



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0052550
(43) 공개일자 2014년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C07K 17/02 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 47/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0118722
(22) 출원일자 2012년10월24일
심사청구일자 2012년10월25일

(71) 출원인
한양대학교 산학협력단
서울 성동구 왕십리로 222, 내 (행당동, 한양대학교)
(72) 발명자
이민형
경기 과천시 별양로 180, 805동 1003호 (부림동, 주공아파트)
김현아
서울 강서구 등촌로3나길 24, (화곡동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

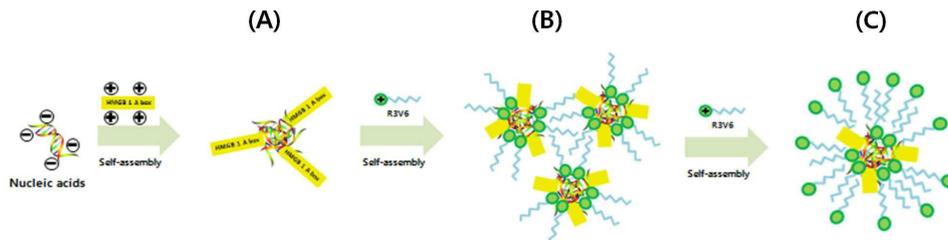
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 핵산 전달 복합체

(57) 요약

본 발명은 핵산 전달 복합체에 관한 것으로, 전달 대상 핵산, HMGB1 A 박스 펩티드를 포함하는 핵산 전달 펩티드, 및 이들을 마이셀의 형태로 둘러싸는 펩티드 마이셀을 포함하는 핵산 전달 복합체를 제공한다. 본 발명의 핵산 전달 복합체는 전달 대상 핵산을 높은 효율로 세포 내로 도입할 수 있으면서도 세포 독성이 적어 안전한 장점이 있는 바, 유전자 치료를 위한 유전자 전달체 및 유전자 치료제 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이나

서울 광진구 자양로3길 40-7, 화이트 하우스 13
501호 (자양동)

오빛나

경기 성남시 분당구 정자로 143, 206동 302호 (정
자동, 한솔마을LG아파트)

류재환

경기 의왕시 내손순환로 8, 203동 1003호 (내손동,
우미린아파트)

김보라

경기도 김포시 감정동 553

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-50199

부처명 교육과학기술부

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 신경교모세포종 조직인지형 치료유전자 전달시스템

기여율 1/1

주관기관 한양대학교 산학협력단

연구기간 2009.07.10 ~ 2014.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

전달 대상 핵산;

HMGB1 A 박스 펩티드를 포함하고, 전하 상호작용을 통해 상기 핵산에 결합된 핵산 전달 펩티드; 및

하기 화학식1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하고, 전하 상호작용 또는 소수성 상호작용을 통해 상기 핵산 및 핵산 전달 펩티드를 마이셀(micelle)의 형태로 둘러싸는 펩티드 마이셀을 포함하고,

[화학식 1]

R_n-X_m

상기 화학식 1에서,

R은 아르기닌(Arg)이고,

X는 소수성 아미노산이고,

n은 1 내지 7의 정수이며,

m은 2 내지 20의 정수인 핵산 전달 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 HMGB1 A 박스 펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 전달 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 핵산 전달 펩티드는 상기 HMGB1 A 박스 펩티드의 N-말단에 세포막 투과 도메인을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 전달 복합체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 세포막 투과 도메인은 TAT인 것을 특징으로 하는 핵산 전달 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 소수성 아미노산은 이소류신(Ile), 발린(Val), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met) 및 알라닌(Ala)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 핵산 전달 복합체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 소수성 아미노산은 알라닌(Ala) 또는 발린(Val)인 것을 특징으로 하는 핵산 전달 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 n은 2 내지 5의 정수인 것을 특징으로 하는 핵산 전달 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 m은 5 내지 10의 정수인 것을 특징으로 하는 핵산 전달 복합체.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 핵산 전달 펩티드는 상기 전달 대상 핵산 1 중량부에 대하여 2 중량부 내지 5 중량부의 비율로 포함되고;

상기 펩티드 마이셀은 상기 전달 대상 핵산 1 중량부에 대하여 10 중량부 내지 30 중량부의 비율로 포함되는 것을 특징으로 하는 핵산 전달 복합체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 전달 대상 핵산은 DNA인 것을 특징으로 하는 핵산 전달 복합체.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 전달 대상 핵산은 폐 세포로 전달되는 것을 특징으로 하는 핵산 전달 복합체.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 핵산 전달 복합체에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 핵산 전달 펩티드와 펩티드 마이셀을 함께 이용한 핵산 전달 복합체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] DNA 재조합 기술의 발달로 외래 유전자를 세포 내 또는 시험관 내에서 발현시키는 기술이 상용화되었으며, 이와 같은 기술을 이용하여 세포 제어의 관찰, 재조합 단백질의 대량 생산, 유전자의 클로닝, 결실되거나 존재하지 않는 유전자의 교체 또는 세포 제어의 저해나 활성화 등 다양한 활용이 가능하게 되었다.

[0003] 그 중에서도 환자가 가진 특정 유전자의 이상으로 인한 질병의 치료를 위하여 환자의 특정 세포 내에 있는 유전자를 조작하는 치료법인 유전자 치료는 질병의 새로운 치료 방법으로서 제시되어, 지난 십수년간 다양한 방법의 유전자 전달 방법에 관한 연구가 이루어지고 있다.

[0004] 유전자 치료의 핵심적인 요소는 목적 유전자와 이 유전자를 안전하고 효율적으로 인체에 전달해 줄 수 있는 유전자 전달체(또는 전달 물질 또는 시스템)이다. 그 중 유전자 전달 시스템의 선택은 목적 유전자를 표적기관에 효과적으로 전달하는 문제와 그 유전자가 적당한 세포에 거부반응 없이 받아들여져 발현을 일으킴으로써 목적하는 치료 효과를 거두는 문제에 관한 것이다. 실제로 유전자 치료의 성공을 위하여 새로운 전달 시스템을 개발하는 것이 유전자 치료 분야에서 주요 과제로 인식되고 있다.

[0005] 종래 알려진 유전자 전달 시스템으로는, 숙주에 대한 감염성을 갖는 바이러스를 변형하여 병원성을 제거하고 전달 유전자를 삽입하여 제조되는 바이러스성 벡터가 있고, 그 모체가 되는 바이러스의 종류에 따라 아데노바이러스, 레트로바이러스, AAV(adeno-associated virus) 벡터 등이 있다. 이들 바이러스성 벡터는 바이러스의 속성이 감염성이기 때문에 유전자를 전달하는 효율은 우수하지만 숙주의 면역체 내에 삽입되었을 때 돌연변이 유발 가능성이 높고, 따라서 감염성 바이러스의 생성 가능성 및 숙주 내 염증 반응 유발 등의 위험요소가 많아 그 사용이 제한적이다.

[0006] 이와 같은 바이러스성 벡터의 문제점을 극복하기 위하여 그 대안으로 개발된 비바이러스성 유전자 전달 시스템은 물리화학적 전달 방법에 의하여 세포 내로 유전자를 이입하는 방법으로서, 리포솜을 비롯한 양이온성 지질 전달체 및 고분자 전달체가 대표적인 예이다. 이들 비바이러스성 벡터들은 생분해성이 있어 생체 안전성이 높고, 비면역성이며, 전달 유전자의 크기에 따른 제한이 없어 사용이 간편하다는 장점이 있다.

[0007] 그러나, 비바이러스성 벡터는 세포 내 이입 후 체내에서 분해되어 유전자가 세포질로 운반되는 효율이 낮아서 핵으로 유전자가 전달되는 비율도 낮아서 바이러스성 벡터와 비교하여 유전자 전달 효율이 낮다는 문제점이 있다.

[0008] 구체적으로, 리포솜을 비롯하여 양이온성 지질로 이루어진 전달체는 조작, 보관, 품질관리가 비교적 간편하며, 생체의 전달 효율이 양호하고 바이러스성 벡터에 비하면 항원성도 낮으며 안전성이 높다는 장점이 있는 반면, 생체내 유전자 전달효율이 낮고 발현 기간 자체가 짧아 실효성이 떨어지는 단점이 있으며 임상 사례도 축적되어 있지 않다. 양이온성 지질 전달체는 지질이 안정된 마이셀(micelle)을 형성하고 표면에 양이온성을 띠고 있어 주로 음전하를 띠는 DNA 또는 RNA인 유전자 치료 약물이 용이하게 결합하여 세포 내로 이입되는 원리를 이용한

것이다. 한편, 유전자 결합 및 전달에 이용할 수 있는 특정 서열을 갖는 펩티드를 사용한 유전자 전달 방법이 보고된 바 있다. 이는 바이러스성 벡터에 비하여 안전하다는 이점이 있지만, 유전자 전달을 위해서 갖추어야 할 세포 내 구조적 안정성이 약하다는 단점이 있어 유전자 전달을 위한 효율성이 떨어지는 문제가 있다.

[0009] 즉, 바이러스성 벡터는 유전자 전달 효율은 우수하지만 숙주의 면역체 내에 삽입되었을 때 돌연변이 유발 가능성이 높고, 감염성 바이러스의 생성 가능성 및 숙주 내 염증 반응 유발 등의 위험요소가 많아 그 사용이 제한적이다. 또한, 이와 같은 문제점을 개선하고자 사용되는 비바이러스성 벡터는 유전자 전달 효율이 낮은 것이 단점이고, 이러한 단점을 다소 개선하기 위한 양이온성 고분자, 양이온성 펩티드 또는 양이온성 리포솜은 바이러스성 벡터와는 또 다른 측면에서의 세포독성을 띠는 문제가 있으며, 전달 효율 또한 상용화하기에는 아직 낮은 수준이다.

[0010] 따라서, 상용화할 수 있을 정도의 높은 효율로 유전자를 세포 내로 전달할 수 있으면서 세포 내에서 독성이 없는 안전한 비바이러스성 전달체에 대한 개발이 절실히 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 전달 대상 핵산을 높은 효율로 세포 내에 전달할 수 있으면서도, 세포 독성이 없는 안전한 핵산 전달체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 전달 대상 핵산, HMGB1 A 박스 펩티드를 포함하는 핵산 전달 펩티드, 및 이들을 마이셀의 형태로 둘러싸는 펩티드 마이셀을 포함하는 핵산 전달 복합체를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 핵산 전달 복합체는 전달 대상 핵산을 높은 효율로 세포 내로 도입할 수 있으면서도 세포 독성이 적어 안전한 장점이 있는 바, 유전자 치료를 위한 유전자 전달체 및 유전자 치료제 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

[0014] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 상기 핵산 전달 펩티드와 상기 펩티드 마이셀이 전달 대상 핵산에 결합되는 모습을 예시적으로 나타낸 예시도이다.

도 2의 (A)는 DNA가 TAT-HMGB1 Abox 펩티드 및 R3V6 펩티드 마이셀과 복합체를 형성하는지 여부를 확인한 결과이고, 도 2의 (B)는 DNA가 HMGB1 Abox 펩티드 및 R3V6 펩티드 마이셀과 복합체를 형성하는지 여부를 확인한 결과이며, (C)는 siRNA가 HMGB1 Abox 펩티드 및 R3V6 펩티드 마이셀과 복합체를 형성하는지 여부를 확인한 결과이다.

도 3은 HMGB1 Abox 펩티드의 비율(A)과 R3V6 펩티드 마이셀의 비율(B, C)을 각각 달리하면서, 핵산 전달 복합체의 핵산 전달 효율을 확인한 실험 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명의 핵산 전달 복합체의 DNA(A) 및 siRNA(B) 전달 효율을 종래의 다양한 핵산 전달 물질과 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명의 핵산 전달 복합체가 DNA(A) 또는 siRNA(B)를 세포 내로 전달할 때의 세포 독성을 확인한 실험 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 핵산 전달 복합체의 폐세포 특이적인 핵산 전달 효율을 확인한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 먼저, 본 발명의 명세서에서 이용된 용어를 설명한다.
- [0017] 본 발명에서 일컫는 '펩티드(peptide)'는 펩티드 결합에 의해 4개 내지 1000개의 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 사슬 형태의 고분자를 의미하며, '폴리펩티드(polypeptide)', '올리고펩티드(oligopeptide)' 및 '단백질(protein)'과 상호 혼용가능한 의미이다.
- [0018] 또한, 본 발명에서 일컫는 '핵산(nucleic acid)'는 염기, 당, 인산의 세 가지 요소로 구성된 화학적 단량체인 뉴클레오티드가 다수의 인산에스테르 결합을 매개로 사슬 형태로 이어진 고분자 화합물을 의미하며, '유전자', 'DNA', 'RNA', '올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)', '폴리뉴클레오티드(polynucleotide)', '애포타머(aptamer)', '플라스미드(plasmid)' 등을 포함하는 의미이다. 또한, 상기 핵산은 핵산 구조 중의 인산부, 에스테르부 등에 포함되는 산소 원자 등이, 예컨대 황 원자 또는 불소 원자 등의 다른 원자나 메틸기 등의 알킬기로 치환된 유도체를 포함한다. 또한, 상기 핵산은 합성된 형태 및 혼성 중합체, 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 모두 포함하며, 당업자에게 명백한 바와 같이, 화학적으로 또는 생화학적으로 개질되거나, 또는 비천연 또는 뉴클레오티드 염기의 유도체를 포함할 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명에서 일컫는 'siRNA'는 표적 mRNA의 번역을 막는 이중 가닥 RNA 분자를 의미한다. 상기 siRNA는 dsRNA 및 shRNA를 모두 포함한다. 상기 'dsRNA'는 한 개의 가닥과 이에 상보적인 서열을 가지는 다른 가닥으로 구성된 두 개의 RNA 분자 컨스트럭트를 지칭한다. 상기 'shRNA'는 서로 상보적인 첫 번째 및 두 번째 영역, 즉 센스 및 안티센스 가닥을 포함하는 줄기-루프 구조(stem-loop structure)를 가지는 siRNA를 지칭한다.
- [0020] 또한, 본 발명에서 일컫는 '세포막 투과 펩티드(cell penetrating peptide, CPP)'는 인 비트로(in vitro) 또는 인 비보(in vivo) 상에서 운반 대상인 카고를 세포 내로 전달할 수 있는 능력을 가진 펩티드를 의미하며, '세포막 투과 도메인'과 상호 혼용가능한 의미이다.
- [0021] 또한, 본 발명에서 일컫는 '접촉'이란 전달 대상 핵산이 포함된 핵산 전달 복합체가 진핵 또는 원핵세포와 접하는 것을 의미하며, 이러한 접촉에 의하여 상기 핵산 전달 복합체 내의 전달 대상 핵산이 상기 진핵 또는 원핵세포의 내로 전달된다.
- [0022] 아울러, 본 발명에서 전달 대상 핵산을 세포 내로 '도입'시키는 것에 대하여 '운반', '침투', '수송', '전달', '투과' 또는 '통과'한다는 표현들과 상호 혼용한다.
- [0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명은 전달 대상 핵산; 핵산 전달 펩티드; 및 펩티드 마이셀을 포함하는 핵산 전달 복합체를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 핵산 전달 복합체는 전달 대상 핵산, 핵산 전달 펩티드 및 펩티드 마이셀을 포함한다. 상기 핵산 전달 펩티드는 전하 상호작용을 통해 상기 전달 대상 핵산에 결합되고, 상기 펩티드 마이셀은 전하 상호작용 또는 소수성 상호작용을 통해 상기 핵산 및 핵산 전달 펩티드를 마이셀의 형태로 둘러싼다.
- [0026] 상기 전달 대상 핵산은 세포 내로 도입하고자 하는 핵산으로서, 복수 개의 뉴클레오티드가 서로 인산디에스테르 결합(phosphodiester bond)으로 연결되고, 분자 전체적으로 음전하를 띠는 중합체를 의미한다. 상기 핵산은 상기 인산디에스테르 결합에 참여하는 인산기의 음전하로 인하여 중합체가 전체적으로 음전하를 띤다. 상기 전달 대상 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥으로 구성된 DNA 또는 RNA인 것이 바람직하고, 상기 전달 대상 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥으로 구성된 DNA인 것이 더욱 바람직하고, 상기 전달 대상 핵산은 이중 가닥으로 구성된 DNA인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0027] 상기 핵산 전달 펩티드는 HMGB1 A 박스(High Mobility Group Box 1 A box) 펩티드를 포함한다. 상기 HMGB1 A 박스 펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 특별히 한정되지 않으나, 서열번호 2의 염기서열에 의하여 코딩되는 것이 바람직하다. 상기 HMGB1 A 박스는 양전하를 띠는 아미노산들이 많이 포함되어 있어, 분자가 전체적으로 양전하를 띤다. 따라서, 상기 HMGB1 A 박스 분자는 전하 상호작용을 통하여 음전하를 띠는 상기 전달 대상 핵산에 결합될 수 있다.
- [0028] 상기 핵산 전달 펩티드는 상기 HMGB1 A 박스 펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 표적 지향성 펩티드로서 세포막 투과 도메인을 더 포함할 수 있다. 특히, 상기 세포막 투과 도메인은 상기 HMGB1 A 박스 펩티드의 N-말단에 포함되는 것이 바람직하다. 상기 세포막 투과 도메인은 본 기술 분야에서 사용되는 모든 종류가 이용될 수 있고,

일 예로 상기 세포막 투과 도메인은 HIV에서 유래한 TAT일 수 있다. 상기 세포막 투과 도메인은 상기 HMGB1 A 박스 펩티드와 함께 핵산 전달 펩티드에 포함되어 상기 핵산 전달 복합체의 세포막 투과능을 향상시킨다.

[0029] 상기 펩티드 마이셀은 하기 화학식 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0030] **[화학식 1]**

[0031] R_n-X_m

[0032] 상기 화학식 1에서, R은 아르기닌(Arg)이고, X는 소수성 아미노산이며, n은 1 내지 7, 바람직하게는 2 내지 5의 정수이고, m은 2 내지 20, 바람직하게는 5 내지 10의 정수이다.

[0033] 상기 펩티드 마이셀은 양이온성 아미노산인 아르기닌(Arg)을 기반으로 한다. 상기 아르기닌은 음전하를 띠는 핵산과 전하 상호작용을 형성함으로써, 상기 펩티드 마이셀을 상기 전달 대상 핵산에 결합시킨다. 상기 아르기닌 잔기의 수 n은 1 내지 7의 정수, 바람직하게는 2 내지 5의 정수일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다. 상기 아르기닌 잔기가 하나만 포함되어 상기 펩티드 마이셀을 구성하는 경우에도 상기 펩티드 마이셀을 상기 전달 대상 핵산에 결합시킬 수 있다. 그러나, 상기 아르기닌 잔기의 수가 7개를 초과하는 경우에는 상기 펩티드 마이셀을 형성하는 단위 펩티드의 전체 길이가 너무 길어져 세포 내 독성이 증가되는 문제가 있다. 즉, 상기 펩티드 마이셀의 전체 길이가 너무 길어지면, 전달 대상 핵산의 전달 후에도 펩티드가 분해되지 않고, 일부 세포막이나 세포소기관의 막에 부착되어 세포 기능을 방해하는 등의 이유로 세포 독성을 야기할 수 있는 것이다. 따라서, 상기 펩티드 마이셀은 세포 독성을 나타내지 않는 범위 내에서 아르기닌의 수가 최소화되도록 디자인되는 것이 중요하다.

[0034] 상기 소수성 아미노산은 상기 펩티드 마이셀이 수성의 용액 내에서 자발적으로 집합되어 마이셀의 구조를 형성하도록 하는 것이다. 즉, 상기 펩티드 마이셀이 소수성 아미노산 부분이 수성의 용액 내에서 서로 소수성 상호작용을 형성하여 집합됨으로써 마이셀 구조가 형성되는 것이다. 이는 수성의 용액 내에서 상기 펩티드 마이셀 분자들이 엔트로피를 낮추기 위한 자발적인 반응이다. 따라서, 상기 소수성 아미노산은 이소류신(Ile), 발린(Val), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met) 및 알라닌(Ala)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하고, 상기 소수성 아미노산은 알라닌(Ala) 또는 발린(Val)인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다. 상기 소수성 아미노산의 잔기 수 m은 2 내지 20의 정수인 것이 바람직하고, 상기 소수성 아미노산의 잔기수 m은 5 내지 10의 정수인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다. 상기 소수성 아미노산의 잔기 수 m이 2 미만인 경우에는 소수성 부분의 길이가 너무 짧아 상기 펩티드 마이셀이 마이셀 구조를 형성하지 못하는 문제가 있고, 상기 소수성 아미노산의 잔기 수 m이 20을 초과하는 경우에는 상기 펩티드 마이셀이 세포 독성이 강해지는 문제가 있다.

[0035] 도 1은 상기 핵산 전달 펩티드와 상기 펩티드 마이셀이 전달 대상 핵산에 결합되는 모습을 예시적으로 나타낸 예시도이다.

[0036] 도 1을 참조하면, 먼저 전달 대상 핵산에 HMGB1 A 박스를 포함하는 핵산 전달 펩티드가 전하 상호작용을 통해 결합된다(도 1의 (A)). 그런 다음, 상기 전달 대상 핵산에서 상기 핵산 전달 펩티드가 결합되지 않고 노출된 부분에 펩티드 마이셀의 아르기닌 부분이 전하 상호작용을 통해 결합되면서, 상기 펩티드 마이셀의 소수성 아미노산 부분이 외부로 노출된다(도 1의 (B)). 여기서, 상기 펩티드 마이셀 분자가 추가적으로 가해지는 경우, 상기 전달 대상 핵산에 결합되어 외부로 노출된 펩티드 마이셀의 소수성 부분이 추가적으로 가해지는 펩티드 마이셀 분자와 소수성 상호작용을 통해 아르기닌 부분이 외부로 노출된 마이셀 구조가 형성된다(도 1의 (C)). 상기 와 같이 형성된 핵산 전달 복합체는 내부에 포함된 전달 대상 핵산을 세포 내로 도입시킬 수 있다.

[0037] 상기와 같은 핵산 전달 복합체가 최적의 핵산 전달 효율을 나타내도록 하기 위하여, 상기 핵산 전달 펩티드 및 상기 펩티드 마이셀은 적절한 비율로 상기 전달 대상 핵산과 혼합되어야 한다. 상기 혼합 비율에 있어서, 상기 핵산 전달 펩티드는 상기 전달 대상 핵산 1 중량부에 대하여 2 중량부 내지 5 중량부의 비율로 포함되는 것이 바람직하고, 상기 펩티드 마이셀은 상기 전달 대상 핵산 1 중량부에 대하여 10 중량부 내지 30 중량부의 비율로 포함되는 것이 바람직하다.

[0038] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 pCMV-Luc 플라스미드 또는 서열번호 6 및 서열번호 7의 염기서열을 갖는 두 siRNA들의 혼합물을 HMGB1-Abox 펩티드(핵산 전달 펩티드) 및 R3V6(펩티드 마이셀)와 혼합하여, 세포 내로 전달될 수 있을 정도의 크기를 갖는 핵산 전달 복합체를 제조하였다(표 2 및 도 2 참조). 상기와 같이 제조된 핵산 전달 복합체를 Raw264.7 세포에 처리하여 전달 대상 핵산인 pCMV-Luc 플라스미드 또는 서열번호 6 및 서열번호

7의 염기서열을 갖는 두 siRNA의 혼합물이 높은 효율로 도입됨을 확인하였다(도 3 참조).

[0039] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 pCMV-Luc 플라스미드 또는 서열번호 6 및 서열번호 7의 염기서열을 갖는 두 siRNA의 혼합물을 다양한 비율의 HMGB1-Abox 펩티드(핵산 전달 펩티드) 및 R3V6(펩티드 마이셀)와 혼합하여 핵산 전달 복합체를 제조하고, Raw264.7 세포에 처리하여 최적의 핵산 전달 효율을 나타내는 최적 비율을 산출하였다(도 3 참조). 그 결과, 전달 대상 핵산 1 중량부에 대하여 핵산 전달 펩티드가 2 중량부 내지 5 중량부의 비율로 포함되고, 펩티드 마이셀이 10 중량부 내지 30 중량부의 비율로 포함될 때, 최적의 핵산 전달 효율을 나타냄을 확인하였다.

[0040] 아울러, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 본 발명의 핵산 전달 복합체를 핵산 전달 펩티드 및 펩티드 마이셀을 각각 단독으로 사용한 경우 및 종래 핵산 전달 물질로서 널리 이용되고 있는 폴리-L-리신(Poly-L-lysine: PLL), PEI25K(polyethylenimide 25K), 리포펙타민 등과 비교하여 핵산 전달 효율 및 세포 독성을 평가하였다. 그 결과, 본 발명의 핵산 전달 복합체는 핵산 전달 펩티드 및 펩티드 마이셀을 각각 단독으로 사용한 경우에 비해서 DNA 전달 효율이 현저히 우수한 것을 확인하였고(도 4 참조), 종래의 핵산 전달 물질인 폴리-L-리신(Poly-L-lysine: PLL), PEI25K(polyethylenimide 25K) 및 리포펙타민 보다 높거나 비슷한 정도의 핵산 전달 효율을 나타냄을 확인하였다(도 4 참조). 또한, 본 발명의 핵산 전달 복합체는 핵산 전달 펩티드 및 펩티드 마이셀을 각각 단독으로 사용한 경우나 종래의 핵산 전달 물질인 폴리-L-리신(Poly-L-lysine: PLL), PEI25K(polyethylenimide 25K) 및 리포펙타민을 이용한 경우보다 높은 세포 생존율을 나타냄으로써(도 5 참조), 본 발명의 핵산 전달 복합체는 세포에 대해 독성이 없는 안전한 물질임을 확인하였다. 또한, 시험관 내 실험을 통해서 본 발명의 핵산 전달 복합체가 리포펙타민, 핵산 전달 펩티드 또는 펩티드 마이셀을 사용한 경우에 비해 폐 세포로의 유전자 도입 효율이 유의적으로 높은 것으로 나타났다(도 6 참조). 상기와 같은 결과로부터, 본 발명의 핵산 전달 복합체는 핵산 전달 펩티드 및 펩티드 마이셀을 함께 이용함으로써, DNA나 siRNA와 같은 핵산 분자를 세포 독성 없이 효율적으로 세포 내로 전달할 수 있음을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 핵산 전달 복합체는 세포 내로 대상 핵산을 고효율로 안전하게 전달할 수 있는 유전자 전달 시스템으로서 유용하게 이용될 수 있다.

[0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0042] 단, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

[0043] 핵산 전달 펩티드의 발현 및 정제

[0044] <1-1> HMGB1-Abox 핵산 전달 펩티드의 발현 및 정제

[0045] 서열번호 1의 HMGB1-Abox 펩티드를 코딩하는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드가 삽입된 pET21a 벡터(Novagen, 미국)를 E. coli BL21에 형질전환시켰다. 상기 형질전환된 균주의 단일 클론을 취하여 50 mg/ml의 암피실린(Fluka Chemical, 스위스)이 포함된 10 ml의 LB (10g/L 트립톤, 5g/L yeast extract, 및 10g/L NaCl) 배지에서 37°C에서 18 시간동안 220 rpm으로 교반하며 배양하였다. 상기 배양액에서 2 ml를 취하여 50 mg/ml의 암피실린이 포함된 2 l의 LB 배양액에 접종하고, 37°C에서 OD600이 약 0.8에 이를 때까지 배양한 후, 최종 농도 0.5mM의 IPTG(Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside)(Sigma Chemical, 미국)를 첨가하여 6시간 동안 교반 배양함으로써, HMGB1-Abox 단백질의 발현을 유도하였다. 상기와 같이 배양된 배양물을 4°C에서 5000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 100 ml의 세포 용해 완충용액(50 mM의 Na₂H₂PO₄, 300mM의 NaCl, 10 mM의 이미다졸)(pH 8.0)에 현탁하고, 라이소자임(Lysozyme)(Sigma Chemical, 미국)을 0.1g 첨가한 후, 30분 동안 얼음 상에서 상기 혼합물을 가볍게 교반하였다. 상기 교반시킨 혼합물을 소니케이터(Sonicator)(Cell Disruptor 200)(Branson Ultrasonics Corp., 미국)로 파쇄한 후, 4°C에서 10000g로 30분 동안 원심분리를 하여 상층액을 회수하였다. 상기와 같이 회수한 상층액을 니켈 레진(nikel resin)(Invitrogen, 미국)이 충전된 컬럼(Glass Econo Column, 1.5 x 30 cm)(Bio-Rad, 미국)에 0.5 ml/min의 속도로 로딩하여 발현된 HMGB1-Abox 단백질을 추출하였다. 상기 HMGB1-Abox 단백질이 결합된 컬럼을 100 ml의 완충용액(50 mM의 Na₂H₂PO₄, 300mM의 NaCl, 20 mM의 이미다졸)(pH 8.0)으로 워싱하여 비특이적으로 결합 되어있는 단백질을 제거하

였다. 그 후, 단계별로 이미다졸의 농도를 증가시키면서 위상을 반복하여, HMGB1-Abox 단백질을 분리·정제하였다.

[0046] <1-2> TAT-HMGB1-Abox 핵산 전달 펩티드의 발현 및 정제

[0047] 서열번호 3의 TAT-HMGB1-Abox 펩티드를 코딩하는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드가 삽입된 pET21a 벡터(Novagen, 미국)를 이용하여, 상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법으로 TAT-HMGB1-Abox 단백질을 분리·정제하였다.

실시예 2

[0048] 핵산 전달 복합체의 제조

[0049] <2-1> Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체의 제조

[0050] PBS에 루시페라제(luciferase) 유전자를 포함하고 있는 pCMV-Luc 플라스미드 0.5 μg 과 상기 실시예 <1-1>에서 분리정제한 HMGB1-Abox 펩티드 1.5 μg 을 첨가하고, 상온에서 30분간 반응시켜 Luc-DNA:HMGB1-Abox 복합체를 먼저 제조하였다.

[0051] 상기 Luc-DNA:HMGB1-Abox 복합체에 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 R3V6 펩티드 마이셀((주)웹트론, 한국)을 0.5 μg , 2.5 μg , 5.0 μg 등과 같이 비율을 높여가면서 각각 처리하고 상온에서 15분 동안 반응시킴으로써, 각각 R3V6의 비율이 서로 다른 다양한 핵산 전달 복합체인 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 제조하였다.

[0052] <2-2> Luc-DNA:TAT-HMGB1-Abox:R3V6 복합체의 제조

[0053] PBS에 루시페라제(luciferase) 유전자를 포함하고 있는 pCMV-Luc 플라스미드 0.5 μg 과 상기 실시예 <1-2>에서 분리정제한 HMGB1-Abox 펩티드 2.0 μg 을 첨가하고, 상온에서 30분간 반응시켜 Luc-DNA:TAT-HMGB1-Abox 복합체를 먼저 제조하였다.

[0054] 상기 Luc-DNA:TAT-HMGB1-Abox 복합체에 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 R3V6 펩티드 마이셀((주)웹트론, 한국)을 0.5 μg , 2.5 μg , 5.0 μg 등과 같이 비율을 높여가면서 각각 처리하고 상온에서 15분 동안 반응시킴으로써, 각각 R3V6의 비율이 서로 다른 다양한 핵산 전달 복합체인 Luc-DNA:TAT-HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 제조하였다.

[0055] <2-3> Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체의 제조

[0056] 루시페라제(luciferase)의 발현을 녹-다운(knock-down)시키는 서열번호 6 및 서열번호 7의 염기서열을 갖는 두 siRNA들의 혼합물 0.5 μg 에 상기 실시예 <1-1>에서 분리정제한 HMGB1-Abox 펩티드 1.5 μg 을 첨가하고, 상온에서 30분간 반응시켜 Luc-siRNA:HMGB1-Abox 복합체를 먼저 제조하였다.

[0057] 상기 Luc-siRNA:HMGB1-Abox 복합체에 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 R3V6 펩티드 마이셀((주)웹트론, 한국)을 0.5 μg , 2.5 μg , 5.0 μg 등과 같이 비율을 높여가면서 각각 처리하고 상온에서 15분 동안 반응시킴으로써, 각각 R3V6의 비율이 서로 다른 다양한 핵산 전달 복합체인 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 제조하였다.

실시예 3

[0058] 핵산 전달 복합체의 형성 여부 확인

[0059] <3-1> Gel-Retardation Assay

[0060] 상기 실시예 2에서 제조된 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체, Luc-DNA:TAT-HMGB1-Abox:R3V6 복합체 및 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체 각각을 EtBr이 포함된 1% 아가로스 젤에서 100V로 30분 동안 전기영동한 후, 젤에 UV를 조사하여 복합체의 형성 여부를 확인하였다. HMGB1-Abox(또는 TAT-HMGB1-Abox) 펩티드와 R3V6 펩티드 마이셀이 상기 Luc-DNA 또는 Luc-siRNA에 결합되는 정도가 높아지면 높아질수록 젤 상에서 상기 복합체의 이동도(mobility)가 떨어지게 되고, EtBr에 의한 염색이 용이하지 않게 되어 젤 상에서 상기 UV에 의해 검출되는 정도가 낮아지게 된다.

[0061] 먼저, Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체의 경우, Luc-DNA(pCMV-Luc 플라스미드)에 비하여 Luc-DNA:HMGB1-Abox 복합체나 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체의 이동도가 현저히 감소되었고, R3V6의 양이 2.5 μg 을 넘어가면서부터는(R3V6의 양이 DNA에 비하여 5배 이상인 경우부터는) 젤 상에서 복합체가 잘 검출되지 않았다(도 2의 (A)). 상기와 같은 결과로부터, 상기 실시예 <2-1>에서 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체가 제대로 형성되었음을 알 수 있다.

[0062] 다음으로, Luc-DNA:TAT-HMGB1-Abox:R3V6 복합체의 경우, Luc-DNA(pCMV-Luc 플라스미드)에 비하여 Luc-DNA:TAT-HMGB1-Abox 복합체나 Luc-DNA:TAT-HMGB1-Abox:R3V6 복합체의 이동도가 현저히 감소되었고, R3V6의 양이 5.0 μg 을 넘어가면서부터는(R3V6의 양이 DNA에 비하여 10배 이상인 경우부터는) 젤 상에서 복합체가 잘 검출되지 않았다(도 2의 (B)). 상기와 같은 결과로부터, 상기 실시예 <2-2>에서 Luc-DNA:TAT-HMGB1-Abox:R3V6 복합체가 제대로 형성되었음을 알 수 있다.

[0063] 마지막으로, Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체의 경우, 서로 다른 양으로 첨가된 HMGB1-Abox 펩티드에 의하여 siRNA(서열번호 6의 폴리뉴클레오티드와 서열번호 7의 폴리뉴클레오티드)의 이동도가 현저히 감소되었고, R3V6를 첨가하면서 젤 상에서 복합체가 검출되지 않았다(도 2의 (C)). 상기와 같은 결과로부터, 상기 실시예 <2-3>에서 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체가 제대로 형성되었음을 알 수 있다.

[0064] <3-2> Zeta-size 측정

[0065] 전달 대상 핵산이 HMGB1-Abox 펩티드 및 R3V6 펩티드 마이셀과 복합체를 형성하였을 때의 크기를 확인하기 위하여, 실시예 <2-1>에서 pCMV-Luc 플라스미드 0.5 μg , HMGB1-Abox 펩티드 1.5 μg 및 R3V6 펩티드 마이셀 10 μg 을 첨가하여 제조한 복합체의 크기를 Zetasizer Nano ZS system(Malvern Instruments, 영국)로 측정하였다.

[0066] 그 결과, 상기 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체는 지름이 228 ± 81 nm 크기로서, 충분히 세포 내로 전달될 수 있는 크기임을 확인하였다(표 1).

표 1

	Avg. Size \pm SE (nm)	Avg. PDI	Avg. Zeta potential(mV)
PLL	173 \pm 108	0.299	0.0572 \pm 0.032
HMGB1-Abox	123 \pm 9	0.0316	0.0269 \pm 0.019
R3V6	1241 \pm 26	0.93	0.0687 \pm 0.046
Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체	228 \pm 81	0.462	0.0327 \pm 0.016

실시예 4

[0068] 최적 전달 효율을 나타내는 핵산 전달 복합체의 최적 비율 확인

[0069] <4-1> HMGB1-Abox 펩티드의 최적 비율

[0070] 최적의 전달 효율을 나타내는 핵산 전달 복합체를 형성할 때 첨가되는 HMGB1-Abox 펩티드의 최적 비율을 확인하기 위하여, 상기 실시예 <2-1>과 같은 방법으로 0.5 μg 의 pCMV-Luc 플라스미드와 0.5 μg 의 R3V6 펩티드 마이셀을 첨가하여 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 제조하되, HMGB1-Abox 펩티드의 첨가량을 0.15 μg , 0.25 μg , 0.35 μg , 0.5 μg , 1.0 μg , 1.5 μg , 2.0 μg 및 2.5 μg 으로 달리하였다.

[0071] 상기와 같이 제조된 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 Raw264.7 세포(ATCC)에 처리하여, 발현된 루시퍼라제의 양을 검출함으로써, 핵산의 전달 효율을 확인하였다. 보다 구체적으로, Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 처리하기 약 24 시간 전에 페니실린, 스트렙토마이신 1%, 10% 혈청이 첨가된 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양한 Raw264.7 세포 1×10^5 개를 6-웰 플레이트(well plate)의 각 웰에 분주하고, 플레이트의 약 70% 정도로 세포가 자랄 때까지 37 $^{\circ}\text{C}$ 및 5% CO $_2$ 의 조건하에서 약 18 시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 웰로부터 배지를 제거하고, 혈청이 첨가되지 않은 배지 1 ml을 분주하여 세척한 다음, 같은 배지 2 ml을 각 웰에 분주하고, 상기 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 첨가하여 4 시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 및 5% CO $_2$ 조건으로 배양하였다. 4시간 경과 후, 1% 페니실린, 스트렙토마이신 및 10% 혈청이 함유된 DMEM 배지 2 ml을 각 웰에 주입하여 24시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 및 5% CO $_2$ 조건으로 배양한 뒤, 각 웰로부터 배지를 제거하고 세포를 1 ml의 PBS(pH 7.4)

로 세척하였다. 상기 세척된 세포를 200 μ l의 용해 완충용액(lysis buffer)으로 용해시켰다. 그런 다음, 각각의 샘플을 잘 혼합한 후에 13000rpm로 4°C에서 3분 동안 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상기 상층액 50 μ l에 루시페라아제 기질 용액(Promega, 미국) 50 μ l를 가한 후, 형광 루미노미터(luminometer)(Detection System GmbH, Pforzheim, 독일)로 루시페라아제 활성을 측정하였다.

[0072] 그 결과, 2.0 μ g의 HMGB1-Abox 펩티드가 첨가된 경우에 가장 높은 루시페라아제 활성을 나타내었고, 최적의 핵산 전달 효율을 나타내었다(도 3의 (A)).

[0073] 상기와 같은 결과로부터, 핵산 1 중량부에 대하여, HMGB1-Abox 펩티드가 2 중량부 내지 5 중량부의 비율로 포함될 때, 최적의 핵산 전달 효율을 나타냄을 알 수 있다.

[0074] <4-2> R3V6 펩티드 마이셀의 최적 비율

[0075] <4-2-1> DNA 전달을 위한 R3V6 펩티드 마이셀의 최적 비율

[0076] 최적의 전달 효율을 나타내는 핵산 전달 복합체를 형성할 때 첨가되는 R3V6 펩티드 마이셀의 최적 비율을 확인하기 위하여, 상기 실시예 <2-1>과 같은 방법으로 0.5 μ g의 pCMV-Luc 플라스미드와 1.5 μ g의 HMGB1-Abox 펩티드를 첨가하여 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 제조하되, R3V6 펩티드 마이셀의 첨가량을 0.5 μ g, 2.5 μ g, 5.0 μ g, 7.5 μ g, 10 μ g, 12.5 μ g 및 15 μ g으로 달리하였다. 상기와 같이 제조된 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 Raw264.7 세포(ATCC)에 처리하여, 발현된 루시페라아제의 양을 상기 실시예 <4-1>과 같은 방법으로 검출함으로써, 핵산의 전달 효율을 확인하였다.

[0077] 그 결과, 10 μ g의 R3V6 펩티드 마이셀이 첨가된 경우에 가장 높은 루시페라아제 활성을 나타내었고, 최적의 핵산 전달 효율을 나타내었다(도 3의 (B)).

[0078] 상기와 같은 결과로부터, 핵산 1 중량부에 대하여, R3V6 펩티드 마이셀이 10 중량부 내지 30 중량부의 비율로 포함될 때, 최적의 핵산 전달 효율을 나타냄을 알 수 있다.

[0079] <4-2-2> RNA 전달을 위한 R3V6 펩티드 마이셀의 최적 비율

[0080] 상기 실시예 <2-3>과 같은 방법으로 0.5 μ g의 Luc-siRNA(서열번호 6 및 서열번호 7)와 1.5 μ g의 HMGB1-Abox 펩티드를 첨가하여 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 제조하되, R3V6 펩티드 마이셀의 첨가량을 0.5 μ g, 2.5 μ g, 5.0 μ g, 7.5 μ g, 10 μ g 및 15 μ g으로 달리하였다. 상기와 같이 제조된 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 pCMV-Luc 플라스미드가 도입되어 루시페라아제가 발현되는 Raw264.7 세포(ATCC)에 처리하여, 루시페라아제의 발현이 억제되는 정도를 상기 실시예 <4-1>과 같은 방법으로 검출함으로써, 핵산의 전달 효율을 확인하였다.

[0081] 그 결과, 10 μ g의 R3V6 펩티드 마이셀이 첨가된 경우에 가장 낮은 루시페라아제 활성을 나타내었고, 최적의 핵산 전달 효율을 나타내었다(도 3의 (C)).

[0082] 상기와 같은 결과로부터, 핵산 1 중량부에 대하여, R3V6 펩티드 마이셀이 10 중량부 내지 30 중량부의 비율로 포함될 때, 최적의 핵산 전달 효율을 나타냄을 알 수 있다.

실시예 5

[0083] 핵산 전달 복합체의 형질전환 효율 확인

[0084] <5-1> DNA의 형질전환 효율 확인

[0085] 상기 실시예 <2-1>과 같은 방법으로 핵산 전달 복합체를 제조하되, 0.5 μ g의 pCMV-Luc 플라스미드, 1.5 μ g의 HMGB1-Abox 펩티드 및 10 μ g의 R3V6 펩티드 마이셀을 이용하여 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 제조하고, 상기 실시예 <4-1>과 같은 방법으로 루시페라아제 활성을 검출함으로써 핵산의 전달 효율을 확인하였다. 또한, 상기 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체의 핵산 전달 효율을 Luc-DNA, Luc-DNA:HMGB1-Abox 복합체, Luc-DNA-R3V6 복합체, Luc-DNA:Poly-L-Lysine 및 Luc-DNA:Lipofectamine와 비교하였다.

[0086] 그 결과, 상기 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체는 Luc-DNA:HMGB1-Abox 복합체 및 Luc-DNA-R3V6 복합체에 비하여 현저히 높은 DNA 전달 효율을 나타내었고, 종래 알려진 PLL(Poly_L_Lysine)보다도 높은 전달 효율을 나타내었으나, 그 전달 효율이 종래 널리 이용되고 있는 리포펙타민(lipofectamine)보다는 다소 낮은 것으로 확인되었다(도 4의 (A)).

[0087] <5-2> RNA의 형질전환 효율 확인

[0088] 상기 실시예 <2-3>과 같은 방법으로 핵산 전달 복합체를 제조하되, 0.5 μ g의 Luc-siRNA(서열번호 6 및 서열번호 7), 1.5 μ g의 HMGB1-Abox 펩티드 및 10 μ g의 R3V6 펩티드 마이셀을 이용하여 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 제조하고, 상기 실시예 <4-2-2>와 같은 방법으로 루시페라제 활성을 검출함으로써 핵산의 전달 효율을 확인하였다. 또한, 상기 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체의 핵산 전달 효율을 Luc-siRNA, Luc-siRNA:HMGB1-Abox 복합체, Luc-siRNA-R3V6 복합체, Luc-siRNA:Polyethylenimide 25K 및 Luc-siRNA:Lipofectamine와 비교하였다.

[0089] 그 결과, 상기 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체는 Luc-siRNA:HMGB1-Abox 복합체 및 Luc-siRNA-R3V6 복합체에 비하여 높은 RNA 전달 효율을 나타내었고, 종래 알려진 PEI25K(Polyethylenimide 25K)보다도 높은 전달 효율을 나타내었으나, 그 전달 효율이 종래 널리 이용되고 있는 리포펙타민(lipofectamine)보다는 다소 낮은 것으로 확인되었다(도 4의 (B)).

실시예 6

[0090] 핵산 전달 복합체의 세포 독성 확인

[0091] 상기 실시예 <2-1> 또는 실시예 <2-3>과 같은 방법으로 핵산 전달 복합체를 제조하되, 0.5 μ g의 pCMV-Luc 플라스미드 또는 0.5 μ g의 Luc-siRNA(서열번호 6 및 서열번호 7), 1.5 μ g의 HMGB1-Abox 펩티드 및 10 μ g의 R3V6 펩티드 마이셀을 이용하여 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체 및 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 제조하고, 상기 복합체를 Raw264.7 세포(ATCC)에 처리한 다음, MTT 분석(MTT assay)를 수행하여 세포 독성을 분석하였다. 또한, 상기 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체의 세포 독성을 PLL(Poly_L_Lysine), PEI25K(Polyethylenimide 25K) 및 리포펙타민(lipofectamine)과 비교하였다.

[0092] 그 결과, 상기 Luc-DNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체 및 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체는 PLL(Poly_L_Lysine), PEI25K(Polyethylenimide 25K) 및 리포펙타민(lipofectamine)보다 높은 세포 생존률을 보여, 종래 널리 알려진 물질들보다 세포 독성이 적음을 확인하였다(도 5).

실시예 7

[0093] 핵산 전달 복합체의 표적 세포 특이성 확인

[0094] 상기 실시예 <2-3>과 같은 방법으로 핵산 전달 복합체를 제조하되, 0.5 μ g의 FITC가 결합된 Luc-siRNA(서열번호 6 및 서열번호 7), 1.5 μ g의 HMGB1-Abox 펩티드 및 10 μ g의 R3V6 펩티드 마이셀을 이용하여 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체를 제조하고, 상기 복합체를 마우스 폐 상피세포 LA-4(ATCC)에 처리한 다음, 유세포분석을 수행하여, FITC-Luc-siRNA가 도입된 세포의 수를 측정하였다. 또한, 상기 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체의 핵산 전달 효율을 Luc-siRNA, Luc-siRNA:HMGB1-Abox 복합체, Luc-siRNA-R3V6 복합체, Luc-siRNA:Polyethylenimide 25K 및 Luc-siRNA:Lipofectamine와 비교하였다.

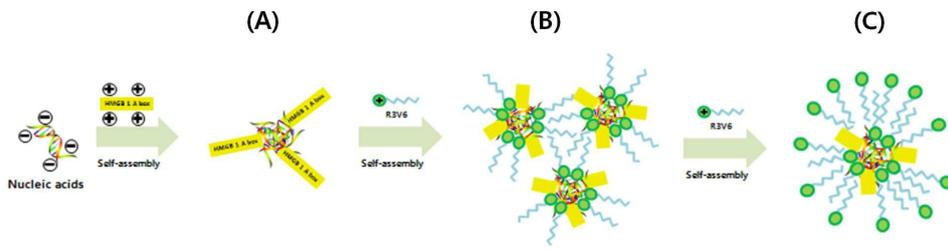
[0095] 그 결과, 리포펙타민에 비하여 낮은 세포 도입 효율을 나타내던 Luc-siRNA:HMGB1-Abox:R3V6 복합체가 폐 세포에서는 특이적으로 매우 우수한 세포 도입 효율을 나타냄을 확인하였다(도 6).

[0096] 상기와 같은 결과로부터, 본 발명의 복합체는 폐 세포에 특히 높은 핵산 전달 특이성을 나타냄을 알 수 있다.

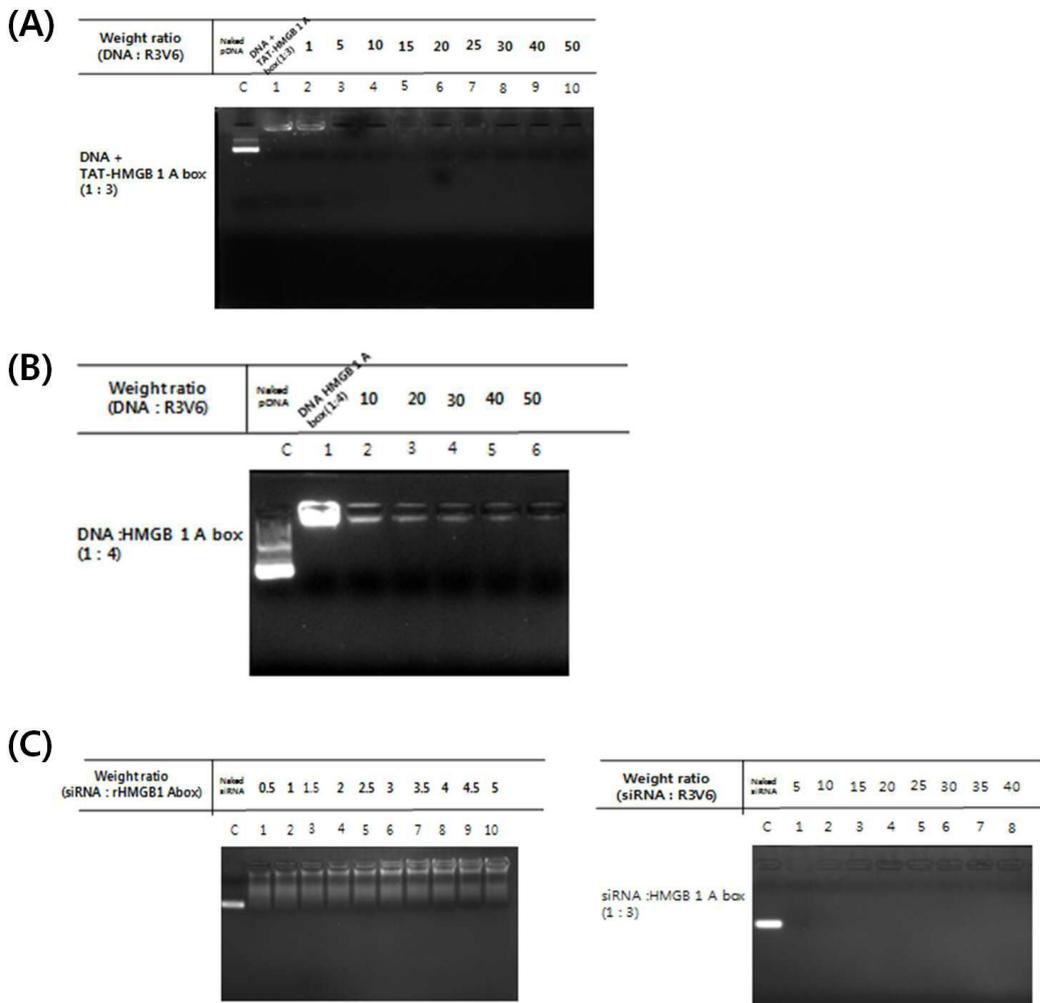
[0097] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 발명의 범위는 상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 특허청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

도면

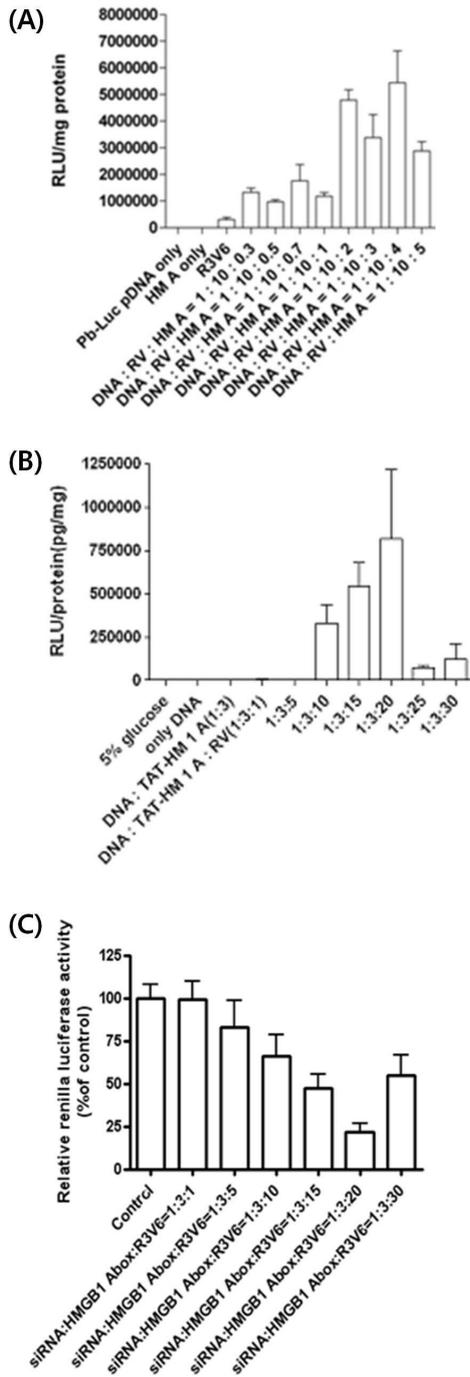
도면1



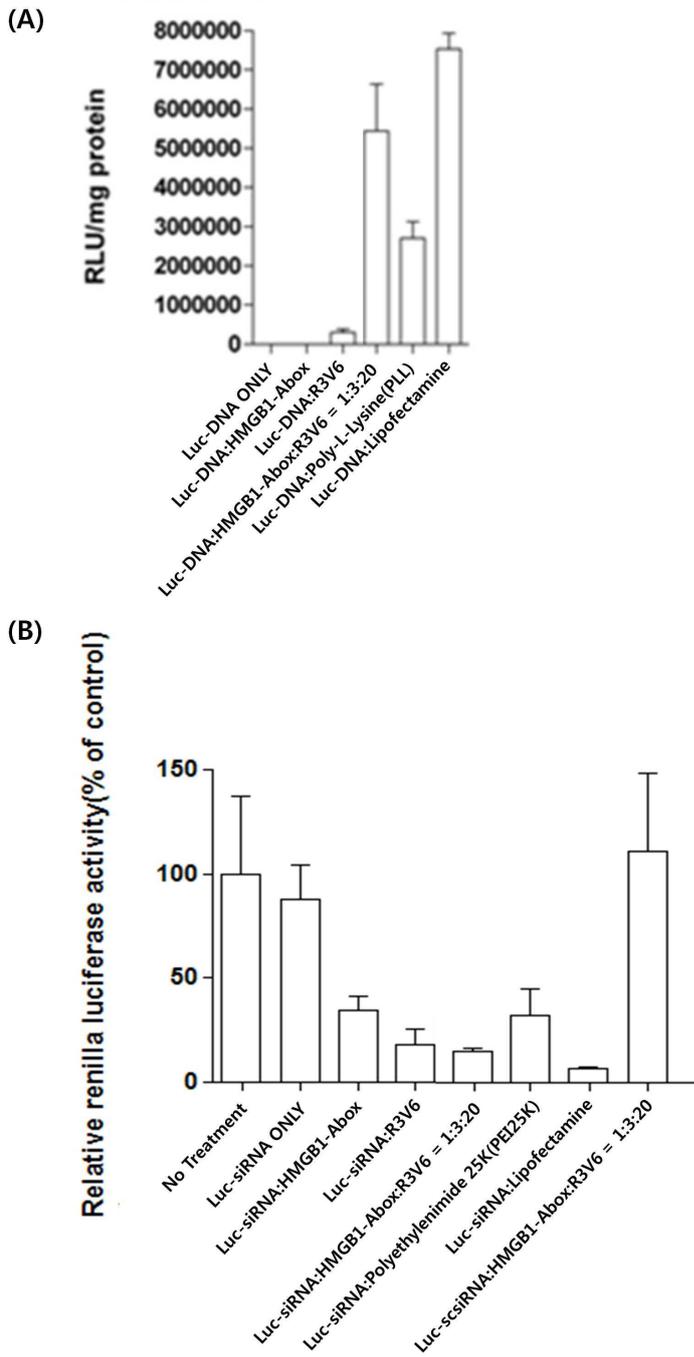
도면2



도면3

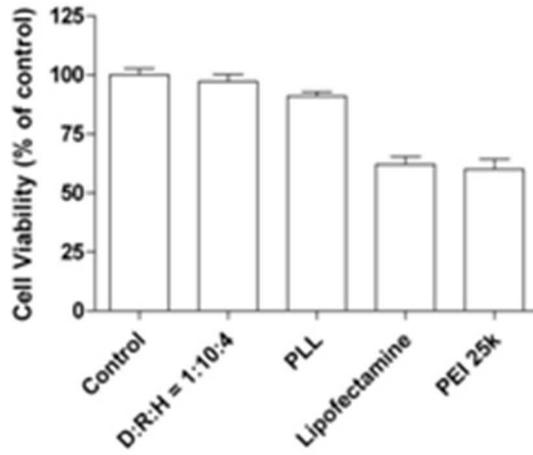


도면4

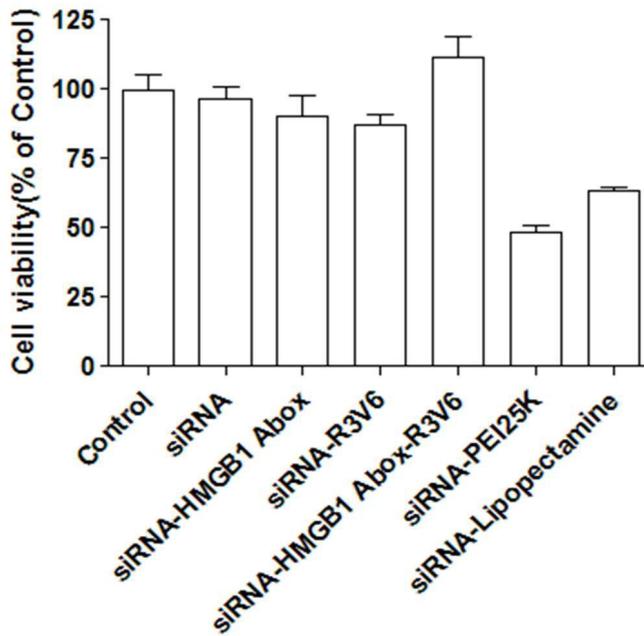


도면5

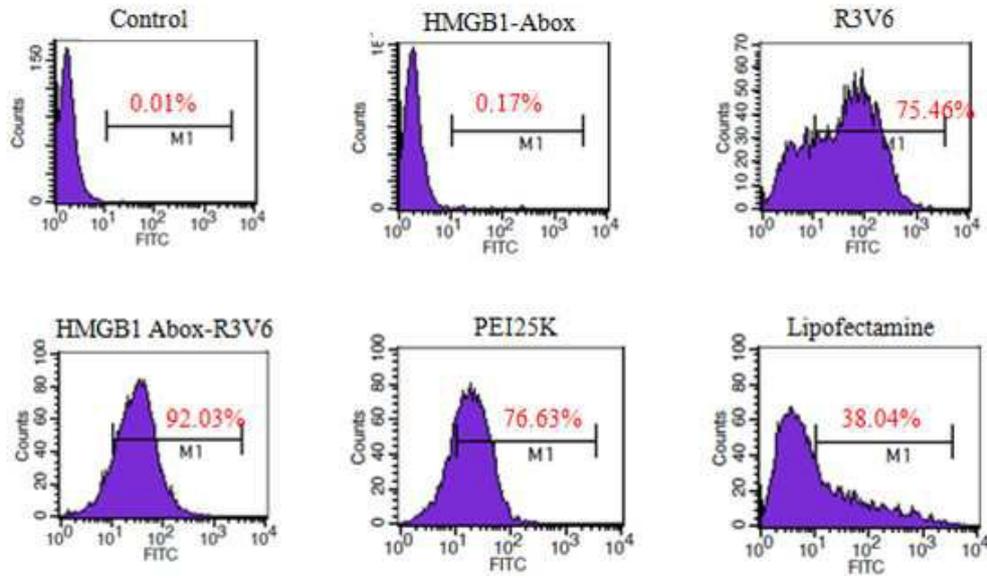
(A)



(B)



도면6



서열목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Hanyang University
- <120> Complex for nucleic acid delivery
- <130> HY120053N
- <160> 7
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 67
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys
 1 5 10 15
 Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys
 20 25 30
 Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe
 35 40 45
 Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys
 50 55 60
 Thr Tyr Ile
 65

<210> 2
 <211> 201
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 atgtcatcat atgcattttt tgtgcaaact tgtcgggagg agcataagaa gaagcaccca 60
 gatgcttcag tcaacttctc agagttttct aagaagtgct cagagagggtg gaagaccatg 120
 tctgctaag agaagggaaa atttgaagat atggcaaaag cggacaaggc ccgttatgaa 180

agagaaatga aaacctatat c 201

<210> 3
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant polypeptide comprising both TAT and HMGB1-Abox
 <400> 3

Lys Leu Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Glu Phe Met Gly Lys
 1 5 10 15
 Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe
 20 25 30
 Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser
 35 40 45
 Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr
 50 55 60
 Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp
 65 70 75 80
 Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile
 85 90

<210> 4
 <211> 276
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Polynucleotide sequence coding for recombinant polypeptide

comprising both TAT and HMGB1-Abox

<400> 4
 aagcttcgca aaaagcggag acagagacgc aggaattca tgggcaaagg agatcctaag 60
 aagccgagag gcaaaatgtc atcatatgca ttttttgtgc aaacttgtcg ggaggagcat 120
 aagaagaagc acccagatgc ttcagtcaac ttctcagagt tttctaagaa gtgctcagag 180
 aggtggaaga ccatgtctgc taaagagaaa gaaaatttg aagatatgc aaaagcggac 240
 aaggcccggtt atgaaagaga aatgaaaacc tatatc 276
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence of peptide micelle R3V6

<400> 5
 Arg Arg Arg Val Val Val Val Val Val
 1 5

<210> 6
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide sequence of 1st siRNA for the knock-down of the luciferase expression

<400> 6
 ggccuuuac uacuccuacu u 21

<210> 7
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide sequence of 2nd siRNA for the knock-down of the luciferase expression

<400> 7
 guaggaguag ugaaggccu u 21