

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0017183
(43) 공개일자 2021년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/705 (2006.01) A61K 47/64 (2017.01)
A61K 47/66 (2017.01) A61K 49/00 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/705 (2013.01)
A61K 47/64 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2019-0096031

(22) 출원일자 2019년08월07일

심사청구일자 2019년08월07일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

한정민

인천광역시 연수구 송도과학로 85, 진리관 D 311
(송도동, 연세대학교 국제캠퍼스)

유희찬

인천광역시 연수구 송도과학로 85, 진리관 D
317-3 (송도동, 연세대학교 국제캠퍼스)

(74) 대리인

특허법인 하나

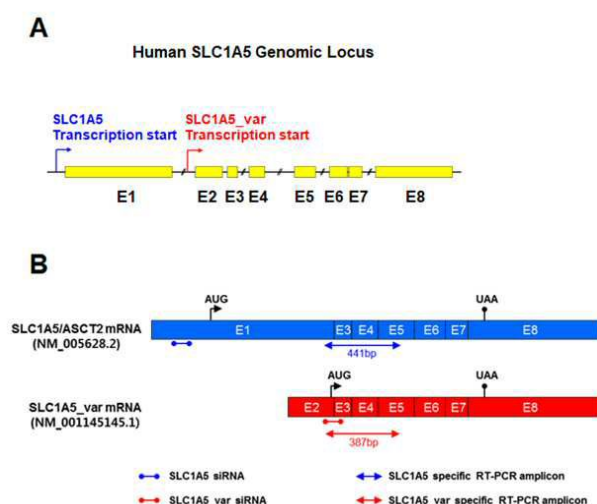
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 미토콘드리아 타겟팅용 폴리펩타이드 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 미토콘드리아 타겟팅용 폴리펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/66 (2017.08)

A61K 49/00 (2013.01)

C07K 7/08 (2013.01)

G01N 33/6872 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345279574
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	BK21플러스사업(R&D)
연구과제명	암대사에서 ASCT2 variants 역할 규명 및 항암약물로서 그에 대한 길항제 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345295623
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	연세대학교 종합약학연구소
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열에서 27 내지 46번째 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드; 또는 상기 폴리펩타이드와 서열 상동성이 90% 이상인 변이체;를 포함하는 것인, 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항의 폴리펩타이드는 미토콘드리아를 타겟팅하기 위한 것인, 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 폴리펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 변이체는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 폴리펩타이드.

청구항 5

제1항의 폴리펩타이드를 포함하는 미토콘드리아 검출용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 발색효소, 방사성동원소, 크로모포어(chromophore), 발광물질, 형광물질(fluorescer), 상자성 입자(superparamagnetic particles) 및 초상자성입자(ultrasuper paramagnetic particles)로 이루어진 군에서 선택되는 하나로 표지된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

- (a) 제1항의 폴리펩타이드를 시료와 혼합하는 단계;
- (b) 미결합되거나 비특이적으로 결합된 상기 폴리펩타이드를 제거하는 단계; 및
- (c) 상기 폴리펩타이드의 결합 여부 및 위치를 확인하는 단계를 포함하는 미토콘드리아의 검출 방법.

청구항 8

제1항의 폴리펩타이드를 포함하는 미토콘드리아 영상화용 조성물.

청구항 9

제1항의 폴리펩타이드를 포함하는 미토콘드리아 특이적 약물 전달용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 약물과 결합된 상태인 것인, 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 약물은 약리학적으로 활성을 나타내는 화합물, 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것인, 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 약물은 미토콘드리아 기능이상과 관련된 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 것인, 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 미토콘드리아 기능이상과 관련된 질환은 암, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤병, 근육 이영양증, 근긴장성 이영양증, 만성 피로 증후군, 프리드리히 운동실소증, 간질, 말초신경병, 시신경병, 자율 신경병, 신경유래의 장 기능부전, 감각신경의 난청, 신경유래의 방광 기능부전, 편두통, 운동실소증, 신세뇨관성 산증, 확장성 심근증, 지방간염, 간부전, 유산성혈증, 미토콘드리아 뇌근증(mitochondrial encephalopathy with lactic acidemia and strokelike episodes; MELAS), 레버 시신경위축증(Leber's hereditary optic neuropathy: LHON), MERRF 증후군(Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers syndrome), MNGIE 증후군(Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy syndrome), NARP 증후군(neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa), 바쓰 증후군(Barth Syndrome), 리증후군 (Leigh Syndrome), 칸스-사이레스 증후군(Kearns-Sayre syndrome), 퇴행성 뇌질환, 다발성 경화증 증후군(Multiple Sclerosis-like Syndrome), 모성 유전 심근증(Maternally Inherited CardioMyopathy), 진행성 외안근 마비(Progressive External Ophthalmoplegia), 피어슨 골수 증후군(Pearson Marrow syndrome), 아미노글루코시드 연관 난청(Aminoglycoside-associated deafness), 난청을 동반하는 당뇨(Diabetes with deafness), Luft 병(Luft disease), 알퍼스병(Alpers Disease), 중쇄 아실코에이 탈수효소 결핍증 (medium chain acyl-CoA dehydrogenase [MCAD] deficiency), 경쇄아실 코에이 탈수효소 결핍증(Segmental colitis associated with diverticular [SCAD] disease), 단쇄 수산화 코에이 탈수효소 결핍증(Short chain 3- hydroxyacyl CoA dehydrogenase[Schad] deficiency), 초장쇄 아실코에이 탈수효소 결핍증(Very long chain acyl-CoA dehydrogenase [VLCAD] deficiency), 장쇄 수산화 아실코에이 탈수효소 결핍증(long chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase [LCHAD] deficiency), 글루타르산뇨증 II형(Glutaric aciduria II) 및 치사성 유아 심근증(Lethal infantile cardiomyopathy)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것인, 조성물.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 약물은 항산화제인 아세틸시스테인 (N-Acetylcysteine), 글루타치온 (glutathione), SOD-유사(SOD-mimicking) 펩타이드, 제토-실러-펩타이드(Szeto-Schiller-peptides) 및 비타민 E (Vitamine E)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것인, 조성물.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 약물은 항암제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 항암제는 겐시타빈(gemcitabine), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 빈크리스틴(vincristine), 다우노루비신(daunorubicin), 빈블라스틴(vinblastine), 액티노마이신-D(actinomycin-D), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 비산트렌(bisantrene), 호모해링토닌(homoharringtonine), 글리벡(Gleevec; STI-571), 시스플라틴(cisplatin), 5-플로오우라실(5-fluouracil), 아드리아마이신(adriamycin), 메토트렉세이트(methotrexate), 부설판(busulfan), 클로람부실(chlorambucil), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란(melphalan), 니트로젠 무스타드(nitrogen mustard), 니트로소우레아

(nitrosourea), 스트렙토키나제(streptokinase), 유로키나제(urokinase), 알테플라제(alteplase), 안지오텐신(angiotensin) II 억제제, 알도스테론(aldosterone) 수용체 억제제, 에리트로포이에틴(erythropoietin), NMDA(N-methyl-d-aspartate) 수용체 억제제, 로바스타틴(Lovastatin), 라파마이신(Rapamycin), 셀레브렉스(Celebrex), 티클로핀(Ticlopin) 마리마스타트(Marimastat) 및 트로케이드(Trocade) 이메손(Imexon), 메나디온(menadione), 모텍사핀 가돌리늄(motexafin gadolinium), 라파콘(β -lapachone), 망가포디피르(mangafodipir), 파테놀라이드(parthenolide), 광활성화 물질(photodynamic substances)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것인, 조성물.

청구항 17

제1항의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 18

제17항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 19

제18항의 재조합 벡터로 형질전환된 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아 타겟팅용 폴리펩타이드 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미토콘드리아는 세포 내에 물질대사(energetic metabolism), 특정 물질(예를 들면, 지방산 등)의 대사 등, 많은 결정적인 세포내 과정(intracellular processes)에서 핵심적인 역할을 한다. 특히, 미토콘드리아는 자유 라디칼(free radicals; 이하, 'FR'이라 한다) 및 활성 산소종(reactive oxygen species; 이하 'ROS'이라 한다)의 형성 및 이용에 직접적으로 관련되어 있다. 이러한 점 때문에 살아있는 세포 내에서 많은 과정에 영향을 미칠 수 있는 극단적인 반응 부분(reactive moieties)과 관련하여, 미토콘드리아가 세포 예정사멸(programmed cell death)의 과정에서 핵심 역할을 하는 것이 보고되고 있다.

[0003] 이러한 미토콘드리아는 세포내 에너지 대사의 중추이므로 미토콘드리아의 기능 이상은 다양한 질병을 유발한다. 미토콘드리아의 기능 이상에 의해 발생하는 질병으로는 파킨슨병, 헌팅턴병과 같이 노화에 따라 흔하게 발생할 수 있는 발병률이 높은 질병이 있으며, 바쓰 증후군(Barth Syndrome), 리증후군(Leigh Syndrome), 멜라스 증후군(MELAS Syndrome)과 같은 발병률이 낮은 희귀 질병 등이 있다.

[0004] 또한 최근의 연구결과에 따르면 미토콘드리아의 이상은 대사성증후군인 제2형 당뇨병 발병원인일 가능성이 있음이 확인되었다(비특허문헌 1). 미토콘드리아의 기능 이상에 의해 발생하는 이러한 질환들은 세포의 에너지공급 체계에 이상이 발생하는 것으로 대부분 근 질환과 뇌질환을 동반한다.

[0005] 따라서, 미토콘드리아의 기능회복을 목적으로 미토콘드리아를 타겟으로 하는 약물 전달체 및 약물에 대한 연구가 활발히 진행중이다.

[0006] 이와 같은 접근은, 목표 타겟에 정확하게 원하는 물질을 반복 축적함으로써 물질의 효과적인 농도를 얻을 수 있는 바, 그 적용 효율을 증가시키고, 전체적인 투약(overall dosage)을 줄일 수 있어 부작용의 가능성 및 강도를 줄일 수 있다는 강점이 있다.

[0007] 그러나, 현재 매우 한정된 수의 미토콘드리아-표적의 생물학적인 활성 물질만이 알려져 있어, 여전히 효과적인 미토콘드리아 타겟팅 수단의 개발이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 미국등록특허 제7,109,189호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 미토콘드리아를 타겟팅하는 폴리펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리펩타이드를 포함하는 미토콘드리아 검출용 조성물 및 검출방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 미토콘드리아 영상화용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리펩타이드를 포함하는 미토콘드리아 특이적 약물 전달용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열에서 27 내지 46 번째 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드; 또는 상기 폴리펩타이드와 서열 상동성이 90% 이상인 변이체;를 포함하는 것인, 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0015] 구체적으로, 상기 폴리펩타이드는 미토콘드리아 타겟팅용일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 발명자들은 SLC1A5(solute carrier family 1 member 5) 유전자로부터 유래된 특정 전사 변이체(NCBI genebank mRNA 서열 NM_001145145.1; 단백질 서열 NP_001138617.1/본 명세서에서 SLC1A5_var로 표기)가 단백질 번역 후 미토콘드리아로 타겟팅(표적화)됨을 최초로 규명하였다.
- [0017] 특히, SLC1A5의 전사물 변이체 단백질로부터 미토콘드리아 타겟팅 효과가 현저한 특정 폴리펩타이드를 규명하고 분리하는데 성공하였으며, 본 발명에서 “SLC1A5의 전사물 변이체”는 미토콘드리아 내 글루타민 운반체의 활성화에 필수적인 미토콘드리아 타겟팅 서열 및 글루타민 운반체 활성을 갖는 단백질을 의미하는 것일 수 있다.
- [0018] 상기 폴리펩타이드는 서열번호 3, 5 또는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열 중 하나 이상 선택된 것을 포함하는 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명에서 용어 “펩타이드(peptide)”는 “단백질” 또는 “폴리펩타이드(polypeptide)”와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.
- [0020] 본 발명의 폴리펩타이드는 천연으로부터 유래될 수도 있으며, 공지의 펩타이드 합성 방법(유전공학적 방법, 화학적 합성)을 이용하여 합성될 수 있다. 유전공학적 방법에 의한 작제는, 예를 들어, 통상적인 방법에 따라 상기 펩타이드 또는 이의 기능적 동등물을 암호화하는 핵산(예를 들어, 서열번호 4, 6 또는 서열번호 9의 폴리뉴클레오티드를 작제한다. 상기 핵산은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 작제할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(Biosearch 또는 Applied Biosystems 사에서 판매하는 것)를 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 작제된 핵산은 이에 작동가능하게 연결되어(operatively linked) 핵산의 발현을 조절하는 하나 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)(예: 프로모터, 인핸서 등)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 세포를 형질전환시킨다. 생성된 형질전환체를 상기 핵산이 발현되기에 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 핵산에 의해 발현된, 실질적으로 순수한 펩타이드를 회수한다. 상기 회수는 당업계에 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 “실질적으로 순수한 펩타이드(substantially pure peptide)”라 함은 본 발명에 따른 펩타이드가 세포로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다. 본 발명의 펩타이드 합성을 위한 유전공학적 방법은 다음의 문헌을 참고할 수 있다: Maniatis et al., Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, 1982; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000)

Editions; Gene Expression Technology, Method in Enzymology, Genetics and Molecular Biology, Method in Enzymology, Guthrie & Fink(eds.), Academic Press, San Diego, Calif, 1991; 및 Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:12073-12080, 1990.

[0021] 또한, 본 발명의 폴리펩타이드는 당업계에서 공지된 화학적 합성(Creighton, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., NY, 1983)에 의해 쉽게 제조될 수 있다. 대표적인 방법으로서 이들로 한정되는 것은 아니지만 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법이 포함된다 (Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., CRC Press, Boca Raton Florida, 1997; A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Eds., IRL Press, Oxford, England, 1989).

[0022] 본 발명의 폴리펩타이드는 전술한 본 발명 폴리펩타이드의 기능적 동등물 및 그들의 염을 포함한다. 일 예로 상기 "기능적 동등물"이란 전술한 본 발명의 폴리펩타이드와 적어도 80% 이상의, 구체적으로는 90%, 더욱 구체적으로는 95%이상의 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 것으로 예를 들면, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 것을 포함하며, 본 발명의 폴리펩타이드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩타이드를 말한다. 상기에서 "실질적으로 동질의 생리활성"이란 미토콘드리아에 타겟팅하는 활성(즉 미토콘드리아로 이동, 분포 및/또는 결합하는 활성)을 말한다.

[0023] 본 발명에서 기능적 동등물은 전술한 본 발명 폴리펩타이드의 아미노산 서열 중 일부가 부가, 치환 또는 결실의 결과 생성된 것일 수 있다. 상기에서 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황 함유 아미노산(Cys, Met). 또한 상기 기능적 동등물에는, 본 발명 폴리펩타이드의 아미노산 서열상에서 아미노산의 일부가 결실된 변형체도 포함된다. 상기 아미노산의 결실 또는 치환은 바람직하게는 본 발명에서 제공하는 폴리펩타이드의 생리활성(미토콘드리아 표적화)에 직접적으로 관련되지 않은 영역에 위치해 있다. 아울러 상기 본 발명 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 양 말단 또는 서열 내에 몇몇의 아미노산이 부가된 변형체도 포함된다.

[0024] 본 발명의 '기능적 동등물'의 범위에는 본 발명 폴리펩타이드의 기본골격과 미토콘드리아에 타겟팅 활성을 유지하면서 펩타이드의 일부 화학 구조가 변형된 유도체가 포함된다. 예를 들어 펩타이드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경이 이에 포함된다.

[0025] 경우에 따라서, 본 발명의 펩타이드는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

[0026] 본 발명에서 사용된 아미노산의 일문자(삼문자)는 생화학 분야에서의 표준 약어 규정에 따라 다음의 아미노산을 의미한다:

[0027] A(Ala): 알라닌; C(Cys): 시스테인; D(Asp): 아스파르트산; E(Glu): 글루탐산; F(Phe): 페닐알라닌; G(Gly): 글라이신; H(His): 히스티딘; I(Ile): 이소류신; K(Lys): 라이신; L(Leu): 류신; M(Met): 메티오닌; N(Asn): 아스파라긴; O(Pro): 피롤라이신; P(Pro): 프롤린; Q(Gln): 글루타민; R(Arg): 아르기닌; S(Ser): 세린; T(Thr): 트레오닌; U(Sec): 셀레노시스테인, V(Val): 발린; W(Trp): 트립토판; Y(Tyr): 티로신.

[0028] 또한, 본 발명의 명세서에 표기되는 '(아미노산일문자)(아미노산위치)(아미노산일문자)'는 천연형(야생형) 폴리펩타이드의 해당 아미노산 위치에서 선행 표기된 아미노산이 후행 표기된 아미노산으로 치환된다는 것을 의미한다. 예를 들어, R44A는 아미노산 서열 44번째에 위치한 아르기닌이 알라닌으로 치환된 점돌연변이를 나타낸다.

[0029] 본 발명의 다른 측면은, 상기 폴리펩타이드를 포함하는 미토콘드리아 검출용 조성물을 제공한다.

[0030] 상기 폴리펩타이드의 미토콘드리아 내부로 이동, 분포 또는/및 결합 여부 확인, 검출 및 정량을 용이하게 하기 위하여, 본 발명의 폴리펩타이드는 표지된 상태로 제공될 수 있다.

[0031] 구체적으로, 상기 검출가능한 표지는 발색효소(예: 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제), 방사성 동위원소(예: ¹⁸F, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ³²P, ³⁵S, ⁶⁷Ga), 크로모포어(chromophore), 발광물질 또는 형광물질(예: FITC, RITC, 형광 단백질

질(GFP(Green Fluorescent Protein); EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein), RFP(Red Fluorescent Protein); DsRed(Discosoma sp. red fluorescent protein); CFP(Cyan Fluorescent Protein), CGFP(Cyan Green Fluorescent Protein), YFP(Yellow Fluorescent Protein), Cy3, Cy5 및 Cy7.5), 자기공명 영상물질(예: Gadolinium(Gd, 가도리늄), 상자성입자(super paramagnetic particles) 또는 초상자성입자(ultrasuper paramagnetic particles))일 수 있다.

- [0032] 표지에 따른 검출 방법은 당업계에 널리 알려져 있으나, 예를 들어 다음과 같은 방법에 의해 수행될 수 있다. 만약 검출가능한 표지로 형광물질을 이용하는 경우에는 면역형광염색법을 이용할 수 있다. 예컨대, 형광물질로 표지된 본 발명의 펩타이드를 시료와 반응시키고 미결합 또는 비특이적인 결합 산물을 제거한 다음 형광현미경 하에서 펩타이드에 의한 형광을 관찰할 수 있다. 또한 검출가능한 표지로 효소를 이용하는 경우에는 효소반응을 통한 기질의 발색반응에 의해 흡광도를 측정하고, 방사선 물질인 경우에는 방사선 방출량을 측정함으로써 수행할 수 있다. 아울러, 검출된 결과는 검출표지에 따른 공지된 영상화 방법에 따라 영상화 될 수도 있다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 측면은, (a) 상기 폴리펩타이드를 시료와 혼합하는 단계; (b) 미결합되거나 비특이적으로 결합된 상기 폴리펩타이드를 제거하는 단계; 및 (c) 상기 폴리펩타이드의 결합 여부 및 위치를 확인하는 단계를 포함하는 미토콘드리아의 검출 방법을 제공한다.
- [0034] 상기 (c) 단계에서 본 발명의 폴리펩타이드의 미토콘드리아 내부로 이동, 분포 또는/및 결합 여부 및 위치를 확인하는 것은, 전술한 미토콘드리아 검출용 조성물에서 설명한 바를 참조로 하여 당업계에 공지된 방법에 따라서 폴리펩타이드를 검출하는 것에 의해 수행될 수 있다.
- [0035] 상기 “시료”는 생물학적 시료를 의미할 수 있으며, 일 예로 세포 시료, 생검 표본, 조직 배양과 같은 고형 조직 시료, 혈액 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 시료는 검출에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 폴리펩타이드를 포함하는 미토콘드리아 영상화용 조성물을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 폴리펩타이드는 미토콘드리아로 이동 및 분포하므로, 임의의 표지수단(영상화용 수단)과 함께 세포 내 미토콘드리아를 *in vitro* 또는 *in vivo* 상에서 영상화 할 수 있다. 이에 제한되지 않으나, 일 예로 상기 영상화에 따라 미토콘드리아의 형태학적 이상 및 이와 관련된 질환에 대한 진단 또는 모니터링이 가능하다.
- [0038] 상기 미토콘드리아 관련 질환의 영상화 및 진단은, 이에 한정되지는 않으나, 질환의 초진 목적, 진행 경과, 치료에 대한 치료 경과, 치료제에 대한 반응 모니터링 등을 포괄하여 사용할 수 있다. 상기 본 발명의 펩타이드는 미토콘드리아 내 이동, 분포 또는/및 결합 여부의 확인, 검출, 정량 등을 용이하게 하기 위하여, 표지된 상태로 제공될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 폴리펩타이드를 포함하는 미토콘드리아 특이적 약물 전달용 조성물을 제공한다.
- [0040] 구체적으로, 상기 펩타이드는 약물과 결합된 상태일 수 있으며, 상기 약물은 약리학적으로 활성을 나타내는 화합물, 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 상기 약물(또는 약물 제제)과 본 발명의 폴리펩타이드의 연결은 당업계에 공지된 방법, 예컨대, 공유 결합, 가교 등을 통해 수행될 수 있다. 이를 위해 본 발명의 폴리펩타이드는 필요하다면 그 활성이 소실되지 않는 범위에서 화학적으로 수식(modification)될 수 있다. 상기 연결은 약물과 본발명 폴리펩타이드의 직접 결합(예를 들어, 공유 결합 등에 의해) 뿐만 아니라, 링커등을 사이에 포함하는 간접적 결합도 모두 포함하는 의미이다. 본 발명의 조성물에 포함되는 본 발명의 펩타이드의 양은 결합되는 상기 치료제의 종류 및 양에 따라 달라질 수 있다.
- [0042] 구체적으로, 상기 약물은 미토콘드리아 기능 이상과 관련된 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 약물일 수 있다. 상기 미토콘드리아 기능 이상과 관련된 질환은 정상적인 세포에서 나타나는 미토콘드리아의 생물학적 활성이 감소 또는 증가된 상태로서 이에 제한되지 않으나 예를 들어, 미토콘드리아의 DNA의 돌연변이, 결손, 또는 재배열에 유래되는 질환; 미토콘드리아의 호흡 사슬의 핵-암호화 결합 단백질 성분에 의해 유래되는 질환; 노화 관련 질환; 세포독성 암 화학요법제의 투여에 의해 유래되는 질환; 미토콘드리아 복합체 I, II, III, IV 또는 V의 활성 결함에 의해 유래되는 질환; 선천성 미토콘드리아 질환; 신경퇴행성 질환; 신경근육 퇴행성 질환; 및 암 질환 등일 수 있다.

- [0043] 추가의 예로서, 상기 질환은 미토콘드리아 효소 활성의 감소, 전자전달계 (electron transport chain) 활성 감소, 막전위 감소, 활성산소종(reactive oxygen species) 생산의 증가, 미토콘드리아 단편화(mitochondria fragmentaion), 칼슘 조절장애, 및 미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 돌연변이로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 미토콘드리아 기능 장애에 기인하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 상기와 같은 질환의 구체적인 예를 들면, 암, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤병, 근육 이영양증, 근긴장성 이영양증, 만성 피로 증후군, 프리드리히 운동실소증, 간질, 말초신경병, 시신경병, 자율 신경병, 신경유래의 장 기능부전, 감각신경의 난청, 신경유래의 방광 기능부전, 편두통, 운동실소증, 신세뇨관성 산증, 확장성 심근증, 지방간염, 간부전, 유산혈증, 미토콘드리아 뇌근증(mitochondrial encephalopathy with lactic acidemia and strokelike episodes; MELAS), 레버 시신경위축증(Leber's hereditary optic neuropathy: LHON), MERRF 증후군(Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers syndrome), MNGIE 증후군(Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy syndrome), NARP 증후군(neuropathy, ataxia, and retinitis pigmantosa), 바쓰 증후군(Barth Syndrome), 리증후군 (Leigh Syndrome), 칸스-사이레스 증후군(Kearns-Sayre syndrome), 퇴행성 뇌질환, 다발성 경화증 증후군(Multiple Sclerosis-like Syndrome), 모성 유전 심근증(Maternally Inherited CardioMyopathy), 진행성 외안근 마비(Progressive External Ophthalmoplegia), 피어슨 골수 증후군(Pearson Marrow syndrome), 아미노글루코시드 연관 난청(Aminoglycoside-associated deafness), 난청을 동반하는 당뇨(Diabetes with deafness), Luft 병(Luft disease), 알퍼스병(Alpers Disease), 중쇄 아실코에이 탈수효소 결핍증 (medium chain acyl-CoA dehydrogenase [MCAD] deficiency), 경쇄아실 코에이 탈수효소 결핍증(Segmental colitis associated with diverticular [SCAD] disease), 단쇄 수산화 코에이 탈수효소 결핍증(Short chain 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase [SCHAD] deficiency), 초장쇄 아실코에이 탈수효소 결핍증(Very long chain acyl-CoA dehydrogenase [VLCAD] deficiency), 장쇄 수산화 아실코에이 탈수효소 결핍증(long chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase [LCHAD] deficiency), 글루타르산뇨증 II형(Glutaric aciduria II) 및 치사성 유아 심근증(Lethal infantile cardiomyopathy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 약물은 미토콘드리아 기능 이상과 관련된 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 약물을 본 발명의 폴리펩타이드와 함께 제공하르로서, 상기 약물이 더욱 효율적으로 작용가능하다. 따라서 본 발명의 상기 조성물은 미토콘드리아의 기능 이상과 관련된 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0045] 구체적으로, 상기 약물은 항산화제일 수 있다. 일 예로, 항산화제는 아세틸시스테인(N-Acetylcysteine), 글루타치온(glutathione), SOD-유사(SOD-mimicking) 펩타이드, 제토-실러-펩타이드(Szeto-Schiller-peptides), 비타민 E(Vitamine E)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 구체적으로, 상기 약물은 항암제일 수 있다. 일 예로, 상기 항암제는 겐시타빈(gemcitabine), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 빈크리스틴(vincristine), 다우노루비신(daunorubicin), 빈블라스틴(vinblastine), 액티노마이신-D(actinomycin-D), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 비산트렌(bisantrene), 호모해링토닌(homoharringtonine), 글리벡(Gleevec; STI-571), 시스플라틴(cisplatin), 5-플로오우라실(5-fluouracil), 아드리아마이신(adriamycin), 메토틱렉세이트(methotrexate), 부설판(busulfan), 클로람부실(chlorambucil), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란(melphalan), 니트로젠 무스타드(nitrogen mustard), 니트로소우레아(nitrosourea), 스트렙토키나제(streptokinase), 유로키나제(urokinase), 알테플라제(alteplase), 안지오텐신(angiotensin) II 억제제, 알도스테론(aldosterone) 수용체 억제제, 에리트로포이에틴(erythropoietin), NMDA (N-methyl-d-aspartate) 수용체 억제제, 로바스타틴(Lovastatin), 라파마이신(Rapamycin), 셀레브렉스(Celebrex), 티클로핀(Ticlopin) 마리마스타트(Marimastat) 및 트로케이드(Trocade), 이메손 (Imexon), 메나디온 (menadione), 모텍사핀 가돌리니움 (motexafin gadolinium), 라파콘 (β -lapachone), 망가포디피르 (mangafodipir), 파테놀라이드 (parthenolide), 광활성화 물질 (photodynamic substances)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 약물 전달용 조성물은 투여 경로에 따라 적합한 담체와 함께 제형화될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다.
- [0048] 상기 약물 전달용 조성물의 유효량은 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 '유효량'이란 환자에게 투여하였을 때, 진단 또는 치료 효과의 추적을 가능하게 하는 물질량(amount of substance)을 말한다. 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 대상 질환 및 이의 중증정도, 연령, 성별, 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다.

- [0049] 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 통상적으로 성인을 기준으로 할 때 1회 투여시 1 mg 내지 1000 mg의 유효용량으로 하루에 수 차례 반복 투여될 수 있다.
- [0050] 상기 본 발명에 따른 조성물의 투여 경로로는 이에 한정되지는 않으나 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다. 비경구적 투여 경로로는 예를 들면, 경피, 비강, 복강, 근육, 피하 또는 정맥 등의 여러 경로가 포함될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다. 상기 담체로는 모든 종류의 용매, 분산매질, 수중유 또는 유중수 에멀전, 수성 조성물, 리포솜, 마이크로비드 및 마이크로솜이 포함된다.
- [0052] 본 발명의 조성물을 비경구적으로 투여하는 경우 본 발명의 조성물은 적합한 비경구용 담체와 함께 주사제, 경피 투여제 및 비강 흡입제의 형태로 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다. 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야하며 박테리아, 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0053] 또한 본 발명에 따른 조성물은 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 카보하이트레이트(예를 들어, 글루코스, 만노즈, 슈크로즈 또는 텍스트란), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 및/또는 보존제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 측면은, 본원 발명의 미토콘드리아 표적용 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0055] 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화할 수 있는 한 폴리뉴클레오티드의 염기 조합이 특별히 제한되지 않는다. 상기 폴리뉴클레오티드는 DNA, cDNA 및 RNA 서열을 모두 포함하여 단쇄 또는 이중쇄의 형태의 핵산분자로서 제공될 수 있다.
- [0056] 구체적으로, 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 염기서열을 포함할 수 있고, 서열번호 5로 표시되는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6의 염기서열을 포함할 수 있으며, 서열번호 8로 표시되는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 9의 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0058] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 구체적으로, 본 발명의 벡터는 재조합 바이러스 벡터 일 수 있다. 본 발명의 재조합 바이러스 벡터는 유전자 치료제 분야에서 유전자를 전달하기 위하여 통상적으로 사용되는 바이러스 벡터라면 제한 없이 사용될 수 있다. 상기 재조합 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노연관바이러스(AAV) 벡터, 레트로바이러스 벡터, 허피스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 백시니아바이러스 벡터 및 포क्स바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0060] 본 발명에서의 재조합 바이러스 벡터는 바람직하게는 아데노바이러스 벡터일 수 있다. 아데노바이러스는 바이러스 중에서 중간 정도의 유전체(genome)의 크기, 유전자 조작과 제조의 편의성, 높은 타이트로 인한 생산과 분리의 용이성, 광범위한 표적 세포(target)와 높은 감염 효율 등으로 유전자 치료 분야에서 치료용 유전자를 전달하기 위한 운반체로 널리 이용되고 있다. 유전자 치료용으로는 바이러스의 자가 복제와 생산 능력이 결여된 아데노바이러스가 많이 이용되고 있다.
- [0061] 본 발명의 벡터는 통상의 클로닝 벡터 또는 발현벡터일 수 있으며, 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터,

개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인헨서(촉진유전자) 같은 발현 조절 서열 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 폴리뉴클레오타이드 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. "작동 가능하게 연결(operably linked)"된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열일 수 있다. "발현 조절 서열(expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 또한 상기 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 벡터인 경우 복제기원을 포함한다.

- [0062] 상기 본 발명에서 제공하는 벡터는 프로모터, 전술한 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 프로모터, 전술한 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 작동 가능하게 연결된 재조합 벡터일 수 있다.
- [0063] 구체적으로, 본 발명에서 상기 "목적 단백질"이란 당업자가 본 발명을 실행함에 있어서 미토콘드리아 내로 이동, 전달, 분포 또는/및 결합을 목적으로 하는 폴리펩타이드 분자를 의미하는 것으로, 이에 제한되지 않으나 일 예로 표지 단백질; 및 질환 치료 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0064] 일 실시예로서, 상기 목적 단백질이 질환 치료 단백질인 경우, 상기 재조합 벡터는 추가적으로 표지 수단(표지 단백질을 코딩하는 유전자)를 더욱 포함하여 제공될 수 있으며, 이 또한 작동 가능하게 연결된다. 이러한 경우에 있어서, 상기 재조합 벡터는 프로모터, 본 발명 폴리펩타이드(대표적 일 예로, 서열번호 3, 5 또는 서열번호 8)의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 목적 단백질을 코딩하는 유전자 및 표지 단백질(예를들어, 형광 단백질) 유전자가 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이러한 경우, 표지 단백질의 발현으로 인해 목적 단백질(특히, 치료단백질)의 미토콘드리아로의 이동/분포 여부를 확인할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 다른 일 측면은 상기 재조합 벡터를 세포 내에 도입하는 단계를 포함하는 목적 단백질을 미토콘드리아로 이동 또는/및 분포시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은, 일 예로 하기 단계를 포함하여 수행되는 것일 수 있다:
- [0066] (i) 프로모터, 본 발명 폴리펩타이드(대표적 일 예로, 서열번호 3 또는 서열번호 5)의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 목적 단백질을 코딩하는 유전자 및 표지 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는(이들이 작동가능하게 연결된) 재조합 벡터(특히, hybrid plasmid)를 준비(작제)하는 단계;
- [0067] (ii) 상기 재조합 벡터를 세포 내에 도입하여 형질전환한 후 유전자가 발현되도록 하는 단계; 및
- [0068] (iii) 상기 형질전환된 세포 내에서 발현되는 목적 단백질의 이동 및 분포를 표지 단백질 검출(또는 영상화)을 통해 확인하는 단계를 포함하는, 세포 내에서 목적 단백질의 미토콘드리아로의 이동과 공간적 분포를 확인하는 방법을 제공한다.
- [0069] 상기 방법에서 세포는, 미토콘드리아를 보유하는 세포라면 그 종류가 특별히 제한되지 않는 것으로, 바람직하게 진핵세포, 특히 인간 또는 포유동물 세포일 수 있다. 바람직하게 상기 세포는 개체로부터 단리된 것일 수 있다.
- [0070] 상기 방법 중 재조합 벡터(특히 hybrid plasmid)의 세포 내 도입은, 재조합 벡터를 이용하여 세포를 형질전환시키는 것으로서 이해될 수 있으며, 상기 형질전환 방법은 당 분야의 통상의 지식을 가진 기술자들에게 잘 알려진 방법을 이용할 수 있다. 예를 들면, 미세사출법(microprojectile bombardment), 전기충격유전자전달법(electroporation), 인산 칼슘(CaPO₄) 침전, 염화칼슘(CaCl₂) 침전, PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection) 및 리포솜 매개법(liposome-mediated method) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 형질전환된 세포에서 신호단백질(후기골지망 타겟팅 펩타이드)과 표지 단백질이 연결된 목적 단백질이 효율적으로 발현되도록 조건을 최적화할 필요가 있는데, 이는 당 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의하여 각 신호단백질 및 형광단백질의 종류에 따라 적절히 조절하여 선택할 수 있을 것이다.
- [0071] 상기 방법에 관한 일 예로 표지 단백질로 형광 단백질을 사용하는 경우, 상기 형질전환된 세포에서 발현되는 단백질로부터 방출되는 특정 파장의 형광을 형광현미경을 사용하여 상기 세포가 살아있는 상태에서 계속하여 영상화할 수 있게 함으로써, 세포 내에서의 목적 단백질의 발현과정 및 미토콘드리아로의 이동과정을 단계별로 세밀

하게 가시화할 수 있다.

[0072] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[0073] 구체적으로, 상기 벡터로 형질전환하는 것은 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있으며, 이는 전술한 바를 참조로 한다. 상기 용어 ‘세포’는 ‘형질전환체’ 등과 호환성 있게 사용될 수 있으며, 임의의 수단(예를들어, 전술한 전기충격법, 칼슘포스포타제 침전법, 미세주입법, 바이러스 감염 등)에 의해 세포 내로 도입된 이종성 DNA를 포함하는 세포(본 발명에서, 바람직하게 진핵세포)를 의미한다.

[0074] 본 발명에서 상기 형질전환체는 클로닝 분야에서 통상적으로 사용되는 모든 종류의 단세포 유기체, 예컨대 각종 박테리아(예컨대, Clostridia속, 대장균, 등) 등의 원핵세포 미생물, 효모 등의 하등 진핵세포 미생물과 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 세포로 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 당업자가 목적하는 바에 가장 적합한 세포를 선택하여 사용할 수 있다. 일 예로 본 발명에서 형질전환체로 이용되는 미생물은 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속 미생물(*Streptomyces* spp.), 슈도모나스 속 미생물(*Pseudomonas* spp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 스태필로코쿠스 속 미생물(*Staphylococcus* spp.), 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 등 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0075] 본 발명의 폴리펩타이드는 미토콘드리아로 타겟팅되는 특징을 나타내므로, 이를 이용하여 미토콘드리아로 목적 물질을 전달하는 용도로서 활용할 수 있다.

[0076] 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

[0077] 도 1은 본 발명에서 확인한 두 개의 새로운 SLC1A5의 전사물 변이체인 SLC1A5 및 SLC1A5_var를 나타낸 것이다(A: 인간 SLC1A5 유전자의 엑손(exon)과 인트론(intron)의 구성 및 두 개의 전사물 변이체 SLC1A5(NM_005628.2) 및 SLC1A5_var(NM_001145145.1)을 나타냄. B: SLC1A5(청색) 및 SLC1A5_var(적색)의 mRNA 전사물의 엑손 구조로서, siRNA의 결합 부위 및 RT-PCR 증폭산물이 표시되어 있음).

도 2는 여러 암세포에서의 SLC1A5_var 발현 양상을 분석한 결과를 나타내었다(A, B: 췌장암 세포주; C, D: 대장암 세포주; E, F: 폐암 세포주).

도 3은 SLC1A5_var가 세포 내 미토콘드리아에 분포하는 것을 면역형광법으로 확인한 결과를 나타내었다(A: HA-tagged SLC1A5_var 또는 HA-tagged SLC1A5로 형질전환된 HeLa 세포를 면역형광법으로 확인한 결과. B: SLC1A5_var와 세포소기관 마커의 공존 여부를 Zen colocalization analysis를 이용하여 정량분석한 결과).

도 4는 SLC1A5_var가 세포 내 미토콘드리아에 분포하는 것을 세포소기관 분획실험을 통해 확인한 결과를 나타내었다(A: MiaPaCa2 세포에서 수득한 SLC1A5_var의 세포소기관 분획실험의 면역블롯 결과. B: SLC1A5_var에 대한 MiaPaCa2의 미토콘드리아 소기관 분획실험 결과).

도 5는 control 벡터, SLC1A5, SLC1A5_var, 또는 SLC1A5_var D186A 돌연변이를 발현하는 MiaPaCa2 세포에서 분리된 미토콘드리아를 대상으로 SLC1A5 전사물 변이체가 미토콘드리아 글루타민 운반체(glutamine transporter)임을 확인한 실험 결과를 나타내었다(A: 시간 경과에 따른 글루타민 흡수(Gln uptake) 정도. B: 아미노산 흡수(amino acid uptake) 정도. C: control 벡터, SLC1A5, SLC1A5_var, 또는 SLC1A5_var D186A 돌연변이에 대한 siRNA를 처리한 경우의 글루타민 흡수 정도. D: siRNA를 처리한 경우의 아미노산 흡수 정도. E: SLC1A5 전사물 변이체의 억제제가 SLC1A5 전사물 변이체의 글루타민 운반체 활성을 억제하는 것을 보여주는 실험 결과. F: 각 세포 별로, 세포 전체 측면에서의 α -KG 수준 및 미토콘드리아에서의 α -KG 수준).

도 6은 SLC1A5_var 단백질로부터 단리된 폴리펩타이드 단편들의 미토콘드리아 타겟팅 여부를 시험한 결과를 나타내었다(A: rediSi 프로그램을 이용하여 SLC1A5_var 전체단백질 중 미토콘드리아 타겟 영역을 예측한 예비 결과. B: 본 발명의 미토콘드리아 타겟팅 폴리펩타이드(NT-WT 단편, NT_(27~46) 및 NT_3A 단편) 및 대표적인 몇 개의 대조군 폴리펩타이드(NT_2A 단편, NT_(1~26) 및 CT 단편)의 위치 및 서열을 간략히 나타내는 도식).

도 7은 GFP의 N-말단에 접합된 각각의 실험군 및 대조군 폴리펩타이드(대표적으로 NT-WT 단편, NT_3A 단편, NT_2A 단편, NT_(1~26) 단편, NT_(27~46) 단편, 및 CT 단편)를 발현하도록 형질전환된 살아있는 HeLa 세포에 대한 공초점 현미경(confocal microscopy) 관찰 이미지를 나타내었다.

도 8은 각각의 실험군 및 대조군 폴리펩타이드와 MitoTracker와 colocalization 정도를 Zen colocalization analysis (mean \pm SD; n = 15, *** $P < 0.005$)를 통해 정량적으로 나타내어 미토콘드리아 타겟팅 효과를 비교한 결과를 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 암세포에서의 SLC1A5 전사물 변이체(SLC1A5_var)의 발현 양상 확인

현재까지 확인된 바 없는 미토콘드리아 내 글루타민 운반체(mitochondrial glutamine transporter)를 찾아내기 위하여, 글루타민 운반체의 전사물 변이체들을 조사하였다.

인간 SLC1A5 유전자는 8개의 엑손으로 구성되어 있으며, 전사 시작점(transcription start site)이 다른 두 개의 전사물 변이체가 존재한다(NM_005628.2 및 NM_001145145.1; 도 1A). 길이가 긴 전사물 변이체(SLC1A5/ASCT2, NM_005628.2)는 엑손 2가 결여되어 있으며, 541개 아미노산으로 이루어져 있고, 짧은 전사물 변이체(SLC1A5_var, NM_001145145.1)는 엑손 1이 결여되어 있으며, 339개 아미노산으로 이루어져 있다(도 1B). SLC1A5 전사물 변이체는 SLC1A5_var로 명명하였다.

다양한 암 세포주에서의 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 양상을 확인하기 위하여, RT-PCR을 이용하여 각 전사물 변이체의 mRNA 수준을 분석하였다.

구체적으로, 상기 RT-PCR을 위한 RNA는 RNA 추출 키트(MiniBEST Universal RNA Extraction Kit, Takara)를 사용하여 분리되었으며 cDNA 합성 키트(PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit, Takara)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 하기 표 1에 나타난 서열번호 10 내지 13의 염기서열을 갖는 프라이머로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여, 95℃, 45℃ 및 72℃에서 각 30초씩 26 사이클 조건에서 역전사중합체연쇄반응(RT-PCR)을 통해 증폭 후, 1% 아가로스 겔 전기영동(agarose gel electrophoresis) 방법을 통해 반응 결과를 확인하였다. 결과는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량 분석되었으며 GAPDH를 정량 기준으로 사용하였다.

표 1

구분	프라이머 서열	서열번호
SLC1A5_var forward	cactatgtac tctaccac	서열번호 10
SLC1A5_var reverse	ctcatctact tcctcttc	서열번호 11
SLC1A5(ASCT2) forward	gcggatgac atcttgcc	서열번호 12
SLC1A5(ASCT2) reverse	ctcatctact tcctcttc	서열번호 13

그 결과, 모든 췌장암 세포주의 SLC1A5_var의 발현이 정상 췌장관 상피세포(human pancreatic ductal epithelial cell, HPDE)보다 증가하였으며, 특히 Panc-1, MiaPaCa-2, AsPC1, 및 Panc10.05 세포주에서 더욱 과 발현된 것을 확인하였다(도 2의 A, B).

또한, 다양한 대장암 세포주에서도 인간의 정상 대장 상피세포(human colon epithelial cell, FHC)보다 SLC1A5_var의 발현 수준이 높게 측정되었다(도 2의 C, D).

반면, SLC1A5_var과 달리 SLC1A5는 췌장암이나 대장암 세포주에서의 발현이 증가하지 않았다.

NCI-H358을 제외한 폐암 세포주에서는 인간의 정상 섬유아세포(human fibroblast, BJ) 또는 정상 기관지 상피세포(human bronchial epithelial cell; 16HBE)와 비교하여 SLC1A5와 SLC1A5_var 모두 발현이 증가한 것을 확인하였다(도 2의 E, F).

이와 유사하게, 암세포에서의 SLC1A5 및 SLC1A5_var의 mRNA 발현 양상은 면역 블롯을 이용하여 확인한 단백질 발현 수준과도 일치하는 것을 확인하였다.

[0090] **실시예 2. 면역형광법을 이용한 SLC1A5 전사물 변이체(SLC1A5_var)의 세포 내 분포 양상 확인**

[0091] 암세포에서 발현수준이 높은 것이 확인된 SLC1A5_var 전사물 변이체 단백질의 세포내 분포 패턴을 확인하였다. SLC1A5_var 전사물 변이체의 cDNA에 HA-tag을 접합하여 HeLa 세포에 형질전환 시키고, 세포소기관 마커와 공존 (colocalization) 양상을 분석하였다.

[0092] 구체적으로, 실험에 사용된 세포는 HeLa 세포이며 메탄올로 고정 후 각각 1차 항체로서 항Cox4 항체, 항 Na⁺-K⁺ ATPase 항체, 항 ERp72 항체, 항 GM130 항체, 항 LAMP2 항체로 라벨링하였다. 그 후 2차 항체로서 Alexa-488 또는 Alexa-594 형광이 표지되어 있는 항체를 사용하여 라벨링하였다. 세포핵은 DAPI로 염색하였으며 이후 공초점 현미경으로 관찰하였다. 이미지 겹침 정도는 각 샘플당 10개 이상의 이미지를 Zen imaging 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0093] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, HA-tag을 포함하는 SLC1A5_var 단백질은 미토콘드리아 마커(COX4)와 공존하는 것으로 관찰되었으나, 세포막(Na,K-ATPase), 소포체(ERp72), 골지체(GM130) 또는 라이소좀(LAMP2) 등의 마커와는 발현 양상이 상이하여 SLC1A5_var 단백질은 미토콘드리아에 존재하는 것을 확인하였다(도 3의 A, B).

[0094] 이와 대조적으로 SLC1A5 단백질은 Na,K-ATPase와 공존하여, 세포막에 존재하는 것을 확인하였다(도 3의 A 내지 C).

[0095] **실시예 3. 세포소기관 분획실험을 통한 SLC1A5 전사물 변이체(SLC1A5_var)단백질의 미토콘드리아 내 분포 양상 확인**

[0096] SLC1A5_var 단백질이 미토콘드리아 내에 존재하며, 그 분포 양상을 더욱 자세히 알아보기 위하여 세포소기관 분획실험을 실시하였다(도 4).

[0097] 구체적으로, 상기 세포소기관 분획실험의 모든 절차는 4℃ 이하의 차가운 온도에서 진행하였으며, 미토콘드리아는 KPBS 버퍼(136 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, pH7.2)를 사용하여 분리하였다. 세포를 먼저 KPBS 버퍼를 사용하여 채취하고, 세포 부유액을 900g, 3min 동안 원심분리하였다. 상층액은 버리고 펠렛만 단백질 분해 효소 억제제인 아프로티닌(aprotinin) 5mg/ml, 류펩틴(leupeptin) 10mg/ml 및 PMSF 250mM가 포함된 KPBS로 재부유 시켰다. 이후 Dounce homogenizer를 사용하여 세포를 깨고, 깨진 세포를 600g, 5분 동안 원심분리하였다. 다시 상층액은 버리고 펠렛만을 7000g에서 2번, 10000g에서 한번씩 각각 10분 동안 원심분리하는 과정을 거쳐 생성된 펠렛을 미토콘드리아 분획으로 사용하였다.

[0098] 미토콘드리아의 내막 분리는 저삼투압 조건에서 실시하였다. 상기 미토콘드리아 분획을 스웰링(swelling) 버퍼(10M KH₂PO₄, 디지토닌 2 mg/ml, pH 7.4)에 넣어준 후 1시간 동안 얼음 위에서 보관하였다. 그리고 같은 부피의 iso-osmotic 용액(32% sucrose, 30% glycerol, and 10mM MgCl₂)을 넣어주었다. 그 후 10000g, 10min로 원심분리하여 이 때 발생하는 상층액을 미토콘드리아 외막 분획으로, 그리고 펠렛은 미토콘드리아 내막과 매트릭스 분획으로 사용하였다. 상기 펠렛을 다시 디지토닌이 없는 스웰링 버퍼를 사용하여 재부유시켜 1시간 동안 얼음 위에 보관하고, 다시 같은 부피의 iso-osmotic 용액을 넣은 후 17000g, 1시간 동안 원심분리 하였다. 분리 후 상층액을 매트릭스 분획으로, 펠렛을 미토콘드리아 내막 분획으로 사용하였다.

[0099] 상기 미토콘드리아의 소기관 분획을 대상으로 면역 블롯을 실시하였다. 면역블롯을 위해서 용해 버퍼(pH 7.4의 40mM HEPES, 0.5% 트리톤 X-100, 10mM β-글리세롤 포스페이트, 10mM 파이로포스페이트, 2.5mM MgCl₂)와 초음파를 이용해 세포를 분쇄하였다. SLC1A5_var의 관찰을 위해서 PNGase F를 처리하였다. 통상적인 면역 블롯 (immunoblotting)과는 다르게 샘플을 끓이는 과정은 하지 않았고, 샘플당 최소 약 30ug 정도의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하였다. 이후 PVDF 막으로 전이하는 과정을 거친 후, 각 단백질에 해당하는 1차 항체를 4℃에서 8시간 동안 처리하고, 각 1차 항체를 인식하는 HRP가 붙어있는 2차 항체를 붙여 막에 존재하는 각 단백질을 확인하였다.

[0100] 그 결과, 실시예 2의 면역형광실험 결과와 유사하게 SLC1A5 단백질은 Na,K-ATPase가 집중적으로 분포하는 세포막 분획에서 관찰되었으나, SLC1A5_var 단백질의 대부분은 COX4가 집중된 미토콘드리아 분획에서 확인되었다(도 4A).

[0101] 나아가 SLC1A5_var 단백질은 미토콘드리아 내막의 마커인 Tim23과 함께 분리되었으나, 미토콘드리아 외막의 마커인 Tom20이나 미토콘드리아 기질의 마커인 MnSOD2와는 독립적으로 분획되었다(도 4B). 따라서 SLC1A5_var 단백질은 미토콘드리아에, SLC1A5 단백질은 세포막에 분포하는 것을 분명하게 확인하였다.

[0102] 실시예 4. SLC1A5_var가 미토콘드리아의 글루타민 운반체인지 여부 확인

[0103] SLC1A5_var가 미토콘드리아에서 글루타민 흡수에 관여하는지 알아보기 위하여, SLC1A5_var의 NMDG 모티프의 보존 부위 내 나트륨 이온이 결합하는 부위의 아스파르트산을 알라닌으로 변경한 돌연변이(D186A)를 제작하였다.

[0104] 췌장암 세포주인 MiaPaCa2 세포에 SLC1A5_var 또는 SLC1A5_var D186A를 각각 안정적으로 발현시키고, 미토콘드리아 내 글루타민 흡수 활성을 측정하였다.

[0105] 구체적으로, 상기 실시예 3의 방법으로 미토콘드리아 분획을 얻은 후, KPBS 버퍼에 10mM NaCl과 100mM 글루타민, 100 mM 세린, 100 mM 알라닌 또는 100 mM 글루탐산이 포함된 버퍼로 재부유 시킨 후 37℃에 보관하는 것으로 아미노산 흡수를 시작하였다. 이후 20mM HgCl₂를 넣어 반응을 종료하였고, 종료 후 각 샘플은 10000g, 5min 동안 원심분리 하였다. 이후 상층액을 취하여 남아있는 처음 대비 소모된 아미노산을 아미노산 측정 키트 (Glutamine assay kit, Serine assay kit, Alanine assay kit, Glutamate assay kit, Biovision)를 사용하여 측정하였다. 측정된 값은 각 샘플의 미토콘드리아의 단백질 양을 측정하여 정량시 기준값으로 사용하여 보정하였다.

[0106] 그 결과 도 5에 나타난 바와 같이, SLC1A5_var를 과발현하는 세포에서 분리된 미토콘드리아에서만 시간의 흐름에 따라 대조군 백터 이상으로 글루타민 수준이 증가하는 것을 확인하였다. 반면 SLC1A5 또는 SLC1A5_var D186A를 과발현하는 세포에서 분리된 미토콘드리아에서는 글루타민이 흡수되지 않는 것을 확인하였다(도 5 A).

[0107] 또한 SLC1A5_var를 과발현하는 세포에서 분리된 미토콘드리아에서는 글루타민 뿐 아니라, SLC1A5의 다른 알려진 기질인 알라닌과 세린도 흡수되는 것으로 나타났다(도 5B).

[0108] 한편, siRNA를 이용하여 SLC1A5 및 SLC1A5_var를 각각 녹다운 시켰다. control siRNA는 서열번호 14로, SLC1A5에 대한 siRNA는 서열번호 15으로, SLC1A5_var에 대한 siRNA는 서열번호 16로 표시된 염기서열로 구성하였다. 상기 siRNA를 이용한 녹다운 실험 결과, SLC1A5_var의 과발현을 억제한 세포에서 분리된 미토콘드리아에서는 글루타민의 흡수가 억제되었으나, SLC1A5의 과발현을 억제한 세포에서 분리된 미토콘드리아에서는 이러한 현상이 관찰되지 않았다(도 5C). 알라닌과 세린에 대해서도 같은 결과가 관찰되었다(도 5D).

[0109] 나아가, 기존에 알려진 SLC1A5의 억제제들인 GPNA(1-γ-글루타밀-p-니트로아닐라이드)와 벤질세린(benzylserine)을 각각 100μM씩 처리함으로써 SLC1A5_var에 의한 미토콘드리아 글루타민 수송을 억제할 수 있는지 확인한 결과, 상기 억제제들은 기저 수준(basal level) 및 SLC1A5_var가 매개하는 미토콘드리아의 글루타민 흡수를 억제하는 것으로 나타났으며, 프로테오리포솜(proteoliposome)에서 SLC1A5에 의한 수송 반응을 종결시키는 것으로 알려진 HgCl₂ 역시 미토콘드리아 글루타민 흡수를 억제하였다(도 5E).

[0110] 미토콘드리아 글루타민은 알파-케토글루타레이트(α-KG)로 대사되기 때문에, 분리된 미토콘드리아 및 전체 세포 측면에서 SLC1A5_var의 과발현에 따른 α-KG 수준에 조절 효과를 모니터링했다. 알파-케토글루타레이트(α-KG) 수준은 alpha-Ketoglutarate Assay kit(Abcam)를 사용하여, 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다.

[0111] SLC1A5_var의 과발현에 따라 미토콘드리아에서 글루타민-유래 α-KG 수준이 현저하게 증가된 것을 확인하였다(도 5F). 상기한 결과를 종합적으로 고려할 때, SLC1A5_var가 미토콘드리아의 글루타민 운반체임을 명확히 확인하였다.

[0112] 실시예 5. SLC1A5_var의 미토콘드리아 타겟팅 단편 제작 및 효과 확인

[0113] 상기 실시예에서 확인된 바와 같이, SLC1A5_var 단백질은 미토콘드리아 내막에 존재하고 있으므로, SLC1A5_var이 미토콘드리아에 특이적인 타겟팅 신호(mitochondrial targeting sequence, MTS)를 포함하고 있는지, 포함하고 있다면 그 위치는 어디인지 및 이를 분리하여 단독으로 사용 가능한지를 확인하였다.

[0114] 구체적으로, SLC1A5_var 단백질로부터 단리된 상태로도 기능이 유지되는 미토콘드리아 타겟 폴리펩타이드를 제작하기 위해, 상기 단백질로부터 폴리펩타이드 단편들을 제작하여 이의 미토콘드리아 타겟팅 여부를 시험하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0115] 도 6A에 나타난 바와 같이, 본 발명자들은 PrediSi 프로그램(<http://www.predisi.de>)을 사용하여 SLC1A5_var 전체 단백질 중 N-말단의 39번째 아미노산 내지 51번째 아미노산 영역에 미토콘드리아 타겟을 위한 주요 모티프의 존재 여부를 확인하였다.

[0116] 특히 비 친수성 나선구조(hydrophobic α-helical structure)에 곧바로 이어지는 양전하를 띤 아미노산(아르기

닌, R; 라이신, K)으로 이루어진 27 내지 46번째 아미노산 서열(도 6B의 NT_(27~46))이 미토콘드리아 타겟팅을 위한 핵심 서열임을 확인하였다.

[0117] 도 6B에는 SLC1A5_var 전체단백질로부터의 N-말단 1~46aa에 해당하는 단편(NT-WT 단편)과 대조군으로 사용된 C-말단 235~339aa 단편(CT 단편)의 위치, 상기 NT-WT 단편의 염기성 아미노산에 점 돌연변이를 도입한 R9A/R15A/K17A 돌연변이(NT_3A로 지칭) 및 R44A/K45A 돌연변이(NT_2A로 지칭)를 나타내었다. 또한, NT-WT 단편을 반으로 나누어, N-말단 전반부인 NT_(1~26)과 후반부인 NT_(27~46) 단편을 각각 나타내었다. 상기한 각 단편의 서열은 하기 표 2에 구체적으로 기재하였다.

표 2

표기	아미노산 서열	서열번호
NT-WT 단편	MYSTTYEERNITGTRVKVPVGQVEGMNIGLVVFAIVFGVALRKL	3
NT_3A 단편	MYSTTYEEANITGTAVAVPVGQVEGMNIGLVVFAIVFGVALRKL	5
NT_2A 단편	MYSTTYEERNITGTRVKVPVGQVEGMNIGLVVFAIVFGVALAAL	7
NT_(27~46) 단편	MNIGLVVFAIVFGVALRKL	8

[0119] 상기 단편들 각각에 EGFP(Enhanced green fluorescent protein, GenBank: AFA52654.1)를 통상적인 방법으로 융합하여, 각각의 EGFP-단편 융합단백질이 미토콘드리아 내로 타겟팅 되는지 확인하였다.

[0120] 구체적으로, 세포를 공초점 현미경 전용 세포 배양 접시에 배양하면서, 각 세포에 대해 컨트롤 벡터 또는 SLC1A5_var의 일부분인 NT-WT, NT_3A, NT_2A, NT_(1~26), NT_(27~46) 및 CT와 EGFP를 발현할 수 있는 플라스미드를 형질주입(transfection) 하였다. 48시간 지난 후 미토콘드리아를 염색할 수 있는 시약인 MitoTracker Red를 사용하여 미토콘드리아를 표지한 후 공초점 현미경으로 관찰하였다.

[0121] 그 결과 도 7에 나타난 바와 같이, 각각 NT-WT 단편 및 NT_3A(R9A/R15A/K17A 돌연변이) 단편과 결합한 EGFP는 미토콘드리아로 타겟팅 되었으나, NT_2A(R44A/K45A 돌연변이) 단편과 결합한 EGFP는 미토콘드리아로 타겟팅 되지 못하고 세포질 내에 분산되어 있었다. 특히, NT-WT 중에서 전반부인 친수성 아미노산 서열로 이뤄진 1 내지 26 번째 아미노산 서열로 구성된 NT_(1~26)은 미토콘드리아로 타겟팅 되지 못하였으나, 후반부 소수성 아미노산 서열 및 양전하 아미노산으로 구성된 NT_(27~46)은 미토콘드리아로 타겟팅 되어 해당 단편이 미토콘드리아로 타겟팅 되는 최소 단위 단편에 해당함을 확인하였다.

[0122] 공초점 현미경 상에서 미토콘드리아 마커인 Mitotracker와 각 단편이 함께 나타나는 것(colocalization)을 정량적으로 평가한 결과를 도 8에 나타내었으며, 도 8에서 보는 바와 같이 NT-WT 단편, NT_3A(R9A/R15A/K17A 돌연변이) 단편 및 NT_(27~46)은 미토콘드리아 타겟팅 효과가 현저히 우수한 것을 확인하였다.

[0123] 이와 유사하게, 차등 원심분리(differential centrifugation)을 이용한 세포분획 실험에서도 NT-WT 단편, NT_3A 단편 또는 NT_(27~46) 단편에 접합된 EGFP는 미토콘드리아가 분리되는 분획에서 COX4와 함께 검출된 반면, NT_2A 단편에 접합된 EGFP나 대조군 EGFP 및 NT_(1~26)는 세포질 또는 세포내막(endomembrane)이 분리되는 분획에서 검출되었다.

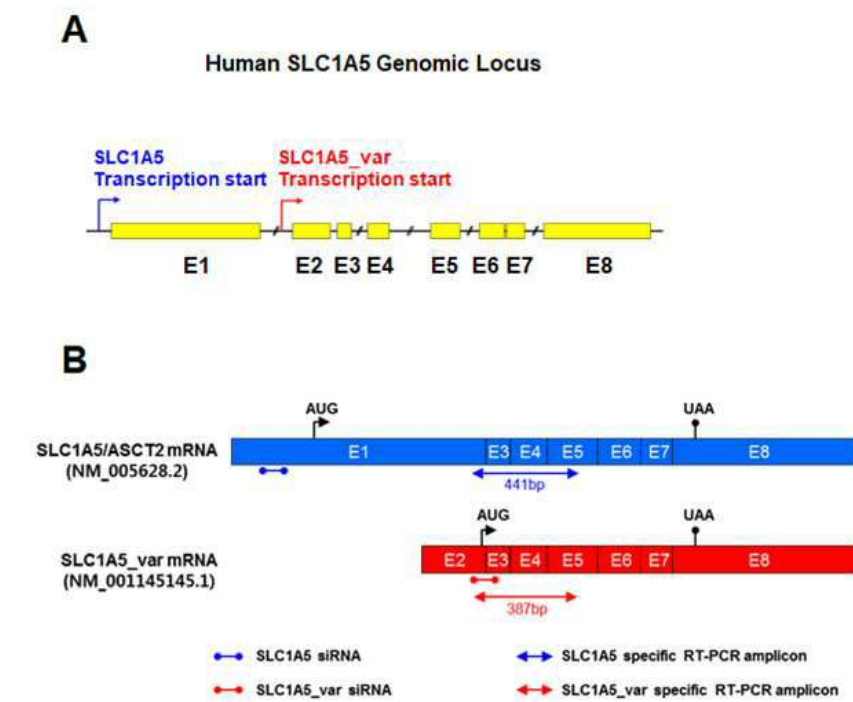
[0124] 상기한 결과는 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 NT_(27~46) 단편이 미토콘드리아 타겟팅을 위한 핵심 서열임을 시사하는 것이다.

[0125] 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.

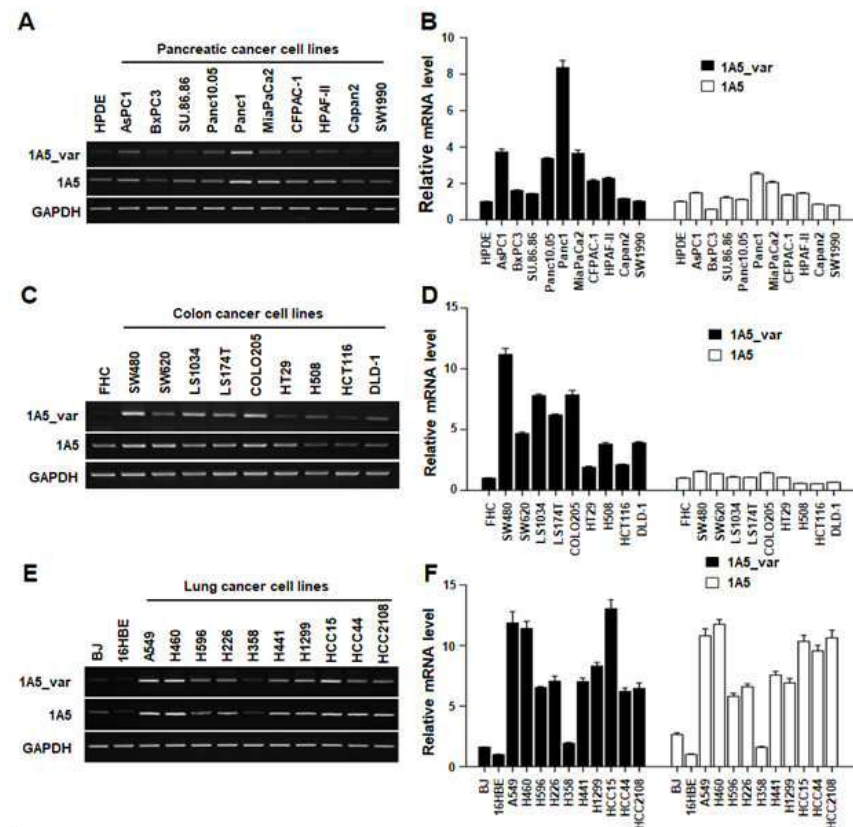
[0126] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

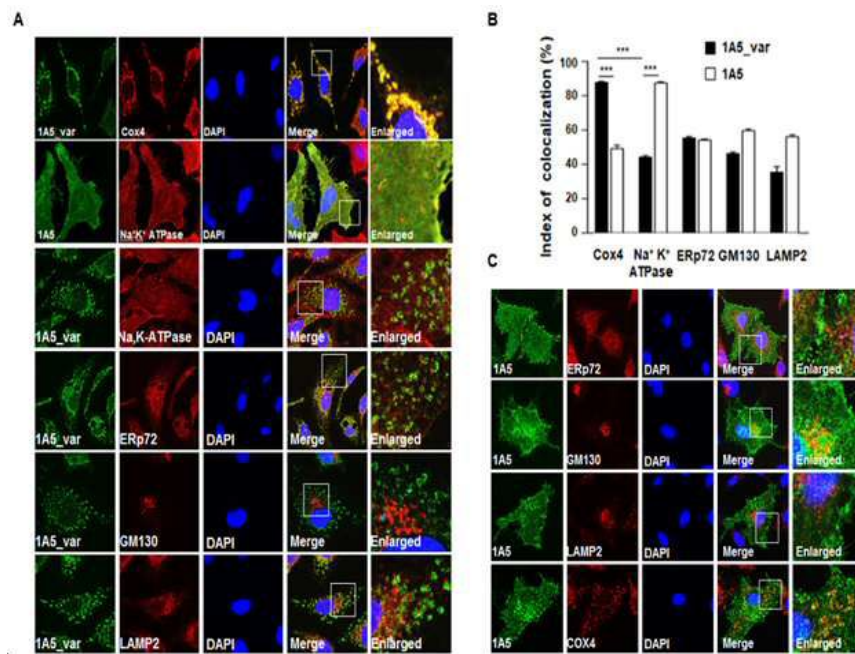
도면1



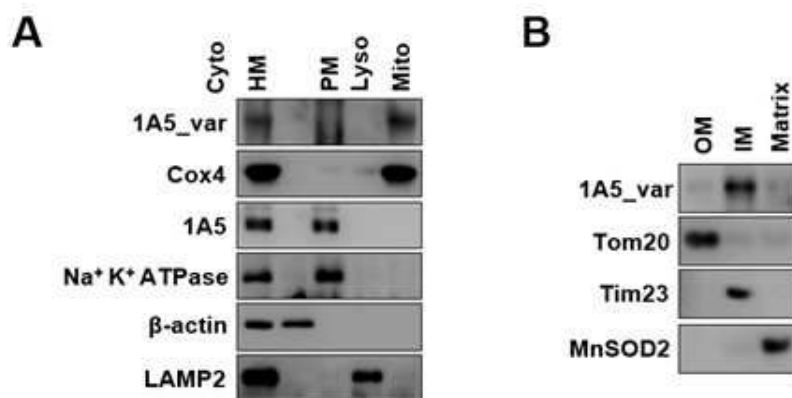
도면2



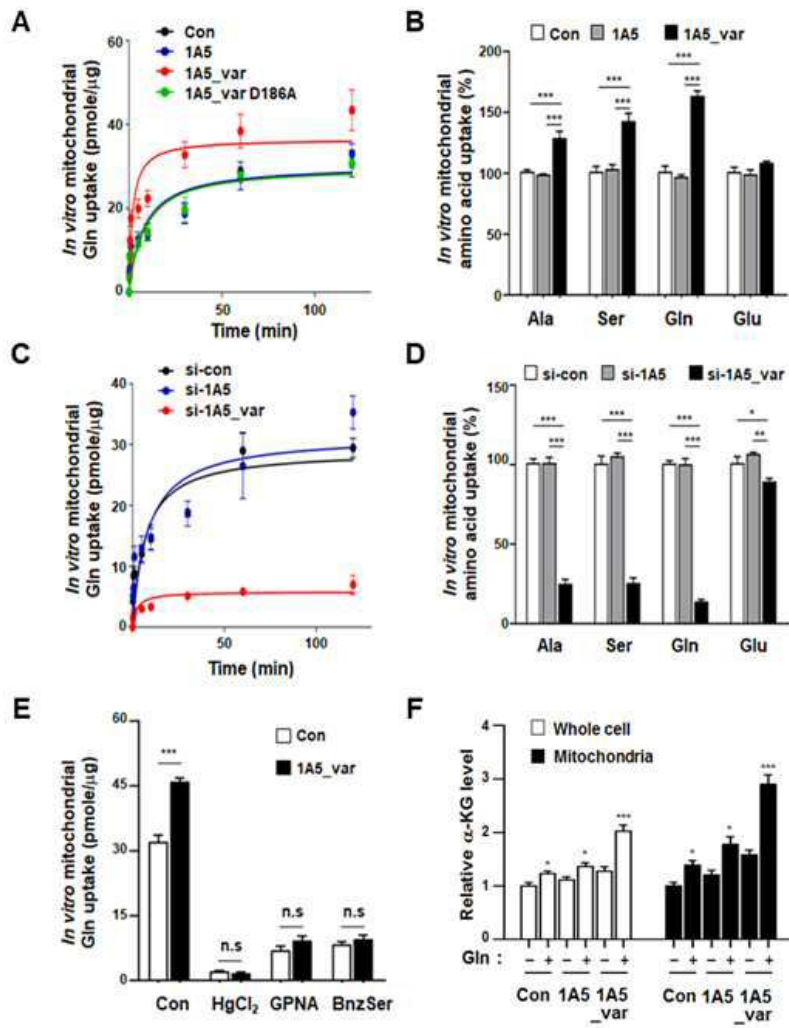
도면3



도면4

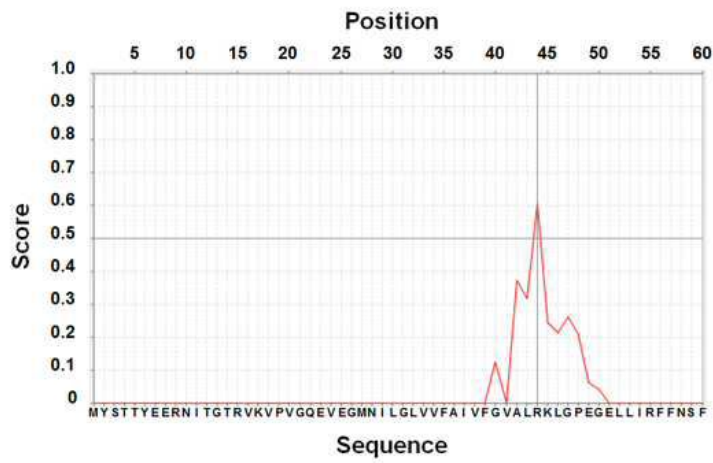


도면5



도면6

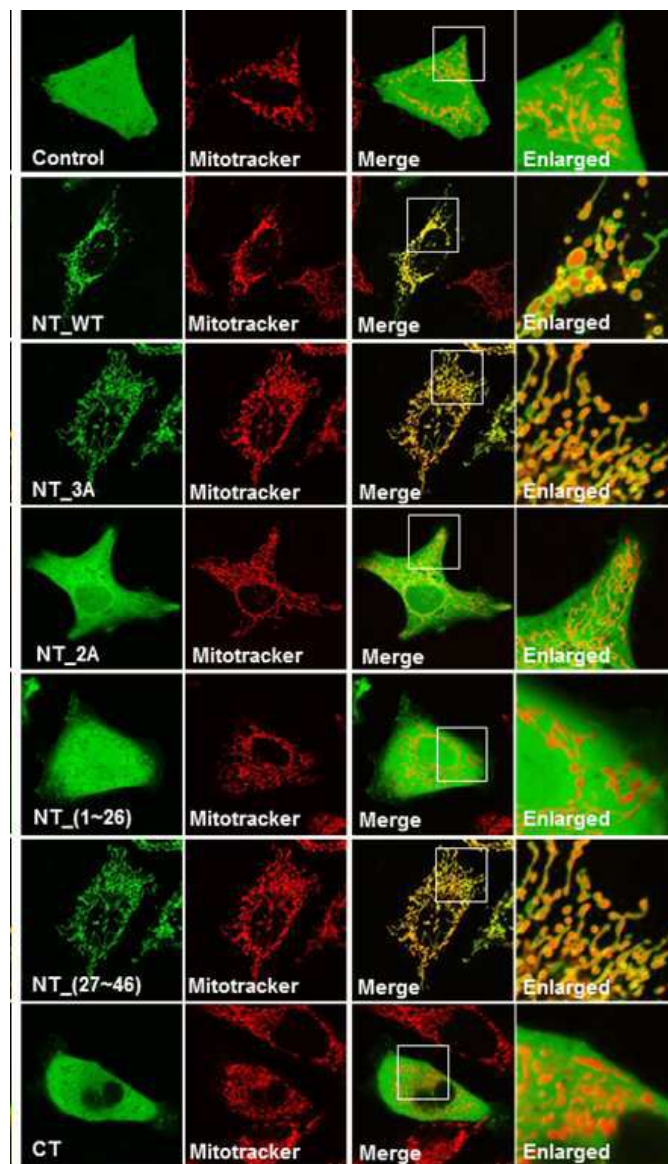
A



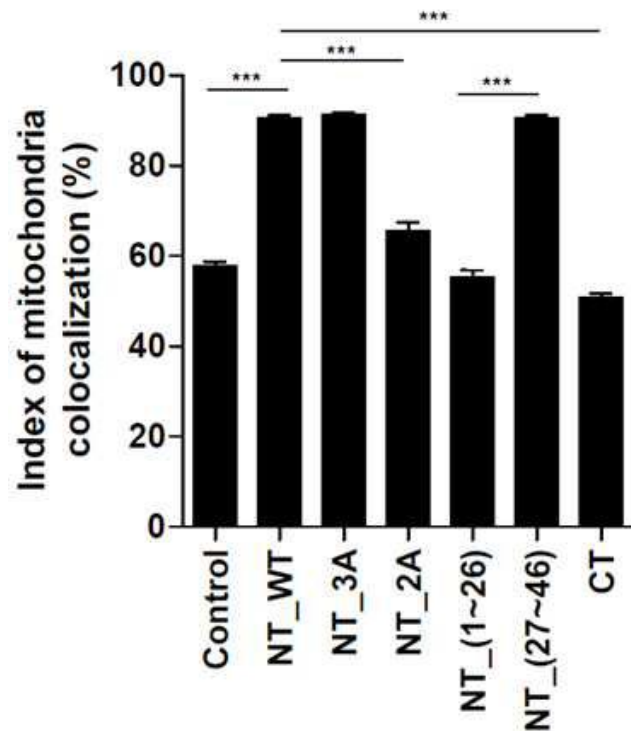
B



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> POLYPEPTIDE FOR TARGETING MITOCHONDRIA AND USES THEREOF
- <130> 19PP30507
- <160> 16
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 339
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> amino acid sequence of Homo sapiens SLC1A5 transcript variant (SLC1A5_var) protein
- <400> 1

Met Tyr Ser Thr Thr Tyr Glu Glu Arg Asn Ile Thr Gly Thr Arg Val
1 5 10 15

Lys Val Pro Val Gly Gln Glu Val Glu Gly Met Asn Ile Leu Gly Leu
20 25 30

Val Val Phe Ala Ile Val Phe Gly Val Ala Leu Arg Lys Leu Gly Pro

35 40 45
 Glu Gly Glu Leu Leu Ile Arg Phe Phe Asn Ser Phe Asn Glu Ala Thr
 50 55 60
 Met Val Leu Val Ser Trp Ile Met Trp Tyr Ala Pro Val Gly Ile Met
 65 70 75 80
 Phe Leu Val Ala Gly Lys Ile Val Glu Met Glu Asp Val Gly Leu Leu

 85 90 95
 Phe Ala Arg Leu Gly Lys Tyr Ile Leu Cys Cys Leu Leu Gly His Ala
 100 105 110
 Ile His Gly Leu Leu Val Leu Pro Leu Ile Tyr Phe Leu Phe Thr Arg
 115 120 125
 Lys Asn Pro Tyr Arg Phe Leu Trp Gly Ile Val Thr Pro Leu Ala Thr
 130 135 140
 Ala Phe Gly Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Leu Pro Leu Met Met Lys
 145 150 155 160

 Cys Val Glu Glu Asn Asn Gly Val Ala Lys His Ile Ser Arg Phe Ile
 165 170 175
 Leu Pro Ile Gly Ala Thr Val Asn Met Asp Gly Ala Ala Leu Phe Gln
 180 185 190
 Cys Val Ala Ala Val Phe Ile Ala Gln Leu Ser Gln Gln Ser Leu Asp
 195 200 205
 Phe Val Lys Ile Ile Thr Ile Leu Val Thr Ala Thr Ala Ser Ser Val
 210 215 220
 Gly Ala Ala Gly Ile Pro Ala Gly Gly Val Leu Thr Leu Ala Ile Ile

 225 230 235 240
 Leu Glu Ala Val Asn Leu Pro Val Asp His Ile Ser Leu Ile Leu Ala
 245 250 255
 Val Asp Trp Leu Val Asp Arg Ser Cys Thr Val Leu Asn Val Glu Gly
 260 265 270
 Asp Ala Leu Gly Ala Gly Leu Leu Gln Asn Tyr Val Asp Arg Thr Glu
 275 280 285
 Ser Arg Ser Thr Glu Pro Glu Leu Ile Gln Val Lys Ser Glu Leu Pro

290

295

300

Leu Asp Pro Leu Pro Val Pro Thr Glu Glu Gly Asn Pro Leu Leu Lys

305 310 315 320

His Tyr Arg Gly Pro Ala Gly Asp Ala Thr Val Ala Ser Glu Lys Glu

325 330 335

Ser Val Met

<210> 2

<211> 1927

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleic acid sequence of Homo sapiens SLC1A5 transcript variant
(SLC1A5_var) mRNA

<400> 2

atggggtgga gctgaggccc ggggcgacct gccctggcct gccgtgggag gccagcattc 60

ctcacccega acccacaatg cctcagggtc agcacgccag cctcttgggg ctgaaggagg 120

ctgactcccc aagtcttgca aaggggtgca agcctagtgc caaccctgcc gggctgaggc 180

atgagtaggg gctgtatttg cgtgcaggcg gggcccaaaa gcttcactc gctgccttaa 240

aagccaacc cagcctctca gacaatgtg cctcccaact atgtactcta ccacctatga 300

agagaggaat atcacgggaa ccagggtgaa ggtgccctg gggcaggagg tggaggggat 360

gaacatcctg ggcttggtag tgtttgcat cgtctttggt gtggcgctgc ggaagctggg 420

gcctgaaggg gagctgctta tccgtttctt caactcctc aatgaggcca ccatggttct 480

ggtctcctgg atcatgtggt acgcccctgt gggcatcatg ttcctggtgg ctggcaagat 540

cgtggagatg gaggatgtgg gtttactctt tgcccgctt ggcaagtaca ttctgtgctg 600

cctgctgggt cagcceaacc atgggtcctt ggtactgccc ctcactact tctcttcac 660

ccgcaaaaac cctaccgt tctgtgggg catcgtgacg ccgtggcca ctgccttgg 720

gacctcttc agttccgcca cgctgccgt gatgatgaag tgcgtggagg agaataatgg 780

cgtggccaag cacatcagcc gtttcatcct gcccatcggc gccaccgtca acatggacgg 840

tgccgcgtc ttccagtgcg tggccgcagt gttcattgca cagctcagcc agcagtcctt 900

ggacttcgta aagatcatca ccatcctggt caggccaca gcgtccagcg tgggggcagc 960

gggcatccct gctggagggtg tctcactct ggccatcatc ctgaagcag tcaacctccc 1020

ggtcgaccat atctccttga tcctggctgt ggactggcta gtcgaccggt cctgtaccgt 1080
 cctcaatgta gaaggtgacg ctctgggggc aggactctc caaaattacg tggaccgtac 1140
 ggagtcgaga agcacagagc ctgagttgat acaagtgaag agtgagctgc ccctggatcc 1200
 gctgccagtc cccactgagg aaggaaaccc cctcctcaaa cactatcggg ggcgccgagg 1260
 ggatgccacg gtcgcctctg agaaggaatc agtcatgtaa accccgggag ggaccttccc 1320

tgccctgctg ggggtgctct ttggacactg gattatgagg aatggataaa tggatgagct 1380
 agggctcttg gggctgcct gcacactctg gggagccagg ggcgccagca ccctccagga 1440
 caggagatct gggatgcctg gctgctggag tacatgtgtt cacaagggtt actcctcaaa 1500
 acccccagtt ctactcatg tccccaactc aaggctagaa aacagcaaga tggagaaata 1560
 atgttctgct gcgtcccccac cgtgacctgc ctggcctccc ctgtctcagg gacgaggtca 1620
 caggtcacca tggggaattc tagcccccac tgggggatg ttacaacacc atgtgtgta 1680
 ttttgccggc tgiagttgtg gggggatgtg tgtgtgcacg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 1740

tgtgtgtgtg tgtgtgttct gtgacctct gtcccatgg tacgtccac cctgtccca 1800
 gateccctat tcctccaca ataacagaaa cactcccagg gactctgggg agaggtgag 1860
 gacaaatacc tgctgtcact ccagaggaca ttttttttag caataaaatt gagtgtcaac 1920
 tatttaa 1927

<210> 3

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aa sequence of NT-WT fragment from SLC1A5_var

<400> 3

Met Tyr Ser Thr Thr Tyr Glu Glu Arg Asn Ile Thr Gly Thr Arg Val

1 5 10 15
 Lys Val Pro Val Gly Gln Glu Val Glu Gly Met Asn Ile Leu Gly Leu
 20 25 30
 Val Val Phe Ala Ile Val Phe Gly Val Ala Leu Arg Lys Leu
 35 40 45

<210> 4

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of NT-WT fragment

<400> 4

atgtactcta ccacctaaga agagaggaat atcaccggaa ccagggtgaa ggtgcccgtg 60

gggcaggagg tggaggggat gaacatcctg ggcttggttag tgtttgcat cgtcttttgt 120

gtggcgctgc ggaagctg 138

<210> 5

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aa sequence of NT_3A fragment from SLC1A5_var

<400> 5

Met Tyr Ser Thr Thr Tyr Glu Glu Ala Asn Ile Thr Gly Thr Ala Val

1 5 10 15

Ala Val Pro Val Gly Gln Glu Val Glu Gly Met Asn Ile Leu Gly Leu

20 25 30

Val Val Phe Ala Ile Val Phe Gly Val Ala Leu Arg Lys Leu

35 40 45

<210> 6

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of NT_3A fragment

<400> 6

atgtactcta ccacctaaga agagaggaat atcaccggaa ccagggtgaa ggtgcccgtg 60

gggcaggagg tggaggggat gaacatcctg ggcttggttag tgtttgcat cgtcttttgt 120

gtggcgctgc ggaagctg 138

<210> 7

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aa sequence of NT_2A variant polypeptide

<400> 7

Met Tyr Ser Thr Thr Tyr Glu Glu Arg Asn Ile Thr Gly Thr Arg Val
1 5 10 15

Lys Val Pro Val Gly Gln Glu Val Glu Gly Met Asn Ile Leu Gly Leu
20 25 30

Val Val Phe Ala Ile Val Phe Gly Val Ala Leu Ala Ala Leu
35 40 45

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NT_(27~46) fragment from SLC1A5_Var

<400> 8

Met Asn Ile Leu Gly Leu Val Val Phe Ala Ile Val Phe Gly Val Ala
1 5 10 15

Leu Arg Lys Leu
20

<210> 9

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of NT_(27~46) fragment

<400> 9

atgaacatcc tgggcttggc agtgcttgcc atcgctcttg gtgtggcgct gcggaagctg 60

60

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for SLC1A5_var

<400> 10

cactatgtac tctaccac 18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for SLC1A5_var
 <400> 11
 ctcactctact tcctcttc 18
 <210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for SLC1A5
 <400> 12
 gcggatgac atcttgcc 18
 <210> 13
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for SLC1A5
 <400> 13
 ctcactctact tcctcttc 18
 <210> 14
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> control siRNA
 <400> 14
 acaacagcca caacgucua 19
 <210> 15
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SLC1A5 siRNA
 <400>
 > 15
 ccagagaaac ucucguauu 19

<210> 16
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> SLC1A5_var siRNA
<400> 16
gcugccucc cacuaugua

19