(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0102519
(43) 공개일자 2023년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/88 (2017.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/115 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/88 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0192719
(22) 출원일자 2021년12월30일
심사청구일자 2021년12월30일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
황병희
인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 15, 2304동 2701호
임두영
경기도 부천시 원종로 95, 가동 201호
(74) 대리인
차준용

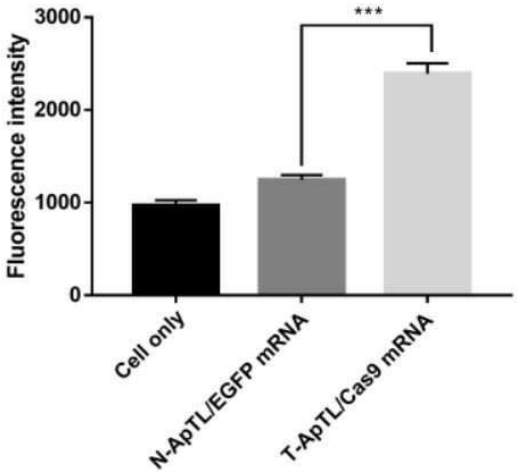
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체 및 그 용도**

(57) 요 약

본 발명은 사면체 DNA에 압타머(Aptamer)가 결합된 압타머-사면체 DNA에 리포좀이 연결된 압타머-사면체 DNA 고정 리포좀 (Aptamer-TDN immobilized liposome, ApTL)을 포함하는 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에서 고안한 압타머-사면체 DNA 고정 리포좀 (Aptamer-TDN immobilized liposome, ApTL)을 포함하는 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체는 암세포 뿐만 아니라 다양한 세포들에 특이적으로 다중 핵산을 전달할 수 있으며, 이를 응용하면 크리스퍼-캐스9 시스템에 의해 암 관련 유전자를 특이적으로 편집할 수 있다.

대 표 도 - 도3a



(52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
C12N 2310/16 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711144630
과제번호 2019R1F1A1063316
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기본연구지원사업
연구과제명 암치료를 위한 비바이러스 정밀 유전자 치료 원천기술개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2019.06.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711136843
과제번호 2021R1F1A1049608
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기본연구지원사업
연구과제명 비바이러스 나노복합체 매개 크리스퍼 유전자가위 기반 다중 형질전환 암 면역치료 기술개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2021.06.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

사면체 DNA에 압타머(Aptamer)가 결합된 압타머-사면체 DNA에 리포좀이 연결된 압타머-사면체 DNA 고정 리포좀(Aptamer-TDN immobilized liposome, ApTL)을 포함하는 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 압타머-사면체 DNA의 함량은 핵산 나노구조 복합체 전체 중량 대비 2.5 μg 내지 7.5 μg인 것을 특징으로 하는 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 압타머-사면체 DNA의 함량은 핵산 나노구조 복합체 전체 중량 대비 5.0 μg 내지 7.5 μg인 것을 특징으로 하는 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 압타머-사면체 DNA 고정 리포좀 (Aptamer-TDN immobilized liposome, ApTL)에 캐스9 mRNA와 가이드 RNA가 결합된 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 압타머-사면체 DNA 고정 리포좀 (Aptamer-TDN immobilized liposome, ApTL)는 압타머에 의해 세포 표면에 바인딩되고 세포 내로 전달되는 것을 특징으로 하는 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 캐스9 mRNA는 세포질로 빠져나와 캐스9 엔도뉴클레아제로 번역되는 것을 특징으로 하는 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 캐스9 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 RNA와 복합체를 형성하는 것을 특징으로 하는 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체.

청구항 8

상기 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체를 포함하는 암세포의 연구, 검출 및 치료 중 어느 하나 이상을 수행하는 조성물.

청구항 9

상기 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체를 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체를 세포에 전달하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체 및 그 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 전 세계적으로 사망률 2위에 해당이 되는 질병이다. 2020년 기준, 여성의 경우 유방암 (226만 명)이 가장 흔하게 발병이 되는 암이 되었고 뒤이어 폐암(221만 명), 간암(180만 명), 위암 (89만 명)이 차지하였다. 남성의 경우에는 폐암 (137만 명)이 1위를 차지하였으며 이어서 전립선암 (128만 명), 직장암 (101만 명), 위암 (68만 명)이 발병률이 높은 것으로 보고되었다. 전 세계의 인구 중 20%가 살면서 암이 걸리며, 그 중 10%는 암에 의해 사망을 한다고 알려져 있다.

[0003] 크리스퍼 캐스9 (Clustered Regularly interspace Short Palindromic Repeats, CRISPR-Cas9)이란 손쉽게 유전자 편집을 유도할 수 있는 기술로, 유전자 편집을 통해 많은 질병을 치료할 수 있는 잠재력을 가지고 있어 최근에 강력한 전략으로 대두되고 있다.

[0004] 암을 치료하는 데에 있어 기존의 화학적 약물 요법은 반복적으로 투여를 해줘야 될 뿐만이 아니라 독성이 높아서 환자의 삶의 질을 떨어트린다는 단점이 있다. 게다가 이러한 치료방법은 재발의 확률이 높고 약물에 대해 내성이 생기기가 쉽다.

[0005] 그에 비해 크리스퍼 유전자 가위를 이용한 치료 방법은 암과 관련된 유전자를 영구적으로 억제하기 때문에 화학적 약물과는 달리 반복적인 투여를 할 필요성이 적어진다. 그러나 이러한 크리스퍼 유전자 가위 시스템은 스스로 특정 세포에만 전달이 되는 타겟팅 능력이 부족하기 때문에 타겟이 아닌 유전자에서 유전자 편집이 일어나는 오프-타겟 효과(off-target effect)가 발생할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2016-0106507호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체 및 그 용도에 관한 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명자들은 크리스퍼 유전자 가위에 타겟팅 능력을 부여하기 위하여 사면체 DNA와 압타머를 이용한 나노캐리어 입자를 개발하였다. 압타머는 짧은 단일 가닥 DNA 혹은 RNA로 이루어져 있는 경우가 대부분이며, 특정 분자에 매우 높은 특이성으로 결합할 수 있다는 특징을 가지고 있다.

[0011] 따라서 지질 기반 나노입자에 압타머를 연결해 주면, 지질 기반 나노입자에 탑재가 된 분자들을 특정 세포에 특이적으로 전달할 수 있다.

[0012] 그러나 압타머를 직접적으로 지질 기반 나노입자에 붙여주게 되면 압타머 사이의 거리가 가까워지게 되고 이로 인해 압타머들끼리 불필요한 반응이 발생할 수 있다.

[0013] 따라서 본 발명에서는 압타머 사이에 발생할 수 있는 불필요한 반응을 없애고, 동시에 암세포 특이적 전달 효율을 높이기 위하여 압타머-사면체 DNA 고정 리포좀 (Aptamer-TDN immobilized liposome, ApTL)을 디자인 및 제작하였다.

[0014] 캐스9 mRNA와 가이드 RNA가 탑재가 된 ApTL은 압타머에 의해 암세포 표면에 특이적으로 바인딩이 되고 세포 내이입 (endocytosis)를 통해 세포 안으로 전달이 된다. 이어서 엔도좀 탈출 (endosomal escape)에 의해 세포질로 빠져나온 캐스9 mRNA는 캐스9 엔도뉴클레아제로 번역이 된다. 캐스9 엔도뉴클레아제는 가이드 RNA와 복합체를 형성하게 되고 최종적으로 핵 안으로 전달이 되어 유전자 편집을 유도하게 된다.

[0015] 구체적으로, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 사면체 DNA에 압타머(Aptamer)가 결합된 압타머-사면체 DNA에 리포좀이 연결된 압타머-사면체 DNA 고정 리포좀 (Aptamer-TDN immobilized liposome, ApTL)을 포함하는 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체를 제공한다.

[0016] 상기 압타머-사면체 DNA의 함량은 핵산 나노구조 복합체 전체 중량 대비 2.5 μg 내지 7.5 μg인 것을 특징으로 한다. 보다 바람직하게는, 상기 압타머-사면체 DNA의 함량은 핵산 나노구조 복합체 전체 중량 대비 5.0 μg 내지 7.5 μg인 것을 특징으로 한다.

[0017] 상기 압타머-사면체 DNA 고정 리포좀 (Aptamer-TDN immobilized liposome, ApTL)에 캐스9 mRNA와 가이드 RNA가 탑재될 수 있다. 이외에도 플라스미드, mRNA, siRNA, gRNA 등 다양한 연구, 진단 및 치료용 핵산들이 탑재 가능하다.

[0018] 상기 압타머-사면체 DNA 고정 리포좀 (Aptamer-TDN immobilized liposome, ApTL)는 압타머에 의해 세포 표면에 바인딩되고 세포 내로 전달되는 것을 특징으로 한다. 이때 특이적으로 전달될 수 있는 세포들은 암세포 뿐만 아니라 면역세포, 뼈세포, 연골세포, 신경세포, 피부세포, 근육세포, 분비세포, 지방세포, 혈세포, 줄기세포 등이 될 수 있다.

[0019] 상기 캐스9 mRNA는 세포질로 빠져나와 캐스9 엔도뉴클레아제로 번역되는 것을 특징으로 한다.

[0020] 상기 캐스9 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 RNA와 복합체를 형성하는 것을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명의 다른 실시형태는 상기 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체를 포함하는 암세포의 연구, 검출 및 치료 중 어느 하나 이상을 수행하는 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 실시형태는 상기 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체를 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체를 세포에 전달하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 사면체 핵산 나노구조 고정 리포좀 복합체를 이용하여 캐스9 mRNA와 가이드 RNA와 같은 다중 핵산을 암세포에 특이적으로 전달할 수 있는 기술이다. 이를 이용하여 백신 개발이나 유전자 진단 및 치료, 생명과학 연구 등이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 사면체 DNA를 합성한 후 아가로스 겔 전기영동을 통해 분석한 결과이다.

도 2는 MCF-7 유방암 세포에 mCherry-N1 플라스미드를 전달하여 형광세포계수기를 통해 형광 세기를 비교한 그래프이다. 통계 분석을 통해 통계적으로 유의미하게 차이가 있는 조건들 사이에는 스타(*)를 표시해 주었다

(***, P < 0.001).

도 3은 MCF-7 유방암 세포에 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescence protein, EGFP) mRNA를 전달하여 형광세포계수기를 통해 형광 세기를 비교한 (a) 그래프 및 (b) 이미지이다. 통계 분석을 통해 통계적으로 유의미하게 차이가 있는 조건들 사이에는 스타(*)를 표시해 주었다 (***, P < 0.001.).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 사면체 DNA에 압타머(Aptamer)가 결합된 압타머-사면체 DNA에 리포좀이 연결된 압타머-사면체 DNA 고정 리포좀 (Aptamer-TDN immobilized liposome, ApTL)을 포함하는 특이적 전달을 위한 핵산 나노구조 복합체를 제공한다.

[0027] 상기 압타머-사면체 DNA의 함량은 핵산 나노구조 복합체 전체 중량 대비 2.5 μg 내지 7.5 μg인 것을 특징으로 한다. 보다 바람직하게는, 상기 압타머-사면체 DNA의 함량은 핵산 나노구조 복합체 전체 중량 대비 5.0 μg 내지 7.5 μg인 것을 특징으로 한다.

[0028] 상기 압타머-사면체 DNA 고정 리포좀 (Aptamer-TDN immobilized liposome, ApTL)에 캐스9 mRNA와 가이드 RNA가 탑재될 수 있다. 이외에도 플라스미드, mRNA, siRNA, gRNA 등 다양한 연구, 진단 및 치료용 핵산들이 탑재 가능하다.

[0029] 상기 압타머-사면체 DNA 고정 리포좀 (Aptamer-TDN immobilized liposome, ApTL)는 압타머에 의해 세포 표면에 바인딩되고 세포 내로 전달되는 것을 특징으로 한다. 이때 특이적으로 전달될 수 있는 세포들은 암세포 뿐만 아니라 면역세포, 뼈세포, 연골세포, 신경세포, 피부세포, 근육세포, 분비세포, 지방세포, 혈세포, 줄기세포 등이 될 수 있다.

[0030] 상기 캐스9 mRNA는 세포질로 빠져나와 캐스9 엔도뉴클레아제로 번역되는 것을 특징으로 한다.

[0031] 상기 캐스9 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 RNA와 복합체를 형성하는 것을 특징으로 한다.

[0033] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0035] **실시예**

[0036] **실험방법**

[0037] *압타머-사면체 DNA 및 ApTL 복합체 형성*

[0038] 합성한 단일가닥 DNA a, b, c, 그리고 d 서열(Integrated DNA Technologies Inc.)을 TM 버퍼 (20 nM Tris, 50 mM MgCl2, pH 8.0)에 같은 몰수로 넣어주었다. Thermal cycler (BIO RAD Laboratories Inc.)를 이용하여 95℃에서 10분 동안 끓여준 뒤 천천히 온도를 내려준다. 합성된 사면체 DNA에 압타머 서열을 넣고 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션을 진행해 주었다.

[0039] Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific Inc.) 50 μL에 플라스미드 0.8 μg 혹은 mRNA 0.5 μg을 넣고 희석을 한다. 이어서 Opti-MEM 50 μL에 리포펙타민을 2.0 μL 혹은 1.0 μL을 넣고 희석을 한 뒤 상온에서 5분 동안 인큐베이션을 한다. 리포펙타민 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.)을 핵산에 추가를 한 뒤 다시 15-20분 동안 상온에서 인큐베이션을 한다. 합성한 압타머-사면체 DNA를 넣어준 뒤 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션을 하고 이어서 4℃에서 천천히 쉐이킹을 해주면서 1시간 동안 인큐베이션을 진행한다.

[0041] *아가로스 겔 전기영동*

[0042] 아가로스 (Bioshop Inc.)와 TAE 버퍼(Tris-Acetate 0.04 M, EDTA 0.001 M, pH of 8.2)을 이용해서 3%의 아가로스 겔을 만든다. 단일가닥 DNA a, b, c, d, 그리고 압타머 서열과 압타머-사면체 DNA 샘플에 6X 로딩 dye (Biofact)를 넣어준 뒤 각 웰에 샘플을 로딩 해준다. 겔 기록 시스템 LSG 1000(iNtRON biotechnology)으로 확

인한다.

[0044] *ApTL 복합체 세포 전달*

[0045] 10% FBS(Fetal bovine serum)와 1% 페니실린-스트렙토마이신(Life Technologies)이 포함되어 있는 DMEM(dulbecco's modified eagle's medium) 배지를 이용하여 인간 유방암 세포인 MCF-7과 MDA-MB-231 세포를 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양한다. 24-웰 플레이트에 MCF-7 세포는 1.0×10^5 세포/웰, MDA-MB-231 세포는 1.2×10^5 세포/웰 만큼 씨딩을 해준다. 오버나이트동안 37℃ 조건으로 5% CO_2 인큐베이터에서 배양한다. 배지를 DMEM에서 Opti-MEM으로 교체를 해준 뒤 합성한 복합체를 세포에 처리를 해준다. 플라스미드는 48시간 동안 처리를 하고, mRNA는 24시간 동안 처리를 한다.

[0047] *형광 세기 분석*

[0048] 플라스미드 혹은 mRNA를 전달한 세포에 Trypsin-EDTA (0.25%) (Thermo Fisher Scientific Inc.)를 처리하여 세포를 웰로부터 분리한다. 형광세포계수기 (Nanoentech)를 이용하여 형광세기를 분석한다.

[0050] **실험결과**

[0051] *압타머-사면체 DNA 복합체 합성 및 특성 분석*

[0052] 도 1은 사면체 DNA를 합성한 후 아가로스 겔 전기영동을 통해 분석한 것이다. 사면체 DNA를 구성하는 단일가닥 DNA a, b, c, d, 그리고 압타머 서열과 합성된 사면체 DNA를 3% 아가로스 겔에 로딩을 해준 뒤 상온에서 30분 동안 전기영동을 진행하였다.

[0053] 압타머-사면체 DNA 복합체 합성 후 아가로스 겔 전기영동을 통해 복합체 합성 정도를 분석하였다. 복합체를 형성하기 전의 단일가닥 DNA a, b, c, d, 압타머, 사면체 DNA 그리고 압타머-사면체 DNA를 각각의 웰에 로딩을 한 후 밴드의 위치를 비교하였다. 단일가닥 DNA는 전체적으로 50 bp 아래에 밴드가 관찰되는 것을 확인하였고, 압타머-사면체 DNA 복합체가 다른 단일가닥 DNA에 비해 높은 위치에서 밴드가 관찰되었다. 이를 통해 압타머-사면체 DNA 복합체가 잘 형성이 되었다는 것을 알 수 있었다(도 1).

[0055] *ApTL 최적화*

[0056] ApTL을 이용해 핵산의 최대 전달 효율을 얻기 위해 실험을 진행하였다(도 2). 도 2는 리포펙타민에 대해서 최적화를 한 실험이다. N-ApTL은 논-타겟팅 압타머가 연결이 된 복합체를 의미하며 T-ApTL은 타겟팅 압타머가 연결이 된 복합체를 의미한다. MCF-7 유방암 세포에 mCherry-N1 플라스미드를 전달하여 형광세포계수기를 통해 형광세기를 비교하였다. 통계 분석을 통해 통계적으로 유의미하게 차이가 있는 조건들 사이에는 스타(*)를 표시해 주었다 (***, $P < 0.001$).

[0057] 압타머-사면체 DNA의 무게에 대해 실험을 하였고, 그 결과 모든 조건에서 타겟팅과 논-타겟팅이 통계적으로 유의미하게 형광 세기가 차이 나는 것을 확인할 수 있었다. 특히 압타머-사면체 DNA를 5.0 μg를 처리해 준 조건에서 타겟팅이 논-타겟팅보다 형광 세기 차이가 약 3.7배로 가장 많은 차이가 발생하였다. 그 외 압타머-사면체 DNA를 2.5 μg 처리해 준 조건에서는 약 2.8배, 7.5 μg를 처리한 조건에서는 약 3.4배의 형광 세기 차이가 나타났다. 따라서 이후의 실험에서는 압타머-사면체 DNA의 양을 5.0 μg 조건으로 하여 실험을 진행하였다.

[0059] *mRNA 전달 및 발현 효율*

[0060] Cas9 mRNA를 전달하기에 앞서 형광 단백질 유전자가 인코딩이 되어 있는 mRNA를 ApTL을 이용해 전달하여 실제 단백질이 발현이 되는지 확인하는 실험을 진행하였다(도 3).

[0061] 도 3은 ApTL 복합체로 mRNA를 전달했을 때 단백질 발현이 잘 되는지 확인하기 위해 진행한 실험이다. MCF-7 유방암 세포에 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescence protein, EGFP) mRNA를 전달하여 형광세포계수기

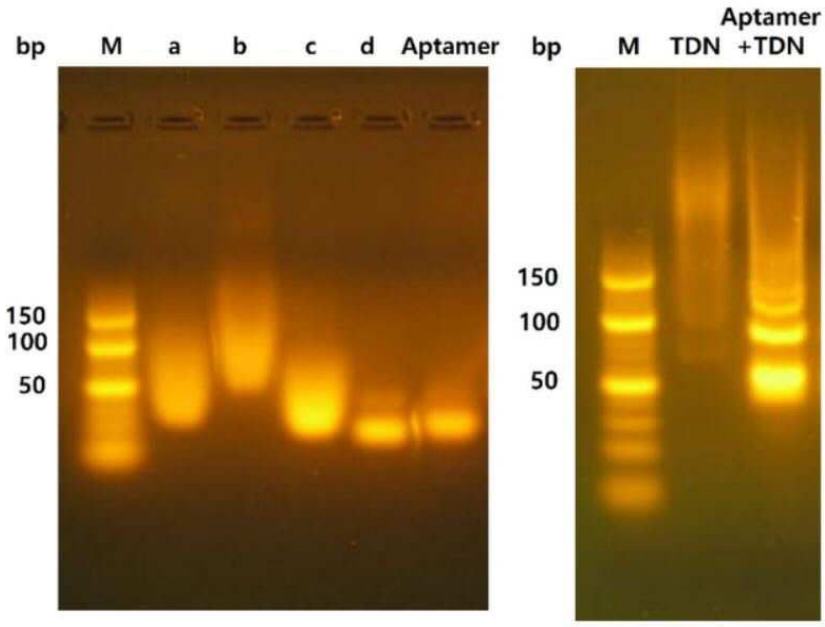
를 통해 형광 세기를 비교한 (a) 그래프 및 (b) 이미지이다. 통계 분석을 통해 통계적으로 유의미하게 차이가 있는 조건들 사이에는 스타(*)를 표시해 주었다 (***, P < 0.001.).

[0062] EGFP mRNA를 전달하여 형광 세기를 분석한 결과, 플라스미드가 아닌 mRNA를 전달하여도 세포가 단백질을 잘 발현한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 타겟팅과 논-타겟팅 사이에 형광 세기가 통계적으로 유의미하게 나타나는 것을 확인했고 타겟팅이 약 2배 더 형광 세기가 높은 것을 확인하였다.

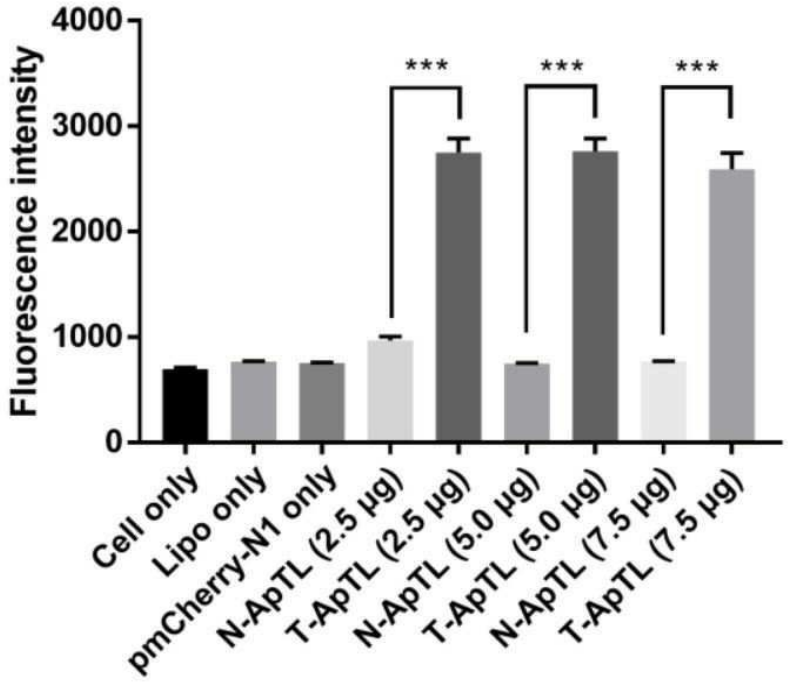
[0064] 이상, 본 발명의 일 실시예에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다고 할 것이다.

도면

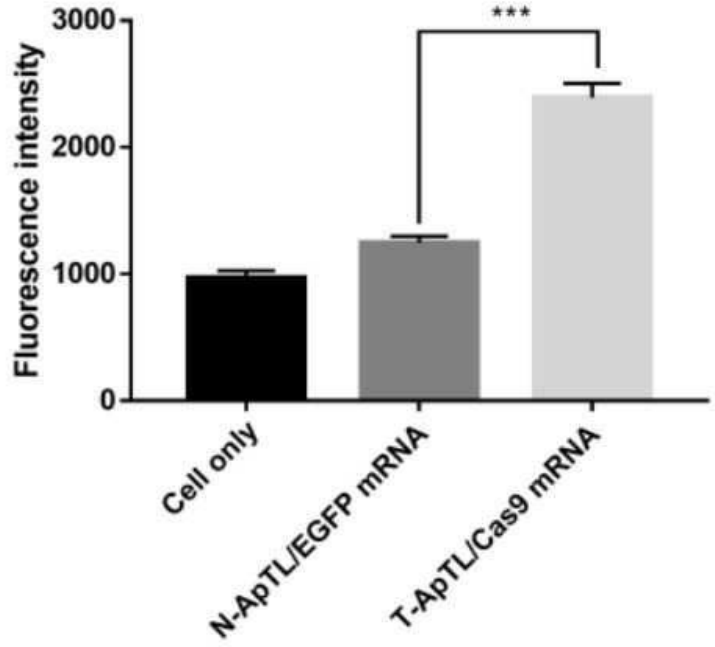
도면1



도면2


Fluorescence intensity
4000
3000
2000
1000
0
***
***
***
Cell only
Lipo only
pmCherry-N1 only
N-ApTL (2.5 μg)
T-ApTL (2.5 μg)
N-ApTL (5.0 μg)
T-ApTL (5.0 μg)
N-ApTL (7.5 μg)
T-ApTL (7.5 μg)

도면3a


Fluorescence intensity
3000
2000
1000
0
***
Cell only
N-ApTL/EGFP mRNA
T-ApTL/Cas9 mRNA

도면3b

