



- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/26 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/003408
- (22) 국제출원일: 2013년 4월 22일 (22.04.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0144593 2012년 12월 12일 (12.12.2012) KR
- (71) 출원인: 한국기초과학지원연구원 (KOREA BASIC SCIENCE INSTITUTE) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 169-148, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 허송옥 (HER, Song); 200-190 강원도 춘천시 영서로 2329, 마젤란아파트 101동 405호, Gangwon-do (KR). 권승해 (KWON, Seung Hae); 200-945 강원도 춘천시 퇴계로 168, 퇴계주공 2차아파트 215동 1406호, Gangwon-do (KR). 박완순 (PARK, Wan Soon); 200-936 강원도 춘천시 우석로 79번길 15-12, 204호, Gangwon-do (KR). 김영한 (KIM, Young Han); 200-100 강원도 춘천시 중앙로 106번길 19, Gangwon-do (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 151-832 서울시 관악구 인현동 1659-2, 청동빌딩 301호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

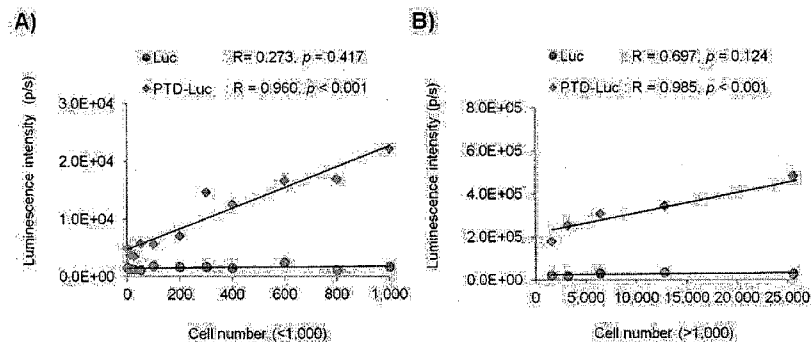
- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

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

(54) Title: INTRACELLULAR ATP VOLUME MEASUREMENT METHOD AND MEASUREMENT KIT

(54) 발명의 명칭: 세포 내 ATP 양의 측정방법 및 측정키트



(57) Abstract: The present invention provides an intracellular ATP volume measuring method and measurement kit. The present invention makes it possible to measure the volume of ATP inside the cell without any additional cytolytic process, and has a sensitivity specific to intracellular ATP since there is no interference due to the cell membrane integrity changes and cytolysis products that result from cytolytic processes. The present invention allows real-time measurement of ATP in living cells, and can be used in detailed dynamic analysis of, by way of example, cell survival, growth, death and toxicity.

(57) 요약서: 본 발명은 세포 내 ATP 양을 측정하는 방법 및 측정키트를 제공한다. 본 발명은 추가적인 세포 용해과정 없이 세포 내부의 ATP 양을 측정할 수 있으며, 세포 용해 과정에 따른 세포막 인테그리티 변화 및 세포 용해물에 의한 간섭이 발생하지 않으므로 세포 내 ATP에 대한 고유한 민감도를 가진다. 본 발명은 살아있는 세포에서 ATP의 실시간 측정이 가능하며 세포의 생존, 증식, 사멸 및 독성 등 상세한 동역학적 분석에 이용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

세포 내 ATP 양의 측정방법 및 측정키트

5

【기술분야】

본 발명은 세포 내 ATP 양을 측정하는 방법 및 측정키트에 관한 것이다.

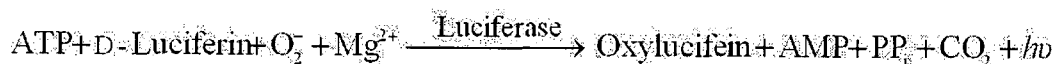
10 【배경기술】

세포 내 ATP 양을 측정함으로써 대사 기능을 평가하는 것은 의약 스크리닝 및 독성학적 안정성 테스트에 필수적인 세포독성 측정방법으로 널리 이용되고 있다. 또한, ATP 모니터링은 의약품, 생물학적 응답조절물질(biological response modifier, BRM) 및 생물학적 화합물에 대한 세포파괴, 세포분열 및 증식효과를 평가하는데 이용될 수 있다(1, 2). ATP 는 세포 대사에서 중요한 역할을 수행하기 때문에 ATP 의 세포 내 레벨은 건강한 세포에서 정확하게 조절된다. 더욱이, 초기 세포 손상은 ATP-변환 효소(예를 들면, ATPase)의 방출에 의한 ATP 합성 감소 뿐 아니라 내재성 ATP 의 급격한 고갈을 초래한다(3). 따라서, 세포 내 ATP 양에 대한

20 빠르고 정확한 측정은 세포독성 상태를 결정하는데 중요하다.

ATP 측정에 다양한 방법들이 이용되는데 그 가운데 민감도 및 신뢰도가 가장 높은 기술은 루시페린-루시페라아제 반응에 기초한 생물발광(bioluminescent) 방법이다(4, 5). 이러한 반응에서 ATP 는 루시페린의 루시페라아제-매개 옥시루시페린 변환에 작용하는데, 이

25 과정에서 생산되는 화학발광 신호는 다음의 방정식과 같이 ATP 양에 비례한다:



생물발광 ATP 어세이는 세포 수득, 용해 및 분리 단계를 포함하는 세포 추출에 의해 세포 내 ATP 를 배출하는 과정을 필수적으로 포함한다.

30 그러나, 추출물질의 사용, 추출물의 중화 및 추출된 성분들에 수행하는

다른 과정들은 세포 내 ATP 양에 영향을 미친다. 세포 추출 과정에 의한 세포막 인테그리티의 감소는 세포질 ATP의 빠른 감소, 세포 내 ATP 양의 부정확한 정량 및 동질 초고속 스크리닝(high-throughput screening, HTS) 적용의 제한을 초래한다. 최근, 세포 추출 과정에 의한 상기 문제점들을 줄이기 위해 단일단계 동질 방법(single-step homogenous method)과 같은 수정된 세포 용해 방법이 개발되고 있다(2, 6). 통합 시약을 사용하는 이러한 방법은 높은 민감도, 우수한 선형성(linearity) 및 간단하고 신속하다는 특징을 가지며 세포 수득 또는 분리과정을 필요로 하지 않는다. 그러나, 세포 내 ATP의 직접적인 측정 및 추가적인 과정의 필요성은 여전히 해결되지 않고 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 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명자들은 세포를 용해시키지 않으면서 살아있는 세포 내의 ATP 양을 정확하면서도 보다 간편한 방법으로 측정할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 루시페라아제에 PTD를 결합시킨 PTD-루시페라아제 융합 폴리펩타이드를 세포에 도입하고 살아있는 세포에서 발광하는 빛의 세기를 측정 및 분석하면 정확도 및 간편성 측면에서 보다 개선된 방식으로 ATP의 양을 측정할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 세포 내 ATP 양 측정방법을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 세포 내 ATP 양 측정키트를 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 세포 내 ATP 양 측정방법을 제공한다:

(a) 단백질 전달 도메인(PTD) 및 루시페라아제를 포함하는 PTD-루시페라아제 융합 폴리펩타이드를 분석 대상의 세포에 도입(transduction)시키는 단계; 및

(b) 상기 세포 내에서 상기 루시페라아제에 의한 발광 세기를 측정하는 단계.

본 발명자들은 세포를 용해시키지 않으면서 살아있는 세포 내의 ATP 양을 정확하면서도 보다 간편한 방법으로 측정할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 루시페라아제에 PTD를 결합시킨 PTD-루시페라아제 융합 폴리펩타이드를 세포에 도입하고 살아있는 세포에서 발광하는 빛의 세기를 측정 및 분석하면 정확도 및 간편성 측면에서 보다 개선된 방식으로 ATP의 양을 측정할 수 있음을 규명하였다.

배양 중인 세포는 여러가지 상태로 존재할 수 있는데 예를 들면, 활발하게 증식하고 있는 세포, 독성 물질이나 부적절한 영양공급으로 손상을 받은 세포, 예정된 세포사멸(apoptosis)의 과정으로 진행되는 세포가 있을 수 있다. 세포들의 생존(cell viability), 독성(toxicity), 사멸(apoptosis)은 생물발광(bioluminescence)을 이용한 어세이 방법을 이용하고 측정이 가능하며, 이를 통해 일반적인 세포연구, 의약품 개발 및 독성연구를 수행할 수 있다.

생물발광을 이용하는 어세이의 기본 원리는 세포생존 유지에 필수적 요소인 ATP를 측정하는 것이다. ATP는 건강한 세포에서는 정확하게 조절되지만, 세포 사멸과 동시에 급격한 분해가 일어난다. ATP는 북미 반딧불이의 일종인 포토너스 피랄리스(*Photinus pyralis*)에서 발견된 루시페라아제라는 효소를 이용하여 측정할 수 있다. 루시페라아제는 ATP와 기질인 루시페린 사이의 반응을 촉매하여 빛을 생성시키며, 루시페린 및 루시페라아제가 과량으로 존재할 경우 생성되는 빛의 세기는 ATP 양에 직접적으로 비례한다. 살아있는 세포에서는 세포 내 ATP의 수준이 일정하게 유지되지만 배양 중인 세포의 ATP 수준은 생존하고 있는 세포 수와

직접적인 관련이 있다. 따라서, ATP 의 측정은 세포증식(proliferation)을 측정하기 위한 강력한 수단이 되며, 배양 중에 있는 세포의 증식속진과 저해를 정확하게 측정할 수 있다.

본 발명의 방법의 가장 큰 특징은 ATP 측정을 위한 세포 용해
5 과정없이 살아있는 세포에서 직접 ATP 양을 측정하는 것이다. 세포 용해 과정에서 용해물질의 사용 및 세포 용해물질이 수행하는 다른 작용들은 세포 내 ATP 양에 영향을 미쳐 세포 내 ATP 정량에 있어서 부정확한 결과를 가져온다. 본 발명의 융합 폴리펩타이드는 세포 용해 과정 없이 살아있는 세포에 도입되어 세포 내 ATP 양을 측정할 수 있어 세포 용해에 따른
10 변수없이 신속하고 정확하게 ATP 양을 측정할 수 있다. 이러한 본 발명의 특징은 도 1 에 잘 나타나 있다. 또한, 본 발명의 방법은 세포를 파괴하지 않는 비파괴적 어세이 방법이기 때문에 여러 번 반복하여 시료를 측정하는 것이 가능하며 다른 부가적인 어세이에 동일한 시료를 이용할 수 있다.

본 발명의 융합 폴리펩타이드는 단백질 전달체(protein transduction
15 domain: PTD)에 융합된 루시페라아제(luciferase)를 포함하는 PTD-루시페라아제 융합 폴리펩타이드이다.

본 명세서에서 사용되는 용어 “PTD-루시페라아제 융합 폴리펩타이드” 는 단백질 전달체(PTD)의 C-말단 또는 N-말단에 루시페라아제가 융합된 융합 폴리펩타이드를 의미한다.

본 발명의 PTD-루시페라아제의 구성요소 중 하나인 루시페라아제는 루시페린과 ATP 의 반응을 촉매하여 빛을 나타내게 한다.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 루시페라아제의 아미노산은 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 갖는다.

본 발명의 융합 폴리펩타이드에 이용되는 단백질 전달체(protein
25 transduction domain: PTD)는 루시페라아제의 세포 내로의 유입을 보다 효과적으로 하기 위하여 부가된 것이다. 상기 단백질 전달체에 의하여, 본 발명의 루시페라아제는 세포 수용체(receptor) 및 수송체(transporter) 의존적 방식으로 세포막을 통과한다. 즉, 세포 흡수 작용(pinocytosis), 식세포 작용 (phagocytosis) 및 수용체-매개 세포내 취입
30 작용(endocytosis)이 아닌 세포막 투과 기작을 통해 유입된다. 따라서,

루시페라아제의 세포 내로의 유입이 다른 기전과 비교하여 보다 효율적으로 이루어질 수 있다.

본 발명의 단백질 전달체는 Hph1, Tat, 페네트라틴(Penetratin), 트랜스포탄(Transportan), VP-22, 양쪽 친매성 펩타이드(Amphipathic peptides), MPG, Pep-1, MAP, SAP, PPTG1, 양이온성 펩타이드(Cationic peptides), 올리고알기닌(Oligoarginine), hCT(9-32), SyrB 및 Pvec 를 포함하는 펩타이드이다.

본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 상기 단백질 전달체는 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 가지는 Hph1 이다.

본 발명의 PTD-루시페라아제 융합 폴리펩타이드가 도입되는 세포는 동물세포, 식물세포, 곤충세포 또는 미생물세포이고, 보다 바람직하게는 포유동물 세포이며, 보다 더 바람직하게는 인간, 돼지, 말, 소, 마우스, 랫트, 햄스터, 토끼, 염소 또는 양의 세포이고, 보다 더욱 더 바람직하게는 인간, 돼지, 말 또는 소의 세포이며, 가장 바람직하게는 인간의 세포이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 세포 내 ATP 양을 측정하기 위해 먼저 세포를 배양접시에 배양하고 PTD-루시페라아제 융합 폴리펩타이드를 세포에 도입한 다음, 루시페라아제에 의해 발생한 세포 내 빛의 발광 세기를 측정한다. 루시페라아제에 의한 발광 신호는 당업계에서 공지된 다양한 광 측정 방법을 이용하여 측정할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, PTD-루시페라아제 융합 폴리펩타이드의 세포 도입 후 루시페라아제의 기질로서 루시페린을 세포에 접촉시킨다. 루시페라아제는 루시페린 및 ATP 의 반응을 촉매하여 빛을 발생시키는데 루시페린 및 루시페라아제가 과량으로 존재하는 경우 생성되는 빛의 양은 ATP 양에 직접적으로 비례한다. 따라서, 본 발명의 PTD-루시페라아제 융합 폴리펩타이드를 세포에 도입하고 기질로서 루시페린을 추가적으로 세포에 처리하면 세포 내 ATP 양을 더욱 정확하게 측정할 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 세포 내 ATP 양 측정키트를 제공한다:

(a) 단백질 전달 도메인(PTD) 및 루시페라아제를 포함하는 PTD-루시페라아제 융합 폴리펩타이드; 및

(b) 루시페린.

본 발명의 키트에서 단백질 전달체는 Hph1, Tat, 페네트라틴(Penetratin), 트랜스포탄(Transportan), VP-22, 양쪽 친매성 펩타이드(Amphipathic peptides), MPG, Pep-1, MAP, SAP, PPTG1, 양이온성 펩타이드(Cationic peptides), 올리고알기닌(Oligoarginine), hCT(9-32), SyrB 및 Pvec 를 포함하는 펩타이드이다.

본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 상기 단백질 전달체는 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 가지는 Hph1 이다.

본 발명의 방법은 상기 PTD-루시페라아제 융합 폴리펩타이드를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

15 【효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 세포 내 ATP 양을 측정하는 방법 및 측정키트를 제공한다.

(b) 본 발명은 추가적인 세포 용해과정 없이 세포 내부의 ATP 양을 측정할 수 있다.

(c) 본 발명은 세포 용해 과정에 따른 세포막 인테그리티 변화 및 세포 용해물에 의한 간섭이 발생하지 않으므로 세포 내 ATP 에 대한 고유한 민감도를 가진다.

(d) 본 발명은 살아있는 세포에서 ATP 의 실시간 측정이 가능하며 세포의 생존, 증식, 사멸 및 독성 등 상세한 동역학적 분석에 이용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 PTD-Luc를 이용하여 살아있는 세포에서 세포 내 ATP를 측정하는 방법에 대한 개략도이다. PTD-Luc는 11 개 아미노산(YARVRRRGPRR)을 포함하고 있으며 Luc는 대조군으로 이용함.

일반적인 ATP 어세이는 ATP를 포함하는 세포 내용물을 배출시키기 위해 세포 용해과정을 필수적으로 수행하는 반면, 살아있는 세포 기반 ATP 어세이에서 PTD-Luc는 세포막을 통과할 수 있기 때문에 세포 용해 없이 직접 세포 내 ATP 양을 측정할 수 있음. C: 세포질(cytosol); N: 핵(nucleus).

도 2는 헬라 세포에서 PTD-Luc의 세포 투과를 확인한 결과이다. (A) 알렉사 647-PTD-Luc를 SDS-PAGE에 전기영동하여 분리한 후 쿠마시 블루(좌측)로 염색 또는 IVIS-200 이미징 시스템(우측)을 이용하여 가시화한 것임. (B) 헬라 세포에서 알렉사 647-PTD-Luc의 세포 투과에 대한 대표적인 형광 이미지임. 헬라 세포를 170 nM 알렉사 647-PTD-Luc 또는 알렉사 647-Luc를 포함하는 글루코오스-프리 링거 용액에 30분간 배양하였음. 핵은 Hoechst 33342(HO, inset)로 염색하였음. 알렉사 647 신호(황색)가 세포 내에서 생성됨(스케일 바, 5 μ m). C: 세포질(cytosol); N: 핵(nucleus), CM: 세포막(cell membrane). (C) 헬라 세포 용해물로부터 루시페라아제 및 β -액틴을 웨스턴 블롯으로 측정함. 헬라 세포에 40 nM PTD-Luc 또는 Luc를 처리하고 5분간 배양한 다음, 글루코오스-프리 링거 용액으로 2회 세척함. 세포를 용해시킨 다음, 세포 내 Luc 또는 PTD-Luc의 존재를 항-루시페라아제 항체를 이용하여 측정함.

도 3은 인 비트로 ATP 어세이에서 PTD 결합 효과를 측정한 결과이다. (A) 대표적인 형광 이미지임. PTD-Luc(40 pM) 또는 Luc(10 pM)를 기재된 농도의 ATP를 포함하는 루시페린 기질 용액과 배양함. (B) 형광 강도(p/s, y-축) 및 ATP 농도(nM, x-축) 간의 상관관계를 나타낸 그래프임. 기호는 측정값을 나타내며, 선은 선형 데이터 피트를 나타냄. 피어슨 상관관계수(R)은 플롯 위에 표시함.

도 4는 인 비보 ATP 어세이에서 PTD-Luc를 평가한 결과이다. 헬라 세포를 웰(96웰) 당 0-100,000 개 세포로 2배 단계 희석하고, 10% FBS를 포함하는 DMEM에서 배양함. 발광신호(p/s)는 40 nM Luc 또는 PTD-Luc 처리 5분 후에 측정함. 웰 당 세포 수 50-1,000개(A) 및 1,000개 이상(B)에 대한 발광신호를 측정함. 기호는 측정값을 나타내며, 선은 선형 데이터 피트를 나타냄. 피어슨 상관관계수(R)는 플롯 위에 표시함.

도 5는 당분해 억제제 2-DG(A) 및 IAA(B) 그리고 KCN(C)의

운동역학적 분석 결과를 나타내는 그래프이다. 헬라 세포를 당분해 억제제를 포함하는 글루코오스-프리 링거 용액에서 1시간 동안 배양한 다음, PTD-Luc(40 nM) 처리 5분 후 발광신호(p/s)를 측정함. 실험결과는 대조군(억제제 무처리)에 대한 발광신호의 상대적 평균 백분율로 표현함. 기호는 $\pm$ 표준편차를 의미하며, 선은 선형 데이터 핏을 나타냄. IC₅₀은 플롯 면적에서 정해짐. 데이터는 3번의 독립 실험에서 4개 샘플로부터 수득함.

【발명의 실시를 위한 구체적인 내용】

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

실시예

재료 및 방법

세포 배양

헬라(HeLa) 세포는 ATCC(American Type Culture Collection; 미국)에서 구입하고, 10% 우태아혈청, 100 U/mL 페니실린 및 100 U/mL 스트렙토마이신을 추가적으로 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 5% CO₂, 37°C 조건으로 배양하였다. 항-대사물질에 대한 ATP 반응을 측정하기 위해, 헬라 세포를 대사 억제제 2-디옥시글루코오스(Sigma, 미국), 요오드 아세트산(Sigma, 미국) 또는 시안화칼륨(Sigma, 미국)을 포함하는 글루코오스 프리 링거 버퍼(116 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM KH₂PO₄, 4.8 mM NaHCO₃, 1.8 mM CaCl₂ 및 20 mM HEPES, pH 7.2)에서 공동배양하였다(8).

ATP 어세이

반딧불이 루시페라아제-결합 단백질 형질도입 도메인(PTD-Luc)은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열(YARVRRRGPRR)을 가지며, 루시페라아제(Luc) 단백질의 발현 및 정제는 종래에 알려진 방법에 따라

수행하였다(7, 9). 세포를 이용하지 않고 루시페라아제 어세이를 수행하기 위해, 1 mM d-루시페린(Biosynth International, 미국) 및 15 mM $MgSO_4$ 가 들어있는 30 mM HEPES(pH 7.8)를 포함하는 루시페린 기질 용액을 신선한 탈이온화 무(free)-ATP 물을 이용하여 준비하였다. ATP(ATP 디소듐 나트륨, Sigma)는 루시페린 기질용액으로 단계 희석하였다. PTD-Luc 또는 Luc 각 10 μ L씩을 90 μ L의 루시페린 기질용액과 혼합한 다음, 즉시 루시페라아제 활성을 IVIS-200 이미징 시스템(Xenogen Corp., 미국)을 이용하여 측정하였다.

세포 내 ATP 어세이를 수행하기 위해, 헬라 세포를 블랙웰 96웰 마이크로타이터 플레이트에 70% 정도로 분포하도록 배양하였다. Luc 또는 PTD-Luc 처리 1시간 전에 배양액을 글루코오스-프리 링거 버퍼로 교체한 다음, 세포에 2-DG, IAA 또는 KCN을 도 5에 기재된 농도로 처리하였다. 그 다음, 40 nM Luc 또는 PTD-Luc을 5분간 처리하고 d-루시페린을 최종 농도 150 μ g/mL이 되도록 첨가하였다. IVIS-200 시스템을 이용하여 약 30초간 빛을 방출하였고, Xenogen Living Image® 소프트웨어를 이용하여 광자 변화(photons/s, p/s)를 정량하였다.

형광 공초점 현미경

알렉사 647 단백질 라벨링 키트(Life Technologies, 미국)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 정제한 PTD-Luc 단백질을 라벨링하였다. 간략하게 설명하면, 단백질을 알렉사 647 염료와 상온에서 2시간 반응시킨 다음, BioGel P-30(40,000 MWC0; Bio-Rad, 미국)을 이용하여 염료를 제거하였다. 단백질 라벨링 효율은 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였으며, 사용 전에 퀄리티 확인을 위해 Xenogen IVIS-200 이미징 시스템(Xenogen)을 이용하여 분석하였다(10).

세포 내부를 가시화하기 위해, 헬라 세포에 170 nM PTD-Luc-알렉사 647을 포함하는 글루코오스 프리 링거 용액을 처리하고 37°C, 5% CO_2 조건으로 30분간 배양하였다. PBS로 세포를 2회 세척한 다음, 4% 파라포름알데히드로 10분간 고정시키고 Hoechst 33342(Molecular Probes, 미국)으로 상온에서 10분간 염색하였다. 형광 시그널은 공초점 레이저 스캐닝 현미경(LSM-5 and LSM System, ver. 3.98; Carl Zeiss, 독일)을

이용하여 분석하였다.

웨스턴 블롯 분석

웨스턴 블롯 분석은 종래에 알려진 방법에 따라 수행하였다(7).

- 5 단백질 농도는 BCA(bicinchoninic acid)를 이용한 단백질 어세이(Pierce Biotechnology, 미국)를 통해 결정하였다. 1차 항체는 루시페라아제 특이적 항체(Sigma, 1:1,000) 또는 베타-액틴 특이적 항체(Sigma, 1:10,000)를 이용하였다. 면역반응성 단백질은 HRP(horseradish peroxidase)-결합 IgG(Santa Cruz Biotechnology, 미국, 1:5,000) 및 ECL 키트(Amersham, 10 영국)를 이용하여 검출하였다.

통계학적 분석

용량 반응 곡선(Dose-response curve) 및 데이터 분석은 Prism 4(GraphPad Software, 미국)를 이용한 비선형 회귀 분석을 통해 실시하였다. 15 통계학적 상관관계를 측정하기 위해 루시페라아제 활성 및 ATP 농도 또는 세포 숫자 사이의 피어슨 상관관계수(R)를 계산하였다. 유의적인 차이는 짝 비교 t-검정을 이용하여 측정하였다. 각 결과는 $\pm$ SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 로 표시하였다.

20 실험 결과

- 본 발명자들은 종래의 연구에서 PTD-매개 전달을 통해 루시페라아제가 원형질막을 빠르게 횡단한다는 것을 보고하였고, 살아있는 세포에서 PTD 전달 효율을 정량화하였다(7). 본 발명에서는 PTD-Luc가 세포 추출과정 없이 세포 내 ATP를 실시간 측정하는 효과적인 센서임을 25 증명하였다(참조: 도 1). PTD-Luc의 세포 내 유입을 확인하기 위해, PTD-Luc 단백질을 알렉사 647로 라벨링 시키고 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 그 결과, PTD-Luc 단백질 및 알렉사 647가 라벨링된 PTD-Luc 단백질 모두 61 kDa 정도에서 단일 밴드를 나타냈는데, PTD-Luc 단백질과 비교하여 알렉사 647이 라벨링된 PTD-Luc 단백질은 약간의 밴드 쉬프트를 보였다(도 30 2A, 좌측 패널). 추가적으로, 형광 신호는 알렉사 647-PTD-Luc에서만 검출되었다(도 2A, 우측 패널). 알렉사 647-PTD-Luc의 세포 내 분포를

조사하기 위해, 헬라 세포에 알렉사 647-PTD-Luc를 30분간 처리한 다음, 공초점 형광 이미지를 촬영하였다. 알렉사 647-PTD-Luc의 형광은 세포 사이토졸 전체에서 관찰된 반면, 알렉사 647-Luc 형광은 세포 막 주변에서 일부 관찰되었으나 사이토졸에서는 거의 관찰되지 않았다(도 2B). 이러한 결과는 Luc와 비교하여 PTD-Luc의 세포 내 유입이 현저하게 높다는 것을 의미하며, 이를 PTD-Luc 처리 세포의 용해물에 대한 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하였다(도 2C). PTD-Luc의 우수한 세포 내 유입은 세포 내 루시페라아제 반응을 유도하는데, 이를 이용하면 세포 추출 과정없이 세포 내 ATP 함량을 바로 측정할 수 있다.

본 발명자들은 인 비트로 루시페라아제 어세이를 이용하여 Luc 및 PTD-Luc의 ATP 농도-의존적 선형성을 비교함으로써 PTD 결합이 ATP 측정에 있어서 루시페라아제 활성의 민감도 및 신뢰도에 영향을 미치는지 조사하였다. 40 pM PTD-Luc 및 10 pM Luc의 발광 신호가 비슷한 수준을 나타낸 것과 같이, PTD 결합은 실험한 전체 농도 범위에 걸쳐 ATP에 대한 루시페라아제 반응의 민감도를 현저하게 감소시켰다. 그렇지만, PTD-Luc의 민감도는 10^{-9} M 이하의 ATP를 측정하기에 충분하였다(도 3A). 더욱이 PTD-Luc의 루시페라아제 활성은 ATP 농도에 비례하였고($R = 0.999$, $p < 0.001$; 도 3B), Luc의 신뢰도와 비교하여 뒤지지 않았으며($R = 0.999$, $p < 0.001$), 이러한 결과는 PTD 결합이 ATP에 대한 루시페라아제 반응의 신뢰도에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

세포 내 ATP 측정에 대한 PTD-Luc의 민감성 및 신뢰도를 평가하기 위해, 다양한 숫자의 세포에 PTD-Luc를 처리한 다음 세포 내 발광 신호를 조사하였다. 헬라 세포를 웰 당 0-100,000 개 세포로 2배 단계 희석하고, PTD-Luc 또는 Luc를 처리한 다음 5분 후에 발광 신호를 측정하였다. 1,000 개 헬라 세포에서 PTD-Luc의 발광 신호는 Luc와 비교하여 12.6배 높았으며, 50개 세포에서도 PTD-Luc의 세포 내 발광 신호가 측정되었다. 발광 신호 및 세포 숫자간의 강한 연관관계는 넓은 세포 숫자 범위에서 발견되었다(도 4, 1,000 개 이상의 세포에서 $R = 0.985$, $p < 0.001$, ; 1,000 개 이하의 세포에서 $R = 0.960$, $p < 0.001$). 이러한 결과는 세포 용해물을 이용한 많은 연구결과와 일치하는데, 이들은 세포 숫자와 직접적으로 비례하는 ATP 바이오 발광 양을 나타낸다(2, 11, 12).

이와 비교하여, Luc 처리군에서 측정된 발광 신호는 세포 숫자와 상관관계를 나타내지 않았으며(1,000 개 이상의 세포에서 $R = 0.697$, $p = 0.124$; 1,000 개 이하의 세포에서 $R = 0.273$, $p = 0.417$), PTD-Luc 보다 현저히 낮은 발광 신호를 나타냈다:

- 5 PTD-Luc와 비교하여 Luc의 낮은 민감도 및 신뢰도는 세포 내 유입이 이루어지지 않는 것에 의해 설명된다. PTD 결합이 세포 외 ATP 측정에 대한 민감도를 감소시키지만, 세포 내 ATP 측정에 대한 민감도 및 신뢰도는 현저하게 증가시킨다는 점에서 살아있는 세포를 기반으로 하는 세포 내 ATP 측정에 PTD-Luc가 효과적으로 이용될 수 있다.
- 10 본 발명자들은 치료제 스크리닝에 있어서 후보 화학물질의 세포 내 독성을 예측하는 약물학적 적용에서 본 발명의 살아있는 세포를 기반으로 하는 세포 내 ATP 어세이를 확인하였다. 이를 위해, 3개의 대표적 대사 블로커(2-DG, IAA 및 KCN)를 이용하였다. 2-DG는 글루코오스의 비-대사 아날로그로서 당분해를 촉진시키는 첫 번째 효소인 헥소키나아제를
- 15 억제한다. IAA는 G3PDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 특이적 비가역 억제제로서 당분해를 촉진시키는 여섯 번째 효소이다(13, 14). 억제제를 처리하기 전에, 2-DG 또는 IAA 처리에 따른 당분해 과정의 억제를 확실히 하기 위해서 헬라 세포는 글루코오스-프리 링거 용액에 1시간 동안 배양시켰다(8). 예상한 바와 같이, 2-DG(IC_{50} : 72.13 ± 1.11
- 20 μM)에 의한 글루코오스 이용 억제는 PTD-Luc의 발광 신호를 빠르게 감소시켰다(도 5A). IAA(IC_{50} : $15.96 \pm 1.06 \mu M$)를 1시간 처리한 경우, 발광 강도가 감소하였고, 2-DG와 비교하여 보다 큰 ATP 감소를 나타냈다. 이러한 결과는 짐작컨대 헬라 세포에서 G3PDH의 양이 작고, IAA는 화학량적(stoichiometric) 방식으로 G3PDH를 억제하기 때문일 것이라고
- 25 생각된다(15). 2-DG 및 IAA의 억제 작용과 반대로 KCN은 산화적 인산화를 억제하며 이는 세포 내 ATP 함량에 영향을 미치지 않으며(도 5C), 이러한 결과는 FRET-기반 ATP 표시자를 이용한 KCN의 효과 부재에 대한 종래의 보고와도 일치한다(3, 16). 당분해 경로 및 산화적 인산화 억제에 대한 다른 효과들은 당분해 경로를 통해 주로 ATP를 생산하는 암 세포(예컨대,
- 30 헬라 세포)의 특이성에서 기인할 것이다(17, 18). 다른 대사 억제제에 따른 PTD-Luc의 다른 ATP 반응은 치료제 스크리닝에 있어서 상세한 운동역학적

분석을 수행할 수 있도록 한다.

논의

본 발명은 PTD-Luc를 이용한 바이오 발광 모니터링에 관한 것으로
 5 살아있는 포유동물 세포 또는 미생물 세포(19)에서 높은 민감도 및
 신뢰도를 나타내는 효과적인 세포 내 ATP 측정 시스템을 제공한다. PTD-
 Luc를 이용한 ATP 어세이의 가장 큰 장점은 다음과 같다: (1) 세포 내부의
 루시페라아제 반응을 측정하기 때문에 세포 내 ATP에 대해 고유한 민감도를
 가짐; (2) 세포막 인테그리티의 변화 또는 세포 물질대사에 대한 간섭없이
 10 ATP를 측정할 수 있음(20); (3) 살아있는 세포에서 실시간으로 측정이
 가능하며 상세한 동역학 분석 가능; 및 (4) 추가적인 세포 추출과정이
 필요없음. 따라서, 살아있는 세포를 기반으로 하는 PTD-Luc를 이용한 세포
 내 ATP 측정 어세이는 제약산업에서 다양한 컴파운드 라이브러리의 세포 내
 독성에 대한 초고속 스크리닝(high-throughput screening, HTS)을 위한
 15 유용한 툴이 될 수 있다.

참고문헌

1. Garewal, H.S.; Ahmann, F.R.; Schiffman, R.B.; Celniker, A. ATP assay:
 Ability to distinguish cytostatic from cytotoxic anticancer drug
 20 effects. *J. Natl. Cancer Inst.* 1986, 77, 1039-1045.
2. Crouch, S.P.; Kozlowski, R.; Slater, K.J.; Fletcher, J. The use of
 ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and
 cytotoxicity. *J. Immunol. Method.* 1993, 160, 81-88.
3. Imamura, H.; Nhat, K.P.; Togawa, H.; Saito, K.; Iino, R.; Kato-
 25 Yamada, Y.; Nagai, T.; Noji, H. Visualization of ATP levels inside
 single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based
 genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009, 106,
 15651-15656.
4. Prioli, R.P.; Tanna, A.; Brown, I.N. Rapid methods for counting
 30 mycobacteria-comparison of methods for extraction of mycobacterial
 adenosine triphosphate (ATP) determined by firefly luciferase assay.

Tubercle 1985, 66, 99-108.

5. Askgaard, D.S.; Gottschau, A.; Knudsen, K.; Bennedsen, J. Firefly luciferase assay of adenosine triphosphate as a tool of quantitation of the viability of BCG vaccines. *Biologicals* 1995, 23, 55-60.

5 6. Minor, L.K. *Handbook of Assay Development in Drug Discovery* Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA, 2006; p. 488.

7. Lee, M.S.; Kwon, E.H.; Choi, H.S.; Kwon, S.H.; Lee, C.H.; Shim, I.S.; Lee, S.K.; Her, S. Quantification of cellular uptake and *in vivo* tracking of transduction using real-time monitoring. *Biochem. Biophys.*

10 *Res. Commun.* 2010, 394, 348-353.

8. Koop, A.; Cobbold, P.H. Continuous bioluminescent monitoring of cytoplasmic ATP in single isolated rat hepatocytes during metabolic poisoning. *Biochem. J.* 1993, 295, 165-170.

9. Choi, J.M.; Ahn, M.H.; Chae, W.J.; Jung, Y.G.; Park, J.C.; Song, H.M.; Kim, Y.E.; Shin, J.A.; Park, C.S.; Park, J.W.; *et al.* Intranasal delivery of the cytoplasmic domain of CTLA-4 using a novel protein transduction domain prevents allergic inflammation. *Nat. Med.* 2006, 12, 574-579.

10. Lee, M.S.; Kim, Y.H.; Kim, Y.J.; Kwon, S.H.; Bang, J.K.; Lee, S.M.; Song, Y.S.; Hahm, D.H.; Shim, I.; Han, D.; Her, S. Pharmacokinetics and biodistribution of human serum albumin-TIMP-2 fusion protein using near-infrared optical imaging. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2011, 14, 368-377.

11. Manfredi, G.; Yang, L.; Gajewski, C.D.; Mattiazzi, M. Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods* 2002, 26, 317-326.

25 12. Finger, S.; Wiegand, C.; Buschmann, H.J.; Hipler, U.C. Antimicrobial properties of cyclodextrin-antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay. *Int. J. Pharm.* 2012, 436, 851-856.

13. Bogliolo, M.; Borghini, S.; Abbondandolo, A.; Degan, P. Alternative metabolic pathways for energy supply and resistance to apoptosis in Fanconi anaemia. *Mutagenesis* 2002, 17, 25-30.

14. Kockskamper, J.; Zima, A.V.; Blatter, L.A. Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release by glycolysis in cat atrial myocytes. *J. Physiol.* 2005, *564*, 697-714.
15. Keenan, J.; Liang, Y.; Clynes, M. Two-Deoxyglucose as an anti-metabolite in human carcinoma cell line RPMI-2650 and drug-resistant variants. *Anticancer Res.* 2004, *24*, 433-440.
16. Ando, T.; Imamura, H.; Suzuki, R.; Aizaki, H.; Watanabe, T.; Wakita, T.; Suzuki, T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLOS Pathog.* 2012, *8*, e1002561.
17. Rossignol, R.; Gilkerson, R.; Aggeler, R.; Yamagata, K.; Remington, S.J.; Capaldi, R.A. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 2004, *64*, 985-993.
18. Wu, M.; Neilson, A.; Swift, A.L.; Moran, R.; Tamagnine, J.; Parslow, D.; Armistead, S.; Lemire, K.; Orrell, J.; Teich, J.; *et al.* Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007, *292*, C125-C136.
19. Nekhotiaeva, N.; Elmquist, A.; Rajarao, G.K.; Hallbrink, M.; Langel, U.; Good, L. Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides. *FASEB J.* 2004, *18*, 394-396.
20. Lelek, M.; Di Nunzio, F.; Henriques, R.; Charneau, P.; Arhel, N.; Zimmer, C. Superresolution imaging of HIV in infected cells with FLAsH-PALM. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012, *109*, 8564-8569.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의

통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

다음 단계를 포함하는 세포 내 ATP 양 측정방법:

(a) 단백질 전달 도메인(PTD) 및 루시페라아제를 포함하는 PTD-
5 루시페라아제 융합 폴리펩타이드를 분석 대상의 세포에
도입(transduction)시키는 단계; 및

(b) 상기 세포 내에서 상기 루시페라아제에 의한 발광 세기를
측정하는 단계.

10 【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 단백질 전달 도메인은 Hph1, Tat,
페네트라틴(Penetratin), 트랜스포탄(Transportan), VP-22, 양쪽 친매성
펩타이드(Amphipathic peptides), MPG, Pep-1, MAP, SAP, PPTG1, 양이온성
펩타이드(Cationic peptides), 올리고알기닌(Oligoarginine), hCT(9-32),
15 SyrB 및 Pvec 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 세포
내 ATP 양 측정방법.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 단백질 전달 도메인은 서열목록 제 2 서열의
20 아미노산 서열을 가지는 Hph1 인 것을 특징으로 하는 세포 내 ATP 양
측정방법.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 세포에 루시페린을 접촉시키는
25 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 내 ATP 양 측정방법.

【청구항 5】

다음을 포함하는 세포 내 ATP 양 측정키트:

(a) 단백질 전달 도메인(PTD) 및 루시페라아제를 포함하는 PTD-
30 루시페라아제 융합 폴리펩타이드; 및

(b) 루시페린.

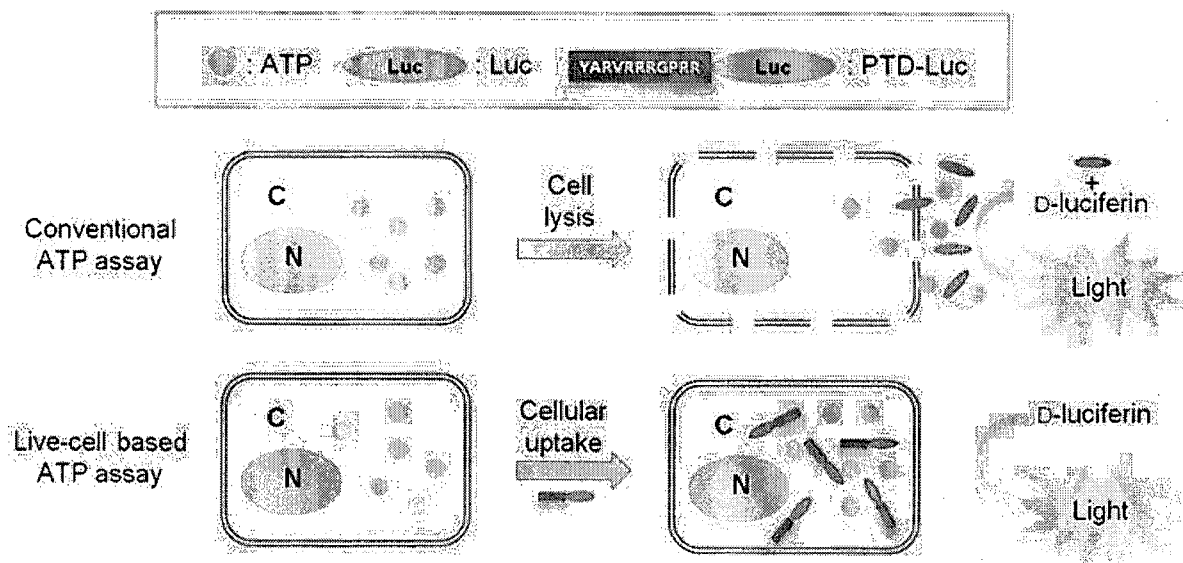
【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 단백질 전달 도메인은 Hph1, Tat, 페네트라틴(Penetratin), 트랜스포탄(Transportan), VP-22, 양쪽 친매성 펩타이드(Amphipathic peptides), MPG, Pep-1, MAP, SAP, PPTG1, 양이온성 펩타이드(Cationic peptides), 올리고알기닌(Oligoarginine), hCT(9-32), SyrB 및 Pvec 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 세포 내 ATP 양 측정키트.

【청구항 7】

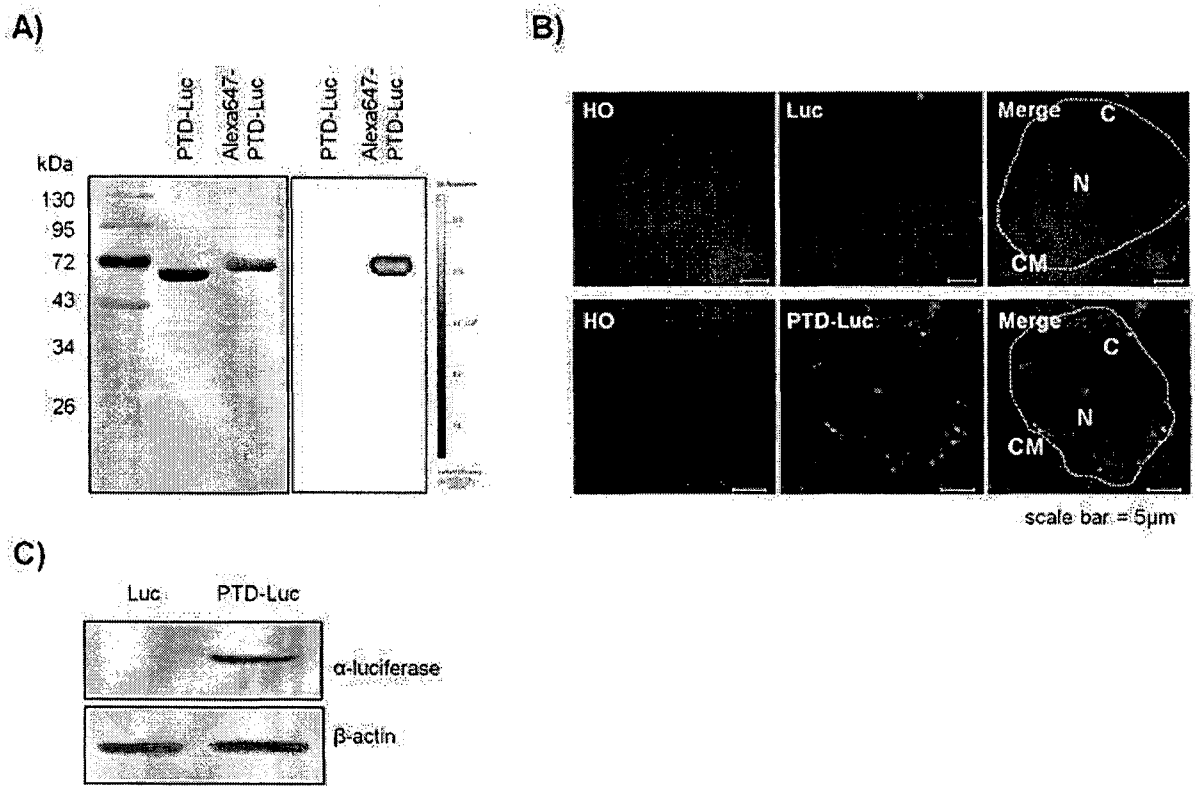
10 제 6 항에 있어서, 상기 단백질 전달 도메인은 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 가지는 Hph1 인 것을 특징으로 하는 세포 내 ATP 양 측정키트.

1/5

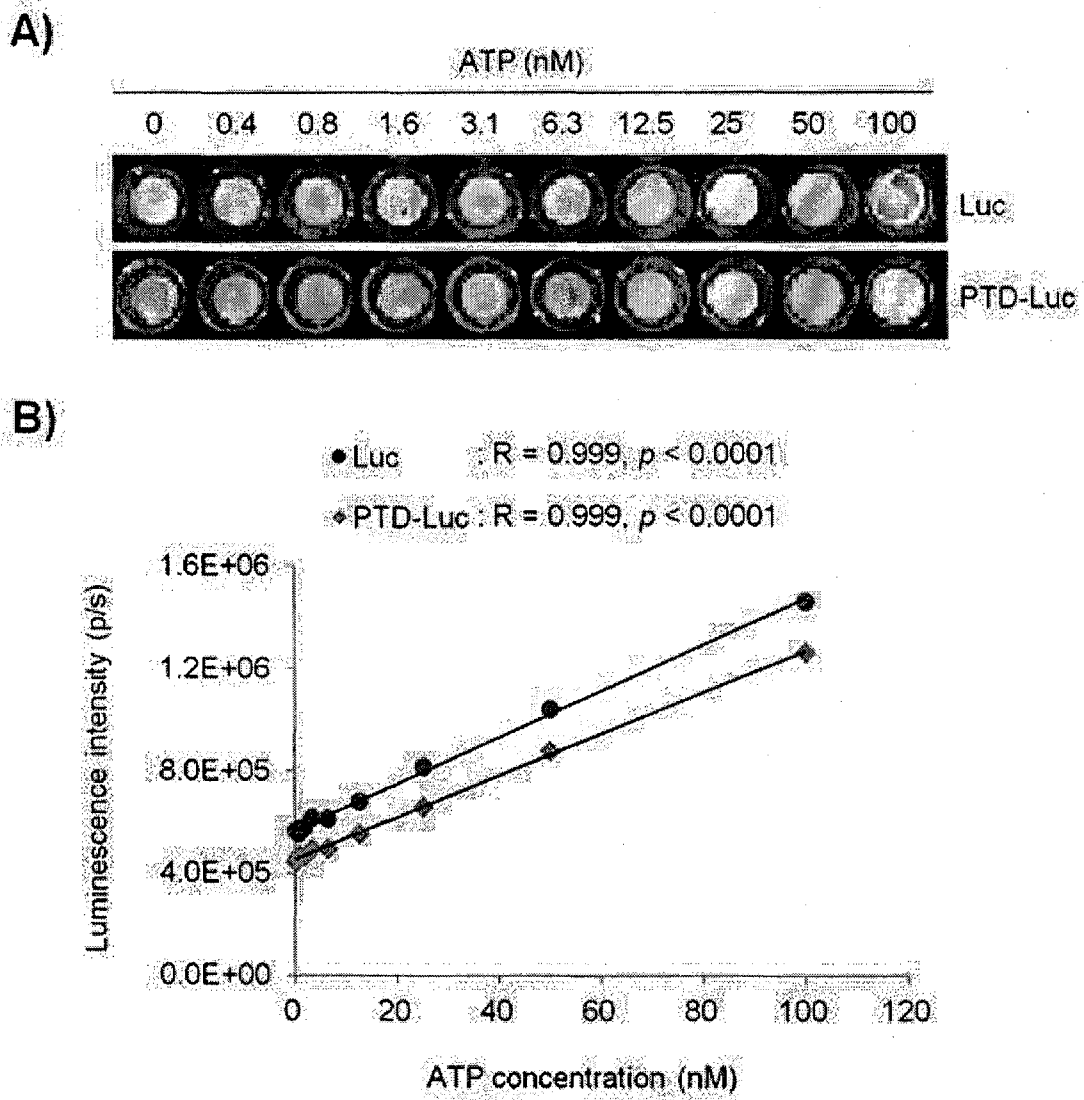
Fig. 1

2/5

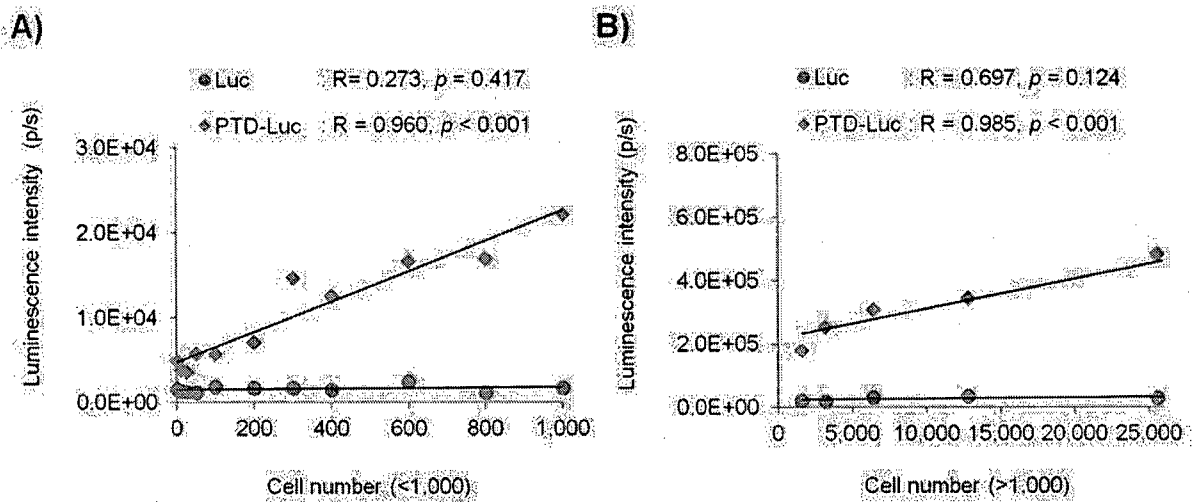
Fig. 2



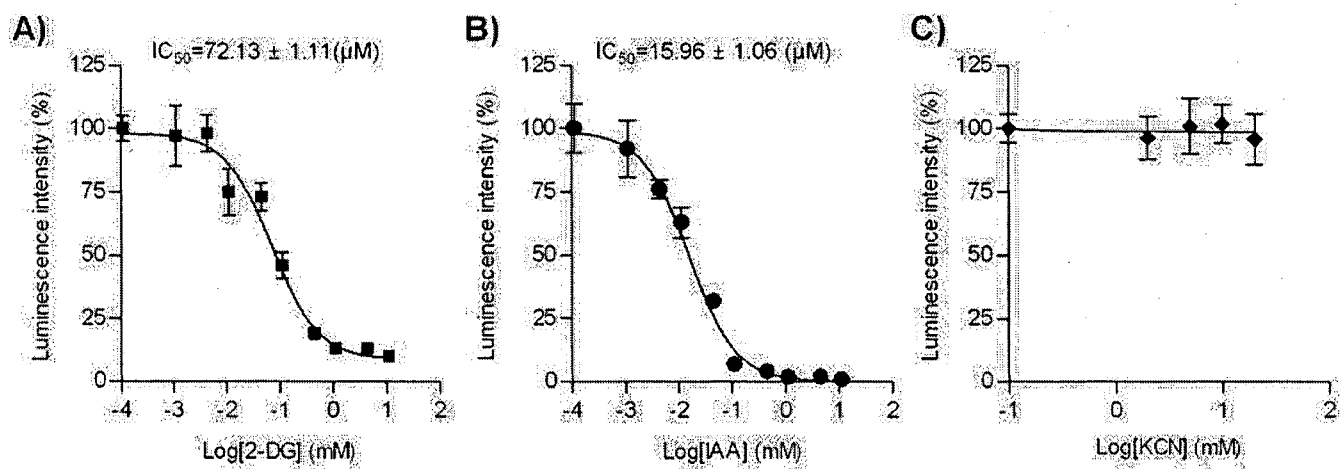
3/5

Fig. 3

4/5

Fig. 4

5/5

Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/003408**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/26(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/26; C12N 15/74; A61K 38/18; G01N 33/68; G01N 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: ATP measurement, protein transduction domain, luciferase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE et al., "Quantification of cellular uptake and in vivo tracking of transduction using real-time monitoring" Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 394, no. 2, pp. 348-353 (02 April 2010) See the entire document.	1-7
A	US 2010-0130414 A1 (LOSORDO et al.) 27 May 2010 See abstract and claims 1, 9-10.	1-7
A	EGUCHI et al., "Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein" Nature Biotechnology, vol. 27, no. 6, pp. 567-571 (17 May 2009) See abstract, page 570 and figure 3.	1-7
A	HASHIDA et al., "Fusion of HIV-1 Tat protein transduction domain to poly-lysine as a new DNA delivery tool" British Journal of Cancer, vol. 90, no. 6, pp. 1252-1258 (24 February 2004) See abstract and figure 1253.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 JULY 2013 (11.07.2013)

Date of mailing of the international search report

11 JULY 2013 (11.07.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/003408

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2010-0130414 A1	27/05/2010	WO 2008-057313 A2 WO 2008-057313 A3	15/05/2008 27/11/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/26(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/26; C12N 15/74; A61K 38/18; G01N 33/68; G01N 33/50 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: ATP 측정, 단백질 전달 도메인, 루시퍼라아제		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LEE 외, 'Quantification of cellular uptake and in vivo tracking of transduction using real-time monitoring' Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.394, No.2, pp.348-353 (2010.04.02.) 전체 문헌 참조.	1-7
A	US 2010-0130414 A1 (LOSORDO 외) 2010.05.27 요약 및 청구항 1, 9-10 참조.	1-7
A	EGUCHI 외, 'Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein' Nature Biotechnology, Vol.27, No.6, pp.567-571 (2009.05.17.) 요약, 페이지 570 및 도면 3 참조.	1-7
A	HASHIDA 외, 'Fusion of HIV-1 Tat protein transduction domain to poly-lysine as a new DNA delivery tool' British Journal of Cancer, Vol.90, No.6, pp.1252-1258 (2004.02.24.) 요약 및 페이지 1253 참조.	1-7
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 07월 11일 (11.07.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 07월 11일 (11.07.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371 

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2010-0130414 A1	2010/05/27	WO 2008-057313 A2 WO 2008-057313 A3	2008/05/15 2008/11/27