

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 7월 14일 (14.07.2016)



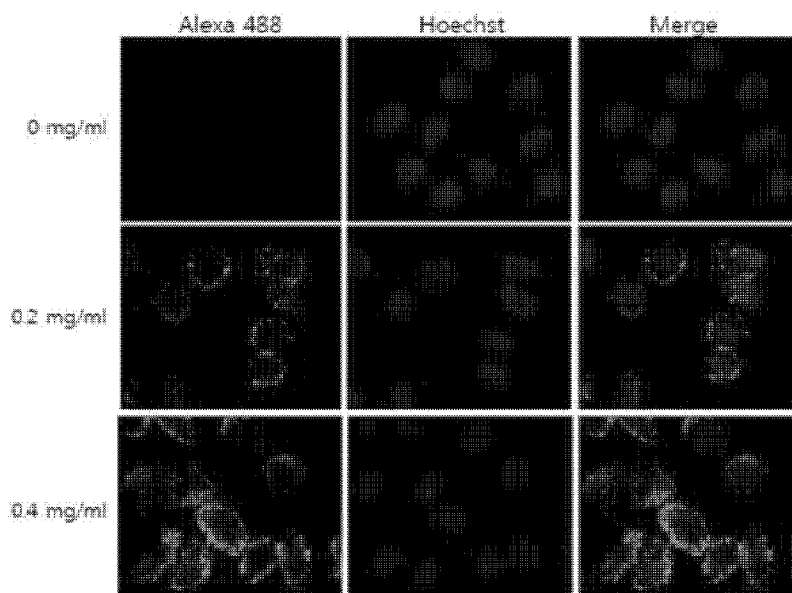
(10) 국제공개번호
WO 2016/111420 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 14/435 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004297
- (22) 국제출원일: 2015년 4월 29일 (29.04.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2015-0001973 2015년 1월 7일 (07.01.2015) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-015 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 박태현 (PARK, Tai Hyun); 137-871 서울시 서초구 효령로 45길 7 402호, Seoul (KR). 김효주 (KIM, Hyo Ju); 463-977 경기도 성남시 분당구 판교원로 82번길 30 1308동 803호, Gyeonggi-do (KR). 류지나 (RYU, Ji Na); 150-833 서울시 영등포구 도영로 16 A동 603호, Seoul (KR). 박희호 (PARK, Hee Ho); 135-895 서울시 강남구 언주로 151길 13-1 101호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 하나 (HANA IP LAW FIRM); 135-923 서울시 강남구 테헤란로 20길 10 6층, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CELL PENETRATION AND ENZYMATIC STABILIZATION FUNCTIONS OF A-HELIX DOMAIN IN 30Kc19 PROTEIN, AND CARGO DELIVERY SYSTEM USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 30Kc19 단백질 내 α -helix 도메인의 세포 투과성과 효소 안정화 기능 및 이를 이용한 카고 전달 시스템



(57) Abstract: The present invention relates to a 30Kc19 α cell penetrating peptide and a cargo delivery system using the same. Specifically, the 30Kc19 α peptide according to the present invention exhibits cell penetration, intracellular stability, or cell penetration and intracellular stability, which are similar or superior to the 30Kc19 entire domain, and thus the 30Kc19 α peptide, as a cell penetrating peptide, binds to a cargo, thereby effectively delivering the cargo into cells.

(57) 요약서: 본 발명은 30Kc19 α 세포 투과 펩티드 및 이를 이용한 카고 전달 시스템에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 30Kc19 α 는 30Kc19 전체 도메인과 대등하거나 30Kc19 전체 도메인 보다 우수한 세포 투과성, 세포내 안정성, 또는 세포 투과성 및 세포내 안정성을 나타내므로, 세포 투과 펩티드로서 카고와 결합하여 카고를 세포 내로 효과적으로 전달할 수 있다.

WO 2016/111420 A1



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

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 30Kc19 단백질 내 α -helix 도메인의 세포 투과성과 효소 안정화 기능 및 이를 이용한 카고 전달 시스템 기술분야

[1] 본 발명은 30Kc19 단백질 내 α -helix 도메인(30Kc19 α)의 세포 투과성과 효소 안정화 기능 및 이를 이용한 카고 전달 시스템에 관한 것이다. 구체적으로, 30Kc19 α 는 30Kc19 전체 도메인과 대등하거나 30Kc19 전체 도메인 보다 우수한 세포 투과성, 세포내 안정성, 또는 세포 투과성 및 세포내 안정성을 나타내므로, 세포 투과 펩티드로서 카고와 결합하여 카고를 세포 내로 효과적으로 전달할 수 있다.

[2]

배경기술

[3] 일반적으로, 인간의 세포를 비롯한 살아있는 동물의 세포막은 단백질 혹은 핵산 등과 같은 거대 생체 분자, 그리고 자성 나노 입자와 양자점과 같은 거대 무기 물질을 통과시키지 아니한다. 일부 크기가 작은 물질들은 낮은 효율로 세포막을 통과하여 세포 내로 전달되기도 하지만, 거대 물질은 이에 대한 특이적인 수용체가 세포막에 있지 않은 한 세포 내로 전달될 수 없다. 따라서 대부분의 질병 치료 및 진단을 위해 사용되는 물질들이 세포 내로 도입하거나 전달하기 어렵다.

[4] 세포 내부로 물질을 도입하거나 전달하기 위한 다양한 방법들이 개발되었는데, 특히 핵산 등을 전달하기 위한 전기 충격(electroporation), 미세 주사체를 이용한 투사법, 그리고 리포솜을 이용한 막 융합 방법 등이 대표적이다. 그러나 상기 핵산 전달 방법은 극히 제한된 수의 세포에만 핵산을 전달할 수 있고, 세포의 종류에 따라 그 효율이 크게 다르다는 단점이 있다. 더욱이, 핵산과 달리 단백질의 경우는 현재까지 검증된 효율적인 세포 내 전달방법이 없다.

[5]

[6] 이러한 상황에서 최근 세포 투과성 단백질 또는 펩타이드가 주목받고 있다. 이 중 가장 많은 연구가 이루어진 것이 인간 면역 결핍 바이러스-1(Human Immunodeficiency Virus-1, HIV-1)에서 유래된 TAT 단백질인데, 86개의 아미노산으로 구성된 TAT 단백질에서 47번부터 57번까지의 11개 아미노산으로 이루어진 펩타이드가 세포 투과 기능이 있다는 사실이 보고되었다[Fawell S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 664-668(1994)]. 이와 비슷한 예로는 HSV-1(Herpes Simplex Virus type 1)의 VP22 단백질의 267번째부터 300번째까지의 아미노산[Elliott G. et al. Cell, 88,223-233(1997)]과 초파리(Drosophila)의 Antennapedia(Antp)의 339번째부터 355번째 아미노산 등이 있다[Schwarze S.R. et al. Trends Pharmacol Sci. 21, 45-48(2000)]. 최근에는

인위적으로 합성한 양전하를 띠는 펩타이드도 세포 투과 기능이 있다고 보고되었다[Laus R. et al. Nature Biotechnol. 18, 1269-1272(2000)]. 위와 같은 사실을 바탕으로 이러한 세포 투과 단백질의 PTD(Protein transduction domain)에 단백질 및 핵산을 결합시켜 이들을 세포 내로 전달하는 연구들이 수행되고 있다. TAT PTD에 녹색형광단백질(Green Fluorescence Protein, GFP)를 결합시켜 세포막을 투과한다는 사실을 관찰 하였고[Park J. et al. J. Gen. Virol., 83, 1173-1181 (2002)], 역시 TAT에 Cre recombinase[Nicolas J. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 316, 12-20 (2004)]와 SOD(Super Oxide Dismutase)[Eum W. et al. Free Radical Biol. Med. 37, 339-349 (2004)]를 결합시켜 세포 내로 전달하여 이 결합 단백질의 활성이 세포 내에서 나타나는지를 확인한 결과들이 보고되어 왔다. 그러나 종래에 많이 연구된 TAT을 비롯한 대다수의 세포 투과 단백질들은 바이러스 유래인 경우가 많아 생체 내(in vivo) 도입 시 세포 독성을 나타낼 수 있는 점이 문제로 지적되어 왔다. 이를 극복하기 위해 인간 유래 세포 투과 단백질이나 인위적으로 합성한 PTD들이 그 대안으로 연구가 되어 왔다. 그러나 이마저도 세포 독성에 대한 정확한 연구가 이뤄져 있지는 않은 상황이다.

[7]

[8]

가장 많이 알려진 PTD인 TAT PTD를 이용하여 단백질 및 핵산을 살아있는 세포 내로 전달하고자 하는 기술은 종래의 연구 및 특허에서 다양하게 개시되어 있다. 미국 특허공개 제20050112640호 및 제20050282281호는 TAT PTD의 유전자를 포함하는 벡터(vector)를 개시하며, 상기 벡터를 이용하여 원하는 단백질에 TAT가 결합되어 발현되도록 하였다. 또한 미국 특허공개 제20080166755호는 뼈의 형성을 돕는 단백질을 TAT와 결합시켜 뼈 생산 세포에 전달하는 기술을 개시하고 있다. 이외에도 TAT을 이용한 단백질 전달은 다양한 특허에 기재되어 있다. 또한 미국 특허공개 제20060182736호는 TAT 이외에 VP22와 Antp 같은 다른 세포 투과 단백질의 PTD를 이용한 단백질의 세포 내 전달 기술을 개시하고 있다. 상기 선행기술들은 단백질과 같은 거대 분자의 세포 전달 기술이다. 그러나 TAT와 VP22는 인체에 매우 유해한 바이러스에서 유래한 것으로서, 전장 TAT는 세포 사멸을 유도한다고 알려져 있다. TAT나 VP22의 PTD 부분만을 취하여 세포에 전달시키면 전달 효율이 상승하면서 세포 독성은 상대적으로 적다는 연구 보고들이 있지만, 이에 대한 정확한 검증은 부족한 실정이다.

[9]

발명의 상세한 설명

[10]

본 발명자들은 누에(*Bombyx mori*)로부터 유래하고 세포 투과 기능이 알려진 30Kc19 단백질의 α -helix 도메인이 세포 투과성을 지니는 부분인 PTD(protein transduction domain)임을 규명하고, 상기 30Kc19 단백질의 α -helix 도메인이 30Kc19 단백질의 전체 도메인과 대등하거나 30Kc19 단백질의 전체 도메인 보다

우수한 세포 투과성, 세포내 안정성, 또는 세포 투과성 및 세포내 안정성이 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[11]

[12] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 30Kc19 단백질의 α -helix 도메인(30Kc19 α)으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 세포 투과 펩티드가 개시된다.

[13] 본 발명에 따른 세포 투과 펩티드에 있어서, 상기 30Kc19 α 는 30Kc19 전체 도메인과 대등하거나 30Kc19 전체 도메인 보다 우수한 세포 투과성, 세포내 안정성, 또는 세포 투과성 및 세포내 안정성을 갖는 것을 특징으로 한다.

[14] 본 발명에 따른 세포 투과 펩티드에 있어서, 상기 30Kc19 α 는 누에(*Bombyx mori*)로부터 유래된 것을 특징으로 한다.

[15] 본 발명에 따른 세포 투과 펩티드에 있어서, 상기 30Kc19 α 는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 1번째 내지 88번째 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 한다.

[16]

[17] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 30Kc19 α 세포 투과 펩티드, 및 상기 세포 투과 펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 카고를 포함하는 카고 전달 시스템이 개시된다.

[18] 본 발명에 따른 카고 전달 시스템에 있어서, 상기 카고는 단백질, 핵산, 펩티드, 지질, 당지질, 미네랄, 당, 조영물질, 약물 또는 화학 물질인 것을 특징으로 한다.

[19] 본 발명에 따른 카고 전달 시스템에 있어서, 상기 펩티드는 사이토카인, 항체, 항체 단편, 치료용 효소 또는 가용성 수용체인 것을 특징으로 한다.

[20] 본 발명에 따른 카고 전달 시스템에 있어서, 상기 조영물질은 방사선 비투과성 조영물질, 상자성 조영물질, 초상자성 조영물질 또는 CT 조영물질인 것을 특징으로 한다.

[21]

[22] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 30Kc19 α 세포 투과 펩티드 및 조영 물질을 대상에게 적용하는 것을 포함하는 대상의 적용 약물 전달 경로 추적 방법이 개시된다.

[23] 본 발명에 따른 약물 전달 경로 추적 방법에 있어서, 상기 30Kc19 α 는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 1번째 내지 88번째 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 한다.

[24]

[25] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 30Kc19 α 세포 투과 펩티드 및 약물을 포함하는 조성물 및 상기 조성물의 투여량, 투여 경로, 투여 횟수 및 적응증 중 하나 이상을 개시한 지시서를 포함하는 대상의 세포 내 약물 전달용 키트가 개시된다.

[26] 본 발명에 따른 세포 내 약물 전달용 키트에 있어서, 상기 30Kc19 α 는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 1번째 내지 88번째 아미노산 서열로 이루어진

것을 특징으로 한다.

[27]

[28] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 30Kc19 α 세포 투과 펩티드를 포함하여 유효성분을 세포 내에 전달하는 효과가 우수한 약품, 화장품 또는 식품 조성물이 개시된다.

[29]

본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 30Kc19 α 는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 1번째 내지 88번째 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 한다.

[30]

[31]

본 발명에 따른 30Kc19 α 는 30Kc19 전체 도메인과 대등하거나 30Kc19 전체 도메인 보다 우수한 세포 투과성, 세포내 안정성, 또는 세포 투과성 및 세포내 안정성을 나타내므로, 세포 투과 펩티드로서 카고와 결합하여 카고를 세포 내로 효과적으로 전달할 수 있다.

[32]

도면의 간단한 설명

[33]

도 1은 30Kc19 단백질의 α -helix 도메인과 β -sheet 도메인의 구조를 나타낸다.

[34]

도 2는 α -helix 도메인과 β -sheet 도메인의 웨스턴 블로팅 분석 결과를 나타낸다.

[35]

도 3은 30Kc19 단백질 내에서 α -helix 도메인이 PTD(protein transduction domain)로서 역할을 하며 수용성단백질로 생산이 되는 것을 나타낸다.

[36]

도 4는 실시예 1에 따른 30Kc19 α 의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸다.

[37]

도 5는 비교예 1에 따른 30Kc19의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸다.

[38]

도 6은 실험예 1(1)에 따른 세포에 들어간 30Kc19 α 단백질의 웨스턴 블로팅 분석 결과를 나타낸다.

[39]

도 7은 실험예 1(2)에 따른 세포에 들어간 30Kc19 α 의 형광이미지 분석 결과를 나타낸다.

[40]

도 8은 실험예 1(3)에 따른 30Kc19a와 30Kc19의 세포 투과성을 비교한 실험 결과를 나타낸다.

[41]

도 9은 실험예 2에 따른 30Kc19 및 30Kc19 α 의 분광형광계 분석 결과를 나타낸다.

[42]

도 10는 실험예 2에 따른 30Kc19 α 의 첨가 농도와 시간에 따른 분광형광계 분석 결과를 나타낸다.

[43]

도 11은 실험예 3(1)에 따른 세포의 β -gal 분석 결과를 나타낸다.

[44]

도 12는 실험예 3(2)에 따른 세포 독성 평가 결과를 나타낸다.

[45]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[46]

본 명세서에 달리 정의되어 있지 않은 한, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다. 본

명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사건이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용 가능하다. 비록 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법, 프로토콜 및 시약으로 본 발명을 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

- [47] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한, "또는"은 "및/또는"을 의미한다. 더욱이, 용어 "포함하는" 뿐만 아니라, 다른 형태, 예를 들어, "가지는", "이루어지는" 및 "구성되는"은 제한적이지 않다.
- [48] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다. 본 명세서에 제공된 제목은 다양한 면 또는 전체적으로 명세서의 참조로서, 하기의 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.
- [49]
- [50] 본 발명은 30Kc19 단백질의 α -helix 도메인(이하, "30Kc19 α "라 함)으로 이루어진 세포 투과 펩티드 및 이를 이용한 카고 전달 시스템을 제공하고자 한다.
- [51]
- [52] 단백질, 핵산, 펩티드 또는 바이러스 등은 치료 물질로서 큰 잠재력을 가지고 있으나, 분자 수준의 크기를 가지므로 조직 및 세포막을 침투하지 못해 그 사용이 매우 제한적이었다. 또한 크기가 작은 물질이라 하더라도 그 성질이나 구조상 세포막의 지질 이중층을 투과하지 못하는 경우가 많다. 이에 전기 천공법(electroporation) 또는 열 충격(heatshock) 등으로, 단백질, 핵산, 펩티드 또는 바이러스 등을 세포 내로 이동시키려는 시도가 있었으나, 세포막에 손상을 주지 않음과 동시에 상기 물질들의 활성을 그대로 유지하면서 상기 물질들을 세포 내로 이동시키기는 곤란하였다. 그러던 중 누에(*Bombyx mori*)로부터 유래된 30Kc19 단백질이 거대 활성 물질들을 세포 내로 이동시킬 수 있는 세포 투과성 펩티드로 작용할 수 있음이 알려지면서, 이에 대한 연구가 활발히 진행되었다.
- [53] 누에(*Bombyx mori*)로부터 유래된 30Kc19 단백질의 아미노산 서열을 서열번호 1에 나타내었다. 30Kc19 단백질은 크게 2개의 도메인, α -helix 도메인(서열번호 1의 1-88 아미노산) 및 β -sheet 도메인(서열번호 1의 89-239 아미노산)으로

이루어져 있는 것으로(도 1), 이에 본 발명자들은 지속적인 연구를 통해 30Kc19 단백질에서 세포 투과성을 지니는 부분인 PTD(protein transduction domain)의 아미노산 서열로서, 30Kc19 단백질의 α -helix 도메인 만으로도 세포 투과성 펩티드로서 우수한 효과를 가짐을 발견하였다.

[54] 본 발명에 따른 30Kc19단백질의 α -helix 도메인은 30Kc19 단백질의 전체 도메인과 대등하거나 30Kc19 단백질의 전체 도메인 보다 우수한 세포 투과성을 가질 수 있다 (실험예 1). 또한, 본 발명에 따른 30Kc19 단백질의 α -helix 도메인은 30Kc19 단백질의 전체 도메인과 대등하거나 30Kc19 단백질의 전체 도메인 보다 우수한 안정성을 가질 수 있다 (실험예 2 및 3).

[55]

[56] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 30Kc19 α 세포 투과 펩티드가 개시된다. 상기 세포 투과 펩티드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 1번째 내지 88번째 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 또는 상기 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드일 수 있다. 상기 세포 투과 펩티드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 1번째 내지 88번째 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 또는 상기 아미노산 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 세포 투과 펩티드는 서열번호 1로 나타내어지는 펩티드 또는 상기 서열과 1개 이상의 아미노산, 3개 이상의 아미노산, 5개 이상의 아미노산, 10개 이상의 아미노산 또는 15개 이상의 아미노산이 변화된 펩티드를 포함할 수도 있다. 상기 서열번호 1로 나타내어지는 펩티드 또는 상기 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드는 안전하면서도 우수한 세포 투과 펩티드로 작용할 수 있으므로, 카고와 결합하여 카고를 세포 내로 효과적으로 전달할 수 있다.

[57]

[58] 본 명세서에서 사용된 용어 "세포 투과 펩티드(Cell Penetrating Peptide, CPP)"는 인비트로(in vitro) 및/또는 인비보(in vivo)에서 카고(cargo)를 세포 내로 이동시킬 수 있는 펩티드를 의미한다.

[59]

본 명세서에서 사용된 용어 "아미노산"은 자연적으로 펩티드로 통합되는 22개의 표준 아미노산들 뿐만 아니라 D-아이소머 및 변형된 아미노산들을 포함한다. 또한, 상기 펩티드는 번역 후 변형(post-translational modification)된 비표준 아미노산을 포함할 수 있다. 번역 후 변형은 인산화(phosphorylation), 당화(glycosylation), 아실화(acylation) (예를 들면, 아세틸화(acetylation), 미리스토일화(myristoylation) 및 팔미토일화(palmitoylation)), 알킬화(alkylation), 카르복실화(carboxylation), 히드록실화(hydroxylation), 당화반응(glycation), 비오틴화(biotinylation), 유비퀴틴화(ubiquitinylation), 화학적 성질의 변화(예를 들면, 베타-제거 탈아미드화, 탈아미드화) 및 구조적 변화(예를 들면, 이황화물 브릿지의 형성)를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기

펩티드는 자연 그대로의 공급원으로부터 동정 및 분리된 야생형 펩티드일 수 있다. 한편, 상기 펩티드는 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 및/또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는, 인공 변이체일 수도 있다. 인공 변이체뿐만 아니라 야생형 폴리펩티드에서의 아미노산 변화는 단백질의 폴딩(folding) 및/또는 활성에 유의한 영향을 미치지 않는 보존성 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들면, 상기 보존성 치환은 염기성 아미노산(아르기닌, 리신 및 히스티딘), 산성 아미노산(글루탐산 및 아스파르트산), 극성 아미노산(글루타민 및 아스파라긴), 소수성 아미노산(루신, 이소로이신, 발린 및 메티오닌), 방향족 아미노산(페닐알라닌, 트립토판 및 티로신) 및 작은 아미노산(글리신, 알라닌, 세린 및 트레오닌)을 포함할 수 있다. 일반적으로 특이적 활성을 변경시키지 않는 아미노산 치환이 본 기술분야에 공지되어 있다. 가장 흔하게 발생하는 교환은 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu 및 Asp/Gly을 포함할 수 있다. 보존적 치환의 다른 예를 하기의 표 1에 나타내었다.

[60] [표 1]

[61]

원래 아미노산	예시적인 잔기 치환	바람직한 잔기 치환
Ala (A)	val: leu: ile	Val
Arg (R)	lys: gln: asn	Lys
Asn (N)	gln: his: asp: lys: arg	Gln
Asp (D)	glu: asn	Glu
Cys (C)	ser: ala	Ser
Gln (Q)	asn: glu	Asn
Glu (E)	asp: gln	Asp
Gly (G)	ala	Ala
His (H)	asn: gln: lys: arg	Arg
Ile (I)	leu: val: met: ala: phe: norleucine	Leu
Leu (L)	norleucine: ile: val: met: ala: phe	Ile
Lys (K)	arg: gln: asn	Arg
Met (M)	leu: phe: ile	Leu
Phe (F)	leu: val: ile: ala: tyr	Tyr
Pro (P)	ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
Thr (T)	ser	Ser
Trp (W)	tyr: phe	Tyr
Tyr (Y)	trp: phe: thr: ser	Phe
Val (V)	ile: leu: met: phe: ala: norleucine	Leu

[62] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 30Kc19α 세포 투과 펩티드 및 상기 세포 투과 펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 카고를 포함하는 카고 전달 시스템이 개시된다. 상기 세포 투과 펩티드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 1번째 내지 88번째 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 또는 상기 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드일 수 있다.

[63]

[64] 본 명세서에서 사용된 용어 "카고(cargo)"는 본 발명에 따른 30Kc19α 세포 투과성 펩티드와 결합하여 세포 내로 이동할 수 있는 물질을 모두 포함하는 것으로, 예를 들면 세포 투과 효율을 높이길 원하는 모든 물질, 구체적으로 약물, 화장품 또는 건강 식품의 유효 물질, 더 구체적으로 일반적인 경로를 통해서만 세포 내로 이동이 용이하지 않은 물질, 보다 더 구체적으로 단백질, 핵산, 펩티드,

미네랄, 포도당을 포함하는 당, 나노 입자, 생물학적 제제, 바이러스, 조영 물질 또는 기타 화학 물질을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[65]

[66] *본 명세서에서 사용된 용어 "운반 펩티드(carrier peptide)"는 유효성분과 결합하여 유효성분을 원하는 부위로 이동시키는 역할을 수행하는 펩티드를 의미한다.

[67]

본 명세서에서 사용된 용어 "약물"은 질병, 상처 또는 특정 증상을 완화, 예방, 치료 또는 진단하기 위한 물질을 포함하는 광범위한 개념이다. 상기 구현예에 있어서, 세포 투과성 펩티드에 의해 세포 내로 전달되는 약물은 리포솜, 미셀, 나노 입자, 자성 입자 또는 콰텀 도트와 같은 약물 전달체를 더욱 포함할 수 있다.

[68]

본 명세서에서 사용된 용어 "펩티드"는 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소 저해제, 신호 전달 단백질(또는 펩티드), 항체 또는 백신을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 핵산은 자연발생적 또는 인공적 DNA 또는 RNA 분자일 수 있고, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 핵산 분자는 하나 이상일 수 있는데, 동일한 유형의 (예를 들면, 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는) 핵산 분자일 수도 있고, 다른 유형으로 핵산 분자들일 수도 있다. DNA, cDNA, decoy DNA, RNA, siRNA, miRNA, shRNA, stRNA, snoRNA, snRNA, PNA, 안티센스 올리고머(antisense oligomer), 플라스미드(plasmid) 및 그 외 변형된 핵산 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[69]

본 명세서에서 사용된 용어 "조영물질"은 의학적 영상 촬영(imaging)에서 생체 내 구조 또는 유체의 조영을 위해 사용되는 모든 물질을 의미한다. 상기 조영물질은 방사선비투과 조영물질(radiopaque contrast agent), 상자성 조영물질(paramagnetic contrast agent), 초상자성 조영물질(superparamagnetic contrast agent), CT (computed tomography) 조영물질 또는 기타 조영물질을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 방사선비투과 조영물질(X-레이 영상용)은 무기 요오드 화합물 및 유기 요오드 화합물(예를 들면, 디아트리지오아트), 방사선비투과 금속 및 그의 염(예를 들면, 은, 금, 백금 등) 및 기타 방사선비투과 화합물(예를 들면, 칼슘염, 황산바륨과 같은 바륨염, 탄탈륨 및 산화 탄탈륨)을 포함할 수 있다. 상자성 조영물질(MR 영상용)은 가돌리늄 디에틸렌 트리아민펜타아세트산(gadolinium diethylene triaminepentaacetic acid, Gd-DTPA) 및 그의 유도체, 및 기타 가돌리늄, 망간, 철, 디스프로시움(dysprosium), 구리, 유로피움(europium), 에르비움(erbium), 크롬, 니켈 및 코발트 복합체, 예를 들면, 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA), 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N''-트리아세트산(D03A), 1,4,7-트리아자시클로노난-N,N',N''-트리아세트산(NOTA), 1,4,8,10-테트라아자시클로테트라데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산 (TETA),

히드록시벤질에틸렌-디아민 디아세트산(HBED)을 포함할 수 있다. 초상자성 조영물질(MR 영상용)은 자철석(magnetite), 초상자성 산화철 (super-paramagnetic iron oxide, SPIO), 초소 초상자성 산화철(ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIO) 및 단결정성(monocrystalline) 산화철을 포함할 수 있다. 다른 적합한 조영물질은 요오드화 및 비요오드화(non-iodinated), 이온성 및 비이온성 CT 조영물질, 및 스핀-표지(spin-label)와 같은 조영물질, 또는 기타 진단 활성제(diagnostically effective agent)를 포함할 수 있다. 또한, 상기 조영물질은 β -갈락토시다아제, 녹색 형광 단백질, 청색 형광 단백질 또는 루시페라아제를 포함할 수 있다. 세포에서 발현되는 경우, 용이하게 검출가능한 단백질을 코딩하는 마커 유전자를 포함할 수 있다. 방사선택종(radionuclide), 형광물질(fluor), 효소, 효소 기질, 효소 보조인자, 효소 저해제 등과 같은 다양한 표지들이 이용될 수 있다.

- [70] 일 예로서, 본 발명에 따른 카고가 단백질 또는 펩티드인 경우, 이동 대상을 발현하는 DNA에 운반 펩티드를 발현하는 DNA를 결합시킨 후 이를 발현시킴으로써, 이동 대상과 펩티드의 융합 단백질 형태로 운반 펩티드와 이동 대상을 결합시킬 수 있다. 융합 단백질에 의한 결합의 구체적인 예는 다음과 같다: 융합 단백질을 생산하기 위한 프라이머(primer) 제작시, 이동 대상을 발현하는 뉴클레오티드 앞에 운반 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드를 붙인 다음, 수득한 뉴클레오티드를 제한 효소로 pET 벡터를 예로 들 수 있는 벡터에 삽입하고, BL-21(DE3)을 예로 들 수 있는 세포에 도입(transformation)하여 발현시킨다. 이때, IPTG(isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside)와 같은 발현 유도제를 처리하여 융합 단백질이 효과적으로 발현되도록 할 수 있다. 이후, His tag 정제(purification)와 같은 방법을 통해 발현시킨 융합 단백질을 정제한 후, PBS를 이용하여 투석하고, 키트에 넣어 예를 들면, 2,000 내지 4,000 rpm에서 5 내지 20 여분간 원심 분리하여 농축시킬 수 있다. 상기 운반 펩티드는 염색 물질 또는 형광 물질, 구체적으로 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC, fluorescein isothiocyanate) 또는 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)과 결합할 수 있다.

[71]

- [72] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 30Kc19 α 세포 투과 펩티드 및 조영 물질을 대상에게 적용하는 것을 포함하는 대상의 적용 약물 전달 경로 추적 방법이 개시된다. 상기 세포 투과 펩티드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 1번째 내지 88번째 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 또는 상기 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드일 수 있다.

- [73] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 30Kc19 α 세포 투과 펩티드 및 약물을 포함하는 조성물 및 상기 조성물의 투여량, 투여 경로, 투여 횟수 및 적응증 중 하나 이상을 개시한 지시서를 포함하는 대상의 세포 내 약물 전달용 키트가 개시된다.

- [74] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 30Kc19 α 세포 투과 펩티드를 포함하여 유효성분을 세포 내에 전달하는 효과가 우수한 약품, 화장품 또는 식품 조성물이 개시된다.
- [75] 본 발명에 따른 조성물은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 1번째 내지 88번째 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 또는 상기 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드를 0.2 mg/ml 내지 2 mg/ml, 또는 0.3 mg/ml 내지 1.5 mg/ml, 또는 0.4 mg/ml 내지 1.0 mg/ml의 함량을 포함할 수 있다. 구체적으로 1 μ g/mg 내지 0.5 mg/mg, 더 구체적으로 10 μ g/mg 내지 0.1 mg/mg 함량으로 포함할 수 있다. 상기 범위로 포함하는 경우 본 발명의 의도한 효과를 나타내기에 적절할 뿐만 아니라, 조성물의 안정성 및 안전성을 모두 만족할 수 있으며, 비용 대비 효과의 측면에서도 상기 범위로 포함하는 것이 적절할 수 있다.
- [76] 본 발명에 따른 조성물은 인간, 개, 닭, 돼지, 소, 양, 기니아피그 또는 원숭이를 포함하는 모든 동물에 적용될 수 있다. 상기 약학 조성물은 경구, 직장, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 골수 내, 경막 내 또는 피하로 투여될 수 있다. 경구 투여를 위한 제형은 정제, 환제, 연질 또는 경질 캡셀제, 과립제, 산제, 액제 또는 유탕제일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 비경구 투여를 위한 제형은 주사제, 점적제, 로션, 연고, 겔, 크림, 현탁제, 유제, 좌제, 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학 조성물은 필요에 따라 희석제, 부형제, 활택제, 결합제, 붕해제, 완충제, 분산제, 계면 활성제, 착색제, 향료 또는 감미제 등의 첨가제를 포함할 수 있다.
- [77] 본 발명에 따른 화장품 조성물은 국소 적용에 적합한 모든 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들면, 용액, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 유상에 수상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 고체, 겔, 분말, 페이스트, 포말(foam) 또는 에어로졸의 제형으로 제공될 수 있다. 이러한 제형은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 화장품 조성물은 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분들을 포함할 수 있다. 또한 상기 화장품 조성물은 보습제, 에몰리언트제, 계면 활성제, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, pH 조정제, 유기 또는 무기 안료, 향료, 냉감제 또는 제한(制汗)제를 더 포함할 수 있다. 상기 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하며, 그 배합량은 화장품 조성물 전체 중량을 기준으로 0.01 내지 5 중량%, 구체적으로 0.01 내지 3 중량%일 수 있다.
- [78] 본 발명에 따른 식품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 분말제, 액제, 고형 제제 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형은 유효성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

[79]

[80] 이하에서는 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 실시예는 발명의 이해를 쉽게하기 위해 제공되는 것 일뿐 발명의 보호범위가 이 이하의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[81]

[82] <실시예>

[83] 실시예 1. 30Kc19 α 단백질의 분리

[84] 누에(*Bombyx mori*)로부터의 30Kc19 α 유전자를 pET23a 벡터(Novagen)의 EcoR I 과 Xho I 사이 부위(site)에 삽입하였다. 이렇게 얻은 플라스미드를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시킨 후 플라스미드가 삽입된 대장균 클론만을 암피실린선별법을 사용하여 선별하였다. 이때 생산되는 30Kc19 α 의 카르복실 말단에 히스티딘 태그(His6-tag)서열이 포함되어 정제를 용이하게 하였다. 상기 균주를 LB배지에서 배양한 뒤 1mM의 이소프로필 - 베타 - 디 - 티오칼락토피라노사이드(isopropyl - β -D - thiogalactopyranoside: IPTG)를 첨가하여 4시간 동안 37°C에서 배양하여 30Kc19 α 단백질을 생산하였다. 그 다음, 원심분리를 통해 모은 세포를 음파처리(sonication)하여 파쇄하였다. 상기 파쇄액을 12,000rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상등액을 HisTrap HP column (5mL, GE Healthcare)을 사용하여 30Kc19 α 를 정제하였다. 정제한 30Kc19 α 를 Tris-HCl (pH 8.0)로 완충액 교환을 하여 이를 SDS-PAGE로 분석하였다 (도 4). 도 4에서 볼 수 있듯이, 약 15kDa에서 30Kc19 α 에 해당하는 밴드를 관찰할 수 있었다. 정제를 한 단백질들은 -70°C에서 보관한 뒤 실험에 사용하였다. Standard protein인 Bovine serum albumin (BSA)를 이용하여 생산한 단백질의 정량을 실시하였다.

[85]

[86] 비교예 1. 30Kc19 단백질의 분리

[87] 30Kc19 α 유전자 대신에 30Kc19 유전자를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다 (도 5). 상기 30Kc19를 SDS-PAGE로 분석한 결과, 도 5로부터 알 수 있듯이 약 35kDa에서 30Kc19에 해당하는 밴드를 관찰할 수 있었다.

[88]

[89] <실험예>

[90]

[91] 실험예 1. 30Kc19 α 단백질의 세포 투과성 평가 (in vitro)[92] (1) 30Kc19 α 의 세포 투과성 분석

[93] HeLa 세포와 CHO 세포를 10% 소 태아 혈청(FBS, Gibco)과 1% 페니실린 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지(Hyclone)에서 배양하였다. 세포가 바닥면의 70% 정도를 차지했을 때, 0 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1.0 mg/ml 농도의 30Kc19 α 가 첨가된 새로운 배지로 교체하였고, 37°C에서 4 시간 동안 배양하였다.

세포로 전달된 30Kc19를 확인하기 위해 먼저 세포를 PBS로 3회 세척한 후 1% 트립신 용액을 이용하여 플레이트 바닥에서 떼어내었다. 원심분리를 통해 떼어낸 세포를 취득하고 이를 RIPA 완충액으로 파쇄하였다. 원심분리를 통해 얻은 상등액을 이용해 12% SDS-PAGE(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하였다. 전기영동 후 젤을 니트로셀룰로스(nitrocellulose) 막으로 전이시킨 뒤 5% 탈지유(skim milk)로 차단(blocking)하였다. 이후 토끼에서 얻은 30Kc19 α 의 항체를 이용하여 세포에 전달된 30Kc19 α 를 웨스턴 블로팅(Western blotting)으로 검출하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[94] 도 6으로부터 알 수 있듯이, 30Kc19 α 가 세포 내에서 검출되었으므로, 세포 투과성이 있음이 확인되었다. 또한, 처리한 농도가 높아질수록 세포에 전달된 30Kc19 α 의 양도 증가하는 것으로 보아 30Kc19 α 의 세포 투과성은 외부에서의 처리 농도에 비례함을 알 수 있었다.

[95]

[96] (2) 세포 내 30Kc19 α 의 위치 분석

[97] 30Kc19 α 단백질을 green fluorescent Alexa Fluor®488 (Invitrogen)로 Labeling을 하였다. 형광이 결합된 30Kc19 α 단백질을 HeLa 세포에 첨가하고 37°C에서 4 시간 동안 배양한 후, PBS로 3회 세척하였다. 상기 세척된 세포에 Hoechst로 핵을 염색하고 세포가 살아있는 상태에서 live cell image를 공초점현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 세포를 관찰하였다. 30Kc19 α 단백질의 농도(0 mg/ml, 0.2 mg/ml 및 0.4 mg/ml)에 따른 세포 내 위치를 형광 이미지를 통해 분석한 결과 도 7에 나타내었다. 각 농도에서 핵을 염색한 결과와 30Kc19 α 와 핵을 합친 이미지를 함께 나타내었다.

[98] 도 7로부터 알 수 있듯이, 30Kc19 α 의 농도가 높아질수록 더 많은 양의 단백질이 세포질에 위치하는 것이 확인되었다.

[99]

[100] (3) 30Kc19 α 와 30Kc19의 세포 투과성 비교

[101] 30Kc19 α 와 30Kc19의 세포 투과성을 비교하기 위하여 동일한 농도로 HeLa 세포와 CHO 세포에 30Kc19 α 와 30Kc19를 각각 처리하고, 24시간 후에 세포를 RIPA buffer를 이용하여 lysis 시켜 세포질에 들어간 단백질의 농도를 확인하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[102] 도 8로부터 알 수 있듯이, 30Kc19보다 30Kc19 α 가 세포질 내로 더 많이 들어가는 것이 확인 되었다.

[103]

[104] 실험예 2. 30Kc19 α 단백질의 효소 안정성 평가 (in vitro)

[105] GFP(Green Fluorescent Protein)를 사용하여 30Kc19 α 단백질의 효소 안정성을 평가하였다. GFP 유전자를 pET23a 벡터 (Invitrogen)의 EcoR 1, Xho 1 부위에 삽입하여 벡터를 얻었다. 상기 플라스미드를 사용하여 형질전환된 대장균 BL21(DE3) 균주를 LB배지에서 배양한 후, 1mM의 IPTG를 첨가하여 6시간동안

27°C에서 배양하여 GFP 단백질을 생산하였다. 그 다음 원심분리를 통해 모은 세포를 음과 과쇄하였다. 이를 His Trp HP column (5ml, GE Healthcare)을 이용하여 정제하여 얻었다. GFP를 상기 실험에 1에서 배양된 400 µg/ml의 30Kc19α 단백질과 30Kc19 단백질의 존재 또는 부재 하에 37°C에서 24시간 동안 배양하고, GFP의 활성을 측정하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[106] 또한, 30Kc19α의 첨가 농도와 시간에 따른 GFP의 형광 정도를 측정하여 도 10에 나타내었다.

[107] 도 9로부터 알 수 있듯이, 30Kc19α 또는 30Kc19 단백질의 부재 하에서는 GFP 활성이 24시간 이후에 약 30% 이상 감소하였으나, 30Kc19α 또는 30Kc19 단백질을 400 µg/ml 첨가한 경우에는 GFP 활성이 50% 이상 유지된다는 것이 확인되었다. 또한, 도 10으로부터 30Kc19α의 첨가 농도가 높을수록 GFP 활성이 높게 유지된다는 것이 확인되었다.

[108]

[109] 실험에 3. 30Kc19α 단백질의 세포 내 안정성 평가 (in vivo)

[110] (1) 세포 내 안정성 평가

[111] HeLa cell에 beta galactosidase를 lipofectamine3000으로 transfection시키고, 24시간 이후에 30Kc19α 단백질을 각각 0 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 120 µg/ml 및 200 µg/ml 농도로 처리하였다. 24시간 이후에 β-gal assay을 수행하고, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[112] 도 11으로부터 알 수 있듯이, 30Kc19α 단백질이 세포 내에서 안정하다는 것이 확인되었다. 특히, 30Kc19a 단백질이 80 µg/ml농도인 경우, 가장 높은 안정성을 나타내었다.

[113] (2) 세포 독성 평가

[114] 30Kc19α 단백질을 CHO cell에 처리하고 24 시간 배양 후 CCK-8 assay를 수행하여 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.

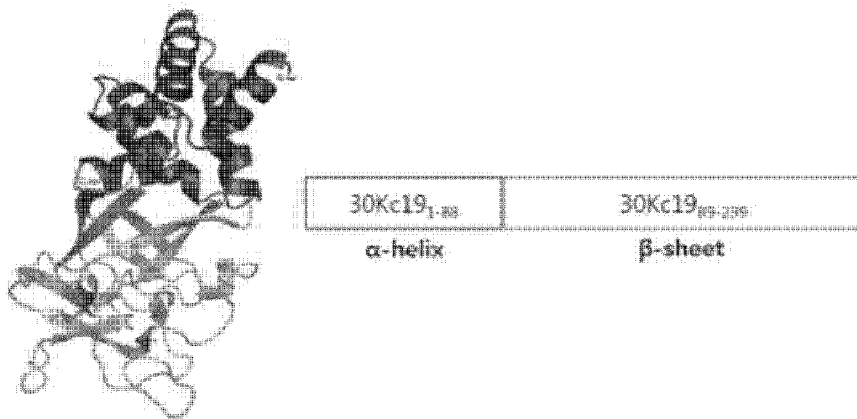
[115] 도 12로부터 알 수 있듯이, 30Kc19α 단백질을 처리한 세포가 단백질을 처리하지 않은 대조군 세포와 유사한 생존도를 보이는 것을 확인하였다. 이로부터 본 발명에 따른 30Kc19α 단백질이 세포 내에서 독성을 유발하지 않아 세포 내 주입이 가능하다는 것을 입증하였다.

[116]

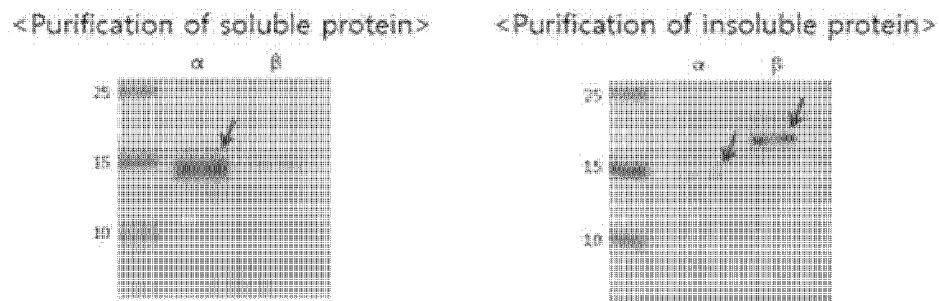
청구범위

- [청구항 1] 30Kc19 단백질의 α -helix 도메인(30Kc19 α)으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 세포 투과 펩티드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 30Kc19 α 는 30Kc19 전체 도메인과 대등하거나 30Kc19 전체 도메인 보다 우수한 세포 투과성, 세포내 안정성, 또는 세포 투과성 및 세포내 안정성을 가지는 것인, 세포 투과 펩티드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 30Kc19 α 는 누에(*Bombyx mori*)로부터 유래된 것인, 세포 투과 펩티드.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 30Kc19 α 는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 1번째 내지 88번째 아미노산 서열로 이루어지는 것인, 세포 투과 펩티드.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 세포 투과 펩티드; 및 상기 세포 투과 펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 카고 를 포함하는 것을 특징으로 하는 카고 전달 시스템.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 카고는 단백질, 핵산, 펩티드, 지질, 당지질, 미네랄, 당, 조영물질, 약물 또는 화학 물질인 것인, 카고 전달 시스템.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 펩티드는 사이토카인, 항체, 항체 단편, 치료용 효소 또는 가용성 수용체인 것인, 카고 전달 시스템.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,
상기 조영물질은 방사선 비투과성 조영물질, 상자성 조영물질, 초상자성 조영물질 또는 CT 조영물질인 것인, 카고 전달 시스템.
- [청구항 9] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 세포 투과 펩티드 및 조영물질을 대상에게 적용하는 것을 포함하는 대상의 적용 약물 전달 추적 방법.
- [청구항 10] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 세포 투과 펩티드, 약물을 포함하는 조성물, 및 상기 조성물의 투여량, 투여 경로, 투여 횟수 및 적응증 중 하나 이상을 개시한 지시서를 포함하는 대상의 세포 내 약물 전달용 키트.

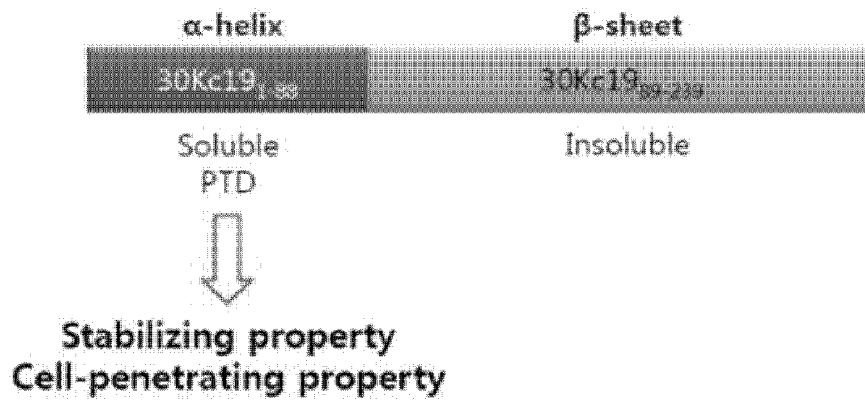
[Fig. 1]



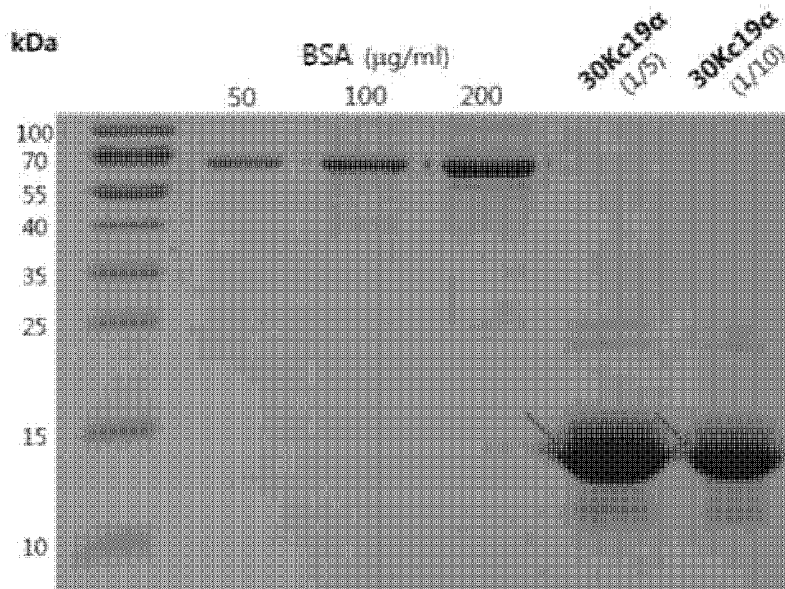
[Fig. 2]



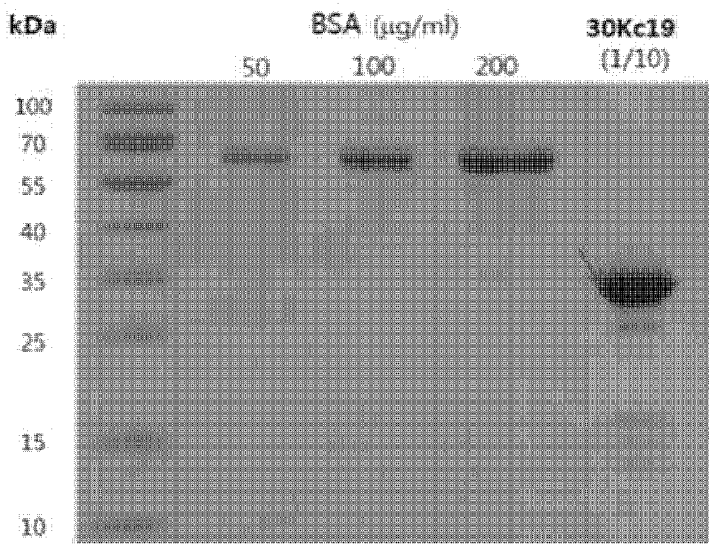
[Fig. 3]



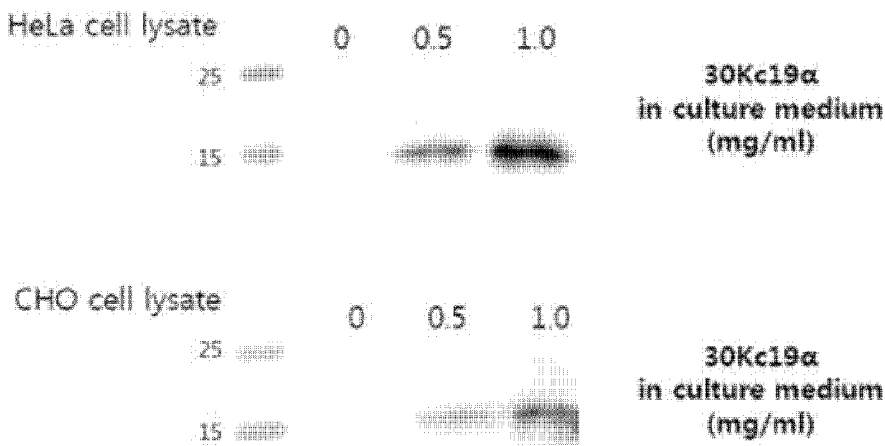
[Fig. 4]



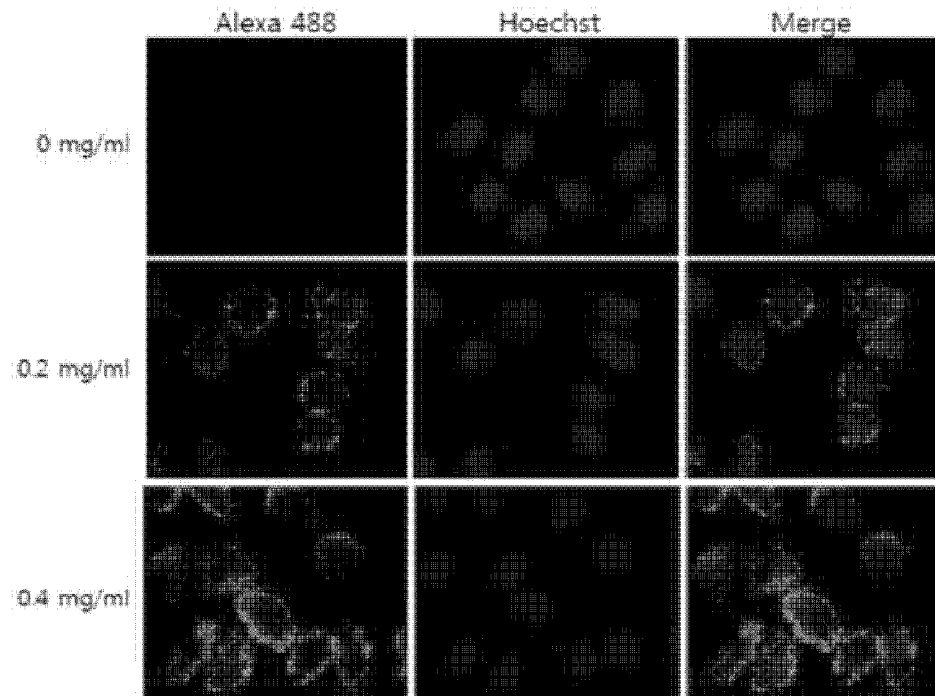
[Fig. 5]



[Fig. 6]



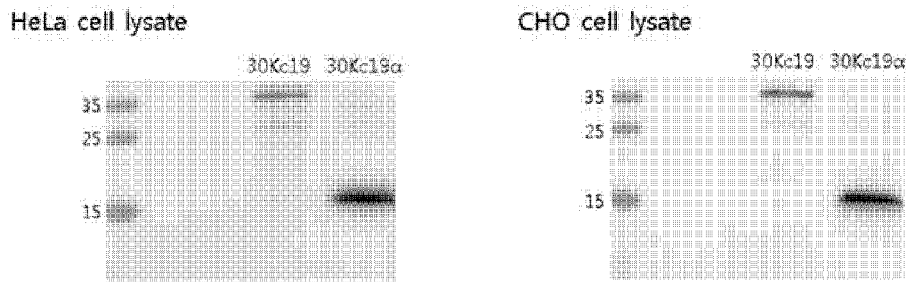
[Fig. 7]



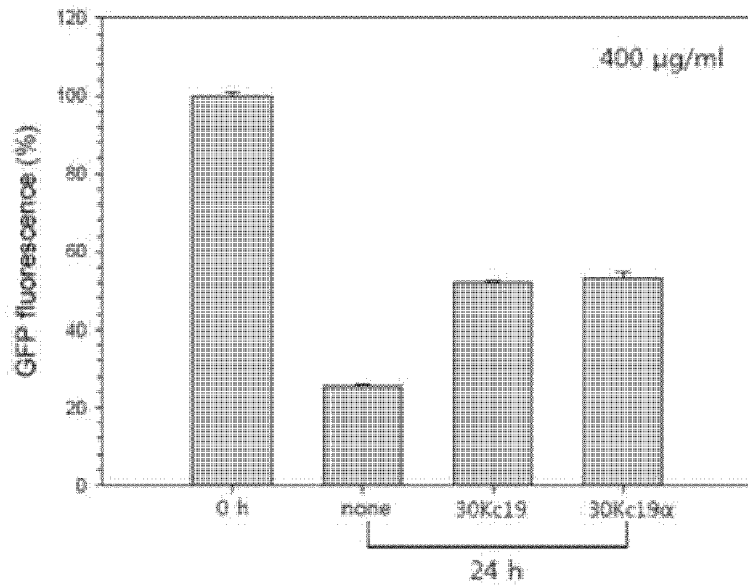
[Fig. 8]

✓ Comparison between 30Kc19 and 30Kc19 α

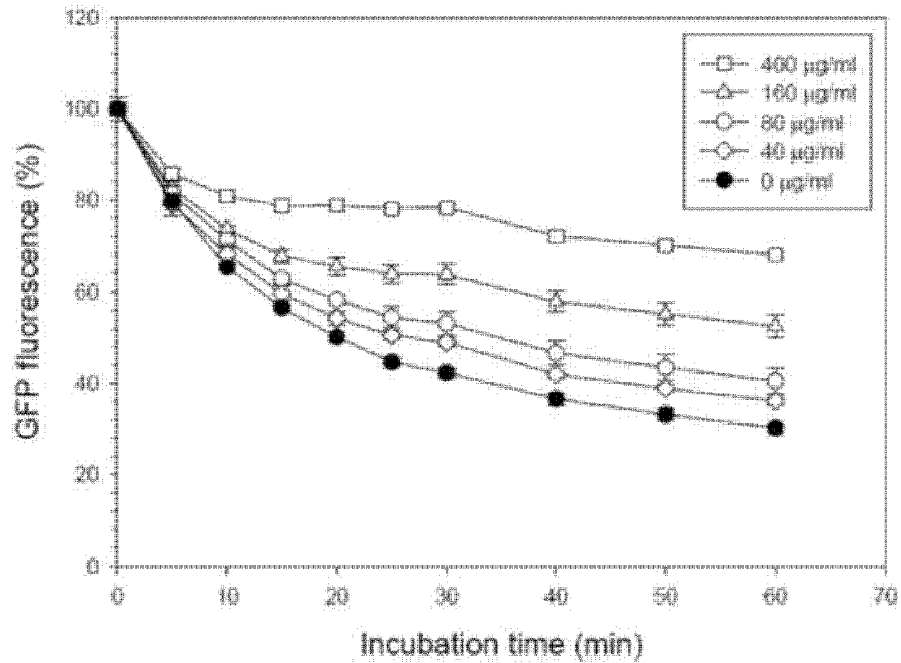
- Western blot



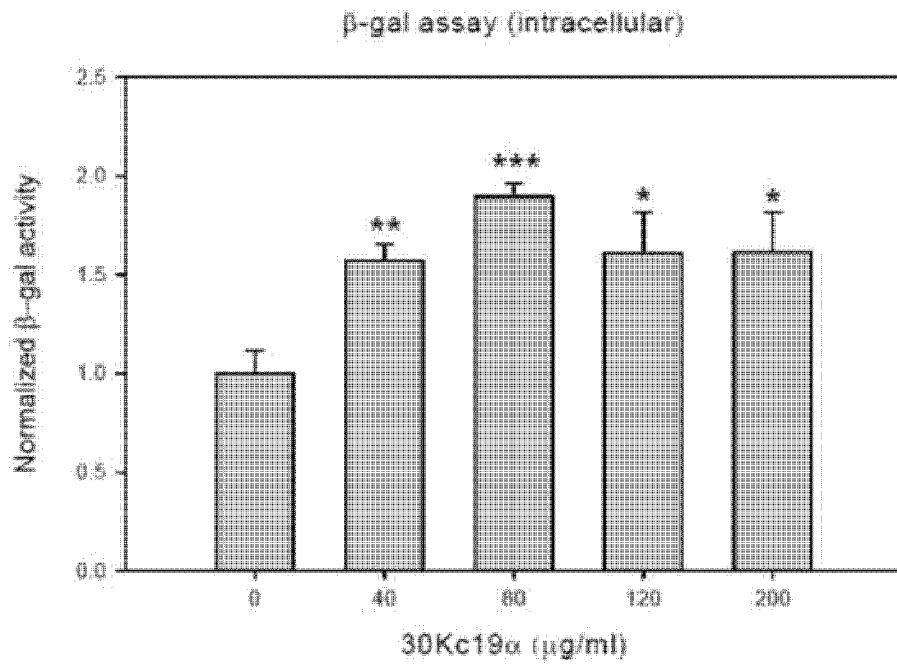
[Fig. 9]



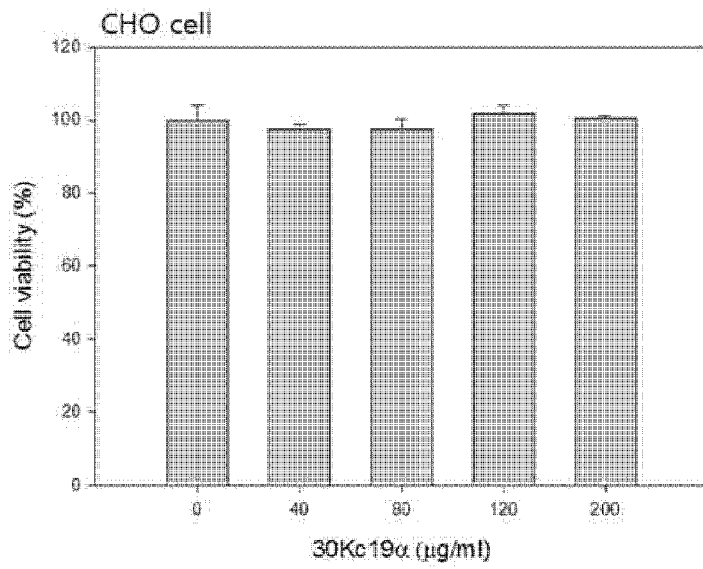
[Fig. 10]



[Fig. 11]



[Fig. 12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004297

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/435(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 49/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/435; C07K 19/00; A61K 47/48; A61K 49/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubMed: 30Kc19 a-helix domain

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, H. et al. Cell-Penetrating and Enzyme-Stabilizing Properties of A-Helix Domain of 30Kc19 Protein. 2014 October, Abstract of Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Fall Meeting and International Symposium, page 208. See abstract.	1-3,5-10
Y		4
Y	PIETRZYK, A. J. et al. High-Resolution Structure of Bombyx Morilipoprotein 7: Crystallographic Determination of the Identity of the Protein and its Potential Role in Detoxification. Acta crystallographica. Section D, Biological Crystallography. 2012 September, Vol. 68, No. 9, pages 1140-51. See the entire document.	4
A		1-3,5-10
A	PARK, H. H. et al. Identification and Characterization of a Novel Cell-Penetrating Peptide of 30Kc19 Protein derived from Bombyx Mori. Process Biochemistry. 2014 September, Vol. 49, No. 9, pages 1516-1526. See the entire document.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 JULY 2015 (17.07.2015)

Date of mailing of the international search report

20 JULY 2015 (20.07.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004297

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PARK, J. H. et al. A protein Delivery System using 30Kc19 Cell-Penetrating Protein Originating from Silkworm. <i>Biomaterials</i> . 2012 December, Vol. 33, No. 35, pages 9127-34. See the entire document.	1-10
A	YANG, J. P. et al. Crystal Structure of the 30 K. Protein from the Silkworm Bombyx Mori Reveals a New Member of the β -trefoil Superfamily. <i>Journal of Structural Biology</i> . 2011 July, Vol. 175, No. 1, pages 97-103. See abstract.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/004297

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C07K 14/435(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 49/00(2006.01)i

B. 조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 14/435; C07K 19/00; A61K 47/48; A61K 49/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
PubMed: 30Kc19 a-helix domain

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM, H. et al. Cell-penetrating and enzyme-stabilizing properties of a-helix domain of 30Kc19 protein. 2014 October, 한국생물공학회 추계학술발표대회 및 국제심포지엄 초록집, page 208. 초록 참조.	1-3,5-10
Y		4
Y	PIETRZYK, A. J. et al. High-resolution structure of Bombyx mori lipoprotein 7: crystallographic determination of the identity of the protein and its potential role in detoxification. Acta crystallographica, Section D, Biological crystallography. 2012 September, Vol. 68, No.9, pages 1140-51. 전문 참조.	4
A		1-3,5-10
A	PARK, H. H. et al. Identification and characterization of a novel cell-penetrating peptide of 30Kc19 protein derived from Bombyx mori. Process Biochemistry. 2014 September, Vol. 49, No. 9, pages 1516-1526. 전문 참조.	1-10

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2015년 07월 17일 (17.07.2015)	국제조사보고서 발송일 2015년 07월 20일 (20.07.2015)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 이현지 전화번호 +82-42-481-8745
---	------------------------------------

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	PARK, J. H. et al. A protein delivery system using 30Kc19 cell-penetrating protein originating from silkworm. <i>Biomaterials</i> . 2012 December, Vol. 33, No. 35, pages 9127-34. 전문 참조.	1-10
A	YANG, J. P. et al. Crystal structure of the 30 K protein from the silkworm <i>Bombyx mori</i> reveals a new member of the β -trefoil superfamily. <i>Journal of Structural Biology</i> . 2011 July, Vol. 175, No. 1, pages 97-103. 초록 참조.	1-10

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음