

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 7월 1일 (01.07.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/074541 A2

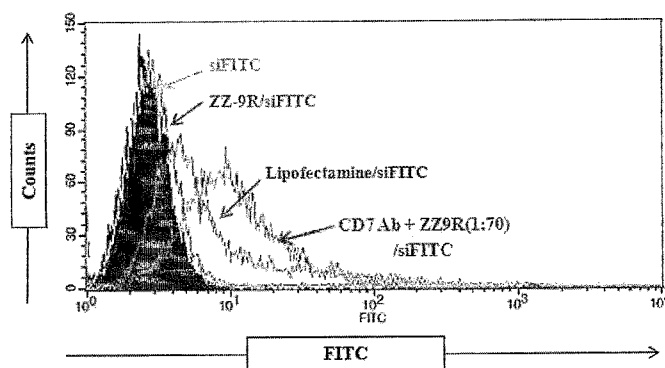
- (51) 국제특허분류: A61K 47/48 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/007806
- (22) 국제출원일: 2009년 12월 24일 (24.12.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2008-0134141 2008년 12월 26일 (26.12.2008) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한양대학교 산학협력단 (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) [KR/KR]; 서울특별시 성동구 행당동 17 한양대학교 내, 133-791 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 이상경 (LEE, Sang-Kyung) [KR/KR]; 서울특별시 송파구 잠실 7동 아시안수송아파트 7동 807호, 138-797 Seoul (KR). 김나현 (KIM, Na-Hyeon) [KR/KR]; 경기도 시흥시 신천동 태청빌라 11동 201호, 429-020 Gyeonggi-do (KR). 쿠마프리티 (KUMAR, Priti) [US/US]; 코네티컷주 햄덴타운 워크 디알. 23111, 06518 Connecticut (US).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun) 등; 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, 151-832 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: DRUG DELIVERY CARRIER USING ZZ DOMAIN

(54) 발명의 명칭 : ZZ 도메인을 이용한 약물전달체

도 10



(57) Abstract: The present invention relates to a drug delivery carrier comprising: (a) a ZZ domain; and (b) a targeting moiety which comprises the Fc site of an antibody and which binds to the ZZ domain for binding to a cell surface molecule. The drug delivery carrier can deliver drugs to a variety of cells by replacing only the targeting moiety, which can be achieved if the characteristics of a ZZ domain, which binds to the Fc site of an antibody (e.g. IgG), are employed to bind the ZZ domain to the targeting moiety (e.g. an antibody) which binds to a target cell surface substance (e.g. a receptor), and to thereby deliver the targeting moiety. Depending on the cargo to be transported, the drug delivery carrier of the present invention can be used in treatment of disease or illness, detection of specific cells, diagnosis of diseases (e.g. cancer), tracking of specific cells, and in-vivo imaging.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 (a) ZZ 도메인; 및 (b) 항체의 Fc 부위를 포함하며 세포의 표면 분자(cell surface molecule)에 결합하는 상기 ZZ 도메인에 결합된 타겟팅 모이어티(targeting moiety)를 포함하는 약물전달체에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 항체(예컨대, IgG)의 Fc 부위에 결합하는 ZZ 도메인의 특징을 이용하여 표적하는 세포 표면물질(예컨대, 수용체)과 결합하는 타겟팅 모이어티(예컨대, 항체)를 ZZ 도메인과 결합시켜 전달하면 타겟팅 모이어티만 교체함으로써 다양한 세포로 약물을 전달할 수 있다. 본 발명의 약물전달체는 운반대상의 카고에 따라, 질병 또는 질환의 치료, 특정 세포의 검출, 질병(예컨대, 암)의 진단, 특정 세포의 위치 추적 및 인 비보 이미징 등에 이용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

ZZ 도메인을 이용한 약물전달체

5 【기술 분야】

본 발명은 ZZ 도메인을 이용한 약물전달체에 관한 것이다.

【배경 기술】

ZZ 단백질은 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 단백질 A 에서
 10 얻어진 것으로, 이는 숙주세포 내에 존재하는 항체에 대한 방어 작용에
 사용되는 단백질이다. ZZ 단백질은 숙주세포 내 항체의 Fc 부위와
 결합하여 마크로파아지(macrophage)에 의한 식균작용이 일어나지 못하게
 하는 자기방어기작으로 사용된다. 단백질 A 에서 항체와 결합하는
 부위만을 조작하여 만든 탠덤 리피트 다이머를 ZZ 도메인이라고
 15 한다(Nilsson et al, *J.Mol. Recognit.* 9:585(1996)).

Y. Zhao et al. *Vaccine* 23:5082-5090(2005)은 ZZ-융합 단백질의
 발현과 IgG 와 결합하는 특징을 이용한 멀티-항원 면역화를 개시하고 있으며,
 ZZ-융합 항원/QuilA 혼합물이 새로운 백신 후보물질로서 이용되어질 수
 있음을 제시하고 있다. Y. Mazor et al. *Journal of Immunological*
 20 *Methods* 321:41-59(2007)은 특이적으로 타겟팅 하는 세포내로 약물을
 전달하여 세포를 죽일 수 있는 IgG 결합 독소 융합 단백질을 제조하고,
 항체의 세포내 유입을 확인하였고, 유방암 세포주를 사용하여 특이적
 세포독성을 확인하였다.

한편, 유전자 사일런싱을 유도하는 siRNA 를 세포 내로 운반하여
 25 다양한 질환을 치료하려는 시도가 있다.

본 발명자는 Kumar P. et al., *Nature*, 448:39-43(2007)에서 RVG-
 9R 과 siRNA 를 결합시켜 BBB(brain blood barrier)를 통과하여 뇌 내로
 siRNA 를 전달하는 전달체를 제시한 바 있다. 이 실험 결과에 따르면,
 RVG 가 아세틸콜린 수용체에 결합하여 뇌까지 전달되고, 9R 에 siRNA 가
 30 결합하여 뇌 내로 siRNA 를 전달할 수 있었다.

또한, 본 발명자는 Kumar P. et al., *Cell* 134:1-10(2008)에서 T 세포의 CD 7 수용체에 결합하는 scFv CD7 항체를 제조하고 이 scFv CD7 에 9R 를 컨주게이션 하여 T 세포 특이적으로 siRNA 를 운반하는 데 성공하였고, HIV 에 감염된 인간화 마우스에 scFv CD7-9R/siRNA 를 처리할 경우 정상으로 회복되는 효과를 확인하였다.

그러나 종래기술에 따르면 표적하는 세포로 단백질, siRNA 혹은 약물을 전달하기 위하여 리포솜에 표적세포와 특이적으로 결합하는 물질을 결합시켜야 하는데, 표적세포와 특이적으로 결합하는 리간드를 찾기 어렵고, 리포솜의 경우 세포독성 (cytotoxicity)를 나타내는 문제점이 있다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 상세한 설명】

본 발명자들은 특정 세포에 카고(cargo)를 타겟팅 함에 있어서, 특이성 있으면서도 간단한 조작만으로도 다양한 세포들에 적용될 수 있는 기술을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 항체의 Fc 부위에 결합하는 특성을 갖는 ZZ 도메인에 특정 세포에 타겟팅 할 수 있는 타겟팅 부위(예컨대, 항체)를 결합시켜 약물전달체를 제조하면 운반하고자 하는 카고를 다양한 세포에 특이적으로 운반할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은 약물전달체를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 카고(cargo)를 세포에 타겟팅 또는 운반하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) ZZ 도메인; 및 (b) 항체의 Fc 부위를 포함하며 세포의 표면 분자(cell surface molecule)에 결합하는 상기 ZZ 도메인에 결합된 타겟팅 모이어티(targeting moiety)를 포함하는 약물전달체를 제공한다.

- 5 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 운반 대상의 카고가 결합되어 있는 본 발명의 약물전달체를 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 카고를 세포에 운반하는 방법을 제공한다.

10 본 발명자들은 특정 세포에 카고(cargo)를 타겟팅 함에 있어서, 특이성 있으면서도 간단한 조작만으로도 다양한 세포들에 적용될 수 있는 기술을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 항체의 Fc 부위에 결합하는 특성을 갖는 ZZ 도메인에 특정 세포에 타겟팅 할 수 있는 타겟팅 부위(예컨대, 항체)를 결합시켜 약물전달체를 제조하면 운반하고자 하는 카고를 다양한 세포에 특이적으로 운반할 수 있음을 확인하였다.

- 15 본 발명의 약물전달체는 (a) ZZ 도메인; 및 (b) 항체의 Fc 부위를 포함하며 세포의 표면 분자(cell surface molecule)에 결합하는 상기 ZZ 도메인에 결합된 타겟팅 모이어티(targeting moiety)를 포함한다.

본 발명에 이용되는 ZZ 도메인은 항체의 Fc 부위와 결합하는 특성을 가지며 이러한 특성이 본 발명에서 이용된다.

- 20 본 명세서에서 용어 “ZZ 도메인”은 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열에서 아미노산 38-153 잔기의 서열을 전부 포함하거나 또는 Fc 부위와 결합하는 특성을 갖는 범위 내에서 제 1 서열의 일부 서열을 포함하는 펩타이드를 의미한다. ZZ 도메인은 단백질 A 에서 항체의 Fc 부위와 결합하는 부위만을 조작하여 만든 탠덤 리피트 다이머로서 일반적으로 알려져 있다. 따라서 항체의 Fc 부위와 결합하는 범위 내에서 모노머 형태의 펩타이드도 본 발명에 포함된다. 예컨대, 서열목록 제 1 서열에서 아미노산 38-95 잔기의 펩타이드가 모노머에 해당되며, 이는 본 발명의 범위에 포함된다.

- 30 본 발명의 약물전달체는 다른 필수 구성 부분으로서 타겟팅 모이어티(targeting moiety)를 포함한다. 타겟팅 모이어티는 반드시 항체의 Fc 부위를 포함하며, 이 Fc 부위를 통하여 ZZ 도메인과 비공유결합

하게 된다. 이러한 특성은 본 발명의 약물전달체를 제조하는 것을 매우 간편하게 만든다. 예를 들어, Fc 부위를 포함하는 타겟팅 모이어티와 ZZ 도메인을 간단하게 혼합하여 적합한 시간 동안 인큐베이션 하면 본 발명의 약물전달체가 제조된다.

5 본 명세서에서 용어 “Fc 부위”는 항체의 테일 부위로서 Fc 수용체로 불리는 세포 표면 수용체와 상호작용하는 항체의 일 부위를 의미한다. 일반적으로, 파파인으로 전장 항체를 절단하면 Fab 부위와 Fc 부위 두 부위를 얻게 된다. 하나의 클래스에서 모든 항체의 Fc 부위는 거의 동일한 특성이 있다.

10 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, Fc 부위는 IgG 의 Fc 부위를 의미한다.

한편, ZZ 도메인과 결합하는 특성을 갖는 범위 내에서는 Fc 부위는 통상적인 Fc 부위의 일부 서열일수도 있다.

15 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 타겟팅 모이어티는 항체의 Fc 부위를 포함하는 항체, 앵타머, 폴리펩타이드, 펩타이드, 리간드, 렉틴, 당, 지질, 당지질 또는 핵산이며, 보다 바람직하게는, 항체의 Fc 부위를 포함하는 항체, 앵타머 또는 리간드이며, 가장 바람직하게는 항체이다.

타겟팅 모이어티가 Fc 부위를 포함하는 항체인 경우에는, 타겟팅 모이어티로서 전장 항체가 이용될 수 있다. 전장 항체는 폴리클론 또는
20 단일클론 항체를 포함한다. 세포의 특정 표면 분자에 결합하는 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제 4,816,56 호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol.*
25 *Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*,
30 Wiley/Greene, NY, 1991 에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는

하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 항원으로서의 세포 표면 분자를 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

본 발명에 따르면, 타겟팅 모이어티로서 항체의 Fc 부위를 포함하는 앵타머가 이용될 수 있다. 상기 앵타머는 RNA 앵타머 및 펩타이드 앵타머를 포함하며, 바람직하게는 펩타이드 앵타머이다. 항체의 Fc 부위를 포함하는 앵타머에서 Fc 부위는 ZZ 도메인과 결합하는 부위이고 앵타머 부위가 세포의 표면 분자에 결합하는 부위이다.

다른 구현예에 따르면, 타겟팅 모이어티로서 항체의 Fc 부위를 포함하는 리간드가 이용될 수 있다. 리간드는 세포 표면의 수용체에 결합한다.

이외에도, 본 발명은 타겟팅 모이어티로서 항체의 Fc 부위를 포함하는 폴리펩타이드, 펩타이드, 렉틴, 당, 지질, 당지질 또는 핵산(DNA 또는 RNA)을 이용할 수 있다.

하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, 타겟팅 모이어티가 CD7 에 특이적으로 결합하는 항체인 경우, 본 발명의 약물전달체는 T 세포에 약물을 특이적으로 운반하며, 타겟팅 모이어티가 CD20 에 특이적으로 결합하는 항체인 경우, 본 발명의 약물전달체는 B 세포에 약물을 특이적으로 운반한다. 이러한 실시예 결과는, 본 발명의 약물전달체에서 타겟팅 모이어티를 목적에 따라 변화시키면 원하는 세포에 특이적으로 약물을 전달할 수 있음을 보여준다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, ZZ 도메인은 핵산이 결합될 수 있는 핵산 결합 도메인(nucleic acid binding domain)이 추가적으로 결합되어 있다.

본 발명의 약물전달체는 다양한 목적으로 이용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약물전달체는 핵산의 운반에 이용되며, 보다 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 RNA 간섭(interference) 유도 물질, 보다 더 바람직하게는 RNA 간섭 유도 물질의 운반에 이용된다.

RNA 간섭 유도물질은 siRNA(small interfering RNA), stRNA(short-temporal RNA), shRNA(short-hairpin) RNA 및 miRNA(microRNA)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

5 이와 같이, 본 발명의 약물전단체가 핵산 분자의 운반에 이용되는 경우, 핵산을 안정되게 운반하기 위하여 핵산 결합 도메인을 포함할 수 있다.

핵산 결합 도메인은 ZZ 도메인에 공유 또는 비공유 결합될 수 있으며, 바람직하게는 공유결합 된다. 공유결합 되는 경우, 핵산 결합 도메인은 ZZ 도메인에 직접 또는 간접적(예컨대, 링커를 통하여)으로 결합될 수 있다.
10 예컨대, ZZ 도메인에 있는 Cys 잔기와 핵산 결합 도메인의 Cys 잔기 사이의 이황화 결합을 유도하여 핵산 결합 도메인과 ZZ 도메인을 공유 결합시킬 수 있다. 핵산 결합 도메인은 ZZ 도메인의 N-말단 또는 C-말단에 결합시킬 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 이용되는 핵산 결합
15 도메인은 GCN4, Fos, Jun, TFIIS, FMRI, 이스트 단백질 HX, 비길린(Vigillin), Mer1, 박테리아 폴리뉴클레오타이드 포스포릴라아제, 라이보솜 단백질 S3, 열쇼크 단백질 또는 프로타민의 핵산 결합 도메인 또는 복수의 염기성 아미노산을 포함하는 펩타이드이며, 보다 바람직하게는 프로타민의 핵산 결합 도메인 또는 복수의 염기성 아미노산을 포함하는
20 펩타이드이고, 가장 바람직하게는 복수의 염기성 아미노산을 포함하는 펩타이드이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 이용되는 핵산 결합 도메인은 헬릭스-턴-헬릭스 모티프(Brennan R, Matthews B (1989). *J. Biol. Chem.* 264 (4):1903-6), 징크 핑거 모티프(McDowall J. "Protein of the
25 Month: Zinc Fingers". *European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)*. 2008-01-13), 루이신 지퍼 모티프(Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. (1988) *Science* 240:1759-1764), 윈드 헬릭스(winged helix) 모티프, 윈드 헬릭스 턴 헬릭스 모티프(Sharrocks AD et al. (1997). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*
30 29(12): 1371-87) 또는 헬릭스-루프-헬릭스 모티프(Lawrence Zipursky et

al., *Molecular Cell Biology & McGill Activation Code*. San Francisco: W. H. Freeman)이다.

5 핵산 결합 도메인으로서 복수의 염기성 아미노산을 포함하는 펩타이드가 이용되는 경우, 바람직하게는 복수의 Arg 잔기, 보다 바람직하게는 2-100 개의 Arg 잔기, 보다 더 바람직하게는 5-50 개의 Arg 잔기, 보다 더욱 더 바람직하게는 6-20 개의 Arg 잔기, 가장 바람직하게는 7-15 개의 Arg 잔기를 포함하는 펩타이드가 이용된다.

10 본 발명의 약물전달체는 다양한 세포의 표면 분자와 결합한다. 바람직하게는, 본 발명의 약물전달체는 박테리아 세포, 진균 세포, 이스트 세포, 단일세포성 기생균 세포, 다세포성 기생균 세포 또는 동물 세포, 보다 바람직하게는 동물 세포, 가장 바람직하게는 인간 세포의 표면 분자와 결합한다.

15 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 세포 표면 분자는 T 세포의 CD 수용체(예컨대, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2-CD244 수용체) 또는 암세포 특이적 표면 단백질(예컨대, Her2/neu 수용체)이다. 본 발명의 약물전달체가 CD 수용체, 예컨대 CD7 에 결합하면 엔도사이토시스를 통해 세포내로 들어간다(internalization).

 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약물전달체는 운반 대상의 카고(cargo)가 추가적으로 결합되어 있다.

20 본 발명의 약물전달체에 결합될 수 있는 물질은 다양하며, 예컨대, 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 뉴클레오타이드 서열(핵산 분자), 화학 물질 (약물) 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

25 본 발명에서 상기 카고(cargo)가 될 수 있는 작은 분자는 예를 들어, 약물, 조영제(예컨대, T1 조영제, 초상자성 물질과 같은 T2 조영제, 방사성 동위 원소 등), 형광 마커, 염색 물질 등이 될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

30 운반 대상의 폴리펩타이드는 둘 또는 그 이상의 잔기로 구성되는 아미노산의 중합체로 펩타이드 및 단백질을 포함한다. 본 발명의 약물전달체에 의해 운반되는 단백질 또는 펩타이드는 세포 불멸에 관여하는 단백질(예컨대, SV40 라지 T 항원 및 텔로머라아제), 항-아포토틱 단백질(예컨대, 돌연변이 p53 및 BclxL), 항체, 암유전자(예컨대, ras, myc,

HPV E6/E7 및 아데노바이러스 E1a), 세포 주기 조절 단백질(예컨대, 사이클린 및 사이클린 의존성 인산화효소) 또는 효소(예컨대, 녹색 형광 단백질, 베타-갈락토시다아제 및 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제), 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소저해제, 신호전달단백질 또는 그 일부분, 항체 또는 그 일부분, 단쇄항체, 결합단백질 또는 그 결합도메인, 항원, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인, 전사조절 인자, 혈액 응고 인자 및 백신 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 보다 상세하게는, 본 발명의 약물전달체에 의해 운반되는 단백질 또는 펩타이드는 인슐린, IGF-1(insulin-like growth factor 1), 성장호르몬, 에리트로포이에틴, G-CSFs (granulocyte-colony stimulating factors), GM-CSFs (granulocyte/macrophage-colony stimulating factors), 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 인터루킨-1 알파 및 베타, 인터루킨-3, 인터루킨-4, 인터루킨-6, 인터루킨-2, EGFs (epidermal growth factors), 칼시토닌(calcitonin), ACTH (adrenocorticotrophic hormone), TNF (tumor necrosis factor), 아토비스반(atobisban), 부세레린(buserelin), 세트로렉릭스(cetrorelix), 테스로레린(deslorelin), 데스모프레신(desmopressin), 디노르핀 A (dynorphin A) (1-13), 엘카토닌(elcatonin), 엘레이도신(eleidosin), 엡티피바타이드(eptifibatide), GHRH-II(growth hormone releasing hormone-II), 고나도레린(gonadorelin), 고세레린(goserelin), 히스트레린(histrelin), 류프로레린(leuprorelin), 라이프레신(lypressin), 옥트레오타이드(octreotide), 옥시토신(oxytocin), 피트레신(pitressin), 세크레틴(secretin), 신칼라이드(sincalide), 테르리프레신(terlipressin), 티모펜틴(thymopentin), 티모신(thymosine) α1, 트리프트레린(triptorelin), 바이발리루딘(bivalirudin), 카르베토신(carbetocin), 사이클로스포린, 엑세딘(exedine), 란레오타이드(lanreotide), LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone), 나파레린(nafarelin), 부갑상선 호르몬, 프람린타이드(pramlintide), T-20 (enfuvirtide), 타이말파신(thymalfasin) 및 지코노타이드를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

또한, 본 발명에서 운반 대상의 핵산은 예컨대, RNA, DNA 또는 cDNA 가 될 수 있으며, 핵산의 서열은 암호화 부위 서열 또는 비암호화 부위 서열(예컨대, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA)이 될 수 있다. 핵산 카고로서의 뉴클레오타이드는 표준 뉴클레오타이드(예컨대, 아데노신, 시토신, 구아닌, 티민, 이노신 및 우라실) 또는 아날로그(예컨대, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드)일 수 있다. 예를 들어, 핵산 카고는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드로 구성된 안티센스 서열 또는 siRNA 일 수 있다.

본 명세서에서 용어 "siRNA" 란 특정 mRNA 의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA 를 의미한다. 표적유전자의 mRNA 와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA 는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자

억제 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다. siRNA 는 RNA 끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 mismatches(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(bulge)(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 표적유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA 는 표적유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA 와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA 분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA 의 일방의 말단 부위가 링커 RNA 에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 운반 대상의 카고는 화학물질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 핵산, 탄수화물 또는 지질이고, 보다 바람직하게는 화학물질, 펩타이드 또는 폴리펩타이드이다.

본 발명의 약물전달체가 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 운반하는 경우에는, 바람직하게는 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 본 발명의 약물전달체와 공유결합 되어 운반된다. 상기 공유결합은 펩타이드 또는 폴리펩타이드와 ZZ 도메인 사이에 형성되는 것이 바람직하다. 본 발명의 약물전달체와 카고로서의 펩타이드 또는 폴리펩타이드 사이의 공유결합은 융합된 형태로 발현시킴으로써 얻을 수 있다.

본 발명의 약물전달체가 핵산분자, 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA, 보다 바람직하게는 siRNA 를 운반하는 경우 본 발명의 약물전달체는, 바람직하게는 ZZ 도메인; Fc 부위를 포함하며 세포의 표면 분자에 결합하고 상기 ZZ 도메인에 결합된 항체; 및 상기 ZZ 도메인에 결합된 복수의 염기성 아미노산을 포함하는 펩타이드를 포함한다.

본 발명에 따르면, 표적하는 세포의 표면물질(예컨대, 수용체)을 알고, 그 표면물질에 결합하는 항체를 가지고 있다면, 표적하는 세포로 약물, 조영제, 형광 마커, 염색 물질 등을 전달할 수 있다. 항체(예컨대, IgG)의 Fc 부위에 결합하는 ZZ 도메인의 특징을 이용하여 표적하는 세포 표면물질(예컨대, 수용체)과 결합하는 타겟팅 모이어티(예컨대, 항체)를 ZZ 도메인과 결합시켜 전달하면 타겟팅 모이어티만 교체함으로써 다양한 세포로 약물을 전달할 수 있다.

본 발명의 약물전달체는 운반대상의 카고에 따라, 질병 또는 질환의 치료, 특정 세포의 검출, 질병(예컨대, 암)의 진단, 특정 세포의 위치 추적 및 인 vivo 이미징 등에 이용될 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기 본 발명의 약물 전달체; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 체제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트,

젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 등으로 투여할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1 일 투여량은 0.001-100 mg/kg이다.

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(i) 본 발명은 새로운 개념의 약물전달체를 제공한다.

(ii) 본 발명에 따르면 항체의 Fc 부위에 결합하는 특성을 갖는 ZZ 도메인에 특정 세포에 타겟팅 할 수 있는 타겟팅 부위(예컨대, 항체)를 결합시켜 약물전달체를 제조하여 운반하고자 하는 카고를 다양한 세포에 특이적으로 운반할 수 있다.

(iii) 항체(예컨대, IgG)의 Fc 부위에 결합하는 ZZ 도메인의 특징을 이용하여 표적하는 세포 표면물질(예컨대, 수용체)과 결합하는 타겟팅 모이어티(예컨대, 항체)를 ZZ 도메인과 결합시켜 전달하면 타겟팅 모이어티만 교체함으로써 다양한 세포로 약물을 전달할 수 있다.

5 (iv) 본 발명에 따르면, 다양한 세포를 표적할 수 있는 다양한 약물전달체를 간편하면서도 효율적으로 제공할 수 있다.

(v) 본 발명의 약물전달체는 운반대상의 카고에 따라, 질병 또는 질환의 치료, 특정 세포의 검출, 질병(예컨대, 암)의 진단, 특정 세포의 위치 추적 및 인 vivo 이미징 등에 이용될 수 있다.

10

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 실시예에서 이용되는 ZZ 도메인 발현 벡터의 개략적인 유전자 맵이다.

15 도 2a 는 *E. coli* BL21 세포에서 발현된 ZZcys, ZZ-HSP27 및 ZZ-GFP 의 SDS-PAGE 결과 사진이고, 도 2b 는 웨스턴 블롯 분석 사진이다.

도 3a 및 3b 는 실시예에서 발현 및 정제된 ZZ 도메인이 IgG 와 결합하는지 여부를 확인하기 위한 면역침강 분석 결과이다.

20 도 3a 에서, 레인 3 은 대조군으로서 ZZcys 단백질, 레인 5 와 7 은 IgG Sepharose 6 Fast Flow 처리된 시료이다. 레인 5 는 ZZ 단백질이 IgG Sepharose 6 Fast Flow 와 결합되어지고 난 후의 상층액으로서, 처리되어진 ZZ cys 단백질 시료가 모두 IgG Sepharose 6 Fast Flow 결합되어 밴드가 나타나지 않았다. 레인 7 은 IgG Sepharose 6 Fast Flow 으로부터 용출된 ZZ 단백질을 나타낸다. 레인 9 는 IgG Sepharose 6 Fast Flow bead 에 결합되어 있는 IgG 이다.

25 도 3b 에서, 레인 2 와 3 은 각각 대조군으로서 ZZcys 단백질과 IgG 항체이다. 레인 5 은 IgG Sepharose 6 Fast Flow 와 결합된 ZZ 단백질에 다른 IgG 항체를 혼합한 후 원심분리하여 얻은 상층액으로서, ZZ 단백질과 결합되지 않은 IgG 항체를 나타낸다. 레인 7 은 IgG Sepharose 6 Fast Flow 에서 얻어진 ZZ 단백질을 나타낸다. 레인 9 은 IgG Sepharose 6 Fast
30 Flow bead 에 존재하는 항체를 나타낸다.

도 4a-4b 는 항-CD7 항체가 결합된 ZZ-GFP 가 T 세포내로 전달되는 지 여부를 분석한 유세포 분석 결과이다. 도 4a 는 항-CD7 항체와 ZZ-GFP 를 다양한 몰비(molar ratio)로 결합시켜 T 세포내로의 단백질 전달 효율을 확인한 결과이다. 도 4b 에서, 패널 a 는 Jurkat 세포이고, 패널 b 는 항-CD7 항체 없이 ZZ-GFP 만을 처리한 Jurkat 세포이고, 패널 c 는 1:50 의 몰비로 항-CD7 항체와 결합한 ZZ-GFP 을 처리한 Jurkat 세포에 대한 FACS 결과이다.

도 5 는 항-CD7 항체와 결합한 ZZ-GFP 가 T 세포 표면에 존재하는 CD7 과 결합하여 세포내로 이동하는지를 규명한 유세포 분석 결과이다. a 패널은 CD7 에 대한 항체 없이 ZZ-GFP 단백질만을 처리한 jurkat 세포이고, b 패널은 항-CD7 항체와 ZZ-GFP 단백질을 처리한 jurkat 세포, c 패널은 패널 a 및 패널 b 의 FACS 데이터를 overlay 한 결과이다.

도 6 은 항-Her2/neu 항체가 결합된 ZZ-GFP 가 유방암 세포주로 운반됨을 보여 주는 FACS 데이터이다. 패널 a 는 GFP 양성 대조군으로 사용된 TAT-GFP 를 처리한 SKBR3 세포이고, 패널 b 는 항-Her/neu-PE 항체(BD)로 염색한 SKBR3 세포이고, 패널 c 는 항체가 결합되지 않은 ZZ-GFP 만을 처리한 SKBR3 세포이며, 패널 d 는 항 Her/neu-항체가 결합된 ZZ-GFP 를 처리한 SKBR3 세포의 FACS 결과이다. 패널 e 는 항 Her2/neu-항체가 결합된 ZZ-GFP(패널 d)와 항-Her/neu-항체가 결합되지 않은 ZZ-GFP(패널 c)의 FACS 데이터를 overlay 한 결과이다.

도 7a 는 항-CD7 항체가 결합된 ZZ-HSP27 의 세포사멸 억제 효과를 나타내는 그래프이다. TAT-HSP27 은 Cheau Yih Tan, et al., *Mol. Cells*, 31:533-538(2009)에 따라 제작된 TAT 펩타이드와 HSP27 의 융합단백질이다.

도 7b 는 항-CD7 항체가 결합된 ZZ-HSP27 및 항-CD7 항체가 결합되지 않은 ZZ-HSP27 의 세포사멸 억제 효과를 비교한 FACS 데이터이다.

도 8 은 본 발명의 약물전달체의 일 구현예인 ZZ-9R 의 모식도이다.

도 9 는 ZZ-9R 이 siRNA 결합정도를 확인하기 위한 gel retardation assay 결과이다.

도 10 은 항-CD7 항체와 결합된 ZZ-9R 에 의한 Jurkat 세포로의 siRNA 의 전달 결과를 보여주는 FACS 데이터이다.

도 11 은 ZZ-9R-운반된 siRNA 가 jurkat 세포에서 유전자 사일런싱을 초래함을 보여주는 FACS(fluorescent activated cell sorter) 데이터이다. 패널 a-g 는 각각 a 패널은 Jurkat 세포(음성대조군), b 패널은 PE 양성 대조군인 항-CD7 PE 로 염색한 jurkat 세포, c 패널은 FITC 양성 대조군인 항-CD4 FITC 로 염색한 jurkat 세포, d 패널은 PE 양성 대조군인 항-CD7 PE 와 FITC 양성 대조군인 항-CD4 FITC 로 염색한 jurkat 세포, e 패널은 siCD4 를 처리한 jurakt 세포, f 패널은 ZZ-9R 과 siCD4 를 혼합하여 처리한 jurkat 세포, g 패널은 항-CD7 PE 와 결합한 ZZ-9R 을 siCD4 와 혼합하여 처리한 jurakt 세포이다.

도 12 는 ZZ-9R-운반된 siRNA 가 인간 PBMC(Peripheral Blood Mononuclear Cell)에서 유전자 사일런싱을 초래함을 보여주는 FACS 데이터이다. 패널 a-g 는 각각 a 패널은 PBMC(음성 대조군), b 패널은 PE 양성 대조군인 항-CD7 PE 로 염색한 PBMC, c 패널은 FITC 양성 대조군인 항-CD4 FITC 로 염색한 PBMC, d 패널은 siCD4 를 처리한 PBMC, e 패널은 ZZ-9R 과 siCD4 를 혼합하여 처리한 PBMC, f 패널은 항-CD7 PE 와 결합한 ZZ-9R 을 siCD4 와 혼합하여 처리한 PBMC, g 패널은 scFv CD7 으로 처리한 후, 항-CD7 PE 와 결합한 ZZ-9R 을 siCD4 와 혼합하여 처리한 PBMC 이다.

도 13 는 T 세포 특이적 항체인 항-CD7 항체가 결합된 ZZ-9R/siFITC 가 T 세포 특이적을 siRNA 전달를 전달하는지를 확인한 결과이다. Control#1 와 Control#2 는 특이적 항체와의 결합 없이 ZZ-9R/siFITC 만을 주입한 인간화된 쥐(Hu-HSC)에 있는 사람의 세포, CD7 은 항-CD7 항체가 결합된 ZZ-9R/siFITC(CD7mAb/ZZ-9dR/siFITC, CD7 은 T 세포 마커)를 주입한 인간화된 쥐에 있는 사람의 세포, CD20#1 와 CD20#2 는 항-CD20 항체가 결합된 ZZ-9R/siFITC(CD20mAb/ZZ-9dR/siFITC, CD20 은 B 세포 마커)를 주입한 인간화된 쥐에 있는 사람의 세포를 분석한 FACS 결과이다.

도 14 는 T 세포 특이적 항체인 항-CD20 항체가 결합된 ZZ-9R/siFIT 가 T 세포 특이적을 siRNA 전달를 전달하는지를 확인한 결과이다. Control#1 과 Control#2 은 특이적 항체와의 결합 없이 ZZ-9R/siFITC 만을 주입한 인간화된 쥐(Hu-HSC)에 있는 사람의 세포, CD7 은 항-CD7 항체가 결합된 ZZ-9R/siFITC(CD7mAb/ZZ-9dR/siFITC, CD7 은 T 세포 마커)를 주입한 인간화된 쥐에 있는 사람의 세포, CD20#1 와 CD20#2 는 항-CD20 항체가

결합된 ZZ-9R/siFITC(CD20mAb/ZZ-9dR/siFITC, CD20 은 B 세포 마커를 주입한 인간화된 쥐에 있는 사람의 세포를 분석한 FACS 결과이다.

【실시에】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시에

실시에 1: ZZ 단백질-코딩 서열의 클로닝

ZZ 단백질을 정제하기 위해 사용된 플라스미드는 도 1에 나타나 있다.

우선, pRSET(ZZcys)를 구축하기 위하여, pEZZ-18 플라스미드(Amersham-Pharmacia)에서 ZZ 코딩 서열을 PCR 증폭하였다. 사용된 프라이머의 서열은 다음과 같다: 5'-GGATCGCCGTAGACAACAAATTC AAC-3'(정방향 프라이머); 및 5'-CGAGCTCGGATCCGCGT CTACTTT-3'(역방향 프라이머). 이어, PCR 증폭 산물을 *Bam*HI 으로 절단된 pRSET 벡터(Invitrogen, pRSET-A)에 연결하여 pRSET(ZZcys)를 얻었다. 한편, 상기 PCR 증폭 산물을 *Bam*HI 으로 절단된 pRSET 벡터(Invitrogen, pRSET-A)에 연결하여 pRSET(ZZ-GFP)를 얻었다. 상기 PCR 증폭 산물을 *Bam*HI 과 *Xho*I 으로 절단한 pRSET 벡터(Invitrogen, pRSET-A)에 연결하여 pRSET(ZZ-HSP27)를 얻었다. 최종적으로 클로닝된 플라스미드에 대하여 시퀀싱을 통하여 제대로 클로닝 되었는지 여부를 확인하였다. 실시예에서 이용된 ZZ 단백질의 아미노산 서열은 서열목록 제 1 서열에 기재되어 있다.

실시에 2: 융합 단백질의 발현과 정제

E. coli BL21 세포에 상기 실시예 1에서 구축된 ZZ 단백질 발현 플라스미드를 넣고, 42°C에서 90 초간 열처리하여 형질전환 시켰다. 이어, 앰피실린이 포함된 LB 액상 배지에 형질전환된 BL21 을 접종한 후, 37°C에서 배양하였고, OD_{600nm} 의 값이 0.6-0.8 이 될 때 IPTG((isopropyl β-D-

thiogalactopyranoside)를 넣고, 26℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 그런 다음, 배양액을 4000 x g 에서 10 분간 원심분리하여 얻은 박테리아 펠릿에 라이시스 완충액(300 mM KCl, 50 mM KH₂PO₄)을 넣고 초음파파쇄 하였다. 파쇄액을 25000 x g 에서 원심분리하여 상층액을 분리하고, FPLC(BioLogic Duoflow™ Chromatography system. Bio-RAD)를 사용하여 단백질을 정제하였다.

정제된 단백질을 PBS(pH 7.4)에서 투석하여 사용하였고, SDS-PAGE 를 통해 정제된 단백질의 크기를 확인하였으며, BCA 키트(BCA™ Protein Assay kit, PIERCE)를 이용하여 농도를 측정하였다. 도 2a 에서 볼 수 있듯이, SDS-PAGE 를 통해 확인된 단백질의 크기는 각각 ZZcys 는 약 15.7 kDa, ZZ-HSP27 은 42.7 kDa 및 ZZ-GFP 는 45 kDa 임을 확인할 수 있었다. 또한 HRP conjugated anti 6x His tag antibody (Santa Cruz Biotechnology)를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 통해 정제된 각각의 단백질을 확인하였다(도 2b).

실시예 3: 면역침강 분석

정제하여 얻어진 ZZ 단백질이 IgG 와 결합하는지 확인하기 위해, IgG Sepharose 6 Fast Flow(GE Healthcare)을 사용하였다. ZZ 단백질을 IgG Sepharose 6 Fast Flow 와 혼합한 다음 4℃에서 2 시간 동안 셰이킹 인큐베이션 하였다. 상기 혼합물을 5000 x g, 1 분간 원심분리하여 상층액을 수집하고(시료 1), 가라앉은 펠릿은 PBS 를 넣고 10 분간 인큐베이션 한 후, 5000xg, 1 분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. IgG Sepharose 6 Fast Flow 와 혼합되어 가라앉은 펠릿은 0.2 M 아세트산과 혼합한 다음, 5000 x g, 1 분간 원심분리하여 상층액을 수집하였다(시료 2). ZZ cys 단백질 분리 후 남은 IgG Sepharose 6 Fast Flow bead 는 SDS loading buffer 를 넣고 94℃에서 15 분간 가열한 후 13000 rpm, 10 min 간 원심분리하여 상층액을 수집하였다(시료 3). 시료 2 에는 1 M NaOH 을 넣어 중성의 pH 를 유지할 수 있도록 하였다. 수집한 각각의 시료는 SDS-PAGE 하였다(도 3).

도 3a 의 레인 3 은 대조군으로서 ZZcys 단백질이다. 레인 5 와 7 은 IgG Sepharose 6 Fast Flow 처리된 시료이다. 레인 5 는 ZZ 단백질이 IgG

Sepharose 6 Fast Flow 와 결합되어지고 난 후의 상층액으로서, 처리되어진 ZZ cys 단백질 시료가 모두 IgG Sepharose 6 Fast Flow 결합되어 밴드가 나타나지 않았다. 레인 7 은 IgG Sepharose 6 Fast Flow 으로부터 용출된 ZZ 단백질을 나타낸다. 레인 9 는 IgG Sepharose 6 Fast Flow bead 에 결합되어 있는 IgG 이다.

한편, ZZ 단백질을 IgG Sepharose 6 Fast Flow 와 혼합한 다음 4℃에서 2 시간 동안 웨이킹 인큐베이션하여 IgG Sepharose 6 Fast Flow 와 결합시켰다. 상기 혼합물은 5000xg, 1 분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, PBS 와 혼합한 후 10 분간 웨이킹 인큐베이션하였다. 그 후, 다시 5000xg, 1 분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 다른 항체를 PBS 와 섞어 4℃에서 1 시간 동안 웨이킹 인큐베이션하였다. 상기 혼합물을 5000 xg, 1 분간 원심분리하여 상층액을 수집하고(시료 1), 가라앉은 펠릿에 PBS 를 넣고 10 분간 인큐베이션 한 후, 5000xg, 1 분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. IgG Sepharose 6 Fast Flow 와 혼합되어 가라앉은 펠릿은 0.2 M 아세트산과 혼합한 다음, 5000 x g, 1 분간 원심분리하여 상층액을 수집하였다(시료 2). ZZ cys 단백질 분리 후 남은 IgG Sepharose 6 Fast Flow bead 는 SDS loading buffer 를 넣고 94℃에서 15 분간 가열한 후 13000rpm, 10min 간 원심분리하여 상층액을 수집하였다(시료 3). 시료 2 에는 1M NaOH 을 넣어 중성의 pH 를 유지할 수 있도록 하였다. 수집한 각각의 시료는 SDS-PAGE 하였다(도 3b).

도 3b 의 레인 2 와 3 은 각각 대조군으로서 ZZcys 단백질과 IgG 항체이다. 레인 5 은 IgG Sepharose 6 Fast Flow 와 결합된 ZZ 단백질에 다른 IgG 항체를 혼합한 후 원심분리하여 얻은 상층액으로서, ZZ 단백질과 결합되지 않은 IgG 항체를 나타낸다. 레인 7 은 IgG Sepharose 6 Fast Flow 에서 얻어진 ZZ 단백질을 나타낸다. 레인 9 은 IgG Sepharose 6 Fast Flow bead 에 존재하는 항체를 나타낸다.

상기 면역침강 분석에서, 본 발명에서 준비된 ZZ 단백질은 IgG Sepharose 6 Fast Flow 와는 결합한다는 것을 알 수 있고 이는 항체의 카파(κ) 경쇄와 특이적으로 결합하며, ZZ 단백질은 항체와 안정한 상태로 결합되어진다는 것을 확인하였다.

실시에 4: T 세포 특이적 유전자 전달

T 세포 표면에 존재하는 CD7 에 항-CD7 항체가 결합하게 되면 엔도사이토시스를 통해 세포내부로 이동된다. 이에, 본 발명자들은 항-CD7 항체와 ZZ-GFP 를 다양한 몰비(molar ratio)로 결합시켜 T 세포내로의 단백질 전달 효율을 확인하고, 항-CD7 항체와 결합된 ZZ-GFP 와 결합하지 않은 ZZ-GFP 와의 T 세포내로의 전달을 비교하였다. 먼저, Jurkat 세포(T 세포, ATCC)을 48-웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰의 밀도로 형질전환 하루 전날 씨딩 하였다. ZZ-GFP 는 항-CD7 항체(BD sciences) 10 μ g 를 기준으로 5, 10, 10, 30, 50, 70, 100, 120 의 몰비(molar ratio)로 혼합한 다음, 4°C에서 16 시간동안 셰이킹 인큐베이션 하였다. 형질전환 한 시간 전에 플레인 배지(RPMI 1640, GIBCO)로 교체하고, 각각의 시료를 플레인 배지 100 μ l와 혼합한 후, 세포에 처리하였다. 16-18 시간 후, 상기 배양물을 트립신처리 하고, PBS 로 세척한 후, FACS 완충액(400ml PBS, 8ml FBS, 80mg NaN₃)로 2 번 세척하고, 고정화 완충액(108ml FACS 완충액, 3ml Formaldehyde) 200 μ l를 넣고 현탁하였다. 각각의 시료에 대하여 flow cytometer(BD)를 이용하여 분석하였다(도 4a).

도 4a 에서 항-CD7 항체와 ZZ-GFP 단백질의 혼합한 몰비의 증가에 따라 Jurkat 세포로의 GFP 단백질 효율이 증가함을 확인할 수 있었다. 특히, 10 μ g 의 항 CD7 항체와 ZZ-GFP 단백질이 1: 50 이상의 몰비로 혼합되었을 때, 단백질 전달 효율은 50% 이상을 나타냄을 확인하였다.

항-CD7 항체가 결합된 ZZ-GFP 단백질이 T 세포 특이적으로 단백질을 전달하는지 알아보기 위해, 항-CD7 항체가 결합된 ZZ-GFP 단백질과 항-CD7 항체가 결합되지 않은 ZZ-GFP 단백질을 각각 Jurkat 세포에 처리하여 확인하였다.

Jurkat 세포(T 세포, ATCC)을 48-웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰의 밀도로 형질전환 하루 전날 씨딩 하였다. ZZ-GFP 는 항-CD7 항체(BD sciences) 10ug 를 기준으로 1 : 50 의 몰비(molar ratio)로 혼합한 다음, 4°C에서 16 시간동안 셰이킹 인큐베이션 하였다. 형질전환 한 시간 전에 플레인 배지(RPMI 1640, GIBCO)로 교체하고, 각각의 시료를 플레인 배지 100 μ l와 혼합한 후, 세포에 처리하였다. 16-18 시간 후, 상기 배양물을

트립신처리 하고, PBS 로 세척한 후, FACS 완충액(400ml PBS, 8ml FBS, 80mg NaN₃)로 2 번 세척하고, 고정화 완충액(108ml FACS 완충액, 3ml Formaldehyde) 200 μ l를 넣고 현탁하였다. 각각의 시료에 대하여 flow cytometer(BD)를 이용하여 분석하였다(도 4b).

- 5 도 4b 의 패널 a 는 Jurkat 세포이고, 패널 b 는 항-CD7 항체 없이 ZZ-GFP 만을 처리한 Jurkat 세포이고, 패널 c 는 1:50 의 몰비로 항-CD7 항체와 결합한 ZZ-GFP 을 처리한 Jurkat 세포에 대한 FACS 결과이다. 항-CD7 항체와 결합하지 않은 ZZ-GFP 의 경우 세포내로 엔도사이토시스 되지 않은 반면, 항-CD7 항체와 결합된 ZZ-GFP 는 세포내로 약 50% 전달된 것을 확인할 수 있었다.

따라서 항-CD7 항체가 결합하지 않은 ZZ-GFP 는 T 세포내로 전달되지 않는 반면, 항-CD7 항체와 결합한 ZZ-GFP 는 T 세포내로 전달됨을 알 수 있다.

- 15 추가적으로, 항-CD7 항체와 결합한 ZZ-GFP 가 T 세포 표면에 존재하는 CD7 과 결합하여 세포내로 이동하는지 보다 명확하게 규명하기 위하여, T 세포 표면의 CD7 과 특이적으로 결합하는 항체(anti-CD7 antibody, BD)를 먼저 처리한 후, 항-CD7 항체가 결합된 ZZ-GFP 단백질을 처리하였다. CD7 에 대한 항체를 처리하지 않은 경우에는 항-CD7 항체와 결합한 ZZ-GFP (도 5 의 패널 a)가 T 세포내로 전달되어지는 반면, CD7 에 대한 항체를 먼저 처리한 경우에는 항-CD7 항체와 결합한 ZZ-GFP(도 5 의 패널 b)는 T 세포내로 전달되어지지 않는다는 것을 확인하였다.

따라서 항-CD7 항체에 결합된 ZZ-GFP 는 T 세포표면에 존재하는 CD7 과 결합하여 엔도사이토시스에 의해 T 세포내로 전달됨을 알 수 있다.

25 실시예 5: Her2/neu 과발현 유방암 세포로의 단백질 운반

SKBR3(ATCC)은 세포표면에 Her2/neu 수용체를 과발현하는 유방암 세포주이다. 본 발명자들은 Her2/neu 수용체와 결합하여 엔도사이토시스를 통해 세포내로 이동하는 항-Her2/neu 항체(BD sciences)를 ZZ 단백질과 결합시켜 암 세포주 내로의 전달을 확인하였다(도 30 6).

도 6 의 패널 a 는 GFP 양성 대조군으로 사용된 TAT-GFP 를 처리한 SKBR3 세포이고, 패널 b 는 항-Her/neu-PE 항체(BD)로 염색한 SKBR3 세포이고, 패널 c 는 항체가 결합되지 않은 ZZ-GFP 만을 처리한 SKBR3 세포이며, 패널 d 는 항 Her/neu-항체가 결합된 ZZ-GFP 를 처리한 SKBR3 세포의 FACS 결과이다. 패널 e 는 항 Her2/neu-항체가 결합된 ZZ-GFP(패널 d)와 항-Her/neu-항체가 결합되지 않은 ZZ-GFP(패널 c)의 FACS 데이터를 overlay 한 결과이다.

도 6 의 결과에서 보는 바와 같이, SKBR3 세포는 세포표면에 Her/neu 수용체를 90%이상 발현하는 세포이며, Her/neu 수용체에 대한 항 Her/neu-항체가 결합되지 않은 ZZ-GFP(도 6, c)는 세포내로 전달되지 않았으나, 항체와 결합된 ZZ-GFP 단백질(도 6, d)은 약 40% 정도의 단백질 전달 효율을 나타냄으로써, SKBR3 세포내로의 단백질이 전달되어졌음을 확인할 수 있었다.

실시예 6: 항-CD7 항체와 결합된 ZZ-HSP27 의 세포사멸 억제 효과

HSP27 (heat shock protein HSP27)은 small HSP(sHSP) 중의 하나로서, 단백질의 aggregation 을 억제하고, denatured proteins 의 refolding 을 돕는 역할을 한다(M. Ehrnsperger, et al., *Embo J.* 16:221-229(1997)). HSP27 은 세포사멸 신호전달의 여러 과정을 억제하여 강한 항-세포사멸 능력을 가진다(C. Garrido. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ.* 9:483-485(2002)). 최근 TAT 펩타이드를 이용하여 세포내로 HSP27 를 전달하여 hypoxia-induced cellular apoptosis 로부터 세포를 보호하는 HSP27 단백질의 효과를 확인하였다(Cheau Yih Tan, et al., *Mol. Cells*, 31:533-538(2009)). 따라서, 본 발명자들은 항체와 결합된 ZZ-HSP27 단백질을 T 세포에 전달하여 hypoxia-induced cellular apoptosis 로부터의 전달되어진 HSP27 의 효과를 확인하였다.

Jurkat 세포는 48-웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰의 밀도로 실험 하루 전날 씨딩하였다. ZZ-HSP27 단백질은 항-CD7 항체와 혼합하여 4℃에서 16 시간동안 웨이킹 인큐베이션 하였다. 형질전환 한 시간 전에 플레인 배지(RPMI 1640, GIBCO)로 교체하고, 각각의 시료를 플레인 배지 100 μ l와

혼합한 후, 세포에 처리하였다. 2 시간 후, 인위적으로 세포사멸을 유도하기 위하여 300 μ M 의 cobalt chloride(CoCl_2 , SigmaAldrich)를 24 시간동안 처리하였다. 그 후, Cell viability 는 CCK assay kit (Dojindo)를 사용하여 확인하였다(도 7a).

5 도 7a 에서 보는 바와 같이, cobalt chloride 를 처리한 Jurkat 세포에 비해 항-CD7 항체와 결합된 ZZ-HSP27 를 Pre-treat 한 Jurkat 세포에서 Cell viability가 증가함을 확인할 수 있었다.

또한, 항-CD7 항체와 결합된 ZZ-HSP27 단백질을 4 시간 동안 Jurkat 세포에 처리한 후, hypoxia chamber (37°C, 95% N_2 , 5% CO_2)에서 24 시간
10 인큐베이션하여 세포사멸을 유도하였다. 24 시간 후, 세포는 PBS 로 두 번 세척하고, Annexin-V PE(BD) 항체로 염색하여 FACS 분석을 통해 세포사멸의 정도를 확인하였다 (도 7b).

도 7b 에서 보는 바와 같이, 항-CD7 항체와 결합된 ZZ-HSP27 단백질을 처리한 Jurkat 세포가 항체가 결합되지 않은 ZZ-HSP27 단백질만을 처리한
15 세포에 비해 dying cells 이 감소함을 확인하였다.

따라서, 항-CD7 항체와 결합된 ZZ-HSP27 단백질은 항체에 의해 세포 특이적으로 단백질을 전달하고, 전달되어진 HSP27 단백질은 효과적으로 apoptosis signal로부터 세포를 보호할 수 있음을 확인하였다.

20 실시예 7: Oligo-9-Arginine-컨쥬게이트 ZZ 단백질을 이용한 siRNA 의 전달
(1) Oligo-9-Arginine-컨쥬게이트 ZZ 단백질(ZZ-9R)의 제조

siRNA 를 결합할 수 있도록 하기 위해서, ZZcys 와 9R 펩타이드의 C-말단을 컨쥬게이션하여, Oligo-9-Arginine-컨쥬게이트 ZZ 단백질(ZZ-9R)을 제조하였다(도 8). pH 7.4 PBS 용액에서 ZZcys 와 9R
25 펩타이드(Anaspec, Inc.)를 1: 1.2 의 몰비로 9R 펩타이드를 ZZcys 용액에 한방울씩 적가하면서 천천히 혼합하였다. 실온에서 30 분간 인큐베이션하여 9R 펩타이드를 컨쥬게이션 한 후, 16-18 시간 동안 PBS(pH 7.4)로 투석하여 사용하였다. 멤브레인을 통한 투석 과정에 의해 ZZcys 와 이황화결합을 형성하지 못한 9R 을 제거하였다.

30

(2) ZZ-9R 단백질과 siRNA 의 결합

9R 펩타이드와 컨쥬게이션되어진 ZZ-9R 단백질의 siRNA 결합정도를 확인하기 위하여, 50pmole 의 siRNA 를 ZZ-9R 단백질 또는 9R 펩타이드가 컨쥬게이션되지 않은 ZZcys 단백질과 각각 1: 1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 의 물비로 혼합하여 상온에서 30 분간 인큐베이션하고 3% 아가로즈겔을 이용하여 전기영동하였다 (도 9). 도 9 에서 보는 바와 같이 9R 펩타이드와 컨쥬게이션되어진 ZZ-9R 단백질은 siRNA 와 1:2 의 물비에서부터 결합되어 1: 20 의 물비에서 완전히 결합되어짐을 확인하였고, 반면 9R 이 컨쥬게이션되지 않은 ZZcys 단백질은 siRNA 와 결합되지 않음을 확인하였다.

10 (3) ZZ-9R 단백질에 의한 세포내로의 siRNA(siFITC)의 전달

siRNA 와 결합이 가능한 ZZ-9R 단백질을 항-CD7 과 결합하여 T 세포 특이적으로 siRNA 가 전달되어짐을 확인하기 위해, 먼저 실험 하루 전날 Jurkat 세포를 48 웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰로 씨딩하였다. ZZ-9R 단백질은 항-CD7 항체와 혼합하여 4°C에서 16 시간동안 셰이킹 인큐베이션하였다. siRNA 를 처리하기 한 시간 전에 세포 배지는 플레인 배지(RPMI 1640, GIBCO)로 교체하였다. siRNA 와 항-CD7 항체와 결합된 ZZ-9R 은 각각 플레인 배지 50 μ l 과 혼합하여 5 분간 상온에서 인큐베이션하고, siRNA 가 혼합된 플레인 배지를 항-CD7 항체와 결합된 ZZ-9R 이 혼합된 배지에 한방울씩 적가하여 혼합하고 상온에서 30 분간 인큐베이션한 후, 세포에 처리하였다. 6 시간 후에 300 μ l 의 complement 배지를 첨가하고 16-18 시간동안 인큐베이션하였다. 그 후, 상기 배양물을 트립신처리 하고, PBS 로 세척한 후, FACS 완충액(400ml PBS, 8ml FBS, 80mg NaN_3)로 2 번 세척하고, 고정화 완충액(108ml FACS 완충액, 3ml Formaldehyde) 200 μ l 를 넣고 현탁하였다. 각각의 시료에 대하여 flow cytometer(BD)를 이용하여 분석하였다(도 10).

도 10 의 FACS 결과에서 나타나는 바와 같이, siFITC 만을 처리한 세포는 0.76%(MFI 3), 항체가 결합되지 않은 ZZ-9R 과 혼합한 siFITC 를 처리한 세포는 4.18%(MFI 4), lipofectamine 을 이용한 siFITC 를 처리한 세포는 28.9%(MFI 23), 항-CD7 항체와 결합된 ZZ9R 과 혼합한 siFITC 를 처리한 세포는 58.61%(MFI 16)의 FACS 결과를 나타냈다. 이를 통해 항-

CD7 항체와 결합된 ZZ-9R 를 이용하여 T 세포로의 특이적 siRNA 전달이 가능함을 확인하였다.

(4) ZZ-9R 에 의해 운반된 siRNA 는 기능하여 유전자 사일런싱을 초래한다

5 ZZ-9R 이 siRNA 전달체로서의 효과를 확인하기 위해 ZZ-9R 과 표적하는 항체를 결합시킨 다음, siCD4(인간 T 세포의 CD4 를 타겟팅 하는 siRNA(센스 가닥 서열 5'-GAU CAA GAG ACU CCU CAG UTT-3', Dharmacon, Inc.)를 결합시켜 jurkat 세포에 처리하였다. 항체-ZZ9R/siCD4 복합체는 anti-CD7 항체(BD sciences)와 ZZ-9R 을 혼합한 다음, 4℃에서 16-18 시간
10 셰이킹 인큐베이션 한 후, siCD4 를 혼합하여 만들어 사용하였다.

실험 결과, siCD4(도 11, e)만 처리하거나 항체를 결합시키지 않은 경우(도 11, f)에는 CD4 의 사일런싱 효과가 없었으나, 항체와 복합체를 형성한 ZZ-9R/siCD4 의 경우(도 11, g)에는 30-40%의 사일런싱 효과가 나타났다.

15 동일한 사일런싱 효과 실험을 세포주가 아닌 인간 혈액에서 분리한 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 이용하여 실험하였다. 실험 결과, 세포주(jurakt 세포)과 동일한 패턴의 사일런싱 효과를 확인할 수 있었다(도 12).

따라서 표적하는 항체와 결합한 ZZ-9R 이 siRNA 를 전달하고 사일런싱
20 효과를 나타냄을 알 수 있다.

(5) 생체 내 표적세포 특이적 siRNA 전달

면역결핍 쥐인 NOD/SCID $\gamma^{-/-}$ 쥐에 사람의 줄기세포를 주입하여 인간화된 쥐 (Hu-HSC)를 만든 다음(Priti Kumar, et al., *Cell*, 134:577-
25 586(2008)), ZZ-9dR/siFITC (Control), CD7mAb/ZZ-9dR/siFITC (CD7, T 세포 마커) 또는 CD20mAb/ZZ-9dR/siFITC (CD20, B 세포 마커) 를 siRNA 35 μ g 을 이용하여 1:35 의 양으로 Ab:ZZ 를 혼합한 후 정맥 주사로 주입을 하여 siFIC 가 표적세포에 전달이 되는지를 확인 하였다. 사람의 세포는 siFITC 주입 후 16 시간 후에 형광물질을 갖는 siRNA 인간화된 쥐에 있는 사람의
30 세포에 있는지를 확인하였다(T 세포: CD45⁺ CD3⁺, B 세포: CD45⁺ CD19⁺). 도 13 과 같이, ZZ-9R/siFITC 를 이용하여 T 세포 마커인 CD7 을 이용하였을

때 오직 T 세포에만 siRNA 가 전달이 됨을 확인 하였으며, B 세포 마커인 CD20 를 이용하였을 경우 B 세포에만 siRNA 가 전달이 됨을 확인 하였다(도 14). 이러한 결과는 ZZ-9R 을 이용하였을 경우 항체의 교체만으로 특정세포에 특이적으로 siRNA 를 전달 할 수 있음을 보여준다.

5

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의

10 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

(a) ZZ 도메인; 및 (b) 항체의 Fc 부위를 포함하며 세포의 표면 분자(cell surface molecule)에 결합하는 상기 ZZ 도메인에 결합된 타겟팅
5 모이어티(targeting moiety)를 포함하는 약물전달체.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 타겟팅 모이어티는 항체의 Fc 부위를 포함하는 항체, 앵타머, 폴리펩타이드, 펩타이드, 리간드, 렉틴, 당, 지질,
10 당지질 또는 핵산인 것을 특징으로 하는 약물전달체.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 ZZ 도메인은 핵산이 결합될 수 있는 핵산 결합 도메인(nucleic acid binding domain)이 추가적으로 결합되어 있는
15 것을 특징으로 하는 약물전달체.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 핵산 결합 도메인은 GCN4, Fos, Jun, TFIIS, FMRI, 이스트 단백질 HX, 비길린(Vigillin), Mer1, 박테리아
20 폴리뉴클레오타이드 포스포릴라아제, 라이보솜 단백질 S3, 열쇼크 단백질 또는 프로타민의 핵산 결합 도메인 또는 복수의 염기성 아미노산을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 하는 약물전달체.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 핵산 결합 도메인은 헬릭스-턴-헬릭스 모티프, 징크 핑거 모티프, 루이신 지퍼 모티프, 윙드 헬릭스(winged helix) 모티프, 윙드 헬릭스 턴 헬릭스 모티프 또는 헬릭스-루프-헬릭스
25 모티프인 것을 특징으로 하는 약물전달체.

30 【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 세포는 박테리아 세포, 진균 세포, 이스트

세포, 단일세포성 기생균 세포, 다세포성 기생균 세포 또는 동물 세포인 것을 특징으로 하는 약물전달체.

【청구항 7】

5 제 1 항에 있어서, 상기 약물전달체는 운반 대상의 카고(cargo)가 추가적으로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 약물전달체.

【청구항 8】

10 제 1 항에 있어서, 상기 카고는 화학물질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 핵산, 탄수화물 또는 지질인 것을 특징으로 하는 약물전달체.

【청구항 9】

15 제 1 항에 있어서, 상기 약물전달체는 ZZ 도메인; Fc 부위를 포함하며 세포의 표면 분자에 결합하고 상기 ZZ 도메인에 결합된 항체; 및 상기 ZZ 도메인에 결합된 복수의 염기성 아미노산을 포함하는 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 약물전달체.

【청구항 10】

20 제 4 항에 있어서, 상기 핵산 결합 도메인으로서의 복수의 염기성 아미노산을 포함하는 펩타이드는 복수의 Arg 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 약물전달체.

【청구항 11】

25 제 10 항에 있어서, 상기 세포의 표면 분자는 T 세포의 CD 수용체 또는 암세포 특이적 표면 단백질인 것을 특징으로 하는 약물전달체.

【청구항 12】

30 제 9 항에 있어서, 상기 약물전달체는 RNA 간섭(interference) 유도 물질을 카고로서 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

【청구항 13】

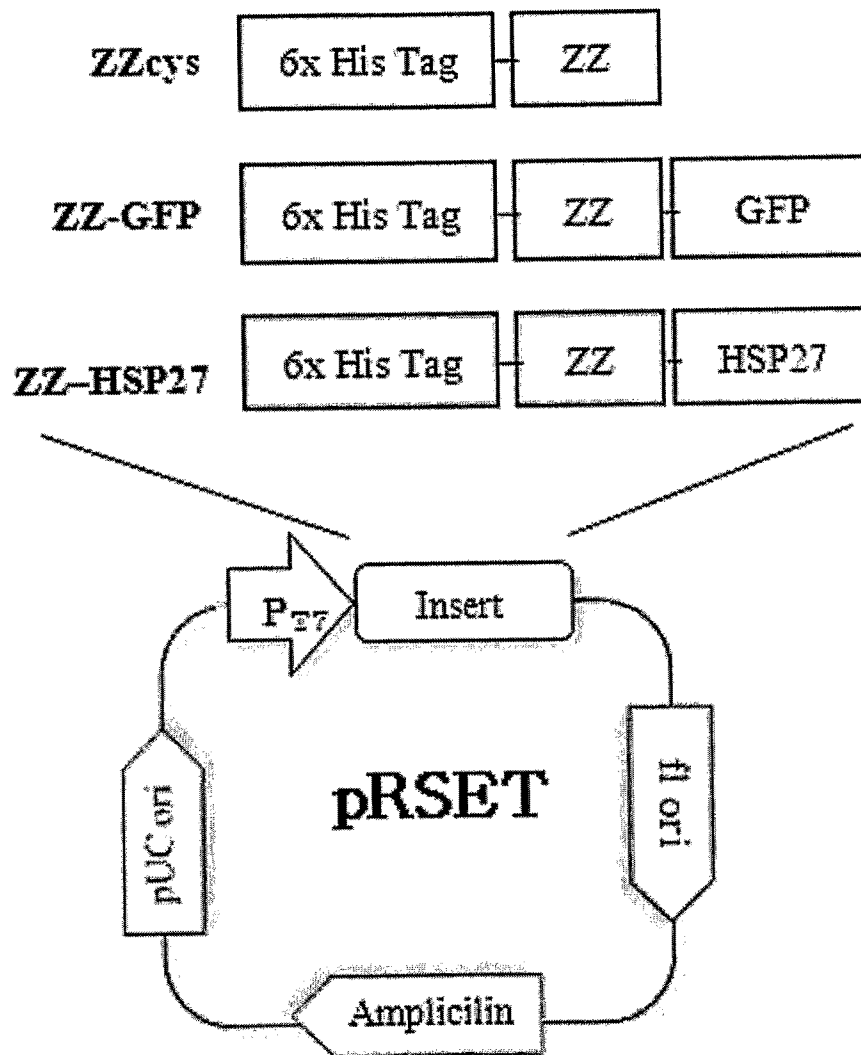
제 12 항에 있어서, 상기 RNA 간섭 유도 물질은 T 세포의 CD 수용체의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

【청구항 14】

- 5 운반 대상의 카고가 결합되어 있는 상기 제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 약물전달체를 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 카고를 세포에 운반하는 방법.

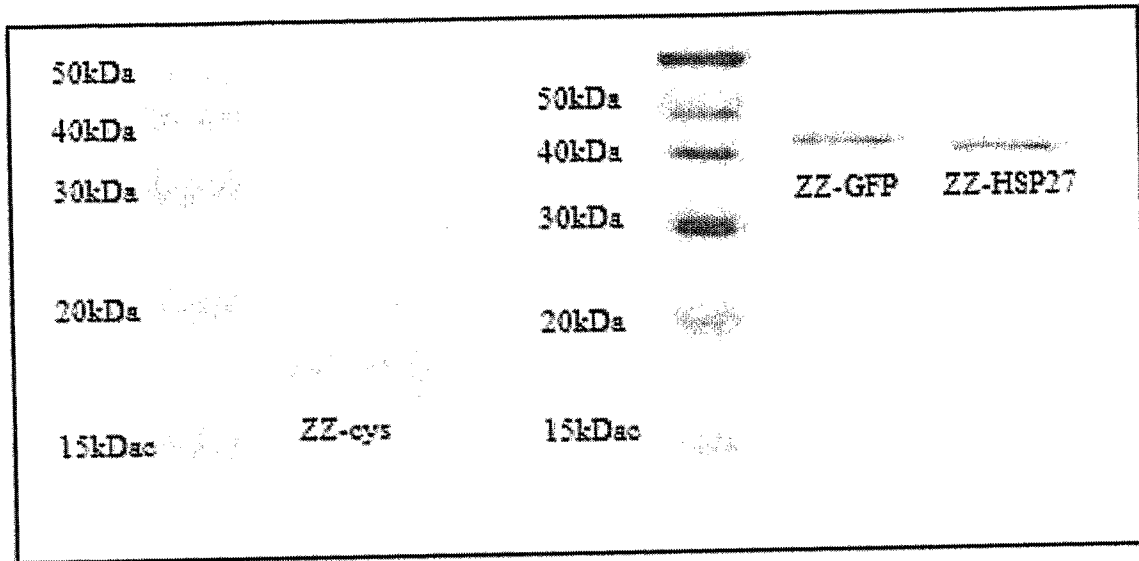
1/15

도 1

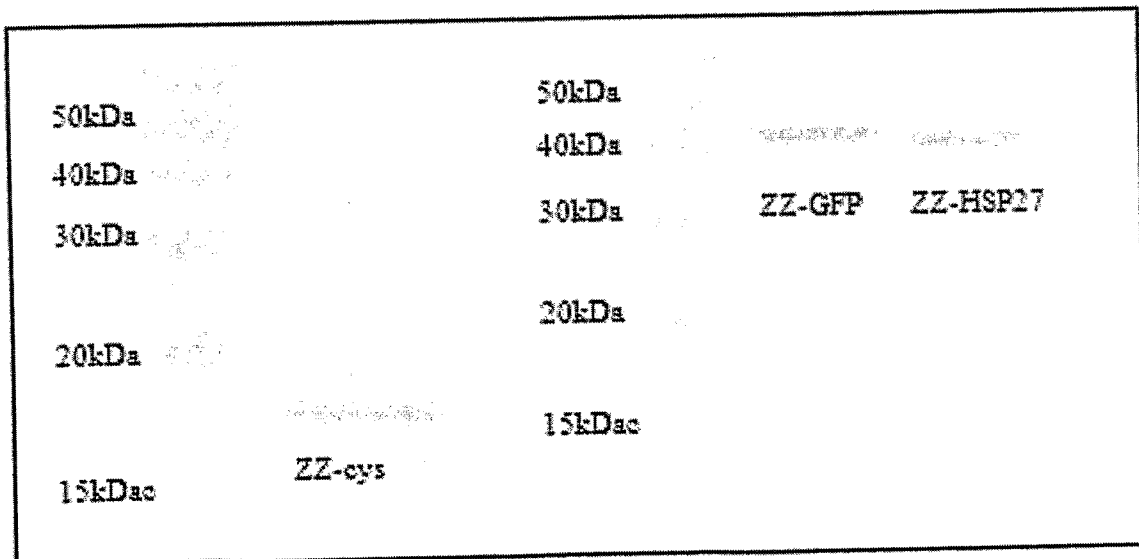


1/15

도 2a

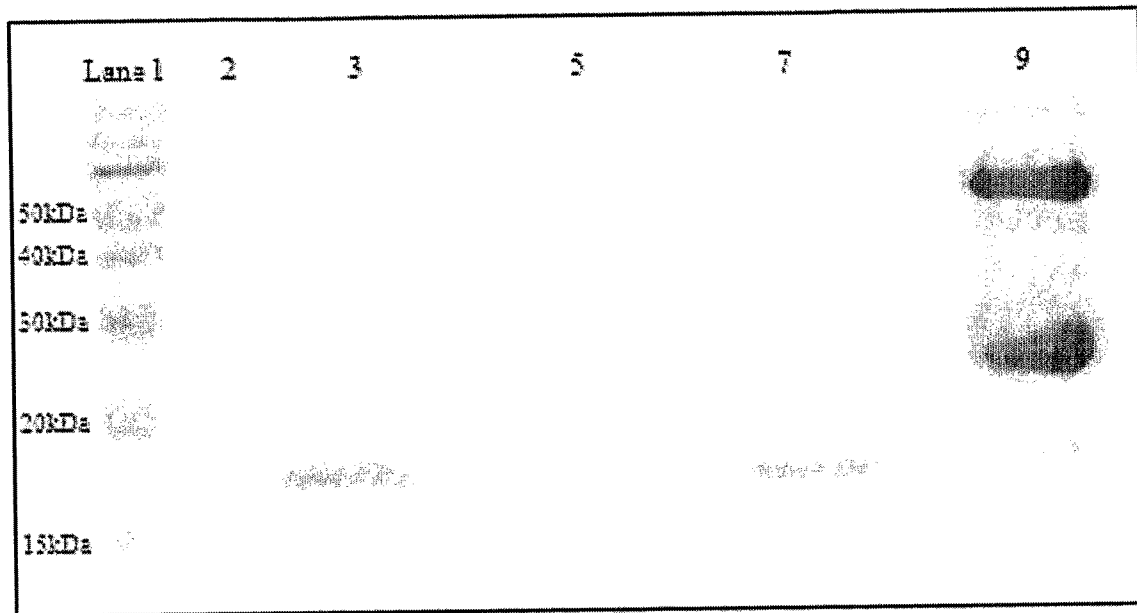


도 2b

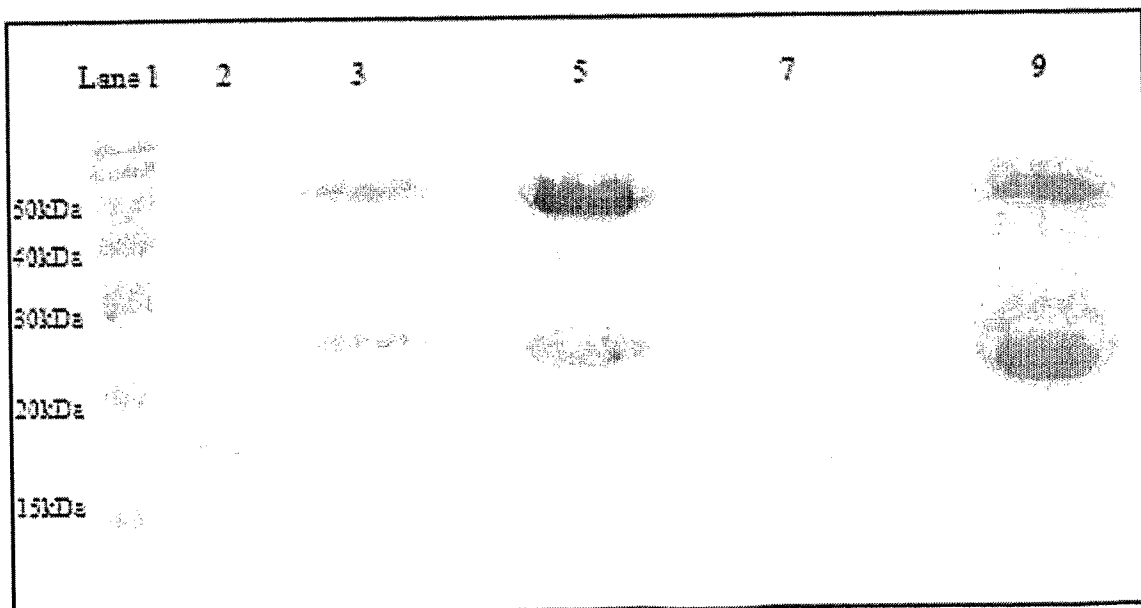


3/15

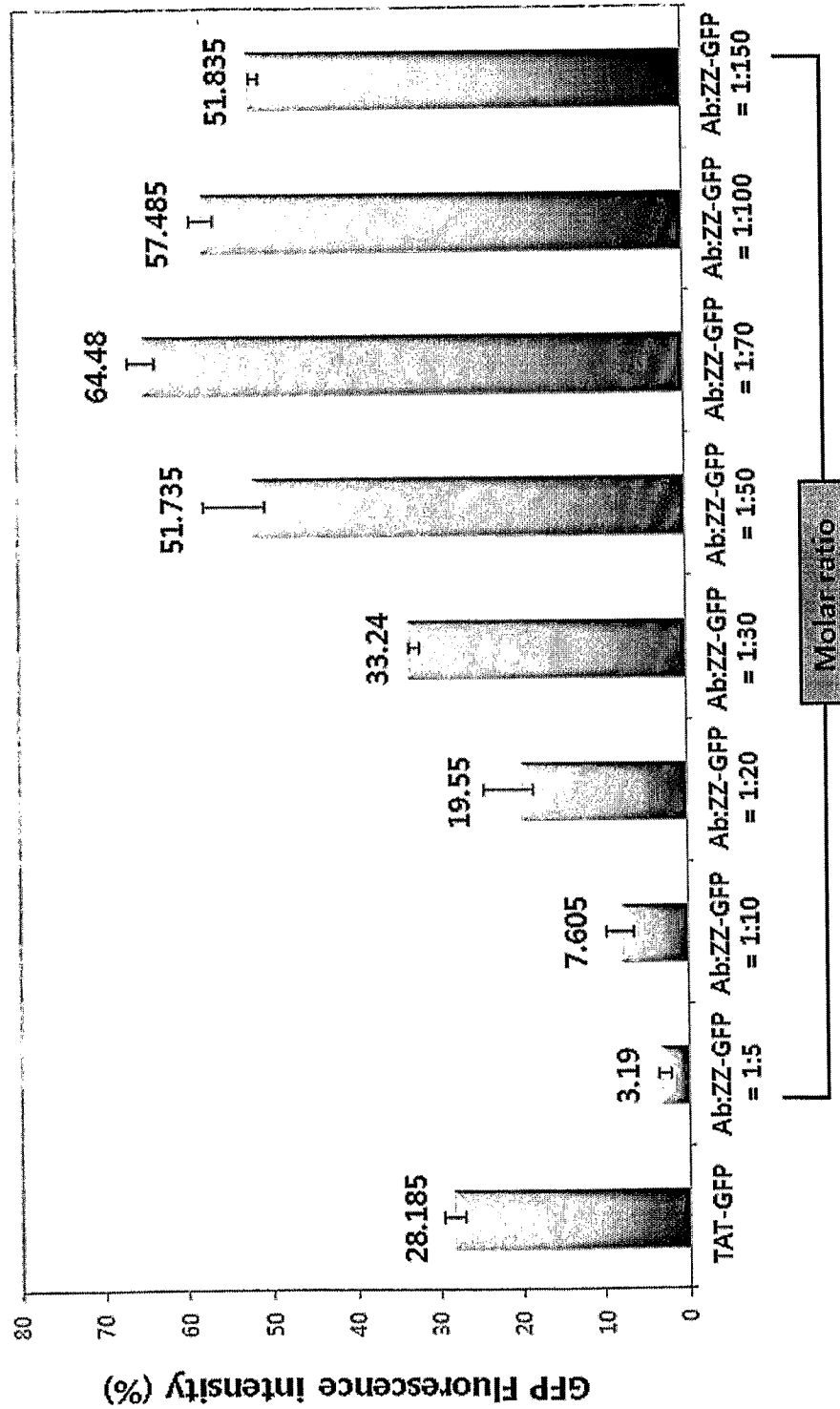
도 3a



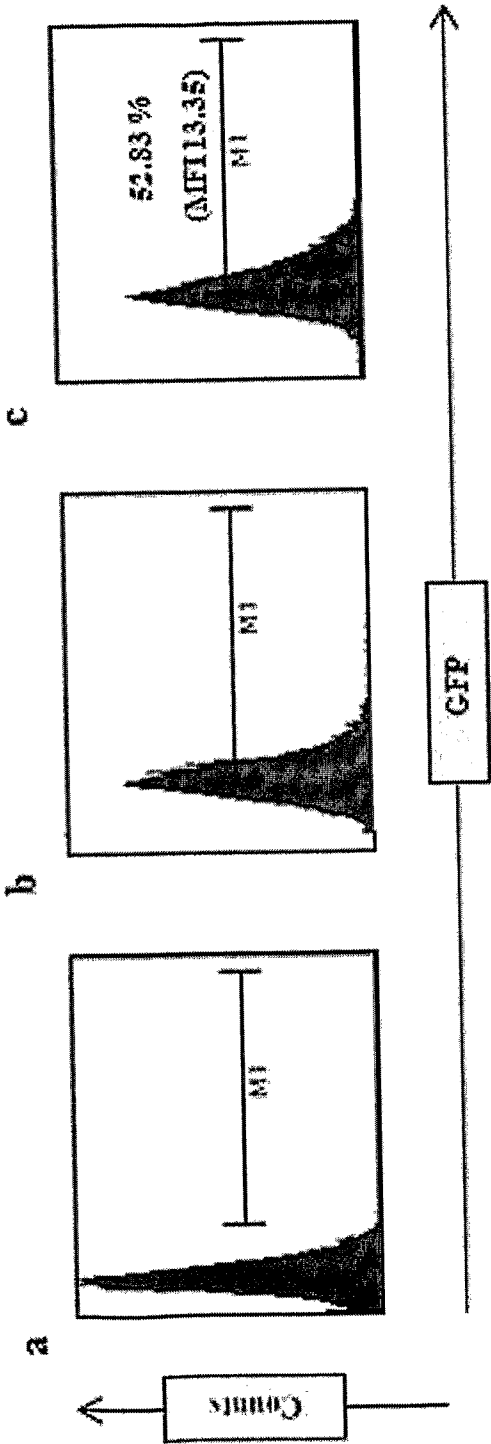
도 3b



4/15

4a

도 4b



도 4c

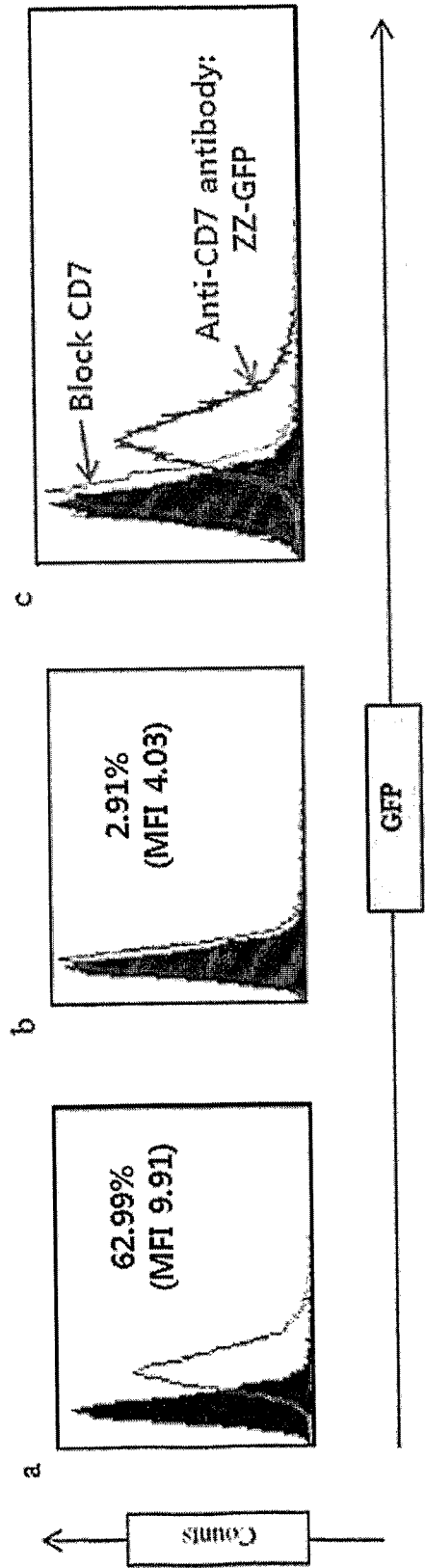


Figure 5

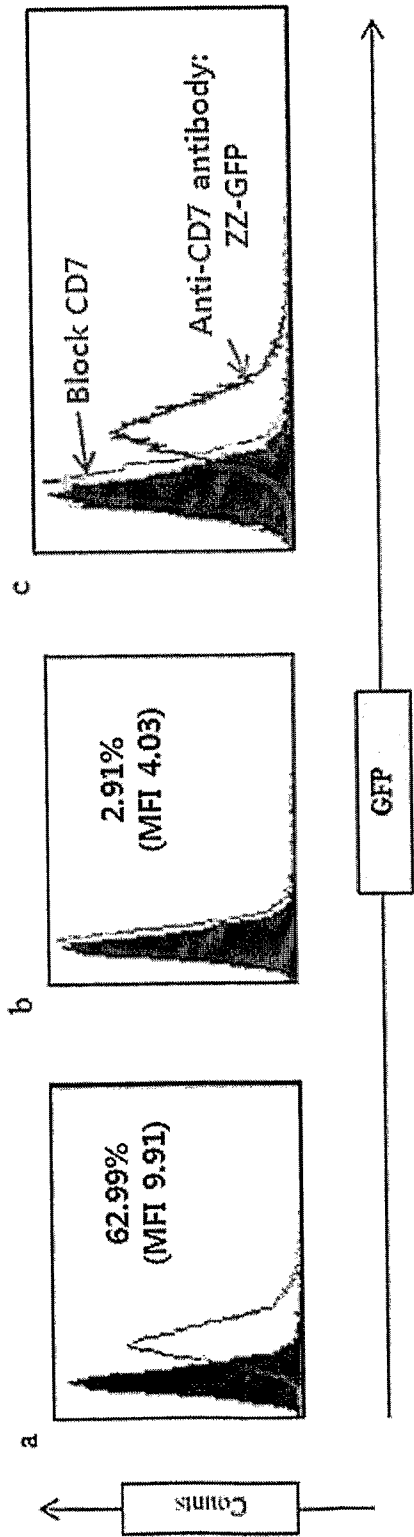
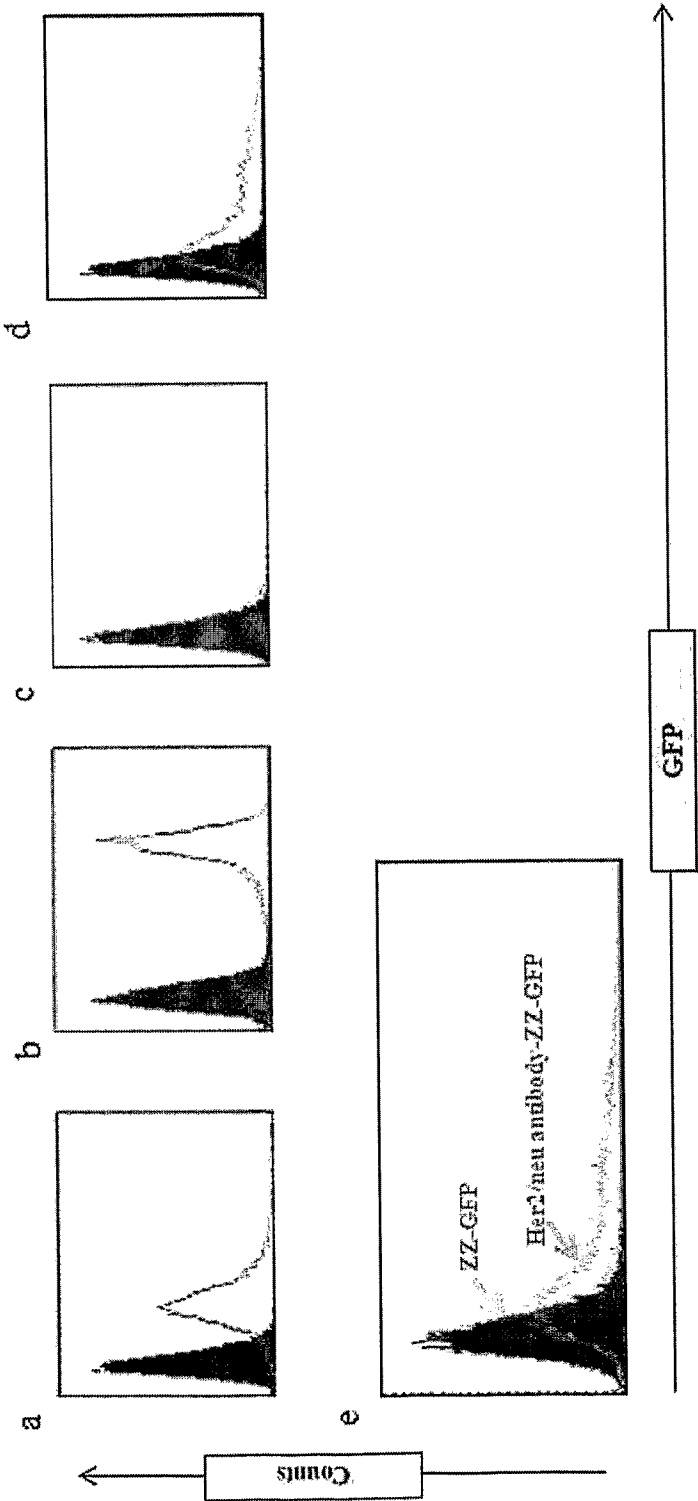
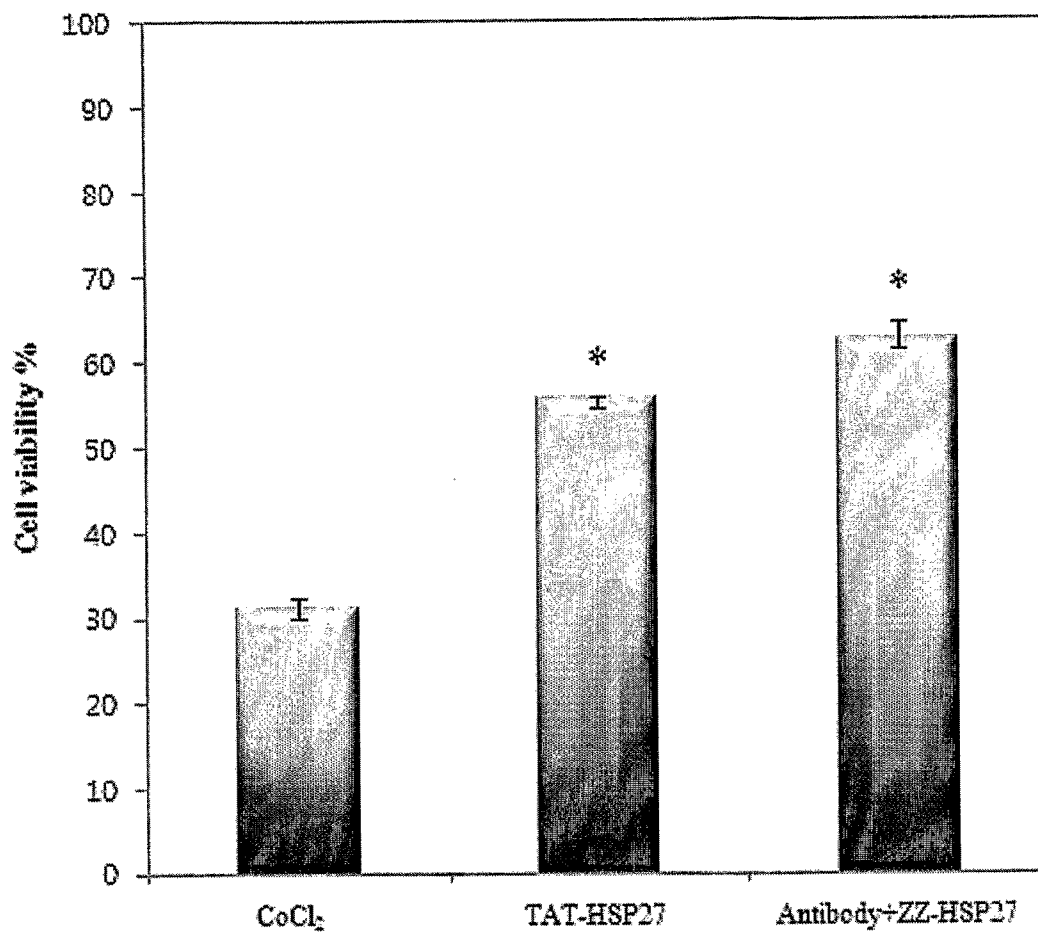


Figure 6



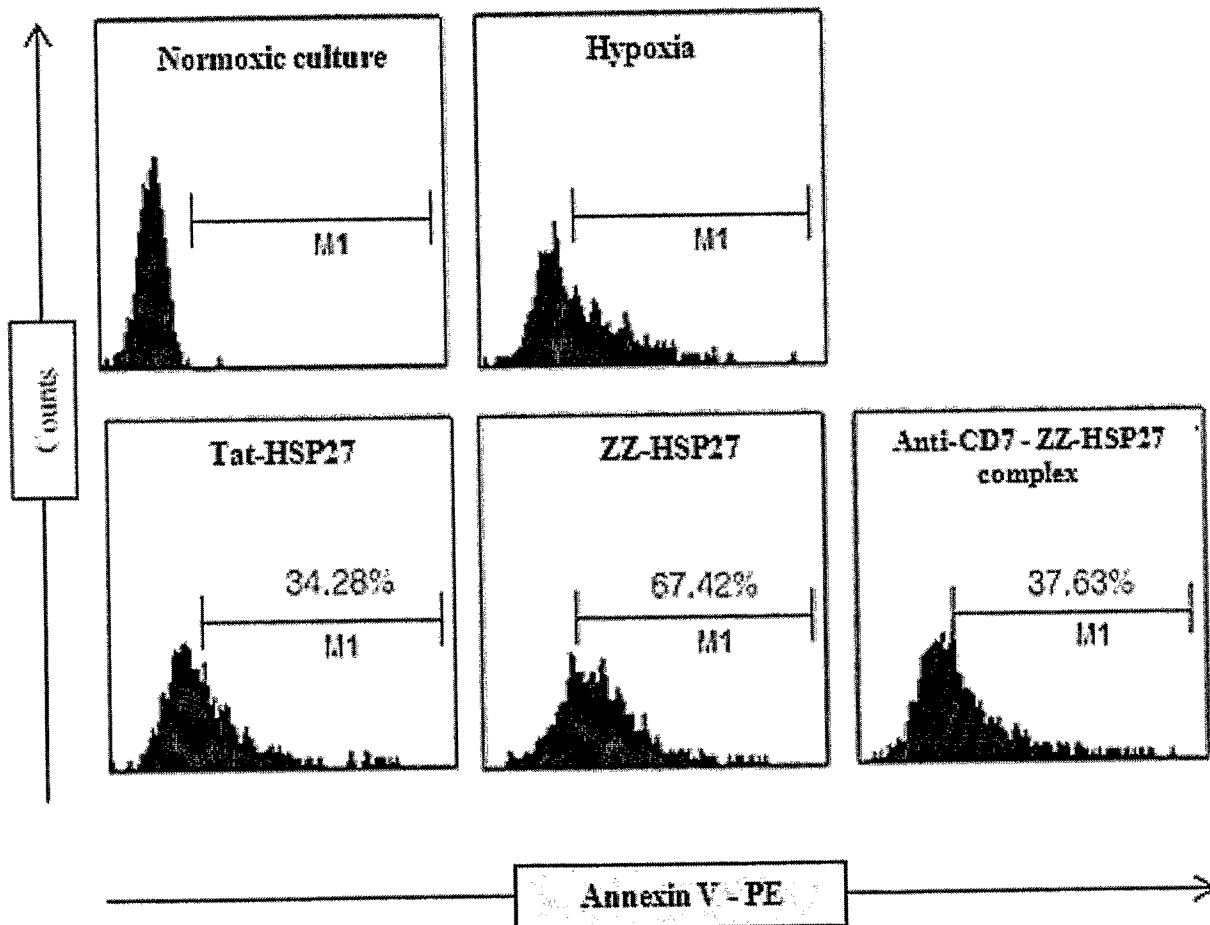
9/15

도 7a

*p<0.01 vs 300uM CoCl₂

10/15

도 7b



11/15

도 8



12/15

Figure 9

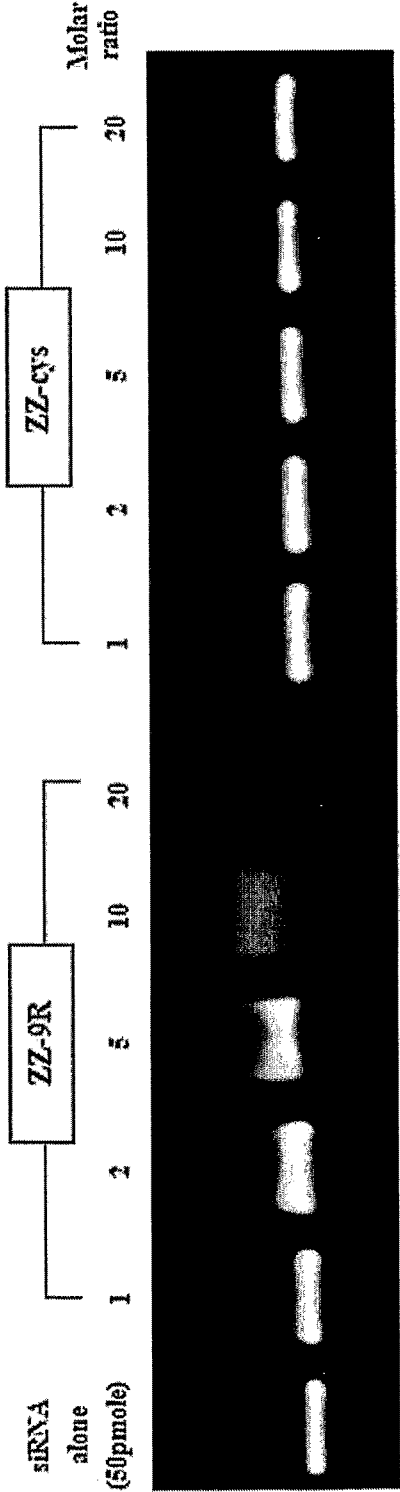


Figure 10

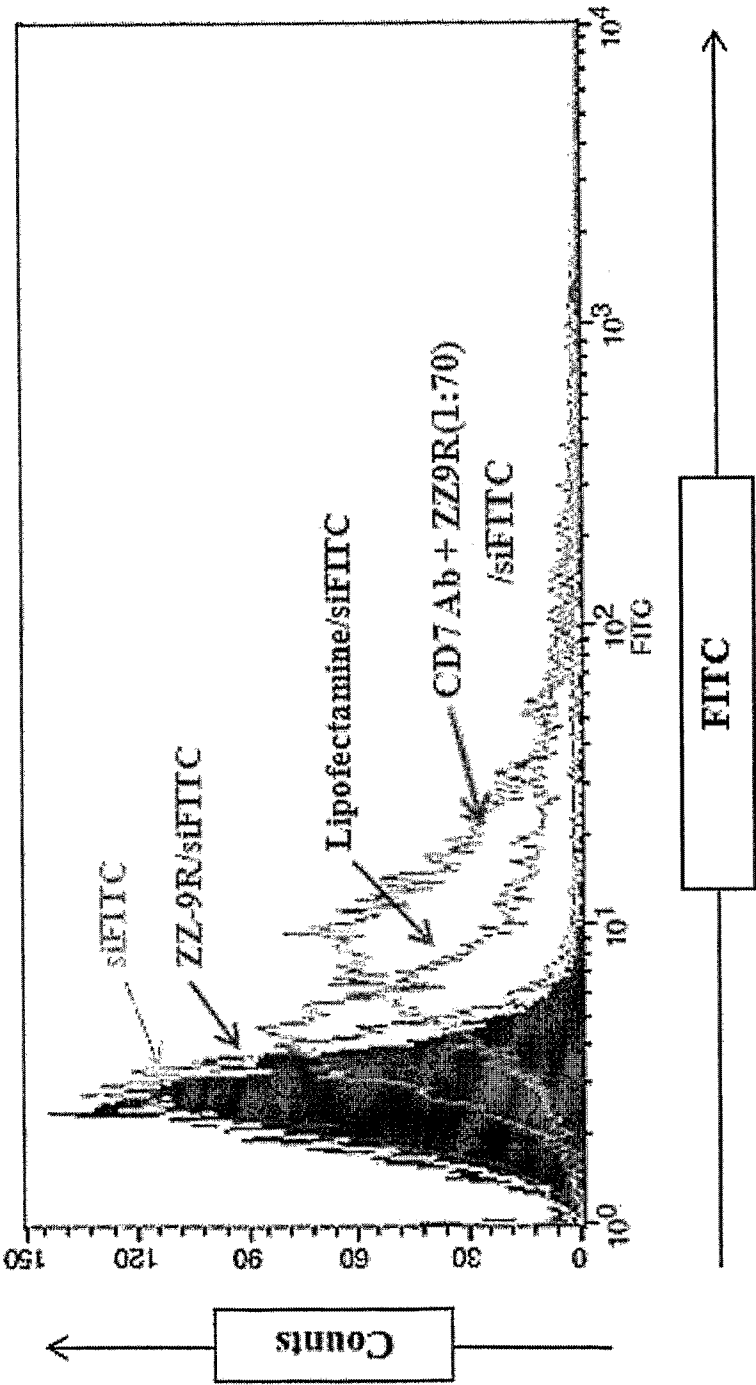


Figure 11

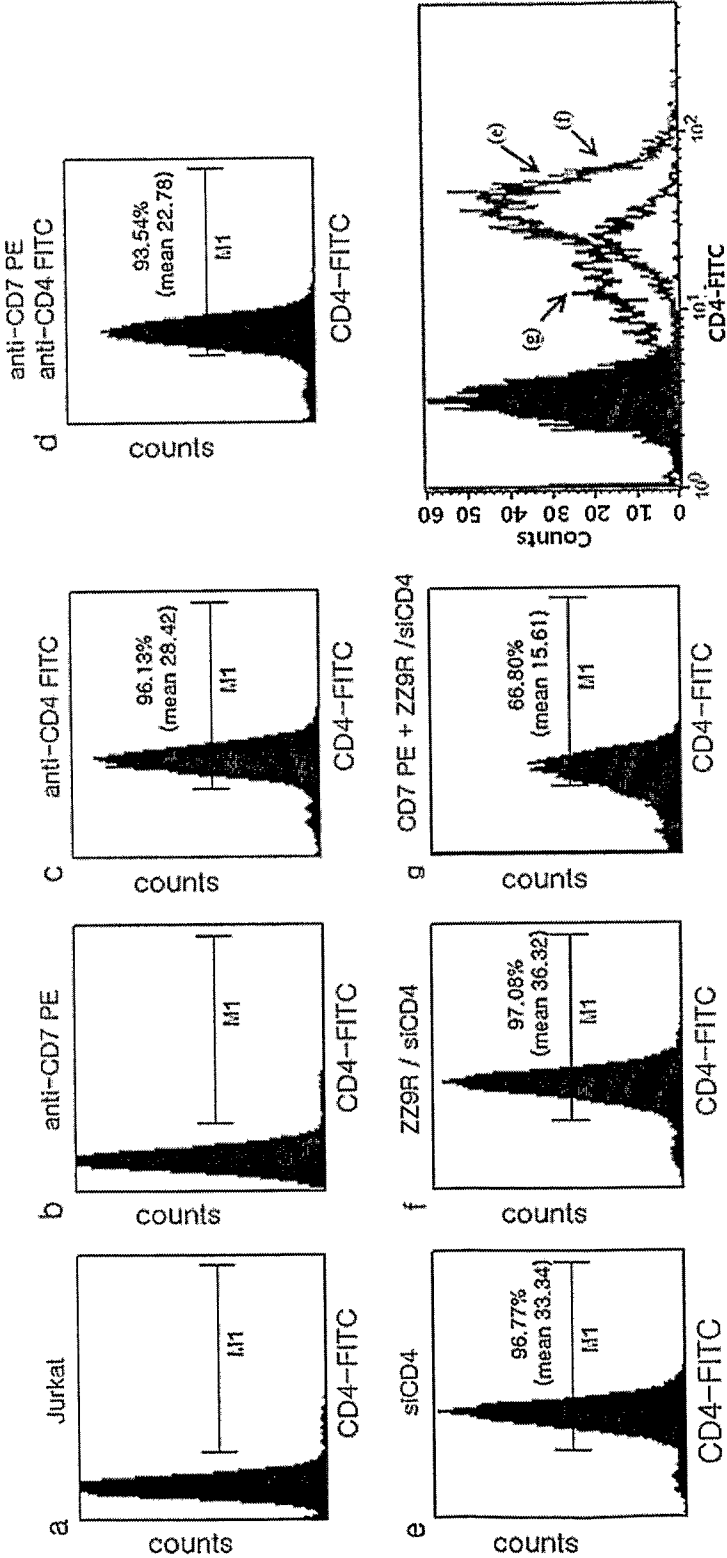


Figure 12

