

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 1월 30일 (30.01.2020) **WIPO | PCT**

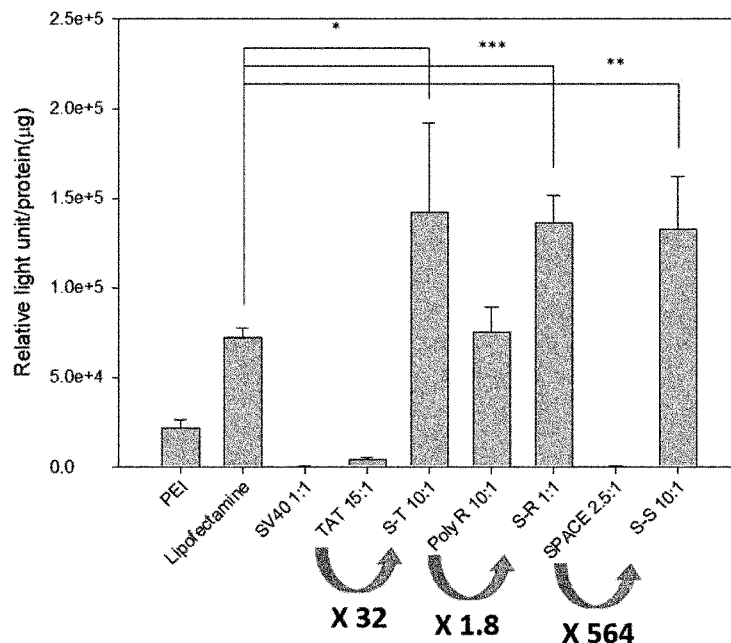


(10) 국제공개번호
WO 2020/022560 A1

- (51) 국제특허분류: *C07K 7/06* (2006.01) *A61K 47/64* (2017.01)
C07K 7/08 (2006.01) *A61K 47/65* (2017.01)
C07K 14/005 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/012211
- (22) 국제출원일: 2018년 10월 17일 (17.10.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0085867 2018년 7월 24일 (24.07.2018) KR
- (71) 출원인: 인천대학교 산학협력단 (INCHEON UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 22012 인천시 연수구 아카데미로 119, Incheon (KR).
- (72) 발명자: 황병희 (HWANG, Byeong Hee); 15023 경기도 시흥시 옥구천동로 452, 101동 201호, Gyeonggi-do (KR).
정순길 (JEONG, Soon Gil); 21951 인천시 연수구 독배로 40번길 18, 4동 902호, Incheon (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울시 서초구 동산로 23 베텔회관 8층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: METHOD FOR TRANSFECTING NUCLEIC ACID INTO CELLS BY USING FUSION PEPTIDE NANOASSEMBLIES AND CALCIUM IONS, AND APPLICATION THEREOF

(54) 발명의 명칭: 융합 펩타이드 나노 어셈블리와 칼슘 이온을 이용한 핵산 세포 형질도입법과 그의 응용



(57) Abstract: The present invention relates to a technique for efficiently delivering a nucleic acid, including a plasmid, into cells by using the synergistic effect of cell- and nuclear membrane-penetrating fusion peptide nanoassemblies and calcium ions. The plasmid delivery ability of cell- and nuclear membrane-penetrating fusion peptide nanoassemblies and calcium ions, according to the present invention, exhibited superior effects than a conventional commercial carrier, and cytotoxicity was not observed, and thus the present invention has optimal conditions as a gene therapeutic agent. In addition, since gene delivery is possible which is efficient and safe, and far less expensive than a viral gene delivery method requiring enormous costs, the present invention is expected to be variously



WO 2020/022560 A1

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

applied to gene therapy methods, immunotherapy and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 세포 및 핵막 투과 융합 펩타이드 나노어셈블리와 칼슘 이온의 시너지 효과를 이용한 플라스미드를 포함하는 핵산의 효율적인 세포전달기술에 관한 것이다. 본 발명에 따른 세포 및 핵막 투과 융합 펩타이드 나노어셈블리와 칼슘 이온의 플라스미드 전달 능력은 기존의 상업적인 전달체보다 우수한 효과를 보였고, 세포독성이 관측되지 않아 유전자 치료제의 전달체로서 최적의 조건을 갖추고 있다. 또한 막대한 비용이 드는 바이러스성 유전자 전달법에 비해 훨씬 저렴하고 효율적이며 안전한 유전자 전달이 가능하기 때문에 유전자치료법, 면역치료법 등에 다양하게 적용될 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 융합 펩타이드 나노 어셈블리와 칼슘 이온을 이용한 핵산 세포 형질도입법과 그의 응용

기술분야

- [1] 본 발명은 세포 및 핵막 투과 융합 펩타이드와 핵산의 나노 어셈블리와 칼슘 이온의 시너지 효과를 기반으로 하는 비바이러스성 유전자 전달시스템을 이용한 세포 유전자 형질도입에 관한 것으로서, 기존의 상업적인 핵산 전달소재보다 유전자 전달 효율과 생체적합성이 우수한 핵산 세포형질도입기술에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 유전자 치료란 비정상 유전자를 정상 유전자로 대체시켜 유전적 결함을 치료하거나 유전자의 형질전환을 통해 새로운 기능을 추가할 수 있는 획기적인 치료법이다. 이는 기존 치료법으로는 치료할 수 없었던 유전질환의 유전적인 결함을 교정하여 근본적인 치료를 가능하게 할 수 있기 때문에 앞으로 수많은 난치성 유전병을 치료할 수 있을 것으로 기대되는 기술이다. 이러한 유전자 치료법을 효과적으로 적용하기 위해서는 유전자를 효율적으로 전달할 수 있는 기술을 개발하는 것이 매우 중요하며, 현재 널리 사용되고 있는 유전자 전달체로는 크게 바이러스성 전달체와 비바이러스성 전달체로 나뉜다.
- [3] 바이러스성 전달체는 레트로 바이러스나, 아데노 바이러스 등의 바이러스를 기반으로 하여 핵산을 전달하는 기술을 의미한다. 이 방법은 유전자 전달체로 바이러스를 이용하기 때문에 매우 뛰어난 유전자 전달효율을 보인다. 하지만 동시에 바이러스를 사용하기 때문에 발생하는 레트로 바이러스의 암 유발 가능성, 아데노 바이러스의 짧은 발현시간, 돌연변이로 인한 병원성 회복 가능성 및 심한 염증 등의 부작용 그리고 굉장히 비싼 가격은 바이러스를 전달체로 이용하는 유전자 치료법이 널리 활용되는데 많은 제약이 되고 있다.
- [4] 그에 비해서 비바이러스성 전달체는 생체분자에서 유래되었거나 화학적으로 합성한 지질, 폴리머, 펩타이드를 이용한다. 따라서 바이러스성 전달체보다는 가격이 저렴하며 생체분자에서 유래된 경우 생체적합성도 우수한 편이지만 유전자의 전달효율이 상대적으로 낮아서 아직까지 상용화를 위해서는 더 많은 연구를 필요로 한다.
- [5] 이 중 본 발명과 관련이 있는 펩타이드를 이용한 유전자 전달을 예로 들어 설명하면 현재까지 크게 세포투과 펩타이드(Cell Penetrating Peptide)와 핵이행신호(Nuclear Localization Signal)를 이용한 많은 연구결과들이 보고되었다. 세포투과 펩타이드는 주로 염기성 아미노산 서열이 많고 전체적으로 양전하를 띠는 펩타이드로써 내포작용을 통해 세포 내부로 함입될 수 있는 능력을 가지고 있다. 또한, DNA와 정전기적 상호작용을 통해 커다란

DNA를 작은 복합체로 만들어주어, DNA의 세포 내 이입의 가능성을 증가시켜준다. 핵이행신호는 핵으로 수송되는 단백질과 결합하여, 핵으로 전달하는 기능을 가지며, 양전하를 띠는 아미노산이 서열에 많은 편이어서, DNA와의 상호작용에 도움을 줄 수 있다. 하지만 각각의 아미노산 서열을 이용한 실험결과들을 살펴보면 상용화된 비바이러스성 유전자 전달체인 polyethylenimine (PEI)나 lipofectamine에 비해 유전자 전달효율이 낮은 결과를 보인다.

- [6] 따라서 비바이러스성 전달체의 유전자 전달효율을 현저히 향상시킬 수 있는 기술이 개발된다면 위험성을 내포하고 있는 바이러스성 전달체 대신 비바이러스 전달체를 통해 안전하고 저렴한 유전자 치료를 가능하게 할 것이다. 그러므로 비바이러스성 전달체의 유전자 전달효율을 향상시킬 수 있는 새로운 전달기술의 개발이 필요하다.

[7]

- [8] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

- [9] (선행기술문헌)

- [10] (특허문헌)

- [11] (특허문헌 1) 중국공개특허공보 제107794280호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명자들은 기존 바이러스를 이용한 약물 전달체의 문제점을 해결하고자, 비바이러스성 약물 전달체를 개발하고자 예의 노력을 하였다. 그 결과, TAT(HIV 1 trans-activating protein), 폴리-아르기닌 및 SPACE(skin permeating and cell entering peptide)로 구성된 군으로부터 선택되는 펩타이드와 Simian virus에서 유래한 가장 효율적인 핵 이행 신호인 SV40를 융합한 후 칼슘 이온을 처리하는 경우 핵산의 세포 형질도입 효율이 획기적으로 향상됨을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

[13]

- [14] 따라서, 본 발명의 목적은 세포투과 펩타이드(cell penetrating peptide, CPP) 및 핵 이행 신호(nuclear localization signal, NLS)를 포함하는 세포 및 핵막-투과 펩타이드(cell and nuclear-penetrating peptide)를 제공하는데 있다.

- [15] 본 발명의 다른 목적은 상기 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드를 포함하는 핵산 형질도입용 약물 전달체를 제공하는데 있다.

- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드 및 칼슘이온을 포함하는 핵산 형질도입용 키트를 제공하는데 있다.

- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드에

칼슘이온(Ca^{2+}) 또는 칼슘염(calcium salt)을 처리하는 단계를 포함하는 핵산의 형질도입 방법을 제공하는데 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 세포 및 핵막 투과용 약물 전달체의 제조방법을 제공하는데 있다.

[19]

[20] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결 수단

[21] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 세포투과 펩타이드(cell penetrating peptide, CPP) 및 핵 이행 신호(nuclear localization signal, NLS)를 포함하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드(cell and nuclear-penetrating fusion peptide)를 제공한다.

[22]

[23] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드를 포함하는 핵산 형질도입용 약물 전달체를 제공한다.

[24]

[25] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 칼슘이온(Ca^{2+}) 또는 칼슘염(calcium salt); 및 (b) 상기 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드를 포함하는 핵산 형질도입용 키트를 제공한다.

[26]

[27] 비바이러스성 전달체의 유전자 전달은 크게 유전자의 세포막 투과와 핵으로의 전달 즉, 핵막투과 과정을 거쳐야 한다. DNA를 이용한 유전자 치료의 경우, 대부분 DNA를 발현시키기 위해 세포 내로 전달하게 되는데, DNA가 발현되기 위해서는 DNA가 세포막을 투과하고 핵안으로 전달되어 mRNA로 전사되는 것이 가장 중요하다. 하지만 DNA는 음전하를 띤 친수성 거대분자이기 때문에 DNA가 표면에 음전하를 띤 소수성 세포막을 투과하는 효율이 바이러스에 비하여 낮은 편이다. 또한 세포막을 투과한 후, 핵 안에 전달되기 위해서는 핵막을 투과하여야 하는데, 핵막을 투과하는 효율 또한 매우 낮은 편이다. 따라서 DNA의 세포막 투과와 핵막 투과 효율을 획기적으로 증가시켜 기존의 상용화된 제품을 능가할 수 있는 핵산의 세포 형질도입 기술개발이 필요하다.

[28] 이에 본 발명자들은 전술한 바와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여, 세포 및 핵막 투과 융합 펩타이드와 핵산의 나노어셈블리와 칼슘 이온과의 시너지 효과를 사용하여 유전자의 효율적인 형질도입을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[29] 융합 펩타이드의 디자인 전략과 구성은 다음과 같다. 세포막의 투과효율을 증가시키는 세포투과 펩타이드와 핵투과 효율을 증가시키는 핵이행신호를 융합한 펩타이드를 디자인하였다. 보다 구체적으로, 세포투과 펩타이드의 양전하를 이용하여 DNA와의 정전기적 상호작용으로 나노어셈블리를 만들어

세포투과 효율을 향상시킨 후 핵이행신호로 핵수송 단백질과의 상호작용으로 핵전달 기능을 향상시키는 시너지 효과를 활용하는 융합 펩타이드 소재를 구성하였다.

- [30] 본 명세서에서 용어 “핵 이행 신호” 또는 “nuclear localization signal”은 핵 수송(nuclear transport)에 의해 세포 내의 핵막을 투과할 수 있는 아미노산 서열을 의미하며, 바람직하게는 SV40(simian virus 40) T 항원(PKKRKV, Kalderon et al., Cell 39:499-509 (1984)); 인간 레티노산 수용체 β - 핵 이행 신호 서열(ARRRRP); NF.kappa- β p50 연관 서열(EEVQRKRQKL, Ghosh et al., Cell 62:1019 (1990)); NF.kappa- β p65 연관 서열(EKRRKRTYE, Nolan et al., Cell 64:961 (1991)); M9 연관서열(NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQ); Nucleoplasm 연관서열(KRPAATKKAGQAKKKK); 및 c-Myc 연관서열(PAAKRVKLD) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 두 부분으로 구성된(Bipartite) 핵 이행 신호는 Bouliskas, J. Cell. Biochem. 55(1):32-58 (1994) 및 Dingwall, et al., J. Cell Biol. 107:641-849 (1988) 등에 기술되어 있다(예를 들어, KRPMTKKAGQAKKKK 등).
- [31] 본 명세서에서 용어 “세포투과 펩타이드” 또는 “cell penetrating peptide”는 핵산과 상호작용하여 나노어셈블리를 이루며 세포막을 투과할 수 있는 아미노산 서열을 의미하며, TAT, 폴리-아르기닌, SPACE 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [32] “TAT” 또는 “HIV 1 trans-activating protein”은 인간면역결핍바이러스(Human immunodeficiency virus)의 transactivator of transcription (TAT)으로부터 유래한 펩타이드(Fawell et al., PNAS 91:664-668 (1994))를 의미하며, 바람직하게는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 포함한다.
- [33] “폴리-아르기닌” 또는 “poly-arginine”은 5 내지 15개의 아르기닌(arginine)이 결합된 폴리펩타이드(Wender et al., PNAS 97:13003-13008 (2000))로 바람직하게는 서열목록 제3서열(R7)(RRRRRRR), 서열목록 제4서열(R8)(RRRRRRRR), 서열목록 제5서열(R9)(RRRRRRRRR), 서열목록 제6서열(R10)(RRRRRRRRRR), 서열목록 제7서열(R11)(RRRRRRRRRRR), 서열목록 제8서열(R12)(RRRRRRRRRRRR) 및 서열목록 제9서열(R13)(RRRRRRRRRRRRR)로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [34] “SPACE” 또는 “Skin penetrating and cell entering peptide”는 바람직하게는 ACTGSTQHQC 서열(서열목록 제10서열)을 포함한다(Hsu et al., PNAS 108:15816-15821 (2011)).
- [35] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 세포투과 펩타이드 및 핵 이행 신호는 링커로 연결된다.
- [36] 링커는 화학적 링커, 핵산 링커 또는 펩타이드 링커일 수 있으며, 바람직하게는 2 내지 10개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커가 사용된다. 상기 펩타이드 링커의 예는 글라이신 폴리머(glycine polymers, (G)n), 글라이신 및 시스테인을 포함하는 폴리머(glycine-cysteine polymers, (GC)n, (GCG)n 및 (CGC)n

등), 글라이신 및 세린을 포함하는 폴리머(glycine-serine polymers, (GS)_n, (GSGGS)_n 및 (GGGS)_n 등), 글라이신 및 알라닌을 포함하는 폴리머(glycine-alanine polymers), 알라닌 및 세린을 포함하는 폴리머(alanine-serine polymers) 등을 사용할 수 있으며(n은 1 이상의 정수), 보다 바람직하게는 서열목록 제9서열의 GCG 서열을 포함할 수 있다.

[37] 또한, 상기 융합 펩타이드는 칼슘 이온과 함께 하는 경우 세포 전달 효율이 극대화 된다. 칼슘 이온은 양이온이기 때문에 DNA의 음전하 부분과 정전기적 상호작용을 통해 DNA의 양전하화를 유도한다. 또한 음전하를 띠는 세포막과도 상호작용하여 DNA와 세포막의 전하적인 반발력을 상쇄시켜 전체적인 세포투과 효율을 향상시키는 시너지 효과를 보일 수 있다.

[38]

[39] 상기 칼슘 이온은 이온 형태(Ca^{2+}) 또는 칼슘염(calcium salt) 형태로 제공될 수 있으며, 바람직하게는 염화칼슘(CaCl_2), 탄산칼슘(CaCO_3), 인산칼슘($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 등), 황산칼슘(CaSO_4), 질산칼슘($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) 등의 형태로 제공될 수 있다.

[40] 상기 칼슘염(calcium salt)의 농도는 바람직하게는 0.5배 내지 2배, 보다 바람직하게는 1배인 것을 사용할 수 있다. 여기서 칼슘이온의 농도는 1배일 때 최종 농도 8.56 mM 이 제공된다. 이를 기준으로 0.1배, 0.5배, 1배, 2배, 4배의 칼슘이온의 농도를 사용할 수 있다.

[41] 본 발명의 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드, 약물 전달체 또는 키트를 이용하여 전달하고자 하는 핵산은 특별히 제한되지 않으며, 바람직하게는 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드, DNA, RNA, snRNA(small nuclear RNA), rRNA(ribosomal RNA), siRNA(short interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), 안티센스 RNA, miRNA(micro RNA), 유전자 가위 등을 포함한다. 상기 핵산은 그 자체로 또는 플라스미드나 벡터, 트랜스포존 등에 삽입되어 본 발명의 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드와 어셈블리(assembly)를 형성할 수 있다.

[42] 상기 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드의 아민기(amine group):플라스미드 인산기(phosphate group)의 N:P비는 바람직하게는 SV40-TAT 펩타이드는 5:1 내지 20:1, SV40-Poly R 펩타이드는 0.5:1 내지 2.5:1, SV40-SPACE 펩타이드는 5:1 내지 20:1, 보다 바람직하게는 SV40-TAT 펩타이드는 10:1 내지 15:1, SV40-Poly R 펩타이드는 1:1 내지 2.5:1, SV40-SPACE 펩타이드는 5:1 내지 10:1인 것을 사용할 수 있다.

[43]

[44] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드에 칼슘이온(Ca^{2+}) 또는 칼슘염(calcium salt)을 처리하는 단계를 포함하는 핵산의 전달 방법을 제공한다.

[45] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 칼슘이온(Ca^{2+}) 또는 칼슘염(calcium salt)이

처리되지 않거나, 너무 적은 양으로 처리된 경우(0.5 미만) 또는 너무 많은 양으로 처리된 경우(2 초과)와 비교하여, 칼슘 이온이 기준이 되는 1Ca의 최종 농도인 8.56 mM의 0.5 내지 2배 처리된 경우 전달 효율이 획기적으로 높았다.

[46]

[47] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 세포 투과용 약물 전달체의 제조방법을 제공한다:

[48] (a) 제 1항의 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드를 제조하는 단계; 및

[49] (b) 상기 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드에 전달하고자 하는 핵산 및 칼슘 이온을 혼합하는 단계.

발명의 효과

[50] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[51] (i) 본 발명은 세포투과 펩타이드(cell penetrating peptide, CPP) 및 핵 이행 신호(nuclear localization signal, NLS)를 포함하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드, 약물 전달체 및 키트를 제공한다.

[52] (ii) 본 발명에 따른 융합 펩타이드와 핵산의 나노 어셈블리와 칼슘 이온의 시너지 효과는 플라스미드와 같은 거대 핵산분자의 전달의 경우 기존에 상업화된 리포펙타민과 같은 값비싼 전달체나 PEI에 비하여 전달효율이 더 우수하며 PEI에 비하여 세포독성은 거의 없어서 생체적합성이 매우 뛰어나고 아니라 화학적 대량생산이 가능하여 단가를 획기적으로 낮출 수 있다. 따라서, 플라스미드와 같은 거대 핵산분자 전달체로써 기존 세포 유전자 세포 형질도입법을 대체할 수 있는 기술로 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[53] 도 1은 본 발명에 따른 플라스미드와 단일 펩타이드의 복합체 형성 정도를 아가로스겔 지연반응을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[54] 도 2는 본 발명에 따른 플라스미드와 융합 펩타이드의 복합체 형성 정도를 아가로스겔 지연반응을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[55] 도 3은 본 발명에 따른 SV40 단일 펩타이드 아민기 : 핵산 플라스미드 인산기 비율별로 칼슘이온과 시너지 효과에 의한 플라스미드 전달효율을 발광효소로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[56] 도 4는 본 발명에 따른 TAT 단일 펩타이드 아민기 : 핵산 플라스미드 인산기 비율별로 칼슘이온과 시너지 효과에 의한 플라스미드 전달효율을 발광효소로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[57] 도 5는 본 발명에 따른 Poly R 단일 펩타이드 아민기 : 핵산 플라스미드 인산기 비율별로 칼슘이온과 시너지 효과에 의한 플라스미드 전달효율을 발광효소로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[58] 도 6은 본 발명에 따른 SPACE 단일 펩타이드 아민기 : 핵산 플라스미드 인산기 비율별로 칼슘이온과 시너지 효과에 의한 플라스미드 전달효율을 발광효소로

측정한 결과를 나타낸 것이다.

[59] 도 7은 본 발명에 따른 SV40-TAT 융합 펩타이드 아민기 : 핵산 플라스미드 인산기 비율별로 칼슘이온과 시너지 효과에 의한 플라스미드 전달효율을 발광효소로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[60] 도 8은 본 발명에 따른 SV40-Poly R 융합 펩타이드 아민기 : 핵산 플라스미드 인산기 비율별로 칼슘이온과 시너지 효과에 의한 플라스미드 전달효율을 발광효소로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[61] 도 9는 본 발명에 따른 SV40-SPACE 융합 펩타이드 아민기 : 핵산 플라스미드 인산기 비율별로 칼슘이온과 시너지 효과에 의한 플라스미드 전달효율을 발광효소로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[62] 도 10은 본 발명에 따른 배율 농도별 칼슘 이온의 SV40-TAT 융합 펩타이드와 시너지 효과에 의한 플라스미드 전달 효율을 발광효소로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[63] 도 11은 본 발명에 따른 배율 농도별 칼슘 이온의 SV40-Poly R 융합 펩타이드와 시너지 효과에 의한 플라스미드 전달 효율을 발광효소로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[64] 도 12는 본 발명에 따른 배율 농도별 칼슘 이온의 SV40-SPACE 융합 펩타이드와 시너지 효과에 의한 플라스미드 전달 효율을 발광효소로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[65] 도 13은 본 발명에 따른 여러 펩타이드들과 칼슘이온과 시너지 효과에 의한 플라스미드 전달효율 중 최적 비율만을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

[66] 도 14는 본 발명에 따른 융합 펩타이드와 칼슘 이온의 시너지 효과에 의한 eGFP 플라스미드 전달효율을 형광현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

[67] 도 15는 본 발명에 따른 칼슘 이온과 농도별 융합 펩타이드의 세포독성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[68] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[69]

[70] 실시예 1. 융합 펩타이드의 특성 분석

[71] 특성 분석 결과에 따르면, 핵 이행 신호인 SV40는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열로 표시되며 등전점 11.79, 분자량 883.14 및 pH 7에서 6의 순전하를 가진다. 또한 함께 어셈블리로 형성된 플라스미드의 핵 이행을 도와준다.

[72] 특성 분석 결과에 따르면, 세포 투과 펩타이드인 TAT는 서열목록 제2서열의

아미노산 서열로 표시되며 등전점 12.7, 분자량 1339.62 및 pH 7에서 9의 순전하를 가진다. 또한 플라스미드와 어셈블리를 형성하고 이 어셈블리의 세포 투과 능력의 향상에 도움이 된다.

[73] 특성 분석 결과에 따르면, 세포 투과 펩타이드인 Poly R은 서열목록 제3서열 내지 서열목록 제9서열의 아미노산 서열로 표시되며 등전점 13.1, 분자량 1736.06 및 pH 7에서 11의 순전하를 가진다. 또한 플라스미드와 어셈블리를 형성하고 이 어셈블리의 세포 투과 능력의 향상에 도움이 된다.

[74] 특성 분석 결과에 따르면, 세포 투과 펩타이드인 SPACE는 서열목록 제10서열의 아미노산 서열로 표시되며 등전점 6.76, 분자량 1092.17 및 pH 7에서 1의 순전하를 가진다. 또한 플라스미드와 어셈블리를 형성하고 이 어셈블리의 세포 및 피부 투과 능력의 향상에 도움이 된다.

[75] 특성 분석 결과에 따르면, 세포 투과 융합 펩타이드인 SV40-TAT은 서열목록 제12서열의 아미노산 서열로 표시되며 등전점 12.41, 분자량 24.21.99 및 pH 7에서 14의 순전하를 가진다. 또한 서열목록 제1서열 및 제2서열의 기능을 조합하기 위해 합성한 융합 펩타이드이다.

[76] 특성 분석 결과에 따르면, 융합 펩타이드 중 하나인 SV40-Poly R은 서열목록 제13서열의 아미노산 서열로 표시되며 등전점 12.81, 분자량 2818.43 및 pH 7에서 17의 순전하를 가진다. 또한 서열목록 제1서열 및 제7서열의 기능을 조합하기 위해 합성한 융합 펩타이드이다.

[77] 특성 분석 결과에 따르면, 세포 투과 융합 펩타이드인 SV40-SPACE는 서열목록 제14서열의 아미노산 서열로 표시되며 등전점 9.77, 분자량 2174.54 및 pH 7에서 7의 순전하를 가진다. 또한 서열목록 제1서열 및 제10서열의 기능을 조합하기 위해 합성한 융합 펩타이드이다.

[78]

[79] 실시예 2. 단일 및 융합 펩타이드와 플라스미드의 어셈블리 형성 확인

[80] 각각의 펩타이드와 플라스미드가 어셈블리를 잘 형성하는지 확인하기 위해, 아가로스 젤 전기영동을 수행하였다. 실험 원리는 다음과 같다. 아가로스 젤 전기영동은 DNA를 크기에 따라 분류해줄 수 있는 실험법이다. 하지만 DNA가 펩타이드와 거대 어셈블리를 형성할 경우, 크기가 매우 커서 전기영동을 해도 아가로스 젤을 투과하지 못하여 이동하지 않는 현상을 관찰할 수 있다. 따라서 쉽게 거대 어셈블리 형성 여부를 알 수 있다.

[81] 실험 방법은 다음과 같다. 아가로스 젤을 1%(w/v) 비율로 1X TAE 버퍼에 녹여 젤을 만든다. 한 웰당 들어가는 플라스미드는 pEGFP-N1(Clontech, Fremont, CA, USA)을 사용하였다. 그 양은 0.5 μ g으로 맞추었고, N:P 비율에 따라 펩타이드를 각각의 비율별(0.5:1, 1:1, 2.5:1, 5:1, 10:1, 20:1)로 섞어주고 증류수를 넣어 총량을 20 μ L로 맞추었다. 여기서 N:P 비율이란, DNA의 인산기(phosphate group) 개수(P)에 대한 펩타이드의 아민기(amine group) 개수(N)의 비율이다. 그리고 상온에 20분간 두면 어셈블리 형성이 완료된다. 그 후에 로딩다이로 DNA를

염색하고, 40분간 전기영동 해준다. 그 결과는 도 1 및 2에 나타내었다.

- [82] 도 1 및 2를 보면 SV40는 비율이 높아져도 거대 어셈블리를 거의 형성하지 않은 것을 확인할 수 있다. 그러나 펩타이드 비율이 높아질수록 크기가 더 커지는 것을 보면 SV40가 플라스미드와 미미하게 상호작용한다는 것을 확인할 수 있다. TAT은 2.5:1 이상에서부터 거대 어셈블리를 형성하였다. Poly R은 5:1 이상에서부터 거대 어셈블리를 형성하였다. SPACE는 비율이 높아져도 거대 어셈블리를 형성하지 않은 것을 확인할 수 있다. SV40-TAT은 5:1 이상에서부터 거대 어셈블리를 형성하였다. SV40-Poly R은 5:1 이상에서부터 거대 어셈블리를 형성하였다. SV40-SPACE는 10:1 이상에서부터 거대 어셈블리를 형성하였다. SV40는 길이가 짧기 때문에 거대한 플라스미드와 거대 어셈블리를 형성하지는 못하고, 핵산과 상호작용만 하는 것으로 추정된다. SPACE는 양전하를 띌 수 있는 염기성 아미노산이 매우 적기 때문에 플라스미드와 상호작용을 잘 하지 못하는 것으로 추정된다. 그에 반해, TAT, Poly R, SV40-TAT, SV40-Poly R, SV40-SPACE는 높은 어셈블리 형성 능력을 확인하였다. 종합적으로 거대 어셈블리 형성에서 TAT, Poly R이 주요한 역할을 하며 SV40 서열이 큰 방해로 하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

[83]

- [84] 실시예 3. 단일 및 융합 펩타이드와 칼슘 이온의 플라스미드 세포 형질도입능력 측정

- [85] 단일 및 융합 펩타이드와 칼슘 이온의 플라스미드 세포 형질도입 능력을 측정하였으며 그 원리는 다음과 같다. Luciferase 발현 벡터 (pGL3, Promega, Madison, WI, USA)의 경우 민감한 검출이 가능하기 때문에 발광측정을 통해 정량적인 결과를 얻었다. 그리고, eGFP 발현 벡터 (pEGFP-N1)의 경우 eGFP 발현을 형광현미경을 통해 정성적으로 확인하였다. 실험 방법은 다음과 같다.

- [86] 24웰 플레이트에 HEK293T 세포(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)의 세포수를 hemocytometer(Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Konigshofen, Germany)를 이용하여 80,000 세포씩 갈아주고, 37°C, 5% 이산화탄소 조건에서 하루 동안 배양하였다. 배지는 10% FBS가 있는 DMEM(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)을 사용하였다. 세포의 용적률이 60% 이상 되었을 때, 동일한 배지로 갈아주고 DNA 세포투과 실험을 진행하였다. 여기에 쓰일 복합체는 다음과 같이 만든다.

- [87] 한 웰당 플라스미드의 양은 1 μ g으로 고정하고, 각각의 비율에 맞게 펩타이드들을 함께 섞어준다. 그리고 1X HEPES Buffered Saline(HBS, 1L 증류수에 HEPES 5 g, NaCl 8 g, KCl 3.7 g, Na₂HPO₄(7H₂O) 0.188 g을 녹여서 제작한다. HEPES 구입처: Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, USA; NaCl 구입처: Genomicbase, Seoul, Korea, KCl; Na₂HPO₄ 구입처: Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 18 μ L만큼 넣어주고 1M CaCl₂를 2.75 μ L 넣어준다. 그리고 30-40분간 상온에 둔다. 음성대조군의 경우엔 플라스미드와 1X HBS만

섞어주고, 양성대조군의 경우엔 플라스미드 1 μg 과 PEI를 5:1(w/w) 비율로 섞어주고, 20분간 상온에 둔다. 또 다른 양성 대조군인 리포펙타민(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)의 어셈블리 형성방법은 다음과 같다. Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 98 μL 와 리포펙타민 2 μL 를 섞어주고, Opti-MEM 100 μL 에 플라스미드 1 μg 을 섞어주고 5분 뒤 두 용액을 합쳐준다. 그리고 20분간 상온에 두면 어셈블리가 형성된다. 복합체 형성이 완료되면, 위에서 준비한 세포들에 복합체를 넣어준다. 그리고 5시간동안 37°C, 5% 이산화탄소 조건에서 배양한다. 5시간이 지나면, 복합체가 들어있는 배지를 제거하고 동일한 배지 1 mL로 교체해준다. 그리고 2일간 더 37°C, 5% 이산화탄소 조건에서 배양해준다. 2일이 지나고 유전자 발현을 확인한다.

- [88] Luciferase를 확인하는 경우, 배지를 제거하고 1X Lysis buffer(Promega, Madison, WI, USA)를 각 웰에 100 μL 씩 넣어 세포를 파쇄해주고, 파쇄물 20 μL 를 96웰 흰색 플레이트에 넣어주었다. 그리고 Luciferin이 들어있는 Luciferase 분석 시료를 100 μL 넣어주고 전체 파장대의 발광을 확인하였다. 그리고 각 세포 파쇄물의 전체 단백질 농도를 BCA 분석을 통해 분석하여 발광값에서 나누어주어 각 세포 양의 차이를 보정해주었다. eGFP 발현을 확인하는 경우, 2일 배양이 끝난 후 배지를 Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 500 μL 로 교체해주고 형광현미경을 통해 eGFP 발현을 확인하였다.
- [89] 도 3은 칼슘이온이 첨가된 SV40와 플라스미드를 비율별로 사용하였을 때의 결과이다. 펩타이드의 최적 비율을 확인하기 위한 실험 결과이다. 펩타이드와 플라스미드의 N:P 비율이 1:1일 때 가장 높은 효율을 보여주었다.
- [90] 도 4는 칼슘이온이 첨가된 TAT과 플라스미드를 비율별로 사용하였을 때의 결과이다. 펩타이드의 최적 비율을 확인하기 위한 실험 결과이다. 펩타이드와 플라스미드의 N:P 비율이 15:1일 때 가장 높은 효율을 보여주었다.
- [91] 도 5는 칼슘이온이 첨가된 Poly R과 플라스미드를 비율별로 사용하였을 때의 결과이다. 펩타이드의 최적 비율을 확인하기 위한 실험 결과이다. 펩타이드와 플라스미드의 N:P 비율이 10:1일 때 가장 높은 효율을 보여주었다.
- [92] 도 6은 칼슘이온이 첨가된 SPACE와 플라스미드를 비율별로 사용하였을 때의 결과이다. 펩타이드의 최적 비율을 확인하기 위한 실험 결과이다. 펩타이드와 플라스미드의 N:P 비율이 2.5:1일 때 가장 높은 효율을 보여주었다.
- [93] 도 7은 칼슘이온이 첨가된 SV40-TAT과 플라스미드를 비율별로 사용하였을 때의 결과이다. 펩타이드의 최적 비율을 확인하기 위한 실험 결과이다. 펩타이드와 플라스미드의 N:P 비율이 10:1일 때 가장 높은 효율을 보여주었다.
- [94] 도 8은 칼슘이온이 첨가된 SV40-Poly R과 플라스미드를 비율별로 사용하였을 때의 결과이다. 펩타이드의 최적 비율을 확인하기 위한 실험 결과이다. 펩타이드와 플라스미드의 N:P 비율이 2.5:1일 때 가장 높은 효율을 보여주었다.

- [95] 도 9는 칼슘이온이 첨가된 SV40-SPACE와 플라스미드를 비율별로 사용하였을 때의 결과이다. 펩타이드의 최적 비율을 확인하기 위한 실험 결과이다. 펩타이드와 플라스미드의 N:P 비율이 10:1일 때 가장 높은 효율을 보여주었다.
- [96] 도 10은 최적 비율의 SV40-TAT 조건에서 칼슘 이온의 농도를 최적화하기 위해 실험한 결과이다. 1Ca는 플라스미드 1 μg 당 칼슘 이온 2.75 μmol 이 적용될 때의 농도이다. 칼슘의 농도가 1Ca일 때 가장 높은 효율을 보여주었다.
- [97] 도 11은 최적 비율의 SV40-Poly R 조건에서 칼슘 이온의 농도를 최적화하기 위해 실험한 결과이다. 1Ca는 플라스미드 1 μg 당 칼슘 이온 2.75 μmol 이 적용될 때의 농도이다. 칼슘의 농도가 1Ca일 때 가장 높은 효율을 보여주었다.
- [98] 도 12는 최적 비율의 SV40-SPACE 조건에서 칼슘 이온의 농도를 최적화하기 위해 실험한 결과이다. 1Ca는 플라스미드 1 μg 당 칼슘 이온 2.75 μmol 이 적용될 때의 농도이다. 칼슘의 농도가 0.5Ca일 때 가장 높은 효율을 보여주었지만 1Ca와 통계적으로 유의한 차이가 없기 때문에 1Ca 농도로 사용하였다.
- [99] 도 13은 양성 대조군인 PEI, 리포펙타민과 비교하여 칼슘이온이 첨가된 단일 및 융합 펩타이드와 플라스미드를 최적 비율만 중합하여 나타낸 결과이다. 먼저, TAT 단일 펩타이드는 SV40와 융합되었을 때 약 32배 정도의 효율 증가를 보여주었고, Poly R 단일 펩타이드는 SV40와 융합되었을 때 약 1.8배 정도의 효율 증가를 보여주었고, SPACE 단일 펩타이드는 SV40와 융합되었을 때 약 564배 정도의 효율 증가를 보여주었다. SPACE 단일 펩타이드는 플라스미드와 거대 어셈블리를 거의 형성하지 못하기 때문에 단일 펩타이드로 사용하였을 때 효율이 거의 나타나지 않았다. 하지만 SV40와 융합하였을 때엔 거대 어셈블리를 형성할 수 있기 때문에 가장 큰 효율 증가를 보여주었다. 기존에 널리 사용되던 PEI에 비하여 칼슘이온과 융합 펩타이드의 시너지 효과는 SV40-Poly R, SV40-TAT과 SV40-SPACE 모두 거의 7배에 달하는 효율을 보여주었다. 또한 효율이 매우 좋다고 알려진 리포펙타민과 비교하였을 때에는 칼슘 이온과 융합 펩타이드의 시너지 효과는 SV40-TAT과 SV40-Poly R과 SV40-SPACE 모두 거의 2배에 달하는 효율을 보여주었다. 그에 반해 Poly R을 제외한 다른 단일 펩타이드들은 효과를 거의 보이지 못한 것을 보아 핵 이행신호와 세포투과 펩타이드와 칼슘이온의 시너지 효과가 상당함을 알 수 있다.
- [100] 도 14는 플라스미드만 처리한 음성 대조군, PEI 및 리포펙타민을 처리한 양성 대조군, 그리고 최적 비율의 칼슘 이온과 융합 펩타이드를 처리하여 eGFP의 발현을 형광현미경으로 관찰한 결과이다. 이 결과를 토대로 다른 종류의 플라스미드 또한 양성 대조군들에 비하여 효율적으로 전달할 수 있다는 사실을 보여주었다.
- [101]
- [102] 실시예 4. 각각 사용된 전달체들의 세포 독성 결과 확인
- [103] 도 15에서는 각 조건별 세포독성을 확인한 결과이다. 유산탈수소효소 분석법을 통해 세포독성을 측정하였다. 유산탈수소효소 분석법은 세포가 죽어 세포막이

파괴될 때, 세포 내부에 있던 유산탈수소효소가 방출되는 양을 효소 반응으로 측정하여 세포독성을 측정하는 실험법이다. 실험 방법은 다음과 같다.

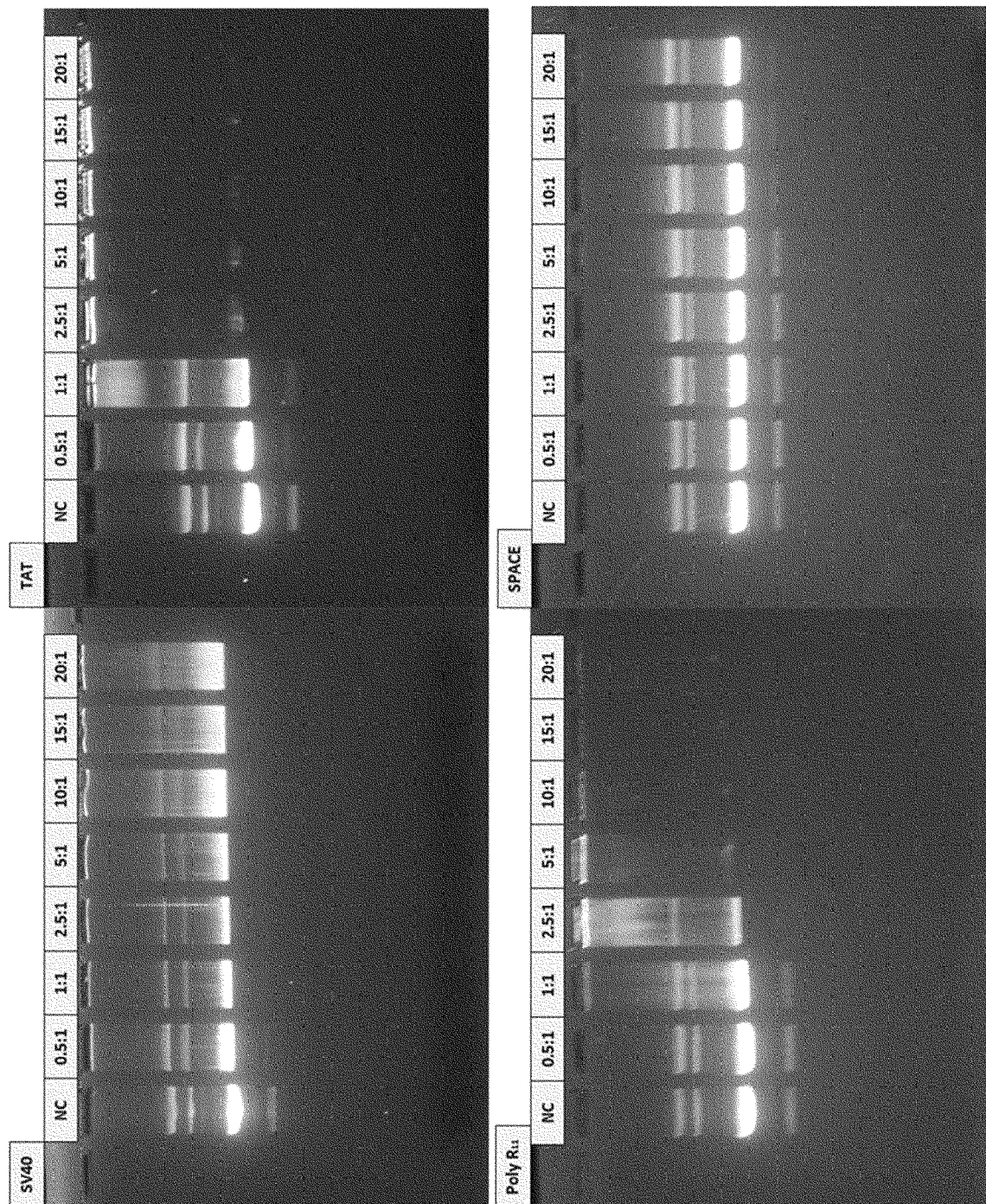
- [104] 96웰 플레이트에 HEK293T 세포를 30,000 마리씩 깔아주고, 37°C, 5% 이산화탄소 조건에서 하루 동안 배양해준다. 배지는 10% FBS가 있는 DMEM을 사용한다. 다음 날, 각 세포들의 배지를 동일한 배지 100 μ L로 교체해준다. 그리고 융합 펩타이드를 다양한 농도별로 준비한 뒤 칼슘이온과 함께 각 세포의 배지에 넣어주고 5시간동안 37°C, 5% 이산화탄소 조건에서 배양한다. 4시간 15분 후에 양성 대조군에 Lysis 버퍼를 10 μ L 넣어주고 5시간째에 각 세포의 배지 50 μ L를 96웰 플레이트의 비어있는 웰에 옮겨준다. 옮겨준 각 웰에 CytoTox 96® (Promega, Madison, WI, USA) 시료를 50 μ L씩 넣어주고, 플레이트를 호일로 감싸 빛을 차단한 채로 30분간 상온에 둔다. 그 후 각 웰에 중단 시료(stop solution) 50 μ L를 넣어주고 1시간 이내에 490 nm에서 흡광도를 측정한다. 결과는 도 15에 나타내었다.
- [105] 양성 대조군을 100으로 잡았을 때, PEI는 상대적으로 높은 세포독성을 보인 반면 리포펙타민 및 융합 펩타이드와 칼슘이온을 처리한 세포들은 아무것도 처리하지 않은 세포들과 비교하여도 세포독성을 보이지 않았다.
- [106] 결론적으로 세포투과효율은 상업적으로 판매되는 PEI와 리포펙타민보다 뛰어나지만 세포독성은 거의 없는 융합펩타이드를 이용한 유전자 전달기술을 개발하였다.
- [107] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

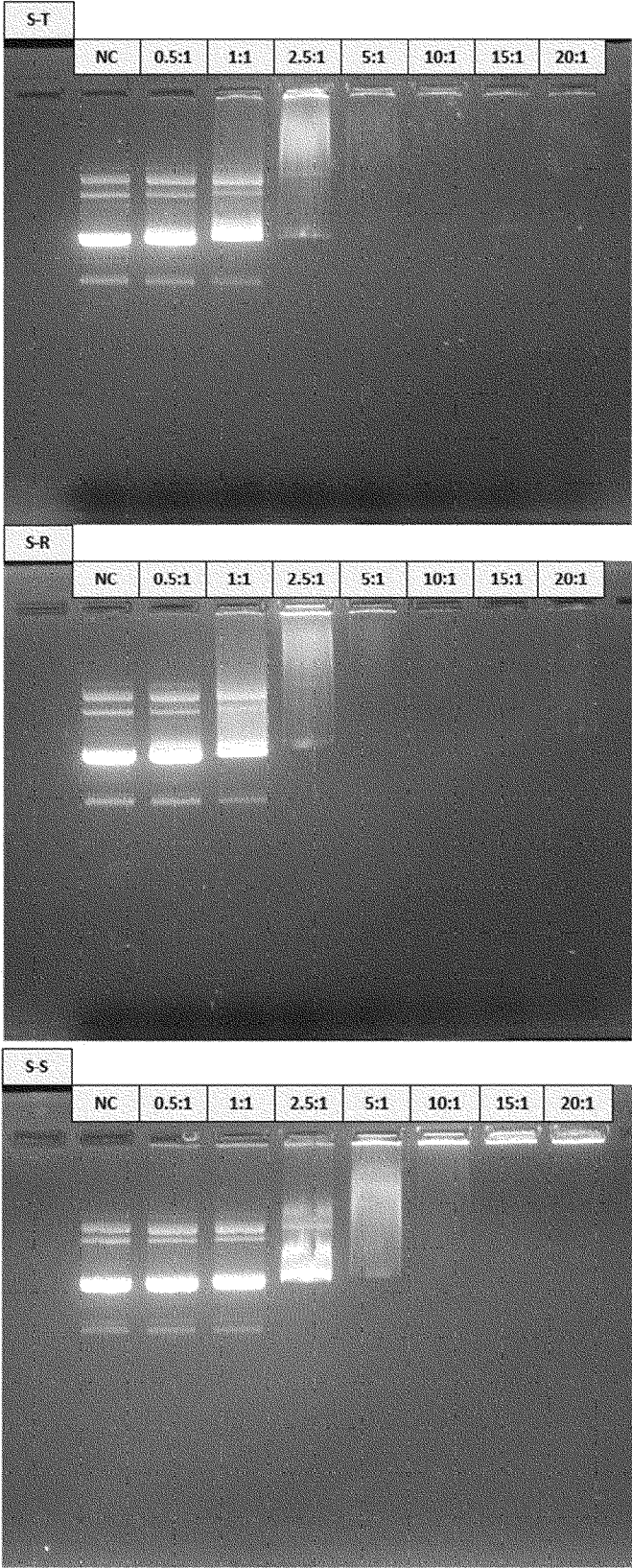
- [청구항 1] 세포투과 펩타이드(cell penetrating peptide, CPP) 및 핵 이행 신호(nuclear localization signal, NLS)를 포함하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드(cell and nuclear-penetrating fusion peptide).
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 핵 이행 신호는 SV40(simian virus 40) T-항원, 인간 레티노산 수용체 β - 핵 이행 신호서열, NF.kappa- β p50 연관 서열, NF.kappa- β p65 연관 서열, M9 연관서열, Nucleoplasm 연관서열, c-Myc 연관서열로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서, 상기 핵 이행 신호는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 세포투과 펩타이드는 TAT(HIV 1 trans-activating protein), 폴리-아르기닌 및 SPACE(skin permeating and cell entering peptide)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 TAT는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드.
- [청구항 6] 제 4 항에 있어서, 상기 폴리-아르기닌은 서열목록 제3서열(R7), 서열목록 제4서열(R8), 서열목록 제5서열(R9), 서열목록 제6서열(R10), 서열목록 제7서열(R11), 서열목록 제8서열(R12) 및 서열목록 제9서열(R13)로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드.
- [청구항 7] 제 4 항에 있어서, 상기 SPACE는 서열목록 제10서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서, 상기 세포투과 펩타이드 및 핵 이행 신호는 링커로 연결된 것을 특징으로 하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서, 상기 링커는 2 내지 10개의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드.
- [청구항 10] 제 9 항에 있어서, 상기 링커는 시스테인(Cysteine) 및 글라이신(Glycine)을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서, 상기 링커는 서열목록 제11서열(GCG)의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드.
- [청구항 12] 제 1 항의 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드를 포함하는 핵산 형질도입용 약물 전달체.
- [청구항 13] (a) 칼슘이온(Ca^{2+}) 또는 칼슘염(calcium salt) 및 (b) 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드를 포함하는 유전자 형질도입용 키트.

- [청구항 14] 제 13 항에 있어서, 상기 유전자 형질도입은 플라스미드에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 핵산 형질도입용 키트.
- [청구항 15] 제 14 항에 있어서, 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드 아민기: 상기 플라스미드 인산기의 N/P비는 0.5:1 내지 20:1인 것을 특징으로 하는 핵산 형질도입용 키트.
- [청구항 16] 제 1항의 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드에 칼슘이온(Ca^{2+}) 또는 칼슘염(calcium salt)을 처리하는 단계를 포함하는 핵산의 형질도입 방법.
- [청구항 17] 하기의 단계를 포함하는 세포 및 핵막 투과용 약물 전달체의 제조방법:
(a) 제 1항의 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드를 제조하는 단계; 및
(b) 상기 세포 및 핵막-투과 융합 펩타이드에 형질도입하고자 하는 핵산 및 칼슘 이온을 혼합하는 단계.

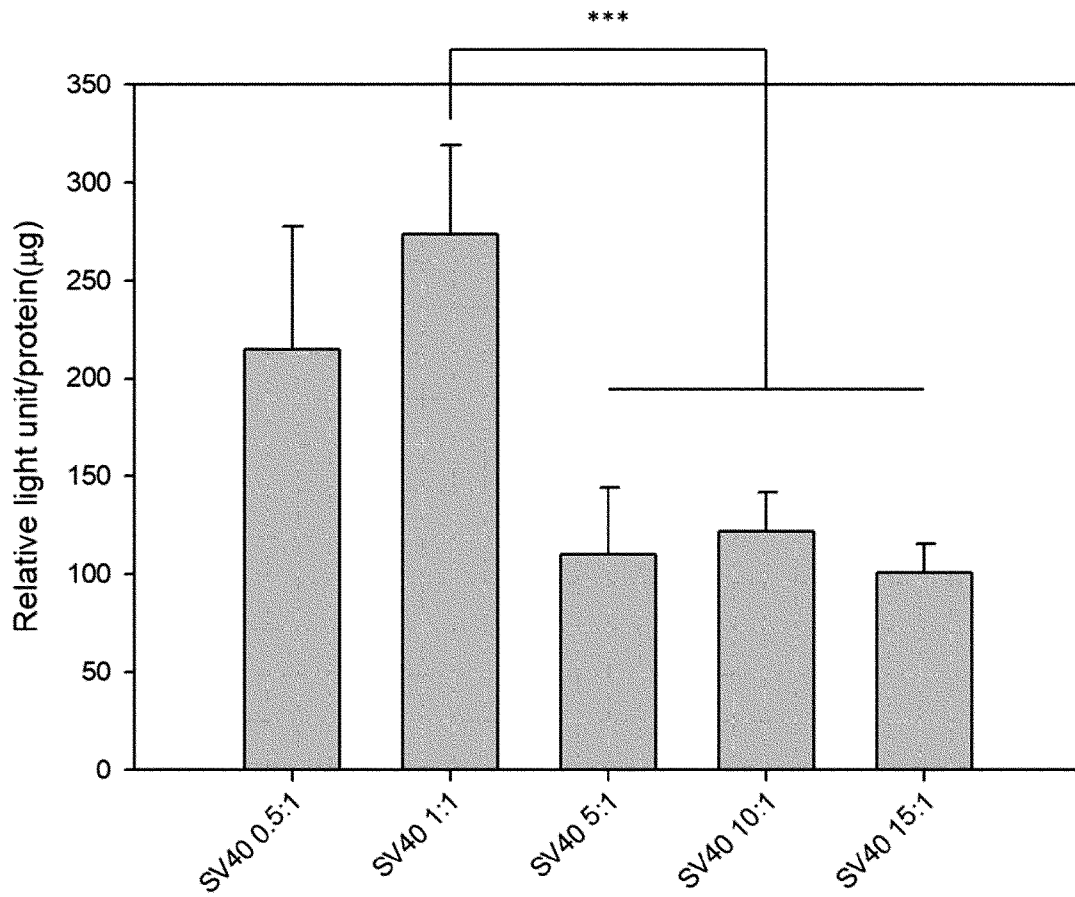
[51]



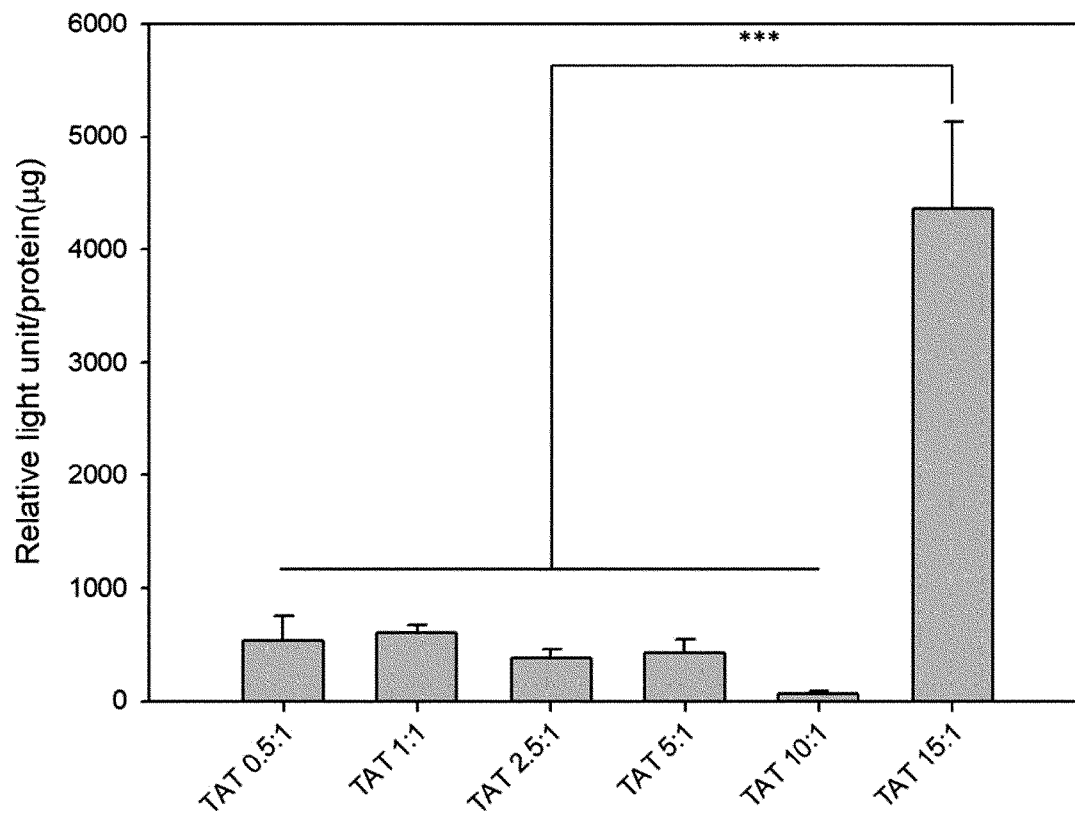
[도2]



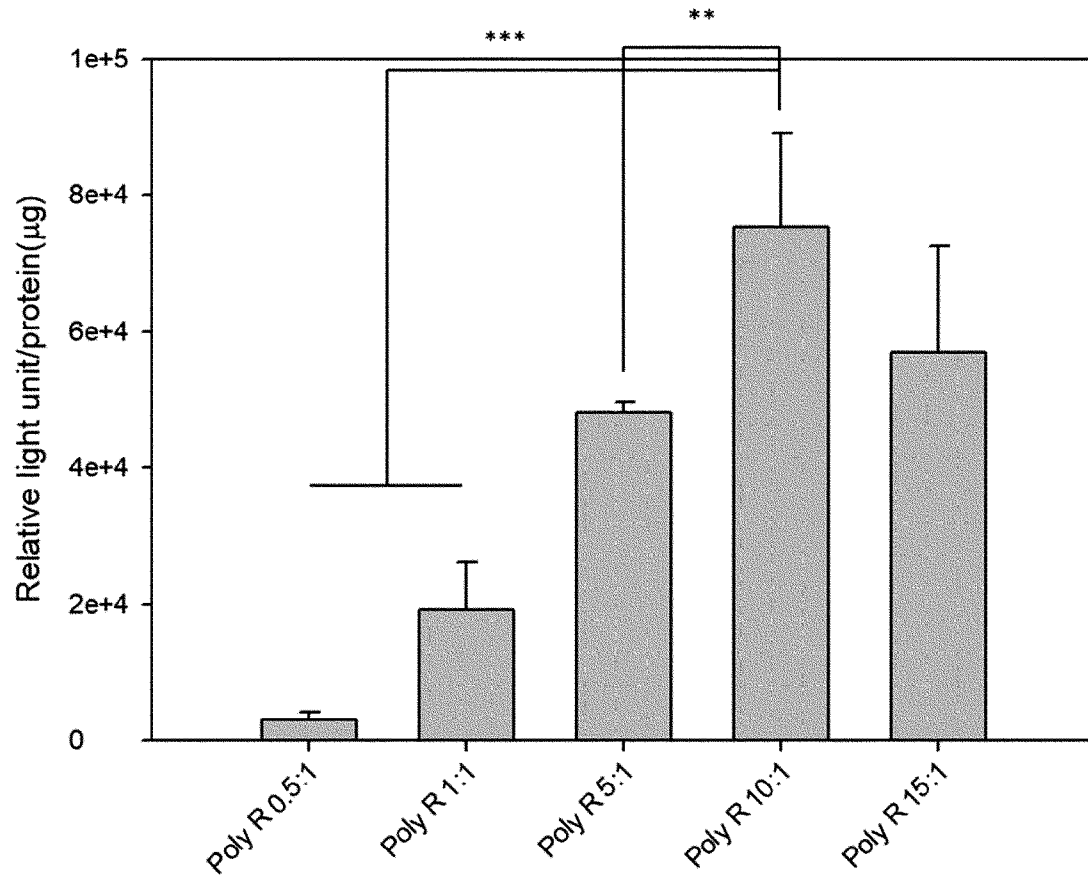
[도3]



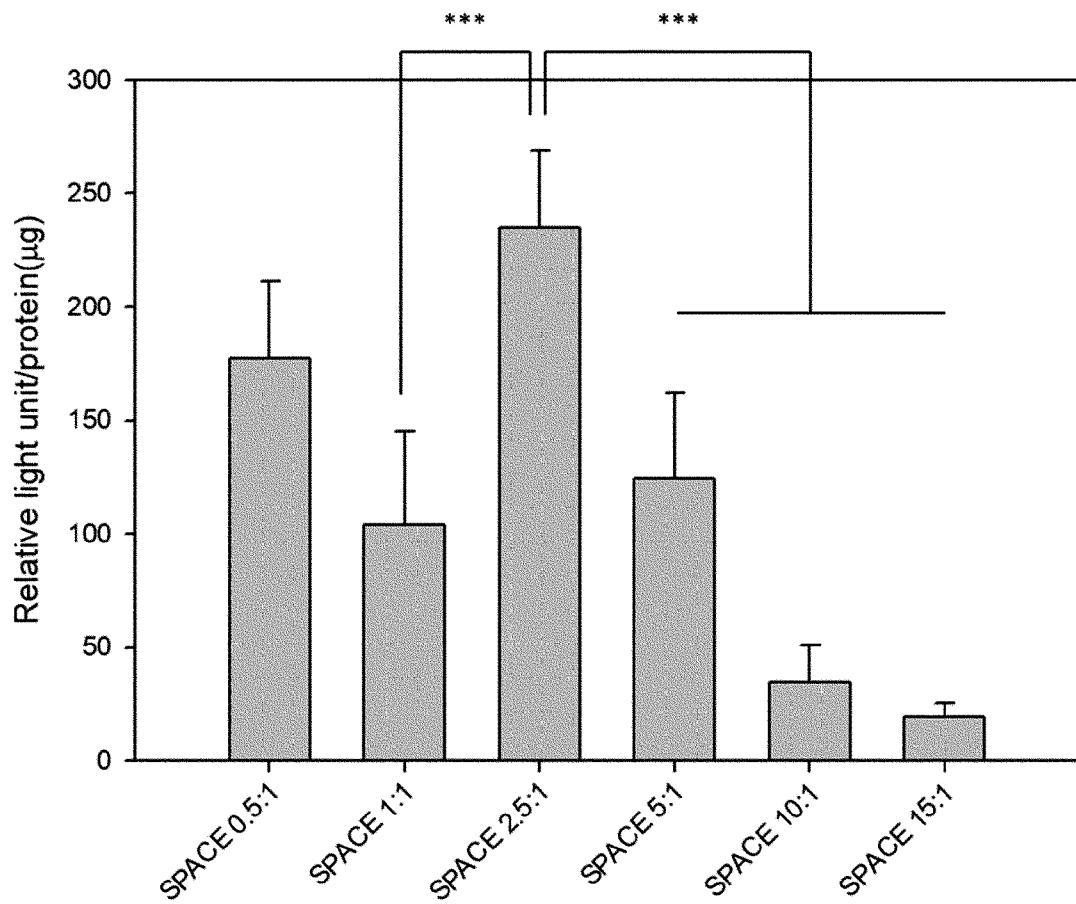
[도4]



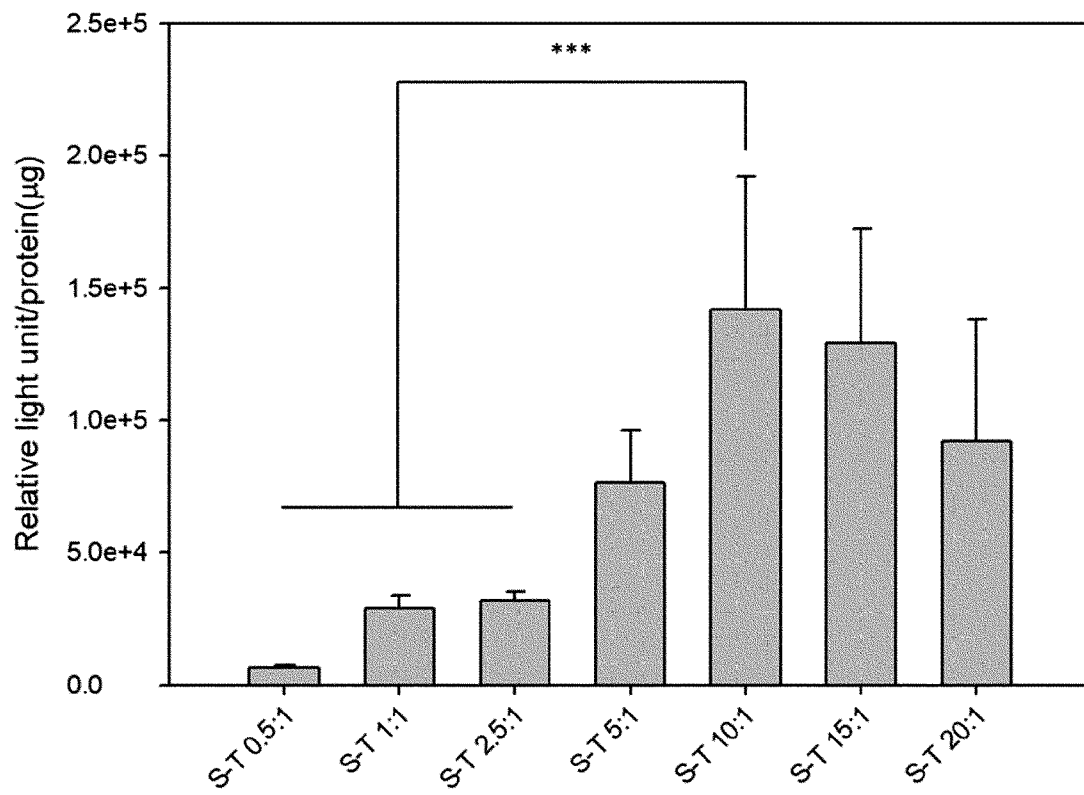
[도5]



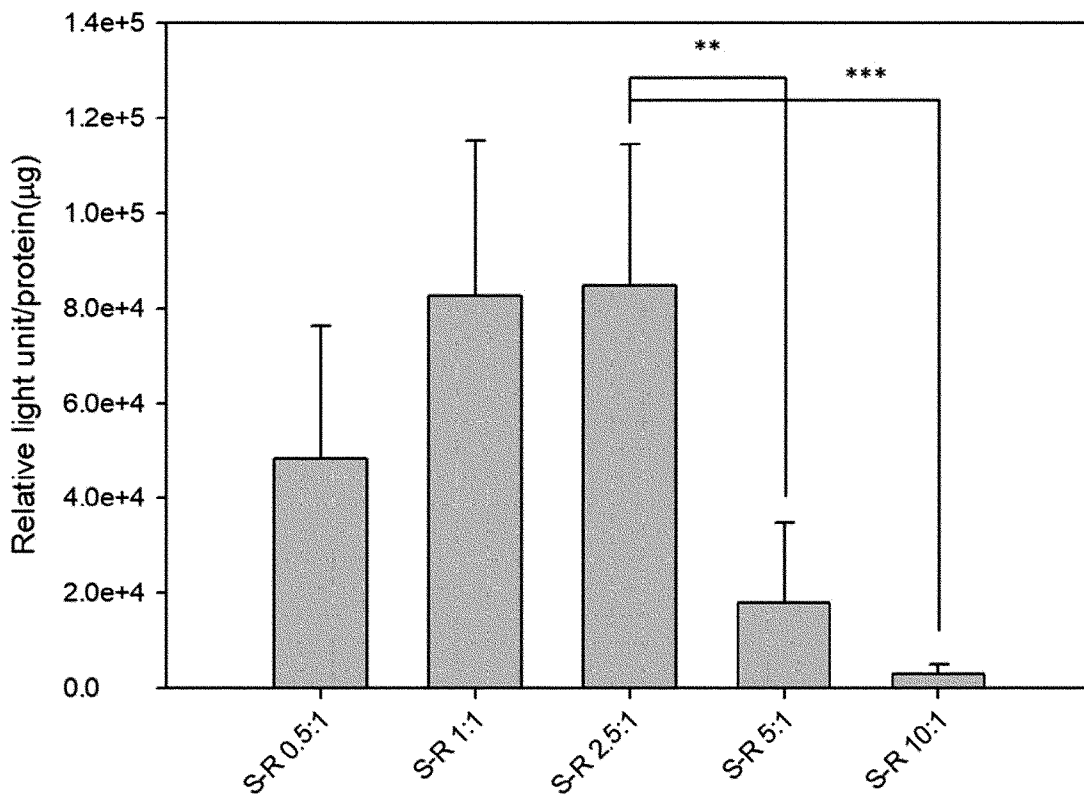
[도6]



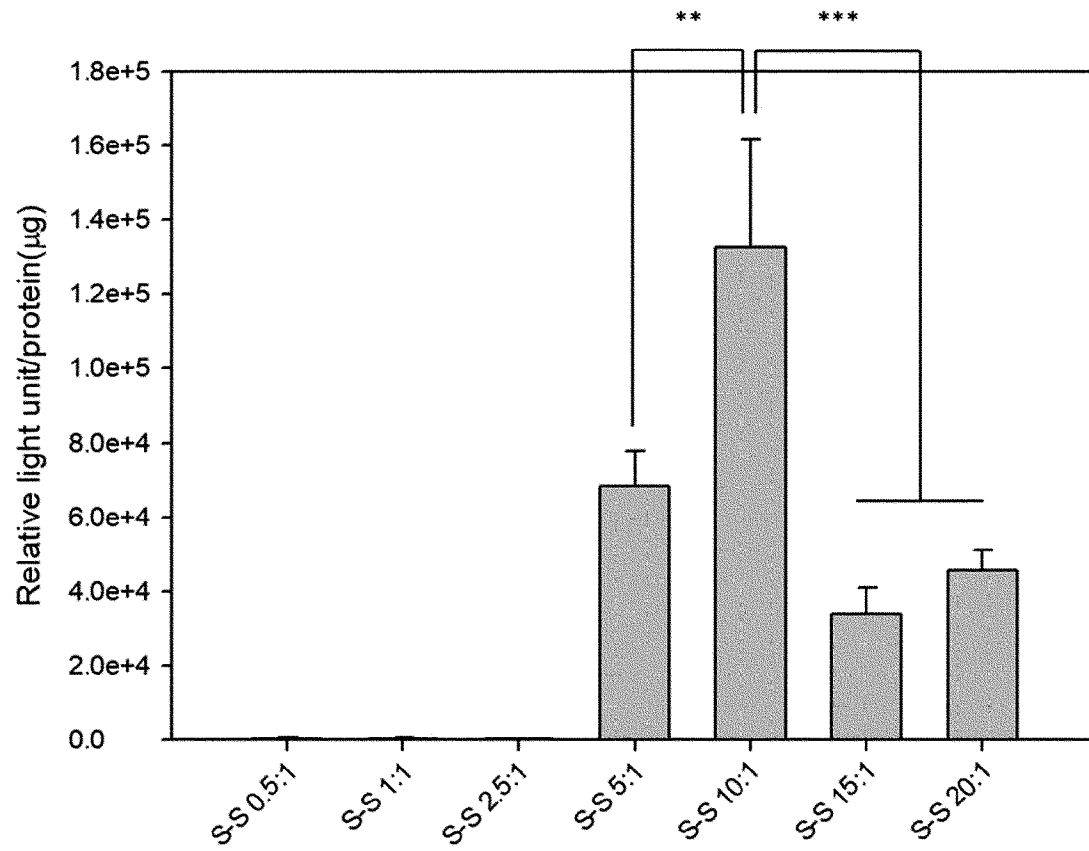
[도7]



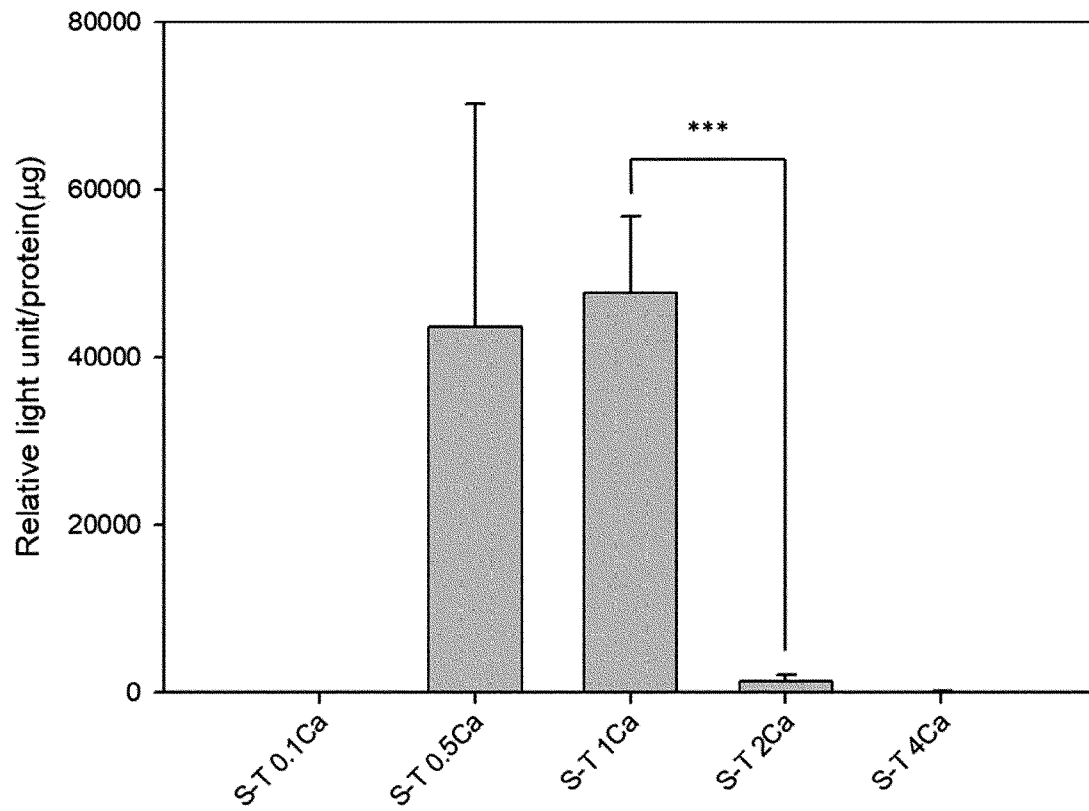
[도8]



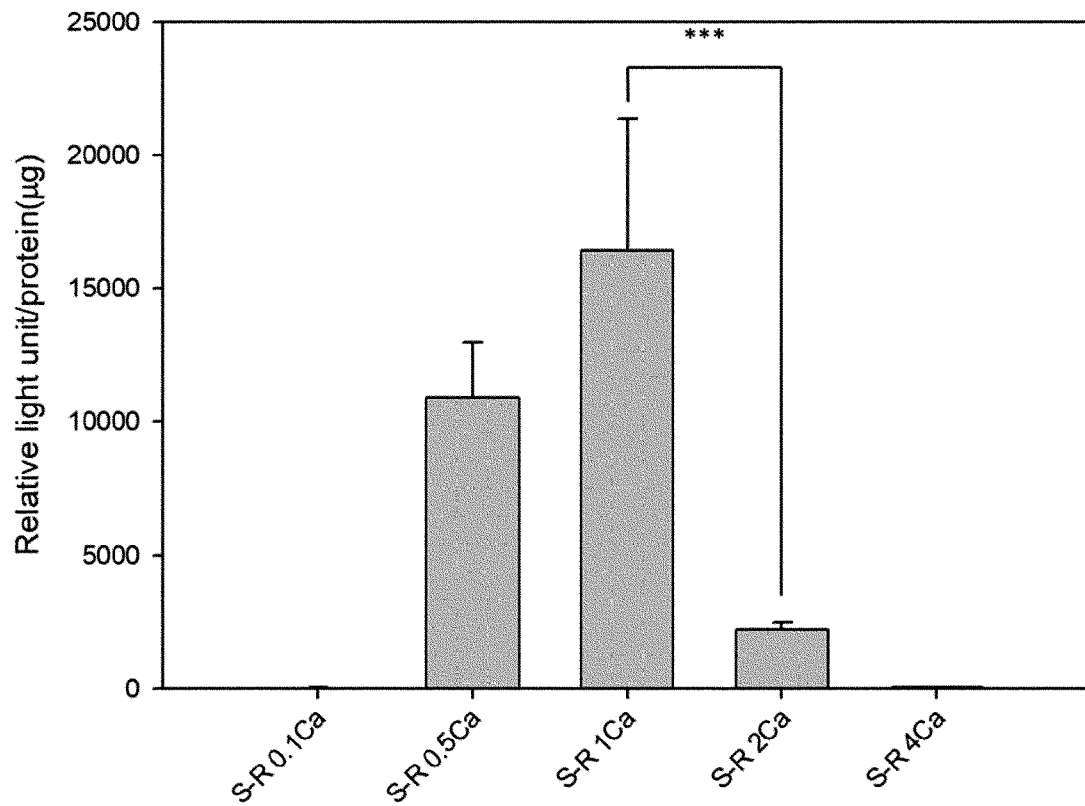
[도9]



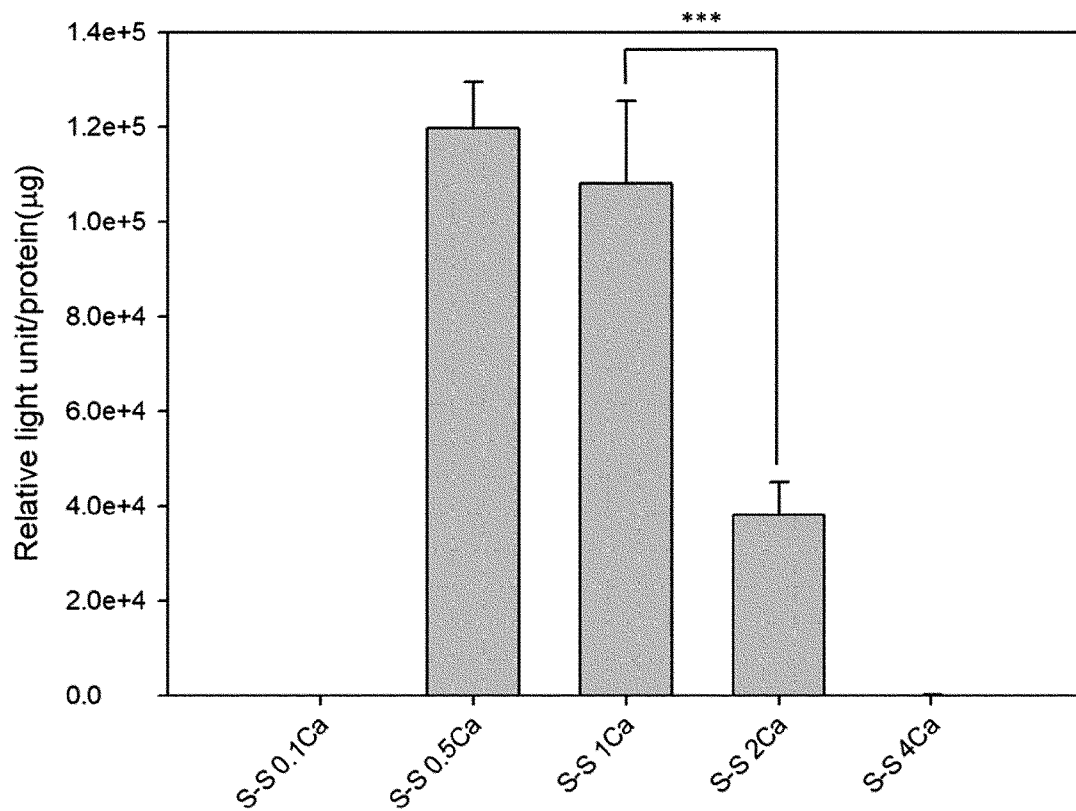
[도10]



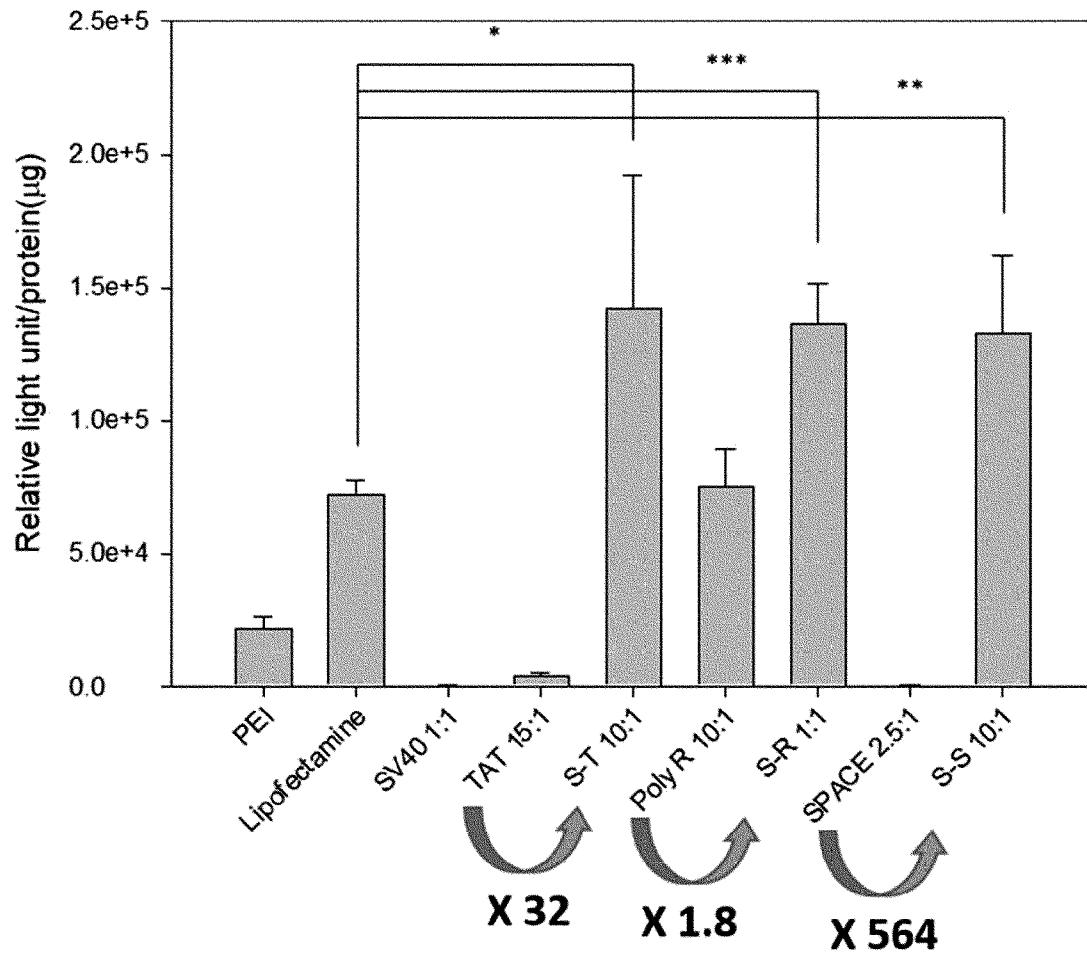
[도11]



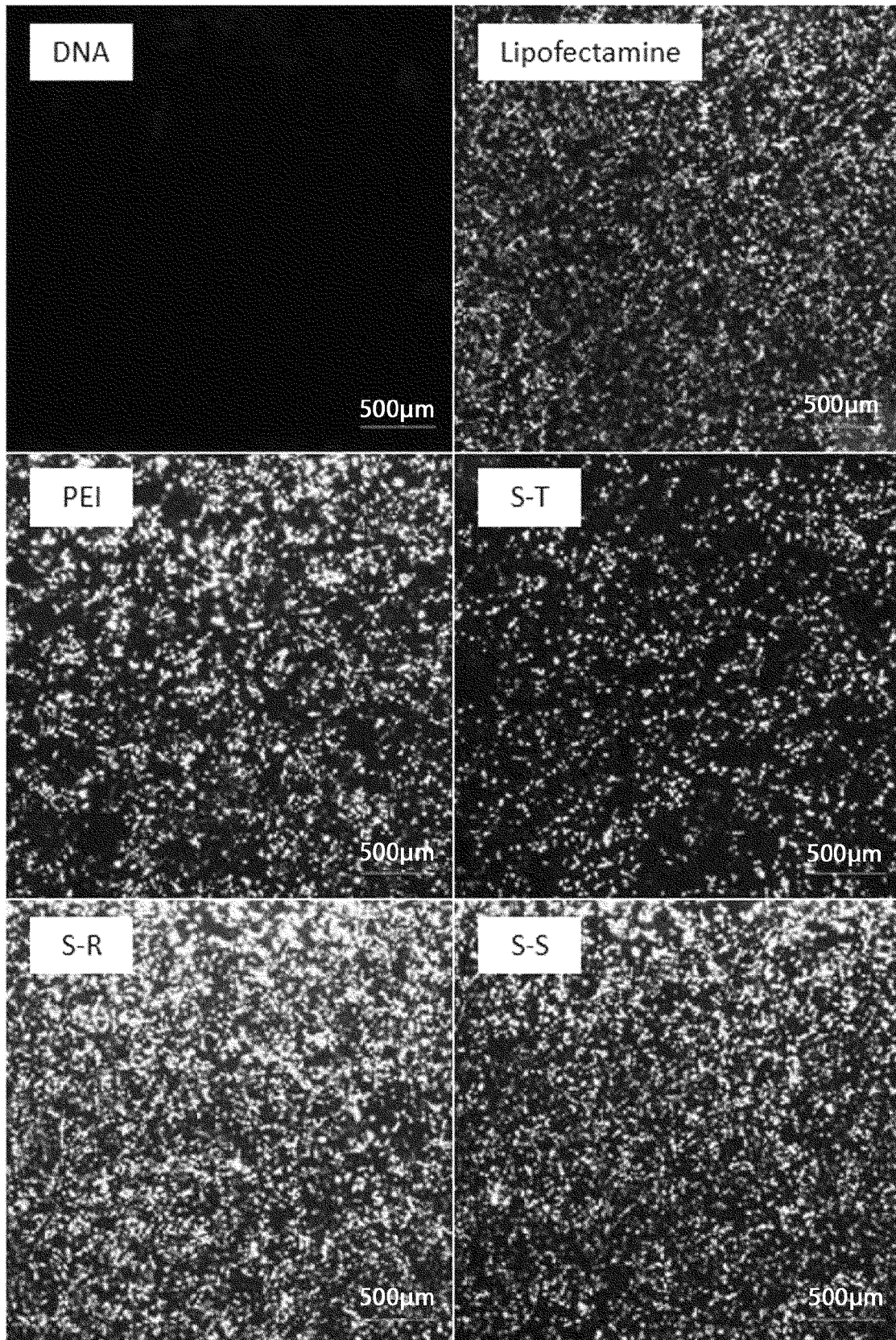
[도12]



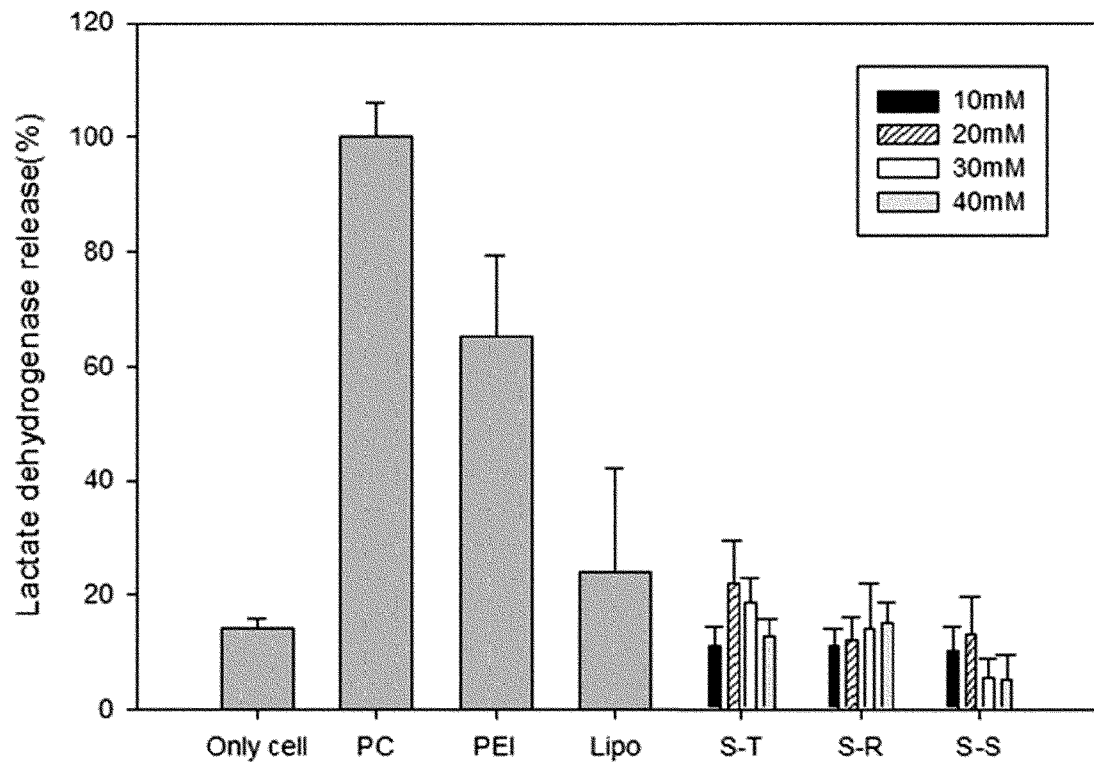
[도13]



[도14]



[도15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/012211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/06(2006.01)i, C07K 7/08(2006.01)i, C07K 14/005(2006.01)i, A61K 47/64(2017.01)i, A61K 47/65(2017.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 7/06; A61K 49/00; C12N 7/00; C12Q 1/70; C07K 7/08; C07K 14/005; A61K 47/64; A61K 47/65

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cell penetrating peptide(CPP), nuclear localization signal(NLS), calcium ion

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005-0042603 A1 (WANG, J.) 24 February 2005 See abstract; claims 7-9, 13-17, 26; paragraphs [0011], [0018], [0019], [0022], [0038]; example 2.	1-17
X	US 2017-0035914 A1 (GENERAL ELECTRIC COMPANY) 09 February 2017 See abstract; table 1; claims 1, 3, 10-11.	1-12
X	DUVSHANI-ESHET, M. et al. Effect of peptides bearing nuclear localization signals on therapeutic ultrasound mediated gene delivery. THE JOURNAL OF GENE MEDICINE. 2008, vol. 10, pages 1150-1159 See abstract; figure 1.	1-12
X	SEHGAL, I. et al. Photoinduced cytotoxicity and biodistribution of prostate cancer cell-targeted porphyrins. J. Med. Chem. 2008, vol. 51, pages 6014-6020 See abstract; formula 1; pages 6014-6015.	1-11
A	SHIRAISHI, T. et al. Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic tat and oligoarginine peptides. Chemistry & Biology. 2005, vol. 12, no. 8, pages 923-929 See the entire document.	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 APRIL 2019 (17.04.2019)

Date of mailing of the international search report

17 APRIL 2019 (17.04.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/012211

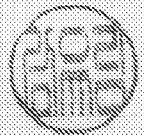
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JEONG, S. G. et al. Enhanced Transfection Efficiency of Plasmid using Fusion Peptide and Calcium Phosphate. 2018 KSBB Spring Meeting and International Symposium [abstracts]. April 2018, page 370 See abstract. ※ The above document is the published document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/012211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2005-0042603 A1	24/02/2005	WO 2005-003315 A2 WO 2005-003315 A3	13/01/2005 14/04/2005
US 2017-0035914 A1	09/02/2017	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 7/06(2006.01)i, C07K 7/08(2006.01)i, C07K 14/005(2006.01)i, A61K 47/64(2017.01)i, A61K 47/65(2017.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 7/06; A61K 49/00; C12N 7/00; C12Q 1/70; C07K 7/08; C07K 14/005; A61K 47/64; A61K 47/65 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 세포투과 펩타이드(cell penetrating peptide, CPP), 핵 이행 신호(nuclear localization signal, NLS), 칼슘 이온																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2005-0042603 A1 (WANG, J.) 2005.02.24 요약; 청구항 7-9, 13-17, 26; 단락 [0011], [0018], [0019], [0022], [0038]; 실시에 2 참조.</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2017-0035914 A1 (GENERAL ELECTRIC COMPANY) 2017.02.09 요약; 표 1; 청구항 1, 3, 10-11 참조.</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>DUVSHANI-ESHET, M. 등, "Effect of peptides bearing nuclear localization signals on therapeutic ultrasound mediated gene delivery", THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, 2008, 제10권, 페이지 1150-1159 초록; 도면 1 참조.</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>SEHGAL, I. 등, "Photoinduced cytotoxicity and biodistribution of prostate cancer cell-targeted porphyrins", J. Med. Chem., 2008, 제51권, 페이지 6014-6020 초록; 도식 1; 페이지 6014-6015 참조.</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SHIRAISHI, T. 등, "Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic tat and oligoarginine peptides", Chemistry & Biology, 2005, 제12권, 제8호, 페이지 923-929 전문 참조.</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	US 2005-0042603 A1 (WANG, J.) 2005.02.24 요약; 청구항 7-9, 13-17, 26; 단락 [0011], [0018], [0019], [0022], [0038]; 실시에 2 참조.	1-17	X	US 2017-0035914 A1 (GENERAL ELECTRIC COMPANY) 2017.02.09 요약; 표 1; 청구항 1, 3, 10-11 참조.	1-12	X	DUVSHANI-ESHET, M. 등, "Effect of peptides bearing nuclear localization signals on therapeutic ultrasound mediated gene delivery", THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, 2008, 제10권, 페이지 1150-1159 초록; 도면 1 참조.	1-12	X	SEHGAL, I. 등, "Photoinduced cytotoxicity and biodistribution of prostate cancer cell-targeted porphyrins", J. Med. Chem., 2008, 제51권, 페이지 6014-6020 초록; 도식 1; 페이지 6014-6015 참조.	1-11	A	SHIRAISHI, T. 등, "Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic tat and oligoarginine peptides", Chemistry & Biology, 2005, 제12권, 제8호, 페이지 923-929 전문 참조.	1-17
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
X	US 2005-0042603 A1 (WANG, J.) 2005.02.24 요약; 청구항 7-9, 13-17, 26; 단락 [0011], [0018], [0019], [0022], [0038]; 실시에 2 참조.	1-17																		
X	US 2017-0035914 A1 (GENERAL ELECTRIC COMPANY) 2017.02.09 요약; 표 1; 청구항 1, 3, 10-11 참조.	1-12																		
X	DUVSHANI-ESHET, M. 등, "Effect of peptides bearing nuclear localization signals on therapeutic ultrasound mediated gene delivery", THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, 2008, 제10권, 페이지 1150-1159 초록; 도면 1 참조.	1-12																		
X	SEHGAL, I. 등, "Photoinduced cytotoxicity and biodistribution of prostate cancer cell-targeted porphyrins", J. Med. Chem., 2008, 제51권, 페이지 6014-6020 초록; 도식 1; 페이지 6014-6015 참조.	1-11																		
A	SHIRAISHI, T. 등, "Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic tat and oligoarginine peptides", Chemistry & Biology, 2005, 제12권, 제8호, 페이지 923-929 전문 참조.	1-17																		
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2019년 04월 17일 (17.04.2019)		국제조사보고서 발송일 2019년 04월 17일 (17.04.2019)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516 																		

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JEONG, S. G. 등, "Enhanced Transfection Efficiency of Plasmid using Fusion Peptide and Calcium Phosphate", 2018 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지엄 [초록집], 2018.4, 페이지 370 초록 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-17

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2018/012211

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2005-0042603 A1	2005/02/24	WO 2005-003315 A2 WO 2005-003315 A3	2005/01/13 2005/04/14
US 2017-0035914 A1	2017/02/09	없음	