



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0076582
(43) 공개일자 2020년06월29일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 39/385</i> (2006.01) <i>A61K 38/08</i> (2019.01)
 <i>A61K 39/00</i> (2006.01) <i>A61K 39/12</i> (2006.01)
 <i>A61P 31/12</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 39/385</i> (2013.01)
 <i>A61K 38/08</i> (2019.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0144779
 (22) 출원일자 2019년11월13일
 심사청구일자 2019년11월13일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020180165438 2018년12월19일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 한국화학연구원
 대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)</p> <p>(72) 발명자
 김성준
 대전광역시 유성구 가정로 141 한국화학연구원
 김균도
 대전광역시 유성구 가정로 141 한국화학연구원
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인주원</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 10 항

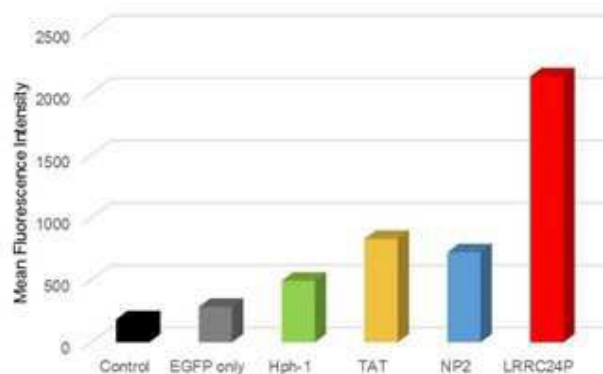
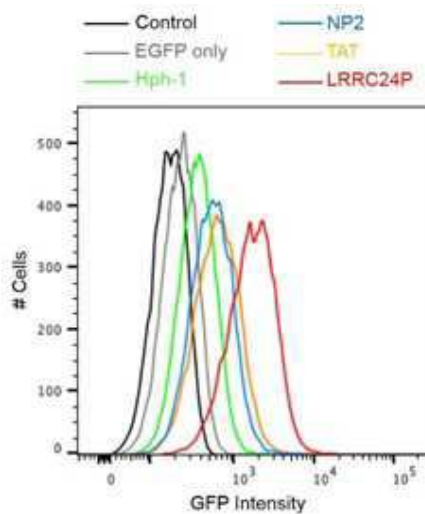
(54) 발명의 명칭 **인간 LRRC24 단백질 유래 세포막 투과 도메인**

(57) 요약

본 발명은 인간 LRRC24 단백질 유래의 세포막 투과 도메인 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 상기 인간 LRRC24 단백질 유래의 세포막 투과 도메인 또는 세포 투과 펩타이드 (LRRC24P 세포 투과 펩타이드, LRRC24P) 인간 LRRC24 단백질 유래의 세포막 투과 도메인 및 이를 포함하는 세포내 전달 시스템에 관한 것이다. 본 발명의 인

(뒷면에 계속)

대표도 - 도6



간 LRRC24 단백질 유래의 세포막 투과 도메인 및 이를 이용하여 화합물, 생체분자 및 다양한 고분자 물질 등의 카고(Cargo) 물질을 세포 내로 전달 할 수 있다.

본 발명의 LRRC24P 세포막 투과 도메인은 종래의 세포 투과펩타이드와 비교하여 더 높은 세포 투과 효율을 나타내며 인간 단백질 유래의 펩타이드로 외래단백질 유래의 펩타이드가 일으키는 부작용 및 면역 반응을 피할 수 있으므로 인체에 적용되는 화합물, 생체분자 및 다양한 고분자 물질을 효과적으로 세포 내로 전달하는 방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/12 (2013.01)

A61P 31/12 (2018.01)

A61K 2039/6031 (2013.01)

(72) 발명자

황인수

대전광역시 유성구 가정로 141 한국화학연구원

구근본

대전광역시 유성구 가정로 141 한국화학연구원

김천생

대전광역시 유성구 가정로 141 한국화학연구원

김범태

대전광역시 유성구 가정로 141 한국화학연구원

안대균

대전광역시 유성구 가정로 141 한국화학연구원

김해수

대전광역시 유성구 가정로 141 한국화학연구원

권영찬

대전광역시 유성구 가정로 141 한국화학연구원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SKM1911-2A

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국화학연구원

연구사업명 융합연구사업

연구과제명 (화학)해외 유입 고위험 신종바이러스 예방에 효과적인 백신 후보물질 발굴 및 효능평가시스템

기 여 율 95/100

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2019.08.01 ~ 2020.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK1803-S01

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국화학연구원

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 의약바이오본부 운영 사업 (CEVI 융합연구단)

기 여 율 5/100

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

인간 LRRC24 (Leucine rich repeat containing 24) 단백질 유래 서열번호 1 내지 22 중 어느 하나의 폴리펩티드를 포함하는 세포막 투과 도메인

청구항 2

제 1항의 세포막 투과 도메인 및 상기 세포막 투과 도메인의 N 말단 또는 C 말단에 융합된 카고를 포함하는 세포막 투과율이 향상된, 재조합 카고.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 카고는 단백질, 핵산, 지질 또는 화합물인, 재조합 카고.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 카고가 호르몬, 면역글로불린, 항체, 구조 단백질, 신호전달 펩타이드, 저장 펩타이드, 막 펩타이드, 막관통 펩타이드, 내부 펩타이드, 외부 펩타이드, 분비성 펩타이드, 바이러스 펩타이드, 천연 (native) 펩타이드, 당화 단백질, 단편화된 단백질, 디설파이드 (Disulfide peptide), 재조합 단백질, 화학적으로 변형된 단백질 및 프리온 군으로부터 선택되는 어느 하나인 재조합 카고.

청구항 5

제 2항에 있어서, 카고가 핵산, 코딩 핵산 서열, mRNA, 안티센스 RNA 분자, 탄수화물, 지질 및 당지질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 재조합 카고.

청구항 6

제 2항에 있어서, 카고가 조영물질, 약물 또는 화학물질인 것인 재조합 카고.

청구항 7

제 1항의 세포막 투과 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 컨스트럭트 (Gene construct).

청구항 8

제 7항의 유전자 컨스트럭트를 포함하는 세포막 투과율이 향상된 재조합 카고 단백질 발현용 발현 벡터

청구항 9

제 1항의 세포막 투과 도메인의 N- 말단 또는 C- 말단에 카고가 융합된 재조합 카고를 제조하는 단계; 및 상기

제조된 재조합 카고를 분리된 세포와 접촉시키는 단계;를 포함하는 세포 내로의 카고 전달 방법.

청구항 10

제 1항의 세포막 투과 도메인의 N- 말단 또는 C- 말단에 카고가 융합된 재조합 카고를 제조하는 단계; 및 상기 제조된 재조합 카고를 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계;를 포함하는 동물 내로의 카고 전달 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 LRRC24 단백질 유래의 세포막 투과 도메인 및 이를 포함하는 세포내 전달 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 질병을 치료하거나 증상을 완화하는 데 쓰이는 의약품은 크게 저분자 화합물 의약품과 고분자 바이오 의약품으로 구분되며 바이오 의약품에는 치료용 단백질, 항체, 예방 또는 치료를 위한 백신, 유전자 치료제 그리고 세포 치료제 등이 포함된다. 특히 재조합 단백질 의약품은 생체를 통한 생산이 힘든 치료용 단백질을 유전자 재조합 기술을 이용하여 대량생산한 의약품이다. 1980년대 초에 당뇨병 치료를 위한 재조합 인간 인슐린 (Recombinant human insulin) 이 최초로 미국 FDA의 승인을 받은 후에 성장호르몬 (Growth hormone), 에리스로포이에틴 (EPO), 인터페론 (Interferon), 콜로니 자극인자 (CSF), 혈액응고인자 (Blood factors) 등의 다양한 재조합 단백질 의약품이 출시되었다. 그러나 세포막을 통과하여 세포 내부에 들어가 활성을 나타내기가 비교적 용이한 저분자 화합물 의약품에 비하여 재조합 단백질이나 핵산 등을 포함한 대부분의 고분자 물질은 세포 내로의 전달이 매우 어려워 의약품으로의 효능이 나타나기에 큰 어려움이 있다. 따라서 고분자 물질의 세포 내 전달을 위해 전기 천공법 (Electroporation), 미세 주입법 (Microinjection), 양이온성 지질 소포체 (Cationic lipid vesicle), 바이러스 벡터 (Viral vector), 바이러스 유사 입자 (Virus-like particles), 유전자 조작 박테리아 (Genetically-modified bacteria) 등을 이용한 방법들이 사용되거나 연구되어 왔다. 하지만 위와 같은 방법들은 생체에 직접 이용이 어렵거나 생체에서 분리한 세포에 전달 후 다시 생체로 주입해야 하는 어려움이 따르며 그에 따른 시간과 비용 증가가 크다는 어려움이 있다. 또한 생체 내에서 세포사멸 또는 면역반응 등을 유도하는 부작용을 일으키기도 하여 적용에 큰 한계를 가지고 있다.

[0004] 위와 같은 문제점들을 극복할 수 있는 새로운 약물 전달 기술 (Drug delivery system) 및 고분자 바이오 의약품 개발을 위한 연구들이 활발히 진행되고 있으며 그 중 대표적인 방법이 바로 단백질 전달 도메인 (Protein Transduction Domain, PTD) 또는 세포 투과 펩타이드 (Cell Penetrating Peptides, CPP) 로 알려진 전달체이다. 세포 투과 펩타이드는 HIV 바이러스의 TAT 단백질 및 TAT 단백질 내 존재하는 폴리펩타이드들이 (GRKKRRQRRPPG, RKRRQRRR, YGRKKRRQRRR) 세포막을 통과하는 성질을 가진 것으로 최초로 밝혀진 후 초파리 유래의 Penetratin (RQIKIWFQNRRMKWKK), HIV glycoprotein 41 유래의 MPG (GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV), 소의 프리온 단백질 유래의 BPrPr (MVKSKIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRP), 인간 Hph-1 단백질 유래의 Hph-1 (YARVRRRGPRR), 인간 NLBP 단백질 유래의 NP2 (KIKKVKKKGRK) 등의 새로운 세포 투과 펩타이드들이 개발되었다. 이 후 위와 같은 세포 투과 펩타이드를 이용한 연구들이 활발히 진행되고 있으며 이를 통해 DNA, siRNA, PNA (Peptide nucleic acid), 단백질, liposome nanoparticle 과 같은 카고 물질들을 효과적으로 세포 내로 전달할 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0005] 선행 연구들을 통해 세포 투과 펩타이드가 직접 투과 (Direct penetration) 를 통해 에너지 비의존적이며 낮은 온도에서도 고분자 물질을 세포 내로 전달 가능하다는 것이 밝혀졌으며 엔도사이토시스 (Endocytosis) 통한 투과 또한 가능하다는 것이 밝혀졌다.

[0006] 현재 세포 투과 펩타이드는 TAT-JBD20를 이용한 뇌혈관질환 (Cerebral ischemia) 및 퇴행성 뇌질환 (Alzheimer's disease) 치료제 개발, TAT-BH4를 이용한 루게릭병 (amyotrophic lateral sclerosis) 치료제 개발, MPG-8/siRNA 및 TAT-DRBD/siRNA 를 이용한 암치료제 등의 전임상 실험이 진행되고 있다. 또한 TAT-δPKC

inhibitor 를 이용한 심근경색 (Myocardial infarction) 치료제 개발, TAT-JBD20를 이용한 청력 손실 및 염증 치료제 개발, p28을 이용한 뇌종양 치료제 등이 임상 실험 중에 있다.

[0007] 위와 같이 세포 투과 펩타이드에 관한 연구 및 이를 이용한 여러 신약 후보 물질의 개발이 활발히 진행되고 있으나 극복해야 할 문제점들이 존재하며 이를 위해 세포 투과 효율을 개선하고 세포 투과 펩타이드 및 이와 결합된 카고 물질에 의한 생체 내 부작용과 의도치 않은 면역반응을 최소화 할 수 있는 새로운 세포 투과 펩타이드의 개발이 필요하다.

[0008] 이에 기존 세포 투과 펩타이드가 바이러스와 초파리 등의 비인간 유래의 단백질에서 주로 발명되었거나 투과 효율이 낮은 단점을 극복하기 위하여, 인간 유래의 펩타이드 중 높은 투과 효율을 가지는 세포 투과 펩타이드, 인간 LRRC24 (Leucine rich repeat containing 24) 단백질 유래 세포 투과 펩타이드를 발명하게 되었고, 인간 유래 단백질 내 존재하는 펩타이드를 대상으로 기존 세포 투과 펩타이드들과 유사성을 확인하였으며, 이를 통해 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) 1. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. J. Gen. Virol., 83 (2002), pp. 1173-1181
- (비특허문헌 0002) 2. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. J. Biol. Chem., 269 (1994), pp. 10444-10450
- (비특허문헌 0003) 3. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. Nucleic Acids Res. 14 (1997) pp. 2730-2736.
- (비특허문헌 0004) 4. N-terminal peptides from unprocessed prion proteins enter cells by macropinocytosis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 348 (2006), pp. 379-385
- (비특허문헌 0005) 5. Intranasal delivery of the cytoplasmic domain of CTLA-4 using a novel protein transduction domain prevents allergic inflammation. Nat Med, 12 (2006), pp. 574-579
- (비특허문헌 0006) 6. dNP2 is a blood-brain barrier-permeable peptide enabling ctCTLA-4 protein delivery to ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. Nat Commun. 8244 (2015), pp. 1-13

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 높은 세포 투과 효율을 나타내며 부작용을 최소화 할 수 있는 신규한 세포막 투과 도메인을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 펩타이드의 말단에 세포내 운반 대상의 카고 (cargo)가 결합되어 있는 세포막 투과 도메인을 포함하는 세포내 전달 시스템을 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 펩타이드의 말단에 세포내 운반 대상의 카고(cargo)가 결합되어 있는 세포막 투과 도메인을 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 카고를 세포 내로 운반하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여, 인간 LRRC24 (Leucine rich repeat containing 24) 단백질 유래 서열번호 1 내지 22 중 어느 하나의 폴리펩티드를 포함하는 세포막 투과 도메인을 제공하는 데 있다.

- [0016] 본 발명에서 용어 “세포 투과 펩타이드 (Cell penetrating peptide, CPP)” 는 인 비트로 및/ 또는 인 비보상에 서 운반 대상의 카고 (Cargo)를 세포 내로 운반할 수 있는 능력을 가진 펩타이드를 의미하여, 용어 “ 세포막 투과 도메인” 과 혼용된다.
- [0017] 또한 본 발명에서 용어 ‘펩티드’ 또는 ‘ 펩타이드’ 는 펩티드 또는 펩타이드 결합에 의해 4개 내지 1000개의 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 사슬 형태의 고분자를 의미하며, ‘폴리펩티드’ 또는 ‘폴레펩타이드 ’ 와 상호 혼용 가능한 의미이다.
- [0018] 본 발명에서는 인체 내로 세포 투과 펩타이드를 통해 카고 물질 전달 시 생겨나는 부작용을 최소화 하기 위해 기존의 바이러스 또는 다른 종에서 유래된 세포 투과 펩타이드와 달리 인간 유래 단백질 내에 존재하는 펩타이드이기 때문에, 기존 세포 투과 펩타이드와 비교하여 세포내로 매우 높은 전달 효율을 가지며 인체에 처리시 부작용을 최소화 할 수 있는 신규 인간 유래 세포막 투과 도메인 또는 세포 투과 펩타이드를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 상기 세포막 투과 도메인 및 상기 세포막 투과 도메인의 N 말단 또는 C 말단에 융합된 카고를 포함하는 세포막 투과율이 향상된 재조합 카고를 제공한다.
- [0020] 상기 카고는 단백질, 핵산, 지질 또는 화합물인 재조합 카고 일 수 있다. 또한 상기 카고는 아주반트 또는 항원 일 수 있다.
- [0021] 일 구현예에 따르면 상기 카고는 호르몬, 면역글로불린, 항체, 구조 단백질, 신호전달 펩타이드, 저장 펩타이드, 막 펩타이드, 막관통 펩타이드, 내부 펩타이드, 외부 펩타이드, 분비성 펩타이드, 바이러스 펩타이드, 천연 (native) 펩타이드, 당화 단백질, 단편화된 단백질, 디설파이드 (Disulfide peptide), 재조합 단백질, 화학적으로 변형된 단백질 및 프리온 군으로부터 선택되는 어느 하나인 재조합 카고 일 수 있다.
- [0022] 또한 본 발명에서 용어 ‘ 재조합 카고’ 란 세포막 투과 도메인 및 한 개이상의 카고가 유전적 융합이나 화학결합에 의해 재조합되어 형성된 복합체를 의미한다.
- [0023] 또한 본 발명에서 용어 ‘접촉’ 이란 카고가 진핵 또는 원핵세포와 접하는 것을 의미하며, 이러한 접촉에 의하여 상기 카고가 상기 진핵 또는 원핵 세포의 내로 전달된다.
- [0024] 또한 본 발명에서 단백질, 펩티드 등을 세포 내로 ‘도입’ 시키는 것에 대하여 '운반', '침투', '수송', ‘전달’ 또는 ‘통과’ 한다는 표현들과 상호 혼용 한다.
- [0025] 또한 일 구현예에 따르면 상기 카고는 핵산, 코딩 핵산 서열, mRNA, 안티센스 RNA 분자, 탄수화물, 지질 및 당 지질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 재조합 카고 일 수 있다.
- [0026] 또한 일 구현예에 따르면, 상기 카고는 조영물질, 약물 또는 화합물질인 재조합 카고 일 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 용어 ‘ 조영물질’ 은 의학적 영상 촬영 (Imaging)에서 생체 구조 또는 유체의 조영을 위해 사용되는 모든 물질을 의미한다. 상기 조영물질은 방사선 비투과성 조영물질, 상자성 조영물질, 초상자성 조영물질, CT 조영물질 또는 기타 조영 물질을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면 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 포함 할 수 있다. 상자성 조영물질(MR 영상용)은 가돌리늄 디에틸렌 트리 아민펜타아세트산 및 그의 유도체 및 기타 가돌리늄, 망간, 철, 디스프로시움(dysprosium), 구리 유로피움 (europium), 에르비움(erbium), 크롬, 니켈 및 코발트 복합체 히드록시벤질에틸렌 디아민 디아세트산(HBED)을 포함할 수 있다. 초상자성 조영물질(MR 영상용)은 자철석(magnetite), 초상자성 산화철, 초소, 초상자성 산화철 및 단결정성 산화철을 포함할 수 있다. 다른 적합한 조영물질은 요오드화 및 비요오드화, 이온성 및 비이온성 CR 조성물질, 및 스핀-표지 (spin-label)와 같은 조영물질, 또는 기타 진단 활성제를 포함 할 수 있다. 세포에서 발현되는 경우, 용이하게 검출가능한 단백질을 코딩하는 마커 유전자를 포함할 수 있다. 방사선헤중, 형광물질, 효소보조인자, 효소 저해제 등과 같은 다양한 표지들이 이용될 수 있다.
- [0028] 일 예로서, 본 발명에 따른 카고가 단백질 또는 펩티드인 경우, 이동 대상을 발현하는 DNA에 운반 펩티드를 발현하는 DNA를 결합시킨 후 이를 발현시킨으로써, 이동 대상과 펩티드의 융합 단백질 형태로 운반 펩티드와 이동 대상을 결합 시킬 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 벡터(예: PET 벡터)에 삽입하고, BL-21(DE3)을 세포에 도입 (transformation)하여 발현시킨다. 이때, IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid)와 같은 발현 유도제를 처리하여, 융합 단백질을 정제한 후 PBS를 처리하면, 상기 운반 펩티드는 염색 물질 또는 형광 물질, 구체적

으로 플루오레세인 이오티오시아네이트 (FITC, fluorescein isothiocyanate), 루시페라아제 (Luciferase, Luc), 녹색 형광 단백질 (Green fluorescent protein, GFP), 증강된 녹색 형광 단백질 (enhanced green fluorescent protein, EGFP), Tag GFP, Superfolder GFP, PA GFP, AcGFP, PS-GFP2, 노랑형광단백질 (Yellow fluorescent protein, YFP), 증강된 노랑 형광 단백질 (enhanced Yellow fluorescent protein, EYFP), SYFP, TagYFP, PhiYFP, Azurite, mKalamal, 청색 형광 단백질 (Cyan fluorescent protein, CFP), 증강된 청색 형광 단백질 (enhanced Cyan fluorescent protein, ECFP), TagCFP, PS-CFP2, 빨강 형광 단백질 (Red fluorescent protein, RFP), Tag RFP, Tag RFP657, mRFP1, PaTagRFP, Turbo RFP, RFP693, tdRFP, 파랑 형광 단백질 (Blue fluorescent protein, BFP), mTag BFP, 노랑 녹색 형광 단백질 (Yellow-green fluorescent protein, mNeongreen), 밝은 형광단백질 (Bright monomeric fluorescent protein, Scarlet-i), 애플럼 (mplum), 엠체리 (monomeric cherry fluorescent protein, mcherry), PAmcherry, 엠스트로베리 (monomeric strawberry fluorescent proteins, mStrawberry), 엠오렌지 (monomeric orange fluorescent protein, mOrange), PSmOrange, 엠라지베리 (mRaspberry), 엠케이트 (mKate), mKate2 엠티에프피 (monomeric teal fluorescent protein, mTFP), 엠넵툼 (mNeptune), 엠루비 (mRubby), mRubby2, 엠바나나(mBanana), 디에스레드(Discosoma sp, red fluorescent protein, DsRed), 엠시트린 (mCitrine), 에메랄드 (Emerald), 티-사파이어 (T-Sapphire), 엠에플 (mApple), 엠그레이프 (mgrape), 비너스 (Venus), 토포즈 (Topaz), 제이-레드 (J-Red), 티디토마토 (tdTomato), mTurquoise, mTurquosie2, mKO, mKO2, mUKG, IFP1.4, mEos2, mEos4, mHoneydew, Dronpa, katushka, Ypet, CyPet, Clover, kaede, KikGR, mTangerine, ZsGreen, ZsYellow, 세투리안 (Cerulean), 베타-갈락토시다아제 (Beta-galactosidase, LacZ), 베타-람타메이즈 (β -lactamase, BLA), 베타-글루쿠로니데이즈 (Beta-glucuronidase, GUS), 알카라인 포스파타아제 (Alkaline phosphatase), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제 (Chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 또는 퍼옥시다아제 (Peroxidase)와 결합할 수 있다.

- [0029] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 세포막 투과 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 컨스트럭트 (Gene construct)를 제공한다.
- [0030] 또한 본 발명은 유전자 컨스트럭트를 포함하는, 세포막 투과율이 향상된 재조합 카고 단백질 발현용 발현 벡터를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 세포막 투과 도메인의 N- 말단 또는 C- 말단에 카고가 융합된 재조합 카고를 제조하는 단계; 및 상기 제조된 재조합 카고를 분리된 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 내로의 카고 전달 방법을 제공한다.
- [0032] 또한 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 세포막 투과 도메인의 N- 말단 또는 C- 말단에 카고가 융합된 재조합 카고를 제조하는 단계; 및 상기 제조된 재조합 카고를 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계;를 포함하는 동물 내로의 카고 전달 방법을 제공한다.
- [0033] 세포막 투과 도메인과 세포막의 접촉에서 특별하게 요구되는 조건, 예컨대, 제한적인 시간, 온도 및 농도 등의 조건은 없으며, 당업계에서 세포막 투과에 적용되는 일반적인 조건으로 실시 될 수 있다.

발명의 효과

- [0036] 본 발명의 세포 투과 펩타이드는 기존 펩타이드와 비교하여 크게 향상된 투과 효율 또는 세포 투과능을 나타냄으로 운반된 카고 또는 생물학적 활성 분자를 세포 내로 도입시키고, 효과적으로 활성을 유지하도록 하고, 비용 또한 크게 절감시킬 수 있다.
- [0037] 또한, 세포 투과 펩타이드 또는 세포막 투과 도메인을 통해 전달되는 카고 물질의 효과를 증대시킬 수 있다.
- [0038] 또한, 인간 단백질 유래의 세포 투과 펩타이드이기 때문에 비인간 단백질 유래의 펩타이드들이 유발 하는 부작용을 최소화 할 수 있다.
- [0039] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않는 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도1은 LRRC24P-EGFP 재조합 융합 단백질을 발현하는 유전자 합성물을 만들기 위한 유전자 합성물의 모식도를 나타낸 것이다.
- 도2는 인간 LRRC24 단백질 유래의 세포 투과 펩타이드 LRRC24P 와 Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) 형광단백질이 융합된 단백질을 발현하는 유전자 합성물을 아가로스 겔 전기영동법을 통해 관찰한 것을 나타낸다.
- 도3은 단백질 발현 벡터 pET28a+ 에 LRRC24P-EGFP 유전자 합성물을 삽입하여 결합된 유전자 합성물에 제한 효소를 처리하여 그 결과를 확인한 것을 나타낸다.
- 도4는 LRRC24P-EGFP-pET28a+ 벡터를 Rosetta (DE3) 수용세포에 형질전환 후 단백질 생산을 유도하고 초음파 분해한 뒤에 폴리아크릴아마이드 겔 전기 영동법을 통해 관찰한 것을 나타낸다.
- 도5는 Rosetta (DE3) 수용세포를 이용해 생산한 LRRC24P-EGFP 재조합 융합 단백질을 정제하여 폴리아크릴아마이드 겔 전기 영동법을 통해 관찰한 것을 나타낸다.
- 도6은 기존의 세포 투과 펩타이드가 EGFP와 융합한 재조합 단백질과 LRRC24P-EGFP 재조합 단백질을 인간 T 면역세포주 (Jurkat) 에 처리한 후 유세포분석기로 세포 내 투과 효율을 비교한 것을 나타낸 것이다.
- 도7은 세포 투과 펩타이드가 융합한 재조합 단백질들을 농도별로 처리한 후 유세포분석기로 세포 내 투과 효율을 비교한 것을 나타낸 것이다.
- 도8은 세포 투과 펩타이드가 융합한 재조합 단백질들을 시간별로 처리한 후 유세포분석기로 세포 내 투과 효율을 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- 도9는 LRRC24P-EGFP 재조합 단백질을 자궁경부암 세포주 (HeLa)에 처리한 후 공초점 현미경 (Confocal Microscope) 를 이용해 세포 내로 투과된 LRRC24P-EGFP 재조합 단백질의 분포 양상을 관찰한 것을 나타낸 것이다.
- 도10은 본 발명의 LRRC24P 변이 (mutant)-EGFP 융합 단백질의 세포 내 전달 효율을 인간 T 면역 세포주 (Jurkat) 에 처리한 후 유세포분석기 (FACS) 로 세포 내 도입 효율을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 본 명세서에서 달리 정의되어 있지 않는 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.
- [0043] 본 발명은 인간 LRRC24 (Leucine rich repeat containing 24) 단백질 유래 서열번호 1 내지 22 중 어느 하나의 폴리펩티드를 포함하는 세포막 투과 도메인 또는 세포투과 펩타이드를 제공한다.
- [0044] 종래의 기존 세포 투과 펩타이드는 바이러스와 초파리 등의 비인간 유래의 단백질에서 주로 발명되었거나 투과 효율이 낮은 단점을 가지고 있다. 이를 극복하기 위하여, 본 발명자들은 인간 유래의 펩타이드 중 세포 투과성을 가질 것으로 예상되는 인간 LRRC24 단백질에서 427 번째에서 436번째 아미노산서열로 이루어진 LRRC24P 펩타이드를 발견하였다.
- [0045] 상기 서열번호 1로 표시되는 세포투과 펩타이드는 인간 LRRC24 단백질에서 427 번째에서 436번째 아미노산서열로 이루어진 LRRC24P의 세포 투과 펩타이드이며, 발명을 위해 사용된 아미노산 및 염기 서열 정보는 하기와 같다.
- [0046] 1. LRRC24P 펩타이드 아미노산 서열(서열번호1): RRRRRRKKAR
- [0047] 2. LRRC24P 발현 유전자 염기서열(서열번호23): cgccggcgccgcaggcgaaaaaaggcgcg
- [0048] 3. LRRC24P 유전자 합성 염기서열 (서열번호24): cgccgccgtagaagacgtaaaaaggcaaga
- [0049] 유전자 합성시에는 코돈 최적화를 위해, 상기와 같이 전환하여 사용하였다. 세포 투과성을 검증하기 위하여 LRRC24P 펩타이드를 발현하는 염기 서열 뒤에 연결된 EGFP 형광단백질(Enhanced Green fluorescent protein)을 발현하는 LRRC24P-EGFP 융합단백질 (253 아미노산) 염기 서열 정보는 염기서열 25와 같으며, 서열번호 26로 기

재되는 실시예에서 사용한 LRRC24P 세포 투과 펩타이드 또는 세포막 투과 도메인과 EGFP 단백질 사이에 linker 부분의 염기서열은 ggaggtgggggctcg 이다. 상기 LRRC24P 세포 투과 펩타이드는 10개이 아미노산이며, 친수성이며 양전하를 가진다.

[0050] 본 발명의 서열번호 2 내지 22로 표시되는 세포 투과 펩타이드 또는 세포막 투과 도메인은 상기 LRRC24P 세포 투과 펩타이드의 변이 (mutant)된 세포 투과 펩타이드로, 상기 LRRC24P의 9번째 아미노산인 알라닌을 다른 아미노산으로 치환한 LRRC24P 변이 (mutant) 및 N 말단과 C 말단의 아미노산을 각각 하나씩 결실한 LRRC24P 변이 (mutant) 된 세포막 도메인 또는 세포 투과 펩타이드이다.

[0051] 본 발명의 인간 LRRC24 단백질 유래 세포막 투과 도메인 또는 세포 투과 펩타이드는 하기 표1과 같다.

표 1

[0053] 인간 LRRC24 단백질 유래 세포막 투과 도메인 또는 세포 투과 펩타이드

서열번호	서열명칭	서열 (Sequence)
서열번호1	LRRC24P	RRRRRRKKAR
서열번호2	LRRC24P-M1	RRRRRRKKSR
서열번호3	LRRC24P-M2	RRRRRRKKVR
서열번호4	LRRC24P-M3	RRRRRRKKYR
서열번호5	LRRC24P-M4	RRRRRRKKER
서열번호6	LRRC24P-M5	RRRRRRKKQR
서열번호7	LRRC24P-M6	RRRRRRKKRR
서열번호8	LRRC24P-MN	RRRRRRKKNR
서열번호9	LRRC24P-MD	RRRRRRKKDR
서열번호10	LRRC24P-MC	RRRRRRKKCR
서열번호11	LRRC24P-MG	RRRRRRKKGR
서열번호12	LRRC24P-MH	RRRRRRKKHR
서열번호13	LRRC24P-MI	RRRRRRKKIR
서열번호14	LRRC24P-ML	RRRRRRKKLR
서열번호15	LRRC24P-MK	RRRRRRKKKR
서열번호16	LRRC24P-MM	RRRRRRKKMR
서열번호17	LRRC24P-MF	RRRRRRKKFR
서열번호18	LRRC24P-MP	RRRRRRKKPR
서열번호19	LRRC24P-MT	RRRRRRKKTR
서열번호20	LRRC24P-MW	RRRRRRKKWR
서열번호21	LRRC24P-M7	RRRRRRKKAR
서열번호22	LRRC24P-M8	RRRRRRKKKA

[0055] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하에서는 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용을 하기 실시예에 한정하는 것은 아니다.

[0057] <실시예 1> 인간 LRRC24 단백질 유래의 세포 투과 펩타이드 (LRRC24P) 와 EGFP 형광단백질이 융합된 단백질을 발현하는 플라스미드 벡터의 제작

[0058] LRRC24의 세포 투과 효율을 실험하기 위해 다음과 같이 인공유전자 합성을 진행하였다. 도 1 과 같이 5'-NheI 제한효소 인식서열-LRRC24P 염기서열-Linker 염기서열-EGFP 단백질 염기서열-종결코돈-XhoI 제한효소 인식서열-3' 합성하였다.

[0059] 특히 LRRC24P 염기 서열은 인공유전자 합성시 코돈 최적화를 통해 동일한 펩타이드를 발현하는 염기 서열로 전환하였으며 세포 투과성을 검증하기 위하여 LRRC24P 세포 투과 펩타이드의 염기 서열 뒤에 EGFP 형광단백질을 발현하는 유전자를 붙여 합성하였다 (도 2). 또한 세포 투과 펩타이드와 EGFP 단백질 사이에 linker 염기서열을

넣어 유연성을 높여주었다. 인공합성 유전자를 *NheI* 제한효소와 *XhoI* 제한효소를 처리 후 마찬가지로 *NheI* 제한효소와 *XhoI* 제한효소를 처리한 pET28a+ 플라스미드 벡터에 T4 연결효소를 통해 도입하였다. 여기서 사용된 pET-28a 플라스미드 벡터는 N-말단에 6개의 히스티딘 (6 x His) 을 LRRC24P-EGFP 융합단백질 앞에 발현하여 Ni-NTA Resin 통한 단백질 정제를 가능하게 한다. LRRC24P-EGFP 융합단백질 인공 유전자가 도입된 pET28a+ 플라스미드 벡터는 Top10 수용세포에 형질전환 후 카나마이신 (Kanamycin) 이 포함된 LB agar plate에서 배양하여 자라난 콜로니 (Colony) 들을 LB 배지에서 약 16시간 배양한다. 이 후 DNA 추출 실험을 통해 플라스미드를 얻고 이를 *NheI* 제한효소와 *XhoI* 제한효소로 처리한 후 아가로스 겔 전기영동법을 통해 LRRC24P-EGFP 융합단백질 인공 유전자가 pET-28a 플라스미드 벡터에 성공적으로 도입된 것을 확인하였다 (도 3).

[0061] <실시예 2> 인간 LRRC24 단백질 유래의 세포 투과 펩타이드 (LRRC24P) 와 EGFP 형광단백질이 융합된 단백질의 발현 조건 확립 및 고순도 정제

[0062] 인간 LRRC24 단백질 유래의 세포 투과 펩타이드 (LRRC24P) 와 EGFP 형광단백질이 융합된 단백질의 발현 조건 확립하기 위해 실시예 1에서 제작된 플라스미드 벡터를 Rosetta (DE3) 수용세포에 형질전환 후에 카나마이신 (Kanamycin) 이 포함된 LB 배지에서 약 16시간 배양한다. 여기에 다시 100 배의 LB 배지를 추가하여 O.D 0.4 - 0.6 에 도달할 때까지 배양한 후 IPTG (Isopropyl β 를 최종 농도 1mM 이 되도록 첨가한 뒤 37 °C 에서 5시간 또는 20 °C 에서 16 시간 배양한다. 이 후 원심 분리를 통해 얻은 세포를 초음파 분해 (Sonication) 하여 다시 원심분리를 통해 상등액과 cell pellet 으로 분리하여 이를 폴리아크릴아마이드 겔 전기 영동법과 Coomassie blue 염색을 통해 단백질의 발현된 양과 수용성을 확인하였다 (도 4).

[0063] 이를 통해 LRRC24P-EGFP 융합단백질이 IPTG를 첨가 후 20 °C 에서 16 시간 배양한 조건에서 단백질의 수용성 및 발현 효율이 높아짐을 확인하였다. 따라서 고순도의 LRRC24P-EGFP 융합단백질을 정제하기 위하여 같은 조건으로 형질 전환 된 Rosetta (DE3) 수용세포를 배양한 후 배양액을 원심 분리하여 cell pellet을 얻었으며 lysis buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole)로 현탁하였다. 이를 초음파 분해하여 다시 원심분리를 통해 상등액을 회수하여 45 μm 필터로 걸러준 후 Ni-NTA agarose column에 상등액을 통과시켜 재조합 단백질을 결합시켰다. Ni-NTA agarose column에 비특이적으로 결합한 단백질을 제거하기 위하여 washing buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole)를 이용하여 Ni-NTA agarose column을 세척한 후 Ni-NTA agarose column에 결합한 재조합 단백질을 회수하기 위하여 elution buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 500 mM Imidazole)를 이용하여 재조합 단백질을 용출시켰다. PD-10 desalting column을 이용하여 LRRC24P-EGFP 융합단백질이 포함된 용액을 PBS로 교체한 후 이를 폴리아크릴아마이드 겔 전기 영동법과 Coomassie blue 염색을 통해 확인하였다 (도 5).

[0065] <실시예 3> LRRC24P-EGFP 융합 단백질의 세포 내 전달 효율 확인

[0066] LRRC24P-EGFP 융합 단백질의 세포 내 전달 효율을 연구하기 위하여 기존에 알려져 있는 세포 투과 펩타이드 (Cell penetrating peptide, CPP), TAT (아미노산 서열 : YGRKKRRQRRR, Diabetes 2001 Aug; 50(8): 1706-1713, Proteins Linked to a Protein Transduction Domain Efficiently Transduce Pancreatic Islets), Hph-1 (아미노산 서열: YARVRRRGPRR, Nature Medicine 12(5):574-9, June 2006, Intranasal delivery of the cytoplasmic domain of CTLA-4 using a novel protein transduction domain prevents allergic inflammation) 그리고 NP2 (아미노산 서열: KIKKVKKKGRK, Nature Communications volume 6, Article number: 8244 (2015), dNP2 is a blood-brain barrier-permeable peptide enabling ctCTLA-4 protein delivery to ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis)에 각각 EGFP 형광단백질이 융합된 단백질을 발현하는 플라스미드 벡터를 LRRC24P-EGFP 융합 단백질을 발현하는 플라스미드 벡터와 동일한 방법으로 제작하였다. 기존의 CPP-EGFP 융합단백질의 발현 및 정제 또한 LRRC24P-EGFP 융합 단백질과 동일한 방법으로 진행하였다. 세포 실험을 위하여 Jurkat 세포를 1.5×10^6 / well 로 24 well plate 에 분주한 후 10% Fetal Bovine Serum 과 1% penicillin/streptomycin 이 포함된 RPMI 1640 배지 2ml 에 부유시켜 CPP-EGFP 융합단백질을 최종 농도 5 μM 로 처리 후 37° C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 이 후 세포가 포함된 배지를 5 ml 튜브에 옮긴 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 PBS 용액으로 세척하는 것을 3회 반복하였다. 이 후 Jurkat 세포를 650 μl 의 PBS 에 부유시킨 후 유세포분석기를 통해 세포 내로 도입된 CPP-EGFP 융합단백질들의 형광을 측

정하여 세포 내 도입 효율을 확인하였다 (도 6).

[0067] 이를 통해 LRRC24P 세포 투과 펩타이드가 기존의 세포 투과 펩타이드들과 비교하여 약 3-5배의 효율을 나타냄을 확인하였다 (도 6).

표 2

[0068] 실시예 3에서 이용된 재조합 단백질

실시예 3에서 이용된 재조합 단백질	
음성대조군	Wild type EGFP
실험군	실시예 2에서 정제한 재조합 LRRC24P의 융합 단백질, LRRC24P-EGFP
양성대조군	TAT-EGFP
	(Hph-1)-EGFP
	NP-2 EGFP

[0069] LRRC24P-EGFP 융합단백질의 농도별 도입 효율을 확인하기 위하여 EGFP 단백질 그리고 현재 가장 폭넓게 사용 중인 세포 투과 펩타이드인 TAT 과 EGFP의 융합단백질을 이용하여 비교 실험을 진행하였다. EGFP, TAT-EGFP 그리고 LRRC24P-EGFP 융합단백질을 각각 최종 농도 0.5, 1, 2, 5, 10 μM 로 Jurkat 세포에 처리하였으며 앞선 실험과 동일한 과정을 통해 도입 효율을 확인하였다 (도 7). 이를 통해 LRRC24P-EGFP 융합단백질이 농도의존적으로 세포 내로 도입됨을 확인하였으며 TAT-EGFP 융합단백질과 비교하여 모든 농도에서 월등히 높은 전달 효율을 보이는 것을 확인하였다.

[0070] 다음으로 LRRC24P-EGFP 융합단백질의 시간 별 도입 효율을 확인하기 위하여 EGFP, TAT-EGFP 융합단백질을 이용하여 비교 실험을 진행하였다. EGFP, TAT-EGFP 그리고 LRRC24P-EGFP 융합단백질을 각각 최종 농도 5 μM 로 Jurkat 세포에 처리한 후 각각 0.5, 1, 2, 4, 6 시간 동안 배양하였으며 앞선 실험과 동일한 과정을 통해 도입 효율을 확인하였다 (도 8). 이를 통해 LRRC24P-EGFP 융합단백질이 시간 의존적으로 세포 내로 도입됨을 확인하였으며 TAT-EGFP 융합단백질과 비교하여 모든 시간에서 월등히 높은 전달 효율을 보이는 것을 확인하였다.

[0072] <실시예 4> LRRC24P-EGFP 융합 단백질의 세포 내 전달 양상 확인

[0073] 세포 내로 도입된 LRRC24P-EGFP 융합 단백질을 공초점현미경으로 확인하기 위하여 먼저 HeLa 세포를 $2 \times 10^4/\text{well}$ 로 24 well cell culture slide 에 분주한 후 10% Fetal Bovine Serum 과 1% penicillin/streptomycin 이 포함된 DMEM 배지 500 μl 에 부유시켜 37° C로 유지되는 5% CO2배양기에서 18 시간 배양하였다. 이 후 EGFP 그리고 LRRC24P-EGFP 융합단백질을 각각 최종 농도 1 μM 로 세포에 처리한 후 1 시간 동안 배양하였다. 이 후 배양액을 제거한 후 PBS 용액으로 3회 세척 후 4% PFA 용액을 상온에서 30분간 처리하여 고정하였다. PFA 용액을 제거한 후 다시 PBS 용액으로 3회 세척 한 뒤 mounting medium 을 처리하고 커버 슬라이드를 덮어 공초점현미경으로 관찰하였다 (도 9). 이를 통해 LRRC24P-EGFP 융합단백질이 HeLa 세포 내로 효과적으로 도입되었음을 확인하였다.

[0075] <실시예 5> LRRC24P mutant-EGFP 융합 단백질의 세포 내 전달 효율 확인

[0076] LRRC24P 세포 투과 펩타이드 변이 (mutant) 의 세포 내 전달 효율을 확인하기 위하여 LRRC24P의 9번째 아미노산인 알라닌을 다른 아미노산으로 치환한 LRRC24P mutant (변이) 및 N 말단과 C 말단의 아미노산을 각각 하나씩 결실한 LRRC24P mutant 를 설계 한 후, LRRC24 mutant-EGFP 융합 단백질을 발현하는 플라스미드 벡터를 제작한 후 단백질을 발현시켜 정제하였다. 본 발명의 상기 LRRC24P 세포 투과 펩타이드 변이 중, 서열번호 LRRC24P M1 내지 M8 (서열번호 2 내지 7, 또는 서열번호 21 및 28) 펩타이드로, 세포 실험을 진행하였다. 상기 세포 실험을 위하여 Jurkat 세포를 $1.5 \times 10^6/\text{well}$ 로 24 well plate 에 분주한 후 10% Fetal Bovine Serum 과 1% penicillin/streptomycin 이 포함된 RPMI 1640 배지 2ml 에 부유시켜 LRRC24P -EGFP 및 LRRC24P mutant-EGFP 융합단백질을 최종 농도 5 μM 로 처리 후 37° C로 유지되는 5% CO2배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 이 후 세포가 포함된 배지를 5 ml 튜브에 옮긴 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 PBS 용액으로 세척하는 것을 3회 반복하였다. 이 후 Jurkat 세포를 650 μl 의 PBS 에 부유시킨 후 유세포분석기를 통해 세포 내로 도입된

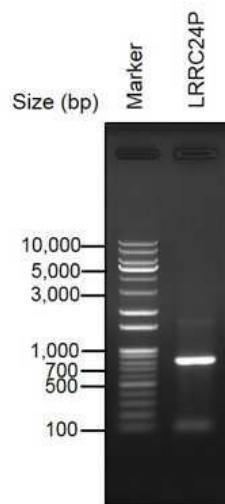
LRRC24P mutant-EGFP 융합단백질들의 형광을 측정하여 세포 내 도입 효율을 확인하였다 (도10). 이를 통해 LRRC24P mutant 들이 변이를 통해 도입 효율의 변화를 나타내지만 세포 투과 능력이 유지됨을 확인하였다 (도 10).

도면

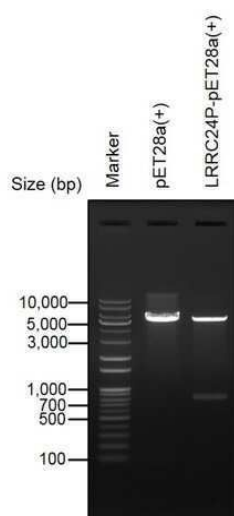
도면1



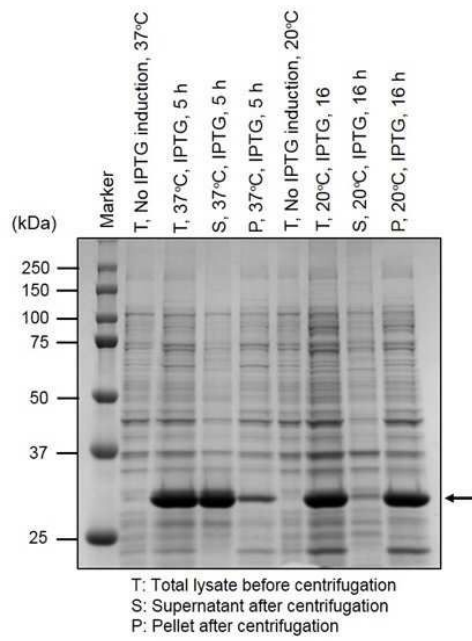
도면2



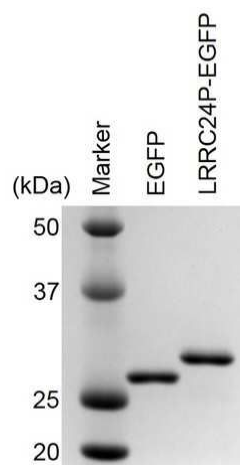
도면3



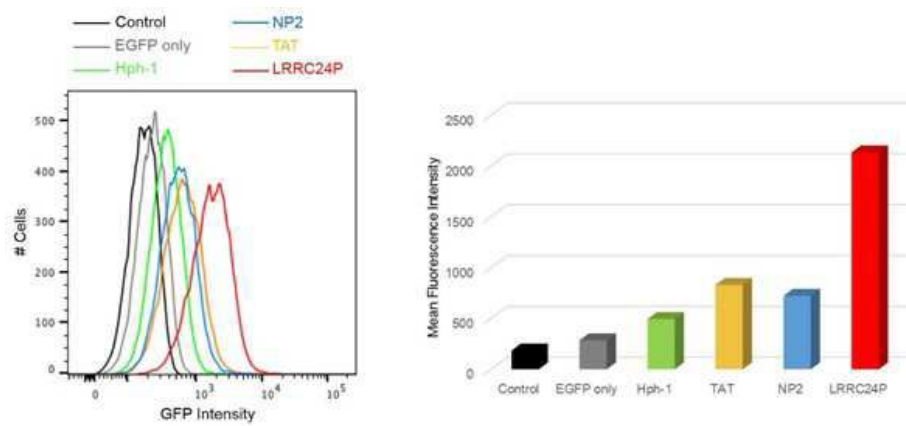
도면4



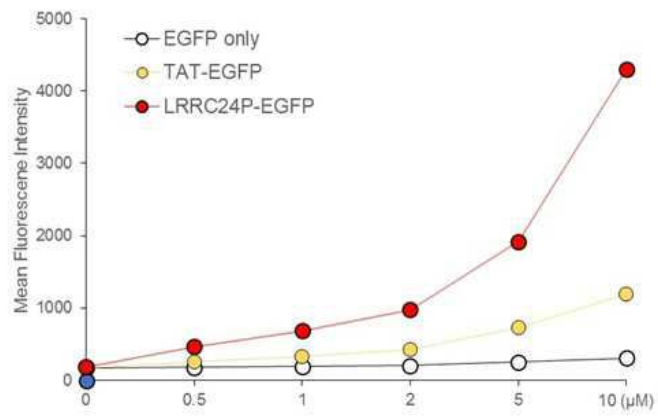
도면5



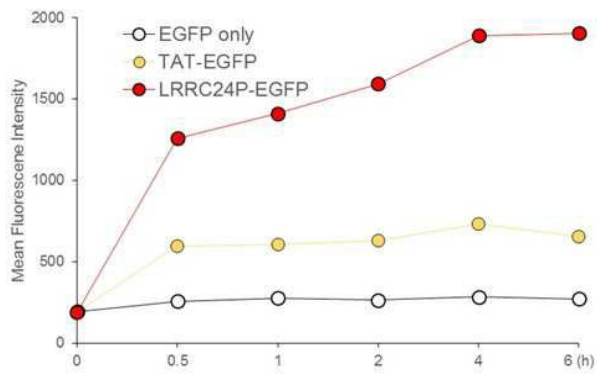
도면6



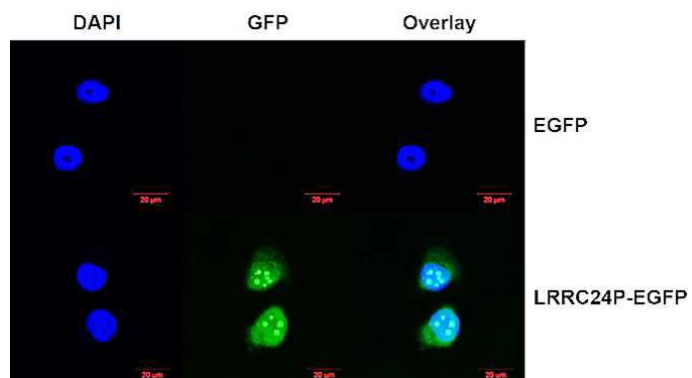
도면7



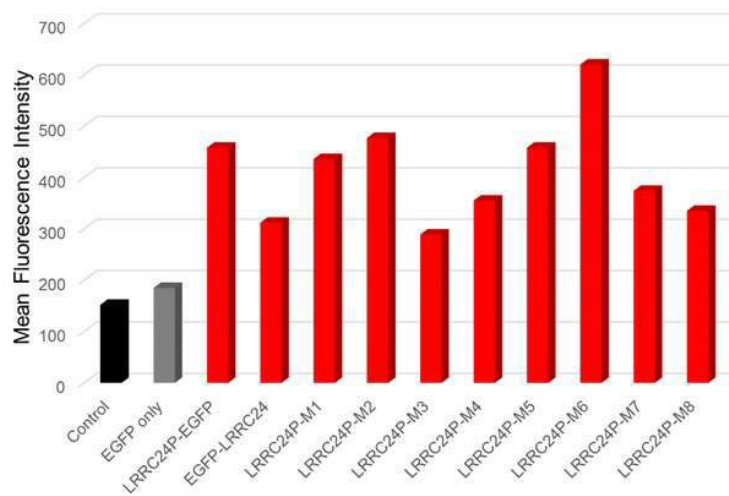
도면8



도면9



도면10



서열목록

<110> KRICT
 <120> Cell penetrating Domain derived from human LRRC24 protein
 <130> M18-5794-A
 <150> KR 10-2018-0165438
 <151> 2018-12-19
 <160> 26
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LRRC24P
 <400> 1

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Ala Arg

1 5 10

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LRRC24P-M1
 <400> 2

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Ser Arg

1	5	10
<210>	3	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LRRC24P-M2	
<400>	3	
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Val Arg		
1	5	10
<210>	4	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LRRC24P-M3	
<400>	4	
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Tyr Arg		
1	5	10
<210>	5	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
><223>	LRRC24P-M4	
<400>	5	
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Glu Arg		
1	5	10
<210>	6	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LRRC24P-M5	
<400>	6	
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Gln Arg		
1	5	10
<210>	7	

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LRRC24P-M6
 <400> 7
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Arg Arg
 1 5 10

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LRRC24P-MN
 <400> 8
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Asn Arg
 1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LRRC24P-MD
 <400> 9
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Asp Arg
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LRRC24P-MC
 <400> 10
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Cys Arg
 1 5 10

<210> 11
 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LRRC24P-MG

<400> 11

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Gly Arg

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LRRC24P-MH

<400> 12

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys His Arg

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LRRC24P-MI

<400> 13

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Ile Arg

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LRRC24P-ML

<400> 14

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Leu Arg

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LRRC24P-MK

<400> 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Lys Arg

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LRRC24P-MM

<400> 16

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Met Arg

1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LRRC24P-MF

<400> 17

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Phe Arg

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LRRC24P-MP

<400> 18

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Pro Arg

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LRRC24P-MT

<400> 19
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Thr Arg
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LRRC24P-MW
 <400> 20
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Trp Arg
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 9
 <212>
 > PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LRRC24P-M7
 <400> 21
 Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Ala Arg
 1 5
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LRRC24P-M8
 <400> 22
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Ala
 1 5
 <210> 23
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LRRC24P expression nucleic acid
 <400> 23

cgccggcgcc gcaggcgaaa aaaggcgcg	30
<210> 24	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> LRRC24P synthesis nucleic acid	
<400> 24	
cgccgccgta gaagacgtaa aaaggcaaga	30
<210> 25	
<211> 720	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> LRRC24P EGFP nucleic acid	
<400> 25	
atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
ctcgtgacca cctgacctc cggcgtgcag tgcttcagcc gctacccga ccacatgaag	240
cagcagcact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccggcac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
tacctgagca ccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgga tcacatggtc	660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa	720
	720
<210> 26	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> linker	

<400> 26

ggaggtgggg gctcg

15