

유전자 치료

Peptide Nucleic Acid를 활용한 antigene 치료

| 이창묵, 동향정보분석팀



미래선도기술 이슈분석보고서는 혁신형 중소기업 정보분석 지원사업의 일환으로 작성된 보고서로서, 유망 기술에 대한 이슈분석을 통해 국내 기업들이 자사에 적합한 사업아이템 발굴 기회를 극대화 하는데 목적이 있다. 이슈 분석 대상은 글로벌 동향 브리핑(GTB) 사업에서 축적한 약 10년간의 글로벌 모니터링 정보를 키워드 빈도분석 후 수요 조사를 통해 정하였다. 또한 국내외 연구개발동향, 산업동향 및 기술/실용화/과급효과 등의 측면에서의 이슈제기 및 분석을 해당분야 전문가와 공동으로 수행함으로써 수요자 중심의 보고서가 되도록 노력하였다.

2006 미래선도기술 이슈분석보고서

• 나노셀룰로오즈 보강 복합재료	• 광촉매 박막제조기술
• 차세대 하드디스크 HAMR	• 산업용 무선 필드버스
• 멀티페로익스(Multiferroics)	• P2P 네트워크
• 탄소나노튜브	• 센서네트워크 기술
• 휴대용 연료전지	• 온라인 게임
• 칩내장형 임베디드 기술	• 임베디드 기술
• 유전자 치료	• 심진 부동산소수점 연산기
• 열화학적 복합전환 공정	• 게임산업
• 자기 냉장고	• 나노소재를 이용한 전자소자
• 유기 반도체 태양전지	• 유기반도체(Organic Semiconductors)
• 충전기기용 나노절연재료	• 공기오염센서
• 무선 통신망간의 간섭	• 위성항법시스템 시험장(GATE)
• 이동통신-무선랜 통합망의 보안	• 위성항법시스템 소프트웨어 수신기
• 해외선진국 반도체장비 기술동향	• 광촉매의 성능 및 응용 기술 현황
• 동유럽의 VoIP 사업현황	• 해외 선진국의 DMB/DAB 기술동향
• 지능형 자동차에 사용되는 텔레매틱스 기술동향	• 신약개발을 위한 RNAi 제품 현황
• 주요 선진국의 냉동·공조 기술 현황	• 해외 선진국의 위성항법 시스템 기술 동향
• 영상진단기기 및 초음파영상진단기기 제품 현황	• 최근의 게임시장 동향
• 해외 주요국의 디지털 전자제품 동향	• 해외 주요국의 디지털 전자제품 동향

Contents

1	서론	
	Peptide nucleic acid(PNA)의 개요	06
	PNA 기술의 종류 및 특성	09
	이슈분석의 필요성	10
2	본론	
	국내외 연구개발 동향	12
	국내외 산업 동향	13
3	Antigene drug로서의 이슈	
	개발 및 치료효과와 관련한 주요이슈	16
	세포내 도입문제	17
	유전자 Targetting 문제	23
	유전자 치료상 문제	26
4	인공 DNA와 인공 gene activation의 전망	30
	참고 문헌	31

서론

1

| Peptide Nucleic Acid의 개요

| PNA 기술의 종류 및 특성

| 이슈 분석의 필요성

1 서론

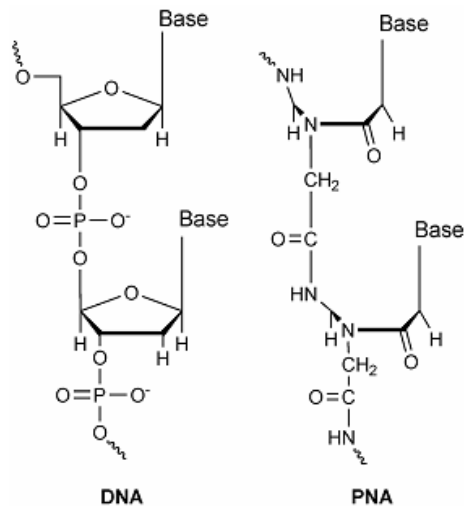
- 지난 몇 십년간 생화학자들은 수백가지의 자연 화합물 가운데 DNA와 성공적으로 결합하는 화학물질의 검색을 수행하였고, 그 가운데 Peptide Nucleic Acid (PNA)가 적절한 화학적 성질을 가지고 있다는 것을 알게 되었음 (Buchardt *et al.*, 1993).
- PNA는 핵산 DNA와 구조가 비슷한 고분자 화학 물질로 1991년 처음으로 개발되었음.
- PNA는 DNA와는 달리 그 backbone 이 단백질의 peptide와 비슷한 구조를 가지고 있음.
- PNA의 개발 목적은 DNA 이중나선 구조 자체에 결합하는 핵산을 개발하여 이중나선에 결합할 수 있는 물질이 3중나선 구조를 만들어 핵산 유전자의 발현에 영향을 미칠 것으로 예상하였음.
- 3중 나선 구조를 특정 유전자에 형성시킬 경우, DNA에서 단백질로 만들어지는 과정인 transcription과 translation 과정을 조절할 수 있을 것으로 기대하고 개발이 시작되었음.
- 이런 초기 목적은 아직 완전하지는 않다고 할 수 있음. 그러나 PNA의 생물학적 안정성은 큰 매력을 가지고 있기 때문에 몇 몇 중요한 이슈를 극복하고 응용하고자 연구가 계속되었음.
- 그 결과 최근에 많은 기술 발전으로 몇 가지 중요한 한계가 극복되기 시작하였고, 임상에서의 응용 가능성이 점차 확장되고 있음.
- 본 보고서는 PNA 개발 초기 목적을 달성하기 위하여 발생한 기술적 이슈를 살펴보고 현재까지 제안되고 실제 응용에 도입된 부분에 대하여 살펴보고자 함.

1 서론

PNA의 개요

가. 화학적·물리적 구조와 특징

- PNA는 단백질 형태를 한 핵산으로 그 기본 backbone은 폴리펩티드 (polypeptide) 구조를 형성하고 있고, heterocyclic base를 가지고 있음.
- 화학구조의 특징은 sugar backbone이 Polyamide N-(2-aminoethyl)glycine으로 대체 됨 (그림1). 이런 backbone 구조는 아주 높은 세포 내 안정성을 보여줌.
- 기존에 알려진 핵산 분해효소들은 이 구조를 인식하지 못하기 때문에 거의 분해되지 않는다. 따라서 이 물질은 즉각적으로 생체 내에서의 응용 가능성이 시험되었음.
- PNA는 전기적으로 중성이며, 약한 소수성(hydrophobicity)을 가지고 있음. 이 약한 소수성은 single-strand PNA의 경우 물에서 엉기는 원인이 됨.
- 이 엉김현상은 특이하게도 double-strand DNA를 첨가하면 사라지며, 엉김 현상이 사라진 single-strand PNA는 주어진 염기서열에 따라 DNA에 결합하게 됨.
- PNA의 backbone이 전기적으로 중성이라는 점이 이미 이중 결합을 형성하고 있는 DNA에 결합할 수 있게 함.
- PNA는 DNA 같이 이중결합을 형성하지 않고 전기적으로 음성의 성질을 가진 RNA 에도 결합할 수 있음.



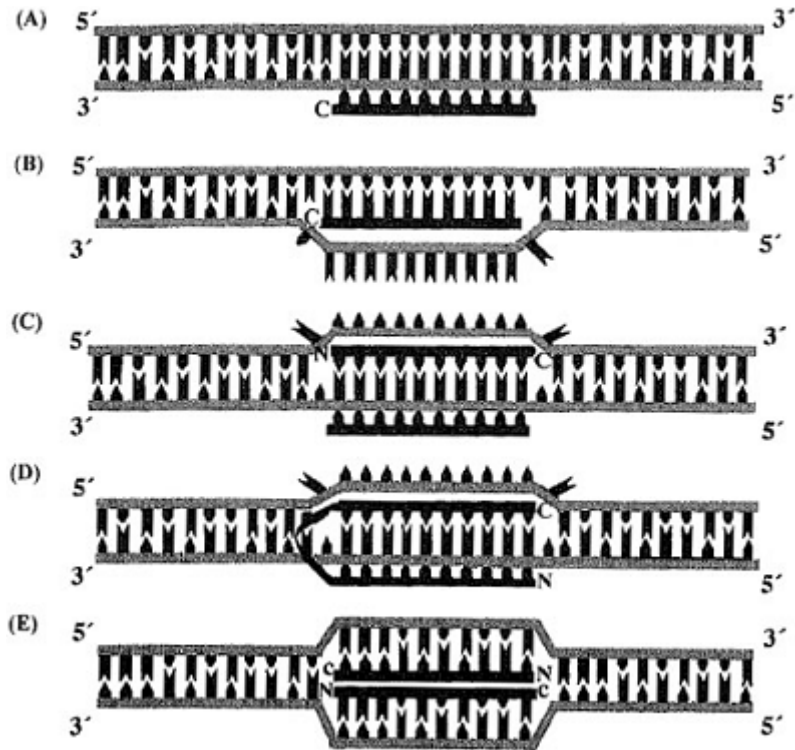
[그림 1] 핵산 (DNA)과 PNA의 화학적 구조의 유사성
 Base는 A,T,G,C 네가지가 존재하며, DNA가 인산기에 의하여 음성전기를 가진다면 PNA는 펩타이드 결합에 의하여 전기적 성질이 존재하지 않음.

나. 용액 상태의 특성

- PNA 분자 자체는 전기적으로 중성이나 수용액 상태에서 높은 농도로 용해 됨 (HEPES 완충용액 (pH7.3) 에서 0.5mM 까지 녹일 수 있음).
- 반면 PNA를 단일 가닥(single-strand)로 용액에 용해 시키면 농도에 상관없이 약한 소수성에 의해 서로 미세한 덩어리를 형성하는 특징이 있음.
- 생성된 미세한 덩어리는 화학적으로 PNA에 전하를 띤 아미노산 lysine같은 서열을 삽입할 경우 대부분 방지할 수 있음.
- 이를 PNA의 "melting 효과"라고 하며 PNA 디자인에서 반드시 고려해야 하는 문제점임.
- 반면 PNA의 용액에서의 DNA/RNA와의 결합(hybridization) 능력은 매우 높음.
- 그 결과, PNA를 원하는 DNA와 결합 시키고 3중 나선 구조를 형성 시키는 것은 아주 낮은 농도에서도 가능함.
- 중성 전하인 성질에 의하여 용액에서의 PNA-nucleic acid 결합은 다른 DNA-DNA, DNA-RNA 같은 결합에 비하여 더 온도에 안정된 특성을 보인다.

다. PNA-nucleic acid간 다형 구조 형성 원리

- 다형 구조 형성은 핵산 (DNA 또는 RNA)의 종류에 따라 형성하는 구조가 달라짐. 즉, DNA에 결합을 유도할 경우 3중나선 구조 (triplex)가 되며 RNA에 결합할 경우 2중 나선 구조 (double helix)가 이루어 짐.
- PNA-DNA 다형 구조 형성은 DNA 이중 나선의 한 가닥에 침투 (invasion) 하는 과정을 거쳐 "bisPNA clamp"라는 특이한 형태를 만들며 다형 구조를 형성 (그림 2)
- 이중 PNA-mRNA 구조 형성은 유전자 치료에서 특별히 중요한 이슈임
- PNA-mRNA의 2중 나선 결합은 P-구조(P-form) 형태로 존재하고, 이 P-구조는 PNA가 partial complement한 염기서열일 경우에도 존재함.
- 이런 특징으로 보아, PNA가 mRNA에 결합하는 능력이 매우 역동적인 mRNA 구조를 안정화 시키는 역할을 하고 있다는 것을 알 수 있음.
- 그러나 지금까지 PNA-mRNA 구조를 완전히 예상할 수 있는 안정한 방식으로 결합을 구성할 수 없는 이슈가 남아 있음.



[그림2] PNA의 DNA 와의 다중 결합 형성 과정.
(A) Double helix DNA-PNA 구조,
(B) Duplex invasion 과정,
(C) Triplex invasion 과정,
(D) bisPNA clamp 형성,
(E) Double duplex invasion 과정.

1 서론

|기술의 종류 및 특성

- PNA를 사용한 생명공학 기술은 비단 유전자 발현을 조절하는 의학적인 목적외에 분자생물학 전반에 걸친 기초 연구에 사용되고 있음.
- 예를 들어 나노 테그놀로지에서는 PNA가 극소 microchip 구성에 사용되기도 함.
- 합성된 PNA 분자는 특성과 응용 목적에 따라 기초 연구와 응용 연구로 구별하여 정리할 수 있음.
- PNA 기술의 종류는 핵산과 결합이 필요한 거의 모든 부분에 걸쳐 응용이 가능함.
 - 예를 들어, 핵산과 PNA의 뛰어난 결합성을 이용한 "molecular glue" 기능 (그림 2), DNA (또는 RNA)에 구별없이 결합할 수 있고 이온 농도에 큰 상관없이 안정한 구조를 형성하는 특성을 이용한 형광물질을 붙인 "molecular beacon"으로서의 응용, 보통의 핵산이 서로 결합하지 못하는 매우 낮은 이온 농도에서도 핵산과 결합하는 성질을 이용한 PNA-FISH (Fluorescent in situ hybridization) 응용 등이 있음.
 - 이들 응용은 기초 연구에서 많이 이용되는 PNA의 예임.
- 반면 실용적인 응용 부분의 연구는 단 하나의 염기서열 차이라도 검출 하기 위한 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)에서의 "PCR clamping" 기술, bisPNA의 결합을 이용한 인공적인 제한 효소 작용점 도입과 특정 염색체 부위 절단, 핵산 특정 위치에 대한 methylation을 억제 시켜 생체에서 실제로 일어나지 않는 형태의 유전자 조작을 수행하는 것 등이 대표적임.

1 서론

|이슈 분석의 필요성

- PNA를 합성하는 것은 단백질을 생합성하는 것과 동일한 과정을 거침.
- 이는 PNA를 사용한 연구가 기존에 있는 설비만으로도 상업적으로 확장될 수 있다는 큰 장점을 보여 줌.
- 하지만 단백질 합성에 들어가는 경비가 아직 DNA 합성 경비보다 높기 때문에, PNA 합성도 대량으로 할 경우 경비 문제가 발생하고, 결국 대량 합성을 요구하는 functional genomics의 경우 PNA의 적용에 한계가 있음.
- 그럼에도 상업화에 성공할 경우 그 파급 효과는 매우 광범위하고, 그 상업화에 근거한 새로운 2차 첨단 기술의 개발이 가능함.
- 앞에서 설명한 몇 가지 예만 살펴보아도 핵산을 포함한 모든 분자 생물학적 응용에 PNA가 관여할 수 있음.

본론

2

- | 국내외 연구개발 동향
- | 국내외 산업 동향

2 본론

| 국내외 연구개발 동향

- PNA의 응용에서 지금까지 가장 큰 장애가 된 점은 이 고분자 물질이 전기적으로 중성이므로 지질로 구성된 생체막 (lipid membrane)을 통과하는 효율이 너무 낮아 고등 세포에 적용하기 어렵다는 점임.
- PNA는 전기적인 성질이 없기 때문에 세포 내로 자연스럽게 확산되는 속도가 너무 낮거나 거의 되지 않음.
- 이 물리적 성질이 지금까지 중요한 한계점으로 작용하여 응용에 장애가 되어왔음.
 - 그러나 이부분에 대한 최근의 발전에 힘입어 세포내부로 투과성을 크게 증가시키는 것이 가능해 지게 됨.
- 현재는 임상예의 응용이 벌써 시작되고 있음. 예를 들어 진단 단계의 PNA를 이용한 PCR clamp는 단 하나의 염기서열 변화도 측정가능함.
 - PNA를 FISH 기법에 이용한 염색체 상의 특정 유전자 검출도 임상 응용의 한 예가 됨.

2 본론

| 국내외 산업동향

가. 합성 분야

- 국내에서는 메신저 바이오텍 회사에서 PNA를 합성하여 판매하고 있고 (<http://m-biotech.co.rk/>) 해외에서는 미국과 유럽 등지의 많은 회사에서 상업적 목적의 PNA 합성이 가능함.
- 대표적인 회사는 Eurogentec (www.eurogentec.be), Active Motif (www.activemotif.com), BioSynthesis (www.biosyn.com) 등이 있음.
- PNA 합성은 기술적으로 이미 다양한 합성기법이 응용 가능하며 사용자의 요구를 충분히 수용하고 있음.

나. Antigene 응용 분야

- PNA의 유전자 발현 조절에 대한 응용은 매우 광범위하게 이루어지고 있음.
 - 일반적으로 연구 목적의 PNA는 직·간접적으로 생체에서 중요한 역할을 수행하는 핵산인 mRNA, 바이러스 RNA, RNP에 대하여 발현을 억제하거나 기능을 변화시키는 것에 집중되어 있음.
 - 또한 점차 기존에 기능을 모르고 있으나 발현되는 구조 RNA (예를 들어 snRNA)들의 기능을 연구하는데 이용되고 있음.
 - 게다가 PNA는 발현에 관련된 일반적인 현상과 메커니즘 연구에 포괄적으로 응용됨. RNA polymerase의 전사과정 종결에 대한 연구가 그 예임 (Guffanti *et al.*, 2004).
 - 임상에서의 응용은 흔히 보편적인 primer를 사용한 antisense 접근 방식과 혼동되고 있음.
 - 이유는 둘의 기본적 접근 개념이 동일하기 때문인데, 그러나 antisense와 PNA는 서로 다른 기작으로 antigene 역할을 수행하게 됨.
 - Antisense 접근 방식은 특정 유전자와의 일시적인 complex 형성에 의존하지만, PNA는 세포 내 효소들의 분해에 대하여 안정하기 때문에 antigene의 역할은 주로 3차원 구조에 의한 것임.
- 따라서 PNA antigene은 PNA 결합체에 의한 발현 조절이라고 할 수 있음.

- 또한 antisense 접근과는 달리 PNA는 세포 내 단백질에 의하여 특별하게 인식되지 않는 화학물질이기 때문에 비 특이적 면역반응 (complicated immune response)을 일으키지 않음.
- 따라서 PNA를 사용한 경우는 antisense 접근 방식에서는 흔히 문제가 되는 Toll-like receptor (TLR) 반응이 생기지 않음
 - TLR은 DNA motif나 double-stranded RNA를 인식하는 문제를 발생시킴.
- 현재까지 PNA의 약리화학적 성질은 임상에 적용가능하기에 충분하다고 알려지고 있음.
- 또한 PNA 약물의 세포 내 분포도 PNA 자체를 변화시켜 적절하게 수정할 수 있음.

Antigene Drug로서의 이슈

3

- | 개발 및 치료효과와 관련한 주요이슈
- | 세포내 도입문제
- | 유전자 Targetting 문제
- | 유전자 치료상 문제

3 Antigene drug로서의 이슈

- 이론적으로 PNA는 모든 유전자 발현을 억제할 수 있어야 하나, 실제로는 여러 변수가 작용하기 때문에 이들 변수를 적절히 조절하는 부분이 현재 가장 큰 이슈가 되고 있음.
- 이슈가 되는 문제로는
 - PNA가 특정RNA만 결합하게 하는데에 부분적인 제한 사항이 있음. 이는 PNA 결합에 관여한 구조적 방해(steric hindrance)가 완전히 예측 가능하게 조절 되지 않기 때문으로 알려짐.
 - 일단 성공적으로 유전자 발현을 막은 뒤 PNA를다시 제거하는 문제가 존재함. PNA는 세포 내 분해 효소 (RNase H)같은 것에 의한 non-specific degradatin작용을 받지 않기 때문에 필요에 의하여 PNA와 결합한 핵산만을 다시 회수하는데 어려움이 따름.
 - 생체에서 실제로 antigene drug이 되기위하여 핵산과의 co-localization의 문제가 중요한 변수로 관여함. 물리적인 성질 차이에 의하여 일반적으로 핵산은 용해된 상태로 cytoplasm에 주로 존재하지만, PNA는 세포 내에서 특정 조직에 모이는 endocytic compartment를 형성하는 경향이 있음.
 - 특히 핵산이 세포 내에서 3차 (또는 4차) 구조를 형성하면 PNA가 접근하기 매우 어렵게 됨. 그 결과 세포 내에서 실제로 PNA-RNA 결합 조건이 실험실에서 예상되는 조건과 다른 경우가 많음. 이는 결합에 관여하는 Tm (Melting Temperature) 값이 일반적인 Tm과는 다르기 때문에 발생하는 현상임.

3 Antigene drug로서의 이슈

| 개발 및 치료효과와 관련한 주요이슈

가. 세포 내 (*in vivo*) 도입 문제

- PNA의 세포 내 (*in vivo*) 도입 문제는 응용에 대한 중요한 이슈임(Nielsen, 2002).
- 이 문제는 PNA의 세포 내 도입이 세포벽에 포함된 지질 성분 (lipid)에 의하여 크게 장애를 받기 때문에 생기는 현상으로, 이 이슈는 근본적으로 전기적 중성 성질에 의한 것이므로, PNA-conjugate 형태라도 세포 내 uptake에 문제를 만듦.
- 이상의 물리적 특성 때문에 세포벽의 receptor를 통한 PNA 흡수는 보통 생기지 않음.
- 그리고 현재까지 아주 제한적인 실험실 내 세포 배양에서만 이런 자연 흡수 (free delivery)가 보고 되고 있으며, 특히 이런 자연 흡수가 이루어 지기 위해서는 아주 높은 농도 (220pM 이상)의 PNA가 세포 주위에 존재해야 함.
 - 이런 농도하에서는 세포 자체에 손상을 끼치게 되므로 PNA의 응용이 불가능한 문제가 보고 되고 있음 (Sei *et al.*, 2000).
- 또한 변형되지 않은 PNA를 실제 세포 내로 도입하는 시도를 쥐를 대상으로 하여 많이 시도하였고 (McMahon *et al.*, 2002), 비록 몇몇 연구에서는 성공적인 보고가 있음.
- 그러나 이 경우 각 실험의 재현성이 매우 달라 결국 변형되지 않은 PNA를 실제 세포에 사용할 경우, 각 PNA에 따른 조건 확립이 필요해 보임.
- 최소한 쥐를 실험 대상으로 하였을 경우, PNA를 transferring receptor binding monoclonal antibody로 conjugate 시킬 경우 정맥 주사로 뇌로 PNA를 도입하는 것이 가능하다는 보고가 있음 (Pardridge *et al.*, 1995).
- 여기에 근거한 주목할 만한 사항은 대부분의 성공적인 생체 내 도입이 중추 신경을 대상으로 PNA를 적용할 때 였다는 점 임.
- 이는 PNA는 그 물리적 성질 때문에 blood-brain barrier를 넘어서 이동할 수 있다는 점을 나타냄.
- 이 점이 시사하는 바는 중추신경계(Central Nervous System)이 PNA의 antigene 치료에 유용한 도구로 사용될 수 있다는 점임.

- 대부분의 경우, PNA를 그냥 사용하기 보다 특정 분자와 conjugate 시킬 경우, 세포 내 도입이 용이하다고 보고되어 있음 (Thierry *et al.*, 2003).
- PNA와 conjugate 시켜 세포 내 도입에 성공한 경우로 cell penetrating activity (CPP) 기능을 가진 HIV 의 pTat을 사용한 경우 (Vives *et al.*, 1997), Conjuate 시킨 물질의(예를 들어, transportan) translocation 작용을 이용한 경우 (Belting *et al.*, 2005) 등이 대표적임.
- PNA-conjugate from이 비록 더 많이 세포 내로 흡수된 경우에도 문제는 생기는데, Conjugated 물질의 독성이 예상됨.
- 따라서 충분히 낮은 농도로 세포 내 도입이 될 수 있는 적절한 conjugate 물질을 사용하는 것이 PNA 세포 내 도입에서 매우 중요한 이슈임.
- 독성을 낮추고 도입 효율을 높이기 위한 여러 conjugate 시도가 있었는데, 성공사례로 아주 작은 양 (100nM)의 anti-TAR-PNA-transportan conjugate를 사용한 HIV 바이러스의 억제 (Chaubey *et al.*, 2005), 바이러스 SV40-T antigen nuclear localization signal (NLS)을 사용할 경우 극미량 PNA (3~5pM)도 세포 내에 도입될 수 있다는 연구 (Sazani *et al.*, 2001)는 PNA를 세포 내 도입 하는 이슈에 대한 주목할 만한 해결책이 될 수 있음.
- 세포 내에 도입되는 PNA의 양을 적절하게 측정하는 방법에 대한 방법도 고려될 필요가 있음.
- 지난 몇 년간 이 세포 내 도입되는 양을 biological assay로 측정하였으나 (Koppelhus *et al.*, 2002), 최근에는 PNA에 형광물질을 직접 붙여 이 형광양을 측정하는 방식으로 변경되고 있음 (Kaihatsu *et al.*, 2004).
- 최근까지 세포 내 PNA 도입에 대하여 시도된 대표적인 방법들을 정리하면 표1 과 같음.

[표 1] 고등 세포에 PNA를 도입하기 위하여 시도된 방법

PNA 변형 및 labeling	Delivery 방법	PNA농도 (M)	세포 형태	검출법	참고문헌
Mixed base(Mb)-15mer unmodified	직접도입	>30	H9 세포 (HIV-infected)	Antisense / FACS	(Sei <i>et al.</i> , 2000)
Mb-21mer -transportan	CPP(Cell-penetrating protein) 방법	1	Bowes melanoma	IF (avidin conjugated)	(Pooga <i>et al.</i> , 1998)
Mb 13mer-4 amino acids-fluorescein	Insuline-like growth factor I- receptor mediated	1	P6 세포	¹⁴ C 흡수량	(Basu and Wickstrom, 1997)
Mb 13mer - (lactose) ₈ -rhodamine	Asialoglycoprotein receptor-mediated	1	HepG2	IF (telomerase inhibition)	(Zhang <i>et al.</i> , 2001)
Mb 13mer-rhodamine	리포솜 (liposome)	1	DU145 (전립선암세포)	IF / FACS (telomerase inhibition)	(Hamilton <i>et al.</i> , 1997)
bisPNA-Lysine-fluorescein	Streptolysin O	1	3340 세포 (mouse fibroblast)	IF / FACS	(Faruqi <i>et al.</i> , 1998)
bisPNA	Electroporation	2~5	K562 세포	유전자발현	(Wang <i>et al.</i> , 1999)

나. 유전자 targeting 문제

- 세포 내 PNA 도입과 더불어 RNA와 PNA의 결합은 antigene 치료의 중요한 이슈라고 할 수 있음.
- 왜냐하면 정확한 PNA-RNA 결합은 antisense 개념이 도입된 모든 유전자 치료에 응용 가능하기 때문임.
- 그러나 RNA-PNA 결합체가 실제 확대 응용 되기 위하여 몇 가지 해결해야 할 문제가 있음.
 - 즉, PNA와 RNA의 결합을 생체 내에서 정확하게 예측하기 어렵다는 점과, PNA-RNA 구성체는 생체 분해 효소 RNaseH의 조절을 받지 못한다는 점임.
- 이 효소 (RNaseH 나 기타 nuclease 계열)를 사용하지 못할 경우 나중에 PNA-RNA 구성체에서 RNA를 나중에 제거할 때 문제가 발생함.
- PNA-RNA 구성체가 유전자 발현 조작시 작용하는 메커니즘은 구성체의 translation inhibition에 의한 조절임.
 - 지금까지 보고된 바로는 이PNA-RNA 구성체가 Rnase H나 siRNA의 RISC component와 반응한다는 보고가 없음.
- 반면 PNA-RNA 구성체를 형성하지 못한 남아있는 RNA들은 위의 핵산 제거 효소 (nuclease)의 영향으로 세포 내의 존재량이 감소하게 된다는 보고가 있음.
- 따라서 PNA가 RNA를 특이적으로 억제하기 위하여 몇 가지 이슈에 대한 해결이 필요함.
 - 즉, 1) PNA의 RNA와의 hybridization 단계에서의 문제,
 - 2) PNA와 결합 후 특히 mRNA의 splicing에 미치는 영향,
 - 3) ribonucleoprotein complex에 미치는 영향 등이 중요한 이슈가 됨.
- 각 단계를 세분하여 살펴보면 다음과 같은 문제점이 존재함.
 - 1) PNA와 RNA의 hybridization
 - : 이 단계에서는 세포 내 요인들이 중요한 역할을 함.
- PNA가 적절한 RNA target과 결합하기 위하여 그 RNA가 존재하는 세포 내 소기관으로 동시에 위치 (colocalization)되어야 하지만, PNA가 세포 내에 도입되었을 때 정확하게 어떤 위치에 많이 존재하게 되는지에 대한 연구가 거의 되어 있지 못하며, 기존의 연구성과도 서로 상반될 경우가 보임.
- 즉, 형광 현미경을 사용한 몇몇 연구에 따르면 세포로 도입된 PNA가 주로 endocytic compartment에 모여 있는 것으로 보이지만 (Folini *et al.*, 2003), 다른 연구에 의하면 PNA가 세포 핵으로 이동하는 경우도 보고 되고 있음 (Bonham *et al.*, 1995).
- 따라서 이 문제는 PNA를 도입하는 것과 동시에 endosome을 파괴 시키는 다른 단계를 더 도입함으로써 효과를 보는 정도로만 각 PNA 응용별로 연구가 되어 있음 (Folini *et al.*, 2003).
- Antigene target으로 유용한 RNA는 많은 경우, 세포 내 단백질과 서로 상호작용하고 있음.

- 그리고 이 RNA와 단백질 간의 작용 메커니즘은 RNA에 따라 서로 다르며 매우 복잡하고 잘 이해되지 못한 상황이므로, 여기에 PNA가 첨가 되었을 때 PNA가 단백질과 상호 작용하는 특정 RNA를 어떻게 찾아 갈지에 대한 예측이 어렵다는 문제가 있음 (Off-target 문제로 불림).
- PNA-RNA간의 결합이 이루어지는 조건에 대한 이론적인 예측도 문제가 되는 이슈임.
- PNA의 서열을 근거로 RNA와 결합하는 온도에 대한 예측이 가능하지만, 이 예측값이 세포 내에서 그대로 적용되지 않을 경우가 많으며 부가적인 실험이 필요함.

2) 고등 생물의 mRNA에 PNA가 결합할 때 그 mRNA의 splicing 에 미치는 영향 :

- 세균의 경우 단백질로 변화되는 RNA는 splice 과정을 거치지 않지만, 고등 생물의 RNA는 mRNA의 splice 과정을 거침.
- 그러므로 세균의 PNA antigene 디자인과 달리, 고등 생물의 경우 이 splice 과정이 PNA 응용에서 고려하여야 할 중요한 이슈임.
- 실제로 세균의 유전자 발현을 조절하기 위한 경우, 대부분의 세균에 공통으로 존재하는 6~13 bp 의 Shine-Dalgarno 부분이 흔히 PNA의 target으로 이용됨.
- 반면 고등 생물에서 PNA를 적절하게 디자인 할 경우 mRNA의 splice 과정에 구조적인 방해를 일으켜 특정 단백질의 축적을 억제하거나 반대로 촉진할 수 있게 함.
- 특정 유전자의 splice 위치는 최근의 genome sequencing의 결과로 많은 부분 컴퓨터 분석으로 정해져 있으므로, 이 splice 위치가 PNA 디자인에서 고려되어야 함.

3) Ribonucleoprotein complex에 미치는 영향 :

- 단백질과 complex를 형성하는 RNA의 경우, 단백질과 상호 작용하는 부위를 선정하여 PNA를 디자인할 경우 효율이 거의 나타나지 않음.
- 예를 들어, 세포에 가장 많으며 병원균에 특이적인 rRNA를 PNA antigene target으로 사용하려고 할 경우, rRNA가 리보솜에서 노출되는 부분만을 PNA target으로 사용할 수 있음.
- 이와 유사하게 telomerase가 염색체에 작용하는 특정 염기서열 (5' -TTAGGG-3')을 PNA로 antigene 하려고 할 경우, telomerase assembly 가 형성되기 전에 사용하여야 한다는 점이 문제가 됨.

다. 유전자 치료상 문제

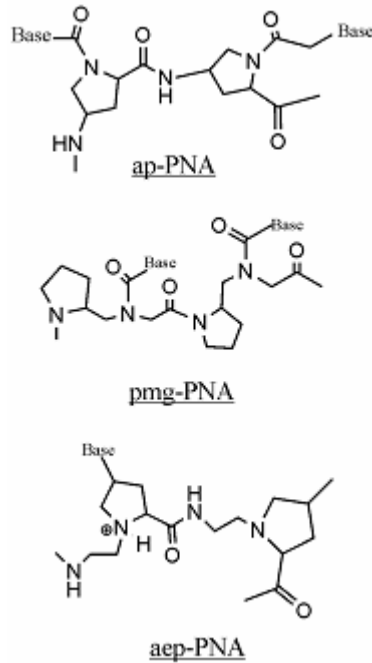
- PNA가 염색체 수준에서 invasion한다는 사실은 DNA에 저장된 유전정보 자체에 작용하여 유전자의 발현을 조절할 수 있다는 가능성을 보여주고 있음.
- 그러나, 앞에서 살펴본 바와 같이 이런 gene therapy를 응용하기 위하여 PNA를 세포 핵으로 직접 전달하여야 한다는 문제가 존재함.
- 세포 핵으로 직접 전달하기 어려운 경우의 유전자 치료를 위하여 이중나선 DNA에 직접 작용하는 것과 비슷하게 transcription factor의 유인 (decoy) RNA로 PNA를 사용하는 경우가 있음.
- 이 경우에도 PNA의 도입 위치가 특정 transcription factor가 존재하는 부위와 일치하여야 하는 문제가 있음.

3 Antigene drug로서의 이슈

| 세포내 도입문제

가. Unmodified-PNA의 경우의 문제점과 해결방안

- 변형이 되지 않은 PNA의 세포 내 도입이 이슈가 된 이후, PNA의 변형체에 대한 연구가 계속됨.
- 초기의 변형체인 aminoethylglycine PNA (aeg-PNA)가 도입된 이후 여기에 근거한 다양한 PNA의 변형이 시도되었는데, Glycine 대신 다른 아미노산을 결합하는 등의 방법이 그것임.
- 그러나 이 방법으로 변형된 PNA 들은 합성단계에서 부가적인 어려움이 발생하고 또한 DNA(또는 RNA) 결합력도 aeg-PNA보다 떨어지는 문제가 발생함.
- 이 문제를 극복하기 위하여 시도된 여러 방법 가운데 가장 성공적인 방식은 aeg-PNA에 4개의 proline 아미노산을 결합한 변형체 (ap-PNA로 불림)로 이 변형체는 PNA-DNA 결합이 안정될 뿐만 아니라 PNA가 DNA에 결합할 때의 5' / 3' 방향성도 조절할 수 있게 됨.
- DNA 보다 RNA에 더 잘 결합하는 것으로 보고된 PNA 변형체도 존재하는데, 대표적인 것이 pyrrolidine-methyl-thymine-1-acetyl-glycine-PNA (pmg-PNA) 인데 이 변형체에 두개 정도의 R-isomer를 도입하면 RNA에 특별히 더 잘 결합하는 성질을 부여할 수 있음.
- 이와 반대로 DNA 에 특별히 잘 결합하는 PNA 변형체는 구조에 전기적인 성질을 부여시키는 aminoethylpropyl 그룹을 도입한 예가 그것임(aep-PNA).
- 이상 대표적인 PNA 변형체의 구조를 비교하면 그림 3과 같음.
- 그러나 아직까지 모든 응용 면에서 만족할 만한 변형 PNA는 존재하지 않음.
 - 이유는 PNA의 결합에서 DNA/RNA substrate-specificity를 증가 시키면, 결합 안정도가 떨어지는 문제가 생기기 때문임.



[그림 3] 변형 PNA의 화학적 구조

나. Conjugated-PNA의 경우의 문제점과 해결방안

- 세포 내 도입을 촉진 하기 위하여 많은 경우 PNA는 특정 Cell-penetrating property (CPP) 단백질을 conjugate 시킴.
- Conjugate 시키는 방법은 합성 단계에서 이루어 지기도 하고 또는 합성이 완전히 끝난 다음에 별도의 반응을 거쳐 이루어지기도 함.
- 이렇게 PNA를 적당한 방식으로 conjugate 시킬 경우 세포 내 도입이 크게 증가하는 사실이 알려져 있지만 (500nM 정도의 낮은 농도에서도 PNA의 흡수가 이루어짐), PNA에 따라 그 정도에 많이 차이가 나는 단점이 있음.
- 이는 PNA가 비록 전기적으로 중성이나 conjugate에 의해 구조적인 방해 를 야기하기 때문으로 예측하고 있음.
- 따라서 PNA의 디자인에서 conjugate 하는 물질과의 steric hindrance 를 미리 확인하는 것이 중요함.
- PNA와 conjugate 되는 CPP는 세포의 receptor를 거쳐서 이루어지지 않는 것이어야 높은 효율 확보가 가능함.
- 그리고 세포 내로 도입되는 과정에서 에너지 소비율이 너무 높을 경우도 문제가 되는데, 아직까지 CPP가 세포에서 작용하는 translocation 메커니즘은 정확히 모르고 있으며 endocytosis나 확산 기작이 작용하는 것으로만 추정하고 있음(Belting *et al.*, 2005).
- 따라서 CPP와 PNA 의 적절한 조합을 테스트하는 과정이 세포 내 효율을 높이기 위한 중요한 이슈가 됨.

다. Liposome PNA의 경우의 문제점과 해결방안

- 지난 2004년 PNA의 세포 내 직접 도입과 PNA-lipid 결합체의 도입을 비교한 연구에 따르면 PNA의 전기적 중성 성질이 lipid에 의해 변하게 된다는 것을 알게 되됨.
- 그 결과 직접 PNA를 도입하는 방법에 비하여 40~50배 정도의 효율로 더 많이 세포 내로 도입되는 것을 확인할 수 있었음 (Kaihatsu *et al.*, 2004).
- 이 연구에 연이어 PNA를 liposome으로 둘러싼 방식으로 도입하는 기술이 많이 시도됨.
- 그러나 liposome을 사용한 경우, 사용된 과량의 lipid 성분에 의하여 세포들이 괴사하는 문제점을 보이기 시작하였음.
- 암세포와 같은 immortal cell line의 경우 liposome에 의한 괴사 문제는 적었지만, 실제 생체 세포에서 유래한 primary cell line의 경우 이 문제가 심각한 이슈로 드러남.
 - 반면 이러한 세포 괴사는 PNA를 직접 사용한 경우에는 심각하게 나타나지 않았음.
- 위 이슈에 대한 대처 방안으로 세포벽 lipid에 친화성을 가진(lipophilic) triphenylphosphonium (TPP)을 대신 사용하는 방법이 시도되고 있음.
 - 이 방법의 문제는 사용된 lipid 친화성의 특성에 따라 세포 내 소기관에 PNA가 축적되는 경향이 있다는 점임.
- 실제로 위의 TPP는 PNA를 미토콘드리아에만 도입되게 하는 단점이 나타났고, 최근에는 이런 문제를 해결하기 위한 방안으로 thiol-TPP를 사용한 disulfide bond의 환원으로 어느정도 극복 가능하다고 보고 되고 있음 (Filipovska *et al.*, 2004).

3 Antigene drug로서의 이슈

| 유전자 Targetting 문제

가. RNA 염기서열 인식 부분의 문제점과 해결방안

- Antigene으로서의 PNA는 DNA 및 RNA두가지 중요 target에 대한 특이적인 염기서열 인식이 필요함.
- PNA 응용에서 DNA는 유전자 치료 (gene therapy)에, 그리고 RNA는 유전자의 발현을 조절하는데 의미를 가짐.
- PNA-DNA 결합체는 PNA의 invasion 메커니즘에 의하여 형성되는 반면 PNA-RNA 결합체는 염기서열의 affinity에 의하여 정해짐.
- 일반적으로 PNA의 위 두가지 핵산에 대한 hybridization은 매우 정확하게 이루어짐.
- 실제로 실험실 상황에서는 단 하나의 염기서열에 차이가 생긴 경우에도 PNA의 결합이 제대로 이루어지지 않게 됨.
- 문제는 두 경우 모두 PNA가 생체 내에서 적절하게 노출된 DNA/RNA부위를 찾아갈 수 있는가 하는 점이며, 만약 접근이 불가능 할 경우 다른 방식의 전략이 필요한 상황임.
- 이에 대한 대표적으로 사용되는 전략은 유전자 자체 염기서열이 아닌 transcription factor가 결합하는 위치를 target으로 하여 PNA를 디자인 하는 방식임.
- 이렇게 함으로서 특정 유전자의 발현을 억제하거나 과다 발현할 수 있게 되는데, DNA의 경우에도 PNA가 DNA에 결합하는 과정 중에 생기는 single-stranded DNA loop (D-loop라고 불린다)를 이용하여 transcription factor를 by-pass 시키는 방식을 이용하기도 함 (Wang *et al.*, 2001).

나. Ribonucleoprotein Complex와의 상호작용 문제와 해결방안

- 특정 유전자의 발현을 조절하기 위하여 위와 같은 유전자 targeting 문제를 회피할 수 없는 경우 (즉, ribonucleoprotein을 target으로 정해야 할 경우), PNA는 유전자 발현 시 형성되는 초기 assembly 부분에 작용하게 디자인 됨.
- 이유는 초기 ribonucleoprotein complex가 생기는 시점에서 PNA에 의한 steric hindrance를 가장 극대화 시킬 수 있기 때문임(Knudsen and Nielsen, 1996).

3 Antigene drug로서의 이슈

| 유전자 치료상 문제

가. 유용 유전자 과대 발현 유도

- 특정 유전자를 PNA를 사용하여 과대 발현 시키는 방법이 가능한데, 사용하는 기법의 개요는 artificial promoter로 특정 유전자의 DNA 부위를 target으로 PNA와 결합시켜 D-loop를 형성시켜 이 부분에 transcription factor가 작용하게 하는 방식임.
- 실제로 이 방법을 사용하여 promoter가 없는 플라스미드에서 GFP 단백질을 과대 발현 시키는 것이 가능함.
- 이런 PNA artificial promoter에서 고려하여야 할 이슈는 어느 정도의 PNA 길이가 가장 적합한가 하는 점인데, 지금까지 16~18 base 정도가 가장 적합하다고 알려져 있음 (Wang *et al.*, 2001).
- 또 다른 유용 유전자 과대 발현의 기법도 최근에 새로운 이슈로 등장하고 있음.
- 이 기법은 yeast 2-hybrid의 activation domain / binding domain의 원리를 이용하고 있음.
 - 이 방법의 개요는 PNA-peptide chimera 를 합성하되 peptide부분은 Gal80 transcriptional repressor에 결합하게 디자인 함.
- PNA 자체만 사용할 경우, 유전자 발현이 거의 완전히 억제되지만, 이 PNA-Gal80 binding peptide를 DNA와 결합 시킬 경우는 반대로 transcription이 완전히 회복됨 (Liu *et al.*, 2003).
- 최근에 이 기술은 유전자의 억제와 과대 발현에 응용 될 수 있는 이슈로 부각되고 있음.

나. 질병 유전자 발현 억제

- Peptide와 conjugate 된 PNA가 세균의 활성을 없애는 역할을 한다는 결과가 있음. 원리는 앞에서 설명한 바와 같이 Peptide-PNA conjugate 형태가 세균의 RNA를 억제하여 최종적으로 세균을 죽이는 역할을 하는 것임 (Nekhotiaeva *et al.*, 2004).

- 병원균의 경우 고등 세포와 달리 유전자 발현 기작이 비교적 단순하고 잘 알려져 있으므로, 대부분 병원균의 잘 보존된 Shine-Dalgarno 부분을 PNA의 중요한 target 부분으로 이용함.
- 최근에 PNA를 사용한 질병 유전자 억제에 대한 주요한 이슈는, 항생제에 저항성을 획득한 병원성 세균의 drug efflux pumping 시스템이 PNA를 인식하는지 하지 못하는지에 집중하고 있음.
- 이 문제는 여러 항생제에 복합 저항성을 획득한 "super bug" 치료에 중요한 이슈가 됨.
- 즉, PNA가 multi-drug resistant 균주의 pumping 대상이 되지 않을 경우, 적절한 PNA를 디자인 하여 세균의 성장을 항생제와 상관없이 억제할 수 있기 때문임.
- 현재 이 기법이 실용화 될 수 있는 가능성이 있는데, 놀랍게도 PNA에 의해 RNA 발현을 억제 할 경우 병원균의 항생제 예민성이 크게 증가한다고 알려지고 있음 (Dryselius *et al.*, 2005).

다. 바이러스 RNA 발현 억제

- 의학적으로 중요한 병을 일으키는 HIV를 포함한 많은 바이러스는 그 genome으로 RNA를 사용하고 있음.
- 또한 질병을 일으키는 바이러스들은 서로간에 잘 보존된 염기서열 부분 (DNA 바이러스의 경우)이나 또는 2차 구조 (RNA 바이러스의 경우)를 가지고 있는데, 최근에 이런 잘 보존된 특성을 이용한 PNA 구성이 중요한 이슈가 되고 있음.
- 전형적인 DNA 바이러스의 경우 mRNA로 숙주에서 발현되기 위하여 internal ribosomal entry site (IRES)를 가지고 있는데, PNA를 사용한 DNA RNA 과정을 억제하는 실험이 이미 성공하였음 (Koppelhus *et al.*, 2002).
- 더욱 최근의 이슈는 이 기법을 응용할 경우 RNA 바이러스를 억제할 수 있는지에 초점이 맞춰지고 있음.
- 이 부분은 몇몇 성공적인 사례가 발표되고 있음.
- 즉, RNA 바이러스에서 잘 보존된 구조 부분 가운데, 바이러스 RNA genome dimerization에 중요한 TAR hairpin loop, HIV 바이러스 Rev-response element (RRE), B형C형 간염 바이러스 IRES 부위 등이 PNA의 target으로 이용될 경우 RNA 바이러스 성장을 억제 할 수 있다고 보고됨 (Chaubey *et al.*, 2005; Robaczewska *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2005).

인공 DNA와 인공 gene activation의 전망

4

4 인공 DNA와 인공 gene activation의 전망

- PNA를 사용한 인공 DNA와 antigene으로서의 기능은 지난 10년간 새로운 형태의 PNA 연구개발로 계속 확인되고 있음.
- PNA를 사용한 인공 DNA는 여러 가지 장점을 제공하고 있음.
 - 즉, 실험실에서 합성하기 쉬우며 펩타이드를 붙임으로서 새로운 기능을 도입할 수 있다는 장점 이외에도, 필요에 따라 형광물질을 붙이거나 이온을 결합시켜 용해도와 세포 내 흡수력을 증가 시키기 용이하다는 점임.
- 이러한 장점이 PNA의 미래 응용에 밝은 전망을 제공하고 있음.
- 지금까지의 이슈를 검토하면 PNA를 사용한 antigene은 세 가지 요인의 적절한 균형이 관건이라고 할 수 있음.
 - 즉, high-affinity binding, stringent sequence specificity, 세포 내 도입 효율이 그것임.
- 또한 PNA가 세포 내 분해에 아주 강하지만 임상에 도입되기 위한 약리학 연구는 거의 없는 상황이므로 이 부분에 대한 추가 연구가 필요하다고 할 수 있음.
- 그럼에도 불구하고 PNA를 사용한 antigene 분야는 매우 전망이 밝음.
- 이미 다양한 산업적인 응용이 이루어지고 있으며 더불어 기초 생리학 연구에 폭 넓은 응용이 예상되기 때문임.
- 유전자 치료에 관한 PNA의 응용도 PNA-conjugate 형태로 여러가지 치료 전략이 이슈로 떠올라 매우 적극적으로 연구되고 있음.
- PNA는 단 하나의 염기서열 차이가 있어도 전체 유전체에서 검출 가능할 정도의 specificity를 가지고 있으며, 이런 의미에서 미래에는 유전병을 일으키는 돌연변이 추적이나, 병원성 세균 및 바이러스 감염의 초기 진단 수단으로 응용될 것으로 예상됨.

참고문헌

1. Basu, S., and Wickstrom, E. (1997) Synthesis and characterization of a peptide nucleic acid conjugated to a D-peptide analog of insulin-like growth factor 1 for increased cellular uptake. *Bioconjug Chem* **8**: 481-488.
2. Belting, M., Sandgren, S., and Wittrup, A. (2005) Nuclear delivery of macromolecules: barriers and carriers. *Adv Drug Deliv Rev* **57**: 505-527.
3. Bonham, M.A., Brown, S., Boyd, A.L., Brown, P.H., Bruckenstein, D.A., Hanvey, J.C., Thomson, S.A., Pipe, A., Hassman, F., Bisi, J.E., and et al. (1995) An assessment of the antisense properties of RNase H-competent and steric-blocking oligomers. *Nucleic Acids Res* **23**: 1197-1203.
4. Buchardt, O., Egholm, M., Berg, R.H., and Nielsen, P.E. (1993) Peptide nucleic acids and their potential applications in biotechnology. *Trends Biotechnol* **11**: 384-386.
5. Chaubey, B., Tripathi, S., Ganguly, S., Harris, D., Casale, R.A., and Pandey, V.N. (2005) A PNA-transportan conjugate targeted to the TAR region of the HIV-1 genome exhibits both antiviral and virucidal properties. *Virology* **331**: 418-428.
6. Dryselius, R., Nekhotiaeva, N., and Good, L. (2005) Antimicrobial synergy between mRNA- and protein-level inhibitors. *J Antimicrob Chemother* **56**: 97-103.
7. Faruqi, A.F., Egholm, M., and Glazer, P.M. (1998) Peptide nucleic acid-targeted mutagenesis of a chromosomal gene in mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1398-1403.
8. Filipovska, A., Eccles, M.R., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2004) Delivery of antisense peptide nucleic acids (PNAs) to the cytosol by disulphide conjugation to a lipophilic cation. *FEBS Lett* **556**: 180-186.
9. Folini, M., Berg, K., Millo, E., Villa, R., Prasmickaite, L., Daidone, M.G., Benatti, U., and Zaffaroni, N. (2003) Photochemical internalization of a peptide nucleic acid targeting the catalytic subunit of human telomerase. *Cancer Res* **63**: 3490-3494.
10. Guffanti, E., Corradini, R., Ottonello, S., and Dieci, G. (2004) Functional dissection of RNA polymerase III termination using a peptide nucleic acid as a transcriptional roadblock. *J Biol Chem* **279**: 20708-20716.
11. Hamilton, S.E., Pitts, A.E., Katipally, R.R., Jia, X., Rutter, J.P., Davies, B.A., Shay, J.W., Wright, W.E., and Corey, D.R. (1997) Identification of determinants for inhibitor binding within the RNA active site of human telomerase using PNA scanning. *Biochemistry* **36**: 11873-11880.
12. Kaihatsu, K., Huffman, K.E., and Corey, D.R. (2004) Intracellular uptake and inhibition of gene expression by PNAs and PNA-peptide conjugates. *Biochemistry* **43**: 14340-14347.

13. Knudsen, H., and Nielsen, P.E. (1996) Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Res* **24**: 494-500.
14. Koppelhus, U., Awasthi, S.K., Zachar, V., Holst, H.U., Ebbesen, P., and Nielsen, P.E. (2002) Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **12**: 51-63.
15. Liu, B., Han, Y., Ferdous, A., Corey, D.R., and Kodadek, T. (2003) Transcription activation by a PNA-peptide chimera in a mammalian cell extract. *Chem Biol* **10**: 909-916.
16. McMahon, B.M., Mays, D., Lipsky, J., Stewart, J.A., Fauq, A., and Richelson, E. (2002) Pharmacokinetics and tissue distribution of a peptide nucleic acid after intravenous administration. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **12**: 65-70.
17. Nekhotiaeva, N., Awasthi, S.K., Nielsen, P.E., and Good, L. (2004) Inhibition of *Staphylococcus aureus* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids. *Mol Ther* **10**: 652-659.
18. Nielsen, P.E. (2002) PNA technology. *Methods Mol Biol* **208**: 3-26.
19. Pardridge, W.M., Boado, R.J., and Kang, Y.S. (1995) Vector-mediated delivery of a polyamide ("peptide") nucleic acid analogue through the blood-brain barrier in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 5592-5596.
20. Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M., and Langel, U. (1998) Cell penetration by transportan. *Faseb J* **12**: 67-77.
21. Robaczewska, M., Narayan, R., Seigner, B., Schorr, O., Thermet, A., Podhajska, A.J., Trepo, C., Zoulim, F., Nielsen, P.E., and Cova, L. (2005) Sequence-specific inhibition of duck hepatitis B virus reverse transcription by peptide nucleic acids (PNA). *J Hepatol* **42**: 180-187.
22. Sazani, P., Kang, S.H., Maier, M.A., Wei, C., Dillman, J., Summerton, J., Manoharan, M., and Kole, R. (2001) Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs. *Nucleic Acids Res* **29**: 3965-3974.
23. Sei, S., Yang, Q.E., O'Neill, D., Yoshimura, K., Nagashima, K., and Mitsuya, H. (2000) Identification of a key target sequence to block human immunodeficiency virus type 1 replication within the gag-pol transframe domain. *J Virol* **74**: 4621-4633.
24. Thierry, A.R., Vives, E., Richard, J.P., Prevot, P., Martinand-Mari, C., Robbins, I., and Lebleu, B. (2003) Cellular uptake and intracellular fate of antisense oligonucleotides. *Curr Opin Mol Ther* **5**: 133-138.
25. Tripathi, S., Chaubey, B., Ganguly, S., Harris, D., Casale, R.A., and Pandey, V.N. (2005) Anti-HIV-1 activity of anti-TAR polyamide nucleic acid conjugated with various membrane transducing peptides. *Nucleic Acids Res* **33**: 4345-4356.
26. Vives, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* **272**: 16010-16017.
27. Wang, G., Xu, X., Pace, B., Dean, D.A., Glazer, P.M., Chan, P., Goodman, S.R., and Shokolenko, I. (1999) Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated induction of human gamma-globin gene expression. *Nucleic Acids Res* **27**: 2806-2813.
28. Wang, G., Jing, K., Balczon, R., and Xu, X. (2001) Defining the peptide nucleic acids (PNA) length requirement for PNA binding-induced transcription and gene expression. *J Mol Biol* **313**: 933-940.
29. Zhang, X., Simmons, C.G., and Corey, D.R. (2001) Liver cell specific targeting of peptide nucleic acid oligomers. *Bioorg Med Chem Lett* **11**: 1269-1272.

저자소개

▶ 이 창 목

- 현, 박사후 연구원, Biomolecular Research Center, 미국 플로리다 대학
- 박사후 연구원, Medical Center, 미국 로체스터(Rochester)대학
- 박사 유전공학과 경북대학교

▶ 한국과학기술정보연구원 동향정보분석팀