(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0033559
(43) 공개일자 2017년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
C07K 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0131427
(22) 출원일자 2015년09월17일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
차의과학대학교 산학협력단
경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)
(72) 발명자
정지형
서울특별시 강남구 선릉로 120, 1동 907호
(74) 대리인
오국진

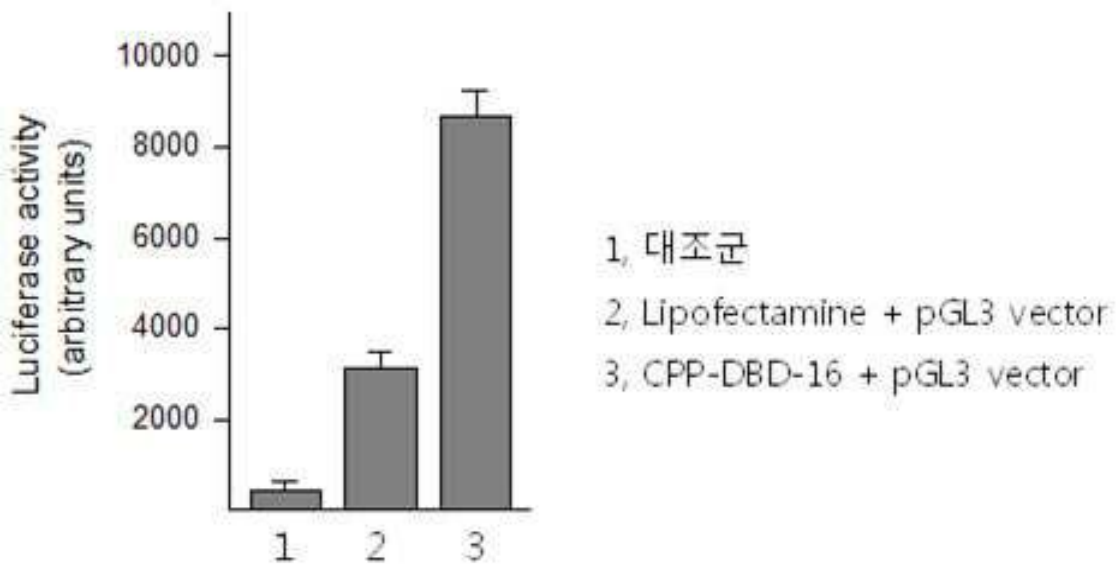
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **유전자 전달을 위한 신규의 융합 펩타이드**

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드에 하나 이상의 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드가 융합된 융합 펩타이드를 제공한다. 본 발명의 융합 펩타이드는 동물세포 내로 플라스미드 DNA 등의 핵산을 전달(transfection)하기 위한 시약, 즉 유전자 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C07K 2319/01 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 C0237272
부처명 중소기업청
연구관리전문기관 한국산학연협회
연구사업명 산학연협력기술개발사업
연구과제명 신규 연구용 유전자 전달 시약 개발
기 여 율 1/1
주관기관 차의과학대학교 산학협력단
연구기간 2014.10.01 ~ 2015.09.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드에 하나 이상의 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드가 융합된 융합 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드의 C-말단에 하나 이상의 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드가 융합된 것을 특징으로 하는 융합 펩타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드에 1 내지 3개의 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드가 융합된 것을 특징으로 하는 융합 펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열번호 3 내지 5 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 융합 펩타이드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규의 융합 펩타이드에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 특정 세포-투과 펩타이드와 특정 DNA 전달 도메인이 융합된 신규의 융합 펩타이드에 관한 것이다. 본 발명의 융합 펩타이드는 동물세포 내로 플라스미드 DNA 등의 핵산을 전달(transfection)하기 위한 시약, 즉 유전자 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 형질감염(transfection)은 DNA 혹은 RNA와 같은 핵산(nucleic acids)을 동물세포로 전달하는 것을 말하며, 통상 '유전자 전달'로도 칭해진다. 유전자 전달은 플라스미드 DNA 전달을 통한 유전자의 과발현(gene overexpression) 또는 siRNA 전달을 통한 발현억제(gene silencing) 실험을 통해 유전자의 기능 연구, 단백질 발현 억제 연구, 유전자 조작을 통한 동물모델, 유전자 치료 기법 등에 필수적으로 사용되는 연구방법으로서, 생명공학 및 의과학 분야 대부분의 연구자들이 활용하고 있다. 이러한 유전자 전달 방법은 위에서 언급한 바와 같이 크게 두가지, (1) 특정 유전자를 플라스미드 DNA 혹은 바이러스성 벡터에 담아 세포내 전달하여 유전자의 과발현이나 돌연변이체의 발현을 유도하는 실험과 (2) siRNA, miRNA 등을 세포내로 전달하여 세포내 특정 유전자의 발현(단백질 발현)을 억제하는 실험에 널리 활용되고 있다. 이러한 유전자 발현 증가 또는 억제 실험 방법으로서, 비바이러스성 벡터에 유전자를 담아 리포좀 등의 유전자 전달체를 활용하여 유전자를 전달하거나 혹은 바이러스성 벡터에 유전자를 담아 직접 세포에 감염(infection)시키는 방법이 대표적으로 사용되고 있다.

[0003] 플라스미드 DNA 벡터로 대표되는 비바이러스성 벡터를 이용한 세포내 유전자 전달 방법은 원하는 유전자를 플라스미드 DNA 벡터에 직접 재조합 방법으로 삽입하여 제조하기가 수월하고, 여기에 리포좀 등의 유전자 전달체만 시약으로 구입해 사용하면 되므로 오래전부터 유용하게 사용되어 왔다. 여기서 필요한 유전자 전달체 연구 시약으로는, DNA를 포함한 핵산이 음이온(negative charge)을 갖기 때문에 이온결합을 통한 복합체를 형성할 수 있는 양이온성 고분자 물질들이 이용되어 왔다. 이러한 양이온성 고분자 물질들에는 폴리에틸이민(polyethulenimine, PEI), 폴리[α-(4-아미노부틸)-L-글리콜산], 폴리아미도아민 덴드리머, 폴리[N,N'-(다이메틸아미노)에틸]메타크릴레이트-(PDMAE-MA) 등이 포함되며, 이들은 유전자들과의 결합 효율이 좋은 것뿐만 아니라 세포내 엔도좀(endosome)에서 탈출하는 기작인 '양성자 스폰지(proton-sponge)' 효과가 뛰어나서 플라스미드 DNA, 올리고뉴클레오티드, siRNA 전달에 널리 사용되고 있다. 최근에는 동물세포의 세포막 구조와 유사한 구조체 형식으로 양이온성 지질(cationic liposome) 또는 음이온성 지질(anionic liposome) 등의 고분자를 이용하여 플라스미드 DNA 뿐만 아니라 siRNA를 세포내 전달하는 시약이 다수 개발되고 있다. 이러한 제품으로는 리포

펙타민(Lipofectamine) (Thermo Fisher Scientific 등), I-FECT (Neuromics), LipoTrust (CosmoBio) 등의 지질 전달체들이 알려져 있다. 이러한 유전자 전달체를 구입하여 비바이러스성 DNA 벡터를 전달하는 방법의 장점은 벡터에 원하는 유전자를 자유롭게 재조합 가능하며, 유전자 크기에도 비교적 제한이 없는 장점과 함께 동물모델에서 바이러스성 벡터 사용으로 나타나는 면역반응이나 안전성의 문제, 유전적 변형 등의 부작용의 우려를 줄일 수 있다는 점이다. 그러나 단점으로는 세포내 전달 효율이 낮고, 특히 1차 배양세포(primary culture cells)나 동물모델에선 유전자 전달이 거의 되지 않으며, 또한 리포좀과 같은 유전자 전달체 시약의 값이 고가인 문제가 있다. 따라서 최근에는 마이크로인젝션(microinjection), 일렉트로포레이션(electroporation) 등의 방법이 시도되고 있으나 세포수준에서만 제한적으로 사용할 수 있는 한계가 있다.

[0004] 바이러스성 벡터(viral vector)로서 주로 사용되고 있는 레트로바이러스(retrovirus) 벡터, 렌티바이러스(rentivirus) 벡터, 아데노바이러스(adenovirus or adeno-associated virus) 벡터 등은 원하는 유전자를 재조합하고 바이러스로 제작하여 세포내 전달하면 직접적인 감염이 되기 때문에 높은 유전자 전달 효율을 기대할 수 있는 장점이 있다. 그러나 동물모델 등의 시험관 내(in vivo) 실험시 바이러스성 벡터 자체가 유발하는 면역반응으로 인해 반복적으로 사용하기 어렵고, 전달하고자 하는 유전자의 크기에도 제한이 있으며, 무엇보다 개별 연구자들이 쉽게 바이러스 벡터를 제조 또는 이를 이용한 클로닝 및 바이러스 파티클을 제조하기 어렵다는 단점이 있다. 따라서 세포모델에서 높은 유전자 전달 효율을 원하거나 동물모델 실험이 필요한 개별 연구자들은 외부 전문업체에 고비용으로 몇주간의 제작과정이 소요되는 바이러스성 벡터 제조를 의뢰하는 방법을 택하고 있다. 최근엔 이를 극복하기 위해, 바이러스 입자를 모방하여 만든 SNALP(stable nucleic acid-lipid particle)을 이용하여 siRNA 등을 동물 모델에서 전달시킨 사례가 보고된 바 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 종래의 비바이러스성 벡터 사용 방법의 장점, 특히 개별 연구자들이 쉽게 사용할 수 있고 스스로 재조합 조작이 가능한 장점은 그대로 유지하면서 동시에 바이러스 벡터를 사용하지 않고도 세포내 유전자 전달 효율을 증가시킬 수 있는 유전자 전달체를 개발하기 위하여 다양한 연구를 수행하였다. 본 발명자들은 특정 세포-투과 펩타이드(cell-penetrating peptide, CPP)와 특정 DNA 전달 도메인(DNA-binding domain, DBD)이 융합된 새로운 융합 펩타이드를 제작하였으며, 얻어진 융합 펩타이드가 동물세포 내로 플라스미드 DNA 등의 핵산을 높은 전달효율로 전달하기 위한 시약, 즉 유전자 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다는 것을 발견하였다.

[0006] 따라서, 본 발명은 유전자 전달체로서 유용한 융합 펩타이드를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 일 태양에 따라, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드에 하나 이상의 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드가 융합된 융합 펩타이드가 제공된다.

[0008] 본 발명의 융합 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드의 C-말단에 하나 이상의 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드가 융합된 것일 수 있다. 또한, 본 발명의 융합 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드에 1 내지 3개의 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드가 융합된 것일 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 융합 펩타이드는 서열번호 3 내지 5 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 융합 펩타이드는 특정 세포-투과 펩타이드(cell-penetrating peptide, CPP)와 특정 DNA 전달 도메인(DNA-binding domain, DBD)이 융합된 새로운 융합 펩타이드로서, 동물세포 내로 플라스미드 DNA 등의 핵산을 높은 전달효율로 전달하기 위한 시약, 즉 유전자 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 융합 펩타이드는 1차 배양세포(primary culture cells)를 사용하는 연구 및 실험에서도 유용하게 사용될 수 있으며, 종래의 연구용 시약의 단점을 근본적으로 회피할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 혈관내피세포를 사용하여 본 발명의 융합 펩타이드가 세포내로 침투하는지 여부를 측정한 결과를 나타낸다.

도 2는 플라스미드 DNA인 pGL3 Luciferase Reporter Vectors (Promega)의 개열지도를 나타낸다.

도 3은 본 발명의 융합 펩타이드 및 리포펙타민을 각각 사용하여 혈관내피세포에 대한 플라스미드 DNA의 전달 효율을 측정한 결과를 나타낸다.

도 4는 본 발명의 융합 펩타이드의 세포 독성을 측정한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드에 하나 이상의 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드가 융합된 융합 펩타이드를 제공한다.

[0012] 본 발명의 융합 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 특정 DNA 전달 도메인(즉, 8-mer의 펩타이드)를 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 특정 세포-투과 펩타이드(즉, 11-mer의 펩타이드)를 융합시켜 얻어진 펩타이드로서, 전달하고자 하는 플라스미드 DNA가 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드에 결합하고, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드에 의해 세포내로 투과되도록 설계되어 있다. 따라서, 본 발명의 융합 펩타이드는 동물세포 내로 플라스미드 DNA 등의 핵산을 높은 전달효율로 전달하기 위한 시약, 즉 유전자 전달체로서 유용하게 사용될 수 있으며, 1차 배양세포(primary culture cells)를 사용하는 연구 및 실험에서도 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 융합 단백질은 종래의 유전자 전달체의 단점(특히 낮은 전달효율)을 효과적으로 해결할 수 있다.

[0013] 본 발명의 융합 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드가 융합된 형태일 수 있다. 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드의 C-말단에 하나 이상의 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드가 융합된 형태일 수 있다.

[0014] 본 발명의 융합 펩타이드에 있어서, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드는 1개 혹은 복수개, 바람직하게는 1개 내지 3개가 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 1개가 융합될 경우, 19-mer의 융합 펩타이드를 형성하게 되며; 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 2개가 융합될 경우, 27-mer의 융합 펩타이드를 형성하게 되며; 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 3개가 융합될 경우, 35-mer의 융합 펩타이드를 형성하게 된다. 상기 융합 펩타이드는 FMOC 고체-상 방법 등을 포함한 통상의 방법에 따라 자동화합성기를 사용하여 합성될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 융합 펩타이드는 서열번호 3 내지 5 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

[0015] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명이 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0017] **실시예 1. 융합 펩타이드의 합성**

[0018] 서열번호 3의 융합 펩타이드(19-mer, 'CPP-DBD-8'로 명명), 서열번호 4의 융합 펩타이드(27-mer, 'CPP-DBD-16'으로 명명), 서열번호 5의 융합 펩타이드(35-mer, 'CPP-DBD-24'로 명명)는 펩트론사(대전, 대한민국)에 의뢰하여 합성하였으며, 자동화합성기(PeptrEx-R48, 펩트론사, 대전, 대한민국)를 이용하여 FMOC 고체-상 방법(FMOC solid-phase method)으로 합성하였다. 합성된 펩타이드는 C18 분석용 RP 컬럼(Shiseido capcell pak)을 사용한 역상 고속액체크로마토그래피(reverse-phase HPLC) (Prominence LC-20AB, Shimadzu사, 일본)로 정제 및 분석하였으며, 질량분석기(HP 1100 Series LC/MSD, Hewlett-Packard사, Roseville, 미국)를 이용하여 동정하였다.

[0020] **실시예 2: 융합 펩타이드의 세포내 침투**

[0021] 혈관내피세포인 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs, Lonza)를 EGM 배지(Lonza)에서 배양한 후, 세포를 염색하기 위해 세포-표지 염색시약(cell-labeling dye) (Vybrant™ DiD - red color, Thermo Fisher Scientific)를 최종 5 ul/ml의 농도로 처리하여 37℃ CO_2 인큐베이터에서 30분간 방치하였다. 이후 PBS로 3회

세척하고, 4-웰 챔버(lab-tek chamber slide, Nalge Nunc)에 1 x 10^5 세포를 각각 EGM 배지(Lonza)와 함께 시딩하고, 24시간 동안 배양하여 안정화시켰다. 서열번호 4의 융합 펩타이드(CPP-DBD-16)는 에스테르-활성화 Dylight 488 염색시약-녹색(ester-activated Dylight 488 dye - green color)(Thermo Fisher Scientific)로 다음과 같이 표지하였다. 융합 펩타이드 CPP-DBD-16 10 ug에 Dylight 488 dye를 처리하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후, 스핀 탈염 컬럼(spin desalting column) (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 30초간 원심분리하여 반응하지 않은 dye를 제거하였다. Vybrant™ DiD로 염색되어 4-웰 챔버에서 배양된 HUVECs에 2 ug의 Dylight 488 dye로 염색된 융합 펩타이드 CPP-DBD-16을 처리하고 37℃ CO_2 인큐베이터에서 1시간 동안 방치한 후, PBS로 3회 세척하고 형광현미경으로 Vybrant™ DiD (red) (Abs 644 nm/Em 665 nm), Dylight 488 NHE-ester (green) (Abs 493 nm/Em 518 nm) 파장으로 관찰하였다. 도 1의 결과로부터, 융합 펩타이드 CPP-DBD-16을 처리하지 않은 대조군에는 녹색이 나타나지 않은 반면 융합 펩타이드 CPP-DBD-16 처리군에서는 녹색이 관찰됨을 알 수 있으며, 따라서 융합 펩타이드 CPP-DBD-16은 효과적으로 세포내로 투과됨을 알 수 있다(도 1).

[0023] **실시예 3: 융합 펩타이드를 이용한 플라스미드 DNA 전달**

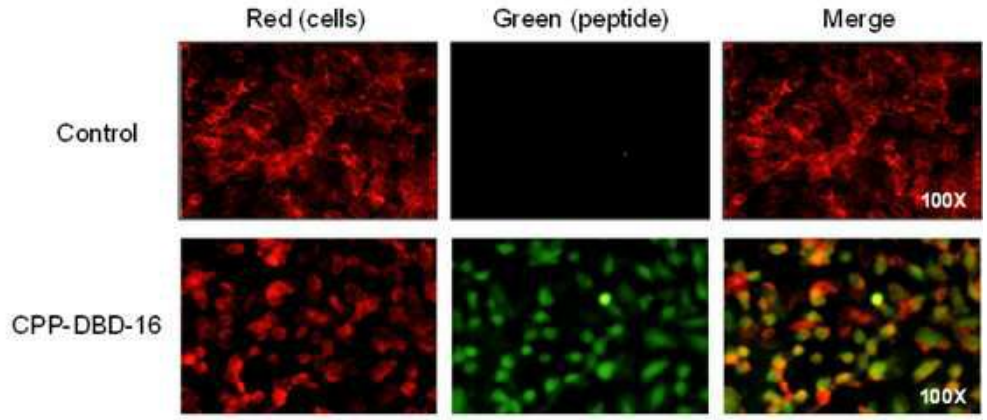
[0024] 혈관내피세포인 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs, Lonza)를 사용하여 본 발명의 융합 펩타이드의 핵산 전달 효율을 평가하였으며, 비교를 위하여 위하여 현재 플라스미드 DNA 전달을 위해 사용되고 있는 시약인 리포펙타민(lipofectamine)의 핵산 전달 효율을 평가하였다. DNA 전달 효율을 위해 사용한 플라스미드 DNA로서, 리포터 유전자로 루시페라아제 유전자가 삽입되어 있는 pGL3 Luciferase Reporter Vectors (Promega) 사용하였고, 활성 분석을 위해 Luciferase Reporter Assay Kit (Promega)을 사용하였다. 상기 pGL3 Luciferase Reporter Vectors (Promega)의 개열지도는 도 2와 같다. 6-웰 플레이트에 1 x 10^6의 HUVECs을 EGM 배지(Lonza)와 함께 12시간 동안 배양한 후, pGL3 vector 4 ug과 융합 펩타이드 CPP-DBD-16 1ug을 섞어 30분간 반응시킨 후 세포에 처리하였다. 이때 비교군은 pGL3 vector 4 ug을 리포펙타민 2000 (Thermo Fisher Scientific) 10 ul과 함께 제조사 지침에 따라 처리하였다. 상기 처리 후 24시간 이후, 루시페라아제 활성 분석을 수행하였다. 도 3의 결과로부터, 리포펙타민 2000을 처리한 대조군에 비해 융합 펩타이드 CPP-DBD-16를 처리한 시험군의 루시페라아제 활성이 약 3배 정도 높음을 알 수 있다(도 3).

[0026] **실시예 4: 융합 펩타이드의 세포 독성**

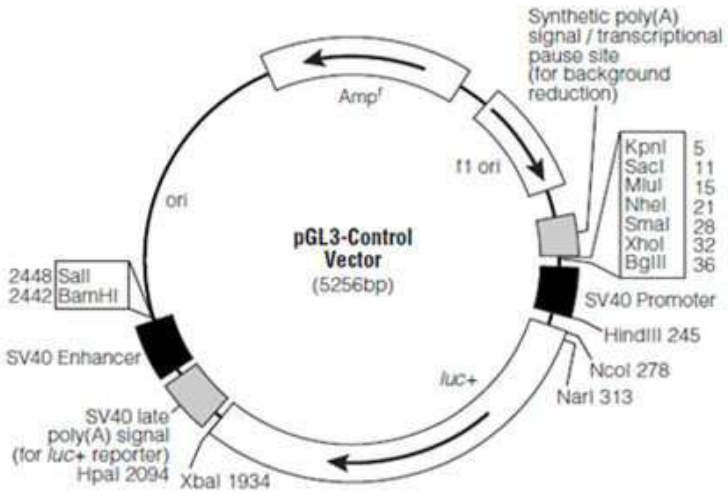
[0027] 기존의 사용중인 일부 유전자 전달체는 세포독성이 발견되는 것으로 보고되고 있어, 본 발명의 융합 펩타이드의 세포 독성을 평가하였다. 24-웰 플레이트에 1 x 10^5의 HUVECs을 EGM 배지(Lonza)와 함께 배양하고 융합 펩타이드 CPP-DBD-16를 농도별로 처리한 후 48시간 후에 MTT 분석을 실시하여 세포 생존율(cell viability)을 측정하였다. 도 4의 결과로부터, 처리 농도에 관계없이 본 발명의 융합 펩타이드는 유의성 있는 세포 사멸을 초래하지 않음을 알 수 있다(도 4).

도면

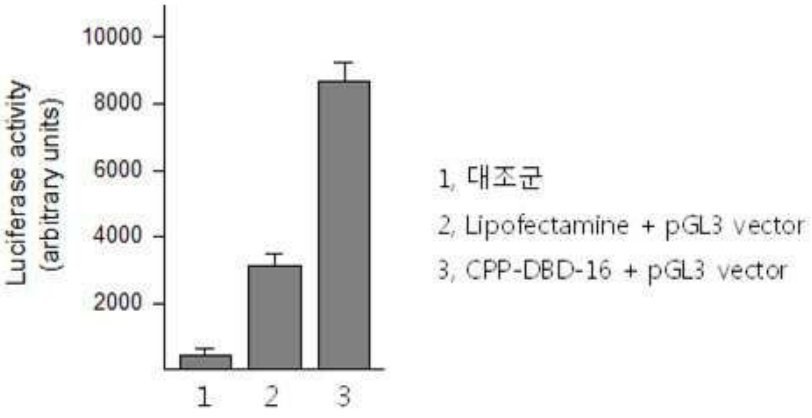
도면1



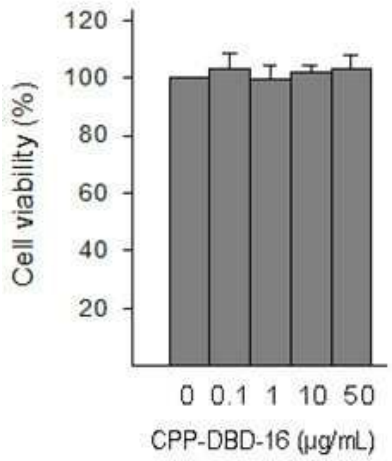
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

<110> College of Medicine Pochon CHA University Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Novel fusion peptides for gene delivery

<130> PN0763

<160> 5

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cell-penetrating peptide

<400> 1

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-binding domain

<400> 2

Lys Ser Pro Lys Lys Ala Lys Lys
1 5

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion peptide

<400> 3

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Ser Pro Lys Lys

1 5 10 15

Ala Lys Lys

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion peptide

<400> 4

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Ser Pro Lys Lys

1 5 10 15

Ala Lys Lys Lys Ser Pro Lys Lys Ala Lys Lys

20 25

<210> 5

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion peptide

<400> 5

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Ser Pro Lys Lys

1 5 10 15

Ala Lys Lys Lys Ser Pro Lys Lys Ala Lys Lys Lys Ser Pro Lys Lys

20 25 30

Ala Lys Lys

35