현되는 유전자의 코딩 부위의 전부 또는 일부에 상응하는 DNA를 치료가 필요한 환자에게 투여한다.
- [0079] 본원에 기술된 조성물 및 약제학적 조성물의 정확한 제형, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태에 따라 개별 의사에 의해 선택될 수 있다
- [0080] 일반적으로 환자에게 투여되는 조성물의 용량 범위는 환자의 체중 1kg 당 0.5 내지 1000 mg, 또는 1 내지 500 mg, 또는 10 내지 500 mg, 또는 50 내지 100 mg이다. 상기 용량은 단일 용량이거나, 환자에 따라 요구되는 경우 1일 이상의 기간 동안 2회 이상 제공되는 연속용량일 수 있다. 인간 용량이 확립되어 있지 않은 경우, 적합한 인간 용량은 동물을 대상으로 한 독성 연구 및 효능 연구에 의해 보증되는 바와 같이, ED₅₀ 또는 ID₅₀ 값으로부터

추정될 수 있거나 시험관 내 또는 생체 내 연구로부터 도출된 기타 적합한 값으로부터 추정될 수 있다

- [0081] 투여량 및 투여 간격은, 조절 효과 또는 최소 유효 농도(MEC)를 유지하기에 충분한 양으로 활성 부분의 혈장 농도가 제공되도록 개별적으로 조정될 수 있다. MEC는 각 화합물에 따라 달라지며, 시험관 내 데이터로부터 측정될 수 있다. MEC를 달성하기 위해 요구되는 투여량은 개인 특성 및 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 그러나, HPLC 검사 또는 생검이 혈장 농도를 측정하는 데 사용될 수 있다. 또한, 투여 간격은 MEC 값을 사용하여 결정될 수 있다. 조성물은 10 내지 90%의 시간 동안, 바람직하게 30 내지 90%의 시간 동안 또는 가장 바람직하게 50 내지 90%의 시간 동안, 혈장 농도가 MEC를 초과하도록 하는 용량법을 사용하여 투여되어야 한다.
- [0082] 조성물의 투여량은 치료되어야 하는 대상체, 대상체의 체중, 질환의 중증도, 투여 방식 및 처방하는 의사의 판단에 따라 달라질 수 있다.
- [0083] 또한, 본 발명의 복합체는 핵산 전달 개선제를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0084] 세포 내로의 핵산 전달에 있어서 문제가 되는 세포 막, 엔도솜 막 및 운반체로부터 바이오분자의 방출현상을 막기 위한 다양한 방법을 함께 적용할 수 있다.
- [0085] DNA 등의 핵산-운반체 복합체는 일차로 세포 막을 통과해야 한다. 이것이 엔도시토시스로 실시될 때, 핵산-운반체 복합체는 이후 내재화된다. 핵산-카고(cargo)와 함께 운반체는 포켓 형성에 의해 세포막에 의해 봉입되고, 이 포켓은 후속적으로 핀치 오프(pinch off)된다. 이 결과는 세포 엔도솜으로 이는 핵산 카고 및 운반체를 포함하는 거대 막-결합 구조물이다. 핵산-운반체 복합체는 이후 엔도솜 막으로부터 세포질내로 탈출해야 하며 세포질 내에서는 효소 분해를 피해야 한다. 핵산 카고는 운반체로부터 분리되어야 한다. 일반적으로 위에서 기술한 하나 이상의 장벽을 극복하도록 고안된 임의의 것이 전달 개선제로 고려될 수 있다.
- [0086] 비-바이러스 전달 개선제는 중합체계이거나 지질계 중 어느 하나일 수 있다. 이 전달 개선제는 일반적으로 핵산의 음전하를 균형잡히게 하는 폴리양이온이다. PEI 및 스타버스트(Starburst) 텐드리머와 같은 폴리양이온의 분지쇄 버전이 엔도솜 방출을 매개할 수 있다[참조: Boussif, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci USA vol.92: 7297-7301]. PEI는 pH 6.9에서 이온화할 수 있는 말단 아민과 pH 3.9에서 이온화할 수 있는 내부 아민을 가진 고급 분지된 중합체로, 이러한 구조로 인해 소포(vesicle)의 pH를 변화시켜 소포 팽창 및 중국적으로 엔도솜 포획으로부터의 방출에 이른다.
- [0087] 전달을 개선시키는 기타 수단은 운반체 상에 리간드를 고안하는 것이다. 리간드는 카고 전달에서 표적화되는 세포 상 수용체를 가져야 한다. 세포 내로의 바이오분자 전달은 이후 수용체 인식에 의해 개시된다. 리간드가 이의 특이적 세포 수용체에 결합하면, 엔도시토시스가 자극된다. 바이오분자 이송을 촉진시키기 위해 다양한 세포 종류에 사용되어 온 리간드의 예는 갈락토스, 트랜스페린, 글리코단백질 아시알로오소뮤코이드, 아데노바이러스 섬유, 말라리아 서큘스포로지트 단백질, 상피세포 성장 인자, 인간 유두종 바이러스 캡시드, 섬유아세포 성장 인자 및 엽산이다
- [0088] 세포의 세포질 내로 DNA와 같은 바이오분자의 방출은 엔도솜 붕괴를 매개하거나, 분해를 감소시키거나 이러한 과정을 모두 함께 우회하는 제제에 의해 촉진될 수 있다. 엔도솜 pH를 높이는 클로로퀸은 리소솜 가수분해 효소를 억제함으로써 내포된(endocytosed) 물질의 분해를 감소시키는 데 사용될 수 있다.
- [0089] 이와 같이, 본 발명은 비-바이러스성 유전자 전달체에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 GC-MA-PEI(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethyleneimine) 구조를 이루는 GMP를 기반으로 하는, 세포독성이 적고 트랜스펙션 효율이 높은 핵산 전달용 중합체 및 그 제조방법에 관한 것이며, 또한 상기 중합체를 담체로하여 제조된 비-바이러스성 유전자 전달체인 중합체/DNA 복합체에 관한 것이다.
- [0090] 이러한 본 발명은 높은 트랜스펙션 효율, 낮은 세포독성, 높은 목적 유전자 발현 효율을 가지므로 효과적인 비-바이러스성 유전자 전달 시스템으로 매우 유용할 것이다.
- [0091] <실시예>
- [0092] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위

한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다

[0093] 통계학적 분석을 unpaired Students t-test (GraphPad Prism 5)을 이용하여 수행하였다. 모든 결과들을 평균 ± 표준편차(SD)로 나타내었다. 그룹간 차이는 $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), 및 $P < 0.001$ (***)에서 통계학적으로 유의미하다.

[0094] **실험준비**

[0095] 글리콜 키토산(Glycol chitosan, $\geq 60\%$, titration, crystalline), 메틸 아크릴레이트(Methyl acrylate, 99%), 메탄올(Methanol, Anhydrous 99.8%), PEI 800D (polyethylenimine, low molecular weight, water free)과 PEI 25kD (polyethylenimine, high molecular weight, water free) 은 Sigma-Aldrich(Seoul, South Korea)에서 구입하였다. EZ-cytox reagent (EZ-cytox enhanced cell viability assay kit)은 DaeilLab service co., Ltd(Seoul, South Korea)에서 구입하여 사용하였고, FBS(Fetal bovine serum), DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 과 $100\times$ antibiotic-antimycotic agent 은 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 루시퍼라아제 분석 키트는 Promega (Madison, WI,USA)에서 구입하였고, Micro BCA Protein Assay Kit 은 Pierce (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. Aquacide II는 Merck KGaA(Frankfurter, Germany)에서 구입하여 사용하였다.

[0096] **<실시예 1>**

[0097] **GMP(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-Polyethyleneimine)의 합성**

[0098] GMP를 얻기 위해서는 총 2단계의 합성 과정이 필요하다. 자세한 합성 반응을 도 1에 도시하였다.

[0099] **1-1. GC-MA(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate) 합성**

[0100] 우선 GC와 PEI를 연결시켜주기 위해 MA를 이용한다. MA는 주로 1차 아민을 가지는 Michael 첨가 반응에서 주로 사용되는 linker이며 이는 덴드리머 합성 시 사용되어지는 물질이다.

[0101] GC-MA를 얻기 위해 메틸 아크릴레이트(methyl acrylate, 0.658ml)를 먼저 둥근바닥 플라스크에 넣은 후 메탄올(methanol, 63ml)과 실온에서 10분간 반응시켰다. 다음 증류수에 녹여진 글라이콜 키토산(glycol chitosan, 15mg)을 둥근바닥 플라스크에 한 방울씩 넣어준다. 그 후 플라스크 내부의 기체를 질소 기체로 교환시킨 후 교반 배양기(shaking incubator)에서 37℃를 유지하며 180rpm으로 4일간 반응시켰다. 4일이 경과한 후 메탄올(methanol)은 증발기(evaporator)를 사용하여 제거하고 최종 생성물은 1일 동안 투석(MWCO : 100-500)한 후 동결건조하여 수득하였다.

[0102] **1-2. GMP(Glycol Chitosan-Methyl Acrylate-polyethylenimine) 합성**

[0103] 상기 실시예 1-1에서 얻어진 GC-MA를 메탄올과 증류수 혼합용액(메탄올:증류수 = 9:1, 부피비)에 녹인 후 이를 둥근바닥 플라스크로 옮긴다. 추가로 메탄올(methanol, 50ml)을 넣고 10분간 반응시킨 후 저분자량의 PEI(PEI 800D, polyethylenimine, low molecular weight, water free)를 넣어 준 후 플라스크 내 기체를 질소로 교환하고 교반 배양기(shaking incubator)에서 37℃를 유지하여 180 rpm으로 5일간 반응시켰다. 5일이 경과한 후 메탄올(methanol)을 증발기(evaporator)로 제거해 준 후 최종 생성물은 1일 동안 투석(MWCO : 1000)한 후 동결건조하여 수득하였다.

[0104] **1-3. GMP 합성 확인**

[0105] 상기 합성방법에 의해 합성된 물질을 확인하기 위하여 ^1H NMR 스펙트럼을 300MHz NMR 분광계 (Bruker, AVANCE 300)를 이용하여 측정해 본 결과, GC-MA-PEI는 GC와 비교하였을 때 2.5-2.8 ppm의 신호가 증가한 것으로 나타났다(도 2 참조). 이를 통해 다량의 아민 그룹이 합성된 것을 알 수 있었고, 예상했던 나노입자가 형성된 것을 알

수 있었다.

[0106]

<실시예 2>

[0107]

GCMP/플라스미드 DNA 복합체의 크기 측정 및 제타 포텐셜 측정

[0108]

GMP/플라스미드 복합체의 입자 크기와 표면 전하는 세포에 의한 전달 복합체의 내재화(internalization)에 영향을 미치므로, 트랜스펙션 효율에 영향을 끼친다.

[0109]

이에 GMP/플라스미드 복합체의 입자 크기를 알아보기 위하여, ELS-Z2 instrument(Photal, Otsuka Electroninc, Otsuka, Japan)를 이용하여 제조자의 방식에 따라 입자의 크기를 측정하였다. 또한, 제타 포텐셜 측정은 ZetasizerNano-Zs(Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, U.K.)를 통해 제조자의 방식에 따라 확인하였다.

[0110]

대조군으로는 플라스미드 DNA를 사용하였는데, 대조군의 크기를 측정한 결과 약 1500nm의 크기를 갖지만 플라스미드 DNA와 나노입자와의 질량비에 따른 복합체를 형성한 후 크기를 측정한 결과 대부분 500nm 이하의 크기를 갖는 것으로 확인할 수 있었다(도 3 참조). 이와 같은 결과로부터 나노입자는 복합체를 형성한 후 세포 내로 유입이 가능한 크기임을 확인할 수 있었다. 또한 표면이 음전하를 띠는 플라스미드 DNA와 양전하는 띠는 제조된 나노입자의 결합력을 예측하기 위하여, 플라스미드 DNA와 나노입자의 질량비에 따른 복합체의 제타 포텐셜을 측정하였다. 그 결과 플라스미드 DNA와 나노입자 복합체는 20 ~ 30mV 사이의 양전하를 띠는 것을 확인할 수 있었다(도 4 참조). 이를 통해 GMP 나노 입자가 플라스미드 DNA와 자가 결합을 할 수 있음을 확인하였다.

[0111]

<실시예 3>

[0112]

전기영동법을 이용한 복합체 형성 확인

[0113]

GMP 나노입자와 플라스미드 DNA의 복합체 형성을 확인하기 위하여 아가로스젤을 이용한 전기영동법을 실행하였다. 0.25 μ g/ μ l 농도의 pCN-Luci DNA와 GMP 나노입자를 1:1-1:10 질량비로 30분 동안 상온에서 복합체를 형성시킨 후 Tri acetate EDTA buffer를 사용하여 ethidium bromide(0.5 μ g/mL of the gel)가 첨가된 0.7%의 아가로스 겔 상에서 전기영동하였다. 30분 동안 100V에서 수행하였고, 결과물 겔의 UV-illumination 하 사진을 수득하였다.

[0114]

그 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, 대조군과 비교하여 1:1 질량비를 비롯한 모든 질량비에서 겔 상의 이동이 지연되었고, 이를 통하여 pDNA와 GMP 나노입자가 복합체를 형성한 것을 확인할 수 있었다. 이 중에서도 특히 플라스미드 DNA와 GMP 나노입자가 1:8 질량비일때 최적 배합 조건을 가지는 것으로 나타났다.

[0115]

<실시예 4>

[0116]

피코그린 정량을 통한 복합체 형성 확인

[0117]

상기 실시예 3을 통하여 아가로스 겔 상에서 복합체 형성을 확인하였으나, 이를 다시 한 번 확인해 보고자 PicoGreen 시약을 사용하여 형광을 관찰해 보았다.

[0118]

GMP/pDNA 복합체를 HEPES 버퍼 (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4)에서 0.4~4 범위로 다른 중량비 (polymer/pDNA) 로 혼합하여 상온에서 30분 반응하였다. 반응시킨 복합체를 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5)와 섞어 picogreen 시약과 2분간 반응시켜 분광형광계(Quantech digital filter fluorometer, Thermo scientific)를 이용하여 관찰하였다. 이 때 excitation 파장은 480nm, emission 파장은 520nm로 고정하여 형광을 측정하였다.

[0119]

그 결과, 도 6에서 볼 수 있듯이, 복합체가 0.5~4 범위에서 형광이 현저히 감소하여, 복합체가 효과적으로 형성되는 것을 알 수 있었다.

[0120]

<실시예 5>

[0121] **세포내 유전자 전달효율 확인**

[0122] **5-1. 세포 배양**

[0123] HeLa 세포(인간 난소암 세포주), 293 세포(인간 신장 세포주)과 HepG2 세포(인간 간세포암 세포주)는 37℃로 배양기(5% CO₂, 95% 습도) 환경에서 배양하였다. 상기 세포주 모두 10% FBS와 1% 항생제를 포함하는 DMEM(Dubelcco's modified Eagles's medium)로 배양하며 세척은 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 용액으로 진행하였다.

[0124] **5-2. 세포 내 독성 확인**

[0125] 본 발명에 따른 GMP를 유전자 치료 등에 이용하기 위해서는 세포 독성이 없어야 한다. 따라서, 세포 내 독성을 확인하기 위하여 WST assay를 수행하였다.

[0126] 이를 위하여, 유전자 전달효율 확인할 세포주인 HeLa 세포, HEK293 세포, HepG2 세포를 사용하였으며, 96 웰 플레이트에 1 웰 당 15,000개의 세포를 분주하고 24시간 동안 배양한 후 합성된 GMP 나노입자와 대조군으로는 PEI 25kD과 PEI800D를 농도별로 희석하여 세포에 처리하였다. 처리 후 24시간 동안 배양한 후 WST-1 시약 (Daeil Lab Service, Seoul, South Korea)을 각 웰에 넣고 2시간 후 ELISA (VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0127] 그 결과, 종래 유전자 전달을 위해 사용해왔던 대조군 PEI25kD는 세포 독성이 매우 강하다는 것을 확인할 수 있었고, 본 발명에 따른 GMP 나노입자의 경우 실험을 진행한 100µg/ml까지 또 다른 대조군으로 사용된 PEI 800D와 유사하게 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다(도 7 참조).

[0128] **5-3. GMP 나노입자의 유전자 세포 내 전달 효율 확인**

[0129] GMP 나노입자의 세포 내 유전자 전달 효율을 확인하기 위하여 HeLa 세포, HepG2 세포와 HEK293 세포를 각각 48 well plate 에 2만 5천개/웰의 농도로 분주하고 24시간 동안 배양시킨 후 pDNA와 GMP 나노입자를 질량비 1:1 ~ 1:20로 30분간 복합체를 형성시켜 세포에 처리해 주었다. 처리 후 다시 24시간 동안 배양 후 repoterlysis buffer(promega)로 용해시켜 루시페라아제 측정과 단백질 정량을 통해 세포 내 유전자 발현 효율을 측정하였다. 대조군으로는 유전자 전달 효율이 높다고 알려진 PEI 25kD과 GMP 나노입자 합성시 사용된 PEI800D를 각 질량비 대로 사용하였다. 효소 활성 분석 시 LB 9507 광도계(Berthold, Germany)를 사용하였고, 단백질 정량은 각각 4 시간 반응 후 ELISA (VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 570nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다.

[0130] 그 결과, 본 발명에 따른 GMP 복합체는 유전자 전달 효율이 높으나 세포 독성 또한 높다고 알려진 PEI25kD과 유사하거나 혹은 그보다 높은 수준의 전달 효율을 보여주었고, 합성에 사용된 PEI800D에 비해서도 훨씬 높은 효율은 보여주었다(도 8 참조). 또한, GMP 나노입자의 양이 증가함에 따라 세 종류의 세포주 모두에서 전달 효율이 증가하는 경향을 보임을 알 수 있었고, 최대 GMP 나노입자와 플라스미드 DNA의 중량비가 20:1일 때까지 실험해 보았을 때, 유전자 전달 효율이 매우 높은 것으로 확인되었다. 이는 양전하가 증가함에 따라 DNA와의 복합체 형성이 증가하며 표면의 아민기(amine group)를 통하여 세포 내로 유입이 용이해진 것으로 판단되었다.

[0131] **5-4. 공초점 형광현미경 실험**

[0132] HeLa 세포를 35mm 공초점용 배양접시(coverglass bottom dish, SPL)에 5000개/웰의 농도로 분주하고 37℃에서 24시간 배양하였다. GMP 나노입자의 형광을 나타내기 위하여 Alexa Fluor[®] 488 5-SDP Ester (Alexa Fluor[®] 488 Sulfodichlorophenol Ester)를 제조자 방식에 따라 제조하였다. 형광이 결합된 GMP 나노입자를 HeLa 세포에 처리하고 2시간이 경과한 후 공초점 현미경(LSM5 live configuration variotwo VRGB)을 이용하여 관찰하였다.

[0133] 또한, 세포의 핵 염색은 bisBenzimide H 33342 trihydrochloride을 처리하여 상온에서 5분간 반응시킨 뒤 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 세척 과정을 거친 후 공초점 현미경(LSM5 live configuration

variotwo VRGB)으로 관찰하였다.

[0134]

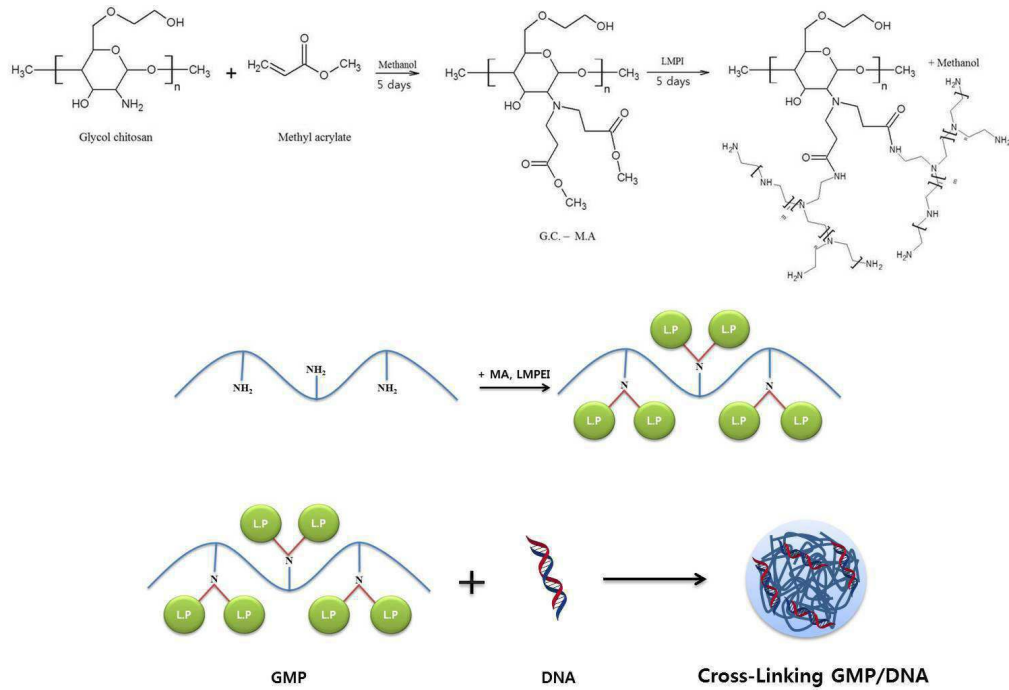
그 결과, GMP 나노입자는 대부분이 세포 내로 유입되어 세포질에 위치하는 것으로 나타났으며, 그 중 일부는 핵까지 전달되는 것으로 나타났다. 대조군인 글리콜 키토산(glycol chitosan)과 PEI25kD을 비교해보았을 때, 본 발명에 따른 GMP 나노입자는 글리콜(glycol chitosan)보다 훨씬 좋은 세포 내로의 전달 효율을 나타내었으며, PEI25kD과 유사하거나 더 높은 세포질 및 핵 내부로의 유전자 전달 효율을 나타내는 것으로 나타났다(도 9 참조).

[0135]

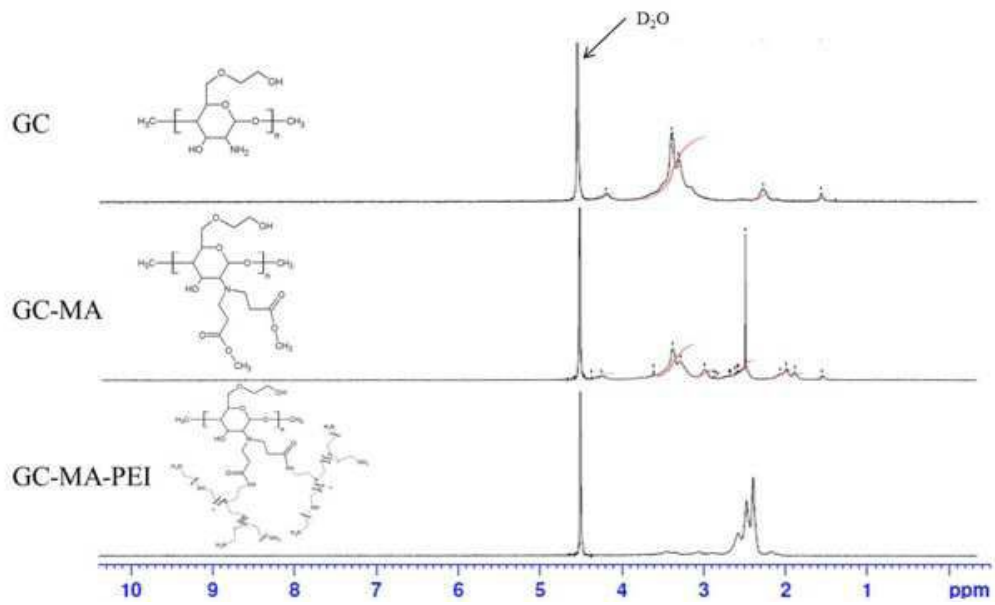
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에 대한 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

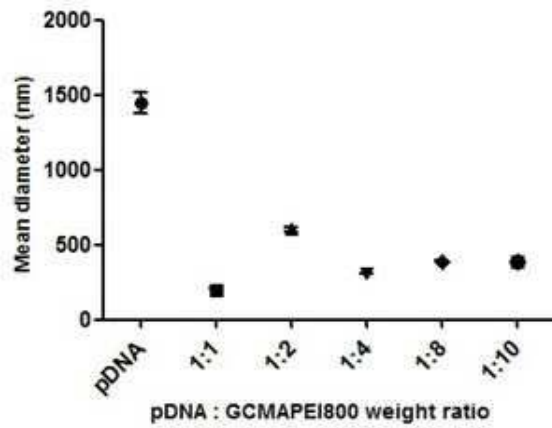
도면1



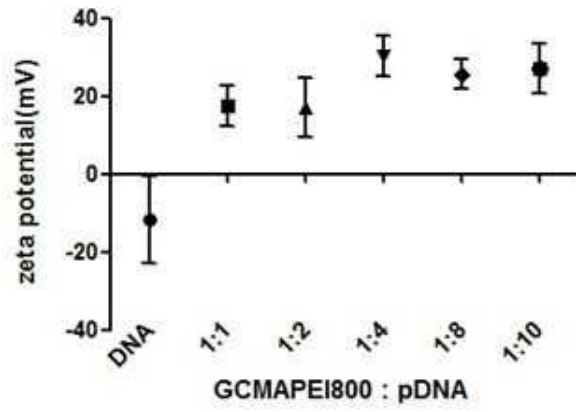
도면2



도면3



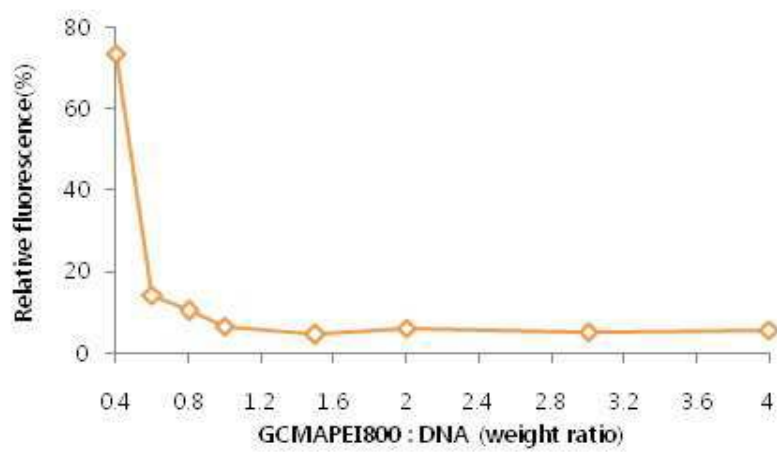
도면4



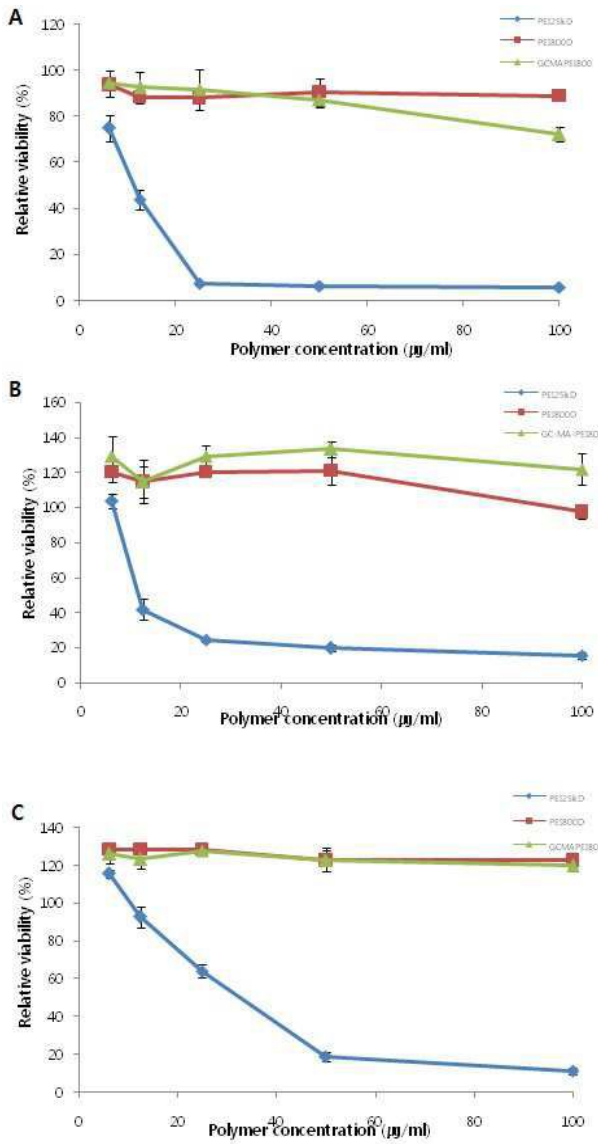
도면5



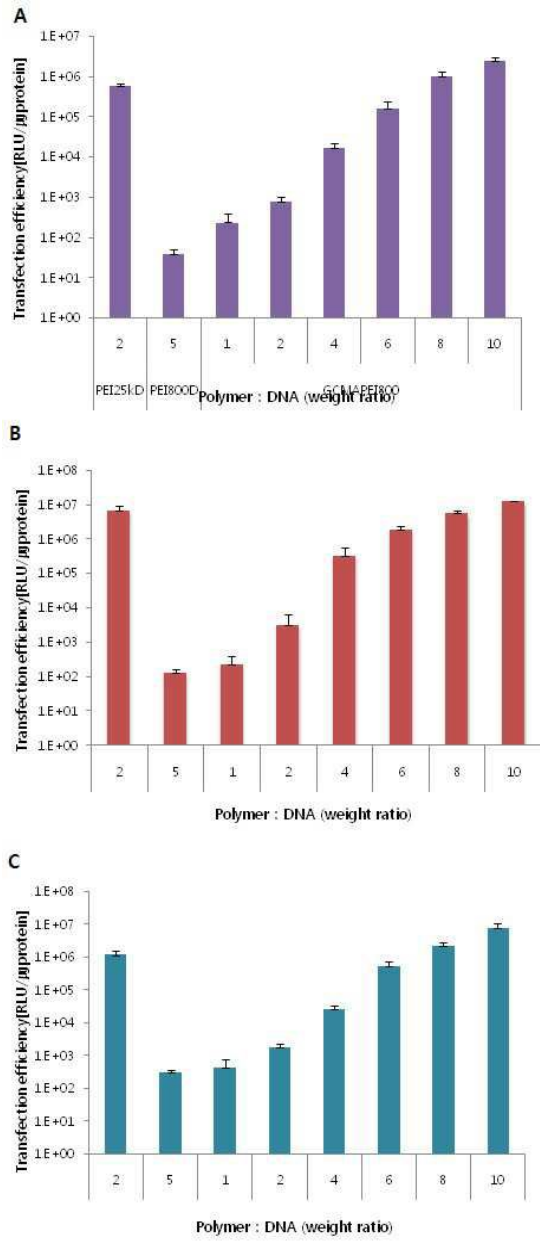
도면6



도면7



도면8



도면9

