(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 8 월 12 일 (12.08.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/157809 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 14/00 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61P 17/06* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/013354

(22) 국제출원일: 2020 년 9 월 29 일 (29.09.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0014183 2020 년 2 월 6 일 (06.02.2020) KR

(71) 출원인: 인천대학교 산학협력단 (**INCHEON UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 22012 인천시 연수구 아카데미로 119, Incheon (KR).

(72) 발명자: **황병희 (HWANG, Byeong Hee)**; 15023 경기도 시흥시 옥구천동로 452, 101동 201호., Gyeonggi-do (KR).

류영채 (RYU, Yeong Chae); 21550 인천시 남동구 석산로101번길 26, Incheon (KR).

(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (**ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).

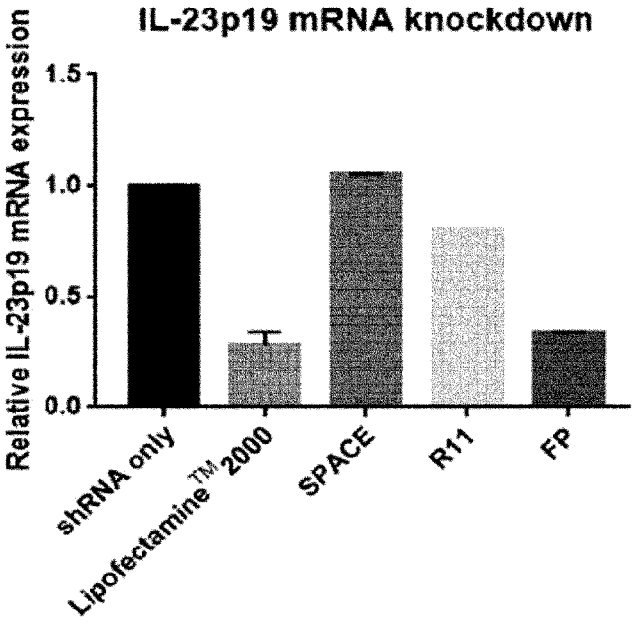
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

WO 2021/157809 A1

(54) **Title:** NOVEL COMPOSITION FOR NUCLEIC ACID MOLECULE DELIVERY, AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 신규한 핵산 분자 전달용 조성물 및 그 용도



(57) **Abstract:** The present invention relates to: a composition for delivering nucleic acid molecules to cells; and a composition for preventing or treating inflammation or autoimmune diseases by using same. The present invention uses a combination of SPACE peptides and polyarginine peptides to form complexes with nucleic acid molecules to be delivered, so as to have remarkably improved cell membrane permeability, and thus can be effectively used as an efficient gene delivery system. In particular, a composition according to the present invention not only improves the permeation efficiency of shRNA into cells, but also prevents shRNA from degrading inside cells for a long period of time, and thus achieves highly efficient suppression of target gene expression using shRNA.

[다음 쪽 계속]

LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, 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 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 세포로의 핵산 분자 전달용 조성물 및 이를 이용한 염증 또는 자가면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 SPACE 펩타이드 및 폴리아르기닌 펩타이드의 조합을 이용하여 전달하고자 하는 핵산 분자와 복합체를 형성함으로써 세포막에 대한 투과성이 현저하게 개선되어, 효율적인 유전자 전달 시스템으로 유용하게 이용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 특히 shRNA의 세포 내 투과 효율을 증진시킬 뿐 아니라 shRNA가 세포 내에서 장기간 분해되는 것을 동안 막아, shRNA를 이용한 목적 유전자의 발현 억제를 우수한 효율로 달성한다.

명세서

발명의 명칭: 신규한 핵산 분자 전달용 조성물 및 그 용도

기술분야

[1] 본 발명은 피부 침투 및 세포 진입(Skin Permeating And Cell Entering, SPACE) 펩타이드 및 폴리아르기닌(polyarginine)의 융합 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 핵산 분자 전달용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 건선은 만성적인 피부 염증을 동반하는 자가면역질환으로, 발병 원인이 명확하게 밝혀지지 않았다. 건선의 병리생리학은 대부분 표피의 케라틴 생성 세포(keratinocyte)의 비정상적인 증식과 면역 세포의 침윤 등을 특징으로 하는데, 이 때 T 세포가 관여하는 면역계가 관련된다[1]. 따라서 T 세포 활성에 관여하는 다양한 사이토카인들이 조절 인자로써 발생 과정에 핵심 역할을 한다고 알려졌다. 그 중 IL-12(interleukin-12)와 IL-23(interleukin-23)은 각각 T 세포에서 분화한 TH1, TH17 세포를 자극하여 캐스케이드 반응을 통해 케라틴 생성 세포의 증식과 염증 반응을 유발한다[2]. IL-12와 IL-23은 p40 서브유닛을 공유하고 있어 두 가지 사이토카인을 동시에 타겟팅하는 치료제들이 개발되었다[3]. 최근에 개발된 치료제는 IL-23만을 선택적으로 억제하여 IL-12에 의존적인 캐스케이드 반응을 기능적으로 유지하기 때문에 우수한 효과를 얻을 수 있다고 보고되었다[4,5].

[4] 본 발명자들은 IL-23p19를 타겟팅하기 위하여 유전자 발현억제 시스템의 일종으로 shRNA(short-hairpin RNA) 전달 기술을 도입하였다. shRNA는 RNA 간섭(RNAi)의 매개자로, 세포 내에서 Dicer 효소에 의해 21-23 bp의 siRNA (short-interfering RNA)로 프로세싱되어 타겟 mRNA에 상보적으로 결합하여 이를 분해한다[6]. 따라서 shRNA는 거의 모든 유전자에 대해 높은 특이성으로 작용할 수 있는 이점을 가진다.

[5] 한편, shRNA는 강한 음전하로 인하여 분자 자체로는 세포막을 투과하기가 어려워 전달 효율을 향상시킬 수 있는 전달체의 개발이 요구된다. 세포 투과성 펩타이드는 약 5-30개의 아미노산으로 구성되어 대부분 양전하성 또는 양친매성 성질을 가진다[7]. 특히 양전하성 펩타이드는 핵산 분자와 정전기적 인력을 바탕으로 한 상호작용이 용이하다. 또한 직접 투과 또는 엔도사이토시스(endocytosis) 등의 기작을 통해 세포막을 효과적으로 가로지르는 능력이 있으며 세포막의 손상을 최소화하기 때문에 활용 가능성이 높다[8,9]. 그러나 기존의 단일 펩타이드는 shRNA와의 상호작용이 불안정하며 전달 효율이 낮다는 제한점이 있었다. 따라서 본 발명자들은 복수개의 펩타이드가 융합된 융합 펩타이드를 설계함으로써 shRNA와의 복합체에서의 안정성을

높이고 전달 효율을 증가시키고자 하였다.

[6]

[7] 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.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명자들은 높은 효율로 핵산 분자를 목적 세포 내로 전달할 수 있는 우수한 유전자 전달 시스템(gene delivery system)을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, SPACE 펩타이드와 폴리아르기닌 펩타이드의 조합을 이용하여 전달하고자 하는 핵산 분자와 복합체를 형성할 경우 세포막에 대한 투과성이 크게 개선되어 목적 세포로의 핵산 분자 전달 효율이 현저하게 상승함을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[10] 따라서 본 발명의 목적은 세포로의 핵산 분자 전달용 조성물을 제공하는 데 있다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 염증 또는 자가면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[12]

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

[14]

과제 해결 수단

[15] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 피부 침투 및 세포 진입(Skin Permeating And Cell Entering, SPACE) 펩타이드 및 폴리아르기닌(polyarginine) 펩타이드를 포함하는 세포로의 핵산 분자 전달용 조성물을 제공한다.

[16] 본 발명자들은 높은 효율로 핵산 분자를 목적 세포 내로 전달할 수 있는 우수한 유전자 전달 시스템(gene delivery system)을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, SPACE 펩타이드와 폴리아르기닌 펩타이드의 조합을 이용하여 전달하고자 하는 핵산 분자와 복합체를 형성할 경우 세포막에 대한 투과성이 크게 개선되어 목적 세포로의 핵산 분자 전달 효율이 현저하게 상승함을 발견하였다.

[17] 본 발명에 따르면, 하기 실시예에서 보는 바와 같이 SPACE 펩타이드와 폴리아르기닌 펩타이드를 각각 단독으로 사용한 경우에 비해 이들을 함께 사용한 경우 핵산 분자의 전달의 효율에 있어 유의한 상승적 효과(synergistic effect)를 나타낸다.

[18] SPACE 펩타이드는 피부 각질층 또는 세포막에 대한 투과성을 개선하기 위해 사용되는 10개 내외의 아미노산으로 이루어진 합성 폴리펩타이드로서, 거대분자의 국소적 전달에 주로 사용된다. 한편, 폴리아르기닌은 다수의 아르기닌(Arg) 잔기가 연속적으로 연결된 양이온성 합성 펩타이드로서, 음이온을 띄는 핵산 분자의 전하를 중화시켜 지질 이중막으로 구성된 세포막의 투과성을 향상시킨다.

[19] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 사용되는 폴리아르기닌 펩타이드는 7 내지 15개의 아르기닌 잔기로 구성되며, 보다 구체적으로는 9 내지 13개의 아르기닌 잔기로 구성되고, 보다 더 구체적으로는 10 내지 12개의 아르기닌 잔기로 구성되며, 가장 구체적으로는 11개의 아르기닌 잔기로 구성된다.

[20] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 SPACE 펩타이드는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열(ACTGSTQHQCG)을 포함한다.

[21] 본 발명의 SPACE 펩타이드 및 폴리아르기닌 펩타이드는 분리된 각각의 분자로서 목적 핵산분자를 포함하는 시료에 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 첨가될 수도 있고, 또는 하나의 융합된(fused) 형태로 이용될 수도 있다. 융합된 형태로 이용되는 경우, 상기 SPACE 펩타이드 및 상기 폴리아르기닌 펩타이드가 직접 공유 또는 비공유 결합을 할 수도 있고, 또는 두 펩타이드가 링커로 연결될 수도 있다. 두 펩타이드가 링커로 연결될 경우, 상기 링커는 서열목록 제3서열(GCG)을 포함하는 폴리펩타이드이다.

[22] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 펩타이드의 아민 그룹(N)과 전달하고자 하는 핵산 분자의 인산 그룹(P)의 비율(N/P ratio)는 5:1 내지 20:1이다.

[23]

[24] 본 명세서에서, 용어“핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA)와 RNA 분자를 포괄하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)). 본 발명의 핵산 분자 전달용 조성물은 연구 목적으로 세포를 형질전환하기 위해 유전자를 전달하는 리서치 툴(research tool)일 수도 있고, 질환을 치료하기 위해 치료 유전자를 환자에 전달하는 치료용 조성물(therapeutic composition)일 수 있다.

[25] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 핵산 분자는 음전하를 띈다.

[26]

[27] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 핵산 분자는 목적 유전자의 발현 억제용 핵산 분자이다. 본 명세서에서 용어“발현의 억제”는 목적 유전자의 활성 또는 발현의 저하를 야기시키는 것을 의미하며, 이에 의해 목적 유전자의 활성 또는 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 경우 뿐

아니라, 타겟 유전자의 생물학적 기능이 유의하게 저하될 수 있을 정도로 활성 또는 발현을 저하시키는 것을 의미한다. 본 발명의 발현 억제용 핵산 분자는 구체적으로는 목적 유전자의 서열에 상보적인 핵산분자로서, 예를 들어 shRNA, siRNA, miRNA, gRNA(guideRNA) 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 모든 유전자의 억제수단인 핵산분자가 이용될 수 있다. 구체적으로는, 본 발명에서 사용되는 발현 억제용 핵산 분자는 shRNA이다.

[28] 본 명세서에서 용어"shRNA(small hairpin RNA)"는 *인 비보* 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드로서, RNA 간섭을 통해 타겟 유전자의 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열을 의미한다. 통상적으로 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성하며, 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 타겟 유전자의 발현억제가 유전되도록 한다.

[29] 본 명세서에서 용어"siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이고, 타겟 유전자의 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.

[30] 본 명세서에서 용어"miRNA(microRNA)"는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드로서 짧은 스템-루프 구조를 가지면서 타겟 유전자의 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제하는 단일 가닥 RNA분자를 의미한다.

[31] 본 명세서에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로서 타겟 mRNA 내의 상보적 서열에 결합하여 이의 단백질로의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해하는 핵산 분자를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당솔포네이 등으로 변형될 수 있다.

[32] 본 명세서에서 용어"gRNA(guideRNA)"는 타겟 유전자를 인식하여

핵산분해효소(nuclease)를 유도함으로써 인식된 분위를 특이적으로 절단하는 유전자 편집 시스템에 사용되는 RNA 분자를 의미한다. 이러한 유전자 편집 시스템에는 대표적으로 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템이 있다.

[33] 본 명세서에서 용어“발현시키다”는 대상체가 외래(exogenous) 유전자를 발현하게 하거나 또는 내인성(endogenous) 유전자의 자연적 발현량을 증가시키기 위해 유전자 전달체를 이용하여 인위적으로 이를 도입함으로써 유전자가 대상체 세포 내에서 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 따라서,
용어“발현”은“형질전환(transformation)”, "형질감염(transfection)" 또는 "형질도입(transduction)"과 동일한 의미이다.

[34] 본 명세서에서, 용어“유전자 전달 시스템(gene delivery system)”는 유전자를 세포 내로 운반하는 모든 수단을 의미하며, 유전자 전달은 유전자의 세포내 침투(transduction)와 동일한 의미를 가진다. 조직 수준에서, 상기 용어 유전자 전달은 유전자의 확산(spread)과 동일한 의미를 가진다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달 시스템은 유전자 침투 시스템 및 유전자 확산 시스템으로 기재될 수 있다.

[35] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 발현을 억제하고자 하는 목적 유전자는 IL-23p19이다. p19는 TH17 세포를 자극하는 친염증성 사이토카인인 IL-23의 서브유닛으로서, 이의 억제를 통해 다양한 염증 및 자가면역 질환을 치료할 수 있다.

[36] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 핵산분자 전달용 조성물 및 IL-23p19의 발현을 억제하는 핵산분자를 유효성분으로 포함하는 염증 또는 자가면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[37] 본 발명의 조성물로 전달하고자 하는 핵산 분자에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[38] 본 명세서에서 용어“예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.

[39] 본 명세서에서 용어“치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물이 대상체에 투여되면 IL-23p19의 발현 억제를 통해 TH17 세포를 자극하면서 시작되는 캐스케이드 반응이 차단됨으로써 과도한 면역반응 및 염증에 따른 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 염증 또는 자가면역 질환의 치료 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서
용어“치료”또는“치료제”는“치료 보조”또는“치료 보조제”의 의미를 포함한다.

[40] 본 명세서에서 용어“투여”또는“투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.

[41] 본 발명에서 용어“치료적 유효량”은 본 발명의 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에“예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.

[42] 본 명세서에서 용어“대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.

[43] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료하고자 하는 염증 또는 자가면역질환은 피부 건선, 류마티스 관절염, 반응성 관절염, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 전신성 홍반성 낭창, 다발성경화증, 특발성섬유성폐포염, 다발성근염, 피부근염, 국한피부경화증, 전신피부경화증, 대장염, 염증성 장질환, 조르젠신드롬(Sjorgen's syndrome), 레이노현상(Raynaud's phenomenon), 베쳇병(Bechet's disease), 가와사키병(Kawasaki's disease), 원발성담즙성경화증(primary biliary sclerosis), 원발성경화성담관염(primary sclerosing cholangitis), 궤양성대장염(ulcerative olitis) 또는 크론병(Crohn's disease)이며, 보다 구체적으로는 피부 건선이다.

[44]

[45] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 핵산분자 전달용 조성물 및 IL-23p19의 발현을 억제하는 핵산분자를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 염증 또는 자가면역 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 본 발명의 핵산분자 전달용 조성물, 이를 통해 전달하고자 하는 핵산 분자 및 이를 이용하여 예방 또는 치료할 수 있는 염증 또는 자가면역 질환에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[46]

[47] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 핵산 분자 전달용 조성물 및 목적 핵산분자를 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 상기 목적 핵산분자를 상기 세포에 전달하는 방법을 제공한다.

[48] 본 발명의 핵산 분자 전달용 조성물 및 이를 이용하여 전달하고자 하는 핵산 분자에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[49]

발명의 효과

[50] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[51] (a) 본 발명은 세포로의 핵산 분자 전달용 조성물 및 이를 이용한 염증 또는 자가면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[52] (b) 본 발명은 SPACE 펩타이드 및 폴리아르기닌 펩타이드의 조합을 이용하여 전달하고자 하는 핵산 분자와 복합체를 형성함으로써 세포막에 대한 투과성이 현저하게 개선되어, 효율적인 유전자 전달 시스템으로 유용하게 이용될 수 있다.

[53] (c) 본 발명의 조성물은 특히 shRNA의 세포 내 투과 효율을 증진시킬 뿐 아니라 shRNA가 세포 내에서 장기간 분해되는 것을 동안 막아, shRNA를 이용한 목적 유전자의 발현 억제를 우수한 효율로 달성한다.

[54]

도면의 간단한 설명

[55] 도 1은 shRNA/FP 복합체에 대한 겔 지연분석(겔 지연 분석) 결과를 보여주는 그림이다. 융합 펩타이드(FP)와 shRNA 간의 질소/인산(N/P) 비율이 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 및 100:1이 되도록 혼합하였다. 30분 뒤 상온에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하였다.

[56] 도 2는 크기(도 2a), 다분산 지수(도 2b) 및 zeta potential(도 2c)을 측정한 결과를 각각 보여주는 그림이다. FP 및 대조군 shRNA를 1:1, 5:1, 10:1 및 20:1의 비율로 30분 간 상온에서 배양하였다. 모든 측정값들은 Zetasizer를 이용하여 3번 측정 후 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

[57] 도 3은 안정성 시험 결과를 보여주는 그림이다. 50% FBS의 존재 하에 37℃에서 0, 4, 8, 12, 24 및 48시간 동안 배양을 수행하고 아가로스 겔 전기영동으로 확인하였다.

[58] 도 4는 형광 현미경을 이용하여 Cy3-표지된 siRNA/FP 복합체의 세포 내 위치를 확인한 결과를 보여주는 그림이다. 핵 및 F-액틴을 호케스트 33342(파란색) 및 팔로이딘(녹색)으로 각각 표지하였다. Cy3-표지된 siRNA는 오렌지색으로 시각화하였다(스케일바 = 100μm)

[59] 도 5는 세포에서 Cy3-표지된 siRNA/FP 복합체가 흡수되는 것을 유세포 분석을 통해 분석한 결과를 보여준다. siRNA만 처리한 대조군 및 siRNA/FP 복합체 처리군에서의 형광 강도가 각각 붉은색 및 녹색으로 나타나 세포의 수를 보여준다.

[60] 도 6은 RAW264.7에서의 IL-23p19 mRNA가 녹다운된 결과를 보여주는 그림이다. poly(I:C)로 활성화된 세포에 shRNA/FP 복합체를 처리하였다. RNA 추출 및 cDNA 합성 후에, 정량적 PCR을 수행하였다. 모든 값은 3번 측정하고 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

[61] 도 7은 FP의 세포 독성을 측정한 결과를 나타낸다. FP는 0.2 mg/mL의 농도까지 처리되었다. HDFn 세포로부터 방출된 LDH 수준은 흡광도를 통해 측정하였다. 모든 값은 3번 측정하고 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

[62]

발명의 실시를 위한 형태

[63] 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.

[64]

[65] **실시예**

[66] **실험방법**

[67] *shRNA/융합 펩타이드 복합체 형성*

[68] 대조군 shRNA(Genolution, Seoul, Korea), Cy3로 표지된 대조군 siRNA (GenePharma, Shanghai, China), IL-23p19 shRNA (Genolution, Seoul, Korea)를 합성하여 nuclease-free water(Integrated DNA Technologies Inc., IA, USA)에 1 μM가 되도록 녹였다. 융합 펩타이드(GL Biochem Ltd., Shanghai, China)는 95% 이상의 순도를 가지도록 합성하여 3차 증류수에 1 mg/mL이 되도록 녹였다. 본 발명에서는 두 가지의 기능성을 가지는 펩타이드 서열 사이에 링커 서열(GCG)을 추가하여 디자인하였다. 융합 펩타이드의 구조는 크게 SPACE 펩타이드 및 폴리아르기닌 펩타이드 사이에 링커 서열로 구성되며, SPACE 펩타이드는 조직전달 기능을, 폴리아르기닌은 양전하를 띄어 음전하인 핵산과 정전기적인 상호작용을 하여 자가조립 기능을 가진다. 반면에 링커 서열은 두 펩타이드가 서로 영향을 주고 받지 않으며 활동할 수 있는 중간다리 역할을 한다. 융합펩타이드의 아미노산 조성을 분석하면 비극성 아미노산(A, G), 전하를 띠지 않는 극성 아미노산(C, T, S, Q), 양전하를 가지는 아미노산(H, R)으로 이루어져 있으며 염기성 부분이 전체의 48%이기 때문에 siRNA 또는 shRNA와의 정전기적 상호작용이 가능하다. shRNA/펩타이드의 자가 조립 복합체 형성을 위하여, 펩타이드의 아민 그룹(N)과 RNA의 인산 그룹(P)의 비율을 계산한 후 적절한 비율에 따라 상온에서 30분 동안 배양하였다.

[69]

[70] *겔 지연 분석*

[71] 대조군 shRNA와 펩타이드의 N/P 비율을 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100까지 계산하여 각각 상온에서 30분 동안 배양하였다. 2% 아가로스 겔 (w/v)을 10,000X TopRed Nucleic Acid Gel Stain (GenomicBase, Seoul, Korea)이 들어있는 1X TAE 완충액에서 제조하고 각 샘플에 6X 로딩 dye (Biofact)를 첨가한 후 겔에 로딩하였다. Mupid-2plus 전기영동 시스템(Optima Inc., Tokyo, Japan)을 이용하여 30분 동안 전기영동을 수행한 후 결과를 겔 기록 시스템 LSG 1000(iNtRON biotechnology, Seongnam, Korea)으로 확인하였다.

[72]

[73] *복합체의 크기 및 제타 전위 측정*

[74] 대조군 shRNA와 펩타이드의 N/P 비율을 1, 5, 10, 20으로 하여 각각 상온에서 30분 동안 배양하였다. 최종 shRNA의 농도가 200 nM이 되도록 nuclease-free water를 첨가하여 희석한 후, 10 mL 주사기와 0.45 μm 주사기 필터를 이용하여

여과하고 30초 동안 볼텍싱하였다. Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK)를 이용하여 크기와 제타 전위를 측정하였다.

[75]

[76] *shRNA의 안정성 확인*

[77] 대조군 shRNA와 펩타이드의 N/P 비율을 20으로 하여 상온에서 30분 동안 배양하였다. 형성된 shRNA/펩타이드 복합체에 우태아 혈청(FBS; PAN Biotech, Bavaria, Germany)을 50% (v/v)로 첨가한 후 37℃에서 배양하였다. 0, 4, 8, 12, 24, 48시간 동안 각각 샘플링하여 -80℃에 보관한 후, RNA 밴드를 확인하기 위해 1 mg/mL의 헤어핀 나트륨 염(Sigma-aldrich, MO, USA)을 첨가하여 37℃에서 30분 동안 배양한 뒤 앞선 실시예에서 언급한 조건과 동일하게 전기영동을 수행하여 결과를 확인하였다.

[78]

[79] *세포 배양*

[80] 인간 피부 섬유아세포인 RAW264.7(HDF, neonatal) 세포를 10% FBS와 1% 페니실린-스트렙토마이신(Life Technologies, CA, USA)이 포함된 DMEM(dulbecco's modified eagle's medium, Corning, MA, USA)에서 37℃, 5% CO_2표준 조건에서 배양하였다. 계대 배양은 세포의 컨플루언시에 따라 2-3일 간격으로 수행하였다.

[81]

[82] *형광 현미경 관찰*

[83] 충분히 자란 RAW264.7 세포를 24-웰 플레이트에 10^5 세포/웰로 총 0.5 mL씩 씨딩한 후 표준 조건에서 하루 동안 배양하였다. 배지를 혈청이 최소화된 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)으로 교체한 후, Cy3가 표지된 대조군 siRNA와 펩타이드를 20:1의 N/P 비율로 상온에서 30분 동안 배양하여 형성된 복합체를 세포에 처리하고 표준조건에서 4시간 동안 배양하였다. PBS로 세척한 후, 10% 포르말린(Sigma-aldrich, MO, USA) 용액을 상온에서 10분 동안, 0.1% Triton X-100(Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA)이 포함된 PBS(0.1% PBST)를 10분 동안, 2% BSA(Generay Biotech Co., Ltd., Shanghai, China)가 포함된 0.1% PBST를 30분 동안 처리하였다. 빛을 차단한 상태에서 호케스트 33342 염색(Invitrogen, CA, USA) 용액을 상온에서 10분 동안, 팔로이딘 염색(BioActs, Incheon, Korea) 용액을 1시간 동안 처리하여 염색하였다. 각 과정 사이에 PBS 세척을 수행하고, 결과를 형광 현미경으로 분석하였다.

[84]

[85] *유세포 분석*

[86] 충분히 자란 RAW264.7 세포를 6-웰 플레이트에 10^6 세포/웰로 총 1 mL씩 씨딩한 후 표준 조건에서 하루 동안 배양하였다. 배지를 Opti-MEM으로 교체한 후, Cy3가 표지된 대조군 siRNA와 펩타이드를 20:1의 N/P 비율로 상온에서 30분 동안 배양하여 형성된 복합체를 세포에 처리하고 표준 조건에서 4시간 동안

배양하였다. PBS로 세척한 후 각 웰에 트립신-EDTA(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 첨가하여 세포 부착성을 떨어뜨리고, 배지를 첨가하여 360g에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 재부유한 후 동일한 조건에서 원심분리를 2번 반복하였다. 최종적으로 pellet을 차가운 PBS로 재부유하여 유세포 분석기 전용 튜브에 옮겨 측정하였다.

[87]

[88] *qRT-PCR*

[89] 충분히 자란 RAW264.7 세포를 6-웰 플레이트에 10^6 세포/웰로 총 1 mL씩 씨딩한 후 표준 조건에서 하루 동안 배양하였다. 배지를 교체하고 각 웰에 Poly (I:C)(Invivogen, CA, USA)를 처리한 후 표준 조건에서 6시간 동안 배양하였다. IL-23p19 shRNA와 펩타이드를 20:1 N/P 비율로 상온에서 30분 동안 배양한 후 Opti-MEM으로 배지를 교체한 세포에 처리하여 5시간 동안 배양하였다. 대조군인 리포펙타민™ 2000 (Invitrogen, CA, USA)은 제공된 프로토콜에 따라 수행하였다. 배지를 DMEM으로 교체하여 추가적으로 13시간 동안 배양한 후 제품 프로토콜에 따라 RNA 추출과 cDNA 합성을 진행하였다. SYBR qPCR mix (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan)와 정방향 및 역방향 프라이머를 이용하여 반응 혼합물을 제조하였고 3단계 사이클에 따라 PCR을 수행하였다.

[90]

[91] *세포 독성 확인*

[92] HDFn 세포를 동일한 배지와 조건에서 배양하였다. 충분히 자란 세포를 96-웰 플레이트에 8.0×10^3 세포/웰로 씨딩하여 하루 동안 배양하였다. 펩타이드를 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/mL의 농도로 희석하여 세포에 5시간 처리한 후 프로토콜에 따라 CytoTox 96® 비-방사성 세포독성 어세이를 수행하였다.

[93]

[94] **실험결과**

[95] *shRNA/펩타이드 복합체 형성 및 특성 분석*

[96] shRNA와 융합 펩타이드가 상호작용하여 형성한 복합체를 확인하고 특성을 분석하였다. 펩타이드 없이 shRNA만 로딩하였을 때 RNA 밴드를 확인하였다. 이 위치를 기준으로 펩타이드가 N/P 비율 1:1로 첨가되었을 때 거의 동일한 위치에 밴드가 나타났고 밝기는 조금 감소한 것을 확인하였다. 펩타이드가 N/P 비율 5:1로 증가하였을 때부터는 RNA 밴드의 지연이 일어나 로딩 웰에 밴드가 관찰되었다 (Fig. 1). 따라서 펩타이드는 5:1의 N/P 비율 이상부터 shRNA와 효과적으로 상호작용하여 복합체를 형성할 수 있음을 확인하였다.

[97] shRNA와 융합 펩타이드 복합체의 크기와 제타 전위를 DLS(dynamic light scattering) 분석으로 측정하였다. 복합체는 N/P 비율 1:1에서 267 nm, 5:1에서 125.6 nm, 10:1에서 135.4 nm, 20:1에서 120.5 nm의 평균 크기를 나타내었다(도 2a). 또한 모든 비율에서 평균 PdI 값이 0.25 아래로 매우 균일한 크기를 가지는 것을 확인하였다(도 2b). 따라서 1:1에서는 펩타이드와 shRNA의 상호작용이

부족하여 크기가 크고 불균일한 복합체를 형성하였지만, 5:1부터는 상호작용이 충분하여 좀 더 응축되고 균일한 복합체가 형성된 것임을 알 수 있으며 이는 겔 지연 분석 결과와 일치하는 양상을 보였다. 한편 1:1, 5:1, 10:1의 복합체는 강한 음전하를 나타냈지만 20:1의 복합체는 강한 양전하를 나타내었기 때문에(도 2c), 이후 실험에서는 비율을 20:1로 고정하여 세포 내 투과 효율을 높이고자 하였다.

[98] 혈청을 과량으로 첨가하였을 때 shRNA/펩타이드 복합체의 shRNA가 분해되는 양상이 변화되는지를 관찰하였다. 먼저 펩타이드가 없는 shRNA는 혈청을 첨가하지 않은 0시간에서 뚜렷한 밴드가 관찰되었으나 혈청을 첨가한 후 4시간부터는 밴드가 관찰되지 않았다. 반면 shRNA/펩타이드 복합체의 shRNA는 혈청 첨가 후 4시간에서 0시간과 거의 동일한 밝기의 밴드를 나타냈고, 48시간까지 배양하였을 때 점점 희미해지는 밴드가 남아있는 것이 관찰되었다(도 3). 따라서 본 발명의 융합 펩타이드는 shRNA의 전달체로써 shRNA가 세포 내에서 분해되는 것을 장시간 동안 막아 안정성을 유지할 수 있는 기능이 있음을 확인하였다.

[99]

[100] *siRNA/펩타이드 복합체의 세포 내 투과 효율 평가*

[101] 펩타이드를 통한 shRNA의 세포 전달 효율을 평가하기 위해 Cy3로 표지한 siRNA를 사용하였다. 모든 조건에서 호케스트 33342, 팔로이딘 염색에 의해 핵과 액틴이 염색되어 현미경 상에서 관찰되었다. siRNA만 전달하였을 때는 Cy3가 관찰되지 않았고, 리포펙타민™ 2000 복합체의 경우에는 부분적으로 약한 형광이 관찰되었다. 반면 펩타이드 복합체에서는 전체적으로 강한 시그널을 보이는 Cy3 형광이 관찰되었고, 세포질 내에 위치하는 양상을 확인하였다(도 4).

[102] 정량적인 결과 확인을 위하여 유세포 분석기를 사용하여 앞의 실험과 동일한 조건에서 Cy3 형광세기를 비교하였다. 펩타이드가 없는 siRNA에 비하여 리포펙타민™ 2000 복합체의 경우 형광 세기가 증가한 세포들이 측정되어 뚜렷한 이동(shift)이 30.13%로 분석되었다. 펩타이드 복합체의 경우 매우 강한 이동이 관찰되었고 87.08%로 나타났다(도 5). 두 결과를 종합하였을 때, 기존의 리포펙타민™ 2000 시약에 비하여 본 발명의 융합 펩타이드가 siRNA의 세포 내 전달 효율을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[103]

[104] *IL-23p19 mRNA 발현 억제 평가*

[105] RAW264.7 세포에서 poly (I:C)에 의한 활성화로 IL-23p19의 발현 양을 증가시킨 후 IL-23p19 shRNA를 전달하여 mRNA 발현량 변화를 qRT-PCR로 확인하였다. shRNA만을 전달한 조건을 대조군으로 하여 상대적인 mRNA 발현량을 1로 고정하고 ΔΔCt 계산으로 분석하였다. SPACE 복합체에 의한 mRNA 발현량은 대조군과 차이가 없었으며, R11 복합체는 약 80%까지 mRNA 발현을 억제하였다. 반면에 리포펙타민™ 2000 복합체는 평균 약 28.1%, 펩타이드 복합체는 약 33.8%까지 mRNA 발현을 억제하였다(도 6). 통계처리

결과 두 조건 사이에서 유의성이 없었기 때문에 융합 펩타이드는 리포펙타민™ 2000의 범위 내의 효율을 나타낸 것으로 평가되었다. 또한 SPACE 펩타이드와 R11 펩타이드 각각을 단독으로 사용한 경우보다 펩타이드 조합에 의한 상승효과(synergistic effect)를 확인하였다. 따라서 융합 펩타이드는 shRNA를 전달하여 목적 mRNA의 발현 억제를 증가시킬 수 있는 매우 효율적인 전달체로써 평가되었다.

[106]

[107] *펩타이드의 세포 독성 평가*

[108] 펩타이드가 세포에 미치는 독성의 영향을 1차 세포에서 확인하였다. 펩타이드가 세포에 처리되어 나타내는 최종 농도는 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 mg/mL이었다. 펩타이드가 처리되지 않은 세포의 LDH(lactate dehydrogenase) 수준을 1로 고정하여 비교한 결과, 펩타이드 농도가 증가하여도 LDH 수준은 대조군과 비교하여 통계적으로 차이나지 않았다(도 7). 앞선 세포 실험에서 사용한 펩타이드 농도는 이 범위 안에 포함되기 때문에 실제로 적용하였을 때 생체적합성을 가질 수 있을 것이라고 판단되었다.

[109]

[110] **참고문헌**

[111] 1. Greb, J. E., Goldminz, A. M., Elder, J. T., Lebwohl, M. G., Gladman, D. D., Wu, J. J., Mehta, N. N., Finlay, A. Y. and Gottlieb, A. B. (2016) Psoriasis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2: 16082

[112] 2. Mortezavi, M., and Ritchlin, C. (2015) IL12/IL23 inhibition in the treatment of psoriatic arthritis. *Curr. Treat. Options in Rheumatology.* 1: 197-209.

[113] 3. Teng, M. W., Bowman, E. P., McElwee, J. J., Smyth, M. J., Casanova, J. L., Cooper, A. M., and Cua, D. J. (2015) IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat. Med.* 21: 719.

[114] 4. Machado, A. and Torres, T. (2018) Guselkumab for the treatment of psoriasis. *BioDrugs.* 32: 119-128.

[115] 5. Fotiadou, C., Lazaridou, E., Sotiriou, E., and Ioannides, D. (2018) Targeting IL-23 in psoriasis: current perspectives. *Psoriasis: Targets and Therapy.* 8: 1-5.

[116] 6. Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N., and Nemunaitis, J. (2009) siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61: 746-759.

[117] 7. Zorko, M., and Langel, Ulo. (2005) Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 529-545.

[118] 8. Drin, G., Cottin, S., Blanc, E., Rees, A. R., and Temsamani, J. (2003) Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.* 278: 31192-31201.

[119] 9. Koren, E., and Torchilin, V. P. (2012) Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends. Mol. Med.* 18: 385-393.

[120]

[121] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 피부 침투 및 세포 진입(Skin Permeating And Cell Entering, SPACE) 펩타이드 및 폴리아르기닌(polyarginine) 펩타이드를 포함하는 세포로의 핵산 분자 전달용 조성물.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 폴리아르기닌 펩타이드는 11개의 아르기닌 잔기로 구성된 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 SPACE 펩타이드는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 SPACE 펩타이드 및 상기 폴리아르기닌 펩타이드는 링커로 연결된 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 5] 제 3 항에 있어서, 상기 링커는 서열목록 제3서열의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 음전하를 띄는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 7] 제 1 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 목적 유전자의 발현 억제용 핵산 분자인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 shRNA, siRNA, miRNA, gRNA(guideRNA) 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 핵산 분자인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 9] 제 8 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 shRNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 10] 제 7 항에 있어서, 상기 목적 유전자는 IL-23p19인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 11] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 하나의 조성물 및 IL-23p19의 발현을 억제하는 핵산분자를 유효성분으로 포함하는 염증 또는 자가면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

[청구항 12] 제 11 항에 있어서, 상기 핵산분자는 음전하를 띄는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 13] 제 12 항에 있어서, 상기 핵산분자는 shRNA, siRNA, miRNA, gRNA(guideRNA) 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 핵산 분자인 것을 특징으로 하는 조성물.

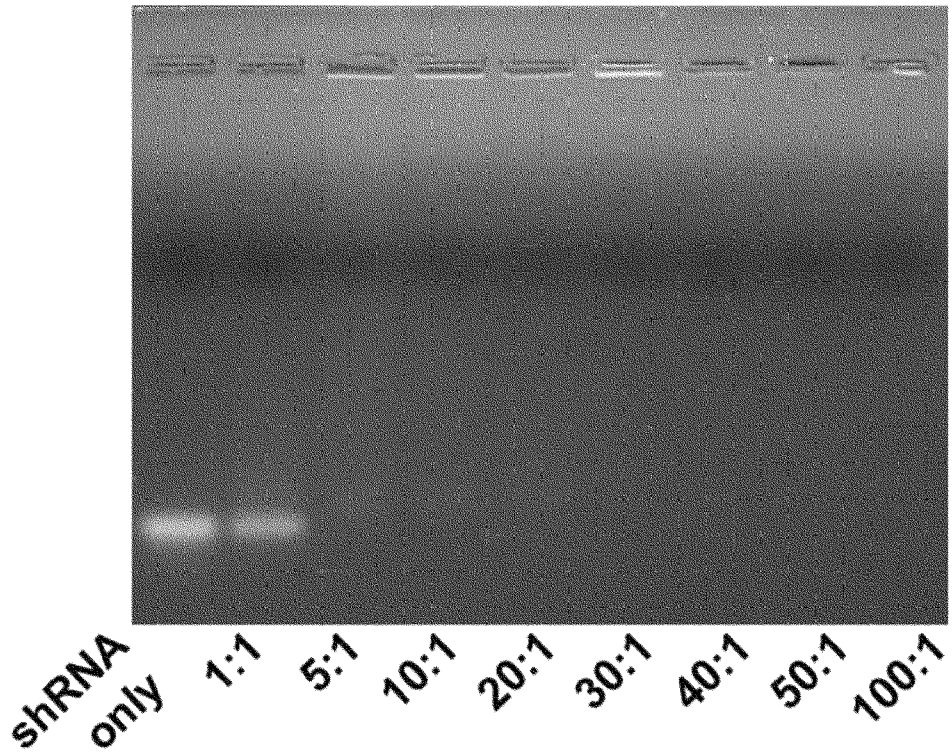
[청구항 14] 제 11 항에 있어서, 상기 염증 또는 자가면역질환은 피부 건선, 류마티스 관절염, 반응성 관절염, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 전신성 홍반성 낭창, 다발성경화증, 특발성섬유성폐포염, 다발성근염, 피부근염, 국한피부경화증, 전신피부경화증, 대장염, 염증성 장질환, 조르젠신드롬(Sjorgen's syndrome), 레이노현상(Raynaud's phenomenon),

베쳇병(Bechet's disease), 가와사키병(Kawasaki's disease),
원발성담즙성경화증(primary biliary sclerosis),
원발성경화성담관염(primary sclerosing cholangitis),
궤양성대장염(ulcerative olitis) 또는 크론병(Crohn's disease)인 것을
특징으로 하는 조성물.

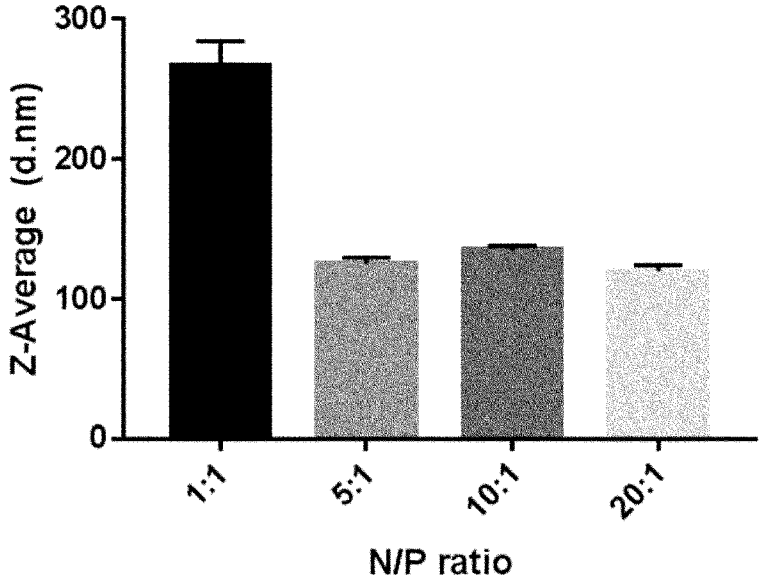
[청구항 15] 제 14 항에 있어서, 상기 염증 또는 자가면역질환은 피부 건선인 것을
특징으로 하는 조성물.

[청구항 16] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 하나의 조성물 및 목적 핵산분자를 세포와
접촉시키는 단계를 포함하는 상기 목적 핵산분자를 상기 세포에
전달하는 방법.

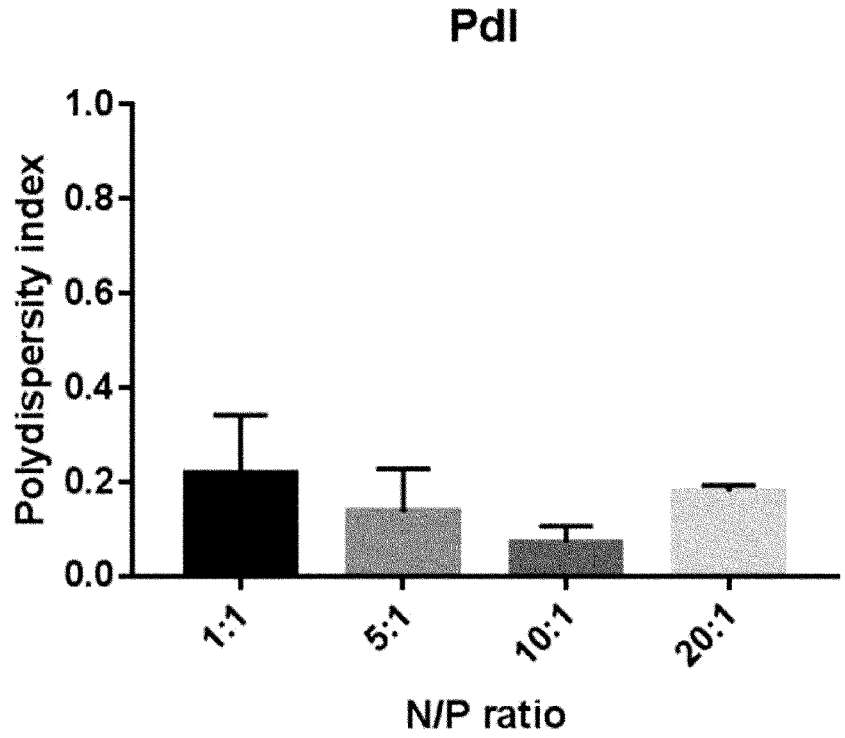
[도1]


shRNA only
1:1
5:1
10:1
20:1
30:1
40:1
50:1
100:1

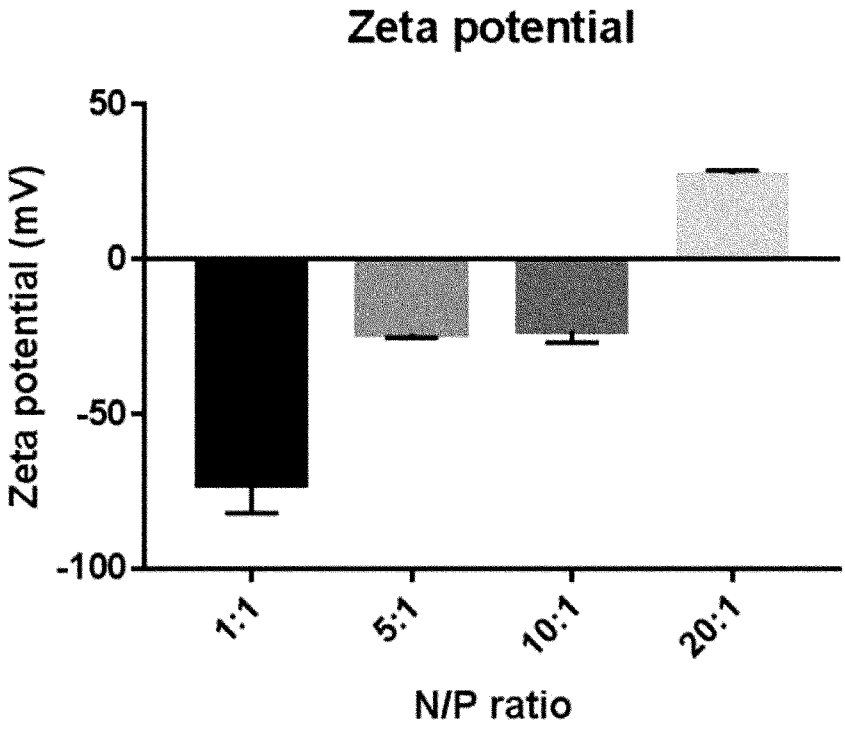
[도2a]


300
200
100
0
Z-Average (d.nm)
1:1
5:1
10:1
20:1
N/P ratio

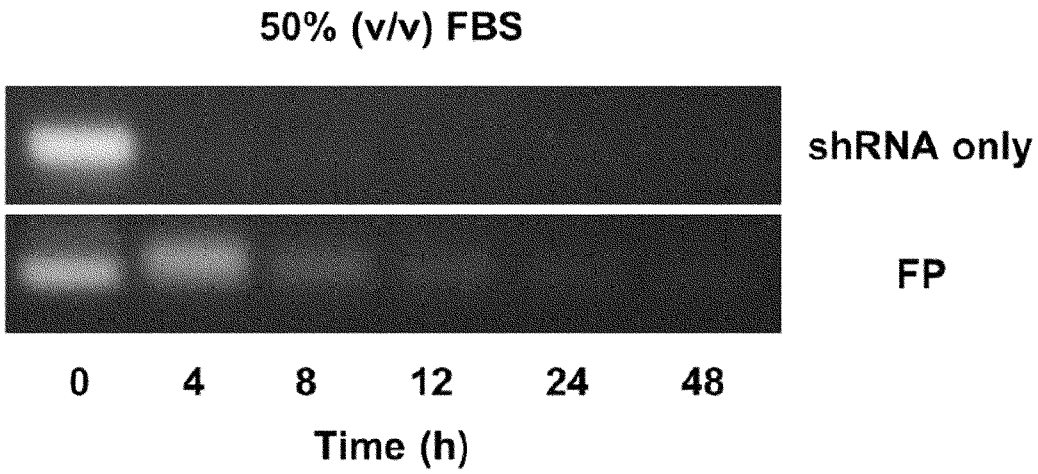
[도2b]


PdI
Polydispersity index
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1:1
5:1
10:1
20:1
N/P ratio

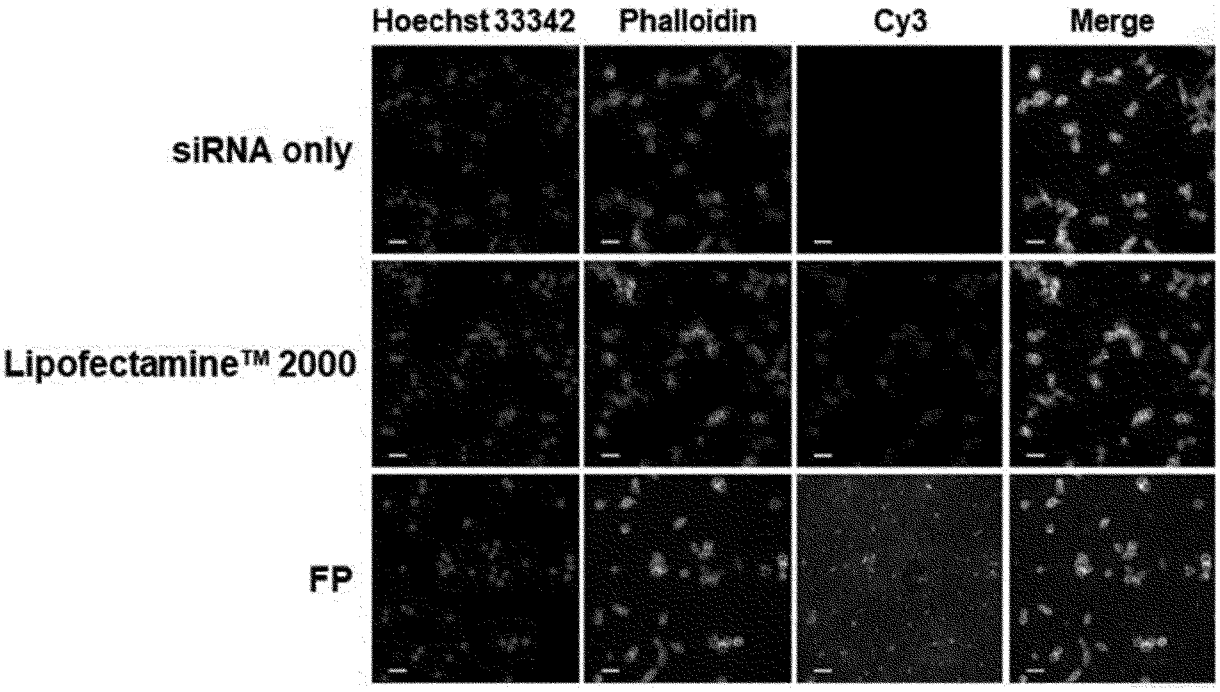
[도2c]


Zeta potential
Zeta potential (mV)
50
0
-50
-100
1:1
5:1
10:1
20:1
N/P ratio

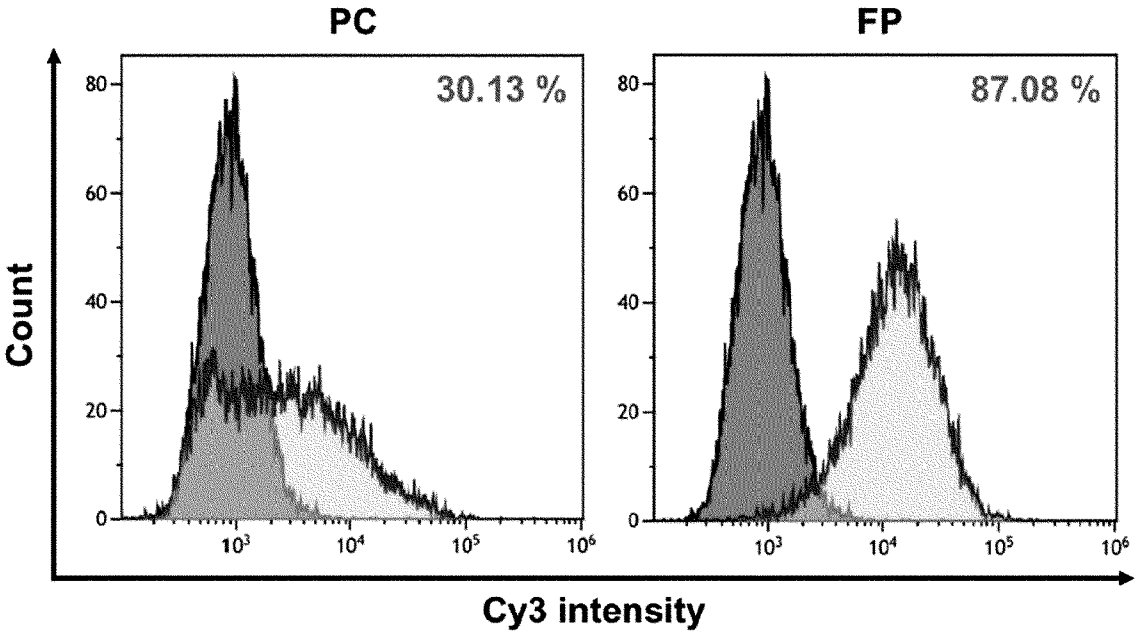
[도3]


50% (v/v) FBS
shRNA only
FP
0
4
8
12
24
48
Time (h)

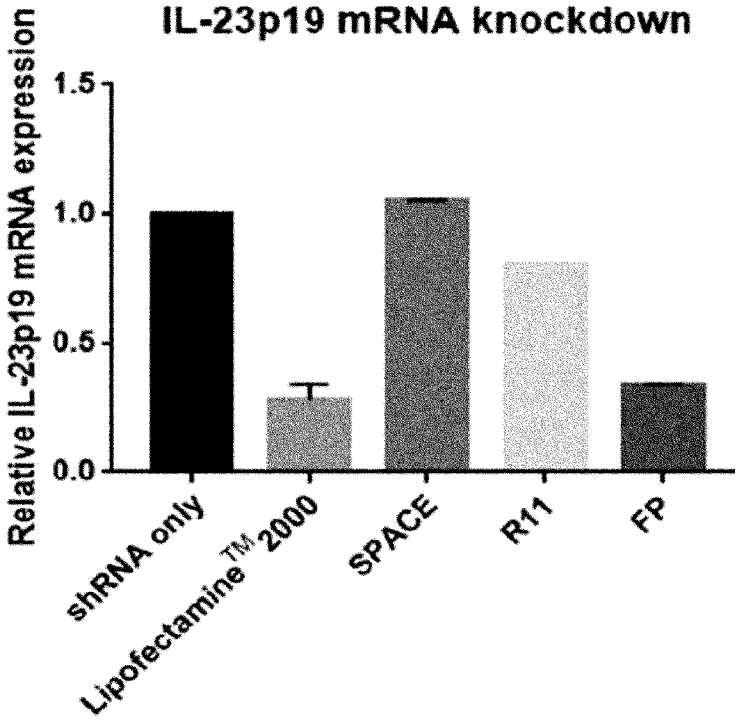
[도4]


Hoechst 33342
Phalloidin
Cy3
Merge
siRNA only
Lipofectamine™ 2000
FP

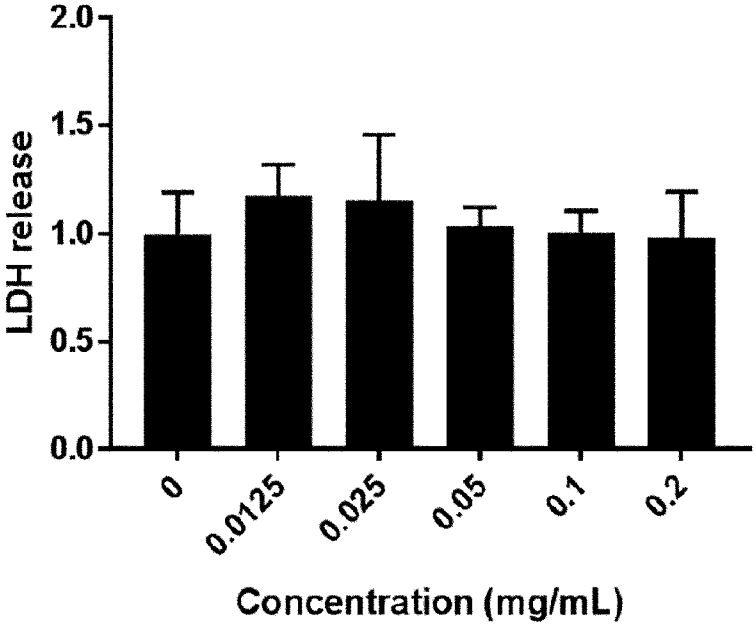
[도5]


PC
FP
30.13 %
87.08 %
Count
Cy3 intensity
0
20
40
60
80
10^3
10^4
10^5
10^6

[도6]


IL-23p19 mRNA knockdown
Relative IL-23p19 mRNA expression
0.0
0.5
1.0
1.5
shRNA only
Lipofectamine™ 2000
SPACE
R11
FP

[도7]


2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
LDH release
0
0.0125
0.025
0.05
0.1
0.2
Concentration (mg/mL)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/013354

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/00(2006.01)i; ***A61K 47/64***(2017.01)i; ***A61K 31/7105***(2006.01)i; ***A61K 48/00***(2006.01)i; ***A61P 29/00***(2006.01)i; ***A61P 17/06***(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 14/00; A61K 38/08; C07K 7/06; C07K 7/08; C12N 15/113; A61K 47/64; A61K 31/7105; A61K 48/00; A61P 29/00; A61P 17/06

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: SPACE 펩타이드(SPACE peptide), 폴리아르기닌 펩타이드(polyarginine peptide), 세포 투과성 펩타이드(cell-penetrating peptide), siRNA, shRNA, IL-23p19

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LI, Hua et al. Intracellular delivery of molecular cargo using cell- penetrating peptides and the combination strategies. International Journal of Molecular Sciences. 2015, vol. 16, pp. 19518-19536. See pages 19523-19524; and table 1.	1-15
Y	KR 10-2013-0139254 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 20 December 2013. See paragraphs [0208], [0211], [0213], [0231] and [0313].	1-15
A	WO 2020-022560 A1 (UNIV INCHEON IND ACAD COOP) 30 January 2020. See entire document.	1-15
A	CHEN, Ming et al. Topical delivery of siRNA into skin using SPACE-peptide carriers. Journal of Controlled Release. 2014, vol. 179, pp. 33-41. See entire document.	1-15
A	US 2014-0030218 A1 (UDALOVA, Irina Alexandrovna et al.) 30 January 2014. See entire document.	1-15

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
14 January 2021	**14 January 2021**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/013354

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RYU, Yeong Chae et al. Functional peptide-mediated shRNA delivery for psorlasis treatment. 2019 KSBB Fall Meeting and International Symposium Exco, Daegu. 2019. See entire document. ※This document is a document declaring exceptions to lack of novelty in the present international application.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/013354

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 16 pertains to a method for treatment of the human body (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/013354

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2013-0139254 A	20 December 2013	CN 103201386 A	10 July 2013
		EP 2638162 A2	18 September 2013
		EP 2638162 B1	10 August 2016
		JP 2014-500867 A	16 January 2014
		US 2012-0128756 A1	24 May 2012
		US 2014-0161871 A1	12 June 2014
		US 2015-0025221 A1	22 January 2015
		US 2017-0173173 A1	22 June 2017
		US 8518871 B2	27 August 2013
		US 8791062 B2	29 July 2014
		US 9441014 B2	13 September 2016
		WO 2012-064429 A2	18 May 2012
WO 2020-022560 A1	30 January 2020	KR 10-2020-0011135 A	03 February 2020
US 2014-0030218 A1	30 January 2014	WO 2012-093258 A2	12 July 2012

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2020/013354

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/00(2006.01)i, A61K 47/64(2017.01)i, A61K 31/7105(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 17/06(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 14/00; A61K 38/08; C07K 7/06; C07K 7/08; C12N 15/113; A61K 47/64; A61K 31/7105; A61K 48/00; A61P 29/00; A61P 17/06

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: SPACE 펩타이드(SPACE peptide), 폴리아르기닌 펩타이드(polyarginine peptide), 세포 투과성 펩타이드(cell-penetrating peptide), siRNA, shRNA, IL-23p19

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	LI, HUA 등, 'Intracellular delivery of molecular cargo using cell-penetrating peptides and the combination strategies', International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16권, 페이지 19518-19536 페이지 19523-19524; 표 1 참조.	1-15
Y	KR 10-2013-0139254 A (더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아) 2013.12.20 단락 [0208], [0211], [0213], [0231], [0313] 참조.	1-15
A	WO 2020-022560 A1 (인천대학교 산학협력단) 2020.01.30 전체 문헌 참조.	1-15
A	CHEN, MING 등, 'Topical delivery of siRNA into skin using SPACE-peptide carriers', Journal of Controlled Release, 2014, 179권, 페이지 33-41 전체 문헌 참조.	1-15
A	US 2014-0030218 A1 (UDALOVA, IRINA ALEXANDROVNA 등) 2014.01.30 전체 문헌 참조.	1-15

☒ 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

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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	국제조사보고서 발송일
2021년 01월 14일 (14.01.2021)	2021년 01월 14일 (14.01.2021)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
정다원
전화번호 +82-42-481-5373

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/013354

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	RYU, YEONG CHAE 등, 'Functional peptide-mediated shRNA delivery for psorlasis treatment', 2019 KSBB Fall Meeting and International Symposium Exco, Daegu, 2019 전체 문헌 참조. ※위 문헌은 본 국제출원에서 `공지예외주장' 된 문헌임.	1-15

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/013354

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 16
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 16은 사람에 대한 치료방법에 해당합니다 (PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/013354

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0139254 A	2013/12/20	CN 103201386 A	2013/07/10
		EP 2638162 A2	2013/09/18
		EP 2638162 B1	2016/08/10
		JP 2014-500867 A	2014/01/16
		US 2012-0128756 A1	2012/05/24
		US 2014-0161871 A1	2014/06/12
		US 2015-0025221 A1	2015/01/22
		US 2017-0173173 A1	2017/06/22
		US 8518871 B2	2013/08/27
		US 8791062 B2	2014/07/29
		US 9441014 B2	2016/09/13
		WO 2012-064429 A2	2012/05/18
WO 2020-022560 A1	2020/01/30	KR 10-2020-0011135 A	2020/02/03
US 2014-0030218 A1	2014/01/30	WO 2012-093258 A2	2012/07/12