



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년10월18일
(11) 등록번호 10-2454966
(24) 등록일자 2022년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5115 (2013.01)
A61K 47/554 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2020-0051711
(22) 출원일자 2020년04월28일
심사청구일자 2020년04월28일
(65) 공개번호 10-2021-0133360
(43) 공개일자 2021년11월08일
(56) 선행기술조사문헌
KR101741977 B1*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
케이비바이오메드 주식회사
충청북도 충주시 대학로 50 화학생명관, 나노바이오연구실(대소원면, 충주대학교)
(72) 발명자
이용규
충북 충주시 연수동산로 12, 107-603
황용화
서울 서초구 반포대로 9길 63, 301호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인지담

전체 청구항 수 : 총 9 항

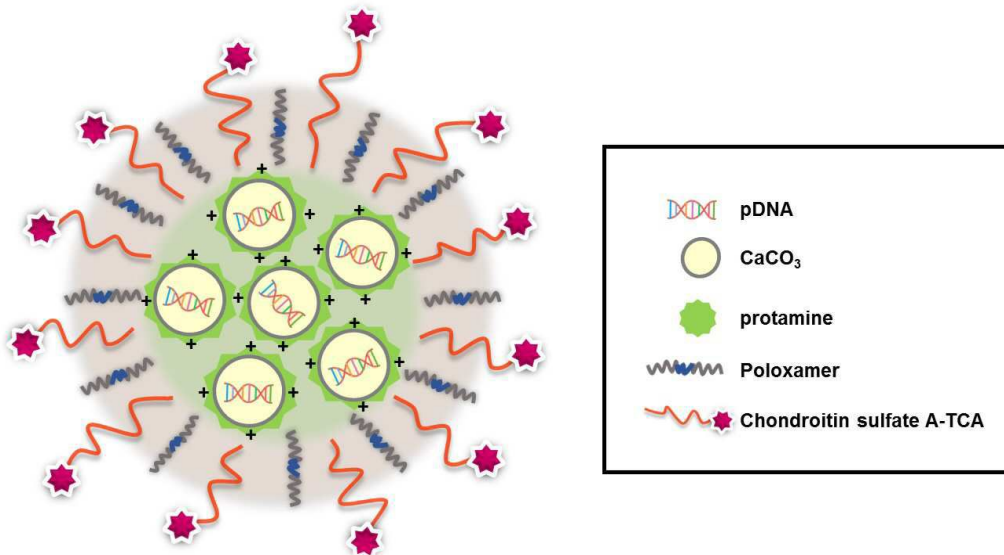
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 핵산 분자 전달용 나노입자

(57) 요약

본원에서는 핵산 분자, 탄산칼슘, 및 양이온성 고분자를 포함하는, 핵산 분자 전달용 나노입자를 개시한다. 본원에서 제시하는 핵산 분자 전달용 나노입자는 음이온성의 유전자가 양이온성 고분자와 탄산칼슘에 의해 효과적으로 응축된 구조를 가지며, 본 발명은 기존의 탄산칼슘 제제가 체내에서 갖는 안정성과 관련한 문제점을 개선함에 특징이 있다. 이에 따라, 상기 나노입자는 핵산 전달체로서 활용될 수 있다.

대표도 - 도7



- (52) CPC특허분류
A61K 47/61 (2017.08)
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 48/0033 (2013.01)
A61K 48/0075 (2013.01)
A61K 9/5169 (2013.01)
- (72) 발명자
김민준
 서울특별시 강남구 영동대로128길 5, 102동 301호
오정주
 경기도 남양주시 도농로 34, 401동 1903호 (다산동, 플루리움)
이승아
 서울특별시 성동구 금호로3길 11, 212동 802호
- (56) 선행기술조사문헌
 KR1020170125793 A*
 Molecular BioSystems. 2014. Vol.10, pp.672-678.*
 Biotechnology & Applied Biochemistry. 2003. Vol.37, pp.267-271.*
 Crystal Growth & Design. 2016. Vol.16, pp.1311-1319.*
 KR1020180047442 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10211373
과제번호	10211373
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	창업진흥원 / 한국엔젠헤ALTH자협회
연구사업명	TIPS 프로그램 창업사업화 자금지원
연구과제명	탁월한 약효와 안전성을 갖춘 경구용 GLP-1 gene 당뇨병 치료제
기여율	80/100
과제수행기관명	케이비바이오메드 주식회사
연구기간	2019.05.01 ~ 2020.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111950
과제번호	2019R1A4A1024116
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	탈모증 치료용 마이크로니들 어레이 기반 모낭 줄기세포 전달 시스템 개발
기여율	20/100
과제수행기관명	부산대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

핵산 분자, 탄산칼슘, 및 양이온성 고분자를 포함하는, 핵산 분자 전달용 나노입자에 있어서,

상기 양이온성 고분자는 프로타민 설페이트이고,

상기 나노입자는 핵산 분자 및 수용성 칼슘염을 포함하는 용액 A 및 프로타민 설페이트 및 수용성 탄산염을 포함하는 용액 B를 혼합하여 공침전 반응에 의해 형성되는 것이고,

상기 용액 A 및 B의 혼합액은 핵산 분자 1 μ g 당 수용성 칼슘염을 1 내지 3M, 프로타민 설페이트를 1 내지 20 μ g 및 수용성 탄산염을 0.01 내지 0.1M, 폴록사머는 0.1 중량% 내지 1 중량%, 아르기닌은 0.1M 내지 0.3M 포함하는, 핵산 분자 전달용 나노입자.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 탄산칼슘과 상기 핵산 분자는 응집되어 복수의 미립자들을 형성하고, 상기 프로타민 설페이트는 상기 미립자들을 둘러싸는 형태를 갖는 것인, 핵산 분자 전달용 나노입자.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 용액 A, 용액 B, 또는 이들 양자는 다가 알코올, 폴리아크릴산, 및 리소솜 양성 작용제 (lysosomotropic agent)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 추가로 포함하고,

상기 다가 알코올은 글리세롤이고, 리소솜 양성 작용제는 PVP 또는 솔비톨인, 핵산 분자 전달용 나노입자.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 다가 알코올은 전체 용액을 기준으로 5 내지 20 중량% 포함되는 것인, 핵산 분자 전달용 나노입자.

청구항 9

삭제

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 폴리아크릴산은 전체 용액을 기준으로 0.1 내지 1M 포함되는 것인, 핵산 분자 전달용 나노입자.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 폴리아크릴산의 분자량은 1,000~10,000 달톤인 것인, 핵산 분자 전달용 나노입자.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 리소좀 형성 작용제는 전체 용액을 기준으로 0.2 내지 0.6M 포함되는 것인, 핵산 분자 전달용 나노입자.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 핵산 분자 및 양이온성 고분자의 중량비는 1:1 내지 1:20인 것인, 핵산 분자 전달용 나노입자.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 양이온성 고분자의 중량평균 분자량은 100,000 내지 300,000인 것인, 핵산 분자 전달용 나노입자.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 핵산 분자 전달용 나노입자에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 유전자 치료는 유전자 조작을 기반으로 치료 타겟 유전자를 전달하는 치료기법으로 특히, 체내 유전자 치료 방법은 환자의 필요한 타겟 유전자가 포함되어 있는 운반체를 직접 전달하는 방식이다. 이러한 체내 유전자 치료 방법은 체외 유전자 치료 방법과는 다르게 환자의 세포를 채취 후 치료 타겟 유전자를 투입하지 않아도 되므로 특이성이 낮아 경제적 비용이 절감되는 이점이 있지만 해당 유전자가 목표로 하는 세포에 도달하기 전에 면역반응 등에 의하여 치료 효과가 저해될 수 있는 문제점을 가지고 있다.

[0004] 체내 유전자 전달 방법으로는 바이러스를 기반으로 하는 운반체 (벡터)와 바이러스를 사용하지 않는 비바이러스성 유전자 전달체로 나눌 수 있다. 현재 다양한 질환에서 사용되는 대부분의 유전자 치료 연구는 절반이상이 바

이러스성 벡터 (77%)를 사용하고 있으며 비바이러스성 유전자 전달체는 상대적으로 연구가 적은 편이다. 바이러스성 벡터의 경우 흔히 아데노바이러스 (adenovirus) 벡터, 레트로바이러스 (retrovirus) 혹은 아데노부속바이러스 (adeno-associated virus, AAV)를 사용하는데, 이러한 바이러스 기반 유전자 치료는 유전자 전달 효율이 상당히 높은 장점을 가지지만 오프-타겟 효과 (타겟 이외 조직 및 장기에서의 치료 유전자가 발현되는 현상)가 상당한 문제로 지적이 되어 있고, 효율이 높은 만큼 오프-타겟의 위험이 높으며 병원성이 있는 바이러스므로 안전성 문제를 가지고 있고 오랜 기간 지속적으로 바이러스성 유전자 치료제에 노출이 되면 암을 유발하는 사례가 보고되고 있다.

[0005] 비바이러스성 유전자 전달체는 인체 세포에 바이러스 유전물질의 유입이 되지 않으며 생산의 용이성, 전달체 내 유전자의 크기 무제한성 및 숙주에 대한 면역반응이 낮음에 따른 낮은 부작용 등이 장점으로 알려져 있다. 하지만 바이러스 벡터에 비해 세포 내 유전자 도입 효율이 낮다는 단점을 가지고 있다.

[0006] 비바이러스성 유전자 전달체의 대표적인 예로는 양이온을 가지는 PEI, PLL (poly-L-lysine), liposome 등이 있다. 하지만 이러한 대부분의 양이온성의 물질들은 대표적인 세포 독성물질이며, 유전자 전달 효율 또한 불규칙한 단점을 가지고 있다. 따라서 유전자 전달 효율을 높이면서 안정적으로 세포 내로 치료 유전자를 전달하는 새로운 전달체의 개발이 필요하다.

[0007] 비바이러스성 유전자 전달체로 예전부터 유전자의 세포 전달 (transfection)을 위하여 인산칼슘 침전법(calcium phosphate precipitation; CaP or hydroxyapatite; HAP)을 이용하여 많은 연구가 진행이 되어 왔다. 하지만 이러한 인산칼슘 유전자 전달체는 제조의 방법이 까다로우며 (pH 의존적, buffer 조성 의존적, 짧은 보관 기간, 온도 등) 유전자의 발현이 불규칙하며 낮은 재현성과 특정 세포 배양액에서는 효율이 낮다는 단점을 가지고 있다. 가장 치명적인 단점으로는 대량 생산 공정이 쉽지 않아 in vivo의 적용이 어렵다는 점이다. 이러한 원인으로는 particle의 안정성 (stability)가 좋지 못해 size growth가 일어나며, 물질의 분산력 (disperse)가 좋지 못하여 정제가 어렵기 때문이다. 한편 나노탄산칼슘(Calcium carbonate; CaCO₃)은 상당히 뛰어난 생체적합성 (biocompatibility)을 가지며 낮은 독성, 생분해성 (biodegradability)의 장점을 바탕으로 오랜 기간 동안 약물 전달체로 연구가 되어왔다. 최근 문헌에 따르면 이러한 나노탄산칼슘도 인산칼슘과 마찬가지로 유전자와의 결합력 (binding affinity)가 좋아 유전자 전달체로서의 연구가 진행이 되고 있다. 그러나 상대적으로 인산칼슘보다 제조 방법이 간단하지만 마찬가지로 대량 공정 (scale-up)이 힘들기 때문에 동물실험으로의 적용이 어렵다는 문제를 가지고 있다. 관련하여, 등록특허 제10-1447901호는 지방세포 표적 비바이러스성 유전자 전달체를 개시하고 있으나, 안정성과 효율성이 모두 담보되지 않는 못하여 유전자 전달체로서 활용되지 못하는 한계가 있다.

[0008] 이러한 상황에서, 본 발명자들은 핵산 전달에 적합한 비바이러스성 핵산 전달 나노입자를 개발하였고, 이 입자를 코어로 하며 담즙산을 포함하는 셸이 코팅된 경구 전달용 복합체를 설계하였으며, 이 복합체의 유전자 전달 능력을 실증적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 이루고자 하는 하나의 기술적 과제는, 핵산 분자, 탄산칼슘, 및 양이온성 고분자를 포함하는, 핵산 분자 전달용 나노입자를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명이 이루고자 하는 다른 하나의 기술적 과제는, 상기 나노입자; 및 담즙산 또는 이의 유도체가 음이온성 다당류가 결합된 컨쥬게이트를 포함하는 복합체로서, 상기 컨쥬게이트는 상기 나노입자와 정전기적 상호작용으로 결합된 구조를 갖는, 경구용 핵산 분자 전달 복합체를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0016] 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에

의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[0017] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0019] **나노입자**

[0020] 전술한 과제를 해결하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 핵산 분자, 탄산칼슘, 및 양이온성 고분자를 포함하는, 핵산 분자 전달용 나노입자를 제공한다.

[0021] 본원에서 제공하는 나노입자(nanoparticle)는 약 1 내지 1000 나노미터(nm) 사이의 크기, 예컨대 100 내지 500 nm의 현미경적 크기이며, 핵산 분자의 전달을 위한 콜로이드성 입자를 지칭한다.

[0022] 본 발명의 나노입자는 유전자 전달체로서 활용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 나노입자는 그 자체로 비바이러스성 유전자 전달체로 핵산 분자 전달에 사용될 수 있으며, 셸(shell)과 같은 구조에 둘러싸인 코어의 형태로서 핵산 분자 전달에 사용될 수 있다. 본 발명의 나노입자는 체내 세포밖에서 안정적인 형태를 나타내며 세포 내에 유입될 경우 리소좀(lysosome) 등에 의해 분해되어 핵산 분자를 전달할 수 있다. 본원에서는 나노입자 대신 코어입자, 벡터입자 또는 전달체로 지칭되기도 한다.

[0023] 본원에서 제시하는 나노입자는 핵산 분자, 탄산칼슘, 및 양이온성 고분자를 포함하며, 상기 탄산칼슘과 상기 핵산 분자는 서로 응집되어 복수의 미립자들을 형성하고, 상기 프로타민은 상기 미립자들을 둘러싸는 형태를 갖는 구조일 수 있다.

[0024] 본원의 일 구현예에 따르면, 나노입자는 양전하를 나타낼 수 있다. 제타 전위는 10 내지 30mV, 보다 구체적으로 15 내지 25mV를 나타낼 수 있다. 핵산이 음전하를 주로 나타내므로, 나노입자는 양전하를 나타내는 것이 안정적인 핵산의 담지를 나타낼 수 있으며, 콜로이드성 분산을 나타내는데 도움이 된다.

[0025] 본원의 일 구현예에 따르면, 나노입자의 형상은 제한되지 않으며, 구형, 산호형 (coral-like), 포도형 (grape-like), 각형 (angular), 마디형 (nodular), 박편형 (flaked), 또는 이들의 임의의 조합의 형상일 수 있다.

[0027] **핵산 분자**

[0028] 본원에서 제공하는 핵산 분자 전달용 나노입자 및 경구용 핵산 분자 전달 복합체는, 유전자 치료를 위해 대상체에 전달되는 핵산 분자를 포함한다.

[0029] 본원의 일 구현예에 따르면, 핵산 분자는 폴리펩티드를 암호화한다. 암호화된 폴리펩티드는 치료적 폴리펩티드일 수 있다. 예를 들어, 암호화된 폴리펩티드는 호르몬, 효소, 응집(coagulation) 또는 응고(clotting) 인자, 성장 인자, 항체 또는 항체의 부분, 혈관신생 조절자, 면역조절자, 통증 조절자, 수용체, 수송 단백질, 조절 단백질, 항원 또는 알러젠일 수 있다. 특히, 암호화된 폴리펩티드는 인터류킨(interleukin), 인터페론- α , IFN- β , IFN- γ 성장 인자 또는 이의 부분, 성장 인자 수용체 또는 이의 부분일 수 있다. 핵산 분자의 예는 GLP-1(glucagon-like peptide-1), GLA(α -galactosidase A), 아데노신 데아미나제(adenosine deaminase), 낭포성 섬유증 막관통 전도 레귤레이터(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR), 갈설패제(galsulfase), 라로니다제(laronidase), N-아세틸갈락토사민 6-설패타제(N-acetylgalactosamine 6-sulfatase), 페닐알라닌 암모니아 리아제(phenylalanine ammonia lyase), 산 알파 글루코시다제(acid alpha glucosidase), 이미글루세라제(imiglucerase), 알글루코시다제 알파 (alglucosidase alpha), 갑상선 자극 호르몬(thyrotropin), 성장 호르몬(growth hormone), 인슐린, 갑상선 호르몬(thyroid hormone), 에리트로포이에틴(erythropoietin, EPO), 인터류킨 1(interleukin-1, IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, 인터페론(IFN), 종양괴사인자(TNF), IL-12, IL-18, fms-관련 티로신 키나제 3(fltn3), 뉴로필린-2(NP2), 골형성 단백질(bone morphogenic protein, BMP), 표피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF), 에리트로포이에틴(erythropoietin, EPO), 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor, FGF), 과립구 콜로니 자극 인자(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), 간세포 성장 인자(hepatocyte growth factor, HGF), 인슐린 유사 성장 인자(insulin-like growth factor, IGF), 혈소판 유래 성장 인자(platelet derived growth factor, PDGF), 형질전환 성장 인자 α 및 β (transforming growth factor α and β , 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 표피 성장 인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR), 섬유아세포 성장 인자 수용체(fibroblast growth factor receptor, FGFR), FGFR 길항제(sFGFR), 형질전환 성장 인자

수용체(transforming growth factor receptor, TGF α), 혈관 내피 성장 인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), 플라스미노겐 액티베이터(plasminogen activator), 유로키나제(urokinase), 인자 VIII(factor VIII), 인자 IX(factor IX), 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand factor), 성장 호르몬(growth hormone), 금속단백질분해효소 트롬보스폰딘 모티프 1(metalloproteinase thrombospondin motifs 1, METH-1), METH-2, 트립토판닐-tRNA 신테타제(tryptophanyl-tRNA synthetase, TrpRS) 단편, 프롤리페린-관련 단백질(proliferin-related protein), 프로락틴(prolactin) 단편, 색소 상피 유래 성장 인자(pigment epithelium derived growth factor, PEDF), 바소스타틴(vasostatin), 안지오스타틴(angiostatin), 엔도스타틴(endostatin), 키니노스타틴(kininostatin), 피브리노젠-E(fibrinogen-E) 단편, 트롬보스폰딘(thrombospondin), 톰스타틴(tumstatin), 캔스타틴(canstatin), 레스틴(restin), 가용성 fms-유사 티로신 키나제-1(soluble fms-like tyrosine kinase-1, sFlt-1), 가용성 혈관 내피 성장인자 수용체(soluble vascular endothelial growth factor receptor, sFlk), 가용성 뉴로필린 1(soluble Neuropilin 1, sNRP1), 인터페론 감마-유도 단백질 10(IP-10), 혈소판 인자 4(Platelet factor 4, PF-4), 그로-베타(Gro-beta), 가용성 에프린 타입-B 수용체 4(soluble Ephrin type-B receptor 4, sEphB4), 세프린B2(sephrinB2), IGF-1, 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK), 카복시펩티다제 G2(carboxypeptidase G2, CPG2), 카복실에스터라제(carboxylesterase, CA), 사이토신 데아미나제(cytosine deaminase, CD), 사이토크롬 P450(cytochrome P450, cyt-450), 데옥시사이티딘 키나제(deoxycytidine kinase, dCK), 니트로리덕타제(nitroreductase, NR), 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(purine nucleoside phosphorylase, PNP), 티미딘 포스포릴라제(thymidine phosphorylase, TP), 수두 대상 포진 바이러스 티미딘 키나제(varicella zoster virus thymidine kinase, VZV-TK), 잔틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(xanthine-guanine phosphoribosyl transferase, XGPRT), 아스파르틸글루코사미니다제(Aspartylglucosaminidase), α -갈락토시다제 A(α -Galactosidase A), 팔미토일 단백질 티오에스터라제(Palmitoyl Protein Thioesterase), 트리펩티딜 펩티다제(Tripeptidyl Peptidase), 리소좀 막관통 단백질(Lysosomal transmembrane protein), 시스테인 트랜스포터(cysteine transporter), 산 세라미다제(acid ceramidase), 산 α -L-푸코시다제(acid α -L-fucosidase), 보호적 단백질(protective protein)/카텝신 A(cathepsin A), 산 β 글루코시다제(acid β glucosidase), 또는 글루코세레브로시다제(glucocerebrosidase), 산 β 갈락토시다제(acid β -galactosidase), 이두로네이트-2-설패타제(iduronate-2-sulfatase), α -L-이두로니다제(α -L-Iduronidase), 갈락토세레브로시다제(galactocerebrosidase), 산 α -만노시다제(acid α -mannosidase), 산 β 만노시다제(acid β -mannosidase), 아릴설패타제 B(arylsulfatase B), 아릴설패타제 A(arylsulfatase A), N-아세틸갈락토사민-6-설패이트 설패타제(N-Acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase), N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제(N-Acetylglucosamine-1-phosphotransperase), 산 스펅고미엘리나제(acid-sphingomyelinase), 니이만-픽병, 타입 C1(Niemann-Pick disease, type C1, NPC-1), β 헥소사미니다제 B(β -Hexosaminidase B), 헤파란 N-설패타제(Heparan N-sulfatase), α -N-아세틸글루코사미니다제(α -N-Acetylglucosaminidase, NaGlu), 아세틸-CoA:알파글루코사미닌드 N-아세틸트랜스퍼라제(Acetyl-CoA: α glucosaminide N-acetyltransferase), N-아세틸 글루코사민-6-설패이트 설패타제(N-Acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase), β 글루쿠로니다제(β -glucuronidase), 산 리파아제(acid lipase), 네프릴리신(neprilysin), 인슐린- 분해 효소 인슐리신(insulysin), 티멧 올리고펩티다제(thimet oligopeptidase), 칼빈딘 D28(calbindin D28), 파발부민(parvalbumin), 저산소증 유도 인자 1-알파(hypoxia induced factor 1-alpha, HIF1-alpha), 서투인-2(sirtuin-2, SIRT-2), 생존 운동 뉴런 단백질-1(survival motor neuron-1, SMN-1), SMN-2, 교세포 유래 신경영양 인자(glial cell neurotrophic factor, GDNF), 모양체 신경영양 인자(ciliary neurotrophic factor, CNF), 저밀도 지단백 수용체(LDLR), 지단백 리파아제(lipoprotein lipase, LPL), 알파 1-항 트립신(Alpha-1-Antitrypsin, AAT), UDP-글루쿠로닐-트랜스퍼라제(UDP-glucuronyl-transferase, UGT), UGT1A1, 글루코스-6 포스포타제(glucose-6 phosphatase), 포스포에놀피루베이트-카복시키나제(phosphoenolpyruvate-carboxykinase), 갈락토스-1 포스포에이트 유리딜 트랜스퍼라제(galactose-1 phosphate uridylyl transferase), 페닐알라닌 히드록실라제(phenylalanine hydroxylase), 분지쇄 알파-케토산 데하이드로지나제(branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase), 푸마릴아세토아세테이트 히드롤라제(fumarylacetoacetate hydrolase), 메틸말로닐-CoA 뮤타제(methylmalonyl-CoA mutase), 오르니틴 트랜스카바미라제(ornithine transcarbamylase), 아르지노숙신산 신테타제(argininosuccinic acid synthetase), 아데노신 데아미나제(adenosine deaminase), 하이포산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(hyposanthine guanine phosphoribosyl transferase), 비오틴다제(biotinidase), 베타-글루코세레브로시다제(beta-glucocerebrosidase), 베타-글루쿠로니다제(beta-gluronidase), 포르포빌리노겐 데아미나제(porphobilinogen deaminase) 및 p53을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 핵산 분자는 GLP-1 및 GLA를 코딩하는 핵산 분자일 수 있다.

[0030] 본원에서 제공되는 방법의 예에서, 상기 핵산 분자는 DNA 분자, RNA 분자, 및 앵타머일 수 있다. 예를 들어, 핵산 분자는 마이크로 RNA, 작은 간섭 RNA, 리보자임 및 안티센스 핵산일 수 있다. 이러한 핵산 분자는 또한 대상체에서 치료적 효과를 달성할 수 있으므로 치료적 핵산 분자이다.

[0032] **탄산칼슘**

[0033] 본원에서 탄산칼슘은 나노입자에 첨가되어 핵산 분자의 구조를 안정화하며 유전자 발현의 효율을 극대화하는 역할을 한다. 또한, 탄산칼슘은 생체 내에서 분해될 수 있기 때문에 생체 적합성이 우수하다.

[0034] 본원의 나노입자 내에서 탄산칼슘은 유전자와 응집되어 미립자를 형성하는 것일 수 있다. 본 발명의 나노입자는 세포 내로 전달된 후 세포 내 리소좀(lysosome) 등에 의해 용해되어 유전자를 전달할 수 있다.

[0035] 본원의 일 구현예에 따르면, 탄산칼슘은 당업계에 알려진 결정구조를 나타낼 수 있다. 즉, 방해석(calcite), 배터라이트(vaterite) 혹은 아라고나이트(aragonite)의 결정구조를 가질 수 있다. 방해석은 탄산칼슘의 가장 안정적인 동질이상이며, 핵산 분자의 전달 측면에서 방해석 또는 배터라이트가 가장 선호될 수 있다. 즉, 아라고나이트의 결정구조로 변화되지 않도록 탄산칼슘의 안정화가 본 발명의 핵산 분자 전달용 나노입자 제조에 중요하다. 기존의 탄산칼슘 제제는 이와 같은 안정성 측면에서 우수하지 못한 결과를 보여왔으나, 본 발명의 핵산 분자 전달용 나노입자는 pH 및 체내 환경에서 높은 안정성을 갖도록 제제화된 것에 특징이 있다.

[0037] **나노입자의 제조**

[0038] 본원의 탄산칼슘을 포함하는 핵산 분자 전달용 나노입자는, 칼슘이온을 포함하는 용액 A와 탄산이온을 포함하는 용액 B를 혼합하여 공침전(co-precipitation) 반응에 의해 형성될 수 있다. 구체적으로, 핵산 분자 및 수용성 칼슘염을 포함하는 용액 A 및 양이온성 고분자 및 수용성 탄산염을 포함하는 용액 B를 혼합하여 공침전 반응에 의해 핵산 분자 전달용 나노입자가 형성될 수 있다. 용액 A 및 B는 임의의 용액의 명칭이며 부피비는 1:2 내지 2:1일 수 있다. 상기 과정에서 칼슘이온과 탄산이온이 결합하여 탄산칼슘을 형성하고 침전되고 핵산 분자는 탄산칼슘과 함께 응집되어 미립자를 생성할 수 있다. 이 때 양이온성 고분자는 미립자들을 둘러싸 최종 나노입자를 생성한다.

[0039] 본원에서 수용성 칼슘염은 칼슘이온(Ca^{2+})과 음이온을 포함하는 수용성 염으로서, 본원의 일 구현예에 따르면, 수용성 칼슘염은 염화칼슘일 수 있다. 본원에서 수용성 탄산염은 (CO_3^{3-})과 금속 양이온을 포함하는 수용성 염으로서, 수용성 탄산염은 탄산나트륨일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0040] 본원에서 용액 A 및 용액 B는 용매가 극성 용매인 용액일 수 있다. 극성 용매는 핵산 분자, 수용성 칼슘염, 수용성 탄산염, 및 양이온성 고분자 등의 본 발명의 재료를 용해하는 용매일 수 있다. 극성 용매는 예시적으로 물, 포름아미드($HCONH_2$), N,N-디메틸포름아미드($HCON(CH_3)_2$), 1-메틸-2-피롤리돈($-(CH_2)_3CON(CH_3)-$), 디메틸설폭시드($(CH_3)_2SO$) 및 C_1-C_3 알코올 등이 포함될 수 있다. 여기서 상기 C_1-C_3 알코올은 1, 2 또는 3 개의 탄소 원자를 포함하는 유기 알코올, 보다 상세하게는 메탄올(CH_3OH), 에탄올(CH_3CH_2OH), 프로판올($CH_3CH_2CH_2OH$), 이소프로판올($(CH_3)_2CH_2OH$), 에틸렌 글리콜($HOCH_2CH_2OH$), 1,3-프로판 글리콜($HOCH_2CH_2CH_2OH$), 1,2-프로판 글리콜($CH_3CHOHCH_2OH$) 및 글리세롤($HOCH_2CHOHCH_2OH$)이 포함될 수 있다. 바람직하게 극성 용매는 물일 수 있다.

[0041] 본원의 일 구현예에 따르면, 나노입자의 제조에는 다양한 첨가제가 사용될 수 있다. 첨가제는 코어의 안정화 또는 유전자의 발현을 증가시키는데 사용되는 것이면 제한되지 않고 사용될 수 있다. 본원의 일 구현예에 따르면, 용액 A, 용액 B, 또는 이들 모두양자는 다가 알코올, 아미노산, 폴리아크릴산, 및 리소좀 향성 작용제(lysosomotropic agent)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0042] 먼저, 탄산칼슘 결정구조의 안정화를 위해 다가 알코올, 아미노산, 및 폴리아크릴산으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 상기 다가 알코올, 아미노산, 또는 폴리아크릴산은 전술한 용액 A, 용액 B, 또는 이들 양자에 일부 포함된 상태로 용액 A 및 B의 혼합에 의해 본 발명의 나노입자가 제조될 수 있다.

[0043] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 다가 알코올은 2가 이상의 알코올로서, 프로필렌글리콜, 1,3-부탄디올, 2-에틸-1,3-핵산디올, 글리세롤, 이소펜틸디올, 에틸핵산디올, 에리트룰로오스, 오존화 글리세린, 카프릴릴글리콜, 글리콜, (C15-18)글리콜, (C20-30)글리콜, 글리세린, 디에틸렌글리콜, 디글리세린, 디티아옥탄디올, DPG, 티오글리세린, 1,10-데칸디올, 테실렌글리콜, 트리에틸렌글리콜, 트리메틸하이드록시메틸시클로hexanol, 피탄트리올,

페녹시프로판디올, 1,2-부탄디올, 2,3-부탄디올, 부틸에틸프로판디올, 1,2-헥산디올, 헥실렌글리콜, 펜틸렌글리콜, 메틸프로판디올, 멘탄디올, 라우릴글리콜 및 폴리프로필렌글리콜 등을 들 수 있다. 바람직하게 상기 다가 알코올은 글리세롤일 수 있다.

[0044] 본원의 일 구현예에 따르면, 다가 알코올은 전체 나노입자 또는 상기 용액 A 및/또는 B를 기준으로 5 내지 20 중량%만큼 포함되는 것일 수 있다. 바람직하게, 상기 다가 알코올은 전체 용액, 즉 용액 A 및 용액 B의 혼합액을 기준으로 5 내지 20 중량% 포함되는 것일 수 있다. 본원의 실험예 2-6에 따르면, 글리세롤의 첨가에 따라 탄산칼슘의 안정화를 나타내며 나아가 핵산 분자에 의한 형질 도입이 증가됨을 확인하였다.

[0045] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 아미노산은 COOH기를 가지고 있는 생체적합성을 갖는 아미노산이라면 제한되지 않고 사용될 수 있으며, 천연 아미노산과 비천연 아미노산 모두 사용될 수 있으나, 생체 적합성이 높은 천연 아미노산이 바람직하다. 양이온성을 나타내는 아르기닌, 라이신, 또는 히스티딘이 바람직할 수 있으며, 가장 바람직하게는 아르기닌일 수 있다.

[0046] 본원의 일 구현예에 따르면, 아미노산은 상기 용액 A 및/또는 B를 기준으로 0.1 내지 1M포함되는 것일 수 있으며, 바람직하게 0.2 내지 0.8M포함되는 것일 수 있다. 바람직하게, 상기 아미노산은 전체 용액, 즉 용액 A 및 용액 B의 혼합액을 기준으로 0.1 내지 1M 포함되는 것일 수 있다. 본원의 실험예 2-7에 따르면, 아르기닌과 같은 양이온성 아미노산의 첨가 시 유전자 발현이 더욱 향상됨을 확인할 수 있었다.

[0047] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 폴리아크릴산은 용어는 중합체 주쇄 내에 대부분(즉, 50% 이상), 바람직하게는 90% 이상의 중합 아크릴 단위를 포함하는 중합체를 의미한다. 흔히 폴리아크릴산은 폴리(아크릴아미드)의 가수분해에 의해 형성되며, 따라서 잔류 아크릴아미드가 중합체 내에 존재할 수 있다. 또한 이 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있으나, 폴리(아크릴산)에 대한 바람직한 수 평균 분자량의 범위는 1,000~10,000 달톤이다. 시판되는 적절한 폴리(아크릴산)의 예로는 Rohm & Hass에서 시판되는 Acumer(등록상표) 1540 및 Acumer 1510, Cytec Industries, Inc.에서 시판되는 Cyanamer(등록상표) A-15, Cyanamer A-100L, Cyanamer P-21, Cyanamer A-370, Alco Chemical에서 시판되는 Alcospere 124, Alcospere 404, Alcospere 406, Alcospere 459, Alcospere 602A 및 Alcospere 747 및 Aldrich Chemical Company에서 시판되는 몇 등급의 폴리(아크릴산)을 들 수 있다.

[0048] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 폴리아크릴산은 상기 용액 A 및/또는 B를 기준으로 1 내지 10 %(w/v) 포함되는 것일 수 있다. 바람직하게, 상기 폴리아크릴산은 전체 용액, 즉 용액 A 및 용액 B의 혼합액을 기준으로 1 내지 10%(w/v) 포함되는 것일 수 있다. 본원의 실험예 4-1에 따르면, 폴리아크릴산이 첨가된 경우 코어입자를 생성하고 원심분리한 이후에도 재분산(redisperse)이 가능함을 알 수 있었다.

[0049] 한편, 유전자의 발현을 향상시키기 위해 리소솜 양성 작용제(lysosomotropic agent)가 사용될 수 있다. 리소솜 양성 작용제는 세포의 리소솜을 침투하기 위한 첨가제라면 제한되지 않고 사용될 수 있다. 구체적으로, PVP, 솔비톨, 글루코오스, 수크로오스, 또는 클로로퀸 등이 사용될 수 있다. 리소솜양성작용제는 전체 용액을 기준으로 0.2 내지 0.6M 만큼 사용될 수 있다. 본원의 실험예 4-1에 따르면, 솔비톨 첨가에 따라 유전자 발현이 극적으로 향상됨을 알 수 있었다.

[0051] **양이온성 고분자**

[0052] 본원에서 양이온성 고분자는 나노입자의 표면에서 탄산칼슘과 유전자가 응집된 미립자를 둘러싸며 존재한다. 양이온성 고분자는 핵 국지화 신호(Nuclear Localization Signal:NLS)를 나타낼 수 있어 유전자 전달에 적합하게 사용될 수 있다. 양이온성 고분자는 DNA 등의 핵산 분자를 압축하며 효소 분해로부터 유전자를 보호하며, 세포 안으로 침투하여 엔도솜에서 빠져나올 수 있도록 한다. 또한, 본 발명에서 양이온성 고분자는 탄산칼슘과 함께 양이온성의 유전자를 효과적으로 응축할 수 있다.

[0053] 양이온성 고분자는 생체 적합성이 있는 독성이 낮은 물질이 적합하며, 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 양이온성 고분자는 키토산, 글리코키토산, 프로타민, 폴리-L-라이신 (PLL: poly-L-lysine) 및 폴리아미도 아민(PAMAM: polyamidoamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 바람직하게 상기 양이온성 고분자는 프로타민일 수 있다. 본원의 일 구현예에 따르면, 양이온성 고분자는 pH 5 에서 총 양전하를 갖는 고분자일 수 있다. 양이온성 고분자의 중량평균 분자량은 200 내지 750,000일 수 있으며, 바람직하게 100,000 내지 300,000 일 수 있다.

[0054] 본원의 일 구현예에 따르면, 핵산 분자와 양이온성 고분자의 중량비는 1:1 내지 1:20일 수 있다. 구체적으로, 1:2 내지 1:14, 보다 구체적으로 1:6 내지 1:12 일 수 있다. 양이온성 고분자의 함량이 1:1 이상으로 증가될수

록 유전자가 안정적으로 결합될 수 있으며, 또한 나노 수준의 적당한 입자 크기를 형성하며, 양이온성의 제타 전위를 형성할 수 있다(실험예 1 참조). 또한, 해당 범위에서 우수한 유전자 발현을 나타낼 수 있다(실험예 2-2 참조).

[0056] 양친매성 고분자

[0057] 본원의 일 구현예에 따르면, 핵산 분자 전달용 나노입자는 양친매성 고분자에 의해 처리된 것일 수 있다. 양친매성 고분자는 분산안정성을 높일 수 있어, 탄산칼슘의 구조를 안정화시키며, 특히 원심분리 후 재 분산시킬 때 응집방지에 효과적일 수 있다. 양친매성 고분자는 나노입자의 표면의 양이온성 고분자와 정전기적 결합을 형성하여 나노입자 표면에 존재할 수 있다. 본원에서 양친성 고분자 또는 계면활성제로 지칭될 수 있다. 양친매성 고분자는 코어와 셸의 결합을 향상시키는데도 기여할 수 있다. 본 발명에서 용액 A, 용액 B, 또는 이들 양자는 양친매성 고분자를 추가로 포함할 수 있다.

[0058] 양친매성 고분자는 친수성기와 소수성기를 모두 가지는 고분자라면 제한되지 않고 사용될 수 있다. 바람직하게 양 말단이 수용성 고분자이며 내부가 지용성 고분자가 결합된 구조의 ABA형 블록 공중합체일 수도 있다. 본원의 일 구현예에 따르면, 양친매성 고분자는, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 (폴리소르베이트, 예를 들어 폴리소르베이트 20 또는 80), 폴록사머 (예를 들어, 에틸렌 옥사이드 및 프로필렌 옥사이드, 소듐 도데실설페이트 및/또는 소듐 라우릴 설페이트의 블록 코폴리머인 LUTROL™ F68, F108 및 F127), 지방산의 소르비탄 에스테르 (SPAN), 폴리에톡실화된 캐스터 오일 및 이의 유도체, 토코페릴 폴리에틸렌 글리콜 숙시네이트, 및 폴리비닐 알코올을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 본원의 일 구현예에 따르면, 에틸렌 옥사이드(E) 및 프로필렌 옥사이드(P)의 삼블록공중합체일 수 있으며, E가 80 내지 120, P가 40 내지 100, 및 E가 80 내지 120가 연결된 삼블록 공중합체일 수 있다.

[0059] 특정 구체예에서, 양친매성 고분자는 전술한 용액 A 및/또는 B 기준 약 0.01 중량% 내지 약 10 중량% 의 양으로 포함될 수 있다. 구체적으로, 0.1 내지 5 중량%의 양으로 포함될 수 있다. 바람직하게, 양친매성 고분자는 전체 용액, 즉 용액 A 및 B의 혼합액을 기준으로 0.01 내지 10 중량% (보다 바람직하게 0.1 내지 5 중량%) 포함될 수 있다. 본원의 실험예 2-4에 따르면, 양친성 고분자인 폴록사머(F108, F127가 약 0.2 중량%로 포함되어 유전자 전달 나노입자를 안정적으로 형성할 뿐만 아니라, 유전자 발현능을 개선하는데도 도움이 됨이 확인되었다. 본원의 실험예 4-2에 따르면, 과량의 양친성 고분자를 사용할 경우 대량 공정화에 적합함을 알 수 있었다.

[0061] 코어-셸 복합체

[0062] 전술한 바와 같이, 본원의 나노입자는 코어로서 셸(shell)과 같은 구조에 둘러싸여 핵산 분자 전달에 사용될 수 있다. 원하는 투여경로/목적에 따른 셸을 상기 코어에 형성함으로써 제제화가 가능하다.

[0063] 본원에서 제시하는 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 전술한 핵산 분자 전달용 나노입자; 및 담즙산 또는 이의 유도체가 음이온성 다당류가 결합된 컨주게이트를 포함하는 복합체로서, 상기 컨주게이트는 상기 나노입자와 정전기적 상호작용으로 결합된 구조를 갖는, 경구용 핵산 분자 전달 복합체를 제공한다. 본원에서는 코어-셸 복합체 대신 복합체, 나노복합체, 또는 경구용 복합체 등으로 지칭되기도 한다.

[0065] 담즙산 또는 유도체

[0066] 담즙산 또는 유도체는 콜산 또는 케노코산과 같은 1차 담즙산, 테옥시콜산, 리토콜산, 우르소테옥시콜산 또는 케노테옥시콜산과 같은 2차 담즙산, 또는 임의의 유형의 담즙산 염일 수 있다. 특정 실시형태에서, 담즙산은 타우로콜산(본원에서 TCA로 칭하기도 함), 글리코콜산, 타우로테옥시콜산, 글리코테옥시콜산, 타우로케노테옥시콜산, 글리코케노테옥시콜산, 또는 ASBT와 같은 담즙산 수송체와 연관된 단백질에 결합하는 임의의 변형된 담즙산 일 수 있다. 담즙산 또는 유도체는 상기 열거된 예시적 성분들 중 임의의 것의 혼합물일 수 있거나 단일의 것일 수 있다.

[0067] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 담즙산은 타우로콜산(TCA)일 수 있다. TCA는 장액의 약 45%를 차지하는 것으로 추정되는 풍부한 담즙산이다. TCA는 말단 회장에 주로 존재하는 정단 나트륨 담즙산 수송체(apical sodium bile acid transporter; ASBT)를 통한 장내 세포횡단 흡수(transcellular absorption)를 최대화함으로써 치료제의 운반체로서 사용될 수 있다. 따라서, 말단 회장에서부터 간문맥으로 그리고 체순환으로의 치료제의 수송은 TCA와 같은 담즙산 운반체에 의해 촉진될 수 있다.

[0068] 담즙산 또는 유도체는 본 발명의 코어-셸 복합체의 표면에 존재한다. 본 발명의 복합체의 표면에 담즙산 또는 유도체의 모이어티가 어떠한 배향으로 일정한 함량으로 존재함으로써, 경구 투여시 장관 순환 메커니즘을 통해

나노 복합체의 흡수를 상당히 촉진할 수 있다.

[0069] 간에서 분비된 담즙산이 장의 상피 세포를 통해 말단 회장(回腸)으로 재흡수되고 간문맥을 경유하여 다시 간으로 수송되기 때문에, 담즙산 수송체는 치료제의 전달에 대한 표적으로 사용될 수 있다. 따라서, 높은 담즙산 재순환비는 담즙산의 장간순환이 매우 효율적인 과정이 되도록 만들며, 간 및 말단 회장에서 주로 발견되는 담즙산 수송체에게 유익하다.

[0070] 담즙산 또는 유도체는 소장의 원위 1/3에서 표면 나트륨 담즙산 수송체 (apical sodium bile acid transporter, ASBT)를 이용하여 완전히 재흡수 될 수 있는 독특한 능력으로 인해 ODDS에 유용하다. 더욱이, 펩티드가 로딩 된 TCA 변형 된 나노 담체는 장 세포의 기저부에서 유기 용질 수송체 (OST α / β)를 통해 95 % 이상의 재흡수를 제공할 수 있다.

[0071] 또한, 담즙산 또는 유도체는 회장 지질 결합 단백질(ILBP)과 콤플렉스를 형성하며, 나노 복합체는 유기 용질 트랜스포터(organic solute transporter)를 통해 간문맥으로 운반을 돕는 역할을 한다. 또한, 담즙산 또는 유도체는 FXR 형 세포내 신호전달이 핵에서 일어날 수 있도록 하여, FGF19의 전신순환으로의 분비를 촉진할 수 있다.

[0072] 또한, 담즙산 또는 유도체는 간의 NTCP (Sodium-taurocholate cotransporting polypeptide)를 타겟팅하여 간을 통한 흡수를 매개할 수 있다.

[0075] **음이온성 다당류**

[0076] 본원에서 음이온성 다당류는 장내 흡수를 증진하며 위산을 보호하는데 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 음이온성 다당류는 음이온성을 나타낼 수 있다. 즉, 비변성 pH 환경 하에서 음이온성인 전기적 전하를 갖는 것을 의미한다. 일반적으로, 음이온성이란 pH 7.0의 환경 내에서 음전하를 나타내는 것을 의미한다. 음이온성 다당류가 담즙산과 공유결합된 키투레이트는 음이온성을 나타낼 수 있고, 이는 양이온성을 나타내는 코어입자와 정전기적으로 상호작용으로 결합될 수 있다. 이에 따라 코어입자를 보호하는 역할을 하며 특히 pH 및 체내 효소에 대한 안정성을 부여할 수 있다.

[0077] 음이온성 다당류는 카르복실기 또는 설페이트기 등 음이온성 작용기를 당의 대부분(즉, 50% 이상), 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게 90% 이상으로 포함하고 있는 다당류를 의미한다. 구체적인 예로서, 카르복실메틸셀룰로오스, 알긴산나트륨, 콘드로이틴, 헤파린, 히아론산 및 이들의 황산 및 카르복실산 유도체를 사용하며 이들의 저분자도 사용할 수 있다. 또한 두가지 이상의 음이온성 물질을 적정의 비율로 혼합하여 사용할 수 있다.

[0078] 바람직하게는 음이온성 다당류로 글리코사미노글리칸이 사용될 수 있다. 글리코사미노글리칸(Glycosaminoglycan, "GAG" 라고도 약칭함)은 생합성 과정에서 부분적인 변화를 통해 구조적으로 다양하고 복잡한 형태를 지니게 된다. GAG류의 기본적인 골격은 우론산(uronic acid)과 글루코사민(glucosamine)의 반복이면서 부분적으로 설페이트화가 이루어져 있는데, 이러한 복잡한 화학 구조에 의해 여러 종류의 생리 활성을 나타낼 수 있게 된다. 이들 GAG류는 주로 연결조직에 분포하며 헤파린만 예외로 간, 허파, 피부 점막내의 동맥에 있는 마스트(mast) 세포 내의 과립에 존재한다. 또한, 하등 동물인 연체동물에서도 GAG류가 발견되고 있는데, 조개류에서 3-O-설페이트기를 가지고 있는 헤파린과 유사한 GAG류의 존재가 보고되었고[Pejler 등, J. Biol. Chem. (1986) 262, 11413-11421], 해삼, 성게류에서도 설페이트기가 치환된 콘드로이틴 황산류가 발견되었으며[Mourao 등, Trends in Glycobiology and Glycoscience (1995) 7, 235-246], 오징어의 각막에서도 콘드로이틴 황산이 존재함이 알려졌다[Karamanos 등, Int. J. Biochem. (1991) 23, 67-72]. 최근에는 식용 달팽이에서도 헤파린 황산과 유사한 GAG류가 발견되어 구조와 생물학적 활성에 대한 연구가 진행되고 있는 실정이다[Kim 등, J. Biol. Chem. (1996) 271, 11750-11754, Wang 등, Biochem, Biophys. Res. Commun. (1997) 235, 369-373]. 글리코사미노글리칸의 예로서는, 이에 제한되지는 않지만, 헤파린, 헤파린 유도체, 헤파린 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 및 히알루론산을 포함한다. 헤파린 유도체의 예로서는, 이에 제한되지는 않지만, 저분자량 헤파린 예컨대 예녹사파린, 달테파린, 틴자파린, 및 폰다파리누스를 포함한다.

[0079] 낮은 상대 분자량을 갖는 음이온성 다당류는 고분자량을 갖는 산물보다 경구 흡수가 더 우수할 수 있다. 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 음이온성 다당류는 10 내지 30kDa, 구체적으로 20 내지 30kDa의 분자량을 가질 수 있으며, 이보다 높은 분자량의 경우에는 경구 흡수가 적절하지 못할 수 있으며, 이보다 낮은 분자량의 경우에는 코어-셸 복합체의 안정성이 떨어질 수 있다.

[0080] 본원의 일 구현예에 따르면, 음이온성 다당류는 적절한 값의 pKa를 갖는 것이 음이온성, 제형의 안정성 및 경구 전달능력에 중요할 수 있다. 구체적으로, 음이온성 다당류의 pKa는 1.0 내지 3.0, 구체적으로 1.5 내지 2.0일 수 있으며, 이보다 높은 경우 PTH계 약제와 정전기적 상호작용이 약해 안정성이 떨어질 수 있으며, 이보다 낮은

경우 경구투여에 적합하지 않을 수 있다.

- [0081] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 음이온성 글리코사미노글리칸은 콘드로이틴 설페이트일 수 있다.
- [0082] 콘드로이틴 설페이트는, 이당류의 반복단위로서 N-아세틸콘드로신을 갖는 글리코사미노글리칸이다. 콘드로이틴 설페이트는 콘드로이틴 설페이트 A(β -글루쿠론산-[1→3]N-아세틸- β 갈락토사민-4-설페이트-[1→의 교번 공중합체), 콘드로이틴 설페이트 C(β -글루쿠론산-[1→3]N-아세틸- β 갈락토사민-6-설페이트-[1→6]의 교번 공중합체) 또는 그것의 혼합물을 포함하는 어떠한 물질로도 제공될 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물에 사용되는 콘드로이틴 설페이트는 약제학적으로 허용가능한 품질의 것이어야 한다.
- [0083] 콘드로이틴 설페이트는 정제된 형태로, 또는 분획, 가수분해산물(hydrolyzate), 분리체, 또는 연골 또는 다른 천연물질의 추출물로서 공급될 수 있고, 상기 분획, 가수분해산물, 분리체 또는 추출물은 콘드로이틴 설페이트 A(CSA) 또는 콘드로이틴 설페이트 C(CSC) 또는 이 둘의 혼합물을 함유한다. 콘드로이틴 설페이트를 제조하는 일반적인 방법은 소, 고래 및 상어 연골로부터의 정제를 포함한다. 콘드로이틴 설페이트는 염의 형태일 수 있고, 특히 천연물질로부터의 분리체로서 공급될 때는, 다른 천연물질이 약제학적으로 허용가능하다면 이들이 동반될 수 있다.
- [0084] 콘드로이틴 설페이트는 정확한 분자 메커니즘이 아직 알려지지 않았음에도 불구하고 핵 인자-카파 B 리간드 (RANKL) 발현 비율의 osteoprotegerin 수용체 활성화제를 촉진함으로써 파골 세포의 비활성화뿐만 아니라 새로운 뼈 형성을 촉진할 수 있다. 콘드로이틴 설페이트는 생체 내 안정성이 높다. 뿐만 아니라, 콘드로이틴 설페이트가 매개된 본 발명의 경구 전달 방식은 혈액 순환 시간을 연장시킬 수 있으며, 생체 이용률을 15 % 이상 향상시킬 수 있다.
- [0086] **킨주게이트**
- [0087] 본원에서 킨주게이트는 음이온성 다당류와 담즙산 또는 이의 유도체가 공유결합된 것을 의미한다. 킨주게이트를 형성하기 위한 일반적인 반응 경로는, 아민기를 갖도록 변형된 담즙산 또는 이의 유도체가 음이온성 다당류의 음이온성 작용기에 아마이드 반응으로 결합되는 것으로서, 도 1 내지 3에 반응의 예시가 기재되어 있다.본원의 일 구현예에 따르면, 상기 아민기를 갖도록 변형된 담즙산 또는 이의 유도체는 폴리에틸아민, 구체적으로 에틸렌디아민이 담즙산에 부가된 것일 수 있으며, 상기 에틸렌디아민은 카르본산(carbonic acid)의 매개로 부가된 것일 수 있다.
- [0088] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 음이온성 다당류 및 상기 담즙산 또는 이의 유도체의 결합 몰비는 1:10 내지 1:1,000일 수 있다. 보다 구체적으로, 1: 50 내지 1:200일 수 있으며, 이 경우에 적절한 표면전하를 가질 뿐만 아니라, 나노 복합체가 안정성이 높은 배향을 가질 수 있다.
- [0089] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 킨주게이트의 제타 전위는 -54.0 내지 -56.0mV를 가질 수 있다. 이보다 약한 음전하를 가질 경우 코어와 셸의 결합력이 저하될 수 있다.
- [0091] **코어-셸 복합체의 제조**
- [0092] 본원에서 코어-셸 복합체는 전술한 코어입자와 킨주게이트(셸)를 반응시켜 제조할 수 있다.
- [0093] 상기 핵산 분자와 상기 킨주게이트의 중량비는 1:0.2 내지 1:20일 수 있으며, 구체적으로 1:1 내지 1:10일 수 있다. 상기 비율보다 킨주게이트가 많은 경우 유전자 발현이 감소되는 문제가 있으며, 이보다 적은 경우 코어입자와 킨주게이트(셸)이 잘 형성되지 않아 in vivo 안정성에 문제가 있다. 킨주게이트의 양이 증가하면 유전자 발현이 증가되거나 일정하게 비례하여 증가되는 것은 아님이 확인되었다(실험예 3-1).
- [0095] **약학적 조성물**
- [0096] 본 발명에 따른 핵산 분자 전달용 나노입자 및 경구용 핵산 분자 전달 복합체는, 특정 질환의 예방 또는 치료적 목적으로 핵산 분자를 생체 내에 주입할 수 있다.
- [0097] 이러한 목적으로, 본원에서는 본 발명에 따른 핵산 분자 전달용 나노입자 및 경구용 핵산 분자 전달 복합체를 포함하는 특정 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제시한다. 즉, 상기 약학적 조성물 내에 예방 또는 치료하고자 하는 질환의 목적에 적합하게 핵산 분자를 사용할 수 있다. 예시적으로, 본 발명의 나노입자에 GLP-1을 코딩하는 핵산 분자를 사용할 수 있으며, 이 경우 당뇨병의 예방 또는 치료용도로 활용될 수 있다. 다른 예시로서, 본 발명의 나노입자에 GLA를 코딩하는 핵산 분자를 사용할 수 있으며, 이 경우 파브리병의 예방 또는 치료용도로 활용될 수 있다.

[0098] 약학적 조성물 내에는 약리활성의 증가, 안정성 향상 등 기타 목적으로 다양한 부형제가 첨가될 수 있다.

발명의 효과

[0100] 본원에서 제시하는 핵산 분자 전달용 나노입자는 음이온성의 유전자가 양이온성 고분자와 탄산칼슘에 의해 효과적으로 응축된 구조를 가지며, 본 발명은 기존의 탄산칼슘 제제가 체내에서 갖는 안정성과 관련한 문제점을 개선함에 특징이 있다. 이에 따라, 높은 효율의 핵산 전달체로서 활용될 수 있다.

[0101] 또한, 상기 나노입자를 코어로 하며 담즙산 또는 이의 유도체가 포함된 쉘이 결합된 코어-셸 복합체의 경우 경구 전달용으로 적합하여, 소장 내피세포에 타겟팅이 되어 유전자 전달체의 체내 흡수를 증진되도록 할 수 있다.

[0103] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0105] 도 1은 TCA-carbonate의 합성 과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 TCA-NH₂ 합성 과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 3은 콘드로이틴 설페이트-TCA 의 합성 과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 4는 TCA, TCA-NPC, 및 TCA-NH₂에 대한 H-NMR 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5 및 도 6은 각각 콘드로이틴 설페이트 A 및 콘드로이틴 설페이트 A-TCA에 대한 H-NMR 결과 및 FT-IR를 나타낸 도이다.
- 도 7 은 본 발명에 따른 프로타민-탄산칼슘 코어/콘드로이틴 설페이트-TCA 쉘의 경구 전달체를 나타낸 모식도이다.
- 도 8은 GLP-1 유전자의 모식도를 나타낸 도이다.
- 도 9는 GLA 유전자의 모식도를 나타낸 도이다.
- 도 10은 프로타민의 유전자대비 중량비에 따른 유전자 젤-지체 측정에 따른 결과이다.
- 도 11은 프로타민의 유전자대비 중량비에 따른 코어입자의 크기를 측정한 결과이다.
- 도 12는 프로타민의 유전자대비 중량비에 따른 코어입자의 제타 포텐셜을 나타낸 도이다.
- 도 13은 프로타민의 유전자대비 중량비에 따른 코어입자의 유전자 봉입율을 나타낸 도이다.
- 도 14는 HEK293 세포에서의 25k bPEI 전달체와 프로타민 전달체의 유전자 발현 양상을 측정한 결과이다(X100배율).
- 도 15는 25k bPEI 전달체와 프로타민 전달체의 세포 독성 결과를 나타낸 도이다.
- 도 16은 프로타민-탄산칼슘 유전자 복합체의 유전자 발현 양상을 측정한 결과이다(X100 배율).
- 도 17은 HepG2와 CaCO-2 세포에서의 유전자 발현 양상을 측정한 결과이다(X100배율).
- 도 18은 인산칼슘-프로타민 코어와 탄산칼슘-프로타민 코어의 유전자 발현 양상을 측정한 결과이다(X100배율).
- 도 19는 프로타민-탄산칼슘-폴록사머 코어의 유전자 발현 양상을 측정한 결과이다(X100 배율).
- 도 20은 칼슘 클로라이드 양에 따른 유전자 발현 양상을 측정한 결과이다(X40배율).
- 도 21은 프로타민-탄산칼슘-폴록사머 코어에 글리세롤 첨가에 따른 유전자 발현 양상을 측정한 결과이다(X100배율).
- 도 22는 프로타민-탄산칼슘-폴록사머 코어에 글리신 및 아르기닌 첨가에 따른 유전자 발현 양상을 측정한 결과이다(X100배율).
- 도 23은 각 중량비에 따른 프로타민-탄산칼슘 코어/콘드로이틴 설페이트-TCA 쉘의 eGFP 유전자 발현 양상을 측

정한 결과이다(X100배율).

도 24는 각 중량비에 따른 프로타민-탄산칼슘 코어/콘드로이틴 설페이트-TCA 셀의 luciferase 유전자 발현 양상을 측정 한 결과이다(X100배율).

도 25는 GFP 유전자 발현의 지속 여부를 관찰한 도이다.

도 26은 각 중량비에 따른 프로타민-탄산칼슘 코어/콘드로이틴 설페이트-TCA 셀을 HepG2 세포에 처리하여 eGFP 유전자 발현 양상을 측정 한 결과이다(X100배율).

도 27은 각 중량비에 따른 프로타민-탄산칼슘 코어/콘드로이틴 설페이트-TCA 셀을 GLA-녹아웃 세포에 처리하여 eGFP 유전자 발현 양상을 측정 한 결과이다(X100배율).

도 28은 프로타민-탄산칼슘 코어/콘드로이틴 설페이트-TCA 셀에 GLP-1 유전자를 담지하여 ASBT-MDCK 세포에 처리한 결과의 GLP-1 발현량을 정량한 결과이다.

도 29는 프로타민-탄산칼슘 코어/콘드로이틴 설페이트-TCA 셀에 GLA 유전자를 담지하여 HepG2 세포에 처리한 결과 GLA의 발현양을 정량한 결과이다.

도 30은 프로타민-탄산칼슘 코어/콘드로이틴 설페이트-TCA 셀에 GLA 유전자를 담지하여 HAP1_KO (GLA knock-out) 세포에 처리한 결과 GLA의 발현양을 정량한 결과이다.

도 31은 프로타민-탄산칼슘 코어/콘드로이틴 설페이트-TCA 셀에 유전자: 컨주게이트의 중량비에 다른 세포 별 독성 평가한 결과를 나타낸 도이다.

도 32는 프로타민-탄산칼슘 코어/콘드로이틴 설페이트-TCA 셀의 다양한 pH 조건에서의 안정성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 33는 실험예 2-6의 기존 코어와 비교하여 폴리아크릴산이 첨가된 코어의 경우 재분산이 가능함을 나타낸 도이다.

도 34는 폴리아크릴산을 이용한 코어에 다양한 농도의 칼슘용액으로 재분산 시킨 후 유전자 발현 정도를 나타낸 도이다(X100배율).

도 35는 폴리아크릴산을 이용한 코어에 PVP 및 솔비톨을 첨가한 경우의 유전자 발현 정도를 비교한 도이다(X100배율).

도 36은 정제 및 재분산 후 ASBT-MDCK세포에 형질주입 양상을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 37은 db/db mice에서의 경구용 GLP-1 유전자 치료제를 투여한 후 혈중 GLP-1 의 수준을 측정 한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0106] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0108] 제조예 1. 경구용 유전자 전달체인 콘드로이틴 설페이트-TCA의 합성

[0109] 제조예 1-1. TCA-카보네이트(TCA-CB)의 합성

[0110] Sodium taurocholate (TCA) 0.5g (0.93mmol)에 DMF 4.6ml을 첨가하고 0℃에서 교반하였다. 상기 용액에 triethylamine(TEA) 0.565g (0.778ml, 5.58mmol)을 첨가한 후에, 4-nitrophenyl chloroformate(NPC) 0.937g(4.65mmol)을 가하였다. 용액을 0℃에서 1시간 교반한 후에 실온에서 12시간 동안 반응시킨 후, 원심분리를 이용하여 침전물을 획득하였다. 25ml ethyl acetate(EtOAc)를 이용하여 미반응 NPC를 완전히 제거하였다. 정제된 생성물은 진공 건조하여 보관하였다.

[0111] TCA-카보네이트 (TCA-CB = TCA=NPC) 합성에 대한 모식도는 도 1에 나타내었다.

[0113] 제조예 1-2. TCA-NH₂ 유도체 합성

[0114] 제조예 1-1에 따라 생성된 TCA-CB(Taurocholic acid carbonate) 0.500g(0.71 mmol)을 5ml DMF에 용해시켰다. 0.144g의 4-methylmorpholine(1.42mmol)을 첨가한 후에 50℃에서 1시간 동안 교반시켰다. 4.276g(4.751ml,

0.071mol) ethylenediamine을 서서히 첨가 후 실온에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 용매인 DMF를 약 1ml 정도 남을 때까지 농축시킨 후 아세톤에 첨가하여 침전을 발생시켰다. 침전물을 아세톤으로 3회 세척하여 미반응 EDA, NPC 및 4-methyl-morpholine을 완전히 제거하였다. (원심분리) 정제된 생성물을 진공 건조하여 보관하였다.

[0115] TCA-NH₂ 합성에 대한 모식도는 도 2에 나타내었다.

[0117] **제조예 1-3. 콘드로이틴 설페이트-TCA의 합성**

[0118] Chondroitin sulfate A 0.1 g (0.004 mmol)을 pH 5 MES buffer 10 mL에 용해시켰다. 여기에 EDC와 NHS를 넣어 20분간 반응시킨 후, 용액의 pH를 NaOH를 이용하여 7.5로 맞추고, 제조예 1-2에 따른 TCA-NH₂ 243.33 mg (0.4 mmol)을 넣고 16시간 동안 상온 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 10 kDa membrane으로 3일간 dialysis 시키고 freezing dry하여 보관하였다.

[0119] 콘드로이틴 설페이트-TCA의 합성 모식도는 도 3에 나타내었다.

[0121] **제조예1-4. 콘드로이틴 설페이트-TCA의 분석**

[0122] 제조예 1-3에 의해 수득된 콘드로이틴 설페이트-TCA를 H-NMR과 FT-IR로 구조를 분석하였다. TCA, TCA-NPC, 및 TCA-NH₂에 대한 H-NMR 결과를 도 4에 나타내었으며, 콘드로이틴 설페이트 A 및 콘드로이틴 설페이트 A-TCA에 대한 H-NMR 결과 및 FT-IR를 각각 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0123] 상기 분석을 통해 생성된 콘드로이틴 설페이트-TCA의 화학구조를 예상대로 확인할 수 있었다.

[0125] **제조예 2. 프로타민-탄산칼슘 코어입자의 제조**

[0126] 프로타민-탄산칼슘 공침전 코어입자를 제조하기 위하여 표 1과 같이 2가지 용액을 준비하였다. 각각의 용액은 별도로 준비하며, 시험 직전에 섞어서 교반 반응시켰다.

표 1

용액 A(총 50 μL)		용액 B(총 50 μL)	
DNA	1 μg	프로타민 설페이트	1-20 μg
CaCl ₂	2M, 5 uL	Na ₂ CO ₃	0.052M, 5ul
폴록사머(F108)	최종 0 내지 20 중량%	폴록사머(F108)	최종 0 내지 20 중량%
폴록사머(F127)	최종 0 내지 20 중량%	폴록사머(F127)	최종 0 내지 20 중량%
글리세롤	최종 5 내지 10 중량%	글리세롤	최종 5 내지 10중량%
증류수	잔량	증류수	잔량

[0128] 상기 표 1에서 DNA로서 발현하고자 하는 유전자를 함유하는 플라스미드 등이 첨가될 수 있다.

[0129] 예시적으로 당뇨병 치료에 적용하기 위한 GLP-1 을 발현하는 유전자는, GLP-1 plasmid를 e.coli 균주에 배양하여 Maxi prep. 혹은 Giga prep을 이용하여 분리 정제한 것을 사용하였다. GLP-1 유전자를 포함하는 벡터의 모식도를 도 8에 나타내었다.

[0130] 다른 예시로서, 파브리병 치료에 적용하기 위한 GLA 를 발현하는 유전자는, GLA plasmid 를 e.coli 균주에 배양하여 Maxi prep. 혹은 Giga prep을 이용하여 분리 정제하여 사용하였다. GLA 유전자를 포함하는 벡터의 모식도를 도 9에 나타내었다.

[0132] **제조예 3. 프로타민-탄산칼슘 코어입자/콘드로이틴 설페이트-TCA 셀 코팅**

[0133] 제조예 2에 따른 프로타민-탄산칼슘 코어입자에 콘드로이틴 설페이트-TCA 셀을 코팅하여 경구형 유전자 전달체를 제조하였다. 컨쥬게이트는 핵산 분자의 함량 대비 일정한 중량비로 첨가될 수 있으며, 본원의 실험예에서는 핵산분자와 컨쥬게이트의 중량비가 1:1 내지 1:20으로 첨가되었다. 제조된 유전자 전달체의 모식도를 도 7에 나타내었다.

[0135] **실험예 1. 코어입자의 특성 확인**

[0136] 실험예 1에서는 상기 코어입자의 유전자 결합 여부, 크기, 제타 전위, 및 유전자 봉입을 등을 측정하였다. 실험

예 1에 사용된 코어입자는 표 2의 구성에 따라 제조예 2의 방법으로 제조하였다.

표 2

용액 A(총 50 μ L)		용액 B(총 50 μ L)	
GLP-1 유전자	1 μ g	프로타민 설페이트	1-10 μ g
CaCl ₂	2M, 5 μ L	Na ₂ CO ₃	0.052M, 5 μ L
폴록사머(F108)	최종 0.2 중량%	폴록사머(F108)	최종 0.2 중량%
폴록사머(F127)	최종 0.2 중량%	폴록사머(F127)	최종 0.2 중량%
글리세롤	최종 5 중량%	글리세롤	최종 5중량%
증류수	잔량	증류수	잔량

1-1. 코어입자의 유전자 결합 여부 확인

프로타민과 GLP-1 유전자의 중량비(유전자:프로타민)에 따른 유전자 결합 유무를 젤-지체 분석법(gel-retardation)으로 확인하였다. 아가로스 젤 전기영동 결과를 도 10에 나타내었다. 중량비가 1:1부터 유전자가 결합되어 복합체를 형성하는 것을 알 수 있었으며, 프로타민의 함량이 증가됨에 따라 안정적으로 유전자가 결합됨을 알 수 있었다.

1-2. 코어입자의 입자 크기 분석

프로타민과 GLP-1 유전자의 중량비(유전자:프로타민)에 따른 코어입자의 크기를 DLS를 통해 측정하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다. GLP-1 유전자를 프로타민과 탄산칼슘을 이용하여 공침전하여 코어입자를 만들면 입자 크기는 대부분 200-300 nm 수준으로 만들어 지는 것을 확인하였다. 이때, 프로타민의 중량비가 증가하여도 확연하게 입자 크기가 조밀하게 작아지지 않았다. 이는 일정 수준이상의 프로타민이 있으면 탄산칼슘과 유전자를 내부에 담지하는 코어입자를 형성함을 의미하는 것으로 보인다.

1-3. 코어입자의 제타 전위 측정

프로타민과 GLP-1 유전자의 중량비(유전자:프로타민)에 따른 코어의 제타 전위를 측정하였다. 측정된 결과를 도 12에 나타내었다. 프로타민-탄산칼슘/GLP-1 유전자로 코어입자를 만들 때, 음전하를 가지는 유전자가 프로타민에 의해 전하 값이 바뀌는 것을 알 수 있었다. 프로타민 중량비가 1:2 이상인 경우부터 코어입자가 양전하를 나타냄을 알 수 있었다. 전술한 DLS 결과와 마찬가지로 프로타민의 양이 일정 수준이 되면 양전하의 수치는 일정하게 유지되는 것을 알 수 있었다. 이로부터 프로타민은 일정 수준 이상이 되면 탄산칼슘과 유전자가 응집된 미립자를 형성하고 표면에 프로타민이 존재하는 것임을 알 수 있었다.

1-4. 유전자 봉입율 분석

프로타민과 GLP-1 유전자의 중량비(유전자:프로타민)에 따른 유전자 봉입율을 분석하였다. GLP-1 유전자에 프로타민-탄산칼슘 공침전을 이용하여 코어입자를 생성한 후, 원심분리 (12,000 rpm, 1분)하고, 상층액에 남아 있는 GLP-1의 유전자의 양을 DNA assay를 통해서 확인하였다. 결과를 도 13에 나타내었다. 프로타민의 중량비가 0인 경우, 유전자는 원심 분리 조건에서 상층액에 남아 있는 반면, 프로타민-탄산칼슘 코어에서는 상층액에 검출되는 유전자의 양이 거의 없었다.

GLP-1 유전자에 프로타민-탄산칼슘을 이용하여 코어 입자를 만들 때, 프로타민의 중량비가 1:1 부터 유전자 봉입율이 99% 이상인 것이 확인되었다. 즉, 프로타민의 함량에 관계없이 유전자는 안정적으로 봉입되어 있음이 확인되었다. 이는 유전자가 대체로 코어 내부에 탄산칼슘과 응집된 형태를 나타내기 때문인 것으로 보인다.

실험예 2. 프로타민-탄산칼슘 코어의 유전자 발현

2-1. 비교예로서 프로타민 전달체 및 PEI 전달체의 발현능과 세포독성

프로타민 설페이트와 유전자가 단순 혼합된 전달체의 유전자 전달능을 평가하기 위해, eGFP (enhanced green fluorescence protein) 유전자가 포함된 전달체를 HEK293세포에 처리하여 발현 능력을 확인하였다. 프로타민 설페이트와 유전자의 중량비를 변화시키며 제조된 전달체를 사용하였다. 또한, 비교를 위해 비 바이러스성 유전자 전달체로 가장 많이 쓰이는 25k 가지형(branched) PEI가 유전자와 혼합하여 제조된 전달체를 사용하였다. 두 전달체를 HEK293 세포에 처리 후 3일 후에 유전자 발현량을 확인한 결과를 도 14에 나타내었다.

[0151] 25k bPEI의 경우 HEK293 세포에서 주입(transfection) 3일 후, 중량비가1:1부터 1:10까지 유전자 발현이 일어났으며 가장 좋은 중량비는 1:5였다. 반면, 프로타민 설페이트의 경우 bPEI에 비하여 유전자 발현이 잘 일어나지 않았으며 1:20에서 유전자 발현이 일부 관찰되었다.

[0152] 한편, 상기 실험에서 두 전달체의 세포 생존율을 측정한 결과를 도 15에 나타내었다. 25k bPEI의 경우 농도에 따라서 세포 독성이 관찰이 되는 반면, 프로타민의 경우는 농도를 높여도 세포 독성이 없는 것을 확인 할 수 있었다.

[0154] **2-2. 프로타민-탄산칼슘 코어의 유전자 발현 능력 평가**

[0155] 프로타민 자체의 유전자 전달체는 세포에 주입시에 유전자 발현능이 약하므로, 제조예 2에서와 같이 탄산칼슘과 공침을 이용하여 유전자 전달입자를 제조하였다. 이 때, 프로타민의 중량비를 다양하게 설정하여 비교하였으며, 탄산칼슘을 형성하기 위한 칼슘이온 및 탄산이온의 조건은 $Ca^{2+}:CO_3^{2-} = 50:1$ (molar ratio)로 설정하였다. 구체적으로, 조성은 표 3과 같다.

표 3

용액 A (총 50 μ L)		용액 B(총 50 μ L)	
pDNA --(eGFP)	1 μ g	프로타민 설페이트	0.5 - 50 μ g
CaCl ₂	2M 5 μ L	Na ₂ CO ₃	0.04M, 5 μ L
증류수	잔량	증류수	잔량

[0157] 상기 조성으로 제조된 코어 입자를 HEK293 세포에 주입하여 3일 뒤 발현 양상을 확인한 결과를 도 16에 나타내었다. 낮은 프로타민 중량비에서도 유전자 발현이 잘 되는 것이 확인되었으며, 그 양상은 눈에 띄게 좋아진 것을 확인하였다.

[0158] 나아가, 상기 조성의 코어 입자를 간세포(HepG2) 및 CaCO-2세포에 주입한 후의 발현량을 평가하여 도 17에 나타내었다. 세포에서의 유전자 발현이 눈에 띄게 증가가 되는 것이 확인되었다. 이때, 25k bPEI의 경우 CaCO-2세포에서의 발현이 관찰이 되지 않는 반면, 코어입자의 경우는 유전자 발현이 관찰이 되었다. 이를 통해 25k bPEI는 세포에 따라 유전자 발현의 양상이 다르지만, 본 발명의 코어입자는 훨씬 안정적으로 세포 종류에 상관없이 유전자 발현을 잘 나타냄을 알 수 있었다.

[0160] **2-3. 인산칼슘을 사용한 코어입자와 비교**

[0161] 제조예 2에서 탄산칼슘 대신 인산칼슘을 사용한 경우의 유전자 전달능이 우수한 코어 입자를 형성하는지 확인하고자 하였다. 이에, 표 4의 조성으로 코어 입자를 제조하였다.

표 4

용액 A (총 50 μ L)		용액 B(총 50 μ L)	
pDNA --(eGFP)	1 μ g	프로타민 설페이트	2 μ g
CaCl ₂	2M 5 μ L	2X HBS(40 mM HEPES, 270 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH7.1)	30 μ L
증류수	잔량	증류수	잔량

[0163] 용액 A 및 B를 섞고 10분간 반응시킨 후 세포에 처리하였다. 인산칼슘의 생성은 pH의 영향을 많이 받으며, 용액이 장기간 보관되지 않았다. 또한, ASBT-MDCK(담즙산 수용체를 발현하도록 유도한 세포주) 세포에서 유전자 발현을 측정한 결과를 도 18에 나타내었고, 탄산칼슘을 이용한 코어입자에 비해 유전자 발현이 현저히 떨어짐을 알 수 있었다.

[0165] **2-4. 폴록사머 처리한 코어입자**

[0166] 탄산칼슘/프로타민의 공침전 방법은 대량화가 힘들고 입자의 크기가 시간에 따라 계속 커질 수 있는 문제가 있을 것으로 보임. 따라서 대량 생산 및 물질의 안정성을 위한 최적화 과정이 필요하다. 본 발명자들은 양친성 고분자인 폴록사머(F108, F127)를 코어 입자에 처리하여 안정화시켰다. 즉, 코어 입자를 하기 표 5의 조성으로 제

조에 2의 방법에 따라 제조하였다.

표 5

용액 A (총 50 μ L)		용액 B(총 50 μ L)	
pDNA --(eGFP)	1 μ g	프로타민 설페이트	1-20 μ g
CaCl ₂	2M 5 μ L	Na ₂ CO ₃	0.052M, 5 μ L
F108	최종 0.2중량%	F108	최종 0.2중량%
F127	최종 0.2중량%	F127	최종 0.2중량%
증류수	잔량	증류수	잔량

[0167] 상기 용액 A 및 용액 B를 섞고 10분간 반응시켜 코어입자를 제조하였다. 상기 코어 입자를 ASBT-MDCK 세포에 처리한 후 유전자 발현을 확인한 결과를 도 19에 나타내었다. 이를 통해, 양친성 고분자인 폴록사머(F108, F127) 처리에 의해 유전자 전달 입자를 안정적으로 형성할 수 있을 뿐만 아니라 기존 조건보다 강한 유전자 발현을 나타내는 입자를 생성할 수 있음을 알 수 있었다.

[0170] **2-5. 최적의 칼슘이온 양 조절**

[0171] 최적의 코어 입자를 형성하는 조성으로서 염화칼슘의 양을 줄일 수 있을지 확인하고자, 기존의 조건에서 염화칼슘의 양을 변경하며 제조한 코어 입자로서 형질주입 실험을 진행하였다. 즉, 코어 입자를 표 6의 조성으로 제조 예 2의 방법에 따라 제조하였다.

표 6

용액 A (총 50 μ L)		용액 B(총 50 μ L)	
pDNA --(eGFP)	1 μ g	프로타민 설페이트	10 μ g
CaCl ₂	2M, 1 내지 5 μ L	Na ₂ CO ₃	0.052M, 5 μ L
F108	최종 0.2중량%	F108	최종 0.2중량%
F127	최종 0.2중량%	F127	최종 0.2중량%
증류수	잔량	증류수	잔량

[0173] 용액 A 및 B를 혼합한 후 10분간 반응시켜 코어 입자를 생성하였다. 상기 코어 입자를 ASBT-MDCK 세포에 처리한 후 유전자 발현을 확인한 결과를 도 20에 나타내었다. 기존 조건의 유전자 1 μ g당 2M 염화칼슘 5 μ L이상에서 유전자 발현이 확인되었다. 더 많은 양의 염화칼슘은 세포독성을 나타낼 수 있기 때문에 이후 실험에서는 칼슘의 양을 유전자 1 μ g당 2M 염화칼슘 5 μ L로 고정하여 진행하였다.

[0175] **2-6. 글리세롤 첨가된 코어**

[0176] 본 발명의 코어의 유전자 전달 및 발현능을 개선하기 위하여 코어에 글리세롤을 첨가하였다. 즉, 코어 입자를 표 7의 조성으로 제조예 2의 방법에 따라 제조하였다.

표 7

용액 A (총 50 μ L)		용액 B(총 50 μ L)	
pDNA --(eGFP)	1 μ g	프로타민 설페이트	10 μ g
CaCl ₂	2M, 5 μ L	Na ₂ CO ₃	0.052M, 5 μ L
F108	최종 0.2중량%	F108	최종 0.2중량%
F127	최종 0.2중량%	F127	최종 0.2중량%
글리세롤	최종 10 중량%	글리세롤	최종 10 중량%
증류수	잔량	증류수	잔량

[0178] 용액 A 및 B를 혼합한 후 10분간 반응시켜 코어 입자를 생성하였다. 상기 코어 입자를 ASBT-MDCK 세포에 처리한 후 유전자 발현을 확인한 결과를 도 21에 나타내었다. 나노입자를 형성할 때 글리세롤의 첨가는 탄산칼슘의 안정화에 도움을 주며, 이를 통해 유전자 형질도입을 향상시키는 결과를 이끌었음. 또한 코어입자의 세포내의 흡수를 증진시키는 것으로 보인다.

[0180] 2-7. 아미노산 첨가된 코어

[0181] 탄산칼슘은 시간에 따라 응집이 잘 되는 성질이 있어 배터라이트(vaterite) 혹은 방해석(calcite) 형태에서 아라고나이트(aragonite) 모양으로 변하게 되는데 이렇게 모양이 변하게 되면 탄산칼슘의 성질이 바뀌게 되며, 분산이 떨어지고 약물의 전달 효율이 감소할 수 있다. 이러한 탄산칼슘을 안정화하기 위해서는 카르복실 그룹(COOH)을 가지고 있는 물질을 첨가하였다. 대표적으로 아미노산 중 글리신과 아르기닌을 코어에 반응시켜 유전자 발현 양상을 비교 실험해 보았다. 즉, 코어 입자를 표 8의 조성으로 제조에 2의 방법에 따라 제조하였다.

표 8

[0182]

용액 A (총 50 μL)		용액 B(총 50 μL)	
pDNA --(eGFP)	1 μg	프로타민 설페이트	10 μg
CaCl ₂	2M, 5 μL	Na ₂ CO ₃	0.052M, 5 μL
F108	최종 0.2중량%	F108	최종 0.2중량%
F127	최종 0.2중량%	F127	최종 0.2중량%
글리신 또는 아르기닌	최종 0.1 M 내지 1M	글리신 또는 아르기닌	최종 0.1 M 내지 1M
증류수	잔량	증류수	잔량

[0183] 용액 A 및 B를 혼합한 후 10분간 반응시켜 코어 입자를 생성하였다. 상기 코어 입자를 ASBT-MDCK 세포에 처리한 후 유전자 발현을 확인한 결과를 도 22에 나타내었다.

[0184] 글리신의 경우 나노입자 형성 반응시 침전이 잘 일어나지 않았으나, 아르기닌의 경우는 침전이 잘 일어났다. 그 결과 세포의 형질주입에서 아르기닌은 유전자 발현이 관찰이 되지만 글리신은 유전자 발현률을 떨어뜨렸다. 하지만 아르기닌 또한 양이 증가되면 유전자 발현이 감소되는 것이 확인되었다. 결과적으로 아르기닌은 유전자 발현 증가를 목적으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0186] 실험에 3. 코어-셀 복합체의 유전자 발현

[0187] 3-1. ASBT-MDCK 세포에서 eGFP를 이용한 유전자 발현 평가

[0188] 제조예 3에서와 같이, 프로타민-탄산칼슘 코어에 콘드로이틴 설페이트-TCA (Chs-TCA)를 이용하여 코어 밖을 담즙산을 가지는 다당류의 셀로 코팅을 진행하였다. 이때, 유전자 대비 Chs-TCA의 중량비를 달리하여 코어-셀 전달체를 제조하였다.

[0189] 구체적으로, 코어 입자를 표 9의 조성에 따라 제조예 2의 방법으로 제조하였다.

표 9

[0190]

용액 A (총 50 μL)		용액 B(총 50 μL)	
pDNA --(eGFP)	1 μg	프로타민 설페이트	6, 8, 10, 또는 12 μg
CaCl ₂	2M, 5 μL	Na ₂ CO ₃	0.052M, 5 μL
F108	최종 0.2중량%	F108	최종 0.2중량%
F127	최종 0.2중량%	F127	최종 0.2중량%
글리세롤	최종 10 중량%	글리세롤	최종 10 중량%
증류수	잔량	증류수	잔량

[0191] 유전자 대비 콘드로이틴-TCA의 중량비를 달리하여, 상기 코어 입자와 콘드로이틴-TCA의 셀을 혼합하고 상온에서 10분간 반응하여 코어-셀 복합체를 제조하였다.

[0192] 상기 코어-셀 전달체를 ASBT-MDCK세포에 처리하며 eGFP 유전자를 이용하여 유전자의 발현 빈도를 관찰하여 결과를 도 23에 나타내었다. 또한, luciferase 유전자를 이용하여 유전자 발현량을 측정된 결과를 도 24에 나타내었다.

[0193] 프로타민의 중량비에 관계없이 Chs-TCA셀의 코팅은 세포에서의 유전자 발현을 확연히 증가시킴을 확인하였다. 유전자 대비 Chs-TCA의 양을 1:10까지 늘려서 관찰해본 결과 대부분의 세포에서 일정하게 유전자가 발현이 되는 것을 확인할 수 있었으나, Chs-TCA에 양적 증가와 비례하는 상관관계를 가지지는 않았다.

- [0194] 한편, eGFP 유전자를 이용하여 유전자 발현 지속 기간을 관찰하였다. 유전자를 ASBT-MDCK 세포에 처리하여 관찰하였으며, 일정한 배양 후, 계대배양을 하여 발현되는 GFP 형광을 추적 관찰하였다. 세포를 계대배양하여 형질 주입된 세포의 수가 희석이 되었지만 2주간 GFP 형광을 지속해서 관찰할 수 있었다.
- [0196] **3-2. 간세포 및 GLA KO 세포에서 eGFP를 이용한 유전자 발현 평가**
- [0197] 코어-셀 전달체를, 실험예 3-1 에서 ASBT-MDCK에 처리한 것과 달리 HepG2 (간세포), HAP1_KO (GLA knock-out 세포)에 처리하여 eGFP 유전자 발현양을 측정하였다. HepG2 (간세포)에 eGFP 유전자를 이용하여 유전자 발현 빈도를 측정한 결과를 도 26에 나타내었다. 또한, GLA knock-out 세포에 eGFP 유전자를 이용하여 유전자 발현 빈도를 측정한 결과를 도 27에 나타내었다.
- [0198] 유전자 대비 프로타민, Chs-TCA의 양을 각각 1:12, 1:10까지 늘려서 관찰해본 결과 대부분의 세포에서 일정하게 유전자가 발현이 되는 것을 확인할 수 있었으나 Chs-TCA에 양적 증가와 비례한 상관관계를 가지지는 않았다.
- [0200] **3-3. GLP-1를 이용한 유전자 발현 평가**
- [0201] 실험예 3-1에서 eGFP 유전자를 처리한 것과 달리, 코어-셀 전달체에 GLP-1 유전자를 담지하여 ASBT-MDCK 세포에 처리하였다. 양성 대조군으로서 PEI를 사용하였다. 세포에서의 GLP-1의 발현양을 ELISA로 측정하였다. 그 결과를 도 28에 나타내었다.
- [0202] 양성 대조군인 PEI 전달체는 유전자의 발현을 거의 일으키지 않은 반면, 본 발명의 코어-셀 복합체의 경우 GLP-1의 발현이 PEI 대비 3배 이상 관찰되었다.
- [0204] **3-4. GLA를 이용한 유전자 발현 평가**
- [0205] 실험예 3-2에서 eGFP 유전자를 처리한 것과 달리, 코어-셀 전달체에 GLA 유전자를 담지하여 HepG2 와 HAP1_KO (GLA knock-out) 세포에 처리하였다. 양성 대조군으로서 PEI를 사용하였다. HepG2 및 HAP1_KO (GLA knock-out) 세포에서의 GLA의 발현양을 ELISA로 측정하였고, 그 결과를 각각 도 29 및 30에 나타내었다.
- [0206] 양성 대조군인 PEI 전달체는 유전자의 발현을 거의 일으키지 않은 반면, 본 발명의 코어-셀 복합체는 HepG2세포의 상층액에서 대조군 대비 3.4배, HepG2 세포 lysates에서 1.1배의 GLA 발현이 상승하였고, HAP1_KO 세포의 상층액에서 대조군 대비 26배, HAP1_KO 세포의 lysates에서 8.4배의 GLA 발현 상승이 관찰되었다. HepG2 세포는 정상적으로 GLA 유전자를 발현하므로 생성된 GLA가 대부분 분비된 반면, HAP1_KO 세포의 경우 GLA 유전자가 부족하므로, 세포내 발현 및 분비가 모두 증가한 것으로 확인되었다.
- [0208] **3-5. 복합체의 세포 독성**
- [0209] 실험예 3-1의 코어-셀 전달체에 있어, 유전자: 컨주게이트의 중량비를 달리하며 세포 독성을 CCK-8을 통해 분석하였다. 96 웰 플레이트에 웰당 각 세포 10,000개씩 담아 테스트를 진행하였다. ASBT-MDCK(담즙산 수용체 발현), HepG2(간세포), CaCO-2(대장세포), HEK293(t신장세포)에서 모두 독성을 나타내지 않았다.
- [0211] **3-6. pH 안정성 평가**
- [0212] 실험예 3-1에 따라 프로타민-탄산칼슘/Chs-TCA 코어-셀 복합체를 제조한 후 다양한 pH조건에 따른 물질의 안정성을 테스트하였다. PBS (pH 7.4)를 기본으로 pH를 1.2, 6.0, 9.3으로 설정을 하여 각각의 pH 용액으로 복합체를 분산하고 1시간뒤 원심분리를 돌려 상층액에 검출되는 GLP-1 DNA의 양을 DNA assay를 통해서 측정하였고, 그 결과를 도 32에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이 모든 pH 조건에서 상층액에 검출되는 DNA의 양이 없었으며, 이를 통해 유전자 복합체가 극한의 pH조건에서도 안정적으로 DNA를 감싸고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 각 조건에서의 유전자 복합체가 가지는 DNA의 양은 90% 이상이었다. 이를 통해 경구용 유전자 전달체로서 위산을 견딜 수 있다는 것을 검증할 수 있었다.
- [0214] **실험예 4. 코어 제조의 공정 최적화**
- [0215] 탄산칼슘은 응집의 형태 변화에 따른 안정성 문제로 in-vivo 수준으로 스케일을 높이는 것이 어려울 수 있다. 염화칼슘은 LD50 값이 1000-2000 mg/kg으로 상당히 낮은 물질이므로, 염화칼슘의 정제 없이 스케일을 높여 in vivo 투여를 진행하면 칼슘의 독성으로 동물이 죽는 문제가 발생할 수 있을 것으로 보인다. 염화칼슘의 정제를 위해 원심분리가 필요할 것이나, 원심분리 이후 입자의 재분산(redisperse)이 되지 않는 문제를 가지고 있어, 이를 해결하기 위한 공정의 최적화 방안을 검토하였다.
- [0216] **4-1. 폴리아크릴산을 이용한 대량 공정화**

[0217] 폴리아크릴산은 카르복실 그룹 (COOH)를 가지며 칼슘과 결합하는 성질을 가지므로, 코어-셸 복합체를 안정화하기 위해 첨가하였다. 즉, 코어 입자를 표 10의 조성으로 제조에 2의 방법에 따라 제조하였다. 폴리아크릴산은 5,100의 분자량의 것을 사용하였다.

표 10

용액 A (총 50 μ L)		용액 B(총 50 μ L)	
pDNA --(eGFP)	1 μ g	프로타민 설페이트	10 μ g
CaCl ₂	2M, 5 μ L	Na ₂ CO ₃	0.052M, 5 μ L
F108	최종 0.2중량%	F108	최종 0.2중량%
F127	최종 0.2중량%	F127	최종 0.2중량%
글리세롤	최종 10 중량%	글리세롤	최종 10 중량%
증류수	잔량	폴리아크릴산	1 내지 5 ug
		증류수	잔량

[0219] 용액 A 및 B를 혼합한 후 10분간 반응시켜 코어 입자를 생성하였다.

[0220] 폴리아크릴산을 유전자 대비 1:5의 중량비로 이용하면 스케일을 높일 수 있고, 원심분리로 정제가 가능하며, 증류수로 재분산이 가능하였다. 실험예 2-6의 기존의 코어와 비교하여 폴리아크릴산이 첨가된 코어입자가 재분산이 가능함을 확인하였고, 이를 도 33에 나타내었다.

[0221] 또한, 재분산된 코어입자를 이용하여 ASBT-MDCK 세포에 처리한 후 유전자 발현을 확인한 결과를 도 34에 나타내었다.

[0222] 나아가, PVP (polyvinylpyrrolidone, MW5500), 솔비톨(sorbitol) 등의 리소솜 향성 작용제(lysosomotropic agent) 를 첨가제로 사용하여 분산시키면 유전자의 발현이 극적으로 좋아지는 것이 확인되었다. 특히 sorbitol 은 PAA를 이용한 유전자 core의 제작에서 유전자 발현을 현저히 높일 수 있고, 이때의 바람직한 솔비톨의 최종 농도는0.2 내지 0.6M 였다. PVP 또는 솔비톨 첨가에 따른 유전자 발현 정도를 나타낸 결과를 도 35에 나타내었다.

[0224] 4-2. 과량의 폴록사머를 이용한 대량 공정화

[0225] 폴록사머의 함량을 증가시켜 코어를 제조하는 경우 안정성 및 재분산의 정도가 확연히 증가됨을 확인하였다. 이때, 폴록사머의 CMC 특성상 용액 A와 B의 조성물은 미리 냉장조건 (4℃)에서 미리 인큐베이션(preincubation)을 시켜 용액의 물질이 잘 섞이도록 유도해준다. 즉, 표 11의 조성으로 용액 A 및 B를 혼합하여 코어를 형성하고 chondroitin-TCA의 셸로 코팅한다. TCA의 in vivo 효과를 최대한 올리기 위하여 chondroitin-TCA의 weight ratio를 1:10으로 고정하였다. 코어와 셸을 결합시킨 후 원심분리를 통해 물질을 정제하였다(상층액 제거).

표 11

용액 A (총 50 μ L)		용액 B(총 50 μ L)	
pDNA --(eGFP)	1 μ g	프로타민 설페이트	10 μ g
CaCl ₂	2M, 5 μ L	Na ₂ CO ₃	0.052M, 5 μ L
F108	최종 5중량%	F108	최종 5중량%
F127	최종 5중량%	F127	최종 5중량%
글리세롤	최종 10 중량%	글리세롤	최종 10 중량%
증류수	잔량	증류수	잔량

[0227] 형성된 코어-셸 복합체를 이용하여 ASBT-MDCK세포에 형질주입한 후 유전자 발현양을 확인한 결과를 도 36에 나타내었다. 유전자의 양에 상관없이 과량의 유전자를 합성하여도 우수한 유전자 발현이 나타났으며, 상당히 좋은 안정성 덕분에 응집 현상이 일어나지 않는 것을 확인하였다.

[0229] 실험예 5. 제2형 당뇨병 동물에서의 in-vivo 실험 결과 확인

[0230] 제2형 당뇨병모델 중 하나인 db/db mice에 실험예 4-2에서 유전자를 GLP-1으로 한 경구용 GLP-1 유전자 복합체 (100 ug/head)를 경구투여하였다.

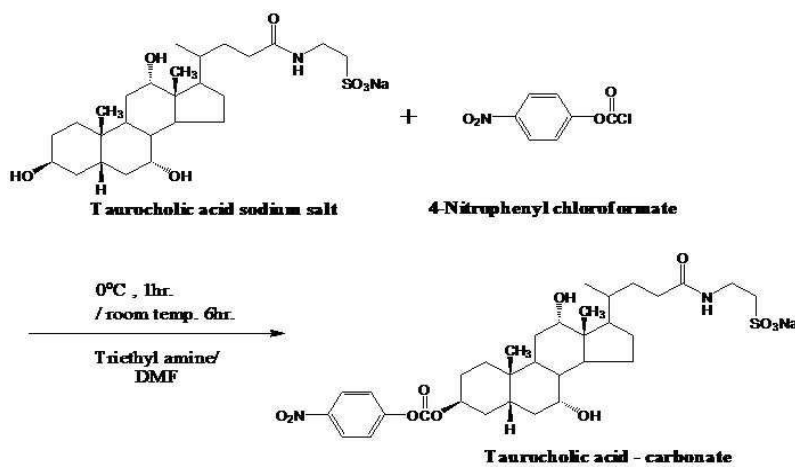
[0231] 3일 후 혈액을 채취하여 혈중 GLP-1의 양을 ELISA를 통하여 측정하였다. 그 결과를 도 37에 나타내었다. 혈중 GLP-1의 양은 경구 투여 후, 대조군 마우스 대비 약 3배이상 증가됨이 확인이 되었다.

[0233] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

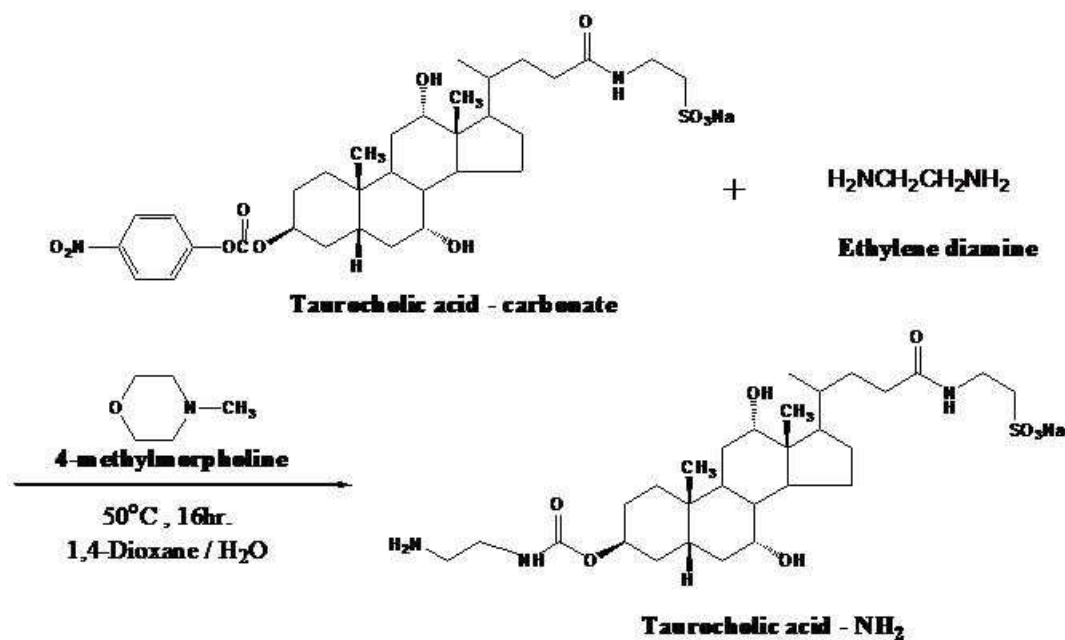
[0234] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

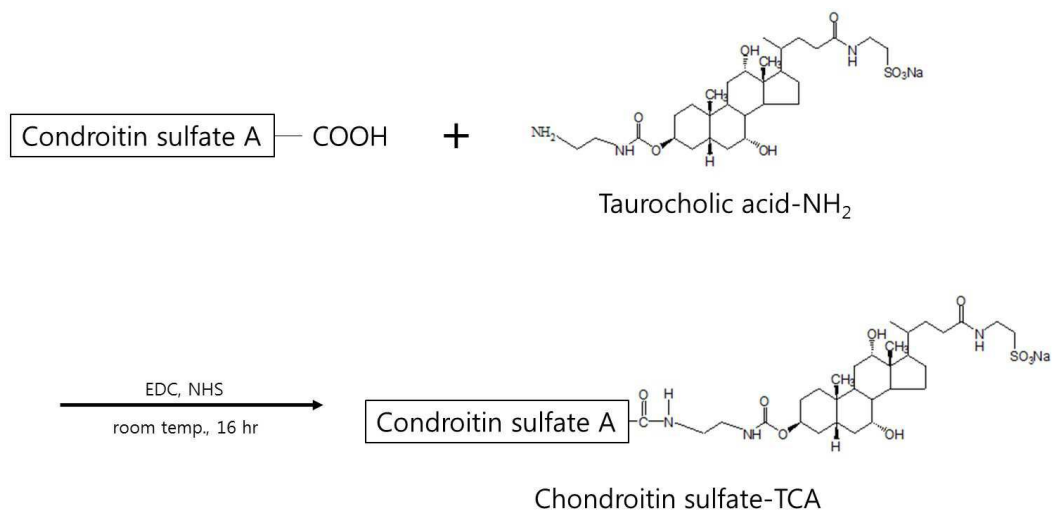
도면1



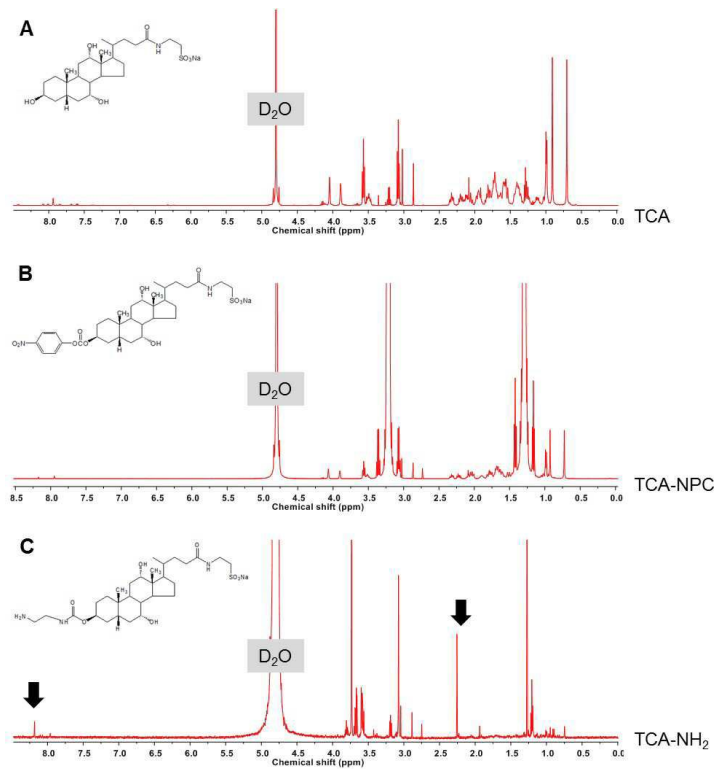
도면2



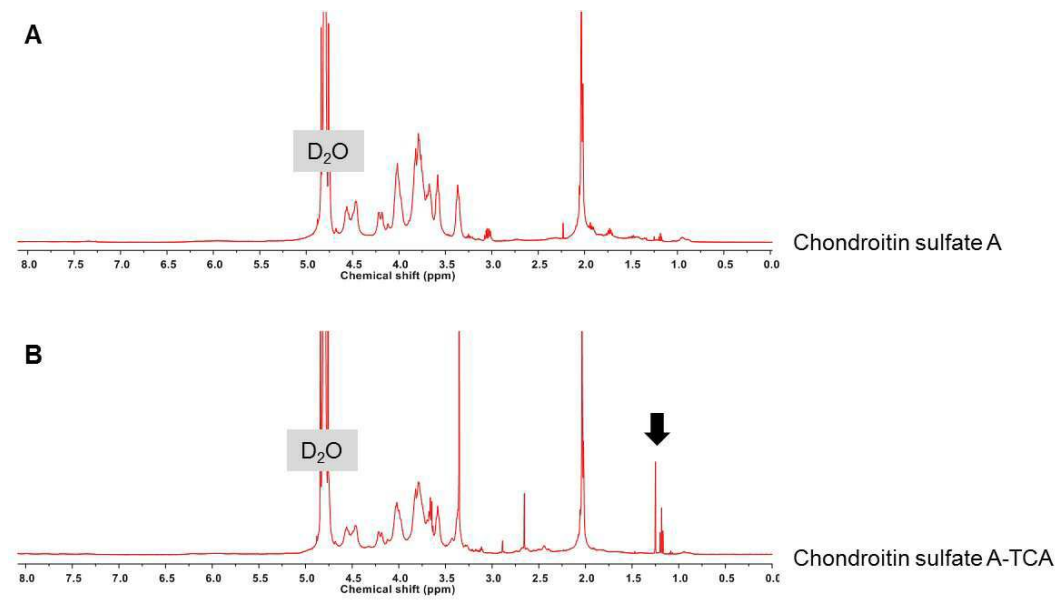
도면3



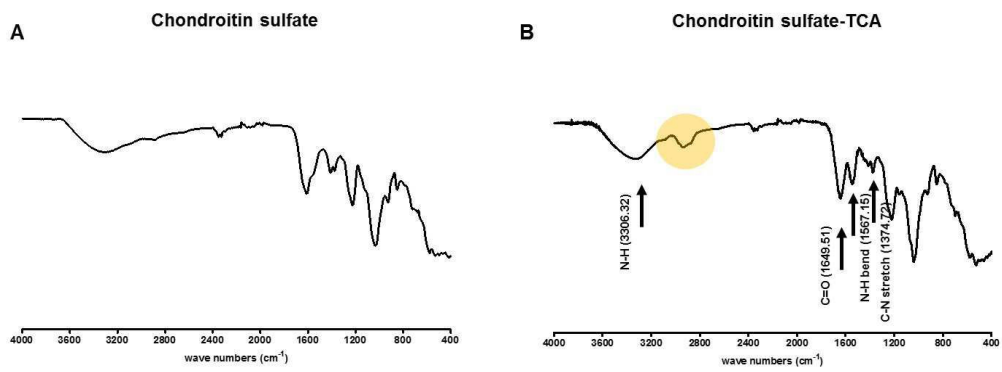
도면4



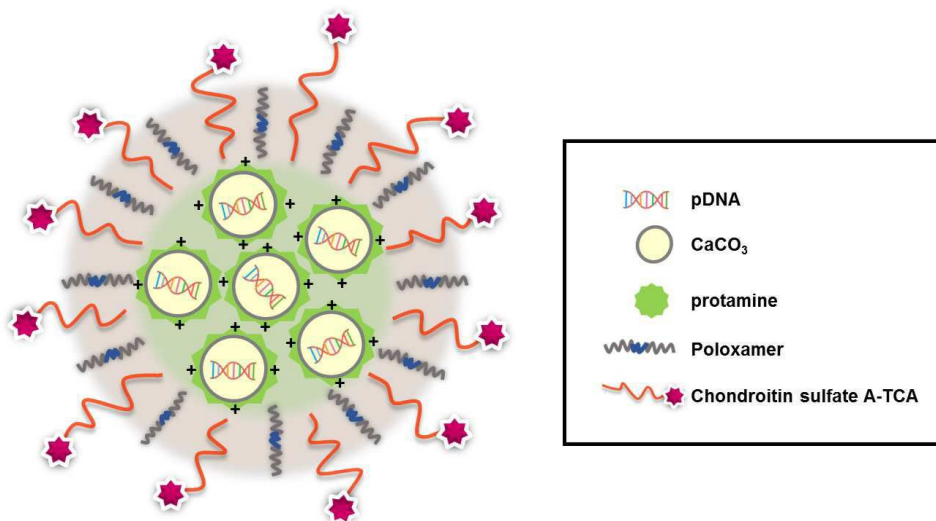
도면5



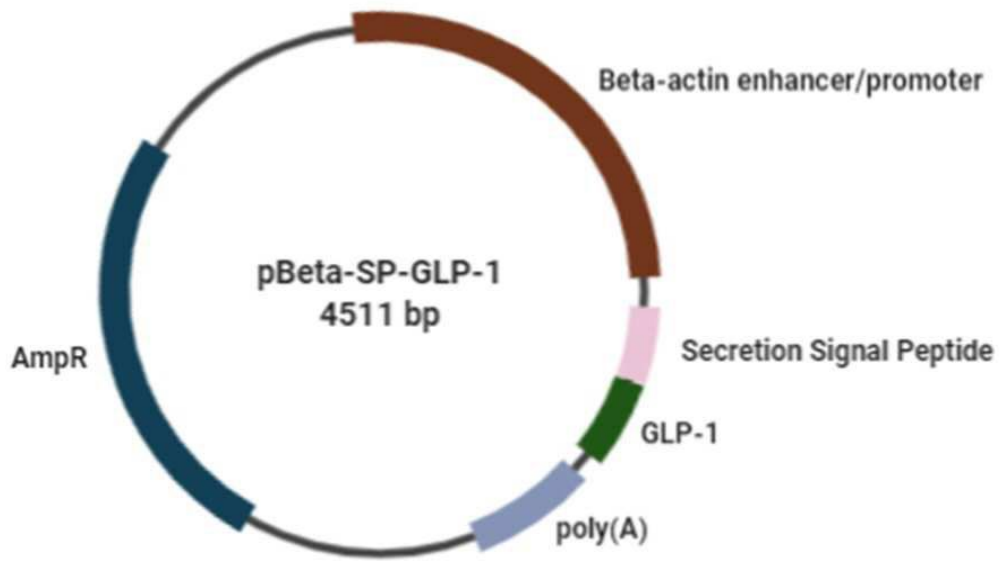
도면6



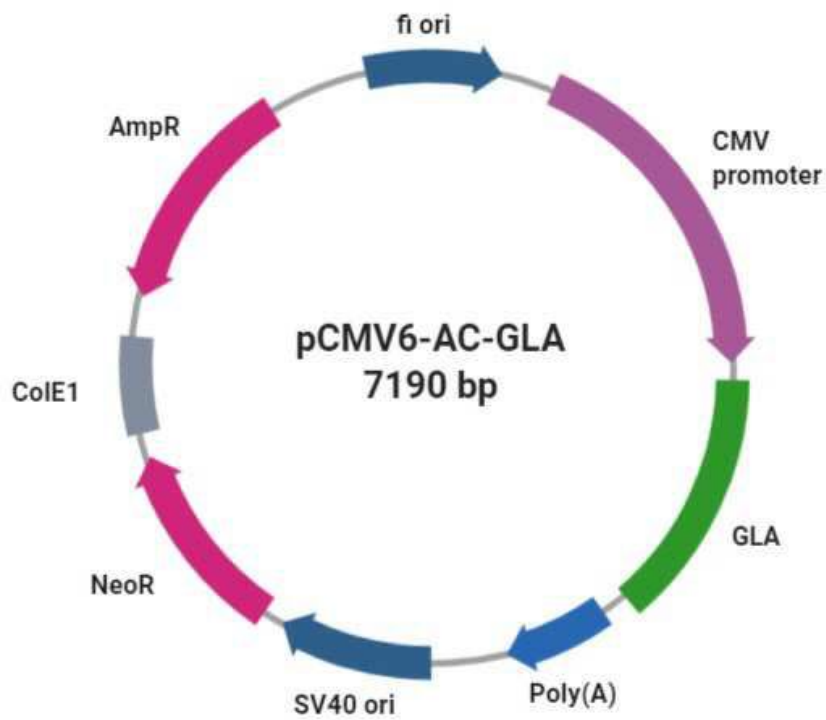
도면7



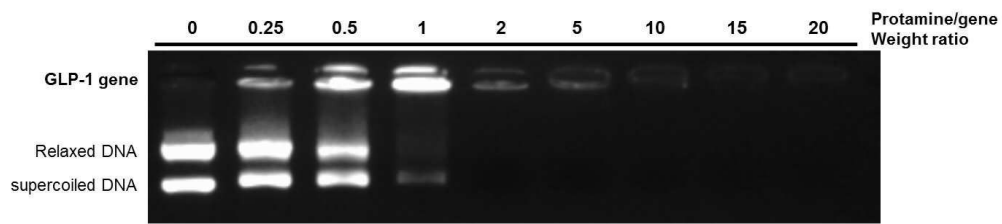
도면8



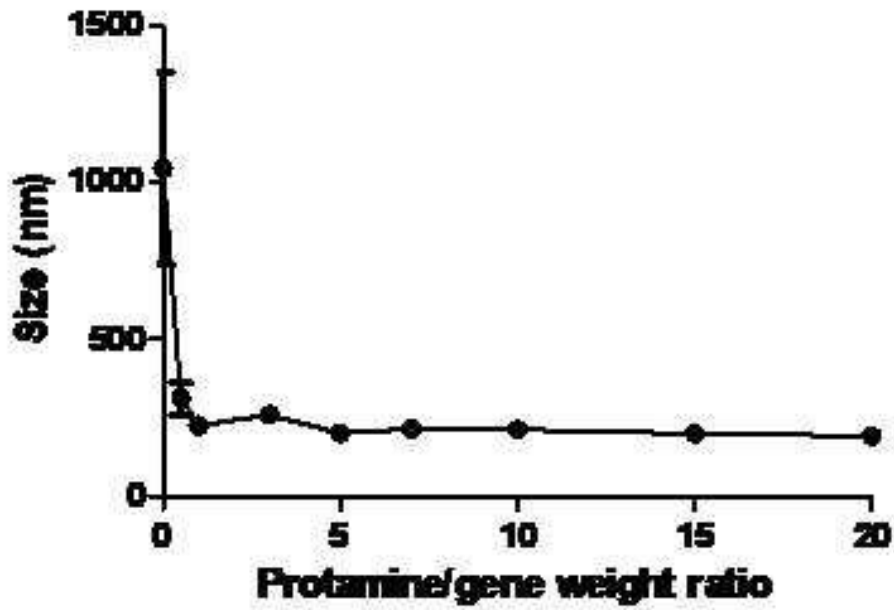
도면9



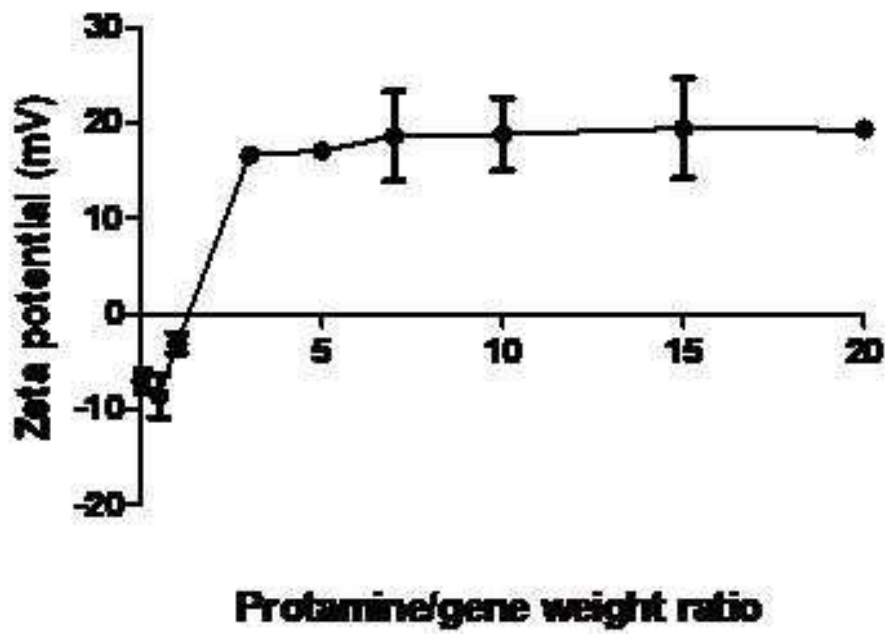
도면10



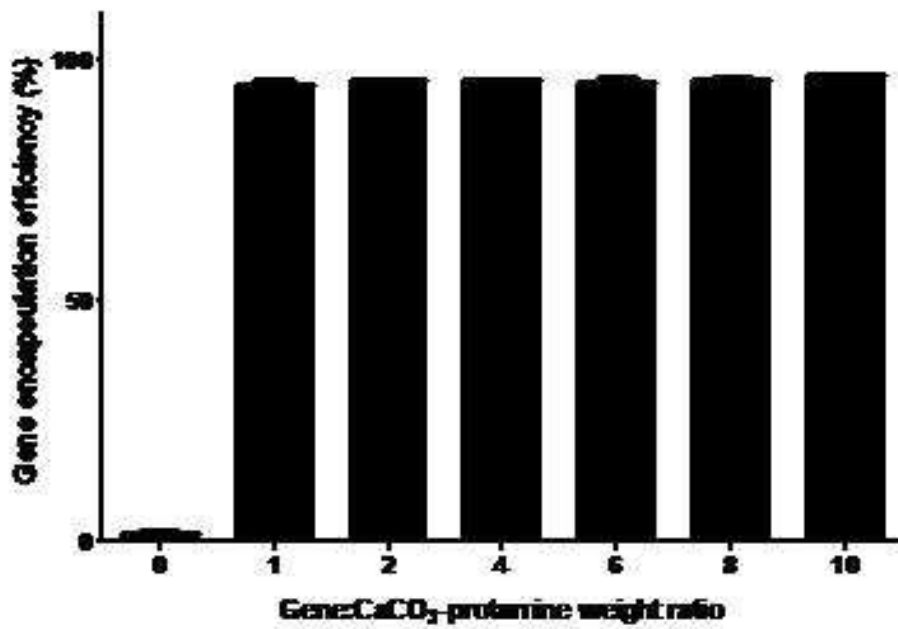
도면11



도면12

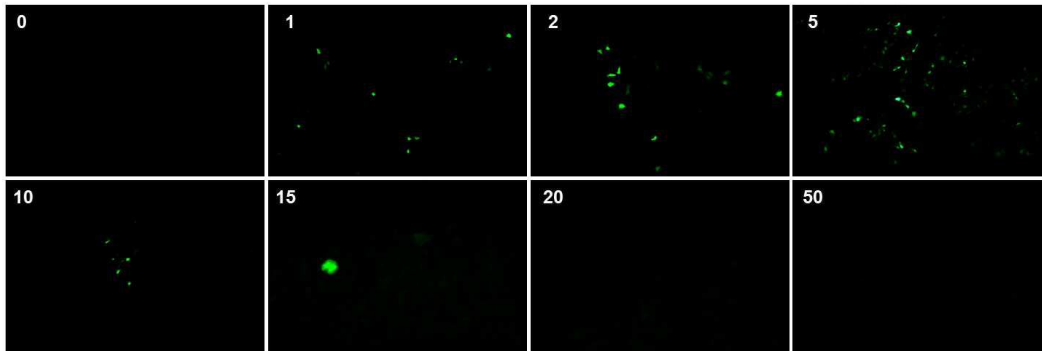


도면13

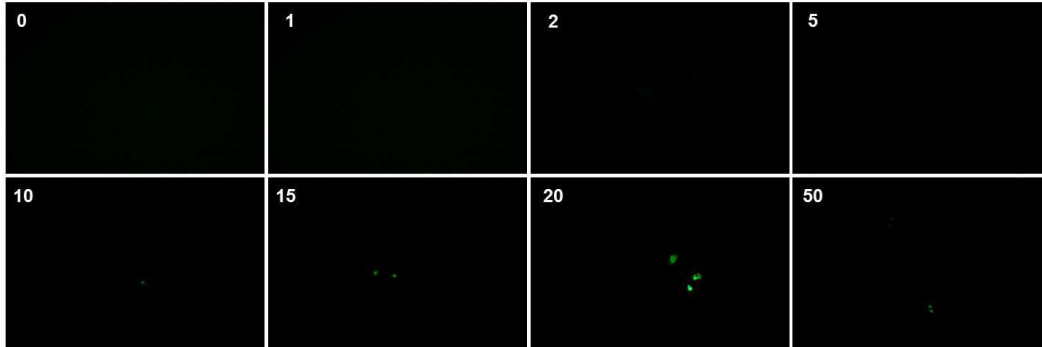


도면14

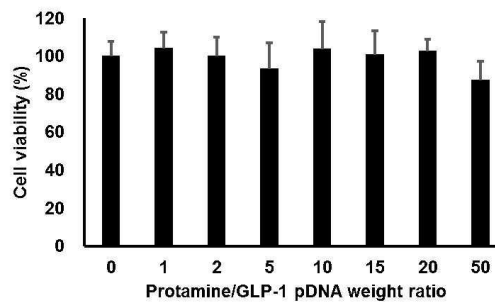
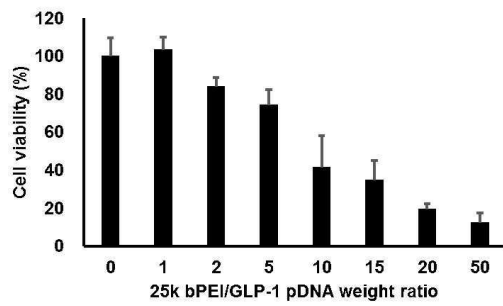
25k bPEI transfection (EGFP_3 days)



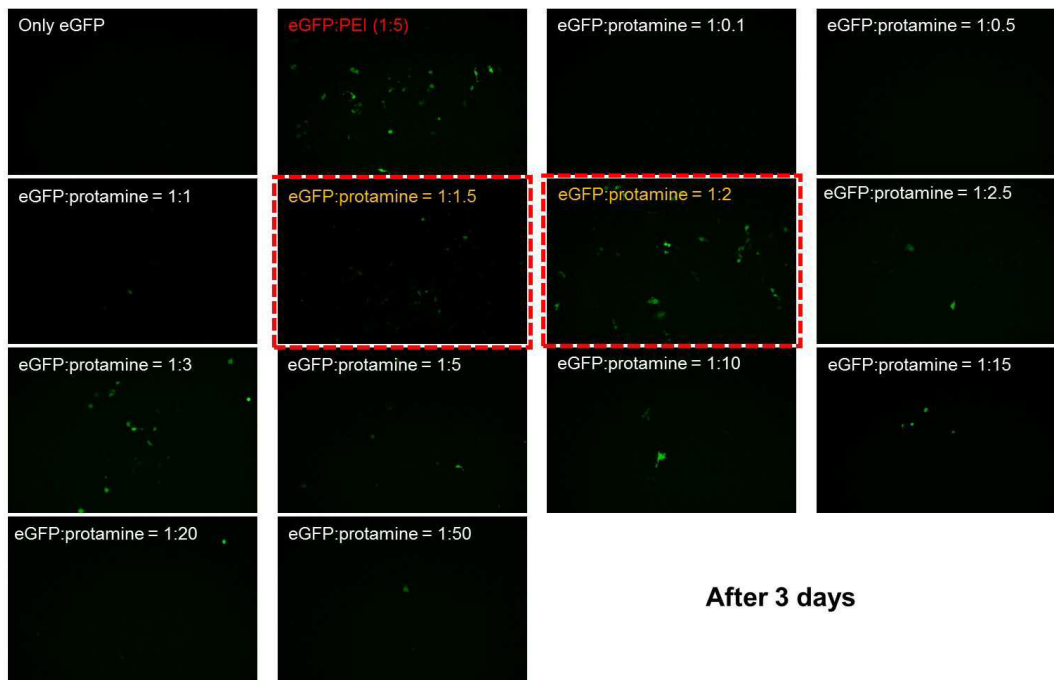
Protamine sulfate transfection (EGFP_3 days)



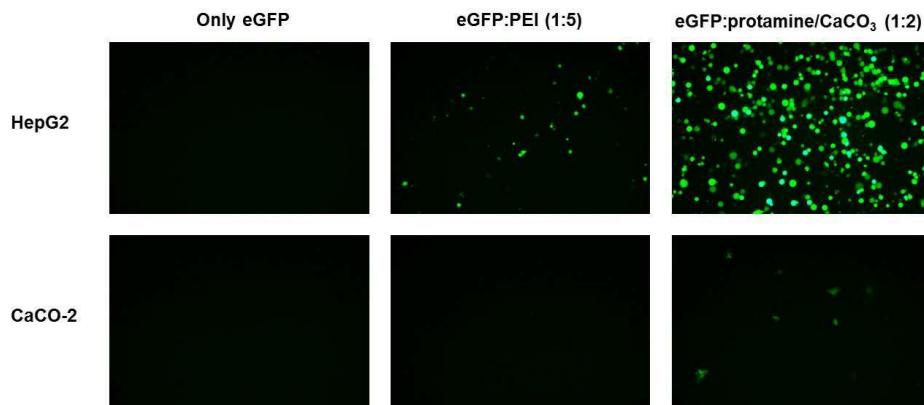
도면15



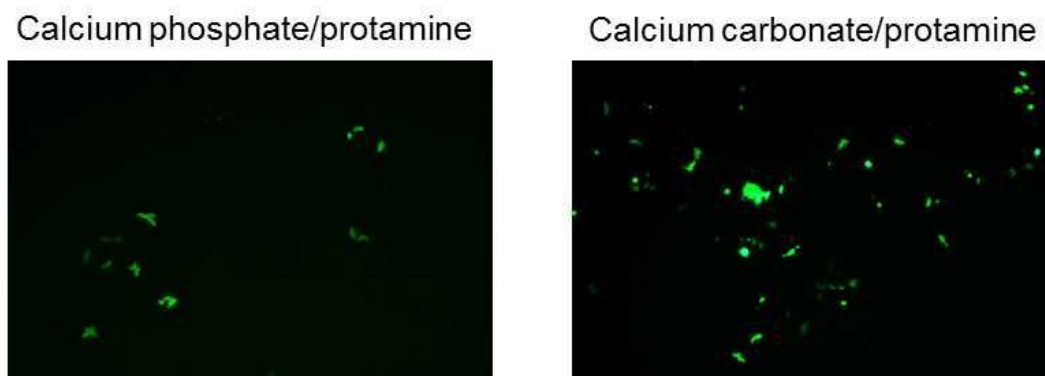
도면16



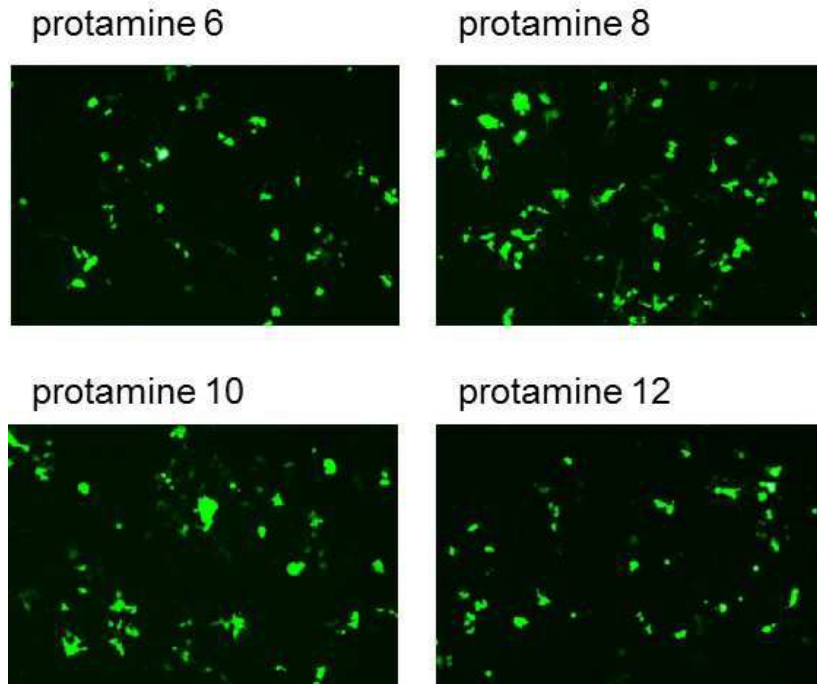
도면17



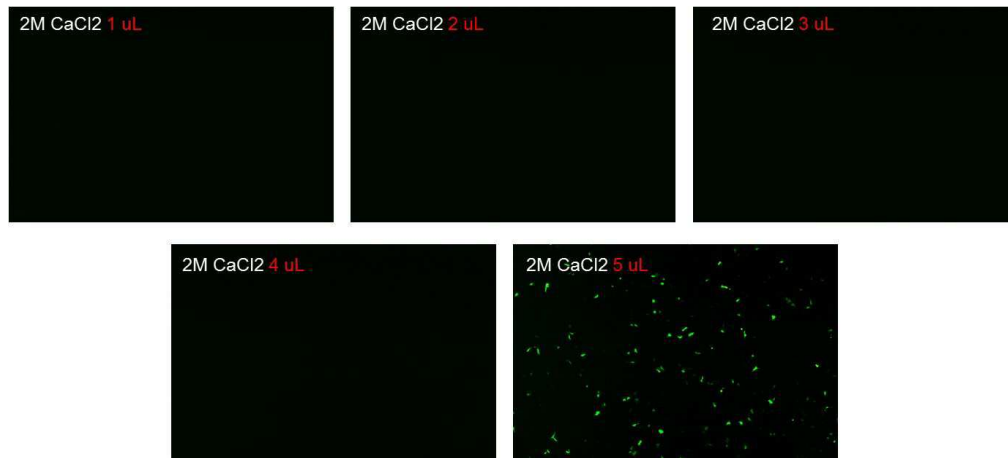
도면18



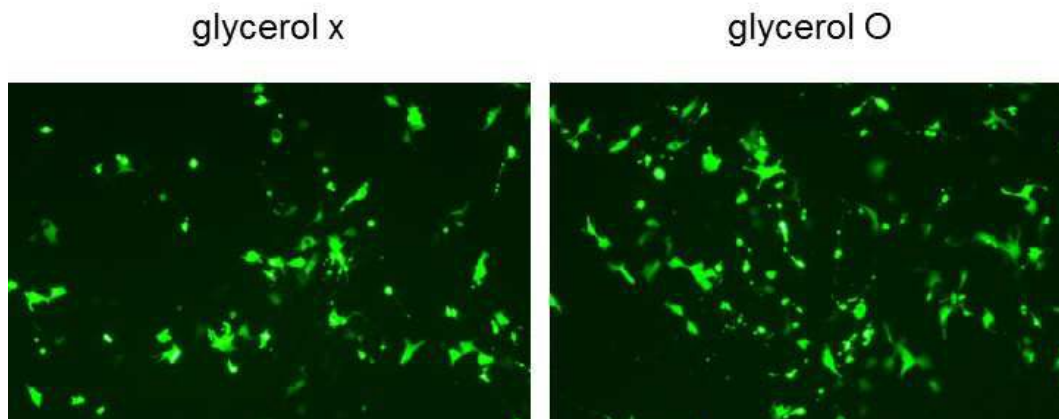
도면19



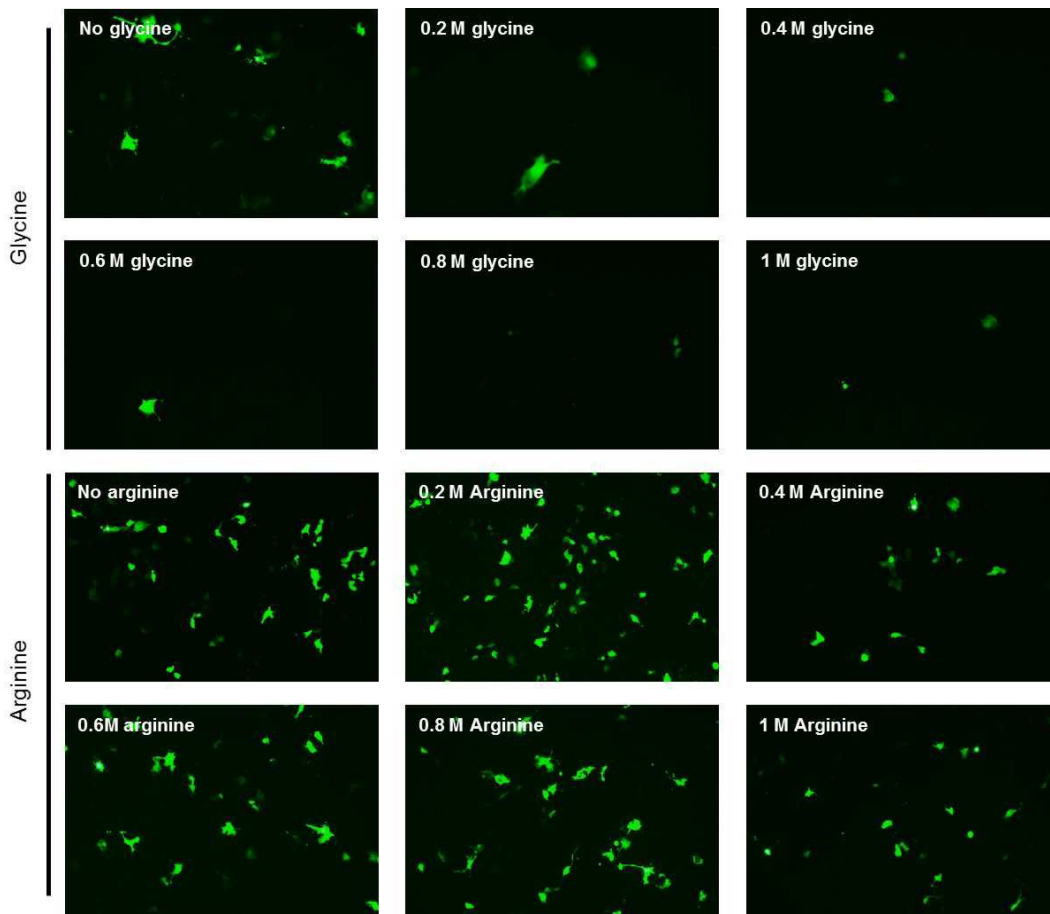
도면20



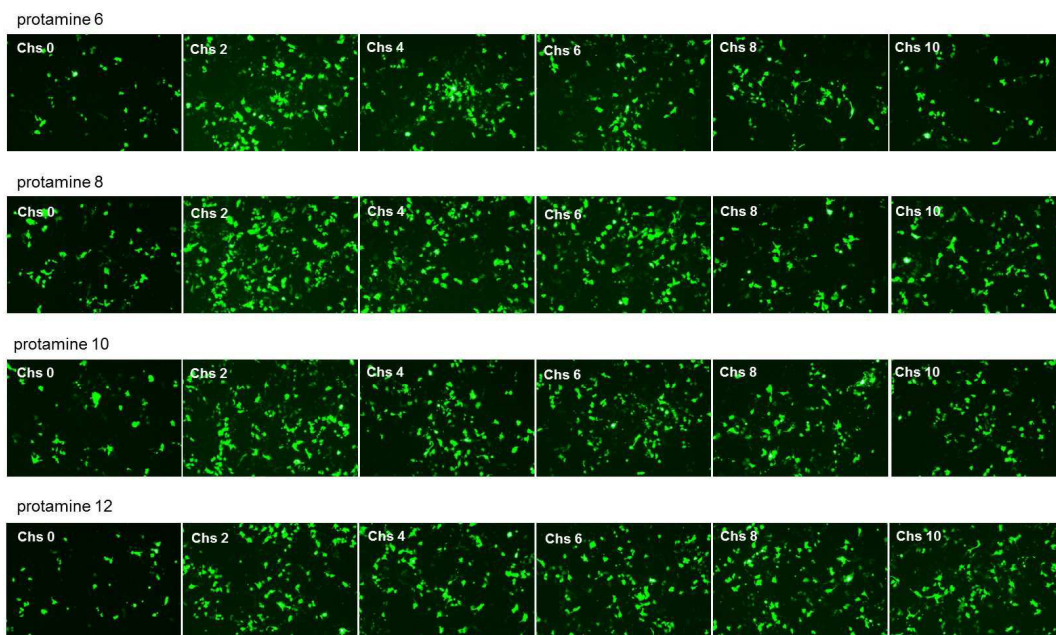
도면21



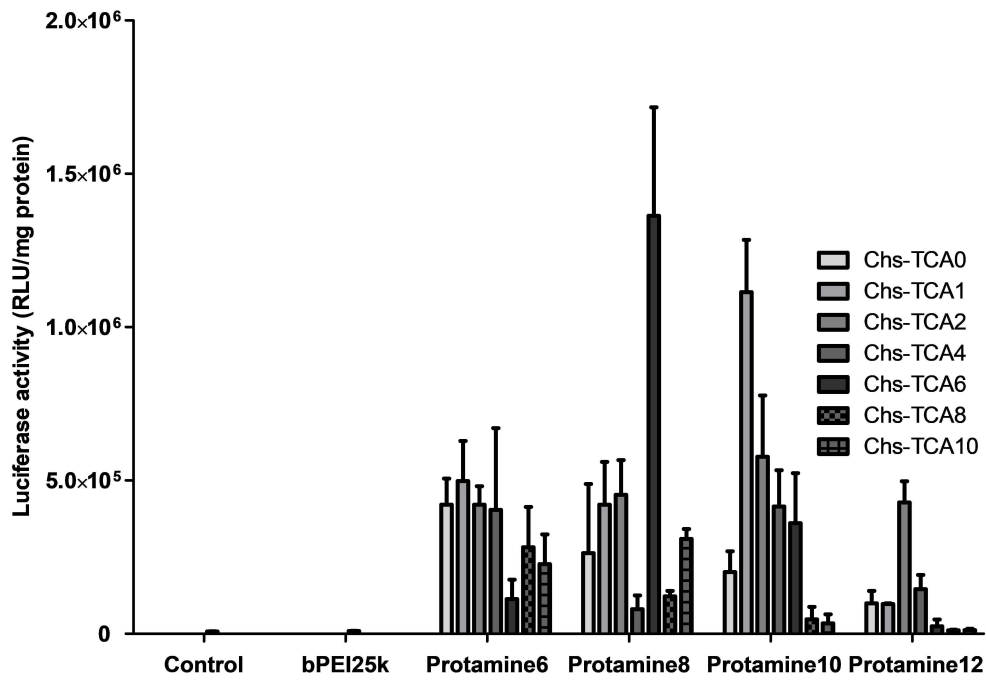
도면22



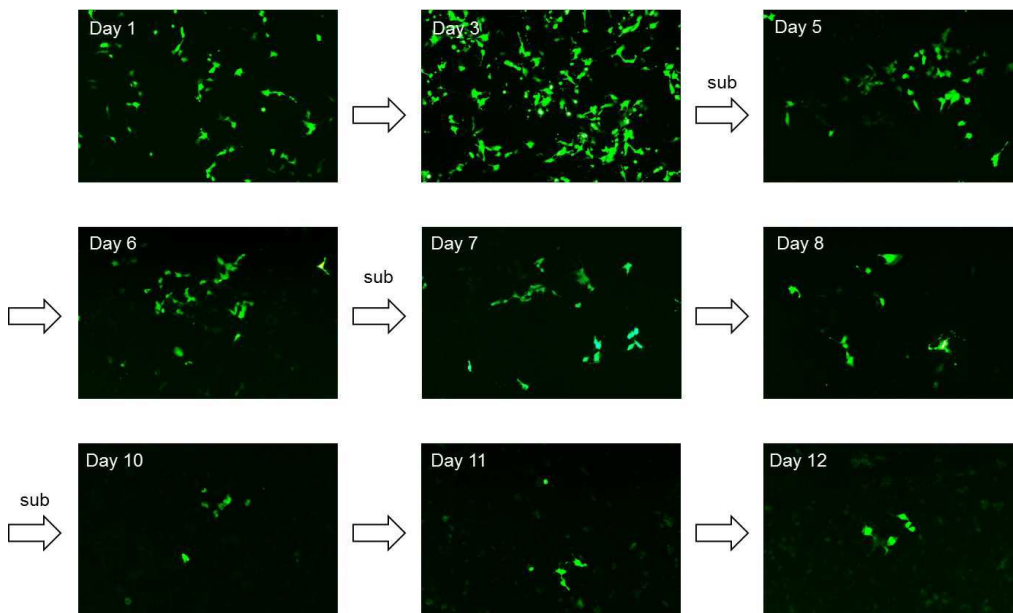
도면23



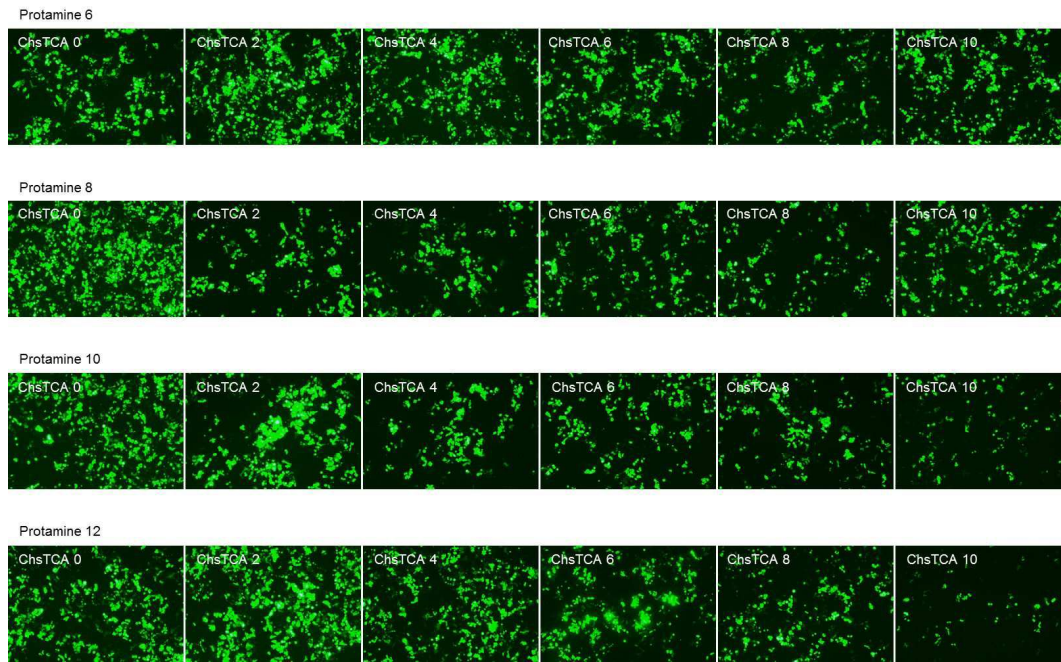
도면24



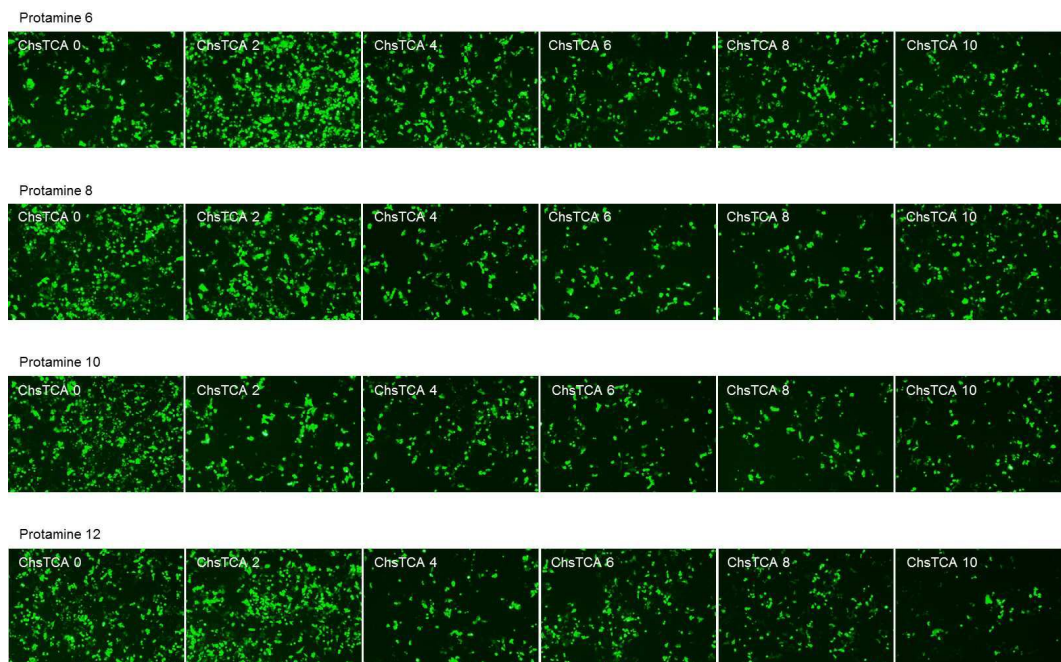
도면25



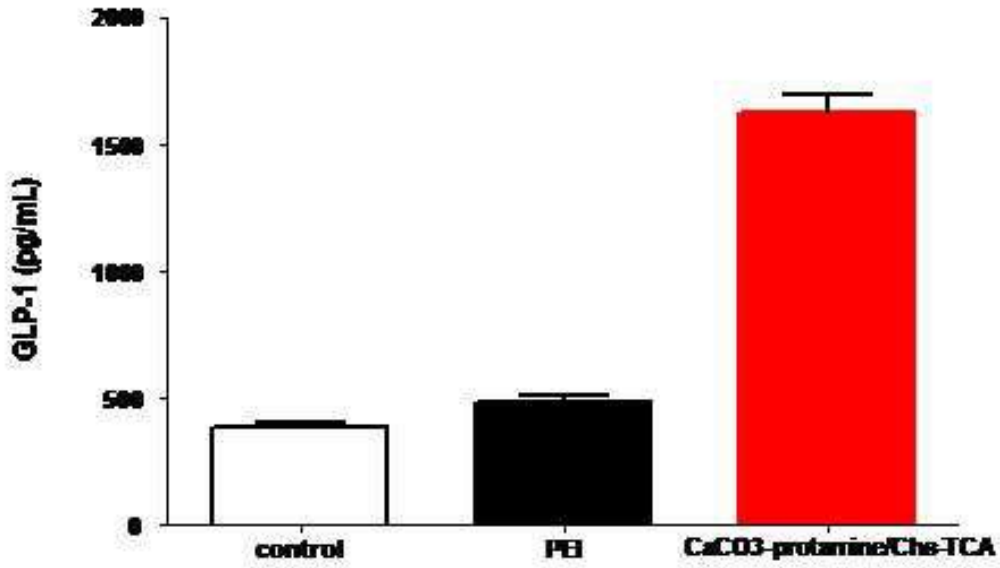
도면26



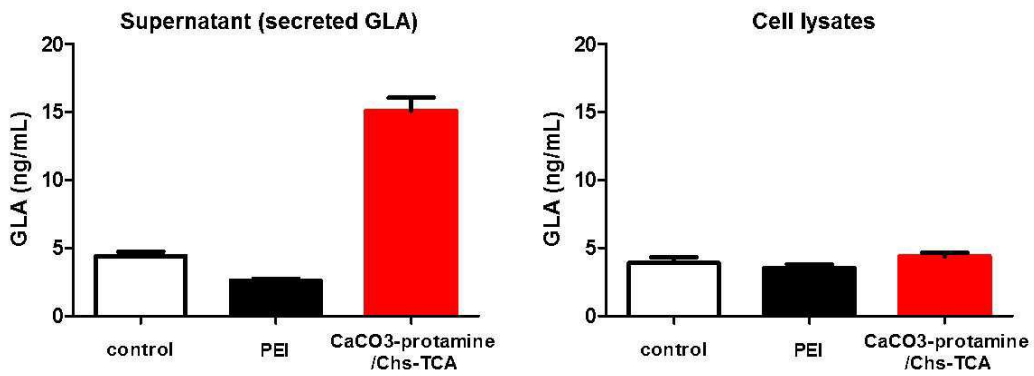
도면27



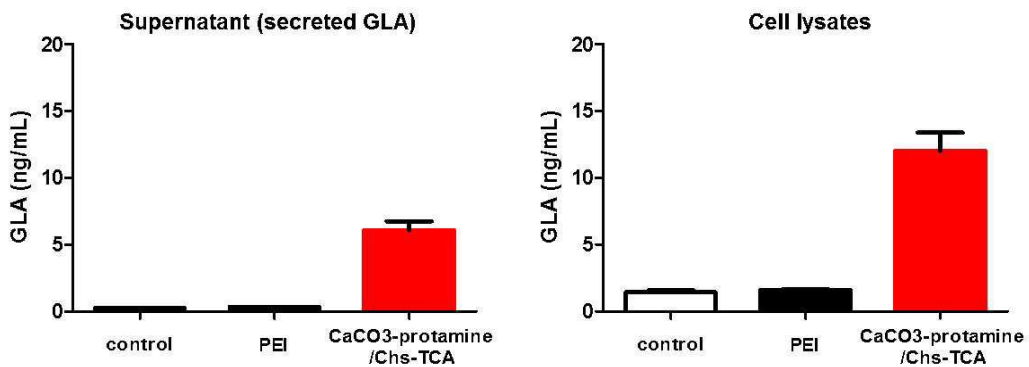
도면28



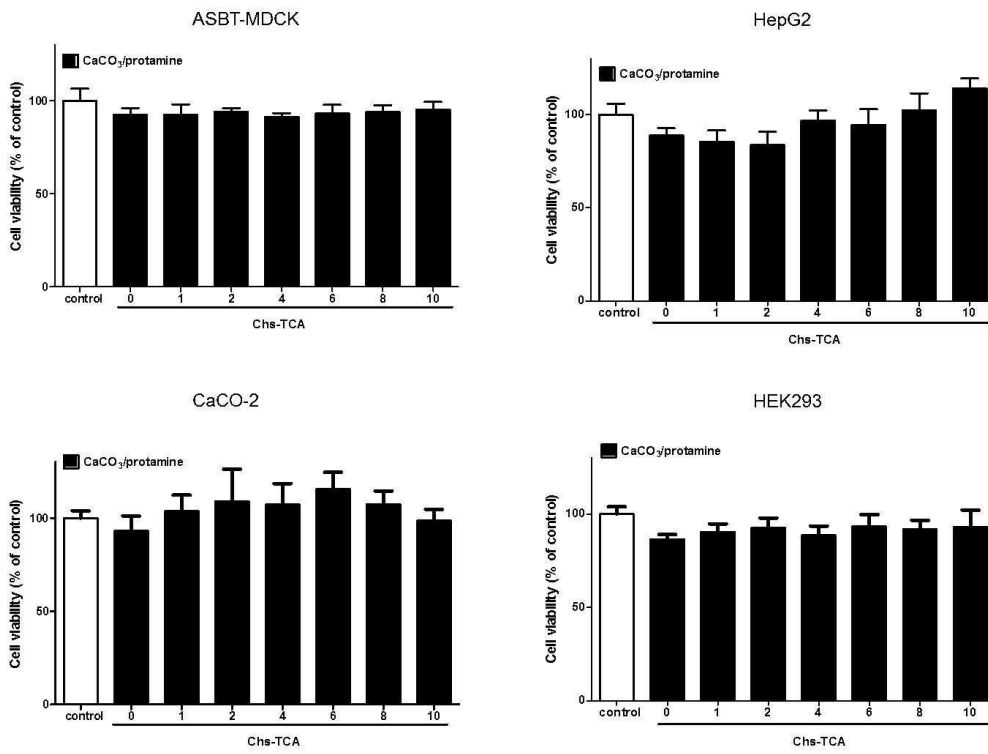
도면29



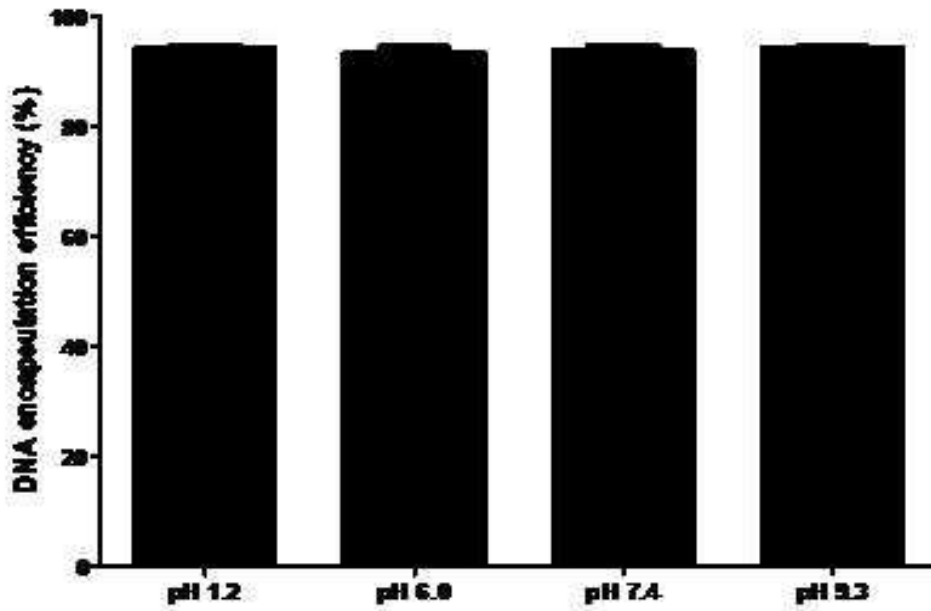
도면30



도면31



도면32



도면33

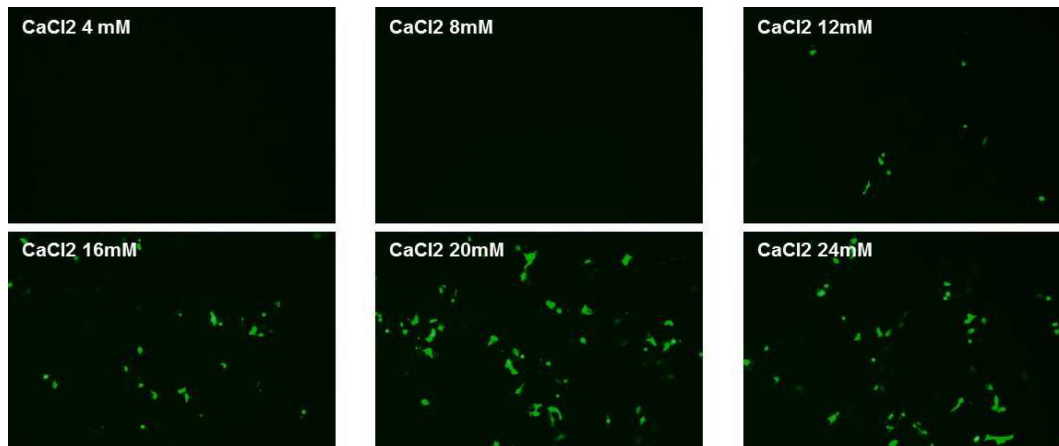
기존 redisperse



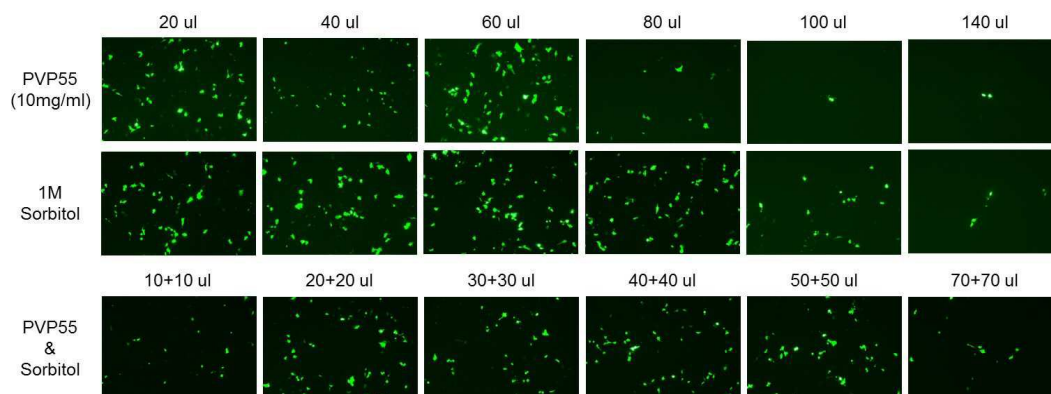
redisperse (PAA 사용)



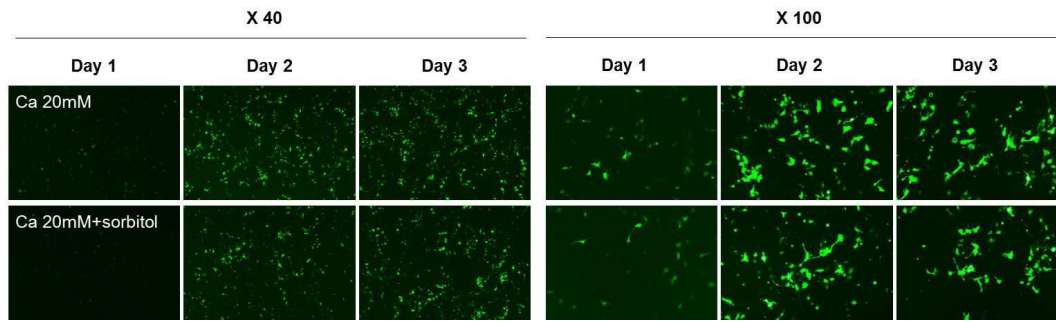
도면34



도면35



도면36



도면37

