



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0001489
(43) 공개일자 2022년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01) A61K 47/69 (2017.01)
A61K 9/51 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/0041 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0083794
(22) 출원일자 2021년06월28일
심사청구일자 2021년06월28일
(30) 우선권주장
1020200079644 2020년06월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
노영훈
서울특별시 성동구 왕십리로 16, 101동 1702호(성수동1가, 트리마제)
이윤석
서울특별시 양천구 목동중앙본로 86-1(목동)
김영민
서울특별시 강서구 강서로 266, 132동 701호(화곡동, 우장산아이파크이편한세상아파트)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이스스

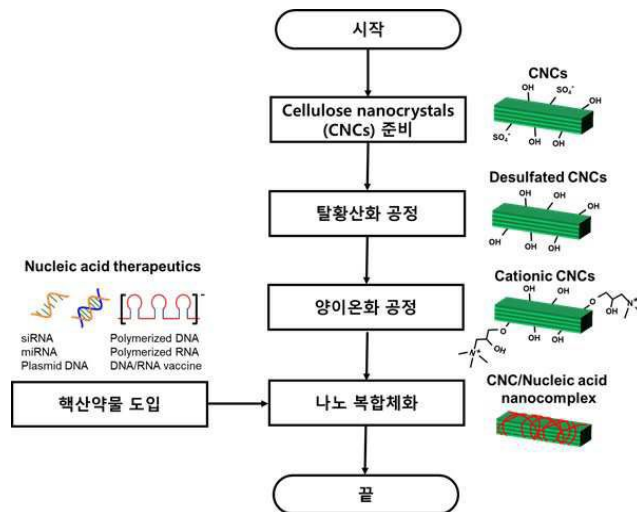
전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 고분산성 셀룰로오스 나노크리스탈을 이용한 핵산 약물 전달용 나노복합체

(57) 요약

본 발명은 분산성이 향상된 양이온성(cationic) 셀룰로오스 나노크리스탈(cellulose nanocrystals, CNCs)의 제조 및 이를 이용한 핵산 약물 전달 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/38 (2013.01)

A61K 47/6939 (2017.08)

A61K 9/5161 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345306720
과제번호	2018R1D1A1A0208555212
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인지초연구지원사업
연구과제명	[통합이지마로_SGER] 비호지킨 림프종 치료용 이중표적 핵산나노전달체 개발(2/3)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.11.01 ~ 2020.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 표면에 황산기($-SO_4^-$)가 부착된 음전하를 띠는 셀룰로오스 나노크리스탈(cellulose nanocrystals, CNCs)을 열수(hydrothermal) 처리하여 CNCs 표면으로부터 황산기를 탈착시키는 탈황산화(desulfation) 단계; 및

(ii) 탈황산화된(desulfated) CNCs에 양이온성(cationic) 분자를 부착시켜 CNCs의 전하를 양전하로 반전시키는 양이온성 변형 단계를 포함하는, 양이온성 CNCs를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, (i) 탈황산화 단계의 열수 처리가 110 내지 130℃에서 1 내지 5시간 수행되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, (i) 탈황산화 단계의 열수 처리가 120 내지 125℃에서 4시간 수행되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, (ii) 양이온성 변형 단계의 양이온성 분자가 트리메틸아민을 함유하는 양이온성 분자인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, (ii) 양이온성 변형 단계의 양이온성 분자가 CHPTAC(3-chloro-2-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride)인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 6

양이온성 CNCs와 핵산 약물의 복합체화에 의해 형성된 나노복합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 양이온성 CNCs가 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해 수득된 것임을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 8

제6항에 있어서, 양이온성 CNCs와 핵산 약물이 정전기적 상호작용에 의해 복합체화된 것임을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 9

제6항에 있어서, 핵산 약물이 RNA 약물, DNA 약물 또는 이들의 폴리머화된 형태(polymerized form)인 것을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 10

제9항에 있어서, RNA 약물이 miRNA, siRNA, mRNA 또는 이들의 폴리머화된 형태인 것을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 11

제9항에 있어서, DNA 약물이 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide), pDNA 또는 이들의 폴

리머화된 형태인 것을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 12

제10항에 있어서, siRNA가 모노머 siRNA 또는 폴리머화된 siRNA인 것을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 13

제6항에 있어서, 핵산 약물이 폴리머화된 RNA 약물인 것을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 14

제13항에 있어서, 폴리머화된 RNA 약물이 회전환 복제기작(rolling circle transcription, RCT)에 의해 합성된 것임을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 15

제13항에 있어서, 폴리머화된 RNA 약물이 Mg^{2+} 킬레이트화에 의해 무기 MgPPi 결정 구조가 파괴된 형태인 것을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 16

제15항에 있어서, Mg^{2+} 킬레이트화가 EDTA에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 17

제15항에 있어서, Mg^{2+} 킬레이트화가 1 mM EDTA에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 18

제13항에 있어서, 폴리머화된 RNA 약물에 대한 양이온성 CNCs의 중량비가 1 내지 20 (w/w)인 것을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 19

제13항에 있어서, 폴리머화된 RNA 약물에 대한 양이온성 CNCs의 중량비가 5 (w/w)인 것을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 20

제6항에 있어서, 암세포로의 전달에 사용되는 것을 특징으로 하는, 나노복합체.

청구항 21

- (i) 표면에 황산기($-SO_4^-$)가 부착된 음전하를 띠는 셀룰로오스 나노크리스탈(CNCs)을 열수 처리하여 CNCs 표면으로부터 황산기를 탈착시키는 탈황산화 단계;
- (ii) 단계 (i)에서 얻은 탈황산화된 CNCs에 양이온성 분자를 부착시켜 CNCs의 전하를 양전하로 반전시키는 양이온성 변형 단계; 및
- (iii) 단계 (ii)에서 얻은 양이온성 CNCs를 핵산 약물과 정전기적 상호작용으로 복합체로 제조하는 복합체화 단계를 포함하는, 나노복합체를 제조하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, (i) 탈황산화 단계의 열수 처리가 110 내지 130℃에서 1 내지 5시간 수행되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 23

제21항에 있어서, (i) 탈황산화 단계의 열수 처리가 120 내지 125℃에서 4시간 수행되는 것을 특징으로 하는,

제조방법.

청구항 24

제21항에 있어서, (ii) 양이온성 변형 단계의 양이온성 분자가 트리메틸아민을 함유하는 양이온성 분자인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 25

제21항에 있어서, (ii) 양이온성 변형 단계의 양이온성 분자가 CHPTAC인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 26

제21항에 있어서, (iii) 복합체화 단계의 핵산 약물이 RNA 약물, DNA 약물 또는 이들의 폴리머화된 형태인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 27

제26항에 있어서, RNA 약물이 miRNA, siRNA, mRNA 또는 이들의 폴리머화된 형태인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 28

제26항에 있어서, DNA 약물이 안티센스 올리고뉴클레오타이드, pDNA 또는 이들의 폴리머화된 형태인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 29

제27항에 있어서, siRNA가 모노머 siRNA 또는 폴리머화된 siRNA인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 30

제21항에 있어서, (iii) 복합체화 단계의 핵산 약물이 폴리머화된 RNA 약물인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 31

제30항에 있어서, (iii) 복합체화 단계의 폴리머화된 RNA 약물이

(a) 회전환 복제기작(RCT)에 의해 폴리머화된 RNA 약물을 합성하는 단계; 및

(b) Mg^{2+} 킬레이트화에 의해 무기 $MgPPi$ 결정 구조를 파괴하여 폴리머화된 RNA 약물만을 정제하는 단계에 의해 수득된 것임을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 32

제31항에 있어서, Mg^{2+} 킬레이트화가 EDTA에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 33

제31항에 있어서, Mg^{2+} 킬레이트화가 1 mM EDTA에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 34

제30항에 있어서, 폴리머화된 RNA 약물에 대한 양이온성 CNCs의 중량비가 1 내지 20 (w/w)인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 35

제30항에 있어서, 폴리머화된 RNA 약물에 대한 양이온성 CNCs의 중량비가 5 (w/w)인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 분산성이 향상된 양이온성(cationic) 셀룰로오스 나노크리스탈(cellulose nanocrystals, CNCs)의 제조 및 이를 이용한 핵산 약물 전달 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명은 1) 셀룰로오스 나노크리스탈의 열수(hydrothermal) 처리를 통한 탈황산화도 조절과 양이온성 물질의 화학 결합을 통해 고분산도의 양전하로 하전된 CNCs를 합성하는 단계 및 2) 양이온성 CNCs에 정전기적 상호작용을 통해 핵산 약물을 탑재하는 단계를 포함하는 나노복합체 제조 방법에 관한 것으로, 상기 나노복합체는 핵산 약물을 효과적으로 전달할 수 있다. 일 측면으로, 폴리머화된 siRNA (polymeric siRNA)를 암세포에 효율적으로 전달하기 위해 표면 변형된 셀룰로오스 나노크리스탈을 개발하였다. 열수(hydrothermal) 탈황산화(desulfation) 및 화학적 변형의 순차적 공정을 사용하여 양이온성(cationic) CNCs를 합성하였고, 이어서 RCT(회전환 복제기작)와 Mg^{2+} 킬레이트화의 2단계 과정을 통해 얻은 폴리머화된 siRNA를 상기 변형된 CNCs와 정전기적 상호작용에 의해 복합체화하였다. 높은 약물 로딩 및 세포질 환경에서의 방출을 위해 복합체화 효율을 최적화하였다. 생성된 나노복합체는 상당히 향상된 효소 안정성, 유전자 녹다운(knockdown) 효능, 및 세포사멸(apoptosis)에 의한 시험관 내 치료 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 CNCs가 RNAi 매개 암 치료제에 활용될 수 있는 유망한 탄소화물-기반 전달 플랫폼임을 시사한다.

배경 기술

[0002] 최근 3세대 약물로서 각광받고 있는 핵산(DNA, RNA)은 RNA간섭 치료제, pDNA 및 mRNA 백신 등의 유전자치료제로 활발히 연구개발되고 있다. 하지만 핵산 약물의 임상적 응용은 핵산의 혈관내 불안정성, 낮은 세포내 전달율, 비특이 조직으로의 전달 및 축적으로 인한 부작용 등의 한계점 극복이 필요하다. 이러한 핵산 약물의 한계점 극복을 위해 지질, 고분자, 무기 나노입자 등을 이용한 다양한 종류의 기능성 약물전달체가 개발되고 있고, 최근에는 나노공학을 이용하여 핵산기반 구조체를 만들고, 이를 핵산약물 전달체로 응용하는 연구도 보고되고 있다. 특히 회전환 복제기작(rolling circle replication, RCR)은 DNA 중합효소가 환형 핵산구조체를 연속적으로 전사 또는 복제하는 핵산나노공법으로, 특정 염기서열이 반복적으로 포함되어 있는 고밀도의 폴리머화된 핵산입자를 만들 수 있다. RCR는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense ODN), siRNA, miRNA, mRNA, 바이러스 벡터, 플라스미드 등 다양한 종류의 핵산 염기서열 폴리머화가 가능한 방법으로 범용성이 높은 기술이다. 이러한 폴리머화된 핵산은 단일 핵산에 비해 상대적으로 매우 높은 생체내 안정성과 약물치료능을 가지고 있다.

[0003] 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA)는 약리학적으로는 표적화할 수 없는(undruggable) 표적 유전자를 서열 특이적으로 사일런싱(silencing, 침묵)시키는 점으로 인해 유망한 항암 약물일 수 있다. 그러나 siRNA 전달은 혈류내 불안정성, 원치 않는 조직 축적 및 비효율적인 세포내 전달과 같이 임상 시험에서 사용하는데 몇 가지 제한이 있으며, 이는 심각한 부작용과 독성을 유발할 수 있다. 현재까지, 모노머(monomeric) siRNA의 효율적인 세포내 전달을 위해 지질, 폴리머 및 무기 나노입자를 사용한 다양한 효과적인 siRNA 전달 플랫폼이 설계되었다. 또한 효율적인 siRNA 전달을 위해 RNA 나노공학-기반 나노구조가 채택되었는데, RNA 다면체(polyhedron), 다가 RNA 나노입자, 폴리머화된 siRNA 입자 등이 포함된다. 특히, RCT(rolling circle transcription) 반응 동안 자가-어셈블되는 폴리머화된 siRNA 전달 플랫폼은 효과적인 siRNA 전달에 대한 장벽을 극복할 수 있다. 폴리머화된 siRNA는 반복되고 밀집된 구조로 인해 모노머 siRNA에 비해 상당히 향상된 생리적 조건 하에서의 안정성 및 치료적 효능을 가진다. 그러나 폴리머화된 siRNA 입자의 서브 마이크로 및 마이크로 크기(600 nm 내지 5 μ m) 및 음전하를 띠는 표면(-18 mV 내지 -22 mV)은 효율적인 세포 전달에 적합하지 않다. 이러한 한계를 극복하기 위하여, 폴리에틸렌민, 폴리 L-라이신, 글리콜 키토산과 같은 양이온성 고분자를 사용하여 정전기적 상호작용에 의해 폴리머화된 siRNA/양이온성 고분자 복합체의 합성을 유도하였다. 양전하를 띠는 표면을 가진 약 100-200 nm 크기의 이러한 폴리플렉스(polyplex)는 기존의 형질감염 시약과 모노머 siRNA의 복합체에 비해 향상된 세포 흡수, 생리적 조건 하에서의 생체안정성 및 현저하게 개선된 RNA 간섭-매개 유전자 조절 효능을 나타내었다. 그러나 합성 양이온성 고분자의 원치 않는 독성과 형질감염 효율의 균형은 이들의 임상 적용에 있어서 여전히 주요한 관심사로 남아있다.

[0004] 셀룰로오스 나노크리스탈(cellulose nanocrystals, CNCs)은 가장 풍부한 천연 고분자인 셀룰로오스에서 유래된 스피들 모양의 결정성 나노 물질이다. CNCs는 일반적으로 셀룰로오스에서 무정형 도메인을 제거하는 산 가수분해 반응을 통해 박테리아, 면화(cotton), 미세결정성 셀룰로오스, 라미(ramie), 사이잘(sisal), 목재를 포함하는 다양한 소스로부터 제조된다. 산 가수분해는 온도, 시간 및 교반의 정밀하게 제어된 조건에서 황산, 염산, 말레산 또는 인산을 사용하여 수행된다. 셀룰로오스의 황산-촉매된 분해는 가장 광범위하게 사용되며 가수분해

중에 CNCs의 표면에 황산기($-SO_4^-$)의 부착을 촉진하여 음전하를 띠는 표면 에스테르를 생성하고 이는 콜로이드 안정성을 향상시킨다. 음전하를 띠는 CNCs는 열수(hydrothermal) 탈황산화에 의해 조절될 수 있는데, 이는 가역적 탈에스테르화(de-esterification)를 통해 황산기($-SO_4^-$)를 점차적으로 제거하고 수산기($-OH$)를 재생하는 것으로, 이에 의해 CNCs의 표면 음전하를 감소시킨다. 열수 처리는 황산기 밀도를 조절할 수 있는 안전하고 비용-효율적이며 환경친화적인 공정인 반면, 산 촉매 및 용매분해(solvolytic) 방법을 포함한 기존의 화학적 탈황산화 방법(비특허문헌 1)은 산 및/또는 용매의 첨가, 복잡한 반응 및 추가 정제 단계를 요한다.

[0005]

무독성, 저밀도, 생체적합성, 생분해성, 재생성, 광학 투명성 및 높은 기계적 강도와 같은 유리한 특성으로 인해 CNCs는 상처 드레싱, 임플란트, 조직 공학 및 약물 전달에의 사용을 포함하여 바이오메디컬 분야의 응용에 대해 적극적으로 연구되었다. 이들의 나노 크기, 스핀들-유사 모양 및 풍부한 수산기는 약물 전달에 특히 유리한 특성이다. 구체적으로, 스핀들 모양의 CNCs의 높은 종횡비(aspect ratio)는 구형 나노입자에 비해 종양 조직에 높은 축적, 향상된 세포 흡수 및 더 빠른 내재화를 나타낸다. CNCs 표면에 있는 풍부한 수산기는 이미징, 종양 표적화 및 치료제 탑재를 위한 기능기 부여의 화학적 변형을 허용한다. 수산기는 CNCs의 친수성 표면을 제공하여 혈액 순환 시간을 연장시킨다. 또한 CNCs는 향상된 투과성 및 유지(enhanced permeability and retention, EPR) 효과를 통해 종양 표적화 능력을 보여주었다. 이러한 장점에도 불구하고 황산 가수분해에 의해 합성된 CNCs의 고유한 표면 음전하는 나노복합체 형성을 방해하는 정전기적 반발로 인해 핵산 전달에 장애가 된다. 몇몇 연구에서 암모니아, 폴리에틸렌이민 및 폴리(N-[3-(디메틸아미노)-프로필]메타크릴아미드)와 같은 아민 및 폴리양이온으로 CNCs 표면을 공유적으로 변형시키거나 정전기적으로 변형시켜 CNCs의 전하를 양전하로 반전시키는 것이 보고되었다. 이러한 양전하로 반전된 CNCs는 정전기적 상호작용에 의해 pDNA 및 siRNA를 포함한 음전하를 띠는 핵산과의 복합체화를 가능케 하였으며 암세포에 효율적인 세포 내 전달을 나타내었다. 그러나 본 발명자들이 아는 한 양전하로 반전된 CNCs에 의한 폴리머화된 핵산 약물의 전달은 지금까지 보고된 바 없다.

[0006]

본 발명의 주요 목적은 향상된 효소 안정성으로 핵산 약물을 효율적으로 전달할 수 있는 신규한 셀룰로오스 유래 나노복합체를 개발하는 것이었다(도 1). 먼저, 수 분산성(aqueous dispersity)을 향상시키기 위해서 CNCs를 열수로 탈황산화시켜 탈황산화 정도를 조절하였다. 다음으로, 양이온성 분자를 탈황산화된 CNCs에 공유적으로 부착시켜 표면 전하를 반전시켰다. 마지막으로, 합성된 양이온성 CNCs와 정제된 음이온성 핵산 약물을 정전기적 상호작용을 통해 나노복합체(PsCNCs)로 통합시켰다. 나아가, 암 치료를 위한 PsCNCs의 잠재적 적용을 조사하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007]

(비특허문헌 0001) Beck, S., & Bouchard, J. (2014). Auto-catalyzed acidic desulfation of cellulose nanocrystals. Nordic Pulp & Paper Research Journal, 29(1), 6-14

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

본 발명은 분산성이 향상된 양이온성 셀룰로오스 나노크리스탈의 제조 및 이를 이용한 핵산 약물 전달 방법을 제공하고자 한다. 일 측면에서, 암세포에 폴리머화된 siRNA의 전달을 위한 신규한 셀룰로오스-유래 나노복합체가 개발되었다. 이러한 목적을 위해, 셀룰로오스 나노크리스탈(CNCs)에 조절이 잘되는(well-controlled) 표면 변형을 시도하였고, 이에 의해 분산성이 향상되고 고유한 특성을 보존하면서 표면 전하의 반전을 가져왔다. 또한, 세포질 환경에서 로딩된 약물의 효율적인 제어 방출 및 생물학적 기능을 위해 CNCs의 적절한 물리화학적 특성을 선택함으로써, 변형된 CNCs 및 폴리머화된 siRNA의 복합체화 효율을 쉽게 조정할 수 있었다. 초기 결과는 나노복합체가 RNase 분해에 대해 상당히 향상된 효소 안정성, 무시할만한 세포독성으로 표적 유전자의 RNAi-매개 조절 및 암세포의 세포사멸(apoptosis)-유도 증식의 억제를 나타냈음을 보여주었다. 향후 연구에서는 생체 내 항암 효능을 위해 여러 생물학적 활성제의 유효탑재량(payload) 및 암 특이적 표적화 기능기를 통합시킴으로써 현재의 전달 전략을 더욱 발전시킬 것이다. 본 발명의 CNCs 플랫폼은 RNAi 암 치료제의 전달을 위한 유망한 접근방식을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 일 측면에서, 본 발명은 (i) 표면에 황산기($-SO_4^-$)가 부착된 음전하를 띠는 셀룰로오스 나노크리스탈(cellulose nanocrystals, CNCs)을 열수(hydrothermal) 처리하여 CNCs 표면으로부터 황산기를 탈착시키는 탈황산화(desulfation) 단계; 및 (ii) 탈황산화된(desulfated) CNCs에 양이온성(cationic) 분자를 부착시켜 CNCs의 전하를 양전하로 반전시키는 양이온성 변형 단계를 포함하는, 양이온성 CNCs를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0010] 일 구현예에서, 상기 제조방법의 (i) 탈황산화 단계의 열수 처리는 110 내지 130℃에서 1 내지 5시간 수행될 수 있다. 구체적으로, (i) 탈황산화 단계의 열수 처리는 120 내지 125℃에서 4시간 수행될 수 있다.
- [0011] 일 구현예에서, 상기 제조방법의 (ii) 양이온성 변형 단계의 양이온성 분자는 트리메틸아민을 함유하는 양이온성 분자일 수 있다. 구체적으로, (ii) 양이온성 변형 단계의 양이온성 분자는 CHPTAC(3-chloro-2-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride)일 수 있다.
- [0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 양이온성 CNCs와 핵산 약물의 복합체화에 의해 형성된 나노복합체를 제공한다.
- [0013] 일 구현예에서, 상기 나노복합체의 양이온성 CNCs는 (i) 표면에 황산기($-SO_4^-$)가 부착된 음전하를 띠는 CNCs를 열수 처리하여 CNCs 표면으로부터 황산기를 탈착시키는 탈황산화 단계; 및 (ii) 탈황산화된 CNCs에 양이온성 분자를 부착시켜 CNCs의 전하를 양전하로 반전시키는 양이온성 변형 단계를 포함하는, 본 발명의 양이온성 CNCs를 제조하는 방법에 의해 수득된 것일 수 있다.
- [0014] 일 구현예에서, 상기 나노복합체의 양이온성 CNCs와 핵산 약물은 정전기적 상호작용에 의해 복합체화된 것일 수 있다.
- [0015] 일 구현예에서, 상기 나노복합체의 핵산 약물은 RNA 약물, DNA 약물 또는 이들의 폴리머화된 형태(polymerized form)일 수 있다. 구체적으로, RNA 약물은 miRNA, siRNA 또는 mRNA일 수 있으며, DNA 약물은 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide) 또는 pDNA일 수 있다. 구체적으로, RNA 약물은 폴리머화된 RNA 약물이다. 보다 구체적으로, RNA 약물은 siRNA이고, 상기 siRNA는 모노머 siRNA 또는 폴리머화된 siRNA일 수 있으며, 보다 구체적으로 siRNA는 폴리머화된 siRNA일 수 있다.
- [0016] 일 구현예에서, 상기 나노복합체의 핵산 약물은 폴리머화된 siRNA이고, 이는 회전환 복제기작(rolling circle transcription, RCT)에 의해 합성된 것일 수 있다. 구체적으로, 폴리머화된 siRNA는 Mg^{2+} 킬레이트화에 의해 무기 $MgPPi$ 결정 구조가 파괴된 형태일 수 있으며, Mg^{2+} 킬레이트화는 EDTA에 의해 수행될 수 있고, 보다 구체적으로는 1 mM EDTA에 의해 수행될 수 있다.
- [0017] 일 구현예에서, 상기 나노복합체의 폴리머화된 siRNA에 대한 양이온성 CNCs의 중량비는 1 내지 20 (w/w)일 수 있다. 구체적으로, 폴리머화된 siRNA에 대한 양이온성 CNCs의 중량비는 5 (w/w)일 수 있다.
- [0018] 일 구현예에서, 상기 나노복합체는 암세포로의 전달에 사용될 수 있다.
- [0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (i) 표면에 황산기($-SO_4^-$)가 부착된 음전하를 띠는 셀룰로오스 나노크리스탈(CNCs)을 열수 처리하여 CNCs 표면으로부터 황산기를 탈착시키는 탈황산화 단계; (ii) 단계 (i)에서 얻은 탈황산화된 CNCs에 양이온성 분자를 부착시켜 CNCs의 전하를 양전하로 반전시키는 양이온성 변형 단계; 및 (iii) 단계 (ii)에서 얻은 양이온성 CNCs를 핵산 약물과 정전기적 상호작용으로 복합체로 제조하는 복합체화 단계를 포함하는, 나노복합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0020] 일 구현예에서, 상기 제조방법의 (i) 탈황산화 단계의 열수 처리는 110 내지 130℃에서 1 내지 5시간 수행될 수 있다. 구체적으로, (i) 탈황산화 단계의 열수 처리는 120 내지 125℃에서 4시간 수행될 수 있다.
- [0021] 일 구현예에서, 상기 제조방법의 (ii) 양이온성 변형 단계의 양이온성 분자는 트리메틸아민을 함유하는 양이온성 분자일 수 있다. 구체적으로, (ii) 양이온성 변형 단계의 양이온성 분자는 CHPTAC일 수 있다.
- [0022] 일 구현예에서, 상기 제조방법의 (iii) 복합체화 단계의 핵산 약물은 RNA 약물, DNA 약물 또는 이들의 폴리머화된 형태(polymerized form)일 수 있다. 구체적으로, RNA 약물은 miRNA, siRNA 또는 mRNA일 수 있으며, DNA 약물은 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide) 또는 pDNA일 수 있다. 보다 구체적으로, RNA 약물은 siRNA이고, 상기 siRNA는 모노머 siRNA 또는 폴리머화된 siRNA일 수 있으며, 보다 구체적으로 siRNA는

폴리머화된 siRNA일 수 있다.

[0023] 일 구현예에서, 상기 제조방법의 (iii) 복합체화 단계의 핵산 약물이 폴리머화된 siRNA인 경우, 이는 (a) 회전 환 복제기작(RCT)에 의해 폴리머화된 siRNA를 합성하는 단계; 및 (b) Mg^{2+} 킬레이트화에 의해 무기 $MgPPi$ 결정 구조를 파괴하여 폴리머화된 siRNA만을 정제하는 단계에 의해 수득된 것일 수 있다. 구체적으로, Mg^{2+} 킬레이트화는 EDTA에 의해 수행될 수 있고, 보다 구체적으로는 1 mM EDTA에 의해 수행될 수 있다.

[0024] 일 구현예에서, 상기 제조방법에 있어서 폴리머화된 siRNA에 대한 양이온성 CNCs의 중량비는 1 내지 20 (w/w)일 수 있다. 구체적으로, 폴리머화된 siRNA에 대한 양이온성 CNCs의 중량비는 5 (w/w)일 수 있다.

[0025] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0027] 셀룰로오스 나노크리스탈의 열수(hydrothermal) 탈황산화 및 양이온성 변형

[0028] 응집을 일으키지 않으면서 표면 전하를 음에서 양으로 반전시키기 위해 CNCs에 열수 탈황산화 및 양이온성 변형을 순차적으로 수행하였다. 먼저, CNCs를 120℃에서 0-4시간 동안 열수 처리하여 가역적 에스테르 가수분해를 통해 CNCs의 황산기($-SO_4^-$)를 점차적으로 제거하였고, 이 과정은 온도 상승에 의해 동력학적으로 가속화된다. CNCs의 탈황산화 정도를 CNCs의 제타 전위(ζ -전위) 및 pH 분석에 의해 열수 처리 시간에 따라 모니터링하였다. CNCs 용액의 ζ -전위는 열수 처리 시간이 증가함에 따라 $-54.6 \text{ mV} \pm 2.1 \text{ mV}$ 에서 $-33.3 \text{ mV} \pm 0.9 \text{ mV}$ 로 변하였고, 이는 CNCs의 표면의 음전하를 띠는 황산기($-SO_4^-$)가 탈착(detachment)되고 수산기($-OH$)가 재생됨을 나타낸다(도 2A). 또한 CNCs 용액의 pH는 처리 시간이 증가함에 따라 점차적으로 7에서 3으로 감소하였는데, 이는 용액 중 황산기($-SO_4^-$)가 증가했음을 나타낸다(도 9). 열수 공정 0-4시간 후, 탈황산화된 CNCs를 에폭시화 및 에테르화 반응을 통해 트리메틸아민을 함유하는 양이온성 분자인 CHPTAC(3-chloro-2-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride)에 의해 화학적으로 변형시켜 표면 전하를 반전시켰다. 양이온성으로 변형된 CNCs의 표면 전하 및 분산도(dispersity)를 전기영동 광 산란(electrophoretic light scattering) 및 UV-Vis 분광법으로 분석하였다. 열수 처리 시간에 관계없이, 양이온성으로 변형된 CNCs는 모두 ζ -전위가 40 mV 이상으로 양의 표면 전하를 나타내었으며, 이는 CHPTAC로 CNCs를 성공적으로 변형시켰음을 의미한다. 1-4시간의 탈황산화를 거친 양이온성으로 변형된 CNCs의 ζ -전위는 $43.7 \text{ mV} \pm 3.1 \text{ mV}$ 내지 $45.7 \text{ mV} \pm 0.3 \text{ mV}$ 로, 이는 탈황산화를 거치지 않은 양이온성으로 변형된 CNCs의 ζ -전위인 $36.6 \pm 0.6 \text{ mV}$ 보다 높았다(도 2A). 양이온성으로 변형된 CNCs 용액의 응집 정도를 나타내는 490 nm에서의 광선 투과율을 UV-Vis 분광광도계로 분석하였다. 탈황산화 시간에 관계없이, 변형되지 않은 CNCs와 탈황산화된 CNCs의 투과율은 모두 약 90%였다(도 2B). 양이온성으로 변형된 CNCs의 경우, 탈황산화를 거치지 않은 것은 투과율이 약 76%였으며, 탈황산화 시간에 따라 투과율이 점차적으로 증가하여 4시간 후에 89%에 도달하였다. 4시간의 탈황산화를 거친 양이온성으로 변형된 CNCs의 투과율은 변형되지 않은 CNCs 및 탈황산화된 CNCs의 투과율과 크게 다르지 않았으며, 이는 양이온성 변형 동안 응집이 거의 발생하지 않았음을 나타낸다. UV-Vis 분광법의 결과와 일관되게, 디지털 사진에서 관찰되는 바와 같이, 양이온성으로 변형된 CNCs의 탁도는 탈황산화 시간에 따라 감소하였다(도 2C). 본 발명자들은 ζ -전위의 증가와 탁도의 감소가 CNCs 표면의 수산기 및 황산기 풍부도의 변화에 기인한다고 가정하였다. 변형되지 않거나 또는 덜 탈황산화된 CNCs에 남아있는 음전하를 띠는 황산기는 양전하를 띠는 CHPTAC를 그들의 표면에 정전기적으로 끌어당겨 CNCs 응집을 유도하였다. 대조적으로, 열수 처리에 의해 고도로 재생된 수산기는 CNCs의 분산성을 향상시켰으며, 이는 결국 응집을 방해하였다(도 10). 추가 특성화 및 복합체화 공정을 위해, 4시간의 탈황산화를 거친 양이온성으로 변형된 CNCs (이하 "양이온성 CNCs")를 선택하였는데, 이는 이들이 양이온성으로 변형된 CNCs 중에서 상대적으로 높은 ζ -전위와 가장 낮은 탁도를 나타냈기 때문이다.

[0029] TEM, FT-IR 및 XRD에 의해 양이온성 CNCs의 물리화학적 특성을 확인하고 변형되지 않은 CNCs 및 탈황산화된 CNCs의 특성과 비교하였다. TEM 이미지에서 변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs 및 양이온성 CNCs는 비슷한 스핀들-유사 모양을 나타내었는데, 이는 CNCs의 고유한 모양으로 이전에 보고된 것이다(도 3A). 변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs 및 양이온성 CNCs의 길이는 각각 $288.1 \text{ nm} \pm 73.0 \text{ nm}$, $292.4 \text{ nm} \pm 50.6 \text{ nm}$ 및 $302.3 \text{ nm} \pm 36.4 \text{ nm}$ 였다(도 12); 또한, TEM 이미지의 ImageJ 소프트웨어 분석 결과가 제시하는 바와 같이, 이들 사이에 큰 크기 차이가 없었다. DLS 결과에서, 양이온성 CNCs의 유체역학적 크기($301.6 \pm 2.1 \text{ nm}$)는 변형되지 않은 CNCs의 유체역학적 크기($298.9 \pm 16.8 \text{ nm}$) 및 탈황산화된 CNCs의 유체역학적 크기($306.9 \pm 60.5 \text{ nm}$)에서

크게 변하지 않은 반면, 양이온성 CNCs의 ζ -전위(43.7 ± 3.1 mV)는 변형되지 않은 CNCs의 ζ -전위(-54.6 ± 2.1 mV) 및 탈황산화된 CNCs의 ζ -전위(-33.3 ± 0.9 mV)와 비교하여 양(positive)으로 반전되었다(도 12). 공정 중 결정도(crystallinity)의 변화를 XRD로 확인하였으며, 변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs 및 양이온성 CNCs는 셀룰로오스 I(Cellulose I)과 유사한 회절 패턴을 나타내었다. 간략하게, 양이온성 CNCs의 CI(결정도 지수, crystallinity index) (70.4%)는 변형되지 않은 CNCs의 CI(69.6%) 및 탈황산화된 CNCs의 CI(67.7%)와 유사하였다(도 3B 및 도 12). 이러한 결과는 CNCs의 원래 형태와 결정 구조가 탈황산화 및 양이온성 변형 공정에서 유지되었음을 시사한다. FT-IR 크로마토그램에서, 셀룰로오스의 특징적인 피크인, 3368 cm^{-1} 에서의 넓은 밴드(O-H 스트레칭 진동) 및 2902 cm^{-1} 에서의 좁은 밴드(C-H 스트레칭)는 열수 처리 및 양이온성 변형 공정 후 거의 변하지 않았다(도 3C). 중요한 것은 1415 cm^{-1} 에서의 피크(CHPTAC으로부터의 C-N 스트레칭)가 양이온성 CNCs에서 증가하여 CHPTAC에 의한 성공적인 화학적 변형을 나타내었다. 또한 NMR 결과에서 CHPTAC의 트리메틸아민 양성자에 기인한 3.2 ppm에서의 피크가 양이온성 CNCs 크로마토그램에서만 볼 수 있었다(도 3D). 이러한 결과는 이전 연구와 유사하게 CHPTAC를 CNCs에 성공적으로 부착했음을 보여준다. CNCs의 XPS 조사 스캔에서 변형되지 않은 CNCs와 탈황산화된 CNCs는 크게 다르지 않았으며 주로 O (532 eV) 및 C (285 eV) 신호를 나타내었다(도 3E). 양이온성 CNCs의 경우 CHPTAC에 포함된 N 및 Cl의 피크가 각각 402 eV 및 197 eV에서 나타났다. NMR 결과와 마찬가지로, XPS의 결과는 양이온성 CNCs에서 CHPTAC의 존재를 보여주며 이는 이전의 보고를 확장한다. 결과적으로 탈황산화 시간을 조정하여 양이온성 CNCs를 성공적으로 최적화하여 높은 양의 표면 전위와 향상된 분산성을 확보하였다. 또한 열수 탈황산화 및 CHPTAC 증착 과정에서 CNCs의 고유한 스핀들-유사 모양과 결정 구조가 보존되었다.

[0031] 유기 및 무기 결정성 마이크로입자로부터 폴리머화된 siRNA

[0032] 폴리머화된 siRNA를 RCT 및 Mg^{2+} 킬레이트화에 의한 폴리머화된 siRNA의 정제를 포함하는 순차적 합성 과정을 통해 획득하였다. 먼저, 환형 DNA를 주형으로 사용하여 RNA 폴리머라제를 RCT 반응에 사용하여 연쇄(concatemeric) 폴리머화된 siRNA를 생성하고 이는 MgPPi 결정성 마이크로입자로 자가-어셈블되었다. 이러한 입자의 형태학적 및 구조적 파라미터를 SEM, STEM 및 CSLM으로 분석하였다. SEM 이미지는, 잘 분산되어 있고 크기가 약 $2.5\text{ }\mu\text{m}$ 인 많은 수의 꽃잎 모양의 구형(spherulitic) 다공성 마이크로입자의 합성을 보여주었다(도 4A). STEM 결과는 무기 계층(hierarchical) 및 다층 MgPPi 결정 구조를 보여주었다(도 4B). 또한, SYBR Green II로 염색한 폴리머화된 siRNA 입자의 CSLM 결과는 폴리머화된 siRNA의 녹색 형광이 주로 입자의 표면을 향해 집중되어 존재함을 보여주었다(도 4C). 다음으로, Mg^{2+} 킬레이트화제인 EDTA를 사용하여 무기 MgPPi 결정 구조를 파괴하는 과정을 통해 폴리머화된 siRNA를 추출하였다. 결정 구조의 파괴를 확인하기 위해 다양한 EDTA 농도로 처리된 폴리머화된 siRNA 입자의 형태를 SEM으로 모니터링하였다. SEM 이미지는, 양이온성 CNCs와 음이온성 폴리머화된 siRNA의 복합체화를 방해할 것으로 예상되었던 무기 계층 및 다층 결정성 MgPPi 구조가 EDTA 농도가 증가함에 따라 점진적으로 파괴되는 것을 보여주었다, 결정 구조는 1 mM EDTA에서 완전히 파괴되었고, 약 $247.6\text{ nm} \pm 65.3\text{ nm}$ 인 무정형 나노 크기의 폴리머화된 siRNA 펠릿이 형성되었다(도 4D). 종합하면, RCT를 사용하여 유기 및 무기 결정성 마이크로입자에 통합된 폴리머화된 siRNA를 생성하였고, 이를 최적의 EDTA 처리에 의해 성공적으로 파괴하여 양이온성 CNCs와의 효율적이고 간단한 복합체화를 위한 정제된 폴리머화된 siRNA를 획득하였다.

[0034] 양이온성 CNCs와 폴리머화된 siRNA의 나노복합체화

[0035] 수득한 스핀들 모양의 양이온성 CNCs와 음이온성의 정제된 폴리머화된 siRNA를 다양한 중량비로 정전기적으로 복합체화하여 PsCNCs를 형성하였다(도 5A). 예비 결과에 의하면, PsCNCs 형성을 위해 20 mM HEPES 버퍼를 사용할 경우 응집을 일으키지 않고 안정적인 나노복합체를 생성하는 것으로 나타났다. PsCNCs의 물리화학적 특성을 TEM, CLSM 및 DLS로 분석하였다. TEM 이미지는 PsCNCs의 형태가 스핀들과 유사하고 분지되어(branched), 양이온성 CNCs의 형태와 큰 차이가 없음을 보여주었다(도 5B). 또한 합성된 PsCNCs의 길이는 $293.6\text{ nm} \pm 28.7\text{ nm}$ 로 변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs 및 양이온성 CNCs와 유사하였다(도 5C). CLSM 이미지를 위해 폴리머화된 siRNA를 핵산 특이적 삽입 염료인 Gel Red(적색 형광)로 염색하였고, 양이온성 CNCs는 DTAF(녹색 형광)로 태그하였다. CLSM 결과는 적색 형광과 녹색 형광이 황색 형광으로 병합된 것을 나타내어 PsCNCs의 성공적인 복합체화를 보여주었고, 또한 응집없이 균질한 분포를 나타내었다(도 5D).

[0036] 나노복합체 형성을 최적화하기 위하여, 폴리머화된 siRNA와 CNCs를 다양한 중량비(w/w, 0-20)로 사용하여 PsCNCs를 생성하였다. 이어서, PsCNCs를 겔 지연 분석(gel retardation assay)하여 복합체화 효율을 평가하였다(도 6A). 그 결과, 중량비가 0인 PsCNCs(정제된 폴리머화된 siRNA만 포함)는 폴리머화된 siRNA의 존재를 나타내는 번짐 밴드를 나타내었다. 중량비가 증가함에 따라 PsCNCs 내 폴리머화된 siRNA의 밴드가 웰에 포획되었고, 5이상의 중량비에서 PsCNCs는 밴드가 웰에 완전히 포획되어 강한 결합 친화력을 가진 성공적인 복합체 형성을 나타내었다. 또한, 헤파린 탈복합체화(decomplexation) 분석을 수행하여 세포질에서 PsCNCs로부터 폴리머화된 siRNA가 적절하게 방출될 수 있도록 폴리머화된 siRNA와 양이온성으로 변형된 CNCs 사이의 정전기적 상호작용을 분석하였다. 이 분석에서, PsCNCs의 구조로부터 폴리머화된 siRNA의 방출을 촉진하는 음이온 경쟁자로서 헤파린을 사용하여 다양한 음전하를 띠는 세포 성분을 모방하도록 하였다. 서로 다른 중량비의 PsCNCs를 헤파린으로 처리하고 구조적 변화를 겔 지연 분석으로 모니터링하였다. 중량비가 10 및 20인 PsCNCs 내 폴리머화된 siRNA의 대부분은 헤파린 처리 후에도 여전히 웰에 포획되어 있었으나, 중량비가 5인 PsCNCs 내 폴리머화된 siRNA는 번짐 밴드를 보여주어 이들이 PsCNCs로부터 방출되었음을 나타내었다(도 6A). 따라서 생물학적 적용을 평가하기 위하여 중량비가 5인 PsCNCs를 선택하였다. 종합하면, PsCNCs를 응집체 없이 성공적으로 합성하였으며, 양이온성 CNCs/폴리머화된 siRNA의 최적 중량비를 결정하였다.

[0038] 양이온성 CNCs와 복합체화된 폴리머화된 siRNA의 생물학적 적용

[0039] 항암 약물 전달 플랫폼으로서 PsCNCs의 생물학적 적용을 평가하기 위해 효소 안정성, 세포내 흡수 및 유전자 조절 효능을 분석하였다. 정제된 폴리머화된 siRNA 및 최적화된 중량비 5의 PsCNCs의 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 모니터링하여 PsCNCs의 효소 안정성을 조사하였다. 정제된 폴리머화된 siRNA 및 PsCNCs를 RNase A 용액(1 μ g/mL)에서 최대 90분 동안 인큐베이션하였다(도 6B). 이어서, 겔 전기영동을 수행하고, 남아있는 폴리머화된 siRNA를 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 정제된 폴리머화된 siRNA는 30분 이내에 RNase A 처리에 의해 80%까지 분해되었으나, PsCNCs 내 폴리머화된 siRNA는 매우 잘 보호되었으며, 90분 동안 RNase A에 의한 무시할만한 분해가 관찰되었다. 이러한 결과는 중량비 5의 PsCNCs가 폴리머화된 siRNA보다 뉴클레아제 분해에 대해 더 저항성이 있으며, 이는 결국 모노머 siRNA 보다 RNase A 매개 분해에 대해 6배 더 높은 저항성을 나타냄을 의미하였다. PsCNCs의 축합 구조는 폴리머화된 siRNA에 대한 RNase A의 접근성을 감소시켰고, 결국 분해로부터 보호하였다.

[0040] PsCNCs의 세포내 전달을 조사하기 위해, SKOV3 암세포를 DTAF가 태그된 PsCNCs로 처리하였고, 이는 CLSM 이미지에서 녹색 형광으로 표시되었다. CLSM 이미지에 따르면, DTAF가 태그된 PsCNCs의 녹색 형광이 세포의 세포질에 국한되어 있어 성공적인 세포내 전달을 나타내었다(도 7A). 또한, PsCNCs의 세포 흡수를 유세포 분석기에 의해 정량적으로 분석하였다(도 7B). 수득한 결과는 40 nM에서 84.4%의 내재화 효율을 나타내어 PsCNCs의 성공적인 내재화를 또한 시사하였다. 또한, 루시페라제(luciferase)를 발현하는 SKOV3 세포를 항-루시페라제 폴리머화된 siRNA 서열(siLuc)이 로딩된 PsCNCs로 다양한 siRNA 농도에서 처리하였으며, 루시페라제 발현을 분석하여 PsCNCs의 유전자 조절 효능을 평가하였다. 루시페라제 분석 결과는, PsCNCs가 기존의 형질감염 시약인 리포펙타민(lipofectamine) 또는 양이온성 CNCs와 복합체를 형성한 모노머 siRNA에 비해 용량-의존적이며 현저하게 향상된 억제 효능을 나타냄을 보여주었다(도 8A). 특히, PsCNCs 처리는 루시페라제 발현을 54.1%로 억제한 반면, 모노머 siRNA와 양이온성 CNCs의 복합체 및 모노머 siRNA와 리포펙타민 복합체는 40 nM siRNA 농도에서 루시페라제 발현을 각각 72.7% 및 64.0%로 억제하였다. 이러한 결과는 PsCNCs로부터 탈복합체화 및 방출 후 전달된 폴리머화된 siRNA가 성공적으로 siRNA 기반 RNA 간섭을 촉진했음을 시사하였다. 또한, 스크램블된 siRNA를 암호화하는 변형되지 않은 CNCs, 양이온성 CNCs 및 PsCNCs는 최대 40 nM의 농도에서 무시할만한 세포독성을 보였으며, 상기 농도에서 폴리머화된 siLuc가 로딩된 PsCNCs는 상당한 유전자 발현의 조절을 나타내었다(도 8B). 나아가, 다양한 중량비(5, 10 및 15)의 PsCNCs를 사용하여 루시페라제를 발현하는 SKOV3 세포의 유전자 사일런싱(침묵)을 수행하였으며, 인큐베이션 72시간 후에 유전자 조절을 모니터링하였다(도 11). 루시페라제 분석 결과에 따르면, 가장 유의한 루시페라제 발현 억제는 중량비 5의 PsCNCs에서 발생하였다. 이 결과는 탈복합체화 분석 결과와 관련이 있으며, 이는 5의 중량비로 형성된 PsCNCs가 세포질에서 siRNA의 탈복합체화 후 RNA 간섭-매개 유전자 조절을 촉진한다는 것을 보여준다. 추가적으로, 세포사멸(apoptosis)을 유도하고 암세포의 증식을 감소시키는 항-폴로(Polo)-유사 키나아제 1 siRNA 서열(siPLK1)의 폴리머화된 형태를 PsCNCs에 통합하여 시험관 내 치료 효과를 평가하였다. SKOV3 세포를 다양한 농도의 폴리머화된 siPLK1 로딩된 PsCNCs로 처리하고 72시간 후 CCK-8 분석에 의해 세포 생존율을 분석하였다(도 8C). 결과는, 폴리머화된 siPLK1가 로딩된 PsCNCs는 용량-의존적 방식으로 세포 생존율을 상당히 감소시켰음을 보여주었다. 구체적으로, 폴리머화된 siPLK1가 로딩된 PsCNCs는 40

nM의 siRNA 농도에서 스크램블된 폴리머화된 RNA가 로딩된 PsCNCs에 비해 SKOV3 세포의 증식을 54.2% 억제하였다. 이러한 결과는, 양이온성으로 변형된 CNCs와 복합체화된 폴리머화된 siRNA가 암세포에 성공적으로 전달되고 표적 유전자를 효율적으로 사일런싱시켜 세포독성 없이 항종양 활성을 유도하기에 충분할 수 있음을 보여주었다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명에서, 핵산 약물의 전달을 위한 신규한 셀룰로오스 유래 나노복합체를 개발하였다. 향후 연구에서는 생체 내 항암 효능을 위해 여러 생물학적 활성제의 유효탑재량(payload) 및 암 특이적 표적화 기능을 통합시킴으로써 현재의 전달 전략을 더욱 발전시킬 것이다. 본 발명의 CNCs 플랫폼은 RNAi 암 치료제의 전달을 위한 유망한 접근방식을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 나노복합체는 상용화된 핵산 약물 전달법 보다 높은 전달 효율과 증진된 생체 내 안정성을 통해 높은 약물적 효능을 나타낸다. 또한, 약물효능이 획기적인 폴리머화된 핵산을 식물에서 유래된 소재 비용이 매우 낮은 생체고분자인 CNCs 기반의 전달체에 도입함으로써 고부가가치 바이오산업에 적용가능하다.
- [0043] 셀룰로오스는 가장 풍부한 생체재료로서, 식물성 재료로부터 추출하고 산처리를 통해 CNCs를 제작할 수 있다. 확보된 CNCs를 간단한 고압 열처리와 화학 공정을 거친 후, 핵산 약물과의 복합체화를 통해 약물 전달체로 제작이 가능하다. 따라서 공정 간소화, 소재비용 절감, 대량생산의 용이성으로 산업화 적용성이 매우 뛰어나다.
- [0044] 또한 본 발명의 양이온성 CNCs를 이용한 나노복합체는 siRNA 뿐만 아니라, miRNA, pDNA, mRNA 등 다양한 질병, 병원균의 예방 및 치료를 위한 유전자치료제의 전달에 도입가능한 플랫폼으로, 광범위한 핵산약물 전달에 활용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 핵산 약물 전달을 위한 PsCNCs 생성의 합성 과정을 보여주는 개략도이다.
- 도 2는 양이온성으로 변형된 CNCs의 표면 전하 및 탁도의 변화를 나타낸 것이다. 다양한 탈황산화 시간 후 탈황산화 및 양이온성으로 변형된 CNCs의 (A) ζ-전위, (B) 490 nm 광 투과율, 및 (C) 디지털 사진. 데이터는 평균 ± 표준편차(n = 3)로 표시되었다.
- 도 3은 열수 탈황산화 및 양이온성 변형의 순차적 단계를 통한 양이온성 CNCs의 물리화학적 특성을 나타낸 것이다. 변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs 및 양이온성 CNCs의 (A) TEM 이미지, (B) FT-IR 스펙트럼, (C) XRD 패턴, (D) NMR 스펙트럼 및 (E) XPS 스펙트럼 (스케일 막대: 500 nm).
- 도 4는 폴리머화된 siRNA 입자의 형태학적 및 구조적 분석 결과를 나타낸 것이다. 폴리머화된 siRNA 입자의 (A) SEM, (B) STEM 및 (C) CLSM 이미지. 녹색 형광으로 표시된 바와 같이, 폴리머화된 siRNA 입자는 SYBR Green II로 염색되었다. (D) 다양한 EDTA 농도로 처리된 폴리머화된 siRNA 입자의 SEM 이미지.
- 도 5는 양이온성 CNCs와 폴리머화된 siRNA의 나노복합체에 대한 형태 학적 분석 결과를 나타낸 것이다. (A) 정전기적 상호작용에 의한 PsCNCs 형성의 개략도. (B-C) PsCNCs의 TEM 이미지 및 입자 길이 분포. 입자 길이 분포는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 TEM 이미지로부터 분석되었다. (D) PsCNCs의 CLSM 이미지. 양이온성 CNCs는 DTAF(녹색 형광)로 태그를 달았고, 폴리머화된 siRNA는 Gel Red(적색 형광)로 염색하였다.
- 도 6은 PsCNCs의 폴리머화된 siRNA의 나노복합체 형성 및 효소 안정성의 최적화 결과를 나타낸 것이다. (A) 폴리머화된 siRNA 대 양이온성 CNCs의 다양한 중량비(w/w)에서 PsCNCs의 겔 전기영동 이미지. PsCNCs를 헤파린(500 ng/mL)으로 처리하였고 비-처리 PsCNCs와 비교하였다. (B) RNase A 처리(1 μg/mL) 후 폴리머화된 siRNA 및 중량비 5의 PsCNCs의 겔 전기영동 이미지.
- 도 7은 인큐베이션 2시간 후 SKOV3 세포에서 PsCNCs의 세포내 전달 결과이다. (A) DTAF-표지된 PsCNCs(녹색 형광)로 처리한 SKOV3 세포 및 비-처리 세포의 CLSM 이미지. 핵을 Hoechst-33342(파란색 형광)로 염색하였다. (B) DTAF-표지된 PsCNCs로 처리한 SKOV3 세포 및 비-처리 세포의 유세포 분석기 분석 결과(스케일 막대: 10 μm).
- 도 8은 암세포에서 PsCNCs의 유전자 조절 효능 및 세포 생존율. (A) 루시페라제를 발현하는 SKOV3 세포에서 폴리머화된 siLuc 로딩된 PsCNCs의 유전자 녹다운 효능(n = 3). (B) 다양한 농도의 siRNA에서 PsCNCs로 처리된 SKOV3 세포의 상대적 생존율(n = 3). (C) 서로 다른 농도의 siPLK1에서 폴리머화된 siPLK1-로딩된 PsCNCs로 처리한 SKOV3 세포의 72시간 인큐베이션 후 상대적 생존율(n = 3).

도 9는 탈황산화 시간의 변화에 따른 탈황산화된 CNCs의 pH 변화를 나타낸 것이다.

도 10은 탈황산화 시간이 양이온성으로 변형된 CNCs의 분산도에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

도 11은 루시페라제를 발현하는 SKOV3 세포(n = 3)에서 양이온성 CNCs 대 폴리머화된 siRNA의 다양한 중량비에 서 PsCNCs의 유전자 녹다운 효능을 나타낸 것이다.

도 12는 변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs, 및 양이온성 CNCs의 물리화학적 특성을 나타낸 것이다.

도 13은 환형 DNA 합성을 위한 DNA 서열을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예 1

1. 재료

목재 펄프에서 유래한 분무-건조된 셀룰로오스 나노크리스탈(CNCs; MW = 15,000 ~ 20,000 Da)은 CelluForce, Inc. (Montreal, QC, Canada)에서 구입하였다. 5-([4,6-디클로로-s-트리아진-2-일 아미노]플루오레세인 하이드로클로라이드(DTAF) 및 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 에탄올, 수산화나트륨(NaOH), 및 염화수소(HCl)는 Duksan Pure Chemicals (대한민국 서울)에서 구입하였다. CHPTAC(65 중량%)는 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (일본 도쿄)에서 구입하였다. T4 리가제 및 리가제 버퍼는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 단일 가닥 DNA 및 프라이머에 대한 DNA 서열은 Integrated DNA Technology (Coralville, IA, USA)에서 구입하였다. T7 RNA 폴리머라제는 BioLabs (Ipswich, MA, USA)에서 구입하였다. 세포 배양용 재료, 즉 페니실린-스트렙토마이신 용액, 돌베코 변형된 이글 배지(DMEM), 소 태아 혈청(FBS) 및 인산염 완충 식염수(PBS)는 Corning, Inc. (Corning, NY, USA)에서 구입하였다.

2. 폴리머화된 siRNA/양이온성 CNCs 나노복합체의 합성

2.1. CNCs의 변형

CNCs의 양이온성 변형에 앞서, 황산기($-SO_4^-$)를 감소시키기 위해 열수(hydrothermal) 처리에 의해 탈황산화를 수행하였다. 간략하게, CNCs 분말을 증류수(DW)에 1% (w/v) 농도로 분산시킨 후 10시간 동안 격렬하게 흔들었다. CNCs 현탁액을 121°C에서 서로 다른 기간(0시간 내지 4시간) 동안 오토클레이브(Biofree, 대한민국 서울)에서 열수(hydrothermally) 처리하였다. 다음으로, CNCs 현탁액을 중성 pH에서 증류수로 2일 동안 멤브레인 필터(MWCO 1.4 kDa; Sigma-Aldrich)를 사용하여 투석하여 부산물을 제거한 후 동결건조하였다. CNCs의 표면 전하를 반전시키기 위해 탈황산화된 CNCs 상에 CHPTAC을 화학적으로 그래프트하였다. 간략하게, 탈황산화된 CNCs를 50 mL의 1.7 N NaOH 용액에 1% (w/v)의 농도로 재현탁시킨 후 30분 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, 5g의 CHPTAC를 30분 간격으로 6시간 동안 65°C로 유지된 탈황산화된 CNCs 현탁액에 첨가하였다. 반응 용액을 원심분리에 의해 증류수로 3회 세척하고 상청액을 대체하였다. 용액을 증류수로 3일에 걸쳐 투석(MWCO 1.4 kDa)으로 교환한 후 동결건조하였다. 형광 이미징을 위해 DTAF를 양이온성 CNCs에 태그하였다. 총 150 μ g의 DTAF를 0.2 N NaOH 중의 1% 양이온성 CNCs 용액에 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 24시간 동안 부드럽게 교반하였다. 이어서, 에탄올을 혼합물에 투입하고 원심분리한 후, 상층액을 폐기하여 미반응 시약을 제거하였다. 용액을 3일에 걸쳐 투석으로 정제하였다.

2.2. 폴리머화된 siRNA의 합성

특정 표적 단백질을 발현을 저해하는 siRNA의 안티센스 및 센스 가닥에 상보적인 5' 인산화를 갖는 선형 단일 가닥 DNA 및 T7 프로모터 서열을 포함하는 단일 가닥 DNA가 환형 DNA를 합성하도록 설계하였다. 두 개의 DNA 가닥을 혼성화하기 위해 각 가닥의 1 μ M을 혼합하고 95°C에서 2분 동안 인큐베이션한 후 PCR 열 사이클러(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)에서 서서히 20°C로 냉각시켰다. 다음으로, 24°C에서 T4 리가제(0.03 units/ μ L)를 사용하여 24시간 동안 혼성화된 DNA의 결찰(라이게이션)을 수행하였다. 폴리머화된 RNA 입자를 합성하기 위해, 37°C에서 16시간 동안 반응 완충액(40 mM Tris-HCl, 6 mM $MgCl_2$, 7 mM DTT, 및 2 mM spermidine, pH 7.9) 중에서 0.3 μ M 환형 DNA, 2.5 mM 리보뉴클레오타이드 용액 혼합물 및 20 U/ μ L T7 폴리머라제를 사용하

여 RCT(회전환 복제기작)를 수행하였다. RCT 반응 후, 생성된 용액을 반복 피펫팅을 사용하여 3회 세척하고, 초음파 처리, 2,400 g에서 원심분리한 후, 100 μ L 증류수에서 재현탁시켜 단분산된(monodispersed) 폴리머화된 siRNA 입자를 수득하였다. 결정 구조를 파괴하고 폴리머화된 siRNA를 모으기 위해 80 μ L의 폴리머화된 siRNA 입자를 40 μ L의 0.4 M EDTA 용액과 혼합한 후 40°C에서 40분 동안 초음파 처리하였다. 다음으로, 120 μ L의 1 M 아세트산 나트륨(NaAc)과 960 μ L의 에탄올을 순차적으로 첨가하고 용액을 -20°C에서 2시간 동안 보관하였다. 침전된 폴리머화된 siRNA를 분리하고 뉴클레아제가 없는 물에 재현탁시켰다.

2.3. 폴리머화된 siRNA와 양이온성 CNCs의 복합체화

0 내지 20의 중량비로 PsCNCs를 제작하기 위해 다양한 중량(0 내지 10,000 ng)의 양이온성 CNCs를 100 μ L의 20 mM HEPES 버퍼 중 500 ng의 폴리머화된 siRNA와 혼합하고 25°C에서 5시간 동안 부드럽게 혼합하였다. 0, 1.25, 2.5, 5, 10 및 20의 중량비에서 PsCNCs의 복합체화를 아가로스 겔 전기영동으로 분석하였다. 0 내지 20의 중량비에서 형성된 PsCNCs로부터 폴리머화된 siRNA의 헤파린 유도 방출을 조사하기 위해, 헤파린(500 ng/mL)을 37°C에서 15분 동안 전처리하였다. 헤파린 처리 후, 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 PsCNCs로부터 폴리머화된 siRNA의 탈복합체화를 분석하였다. 모든 샘플을 로딩 염료와 혼합하고 Gel Red(Biotium, Hayward, CA, USA)로 미리 염색한 4% 아가로스 겔에 로딩하였다. 아가로스 겔 전기영동을 TBE 버퍼에서 10 V/cm에서 40분 동안 수행하였으며, 밴드는 겔 문서화 시스템(Gel Doc XR+; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)을 사용하여 시각화하였다.

3. 분석 방법

3.1. 물리화학적 분석

CNCs의 결정도(crystallinity)를 조사하기 위해 X-선 회절(XRD) 분석을 수행하였다. 간략하게, 200 μ L의 1% (w/v) CNCs 현탁액을 XRD 플레이트에 올려놓고 25°C에서 4시간 동안 건조시켰다. XRD 피크의 패턴을 X-선 회절 측정기(Smartlab; Rigaku Co., Tokyo, Japan)로 수득하였다. XRD 스캐닝 데이터는 10° -40° 의 2° 범위에서 2° /분으로 수집하였다. CNCs의 결정도 지수(crystallinity index, CI)를 하기 방정식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{결정도 지수(\%)} = [(I_{cr} - I_{am})/I_{cr}] \times 100$$

상기 식에서, I_{cr} 은 최대 강도였고, I_{am} 은 최소 강도였다.

CNCs의 성공적인 변형을 확인하기 위해, 푸리에 변환 적외선 분광법(FT-IR), 핵 자기 공명(NMR) 및 X-선 광전자 분광법(XPS) 분석을 수행하였다. 간략하게, CNCs를 증류수로 투석한 후 동결건조하였다. 투과 스펙트럼은 4000 cm^{-1} 내지 650 cm^{-1} 범위에서 4 cm^{-1} 해상도로 32개의 스펙트럼을 평균화하여 감쇠된 총 반사율을 사용하여 FT-IR (Nicolet 6700; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 측정하였다. ^1H NMR 스펙트럼은 중수소화 디메틸설폭사이드를 용매로 사용하여 400 MHz에서 5-mm BBO 프로브를 사용하여 NMR (Avance III HD 400; Bruker Biospin, Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany)로 측정하였다. XPS (K-alpha; Thermo Fisher Scientific) 분석은 통과 에너지가 200 eV인 여기 소스(excitation source)로 단색 Al K α (1486.6 eV)를 사용하여 수행하였다.

변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs 및 양이온성 CNCs의 유체역학적 크기 및 ζ -전위는 0.1% (w/v) 농도에서 입자 크기 및 제타 전위 분석기 (ELS-2000ZS; Otsuka, Tokyo, Japan)를 사용하여 분석하였다. CNCs의 광 투과율을 Victor V 멀티 플레이트 판독기로 490 nm에서 측정하여 1% (w/v) 농도에서 응집도(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 결정하였다. pH 또는 잔류 반응물과 같은 용매 조건으로 인한 변화를 피하기 위해 모든 샘플을 증류수로 투석한 후 분석하였다.

3.2. 형태학적 분석

전계 방출 주사 전자 현미경 (FE-SEM; JSM-7001F; JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하여 5 kV의 가속 전압에서 폴리머화된 siRNA 구조를 이미징하였다. SEM 이미징을 위해 폴리머화된 siRNA 구조를 실리콘 웨이퍼에서 건조시켰다. 200 kV에서 JEM-F200(JEOL)을 사용하여 변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs 및 양이온성 CNCs의

투과 전자 현미경(TEM) 분석을 수행하였다. 샘플을 Formvar/탄소 코팅 구리 그리드(EMS, Hatfield, PA, USA)에 로딩하고 UranylLess EM 염색(EMS)으로 염색하였다. Scanning TEM (STEM; JEM-F200; JEOL, Tokyo, Japan)을 200 kV의 가속 전압에서 폴리머화된 siRNA 입자의 구조 분석에 사용하였다. 변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs, 양이온성 CNCs 및 PsCNCs의 크기를 ImageJ 소프트웨어(v1.8; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)로 결정하였다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (CLSM; LSM 700; Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)을 사용하고 이어서 SYBR Green II로 염색하여 폴리머화된 RNA 입자에서 RNA의 존재를 조사하였다. PsCNCs의 복합체화를 시각화하기 위해 CNCs를 DTAF로 라벨링하였고 폴리머화된 RNA는 Gel Red로 염색하였다.

3.3. 효소 안정성 분석

RNase A (Sigma-Aldrich)를 사용하여 PsCNCs 내 폴리머화된 siRNA의 효소 안정성을 평가하고 정제된 폴리머화된 siRNA의 안정성과 비교하였다. RNase A 분해에 대한 저항성을 평가하기 위하여, 300 ng의 폴리머화된 siRNA 및 동일한 양의 PsCNCs 내 폴리머화된 siRNA를 RNase A 용액(1 µg/mL) 중에서 37°C에서 0, 30, 60, 및 90분 동안 인큐베이션한 다음 아가로스 겔 전기영동을 수행하였다. 겔 이미지를 ImageJ 소프트웨어로 분석하여 남아있는 폴리머화된 siRNA의 양을 정량화하였다. 모든 샘플을 로딩 염료와 혼합하고 40분 동안 10 V/cm에서 TBE 버퍼 중 4% 아가로스 겔(Gel Red로 미리 염색)에서 분리(resolve)하였다. 겔은 겔 문서화 시스템을 사용하여 시각화하였다.

4. 시험관 내 실험

4.1 세포 배양

반딧불이 루시페라제 유전자를 안정적으로 발현하는 SKOV3 난소암 세포 (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)를 37°C 및 5% CO₂에서 가슴 배양기를 사용하여 10% (v/v) FBS 및 1% (v/v) 페니실린-스트렙토마이신과 함께 DMEM에서 배양하였다.

4.2. PsCNCs의 세포 흡수

PsCNCs의 세포 흡수를 검증하기 위하여, 1×10^5 개의 SKOV3 세포를 24-웰 플레이트의 커버 슬립 상에 시딩하고 24시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 무혈청 배지에서 40 nM DTAF-표지된 PsCNCs로 처리하고 4시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, 세포를 4% 포름알데히드에 고정하고, Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 핵을 염색하였다. 커버 슬립을 슬라이드 유리 위에 올리고 CLSM을 활용하여 시각화하고 분석하였다. 세포 흡수의 정량적 유세포 분석기 분석을 위해, 1×10^5 개의 SKOV3 세포를 24-웰 배양 플레이트에 시딩하였다. 무혈청 배지에서 40 nM DTAF-표지된 PsCNCs와 함께 2시간 인큐베이션한 후, 트립신-EDTA를 사용하여 세포를 수확하고 분리된 세포를 유세포 분석기 (BD제 LSR II; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 분석하였다. 데이터 수집은 샘플 당 10,000 카운트를 사용하여 수행하였다.

4.3. 유전자 녹다운 분석

반딧불이 루시페라제를 발현하는 SKOV3 세포에서 루시페라제 유전자 녹다운 분석을 수행하였다. 간략하게, 반딧불이 루시페라제를 발현하는 6×10^3 개의 SKOV3 세포를 96-웰 플레이트에 시딩하고 24시간 동안 배양하였다. 세포를 무혈청 배지에서 다양한 농도의 PsCNCs로 처리하였다. 배양 4시간 후에 배양 배지를 교체하고, 세포를 48시간 더 배양하였다. Bright-GloTM (Promega)를 제조업체의 프로토콜에 따라 세포 용해 및 루시페라제 반응에 사용하였으며, Victor V 멀티플레이트 리더(Perkin Elmer)에 의해 루시페라제 활성을 검출하였다. 항-루시페라제 폴리머화된 siRNA가 로딩된 PsCNCs로 처리된 세포의 루시페라제 활성을 스크램블된 폴리머화된 siRNA가 로딩된 PsCNCs로 처리된 세포의 루시페라제 활성과 비교하여 상대적 루시페라제 활성을 계산하였다.

[0084] 4.4. 세포독성 및 세포 생존율

[0085] PsCNCs의 세포독성 및 항-PLK1 폴리머화된 siRNA가 로딩된 PsCNCs의 증식 억제를 세포 계수 키트(CCK)-8 (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan)을 사용하여 평가하였다. 간략하게, SKOV3 세포를 96-웰 플레이트에 시딩하고(8×10^3 세포/웰) 무혈청 배지에서 다양한 농도의 PsCNCs로 처리하였다. 3시간의 인큐베이션 후, 무혈청 배지를 성장 배지로 교체하였다. 72시간 후에 CCK-8 시약을 제조업체가 권장하는 대로 추가하였다. Victor V 멀티 플레이트 리더(Perkin Elmer)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 포르마잔(formazan)의 농도를 분석하였다. PsCNCs로 처리된 세포의 배지 흡광도 값을 비처리 세포 또는 스크램블된 siRNA가 로딩된 PsCNCs로 처리된 세포의 흡광도 값과 비교하여 상대적 세포 생존율을 계산하였다.

[0087] 5. 통계학적 분석

[0088] 실험 데이터는 그룹당 3개의 샘플에 대한 평균 \pm 표준 편차(SD)로 표현하였다. 그룹 간의 차이는 SPSS 소프트웨어 패키지 버전 24.0 (IBM, Armonk, NY, USA)의 기능인 Scheffe's 테스트를 사용하여 원-웨이 ANOVA로 분석하였다. 차이는 *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.005에서 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0090] 실시예 2: 셀룰로오스 나노크리스탈의 열수(hydrothermal) 탈황산화 및 양이온성 변형

[0091] 응집을 일으키지 않으면서 표면 전하를 음에서 양으로 반전시키기 위해 CNCs에 열수 탈황산화 및 양이온성 변형을 순차적으로 수행하였다. 먼저, CNCs를 120°C에서 0-4시간 동안 열수 처리하여 가역적 에스테르 가수분해를 통해 CNCs의 황산기($-\text{SO}_4^-$)를 점차적으로 제거하였고, 이 과정은 온도 상승에 의해 동력학적으로 가속화된다. CNCs의 탈황산화 정도를 CNCs의 제타 전위(ζ -전위) 및 pH 분석에 의해 열수 처리 시간에 따라 모니터링하였다. CNCs 용액의 ζ -전위는 열수 처리 시간이 증가함에 따라 $-54.6 \text{ mV} \pm 2.1 \text{ mV}$ 에서 $-33.3 \text{ mV} \pm 0.9 \text{ mV}$ 로 변하였고, 이는 CNCs의 표면의 음전하를 띠는 황산기($-\text{SO}_4^-$)가 탈착(detachment)되고 수산기($-\text{OH}$)가 재생됨을 나타낸다(도 2A). 또한 CNCs 용액의 pH는 처리 시간이 증가함에 따라 점차적으로 7에서 3으로 감소하였는데, 이는 용액 중 황산기($-\text{SO}_4^-$)가 증가했음을 나타낸다(도 9). 열수 공정 0-4시간 후, 탈황산화된 CNCs를 에폭시화 및 에테르화 반응을 통해 트리메틸아민을 함유하는 양이온성 분자인 CHPTAC(3-chloro-2-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride)에 의해 화학적으로 변형시켜 표면 전하를 반전시켰다. 양이온성으로 변형된 CNCs의 표면 전하 및 분산도(dispersity)를 전기영동 광 산란(electrophoretic light scattering) 및 UV-Vis 분광법으로 분석하였다. 열수 처리 시간에 관계없이, 양이온성으로 변형된 CNCs는 모두 ζ -전위가 40 mV 이상으로 양의 표면 전하를 나타내었으며, 이는 CHPTAC로 CNCs를 성공적으로 변형시켰음을 의미한다. 1-4시간의 탈황산화를 거친 양이온성으로 변형된 CNCs의 ζ -전위는 $43.7 \text{ mV} \pm 3.1 \text{ mV}$ 내지 $45.7 \text{ mV} \pm 0.3 \text{ mV}$ 로, 이는 탈황산화를 거치지 않은 양이온성으로 변형된 CNCs의 ζ -전위인 $36.6 \pm 0.6 \text{ mV}$ 보다 높았다(도 2A). 양이온성으로 변형된 CNCs 용액의 응집 정도를 나타내는 490 nm에서의 광선 투과율을 UV-Vis 분광광도계로 분석하였다. 탈황산화 시간에 관계없이, 변형되지 않은 CNCs와 탈황산화된 CNCs의 투과율은 모두 약 90%였다(도 2B). 양이온성으로 변형된 CNCs의 경우, 탈황산화를 거치지 않은 것은 투과율이 약 76%였으며, 탈황산화 시간에 따라 투과율이 점차적으로 증가하여 4시간 후에 89%에 도달하였다. 4시간의 탈황산화를 거친 양이온성으로 변형된 CNCs의 투과율은 변형되지 않은 CNCs 및 탈황산화된 CNCs의 투과율과 크게 다르지 않았으며, 이는 양이온성 변형 동안 응집이 거의 발생하지 않았음을 나타낸다. UV-Vis 분광법의 결과와 일관되게, 디지털 사진에서 관찰되는 바와 같이, 양이온성으로 변형된 CNCs의 탁도는 탈황산화 시간에 따라 감소하였다(도 2C). 본 발명자들은 ζ -전위의 증가와 탁도의 감소가 CNCs 표면의 수산기 및 황산기 풍부도의 변화에 기인한다고 가정하였다. 변형되지 않거나 또는 덜 탈황산화된 CNCs에 남아있는 음전하를 띠는 황산기는 양전하를 띠는 CHPTAC를 그들의 표면에 정전기적으로 끌어당겨 CNCs 응집을 유도하였다. 대조적으로, 열수 처리에 의해 고도로 재생된 수산기는 CNCs의 분산성을 향상시켰으며, 이는 결국 응집을 방해하였다(도 10). 추가 특성화 및 복합체화 공정을 위해, 4시간의 탈황산화를 거친 양이온성으로 변형된 CNCs (이하 "양이온성 CNCs")를 선택하였는데, 이는 이들이 양이온성으로 변형된 CNCs 중에서 상대적으로 높은 ζ -전위와 가장 낮은 탁도를 나타냈기 때문이다.

[0092] TEM, FT-IR 및 XRD에 의해 양이온성 CNCs의 물리화학적 특성을 확인하고 변형되지 않은 CNCs 및 탈황산화된 CNCs의 특성과 비교하였다. TEM 이미지에서 변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs 및 양이온성 CNCs는 비슷한

스핀들-유사 모양을 나타내었는데, 이는 CNCs의 고유한 모양으로 이전에 보고된 것이다(도 3A). 변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs 및 양이온성 CNCs의 길이는 각각 $288.1 \text{ nm} \pm 73.0 \text{ nm}$, $292.4 \text{ nm} \pm 50.6 \text{ nm}$ 및 $302.3 \text{ nm} \pm 36.4 \text{ nm}$ 였다(도 12); 또한, TEM 이미지의 ImageJ 소프트웨어 분석 결과가 제시하는 바와 같이, 이들 사이에 큰 크기 차이가 없었다. DLS 결과에서, 양이온성 CNCs의 유체역학적 크기($301.6 \pm 2.1 \text{ nm}$)는 변형되지 않은 CNCs의 유체역학적 크기($298.9 \pm 16.8 \text{ nm}$) 및 탈황산화된 CNCs의 유체역학적 크기($306.9 \pm 60.5 \text{ nm}$)에서 크게 변하지 않은 반면, 양이온성 CNCs의 ζ -전위($43.7 \pm 3.1 \text{ mV}$)는 변형되지 않은 CNCs의 ζ -전위($-54.6 \pm 2.1 \text{ mV}$) 및 탈황산화된 CNCs의 ζ -전위($-33.3 \pm 0.9 \text{ mV}$)와 비교하여 양(positive)으로 반전되었다(도 12). 공정 중 결정도(crystallinity)의 변화를 XRD로 확인하였으며, 변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs 및 양이온성 CNCs는 셀룰로오스 I(Cellulose I)과 유사한 회절 패턴을 나타내었다. 간략하게, 양이온성 CNCs의 CI(결정도 지수, crystallinity index) (70.4%)는 변형되지 않은 CNCs의 CI(69.6%) 및 탈황산화된 CNCs의 CI(67.7%)와 유사하였다(도 3B 및 도 12). 이러한 결과는 CNCs의 원래 형태와 결정 구조가 탈황산화 및 양이온성 변형 공정에서 유지되었음을 시사한다. FT-IR 크로마토그램에서, 셀룰로오스의 특징적인 피크인, 3368 cm^{-1} 에서의 넓은 밴드(O-H 스트레칭 진동) 및 2902 cm^{-1} 에서의 좁은 밴드(C-H 스트레칭)는 열수 처리 및 양이온성 변형 공정 후 거의 변하지 않았다(도 3C). 중요한 것은 1415 cm^{-1} 에서의 피크(CHPTAC으로부터의 C-N 스트레칭)가 양이온성 CNCs에서 증가하여 CHPTAC에 의한 성공적인 화학적 변형을 나타내었다. 또한 NMR 결과에서 CHPTAC의 트리메틸아민 양성자에 기인한 3.2 ppm에서의 피크가 양이온성 CNCs 크로마토그램에서만 볼 수 있었다(도 3D). 이러한 결과는 이전 연구와 유사하게 CHPTAC를 CNCs에 성공적으로 부착했음을 보여준다. CNCs의 XPS 조사 스캔에서 변형되지 않은 CNCs와 탈황산화된 CNCs는 크게 다르지 않았으며 주로 O (532 eV) 및 C (285 eV) 신호를 나타내었다(도 3E). 양이온성 CNCs의 경우 CHPTAC에 포함된 N 및 Cl의 피크가 각각 402 eV 및 197 eV에서 나타났다. NMR 결과와 마찬가지로, XPS의 결과는 양이온성 CNCs에서 CHPTAC의 존재를 보여주며 이는 이전의 보고를 확장한다. 결과적으로 탈황산화 시간을 조정하여 양이온성 CNCs를 성공적으로 최적화하여 높은 양의 표면 전위와 향상된 분산성을 확보하였다. 또한 열수 탈황산화 및 CHPTAC 증착 과정에서 CNCs의 고유의 스핀들-유사 모양과 결정 구조가 보존되었다.

[0094] 실시예 3: 유기 및 무기 결정성 마이크로입자로부터 폴리머화된 siRNA

[0095] 폴리머화된 siRNA를 RCT 및 Mg^{2+} 킬레이트화에 의한 폴리머화된 siRNA의 정제를 포함하는 순차적 합성 과정을 통해 획득하였다. 먼저, 환형 DNA를 주형으로 사용하여 RNA 폴리머라제를 RCT 반응에 사용하여 연쇄(concatemeric) 폴리머화된 siRNA를 생성하고 이는 MgPPi 결정성 마이크로입자로 자가-어셈블되었다. 이러한 입자의 형태학적 및 구조적 파라미터를 SEM, STEM 및 CSLM으로 분석하였다. SEM 이미지는, 잘 분산되어 있고 크기가 약 $2.5 \mu\text{m}$ 인 많은 수의 꽃잎 모양의 구형(spherulitic) 다공성 마이크로입자의 합성을 보여주었다(도 4A). STEM 결과는 무기 계층(hierarchical) 및 다층 MgPPi 결정 구조를 보여주었다(도 4B). 또한, SYBR Green II로 염색한 폴리머화된 siRNA 입자의 CLSM 결과는 폴리머화된 siRNA의 녹색 형광이 주로 입자의 표면을 향해 집중되어 존재함을 보여주었다(도 4C). 다음으로, Mg^{2+} 킬레이트화제인 EDTA를 사용하여 무기 MgPPi 결정 구조를 파괴하는 과정을 통해 폴리머화된 siRNA를 추출하였다. 결정 구조의 파괴를 확인하기 위해 다양한 EDTA 농도로 처리된 폴리머화된 siRNA 입자의 형태를 SEM으로 모니터링하였다. SEM 이미지는, 양이온성 CNCs와 음이온성 폴리머화된 siRNA의 복합체화를 방해할 것으로 예상되었던 무기 계층 및 다층 결정성 MgPPi 구조가 EDTA 농도가 증가함에 따라 점진적으로 파괴되는 것을 보여주었다, 결정 구조는 1 mM EDTA에서 완전히 파괴되었고, 약 $247.6 \text{ nm} \pm 65.3 \text{ nm}$ 인 무정형 나노 크기의 폴리머화된 siRNA 펠렛이 형성되었다(도 4D). 종합하면, RCT를 사용하여 유기 및 무기 결정성 마이크로입자에 통합된 폴리머화된 siRNA를 생성하였고, 이를 최적의 EDTA 처리에 의해 성공적으로 파괴하여 양이온성 CNCs와의 효율적이고 간단한 복합체화를 위한 정제된 폴리머화된 siRNA를 획득하였다.

[0097] 실시예 4: 양이온성 CNCs와 폴리머화된 siRNA의 나노복합체화

[0098] 획득한 스핀들 모양의 양이온성 CNCs와 음이온성의 정제된 폴리머화된 siRNA를 다양한 중량비로 정전기적으로 복합체화하여 PsCNCs를 형성하였다(도 5A). 예비 결과에 의하면, PsCNCs 형성을 위해 20 mM HEPES 버퍼를 사용할 경우 응집을 일으키지 않고 안정적인 나노복합체를 생성하는 것으로 나타났다. PsCNCs의 물리화학적 특성을 TEM, CLSM 및 DLS로 분석하였다. TEM 이미지는 PsCNCs의 형태가 스핀들과 유사하고 분지되어(branched), 양이온

성 CNCs의 형태와 큰 차이가 없음을 보여주었다(도 5B). 또한 합성된 PsCNCs의 길이는 $293.6 \text{ nm} \pm 28.7 \text{ nm}$ 로 변형되지 않은 CNCs, 탈황산화된 CNCs 및 양이온성 CNCs와 유사하였다(도 5C). CLSM 이미징을 위해 폴리머화된 siRNA를 핵산 특이적 삽입 염료인 Gel Red(적색 형광)로 염색하였고, 양이온성 CNCs는 DTAF(녹색 형광)로 태그하였다. CLSM 결과는 적색 형광과 녹색 형광이 황색 형광으로 병합된 것을 나타내어 PsCNCs의 성공적인 복합체화를 보여주었고, 또한 응집없이 균질한 분포를 나타내었다(도 5D).

[0099] 나노복합체 형성을 최적화하기 위하여, 폴리머화된 siRNA와 CNCs를 다양한 중량비(w/w, 0-20)로 사용하여 PsCNCs를 생성하였다. 이어서, PsCNCs를 겔 지연 분석(gel retardation assay)하여 복합체화 효율을 평가하였다(도 6A). 그 결과, 중량비가 0인 PsCNCs(정제된 폴리머화된 siRNA만 포함)는 폴리머화된 siRNA의 존재를 나타내는 번짐 밴드를 나타내었다. 중량비가 증가함에 따라 PsCNCs 내 폴리머화된 siRNA의 밴드가 웰에 포획되었고, 5이상의 중량비에서 PsCNCs는 밴드가 웰에 완전히 포획되어 강한 결합 친화력을 가진 성공적인 복합체 형성을 나타내었다. 또한, 해파린 탈복합체화(decomplexation) 분석을 수행하여 세포질에서 PsCNCs로부터 폴리머화된 siRNA가 적절하게 방출될 수 있도록 폴리머화된 siRNA와 양이온성으로 변형된 CNCs 사이의 정전기적 상호작용을 분석하였다. 이 분석에서, PsCNCs의 구조로부터 폴리머화된 siRNA의 방출을 촉진하는 음이온 경쟁자로서 해파린을 사용하여 다양한 음전하를 띠는 세포 성분을 모방하도록 하였다. 서로 다른 중량비의 PsCNCs를 해파린으로 처리하고 구조적 변화를 겔 지연 분석으로 모니터링하였다. 중량비가 10 및 20인 PsCNCs 내 폴리머화된 siRNA의 대부분은 해파린 처리 후에도 여전히 웰에 포획되어 있었으나, 중량비가 5인 PsCNCs 내 폴리머화된 siRNA는 번짐 밴드를 보여주어 이들이 PsCNCs로부터 방출되었음을 나타내었다(도 6A). 따라서 생물학적 적용을 평가하기 위하여 중량비가 5인 PsCNCs를 선택하였다. 종합하면, PsCNCs를 응집체 없이 성공적으로 합성하였으며, 양이온성 CNCs/폴리머화된 siRNA의 최적 중량비를 결정하였다.

[0101] 실시예 5: 양이온성 CNCs와 복합체화된 폴리머화된 siRNA의 생물학적 적용

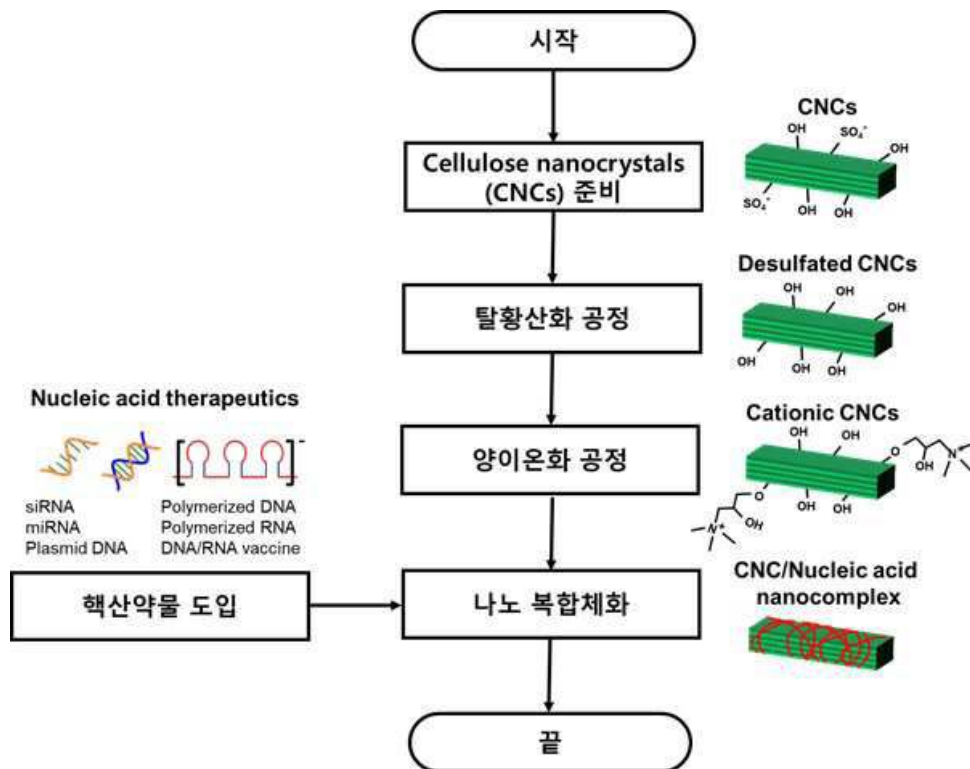
[0102] 항암 약물 전달 플랫폼으로서 PsCNCs의 생물학적 적용을 평가하기 위해 효소 안정성, 세포내 흡수 및 유전자 조절 효능을 분석하였다. 정제된 폴리머화된 siRNA 및 최적화된 중량비 5의 PsCNCs의 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 모니터링하여 PsCNCs의 효소 안정성을 조사하였다. 정제된 폴리머화된 siRNA 및 PsCNCs를 RNase A 용액($1 \mu\text{g/mL}$)에서 최대 90분 동안 인큐베이션하였다(도 6B). 이어서, 겔 전기영동을 수행하고, 남아있는 폴리머화된 siRNA를 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 정제된 폴리머화된 siRNA는 30분 이내에 RNase A 처리에 의해 80%까지 분해되었으나, PsCNCs 내 폴리머화된 siRNA는 매우 잘 보호되었으며, 90분 동안 RNase A에 의한 무시할만한 분해가 관찰되었다. 이러한 결과는 중량비 5의 PsCNCs가 폴리머화된 siRNA보다 뉴클레아제 분해에 대해 더 저항성이 있으며, 이는 결국 모노머 siRNA 보다 RNase A 매개 분해에 대해 6배 더 높은 저항성을 나타냄을 의미하였다. PsCNCs의 축합 구조는 폴리머화된 siRNA에 대한 RNase A의 접근성을 감소시켰고, 결국 분해로부터 보호하였다.

[0103] PsCNCs의 세포내 전달을 조사하기 위해, SKOV3 암세포를 DTAF가 태그된 PsCNCs로 처리하였고, 이는 CLSM 이미지에서 녹색 형광으로 표시되었다. CLSM 이미지에 따르면, DTAF가 태그된 PsCNCs의 녹색 형광이 세포의 세포질에 국한되어 있어 성공적인 세포내 전달을 나타내었다(도 7A). 또한, PsCNCs의 세포 흡수를 유세포 분석기에 의해 정량적으로 분석하였다(도 7B). 수득한 결과는 40 nM 에서 84.4%의 내재화 효율을 나타내어 PsCNCs의 성공적인 내재화를 또한 시사하였다. 또한, 루시페라제(luciferase)를 발현하는 SKOV3 세포를 항-루시페라제 폴리머화된 siRNA 서열(siLuc)이 로딩된 PsCNCs로 다양한 siRNA 농도에서 처리하였으며, 루시페라제 발현을 분석하여 PsCNCs의 유전자 조절 효능을 평가하였다. 루시페라제 분석 결과는, PsCNCs가 기존의 형질감염 시약인 리포펙타민(lipofectamine) 또는 양이온성 CNCs와 복합체를 형성한 모노머 siRNA에 비해 용량-의존적이며 현저하게 향상된 억제 효능을 나타냄을 보여주었다(도 8A). 특히, PsCNCs 처리는 루시페라제 발현을 54.1%로 억제한 반면, 모노머 siRNA와 양이온성 CNCs의 복합체 및 모노머 siRNA와 리포펙타민 복합체는 40 nM siRNA 농도에서 루시페라제 발현을 각각 72.7% 및 64.0%로 억제하였다. 이러한 결과는 PsCNCs로부터 탈복합체화 및 방출 후 전달된 폴리머화된 siRNA가 성공적으로 siRNA 기반 RNA 간섭을 촉진했음을 시사하였다. 또한, 스크램블된 siRNA를 암호화하는 변형되지 않은 CNCs, 양이온성 CNCs 및 PsCNCs는 최대 40 nM 의 농도에서 무시할만한 세포독성을 보였으며, 상기 농도에서 폴리머화된 siLuc가 로딩된 PsCNCs는 상당한 유전자 발현의 조절을 나타내었다(도 8B). 나아가, 다양한 중량비(5, 10 및 15)의 PsCNCs를 사용하여 루시페라제를 발현하는 SKOV3 세포의 유전자 사일런싱(침묵)을 수행하였으며, 인큐베이션 72시간 후에 유전자 조절을 모니터링하였다(도 11). 루시페라제 분석 결과에 따르면, 가장 유의한 루시페라제 발현 억제는 중량비 5의 PsCNCs에서 발생하였다. 이 결과는 탈복합체화 분석 결과와 관련이 있으며, 이는 5의 중량비로 형성된 PsCNCs가 세포질에서 siRNA의 탈복합체화 후 RNA 간섭-매개 유전

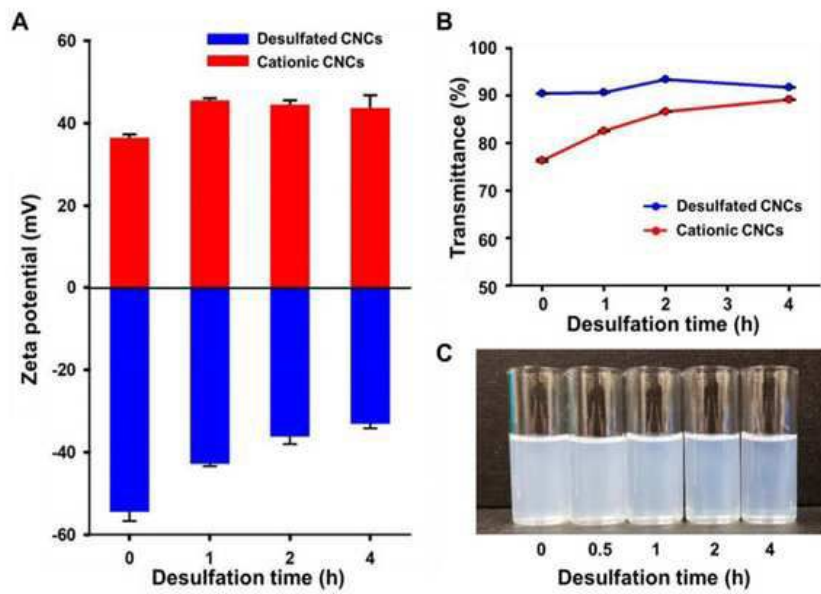
자 조절을 촉진한다는 것을 보여준다. 추가적으로, 세포사멸(apoptosis)을 유도하고 암세포의 증식을 감소시키는 항-폴로(Polo)-유사 키나아제 1 siRNA 서열(siPLK1)의 폴리머화된 형태를 PsCNCs에 통합하여 시험관 내 치료 효과를 평가하였다. SKOV3 세포를 다양한 농도의 폴리머화된 siPLK1 로딩된 PsCNCs로 처리하고 72시간 후 CCK-8 분석에 의해 세포 생존율을 분석하였다(도 8C). 결과는, 폴리머화된 siPLK1가 로딩된 PsCNCs는 용량-의존적 방식으로 세포 생존율을 상당히 감소시켰음을 보여주었다. 구체적으로, 폴리머화된 siPLK1가 로딩된 PsCNCs는 40 nM의 siRNA 농도에서 스크램블된 폴리머화된 RNA가 로딩된 PsCNCs에 비해 SKOV3 세포의 증식을 54.2% 억제하였다. 이러한 결과는, 양이온성으로 변형된 CNCs와 복합체화된 폴리머화된 siRNA가 암세포에 성공적으로 전달되고 표적 유전자를 효율적으로 사일렌싱시켜 세포독성 없이 항종양 활성을 유도하기에 충분할 수 있음을 보여주었다.

도면

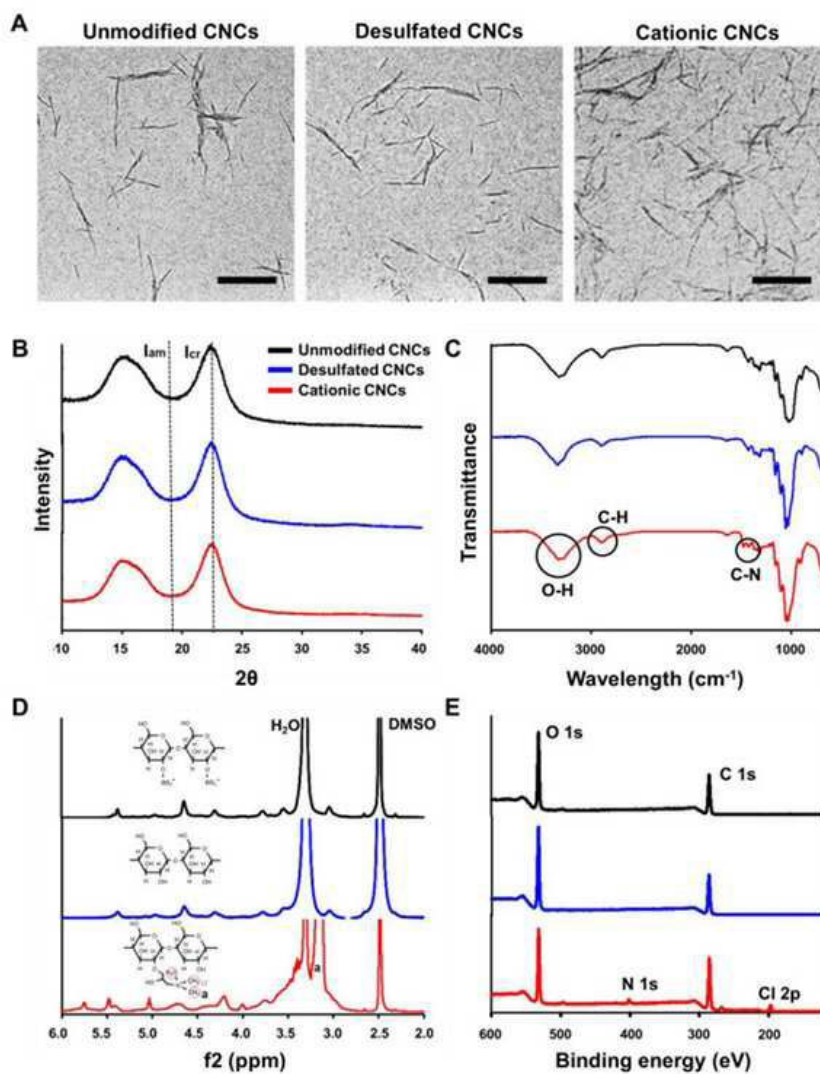
도면1



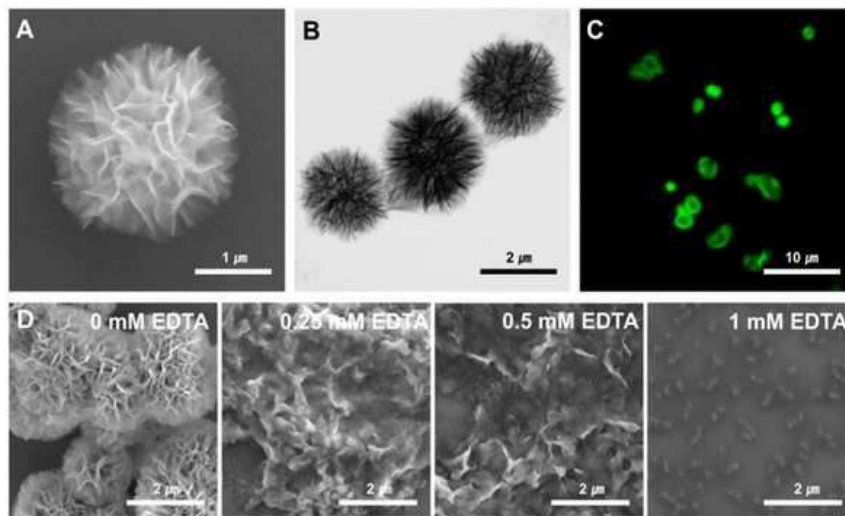
도면2



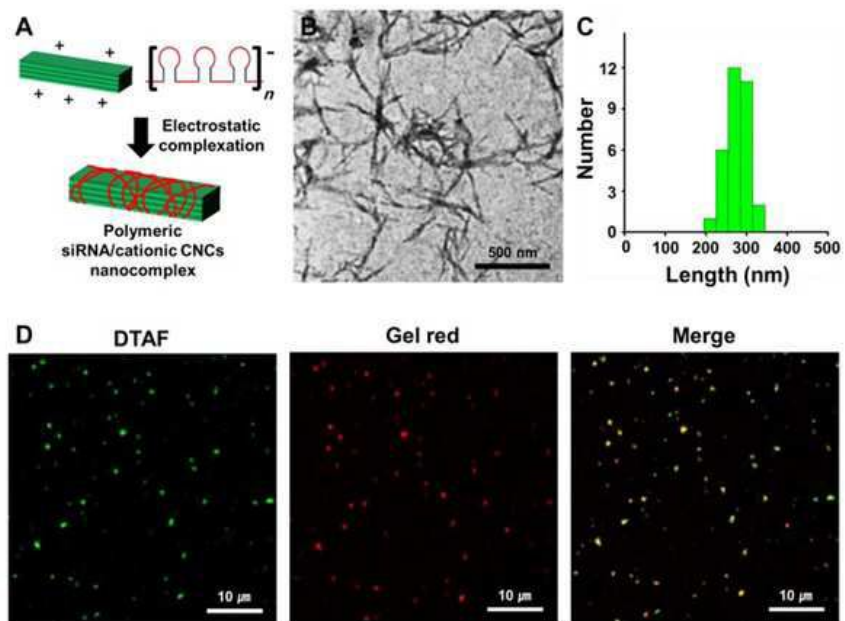
도면3



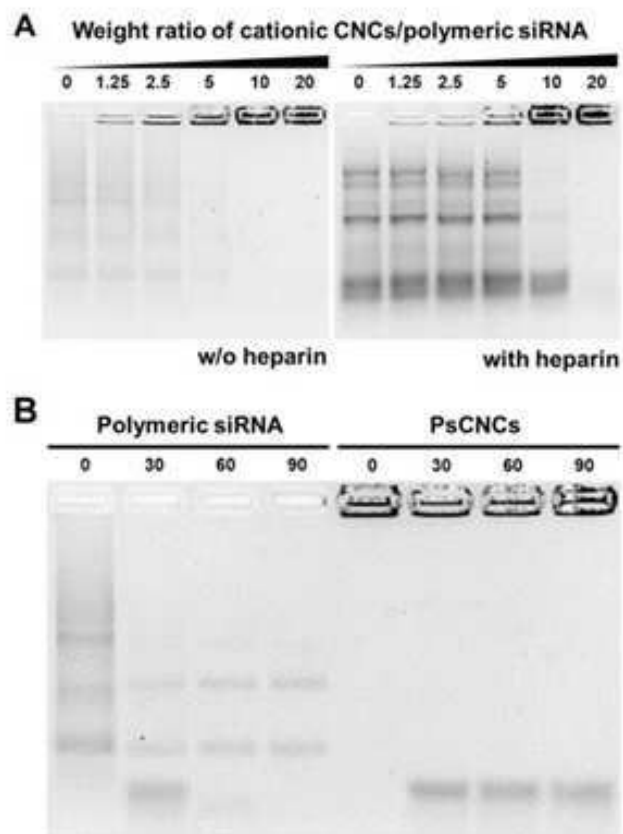
도면4



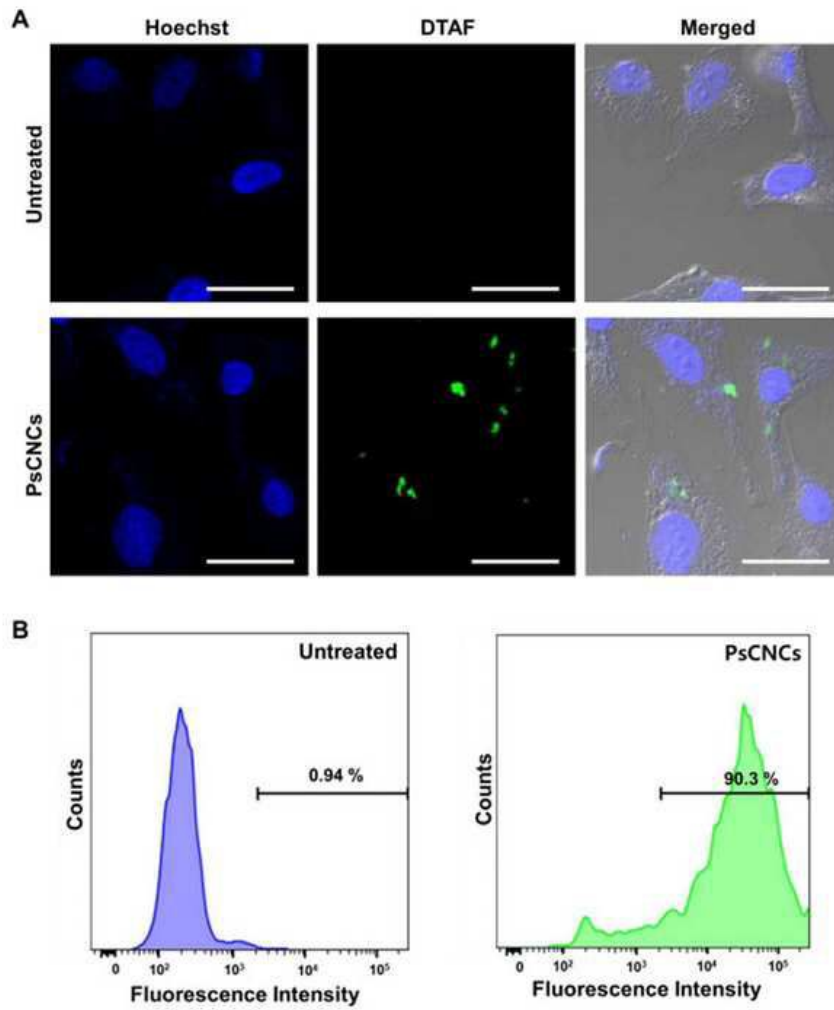
도면5



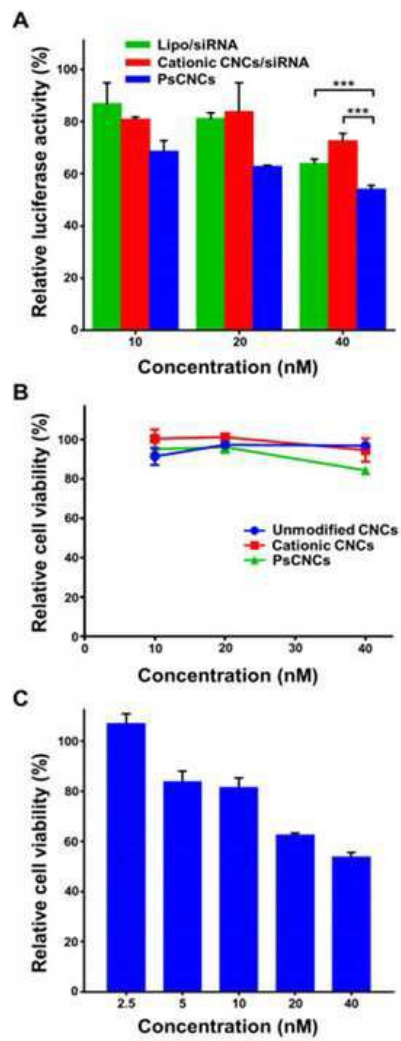
도면6



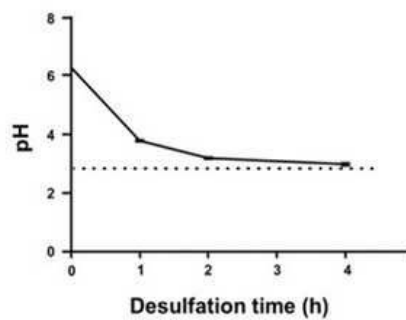
도면7



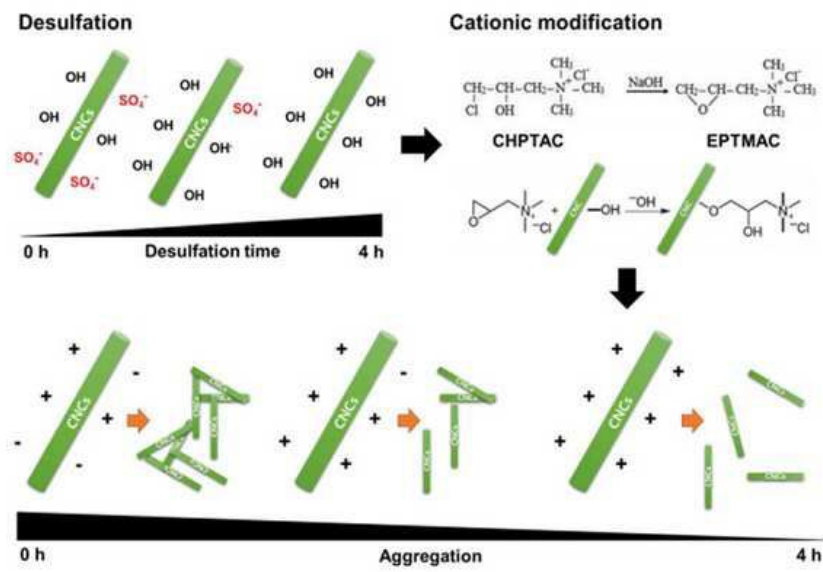
도면8



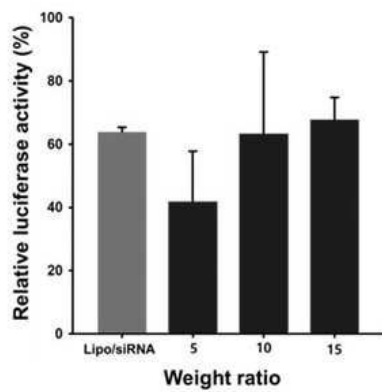
도면9



도면10



도면11



도면12

Type	Length (nm)	Hydrodynamic size (nm)	Zeta potential (mV)	CI (%)
Unmodified CNCs	288.1 ± 73.0	298.9 ± 16.8	-54.6 ± 2.1	69.6
Desulfated CNCs	292.4 ± 50.6	306.9 ± 60.5	-33.3 ± 0.9	67.7
Cationic CNCs	302.3 ± 36.4	301.6 ± 2.1	43.7 ± 3.1	70.4

도면13

Strand	DNA sequences
Linear ssDNA (Luciferase-specific siRNA, 92 bp)	5'-Phosphate-ATAGTGAGTCGTATTAACGTACCAACAAGCCATTCTACC CACTCGAATTACTTGAATTCGAGTGGGTAGAATGGCTTTAGAGGCA TATCCCT-3'
Linear ssDNA (PLK1-specific siRNA, 96 bp)	5'-Phosphate-ATAGTGAGTCGTATTAACGTACCAACAAGATCACCTC CTTAAATATTTTACTTGAAAATATTTAAGGAGGGTGATCTTTAGAG GCATATCCCT-3'
Linear ssDNA (Scrambled siRNA, 92 bp)	5'-Phosphate-ATAGTGAGTCGTATTAACGTACCAACAAGCTGAAAGAAC ACGAACTTTTACTTGAAAAGTTCGTGTTCTTTCAGCTTTAGAGGCAT ATCCCT-3'
Primer ssDNA (16 bp)	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAT-3'

*Bold indicates complementary sequence to siRNA sequence.