



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월28일

(11) 등록번호 10-2515464

(24) 등록일자 2023년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/00 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/88 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/001 (2013.01)

C12N 15/85 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0051969

(22) 출원일자 2020년04월29일

심사청구일자 2020년04월29일

(65) 공개번호 10-2021-0133413

(43) 공개일자 2021년11월08일

(56) 선행기술조사문헌

W02002062823 A2

KR1020160103024 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

엄영우

강원도 원주시 행구로 54, 102동 401호(개운동, 원주힐스테이트아파트)

백순구

강원도 원주시 백간길 17, 108동 2201호(단계동, 원주 봉화산 벨라시티 아파트)

(74) 대리인

김보정

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 문명순

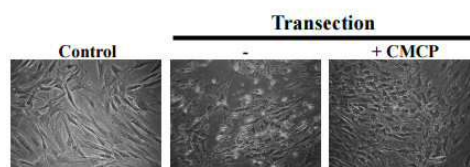
(54) 발명의 명칭 핵산 또는 유전자 형질감염 효율을 개선하는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

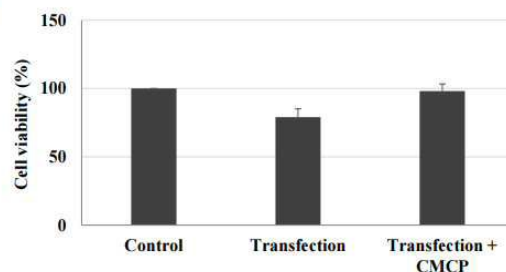
본 발명은 핵산 또는 유전자 형질감염 효율을 개선하는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명의 세포독성 완화 막 투과 펩타이드(cytotoxic mitigating cell-penetrating peptides, CMCP)를 함께 이용하여 성체줄기세포에 유전자 형질감염 시 낮은 세포독성, 높은 형질감염 효율 및 이에 따른 증가된 단백질 발현을 나타내는바 기존의 유전자 형질감염 기술과 비교해 보았을 때 유전자 형질감염이 어려운 세포로의 유전자 형질감염 효율 향상을 위한 제제로 유용하게 이용하는 것이 가능하다.

대표도 - 도1

A



B



(52) CPC특허분류

C12N 15/88 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345299487
과제번호	NRF-2017R1D1A1A02019212
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인지초연구지원사업
연구과제명	비 바이러스 TAT-peptides를 이용한 유전자 형질전환 효율 개선과 이를 적용한 기능
강화 중간엽줄기세포의 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교(원주의대)
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포독성 완화 막 투과 펩타이드는 세포의 핵산 또는 유전자 형질감염 효율을 개선하는 것을 특징으로 하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 핵산은 DNA 분자, RNA 분자, PNA 분자, siRNA 분자, 안티센스 분자, 리보자임 및 앵타머로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 유전자 형질감염은 벡터에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 세포는 줄기세포, 전구세포 및 동물세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 성체줄기세포 및 유도만능줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 성체줄기세포는 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell) 또는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)인 것을 특징으로 하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 체대, 체대혈, 골수, 혈액, 지방, 근육, 골격, 신경, 피부, 골막, 양막 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 조직으로부터 유래된 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드.

청구항 9

제2항에 있어서, 상기 핵산 또는 유전자 형질감염은 칼슘 포스페이트-매개된 형질감염, 양이온 폴리머 형질감염, 비로솜(virosome) 형질감염, 리포펙션(lipofection), 비리포솜 지질 형질감염, 덴드리머(dendrimer) 형질감염, 열 쇼크 형질감염, 마그네토펙션(magnetofection), 임팔레펙션(impalefection) 및 소노포레이션(sonoporation)으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 형질감염 방법을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 세포독성 완화 막 투과 펩타이드는 상기 핵산 또는 유전자 형질감염 방법 수행 시 유발되는 세포독성을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드.

청구항 11

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 포함하는 핵산 또는 유전자 형질감염용 키트.

청구항 12

시험관내(*in vitro*) 또는 인체를 제외한 생체내(*in vivo*)에서 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 처리하고 핵산 또는 유전자 형질감염하는 단계;를 포함하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 이용한 핵산 또는 유전자 형질감염 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 핵산 또는 유전자 형질감염은 칼슘 포스페이트-매개된 형질감염, 양이온 폴리머 형질감염, 비로솜(virosome) 형질감염, 리포펙션(lipofection), 비리포솜 지질 형질감염, 덴드리머(dendrimer) 형질감염, 열 쇼크 형질감염, 마그네토펙션(magnetofection), 임팔레펙션(impalefection) 및 소노포레이션(sonoporation)으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 형질감염 방법을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 이용한 핵산 또는 유전자 형질감염 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 핵산 또는 유전자 형질감염(transfection) 효율을 개선하는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 골수, 지방 및 제대를 포함하는 많은 조직으로부터 쉽게 분리되고 확장될 수 있는 다분화성(multipotent) 성체 줄기세포(adult stem cells)이며, 세포 치료(cell therapy)에 사용하기 위해 활발하게 연구되어 왔다. 그동안 중간엽 줄기세포 치료요법(MSC therapy)은 약간의 성공을 거두었지만, 아직 임상 용도로 미국 식품의약국(food and drug administration, FDA) 승인을 받은 것은 없다. 중간엽 줄기세포는 생체 밖(*ex vivo*)에서는 줄기세포능(stemness)을 잃어 치료 가능성(therapeutic potential)이 감소하고, 생체 내(*in vivo*)에서는 추가적인 장벽 때문에 치료 효능(therapeutic efficacy)이 감소하지만, 중간엽 줄기세포의 배양 최적화 및 유전자 변형(genetic modification)으로 이러한 장벽을 극복할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 유전자 변형 중 바이러스성 형질도입(transduction)은 효율적이지만, 통합 바이러스 벡터의 변이 유발성 및 바이러스 항원의 잠재적 면역원성(immunogenicity)과 관련된 안전성 문제로 제한되며, 비 바이러스성 전달 방법은 비효율성(inefficiency) 및 독성(toxicity)에 의해 제한되지만, 보다 더

안전하고 유연하며 확장 가능하여 중간엽 줄기세포 치료요법 엔지니어링에 매력적인 분야로 주목받고 있다.

[0004] 또한, 유전자 변형 중 비-바이러스성 벡터를 이용한 형질감염(transfection) 방법에는 미량주입(microinjection), 전기천공법(electroporation) 및 나노 담체 전달(nanocarrier delivery) 등이 있는데, 이중 미량주입 및 전기천공법은 효율적이지만 처리량 및 세포독성으로 인해 제한되는 것으로 알려져 있고, 다양한 나노 담체들은 핵산을 세포로 전달한다는 것이 입증되었지만 중간엽 줄기세포에서의 나노 담체 전달 효율이 비효율적인 것으로 알려져 있다. 이처럼 중간엽 줄기세포는 재생의학 분야에서 널리 활용되고 있는 것에 비하여 치료효능은 충분하지 못한 것으로 보고되고 있다. 따라서 이를 극복하기 위하여 유전자 발현을 강화하고자 하는 연구가 집중되고 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 유전자 형질감염이 어려운 세포로의 효과적인 유전자 형질감염 방법을 개발하기 위하여 노력한 결과, 성체줄기세포에 유전자 형질감염 시 세포독성 완화 막 투과 펩타이드(cytotoxic mitigating cell-penetrating peptides, CMCP)를 함께 이용하는 경우 낮은 세포독성, 높은 형질감염 효율 및 이에 따른 증가된 단백질 발현을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 유전자 형질감염이 어려운 세포로의 유전자 형질감염 효율 향상을 위한 제제로 유용하게 이용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 핵산 또는 유전자 형질감염 효율을 개선하는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드 및 이의 용도를 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 포함하는 핵산 또는 유전자 형질감염용 키트를 제공한다.

[0012] 아울러, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 처리하고 핵산 또는 유전자 형질감염하는 단계를 포함하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 이용한 핵산 또는 유전자 형질감염 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에서는 성체줄기세포로 유전자 형질감염 시 본 발명에 따른 세포독성 완화 막 투과 펩타이드(cytotoxic mitigating cell-penetrating peptides, CMCP)를 함께 이용하는 경우 낮은 세포독성, 높은 형질감염 효율 및 이에 따른 증가된 단백질 발현을 나타내는 것을 확인하였으므로, 상기 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 유전자 형질감염이 어려운 세포로의 유전자 형질감염 효율 향상을 위한 제제로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명에 따른 세포독성 완화 막 투과 펩타이드(cytotoxic mitigating cell-penetrating peptides, CMCP)의 세포독성 완화 효과를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명에 따른 CMCP의 세포막 투과 효율을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명에 따른 CMCP의 유전자 형질감염 효율을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명에 따른 CMCP에 의한 유전자 형질감염으로 발현된 단백질을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명에 따른 CMCP의 형질감염 방법 및 용량에 의한 유전자 형질감염 효율을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 세포의 핵산 또는 유전자 형질감염 효율을 개선하는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드로, 서열번호 1

의 아미노산 서열로 표시되는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 제공한다.

- [0020] 본 발명에서, 상기 세포독성 완화 막 투과 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 TAT 부위, 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 힌지(hinge) 부위 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 DNA 결합 부위를 포함한다.
- [0021] 본 발명에서, 상기 용어 “형질감염”은 세포, 구체적으로 진핵세포로의 핵산 또는 유전자를 도입하는 것을 말한다.
- [0022] 본 발명에서, 상기 핵산은 공유결합으로 연결된 2개 이상의 뉴클레오티드로 이루어진 임의의 중합체로, 예컨대 DNA 분자, RNA 분자, PNA 분자, 앱타머 또는 이들의 혼합물로 이루어진 경우 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 또한, 개별 뉴클레오티드의 염기 부분, 당 부분 및/또는 포스페이트 부분은 핵산 또는 각각의 유사체를 형성하는 각각 임의의 뉴클레오티드에 대해 개별적 및 독립적으로 수식될 수 있다. 상기 수식된 당 부분은 당 부분의 2' 원자에 메틸, 메톡시, 에틸 또는 에톡시기를 갖는 것일 수 있고, 상기 수식된 포스페이트 부분은 포스포티오에이트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 DNA 분자는 선형 DNA 또는 환형 DNA, 예를 들면, 원형 플라스미드, 에피솜 또는 발현 벡터 형태의 DNA일 수 있고, 상기 RNA 분자는 세포 내부로 전달되는 것이 추구되는 mRNA, siRNA, miRNA, 안티센스 RNA 또는 리보자임일 수 있으나 이에 한정되지 않으며 임의의 유형의 RNA를 포함한다.
- [0023] 본 발명에서, 상기 유전자는 벡터에 의해 형질감염이 이루어질 수 있다. 상기 벡터는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 상기 벡터는 상기 유전자 발현을 위한 요소(elements)를 포함하는 것으로, 복제원점(replication origin), 프로모터, 작동 유전자(operator), 전사 종결 서열(terminator) 등을 포함할 수 있고, 숙주 세포의 게놈 내로의 도입을 위한 적절한 효소 부위(예컨대, 제한 효소 부위) 및/또는 숙주 세포 내로의 성공적인 도입을 확인하기 위한 선별 마커 및/또는 단백질로의 번역을 위한 리보솜 결합 부위(ribosome binding site; RBS), IRES(Internal Ribosome Entry Site) 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 벡터는 상기 프로모터 이외의 전사 조절 서열(예를 들어, 인핸서 등)을 추가로 포함할 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 벡터는 당업계에 공지된 플라스미드 DNA, 재조합 벡터 또는 기타 매개체일 수 있고, 구체적으로 선형 DNA 플라스미드 DNA, 재조합 비바이러스성 벡터, 재조합 바이러스성 벡터 또는 유전자 발현 유도 벡터 시스템(inducible gene expression vector system)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0025] 본 발명에서, 상기 세포는 연구 및 임상 현장에서 일상적으로 사용되는 임의의 세포 및 세포주, 구체적으로 진핵 세포, 특히 배양으로 성장한 세포, 동물 또는 인간의 조직에서 발견된 세포일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 또한, 상기 세포는 핵산 또는 유전자 형질감염이 어려운 세포일 수 있다. 여기서 “형질감염이 어려운”이란 표준 상업적으로 입수 가능한 형질감염 시약, 예를 들면, 양이온성 지질(이의 예는 리포펙타민(등록상표) 2000, 리포펙타민(등록상표) LTX, 리포펙타민(등록상표), 리포펙틴(등록상표), 퓨진(등록상표) HD, X-트립진(상표명) HP 등을 포함하지만 이에 한정되지 않음)을 사용하여 형질감염되는 경우, 전형적으로 60 % 미만의 형질감염 효율을 나타내는 임의의 세포 또는 세포주를 일반적으로 나타내는 상대적인 용어이다.
- [0027] 상기 세포는 예컨대, 줄기세포, 전구세포 또는 동물세포일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 줄기세포는 구체적으로 배아줄기세포, 성체줄기세포 또는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPS)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 또한, 상기 성체줄기세포는 배아 발달 단계 이후에도 성체 전반에서 발견되는 미분화된 줄기세포로 이러한 성체 줄기세포는 주변 조직의 특성에 세포 자신을 맞추어 분화하는 조직특이적 분화능력(site-specific differentiation)을 가지고 있다. 성체줄기세포는 골수, 혈액, 뇌, 피부, 지방, 골격근, 털줄, 제대혈 등의 다양한 성체 세포로부터 유래할 수 있다. 구체예로, 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC), 골격근 줄기세포(skeletal muscle stem cell), 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell), 신경 줄기세포(neural stem cell, NSC), 지방유래 줄기세포(adipose-derived stem cell), 지방유래 전구세포(adipose-derived progenitor cell), 혈관내피 전구세포(vascular endothelial progenitor cell) 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 또한, 상기 중간엽 줄기세포는 이미 성인이 된 몸의 각 부위에서 얻어지는 성체조직으로부터 유래된 줄기세포로, 제대, 제대혈, 골수, 혈액, 지방, 근육, 골격, 신경, 피부, 골막, 양막 또는 태반에서 분리될 수

있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0030] 본 발명에서, 상기 핵산 또는 유전자 형질감염은 당 분야의 통상의 지식을 가진 기술자들에게 잘 알려진 방법을 이용할 수 있다. 상기 핵산 또는 유전자 형질감염 방법은 예를 들면, 칼슘 포스페이트-매개된 형질감염, 양이온 폴리머 형질감염(예로써, DEAE-덱스트란(dextran) 또는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG)), 비로솜(virosome) 형질감염, 양이온성 지질을 이용한 형질감염, 리포펙션(lipofection)(예로써, 리포솜 형질감염, 양이온 리포솜 형질감염, 면역리포솜 형질감염), 비리포솜 지질 형질감염, 덴드리머(dendrimer) 형질감염, 열 쇼크 형질감염, 마그네토펙션(magnetofection), 임팔레펙션(impalefection), 소노포레이션(sonoporation) 또는 이들의 조합에 의하여 수행될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 상기 형질감염 방법은 당 분야에 공지되어 있다(예로써, “Current Protocols in Molecular Biology” Ausubel et al., John Wiley & Sons, New York, 2003 or “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 3rd edition, 2001).
- [0031] 이에, 상기 세포독성 완화 막 투과 펩타이드는 상기 핵산 또는 유전자 형질감염 방법에 사용되는 형질감염 시약과 조합으로서 사용될 수 있고, 상기 형질감염 시약과 조합으로 사용하여 핵산 또는 유전자 형질감염 효율을 개선할 수 있다.
- [0032] 또한, 상기 세포독성 완화 막 투과 펩타이드는 상기 핵산 또는 유전자 형질감염 시 유발되는 세포독성을 감소시킬 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 핵산 또는 유전자 형질감염 방법을 이용한 유전자 형질감염 시, 구체적으로 리포펙션 및/또는 마그네토펙션을 이용한 유전자 형질감염 시 본 발명에 따른 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 조합할 경우 유전자 형질감염 효율을 3 내지 15배 개선할 수 있고, 구체적으로 4 내지 12배 개선할 수 있으며, 더 구체적으로 5 내지 9배 개선할 수 있음을 확인하였다.
- [0035] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드(cytotoxic mitigating cell-penetrating peptides, CMCP)를 합성하였다.
- [0036] 또한, 본 발명자들은 성체줄기세포에 유전자 형질감염 시 기존의 유전자 형질감염 방법으로 리포펙션 및/또는 마그네토펙션과 상기 펩타이드를 함께 사용할 경우 리포펙션 또는 마그네토펙션 단독으로 사용하는 경우와 비교하여
- [0037] 세포독성이 완화되고, 세포막 투과성, 유전자 형질감염 효율 및 형질감염된 유전자로부터 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.
- [0038] 따라서, 본 발명에 따른 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 성체 줄기세포를 포함한 유전자 형질감염이 어려운 세포로의 핵산 또는 유전자 형질감염 효율 개선을 위한 제제로 유용하게 이용할 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 포함하는 핵산 또는 유전자 형질감염용 키트를 제공한다.
- [0041] 본 발명에서, 상기 핵산 또는 유전자 형질감염용 키트는 상기 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 0.00001 내지 100 μ g 포함할 수 있고, 보다 구체적으로 0.0001 내지 60 μ g 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 핵산 또는 유전자 형질감염 방법은 예를 들면, 칼슘 포스페이트-매개된 형질감염, 양이온 폴리머 형질감염(예로써, DEAE-덱스트란(dextran) 또는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG)), 비로솜(virosome) 형질감염, 양이온성 지질을 이용한 형질감염, 리포펙션(lipofection)(예로써, 리포솜 형질감염, 양이온 리포솜 형질감염, 면역리포솜 형질감염), 비리포솜 지질 형질감염, 덴드리머(dendrimer) 형질감염, 열 쇼크 형질감염, 마그네토펙션(magnetofection), 임팔레펙션(impalefection), 소노포레이션(sonoporation) 또는 이들의 조합을 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0043] 이에, 상기 핵산 또는 유전자 형질감염용 키트는 상기 핵산 또는 유전자 형질감염 방법에 이용되는 형질감염 시약을 포함할 수 있다. 상기 형질감염 시약은 당 분야의 통상의 지식을 가진 기술자들에게 잘 알려져 있다.
- [0044] 일례로, 상기 형질감염 시약은 양이온성 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌이민(PEI), 양으로 하전된 아미노산의 중합체, 예를 들면, 폴리아민 및 폴리아르기닌, 양으로 하전된 덴드리머 및 분절된 덴드리머, 양이온성 β -사이클로덱스트린 함유 중합체(CD-중합체), DEAE-덱스트란 등을 포함하는 하나 이상의 화합물 및/또는 조성물을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 형질감염 시약은 양이온성 지질 및/또는 중성 지질을 포함

할 수 있다. 상기 지질의 예로는 N-[1-(2,3-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), 다이올레오일포스파티딜콜린(DOPE), 1,2-비스(올레오일옥시)-3-(4'-트라이메틸암모니오)프로판(DOTAP), 1,2-다이올레오일-3-(4'-트라이메틸암모니오)부타노일-sn-글리세롤(DOTB), 1,2-다이올레오일-3-석시닐-sn-글리세롤 콜린 에스터(DOSC), 콜레스테릴(4'-트라이메틸암모니오)부타노에이트(ChoTB), 세틸트라이메틸암모늄 브로마이드(CTAB), 1,2-다이올레오일-3-다이메틸-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드(DORI), 1,2-다이올레일옥시프로필-3-다이메틸-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드(DORIE), 1,2-다ими리스틸옥시프로필-3-다이메틸-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드(DMRIE), 0,0'-다이도데실-N-[p(2-트라이메틸암모니오에틸옥시)벤조일]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드, 하나 이상의 지질에 컨쥬게이트된 스퍼민(예를 들면, 5-카복시스퍼밀글리신 다이옥타데실아마이드(DOGS), N,N^I,N^{II},N^{III}-테트라메틸-N,N^I,N^{II},N^{III}-테트라팔미틸스퍼민(TM-TPS) 및 다이팔미토일파스페이트디에탄올아민 5-카복시스퍼밀아민(DPPES)), 리포폴리리신(DOPE에 컨쥬게이트된 폴리리신), TRIS(트리스(하이드록시메틸)아미노메탄, 트로메타민) 컨쥬게이트된 지방산(TFA) 및/또는 펩타이드, 예를 들면, 트릴리실-알라닐-TRIS 모노-, 다이- 및 트라이-팔미테이트, (3β-[N-(N',N'-다이메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DCchol), N-(α-트라이메틸암모니오아세틸)-다이도데실-D-글루타메이트 클로라이드(TMAG), 다이메틸다이옥타데실 암모늄 브로마이드(DDAB), 2,3-다이올레일옥시-N-[2(스퍼민-카복시아미도)에틸]-N,N-다이메틸-1-프로판아미니움 트라이플루오로아세테이트(DOSPA) 및 이의 조합을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0045] 당 분야의 통상의 지식을 가진 기술자들은 상기 언급된 지질의 특정한 조합이 세포 내로 핵산의 도입에 특히 적합하다는 것을 인식할 것이고, 예를 들면, DOSPA 및 DOPE의 3:1(w/w) 조합이 라이프 테크놀로지스 코포레이션(Life Technologies Corporation, 캘리포니아주의 칼스배드시에 소재)으로부터 상표명 리포펙타민(상표명)하에 이용 가능하고, DOTMA 및 DOPE의 1:1(w/w) 조합이 라이프 테크놀로지스 코포레이션(캘리포니아주의 칼스배드시에 소재)으로부터 상표명 리포펙틴(등록상표)하에 입수 가능하고, DMRIE 및 콜레스테롤의 1:1(M/M) 조합이 라이프 테크놀로지스 코포레이션(캘리포니아주의 칼스배드시에 소재)으로부터 상표명 DMRIE-C 시약하에 입수 가능하고, TM-TPS 및 DOPE의 1:1.5(M/M) 조합이 라이프 테크놀로지스 코포레이션(캘리포니아주의 칼스배드시에 소재)으로부터 상표명 셀펙틴(CELLFECTIN)(등록상표)하에 입수 가능하고, DDAB 및 DOPE의 1:2.5(w/w) 조합이 라이프 테크놀로지스 코포레이션(캘리포니아주의 칼스배드시에 소재)으로부터 상표명 리포펙테이스(LIPOFECTACE)(등록상표)하에 입수 가능하다.

[0046] 또한, 상기 형질감염 시약의 일 예로 지질 응집체, 예를 들면 리포솜을 포함할 수 있다. 특히, 하나 이상의 양이온성 지질을 포함하는 지질 응집체를 들 수 있고, 여기서 하나의 일반적으로 사용되는 양이온성 지질은 N-[1-(2,3-다이올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTMA)를 들 수 있다. 또한, 상기 리포솜으로 단독 또는 다이올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE)과의 1:1 혼합물로서 DOTMA를 포함하는 리포솜을 들 수 있다. DOTMA:DOPE의 1:1 혼합물은 라이프 테크놀로지스 코포레이션(캘리포니아주의 칼스배드시에 소재)으로부터 상표명 리포펙틴(상표명)하에 입수 가능하다.

[0047] 또한, 상기 형질감염 시약의 일 예로 라이프 테크놀로지스(Life technologies)로부터 입수가 가능한 리포펙타민 2000(상표명)(참조: 제WO 00/27795호로서 공개된 미국 국제 특허 제PCT/US99/26825호), 엑스피펙타민(EXPIFECTAMINE)(상표명), 리오펙타민(LIOFECTAMINE)(상표명) RNAiMAX, 리포펙타민(상표명) LTX, 올리고펙타민(OLIGOFECTAMINE)(상표명), 셀펙틴(상표명), 인비보펙타민(INVIVOFECTAMINE)(상표명), 인비보펙타민(상표명) 2.0을 포함할 수 있다.

[0048] 또한, 상기 형질감염 시약의 일 예로 자성 나노입자, 예를 들어, 산화철(Fe₂O₃, Fe₃O₄) 나노입자를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0049] 또한, 상기 형질감염 시약의 일 예로 탄소 나노섬유, 탄소 나노튜브 또는 나노와이어를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0051] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 처리하고 핵산 또는 유전자 형질감염하는 단계;를 포함하는, 세포독성 완화 막 투과 펩타이드를 이용한 핵산 또는 유전자 형질감염 방법을 제공한다.

[0052] 본 발명에서, 상기 세포독성 완화 막 투과 펩타이드는 0.00001 내지 50 μg으로 처리될 수 있고, 보다 구체적으로 0.0001 내지 10 μg으로 처리될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0053] 본 발명에서, 상기 핵산 또는 유전자 형질감염 방법은 칼슘 포스페이트-매개된 형질감염, 양이온 폴리머 형질감염, 비리솜(virosome) 형질감염, 리포펙션(lipofection), 비리솜 지질 형질감염, 덴드리머(dendrimer) 형질

감염, 열 쇼크 형질감염, 마그네토펙션(magnetofection), 임팔레펙션(impalefection) 및 소노포레이션(sonoporation) 또는 이들의 조합에 의하여 수행될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

이에 본 발명의 일 예에서는 하기의 단계를 거쳐 핵산 또는 유전자를 형질감염할 수 있다:

1) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 세포독성 완화 막 투과 펩타이드, 형질감염 시약, 및 핵산 또는 유전자를 혼합하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 혼합물을 세포에 처리하는 단계.

상기 단계 1)에서 형질감염 시약은 수행되는 핵산 또는 유전자 형질감염 방법에 따라 선택적으로 포함될 수 있다.

상기 단계 2)에서 물리적 힘, 예컨대, 전기 펄스, 자성, 열 또는 초음파가 가해질 수 있다.

한편, 상기 세포독성 완화 막 투과 펩타이드, 핵산 또는 유전자 형질감염 방법, 형질감염 시약, 및 핵산 또는 유전자에 대해서는 상기 펩타이드 및 이를 포함하는 핵산 또는 유전자 형질감염용 키트에 대한 설명과 동일한바, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용한다.

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 세포독성 완화 막 투과 펩타이드(cytotoxic mitigating cell-penetrating peptides, CMCP)의 합성

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 CMCP 펩타이드를 합성하였다. 펩타이드의 순도는 95 % 이상이 되도록 제작하였으며, 펩타이드 합성은 펩타이드 합성 전문 회사인 (주)펩트론에 의뢰하여 진행하였다. 서열번호 1의 아미노산 서열은 하기 표 1과 같다. 또한, CMCP 펩타이드는 TAT 부위(서열번호 2), 힌지(hinge) 부위(서열번호 3) 및 DNA 결합 부위(서열번호 4)로 구성된다.

표 1

명칭	아미노산 서열	서열번호
CMCP	YGRKKRRQRRRGGGGRRRRRRRR	1
TAT 부위	YGRKKRRQRRR	2
힌지(hinge) 부위	GGGG	3
DNA 결합 부위	RRRRRRRRR	4

<실시예 2> CMCP의 세포독성 완화 효과 확인

상기 <실시예 1>에서 합성된 CMCP의 세포독성 완화 효과를 확인하기 위하여 본 실험을 진행하였다. 구체적으로, 6-웰 플레이트(well plate)에 인간 지방유래 중간엽 줄기세포(adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, ASC)를 0.5 내지 1×10^5 세포 수로 분주하고 24시간 동안 배양배지(DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Media), 10 % 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), $1 \times$ 항생제(antibiotics))에서 배양하였다. 또한, 5 μ l의 리포펙타민 2000(리포펙션(lipofection) 시약, Invitrogen) 및 6 μ g의 pCMV3-GFP(GFP를 인코딩하는 발현벡터)를 혼합한 뒤 상온에서 15분간 반응시켜 GFP 형질감염 혼합물(transfection 혼합물)을 제조하고, 5 μ l의 리포펙타민 2000, 6 μ g의 pCMV3-GFP 및 60 μ g의 <실시예 1>에서 합성된 CMCP를 혼합한 다음 상온에서 15분간 반응시켜 GFP 형질감염 혼합물(transfection + CMCP 혼합물)을 제조하였다. 그다음, 상기 배양한 중간엽 줄기세포에 상기 제조한 transfection 혼합물 또는 transfection + CMCP 혼합물을 48시간 동안 처리하여 pCMV3-GFP를 형질감염하였다. 상기 형질감염한 세포를 혼합물 존재 하에 48시간 동안 배양한 후, MTT(Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich) 용액을 처리하고 2시간 후 570 nm에서 세포의 생존율을 측정하였다. 대조군으로 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)만 처리한 중간엽 줄기세포를 사용하였다.

그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이, 리포펙션 시 CMCP를 함께 사용한 경우 중간엽 줄기세포의 세포 생존율이 대조군과 유사한 것을 확인하였다. 상기 결과를 통해 본 발명의 CMCP가 기존의 핵산 또는 유전자 형질감염 방법에 의해 유발되는 세포 독성을 완화하는 것을 알 수 있다.

[0072] <실시예 3> CMCP의 세포막 투과 활성 개선 확인

[0073] 상기 <실시예 1>에서 합성된 CMCP의 세포막 투과 활성을 확인하기 위하여 본 실험을 진행하였다. 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 합성된 CMCP가 결합된 GFP 유전자(CMCP-GFP gene) 및 CMCP가 결합되지 않은 GFP 유전자를 합성 전문 회사인 바이오니아에 의뢰하여 제조하였고, 상기 CMCP-GFP 및 GFP를 각각 pQE30 Xa 벡터에 제조한 후, CMCP-GFP 또는 GFP 단백질을 발현하는 대장균으로부터 Ni-NTA 스핀 키트(Ni-NTA spin kit, Qiagen)를 이용하여 CMCP-GFP 및 GFP 단백질을 분리 및 정제하였다. 그다음, 상기 <실시예 2>에서 배양한 중간엽 줄기세포에 분리정제된 CMCP-GFP 단백질 또는 GFP 단백질을 처리하고 1시간 후 형광 현미경(fluorescence microscope)을 이용하여 세포의 형광 정도를 확인하였다.

[0074] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이, CMCP-GFP 단백질을 처리한 중간엽 줄기세포에서 GFP 단백질을 처리한 경우와는 다르게 높은 형광 강도를 나타내는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통해 핵산 또는 유전자 형질감염 시 본 발명의 CMCP가 핵산 또는 유전자와 결합하여 이들의 세포막 투과 활성을 높이는 것을 알 수 있다.

[0076] <실시예 4> CMCP의 유전자 형질감염 효율 개선 확인

[0077] <4-1> GFP 발광 증가 확인

[0078] 상기 <실시예 1>에서 합성된 CMCP의 유전자 형질감염 효율을 확인하기 위하여 본 실험을 진행하였다. 구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 transfection 혼합물 또는 transfection + CMCP 혼합물을 처리하고 형질감염한 중간엽 줄기세포에서 명시야 현미경(bright-field microscope) 또는 형광 현미경(fluorescence microscope)을 이용하여 세포의 형광 정도를 확인하고, 유동 세포 계측법으로 GFP의 형광을 정량화하여 측정하였다. 대조군으로 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)만 처리한 중간엽 줄기세포를 사용하였다.

[0079] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이, 리포펙션 시 CMCP를 함께 사용한 경우 중간엽 줄기세포의 형질감염 비율이 증가한 것을 형광 강도의 차이로 확인하였고(도 3A), 기존 5 % 정도이던 형질감염 효율이 CMCP를 함께 사용함으로써 약 35 %까지 약 7배 증가하는 것을 확인하였다(도 3B). 상기 결과를 통해 본 발명의 CMCP가 기존의 핵산 또는 유전자 형질감염 방법에 따른 형질감염 효율을 개선하는 것을 알 수 있다.

[0081] <4-2> GFP 단백질 발현 증가 확인

[0082] 상기 <실시예 1>에서 합성된 CMCP의 유전자 형질감염 효율을 확인하기 위하여 본 실험을 진행하였다. 구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 transfection 혼합물 또는 transfection + CMCP 혼합물을 처리하고 형질감염한 중간엽 줄기세포를 회수한 후, 웨스턴 블롯(western blot)을 이용하여 형질감염된 GFP의 단백질 발현을 분석하였다.

[0083] 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이, 리포펙션 시 CMCP를 함께 사용한 경우 GFP의 단백질 발현이 기존의 핵산 또는 유전자 형질감염 방법과 비교하여 약 15배 증가하는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통해 본 발명의 CMCP가 기존의 핵산 또는 유전자 형질감염 방법에 따른 형질감염 효율을 개선하는 것을 알 수 있다.

[0085] <실시예 5> 형질감염 방법 및 CMCP 용량에 의한 유전자 형질감염 효율 확인

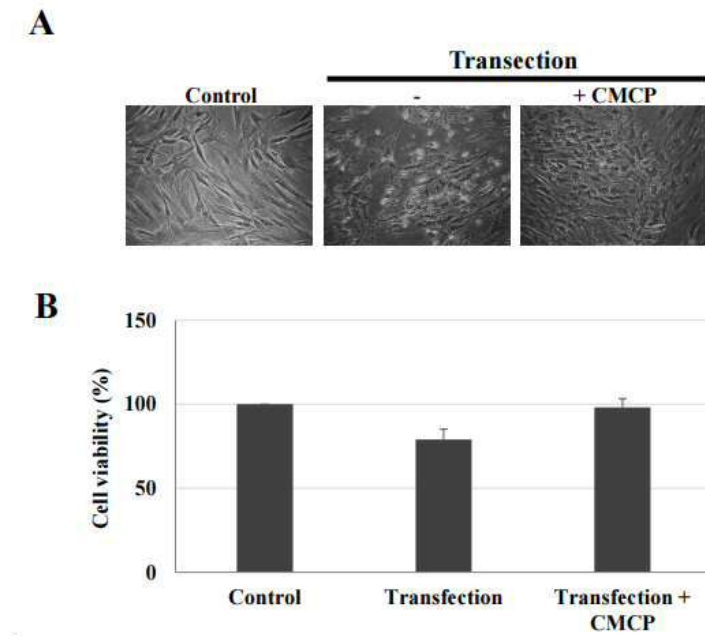
[0086] 상기 <실시예 1>에서 합성된 CMCP의 형질감염 방법 및 CMCP 용량에 의한 유전자 형질감염 효율을 확인하기 위하여 본 실험을 진행하였다. 구체적으로, 상기 <실시예 2>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 60 μ g의 CMCP 대신 CMCP 0, 1 및 10 μ g을 포함하는 GFP 형질감염 혼합물(lipofection + CMCP 혼합물)을 제조하고, 중간엽 줄기세포에 처리하여 리포펙션에 의한 pCMV3-GFP 형질감염을 하였다. 또한, 200 μ l의 무혈청 무항생제 DMEM(serum/antibiotics free DMEM) 배지에 6 μ l의 폴리매그 네오(PolyMag Neo)(매그네토펙션(magnetofection) 시약, OZ Biosciences), 6 μ g의 pCMV3-GFP 및 0, 1 및 10 μ g의 <실시예 1>에서 합성된 CMCP를 혼합하여 5회 피펫으로 잘 섞고 20분간 반응시켜 GFP 형질감염 혼합물(magnetofection + CMCP 혼합물)을 제조하였다. 그다음, 상기 배양한 중간엽 줄기세포에 상기 제조한 magnetofection + CMCP 혼합물을 30분간 마그네틱 플레이트(magnetic plate) 위에서 처리하여 매그네토펙션에 의한 pCMV3-GFP 형질감염을 하였다. 또한, 0, 1 및 10 μ g의 <실시예 1>에서 합성된 CMCP를 포함하고 상기 리포펙션 및 매그네토펙션을 병용하여 형질감염을 하였다. 상기 형질감염한 세포들을 혼합물 존재 하에 각각 48시간 동안 배양한 후, 명시야 현미경(bright-field microscope) 또는 형광 현미경(fluorescence microscope)을 이용하여 세포의 형광 정도를 확인하고, 유동 세포 계측법으로 GFP의 형광을 정량화하여 측정하였다. 대조군으로 pCMV3-GFP만을 이용하여 형질감염한 중간엽 줄기세포를 사용하였다.

[0087] 그 결과, 도 5에서 나타난 바와 같이, 대조군과 비교하여 CMCP 10 μ g을 함께 사용한 경우 모든 실험군의 형광 신호가 증가하는 것을 확인하였고, 특히 매그네토펙션 시 CMCP 10 μ g을 함께 사용한 경우 중간엽 줄기세포의

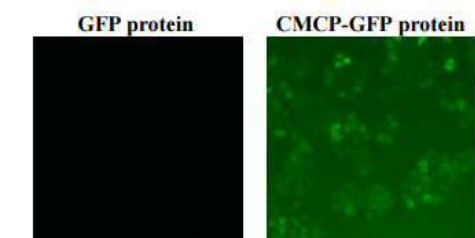
GFP 양성세포(GFP positive cells) 비율이 가장 높은 것을 확인하였으며, 이어 리포펙션 및 매그네토펙션 병용 시 CMCP 10 μ g을 함께 사용한 경우가 높은 것을 확인하였다.

도면

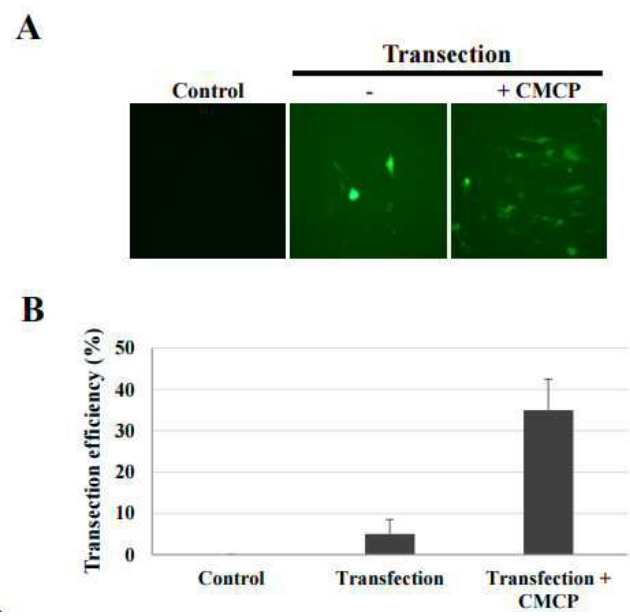
도면1



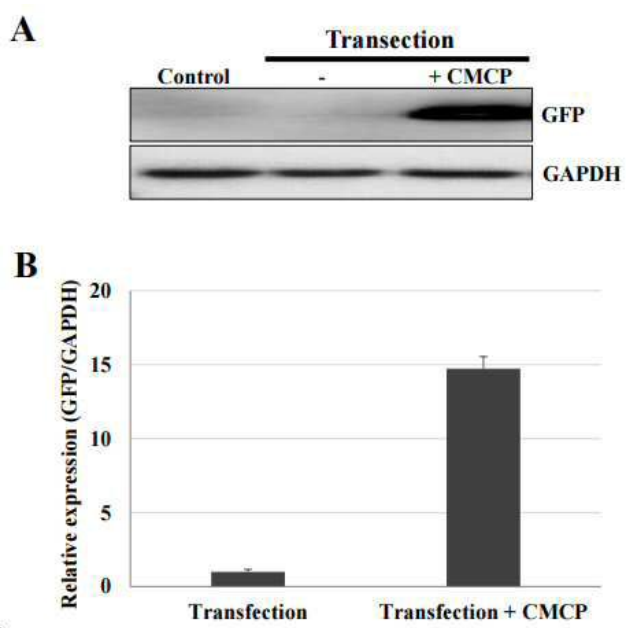
도면2



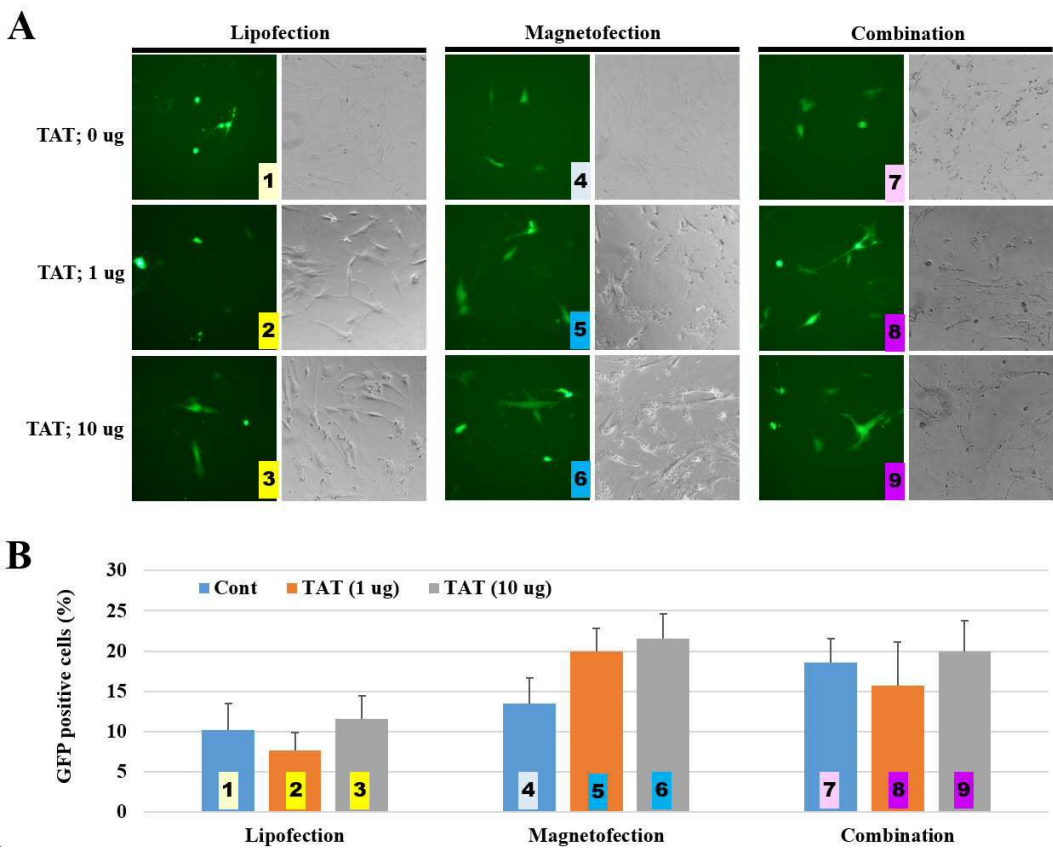
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> EOM, YOUNG WOO

<120> CYTOTOXIC MITIGATING MEMBRANE PERMEABLE PEPTIDES FOR IMPROVING
NUCLEIC ACID OR GENETRANSFECTION EFFICIENCY AND USE THEREOF

<130> PB2020-026

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Arg

1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

20

<210> 2

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Gly Gly Gly Gly
 1
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5