



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0071981
(43) 공개일자 2019년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/62 (2017.01)

(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0172955

(22) 출원일자 2017년12월15일

심사청구일자 2017년12월15일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

김태형

광주광역시 서구 풍암동 동부센트레빌 104-602

박정희

광주광역시 광산구 월계동 대우아파트 108-102

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤대웅, 공병욱

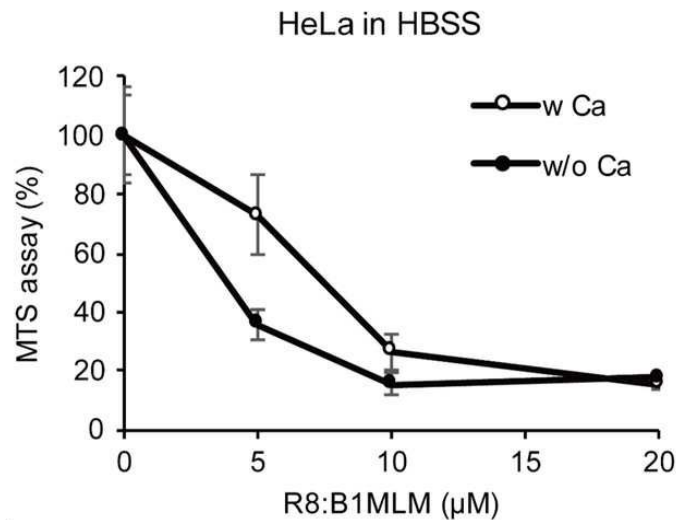
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 B1MLM에 의한 세포사 유도 펩타이드

(57) 요약

본 발명은 새로운 세포사 유도 펩타이드에 관한 것으로서, 구체적으로는Bnip1 단백질에서 유래한 MTD 유사 세포사 유도 펩타이드 B1MLM이 암세포를 죽이는 것을 발견하고 개발한 세포사 유도 펩타이드와 이를 포함하는 세포사 유도 융합단백질에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 47/62 (2017.08)

C07K 2319/01 (2013.01)

(72) 발명자

한지혜

광주광역시 남구 방림동 용대로 194 302호

명승현

광주광역시 북구 북문대로 242번길 50, 푸른마을
205-1103

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711030406

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 핵심개인연구

연구과제명 MTD 펩타이드 항암제 플랫폼 기술의 개념 증명

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C2025

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 세포괴사를 이용한 암 내성 세포 극복 전략

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 21의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 세포사 유도 펩타이드.

청구항 2

서열번호 1 내지 21의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 세포사 유도 펩타이드; 및

세포 투과 펩타이드;

를 포함하는 세포사 유도 융합단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 세포 투과 펩타이드는 Tat, Antp, NLS, 8-Lysine, 8-Arginine, MPG, pVEC, ARF, BPrPp, VP22, VT5, MAP, Transportan, SG3, Pep-7, FGF에서 유래된 것인, 세포사 유도 융합단백질.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 세포 투과 펩타이드는 서열번호 22 내지 43으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 세포사 유도 융합단백질.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 세포 투과 펩타이드 및 세포사 유도 펩타이드는 링커를 통해 연결된 것인, 세포사 유도 융합단백질.

청구항 6

제1항의 세포사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 7

제1항의 세포사 유도 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합벡터.

청구항 8

제1항의 세포사 유도 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합벡터로 형질전환된 세포.

청구항 9

제1항의 세포사 유도 펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 새로운 세포사 유도 펩타이드에 관한 것으로서, 구체적으로는 Bnip1 단백질에서 유래한 MTD 유사 세포사 유도 펩타이드 B1MLM이 암세포를 죽이는 것을 발견하고 개발한 세포사 유도 펩타이드와 이를 포함하는 세포사 유도 융합단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대표적인 세포사의 형태로는 세포괴사(necrosis)와 세포사멸(apoptosis)이 있다. 세포괴사는 온도나 압력과 같

은 물리적인 손상이나 과도한 세포의 독성 등에 의해 비가역적으로 일어나며 에너지를 소모하지 않는다. 또한 면역반응을 일으켜 주변 세포들의 손상을 야기한다. 이에 반해 세포사멸은 기관의 생성이나 면역세포의 조절 등에서 일어나며 에너지를 소모하면서 여러 단계를 거쳐 주변에 면역반응을 거의 일으키지 않으면서 일어난다. 얼핏 보기에 이 둘은 서로 상반된 상황에 일어나며 상반된 성격을 가지고 있지만, 두 현상 사이의 연관성과 상호작용, 그리고 그 중요성은 계속해서 보고되고 있다.

[0003] 세포사를 일으키는 물질들은 이미 수많은 질환에서 이용되고 있다. 가장 대표적으로 항암제들이 있는데, 수많은 종류의 항암제들이 암세포의 세포괴사와 세포사멸을 유도하여 암을 치료하는데 도움을 주고 있다. 대표적으로 세포의 DNA를 알킬화하여 세포사멸을 일으키는 물질들과 (예. Cisplatin, Doxorubicin, Etoposide), 대사길항 물질로 작용하여 세포독성을 나타내는 물질들이 (예. methotrexate, fluorouracil, mercaptopurin) 있다. 이들은 자가면역 질환에서도 폭넓게 이용되고 있는데, 류마티스성 관절염(methotrexate), 루푸스(cyclophosphamide, methotrexate), 다발성 경화증(Cyclophosphamide) 등에서 치료제로 쓰이고 있다.

[0004] 세포사를 일으키는 물질들은 치명적인 단점들도 가지고 있다. 대부분은 세포사를 유발하는 그 자체의 특성에서 야기한다. 원하는 세포만을 골라서 죽일 수 있는 방법이 없는 경우 이들은 질환을 일으키는 세포가 아닌 신체에 필요한 기능을 수행하는 세포들을 죽이기도 한다. 특히 빠르게 분열하는 세포들을 주 대상으로 삼는데 피부나 소화기관의 상피세포, 손, 발톱과 머리카락이 피해를 입는 대표적인 기관이다. 또한 이들은 정상적으로 신체에 존재하는 물질들이 아니기 때문에 간에서 대사되거나 신장으로 배출되어야 하는데 이 과정에서 독성을 나타내는 경우가 많다. 이러한 단점들을 보완하기 위하여 암세포만을 물리적(예. 화학색전술), 분자생물학적으로(예. apatinib) 표적하는 방법들이 많이 고안되고 있다.

[0005] 본 발명자들은 이러한 단점을 극복할 수 있는 세포사 유도 펩타이드를 이미 발명한 바 있다. 세포사멸을 일으키는 Noxa 단백질의 MTD 도메인이 세포사를 유발할 수 있다는 것을 발견하였고, 이 도메인과 세포 투과 펩타이드(CPP)인 R8을 결합시켜서 세포사를 강력하게 일으키는 세포사 유도 펩타이드(CKP: cell-killing peptide)를 완성하였다(등록번호:10-685345). 또한 암세포만을 죽이는 암 특이적 펩타이드를 만들기 위해 암세포를 표적화하는 7개의 아미노산을 융합하여 암 소멸효과를 나타내는 융합단백질(TU17:MTD)를 발명하여 보고하였다(등록번호:10-1323669). 세포사 유도 펩타이드는 이렇게 표적화 펩타이드와 융합하여 특정 암세포만을 죽일 뿐만 아니라 구성 아미노산을 교체하여 그 반감기나 세포사 유도 정도를 조절할 수 있다. 원하는 목적을 달성한 후에는 혈액 안에서 아미노산으로 분해되기 때문에 간이나 신장 등 다른 기관에 손상을 주지 않고 자연스럽게 체내로 흡수되게 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 본 발명자들은 세포사를 유도하는 새로운 펩타이드가 더 존재할 수 있다는 가능성을 염두에 두고 MTD 펩타이드와 유사한 구조를 가지는 몇몇 펩타이드 서열을 사람의 유전자 안에서 찾아내었다. 그 중에서도 Bnip1 이라는 단백질의 막관통 영역에서 11개의 아미노산으로 이루어진 비슷한 서열을 찾아내었으며, 이에 세포 투과 도메인(CPP)인 R8를 조합하여 강력한 세포사 유도 현상을 확인하고 이 발명을 완성하였다.

[0007] 본 발명의 목적은 세포사 유도 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 세포사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 세포사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제조합백터를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 세포사 유도 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제조합백터로 형질 전환된 세포를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 세포사 유도 펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 세포사 유도 펩타이드의 암 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 세포사 유도 펩타이드를 이용한 암 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 세포사 유도 펩타이드 및 세포 투과 펩타이드를 포함하는 세포사 유도 융합단백질을 제

공하는 것이다.

- [0015] 본 발명의 다른 목적은 세포사 유도 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 세포사 유도 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제조합백터를 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 세포사 유도 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 세포를 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 세포사 유도 융합단백질을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 세포사 유도 융합단백질의 암 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합단백질을 이용한 암 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0021] 본 발명은 새로운 세포사 유도 펩타이드에 관한 것으로서, 구체적으로는Bnip1 단백질에서 유래한 MTD 유사 세포사 유도 펩타이드 BIMLM이 암세포를 죽이는 것을 발견하고 개발한 세포사 유도 펩타이드와 이를 포함하는 세포사 유도 융합단백질에 관한 것이다.
- [0022] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0023] 본 발명의 일 예는 세포사 유도 펩타이드에 관한 것이다.
- [0024] 상기 세포사 유도 펩타이드는 서열번호 1 내지 21의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것 일 수 있다.
- [0025] 상기 세포사 유도 펩타이드는 세포 내로 들어감으로써 세포를 죽이는 효과를 달성한다.
- [0026] 상기 세포사 유도 펩타이드를 세포 내로 도입하는 방법은 여러 가지를 이용할 수 있으며, 예를 들어, ATP 또는 EDTA를 이용하는 화학적 방법(Rozengurt, E., et al. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 1581-1588), 전기 천공법, 미세주사 같은 기계적 방법(Wong, T. K. & Neumann, E. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 584-587), S. aureus 의 알파-톡신과 같은 포어(pore) 형성 톡신과의 혼합 방법(Grant, N. J., Aunis, D., & Bader, M.F. (1987) Neuroscience 23, 1143-1155), 비히클 및 리포솜과의 융합과 같은 융합 방법(Celis, J. E., ed.(1998) in Cell Biology: a laboratory handbook, 2nd. ed., Vol. 4. (Acad Press, San Diego, Calif.))등을 사용할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 일 예는 세포 투과 펩타이드 및 세포사 유도 펩타이드를 포함하는 세포사 유도 융합단백질에 관한 것이다.
- [0028] 상기 세포 투과 펩타이드는 세포사 유도 단백질이 세포막을 투과하여 세포 내로 침투하도록 만드는 역할을 한다.
- [0029] 상기 세포 투과 펩타이드는 Tat (Green and Loewenstein, 1988, Frankel and Pabo, 1988), Antp (Joliot et al, 1991), NLS (Ragin et al, 2002), 8-Lysine (Mai et al, 2002), MPG (Oehlke et al, 1998), pVEC (Deshayes et al, 2004), ARF (Nan et al, 2011), BPrPp (Johansson et al, 2008), VP22 (Elliot and O'Hare, 1997), VT5 (Magzoub et al, 2006), MAP (Oehlke et al, 1998), Transportan (Pujals and Giralt, 2008), SG3 (Gao et al, 2011), Pep-7 (Gao et al, 2002), FGF (Nakayama et al, 2011)에서 유래된 것일 수 있으며, 예를 들어, 8-Arginine (Wender et al, 2000)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 상기 세포 투과 펩타이드는 서열번호 22 내지 43로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

표 1

서열번호	명명	서열목록	비고
22	8-Arginine	RRRRRRRR	
23	Tat	GRKKRRQRRRPQ	
24	Antp	RQIKIWFAQNRMRKWK	

25	8-Lysine	KKKKKKKK	
26	MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	
27	ARF	MVRRFLVTLRIRACGPPrRV	
28	BPrPp	MVKSIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRP	
29	VP22	DAATATRGRSAASRPTEPRAPARSASRPPrVD	
30	VT5	DPKGDPKGVTVTVTVTVTKGDPKPD	
31	MAP	KLALKLALKALKAALKLA	
32	Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	
33	SG3	RLSGMNEVLSFRWL	
34	Pep-7	SDLWEMMMVSLACQY	
35	FGF	AAVALLPAVLLALLAP	
36	pVEC	LLIILRRRIKQAHASK	
37	NLS-1	VQRKRQKLP	
38	NLS-2	SKKKKTKV	
39	NLS-3	GRKKRKRT	
40	NLS-4	GKKKKRKREKL	
41	NLS-5	PKKKRKV	
42	NLS-6	ERKKRRRE	
43	NLS-7	FKKFRKF	

- [0033] 또한, 상기 세포 투과 펩타이드와 단백질을 접합시켜 발현시킬 수 있는 벡터에 (예, pTAT vector: Jennifer Embury et al. Diabetes, August 2001) 상기 세포사 유도 펩타이드를 암호화하는 염기서열을 삽입한 재조합 벡터를 제작 후 *in vivo*에서 융합단백질을 발현시킨 후 정제하여 제조할 수 있다.
- [0034] 구체적으로, 상기 세포사 유도 펩타이드를 세포 내에 투과시키기 위해, 세포 투과 펩타이드인 R8G를 세포사 유도 펩타이드의 N-말단에 결합시켜 세포사 활성을 갖는 융합단백질을 펩타이드 합성법으로 제조할 수 있다.
- [0035] 상기 세포 투과 펩타이드 및 세포사 유도 펩타이드는 링커를 통해 연결된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 링커는 세포사 유도에 방해가 되지 않을 정도의 길이를 가진 아미노산 서열 또는 세포 내 분해가 가능한 화학연결기를 연결자로 포함할 수 있다.
- [0037] 예를 들어, 상기 링커는 당업계에서 공지된 다양한 링커를 이용할 수 있으며(Huston, et al., Methods in Enzymology, 203:46-88(1991) 및 Whitlow, et al., Protein Eng., 6:989(1993) 참조), 구체적인 일 예로, 글리신 또는 세린 아미노산과 기타 아미노산들로 구성되며, 그 길이는 1 내지 5 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다.
- [0038] 상기 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다.
- [0039] 본 발명의 펩타이드는 당업계에서 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques)에 따라 제조될 수 있다(Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)).
- [0040] 본 발명의 다른 일 예는 세포사 유도 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.
- [0041] 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1 내지 21로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 코딩하는 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 세포사 유도단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.
- [0043] 상기 세포사 유도단백질은 상술한 바와 동일하다.
- [0044] 상기 폴리뉴클레오타이드는 상기 세포사 유도 펩타이드 또는 세포사 유도단백질을 암호화하는 코돈을 기초로 자동합성기에서 화학합성하여 제조 또는 합성된 유전자의 PCR 증폭 또는 전사를 통해 제조할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 세포사 유도 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합벡터

에 관한 것이다.

- [0046] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 세포사 유도 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터에 관한 것이다.
- [0047] 상기 용어 "백터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 백터, 코즈미드 백터 및 박테리오파지 백터, 아데노바이러스 백터, 레트로바이러스 백터 및 아데노연관 바이러스 백터와 같은 바이러스 백터를 포함한다. 상기 재조합 백터로 사용될 수 있는 백터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHCT9, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 상기 재조합 백터는, 전형적으로 클로닝을 위한 백터 또는 발현을 위한 백터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 백터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 백터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0049] 상기 재조합 백터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 백터가 발현 백터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL ^{λ} 프로모터, CMV 프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, *tac* 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 백터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 계능으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 세포사 유도 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 세포에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 세포사 유도 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 세포에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명에서 사용된 숙주세포로는 대장균, 효모, 동물세포, 식물세포, 또는 곤충세포 등을 포함할 수 있으며, 원핵세포로는, 예를 들어, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이를 포함하는 재조합 백터의 숙주 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [0054] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 세포사 유도 펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 세포사 유도 융합단백질을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관

한 것이다.

- [0057] 상기 암은 폐암, 유방암, 간암, 피부 흑색종, 위암, 췌장암, 대장암, 난소암, 신장 세포암, 전립선암 또는 뇌종양인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명에 따른 조성물 내의 유효성분으로서의 융합단백질의 함량은 사용 형태 및 목적, 환자 상태, 증상의 종류 및 경증 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 고형분 중량 기준으로 0.001 내지 99.9 중량%, 또는 0.1 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 50 중량%, 또는 0.1 내지 40 중량%일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0059] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구, 피부, 정맥, 근육, 피하 등의 경로로 투여될 수 있으며, 이 외에도 비강에 투여하는 국소 분무의 형태를 띌 수도 있다.
- [0060] 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연고제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 경피제, 스프레이제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태의 비경구 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 융합단백질 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제 등의 보조제를 추가로 함유하는 것일 수 있다.
- [0062] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0063] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0064] 경구를 위한 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 연고제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0065] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제, 경피제 등이 포함된다.
- [0066] 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0067] 좌제의 제제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 약학적 조성물을 인간에게 적용하는 구체적 예에 있어서, 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 투여될 수 있으나, 일반적으로 투여방식과 표준 약제학적 관행(standard pharmaceutical practice)을 고려하여 선택된 약제학적 담체와 혼합되어 투여될 수 있다.
- [0069] 예를 들면, 본 발명의 약학적 조성물은 전분 또는 락토오스를 함유하는 정제 형태로, 또는 단독 또는 부형제를 함유하는 캡슐 형태로, 또는 맛을 내거나 색을 띄게 하는 화학 약품을 함유하는 엘릭시르 또는 현탁제 형태로 경구, 구강 내 또는 혀 밑 투여될 수 있다.
- [0070] 이러한 액체 제제는 현탁제(예를 들면, 메틸셀룰로오즈, 위텡솔(witepsol)과 같은 반합성 글리세라이드 또는 행인유(apricot kernel oil)와 PEG-6 에스테르의 혼합물 또는 PEG-8과 카프릴릭/카프릭 글리세라이드의 혼합물과 같은 글리세라이드 혼합물)와 같은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제와 함께 제형화 될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0072] 예컨대, 유효성분 함량을 기준으로 1일 투여량이 0.1 내지 500 mg/kg, 바람직하게는 0.5 내지 300 mg/kg일 수 있다. 상기한 투여량은 평균적인 경우를 예시한 것으로서 개인적인 차이에 따라 그 투여량이 높거나 낮을 수 있다.

[0073] 본 발명의 약학적 조성물의 1일 투여량이 상기 투여 용량 미만이면 유의성 있는 효과를 얻을 수 없으며, 그 이상을 초과하는 경우 비경제적일 뿐만 아니라 상용량의 범위를 벗어나므로 바람직하지 않은 부작용이 나타날 우려가 발생할 수 있으므로, 상기 범위로 하는 것이 좋다.

[0074] 본 발명에서는 MTD 유사 세포사 유도 펩타이드가 세포 투과 펩타이드와 조합되었을 때, 암세포주(예를 들어, HeLa 세포)에 강력하게 세포사를 일으킬 수 있다는 것을 보여주었다. 이러한 세포사가 어떤 경로를 통해서 이루어지는지 아직 알려지지 않았으나, 통상적인 세포사멸보다 강력한 효과를 나타낸다.

발명의 효과

[0075] 본 발명은 새로운 세포사 유도 펩타이드에 관한 것으로서, 구체적으로는Bnip1 단백질에서 유래한 MTD 유사 세포사 유도 펩타이드 B1MLM이 암세포를 죽이는 것을 발견하고 개발한 세포사 유도 펩타이드와 이를 포함하는 세포사 유도 융합단백질에 관한 것으로, 세포사 유도 펩타이드는 목적에 따라 세포 투과 펩타이드와 결합하여 원하는 암세포의 사멸을 유도할 수 있으므로, 암의 치료제로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0076] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 MTD 유사 세포사 유도 펩타이드 B1MLM의 아미노산 서열과 Noxa 단백질의 MTD 아미노산 서열의 개략도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 투과 펩타이드(cell penetrating peptide; CPP) 도메인과 B1MLM 도메인을 융합한 융합단백질 및 종양 유도 펩타이드(tumor homing peptide; THP) 도메인과 B1MLM 도메인을 융합한 융합단백질의 개략도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포에 세포 외부에 칼슘이온이 있는 상황과 없는 상황에서 B1MLM를 농도별로 처리한 후 MTS 어세이를 통하여 세포의 상대적 생존율 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포에 B1MLM를 10 uM 처리한 후에 시간 별로 현미경을 통해 촬영한 사진이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 CT26 및 HeLa 세포에 B1MLM의 변이체를 농도 별로 처리한 후 MTS 어세이를 통하여 세포의 상대적 생존율을 색깔로 나타낸 그림이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포를 칼슘이 존재하는 배지에서 Fluo-4로 염색한 뒤 B1MLM를 10 uM 처리한 후에 시간 별로 콘포칼 현미경을 통해 촬영한 사진이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포를 칼슘이 없는 배지에서 Fluo-4로 염색한 뒤 B1MLM를 10 uM 처리한 후에 시간 별로 콘포칼 현미경을 통해 촬영한 사진이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포를 칼슘이 존재하는 배지에서Fluo-4로 염색한 뒤 B1MLM를 10 uM 처리한 후에 시간 별로 콘포칼 현미경으로 촬영한 Fluo-4의 형광강도를 나타는 그래프이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포를 칼슘이 없는 배지에서Fluo-4로 염색한 뒤 B1MLM를 10 uM 처리한 후에 시간 별로 콘포칼 현미경으로 촬영한 Fluo-4의 형광강도를 나타는 그래프이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포를 Calcein-AM 및 코발트이온으로 염색한 뒤 B1MLM를 10 uM 처리한 후에 시간별로 콘포칼 현미경을 통해 촬영한 사진이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포를 Calcein-AM 및 코발트이온으로 염색한 뒤 비교군으로 시간별로 콘포칼 현미경을 통해 촬영한 사진이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포를 DCF로 염색한 뒤 B1MLM를 10 uM 처리한 후에 시간별로 콘포칼 현미경을 통해 촬영한 사진이다.

도 13는 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포를 Mitosox로 염색한 뒤 B1MLM를 10 uM 처리한 후에 시간별로 콘포칼 현미경을 통해 촬영한 사진이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포를 DCF로 염색한 뒤 B1MLM를 10 μ M 처리한 후에 시간별로 콘포칼 현미경으로 촬영한 형광강도를 그래프로 나타낸 그림이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포를 Mitosox로 염색한 뒤 B1MLM를 10 μ M 처리한 후에 시간별로 콘포칼 현미경으로 촬영한 형광강도를 그래프로 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 펩타이드 합성

펩타이드 합성은 0.25 mmol를 단위로 하는 수동 Fmoc 합성방법을 기본적으로 이용하였다. 구체적으로, 레진을 DMF (4x)로 깨끗이 씻은 후 10 ml의 20% 피페리딘(piperidine)/DMF 용액을 레진에 넣었다. 1분간 잘 저은 후 위의 용액을 제거하고, 다시 10 ml의 20% 피페리딘/DMF 용액을 레진에 넣었다. 30분 동안 흔들어 준 후 다시 레진을 DMF (4x)으로 씻고 피페리딘이 남아 있지 않았음을 난하이드린 테스트를 하여 확인하였다(레진이 파란색이 되어야 한다). 커플링 단계를 진행하기 위해 아래의 용액을 준비하였다:

1 mmol Fmoc-아미노산, 2.1 ml 0.45 M HBTU/HOBT (1 mmol), 348 μ L DIEA (2 mmol).

위의 용액을 레진에 넣고 30분 동안 흔들어 주었다. 용액을 레진에서 따라낸 후 DMF (4x) 넣어 레진을 씻어 주었다. 다음 아미노산을 커플링 시키기 위해 위의 용액을 넣은 후 위의 커플링 단계를 반복하여 세포사 유도 펩타이드와 결합된 형태의 여러 종류의 본 발명의 암세포 표적화 펩타이드를 합성하였다. 이러한 방법으로 합성된 펩타이드는 HPLC(기기: Waters 2690 separations module, Flow rate: 1.0 ml/min, Gradient: 0% 내지 20% B 5분; 20% 내지 50% B 20분; 50% 내지 80% B 5분, A; 0.1% TFA water, B; 0.1% TFA 아세트나이트릴, 컬럼: Waters C18, 5 micron, Detection: 220 nm, 순도: 95%) 그리고 질량 분석(기기: HP 1100 series LC/MSD)을 하였다. 합성된 펩타이드는 물에 1 mM 농도로 녹여 -80에 보관하여 사용하였다.

표 2

서열번호	명명	서열목록	비고
1	B1MLM	KLLIFLALALF	

실시예 2. 암세포주의 배양

인체 암세포주인 HeLa 세포주를 한국세포주은행에서 구입하였고 돌베코수정이글배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM), 트립신-EDTA, 우태아혈청(Fetal bovine serum; FBS), HBSS는 Gibco사에서 구입하였으며, MTS 어세이 키트는 프로메가(Promega)에서 구입하였다.

HeLa 세포주는 3회 이상 계대배양하여 실험에 사용되었다. 10%의 FBS가 들어간 DMEM 배양액을 사용하여 5%의 이산화탄소가 유지되는 37의 인큐베이터에서 배양하였다.

실시예 3. R8:B1MLM 펩타이드의 세포사 유도 실험

실시예 1에서 제조된 R8:B1MLM 펩타이드의 세포사 유도 활성을 알아보기 위하여, 자궁경부암 세포주인 HeLa를 96웰에 90%의 confluency로 배양하였다. 세포의 배양액을 HBSS 버퍼로 교환한 후, B1MLM 펩타이드를 각각 0, 5, 10, 20 μ M의 농도로 처리하고 한시간 후 MTS 어세이 키트를 처리하고 OD값을 측정하여 세포의 생존 정도를 측정하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

도 3에서 확인할 수 있듯이, R8:B1MLM 펩타이드는 10 μ M에서부터 현저한 세포사 유도능력을 보여주었다.

또한, 구체적으로 세포사 모양을 보기 위하여 콘포칼 현미경 (Leika)을 이용하여 시간에 따른 세포모양의 변화를 촬영하여, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0093] 도 4에서 확인할 수 있듯이, HeLa 세포는 10분이 지나가기 전에 수포(Bleb)가 생기며 모양이 망가지는 것을 관찰할 수 있었다.

[0095] **실시예 4. R8:B1MLM 펩타이드의 변이체에 의한 세포사 유도 실험**

[0096] 본 발명의 B1MLM 펩타이드 중 일부의 변화가 세포사 유도 능력에 변화를 주는지 알아보기 위하여 1 내지 3개의 아미노산이 치환되거나 결실된 변이체를 실시예 1과 같이 합성하였다. 이들의 아미노산 서열은 표 3에 나타낸 바와 같으며, 세포사 유도 능력을 알아보기 위해, 실시예 3과 같은 방법으로 실험을 시행하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

표 3

서열번호	명명	서열목록	비고
2	R8:ETD(De19A)	LIFLALALF	
3	R8:ETD(De19B)	KLLIFLALA	
4	R8:ETD(2DA)	KAAIFLALALF	
5	R8:ETD(4DA)	KLLAALALALF	
6	R8:ETD(6DA)	KLLIFAALALF	
7	R8:ETD(7DA)	KLLIFLAAGLF	
8	R8:ETD(9DA)	KLLIFLALAAA	
9	R8:ETD(De11I)	KLLFLALALF	
10	R8:ETD(De11F)	KLLILALALF	
11	R8:ETD(1SA)	ALLIFLALALF	
12	R8:ETD(2SA)	KALIFLALALF	
13	R8:ETD(3SA)	KLAIFLALALF	
14	R8:ETD(4SA)	KLLAFLALALF	
15	R8:ETD(5SA)	KLLIALALALF	
16	R8:ETD(6SA)	KLLIFAALALF	
17	R8:ETD(7SA)	KLLIFLGLALF	
18	R8:ETD(8SA)	KLLIFLAAALF	
19	R8:ETD(9SA)	KLLIFLALGLF	
20	R8:ETD(10SA)	KLLIFLALAAF	
21	R8:ETD(11SA)	KLLIFLALALA	

[0099] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 아미노산 1 내지 3개의 치환이나 결실로는 B1MLM의 세포사 유도 능력에 큰 변화를 주지는 못하였다.

[0101] **실시예 5. R8:B1MLM 펩타이드에 의한 세포사 및 세포 내 칼슘 농도의 변화**

[0102] 본 발명의 R8:B1MLM 펩타이드가 어떠한 기전으로 세포사를 일으키는지 알아보기 위하여, 세포사를 일으키는 과정에서 중요한 요소 중 하나인 세포 내 칼슘의 농도변화를 콘포칼 현미경(Leika)을 이용하여 관찰하였다.

[0103] 구체적으로, 실험 전날 HeLa 세포주를 Lab-Tek 챔버 글라스에 약 70%정도로 깔았으며, 실험 직전 5 μ M의 농도의 Fluo-4를 이용하여 염색하였다. 10분 동안 488nm의 레이저를 이용하여 관찰한 세포의 모양과 세포 내 칼슘의 변화를 도 6 및 7에 나타내었으며, 좀 더 자세한 분석을 위해 Fluo-4 형광의 강도를 그래프로 그려서 도 8 내지 9에 나타내었다.

[0104] 도 8 내지 9에서 확인할 수 있듯이, HeLa 세포 내의 칼슘농도는 5분이되기 전에 급격히 올라가기 시작했으며, 2 내지 3분의 시간이 지난 뒤에 세포의 수포가 생겨나면서 모양이 급격히 망가지기 시작했다. 세포 외부의 칼슘 존재 여부에 따라 세포사의 정도와 세포 내 칼슘농도의 변화양상이 달라지는 것으로 보아 세포 바깥의 칼슘도 R8:B1MLM에 의한 세포사에 중요한 영향을 미치는 것으로 보인다.

[0105] 또한, 세포사의 중요한 매개 소기관인 미토콘드리아에서 칼슘이 유래되는지 여부를 알아보기 위해 칼세인

(Calcein) Am과 코발트 이온을 이용하여 미토콘드리아의 PT pore가 열리는지를 관찰하였다. 실험 전날 HeLa 세포주를 Lab-Tek 챔버 글라스에 약 70%정도로 깔았으며, 실험직전 1uM 농도의 칼세인 Am과 2mM의 코발트이온을 이용하여 20분간 염색하였고 0.1 uM의 Mitotracker Red를 이용하여 2분간 염색하여, 그 결과를 도 10 및 11에 나타내었다.

[0106] 도 10 및 11에서 확인할 수 있듯이, PT pore가 열리는 경우 미토콘드리아 안으로 코발트이온이 들어가게 되면 미토콘드리아 내의 Calcein이 형광을 잃어버리게 되는데, R8:B1MLM을 처리한 경우 미토콘드리아 내의 칼세인이 형광을 잃어버리는 모습을 보였으며 이는 R8:B1MLM에 의한 세포사가 일어나기 전에 보이는 칼슘농도의 증가가 미토콘드리아에서도 기인한다 라는 것을 보여준다.

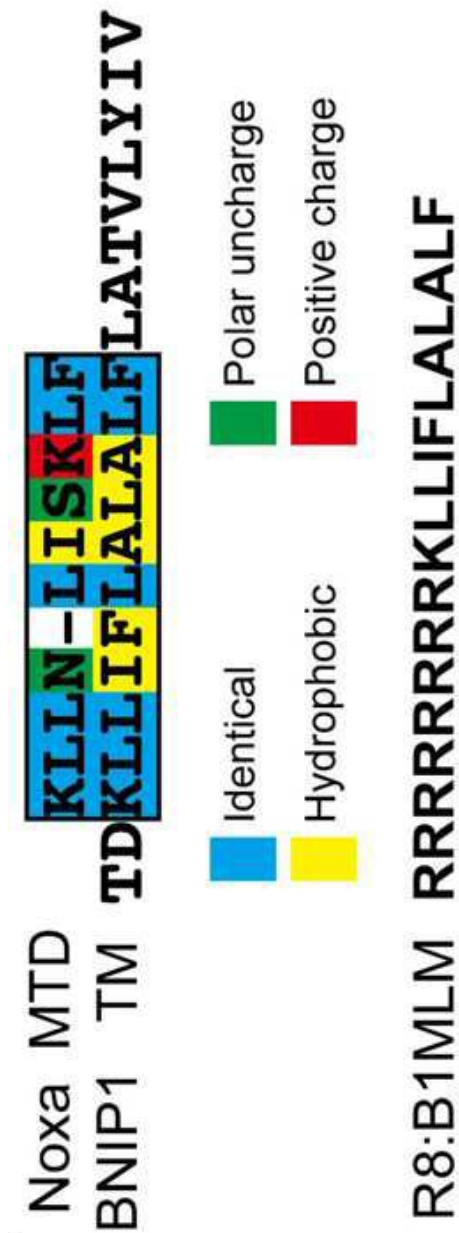
[0108] 실시예 6. R8:B1MLM 펩타이드에 의한 세포사 및 ROS의 변화

[0109] 일반적인 세포사가 일어나는 과정에 중요한 또 다른 매개체로는 ROS가 있다. 우리는 본 발명의 R8:B1MLM 펩타이드가 세포사를 유도하는데 있어서 ROS가 어떤 역할을 하는지 알아보기 위하여 콘포칼 현미경을 이용하여 세포내의 ROS변화를 관찰하였다. 실험 전날 HeLa 세포주를 Lab-Tek 챔버 글라스에 약 70%정도로 깔았으며 세포질내의 ROS를 보기 위하여 5 uM의 DCF를 10분간 염색하였고, 미토콘드리아의 ROS를 보기위하여 5 uM의 Mitosox를 각각 염색하였다. 10분동안 DCF는 496nm, Mitosox는 488nm의 레이저를 각각 이용하여 관찰한 세포의 모양과 세포 내 ROS의 변화를 도 12 및 도 13에 나타내었으며, 좀 더 자세한 분석을 위해 DCF와 Mitosox의 형광의 강도를 그래프로 그려서 도 14 내지 도 15에 나타내었다.

[0110] 도 14 내지 도 15에서 확인할 수 있듯이, 세포 내의 ROS는 증가하지 않는 모습을 보이다가 기포가 생기면서 세포질이 밖으로 빠져나가는 양상을 보이면서 형광을 더 이상 관찰할 수 없게 되는 모습이 보이며, 미토콘드리아의 ROS는 Bleb이 생기면서 올라가기 시작한다. 이 결과만으로 ROS가 세포사의 과정인지 결과인지는 알아낼수 있으나 본 발명의 R8:B1MLM이 세포 내로 들어가게 되면 미토콘드리아에서 ROS가 형성이 된다는 사실은 알 수 있다.

도면

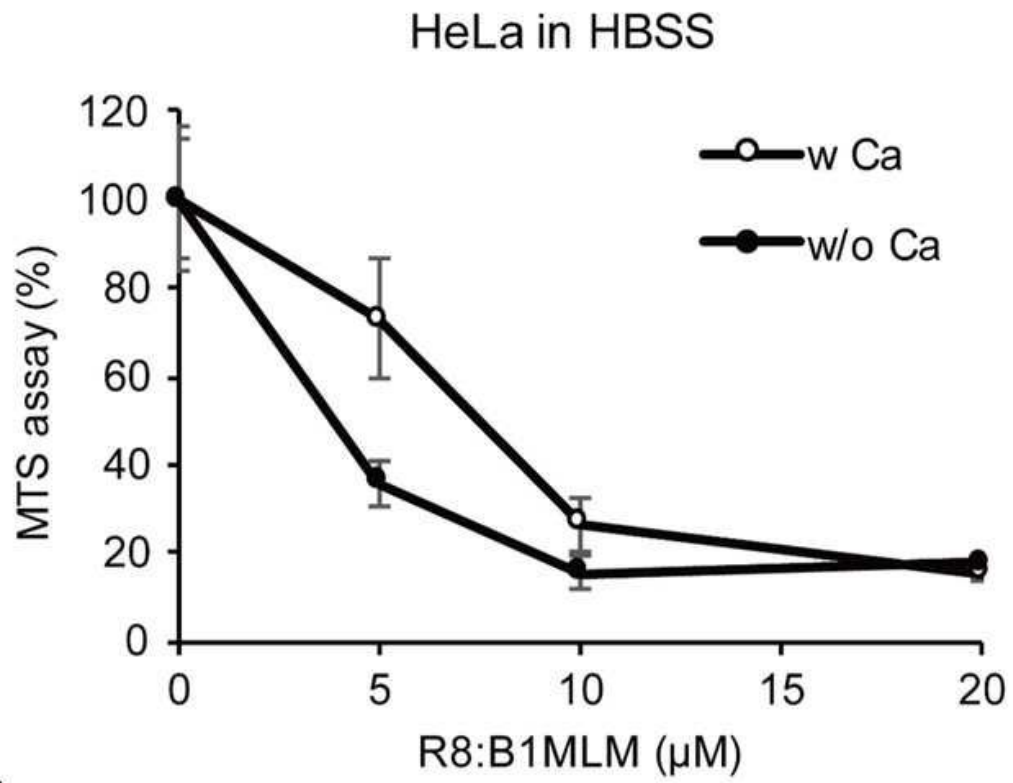
도면1



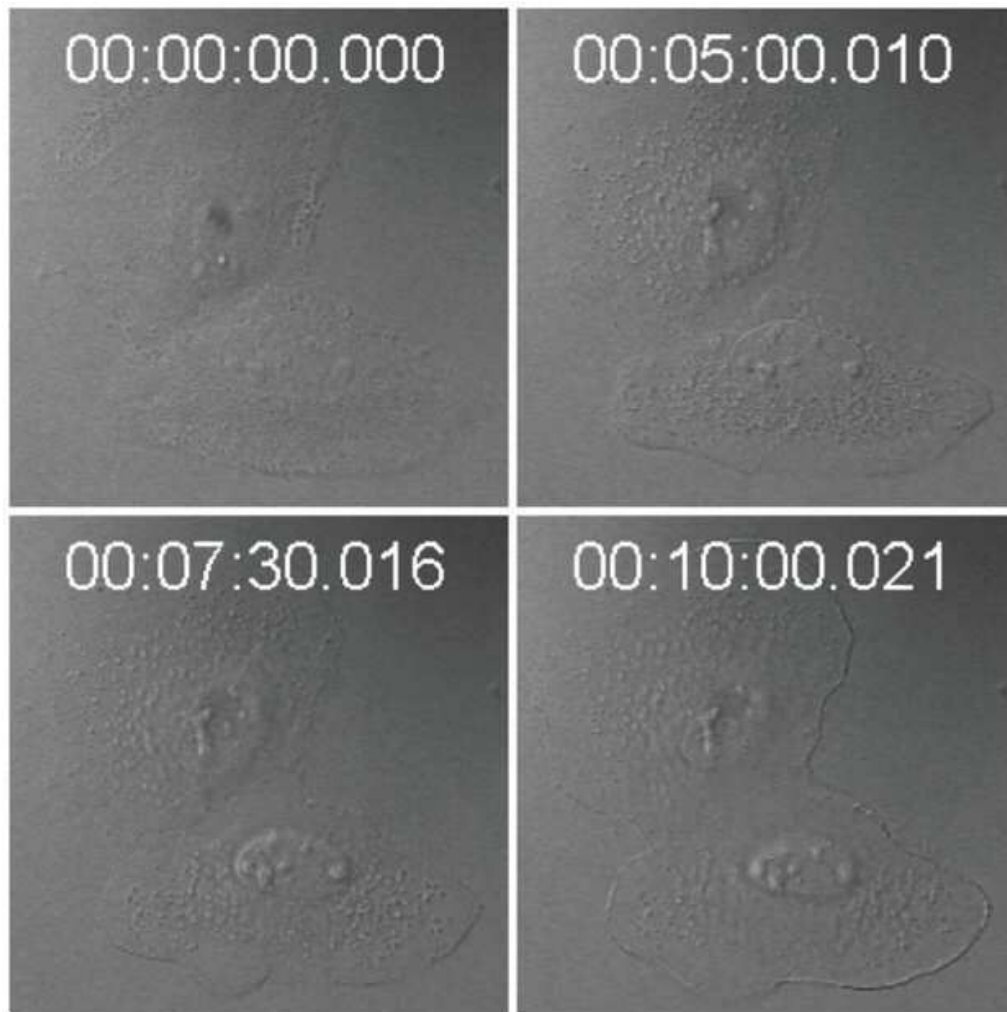
도면2



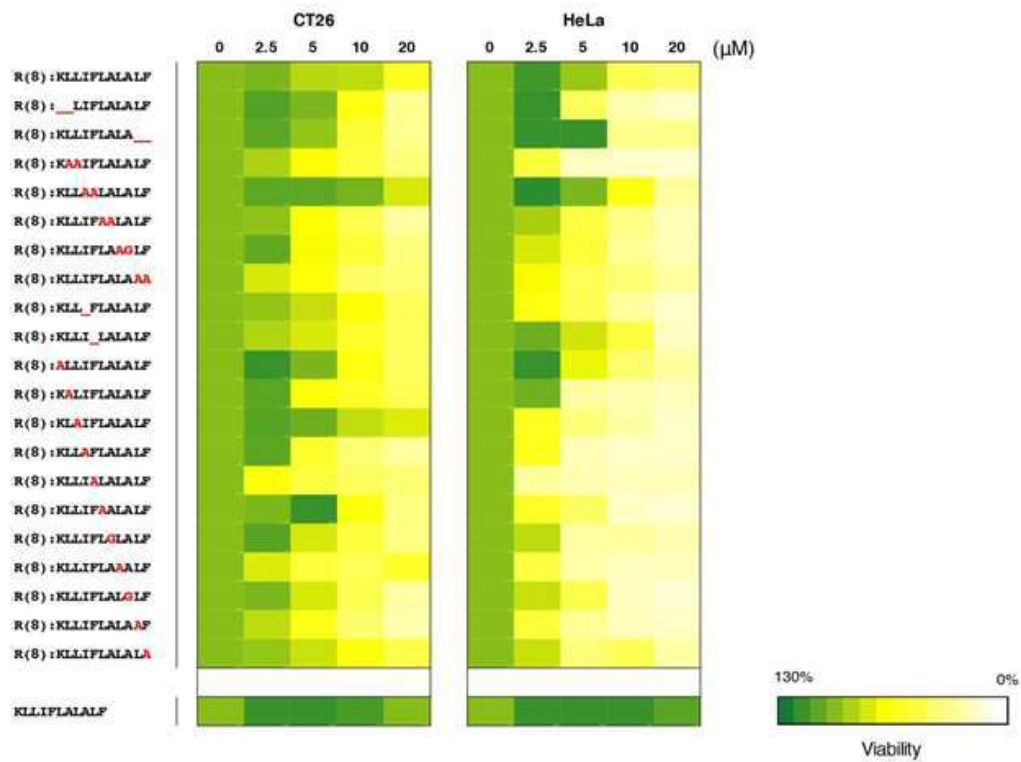
도면3



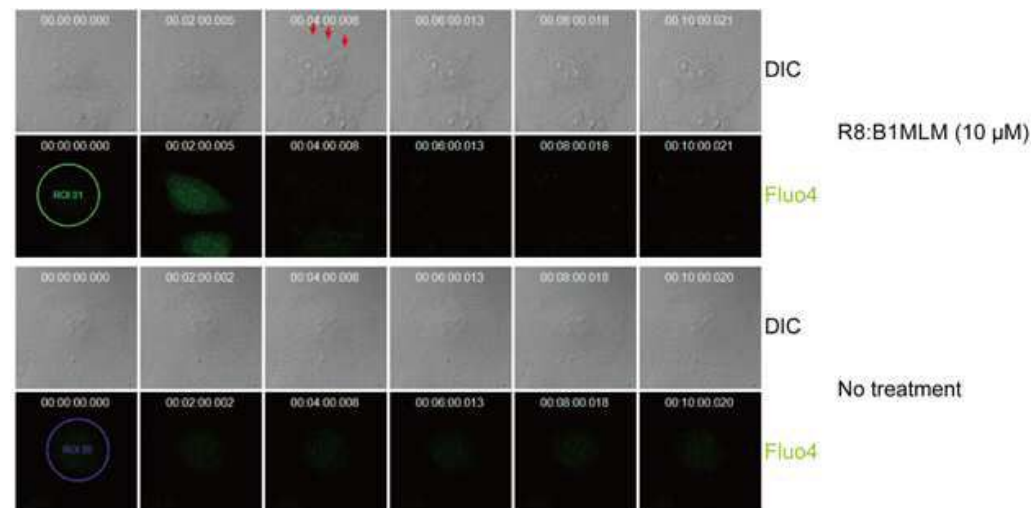
도면4



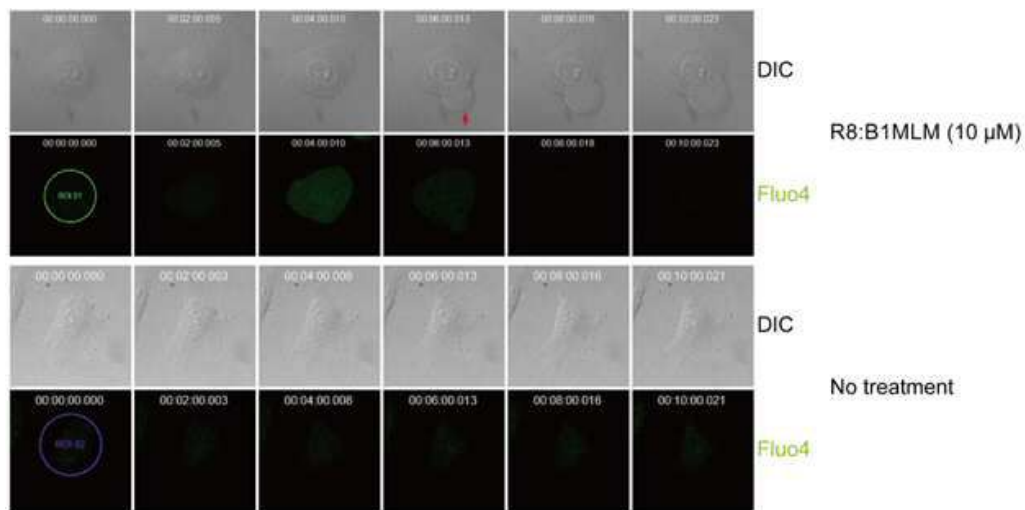
도면5



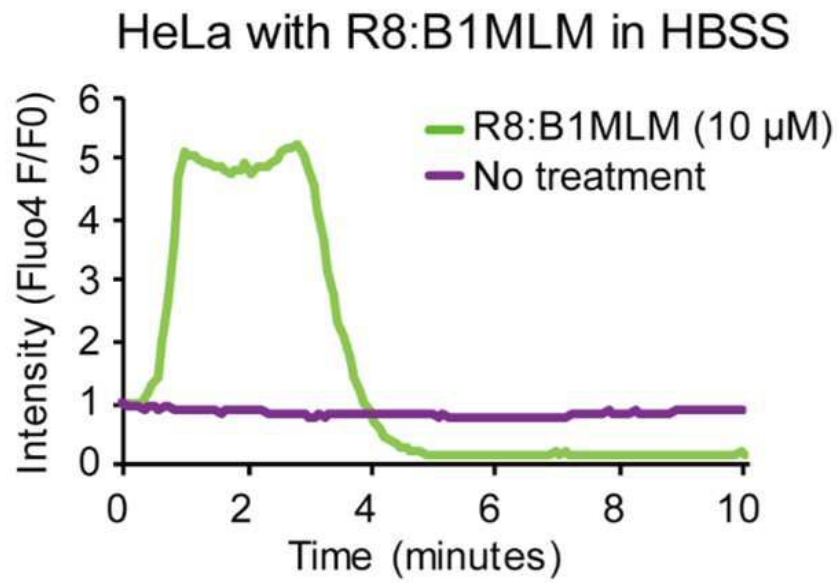
도면6



도면7

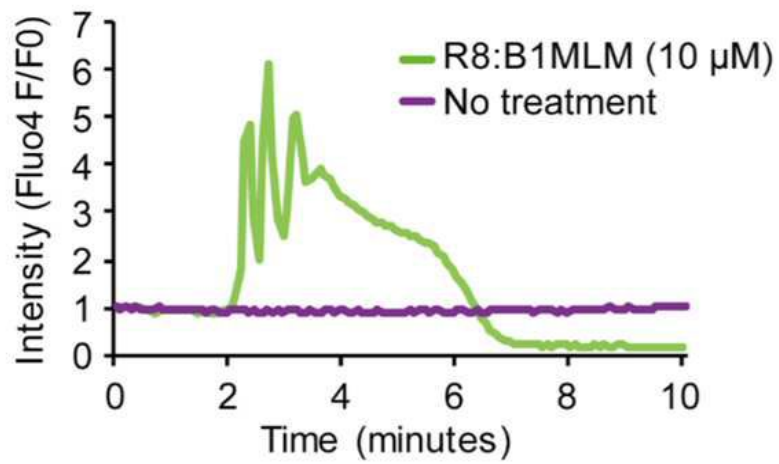


도면8



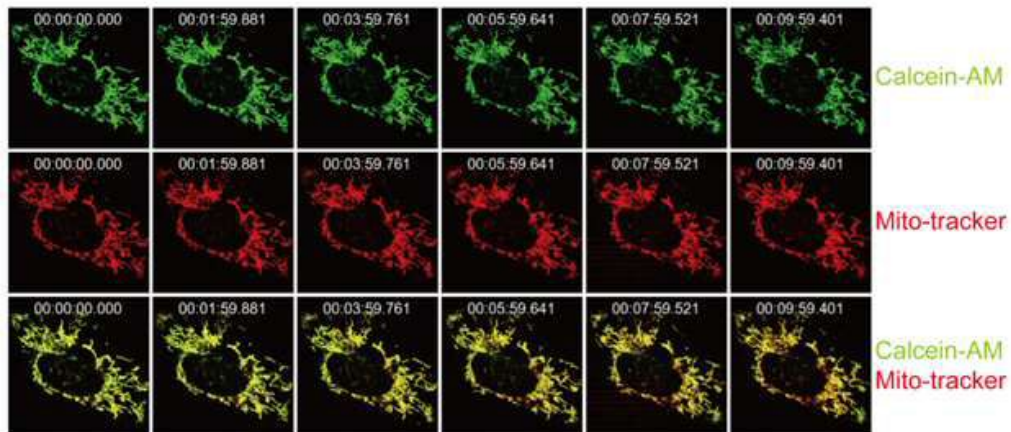
도면9

HeLa with R8:B1MLM in HBSS w/o Ca^{2+}



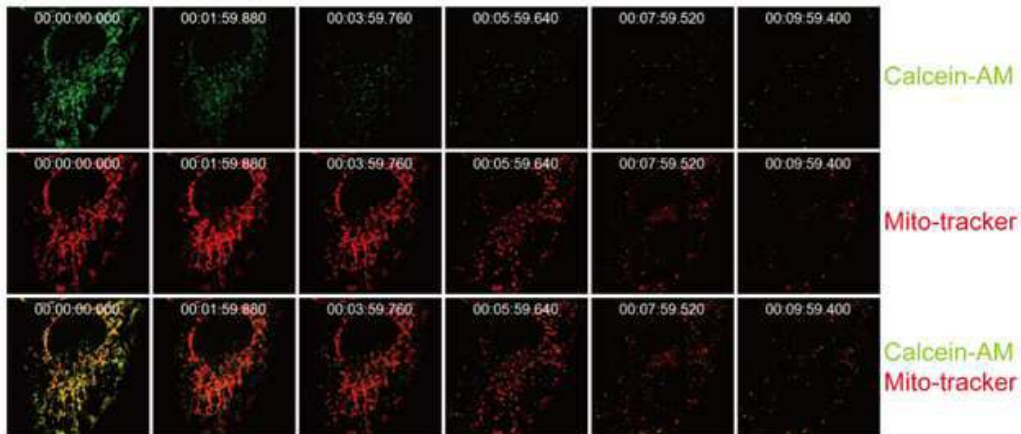
도면10

No treatment

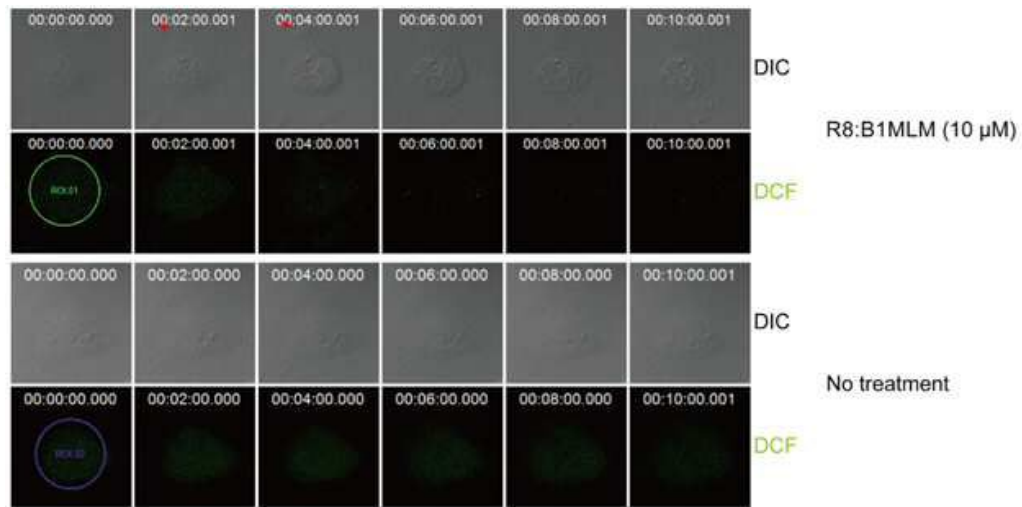


도면11

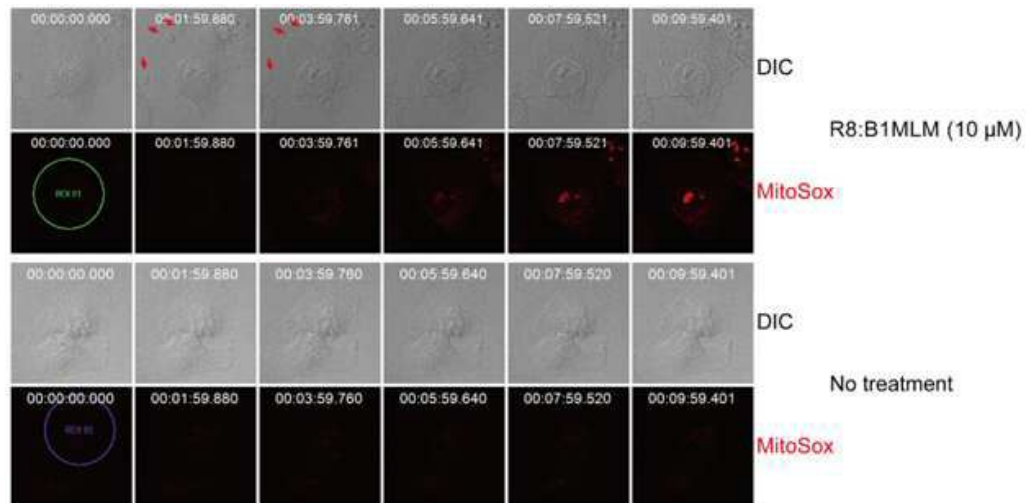
+ R8:B1MLM (10 μM)



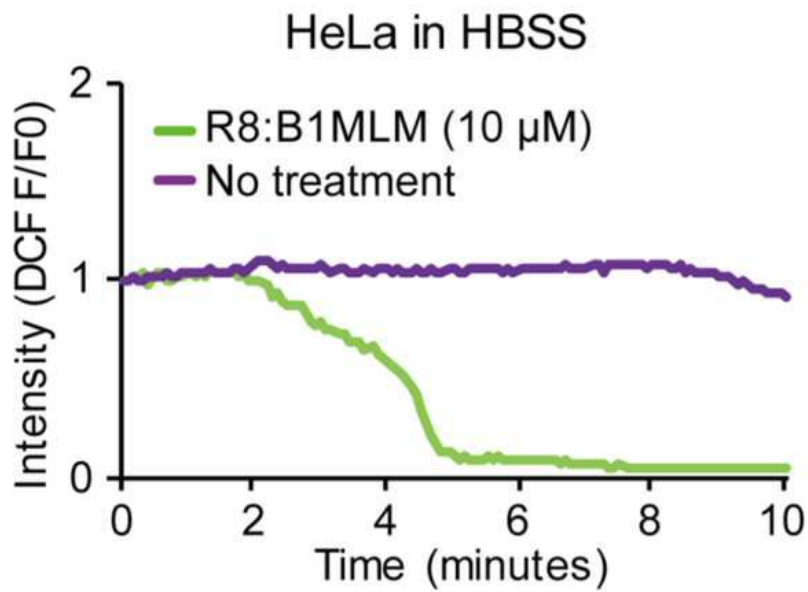
도면12



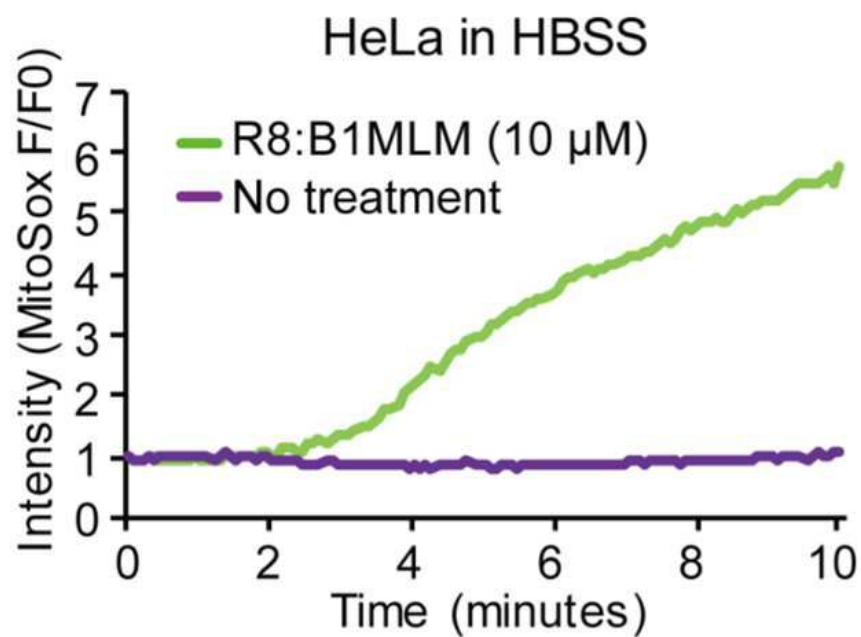
도면13



도면14



도면15



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> Cell death induction peptide by B1MLM
- <130> PN170271
- <160> 43
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B1MLM

<400> 1

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(De19A)

<400> 2

Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ala Leu Phe

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(De19B)

<400> 3

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ala

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(2DA)

<400> 4

Lys Ala Ala Ile Phe Leu Ala Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> R8:ETD(4DA)

<400> 5

Lys Leu Leu Ala Ala Leu Ala Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(6DA)

<400> 6

Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(7DA)

<400> 7

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ala Gly Leu Phe

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(9DA)

<400> 8

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(DeII)

<400> 9

Lys Leu Leu Phe Leu Ala Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(DeIF)

<400>

10

Lys Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(1SA)

<400> 11

Ala Leu Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(2SA)

<400> 12

Lys Ala Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210>

> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(3SA)

<400> 13

Lys Leu Ala Ile Phe Leu Ala Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(4SA)

<400> 14

Lys Leu Leu Ala Phe Leu Ala Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(5SA)

<400> 15

Lys Leu Leu Ile Ala Leu Ala Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(6SA)

<400> 16

Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(7SA)

<400> 17

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(8SA)

<400> 18

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ala Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(9SA)

<400> 19

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Leu Gly Leu Phe

1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(10SA)

<400> 20

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ala Ala Phe

1 5 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R8:ETD(11SA)

<400> 21

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 8-Arginine
 <400> 22
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 23

<211

> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat

<400> 23

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln

1 5 10

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antp

<400> 24

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8-Lysine

<400> 25

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5

<210> 26

<211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MPG
 <400> 26
 Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
 1 5 10 15
 Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20 25

<210> 27
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ARF
 <400> 27

Met Val Arg Arg Phe Leu Val Thr Leu Arg Ile Arg Arg Ala Cys Gly
 1 5 10 15
 Pro Pro Arg Val Arg Val
 20
 <210> 28
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BPrPp
 <400> 28

Met Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Trp Ile Leu Val Leu Phe Val Ala
 1 5 10 15
 Met Trp Ser Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro
 20 25
 <210> 29
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VP22

<400> 29

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr

1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Val

20 25 30

Asp

<210> 30

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VT5

<400> 30

Asp Pro Lys Gly Asp Pro Lys Gly Val Thr Val Thr Val Thr Val Thr

1 5 10 15

Val Thr Gly Lys Gly Asp Pro Lys Pro Asp

20 25

<210> 31

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MAP

<400> 31

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ala

<210> 32

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Transportan

<400> 32

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu

1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu

20 25

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SG3

<400> 33

Arg Leu Ser Gly Met Asn Glu Val Leu Ser Phe Arg Trp Leu

1 5 10

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pep-7

<400> 34

Ser Asp Leu Trp Glu Met Met Met Val Ser Leu Ala Cys Gln Tyr

1 5 10 15

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF

<400> 35

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro

1 5 10 15

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pVEC

<400> 36

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His

1 5 10 15

Ser Lys

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NLS-1

<400> 37

Val Gln Arg Lys Arg Gln Lys Leu Met Pro

1 5 10

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NLS-2

<400> 38

Ser Lys Lys Lys Lys Thr Lys Val

1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NLS-3

<400> 39

Gly Arg Lys Arg Lys Lys Arg Thr

1 5

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NLS-4

<400> 40

Gly Lys Lys Lys Lys Arg Lys Arg Glu Lys Leu

1 5 10

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NLS-5

<400> 41

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NLS-6

<400> 42

Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NLS-7

<400> 43

Phe Lys Lys Phe Arg Lys Phe

1 5