

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 7월 15일 (15.07.2021)



(10) 국제공개번호
WO 2021/141368 A2

(51) 국제특허분류:
A61K 47/54 (2017.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/000102

(22) 국제출원일: 2021년 1월 6일 (06.01.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0001256 2020년 1월 6일 (06.01.2020) KR
10-2021-0000730 2021년 1월 5일 (05.01.2021) KR

(71) 출원인: 주식회사 시선테라퓨틱스 (SEASUN THERAPEUTICS) [KR/KR]; 34015 대전시 유성구 테크노1로 11-3 #N503, N514, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 이동인 (LEE, Dong In); 34675 대전시 동구 동부로10번길 55 #103-2301, Daejeon (KR). 김혜주 (KIM, Hye Joo); 34080 대전시 유성구 노은서로 222 #101-1401, Daejeon (KR). 유지연 (YU, Ji-Yeon); 28193 충청북도 청주시 상당구 낭성면 인정1길 35, Chungcheongbuk-do

(KR). 강유선 (KANG, Yusun); 50898 경상남도 김해시 해반천로168번길 23 #411-303, Gyeongsangnam-do (KR). 박희경 (PARK, Hee Kyung); 34034 대전시 유성구 용산2로 30 #103-603, Daejeon (KR).

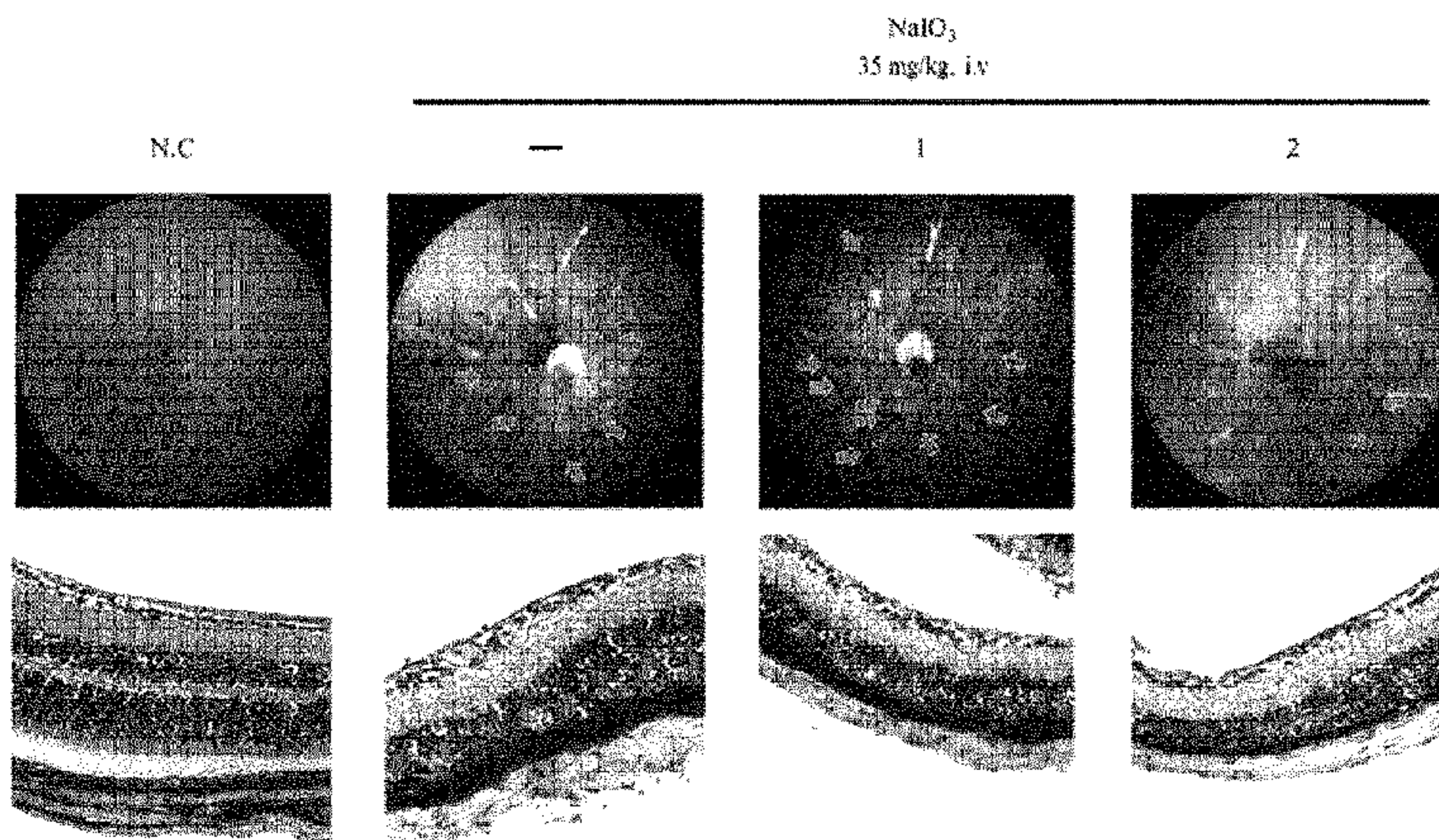
(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울시 강남구 언주로 430 16층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING MACULAR DEGENERATION, CONTAINING CELL PERMEABLE NUCLEIC ACID COMPLEX AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 세포 투과성 핵산 복합체를 유효성분으로 함유하는 황반변성의 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating macular degeneration, containing a cell permeable nucleic acid complex as an active ingredient and, more specifically, to a pharmaceutical composition for preventing, ameliorating, or treating macular degeneration, containing a cell permeable nucleic acid complex in which a bioactive nucleic acid targeting an NLRP3 gene and a carrier peptide nucleic acid are complementarily bound to each other. The cell permeable nucleic acid complex, in which the bioactive nucleic acid targeting the NLRP3 gene and the carrier peptide nucleic acid are complementarily bound to each other, according to the present invention, has high cell permeability and thus inhibits the expression of NLRP3 without direct injection, and thereby is useful for preventing, ameliorating, or treating macular degeneration.

(57) 요약서: 본 발명은 세포 투과성 핵산 복합체를 유효성분으로 함유하는 황반변성의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체를 함유하는 황반변성의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체는 세포 투과성이 높아 직접적인 주사투여 없이도 NLRP3의 발현을 억제함으로써, 황반변성의 예방, 개선 또는 치료에 유용하다.

[다음 쪽 계속]

WO 2021/141368 A2



LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 세포 투과성 핵산 복합체를 유효성분으로 함유하는 황반변성의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 세포 투과성 핵산 복합체를 유효성분으로 함유하는 황반변성의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 NLRP3 유전자를 표적하는 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체를 함유하는 황반변성의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 녹내장, 당뇨병성 망막병증과 함께 3대 실명질환으로 꼽히는 황반변성은 크게 습성 (삼출성) 황반변성과 건성 (비삼출성) 황반변성으로 분류된다. 망막 중심부에 위치한 신경조직인 황반은 시력에 중요한 역할을 하는 곳으로 특히 건성 황반변성의 경우 나이가 들면서 드루젠 (drusen)의 축적으로 망막 및 맥락막 위축이 나타나는 질환으로 시력에는 영향을 주지 않지만 습성 황반변성으로 진행할 수 있어 주의가 필요한 질환이다. 대부분 노화로 인해 발생하여 노인성 질환으로 여겼으나 최근에는 청장년층에서도 발병이 증가하는 추세로, 2011-2015년의 황반변성 환자는 5년 사이에 49% 가량이 증가하였다(건강보험심사평가원). 황반변성의 주요 원인은 노화이며, 그 다음으로 유전적인 요인, 그리고 환경적 요인으로서는 자외선, 흡연, 고지방·고열량의 서구화 식단 등이 꼽히고 있다.
- [4] 일반적인 건성(비삼출성) 황반변성의 치료방법에는 황반변성의 진행을 늦추는 것으로 알려진 항산화 비타민제의 복용을 하고, 황반변성의 위험인자인 고혈압, 고지혈증 등에 대한 치료와, 흡연 및 자외선 차단과 같은 생활치료가 병행된다. 건성 (비삼출성) 황반 변성에서 습성 (삼출성) 황반변성으로 진행되는 경우, 시력보존을 위한 적극적인 치료가 필요하다. 변성이 일어난 부위의 경계를 명확히 알 수 있는 경우는 열레이저광응고술을 시행하며, 광역학치료, 항체주사, 유리체절제술 등을 시행하나 아직까지 완전한 치료법은 없고 이에 관한 활발한 연구가 진행 중이다.
- [5] 건성 (비삼출성) 황반변성에서 습성 (삼출성) 황반변성으로 진행되는 경우의 치료방법은 일반적으로 열레이저응고술을 시행하여 장기적인 시력저하를 예방하지만, 레이저치료 후 즉시 망막을 손상시켜 시력이 감소되는 문제점이 있다. 그 후 이러한 문제점을 보완하기 위해 약물과 레이저를 함께 사용하는 광역학치료 (Photodynamic therapy, PDT)가 개발되어 신생혈관성 병변을 안정화시키는데 도움이 되기는 하지만, 치료의 적응에 제한이 있고, 치료약이

비싸며 재치료를 필요로 하는 경우가 많은 단점이 있다.

- [6] 최근에는 항 혈관내피성장인자 항체 (Anti-VEGF antibody)를 눈 속으로 주사하는 방법이 주로 사용되고 있다. 대표적인 약물에는 아플리버셉트 (아일리아), 라니비주맙 (루센티스), 베바시주맙 (아바스틴)이 있다. 앞의 치료에 비해 많은 수의 환자에서 시력 유지가 가능하며 일부에서 시력의 호전이 가능하다고 보고되고 있다. 그러나 4주 내지 8주 마다 반복적으로 주사를 시행해야 한다는 불편이 있으며 고가라는 단점이 있다.

[7]

- [8] 한편, NLRP3는 염증반응에 관여하는 단백질로서, IL-1 β , IL-18 발현에 주요한 역할을 한다. NLRP3(NOD-like receptor family, pyrin domain-containing 3)는 caspase-1 활성화 복합 단백질 복합체인 인플라마솜 (Inflammasome)을 구성한다. 상기 인플라마솜은 감각 단백질(sensor protein)인 NLRP3(NOD-like receptor family, pyrin domain-containing 3); 연결 단백질(adaptor protein)인 ASC(adaptor protein apoptosis-associated spec-like protein containing a caspase-recruitment domain); 및 이펙터 단백질인 pro-caspase-1로 구성되는 것으로 알려져 있으며, 조립에 의해 활성화된 Inflammasome은 caspase-1을 활성화시켜 IL-1 β 또는 IL-18을 분비하여 염증반응을 유발한다. NLRP3 inflammasome 활성화와 망막질환(건성, 습성 노인성 황반변성)과의 연관성은 종래의 여러 문헌에서 보고된 바 있다(Lucia Celkova, et al., NLRP3 Inflammasome and Pathobiology in AMD, J Clin Med. 2015 Jan; 4(1): 172-192). 또한, 건성 (비삼출성) 황반변성은 과도한 양의 드루젠이 존재한다는 특징이 있으며, Sarah Doyle 및 Matthew Campbell은 황반에 축적된 드루젠이 염증반응을 통해 IL-18, IL-1 β 의 생성으로 이어질 수 있고, IL-18 등에 의해 건성 황반변성에서 습성 황반변성으로 진행될 수 있다고 보고한 바 있다. 또한, NLRP3는 AluRNA의 축적, Dicer-1의 손실과 연관되어 있으며, NLRP3 inflammasome과 더불어 caspase-1의 활성화로 망막 색소상피 위축(retinal pigment epithelial degeneration)을 일으켜, 이는 *in vivo* 상에서 지도형위축과 매우 흡사한 양상을 나타낸다고 보고된 바 있다(Valeria Tarallo et al., Cell 2012 May 11;149(4):847-59).

[9]

- [10] 다른 한편, 전통적인 약제와 다르게 핵산 약제는 표적 특이적 전령 RNA(messenger RNA, mRNA)의 발현을 억제하므로, 단백질을 표적으로 하는 기존 약제로 치료가 불가능 했던 연구 영역을 다룰 수 있게 되었다(Kole R. 등 Nature Rev. Drug Discov. 2012; 11; 125-140., Wilson C. 등 Curr. Opin. Chem. Bio. 2006; 10: 607-614.). 약제로서의 성능 및 장점으로 인하여 핵산을 이용한 다양한 임상시험이 진행되고 있고, 증가하는 핵산 기반 치료제의 용도에도 불구하고 세포내 도입을 위한 운반체의 사용은 극히 제한적이다. 예를 들어, 나노입자(nanoparticle), 양성 리포솜(cationic liposome) 및 폴리머 나노입자(polymeric nanoparticle)를 사용하는 올리고 핵산을 기반으로 하는

약제의 세포 또는 조직 내로의 운반 전략(방법)을 사용한 임상시험이 진행되고 있으나, 대다수의 경우 운반 시스템을 포함하지 않고, 비경구적인 방법인 근육주사, 안구(ocular) 투여, 피하주사 등의 투여 경로(administration route)로 핵산의 직접 도입이 주를 이루고 있다.

- [11] 또한, 올리고 핵산 자체의 세포막 투과 능력은 상당히 낮으며, 특히 DNA 또는 RNA는 음전하를 띄고 있기 때문에, 세포의 소수성 인지질 이중막을 통과하지 못하므로 단순 핵산을 통한 세포 내 전달이 어렵다. 레트로바이러스(Retrovirus) 혹은 AAV(adeno-associated virus) 등의 바이러스 운반체의 사용은 올리고 핵산의 세포내 도입을 가능하게 하지만, 의도치 않은 면역활성과 발암유전자(oncogene)의 재조합 가능성 등의 위험성이 있다(Couto L. B. 등 Curr. Opin. Pharmacol. 2010, 5; 534-542.).
- [12] 이러한 이유로 세포독성이 적고, 면역활성이 낮은 비-바이러스성 올리고 핵산을 기반으로 하는 핵산 운반체 개발의 중요성이 더욱 커지고 있으며, 그 결과로 양전하성 지질(cationic lipid), 리포솜(liposome, 안정된 핵산 지질 입자(stable nucleic acid lipid particle, SNALP), 폴리머 및 세포-투과 입자(cell-penetrating peptide)를 이용한 세포 도입 기법이 개발되고 있다(Zhi D. 등 Bioconjug. Chem. 2013, 24; 487-519., Buyens K. 등 J. Control Release, 2012, 158; 362-70., ROSSI, J. J. 등 Gene Ther. 2006, 13: 583-584., Yousefi A. 등 J. Control Release, 2013, 170; 209-18., Trabulo S. 등 Curr. Pharm. Des. 2013, 19; 2895-923.).
- [13] 이러한 핵산전달 기법은 기능성 잔기를 직접적인 결합으로 가지고 있으며, 복합체 형성을 위한 단계를 포함하고, 리포솜(liposome) 구조의 엔도솜 에스케이프(endosome escape) 효율 및 생체독성 등의 문제점을 가지고 있어, 올리고 핵산 도입 기능의 향상과 제조 절차 및 부작용과 관련된 문제점의 해소가 필요하다.
- [14] 이와 관련하여, 본 발명자들은 생활성 핵산과 전체적으로 양전하를 가지도록 변형된 캐리어 펩티드 핵산(Carrier Peptide Nucleic Acid)이 상보적으로 결합된 핵산 복합체가 세포 투과성(cell permeability)이 놀랍게 향상되며, 이를 이용하여 표적 유전자의 발현을 매우 효율적으로 조절할 수 있음을 확인하고, 이러한 세포 독성이 낮고, 생활성 핵산의 세포투과성 및 유전자 발현 조절능력이 향상된 새로운 구조체에 대한 특허를 등록받은 바 있다(대한민국 특허 제10-1963885호).
- [15] 상기 구조체 및 치료용 약물 등의 세포 전달 기능이 향상에 대한 연구를 지속적으로 수행한 결과, 본 발명자들은 생활성 핵산(Bioactive Nucleic Acid)과 전체적으로 양전하를 가지도록 변형된 캐리어 펩티드 핵산(Carrier Peptide Nucleic Acid)이 상보적으로 결합된 핵산 복합체가 피부 및 세포를 매우 효율적으로 통과하는 특성을 가지고 있어, 이러한 핵산 복합체가 세포 투과성이 우수함을 확인하였다.
- [16]
- [17] 이에, 본 발명자들은 안구 세포 투과성을 향상시켜서 직접적인 주사 투여 없이,

안구 점안액투여와 같은 간단한 방법으로 황반변성을 효과적으로 치료할 수 있는 핵산 복합체를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체가 황반변성의 예방 또는 치료에 우수한 효과를 나타냄을 규명하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[18]

[19] **발명의 요약**

[20] 본 발명의 목적은 세포 투과성이 높고 황반변성의 예방 또는 치료 효과가 우수한 핵산 복합체를 유효성분으로 함유하는 황반변성의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[21] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산 (Bioactive Nucleic Acid); 및 캐리어 펩티드 핵산 (Carrier Peptide Nucleic Acid)이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체를 유효성분으로 함유하는 황반변성의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[22] 본 발명은 또한, 상기 세포 투과성 핵산 복합체를 투여하는 단계를 포함하는 황반변성의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[23] 본 발명은 또한, 상기 세포 투과성 핵산 복합체를 황반변성의 예방 또는 치료에 사용하는 용도를 제공한다.

[24] 본 발명은 또한, 황반변성의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 세포 투과성 핵산 복합체의 용도를 제공한다.

[25]

도면의 간단한 설명

[26] 도 1은 핵산 복합체의 투여 후, 시간(24시간, 48시간, 72시간, 96시간 및 120시간)에 따른 NLRP3 및 하위단계의 유전자 발현 변화를 확인한 웨스턴 블랏 분석 결과이다. 각 레인의 복합체(1, 2, 3, 4, 5)는 표 4에 개시되어 있다.

[27] 도 2a는 표 5의 핵산복합체를 건성 사람 유래 망막색소상피 세포주에 처리한 후, 시간(1일, 3일 및 5일)에 따른 NLRP3의 발현 변화를 확인한 면역세포화학 염색법으로 분석한 결과이다.

[28] 도 2b는 표 5의 핵산복합체를 건성 사람 유래 망막색소상피 세포주에 처리한 후, 시간(1일, 3일 및 5일)에 따른 하위단계 유전자(Caspase-1)의 발현 변화를 확인한 면역세포화학 염색법으로 분석한 결과이다.

[29] 도 3은 황반 변성이 유도된 마우스에서 표 6의 핵산 복합체를 함유하는 안구점안액을 투여한 후, 2주 뒤에 광현미경으로 관찰한 망막 조직 사진이다. 핵산 복합체 처리군에서 망막색소상피세포의 손상이 억제되고 외과립층과 내과립층의 붕괴 현상이 완화되었다.

[30] 도 4는 황반 변성이 유도된 마우스에서 표 6의 핵산 복합체를 함유하는 안구점안액을 투여한 후, 4주 뒤에 광현미경으로 관찰한 망막 조직 사진 및,

안저 촬영을 통해 확인한 드루젠의 축적과 맥락막 위축부위를 image J로 수치화한 그래프이다.

[31] 도 5a는 황반 변성이 유도된 마우스에서 표 7의 핵산 복합체를 함유하는 안구점안액을 투여한 후, 2주 뒤에 광현미경으로 관찰한 망막 조직 사진이다.

[32] 도 5b는 황반 변성이 유도된 마우스에서 표 7의 핵산 복합체를 함유하는 안구점안액을 투여한 후, 2주 뒤에 확인한 망막 절편 사진이다.

[33]

[34] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[35] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[36]

[37] 황반변성은 실명 원인 1위를 유지하고 있으며 이는 건강한 노년의 삶을 위협하고 있다. 건성 황반변성은 드루젠의 존재 여부, 드루젠의 크기 및 개수 그리고 지도형 위축의 존재 여부와 침범범위에 따라 초기, 중기, 후기의 황반변성으로 구분한다. 건성 황반변성 환자의 약 10%는 습성 황반변성으로 진행되는 것으로 알려져 있으며, 최종적으로는 실명에 이를 수 있어, 건성 황반변성 치료제의 개발이 매우 중요하다. 현재 건성 황반 변성이 발병한 경우에, 항산화 비타민제의 복용, 황반변성의 위험인자인 고혈압, 고지혈증 등에 대한 치료 및 흡연 및 자외선 차단과 같은 생활치료와 같이, 병의 치료보다는 현상 유지 및 습성 황반변성 등으로의 병의 진행을 억제하는 데 의미가 있으며, 효과적인 치료제는 전무한 실정이다.

[38] 본 발명에서는 NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체가 황반변성의 예방 및 치료에 활용될 수 있음을 확인하였다.

[39] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명자들의 대한민국 등록특허 제10-1963885호를 기반으로, NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체를 인간 망막색소 상피세포에 처리한 경우에, 효과적으로 NLRP3 및 하위단계 유전자의 발현이 억제되는 것을 확인하였으며, 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 핵산 복합체를 안구에 투여한 마우스에서, 망막색소상피세포의 손상이 억제될 뿐만 아니라, 외과립층과 내과립층의 붕괴 현상이 완화되는 것을 확인하였다.

[40]

[41] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산 (Bioactive Nucleic Acid); 및 캐리어 펩티드 핵산 (Carrier Peptide Nucleic Acid)이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체를 유효성분으로 함유하는

황반변성의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[42] 본 발명에 있어서, 생활성 핵산과 캐리어 펩티드가 상보적으로 결합된 핵산 복합체는 하기 구조식 (1)의 구조를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[43] 구조식 (1)

[44] $[A \equiv C(+)]$

[45] 상기 구조식 (1)에 있어서,

[46] A는 목적하는 유전자와 결합할 수 있는 서열을 가지는 생활성 핵산(Bioactive Nucleic Acid)이고,

[47] C는 생활성 핵산과 결합할 수 있는 캐리어 펩티드 핵산(Carrier Peptide Nucleic Acid)이고,

[48] '='는 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산 간의 상보적인 결합을 의미하며,

[49] A로 표시되는 생활성 핵산은 전체적으로 음전하 또는 중성을 가지며,

[50] C(+)는 캐리어 펩티드 핵산이 전체적으로 양전하를 가진다는 것을 의미하며,

[51] 캐리어 펩티드 핵산은 캐리어 펩티드 핵산 전체적으로 양전하를 띠도록 변형된 펩티드 핵산 단량체를 하나 이상 포함한다.

[52] 본 발명에 따른 핵산 복합체에서의 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산은 역평행결합(anti-parallel binding) 또는 평행결합(parallel binding) 형태를 가질 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 핵산의 상보적인 결합 형태는 생활성 핵산의 목적서열(생활성 핵산과 상보적인 서열) 존재 하에서 분리될 수 있다.

[53] 본 발명에 있어서, 상기 캐리어 펩티드 핵산은 캐리어 펩티드 핵산 전체적으로 양전하를 띠도록 1개 이상의 gamma- 또는 alpha-backbone 변형 펩티드 핵산 단량체를 하나 이상 포함하는 것이 바람직하며, 상기 gamma- 혹은 alpha-backbone 변형 펩티드 핵산 단량체는 양전하를 가지는 아미노산을 가지는 단량체가 음전하를 가지는 아미노산을 가지는 단량체에 비해 더 많이 포함되어 전체적인 캐리어 펩티드 핵산의 전하가 양성이 되도록 하는 것이 더욱 바람직하다.

[54]

[55] 본 발명에 있어서, "생활성 핵산"은 생체외(in vitro) 또는 생체내(in vivo)에서 표적 유전자, 및 이를 포함하는 염기서열과 결합하여 해당 유전자의 고유 기능(예를 들어, 전사체(transcript) 발현 또는 단백질 발현)을 활성화시키거나 또는 저해하거나, pre-mRNA의 스플라이싱(splicing)을 조절(예를 들어, 엑손스킵핑(exon skipping) 하는 등의 기능을 수행하며, 상기 염기서열은 유전자 조절부위(gene regulatory sequence) 또는 유전자 부위(gene coding sequence) 또는 스플라이싱 조절 부위(splicing regulatory sequence)인 것을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게는, 상기 생활성 핵산은 발현을 감소시키고자 하는 목적하는 표적 유전자와 결합할 수 있는 상보적인 서열, 특히 그러한 목적하는 표적 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 상보적인 서열을 가지는 핵산으로, 해당 유전자의 발현을 억제하는 등의 유전자 발현조절에 관여하는 핵산을 의미하며, 발현을

감소시키고자 하는 표적 유전자에 상보적인 서열을 가지는 핵산일 수 있다.

[56] 따라서, 본 발명에서의 "생활성 핵산(Bioactive Nucleic Acid)"은 황반변성의 관련 표적 유전자인 NLRP3(NOD-like receptor family, pyrin domain-containing 3) 유전자의 안티센스 펩티드 핵산인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 하기 표 1의 서열번호 4의 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[57]

[58] [표1]

구분	서열번호	염기서열	단량체 변형
생활성 핵산	서열번호 4	5'-TCG ⁽⁻⁾ AT ⁽⁺⁾ CAT ⁽⁻⁾ TA ⁽⁺⁾ GCG ⁽⁻⁾ TG-O-K-3'	-+--+

[59]

[60] 상기 생활성 핵산은 DNA, RNA, 또는 변형된 핵산인 PNA(peptide nucleic acid), PMO(phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide), LNA(locked nucleic acid), GNA(glycol nucleic acid) 및 TNA(threose nucleic acid), 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide), 앵타머(aptamer), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), 리보자임(ribozyme) 및 DNAzyme로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 상기 생활성 핵산은 DNA, RNA, 또는 변형된 핵산인 PNA(peptide nucleic acid), PMO(phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide), LNA(locked nucleic acid), GNA(glycol nucleic acid) 및 TNA(threose nucleic acid)로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[61] 본 발명에 있어서, "캐리어 펩티드 핵산"은 생활성 핵산과 일부 혹은 전부의 염기가 상보적으로 결합하여 기능성을 부여하는 핵산을 의미하며, 본 발명에서 사용되는 캐리어 펩티드 핵산은 펩티드 핵산(PNA : Peptide Nucleic Acid) 뿐 아니라, 이와 유사한 변형된 핵산을 사용할 수 있으며, 펩티드 핵산이 바람직하지만, 이에 한정되는 의미는 아니다.

[62] 특히, 본 발명에 있어서, 상기 캐리어 펩티드 핵산은 하기 표 2의 서열번호 5 내지 11로 구성된 군에서 선택되는 서열로 표시되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[63]

[64] [표2]

구분	서열 번호	엔도좀탈출 펩타이드	염기서열	단량체 변형
캐리어 펩티드 핵산	5	Histidine(10)	5'-Histidine(10)-O- TGGA ⁽⁺⁾ GATG ⁽⁺⁾ CGTT ⁽⁺⁾ AGG-O-K-3'	+++
	6	-	5'-TGGA ⁽⁺⁾ GATG ⁽⁺⁾ CGTT ⁽⁺⁾ AGG-O-K-3'	+++
	7	Histidine(10)	5'-K-O-CA ⁽⁺⁾ CG ⁽⁺⁾ C-O-Histidine(10)-3'	++
	8	Histidine(10)	5'-Histidine(10)-O-CG ⁽⁺⁾ CA ⁽⁺⁾ C-O-K-3'	++
	9	Histidine(10)	5'-K-O-CA ⁽⁺⁾ CGCTA ⁽⁺⁾ ATGAT ⁽⁺⁾ CGA-O- Histidine(10)-3'	+++
	10	Histidine(10)	5'-Histidine(10)-O- AGC ⁽⁺⁾ TAGTA ⁽⁺⁾ ATCGC ⁽⁺⁾ AC-O-K-3'	+++
	11	-	5'-AGC ⁽⁺⁾ TAGTA ⁽⁺⁾ ATCGC ⁽⁺⁾ AC-O-K-3'	+++

[65]

[66] 본 발명에 있어서, 상기 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산은 포스포디에스테르(phosphodiester), 2'0-메틸(2'0-methyl), 2' 메톡시-에틸(2' methoxy-ethyl), 포스포르아미데이트(phosphoramidate), 메틸포스포네이트(methylphosphonate) 및 포스포로티오에이트(phosphorothioate)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 작용기를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[67]

[68] 본 발명에 있어서, "세포 투과성 핵산 복합체"는 세포 외 처리를 통해 생활성 물질을 체내, 궁극적으로 세포 내로 침투시킬 수 있으며, 구체적으로, 세포 내로 NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산을 전달할 수 있는 능력을 가진다.

[69] 본 발명에 따른 세포 투과성 핵산 복합체에서의 전체적인 전하량(net charge) 및/또는 핵산 복합체에서의 생활성 핵산 및/또는 캐리어 펩티드 핵산의 개수 등에 따라 안구에 잔류하거나, 세포를 통과하여 체내로 전달될 수 있다

[70] 이에 따라 본 발명에 있어서, 상기 핵산 복합체는 안구 잔류성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[71] 특히, 본 발명에 따른 "세포 투과성 핵산 복합체"는 세포 내로의 직접 투여 이외에도, 안구 위 점안, 망막 내 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여,

피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 또는 경피 투여 등을 통해 목적하는 세포 내, 본 발명에서는 안구세포 내로 전달될 수 있는 특성을 가지며, 상기 핵산 복합체를 함유하는 어떠한 형태로도 이용될 수 있다.

[72] 본 발명에 있어서, 상기 세포 투과성 핵산 복합체는 서열번호 2로 표시되는 생활성 핵산; 및 서열번호 3 내지 7로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 서열로 표시되는 캐리어 펩티드 핵산을 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[73] 또한, 상기 NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산의 결합력(융해온도, melting temperature, T_m)은 생활성 핵산과 생활성 핵산의 표적인 NLRP3 유전자와의 결합력보다 낮은 것을 특징으로 할 수 있다.

[74] 상기 결합력은 생활성 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산은 각각의 핵산의 5'-방향성 및 3'-방향성에 따라 평행 결합(Parallel binding) 또는 부분 특이결합(Partial specific binding)함으로써, 생활성 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산의 결합력(융해온도, melting temperature, T_m)이 생활성 핵산과 생활성 핵산의 목적하는 유전자와의 결합력보다 낮게 할 수 있다.

[75]

[76] 본 발명에 있어서, 생활성 핵산 또는 캐리어 펩티드 핵산은 각각의 핵산의 5'-말단 또는 3'-말단에 엔도솜 탈출을 도와주는 물질이 추가로 결합된 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산의 엔도솜 탈출(endosome escape)을 도와주는 물질을 더 포함하여 하기 구조식 (2)의 구조를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[77] 구조식 (2)

[78] $[mA \equiv mC(+)]$

[79] 상기 구조식 (2)에 있어서,

[80] 'm'은 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산의 엔도솜 탈출(endosome escape)을 도와주는 물질을 의미한다.

[81] 본 발명에 있어서, "엔도솜 탈출을 도와주는 물질"은 엔도솜 내부의 삼투압을 증가시키거나, 엔도솜의 막을 불안정화 시키는 방법에 의하여 생활성 핵산의 엔도솜에서 탈출을 도와주는 것을 특징으로 할 수 있다. 생활성 핵산이 보다 효율적이고 빠르게 핵이나 세포질로 이동하여 표적 유전자를 만나 작용하도록 도와주는 것을 의미한다(D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, P. S. Stayton, "Design and development of polymers for gene delivery," Nat. Rev. Drug. Discov., 4, 581-593 (2005)).

[82] 본 발명에 있어서, 상기 엔도솜 탈출을 도와주는 물질은 펩티드, 지질 나노물질(lipid nanoparticles), 접합체 나노물질(polyplex nanoparticles), 고분자 나노구(polymer nanospheres), 무기물 나노물질(inorganic nanoparticles), 양이온 지질 나노물질(cationic lipid-based nanoparticles), 양이온 고분자(cationic polymer) 및 pH 감응 고분자(pH sensitive polymers)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나

이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [83] 본 발명에 있어서, 상기 엔도솜 탈출을 도와주는 물질로서 생활성 핵산에는 펩티드 (GLFDIHKKIAESF, 서열번호 12)가 링커 매개로 연결될 수 있으며, 캐리어 펩티드 핵산에는 Histidine(10)을 링커 매개로 연결하는 방법으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [84] 본 발명에 있어서, 상기 지질 나노물질(lipid nanoparticles)은 Lipid, phospholipids, acetyl palmitate, poloxamer 18, Tween 85, tristearin glyceride 및 Tween 80로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [85] 본 발명에 있어서, 상기 접합체 나노물질(polyplex nanoparticles)은 poly(amidoamine) 또는 polyethylenimine (PEI)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [86] 본 발명에 있어서, 상기 고분자 나노구(polymer nanospheres)는 polycaprolactone, poly(lactide-co-glycolide, polylactide, polyglycolide, poly(d,l-lactide), chitosan 및 PLGA-polyethylene glycol로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [87] 본 발명에 있어서, 상기 무기물 나노물질(inorganic nanoparticles)은 Fe₂O₃, Fe₃O₄, WO₃ 및 WO_{2.9}로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [88] 본 발명에 있어서, 상기 양이온 지질 나노물질(cationic lipid-based nanoparticles)은 1-(aminoethyl)iminobis[N-(oleicylcysteinyl-1-amino-ethyl)propionamide], N-alkylated derivative of PTA 및 3, 5-didodecyloxybenzamidine로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [89] 본 발명에 있어서, 상기 양이온 고분자(cationic polymer)는 vinylpyrrolidone-N, N-dimethylaminoethyl methacrylate acid copolymer diethyl sulphate, polyisobutylene 및 poly(N-vinylcarbazole)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [90] 본 발명에 있어서, 상기 pH 감응 고분자(pH sensitive polymers)는 polyacids, poly(acrylic acid), poly(methacrylic acid) 및 hydrolyzed polyacrylamide로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [91] 본 발명에 있어서, 상기 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산은 각각 2 내지 50개, 바람직하게는 5 내지 30개, 더욱 바람직하게는 10 내지 25개, 가장 바람직하게는 15 내지 17개의 핵산 단량체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [92] 상기 생활성 핵산은 천연(natural) 핵산 염기 및/또는 변형된 핵산 단량체로 이루어져 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [93] 본 발명에 있어, 상기 생활성 핵산에 사용된 단량체가 PNA일 경우, 생활성 핵산이라고 하며, 다른 단량체가 사용된 경우에도 동일한 방식으로 부른다.
- [94] 본 발명에 있어서, 상기 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산은 포스포디에스테르(phosphodiester), 2' 0-메틸(2' 0-methyl), 2' 메톡시-에틸(2' methoxy-ethyl), 포스포르아미데이트(phosphoramidate), 메틸포스포네이트(methylphosphonate) 및 포스포로티오에이트(phosphorothioate)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나

이상의 작용기를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [95] 본 발명에 있어서, 상기 캐리어 펩티드 핵산은 상기 생활성 핵산과 염기서열 일부 혹은 전부가 상보적인 서열로 구성되는 것을 특징으로 할 수 있다. 특히, 캐리어 펩티드 핵산은 유니버설 염기(universal base)를 하나 이상 포함할 수 있으며, 캐리어 펩티드 핵산 모두가 유니버설 염기로 이루어질 수도 있다.
- [96]
- [97] 본 발명에 있어서, 상기 세포 투과성 핵산 복합체 내의 상기 생활성 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산 각각은 전기적 특성이 전체적으로, 양전하(양성), 음전하(음성) 또는 중성 전하를 가지는 것을 특징으로 하는 복합체일 수 있다.
- [98] 상기 전기적 특성의 표현에 있어, "전체적으로"의 의미는 개별 염기의 전기적 특성이 아닌 전체적인 생활성 핵산 또는 캐리어 펩티드 핵산 각각의 전하가 외부에서 볼 때 전체적인 전기적 특성을 의미하는 것으로, 예를 들어, 생활성 핵산 내의 일부 단량체가 양성을 가지더라도 음성을 가지는 단량체의 개수가 더 많이 존재하는 경우에는 생활성 핵산은 "전체적으로" 전기적 특성을 볼 때 음전하를 가지게 되는 것이며, 캐리어 펩티드 핵산 내의 일부 염기 및/또는 백본(backbone)이 음성을 가지더라도 양성을 가지는 염기 및/또는 백본의 개수가 더 많이 존재하는 경우에는 캐리어 펩티드 핵산은 "전체적으로" 전기적 특성을 볼 때 양전하를 가지게 되는 것이다.
- [99] 이러한 관점에서, 본 발명의 핵산 복합체는 전체적으로 양전하를 가지는 것이 바람직하다. 상기 핵산 복합체에 있어서, 바람직하게는 상기 생활성 핵산은 전체적으로 전기적 특성을 볼 때 음전하 또는 중성의 특성을 가지며, 상기 캐리어 펩티드 핵산은 전체적으로 전기적 특성을 볼 때 양전하 특성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [100] 본 발명에 있어서, 상기 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산의 전기적 특성의 부여는 변형된 펩티드 핵산 단량체를 사용할 수 있고, 변형된 펩티드 핵산 단량체는 양전하를 가지는 캐리어 펩티드 핵산으로 리신(Lysine, Lys, K), 아르기닌(Arginine, Arg, R), 히스티딘(Histidine, His, H), 디아미노 부티르산(Diamino butyric acid, DAB), 오르니틴(Ornithine, Orn) 및 아미노산 유사체로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 양전하의 아미노산을 포함하고, 음전하를 가지는 캐리어 펩티드 핵산으로 음전하의 아미노산인 글루타민산(Glutamic acid, Glu, E) 또는 아미노산 유사체의 음전하의 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [101] 본 발명에 있어서, 상기 캐리어 펩티드 핵산은 전체적으로 양전하를 가지도록 1개 이상의 gamma- 또는 alpha-backbone 변형 펩티드 핵산 단량체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [102] 상기 gamma- 혹은 alpha-backbone 변형 펩티드 핵산 단량체는 전기적 양성을 가지도록 리신(Lysine, Lys, K), 아르기닌(Arginine, Arg, R), 히스티딘(Histidine, His, H), 디아미노 부티르산(Diamino butyric acid, DAB), 오르니틴(Ornithine, Orn)

및 아미노산 유사체로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 양전하를 가지는 아미노산을 backbone에 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[103] 본 발명에 있어서, 전하 부여를 위한 펩티드 핵산 단량체의 변형은 상기 backbone 변형 이외에도 nucleobase가 변형된 펩티드핵산 단량체를 사용할 수 있다. 바람직하게는 전기적 양성을 가지도록 amine, triazole, imidazole moiety를 nucleobase에 포함하거나, 전기적 음성을 가지도록 carboxylic acid를 염기에 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[104] 본 발명에 있어서, 상기 캐리어 펩티드 핵산의 변형 펩티드 핵산 단량체는 음전하를 backbone 혹은 nucleobase에 더 포함할 수 있지만, 변형 펩티드 핵산 단량체는 양전하를 가지는 단량체가 음전하를 가지는 단량체에 비해 더 많이 포함되어 전체적으로 캐리어 펩티드 핵산의 전하가 양성이 되는 것이 바람직하다.

[105] 바람직하게는 본 발명에 따른 상기 핵산 복합체는 전체적으로 양의 전하를 가지는 것을 특징으로 한다.

[106]

[107] 본 발명에 따른 상기 핵산 복합체에 있어, 소수성 잔기(hydrophobic moiety), 친수성 잔기(hydrophilic moiety), 표적 항원 특이적 항체, 앵타머 또는 형광/발광 표지자 등으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 물질이 생활성 핵산 및/또는 캐리어 펩티드 핵산에 결합된 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 상기 소수성 잔기(hydrophobic moiety), 친수성 잔기(hydrophilic moiety), 표적 항원 특이적 항체, 앵타머 및 이미징을 위한 형광/발광 표지자 등으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 물질은 상기 캐리어 펩티드 핵산에 결합된 것일 수 있다.

[108] 본 발명에서 상기 소수성 잔기(hydrophobic moiety), 친수성 잔기(hydrophilic moiety), 표적 항원 특이적 항체, 앵타머, 소광자, 형광 표지자 및 발광 표지자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 물질과 생활성 핵산 및/또는 캐리어 펩티드 핵산의 결합은 단순 공유결합 또는 링커로 매개된 공유결합인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 핵산 운반체에 결합된 세포투과, 용해도, 안정성, 운반 및 이미징 관련 물질(예컨대, 소수성 잔기 등)은 표적 유전자의 발현을 조절하는 생활성 핵산과 독립적으로 존재하게 된다.

[109]

[110] 본 발명에 있어서, 앞서 기술한 바와 같이, 상기 생활성 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산의 상보적인 결합 형태는 크게 역평행결합(antiparallel binding)과 평행결합(parallel binding)의 형태를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 상보적인 결합 형태는 생활성 핵산의 목적서열(생활성 핵산과 상보적인 서열) 존재 하에서 분리되는 구조를 가진다.

[111] 상기 역평행결합과 평행결합은 DNA-DNA 또는 DNA-PNA의 결합 방식에 있어, 5'-방향성과 3'-방향성에 따라 결정된다. 역평행 결합은 일반적인 DNA-DNA 또는 DNA-PNA의 결합 방식으로, 본 발명에 따른 핵산 복합체를 예로

들어 설명하면, 생활성 핵산은 5'에서 3' 방향으로, 캐리어 펩티드 핵산은 3'에서 5' 방향으로 서로 결합되는 형태를 의미한다. 평행결합은 역평행결합에 비해서는 결합력이 다소 떨어지는 형태로, 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산 모두가 5'에서 3' 방향 또는 3'에서 5' 방향으로 서로 결합되는 형태를 의미한다.

- [112] 본 발명에 따른 핵산 복합체에 있어서, 바람직하게는 상기 생활성 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산의 결합력은 생활성 핵산과 생활성 핵산의 목적하는 유전자, 특히 목적 유전자의 mRNA와의 결합력보다 낮은 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 결합력은 용해온도, melting temperature 또는 T_m에 의해 결정된다.
- [113] 상기 생활성 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산의 결합력(용해온도, melting temperature, T_m)이 생활성 핵산과 생활성 핵산의 목적하는 유전자, 특히 목적 유전자의 mRNA와의 결합력보다 낮게 하기 위한 구체적인 방법의 예로는, 상기 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산이 평행 결합(Parallel binding) 또는 부분 특이결합(Partial specific binding)하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [114] 또 다른 예로서 상기 캐리어 펩티드 핵산이 링커, 유니버설 염기(universal base) 및 생활성 핵산의 대응되는 염기와 상보적이지 않은 염기를 가지는 펩티드 핵산 염기로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 펩티드 핵산 염기를 갖는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [115] 본 발명에 있어서, 상기 유니버설 염기(universal base)는 아데닌(adenine), 구아닌(guanine), 사이토신 (cytosine), 티민(thymine), 우라실(Uracil) 등의 천연 염기와 선택성 없이 결합하고, 상보적인 결합력보다 낮은 결합력을 가지는 염기로 이노신 PNA(inosine PNA), 인돌 PNA(indole PNA), 나이트로인돌 PNA(nitroindole PNA) 및 무염기(abasic)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상 사용할 수 있으며, 바람직하게는 이노신 PNA를 사용하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [116] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 복합체의 기능 조절을 위한 핵산들의 결합 형태와 전기적 성질 조합을 제공하고, 상기 핵산의 결합 형태와 전기적 성질 조합으로 입자 크기 및 작용 시점을 조절하고, 세포투과성, 용해도 및 특이도를 향상시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [117] 본 발명에 있어서, 상기 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산의 결합력 조절을 통해, 목적 유전자의 존재 하에서, 생활성 핵산이 목적 서열과 결합되는 시점(생활성 핵산의 목적 서열로의 치환되는 시점, 표적 특이적 분리 및 결합 시점) 등의 조절이 가능하다.
- [118] 본 발명에 따른 핵산 복합체에 있어서, 생활성 핵산의 목적 유전자로의 치환(strand displacement) 시점, 표적 특이적 분리 및 결합(target specific release and bind) 시점의 조절은 복합체의 비특이 결합을 위한 캐리어 펩티드 핵산의 비특이 염기, 유니버설 염기 및 linker의 유무, 개수 및 위치에 의하여 조절이 가능한 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 펩티드 복합체의 상보적인 결합의

형태인 평행(parallel) 또는 역평행(antiparallel) 형태의 결합 등과 상기 조건의 조합에 의하여 조절이 가능한 것을 특징으로 할 수 있다.

[119]

[120] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 복합체의 입자는 5 nm 내지 300 nm, 바람직하게는 10 nm 내지 200 nm, 가장 바람직하게는 15 nm 내지 100 nm의 크기를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[121] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 복합체의 입자 크기는 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산의 전하 밸런스(charge balance)를 조절함으로써 조절되는 것을 특징으로 할 수 있다. 구체적으로는 캐리어 펩티드 핵산의 양전하가 증가하면 입자의 크기가 작아지나, 캐리어 펩티드 핵산의 양전하가 일정 수준을 넘게 되면 입자의 크기가 커지는 특징을 가지게 된다. 또한, 입자 크기를 결정하는 다른 중요한 요소로 복합체를 이루는 생활성 핵산 전하에 따른 전반적인 캐리어 펩티드 핵산과의 적절한 전하 밸런스에 의해서 입자 크기가 결정된다.

[122] 본 발명에 따른 캐리어 펩티드 핵산의 양전하는 1개 내지 7개(양전하를 가지는 단량체가 1개 내지 7개 포함됨을 의미한다), 바람직하게는 2개 내지 5개, 가장 바람직하게는 2개 내지 3개이며, 생활성 핵산의 전하는 전하 밸런스의 넷 차지(net charge)가 음전하 0개 내지 5개, 바람직하게는 0개 내지 3개이다.

[123]

[124] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 복합체는 생활성 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산이 적절한 조건에서 혼성화됨으로써 제조될 수 있다.

[125] 본 발명의 "혼성화"는 상보적인 단일가닥 핵산들이 이중-가닥 핵산을 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 2개의 핵산 가닥 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 또는 일부 부정합(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 결합 온도에 의하여 조절될 수 있다.

[126]

[127] 본 발명의 "표적 유전자"는 활성, 억제 또는 표지하고자 하는 핵산 서열(염기서열)을 의미하며, 용어 "표적 핵산"과 차이가 없으며, 본 명세서에서 혼용된다.

[128] 본 발명에 있어서, 표적 유전자를 포함하는 표적 핵산(염기서열)이 생체 외(in vitro) 또는 생체 내(in vivo)에서 상기 복합체와 접촉(결합)하게 되면, 캐리어 펩티드 핵산으로부터 생활성 핵산이 분리되어 생물학적 활성을 나타내게 된다.

[129] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 복합체를 이용하여 예방, 치료할 수 있는 질병은, 상기 핵산 복합체 내의 생활성 핵산의 표적 유전자에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에서는 생활성 핵산의 표적 유전자는 NLRP3인 것을 특징으로 할 수 있다.

[130] 따라서, 본 발명에서 상기 핵산 복합체를 이용하여 예방, 치료할 수 있는 질병은 바람직하게는 황반변성(Macular Degeneration)일 수 있으며, 상기 황반변성은, 노인성 황반변성, 건성 황반변성 및 습성 황반변성을 포함하며, 가장

바람직하게는, 본 발명의 핵산 복합체는 건성 황반 변성(Dry Macular Degeneration)의 예방, 개선 또는 치료가 가능하다.

- [131] 본 발명의 일 실시예에서는, 건성 황반변성에 대한 예방 및 치료효과를 확인하였으나, NLRP3 단백질과 관련된 caspase-1 활성화 복합 단백질 복합체인 인플라마솜은 건성 황반변성에서 습성 황반변성으로 진행되는 데 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로, 본 발명의 치료용 조성물은 습성 황반변성의 예방, 개선 또는 치료, 특히, 건성 황반변성에서 습성 황반변성으로의 진행을 예방하기 위해서도 사용될 수 있다 (Alexander G. Marneros, 9445-958, 2013; Lucia Celkova, et. al., Journal of Clinical Medicine 4(1), 172-192, 2015; Yerramothu, P., et al., Eye 32, 491-505, 2018)
- [132]
- [133] 한편, 본 발명에 있어서, 용어 "치료용 조성물"은 "의약(약제학적, 약학적) 조성물(pharmaceutical composition)"과 혼용될 수 있으며, 본 발명의 생활성 핵산 및 상기 핵산과 결합하는 캐리어 펩티드 핵산을 포함하는 핵산 복합체를 유효성분으로 포함하며, 추가적으로 상기 핵산 복합체에 목적하는 질환을 치료하기 위한 치료용 약물이 결합된 형태일 수 있다.
- [134] 상기 약학 조성물이 제형화되어 투여될 경우, 통상적인 방법에 의해 생성된 제제의 형태로서 투여될 수 있다.
- [135] 투여되는 제제의 형태는 예를 들어 점안제(eye drop), 안 연고, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 주사제, 연고 등일 수 있으며, 바람직한 것은 점안액 또는 피부 전달 형태의 제제이나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 제제는 해당 분야의 일반적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 안과적 국소 투여 형태로서, 점적, 스프레이 또는 젤 형태가 가능하며, 또 다른 방법으로 리포솜을 이용하여 눈에 투여할 수 있다. 또한, 펌프-카테테르(pump-catheter) 시스템을 통해 눈물막에 주입될 수 있다. 부가적인 구체예로서, 눈 위의 콘택트렌즈에 포함될 수 있으며, 그에 의해 운반되거나 그에 부착될 수 있다. 다른 구현예로, 안구 표면에 가해질 수 있는 스펀지 또는 면봉에 함유된 형태가 이용될 수 있으며, 안구 표면에 가해질 수 있는 액체 스프레이도 이용될 수 있다.
- [136] 바람직하게는 본 발명에 따른 조성물은 점안액, 수성액, 젤, 연고, 크림, 로션, 페이스트, 도말제 또는 패치 형태로 제형화될 수 있다.
- [137] 가장 바람직하게는 수성액의 형태로 제형화될 수 있고, 이때 수성액은 증류수 및 버퍼 용액의 형태가 사용될 수 있다.
- [138] 이들 제형은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는, 예를 들어, 안구 또는 피부에 적용될 수 있는 형태의 제형에 적합한 담체, 부형제, 보조제 또는 희석제 등의 첨가물을 함유할 수 있다.
- [139] 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의

예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 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. 상기 약학 조성물은 충전제, 항응집제, 율활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 약학 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 멸균 주사 용액 등의 형태일 수 있다.

- [140] 용어 "담체(carrier)"는 세포 또는 조직 내로의 핵산 복합체의 부가를 용이하게 하는 화합물로 정의된다. 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기 화합물들의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.
- [141] 용어 "희석제(diluent)"는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다.
- [142] 본 발명에서의 핵산 복합체를 함유하는 물질은, 환자에게 그 자체로서 또는 병용 요법(combination therapy)에서와 같이 다른 활성 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 의약 조성물로서 투여될 수 있다.
- [143] 본 발명에서 사용에 적합한 의약 조성물에는, 활성 성분들이 그것의 의도된 목적을 달성하기에 유효한 양으로 함유되어 있는 조성물이 포함된다. 더욱 구체적으로, 치료적 유효량은 치료될 객체의 생존을 연장하거나, 질환의 증상을 방지, 경감 또는 완화시키는데 유효한 화합물의 양을 의미한다. 치료적 유효량의 결정은, 특히, 여기에 제공된 상세한 개시 내용 측면에서, 통상의 기술자의 능력 범위 내에 있다.
- [144] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 세포 투과성 핵산 복합체를 포함하는 치료용 조성물의 투여(또는 도포)로 질환의 발병을 막거나, 이의 진행을 억제시키는 모든 행위를 의미한다.
- [145] 본 발명의 용어 "개선"이란 상기 세포 투과성 핵산 복합체를 포함하는 치료용 조성물의 투여(또는 도포)로 질환의 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [146] 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 세포 투과성 핵산 복합체를 포함하는 치료용 조성물의 투여(또는 도포)로 질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [147] 본 발명의 핵산 복합체의 투여(또는 도포)에 있어서, 당업계에 공지된 임의의

핵산 전달 방법이 사용될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 적합한 전달 시약은 예를 들어, Mirus Transit TKO lipophilic reagent, lipofectin, lipofectamine, cellfectin, polycations(예를 들어, polylysine), atelocollagen, nanoplexes 및 리포솜이 있다. 핵산 분자의 전달 운반체로서 아테로콜라겐(atelocollagen)의 사용은 Minakuchi et al. Nucleic Acids Res., 32(13):e109 (2004); Hanai et al. Ann NY Acad Sci., 1082:9-17 (2006); and Kawata et al. Mol Cancer Ther., 7(9):2904-12 (2008)에 기술되어 있다. 예시적인 간접 핵산 전달 시스템은 미국 특허 제8,283,461호, 제8,313,772호, 제8,501,930호에 제공된다.

- [148] 본 발명에 있어서, 상기 세포 투과성 핵산 복합체는 리포솜(liposome) 등의 전달체를 이용하여 투여(또는 도포)할 수도 있다. 상기 리포솜은 림프 조직과 같은 특정 조직에 대해 상기 복합체를 표적화하거나, 감염 세포에 대해 선택적으로 표적화하는데 도움을 줄 수 있고, 또한 상기 복합체가 포함된 조성물의 반감기를 증가시키는데 도움을 줄 수 있다. 리포솜으로는 에멀션, 폼(foam), 마이셀(micelle), 불용성 단층, 액정, 인지질 분산물, 라멜라 층(lamellar layer) 등이 있다. 이러한 제제에 있어서, 송달되는 상기 복합체는, 단독으로 또는 특정 세포들을 대상으로, CD45 항원에 결합되는 모노클로날 항체와 같은 림프 세포 중 우세한 수용체에 결합하는 분자와 함께 또는 기타 치료 조성물과 함께, 리포솜의 일부로서 혼입시킨다. 따라서, 본 발명의 소정 복합체로 충전되거나 도포되어(decorated) 상기 핵산 복합체 조성물을 송달하는 리포솜은 림프 세포의 상기 부위로 지향될 수 있다.

[149]

- [150] 본 발명에 따라 사용하기 위한 리포솜은 일반적으로 중성 및 음전하 인지질 및 콜레스테롤 등의 스테롤을 비롯한 표준 베시클(vesicle)-형성 지질로부터 형성된다. 일반적으로, 예를 들어 혈류 중의 리포솜의 안정성, 산 불안정성(acid lability) 및 리포솜의 크기 등을 고려하여 지질을 선택한다. 리포솜 제조에는 다양한 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Szoka, et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9:467, 1980), 및 미국 특허 제4,235,871호, 제4,501,728호, 제4,837,028호 및 제5,019,369호]에 기재되어 있는 바와 같은 방법을 이용할 수 있다.

- [151] 본 발명은 또 다른 관점에서, NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산(Bioactive Nucleic Acid); 및 캐리어 펩티드 핵산(Carrier Peptide Nucleic Acid)이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 황반변성의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

- [152] 본 발명에 따른 핵산 복합체를 포함하는 조성물은 황반변성을 치료하기 위하여 또는 황반변성의 증세를 억제(또는 완화)하기 위하여 의약으로 효과적인 양으로 안구에 적용될 수 있다. 황반변성의 종류, 환자의 연령, 체중, 증상의 특성 및 정도, 현재 치료법의 종류, 치료 회수, 적용 형태 및 경로 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 해당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 상기한 약리학적 또는 생리학적 성분을 함께 적용하거나

순차적으로 적용할 수 있으며, 또한 추가의 종래의 치료제와 병용하여 적용될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 적용될 수 있다. 이러한 적용은 단일 또는 다중적으로 적용될 수 있다.

[153] 본 발명에서, "개체"는 본 발명에 따른 세포 투과성 핵산 복합체를 투여(도포)하여 경감, 억제 또는 치료될 수 있는 상태 또는 질환을 앓고 있거나 그러한 위험이 있는 포유동물을 의미하며, 바람직하게 사람을 의미한다.

[154] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량(도포량)은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여(도포) 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000mg/일이고, 바람직하게는 0.01 ~ 500mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여(도포)할 수도 있다.

[155] 본 명세서에 기재되어 있는 세포 투과성 핵산 복합체를 포함하는 조성물의 독성과 치료 효율성은, 예를 들어, LD50(군집의 50%에 대한 치사량), ED50(군집의 50%에 대해 치료 효과를 갖는 선량), IC50(군집의 50%에 대해 치료 억제 효과를 갖는 선량)을 결정하기 위하여, 세포 배양 또는 실험동물에서의 표준 제약 과정들에 의해 산정될 수 있다. 독성과 치료 효과 간의 선량 비가 치료 지수이고 이것은 LD50과 ED50(또는, IC50) 간의 비율로서 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 보이는 화합물들이 바람직하다. 이들 세포 배양 분석에서 얻어진 데이터는 인간에 사용하는 선량의 범위를 산정하는데 사용될 수 있다. 그러한 화합물들의 투여량(dosage) 또는 도포량은 바람직하게는 독성이 없거나 거의 없는 상태에서 ED50(또는, IC50)을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다.

[156] 본 발명의 용어 "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 행위를 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[157] 본 발명의 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 안구 위 점안, 망막 내 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[158] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명의 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

- [159] 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [160] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물을 사람을 포함하는 포유동물에 하루 동안 10 내지 100 mg/kg, 보다 바람직하게는 10 내지 30 mg/kg으로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 내지 3회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.
- [161]
- [162] 본 발명은 또 다른 관점에서, NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산 (Bioactive Nucleic Acid); 및 캐리어 펩티드 핵산 (Carrier Peptide Nucleic Acid)이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체를 황반변성의 예방 또는 치료에 사용하는 용도에 관한 것이다.
- [163] 바람직하게는, 상기 황반변성은 건성 황반변성 또는 습성 황반변성일 수 있으며, 가장 바람직하게는 건성 황반변성일 수 있다.
- [164]
- [165] 본 발명은 또 다른 관점에서, 황반변성의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산 (Bioactive Nucleic Acid); 및 캐리어 펩티드 핵산 (Carrier Peptide Nucleic Acid)이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체의 용도에 관한 것이다.
- [166] 바람직하게는, 상기 황반변성은 건성 황반변성 또는 습성 황반변성일 수 있으며, 가장 바람직하게는 건성 황반변성일 수 있다.
- [167]
- [168] 실시예
- [169] 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.
- [170]
- [171] 실시예 1: 생활성 핵산(Bioactive Peptide Nucleic Acid) 및 캐리어 펩티드 핵산, 및 이들을 이용한 복합체의 제조
- [172] 본 발명의 핵산 복합체의 건성 황반변성에 대한 효과를 검정하기 위하여 표적 유전자로 NLRP3 유전자를 사용하였으며, 건성 황반변성의 치료 효과를 확인하기 위해 NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산(Bioactive Peptide Nucleic Acid)으로 안티센스 펩티드 핵산(antisense PNA)을 사용하였다.

- [173] 본 발명의 대조군으로 사용한 생활성 펩티드 핵산 (antisense PNA)은 서열번호 1 내지 2번으로 표시되는 서열로 구성되어 있으며, 건성황반변성 치료효과를 확인하기 위해 사용한 생활성 펩티드 핵산(antisense PNA)은 서열번호 3 내지 4번으로 표시되는 서열로 구성되어 있다.
- [174] 본 실시예에서 사용된 펩티드 핵산 기반 생활성 핵산 중 서열번호 1번 및 3번 엔도솜 탈출능을 돕기 위한 펩타이드 GLFDIHKKIAESF(서열번호 12)를 5'에 결합하였고, 서열번호 2번 및 4번은 엔도솜 탈출능을 돕는 펩타이드가 없는 형태로 합성하였다. 본 실시예에서 사용된 캐리어 펩티드 핵산은 서열번호 6번과 11번을 제외하고 모두 엔도솜 탈출능을 돕기 위한 펩타이드를 5' 내지 3' 말단에 결합하였으며, 기재되는 서열로 구성되어 있다. 염기서열, 단량체 변형 및 구조는 하기 표 3과 같다.
- [175] 본 발명에서 사용한 모든 펩티드 핵산은 파나진(PANAGENE, 한국)에서 HPLC 정제 방법을 통해 합성하였다(표 3).
- [176]

[177] [표3]

건성 황반변성 치료 효과 검증을 위한 생활성 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산의
서열

구분	서열 번호	엔도솜탈출 펩타이드	염기서열	단량체 변형
생활성 핵산	1	GLFDIIKKIAESF	5'-GLFDIIKKIAESF-O-AC(-)CT(+)CTA(-)CGC(+)AAT(-)CC-O-K-3'	-+--+
	2	-	5'-AC(-)CT(+)CTA(-)CGC(+)AAT(-)CC-O-K-3'	-+--+
	3	GLFDIIKKIAESF	5'-GLFDIIKKIAESF-O-TCG(-)AT(+)CAT(-)TA(+)GCG(-)TG-O-K-3'	-+--+
	4	-	5'-TCG(-)AT(+)CAT(-)TA(+)GCG(-)TG-O-K-3'	-+--+
캐리어 펩티드 핵산	5	Histidine(10)	5'-Histidine(10)-O- TGGA(+)GATG(+)CGTT(+)AGG-O-K-3'	+++
	6	-	5'-TGGA(+)GATG(+)CGTT(+)AGG-O-K-3'	+++
	7	Histidine(10)	5'-K-O-CA(+)CG(+)C-O-Histidine(10)-3'	++
	8	Histidine(10)	5'-Histidine(10)-O-CG(+)CA(+)C-O-K-3'	++
	9	Histidine(10)	5'-K-O-CA(+)CGCTA(+)ATGAT(+)CGA-O- Histidine(10)-3'	+++
	10	Histidine(10)	5'-Histidine(10)-O- AGC(+)TAGTA(+)ATCGC(+)AC-O-K-3'	+++
	11	-	5'-AGC(+)TAGTA(+)ATCGC(+)AC-O-K-3'	+++

[178]

[179] 상기 표 3 은 NLRP3 유전자를 표적으로 하는 건성 황반변성 치료제로서의
효과를 확인하기 위해 사용된 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산 및 대조군으로
사용된 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산의 서열 정보를 나타내었다.

[180] 단량체의 변형은 전기적인 성질을 부여하기 위하여 펩티드 핵산의 backbone을
전기적 양성은 리신(Lysine, Lys, K, (+)로 표기)을 전기적 음성은
글루타민산(Glutamic acid, Glu, E, (-)로 표기)로 변형된 펩티드 backbone을

가지도록 제작하였다.

[181] 각각의 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산 조합은 DMSO 하에서 혼성화 하였으며, 그 결과 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산을 포함하는 복합체를 제조하였다.

[182]

[183] 실시예 2: 핵산 복합체를 이용한 건성 황반변성의 치료 효과 분석

[184] 실시예 1에 따라 제조된 NLRP3 유전자를 표적 유전자로 하는 생활성 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산을 포함하는 핵산 복합체를 이용하여 건성 황반변성의 치료 효과를 분석하였다.

[185]

[186] 실시예 2-1: 세포 배양

[187] ATCC(American Type Culture Collection, 미국)로부터 입수한 인간 망막색소상피(ARPE-19, ATCC NO. CRL-2302)를 DMEM:F-12 배양배지(Dulbecco Modified Eagle Medium Nutrient Mixure F-12(Ham), Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10%(v/v) 소태아혈청, 페니실린 100units/ml, 스트렙토마이신 100 μ g/ml을 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5%(v/v) CO₂의 조건하에서 배양하였다. 건성 황반변성 유사 세포 모델을 만들기 위해 IL (Interleukin)-1 α 4 ng/ml과 LPS (Lipopolysaccharide) 50 ng/ml 처리하여 24시간 배양하였다.

[188]

[189] 실시예 2-2: 웨스턴 블랏 분석(Western blot assay)을 통한 유전자 발현의 분석

[190] 사람 유래 망막색소상피 세포주를 6웰 플레이트에 1x10⁵으로 세포를 씨당하고 24시간 배양 후 실시예 2-1의 조건으로 실험을 진행하여 생활성 펩티드 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산을 포함하는 복합체를 처리하고 24, 48, 72, 96, 120 시간 배양한 후, RIPA buffer를 각 웰에 30 μ L씩 첨가하여 protein lysate를 얻었다. Protein lysate를 BCA assay kit (Thermo Fisher, 미국)를 사용하여 단백질 양을 정량하고 단백질 30 μ g을 전기영동을 통해 사이즈 별로 분리하여, PVDF membrane에 단백질을 옮긴 후 1차 항체인 NLRP3 (abcam, 미국), ASC (SantaCruz Biotechnology, 미국), procaspase-1, caspase-1 (SantaCruz Biotechnology, 미국), proIL-1beta, IL-1beta (Abcam, 미국)를 1:1000으로 처리하고 4 $^{\circ}$ C 에서 하루 동안 방치하였다.

[191] 1X TBS-T를 이용하여 워싱하고 2차 항체인 Anti-Rabbit (Cell signaling Technology, 미국), Anti-Mouse (Santa cruz Biotechnology, 미국)를 1:2000으로 처리하여 상온에서 1시간 방치하였다. SupersignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher, 미국)을 처리하고 Image600 (Amersham, 독일) 장비를 이용하여 사람 망막색소상피 세포주에서 표적 유전자의 발현 억제 효율을 분석하였다.

[192] 본 실시예에서는 IL-1alpha를 이용한 건성황반변성 유사 세포 모델에서의 NLRP3 및 하위단계 유전자 발현 변화를 분석하였으며, 사용한 핵산 복합체

조합은 표 4와 동일하다.

[193]

[194] [표4]

망막 색소상피 세포주 (ARPE-19)에서 NLRP3 및 하위단계 유전자 발현 분석을 위해 사용한 핵산 복합체

핵산 복합체	생활성 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산 조합
1	서열번호 1 및 5
2	서열번호 3 및 7
3	서열번호 3 및 8
4	서열번호 3 및 9
5	서열번호 3 및 10

[195]

[196] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 서열번호 3과 서열번호 8의 조합과 서열번호 3과 서열번호 10의 조합 핵산 복합체를 통하여 표적 유전자의 발현 및 하위 경로 유전자의 발현이 시간에 따라 가장 많이 억제되는 것을 확인하였다.

[197]

[198] 실시예 2-3: 면역세포화학(Immunocytochemistry) 염색 분석

[199] 사람 유래 망막색소상피 세포주를 8웰 플레이트에 5x10³으로 세포를 씨딩하고 24시간 배양 후, 실시예 2-1의 조건으로 실험을 진행하여 생활성 펩티드 핵산 및 캐리어 펩티드 핵산을 포함하는 복합체를 처리하고 24, 48, 72 배양한 후, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 고정시킨 후, 0.1% 트리톤(Triton) X-100과 정상 당나귀 혈청(normal donkey serum)을 블로킹(blocking)을 거치고 1차 항체인 NLRP3 (abcam, 미국), caspase-1 (SantaCruz Biotechnology, 미국)를 1:200으로 처리하고 4 °C 에서 하루 동안 방치하였다.

[200] 이후 2차 항체인 Donkey Anti-Goat IgG H&L (Alexa Fluor® 647) (abcam, 미국), Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (abcam, 미국)를 1:200으로 처리하여 상온에서 1시간 방치하고 DAPI가 포함된 마운팅제를 이용하여 고정시킨 후 현미경으로 결과를 확인하였다.

[201] 본 실시예에서는 LPS를 이용한 건성황반변성 유사 세포 모델에서의 NLRP3 및 하위단계 유전자 발현 변화를 분석하였으며, 사용한 핵산 복합체 조합은 표 5와 동일하다.

[202]

[203] [표5]

면역세포화학 염색에서의 건성 황반변성 치료 효과 분석을 위한 hexan 복합체 조합

구분	hexan 복합체
1	서열번호 1 및 5
2	서열번호 3 및 8
3	서열번호 3 및 10

[204]

[205] 그 결과, 도 2a 내지 2b 에 나타낸 바와 같이, 서열번호 3과 서열번호 10의 hexan 복합체 조합이 건성황반변성 유사 세포 모델에서 NLRP3 발현 및 하위 경로 유전자의 발현이 시간에 따라 가장 많이 억제되는 것을 확인하였다.

[206]

[207] 실시예 3: hexan 복합체를 이용한 건성 황반변성 유사 NaIO₃ 유도 동물모델에서 치료 효과 분석

[208] 본 실시예에서는 실시예 2을 통하여 효과가 검증된 hexan 조합체를 선별하여 NaIO₃ 이용한 건성황반변성 유사 동물 모델에서 표현형 및 조직학적 소견을 분석하였으며, 사용한 hexan 복합체 조합은 표 6과 같다.

[209]

[210] [표6]

NaIO₃ 유도 동물모델에서 건성 황반변성 치료 효과 분석을 위한 hexan 복합체 조합

구분	hexan 복합체
1	서열번호 1 및 5
2	서열번호 3 및 10

[211]

[212] 실시예 3-1: 실험 동물 사육 및 실험 디자인

[213] 5주령 male B6 mouse을 일주일 동안 순화 후 사용하였다. 황반변성에서 나타나는 변화 중 하나로 망막색소상피세포의 선택적인 변성 및 손상을

유발하기 위하여 NaIO₃ (Sigma, 미국) 35mg/kg을 정맥주사하였다.

[214] NaIO₃ 3주 유도 시킨 뒤 핵산 복합체(1, 2)를 안구 점안액을 이용하여 대조군 (핵산 복합체 1)의 경우 60 µg / 1 drop 으로 하루에 한번 14일 동안 처리한 군과 시험약물군 (핵산 복합체 2)의 경우 60 µg / 1 drop 으로 하루에 한번 14일 동안 처리한 군으로 나누어 실험을 진행하였음.

[215] 핵산 복합체(1, 2)를 14일 동안 투여한 뒤 Micron IV (Phoenix Research Laboratories, 미국)으로 안저촬영을 실시하였다.

[216] 부검하여 안구 적출한 후, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 고정시킨 후 파라핀으로 포매하여 슬라이드 절편을 제작하였다. 슬라이드 절편은 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색하여 광학현미경 하에서 망막조직을 평가하였다.

[217] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, NaIO₃ 투여로 인하여 망막색소상피세포의 손상을 받았고 바로 위에 위치하는 광수용체 세포의 핵들이 밀집되어 있는 외과립층(outer nuclear layer)과 내과립층(inner nuclear layer)에서 휘어지는 현상을 관찰하였다. 안구 점안액을 이용한 핵산 복합체 처리군에서 망막색소상피세포의 손상을 억제하여 외과립층 붕괴되는 현상을 억제하는 것을 확인하였다.

[218]

[219] 실시예 3-2: NLRP3 표적 유전자의 핵산 복합체(60ug) 4주 투여 효과

[220] 실시예 3-1에서의 실험 조건으로 핵산 복합체(1, 2)를 안구점안액을 이용하여 60 µg / 1 drop / 1 day로 28일 동안 처리하여 망막색소상피의 손상 예방 효과를 진행하였다.

[221] 핵산 복합체(1, 2) 28일 동안 투여한 뒤 Micron IV (Phoenix Research Laboratories, 미국)으로 안저촬영을 실시하였다.

[222] 부검하여 안구 적출한 후, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 고정시킨 후 파라핀으로 포매하여 슬라이드 절편을 제작하였다. 슬라이드 절편은 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색하여 광학현미경 하에서 망막조직을 평가하였다.

[223] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, NaIO₃ 투여로 인하여 망막색소상피세포의 손상을 받았고 바로 위에 위치하는 광수용체 세포의 핵들이 밀집되어 있는 외과립층(outer nuclear layer)과 내과립층(inner nuclear layer)에서 휘어지는 현상을 관찰하였다. 안구 점안액을 이용한 핵산 복합체 처리군에서 망막색소상피세포의 손상을 억제하여 외과립층 휘어지는 현상을 억제하는 것을 확인하였다.

[224]

[225] 실시예 3-3: 핵산 복합체를 이용한 NaIO₃ 유도 동물 모델의 치료 효과 분석

[226] 실시예 3-1에서의 실험 조건으로 표 7의 핵산 복합체(6, 7)를 안구 점안액을 이용하여 망막색소상피의 손상 억제 효과를 진행하였다. 핵산 복합체 6번의

경우 30 μg / 1 drop / 1 day로 14일 동안 투여하였고 핵산 복합체 7번의 경우 30 μg / 1 drop / 1 day, 핵산 복합체 7-1번의 경우 10 μg / 1 drop / 1 day, 핵산 복합체 7-2번의 경우 5 μg / 1 drop / 1 day로 14일 동안 투여하여 억제 효과를 확인하였다. 양성 대조군의 경우 NLRP3 억제제인 MCC950 (InvivoGen, 미국)을 10mg/kg의 용량으로 14일 동안 매일 경구투여하였다.

[227]

[228] [표7]

NaIO₃ 유도 동물모델에서 건성 황반변성 치료 효과 분석을 위한 추가 핵산 복합체 조합

구분	핵산 복합체
6	서열번호 2 및 6
7	서열번호 4 및 11

[229]

[230] 핵산 복합체(6, 7) 14일 동안 투여한 뒤 Micron IV (Phoenix Research Laboratories, 미국)으로 안저촬영을 실시하였다.

[231] 부검하여 안구 적출한 후, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 고정시킨 후 파라핀으로 포매하여 슬라이드 절편을 제작하였다. 슬라이드 절편은 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색하여 광학현미경 하에서 망막조직을 평가하였다.

[232] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, NaIO₃ 투여로 산화적 스트레스를 통해 망막색소상피세포의 퇴행을 유발하여 망막 변성을 유도한 것을 관찰하였으며, 핵산 복합체 (PNA 7, 30 μg / 1 drop / 1 day) 의 경우 양성 대조군 (Positive control, PC)보다 망막색소상피세포의 변성이 감소한 것을 확인하였다. 핵산 복합체 (PNA 7-1: 10 μg / 1 drop / 1 day, PNA 7-2: 5 μg / 1 drop / 1 day) 에서도 양성 대조군과 비슷한 억제 효과를 확인하였다(도 5a).

[233] 도 5b의 망막 절편 사진과 같이 망막에서 광수용체 세포(photoreceptor cell)의 핵들이 밀집되어 있는 외과립층(outer nuclear layer)의 두께가 안구 점안액을 이용한 핵산 복합체 처리군 (PNA 7)에서 광수용체 세포의 손상을 유의적으로 억제하여 건성 황반변성 치료 효과를 확인하였다.

[234]

[235] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 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.

[236]

산업상 이용가능성

[237] 본 발명에 따른 NLRP3를 표적으로 하는 생활성 핵산과 캐리어 펩티드 핵산이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체는 세포 투과성이 높아 직접적인 주사투여 외에도, 점안액이나 피부도포 등을 포함하는 여러 방법으로 투여가 가능하고, NLRP3의 발현을 억제함으로써, 황반변성의 예방, 개선 또는 치료에 유용하다.

[238]

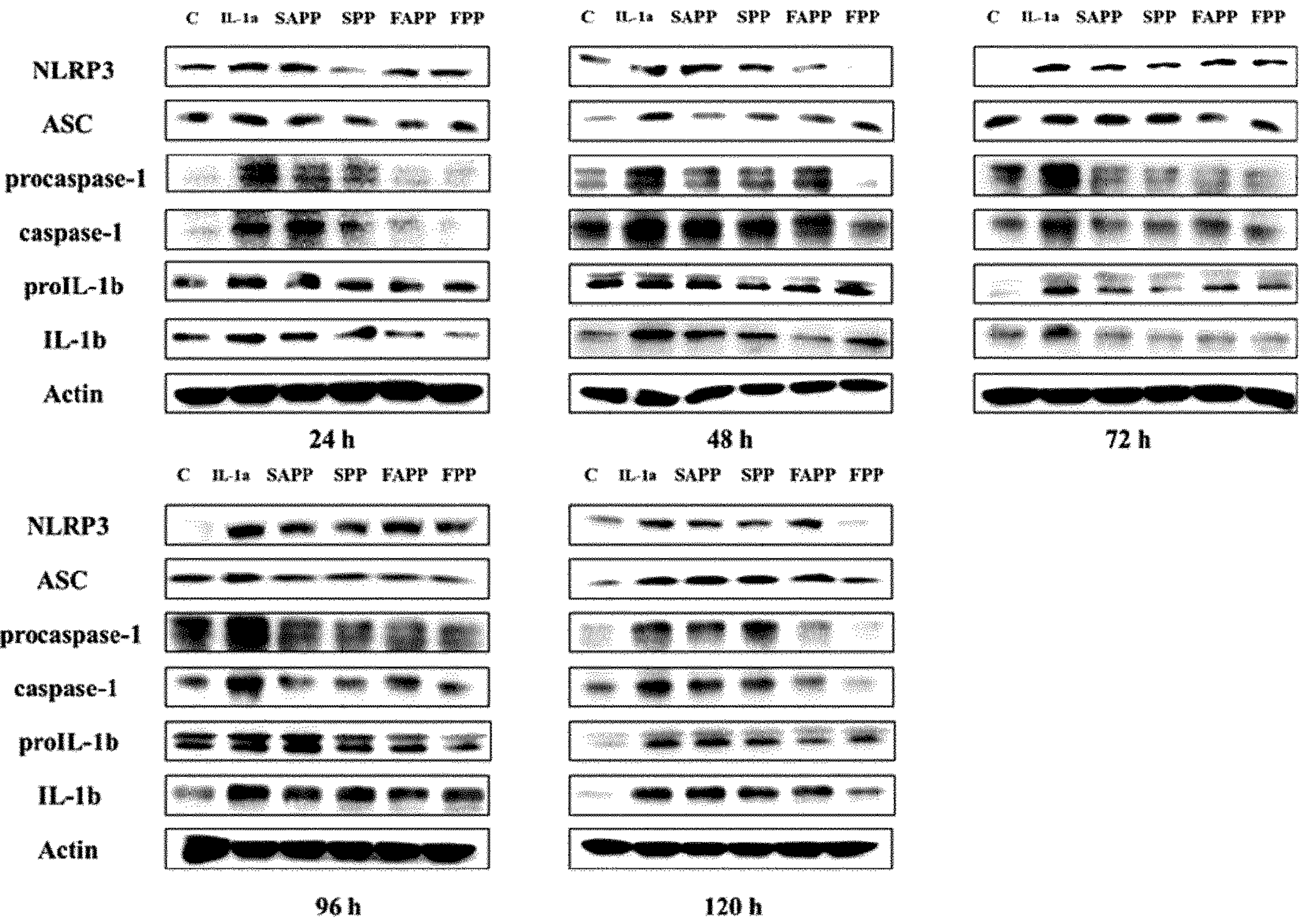
서열목록 Free Text

[239] 전자파일 첨부하였음.

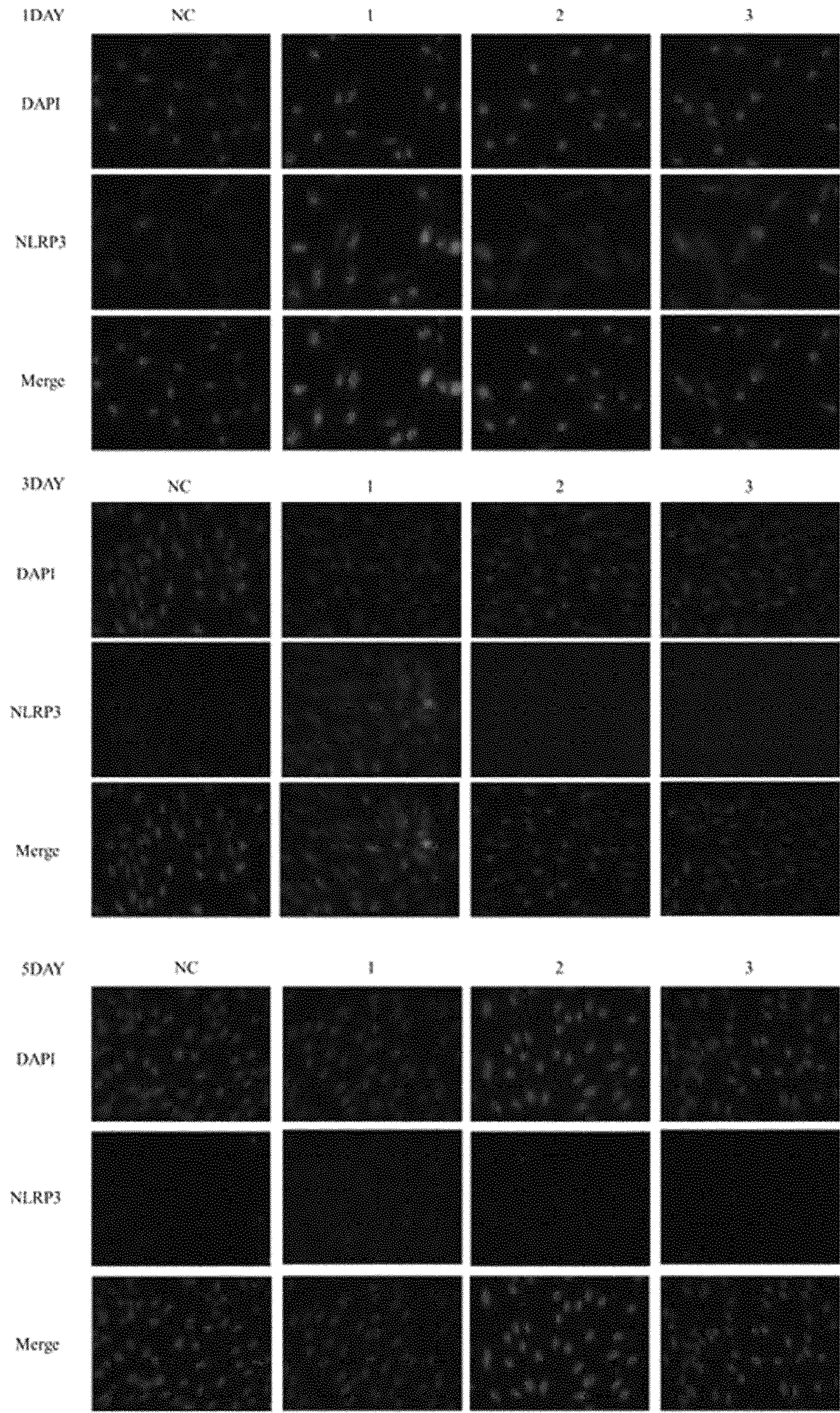
청구범위

- [청구항 1] NLRP3 유전자를 표적으로 하는 생활성 핵산 (Bioactive Nucleic Acid); 및 캐리어 펩티드 핵산 (Carrier Peptide Nucleic Acid)이 상보적으로 결합된 세포 투과성 핵산 복합체를 유효성분으로 함유하는 황반변성의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 생활성 핵산은 서열번호 4의 서열로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 캐리어 펩티드 핵산은 서열번호 5 내지 11로 구성된 군에서 선택되는 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 핵산 복합체는 서열번호 4로 표시되는 서열을 포함하는 생활성 핵산; 및 서열번호 5 내지 11로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 서열로 표시되는 서열을 포함하는 캐리어 펩티드 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 생활성 핵산 또는 캐리어 펩티드 핵산은 각각의 핵산의 5'-말단 또는 3'-말단에 엔도솜 탈출을 도와주는 물질이 추가로 결합된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 엔도솜 탈출을 도와주는 물질은 펩티드, 지질 나노물질(lipid nanoparticles), 접합체 나노물질(polyplex nanoparticles), 고분자 나노구(polymer nanospheres), 무기물 나노물질(inorganic nanoparticles), 양이온 지질 나노물질(cationic lipid-based nanoparticles), 양이온 고분자(cationic polymer) 및 pH 감응 고분자(pH sensitive polymers)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 7] 6항에 있어서, 상기 펩티드는 GLFDIHKKIAESF(서열번호 12) 또는 Histidine(10)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 생활성 핵산은 전체적으로 음전하 또는 중성을 가지는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 캐리어 펩티드 핵산은 전체적으로 양전하를 가지는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 핵산 복합체는 전체적으로 양전하를 가지는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

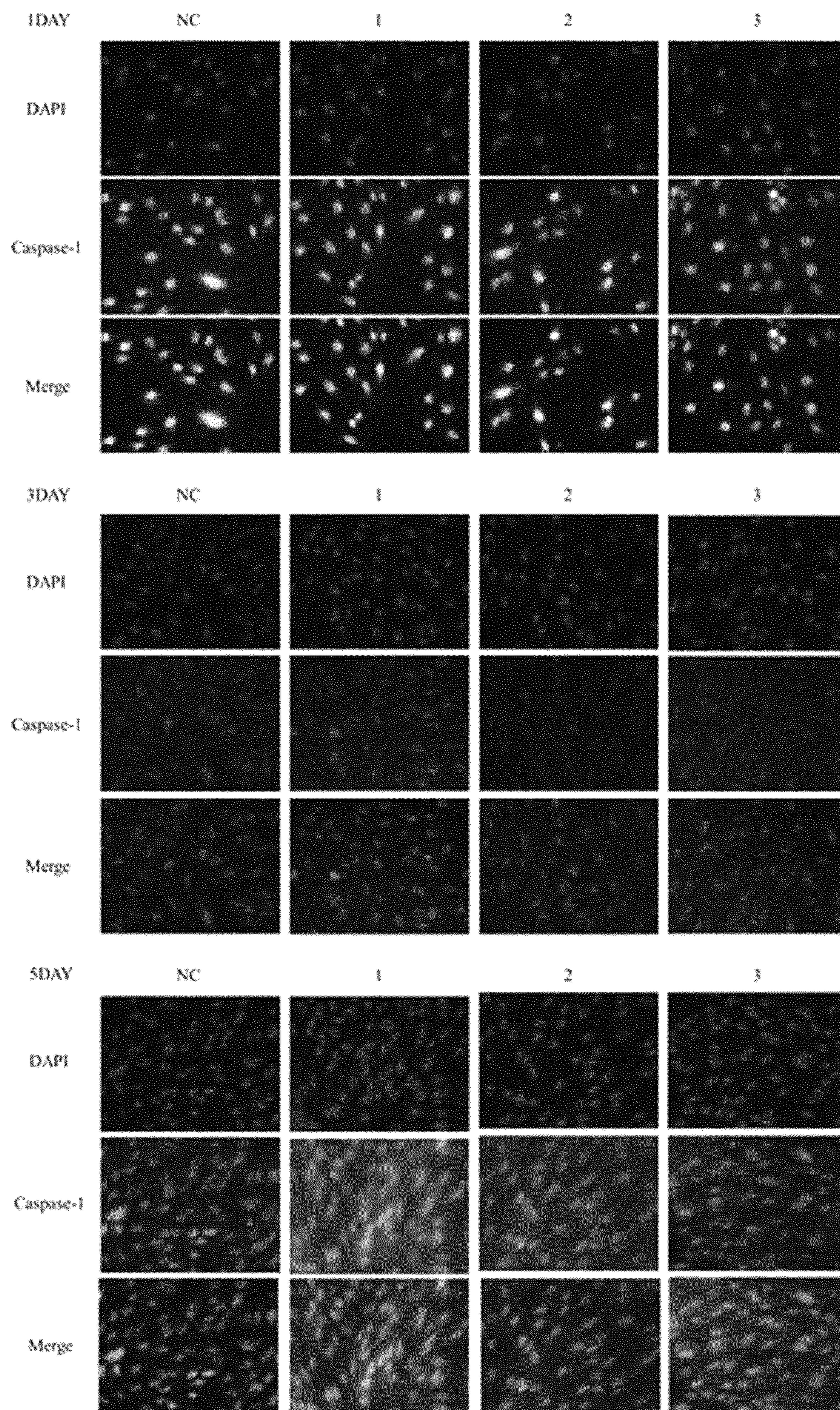
[도 1]



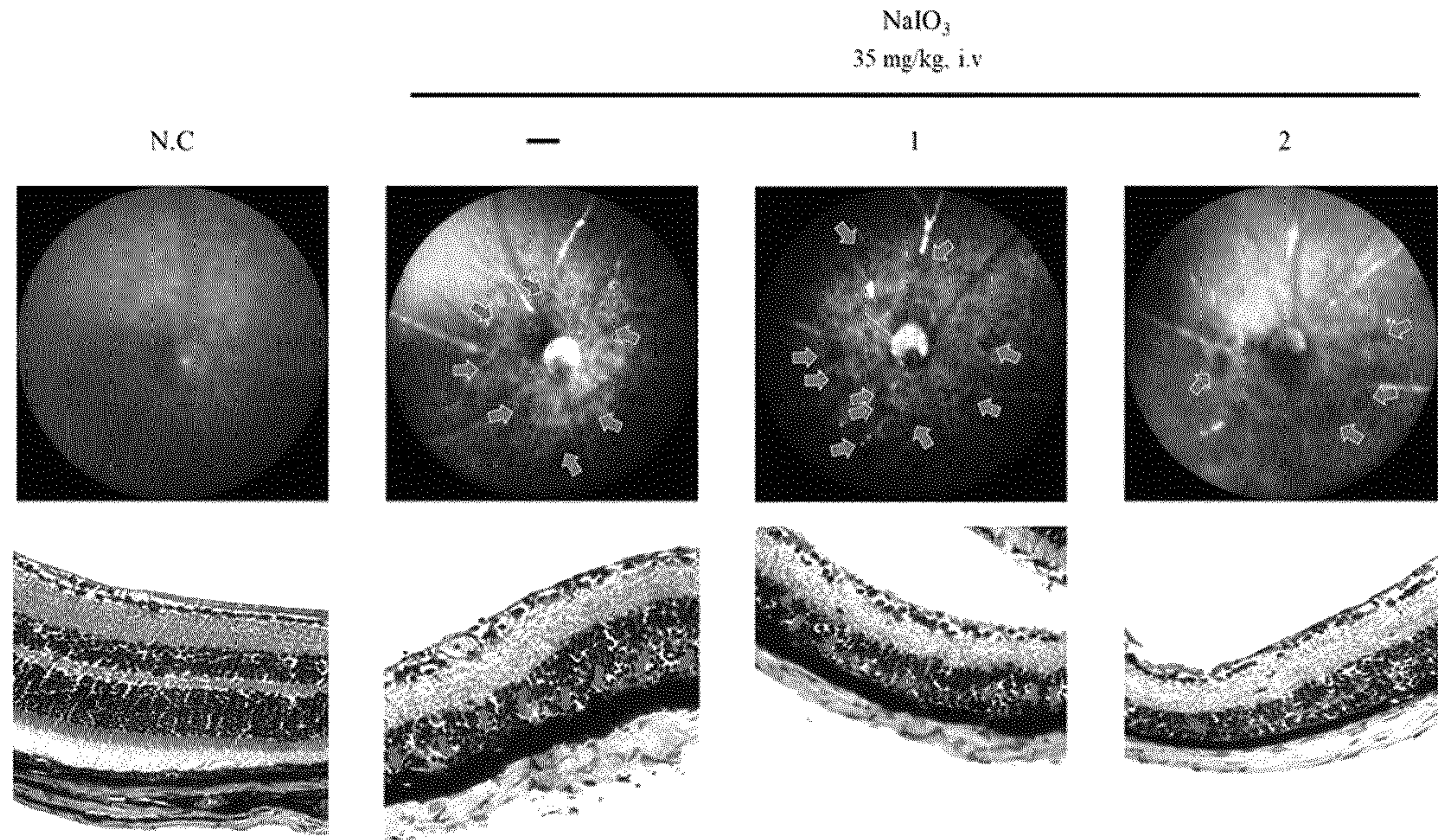
[도2a]



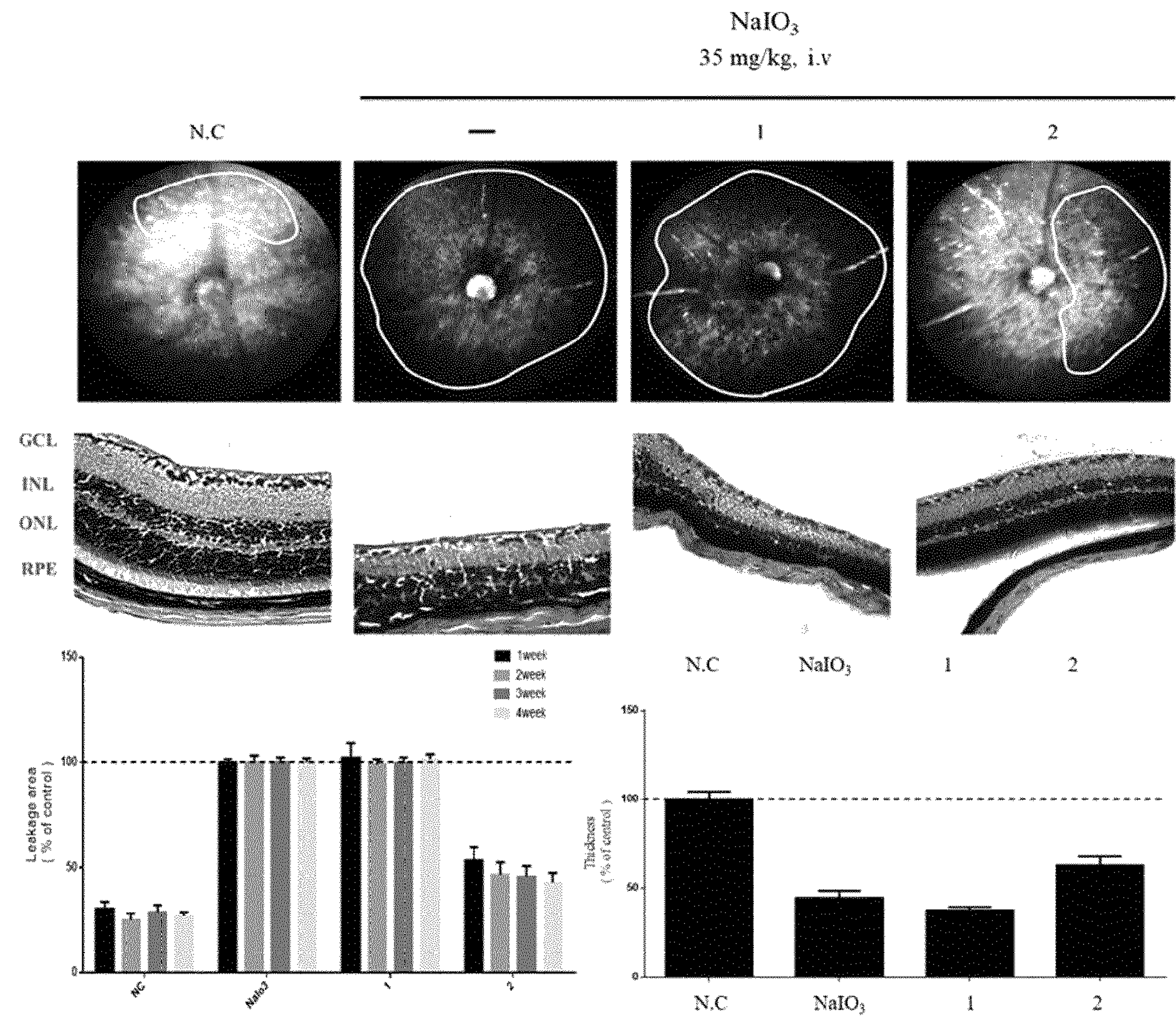
[도2b]



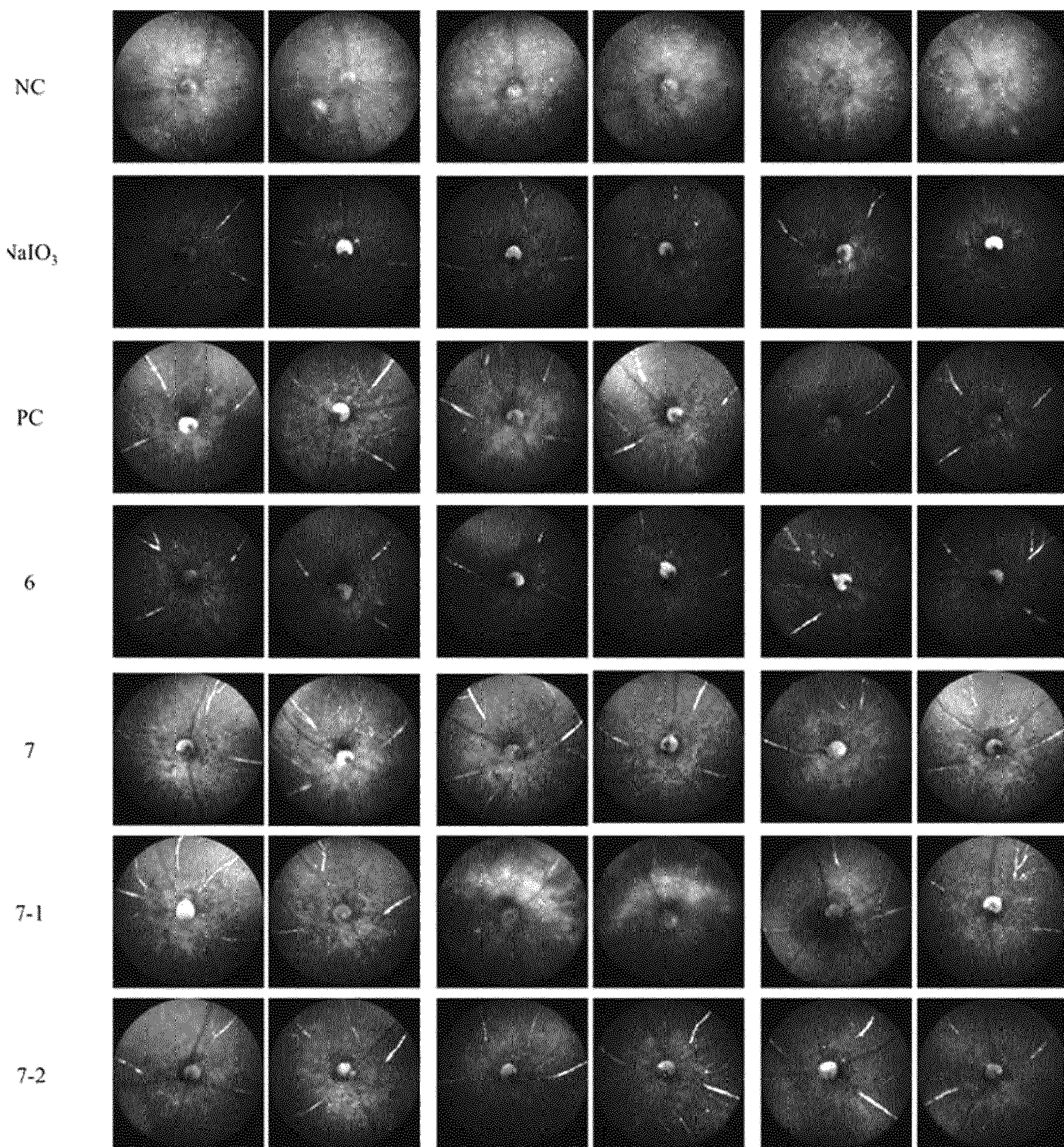
[도3]



[도4]



[도5a]



[도5b]

