



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년10월06일

(11) 등록번호 10-1557101

(24) 등록일자 2015년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01) C12N 15/87 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0036806

(22) 출원일자 2014년03월28일

심사청구일자 2014년03월28일

(56) 선행기술조사문헌

Nature Reviews, 9, p.447-464, 2010. 6

US20110177051 A1

KR1020050011288 A

US20100286069 A1

(73) 특허권자

인제대학교 산학협력단

경남 김해시 인제로 197, 내 (어방동, 인제대학교)

충남대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

최준식

대전 유성구 엑스포로123번길 65-38, 203동 1102호 (도룡동, 스마트시티주상복합아파트)

유광식

충남 천안시 서북구 성정로 75, 118동 403호 (성정동, 주공5단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 2 항

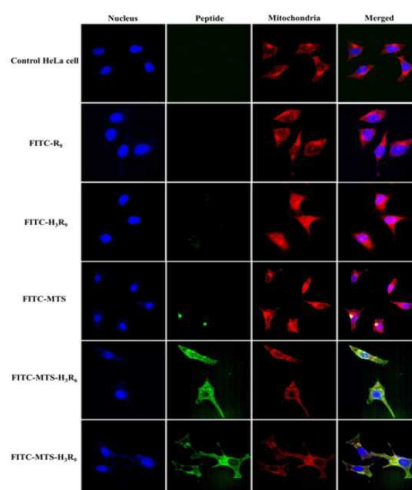
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **미토콘드리아 타겟팅 시퀀스와 양이온성 올리고펩타이드를 유효성분으로 함유하는 미토콘드리아 약물전달용 담체**

(57) 요약

본 발명은 미토콘드리아를 표적하는 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스와 세포막 투과성 및 흡수율을 증가시킬 수 있는 양이온성 올리고 펩타이드를 결합시켜 미토콘드리아 선택적 약물전달용 담체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 미토콘드리아를 표적하는 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스를 통하여 약물전달용 담체가 선택적으로 미토콘드리아를 표적화할 수 있으며, 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스에 결합된 히스티딘 및 아르기닌으로 구성된 양이온성 올리고 펩타이드는 양친매성을 증가시켜 미토콘드리아 세포막의 투과성 및 약물의 세포내 흡수력을 증가시킴으로써, 안전하고 효과적으로 미토콘드리아에 약물을 전달할 수 있으므로, 미토콘드리아 질환 치료 및 치료제 개발에 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

고경수

서울 강남구 삼성로 150, 202동 801호 (대치동, 미
도아파트)

한진

부산광역시 수영구 망미동 640-1 포스코더샵파크리
치 106동 1003호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0020224

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 심혈관 및 대사질환센터 (미토콘드리아 기능조절 질병치료 전략)

기 여 율 1/2

주관기관 인제대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2019.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013064737

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구)

연구과제명 합성 및 생체고분자를 이용한 치료용 생체모사 고분자 나노입자 개발 연구

기 여 율 1/2

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스와 상기 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스의 N-말단에 연결된 양이온성 올리고펩타이드를 유효성분으로 함유하며, 상기 양이온성 올리고펩타이드는 3량체의 히스티딘 펩타이드와 6량체의 아르기닌 펩타이드가 결합된 His₃-Arg₆ 또는 3량체의 히스티딘 펩타이드와 9량체의 아르기닌 펩타이드가 결합된 His₃-Arg₉에서 선택된 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 약물전달용 담체.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 약물전달용 담체는 미토콘드리아를 선택적으로 타겟팅하고 양친매성을 나타내어 세포막 통과 효율을 증가시킴으로써 미토콘드리아 내 약물 흡수율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 약물전달용 담체.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스와 양이온성 올리고펩타이드를 결합시킨 약물전달체로, 미토콘드리아를 선택적으로 타겟팅하며, 미토콘드리아 세포내로 흡수율을 증가시킬 수 있는 약물전달용 담체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 미토콘드리아는 에너지 합성 및 세포 수명에 있어서, 중요한 세포 내 소기관으로, 최근 미토콘드리아의 역기능에 의해 발병되는 것으로 알려진 알츠하이머와 같은 신경 퇴행성 질환, 헌팅턴병, 파킨슨병, 당뇨병, 암 및 노화관련 질환과 같이 다양한 질병들이 보고되어짐에 따라, 미토콘드리아에 대한 연구가 증가하고 있다.

[0003] 이러한 질병들을 치료하기 위한 방법으로, 약 또는 유전자와 같은 치료 생리활성 물질을 미토콘드리아로 전달함으로써 상기 질병의 치료 효과를 증진시킬 수 있다. 이에 따라, 선택적이며 효율적으로 미토콘드리아를 타겟팅할 수 있는 담체 시스템에 대한 연구의 필요성이 높아졌다.

[0004] 그러나, 미토콘드리아로 생리 활성물질을 운반하기 위해서는 플라스마 막과 미토콘드리아 막을 통과해야 하는데 기존의 미토콘드리아 약물전달용 담체는 이러한 세포 장벽 통과에 어려움을 겪고 있다. 또한 코돈 시스템을 포함한 미토콘드리아 유전자 발현 시스템은 다른 핵 유전자 시스템과 다르며 이들의 유전적 차이들은 미토콘드리아

아 특이적 코어 시스템의 발달에 방해가 된다.

- [0005] 이러한 문제점을 해결하기 위한 미토콘드리아 약물전달용 담체 연구는 담체 자체가 미토콘드리아에 영향을 주지 않는 물질이면서, 미토콘드리아를 정확하게 목표로 하여 세포막을 안전하게 통과함으로써, 약물을 효과적으로 전달할 수 있는 담체에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제 10-2005-0011288 호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 상기 문제점을 해결하기 위해서, 본 발명은 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스와 양이온성 올리고펩타이드를 유효성분으로 함유하는 약물전달용 담체를 제공함으로써, 미토콘드리아 타겟팅과 세포막 투과성을 증가시켜 미토콘드리아 세포내로 목적하는 약물의 흡수를 향상시킬 수 있는 약물전달용 담체를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스와 양이온성 올리고펩타이드를 유효성분으로 함유하는 약물전달용 담체를 제공한다.
- [0009] 상기 양이온성 올리고펩타이드는 1 내지 5 량체의 히스티딘 펩타이드와 1 내지 10 량체의 아르기닌 펩타이드가 결합된 올리고펩타이드일 수 있다.
- [0010] 상기 약물전달용 담체는 미토콘드리아를 선택적으로 타겟팅하고 양친매성을 나타내어 세포막 통과 효율을 증가 시킴으로써 미토콘드리아 내 약물 흡수율을 증가시킬 수 있다.
- [0011] 또한 본 발명은 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스; 양이온성 올리고펩타이드; 및 생리활성 물질 또는 약물 중 어느 하나를 유효성분으로 함유하는 미토콘드리아 질환 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0012] 상기 질환은 허혈성 뇌질환, 허혈성 심질환, 파킨스 질환, 알츠하이머 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성측색경화증(ALS), 미토콘드리아뇌근증, 자폐증, 우울증, 당뇨, 비만, 뇌졸중, 심장병, 동맥경화, 고혈압, 고콜레스테롤증, 비정형 페닐케톤뇨증 및 암질환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0013] 상기 약물은 항산화제 또는 항암제로써 레스베라트롤, 폴리페놀, 플라보노이드, 카로티노이드, 아스코르빈산, 알파 리포익산, 토코페롤, 파클리탁셀, 미토마이신, 블레오마이신, 시스플레틴, 독소루비신 및 5-플로로우라실로 이루어진 군에서 하나 또는 둘 이상으로 선택될 수 있다.
- [0014] 상기 생리활성 물질은 펩타이드, 단백질, 호르몬제 또는 유전자로써 인간성장호르몬, 백혈구성장인자, 적혈구성장인자, 대식세포 성장인자, 신경성장인자, 엔지오스테틴, 코르티솔, 인슐린, 갑상선 자극 호르몬, 글루카곤, 테트라하이드로바이오프테린, 단일 항체 및 백신류로 이루어진 군에서 하나 또는 둘 이상으로 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따르면, 미토콘드리아를 표적하는 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스와 세포막 투과성 및 흡수율을 증가시킬 수 있는 양이온성 올리고 펩타이드를 결합시켜 미토콘드리아 선택적 약물전달용 담체를 제공할 수 있다.
- [0016] 보다 상세하게는 상기 약물전달용 담체는 미토콘드리아를 표적으로 하는 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스를 통하여 선택적으로 미토콘드리아를 표적할 수 있으며, 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스에 결합된 히스티딘 및 아르기닌으로 구성된 양이온성 올리고 펩타이드는 수용성을 증가시키고, 약물전달용 담체에 양친매성을 갖게 하여 세포막 투과성 및 생리활성 물질 또는 약물의 세포내 흡수력을 증가시킬 수 있으므로, 안전하고 효과적으로 미토콘드리아 질환 치료 및 치료제 개발에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 FITC-MTS-H₃R₉의 화학적 구조로, 오른쪽 파란색으로 표시된 올리고-펩타이드 H₃R₉가 가운데 적색부분의 미토콘드리아 타겟팅 서열(MTS)의 N-말단과 연결되어있으며, 왼쪽의 녹색부분의 FITC는 미토콘드리아 타겟팅 서열(MTS)의 C-말단과 안정된 아미드산 연결자(Linker)를 통하여 연결되어있다.
- 도 2는 HeLa 세포에서 FITC-MTS 유도체들의 세포 내 위치화를 공초점 현미경을 이용하여 확인한 결과로, 모든 FITC가 결합된 펩타이드를 50nM 농도로 처리하였으며, 핵, FITC가 결합된 펩타이드 및 미토콘드리아를 각각 파랑, 녹색 및 적색으로 나타낸 공초점 현미경 이미지 결과이다.
- 도 3은 FITC-MTS-H₃R₉ 및 미토티랙커 CMXRos의 상대적 형광 강도 프로파일 결과이다.
- 도 4는 유동세포 분석기를 이용하여 HeLa 세포에서 FITC-MTS-H₃R₉의 세포 흡수 효율을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스와 양이온성 올리고펩타이드를 유효성분으로 함유하는 약물전달용 담체를 제공한다.
- [0019] 상기 양이온성 올리고펩타이드는 1 내지 5 량체의 히스티딘 펩타이드와 1 내지 10 량체의 아르기닌 펩타이드가 결합된 올리고펩타이드일 수 있다.
- [0020] 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스(mitochondria-targeting sequence; MTS)는 생리 활성 분자를 직접 미토콘드리아로 운반할 수 있는 물질로, 새로 합성된 전구체 단백질의 아미노산 말단에 위치하여 전구체 단백질을 미토콘드리아에 선택적으로 전달하는 운반체로 알려져있다.
- [0021] 상기 약물전달용 담체는 미토콘드리아를 선택적으로 타겟팅하고 양친매성을 나타내어 세포막 통과 효율을 증가 시킴으로써 미토콘드리아 내 약물 흡수율을 증가시킬 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 따르면, 도 2와 같이, 올리고 펩타이드로 변형된 MTS인 FITC-MTS-H₃R₆ 및 FITC-MTS-H₃R₉가 모두 미토콘드리아 세포질에서 유의하게 확인된 반면, 올리고 펩타이드로 변형되지 않은 FITC-MTS; MTS가 없는 올리고 펩타이드인 FITC-R₉ 및 FITC-H₃R₆는 세포질 내에서 발견되지 않았거나, 아주 적은 양으로 확인되었다.
- [0023] 또한 친수성을 나타내는 H₃R₆ 올리고 펩타이드 단위의 도입은 용해성과 양친매성을 증가시키기 위한 유용한 방법으로, 도 2의 공초점 현미경 결과에 의하면, 반복된 아르기닌 수와 관계없이 H₃R₆- 및 H₃R₉-변형된 MTS 펩타이드 모두 미토콘드리아에 광범위하게 내부화되어진 것을 확인하였다.
- [0024] 상기 결과로부터 양이온성 올리고 펩타이드 단위 및 MTS는 미토콘드리아 세포막 통과 및 세포 흡수를 증가시킬 수 있음이 확인되었다.
- [0025] 또한 본 발명은 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스; 양이온성 올리고펩타이드; 및 생리활성 물질 또는 약물 중 어느 하나를 유효성분으로 함유하는 미토콘드리아 질환 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0026] 상기 질환은 허혈성 뇌질환, 허혈성 심질환, 파킨스 질환, 알츠하이머 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성측색경화증(ALS), 미토콘드리아뇌근증, 자폐증, 우울증, 당뇨, 비만, 뇌졸중, 심장병, 동맥경화, 고혈압, 고콜레스테롤증, 비정형 폐닐케톤노증 및 암질환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0027] 상기 약물은 항산화제 또는 항암제로써 레스베라트롤, 폴리페놀, 플라보노이드, 카로티노이드, 아스코르빈산, 알파 리포익산, 토코페롤, 파클리탁셀, 미토마이신, 블레오마이신, 시스플레틴, 독소루비신 및 5-플로로우라실로 이루어진 군에서 하나 또는 둘 이상 선택될 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.
- [0028] 본 발명에 따른 약물전달용 담체는 약학적으로 유효한 양의 생리활성 물질을 추가로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 상기 생리활성 물질이 동물 또는 사람에게 투여되어 목적하는 생리학적 또는 약리학적 활성을 나타내기에 충분한 양을 말한다. 상기 약학적으로 유효한 양은 투여 대상의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [0029] 상기 “생리활성 물질”은 동물 또는 사람의 체내에서 생리적인 기능을 촉진 또는 억제하여 목적하는 생물학적 또는 약리학적 효과를 유도할 수 있는 물질로서, 동물 또는 사람에게 투여하기 적합한 화학적 또는 생물학적 물질 또는 화합물을 의미하며, (1) 감염 예방과 같은 원하지 않은 생물학적 효과를 예방하여 유기물에 대한 예방

효과를 가지고, (2) 질병으로 생기는 컨디션을 경감시키며, 예를 들어 질병의 결과로 생기는 고통 또는 감염을 완화시키며, (3) 유기물로부터 질병을 완화, 감소 또는 완전히 제거할 수 있는 역할을 수행할 수 있다. 또한, 상기 “생리활성물질”은 “약물” 또는 “치료제”의 용어와도 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0030] 상기 생리활성 물질은 펩타이드, 단백질, 호르몬제 또는 유전자로써 인간성장호르몬, 백혈구성장인자, 적혈구성장인자, 대식세포 성장인자, 신경성장인자, 엔지오스테틴, 코르티솔, 인슐린, 갑상선 자극 호르몬, 글루카곤, 테트라하이드로바이오프테린, 단일 항체 및 백신류로 이루어진 군에서 하나 또는 둘 이상 선택될 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.

[0031] 또한, 상기에서 “약학적으로 허용되는”이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 또한 본 발명에 따른 약물전달용 담체는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 약물전달용 담체는 상기 생리활성 물질의 목적하는 효과를 상승시킬 수 있는 공지의 화합물과도 병행하여 투여할 수 있다.

[0033] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0034] <실시예 1> His₃ - Arg₉ 결합된 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스(MTS) 펩타이드 합성 및 특성 분석

[0035] MTS-H₃R₉ 펩타이드 및 그 유사체에 형광 태그를 결합시켜 합성한 MTS 펩타이드를 Peptron (Daejeon, Korea)로부터 제공받아 사용하였으며, 상기 MTS-H₃R₉ 펩타이드 및 그 유사체는 이미 보고되어진 방법(Solid-Phase Synthesis: A practical guide, Kates S. A., Albericio F.(ed) CRC Press, 2000)으로 합성되었다. 또한 형광으로 표시된 MTS 펩타이드는 아미노헥사노익 산을 MTS 펩타이드에 FITC 태그 연결분자로 사용하였다.

[0036] 상기 형광으로 표시된 MTS 펩타이드를 포함한 모든 MTS 펩타이드를 순도 95% 이상으로 합성하고 정제하였으며 95%로 수득하여, 도 1 및 표 1의 FITC가 결합된 MTS-His₃Arg₉을 제작하였다. 합성된 MTS 펩타이드의 무게 및 전체 서열은 표 1과 같으며, FITC-MTS-H₃R₉의 구조는 도 1과 같다.

[0037] MTS-H₃R₉는 플라스마뿐만 아니라 미토콘드리아 막을 통과할 수 있도록 두 가지의 중요한 특성을 나타내도록 설계되어졌다.

[0038] 첫 번째, H₃R₉ 구성단위는 향상된 양성자 완충 능력을 통하여 플라스마 막을통과하는데 도움을 주며, 특히 양성자 특성을 나타내는 잔기들은 전하를 이용한 흡수 메커니즘을 통하여 물질의 세포내 이동을 가능하게 하였다.

[0039] 양성자를 포함하고 있는 히스티딘의 이미다졸기는 pK_a 6.0의 강한 양성자 활성으로 엔도솜-라이소솜(endosome-lysosome)상태의 혹독한 환경을 견뎌내는데 도움을 주고, 이와 함께 양성 전하를 띠는 아르기닌 단위의 구아니딘기는 세포내 수용을 용이하게 하며, MTS 시퀀스의 세포질 내재화 증가 효과를 나타내도록 하였다.

[0040] 두 번째, MTS 시퀀스는 미토콘드리아 수용체인 TOM22 및 TOM20와 상호작용하는 것으로 알려진 아르기닌 및 루이신 잔기를 포함하여 미토콘드리아를 특이적으로 타겟팅할 수 있게 하였다.

[0041] 그 결과, 체외 실험 전에 사용되는 전산 예측 시스템인 MITOPROT 분석 결과에서 MTS-H₃R₉은 거의 99% 이상으로 증가된 미토콘드리아 흡수 효율이 확인되었으며, 변형되지 않은 MTS보다 27% 개선된 미토콘드리아 흡수 효율을 나타내는 것으로 확인되었다.

표 1

펩타이드	서열	MS 추측	MS 확인
MTS	MLSLRQSI RFFKPATRTLCSRYLL-NH ₂	2985.65	2987
MTS-H ₃ R ₆	MLSLRQSI RFFKPATRTLCSRYLLHHHRRRRRR-NH ₂	4336.21	4336
MTS-H ₃ R ₉	MLSLRQSI RFFKPATRTLCSRYLLHHHRRRRRRRR-NH ₂	4801.74	4804
FITC-MTS	FITC-linker-MLSLRQSI RFFKPATRTLCSRYLL-NH ₂	3488.20	3490
FITC-MTS-H ₃ R ₆	FITC-linker-MLSLRQSI RFFKPATRTLCSRYLLHHHRRRRRR-NH ₂	4835.99	4838
FITC-MTS-H ₃ R ₉	FITC-linker-MLSLRQSI RFFKPATRTLCSRYLLHHHRRRRRRRR-NH ₂	5304.29	5306
FITC-R ₉	FITC-linker-RRRRRRRR-NH ₂	1924.49	1925
FITC-H ₃ R ₉	FITC-linker-HHHRRRRRRRR-NH ₂	2335.66	2336

<실시예 2> FITC가 결합된 MTS 펩타이드를 이용한 세포내 내재화 분석

2-1. 세포 배양 및 유지

사람 상피성 암종인 HeLa 세포를 T25 배양 용기에 10% 태아소혈청(FBS)가 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)배지에서 37°C, 5% 이산화탄소 조건의 습식배양기로 배양하였다.

또한 세포가 배양 용기의 70 내지 80% 합류되었을 때, 0.25% 트립신/EDTA 용액을 사용하여 계대 배양하였다.

2-1. 공초점 현미경(Confocal Microscopy) 및 미토타랙커 형광염색 분석

웰(well)당 5×10^3 HeLa 세포를 배양 슬라이드에 접종하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 세포에 50nM 형광 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate; FITC)로 변형된 MTS 유사체 또는 대조군 펩타이드를 처리하고 24시간 동안 추가 배양하였다.

24시간 후 배지를 버리고 세포를 조심스럽게 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)로 반복 세척하고 미토타랙커 염색을 위해 25 nM 미토타랙커 CMXRos(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 첨가한 후 15분간 인큐베이션하였다.

그 후 미토타랙커 용액을 제거하고 DPBS로 세포를 조심스럽게 세척하였다.

세척된 세포를 4% 파라포름알데하이드로 15분간 고정시키고 세포핵을 4'6-디아미노-2-페닐인돌(DAPI; Molecular probes, Eugene, OR, USA)로 8분간 염색한 후 DPBS로 세포를 조심스럽게 세척하였다.

슬라이드 글래스를 플라스틱 챔버에 올려놓고 봉입제(mounting medium, Dako, Carpinteria, CA)을 처리하고 세포 위에 커버 글래스를 덮어 Zeiss LSM 5 Live 공초점 레이저 현미경을 사용하여 형광 신호를 확인하였다.

FITC가 결합된 MTS 유사체의 여기 파장은 488nm 이었으며, 방출 파장은 530nm였다. 또한 미토타랙커 CMXRos는 579nm 여기 파장과 599 nm 방출 파장에서 확인되었다.

2-3. FITC가 결합된 MTS 펩타이드를 이용한 세포내 내재화 확인

세포 내 MTS 내재화를 확인하기 위해 실시예 2-2의 방법으로 도 2에 표시된 FITC가 결합된 펩타이드를 50nM 농도로 HeLa 세포에 처리하여 공초점 레이저 현미경분석을 수행하였다.

그 결과 도 2와 같이, 올리고 펩타이드로 변형된 MTS인 FITC-MTS-H₃R₆ 및 FITC-MTS-H₃R₉가 모두 미토타랙커에서 유의하게 확인된 반면, 올리고 펩타이드로 변형되지 않은 FITC-MTS; MTS가 없는 올리고 펩타이드인 FITC-R₉ 및 FITC-H₃R₆는 세포 내에서 발견되지 않았거나, 아주 적은 양으로 확인되었다.

상기 결과로부터 양이온성 올리고 펩타이드 단위 및 MTS 모두 내부화에 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다. 또한 올리고 펩타이드로 변형되지 않은 FITC-MTS은 낮은 수용성을 보였으며 이는 흡수 실패의 원인으로 분석되었다.

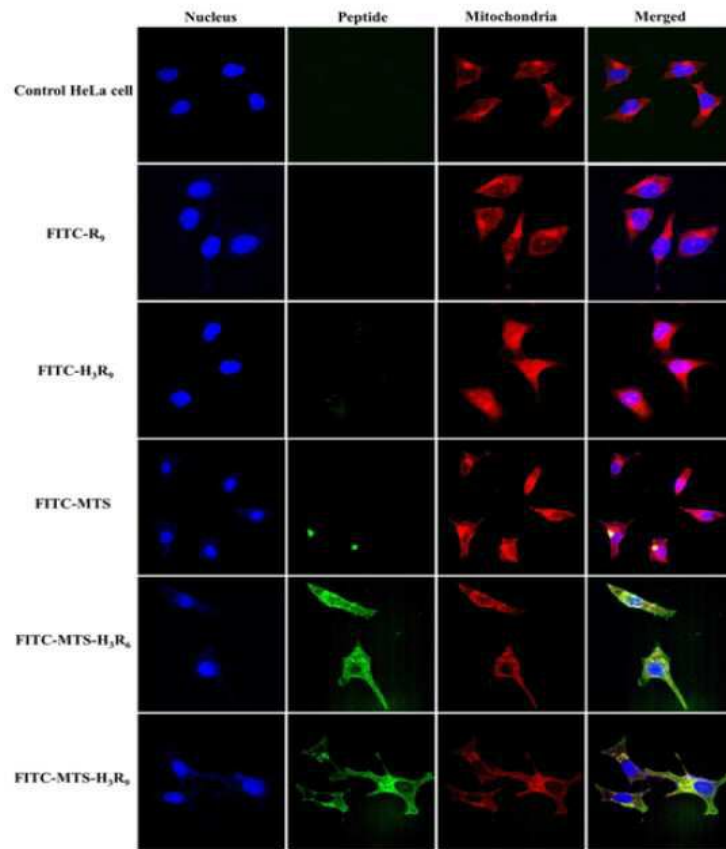
- [0058] 상기 결과를 통하여 미토콘드리아로 약물을 운반을 위해서는 운반체의 양친매성이 필수적인 것이 확인되었다.
- [0059] 따라서, 친수성을 나타내는 H_3R_6 올리고 펩타이드 단위의 도입은 용해성과 양친매성을 증가시키기 위한 유용한 방법으로 공초점 현미경 결과에 의하면, 반복된 아르기닌 수와 관계없이 H_3R_6 - 및 H_3R_9 -변형된 MTS 펩타이드 모두 미토콘드리아에 광범위하게 내부화되어진 것을 확인하였다.
- [0060] 또한 살아있는 세포내 미토콘드리아 막을 염색시키는 미토타렉터 CMXRos 염색분석 결과와 FITC-MTS- H_3R_9 의 상대적인 형광 강도 분석 결과, 도 3을 참고하면, 공초점 이미지에 표시된 적색 화살표 부분을 따라 각각의 높은 형광 강도를 나타내는 피크들이 뚜렷한 중첩을 확인하였다.
- [0061] 상기 결과로부터 MTS- H_3R_9 펩타이드가 미토콘드리아를 선택적 표적할 수 있음이 확인되었으며, 이를 통하여 미토콘드리아 선택적 전달용 펩타이드로 적합한 것이 확인되었다.
- [0062] <실시예 3> FITC-MTS- H_3R_9 의 세포 내 흡수 분석
- [0063] FITC-MTS- H_3R_9 의 세포 내 흡수율을 확인하기 위해 유동세포계수법을 시행하였다. 6-웰(well) 플레이트에 웰(well)당 5×10^4 HeLa 세포를 접종하고 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션한 후 0, 3.125 및 6.25 μM 농도의 FITC-MTS- H_3R_9 를 37°C에서 24시간 동안 처리하였다.
- [0064] 인큐베이션 후 DPBS로 세포를 조심스럽게 3번 반복 세척하여 배지에 남아있는 FITC-MTS- H_3R_9 를 제거하였다. 그 후에 트립신/EDTA 용액을 37°C에서 10분간 처리하여 플레이트 표면에서 세포를 분리하고 떨어져나온 세포를 50 μL DPBS로 재부유시킨 후 FACS Calibur flow cytometer (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ)를 이용하여 세포를 분석하였다.
- [0065] 그 결과 도 4와 같이 FITC-MTS- H_3R_9 의 형광 강도는 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다.
- [0066] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

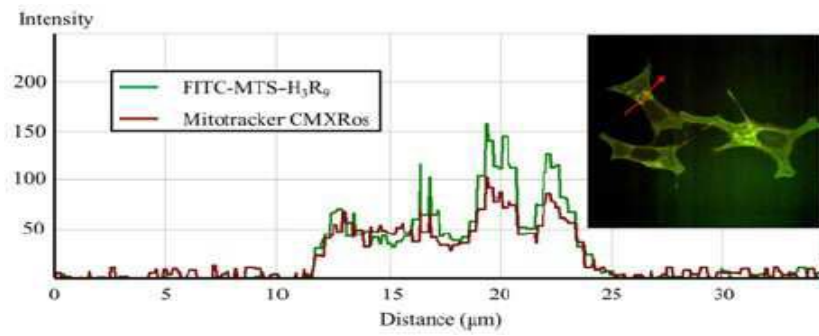
도면1



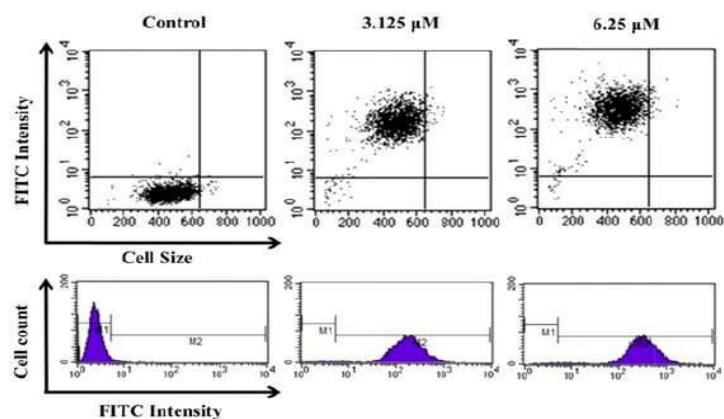
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
- <120> Carrier for drug delivery to mitochondria containing mitochondria targeting sequence and cationic oligopeptide
- <130> ADP-2014-0066
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> MTS
- <400> 1

Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg

1 5 10 15

Thr Leu Cys Ser Ser Arg Tyr Leu Leu

20

25