(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0016890
(43) 공개일자 2009년02월18일

(51) Int. Cl.
C07K 7/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0081208
(22) 출원일자 2007년08월13일
심사청구일자 2007년08월13일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기획팀
(72) 발명자
함경수
서울 서대문구 홍은3동 미성아파트 3동 305호
박윤경
전남 장성군 장성읍 남면 분향리 876-3번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 새로운 세포투과성 펩타이드 및 이를 이용한 생물학적 활성물질의 전달 방법

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체에 관한 것으로, 구체적으로 세포막을 통과하기 어려운 거대 분자의 생물학적 활성을 가지는 물질에 결합하여 상기 물질을 세포 내 또는 생체 내로 전달하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체에 관한 것이다. 본 발명의 PLAC는 소수성을 띄는 새로운 형태의 세포투과성 펩타이드이며, 거대 분자 물질을 세포 및 물질의 손상 없이 세포 내 및 생체 내 각 장기로 운반할 수 있으므로 다양한 치료용 약물의 전달 시스템 및 약물 치료 기술에 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도7



(72) 발명자

신선오

광주 남구 주월1동 금영푸르미 101동 1204호

박성철

광주 북구 두암동 주공아파트 307-305

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 서열번호 1로 기재되는 펩타이드는 소수성인 것을 특징으로 하는 펩타이드 또는 변이체.

청구항 3

제 1항의 펩타이드 또는 변이체와 생물학적 활성을 갖는 물질이 융합된 융합체.

청구항 4

제 3항에 있어서, 생물학적 활성을 갖는 물질은 DNA, RNA, 단백질, 지방, 탄수화물 및 화학화합물을 포함하는 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 융합체.

청구항 5

제 4항에 있어서, 화학화합물은 항암제, 면역질환 치료제, 항바이러스 치료제, 항생제 및 생물의 성장, 발달 또는 분화의 인자를 포함하는 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 융합체.

청구항 6

제 3항에 있어서, 특정 세포, 조직 또는 장기의 수용체와 선택적으로 결합하는 리간드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 융합체.

청구항 7

제 3항의 융합체를 유효성분으로 포함하는 생물학적 활성물질의 세포내 전달용 조성물.

청구항 8

제 3항의 융합체를 유효성분으로 포함하는 유전자 치료용 조성물.

청구항 9

제 1항의 펩타이드 또는 변이체와 목적 단백질이 융합된 융합단백질을 발현하는 재조합 발현벡터.

청구항 10

제 9항에 있어서, 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 코딩하는 DNA와 목적 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 11

1) 제 1항의 펩타이드를 생물학적 활성을 갖는 목적 물질과 결합시켜 전달 복합체를 제조하는 단계; 및

2) 상기의 전달 복합체를 생체 또는 세포 내로 주입하는 단계로 구성되는 생물학적 활성을 갖는 목적 물질의 전달 방법.

청구항 12

1) 제 1항의 펩타이드 또는 변이체를 목적 유전자와 결합시켜 전달 복합체를 제조하는 단계; 및

2) 상기의 전달 복합체를 세포 내로 주입하는 단계로 구성되는 유전자 치료 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 세포막을 통과하기 어려운 거대 분자의 생물학적 활성을 가지는 물질에 결합하여 상기 물질을 세포 내 또는 생체 내로 전달하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 일반적으로 친수성이거나 분자량이 크고 거대한 물질들은 세포막이라는 장벽에 의해 세포 안으로 들어갈 수 없다. 세포막은 펩타이드나 단백질, 핵산과 같은 거대 분자가 세포 내로 들어오지 못하게 막고, 세포막 수용체에 의한 엔도사이토시스(endocytosis)라는 생리적 기작을 통해 세포 내로 들어오더라도 세포의 용해소체 분획(lysosomal compartment)과 융합되어 결국 분해되므로, 상기 거대 분자들을 이용한 질병의 치료 및 예방에 있어서 많은 제약이 따른다. 또한 항암제의 경우 세포 내로 약물을 전달하기 위해선 다약제 저항성(multidrug resistance)과 같은 장애물을 극복해야만 한다. 이에 약물 분해를 막기 위해 다양한 거대 분자 및 약물이 함유된 전달체를 엔도사이토시스 과정을 통하지 않고, 직접 세포 내로 전달하는 많은 방법이 제시되었다. 이러한 방법들에는 마이크로 주입(microinjection), 전기적 자극(electroporation) 등이 있는데, 이는 세포막에 손상을 줄 가능성이 있다. 또 다른 방법들로 pH 민감성 리포좀과 세포투과성 물질을 이용하는 방법이 있다. 하지만 이러한 방법을 통하여 세포 내로 약물들을 전달하였다 하더라도 약효를 발휘하기 위해서는 특정한 기관으로 이동되어야 하는 문제가 있다.

<3> 대부분 약물의 안정성 및 효율성을 높이고 부작용을 감소시키기 위하여 약물전달체를 많이 사용한다. 대표적인 예로 리포좀(liposome)과 마이셀(micelle)이 있다. 리포좀은 인공적으로 만든 인지질 전달체로 친유성 및 친수성 약물 모두 봉입할 수 있으며, 생체 적합성 물질이므로 독성이 없고 약물을 외부환경으로부터 보호한다. 하지만 흡수가 지연되고 분포의 제한을 받으며 대사율이 낮아진다. 또한, 간이나 비장의 세포에 포획되어 혈액으로부터 신속하게 제거되는 단점이 있다. 표적화를 위해 항체를 붙인 면역리포좀의 경우도 혈액 내에서 신속하게 제거되는 문제 때문에 표적에 도달되는 양이 적어질 수밖에 없다. 또 다른 전달체인 마이셀은 약물의 용해도 및 생체이용률을 높여줄 수 있는 특징이 있으나(Vladimir P. Torchilin, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8:343-375, 2006), 물질의 세포 내로의 이동에 관한 효과와 기초 의학적 및 임상적 적용가능성에 대해서는 아직도 많은 연구가 필요하다. 이러한 한계점 때문에, 생체물질을 생체 내로 효과적으로 전달할 수 있고 세포독성이 없으며, 특히 엔도사이토시스를 통하여 들어가지 않는 새로운 제재들이 필요하다.

<4> 최근, 새로운 대안들이 제시되었는데 그중 세포막 투과성 펩타이드(cell penetrating peptide)들이 지금까지 낮은 세포막 투과성 및 빠른 생체 내 반감기로 인하여, 약물로 사용하기 어려웠던 치료용 단백질 및 유전자와 같은 거대 분자들의 이용가치를 높일 수 있어 많은 각광을 받고 있다. 세포투과성 펩타이드들이 단백질뿐만 아니라 여러 물질들과 화학적으로 결합하여 세포 내로 상기 물질들을 투과시킬 수 있다는 것은 이미 많이 보고되었다(Maarja and Ulo, *Current Opinion in Pharmacology*, 6:509-514, 2006). 이러한 세포막 투과성 펩타이드에는 대표적으로 인간 면역 결핍 바이러스의 전사인자인 Tat 단백질의 47번째 아미노산부터 57번째 아미노산으로 구성된 펩타이드(Schwarze SR *et al.*, *Science*, 285:1569-1572, 1999), 초파리의 안테나페디아(antennapedia) 단백질의 339번째 아미노산부터 355번째 아미노산으로 이루어진 펩타이드(Joliot A. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci*, 88:1864-1868, 1991)등이 알려져 있다. 이러한 펩타이드에 의한 거대분자의 생체 내 운반 가능성에 대해서도 많은 연구가 되어왔다. Tat 펩타이드에 의해 베타갈락토시데이스의 생체내 운반(Schwarze SR *et al.*, *Science*, 285:1569-1572, 1999), 알지닌 올리고머(arginine oligomer)에 의한 사이클로스포린 A(cyclosporin A)의 국소적 적용 및 그에 따른 항염증효과(Jonathan B. Rothbard. *et al.*, *Nature Medicine*, 6:1253-1257, 2000), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor)의 시그날 펩타이드로부터 유래한 MTS 펩타이드에 의한 SOC3 단백질의 생체 내 침투 및 항염증 및 항세포사멸 효과(DaeWoong Jo *et al.*, *Nature Medicine*, 11:892-898, 2005), 인간의 전사인자(transcription factor)의 시그날 펩타이드로부터 유래된 Hph-1 펩타이드에 의한 CTL-4 부분의 코점막 적용에 따른 알러지 염증반응의 억제효과(JM Choi *et al.*, *Nature Medicine*, 12:574-579, 2006) 등이 보고되어 있다. 알려진 대부분의 세포투과성 펩타이드들은 양이온을 띠는 특징이 있다. 상기 양이온을 띠는 펩타이드의 전달 기작이 엔도사이토시스 인지에 대해서는 아직까지 논란이 많다. 또한 세포투과성 펩타이드 자체나 이와 결합한 작은 분자들은 정전기적 인력이나 수소결합에 의한 에너지 비의존적 투과 기작을 갖고, 단백질과 같은 거대분자의 경우는 에너지 의존적인 기작을 갖는다고 알려져 있다.

<5> 본 발명자들은 세포 내에 존재하는 포스포라이페이즈 $A_2\alpha$의 활성억제 펩타이드를 개발하던 중, 알려진 펩타이드 중 가장 짧은 길이를 갖고 소수성을 띈 새로운 세포투과성을 가진 펩타이드를 발견하였고 이를 PLAC라고 명명하였다. PLAC 펩타이드가 목적 단백질을 동물세포뿐만 아니라 생체 내 각 장기로 아무 손상 없이 운반할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> 본 발명의 목적은 거대 분자 물질을 세포 및 물질의 손상 없이 세포 내 및 생체 내 각 장기로 운반할 수 있는 세포투과성 펩타이드를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<7> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체를 제공한다.

<8> 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체와 생물학적 활성을 갖는 물질이 융합된 융합체를 제공한다.

<9> 또한, 본 발명은 상기 융합체를 유효성분으로 포함하는 생물학적 활성물질의 세포내 전달용 조성물 및 유전자 치료용 조성물을 제공한다.

<10> 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체와 목적 단백질이 융합된 융합 단백질을 발현하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

<11> 또한, 본 발명은 1) 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드를 생물학적 활성을 갖는 목적 물질과 결합시켜 전달 복합체를 제조하는 단계; 및

<12> 2) 상기의 전달 복합체를 생체 또는 세포 내로 주입하는 단계로 구성되는 생물학적 활성을 갖는 목적 물질의 전달 방법을 제공한다.

<13> 아울러, 본 발명은 1) 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체를 목적 유전자와 결합시켜 전달 복합체를 제조하는 단계; 및

<14> 2) 상기의 전달 복합체를 세포 내로 주입하는 단계로 구성되는 유전자 치료 방법을 제공한다.

<15> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<16> 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체를 제공한다.

<17> 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 소수성을 띄는 세포투과성 펩타이드로 PLAC로 명명하였다. 상기 펩타이드 또는 변이체는 생물학적 활성을 갖는 물질에 결합하여 세포 내 또는 생체 내로 상기 물질을 전달하여 생리적 현상과 관련된 활성 또는 치료 목적과 관련된 활성을 나타내게 할 수 있다. 본 발명의 물질 전달기능을 가지는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체는 매우 작은 펩타이드이므로 혹시 발생할 수 있는 활성물질에 대한 생물학적 간섭을 최소화할 수 있다.

<18> 상기 변이체는 상기 펩타이드의 아미노산 단편 또는 일부가 치환 또는 결실되거나, 아미노산 서열의 일부가 생체 내에서 안정성을 증가시킬 수 있는 구조로 변형되거나, 친수성을 높이기 위해 아미노산 서열의 일부가 변형되거나, 아미노산의 일부 또는 전부가 L- 또는 D- 아미노산으로 치환되거나 또는 아미노산의 일부가 변형된 단편들일 수 있다. 상기 변이체는 세포투과성 및 세포 내 전달 기능을 보유하도록 변형될 것이다.

<19> 본 발명자들은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 세포투과성 펩타이드(PLAC)를 합성하였다. 상기 펩타이드의 세포 내로의 유입을 유세포 분석기를 이용하여 확인한 결과, 도 1에 나타난 것처럼 반응시간이 길어짐에 따라, 세포 내로 침투되는 형광 펩타이드의 양이 많아짐을 확인할 수 있다. 또한, 상기 펩타이드의 세포 내로의 유입을 공초점 형광분석기를 이용하여 확인한 결과, 도 2에 나타난 것처럼 PLAC 펩타이드가 세포질뿐 아니라, 핵까지 도달한 것을 확인할 수 있었다.

<20> 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체와 생물학적 활성을

갖는 물질이 융합된 융합체를 제공한다.

<21> 상기 생물학적 활성은 세포 내 또는 생체 내로 전달되어 생리적 현상과 관련된 활성 또는 치료 목적과 관련된 활성을 나타낸다. 또한 상기 생물학적 활성을 갖는 물질은 DNA, RNA, 단백질, 지방, 탄수화물 및 화학화합물일 수 있다. 상기 화학화합물은 항암제, 면역질환 치료제, 항바이러스 치료제, 항생제 및 생물의 성장, 발달 또는 분화의 인자일 수 있다. 본 발명의 물질 전달기능을 가지는 세포투과성 펩타이드는 매우 작은 펩타이드이므로 혹시 발생할 수 있는 활성물질에 대한 생물학적 간섭을 최소화할 수 있다. 상기 펩타이드 또는 변이체와 생물학적 활성을 갖는 물질의 융합체는 정맥내(intravein), 복막내(intraperitoneal), 근육내(intramuscular), 피하내(subcutaneous), 피내(intradermal), 비내(nasal), 점막내(mucosal), 흡입(inhalation) 및 경구(oral) 등의 경로로 주입함으로써 생체 내 전달될 수 있다. 상기 융합체를 특정 세포, 조직 또는 장기로 전달하고자 하는 경우, 상기 생물학적 활성을 갖는 물질은 특정 세포, 조직 또는 장기에서 특이적으로 발현하는 수용체와 선택적으로 결합할 수 있는 리간드의 세포외 부분 단백질, 또는 이들 수용체 또는 리간드와 특이적으로 결합할 수 있는 단클론항체(mAb) 및 변형된 형태와 결합하여 융합체를 형성할 수 있다. 상기 펩타이드와 생물학적 활성을 갖는 물질의 결합은 뉴클레오티드 수준에서 발현 벡터를 이용한 클로닝 기법에 의한 간접적인 연결에 의하거나 펩타이드와 생물학적 활성을 갖는 물질의 화학적 또는 물리적 공유 결합 또는 비공유 결합에 의한 직접적인 연결에 의할 수 있다.

<22> 세포투과 펩타이드 PLAC의 단백질 세포내 운반 가능성을 확인하기 위해서, 베타갈락토시데이와 PLAC의 융합단백질을 발현하는 벡터를 제조하고, 이로부터 재조합 베타갈락토시데이스와 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백질을 수득하였다. SDS-PAGE를 실시하여, 분자량과 정제도를 확인한 결과, 도 5에 나타난 것처럼 120kDa의 분자량과 90% 이상의 정제도를 나타내었다. 상기 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백질의 세포 내 전달을 확인하기 위해 X-gal에 의한 색 변화 정도를 확인한 결과, 도 6-1 및 6-2에서 나타난 것처럼 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백질은 세포 내로 침투되어 푸른색을 띄는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백질의 생체 내 전달을 확인하기 위해 동물실험을 수행한 결과, 도 7에 나타난 것처럼 마우스의 모든 장기에서 푸른색이 띄는 것을 확인함으로써 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백질의 생체 내 전달을 확인할 수 있었다.

<23> 또한, 본 발명은 상기 융합체를 유효성분으로 포함하는 생물학적 활성물질의 세포내 전달용 조성물 및 유전자 치료용 조성물을 제공한다.

<24> 본 발명의 조성물은 종래에 생물학적 활성물질이 쉽게 통과할 수 없었던 세포막을 통과하여 세포 내에 직접 작용할 수 있게 한다. 따라서 본 발명의 조성물은 약물전달체계(drug delivery system)의 발전에 획기적인 계기가 될 수 있다.

<25> 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량%로 포함한다.

<26> 본 발명의 조성물은 상기 유효성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

<27> 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포좀 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적정한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

<28> 상기 융합체를 유효성분으로 포함하는 조성물은 정맥내(intravein), 복막내(intraperitoneal), 근육내(intramuscular), 피하내(subcutaneous), 피내(intradermal), 비내(nasal), 점막내(mucosal), 흡입(inhalation) 및 경구(oral) 등의 경로로 주입함으로써 생체 내 전달될 수 있다. 투여량은 대상의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 화합물의 경우 약 0.1 내지 100 ㎎/㎏ 이고, 바람직하게는 0.5 내지 10 ㎎/㎏ 이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

<29> 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체와 목적 단백질이 융합된 융합 단백질을 발현하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

<30> 상기 목적 단백질은 세포 내 또는 생체 내로 전달되어 생리적 현상과 관련된 활성 또는 치료 목적과 관련된 활성을 나타내는 것일 수 있다. 상기 재조합 발현 벡터는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드와 목적 단백질의 서열 및 으들 융합 단백질의 정제를 용이하게 하는 태그(tag) 서열 예를 들어, 연속된 히스티딘 코돈, 말토우즈 바인딩 단백질 코돈 및 Myc 코돈 등을 포함할 수 있고, 융합체의 가용성(solubility)을 증가시키기 위한 융합파트너(partner) 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 융합 단백질의 전체적 구조와 기능의 안정 또는 각 유전자가 코딩하는 단백질의 유연성(flexibility)을 위하여 1개 이상의 글라이신, 프롤린, 아미노산 AAY를 포함하는 스페이서(spacer) 아미노산 또는 염기서열을 추가로 포함할 수 있다. 또한 상기 융합 단백질의 불필요한 부분을 제거하기 위하여 효소에 의해 특이적으로 절단되는 서열, 발현 조절 서열 및 세포 내 전달을 확인하기 위한 마커(marker) 또는 리포터 유전자 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 재조합 발현벡터에 사용되는 발현 조절 서열은 목적 DNA 및/또는 RNA가 선택적으로 전달 또는 발현되는 세포, 조직, 장기에 특이적인 프로모터를 포함하는 조절 도메인(regulatory domain)으로 구성될 수 있다.

<31> 또한, 본 발명은 1) 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체를 생물학적 활성을 갖는 목적 물질과 결합시켜 전달 복합체를 제조하는 단계; 및

<32> 2) 상기의 전달 복합체를 생체 또는 세포 내로 주입하는 단계로 구성되는 생물학적 활성을 갖는 목적 물질의 전달 방법을 제공한다.

<33> 단계 1의 결합은 뉴클레오티드 수준에서 발현 벡터를 이용한 클로닝 기법에 의한 간접적인 연결에 의하거나 펩타이드 또는 변이체와 생물학적 활성을 갖는 물질의 화학적 또는 물리적 공유 결합 또는 비공유 결합에 의한 직접적인 연결에 의할 수 있다. 상기 펩타이드 또는 변이체와 생물학적 활성을 갖는 물질의 전달 복합체를 생체 또는 세포 내 주입은 정맥내(intravein), 복막내(intraperitoneal), 근육내(intramuscular), 피하내(subcutaneous), 피내(intradermal), 비내(nasal), 점막내(mucosal), 흡입(inhalation) 및 경구(oral) 등의 경로로 주입함으로써 수행될 수 있다. 본 발명의 전달 방법은 배양 세포뿐만 아니라 일반적인 생체 내 전달, 즉 동물 세포, 동물 조직 및 동물체로의 전달시에도 충분히 확대 적용될 수 있다.

<34> 실시예 1의 방법으로 제조된 본 발명의 펩타이드가 생체 내 고분자 전달 시 무해하게 사용가능한지 확인하기 위해 세포독성을 확인하였다. 그 결과, 표 1에 나타난 것처럼 PLAC는 200 μM의 높은 농도에서도 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

<35> 아울러, 본 발명은 1) 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재되는 세포투과성 펩타이드 또는 변이체를 목적 유전자와 결합시켜 전달 복합체를 제조하는 단계; 및

<36> 2) 상기의 전달 복합체를 세포 내로 주입하는 단계로 구성되는 유전자 치료 방법을 제공한다.

<37> 단계 1의 결합은 펩타이드 또는 변이체와 유전자의 화학적 또는 물리적 공유 결합 또는 비공유 결합에 의한 직접적인 연결에 의할 수 있다. 상기 생물학적 활성을 갖는 물질과 펩타이드 또는 변이체 전달 복합체를 생체 또는 세포 내 주입은 앞서 기재된 것과 동일한 경로로 투여 가능하다. 본 발명의 전달 방법은 배양 세포뿐만 아니라 일반적인 생체 내 전달, 즉 동물 세포, 동물 조직 및 동물체로의 전달시에도 충분히 확대 적용될 수 있다.

<38> 추가로, 유전자의 전달 복합체를 비면역원성, 비감염성이며, 레트로바이러스 또는 아데노 바이러스와 같은 벡터 유기체에 DNA가 패키징되어 있지 않기 때문에 플라스미드 크기에 제한을 받지 않는다. 따라서 어떤 실용적인 크기의 재조합 유전자 발현 구조물에 사용될 수 있다.

효 과

<39> 본 발명의 PLAC는 소수성을 띄는 새로운 형태의 세포투과성 펩타이드이며, 거대 분자 물질을 세포 및 물질의 손상 없이 세포 내 및 생체 내 각 장기로 운반할 수 있으므로 다양한 치료용 약물의 전달 시스템 및 약물 치료 기술에 유용하게 이용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<40> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<41> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<42> **<실시예 1> 펩타이드의 합성 및 분리정제**

<43> 본 발명자들은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 세포투과성 펩타이드(PLAC)를 합성하였다. 상기 펩타이드를 이용한 생체분자의 전달을 형광분석법 등에 의해 확인하기 위해 형광물질은 FITC가 표지된 FITC-PLAC를 합성하였다.

<44> 구체적으로, 펩타이드 제조업체에 의뢰하여((주) 애니젠, 한국) 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법(Merrifield, RB., *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149, 1963)에 따라, Fmoc(9-fluorenylmethoxy carbonyl)를 아미노기 보호 용기로 이용하여 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 세포투과성 펩타이드를 합성하였다. 본 발명에서 설계한 펩타이드의 카르복실말단이 $-NH_2$ 형태인 펩타이드는 링크 아미드 MBHA-레진(Rink Amide MBHA-Resin)을 출발물질로 사용하였으며, 카르복실말단이 -OH 형태의 펩타이드는 Fmoc-아미노산-왕 레진(Fmoc-amino acid Wang Resin)을 출발물질로 사용하였다. Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 사슬(chain)의 연장은 N-하이드록시벤조-트리아졸-디사이클로-헥시카르보이미드법(N-hydroxybenzo triazole-dicyclo-hexycarbodiimide)(HOBt-DCC)에 의해 실시하였다.

<45> FITC는 10 ㎎/㎖의 농도로 DMSO에 녹여 펩타이드 10 ㎎에 FITC 용액 100 ㎕의 비율로 섞어 1시간 동안 반응해주어, 펩타이드에 FITC를 표지하였다.

<46> 각 펩타이드의 아미노말단의 Fmoc-아미노산을 커플링(coupling) 시킨 후, 20% 피페리딘/N-메틸 피롤리돈(20% piperidine /N-methyl pyrolidone, 이하 'NMP') 용액으로 Fmoc기를 제거하고 NMP 및 디클로로메탄(dichoromethane; DCM)으로 여러 번 씻어준 다음 질소 가스로 건조시켰다. 여기에 트리플루오로아세틱산: 페놀: 티오아니졸: 물: 트리이소프로필실란(trifluoroacetic acid(TFA): phenol: thioanisole: H_2O: triisopropylsilane = 85: 5: 5: 2.5: 2.5(vol./vol.)) 용액을 가하고 2시간 동안 반응시켜 보호기의 제거 및 레진으로부터 펩타이드를 분리시킨 후, 디에틸에테르(diethylether)로 펩타이드를 침전시켰다. 상기의 방법으로 얻은 크루드(crude) 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 아세토니트릴 농도구배(acetonitrile gradient)에서 정제형 역상(reverse phase, RP)-HPLC 컬럼(Delta Pak, C_{18} 300Å, 15, 19.0mm ×30 cm, Waters, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 합성 펩타이드를 6N HCl로 110℃에서 가수분해한 후 잔사를 감압 농축하고, 0.02N HCl에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정하였다. 또한, MALDI 질량 분석법(Hill, *et al* ., *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 5: 395, 1991)을 이용하여 펩타이드의 분자량을 측정하였다.

<47> 그 결과, 본 발명에서 합성한 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 95% 이상의 순도를 나타내었으며, 측정된 분자량이 아미노산 서열로부터 계산하여 얻은 분자량과 일치하여 정확한 아미노산 서열을 가지는 펩타이드가 합성되었음을 확인하였다.

<48> **<실시예 2> PLAC의 세포 내 유입 확인**

<49> **<실시예 2-1> 유세포 분석기(flow cytometry)**

<50> 실시예 1의 방법으로 제조된 본원 발명의 펩타이드의 세포 내로의 유입을 유세포 분석기를 이용하여 확인하였다.

<51> 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 포함된 RPMI1640 배지에서 배양된 U937 세포(CRL-1593.2, ATCC)를 6 웰 플레이트에 각각 5×10^5 개씩 분주하고 FITC-PLAC 펩타이드를 5 μM 농도로 10분 및 20분간 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 처리한 후 상등액을 제거했다. 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)로 4회 세척한 후 유세포 분석기를 이용하여 세포 내 형광을 분석하였다. 즉, 각각 즉, 각각 FL1 레이저로 530/30 ㎚ 의 여기(excitation) 및 검출 파장으로, 유세포 분석기(BD FACSCalibur, Becton Dickinson Korea, Inc., 한국)를 사용하여 세포를 분석하였다. 갇힌(gated) 가변 모집단을 확인하기 위하여 측면 비산(scatter) 대 전면 비산 대수를 사용하였고, 이 모집단에 대하여 형광의 수준(세포 내도 도입된 단백질의 양)을 측정하였다. (A) 음성 대조군(세포에 같은 농도의 FITC만 처리), (B) 10분 처리군 및 (C) 20분 처리군에 대한 분포를 일정한 세포수에서 형광의 양으로서 도 1에 나타내었다.

<52> 그 결과, 도 1에 나타난 것처럼 반응시간이 길어짐에 따라, 세포 내로 침투되는 형광 펩타이드의 양이 많아짐을 확인할 수 있다.

<53> **<실시예 2-2> 공초점 형광분석(Confocal microscopy)**

<54> 실시예 1의 방법으로 제조된 본원 발명의 펩타이드의 세포 내로의 유입을 공초점 형광분석기를 이용하여 확인하였다.

<55> 10% FBS가 포함된 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 배양된 NIH3T3 세포(ATCC, CRL-1658)를 폴리-L-라이신 코팅된 슬라이드에 각각 1 × 10^5 개씩 분주하고 16시간 배양한 후, FITC-PLAC 펩타이드를 5 μM 농도로 30분간 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 처리한 후 상등액을 제거했다. 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)로 4회 세척한 후 커버 글래스를 덮어 공초점 형광현미경(510-META, CARL ZEISS Korea, Inc., 한국)을 이용하여 488 ㎚ 형광필터로 세포 내 형광 유무를 관찰함으로써 PLAC 펩타이드의 세포 내 분포를 분석하였다.

<56> 그 결과 도 2에 나타난 것처럼 PLAC 펩타이드가 세포질뿐 아니라, 핵까지 도달한 것을 확인할 수 있었다.

<57> **<실시예 3> 세포투과성 펩타이드 PLAC의 세포독성 확인**

<58> 실시예 1의 방법으로 제조된 본원 발명의 펩타이드가 생체 내 고분자 전달 시 무해하게 사용가능한지 확인하기 위해 세포독성을 확인하였다.

<59> 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양된 HaCat 세포(Dr. Norbert Fusenig's laboratory)를 3 × 10^3 씩 96 웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후, PLAC 펩타이드를 표 1에 나타낸 바와 같이 농도별로 처리하여 24시간 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 반응시켰다. 배양 후, 5 ㎎/㎖ 농도로 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 녹인 MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 용액 20 ㎕를 각 웰에 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 상층액을 제거하고, 200 ㎕의 DMSO를 넣어 형성된 MTT 크리스탈을 녹여, 560 ㎚에서 결과를 확인하고, PLAC 펩타이드 비처리군의 세포수에 대한 처리군들의 세포생존율을 계산하였다.

<60> 그 결과, 표 1에 나타난 것처럼 PLAC는 200 μM의 높은 농도에서도 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

표 1

<61> 세포독성

PLAC 농도	세포생존율(%)
200 μM	100
100 μM	100
50 μM	100
25 μM	100
12.5 μM	100
6.25 μM	100

<62> **<실시예 4> 세포투과성 펩타이드 PLAC를 포함하는 발현벡터 제조**

<63> 세포투과 펩타이드 PLAC의 단백질 세포내 운반 가능성을 확인하기 위해서, 베타갈락토시데이와 PLAC의 융합단백질을 발현하는 벡터를 제조하였다.

<64> **<실시예 4-1> 베타갈락토시데이스 발현 벡터의 제조**

<65> 세포투과 펩타이드 PLAC의 단백질 세포 내 운반 가능성을 확인하기 위해서, 베타갈락토시데이스(beta-galactosidase)를 발현하는 벡터를 제조하였다.

<66> pBAD/His/*lacZ*(Invitrogen, USA)로부터 서열번호 2 및 3으로 기재되는 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머와 Pfu DNA 중합효소를 이용하여 PCR 반응을 수행함으로써 베타갈락토시데이스의 완전한 서열을 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 제한효소 *Hind*Ⅲ 및 *BamH*Ⅰ으로 절단하여 동일한 제한효소로 절단된 pREST-A(Invitrogen, USA)에 서브클론 되었다(도 3). 뉴클레오타이드 서열 결정을 통하여 대략 3 kb 크기의 삽입체를 가진 클론을 확인하였다.

<67> **<실시예 4-2> 베타갈락토시데이스 발현 벡터의 제조**

<68> 세포투과 펩타이드 PLAC의 단백질 세포 내 운반 가능성을 확인하기 위해서, 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백

질을 발현하는 벡터를 제조하였다.

<69> pBAD/His/*lacZ*(Invitrogen, USA)로부터 서열번호 4 및 5로 기재되는 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머와 Pfu DNA 중합효소를 이용하여 PCR 반응을 수행함으로써 베타갈락토시데이스의 완전한 서열을 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 제한효소 *Hind*Ⅲ 및 *BamH*Ⅰ으로 절단하여 동일한 제한효소로 절단된 pREST-A(Invitrogen, USA)에 서브클론 되었다(도 4). 뉴클레오타이드 서열 결정을 통하여 대략 3 kb 크기의 삽입체를 가진 클론을 확인하였다.

<70> **<실시예 5> 재조합 단백질의 발현 및 정제**

<71> 재조합 베타갈락토시데이스와 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백질을 수득하였다.

<72> 실시예 4-1 내지 4-2에서 제조된 발현벡터들을 열충격 형질전환 방법에 의해 대장균 BL21(DE3)pLysS(Stratagene, USA)에 형질전환시킨 다음, 100 ㎍/㎖의 앰피실린(ampicillin)과 35 ㎍/㎖의 클로람페니콜(chloramphenicol)을 포함하는 LB 고체배지에 접종하고 37℃에서 16시간 배양하였다. 새로운 LB 배지에 1/50배 희석되게 접종하여 37℃에서 200 rpm으로 교반하여 배양하였다. $O.D._{600}$ = 0.6이 되면 IPTG를 최종농도가 0.1 mM 이 되게 첨가해준 다음 4시간을 더 배양하여 재조합 단백질들의 과발현을 유도하였다. 상기 배양액을 5,000 rpm으로 10분간 4℃에서 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 1 ㎎/㎖의 라이소자임이 포함된 결합용액(20 mM 트리스, 10 mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 1% 트리톤 X-100, pH 7.4)으로 세포들을 풀어주었다. 얼음에서 30분간 방치한 후, 초음파 분쇄기를 사용하여 200W의 세기로 10초간 초음파를 쏘여주고 10초간 냉각하는 과정을 6번 반복하였다. 세포내용물을 16,000 rpm으로 30분간 4℃에서 원심분리하여 수용성의 단백질을 수확하였다. 수확된 크루드 단백질(crude protein)을 5 ㎖의 Ni^{2+}-NTA 아가로스 레진(Qiagen, USA)에 넣고 4℃에서 1시간 동안 교반하여 재조합 단백질들과 Ni^{2+}-NTA 아가로스 레진을 결합시키고 난 뒤, 크로마토그래피용 컬럼에 넣어서 20 ㎖의 세척용액(20 mM Tris, 30 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100, pH 7.4)으로 2번 세척한 후, 2.5 ㎖의 용출용액(20 mM 트리스, 250 mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 1% 트리톤X-100, pH 7.4)으로 4회에 걸쳐 재조합 단백질들을 수확하였다. 마지막으로 SDS-PAGE를 실시하여, 분자량과 정제도를 확인하였다.

<73> 그 결과, 도 5에 나타난 것처럼 120 kDa의 분자량과 90% 이상의 정제도를 나타내었다.

<74> **<실시예 6> 재조합 단백질의 세포 내 전달 확인**

<75> 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백질의 세포 내 전달을 확인하기 위해 X-gal에 의한 색 변화 정도를 확인하였다.

<76> 16시간 동안 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에서 배양된 HaCat 세포([입수처를 기재하여 주시기 바랍니다.])와 10% FBS 함유된 RPMI1640 배지에서 배양된 HeLa-S3 세포([CCL-2.2, ATCC)에 실시예 4 내지 5의 방법으로 수득한 재조합 베타갈락토시데이스와 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백질을 각각 10 μM의 농도로 가한 후, 1시간 동안 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 반응시켰다. 상층액을 제거하고 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline;PBS)로 4회 세척 후 고정용액(2% 포름알데하이드, 0.2% 글루타르알데하이드)에서 15분간 고정시켰다. 고정용액을 제거하고 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline;PBS)로 4회 세척한 후, 베타갈락토시데이스 염색용액(X-gal, 35 mM potassium ferrocyanide, 35 mM potassium ferricyanide, 2 mM $MgCl_2$; Sigma, USA)을 첨가하여, 1시간 동안 37℃에서 반응시킨 후 푸른색으로의 색 변화를 관찰하였다.

<77> 그 결과, 도 6-1 및 6-2에서 나타난 것처럼 HaCat 세포뿐만 아니라 HeLa-S3 세포에서도 재조합 베타갈락토시데이스는 세포 내로 침투되지 못하는 반면, 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백질은 세포 내로 침투되어 푸른색을 띄는 것을 확인할 수 있었다.

<78> **<실시예 7> 재조합 단백질의 생체 내로 전달 확인**

<79> 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백질의 생체 내 전달을 확인하기 위해 동물실험을 수행하였다.

<80> 실시예 4 내지 5의 방법으로 수득한 재조합 베타갈락토시데이스와 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백질 5 ㎎을 각각 500 ㎕의 부피로 5주령의 BALB/c 마우스(샘타코, 한국)에게 복강 주사하였다. 4시간 경과 후 마우스를 해부하여 각 장기(간, 심장, 정소, 신장, 뇌, 폐 및 이자)를 떼어내어 5% 포르말린에 고정하였고, PBS로 세척하였다. 각 장기를 베타갈락토시데이스 염색용액(X-gal, 35 mM potassium ferrocyanide, 35 mM potassium ferricyanide, 2 mM $MgCl_2$; Sigma, USA)에 담가 4시간 동안 반응시킨 후, 푸른색으로의 색 변화를 관찰하였다.

<81> 그 결과, 도 7에 나타난 것처럼 마우스의 모든 장기에서 푸른색이 띄는 것을 확인함으로써 베타갈락토시데이스-PLAC 융합 단백질의 생체 내 전달을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

<82> 도 1은 NIH/3T3 세포에서 PLAC의 투과를 유세포 분석기를 이용하여 나타낸 것이다.

<83> 도 2는 NIH/3T3 세포에서 PLAC의 투과를 Confocal microscopy를 이용하여 나타내는 것이다.

<84> 도 3은 발현벡터 pRSET-β-gal의 구조를 나타낸 것이다.

<85> 도 4는 PLAC를 이용한 발현벡터 pRSET-β-gal-PLAC의 구조를 나타낸 것이다.

<86> 도 5는 정제된 발현벡터 pRSET-β-gal와 pRSET-β-gal-PLAC 융합단백질의 코마쉬블루 염색 결과를 나타낸 것이다.

<87> 도 6은 β-gal-PLAC 융합단백질의 세포내 전달 효과를 나타낸 것이다.

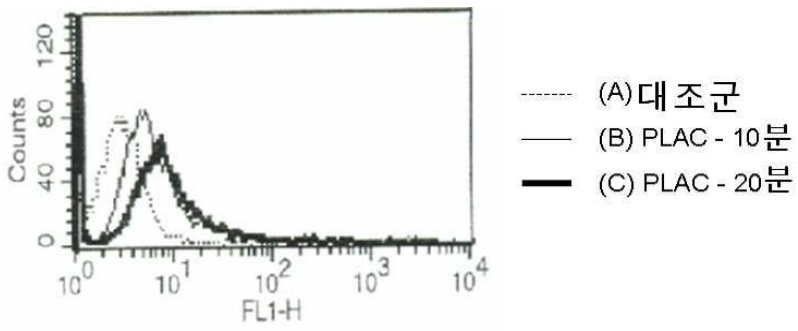
<88> 도 6-1: HaCat 세포에서의 β-gal-PLAC 융합단백질의 세포내 전달 효과.

<89> 도 6-2: HeLa-S3 세포에서의 β-gal-PLAC 융합단백질의 세포내 전달 효과.

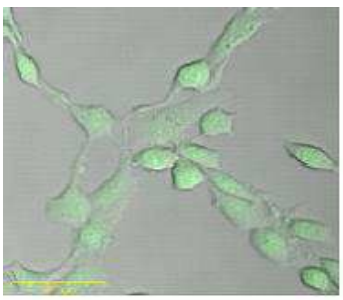
<90> 도 7은 PLAC에 의한 β-gal 단백질의 다양한 장기 내로의 전달효과를 나타낸 것이다.

도면

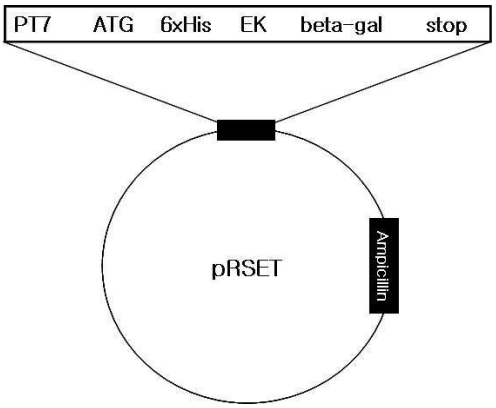
도면1



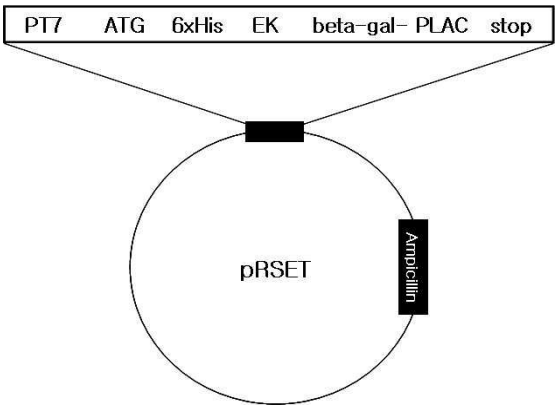
도면2



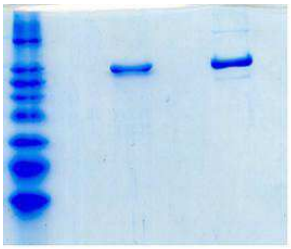
도면3


PT7
ATG
6xHis
EK
beta-gal
stop
pRSET
Ampicillin

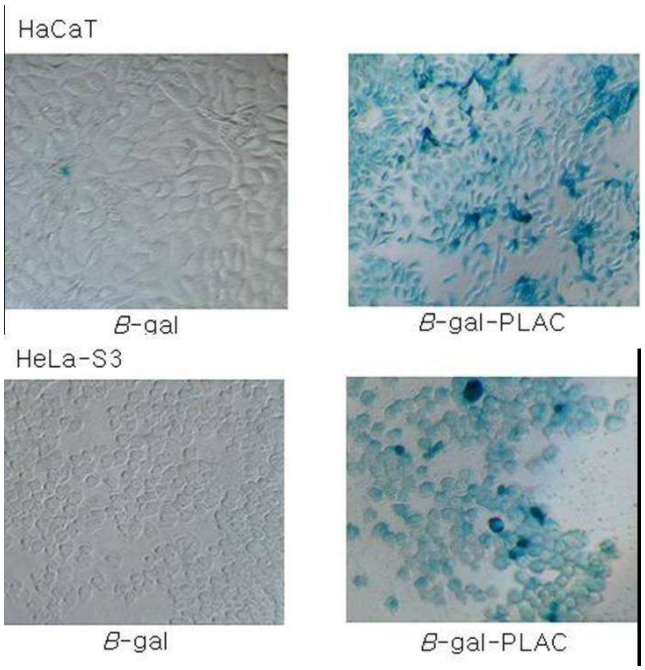
도면4


PT7
ATG
6xHis
EK
beta-gal- PLAC
stop
pRSET
Ampicillin

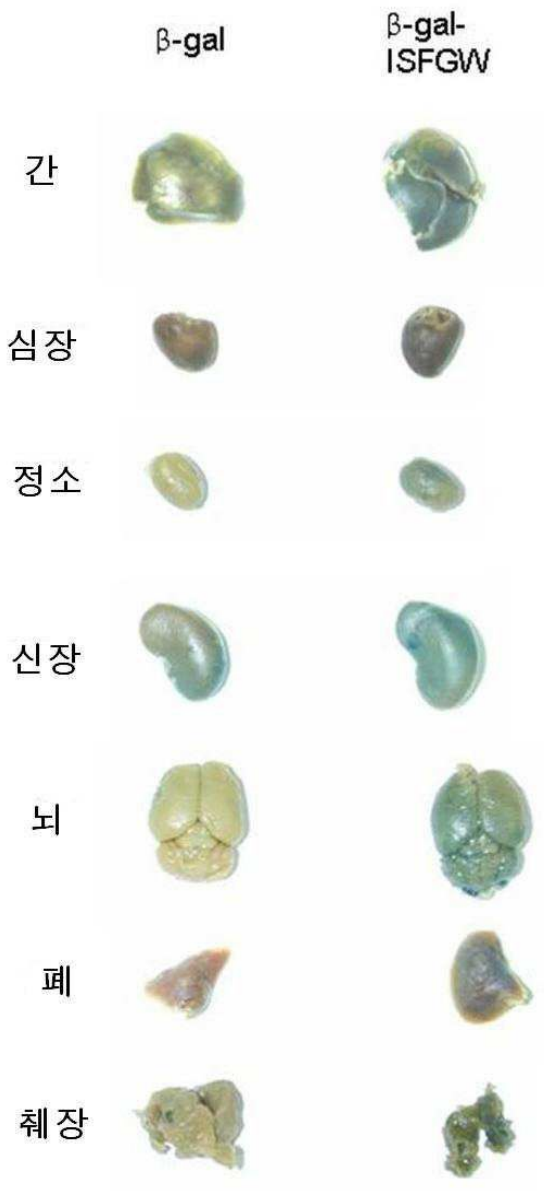
도면5


β-gal
β-gal-PLAC

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, ChoSun University

<120> New penetrating peptides and method for delivery of biologically active agents using thereof

<130> 7p-07-97

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Penetrating peptide

<400> 1
Ile Ser Phe Gly Trp
1 5

<210> 2
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> non-fusion vector sense primer

<400> 2
attgaatcca tgatagatcc cgtcgtt 27

<210> 3
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> non-fusion vector antisense primer

<400> 3
atccaagctt ttatttttga caccagac 28

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fusion vector sense primer

<400> 4
attgaatcca tgatagatcc cgtcgtt 27

<210> 5
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fusion vector antisense primer

<400> 5
atccaagctt ttaccagcca aaacttattt tttgacacca gaccaac 47