



- (51) 국제특허분류:
C07K 19/00 (2006.01) A61K 8/92 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/006278
- (22) 국제출원일: 2014년 7월 11일 (11.07.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 주식회사 프로셀테라퓨틱스 (PROCELL THERAPEUTICS INC.) [KR/KR]; 152-779 서울시 구로구 디지털로 273, 1009호 (구로동, 에이스트윈타워 2), Seoul (KR). 인스티튜트 큐리 (INSTITUT CURIE) [FR/FR]; F-75248 프랑스 파리 세덱스 05, 뒤킵. 26, Paris (FR).
- (72) 발명자: 이병규 (LEE, Byung Kyu); 435-730 경기도 군포시 수리산로 244, 993동 1201호 (산본동, 백두아파트), Gyeonggi-do (KR). 신기덕 (SHIN, Ki Deok); 305-742 대전시 유성구 배울1로 13, 211동 602호 (관평동, 대우푸르지오), Daejeon (KR). 김한수 (KIM, Han Soo);

134-820 서울시 강동구 양재대로 1340, 415동 803호 (둔촌1동, 주공아파트), Seoul (KR). 윤진아 (YOON, Jin A); 150-832 서울시 영등포구 도림로 371, 602호 (도림동), Seoul (KR). 라포조그래커 (RAPOSO, Graca); F-75004 프랑스 파리 8 우이서 막당, Paris (FR). 들르브 아시드릭 (DELEVOYE, Cedric); F-94220 프랑스 샤희앙 푸리퐁 139 우이더 페리, Charenton le Pont (FR). 유어뱅 일세 (HURBAIN, Ilse); F-91440 프랑스 부 17 우이더 독터 호우, Bures (FR). 텐자테니엘 (TENZA, Daniele); F-95470 프랑스 슈빌리 31 슈만 디지털, Survilliers (FR).

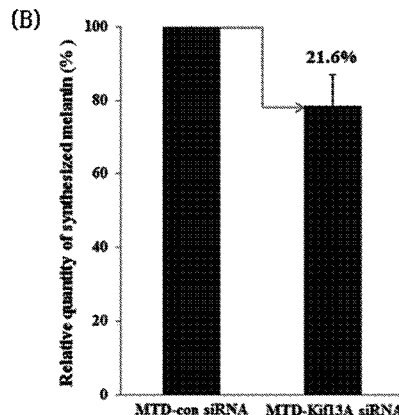
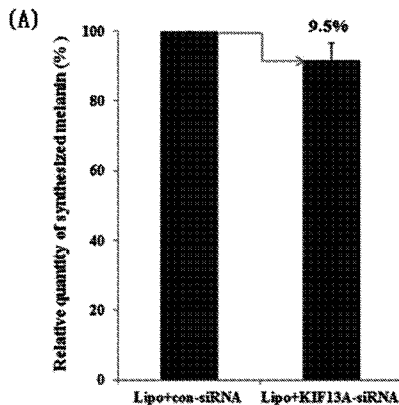
(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 135-846 서울특별시 강남구 영동대로 85길 28, 6층 명진국제특허법률사무소, Seoul (KR).

(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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PEPTIDE-SIRNA COMPLEX FOR TRANSDERMAL DELIVERY USING INTRACELLULAR MOLECULAR TRANSPORT PEPTIDE, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 세포 내 분자 전송 펩티드를 이용한 경피 전달용 펩티드-SIRNA 복합체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a method for effectively delivering an siRNA, which encodes a material regulating a biofunction, into an organism by using an intracellular molecular transport peptide. Specifically, the composition in which an siRNA, which cannot readily permeate into a cell due to the molecular weight size thereof and a characteristic of having an excessive negative charge, and a peptide having remarkable intracellular molecular transport ability are chemically fused, does not exhibit toxicity to skin cells, can be effectively used for delivering an siRNA, which can effectively inhibit a Kif13A gene playing an important role in melanin formation, into skin cells, and can be formulated into various forms, and thus can be useful as a differentiated material for a functional whitening cosmetic material.

(57) 요약서: 본 발명은 세포내 분자 전송 펩티드를 이용하여 생체기능을 조절하는 물질을 코딩하는 siRNA를 생체 내로 효과적으로 전달하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 조성물은 분자량의 크기 및 과다한 음전하를 보유한 특성으로 인해 세포 내 투과가 용이하지 않은 siRNA를 생체 내 분자 전송능이 탁월한 펩티드를 화학적으로 융합한 것으로, 피부세포에 독성을 나타내지 않으며 피부 세포 내로 멜라닌 형성에 중요한 역할을 하는 Kif13A 유전자를 효과적으로 저해할 수 있는 siRNA를 피부세포 안으로 전달하는 데 효과적으로 이용될 수 있을 뿐 아니라, 다양한 형태로 제형화가 가능하여, 차별화된 미백 기능성 화장품의 원료로 유용하게 이용될 수 있다.



MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (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,

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 세포 내 분자 전송 펩티드를 이용한 경피 전달용 펩티드-SIRNA 복합체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 세포 내 분자 전송 펩티드를 이용한 경피 전달용 펩티드-siRNA 복합체 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 멜라닌 형성(melanogenesis)을 저해하는 Kif13A-siRNA와 세포내 분자 전송 펩티드의 공유결합에 의해 형성된 복합체를 포함하는 경피 전달용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 일반적으로 피부는 표피, 진피, 피하지방으로 구성되어 있고, 보호기능, 장벽기능, 온도조절기능, 배설기능, 호흡기능 등 다양한 역할을 하고 있는 아주 중요한 기관이다(Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. Exp Dermatol. 17(12):1063-72. 2008). 표피의 각질층은 피부의 가장 바깥에 존재하면서 피부 밖으로의 수분 손실, 기계적인 스트레스(mechanical stress), 감염 등을 방지하는 중요한 역할을 한다(Sotiropoulou PA, Blanpain C. Cold Spring Harb Perspect Biol. 4:a008383. 2012).
- [3] 이러한 피부의 색깔은 멜라닌에 의해 근본적으로 결정된다(Nesterov A, Zhao J, Minter D, Hertel C, Ma W, Abeyasinghe P, Hong M, Jia Q. Chem Pharm Bull. 56(9):1292-96. 2008). 특히, 인종에 의한 피부색의 차이는 개개인의 멜라닌형성세포에 있는 멜라노솜의 생성능력과 표피로 이동하는 멜라노솜의 수, 성숙도, 존재양식에 의해 나타난다. 즉, 백인의 표피세포 내에는 멜라노솜이 일반적으로 막에 둘러싸여 집괴상의 멜라노솜 복합체를 형성하지만, 유색인종에서는 멜라노솜들이 산재하여 분포하고 있기 때문에 짙은 색으로 보여진다. 흑인의 경우는 백인에 비하여 유전적으로 더 많은 멜라닌을 생성하고, 생성하는 멜라닌의 종류도 유멜라닌(eumelanin)의 비율이 더 높으며, 또한 각질형성세포 내에서 멜라닌이 더 퍼지게 되어 있어서 결국은 피부색이 더 검게 보인다(Riley PA. Int J Biochem Cell Biol. 29: 1235-39. 1997).
- [4] 멜라닌은 표피조직의 기저층에 존재하는 멜라닌세포(melanocyte)에서 생성되는데, 이 멜라닌세포는 표피 내 세포 중 약 5%를 차지하며, 일부는 케라티노사이트(keratinocyte)의 중간에 섞여있다. 구조적으로는 수지상돌기를 가진 형태로, 주변으로 확장되어 멜라노솜을 운반하는 일을 하게 된다.
- [5] 멜라노솜(melanosome)은 멜라닌으로 채워진 막형태의 과립으로 멜라닌을 수지상돌기의 끝으로 이동시키는 역할을 한다. 형태학적인 기준에 따라 4단계로 발달(성숙)하는데, 유멜라닌이 많으면 타원형의 흑갈색, 페오멜라닌이 많으면 황적색의 원형을 띠게 된다. 첫 번째 단계(Stage 1)에서는 엔도솜(endosomal

system)으로부터 유래한 색소가 침착되지 않은 액포(nonpigmented vacuole) 형태인 프리멜라노솜(pre-melanosome)을 형성하고, 2번째 단계(Stage 2)에서는 프리멜라노솜 내부에 줄무늬 구조가 형성이 되고, 세 번째 단계(Stage3)에서는 줄무늬구조에 멜라닌이 축적이 되기 시작하며, 마지막 네 번째 단계(Stage 4)에서는 완전히 성숙된 멜라노솜으로 발전한다(Van Den Bossche K, Naeyaert JM, Lambert J. Traffic. 7. 769-78. 2006). 3~4단계의 성숙된 멜라노솜이 형성되기 위해서는 골지체에서 티로시나아제(tyrosinase)와 Tyrp1(tyrosinase-related protein1)을 합성하여 프리멜라노솜(pre-melanosome)으로 이동시키는 작동체(effector)가 필요한데(Raposo G, Marks MS. Nat Rev Mol Cell Biol. 8:786-707, 2007), 이러한 이동에 대한 메커니즘이 거의 알려져 있지 않지만, 전송 소포낭(transport vesicle)에 효소를 담지하는 역할을 수행하는 부착 단백질 복합체(adaptor protein complex, AP)가 필요하며, 부착 단백질 복합체는 4종류(AP-1, AP-2, AP-3, AP-4)로 구분된다고 알려져 있다(Bonifacino JS, Glick BS. Cell. 116: 153-166. 2004). 부착 단백질 복합체는 Kif13A(kinesin superfamily protein 13A)와 함께 작용하여 3단계의 과정을 거쳐 멜라노솜에서 멜라닌이 생성될 수 있도록 한다. 첫 번째 과정에서는 4종류의 부착 단백질 복합체 중에서 AP-1이 세포질 영역의 시그널과 반응을 하여 멜라노솜에 내재된 Tyrp1을 엔도솜(endosome)으로 이동하게 한다. 두 번째 단계에서는 AP-1이 Kif13A와 반응하여, Kif13A가 미세소관을 따라서 엔도솜을 세포의 주변부까지 이동시켜 멜라노솜과 접촉을 할 수 있도록 내포체(endosome)에 튜브를 형성한다. 세 번째 단계에서는 튜브가 형성된 내포체(endosome)가 멜라노솜과 접합을 하여 멜라닌 형성에 필요한 Tyrp1이 멜라노솜으로 이동하게 된다(Delevoeye C, Hurbain I, Tenza D, Sibarita J, Uzan-Gafsou S, Ohno H, Geert W, Verkleij AJ, Salamero J, Marks MA, Raposo G. J Cell Biol. 187: 247-264. 2009).

- [6] 멜라닌은 아미노산의 일종인 타이로신(tyrosine)이 산화과정을 거치며, 합성되는 고분자 색소로, 타이로신(tyrosine)의 첨가반응 혹은 타이로신과 시스테인(cystein)의 축합반응에 의해서 생성된다. 주로 티로시나아제(tyrosinase) 및 티로시나제관련단백질-1(tyrosinase-related protein-1, Tyrp-1)이 관여하며, 이 두 효소는 타이로신을 도파(DOPA, dihydroxyphenylalanine)와 도파퀴논(dopaquinone)으로의 전환을 촉진하는 역할을 한다. 생성된 도파퀴논은 유멜라닌(eumelanin)과 페오멜라닌(pheomelanin)으로 합성되는 두 개의 생합성 경로를 거치는데(US20120321575A1), 유멜라닌(eumelanin)은 갈색 내지 검은색 색소로 나타나며, 페오멜라닌(pheomelanin)은 황색 내지 적색 색소로 나타나게 된다. 이러한 멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하고, 여러 염증상태의 부산물에 의해 생성되는 활성산소를 중화하는 유익한 작용을 하는 존재이지만, 자외선에 대한 방어기작으로 멜라닌이 과잉생산하게 되면, 이를 피부 밖으로 계속적으로 내보내면서 국소 부위에서 기미가 생성되거나, 피부가 검게 된다.
- [7] 이는 미용적으로 좋지 못하기 때문에, 피부에 멜라닌이 과도하게 침착되는

것을 방지하고, 피부 내 색소함량을 줄이기 위한 다양한 미백방법이 주목받고 있다. 주요 방법으로는 자외선 차단, 멜라닌 색소를 신속하게 표백(bleaching)시키는 방법, 생합성 된 멜라닌이 멜라노솜에 실려 각질형성세포로 전달되는 단계를 차단하는 방법, 멜라닌 생합성의 속도결정 단계인 티로시나제 활성을 억제하는 방법, 멜라닌형성세포의 세포막으로부터 티로시나제 활성 및 생합성 촉진을 유도하는 신호전달을 차단하는 방법, 멜라닌생성 세포에 특이적으로 독성을 나타내는 물질을 투여하는 방법 등이 있다(Son KH, Heo MY. *Int J Cosmeti Sci.* 35: 9-18. 2013).

- [8] 하지만, 피부 각질층은 피부의 주요 구성 세포인 각질형성세포(keratinocyte)가 자연사 되어 피부의 최외각층에 치밀한 구조를 이루고 있으며, 수분의 증발뿐만 아니라 외부 물질의 침투를 억제하며, 땀과 각종 지질 성분으로 인하여 pH 5 부근의 산성도를 보이고 있는바, 피부, 특히 이러한 각질층을 통한 생리활성물질의 전달은 피부의 구조적, 물리적 특성상 여러 가지 제한을 받는다. 즉, 피부 생리활성물질이 각질층 장벽을 투과하기 위해서는 분자량이 1,000 이하로 작아야 하고, 친지질 특성을 보유하고 있어야 한다(Metha RC, Fitzpatrick RE. *Dermatol Ther.* 20:350-359. 2007).
- [9] 따라서, 이러한 피부생리활성 물질의 경피 투과율을 촉진시킬 수 있는 다양한 방법들이 연구되어 왔는데, 이러한 방법들은 크게 물리적, 생화학적, 화학적 방법 등으로 나눌 수 있다. 물리적인 방법은 주로 전기(electroporation), 초음파(sonophoresis), 열(thermal ablation)을 이용하여 물질을 투과시키는 방법이고, 생화학적인 방법은 전구체를 이용하여 유효성분이 피부 통과 중이거나 통과 후에 활성화되어 작용을 나타낼 수 있는 성분의 형태로 변환시켜 피부투과 후 활성을 나타내게 하는 것이다. 화학적인 방법으로는 업계에서 가장 많이 활용되는 방법으로 다양한 종류의 기체, 계면활성제, 용매류 및 지방산류 등이 주로 생리 활성 분자를 담지하고 있는 복합체의 형태인 담체-매개 전달 시스템(carrier-mediated delivery systems)이 사용되고 있다(Prausnitz M. R. and Langer R. *Nat Biotech.* 26:1261-1268 (2008)). 이들 중에서 최근 펩티드계(peptide-base) 전달 시스템의 활용에 많은 관심이 집중되고 있다.
- [10] 세포 투과성을 갖는 펩티드의 사용은 여러 장점을 갖는데, 이는 주로 상시 펩티드 서열에 이루어질 수 있는 다양한 변형에 기인한다. 이는 다른 세포 하부 도메인을 지정할 수 있으며, 다양한 형태의 화물 분자들(cargo molecules)을 운반할 수 있는 담체의 조작을 가능케 한다. 대표적인 세포막 투과성 펩티드를 예로 들면 다음과 같다.
- [11] 맨 처음 발견된 펩티드계 전송 도메인은 HIV-Tat으로 1988년 Green 과 Loewenstein 그룹(Green 및 Loewenstein. *Cell* 55, 1179-1188(1988))과 Frankel과 Pabo 그룹(Frankel 및 Pabo. *Cell* 55, 1189-1193(1988))이 각각 별도로 후천성 면역 결핍증후군(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)을 발생시키는 바이러스인 HIV-1의 전사관련 단백질 Tat이 세포막을 투과하고 바이러스

- 유전자를 교차-활성화(trans-activation)시키는 것을 발견하였다. 세포 투과성을 보이는 Tat 도메인은 Tat 단백질의 48번부터 57번째의 염기성 아미노산 서열(GRKKRRQRRR)로서, 이 서열이 세포막을 통과하는데 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다(Vives et al., *J. Biol. Chem.* 272, 16010-16017 (1997); Futaki 등, *J. Biol. Chem.* 276, 5836-5840 (2001); Wadia, J.S. 및 S.F. Dowdy, *Cum Opin. Biotechnol.* 13(1): 52-6 (2002); Wadia 등, *Nature Medicine* 10(3), 310-315(2004)).
- [12] 다음으로는, 초파리의 안테나페디아 (antennapedia) 호메오 도메인(homeodomain) 유래 16개의 아미노산으로 이루어진 페네트라틴(RQIKIYFQNRRMKWKK)을 들 수 있으며 (Joliot et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1864-1868 (1991); Derossi et al., *J Biol Chem* 269, 10444-10450 (1994); Joliot, A. 및 A. Prochiantz, *Nat. Cell Biol.* 6(3): 189-96 (2004)), 생체막 전위 서열(membrane translocating sequence, MTS) 또는 신호 서열(signal sequences)에 기반한 펩티드도 대표적인 펩티드 도메인으로 알려져 있다. 이 서열들은 RNA에 의해 새로이 합성된 단백질을 생체 내의 적합한 세포 내 소기관의 생체막으로 이동시켜주는 것을 돕는 수용체 단백질에 의해 인식되며, 핵 위치화 신호(nuclear localization signal, NLS)와 결합된 생체막 전위 서열은 몇 종류의 세포에서 세포막을 통과하여 세포핵에 축적된다고 알려져 있다(J.S. Wadia, et al., *Nat. Med.* 10: 310-315 (2004); I. Nakase, et.al. *Biochemistry* 46: 492-501 (2007); H.L. Amand, et al., *Biochim. Biophys. Acta* (2011)).
- [13] 이러한 펩티드들은 화물(cargo) 분자와 결합하여 세포에 근접하였을 경우 내제 시그널(import signal)로 작용하고, 화물 분자의 세포 내로의 유입을 유도한다. 이에 따라, 세포막 투과성 펩티드를 본래 세포내에 존재하는 단백질과 연결하여 생물학적 연구 및 질병치료에 적용하려는 시도가 활발히 진행되고 있다 (F. Milletti, *Drug Discovery Today* 17: 850-860 (2012)). 그러나, 세포막 투과성 펩티드가 Tat나 VP22와 같이 바이러스로부터 유도된 경우에는 생체 내에서 면역반응을 유도할 가능성이 있다. 따라서, 인간에게서 발견되는 분비 단백질(secreted protein)에서 새로운 세포막 투과성 펩티드들을 주로 개발함으로써 면역원성을 최소화 하고자 하는 연구가 진행되고 있다(Eguchi, A. and Dowdy, S.F. *Trends Pharmacol. Sci.* 30: 341-345 (2009); Mae, M. and Langel, U. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6: 509-514 (2006); Jarver, P. et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 31: 528-535 (2010)). 또한 세포막 투과성을 높이기 위해서 아미노산 서열상의 결실(deletion) 및 변형(modification), 키메라 융합(chimeric fusion) 등의 방법으로 새로운 세포막 투과성 펩티드를 개발하고 있다 (Taylor, B.N. et al., *Cancer Res.* 69: 537-546 (2009); Johansson, H.J. et al., *Mol. Ther.* 16: 115-123 (2007)).
- [14] 현재 공지된 담체-매개 전달 시스템은 효율이 떨어지거나 자체의 독성으로 인해 그 활용도가 제한적이며, 전달 메커니즘은 논란의 소지가 많다. 담체의 세포내 물질 전송 기전이 내포작용(endocytosis)인지의 여부에 대해서는 정확한 대답을 얻지 못했지만 다양한 메커니즘이 제안되었다. 수용체가 관여하지 않고

반전된 미셀(inverted micelle)을 형성하여 전이된다는 주장이 있으며, 또 다른 의견으로는 세포 표면의 프로테오글리칸(proteoglycan)이 전달에 중요한 역할을 한다는 의견과 세포막 투과성 펩티드와 정전기적 상호작용 외에 큰 역할을 하지 못한다는 의견도 제시되었다. 몇몇 연구는 TAT-단백질이 직접 세포막을 투과하는 것이 아니라, 세포 표면과 정전기적 상호작용을 강하게 일으켜 내포작용을 일으킴으로써 형성되는 엔도솜(endosome) 내부에 축적된다는 보고가 있으며, 형성된 엔도솜은 세포질 내에 존재하는 라이소솜(lysosome)과 융합되어 라이소솜에 존재하는 단백질 가수분해 효소에 의해 Tat-단백질이 쉽게 분해됨을 제시하고 있다(Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, De Lima MC.

Pharmaceutics.3: 961-993. 2010). TAT와 같은 염기성 아미노산으로 구성된 물질 수송 담체를 이용하여 특정 유효성분을 세포 내로 전달하고자 할 경우 세포질 내의 표적으로 TAT-유효물질을 직접 전달하기가 어렵고 필요한 활성을 보일 수 있는 수준으로 유효성분을 전달하기 위해서는 고농도의 처리가 요구되어, 이를 TAT와 같은 전송서열과 생리활성 물질 복합체 전송 시 기대하는 효과를 충분히 얻을 수 없다는 문제점이 보고되기도 하였다(J.S. Wadia, et al., Nat.Med. 10: 310-315 (2004); I. Nakase, et.al. Biochemistry 46: 492-501 (2007); H.L. Amand, et.al. Biochim. Biophys. Acta (2011), F. Milletti, Drug Discovery Today 17: 850-860 (2012)).

- [15] 최근 연구에서는 담체-매개 전달 시스템은 하나 이상의 메커니즘을 통해 전이가 일어나고, 수송체가 거대분자인 경우 에너지 의존적 대음세포작용(macropinocytosis)을 일으키고 세포막 투과성 펩티드 자체나 세포막 투과성 펩티드와 결합된 작은 분자들은 정전기적 인력이나 수소결합에 의해 에너지 비의존적 투과 메커니즘을 가진 것으로 알려져 있다. 이는 세포막 또는 세포막에 존재하는 프로테오글리칸과 세포막 투과성 펩티드의 직접적인 접촉이 세포 내 전달의 성공에 필수적으로, β -사이클로텍스트린 처리, 사이토칼라신-D 처리, 혹은 Dybk44A (dominant-negative dynamine) 발현 등의 실험으로 볼 때 지질함입매개(lipid raft-mediated) 대음세포작용이 주요한 기전임을 알 수 있다(Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF. Nat Med. 2004 Mar;10(3):310-5.). 이와 같이, 공지된 염기성 아미노산 함량이 높은 펩티드 매개 전달 시스템의 경우 세포 내 유입 기전에 대해서는 논란의 여지가 많이 남아 있는 상태이고(F. Milletti, Drug Discovery Today 17: 850-860 (2012)), 또한, 기존의 개발된 펩티드의 경우 현재까지 피부 각질층을 투과하여 피부 세포까지 전달이 가능함을 보여준 예가 없다.

- [16] 그러나, 2000년도에 들어서 세포 내 전달 효율이 향상되고, 구조 및 정전기적 특성이 다른 새로운 세포막 투과성 펩티드인 MTD(Macromolecule Transduction Domain)가 개발되었는데, 그 중 프로셀제약이 개발한 '거대분자 세포 내 전송 기술(Macromolecule Intracellular Transduction Technology: MITT)'과 그에 기반한 거대분자 전송 도메인(Macromolecule Transduction Domain)은 이러한 펩티드의

전송한계에 해결책을 줄 수 있다. 거대분자 전송 도메인(MTD)은 TAT, 페니트라틴 및 다른 염기성 아미노산 함량이 높은 전송 펩티드 전달체들과 전혀 다른 메카니즘을 보이며, 세포 내 전송과정에 필요한 내포작용 및 에너지를 거의 필요로 하지 않는 특징을 가진다. 또한, 세포막의 강직성(rigidity)과 완전성(integrity)이 세포막 투과의 중요 요소로 작용하기 때문에 세포막과의 직접적인 상호작용(direct interaction)이 중요하며, 기존의 세포막 투과성 펩티드인 TAT, 페니트라틴 등에 비해 저분자 화합물, 펩티드 및 단백질과 같은 화물(cargo material)의 전달효율이 높고, 세포간 전달(cell-to-cell delivery)이 가능한 장점을 가지고 있어 약품 및 화장품 개발에 그 활용성이 높이 평가되고 있다.

- [17] 이에, 본 발명자들은 상기의 거대분자 전송 도메인(MTD)을 최적화하고, 보다 우수한 세포 투과능을 갖는 전송 도메인을 선별하여, 이를 본 발명의 세포내 분자 전송 펩티드에 적용하였다. 이러한 세포 내 분자 전송 펩티드에 미백효능을 유도하는 Kif13A-siRNA와 같은 분자량이 1,000 이상의 거대분자인 피부 생리 활성 분자를 공유결합하면, 피부 각질층 내, 또는 피부 세포 내로 효과적으로 전달할 수 있음을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [18] 본 발명은 상기와 같이 분자량의 크기와 피부 각질층의 고유 특성으로 인해 피부를 통해 전달되기 어려운 Kif13A-siRNA를 멜라닌형성세포 내로 효율적으로 도입하기 위해 고안된 것으로, 세포 내 전송 펩티드와 Kif13A-siRNA의 공유결합을 통해 이루어진 복합체를 포함하는 경피 전달용 조성물, 상기 펩티드와 공유결합된 siRNA를 이용한 경피 전달 시스템, 및 세포 내 분자 전송 펩티드가 공유결합된 siRNA를 피부 세포 또는 피부 각질층 내로 전달하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [19] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [20] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [21] 본 발명은 세포 내 분자 전송 펩티드와 siRNA가 공유결합으로 연결된 복합체를 포함하는 경피 전달용 조성물로서, 상기 펩티드는 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 경피 전달용 조성물을 제공한다.
- [22] 본 발명의 일 구현예로, 상기 펩티드는 서열번호 6으로 기재되는 폴리뉴클레오티드 서열로부터 인코딩되는 것을 특징으로 한다.
- [23] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 siRNA는 Kif13A(kinesin superfamily protein

- 13A)의 발현을 억제하여 멜라닌 형성을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [24] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 siRNA는 서열번호 1로 이루어지는 센스 RNA 가닥과 서열번호 2로 이루어지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [25] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 공유결합은 비분해성 결합 또는 분해성 결합인 것을 특징으로 한다.
- [26] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 비분해성 결합은 아미드 결합 또는 포스포이트 결합인 것을 특징으로 한다.
- [27] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 분해성 결합은 이황화결합, 산 분해성 결합, 에스테르 결합, 안하이드라이드 결합, 생분해성 결합 및 효소 분해성 결합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [28] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 공유결합은 Thioether 링커, S-HyNic(6-hydrazino-nicotinic acid)/4-FB(4-formylbenzoate) 링커 및 4FB(N-succinimidyl-4-formylbenzamide)/hydroxylamine 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 링커에 의해 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [29] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 공유결합은 4FB(N-succinimidyl-4-formylbenzamide)/hydroxylamine 링커에 의해 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [30] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 화장용 조성물인 것을 특징으로 한다.
- [31] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 에멀전, 크림, 에센스, 스킨, 세럼, 리포솜, 마이크로캡슐, 복합 입자, 샴푸 및 린스로 이루어진 군으로부터 선택된 제형으로 제조되는 것을 특징으로 한다.
- [32] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 피부 각질층을 투과하는 것을 특징으로 한다.
- [33] 또한, 본 발명은 siRNA를 피부 세포 내로 전달하는 경피 전달시스템으로서, 상기 시스템은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 세포 내 분자 전송 펩티드를 siRNA와 공유결합시켜 전달하는 것을 특징으로 하는 시스템을 제공한다.
- [34] 본 발명의 일구현예로, 상기 siRNA는 서열번호 1로 이루어지는 센스 RNA 가닥과 서열번호 2로 이루어지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [35] 더욱이, 본 발명은 siRNA를 피부 세포 내로 전달하는 방법으로서, 상기 방법은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 세포 내 분자 전송 펩티드를 siRNA와 공유결합시켜 전달하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.
- [36] 본 발명의 일구현예로, 상기 siRNA는 서열번호 1로 이루어지는 센스 RNA 가닥과 서열번호 2로 이루어지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되는 것을 특징으로 한다.

- [37] 뿐만 아니라, 본 발명은 siRNA를 피부 각질층 내로 전달하는 방법으로서, 상기 방법은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 세포 내 분자 전송 펩티드를 siRNA와 공유결합시켜 전달하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.
- [38] 본 발명의 일구현예로, 상기 siRNA는 서열번호 1로 이루어지는 센스 RNA 가닥과 서열번호 2로 이루어지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [39] 아울러, 본 발명은 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열로 이루어지는 세포 내 분자 전송 펩티드와 siRNA가 공유결합시켜 표피에 국소 적용하여 피부를 미백화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 화장방법을 제공한다.
- [40] 본 발명의 일구현예로, 상기 siRNA는 서열번호 1로 이루어지는 센스 RNA 가닥과 서열번호 2로 이루어지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [41] 본 발명의 경피 전달용 조성물은 분자량의 크기와 높은 수준의 음전하로 인하여 피부 각질층의 투과가 용이하지 않은 Kif13A에 생체 내 분자 전송능이 탁월한 펩티드를 결합시켜, 이를 통해 Kif13A를 피부 각질층 및 멜라닌형성세포 내까지 효과적으로 전달할 수 있다. 또한 기존의 리포솜을 이용한 전송방법과 비교하여 세포 독성을 유발하지 않는다. 따라서, 멜라닌 생성을 안전하고 효과적으로 감소시키며 다양한 형태로 제형화 할 수 있어 미백 기능성 화장품 원료로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [42] 도 1은 MTD2173A 펩티드와 Kif13A 및 con siRNA가 공유결합을 이루고 있음을 보여주는 사진이다.
- [43] 도 2는 MTD2173A-siRNA의 세포 증식능을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [44] 도 3은 MTD2173A-siRNA 및 리포솜을 이용한 siRNA 전달체에 대한 세포 독성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [45] 도 4는 (A) 리포솜을 이용하여 siRNA를 세포 내로 트랜스펙션 시킨 것과 (B) MTD2173A-siRNA를 이용한 세포 내 전달을 Real-time PCR 실험으로 목표유전자의 발현을 억제하는 정도를 나타낸 결과이다.
- [46] 도 5는 (A) 리포솜을 이용하여 siRNA를 세포 내로 트랜스펙션 시킨 것과 (B) MTD2173A-siRNA를 이용한 세포 내 전달을 웨스턴 블랏(western blot)으로 Kif13A 단백질 발현을 억제하는 정도를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- [47] 도 6은 (A) 리포솜을 이용하여 siRNA를 세포 내로 트랜스펙션 시킨 것과 (B) MTD2173A-siRNA를 이용하여 세포 내 멜라닌 생성 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [48] 도 7은 M1173A-LacZ-siRNA-Cy3, M2173A-LacZ-siRNA-Cy3,

M3173A-LacZ-siRNA-Cy3와 M1018m-LacZ-siRNA-Cy3을 투여한 마우스 장기 절편의 베타갈락토시다제 활성 억제를 공초점 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

- [49] 도 8은 M1173A-LacZ-siRNA-Cy3, M2173A-LacZ-siRNA-Cy3, M3173A-LacZ-siRNA-Cy3와 M1018m-LacZ-siRNA-Cy3을 투여한 마우스 장기 절편을 X-gal 염색용액에서 밤 동안 반응시킨 이후 헤마토자일렌에 오신 염색으로 조직을 염색시킨 다음 베타갈락토시다제 활성을 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [50] 저분자 합성 화합물이나 또는 천연화합물들은 쉽게 세포 내로 전달될 수 있다고 알려져 있으며, 단백질, 펩티드 및 핵산과 같은 거대분자들은 분자량의 크기 때문에 이중 지질막 구조로 되어 있는 세포막 안으로 투과하기 어려운 제한점이 있다. 더욱이, 피부를 통한 활성물질의 전달은 피부의 구조적, 물리적 특성상 여러 가지 제한점을 가지고 있다. 특히, 피부 각질층은 피부의 주요 구성 세포인 각질형성세포 (keratinocyte)가 자연사 되어 피부의 최외각층에 치밀한 구조를 이루고 있으며, 수분의 증발뿐만 아니라 외부 물질의 침투를 억제하며, 땀과 각종 지질 성분으로 인하여 pH 5 부근의 산성 영역에 있다. 이러한 각질층을 투과하기 위해서는 분자량이 1,000 이하로 작아야 하고, 친지질 특성을 보유하고 있어야 가능하다. 때문에, 화장품 원료로 사용되는 여러 유효물질들은 실제로 피부 장벽을 구성하는 각질층의 고유 특성으로 인하여 저분자량 물질들의 투과 효율이 극히 낮으며, 고분자량 물질들의 투과 효율은 더욱 낮은 것으로 알려져 있다. 이러한 저분자 및 거대분자들이 피부 투과 효율을 증진시키기 위한 방법으로서 '거대분자 세포 내 전송 기술(Macromolecule Intracellular Transduction Technology: MITT)'을 이용할 수 있다.
- [51] 이에, 본 발명에서는 기존에 발명된(대한민국 공개특허 제10-2009-0103957호) 소수성 거대분자 전달 도메인(MTD)에 양전하를 띄는 1~2개의 친수성(극성) 아미노산을 소수성 도메인에 적용하여 음전하를 띄고 있는 세포막으로의 접근성을 높임으로써, 효율적으로 생물학적 활성 분자를 세포 내로 전달하는 개량형 MTD 펩티드를 개발하고, 이를 이용하여 siRNA를 보다 효율적으로 피부 세포 안으로 전달할 수 있는 경피 전달용 조성물, 경피 전달시스템, siRNA를 피부 세포 또는 피부 각질층 내로 전달하는 방법 및 화장방법을 제공한다.
- [52]
- [53] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [54]
- [55] 본 발명은 세포 내 분자 전송 펩티드와 siRNA가 공유결합으로 연결된 복합체를 포함하는 경피 전달 시스템 조성물로서, 상기 펩티드는 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 경피 전달 시스템

조성물을 제공한다.

- [56] 본 발명에서, 상기 펩티드는 생물학적 활성 분자의 세포 내로의 운반을 매개할 수 있는 펩티드로서, 대한민국 공개특허 제10-2009-0103957호에 기재된 MTD 펩티드에 비해 우수한 세포 투과능을 나타내는 펩티드이며, 본 발명에서는 이를 "세포 내 분자 전송 펩티드"라 명명하였다.
- [57] 상기 펩티드는 서열번호 5의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 서열번호 5의 아미노산 서열은 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [58] 본 발명에서, siRNA는 Kif13A(kinesin superfamily protein 13A)의 발현을 억제하여 멜라닌 형성을 억제하는 효능을 가지며, 보다 구체적으로는 서열번호 1로 이루어지는 센스 RNA 가닥과 서열번호 2로 이루어지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [59] 미백활성을 나타내는 Kif13A-siRNA는 Kif13A 발현을 억제함으로써 내포체(endosome)가 세포의 주변부까지 이동하지 못하여 멜라노솜과 접촉을 할 수 있는 내포체 튜브를 형성하지 못한다. 따라서, 멜라닌 형성에 필요한 Tyrp1이 멜라노솜으로 이동을 하지 못하여 멜라닌 형성을 저해할 수 있다(Delevoeye C, Hurbain I, Tenza D, Sibarita J, Uzan-Gafsou S, Ohno H, Geert W, Verkleij AJ, Salamero J, Marks MA, Raposo G. J Cell Biol. 187: 247-264. 2009).
- [60] 이와 같은 작용기전을 바탕으로 MNT-1 (highly pigmented human melanoma cell) 세포에 Kif13A-siRNA를 처리하였을 때 성숙한 멜라노솜의 숫자가 현저히 줄었으며, 대조군과 비교하였을 때 멜라닌 함량도 40% 정도 감소하였다(Delevoeye C, Hurbain I, Tenza D, Sibarita J, Uzan-Gafsou S, Ohno H, Geert W, Verkleij AJ, Salamero J, Marks MA, Raposo G. J Cell Biol. 187: 247-264. 2009).
- [61] 본 발명에서, 상기 세포 내 분자 전송 펩티드와 siRNA는 공유결합에 의해 결합되는 것이 바람직하다. 펩티드와 siRNA 사이의 결합은 공유결합 또는 비공유결합에 의해 이루어질 수 있는데, 음전하를 띄는 siRNA와 양전하 펩티드 간의 비공유결합은 결합체의 중성화로 인하여 침전물이 형성이 되어 펩티드의 기능이 불활성이 되는 문제점이 있기 때문이다. 상기 공유결합은 비분해성 결합 또는 분해성 결합 중 어느 것이어도 무방하다. 이때, 비분해성 결합으로는 아미드 결합(amide bond) 또는 포스페이트 결합(phosphate bond)이 있고, 분해성 결합으로는 이황화결합, 산분해성 결합, 에스테르 결합, 안하이드라이드(anhydride) 결합, 생분해성 결합, 또는 효소 분해성 결합 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 더욱이, 상기 공유결합은 Thioether 링커, S-HyNic(6-hydrazino-nicotinic acid)/4-FB(4-formylbenzoate) 링커 및 4FB(N-succinimidyl-4-formylbenzamide)/hydroxylamine 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 링커에 의해 이루어지는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는
- [62]

4FB(N-succinimidyl-4-formylbenzamide)/hydroxylamine 링커에 의해 이루어질 수 있다.

- [63] 본 발명의 조성물은 국소 적용하기 위해 의도된 많은 화장품용 또는 피부학적(dermatological) 조성물, 특히, 피부의 미백을 개선, 예방, 방지 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [64] 본 발명의 조성물은 약리학적으로나 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제를 추가로 포함할 수 있다.
- [65] 이러한 조성물에 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토오스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 비정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 상기 조성물은 약제화하는 경우, 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [66] 제형의 측면에서, 본 발명의 조성물은 용액, 에멀션(마이크로에멀션 포함), 현탁액, 크림, 로션, 젤, 분말, 또는 본 조성물이 적용될 수 있는 피부 및 기타 조직에 적용하기 위해 이용되는 기타 전형적인 고체 또는 액체 조성물을 포함할 수 있다. 그와 같은 조성물은 추가적인 항미생물제(antimicrobial), 보습제 및 수화제(hydration agent), 투과제(penetration agent), 보존제, 유화제, 천연 오일 또는 합성 오일, 용매, 계면활성제, 세정제(detergent), 겔화제(gelling agent), 연화제(emollient), 항산화제, 향료, 충전제, 증점제(thickener), 왁스, 냄새 흡수제, 염료(dyestuff), 착색제, 분말, 점도-조절제(viscosity-controlling agent) 및 물을 포함할 수 있고, 선택적으로, 마취제, 항-가려움 활성제(anti-itch active), 식물 추출물(botanical extract), 컨디셔닝제(conditioning agent), 흑화제 또는 미백제(darkening or lightening agent), 글리터(glitter), 습윤제(humectant), 운모, 미네랄, 폴리페놀, 실리콘 또는 그의 유도체, 일광 차단제(sunblock), 비타민, 및 약용식물(phytomedicinal)을 포함할 수 있다. 일부 구체 예에서, 본 발명의 조성물은 장기간 동안 안정적이게 하기 위해, 전술된 성분들과 함께 제제화되며, 이는 지속적인 또는 장기간의 사용이 의도되는 경우 유용할 수 있다.
- [67] 본 발명의 일실시예에서, 세포 내 비투과성 미백 기능성 Kif13A siRNA를 세포 내부로 전달하기 위하여 MTD2173A 펩티드에 Kif13A siRNA를 연결한 복합체를 제조하였으며, MTD2173A-Kif13A siRNA를 세포에 처리한 후 Real time PCR과 웨스턴 블랏(western blot)으로 목표 유전자인 Kif13A의 유전자 발현과 단백질 발현을 관찰하였다. 그 결과, 기존에 siRNA를 세포 내로 전달하는 방법인 리포좀을 이용한 방법과 유사한 수준으로 목표유전자의 mRNA 발현의 감소와 단백질의 발현 감소 효과를 관찰하여, MTD2173A를 활용하여 제조된 MTD2173A-Kif13A siRNA가 새로운 세포 내 전달 방법임을 입증하였다.

- [68] 본 발명의 다른 실시예에서, MTD2173A-Kif13A siRNA를 사용하여 세포 증식능 (cell proliferation assay) 실험과 세포 독성 (cell cytotoxicity) 실험을 통하여 세포 안전성을 관찰하였다. 그 결과, MTD2173A-Kif13A siRNA는 1.5 μ M까지의 처리농도에서도 세포의 증식을 저해시키지 않았으며, 세포 독성도 일으키지 않음을 알 수 있었다.
- [69] 아울러, 본 발명의 또 다른 실시예에서, MTD2173A-Kif13A siRNA를 인체 유래 멜라닌형성 세포(Human melanocyte, MNT1)에 처리한 결과 멜라닌 생성 저해 정도가 기존에 사용하고 있는 Lipofectamine을 이용한 Kif13A siRNA의 세포 내 전달 방법보다 효능이 우수함을 확인함으로써, MTD가 새로운 siRNA의 전달체임을 확인할 수 있었다. 세포에서 MTD2173A-Kif13A siRNA의 멜라닌 생성저해 효과는 이물질이 미백 효능을 갖는 화장품 원료로 사용될 수 있음을 입증하였다.
- [70]
- [71] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [72]
- [73] **[실시예]**
- [74] **실시예 1. 세포 내 분자 전송 펩티드 합성**
- [75] 세포 내 분자 전송 펩티드의 합성은 일반적인 Fmoc SPPS (solid phase peptide synthesis) 방법을 이용하여 C-말단부터 하나씩 아미노산을 연결하였다.
- [76] 보다 구체적으로 먼저, 펩티드의 C-말단 첫 번째 아미노산을 고체상 지지체에 HCTU (5-Chloro-1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate) 농축 물질을 사용하여 Fmoc-Lys(e-ivDde)-OH를 붙였다.
- [77] 다음으로, 펩티드 합성에 사용한 모든 아미노산 원료는 N-term이 Fmoc으로 보호되고, 잔기는 모두 산에서 제거되는 Trt, Boc, t-Bu 등으로 보호된 것을 사용하였다 (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Thr(t-Bu)-OH, Fmoc-Ser(t-Bu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Met-OH). 특수 아미노산의 경우에는 Fmoc-Lys(Ac)-OH, Fmoc-Lys(e-ivDde)-OH를 사용하였다.
- [78] 다음으로, DMF(Dimethylformamide)에 20%의 농도로 용해된 piperidine을 이용하여 상온에서 5분간 2회 반응시켜 Fmoc을 제거하였다.
- [79] 다음으로, DMF, 메칠알콜(MeOH), 메칠클로라이드(MC), DMF 순으로 세척한 후, O-(1H-6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate(HCTU) 농축 물질을 사용하여 hydroxylamine 링커(linker)를 붙였다.
- [80] 다음으로, TFA/EDT/Thioanisole/TIS/H₂O=90/2.5/2.5/2.5/2.5을 사용하여(TFA = trifluoroacetic acid, EDT = 1,2-ethanedithiol, TIS = triisopropylsilane) 합성된

펩티드를 레진에서 분리하고 잔기 보호기를 제거하였다.

[81] 마지막으로 고속액체크로마토그래피(HPLC) 시스템으로 정제 후, MS확인하고 동결 건조하여 최종적으로 세포 내 분자 전송 펩티드(이하 'MTD2173A'라 함) 합성품을 얻었다.

[82]

[83] 그 결과, 상기 실시예 1에 의해 얻은 MTD2173A의 구체적인 정보는 다음과 같다:

[84] MTD_{2173A}

[85] Met His Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val-hydroxylamine (서열번호 5)

[86] 즉, 상기 MTD2173A는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 세포 내 분자 전송 펩티드에 hydroxylamine 링커가 부착되어 있다.

[87]

[88] **실시예 2. MTD2173A와 siRNA 공유결합**

[89] 실시예 1에 의해 얻은 MTD2173A 펩티드와 Kif13A siRNA, con siRNA와의 공유결합을 위해 하기와 같이 실험을 진행하였다. 즉, 실시예 1에 의해 얻은 MTD2173A 펩티드와 siRNA의 공유결합은 Innopep사의 올리고뉴클레오타이드/펩티드 연결(Oligonucleotide/peptide conjugation) 방법에 따라 4FB-siRNA와 hydroxylamine-펩티드를 이용하여 공유결합을 진행하였다.

[90] 보다 구체적으로 먼저, DMF 용액에 S-4FB(N-succinimidyl-4-formylbenzamide)를 용해시키고 siRNA와 siRNA 농도의 20배가 되게 S-4FB를 연결 완충용액(conjugation buffer, 100 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, pH 6.0)에 넣은 후 2시간 동안 실온에서 반응을 시켰다. 이후, 반응 혼합물에 존재하는 잉여 S-4FB와 완충용액 교환을 위하여 탈염 정제(desalting purification)를 진행하였다.

[91] 다음으로, 준비된 4FB-modified siRNA와 이의 molar 비율이 5배에 해당하는 hydroxylamine-펩티드를 TurboLink 촉매완충용액(Catalyst Buffer)(10 mM Phosphate, 15 mM Sodium Chloride, 10 mM aniline, pH 6.0) 용액에서 혼합하고 실온에서 2시간 동안 반응을 시켰다.

[92] 마지막으로, 한외 여과 (diafiltration, Sartorius Vivaspın)를 이용하여 반응물에서 잉여 펩티드를 제거하고 도 1과 같이 2% NuSieve GTG 아가로즈 젤(agarose gel)로 반응결과를 확인한 후 질량분석기로 분자량을 확인하고 동결 건조하여 펩티드-siRNA 복합체 제조를 완료하였다.

[93] 한편, 상기 실시예에서 사용한 siRNA의 구체적인 정보는 하기 표 1에 나타내었다.

[94] 표 1

[Table 1]

구분	서열정보
sense Kif13A siRNA	S-4FB-GGCGGGUAGCGAAAGAGUA dTdT(서열번호 1)
Antisense Kif13A siRNA	UACUCUUUCGCUACCCGCC dAdG(서열번호 2)
sense con siRNA	S-4FB-CCUACGCCACCAAUUUCGU dTdT(서열번호 3)
Antisense con siRNA	ACGAAAUUGGUGGCGUAGG dTdT(서열번호 4)

[95]

[96] 실시예 3. 세포 내 분자 전송 펩티드-siRNA 복합체의 세포 안전성 확인[97] 3-1. 세포 증식능 실험

[98] 실시예 2에 의해 제조된 세포 내 분자 전송 펩티드-siRNA 복합체의 세포 안전성을 확인하기 위해 하기와 같이 실험을 실시하였다.

[99] 즉, 인체 유래 멜라닌형성 세포(Human melanocyte, MNT1)를 10% FBS (fetal bovine serum)가 함유된 Modified DMEM (Dubecco's modified eagle medium, 5% AIM V medium, 1% Pyruvate Sodium, 1% non-essential amino acids, 1% penicillin/streptomycin) 배지로 96-well plate에 well당 1×10^4 개로 접종한 후 5% CO₂, 37°C 하에서 24 시간동안 배양하였다. 배양 완료 후 배지를 제거하고 상기 실시예 2에 의해 얻은 복합체를 시료로 이용하여 상기 시료가 적당한 농도 (37.5, 75, 150, 750, 1500 nmol/L)로 희석된 배지로 교체한 후 5% CO₂, 37°C 하에서 2일 동안 배양하였다. 세포 증식능을 확인하기 위하여 10 μ l의 WST-1 시액을 배양된 세포에 처리한 후 1 시간 동안 37°C 에서 배양하였으며, ELISA 판독기로 450 nm의 파장에서 그 값을 측정한 후, 하기 수학식 1에 의해 증식율(%)을 계산하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[100]

[101] [수학식 1]

[102] $\text{증식율}(\%) = (B/A) \times 100$

[103] 상기 수학식 1에서,

[104] A는 시료가 첨가되지 않은 것의 450nm에서의 흡광도이며,

[105] B는 시료가 첨가된 것의 450nm에서의 흡광도이다.

[106]

[107] 도 2에 나타낸 바와 같이, MTD2173A-siRNA의 처리 농도가 증가하여도 세포의 증식능에는 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다.

[108]

[109] 3-2. 세포 독성 확인

[110] 세포 독성을 실험하기 위하여 프로메가사(Promega, USA)에서 제공하는

세포독성측정키트(cell cytotoxicity assay kit)를 사용하여 세포 내부의 젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase, LDH)가 세포 외부로 유출되는 정도를 관찰하였다. 보다 구체적으로, 인체 유래 멜라닌형성 세포(Human melanocyte, MNT1)를 10% FBS (fetal bovine serum)이 함유된 변형된 DMEM (Dubecco's modified eagle medium, 5% AIM V medium, 1% Pyruvate Sodium, 1% non-essential amino acids, 1% penicillin/streptomycin) 배지로 96-well plate에 well당 1×10^4 개로 접종한 후 5% CO₂, 37°C 하에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 실시예 2에 의해 얻은 복합체를 시료로 이용하여 상기 시료가 적당 농도 (150, 300 nmol/L)로 희석된 배지로 교체한 후 5% CO₂, 37°C 하에서 2일 동안 배양하였다. 세포에서 최대 유출되는 LDH 양을 측정하기 위하여 96-well plate의 세포에 10X cell lysis buffer 10 μ l를 처리하고 1 시간 동안 37°C 하에서 배양하였다. 세포 독성을 확인 하기 위하여 각각의 well에서 50 μ l의 배양액을 취하여 새로운 96-well plate로 옮겼다. 기질이 혼합되어 있는 용액 50 μ l를 각각의 96-well plate에 처리하고 암 조건에서 30 분간 실온 배양하였다. 반응정지 용액 50 μ l를 각각의 well에 처리한 후 ELISA 판독기로 490 nm의 파장에서 그 값을 측정한 후, 하기 수식 2에 의해 세포 독성율(%)을 계산하였고, 그 결과로도 3에 나타내었다.

[111]

[112] [수식식 2]

[113] 세포 독성율(%) = (B/A) X 100

[114] 상기 수식식 2에서,

[115] A는 최대 LDH가 세포외로 분비된 490nm에서의 흡광도이며,

[116] B는 시료가 첨가된 것의 490nm에서의 흡광도이다.

[117]

[118] 도 3에 나타낸 바와 같이, 리포솜을 이용하여 siRNA를 세포 내로 전달시키면 최대 6.5%의 독성을 나타내는 반면, MTD2173A-siRNA는 상대적으로 아주 낮은 0.5%의 독성 수치를 나타내어 리포솜을 이용한 방법보다 안전함을 확인할 수 있었고, 이로부터 본 발명의 세포 내 분자 전송 펩티드가 세포 내 전달체로서 이용가치가 현저히 우수함을 알 수 있었다.

[119]

[120] **실시예 4. 세포 내 분자 전송 펩티드-siRNA 복합체의 목표유전자 발현 억제능 확인**

[121] 인체 유래 멜라닌형성 세포(Human melanocyte, MNT1)를 10% FBS (fetal bovine serum)이 함유된 변형된 DMEM (Dubecco's modified eagle medium, 5% AIM V medium, 1% Pyruvate Sodium, 1% non-essential amino acids, 1% penicillin/streptomycin) 배지로 6-well plate에 well당 1×10^5 개로 접종한 후 5% CO₂, 37°C 하에서 24 시간 배양한 후 변형된 DMEM에서 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)이 첨가되지 않은 배지를

사전에 처리하여 배양시켰다. 용액 A에는 Opti-MEM 배지 98.5 μl 에 100 μM siRNA를 1.5 μl 첨가하여 넣었고, 용액 B에는 Opti-MEM 배지 94 μl 에 6 μl 의 RNAi MAX (Invitrogen)를 넣어 각각 준비한 후, 용액 A와 B를 혼합시키고 5 분간 실온에서 배양하였으며, 또 다른 시료인 MTD2173A-siRNA의 경우는 Opti-MEM 배지 194 μl 에 100 μM MTD2173A-siRNA 6 μl 를 첨가하여 5 분 동안 배양한 후 세포에 균등하게 처리하였다. 24 시간 배양 후, 세포들을 각각 모은 후 6-well에는 1.2×10^5 개 및 12-well에는 6×10^4 개로 접종하였다. 그 다음날 위와 같은 방법으로 시료를 다시 처리하였다.

[122]

[123] **4-1. Real time PCR(RT-PCR)을 이용한 목표 유전자의 mRNA 상대적 정량 분석**

[124] RNA 간섭 후에 배지를 제거하고 Trizol (Invitrogen, 미국)을 처리하여 총 RNA를 추출하여 정량하였다. 2 μg 에 해당하는 동량의 RNA를 주형으로 사용하였으며, cDNA 합성키트(RevertAid first strand cDNA Synthesis kit, Thermo scientific)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 보다 구체적으로, 250 μl 에펜도르프 튜브에 2 μg 의 RNA를 넣고 oligo dT 1 μl , 5X Reaction buffer 4 μl , RiboLock RNase Inhibitor 1 μl , 10 mM dNTP Mix 2 μl , RevertAid M-MuLV reverse Transcriptase 1 μl 씩을 넣고 총 부피가 20 μl 가 되도록 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 증류수를 첨가하였다. 이를 유전자 증폭기기(Mastercycler pro, Eppendorf, 독일)로 42°C에서 1시간 동안 cDNA를 합성하고, 70°C에서 5분 동안 효소 활성을 종료시켰다. 합성된 cDNA는 1/10로 증류수로 희석하고, Kif13A의 발현량을 분석하기 위해서 96-웰 플레이트의 각 웰에 SYBR Green PCR master mix 2X(Applied Biosystems, 미국) 10 μl , qPCR 프라이머 1 μl , cDNA 1 μl , 증류수 8 μl 를 넣어 혼합액을 만들었다. 한편, mRNA의 발현량에 대한 보정을 하기 위해 하우스키핑 유전자(House keeping gene)인 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)를 표준 유전자로 사용하였으며, qPCR 프라이머는 바이오니아(Kif13A:Cat# P141985, GAPDH:Cat# P267613, 바이오니아, 한국)에서 구입하였다.

[125] 96-웰 플레이트에 담긴 혼합액은 7500 Fast Real Time PCR System(Applied Biosystems, 미국) 기기를 사용하여 Real-time PCR을 수행하였다. GAPDH 유전자에 의해서 보정된 Kif13A의 Ct값에 Con siRNA를 대조군으로 하여 ΔCt 값의 차이를 구했다. 유전자 발현 계산식 $2^{(-\Delta\text{Ct})}$ 을 이용하여 Kif13A의 mRNA 발현율을 비교하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[126] 도 4에 나타낸 바와 같이, 36시간 동안 Kif13A siRNA를 기존의 방법인 리포솜으로 도입한 MNT1 세포주에서 Kif13A 유전자의 mRNA 양과 MTD2173A-Kif13A siRNA를 MNT1 세포주에 도입 시켰을 때 대조군으로 사용한 con siRNA를 도입한 세포주와 비교하였을 때 그 감소 효과가 75%, 80%로 유사함을 확인할 수 있었고, 상기 결과로부터 본원발명의 MTD2173A-Kif13A

siRNA의 세포 내 투과 효과가 우수함을 알 수 있었다.

[127]

[128] **4-2. Western Blot을 이용한 목표유전자의 발현분석**

[129] RNA 간섭 후에 세포를 PBS로 2번 씻어준 후에 well당 150 μ l의 lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton, 1% protease inhibitor, pH 8)를 처리하고 얼음 위에 30분간 방치하였다. 세포 lysate는 스크래퍼를 이용하여 모았으며, 원심분리(13,000 rpm, 4°C)하여 상층액을 모았다. 상층액내의 단백질량은 BCA protein assay kit(Pierce)로 총 단백질 양을 측정하였으며 일정량의 단백질을 SDS-폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동으로 단백질을 분리시킨 후에, 전기적 방법으로 니트로셀룰로오즈(NC) 막에 전이시켜서 웨스턴 블랏팅을 실시하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 이때, 1차 항체는 베틀(Bethyl Laboratories, Inc.)사에서 구입한 항-Kif13A 다항체(polyclonal Ab, Cat#A301-077A)를 사용하였다. 결과를 분석하기 위해 케미루미네스스 루미놀리에이션트(Chemiluminescence luminol reagent)와 이미지 분석 장비인 LAS 4000(GE healthcare)을 사용하였다.

[130] 도 5에 나타낸 바와 같이, 대조군으로 사용된 con siRNA와 MTD2173A-con siRNA에서는 Kif13A 유전자의 단백질 발현이 억제되지 않았지만, Kif13A siRNA와 MTD2173A-Kif13A siRNA를 처리한 실험군에서는 Kif13A의 발현이 완전히 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터, 리포솜을 이용한 Kif13A siRNA의 세포 내 전달에 의한 목표 단백질의 발현억제 효과와 유사하게 리포솜을 처리하지 않고 MTD2173A-Kif13A siRNA에 의해서도 세포 내로 siRNA를 전달시켜 목표 유전자 단백질의 발현억제 효과가 나타남을 관찰할 수 있었다.

[131]

[132] **실시예 5. 세포내 분자 전송 펩티드-siRNA의 멜라닌 생성 저해 활성 확인**

[133] 상기 실시예 4에서와 같이 목표 유전자의 발현을 억제시킨 세포를 PBS (phosphated buffer saline)로 세척하고, 이것을 트립신으로 처리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 10,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 다음 상층액을 제거하여 cell pellet을 얻었고, 회수된 세포중 일부는 TC10™ Automated Cell Counter(Bio-Rad, 미국)를 이용하여 세포수를 관찰하였다. 상기 세포 pellet은 60°C에서 건조한 후 10% DMSO가 함유된 1M 수산화나트륨용액 200 μ L를 넣어 60°C에서 충분히 녹여 세포내 멜라닌을 얻었다. Melanin 용액을 이용하여 단계별로 희석하여 표준용액을 만들고 96-웰 플레이트에 표준용액과 시액을 옮겨 넣고 Microplate 판독기로 490 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 이용하여 정량한 후 세포수를 이용하여 세포당 멜라닌 생성량을 구하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[134] 도 6에 나타낸 바와 같이, 멜라닌 형성 세포에 리포솜을 이용하여 Kif13A siRNA를 트랜스펙션 시킨 것과 대조군을 트랜스펙션 시킨 세포에서의 멜라닌의

생성량을 상대 비교하였을 때 합성된 멜라닌 양이 9.5% 가량 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 이와는 대조적으로 MTD2173A-Kif13A siRNA를 처리한 세포에서는 대조군인 MTD2173A-con siRNA를 처리한 세포에서의 멜라닌의 생성량을 상대 비교하였을 때 합성된 멜라닌 감소 효과가 21.6%로 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[135] 상기 결과로부터, 본원발명의 MTD2173A-siRNA 복합체는 기존의 세포내 트랜스펙션방법과는 다른 방법으로 siRNA와 같은 물질을 세포 내로 효과적으로 전달시킬 뿐 아니라 전달된 물질이 세포 내에서 그 효능을 효과적으로 발휘할 수 있음을 알 수 있었다.

[136] 뿐만 아니라, 멜라닌 형성에 중요한 역할을 하는 키네신(kinesin) Kif13A에 특이적인 MTD2173A-siRNA가 멜라닌 색소 생성을 효과적으로 억제시킬 수 있으며, 미백 물질로 효과적으로 사용할 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있었다.

[137]

[138] 실시예 6. 베타갈락토시다제 활성 억제능 확인

[139] 베타갈락토시다제가 지속적으로 발현되는 B6 ROSA26 마우스에 M1173A-LacZ-siRNA-Cy3, M2173A-LacZ-siRNA-Cy3, M3173A-LacZ-siRNA-Cy3와 M1018m-LacZ-siRNA-Cy3 200 μ g/head를 3일간 정맥으로 투여하고 이틀 후에 마우스를 희생시켜 폐를 적출하였다. 적출된 폐는 4% 파라포름알데하이드에 15시간 이상 넣어 고정한 후, 동결절편을 마이크로 냉동박절기를 이용하여 제조하고, 이를 글래스 슬라이드 위에 올려 현미경 관찰용 슬라이드를 제작하였다. 제작된 슬라이드는 10분 동안 인산완충용액으로 절편을 세척하고 0.5 mM DAPI 용액으로 5분간 조직 내 세포핵을 염색하였다. 염색된 조직을 다시 10분간 3번씩 완충용액으로 세척한 후, 중첩 배지를 이용하여 고정한 뒤 공초점 현미경으로 관찰을 하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[140] 한편, 상기 실험에서 사용된 MTD1173A, MTD3173A, 및 MTD1018m의 구체적인 정보는 다음과 같다:

[141] MTD_{1018m}

[142] Met Arg Pro Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Val Val Ala Val (서열번호 7)

[143] MTD_{1173A}

[144] Met Arg Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val (서열번호 8)

[145] MTD_{3173A}

[146] Met Lys Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Ala Val (서열번호 9)

[147] 도 7에 나타낸 바와 같이, 음성 대조군에서는 어떠한 유의미한 수준의 형광도 관찰되지 않은 반면, 실험에 사용한 M1173A-LacZ-siRNA-Cy3, M2173A-LacZ-siRNA-Cy3, M3173A-LacZ-siRNA-Cy3와 M1018m-LacZ-siRNA-Cy3의 경우, 폐 조직의 세포 내의 투과가 일어나는 것을 관찰할 수 있었다.

- [148] 또한, 상기와 같이 제작된 슬라이드를 X-gal 염색용액에서 밤 동안 반응시킨 이후 헤마토자일렌에오신 염색으로 조직을 염색시킨 다음 베타갈락토시다제 활성을 관찰하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에 나타난 바와 같이, 음성 대조군에서는 대부분의 장기 절편 전반에 베타갈락토시다제 활성이 관찰되었지만, M1173A-LacZ-siRNA-Cy3, M2173A-LacZ-siRNA-Cy3, M3173A-LacZ-siRNA-Cy3와 M1018m-LacZ-siRNA-Cy3를 투여한 마우스 장기 절편에서의 경우 베타갈락토시다제 활성이 감소되었음을 확인하였다. 하지만, M1173A, M3173A, 및 M1018m의 경우 폐 조직의 세포 내의 투과가 M2173A에 비하여 효율이 떨어지는 것을 공초점 현미경으로 관찰 할 수 있었으며, 이는 베타갈락토시다제 활성의 결과에서도 M2173A의 효능이 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여, M2173A는 세포 내 전달이 어려운 siRNA를 장기 조직 내에 효과적으로 전달시킬 뿐 아니라, 전달된 물질 또는 약물이 전달된 조직 내에서 그 효능을 효과적으로 발휘할 수 있음을 알 수 있다.

[149]

- [150] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

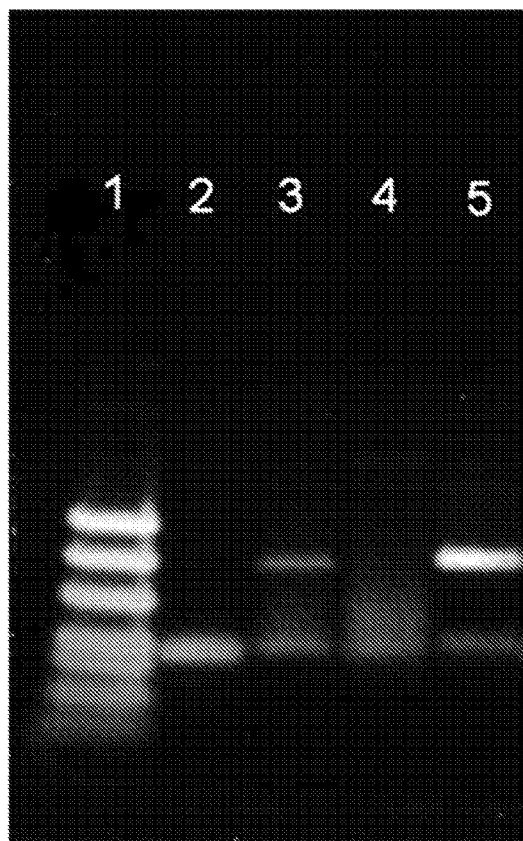
- [151] 본 발명의 경피 전달용 조성물은 분자량의 크기와 높은 수준의 음전하로 인하여 피부 각질층의 투과가 용이하지 않은 Kif13A에 생체 내 분자 전송능이 탁월한 펩티드를 결합시켜, 이를 통해 Kif13A를 피부 각질층 및 멜라닌형성세포 내까지 효과적으로 전달할 수 있다. 또한 기존의 리포솜을 이용한 전송방법과 비교하여 세포 독성을 유발하지 않는다. 따라서, 멜라닌 생성을 안전하고 효과적으로 감소시키며 다양한 형태로 제형화 할 수 있어 미백 기능성 화장품 원료로 유용하게 이용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 세포 내 분자 전송 펩티드와 siRNA가 공유결합으로 연결된 복합체를 포함하는 경피 전달용 조성물로서, 상기 펩티드는 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 경피 전달용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 펩티드는 서열번호 6으로 기재되는 폴리뉴클레오티드 서열로부터 인코딩되는 것을 특징으로 하는, 경피 전달용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 siRNA는 Kif13A(kinesin superfamily protein 13A)의 발현을 억제하여 멜라닌 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 경피 전달용 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 1로 이루어지는 센스 RNA 가닥과 서열번호 2로 이루어지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 경피 전달용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 공유결합은 비분해성 결합 또는 분해성 결합인 것을 특징으로 하는, 경피 전달용 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 비분해성 결합은 아미드 결합 또는 포스페이트 결합인 것을 특징으로 하는, 경피 전달용 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 분해성 결합은 이황화결합, 산 분해성 결합, 에스테르 결합, 안하이드라이드 결합, 생분해성 결합 및 효소 분해성 결합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 경피 전달용 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 공유결합은 Thioether 링커, S-HyNic(6-hydrazino-nicotinic acid)/4-FB(4-formylbenzoate) 링커 및 4FB(N-succinimidyl-4-formylbenzamide)/hydroxylamine 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 링커에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 경피 전달용 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 공유결합은 4FB(N-succinimidyl-4-formylbenzamide)/hydroxylamine 링커에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 경피 전달용 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 화장용 조성물인 것을 특징으로 하는, 경피 전달용 조성물.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 에멀전, 크림, 에센스, 스킨, 세럼, 리포솜, 마이크로캡슐, 복합 입자, 샴푸 및 린스로 이루어진 군으로부터 선택된 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는, 경피 전달용 조성물.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 각질층을 투과하는 것을

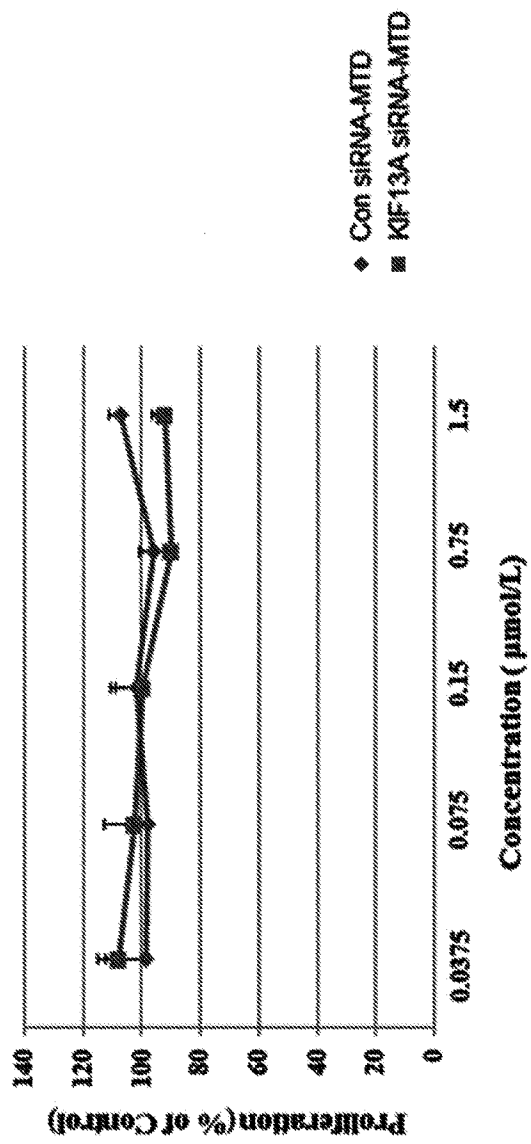
- 특징으로 하는, 경피 전달용 조성물.
- [청구항 13] siRNA를 피부 세포 내로 전달하는 경피 전달시스템으로서, 상기 시스템은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 세포 내 분자 전송 펩티드를 siRNA와 공유결합시켜 전달하는 것을 특징으로 하는, 시스템.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 1로 이루어지는 센스 RNA 가닥과 서열번호 2로 이루어지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 시스템.
- [청구항 15] siRNA를 피부 세포 내로 전달하는 방법으로서, 상기 방법은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 세포 내 분자 전송 펩티드를 siRNA와 공유결합시켜 전달하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 1로 이루어지는 센스 RNA 가닥과 서열번호 2로 이루어지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 17] siRNA를 피부 각질층 내로 전달하는 방법으로서, 상기 방법은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 세포 내 분자 전송 펩티드를 siRNA와 공유결합시켜 전달하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 1로 이루어지는 센스 RNA 가닥과 서열번호 2로 이루어지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 19] 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열로 이루어지는 세포 내 분자 전송 펩티드와 siRNA가 공유결합시켜 표피에 국소 적용하여 피부를 미백화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 화장방법.
- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 1로 이루어지는 센스 RNA 가닥과 서열번호 2로 이루어지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 방법.

[Fig. 1]

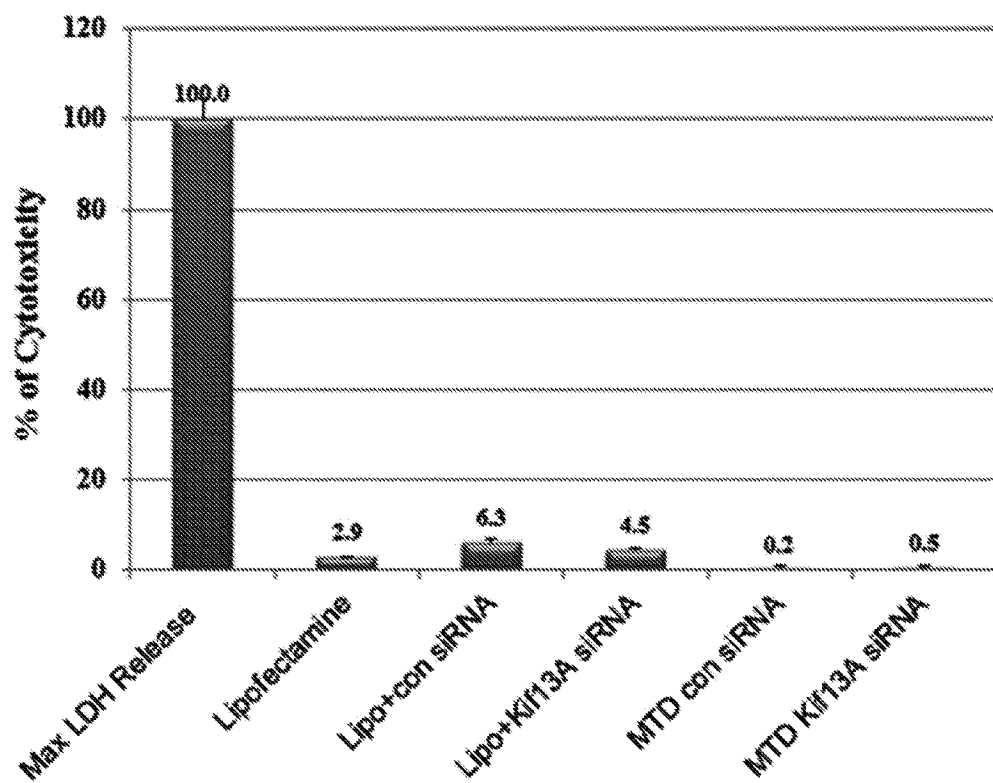


1. Lane: Invitrogen 10/60 Oligo length standard
2. Lane: Sulfo-4FB modified Con siRNA
3. Lane: Con siRNA conjugate with MTD2173A
4. Lane: Sulfo-4FB modified Kif13A siRNA
5. Lane: Kif13A siRNA conjugate with MTD2173A

[Fig. 2]

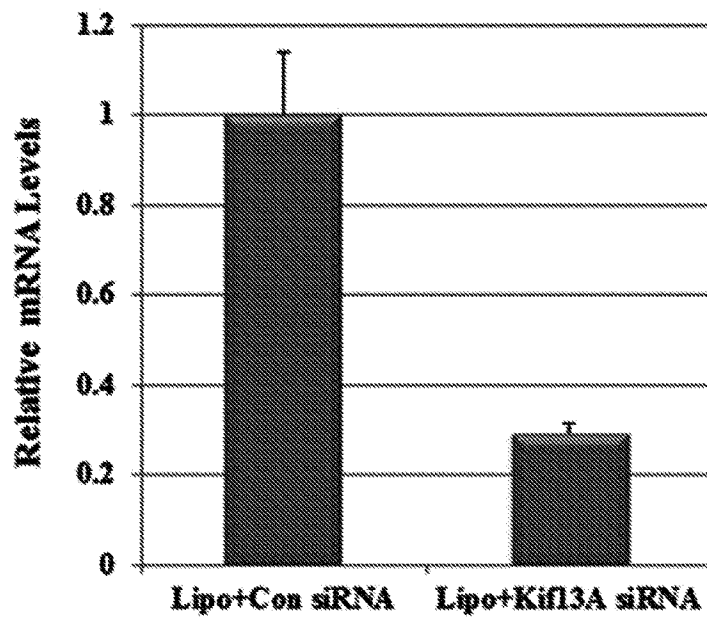


[Fig. 3]

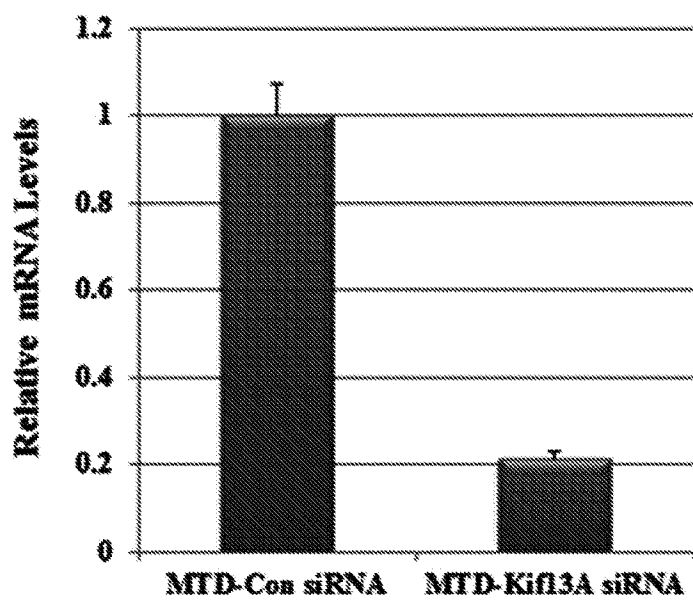


[Fig. 4]

(A)

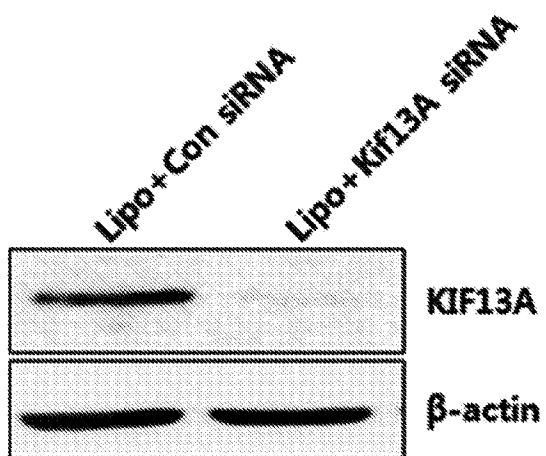


(B)

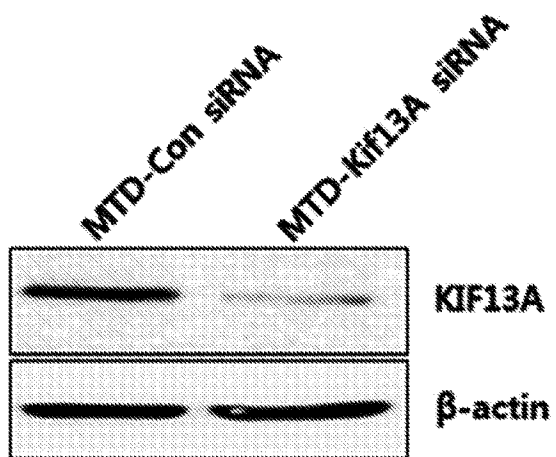


[Fig. 5]

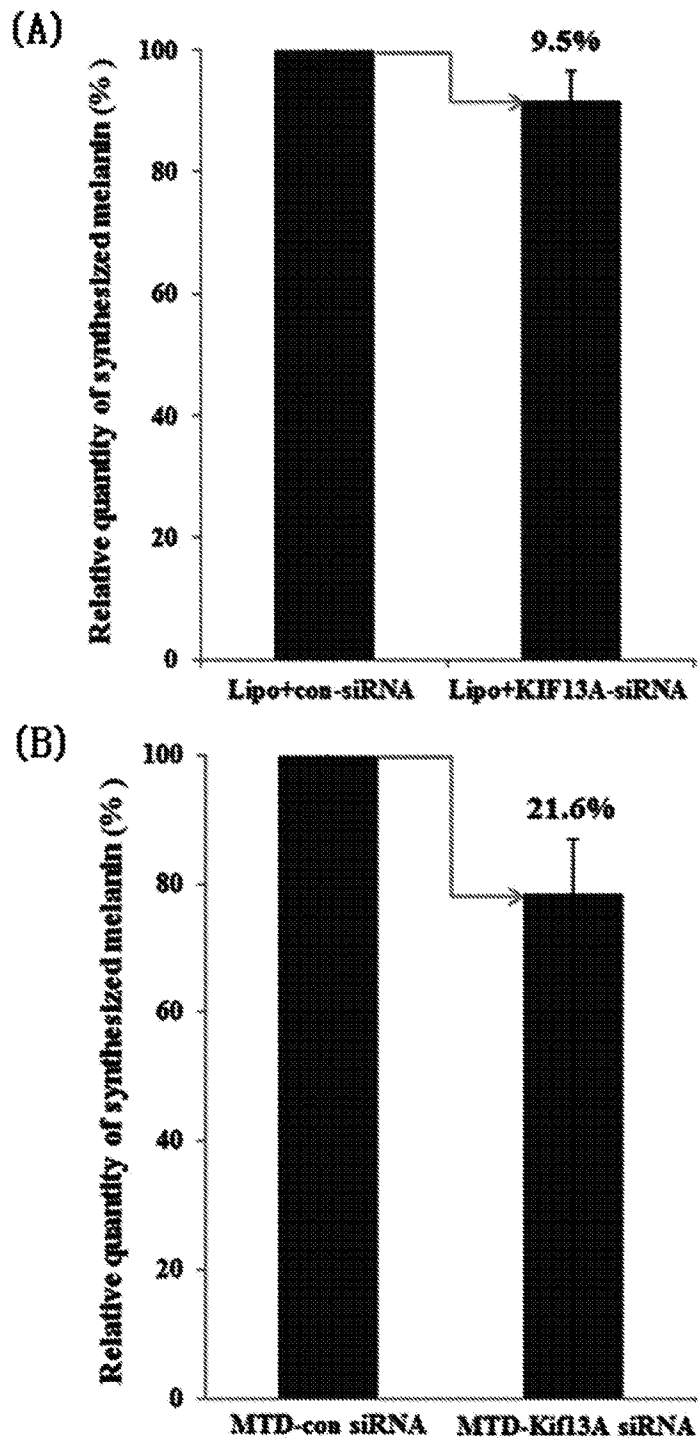
(A)



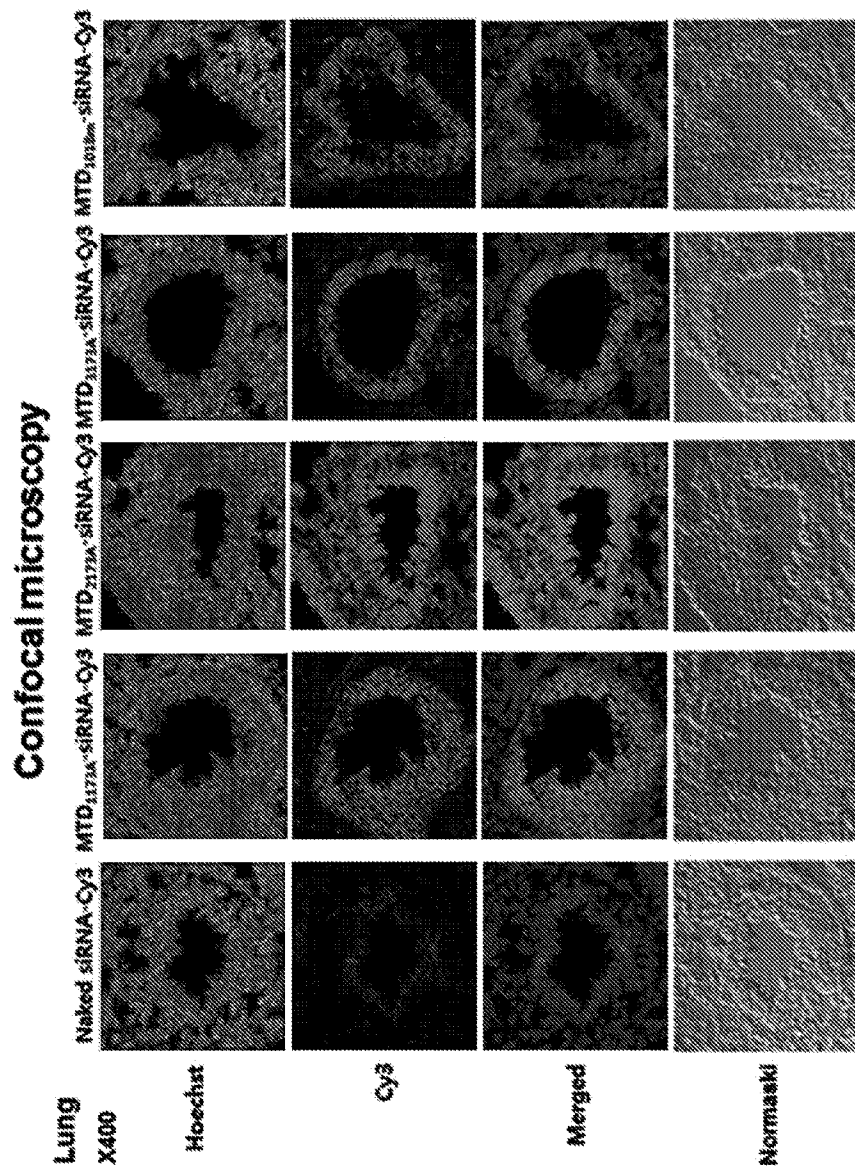
(B)



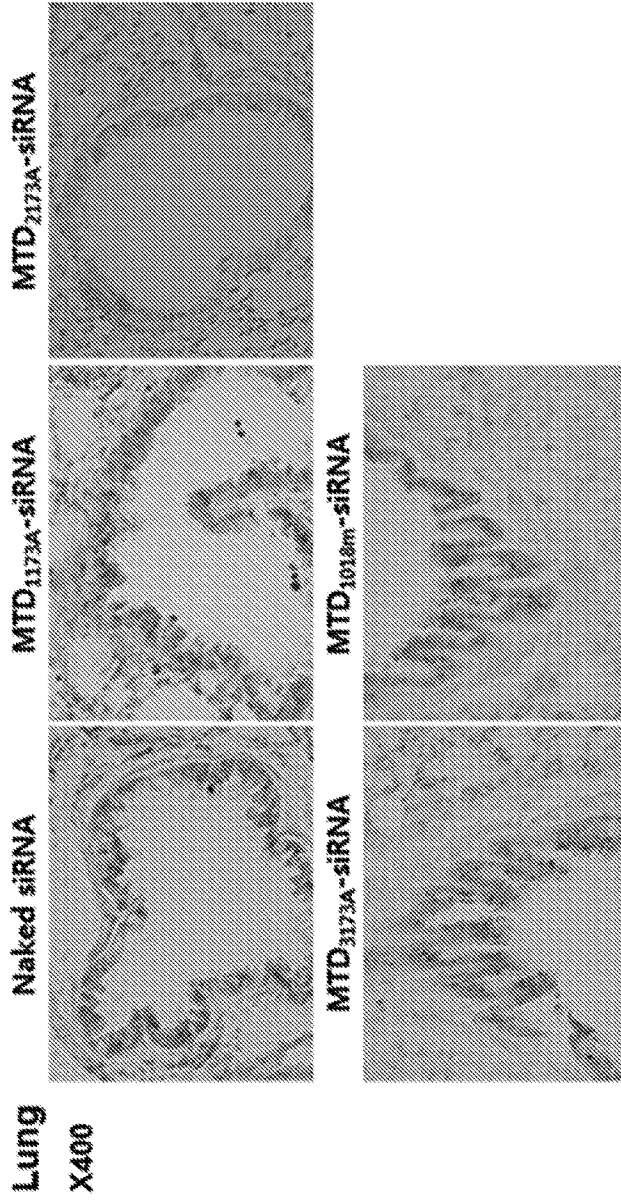
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

X-gal staining

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/006278**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, A61K 8/92(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)

C07K 19/00; C07K 7/08; C07K 7/06; A61K 45/06; C07K 14/00; A61K 31/7088; C12N 15/11; A61K 8/92

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: MTD(macromolecule transduction domain), siRNA, KiF13A, lightening, cosmetics

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-1258279 B1 (PROCELL THERAPEUTICS, INC.) 25 April 2013 See abstract; claims 5-15; paragraphs [0009], [0104]-[0106]; figures 4-9; examples 7-1, 12-3; and sequence number 49.	1-2,5-13,15,17,19
Y		3-4,14,16,18,20
Y	JP 2011-518214 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE et al.) 23 June 2011 See claims 1-10; and table 1.	3-4,14,16,18,20
A	KR 10-2011-0130943 A (SUNGSHIN WOMEN'S UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 06 December 2011 See the entire document.	1-20
A	KR 10-2010-0085527 A (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 29 July 2010 See the entire document.	1-20
A	VAN DEN BERG et al., "Protein transduction domain delivery of therapeutic macromolecules" Current Opinion in Biotechnology, Vol. 22, No. 6, pp. 888-893 (2011) See the entire document.	1-20



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

"I" 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

12 MARCH 2015 (12.03.2015)

Date of mailing of the international search report

13 MARCH 2015 (13.03.2015)

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/KR2014/006278

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1258279 B1	25/04/2013	CN 104039811 A EP 2784081 A1 US 2014-0329737 A1 WO 2013-077680 A1	10/09/2014 01/10/2014 06/11/2014 30/05/2013
JP 2011-518214 A	23/06/2011	CA 2720664 A1 CN 102014859 A EP 2276455 A2 JP 5462862 B2 US 2011-0038853 A1 US 2012-0321575 A1 US 8669238 B2 WO 2009-141541 A2 WO 2009-141541 A3	26/11/2009 13/04/2011 26/01/2011 02/04/2014 17/02/2011 20/12/2012 11/03/2014 26/11/2009 29/04/2010
KR 10-2011-0130943 A	06/12/2011	NONE	
KR 10-2010-0085527 A	29/07/2010	WO 2010-085100 A2 WO 2010-085100 A3	29/07/2010 11/11/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, A61K 8/92(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 19/00; C07K 7/08; C07K 7/06; A61K 45/06; C07K 14/00; A61K 31/7088; C12N 15/11; A61K 8/92

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: MTD(macromolecule transduction domain), siRNA, Kif13A, 미백, 화장품

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-1258279 B1 (주식회사 프로셀제약) 2013.04.25 요약; 청구항 5-15; 문단 [0009], [0104]-[0106]; 도면 4-9; 실시예 7-1, 12-3; 및 서열번호 49 참조.	1-2, 5-13, 15, 17, 19
Y		3-4, 14, 16, 18, 20
Y	JP 2011-518214 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 외) 2011.06.23 청구항 1-10; 및 표 1 참조.	3-4, 14, 16, 18, 20
A	KR 10-2011-0130943 A (성신여자대학교 산학협력단) 2011.12.06 전체 문헌 참조.	1-20
A	KR 10-2010-0085527 A (광주과학기술원 외) 2010.07.29 전체 문헌 참조.	1-20
A	VAN DEN BERG 외, 'Protein transduction domain delivery of therapeutic macromolecules' Current Opinion in Biotechnology, Vol.22, No.6, pp.888-893 (2011) 전체 문헌 참조.	1-20

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 03월 12일 (12.03.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 03월 13일 (13.03.2015)

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
KR 10-1258279 B1	2013/04/25	CN 104039811 A EP 2784081 A1 US 2014-0329737 A1 WO 2013-077680 A1	2014/09/10 2014/10/01 2014/11/06 2013/05/30
JP 2011-518214 A	2011/06/23	CA 2720664 A1 CN 102014859 A EP 2276455 A2 JP 5462862 B2 US 2011-0038853 A1 US 2012-0321575 A1 US 8669238 B2 WO 2009-141541 A2 WO 2009-141541 A3	2009/11/26 2011/04/13 2011/01/26 2014/04/02 2011/02/17 2012/12/20 2014/03/11 2009/11/26 2010/04/29
KR 10-2011-0130943 A	2011/12/06	없음	
KR 10-2010-0085527 A	2010/07/29	WO 2010-085100 A2 WO 2010-085100 A3	2010/07/29 2010/11/11