



등록특허 10-2697262



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월20일
(11) 등록번호 10-2697262
(24) 등록일자 2024년08월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/00 (2006.01) *C12N 15/90* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/00 (2013.01)
C07K 14/001 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7032040(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2016년04월08일
심사청구일자 2021년10월06일
- (85) 번역문제출일자 2021년10월06일
- (65) 공개번호 10-2021-0124536
- (43) 공개일자 2021년10월14일
- (62) 원출원 특허 10-2017-7032555
원출원일자(국제) 2016년04월08일
심사청구일자 2020년11월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/CA2016/050403
- (87) 국제공개번호 WO 2016/161516
국제공개일자 2016년10월13일
- (30) 우선권주장
62/145,760 2015년04월10일 미국(US)
62/246,892 2015년10월27일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
Journal of Controlled Release (2012) Vol.163, pp.293-303
Biomaterials (2008) Vol.29, pp.2408-2414

- (73) 특허권자
펠단 바이오 인코포레이티드
캐나다 퀘벡 쥐1피 4에스6 퀘벡 스위트 290 듀 파크 테크놀로지큐 블러바드 2666
- (72) 발명자
파이 테이비드
캐나다 퀘벡 쥐1엠 3피5 퀘벡 류 데스 아카시아 2614
델'쥬디쎄 토마스
캐나다 퀘벡 쥐1씨 5에스6 퀘벡 류 조르쥬 도르 251
레베티-스토프파에스 잔-파스칼
캐나다 퀘벡 쥐1알 3제트4 퀘벡 에이피티. 304 류 세인트-루이스 79

- (74) 대리인
특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 문명순

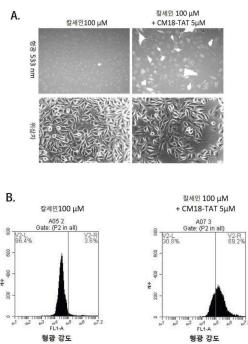
(54) 발명의 명칭 표적 진핵세포의 세포질로의 폴리펩타이드 카고의 형질 도입 효과를 향상시키기 위한 폴리펩타이드계 셔틀체, 이의 용도, 방법 및 이에 관련된 키트

(57) 요약

본 발명은 폴리펩타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로의 형질 도입 효과를 향상시키는데 유용한 합성 펩타이드에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하도록 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD), 또는 히스티딘-리치 도메인 및 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하도록 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD)을 포함하는 폴리펩타이드를 제공하는 것이다.

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



인(ELD)을 포함하는 합성 웹타이드 및 웹타이드계 셔틀체에 관한 것이다. 이와 관련된 조성물, 키트, 방법 및 용도들도 기재되어 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/907 (2013.01)

C07K 2319/01 (2013.01)

C07K 2319/10 (2013.01)

C07K 2319/21 (2013.01)

C12N 2501/60 (2013.01)

C12N 2501/998 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

표적 진핵세포의 사이토졸로 독립성 폴리펩타이드 카고의 형질 도입 효율을 증가시키기 위해 임상 또는 치료적 생체 내 방법에 사용하기 위한 조성물로서,

상기 조성물은

(a) (i) 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하게 연결된, 엔도조몰리틱(endosomolytic) 활성을 가지는 양친매성 엔도좀 누출 도메인(ELD), 또는

(ii) 적어도 3개의 연속된 히스티딘 잔기를 포함하는 히스티딘-리치 도메인 및 CPD에 작동가능하게 연결된 엔도조몰리틱 활성을 가지는 양친매성 ELD를 포함하는,

수용액에 용해 가능하고, 생리학적 pH에서 적어도 +6의 예상 순전하를 가지고, 아미노산 잔기 100개의 최대 길이를 가지는,

폴리펩타이드 기반 셔틀제; 및

(b) 생물학적 활성 폴리펩타이드인 독립성 폴리펩타이드 카고를 포함하고,

여기서 상기 ELD는 CM 18(서열번호 1); GALA(서열번호 3); INF-7(서열번호 5); LAH4(서열번호 6); HGP(서열번호 7); H5WYG(서열번호 8); HA2(서열번호 9); EB1(서열번호 10); VSVG(서열번호 11); 멜리틴(melittin)(서열번호 13); KALA(서열번호 14); JST-1(서열번호 15); C(LLKK)₃C(서열번호 63); 또는 G(LLKK)₃G(서열번호 64)이고,

여기서 상기 조성물 내 폴리펩타이드 기반 셔틀제의 농도는 적어도 2.5 μ M이고, 독립성 폴리펩타이드 카고가 원형질막을 통하여 사이토졸로 세포 내로 전달되는 표적 진핵세포의 개체군 중 백분율 또는 비율을 증가시키기에 충분한 농도인 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리펩타이드 기반 셔틀제는

(a) 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의 최소 길이인 아미노산 잔기 및 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 또는 95개의 최소 길이인 아미노산 잔기를 포함하거나;

(b) 생리학적 pH에서 예상 순 전하가 적어도 +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, 또는 +15이거나;

(c) (a) 및 (b) 둘다를 만족시키는,

조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CPD는 세포-투과 펩타이드 또는 세포-투과 펩타이드로부터의 단백질 도입 영역; TAT; PTD4; 페너트라틴(안테나페디아); pVEC; M918; Pep-1; Pep-2; Xentry; 아르기닌 스트레치(arginine stretch); 트랜스포탄(transportan); SynB1; SynB3; 또는 이들의 임의의 조합인 것인,

조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 폴리펩타이드 기반 셔틀제는

(a) 서열번호 16 내지 27 또는 65 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CPD;

(b) 4 개 이상, 5 개 이상 또는 6 개 이상의 연속적인 히스티딘 잔기를 갖는 히스티딘-리치 도메인; 또는
 (c) (a) 및 (b) 둘다를 만족시키는,
 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 도메인은 하나 이상의 링커 도메인을 통해 작동가능하게 연결된, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 폴리펩타이드 기반 셔틀제는

- (a) 서열번호 1, 14 또는 63의 아미노산 서열을 포함하는 CM18, KALA 또는 C(LLKK)₃C인 ELD;
- (b) 서열번호 17 또는 65의 아미노산 서열을 포함하는 TAT 또는 PTD4; 또는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 페너트라틴인 CPD;
- (c) 적어도 6개의 연속적인 히스티딘 잔기를 포함하는 히스티딘-리치 도메인; 또는
- (d) (a) 내지 (c)의 임의의 조합을 포함하는,

조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 폴리펩타이드 기반 셔틀제는 서열번호 57 내지 59, 66 내지 72 또는 82 내지 102 중 어느 하나의 아미노산을 포함하거나 이로 구성된, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 독립성 폴리펩타이드 카고는

- (a) 재조합 단백질이거나;
- (b) 준세포 목표 도메인을 포함하거나;
- (c) DNA 또는 RNA 분자와 복합체를 형성하거나;
- (d) (a) 내지 (c)의 임의의 조합인,

조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 준세포 목표 도메인은

- (a) 핵 국제화 신호(nuclear localization signal, NLS);
- (b) 핵인 신호 서열(nucleolar signal sequence);
- (c) 미토콘드리아성 신호 서열; 또는
- (d) 퍼옥시솜 신호 서열인,

조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 카고는 전사 인자, 뉴클레아제, 사이토카인, 호르몬, 성장 인자 또는 항체인, 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

(a) 상기 전사 인자는 HOXB4, NUP98-HOXA9, Oct3/4, Sox2, Sox9, Klf4, c-Myc, MyoD, Pdx1, Ngn3, MafA, Blimp-1, Eomes, T-bet, FOXO3A, NF-YA, SALL4, ISL1, FoxA1, Nanog, Esrrb, Lin28, HIF1-알파, Hlf, Runx1t1, Pbx1, Lmo2, Zfp37, Prdm5, Bcl-6, 또는 이들의 임의의 조합이거나;

(b) 상기 뉴클레아제는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제, CRISPR 엔도뉴클레아제, I 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, II 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, III 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, IV 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, V 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, VI 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, CRISPR 관련 단백질 9(Cas9), Cpf1, 징크 평거 뉴클레아제(ZFNs), 전사 활성체-유사 이펙터 뉴클레아제(Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)), 호밍 엔도뉴클레아제(homing endonuclease), 메가뉴클레아제, 또는 이들의 임의의 조합인,

조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 세포 치료, 유전자 교정(genome editing), 입양 세포 이식(adoptive cell transfer) 또는 재생 의학(regenerative medicine)에 사용하도록 의도된, 표적 진핵세포의 사이토졸로 폴리펩타이드 카고의 형질 도입 효율을 증가시키기 위한, 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 표적 진핵세포는 동물 세포, 포유류 세포, 인간 세포, 줄기 세포, 일차 세포, 면역 세포, T 세포 또는 수지상 세포인, 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 독립성 폴리펩타이드 카고가 세포 투과 도메인(CPD)을 포함하지 않는 것인, 조성물.

청구항 15

표적 진핵세포의 사이토졸로 독립성 폴리펩타이드 카고의 형질 도입 효율을 증가시키기 위한 시험관 내 방법으로,

상기 방법은 표적 진핵세포를 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 조성물로 접촉시키는 것인, 시험관 내 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 독립성 폴리펩타이드 카고가 세포 투과 도메인(CPD)을 포함하지 않는 것인, 시험관 내 방법.

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 폴리펩타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로의 형질 도입 효과를 향상시키는데 유용한 합성 펩타이드에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하도록 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD), 또는 히스티딘-리치 도메인 및 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하도록 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD) 포함하는 합성 펩타이드 및 펩타이드계 셔틀제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

큰 분자를 진핵세포 내로 전달하는 세포 전달 기술들은 특히 생물 약제 산업에서 광범위하게 적용된다. 몇몇 용해성 화학 물질(예를 들어, 작은 분자 약물들)은 진핵세포 막을 수동적으로 확산할 수 있으나, 큰 카고들(예를 들어, 생물학적 제재, 폴리뉴클레오디드, 및 폴리펩타이드)은 세포내 표적에 도달하기 위하여 운반체의 도움을 필요로 한다.

[0003]

세포 전달 기술들의 발전으로 큰 이익을 얻은 영역은 지난 20년간 큰 도약을 이룬 세포 치료 분야이다. 세포 성장, 분화 및 재프로그램화를 통제하는 다른 성장 인자들 및 분자 신호의 해독은 충족되지 못한 의학적 수요 (unmet medical needs)의 해결을 위한 치료 가능성을 열어 준다. 예를 들어, 성인 세포로부터 직접적으로 다능성 줄기 세포를 유도, 직접 세포 전환(전환-분화), 및 유전자 편집(징크 평거 뉴클레아제, TALENTM 및 CRISPR/Cas9 기술들)은 임상 응용을 위한 세포의 치료 가치를 극대화하기 위하여 개발된 방법의 예시이다. 현재, 높은 치료 활성을 가지는 세포의 제조는 임상 적용을 위한 중요한 안전성 및 경제성의 문제가 제기되는, 바이러스 형질 도입(viral transduction)에 의해 주로 달성되는 생체외 조작(ex vivo manipulations)을 보통 요구한다. 전사 인자 또는 인공 뉴클레아제와 같은 활성 단백질을 직접적으로 이들의 세포 내로 전달하는 능력은 보다 위험한 유전자 전달 방법과 연관된 안전성 문제 및 규제 장애를 유리하게 우회할 수 있다.

[0004]

이와 관련하여, 폴리펩타이드계 형질 도입제는 정제된 재조합 단백질을 표적 세포에 직접적으로 도입시키는데 유효할 수 있으며, 예를 들어, 외래 DNA의 도입에 관련된 안정성 문제를 우회하는데 도움을 줄 수 있다. 지질계 또는 양이온성 폴리머계 형질 도입제는 존재하나, 인간 치료의 사용을 방해하는 화학 독성 및 효율성과 관련하여 안정성의 우려를 제기한다. 재조합 단백질 카고를 세포-투과 웨타이드(예를 들어, HIV 전사촉진 단백질 TAT)에 직접적으로 융합시키는 방법과 관련된 단백질 형질 도입 접근법은 다량의 재조합 단백질을 필요로 하며, 종종 카고를 적절한 준세포 위치에 전달하지 못하여 엔도좀 포획(endosomal trapping) 및 궁극적인 분해(eventual degradation)로 이어진다. 엔도좀-포획된 카고가 세포질로 빠져나가도록 시도하고 촉진시키기 위한 몇몇의 웨타이드를 방해하는 엔도좀 막이 개발되었다. 그러나, 많은 엔도조몰리티 웨타이드들은 이미 세포 내로 전달된 카고의 엔도솜 포착(endosomal entrapment)를 완화하려는 것이고, 원형질막을 세포 내로 가로질러 카고를 전달하는 초기 단계에서는 도움을 주지 못한다(Salomone et al., 2012; Salomone et al., 2013; Erazo-Oliveras et al., 2014; Fasoli et al., 2014). 따라서, 폴리펩타이드 카고의 형질 도입 효과가 향상되고, 카고를 표적 진핵세포에 전달할 수 있는 개선된 셔틀제가 필요하다.

[0005]

본 명세서는 다수의 문서가 관련되어 있으며, 그들 전부는 참고로 인용되어 본 명세서에 포함되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

본 발명은 세포 투과 도메인(CPD) 그리고 선택적으로 히스티딘-리치 도메인에 작동가능하도록 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD)을 포함하고, 관심있는 폴리펩타이드 카고가 형질 도입될 수 있는 세포의 비율을 증가시킬 수 있는 능력을 가지고, 합성 웨타이드와 폴리펩타이드 카고가 공유결합하지 않는 합성 웨타이드의 놀라운 발견으로부터 비롯된다. 성공적인 형질 도입 후에는 상기 합성 웨타이드는 엔도좀-포획된(endosomally-trapped) 폴리펩타이드 카고가 세포질에 접근하고, 선택적으로 다양한 세포내 구획(예를 들어, 핵)을 표적으로 하는 능력을 촉진할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0007]

따라서, 본 설명은 다음의 측면들과 관련되어 있을 수 있다.

[0008]

(1) 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하게 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD), 또는 히스티딘-리치 도메인 및 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하게 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD)을 포함하는 합성 웨타이드.

[0009]

(2) 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하게 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD), 또는 히스티딘-리치 도메인 및 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하게 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD)을 포함하고, 독립된 폴리펩타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로의 형질 도입 효과를 향상시키기 위한 폴리펩타이드계 셔틀제.

[0010]

(3) (a) 최소 길이가 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30인 아미노산 잔기들 및 최대 길이가 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 또는 150인 아미노산 잔기들을 포함하며; (b) 생리학적 pH의 예상 순 전하가 적어도 +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, 또는 +15이며; (c) 수용액에 용해 가능하며; 또는 (d) (a) 내지 (c)의 조합인 (1) 또는 (2)의 상기 합성 웨타이드 또는 상기 폴리펩타이드계 셔틀제.

[0011]

(4) (a) 상기 엔도좀 누출 도메인(ELD):이 엔도조몰리티 웨타이드(endosomolytic peptide); 항균 웨타이드(AMP); 선형 양이온성 알파헬릭스의 항균 웨타이드; 세크로핀-A/멜리틴 하이브리드(CM series) 웨타이드; pH 의 존성 멤브레인 활성 웨타이드(PAMP); 양친매성 웨타이드(peptide amphiphile); 인플루엔자 혈구응집소(HA)의

HA2 서브유닛의 N 말단으로부터 유래한 웨타이드; CM 18; 디프테리아 독소 T 도메인(DT); GALA; PEA; INF-7; LAH4; HGP; H5WYG; HA2; EB1; VSVG; 슈도모나스 독소(*Pseudomonas* toxin); 멜리틴(melittin); KALA; JST-1; C(LLKK)₃C; G(LLKK)₃G; 또는 이들의 조합이거나 이로부터 유래하며; (b) 상기 세포 투과 도메인(CPD):이 세포-투과 웨타이드 또는 세포-투과 웨타이드로부터 제조된 단백질 형질 도입 도메인; TAT; PTD4; 페너트라틴(안테나 페디아); pVEC; M918; Pep-1; Xentry; 아르기닌 스트레치(arginine stretch); 트랜스포탄(transportan); SynB1; SynB3; 또는 이들의 조합이거나 이로부터 유래하며; (c) 상기 히스티딘-리치 도메인은 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 적어도 90%의 히스티딘 잔기를 포함하는 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개 아미노산의 스트레치이며; 및/또는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 또는 적어도 9개의 연속적인 히스티딘 잔기(consecutive histidine residues)를 포함하며; 또는 (d) (a) 내지 (c)의 조합인 (1) 내지 (3) 중 하나의 상기 합성 웨타이드 또는 상기 폴리웨타이드계 셔틀제.

[0012] (5) (a) 엔도조몰리틱 활성(endosomolytic activity)을 가지는 서열번호 1 내지 15, 63 또는 64 중 어느 하나의 아미노산 서열, 이의 변이체(variant), 또는 단편(fragment)을 포함하는 상기 엔도좀 누출 도메인(ELD); (b) 세포 투과 활성(cell penetrating activity)을 가지는 서열번호 16 내지 27 또는 65 중 어느 하나의 아미노산 서열, 변이체(variant), 또는 단편(fragment)을 포함하는 상기 세포 투과 도메인(CPD); (c) 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 연속적인 히스티딘 잔기를 포함하는 히스티딘-리치 도메인; 또는 (d) (a) 내지 (c)의 조합을 포함하는 (1) 내지 (4) 중 하나의 상기 합성 웨타이드 또는 상기 폴리웨타이드계 셔틀제.

[0013] (6) 상기 도메인들은 하나 이상의 링커 도메인들(linker domains)을 통하여 작동가능하게 연결된 (1) 내지 (5) 중 하나의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀제.

[0014] (7) 적어도 2 이상의 서로 다른 타입의 세포 투과 도메인(CPD) 및/또는 엔도좀 누출 도메인(ELD)을 포함하는 (1) 내지 (6) 중 하나의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀제.

[0015] (8) (a) 서열번호 1, 14 또는 63의 아미노산 서열 또는 서열번호 1, 14 또는 63과 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 동일성(identity)을 갖는 이의 변이체를 포함하며, 엔도조몰리틱 활성을 가지는 CM18, KALA 또는 C(LLKK)₃C인 엔도좀 누출 도메인(ELD); (b) 서열번호 17 또는 65의 아미노산 서열 또는 서열번호 17 또는 65와 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 동일성(identity)을 갖는 이의 변이체를 포함하며, 세포 투과 활성을 가지는 TAT 또는 PTD4; 또는 서열번호 18의 아미노산 서열 또는 서열번호 18과 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 동일성(identity)을 갖는 이의 변이체를 포함하며, 세포 투과 활성을 가지는 페너트라틴인 세포 투과 도메인(CPD); (c) 적어도 6개의 연속적인 히스티딘 잔기를 포함하는 히스티딘-리치 도메인; 또는 (d) (a) 내지 (c)의 조합을 포함하는 (1) 내지 (7) 중 하나의 상기 합성 웨타이드 또는 상기 폴리웨타이드계 셔틀제.

[0016] (9) 서열번호 57 내지 59, 66 내지 72 또는 82 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 또는 서열번호 57 내지 59, 66 내지 72 또는 82 내지 102 중 어느 하나와 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 동일성을 가지는 기능적 변이체를 포함하거나 이로 구성되는 (1) 내지 (7) 중 하나의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀제.

[0017] (10) 무독성(non-toxic) 및/또는 대사 가능한(metabolizable) (1) 내지 (9) 중 하나의 상기 합성 웨타이드 또는 상기 폴리웨타이드계 셔틀제.

[0018] (11) (a) (1) 내지 (10) 중 하나의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀제 및 히스티딘-리치 도메인 및 세포 투과 도메인(CPD)을 포함하는 추가의 독립 합성 웨타이드; 및/또는 (b) 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개 종류의 (1) 내지 (10) 중 하나의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀제의 혼합물을 포함하는 조성물.

[0019] (12) 독립 폴리웨타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로 전달하기 위한 (1) 내지 (11) 중 하나의 합성 웨타이드, 폴리웨타이드계 셔틀제, 또는 조성물의 용도.

[0020] (13) 표적 진핵세포와 (1) 내지 (11) 중 하나의 합성 웨타이드, 폴리웨타이드계 셔틀제, 또는 조성물을 접촉시키는 단계를 포함하는 폴리웨타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로의 형질 도입 효과를 향상시키기 위한 방법.

[0021] (14) (1) 내지 (11) 중 하나의 합성 웨타이드, 폴리웨타이드계 셔틀제, 또는 조성물과 적합한 용기를 포함하는 폴리웨타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로의 형질 도입 효과를 증가시키기 위한 키트.

- [0022] (15) 혈청의 존재 하에서 폴리펩타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로의 형질 도입 효과를 향상시키기 위하여 사용되는 (1) 내지 (14) 중 하나의 합성 웨타이드, 폴리펩타이드계 셔틀체, 조성물, 방법 또는 키트.
- [0023] (16) 상기 폴리펩타이드 카고는: (a) 세포 투과 도메인(CPD) 또는 제4항 (b)에서 정의된 세포 투과 도메인(CPD)을 포함하거나 포함하지 않으며; (b) 재조합 단백질이며; (c) 준세포 목표 도메인(subcellular targeting domain)을 포함하며; (d) DNA 및/또는 RNA 분자와 복합체를 형성하며; 또는(e) (a) 내지 (d)의 조합인 (2) 내지 (15) 중 하나의 합성 웨타이드, 폴리펩타이드계 셔틀체, 조성물, 방법 또는 키트.
- [0024] (17) 상기 준세포 목표 도메인은: (a) 핵 국재화 신호(nuclear localization signal, NLS); (b) 핵인 신호 서열(nucleolar signal sequence); (c) 미토콘드리아성 신호 서열(mitochondrial signal sequence); 또는(d) 퍼옥시솜 신호 서열(peroxisome signal sequence)인 (16)의 합성 웨타이드, 폴리펩타이드계 셔틀체, 조성물, 방법 또는 키트.
- [0025] (18) (a) 상기 NLS는 E1a, T-Ag, c-myc, T-Ag, op-T-NLS, Vp3, 핵원형질(nucleoplasm), 히스톤 2B(histone 2B), Xenopus N1, PARP, PDX-1, QKI-5, HCDA, H2B, v-Rel, Amida, RanBP3, Pho4p, LEF-1, TCF-1, BDV-P, TR2, SOX9, 또는 Max로부터 유래하며; (b) 상기 핵인 신호 서열은 BIRC5 또는 RECQL4로부터 유래하며; (c) 상기 미토콘드리아성 신호 서열은 Tim9 또는 효모 시토크롬 c 산화효소 서브유닛 IV(Yeast cytochrome c oxidase subunit IV)로부터 유래하며; 또는 (d) 퍼옥시솜 신호 서열은 PTS1으로부터 유래하는 (17)의 합성 웨타이드, 폴리펩타이드계 셔틀체, 조성물, 방법 또는 키트.
- [0026] (19) 상기 폴리펩타이드 카고는 전사 인자(transcription factor), 뉴클레아제(nuclease), 시토카인(cytokine), 호르몬(hormone), 성장 인자(growth factor), 또는 항체(antibody)인 (2) 내지 (18) 중 하나의 합성 웨타이드, 폴리펩타이드계 셔틀체, 조성물, 방법 또는 키트.
- [0027] (20) (a) 상기 전사 인자는 HOXB4, NUP98-HOXA9, Oct3/4, Sox2, Sox9, Klf4, c-Myc, MyoD, Pdx1, Ngn3, MafA, Blimp-1, Eomes, T-bet, FOXO3A, NF-YA, SALL4, ISL1, FoxA1, Nanog, Esrrb, Lin28, HIF1-alpha, Hif, Runx1t1, Pbx1, Lmo2, Zfp37, Prdm5, Bcl-6, 또는 이들의 조합이며; 및/또는 (b) 상기 뉴클레아제는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제(RNA-guided endonuclease), CRISPR 엔도뉴클레아제(CRISPR endonuclease), I 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, II 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, III 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, IV 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, V 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, VI 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, CRISPR 관련 단백질 9(Cas9), Cpf1, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFNs), 전사 활성-유사 이펙터 뉴클레아제(Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)), 호밍 엔도뉴클레아제(homing endonuclease), 메가뉴클레아제(meganuclease), 또는 이들의 조합인 (19)의 합성 웨타이드, 폴리펩타이드계 셔틀체, 조성물, 방법 또는 키트.
- [0028] (21) 세포 치료, 유전자 교정(genome editing), 입양 세포 이식(adoptive cell transfer) 및/또는 재생 의학(regenerative medicine)에 사용되는 (1) 내지 (20) 중 하나의 합성 웨타이드, 폴리펩타이드계 셔틀체, 조성물, 방법 또는 키트.
- [0029] (22) 상기 표적 진핵세포는 줄기 세포, 일차 세포, 면역 세포, T 세포, 또는 수지상 세포인 (2) 내지 (21) 중 하나의 합성 웨타이드, 폴리펩타이드계 셔틀체, 조성물, 방법 또는 키트.
- [0030] (23) (1) 내지 (10) 중 하나의 합성 웨타이드 또는 폴리펩타이드계 셔틀체, 또는 (11)의 조성물을 포함하는 진핵 세포.
- [0031] (24) 상기 세포는 상기 합성 웨타이드 또는 폴리펩타이드계 셔틀체에 의하여 세포 내로 전달된 독립 폴리펩타이드 카고를 더 포함하는 (23)의 진핵세포.
- [0032] (25) 표적 진핵세포와 (1) 내지 (10) 중 어느 하나의 합성 웨타이드 또는 폴리펩타이드계 셔틀체, 또는 (11)의 조성물, 그리고 상기 합성 웨타이드 또는 폴리펩타이드계 셔틀체에 의하여 세포 내로 전달되도록 독립 폴리펩타이드 카고를 접촉시키는 단계를 포함하는 표적 진핵세포에 독립 폴리펩타이드 카고를 전달하는 방법.
- [0033] (26) 상기 독립 폴리펩타이드 카고는 (16) 내지 (20) 중 하나의 독립 폴리펩타이드 카고인 (23) 또는 (24)의 진핵 세포 또는 (25) 진핵세포에 독립 폴리펩타이드 카고를 전달하는 방법.
- [0034] (27) 상기 독립 폴리펩타이드 카고는 (16) 내지 (20) 중 하나의 독립 폴리펩타이드 카고인 (24) 또는 (26)의 진핵 세포 또는 (25) 또는 (26)의 표적 진핵세포에 독립 폴리펩타이드 카고를 전달하는 방법.
- [0035] (28) 상기 진핵 세포는 동물 세포, 포유류 세포, 인간 세포, 줄기 세포, 일차 세포, 면역 세포, T 세포, 또는

수지상 세포인 (23), (24), (26) 또는 (27)의 진핵 세포 또는 (25), (26) 또는 (27)의 표적 진핵세포에 독립 폴리펩타이드 카고를 전달하는 방법.

[0036] 몇몇 관점에서, 본 설명은 다음 항목들 중 하나 이상에 관련되어 있을 수 있다.

[0037] 1. 표적 진핵세포와 합성 펩타이드 및 독립 폴리펩타이드 카고를 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 합성 펩타이드는:

[0038] (a) 엔도조몰리틱 활성(endosomolytic activity)을 가지고, 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하게 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD), 이의 변이체(variant), 또는 단편(fragment)을 포함하고, 상기 엔도좀 누출 도메인(ELD)은 서열번호 1 내지 15, 63 또는 64 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하며;

[0039] (b) 합성 펩타이드와 폴리펩타이드 카고가 공유결합하지 않고;

[0040] (c) 전체 길이 20 내지 100 사이의 아미노산 잔기를 가지며;

[0041] (d) 생리학적 pH에서 적어도 +6의 순전하를 가지며; 및

[0042] (e) 생리학적 pH에서 적어도 수용액에 가용성이며,

[0043] 상기 세포 투과 도메인(CPD)은 상기 합성 펩타이드의 세포내 전달을 가능하게 하며, 엔도좀 누출 도메인(ELD)은 엔도좀 포획된 독립 폴리펩타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로 털출 가능하도록 하는 독립 폴리펩타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로의 형질 도입 효과를 향상시키기 위한 방법.

[0044] 2. 상기 합성 펩타이드는 전체 길이 20 내지 70 사이의 아미노산 잔기를 가지는 1의 방법.

[0045] 3. 상기 세포 투과 도메인(CPD)은 서열번호 16 내지 27, 또는 65를 포함하거나, 세포 침투 활성을 가지는 이의 변이체 또는 단편인 1의 방법.

[0046] 4. 상기 합성 펩타이드는 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 적어도 90%의 히스티딘 잔기를 포함하는 적어도 6개 아미노산의 스트레치를 포함하는 히스티딘-리치 도메인을 더 포함하며; 및/또는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 적어도 6개의 연속적인 히스티딘 잔기(consecutive histidine residues)를 포함하는 1의 방법.

[0047] 5. 상기 엔도좀 누출 도메인(ELD) 변이체 또는 엔도좀 누출 도메인(ELD) 단편은 서열번호 1 내지 15, 63 또는 64 중 하나와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 가지는 1의 방법.

[0048] 6. 상기 세포 투과 도메인(CPD) 변이체 또는 세포 투과 도메인(CPD) 단편은 서열번호 16-27 또는 65 중 하나와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 가지는 3의 방법.

[0049] 7. 상기 엔도좀 누출 도메인(ELD) 및 세포 투과 도메인(CPD)은 하나 이상의 링커 도메인들(linker domains)을 통하여 작동가능하게 연결된 1의 방법.

[0050] 8. 상기 합성 펩타이드는 N-말단 메티오닌 잔기없이 화학적으로 합성된 1의 방법.

[0051] 9. 상기 합성 펩타이드는 서열번호 57 내지 59, 66 내지 72 또는 82 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 또는 서열번호 57 내지 59, 66 내지 72 또는 82 내지 102 중 어느 하나와 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 동일성을 가지는 기능적 변이체를 포함하는 1의 방법.

[0052] 10. 상기 독립 폴리펩타이드 카고는 세포 투과 도메인(CPD)을 포함하지 않는 재조합 단백질인 1의 방법.

[0053] 11. 상기 독립 폴리펩타이드 카고는 전사 인자, 뉴클레아제, 시토카인, 호르몬, 성장 인자, 또는 항체인 1의 방법.

[0054] 12. (a) 상기 전사 인자는 HOXB4, NUP98-HOXA9, Oct3/4, Sox2, Sox9, Klf4, c-Myc, MyoD, Pdx1, Ngn3, MafA, Blimp-1, Eomes, T-bet, FOXO3A, NF-YA, SALL4, ISL1, FoxA1, Nanog, Esrrb, Lin28, HIF1-alpha, Hlf, Runx1t1, Pbx1, Lmo2, Zfp37, Prdm5, Bcl-6, 또는 이들의 조합이며; 또는

[0055] (b) 상기 뉴클레아제는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제(RNA-guided endonuclease), CRISPR 엔도뉴클레아제(CRISPR endonuclease), I 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, II 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, III 타입 CRISPR 엔도뉴클레

아제, IV 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, V 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, VI 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, CRISPR 관련 단백질 9(Cas9), Cpf1, 징크 평거 뉴클레아제(ZFNs), 전사 활성-유사 이펙터 뉴클레아제(Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)), 호밍 엔도뉴클레아제(homing endonuclease), 메가뉴클레아제(meganuclease), 또는 이들의 조합인 11의 방법.

[0056] 13. 상기 뉴클레아제는 Cas9 또는 Cpf1인 11의 방법.

[0057] 14. 상기 뉴클레아제는 유도 RNA, CRISPR RNA(crRNA), 트랜스-활성 CRISPR RNA(tracrRNA), 또는 CRISPR RNA 및 트랜스-활성 CRISPR RNA 둘다를 더 포함하는 13의 방법.

[0058] 15. 상기 독립 폴리펩타이드 카고는 핵 국재화 신호 또는 추가적인 핵 국재화 신호를 포함하는 1의 방법.

[0059] 16. 상기 독립 폴리펩타이드 카고는 전사 인자 또는 뉴클레아제인 15의 방법.

[0060] 17. (a) 상기 전사 인자는 HOXB4, NUP98-HOXA9, Oct3/4, Sox2, Sox9, Klf4, c-Myc, MyoD, Pdx1, Ngn3, MafA, Blimp-1, Eomes, T-bet, FOXO3A, NF-YA, SALL4, ISL1, FoxA1, Nanog, Esrrb, Lin28, HIF1-alpha, Hlf, Runx1t1, Pbx1, Lmo2, Zfp37, Prdm5, Bcl-6, 또는 이들의 조합이며; 또는

[0061] (b) 상기 뉴클레아제는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제(RNA-guided endonuclease), CRISPR 엔도뉴클레아제(CRISPR endonuclease), I 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, II 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, III 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, IV 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, V 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, VI 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, CRISPR 관련 단백질 9(Cas9), Cpf1, 징크 평거 뉴클레아제(ZFNs), 전사 활성-유사 이펙터 뉴클레아제(Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)), 호밍 엔도뉴클레아제(homing endonuclease), 또는 메가뉴클레아제(meganuclease)인 16의 방법.

[0062] 18. 상기 뉴클레아제는 Cas9 또는 Cpf1인 17의 방법.

[0063] 19. 상기 뉴클레아제는 유도 RNA를 더 포함하는 18의 방법.

[0064] 20. 상기 세포는 줄기 세포, 일차 세포, 면역 세포, T 세포, 또는 수지상 세포인 1의 방법.

[0065] 21. 표적 진핵세포와 합성 웨타이드 및 독립 폴리펩타이드 카고를 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 합성 웨타이드는:

[0066] (a) 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하게 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD)을 포함하며, 상기 엔도좀 누출 도메인(ELD)은 선형 양이온성 알파헬릭스의 항균 웨타이드; 세크로핀-A/멜리틴 하이브리드(CM series) 웨타이드; pH 의존성 멤브레인 활성 웨타이드(PAMP); 양친매성 웨타이드(peptide amphiphile); 인플루엔자 혈구응집소(HA)의 HA2 서브유닛의 N 말단으로부터 유래한 웨타이드; CM 18; 디프테리아 독소 T 도메인(DT); GALA; PEA; INF-7; LAH4; HGP; H5WYG; HA2; EB1; VSVG; 슈도모나스 독소(*Pseudomonas* toxin); 멜리틴(melittin); KALA; JST-1; C(LLKK)₃C; G(LLKK)₃G이거나 이로부터 유래한 엔도조몰리틱 웨타이드이며;

[0067] (b) 합성 웨타이드와 폴리펩타이드 카고가 공유결합하지 않고;

[0068] (c) 전체 길이 20 내지 100 사이의 아미노산 잔기를 가지며;

[0069] (d) 생리학적 pH에서 적어도 +6의 순전하를 가지며; 및

[0070] (e) 생리학적 pH에서 적어도 수용액에 가용성이며,

[0071] 상기 세포 투과 도메인(CPD)은 상기 합성 웨타이드의 세포내 전달을 가능하게 하며, 엔도좀 누출 도메인(ELD)는 엔도좀 포획된 독립 폴리펩타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로 털출 가능하도록 하는 독립 폴리펩타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로의 형질 도입 효과를 향상시키기 위한 방법.

[0072] 22. 상기 세포 투과 도메인(CPD)는 세포-투과 웨타이드 또는 세포-투과 웨타이드로부터 제조된 단백질 형질 도입 도메인; TAT; PTD4; 페너트라틴(안테나페디아); pVEC; M918; Pep-1; Pep-2; Xentry; 아르기닌 스트레치(arginine stretch); 트랜스포탄(transportan); SynB1; SynB3; 또는 이들의 조합이거나 이로부터 유래한 21의 방법.

[0073] 23. 상기 합성 웨타이드는 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 적어도 90%의 히스티딘 잔기를 포함하는 적어도 3개 아미노산의 스트레치로 구성되며; 및/또는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 적어도 6개의 연속적인 히스티딘 잔기

(consecutive histidine residues)를 포함하는 히스티딘-리치 도메인을 포함하는 21의 방법.

[0074] 24. 상기 엔도좀 누출 도메인(ELD) 및 세포 투과 도메인(CPD)은 하나 이상의 링커 도메인들(linker domains)을 통하여 작동가능하게 연결된 21의 방법.

[0075] 25. 상기 독립 폴리펩타이드 카고는 전사 인자(transcription factor), 뉴클레아제(nuclease), 시토카인(cytokine), 호르몬(hormone), 성장 인자(growth factor), 또는 항체(antibody)인 21의 방법.

[0076] 26. 상기 전사 인자는 HOXB4, NUP98-HOXA9, Oct3/4, Sox2, Sox9, Klf4, c-Myc, MyoD, Pdx1, Ngn3, MafA, Blimp-1, Eomes, T-bet, FOXO3A, NF-YA, SALL4, ISL1, FoxA1, Nanog, Esrrb, Lin28, HIF1-alpha, Hlf, Runx1t1, Pbx1, Lmo2, Zfp37, Prdm5, Bcl-6, 또는 이들의 조합인 25의 방법.

[0077] 27. 상기 뉴클레아제는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제(RNA-guided endonuclease), CRISPR 엔도뉴클레아제(CRISPR endonuclease), I 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, II 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, III 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, IV 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, V 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, VI 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, CRISPR 관련 단백질 9(Cas9), Cpf1, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFNs), 전사 활성-유사 이펙터 뉴클레아제(Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)), 호밍 엔도뉴클레아제(homing endonuclease), 또는 메가뉴클레아제(meganuclease)인 25의 방법.

[0078] 28. 상기 뉴클레아제는 Cas9 또는 Cpf1인 25의 방법.

[0079] 29. 표적 진핵세포와 합성 펩타이드 및 상기 합성 펩타이드와 공유결합하지 않은 독립 폴리펩타이드 카고를 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 합성 펩타이드는 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하게 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD), 또는 세포 투과 도메인(CPD) 및 히스티딘-리치 도메인에 작동가능하게 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD)을 포함하며:

[0080] (a) 상기 엔도좀 누출 도메인(ELD)은 서열번호 1 내지 15, 63 또는 64 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하며;

[0081] (b) 상기 세포 투과 도메인(CPD)은 서열번호 16 내지 27 또는 65 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하며; 및

[0082] (c) 상기 히스티딘-리치 도메인은 적어도 2개의 연속적인 히스티딘 잔기를 포함하는 독립 폴리펩타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로의 형질 도입 효과를 향상시키기 위한 방법.

[0083] 30. 진핵세포를 핵 국재화 신호, 및 길이가 100 잔기 미만인 분리된 합성 펩타이드 셔틀체를 포함하고 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하게 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD), 또는 세포 투과 도메인(CPD) 및 히스티딘-리치 도메인에 작동가능하게 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD)을 포함하는 CRISPR 관련 단백질(Cas9) 재조합 단백질과 접촉시키는 단계를 포함하며,

[0084] (a) 상기 엔도좀 누출 도메인(ELD)은 서열번호 1 내지 15, 63 또는 64 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하며;

[0085] (b) 상기 세포 투과 도메인(CPD)은 서열번호 16 내지 27 또는 65 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하며;

[0086] (c) 상기 히스티딘-리치 도메인은 적어도 2개의 연속적인 히스티딘 잔기를 포함하는 CRISPR 관련 단백질(Cas9)을 표적 진핵세포의 핵에 전달하는 방법.

일반 정의

[0088] 제목 및 다른 식별 기호들, 예를 들어, (a), (b), (i), (ii), 등은 그저 명세서 및 청구범위를 용이하게 해석하기 위하여 제시된 것이다. 명세서 및 청구범위에서 제목 및 다른 식별 기호들의 사용이 반드시 단계들 또는 요소들이 알파벳 순서 또는 숫자 순서 또는 제시된 순서대로 수행되어야 할 필요는 없다.

[0089] 청구범위 및/또는 명세서에서 용어 "포함하는"과 함께 사용되는 경우 "하나"라는 용어의 사용은 "하나"를 의미할 수도 있지만 "하나 이상"의 의미와도 일치한다.

[0090] "약"이라는 용어는 값을 결정하기 위해 채용되는 장치 또는 방법에 대한 오류의 표준 편차를 포함하는 값을 나타내기 위해 사용된다.

[0091] 일반적으로, "약"이라는 용어는 최대 10%의 변화 가능성을 지정하는 것을 의미한다. 따라서, 값의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10%의 변화는 용어 "약"에 포함된다. 달리 명시하지 않는 한, 범위를 그 범위의 양 끝에 적용

하기 전에 "약"이라는 용어를 사용한다.

[0092] 본 명세서 및 청구범위에서 사용된 바와 같이, "포함하는" 및 "가지는"의 단어는 포괄적, 개방형이며 추가적인, 인용되지 않은 요소 또는 방법 단계들을 배제하지 않는다.

[0093] 본원에서 사용 된 "단백질"또는 "폴리 웨პ타이드"는 모든 유형의 변형(예를 들어, 아세틸화, 인산화, 글리코실화, 설페이트화, 수모화, 프레닐화, 유비퀴틴화 등)을 포함하거나 포함하지 않을 수 있는, 모든 아미노산의 웨პ타이드-결합된 사슬을 의미한다.

[0094] 본원에서 사용 된 바와 같이, "이거나 유래한" 또는 "유래한"이라는 표현은 단백질 도메인의 활성을 파괴하지 않는, 보존적 아미노산 치환, 결실, 변형 및 변이체 또는 기능 유도체와 같은 주어진 단백질 도메인(CPD 또는 ELD)의 기능적 변이체를 포함한다. 예시적으로 주어진 이하의 구체적인 실시예들의 비제한적인 설명의 해석에 따라 더욱 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0095] 도 1은 형광 염료 칼세인("100uM calcein")으로 채우고, 그 뒤 칼세인의 엔도좀 탈출을 촉진하는 셔틀제("100uM calcein+ CM18-TAT 5uM") 처리(또는 미처리)한 HEK293A 세포의 칼세인 엔도좀 탈출 분석의 전형적인 결과를 나타낸다. 패널 A는 형광 현미경 실험 결과를 나타내며, 패널 B는 유동 세포 계측 실험 결과를 나타낸다.

도 2는 칼세인("100uM calcein")으로 채우고, 그 뒤 셔틀제 CM18-TAT-Cys("CM18-TAT"로 표시)의 농도를 증가시켜 처리한 HeLa 세포의 칼세인 엔도좀 탈출 유동 세포 계측 결과를 나타낸다.

도 3 및 도 4는 칼세인("100uM calcein")으로 채우고, 그 뒤 5uM 또는 8uM의 셔틀제 CM18-TAT-Cys 또는 CM18-Penetratin-Cys("CM18-TAT" 및 "CM18-Penetratin"으로 각각 표시)로 처리한 HeLa 세포(도 3) 또는 1차 근아세포(도 4)의 칼세인 엔도좀 탈출 유동 세포 계측 결과를 나타낸다.

도 5는 0, 3 또는 5uM의 CM18-TAT-Cys("CM18-TAT"로 표시)와 함께 배양하고, 그 뒤 HeLa 세포에 노출 시킨 GFP 카고 단백질의 형광 현미경으로 시각화된 GFP 형질 도입 실험 결과를 나타낸다. 세포는 명시야(상부 패널) 및 형광 현미경(하부 패널)에 의해 관찰되었다.

도 6은 서로 다른 농도의 CM18-TAT-Cys("CM18-TAT"로 표시)와 함께 배양하고, 그 뒤 HeLa 세포에 노출 시킨 GFP 카고 단백질의 GFP 형질 도입 효율 실험 결과를 나타낸다. 세포는 유동 세포 계측법으로 측정하였고, 형광(GFP-양성) 세포의 백분율은 패널 A에 나타내었으며, 대응하는 세포 독성 데이터는 패널 B에 나타내었다.

도 7은 5uM의 CM18-TAT-Cys(패널 A, "CM18TAT"로 표시), 또는 2.5uM의 dCM18-TAT-Cys(패널 B, "dCM18TAT"로 표시)와 함께 배양하고, 그 뒤 HeLa 세포에 노출 시킨 서로 다른 농도의 GFP 카고 단백질(10, 5 또는 1uM)의 GFP 형질 도입 효율 실험 결과를 나타낸다. 세포는 유동 세포 계측법으로 측정하였고, 형광(GFP-양성) 세포의 백분율을 나타내었다.

도 8 및 도 9는 서로 다른 농도의 CM18-TAT-Cys("CM18TAT"로 표시), CM18-Penetratin-Cys("CM18penetratin"로 표시), 및 dCM18-TAT-Cys("dCM18TAT"로 표시), dCM18-Penetratin-Cys(labeled "dCM18penetratin") 각각의 이량체 및 이들의 조합과 함께 배양하고, 그 뒤 HeLa 세포에 노출시킨 GFP 카고 단백질(10uM)의 GFP 형질 도입 효율 실험 결과를 나타낸다. 세포는 유동 세포 계측법으로 측정하였고, 형광(GFP-양성) 세포의 백분율을 나타내었다.

도 10은 3uM의 CM18-TAT-Cys("CM18-TAT"로 표시)와 함께 배양하고, 그 뒤 HeLa 세포에 노출시킨 TAT-GFP 카고 단백질(10uM)의 TAT-GFP 형질 도입 실험의 전형적인 결과를 나타낸다. 세포와 GFP 형광은 명시야 및 형광 현미경에 의해 10배율 및 40배율로 시각화되었다. 화살표는 CM18-TAT-Cys가 없는 경우 TAT-GFP의 엔도솜 전달, 그리고 CM18-TAT-Cys가 있는 상태에서의 핵 전달을 가리킨다.

도 11은 서로 다른 농도의 CM18-TAT-Cys("CM18-TAT"로 표시)와 함께 배양하고, 그 뒤 HeLa 세포에 노출 시킨 TAT-GFP 카고 단백질(5uM)의 TAT-GFP 형질 도입 효율 실험 결과를 나타낸다. 세포는 유동 세포 계측법으로 측정하였고, 형광(GFP-양성) 세포의 백분율은 패널 A에 나타내었으며, 대응하는 세포 독성 데이터는 패널 B에 나타내었다.

도 12는 5uM의 CM18-TAT-Cys("CM18-TAT"로 표시)와 함께 배양하고, 그 뒤 HeLa 세포에 5분간 노출시킨 GFP-NLS 카고 단백질(5uM)의 GFP-NLS 형질 도입 실험의 전형적인 결과를 나타낸다. 세포와 GFP 형광은 명시야 및 형광

현미경에 의해 10배율, 20배율 및 40배율로 시작화되었다. 화살표는 GFP-NLS의 핵 전달을 가리킨다.

도 13은 서로 다른 농도의 CM18-TAT-Cys("CM18-TAT"로 표시)와 함께 배양하고, 그 뒤 HeLa 세포에 노출 시킨 GFP-NLS 카고 단백질(5uM)의 GFP-NLS 형질 도입 효율 실험 결과를 나타낸다. 세포는 유동 세포 계측법으로 측정하였고, 형광(GFP-양성) 세포의 백분율은 패널 A에 나타내었으며, 대응하는 세포 독성 데이터는 패널 B에 나타내었다.

도 14 및 도 15는 서로 다른 농도의 CM18-TAT("CM18TAT"로 표시), CM18-Penetratin("CM18penetratin"로 표시), 및 dCM18-TAT-Cys("dCM18TAT"로 표시), dCM18-Penetratin-Cys(labeled "dCM18penetratin") 각각의 이량체 및 이들의 조합과 함께 배양하고, 그 뒤 HeLa 세포에 노출시킨 GFP-NLS 카고 단백질(5uM)의 GFP-NLS 형질 도입 효율 실험 결과를 나타낸다. 세포는 유동 세포 계측법으로 측정하였고, 형광(GFP-양성) 세포의 백분율을 나타내었다.

도 16은 보통 DMEM 배지("DMEM") 또는 10% FBS ("FBS")를 포함하는 DMEM 배지에서 CM18-TAT-Cys(3.5uM, "CM18TAT"로 표시) 단독 또는 dCM18-Penetratin-Cys(1uM, "dCM18pen"로 표시)와 함께 5분 또는 1시간 동안 함께 배양한 후, 유동 세포 계측한 GFP-NLS 카고 단백질(5uM)의 GFP-NLS 형질 도입 효율 실험 결과를 나타낸다. 형광(GFP-양성) 세포의 백분율을 나타내었다. 셔틀제 또는 GFP-NLS로 처리되지 않은 세포("ctrl"), 및 셔틀제를 제외한 GFP-NLS로 처리된 세포("GFP-NLS 5uM")는 대조구로 사용되었다.

도 17은 1uM의 CM18-TAT-Cys("CM18-TAT"로 표시)와 함께 배양하고, 그 뒤 THP-1 세포에 노출시킨 GFP-NLS 카고 단백질(5uM)의 GFP-NLS 형질 도입 효율 실험의 결과를 나타낸다. 세포는 유동 세포 계측법으로 측정하였고, 형광(GFP-양성) 세포의 백분율은 패널 A에 나타내었으며, 대응하는 세포 독성 데이터는 패널 B에 나타내었다.

도 18은 5uM의 CM18-TAT-Cys("CM18-TAT"로 표시)와 함께 배양하고, 그 뒤 HeLa 세포에 노출시킨 카고 단백질, FITC-표지 항-튜불린 항체(0.5uM)의 GFP-NLS 형질 도입 효율 실험의 결과를 나타낸다. 기능성 항체 전달은 명시야(20배율) 및 형광 현미경(20배율 및 40배율)에 의해 시작화되었으며, 세포질 내의 형광 튜불린 섬유가 가시화되었다.

도 19는 3.5uM의 CM18-TAT-Cys("CM18TAT"로 표시), CM18-Penetratin-Cys("CM18pen"로 표시) 또는 dCM18-Penetratin-Cys("dCM18pen"로 표시), 또는 3.5uM의 CM18-TAT-Cys 및 0.5uM의 dCM18-Penetratin-Cys의 조합과 함께 배양하고, 그 뒤 HeLa 세포에 노출시킨 항체 카고 단백질(0.5uM)의 FITC-표지 항-튜불린 항체 형질 도입 효율 실험 결과를 나타낸다. 세포는 유동 세포 계측법으로 측정하였고, 형광(FITC-양성) 세포의 백분율은 패널 A에 나타내었으며, 대응하는 세포 독성 데이터는 패널 B에 나타내었다.

도 20은 0, 0.05, 0.5, 또는 5uM의 CM18-TAT-Cys("CM18-TAT"로 표시)와 함께 배양하고, 그 뒤 HEK293A 세포에 노출시킨 Cy5TM 염료로 표지된 플라스미드 DNA(pEGFP)가 도입된 DNA 형질 도입 효율 실험의 결과를 나타낸다. 유동 세포 계측법을 통해 Cy5TM 방출(DNA 세포 내 전달; y- 축에 해당) 및 GFP 방출(DNA의 성공적인 핵 전달에 해당; 각 막대 위에 표시된 백분율)을 정량화할 수 있었다.

도 21은 1, 3, 또는 5 uM의 CM18-TAT-Cys("CM18TAT"로 표시), 또는 His-CM18-TAT("His-CM18TAT"로 표시)와 함께 배양하고, 그 뒤 HeLa 세포에 노출시킨 GFP-NLS 카고 단백질(5uM)의 GFP-NLS 형질 도입 효율 실험 결과를 나타낸다. 세포는 유동 세포 계측법으로 측정하였고, 형광(FITC-양성) 세포의 백분율은 패널 A에 나타내었으며, 대응하는 세포 독성 데이터는 패널 B에 나타내었다.

도 22는 HeLa 세포에서 His-CM18-PTD4 셔틀제를 사용하여 세포 내로 전달된 GFP-NLS 카고 단백질의 GFP-NLS 형질 도입 효율 실험 결과를 나타낸다. GFP-NLS 형질 도입 효율은 유동 세포 계측법으로 측정하였고, GFP 형광센("Pos cells(%)"), 뿐만 아니라 해당 세포 생존도 데이터("viability(%)")의 백분율을 나타내었다. 패널 A는 서로 다른 형질 도입 프로토콜(Protocol A vs. B)을 사용한 경우의 GFP-NLS 형질 도입 효율 비교를 나타낸다. 패널 B는 프로토콜 B의 사용시 서로 다른 농도의 His-CM18-PTD4 셔틀을 사용한 경우의 효과를 나타낸다.

도 23 내지 도 26은 HeLa 세포에서 His-CM18-PTD4 셔틀로 세포 내로 전달된 GFP-NLS (도 23, 도 24A, 도 24B, 도 25 및 도 26) 또는 FITC-표지 항-튜불린 항체(도 24C 및 도 24D) 카고 단백질에서의 형질 도입 실험의 결과를 보여주는 현미경 이미지들이다. 살아 있는 세포의 명시야 및 형광 이미지를 도 23, 도 24 및 도 26에 나타내었다. 도 25에서, 세포를 고정 및 투과성으로 하였고, 항-GFP 항체 및 형광성 2차 항체를 면역 표지하였다. 흰 삼각형 창은 핵(DAPI) 및 GFP-NLS 신호를 사이의 공동-표지 영역의 예를 나타낸다. 도 26은 공초점 현미경으로 캡쳐된 이미지를 나타낸다.

도 27은 HeLa 세포에서 운동학적(시간-코스) 형질 도입 실험의 현미경 이미지를 나타내며, GFP-NLS화물 단백질의 형광 His-CM18-PTD4 셔틀로 세포내 전달 후 45, 75, 100, 및 120초 후에 추적되었다. 45초 후 관찰 된 확산 세포질 형광 패턴(패널 A)은 120초(패널 D)에서 점차 더 농축 된 핵 패턴이 된다.

도 28은 공동-전달 형질 도입 실험의 현미경 이미지를 나타내며, 2개의 카고 단백질들(GFP-NLS 및 mCherryTM-NLS)은 HeLa 세포에서 His-CM18-PTD4 셔틀에 의하여 세포 내로 동시에 전달된다. 세포 및 형광 신호는 (A) 명시야 및 (B) 내지 (D) 형광 현미경으로 시각화하였다. 흰 삼각형 창은 핵(DAPI) 및 GFP-NLS 또는 mCherryTM 사이의 공동-표지 영역의 예를 나타낸다.

도 29는 서로 다른 셔틀제 또는 단일-도메인/대조구 웹타이드를 사용하여 HeLa 세포에서 GFP-NLS 형질 도입 효율 실험 결과를 나타낸다. GFP-NLS 전달 효율은 유동 세포 계측법에 의해 평가되었으며, GFP 형광 세포("Pos 세포(%)"') 뿐만 아니라 대응하는 세포 생존력 데이터("생존도(%)"')의 백분율을 패널 A, B, D 내지 G 및 I에 나타냈다. 패널 A 및 D 내지 F에서, 세포를 카고/셔틀제에 10초 간 노출 시켰다. 패널 I에서, 세포를 카고/셔틀제에 1분 간 노출 시켰다. 패널 B, C, G 및 H에서, 세포를 카고/셔틀제에 1, 2, 또는 5분 간 노출 시켰다. "상대 형광 강도 (FL1-A)" 또는 "신호 강도"는 셔틀제와 GFP-NLS 형광 단백질 전달 후 GFP 형광 신호와 각 세포의 모든 형광 강도의 평균에 해당한다. 패널 D는 단일-도메인 웹타이드(ELD 또는 CDP) 또는 웹타이드 His-PTD4(His-CPD)만이 다중-도메인 셔틀제 대신에 GFP-NLS 형질 도입에 사용 된 대조군 실험의 결과를 나타낸다.

도 30은 셔틀제로 (A) TAT-KALA, (B) His-CM18-PTD4, (C) His-C (LLKK) 3C-PTD4, (D) PTD4-KALA, (E) EB1-PTD4 및 (F) His-CM18-PTD4-His를 사용하여 GFP-NLS로 형질 도입 된 HeLa 세포의 현미경 이미지를 나타낸다. 하단 행 패널들은 GFP 형광을 보이는 세포의 백분율을 나타내는 상응하는 유동 세포 계측법 분석 결과를 나타낸다.

도 31은 상이한 프로토콜들(Protocol A vs C)을 사용하여 THP-1 세포에 His-CM18-PTD4 셔틀을 사용하여 세포내로 전달 된 GFP-NLS화물 단백질의 형질 도입 효율 실험 결과를 나타낸다. GFP-NLS 형질 도입 효율은 유동 세포 계측법에 의해 평가되었으며 GFP 형광 세포("Pos cells(%)"') 및 해당 세포 생존력 데이터("생존도(%)"')의 백분율을 나타내었다. "Ctrl"은 셔틀제가 없는 상태에서 GFP-NLS 카고 단백질에 노출된 THP-1 세포에 해당한다.

도 32는 His-CM18-PTD4 셔틀을 이용하여 GFP-NLS 카고 단백질로 형질 도입된 THP-1 세포의 현미경 이미지를 나타낸다. 4배율, 10배율 및 40배율에서 캡쳐된 이미지를 패널 A 내지 C에 각각 나타내었다. 패널 C의 흰 삼각형 창은 세포(명시야) 및 GFP-NLS 형광 사이의 공동-표지 영역의 예를 나타낸다. 패널 D는 상응하는 유동 세포 계측법 분석 결과를 나타내며, GFP 형광을 나타내는 세포의 백분율을 나타내었다.

도 33은 His-CM18-PTD4 셔틀을 이용하여 GFP-NLS 카고 단백질로 형질 도입된 THP-1 세포의 현미경 이미지를 나타낸다. 흰 삼각형 창은 세포(명시야; 패널 A 및 B) 및 GFP-NLS 형광(패널 C 및 D) 사이의 공동-표지 영역의 예를 나타낸다.

도 34는 TAT-KALA, His-CM18-PTD4, 또는 His-C(LLKK)₃C-PTD4 셔틀을 사용하여 THP-1 세포에 GFP-NLS 형질 도입 효율 실험의 결과를 나타낸다. 카고 단백질/셔틀제를 THP-1 세포에 15, 30, 60 또는 120초 동안 노출시켰다. GFP-NLS 형질 도입 효율은 유동 세포 계측법에 의해 평가되었으며 GFP 형광 세포("Pos cells(%)"') 및 해당 세포 생존력 데이터("생존도(%)"')의 백분율을 패널 A에 나타내었다. 패널 B에서, "상대 형광 강도(FL1-A)"는 셔틀제로 GFP-NLS 형광 단백질 전달 후 GFP 형광 신호를 갖는 각 세포의 모든 형광 강도의 평균에 대응한다.

도 35는 2.5시간 동안 셔틀제 존재 하에 GFP-NLS 카고에 매일 노출시킨 THP-1 세포의 형질 도입 효율 실험의 결과를 나타낸다. His-CM18-PTD4는 패널 A 내지 E에 사용되었고, His-C (LLKK)₃C-PTD4는 패널 F에 사용되었다. GFP-NLS 전달 효율은 1일 또는 3 일에 유동 세포 계측법에 의해 측정되었고, 결과는 패널 A 내지 C 및 F에서의 GFP 형광 세포("Pos cells(%)"') 및 해당 세포 생존력 데이터("생존도(%)"')의 백분율을 나타내었다. 패널 D는 1, 2, 4 및 24 시간 후의 THP-1 세포의 대사 활성 지수를 나타내며, 패널 E는 His-CM18-PTD4 셔틀에 노출 된 세포에 대한 1 내지 4일후의 THP-1 세포의 대사 활성 지수를 나타낸다.

도 36은 유동 세포 계측법으로 측정된, His-CM18-PTD4 셔틀을 사용하여 복수의 서로 다른 유형의 세포들(예를 들어, 부착성 및 혼탁액, 세포주 및 일차 세포)에서 GFP-NLS 형질 도입 효율의 비교를 나타낸다. GFP 형광 세포("Pos cells(%)"') 및 해당 세포 생존력 데이터("생존도(%)"')의 백분율을 나타내었다.

도 37은 His-CM18-PTD4 셔틀을 사용하여 GFP-NLS 카로로 형질 도입된 서로 다른 유형의 세포들(A-H)의 형광 현

미경 이미지를 나타낸다. GFP 형광은 형광 현미경으로 10배 확대하여 시각화되었다. 평행 유동 세포 계측법 실험의 결과는 삽도(GFP-형광 세포의 생존도 및 백분율)에서도 제공되었다.

도 38은 His-CM18-PTD4 셔틀을 사용하여 GFP-NLS로 형질 도입된 1차 사람 근아세포의 형광 현미경 이미지를 나타낸다. 항-GFP 항체 및 형광성 이차 항체와 GFP-NLS 면역-표지하기 전에 세포를 고정시키고 투과성으로 만들었다. 면역-표지된 GFP는 패널 A에 나타내었고, 이는 패널 B에 핵(DAPI) 표지와 중첩되어 있다.

도 39는 세포내 전달 된 CRISPR(CRISPR)/Cas9-NLS 복합체의 활성을 평가하기 위해 사용된 형질 전환 플라스미드 대리 분석의 개략도(A, B 및 C) 및 샘플 형광 이미지(D 및 E)를 나타낸다. (A) 1일째, 두 개의 오픈리딩프레임을 분리하는 정지 코돈(STOP codon)을 사용하여, 형광 단백질인 mCherryTM 및 GFP를 코딩하는 발현 플라스미드로 세포가 감염(transfected)되었다. 발현 플라스미드로 감염된 세포의 결과는 mCherryTM 발현(D)에 나타난다. 정지 코돈에서 플라스미드 DNA를 절단하도록 설계/프로그램 된 CRISPR/Cas9-NLS 복합체는, 정지 코돈에서 플라스미드 DNA의 이중 가닥 절단하도록, mCherryTM을 발현하는 감염 세포에 세포 내로 전달된다(B). 세포의 분획에서, 절단된 플라스미드의 임의의 비-상동 DNA 수리가 발생하고 정지 코돈의 제거(C), 따라서, GFP 발현 및 형광(E)을 초래한다. 흰 삼각형 창은 mCherryTM 및 GFP 형광의 공동-표지 영역의 예를 나타낸다.

도 40은 mCherryTM 및 GFP를 발현하는 HeLa 세포의 형광 현미경 이미지를 나타내며, CRISPR/Cas9-NLS-매개 플라스미드 대리 DNA(plasmid surrogate DNA)의 절단을 나타낸다. 패널 A 내지 D에서는, HeLa 세포는 도 39의 간략한 설명에 기재된 플라스미드 대리, 그리고 Cas9-NLS 단백질 및 crRNA/tracrRNA를 코딩하는 2 개의 다른 발현 플라스미드인 3개의 플라스미드 각각과 공동 감염된 것을 나타낸다. 정지 코돈에서의 플라스미드 대리의 CRISPR/Cas9-매개 절단 및 세포에 의한 후속 DNA 수리는 mCherryTM (패널 A 및 C) 뿐만 아니라 GFP (패널 B 및 D)의 발현을 가능하게 한다. 패널 E 내지 H에서, HeLa 세포를 플라스미드 대리로 감염시킨 후, His-CM18-PTD4 셔틀을 사용하여 활성 CRISPR/Cas9-NLS 복합체로 형질 도입하였다. 정지 코돈에서 플라스미드 대리의 CRISPR/Cas9-NLS-매개 절단 및 세포에 의한 후속 DNA 수리는 mCherryTM (패널 E 및 G) 뿐만 아니라 GFP (패널 F 및 H)의 발현을 가능하게 한다.

도 41A는 세포 유전체 DNA의 CRISPR/Cas9-매개 절단을 측정하기 위해 사용되는 아가로오스 젤 전기 영동에 의해 분리 된 DNA 절단 분석(T7E1 분석)의 산물을 나타낸다. HeLa 세포는 PPIB 유전자를 절단하도록 프로그램 된 CRISPR-Cas9-NLS 복합체로 형질 감염되었다. 흰색 박스 1 및 2로 프레임된 절단 산물의 존재는 His-C(LLKK)₃C-PTD4 셔틀(레인 B)을 사용하여 세포 내로 전달 된 CRISPR-Cas9-NLS 복합체에 의한 PPIB 유전자의 절단을 나타내며, 양성 대조군으로 사용된 지질 형질 감염제(레인 D)가 사용되었다. 이러한 절단 산물은 음성 대조군에는 존재하지 않는다(레인 A 및 레인 C).

도 41B는 세포 유전체 DNA(PPIB DNA 서열)의 CRISPR/Cas9-매개 절단을 측정하기 위해 사용되는 아가로오스 젤 전기 영동에 의해 분리 된 DNA 절단 분석(T7E1 분석)의 산물을 나타낸다. 왼쪽 패널은 HeLa 세포에 복합체와 His-CM18-PTD4 셔틀제를 전달한 후 CRISPR/Cas9 복합체에 의하여 증폭된 PPIB DNA 서열의 절단 산물을 나타낸다. 오른쪽 패널은 음성 대조군으로 T7E1 분해 과정 전에 증폭 된 DNA 서열을 나타낸다.

도 41C는 세포 유전체 DNA(PPIB DNA 서열)의 CRISPR/Cas9-매개 절단을 측정하기 위해 사용되는 아가로오스 젤 전기 영동에 의해 분리 된 DNA 절단 분석(T7E1 분석)의 산물을 나타낸다. 왼쪽 패널은 지질 형질 감염제 (DharmaFectTM 형질 도입 시약 # T-20XX-01) (양성 대조군)의 존재 하에 Cas9/RNAs 복합체와 함께 HeLa 세포를 배양한 후, 증폭 된 PPIB DNA 서열을 나타낸다. 오른쪽 패널은 음성 대조군으로 T7E1 분해 과정 전에 증폭 된 DNA 서열을 나타낸다. 도 42 내지 도 44는 상이한 농도의 셔틀 His-CM18-PTD4 및 상이한 카고/셔틀 노출 시간을 사용하여 전사 인자 HOXB4로 형질 도입 된 THP-1 세포의 전사 활성을 나타낸다. HOXB4의 성공적인 핵내 전달은 실시간 PCR에 의해 표적 유전자의 mRNA 수준을 모니터링함으로써 결정되었고, 그 결과는 이들의 음성 대조군(셔틀제 없는 HOXB4)에 대해 정규화되고 "폴드오버 대조군"으로 표현되었다(왼쪽 바). 총 세포 RNA(ng/uL)를 정량화하고, 세포 생존 능력에 대한 표시를 사용했다(오른쪽 바). "Ø" 또는 "Ctrl"은 "처리 없음"을, "TF"는 "전사 인자 단독"을, 그리고 "FS"는 "셔틀 단독"을 의미한다.

도 45는 His-CM18-PTD4 셔틀을 사용하여 야생형 HOXB4 카고 형질 도입된 HeLa 세포의 형광 현미경 이미지를 나타낸다. 형질 도입된 HOXB4-WT가 핵에 축적되도록 하기 위해, 30분 배양한 후, 세포를 고정시키고 투과성으로 만들고, 일차 항-HUXB4 단일클론 항체 및 형광 이차 항체를 사용하여 HOXB4-WT를 표지하였다(패널 B 및 D). 핵

을 DAPI로 표지하였다(패널 A 및 C). 흰 삼각형 창은 핵과 HOXB4 사이의 공동-표지 영역의 예를 나타낸다-A vs B(20배율) 및 C vs D (40배율)의 비교.

도 46은 서로 다른 셔틀제로 복합체를 세포 내 전달한 후 세포 유전체 DNA(HPTR 서열)의 CRISPR/Cas9-매개 절단을 측정하기 위해 사용되는 아가로오스 겔 전기 영동에 의해 분리된 DNA 절단 분석 산물을 나타낸다. 패널 A는 HeLa 세포에서 His-CM18-PTD4, His-CM18-PTD4-His 및 His-C (LLKK)₃C-PTD4 셔틀제와의 결과를 나타낸다. 패널 B는 Jurkat 세포에서 His-CM18-PTD4-His 및 His-CM18-L2-PTD4를 사용한 결과를 나타낸다. 음성 대조군(패널 A 및 B의 레인 4)은 셔틀제 없이 CRISPR/Cas9 복합체와 세포를 배양한 후 증폭 된 HPTR DNA 서열을 나타낸다. 양성 대조군(패널 A 및 B의 레인 5)은 시판중인 지질 형질 주입제의 존재 하에 Cas9/RNAs 복합체와 세포를 배양한 후 증폭 된 HPTR DNA 서열을 나타낸다.

도 47은 His-CM18-PTD4, TAT-KALA, EB1-PTD4, His-C(LLKK)₃C-PTD4 및 His-CM18-PTD4-His 셔틀제를 사용하여 전사 인자 HOXB4로 형질 도입된 THP-1 세포의 전사 활성을 나타낸다.

HOXB4의 성공적인 핵내 전달은 실시간 PCR에 의해 표적 유전자의 mRNA 수준을 모니터링함으로써 결정되었고, 그 결과는 이들의 음성 대조군(셔틀제 없는 HOXB4)에 대해 정규화되고 "폴드오버 대조군"으로 표현되었다(왼쪽 바). 총 세포 RNA(ng/uL)를 정량화하고, 세포 생존 능력에 대한 표시를 사용했다(오른쪽 바). "Ø" 또는 "Ctrl"은 "처리 없음"을, "TF"는 "전사 인자 단독"을, 그리고 "FS"는 "셔틀 단독"을 의미한다.

도 48은 His-CM18-PTD4에 의한 쥐의 두정 피질에서의 생체내 GFP-NLS 전달을 나타낸다. 간략하게, GFP-NLS(20uM)를 10분 동안 His-CM18-PTD4(20uM) 셔틀제의 존재하에 쥐의 두정 피질에 주입하였다. 등-배(dorsal-ventral) 방향의 쥐 뇌 조각을 수집하고 (A) 4배율, (C) 10배율 및 (D) 20배율로 광학 현미경을 통하여 분석하였다. 주사 부위는 두정 피질(PCx)의 가장 깊은 층에 위치한다. His-CM18-PTD4 셔틀제의 존재 하에, GFP-NLS는 두정 피질, 코퍼스 캘러스(Cc) 및 선조체(Str)의 세포핵에 확산되었다(백색 곡선은 뇌 구조 간의 한계를 나타냄). 패널 B는 Franklin 및 Paxinos의 쥐 뇌 지도에서 주입 부위의 입체 정의 좌표(검은 색 화살표)를 보여준다. His-CM18-PTD4의 존재하에 GFP-NLS의 주입은 뇌의 왼쪽 부분에서 수행되었으며, 음성 대조군(GFP-NLS 단독 투여)은 반대 위치에서 수행되었다. 패널 B의 검은색 원과 연결된 검은 선은 형광 그림(A, C 및 D)에서 관찰 된 영역을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열목록

[0096] 본 출원은 2016년 4월 3일 형성된 약 57kb 크기를 가지는 Sequence_Listing.txt라는 제목의 컴퓨터 판독 가능 형식의 서열 목록이 포함되어 있다. 컴퓨터 판독 가능 형태는 참고로 포함된다.

서열 번호	설명	서열 번호	설명
1	CM18	53	18S rRNA의 미토콘드리아성 신호 서열
2	디프테리아 독소 T 도메인(DT)	54	파우시솜 신호 서열 - PTS1
3	GALA	55	BIRC5의 핵 신호 서열
4	PEA	56	RECQL4의 핵 신호 서열
5	INF-7	57	CM18-TAT
6	LAH4	58	CM18-페너트라틴
7	HGP	59	His-CM18-TAT
8	H5WYG	60	GFP
9	HA2	61	TAT-GFP
10	EB1	62	GFP-NLS
11	VSVG	63	C(LLKK) ₃ C
12	슈도모나스 독소	64	G(LLKK) ₃ G
13	멜리틴	65	PTD4
14	KALA	66	TAT-CM18
15	JST-1	67	TAT-KALA
16	SP	68	His-CM18-PTD4
17	TAT	69	His-CM18-9Arg
18	페너트라틴(안데나페디아)	70	His-CM18-트랜스포타
19	pVEC	71	His-LAH4-PTD4
20	M918	72	His-C(LLKK) ₃ C-PTD4
21	Pep-1	73	mCherry TM -NLS
22	Pep-2	74	Cas9-NLS
23	Xentry	75	crRNA (설시예 13.3)
24	아르기닌 스트레치	76	tracrRNA (설시예 13.3)
25	트랜스포타	77	Feldan tracrRNA (설시예 13.5, 13.6)
26	SynB1	78	PPIB crRNA (설시예 13.5)
27	SynB3	79	Dharmacon tracrRNA (설시예 13.5)
28	E1a	80	HOXB4-WT
29	SV40 T-Ag	81	His-PTD4
30	c-myc	82	PTD4-KALA
31	Op-T-NLS	83	9Arg-KALA
32	Vp3	84	Pep1-KALA
33	뉴클레오플라스민	85	Xentry-KALA
34	히스톤 2B NLS	86	SynB3-KALA
35	Xenopus N1	87	VSVG-PTD4
36	PARP	88	EB1-PTD4
37	PDX-1	89	JST-PTD4
38	OKI-5	90	CM18-PTD4
39	HCDA	91	6Cys-CM18-PTD4
40	H2B	92	CM18-L1-PTD4
41	v-Rel	93	CM18-L2-PTD4
42	Amida	94	CM18-L3-PTD4
43	RanBP3	95	His-CM18-TAT
44	Pho4p	96	His-CM18-PTD4-6Cys
45	LEF-1	97	3His-CM18-PTD4
46	TCF-1	98	12His-CM18-PTD4
47	BDV-P	99	HA-CM18-PTD4
48	TR2	100	3HA-CM18-PTD4
49	SOX9	101	CM18-His-PTD4
50	Max	102	His-CM18-PTD4-His
51	Tim9로부터의 미토콘드리아 성 신호 서열	103	HPRT crRNA (Example 13.6)

[0098]

52	효모 시토코롬 c 산화효소 서브유닛 IV미토콘드리아성 신호 서열		
----	---	--	--

[0099]

상세한 설명

[0100]

본 설명은 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하도록 연결되고 독립 폴리펩타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로의 형질 도입 효과를 상당히 향상시킬 수 있는 엔도좀 누출 도메인(ELD)을 포함하는 다중-도메인 합성 웹타이트의 놀라운 발견으로부터 비롯된다. 이와 달리, 이러한 형질 도입 효율의 증가는 ELD 만을 또는 CPD만을 단독으로, 또는 함께(즉, 분리된 단일-도메인 웹타이드의 혼합물로) 포함하는 독립 단일-도메인 웹타이드의 사용하여 발견되지 않았다. 따라서, 본 발명의 몇몇 실시예들은 독립 폴리펩타이드 카고를 표적 진핵세포의 세포질로의 형질 도입 효과를 향상시키기 위하여 사용되는, 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하게 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD), 또는 히스티딘-리치 도메인 및 세포 투과 도메인(CPD)에 작동가능하게 연결된 엔도좀 누출 도메인(ELD)을 포함하는 웹타이드계 셔틀제와 관련된다.

[0102]

합성 웹타이드 및 폴리펩타이드계 셔틀제

- [0103] 여기서 사용된, "합성 웨타이드" 또는 "합성 폴리웨타이드"와 같은 표현에 사용된 "합성"이라는 용어는 시험관내(*in vitro*)에서 생산될 수 있는(예를 들어, 화학적으로 합성된 및/또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조된) 비-자연발생적으로 발생된 분자들을 지칭한다. 다양한 합성 제제의 순도는 고성능 액체 크로마토 그래피 분석 및 질량 분광법에 의해 평가될 수 있다. 화학 합성 접근법은 광범위한 재조합 단백질 정제 단계(예를 들어, 임상 용도에 요구됨)에 대한 필요성을 배제할 수 있기 때문에, 세포 발현 시스템(예를 들어, 효모 또는 박테리아 단백질 발현 시스템)보다 유리할 수 있다. 이에 반해, 더욱 긴 합성 폴리웨타이드는 화학 합성 접근법을 통해 생성하기에는 보다 복잡하고 및/또는 비용이 많이 소모될 수 있으며, 이러한 폴리웨타이드는 세포 발현 시스템을 이용하여 더욱 유리하게 생산될 수 있다. 실시예들에 있어서, 본 발명의 웨타이드 또는 셔틀제는 재조합 속주 세포로부터 발현되는 것과는 대조적으로 화학적으로 합성(예를 들어, 고체- 또는 액체 상 웨타이드 합성)될 수 있다. 실시예들에 있어서, 본 발명의 웨타이드 또는 셔틀제는 N-말단 메티오닌 잔기를 가지지 않을 수 있다. 통상의 기술자는 본 발명의 하나 이상의 개질된 아미노산(예를 들어, 비-자연발생적-발생 아미노산)을 사용하거나 또는 합성 웨타이드 또는 셔틀제를 화학적 개질하여, 본 발명의 합성 웨타이드 또는 셔틀제의 안정성 또는 기타 요구 사항의 특정 요구에 맞출수 있다.
- [0104] 본 발명의 셔틀제의 문맥 내에서 여기서 사용되는 "폴리웨타이드계"의 표현은, 종종 증가된 세포 독성과 연관되어 인간 치료에의 사용에 적합하지 않을 수 있는, 지질 또는 양이온 폴리머계 형질 도입제와 같은 비폴리웨타이드 또는 비단백질계 셔틀제와 구별하기 위한 것이다.
- [0105] 여기서 사용된 "향상된 형질 도입 효과"라는 표현은 관심 카고(예를 들어, 폴리웨타이드 카고)가 원형질막을 통하여 세포 내로 전달되는 표적 세포의 개체군 중 백분율 또는 비율을 향상시키는 셔틀제(예를 들어, 본 발명의 폴리웨타이드계 셔틀제)의 능력을 나타낸다. 면역 형광 현미경 분석, 유동 세포 계측법, 및 기타 적절한 방법을 사용하여 카고 형질 도입 효율을 평가할 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀제는 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85 %의 형질 도입 효율을 가능하게 할 수 있으며, 예를 들어, 면역 형광 현미경 분석, 유동 세포 계측법, FACS, 및 기타 적절한 방법을 사용하여 측정 할 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀제는 상술한 형질 도입 효율 중 하나와 함께 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 세포 생존도를 갖는 것을 가능하게 할 수 있으며, 예를 들어, 실시예 3.3a에 개시된 분석법으로 측정하거나 기타 널리 알려진 적절한 방법을 사용하여 측정할 수 있다.
- [0106] 여기서 사용된 "독립적인"이라는 표현은 일반적으로 서로 공유결합되지 않은 분자 또는 제제를 의미한다. 예를 들어, "독립적인 웨타이트 카고"의 표현은 본 발명 셔틀제에 공유 결합되지 않은(예를 들어, 융합되지 않은) 세포 내로 전달되는 폴리웨타이드 카고를 의미한다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 폴리웨타이드 카고와 독립적인(융합되지 않은) 셔틀제를 가지는 것은 향상된 융통성을 가지는 셔틀제를 제공함에 따른 장점, 예를 들어, 상이한 폴리웨타이드 카고들에 대한 새로운 융합 단백질을 새로이 제작할 필요가 없고, 및/또는 (융합 단백질의 경우 1:1의 비율로 제한되는 것과 달리) 카고에 대한 셔틀제의 비율을 쉽게 변화시킬 수 있다.
- [0107] 본 발명의 셔틀제는 표적 세포 형질 도입 효율의 향상 이외에 표적 세포의 세포질에 관심 카고(예를 들어, 폴리웨타이드 카고)의 전달을 촉진할 수 있다. 이와 관련하여, 카고는 세포내 가용성을 제한할 수 있는 원형질 막을 가로지른 후 세포내 엔도좀에 종종 포획되므로, 세포 투과 웨타이드에 기초한 접근을 이용하여 표적 세포의 세포질로 세포 외부로부터 카고를 효율적으로 전달하는 것은 어려울 수 있으며, 궁극적으로 대사 작용이 저하되는 결과를 가져올 수 있다. 예를 들어, HIV-1 Tat 단백질의 단백질 형질 도입 도메인을 사용하는 것은 세포 내부 소포로 카고의 대량 격리를 초래하는 것으로 보고되었다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀제는 엔도좀-포획된 카고를 엔도좀으로부터 탈출시키고 세포질 구획으로 접근할 수 있는 능력을 촉진시킬 수 있다. 이와 관련하여, "독립 폴리웨타이드 카고의 세포질로의 형질 도입 효율을 향상시키는"이라는 문구에서 "세포질로"라는 표현은 엔도좀 포착을 탈출하고 세포질 구획으로 접근하고자 하는 세포내 전달된 카고를 허용하는 본 발명의 셔틀제의 능력을 의미한다. 관심 카고를 세포질에 접근시킨 후에, 다양한 세포 내 구획(예를 들어, 핵, 인, 미토콘드리아, 퍼옥시좀)을 목표로 할 수 있다. 본 발명의 실시예에 있어서, "세포질로"라는 표현은, 따라서, 세포질 전달 뿐만 아니라, 세포질 구획에의 접근을 위해 우선적으로 요구하는 다른 세포 내 구획으로 전달하는 것을 포함한다.
- [0108] 본 발명의 셔틀제와 관련하여 여기서 사용되는 "도메인" 또는 "단백질 도메인"은 일반적으로 특정 작용기 또는 기능을 가지는 단백질의 일부를 의미한다. 몇몇 도메인들은 단백질의 잔부와 분리되었을 때 그 기능을 보존하므로, 모듈 방식으로 사용할 수 있다. 바이러스성, 박테리아성 또는 진핵성 기원의 상이한 단백질로부터의 이러한 도메인을 조합함으로써, 본 발명에 따르면 세포 내에서 카고를 전달할 수 있는 다중-도메인 폴리웨타이드

제 셔틀체를 디자인할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 카고가 엔도솜을 탈출하고 세포질 구획에 도달하는 것이 가능해질 수 있다.

[0109]

많은 단백질 도메인의 모듈 특성은 본 발명의 셔틀체 내에서의 그들의 배치 측면에서 유연성을 제공할 수 있다. 그러나, 몇몇 도메인들은 셔틀체의 특정 위치(예를 들어, N- 또는 C- 말단 영역 또는 그들 사이)에서 조작될 때 좋은 능력을 가질 수 있다. 내인성 단백질 내의 도메인의 위치는 종종 셔틀체 내에서 도메인이 조작되어야 하는 위치 및 사용되어야 하는 링커의 유형/길이의 지표이다. 표준 재조합 DNA 기술은 통상의 기술자가 본 개시의 관점에서 본 발명의 셔틀체 내에서 도메인의 배치 및/또는 개수를 조작하는데 사용될 수 있다. 본 발명에 개시된 분석 및 당업계에서 공지된 다른 분석은 상기 셔틀체의 문맥 내에서 각 도메인들의 기능성(예를 들어, 원형질막을 가로지르는 세포 투과를 촉진하는 능력, 엔도솜 탈출, 및/또는 세포질에의 접근)을 평가하는데 사용될 수 있다. 셔틀체의 도메인이 세포 내로 전달될 카고의 활동성에 영향을 미치는지 평가하기 위해 표준 방법이 사용될 수도 있다. 이와 관련하여, 여기서 사용된 "작동가능하게 연결된"이라는 표현은 본 발명의 상기 셔틀체의 문맥 내에서 의도된 기능(예를 들어, 세포 침투, 엔도솜 탈출, 및/또는 세포내 표적화)을 수행하기 위한 도메인의 능력을 의미한다. 보다 명확하게는, "작동가능하게 연결된"이라는 표현은 두개 이상의 도메인들 사이의 특정 순서 또는 그들 사이의 거리에 제한없이 기능적 연결된 것을 정의하는 것을 의미한다.

[0110]

본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀체는 최소 길이가 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30인 아미노산 잔기들 및 최대 길이가 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 또는 150의 길이 아미노산 잔기들을 포함할 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 보다 짧은 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀체는 화학적 합성 접근법에 의해보다 쉽게 합성되고 정제될 수 있어서 특히 유리한데, 이는 임상 용도에 있어서 보다 적합할 수 있다(재조합 단백질 발현 시스템으로 정제되어야 하는 재조합 단백질과는 대조적으로). 본 발명에서 숫자 및 범위는 종종 5의 배수로 열거되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 본 발명에서 설명된 최대 길이는 본 명세서에서 36, 37, 38...51, 62 등의 길이를 포함하는 것으로 이해되어야 하며, 이들을 리스팅하지 않은 것은 단순히 간결성을 위한 것이다. 동일한 추론이 여기에 나열된 동일성의 %(예를 들어, 86%, 87%...93%...), 히스티딘 잔기의 백분율 등에 적용된다.

[0111]

본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀체는 생리학적 pH의 예상 순전하가 적어도 +5, +6, +7, 적어도 +8, 적어도 +9, 적어도 +10, 적어도 +11, 적어도 +12, 적어도 +13, 적어도 +14, 또는 적어도 +15를 포함할 수 있다. 이러한 양전하는 일반적으로 음전하를 띠는 아스파테이트(aspartate) 및/또는 글루타메이트(glutamate) 잔기와는 대조적으로 양전하를 띠는 리신(lysine) 및/또는 아르기닌 잔기의 존재가 증가함에 따라 부여된다.

[0112]

본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀체는, 예를 들어 카고를 생균으로 세포 내에 전달하기 위한 세포 배양 배지에서 이들의 사용을 촉진하는 수용액(예를 들어, 생리학적 pH)에 용해 가능할 수 있다.

[0113]

본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀체는 서열번호 57 내지 59, 66 내지 72 또는 82 내지 102중 어느 하나의 아미노산 또는 서열번호 57 내지 59, 66 내지 72 또는 82 내지 102 중 어느 하나와 적어도 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 또는 95%의 동일성을 가지는 기능적 변이체를 포함하거나 구성될 수 있다.

[0114]

본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀체는 여기서 정의된 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀체의 올리고머(예를 들어, 이량체, 삼량체 등)을 포함할 수 있다. 이와 같은 올리고머는 동일 또는 상이한 타입의 셔틀체 모노머들(예를 들어, 모노머 서열에 도입된 시스테인 잔기와 연결된 디설파이드(disulfide) 브릿지를 사용)을 공유 결합으로써 구성될 수 있다.

[0115]

본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀체는 N-말단 및/또는 C-말단 시스테인 잔기를 포함할 수 있다.

[0116]

엔도솜 누출 도메인(ELDs)

[0117]

본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀체는 엔도솜 탈출 및 세포질 구획으로의 접근을 촉진하기 위한 엔도솜 누출 도메인(ELD)을 포함할 수 있다. 여기서 사용된 "엔도솜 누출 도메인"이라는 표현은 엔도솜-포획된 거대 분자의 세포질 구획에 접근을 촉진하기 위한 능력을 부여하는 아미노산

서열을 의미한다. 이론과 관계없이, 엔도좀 누출 도메인은 엔도좀 막의 불안정화 및 엔도좀 내용물을 세포질로 분리를 유도하는 것으로 생각되는 짧은 서열(종종 바이러스성 또는 박테리아성 웹타이드로부터 유래됨)이다. 여기서 사용된 "엔도조몰리틱 웹타이드"라는 표현은 엔도좀 막-불안정화 특성을 가지는 일반적인 웹타이드류를 지칭한다. 따라서, 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 합성 웹타이드 또는 폴리웹타이드계 셔틀체는 엔도조몰리틱 웹타이드인 ELD를 포함할 수 있다. 이러한 웹타이드의 활성을 예를 들어 실시예 2에 설명된 칼세인 엔도좀 탈출 검정을 사용하여 평가할 수 있다.

[0118] 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 ELD는 pH-의존성 막 활성 웹타이드(PMAP) 또는 pH-의존성 용해 웹타이드와 같이, 산성 pH에서 막을 파괴시키는 웹타이드일 수 있다. 예를 들어, 상기 웹타이드 GALA 및 INF-7은 pH가 하락이 이들이 함유하는 아미노산의 전하를 변형시킬 때 알파 헬릭스를 형성하는 양친매성 웹타이드이다. 보다 구체적으로, 이론과 관계없이, GALA와 같은 ELD는 pH의 감소로 인한 구조 변화에 따라 막 지질의 기공 및 플립-플롭(flip-flop)을 형성함에 따라 엔도좀 누출을 유도하는 것으로 제안된다(Kakudo, Chaki et al., 2004, Li, Nicol et al., 2004). 대조적으로, INF-7과 같은 ELD는 엔도좀 막에 축적되고 불안정화됨에 따라 엔도좀 누출을 유도하는 것으로 제안되었다(El-Sayed, Futaki et al., 2009). 따라서, 엔도좀 성숙 과정에서 수반되는 pH의 감소는 웹타이드의 형태 변화를 유발하고, 이는 엔도좀 막을 불안정하게 하여 엔도좀 내용물이 분리되도록 한다. 동일한 원리가 슈도모나스의 독소 A에도 적용된다(Varkouhi, Scholte et al., 2011)고 생각된다. pH의 감소에 따라, 독소의 전좌의 도메인 구조가 바뀌어 기공을 형성하는 엔도좀 막으로의 삽입을 허용한다(London 1992, O'Keefe 1992). 이것은 결국에는 엔도좀의 외부 복합체의 엔도좀 불안정화 및 전좌를 선호한다. 상술한 ELD는 본 발명의 ELD 뿐만 아니라, 그 활동 메커니즘이 덜 잘 정의된 엔도좀 누출의 다른 메커니즘을 아우른다.

[0119] 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 ELD는 항균 웹타이드(AMP)와 같은 선형 양이온성 알파헬릭스 항균 웹타이드(AMP)일 수 있다. 이러한 웹타이드들은 박테리아 막들과 강력하게 상호 작용할 수 있기 때문에 타고난 면역 반응에서 중요한 역할을 한다. 이론과 관계없이, 이를 웹타이드는 수용액에서 무질서 상태를 취하는 것으로 생각되지만, 소수성 환경에서 알파헬릭스 2차 구조를 채택한다. 후자의 구조는 그들의 전형적인 농도-의존성 막-파괴 특성에 기여하는 것으로 생각된다. 특정 농도에서 엔도좀이 축적되면, 일부 항균성 웹타이드가 엔도좀 누출을 유발할 수 있다.

[0120] 본 발명의 실시예들에 있어서, ELD는 세크로핀-A/멜리틴 하이브리드(CM series) 웹타이드와 같은 항균 웹타이드(AMP)일 수 있다. 이러한 웹타이드는 막 파괴 능력을 지닌 가장 작고 가장 효과적인 AMP-유래 웹타이드로 생각된다. 세크로핀은 그램 양성균과 그램 음성균 모두에 대한 막 교란 능력을 가진 항균 웹타이드 군이다. 세크로핀 A(CA)는 최초로 밝혀진 항균성 웹타이드로 선형 구조의 37개 아미노산으로 이루어져 있다. 멜리틴(M)은 26개의 아미노산으로 이루어진 웹타이드로, 별도에서 발견되는 세포막 용해 인자이다. 세크로핀-멜리틴 하이브리드 웹타이드는 임의의 항균제에서 바람직한 특성인 진핵 세포에 대해 세포 독성이 없는(즉, 비-용혈) 짧은 효율적인 항생제 웹타이드를 생성하는 것으로 나타났다. 이러한 키메릭(chimeric) 웹타이드는 세크로핀 A의 친수성 N-말단 도메인과 멜리틴의 소수성 N-말단 도메인의 다양한 조합으로 구성되었으며, 세균 모델 시스템에서 테스트되었다. 2 개의 26-mer, CA(1-13)M(1-13) 및 CA(1-8)M(1-18) (Boman et al., 1989)은, 메리틴의 세포 독성 효과가 없는 자연 세크로핀 A의 더 넓은 스펙트럼과 향상된 효력을 보여주었다.

[0121] 더 짧은 CM 시리즈 웹타이드를 제조하기 위하여, Andreu et al., 1992의 저자들은 26-mer (CA(1-8)M(1-18))와 같은 하이브리드 웹타이드를 만들었고, 이를 20-mer (CA(1-8)M(1-12)), 18-mer (CA(1-8)M(1-10)) and 6개의 15-mers ((CA(1-7)M(1-8), CA(1-7)M(2-9), CA(1-7)M(3-10), CA(1-7)M(4-11), CA(1-7)M(5-12), 및 CA(1-7)M(6-13))와 비교하였다. 상기 20 및 18-mers는 CA(1-8)M(1-18)와 비교적으로 유사한 활성을 유지한다. 6개의 15-mer 중, CA(1-7)M(1-8)은 낮은 항균 활성을 보였으나, 다른 5개은 용혈 효과가 없는 26-mer와 비교하여 유사한 항생제 효능을 나타내었다. 따라서, 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 합성 웹타이드 또는 폴리웹타이드계 셔틀체는 상술한 바와 같이 CM 시리즈 웹타이드 변이체이거나 이로부터 유래한 ELD를 포함할 수 있다.

[0122] 본 발명의 실시예들에 있어서, ELD는 멜리틴(YGRKKRRQRRR), [C(1-7)M(2-12)]의 잔기 2-12에 융합된 세크로핀-A(KWKLFFKIGAVLKVLTTG)의 잔기 1-7로 구성되는 CM 시리즈 웹타이드 CM18일 수 있다. 세포 침투 웹타이드 TAT에 융합되었을 때, CM18은 원형질막을 독립적으로 가로지르며 엔도좀 막을 불안정하게 만들고, 몇몇 엔도좀-포획 카고를 세포질로 방출되도록 한 것으로 나타났다(Salomone et al., 2012). 그러나 저자의 실험들에서 형광단(atto-633)에 융합된 CM18-TAT11 웹타이드의 사용시, 웹타이드와 형광단의 기여도에 대한 불확실성이 제기되며, 형광의 사용은 엔도좀 파괴에 기여하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 엔도좀 막의 광화학적 파괴를 통하여 (Erazo-Oliveras et al., 2014).

[0123] 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 ELD는 서열번호 1의 아미노산, 또는 서열번호 1과 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 또는 95%의 동일성을 가지는 이들의 변이체를 포함하며, 엔도조몰리틱 활성을 가지는 CM18일 수 있다.

[0124] 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 ELD는 엔도좀에 축적되면 엔도좀 막 불안정화를 유발할 수 있는 인플루엔자 혈구응집소(HA)의 HA2 서브유닛의 N 말단으로부터 유래한 웹타이드일 수 있다.

[0125] 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 합성 웹타이드 또는 폴리웹타이드계 셔틀체는 표 A에 기재된 ELD 또는 이로부터 유래한 것, 또는 엔도좀 탈출 활성 및/또는 pH-의존성 막 파괴 활성을 가지는 그의 변이체를 포함할 수 있다.

[표 A]

엔도좀 누출 도메인의 예

이름	아미노산 서열	서열번호	참조문헌
CM18	KWKLFKKIGAVLKVLTTG	1	(Salomone, Cardarelli et al., 2012)
디프테리아 독 소 T 도메인(DT)	VGSSLSCINLDWDVIRDKTKIESLKEHGPINKNM SESPNKTVSEEKAQYLEEFHQTALEHPELSELKTV TGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTA ALSILPGIGSVMGILADGAVIHNTTEIVAGSIALSSL MVAQAIPLVGEVDIGFAAYNFVESIINLFQVWHNS YNRPAYSPG	2	(Uherek, Fominaya et al., 1998, Glover, Ng et al., 2009)
GALA	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAA	3	(Parente, Nir et al., 1990)(Li, Nicol et al., 2004)
PEA	VLAGNPARKHLDIKPTVISHRLHFPEGGSALALTQ QACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALY LAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPE QARLALT	4	(Fominaya and Wels 1996)
INF-7	GLFEATIEGFIEENGWEGMIDGHWYGC	5	(El-Sayed, Futaki et al., 2009)
LAH4	KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA	6	(Kichler, Mason et al., 2006) Kichler et al., 2003
HGP	LLGRRGWEVLKYWWNLLQYWSQEL	7	(Zhang, Cui et al., 2006)
H5WYG	GLPHAIAHFIHGGWHGLIHGWYG	8	(Midoux, Kichler et al., 1998)
HA2	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGHWYG	9	(Lorieau, Louis et al., 2010)
EB1	LIRLWSHLIHIWFQNRRLWKKK	10	(Amand, Norden et al., 2012)
VSVG	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCP	11	(Schuster, Wu et al., 1999)
슈도모나스 독 소	EGGSLAALTQHACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTAAESERFVRQGTGNDE AGAANAD	12	(Fominaya, Uherek et al., 1998)
멜리틴	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	13	(Tan, Chen et al., 2012)
KALA	WEAKLAKALAKLAKHLAKALAKALKACEA	14	(Wyman, Nicol et al., 1997)
JST-1	GLFEALLELLESWELLLEA	15	(Gottschalk, Sparrow et al., 1996)
C(LLKK) ₃ C	CLLKKLLKKLLKKC	63	(Luan et al., 2014)
G(LLKK) ₃ G	GLLKKLLKKLLKKG	64	(Luan et al., 2014)

[0126]

[0127] 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀체는 하나 이상의 ELD 또는 ELD의 유형을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 셔틀체는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 그 이상의 ELD를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 셔틀체는 1 내지 10개의 ELD, 1 내지 9개의 ELD, 1 내지 8개의 ELD, 1 내지 7개의 ELD, 1 내지 6개의 ELD, 1 내지 5개의 ELD, 1 내지 4개의 ELD, 1 내지 3개의 ELD 등을 포함할 수 있다.

[0128]

본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀체 내에서 다른 도메인(CPD, 히스티딘-리치 도메인)에 대한 ELD의 순서 또는 배치는 셔틀체의 셔틀링 능력이 유지되는 한 변경될 수 있다.

[0129]

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 ELD는 엔도조몰리틱 활성을 가지며, 표 A에 기재된 것들 중 어느 하나의 변이체 또는 단편일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 ELD는 엔도조몰리틱 활성을 가지며, 서열번호 1

내지 15, 63 또는 64 중 어느 하나의 아미노산 서열, 또는 서열번호 1 내지 15, 63 또는 64와 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 또는 95%의 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 구성될 수 있다.

[0130] 세포 투과 도메인(CPDs)

본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀체는 세포 투과 도메인(CPD)를 포함할 수 있다. 여기서 사용된 "세포 투과 도메인"이라는 표현은 세포 내로 형질 도입될 CPD를 포함하는 거대 분자(예를 들어, 웹타이드 또는 단백질)의 능력을 부여하는 아미노산의 서열을 지칭한다.

본 발명의 실시예들에 있어서, CPD는 세포 투과 웹타이드 또는 세포 투과 웹타이드의 단백질 형질 도입 도메인 일 수(또는 이로부터 유래한 것) 있다. 세포 침투 웹타이드는 세포 내에서 다양한 카고(예를 들어, 폴리뉴클레 오타이드, 폴리웹타이드, 소분자 화합물 또는 막-불투과성인 기타 거대 분자/화합물)을 성공적으로 전달하는 담체로서의 역할을 할 수 있다. 세포 침투 웹타이드는 종종 거대 분자에 융합(또는 이와 달리 작동가능하게 연결된)된 기본 아미노산이 풍부한 짧은 웹타이드를 포함하여 세포 내에서의 내재화를 막개한다(Shaw, Catchpole et al., 2008). 첫 번째 세포 침투 웹타이드는 HIV-1 전사의 트랜스-활성(Tat) 단백질의 세포 침투능을 분석함으로써 확인되었다(Green and Loewenstein 1988, Vives, Brodin et al., 1997). 이 단백질은 "TAT"라고 명명된 짧은 친수성 아미노산 서열을 포함하고 있으며, 이는 원형질막 내에서의 삽입 및 공극의 형성을 촉진한다. 이 발견 이후, 많은 다른 세포 침투 웹타이드가 기술되었다. 이와 관련하여, 본 발명의 실시예들에 있어서, CPD는 표 B에 기재된 세포 침투 웹타이드 또는 세포 침투 활성을 갖는 그의 변이체일 수 있다.

[표 B]

세포 투과 웹타이드의 예

이름	아미노산 서열	서열번호	참조문헌
SP	AAVALLPAVLLALP	16	(Mahlum, Mandal et al., 2007)
TAT	YGRKKRRQRRR	17	(Green and Loewenstein 1988, Fawell, Seery et al., 1994, Vives, Brodin et al., 1997)
페너트라틴(안데 나페디아)	RQIKIWFQNRRMKWKK	18	(Perez, Joliot et al., 1992)
pVEC	LLIILRRRIRKQAHHSK	19	(Elmquist, Lindgren et al., 2001)
M918	MVTVLFRRRLIRRACGPPRVRV	20	(El-Andaloussi, Johansson et al., 2007)
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	21	(Morris, Depoiller et al., 2001)
Pep-2	KETWFETWFTEWSQPKKKRKV	22	(Morris, Chaloin et al., 2004)
Xentry	LCLRPVG	23	(Montrose, Yang et al., 2013)
아르기닌 스트레치	RRRRRRRRR	24	(Zhou, Wu et al., 2009)
트랜스포坦	WTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	25	(Hallbrink, Floren et al., 2001)
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	26	(Drin, Cottin et al., 2003)
SynB3	RRRLSYSRRRF	27	(Drin, Cottin et al., 2003)
PTD4	YARAARQARA	65	(Ho et al., 2001)

[0133]

이론과 관계없이, 세포 침투 웹타이드는 피노시토시스(pinocytosis) 또는 엔도시토시스(endocytosis)에 의해 교차되기 이전에 세포 원형질막과 상호 작용하는 것으로 생각된다. TAT 웹타이드의 경우, 친수성과 전하가 원형질막 내에서의 삽입과 기공의 형성을 촉진한다고 생각된다(Herce and Garcia 2007). 소수성 웹타이드(SP와 같은) 내의 알파헬리스 모티프는 또한 원형질막 내에서 기공을 형성한다고 생각된다(Veach, Liu et al., 2004).

[0135]

본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀체는 하나 이상의 CPD 또는 CPD의 유형을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 이들은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개 또는 그 이상의 CPD를 포함할 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 셔틀체는 1 내지 10개의 CPD, 1 내지 6개의 CPD, 1 내지 5개의 CPD, 1 내지 4개의 CPD, 1 내지 3개의 CPD, 등을 포함할 수 있다.

[0136]

본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 CPD는 세포 침투 활성을 가지며, 서열번호 17의 아미노산 서열, 또는 서열 번호 17과 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 또는 95%의 동일성을 가지는 이들의 변이체, 또는 세포 침투 활성을

가지며, 서열번호 28의 아미노산 서열, 또는 서열번호 18과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 또는 95%의 동일성을 가지는 이들의 변이체를 포함하는 TAT일 수 있다.

[0137] 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 CPD는 서열번호 65의 아미노산 서열, 또는 서열번호 65와 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 또는 95%의 동일성을 가지는 이들의 변이체를 포함하는 PTD일 수 있다.

[0138] 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀제 내의 다른 도메인(ELD, 히스티딘-리치 도메인)의 순서 또는 배치는 셔틀제의 순서 또는 배치는 셔틀링 능력이 유지되는 한 변경될 수 있다.

[0139] 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 CPD는 세포 침투 활성을 가지며, 표 B에 기재된 것들 중 어느 하나의 변이체 또는 단편일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 CPD는 세포 침투 활성을 가지며, 서열번호 16 내지 27 또는 65 중 어느 하나의 아미노산 서열, 또는 서열번호 16 내지 27 또는 65와 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 또는 95%의 동일성을 가지는 서열을 포함하거나 구성될 수 있다.

히스티딘-리치 도메인

[0141] 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀제는 히스티딘-리치 도메인을 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀제는 히스티딘-리치 도메인 및 CPD(예를 들어, ELD가없는)를 필수적으로 포함하거나 구성된 추가의 독립적 합성 웹타이드와 조합/사용될 수 있다. 후자의 접근법은 히스티딘-리치 도메인의 농도를 셔틀제에 함유된 상기 ELD 및 CPD의 농도와 독립적으로 변형 또는 조절할 수 있게하는 추가적인 장점을 제공할 수 있다. 이론과 관계없이, 히스티딘-리치 도메인은 엔도좀에서 양성자 스폰지로서 작용할 수 있으며, 엔도좀 막 불안정화의 또 다른 메커니즘을 제공할 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 히스티딘-리치 도메인은 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 적어도 90%의 히스티딘 잔기를 포함하는 적어도 2 개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개 아미노산의 스트레치일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 히스티딘-리치 도메인은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 또는 적어도 9개의 연속적인 히스티딘 잔기를 포함할 수 있다. 이론과 관계없이, 셔틀제의 히스티딘-리치 도메인은 엔도좀의 산성 조건 하에서 이의 이미다졸 그룹의 양성자화를 통해 엔도좀에서 양성 스폰지로 작용할 수 있어 엔도좀 막 불안정화의 또 다른 메커니즘을 제공하며 따라서 엔도좀 포획 카고의 세포질 접근을 더욱 촉진시킨다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 히스티딘-리치 도메인은 합성 웹타이드 또는 셔틀제의 N 또는 C 말단에 위치할 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 히스티딘-리치 도메인은 CPD 및/또는 ELD의 N 말단 또는 C 말단에 위치할 수 있다.

[0142] 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀제 내의 다른 도메인(CPD, ELD)에 대한 히스티딘-리치 도메인의 순서 또는 배치는 셔틀제의 순서 또는 배치는 셔틀링 능력이 유지되는 한 변경될 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀제는 셔틀 작용제는 하나 이상의 히스티딘-리치 도메인(예를 들어, 아미노 및 카르복실 말단에 히스티딘-리치 도메인)을 포함할 수 있다.

링커

[0144] 본 발명의 실시예들에 있어서, 적절한 링커(예를 들어, 플렉서블 폴리웹타이드 링커)를 사용하여 본 발명의 합성 웹타이드 및 셔틀제의 맥락 내에서 도메인(CPD, ELD 또는 히스티딘-리치 도메인)을 서로 작동가능하게 연결시킬 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 링커는 안정성 및 유연성을 부여하는 회전 포텐셜(글리신과 같이) 및 극성 세린 잔기들이 없이 작은 소수성 아미노산의 서열을 첨가함으로서 형성될 수 있다. 링커는 부드럽고 셔틀제의 도메인을 이동시킬 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 프롤린은 유의미한 구조의 강성을 부여할 수 있어 회피될 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 링커는 세린/글리신-리치 링커(예를 들어, GGS, GGSGGGS, GGSGGGGGGS, 또는 이와 유사한 것)일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 적절한 링커를 포함하는 셔틀 작용제의 사용은 접착성 세포보다는, 독립 폴리펩티드 카고를 혼탁 세포로 전달하는데 유리할 수 있다.

카고

[0146] 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 합성 웹타이드 또는 폴리웹타이드계 셔틀제는 독립 카고(예를 들어, 폴리웹타이드 카고)를 표적 진핵세포의 세포질로 전달하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 폴리웹타이드 카고는 하나 이상의 CPD에 융합되어 세포 내 전달을 더욱 촉진시킬 수 있다. 본 발명의 실시예들

에 있어서, 폴리펩타이드 카고에 융합된 CPD는 본 발명의 셔틀제의 CPD와 동일하거나 상이할 수 있다. 이러한 융합 단백질은 표준 재조합 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 독립 폴리펩티드 카고는 제2 생물학적 활성 카고(예를 들어, 생물학적 활성 폴리펩타이드 또는 화합물)에 융합, 복합 또는 공유 결합될 수 있다. 대안적으로 또는 동시에, 폴리펩타이드 카고는 준세포 목표 도메인을 포함할 수 있다.

[0147]

본 발명의 실시예들에 있어서, 폴리펩타이드 카고는 의도된 생물학적 효과를 수행하기 위해 핵으로 전달되어야만 한다. 그러한 하나의 예는 카고가 핵 전달을 목적으로하는 폴리펩타이드(예를 들어, 전사 인자)일 때이다. 이와 관련하여, 바이러스성 DNA의 전좌 메커니즘에 관한 연구로 핵 국제화 신호(NLS)가 규명되었다. NLS 서열은 핵막(nuclear envelope)를 통한 전좌의 매개자 및 운반체로서 작용하는 단백질(임포틴 α 및 β)에 의해 인식된다. NLS는 일반적으로 아르기닌, 히스티딘 및 라이신과 같은 전하를 띤 아미노산이 풍부하여, 임포틴에 의해 인식되는 부분적인 양전하를 부여한다. 따라서, 본 발명의 실시예들에 있어서, 폴리펩타이드 카고는 핵 전달을 촉진시키기 위한 NLS, 예컨대 표 C에 기재된 하나 이상의 NLS 또는 핵 표적화 활성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다. 물론, 특정 실시예들에 있어서, 폴리펩타이드 카고는 천연 NLS를 포함할 수 있다.

[표 C]

핵 국제화 시그널

이름	아미노산 서열	서열번호	참조문헌
E1a	KRPPRP	28	(Kohler, Gorlich et al., 2001)
SV40 T-Ag	PKKKRKV	29	(Lanford, Kanda et al., 1986)
c-myc	PAAKRVLKD	30	(Makkerh, Dingwall et al., 1996)
Op-T-NLS	SSDDEATADSQHAAPPKKRKV	31	(Chan and Jans 1999)
Vp3	KKKRK	32	(Nakanishi, Shum et al., 2002)
뉴클레오플라스민	KRPAAATKKAGQAKKK	33	(Fanara, Hodel et al., 2000)
히스톤 2B NLS	DGKKRKRSRK	34	(Moreland, Langevin et al., 1987)
Xenopus N1	VRKKRKTEESPLKDKDAKKSKQE	35	(Kleinschmidt and Seiter 1988)
PARP	KRKGDDEVGVDECAKKSKK	36	(Schreiber, Molinete et al., 1992)
PDX-1	RRMKWKK	37	(Moede, Leibiger et al., 1999)
QKI-5	RVHPYQR	38	(Wu, Zhou et al., 1999)
HCDA	KRPACTLKPCEVQQQLVCSQEAKK	39	(Somasekaram, Jarmuz et al., 1999)
H2B	GKKRSKA	40	(Moreland, Langevin et al., 1987)
v-Rel	KAKRQR	41	(Gilmore and Temin 1988)
Amida	RKRRR	42	(Irie, Yamagata et al., 2000)
RanBP3	PPVKRERTS	43	(Welch, Franke et al., 1999)
Pho4p	PYLNKRKGKP	44	(Welch, Franke et al., 1999)
LEF-1	KKKKRKREK	45	(Prieve and Waterman 1999)
TCF-1	KKKRRSREK	46	(Prieve and Waterman 1999)
BDV-P	PRPRKIPR	47	(Shoya, Kobayashi et al., 1998)
TR2	KDCVINKIIRRNRQYCRILQR	48	(Yu, Lee et al., 1998)
SOX9	PRRRK	49	(Sudbeck and Scherer 1997)
Max	PQSRKKLR	50	(Kato, Lee et al., 1992)

[0148]

일단 세포질에 전달되면, 재조합 단백질은 진핵세포의 단백질 트래피킹 시스템(protein trafficking system)에 노출된다. 실제로, 모든 단백질은 세포의 세포질에서 합성되고 그 뒤 셔틀 단백질에 의해 인식되는 작은 아미노산 서열에 기초한 수송 시스템에 의하여 최종 세포 내 위치로 재분배된다(Karniely and Pines 2005, Stojanovski, Bohnert et al., 2012). NLS 이외에도, 다른 국제화 서열은 본 발명의 폴리펩타이드 카고의 세포 내 전달 후에 다양한 세포 기관에 대한 세포 내 표적화를 매개할 수 있다. 따라서, 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 폴리펩타이드 카고는 표 D에 기재된 하나 이상과 같은 특정 세포 기관으로의 셔틀제 및 카고의 전달을 촉진하기 위한 세포 내 국제화 신호 또는 대응되는 세포내 표적화 활성을 가지는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.

[0149]

[표 D]

준세포 국제화 신호

이름	아미노산 서열	서열번호	참조문헌
Tim9로부터의 미토콘드리아성 신호 서열	NLVERCFTD	51	(Milenkovic, Ramming et al., 2009)
효모 시토크롬 c 산화효소 서브유닛 IV로부터의 미토콘드리아성 신호 서열	MLSLRQSIRFFK	52	(Hurt, Pesold-Hurt et al., 1985)
18S rRNA로부터의 미토콘드리아성 신호 서열	MLISRCKWSRFPGNQR	53	(Bejarano and Gonzalez 1999)
PTS1으로부터의 페옥시솜 신호 서열	SKL	54	(Gould, Keller et al., 1989)
BIRC5로부터의 핵인 신호 서열	MQRKPTIRRKNLRLRRK	55	(Scott, Boisvert et al., 2010)
RECQL4로부터의 핵인 신호 서열	KQAWKQKWRKK	56	(Scott, Boisvert et al., 2010)

[0150]

[0151] 본 발명의 실시예들에 있어서, 카고는 세포 내 전달을 목적으로 하는 생물학적으로 활성인(재조합) 폴리펩타이드(예를 들어, 전사 인자, 사이토kin 또는 뉴클레아제)와 같은 생물학적 활성 화합물일 수 있다. 여기서 사용된 "생물학적으로 활성"이라는 표현은 표적세포에 도입될 때 구조적, 규제적 및/또는 생화학적 기능을 매개하는 화합물의 능력을 의미한다.

[0152]

본 발명의 실시예들에 있어서, 카고는 전사 인자와 같은, 핵 전달을 위한 재조합 폴리펩타이드일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 전사 인자는 HOXB4(Lu, Feng et al., 2007), NUP98-HOXA9(Takeda, Goolsby et al., 2006), Oct3/4, Sox2, Sox9, Klf4, c-Myc(Takahashi and Yamanaka 2006), MyoD(Sung, Mun et al., 2013), Pdx1, Ngn3 and MafA(Akinci, Banga et al., 2012), Blimp-1(Lin, Chou et al., 2013), Eomes, T-bet(Gordon, Chaix et al., 2012), FOXO3A(Warr, Binnewies et al., 2013), NF-YA(Dolfini, Minuzzo et al., 2012), SALL4(Aguila, Liao et al., 2011), ISL1(Fonoudi, Yeganeh et al., 2013), FoxA1(Tan, Xie et al., 2010), Nanog, Esrrb, Lin28(Buganim et al., 2014), HIF1-alpha(Lord-Dufour et al., 2009), H1f, Runx1t1, Pbx1, Lmo2, Zfp37, Prdm5(Riddell et al., 2014), 또는 Bcl-6(Ichii, Sakamoto et al., 2004)일 수 있다.

[0153]

본 발명의 실시예들에 있어서, 카고는 유전자 편집 기술에 유용한 뉴클레아제와 같이, 핵전달을 목적으로 하는 재조합 폴리펩타이드일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 뉴클레아제는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제, CRISPR 엔도뉴클레아제, I 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, II 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, III 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, IV 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, V 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, VI 타입 CRISPR 엔도뉴클레아제, CRISPR 관련 단백질 9(Cas9), Cpf1(Zetsche et al., 2015), 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) (Cox et al., 2015), 호밍 엔도뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 또는 이들의 조합을 포함한다. 여기에 언급되지 않은 다른 뉴클레아제들 역시 본 발명에 포함될 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 뉴클레아제는 핵 국제화 신호(예를 들어, Cas9-NLS; Cpf1-NLS; ZFN-NLS; TALEN-NLS)에 융합될 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 뉴클레아제는 핵산(예를 들어, 하나 이상의 가이드 RNA, crRNA, tracrRNA 또는 crRNA 및 tracrRNA둘다)과 복합될 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 뉴클레아제는 DNA 또는 RNA 결합 활성을 가질 수 있지만, DNA를 절단하는 능력이 결여될 수 있다.

[0154]

본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 서틀제는 하나 이상의 CRISPR 엔도뉴클레아제, 예를 들어, 하기의 개시된 하나 이상의 CRISPR 엔도뉴클레아제의 세포 내 전달(예를 들어, 핵 전달)에 사용될 수 있다.

[0155]

타입 I 및 그의 서브 타입 A, B, C, D, E, F 및 I는 각각 그들의 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas6, Cas7 및 Cas8 단백질을 포함하고, 이들 Cas 단백질의 특정 동족체 및 서브유닛은 *E.coli*(타입 I 내지 E)의 Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, 및 Cas6e 서브유닛을 포함하며, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)의 Csyl, Csyl2, Csyl3, 및 Csyl6f를 포함한다(Wiedenheft et al., 2011; Makarova et al., 2011). 타입 II 및 그의 서브 타입 A, B, C는 각각 그들의 Cas1, Cas2 및 Cas9 단백질을 포함하고, 그리고 Csn 복합체의 서브 타입은 Csn 복합체를 포함한다(Makarova et al., 2011). 타입 III 및 그의 서브 타입 A, B 및 MTH326-유사 모듈은 각각 Cas1, Cas2, Cas6 및 Cas10 단백질을 포함하고, 그리고 이들 Cas 단백질의 특정 동족체 및 서브 유닛은 Csm 및 CMR 복합체를 포함한다.(Makarova et al., 2011). 타입 IV는 Cas 단백질의 Csf3 계열을 나타낸다. 이 계열의 구성들은 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, *Azoarcus* sp.(strain EbN1), 및 *Rhodoferax ferrireducens*(strain DSM 15236/ATCC BAA-621/T118)에서 CRISPR 근처에서 나타난다. 후자의 두 종에서, CRISPR/Cas 유전자 위치는 플라스미드에서 발견된다. 타입 V와 그 하위 타입은 최근에 발견되었으며 Cpf1,

C2c1 및 C2c3을 포함한다. 타입 VI는 알려진 서열과 거의 상동성을 나타내지 않는 C2c2 효소를 포함한다.

[0156] 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 셔틀제는 여기에 개시된 바와 같은 다양한 용도를 위해, 하나 이상의 상기 뉴클레아제, 엔도뉴클레아제, RNA-가이드 엔도뉴클레아제, CRISPR 엔도뉴클레아제와 함께 사용될 수 있다. CRISPR 시스템은 DNA 결합, RNA 결합, 헬리카제(helicase) 및 뉴클레아제 모티프와 같은 각각의 핵산과 상호 작용한다(Makarova et al., 2011; Barrangou & Marraffini, 2014). CRISPR 시스템은 다음과 같은 다양한 유전자 편집 응용 프로그램에 사용될 수 있다.

[0157] 비-상동 말단-결합(NHEJ) 및/또는 상동-직접 재조합(HDR)을 수행하는 Cas-매개 유전자 편집 방법(Cong et al, 2013);

[0158] 하나 이상의 gRNA(s) 및 다른 단백질 파트너와 복합체 형성하거나 하지 않는 RNA 중합효소와 프로모터 서열에 결합될 때 전사 개시를 억제 및/또는 활성화할 수 있는 촉매적 사멸 Cas(dCas)(Bikard et al, 2013);

[0159] 전사 억제, 전사 활성, 염색질 재구성, 형광 리포터, 히스톤 변형, 재조합 효소 시스템 아세틸화, 메틸화, 유비퀴틴화, 인산화, 수모화, 리보실화 및 시트룰린화를 포함하는 유전체의 특정 부위에서 효소 활성을 가져오는 방법으로서 상이한 기능성 단백질 도메인에 융합될 수 있는 촉매적 사멸 Cas(dCas)(Gilbert et al, 2013).

[0160] 당해 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자라면, 본 발명의 셔틀제는, 본 발명의 실시예들에서 Cas9로 예시되어 있지만, 본 발명에 기재된 다른 뉴클레아제들과 함께 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, Cpf1, Cas9와 같은 뉴클레아제 및 이러한 뉴클레아제 또는 다른 것들의 변이체는 본 발명에 포함된다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제, 또는 이들의 변이체(예를 들어, DNA 또는 RNA와 결합할 수 있지만, 그들의 뉴클레아제 활성을 상실하거나 전사 인자에 융합된 것)와 같이 뉴클레아제 활성을 가지는 어떠한 카고를 넓게 커버할 수 있음을 이해할 것이다.

[0161] 본 발명의 실시예들에 있어서, 폴리펩타이드 카고는 케모카인, 인터페론, 인터루킨, 림포카인, 또는 종양괴사인 자일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 폴리펩타이드 카고는 호르몬 또는 성장 인자일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 카고는 항체(예를 들어, 표지 된 항체)일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 카고는, 예를 들어, 연구 및/또는 진단 목적을 위해 세포 내 전달을 위해 의도된 검출 가능한 표지(형광 폴리 펩타이드 또는 리포터 효소)일 수 있다.

[0162] 본 발명의 실시예들에 있어서, 카고는 구형의 단백질(globular protein) 또는 섬유 단백질일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 카고는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 내지 50, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 kDa 이상을 가질 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 카고는 약 20 내지 200 kDa 사이의 분자량을 가질 수 있다.

비독성, 대사가능한 합성 펩타이드 및 셔틀제

[0164] 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 명세서의 합성 펩타이드 및 셔틀제는 50uM, 45uM, 40uM, 35uM, 30uM, 25uM, 20uM, 15uM, 10uM, 9uM, 8uM, 7uM, 6uM, 5uM, 4uM, 3uM, 2uM, 1uM, 0.5uM 0.1uM 또는 0.05uM 이하의 농도에서 의도된 표적 진핵세포로 비독성일 수 있다. 본 발명의 셔틀제의 세포 독성은 임의의 적합한 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 또한, 셔틀제의 독성을 감소 또는 최소화, 및/또는 형질 주입 효율의 증가 또는 최소화를 위하여 형질 도입 프로토콜(예를 들어, 사용된 셔틀제 및/또는 카고의 농도, 셔틀제 및/또는 카고의 노출 시간, 혈청의 존재 또는 부재하에서 노출)이 적용될 수 있다.

[0165] 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 합성 펩타이드 및 셔틀제는 의도된 표적 진핵세포에 의해 쉽게 대사될 수 있다.

[0166] 예를 들어, 합성 펩타이드 및 셔틀제는 전체 또는 필수적으로 펩타이드 또는 폴리펩타이드로 구성될 수 있으며, 표적 진핵세포는 대사/분해될 세포 기관을 보유한다. 실제로, 본 기술의 합성 펩타이드 및 폴리펩타이드 셔틀제의 세포 내 반감기는 형광 물질과 같은 외부 유기 화합물의 반감기보다 훨씬 낮을 것으로 예상된다. 그러나 형광 물질은 독성이 있을 수 있어 임상적으로 안전하게 사용되기 전에 조사되어야 한다(Alford et al., 2009). 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 명세서의 합성 펩타이드 및 셔틀제는 임상 용도에 적합할 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 명세서의 합성 펩타이드 및 셔틀제는 독성이 불확실하거나 배제되지 않은 도메인 또는 화합물의 사용을 피할 수 있다.

혼합물(Cocktails)

[0168] 본 발명의 실시예들에 있어서, 여기서 정의된 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀제의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개의 다른 유형의 혼합물을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 상이한 유형의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀제(예를 들어, 상이한 유형의 CPD를 포함하는 상이한 셔틀제)를 조합하는 것으로 상이한 폴리웨타이드 카고를 세포 내로 전달하기 위한 융통성을 증가시킬 수 있다. 또한, 이론과 관계없이, 상이한 유형의 셔틀제의 더 낮은 농도를 조합하는 것은 단일 유형의 셔틀제(예를 들어, 더 높은 농도)를 사용하는 것과 관련된 세포 독성을 감소시키는 것을 도와줄 수 있다.

[0169] 방법, 키트, 용도 및 세포

[0170] 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명은 폴리웨타이드 카고의 표적진핵 세포의 세포질로의 형질 도입 효율을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 표적 진핵세포를 합성 웨타이드, 폴리웨타이드계 셔틀제 또는 여기서 정의된 조성물, 그리고 폴리웨타이드 카고와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 합성 웨타이드, 폴리 웨타이드계 셔틀제 또는 조성물은 표적 진핵세포를 그 혼합물에 노출시키기 전에 폴리웨타이드 카고와 사전-배양되어 혼합물을 형성할 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, CPD의 유형은 세포 내로 전달될 폴리웨타이드 카고의 아미노산 서열에 기초하여 선택될 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, CPD 및 ELD의 유형은 세포 내로 전달될 폴리웨타이드 카고의 아미노산 서열, 세포의 유형, 조직의 유형 등을 고려하여 선택될 수 있다.

[0171] 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 방법은 합성 웨타이드, 폴리 웨타이드계 셔틀제 또는 조성물을 표적 세포와 반복된 처리(예를 들어, 하루에 1, 2, 3, 4 회 이상, 및/또는 미리-결정된 일정)를 포함할 수 있다. 이러한 경우, 합성 웨타이드, 폴리 웨타이드계 셔틀제 또는 조성물보다 낮은 농도가 바람직할 수 있다(예를 들어, 감소된 독성). 본 발명의 실시예들에 있어서, 세포는 혼탁 세포 또는 부착 세포일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 업계에서 통상의 기술자는 원하는 생존력을 갖는 특정 세포에 폴리웨타이드 카고를 전달하는 특정 요구에 적합하도록 상이한 조합의 셔틀, 도메인, 용도 및 방법을 사용하여 본 발명의 교시(teaching)를 적용시킬 수 있을 것이다.

[0172] 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명의 방법은 생체 내에서 세포 내로 폴리웨타이드 카고를 전달하는 방법에 적용될 수 있다. 이러한 방법은 비경구 투여 또는 조직, 기관 또는 시스템으로의 직접 주사에 의해 수행될 수 있다.

[0173] 본 발명의 실시예들에 있어서, 합성 웨타이드, 폴리웨타이드계 셔틀제 또는 조성물 및 폴리웨타이드 카고는 혈청 존재 또는 부재하에 표적 세포에 노출될 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 상기 방법은 임상적 또는 치료학적 용도에 적합할 수 있다.

[0174] 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명은 폴리웨타이드 카고의 표적 진핵세포의 세포질로의 형질 도입 효율을 증가시키기 위한 키트에 관한 것이다. 상기 키트는 합성 웨타이드, 폴리웨타이드계 셔틀제 또는 여기서 정의된 조성물 및 적합한 용기를 포함할 수 있다.

[0175] 본 발명의 실시예들에 있어서, 표적 진핵 세포는 동물 세포, 포유류 세포 또는 인간 세포일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 표적 진핵 세포는 줄기 세포(예를 들어, 배아 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포, 신경 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 조혈 간세포, 말초혈 줄기 세포), 일차 세포(예를 들어, 근아세포, 섬유아세포), 또는 면역 세포(예를 들어, T 세포, 수지상 세포, 항원 제시 세포)를 포함할 수 있다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 본 발명은 여기서 정의된 바와 같은 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀제를 포함하는 분리된 세포에 관한 것이다. 본 발명의 실시예들에 있어서, 세포는 단백질-유도 다능성 줄기 세포일 수 있다. 단백질 형질 도입에 종종 내성을 가지거나 받아들이지 않는 세포들은 종종 단백질 형질 도입에 내성이거나 그렇지 않은 세포는 본 발명의 합성 웨타이드 또는 폴리웨타이드계 셔틀제에 대한 흥미로운 주제일 수 있음을 이해할 것이다.

[0176] 본 발명의 다른 목적, 장점 및 특징은 첨부된 도면을 참조하여 예로서 주어진, 특정 실시예의 비제한적인 설명의 해석에 따라 더욱 명백해질 것이다.

[0177] 실시예들

[0178] 실시예 1:

[0179] 재료 및 방법

[0180]

1.1 재료

[0181] 모든 화학 물질은 다른 언급이 없는 한, Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA or Oakville, ON, Canada)에서 구입하거나, BioShop Canada Inc.(Mississauga, ON, Canada) 또는 VWR(Ville Mont-Royal, QC, Canada)에 상응하는 등급으로 구입하였다.

[0182] 1.2 시약

[표 1.1]

물질	회사	지역
RPMI 1640 media	Sigma-Aldrich	Oakville, ON, Canada
DMEM	Sigma-Aldrich	Oakville, ON, Canada
Fetal bovine serum (FBS)	NorthBio	Toronto, ON, Canada
L-glutamine-Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich	Oakville, ON, Canada
Trypsin-EDTA solution	Sigma-Aldrich	Oakville, ON, Canada
peGFRP-C1	CLONTECH Laboratories	Palo Alto, CA, USA
FITC-Antibody α -tubulin	Abcam ab64503	Cambridge, MA, USA
ITS	Invitrogen/41400-045	Burlington, ON, Canada
FGF 2	Feldan Bio/ID-07-017	Quebec, QC, Canada
Dexamethasone	Sigma-Aldrich/D8893	Oakville, ON, Canada
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich/A-1933	Oakville, ON, Canada
MB1 media	GE Healthcare HyClone	Logan, Utah, USA
Calcein	Sigma-Aldrich/ C0875	Oakville, ON, Canada
HistTrap TM FF column	GE Healthcare	Baie d'Urfe, QC, Canada
Q Sepharose TM	GE Healthcare	Baie d'Urfe, QC, Canada
SP Sepharose TM	GE Healthcare	Baie d'Urfe, QC, Canada
Amicon Ultra centrifugal filters	EMD Millipore	Etobicoke, ON Canada
Label IT [®] Cv [®] 5 kit	Mirus Bio LLC	Madison, WI, USA
Calf serum	NorthBio	Toronto, ON, Canada
beta-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Oakville, ON, Canada
IL-2	Feldan Bio/ rhIL-2 Research	Quebec, QC, Canada
Reazurine sodium salt	Sigma-Aldrich/R7017-1 G	Oakville, ON, Canada
Anti-HOXB4 monoclonal antibody	Novus Bio #NBP2-37257	Oakville, ON, Canada
Alexa TM -594 Anti-Mouse	Abcam #150116	Toronto, ON, Canada
Fluoroshield TM with DAPI	Sigma #F6057	Oakville, ON, Canada
GFP Monoclonal antibody	Feldan Bio #A017	Quebec, QC, Canada
Phusion TM High-Fidelity DNA polymerase	(NEB #M0530S)	Whitby, ON, Canada
Edit-R TM Synthetic crRNA Positive Controls	(Dharmacon #U-007000-05)	Ottawa, ON, Canada
T7 Endonuclease I	(NEB, Cat #M0302S)	Whitby, ON, Canada
FastFect TM transfection reagent	(Feldan Bio # 9K-010-0001)	Quebec, QC, Canada

[0183]

1.3 세포주(Cell lines)

[0184] HeLa, HEK293A, HEK293T, THP-1, CHO, NIH3T3, CA46, Balb3T3 및 HT2 세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하여 제조사의 지침에 따라 배양하였다. 근아세포는 J.P. Tremblay 교수(Universite Laval, Quebec, Canada)가 친절하게 제공한 최초의 인간 세포이다.

[표 1.2]

세포계 및 배양 조건

세포계	설명	ATCC/기타	배지	형 청	첨가제
HeLa (부착 세포)	인간 자궁 경부암 세포	ATCC™ CCL-2	DMEM	10% FBS	L-glutamine 2mM Penicillin 100units Streptomycin 100ug/mL
HEK 293A (부착 세포)	인간 배아 상피 세포	ATCC™ CRL-1573	DMEM	10% FBS	L-glutamine 2mM Penicillin 100units Streptomycin 100ug/mL
HEK 293T (부착 세포)	인간 배아 상피 세포	ATCC™ CRL-3216	DMEM	10% FBS	L-glutamine 2mM Penicillin 100units Streptomycin 100ug/mL
THP-1 (현탁 세포)	급성 단구 백혈병	ATCC™ TIB202	RPMI 1640	10% FBS	2- mercaptoethanol 0.05mM L-glutamine 2mM Penicillin 100units Streptomycin 100ug/mL
Myoblasts (1차 부착 세포)	인간(13 개월) 근아세포	Kindly provided by Professor JP Tremblay	MB1	15% FBS	ITS 1x, FGF 2 10 ng/mL, Dexamethasone 0.39ug/mL, BSA 0.5mg/mL, MB1 85%
CHO (부착 세포)	중국 햄스터 난소 세포	ATCC™ CCL-61	DMEM	10% FBS	L-glutamine 2mM Penicillin 100units Streptomycin 100ug/mL
NIH3T3 (부착 세포)	섬유아세포	ATCC™ CRL-1658	DMEM	10% Calf serum	L-glutamine 2mM Penicillin 100units Streptomycin 100ug/mL
HT2 (현탁 세포)	T 임파구	ATCC™ CRL-1841	RPMI 1640	10% FBS	200IU/mL IL-2 β-mercaptopethanol 0.05mM L-glutamine 2mM Penicillin 100units Streptomycin 100ug/mL
CA46 (현탁 세포)	호모 사파엔스 버켓 림프종	ATCC™ CRL-1648	RPMI 1640	20% FBS	L-glutamine 2mM Penicillin 100units Streptomycin 100ug/mL
Balb3T3 (부착 세포)	섬유아세포	ATCC™ CCL-163	DMEM	10% Calf serum	L-glutamine 2mM Penicillin 100units Streptomycin 100ug/mL
Jurkat (현탁 세포)	인간 T 세포	ATCC™ TIB-152	RPMI 1640	10% FBS	L-glutamine 2mM Penicillin 100units Streptomycin 100ug/mL

FBS: 소태아혈청(Fetal bovine serum)

[0186]

1.4 단백질 정체

[0188]

융합 단백질은 표준 조건 하에서 T5 프로모터를 포함하는 이소프로필 β -D-1-티오갈락토파라노사이드(IPTG) 유도 벡터를 사용하여 박테리아(*E. coli* BL21DE3)에서 발현되었다. 배지는 리터당 효모 추출물 24g, 트립톤 12g, 글리세롤 4mL, KH_2PO_4 2.3g 및 K_2HPO_4 12.5g을 포함하였다. 박테리아 부용(broth)을 적절한 항생제(예를 들어, 암피실린)와 교반하면서 37°C에서 배양하였다. 발현은 30°C에서 3시간 동안 1mM IPTG의 최종 농도로 0.5 및 0.6 사이의 광학 밀도(600 nm)에서 유도되었다. 박테리아는 5000RPM으로 원심 분리한 후 회복되었고 박테리아 펠릿은 -20°C에서 저장되었다.

[0189]

박테리아 펠릿을 페닐메틸솔포닐플루오라이드(PMSF) 1mM을 트리스 완충액(Tris 25mM pH 7.5, NaCl 100mM, 이미 다졸 5mM)에 재현탁시키고, 균질 기 Panda 2K™을 1000 bar에서 3회 통과시켜 용해시켰다. 용액을 15000RPM, 4°C에서 30분간 원심 분리하였다. 상동액을 수집하고 0.22uM 여과 장치로 여과하였다.

[0190]

5 컬럼 부피(CV)의 트리스 완충액으로 이미 평형화된 HisTrap™ FF 컬럼에서 FPLC(AKTA Explorer 100R)를 사용하여, 용해된 단백질을 넣었다. 컬럼을 0.1% Triton™ X-114가 보충된 30 컬럼 부피(CV)의 트리스 완충액으로 세척하고, 이어서 40mM의 이미다졸을 갖는 30CV의 트리스 완충액으로 세척하였다. 단백질은 350mM 이미다졸을 갖는 5CV의 트리스 완충액으로 용출되어 수집되었다. 특정 단백질에 대응하는 수집된 부분을 표준 변성 SDS-PAGE로 결정하였다.

[0191]

정제된 단백질을 단백질의 pI에 따라 원하는 pH에서 트리스 20mM에 희석하고 5CV의 Tris 20mM, NaCl 30mM로 미리 평형화시킨 적절한 이온 교환 컬럼(Q Sepharose™ 또는 SP Sepharose™)에 투입하였다. 컬럼은 Tris 20mM, NaCl 30mM의 10CV로 세척하고, 단백질을 15CV에서 1M이 될 때까지 NaCl 구배(gradient)로 용리시켰다. 특정 단백질에 상응하는 수집된 부분을 표준 변성 SDS-PAGE로 결정하였다. 그 뒤, 정제된 단백질을 세척하고 Amicon

UltraTM 원심 필터 10,000 MWCO에서 PBS 1X로 농축하였다. 단백질 농도는 표준 브래드포드(Bradford) 분석을 사용하여 평가하였다.

[0192] 1.5 합성 웹타이드 및 셔틀제

본 연구에 사용된 모든 웹타이드는 GLBiochem(Shanghai, China)에서 구입하였고, 그 순도는 고-성능 액체 크로마토그래피 분석 및 질량 분광 분석에 의하여 확인하였다. 실시예들에 있어서, 키메릭(chimeric) 웹타이드는 C-말단 시스테인 잔기를 함유하도록 합성되어 웹타이드 다이머의 제조를 가능하게 한다. 이들 다이머 웹타이드는 2개의 단량체의 C-말단 시스테인들 사이의 디설파이드 가교로 직접 합성되었다. 본 발명의 실시예들에서 실험된 합성 웹타이드 및 셔틀제 각각의 아미노산 서열 및 특성은 표 1.3에 요약하였다.

[표 1.3]

합성 웹타이드 및 셔틀제 실험

도메인	웹타이드 또는 셔틀제	아미노산 서열 [서열번호: *로, 달리 지적하지 않는 한, C-말단 Cys을 포함 하지 않음]	a.a.	MW (kDa)	pI	전하	친수도 지표
ELD	CM18	KWKLFKKIGAVLKVLTTG [1]	18	2.03	10.6 0	5+ / 0-	0.350
	C(LLKK) ₃ C	CLLKKLLKKLLKKC [63]	14	1.69	10.0 5	6+ / 0-	0.314
	LAH4	KKALLALAHHLALHLALALKKA [6]	26	2.78	10.4 8	4+ / 0-	0.923
	KALA	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKAA CEA [14]	30	3.13	9.9	7+ / 2-	0.283
CPD	TAT-cys	YGRKKRRQRRRC [17]	12	1.66	12.0 1	8+ / 0-	-3.125
	Penetratin-cys	RQIKIWFQNRRMKWKKC [18]	17	2.35	11.7 5	7+ / 0-	-1.482
	PTD4	YARAARQARA [65]	11	1.2	11.7 2	3+ / 0-	-0.682
His- -PT D4	His-PTD4	HHHHHHYARAARQARA [81]	17	2.03	11.7 1	3+ / 0-	-1.57
CPD -EL -D	TAT-CM18	YGRKKRRQRRCKWKLFKKIGAVLKVL TTG [66]	30	3.68	12.0 2	13+ / 0-	-1.041
	TAT-KALA	YGRKKRRQRRRCWEAKLAKALAKALAK HLAKALAKALAKCEA [67]	42	4.67	11.4 6	15+ / 2-	-0.768
	PTD4-KALA	YARAARQARWEAKLAKALAKALAKHL LAKALAKALKACEA [82]	41	4.32	10.4 6	10+ / 2-	0.024
	9Arg-KALA	RRRRRRRWEAKLAKALAKALAKHLA KALAKALKACEA [83]	39	4.54	12.1 1	16+ / 2-	-0.821
	Pep1-KALA	KETWWETWWTEWSQPKKKRKVWEAKLA KALAKALAKHLAKALAKALAKACEA [84]	51	5.62	10.0 1	13+ / 5-	-0.673
	Xentry-KALA	LCLRPVGWEAKLAKALAKALAKHL AKALAKALKACEA [85]	37	3.87	9.93	8+ / 2-	0.441
	SynB3-KALA	RRLSYSRERRFWEAKLAKALAKALAKHL AKALAKALKACEA [86]	40	4.51	11.1 2	12+ / 2-	-0.258

[0194]

[0195]	ELD -CP D	CM18-TAT-Cys	KWKLFFKKIGAVLKVLTTGYGRKKRRQR RRC [57]	30	3.67	12.0 2	13+ / 0-	-1.04	
		CM18-Penetratin-Cys	KWKLFFKKIGAVLKVLTTGRQIKIWFQN RRMKWKKC [58]	35	4.36	11.3 6	12+ / 0-	-0.54	
		dCM18-TAT-Cys (CM18-TAT-cys dimer)	KWKLFFKKIGAVLKVLTTGYGRKKRRQR RRC [57]	60	7.34	12.1 6	26+ / 0-	-1.04	
		dCM18-Penetratin-Cys (CM18-Penetratin-Cys dimer)	KWKLFFKKIGAVLKVLTTGRQIKIWFQN RRMKWKKC [58]	70	8.72	12.0 5	24+ / 0-	-0.54	
		VSVG-PTD4	KFTIVFPHNQGNWKNVPSNYHYCPYA RAAARQARA [87]	36	4.2	10.3	6+ / 0-	-0.89	
		EB1-PTD4	LIRLWSHLIHWFQNRRLKWWKKYARA AAARQARA [88]	34	4.29	12.3 1	10+ / 0-	-0.647	
		JST-PTD4	GLFEALLELLESLWELLLEAYARAARQA QARA [89]	31	3.49	4.65	5+ / 3-	0.435	
		CM18-PTD4	KWKLFFKKIGAVLKVLTTGYARAAARQA RA [90]	29	3.21	11.7 7	8+ / 0-	-0.041	
		6Cys-CM18-PTD4	CCCCCCKWKLFFKKIGAVLKVLTTGYAR AAARQARA [91]	35	3.83	9.7 5	8+ / 0-	0.394	
		CM18-L1-PTD4	KWKLFFKKIGAVLKVLTTGGGSYARAAA ROARA [92]	32	3.42	11.7 6	8+ / 0-	-0.087	
		CM18-L2-PTD4	KWKLFFKKIGAVLKVLTTGGGSCGGSYA RAAARQARA [93]	36	3.68	11.7 6	8+ / 0-	-0.133	
		CM18-L3-PTD4	KWKLFFKKIGAVLKVLTTGGGSCGGSG GSYARAAARQARA [94]	41	3.99	11.7 6	8+ / 0	-0.176	
		His-EL D-C PD	Met-His-CM18-T AT-Cys	MHHHHHHHKWKLFFKKIGAVLKVLTTGYG RKRRRRR [59*]	37	4.63	12.0 2	13+ / 0-	-1.311
		His-CM18-TAT	HHHHHHHKWKLFFKKIGAVLKVLTTGYGR KKRRRRR [95]	35	4.4	12.3 1	13+ / 0-	-1.208	
		His-CM18-PTD4	HHHHHHHKWKLFFKKIGAVLKVLTTGYAR AAARQARA [68]	35	4.03	11.7 9	8+ / 0-	-0.583	
		His-CM18-PTD4- 6Cys	HHHHHHHKWKLFFKKIGAVLKVLTTGYAR AAARQARACCCCCC [96*]	41	4.65	9.7 9	8+ / 0-	-0.132	
		His-CM18-9Arg	HHHHHHHKWKLFFKKIGAVLKVLTTGRRR RRRRRR [69]	33	4.26	12.9 1	14+ / 0-	-1.618	
		His-CM18-Trans portan	HHHHHHHKWKLFFKKIGAVLKVLTTGGWT LNSAGYLLKINLAKALAALAKKIL [70]	50	5.62	10.6	9+ / 0-	0.092	
		His-LAH4-PTD4	HHHHHHHKALLALALHHLAHLHLAL ALKAYARAARQARA [71]	43	4.78	11.7 5	7+ / 0-	-0.63	
		His-C(LLKK).C-P TD4	HHHHHHHKCLLKKLKKLKKCYARAAR QARA [72]	31	3.56	11.2 1	9+ / 0-	-0.827	
		3His-CM18-PTD4	HHHKWKLFFKKIGAVLKVLTTGYARAAA ROARA [97]	32	3.63	11.7 6	8+ / 0-	-0.338	
		12His-CM18-PTD 4	HHHHHHHHHHHHHKWKLFFKKIGAVLKVL TTGYARAARQARA [98]	41	4.86	11.7 6	8+ / 0-	-0.966	
		HA-CM18-PTD4	HHHAAHHHKWKLFFKKIGAVLKVLTTGYA RAAARQARA [99]	36	4.11	11.7 6	8+ / 0-	-0.517	
		3HA-CM18-PTD4	HAHHAAHHHKWKLFFKKIGAVLKVLTTG YARAARQARA [100]	38	4.25	11.7 6	8+ / 0-	-0.395	

[0196]	ELD -Hi s-C PD	CM18-His-PTD4	KWKLFFKKIGAVLKVLTTGHHHHHHYAR AAARQARA [101]	35	4.04	11.7 6	8+ / 0-	-0.583
		His-CM18-PTD4- His	HHHHHHHKWKLFFKKIGAVLKVLTTGYAR AAARQARAHHHHH [102]	41	4.86	11.7 6	8+ / 0-	-0.966

[0197] ExPASy™ Bioinformatics Resource Portal (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)에서 제공되는 ProtParam™ 온라인 도구를 사용하여 계산된 결과이다.

[0198] MW: 분자량

[0199] pI: 등전점

[0200] 전하: 양 (+) 및 음 (-) 저하 잔기의 총 수

[0201] 실시예 2:

[0202] 엔도좀-포획된 칼세인의 탈출을 촉진하는 웹타이드 셔틀제

[0203] 2.1 엔도좀 탈출 분석

[0204] 엔도좀 누출을 연구하고 셔틀제의 첨가가 폴리웹타이드 카고의 엔도좀 누출을 촉진하는지를 확인하기 위하여 현미경 및 유세포 분석기 기반 형광 분석법이 개발되었다.

[0205] 2.1.1 현미경을 통한 엔도좀 누출 시각화

- [0206] 칼세인은 세포의 배지에 투여될 때, 세포에 의하여 쉽게 내부화(internalized)되는 막-비투과성 형광 분자이다. 이 형광 분자는 더 높은 농도에서 pH-의존적이며 칼세인 자기-소멸(self-quenches)된다. 일단 내재화되면, 칼세인은 세포 엔도좀에서 높은 농도로 격리되고 점상의 패턴으로 형광 현미경으로 시각화될 수 있다. 엔도좀 누출 이후에, 칼세인은 세포의 세포질에 방출되고 이 방출은 분산 패턴으로 형광 현미경으로 시각화될 수 있다.
- [0207] 칼세인 검정의 수행 하루 전, 지수 성장단계의 포유류 세포(예를 들어, HeLa, HEK293A 또는 근아세포)를 수화하였고 24-웰 플레이트(웰당 80,000 세포)에 배치되었다. 세포를 실시예 1에 기술된 바와 같이 적절한 성장 배지에서 하룻밤 배양함으로써 부착시킬 수 있었다. 다음날, 배지를 제거하고 HEK293A(250ug/mL, 400uM)를 제외한, 62.5ug/mL(100uM)의 칼세인을 함유한 FBS가 없는 신선한 배지 300uL로 교체하였다. 동시에, 실험될 셔틀제를 미리 정해진 농도로 첨가하였다. 플레이트를 30분 동안 37°C에서 배양하였다. 세포를 1X PBS(37°C)로 세척하고 FBS를 함유하는 신선한 배지를 첨가하였다. 플레이트를 2.5시간 동안 37°C에서 배양하였다. 세포를 3번 세척하였고 위상차 및 형광 현미경 (IX81TM, Olympus)으로 시각화하였다.
- [0208] 전형적인 결과는 도 1A에 나타나며, 형광 현미경 분석에 의한 시각화시 칼세인("100uM 칼세인")이 채워지고 처리되지 않은 HEK293A 세포는 낮은 강도, 점상 형광 패턴을 나타낸다. 대조적으로, 칼세인("100uM 칼세인+CM18-TAT 5uM")의 엔도좀 탈출을 촉진시키는 셔틀제로 처리된 HeLa 세포는 보다 큰 세포 비율(우상단 패널)에서 더 높은 강도와 확산 형광 패턴을 나타낸다.
- [0209] 2.1.2 유동 세포 계측법으로 엔도좀 누출 정량화
- [0210] 현미경 검사 외에도 유동 세포 계측법은 칼세인이 세포질에서 방출되면 형광 강도 신호가 증가함에 따라 엔도좀 누출의 정량 분석을 가능하게 합니다. 칼세인 형광은 엔도좀의 산성 환경과 비교하여 생리학적 pH(예를 들어, 세포질)에서 최적이다.
- [0211] 칼세인 검정의 수행 하루 전, 지수 성장 단계의 포유류 세포(예를 들어, HeLa, HEK293A 또는 근아세포)를 수화하였고 96-웰 플레이트(웰당 20,000 세포)에 배치되었다. 세포를 실시예 1에 기술된 바와 같이 적절한 성장 배지에서 하룻밤 배양함으로써 부착시킬 수 있었다. 다음날, 배지를 제거하고 HEK293A(250ug/mL, 400uM)를 제외한, 62.5ug/mL(100uM)의 칼세인을 함유한 혈청이 없는 신선한 배지 50uL로 교체하였다. 동시에, 실험될 셔틀제를 미리 정해진 농도로 첨가하였다. 플레이트를 30분 동안 37°C에서 배양하였다. 세포를 1X PBS(37°C)로 세척하고 5 내지 10% 혈청을 함유하는 신선한 배지를 첨가하였다. 플레이트를 2.5시간 동안 37°C에서 배양하였다. 세포를 1X PBS로 세척하고 트립신 처리를 사용하여 분리하였다. 트립신 처리는 적절한 성장 배지의 추가에 의하여 중단되었으며, 칼세인 형광은 유동 세포 계측법(Accuri C6, Becton, Dickinson and Company (BD))을 사용하여 정량화되었다.
- [0212] 미처리 된 칼세인-로딩된 세포를 엔도좀으로부터 칼세인의 방출로 인한 증가된 형광을 가지는 세포로부터 엔도좀-포획된 칼세인으로 인한 형광의 기준선을 갖는 세포를 구별하는 대조군으로 사용하였다. 엔도좀 탈출 정량화를 위하여 형광 신호 평균("평균 개수")이 분석되었다. 실시예들에 있어서, 대조군(미처리 칼세인-로딩된 세포)에 비례하는 평균 개수의 배수-증가에 대응하는 "평균 인자"가 계산되었다. 또한, 세포(크기 및 입도)에 대응하는 유동 세포 계측법에 의해 관찰된 결과가 분석되었다. 세포의 사망률은 관찰된 총 결과에서 세포의 백분율로 관찰되었다. 대조군보다 낮으면, 독성으로 인해 세포 잔해의 수가 증가한 것으로 간주되었으며 분석은 폐기되었다.
- [0213] 전형적인 결과를 도 1B에 나타내었으며, 엔도좀 탈출을 촉진하는 셔틀제로 처리된 칼세인-로딩된 HeLa 세포("칼세인 100uM+CM18-TAT 5uM", 우측 패널)는 미처리된 칼세인-로딩된 HeLa 세포("칼세인 100uM", 좌측 패널)과 비교하여 형광 강도(우측-시프트)의 증가가 관찰되었다. 칼세인 형광의 증가는 엔도좀(산성)으로부터 세포질(생리적인)로의 방출과 관련된 pH의 증가로 초래된다.
- [0214] 2.2 엔도좀 탈출 분석을 통한 결과
- [0215] 2.2.1 HeLa 세포
- [0216] HeLa 세포를 배양하고 실시예 2.1에 기재된 바와 같이 엔도좀 탈출 검정법으로 시험하였다. 유동 세포 계측법 분석의 결과는 아래에 요약되어 있다. 각각의 경우에, 유동 세포 계측법 결과는 형광 현미경에 의해서도 확인되었다(데이터 미표시).

[표 2.1]

CM18-Penetratin-Cys v. HeLa 세포의 대조군

도메인	펩타이드	세포	농도(uM)	평균 개수 (\pm 표준 편차; n=3)	평균 인자
-	펩타이드 없음	HeLa	0	55 359 \pm 6844	1.0
ELD	CM18	HeLa	5	46 564 \pm 9618	0.8
CPD	TAT-Cys	HeLa	5	74 961 \pm 9337	1.3
	Penetratin-Cys	HeLa	5	59 551 \pm 7119	1.1
ELD + CPD	CM18 + TAT-Cys	HeLa	5 + 5	64 333 \pm 6198	1.2
	CM18 + Penetratin-Cys	HeLa	5 + 5	40 976 \pm 8167	0.7
ELD-CPD	CM18-Penetratin-Cys	HeLa	5	262 066 \pm 28 146	4.7

[0217]

[표 2.2]

CM18-TAT-Cys v. HeLa 세포의 대조군

도메인	펩타이드	세포	농도(uM)	평균 개수 (n=3)	표준 편차	평균 인자
-	펩타이드 없음	HeLa	0	53 369	4192	1.0
ELD-CPD	CM18-TAT-Cys	HeLa	5	306 572	46 564	5.7

[0218]

표 2.1 및 표 2.2에서, CM18-Penetratin-Cys 및 CM18-TAT-Cys(ELD-CPD도메인 구조를 가짐) 셔틀제로 칼세인-로딩된 HeLa 세포의 처리시, 미처리 대조군 세포 또는 단독으로 사용(CM18, TAT-Cys, Penetratin-Cys) 또는 함께 사용(CM18+TAT-Cys, CM18+Penetratin-Cys)된 단일-도메인 펩타이드과 비교하여, 평균 세포 칼세인 형광 강도가 증가하는 결과를 보여준다. 이러한 결과는 CM18-Penetratin-Cys와 CM18-TAT-Cys가 엔도좀-포획된 칼세인의 탈출을 촉진하지만, 단일 도메인 펩타이드(단독으로 또는 함께 사용)는 그렇지 않음을 시사한다.

[표 2.3]

HeLa세포에서 CM18-TAT-Cys의 용량 반응, 도 2의 데이터

도메인	펩타이드	세포	농도(uM)	평균 개수 (n=3)	표준 편차	평균 인자
-	펩타이드 없음("칼세인 100uM")	HeLa	0	63 872	11 587	1.0
ELD-CPD	CM18-TAT-Cys	HeLa	1	86 919	39 165	1.4
	CM18-TAT-Cys	HeLa	2	137 887	13 119	2.2
	CM18-TAT-Cys	HeLa	3	174 327	11 519	2.7
	CM18-TAT-Cys	HeLa	4	290 548	16 593	4.5
	CM18-TAT-Cys	HeLa	5	383 685	5578	6.0

[0220]

[표 2.4]

HeLa세포에서 CM18-TAT-Cys의 용량 반응

도메인	펩타이드	세포	농도(uM)	평균 개수 (n=3)	표준 편차	평균 인자
ELD-CPD	펩타이드 없음	HeLa	0	81 013	14 213	1.0
	CM18-TAT-Cys	HeLa	3	170 652	63 848	2.1
	CM18-TAT-Cys	HeLa	4	251 799	33 880	3.1
	CM18-TAT-Cys	HeLa	5	335 324	10 651	4.1

[0221]

[표 2.5]

HeLa 세포에서 CM18-TAT-Cys 및 CM18-Penetratin-Cys의 용량 반응, 도 3의 테

이터

도메인	펩타이드	세포	농도(uM)	평균 개수 (n=3)	표준 편차	평균 인자
ELD-CPD	펩타이드 없음	HeLa	0	62 503	23 752	1.0
	CM18-TAT-Cys	HeLa	5	187 180	8593	3.0
	CM18-TAT-Cys	HeLa	8	321 873	36 512	5.1
	CM18-Penetratin-Cys	HeLa	5	134 506	2992	2.2
	CM18-Penetratin-Cys	HeLa	8	174 233	56 922	2.8

[0222]

[0223]

표 2.3(도 2) 및 표 2.5(도 3)의 결과는 CM18-TAT-Cys 및 CM18-Penetratin-Cys가 HeLa 세포에서 엔도좀-포획 칼세인의 탈출을 용량-의존적인 방법으로 촉진함을 시사한다. 실시예들에서, CM18-TAT-Cys 및 CM18-Penetratin-Cys의 농도는 HeLa 세포의 세포독성을 증가시키는 것과 관련이 있었다.

[표 2.6]

HeLa 세포에서 CM18-TAT-Cys 및 CM18-Penetratin-Cys의 다이머 v. 모노머

도메인	펩타이드	세포	농도(uM)	평균 개수 (n=4)	표준 편차	평균 인자
ELD-CPD	펩타이드 없음	HeLa	0	60 239	9860	1.0
	CM18-TAT-Cys	HeLa	4	128 461	25 742	2.1
	CM18-Penetratin-Cys	HeLa	4	116 873	3543	1.9
ELD-CPD 다 이머	dCM18-TAT-Cys	HeLa	2	79 380	4297	1.3
	dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	2	128 363	8754	2.1

[표 2.7]

HeLa 세포에서 CM18-TAT-Cys 및 CM18-Penetratin-Cys의 모노머 v. 다이머

도메인	펩타이드	세포	농도(uM)	평균 개수 (n=3)	표준 편차	평균 인자
ELD-CPD	펩타이드 없음	HeLa	0	55 834	1336	1.0
	CM18-TAT-Cys	HeLa	4	159 042	16 867	2.8
	dCM18-TAT-Cys	HeLa	2	174 274	9 553	3.1

[0224]

[0226]

표 2.6 및 2.7의 결과는 셔틀 펩타이드 다이머(하나 이상의 ELD 및 CPD를 포함하는 분자인)가 상응하는 모노머와 비교 가능한 칼세인 엔도좀 탈출 수준을 촉진할 수 있음을 시사한다.

[0227]

2.2.3 HEK293A 세포

[0228]

상이한 세포계에서 셔틀제의 효과를 실험하기 위하여, HEK293A 세포를 배양하였고 실시예 2.1에 개시된 바에 따라 엔도좀 탈출 검정법으로 시험하였다. 유동 세포 분석의 결과는 아래 표 2.8 및 도 1B에 요약되어 있다.

[표 2.8]

HEK293A 세포에서 CM18-TAT-Cys

도메인	펩타이드	세포	농도(uM)	평균 개수 (n=2)	표준 편차	평균 인자
ELD-CPD	펩타이드 없음	HEK293A	0	165 819	7693	1.0
	CM18-TAT-Cys	HEK293A	0.5	196 182	17 224	1.2
	CM18-TAT-Cys	HEK293A	5	629 783	1424	3.8

[0229]

[0230]

표 2.8 및 도 1B에서의 결과는 CM18-TAT-Cys 셔틀제로 칼세인-로딩된 HEK293A 세포의 처리시, 미처리 대조군 세포와 비교하여, 평균 세포 칼세인 형광 강도가 증가하는 결과를 보여준다.

[0231] 2.2.2 근아세포(Myoblasts)

일차 세포에서의 셔틀제의 효과를 실험하기 위하여, 실시예 2.1에 개시된 바에 따라 일차 근아세포가 배양되고 엔도좀 탈출 검정법으로 시험하였다. 유동 세포 계측법 분석 결과는 아래 표 2.9 및 2.10, 그리고 도 4에 요약되어 있다. 각각의 경우에, 유동 세포 계측 결과는 형광 현미경에 의하여 또한 확인되었다.

[표 2.9]

일차 근아세포에서 CM18-TAT-Cys의 용량 반응, 도 4의 데이터

도메인	펩타이드	세포	펩타이드 농도(μM)	평균 개수 (n=3)	표준 편차	평균 인자
-	펩타이드없음; 칼세인없음(“세포들”)	근아세포	0	863	61	n/a
-	펩타이드없음 (“칼세인 100μM”)	근아세포	0	38111	13715	1.0
ELD-CPD	CM18-TAT-Cys	근아세포	5	79826	12050	2.1
	CM18-TAT-Cys	근아세포	8	91421	10 846	2.4

[표 2.10]

일차 근아세포에서 CM18-TAT-Cys의 용량 반응

도메인	펩타이드	세포	펩타이드 농도(μM)	평균 개수 (n=3)	표준 편차	평균 인자
-	펩타이드없음	근아세포	0	31071	21075	1.0
ELD-CPD	CM18-TAT-Cys	근아세포	5	91618	10535	2.9
	CM18-TAT-Cys	근아세포	7.5	95289	11 266	3.1

[0233]

표 2.9(도 4에 그래프로로 표시) 및 표 2.10의 결과는 CM18-TAT-Cys가 일차 근아세포에서 엔도좀-포획 칼세인의 탈출을 용량-의존적인 방법으로 촉진함을 시사한다. 10uM 초과의 CM18-TAT-Cys 농도는 HeLa 세포에서와 마찬가지로 근아세포에서 세포독성을 증가시키는 것과 관련이 있었다.

[표 2.11]

일차 근아세포에서 CM18-TAT-Cys 및 CM18-Penetratin-Cys의 모노머 v. 다이머

도메인	펩타이드	세포	농도(μM)	평균 개수	표준 편차	평균 인자
-	펩타이드없음	근아세포	0	30175	4687	1.0
ELD-CPD	CM18-TAT-Cys	근아세포	5	88686	19481	2.9
ELD-CPD 다 이미	dCM18-TAT-Cys	근아세포	2.5	64864	1264	2.1
ELD-CPD	CM18-Penetratin-Cys	근아세포	5	65636	3288	2.2
ELD-CPD 다 이미	dCM18-Penetratin-Cys	근아세포	2.5	71547	10975	2.4

[0235]

표 2.11의 결과는 셔틀 펩타이드 다이머가 일차 근아세포에 상응하는 단량체와 필적할 정도의 칼세인 엔도좀 탈출 수준을 촉진할 수 있음을 시사한다.

[0237] 실시예 3:

GFP 형질 도입 효과를 향상시키는 펩타이드 셔틀제

[0239] 3.1 단백질 형질 도입 분석

형질 도입 분석을 수행하기 하루 전에, 지수 성장 단계의 포유류 세포 (예를 들어, HEK293, CHO, HeLa, THP-1 및 근아세포)를 수확하고 96-웰 플레이트(웰 당 20,000 세포)에 배치하였다. 세포를 FBS를 함유하는 적절한 성장 배지에서 하룻밤 배양하였다(실시예 1 참조). 다음날, 별도의 멸균 1.5mL 튜브에 0.5 내지 10uM(GFP, TAT-GFP, GFP-NLS 또는 FITC-표지된 항-튜불린 항체)의 카고 단백질을 10분간 37에서 혈청없는 새로운 배지 50uL의 셔틀제(0.5 내지 5uM)와 미리-혼합(사전-배양)하였다. GFP, GFP-NLS 및 TAT-GFP는 Feldan이 개발하고 생산하는 재조합 단백질이다(아래의 실시예 3.4 참조). FITC-표지된 항-튜불린 항체는 Abcam(ab64503)에서 구입하였다.

웰 내의 배지를 제거하고 미리 37로 가온한 새롭게 준비된 인산 완충 식염수(PBS)로 세포를 3회 세척하였다. 세포를 37에서 5분 또는 6 분 동안 카고 단백질/셔틀제 혼합물과 함께 배양하였다. 배양 후, 미리 37로 가온한 새로 제조한 PBS 및/또는 혼화린(0.5 mg/mL)으로 세포를 신속하게 3회 세척하였다. 혼화린을 이용한 세척은 추후 분석에서 인간 THP-1 혈액 세포가 원하지 않는 세포 막-결합 단백질 배경을 피하기 위하여 요구된다. 분석 전에 37에서 혈청과 함께 새로운 배지 50uL에서 세포를 최종 배양하였다.

[0241] 3.2 형광 현미경 분석

[0242] 세포질 및 핵 세포 구획에서 형광 단백질 카고의 전달은 형광 램프(모델 U-LH100HGAPO) 및 상이한 필터가 장착된 Olympus IX70TM 현미경(일본)으로 관찰되었다. Olympus filter U-MF2TM(C54942-Exc495/Em510)을 사용하여 GFP 및 FITC-표지 항체 형광 신호를 관찰하였다. Olympus 필터 HQ-TRTM(V-N41004-Exc555-60/Em645-75)을 사용하여 mCherry™ 및 GFP 항체 형광 신호를 관찰하였다. Olympus 필터 U-MWU2TM(Exc330/Em385)을 사용하여 DAPI 또는 Blue Hoechst 형광 신호를 관찰했다. 50uL의 신선한 배지에서 배양된 세포를 상이한 배율(4배율 내지 40 배율)에서 현미경(명시야 및 형광)에 의해 직접 관찰하였다. CoolSNAP-PROTM 카메라(A02D874021 시리즈)를 사용하여 세포를 관찰하고 Image-Plus™ 소프트웨어를 사용하여 이미지를 얻었다.

[0243] 3.2a 세포 면역-표지

[0244] 부착 세포는 24-플레이트 웰(well)에서 웰당 1.5×10^5 세포의 멸균 유리 스트립에 도말하고 37°C에서 하룻밤 배양했다. 고정을 위하여, 세포를 실온에서 15분 동안 웰 당 500uL의 포름알데히드(3.7%v/v)로 배양하고 PBS로 5분 동안 3회 세척하였다. 침투를 위하여, 세포는 실온에서 10분 동안 웰 당 500uL의 트리톤™ X- 100(0.2%)로 배양하고 PBS로 5분 동안 3회 세척하였다. 차단을 위하여, 실온에서 60분 동안 웰 당 500uL의 PBS를 함유하는 1% BSA(PBS/BSA)로 배양하였다. 일차 쥐 단일클론항체를 PBS/BSA(1%)로 희석하였다. 세포를 30uL의 일차 항체로 하룻밤 배양하였다. 세포를 PBS로 5분간 3회 세척하였다. 이차 항체를 PBS/BSA(1%)로 희석하고 세포를 암실에서 실온으로 30분간 250uL의 이차 항체에서 배양하였다. 세포를 PBS로 5분간 3회 세척하였다. 세포가 함유하는 유리 스트립을 DAPI가 있는 10uL의 장착 매질 Fluoroshield™와 함께 현미경 유리 슬라이드에 장착하였다.

[0245] 3.3 유동 세포 계측법

[0246] 유동 세포 계측법(Accuri C6, Becton, Dickinson and Company(BD))을 사용하여 GFP의 형광을 정량화하였다. 처리된 세포에서 형광 단백질의 내재화로 인한 증가된 형광을 정량화하기 위한 기준선을 확립하는데 미처리된 세포를 사용하였다. "평균%" 또는 "포스 세포(%)"의 미처리된 세포의 최대 형광 이상의 형광 신호와 세포의 비율은 양성 형광 세포를 식별하는데 사용되었다. "상대 형광 강도(FL1-A)"는 셔틀제로 형광 단백질을 전달한 후 형광 신호를 갖는 각 세포의 모든 형광 강도의 평균에 해당한다. 또한, 세포(크기 및 입도)에 상응하는 유동 세포 계측법에 의해 관찰된 결과를 분석하였다. 세포 독성(% 세포 생존도)은 미처리 세포에 비해 상대적으로 처리된 세포의 전체 결과에서 세포의 백분율을 비교하여 관찰하였다.

[0247] 3.3a 생존도 분석

[0248] 레자주린(reazurine) 시험을 세포의 생존도를 평가하였다. 레자주린은 대사 활성 세포에서 미토콘드리아 효소에 의해 청색에서 분홍색으로 전환되는 나트륨 염착색제이다. 생존 가능한 세포에서만 발생하는 이 비색 변환(colorimetric conversion)은 생존 가능한 세포의 비율을 정량화하기 위해 분광 분석으로 측정될 수 있다. 레자주린의 저장 용액을 1mg/100mL의 물에서 준비하고 4°C에서 보관하였다. 저장 용액 25uL를 96-웰 플레이트의 각 웰에 첨가하고, 세포를 분광 분석 전에 37에서 1시간 동안 배양하였다. 레자주린 효소 반응에 사용 된 배양 시간은 세포의 양 및 웰에 사용된 배지의 양에 의존된다.

[0249] 3.4 GFP의 구성 및 아미노산 서열

[0250] GFP-코딩 유전자는 N-말단에 6x 히스티딘 태그 및 세린/글리신 리치 링커, 그리고 세린/글리신 리치 링커 및 정지 코돈(-)을 함유하는 GFP 단백질을 C-말단에서 발현시키기 위하여 T5 세균 발현 벡터에 복제된다. 제조함 GFP 단백질을 실시예 1.4에 개시된 바와 같이 정제하였다. GFP 구성물의 서열은 다음과 같다:

MHHHHHHGGGGSGGGSGGASTGTGIRMSKGEEELFTGVVPILVELGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTGFICTTGKLPVPW
 PTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQUDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEQDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLE
 YNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYKGGGGGGGGSGWTRASSGGREIS- [서열번호 60]

[0251]

(MW= 31.46 kDa; pI=6.19)

[0253]

세린/글리신 리치 링커는 굵은 글씨로 표시하였다.

[0254]

GFP 서열은 밑줄로 표시하였다.

[0255]

3.5 HeLa 세포에서 CM18-TAT-Cys에 의한 GFP 형질 도입: 형광 현미경

[0256]

HeLa 세포를 배양하고 실시예 3.1에 개시된 단백질 형질 도입 분석법으로 시험하였다. 간략하게, GFP 재조합 단백질을 0, 3 또는 5uM의 CM18-TAT와 함께 배양한 다음, 1시간 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세포는 실시예 3.2에서 개시된 바와 같이 명시야 및 형광 현미경으로 관찰되었다. 도 5에 제시된 결과는 GFP가 셔틀체 CM18-TAT의 존재하에 HeLa 세포에 세포 내 전달 된 것을 보여준다.

[0257]

3.6 HeLa 세포에서 셔틀체에 의한 GFP 형질 도입: 용량 반응(CM18-TAT-Cys, dCM18-TAT-Cys, GFP) 및 세포 생존 능력

[0258]

HeLa 세포를 배양하고 실시예 3.1 내지 3.3에서 개시된 단백질 형질 도입 분석법으로 시험하였다. 간략하게, GFP 재조합 단백질을 상이한 농도의 CM18-TAT-Cys 또는 이랑체화(dimerized) 된 CM18-TAT-Cys(dCM18-TAT-Cys)와 함께 배양한 다음, 1시간 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 그 결과를 표 3.1 및 도 6에 나타내었다.

[표 3.1]

용량 반응(CM18-TAT) 및 세포 생존도, 도 6A 및 도 6B의 데이터

셔틀체	세포	농도 (uM)	도 6A		세포 생존도(%) (± 표준 편차.; n=3)
			평균 (%) (n=3)	표준 편차	
CM18-TAT-Cys	HeLa	0	0.69	0.12	95 ± 4
	HeLa	0.5	8.67	0.96	88.4 ± 6
	HeLa	1	20.03	2.55	90 ± 6
	HeLa	3	31.06	5.28	91 ± 5
	HeLa	5	36.91	4.33	90 ± 7

[0259]

표 3.1 및 도 6A는 CM18-TAT-Cys가 없거나 5, 3, 1, 0.5uM의 경우 GFP(5uM)와 형질 도입된 HeLa 세포의 형광 강도를 유동 세포 분석한 결과를 나타낸다. 해당 세포 특성 데이터는 표 3.1 및 도 6B에 제시되어 있다. 이러한 결과는 셔틀체 CM18-TAT-Cys가 용량-의존적 방식으로 GFP의 형질 도입 효율을 증가 시킨다는 것을 시사한다.

[표 3.2]

용량 반응(GFP), 도 7A 및 도 7B의 데이터

셔틀체	세포	셔틀체 농도 (uM)	GFP 농도 (uM)	평균 (%) (n=3)	표준 편차
대조군	HeLa	0	10	0.93	0.08
CM18-TAT-Cys	HeLa	5	10	37.1	4.29
	HeLa	5	5	21.1	2.19
	HeLa	5	1	8.56	1.91
대조군	HeLa	0	10	0.91	0.09
dCM18-TAT-Cys	HeLa	2.5	10	34.2	3.42
	HeLa	2.5	5	22.2	3.17
	HeLa	2.5	1	9.38	2.11

[0261]

표 3.2 및 도 7은 사용하거나 사용하지 않은 5uM의 CM18-TAT-Cys(도 7A) 또는 2.5uM dCM18-TAT-Cys(도 7B)을 다양한 농도의 GFP(1에서 10uM)로 형질 도입된 HeLa 세포의 형광 강도의 유동 세포 계측 분석 결과를 보여준다.

[0263]

3.7 HeLa 세포에서의 GFP 형질 도입: CM18-TAT-Cys 및 CM18-Penetratin-Cys의 용량 반응, 및 다이머

[0264]

HeLa 세포를 배양하고 실시 예 3-1에서 개시된 단백질 형질 도입 분석으로 시험하였다. 간략하게, CM18-TAT-

Cys, CM18-Penetratin-Cys 및 각각의 다이머(dCM18-TAT-Cys, dCM18-Penetratin-Cys)의 상이한 농도 및 조합으로 GFP 재조합 단백질(5uM)을 공동-배양하고, 1시간 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세포를 실시예 3.3에서 개시된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석하였다. 결과는 표 3.3 및 도 8뿐 아니라 표 3.4 및 도 9에도 나타냈다.

[표 3.3]

도 8의 데이터

도 8의 도번	셔틀제	세포	농도 (uM)	평균 (%) (n=3)	표준 편차
대조군	셔틀제 없음	HeLa	0	0.43	0.08
1	CM18-TAT-Cys	HeLa	0.5	8.75	0.63
2	dCM18-TAT-Cys	HeLa	0.5	8.86	1.03
3	CM18-Penetratin-Cys	HeLa	3	0.59	0.11
4	dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	3	0.73	0.08
1 + 3	CM18-TAT-Cys + CM18-Penetratin-Cys	HeLa	0.5 3	19.52	2.18
2 + 3	dCM18-TAT-Cys + CM18-Penetratin-Cys	HeLa	0.5 3	22.44	3.29
1 + 4	CM18-TAT-Cys + dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	0.5 3	18.73	1.55
2 + 4	dCM18-TAT-Cys + dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	0.5 3	17.19	1.93

[0265]

표 3.3 및 도 8의 결과는 GFP의 형질 도입 효율이 셔틀제 CM18-TAT-Cys 및 dCM18-TAT-Cys를 사용하여 HeLa 세포에서 증가함을 보여준다(도 8의 막대 "1" 및 "2" 참조). CM18-Penetratin-Cys 또는 dCM18-Penetratin-Cys 단독(도 8에서 막대 "3" 또는 "4" 참조)을 사용하여 GFP 세포 내 전달은 관찰되지 않았지만, CM18-TAT-Cys와 CM18-Penetratin-Cys(모노머 또는 다이머)의 조합은 GFP 단백질 전달(도 8에서 가장 오른쪽에 있는 4개의 막대 참조)을 개선하였다.

[표 3.4]

도 9의 데이터

도 9의 도번	셔틀제	세포	농도 (uM)	평균 (%) (n=3)	표준 편차
대조군	셔틀제 없음	HeLa	0	0.51	0.07
1	CM18-TAT-Cys	HeLa	1	20.19	2.19
2	dCM18-TAT-Cys	HeLa	1	18.43	1.89
3	CM18-Penetratin-Cys	HeLa	3	0.81	0.07
4	dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	3	0.92	0.08
1 + 3	CM18-TAT-Cys + CM18-Penetratin-Cys	HeLa	1 3	30.19	3.44
2 + 3	dCM18-TAT-Cys + CM18-Penetratin-Cys	HeLa	1 3	22.36	2.46
1 + 4	CM18-TAT-Cys + dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	1 3	26.47	2.25
2 + 4	dCM18-TAT-Cys + dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	1 3	21.44	3.11

[0267]

표 3.4 및 도 9의 결과는 GFP의 형질 도입 효율이 셔틀제 CM18-TAT-Cys 및 dCM18-TAT-Cys를 사용하여 HeLa 세포에서 증가함을 보여준다(도 9의 막대 "1" 및 "2" 참조). CM18-Penetratin-Cys 또는 dCM18-Penetratin-Cys 단독(도 9에서 막대 "3" 또는 "4" 참조)을 사용하여 GFP 세포 내 전달은 관찰되지 않았지만, CM18-Penetratin-Cys와 dCM18-Penetratin-Cys(모노머 또는 다이머)의 조합은 GFP 단백질 전달(도 9에서 가장 오른쪽에 있는 4개의 막대 참조)을 개선하였다.

3.8 HeLa 세포에서 셔틀제에 의한 GFP 형질 도입: 대조군

[0269]

HeLa 세포를 배양하고 실시예 3.1에 개시된 단백질 형질 도입 분석법으로 실험하였다. 간략하게, GFP 재조합 단백질(5uM)을 하기 웨티드 각각 5uM과 함께 배양하고: TAT-Cys; CM18; Penetratin-Cys; TAT-Cys + CM18; Penetratin-Cys + CM18; and CM18-TAT-Cys, 1시간 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 명시야와 형광 현미경을 이용하여 GFP 형광을 시각화하였다. 현미경 결과(데이터는 표시되지 않음)는 GFP가 CM18-TAT-Cys를 사용하여 세포 내로 성공적으로 전달되었음을 나타냈다. 그러나 GFP는 단독으로(CM18, TAT-Cys, Penetratin-Cys) 또는 함께 사용하는(CM18+TAT-Cys, CM18+Penetratin-Cys) 단일 도메인 웨타이드를 사용하여 세포 내로 성공적으로 전달되지 않았다. 이러한 결과는 칼세인 엔도좀 탈출 검정과 관련하여 표 2.1 및 2.2에 제시된 결과와 일치한다.

[0271] 실시예 4[0272] **TAT-GFP 형질 도입 효율을 향상시키는 웨타이드 셔틀제**

[0273] 실시예 3에서의 실험은 셔틀제가 GFP를 세포 내로 전달할 수 있는 능력을 나타냈다. 본 실시예에 제시된 실험은 셔틀제가 또한 CPD(TAT-GFP)에 융합된 GFP 카고 단백질의 세포 내 전달을 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

[0274] **4.1 TAT-GFP의 구조 및 아미노산 서열**

[0275] 실시예 3.4에 개시된 6x 히스티딘 태그 및 GFP 서열사이에 복제된 TAT 유전자는 제외된다.

[0276] 6x 히스티딘 태그, TAT, GFP 및 정지 코돈(–)은 세린/글리신 리치 링커와 분리된다. 재조합 TAT-GFP 단백질은 실시예 1.4에 개시된 바에 따라 정제된다. TAT-GFP 구성의 서열은 다음과 같다:

MHHHHHHGGGGSGGGGGGGASTGTGRKKRRQRRPPQGGGGSGGGGGGGGTGIRMSKGEEELFTGVVPILVELGDGVNGHFKFSVS
 GEGEGDATYGKLTLEKICCTTGKLPVWPPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFE
 GDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNYH
 LSTQALSASKDPNEKRDHMLVLEFVTAAGITLGMDELYKGGSGGGSGGGSGWIRASSGGREIS-

[0277] [서열번호 61]

[0278] (MW= 34.06 kDa ; pI=8.36)

[0279] TAT 서열은 밑줄로 표시하였다.

[0280] 세린/글리신 리치 링커는 굵은 글씨로 표시하였다.

[0281] **4.2 HeLa 세포에서 CM18-TAT-Cys에 의한 TAT-GFP 형질 도입: 형광 현미경에 의한 시각화**

[0282] HeLa 세포를 배양하고 실시예 3.1에 개시된 단백질 형질 도입 분석법으로 시험하였다. 간략하게, TAT-GFP 재조합 단백질(5uM)을 3uM의 CM18-TAT-Cys와 함께 항온 배양한 다음, 1시간 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세포 및 GFP 형광은 10배율 및 40배율에서 명시야 및 형광 현미경(실시예 3.2에 개시)에 의해 시각화되었고, 샘플 결과는 10에 나타내었다. 현미경분석 결과는 CM18-TAT-Cys가 없는 경우 TAT-GFP가 문헌에 보고 된 바와 같이, 저강도, 엔도좀 분포를 나타내는 것으로 나타났다. 대조적으로, TAT-GFP는 셔틀제 CM18-TAT-Cys의 존재하에 세포질 및 핵으로 전달된다.

[0283] 이론과 관계없이, TAT 웨타이드 자체는 TAT-GFP의 핵 국재화를 설명하는 핵 국재화 신호(NLS)로서 작용할 수 있다.

[0284] 이러한 결과는 CM18-TAT-Cys가 TAT-GFP 전달 효율을 증가시키고 엔도좀-포획된 TAT-GFP가 세포 내 및 핵 구획에 접근할 수 있음을 보여줍니다.

[0285] **4.3 HeLa 세포에서 CM18-TAT-Cys에 의한 TAT-GFP 형질 도입: 세포 형질 도입의 용량 반응 및 생존도**

[0286] HeLa 세포를 배양하고 실시예 3.1에 기재된 단백질 형질 도입 분석법으로 시험하였다. 간략하게, TAT-GFP-Cys 재조합 단백질(5uM)을 CM18-TAT-Cys(0, 0.5, 1, 3 또는 5uM)의 상이한 농도와 함께 항온 배양한 다음, 1시간 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세포를 실시예 3.3에서 기재된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과는 표 4.3 및 도 11A에 나와 있다. 상응하는 세포 독성 데이터도 도 11B에 제시되었다.

[표 4.3]

도 11A 및 도 11B의 데이터

셔틀제	세포	농도 (uM)	도 11A		도 11B	
			평균 (%) (n=3)	표준 편차	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n= 3)	
CM18-TAT-Cys	HeLa	0	11.79 ¹	1.16	100	
	HeLa	0.5	10.19	1.94	84.36 ± 5	
	HeLa	1	14.46	2.59	89.26 ± 5.26	
	HeLa	3	28.12	3.27	93.18 ± 6.28	
	HeLa	5	35.5 ²	3.59	95.14 ± 5.28	

[0287] ¹형광은 대부분 형광 현미경으로 확인한 바와 같이 엔도좀이었다.

[0289] ² 형광은 형광 현미경에 의해 확인 된 바와 같이 더 확산되고 또한 핵이었다.

[0290] **실시예 5:**

[0291] **펩타이드 셔틀 작용제는 GFP-NLS 전달 효율 및 핵 국재화를 증가시킴**

[0292] 실시예 3 및 4의 실험은 셔틀제이 GFP 및 TAT-GFP를 세포 내로 전달할 수 있는 능력을 나타낸다. 이 실시예에 제시된 실험은 셔틀제가 핵 국재화 신호(NLS)에 융합된 GFP 단백질 카고의 핵 전달을 용이하게 할 수 있음을 보여준다.

[0293] **5.1 GFP-NLS의 구성 및 아미노산 서열**

[0294] 최적화된 NLS 서열이 GFP 서열과 정지 코돈(-) 사이에서 복제된 것을 제외하고는 실시 예 3.4에 기재된 바와 같이 수행하였다. NLS 서열은 두 개의 세린/글리신 리치 링커에 의해 GFP 서열 및 정지 코돈으로부터 분리되었다. 재조합 GFP-NLS 단백질을 실시예 1.4에서 개시된 바와 같이 정제하였다. GFP-NLS 구성의 서열은 다음과 같다:

MHHHHHHGGGGSGGGSGGASTGIRMSKGEEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLTLKFICTTGKLPVPWPT
LVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVRNIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN
YNSHNVYIMADRKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYSTQSALSKDNEKRDHMVLLFVTAAGI
TLGMDELYKGGSGGGSGGGSGWIRA~~SSGGRSSDDEATAD~~SQHAAPPKKRKVGGSGGGSGGGSGGRGTEIS-[서열번호
62]

[0295] (MW = 34.85 kDa; pI = 6.46)

[0296] NLS 서열은 밑줄로 표시하였다.

[0297] 세린/글리신 리치 링커는 굵은 글씨로 표시하였다.

[0298] **5.2 5분 안에 HeLa 세포에서 CM18-TAT-Cys에 의한 GFP-NLS의 핵 전달: 형광 현미경에 의한 가시화**

[0299] HeLa 세포를 배양하고 실시예 3.1에 개시된 단백질 형질 도입 분석법으로 시험하였다. 간략하게, 5uM의 CM18-TAT-Cys와 함께 GFP-NLS 재조합 단백질(5uM)을 공동 배양한 다음, HeLa 세포에 노출시켰다. 10배율, 20배율 및 40배율에서 5분 후(실시예 3.2에서 개시된 바와 같이) 명시야 및 형광 현미경에 의해 GFP 형광을 시작화하고, 샘플 결과를 도 12에 나타내었다. 현미경 검사 결과, GFP-NLS는 5분간의 항온 배양 후에 셔틀제 CM18-TAT-Cys의 존재하에 핵을 제거하였다.

[0300] **5.3 HeLa 세포에서 CM18-TAT-Cys에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 투여된 세포의 용량 반응과 생존도**

[0301] HeLa 세포를 배양하고 실시예 3.1에 개시된 단백질 형질 도입 분석법으로 시험하였다. GFP-NLS 재조합 단백질(5uM)을 0, 0.5, 1, 3 또는 5 uM의 CM18-TAT-Cys와 함께 배양한 다음, 1시간 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세포를 실시예 3.3에 개시된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과를 표 5.1 및 도 13A에 나타내었다. 상응하는 세포 독성 데이터가 도 13B에 제시되어 있다.

[표 5.1]

도 13A 및 도 13B의 데이터

셔틀제	세포	농도 (uM)	도 13A		도 13B 세포 생존도 (%) (\pm 표준 편차; n= 3)
			평균 (%) (n=3)	표준 편차	
CM18-TAT-Cys	HeLa	0	0.90	0.12	100
	HeLa	0.5	9.81	1.63	87.6 \pm 4
	HeLa	1	18.42	2.47	93 \pm 8
	HeLa	3	28.09	3.24	94 \pm 5
	HeLa	5	32.26	4.79	93 \pm 4

[0302] 이러한 결과는 CM18-TAT-Cys가 HeLa 세포에서 GFP-NLS 전달 효율을 용량-의존적으로 증가시킬 수 있음을 보여준다.

[0303] **5.4 HeLa 세포에서의 CM18-TAT-Cys, CM18-Penetratin-Cys 및 이의 다이머에 의한 GFP-NLS 형질 도입**

[0304] HeLa 세포를 배양하고 실시예 3.1에 개시된 단백질 형질 도입 분석법으로 시험하였다. CM18-TAT-Cys, CM18-

Penetratin-Cys 및 각각의 다이머(dCM18-TAT-Cys, dCM18-Penetratin-Cys)의 상이한 농도 및 조합으로 GFP-NLS 재조합 단백질(5uM)을 공동 배양하고, 1시간 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세포를 실시예 3.3에 개시된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 그 결과를 표 5.2 및 표 5.3 및 도 14 및 도 15에 나타내었다.

[표 5.2]

도 14의 데이터

도 14의 도변	셔틀제	세포	농도 (uM)	평균 (%) (n=3)	표준 편차
대조군	셔틀제 없음	HeLa	0	0.41	0.10
1	CM18-TAT-Cys	HeLa	0.5	7.64	0.85
2	dCM18-TAT-Cys	HeLa	0.5	8.29	0.91
3	CM18-Penetratin-Cys	HeLa	3	0.43	0.08
4	dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	3	0.85	0.07
1 + 3	CM18-TAT-Cys + CM18-Penetratin-Cys	HeLa	0.5 3	21.1	2.47
2 + 3	dCM18-TAT-Cys + CM18-Penetratin-Cys	HeLa	0.5 3	19.22	2.73
1 + 4	CM18-TAT-Cys + dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	0.5 3	23.44	2.51
2 + 4	dCM18-TAT-Cys + dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	0.5 3	19.47	2.16

[0307]

[표 5.3]

도 15의 데이터

도 15의 도변	셔틀제	세포	농도 (uM)	평균 (%) (n=3)	표준 편차
대조군	셔틀제 없음	HeLa	0	0.44	0.12
1	CM18-TAT-Cys	HeLa	1	15.56	2.24
2	dCM18-TAT-Cys	HeLa	1	17.83	2.13
3	CM18-Penetratin-Cys	HeLa	3	0.68	0.05
4	dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	3	0.84	0.07
1 + 3	CM18-TAT-Cys + CM18-Penetratin-Cys	HeLa	1 3	27.26	3.61
2 + 3	dCM18-TAT-Cys + CM18-Penetratin-Cys	HeLa	1 3	25.47	3.77
1 + 4	CM18-TAT-Cys + dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	1 3	31.47	4.59
2 + 4	dCM18-TAT-Cys + dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	1 3	28.74	2.93

[0308]

표 5.2 및 5.3 및 도 14 및 15의 결과는 셔틀제 CM18-TAT-Cys 및 dCM18-TAT-Cys를 사용하여 HeLa 세포에서 GFP-NLS의 형질 도입 효율이 증가함을 나타낸다(도 14 및 15의 막대 "1" 및 "2" 참조). CM18-Penetratin-Cys 또는 dCM18-Penetratin-Cys 단독을 사용하여 GFP-NLS 세포 내 전달은 관찰되지 않았지만(도 14 및 도 15에서 막대 "3" 및 "4" 참조), CM18-TAT-Cys와 CM18-Penetratin-Cys의 조합(단량체 또는 다이머)은 GFP-NLS 세포 내 전달을 향상시켰다(도 14 및 도 15에서 가장 오른쪽에 있는 4개의 막대를 참조).

[0310]

5.5 HeLa 세포에서 셔틀제에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 5분 v. 1시간 배양; FBS 유무

[0311]

HeLa 세포를 배양하고 실시예 3.1에 개시된 단백질 형질 도입 분석법으로 시험하였다. GFP-NLS 재조합 단백질 (5uM)을 CM18-TAT-Cys (3.5uM) 단독 또는 dCM18-Penetratin-Cys (1uM)와 함께 배양하였다. 실시예 3.3에 개시된 바와 같이 유동 세포 분석을 하기 전에, 일반 DMEM 배지 ("DMEM") 또는 10% FBS ("FBS")를 함유하는 DMEM 배지에서 5분 또는 1시간 동안 배양하였다. 결과를 표 5.4 및 도 16에 나타내었다. 셔틀제 또는 GFP-NLS ("대조

군")로 처리하지 않은 세포 및 셔틀제 없이 GFP-NLS로 처리한 세포("GFP-NLS 5uM")를 대조군으로 사용하였다.

[표 5.4]

도 16의 데이터

셔틀제	도 16의 도번	세포	배지	배양 시간	셔틀제 농도 (uM)	평균 (%) (n=3)	표준 편차
셔틀제 없음(대 조군)	1	HeLa	DMEM	1h	0	0.59	0.09
GFP-NLS 단독	2	HeLa	DMEM	1h	0	1.19	0.31
CM18-TAT-Cys	3	HeLa	DMEM	1 h	3.5	20.69	1.19
	4	HeLa	FBS	1 h	3.5	13.20	0.82
CM18-TAT-Cys	5	HeLa	DMEM	5 min	3.5	20.45	4.26
	6	HeLa	FBS	5 min	3.5	10.83	1.25
셔틀제 없음 (대 조군)	1	HeLa	DMEM	1h	0	0.53	0.11
GFP-NLS 단독	2	HeLa	DMEM	1h	0	1.25	0.40
CM18-TAT-Cys + dCM18-Penetrat in-Cys	3	HeLa	DMEM	1 h	3.5 1	27.90	2.42
	4	HeLa	FBS	1 h	3.5 1	8.35	0.46
CM18-TAT-Cys + dCM18-Penetrat in-Cys	5	HeLa	DMEM	5 min	3.5 1	24.10	2.76
	6	HeLa	FBS	5 min	3.5 1	5.02	0.72

[0312]

표 5.4 및 도 16의 결과는 비교적 적은 양의 다이머 dCM18-Penetratin-Cys(1uM; "dCM18pen")를 CM18-TAT-Cys 단량체에 첨가하면 GFP-NLS 전달 효율이 향상됨을 보여준다. 세포 내 GFP-NLS 전달은 최소한 5분의 배양을 통하여 달성되며, FBS의 존재하에서 전달은 여전히 가능하다(비록 감소되더라도).

[0313]

5.6 THP-1 혼탁 세포에서 셔틀제에 의한 GFP-NLS 형질 도입

[0314]

셔틀제가 GFP-NLS를 세포 내로 전달하는 능력은 혼탁액에서 성장하는 급성 단핵 세포 백혈병 세포계인 THP-1 세포에서 시험하였다. THP-1 세포를 배양하고(실시예 1 참조), 실시예 3.1에 기재된 단백질 형질 도입 분석법으로 시험하였다. GFP-NLS 재조합 단백질(5uM)을 실시예 3.3에 개시된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하기 전에, 1uM CM18-TAT-Cys의 존재 또는 부재하에 공동 배양하고 5분 동안 THP-1 세포에 노출시켰다. 그 결과를 표 5.5 및 도 17A에 나타내었다. 상응하는 세포 독성 데이터가 도 17B에 제시되어 있다.

[표 5.5]

도 17A 및 도 17B의 데이터

셔틀제	세포	셔틀제 농도(uM)	도 17A		도 17B
			평균 (%) (n=3)	표준 편차	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n= 3)
셔틀제 없음 (대 조군)	THP-1	0	1.23	0.16	95 ± 4
GFP-NLS 단독		0	2.49	0.37	96 ± 3
CM18-TAT-Cys		1	38.1	4.16	85 ± 6

[0315]

표 5.5 및 도 17의 결과는 혼탁액에서 성장한 인간 단구 세포계에 세포 내로 단백질 카고를 전달하는 셔틀제의 능력을 증명한다.

[0316]

실시예 6:

[0317]

펩타이드 셔틀제는 FITC-표지된 항-튜불린 항체의 형질 도입 효율을 증가시킴

[0318]

실시예 3 내지 5의 실험은 셔틀제가 GFP, TAT-GFP 및 GFP-NLS의 전달 효율을 증가시키는 능력을 나타내었다. 본 실험에서 제시된 실험은 셔틀제가 더 큰 단백질 카고: FITC-표지된 항-튜불린 항체를 전달할 수 있음을 보여준다. FITC-표지된 항-튜불린 항체는 (Abcam, ab64503)로부터 구입하였고, 추정된 분자량은 150KDa이다. 전달 및 혼미경 프로토콜은 실시예 3에 설명되어져 있다.

[0319]

6.1 HeLa 세포에서 CM18-TAT-Cys에 의한 기능성 항체의 전달: 혼미경에 의한 시작화

[0320]

FITC-표지된 항-튜불린 항체(0.5uM)를 5uM의 CM18-TAT-Cys와 함께 항온 배양하고 1시간 동안 HeLa 세포에 노출

시켰다. 항체 전달은 명시야(20배율) 및 형광 혼미경(20배율 및 40배율)에 의해 시작화되었다. 도 18에 나타낸 바와 같이, 세포질 내의 형광성 튜불린 섬유가 시작화되어 세포 내부의 항체의 기능을 입증하였다.

[0323] 6.2 CM18-TAT-Cys, CM18-Penetratin-Cys 및 HeLa 세포의 다이머에 의한 기능성 항체의 형질 도입: 유동 세포 계측법

[0324] HeLa 세포를 배양하고 실시예 3.1에 개시된 단백질 형질 도입 분석법으로 시험하였다. 3.5uM의 CM18-TAT-Cys, CM18-Penetratin-Cys 또는 dCM18-Penetratin-Cys, 또는 3.5uM의 CM18-TAT-Cys 및 3.5uM의 CM18-TAT-Cys와 함께 공동 배양한 FITC-표지된 항-튜불린 항체(0.5uM) 0.5uM의 dCM18-Penetratin-Cys로 처리하고 HeLa 세포에 1시간 동안 노출시켰다. 세포를 실시예 3.3에 개시된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과를 표 6.1 및 도 19A에 나타내었다. 상응하는 세포 독성 데이터는 도 19B에 제시되어 있다.

[표 6.1]

도 19A 및 도 19B의 데이터

도메인	셔틀체	세포	셔틀체 농도 (uM)	도 19A		도 19B 세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n= 3)
				평균 (%) (n=3)	표준 편차	
-	셔틀체 없음 ("대조군")	HeLa	0	0.9	0.06	98 ± 1.0
-	항원 단독("antibody")	HeLa	0	2.66	0.61	96 ± 3.4
ELD-CPD	CM18-TAT-Cys	HeLa	3.5	36.56	4.06	95 ± 4.06
	CM18-Penetratin-Cys	HeLa	3.5	53.05	9.5	73 ± 9.5
ELD-CPD dimer	dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	3.5	50.23	9.12	74 ± 9.0
ELD-CPD + ELD-CPD dimer	CM18-TAT-Cys + dCM18-Penetratin-Cys	HeLa	3.5 0.5	47.19	8.5	93 ± 8.5

[0325]

[0326] 표 6.1 및 도 18 및 19의 결과는 CM18-TAT-Cys 및 CM18-Penetratin-Cys 모두가 FITC-표지 항-튜불린 항체의 세포 내 전달을 촉진한다는 것을 보여준다. 실시예 3 내지 5에서 GFP, TAT-GFP 및 GFP-NLS의 결과와 대조적으로, CM18-Penetratin-Cys는 (CM18-TAT-Cys 없이) 단독 사용시 항체 카고를 세포 내로 전달할 수 있다. 그러나 CM18-TAT-Cys 및 dCM18-Penetratin-Cys의 조합은 CM18-Penetratin-Cys 단독에 비해 높은 세포내 전달을 허용하고 CM18-Penetratin-Cys 및 dCM18-Penetratin-Cys와 비교하여 적은 세포 독성을 보인다(도 19a 및 도 19b 참조).

[0327] 실시예 7:

[0328] CM18-TAT-Cys는 세포 내 플라스미드 DNA 전달을 가능하게 하지만 플라스미드 발현에 약함

[0329] 플라스미드 DNA를 세포 내로 전달하는 CM18-TAT-Cys 셔틀체의 능력을 본 실시예에서는 GFP를 코딩하는 플라스미드를 사용하여 HEK293A 세포에서 시험하였다.

[0330] 7.1 HEK293A 세포에서의 형질 감염 분석

[0331] 형질 감염 분석 하루 전, 지수 성장 단계의 포유류 세포(HEK293A)를 수확하고 24-웰 플레이트 (웰당 50,000 세포)에 배치하였다. 세포를 FBS를 함유하는 적절한 성장 배지에서 하룻밤 배양하였다. 다음날, 별도의 무균 1.5mL 튜브, Cy5TM 형광 색소로 분류된 pEGFP는 최종 100uL 볼륨에서 신선한 PBS에 CM18-TAT-Cys(0.05, 0.5, 또는 5uM)와 37°C에서 10분 동안 혼합되었다. 웰내의 배지를 제거하고 세포를 PBS로 3회 신속하게 세척하고 FBS가 없는 따뜻한 배지 500uL를 첨가하였다. pEGFP 및 CM18-TAT-Cys 용액을 세포에 첨가하고 37에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 PBS로 세척하고 FBS를 함유하는 신선한 배지를 첨가하였다. 세포를 37에서 배양한 다음, 실시예 3에 개시된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석을 수행하였다.

[0332] 7.2 CM18-TAT-Cys를 이용한 플라스미드 DNA 전달

[0333] 플라스미드 DNA(pEGFP)는 제조자의 지시(Mirus Bio LLC)에 따라 Cy5TM 염료로 표지였다. Cy5TM 부분은 표준 형질 감염 프로토콜(데이터 표시되지 않음)을 사용하여 레이블이 지정되지 않은 플라스미드와 비교할 때 형질 감염 효율에 영향을 미치지 않는다. 유동 세포 계측 분석은 성공적인 세포 전달, DNA 전사 및 단백질 발현에 해당하는 Cy5TM 방출(DNA 세포 내 전달 및 GFP 방출에 해당)의 정량화를 허용하였다. 결과는 표 7.1과 도 20에 나타내었다.

[표 7.1]

도 20의 데이터

샘플	DNA (ng)	Cy5™ 형광 색소		GFP 발현	
		평균 Cy5™ 신호 (n=3)	표준 편차	평균 (GFP 신호가 있는 셀의 %; n=3)	표준 편차
pEGFP-Cy5 단독	500	914	0	0.0%	n/a
CM18-TAT-Cys, 0.05 uM	500	1450	120	0.0%	n/a
CM18-TAT-Cys, 0.5 uM	500	8362	294	0.0%	n/a
CM18-TAT-Cys, 5 uM	500	140 497	3977	0.1%	n/a

[0334]

[0335]

표 7.1 및 도 20에 나타낸 결과는 CM18-TAT-Cys가 0.05, 0.5 및 5 uM 농도에서 사용되는 경우 DNA 단독으로 배양된 세포("pEGFP-Cy5"). 그러나, GFP의 발현은 세포에서 검출되지 않았으며, 이는 플라스미드 DNA가 세포질 구획에 접근하여 핵 국제화 확인이 가능하다는 것을 의미한다. 이론과 관계없이, 플라스미드 DNA가 세포질 구획으로 빠져 나가는 것을 막아 엔도좀에서 대량으로 분리될 가능성이 있다. Salomone et al., 2013은 세포 내로 플라스미드 DNA를 전달하기 위해 CM18-TAT11 하이브리드 단백질의 사용을 보고했다. 그들은 엔도좀에서 성공적으로 방출되어 핵으로 전달되는 플라스미드 DNA의 비율이 루시퍼라제 효소의 강력한 활성으로 인해 과대평가될 수 있기 때문에 세포질/핵 전달 효율을 정량화하는데 이상적이지 않은 형질 전환 효율을 평가하기 위해 루시퍼라제 효소 리포터 분석을 사용했다. 이와 관련하여 Salomone et al., 2013의 저자들은 루시퍼라제의 발현이 (알몸의) DNA 분자를 소포로 다양으로 포획하는 것과 함께 발생한다는 점을 지적했는데 이는 표 7.1과 그림 20에 나와 있는 결과와 일치합니다.

[0336]

실시예 8:

[0337]

셔틀제에 히스티딘-리치 도메인을 첨가시 GFP-NLS 전달 효율이 더욱 향상됨

[0338]

8.1 HeLa 세포에서 His-CM18-TAT-Cys에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 현미경으로 가시화

[0339]

GFP-NLS(5uM, 실시예 5 참조)를 5uM의 CM18-TAT-Cys 또는 His-CM18-TAT와 함께 항온 배양하고 1시간 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세포 내로 전달된 GFP-NLS의 핵 형광은 형광 현미경에 의해 확인되었으며(데이터는 표시되지 않음), 이는 핵에 GFP-NLS가 성공적으로 전달되었음을 나타낸다.

[0340]

8.2 HeLa 세포에서 His-CM18-TAT에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 유동 세포 계측 분석

[0341]

HeLa 세포를 배양하고 실시예 3.1에 기재된 단백질 형질 도입 분석법으로 시험하였다. GFP-NLS(5uM)를 0, 1, 3 또는 5uM의 CM18-TAT-Cys 또는 His-CM18-TAT와 함께 항온 배양하고 1시간 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세포를 실시예 3.3에 기재된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과는 표 8.1 및 도 21A에 나와 있다. 상응하는 세포 특성 데이터는 도 21B에 제시되어 있다.

[표 8.1]

도 21A 및 21B의 데이터

셔틀제	세포	셔틀제 농도(uM)	도 21A		도 21B
			GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (n=3)	표준 편차	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)
대조군 (셔틀제 없음, GFP-NLS 없음)	HeLa	0	0.63	0.10	96 ± 3.17
		0	0.93	0.26	97 ± 2.05
		5	20.54	3.51	81 ± 6.34
		3	15.66	2.18	89 ± 5.37
GFP-NLS 단독		1	8.64	1.11	94 ± 4.28
		0	0.51	0.28	95 ± 4.19
		0	1.07	0.42	96 ± 3.16
		5	41.38	4.59	86 ± 4.59
His-CM18-TAT		3	29.58	3.61	91 ± 5.18
		1	8.45	1.83	95 ± 3.55

[0342]

[0343] 두드러지게, 표 8.1 및 도 21의 결과는 His-CM18-TAT가 CM18-TAT-Cys와 비교하여 3uM 및 5uM 농도에서 약 2 배의 GFP-NLS 단백질 전달 효율을 증가시킬 수 있음을 보여준다. 이러한 결과는 ELD 및 CPD를 포함하는 셔틀체에 히스티딘-리치 도메인을 첨가하면 폴리펩타이드 카고 형질 도입 효율을 상당히 증가시킬 수 있음을 시사한다. 그렇지 않으면 또는 병행하여, 셔틀체를 CPD에 융합된 히스티딘-리치 도메인을 함유하는 추가의 독립적인 합성 펩타이드와 결합시키면(그러나 ELD가 결여됨) 단백질 전달에 유사한 이점을 제공할 수 있으며, 히스티딘-리치 도메인은 셔틀체의 농도와 독립적으로 다양하거나 조절될 수 있다. 이론과 관계없이, 히스티딘-리치 도메인은 엔도 존에서 양성자 스폰지로서 작용하여 엔도존 막 불안정화의 또 다른 메커니즘을 제공할 수 있다.

[0344] 실시예 9:

[0345] His-CM18-PTD4는 GFP-NLS, mCherryTM-NLS 및 FITC-표지된 항-튜불린 항체의 형질 도입 효율 및 핵 전달을 증가시킴

9.1 단백질 형질 도입 프로토콜

프로토콜 A: 세포 배양 배지에서의 전달을 위한 단백질 형질 도입 분석

[0346] 형질 도입 분석을 수행하기 하루 전, 지수 성장 단계의 세포를 수확하고 96-웰 플레이트(웰당 20,000 세포)에 배치하였다. 세포를 FBS를 함유하는 적절한 성장 배지에서 하룻밤 배양하였다(실시예 1 참조). 다음날, 별도의 멸균 1.5-mL 투브에서 목적하는 농도의 카고 단백질을 37에서 10분간 미리 혼합(사전 배양) 한 후 50uL 새로운 혈청 없는 배지(별도의 규정이 없는) 웰의 배지를 제거하고 미리 37로 가온 한 PBS로 세포를 1 내지 3 회(사용된 세포 유형에 따라) 세척하였다. 세포를 카고 단백질/셔틀체 혼합물과 함께 37에서 원하는 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 PBS 및 / 또는 미리 37로 가온 한 혼합물(0.5mg/mL)으로 3회 세척하였다. 혼합물을 이용한 세척은 후속 분석(현미경 검사 및 유동 세포 계측법)에서 원하지 않는 세포막-결합 단백질 배경을 피하기 위해 인간 THP-1 혈액 세포에 사용되었다. 분석하기 전에 37에서 혈청과 함께 새로운 배지 50uL에서 세포를 최종 배양하였다.

프로토콜 B: PBS의 부착 세포에 대한 단백질 형질 도입 분석

[0347] 형질 도입 분석을 수행하기 하루 전, 지수 성장 단계의 세포를 수확하고 96-웰 플레이트(웰당 20,000 세포)에 배치하였다. 세포를 혈청을 함유하는 적절한 성장 배지에서 하룻밤 배양하였다(실시예 1 참조). 다음날, 별도의 멸균 1.5-mL 투브에서 셔틀체를 상온에서 멸균 중류수에 희석시켰다(카고가 핵산이거나 핵산을 포함하는 경우, 뉴클레아제가 없는 물이 사용되었다). 그 다음에 카고 단백질을 셔틀체에 첨가하고, 필요하다면, 멸균된 PBS를 첨가하여 세포를 덮기에 충분한 최종 부피의 셔틀체 및 카고의 원하는 농도(예를 들어, 웰당 10 내지 100uL 96-웰 플레이트)를 얻었다하였다. 셔틀체/카고 혼합물을 즉시 실험을 위해 사용되었다. 적어도 3개의 대조군이 각 실험에 포함되었다: (1) 셔틀체 단독 (예를 들어, 시험된 최고 농도에서); (2) 카고 단독; (3) 카고 또는 셔틀체 없이. 웰 내의 배지를 제거하고 미리 37로 가온한 PBS로 세포를 한 번 세척 한 다음 셔틀체/카고 혼합물을 첨가하여 원하는 시간 동안 모든 세포를 덮었다. 웰 내의 셔틀체/카고 혼합물을 제거하고, 세포를 PBS로 1회 세척하고, 신선한 완전 배지를 첨가하였다. 분석 전에, 세포를 PBS로 1회 세척하고 신선한 완전한 배지를 첨가하였다.

프로토콜 C: PBS의 혼탁 세포에 대한 단백질 형질 도입 분석

[0348] 형질 도입 분석을 수행하기 하루 전, 지수 성장 단계의 혼탁 세포를 수확하고 96-웰 플레이트 (웰 당 20,000 세포)에 배치하였다. 세포를 혈청을 함유하는 적절한 성장 배지에서 하루밤 배양하였다(실시예 1 참조). 다음날, 별도의 멸균 1.5-mL 투브에서 셔틀체를 상온에서 멸균 중류수에 희석시켰다(카고가 핵산이거나 핵산을 포함하는 경우, 뉴클레아제가 없는 물이 사용되었다). 이어서, 카고 단백질을 셔틀체에 첨가하고, 필요하다면, 멸균된 PBS 또는 세포 배양 배지(혈청 없는)를 첨가하여 세포를 재현탁하기에 충분한 최종 부피의 셔틀 작용제 및 화물의 원하는 농도(예를 들어, 96-웰 플레이트에서 웰당 10 내지 100uL)를 얻었다. 셔틀체/카고 혼합물을 즉시 실험을 위해 사용되었다. 적어도 3개의 대조군이 각 실험에 포함되었다: (1) 셔틀체 단독 (예를 들어, 시험된 최고 농도에서); (2) 카고 단독; (3) 카고 또는 셔틀체 없이. 세포를 400g에서 2분 동안 원심 분리 한 후, 배지를 제거하고 세포를 미리 37로 가온한 PBS에 재현탁시켰다. 세포를 400g에서 2분간 다시 원심 분리하고, PBS를 제거하고, 세포를 셔틀체/카고 혼합물에 재현탁시켰다. 원하는 배양 시간 후 100uL의 완전한 배지를 세포에 직접 첨가하였다. 세포를 400g에서 2분 동안 원심 분리하고 배지를 제거하였다. 펠렛을 재현탁하고 미리 37로 가온한 PBS 200uL로 세척하였다. 또 다른 원심 분리 후, PBS를 제거하고 세포를 100uL의 완전한 배지에 재현탁시켰다. 마지막 두 단계는 분석 전 한 번 반복되었다.

[0353] 9.2 프로토콜 A 또는 B를 사용하여 HeLa 세포에서 His-CM18-PTD4에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 유동 세포 계측법

[0354] 셔틀체 형질 도입 효율에 대한 상이한 프로토콜의 효과를 비교하기 위해, HeLa 세포는 배양되고, 실시 예 9.1에 개시된 바와 같이 프로토콜 A 또는 B를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 시험되었다. 간략히, GFP-NLS 재조합 단백질(5uM, 실시 예 5.1 참조)을 프로토콜 A를 사용하여 10uM의 His-CM18-PTD4와 공동 배양하고 1시간 동안 HeLa 세포에 노출시키거나 프로토콜 B를 사용하여 35uM의 His-CM18-PTD4와 함께 배양하고 10초 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세포를 실시 예 3.3에서 개시된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용시켰다. 결과는 표 9.1과 도 22A에 나와있다("Pos cells(%)"는 GFP 신호를 방출하는 세포의 백분율이다).

[표 9.1]

단백질 형질 도입 프로토콜 A 및 B의 비교: 도 22A의 데이터

프로토콜	셔틀체	세포	셔틀체 농도 (uM)	GFP-NLS 의 농도 (uM)	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)
B	없음("대조군")	HeLa	0	5	0.53 ± 0.07	100
A	His-CM18-PTD4	HeLa	10	5	25.4 ± 3.6	96.4 ± 2.7
B	His-CM18-PTD4	HeLa	35	5	78.3 ± 5.3	94.6 ± 0.4

[0355]

[0356] 상기 결과는 프로토콜 A와 비교하여 프로토콜 B를 사용하여 셔틀체 His-CM18-PTD4를 사용하여 카고 GFP-NLS에 대한 보다 높은 단백질 형질 도입 효율을 얻었음을 보여준다.

[0357] 9.3 프로토콜 B를 사용하여 HeLa 세포에서 His-CM18-PTD4에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 유동 세포 계측법

[0358]

단백질 형질 도입 효율에 대한 His-CM18-PTD4 농도의 효과를 평가하기 위해 용량 반응 실험을 수행하였다. HeLa 세포를 배양하고 실시 예 9.1의 프로토콜 B에 기재된 단백질 전달 분석에서 시험하였다. 간략히, GFP-NLS 재조합 단백질 (5uM, 실시 예 5.1 참조)을 0, 50, 35, 25 또는 10uM의 His-CM18-PTD4와 함께 항온 배양한 다음, 10초 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세포를 실시 예 3.3에서 기술 된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과는 표 9.2 및 도 22B에 나타냈다.

[표 9.2]

프로토콜 B를 사용한 셔틀체의 용량 반응: 도 22B의 데이터

프로토콜	셔틀체	세포	셔틀체의 농도 (uM)	GFP-NLS 의 농도 (uM)	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)	
B	없음 ("대조군")	HeLa	0	5	0.13 ± 0.1	100 ± 0	
			50	5	73.2 ± 5.2	69.2 ± 2.7	
	His-CM18-PTD4		35	5	77.7 ± 7.8	79.6 ± 5.9	
			25	5	62.1 ± 6.1	95.3 ± 3.7	
			10	5	25.3 ± 3.6	96.3 ± 2.3	

[0359]

[0360] 상기 결과는 His-CM18-PTD4가 HeLa 세포에서 GFP-NLS 전달 효율을 용량 의존적으로 증가시킬 수 있음을 보여준다.

[0361] 9.4 프로토콜 B를 사용하여 HeLa 세포에서 His-CM18-PTD4에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 현미경으로 가시화

[0362]

GFP-NLS 재조합 단백질 (5uM, 실시 예 5.1 참조)을 35uM의 His-CM18-PTD4와 함께 항온 배양한 다음, 실시 예 9.1에 기재된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 10 초간 HeLa 세포에 노출시켰다. 이어서, 실시 예 3.2 및 3.2a에 기재된 바와 같이 형광 현미경 분석을 수행하였다.

[0363]

도 23 및 24에 도시된 샘플 결과에 대하여, HeLa 세포의 GFP 형광은 최종 세척 단계 후에 4배율, 20배율 및 40배율의 밝은 영역 및 형광 현미경에 의해 즉시 시각화되었다.

[0364]

도 23에서, A, B 및 C의 상부 패널은 각각 4배, 20배 및 40배 배율의 핵 라벨링(DAPI)을 나타내지만, 하부 패널은 상응하는 GFP-NLS 형광을 나타낸다. 패널 C에서 흰 삼각형 창은 핵(DAPI)과 GFP-NLS 신호 사이의 공동 표지 영역의 예를 나타냅니다. 패널 D에서, 상부 및 하부 패널은 HeLa 세포의 샘플 명시야 이미지를 나타내고, 중간

패널은 96-웰 플레이트에서 세포의 백분율을 나타내는 상응하는 FACS 분석 (실시 예 3.3에서 기술 된 바와 같이 수행된) GFP 신호가 있는 플레이트. 음성 대조군 샘플(즉, 어떠한 셔틀제 없이 GFP-NLS에 노출된 세포; 데이터는 나타내지 않음)에서 유의적인 GFP 형광은 관찰되지 않았다.

[0365] 도 24는 명시야 (패널 A) 및 형광 이미지 (패널 B)를 도시한다. 패널 B의 삽입은 상응하는 FACS 분석 (실시 예 3.3에 기재된 바와 같이 수행됨)의 결과를 나타내며, GFP 신호를 갖는 96-플레이트 웰 내의 세포의 백분율을 나타낸다. 음성 대조군 샘플(즉, 어떠한 셔틀제 없이 GFP-NLS에 노출된 세포; 데이터는 나타내지 않음)에서 유의적인 GFP 형광은 관찰되지 않았다.

[0366] 도 25에 도시된 샘플 결과에 대해, 실시 예 3.2에 기술된 바와 같이 형광 현미경에 의한 가시화 전에, 실시 예 3.2a에 기술된 바와 같이 HeLa 세포를 고정시키고, 투과성으로 만들고 면역 표지하였다. GFP-NLS는 일차 쥐 단일클론 항-GFP 항체(Feldan, # A017) 및 이차 염소 항-쥐 AlexaTM-594 항체 (Abcam # 150116)를 사용하여 표지하였다. 도 25의 상부 패널은 핵 표지 (DAPI)를 나타내고, 하부 패널은 GFP-NLS의 해당 표지를 나타낸다. 패널 A와 B는 각각 20배율과 40배율의 샘플 이미지를 보여준다. 흰 삼각형 창은 핵과 GFP-NLS 사이의 공동 표지 영역의 예를 나타낸다. 음성 대조군 샘플(즉, 어떠한 셔틀제 없이 GFP-NLS에 노출된 세포, 데이터는 나타내지 않음)에서 유의적인 GFP-NLS 표지는 관찰되지 않았다.

[0367] 도 26은 살아있는 세포의 6배 확대에서 공초점 현미경으로 캡처한 샘플 이미지를 보여준다. 도 26의 패널 A는 명시야 이미지를 도시하고, 패널 B는 대응하는 형광 GFP-NLS를 나타낸다. 패널 C는 패널 A 및 B의 이미지 사이의 오버레이이다. 음성 대조 샘플(즉, 셔틀제없이 GFP-NLS에 노출된 세포, 데이터는 나타내지 않음)에서 유의적인 GFP-NLS 형광은 관찰되지 않았다.

[0368] 9.4a **프로토콜 B를 사용하여 HeLa 세포에서 His-CM18-PTD4에 의한 FITC-표지된 항-튜불린 항체 형질 도입: 현미경에 의한 시각화**

[0369] FITC-표지된 항-튜불린 항체(0.5uM, Abcam, ab64503)를 50uM의 His-CM18-PTD4와 함께 배양한 다음, 실시 예 9.1에 기재된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 10 초간 HeLa 세포에 노출시켰다. 이어서, 세포를 실시 예 3.2 및 3.2a에 기술된 바와 같이 형광 현미경 분석에 적용하였으며, 최종 세척 단계 후에 HeLa 세포에서 항-튜불린 항체의 FITC 형광을 명시야 및 형광 현미경으로 즉시 20배율 확대하여 시각화하였다. 샘플 결과는 도 24C 및 24D에 도시된다. 음성 대조군 샘플(즉, 셔틀제없이 FITC-표지된 항-튜불린 항체에 노출된 세포; 데이터는 나타내지 않음)에서 유의한 FITC 형광은 관찰되지 않았다.

[0370] 전체적으로, 실시 예 9.4 및 9.4a의 결과는 GFP-NLS 및 FITC-표지된 항-튜불린 항체 카고가 성공적으로 전달되어 셔틀제 His-CM18-PTD4의 존재하에 HeLa 세포의 핵 및/또는 세포질에 전달되었다는 것을 보여준다.

[0371] 9.5 **HeLa 세포에서 His-CM18-PTD4에 의한 GFP-NLS 동역학적 형질 도입: 현미경에 의한 가시화**

[0372] GFP-NLS 재조합 단백질 (5uM, 실시 예 5.1 참조)을 50uM의 His-CM18-PTD4와 함께 항온 배양한 다음, 실시 예 9.1에 기재된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 10초간 HeLa 세포에 노출시켰다. 세척 단계 후, HeLa 세포의 GFP 형광은 시간의 다른 간격 후에 20배율로 형광 현미경(실시 예 3.2)에 의해 즉시 시각화되었다. 전형적인 결과는 형광 현미경 이미지가 45초, 75초, 100초 및 120초 후에 포착된 도 27에 나타냈다(각각 패널 A, B, C 및 D 참조).

[0373] 도 27A에 도시 된 바와 같이, 확산 세포성 GFP 형광은 일반적으로 45초 후에 관찰되었고, 많은 세포에서 핵에서 더 낮은 GFP 형광 영역을 보였다. 이러한 결과는 45초 후에 셔틀제를 통해 세포 내로 전달 된 GFP-NLS의 세포질 및 핵 분포가 우세하게 나타남을 시사한다. 도 27B 내지 27D는 His-CM18-PTD4 셔틀제 및 GFP-NLS 카고에 노출된 후 75초(패널 B), 100초(패널 C) 및 120초(패널 D)에서 세포 핵에 대한 GFP 형광의 점진적 재분배를 나타낸다. 음성 대조군 샘플(즉, 어떠한 셔틀제없이 GFP-NLS에 노출된 세포; 데이터는 나타내지 않음)에서 유의 한 세포성 GFP 형광은 관찰되지 않았다.

[0374] 실시 예 9.5의 결과는 GFP-NLS가 2분 동안 셔틀제 His-CM18-PTD4의 존재하에 HeLa 세포의 핵으로 성공적으로 전달되었음을 보여준다.

[0375] 9.6 **HeLa 세포에서 His-CM18-PTD4에 의한 GFP-NLS 및 mCherryTM-NLS 동시 형질 도입: 현미경으로 가시화**

[0376] mCherryTM-NLS 재조합 단백질을 실시 예 1.4에 기재된 바와 같이 박테리아 발현 시스템으로부터 제조, 발현 및

정제하였다. mCherryTM-NLS 재조합 단백질의 서열은 다음과 같다.

MHHHHHHGGGGSGGGSGGASTGIRMVKCEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGERPYEGTQAKLKVTKGGLP
FAWDILSPQFMYGSKAYVKH PADL PDYL KLSF PEGFKW ERMN FEDGGV VT VTDQSSLQDGEF IYKVKL RGTN FPDGQVMQKKT
MGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNVIKLDITSHNEDTYIVEQYERAEGRHSTGG
MDELYKGGSGGGSGGGSGWIRASSGR SSDDEATADSQHAAPPKKRKV GGSGGGSGGGSGGGRGTEIS [서열번호 73]

[0377]

[0378] (MW = 34.71 kDa; pI = 6.68)

[0379]

NLS 서열은 밑줄로 표시하였다.

[0380]

세린/글리신 리치 링커는 굵은 글씨로 표시하였다.

[0381]

GFP-NLS 재조합 단백질(5uM, 실시 예 5.1 참조) 및 mCherryTM-NLS 재조합 단백질(5uM)을 35uM의 His-CM18-PTD4와 함께 공동 배양한 다음, 실시 예 9.1에서 설명한 프로토콜 B를 사용하여 10 초 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세척 단계 후에, 세포는 실시 예 3.2에서 기술된 바와 같이 20배율 확대에서 명시야 및 형광 현미경에 의해 즉시 가시화되었다. 샘플 결과는 명시야(패널 A), DAPI 형광(패널 B), GFP-NLS 형광(패널 C), 및 mCherryTM-NLS 형광(패널 D)을 나타내는 상응하는 이미지가 도 28에 도시된다. 흰 삼각형 창은 세포핵에서 GFP-NLS와 mCherryTM 형광 신호 간의 공동 라벨링 영역의 예를 나타낸다. 음성 대조군 샘플(즉, 셔틀제없이 GFP-NLS 또는 mCherryTM에 노출된 세포, 데이터는 나타내지 않음)에서 유의한 세포성 GFP 또는 mCherryTM 형광은 관찰되지 않았다.

[0382]

이러한 결과는 GFP-NLS와 mCherryTM-NLS가 셔틀 에이전트 His-CM18-PTD4의 존재하에 HeLa 세포의 핵에 성공적으로 전달되었음을 보여준다.

[0383]

9.7 THP-1 혈탁 세포에서 His-CM18-PTD4에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 유동 세포 계측법

[0384]

서스펜션 세포의 핵에서 GFP-NLS를 전달하는 His-CM18-PTD4의 능력을 THP-1 세포를 사용하여 시험하였다. THP-1 세포를 배양하고 실시 예 9.1에서 기술된 바와 같이 프로토콜 A 및 C를 사용하여 단백질 전달 분석에서 시험하였다. GFP-NLS (5uM, 실시 예 5.1 참조)를 1uM의 His-CM18-PTD4와 공동 배양하고 THP-1 세포에 1 시간 동안 노출시켰다(프로토콜 A). 또는 5uM의 His-CM18-PTD4를 처리하고 THP-1 세포에 15초 동안 노출시켰다(프로토콜 C). 세포를 실시 예 3.3에서 기술된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과는 표 9.3과 그림 31에 나타냈다.

[표 9.3]

도 31의 데이터

프로토콜	셔틀제	세포	셔틀제의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)
C	셔틀제 없음("대조군")	THP-1	0	5	0.2 ± 0.03	99.1 ± 0.7
A	His-CM18-PTD4		1	5	14.2 ± 2.2	96.9 ± 3.6
C	His-CM18-PTD4		0.5	5	34.9 ± 3.8	82.1 ± 2.7
			5	5	64.1 ± 1.6	64.0 ± 4.1

[0385]

9.8 THP-1 세포에서 His-CM18-PTD4에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 현미경으로 가시화

[0386]

GFP-NLS 재조합 단백질(5uM, 실시 예 5.1 참조)을 5uM의 His-CM18-PTD4와 함께 항온 배양한 다음, 실시 예 9.1에 기재된 바와 같이 프로토콜 C를 사용하여 15초 동안 THP-1 세포에 노출시켰다. 세포를 실시 예 3.2에서 기술된 바와 같이 현미경으로 관찰하였다.

[0387]

도 32에 도시된 샘플 결과에 대하여, HeLa 세포의 GFP 형광은 최종 세척 단계 후에 명시야(상부 패널) 및 형광(하부 패널) 현미경으로 4배율, 10배율 및 40배율(각각 패널 A내지 C)에 의해 즉시 시각화되었다. 패널 C의 흰 삼각형 창은 명시야와 형광 이미지 간의 공동 라벨링 영역의 예를 나타낸다. 패널 D는 상응하는 FACS 분석(실시 예 3.3에 기재된 바와 같이 수행됨)의 전형적인 결과를 나타내며, 이는 GFP 신호를 갖는 96-플레이트 웰 내의 세포의 백분율을 나타낸다. 추가적인 결과가 도 33에 도시되어 있으며, 패널 A 및 B는 명시야 이미지를 나타내고, 패널 C 및 D는 상응하는 형광 이미지를 나타낸다. 흰 삼각형 창은 패널 A와 C, 패널 B와 D의 공동 표지

영역의 예를 나타낸다. 가장 오른쪽 패널은 해당 FACS 분석의 전형적인 결과를 보여준다(실시예 3.3에서 설명한대로 수행됨). 가장 오른쪽 패널은 해당 FACS 분석 (실시예 3.3에 기재된 바와 같이 수행됨)의 전형적인 결과를 나타내며, 이는 GFP 신호를 갖는 96-플레이트 웰 내의 세포의 백분율을 나타낸다.

[0389] 음성 대조군 샘플 (즉, 어떠한 셔틀제 없이 GFP-NLS에 노출된 세포; 데이터는 나타내지 않음)에서 유의한 세포 성 GFP 형광은 관찰되지 않았다.

[0390] 이 실시 예에서의 결과는 GFP-NLS가 셔틀제 His-CM18-PTD4의 존재하에 THP-1 세포에서 세포 내로 성공적으로 전달된다는 것을 보여준다.

[0391] 실시예 10:

[0392] 단일 도메인 펩타이드가 아닌 상이한 다중 도메인 셔틀제가 HeLa 및 THP-1 세포에서 GFP-NLS를 성공적으로 형질 도입

10.1 HeLa 세포에서 다른 셔틀 작용제에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 유동 세포 계측법

[0394] HeLa 세포를 배양하고 실시 예 9.1에 기재된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 단백질 형질 도입 분석으로 시험하였다. 간략하게, GFP-NLS 재조합 단백질(5uM, 실시예 5.1 참조)을 50uM의 상이한 셔틀제와 함께 항온 배양하고 10초 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세포를 실시예 3.3에서 기술된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과를 표 10.1 및 도 29A에 나타내었다. "Pos cells(%)"은 GFP 신호를 방출하는 모든 세포의 평균 백분율을 의미한다. 네거티브 대조군은 셔틀제 없이 GFP-NLS 재조합 단백질 (5uM)로 배양한 세포에 해당한다.

[표 10.1]

도 29A의 데이터

프로토 콜	셔틀제	세포	셔틀제의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)
B	셔틀제 없음 ("대조군")	HeLa	0	5	0	100
	His-CM18-TAT	HeLa	55.5 ± 3.6		35.2 ± 5.7	
	His-CM18-Transportan (TPT)	HeLa	33.2 ± 2.8		41.3 ± 3.3	
	TAT-KALA	HeLa	56.3 ± 3.6		95.6 ± 4.3	
	His-CM18-PTD4	HeLa	68 ± 2.2		92 ± 3.6	
	His-CM18-9Arg	HeLa	57.2 ± 3.9		45.8 ± 5.4	
	TAT-CM18	HeLa	39.4 ± 3.9		23.5 ± 1.1	
	His-C(LLKK) ₃ C-PTD	HeLa	76 ± 3.8		95 ± 2.7	
	4	HeLa	63 ± 1.64		98 ± 1.5	
	PTD4-KALA	HeLa	73.4 ± 4.12		91.4 ± 3.67	

[0395]

10.2 HeLa 세포에서 다양한 항온 처리 시간을 갖는 다양한 셔틀제에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 유동 세포 계측법

[0397] HeLa 세포를 배양하고 실시 예 9.1에 기재된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 시험하였다. 간단히 말해, GFP-NLS 재조합 단백질 (5 uM, 실시 예 5.1 참조)을 1, 2 또는 5일 동안 10 uM의 TAT-KALA, His-CM18-PTD4 또는 His-C(LLKK)₃C-PTD4와 함께 항온 배양하였다 의사록. 최종 세척 단계 후, 세포를 실시예 3.3에 기술된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과를 표 10.2 및 그림 29B에 나타내었다. "Pos cells (%)"은 GFP 신호를 방출하는 모든 세포의 평균 백분율을 의미한다. 네거티브 컨트롤("대조군")은 셔틀제 없이 GFP-NLS 재조합 단백질(5uM)로 배양한 세포에 해당한다.

[표 10.2]

도 29B의 데이터

프로토 콜	셔틀제	세포	셔틀제의 농도 (uM)	배양 시간	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)
-	셔틀제 없음 ("대조군")	HeLa	0	5 min.	0 ± n/a	97.5 ± 1.7
B	TAT-KALA	HeLa	10	1 min.	83.7 ± 3.5	93.5 ± 2.7
				2 min.	86.2 ± 4.3	92.1 ± 3.1
				5 min.	68.1 ± 3.0	86 ± 4.4
	His-CM18-PTD4	HeLa	10	1 min.	50.6 ± 3.5	97.6 ± 2.7
				2 min.	74 ± 3.3	80.9 ± 3.2
				5 min.	82.7 ± 5.0	66.2 ± 4.4
	His-C(LLKK) ₃ C-PTD4	HeLa	10	1 min.	51.1 ± 3.5	99.5 ± 2.7
				2 min.	77.8 ± 4.3	94.3 ± 3.2
				5 min.	86.4 ± 4.0	80.8 ± 4.4

[0398]

[0399]

10.3 HeLa 세포에서 다양한 배양 시간을 갖는 TAT-KALA, His-CM18-PTD4 및 His-C(LLKK)₃C-PTD4에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 유동 세포 계측법

[0400]

HeLa 세포를 배양하고 실시 예 9.1에 기재된 바와 같이 프로토콜 C를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 시험하였다. 간단히 말해, GFP-NLS 재조합 단백질 (5 uM, 실시 예 5.1 참조)을 1, 2 또는 5분 동안 5uM의 TAT-KALA, His-CM18-PTD4 또는 His-C(LLKK)₃C-PTD4와 함께 배양시켰다. 최종 세척 단계 후, 세포를 실시 예 3.3에 기술 된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과를 표 10.3 및 그림 29C에 나타내었다. 네거티브 컨트롤 ("대조군")은 셔틀제 없이 GFP-NLS 재조합 단백질 (5uM)로 배양한 세포에 해당한다.

[표 10.3]

도 29C의 데이터

프로토 콜	셔틀제	세포	셔틀제의 농도 (uM)	배양 시간	상대 발광 강도 (FL1-A) (n=3)	표준 편차
	셔틀제 없음("대조군")		0	5 min.	8903	501
C	TAT-KALA	HeLa	10	1 min.	216 367	13 863.48
				2 min.	506 158	14 536.28
				5 min.	78 010	2 463.96
	His-CM18-PTD4	HeLa	10	1 min.	524 151	12 366.48
				2 min.	755 624	26 933.16
				5 min.	173 930	15 567.33
	His-C(LLKK) ₃ C-PTD4	HeLa	10	1 min.	208 968	23 669.19
				2 min.	262 411.5	19 836.84
				5 min.	129 890	16 693.29

[0401]

[0402]

10.4 HeLa 세포에서 다른 셔틀 작용제에 의한 10.4 GFP-NLS 형질 도입: 유동 세포 계측법

[0403]

HeLa 세포를 배양하고 실시 예 9.1에 기재된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 시험하였다. 간략하게, GFP-NLS 재조합 단백질 (5uM, 실시 예 5.1 참조)을 50uM의 상이한 셔틀제 (아미노산 서열 및 특성에 대해 표 1.3 참조)와 함께 공동 배양하고 10초 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 세포를 실시 예 3.3에서 기술된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과는 표 10.3a 및 표 10.3b 및 도 29e 및 도 29f에 나타내었다. "Pos cells (%)"은 GFP 신호를 방출하는 모든 세포의 평균 백분율을 의미한다. 네거티브 컨트롤 ("대조군")은 셔틀 에이전트 없이 GFP-NLS 재조합 단백질 (5uM)로 배양한 세포에 해당한다.

[표 10.3A]

도 29E의 데이터

도메인 구조	셔틀체	셔틀체의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)
-	셔틀체 없음 ("대조군")	0	5	0	100
ELD-CPD	VSVG-PTD4	50	5	3.5 ± 1.1	100
	EB1-PTD4			75.8 ± 8.26	39 ± 5.6
	JST-PTD4			0.84 ± 0.69	98.9 ± 0.57
His-ELD-CPD	His-C(LLKK) ₃ C-PTD4	50	5	76 ± 3.8	95 ± 2.7
	His-LAH4-PTD4			63 ± 1.64	98 ± 1.5
	His-CM18-PTD4			68 ± 2.2	92 ± 3.6
	His-CM18-TAT			55.5 ± 3.6	35.2 ± 5.7
	His-CM18-TAT-Cys*			49.3 ± 4.1	41.4 ± 3.91
	His-CM18-9Arg			57.2 ± 3.93	45.8 ± 3.53
	His-CM18-Transport an (IPT)			33.2 ± 2.82	41.3 ± 3.29

[0404]

* 도 29E에 도시되지 않음

[표 10.3B]

도 29F의 데이터

도메인 구조	셔틀체	셔틀체의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)
-	셔틀체 없음 ("대조군")	0	5	0	100
CPD-ELD	TAT-CM18	50	5	39.4 ± 3.9	23.5 ± 1.1
	TAT-KALA			56.3 ± 3.6	95.6 ± 4.3
	PTD4-KALA			73.4 ± 4.12	91.4 ± 3.67
	9Arg-KALA			7.8 ± 1.53	62.8 ± 5.11
	Pep1-KALA			17.2 ± 3.07	94.7 ± 3.77
	Xentry-KALA			19.4 ± 1.01	98.3 ± 0.64
	SvnB3-KALA			14.3 ± 2.37	91.1 ± 0.82

[0406]

HeLa 세포를 배양하고 실시 예 9.1에 기재된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 시험하였다. 간단히 말해, GFP-NLS 재조합 단백질 (5 uM, 실시 예 5.1 참조)을 1, 2 또는 5일동안 10uM의 TAT-KALA, His-CM18-PTD4 또는 His-C(LLKK)₃C-PTD4와 함께 항온 배하였다 의사록. 최종 세척 단계 후, 세포를 실시 예 3.3에 기술된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과는 표 10.3c 및 표 10.3b 및 도 29g 및 도 29h에 나타내었다. "Pos cells (%)"은 GFP 신호를 방출하는 모든 세포의 평균 백분율을 의미한다. 네거티브 컨트롤 ("대조군")은 셔틀체 없이 GFP-NLS 재조합 단백질(5uM)로 배양한 세포에 해당한다.

[표 10.3C]

도 29G의 데이터

도메인 구조	셔틀체	셔틀체의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	배양 시간 (min)	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)
-	셔틀체 없음("대조군")	0	5	5	0 ± n/a	98.3 ± 0.9
CPD-ELD	PTD4-KALA	10	5	1	64.6 ± 4.3	96.2 ± 3.0
				2	78.8 ± 3.6	75.3 ± 3.8
				5	71.4 ± 4.2	82.4 ± 4.7
ELD-CPD	EB1-PTD4	10	5	1	76.3 ± 3.5	61.7 ± 2.7
				2	79.0 ± 3.3	56.6 ± 3.2
				5	71.1 ± 5.0	55.8 ± 4.4
His-ELD-CPD-His	His-CM18-PTD4-His	10	5	1	68.6 ± 3.5	68.1 ± 2.7
				2	74.1 ± 4.3	61.6 ± 3.2
				5	59.8 ± 4.0	41.2 ± 4.4

[표 10.3D]

도 29H의 데이터

도메인 구조	셔틀체	셔틀체의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	배양 시간 (min)	상대 발광 강도 (FL1-A) (± 표준 편차; n=3)
-	셔틀체 없음 ("대조군")	0	5	5	8903 ± 501.37
CPD-ELD	PTD4-KALA	10	5	1	190 287 ± 9445
				2	386 480 ± 17 229
				5	241 230 ± 14 229
ELD-CPD	EB1-PTD4	10	5	1	178 000 ± 11 934
				2	277 476 ± 25 319
				5	376 555 ± 16 075
His-ELD-CPD-His	His-CM18-PTD4-His	10	5	1	204 338 ± 22 673
				2	307 329 ± 19 618
				5	619 964 ± 17 411

[0408]

[0409]

셔틀체 CM18-PTD4는 단백질 도메인 개개의 모듈 특성, 뿐만 아니라 변형(modified)될 수 있는 능력을 입증하기 위하여 사용되었다. 보다 구체적으로, N-말단 시스테인 잔기("Cys"); ELD 및 CPD 도메인들("L1": GGS; "L2": GGSGGGS; and "L3": GGSGGGSGGGGS) 사이의 상이한 유연한 링커들 및 히스티딘-리치 도메인과 상이한 길이, 위치, 및 변이체;의 존재 또는 부재에 관하여 연구하였다.

[0410]

HeLa 세포를 배양하고 실시예 9.1에 기재된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 시험하였다. 간략하게, 셔틀체 His-CM18-PTD4의 상이한 셔틀 웹타이드 변이체 (아미노산 서열 및 특성에 대해 표 1.3 참조) 20uM와 1분 동안 GFP-NLS 재조합 단백질(5uM; 실시예 5.1 참조)을 공동 배양하였다. 최종 세척 단계 후, 세포를 실시예 3.3에 개시된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과를 표 10.3e 및 도 29I에 나타내었다. "Pos cell s(%)"은 GFP 신호를 방출하는 모든 세포의 평균 백분율이다. 음성 대조군은 셔틀체 없이 GFP-NLS 재조합 단백질(5uM)로 배양한 세포에 해당한다.

[표 10.3E]

도 29I의 데이터

도메인 구조	셔틀체	셔틀체의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)
-	셔틀체 없음 ("대조군")	0	5	0	99.6 ± 0.12
ELD-CPD	CM18-PTD4	20	5	47.6 ± 2.6	33.9 ± 3.7
	Cys-CM18-PTD4			36.6 ± 2.3	78.7 ± 3.1
	CM18-L1-PTD4			48.5 ± 3.0	50.1 ± 3.8
	CM18-L2-PTD4			45.5 ± 6.5	64.0 ± 1.3
	CM18-L3-PTD4			39.0 ± 2.7	71.9 ± 6.0
His-ELD-CPD	His-CM18-PTD4	20	5	60.3 ± 3.2	81.6 ± 4.5
	His-CM18-PTD4-6Cys			41.3 ± 4.28	62 ± 5.76
	Met-His-CM18-PTD4-Cys			45.6 ± 3.88	54.9 ± 3.45
	3His-CM18-PTD4			39.4 ± 0.5	39.2 ± 3.3
	12His-CM18-PTD4			36.9 ± 4.3	33.4 ± 4.3
	HA-CM18-PTD4			42.3 ± 4.2	68.3 ± 4.1
	3HA-CM18-PTD4			37.2 ± 3.9	43.6 ± 2.8
	ELD-His-CPD			61.7 ± 1.8	57.7 ± 4.2
His-ELD-CPD-His	His-CM18-PTD4-His	20	5	68.0 ± 6.0	78.6 ± 1.1

[0411]

[0412]

이러한 결과는 주어진 셔틀(예를 들어, CM18-PTD4)의 변이가 주어진 셔틀체의 형질 도입 효율 및 세포 생존력의 정도를 조절하는데 사용될 수 있음을 보여준다. 더 구체적으로, CM18-PTD4(Cys-CM18-PTD4 참조)에 N-말단 시스테인 잔기를 첨가하면 GFP-NLS 형질 도입 효율이 11%(47.6%에서 36.6%로) 감소했지만 세포 생존도는 33.9%에서 78.7%로 증가했다. CM18과 PTD4 도메인 사이에 서로 다른 길이의 유연한 링커 도메인(L1, L2, L3)의 도입은 형질 도입 효율은 크게 떨어지는 결과를 나타내지 않으나, 세포 생존율은 증가했다(CM18-L1-PTD4, CM18-L2-PTD4 및 CM18-L3-PTD4 참조).

[0413]

마지막으로 His-CM18-PTD4 (3His-CM18-PTD4, 12His-CM18-PTD4 참조)의 아미노산 서열 및/또는 히스티딘이 풍부한 도메인 (들)의 위치가 변이 효율 및 세포 생존력을 완전히 상실하지 않았다. CM18-PTD4, HA-CM18-PTD4, 3HA-CM18-PTD4, CM18-His-PTD4 및 His-CM18-PTD4-His)를 포함한다. 주목할 것은, His-CM18-PTD4의 C 말단에 두 번째 히스티딘이 풍부한 도메인 (즉, His-CM18-PTD4-His)을 첨가하면 유사한 세포 생존력으로 60%에서 68%로 형질 도입 효율이 증가한다는 것이다.

[0414]

10.5 HeLa 세포에서 단일-도메인 웹타이드 또는 His-CPD 웹타이드에 의한 GFP-NLS 형질 도입의 결핍: 유동 세포 계측법

[0415]

HeLa 세포를 배양하고 실시예 9.1에 개시된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 시험하였다. 간략히, GFP-NLS 재조합 단백질(5uM, 실시예 5.1 참조)을 50uM의 상이한-단일 도메인 웹타이드(TAT; PTD4; Penetratin; CM18; C(LLKK)₃C; KALA) 또는 2-도메인 웹타이드 His-PTD4(ELD의 결여)를 사용하여 10초 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 최종 세척 단계 후, 세포를 실시예 3.3에 개시된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. 결과를 표 10.4 및 도 29D에 나타내었다. "Pos cells (%)"은 GFP 신호를 방출하는 모든 세포의 평균 백분율을 의미한다. 네거티브 대조군은 단일 도메인 웹타이드 또는 셔틀체 없이 GFP-NLS 재조합 단백질 (5uM)로 배양한 세포에 해당한다.

[표 10.4]

도 29D의 데이터

프로토콜	도메인	단일-도메인 웹타이드	세포	셔틀제의 농도(μM)	GFP-NLS의 농도(μM)	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)
B	-	웹타이드 없음 ("대조군")	HeLa	0	5	0.1 ± 0.02	98.3 ± 0.59
	CPD	TAT	HeLa	50	5	1.1 ± 0.27	94.6 ± 0.44
		PTD4				1.1 ± 0.06	94 ± 4.5
		Penetratin (Pen)				3.6 ± 0.1	96 ± 0.6
	ELD	CM18	HeLa	50	5	2.9 ± 0.2	95 ± 1.2
		C(LLKK) ₃ C				1.1 ± 0.57	61.8 ± 0.1
		KALA				1.4 ± 0.13	84 ± 0.7
	His-CPD	His-PTD4	HeLa	50	5	1.04 ± 0.12	96.5 ± 0.28

[0416]

[0417] 이러한 결과는 단일-도메인 웹타이드 TAT, PTD4, Penetratin, CM18, C(LLKK)₃C, KALA, 또는 2-도메인 웹타이드 His-PTD4(ELD의 결여)가 HeLa 세포에서 GFP-NLS를 성공적으로 형질 도입될 수 없음을 보여준다

[0418]

10.6 HeLa 세포에서 TAT-KALA, His-CM18-PTD4, His-C(LLKK)₃C-PTD4, PTD4-KALA, EB1-PTD4 및 His-CM18-PTD4-His에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 현미경에 의한 가시화

[0419]

GFP-NLS 재조합 단백질(5uM, 실시예 5.1 참조)을 50uM의 셔틀제와 함께 항온 배양한 다음, 실시예 9.1에 기재된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 10초간 HeLa 세포에 노출시켰다. 2분의 배양 시간 후, 실시예 3.2에 기재된 바와 같이 세포를 현미경으로 가시화하였다.

[0420]

도 30에 표시된 샘플 결과의 경우, HeLa 세포의 GFP 형광은 최종 세척 단계 후 명시야(하단 행 패널) 및 형광(상단 및 중간 행 패널) 현미경으로 20배율 또는 40배율을 확대하여 즉시 시각화되었다. 셔틀제 TAT-KALA, His-CM18-PTD4 및 His-C(LLKK)₃C-PTD4의 결과는 각각 패널 A, B 및 C에 나타내었다. PTD4-KALA, EB1-PTD4 및 His-CM18-PTD4-His 셔틀제의 결과는 각각 패널 D, E 및 F에 나타내었다. 최하단 열 패널의 삽입은 상응하는 FACS 분석(실시예 3.3에 기재된 바와 같이 수행됨)의 결과를 나타내며, 이는 GFP 신호를 갖는 96-플레이트 웰 내의 세포의 백분율을 나타낸다. 음성 대조군 샘플(즉, 어떠한 셔틀제 없이 GFP-NLS에 노출된 세포; 데이터는 나타내지 않음)에서 유의한 세포성 GFP 형광은 관찰되지 않았다.

[0421]

10.7 THP-1 세포에서 다양한 배양 시간을 갖는 TAT-KALA, His-CM18-PTD4 및 His-C(LLKK)₃C-PTD4에 의한 GFP-NLS 형질 도입: 유동 세포 계측법

[0422]

THP-1 세포를 배양하고 실시 예 9.1에 기재된 바와 같이 프로토콜 C를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 시험하였다. 간단히 말하면, GFP-NLS 재조합 단백질 (5 uM, 실시 예 5.1 참조)을 15, 30, 60, 60 또는 120초 동안 1uM의 TAT-KALA, His-CM18-PTD4 또는 His-C(LLKK)₃C-PTD4와 함께 배양하였다. 최종 세척 단계 후, 세포를 실시예 3.3에 개시된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석에 적용하였다. GFP 신호를 발산하는 세포의 평균 백분율 ("Pos cells (%)")은 표 10.4a 및 도 34A에 나타났다. 평균 형광 강도를 표 10.5 및 도 34B에 나타낸다. 네거티브 대조군은 셔틀제 없이 GFP-NLS 재조합 단백질(5uM)로 배양한 세포에 해당한다.

[표 10.4a]

도 34A의 데이터

프로토콜	셔틀제	세포	셔틀제의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	배양 시간(초)	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)
C	셔틀제 없음 ("대조군")	THP-1	0	5	120	1.12 ± 0.27	97.3 ± 1.55
	TAT-KALA	THP-1	1	5	15	47 ± 3.5	84.6 ± 2.7
					30	52.9 ± 1.3	70.3 ± 3.2
					60	70.1 ± 2.0	82.7 ± 1.4
					120	82.1 ± 2.5	46.3 ± 4.9
	His-CM18-PTD4	THP-1	1	5	15	23.7 ± 0.2	90 ± 3.0
					30	53 ± 0.3	89 ± 1.1
					60	69.6 ± 4.2	85.3 ± 3.6
					120	89 ± 0.8	74.3 ± 3.2
	His-C(LLKK) ₃ C-PTD4	THP-1	1	5	15	38.4 ± 0.3	85.2 ± 2.8
					30	42.3 ± 4.2	86 ± 2.0
					60	64.5 ± 1.0	86.9 ± 3.8
					120	78.7 ± 0.3	79.6 ± 2.8

[표 10.5]

도 34B의 데이터

프로토콜	셔틀제	세포	셔틀제의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	상대 형광 강도 (FL1-A) (n = 3)	표준 편차
C	셔틀제 없음 ("대조군")	THP-1	0	120	217	23.09
	TAT-KALA	THP-1	1	15	6 455.12	333.48
					8 106.81	436.28
					13 286.2	463.96
					27 464.92	2 366.48
	His-CM18-PTD4	THP-1	1	30	5 605.45	933.16
					25 076.41	5 567.33
					34 046.94	3 669.19
					55 613.48	9 836.84
	His-C(LLKK) ₃ C-PTD4	THP-1	1	60	5 475.12	693.29
					5 755.8	635.18
					8 267.38	733.29
					21 165.06	209.37

[0423]

[0424]

실시예 11:

[0425]

혈청 존재 하에서 셔틀제를 저농도로 반복 투여함으로써 THP-1 세포에서 GFP-NLS 전달이 일어남

[0426]

11.1 THP-1 세포에서 His-CM18-PTD4 또는 His-C(LLKK)₃C-PTD4로 GFP-NLS 형질 도입: 유동 세포 계측법

[0427]

THP-1 세포를 배양하고, 하기 수정과 함께 실시예 9.1에 개시된 바와 같이 프로토콜 A를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 시험하였다. His-CM18-PTD4 0.5uM 또는 0.8uM의 His-C(LLKK)₃C-PTD4와 함께 GFP-NLS 재조합 단백질(5, 2.5 또는 1uM, 실시예 5.1 참조)을 0.5 또는 0.8uM으로 공동 배양하고, 이어서 혈청을 함유한 세포 배양 배지의 존재 하에 150분 동안 THP-1 세포에 매일 노출시켰다. 세포를 세척하고 셔틀제/화물에 반복적으로 1일 또는 3일 동안 노출시킨 후 실시예 3.3에 개시된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석을 실시하였다. 그 결과를 표 11.1 및 도 35A, B, C 및 F에 나타내었다. 음성 대조군("대조군")은 어떠한 셔틀제도 없이 GFP-NLS 재조합 단백질(5uM)로 배양한 세포에 대응한다.

[0428]

[표 11.1]

[0429]

도 35A, B, C 및 F의 데이터

도면	셔틀제	세포	셔틀제의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	셔틀제/카고의 노출 (일)	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)
35A	셔틀제 없음 (대조군)	THP-1	0	5	0	0.15 ± 0.04	98.7 ± 0.1
			0.5	5	1 3	12.1 ± 1.5 73.4 ± 1.1	98.2 ± 2.4 84.3 ± 3.8
35B	셔틀제 없음 (대조군)	THP-1	0	5	0	0.36 ± 0.09	97.1 ± 1.2
			0.8	2.5	1 3	12.2 ± 0.9 62.4 ± 3.5	92.3 ± 1.9 68.5 ± 2.2
35C	셔틀제 없음 (대조군)	THP-1	0	5	0	0.28 ± 0.05	96.4 ± 2.0
			0.8	1	1 3	1.6 ± 0.2 6.5 ± 0.9	98.4 ± 6.4 80.6 ± 4.6
35F	셔틀제 없음 (대조군)	THP-1	0	5	0	0.62 ± 0.11	96.3 ± 1.4
			0.8	1	1 3	1.8 ± 0.2 6.6 ± 0.8	97.2 ± 2.2 76.6 ± 3.4

[0430]

His-CM18-PTD4 및 GFP-NLS에 반복적으로 노출된 THP-1 세포의 생존도를 실시예 3.3a에 개시된기재된 바와 같이 결정하였다. 그 결과를 표 11.2 및 표 11.3 및 도 35D 및 도 35E에 나타냈다. 표 11.2 및 도 35D의 결과는 1, 2, 4 및 24시간 후의 THP-1 세포의 대사 활성 인덱스를 나타내며, 표 11.3 및 도 35E의 결과는 1 내지 4일 후 THP-1 세포의 대사 활성 지수를 나타낸다.

[표 11.2]

도 35D의 데이터

셔틀제	세포	셔틀제의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	평균 대사 활성 지수 (± 표준 편차; n=3) (셔틀제/카고에 노출)			
				1시간	2시간	4시간	24시간
셔틀제 없음 (대조군)	THP-1	0	5	40810 ± 757.39	38223 ± 238.66	44058 ± 320.23	42362 ± 333.80
His-CM18-PTD4	THP-1	0.5	5	9974 ± 1749.85	9707 ± 1259.82	3619 ± 2247.54	2559 ± 528.50
		1	5	42915 ± 259.67	41386 ± 670.66	44806 ± 824.71	43112 ± 634.56

[표 11.3]

도 35E의 데이터

셔틀제	세포	셔틀제의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	평균 대사 활성 지수 (± 표준 편차; n=3) (셔틀제/카고에 노출)			
				1일	2일	3일	4일
셔틀제 없음 (대조군)	THP-1	0	5	44684 ± 283.27	43389 ± 642.47	45312 ± 963.40	43697 ± 1233
His-CM18-PTD4	THP-1	0.5	5	44665 ± 310.3	42664 ± 398.46	43927 ± 3511.54	43919 ± 4452.25
		0.8	5	44531 ± 176.66	43667 ± 421.66	44586 ± 383.68	44122 ± 239.98
		1	5	41386 ± 670.66	36422 ± 495.01	27965 ± 165.33	22564 ± 931.28

[0432]

실시예 11의 결과는 혈청 존재 하에 비교적 저농도의 His-CM18-PTD4 또는 His-C(LLKK)₃C-PTD4를 반복하여 매일 (또는 만성) 처리함으로써 THP-1 세포의 GFP-NLS의 세포내 전달의 결과를 나타낸다. 또한, 그 결과는 셔틀제 및 카고의 투여용량이 카고 형질 도입 효율 및/또는 세포 생존도를 향상시키기 위하여 독립적으로 조정될 수 있음을 시사한다.

[0434]

실시예 12:

His-CM18-PTD4는 다수의 세포계에서 GFP-NLS의 형질 도입 효율 및 핵 전달을 증가시킴

12.1 상이한 부착 및 혼탁 세포에서 His-CM18-PTD4로 GFP-NLS 형질 도입: 유동 세포 계측법

[0437]

프로토콜 B(부착 세포) 또는 C(현탁 세포)를 사용하여 상이한 부착 및 현탁 세포의 핵에 GFP-NLS를 전달하는 셔틀제 His-CM18-PTD4의 능력을 실시예 9.1에 개시된 바와 같이 실험하였다. 시험된 세포계는 실시예 1에 개시된 바와 같이 배양된, HeLa, Balb3T3, HEK 293T, CHO, NIH3T3, Myoblasts, Jurkat, THP-1, CA46 및 HT2 세포를 포함하여 실험하였다. GFP-NLS(5uM, 실시예 5.1 참조)를 35uM의 His-CM18-PTD4와 공동 배양하고 부착 세포에 10초간 노출(프로토콜 B)시키거나, 5uM의 His-CM18-PTD4로 처리하고 15초 동안 현탁 세포에 노출시켰다(프로토콜 C). 세포를 세척하고 실시예 3.3에 개시된 바와 같이 유동 세포 계측법 분석을 수행하였다. 결과는 표 12.1과도 36에 나타냈다. "Pos cells (%)"은 GFP 신호를 방출하는 모든 세포의 평균 백분율이다.

[표 12.1]

도 36의 데이터

셔틀제	프로토콜	셔틀제의 농도 (uM)	GFP-NLS의 농도 (uM)	세포	GFP 신호가 있는 셀 평균(%) (± 표준 편차; n=3)	세포 생존도 (%) (± 표준 편차; n=3)		
His-CM18-PTD4	B	35	5	HeLa	72.3 ± 5.3	94.6 ± 0.4		
				Balb3T3	40.2 ± 3.1	98.4 ± 0.6		
				HEK 293T	55.3 ± 0.2	95.3 ± 1.2		
				CHO	53.7 ± 4.6	92.8 ± 0.1		
				NIH3T3	35.4 ± 3.9	3.3 ± 5.4		
				Myoblasts	25.6 ± 2.6	23.5 ± 1.1		
	C			Jurkat	30.7 ± 2.2	73.6 ± 0.7		
				THP-1	64.1 ± 1.6	64.1 ± 4.5		
				CA46	24.4 ± 0.6	71.6 ± 1.0		
				HT2	30.5 ± 2.5	90.6 ± 1.5		

[0438]

12.2 몇몇 부착 및 현탁 세포에 His-CM18-PTD4를 이용한 GFP-NLS 형질 도입: 현미경에 의한 시각화

[0439]

GFP-NLS 재조합 단백질(5uM, 실시예 5.1 참조)을 실시예 9.1에 개시된 바와 같이, 프로토콜 A를 사용하여 35uM의 His-CM18-PTD4와 공동 배양하고 10초 동안 부착 세포에 노출시키거나, 프로토콜 B를 사용하여 5uM의 His-CM18-PTD4와 함께 배양하고 15초 동안 현탁 세포에 노출시켰다. 세포를 세척한 후, GFP 형광을 명시야 및 형광 현미경으로 시각화하였다. (A) 293T, (B) Balb3T3, (C) CHO, (D) Myoblasts, (E) Jurkat, (F) CA46, (G) HT2, 및 (H) NIH3T3 세포의 GFP 형광을 나타내는 10배율로 캡쳐된 샘플 이미지를 도 37에 나타내었다. 삽입된 도면은 실시예 3.3에 개시된 바와 같이 수행된 GFP-NLS-양성 세포의 백분율을 나타내는, 상응하는 유동 세포 계측 결과를 나타낸다. 음성 대조군 샘플(즉, 어떠한 셔틀제 없이 GFP-NLS에 노출된 세포; 데이터는 나타내지 않음)에서 유의한 세포성 GFP 형광은 관찰되지 않았다.

[0440]

GFP-NLS의 핵 국재화는 실시예 3.2a에 개시된 바와 같이 세포 면역 표지를 사용하여 고정 및 투과성 근아세포에서 추가로 추가로 확인되었다. GFP-NLS는 일차 쥐 단일클론 항-GFP 항체(Feldan, # A017) 및 이차 염소 항-쥐 AlexaTM-594 항체(Abcam # 150116)를 사용하여 표지하였다. 핵은 DAPI로 분류되었다. 일차 인간 근아세포의 샘플 결과가 도 28에 나타나며, GFP 면역-표지는 패널 A에 나타내었으며, GFP 면역-표지 및 DAPI 표지의 중첩은 패널 B에 나타내었다. 음성 대조군 샘플(즉, 셔틀제 없이 GFP-NLS에 노출된 세포; 데이터는 표시되지 않음)에서 유의미한 세포 GFP 표지는 관찰되지 않았다. 현미경 결과는 GFP-NLS가 셔틀제 His-CM18-PTD4를 사용하여 실험된 세포의 핵으로 모두 성공적으로 전달됨을 나타내었다.

[0441]

실시예 13:

His-CM18-PTD4는 HeLa 세포에서 CRISPR/Cas9-NLS 시스템의 형질 도입과 유전자 편집을 가능하게 함

[0442]

13.1 Cas9-NLS 재조합 단백질

[0443]

Cas9-NLS 재조합 단백질을 실시예 1.4에 개시된 바와 같이 박테리아 발현 시스템으로부터 제조, 발현 및 정제하였다. Cas9-NLS 재조합 단백질의 서열은 다음과 같다.

MDKKYSIGLDIGTNNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNIIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDFLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAISARLSSRSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAIIISDILRVNTETIKAPLSASMSIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPKEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGSQEEFYKFIIKPILEKMDGTEELLVKLNRDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRQQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKP AFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKLIIKDKDFLDNEEEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMQKLRRRTGWRGLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFGNANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKGQILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMRKIREEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVHIVPQSLKDDSIDNKVLTTRSDKNRGKSDNPSEEVVKMKNYWRQLLNNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFVFTETLANGEIIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVVKTEVQTCGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKYGGFDSPVAVSVLVAKVEKGSKKLKSVKELLGTTIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIICKLPKYSLSFELENGRKRMLASAGELQKGNEALPSPKVNFYFLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVILADANLDKVLISAYNKHRDKPITREQAENIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDSQQLGGDGGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKVGGGGGGGGGGRRHHHHHHH [서열번호 74]

[0446]

(MW = 162.9 kDa; pI = 9.05)

[0447]

NLS 서열은 밑줄로 표시하였다.

[0448]

세린/글리신 리치 링커는 굵은 글씨로 표시하였다.

[0449]

13.2 형질 감염 플라스미드 대리 검정

[0450]

이 분석을 통해 활성 CRISPR/Cas9 복합체가 성공적으로 전달된 세포를 시각적으로 확인할 수 있다. 도 39A에 도시된 바와 같이, 분석은 두개의 오픈 판독 프레임을 분리시키는 중지 코돈으로, 형광 단백질 *mCherry*TM 및 GFP를 코딩하는 발현 플라스미드 DNA로 세포를 형질 감염시키는 것을 수반한다. 발현 플라스미드로 세포의 형질 감염은 *mCherry*TM 발현이 나타나지만 GFP 발현은 일어나지 않는다(도 39B). 정지 코돈에서 플라스미드 DNA를 절단하도록 설계/프로그램 된 CRISPR/Cas9 복합체는 *mCherry*TM를 발현하는 형질 전환 세포에 세포 내로 전달된다(도 39D). 활성 CRISPR/Cas9 복합체의 성공적인 형질 도입은 CRISPR/Cas9 복합체가 중지 코돈에서 플라스미드 DNA를 절단하게 한다(도 39C). 세포 분획에서, 절단된 플라스미드의 무작위 비 상동성 DNA 수리가 일어나서 중지 코돈 및 GFP 발현 및 형광이 제거된다(도 39E).

[0451]

형질 감염 플라스미드 대리 검정의 1일, 다른 실험 조건(250 ng)에 대한 DNA 플라스미드는 별도의 멸균 1.5-mL 튜브에서 DMEM(50uL)로 희석하고, 와동(vortexed)하고 간단히 원심 분리(centrifuged)하였다. 별도의 멸균 1.5-mL 튜브에서 FastfectTM 형질 감염 시약은 혈청과 항생제가 없는 DMEM(50uL)에 3:1의 비율(1ug의 DNA에 대하여 FastfectTM 형질 감염 시약 3ug)로 희석시킨 후 빠르게 와동하고 간단히 원심 분리하였다. 그런 다음 FastfectTM/DMEM 혼합물을 DNA 믹스에 첨가하고 빠르게 와동하고 간단히 원심 분리했다. 그런 다음 FastfectTM/DMEM/DNA 혼합물을 실온에서 15 내지 20분 동안 배양한 후 세포에 첨가했다(웰당 100uL). 그런 다음 세포를 5시간 동안 37°C 및 5% CO₂에서 배양했다. 그런 다음 배지를 완전 배지(혈청 포함)로 변경하고 37°C와 5% CO₂에서 24 내지 48시간 동안 더 배양했다. 그런 다음 *mCherry*TM 신호를 관찰하기 위하여 형광 현미경으로 세포를 가시화했다.

[0452]

13.3 His-CM18-PTD4-매개 CRISPR/Cas9-NLS 시스템 전달 및 플라스미드 DNA의 절단

[0453]

RNAs (crRNA & tracrRNA)는 실시예 13.2의 플라스미드에서 *mCherry*TM와 GFP 코딩 서열 사이에 정지 코돈을 함유하는 EMX1 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하도록 설계되었다. 사용된 crRNA 및 tracrRNA의 서열은 다음과 같다:

[0454]

RNAs(crRNA & tracrRNA)는 실시예 13.2의 플라스미드에서 *mCherry*TM와 GFP 코딩 서열 사이에 정지 코돈을 함유하는 EMX1 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하도록 설계되었다. 사용된 crRNA 및 tracrRNA의 서열은 다음과 같다:

- crRNA [서열번호 75]:
5'-GAGUCCGAGCAGAAGAAGUUUAGAGCUAUGCUGUUUG-3' '

- tracrRNA [서열번호 76]:
5'-AAACAGCAUAGCAAGUAAAAGGUAGGUAGCUAUCACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU-3' '

[0456]

[0457] HeLa 세포를 배양하고 실시예 13.2)에 개시된 바와 같은 형질 전환 플라스미드 대리 검정을 실시하였다. 1일에, HeLa 세포를 도 39A에 나타낸 바와 같이 mCherryTM 단백질을 암호화하는 플라스미드 대리로 형질 감염시켰다. 2일째, Cas9-NLS 재조합 단백질(2uM; 실시예 13.1 참조) 및 RNA(crRNA & tracrRNA; 2uM; 상기 참조)의 혼합물을 50uM의 His-CM18-PTD4와 함께 배양하고, 혼합물(CRISPR/Cas9 복합체)를 실시예 9.1에 개시된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 10초 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. mCherryTM 및 GFP 코딩 서열 사이의 정지 코돈에서 CRISPR/Cas9 복합체에 의한 이중-가닥 플라스미드 DNA 절단(도 39B) 및 세포에 의한 후속적인 비 상동 수리는 경우에 따라 정지 코돈의 제거를 초래하며(도 39C), 이로써 3일째 동일한 세포에서 mCherryTM 및 GFP 형광 단백질 모두의 발현이 가능해진다(도 39D-E). 패널 D와 E의 흰 삼각형 창이 mCherryTM와 GFP 사이의 공동 라벨링 영역의 예를 나타낸다.

[0458] CRISPR/Cas9-NLS 시스템에 대한 양성 대조군으로서, HeLa 세포는 플라스미드 대리(실시예 13.2에 개시된) 및 Cas9-NLS 단백질(실시예 13.1)을 코딩하는 다른 발현 플라스미드 및 crRNA/tracrRNA (실시예 13.3)의 3개 플라스미드로 배양 및 함께 형질 감염 시켰다. 전형적인 형광 현미경 검사 결과는 도 40A 내지 D에 나타냈다. 패널 A 및 B는 형질 감염 24시간 후 세포를 나타내며, 패널 C 및 D는 형질 감염 72 시간 후의 세포를 나타낸다.

[0459] 도 40E 내지 H는 도 39에 대해 기재된 바와 같이, 35uM의 셔틀제 His-CM18-PTD4를 사용하여 수행된 평행 형질 전환 플라스미드 대리 검정의 결과를 보여준다. 패널 E 및 F는 형질 전환 24시간 후 세포를 보여주며, 패널 G 및 H는 형질 전환 48시간 후 세포를 보여준다. 패널 E 및 G는 mCherryTM 형광을 보여주고, 패널 F 및 H는 GFP 형광을 보여주며, 후자의 결과는 CRISPR/Cas9-NLS 복합체에 의한 정지 코돈의 제거 및 세포에 의한 이후의 비상동 수리에 의한 정지 코돈의 제거에 기인한다. 음성 대조군 샘플(즉, 어떠한 셔틀제 없이 CRISPR/Cas9-NLS 복합체에 노출된 세포; 데이터는 나타나지 않음)에서 유의한 세포성 GFP 형광은 관찰되지 않았다.

13.4 T7E1 분석

[0460] T7E1 분석은 Edit-RTM 합성 crRNA 양성 대조군(Dharmacon #U-007000-05) 및 T7 엔도뉴클레아제 I(NEB, Cat #M0302S)로 수행하였다. CRISPR/Cas9 복합체 전달 후, 세포를 첨가제를 포함한 100uL의 PhusionTM 고-충실도 DNA 중합효소(NEB #M0530S) 실험실에서 용해시켰다. 세포를 56에서 15 내지 30분 동안 배양시킨 후, 96에서 5 분 동안 비활성화시켰다. 웰 바닥에서 액체를 수집하기 위하여 플레이트를 간단히 원심 분리하였다. 50-uL PCR 샘플은 분석할 각 샘플로 설정하였다. PCR 샘플을 95에서 10분간 가열한 다음 천천히(>15분) 실온으로 냉각시켰다. PCR 산물(~5uL)을 증폭 확인을 위하여 아가로스 겔(2%)에서 분리하였다. 15uL의 각 반응은 T7E1 뉴클레아제와 37에서 25분 동안 배양되었다. 즉시, 전체 반응 부피는 아가로스 겔(2%) 상의 적절한 겔 로딩 완충액으로 수행하였다.

13.5 His-CM18-PTD4 및 His-C(LLKK)₃C-PTD4-매개-CRISPR/Cas9-NLS 시스템 전달 및 유전자 PPIB 서열의 절단

[0463] PPIB 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 Cas9-NLS 재조합 단백질(25nM; 실시예 13.1) 및 crRNA/tracrRNA(50nM; 하기 참조)로 구성된 혼합물을 10uM의 His-CM18-PTD4 또는 His-C(LLKK)₃C-PTD4로 처리하고, 실시예 9.1에 개시된 바와 같이 프로토콜 A를 사용하여 혈청이 없는 배지에서 16시간 동안 HeLa 세포와 함께 배양하였다.

[0464] 구성된 crRNA 및 tracrRNA의 서열 및 이들의 표적은 다음과 같다.

- Feldan tracrRNA [서열번호 77]:
5'- AAACAGCAUAGCAAGUAAAAGGUAGGUAGCUAUCACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU-3' '

- PPIB crRNA [서열번호 78]:
5'-GUGUAUUUUGACCUACGAAUGUUUAGAGCUAUGCUGUUUG-3'

- Dharmacon tracrRNA [서열번호 79]:
5'-AACAGCAUAGCAAGUAAAAGGUAGGUAGCUAUCACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU-3' '

[0465]

- [0466] 16시간 후, HeLa 세포를 PBS로 세척하고 혈청을 포함하는 배지에서 48시간 동안 배양하였다. 실시예 13.4에 개시된 바와 같이 T7E1 프로토콜 분석을 진행하기 위하여 HeLa 세포를 수화하였다. 도 41A는 PCR 증폭 후 PPIB DNA 서열을 갖는 아가로스 겔을 나타낸다. 레인 A는 어떠한 처리없이(즉, 셔틀제 또는 Cas9/RNAs 복합체 없음) HeLa 세포에서 증폭된 PPIB DNA 서열을 나타낸다. 레인 B: 흰 박스로 #1의 2개의 밴드는 셔틀제 His-C(LLKK)₃C-PTD4로 복합체 전달 후 CRIPR/Cas9 복합체에 의한 PPIB DNA 서열의 절단 산물(cleavage product)이다. 레인 C: 이 밴드는 HeLa 세포를 셔틀제 없이(음성 대조군) Cas9/RNA 복합체와 배양한 후 증폭된 PPIB DNA 서열을 나타낸다. 레인 D: 흰 박스 #2의 밴드는 지질 형질 감염제(DharmaFectTM 형질 감염제 # T-20XX-01)(양성 대조군)의 존재 하에 HeLa 세포를 Cas9/RNAs 복합체와 함께 배양한 후 증폭된 PPIB DNA 서열을 나타낸다. 셔틀제 His-CM18-PTD4를 사용하여 유사한 결과를 얻었다(데이터는 나타내지 않음).
- [0467] 도 41B는 PCR 증폭 후 PPIB DNA 서열을 갖는 아가로스 겔을 나타낸다. 좌측 패널은 HeLa 세포에서 셔틀제 His-CM18-PTD4로 복합체 전달 후 CRIPR/Cas9 복합체에 의하여 증폭된 PPIB DNA 서열의 절단 산물을 나타낸다. 우측 패널은 T7E1 분해 과정 전에 증폭 된 DNA 서열을 음성 대조군으로 나타낸다.
- [0468] 도 41C는 PCR 증폭 후 PPIB DNA 서열을 갖는 아가로스 겔을 나타낸다. 왼쪽 패널은 지질 형질 감염제 (DharmaFectTM 형질 전환 시약 # T-20XX-01)(양성 대조군)의 존재 하에 Cas9/RNAs 복합체와 함께 HeLa 세포를 배양한 후 증폭된 PPIB DNA 서열을 나타낸다. 우측 패널은 T7E1 분해 과정 전에 증폭 된 DNA 서열을 음성 대조군으로 나타낸다.
- [0469] 이러한 결과는 셔틀제 His-CM18-PTD4 및 His-C(LLKK)₃C-PTD4가 기능적 CRISPR/Cas9 복합체를 HeLa 세포의 핵에 성공적으로 전달하고, 이 전달은 유전체 DNA의 CRISPR/Cas9-매개 절단을 초래한다는 것을 나타낸다.
- [0470] 13.6 상이한 셔틀제에 의한 CRISPR/Cas9-NLS 시스템 전달 및 HeLa 및 Jurkat 세포에서의 유전체 HPTR 서열의 절단
- [0471] HPTR 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 Cas9-NLS 재조합 단백질(2.5uM; 실시예 13.1) 및 crRNA/tracrRNA(2uM; 하기 참조)로 구성된 혼합물을 35uM의 His-CM18-PTD4, His-CM18-PTD4-His, His-C(LLKK)₃C-PTD4, 또는 EB1-PTD4와 함께 배양하고, 그리고 실시예 9.1에 개시된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 PBS 중에서 2분 동안 HeLa 또는 Jurkat 세포와 함께 배양하였다.
- [0472] 구성된 crRNA 및 tracrRNA의 서열 및 이들의 표적은 다음과 같다.
- Feldan tracrRNA [SEQ ID NO: 77]:
5'- AAACAGCAUAGCAAGUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU-3'

- HPRT crRNA [SEQ ID NO: 103]:
5'- AAUUAUGGGAUACUAGGAGUUUAGAGCUAUGCU-3'
- [0473] 2분 후, 세포를 PBS로 세척하고 혈청을 포함하는 배지에서 48시간 동안 배양하였다. 세포를 수화하여 실시예 13.4에 개시된 바와 같이 T7E1 프로토콜 분석을 진행하였다. 도 46은 PCR 증폭 후 HPTR DNA 서열을 갖는 아가로스 겔 및 상이한 셔틀제로 복합체를 전달한 후 CRISPR/Cas9 복합체에 의해 증폭된 HPTR DNA 서열의 절단 산물을 나타낸다. 패널 A는 HeLa 세포에서 His-CM18-PTD4, His-CM18-PTD4-His 및 His-C(LLKK)₃C-PTD4의 결과를 나타낸다. 패널 B는 Jurkat 세포에서 His-CM18-PTD4 및 His-CM18-L2-PTD4를 사용한 결과를 나타낸다. 음성 대조군(레인 4)은 셔틀제없이 CRISPR/Cas9 복합체와 세포 배양 후 증폭된 HPTR DNA 서열을 나타낸다. 양성 대조군(패널 A 및 B의 레인 5)은 지질 형질 감염제 (Lipofectamine[®] RNAiMAX[™] 형질 전환 시약 ThermoFisher 제품 No. 13778100)의 존재 하에 Cas9/RNAs 복합체와 세포를 배양한 후 증폭된 HPTR DNA 서열을 나타낸다.
- [0474] 이러한 결과는 본 발명의 상이한 폴리펩타이드 셔틀제가 기능적 CRISPR/Cas9 복합체를 HeLa 및 Jurkat 세포의 핵에 성공적으로 전달할 수 있으며, 이러한 전달은 CRISPR/Cas9-매개 유전체 DNA 절단을 초래한다는 것을 보여준다.
- [0475] 실시예 14:
- [0476] His-CM18-PTD4는 THP-1 세포에서 전사 인자 HOXB4의 형질 도입을 가능하게 함
- [0477] 14.1 HOXB4-WT 재조합 단백질

[0479] 인간 HOXB4 재조합 단백질을 실시예 1.4에 개시된 바와 같이 박테리아 발현 시스템으로부터 제조, 발현 및 정제하였다. 생산된 HOXB4-WT 재조합 단백질의 서열은 다음과 같다.

**MHHHHHHMAMSSFLINSNYVDPKFPCEEYSQSDYLPSPDHSPGYYAGGQRRESSFQPEAGFRRRAACTVQRYPoooooooooGLS
PRA PAPPPAGALLPEPGQRCEAVSSPPPPCAQNPLHPSPSHSACKEPVYPWMRKVHVSTVNPNYAGGEPKRSRTAYTRQQVL
ELEKEFHYNRYLTRRRRVEIAHALCLSERQIKIWFQNRRMKWKKDHKLPTKIRSGGAAGSAGGPPGRPNNGPRAL** [서열 번
호 80]

[0480]

(MW = 28.54 kDa; pI = 9.89)

[0482] 초기 메티오닌 및 6x 히스티딘 태그는 굵은 글씨로 표시하였다.

14.2 실시간 중합 효소 연쇄 반응(rt-PCR)

[0484] 대조군과 처리된 세포를 별도의 무균 1.5-mL 투브에 옮기고 300g에서 5 분간 원심 분리한다. 세포 펠릿을 적절한 완충액에 재현탁시켜 세포를 용해시킨다. RNAase가 없는 70% 에탄올을 첨가한 다음 피펫팅으로 혼합한다. 용해액을 RNeasyTM Mini 스판 컬럼으로 옮기고 13000 RPM으로 30 초간 원심 분리한다. 적절한 완충액으로 수차례 세척 후 원심 분리 단계 이후에 용출액을 얼음 위에서 멀균된 1.5-mL 투브에 수집하고, 각 투브의 RNA 양을 분광 광도계로 정량한다. DNase 처리를 위해, RNase가 없는 물 15uL에 2ug의 RNA를 희석하였다. 이어서, 10X DNase 완충액 1.75 uL 및 DNase 0.75 uL를 첨가한 다음, 37에서 15분 동안 배양하였다. 역전사 효소 처리를 위하여, 0.88uL의 EDTA(50nM)를 첨가한 다음, 75에서 5분 동안 배양하였다. PCR 투브에 DNase 처리된 RNA 0.5ug을 iScriptTM Reverse Transcription Supermix (5X) 4uL와 뉴클레아제가 없는 물 20uL와 혼합하였다. 혼합물은 PCR 기계에서 다음 프로그램으로 배양되었다: 25°C에서 5분, 42°C에서 30분 및 85°C에서 5분. 세로이 합성 된 cDNA를 무균 1.5-mL 투브에 옮기고 2mL의 뉴클레아제가 없는 물로 희석하였다. 그 뒤 분석을 위해 qPCR 기기 (CFX-96TM) 혼합물 1 웨딩 18uL를 PCR 플레이트에 첨가하였다.

14.3 THP-1 세포에서 His-CM18-PTD4에 의한 HOXB4-WT 형질 도입: 용량 반응 및 생존력

[0486] THP-1 세포를 배양하고 실시예 9.1에 개시된 바와 같이 프로토콜 A를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 실험하였다. 간단히, 형질 도입 하루 전에 THP-1 세포를 30,000세포/웰에 배치하였다. 상이한 농도의 His-CM18-PTD4(0, 0.5, 7.5, 0.8 또는 1uM)와 함께 HOXB4-WT 재조합 단백질(0.3, 0.9 또는 1.5uM; 실시예 14.1)을 함께 배양한 다음 혈청 존재 하에서 2.5시간 동안 THP-1 세포를 노출하였다.

[0487] HOXB4 활성에 대한 마커로 표적 유전자의 mRNA 수준을 측정하기 위하여 세포를 실시예 14.2에 개시된 바와 같이 실시간 PCR 분석하였으며, 그 뒤 "폴드오버 대조군" 값을 얻기 위해 음성 대조군 세포(미처리)에서 검출된 표적 유전자 mRNA 수준으로 표준화하였다. 총 RNA 수준(ng/uL) 역시 세포 생존도의 마커로 측정되었다. 결과는 표 14-1 및 도 42에 나타내었다.

[표 14.1]

도 42의 데이터

카고/셔틀제 (도 41)	세포	셔틀제의 농도 (uM)	HOXB4-WT의 농도 (uM)	폴드오버 대조군 (평균 표준 편차)	총 RNA ng/?L (평균 표준 편차)
미처리 ("Ø")	THP-1	0	0	1 ± 0.1	263 ± 0.4
HOXB4-WT 단독 ("TF")	THP-1	0	1.5	4.3 ± 0.1	271 ± 6.0
His-CM18-PTD4 단독 ("FS")	THP-1	1	0	2.7 ± 0.3	252 ± 10.7
His-CM18-PTD4 + HOXB4-WT	THP-1	0.5	0.3	2.7 ± 0.6	255 ± 3.9
			0.9	4.3 ± 2.1	239 ± 17.5
			1.5	3.8 ± 0.7	269 ± 6.4
His-CM18-PTD4 + HOXB4-WT	THP-1	0.75	0.3	4.2 ± 1.2	248 ± 28
			0.9	5.7 ± 2.5	245 ± 31
			1.5	7.5 ± 2.8	230 ± 3.3
His-CM18-PTD4 + HOXB4-WT	THP-1	0.8	0.3	9.1 ± 2.7	274 ± 4.4
			0.9	16.4 ± 1.7	272 ± 12.5
			1.5	22.7 ± 3.2	282 ± 4.7
His-CM18-PTD4 + HOXB4-WT	THP-1	0.9	0.3	10.2 ± 2.5	280 ± 11.3
			0.9	18.7 ± 3.1	281 ± 9.2
			1.5	26.1 ± 3.5	253 ± 7.1
His-CM18-PTD4 + HOXB4-WT	THP-1	1	0.3	10.5 ± 0.7	184 ± 12.3
			0.9	17 ± 3.7	168 ± 16.2
			1.5	24.5 ± 3.9	154 ± 4.7

[0488]

이러한 결과는 THP-1 세포를 혈청 존재 하에 2.5시간 동안 셔틀제 His-CM18-PTD4와 전사 인자 HOXB4-WT의 혼합물에 노출시킴으로써 표적 유전자의 mRNA 전사에 용량-의존적인 증가를 초래함을 나타낸다. 이러한 결과는 HOXB4-WT가 THP-1 세포의 핵에 활성 형태로 성공적으로 전달되어 전사 활성화를 매개할 수 있음을 보여준다.

[0489]

14.4 THP-1 세포에서 His-CM18-PTD4에 의한 HOXB4-WT 형질 도입: 시간 경과 및 생존율(0 내지 48 시간)

[0491]

THP-1 세포를 배양하고 실시예 9.1에 개시된 바와 같이 프로토콜 A를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 실험하였다. 간단히, THP-1 세포는 첫번째 코스 실험 하루 전에 30,000 세포/웰에 배치하였다. HOXB4-WT 재조합 단백질(1.5uM; 실시예 14.1)을 His-CM18-PTD4(0.8uM)와 함께 공동 배양한 다음, 혈청 존재 하에 0, 2.5, 4, 24 또는 48시간 동안 THP-1 세포에 노출시켰다. HOXB4 활성에 대한 마커로 표적 유전자의 mRNA 수준을 측정하기 위하여 세포를 실시예 14.2에 개시된 바와 같이 실시간 PCR 분석하였으며, 그 뒤 "폴드오버 대조군" 값을 얻기 위해 음성 대조군 세포(미처리)에서 검출된 표적 유전자 mRNA 수준으로 표준화하였다. 총 RNA 수준(ng/uL) 역시 세포 생존도의 마커로 측정되었다. 결과는 표 14-2 및 도 43에 나타내었다.

[표 14.2]

도 43의 데이터

카고/셔틀제 (도 43)	세포	셔틀제의 농도 (uM)	HOXB4-WT의 농도 (uM)	노출 시간 (시간)	폴드오버 대조군 (평균 표준 편차)	총 RNA ng/uL (평균 표준 편차)
미처리 ("대조군")	THP-1	0	0	-	1 ± 0.1	180 ± 0.4
HOXB4-WT 단독 ("TF")	THP-1	0	1.5	2.5 h	3.4 ± 0.3	129 ± 10.7
His-CM18-PTD4 단독 ("FS")	THP-1	0.8	0	2.5 h	1.2 ± 0.14	184 ± 6.0
His-CM18-PTD4 + HOXB4-WT	THP-1	0.8	1.5	48 h	0.27 ± 0.1	58 ± 11.2
				24 h	0.8 ± 0.14	74 ± 9.2
				4 h	5.6 ± 1.2	94 ± 7.1
				2.5 h	9.1 ± 1.2	146 ± 11.6
				0	3.9 ± 0.4	167 ± 13

[0492]

14.5 THP-1 세포에서 His-CM18-PTD4에 의한 HOXB4-WT 형질 도입: 시간 경과 및 생존력(0-4 시간)

[0493]

THP-1 세포를 배양하고 실시예 9.1에 개시된 바와 같이 프로토콜 A를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 실험하였다. 간단히, THP-1 세포는 첫번째 코스 실험 하루 전에 30,000 세포/웰에 배치하였다. HOXB4-WT 재조합 단백질(0.3uM; 실시예 14.1)을 His-CM18-PTD4(0.8uM)와 함께 공동 배양한 다음, 혈청 존재 하에 0, 0.5, 1, 2, 2.5, 3 또는 4시간 동안 THP-1 세포에 노출시켰다. HOXB4 활성에 대한 마커로 표적 유전자의 mRNA 수준을 측정

하기 위하여 세포를 실시예 14.2에 개시된 바와 같이 실시간 PCR 분석하였으며, 그 뒤 "폴드오버 대조군" 값을 얻기 위해 음성 대조군 세포(미처리)에서 검출된 표적 유전자 mRNA 수준으로 표준화하였다. 총 RNA 수준 (ng/uL) 역시 세포 생존도의 마커로 측정되었다. 결과는 표 14-3 및 도 44에 나타내었다.

[0495] [표 14.3]

도 44의 데이터

카고/셔틀제 (도 42)	세포	셔틀제의 농도 (uM)	HOXB4-WT의 농도 (uM)	노출 시간 (시간)	폴드오버 대조군 (평균 표준 편차)	총 RNA ng/uL (평균 표준 편차)
미처리 ("대조군")	THP-1	0	0	-	1 ± 0.1	289 ± 9.2
His-CM18-PTD4 단독 ("FS")	THP-1	0	0.3	2.5 h	2.5 ± 0.2	260 ± 7.1
HOXB4-WT 단독 ("TF")	THP-1	0.8	0	2.5 h	1 ± 0.14	264 ± 12.3
His-CM18-PTD4 + HOXB4-WT	THP-1	0.8	0.3	4 h	1.2 ± 0.1	198 ± 6.0
				3 h	1.3 ± 0.21	268 ± 12.5
				2.5 h	2 ± 0.3	275 ± 4.7
				2 h	2.2 ± 0.2	269 ± 12.5
				1	9.7 ± 2.6	268 ± 3.9
				0.5	23.1 ± 2.0	266 ± 17.5
				0	4 ± 0.5	217 ± 6.4

[0497]

[0498] 14.6 HeLa 세포에서 His-CM18-PTD4에 의한 HOXB4-WT 형질 도입: 면역 표지 및 현미경에 의한 시각화

[0499]

재조합 HOXB4-WT 전사 인자(25uM; 실시예 14.1)를 35uM의 His-CM18-PTD4와 함께 배양하고, 실시예 9.1에 개시된 바와 같이 프로토콜 B를 사용하여 10초 동안 HeLa 세포에 노출시켰다. 형질 도입된 HOXB4-WT를 핵에 축적되도록 하기 위해 30-분 배양한 후, 실시예 3.2a에 개시된 바와 같이 세포를 고정, 투과성으로 하고 면역 표지하였다. 1/500으로 희석된 일차 쥐 항-HOXB4 단일클론 항체(Novus Bio #NBP2-37257), 및 1/1000으로 희석된 이차 항-쥐 항체 AlexaTM-594(Abcam #150116)를 사용하여 HOXB4-WT를 표지하였다. 핵은 DAPI로 표지되었다. 세포를 실시예 3.2에 개시된 바와 같이 20배율 및 40배율의 명시야 및 형광 현미경으로 가시화하고, 샘플 결과를 도 45에 나타내었다. 공동-국재화(co-localization)은 핵 표지(페널 A 및 C) 및 HOXB4-WT 표지(페널 B 및 D)의 사이에서 관찰되었으며, 이는 HOXB4-WT가 셔틀제 His-CM18-PTD4의 존재 하에 30분 후에 핵에 성공적으로 전달되었음을 나타낸다. 흰 삼각형 창은 핵(DAPI)과 HOXB4-WT 면역-표지 간의 공동-국재화 영역의 예를 나타낸다.

[0500]

14.7 THP-1 세포에서 상이한 셔틀제들에 의한 HOXB4-WT 형질 도입: 용량 반응 및 생존도

[0501]

THP-1 세포를 배양하고 실시예 9.1에 개시된 바와 같이 프로토콜 A를 사용하여 단백질 형질 도입 분석에서 실험하였다. 간단히, THP-1 세포는 첫번째 코스 실험 하루 전에 30,000 세포/웰에 배치하였다. HOXB4-WT 재조합 단백질(1.5uM; 실시예 14.1)을 셔틀제 His-CM18-PTD4, TAT-KALA, EB1-PTD4, His-C(LLKK)3C-PTD4 및 His-CM18-PTD4-His 0.8 uM와 함께 공동 배양한 다음, 혈청 존재 하에 2.5시간 동안 THP-1 세포에 노출시켰다. HOXB4 활성에 대한 마커로 표적 유전자의 mRNA 수준을 측정하기 위하여 세포를 실시예 14.2에 개시된 바와 같이 실시간 PCR 분석하였으며, 그 뒤 "폴드오버 대조군" 값을 얻기 위해 음성 대조군 세포(미처리)에서 검출된 표적 유전자 mRNA 수준으로 표준화하였다. 총 RNA 수준(ng/uL) 역시 세포 생존도의 마커로 측정되었다. 결과는 표 14-4 및 도 47에 나타내었다.

[0502]

[표 14.4]

[0503]

도 47의 데이터

카고/셔틀제	셔틀 제의 농도 (μ M)	HOXB4-WT 의 농도 (μ M)	노출 시 간 (시 간)	폴드오버 대 조군 (평균 표준 편차)	총 RNA ng/ μ L (평균 표준 편 차)
미처리 ("대조군")	0	0	-	1 ± 0.09	240.3 ± 8.9
His-CM18-PTD4 단독 ("FS")	0	1.5	2.5 h	2.5 ± 0.3	303.9 ± 7.6
HOXB4-WT 단독 ("TF")	0.8	0	2.5 h	1 ± 0.11	251.9 ± 11.9
His-CM18-PTD4 + HOXB4-WT	0.8	1.5	2.5 h	44.5 ± 0.09	182 ± 5.97
TAT-KALA + HOXB4-WT				5.1 ± 0.21	222.4 ± 12.5
EB1-PTD4 + HOXB4-WT				6.4 ± 0.3	240.4 ± 4.71
His-C(LLKK) ₅ C-PTD4 +HOXB4-WT				9.8 ± 0.19	175.3 ± 11.25
His-CM18-PTD4-His +HOXB4-WT				28.1 ± 2.61	91.4 ± 3.92

[0504]

실시예 15:

[0505] His-CM18-PTD4에 의한 쥐 두정 피질에서 생체 내 GFP-NLS 전달

쥐 뇌 세포의 핵에서 생체 내에서 GFP-NLS를 전달하는 셔틀제 His-CM18-PTD4의 능력을 실험하였다.

[0506]

별도의 무균 1.5- μ L튜브에서, 셔틀제 His-CM18-PTD4를 실온에서 멸균 증류수로 희석시켰다. 쥐 뇌에 주사하기 충분한 최종 부피의 셔틀제 및 카고의 원하는 농도(예를 들어, 각 주사 뇌 부위당 5 μ L)를 얻기 위하여 카고 단백질로 사용되는 GFP-NLS를 셔틀제에 첨가하고, 필요시 멸균 PBS를 첨가하였다. 그 뒤 셔틀제/카고 혼합물을 실험에 즉시 사용되었다. GFP-NLS 단독 주입에 해당하는 하나의 음성 대조군이 실험에 포함되었다.

[0507]

양쪽 주입(bilateral injection)은 쥐 3마리의 두정 피질에서 수행되었다. 좌측 두정 피질(동측성(ipsilateral))에서 셔틀제(20 μ M) 및 GFP-NLS(20 μ M)로 구성된 혼합물을 주입하였고, 우측 두정 피질(대측성(contralateral))에는 GFP-NLS(20 μ M) 단독으로 음성 대조군으로 주입하였다. 외과 수술을 위해, 쥐를 이소플루란(isoflurane)으로 마취시켰다. 그 뒤 동물을 입체 정의(stereotaxic) 프레임에 배치하고 두개골 표면을 노출시켰다. 5 μ L 해밀턴 주사기(Hamilton syringe)로 셔틀제/카고 혼합물 또는 GFP-NLS 단독(20 μ M)의 양측 주입을 허용하기 위하여 적절한 위치에 2개의 구멍을 뚫었다. 브레그마(bregma)와 관련하여 전후 방향(AP), 외측(L), 및 배복 방향(DV) 좌표를 취했다: (a) AP +0.48 mm, L ± 3 mm, V - 5 mm; (b) AP - 2mm, L ± 1.3mm, V - 1.5mm; (c) AP - 2.6 mm, L ± 1.5 mm, V - 1.5 mm. 셔틀제/카고 혼합물 또는 카고 단독의 주입된 양은 주사 부위 당 5 μ L이었고 주사는 10분 동안 수행되었다. 그 후, 실험자는 뇌에서 바늘을 제거하기 전에 1분을 대기하였다. 모든 측정은 동물의 통증과 불편을 최소화하기 위해 수술 전, 수술 중, 치료 후에 얻었다. 수술 2시간 후 파라포름알데히드(paraformaldehyde)(4%)를 관류시켜 동물을 희생시켰으며, 뇌를 수집하여 축소 복사(microcopy) 분석을 위하여 준비하였다. 실험 절차는 동물 보호에 관한 캐나다 협의회(Canadian Council on Animal Care)의 지침에 따라 동물 실험 위원회(Animal Care Committee)에서 승인 받았다.

[0508]

배복 방향(dorso-ventral)의 쥐 뇌 조각을 수집하고 형광 현미경으로 분석하였고 결과는 (A) 4배율, (C) 10배율 및 (D) 20배율로 도 48에 나타냈다. 주사 부위는 두정 피질(PCx)의 가장 깊은 층에 위치한다. His-CM18-PTD4 셔틀제의 존재 하에, GFP-NLS는 PCx, 코퍼스 캘러스(Corpus Callus)(Cc) 및 선조체(striatum)(Str)의 세포 핵 내에서 확산되었다(흰색 곡선은 뇌 구조 사이의 한계를 의미함). 패널 B는 Franklin 및 Paxinos의 쥐 뇌지도에서 주입 부위의 입체 정의 좌표(검은 색 화살표)를 보여준다. His-CM18-PTD4의 존재하에 GFP-NLS의 주사는 뇌의 왼쪽 부분에서 수행되었고, 음성 대조군(GFP-NLS 단독 주사)은 대측성 부위에서 수행되었다. 패널 B의 검은 원 및 검은 선은 형광 사진(A, C 및 D)에서 관찰된 영역을 나타낸다.

[0509]

이번 실험은 셔틀제 His-CM18-PTD4의 존재 하에 쥐 두정 피질에서 입체 정의 주사 후 카고 GFP-NLS의 세포 전달을 입증했다. 결과는 두정 피질(주사 부위)의 더 깊은 층에서 더 깊은 층에서 코퍼스 캘러스(corpus callus)와 선조체(striatum)(피곡(putamen))로의 세포의 핵에서의 GFP-NLS의 전달을 나타낸다. 대조적으로, 음성 대조군에서 GFP-NLS는 주입 부위 주변에 국부적으로만 검출된다. 이번 실험은 셔틀제가 주사 부위(두정 피질)에서 카고의 핵전달을 두 인접한 뇌 영역(코퍼스 캘러스 및 선조체 쥐 뇌)을 통한 확산을 유도하는 것을 보여준다.

참조문헌

- [0512] 참조문헌
- [0513] Andreu, D., Ubach, J., Boman, A., Wahlin, B., Wade, D., Merrifield, R. B., and Boman, H. G. (1992) Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity. FEBS letters 296, 190-194
- [0514] Aguila, J. R., W. Liao, J. Yang, C. Avila, N. Hagag, L. Senzel and Y. Ma (2011). "SALL4 is a robust stimulator for the expansion of hematopoietic stem cells." Blood 118(3): 576-585.
- [0515] Akinci, E., A. Banga, L. V. Greder, J. R. Dutton and J. M. Slack (2012). "Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (beta) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA." Biochem J 442(3): 539-550.
- [0516] Alford et al., (2009). "Toxicity of organic fluorophores used in molecular imaging: literature review." Mol Imaging. 8(6):341-54.
- [0517] Amand, H. L., B. Norden and K. Fant (2012). "Functionalization with C-terminal cysteine enhances transfection efficiency of cell-penetrating peptides through dimer formation." Biochem Biophys Res Commun 418(3): 469-474.
- [0518] Bejarano, L. A. and C. Gonzalez (1999). "Motif trap: a rapid method to clone motifs that can target proteins to defined subcellular localisations." J Cell Sci 112 (Pt 23): 4207-4211.
- [0519] Bikard et al., Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. Nucleic Acids Res. 41, 7429-7437.
- [0520] Boman, H. G., Wade, D., Boman, I. A., Wahlin, B., and Merrifield, R. B. (1989) Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. FEBS letters 259, 103-106.
- [0521] Buganim et al., (2014) "The Developmental Potential of iPSCs Is Greatly Influenced by Reprogramming Factor Selection". Cell stem cell. 15, 295-309.
- [0522] Chan, C. K. and D. A. Jans (1999). "Enhancement of polylysine-mediated transferrinfection by nuclear localization sequences: polylysine does not function as a nuclear localization sequence." Hum Gene Ther 10(10): 1695-1702.
- [0523] Chan, C. K. and D. A. Jans (2001). "Enhancement of MSH receptor- and GAL4-mediated gene transfer by switching the nuclear import pathway." Gene Ther 8(2): 166-171.
- [0524] Cong et al., (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819-823.
- [0525] Cox et al. (2015). "Therapeutic genome editing: prospects and challenges". Nature medicine, 21: 121-131.
- [0526] Dolfini, D., M. Minuzzo, G. Pavesi and R. Mantovani (2012). "The short isoform of NF-YA belongs to the embryonic stem cell transcription factor circuitry." Stem Cells 30(11): 2450-2459.
- [0527] Drin, G., S. Cottin, E. Blanc, A. R. Rees and J. Temsamani (2003). "Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides." J Biol Chem 278(33): 31192-31201.
- [0528] El-Andaloussi, S., H. J. Johansson, T. Holm and U. Langel (2007). "A novel cell-penetrating peptide, M918, for efficient delivery of proteins and peptide nucleic acids." Mol Ther 15(10): 1820-1826.
- [0529] El-Sayed, A., S. Futaki and H. Harashima (2009). "Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment." AAPS J 11(1): 13-22.
- [0530] Elmquist, A., M. Lindgren, T. Bartfai and U. Langel (2001). "VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions." Exp Cell Res 269(2): 237-244.
- [0531] Erazo-Oliveras et al., (2014) "Protein delivery into live cells by incubation with an endosomolytic agent." Nat Methods. (8):861-7.

- [0532] Fanara, P., M. R. Hodel, A. H. Corbett and A. E. Hodel (2000). "Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding." *J Biol Chem* 275(28): 21218-21223.
- [0533] Fasoli A et al., (2014) "Mechanistic insight into CM18-Tat11 peptide membrane-perturbing action by whole-cell patch-clamp recording." *Molecules*. 19(7):9228-39.
- [0534] Fawell, S., J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky and J. Barsoum (1994). "Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(2): 664-668.
- [0535] Fominaya, J., C. Uhrek and W. Wels (1998). "A chimeric fusion protein containing transforming growth factor-alpha mediates gene transfer via binding to the EGF receptor." *Gene Ther* 5(4): 521-530.
- [0536] Fominaya, J. and W. Wels (1996). "Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system." *J Biol Chem* 271(18): 10560-10568.
- [0537] Fonoudi, H., M. Yeganeh, F. Fattah, Z. Ghazizadeh, H. Rassouli, M. Alikhani, B. A. Mojarrad, H. Baharvand, G. H. Salekdeh and N. Aghdam (2013). "ISL1 protein transduction promotes cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells." *PLoS One* 8(1): e55577.
- [0538] Gilbert et al., CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154, 442-451.
- [0539] Gilmore, T. D. and H. M. Temin (1988). "v-rel oncoproteins in the nucleus and in the cytoplasm transform chicken spleen cells." *J Virol* 62(3): 703-714.
- [0540] Glover, D. J., S. M. Ng, A. Mechler, L. L. Martin and D. A. Jans (2009). "Multifunctional protein nanocarriers for targeted nuclear gene delivery in nondividing cells." *FASEB J* 23(9): 2996-3006.
- [0541] Gordon, S. M., J. Chaix, L. J. Rupp, J. Wu, S. Madera, J. C. Sun, T. Lindsten and S. L. Reiner (2012). "The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation." *Immunity* 36(1): 55-67.
- [0542] Gottschalk, S., J. T. Sparrow, J. Hauer, M. P. Mims, F. E. Leland, S. L. Woo and L. C. Smith (1996). "A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells." *Gene Ther* 3(5): 448-457.
- [0543] Gould, S. J., G. A. Keller, N. Hosken, J. Wilkinson and S. Subramani (1989). "A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes." *J Cell Biol* 108(5): 1657-1664.
- [0544] Green, M. and P. M. Loewenstein (1988). "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein." *Cell* 55(6): 1179-1188.
- [0545] Grimes, M. L., J. Zhou, E. C. Beattie, E. C. Yuen, D. E. Hall, J. S. Valletta, K. S. Topp, J. H. LaVail, N. W. Bennett and W. C. Mobley (1996). "Endocytosis of activated TrkB: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes." *J Neurosci* 16(24): 7950-7964.
- [0546] Hallbrink, M., A. Floren, A. Elmquist, M. Pooga, T. Bartfai and U. Langel (2001). "Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides." *Biochim Biophys Acta* 1515(2): 101-109.
- [0547] Herce, H. D. and A. E. Garcia (2007). "Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(52): 20805-20810.
- [0548] Ho et al., (2001). "Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vivo." *Cancer Research* 61: 474-477.
- [0549] Hurt, E. C., B. Pesold-Hurt, K. Suda, W. Oppliger and G. Schatz (1985). "The first twelve amino acids (less than half of the pre-sequence) of an imported mitochondrial protein can direct mouse cytosolic dihydrofolate reductase into the yeast mitochondrial matrix." *EMBO J* 4(8): 2061-2068.

- [0550] Ichii, H., A. Sakamoto, Y. Kuroda and T. Tokuhisa (2004). "Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8+ T cells." *J Immunol* 173(2): 883-891.
- [0551] Irie, Y., K. Yamagata, Y. Gan, K. Miyamoto, E. Do, C. H. Kuo, E. Taira and N. Miki (2000). "Molecular cloning and characterization of Amida, a novel protein which interacts with a neuron-specific immediate early gene product arc, contains novel nuclear localization signals, and causes cell death in cultured cells." *J Biol Chem* 275(4): 2647-2653.
- [0552] Kakudo, T., S. Chaki, S. Futaki, I. Nakase, K. Akaji, T. Kawakami, K. Maruyama, H. Kamiya and H. Harashima (2004). "Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system." *Biochemistry* 43(19): 5618-5628.
- [0553] Karniely, S. and O. Pines (2005). "Single translation--dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes." *EMBO Rep* 6(5): 420-425.
- [0554] Kato, G. J., W. M. Lee, L. L. Chen and C. V. Dang (1992). "Max: functional domains and interaction with c-Myc." *Genes Dev* 6(1): 81-92.
- [0555] Kichler, A., A. J. Mason and B. Bechinger (2006). "Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery." *Biochim Biophys Acta* 1758(3): 301-307.
- [0556] Kichler et al., (2003). "Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 18; 100(4): 1564-1568.
- [0557] Kira et al., (2011). "Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems". *Biol Direct*. 2011; 6: 38.
- [0558] Kleinschmidt, J. A. and A. Seiter (1988). "Identification of domains involved in nuclear uptake and histone binding of protein N1 of *Xenopus laevis*." *EMBO J* 7(6): 1605-1614.
- [0559] Kohler, M., D. Gorlich, E. Hartmann and J. Franke (2001). "Adenoviral E1A protein nuclear import is preferentially mediated by importin alpha3 in vitro." *Virology* 289(2): 186-191.
- [0560] Lanford, R. E., P. Kanda and R. C. Kennedy (1986). "Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal." *Cell* 46(4): 575-582.
- [0561] Lord-Dufour et al., (2009) "Evidence for transcriptional regulation of the glucose-6-phosphate transporter by HIF-1alpha: Targeting G6PT with mumbaistatin analogs in hypoxic mesenchymal stromal cells". *Stem cells* 27: 489-497.
- [0562] Li, W., F. Nicol and F. C. Szoka, Jr. (2004). "GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery." *Adv Drug Deliv Rev* 56(7): 967-985.
- [0563] Lin, M. H., F. C. Chou, L. T. Yeh, S. H. Fu, H. Y. Chiou, K. I. Lin, D. M. Chang and H. K. Sytwu (2013). "B lymphocyte-induced maturation protein 1 (BLIMP-1) attenuates autoimmune diabetes in NOD mice by suppressing Th1 and Th17 cells." *Diabetologia* 56(1): 136-146.
- [0564] Liu, X., P. K. Tian, D. W. Ju, M. H. Zhang, M. Yao, X. T. Cao and J. R. Gu (2003). "Systemic genetic transfer of p21WAF-1 and GM-CSF utilizing of a novel oligopeptide-based EGF receptor targeting polyplex." *Cancer Gene Ther* 10(7): 529-539.
- [0565] London, E. (1992). "Diphtheria toxin: membrane interaction and membrane translocation." *Biochim Biophys Acta* 1113(1): 25-51.
- [0566] Lorieau, J. L., J. M. Louis and A. Bax (2010). "The complete influenza hemagglutinin fusion domain adopts a tight helical hairpin arrangement at the lipid:water interface." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(25): 11341-11346.
- [0567] Lu, S. J., Q. Feng, Y. Ivanova, C. Luo, T. Li, F. Li, G. R. Honig and R. Lanza (2007). "Recombinant HoxB4 fusion proteins enhance hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells." *Stem Cells*

Dev 16(4): 547-559.

[0568] Luan et al., (2015). "Peptide amphiphiles with multifunctional fragments promoting cellular uptake and endosomal escape as efficient gene vectors." *J. Mater. Chem. B*, 3: 1068-1078.

[0569] Mack, M., B. Luckow, P. J. Nelson, J. Cihak, G. Simmons, P. R. Clapham, N. Signoret, M. Marsh, M. Stangassinger, F. Borlat, T. N. Wells, D. Schlondorff and A. E. Proudfoot (1998). "Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity." *J Exp Med* 187(8): 1215-1224.

[0570] Maeng, C. H., J. H. Yi, J. Lee, J. Y. Hong, M. K. Choi, H. A. Jung, J. O. Park, S. H. Park, Y. S. Park, W. K. Kang and H. Y. Lim (2013). "Effects of single nucleotide polymorphisms on treatment outcomes and toxicity in patients treated with sunitinib." *Anticancer Res* 33(10): 4619-4626.

[0571] Mahlum, E., D. Mandal, C. Halder, A. Maran, M. J. Yaszemski, R. B. Jenkins, M. E. Bolander and G. Sarkar (2007). "Engineering a noncarrier to a highly efficient carrier peptide for noncovalently delivering biologically active proteins into human cells." *Anal Biochem* 365(2): 215-221.

[0572] Makarova et al., (2011). "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems." *Nat Rev Microbiol*. 9(6): 467-477.

[0573] Makkerh, J. P., C. Dingwall and R. A. Laskey (1996). "Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids." *Curr Biol* 6(8): 1025-1027.

[0574] Martinez-Fong, D., I. Navarro-Quiroga, I. Ochoa, I. Alvarez-Maya, M. A. Meraz, J. Luna and J. A. Arias-Montano (1999). "Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells." *Brain Res Mol Brain Res* 69(2): 249-262.

[0575] Maurer, M. and E. von Stebut (2004). "Macrophage inflammatory protein-1." *Int J Biochem Cell Biol* 36(10): 1882-1886.

[0576] McKay, T., P. Reynolds, S. Jeppard, D. Curiel and C. Coutelle (2002). "Secretin-mediated gene delivery, a specific targeting mechanism with potential for treatment of biliary and pancreatic disease in cystic fibrosis." *Mol Ther* 5(4): 447-454.

[0577] Midoux, P., A. Kichler, V. Boutin, J. C. Maurizot and M. Monsigny (1998). "Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines." *Bioconjug Chem* 9(2): 260-267.

[0578] Milenkovic, D., T. Rammig, J. M. Muller, L. S. Wenz, N. Gebert, A. Schulze-Specking, D. Stojanovski, S. Rospert and A. Chacinska (2009). "Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria." *Mol Biol Cell* 20(10): 2530-2539.

[0579] Miyoshi, I., N. Kasai and Y. Hayashizaki (1994). "[Structure and regulation of human thyroid-stimulating hormone (TSH) gene]." *Nihon Rinsho* 52(4): 940-947.

[0580] Moede, T., B. Leibiger, H. G. Pour, P. Berggren and I. B. Leibiger (1999). "Identification of a nuclear localization signal, RRMKWKK, in the homeodomain transcription factor PDX-1." *FEBS Lett* 461(3): 229-234.

[0581] Montrose, K., Y. Yang, X. Sun, S. Wiles and G. W. Krissansen (2013). "Xentry, a new class of cell-penetrating peptide uniquely equipped for delivery of drugs." *Sci Rep* 3: 1661.

[0582] Moreland, R. B., G. L. Langevin, R. H. Singer, R. L. Garcea and L. M. Hereford (1987). "Amino acid sequences that determine the nuclear localization of yeast histone 2B." *Mol Cell Biol* 7(11): 4048-4057.

[0583] Morris, M. C., L. Chaloin, M. Choob, J. Archdeacon, F. Heitz and G. Divita (2004). "Combination of a new generation of PNAs with a peptide-based carrier enables efficient targeting of cell cycle progression." *Gene Ther* 11(9): 757-764.

[0584] Morris, M. C., J. Depollier, J. Mery, F. Heitz and G. Divita (2001). "A peptide carrier for the

delivery of biologically active proteins into mammalian cells." *Nat Biotechnol* 19(12): 1173-1176.

[0585] Nakanishi, A., D. Shum, H. Morioka, E. Otsuka and H. Kasamatsu (2002). "Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin alpha 2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40." *J Virol* 76(18): 9368-9377.

[0586] O'Keefe, D. O. (1992). "Characterization of a full-length, active-site mutant of diphtheria toxin." *Arch Biochem Biophys* 296(2): 678-684.

[0587] Parente, R. A., S. Nir and F. C. Szoka, Jr. (1990). "Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA." *Biochemistry* 29(37): 8720-8728.

[0588] Paul, R. W., K. E. Weisser, A. Loomis, D. L. Sloane, D. LaFoe, E. M. Atkinson and R. W. Overell (1997). "Gene transfer using a novel fusion protein, GAL4/invasin." *Hum Gene Ther* 8(10): 1253-1262.

[0589] Perez, F., A. Joliot, E. Bloch-Gallego, A. Zahraoui, A. Triller and A. Prochiantz (1992). "Antennapedia homeobox as a signal for the cellular internalization and nuclear addressing of a small exogenous peptide." *J Cell Sci* 102 (Pt 4): 717-722.

[0590] Pimenta, D. C., V. C. Chen, J. Chao, M. A. Juliano and L. Juliano (2000). "Alphal-antichymotrypsin and kallistatin hydrolysis by human cathepsin D." *J Protein Chem* 19(5): 411-418.

[0591] Prieve, M. G. and M. L. Waterman (1999). "Nuclear localization and formation of beta-catenin-lymphoid enhancer factor 1 complexes are not sufficient for activation of gene expression." *Mol Cell Biol* 19(6): 4503-4515.

[0592] Rajagopalan, R., J. Xavier, N. Rangaraj, N. M. Rao and V. Gopal (2007). "Recombinant fusion proteins TAT-Mu, Mu and Mu-Mu mediate efficient non-viral gene delivery." *J Gene Med* 9(4): 275-286.

[0593] Riddell et al., (2014) "Reprogramming committed murine blood cells to induced hematopoietic stem cells with defined factors". *Cell*, 157: 549-564

[0594] Rodolphe Barrangou and Luciano A. Marraffini (2014). "'CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity''. *Cell* Volume 54, Issue 2, p234-244, 24 April 2014.

[0595] Salomone, F., F. Cardarelli, M. Di Luca, C. Boccardi, R. Nifosi, G. Bardi, L. Di Bari, M. Serresi and F. Beltram (2012). "A novel chimeric cell-penetrating peptide with membrane-disruptive properties for efficient endosomal escape." *J Control Release* 163(3): 293-303.

[0596] Salomone F., Cardarelli F, Signore G, Boccardi C, Beltram F. (2013) "In vitro efficient transfection by CM1-Tat1₁ 1 hybrid peptide: a new tool for gene-delivery applications." *PLoS One*. 8(7):e70108.

[0597] Schneider, H., R. P. Harbottle, Y. Yokosaki, J. Kunde, D. Sheppard and C. Coutelle (1998). "A novel peptide, PLAEIDGIELTY, for the targeting of alpha9beta1-integrins." *FEBS Lett* 429(3): 269-273.

[0598] Schreiber, V., M. Molinete, H. Boeuf, G. de Murcia and J. Menissier-de Murcia (1992). "The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity." *EMBO J* 11(9): 3263-3269.

[0599] Schuster, M. J., G. Y. Wu, C. M. Walton and C. H. Wu (1999). "Multicomponent DNA carrier with a vesicular stomatitis virus G-peptide greatly enhances liver-targeted gene expression in mice." *Bioconjug Chem* 10(6): 1075-1083.

[0600] Scott, M. S., F. M. Boisvert, M. D. McDowall, A. I. Lamond and G. J. Barton (2010). "Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences." *Nucleic Acids Res* 38(21): 7388-7399.

[0601] Shaw, P. A., I. R. Catchpole, C. A. Goddard and W. H. Colledge (2008). "Comparison of protein transduction domains in mediating cell delivery of a secreted CRE protein." *Biochemistry* 47(4): 1157-1166.

[0602] Shoya, Y., T. Kobayashi, T. Koda, K. Ikuta, M. Kakinuma and M. Kishi (1998). "Two proline-rich nuclear

localization signals in the amino- and carboxyl-terminal regions of the Borna disease virus phosphoprotein." *J Virol* 72(12): 9755-9762.

- [0603] Somasekaram, A., A. Jarmuz, A. How, J. Scott and N. Navaratnam (1999). "Intracellular localization of human cytidine deaminase. Identification of a functional nuclear localization signal." *J Biol Chem* 274(40): 28405-28412.
- [0604] Stojanovski, D., M. Bohnert, N. Pfanner and M. van der Laan (2012). "Mechanisms of protein sorting in mitochondria." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(10).
- [0605] Sudbeck, P. and G. Scherer (1997). "Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9." *J Biol Chem* 272(44): 27848-27852.
- [0606] Sung, M. S., J. Y. Mun, O. Kwon, K. S. Kwon and D. B. Oh (2013). "Efficient myogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by the transduction of engineered MyoD protein." *Biochem Biophys Res Commun* 437(1): 156-161.
- [0607] Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* 126(4): 663-676.
- [0608] Takeda, A., C. Goolsby and N. R. Yaseen (2006). "NUP98-HOXA9 induces long-term proliferation and blocks differentiation of primary human CD34+ hematopoietic cells." *Cancer Res* 66(13): 6628-6637.
- [0609] Tan, Y., Z. Xie, M. Ding, Z. Wang, Q. Yu, L. Meng, H. Zhu, X. Huang, L. Yu, X. Meng and Y. Chen (2010). "Increased levels of FoxA1 transcription factor in pluripotent P19 embryonal carcinoma cells stimulate neural differentiation." *Stem Cells Dev* 19(9): 1365-1374.
- [0610] Tan, Y. X., C. Chen, Y. L. Wang, S. Lin, Y. Wang, S. B. Li, X. P. Jin, H. W. Gao, F. S. Du, F. Gong and S. P. Ji (2012). "Truncated peptides from melittin and its analog with high lytic activity at endosomal pH enhance branched polyethylenimine-mediated gene transfection." *J Gene Med* 14(4): 241-250.
- [0611] Uherek, C., J. Fominaya and W. Wels (1998). "A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery." *J Biol Chem* 273(15): 8835-8841.
- [0612] Varkouhi, A. K., M. Scholte, G. Storm and H. J. Haisma (2011). "Endosomal escape pathways for delivery of biologicals." *J Control Release* 151(3): 220-228.
- [0613] Veach, R. A., D. Liu, S. Yao, Y. Chen, X. Y. Liu, S. Downs and J. Hawiger (2004). "Receptor/transporter-independent targeting of functional peptides across the plasma membrane." *J Biol Chem* 279(12): 11425-11431.
- [0614] Vives, E., P. Brodin and B. Lebleu (1997). "A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus." *J Biol Chem* 272(25): 16010-16017.
- [0615] Wagstaff, K. M., D. J. Glover, D. J. Tremethick and D. A. Jans (2007). "Histone-mediated transduction as an efficient means for gene delivery." *Mol Ther* 15(4): 721-731.
- [0616] Warr, M. R., M. Binnewies, J. Flach, D. Reynaud, T. Garg, R. Malhotra, J. Debnath and E. Passegue (2013). "FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells." *Nature* 494(7437): 323-327.
- [0617] Welch, K., J. Franke, M. Kohler and I. G. Macara (1999). "RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin-alpha3." *Mol Cell Biol* 19(12): 8400-8411.
- [0618] Wiedenheft et al., (2011). RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 10092-10097.
- [0619] Witzel, I., M. Graeser, T. Karn, M. Schmidt, R. Wirtz, D. Schutze, A. Rausch, F. Janicke, K. Milde-Langosch and V. Muller (2013). "Androgen receptor expression is a predictive marker in chemotherapy-

treated patients with endocrine receptor-positive primary breast cancers." *J Cancer Res Clin Oncol* 139(5): 809-816.

[0620] Wu, J., L. Zhou, K. Tonissen, R. Tee and K. Artzt (1999). "The quaking I-5 protein (QKI-5) has a novel nuclear localization signal and shuttles between the nucleus and the cytoplasm." *J Biol Chem* 274(41): 29202-29210.

[0621] Wyman, T. B., F. Nicol, O. Zelphati, P. V. Scaria, C. Plank and F. C. Szoka, Jr. (1997). "Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers." *Biochemistry* 36(10): 3008-3017.

[0622] Yu, Z., C. H. Lee, C. Chinpaisal and L. N. Wei (1998). "A constitutive nuclear localization signal from the second zinc-finger of orphan nuclear receptor TR2." *J Endocrinol* 159(1): 53-60.

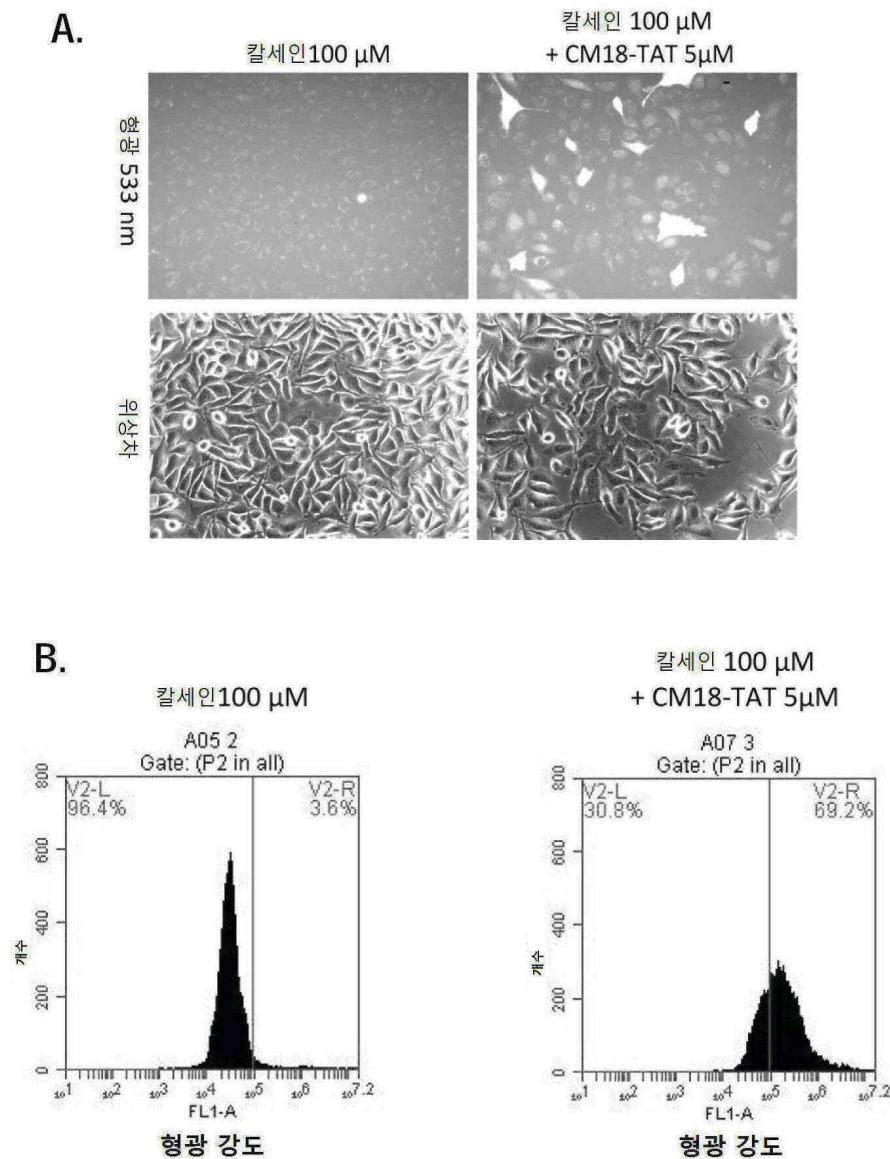
[0623] Zetsche et al., (2015). "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System". *Cell*. 25. pii: S0092-8674(15)01200-3 [<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>].

[0624] Zhang, J. K., J. Cui, Y. J. Lv and H. Yan (2006). "[Analysis of reasons for eye trauma in construction workers and visual acuity after treatment]." *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 24(6): 371-372.

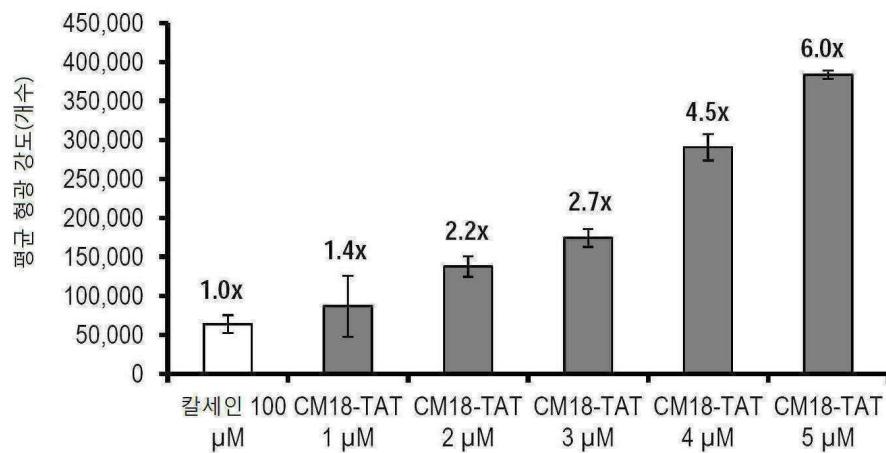
[0625] Zhou, H., S. Wu, J. Y. Joo, S. Zhu, D. W. Han, T. Lin, S. Trauger, G. Bien, S. Yao, Y. Zhu, G. Siuzdak, H. R. Scholer, L. Duan and S. Ding (2009). "Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins." *Cell Stem Cell* 4(5): 381-384.

도면

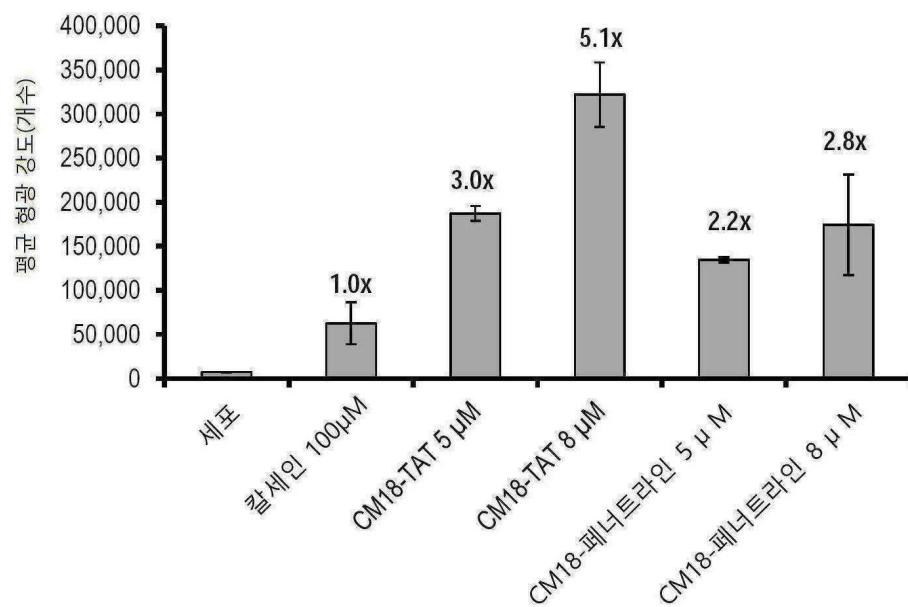
도면1



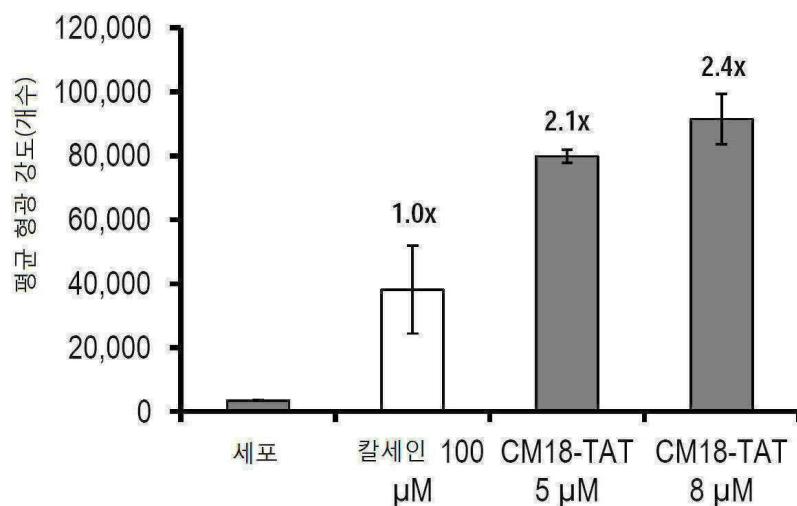
도면2



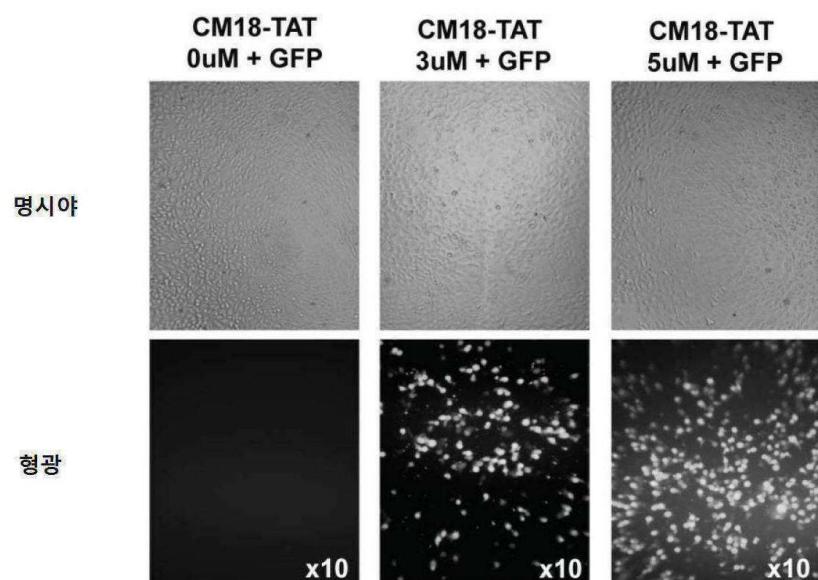
도면3



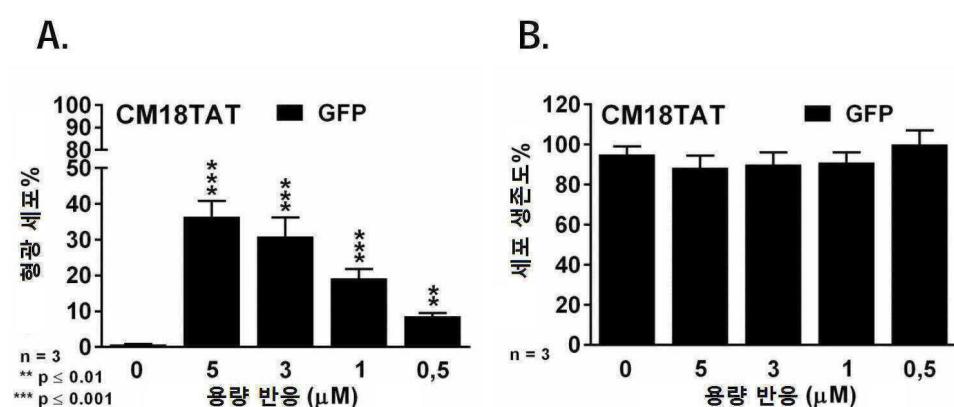
도면4



도면5

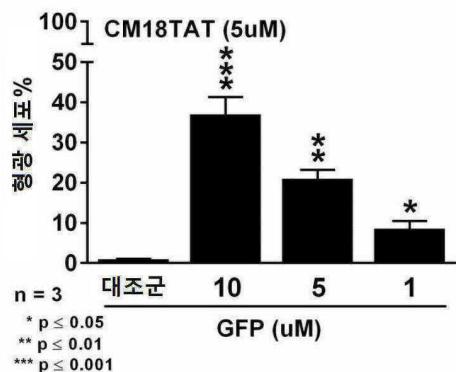


도면6

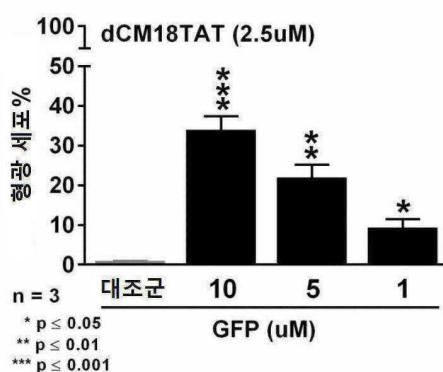


도면7

A.

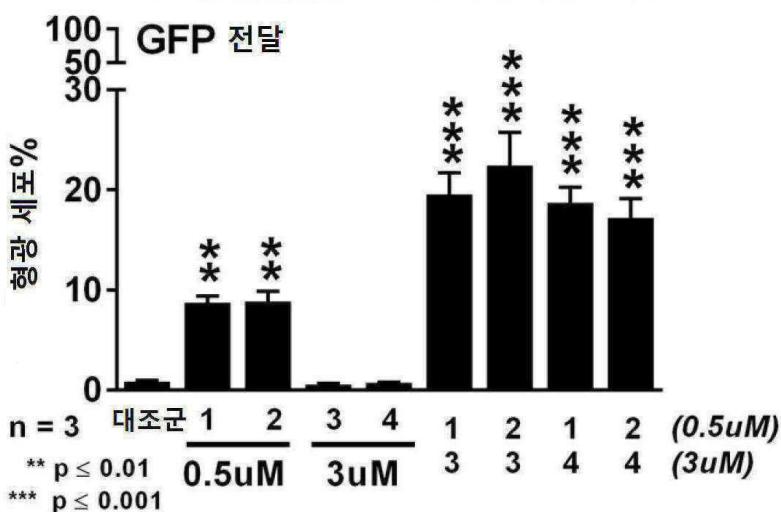


B.



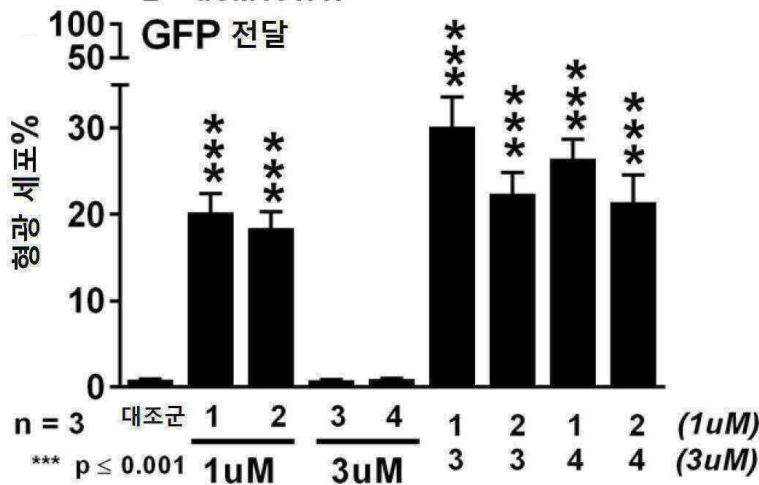
도면8

1 = CM18TAT 3 = CM18페네트라틴
2 = dCM18TAT 4 = dCM18페네트라틴

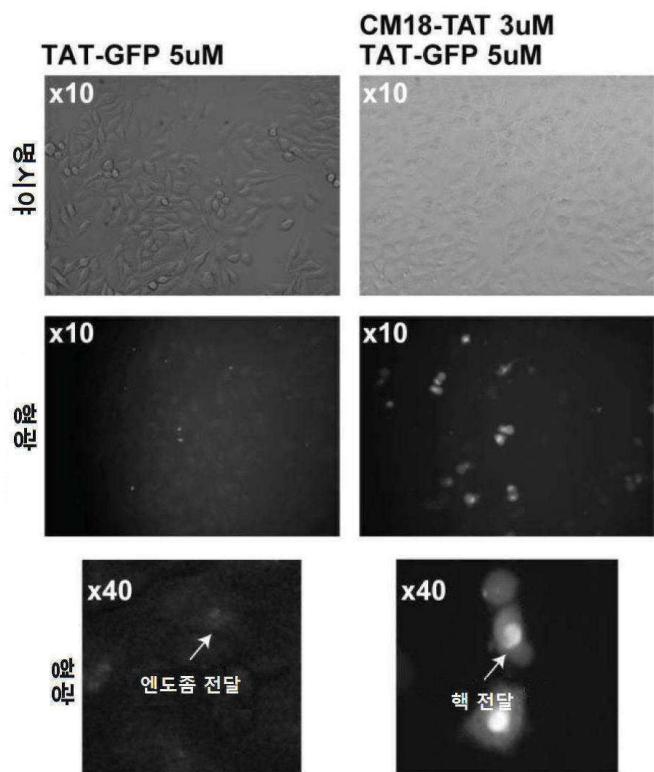


도면9

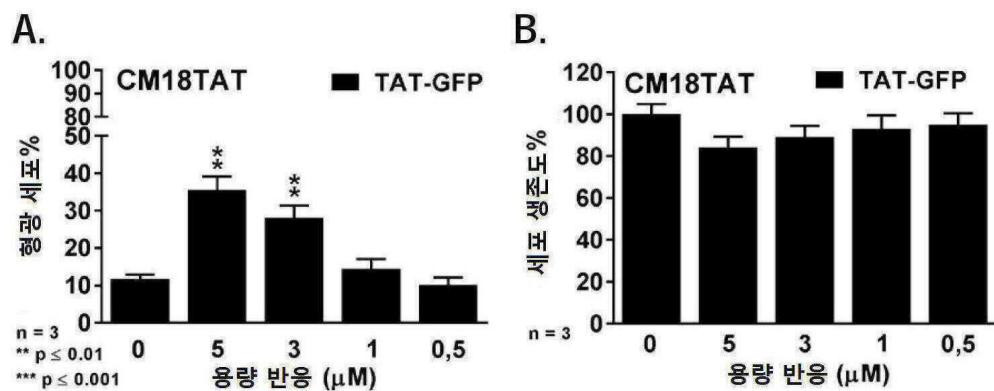
1 = CM18TAT 3 = CM18페네트라틴
2 = dCM18TAT 4 = dCM18페네트라틴



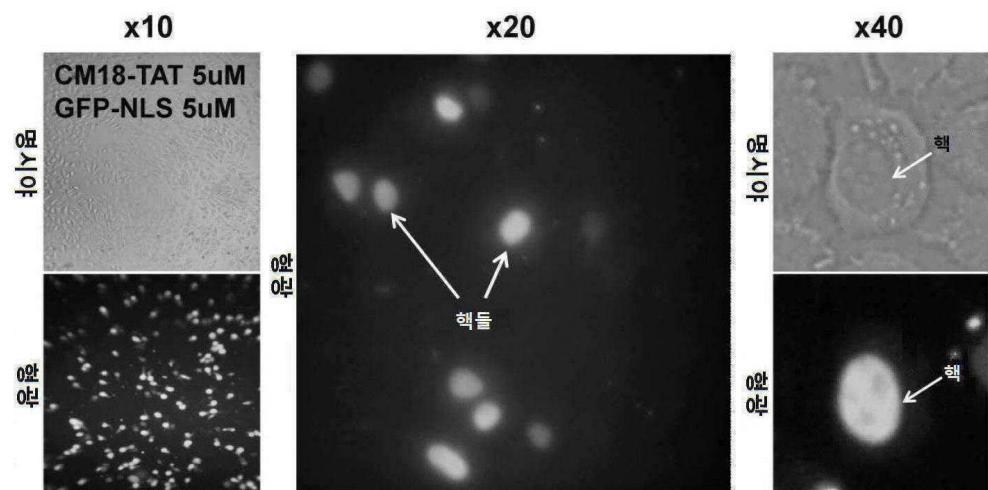
도면10



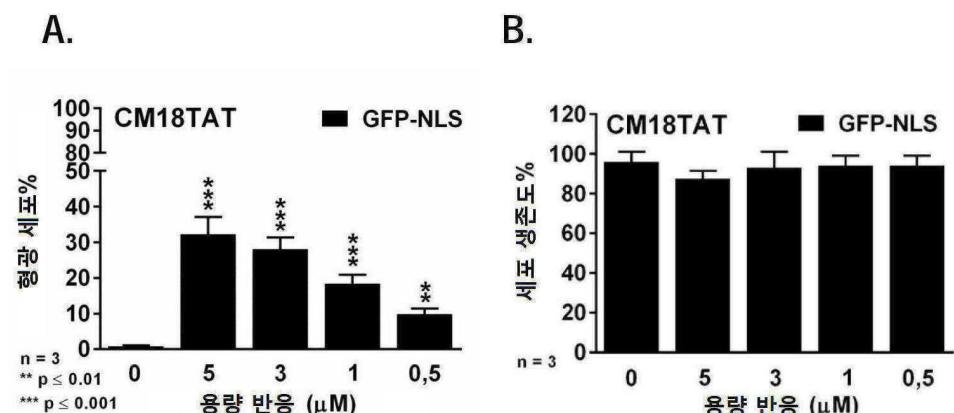
도면11



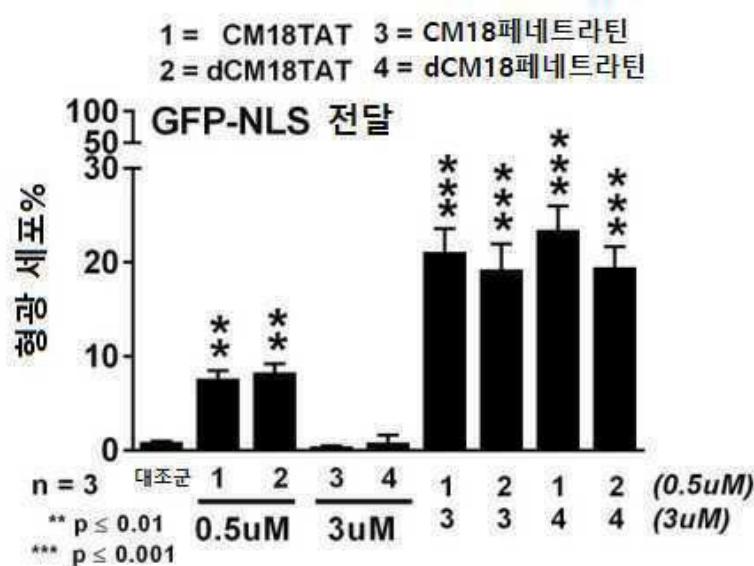
도면12



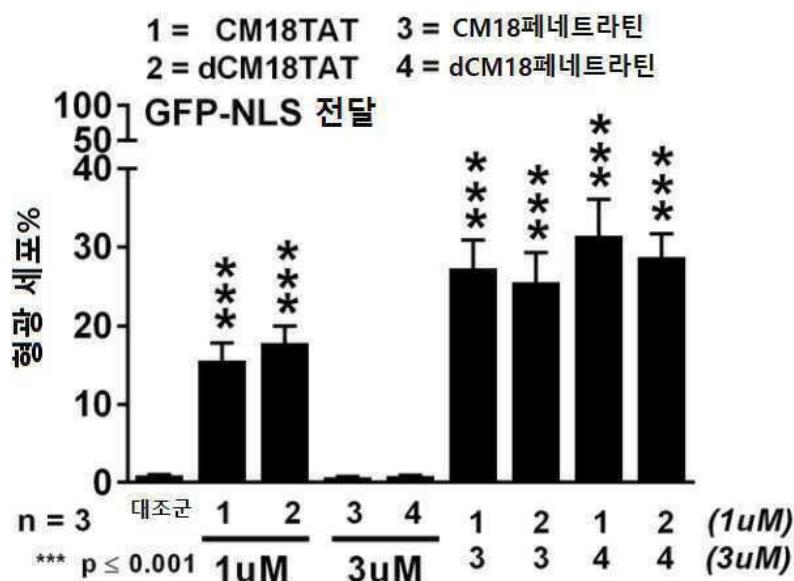
도면13



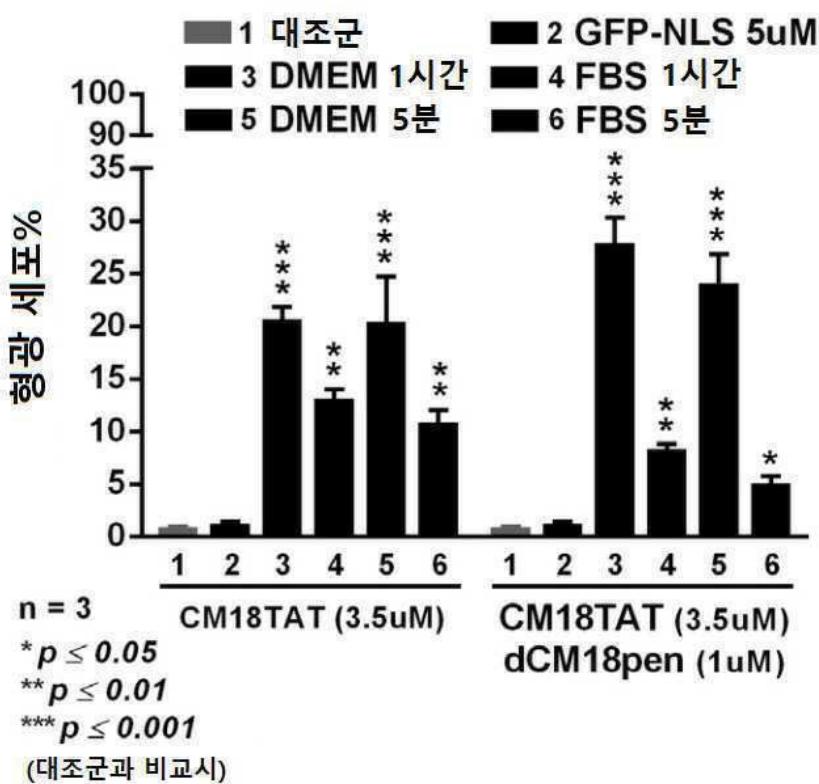
도면14



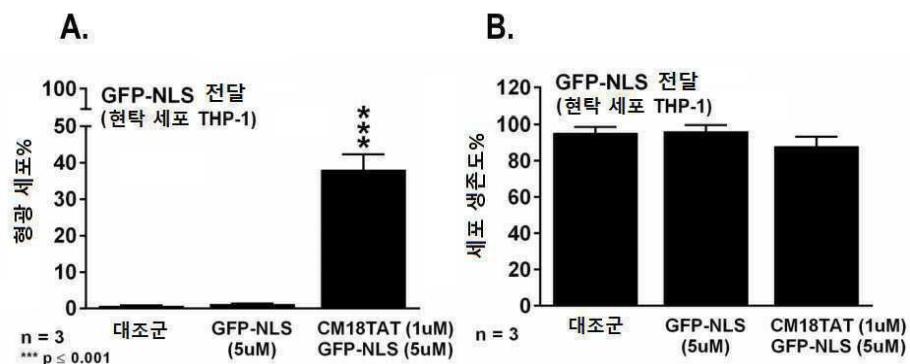
도면15



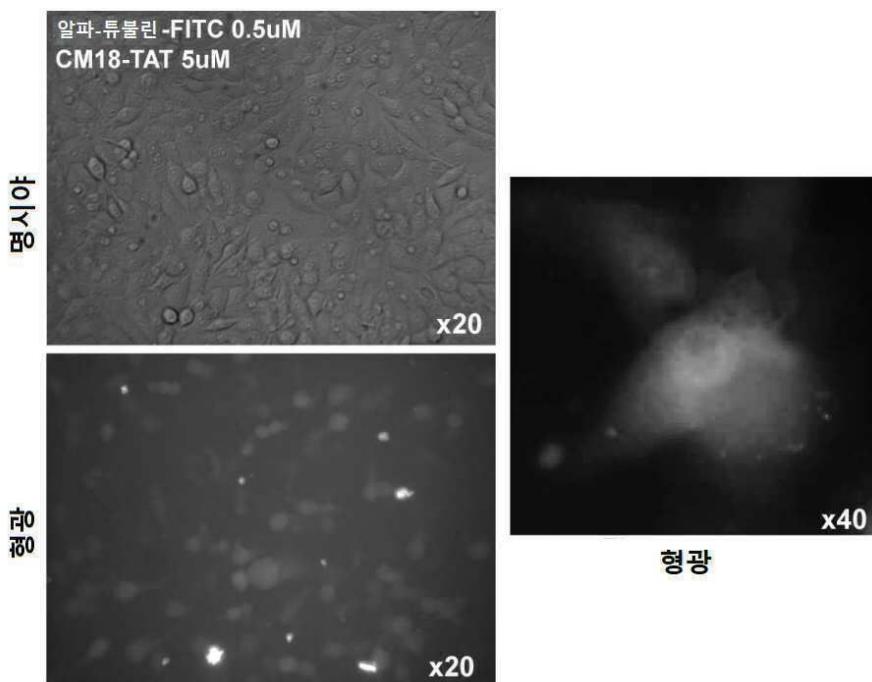
도면16



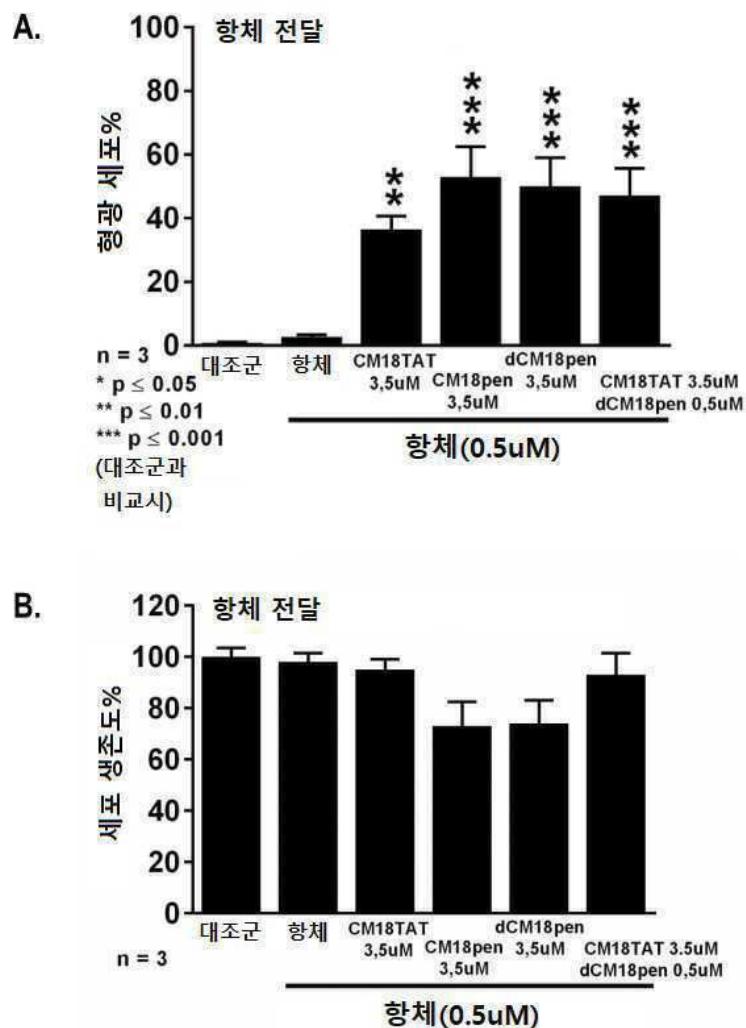
도면17



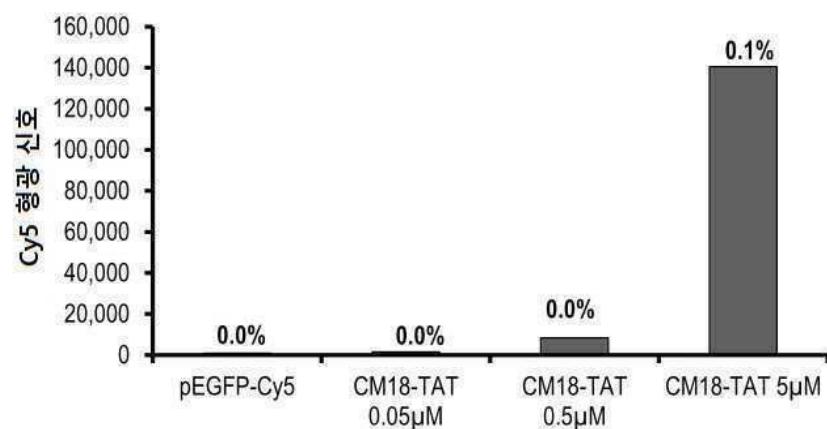
도면18



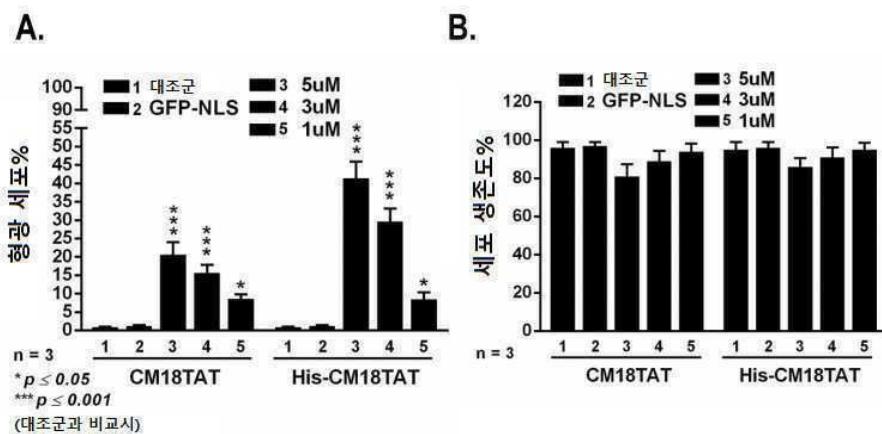
도면19



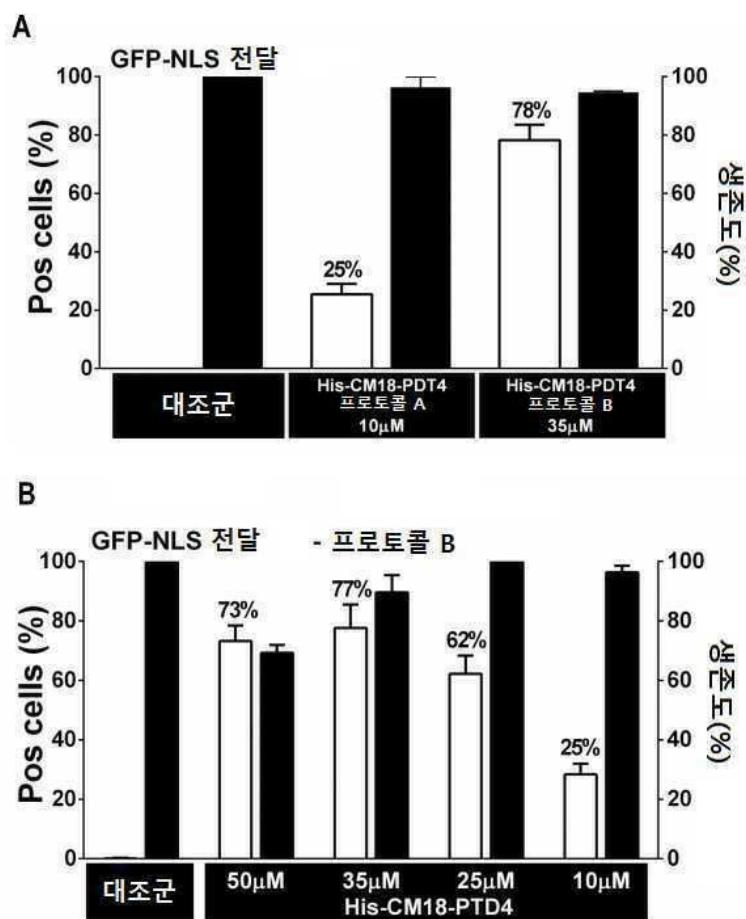
도면20



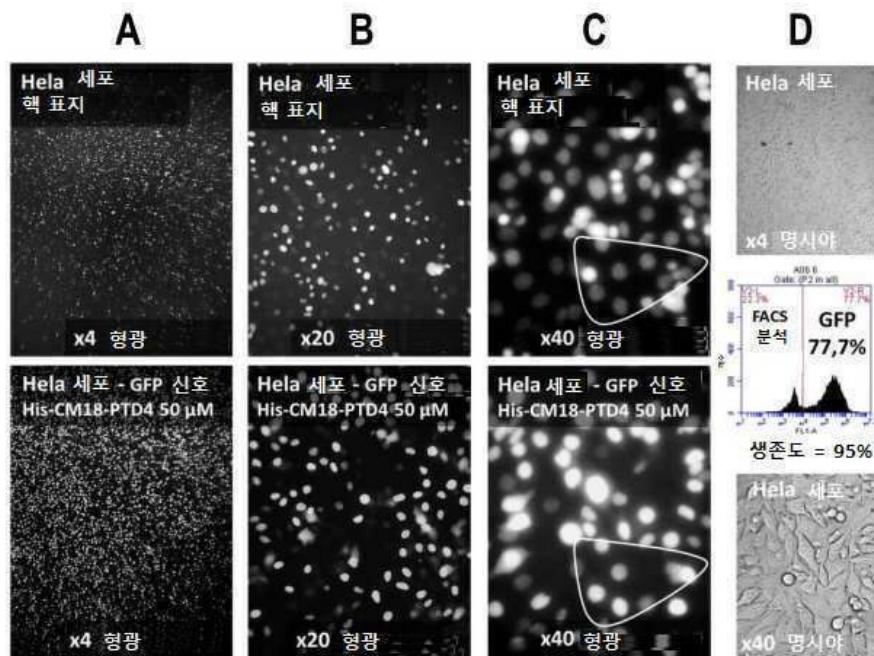
도면21



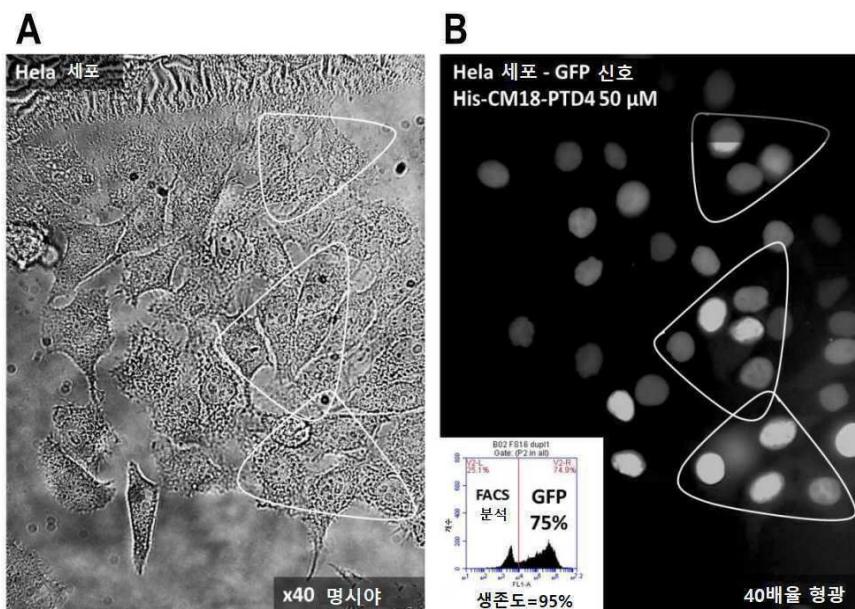
도면22



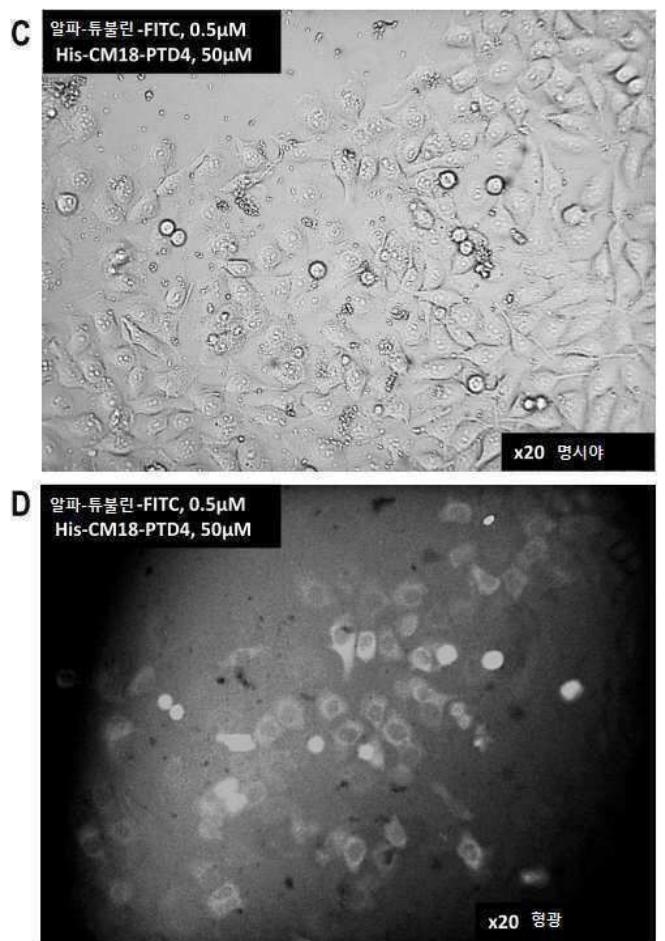
도면23



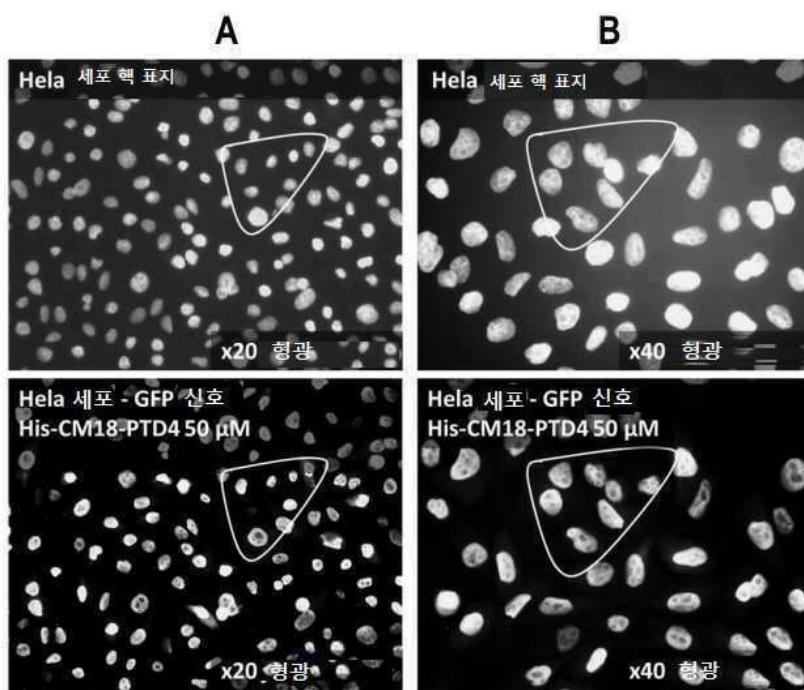
도면24a



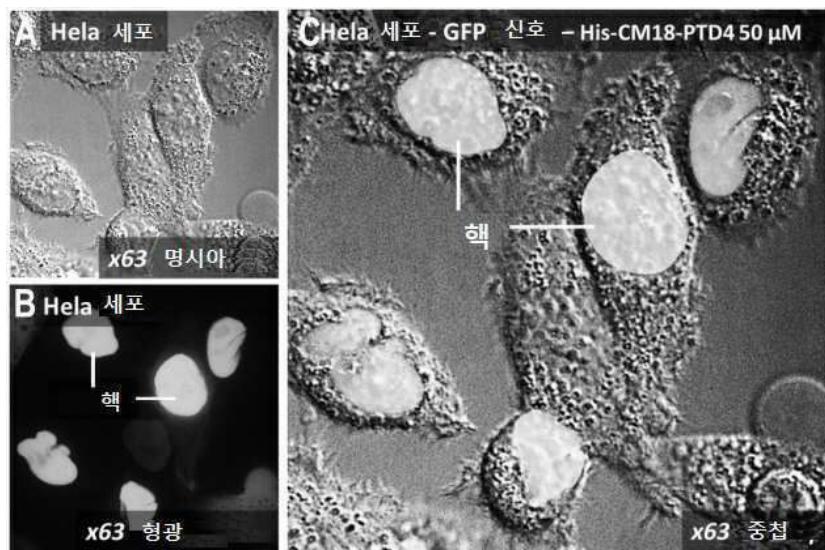
도면24b



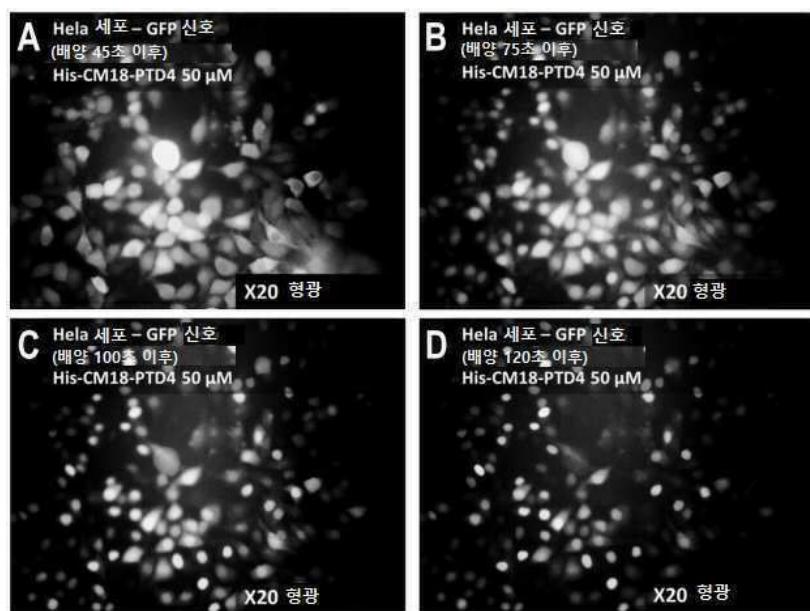
도면25



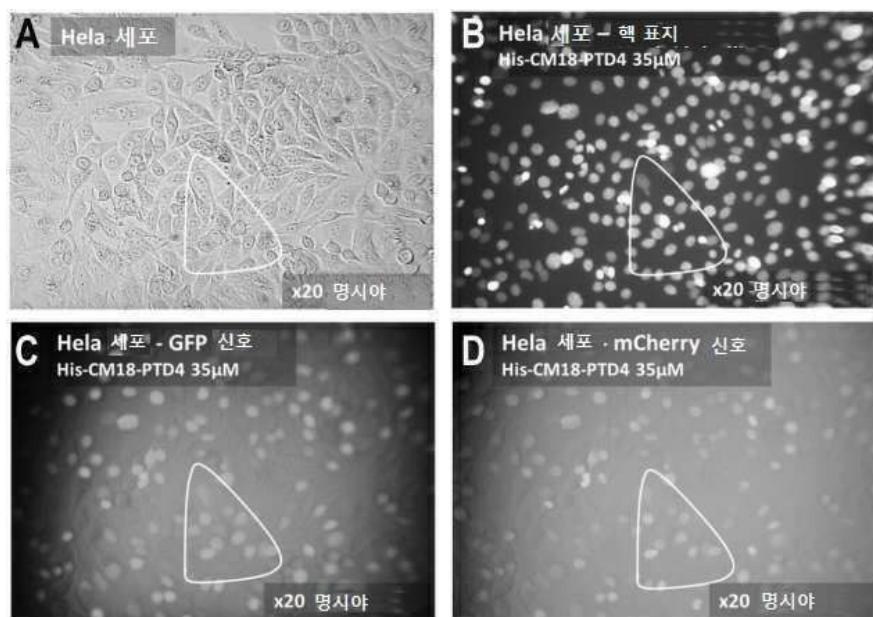
도면26



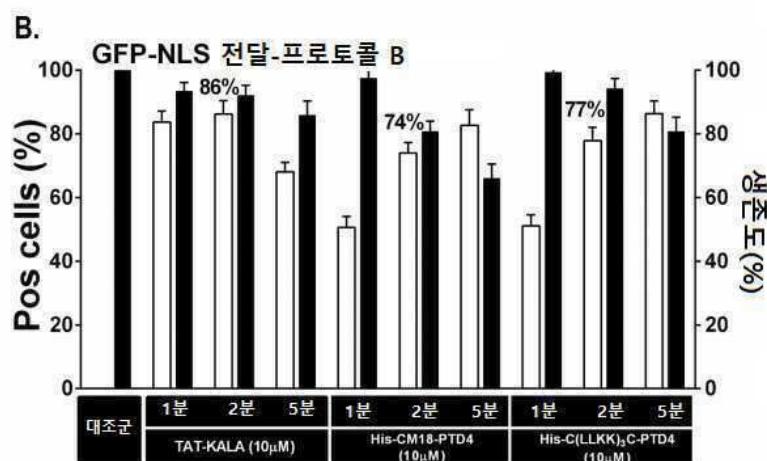
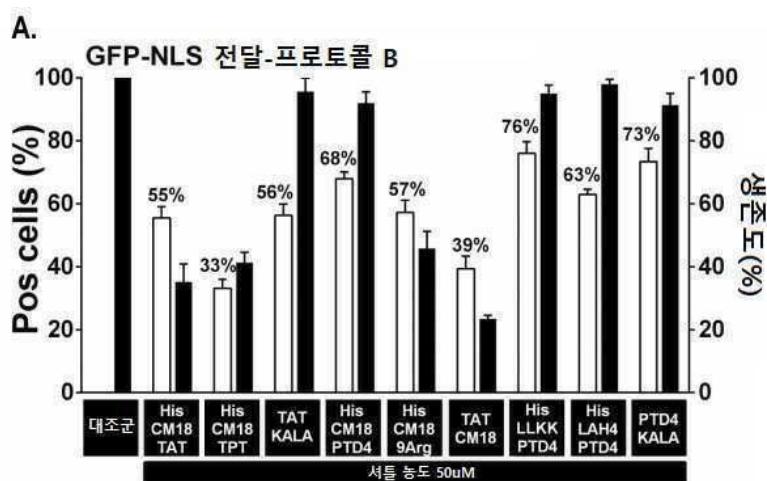
도면27



도면28

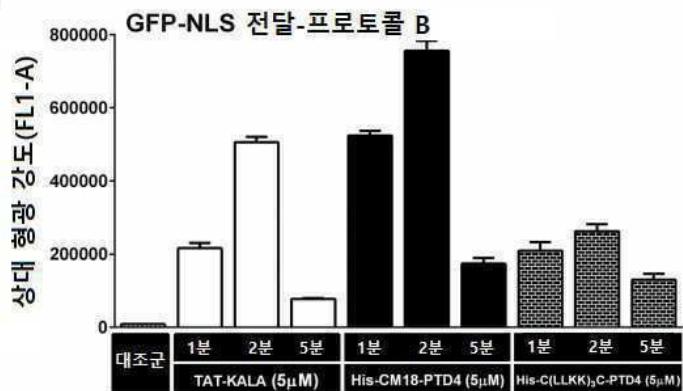


도면29a

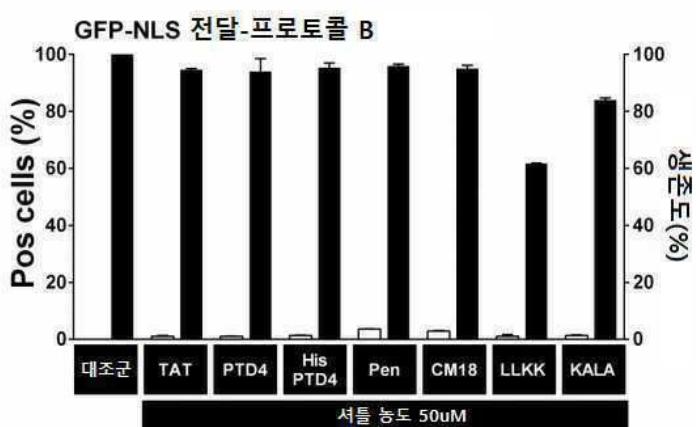


도면29b

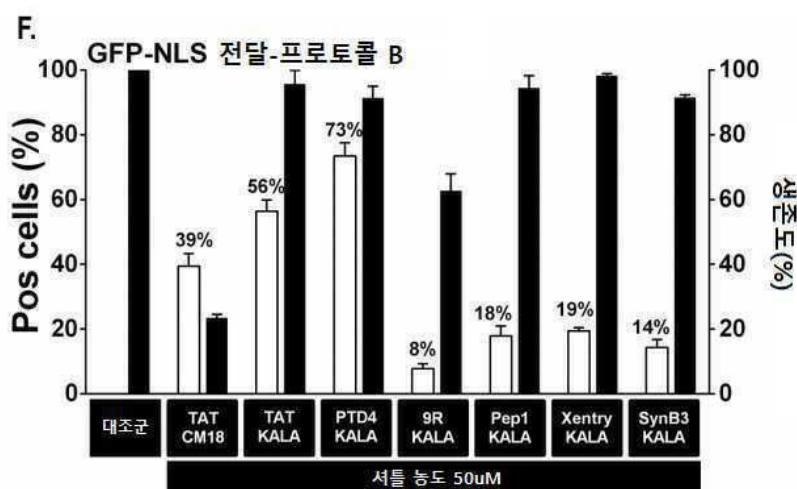
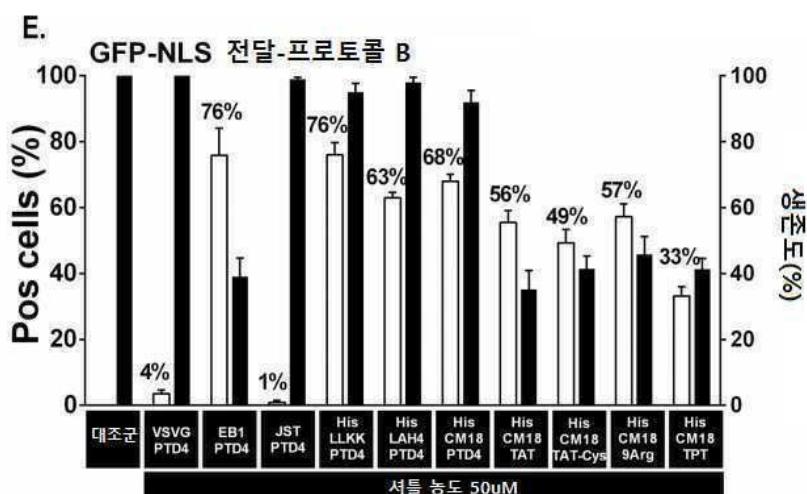
C.



D.

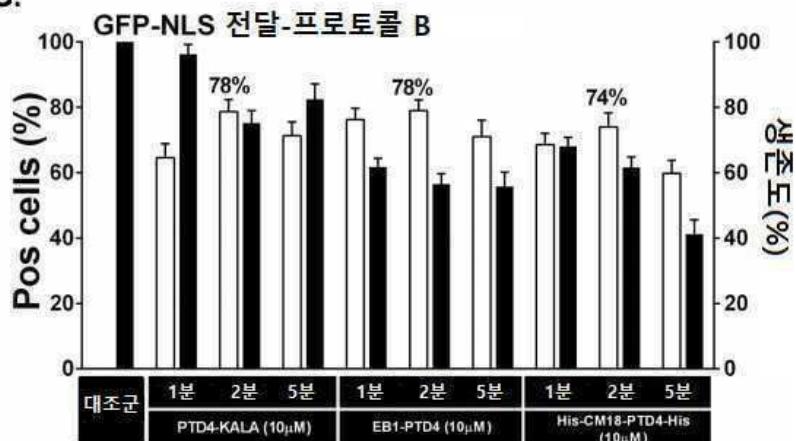


도면29c

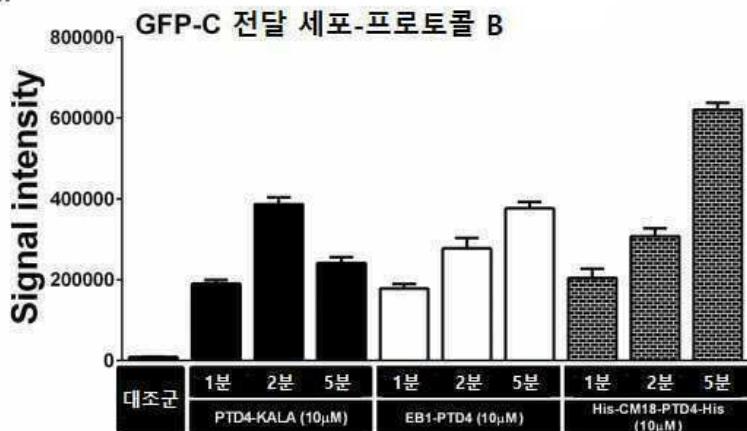


도면29d

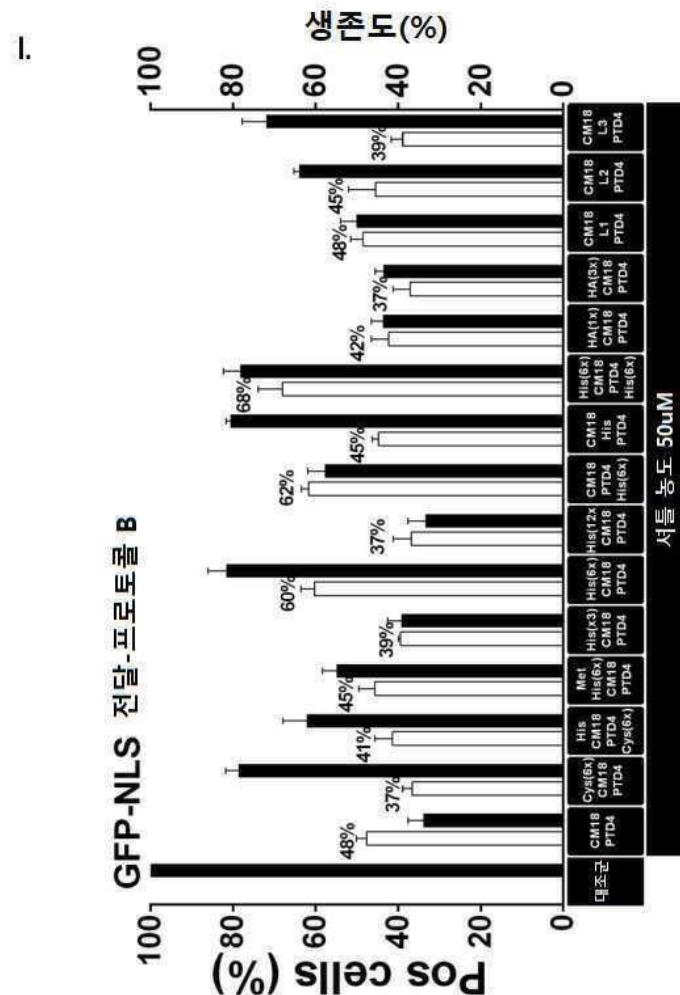
G.



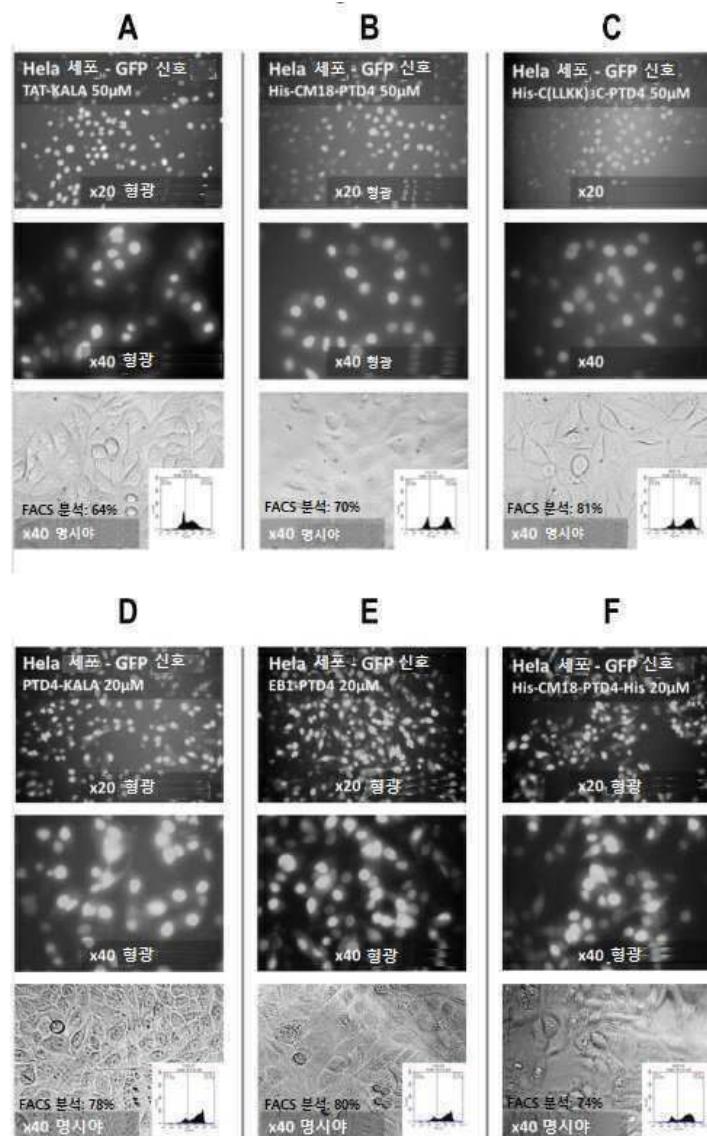
H.



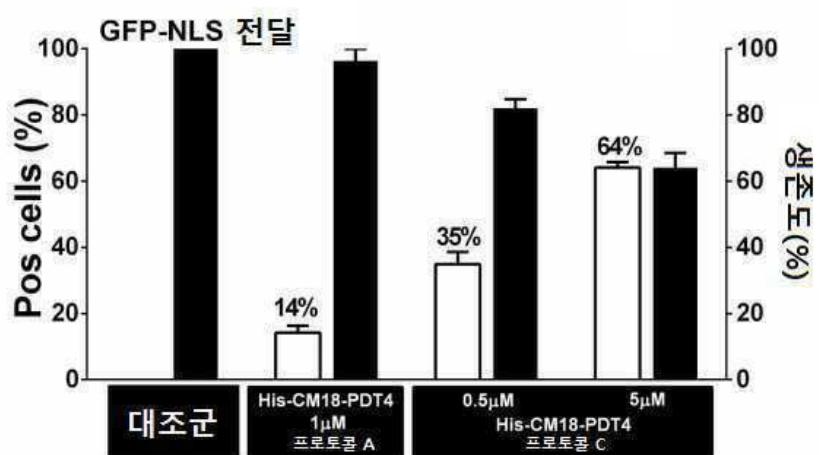
도면 29e



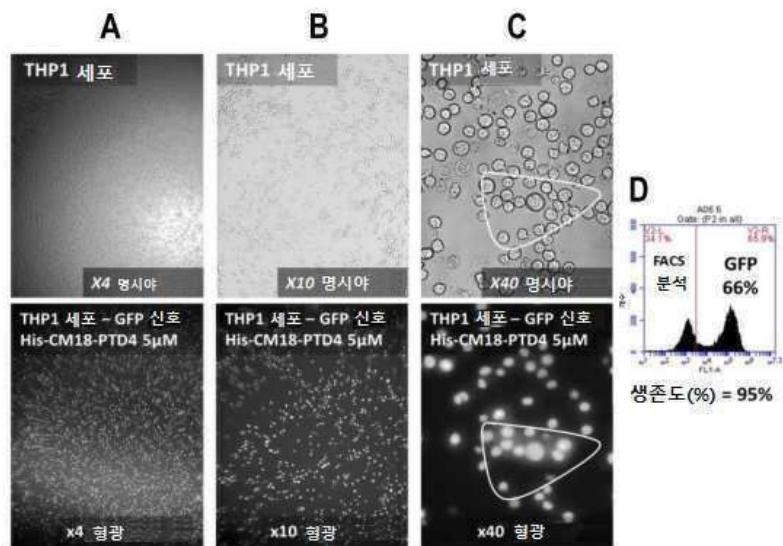
도면30



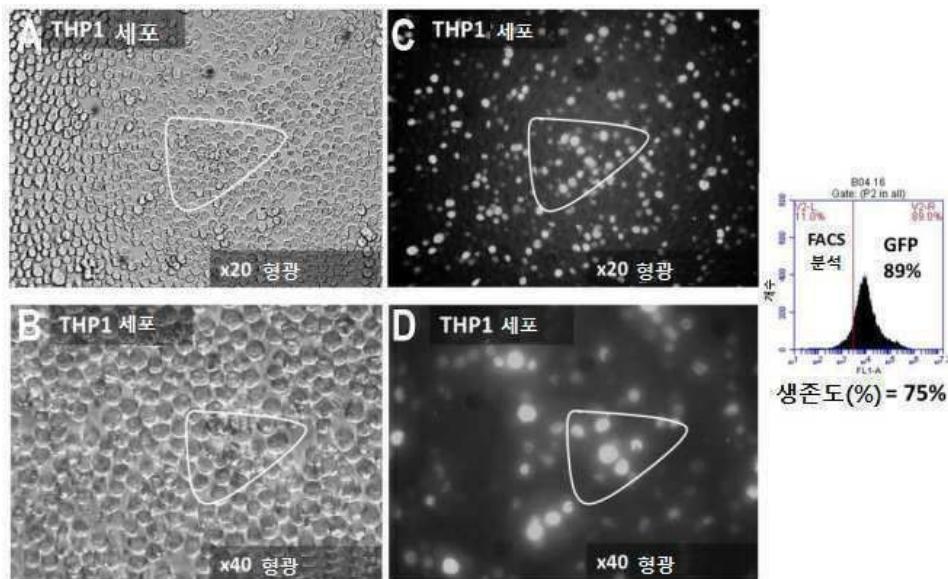
도면31



도면32

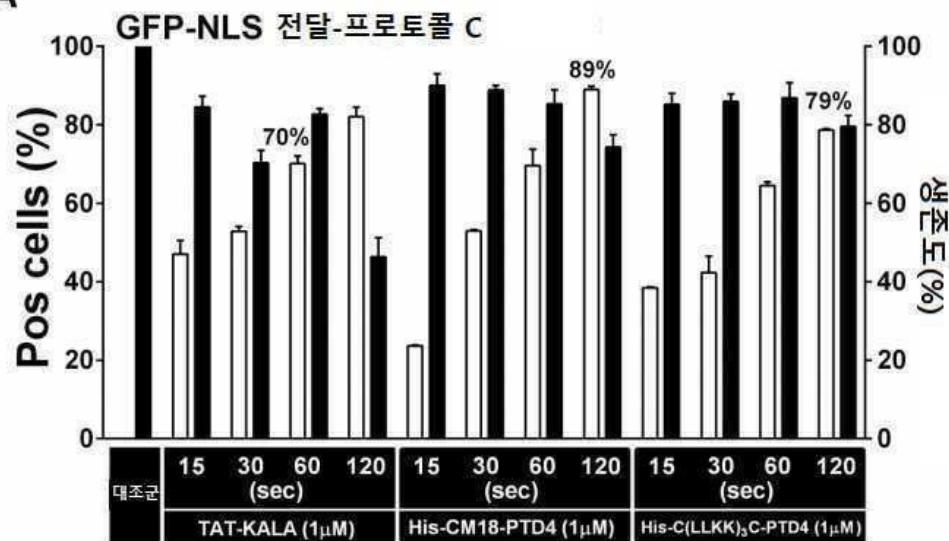


도면33



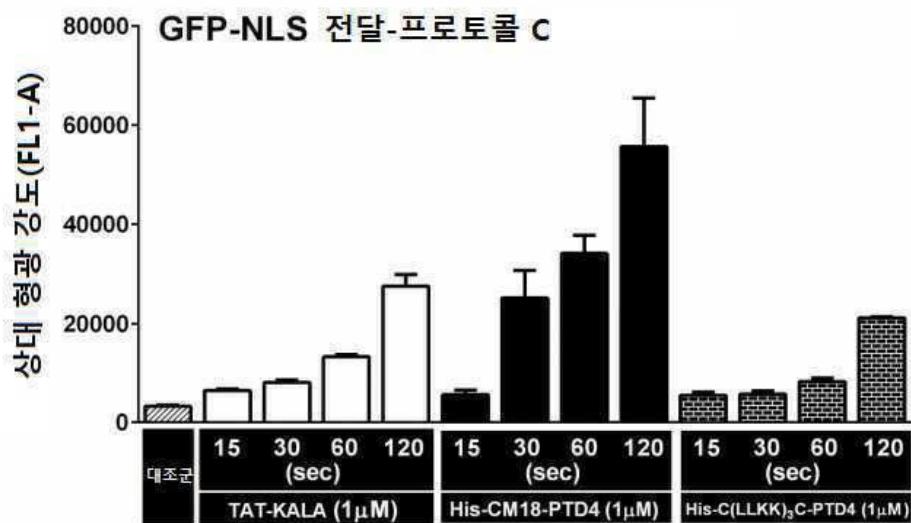
도면34a

A

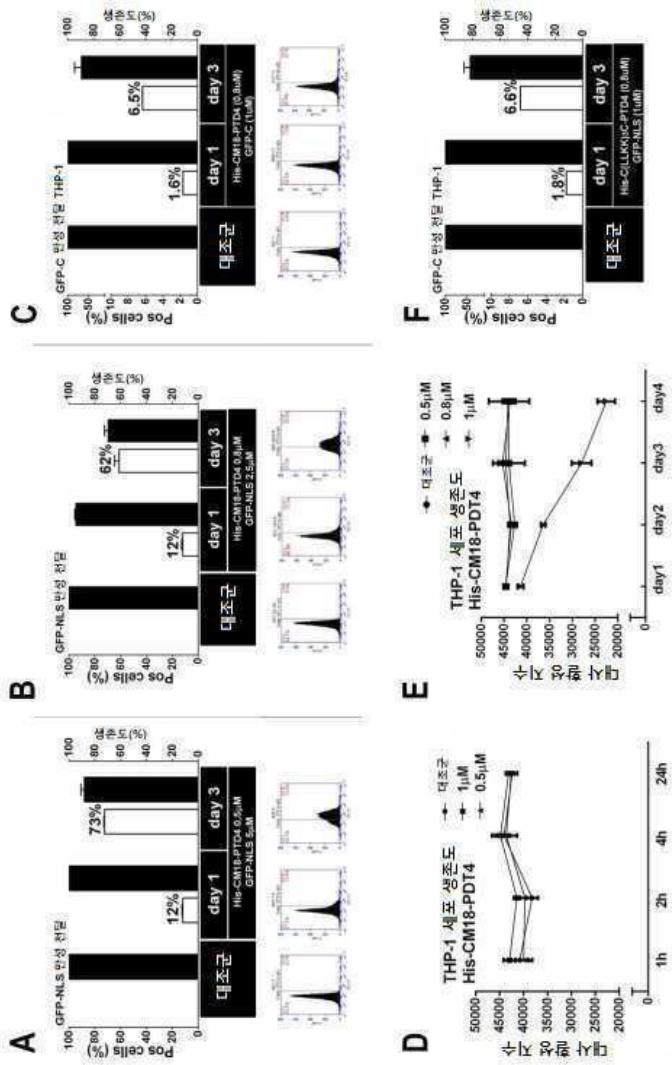


도면34b

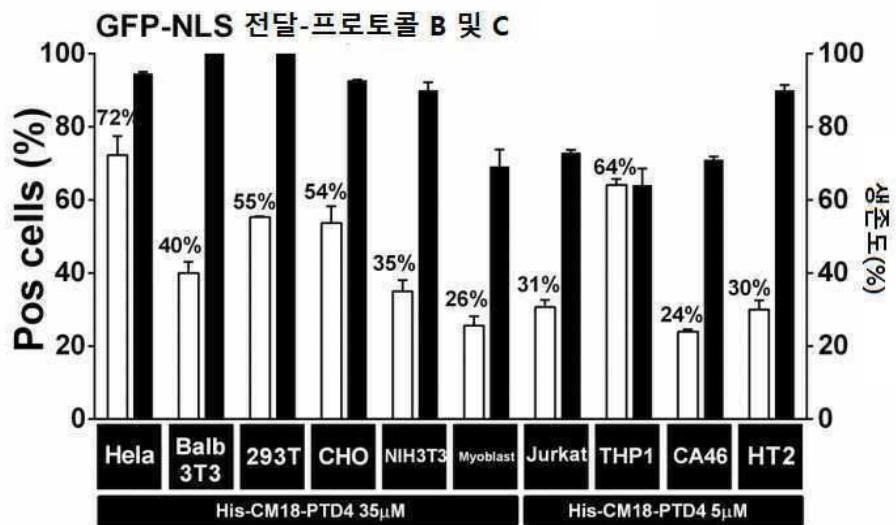
B



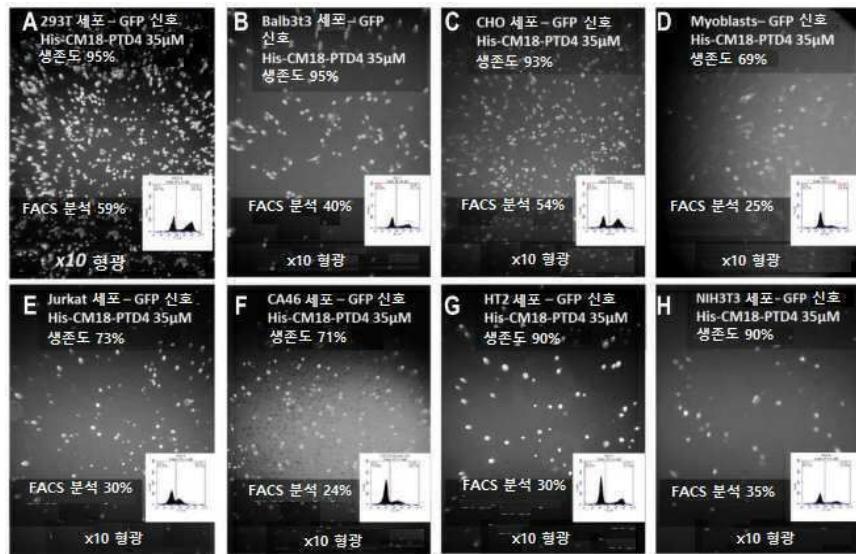
도면35



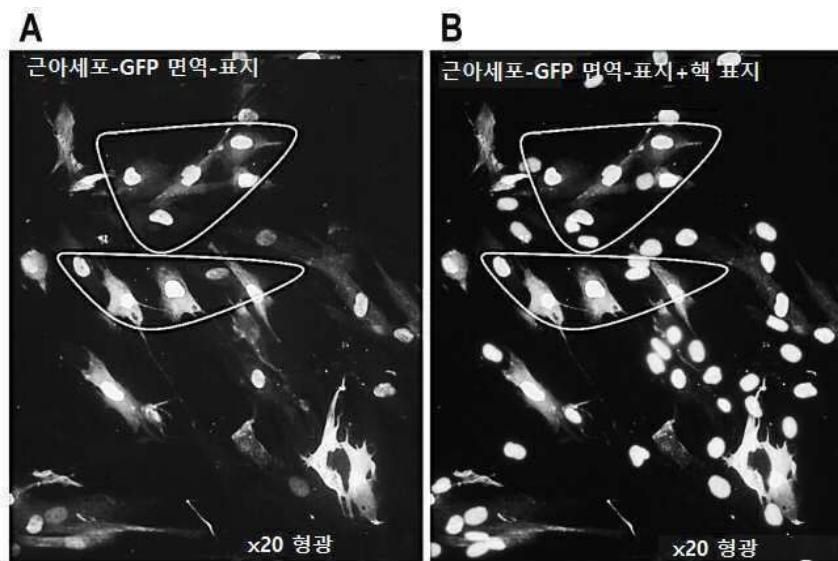
도면36



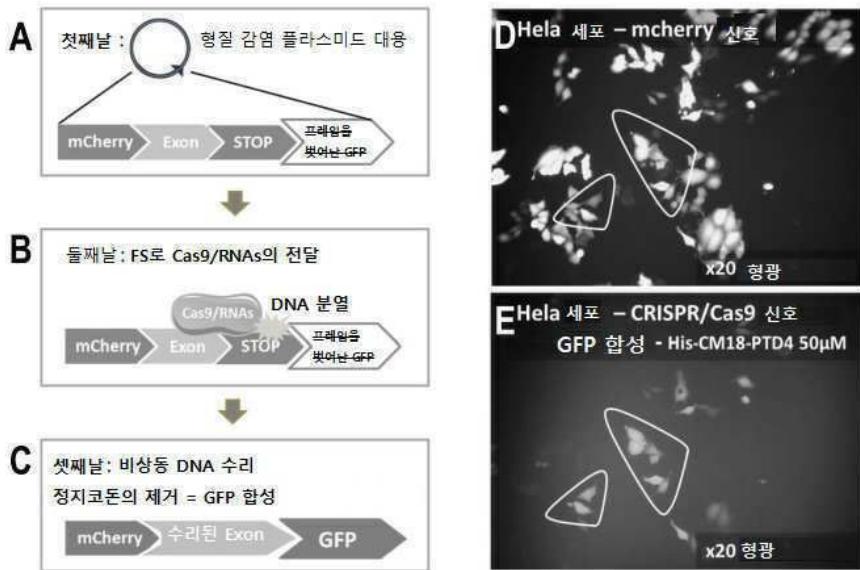
도면37



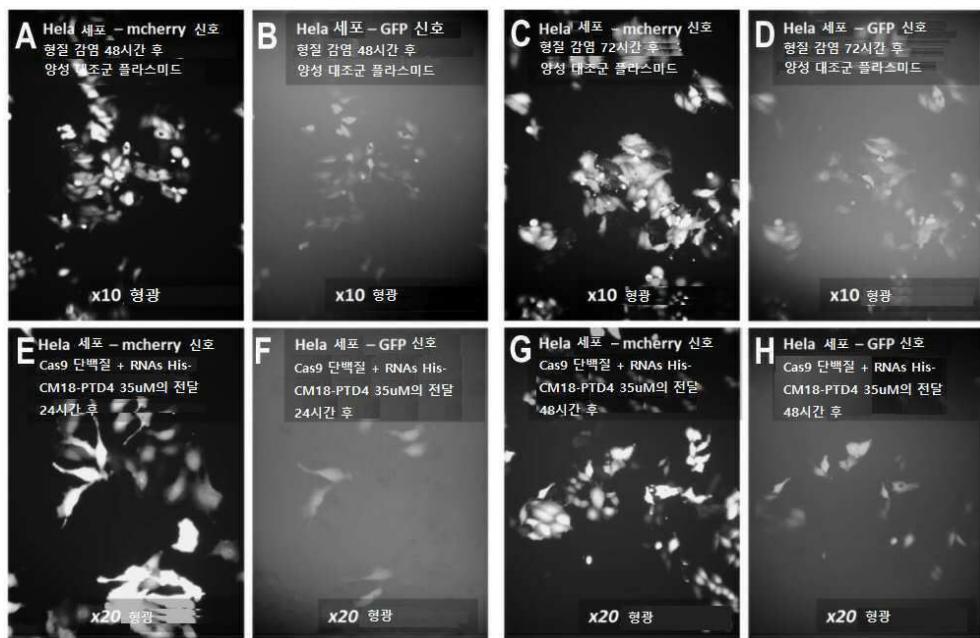
도면38



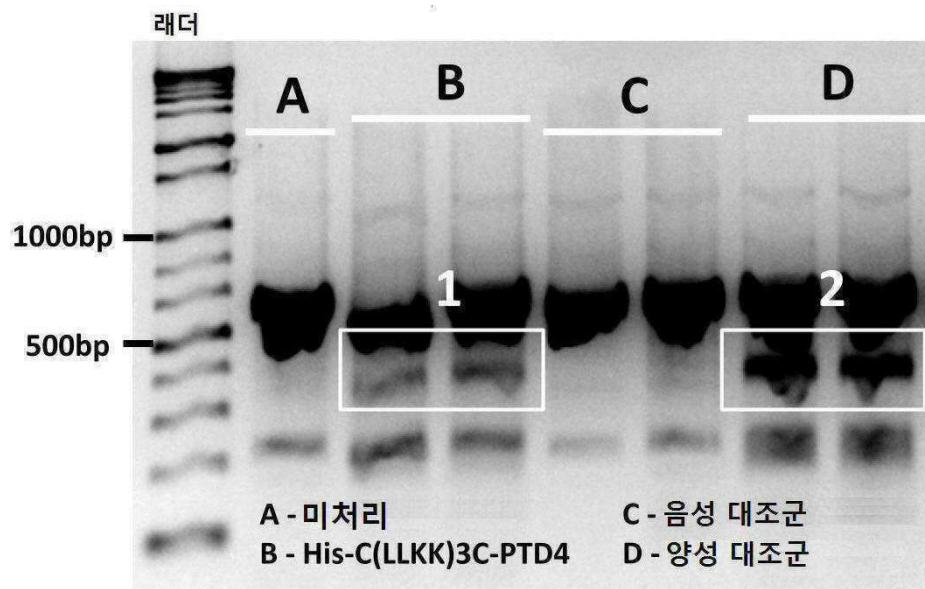
도면39



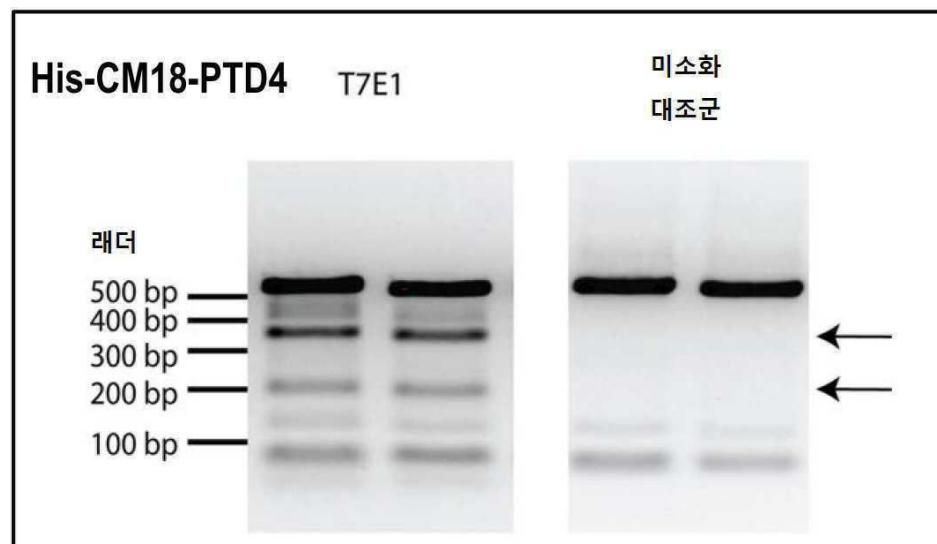
도면40



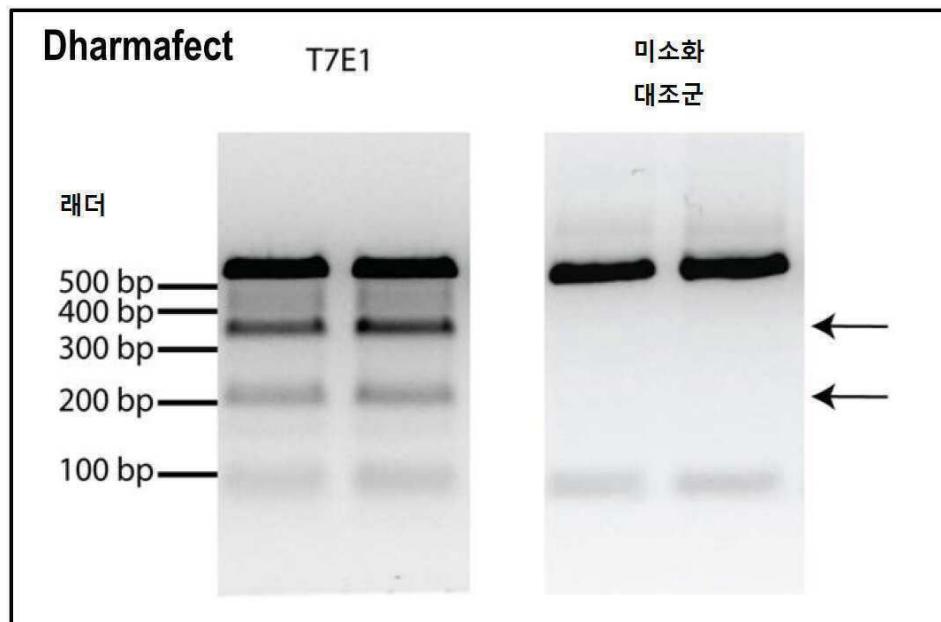
도면41a



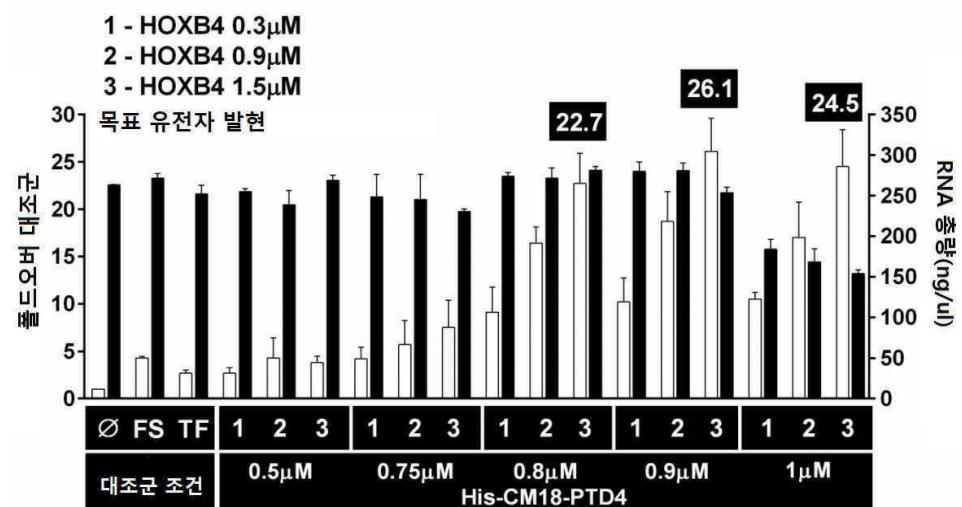
도면41b



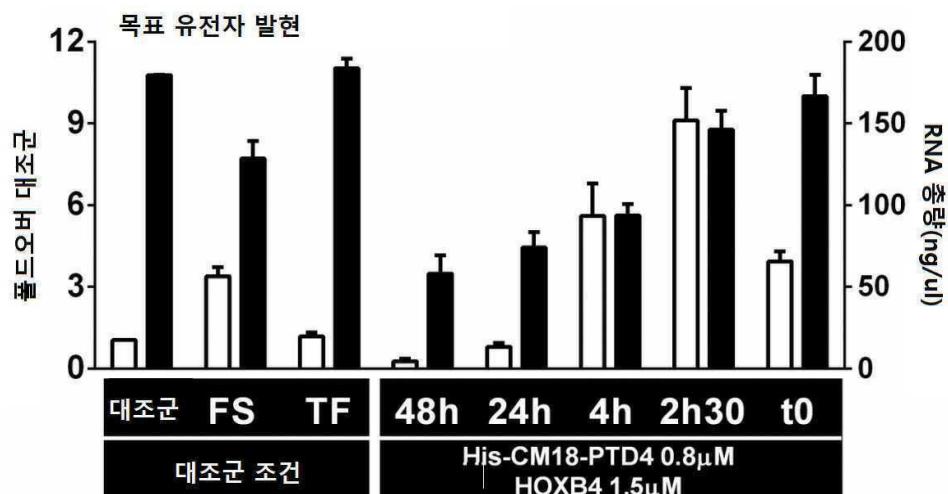
도면41c



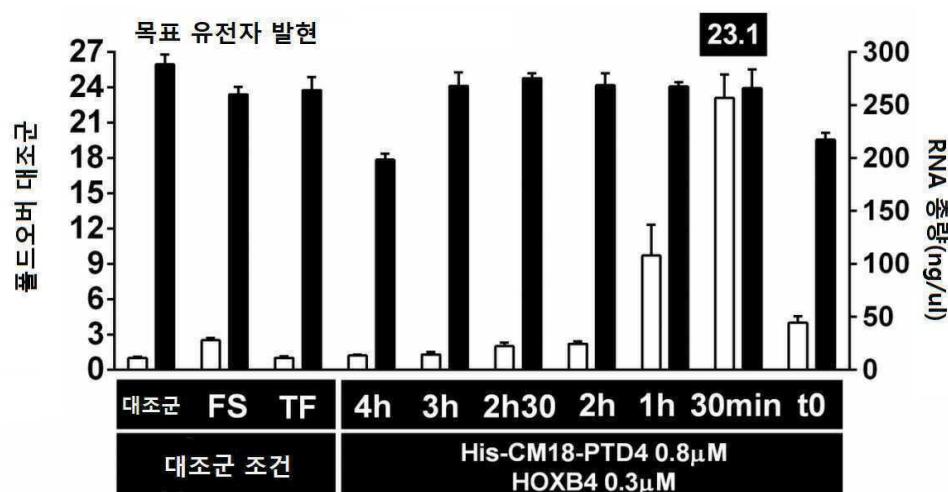
도면42



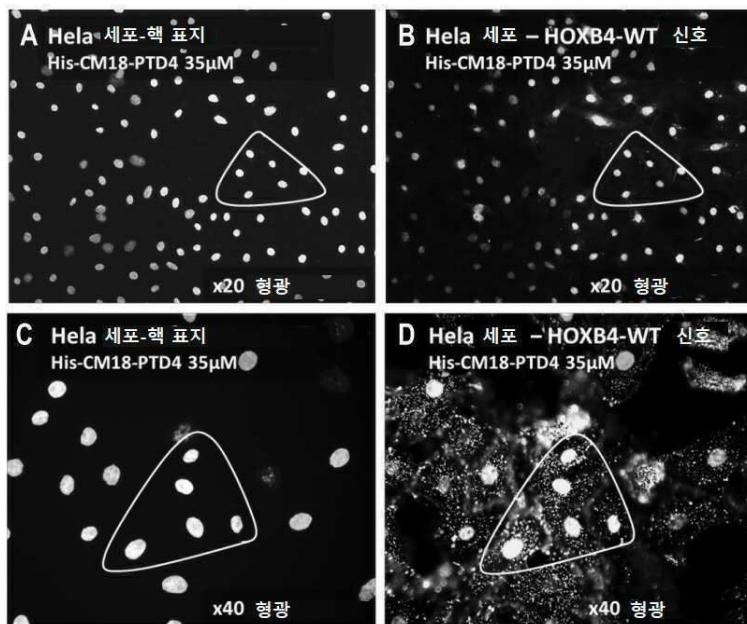
도면43



도면44

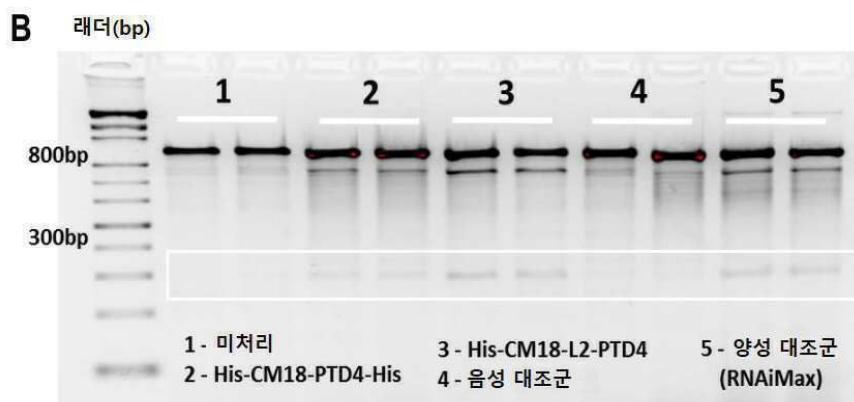
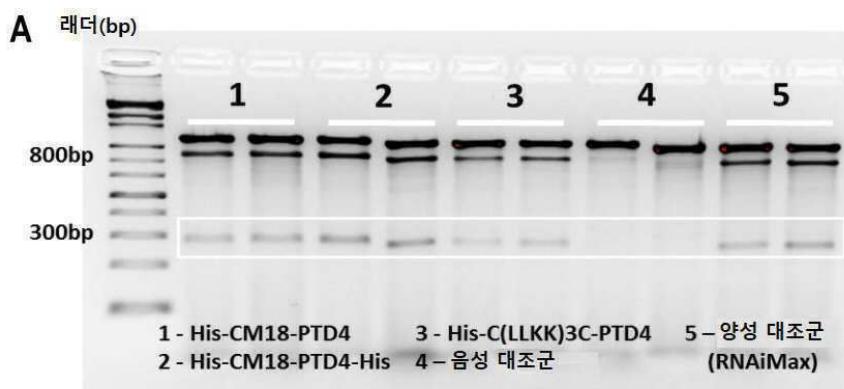


도면45

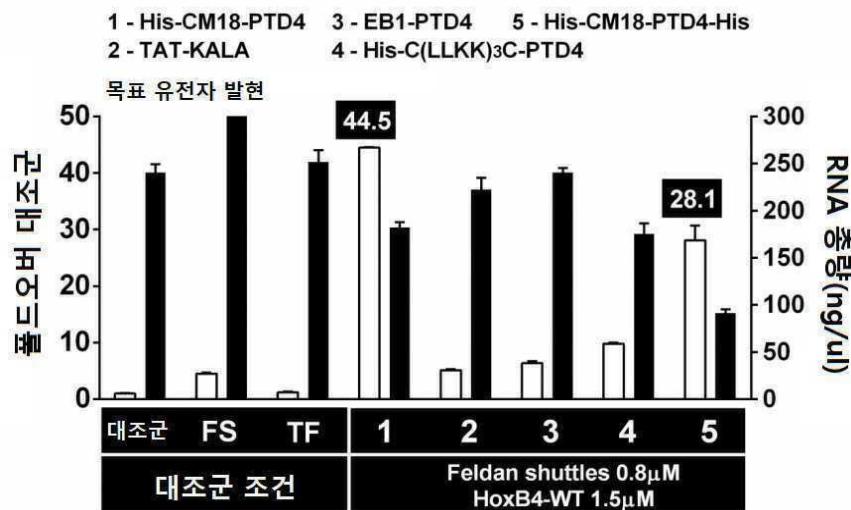


33/36

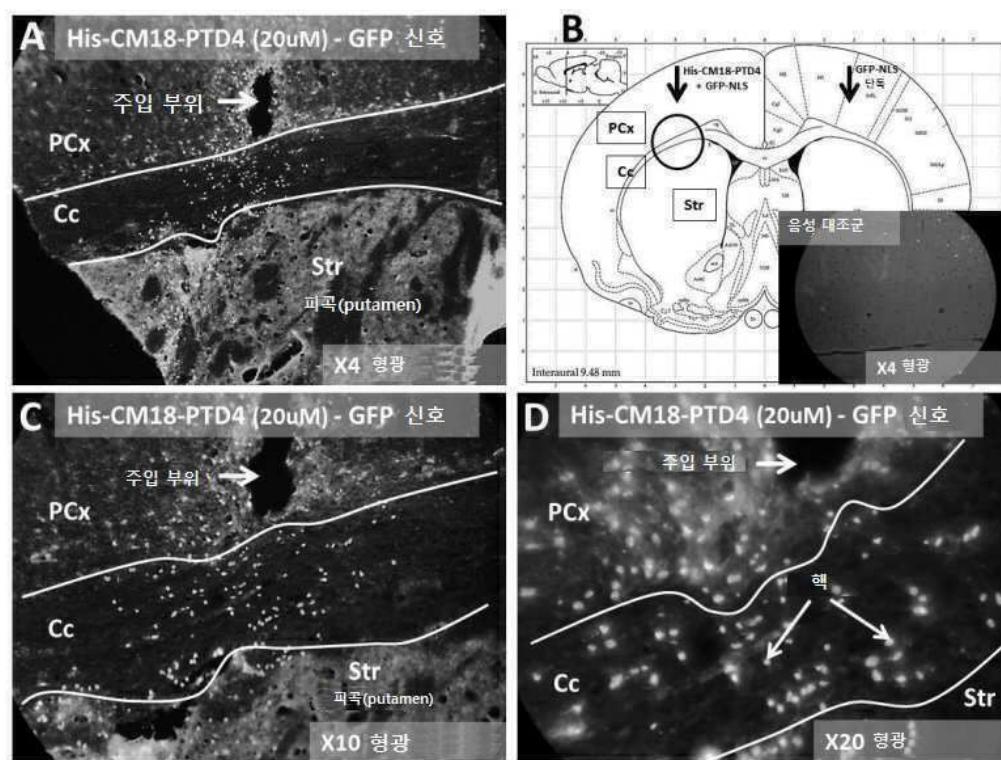
도면46



도면47



도면48



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> FELDAN BIO INC.

GUAY, David

DEL'GUIDICE, Thomas

LEPETIT-STOFFAES, Jean-Pascal

<120> POLYPEPTIDE-BASED SHUTTLE AGENTS FOR IMPROVING THE TRANSDUCTION
EFFICIENCY OF POLYPEPTIDE CARGOS TO THE CYTOSOL OF TARGET
EUKARYOTIC CELLS, USES THEREOF, METHODS AND KITS RELATING TO SAME

<130> 016995-0034

<140> Not yet assigned

<141> 2016-04-08

<150> PCT/CA2016/050403

<151> 2016-04-08

<150> US 62/145,760

<151> 2015-04-10

<150>

> US 62/246,892

<151> 2015-10-27

<160> 103

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CM18

<400> 1

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Gly

<210> 2

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Diphtheria toxin T domain (DT)

<400> 2

Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg

1 5 10 15

Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile

20	25	30
Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys		
35	40	45
Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro		
50	55	60
Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala		
65	70	75
Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp		
85	90	95
Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile		
100	105	110
Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His		
115	120	125
His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu		
130	135	140
Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly		
145	150	155
Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val		
165	170	175
Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly		
180	185	
<210> 3		
<211> 30		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223>		
> GALA		
<400> 3		
Trp Glu Ala Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu His		
1	5	10
Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala		
20	25	30
<210> 4		

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PEA

<400> 4

Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys Pro Thr

1 5 10 15

Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala

20 25 30

Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg

35 40 45

His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro

50 55 60

Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn

65 70 75 80

Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly

85 90 95

Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu

100 105 110

Ala Leu Thr

115

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> INF-7

<400> 5

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly

1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Cys

20

<210> 6

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LAH4

<400> 6

Lys Lys Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu His His Leu Ala His Leu Ala

1 5 10 15

Leu His Leu Ala Leu Ala Leu Lys Lys Ala

20 25

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HGP

<400> 7

Leu Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Val Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu

1 5 10 15

Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu

20

<210> 8

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H5WYG

<400> 8

Gly Leu Phe His Ala Ile Ala His Phe Ile His Gly Gly Trp His Gly

1 5 10 15

Leu Ile His Gly Trp Tyr Gly

20

<210> 9

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HA2

<400> 9

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly

1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly

20

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> EB1

<400> 10

Leu Ile Arg Leu Trp Ser His Leu Ile His Ile Trp Phe Gln Asn Arg

1 5 10 15

Arg Leu Lys Trp Lys Lys Lys

20

<210> 11

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VSVG

<400> 11

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn

1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro

20 25

<210> 12

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Pseudomonas toxin

<400> 12

Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu

1 5 10 15

Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln

20 25 30

Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu

35 40 45

Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala

50 55 60

Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu

65 70 75 80

Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Glu Ser

85 90 95

Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala

100 105 110

Asn Ala Asp

115

<210> 13

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Melittin

<400> 13

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu

1 5 10 15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln

20 25

<210> 14

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> KALA

<400> 14

Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His

1 5 10 15

Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala

20 25 30

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> JST-1

<400> 15

Gly Leu Phe Glu Ala Leu Leu Glu Leu Leu Glu Ser Leu Trp Glu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Glu Ala

20

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SP

<400> 16

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Ala Pro

1 5 10 15

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAT

<400> 17

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Penetratin (Antennapedia)

<400> 18

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> pVEC

<400> 19

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His

1 5 10 15

Ser Lys

<210> 20

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> M918

<400> 20

Met Val Thr Val Leu Phe Arg Arg Leu Arg Ile Arg Arg Ala Cys Gly

1 5 10 15

Pro Pro Arg Val Arg Val

20

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Pep-1

<400> 21

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

<213>

> Artificial sequence

<220><223> Pep-2

<400> 22

Lys Glu Thr Trp Phe Glu Thr Trp Phe Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Xentry

<400> 23

Leu Cys Leu Arg Pro Val Gly

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Arginine stretch

<400> 24

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 25

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Transportan

<400> 25

Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu

20 25

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SynB1

<400> 26

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr

1 5 10 15

Gly Arg

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SynB3

<400> 27

Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe

1 5 10

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ela

<400> 28

Lys Arg Pro Arg Pro

1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SV40 T-Ag

<400> 29

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> c-myc

<400> 30

Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp

1 5

<210> 31

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0p-T-NLS

<400> 31

Ser Ser Asp Asp Glu Ala Thr Ala Asp Ser Gln His Ala Ala Pro Pro

1 5 10 15

Lys Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Vp3

<400> 32

Lys Lys Lys Arg Lys

1 5

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleoplasmin

<400> 33

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys

1 5 10 15

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Histone 2B NLS

<400> 34

Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys

1 5 10

<210> 35

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Xenopus N1

<400> 35

Val Arg Lys Lys Arg Lys Thr Glu Glu Glu Ser Pro Leu Lys Asp Lys

1 5 10 15

Asp Ala Lys Lys Ser Lys Gln Glu

20

<210> 36

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PARP

<400> 36

Lys Arg Lys Gly Asp Glu Val Asp Gly Val Asp Glu Cys Ala Lys Lys

1 5 10 15

Ser Lys Lys

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PDX-1

<400> 37

Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> QKI-5

<400> 38

Arg Val His Pro Tyr Gln Arg

1 5

<210> 39

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HCDA

<400> 39

Lys Arg Pro Ala Cys Thr Leu Lys Pro Glu Cys Val Gln Gln Leu Leu

1 5 10 15

Val Cys Ser Gln Glu Ala Lys Lys

20

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H2B

<400> 40

Gly Lys Lys Arg Ser Lys Ala

1 5

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> v-Rel

<400> 41

Lys Ala Lys Arg Gln Arg

1 5

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amida

<400> 42

Arg Lys Arg Arg Arg

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> RanBP3

<400> 43

Pro Pro Val Lys Arg Glu Arg Thr Ser

1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Pho4p

<400> 44

Pro Tyr Leu Asn Lys Arg Lys Gly Lys Pro

1 5 10

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LEF-1

<400> 45

Lys Lys Lys Lys Arg Lys Arg Glu Lys

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TCF-1

<400> 46

Lys Lys Lys Arg Arg Ser Arg Glu Lys

1 5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> BDV-P

<400> 47

Pro Arg Pro Arg Lys Ile Pro Arg

1 5

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TR2

<400> 48

Lys Asp Cys Val Ile Asn Lys His His Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys

1 5 10 15

Arg Leu Gln Arg

20

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SOX9

<400> 49

Pro Arg Arg Arg Lys

1 5

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Max

<400> 50

Pro Gln Ser Arg Lys Lys Leu Arg

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Mitochondrial signal sequence from Tim9

<400> 51

Asn Leu Val Glu Arg Cys Phe Thr Asp

1 5

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Mitochondrial signal sequence from Yeast cytochrome c oxidase

subunit IV

<400> 52

Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys

1 5 10

<210> 53

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Mitochondrial signal sequence from 18S rRNA

<400> 53

Met Leu Ile Ser Arg Cys Lys Trp Ser Arg Phe Pro Gly Asn Gln Arg

1 5 10 15

<210> 54

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Peroxisome signal sequence - PTS1

<400> 54

Ser Lys Leu

1

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleolar signal sequence from BIRC5

<400> 55

Met Gln Arg Lys Pro Thr Ile Arg Arg Lys Asn Leu Arg Leu Arg Arg

1 5 10 15

Lys

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleolar signal sequence from RECQL4

<400> 56

Lys Gln Ala Trp Lys Gln Lys Trp Arg Lys Lys

1 5 10

<210> 57

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CM18-TAT

<400> 57

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr

1 5 10 15

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

20 25

<210> 58

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CM18-Penetratin

<400> 58

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Gly Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp

20 25 30

Lys Lys

<210> 59

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> His-CM18-TAT

<400> 59

Met His His His His His Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly

1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg

20 25 30

Gln Arg Arg Arg

35

<210> 60

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> GFP

<400> 60

Met His His His His Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Ala Ser Thr Gly Thr Gly Ile Arg Met Val Ser Lys Gly

20 25 30

Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly

35 40 45

Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp

50 55 60

Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys

65 70 75 80

Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val

85 90 95

Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe

100 105 110

Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe

115 120 125

Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly

130 135 140

Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu

145 150 155 160

Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His

165 170 175

Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn

180 185 190

Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp

195 200 205

His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro

210	215	220	
Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn			
225	230	235	240
Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly			
245	250	255	
Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
260	265	270	
Ser Gly Gly Ser Gly Trp Ile Arg Ala Ser Ser Gly Gly Arg Glu			
275	280	285	
Ile Ser			
290			
<210> 61			
<211> 317			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><223> TAT-GFP			
<400> 61			
Met His His His His His Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Gly Gly Ala Ser Thr Gly Thr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg			
20	25	30	
Arg Arg Pro Pro Gln Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly			
35	40	45	
Gly Gly Thr Gly Ile Arg Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr			
50	55	60	
Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His			
65	70	75	80
Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Asp Ala Thr Tyr Gly Lys			
85	90	95	
Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp			
100	105	110	

Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg
 115 120 125
 Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro
 130 135 140
 Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn
 165 170 175

 Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu
 180 185 190
 Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met
 195 200 205
 Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His
 210 215 220
 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn
 225 230 235 240

 Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu
 245 250 255
 Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His
 260 265 270
 Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met
 275 280 285
 Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 290 295 300

 Gly Trp Ile Arg Ala Ser Ser Gly Gly Arg Glu Ile Ser
 305 310 315
 <210> 62
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> GFP-NLS
 <400> 62

Met His His His His Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Ala Ser Thr Gly Ile Arg Met Val Ser Lys Gly Glu Glu
 20 25 30
 Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val
 35 40 45
 Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Asp Ala Thr
 50 55 60
 Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro
 65 70 75 80
 Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys
 85 90 95
 Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser
 100 105 110
 Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp
 115 120 125
 Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr
 130 135 140
 Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly
 145 150 155 160
 Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val
 165 170 175
 Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys
 180 185 190
 Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr
 195 200 205
 Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
 210 215 220
 His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
 225 230 235 240
 Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr

245 250 255

Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

260 265 270

Gly Gly Ser Gly Trp Ile Arg Ala Ser Ser Gly Gly Arg Ser Ser Asp

275 280 285

Asp Glu Ala Thr Ala Asp Ser Gln His Ala Ala Pro Pro Lys Lys Lys

290 295 300

Arg Lys Val Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

305 310 315 320

Gly Arg Gly Thr Glu Ile Ser

325

<210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C(LLKK)3C

<400> 63

Cys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Cys

1 5 10

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G(LLKK)3G

<400> 64

Gly Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Gly

1 5 10

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PTD4

<400> 65

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 66

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TAT-CM18

<400> 66

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Cys Lys Trp Lys Leu

1 5 10 15

Phe Lys Lys Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly

20 25 30

<210> 67

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TAT-KALA

<400> 67

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Cys Trp Glu Ala Lys

1 5 10 15

Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala

20 25 30

Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala

35 40

<210> 68

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> His-CM18-PTD4

<400> 68

His His His His His Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala

1 5 10 15

Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Gln

20	25	30
Ala Arg Ala		
35		
<210> 69		
<211> 33		
<212>		
> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> His-CM18-9Arg		
<400> 69		
His His His His His Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala		
1	5	10
Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg		
20	25	30
Arg		
<210> 70		
<211> 50		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> His-CM18-Transportan		
<400> 70		
His His His His His Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala		
1	5	10
Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly		
20	25	30
Tyr Leu Leu Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys		
35	40	45
Ile Leu		
50		
<210> 71		
<211> 43		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		

<220><223> His-LAH4-PDT4

<400> 71

His His His His His Lys Lys Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu His

1 5 10 15

His Leu Ala His Leu Ala Leu His Leu Ala Leu Ala Leu Lys Lys Ala

20 25 30

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

35 40

<210> 72

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> His-C(LLKK)3C-PDT4

<400> 72

His His His His His Cys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu

1 5 10 15

Leu Lys Lys Cys Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

20 25 30

<210> 73

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mCherry-NLS

<400> 73

Met His His His His Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Ala Ser Thr Gly Ile Arg Met Val Ser Lys Cys Glu Glu

20 25 30

Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val His Met

35 40 45

Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu

50 55 60

Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys
 65 70 75 80
 Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met
 85 90 95
 Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr
 100 105 110
 Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn
 115 120 125
 Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln
 130 135 140
 Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro
 145 150 155 160
 Ser Asp Gly Gln Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser
 165 170 175
 Ser Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys
 180 185 190
 Gln Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Asp Ala Glu Val Lys
 195 200 205
 Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn
 210 215 220
 Val Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile
 225 230 235 240
 Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly Arg His Ser Thr Gly Gly Met
 245 250 255
 Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 260 265 270
 Gly Trp Ile Arg Ala Ser Ser Gly Arg Ser Ser Asp Asp Glu Ala
 275 280 285
 Thr Ala Asp Ser Gln His Ala Ala Pro Pro Lys Lys Arg Lys Val
 290 295 300
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Arg Gly

305 310 315 320

Thr Glu Ile Ser

<210> 74

<211> 1414

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cas9-NLS

<400> 74

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile

35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu

50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys

100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr

115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp

130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His

145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro

165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr

180	185	190
Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala		
195	200	205
Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn		
210	215	220
Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn		
225	230	235
Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe		
245	250	255
Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp		
260	265	270
Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp		
275	280	285
Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp		
290	295	300
Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser		
305	310	315
Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys		
325	330	335
Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe		
340	345	350
Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser		
355	360	365
Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp		
370	375	380
Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg		
385	390	395
Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu		
405	410	415
Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe		
420	425	430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
 435 440 445
 Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
 450 455 460
 Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
 465 470 475 480
 Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
 485 490 495
 Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
 500 505 510
 Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
 515 520 525
 Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
 530 535 540
 Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
 545 550 555 560
 Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
 565 570 575
 Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
 580 585 590
 Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
 595 600 605
 Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
 610 615 620
 Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
 625 630 635 640
 His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
 645 650 655
 Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
 660 665 670
 Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe

675	680	685
Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe		
690	695	700
Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu		
705	710	715
His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly		
725	730	735
Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly		
740	745	750
Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln		
755	760	765
Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile		
770	775	780
Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro		
785	790	795
Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu		
805	810	815
Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg		
820	825	830
Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys		
835	840	845
Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg		
850	855	860
Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys		
865	870	875
Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys		
885	890	895
Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Leu Ser Glu Leu Asp		
900	905	910
Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr		
915	920	925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
 930 935 940
 Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
 945 950 955 960
 Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
 965 970 975
 Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
 980 985 990
 Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
 995 1000 1005
 Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
 1010 1015 1020
 Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
 1025 1030 1035
 Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
 1040 1045 1050
 Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
 1055 1060 1065
 Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
 1070 1075 1080
 Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
 1085 1090 1095
 Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
 1100 1105 1110
 Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
 1115 1120 1125
 Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
 1130 1135 1140
 Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
 1145 1150 1155
 Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser

1160	1165	1170
Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys		
1175	1180	1185
Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu		
1190	1195	1200
Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly		
1205	1210	1215
Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val		
1220	1225	1230
Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser		
1235	1240	1245
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys		
1250	1255	1260
His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys		
1265	1270	1275
Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala		
1280	1285	1290
Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn		
1295	1300	1305
Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala		
1310	1315	1320
Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser		
1325	1330	1335
Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr		
1340	1345	1350
Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp		
1355	1360	1365
Gly Gly Arg Ser Ser Asp Asp Glu Ala Thr Ala Asp Ser Gln His		
1370	1375	1380
Ala Ala Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Gly Ser Gly Gly		
1385	1390	1395

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Arg His His His His His

1400 1405 1410
His

<210> 75

<211> 42

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crRNA (Example 13.3)

<400> 75

gaguccgagc agaagaagaa guuuuagagc uaugcuguuu ug 42

<210> 76

<211> 69

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tracrRNA (Example 13.3)

<400> 76

aaacagcaua gcaaguuaaa auaggcuag uccguuaauca acuugaaaaa guggcaccga 60

guccgugcu 69

<210> 77

<211> 69

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tracrRNA (Example 13.5)

<400> 77

aaacagcaua gcaaguuaaa auaggcuag uccguuaauca acuugaaaaa guggcaccga 60

guccgugcu 69

<210> 78

<211> 42

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPIB crRNA (Example 13.5)

<400> 78

guguauuuug accuacgaau guuuuagagc uaugcuguuu ug 42
 <210> 79
 <211> 74
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> PPIB tracrRNA (Example 13.5)

<400> 79
 aacagcauag caaguuaaaa uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag 60
 ucggugcuuu uuuu 74
 <210> 80
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> HOXB4-WT

<400> 80
 Met His His His His Met Ala Met Ser Ser Phe Leu Ile Asn
 1 5 10 15
 Ser Asn Tyr Val Asp Pro Lys Phe Pro Pro Cys Glu Glu Tyr Ser Gln
 20 25 30

Ser Asp Tyr Leu Pro Ser Asp His Ser Pro Gly Tyr Tyr Ala Gly Gly
 35 40 45

Gln Arg Arg Glu Ser Ser Phe Gln Pro Glu Ala Gly Phe Arg Arg
 50 55 60

Ala Ala Cys Thr Val Gln Arg Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Leu Ser Pro Arg Ala Pro Ala Pro Pro Ala Gly Ala
 85 90 95

Leu Leu Pro Glu Pro Gly Gln Arg Cys Glu Ala Val Ser Ser Ser Pro
 100 105 110

Pro Pro Pro Pro Cys Ala Gln Asn Pro Leu His Pro Ser Pro Ser His
 115 120 125

Ser Ala Cys Lys Glu Pro Val Val Tyr Pro Trp Met Arg Lys Val His

130	135	140	
Val Ser Thr Val Asn Pro Asn Tyr Ala Gly Gly Glu Pro Lys Arg Ser			
145	150	155	160
Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Gln Gln Val Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe			
165	170	175	
His Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg Val Glu Ile Ala His			
180	185	190	
Ala Leu Cys Leu Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg			
195	200	205	
Arg Met Lys Trp Lys Asp His Lys Leu Pro Asn Thr Lys Ile Arg			
210	215	220	
Ser Gly Gly Ala Ala Gly Ser Ala Gly Gly Pro Pro Gly Arg Pro Asn			
225	230	235	240
Gly Gly Pro Arg Ala Leu			
245			
<210> 81			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> His-PTD4			
<400> 81			
His His His His His Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Gln Ala Arg			
1	5	10	15
Ala			
<210> 82			
<211> 41			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> PTD4-KALA			
<400> 82			
Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Trp Glu Ala Lys Leu			

1 5 10 15
 Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu

20 25 30

Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala

35 40

<210> 83

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9Arg-KALA

<400> 83

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys

1 5 10 15
 Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys
 20 25 30

Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala

35

<210> 84

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pep1-KALA

<400> 84

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys

20 25 30

Ala Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala
 35 40 45
 Cys Glu Ala

50

<210> 85

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Xentry-KALA

<400> 85

Leu Cys Leu Arg Pro Val Gly Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu

1 5 10 15

Ala Lys Ala Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu

20 25 30

Lys Ala Cys Glu Ala

35

<210> 86

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SynB3-KALA

<400> 86

Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Trp Glu Ala Lys Leu Ala

1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala

20 25 30

Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala

35 40

<210> 87

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VSVG-PTD4

<400> 87

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn

1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg

20 25 30

Gln Ala Arg Ala

35

<210> 88

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> EB1-PTD4

<400> 88

Leu Ile Arg Leu Trp Ser His Leu Ile His Ile Trp Phe Gln Asn Arg

1 5 10 15

Arg Leu Lys Trp Lys Lys Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala

20 25 30

Arg Ala

<210> 89

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JST-PTD4

<400> 89

Gly Leu Phe Glu Ala Leu Leu Glu Leu Leu Glu Ser Leu Trp Glu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Glu Ala Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

20 25 30

<210> 90

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CM18-PTD4

<400> 90

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Gly Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

20 25

<210> 91

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6Cys-CM18-PTD4

<400> 91

Cys Cys Cys Cys Cys Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala

1 5 10 15

Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln

20 25 30

Ala Arg Ala

35

<210> 92

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CM18-L1-PTD4

<400> 92

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Gly Gly Ser Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

20 25 30

<210> 93

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CM18-L2-PTD4

<400> 93

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg

20 25 30

Gln Ala Arg Ala

35

<210> 94

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CM18-L3-PTD4

<400> 94

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Ala

20 25 30

Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

35 40

<210> 95

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> His-CM18-TAT

<400> 95

His His His His His Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala

1 5 10 15

Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln

20 25 30

Arg Arg Arg

35

<210> 96

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> His-CM18-PTD4-6Cys

<400> 96

His His His His His Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala

1 5 10 15

Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Gln

20 25 30

Ala Arg Ala Cys Cys Cys Cys Cys

35 40

<210> 97

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3His-CM18-PTD4

<400> 97

His His His Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala Val Leu Lys

1 5 10 15

Val Leu Thr Thr Gly Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

20 25 30

<210> 98

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12His-CM18-PTD4

<400> 98

His His His His His His His His His Lys Trp Lys Leu

1 5 10 15

Phe Lys Lys Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Tyr Ala

20 25 30

Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

35 40

<210> 99

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA-CM18-PTD4

<400> 99

His His His Ala His His His Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly

1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg

20 25 30

Gln Ala Arg Ala

35

<210> 100

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3HA-CM18-PTD4

<400> 100

His Ala His His Ala His His Ala His Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys

1 5 10 15

Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Tyr Ala Arg Ala Ala

20 25 30

Ala Arg Gln Ala Arg Ala

35

<210> 101

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CM18-His-PTD4

<400> 101

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Gly His His His His His Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Gln

20 25 30

Ala Arg Ala

35

<210> 102

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> His-CM18-PTD4-His

<400> 102

His His His His His Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala

1 5 10 15

Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln

20 25 30

Ala Arg Ala His His His His His His

35 40

<210> 103

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPRT crRNA

<400> 103

aauuaugggg auuacuagga guuuuagagc uaugcu 36