



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0083218

(43) 공개일자 2007년08월23일

(21) 출원번호 10-2007-0017201

(22) 출원일자 2007년02월20일

심사청구일자 2007년02월20일

(30) 우선권주장 1020060016156 2006년02월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단  
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자 이경림  
서울특별시 강남구 대치동 503 개포1차우성아파트 10-1101  
김미영  
경기 용인시 수지구 죽전1동 현대1차아파트 106동 1102호  
김문희  
서울 서대문구 대현동 이화여자대학교 약학대학 111호  
권영주  
서울 서대문구 대현동 이화여자대학교 약학대학 101호

(74) 대리인 안소영

전체 청구항 수 : 총 40 항

## (54) 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드

### (57) 요약

본 발명은 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드, 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 하는 세포막투과 전달체, 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체, 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드 및 상기 목적 물질을 포함하는 트랜스펙션 키트, 세포막 투과 복합체의 제조를 위한 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드의 용도, 의약의 제조를 위한 상기 세포막 투과 복합체의 용도, 및 상기 세포막 투과 복합체를 대상개체에 투여하여 세포 내로 도입시키는 단계를 포함하는 목적 물질을 세포로 운반하는 방법을 제공한다.

본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드는 기존의 TAT 유래 펩타이드보다 세포막 투과 효율이 탁월하므로, 세포 내 다양한 연구 분야뿐만 아니라 높은 효율로 약물이 전달되어야 하는 특정 질환의 치료 목적으로도 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드, 상기 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체 및 이를 이용한 목적 물질을 세포로 운반하는 방법은 약물 전달 시스템으로서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

### 대표도

도 2a

## 특허청구의 범위

### 청구항 1.

하기의 아미노산 서열로 이루어진 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드:

R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8-R9-R10

상기 식에서,

R1은 결실되거나, M, A, Q, C, F, L 또는 W로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,

R2는 결실되거나 I 또는 A로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이며,

R3는 I 또는 A로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,

R4는 Y, A, F, S 또는 R로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이며,

R5는 R, A 또는 K로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,

R6은 D, A, I 또는 R로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이며,

R7은 결실되거나, L, K, A, E 또는 R로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,

R8은 결실되거나, I, K 또는 A로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이며,

R9는 결실되거나, A, S, E, Y 또는 T로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,

R10은 결실되거나 A, H, K 또는 E로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이며, R10이 K 또는 H인 경우, K, KK, R, RR 또는 HH로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이 부가될 수 있다.

### 청구항 2.

제1항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 1인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

### 청구항 3.

제1항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 13으로부터 선택된 어느 하나인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

### 청구항 4.

제1항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호20, 서열번호21, 서열번호22, 서열번호23, 서열번호24, 서열번호25, 서열번호 26, 서열번호27, 서열번호28, 서열번호29, 서열번호30, 서열번호31, 서열번호32, 서열번호33, 서열번호34, 서열번호35,

서열번호36, 서열번호37, 서열번호38, 서열번호39, 서열번호40, 서열번호41, 서열번호42, 서열번호43, 서열번호44, 서열번호45, 서열번호46, 서열번호47, 서열번호48, 서열번호49, 서열번호50, 서열번호51, 서열번호 52, 서열번호53, 서열번호54로부터 선택된 어느 하나인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 5.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 22인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 6.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 26인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 7.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 27인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 8.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 31인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 9.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 32인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 10.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 33인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 11.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 34인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 12.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 35인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 13.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 36인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 14.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 37인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 15.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 38인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 16.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 39인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 17.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 40인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 18.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 41인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 19.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 42인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 20.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 43인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 21.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 44인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 22.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 45인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 23.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 46인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 24.

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 47인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

**청구항 25.**

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 48인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

**청구항 26.**

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 49인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

**청구항 27.**

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 50인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

**청구항 28.**

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 51인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

**청구항 29.**

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 52인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

**청구항 30.**

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 53인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

**청구항 31.**

제4항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 54인 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드.

**청구항 32.**

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 하는 세포막투과 전달체 (transmembrane carrier).

**청구항 33.**

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체.

**청구항 34.**

제33항에 있어서, 상기 목적 물질은 핵산, 약물(drugs), 화학물질(chemical compound), 탄수화물, 지질, 당지질, 효소, 조절 인자, 성장인자, 항체 중에서 선택된 하나 이상인 세포 내 투과 복합체.

### 청구항 35.

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드 및 목적 물질을 포함하는 트랜스펙션 키트.

### 청구항 36.

제35항에 있어서, 상기 펩타이드와 목적 물질 간의 결합인자를 추가로 포함하는 트랜스펙션 키트.

### 청구항 37.

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질을 결합시켜 세포막 투과 복합체를 제조하는 방법.

### 청구항 38.

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체를 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 것을 포함하는 의약의 제조 방법.

### 청구항 39.

서열번호 1, 2, 22, 26, 27, 또는 31-54 중 어느 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산.

### 청구항 40.

제39항에 있어서, 상기 핵산은 각각 서열번호 17, 18, 또는 55-81 인 핵산 서열로 구성된 핵산.

## 명세서

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드, 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 하는 세포막투과 전달체, 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체, 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드 및 상기 목적 물질을 포함하는 트랜스펙션 키트, 세포막 투과 복합체의 제조를 위한 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드의 용도, 의약의 제조를 위한 상기 세포막 투과 복합체의 용도 및 상기 세포막 투과 복합체를 대상개체에 투여하여 세포 내로 도입시키는 단계를 포함하는 목적 물질을 세포로 운반하는 방법에 관한 것이다.

최근에 치료목적의 약물과 펩타이드(peptide) 그리고 단백질을 세포 안으로 도입하는 실험들이 in vitro 및 in vivo 상에서 활발히 진행되고 있다.

in vitro 방법에는 전기천공법(electroporation), 리포솜(liposome)과의 세포막 융합, DNA가 코팅된 미세발사체(microprojectile)의 고속 포격(high velocity bombardment), 칼슘-포스페이트-DNA(calcium-phosphate-DNA) 침전물과의 배양, DEAE-덱스트란(dextran)을 이용한 트랜스펙션(transfection), 바이러스를 이용한 감염(infection), 그리고 단일세포로의 직접적인 미량주사법(microinjection) 등이 있다. 그러나 이들 방법은 모두 일부의 세포에만 핵산을 전달할 수 있다는 한계를 안고 있다.

in vivo 방법에는 스크랩 로딩(scrape loading), 칼슘-포스페이트 침전법과 리포솜 방법 등이 있다. 이들 기술 또한 단백질을 세포 내로 이동시키기에는 아직 많은 어려움이 있어, 제한된 범위에서만 사용되고 있다.

in vitro와 in vivo에서 생물활성을 가진 단백질을 세포 내로 도입하기 위해 시도된 방법에는 리포펩타이드(lipo-peptide)의 화학적인 첨가(P. Hoffmann et al.1988) 또는 폴리리신(polylysine)이나 폴리아르기닌(polyarginine) 등의 염기성고분자(basic polymer, W-C. Chen et al. 1978)을 이용한 방법 등이 있다.

또한 엽산(Folic acid, C.P. Leamon and Low, 1991)과 Pseudomonas exotoxin(T.I. Prior et al.,1991)이 전달체(transport moiety)로 사용된 바 있다. 그러나 이들 방법 또한 아직까지 일반적인 세포 내 전달 방법으로 인정받지 못하고 있으며, 여전히 해결해야 할 문제점을 안고 있다.

최근에는 단백질과 같은 거대분자도 세포 내 도입이 가능하도록 유전자 치료(gene therapy)가 각광받고 있으나, 이 또한 타겟팅(targeting)이 정확하지 않다는 문제점이 있다. 그 대안으로 단백질 투과(protein transduction) 또는 단백질 치료(protein therapy)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

막투과 단백질 도메인(protein transduction domain, PTD)은 HIV-1의 TAT 단백질을 세포배양 배지에 첨가하면 이 단백질이 세포 내로 들어가는 것을 발견하면서 처음 알려졌으며(Green et al., 1988, Frankel et al., 1988), 이 이후에 세포막을 건너서 세포 내로 도입하는 능력을 가진 초파리의 안테나피디아 호메오 전사인자(Drosophila Antennapedia (Antp) homeotic transcription factor, Joliot et al., 1991)와 허피스 심플렉스 바이러스-1 DNA 결합단백질 VP22(herpes-simplex-virus-1 DNA-binding protein VP22, Elliot et al., 1997)도 밝혀졌다.

상기 TAT, Antp, VP22 등의 PTD 간 아미노산 서열을 비교해보면, 염기성 아미노산인 아르기닌(arginine)과 리신(lysine)이 많이 존재하는데(표 1), 이 서열이 음전하를 갖는 세포 지질막에의 접근을 용이하게 해 주어 통과할 수 있게 한다. 이러한 세포 지질막을 통과할 수 있게 하는 단백질 서열을 일컬어 막투과 단백질 도메인(이하 'PTD'라 한다)이라고 명명하였다.

**[표 1]**

| PTD       | 아미노산 서열                                                                                                                                 |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HIV-1 TAT | Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg                                                                                             |
| HSV VP22  | Asp-Ala-Ala-Thr-Ala-Thr-Arg-Gly-Arg-Ser-Ala-Ala-Ser-Arg-Pro-Thr-Glu-Arg-Pro-Arg-Ala-Pro-Ala-Arg-Ser-Ala-Ser-Arg-Pro-Arg-Arg-Pro-Val-Glu |
| Antp      | Arg-Gln-Iso-Lys-Iso-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys                                                                         |

특히, TAT 중에서도 단백질 투과를 수행하는 11개 아미노산을 이용해서 벡터를 개발하여 다른 펩타이드 또는 단백질과 연결함으로써 TAT 융합 단백질을 만들어, 크기나 기능에 영향 없이 세포 내로 전체 단백질(full-length protein)을 도입을 가능하게 하였다(Nagahara et al., 1998).

이렇게 PTD가 다른 펩타이드 또는 단백질과 연결되어 융합단백질을 이루어 세포 내로 수송이 가능함이 밝혀짐에 따라, PTD를 이용하여 치료목적의 약물, 펩타이드, 단백질 등을 세포 내로 수송하려는 다양한 시도가 이루어지고 있다.

최근 들어, 염기성 아미노산 잔기들을 많이 함유하지 않는 PTD들도 알려져 있으며, 또 다른 경우는 나선형(helix) 구조를 통해 세포막 인지질을 통과한다는 보고도 있다.

한편, TCTP(translationally controlled tumor protein)은 MacDonald et al.(1995)에 의해 히스타민 유리활성이 있는 IgE-dependent histamine-releasing factor(HRF)로 보고된 단백질이다. TCTP는 1980년대까지 종양에 관련된 단백질(tumor-specific protein)로 알려져 왔으며, 그 합성은 종양의 증식 단계(proliferative stage)와 관련이 있을 것으로 생각되어 왔다. 마우스 적백혈병(erythroleukemia) 세포에서는 21 kDa의 종양 단백질 p21으로 밝혀졌고(Chitpatima et al., 1988), Ehrlich ascites tumor에서 세포성장과 관련이 있는 단백질 p23이 역시 TCTP/HRF와 동일한 것으로 밝혀졌다(Bohm et al., 1989).

이는 특히 활발하게 자라고 있는 암세포에서 많이 발견되고, 세포구조상 세포질에 존재하는 단백질로서, 172개의 아미노산(NCBI accession # P13693(Homo sapiens))으로 구성되어 있으며, 중간에 있어서 높은 상동성(homology)을 나타낸다. TCTP의 172개의 아미노산 중 C-말단의 45개의 아미노산은 염기성 도메인을 형성하고 있으며 이 부위는 마이크로튜불-관련 단백질(microtubule-associated protein)인 MAP-1B와 약 46% 상동성을 보이므로 마이크로튜불 결합 단백질 일 것으로 추정되고 있다. Gadhet et al. (1997)은 공초점 현미경(confocal microscope)을 사용하여서 TCTP의 분포와 세포골격망 분포가 어느 정도 일치함을 관찰하였는데, 이는 TCTP가 세포골격과 결합하여 있음을 시사한다.

TCTP 발현은 일정 수준의 mRNA 양을 유지하며 번역(translation)이 적게 되다가 혈청과 같은 외부자극에 의해서 폴리솜(polysome)으로 전환되어 번역되는 특성을 갖고, 이에 따라 TCTP(translationally controlled tumor protein)라고 명명되었다(Thomas et al., 1981; Thomas and Thomas., 1986). 또한, TCTP mRNA는 번역과정에서 저해되어 있다가 세포분열 신호를 받으면 이 저해가 풀려서 활성화됨으로써 단백질로의 번역이 시작된다는 보고가 있으며 TCTP mRNA가 활성화된다고도 알려져 있다(Thomas and Thomas, 1986).

이러한 TCTP/HRF는 염기성구, 비만세포와 상호작용하여 히스타민을 유리하는 물질로, 알러지성 염증반응과 관계가 있을 것으로 생각되고 있다.

TCTP/HRF는 세포질 내에 존재하는 단백질임에도 불구하고, MacDonald et al. (1995)은 이들이 세포밖에 존재하면서 IgE-감작화된 호염구(IgE-sensitized basophil)를 자극해서 히스타민을 유리하게 한다고 밝힌바 있다(Schroeder et al., 1996). 하지만 IgE가 존재하지 않을 때에도 HRF가 특이한 항원이나 항-IgE 항체에 의해 호염구의 반응이 조절되는 것을 관찰함으로써 HRF가 IgE와 결합해서 작용하는 것이 아니라 HRF에 특이적인 세포막 수용체에 작용함을 제시했다.

본 발명자들은 대한민국 특허출원번호 10-2001-0027896에 공지한 바와 같이, TCTP와 동일한 단백질로 밝혀진 HRF가 나트륨/칼륨 APT아제 펌프(Na,K-ATPase pump)의 소단위체(subunit)의 3번째 세포질 루프(cytoplasmic loop)인 NAKL3와 상호작용한다는 사실과 그림으로써 Na,K-ATPase의 활성을 저해한다는 사실을 보고한 바 있다(Jung et al., 2004).

이와 동시에 본 발명자는 TCTP/HRF가 세포막을 투과할 수 있다는 사실을 관찰하였는데, TCTP/HRF의 아미노산 서열에는 대표적인 PTD들의 특징인 염기성 아미노산인 아르기닌이나 리신이 특이적으로 많은 부분이 없는 점, 다른 개개의 PTD들과의 유사한 아미노산 서열이 없는 점으로부터 현재까지 알려진 PTD와는 구조적으로 전혀 상이한 도메인을 갖는 것으로 사료되었다.

전체적인 TCTP의 구조는 아미노 말단과 카복시 말단이 풀려져 있고 노출되어 있으며, 중간 부분은 구형으로 뭉쳐있는 형태이다.

이의 3차 구조를 예측해 보면, 나선구조(helix)를 이루는 부분이 3군데가 있는데, 첫번째 helix (H1)는 너무 짧고, 두번째 helix (H2)와 세번째 helix (H3)가 바깥쪽에 노출되어 있으며, Schizosaccharomyces pombe의 TCTP의 구조를 보면 H2와 H3의 외부에는 염기성 아미노산이 분포한다(Thaw et al., 2001). 이것으로 보아 H2와 H3가 protein transduction에 관여할 가능성이 예측되었다. 그러나 실험해 본 결과, 이 부위는 translocation 과 상관성이 없음을 확인하였다.

따라서 TCTP/HRF 내에서 단백질 세포 내 투과(protein transduction) 기능을 갖는 아미노산 서열을 찾는다면, 새로운 종류의 PTD를 발견하는 것 뿐만 아니라, 이를 이용한 벡터 개발을 통해 약물전달시스템(drug delivery system)에 기여할 것으로 사료된다.

이에 본 발명자는 TCTP에서 PTD 도메인을 찾기 위해 끊임없이 연구한 결과, 기존의 PTD와는 매우 상이한 아미노산 서열을 갖는 단백질 세포 투과 도메인을 발견하고, 이 도메인이 기존의 PTD보다 현저한 세포 투과율을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드, 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 하는 세포막투과 전달체, 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체, 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드 및 상기 목적 물질을 포함하는 트랜스펙션 키트, 세포막 투과 복합체의 제조를 위한 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드의 용도 및 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질을 결합시켜 세포막 투과 복합체를 제조하는 방법, 의약의 제조를 위한 상기 세포막 투과 복합체의 용도 및 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체를 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 것을 포함하는 의약의 제조 방법, 및 상기 세포막 투과 복합체를 대상개체에 투여하여 세포 내로 도입시키는 단계를 포함하는 목적 물질을 세포로 운반하는 방법을 제공하고자 한다.

### 발명의 구성

본 발명은 하기의 아미노산 서열로 이루어진 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 제공한다:

R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8-R9-R10

상기 식에서,

R1은 결실되거나, M, A, Q, C, F, L 또는 W로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,

R2는 결실되거나 I 또는 A로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이며,

R3는 I 또는 A로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,

R4는 Y, A, F, S 또는 R로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이며,

R5는 R, A 또는 K로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,

R6은 D, A, I 또는 R로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이며,

R7은 결실되거나, L, K, A, E 또는 R로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,

R8은 결실되거나, I, K 또는 A로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이며,

R9는 결실되거나, A, S, E, Y 또는 T로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고,

R10은 결실되거나 A, H, K 또는 E로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이고, R10이 K 또는 H 인 경우, K, KK, R, RR 또는 HH로부터 선택된 어느 하나의 아미노산이 추가될 수 있다.

본 발명의 일 실시예에서, 상기 아미노산 서열은 서열번호 1일 수 있다.

본 발명의 일 실시예에서, 상기 아미노산 서열은 서열번호 2-7의 아미노산 서열일 수 있다.

또한, 본 발명의 일 실시예에서, 상기 아미노산 서열은 상기 서열번호 2의 아미노산 서열 중 하나의 아미노산이 알라닌으로 치환된 아미노산 서열일 수 있다. 상기 아미노산 서열은 예를 들어 서열번호 8-16의 아미노산 서열, 특히 서열번호 13의 아미노산 서열일 수 있다.

또한, 본 발명의 일 실시예에서, 상기 아미노산 서열은 서열번호 20-54의 아미노산 서열일 수 있다. 상기 아미노산 서열은 예를 들어 서열번호 22, 26, 27, 또는 31-54의 아미노산 서열일 수 있다.

본 발명에서 '막투과 단백질 도메인'은 세포 기질막을 건너서 세포 내(세포질, 핵내)로 도입되는 능력이 있는 단백질 서열을 의미한다.

본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드는 기존의 PTD(Protein transduction domain)로 이미 알려진 TAT, VP22, Antp 아미노산 서열과는 서열상 유사성이 없는 새로운 막투과 단백질 도메인이다.

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 제공한다. 본 발명은 또한 서열번호 2-7의 아미노산 서열로 이루어진 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 제공한다.

본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 서열번호 1, 2, 3, 4의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드는 종래의 TAT 단백질의 투과율과 비교하여 탁월한 세포막 투과도를 나타내며, 처리농도가 높을수록, 처리시간이 길수록 세포 내 투과율은 급격히 증가하는 양상을 나타낸다.

구체적으로, TCTP의 1 번째부터 10 번째 아미노산(서열번호 1) 잔기를 사용하여 세포막 투과도를 측정하였을 때, 처리농도 50  $\mu$ M에서 15 분 처리하였을 경우 TCTP 1-10의 경우가 기존의 TAT 서열에 비해 3 배 이상, 처리농도 100  $\mu$ M에서 15 분 처리하였을 경우 TCTP 1-10의 경우가 기존의 TAT 서열에 비해 6 배 이상의 높은 투과도를 나타낸다. 2 시간 처리한 경우는 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M에서 각각 약 29 배, 30 배의 높은 투과도를 나타낸다.

또한, 처리시간이 15 분인 경우와 비교하여, 처리시간이 2 시간인 경우 세포 내 투과도가 증가하는 양상을 나타낸다.

또한, TCTP 1 번째부터 9 번째 아미노산(서열번호 2) 잔기를 포함하거나, TCTP 1 번째부터 8 번째 아미노산(서열번호 3) 잔기를 포함하거나, TCTP 2 번째부터 10 번째 아미노산(서열번호 4) 잔기를 포함하는 펩타이드는 또한 기존의 TAT 47-58 펩타이드보다 탁월한 세포투과도를 나타낸다. 이 중 TCTP 1-10(서열번호 1), TCTP 1-9(서열번호 2), TCTP 1-8(서열번호 3), TCTP 2-10(서열번호 4)의 순으로 우수한 세포투과도를 나타내며, TCTP의 1 번째 아미노산 잔기가 있을 때 더욱 세포투과도가 우수하다.

상기 펩타이드의 길이는 당업계에서 막투과 단백질 도메인으로 수용되는 일반적인 길이로서, 바람직하게는 9 내지 15개의 아미노산, 보다 바람직하게는 9 내지 10개 아미노산이 될 수 있다.

본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드는 인공적으로 합성하여 사용할 수도 있고, TCTP의 1 번째부터 10 번째(서열번호 1), 1 번째부터 9 번째(서열번호 2), 1 번째부터 8 번째(서열번호 3), 또는 2 번째부터 10 번째(서열번호 4)까지의 아미노산 서열을 분리하여 사용할 수도 있다.

본 발명의 펩타이드의 합성은 예를 들어 기기를 이용하거나 유전공학 기법을 이용하여 수행할 수 있다.

기기를 이용하여 합성하는 경우, 자동 펩타이드 합성기(PeptideEX-R48, Peptron, Daejeon, Korea)에서 원하는 펩타이드를 Fmoc 고체상(Fmoc solid-phase) 방법으로 합성한다. 수지(resin)에서 합성 펩타이드를 분리한 후, 시세이드 캡셀 팩 C18 분석 RP 칼럼(Shiseido capcell pak C18 analytical RP column)을 이용한 역상 HPLC(reverse-phase HPLC, Prominence LC-20AB, Shimadzu, Japan)에 의해 펩타이드를 순수분리 및 분석한다. 최종 펩타이드는 질량분광계(mass spectrometer, HP 1100 Series LC/MSD, Hewlett-Packard, Roseville, USA)를 사용하여 동정한다.

유전공학적 기법을 이용하는 경우, 원하는 펩타이드의 해당 염기 서열을 단백질 발현 벡터(vector)에 도입한 후, BL21 ( $\lambda$ DE3)와 BL21( $\lambda$ DE3)pLys와 같은 단백질 분해효소(protease)가 결핍된 박테리아(bacteria)에서 IPTG를 이용하여 발현을 유도하고 순수 분리한다.

본 발명은 또한 서열번호 8-16의 아미노산 서열로 이루어진 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 제공한다.

본 발명의 실시예에 따르면, 서열번호 2의 아미노산 서열을 각각 하나씩 알라닌으로 치환하여 얻은 펩타이드 중에서 6 번째 잔기 아스파틱산의 알라닌 치환형인 서열번호 13 번의 경우 저농도(10  $\mu$ M)에서 세포투과 능력이 원래 펩타이드보다 약 2.5 배 증가하는 것으로 나타났으며, 5, 7-9 잔기(R, L, I, S)를 치환한 경우인 서열번호 12, 14, 15, 16은 세포 투과 능

력이 원래보다 약간 감소하긴 하나 여전히 활성을 나타낸다. 1-4 잔기(M, I, I, Y)를 치환한 경우인 서열번호 8, 9, 10, 11은 세포투과 능력이 급격히 감소하긴 하나, 기능상으로도 원래 펩타이드의 세포막 투과 활성을 유지한다. 따라서 서열번호 8-16의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드는 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 포함된다.

본 발명은 또한 서열번호 22, 26, 27, 또는 31-54의 아미노산 서열로 이루어진 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 제공한다.

본 발명의 실시예에서는, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로서, 서열번호 20 내지 30의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 제조하였다. 그 결과, 서열번호 22, 26 및 27의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 TAT보다도 더 좋은 세포내 투과도를 보였으며(100  $\mu$ M), 이 결과를 기초로 다시 서열번호 31 내지 45의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 제조한 결과, 이들 모두 10  $\mu$ M에서 TAT 보다 더 좋은 세포내 투과도를 보였다. 다시 상기 결과들을 바탕으로 서열번호 1의 아미노산 서열의 여러 가지 변이형의 펩타이드로서 서열번호 46 내지 54의 펩타이드를 제작하고 세포내 투과도를 확인하였다. 그 결과 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드가 TAT에 비해 탁월한 세포내 투과도를 보였고, 서열번호 46 내지 54은 TAT과 비슷하거나 좋은 결과이고 서열번호 1인 TCTP 1-10보다는 탁월한 효과의 세포내 투과도를 보였다. 따라서, 서열번호 22, 26, 27, 31-54의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 또한 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 포함된다.

상기 펩타이드의 길이는 당업계에 막투과 단백질 도메인으로 수용되는 일반적인 길이로서, 바람직하게는 5 내지 15개의 아미노산, 보다 바람직하게는 8 내지 10개 아미노산이 될 수 있다.

상기 펩타이드는 인공적으로 합성하여 사용할 수도 있고, TCTP의 1 번째부터 10 번째(서열번호 1), 1 번째부터 9 번째(서열번호 2), 1 번째부터 8 번째(서열번호 3), 2 번째부터 10 번째(서열번호 4)까지의 아미노산 서열을 분리하고 변형시켜 사용할 수도 있다.

상기 펩타이드의 합성은 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드의 합성방법과 동일한 방법을 사용할 수 있다.

본 발명은 또한 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 하는 세포막투과 전달체(transmembrane carrier)를 제공한다. 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드는 목적 물질을 세포막을 통해 이동시키는 세포막투과 전달체(transmembrane carrier)로서의 용도를 갖는다.

또한, 본 발명은 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체를 제공한다.

본 발명의 '목적 물질'은 세포 내(세포질 또는 핵 내)로 투과되어 생리활성조절에 관여하거나 약리효과를 발현할 수 있는 것 또는 세포 내에서도 생물학적 활성을 갖는 물질을 의미한다.

본 발명의 목적 물질은, 예를 들면, 비-단백 분자로서, DNA 및 RNA를 포함한 핵산, 약물(drugs)과 같은 화학물질(chemical compound), 탄수화물, 지질, 당지질 등을 포함하고, 단백질 분자로서 효소, 조절 인자, 성장인자, 항체, 세포골격 구성인자 등을 포함한다.

본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드는 하나 이상의 목적 물질과 물리/화학적 공유 결합, 비공유 결합으로 연결되거나, 또는 매개체를 이용하여 통합된(incorporated) 또는 융합된(fused) 형태로 연결될 수 있다.

구체적으로, 목적 물질이 비-단백 분자일 경우, 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드와 공유결합할 수도 있고, 이들의 존재가 타겟 세포군에 노출될 수 있다. 또 다른 예로 목적 물질이 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드와 비공유 결합할 수도 있으며, 그 예로 핵산이 목적 물질일 때, 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드와 통합되어 지질기반운반체(lipid based vehicle) 형태로 타겟 세포군에 노출될 수 있다.

목적 물질은 단백질인 경우는 그 단백질의 cDNA를 PCR하여 획득한 후 벡터를 이용한 클로닝(cloning) 기법으로 융합된 단백질을 수득할 수 있으며, 이것이 불가능한 경우는 화학적인 융합방법이 있다. 예를 들어, 활성이 있는 목적 물질을 여러 링커(linker)와 연결한 후 세포막 투과 펩타이드와 결합반응시켜 획득한다.

특히, 목적 물질이 단백질일 경우, 본 발명의 펩타이드와 융합 단백질(fusion protein) 형태를 이루어 세포 내로 투과될 수 있다. 이 경우 본 발명의 세포막 투과 복합체의 생산 방법은 다음과 같다.

우선 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드와 목적 물질로서 단백질을 포함하는 융합 단백질을 암호화하는 핵산 및 이를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조한다.

상기 융합 단백질을 암호화하는 핵산은 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열 및 목적 물질인 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열은 예를 들면 서열번호 1, 2, 22, 26, 27, 31-54의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 암호화하는 핵산서열을 포함한다. 이러한 핵산 서열은 예를 들어, 서열번호 17-18 또는 55-81의 핵산 서열일 수 있다.

서열번호 17-18 또는 55-81의 핵산 서열은 다음과 같다.

| 구분                       | 핵산서열(Homo sapiens)                   | 서열번호 |
|--------------------------|--------------------------------------|------|
| 서열번호 1(TCTP1-10)의 핵산     | atgattatctaccgggacctcatcagccac       | 17   |
| 서열번호 2(TCTP1-9)의 핵산      | atgattatctaccgggacctcatcagc          | 18   |
| 서열번호 22(TCTP-CPP#3)의 핵산  | atgattatTTTTcgcgatctgattagccat       | 55   |
| 서열번호 26(TCTP-CPP#7)의 핵산  | atgattatttatcgcgcgctgattagccataaaaaa | 56   |
| 서열번호 27(TCTP-CPP#8)의 핵산  | atgattatttatcgcatctgcgcgagccataaaaaa | 57   |
| 서열번호 31(TCTP-CPP#12)의 핵산 | atgattatTTTTcgcatctgcgcgagccataaaaaa | 58   |
| 서열번호 32(TCTP-CPP#13)의 핵산 | atgattatTTTTcgcgcgctgattagccataaaaaa | 59   |
| 서열번호 33(TCTP-CPP#14)의 핵산 | atgattatTTTTcgcgcgcgcgagccataaaaaa   | 60   |
| 서열번호 34(TCTP-CPP#15)의 핵산 | tttattatTTTTcgcatctgcgcgagccataaaaaa | 61   |
| 서열번호 35(TCTP-CPP#16)의 핵산 | ctgattatTTTTcgcatctgcgcgagccataaaaaa | 62   |
| 서열번호 36(TCTP-CPP#17)의 핵산 | tggattatTTTTcgcatctgcgcgagccataaaaaa | 63   |
| 서열번호 37(TCTP-CPP#18)의 핵산 | tggattatTTTTcgcgcgcgcgagccataaaaaa   | 64   |
| 서열번호 38(TCTP-CPP#19)의 핵산 | tggattatTTTTcgcgcgctgattagccataaaaaa | 65   |
| 서열번호 39(TCTP-CPP#20)의 핵산 | atgattatTTTTcgcatctgcgcgatcataaaaaa  | 66   |
| 서열번호 40(TCTP-CPP#21)의 핵산 | tggattatTTTTcgcatctgcgcgatcataaaaaa  | 67   |
| 서열번호 41(TCTP-CPP#22)의 핵산 | atgattatTTTTcgcatctgcgcgacccataaaaaa | 68   |
| 서열번호 42(TCTP-CPP#23)의 핵산 | tggattatTTTTcgcatctgcgcgacccataaaaaa | 69   |
| 서열번호 43(TCTP-CPP#24)의 핵산 | atgattatTTTTaaaattgcgcgagccataaaaaa  | 70   |
| 서열번호 44(TCTP-CPP#25)의 핵산 | tggattatTTTTaaaattgcgcgagccataaaaaa  | 71   |
| 서열번호 45(TCTP-CPP#26)의 핵산 | atgattatTTTTcgcatctgcgcgagccataaaaaa | 72   |
| 서열번호 46(TCTP-CPP#27)의 핵산 | ctgattatTTTTcgcatctgattagccataaaaaa  | 73   |
| 서열번호 47(TCTP-CPP#28)의 핵산 | atgattatTTTTcgcatctgattagccataaaaaa  | 74   |
| 서열번호 48(TCTP-CPP#29)의 핵산 | ctgattatTTTTcgcatctgattagccatcgccgc  | 75   |
| 서열번호 49(TCTP-CPP#30)의 핵산 | ctgattatTTTTcgcatctgattagccatcatcat  | 76   |
| 서열번호 50(TCTP-CPP#31)의 핵산 | ctgattatTTTTcgcatctgattagccataaa     | 77   |
| 서열번호 51(TCTP-CPP#32)의 핵산 | ctgattatTTTTcgcatctgattagccatcgc     | 78   |
| 서열번호 52(TCTP-CPP#33)의 핵산 | ctgattatTTTTcgcatctgattagccat        | 79   |
| 서열번호 53(TCTP-CPP#34)의 핵산 | ctgattatTTTTcgcatctgcgcgagccataaaaaa | 80   |
| 서열번호 54(TCTP-CPP#35)의 핵산 | ctgattatTTTTcgcatctgattagccataaaaaa  | 81   |

하나의 아미노산을 암호화하는 코돈은 다수 개이므로 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 핵산서열은 상기 예시된 핵산서열 외의 다른 코돈에 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 모든 핵산서열을 포함한다.

본 발명의 재조합 발현 벡터에는 당업계에 통상적인 발현 프로모터, 종결인자, 선택마커(selection marker), 리포터 유전자, 태그 서열, 효소인자서열, 다중클로닝부위(multi-cloning site) 등을 포함할 수 있다.

본 발명의 재조합 발현백터를 이용하여 미생물 균주를 형질전환할 때는 기존에 공지된 열충격법(heat shock) 또는 전기천공법 등을 이용할 수 있다.

상기와 같이 형질전환된 균주를 적절한 조건에서 배양하여 융합 단백질을 발현시킨 후, 당업계 통상의 단백질 정제방법을 이용하여 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드 및 목적 물질인 단백질의 융합 단백질을 분리 정제할 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드 및 상기 목적 물질을 포함하는 트랜스펙션 키트를 제공한다. 트랜스펙션 키트(transfection kit)은 외부의 DNA/RNA를 포유동물의 세포내로 도입이 용이하도록 최적화된 시스템이다. 현재까지의 트랜스펙션 키트는 칼슘포스페이트법, 지질결합체를 이용하는 방법, 텍스트란 복합체를 이용하는 방법 등이 있으나 이들의 효율성은  $1/10^6$  내지  $1/10^2$  정도이고 세포의 종류에 의존성이 있는 한계가 있다. 이를 극복하기 위해 세포막 투과 단백질을 이용한 트랜스펙션 키트를 이용할 수 있다.

본 발명의 트랜스펙션 키트는 추가로 상기 펩타이드와 목적 물질 간의 결합인자를 추가로 포함할 수 있다. 상기 결합인자는 전사인자 또는 바이러스 단백질을 포함하는 특정 DNA/RNA 서열 또는 단백질 등의 목적 물질과 결합할 수 있는 단백질 전체 또는 일부를 의미한다. 예를 들어 Gal4는 DNA 결합인자이다. Gal4는 원래 진핵세포 생물, 원핵세포 생물, 바이러스에서 널리 사용되는 전사인자이다. DNA/RNA 결합인자는 in vivo와 in vitro에서 PTD와 융합단백질을 제조할 수 있는 단백질 발현 벡터를 이용하여 가능하다. 또는 DNA/RNA 결합인자와 PTD간의 융합은 화학적 결합, 물리적 공유결합, 또는 비공유 결합에 의해서도 가능하다.

본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드와 DNA/RNA과의 융합체를 만들어 이를 세포외부에 처리해주면 효율성과 세포 종류에 의존적인 한계를 극복할 수 있게 된다. 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드와 DNA/RNA 결합인자를 이용하여 in vivo와 in vitro에서 다양한 세포내의 세포질 또는 핵으로 DNA/RNA를 효율적으로 도입할 수 있게 된다. 특히 전달 방법은 근육내, 복강내, 정맥, 경구, 피하, 피내, 비강내, 흡입을 포함하는 다양한 방법을 통해서 가능하다.

또한 본 발명의 트랜스펙션 키트는 목적물질이 단백질, 지방, 탄수화물, 또는 화학물질(chemicals)로 구성된 그룹으로부터 선택한 하나 또는 그 이상의 생물조절물질도 in vivo와 in vitro에서 다양한 세포내의 세포질 또는 핵으로 효율적으로 도입하는 것을 포함한다. PTD와 목적물질의 융합은 화학적, 물리적인 공유결합 또는 비공유결합에 의할 수 있다.

또한 본 발명의 트랜스펙션 키트는 본 발명의 방법에 의해서 유전자 치료와 DNA/RNA 백신에 대한 새로운 방법을 제공할 수 있으며, 일시적 또는 영구적으로 발현이 가능하며 DNA/RNA 백신과 유전자치료와 같은 의학임상 적용에서 뿐만 아니라 기초 연구의 활용에서도 다양하게 사용될 수 있다.

본 발명은 또한 세포막 투과 복합체의 제조를 위한 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드의 용도 및 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질을 결합시켜 세포막 투과 복합체를 제조하는 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 의약의 제조를 위한 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체의 용도 및 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체를 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 것을 포함하는 의약의 제조 방법을 제공한다. 의약의 제조를 위해 사용되는 약제학적으로 허용되는 담체는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 당업자는 세포막 투과 복합체의 생체 내 도입에 적합한 담체를 적절히 선택하여 이용할 수 있다.

또한, 본 발명은 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체를 대상개체에 투여하여 세포 내로 도입시키는 단계를 포함하는 목적 물질을 세포로 운반하는 방법을 제공한다.

상기 목적 물질이 비-단백 분자일 경우, 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드와 공유결합 할 수도 있고, 이들의 존재가 타겟 세포군에 노출될 수 있다. 또 다른 예로 목적 물질이 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드와 비공유 결합할 수도 있으며, 그 예로 핵산이 목적 물질일 때 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드와 통합되어 지질기반운반체(lipid based vehicle)로 타겟 세포군에 노출될 수 있다.

상기 대상 개체는 인간을 포함한 포유동물이 될 수 있고, 대상개체에 투여시, 근육내, 복강내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 및 흡입 등을 포함한 다양한 경로를 통하여 투여 및 전달될 수 있다.

본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체의 투여량은 목적 물질의 치료상 유효량 및 상기 세포막 투과 복합체의 세포막 투과도에 따라 변화되는 것으로 특정한 양으로 한정되지 아니한다. 다만, 예를 들자면, 목적 물질이 핵산인 경우 목적 물질은 10 ~ 1000  $\mu\text{g/kg}$ 이며, 본 발명의 펩타이드는 0.1mg-10mg/kg일 수 있다.

또한, 본 발명은 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체를 대상 개체에 투여하여 목적 물질을 세포 내로 투과시킴으로써 해당 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

상기 세포 내로 투과시키고자 하는 목적 물질에 따라 치료하려는 질환의 종류는 변할 수 있다.

상기 대상 개체는 인간을 포함한 포유동물이 될 수 있고, 대상개체에 투여시, 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 및 흡입 등을 포함한 다양한 경로를 통하여 투여 및 전달될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 상기 막투과 단백질 도메인 기능을 나타내고 서열번호 1, 2, 22, 26, 27, 또는 31-54의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.

상기 핵산분자는 단일사슬 또는 이중사슬의 DNA 또는 RNA이고, 인공적으로 합성한 것이거나 생물체에서 유래한 TCTP 유전자로부터 분리한 것이 될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 1, 2, 22, 26, 27, 또는 31-54의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 암호화하는 핵산 분자는 각각 서열번호 17-18, 또는 55-81의 핵산 서열로 이루어질 수 있다.

하나의 아미노산을 암호화하는 코돈은 다수 개이므로 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 핵산서열은 상기 예시된 핵산서열 외의 다른 코돈에 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 모든 핵산서열을 포함한다. 예를 들어, 아미노산 서열 중 알라닌을 암호화하는 서열은 gca, gcc, gcg 또는 gct가 될 수 있다.

본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드는 기존의 TAT 유래 펩타이드보다 세포막 투과 효율이 탁월하므로, 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드, 세포막 투과 복합체 및 이를 이용한 운반 방법은 세포 내 다양한 연구분야 뿐만 아니라 높은 효율로 약물이 전달되어야 하는 특정 질환의 치료 목적으로도 사용할 수 있다. 예를 들어, 암환자의 경우 암 억제 약물을 암세포에 운반함으로써 암의 치료에 사용할 수 있다.

따라서, 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드, 이에 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체 및 이를 이용한 운반 방법은 약물 전달 시스템으로서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

#### [실시예 1] 본 발명의 TCTP 단백질의 결실형을 이용한 세포 내 투과 도메인 확인

TCTP 단백질 중 어느 부분이 세포 내 투과 도메인으로서 작용할 수 있는지 확인하기 위해 다음과 같이 TCTP의 다양한 결실체(deletion constructs)를 제조하여 실험을 수행하였다.

##### 1) TCTP 단백질의 결실형의 순수분리

TCTP의 결실체(도 1의 a와 c)를 생산하기 위하여 6개의 히스티딘을 부착(tagging)할 수 있는 pRSET 벡터를 이용하였다. 이 벡터의 다중클로닝부위에 TCTP의 각 결실 형태에 해당하는 DNA 서열을 서브클로닝(sub-cloning) 한 후 BL21 ( $\Delta\text{DE3}$ ) 또는 BL21( $\Delta\text{DE3}$ )pLys E.coli 균주를 형질전환하였다. 100  $\mu\text{M}$  IPTG로 3 시간 동안 단백질 발현을 유도하였으며, 폴리히스티딘과 결합하는 Ni 칼럼을 이용하여 단백질을 순수분리하였다.

##### 2) 세포배양 및 단백질 처리

결실형 단백질들을 BEAS-2B 세포주에 15  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 1 시간 및 24 시간 처리하였다. 처리한 배양액(supernatant)과 세포 용해액(cell lysate)을 수득하여 SDS-PAGE 겔에서 단백질을 분리한 후, TCTP 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석하였다(도 1b).

도 1b에 나타난 바와 같이, 1 시간 처리시 관찰되던 온전한 길이(full length)의 TCTP(레인 1)가 24 시간 처리 후 배양액에서 사라진 것을 볼 수 있다(레인 6). 또한 C 말단이 소실된 Del-C112HRF(레인 4)도 24 시간 처리한 후 배양액에서 사라진 것을 관찰할 수 있었다(레인 9). 반면 나머지 N 말단이 소실된 Del-N11, N35, N39C110HRF는 24 시간 후에도 여전히 배양액에 존재하였다.

따라서 본 발명의 TCTP의 세포 내 투과 도메인은 N 말단에 존재함을 알 수 있다. 특히 1-10 번까지의 N 말단이 소실된 Del-N11HRF는 24 시간 처리 후에도 남아있는 것으로 보아(레인 7), TCTP의 1-10 아미노산이 세포 내 투과 도메인으로써 기능할 것이라고 생각된다.

한편 본 발명의 TCTP 단백질이 상기보다 더욱 짧은 시간인 5 분과 30 분 동안에도 세포 내로 이동하는지를 살펴보았다. 실험은 상기와 같은 방법에 의해 수행하였다(도 1d).

도 1d에 나타난 바와 같이, N 말단을 포함하는 Del-C38HRF는 배양액에서 30 분 후에 사라졌으며 (레인 4), 세포용해액에서는 5 분 후에도 검출되고 (레인 1) 30 분에는 더 많이 검출되었다 (레인 4).

따라서 본 발명의 TCTP는 수 분에서 수십 분 정도의 빠른 시간 동안에도 세포 내로 이동이 가능함을 알 수 있다.

## [실시예 2] 본 발명의 펩타이드의 세포 내 투과도 확인

실시에 1에서 나타난 바와 같이 TCTP의 N 말단 펩타이드가 세포 내 투과 도메인으로서 작용할 수 있는지 확인하기 위해, 이들 펩타이드의 세포 내 투과도를 확인하였다.

### 1) 본 발명의 펩타이드 제작

다음과 같이 TCTP로부터 유래한 펩타이드들과 그 대조군 펩타이드를 제작하였다.

| 구분             | 아미노산 서열       | 서열번호 |
|----------------|---------------|------|
| TCTP의 1-10번 잔기 | MI IYRDL I SH | 1    |
| TCTP의 1-9번 잔기  | MI IYRDL I S  | 2    |
| TCTP의 1-8번 잔기  | MI IYRDL I    | 3    |
| TCTP의 2-10번 잔기 | I IYRDL I SH  | 4    |
| TCTP의 1-7번 잔기  | MI IYRDL      | 5    |
| TCTP의 1-6번 잔기  | MI IYRD       | 6    |
| TCTP의 3-10번 잔기 | IYRDL I SH    | 7    |
| 대조군(TAT 48-57) | GRKKRRQRRR    | 19   |

각 펩타이드의 아미노 말단에 로다민(Rhodamine) 형광염료를 표지(labeling)하고, 카복시 말단은 보호(Protection)하고, 순도는 95% 이상이 되도록 제작하였다. 이 펩타이드 합성은 PEPTRON사에 의뢰하여 진행하였다.

음성 대조군으로 모든 펩타이드의 아미노 말단에 표지한 형광염료인 로다민(Molecular Probe)을 사용하였다.

### 2) 세포배양 및 펩타이드 처리

HeLa 세포를 10% FBS 및 100 units/mL 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)을 첨가한 DMEM 배지를 배양액으로 하여, 37℃의 가습조건이 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다.

HeLa 세포를 전일 70-80% 정도 자라도록 48 웰 플레이트에 접종(seeding) 후, 안정화되면 실험을 진행하였다. 37℃의 DMEM 배지로 2번 세척한 후, 상기 1)에서 준비한 펩타이드들을 농도별(0, 1, 5, 10, 50, 100 μM)로 배양배지에 처리하고, 시간별(15 분, 2 시간)로 37℃, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

배양 후 세포를 차가운 PBS로 3번 세척하고, 즉시 FL600 마이크로 플레이트 형광 판독기(micro plate fluorescence reader, BIO-TEK instruments, INC, Vermont, USA)를 사용하여 방출(emission) 530 nm, 여기(excitation) 590 nm에

서 측정하여 세포 내로 들어간 단백질의 지표인 로다민의 형광도를 측정하였다. 민감도(sensitivity)는 기본을 100으로 정하여 측정하였고, 형광 수치가 너무 강하여 읽을 수 없을 때에는 75로 측정하였다. 모든 실험은 재현성을 위해 중복하여(duplet 또는 triplet) 진행하였다(도 2).

도 2에 나타난 바와 같이, 대조군 펩타이드는 공지된 바와 같이 세포 내로 이동함을 관찰할 수 있었으며 처리농도가 높아질수록 이동 정도도 증가하였고, 15 분 처리시보다 2 시간 처리시 세포 내로 더 많이 들어가는 것으로 확인되었다.

본 발명의 펩타이드 TCTP 1-10, 1-9, 1-8의 경우, 처리농도 1-10  $\mu\text{M}$ 에서는 기본 수준(basal level)으로 세포 내로의 이동(translocation)이 잘 보이지 않았으나, 처리농도 50, 100  $\mu\text{M}$ 에서는 15 분(도 2a)과 2 시간(도 2b)에서 모두 아주 높은 형광수치가 측정되어 탁월한 세포 내 투과율을 나타냄을 알 수 있었다. 특히, 2 시간 처리한 경우 50, 100  $\mu\text{M}$ 에서는 민감도 100으로 설정할 경우 수치를 측정할 수 없을 정도로 높은 형광수치를 보였다. 그런 경우는 민감도를 75로 낮추어 측정하였다.

도 2b의 결과를 보면, TCTP 1-10 펩타이드가 50 및 100  $\mu\text{M}$ 에서 별로 차이가 없는 것으로 보아, 2 시간에서는 약 50  $\mu\text{M}$ 의 처리농도에서 포화(saturation) 되는 것으로 생각된다. 반면, 대조군은 1  $\mu\text{M}$  이상의 농도에서 포화되는 양상으로, 더 이상의 형광 수치의 증가가 없는 것으로 나타났다.

TCTP 2-10 펩타이드는 1 내지 10  $\mu\text{M}$ 에서는 이동(translocation)이 관찰되지 않았으나, 15 분 처리시 100  $\mu\text{M}$ 에서 대조군보다 높은 형광도를 보였고, 2 시간 처리시 50  $\mu\text{M}$ 에서 대조군 수준의 막투과 단백질 도메인 효율을 가지고 100  $\mu\text{M}$ 에서 급격한 이동 능력이 나타났다.

따라서, 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드인 TCTP 1-10, TCTP 1-9, TCTP 1-8, TCTP 2-10는 기존의 TAT 48-57 펩타이드에 비하여 세포 내 투과율이 탁월함을 확인할 수 있었다.

TCTP의 경우 고농도에서 급격한 PTD 효율을 보이는데 이는 이동(translocation) 기전의 차이에 기인하는 것으로 보인다.

결과적으로, TCTP 1-10, TCTP 1-9, TCTP 1-8, TCTP 2-10의 펩타이드가 모두 기존의 막투과 단백질 도메인으로 알려진 TAT 47-58 펩타이드보다 세포 투과 능력이 탁월함을 알 수 있었다. 이 중 TCTP 1-10, TCTP 1-9, TCTP 1-8, TCTP 2-10의 순으로 세포투과능력이 우수함을 확인하였으며, TCTP의 1번째 아미노산 잔기(M)가 존재할 때 더욱 세포 투과능력이 우수한 것으로 나타났다.

### [실시예 3] 본 발명의 펩타이드의 세포 내 투과 양상 확인

본 발명의 펩타이드의 세포 내 투과 양상을 형광현미경으로 확인하였다.

실시예 2의 2)와 동일한 방법으로 세포에 10  $\mu\text{M}$  과 100  $\mu\text{M}$ 의 농도로 펩타이드 TCTP 1-9(서열번호 2)를 처리하였다. 단, 세포 접종시 12 웰 플레이트에 유리 커버 글라스를 깔고 접종하였는데, 이는 형광 현미경 관찰시 플라스틱은 형광간섭 현상을 유발하기 때문이다. 세척 후 세포가 붙어있는 유리 커버 글라스를 슬라이드 글라스에 밀착시켜 형광 현미경으로 시료를 관찰하였다(도 3).

도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 펩타이드는 10  $\mu\text{M}$ 의 저농도에서도 약하게 세포 내로 투과되는 것으로 나타났다. 100  $\mu\text{M}$ 의 경우는 강한 형광 강도를 나타내었다. 세포 내 위치는 전체적으로 세포질과 핵에 골고루 퍼져 있는 것으로 보인다.

### [실시예 4] 본 발명의 펩타이드의 치환형의 세포 내 투과도 확인

본 발명의 펩타이드의 치환형이 세포 내 투과 활성을 나타내는지 확인하기 위해, 이들 펩타이드의 세포 내 투과도를 확인하였다.

#### 1) 펩타이드 치환형의 제작

다음과 같이 TCTP 1-9(서열번호 2)의 아미노산 잔기 9개를 각각 하나씩 알라닌으로 치환한 펩타이드들을 제작하였다.

| 구분 | 아미노산 서열 | 서열번호 |
|----|---------|------|
|----|---------|------|

|              |            |    |
|--------------|------------|----|
| TCTP(1-9)M1A | AI IYRDLIS | 8  |
| TCTP(1-9)I2A | MAIYRDLIS  | 9  |
| TCTP(1-9)I3A | MIAYRDLIS  | 10 |
| TCTP(1-9)Y4A | MI IARDLIS | 11 |
| TCTP(1-9)R5A | MI IYADLIS | 12 |
| TCTP(1-9)D6A | MI IYRALIS | 13 |
| TCTP(1-9)L7A | MI IYRDAIS | 14 |
| TCTP(1-9)I8A | MI IYRDLAS | 15 |
| TCTP(1-9)S9A | MI IYRDLIA | 16 |

각 펩타이드의 아미노 말단에 로다민 형광염료를 표지하고, 카복시 말단은 보호하고, 순도는 95% 이상이 되도록 제작하였다. 이 펩타이드 합성은 PEPTRON사에 의뢰하여 진행하였다.

## 2) 세포배양 및 펩타이드 처리

HeLa 세포를 10% FBS 및 100 units/mL 페니실린-스트렙토마이신을 첨가한 DMEM 배지를 배양액으로 하여, 37℃의 가습조건이 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다.

HeLa 세포를 전일 70-80% 정도 자라도록 48 웰 플레이트에 접종 후, 안정화되면 실험을 진행하였다. 37℃의 DMEM 배지로 2번 세척한 후, 상기 1)에서 준비한 펩타이드들을 농도별(0, 1, 10, 100 μM)로 배양배지에 처리하고, 시간별(15 분, 2 시간)로 37℃, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

배양 후 세포를 차가운 PBS로 3번 세척하고, 즉시 FL600 마이크로 플레이트 형광 판독기를 사용하여 방출 530 nm, 여기 590 nm에서 측정하여 세포 내로 들어간 단백질의 지표인 로다민의 형광도를 측정하였다. 민감도는 기본을 100으로 정하여 측정하였고, 형광 수치가 너무 강하여 읽을 수 없을 때에는 75로 측정하였다. 모든 실험은 재현성을 위해 삼중으로(triplet) 진행하였다(도 4).

도 4a에 나타난 바와 같이, TCTP 1-9를 100 μM 처리하여 얻은 형광 수치를 100%로 설정한 경우 아미노산 잔기 1, 2, 3, 4번(각각 M, I, I, Y)를 알라닌으로 치환(각각 서열번호 8, 9, 10, 11)한 경우 세포투과도가 약 80-90% 정도의 급격한 감소를 보였다.

반면 아미노산 잔기 5, 6, 7, 8, 9번(각각 R, D, L, I, S)을 알라닌으로 치환(서열번호 12, 13, 14, 15, 16)한 경우 약 50% 정도의 감소를 보이지만, 활성은 유지되는 것으로 판단되었다. 따라서 아미노 말단에 위치한 4개의 아미노산(MIIY)는 세포 투과도에 필수적인 아미노산 서열이라 볼 수 있다.

한편 KC4 플레이트 판독기의 민감도를 75로 설정하여 분석하면 1 또는 10 μM처럼 비교적 낮은 농도의 세포 투과도 결과를 분석할 수가 없었으므로, 민감도를 100으로 하여 형광도를 측정하여 도표로 나타내었다(도 4b). 이때 100 μM의 결과는 형광 수치가 너무 높아 읽을 수 가 없었기 때문에 표에 나타낼 수 없었다.

도 4b에 나타난 바와 같이, TCTP 1-9를 1 0uM 처리한 결과를 1로 설정한 경우 6 번째 아스파틱산을 알라닌으로 치환한 펩타이드(서열번호 13)는 원래 펩타이드에 비해 약 2.5 배 높은 세포 투과력을 보였다. 아스파틱산은 음전하 성질을 갖는 아미노산으로 TCTP 1-9에서 유일하게 음전하를 갖는 아미노산 잔기이다. 따라서 음전하를 갖는 아미노산은 TCTP의 세포투과 능력을 감소시키는 것으로 판단된다.

또한 원래 펩타이드인 TCTP 1-10, TCTP 1-9, TCTP 1-8, TCTP 2-10가 고농도에서는 모두 우수한 세포투과능력을 나타내지만 비교적 낮은 농도인 1, 10 μM에서는 대조군보다 낮은 투과도를 나타내었던 것에 비해(실시예 2), 이들 펩타이드의 6 번째 잔기가 결실, 부가 또는 치환된 유사체는 저농도에서도 우수한 막 투과 활성을 나타냄을 알 수 있다.

상기 결과를 종합하여 보면, 펩타이드의 아미노말단에 위치한 4개의 아미노산 잔기(MIIY)가 세포내 투과도에서 중요한 역할을 하고, 특히 6번째 아미노산 잔기인 아스파틱산(D)을 알라닌(A)으로 치환한 결과 저농도(10 μM)에서 세포내 투과도가 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이때 저농도에서는 세포내 투과도가 증가하였으나 고농도(100 μM)에서는 다시 감소되는 것은 산성의 아스파틱산보다 소수성의 알라닌이 막투과도를 증가시키는 활성에 중요하게 작용하지만 알라닌 치환형의 용해도 감소가 고농도에서 활성 저하를 야기하는 것으로 사료된다.

[실시예 5] 본 발명의 변이형 펩타이드의 세포 내 투과도

실시예 4에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 펩타이드의 치환형이 세포 내 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 이에 본 발명의 펩타이드의 변이형 또한 세포 내 투과 활성을 나타내는지 확인하기 위해, 이들 펩타이드의 세포 내 투과도를 확인하였다.

1) 펩타이드 변이형의 제작

실시예 4의 결과를 바탕으로 다시 서열번호 1인 TCTP의 1-10번 잔기를 골격으로 여러 가지 변이형의 펩타이드를 제작하였다.

| 구분          | 아미노산 서열                 | 서열번호 |
|-------------|-------------------------|------|
| TCTP-CPP#1  | M I I Y R D L I S K K   | 20   |
| TCTP-CPP#2  | M I I Y R D K K S H     | 21   |
| TCTP-CPP#3  | M I I F R D L I S H     | 22   |
| TCTP-CPP#4  | M I I S R D L I S H     | 23   |
| TCTP-CPP#5  | Q I I S R D L I S H     | 24   |
| TCTP-CPP#6  | C I I S R D L I S H     | 25   |
| TCTP-CPP#7  | M I I Y R A L I S H K K | 26   |
| TCTP-CPP#8  | M I I Y R I A A S H K K | 27   |
| TCTP-CPP#9  | M I I R R D L I S E     | 28   |
| TCTP-CPP#10 | M I I Y R A E I S H     | 29   |
| TCTP-CPP#11 | M I I Y A R R A E E     | 30   |
| TCTP-CPP#12 | M I I F R I A A S H K K | 31   |
| TCTP-CPP#13 | M I I F R A L I S H K K | 32   |
| TCTP-CPP#14 | M I I F R A A A S H K K | 33   |
| TCTP-CPP#15 | F I I F R I A A S H K K | 34   |
| TCTP-CPP#16 | L I I F R I A A S H K K | 35   |
| TCTP-CPP#17 | W I I F R I A A S H K K | 36   |
| TCTP-CPP#18 | W I I F R A A A S H K K | 37   |
| TCTP-CPP#19 | W I I F R A L I S H K K | 38   |
| TCTP-CPP#20 | M I I F R I A A Y H K K | 39   |
| TCTP-CPP#21 | W I I F R I A A Y H K K | 40   |
| TCTP-CPP#22 | M I I F R I A A T H K K | 41   |
| TCTP-CPP#23 | W I I F R I A A T H K K | 42   |
| TCTP-CPP#24 | M I I F K I A A S H K K | 43   |
| TCTP-CPP#25 | W I I F K I A A S H K K | 44   |
| TCTP-CPP#26 | M I I F A I A A S H K K | 45   |
| TCTP-CPP#27 | L I I F R I L I S H K K | 46   |
| TCTP-CPP#28 | M I I F R I L I S H K K | 47   |
| TCTP-CPP#29 | L I I F R I L I S H R R | 48   |
| TCTP-CPP#30 | L I I F R I L I S H I H | 49   |
| TCTP-CPP#31 | L I I F R I L I S H K   | 50   |
| TCTP-CPP#32 | L I I F R I L I S H R   | 51   |
| TCTP-CPP#33 | L I I F R I L I S H     | 52   |
| TCTP-CPP#34 | L I I F A I A A S H K K | 53   |
| TCTP-CPP#35 | L I I F A I L I S H K K | 54   |

각 펩타이드의 아미노 말단에 FITC 형광염료를 표지하고, 카복시 말단은 보호하고, 순도는 95% 이상이 되도록 제작하였다. 이 펩타이드 합성은 PEPTRON사에 의뢰하여 진행하였다.

2) 세포배양 및 펩타이드 처리

HeLa 세포를 10% FBS 및 100 units/mL 페니실린-스트렙토마이신을 첨가한 DMEM 배지를 배양액으로 하여, 37°C의 가스 조건이 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다.

HeLa 세포를 전일 70-80% 정도 자라도록 6 웰 플레이트에 접종 후, 안정화되면 실험을 진행하였다. 37°C의 DMEM 배지로 2번 세척한 후, 상기 1)에서 준비한 펩타이드들을 농도별(0, 1, 10, 100  $\mu$ M)로 배양배지에 처리하고, 2 시간동안 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

배양 후 세포를 차가운 PBS로 2번 세척하고, 1 mg/ml의 트립신으로 15 분 동안 37°C 방치하여 세포막에 결합되어 있는 펩타이드를 분해시킨 후 다시 PBS로 2번 세척한다. 그후 FACS를 사용하여 방출 510 nm, 여기 530 nm에서 측정하여 세포 내로 들어간 단백질의 지표인 FITC의 형광도를 측정하였다(도 5). TAT을 대조군으로 하고 서열번호 1인 TCTP 1-10 잔기인 wild type(WT)과 그것의 변이형인 TCTP-CPP#1-35(서열20-54)의 펩타이드의 세포내 투과도를 비교하였다.

### 3) 펩타이드 변형과 세포내 투과도와 상관관계

변이형 펩타이드를 디자인할 때 알려진 치환과 같이 각 아미노산 잔기에 각 20개의 아미노산을 다 치환 시험하여 위치별로 각각 좋은 효능을 나타내는 아미노산을 찾기에는 비효율적이며 또한 각각 좋은 아미노산들의 전체 조합이 반드시 좋은 효능을 나타낸다고 할 수 없다. 이는 주위 다른 위치의 아미노산의 변형 후 펩타이드 전체의 전하(charge)와 등전점(pI)등을 고려하여야 하기 때문이다. 그래서 일차적 변형 시도 후 도출된 결과를 바탕으로 변형을 시도하였으며, 다시 중요 아미노산의 역할의 재검증하는 방식으로 디자인 하였다. 전체 변형된 펩타이드 종류와 그서열은 아래 표에 정리되어 있다. WT(서열1)의 각 10개의 아미노산에 N-말단에서부터 번호 I에서 X까지 부여하여 변형 위치를 쉽게 설명하려고 한다. 일단 WT의 용해도와 세포막과의 결합 정도를 높이기 하기 위하여 (폴리아르기닌 또는 폴리리신의 사용 시도와 같은 이유에서) WT-X 위치에 리신치환과 동시에 리신 첨가(서열 20), WT-VII, VIII에 리신 두 개 치환(서열 21), WT에 리신 두 개를 첨가(서열 26, 27) 했을 때, 서열 29와 30만이 세포내 투과도를 증가시켰다. WT 보다 10  $\mu$ M을 1로 놓고 평균형광수치를 비교하여 분석한 결과에 따르면, 10  $\mu$ M에서 TAT은 6.1 배, 서열 29 및 30은 6.04 및 1.73 배의 세포내 투과도 증가를, 100  $\mu$ M에서는 TAT은 94.75 배 증가, 서열 26 및 27은 각각 144.6, 342.9배 증가된 결과를 보였다. 그러므로 차 후의 변형 연구(서열 34부터)에서는 C-말단에 2개의 리신이 첨가된 총 12개 아미노산의 변형 펩타이드를 유지하였고 염기성 리신의 외 다른 염기성 아미노산의 치환 및 염기성 아미노산의 개수 변형도 시도하였다(서열 48, 49, 50, 51 및 52). 그 결과 C-말단의 염기성 아미노산의 1 또는 2개 첨가는 WT보다 훨씬 좋은 효과를 나타냈다.

WT-I 위치의 메치오닌(M) 중의 황의 기능을 분석하기위하여 메치오닌 대신에 글루타민(Q) 및 시스테인(C)을 치환(서열 23 과 서열 24, 25 비교) 하였다. 그 결과 황 함유 성질은 중요한 역할이 없음을 알 수 있었기 때문에 메치오닌에 의한 hydrophobic interaction (소수성 작용)의 역할을 알기 위하여 메치오닌 대신에 페닐알라닌(F), 로이신(L), 트립토판(W)을 치환(서열 31와 서열 34, 35, 36 비교, 서열 32와 38 비교, 서열 33과 37비교, 서열 39과 40비교, 서열 41와 42비교, 서열 43와 44비교 및 서열 46 대비 47 비교)하였다. 그 결과 100  $\mu$ M 농도에서는 서열 37, 38, 39의 세포막 투과능은 서열 34보다 좋지 않으나, 10  $\mu$ M 농도에서는 WT 10  $\mu$ M 농도 대비 52.0 배, 55.6 배, 및 25.0 배로서 서열 31(WT대비 29 배)보다 탁월한 세포내 투과도를 보였다. 서열 32 대비 38과 서열 33 대비 37의 결과도 트립토판의 치환이 세포막 투과능 증가를 나타내지 않았다. 이는 트립토판 치환체의 100  $\mu$ M에서의 비교적 높은 독성 결과(도 6b)와 관련이 있을 것이다. 그 외 서열 39과 40, 서열 41와 42, 서열 43와 44의 비교에서 메치오닌 대신의 트립토판 치환은 효능 및 독성에서 중요한 변화를 나타내지 않았다. 페닐알라닌(서열 34) 또는 로이신(서열 35)의 치환이 10  $\mu$ M에서는 서열 31 대비 세포막 투과능 증가와 100  $\mu$ M에서는 감소의 결과를 보여주었다. 서열 31, 34, 35 및 36에서 로이신 치환체가 10  $\mu$ M에서 가장 큰 증가와 100  $\mu$ M에서 작은 감소를 나타냈고 서열 35이 서열 31보다 100  $\mu$ M에서 독성이 약하였다. 서열 46 (WT 10  $\mu$ M 농도 대비 3.75 배 증가)와 서열 47(7.04 배 증가)에서는 로이신의 치환이 세포막 투과능 감소를 보였지만 서열 46의 독성이 서열 47의 독성보다 약하다. 그러므로 메치오닌 자체의 독성과 쉽게 환원되는 불안정성 문제를 고려하여 첫 번째 아미노산인 메치오닌은 로이신으로 치환됨이 가장 적합할 것으로 생각되어 차후의 변형 연구에서는 로이신을 도입하였다(서열 48 이상).

WT-IV 위치의 타이로신(Y)의 역할을 알기 위하여 타이로신과 isosteric 하지만 OH가 없는 페닐알라닌(F)(서열 22)을 타이로신과 동일하게 하이드록실기(OH)을 가지는 세린(S)을 치환(서열 23)함으로써 이 위치에서의 소수성 작용의 중요성 및 하이드록실기에 의한 작용 등을 시험해 보았다. 10  $\mu$ M 농도에서는 서열 22 및 25은 WT(서열 1)대비 19.63 배 및 0.91 배 증가를, 100  $\mu$ M 농도에서는 WT(서열 1)대비 216.75 배 및 1.81 배 증가를 보였다. 그 결과 이 위치에서는 소수성 증대가 세포막투과능을 훨씬 증가시킴을 알 수 있었기 때문에 차 후에는 WT-IV 위치에 페닐알라닌을 도입했다(서열 31 이상).

WT-V 위치의 알기닌(R)을 대신하여 같은 염기성 아미노산인 리신을 치환(서열 31와 43 비교 및 서열 36와 44 비교)하거나 알라닌을 치환(서열 31와 45 비교, 서열 35와 53 비교)하여 비교하였다. 그 결과 10  $\mu$ M 농도에서 서열 31(WT 대비 26.77배 증가)는 서열 43(WT 대비 12.1배 증가)보다, 서열 36(WT 대비 18.4배 증가)는 서열 44(WT 대비 15.04배 증가)보다 세포막 투과능이 저하됨을 알 수 있었고, 10  $\mu$ M 농도에서 서열 45(WT 대비 11.47 배 증가) 및 서열 53(WT 대비 8.24 배 증가)은 서열 31 및 서열 35(WT 대비 29.53 배 증가)보다 세포막 투과능 저하를 보였다. 이로써 WT-V 위치는 알기닌을 그대로 유지하는 것이 유리할 것으로 생각된다.

WT-VI 위치의 아스파틱산은 알라닌 치환 시험(실시예 4)에서 서열 13이 저농도(10  $\mu$ M)에서 세포막 투과능 증가를 보였기 때문에 이 위치에 알라닌을 치환시키거나 소수성 증가를 위해 이소로이신(I)을 치환시켰다. 서열 31(WT-VI: I)와 33(WT-VI: A) 비교하면 100  $\mu$ M 농도에서는 거의 유사하게 증가시키지만, 10  $\mu$ M 농도에서는 서열 31(WT 대비 29.0 배 증가)가 서열 33(WT 대비 3.2 배 증가)보다 월등히 세포막 투과능을 증가시키기 때문에 WT-VI 위치에 이소로이신이 치환이 알라닌 치환보다 유효하다고 볼 수 있다. 이로서 차 후 변형 연구에서는 WT-VI 위치에 이소로이신을 도입하였다(서열 31, 서열 34 내지 36, 서열 39 이상).

WT-VII 및 VIII 위치의 로이신 및 아이소로이신이 각각 알라닌 치환(서열 14 및 15)되었을 때 세포막 투과능이 저하되었고, 이 두 개 위치에 염기성 아미노산으로 치환하였을 때 100  $\mu$ M에서는 두 배 정도의 저하를(서열 1과 21 비교) 보였고, WT-VII 위치의 로이신만을 친수성이 강한 음전하를 갖는 글루탐산(E)으로 치환시(서열 1과 29 비교) 알라닌 치환시와 거의 같은 정도의 세포막 투과능 저하를 보였기 때문에 이 두 위치에는 로이신 및 아이소로이신의 가장 유효한 아미노산이다.

WT-IX 위치의 세린(S)은 이 위치에서만 타이로신(Y) 및 트레오닌(T)으로 변형이 있는 서열 31(WT-IX: S)와 서열 39(WT-IX: Y) 및 41(WT-IX: T)의 세포막투과 정도를 비교 할 때 유지되는 것이 가장 유효하다. 한편 WT-I 위치에 모두 메치오닌 대신 트립토판이 치환된 경우에는 서열 36(WT-IX: S)이 서열 40(WT-IX: Y) 및 42(WT-IX: T)보다 10  $\mu$ M 농도에서만 더 강한 세포막 투과능을 보였다.

WT-X 위치의 히스티딘(H)은 유지되는 것이 유효하다. 서열 1과 서열 2(서열 1에서 H만 제거된 아미노산)의 세포막 투과능을 비교할 때 농도 50  $\mu$ M 까지는 서열이 더 효과적 이었고(도 2 참조), 히스티딘 대신 글루탐산을 치환시켰을 때(서열 1과 서열 28 및 30 비교, 도 5 참조) 10  $\mu$ M 농도에서는 WT와 차이가 거의 없었으며 고농도에서는 WT보다 4 내지 5 배 정도 감소함을 보였다.

#### [실시예 6] 본 발명의 변이형 펩타이드의 세포 내 독성 확인

본 발명의 펩타이드의 세포 내 투과 활성이 세포독성으로 인해 세포막이 약해져서 발생한 것인지 확인하기 위해 다음과 같이 세포독성을 확인하였다. 96 웰 플레이트에 HeLa 세포를 전날 접종 후 약 70% 정도로 플레이트를 채우며 자라면, 10% FBS가 포함된 DMEM에 대조군 TAT 48-57과 본 발명의 TCTP 변이체 펩타이드를 0, 1, 10, 100  $\mu$ M 농도로 24 시간과 48 시간 처리하였다. 각 웰에 10  $\mu$ l의 CCK-8을 첨가하고 2 시간 후 450 nm에서의 흡광도를 KC4 플레이트 판독기로 측정하였다(도 6). 그 결과 대조군과 비교할 때 24 시간 동안 100  $\mu$ M 농도로 처리한 경우에 서열번호 1인 TCTP 1-10 서열에서 약 14% 정도의 독성을 나타내었고 그 외의 TCTP-CPP#3, 7, 8은 표준편차를 감안하면 의미있는 독성은 나타나지 않았다. 48 시간을 처리한 경우에는 1과 10  $\mu$ M에서는 모두 독성이 없었으며, 100  $\mu$ M에서 TAT은 약 53.8%, TCTP 1-10은 약 28.3%, TCTP-CPP#3, 7, 8은 각각 46.2%, 8.2%, 25.6%의 독성을 나타내었다. TCTP-CPP#12 내지 26 모두 1  $\mu$ M과 10  $\mu$ M에서는 독성이 없었으나 100  $\mu$ M에서는 독성이 있었다. 그러나 TCTP-CPP#26은 100  $\mu$ M에서도 독성이 나타나지 않는 유일한 펩타이드이다. TCTP-CPP#27 내지 35 모두 24시간과 48시간 동안 1  $\mu$ M과 10  $\mu$ M에서는 독성이 없었으나 100  $\mu$ M에서는 독성이 있었다.

#### 발명의 효과

본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드는 기존의 TAT 유래 펩타이드보다 세포막 투과 효율이 탁월하므로, 세포 내 다양한 연구분야 뿐만 아니라 높은 효율로 약물이 전달되어야 하는 특정 질환의 치료 목적으로도 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 막투과 단백질 도메인 기능을 갖는 펩타이드, 이와 목적 물질이 결합하여 이루어진 세포막 투과 복합체 및 이를 이용한 운반 방법은 약물 전달 시스템으로서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

#### 도면의 간단한 설명

도 1에서 a와 c는 본 발명의 TCTP 단백질의 결실형들을 나타낸 도식도이다. b와 d는 각각 a와 c의 결실 단백질을 BEAS-2B 세포에 처리하여 그 결과를 웨스턴 블롯 분석한 도이다.

도 2에서 a는 본 발명의 TCTP 펩타이드들을 다양한 농도로 HeLa 세포에 처리하고, 15 분 후 세포 내 투과 정도를 분석한 도이다. b는 2 시간 처리 후의 세포 내 투과 정도를 분석한 도이다.

도 3은 본 발명의 TCTP 펩타이드를 다양한 농도로 HeLa 세포에 처리하고, 2 시간 후 형광 현미경으로 분석한 사진이다.

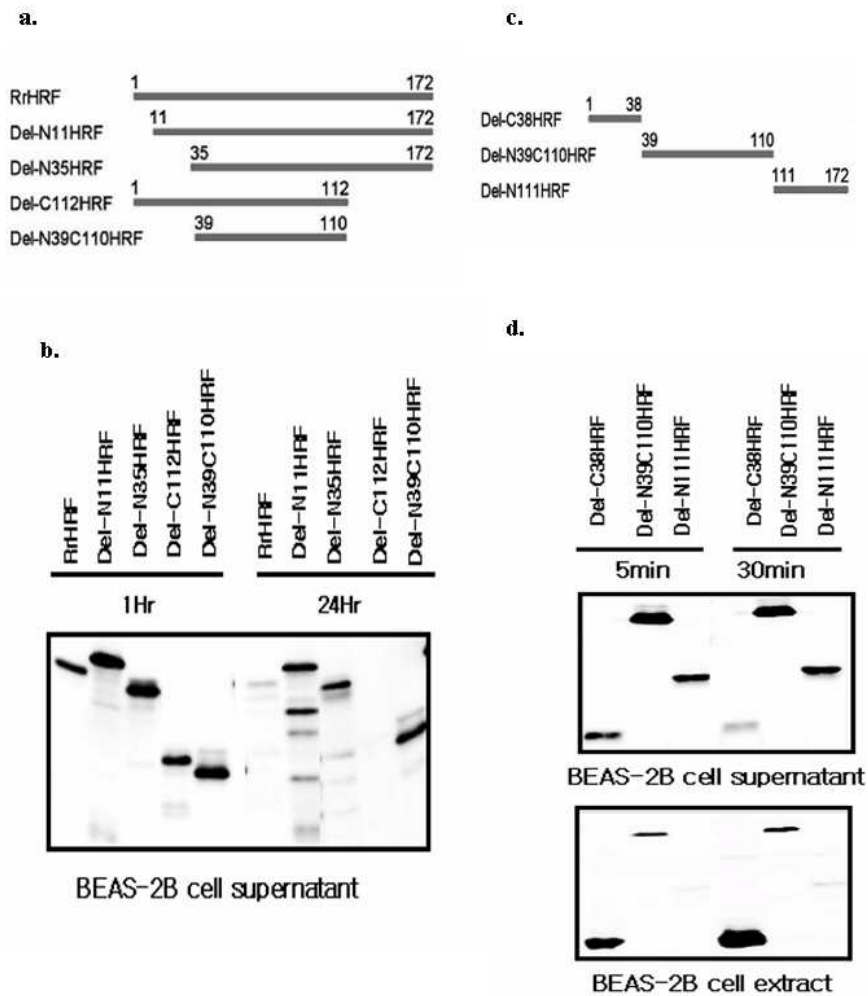
도 4a는 본 발명의 TCTP 펩타이드의 치환체들을 다양한 농도로 HeLa 세포에 처리하고, 2 시간 후 세포 내 투과 정도를 민감도 75에서 분석한 도이다. 도 4b는 민감도 100에서 분석한 도이다.

도 5a, b, c는 본 발명의 TCTP 펩타이드의 변이형 펩타이드를 다양한 농도로 HeLa 세포에 처리하고, 2 시간 후 세포 내 투과 정도를 FACS에서 평균형광값으로 분석한 도이다.

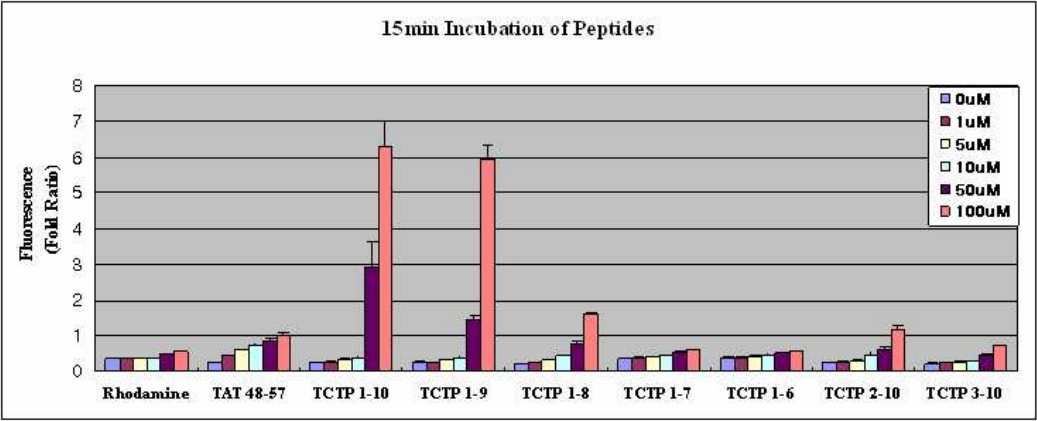
도 6a, b, c는 본 발명의 TCTP 펩타이드의 변이형 펩타이드를 다양한 농도로 HeLa 세포에 처리하고, 24 시간 및 48 시간 후 세포 독성 정도를 분석한 도이다.

## 도면

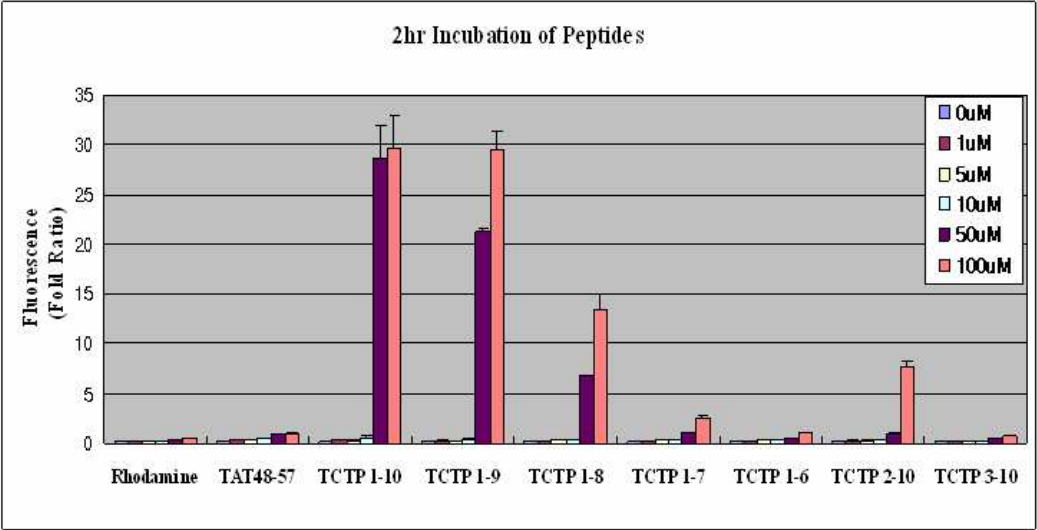
도면1



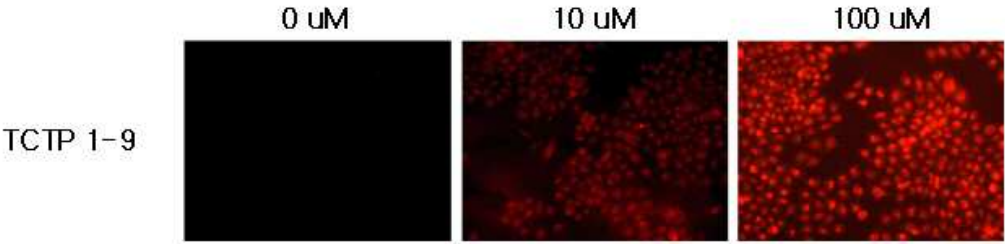
도면2a



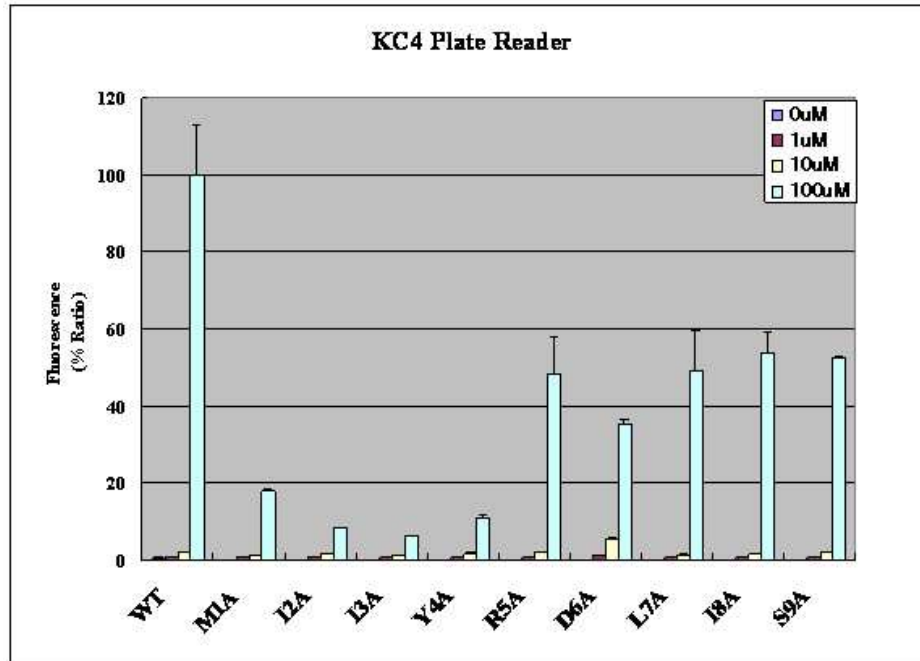
도면2b



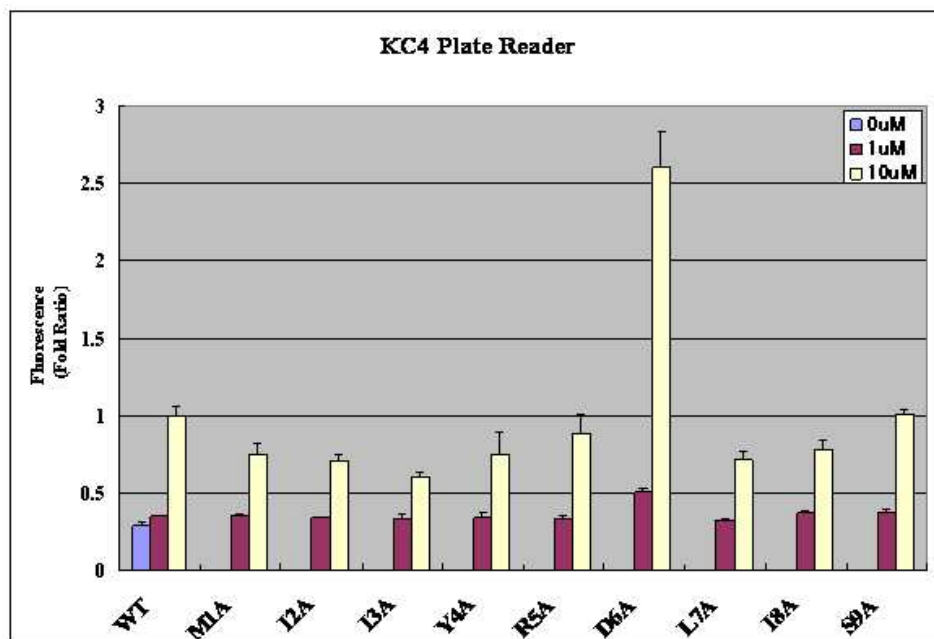
도면3



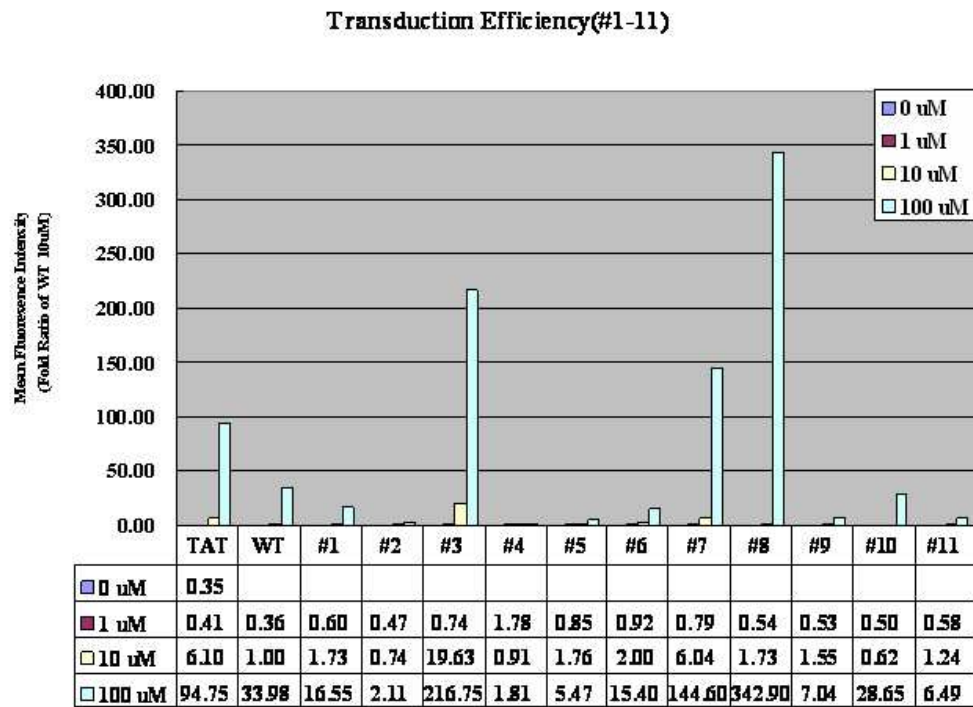
도면4a



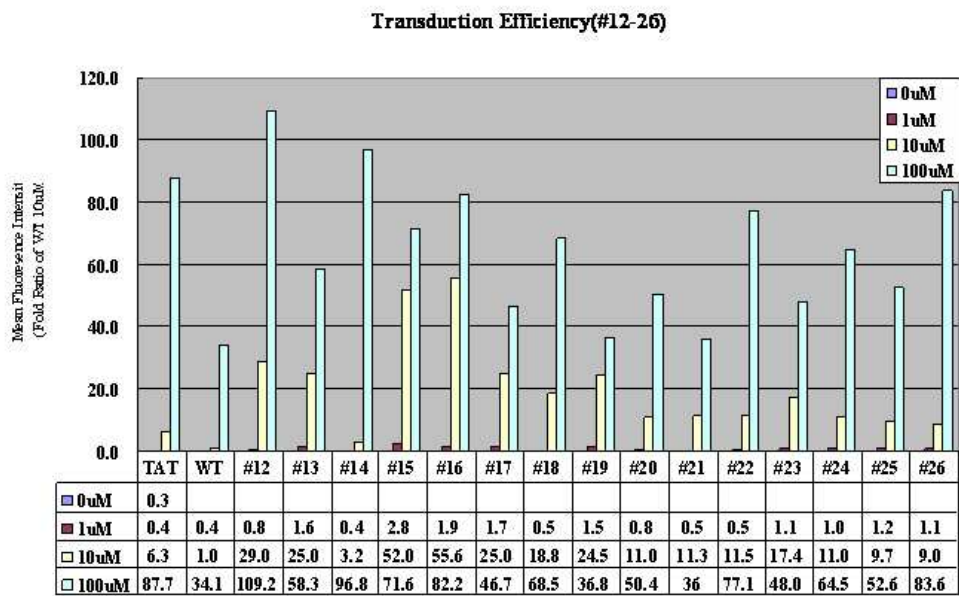
도면4b



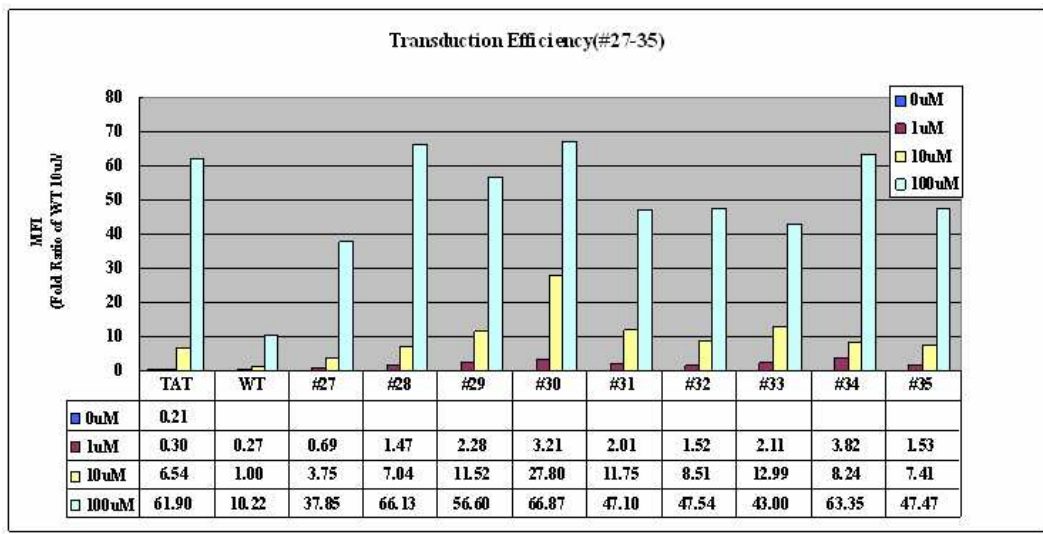
도면5a



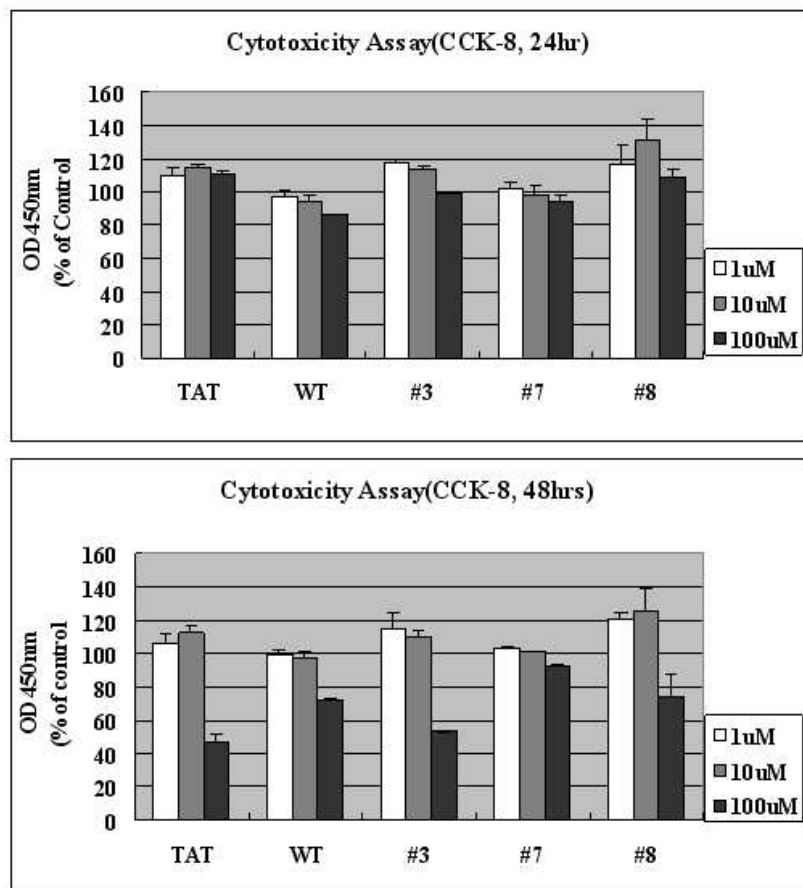
도면5b



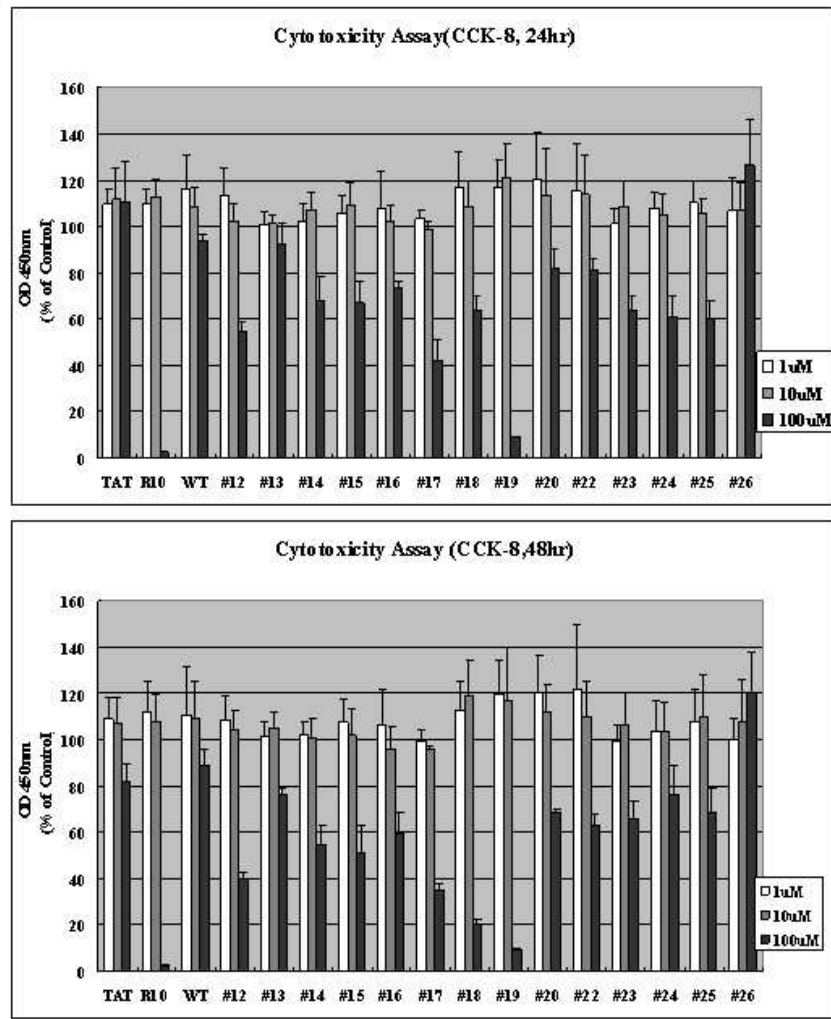
도면5c



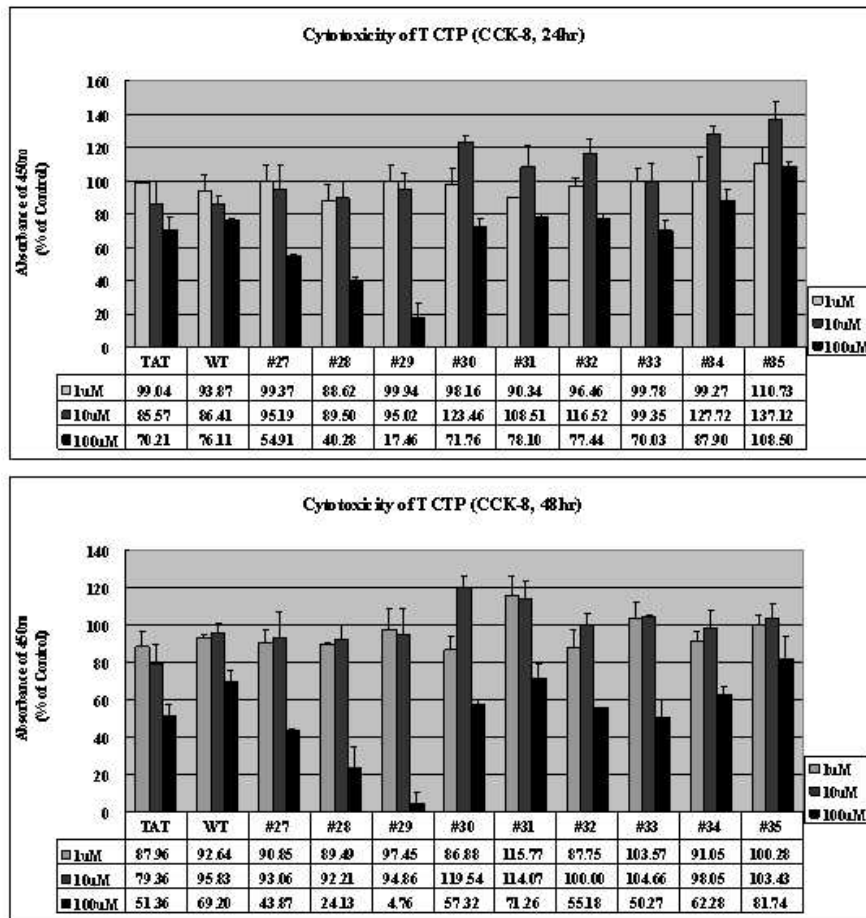
도면6a



도면6b



도면6c



## 서열목록

- <110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation
- <120> Peptide having cell membrane penetrating activity
- <130> P07-011-EWHA
- <150> KR10-2006-0016156
- <151> 2006-02-20
- <160> 81
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> PEPTIDE
- <222> (1)..(10)
- <223> 1-10 amino acid residue of TCTP

<400> 1  
Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser His  
1 5 10

<210> 2  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1) .. (9)

<400> 2  
Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser  
1 5

<210> 3  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1) .. (8)  
<223> 1-8 amino acid residue of TCTP

<400> 3  
Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile  
1 5

<210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1) .. (9)  
<223> 2-10 amino acid residue of TCTP

<400> 4  
Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser His  
1 5

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(7)  
 <223> 1-7 amino acid residue of TCTP

<400> 5  
 Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu  
 1 5

<210> 6  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(6)  
 <223> 1-6 amino acid residue of TCTP

<400> 6  
 Met Ile Ile Tyr Arg Asp  
 1 5

<210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(8)  
 <223> 3-10 amino acid residue of TCTP

<400> 7  
 Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser His  
 1 5

<210> 8  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TCTP(1-9)M1A

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1) .. (9)

<223> TCTP(1-9)M1A

<400> 8

Ala Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TCTP(1-9)I2A

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1) .. (9)

<223> TCTP(1-9)I2A

<400> 9

Met Ala Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TCTP(1-9)I3A

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1) .. (9)

<223> TCTP(1-9)I3A

<400> 10  
Met Ile Ala Tyr Arg Asp Leu Ile Ser  
1 5

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TCTP(1-9)Y4A

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1) .. (9)  
<223> TCTP(1-9)Y4A

<400> 11  
Met Ile Ile Ala Arg Asp Leu Ile Ser  
1 5

<210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TCTP(1-9)R5A

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1) .. (9)  
<223> TCTP(1-9)R5A

<400> 12  
Met Ile Ile Tyr Ala Asp Leu Ile Ser  
1 5

<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TCTP(1-9)D6A

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> TCTP(1-9) D6A

<400> 13  
 Met Ile Ile Tyr Arg Ala Leu Ile Ser  
 1 5

<210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP(1-9) L7A

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> TCTP(1-9) L7A

<400> 14  
 Met Ile Ile Tyr Arg Asp Ala Ile Ser  
 1 5

<210> 15  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP(1-9) I8A

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> TCTP(1-9) I8A

<400> 15  
 Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP(1-9)S9A

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> TCTP(1-9)S9A

<400> 16  
 Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ala  
 1 5

<210> 17  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (1) .. (30)  
 <223> DNA sequence coding 1-10 amino acid residue of TCTP

<400> 17  
 atgattatct accgggacct catcagccac

30

<210> 18  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (1) .. (27)  
 <223> DNA sequence coding 1-9 amino acid residue of TCTP

<400> 18  
 atgattatct accgggacct catcagc

27

<210> 19

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Human immunodeficiency virus

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (10)  
 <223> 48-57 amino acid residue of TAT

<400> 19  
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10

<210> 20  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#1

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (11)  
 <223> TCTP-CPP#1

<400> 20  
 Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Lys Lys  
 1 5 10

<210> 21  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#2

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (10)  
 <223> TCTP-CPP#2

<400> 21  
 Met Ile Ile Tyr Arg Asp Lys Lys Ser His  
 1 5 10

<210> 22  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#3

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (10)  
 <223> TCTP-CPP#3

<400> 22  
 Met Ile Ile Phe Arg Asp Leu Ile Ser His  
 1 5 10

<210> 23  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#4

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (10)  
 <223> TCTP-CPP#4

<400> 23  
 Met Ile Ile Ser Arg Asp Leu Ile Ser His  
 1 5 10

<210> 24  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#5

<220>

<221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (10)  
 <223> TCTP-CPP#5

<400> 24  
 Gln Ile Ile Ser Arg Asp Leu Ile Ser His  
 1 5 10

<210> 25  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#6

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (10)  
 <223> TCTP-CPP#6

<400> 25  
 Cys Ile Ile Ser Arg Asp Leu Ile Ser His  
 1 5 10

<210> 26  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#7

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#7

<400> 26  
 Met Ile Ile Tyr Arg Ala Leu Ile Ser His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 12  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TCTP-CPP#8

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1) .. (12)

<223> TCTP-CPP#8

<400> 27

Met Ile Ile Tyr Arg Ile Ala Ala Ser His Lys Lys  
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TCTP-CPP#9

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1) .. (10)

<223> TCTP-CPP#9

<400> 28

Met Ile Ile Arg Arg Asp Leu Ile Ser Glu  
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TCTP-CPP#10

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1) .. (10)

<223> TCTP-CPP#10

<400> 29  
Met Ile Ile Tyr Arg Ala Glu Ile Ser His  
1 5 10

<210> 30  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TCTP-CPP#11

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1) .. (10)  
<223> TCTP-CPP#11

<400> 30  
Met Ile Ile Tyr Ala Arg Arg Ala Glu Glu  
1 5 10

<210> 31  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TCTP-CPP#12

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1) .. (12)  
<223> TCTP-CPP#12

<400> 31  
Met Ile Ile Phe Arg Ile Ala Ala Ser His Lys Lys  
1 5 10

<210> 32  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TCTP-CPP#13

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#13

<400> 32  
 Met Ile Ile Phe Arg Ala Leu Ile Ser His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#14

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#14

<400> 33  
 Met Ile Ile Phe Arg Ala Ala Ala Ser His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#15

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#15

<400> 34  
 Phe Ile Ile Phe Arg Ile Ala Ala Ser His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#16

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#16

<400> 35  
 Leu Ile Ile Phe Arg Ile Ala Ala Ser His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 36  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#17

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#17

<400> 36  
 Trp Ile Ile Phe Arg Ile Ala Ala Ser His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 37  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#18

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#18

<400> 37  
 Trp Ile Ile Phe Arg Ala Ala Ala Ser His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 38  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#19

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#19

<400> 38  
 Trp Ile Ile Phe Arg Ala Leu Ile Ser His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 39  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#20

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#20

<400> 39  
 Met Ile Ile Phe Arg Ile Ala Ala Tyr His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 40  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#21

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#21

<400> 40  
 Trp Ile Ile Phe Arg Ile Ala Ala Tyr His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 41  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#22

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#22

<400> 41  
 Met Ile Ile Phe Arg Ile Ala Ala Thr His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 42  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#23

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#23

<400> 42  
 Trp Ile Ile Phe Arg Ile Ala Ala Thr His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 43  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#24

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#24

<400> 43  
 Met Ile Ile Phe Lys Ile Ala Ala Ser His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 44  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#25

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#25

<400> 44  
 Trp Ile Ile Phe Lys Ile Ala Ala Ser His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 45  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#26

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#26

<400> 45  
Met Ile Ile Phe Ala Ile Ala Ala Ser His Lys Lys  
1 5 10

<210> 46  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TCTP-CPP#27

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1) .. (12)  
<223> TCTP-CPP#27

<400> 46  
Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Ile Ser His Lys Lys  
1 5 10

<210> 47  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TCTP-CPP#28

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1) .. (12)  
<223> TCTP-CPP#28

<400> 47  
Met Ile Ile Phe Arg Ile Leu Ile Ser His Lys Lys  
1 5 10

<210> 48  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TCTP-CPP#29

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#29

<400> 48  
 Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Ile Ser His Arg Arg  
 1 5 10

<210> 49  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#30

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#30

<400> 49  
 Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Ile Ser His His His  
 1 5 10

<210> 50  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#31

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (11)  
 <223> TCTP-CPP#31

<400> 50  
 Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Ile Ser His Lys  
 1 5 10

<210> 51  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#32

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (11)  
 <223> TCTP-CPP#32

<400> 51  
 Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Ile Ser His Arg  
 1 5 10

<210> 52  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#33

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (10)  
 <223> TCTP-CPP#33

<400> 52  
 Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Ile Ser His  
 1 5 10

<210> 53  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#34

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#34

<400> 53  
 Leu Ile Ile Phe Ala Ile Ala Ala Ser His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 54  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TCTP-CPP#35

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> TCTP-CPP#35

<400> 54  
 Leu Ile Ile Phe Ala Ile Leu Ile Ser His Lys Lys  
 1 5 10

<210> 55  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> DNA sequence coding TCTP-CPP#3

<400> 55  
 atgattattt ttgcgatct gattagccat 30

<210> 56  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> DNA sequence coding TCTP-CPP#7

<400> 56  
 atgattattt atcgcgct gattagccat aaaaaa 36

|       |                                         |    |
|-------|-----------------------------------------|----|
| <210> | 57                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#8          |    |
| <400> | 57                                      |    |
|       | atgattattt atcgcattgc ggcgagccat aaaaaa | 36 |
| <210> | 58                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#12         |    |
| <400> | 58                                      |    |
|       | atgattattt ttcgcattgc ggcgagccat aaaaaa | 36 |
| <210> | 59                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#13         |    |
| <400> | 59                                      |    |
|       | atgattattt ttcgcgcgct gattagccat aaaaaa | 36 |
| <210> | 60                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#14         |    |
| <400> | 60                                      |    |
|       | atgattattt ttcgcgcggc ggcgagccat aaaaaa | 36 |

|             |                                 |                      |
|-------------|---------------------------------|----------------------|
| <210>       | 61                              |                      |
| <211>       | 36                              |                      |
| <212>       | DNA                             |                      |
| <213>       | Artificial Sequence             |                      |
| <220>       |                                 |                      |
| <223>       | DNA sequence coding TCTP-CPP#15 |                      |
| <400>       | 61                              |                      |
| tttattatttt | ttcgcattgc                      | ggcgagccat aaaaaa 36 |
| <210>       | 62                              |                      |
| <211>       | 36                              |                      |
| <212>       | DNA                             |                      |
| <213>       | Artificial Sequence             |                      |
| <220>       |                                 |                      |
| <223>       | DNA sequence coding TCTP-CPP#16 |                      |
| <400>       | 62                              |                      |
| ctgattatttt | ttcgcattgc                      | ggcgagccat aaaaaa 36 |
| <210>       | 63                              |                      |
| <211>       | 36                              |                      |
| <212>       | DNA                             |                      |
| <213>       | Artificial Sequence             |                      |
| <220>       |                                 |                      |
| <223>       | DNA sequence coding TCTP-CPP#17 |                      |
| <400>       | 63                              |                      |
| tggattatttt | ttcgcattgc                      | ggcgagccat aaaaaa 36 |
| <210>       | 64                              |                      |
| <211>       | 36                              |                      |
| <212>       | DNA                             |                      |
| <213>       | Artificial Sequence             |                      |
| <220>       |                                 |                      |
| <223>       | DNA sequence coding TCTP-CPP#18 |                      |
| <400>       | 64                              |                      |
| tggattatttt | ttcgcgcggc                      | ggcgagccat aaaaaa 36 |

|       |                                         |    |
|-------|-----------------------------------------|----|
| <210> | 65                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#19         |    |
| <400> | 65                                      |    |
|       | tggattattt ttcgcgcgct gattagccat aaaaaa | 36 |
| <210> | 66                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#20         |    |
| <400> | 66                                      |    |
|       | atgattattt ttcgcattgc ggcgtatcat aaaaaa | 36 |
| <210> | 67                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#21         |    |
| <400> | 67                                      |    |
|       | tggattattt ttcgcattgc ggcgtatcat aaaaaa | 36 |
| <210> | 68                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#22         |    |
| <400> | 68                                      |    |
|       | atgattattt ttcgcattgc ggcgacccat aaaaaa | 36 |

|       |                                         |    |
|-------|-----------------------------------------|----|
| <210> | 69                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#23         |    |
| <400> | 69                                      |    |
|       | tggattattt ttcgcattgc ggcgacccat aaaaaa | 36 |
| <210> | 70                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#24         |    |
| <400> | 70                                      |    |
|       | atgattattt ttaaaattgc ggcgagccat aaaaaa | 36 |
| <210> | 71                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#25         |    |
| <400> | 71                                      |    |
|       | tggattattt ttaaaattgc ggcgagccat aaaaaa | 36 |
| <210> | 72                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#26         |    |
| <400> | 72                                      |    |
|       | atgattattt ttgcgattgc ggcgagccat aaaaaa | 36 |

|       |                                         |    |
|-------|-----------------------------------------|----|
| <210> | 73                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#27         |    |
| <400> | 73                                      |    |
|       | ctgattattt ttcgcattct gattagccat aaaaaa | 36 |
| <210> | 74                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#28         |    |
| <400> | 74                                      |    |
|       | atgattattt ttcgcattct gattagccat aaaaaa | 36 |
| <210> | 75                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#29         |    |
| <400> | 75                                      |    |
|       | ctgattattt ttcgcattct gattagccat cgccgc | 36 |
| <210> | 76                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | DNA sequence coding TCTP-CPP#30         |    |
| <400> | 76                                      |    |
|       | ctgattattt ttcgcattct gattagccat catcat | 36 |

<210> 77  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> DNA sequence coding TCTP-CPP#31  
  
  
 <400> 77  
 ctgattattt ttcgcattct gattagccat aaa 33  
  
  
 <210> 78  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> DNA sequence coding TCTP-CPP#32  
  
  
 <400> 78  
 ctgattattt ttcgcattct gattagccat cgc 33  
  
  
 <210> 79  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> DNA sequence coding TCTP-CPP#33  
  
  
 <400> 79  
 ctgattattt ttcgcattct gattagccat 30  
  
  
 <210> 80  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> DNA sequence coding TCTP-CPP#34  
  
  
 <400> 80  
 ctgattattt ttgcgattgc ggcgagccat aaaaaa 36

<210> 81  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> DNA sequence coding TCTP-CPP#35

<400> 81  
ctgattattt ttgcgattct gattagccat aaaaaa

36