



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0060133
(43) 공개일자 2016년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 15/88 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
 C07K 14/47 (2006.01) C07K 14/475 (2006.01)
 C08L 77/04 (2006.01) C08L 79/08 (2006.01)
 C12N 15/52 (2006.01) C12N 15/90 (2006.01)
 C12N 9/22 (2006.01) B82Y 5/00 (2011.01)

(52) CPC특허분류
 C12N 15/88 (2013.01)
 A61K 48/0041 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7010607
 (22) 출원일자(국제) 2014년09월23일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2016년04월22일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2014/057000
 (87) 국제공개번호 WO 2015/042585
 국제공개일자 2015년03월26일
 (30) 우선권주장
 61/881,072 2013년09월23일 미국(US)

(71) 출원인
 렌슬러 폴리테크닉 인스티튜트
 미국 뉴욕 트로이 8 스트리트 110 (우편번호 : 12180-3590)
 (72) 발명자
 고타, 쇠바 프라사드
 미국 뉴욕 12118 메케니크빌 폴스하운드 셔틀 11
 웃슨, 안드레 로날드
 미국 뉴욕 12180 트로이 15번가 1991
 판디드, 바이바브 에이
 미국 뉴욕 12180 트로이 14번가 106
 (74) 대리인
 서종완

전체 청구항 수 : 총 24 항

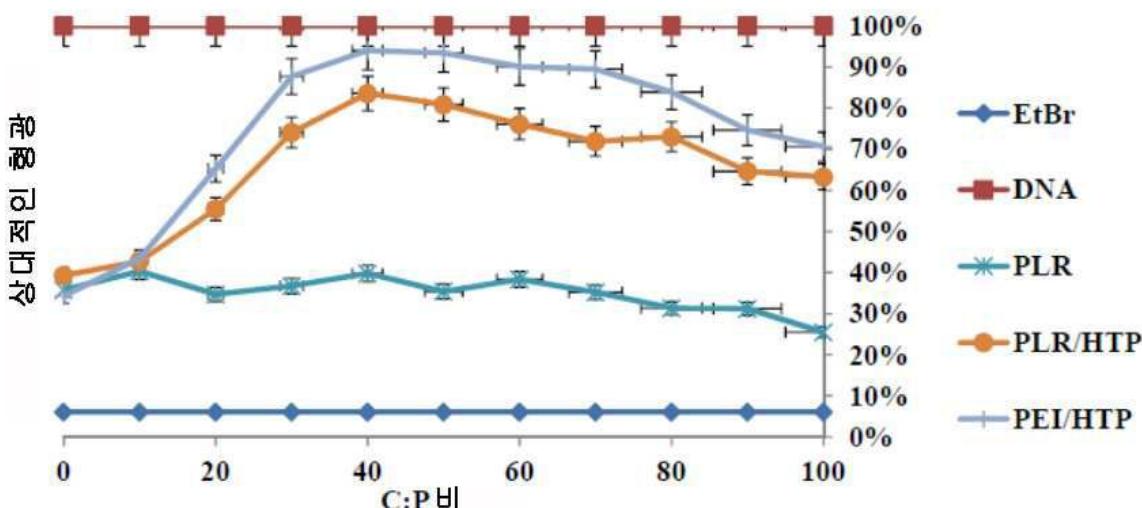
(54) 발명의 명칭 다양한 세포 집단에서 나노입자-매개된 유전자 전달, 게놈 편집 및 리간드-표적화된 변형

(57) 요 약

세포의 형질감염을 위한 개선된 나노입자를 제공한다. 상기 나노입자는 코어 폴리플렉스 및 상기 코어 폴리플렉스상의 실리카 코팅, 그리고 임의로, 상기 실리카 코팅의 외부 표면에 부착된 중합체를 포함하며, 여기에서 상기 폴리플렉스는 음이온성 중합체, 양이온성 중합체, 양이온성 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 세포내 폴리뉴클레오타이드의 개선된 변형 방법을 또한 제공한다. 상기 방법은 세포를, 코어 폴리플렉스 및 상기 코어 폴리플렉스상의 실리카 코팅 및 임의로 상기 실리카 코팅의 외부 표면에 부착된 중합체를 포함하는 나노입자와 접촉시킴을 포함하며, 여기에서 상기 폴리플렉스는 음이온성 중합체, 양이온성 중합체, 양이온성 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

대 표 도 - 도5

과잉의 음이온성 총전물-매개된 불안정화



(52) CPC특허분류

B82Y 5/00 (2013.01)
C07K 14/47 (2013.01)
C07K 14/475 (2013.01)
C08L 77/04 (2013.01)
C08L 79/08 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
C12N 15/907 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

코어 폴리플렉스 및 상기 코어 폴리플렉스 상의 실리카 코팅

을 포함하는 나노입자로, 상기 코어 폴리플렉스가 음이온성 중합체, 양이온성 중합체, 양이온성 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 나노입자.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

음이온성 중합체가 폴리(D-글루탐산)인 나노입자.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

양이온성 중합체가 폴리(에틸렌이민) 및 폴리(L-아르기닌)으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 나노입자.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

양이온성 폴리펩타이드가 히스톤 꼬리 펩타이드인 나노입자.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

히스톤 꼬리 펩타이드가 인간 H3 히스톤 꼬리 펩타이드인 나노입자.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

음이온성 중합체가 폴리(D-글루탐산)이고, 양이온성 중합체가 폴리(에틸렌이민) 및 폴리(L-아르기닌)으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되고, 양이온성 폴리펩타이드가 히스톤 꼬리 펩타이드인 나노입자.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

폴리뉴클레오타이드가 뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 나노입자.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

뉴클레아제가 TALEN인 나노입자.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

TALEN이 DNA의 부위-특이적 유전자좌에서 파손을 유도할 수 있고, 상기 파손이 유전자에 의해 암호화된 단백질의 발현의 변화를 생성시키는 나노입자.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

변화가 감소이고 유전자가 스클레로스틴 단백질을 암호화하는 나노입자.

청구항 11

제 6 항에 있어서,

실리카 코팅의 외부 표면에 부착된 중합체를 추가로 포함하는 나노입자.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

실리카 코팅의 외부 표면에 부착된 중합체가 폴리(L-아르기닌) 또는 혈관작용성 내피성장인자 웨타이드를 포함하는 나노입자.

청구항 13

세포를 나노입자와 접촉시킴을 포함하는 세포내 폴리뉴클레오타이드의 변형 방법으로,

상기 나노입자가 코어 폴리플렉스 및 상기 코어 폴리플렉스상의 실리카 코팅을 포함하고;

상기 코어 폴리플렉스가 음이온성 중합체, 양이온성 중합체, 양이온성 폴리웨타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

음이온성 중합체가 폴리(D-글루탐산)인 방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서,

양이온성 중합체가 폴리(에틸렌이민) 및 폴리(L-아르기닌)으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 16

제 13 항에 있어서,

양이온성 폴리웨타이드가 히스톤 꼬리 웨타이드인 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

히스톤 꼬리 웨타이드가 인간 H3 히스톤 꼬리 웨타이드인 방법.

청구항 18

제 13 항에 있어서,

음이온성 중합체가 폴리(D-글루탐산)이고, 양이온성 중합체가 폴리(에틸렌이민) 및 폴리(L-아르기닌)으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되고, 양이온성 폴리웨타이드가 히스톤 꼬리 웨타이드인 방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

폴리뉴클레오타이드가 뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

뉴클레아제가 TALEN인 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

TALEN이 DNA의 부위-특이적 유전자좌에서 파손을 유도할 수 있고, 상기 파손이 유전자에 의해 암호화된 단백질의 발현의 변화를 생성시키는 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

변화가 감소이고 유전자가 스클레로스틴 단백질을 암호화하는 나노입자.

청구항 23

제 18 항에 있어서,

실리카 코팅의 외부 표면에 부착된 중합체를 추가로 포함하는 나노입자.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

실리카 코팅의 외부 표면에 부착된 중합체가 폴리(L-아르기닌) 또는 혈관작용성 내피성장인자 웨타이드를 포함하는 나노입자.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호참조

[0002]

본 출원은 35 U.S.C. § 119 하에서 2013년 9월 23일자로 출원된 미국 가 출원 제 61/881,072 호에 대한 우선권을 주장하며, 상기 출원은 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다.

[0003]

정부 권리 진술

[0004]

본 발명은 국립보건원에 의해 수여된 R01 AG030637하에서 미국 정부 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 일정한 권리를 갖는다.

[0005]

기술 배경

[0006]

본 발명은 일반적으로 세포의 형질감염을 위한 나노입자의 용도에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 유전자 발현을 변형시키기 위한 폴리뉴클레오타이드의 세포내 전달을 위한 폴리플렉스(polyplex) 코어를 갖는 코팅된 나노입자에 관한 것이다.

배경 기술

[0007]

유전자 발현을 변경시키기 위해 세포에 폴리뉴클레오타이드를 도입시키는 것은 상기 폴리뉴클레오타이드를 세포 진입 전에 분해로부터 보호하여 세포내로의 진입을 허용하고 적합한 세포하 구획으로 전달되게 하는 상기 폴리뉴클레오타이드의 적합한 패키징을 요구한다. 발현 변경의 유효성은 또한 세포진입 후 패키징으로부터 폴리뉴클레오타이드 방출의 시간-틀에 따라 변할 수 있다. 유전자 발현의 변형에 이용가능한 나노입자-기반 기술은 적어도 부분적으로 상기 요구의 충족에 있어서 상기 기술의 한계로 인한 낮은 수준의 세포 형질감염 및 형질감염시 제한된 유효성이 문제가 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서, 유효성을 증대시키기 위해 상기 요구를 모두 다루는 나노입자-기반 형질감염체 및 그의 사용 방법을 획득하는 것이 바람직할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 발명의 요약

[0010] 하나의 태양에서, 나노입자의 제공을 통해 종래 기술의 단점이 극복되고 추가적인 이점이 제공된다. 상기 나노입자는 코어 폴리플렉스 및 상기 코어 폴리플렉스상의 실리카 코팅을 포함하며, 상기 폴리플렉스는 음이온성 중합체, 양이온성 중합체, 양이온성 폴리펩타이드, 및 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 또 다른 태양에서, 상기 나노입자는 또한 상기 실리카 코팅의 외부 표면에 부착된 중합체를 포함할 수 있다.

[0011] 세포내 폴리뉴클레오타이드의 변형 방법을 또한 제공한다. 상기 방법은 세포를, 코어 폴리플렉스 및 상기 코어 폴리플렉스상의 실리카 코팅을 포함하는 나노입자와 접촉시킴을 포함하며, 상기 폴리플렉스는 음이온성 중합체, 양이온성 중합체, 양이온성 폴리펩타이드, 및 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 또 다른 태양에서, 상기 나노입자는 또한 상기 실리카 코팅의 외부 표면에 부착된 중합체를 포함할 수 있다.

[0012] 추가적인 특징 및 이점들은 본 발명의 기법을 통해 실현된다. 본 발명의 상기 및 다른 목적, 특징 및 이점들은 첨부되는 도면과 함께 하기 본 발명의 다양한 태양의 상세한 개시로부터 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 본 발명의 하나 이상의 태양을 명세서 마지막의 특허청구범위에 예로서 특별히 지적하고 분명하게 청구하고 있다. 본 발명의 상기 및 다른 목적, 특징 및 이점들은 첨부되는 도면과 함께 하기 상세한 개시로부터 자명하다.

도 1a 내지 1b는 본 발명의 태양에 따른 나노입자 및 그의 성분들의 일부 실시태양의 도식적 표현이고;

도 2a는 본 발명의 태양에 따른 나노입자의 제조 방법의 도식적 표현이고;

도 2b는 세포가 본 발명의 태양에 따른 나노입자를 흡수하고 세포내에서 처리할 수 있는 수단의 도식적 표현이고;

도 3은 본 발명의 태양에 따른, 상이한 비의 다양한 하전된 중합체 및 폴리뉴클레오타이드 포함의, 폴리플렉스 복합체형성에 대한 효과를 예시하는 그래프이고;

도 4는 본 발명의 태양에 따른, 폴리플렉스 중의 음이온성 중합체의 존재 또는 부재하의, 상이한 비의 다양한 하전된 중합체 및 폴리뉴클레오타이드 포함의, 폴리플렉스 복합체형성에 대한 효과를 예시하는 그래프이고;

도 5는 본 발명의 태양에 따른 양이온성 폴리펩타이드의 존재 또는 부재하의 증가하는 양의 음이온성 중합체 포함의, 폴리플렉스에 대한 불안정화 효과를 예시하는 그래프이고;

도 6은 본 발명의 태양에 따른 다양한 층을 갖는 나노입자의 크기를 예시하는 그래프이고;

도 7은 본 발명의 태양에 따른 형질감염에 따른 나노입자의 세포 흡수 및 세포하 국소화를 나타내는 다양한 나노입자로 형질감염된 세포의 현미경사진이고;

도 8은 본 발명의 태양에 따른 형질감염에 따른 세포 중 나노입자의 거주 지속기간을 나타내는 나노입자로 형질감염된 세포의 현미경사진이고;

도 9a-b는 본 발명의 태양에 따른 폴리플렉스의 실리카 코팅 외부에 부착된 중합체층을 갖는 나노입자의 세포 흡수를 나타내는 현미경사진이고;

도 10은 본 발명의 태양에 따른 스클레로스틴 발현의 높다운을 야기하는 나노입자 중에 포함된 핵산에 의해 암호화된 TALEN 웹타이드의 도식적 표현이고;

도 11a-11c는 본 발명의 태양에 따른 스클레로스틴 발현 및 β -카테닌 발현에 대한, 스클레로스틴 발현을 표적화하는 상이한 양의 나노입자에 의한 세포의 형질감염 효과를 예시하는 그래프이고;

도 12a-12f는 본 발명의 태양에 따른 다양한 세포 신호전달 웹타이드의 발현 수준에 대한, 스클레로스틴 발현을 표적화하는 상이한 양의 나노입자에 의한 세포의 형질감염 효과를 예시하는 그래프이고;

도 13은 본 발명의 태양에 따른 스클레로스틴-매개된 신호전달에 의해 활성이 억제되는 전사 인자들에 반응성인 동시-형질감염된 리포터 유전자의 발현에 대한, 스클레로스틴 발현을 표적화하는 나노입자에 의한 세포의 형질감염 효과를 나타내는 현미경사진이고;

도 14a-14c는 본 발명의 태양에 따른 무기질화(mineralization)에 대한 스클레로스틴 발현을 표적화하는 나노입자에 의한 세포의 형질감염 효과를 나타내는 현미경사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

본 발명의 태양들 및 그들의 몇몇 특징, 이점 및 세부사항을 첨부되는 도면에 예시된 비-제한적인 실시태양을 참조하여 하기에 보다 충분히 설명한다. 주지된 물질, 제조 도구, 가공 기법 등의 개시는 본 발명을 불필요하게 상세히 모호하게 하지 않도록 생략한다. 그러나, 상세한 개시 및 구체적인 실시예들은 본 발명의 실시태양들을 가리키기는 하지만 단지 예시로서 제공되며 제한이 아님은 물론이다. 근원적인 발명의 개념의 진의 및/또는 범위내의 다양한 치환, 변형, 부가 및/또는 재배열은 본 명세로부터 당해 분야의 숙련가들에게 자명할 것이다.

[0015]

본 명세는, 부분적으로, 유전자 발현을 변형시키는 작용제로 세포를 형질감염시키기 위한 다층의 나노입자를 제공한다. 개선된 혈청 안정성, 특정 세포 유형으로의 표적화된 전달, 보다 큰 핵 특이적 및 구획-특이적 개봉(unpackaging), 초기 내면화 단계 동안 의미있는 페이로드(payload) 수준을 유지시키는 개선된 능력, 및 내면화에 이은 다양한 지속기간 동안 페이로드의 방출을 유지하는 능력을 위해 설계된 나노입자, 및 그의 사용 방법을 제공한다.

[0016]

하나의 태양에서, 폴리뉴클레오타이드와 중합체와의 복합체, 또는 음이온성 중합체 존재하에서의 양이온성 중합체와 폴리뉴클레오타이드의 축합에 의해 생성된 폴리플렉스는 폴리뉴클레오타이드-양이온성 중합체 접합체에 비해 증가된 형질감염 효율을 매개할 수 있다. 상기 과정이 보다 많은 입자를 생성시키고 세포 흡수를 위해 노출된 나노입자의 순 표면적을 증가시킬 수 있지만, 개선된 정전기적 반발 요소가 또한 상기 기법을 통한 핵산의 방출에 작용할 수도 있다. 놀랍게도, 기존 문헌을 토대로 예측될 수 있는 바와 같은 음이온성 중합체를 포함하는 나노입자 폴리플렉스로부터 뉴클레오타이드의 보다 빠른 분해와 대조적으로, 본 발명의 하나의 태양에서, 나노입자 폴리플렉스 코어 중에 음이온성 중합체를 포함하는 것은 상기 나노입자의 세포내 거주의 지속기간, 및 유전자 발현에 영향을 미치거나 또는 달리 세포 기능 또는 페이로드를 조절하는 작용제의 방출을 연장시킬 수 있다.

[0017]

또 다른 태양에서, 나노입자 중의 양이온성 폴리웹타이드의 존재는 안정성, 세포하 구획화, 및 페이로드 방출을 매개할 수 있다. 일례로서, 다양한 폴리플렉스내 히스톤 웹타이드(일반적으로 히스톤 꼬리 웹타이드라 칭함)의 N-말단의 단편은, 예를 들어 히스톤 아세틸트랜스퍼라제-매개된 아세틸화의 경우에, 다양한 히스톤 변형에 의해 탈양성자화될 수 있을 뿐만 아니라, 폴리플렉스의 성분으로서 유효한 핵-특이적 개봉을 매개할 수 있다. 이들의 수송은 끌지체 및 소포체를 통한 역수송을 사용하는 또 다른 내포작용 경로에 의존할 수 있으며, 상기 핵막의 내부에 존재하는 히스톤의 성질은 히스톤 꼬리 웹타이드상의 본래의 핵 국소화 서열을 암시한다. 본 발명의 하나의 태양에서, 히스톤 꼬리 웹타이드를 포함하는 것은 나노입자의 핵 국소화를 촉진할 수 있으며 이로부터 폴리뉴클레오타이드 페이로드의 효소-매개된 방출을 생성시킬 수 있다.

[0018]

또 다른 태양에서, 폴리플렉스의 실리카 코팅은 초기 세포 흡수 전 및 흡수 중에 그의 페이로드를 밀봉할 수 있다. 폴리(에틸렌이민) 및 DNA로 이루어지는 통상적으로 사용되는 폴리플렉스는 세포 내면화 중 그의 페이로드의 대부분(약90%)을 발산하는 경향이 있으며, 이때 나머지 페이로드는 종종 그의 양이온성 나노담체의 중합체성 존재에 결합된 채로 남아있다. 실리카의 일시적인 충간 안정화에 의해, 세포 흡수의 감소된 확률에도 불구하고 보다 큰 세포내 전달 효율이 관찰될 수 있다. 본 발명의 또 다른 태양에서, 나노입자 폴리플렉스를 실리카 코팅으로 코팅시키는 것은 상기 폴리플렉스를 밀봉시켜, 상기 폴리플렉스를 목적하는 세포하 구획에서 가공할 때 그의 방출시까지 안정화시킨다.

[0019]

본 발명의 또 다른 태양에서, 형질감염 효율을 또 다른 양이온성 중합체 중의 첨가에 의해 추가로 증가시켜, 전달 효율을, 추정상 세포 반발성인 올리고머성 실리카 코팅의 양이온성 성질로 인해, 맨 폴리플렉스 또는 실리카-코팅된 폴리플렉스보다 두자릿수 정도로 더 크게 만들 수 있다. 추가의 태양에서, 실리카-코팅된 폴리플렉스 및 그의 추가-층 유도체는 양이온성 중합체/핵산 접합체 단독과 달리 혈청 중에서 안정성이며 생체내 실험에 적

합하다.

[0020] 도 1A 내지 1B는 본 발명에 따른 나노입자 성분들의 예를 도시한다. 본 발명에 따라, 나노입자 폴리플렉스 코어는 폴리뉴클레오타이드, 음이온성 중합체, 양이온성 중합체, 및 양이온성 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 이어서 실리카 코팅을 상기 폴리플렉스 코어에 적용시킬 수 있으며, 이어서 중합체를 상기 실리카 코팅의 외부 표면에 부착시킬 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 상기가 함유하는 핵산 서열의 세포내 발현을 구동하기 위한 DNA 벡터일 수 있다. 그러나, 나노입자는 또한 다른 유형의 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 선형 DNA 또는 다양한 유형의 RNA, 예를 들어 dsDNA, ssDNA, mRNA, siRNA, 또는 CRISPR RNA 서열, 또는 다른 것들, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 나노입자는 또한 상기 폴리뉴클레오타이드의 예들 중 임의의 폴리뉴클레오타이드 외에 또는 상기 대신에, 웨타이드 핵산, 50 내지 1000 Da, 또는 한편으로 200 내지 10 kDa 크기의 다른 하전된 또는 극성 소분자, 예를 들어 환상 뉴클레오타이드, 예를 들어 cAMP, DNA 오리가미 주형, 앱타미, 하전된 폴리펩타이드, 단백질 또는 2 내지 100 kDa의 단백질 단편, 웨토이드, 인산화된 또는 황산화된 구성성분, 음이온 변형된 구성성분, 및 이들의 다양체성 또는 올리고머성 조합을 포함할 수 있다. 통상적인 숙련가는 상기 중 임의의 것, 또는 이들의 임의의 조합을 본 발명 내에 포함되는 것으로서 이해할 것이다.

[0021] 도 1A에 계속해서, 본 발명의 하나의 태양에서, 상기 폴리플렉스 내 양이온성 중합체는 양이온성 아미노산을 함유하는 폴리펩타이드일 수 있으며, 예를 들어 폴리(아르기닌), 폴리(리신), 폴리(히스티딘), 폴리(오르니틴), 폴리(시트룰린), 또는 이들 중 하나 초과의 임의의 조합을 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 나노입자는 또한 상기 양이온성 중합체의 예 중 임의의 중합체 외에 또는 상기 중합체 대신에, 폴리(에틸렌이민), 폴리(아스파트 아미드), 폴리펩토이드, 전하-기능화된 폴리에스테르, 양이온성 폴리사카라이드, 아세틸화된 아미노 당, 키토산, 또는 선형 또는 분지된 형태의, 상기 중 하나 초과의 임의의 조합을 포함하는 변체 또는 변체들을 포함할 수 있다.

[0022] 일례로, 양이온성 중합체는 폴리(아르기닌), 예를 들어 폴리(L-아르기닌)을 포함할 수 있다. 상기 폴리플렉스 내 양이온성 중합체는 1 kDa 내지 200 kDa의 분자량을 가질 수 있다. 상기 폴리플렉스 내 양이온성 중합체는 또한 10 kDa 내지 100 kDa의 분자량을 가질 수 있다. 상기 폴리플렉스 내 양이온성 중합체는 또한 15 kDa 내지 50 kDa의 분자량을 가질 수 있다. 일례로, 양이온성 중합체는 서열번호 1에 의해 나타내는 바와 같은, 대략 29 kDa의 분자량을 갖는 폴리(L-아르기닌)을 포함한다(PLR). 또 다른 예에서, 양이온성 중합체는 25 kDa의 분자량을 갖는 선형 폴리(에틸렌이민)을 포함할 수 있다(PEI). 또 다른 예에서, 양이온성 중합체는 10 kDa의 분자량을 갖는 분지된 폴리(에틸렌이민)을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 양이온성 중합체는 70 kDa의 분자량을 갖는 분지된 폴리(에틸렌이민)을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 양이온성 중합체는 폴리(아르기닌) 또는 상기 중합체들 중 임의의 중합체, 예를 들어 폴리펩타이드의 D-이성질체를 포함할 수 있는데, 상기 D-이성질체를 함유하는 폴리펩타이드와 같은 중합체는 세포내에서 분해에 덜 민감할 수 있고 따라서 시간에 따라 페이로드 방출 및 그의 속도에 영향을 미치는데 연장된 효과를 가질 수 있기 때문에 특히 유리할 수 있다.

[0023] 도 1A에 계속해서, 본 발명의 추가의 태양에서, 상기 폴리플렉스 내 음이온성 중합체는 음이온성 아미노산을 함유하는 폴리펩타이드일 수 있으며, 예를 들어 폴리-글루탐산 또는 폴리-아스파트산, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 나노입자는 또한 상기 음이온성 중합체의 예 중 임의의 중합체 외에 또는 상기 중합체 대신에, 글리코스아미노글리칸, 당단백질, 폴리사카라이드, 폴리(만뉴론산), 폴리(글루론산), 헤파린, 헤파린 설페이트, 콘드로이친, 콘드로이친 설페이트, 케라坦, 케라탄 설페이트, 아그레칸, 폴리(글루코스아민), 또는 이들 중 임의의 조합을 포함하는 음이온성 중합체를 포함할 수 있다. 일례로, 음이온성 중합체는 폴리글루탐산을 포함할 수 있다. 상기 폴리플렉스 내 음이온성 중합체는 1 kDa 내지 200 kDa의 분자량을 가질 수 있다. 상기 폴리플렉스 내 음이온성 중합체는 또한 10 kDa 내지 100 kDa의 분자량을 가질 수 있다. 상기 폴리플렉스 내 음이온성 중합체는 대략 15 kDa의 분자량을 갖는 폴리(글루탐산)이다. 글루탐산의 D-이성질체로 이루어지거나 또는 상기 이성질체를 포함하는 중합체는 세포내에서 분해에 덜 민감할 수 있고 따라서 시간에 따라 페이로드 방출 및 그의 속도에 영향을 미치는데 연장된 효과를 가질 수 있기 때문에 특히 유리할 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리플렉스 내 음이온성 중합체는 서열번호 2에 의해 나타내는 서열을 가질 수 있다(PDGA). 또 다른 예에서, 음이온성 중합체는 상기 중합체들 중 임의의 중합체 또는 폴리펩타이드의 D-이성질체를 포함할 수 있는데, 상기 D-이성질체를 함유하는 폴리펩타이드와 같은 중합체는 세포내에서 분해에 덜 민감할 수 있고 따라서 시간에 따라 페이로드 방출 및 그의 속도에 영향을 미치는데 연장된 효과를 가질 수 있기 때문에 특히 유리할 수 있다.

[0024] 도 1A에 계속해서, 본 발명의 또 다른 태양에서, 나노입자의 폴리플렉스 코어 중의 양이온성 웨타이드는 히스톤 웨타이드의 단편, 예를 들어 H1, H2, H3 또는 H4 단백질의 단편일 수 있다. 상기 단편은 히스톤 단백질의 N-말

단에 상응하는 서열을 갖는 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 단편은 히스톤 단백질의 처음 5(서열번호 9), 10(서열번호 10), 15(서열번호 11), 20(서열번호 12), 25(서열번호 13)개 이하 또는 그 이상의 N-말단 아미노산을 포함할 수 있다. 상기 단편은 또한 그의 C-말단상에서 아미드화될 수도 있다. 상기 단편은 또한 하나 이상의 리신 잔기가 메틸화되거나, 하나 이상의 히스티딘, 리신, 아르기닌, 또는 다른 상보성 잔기가 아세틸화되거나 또는 히스톤 아세틸트랜스퍼라제 또는 아세틸 coA 기질로서 아세틸화에 민감하도록, 또는 이들 중 임의의 조합으로 변형되었을 수도 있다. 예를 들어, 나노입자 폴리플렉스 코어 중의 양이온성 웨პ타이드는 서열번호 3에 의해 나타내는 바와 같은 서열을 가질 수도 있으며, 이는 본 발명에 따라 C-말단상에서 아미드화되고 리신 4상에서 3중-메틸화된 인간 히스톤 3 단백질의 처음 25개 아미노산을 포함한다(HTP).

[0025] 또 다른 실시태양에서, 나노입자는 상기 양이온성 폴리웨პ타이드 중 임의의 폴리웨პ타이드 외에, 또는 상기 폴리웨პ타이드 대신에, 핵 국소화 서열을 포함하거나 함유할 수 있다. 양이온성 폴리웨პ타이드는 그의 N- 또는 C-말단상에 핵 국소화 서열을 포함할 수 있다. 핵 국소화 서열은 임포틴 또는 카리오페린 기질을 포함하거나, 또는 서열번호 8에 상응하는 서열을 갖거나 함유할 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 나노입자는 상기 양이온성 폴리웨პ타이드 중 임의의 폴리웨პ타이드 외에 또는 상기 폴리웨პ타이드 대신에, mtHSP70의 미토콘드리아 국소화 신호 또는 웨პ타이드 단편을 포함할 수 있다.

[0026] 도 1B에 계속해서, 본 발명의 또 다른 태양에서, 상기 나노입자는 세포 또는 구획 내면화에 앞서 상기 폴리플렉스 코어에 안정성을 제공하여, 조기 분해 또는 불안정화를 방지하는 가역적인 코팅을 포함할 수 있다. 예를 들어, 실리카 코팅을 상기 폴리플렉스 코어에 적용할 수 있다. 또 다른 예에서, 칼슘 포스페이트 또는 하이드록시아파타이트를 폴리플렉스 코어에 적용할 수 있다. 또 다른 예에서, 분지된 양이온성 중합체, 폴리웨პ타이드, 또는 웨პ토이드를 음이온 전하 과정으로 폴리플렉스 코어에 적용할 수 있다. 코팅, 예를 들어 실리카 코팅은 상기 폴리플렉스를 엔도솜 미세환경에의 노출 전에 분해로부터 보호할 수 있다.

[0027] 또 다른 태양에서, 나노입자는 코팅된 폴리플렉스의 외부 표면, 예를 들어 실리카 코팅의 외부 표면에 부착되거나 또는 상기 표면과 정전기적으로 결합된 중합체층을 포함할 수 있다. 상기와 같은 외부 중합체는 세포와의 접촉 및 세포에 의한 흡수를 촉진하기 위해서 상기 코팅된 폴리플렉스의 세포 반발을 방지하는 작용을 할 수 있다. 외부 중합체층은 또한 특정한 세포 유형에 의한 내면화를, 예를 들어 상기 외부적으로 부착된 중합체가 형질감염을 원하는 세포 유형에 의해 발현되는 수용체에 대한 리간드이거나 또는 상기 리간드를 모방하는 경우, 촉진하는 작용을 할 수 있다. 폴리플렉스상의 코팅의 외부 표면에 부착된 중합체층 중의 중합체는 0.1 내지 20 kDa의 크기이거나, 또는 40 또는 50 kDa의 크기일 수 있다.

[0028] 상기 코팅된 코어 폴리플렉스의 외부 표면에 부착된 중합체층을 포함하는 중합체의 예는 본 발명에 따른, 대략 10 kDa 폴리(아르기닌) 중합체인 서열번호 4 및 인간 혈관작용성 내피 성장인자 단백질인 서열번호 5에 의해 나타내는 것들을 포함한다. 또 다른 예에서, 상기 코팅된 코어 폴리플렉스의 외부 표면에 부착된 층을 포함하는 중합체는 상기 중합체, 폴리웨პ타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 N-말단, C-말단, 5' 또는 3' 단부에 1 내지 25 개의 반복하는 음이온성 또는 양이온성 부분의 앵커 기질을 포함하여 상기 코팅된 폴리플렉스 코어에의 중합체, 폴리웨პ타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 중에 함유된 표적 동기의 정전기적 접합을 제공할 수 있다. 또 다른 예에서, 상기 코팅된 코어 폴리플렉스의 외부 표면에 부착된 층을 포함하는 중합체는 아미노산 서열 결합 동기에 대해 염기쌍 상보성 또는 결합 친화성을 나타내는 중합체, 폴리웨პ타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하여, 첨가될 수도 있는 추가의 층들과 결합할 수 있다.

[0029] 도 2A에 예시된 본 발명의 또 다른 태양에서, 양이온성 폴리플렉스를 생성시키고, 이어서 실리카 코팅으로 코팅시킨다. 나노입자의 폴리플렉스 코어를 축합에 이르는 정전기적 상호작용을 통해 생성시킬 수 있다. 2개의 같은 부피의 용액을 생성시킬 수 있으며, 이때 하나는 수중 0.1% w/v 양이온성 중합체 및 양이온성 폴리웨პ타이드와 배합된 pH-조절되지 않은 40 mM HEPES(pH 약5.5)를 갖고 다른 하나는 수중 0.1% w/v 음이온성 중합체 및 폴리뉴클레오타이드와 배합된 30 mM 트리스-HCl(pH 약7.4)을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 양이온성 중합체는 서열번호 1을 포함하고, 상기 음이온성 중합체는 서열번호 2를 포함하며, 상기 양이온성 폴리웨პ타이드는 서열번호 3을 포함한다. 이들 용액을, 상기 양이온성 용액을 상기 음이온성 용액에 교반없이 적가함으로써 배합할 수 있다. 실온에서 30분 배양 후에, 폴리플렉스 내 핵산 10 μ g을 함유하는 200 μ l 용액을 트리스-HCl(pH = 7.4) 중의 45 mM 나트륨 실리케이트(시그마) 용액에 적가하고 실온에서 8 내지 24시간 동안 배양시킬 수 있다. 실리카-코팅된 폴리플렉스를, 결합되지 않은 실리카 종 및 중합체로부터 복합체를 단리시키기 위해서 3000 g에서 300 kDa 나노셉(Nanosep)(등록상표) 필터(Pall), 미국 뉴욕주 포트 워싱턴 소재)에 의한 원심분리를 통해 단리시킬 수 있다. 나노입자를, 상기 실리카 코팅의 외부 표면에 부착시키려는 중합체를 함유하는 용액 중에 추가로 재현탁시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 나노입자를 1시간 동안 0.1% w/v로 서열번호 4 또는

서열번호 5에 의해 나타내는 중합체를 포함하는 용액 중에 재현탁시킬 수 있다. 이어서 나노입자를 형질감염 매질에 재현탁시키기 전에 다시 원심분리시킬 수도 있다. 상기 방법은 본 발명에 따른 나노입자의 단지 하나의 제조예이다.

[0030] 도 2B는 예를 들어 포낭-매개된 내포작용 또는 대음세포작용 (macropinocytosis)에 의한 상기 나노입자의 세포내면화를 유도하는, 본 발명에 따라 세포를 나노입자와 접촉시키는 도식적인 표현이다. 나노입자를 추가로 콜지체 및 소포체를 통해 역수송하거나 또는 리소솜 경로를 통해 처리하여 코팅, 예를 들어 실리카 코팅을 상실시키고 상기 폴리플렉스 코팅을 노출시킬 수 있다. 상기 폴리플렉스 코어를 본 발명에 따라 추가로 세포핵내로 전위시킬 수 있으며, 상기 핵에서 효소 가공이, 예를 들어 아르기나제의 활성을 통해 상기 양이온성 중합체를 분해시키거나 또는 달리, 예를 들어 상기 폴리플렉스내 히스톤 꼬리 펩타이드의 아세틸화를 통해 상기 폴리플렉스 코어의 개봉을 촉진하여 상기 폴리플렉스 코어로부터 플라스미드 DNA와 같은 폴리뉴클레오타이드의 방출을 유도할 수 있다. 나노입자 및 그의 폴리플렉스 코어 또는 코팅 또는 상기 코팅에 부착된 중합체층의 구성성분들을 변형시키는 다른 세포내 가공 단계들이 또한 본 발명에 따라 일어날 수 있다.

[0031] 추가의 태양에서, 본 발명은 나노입자의 부분으로서 폴리플렉스 코어의 복합체형성을 위해 최적화된 비의 음이온성 및 양이온성 중합체, 양이온성 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일례로, 플라스미드 DNA를, 폴리(D-글루탐산)(PDGA; 서열번호 2) 부가의 경우에 [아민(n)]:[포스페이트(p)+카복실레이트(c)] 또는 c:p의 몰[1(양성)]:[1(음성)] 비로 다양한 중합체 구성성분의 부가 전에 에티디움 브로마이드(40 ng EtBr/ μ g DNA)로 형광 표지하였다. 선형 폴리(에틸렌아민)(PEI, 25 kDa)의 부가를, 2원 복합체(즉 PEI + DNA 또는 PEI + DNA) 또는 3원 복합체(HTP + PEI + DNA 또는 HTP + PLR + DNA)의 부분으로서 2개 중합체들간의 유사한 복합체 형성 양상을 정량분석하기 위해서, 폴리(L-아르기닌)(PLR, 29 kDa; 서열번호 1)의 부가와 독립적으로 또는 H3K4(Me3) 히스톤 꼬리 펩타이드(HTP; 서열번호 3)와 함께 비교하였다. 양이온성 중합체 및 양이온성 폴리펩타이드가 모두 존재하는 경우, 각 성분의 상대적인 몰비는 각각 60%:40%이었다. 자이스(Zeiss) 필터 및 분광광도계를, 595 nm에서의 방출에 대해 510 nm에서 EtBr-표지된 DNA를 여기시키는데 사용하였으며, 결과를 음성 대조용으로서 결합되지 않은 EtBr을 갖는 다양한 제형들간에 비교하였다.

[0032] 도 3은 음이온성 또는 양이온성 중합체 또는 폴리펩타이드 대 폴리뉴클레오타이드의 비의 변화 효과를 도시하는 그래프이다. X축은 하천된 중합체 대 포스페이트비를 도시하고 Y축은 지시된 구성성분들의 조합에 따른 상대적인 형광을 도시한다. 상대적인 형광의 감소는 DNA로부터 EtBr의 치환 및 폴리플렉스 형성을 가리킨다. 대략 5:1 이상의 양이온성 중합체 또는 양이온성 중합체 및 양이온성 폴리펩타이드 대 DNA의 비는 DNA 및 중합체의 폴리플렉스로의 복합체형성을 가리키는 형광의 대략 40% 감소를 나타내었다. 양이온성 중합체 또는 양이온성 폴리펩타이드의 부재하에서의 PDGA의 부가는 복합체형성에 영향을 미치지 않았다.

[0033] PLR-HTP-DNA, PEI-HTP-DNA, PLR-DNA 및 PEI-DNA 폴리플렉스의 복합체형성 및 PDGA가 폴리뉴클레오타이드의 복합체형성을 야기하는 능력을 갖지 않음을 판단한 후에, 나노입자 복합체형성에 대한 과잉의 양이온성 및 동등화된 전하비의 효과를 측정하기 위해서 형성 동역학에 대한 PDGA의 영향을, 복합체형성 효율에 대한 [아민(n)]:[포스페이트(p)] 및 [아민(n)]:[포스페이트(p) + 카복실레이트(c)]의 [5.5(양성)]:[1(음성)] 및 [10(양성)]:[1(음성)] 몰비를 비교함으로써 확립시켰다. PDGA로부터 카복실레이트기의 포함은 DNA로부터 포스페이트기의 포함에 필적하는 전체 형성 동역학에 대한 효과를 가짐이 예측되었다. 상대적인 형광을 대조용으로서 중합체 또는 폴리펩타이드의 부가 없는 DNA 또는 DNA 부재하에서의 EtBr에 비교하였다.

[0034] 도 4는 폴리플렉스 복합체형성 동역학에 대한 양이온성 중합체 및 양이온성 폴리펩타이드에 대한 PDGA 부가의 영향을 가리킨다. DNA는 PDGA의 부가와 함께 또는 상기 부가 없이, HTP, PLR 또는 PEI와 복합체를 형성하였다. HTP의 부가와 함께 또는 상기 부가 없이, 5.5:1(n/p=5.5 표지된 막대에 도시된 바와 같은)의 양이온성 중합체(PLR 또는 PEI) 대 폴리뉴클레오타이드 몰비 및 5.5:1 및 10:1(n/(p+2c) = 5.5 또는 10 표지된 막대에 도시된 바와 같은)의 양이온성 중합체(PLR 또는 PEI) 대 폴리뉴클레오타이드 + 음이온성 중합체 몰비를 사용한 실험을 도시한다. PDGA의 부가는 시험된 몰비 중 임의의 몰비에서 복합체형성 동역학을 방해하지 않았다.

[0035] 폴리플렉스 불안정화에 대한 양이온성 중합체 및 양이온성 폴리펩타이드 포함의 효과를 또한 도 5에 도시된 바와 같이 측정하였다. 0에서부터 100까지 변하는 [(PDGA) 카복실레이트(c):(DNA) 포스페이트(p)] 몰비를 갖는 DNA 및 양이온성 폴리펩타이드(HTP의 존재 또는 부재하의 PLR, 또는 HTP 존재하의 PEI)의 폴리플렉스 나노입자는, 대조용으로서 DNA 또는 EtBr 단독에 비해, 개시된 바와 같이 복합체를 형성하였으며, 불안정화(증가된 형광에 의해 지시되는 바와 같은)의 효과를 측정하였다. HTP의 부재하에서, PDGA의 부가는 폴리플렉스 불안정화를 유도하지 않았다. 그러나, HPT의 존재하에서, 20 이상의 PDGA 대 DNA의 몰비의 부가는 폴리플렉스 불안정화를

유도하였다. 이러한 결과는 복합체 불안정화에 대한 양이온성 폴리펩타이드 및 음이온성 중합체의 놀라운 상승 작용 효과를 가리킨다. 나노입자 폴리플렉스 코어내로의 양이온성 폴리펩타이드 통합, 및/또는 완전히 다른 분자량 또는 크기의 양이온성 구성성분들의 포함은 유리하게는 상기 폴리플렉스 및 그의 다른 구성성분으로부터 상기 폴리뉴클레오타이드 페이로드의 분리 및 방출을 촉진하는 양이온성 중합체의 능력을 증대시킬 수 있다.

[0036] 동적 광산란(BRAND)을 사용하여 다양한 형성 단계에서의 나노입자의 유체역학적 반경을 측정하였다. 5.5:1의 [아미드]:[(포스페이트)]의 몰비로 코어 폴리플렉스와 플라스미드 DNA, PLR, PDGA 및 HTP를 함유하는 나노입자를 개시된 바와 같이 복합체형성시켰다. 일부 폴리플렉스 코어를 개시된 바와 같이 실리카로 추가로 코팅시켰다. 일부 실리카-코팅된 폴리플렉스를 개시된 바와 같이 양이온성 중합체(서열번호 4)로 추가로 증상화시켰다. 3원 복합체의 초기 코어 형성, 코어의 실리카 코팅, 및 실리카-코팅된 코어의 양이온성 중합체-코팅에 이어서 30 내지 60분의 측정을 수행하였다. 도 6은 나노입자의 직경을 도시하는 그래프이다. 코팅되지 않은 폴리플렉스 코어 및 실리카로 코팅된 폴리플렉스 코어는 직경이 평균적으로 대략 70 내지 150 nm이었다. 다른 실시태양에서, 폴리플렉스 코어 및 실리카-코팅된 폴리플렉스 코어는 평균 직경이 100 내지 170 nm의 범위 이내일 수 있다. 상기 실리카 코팅에 양이온성 중합체 코팅의 부가는 대략 170 nm의 평균 직경을 갖는 나노입자를 제공하였다. 다른 실시태양에서, 실리카의 외부층에 부착된 양이온성 중합체의 추가적인 층을 갖는 실리카-코팅된 폴리플렉스 코어는 평균 직경이 대략 80 내지 200 nm의 범위 이내일 수 있다.

[0037] 나노입자의 세포 흡수를 또한 측정하였다. 플루오레세인 아이소티오시아네이트(FITC)를, 아민 대 FITC의 몰비가 100:1이도록 PEI(25 kDa 선형) 및 PLR(29 kDa)의 아민에 공유적으로 접합시켰다. 상기 반응을 같은 부피의 물 및 DMSO 중에서 4시간 동안 실온의 암실에서 수행하였다. 접합을 확립시키기 위해서, 각각의 형광 변형된 중합체 0.05% w/v 500 μ l 용액을 10 kDa 나노캡(등록상표) 필터 중에서 원심분리시켰으며 용리물의 형광 강도(485 ex./520 em.)를 물뿐만 아니라 여과되지 않은 중합체 용액에 비교하였다. mCherry 플라스미드(애드제인(Addgene))를 나노입자에 포함시켜 플라스미드-구동된 발현의 형광 검출을 허용하였다.

[0038] MC3T3 쥐 조골세포를 폴리스티렌 T-75 조직 배양 플라스틱 플라스크(코닝(Corning), 미국 캘리포니아주 소재)상에서 배양하였다. 10% 소 태아 혈청(씨모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 미국 버지니아주 소재)이 보충된 둘베코의 변형된 이글 배지를 1% 페니실린/스트렙토마이신(인비트로젠(Invitrogen), 미국 뉴욕주 소재)과 함께 조골세포에 사용하였다. 자일레놀 오렌지를 세포 배양 개시후 15일 내지 25일째에 상기 세포 배양 배지에 가하였다. 25일째에 세포를 고정시키고 무기질화에 대해 분석하였다. FITC-변형된 나노입자를 사용하는 mCherry 플라스미드 전달을 위해서, 조골세포를 96-웰 플레이트에서 1000 세포/웰로 도말하고 10% FBS를 함유하는 무항생제 DMEM에서 12 내지 16시간 동안 부착되게 하였다. 형질감염 직전에 배지를 같은 부피의 OptiMEM-현탁된 나노입자 및 10% FBS를 함유하는 DMEM으로 대체하였다.

[0039] 모든 복합체를 FITC-표지하고 형질감염 전에 형광 강도(488/520 ex./em.)의 정성적인 관찰을 수행하였다. 96-웰-도말된 조골세포(1000 세포/웰)를 각각의 2원(플라스미드 및 양이온성 중합체), 3원(플라스미드 및 양이온성 중합체, + 음이온성 중합체 또는 양이온성 폴리펩타이드), 및 4원(플라스미드, 양이온성 중합체, 음이온성 중합체, 및 양이온성 폴리펩타이드) 복합체뿐만 아니라 그의 실리카-코팅된 대응물에 대해, 하나의 대조용 및 총 8개의 실험 세트(n=3)로, 200 ng의 플라스미드로 3회 중복하여 형질감염시켰다. 세포외 응집 성질에 대한 혈청의 효과를 연구하기 위해서 5% 혈청을 사용하였다.

[0040] 30시간 형질감염-후에, 바이모달 형광 영상화는 FITC-표지된 나노입자(488 ex./520 em.), 및 (633 ex./680 em.)에 원인인 mCherry 유전자 발현의 동시 관찰을 허용하였다. 최소 20개의 세포를 각 웰의 상이한 위치들에서 관찰하였으며 전형적인 영상을 획득하였다. ImageJ를 사용하여 오버레이 영상을 처리하고 상-콘트라스트, 488/520 및 633/680 채널을 합하였다.

[0041] 세포 흡수를 나타내는 현미경사진을 도 7에 도시한다. 도 7의 원은 높은 수준의 핵 국소화가 명백한 곳을 가리킨다. 실리카-코팅된 2원 나노입자는 파열 방출 성질을 보인다(즉 핵 국소화가 DNA-PLR + 실리카 샘플에서 명백하지 않다). 폴리플렉스 코어 중의 PDGA의 포함은 세포핵 내 플라스미드의 연장된 방출을 야기한다. 연장된 방출을 야기하는 상기 PDGA의 효과는, 나노입자 폴리플렉스 중에 양이온성 중합체의 포함이 다른 폴리플렉스 구성성분들로부터 폴리뉴클레오타이드 페이로드의 분리를 촉진하고 상기 분리의 지속기간을 단축시킨다는 정반대를 암시하는 문헌에 비추어 놀라운 것이었다. HTP의 부가는 또한 광범위한 핵 국소화를 야기한다.

[0042] 폴리(아르기닌)(서열번호 4)에 의한 실리카-코팅된 나노입자(DNA-HTP-PDGA-PLR + Si)의 추가 코팅은 나노입자가 혈청 중에서 안정성 있게 하며 세포내 나노입자 페이로드의 연장된 거주를 야기한다. 도 8은 본 발명에 따른, MC3T3 쥐 조골세포에 의한, 폴리(L-아르기닌)(서열번호 4)의 추가적인 층이 부가된 실리카-코팅된 FITC-접합된

폴리플렉스 코어의 유지 및 세포 흡수를 도시하는 현미경사진이다. 도 7에 도시된 실리카-코팅된 나노입자의 경우와 달리, 상기 실리카 코팅의 외부상에 양이온성 중합체의 추가적인 층을 함유하는 나노입자의 응집은 도 8에서 관찰될 수 없으며, 이는 상기와 같은 나노입자가 혈청 중에서 안정하게 남아있음을 암시한다. 더욱 또한, 상기 나노입자는, 형광이 대략 1.5일 이내에 정성적으로 절정이도록 세포핵 내에서 연장된 거주를 나타내는 것으로 관찰되며 검출 가능한 형광이 14일 내내 지속되었다.

[0043] 특정한 세포 유형에 결합하도록 특이적으로 지시된 중합체와의 실리카-코팅된 폴리플렉스 코어의 층상화는 흡수를 추가로 증대시킬 수 있다. 나노입자의 표면과 세포 수용체에 대한 리간드의 회합은, 상기와 같은 수용체를 발현하고 상기와 같은 세포의 형질감염을 증가시키는 세포에 대한 상기 나노입자의 친화성을 증대시킬 수 있다. 본 발명에 따른 일례로서, 실리카-코팅된 폴리플렉스를, 인간 제대정맥 내피세포(HUVEC)에 의해 높은 수준으로 발현되는 VEGF 수용체에 대한 고-친화성 리간드인 VEGF(서열번호 5)로 코팅하였다. HUVEC를 40분 동안 상기 실리카 코팅의 외부 표면에 부착된 폴리(L-아르기닌)(서열번호 4) 또는 인간 VEGF(서열번호 5)를 갖는 실리카-코팅된 FITC-접합된 폴리플렉스와 배양한 후에 PBS로 2회 세척하고 이어서 DMEM(10% FBS)에 재현탁시켰다. 세포를 4시간 후에 영상화하였다. 상기 짧은 배양 기간 후에, 상기 외부 실리카 표면에 부착된 폴리(L-아르기닌)층을 함유하는 나노입자에 의해 단지 낮은 수준의 형질감염이 관찰된 반면(도 9a), 폴리(L-아르기닌) 대신에 VEGF에 의한 코팅은 상기 4시간 시점에서 현저하게 더 큰 세포 내면화를 생성시켰다. 숙련가는 실질적으로 임의의 다른 세포 유형도 또한 본 발명에 따른 나노입자에 의해 형질감염될 수 있으며 중합체층을 실리카-코팅된 폴리플렉스 코어의 외부 층에 부착시켜 상기 효과를 촉진하거나 달리 영향을 미칠 수 있음을 인식할 것이다. 상기와 같은 숙련가는 또한 상기와 같은 결과를 성취하기 위해서 세포를 나노입자와 접촉시키는 다른 수단, 예를 들어 인간 또는 동물에게 i.p., i.v., i.m. 또는 s.c. 또는 다른 주사 또는 경피 투여 또는 죠약 또는 섭취 또는 경구 또는 비흡입을 통해 접촉시키는 다른 수단, 또는 이식된 조직 또는 세포 또는 줄기세포와의 접촉이 또한 본 발명 내에 포함됨을 이해할 것이다.

[0044] 본 발명의 또 다른 태양에서, 뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 나노입자 폴리플렉스 코어에 통합시킬 수 있다. 하나의 비제한적인 예로서, TALEN(전사인자-유사 효과기 뉴클레아제)을 암호화하고 그의 발현을 구동하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 나노입자에 포함시킬 수 있다. 아연 집게 뉴클레아제와 같이, TALEN은 새로운 DNA 결합 특이성을 도입하도록 변형시킬 수 있는 모듈 DNA 결합 동기(TALE) 및 심지어 뉴클레아제(TALEN)를 사용한다. TALE는 단일 뉴클레오타이드에의 결합을 각각 명시하는 다수의 반복 가변 이중잔기(RVD)로 이루어진다. TALE 배열은 목적하는 DNA 서열에 특이성 및 결합 친화성을 제공하기 위해 특정한 순서로 RVD를 함께 배열함으로써 제조된다. 통상적으로, 이들 게놈-이어맞추기 도구들은 비-특이성 절단 도메인, 예를 들어 FokI 뉴클레아제를 TALE에 융합시킴으로써 조작된다. 골든 게이트(Golden Gate)로서 공지된 개방 소스 조립 방법을 포함한 이들 반복적인 서열의 조립을 허용하는 TALEN 조립 프로토콜을 이용할 수 있다.

[0045] 본 발명의 또 다른 태양에서, 나노입자를, 세포 기능을 변경시키기 위해 신호전달 분자의 발현을 조절하는 방식으로 설계하고 사용할 수 있다. 예를 들어, 염색체 DNA의 서열을 결실시키거나 변경시켜 질병 상태 또는 그에 대한 치료의 세포 또는 동물 모델을 생성시키거나, 또는 질병 상태를 치료하거나 달리 인간 건강을 향상시킬 수 있다. 본 발명에 따라 발현을 변형시킬 수 있는 단백질의 한 가지 비제한적인 예는 스클레로스틴(SOST)이다. LRP5/6 수용체에 대한 SOST 결합은, 추정상 Wnt3A, Wnt7B, Wnt10A, 스클레로스틴, β -카테닌, LEF1 및 TCF1간의 피드백 시스템을 통해 Wnt 신호전달을 억제한다. 스클레로스틴의 제거를 통한 이들 캐스케이드의 억제 해제는 현저하게 증가된 무기질화 활성을 생성시킬 수 있다.

[0046] 골선조세포(OPG) 및 RANKL이 또한 SOST 결합에 응답 역할을 할 것으로 예측되며, 이때 RANKL은 그 자신을 파골 세포-결합된 RANK 또는 ODF(파골세포 분화 인자) 결합을 통해 파골세포형성을 촉진하기 위한 수용체로서 발현하고, OPG는 RANKL에 길항적으로 결합한다. 따라서, OPG와 RANKL간의 비는 골 형성과 재흡수간의 관계에 대한 결정인자이다. 그러나, 조골세포의 단일 배양은 다른 형태의 주변분비 신호전달을 통해 연통할 것이며 상기 비는 파골세포와의 공-배양에서 또는 생체내에서 변경된 세포의 양상을 보다 더 반영할 것이다.

[0047] 본 발명의 또 다른 태양에서, 나노입자를, SOST의 발현을 중단시키고 결과적으로 높은 골-질량 표현형을 생성시킬 수 있는 TALEN에 의한 형질감염을 허용하도록 설계할 수 있다. 일례로서, TALEN을, 상기 SOST 유전자 중의 유전자좌에 특이적으로 결합하고 게놈 중에 이중-가닥 파손을 생성시켜 전사 또는 번역을 중단시키고 SOST 발현이 감소하도록 조작할 수 있다. 추가의 예로서, 나노입자는 SOST에 대한 개시 코돈의 염색체 유전자좌의 어느 한 쪽에 이중-가닥 파손을 생성시키는 2개의 TALEN을 암호화하는 플라스미드를 함유할 수 있다. 상기 개시 코돈을 암호화하는 서열의 삭제에 이은 내인성 게놈 DNA의 수복은, SOST 단백질로 적합하게 번역될 수 없고 이에 의해 SOST 발현 및 활성을 하향 구동하는 상기 개시 코돈이 없는 스클레로스틴 mRNA의 전사를 생성시킬 수

있다. 상기 모델의 도식적인 표현을 도 10에 도시하며, 여기에서 "좌측" TALEN 및 "우측" TALEN은 상기 SOST 개시 코돈 유전자좌의 반대쪽의 부위들에 결합하여 상기 부위들을 절단시킨다. 일례로서, 좌측 TALEN은 서열번호 6으로 나타내는 서열을 가질 수 있고 우측 TALEN은 서열번호 7로 나타내는 서열을 가질 수 있다. 나노입자는 발현 플라스미드, 예를 들어 pUC19(진뱅크(Genbank) 수납 번호 L09137 X02514)를 포함할 수 있으며, 상기 플라스미드내에는 좌측 또는 우측 TALEN을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 예를 들어 서열번호 6 및 서열번호 7로 나타내는 서열들이 상기 암호화된 TALEN의 세포 발현을 구동하도록 서브클로닝되어 있다. 나노입자는 또한 좌측 및 우측 TALEN을 암호화하는 서열을 포함하는 발현 플라스미드의 조합을 포함할 수 있다.

[0048] 나노입자는 또한 본 발명에 따라, SOST 또는 임의의 다른 관심 유전자를 표적화하는 다른 TALEN 서열을 포함할 수 있으며, 다른 발현 벡터를 또한 포함할 수 있다. 나노입자는 본 발명에 따라, 다른 유형의 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 유사체, 예를 들어 RNA 또는 DNA의 종들, 예를 들어 mRNA, siRNA, miRNA, 앱타미, shRNA, AAV-유도된 핵산, 모르폴레노 RNA, 웨토이드 및 웨타이드 핵산, cDNA, DNA 오리가미, 합성 뉴클레오타이드를 갖는 DNA 및 RNA, 소정의 2차 구조를 갖는 DNA 및 RNA, CRISPR 서열, 및 다양체 및 올리고머, 및 이를 중 임의의 조합을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 나노입자는 발현을 목적하는 임의의 단백질 또는 폴리웨타이드와 같은 다른 생성물을 암호화할 수 있는 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 숙련가는 상기 예들이 본 발명에 따르며 본 발명에 대한 특허청구범위에 의해 포함될 수 있음을 알 것이다.

[0049] 본 발명에 따라, SOST 발현을 녹다운시키도록 설계된 나노입자에 의한 MC3T3 쥐 조골세포의 형질감염에 이어서, ELISA 및 정량적인 실시간 PCR(qPCR) 분석을 세포 용해물 및 상등액 분획상에서 수행하였다. 도 11a-11c는, 형질감염에 이은 20일까지의 기간에 걸쳐 SOST 발현 및 β -카테닌 발현을 조절함에 있어서, 본 발명에 따라, 좌측(서열번호 6) 및 우측(서열번호 7) SOST TALEN을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 플라스미드를 함유하는 상이한 양(800 ng, 1600 ng, 또는 2500 ng)의 나노입자(NP)의 유효성을 나타내는 그래프이다. 비교를 위해서, 다른 세포를, 세포 형질감염에 대해 공지된 작용제인 리포펙타민을 사용하여 동일한 TALEN을 암호화하는 mRNA로 형질감염시켰다. 도 11a-11c에 도시된 바와 같이, 세포내 및 세포외 SOST 수준은 본 발명에 따른 나노입자에 의한 형질감염에 이어서 적어도 수주 동안 억제된 반면, β -카테닌 발현은 동시에 상향조절되었으며, 이는 SOST 발현 및 활성을 하향조절함에 있어서 상기 나노입자의 유효성을 의미한다.

[0050] qPCR을 또한, 본 발명에 따른 나노입자에 의한 SOST 발현의 하향조절이, 관련된 신호전달 캐스케이드의 다른 성분들에 하향 효과를 미칠 수 있는지를 측정하기 위해 수행하였다. 세포를 상술한 바와 같이 형질감염시켰다. 지시된 바와 같은 상이한 양의 나노입자에 의한 형질감염 후 5, 14 및 21일째에, 신호전달 경로의 다수 성분들(SOST, β -카테닌, TCF1, LEF1, Wnt3A, Wnt7B, Wnt10b, OPG 및 RANKL)의 발현에 대한 결과를 도 12a 내지 12f에 도시한다. 비교를 위해서, 다른 세포를 리포펙타민을 사용하여 동일한 TALEN을 암호화하는 mRNA로 형질감염시켰다. 실시간 PCR 결과는 리포펙타민에 의해 전달된 SOST TALEN에 비해, SOST TALEN을 전달하는 나노입자로 형질감염된 세포주에서의 Wnt 응답성 유전자가 Wnt 신호전달 억제제 스클레로스틴의 녹다운에 대한 반응으로서 2 내지 6배까지 더 크게 상향조절됨을 나타내었다.

[0051] TCF/LEF-1 매개된 전사가 또한 본 발명에 따라 SOST 발현의 녹다운에 이어서 상향조절될 수 있다. MC3T3-E1 세포를 TCF/LEF-1 결합 부위를 함유하는 TOP플래시 및 대조용 FOP플래시 루시페라제 리포터 플라스미드 구조물(애드젠# 12456 및 12457)로 형질감염시켰다. 상기 세포를 8-웰 랩텍(labtek) 캠버 슬라이드의 웰 중 5000 세포의 밀도로 도말하고 1 μ g의 TOP플래시 및 FOP플래시 플라스미드로 별도로 형질감염시켰다. 형질감염 효율을 조절하기 위해서 대조용 플라스미드 레닐라(프로메가(Promega))를 사용하였다. 도 13은 본 발명에 따른, SOST-지시된 TALEN을 암호화하는 플라스미드를 함유하는 나노입자에 의한 형질감염에 이어서 21일 동안 TCF/LEF-1 매개된 전사의 상향조절을 나타내는 현미경사진이며, 이는 본 발명의 나노입자에 의한 형질감염에 따른 TCF/LEF-1 발현 및 활성의 상향조절과 일치한다.

[0052] 본 발명에 따른 SOST 발현의 녹다운은 또한 기질 골수세포 및 조골세포의 무기질화를 증가시킬 수 있다. 무기질화를 2가지 별도의 방법에 의해 정량분석하였으며, 첫 번째 방법은 MATLAB(매쓰웍스(Mathworks), 미국 매사추세츠주 나틱 소재)를 사용하는 자일레놀-오렌지-표지된 바이탈 배양물의 영상 경계화에 기반하고, 두 번째 방법은 원자흡수 분광법(AAS)에 의한다. 상기 자일레놀 오렌지 경계의 경우, 2개 상 모두 및 형광의 영상(텍사스 레드(Texas Red) 필터 세트에 의한)을 웰의 5개의 인접한 영역들에서 촬영하였으며, 이어서 보다 큰 8-비트 영상(4x, 니콘(Nikon) Ti-100)으로 철하였다. 상기 상 채널을 상기 형광으로부터 제외시키고, 경계를 배경과 신호(-6dB) 사이 수준의 절반으로 지정하였다. 상기 경계 이상의 픽셀의 수를 카운트하고 이를 사용하여 각 웰 중 무기질화된 면적의 백분율을 나타내었다. 상 및 형광의 조합은 결합되지 않은 자일레놀 오렌지를 식별할 수

있게 한 반면, 데시벨 수준의 사용은 각 영상 중 가지각색 배경 수준의 보정을 허용하였다.

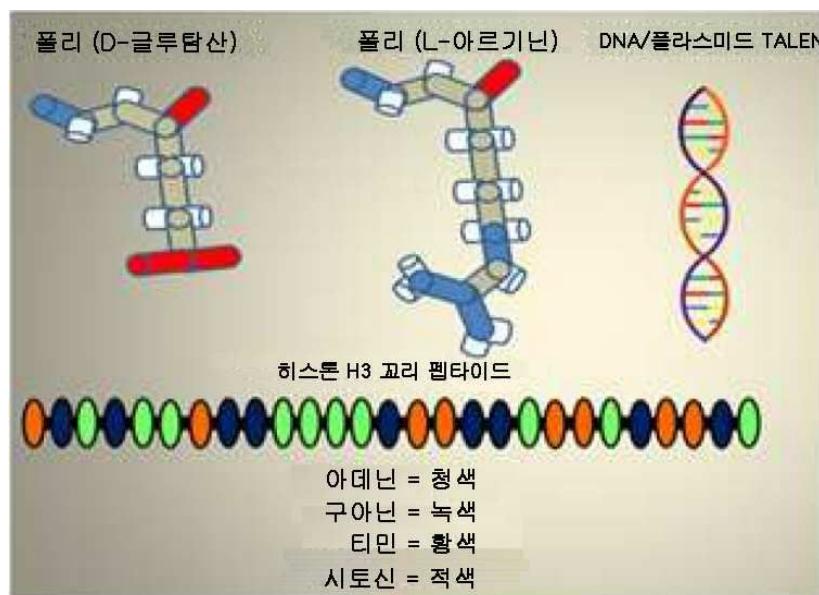
[0053] 무기질화를 또한 원자흡수 분광계(AA-퍼킨 엘머(Perkin Elmer), 미국 매사추세츠주 소재)에 의한 원자 흡수에 의해 정량분석하였다. 각 웰을 0.5 ml의 10% 질산을 가하여 제조하였으며, 생성된 칼슘 함량을 표준 곡선에 대해 측정하고 그룹들간에 비교하였다. 포스페이트 상과 함께 침전하는 이온화된 칼슘에 기인한 간섭이 최소화되도록 조심하였으며, 따라서 큰 과잉의 칼륨 및 란타늄 이온을 각 웰에 가하였다.

[0054] 도 14a-14c는 SOST 녹다운에 따른 무기질화에 대한 본 발명에 따른 나노입자에 의한 형질감염의 효과를 도시한다. 도 14a는 SOST 녹다운 후 25일째에 형성된 무기질화된 기질의 염색에 대한 현미경사진이다. 기질 세포를 패널 A-C에 나타내며, 여기에서 패널 A는 대조용 세포를 나타내고, 패널 B는 리포펙타민을 통해 형질감염된 세포를 나타내며, 패널 C는 본 발명에 개시된 바와 같고 본 발명에 따르는 SOST-지시된 TALEN을 암호화하는 플라스미드를 함유하는 나노입자로 형질감염된 세포를 나타낸다. MC3T3-E1 조골세포를 패널 D-G에 나타내며, 여기에서 패널 D는 대조용 세포를 나타내고, 패널 E-G는 본 발명에 따르는, 각각 800 ng, 1600 ng 및 2500 ng의 용량으로 개시된 바와 같은 SOST-지시된 TALEN을 암호화하는 플라스미드를 함유하는 나노입자로 형질감염된 세포를 나타낸다. 도 14b 및 14c는 물기질화의 정량분석을 나타내는 그래프이다. 도 14a-14c는 본 발명에 따른 나노입자를 통한 SOST-표적화 TALEN에 의한 형질감염에 따른 기질 골수세포 및 조골세포 중 증가된 칼슘 농도를 나타내며, 이는 유전자의 세포 발현 및 활성 및 하류 신호전달 경로를 변형시키는 상기 기법의 유효성을 추가로 입증한다.

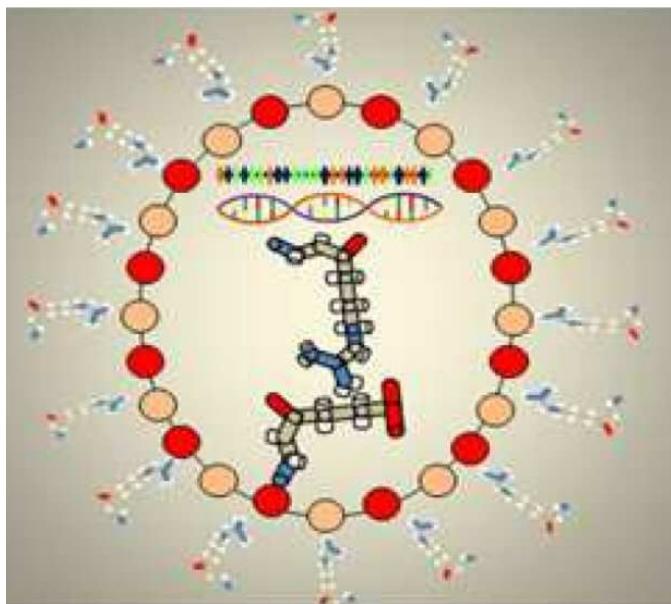
[0055] 본 발명의 다수의 태양들을 본 발명에서 개시하고 묘사하였지만, 동일한 목적을 위해 대안의 태양들이 당해 분야의 숙련가들에 의해 성취될 수 있다. 상응하게, 본 발명의 진의 및 범위 내에 있는 바와 같은 모든 상기와 같은 대안의 태양들을 첨부된 특허청구범위에 의해 포함하고자 한다.

도면

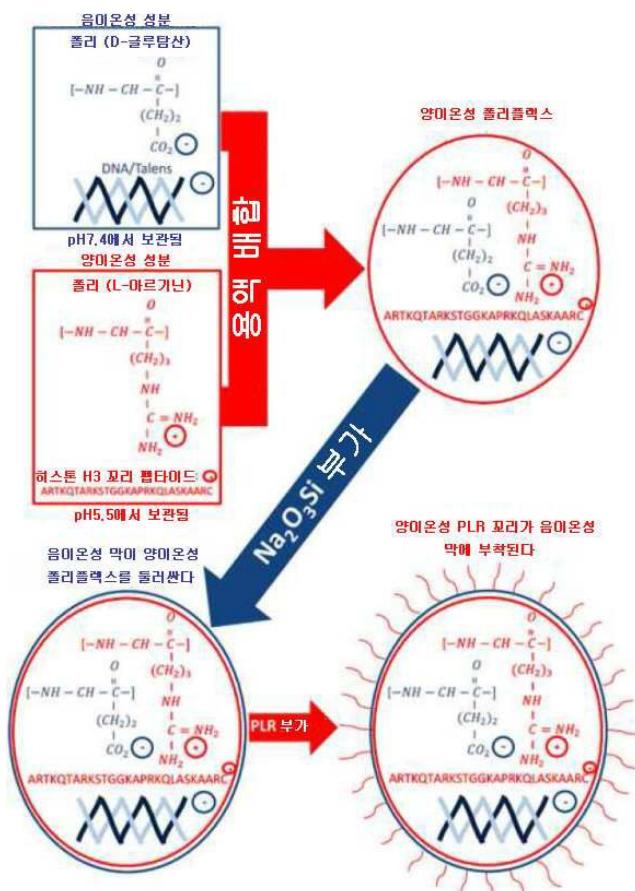
도면1a



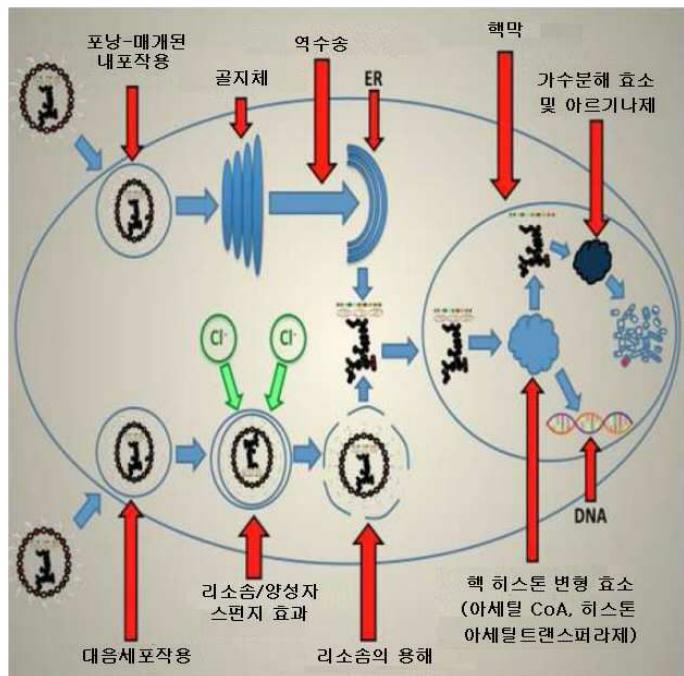
도면1b



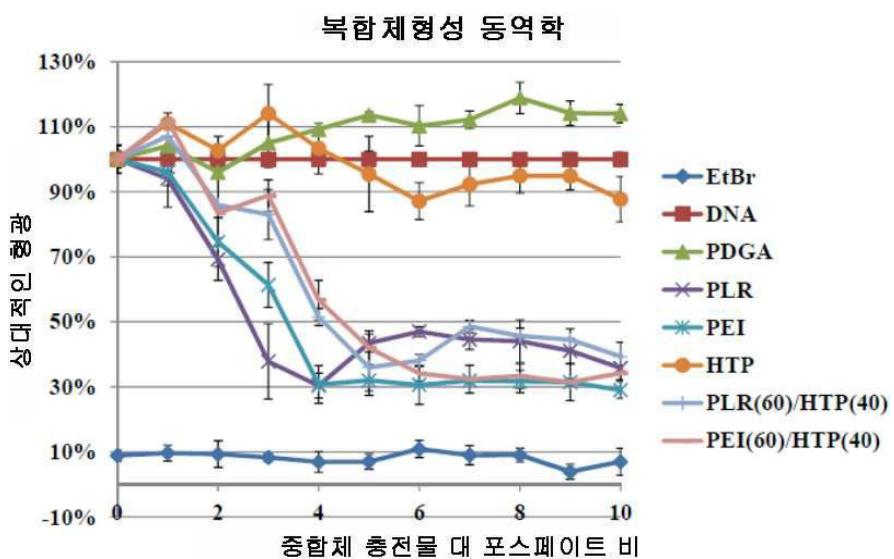
도면2a



도면2b

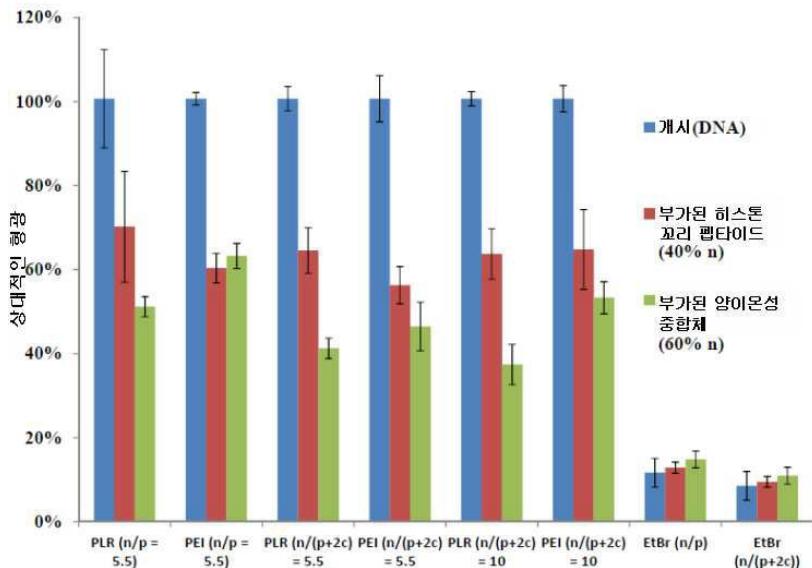


도면3



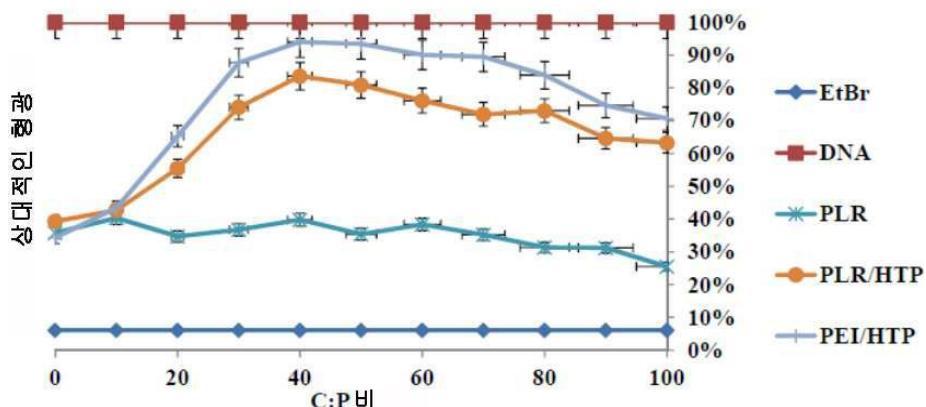
도면4

최적화된 복합체 형성 동역학



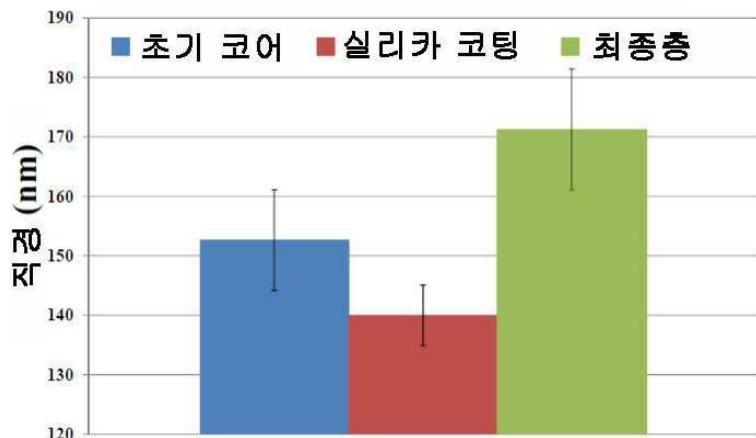
도면5

과잉의 음이온성 충전물-매개된 불안정화

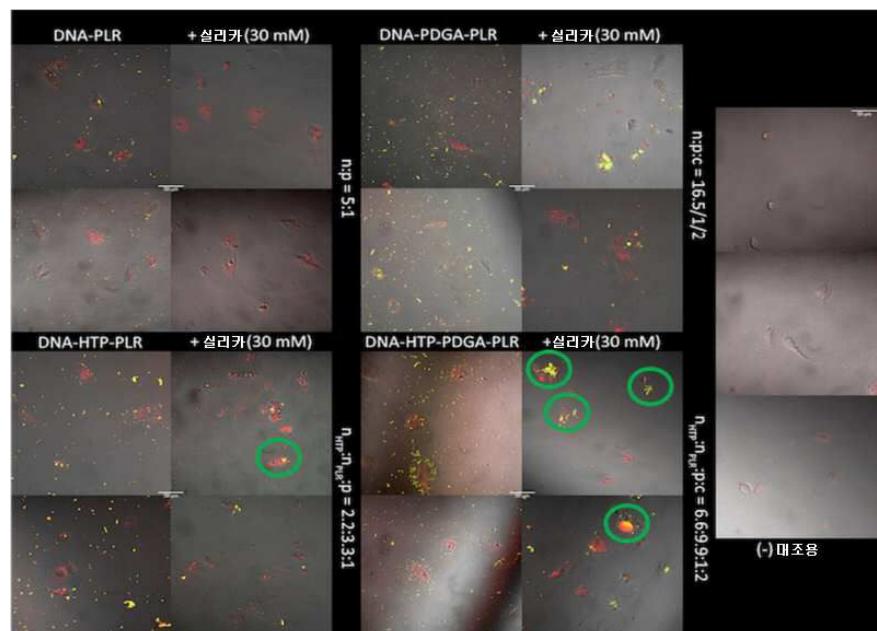


도면6

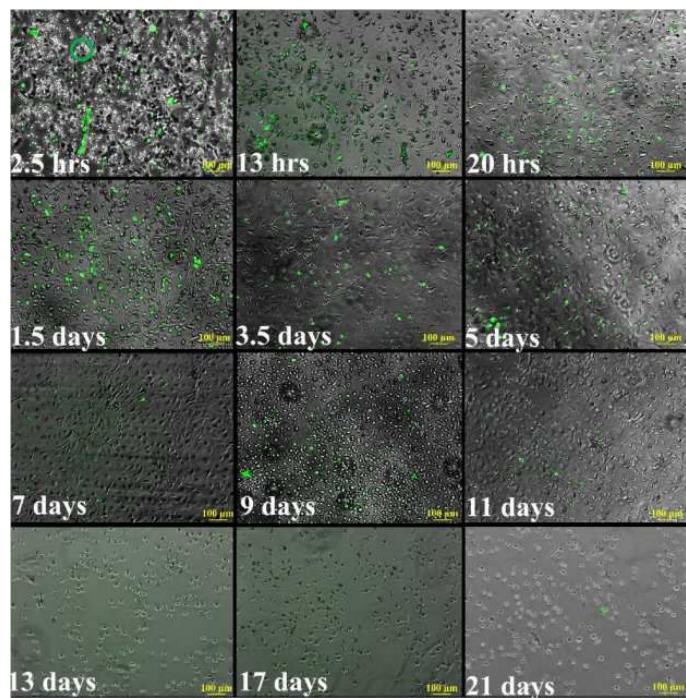
진행총들의 유체역학적 크기



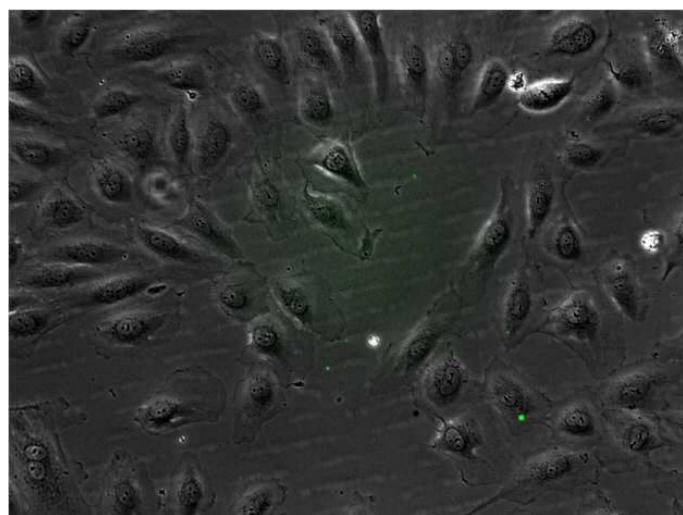
도면7



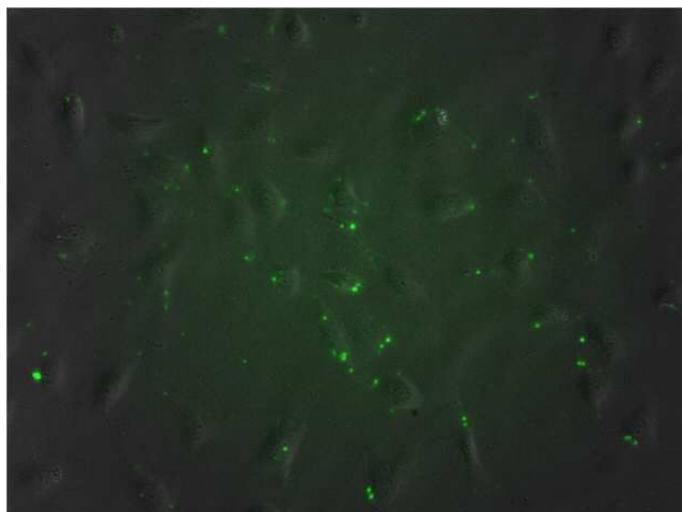
도면8



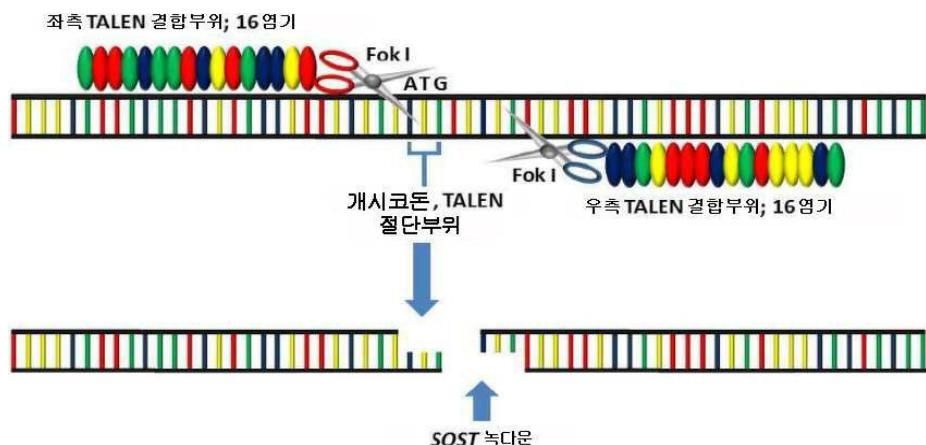
도면9a



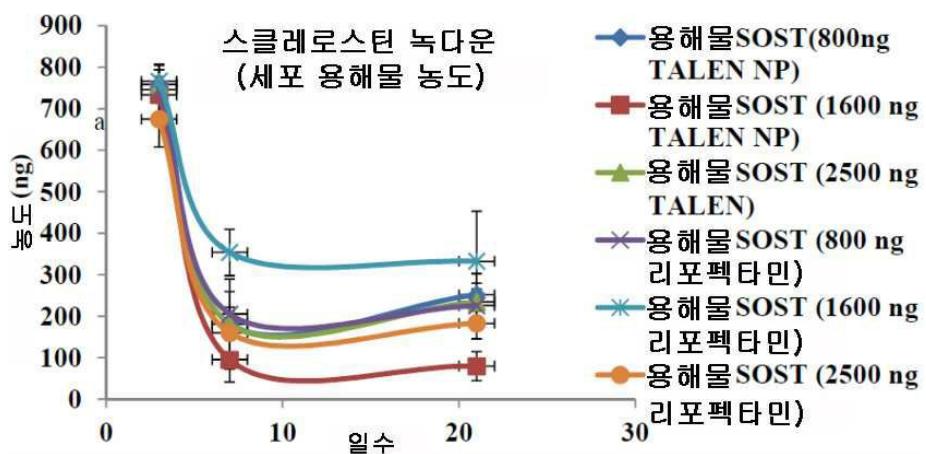
도면9b



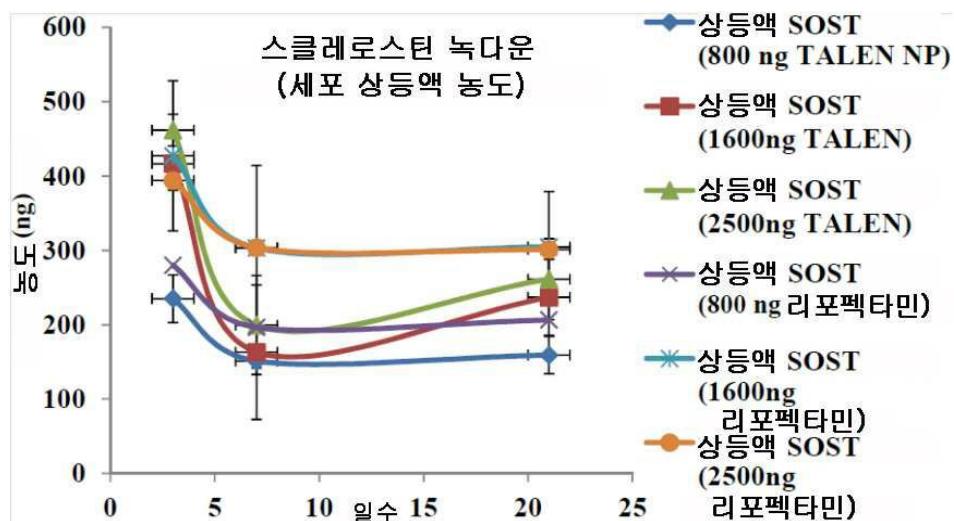
도면10



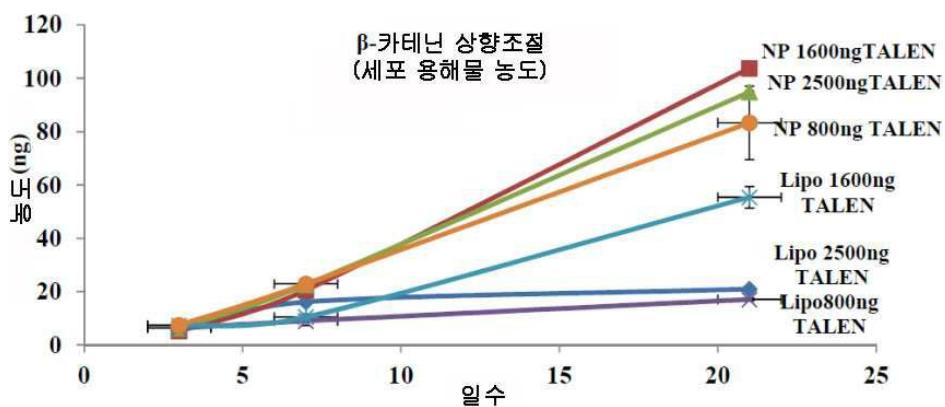
도면11a



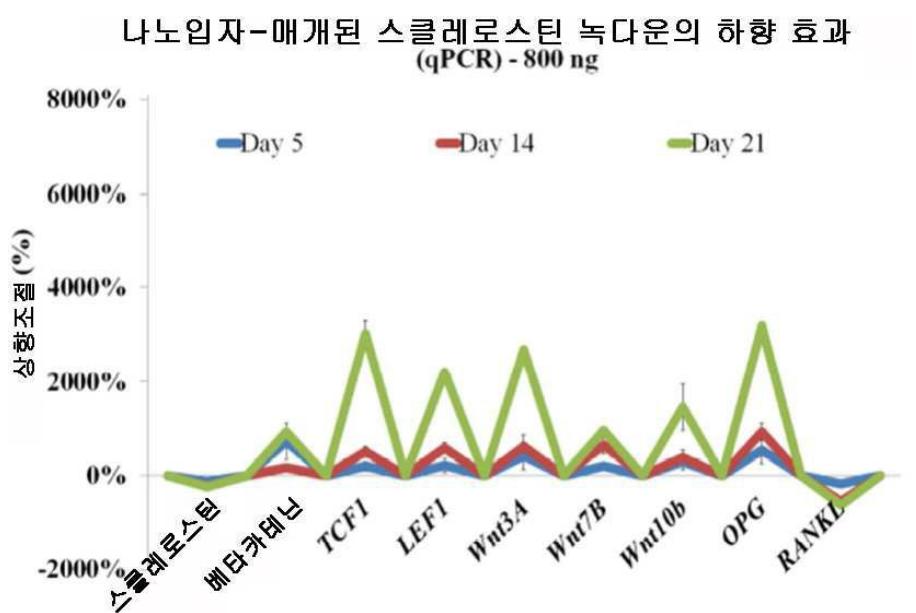
도면11b



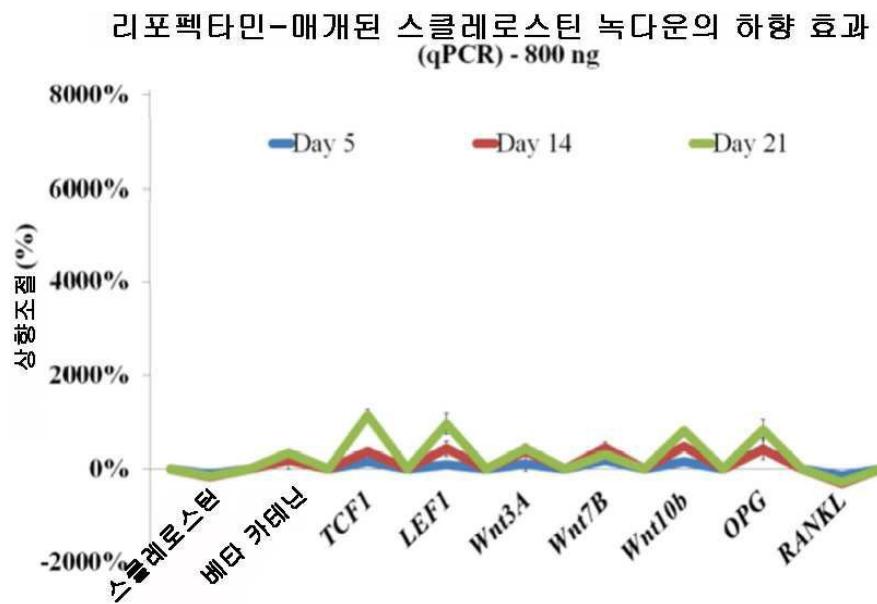
도면11c



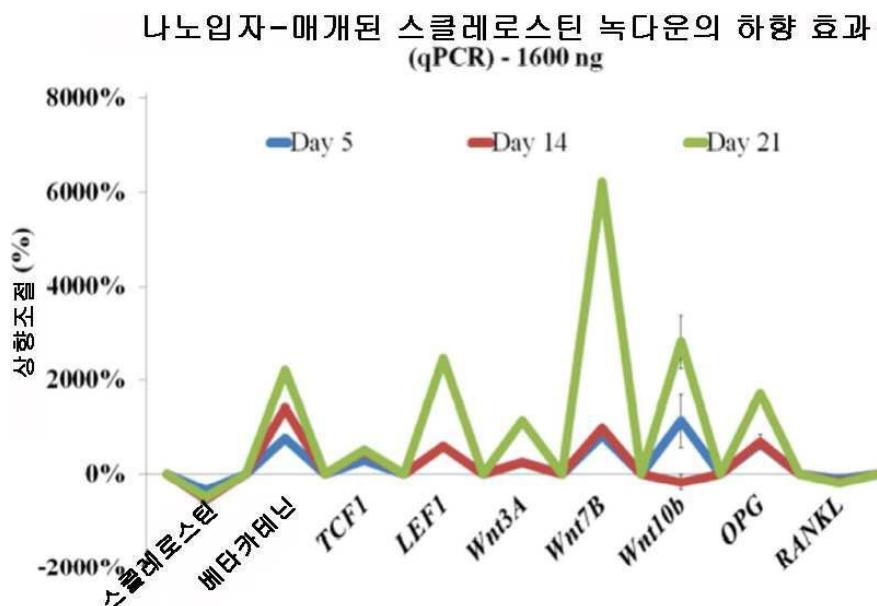
도면12a



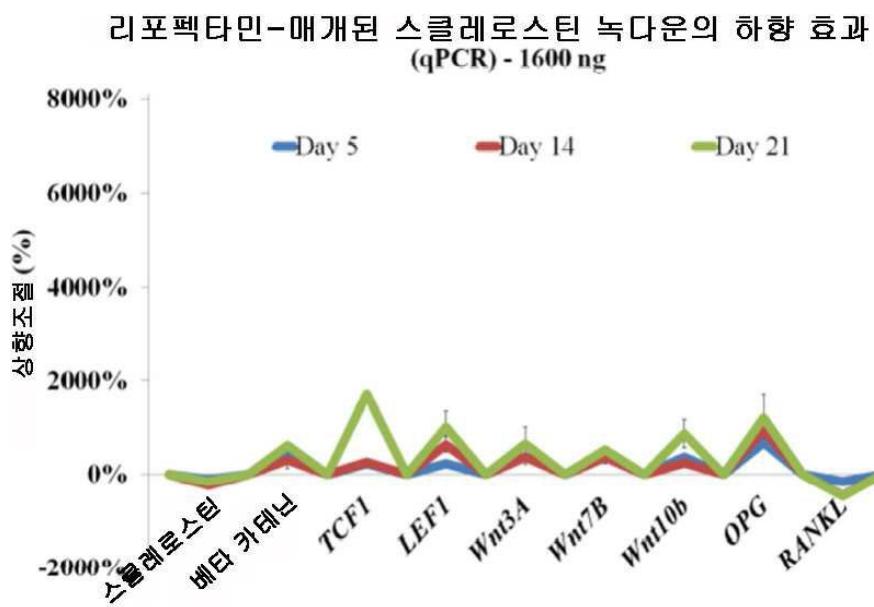
도면12b



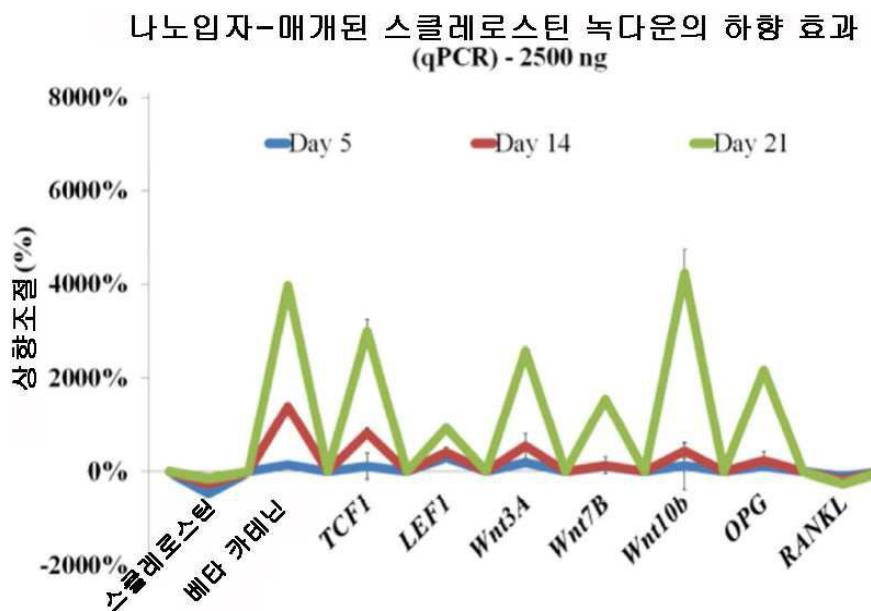
도면12c



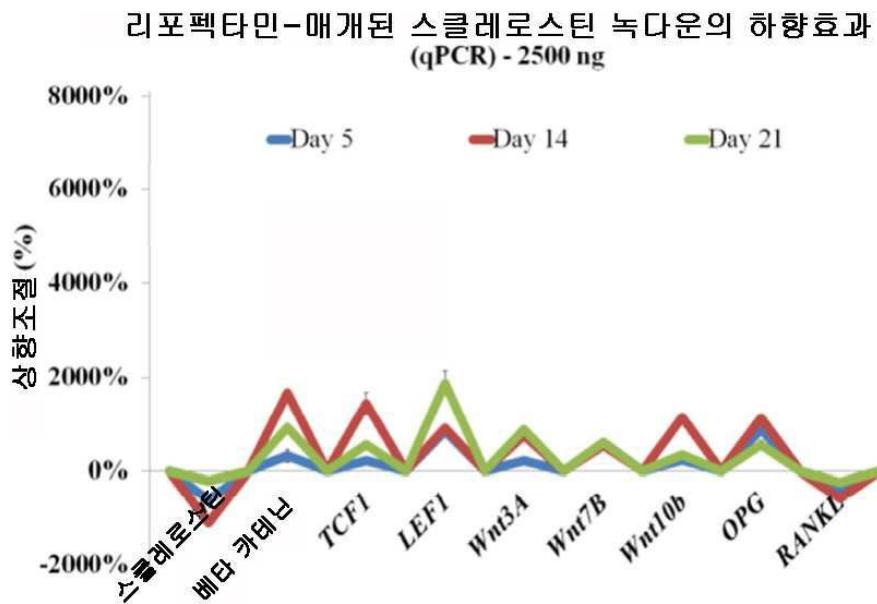
도면12d



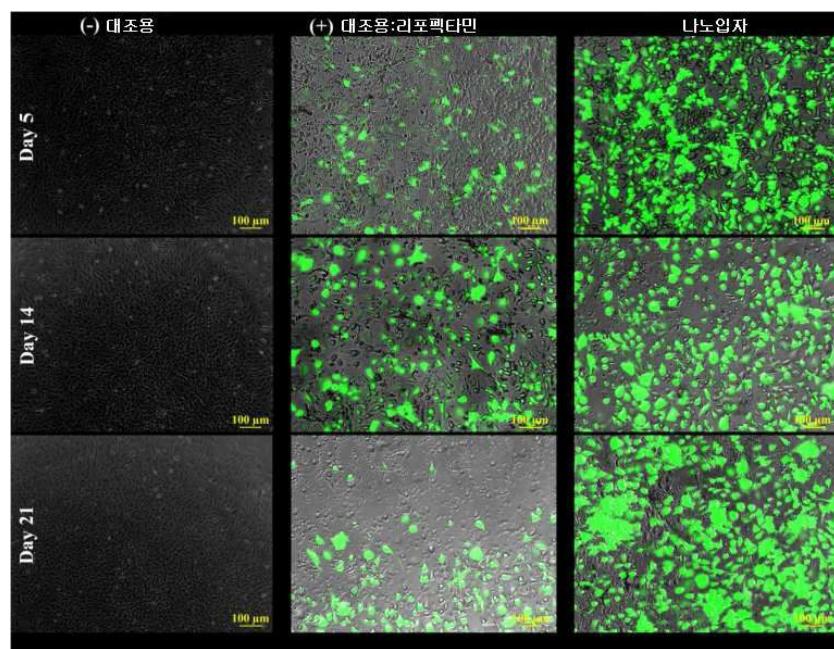
도면12e



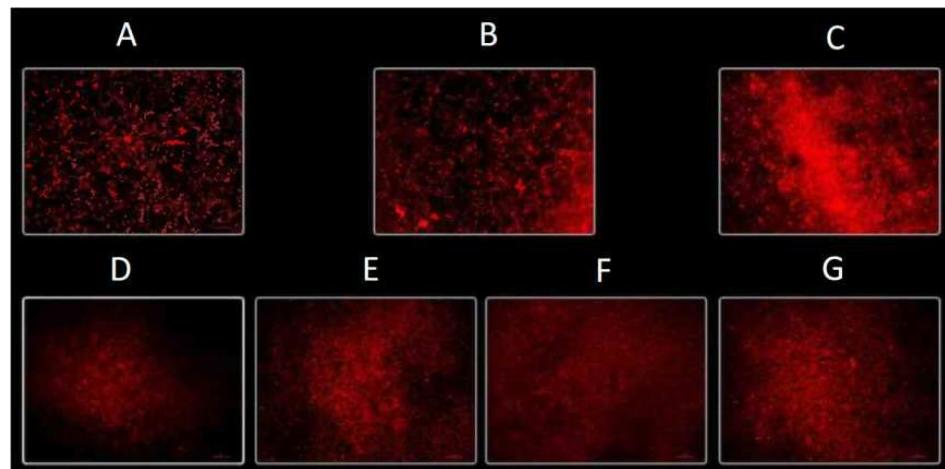
도면12f



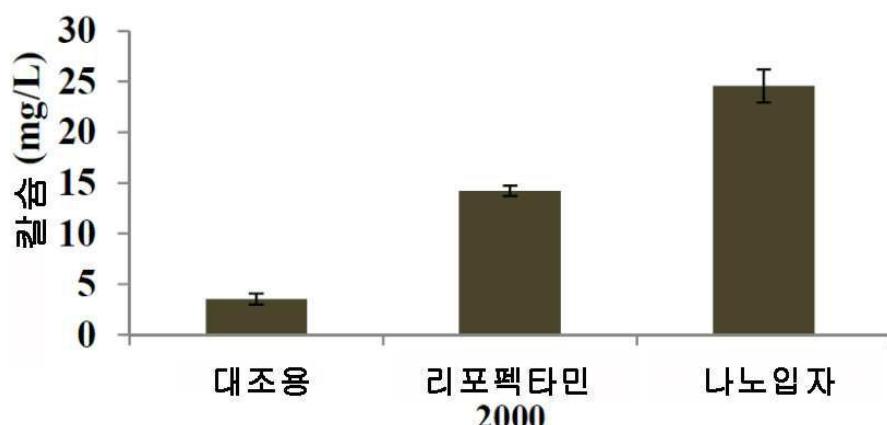
도면13



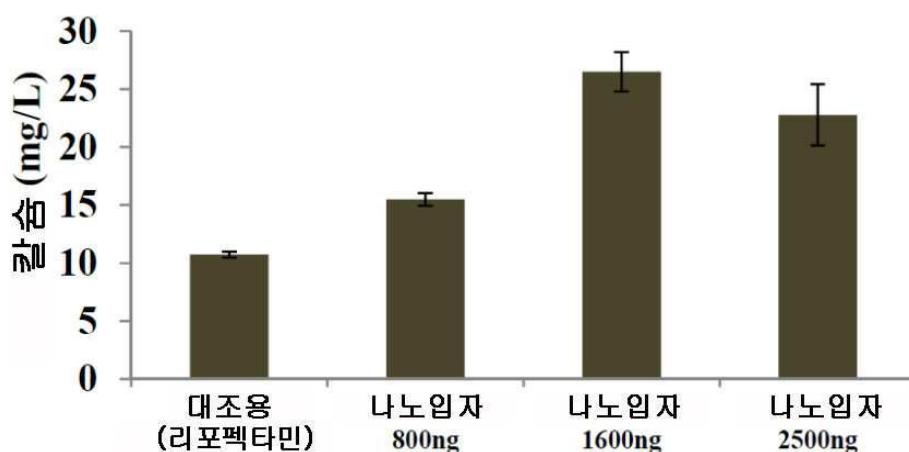
도면14a



도면14b

기질 골수세포 무기질화
(칼슘 정량분석)

도면14c

조골세포 무기질화 정량분석
(칼슘 농도)

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Rensselaer Polytechnic Institute

<120> NANOPARTICLE-MEDIATED GENE DELIVERY, GENOMIC EDITING AND
LIGAND-TARGETED MODIFICATION IN VARIOUS CELL POPULATIONS

<130> 0094.183WO

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 186

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Laboratory-synthesized sequence.

<400> 1

Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg

20 25 30

Arg Arg

35 40 45

Arg Arg

50 55 60

Arg Arg

65 70 75 80

Arg Arg

85 90 95

Arg Arg

100 105 110

Arg Arg

115 120 125

Arg Arg

130	135	140
Arg		
145	150	155
Arg		160
	165	170
Arg		175
180	185	
<210> 2		
<211> 116		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Laboratory-created sequence.		
<220><221> MISC_FEATURE		
<222> (1)..(116)		
<223> D isomer.		
<400> 2		
Glu		
1	5	10
Glu		15
	20	25
Glu		30
	35	40
Glu		45
	50	55
Glu		60
Glu		
65	70	75
Glu		80
	85	90
Glu		95
	100	105
Glu Glu Glu Glu		110
	115	

<210> 3
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> TRIMETHYLATION.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> AMIDATED.

<400> 3

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

1	5	10	15
Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala			
20		25	

<210> 4

<211> 64

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Laboratory-created sequence.

<400> 4

Arg Arg

1	5	10	15
Arg			
20	25		30
Arg			
35		45	
Arg			

50	55	60
Arg		
55		
<210> 5		
<211> 165		
<212> PRT		

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys

1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu

20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys

35 40 45

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Cys Cys Asn Asp Glu

50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile

65 70 75 80

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe

85 90 95

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg

100 105 110

Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe

115 120 125

Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser

130 135 140

Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys

145 150 155 160

Asp Lys Pro Arg Arg

165

<210> 6

<211> 936

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Laboratory-created sequence.

<400> 6

Met Gly Asp Pro Lys Lys Arg Lys Val Ile Asp Tyr Pro Tyr Asp

1	5	10	15
Val Pro Asp Tyr Ala Ile Asp Ile Ala Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr			
20	25	30	
Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val			
35	40	45	
Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His Ala His			
50	55	60	
Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Leu Gly Thr Val Ala Val			
65	70	75	80
Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro Glu Ala Thr His Glu Ala			
85	90	95	
Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala			
100	105	110	
Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly Pro Pro Leu Gln Leu Asp			
115	120	125	
Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Val			
130	135	140	
Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn			
145	150	155	160
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys			
165	170	175	
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala			
180	185	190	
His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly			
195	200	205	
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys			
210	215	220	
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His			
225	230	235	240
Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val			
245	250	255	

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 260 265 270

 Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 275 280 285
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 290 295 300
 Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 305 310 315 320
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 325 330 335

 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 340 345 350
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 355 360 365
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 370 375 380
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 385 390 395 400

 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala
 405 410 415
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 420 425 430
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 435 440 445
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 450 455 460

 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
 465 470 475 480
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 485 490 495
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

500	505	510
Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val		
515	520	525
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala		
530	535	540
Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu		
545	550	555
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala		
565	570	575
Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg		
580	585	590
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val		
595	600	605
Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val		
610	615	620
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln		
625	630	635
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu		
645	650	655
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr		
660	665	670
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala		
675	680	685
Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala		
690	695	700
Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg		
705	710	715
Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Gly Asp Pro Ile Ser Arg		
725	730	735
Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg		
740	745	750

His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile
 755 760 765
 Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu
 770 775 780

Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser
 785 790 795 800
 Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr
 805 810 815
 Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro
 820 825 830
 Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr
 835 840 845

Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser
 850 855 860
 Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly
 865 870 875 880
 Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn
 885 890 895
 Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile
 900 905 910

Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn
 915 920 925
 Gly Glu Ile Asn Phe Ala Ala Asp
 930 935

<210> 7

<211> 942

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Laboratory-created sequence.

<400> 7

Met Gly Asp Pro Lys Lys Arg Lys Val Ile Asp Lys Glu Thr Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Ile Asp Ile Ala Asp

20 25 30

Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro

35 40 45

Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His

50 55 60

Gly Phe Thr His Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala

65 70 75 80

Leu Gly Thr Val Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro

85 90 95

Glu Ala Thr His Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly

100 105 110

Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly

115 120 125

Pro Pro Leu Gln Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg

130 135 140

Gly Gly Val Thr Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu

145 150 155 160

Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

165 170 175

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

180 185 190

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

195 200 205

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala

210 215 220

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

225 230 235 240

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

245 250 255

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

260	265	270
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu		
275	280	285
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr		
290	295	300
Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala		
305	310	315
Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly		
325	330	335
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys		
340	345	350
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala		
355	360	365
His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly		
370	375	380
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys		
385	390	395
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn		
405	410	415
Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val		
420	425	430
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala		
435	440	445
Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu		
450	455	460
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala		
465	470	475
Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg		
485	490	495
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val		
500	505	510

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

515 520 525

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu

530 535 540

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

545 550 555 560

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

565 570 575

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala

580 585 590

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly

595 600 605

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys

610 615 620

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

625 630 635 640

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly

645 650 655

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

660 665 670

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

675 680 685

Gly Gly Gly Arg Pro Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg

690 695 700

Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu

705 710 715 720

Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu

725 730 735

Gly Asp Pro Ile Ser Arg Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu

740 745 750

Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr

755	760	765	
Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu			
770	775	780	
Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly			
785	790	795	800
Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val			
805	810	815	
Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser			
820	825	830	
Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr			
835	840	845	
Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp			
850	855	860	
Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val			
865	870	875	880
Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn			
885	890	895	
His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu			
900	905	910	
Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val			
915	920	925	
Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Ala Ala Asp			
930	935	940	
<210> 8			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Laboratory-created sequence.			
<400> 8			
Asp Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys			
1	5	10	15
Lys			

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Ala Arg Thr Lys Gln

1 5

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser

1 5 10

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala

1 5 10 15

<210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

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

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu
 20

<210> 13
 <211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala

20 25