



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년04월28일
 (11) 등록번호 10-1383324
 (24) 등록일자 2014년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 47/48 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
 A61K 31/722 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0117082
 (22) 출원일자 2011년11월10일
 심사청구일자 2012년11월08일
 (65) 공개번호 10-2013-0051754
 (43) 공개일자 2013년05월21일
 (56) 선행기술조사문헌
 US20100113559 A1
 US20100040694 A1
 WO2004074314 A2

(73) 특허권자
주식회사 종근당
 서울특별시 서대문구 충정로 8 (충정로3가, 종근당빌딩)
 (72) 발명자
이영남
 경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 315-20, 주
 종근당 효종 연구소 (중등)
황호영
 경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 315-20, 주
 종근당 효종 연구소 (중등)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 10 항

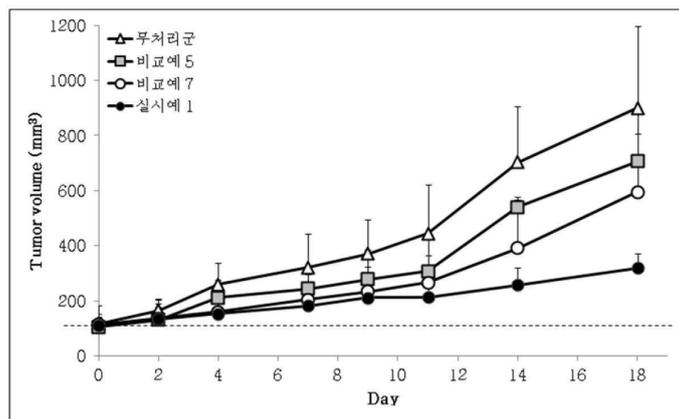
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 신규한 유전자 전달용 조성물

(57) 요약

본 발명은 (i) 유전자, (ii) 수용성 키토산, (iii) 티아민피로포스페이트, (iv) 프로타민 및 (v) 중성 또는 음이온성 포스포리피드를 함유하는 유전자 전달용 약제학적 조성물, 및 그의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 조성물은 in vitro 뿐 아니라 in vivo에서도 우수한 유전자 전달효과를 나타내며, 우수한 혈청 내 안정성을 나타낸다. 또한 모든 구성성분이 안전한 주사 가능한 물질들이기 때문에, 인체에 안전하게 적용할 수 있어 의약품으로써 상용화에 유리하다는 장점을 가진다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

노상명

경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 315-20, 주 중
근당 효종 연구소 (중동)

조희정

경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 315-20, 주 중
근당 효종 연구소 (중동)

채아름

경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 315-20, 주 중
근당 효종 연구소 (중동)

이지희

경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 315-20, 주 중
근당 효종 연구소 (중동)

기민효

경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 315-20, 주 중
근당 효종 연구소 (중동)

임종래

경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 315-20, 주 중
근당 효종 연구소 (중동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10030044
부처명	지식경제부
연구사업명	성장동력/중기거점/차세대신기술개발사업
연구과제명	생분해성 키토산 나노복합체를 이용한 siRNA 전달시스템 개발
기 여 율	1/1
주관기관	(주)중근당
연구기간	2007.09.01 ~ 2014.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 유전자, (ii) 수용성 키토산, (iii) 티아민피로포스페이트 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, (iv) 프로타민 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 (iv) 중성 또는 음이온성 포스포리피드를 함유하는 유전자 전달용 약제학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 수용성 키토산은 키토산 HCl, 키토산 아세테이트, 키토산 글루타메이트, 또는 키토산 락테이트 중에서 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 프로타민의 약제학적으로 허용가능한 염은 프로타민 염산염 또는 프로타민 황산염인 약제학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 중성 또는 음이온성 포스포리피드는 비극성 꼬리 부분으로서 포화 또는 불포화된 탄소수 4 내지 30인 알킬 에스터 그룹을 가지며, 극성 머리 부분으로서 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine), 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 포스파티딜글리세린(phosphatidylglycerine), 포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol), 포스파티딘산(phosphatidic acid), 스피핑고미엘린(sphingomyelin), 포스파티딜콜린-N-메톡시 폴리에틸렌글리콜, 포스파티딜에탄올아민-N-메톡시 폴리에틸렌글리콜, 포스파티딜세린-N-메톡시 폴리에틸렌글리콜, 포스파티딘산 메톡시 폴리에틸렌글리콜 및 이들의 혼합물 중에서 선택되는 극성 머리 부분을 가지는 약제학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 유전자는 단일가닥 또는 이중가닥 DNA, 단일가닥 또는 이중가닥 RNA, 플라스미드 형태 DNA, 단일가닥 또는 이중가닥 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 촉매적 RNA 또는 뉴클레오타이드 중에서 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 조성물 내에 유전자 전달을 위한 10~500nm 입자경의 나노복합체가 형성된 약제학적 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 유전자 100 중량부에 대하여, 키토산 10 내지 3,000 중량부, 티아민피로포스페이트 1 내지 1,000 중량부, 프로타민 10 내지 1,000 중량부, 및 중성 또는 음이온성 포스포리피드 100 내지 5,000 중량부를 함유하는 약제학적 조성물.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 만노스, 글루코스, 프럭토스, 아라비노우즈, 만니톨, 소르비톨, 수크로스, 트레할로스, 말토스, 락토스, 셀로비오스, 이소 말토스, 텍스트란, 텍스트린, α-시클로텍스트린, β-시클로텍스트린, γ-시클로 텍스트린, 히드록시프로필-β-시클로텍스트린, 히드록시에틸-β-시클로텍스트린, 디메틸-β-시클로텍스트린, 트리메틸-β-시클로텍스트린 및 설포부틸에테르 β-시클로텍스트린으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 당류를 추가로 함유하는 약제학적 조성물.

청구항 9

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 안정화제, 완충제, 보존제, 무통화제, 또는 등장화제 중에서 선택되는 하나 이상을 추가로 함유하는 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 주사제, 점적용제, 흡입제 또는 동결건조된 형태로 제형화된 약제학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 양이온성 폴리머로서 키토산을 이용한 유전자 전달용 나노복합체 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재까지 세포내로 유전자를 전달하기 위한 연구는 지속적으로 수행되어 왔으며 또한 이러한 연구 성과를 실제 사용될 수 있는 치료제로 개발하기 위한 노력도 계속되고 있다. 유전자는 뉴클레오타이드(nucleotide) 및 뉴클레오타이드의 중합체인 핵산을 포함하는 물질로서 핵산 단위체에서 기인하는 강한 음전하를 가진다. 유전자는 생체내 및 생체외에 존재하는 다양한 유전자 분해효소들에 의해 쉽게 분해될 수 있으며, 세포 혹은 생체 내에서 짧은 반감기를 가진다. 따라서 모든 핵산 기반의 유전자 치료제들은 그 치료제 개발과 함께 치료제 전달기술의 개발이 수반되어야 한다.

[0003] 유전자 약물을 진핵생물의 세포 내로 도입하는 트랜스펙션(transfection) 기술은 세포 및 분자생물학, 유전자기능 연구, 약물타겟 연구 등 기초 과학 분야에서 요구되는 기술일 뿐 아니라 실제 의약품의 개발을 위한 약물학 및 약제학 등의 응용 과학 분야에서도 핵심기술로서 중요한 위치를 차지하고 있다. 유전자를 세포내로 도입하기 위한 기술들은 바이러스 전달체를 이용하는 방법과 비바이러스 전달체를 이용하는 방법을 중심으로 연구되어 왔다.

[0004] 현재는 바이러스 벡터를 활용하는 방식이 보편적이다. 바이러스성 전달체를 이용한 유전자 전달방법은 유전자 전달 효율이 매우 높으나, 면역 반응에 의한 장기 투여의 어려움이 있으며, 아직까지 병원성을 지닌 바이러스의 복제 가능성을 완전히 배제하지 못한다는 한계가 있다. 이에 반해, 비바이러스성 전달체는 상기한 바이러스성 전달체의 위험 요인 없이 유전자를 전달할 수 있다는 장점을 가진다(The AAPS Journal, 2010; 12: 492-503). 이러한 바이러스성 전달체의 위험성을 극복하기 위해, 음이온성인 유전자와 결합할 수 있는 양이온성 지질이나 양이온성 폴리머를 활용하는 비바이러스 전달 방법이 사용되고 있다.

[0005] 미국특허공보 US 7361640호는 유전자/지질/다가양이온의 비공유 결합체를 청구하고 있으며, 최소한 하나의 양이온성 지질(cationic lipid)과 다가양이온성 물질(polycation)로 구성된 용액에 유전자를 첨가함으로써 비공유 결합체를 형성시키는 기술을 개시하고 있다. 상기 기술에서 사용된 양이온성 지질은 세포 독성을 나타낸다는 문제점을 가지고 있다(Pharmaceutical Research 1994; 11: 1127-1131).

[0006] 또한 양이온성 지질은 합성과 고순도 정제가 필요한 소재로 품질관리가 어려워 대량 생산에 부적합하고, 보관 및 유통과정의 안정성이 낮다는 단점도 있어 제품화에 적합하지 않다.

[0007] 미국특허 출원공개공보 US 2011/0038941호는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide), 지질, 및 복합체화제(complexation agent)로 구성된 올리고뉴클레오타이드-지질 나노입자의 제조방법으로써, (1) 지질, 복합체화제, 및 양이온성 폴리머를 수산화성 유기용매에서 혼합하고, (2) 올리고뉴클레오타이드를 수용액에 녹인 후, (3) 단계 (1)의 혼합물을 단계 (2) 수용액에 주사주입하거나, 또는 단계 (1)의 혼합물과 단계 (2) 수용액을 가압 하에서 섞어 최종 용액을 제조하고, (4) 여기에서 유기용매를 제거함으로써 나노입자를 형성시키는 제조방법을 개시하고 있다. 이러한 제조방법은 품질관리가 어려우며, 제조과정에서 특별한 기계가 요구되거나, 대량 생산화가 곤란하여 산업적인 기술의 실사가 어려운 단점이 있다.

[0008] 미국특허 출원공개공보 US 2003/0068277호는 프로타민, 스페르민, 스페르미딘, 키토산을 포함하는 다가양이온성 물질과 인지질로 조성된 복합체의 제조방법을 개시하고 공지하고 있으나 이는 폐 흡입을 통한 단백질 전달을 목적으로 한 것이다.

[0009] 키토산은 유전자 전달 복합체의 제조에 있어서, 생체 적합성이 우수하고 대량생산에 유리한 천연의 양이온성 소재이므로 양질의 비바이러스성 전달체 후보로 주목받고 있다. 특히 키토산은 생체 내로 투여된 후, 리소자임에 의해서 아미노당으로 분해되는 물질로서, 현재 랫트에서의 LD₅₀이 16g/kg로 알려져 있을 만큼 안전한 폴리머 물

질이다(Trends in Food Science & Technology, 2007; 18: 117-131).

- [0010] 키토산은 유전자와 이온결합을 통해 유전자를 세포 내로 전달할 수 있는 비바이러스성 전달체로서 유력한 후보이지만, 생리학적 pH(pH7~7.4)에서 양이온성 전하가 약해지기 때문에 유전자와의 결합력이 떨어지게 된다는 문제가 있다. 결국 생리학적 pH에서 키토산은 유전자와의 복합체를 유지하지 못하고 풀리게 되어 유전자를 세포내로 전달하는 전달력이 현저하게 낮아질 수 있다는 한계가 있다.
- [0011] Theerasak Rojanarata 등은 생리적 pH 조건인 중성에서 불용성인 키토산을 용해시키기 위하여 산성물질의 목적으로 과량의 티아민피로포스페이트를 사용하여 키토산-티아민피로포스페이트염을 형성하고 이것의 유전자 전달체로서의 가능성을 언급하고 있다(Pharmaceutical Research 2008; 25: 2807-2814).
- [0012] Theerasak Rojanarata 등에 개시된 키토산과 티아민피로포스페이트로 조성된 나노복합체는 in vitro에서는 양호한 유전자 전달력을 나타내나, in vivo에서는 양호한 키토산 복합체의 유전자 전달력을 나타내지 못한다. in vivo에는 in vitro와 달리 다양한 혈청 단백질 및 세포 삼출물이 존재하기 때문에, 키토산 나노복합체가 생체 내로 투여시, in vivo 환경의 혈청 단백질 등과 응집하여 결국 침전현상이 일어나 유전자 전달력을 상실하기 때문이다. 이러한 이유로 인하여 종래의 키토산 복합체는 생체 내에서 유전자 전달력을 나타내지 못하고 유전자 전달체로서 제품화에 성공하지 못한 것으로 보고되었다(Expert Opinion on Drug Delivery, 2011; 8: 343-357).

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 미국특허출원 공개공보 제2003/0212031호 (2003.11.13.공개)
- (특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2004-0058199호 (2004.7.3.공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 생체내 안정성이 뛰어나고, 우수한 유전자 전달 효율을 나타내는 유전자 전달용 조성물 및 그의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명자들은 시험관내 뿐 아니라 생체내에서의 안정성 및 유전자 전달효율이 우수하며, 또한 인체에 무해하여 실제 의약품으로써 상업화가 가능한 유전자 전달용 조성물을 제공하기 위하여 다양한 조성물 제형을 예의 연구한 결과, 놀랍게도, 유전자, 수용성 키토산, 티아민피로포스페이트, 프로타민, 및 중성 또는 음이온성 포스포리피드의 조합으로 조성된 나노복합체를 함유하는 조성물이 시험관내 뿐 아니라 생체내에서도 안정한 나노복합체 구조를 유지하고, 그에 의하여 우수한 유전자 전달 효과를 나타내는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

[0016] [발명의 요약]

- [0017] 본 발명은 (i) 유전자, (ii) 수용성 키토산, (iii) 티아민피로포스페이트, (iv) 프로타민, 및 (v) 중성 또는 음이온성 포스포리피드를 함유하는 유전자 전달용 약제학적 조성물, 및 그의 제조방법을 제공한다.

- [0018] 앞서 언급한 바와 같이, 키토산 나노복합체가 유전자 전달을 위한 제품으로 상용화되기 위해서는 유전자 결합력 뿐 아니라 혈청 내 안정성이 동시에 확보되어야 하며, 어느 한 쪽이라도 확보되지 못하면 인체 투여가 불가능하다. 본 발명의 나노복합체는 종래의 키토산 나노복합체의 단점인 생리학적 pH에서 유전자 결합력이 감소한다는 문제를 해결함과 동시에 복합체가 혈청 내에서 단백질 및 세포 삼출물과 응집되는 것을 방지하여, 우수한 혈청 내 입자 안정성 나타낸다. 이러한 놀라운 본 발명의 나노복합체의 효과는 종래 알려진 무수히 많은 키토산을 이용한 유전자전달 연구에서도 밝혀진 바 없었다.

- [0019] 이에, 본 발명은 키토산이 우수한 천연소재임에도 불구하고 유전자 전달체로서 상용화가 되지 못하는 문제점을 극복하여, 고효율의 유전자 전달력과 함께 우수한 안정성을 가지는 새로운 유전자 전달용 조성물을 제공한다.

[0020] [구성]

- [0021] 본 발명은 (i) 유전자, (ii) 수용성 키토산, (iii) 티아민피로포스페이트, (iv) 프로타민, 및 (v) 중성 또는 음이온성 포스포리피드를 함유하는 유전자 전달용 약제학적 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기한 유전자 전달용 약제학적 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 '유전자'는 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드의 중합체인 핵산을 포함하는 물질로서, 세포 내로 도입되어 원하는 기능 내지 작용, 또는 효과를 나타내기 위하여 세포 내로 전달될 목적의 임의의 유전자를 의미하며, 이러한 유전자는 단일가닥 또는 이중가닥 DNA(deoxyribonucleic acid), 단일가닥 또는 이중가닥 RNA(ribonucleic acid), 플라스미드 형태 DNA, 단일가닥 또는 이중가닥 siRNA(small interfering RNA), 안티센스 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide), 리보자임, 촉매적 RNA 및 뉴클레오타이드 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 바람직하게는, 상기 유전자는 플라스미드 형태 DNA, 단일가닥 또는 이중가닥 siRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 상기 유전자는 유전자 약물일 수 있으며, 여기서 유전자 약물은 하나 이상의 질병 치료 또는 예방을 약효로 나타내는 유전자를 의미한다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 키토산(chitosan)은 (1->4) 2-amino-2-deoxy- β -D-glucan의 구조를 가지는 천연에 존재하는 매우 안전한 양이온성 다당류이다. 키토산은 천연의 갑각류 등으로부터 얻어지는 키틴(chitin)을 탈아세틸화하여 유리 아민기를 생성시킨 폴리머 형태를 가지며, 여기서 키토산은 분자량 1~500kDa이고 유리 아민기가 50% 이상일 수 있으며, 바람직하게는 키토산의 분자량이 150~400kDa이고 유리 아민기가 80% 이상일 수 있으나 본 발명이 여기에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 키토산의 가용화 측면에서, 수용성 키토산 및 불용성 키토산, 키토산의 분자를 변화시킨 키토산 유도체도 본 발명의 키토산의 범주에 포함되나 바람직하게는 수용성 키토산이 선택될 수 있다. 본 발명의 수용성 키토산은 키토산 HCl, 키토산 아세테이트, 키토산 글루타메이트, 키토산 락테이트 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 수용성 키토산은 분자구조 내의 아민기가 염산 또는 초산, 글루탐산, 젖산 등의 산성물질과 당량비로 염을 형성하고 있어 물에 용해가 가능하다. 특히 수용성 키토산은 주사제 제조과정에서 제균 및 이물질 제거가 가능하지만, 불용성 키토산은 물이나 유기용매에 용해되지 않기 때문에 제균이나 이물질 제거가 어려워 연구단계에서는 사용이 가능하나 인체 대상의 주사제형 의약품으로 적용이 어렵다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 티아민피로포스페이트(thiamine pyrophosphate)는 비타민 B1을 체내에 투여했을 때, 생체 내에서 형성되는 비타민 B1의 활성형 형태로 안전한 물질이며, 구조적으로 양이온과 음이온을 함께 가지고 있어 키토산과 유전자 간의 약한 결합을 보완하는 기능을 한다. 본 발명의 티아민피로포스페이트는 티아민피로포스페이트 자체 및 약제학적으로 허용 가능한 염을 모두 포함한다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 프로타민(protamine)은 아르기닌이 풍부한 천연의 양이온성 단백질로서, 동물의 정소 중에서 특히 연어를 포함한 어류의 정자핵에 많이 존재하며, 히스톤과 같이 DNA와 회합 또는 해리를 통하여 유전 정보 발현에 관여하는 단백질로 알려져 있다. 통상, 어류의 정자핵으로부터 추출되는 프로타민의 분자량은 약 4,000 내지 10,000이며, 구성 아미노산의 70% 이상이 아르기닌으로 존재하나 본 발명이 여기에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 프로타민은 프로타민 자체 및 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 모두 포함한다. 구체적으로 본 발명의 프로타민의 염은 염산염 또는 황산염을 포함한 산성물질에 의한 염 형태를 포괄한다.
- [0027] 프로타민은 염 형성 없이도 물에 용해가 가능하며 염 형태 또한 물에 용해가 가능하므로 어떤 형태로든 본 발명의 유전자 전달용 조성물에 적용이 가능하다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 중성 또는 음이온성 포스포리피드 (neutral or anionic phospholipid)는 비극성 꼬리 (tail) 부분으로서 알킬 에스터 그룹 (alkyl ester group)과 인산을 포함하는 극성 머리(head) 부분으로 구성된다. 중성 포스포리피드는 극성 머리 부분이 전기적으로 중성상태인 포스포리피드를 의미하며 음이온성 포스포리피드는 극성 머리 부분이 음전하를 가지고 있는 포스포리피드를 의미한다. 양이온성 포스포리피드는 유전자 전달력을 가지고 있지만 독성이 높아 의약품 부형제로서 활용이 어렵다는 한계가 있다. 본 발명의 중성 또는 음이온성 포스포리피드는 비극성 꼬리 부분으로서 포화 또는 불포화된 탄소수 4내지 30인 알킬 에스터 그룹을 가지며 극성 머리 부분으로서 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine), 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 포스파티딜글리세린(phosphatidylglycerine), 포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol), 포스파티딘산(phosphatidic acid), 스피고미엘린(sphingomyelin), 포스파티딜콜린-N-메톡시 폴리에틸렌글리콜, 포스파티딜에탄올아민-N-메톡시 폴리에틸렌글리콜, 포스파티딜세린-N-메톡시 폴리에틸렌글리콜, 포스파티딘산 메톡시 폴리에틸렌글리콜 및 이들의 혼합물 중에서 선택되는 극성 머리 부분을 가진다. 또한, 중성 또는 음이온성 포스포리피드는 콩이나 계란 등과 같이 식물이나 동물에서 유래된 형태일 수 있으며, 중성 또는 음이온성 포스포리피드에 결합되는 알킬 에스터

그룹은 모노- 및 디-팔미토일, 모노- 및 디-미리스토일, 모노- 및 디-라우릴, 모노- 및 디-스테아릴 등의 포화 지방산 에스터나 모노- 및 디-리놀레일, 모노- 및 디-올레일, 모노- 및 디-팔미톨레일, 모노- 및 디-미리스톨레일 등의 불포화 지방산 에스터가 있으며 또는 포화 지방산 에스터와 불포화 지방산 에스터가 함께 존재하는 형태일 수 있다.

[0029] 상기한 구성성분을 함유하는 본 발명의 유전자 전달용 조성물은 다음과 같이 제조될 수 있으나 본 발명이 여기에 한정되는 것은 아니다. 일례로, (1) 유전자와 프로타민을 적절한 용매, 바람직하게는, 멸균 증류수 또는 식염수에서 혼합하여 전복합체(pre-complex)를 제조하는 단계, 및 (2) 여기에 키토산과 티아민피로포스페이트, 중성 또는 음이온성 포스포리피드를 첨가하여 최종적인 나노복합체 형태가 형성되는 단계를 포함하는 방법으로 제조된다. 다른 예로, 본 발명의 조성물은 (1) 유전자와 키토산, 티아민피로포스페이트를 물에서 혼합하여 전복합체를 제조하는 단계, 및 (2) 여기에 프로타민과 중성 또는 음이온성 포스포리피드를 첨가하여 최종적인 나노복합체 형태가 형성되는 단계를 포함하는 방법으로 제조된다. 여기서, 사용되는 용매의 양은 유전자 1mg 에 대하여 약 1 ml 또는 그 이하이다. 이렇게 형성되는 나노복합체는 세포 내 도입 시 요구되는 입자경을 만족할 수 있도록 10~500nm의 크기를 가질 수 있으며, 바람직하게는 10~300nm의 크기를 가질 수 있다.

[0030] 상기한 나노복합체 형성을 위한, 본 발명의 조성물 내 구성성분들의 함량은 유전자 100 중량부에 대하여, 키토산 10 내지 3,000 중량부, 티아민피로포스페이트 1 내지 1,000 중량부, 프로타민 10 내지 1,000 중량부, 및 중성 또는 음이온성 포스포리피드 100 내지 5,000 중량부이며, 바람직하게는, 유전자 100 중량부에 대하여 키토산 40 내지 2,000 중량부, 티아민피로포스페이트 20 내지 500 중량부, 프로타민 10 내지 700 중량부, 및 중성 또는 음이온성 포스포리피드 500 내지 5,000 중량부이다.

[0031] 본 발명의 유전자 전달용 조성물은 상술한 바와 같은 나노복합체 형태로 형성된 조성물 그 자체로 이용될 수 있을 뿐 아니라, 당 분야에서 통상적으로 사용되는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 제형화되어 사용될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 유전자 전달용 조성물은 주사제, 점적용제, 흡입제 등 다양한 형태로 제형화될 수 있다. 상기한 약제학적으로 허용되는 담체와 제형화에 관한 사항은 당 분야의 통상의 지식을 가진 자의 기술 수준의 범위 내에 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 유전자 전달용 조성물은 보관 및 유통과정 상의 나노복합체의 변질이나 변형을 방지하는 목적으로 당류를 추가적으로 함유할 수 있다. 당류로서 만노스, 글루코스, 프럭토스, 아라비노우즈, 만니톨, 소르비톨, 수크로스, 트레할로스, 말토스, 락토스, 셀로비오스, 이소 말토스, 텍스트란, 텍스트린, α -시클로덱스트린, β -시클로덱스트린, γ -시클로 텍스트린, 히드록시프로필- β -시클로덱스트린, 히드록시에틸- β -시클로덱스트린, 디메틸- β -시클로덱스트린, 트리메틸- β -시클로덱스트린 및 셀포부틸에테르 β -시클로덱스트린 중에서 선택된 1종 이상의 당류가 선택될 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명의 유전자 전달용 조성물은 추가적으로 약제학적으로 허용되는 첨가제로써 안정화제 또는 완충제, 보존제, 무통화제, 등장화제 등을 함유할 수 있다. 여기서 약제학적으로 허용되는 첨가제로써 안정화제는 항산화제, 환원제, 및 킬레이트제 성분 등을 포함하며, 완충제는 pH 조절을 위한 유기 또는 무기염류 등을 포함하며, 보존제는 파라옥시안식향산 메틸, 파라옥시안식향산 에틸, 파라옥시안식향산 프로필, 파라옥시안식향산 부틸, 클로로부탄올, 염화벤잘코늄, 염화벤제토늄, 페놀, 크레졸, 클로로크레졸, 및 벤질알코올과 같은 방부성 성분 등을 포함하며, 무통화제는 벤질알코올, 및 클로로부탄올과 같은 국소마취 성분을 포함하며, 등장화제는 삼투압 조절을 위한 당류 및 무기염류 성분 등을 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 유전자 전달용 조성물은 또한 상기한 당류 등을 포함하여 동결건조된 형태로 제형화될 수 있다. 조성물이 동결건조된 형태로 제공되는 경우, 이들은 사용 전에 적당한 완충액, 예를 들어 멸균 식염수 내에 재수화될 수 있다. 정맥내 투여용으로 재구성되는 경우, 적합한 담체에는 생리 식염수 또는 인산 완충 식염수 (PBS), 및 증점 및 가용화제, 예컨대 글루코스, 폴리에틸렌 글리콜, 및 폴리프로필렌 글리콜 및 이들의 혼합물을 포함하는 용액이 포함된다.

[0035] 본 발명의 유전자 전달용 조성물은 인간 등의 포유동물에 적절한 경로로서, 예를 들면, 주사, 경폐, 경비, 경구, 직장투여의 형태로 적용될 수 있다. 바람직하게는 주사투여 형태로서 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막, 뇌혈관 등에 투여될 수 있으며 필요에 따라 특정 조직 장기 및 암 조직에 직접 투여될 수 있다.

[0036] 본 발명의 유전자 전달용 조성물의 투여량은 특별한 투여 형태, 투여 경로 및 목적 및 치료하려는 환자의 연령, 체중 및 증상 등 다양한 인자에 따라 적절하게 결정되며 변경될 수 있다. 일반적으로, 성인의 경우 1일 투여량은 체중 내에 함유된 활성 성분의 양으로 1 μ g 내지 200 mg/kg이다. 이러한 투여량은 다양한 인자에 따라 변할

수 있다.

[0037] 본 발명의 조성물은 모두 세포독성이 없고, 주사가 가능한 안전한 물질로 구성되어 있기 때문에 안전하며, 유전자 전달을 위한 의약품으로써 실제 상용화에 유리하다.

발명의 효과

[0038] 본 발명의 유전자 전달용 조성물은 유전자를 안전하고 효율적으로 세포 내로 전달하며, 모든 구성성분이 안전하고 주사 가능한 물질들이기 때문에, 인체에 적용이 용이하고, 상용화에 유리하다. 특히, 본 발명의 유전자 전달용 조성물은 in vitro 뿐 아니라 in vivo에서도 우수한 유전자 전달 효과를 나타내며, 우수한 혈청 내 안정성을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1 은 실시예 1로 제조된 유전자 전달용 조성물의 급속 동결 전자현미경 사진이다.
 도 2는 실시예 1, 2, 3, 4 및 11로 제조된 유전자 전달용 조성물 내 형성된 나노 복합체의 입자경을 확인한 결과이다.
 도 3은 실시예 1, 3 및 11로 제조된 유전자 전달용 조성물 내 형성된 나노 복합체의 입자 표면전하를 확인한 결과이다.
 도 4는 실시예 1, 11 로 제조된 유전자 전달용 조성물과 비교예 1, 2, 7로 제조된 조성물의 유전자 전달에 의한 표적 단백질 발현 억제 효과를 관찰한 결과이다.
 도 5는 실시예 1, 3, 11 로 제조된 유전자 전달용 조성물과 비교예 2, 3, 4, 6으로 제조된 조성물의 혈청 내 입자 안정성을 확인한 결과이다.
 도 6은 실시예 15, 16 및 17로 제조된 유전자 전달용 조성물 내 형성된 나노 복합체의 동결건조 후 재수화시의 입자경을 확인한 결과이다.
 도 7은 실시예 1로 제조된 유전자 전달용 조성물의 in vivo 유전자 전달 효과(종양 증식 억제력)를 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 설명하나 이에 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0041] [실시예]

[0042] <실시예 1~4> Survivin siRNA 유전자 전달용 조성물의 제조

[0043] 먼저 분자량 150~400kDa 키토산 HCl 4mg (FMC CL214, FMC), 티아민피로포스페이트 2mg (Thiamine pyrophosphate, 시그마 알드리치), 프로타민 0.5mg (Protamine sulfate, Alps pharmaceutical)을 각각 멸균 증류수 1ml에 녹인 용액을 제조하고 상기 용액들을 0.22 μ m 필터로 여과하였다. Survivin siRNA 유전자 (바이오니아)는 멸균 증류수를 이용하여 1mg/ml의 농도로 제조하였다. 포스포리피드로서 Lipoid S-100 (Lipoid S-100 Lipoid) 및 distearoyl-glycero-phosphoethanolamine-methyl polyethyleneglycol-2000(DSPE-mPEG2000) (Lipoid PE 18:0/18:0-PEG 2000, Lipoid)을 하기 표 1에 나타난 Lipoid S-100과 DSPE-mPEG2000의 중량비와 같이, 포스포리피드 총량으로서 30mg이 되도록 하여 에탄올 1ml에 녹인 용액을 제조하고 0.22 μ m 필터로 여과하였다. 하기 표1의 중량비가 되도록 Survivin siRNA 유전자 수용액과 프로타민 용액을 혼합하여 진복합체를 형성시킨 후, 수용성 키토산, 티아민피로포스페이트 및 포스포리피드 용액을 혼합하여, 나노복합체를 함유하는 조성물을 제조하였다. 여기서, survivin siRNA의 시퀀스는 센스: 5'-AAG GAG AUC AAC AUU UUC A(dTdT)-3', 안티센스: 5'-UGA AAA UGU UGA UCU CCU U(dTdT)-3'를 사용하였다.

[0044] 하기 표 1에서 단위는 중량(μ g)이다.

[0045] [표 1]

	실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4
Survivin siRNA	1	1	1	1
키토산 HCl	17.1	17.1	8.6	8.6
티아민피로포스페이트	2.9	2.9	2.9	2.9
프로타민	0.6	0.6	5	5
Lipoid S-100 ¹⁾	32	30.4	32	30.4
DSPE-mPEG2000	0	1.6	0	1.6

¹⁾ Lipoid S-100 은 phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, lysophosphatidylcholine 으로 구성되어 있으며, 주성분으로서 phosphatidylcholine 을 94% 이상 함유.

[0046] [0047] <실시예 5~8> VEGF siRNA 유전자 전달용 조성물의 제조

[0047] <실시예 5~8> VEGF siRNA 유전자 전달용 조성물의 제조

[0048] 먼저 분자량 150~400kDa 키토산 HCl 4mg, 티아민피로포스페이트 2mg, 프로타민 0.5mg을 각각 멸균 증류수 1ml에 녹인 용액을 제조하고 상기 용액들을 0.22 μ m 필터로 여과하였다. Vascular endothelial growth factor (VEGF) siRNA 유전자 (바이오니아)는 멸균 증류수를 이용하여 1mg/ml의 농도로 제조하였다. 포스포리피드로서 Lipoid S-100 및 DSPE-mPEG2000을 하기 표 2에 나타난 Lipoid S-100과 DSPE-mPEG2000의 중량비와 같이, 포스포리피드 총량으로서 30mg이 되도록 하여 에탄올 1ml에 녹인 용액을 제조하고 0.22 μ m 필터로 여과하였다. 하기 표2의 중량비가 되도록 VEGF siRNA유전자 수용액과 수용성 키토산 및 티아민피로포스페이트 용액을 혼합하여 전복합체를 형성시킨 후, 프로타민 및 포스포리피드 용액을 혼합하여, 나노복합체를 함유하는 조성물을 제조하였다. 여기서, VEGF siRNA의 시퀀스는 5'-GGA GUA CCC UGA UGA GAU C(dTdT)-3'를 사용하였다. 하기 표 2에서 단위는 중량(μ g)이다.

[0049] [표 2]

	실시예 5	실시예 6	실시예 7	실시예 8
VEGF siRNA	1	1	1	1
키토산 HCl	17.1	17.1	8.6	8.6
티아민피로포스페이트	2.9	2.9	2.9	2.9
프로타민	0.6	0.6	5	5
Lipoid S-100	32	30.4	32	30.4
DSPE-mPEG2000	0	1.6	0	1.6

[0050] [0051] <실시예 9~14> Gataparsen 유전자 전달용 조성물의 제조

[0052] 먼저 분자량 150~400kDa 키토산 HCl 4mg, 티아민피로포스페이트 2mg, 프로타민 0.5mg을 각각 멸균 증류수 1ml에 녹인 용액을 제조하고 상기 용액들을 0.22 μ m 필터로 여과하였다. Gataparsen(survivin antisense) 유전자 (바

이오니아)는 멸균 증류수를 이용하여 1mg/ml의 농도로 제조하였다. 포스포리피드로서 Lipoid S-100 및 DSPE-mPEG2000을 하기 표 3에 나타난 Lipoid S-100과 DSPE-mPEG2000의 중량비와 같이, 포스포리피드 총량으로서 30mg이 되도록 하여 에탄올 1ml에 녹인 용액을 제조하고 0.22 μ m 필터로 여과하였다. 하기 표3의 중량비가 되도록 Gataparsen(survivin antisense) 유전자 수용액과 프로타민 용액을 혼합하여 전복합체를 형성시킨 후, 수용성 키토산, 티아민피로포스페이트 및 포스포리피드 용액을 혼합하여, 나노복합체를 함유하는 조성물을 제조하였다. 여기서, gataparsen의 시퀀스는 3'-d(P-thio)([2'-O-(2-methoxyethyl)]m5rU-[2'-O-(2-methoxyethyl)]rG-[2'-O-(2-methoxyethyl)]m5rU-[2'-O-(2-methoxyethyl)]rG-m5C-T-A-T-T-m5C-T-G-T-G-[2'-O-(2-methoxyethyl)]rA-[2'-O-(2-methoxyethyl)]rA-[2'-O-(2-methoxyethyl)]m5rU-[2'-O-(2-methoxyethyl)]m5rU)-5'를 사용하였다. 하기 표 3에서 단위는 중량(μ g)이다.

[0053] [표 3]

	실시예 9	실시예 10	실시예 11	실시예 12	실시예 13	실시예 14
Gataparsen	1	1	1	1	1	1
키토산 HCl	17.1	17.1	1.7	1.7	0.43	0.43
티아민피로포스페이트	2.9	2.9	0.3	0.3	0.07	0.07
프로타민	0.6	0.6	0.2	0.2	0.2	0.2
Lipoid S-100	32	30.4	12	11.4	6	5.7
DSPE-mPEG2000	0	1.6	0	0.6	0	0.3

[0054]

[0055] <실시예 15~17> Survivin siRNA 유전자 전달용 조성물의 동결건조물의 제조

[0056] 먼저 분자량 150~400kDa 키토산 HCl 4mg, 티아민피로포스페이트 2mg, 프로타민 0.5mg을 각각 멸균 증류수 1ml에 녹인 용액을 제조하고 상기 용액들을 0.22 μ m 필터로 여과하였다. Survivin siRNA 유전자는 멸균 증류수를 이용하여 1mg/ml의 농도로 제조하였다. 포스포리피드로서 Lipoid S-100 30mg을 에탄올 1ml에 녹인 용액을 제조하고 0.22 μ m 필터로 여과하였다. 표 4의 중량비가 되도록 Survivin siRNA 유전자 수용액과 프로타민 용액을 혼합하여 전복합체를 형성시킨 후, 수용성 키토산, 티아민피로포스페이트 및 포스포리피드 용액을 혼합하여, 나노복합체를 함유하는 조성물을 제조하였다. 여기서, survivin siRNA의 시퀀스는 실시예 1~4에서와 동일한 것을 사용하였다. 여기에 미리 멸균 증류수에 30% 용액으로 제조한 당류의 부형제(트레할로즈 (Trehalose SG, Hayashibara), 글루코즈)를 표 4의 중량비와 같이 혼합한 후 -70 $^{\circ}$ C로 냉동시키고 동결 건조하여 고체상을 제조하였다. 하기의 표 4에서 단위는 중량(μ g)이다.

[0057] [표 4]

	실시예 15	실시예 16	실시예 17
Survivin siRNA	1	1	1
키토산 HCl	17.1	17.1	17.1
티아민피로포스페이트	2.9	2.9	2.9
프로타민	0.6	0.6	0.6
Lipoid S-100	32	32	32
트레할로스	600	300	300
글루코즈	0	150	300

[0058]

[0059] [비교예]

[0060] <비교예 1> 유전자, 프로타민, 티아민피로포스페이트 및 포스포리피드로 구성된 조성물의 제조

[0061] 조성성분 중 키토산 HCl 을 배제한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방법으로 나노복합체를 함유하는 조성물을 제조하였다. 그 조성은 하기 표 5와 같았다 (단위: μg). 이를 본 발명의 유전자 전달용 조성물(실시예 1)과 효과 대비를 위한 대조군으로 사용하였다.

[0062] [표 5]

	비교예 1
Survivin siRNA	1
티아민피로포스페이트	2.9
프로타민	0.6
Lipoid S-100	32

[0063]

[0064] <비교예 2> 유전자, 수용성 키토산, 프로타민 및 포스포리피드로 구성된 조성물의 제조

[0065] 조성성분 중 티아민피로포스페이트를 배제한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방법으로 나노복합체를 함유하는 조성물을 제조하였다. 그 조성은 하기 표 6과 같았다 (단위: μg). 이를 본 발명의 유전자 전달용 조성물(실시예 1)과 효과 대비를 위한 대조군으로 사용하였다.

[0066] [표 6]

	비교예 2
Survivin siRNA	1
키토산 HCl	17.1
프로타민	0.6
Lipoid S-100	32

[0067]

[0068] <비교예 3> 유전자, 수용성 키토산, 티아민피로포스페이트 및 포스포리피드로 구성된 조성물의 제조

[0069] 조성성분 중 프로타민을 배제한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방법으로 나노복합체를 함유하는 조성물을 제조하였다. 그 조성은 하기 표 7과 같았다 (단위: μg). 이를 본 발명의 유전자 전달용 조성물(실시예 1)과 효과 대비를 위한 대조군으로 사용하였다.

[0070] [표 7]

	비교예 3
Survivin siRNA	1
키토산 HCl	17.1
티아민피로포스페이트	2.9
Lipoid S-100	32

[0071]

[0072] <비교예 4> 유전자, 수용성 키토산, 티아민피로포스페이트 및 프로타민로 구성된 조성물의 제조

[0073] 조성성분 중 포스포리피드를 배제한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방법으로 나노복합체를 함유하는 조성물을 제조하였다. 그 조성은 하기 표 8과 같았다 (단위: μg). 이를 본 발명의 유전자 전달용 조성물(실시예 1)과 효과 대비를 위한 대조군으로 사용하였다.

[0074] [표 8]

	비교예 4
Survivin siRNA	1
키토산 HCl	17.1
티아민피로포스페이트	2.9
프로타민	0.6

[0075]

[0076] <비교예 5> 유전자, 수용성 키토산, 티아민피로포스페이트, 프로타민 및 포스포리피드로 구성된 조성물의 제조

[0077] 실시예1의 Survivin siRNA의 in vivo 종양 증식 억제 활성을 확인하기 위하여, 조성성분 중 Survivin siRNA 유전자 대신 Fluorescein-labeled dsRNA oligomer(FL dsRNA, Invitrogen) 유전자를 사용한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방법으로 나노복합체를 함유하는 조성물을 제조하였다. 그 조성은 하기 표 9와 같았다 (단위: μg). 여기서, FL dsRNA의 시퀀스는 5'-UUG UUU UGG AGC ACG GAA A(dTdT)-3'를 사용하였다.

[0078] [표 9]

	비교예 5
FL dsRNA	1
키토산 HCl	17.1
티아민피로포스페이트	2.9
프로타민	0.6
Lipoid S-100	32

[0079]

[0080] <비교예 6> 유전자, 수용성 키토산, 티아민피로포스페이트로 구성된 조성물의 제조

[0081] 조성성분 중 프로타민과 포스포리피드를 배제한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방법으로 나노복합체를 함유하는 조성물을 제조하였다. 그 조성성분의 함량은 하기 표 10과 같았다 (단위: μg). 이를 본 발명의 유전자 전달용 조성물(실시예 1)과 효과 대비를 위한 대조군으로 사용하였다.

[0082] [표 10]

	비교예 6
Survivin siRNA	1
키토산 HCl	17.1
티아민피로포스페이트	2.9

[0083]

[0084] <비교예 7> 유전자, 수용성 키토산 및 포스포리피드로 구성된 조성물의 제조

[0085] 조성성분 중 티아민피로포스페이트와 프로타민을 배제한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방법으로 나노복합체를 함유하는 조성물을 제조하였다. 그 조성은 하기 표 11과 같았다 (단위: μg). 이를 본 발명의 유전자 전달용 조성물(실시예 1)과 효과 대비를 위한 대조군으로 사용하였다.

[0086] [표 11]

	비교예 7
Survivin siRNA	1
키토산 HCl	17.1
Lipoid S-100	32

[0087]

[0088] [실험예]

[0089] <실험예 1> 유전자 전달용 조성물 내 나노복합체 형성 확인

[0090] 상기 실시예 1 에서 제조된 조성물에 대하여 급속 동결 전자현미경(Tecnai 12 electron microscope, 필립스, 네델란드)을 이용하여 나노복합체 형성을 관찰하였다. 실시예1에서 제조된 조성물을 얇은 수막형태로 그리드(grid) 위에 올린 다음 -170℃에서 급속 동결하였다. 이어서, 제조사 설명서에 따라 그리드 위의 급속 동결된 조성물 내에 형성된 나노복합체를 전자현미경을 통해 관찰하였다(도 1).

[0091] 도 1에서 보는 바와 같이, 본 발명의 유전자, 수용성 키토산, 티아민피로포스페이트, 프로타민 및 포스포리피드로 조성된 유전자 전달용 조성물 내에 구형의 전형적인 나노복합체가 형성되었음을 확인하였다.

[0092] <실험예 2> 유전자 전달용 조성물 내 형성된 나노복합체의 입자경 측정

[0093] 상기 실시예 1~4, 11 에서 제조된 조성물들에 대하여 ELS(Electrophoretic Light Scattering Spectrophotometer) 입도 및 전하 분석기(ELS-Z, 오즈카, 일본)를 이용하여 입자경을 측정하였다. 실시예 1~4, 11에서 제조한 조성물들을 ELS 제조사 설명서를 따라서 particle size cell을 이용하여 입자경을 측정하였다(도 2).

[0094] 도 2에서 보는 바와 같이, 유전자, 수용성 키토산, 티아민피로포스페이트, 프로타민 및 포스포리피드로 조성된 유전자 전달용 조성물(실시예 1~4)은 모두 200~300nm의 균일한 입자경을 가지는 나노복합체를 함유하는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 본 발명의 조성물이 유전자 전달을 위한 세포투과에 적합한 나노 직경을 가지는 복합체를 형성함을 의미한다.

[0095] <실험예 3> 유전자 전달용 조성물 내 형성된 나노복합체의 표면전하 측정

[0096] 상기 실시예 1, 3 및 11 에서 제조된 조성물들에 대하여 ELS(Electrophoretic Light Scattering Spectrophotometer) 입도 및 전하 분석기(ELS-Z, 오즈카, 일본)를 이용하여 표면전하를 측정하였다. 실시예 1, 3 및 11에서 제조한 조성물들을 ELS 제조사 설명서를 따라서 zeta potential cell을 이용하여 입자 표면전하를 측정하였다(도 3).

[0097] 도 3에서 보는 바와 같이, 본 발명의 유전자, 수용성 키토산, 티아민피로포스페이트, 프로타민 및 포스포리피드로 조성된 유전자 전달용 조성물 내 나노복합체는 15mV 이상의 양성(cationic)의 표면전하를 가지는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 본 발명의 조성물이 유전자 전달을 위한 세포투과에 적합한 양이온성의 표면전하를 가지는 이온 복합체를 형성함을 의미한다.

[0098] <실험예 4> 유전자 전달용 조성물의 표적 단백질 발현 억제력 in-vitro 확인

[0099] 상기 실시예 1, 11, 및 비교예 1, 2, 7 의 조성물 처리군과 유전자 단독 처리군의 표적 단백질 발현 억제 효과를 평가하기 위해 survivin ELISA kit(R&D systems, catalog No. SVE00)를 사용하여 하기의 방법으로 실험을 수행하였다.

[0100] 사람의 전립선 암세포주(PC-3, ATCC)를 6 웰 플레이트에 웰 당 1×10^5 개수로 접종하여 10% FBS(fatal bovine serum) 배지 조성 (pH7.2)으로 37℃, 5% CO₂ 조건에서 세포를 48시간 배양하였다. 유전자 약물을 투여하기 전에 10% FBS가 포함된 새 배지 (pH7.2)로 교체를 해 준 후, 2시간 동안 안정화 시켰다. 그 후에 실시예 1, 11 의 조성물, 비교예 1, 2, 7의 조성물 (각각, 실시예 1, 11, 비교예 1, 2, 7 처리군), 및 유전자 단독 (유전자 단독

처리군)을 각각 전립선 암세포주에 첨가한 후 37℃, 5% CO₂ 조건에서 세포를 48시간 배양하였다. 이때 투여되는 유전자 약물은 2μg/웰이다. 배양이 종료되면 배지를 제거한 후 세포 용해 완충액(cell lysis buffer; cell signaling technology) 500μl을 첨가하여 전립선 암세포주를 수거하였다. 그후, 수거물에서 세포 잔해물과 상층액을 분리하기 위하여 12000rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 효력 평가에는 상층액 100μl을 사용하였으며, survivin ELISA kit로 제조사의 설명서에 따라 배지 샘플에 포함되어 있는 survivin 단백질의 발현량을 측정하였다(도 4).

[0101] 도 4에서 보는 바와 같이, 본 발명의 유전자, 수용성 키토산, 티아민피로포스페이트, 프로타민 및 포스포리피드(실시예 1, 실시예 11)로 조성된 유전자 전달용 조성물은 표적 단백질의 발현을 현저히 억제하였다. 이는 본 발명의 조성물이 우수한 유전자 전달 효능을 나타냄을 의미한다. 반면에, 유전자 단독 처리군과 본 발명의 조성에서 키토산이 제외된 비교예 1의 경우 표적 단백질의 발현을 전혀 억제시키지 못하는 것으로 확인되었다. 이는 키토산이 유전자 전달에 중요한 역할을 하며, 본 발명의 조성에서 키토산이 배제될 경우 유전자 전달기능이 완전히 상실될 수 있음을 나타낸다.

[0102] 그리고 본 발명의 조성에서 티아민피로포스페이트가 제외된 비교예 2는 60%의 표적 단백질 발현율을 나타내었다. 이것은 본 발명의 조성에서 티아민피로포스페이트가 배제될 경우, 생리학적 pH 조건 (pH7~7.4)에서 유전자와 키토산의 결합력이 약해져 유전자 전달 효능이 본 발명의 조성에 비하여 현저히 감소됨을 나타낸다. 또한 티아민피로포스페이트와 프로타민이 제외된 비교예 7의 경우도 68%의 표적 단백질 발현율을 나타내어 유전자 전달 효능이 본 발명의 조성에 비하여 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다.

[0103] <실험예 5> 유전자 전달용 조성물의 혈청에서의 입자 안정성 평가

[0104] 상기 실시예 1, 3, 11의 조성물과 비교예 2, 3, 4, 6의 조성물을 50% 혈청 (Invitrogen) 상태가 되도록 혼합하고 3시간 후에 ELS(Electrophoretic Light Scattering Spectrophotometer) 입도 및 전하 분석기(ELS-Z, 오즈카, 일본)를 이용하여 입자경 변화를 측정하였다. 상기 제조한 조성물들은 ELS 제조사 설명서를 따라서 각각 particle size cell을 이용하여 입자경을 측정하였다(도 5).

[0105] 도 5에서 보는 바와 같이, 본 발명의 조성물 (실시예 1, 3, 11)로 형성된 나노복합체는 증류수에서와 마찬가지로 혈청 내에서도 최초 제조되었을 때의 200~300nm 입자경을 그대로 유지하는 것을 확인하였다.

[0106] 반면에, 본 발명의 조성에서 프로타민이 제외된 비교예 3의 경우 1,500nm 이상의 입자 사이즈가 측정되어, 혈청 내 단백질과의 응집이 심하게 일어나 입자 안정성이 유지되지 못하는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명의 조성에서 포스포리피드가 제외된 비교예 4의 경우도 4,000nm 이상의 입자 사이즈가 관찰되어, 혈청 내 단백질과의 응집이 더욱 심하게 일어나 입자 안정성이 떨어짐을 알 수 있었다. 또한, 본 발명의 조성에서 프로타민과 포스포리피드가 제외된 비교예 6의 경우도 3,000nm 이상의 입자 사이즈가 관찰되어, 혈청 내 단백질과의 응집이 매우 심하게 일어나 입자안정성이 떨어짐을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 조성과 같이 조성되어야만 혈청 단백질 등과 응집되는 현상을 방지할 수 있으며, 키토산으로 구성되는 나노복합체의 혈청 내 안정성을 확보할 수 있음을 의미한다.

[0107] 그리고, 본 발명의 조성에서 티아민피로포스페이트가 제외된 비교예 2의 경우도 1,000nm 이상의 입자 사이즈가 관찰되어, 혈청에서의 입자 안정성이 유지되지 못함을 확인하였다. 이는 본 발명의 조성 중 유전자, 수용성 키토산, 프로타민 및 포스포리피드가 조성되더라도 유전자와 키토산 간의 결합력을 유지시키는 티아민피로포스페이트가 배제되면 혈청에서 복합체가 쉽게 풀어져 결국 입자 안정성이 유지되지 못하기 때문이다.

[0108] 결론적으로, 키토산이 유전자 전달체로서 생체 내에 적용되기 위해서는 반드시 혈청 내에서의 입자 안정성이 확보되어야 하는데, 이를 달성하기 위해서는 본 발명의 조성과 같이 조성되어야만 함을 확인할 수 있었다.

[0109] <실험예 6> 유전자 전달용 조성물의 동결건조물 제조 및 입자경 측정

[0110] 상기 실시예 15, 16, 및 17에서 제조된 유전자 전달용 조성물의 동결건조물을 유전자로서로서 100μg/ml이 되도록 정제수로 재분산시킨 후, ELS(Electrophoretic Light Scattering Spectrophotometer) 입도 및 전하 분석기(ELS-Z, 오즈카, 일본)를 이용하여 입자경을 관찰하였다. 상기 제조한 조성물들은 ELS 제조사 설명서를 따라서 각각 particle size cell을 이용하여 입자경을 측정하였다(도 6).

[0111] 도 6에서 보는 바와 같이, 실시예 15~17의 조성물은 동결건조 후 재수화하여도 약 300nm의 입자경을 유지할 수 있음을 확인하였다. 즉, 당류를 추가적으로 첨가하여 동결건조물을 제조함으로써, 보관 및 유통과정에서 유전자 약물 전달용 복합체를 동결건조물 형태로 안정하게 보관할 수 있으며, 또한, 생체 적용 시에 재분산하여 사용할

수 있음을 의미한다.

[0112] <실험예 7> 유전자 전달용 조성물의 in vivo 종양 증식 억제력 평가

[0113] 상기 실시예 1의 조성물 및 비교예 5, 7의 조성물의 생체 내에서의 유전자 약물 전달능을 평가하기 위해 전립선암이 이식된 면역부전 마우스 모델을 사용하였다. 전립선암이 이식된 면역부전 마우스 모델을 구축하기 위해 RPMI 배양액 50 μ l에 재분산된 전립선 암세포주 2×10^6 개를 매트릭젤(Matrigel, BD biosciences) 50 μ l와 혼합하고, 이를 5주령 면역부전 수컷 마우스 피하에 주사하였다. 종양 크기를 100mm³까지 증식시킨 다음, 3그룹의 마우스에 대하여 (그룹 당 8마리), 각각 유전자량으로 100 μ g/ml이 되도록 실시예 1의 조성물, 비교예 5, 7의 조성물을 마우스 꼬리 정맥에 주사하였으며, 약물 미처리군을 대조군으로 하였다(무처리군). 이때 1회 투여되는 유전자 약물은 40 μ g이며 2주간 총 6회 투여하였다. 종양 크기는 캘리퍼스를 이용하여 종양 중부의 너비(짧은 쪽)와 길이 (긴 쪽)를 측정된 뒤, 아래 공식으로 산출하였다(Biomaterials, 2011; 32: 9786-9795).

[0114] 종양 크기 (mm²) = (너비² x 길이) / 2

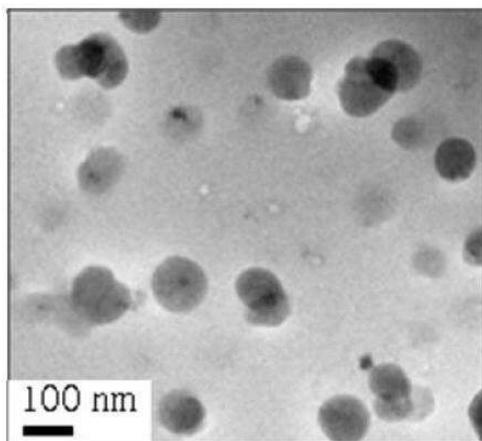
[0115] 그 결과를 도7에 나타내었다. 도 7에서 보는 바와 같이 전립선암이 이식된 면역부전 마우스 모델에 실시예 1의 유전자 전달용 조성물을 정맥 주사한 경우, in vivo 종양 증식이 현저하게 억제됨을 관찰하였다. 특히, 실시예 1의 조성물이 정맥 주사된 군은 미처리군과 비교하여 Day 14과 Day 18에 각각 약 77%와 약 74%의 우수한 종양 증식 억제효과를 나타내었다. 반면, 미처리군과 종양 증식 억제력이 없는 유전자를 포함한 비교예 5의 경우는 종양의 증식이 억제되지 않고 증식이 계속적으로 진행되는 것을 확인하였다. 그리고 본 발명의 조성에서 티아민 피로포스페이트와 프로타민이 제외된 비교예 7의 경우는 처음 투여 날부터 일주일까지는 실시예 1의 조성물과 유사한 수준의 효과를 나타내었으나, 이후부터 효과가 감소되어 Day 18에는 미처리군에 비하여 약 32% 이하의 종양 증식 억제효과를 나타내어 본 발명의 조성물에 비해 유전자 전달 효능이 현저하게 낮음이 확인되었다.

[0116] 이 결과는 본 발명의 유전자 전달용 조성물이 실제 in vivo 정맥 주사를 통해서도 우수한 유전자 전달효과를 나타낸다는 것을 증명하는 것이다.

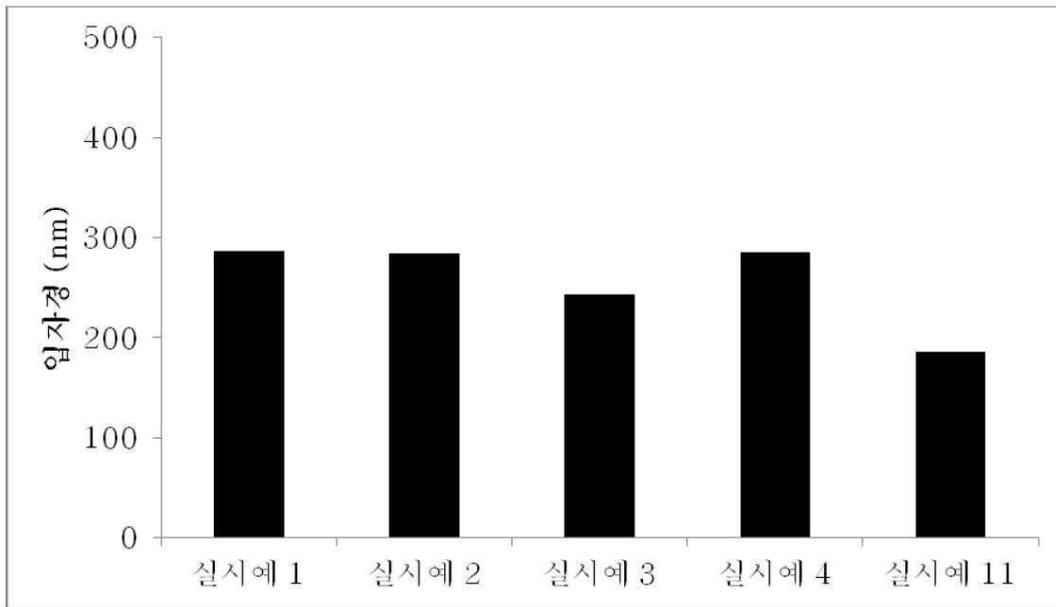
[0117] 기존의 키토산 소재는 낮은 유전자 결합력과 혈청 내 불안정성 때문에 유전자 전달용 의약품으로서 실제 생체에 적용되지 못하는 문제점을 안고 있었다. 이에 본 발명자들은 상기의 문제점들을 모두 극복할 수 있는 유전자 전달용 조성물을 착안하였으며, 본 실험을 통하여 본 발명의 조성물이 실제로 in vivo 전신투여에서 우수한 유전자 전달효과를 나타냄을 증명하였다.

도면

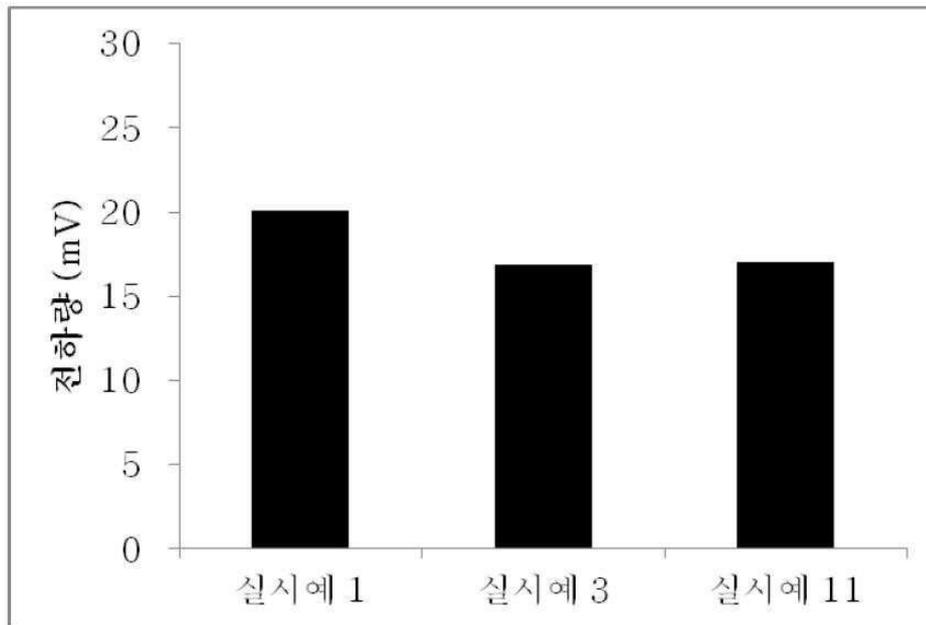
도면1



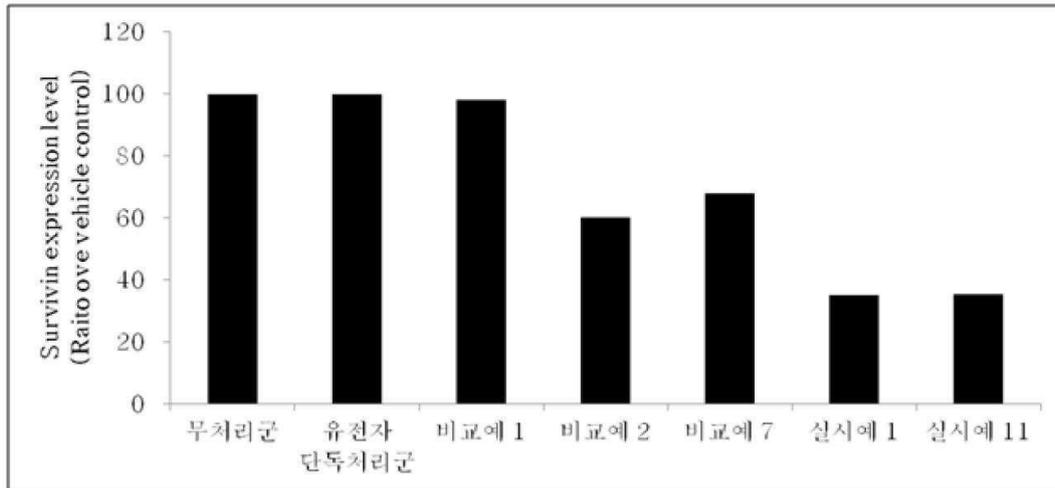
도면2



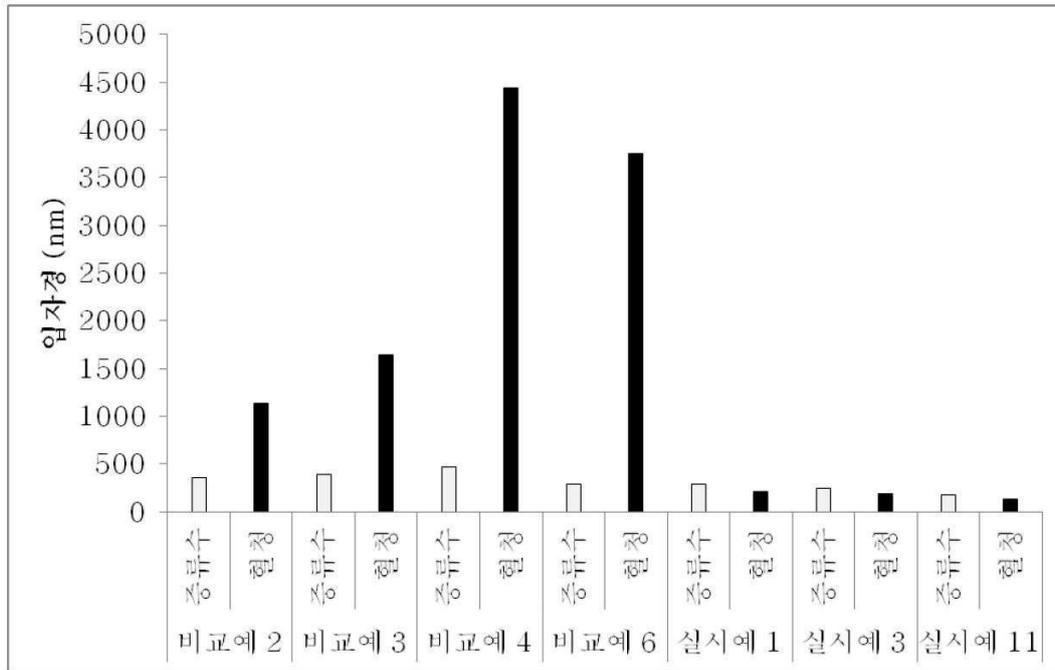
도면3



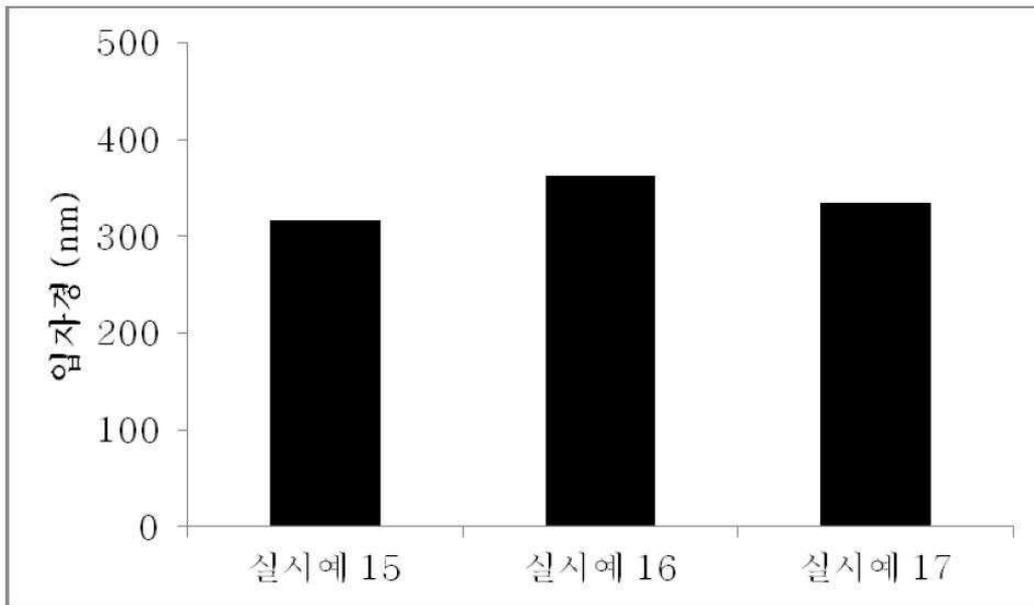
도면4



도면5



도면6



도면7

