

|                                                                                                                                                                                                                            |                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                           | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2013-0022891<br>(43) 공개일자 2013년03월07일                                                                                                                                                                                                                              |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br><i>A61K 47/48</i> (2006.01) <i>A61K 47/30</i> (2006.01)<br><i>A61K 48/00</i> (2006.01)<br>(21) 출원번호 10-2011-0085893<br>(22) 출원일자 2011년08월26일<br>심사청구일자 2011년08월26일<br>기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도 |                                    | (71) 출원인<br><b>충남대학교산학협력단</b><br>대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)<br>(72) 발명자<br><b>최준식</b><br>대전광역시 서구 청사로 281, 샘머리아파트 201동 704호 (둔산동)<br><b>배윤미</b><br>충청남도 논산시 연무읍 동산리 기산아파트 102-1808호<br><b>유광식</b><br>충청남도 천안시 서북구 성정로 75, 주공아파트 118동 403호 (성정동)<br>(74) 대리인<br><b>특허법인 충정</b> |

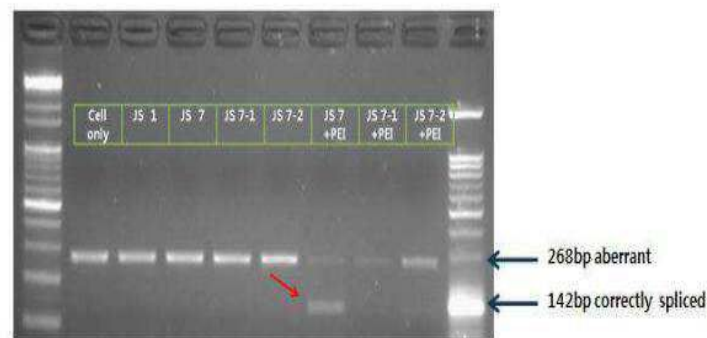
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 PNA 전달을 위한 올리고-아스파라긴산(Asp)-PNA 함유 복합체

### (57) 요약

본 발명은 세포 내에 PNA의 세포 흡수율 향상 및 효과적인 전달을 위한 복합체 및 이의 이용 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 올리고-아스파라긴산(Asp)-PNA-양이온 담체(PEI 또는 Lipofectamine)의 복합체를 형성함으로써 PNA의 세포 흡수능 및 트랜스펙션 효율을 증가시키고, mRNA의 스플라이싱 교정(splicing correction) 작용을 하는, 효과적인 우수한 유전자 전달 시스템에 관한 것이다.

**대표도** - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100021647

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자 지원사업

연구과제명 유전자치료용 바이오소재 및 펩티드핵산 유도체 연구 및 개발

주관기관 한국연구재단

연구기간 2010.09.01 ~ 2013.08.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

음전하의 올리고-아스파라긴산(Asp)-PNA 및 양이온 담체로 이루어진 PNA 전달용 복합체.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 양이온 담체는 폴리에틸렌이민(PEI) 또는 리포펙타민(Lipofectamine)인 것을 특징으로 하는 PNA 전달용 복합체.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 올리고-아스파라긴산(Asp)은 PNA와 컨쥬게이션을 형성하고 있는 것을 특징으로 하는 PNA 전달용 복합체.

### 청구항 4

제2항에 있어서,

상기 복합체는 Asp(n)-PNA-PEI로 구성되고, 상기 n은 5~12인 것을 특징으로 하는 PNA 전달용 복합체.

### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 PEI는 분자량 20~30kD인 것을 특징으로 하는 PNA 전달용 복합체.

### 청구항 6

제2항에 있어서,

상기 복합체는 Asp(n)-PNA-리포펙타민으로 구성되고, 상기 n은 5~12인 것을 특징으로 하는 PNA 전달용 복합체.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 복합체는 세포 내에서 스플라이싱 교정(splicing correction) 작용을 하는 것을 특징으로 하는 PNA 전달용 복합체.

### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 복합체는 부-나노몰(sub-nanomolar) 범위에서 작용하는 것을 특징으로 하는 PNA 전달용 복합체.

### 청구항 9

제1항에 있어서,

복합체의 트랜스펙션 효율은 PNA에 컨쥬게이션된 올리고-아스파라긴산(Asp)의 개수에 의존적인 것을 특징으로 하는 PNA 전달용 복합체.

### 청구항 10

제1항에 있어서,

복합체의 트랜스펙션 효율은 양이온 담체 용량 의존적인 것을 특징으로 하는 PNA 전달용 복합체.

## 청구항 11

제1항 또는 제2항의 PNA 전달용 복합체를 이용하여 유전자를 교정하는 방법.

## 청구항 12

제11항에 있어서,

상기 유전자 교정(Gene correction)은 mRNA의 스플라이싱 교정(splicing correction)인 것을 특징으로 하는 방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은, 세포 내에 PNA의 세포 흡수율 향상 및 효과적인 전달을 위한 복합체 및 이의 이용 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 통상적인 단백질 치료의 대용으로서 다양한 유전자 치료 기법이 발달되어 왔으나, 이에는 여전히 해결되어야 할 중요한 과제들이 존재한다. 유전자 치료의 주요한 과제 중 하나는 세포 독성이 거의 없는 유전자 전달체를 이용하여 효율적인 세포막 및 핵막의 통과를 통하여 치료용 유전자의 효과적인 유입(influx) 및 유전자의 발현을 달성하는 것이다.

[0003] 합성 펩타이드에 기초한 유전자 전달 시스템은, 낮은 pH의 엔도솜 막 내에서 누출을 야기시킴으로써 DNA를 응축시키고, 또한 엔도솜 탈출을 촉진하므로 중합체성 유전자 전달 시스템과 관련된 상기 문제점들을 극복할 수 있다. 이러한 이유로, 다양한 합성 펩타이드가 *in vitro* 여러 세포주에서의 유전자 전달을 촉진하는 것으로 개발되어 왔다. 그러나, 이 역시 *in vivo* 적용에 있어서 독성 및 혈청 불안정성 등의 문제점이 존재한다.

[0004] 단백질 전달을 위한 PTDs(Protein transduction domain)가 세포내 흡수 및 핵 전위(translocation)를 강화할 수 있기 때문에, 중합체성 또는 합성 펩타이드-기재 유전자 전달 시스템의 대안으로서 제안되었다.

[0005] 폴리(L-리신)(PLL) 및 폴리에틸렌이민(PEI) 기재 유전자 캐리어(carrier)는 비바이러스성 중합체성 유전자 캐리어의 전형적인 예이다. 양이온성 중합체 중에서, 분지화된 25kD의 PEI 는 가장 광범위하게 연구되는 화합물 중 하나이다. 분지화된 PEI 는 일차 및 이차 아민기를 함유함으로써 엔도솜의 산성 환경에서 용이하게 양성자화된다. 그 결과 양성자 스폰지(sponge) 활성은 엔도솜 팽창 및 막 파괴에 이은 DNA/PEI 의 엔도솜 탈출을 이끈다.

[0006] 또한, 짧은 양이온성 펩타이드를 갖는 응축된 DNA 는 더 낮은 협동 효과(cooperative effect)에 의하여 안정성이 낮다는 문제가 있으며, 그 결과로서 복합체는 혈류에서 불안정하고, *in vitro* 에서 DNA를 대사로부터 보호하기에 불충분하게 된다. 반면 양이온성 펩타이드가 음성으로 하전된 유전자와 너무 강하게 결합하는 경우에는 유전자가 복합체로부터 유리되지 않을 수 있다.

[0007] 즉, 바이러스성 벡터의 경우 면역반응이나 자가복제와 같은 문제점이 있으며, 일반적인 중합체성 벡터의 경우 생체 적합성이 떨어지고 이로 인하여 세포 및 생체 독성이 크고 핵산 전달 효율이 낮다는 문제점이 있다.

[0008] 따라서, 세포외 공간에서 핵산을 안정화시키면서, 핵산의 세포 내로의 유입 및 복합체로부터의 핵산의 유리를 원활히 하여 유전자 발현의 수준을 높일 수 있는 새로운 유형의 유전자 전달 시스템의 개발이 필요하다.

[0009] 이에 본 발명자들은 PNA와 올리고 아스파라긴산(Asp)을 컨주게이션시켜 음전하의 올리고-아스파라긴산(Asp)-PNA를 고안하여 양이온 담체와 복합체를 형성함으로써 PNA의 세포 흡수능 및 트랜스펙션 효율을 증가시키고, 나아가 mRNA의 스플라이싱 교정(splicing correction) 작용을 하는 것을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

### 발명의 내용

## 해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 음전하의 올리고-아스파라긴산(Asp)-PNA 및 양이온 담체로 이루어진 PNA 전달용 복합체를 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 PNA 전달용 복합체를 이용하여 유전자를 교정(gene correction)하는 방법을 제공하는데 있다.

## 과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 해결하기 위하여 본 발명은 음전하의 올리고-아스파라긴산(Asp)-PNA 및 양이온 담체로 이루어진 PNA 전달용 복합체를 제공하며, 상기 복합체는 구체적으로 Asp(n)-PNA-PEI로 구성되고, 이 때, 상기 n은 5~12일 수 있고, 올리고-아스파라긴산(Asp)은 PNA와 컨쥬게이션을 형성하고 있다.
- [0013] 또한, 상기 양이온 담체는 비제한적으로, 폴리에틸렌아민(PEI) 또는 리포펙타민(Lipofectamine)일 수 있다. 따라서, 상기 복합체는 Asp(n)-PNA-PEI로 구성되거나, Asp(n)-PNA-리포펙타민(Lipofectamine)으로 구성될 수 있다. 이 때, 상기 PEI는 분자량 20~30kD인 것이 바람직하다.
- [0014] 이러한 본 발명의 복합체는 부-나노몰(sub-nanomolar) 범위에서 작용하므로 낮은 농도일지라도 우수한 효과를 나타낸다.
- [0015] 본 발명의 상기 복합체는 PNA의 세포 내 전달, 즉 트랜스펙션 효율이 높을 뿐만 아니라, 세포 흡수능이 우수하다. 또한, 상기 복합체는 세포 내에서 유전자 교정(gene correction), 특히, 스플라이싱 교정(splicing correction) 작용을 한다.
- [0016] 이 때, 상기 복합체의 트랜스펙션 효율은 PNA에 컨쥬게이션된 올리고-아스파라긴산(Asp)의 개수 및 양이온 담체 용량에 각각 의존적이다.
- [0017] 한편, 본 발명은 다른 관점에서 상기 Asp(n)-PNA-PEI/리포펙타민(Lipofectamine)복합체를 이용하여 유전자를 교정하는 방법, 특히, 목적 유전자의 mRNA의 스플라이싱 교정(splicing correction)하는 방법을 제공한다.

## 발명의 효과

- [0018] 본 발명은 PNA와 올리고 아스파라긴산(Asp)을 컨쥬게이션시켜 음전하의 올리고-아스파라긴산(Asp)-PNA를 고안하여 양이온 담체와 복합체, 예를 들어, Asp(n)-PNA-PEI/Lipofectamine 복합체를 형성함으로써 PNA의 세포 흡수능 및 트랜스펙션 효율을 증가시키고, mRNA의 스플라이싱 교정(splicing correction) 작용을 하는 바, 효과적인 우수한 유전자 전달 시스템으로 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 free PNA 및 Asp<sub>(12)</sub>-PNA/PEI 복합체의 HeLa Luc705 세포에서의 루시페라제 활성을 관찰한 결과이다.
- 도 2는 free PNA 및 Asp<sub>(12)</sub>, (8), (4)-PNA/PEI 복합체의 다양한 농도에서의 루시페라제 활성을 관찰한 결과이다.
- 도 3은 다양한 nanomolar PNA에서 PEI 또는 Lipofectamine 복합체의 루시페라제 활성을 관찰한 결과이다.
- 도 4는 스플라이싱 복원(splicing restoration)을 확인하는 RT-PCR 실험 결과이다.
- 도 5는 free PNA 및 Asp-PNA/PEI 복합체로 트랜스펙션된 HeLa Luc705 세포에 대한 형광 현미경 관찰 결과이다.
- 도 6은 Asp<sub>(12)</sub>-PNA/PEI 복합체의 세포 흡수능을 관찰한 공초점 현미경 실험 결과이다.
- 도 7은 세포 독성을 평가한 MTT 분석 결과이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.
- [0021] "핵산"은 임의의 DNA 또는 RNA, PNA 예를 들어, 조직 샘플에 존재하는 염색체, 미토콘드리아, 바이러스 및/또는 세균 핵산을 포함하는 의미이다. 이중가닥 핵산 분자의 하나 또는 두개 모두의 가닥을 포함하고, 무손상 핵산 분자의 임의의 단편 또는 일부를 포함한다. 본 발명에서는 특히, PNA를 의미한다.
- [0022] "유전자"는 단백질 코딩 또는 전사시에 또는 다른 유전자 발현의 조절시에 기능적 역할을 갖는 임의의 핵산 서열 또는 그의 일부를 의미한다. 유전자는 기능적 단백질을 코딩하는 모든 핵산 또는 단백질을 코딩 또는 발현하는 핵산의 일부만으로 이루어질 수 있다. 핵산 서열은 엑손, 인트론, 개시 또는 종료 영역, 프로모터 서열, 다른 조절 서열 또는 유전자에 인접한 특유한 서열 내에 유전자 이상을 포함할 수 있다.
- [0023] "트랜스펙션(transfection)"은 배양동물 세포에 핵산(DNA, PNA 등)을 직접 도입하여 세포 내에서 유전형질을 발현시키는 방법을 의미한다. 대상이 식물세포일 때는 세포벽을 제거하고 원형질체로 도입하는 경우도 많다. 이 방법으로 발암기구, 감염, 면역, 발생, 정보전달 등 의학, 생물학의 여러 가지 문제에 세포 수준에서 접근할 수 있게 되었다. 도입한 핵산은 목적으로 하는 유전자를 플라스미드 등의 매개체에 넣어 도입하는 것이 일반적인 방법이다. 도입한 유전자가 세포에서 안정화된 경우는 염색체에 끼어들어간 경우가 많았다. 핵산을 도입한 세포를 형질도입체라고 한다. 형질주입 효율이 매우 낮기 때문에 효율을 높이기 위해서 여러 가지 방법을 개발되었다. 그 중에서도 인산칼슘공침법, DEAE-텍스트란처리법, 전기천공법, 재분포법(리포솜이라는 인공막과 DNA복합체를 만들게 하는 세포와 융합시키는 방법) 등이 있다.
- [0024] "루시페라제(luciferase)"는 루시페린의 산화를 촉진하여 화학에너지를 빛에너지로 전환시켜 광을 발산하게 하는 효소로, 생체 내에서 연속적, 실시간적으로 발현을 측정하고, 목적의 물질들에 대한 효과를 검증할 수 있게 하는 리포터 유전자(reporter gene) 기능을 한다. 반딧불이(firefly; 개뿔벌레) 또는 딱정벌레(glow-worm)와 같은 곤충체로부터 직접 수득하거나 이러한 효소를 암호화하는 재조합 DNA 절편을 포함하는 미생물로부터의 발현에 의해 수득할 수 있다.
- [0025] "담체(carrier)"는, 생물체 내에 있는 활성물질이 다른물질과 결합하여 존재하는 경우, 또는 세포막을 통한 물질의 이동인 운반체수송을 담당하는 고분자 물질을 총칭한다. 담체의 예로는 비제한적으로 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산과 같은 완충제, 아스코르브산과 같은 항산화제, 저분자량 폴리펩티드(약 10 잔기 미만), 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질, 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 폴리머, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산, 당당류, 이당류 및 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물, EDTA와 같은 킬레이트화제, 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당알코올, 나트륨과 같은 염-형성 반대이온(salt-forming counterion), 및/또는 TWEEN, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 및 PLURONICS 같은 무이온 계면활성제를 포함한다.
- [0026] "유전자 치료(gene therapy)"는 돌연변이를 일으킨 유전자를 정정하여 유전병을 치료하려는 것을 말한다. 즉 환자의 세포에 외부에서 정상유전자를 이식하여 그 세포의 표현형을 변화시킴으로써 병을 치료하는 방법이다. 현재 사람의 정자, 난자, 수정란에 대한 유전자치료는 전 세계적으로 윤리문제가 제기되고 있으나, 1993년대에 「유전자치료 임상연구에 관한 지침」을 지정한 후부터 유전자치료시대로 돌입하였다. 유전자 치료에는 체내에 유전자를 도입하는 유전자 벡터, 시스템의 연구가 필수적이다.
- [0027] "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.
- [0028] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.
- [0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 PNA(peptide nucleic acid)의 세포 내 전달(delivery)에 관한 것이다.
- [0031] 일 관점에서 음전하의 올리고-아스파라긴산(Asp)-PNA 및 양이온 담체로 이루어진 PNA 전달용 복합체에 관한 것이다.
- [0032] PNA(peptide nucleic acid)는 1991년에 덴마크의 P. Nielsen 등에 의해서 최초로 개발된 천연 DNA 유사체로 인공으로 합성된 물질이다. 구조적으로 PNA는 DNA와는 달리 기본 골격 구조가 폴리아마이드(polyamide)로 구성되

어 있으나, 천연 DNA와 동일한 염기 (아데닌, 구아닌, 사이토신, 티미딘, 우리딘)를 가지고 있기 때문에 상보적 염기서열을 가지고 있는 DNA 또는 RNA 등의 핵산과 결합하여 이중 나선 구조를 형성할 수 있다. PNA는 DNA에 비해 우수한 생물학적, 화학적, 열적 안정성을 갖고 있을 뿐 아니라 상보적 염기서열에 대하여 강한 친화도와 탁월한 특이성을 갖는다.

- [0033] 알려진 많은 펩타이드 서열은 리신이나 아르기닌 잔기들을 포함하기 때문에 양전하를 띤다. 양전하로 대전된 아미노산들은 이러한 펩타이드 대부분의 가장자리에 있고 음전하에 의해 대전된 플라즈마 막과 상호작용을 하는 것이 통상적이다.
- [0034] 그러나, 본 발명에서는 음전하에 의해 대전한 PNA를 DNA나 RNA에 유사하게 디자인하고자 하였다.
- [0035] 이를 위해, 본 발명에서는 올리고-아스파라긴산-PNA[Asp(n)-PNA]를 제공한다. PNA 서열의 말단에 올리고-아스파라긴산(aspartic acid)을 컨주게이션하고, 이 때, 상기 n은 5 내지 12 중 하나의 정수를 의미한다. 이 때, 올리고-아스파라긴산(Asp)의 말단에 카르복시기 음이온(COO-)이 존재하는 바, 상기 Asp(n)-PNA는 음전하를 띄게 되는 것이다.
- [0036] 아스파라긴 산을 이용하여 음전하로 대전된 PNA는 양전하로 대전된 펩타이드들 보다, 양이온 담체(cationic carrier)를 더 많이 사용할 수 있는 장점이 있다. 즉, 양이온 담체와의 복합체를 형성하여 많은 음전하의 PNA들을 전달할 수 있다.
- [0037] 이차림, 올리고-아스파라긴산과 PNA의 결합은 PNA의 잘 녹지 않는 용해성을 개선시킬 뿐만 아니라, 양이온 담체와 복합체를 형성하여 PNA 전달 효율을 높이는 기능을 한다.
- [0038] 그러므로, 본 발명의 올리고-아스파라긴산-PNA는 아스파라긴산의 카르복시기 음전하를 통해, PNA와 양이온 담체 사이의 전하간 상호작용을 가능하게 하는데, 구체적으로, 전자쌍에 의한 공유결합 및 정전기 상호작용을 통해, 보다 많은 음전하의 PNA들을 세포 내로 전달할 수 있다.
- [0039] 이러한 양이온 담체는 트랜스펙션 시약(transfection reagent)으로 나타내기도 하는데, 잠재적으로 (치료)유전자 또는 약물 전달에 매우 유용하다.
- [0040] 본 발명에서, 양이온 담체로, 예를 들어, 폴리(L-리신)(PLL), 폴리에틸렌이민(PEI), 키토산, PAMAM 덴드리머, 및 폴리(2-디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트(pDMAEMA)가 PNA 운반체로 사용될 수 있다. 특정 경우에서, PEI는 엔도솜붕괴제 또는 표적화제를 사용하지 않고도 효과적인 유전자 전달을 제공한다[참조: Boussif O., et al., Proc Natl Acad Sci USA. Aug.1, 1995, 92(16) 7297-301].
- [0041] 특히, 바람직하게는 PEI 또는 양이온 lipid Lipofectamine을 양이온 담체로 사용할 수 있다.
- [0042] 따라서, 본 발명의 구체적인 일 태양으로서, 상기 복합체는 "Asp(n)-PNA-PEI"로 구성될 수 있고, 이 때, 상기 n은 5~12 중 하나의 정수, 예를 들어 n=12일 수 있다.
- [0043] 상기 PEI는 합성 양이온 폴리머로서, 세포 흡수 목적으로 음으로 대전된 잔기와 복합체를 형성한다. 본 발명에서는 PNA를 세포 내로 전달하기 위해, 양이온 PEI 및 올리고-아스파라긴산-PNA 간에 정전기 상호작용(electrostatic interaction)에 의해 복합체를 형성시킨다. 상기 PEI는 세포의 흡수율을 높이고 핵산 전달을 위해 엔도솜의 탈출을 촉진시킨다.
- [0044] 다만, 상기 PEI는 분자량이 높아질수록 세포독성이 높아지는 문제가 있는 바, PNA 전달에 효율적이면서도 지나치게 높은 세포독성을 가지지 않도록 적절한 분자량의 PEI를 선택해서 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어 본 발명에서는 20~30kD의 PEI를 사용할 수 있으며, 일 실시예에서는 약 25kD의 PEI를 사용하였다.
- [0045] 유사하게, 본 발명의 구체적인 다른 태양으로서, 상기 복합체는 "Asp(n)-PNA-Lipofectamine"로 구성될 수 있고, 이 때, 상기 n은 5~12 중 하나의 정수, 예를 들어 n=12일 수 있다.
- [0046] 리포솜을 이용하여 트랜스펙션하는데 사용되는 리포펙타민(Lipofectamine)은 친수성(hydrophilic) 부분이 양전하(positive charge)를 띠고 있어, 이 부분과 본 발명의 음전하(negative charge)의 올리고-아스파라긴산-PNA가 서로 상호작용하여 복합체를 형성하고, 이를 통해 PNA를 세포 내로 전달시킨다. 특히, 본 발명의 Asp<sub>(12)</sub>-PNA-Lipofectamine은 매우 우수한 트랜스펙션 효율을 나타냈다.
- [0047] 이와 같이, PNA를 세포에 전달하기 위해, 기존의 방법과 달리, 본 발명의 PNA를 올리고-아스파라긴산을 이용해 "음전하"로 대전시켜 "양이온 담체"를 사용하는 것은 당해 분야에서 새로운 효과적인 PNA 전달 방법이다.

- [0048] 이러한 본 발명의 복합체 및 이를 이용한 방법은 특히 다음과 같은 장점을 가지고 있다.
- [0049] (1) 본 발명의 "Asp(n)-PNA-PEI/Lipofectamine"은 유전자 교정(gene correction), 특히 mRNA의 스플라이싱 교정(splicing correction) 작용을 한다.
- [0050] 유전자 교정(gene correction)은 유전자 치료(Gene Therapy) 방법 중 하나로, 결함이 있는 유전자의 염기서열을 고치는, 즉, 돌연 변이된 부분만을 수정하는 것을 의미하는데, 그 중에서도 본 발명은 mRNA의 스플라이싱(splicing) 교정 작용을 한다.
- [0051] RNA 중합효소에 의해 핵에서 DNA를 주형으로 하여 합성된 1차 RNA(전사체)는 엑손과 인트론을 모두 포함하고 있고, 이런 전구체 RNA로부터 인트론들이 제거되어 단백질의 아미노산 서열을 암호화하거나 5'-, 3'-비번역 부위인 엑손(exon)들만을 모으는 과정을 '스플라이싱(splicing)'이라 한다. 본 발명에서는 PNA 트랜스펙션을 통하여 이러한 스플라이싱 과정 중에 생긴 돌연변이 부분을 교정한다.
- [0052] 본 발명의 일 실시예에서는 이러한 mRNA의 스플라이싱 교정 효과를 루시페라제 활성 측정, 예를 들어 RT-PCR 실험 등을 통해 확인하였다. 즉, 본 발명의 복합체는 루시페라제 mRNA의 스플라이싱 교정을 통해 유전자 발현을 교정함으로써 루시페라제 발현을 촉진시킨다.
- [0053] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서 상기 Asp(n)-PNA-PEI/Lipofectamine 복합체를 이용하여 PNA의 전달효율을 향상시키고, 전달된 PNA를 이용하여 유전자 교정(gene correction), 특히 mRNA의 스플라이싱 교정(splicing correction)을 하는 방법에 관한 것이다.
- [0054] (2) 본 발명의 복합체는 부-나노몰(sub-nanomolar) 범위에서 작용한다.
- [0055] 본 발명의 Asp(n)-PNA-PEI/Lipofectamine 복합체는 부-나노몰(sub-nanomolar) 범위인 매우 낮은 농도에서도 기능하는 장점이 있다. 도 3에 도시하고 있는 바와 같이 낮은 농도에도 매우 우수한 세포 내로의 트랜스펙션 효율을 나타낸다.
- [0056] (3) 본 발명의 복합체의 트랜스펙션 효율은 올리고-아스파라긴산(Asp)의 개수 또는/및 양이온 담체 용량 의존적인 것을 특징으로 한다.
- [0057] 본 발명의 Asp(n)-PNA-PEI/Lipofectamine 복합체의 트랜스펙션 효율은, 상기 PNA에 컨쥬게이션된 올리고-아스파라긴산(Asp)의 개수와 양이온 담체 PEI 또는 Lipofectamine 용량에 각각 의존적이다.
- [0058] 이 때, Asp산의 갯수(n)는 3~15, 바람직하게는 5~12인 것이 바람직하고 본 발명의 일 실시예에서는 12인 경우를 사용하였다. 그리고, 양이온 담체의 용량은 트랜스펙션 효율과 세포독성을 함께 고려하여 사용되어지는 것이 바람직하다. 본 발명의 일 실시예에서는 25kD의 PEI 및 Lipofectamin 2000<sup>TM</sup>을 사용하였다.
- [0059] 이처럼, 본 발명은 Asp(n)-PNA-PEI/Lipofectamine 복합체 및 이를 이용하여, 높은 트랜스펙션 효율, 세포 흡수율을 가지는 PNA 세포 내 전달을 달성하고, 나아가 mRNA의 스플라이싱 교정(splicing correction) 효과를 발휘한다. 따라서, 효과적인 우수한 유전자 전달 시스템으로 사용될 수 있다.
- [0060] 또한, 본 발명에서 사용할 수 있는 양이온 담체의 농도는 세포에 독성을 미치지 않는 양으로서 1~2ug의 농도로 사용하는 것이 바람직하며, 본 발명의 일 실시예에서는 PEI를 1ug의 양으로 사용하였을 경우 가장 좋은 효과를 얻을 수 있었다.
- [0061] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

## [0062] 실험 준비 및 실험방법

### [0063] 1. 재료준비

[0064] 폴리에틸렌 이민 (branched, 25kD와 2kD)과 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다(대한민국, 서울). Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 transfection 시약과 TRIzol 시약을 Invitrogen으로부터 구입하였다(미국, 캘리포니아, Carlsbad). 루시페라제 1000분석 키트와 reporter 용

해 완충액이 Promega로부터 구입되었다(미국, 위스콘신, 매디슨). 태아 소 혈청(FBS)과 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 GIBCO로부터 구입하였고(미국, 매릴랜드, 게이더스버그), PNA와 올리고-Asp-PNA(Asp(4)-PNA, Asp(8)-PNA, Asp(12)-PNA, PNA-Fam, Asp(12)-PNA-Fam)이 Panagene Co.에 의해 합성되었다(대한민국, 대전).

## 2. 세포배양

HeLa pLuc 705 세포들을 10% FBS가 함유된 DMEM 배양액을 사용하여 5% 이산화탄소가 포함된 습한 대기의 37도 인큐베이터에서 배양하였다.

## 3. PNA 트랜스펙션

HeLa pLuc 705 세포는 트랜스펙션하기 24시간 전에 96-well plates에 well 당  $2 \times 10^4$  cells 및  $1.2 \times 10^4$  cells의 수로 각각 분주하여 배양하였다. PNA 및 올리고-아스파라긴산-PNA/polymer 복합체는 다양한 몰비 혹은 고분자 중량 비율로 준비하여 상온에서 30분간 배양하였다. 고안된 농도에서 PNA, oligo-Asp-PNA/25kD PEI 및 oligo-Asp-PNA/2kD PEI를 함유하는 20  $\mu$ l/well 배양액을 세포에 처리하였다. 그리고 분석 전에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 인큐베이터에서 하루 동안 배양하였다.

## 4. Luciferase assay

PNA 트랜스펙션 24시간 후에, 96-well plates의 세포들을 PBS 용액으로 세척 후 리포터 용해 완충액 (Promega)를 각 well에 첨가하였다. 상온에서 30분간 배양 후, 세포들을 수득하여 미세 원심 분리 관들로 옮겼다. 15초 동안 볼텍싱 후, 세포들을 20분간 12000rpm에서 원심 분리기로 분리하였다. 루시페라제 활성을 luminometer를 사용해서 RLU(relative light unit)로 측정하였다. 최종 루시페라제 값은 RLU/Well로 기록하였다.

## 5. RT-PCR

사용된 프라이머의 서열:

luciferase sense: 5' -TTGATATGTGGATTTCGAGTCGTC-3' (서열번호 2)

luciferase antisense: 5' -AGCCACGCTTTCATACTGCT-3' (서열번호 3)

GAPDH sense: 5' -AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3' (서열번호 4)

GAPDH antisense: 5' -ACACATTGGGG TAGGAACA-3' (서열번호 5)

제조업자의 실험 계획안에 따라 전체 RNA를 트리졸 시약으로 분리하였다. 전체 RNA의 농도와 순도는 260nm과 280nm의 흡광도로 계산하였다. 1가닥 cDNA를 전체 RNA의 2  $\mu$ g와 oligo-dT15 primers의 1  $\mu$ M로 Omniscript 역전 사효소를 사용하여 합성하였다(Qiagen, Valencia, CA, USA).

제조업자의 실험계획안에 따라 Peltier thermal cycler(미국, 메사츄세츠, 워터타운, MJ Research) 및 1:25로 희석된 한 가닥의 cDNA와 20pmol의 프라이머를 함유하는 Taq PCR Master Mix kit(Qiagen)를 사용하여 정량 PCR 증폭이 이루어졌다. PCR반응은 94° C에서 3분간 변성(denaturation) 개시, 94° C에서 40초, 60°C에서 40초 및 72°C에서 1분의 3단계 cycling (40 cycles), 및 72° C에서 최종 확장(extention)으로 이루어졌다.

PCR 산물을, TBE 버퍼의 2%의 아가로스 겔 상에서 분석하였고, 브롬화 에티듐 염색으로 가시화하였다. 겔 이미지는 DP001-IPC 장치로 캡처하였다(프랑스, Marne-La-Vallee, Vilber Lourmat).

## 6. Fluorescence imaging (nuclear staining)

[0081] HeLa pLuc705세포들을, 96-well plates에  $5 \times 10^3$  cells/well로 재-플레이트하였다. 다음날, 세포에 Fam-PNA/PEI(25kD) 복합체를 배양액과 함께 트랜스펙션하여 하루 동안 배양하였다. 배양 후, PBS 로 2회 세척한 후, 5분간 10%의 포르말린으로 고정시켰다. 또한, 다시 PBS로 세척한 후, 암실에서 세포핵을 5분간 10  $\mu$ g/ml Hoechst 33342로 염색하였다. 염색된 세포 이미지들은 DP Controller가 장착된 형광 현미경(IX51)으로 캡처되었다(일본, 도쿄, Olympus Optical).

## [0082] 7. Confocal imaging

[0083] 기하급수적으로 늘어난 세포들을 트랜스펙션 전 날,  $5 \times 10^4$  cells/well 밀도로 8-well Lab-Tek chambered coverglass (Nunc)에 플레이트하였다. PNA/PEI 트랜스펙션을 위해 1 $\mu$ M Fam-PNA는 PEI와 함께 또는 PEI 없이 100 $\mu$ l/well DMEM 배양액에 준비하여 세포에 처리하고 배양하였다.

[0084] 배양 4시간 후, 세포에 새로운 배양액 100  $\mu$ l/well(FBS 10%를 포함한 DMEM)로 보충하였고, 이후 16시간 더 배양되었다. 다음 날, 세포들을 PBS로 2회 세척하고 10% 포르말린으로 5분 동안 고정 후, 10  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 으로 세포들을 염색하였다.

[0085] 슬라이드 상의 세포들은 마운팅 용액(미국, 캘리포니아, Burlingame, Vectashield mounting medium for fluorescence, Vectro Lab. cat no. H1400)을 넣어 고착한 후 덮개유리로 덮었다. Olympus IX71microscope (oil immersion 60 $\times$  1.4 NA objective; Olympus)에 연결된 아르곤 레이저 (excitation and absorbance wavelengths, 528 nm 와 UV, 각각; Applied Precision, Issaquah, WA, USA)로 장착된 Deltavision RT confocal system을 사용하여 세포 이미지들을 분석하였다. 이미지 소프트웨어 패키지 (Applied Precision)가 이미지 획득 과 처리에 사용되었다.

## [0086] 8. 세포 생존력 분석(Cell viability assays)

[0087] 세포 생존력을 평가하기 위해 MTT분석을 사용하였다. HeLa pLuc 705 세포들을 96-well plates에서  $1.2 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 씨딩하여 하루 동안 배양하였다. 배양 24시간 뒤, free PNA, 올리고-아스파라긴산-PNA-PEI/Lipofectamine 복합체 및 양이온성 담체 PEI, Lipofectamine을 배양액 20 $\mu$ l와 함께 세포에 처리하고 37 $^{\circ}$ C 에서 하루 동안 배양하였다.

[0088] 배양 후, 2mg/ml MTT 용액을 첨가하였다. 그 후, 세포들을 37 $^{\circ}$  C에서 4시간 동안 배양하고, MTT-함유 배지를 제거하였고, 살아있는 세포에 의해 형성된 포르마잔 결정체를 녹이기 위해 DMSO를 첨가하였다. 570nm에서 microplate reader(미국, 캘리포니아, VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale)를 사용해서 흡광도를 측정하였다.

### [0089] <실시예 1>

#### [0090] 올리고-아스파라긴산(Asp)-PNA 및 PNA/PEI 복합체 제작

[0091] PNA 서열로, CCTCCTACCTCAGTTACA(서열번호 1)를 사용하였다. 상기 PNA는 HeLa pLuc 705 cells에서 스플라이싱 교정을 위해 전달된 PNA의 루시페라제 발현을 스크리닝하기 위해 사용되었다.

[0092] 루시페라제 리포터 유전자 내 비정상적 스플라이싱 위치(the aberrant splice site)에 상보적인 올리고-아스파라긴산-PNA[Asp(n)-PNA]을 고안하였다. PNA 서열의 말단에 올리고-아스파라긴산을 컨주게이션하였다.

[0093] 그 결과, 올리고-아스파라긴산과 PNA의 결합은 PNA의 잘 녹지 않는 용해성을 개선시켰으며 양이온 담체와의 복합체 형성을 가능하게 했다. 즉, 올리고-아스파라긴산의 카르복시기 음이온은 PNA와 양이온 운반체 사이의 전하 간 상호작용을 가능하게 했다.

[0094] 즉, 본 발명의 Asp(n)-PNA는 PEI 또는 Lipofectamine과 복합체를 형성한다.

### [0095] <실시예 2>

- [0096] **올리고-아스파라긴산-PNA/PEI 복합체에 의한 루시페라제 발현의 상향조절(Upregulating)**
- [0097] 루시페라제 활성은 스플라이싱 교정에서 관찰되므로, 이러한 루시페라제 활성 측정은 전달된 PNA에 의한 기능활성의 지표가 된다. 데이터는 웰 당 전체 세포 단백질의 microgram으로 나타냈다.
- [0098] free PNA 및 Asp(n)-PNA /PEI 복합체를 DMEM과 혼합하고 HeLa Luc705 세포에 첨가하였다. Asp<sub>(12)</sub>-PNA와의 트랜스펙션을 위해 다양한 PEI농도 비율(2kD, 25kD)에서 담체 및 조건을 조사하였다.
- [0099] 그 결과, 도 1에 도시한 바와 같이, 고분자량의(MW) PEI 폴리머가 뛰어난 트랜스펙션 효과를 나타냈다. 이는 트랜스펙션 효율은 PEI 크기(MW) 증가에 따라 함께 증가되는 것을 의미한다. 하지만 트랜스펙션 효율 증가를 위해 MW를 증가시키면 세포독성도 증가하는 문제가 있다. 따라서, 이를 고려하여, 본 발명자들은 전달 효율 및 세포독성 간의 균형을 위해 25kD PEI로 실험하였다.
- [0100] 도 1에서 도시한 바와 같이, Asp<sub>(12)</sub>-PNA/25kD PEI 복합체의 경우 루시페라제 활성은 용량 의존적이었고, 2kD PEI(낮은 분자량)의 경우는 별다른 변화가 없었다.
- [0101] 뿐만 아니라, 루시페라제 활성은 컨주게이션된 아스파라긴산의 수에도 의존적이었다. 도 2는 아스파라긴산 및 PEI 폴리머 사이의 관계를 명확히 보여준다.
- [0102] 즉, 아스파라긴산의 수는 PEI 폴리머와의 상호작용을 증가시킴으로써 루시페라제 활성에 영향을 미쳤다. 이는 PEI의 양뿐만 아니라, 결합된 아스파라긴산 수의 증가도 루시페라제 활성을 촉진시킴을 알 수 있다.
- [0103]
- [0104] 또한, 본 발명의 Asp(n)-PNA /PEI 복합체는 sub-nanomolar 범위에서 효과적임을 관찰하였다(도 3). 그러나, free PNA와 Asp(n)-PNA의 경우에는 그렇지 않았다. 그리고, Lipofectamine 복합체 역시 sub-nanomolar 범위에서 작용했다.
- [0105] Asp<sub>(12)</sub>-PNA는 PEI와 Lipofectamine의 결합으로 루시페라제 활성을 현저하게 향상시켰다. Asp<sub>(4),(8)</sub>-PNA 역시 고농도의 PEI 또는 Lipofectamine과 결합하여 루시페라제 활성을 향상시켰다. 특히, Asp<sub>(12)</sub>-PNA/Lipofectamine 복합체가 5nM에서 놀랄만한 트랜스펙션 효율을 나타냈다.
- [0106] 이러한 결과를 통해, PNA 변형 및 양이온성 담체 모두가 중요함을 알 수 있다. 트랜스펙션 효율은 PEI의 양과 결합된 아스파라긴산의 수에 의존적이었다. 즉, Asp의 음전하가 PEI 및 Asp(n)-PNA 사이에서 복합체의 형성에 영향을 주고, 상기 복합체는 루시페라제 활성에 결정적인 영향을 미치는 것이다.
- [0107] **<실시예 3>**
- [0108] **올리고-아스파라긴산-PNA/PEI 복합체에 의한 스플라이싱 교정**
- [0109] 증가된 루시페라제 활성은 교정된 루시페라제 mRNA의 수준을 직접적으로 반영하였다. 정확하게 스플라이싱된 mRNA에서 정량적 차이를 확인하기 위해 RT-PCR분석을 사용하였다.
- [0110] RT-PCR 결과를 도 5에 도시하였다.
- [0111] Asp(n)-PNA/PEI 복합체에 의해 교정된 루시페라제 mRNA 밴드를 확인하였다. 교정된 mRNA 밴드는, 루시페라제 pre-mRNA의 비정상적 스플라이싱 위치에 대한 PNA의 반응을 나타낸다. 이는 PNA 트랜스펙션 동안의 루시페라제 활성의 상대적 증가를 의미한다.
- [0112] **<실시예 4 >**
- [0113] **올리고-아스파라긴산-PNA/PEI 복합체의 세포 흡수력(Cellular uptake)**
- [0114] 형광성으로 표지된 Asp<sub>(12)</sub>-PNA/PEI 복합체 (Asp<sub>(12)</sub>-PNA-Fam/PEI complex)를 인지할 수 있는 형광현미경에 의해 Asp(n)-PNA/PEI 복합체의 흡수가 확인되었다.
- [0115] 도 5에 나타내고 있는 바와 같이, PNA 형광 신호가 free PNA-Fam에서는 나타나지 않은 반면, Asp<sub>(12)</sub>-PNA-

Fam/PEI 복합체에는 세포 흡수가 가시적으로 명백히 나타났고, 세포질(cytosol) 및 핵 분획(nuclear fraction) 양쪽 모두에서 확산되어 나타났다. PNA 형광신호는 이러한 세포흡수의 명백한 증거가 되기는 하지만, 그 방법으로는 세포 내에서의 세포성 형광신호의 위치까지는 확인할 수 없었다.

[0116] 그러나, 공초점 형광 현미경에 의해 Asp<sub>(12)</sub>-PNA-Fam 세포내의 형광 발광 위치를 관찰했다. PNA 형광신호는 세포 핵에 위치했고(도 6), 이는 PNA가 핵에 전달되었다는 것을 의미한다.

[0117] 그리고, PNA의 전달은 PEI의 용량-의존적 효과를 재확인시켰다(도 6). 공초점 연구에 의해 제공된 형광데이터를 통해, PEI 폴리머가 PNA를 핵 내로 운반시킴을 알 수 있었다. 다만, Asp<sub>(12)</sub>-PNA-Fam이 핵 내에서 PEI와 함께 있는지 여부는 불분명하였다.

[0118] 그럼에도 불구하고, 상기 형광 데이터를 통해 세포내로 흡수되는 PNA의 경로가 설명될 수 있고, 그 흡수된 PNA에 의해 증가하는 루시페라제의 활성화와 스플라이싱 교정을 통한 수정된 mRNA 밴드 또한 설명될 수 있다.

#### [0119] <실시예 5>

#### [0120] PNA 및 올리고-아스파라긴산-PNA/PEI 복합체의 세포독성

[0121] PEI는 폴리머-기반의 DNA 및 siRNA 전달에 매우 효과적이나, 세포독성이 높고 이는 분자량(MW) 의존적이다.

[0122] MTT 분석을 사용해서 PNA 및 Asp(n)-PNA/PEI 복합체의 세포 독성을 측정하였다. 그리고 독성에 대한 세포 전달의 범위를 최적화하기 위해 HeLa pLuc 705 세포에서 PEI 및 Lipofectamine 결과를 비교하였다(도 7).

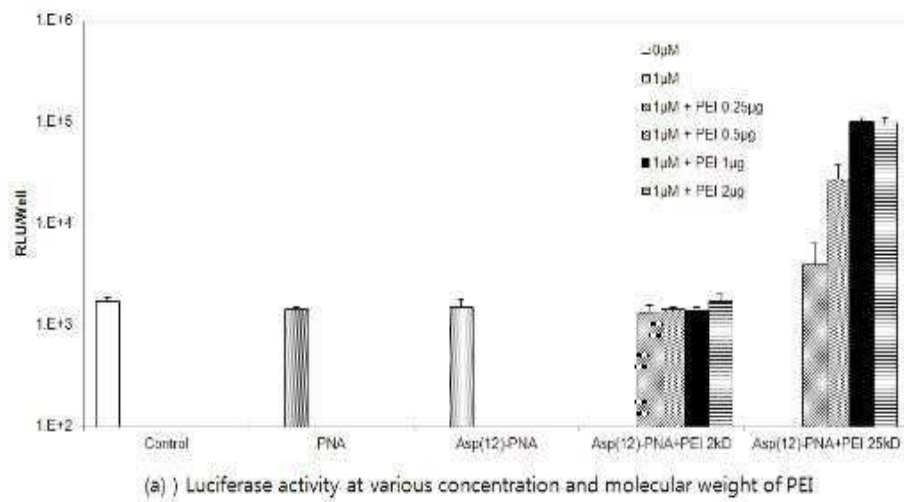
[0123] Asp(n)-PNA/PEI 복합체는 free PNA와 Asp(n)-PNA/Lipofectamine 복합체보다 더 높은 독성을 나타냈다. 이러한 결과는 PEI의 독성에 의해 야기된 것이다.

[0124] PEI와 Lipofectamine의 비교결과는 PEI가 훨씬 독성을 띤다는 것을 나타내고, PEI의 농도가 높을수록 더욱 독성을 띄었다(도 7 b). 그것은 양이온 폴리머가 높은 양이온 전하 밀도를 가짐으로써 갖는 PEI 자체의 세포독성이다. 또한, 도 4 a에 도시하고 있는 바와 같이, PNA도 보다 높은 농도에서 더욱 독성을 가짐을 발견했다. 즉, PNA와 Asp(n)-PNA/PEI 복합체는 PEI의 높은 농도에 기인하여 세포독성이 있다.

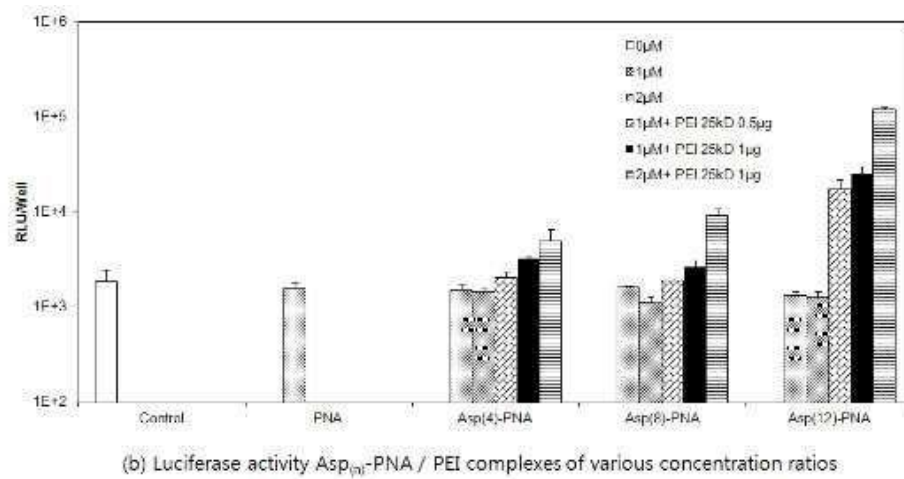
[0125] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

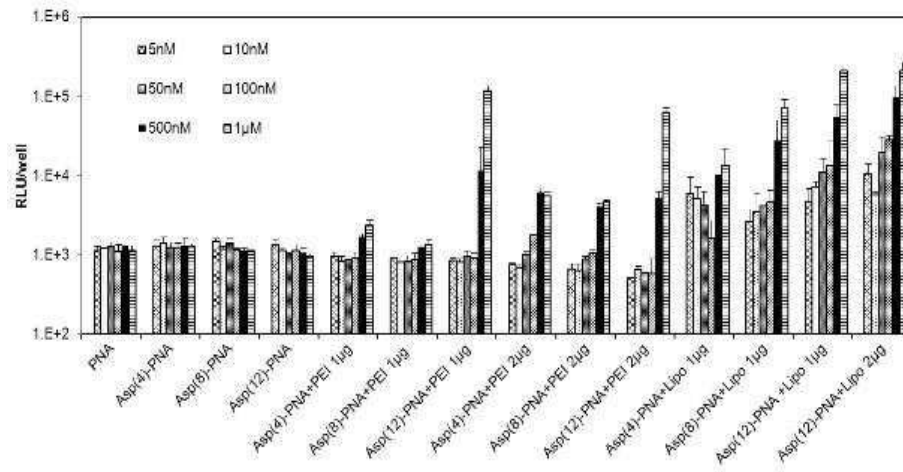
도면1



도면2

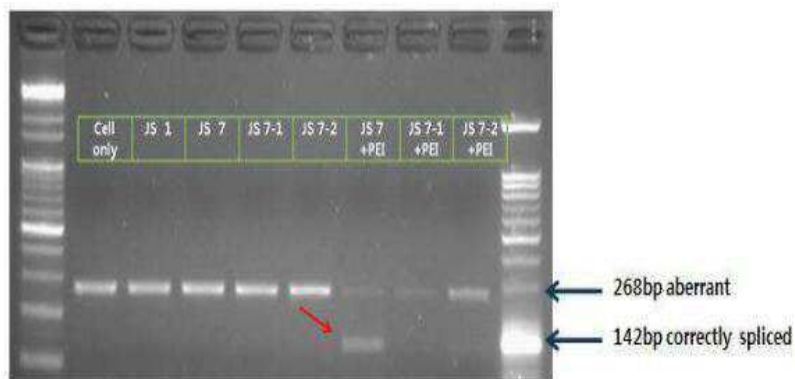


도면3

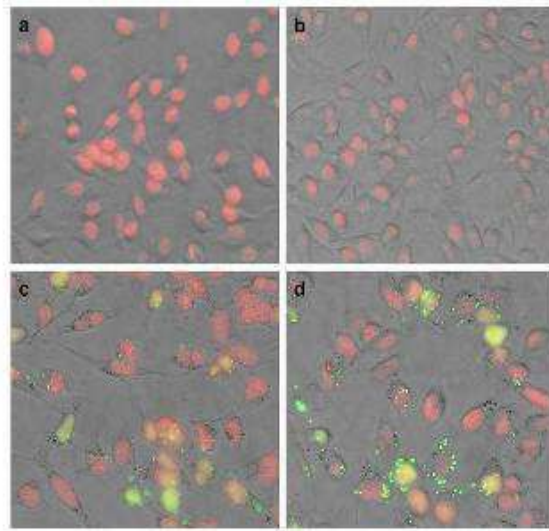


(c) Luciferase activity of PNA at nanomolar range

도면4

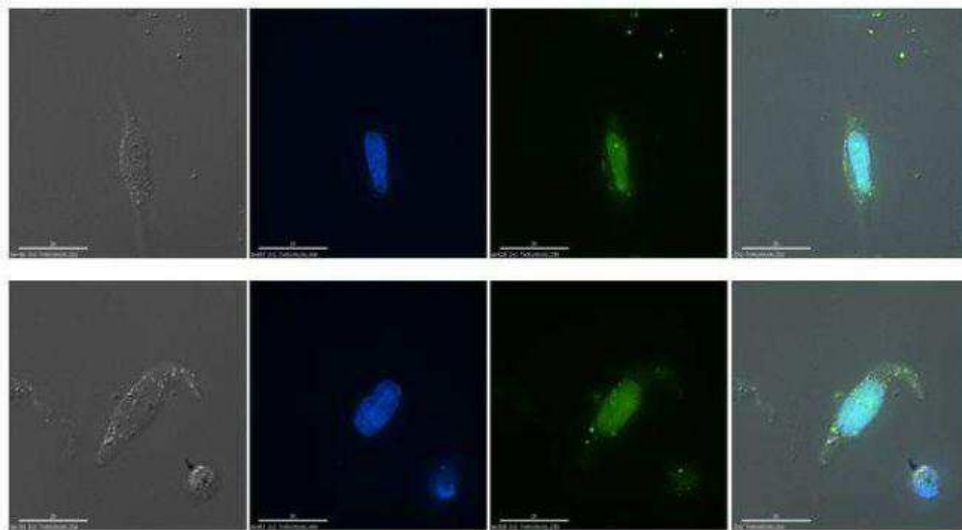


도면5

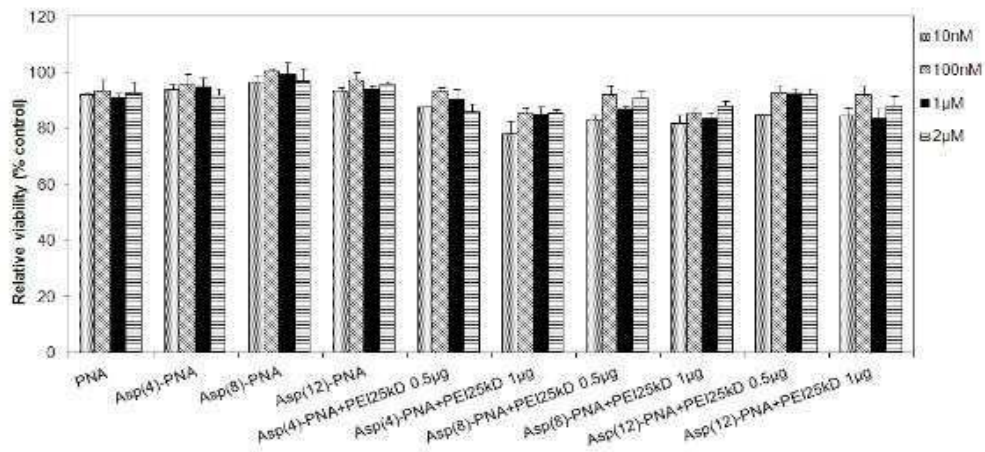


(a) Fam-PNA 1μM, (b) Fam-Asp<sub>12</sub>-PNA 1μM,  
(c) Fam-Asp<sub>12</sub>-PNA 1μM / PEI 1μg complex, (d) Fam-Asp<sub>12</sub>-PNA 1μM / PEI 2μg complex

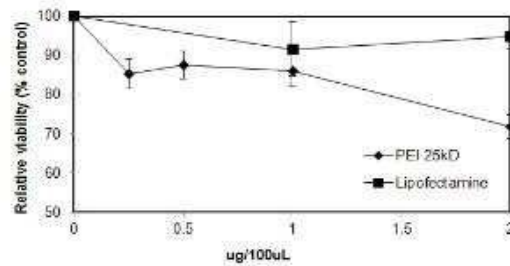
도면6



# 도면7



(a) Cytotoxicity comparison of Asp<sub>n</sub>-PNA / PEI complex and Asp-PNA / Lipofectamine complex.



(b) The cytotoxicity comparison of PEI polymer and Lipofectamine.

## 서열목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Chungnam National University
- <120> A Complex containing Oligo-Aspartic acids-PNA for PNA delivery
- <130> np11-1155
- <160> 5
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> PNA sequence
- <400> 1
- cctectacct cagttaca
- <210> 2
- <211> 24
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> luciferase sense primer

<400> 2

ttgatatgtg gatttcgagt cgtc 24

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> luciferase antisense primer

<400> 3

agccacgctt tcatactgct 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH sense primer

<400> 4

aactttggca ttgtggaagg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH antisense primer

<400> 5

acacattggg ggtaggaaca 20