(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 8 월 14 일 (14.08.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/123399 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/001094

(22) 국제출원일: 2014 년 2 월 10 일 (10.02.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0014510 2013 년 2 월 8 일 (08.02.2013) KR

(71) 출원인: **경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 702—701 대구광역시 북구대학로 80 경북대학교내 (산격동), Daegu (KR).

(72) 발명자: **전은성 (JUN, Eunsung)**; 700-806 대구광역시 중구 남산로 3 안길 8-3 (남산동), Daegu (KR). **전재옥 (JEON, Jaeog)**; 702-120 대구광역시 북구동변로 16 길 2-7 (동변동), Daegu (KR). **김소연 (KIM, Soyoun)**; 706-777 대구광역시 수성구 수성로 411 103-205 (수성동 4 가), Daegu (KR). **소인섭 (SO, In-Seop)**; 706-953 대구광역시 수성구 동원로 110 메트로팔레스아파트 309-302 (만촌동), Daegu (KR). **김인산 (KIM, In-San)**; 706-939 대구광역시 수성구동대구로 59 대우트럼프월드 B 동 1005 호 (두산동), Daegu (KR). **김선지 (KIM, Sun-Ji)**; 711-784 대구광역시 달성군 다사읍 대실역북로 38 청아람아파트 203-2016, Daegu (KR).

(74) 대리인: **이희숙 (LEE, Hee Sook)** 등; 135-915 서울특별시 강남구 테헤란로 33 길 11 9 층 (역삼동, JS 빌딩) 시원국제특허법률사무소, 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, 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, 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.

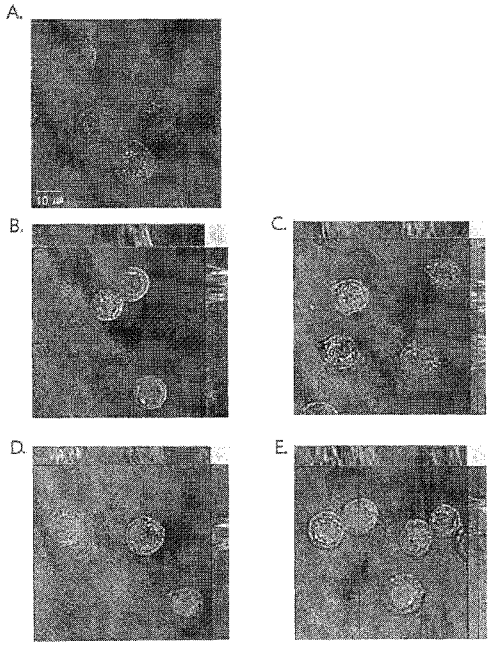
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: HUMAN FERRITIN-DERIVED FUSION POLYPEPTIDE

(54) **발명의 명칭** : 인간 페리틴 유래 융합폴리펩티드

【도 7】



(57) **Abstract**: The present invention relates to a fusion polypeptide, and more specifically, to a fusion polypeptide, wherein a polypeptide fragment comprising 5-30 amino acids is fused between the first to fifth amino acids in the fourth loop of a human-derived ferritin monomer. The fusion polypeptide of the present invention has a protein cage, thereby allowing an active ingredient to be included therein, and is effective for diagnosing diseases and developing a therapeutic agent since the binding force of a polypeptide fragment to a specific molecule, cell or tissue is greatly improved.

(57) **요약서**: 본 발명은 융합폴리펩티드에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인간 유래 페리틴 모노머의 4 번째 루프 (loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 5 개 내지 30 개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드단편이 융합된 융합폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명의 융합폴리펩티드는 단백질 케이지를 형성하여 내부에 유효물질의 봉입이 가능하며, 폴리펩티드단편의 특정 분자, 세포 또는 조직과의 결합력을 매우 향상시켜 질병의 진단, 치료제 개발에 효과적이다.

WO 2014/123399 A1

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 4.17 에 의한 선언서:

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

인간 페리틴 유래 융합폴리펩티드

【기술분야】

<1> 본 출원은 2013년 2월 8일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2013-0014510호(출원번호)를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

<2> 본 발명은 융합폴리펩티드에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 5개 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드단편이 융합된 융합폴리펩티드에 관한 것이다.

<3>

【배경기술】

<4> 케이지(cage) 단백질은 저분자량 단일체들의 정밀한 자가조립 성질에 의하여 단일체 분자량의 수십에서 수백 배의 거대분자를 형성할 수 있는 단백질이다. 자연계에서 바이러스 capsid 단백질, 페리틴, heat shock protein, Dps 단백질이 이에 해당되며 케이지(cage)를 구성하는 각각의 단일체들은 인접 단일체들과 매우 규칙적이고 정밀한 상호작용을 이루고 있고 케이지(cage)의 내부는 비어있는 구조이다. 상기와 같은 케이지 단백질의 용기(container)와 같은 성질에 의해 내부와 외부가 격리되는 특징을 가지고 있어, 약물 전달체로 의학분야에서 활용 빈도가 높다.

<5> 케이지 단백질 응용 물질 수송 분야는 바이러스성 수송체 (viral vector)와 비 바이러스성 수송체 (non-viral vector)에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 현재까지 바이러스성 수송체로는 아데노바이러스 (adenovirus) 등이 많이 연구되고 있고 비 바이러스성 수송체로는 페리틴, heat shock protein 등에 관하여 연구되고 있다. 그러나 기존의 바이러스성 수송체일 경우에는 바이러스 자체가 소유하는 유전자에 의한 체내 안전성 문제가 제기되어 왔다.

<6> 페리틴은 단백질은 세포내 단백질의 일종으로 철을 저장하고, 방출하는 역할을 한다. 페리틴은 일반적으로 생체 내에서 속이 빈 구형의 케이지(cage) 형태를 하고 있으며, 상기 케이지는 24개의 subunit으로 구성되며, subunit은 그 구조에 따라 heavy chain과 light chain으로 구분된다.

<7> 인간유래 페리틴 단백질은 바이러스성 수송체가 가지는 안정성의 문제는 없으나, 임의의 부위에 타겟팅 부위(targeting moiety)를 결합시키는 경우 특이적 결합력이 떨어지거나, 케이지를 형성하지 아니하는 문제가 있다. 따라서 케이지를 형

성에 문제가 없으면서, 부착되는 타겟팅 부위의 특이적 affinity를 높여 효과적으로 표적에 전달 할 수 있는 융합폴리펩티드 개발이 시급한 실정이다.

<8>

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

<9> 이에 본 발명자들은 유효물질의 효과적인 전달을 위한 새로운 방법에 관하여 연구하던 중 인간유래 페리틴의 light chain의 특정부위 사이에 특정 분자, 세포 또는 조직에 결합하는 폴리펩티드단편을 삽입하여 융합폴리펩티드를 제조하는 경우 상기 폴리펩티드단편이 목적하는 분자, 세포 또는 조직에 매우 효과적으로 결합하며, 단백질 케이지를 잘 형성하는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

<10>

<11> 따라서 본 발명의 목적은 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 5개 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 제1 폴리펩티드단편이 융합된 융합폴리펩티드를 제공하는 것이다.

<12>

<13> 본 발명의 다른 목적은 상기 융합폴리펩티드를 포함하는 페리틴 단백질을 제공하는 것이다.

<14>

<15> 본 발명의 다른 목적은 상기 융합폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

<16>

<17> 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.

<18>

<19> 본 발명의 다른 목적은 상기 발현벡터로 형질 전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

<20>

<21> 본 발명의 다른 목적은 상기 융합폴리펩티드를 포함하는 단백질 케이지를 제공하는 것이다.

<22>

<23> 본 발명의 다른 목적은 상기 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 약물 전달시스템을 제공하는 것이다.

<24>

<25> 본 발명의 다른 목적은 상기 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 인터루킨-4 매개 질병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

<26>

<27> 본 발명의 다른 목적은 상기 융합폴리펩티드를 이를 필요로 하는 개체에 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 인터루킨-4 매개 질병 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

<28>

<29> 본 발명의 다른 목적은 상기 융합폴리펩티드의 인터루킨-4 매개 질병 예방 또는 치료제 제조를 위한 용도를 제공하는 것이다.

<30>

<31> 본 발명의 다른 목적은 서열번호 2 내지 5, 23, 25, 27, 29 및 31로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 천식 치료제를 제공하는 것이다.

<32>

【기술적 해결방법】

<33> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 5개 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 제1폴리펩티드단편이 융합된 융합폴리펩티드를 제공한다.

<34>

<35> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 융합폴리펩티드를 포함하는 페리틴 단백질을 제공한다.

<36>

<37> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 융합폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

<38>

<39> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

<40>

<41> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

<42>

<43> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 융합폴리펩티드를 포함하는 단백질 케이지를 제공한다.

<44>

<45> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 약물전달시스템을 제공한다.

<46>

<47> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 인터루킨-4 매개 질병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<48>

<49> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 융합폴리펩티드를 이를 필요로 하는 개체에 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 인터루킨-4 매개 질병 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

<50>

<51> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 융합폴리펩티드의 인터루킨-4 매개 질병 예방 또는 치료제 제조를 위한 용도를 제공한다.

<52>

<53> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 2 내지 5, 23, 25, 27, 29 및 31로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 천식 치료제를 제공한다.

<54>

<55> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<56>

<57> 본 발명은 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 5개 내지 30개의 제1폴리펩티드단편이 융합된 융합폴리펩티드를 제공한다.

<58>

<59> 페리틴(ferritin)은 단백질은 세포내 단백질의 일종으로 철을 저장하고, 방출하는 역할을 한다. 페리틴은 일반적으로 생체 내에서 속이 빈 구형의 케이지(cage) 형태를 하고 있으며, 상기 케이지는 24개의 페리틴 모노머(monomer)로 구성되며, 상기 페리틴 모노머는 그 구조에 따라 heavy chain과 light chain으로 구분된다.

<60> 본 발명의 페리틴 모노머는 페리틴 모노머의 구조에 상관없이 모두 가능하며, 바람직하게는 페리틴 라이트 체인(light chain) 일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 일 수 있다. 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열은 인간유래 페리틴(ferritin) 단백질의 light chain이다.

<61>

<62> 페리틴 모노머의 구조는 5개의 알파헬릭스(alpha helix) 구조가 순차적으로 연결된 형태이며, 각각의 알파헬릭스 구조의 폴리펩티드를 연결하는 비정형 폴리펩티드 부분을 루프(loop)라고 한다.

<63> 본 발명의 4번째 루프는 인간유래 페리틴 모노머의 네 번째와 다섯 번째 알파헬릭스 구조의 폴리펩티드 사이에 위치하는 루프를 말한다.

<64> 본 발명의 융합폴리펩티드는 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 5개 내지 30개의 아미노산으로 구성된 제1폴리펩티드단편이 융합된 것을 특징으로 한다.

<65>

<66> 본 발명의 융합폴리펩티드는 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이이면, 어디라도 제1폴리펩티드단편이 융합될 수 있으며, 예를 들어, 첫 번째와 두 번째 아미노산 사이, 두 번째 와 세 번째 아미노산 사이, 세 번째와 네 번째 아미노산 사이 또는 네 번째와 다섯 번째 아미노산 사이 일 수 있다.

<67> 본 발명 융합폴리펩티드의 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 154번째 내지 158번째 아미노산 사이이며, 예를 들어, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 154번째와 155번째 아미노산 사이, 155번째 와 156번째 아미노산 사이, 156번째와 157번째 아미노산 사이 또는 157번째와 158번째 아미노산 사이 일 수 있다.

<68> 또한 본 발명의 융합폴리펩티드는 제1폴리펩티드단편이 융합되며, 4번째 루프의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 중 일부가 결실될 수 있다. 또는 제1폴리펩티드단편이 상기 4번째 루프의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 중 일부로 치환될 수 있다. 이러한 결실 또는 치환이 있어도, 융합폴리펩티드의 구조에는 큰 변화가 없어, 융합폴리펩티드 간 또는 융합폴리펩티드와 인간 유래 페리틴 모노머 간의 결합이 잘 이루어지며, 융합된 제1폴리펩티드단편의 결합 특이성 향상도 유지된다.

<69> 결실은 상기 4번째 루프의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 중 하나가 결실될 수도 있으며, 복수개가 결실 될 수도 있다. 상기 치환은 상기 4번째 루프의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 중 하나가 본 발명의 제1폴리펩티드단편으로 치환될 수도 있으며, 복수개가 본 발명의 제1폴리펩티드단편으로 치환 될 수도 있다. 본 발명 실시예의 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산으로 이루어진 융합폴리펩티드는 제1폴리펩티드단편이 154번째와 155번째 아미노산 사이에 융합되며, 155번째 아미노산 이 결실되었다.

<70> 또한 본 발명의 융합폴리펩티드는 목적하는 물질에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 한다. 상기 목적하는 물질은 본 발명 융합폴리펩티드에 융합된 제1 또는 제2폴리펩티드단편과 결합친화력(binding affinity)을 보이는 물질을 말한다.

<71> 상기 목적하는 물질은 어떠한 종류도 가능하며, 생체 내 물질과 생체 외 물질을 모두 포함한다. 생체 내 물질은 생체 내 장기, 조직, 세포, 세포 표면의 수용체(receptor), 효소를 포함한 세포내 단백질, 세포간 물질, 핵산, 외부로부터 들어온 독성물질, 치료물질, 검사용 물질을 모두 포함한다.

<72> 생체 외 물질은 다양한 시험을 위한 물질 고정용 지지체(각종 레진, 슬라이드 글라스, 플레이트, 필름) 또는 각종 시험 대상인 유기, 무기 화합물을 모두 포함한다.

<73>

<74> 본 발명의 연구진은 서열번호 1로 표시되는 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 폴리펩티드단편을 융합시켜 만든 융합폴리펩티드는 상기 융합폴리펩티드 간 또는 상기 융합폴리펩티드와 다른 페리틴 모노머와 결합하여 구형의 케이지(cage)를 형성하며, 이때 본 발명의 융합폴리펩티드에 포함된 폴리펩티드단편이 케이지 바깥쪽으로 돌출되는 구조가 만들어져, 목적하는 물질에 특이적으로 결합할 수 있게 하는 점을 확인하였다. 특히, 본 발명의 융합폴리펩티드와 같이 폴리펩티드단편을 페리틴 모노머의 4번째 루프의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 융합시키는 경우 융합된 폴리펩티드단편의 표적 특이적 결합력이 매우 향상되어, 월등히 낮은 농도의 물질과도 결합이 가능하게 한다는 것을 밝혀내었다. 이와 같은 점은 본 발명에서 최초로 공개되는 것이다.

<75>

<76> 본 발명의 제1폴리펩티드단편은 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 융합되는 폴리펩티드로 그 길이나 구성 아미노산 배열에는 제한이 없으나, 바람직하게는 임의의 5개 내지 30개의

아미노산으로 이루어진 것일 수 있다.

<77>

<78> 한편 본 발명의 제1폴리펩티드단편은 하기 서열 일반식(I)로 표시되는 것일 수 있다.

<79> 일반식 (I)

<80> [N말단-X1-X2-X3-C말단]

<81> 상기 X1 및 X3은 각각 1개 내지 3개의 임의의 아미노산으로 이루어진 링커이며, 상기 X2는 1개 내지 28개의 임의의 아미노산으로 이루어진 활성폴리펩티드이다.

<82> 상기 제1폴리펩티드단편은 임의의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드단편일 수 있으며, 바람직하게는 활성폴리펩티드를 포함할 수 있다.

<83> 상기 활성폴리펩티드는 의도한 활성(activity)을 나타내는 펩타이드로 예를 들어, 특정한 분자, 세포 또는 조직(tissue)과 결합하는 활성을 나타내는 펩타이드일 수 있다.

<84> 또한 상기 제1폴리펩티드단편은 링커를 포함할 수 있다. 상기 링커는 활성폴리펩티드를 서열번호 1로 표시되는 인간유래 페리틴(ferritin) 단백질의 light chain의 특정부위에 부착시키기 위한 것으로, 1개 내지 수 개의 아미노산으로 이루어지며, 바람직하게는 1개 내지 3개의 임의의 아미노산으로 이루어질 수 있으며, 더욱 바람직하게는 특정 단백질 제한효소의 절단부위일 수 있다.

<85> 바람직하게는 상기 링커 X1은 글리신-세린이며, X3은 글리신-프롤린 또는 글리신-글리신-프롤린일 수 있다.

<86> 상기 활성폴리펩티드의 길이는 융합폴리펩티드의 골격구조를 유지하는 한 그 제한이 없으며, 예를 들어 5개 내지 28개의 임의의 아미노산으로 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 7개 내지 9개의 임의의 아미노산으로 이루어진 활성폴리펩티드일 수 있다.

<87> 가장 바람직하게는 상기 활성폴리펩티드는 서열번호 6 (AP1S), 서열번호 7 (AP1L), 서열번호 33 (RGD) 및 서열번호 34 (GRGDSP)로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 활성 폴리펩티드일 수 있다.

<88>

<89> 한편 본 발명의 융합폴리펩티드는 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 5개 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 제1폴리펩티드단편이 융합되며, 추가로 상기 융합폴리펩티드의 N 말단에

5개 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 제2폴리펩티드단편이 추가로 융합된 것일 수 있다.

<90>

<91> 상기 제2폴리펩티드단편은 본 발명의 인간 유래 페리틴 모노머의 N 말단에 융합되는 폴리펩티드로 그 길이나 구성 아미노산 배열에는 제한이 없으나, 바람직하게는 임의의 5개 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 또한 상기 융합 폴리펩티드 간 또는 상기 융합 폴리펩티드와 인간 유래 패리틴 모노머 간의 결합을 방해하지 않는 것이 바람직하다.

<92> 상기 제2폴리펩티드단편은 제1폴리펩티드단편과 동일한 활성폴리펩티드를 포함하거나, 제1폴리펩티드단편과 상이한 활성폴리펩티드를 포함할 수 있다.

<93> 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이 및 N 말단에 제1폴리펩티드단편 및 제2폴리펩티드단편이 각각 융합된 융합폴리펩티드는 제1폴리펩티드단편만 융합된 융합폴리펩티드에 비하여 목적하는 분자, 세포 또는 조직에 더욱 효과적으로 결합한다.

<94> 상기 본 발명의 융합폴리펩티드는 바람직하게는 서열번호 2 내지 서열번호 5로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 23, 25, 27, 29 및 31로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드 일 수 있다.

<95>

<96> 한편, 본 발명의 폴리펩티드단편은 바람직하게는 상기 융합 폴리펩티드 간 또는 상기 융합 폴리펩티드와 인간 유래 패리틴 모노머 간의 결합을 방해하지 않는 것을 특징으로 할 수 있다.

<97> 본 발명의 융합폴리펩티드는 상기 융합폴리펩티드 간 또는 융합폴리펩티드와 다른 페리틴 모노머 간의 결합 없이 단독으로 사용이 가능하나, 페리틴과 같이 융합폴리펩티드 간 또는 융합폴리펩티드와 다른 페리틴 모노머 간의 결합을 통하여 다이머, 트라이머를 형성하거나, 또는 수개의 모노머가 케이지 단백질을 형성하여 새로운 기능을 나타내거나, 다른 물질과의 결합 특이성을 더욱 높일 수 있으므로, 본 발명의 폴리펩티드단편은 상기 융합 폴리펩티드간 또는 상기 융합 폴리펩티드와 인간 유래 패리틴 모노머 간의 결합을 방해하지 않는 것이 바람직하다.

<98>

<99> 본 발명의 융합폴리펩티드는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 외부 유전자를 발현할 수 있는 용도로 제작된 통상의 벡터에 발현 가능하도록 삽입하여, 유

전공학적인 방법으로 대량 생산할 수 있다. 상기 벡터는 단백질을 생산하기 위한 숙주세포의 종류 및 특성에 따라 적절히 선택하거나, 신규로 제작할 수 있다. 상기 벡터를 숙주세포에 형질전환하는 방법 및 형질전환체로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법은 통상의 방법으로 용이하게 실시 할 수 있다. 상기한 벡터의 선택, 제작, 형질전환 및 재조합 단백질의 발현 등의 방법은, 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시할 수 있으며, 통상의 방법에서 일부의 변형도 본원발명에 포함된다.

<100>

<101> 한편 본 발명은 본 발명의 융합폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

<102> 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 융합폴리펩티드를 암호화하는 것이면 어떠한 염기서열의 것도 가능하나, 바람직하게는 서열번호 9 내지 서열번호 12로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열로 표시되는 것일 수 있다. 또한 상기 융합폴리펩티드는 서열번호 24, 26, 28, 30 및 32로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 표시되는 것 일 수 있다.

<103>

<104> 한편 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

<105> 본 발명의 발현벡터는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하며, 그 종류는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 발현벡터는 통상의 발현벡터일 수 있으며, 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서(촉진유전자) 같은 발현 조절 서열 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 상기 발현벡터의 프로모터는 구성적(constitutive) 또는 유도성(inducible)일 수 있다. 또한 상기 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 벡터인 경우 복제기원을 포함한다.

<106>

<107> 한편 본 발명은 본 발명의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

<108> 본 발명의 형질전환체는 본 발명의 발현벡터로 형질전환 된 것을 특징으로 한다. 상기 발현벡터로 형질전환하는 것은 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는 미세사출법(microprojectile bombardment), 전기충

격유전자전달법(electroporation), 인산 칼슘($CaPO_4$) 침전, 염화칼슘($CaCl_2$) 침전, PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection) 및 리포좀 매개법(liposome-mediated method)을 이용할 수 있으며, 상기 형질전환체는 대장균(Escherichia coli), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 슈도모나스(Pseudomonas), 프로테우스 미라빌리스(Proteus mirabilis), 스타필로코쿠스(Staphylococcus), 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

<109>

<110> 한편 본 발명은 본 발명의 융합폴리펩티드를 포함하는 단백질 케이지를 제공한다. 또한 본 발명은 본 발명의 융합폴리펩티드를 포함하는 페리틴 단백질을 제공한다.

<111> 단백질 케이지(Protein cage)는 저분자량 단일체들의 정밀한 자가조립 성질에 의하여 형성되며, 내부에 공간을 가지는 단백질로 된 케이지이다. 바이러스 capsid 단백질, 페리틴, heat shock protein, Dps 단백질이 이에 해당된다. 본 발명의 단백질 케이지는 본 발명의 융합폴리펩티드를 상기 단백질 케이지를 구성하는 단일체(모노머, monomer)로 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 단백질 케이지는 본 발명의 융합폴리펩티드만으로, 또는 본 발명의 융합폴리펩티드 및 다른 페리틴 단백질 모노머와의 조합으로 구성될 수 있다.

<112>

<113> 본 발명의 페리틴 단백질은 페리틴 단백질 모노머의 결합에 의해 만들어지는 것으로 일반적으로 생체 내에서 구형의 케이지 형태를 하고 있다.

<114> 본 발명의 페리틴 단백질은 본 발명의 융합폴리펩티드가 단위체로서 규칙적으로 배열된 복합 단백질일 수 있으며, 더 바람직하게는 본 발명의 융합폴리펩티드 24개가 3차원적으로 규칙적으로 배열을 통해 형성된 것일 수 있다.

<115>

<116> 본 발명의 일실시예에서는 인간 페리틴 light chain에 BamH1, Apa1 제한효소 사이트를 넣어 카세트를 제조하고, 두 종류의 AP1 펩타이드를 카세트 사이에 삽입하였다. 이를 대장균 발현벡터 pET28a에 넣어 발현벡터를 제조하고, 상기 발현벡터로 대장균을 형질전환 하여 융합폴리펩티드를 대량 생산하였다. 제조된 단백질을 affinity 컬럼을 이용하여 분리, 정제하였다. 상기 정제된 단백질을 SDS-PAGE로 분석 결과 본 발명의 융합폴리펩티드가 제조된 것을 확인하였다.

117>

<118> 본 발명의 다른 일실시예에서는 상기 제조된 융합폴리펩티드가 wild type과 동일하게 cage를 형성하는지 FPLC 및 전자현미경 촬영을 통하여 확인하였다. 그 결과 본 발명의 융합폴리펩티드는 cage를 잘 형성하는 것을 확인하였다.

<119>

<120> 본 발명의 다른 일실시예에서는 상기 제조된 융합폴리펩티드에 포함된 활성 폴리펩티드가 의도된 활성을 나타내는지 확인하여 위하여 IL-4 receptor에 binding 하는지 여부를 확인하였다. 실시예에서 활성 폴리펩티드로 사용된 AP1 펩타이드 IL-4 receptor에 binding하는 특성이 있다. AP1 펩타이드가 결합된 페리틴인 본 발명의 융합폴리펩티드 및 AP1 펩타이드가 결합하지 않은 wild type의 페리틴을 IL-4를 많이 발현하는 A549 세포에 결합시킨 결과, AP1이 결합된 본 발명의 융합폴리펩티드는 잘 결합하는 반면, AP1이 결합되지 아니한 wild type의 페리틴은 결합하지 않는 것을 확인하였다.

<121>

<122> 본 발명의 다른 일실시예에서는 상기 AP1이 결합된 본 발명의 융합폴리펩티드가 A549세포내로 침투하는지 여부를 공초점 현미경 관찰로 확인하였다. 그 결과 본 발명의 융합폴리펩티드는 대상 세포에 결합 후 세포내로 잘 uptake되는 것을 확인하였다.

<123>

<124> 본 발명의 다른 일실시예에서는 본 발명의 융합폴리펩티드에 의하여 활성폴리펩티드의 결합력이 증가하는지 여부를 표면 플라즈몬 공명 분석을 통하여 확인하였다. 실험결과 AP1이 포함된 본 발명의 융합폴리펩티드는 AP1 펩타이드 단독에 비하여 10^5~10^6배 더 IL-4 receptor와의 결합력(affinity)이 높아진 것을 확인하였다.

<125>

<126> 한편 본 발명의 다른 일실시예에서는 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이 및 N 말단에 AP1 펩티드가 활성폴리펩티드로서 포함된 제1 및 제2폴리펩티드단편을 융합한 융합폴리펩티드를 제조하였다.

<127> 본 발명의 다른 일실시예에서는 상기 제1 및 제2폴리펩티드단편이 융합된 융합폴리펩티드와 제1폴리펩티드단편만이 융합된 융합폴리펩티드의 결합력을 비교하였다. 그 결과 제1 및 제2폴리펩티드단편이 융합된 융합폴리펩티드가 제1폴리펩티드단편만이 융합된 융합폴리펩티드에 비하여 결합력이 10배 이상 증가되는 것을 확인하였다.

<128> 본 발명의 다른 일실시예에서는 상기 제1 및 제2폴리펩티드단편이 융합된 융합폴리펩티드가 단백질 케이지를 잘 형성하는지 전자현미경 관찰을 통하여 확인하였다. 그 결과 본 발명의 제1 및 제2폴리펩티드단편이 융합된 융합폴리펩티드는 인간유래 페리틴 모노머 또는 본 발명의 제1폴리펩티드단편만이 융합된 융합폴리펩티드와 동일하게 단백질 케이지를 잘 형성하는 것을 확인하였다.

<129> 이로서 본 발명의 융합폴리펩티드는 cage를 잘 형성하며, 내부에 포함되는 활성폴리펩티드의 결합력을 향상시키는 것을 확인하였다.

<130>

<131> 본 발명의 다른 일실시예에서는 제1폴리펩티드와 제2폴리펩티드가 서로 상이한 융합폴리펩티드를 제조하여 cage 형성 및 target 결합력을 측정하였다. AP1 외에 인테그린 alphavbeta3 단백질에 결합하는 RGD 펩타이드를 융합한 후, 인테그린 alphavbeta3단백질과 결합력을 SPR로 분석한 결과, 인테그린 alphavbeta3에 농도 의존적으로 결합하는 것을 확인하였다. 또한 FPLC 분석 및 전자현미경 관찰을 통하여 cage를 형성하는 것을 확인하였다.

<132>

<133> 따라서 본 발명은 본 발명의 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 약물전달시스템을 제공한다.

<134> 본 발명의 약물전달시스템은 본 발명의 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

<135> 상기 약물은 예를 들어 특정 질병의 치료 또는 예방 활성이 있는 약물 또는 진단용 약물일 수 있다. 상기 특정 질병은 약물에 의한 치료 또는 예방이 가능한 어떠한 질병도 가능하다. 바람직하게는 상기 특정 질병은 암, 알레르기, 동맥경화 또는 천식 일 수 있다. 상기 약물은 화학적 합성 화합물, 단백질 치료제, 핵산 등 알려진 어떠한 종류의 물질도 가능하며, 바람직하게는 암, 알레르기, 동맥경화 또는 천식 치료용 화학적 합성 화합물, 단백질 치료제, siRNA 등의 핵산 일 수 있다.

<136>

<137> 본 발명의 융합폴리펩티드는 단백질 케이지를 형성할 수 있으며, 약물을 형성된 단백질 케이지 내부에 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 융합폴리펩티드는 단백질 케이지 형성시 활성폴리펩티드를 외부로 노출시켜 이와 결합하는 분자, 세포 또는 조직과 특이적으로 결합할 수 있으므로, 약물을 상기 분자, 세포 또는 조직에 선택적으로 전달하는 약물전달시스템으로 사용할 수 있다.

<138> 또한 본 발명의 융합폴리펩티드에 융합되는 제1폴리펩티드단편 또는 제2폴리

펩티드단편이 약물이 결합가능한 폴리펩티드로 구성될 수 있으며, 이 경우 본 발명의 융합폴리펩티드는 약물이 상기 제1폴리펩티드단편 또는 제2폴리펩티드단편에 결합하여 전달되는 약물전달시스템으로 사용될 수 있다.

<139> 또한 본 발명의 융합폴리펩티드는 특정 질병의 치료, 진단, 예방 효력이 있는 폴리펩티드를 본 발명의 제1폴리펩티드단편 또는 제2폴리펩티드단편으로 구성하여 제조 될 수 있으며, 이 경우 본 발명의 융합폴리펩티드는 약물인 상기 제1폴리펩티드단편 또는 제2폴리펩티드단편을 전달하는 약물전달시스템으로 사용될 수 있다.

<140>

<141> 본 발명의 약물전달시스템은 본 발명의 융합폴리펩티드에 융합되는 폴리펩티드단편의 종류에 따라 다양한 세포, 조직, 질병을 표적할 수 있다.

<142> 본 발명의 일실시예에서는 본 발명의 융합폴리펩티드에 융합되는 제1 또는 제2폴리펩티드단편의 일부로서 인터루킨-4 수용체와 특이적으로 결합하는 서열번호 6 또는 서열번호 7로 표시되는 펩티드를 포함하여 융합폴리펩티드를 제조하고 이들이 인터루킨-4 수용체와 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다.

<143> 따라서 본 발명의 약물전달시스템은 바람직하게는 인터루킨-4 수용체를 특이적으로 표적하는 약물전달시스템일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 본 발명의 약물전달시스템은 서열번호 2 내지 5, 23, 25, 27, 29 및 31로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 약물전달시스템일 수 있다.

<144>

<145> 본 발명의 다른 일실시예에서는 천식 동물모델을 제조하고, AP-1이 포함된 페리틴 cage와 대조군(AP-1이 포함되지 아니한 페리틴 cage)을 투여하여 천식 억제 여부를 확인하였다.

<146> 그 결과, AP-1이 포함된 페리틴 cage를 투여한 군의 경우 대조군에 비하여 기도 과반응성(AHR), 기관지폐포세척액(BAL) 내의 염증세포 수, 호산구 수, *glycoprotein* 분비 수준 등 천식 증상이 완화되는 것을 확인하였다.

<147>

<148> 따라서 본 발명은 서열번호 2 내지 5, 23, 25, 27, 29 및 31로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 천식 치료제를 제공한다.

<149>

<150> 상기 AP-1은 인터루킨-4 수용체에 특이적으로 결합하는 펩타이드로 본 발명의 다른 실시예에서 상기 AP-1이 포함된 본 발명의 융합폴리펩티드가 인터루킨-4 수용체에 특이적으로 결합함을 확인하였다. 따라서 본 발명의 융합폴리펩티드는 인터루킨-4 수용체에 인터루킨-4와 경쟁적으로 결합하므로 인터루킨-4에 의해 매개되는 질병의 치료 용도로 사용될 수 있다.

<151> 따라서 본 발명은 상기 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 인터루킨-4 매개 질병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<152> 또한 본 발명은 상기 융합폴리펩티드를 이를 필요로 하는 개체에 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 인터루킨-4 매개 질병 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

<153> 또한 본 발명은 상기 융합폴리펩티드의 인터루킨-4 매개 질병 예방 또는 치료제 제조를 위한 용도를 제공한다.

<154>

<155> 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 융합폴리펩티드를 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "유효량"이란 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 인터루킨-4 매개 질병을 치료하기에 충분한 양을 말한다.

<156> 상기 '개체(subject)'란 동물, 바람직하게는 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 동물에서 유래한 세포, 조직, 기관 등일 수도 있다. 상기 개체는 치료가 필요한 환자(patient)일 수 있다.

<157> 상기에서 "약학적으로 허용되는" 이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.

<158>

<159> 본 발명의 조성물은 본 발명의 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 서열번호 2 내지 5, 23, 25, 27, 29 및 31로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물일 수 있다.

<160>

<161> 인터루킨-4(interleukin-4, IL-4)는 T-헬퍼2(T-helper2, Th2) 림프구, 호산구, 비만세포 등에서 분비되는 다양한 면역조절 기능을 가진 사이토카인이다. IL-4 수용체는 정상세포 중 T 림프구, B 림프구, CD34 골수세포 등의 세포표면에 존재한

다(Nelms, Annu Rev Immunol, 1999;17:701-738). IL-4 수용체는 IL-4 수용체 α 사슬과 IL-2 수용체 γc 사슬이 복합체를 이룬 제 1형과, IL-4 수용체 α 사슬과 IL-13 수용체 α1 사슬이 복합체를 이룬 제2형의 두 가지 형태가 있다. IL-4와 수용체가 결합하면 세포 내 야누스 키나제(janus kinase)를 통하여 STAT6 신호단백질을 인산화 및 활성화시키고, 활성화된 STAT6은 이합체 형태로 핵으로 이동하여 IL-4와 관련 있는 여러 유전자의 발현을 조절하여 염증을 증가시킨다. 또한, 야누스 키나제를 통하여 AKT/PKB를 활성화시켜 세포의 생존반응을 증가시킨다고 한다(Nelms et al., Annu Rev Immunol, 1999;17:701-738). IL-4는 나이브 T-헬퍼(naive T-helper, naive Th)를 Th2 림프구로 분화를 유도하고, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13과 같은 사이토카인들의 생산을 유도한다. 또한, B 림프구에 의한 IgE(immunoglobin E)의 분비를 유도한다. 특히 천식에서는 IL-4가 점액단백질인 뮤신(mucin) 유전자의 발현 유도와 점액분비를 촉진시켜 기도 폐색과 염증에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Paul, Blood, 1991; 77:1859-1870). 이와 같이 IL-4는 알레르기성 염증반응의 핵심 물질이다. 따라서, IL-4에 의해 조절되는 효과를 적절히 저해할 수 있으면 알레르기성 질병의 치료에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

<162> 한편 IL-4는 동맥경화 조직에서 정상조직 보다 높은 농도로 발견되며, 혈관내피세포에서 VCAM-1 및 MCP-1의 발현을 유도하여 염증부위로 단핵구, T 림프구, 호염기구 및 호산구 등의 이동을 촉진시킨다(Sasaguri et al., Atherosclerosis, 1998;138:247-253; Lee et al., J Mol Cell Cardiol, 2001;33:83-94). 보다 중요하게는, LDL 수용체 또는 ApoE 단백질이 유전적으로 결핍된 동맥경화모델 쥐에 IL-4를 유전적으로 결핍시키면 대동맥의 동맥경화 병변의 크기가 줄어든다고 보고되었다(Davenport et al., Am J Pathol, 2003;163:1117-1125; King et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002;22:456-461). 이와 같이 IL-4는 동맥경화 발생과정에 역할을 하며 IL-4의 작용을 길항할 수 있다면 동맥경화의 치료 또는 예방에 효과가 있을 것이다.

<163> 또한, IL-4는 여러 암 조직에서 정상조직 보다 높은 농도로 발견되며, 종양침윤 림프구(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)에서 다량의 IL-4가 생성되는 것이 보고되었다(Shurin, Springer Semin Immunopathol, 1999;21:339). IL-4는 만성 임파성 백혈병 B 세포에 작용하여 이들 세포의 세포사멸에 대한 저항성을 유발한다(Dancescu, J Exp Med, 1992;176:1319). 또한, IL-4는 종양세포 및 암 줄기세포에서도 합성되며, 암세포 표면의 IL-4 수용체를 통하여 세포사멸에 대한 암세포의 저항성을 부여하는 것이 최근 보고되었다(Todaro, Cell Death Differ,

2008;15:762-772; Todaro, Cell Stem Cell, 2007,1:389-402). IL-4 수용체는 비소세포 폐암, 뇌종양, 유방암, 방광암, 췌장암, 신장암, 전립선암, 신장암 및 카포시 육종(kaposi's sarcoma) 등의 여러 암세포에서 정상세포에서 보다 훨씬 더 많이 발현된다. IL-4 수용체에 의한 암세포의 항암제 내성 획득 및 암세포에서의 높은 발현 정도를 고려할 때, IL-4 수용체는 암표적을 위한 유망한 표적이라고 볼 수 있다. 현재 IL-4 자체를 일부 변형시킨 다음 이를 슈도모나스 독소(psuedomonas toxin)와 결합한 융합단백질을 이용하여 암세포를 표적하여 세포 내로 독소를 집어넣어 암세포를 사멸시키는 연구 등이 보고되었다(Joshi, Cancer Res,2001;61:8058-8061; Garland, J Immunother, 2005;28:376-381; Kioi, Cancer Res, 2005;65:8388-8396; Kawakami, Clin Cancer Res, 2002;8:3503-3511).

<164> 한편, IL-4 자체에 대한 다양한 형태의 길항제가 천식 등의 치료제로 개발이 된 바 있다. 이의 일 예로, 이뮤넥스 사는 분비형(soluble form) IL-4 수용체인 Nuvance를 개발하여 천식 치료제로서 임상시험을 하였으나 치료 효과가 부족하여 중단되었다. 또한, 글락소스미스클라인 사에 의해 IL-4에 대한 단클론항체인 pascolizumab이 개발되어 임상시험을 하였으나 중단되었다. 바이엘 사는 두 개의 돌연변이를 가진 변형된 형태의 IL-4 단백질인 피트라킨라(pitrakinra)를 개발하여 임상시험을 하고 있다. 수네시스(Sunesis Pharm. Inc) 사는 IL-4의 길항작용을 가진 화합물인 트리페닐 화합물(WO0198245)을 개발하여 임상시험을 하고 있다.

<165>

<166> 따라서 본 발명의 인터루킨-4 매개 질병은 바람직하게는 암, 알레르기, 동맥경화 및 천식으로 이루어진 군에서 선택된 것 일 수 있다.

<167>

<168> 상기 암은 편평 상피세포암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 담관암, 담낭암 등을 포함하는 암 등이 바람직하나 이에 한정되지는 않는다.

<169>

<170> 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 융합폴리펩타이드는 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조될 수 있다.

<171> 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키

제 등이 포함되며, 이러한 제제는 하나 이상의 본 발명의 융합폴리펩티드에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들어, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들어 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

<172> 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다.

<173> 본 발명의 치료용 조성물을 임의의 생리학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Alfonso, R., ed, Mack Publishing Co.(Easton, PA: 1995))와 바람직한 순도를 갖는 항체를 혼합하여 저장하기 위해 동결건조된 케이크 또는 수용액의 형태로 제조할 수 있다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충용액, 예를 들어 인산, 시트르산 및 다른 유기산; 아스코르브산을 비롯한 항산화제; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 비롯한 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예를 들어 EDTA; 당 알콜, 예를 들어 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예를 들어 나트륨; 및(또는) 비이온성 계면활성제, 예를 들어 트윈, 플루로닉스 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 포함된다.

<174>

<175> 또한, 본 발명의 융합폴리펩티드의 인체에 대한 투여는 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 융합폴리펩티드의 투여량은 1일당 환자 체중 1kg 당 약 0.0001mg 내지 100mg, 가장 바람직하게는 0.001mg 내지 10mg일 수 있다. 투여량은 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 본 발명 조성물의 특정한 용도에 따

른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

<176>

<177> 본 발명의 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있다.

<178> 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다.

<179> 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

<180>

<181> 본 발명의 약학적 조성물은 인터루킨-4 매개 질병의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

<182>

【유리한 효과】

<183> 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명은 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 5개 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드단편이 융합된 융합폴리펩티드를 제공한다. 본 발명의 융합폴리펩티드는 단백질 케이지를 형성하여 내부에 유효물질의 봉입이 가능하며, 폴리펩티드단편의 특정 분자, 세포 또는 조직과의 결합력을 매우 향상시켜 질병의 진단, 치료제 개발에 효과적이다.

<184>

【도면의 간단한 설명】

<185> 도 1은 인간 페리틴 light chain의 4번째 loop에 AP1 펩타이드를 넣은 모식도이다(GG cassette 또는 GP cassette 내의 AP1 : AP1S 또는 AP1L의 서열).

<186> 도 2는 AP1 펩타이드가 삽입된 융합단백질을 정제하여 전기영동한 결과사진이다(A : GG 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, B : GG 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴, C : GP 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, D : GP 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴).

<187> 도 3은 발현된 융합단백질의 FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography) 결과 그래프이다(FTL : 인간 페리틴 Light chain, FTL-GG-AP1S : GG 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, FTL-GG-AP1L : GG 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴, FTL-GP-AP1S : GP 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, FTL-GP-AP1L : GP 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴).

<188> 도 4는 생성된 융합단백질로 형성된 단백질 Cage의 전자현미경 사진 촬영 결과이다(A : AP1이 삽입되지 않은 wild type 페리틴, B : GG 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, C : GG 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴, D : GP 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, E : GP 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴).

<189> 도 5는 AP1 펩타이드를 삽입한 페리틴의 IL-4 receptor 결합여부를 확인하기 위한 FACS 측정 결과그래프이다(A : GG 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, B : GG 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴, C : GP 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, D : GP 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴, FTL : wild type 인간유래 페리틴, binding : AP1이 결합된 인간유래 페리틴, blocking : IL-4 receptor 항체로 IL-4 receptor를 blocking시킨 후 실험한 결과, FL1-H : 세포당 형광강도(the fluorescence intensity per cell), count : 세포수)

<190> 도 6은 AP1 펩타이드를 삽입한 페리틴의 IL-4 receptor 결합여부를 확인하기 위한 공초점 현미경 관찰 결과사진이다(A : AP1이 삽입되지 않은 wild type 페리틴, B : GG 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, C : GG 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴, D : GP 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, E : GP 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴, DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole로 세포를 염색한 이미지, 488 : Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG 특이적 촬영을 한 이미지, merge : DAPI과 488 이미지를 합친 것).

<191> 도 7은 AP1 펩타이드를 삽입한 페리틴이 IL-4 receptor 결합에 의해 세포 내부로 uptake되는 것을 확인하기 위한 현미경 관찰 결과사진이다(A : AP1이 삽입되지 않은 wild type 페리틴, B : GG 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, C : GG 카세트

에 AP1L이 삽입된 페리틴, D : GP 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, E : GP 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴).

<192> 도 8은 AP1 펩타이드와 IL-4 receptor의 결합력을 측정하기 위한 표면 플라즈몬 공명 분석 결과 이다.

<193> 도 9는 AP1 펩타이드를 삽입한 페리틴의 IL-4 receptor 결합력 측정을 위한 표면 플라즈몬 공명 분석 결과이다(A(GGAP1S) : GG 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, B(GGAP1L) : GG 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴, C(GPAP1S) : GP 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, D(GPAP1L) : GP 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴).

<194> 도 10은 4종류의 AP1 펩타이드를 삽입한 페리틴의 IL-4 receptor와의 결합력을 비교하기 위한 농도별 표면 플라즈몬 공명 분석 결과를 분석한 그래프이다(GGAP1S : GG 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, GGAP1L : GG 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴, GPAP1S : GP 카세트에 AP1S가 삽입된 페리틴, GPAP1L : GP 카세트에 AP1L이 삽입된 페리틴).

<195> 도 11은 제조한 펩타이드 함유 페리틴 발현을 확인한 SDS-PAGE실험결과 사진이다.

<196> (A)는 FTL-AP1_RGD의 실험결과이다(1번 lane ; marker, 2번 lane ; lysate supernant, 3번 lane ; lysate pellet, 4번 lane ; Elute fraction 2, 5번 lane ; Elute fraction 3, 6번 lane ; Elute fraction 4).

<197> (B)는 FTL-AP1-GRGDSP의 실험결과이다(1번 lane ; lysate supernant, 2번 lane ; lysate pellet, 3번 lane ; marker, 4번 lane ; Elute fraction 2, 5번 lane ; Elute fraction 3, 6번 lane ; Elute fraction 4).

<198> (C)는 FTL-RGD_AP1의 실험결과이다(1번 lane ; marker, 2번 lane ; uninduced lysate, 3번 lane ; induced lysate, 4번 lane; lysate supernant, 5번 lane ; pellet urea extration, 6번 lane ; Elute fraction).

<199> (D)는 FTL-GRGDSP_AP1의 실험결과이다(1번 lane ; uninduced lysate, 2번 lane ; induced lysate, 3번 lane ; lysate supernant, 4번 lane ; pellet urea extration, 5번 lane ; Elute fraction, 6번 lane ; Marker).

<200> (E)는 FTL-AP1_AP1의 실험결과이다(1번 lane ; marker, 2번 lane ; induced lysate, 3번 lane ; lysate supernant, 4번 lane ; lysate pellet).

<201> (F)는 FTL-AP1_AP1 펩타이드 발현을 확인한 SDS-PAGE 실험결과 사진이다(M : Size 마커, E2~E8 : 분리정제된 FTL-AP1_AP1 펩타이드를 로딩한 레인).

<202> 도 12는 AP1을 포함하는 페리틴 펩타이드가 cage를 형성한 것을 생물전자현

미경을 통하여 확인한 사진이다.

<203> (A)는 FTL-AP1_GRD의 cage 형성을 생물 투과 전자현미경을 통하여 확인한 사진이다.

<204> (B)는 FTL-AP1_GRGDSP의 cage 형성을 생물 투과 전자현미경을 통하여 확인한 사진이다.

<205> (C)는 FTL-AP1_AP1의 cage 형성을 생물 투과 전자현미경을 통하여 확인한 사진이다.

<206> (D) 는 FTL-AP1_AP1의 cage 형성을 생물 투과 전자현미경을 통하여 확인한 사진이다.

<207> 도 13은 FACS를 이용한 세포 결합 실험 결과 그래프이다(FTL(검은색) : AP1 펩타이드가 삽입되지 아니한 페리틴, FTL-AP1(연두색) : AP1 펩타이드가 하나 삽입된 페리틴, FTL-AP1_AP1(빨간색) : AP1 펩타이드가 두 군데 삽입된 페리틴, FL1-H : 세포당 형광강도(the fluorescence intensity per cell), counts : 세포수).

<208> 도 14는 FTL-AP1과 FTL-AP1_AP1의 결합력 비교를 위한 표면 플라스몬 공명(SPR:Surface plasmon resonance) 분석결과이다(FTL-AP1 : AP1 펩타이드가 하나 삽입된 페리틴과 IL-4 receptor의 결합력 분석 결과, FTL-AP1_AP1 : AP1 펩타이드가 두 군데 삽입된 페리틴과 IL-4 receptor의 결합력 분석 결과).

<209> 도 15는 발현된 융합단백질의 FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography) 결과 그래프이다(Y 축 : 280nm에서의 흡광도(mRU), X 축 : elution volume(ml), GRGDSP : AP1 및 GRGDSP가 삽입된 FTL-AP1_GRGDSP 페리틴, RGD : AP1 및 RGD가 삽입된 FTL-AP1_RGD 페리틴, STD : Standard).

<210> 도 16은 인테그린 alphavbeta3과 RGD 펩타이드가 삽입된 페리틴의 결합력을 표면 플라스몬 공명(SPR:Surface plasmon resonance)으로 분석한 결과이다 (RGD(S1)+AP1S(S3)_FTL : RGD 및 AP1 펩타이드가 삽입된 페리틴, GRGDSP(S1)+AP1S(S3)_FTL : GRGDSP 및 AP1 펩타이드가 삽입된 페리틴).

<211> 도 17은 AP1 펩타이드가 삽입된 페리틴 cage(^{157}cysAP1-PBNC)에 의해 천식 증상이 완화 되는 것을 확인한 동물 실험 결과이다(Data는 3번의 독립적인 실험을 통한 결과의 평균 및 측정표준오차(SEM)를 표시한 것이다. '*' 는 APO+ wt FTL과 비교하여 $p<0.05$ 유의적으로 변화한 것을 표시한 것이다. Saline : 식염수 처리군, APO+wtFTL : 천식 유도 후 AP1이 포함되지 않은 야생형 페리틴 cage를 투여한 군, APO+157cysAP1-PBNC : 천식 유도 후 AP1이 포함된 페리틴 cage를 투여한 군).

<212> (a) OVA가 혼합된 A. oryzae protease (APO)를 allergen으로 하여 천식을 유

도한 후 FlexiVent system으로 AHR(기도 과반응성, airway hyper-responsiveness)을 측정한 결과이다.

<213> (b) BAL(기관지폐포세척, bronchoalveolar lavage) 세포 수 측정 결과이다.

<214> (c) BAL 호산구(eosinophils) 세포 수 측정 결과이다.

<215> (d) BAL fluid 내의 glycoprotein 분비량 측정 결과이다.

<216> (e) 실험대상 마우스 폐 조직 관찰 결과 사진이다.

<217>

【발명의 실시를 위한 형태】

<218> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<219> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<220>

<221> **<실시예 1>**

<222> **발현벡터 제조 및 정제**

<223>

<224> **<1-1> 발현벡터의 제조**

<225> human ferritin light chain에 AP1 펩타이드가 연결된 융합 단백질을 제조하기 위하여 유전자 재조합 방법을 이용하였다.

<226> 구체적으로 4번째 loop지역인 Glycine과 Glycine사이, Glycine과 Proline사이에 AP1 펩타이드를 삽입하기 위하여 BamHI과 ApaI의 제한효소 사이트를 집어넣어 카세트형식으로 제조하고 AP1 펩타이드를 카세트에 삽입하였다.

<227> 이 때 AP1 펩타이드의 아미노산서열은 RKRLDRN (AP1S)와 CRKRLDRNC (AP1L)인 두 가지 종류의 펩타이드를 삽입하였다. 발현벡터는 대장균의 발현벡터인 pET28a(+)를 사용하였다. AP1 펩타이드의 염기서열을 합성하기 위하여 표 1의 프라이머를 사용한 후, *molar ratio*를 1:1로 하여 섞은 후 최종 농도가 1pmol/ul가 되게 희석하였다. 그리고 섞은 염기서열을 95℃에 5분정도 heat block에서 incubation한 후 서서히 온도를 상온까지 내려서 double strand의 AP1의 유전자를 만들었다. pET28a(+) 발현벡터를 NdeI, XhoI 제한효소 (TAKARA 구입)를 이용하여 37℃에서 2시간동안 처리를 하고 정제를 한 후 T4 DNA ligase를 이용하여 상기 AP1 유전자를 결합시켰다.

<228>

<229> 【표 1】

삽입위치	삽입펩타이드	프라이머 서열	서열번호
GG 카세트	AP1S	5-gatcccgtaagcgtcttgatcggaatggtgggcc-3	13
		5-caccattccgatcaagacgcttacgg-3	14
GG 카세트	AP1L	5-gatcctgccgtaagcgtcttgatcggaattgcggtgggcc-3	15
		5-caccgcaattccgatcaagacgcttacggcag-3	16
GP카세트	AP1S	5-gatcccgtaagcgtcttgatcggaatgggcc-3	17
		5-cattccgatcaagacgcttacgg-3	18
GP카세트	AP1L	5-gatcctgccgtaagcgtcttgatcggaattgcgggcc-3	19
		5-cgcaattccgatcaagacgcttacggcag-3	20

<230>

<231> human ferritin light chain의 4번째와 5번째 α-helix사이, 즉 4번째 loop 지역인 Glycine과 Glycine사이, Glycine과 Proline사이에 IL-4 receptor와 잘 binding하는 것으로 알려진 AP1 peptide를 삽입하였다. AP1 peptide를 삽입한 위치는 24mer를 형성하였을 때 밖으로 돌출되는 부분으로서 삽입하기 좋은 위치이다. 또한 AP1 peptide뿐만 아니라 다른 것도 삽입할 수 있도록 BamHI과 ApaI의 제한효소 사이트를 만들어 카세트 형식으로 제작하였다(도 1).

<232>

<233> **<1-2> 벡터의 발현 및 분리정제**

<234> 제조된 발현벡터로 대장균을 형질 전환하여 융합단백질을 대량 생산하였다. 구체적으로 GG 카세트에 AP1S, AP1L유전자가 삽입된 발현벡터와 GP 카세트에 AP1S, AP1L유전자가 삽입된 발현벡터를 BL21 숙주세포에 형질변환을 시킨 후, LB배지에서 37℃에서 키운 후 OD_{600}값이 0.5에 도달하면 IPTG 1mM을 이용하여 발현을 유도하였다. 이 후 20℃에서 18시간을 더 배양한 후 세포를 수거하고 lysis 버퍼 (50mM Tris, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1% tripton X-100, 1mM PMSF, 0.5mM DTT)를 이용하여 세포를 파괴한 후 AP1 펩타이드를 넣지 않은 페리틴은 용해된 부분만을 정제에 이용하였고, AP1 펩타이드가 삽입된 페리틴은 세포의 pellet을 8M urea가 들어간 binding 버퍼 (20mM Tris, 500mM NaCl, 5mM imidazole)로 용해한 후 Ni-NTA bead상에서 urea를 서서히 제거하여 protein을 refolding시켜서 정제하였다.

<235> 상기 정제를 위하여 affinity 크로마토그래피를 이용하여 단백질을 순수하게 정제하고 정제된 단백질의 분자량을 변성 SDS-PAGE 전기영동을 통해 확인하였다.

구체적으로 affinity 크로마토그래피는 Ni-NTA 컬럼을 사용하였으며 wash 버퍼 (20mM Tris, 500mM NaCl, 20mM imidazole)로 단백질 로딩 후 wash하였다. elution 버퍼 (20mM Tris, 150mM NaCl, 180mM Histidine)로 컬럼에 붙어있는 단백질을 용출시킨 후 전기영동을 통하여 확인하였다.

<236>

<237> 그 결과, [도 2]에서 보는 바와 같이 약 23kDa의 protein이 정제된 것을 SDS-PAGE에서 확인할 수 있었다.

<238>

<239> **<실시예 2>**

<240> **AP1 펩타이드 삽입 페리틴의 Cage 형성 테스트**

<241>

<242> **<2-1> 고속 단백질 액체 크로마토그래피 (FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography)를 이용한 페리틴 단백질 형성 테스트**

<243> AP1 펩타이드를 삽입한 페리틴 단백질이 wild type과 마찬가지로 cage 단백질을 형성하는지 여부를 확인하기 위하여 FPLC를 시행하였다.

<244> FPLC는 Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare)을 이용하였고, injection volume은 50ul 이었으며 버퍼는 20mM Tris-HCl(8.0), 150mM NaCl, 180mM Histidine을 사용하였다. standard curve를 제작하기 위하여 wild-type 페리틴 (분자량 440kDa), BSA (분자량 67kDa), ovalbumin(45kDa), Chymotrypsin A (25Kda), Ribonuclease A (13Kda)을 사용하였다.

<245>

<246> 그 결과 [도 3]에서 보는 바와 같이 4가지 protein 모두 cage를 잘 형성하는 것으로 확인 되었다. AP1이 삽입된 페리틴이 wild type에 비해 size가 작게 보이지만, elution volume 10~11ml사이에서 peak가 형성되는 것을 확인하였다.

<247>

<248> **<2-2> 생물 투과 전자현미경**

<249> AP1 peptide를 삽입한 페리틴이 cage를 잘 형성하는지 확인하기 위하여 생물투과전자현미경을 찍었다. 각 sample의 농도는 0.1mg/ml로 만들어 기초과학지원연구원(KBSI)에 의뢰해 사진을 찍었다. sample은 uranyl acetate로 negative staining을 하고, FEI제조사의 tecnai기계로 시행되었다.

<250>

<251> 실험 결과, FPLC와 같은 결과로 wild type과 마찬가지로 cage를 잘 형성하는

것을 확인하였다(도 4).

<252>

<253> **<실시예 3>**

<254> **세포 결합 테스트**

<255>

<256> **<3-1> 유세포분석기(FACS)를 이용한 세포 결합 테스트**

<257> AP1 peptide를 삽입한 페리틴이 IL-4 receptor에 binding하는지 확인하기 위하여, IL-4 receptor가 많이 발현하고 있는 A549 cell을 이용하였다.

<258> 먼저 A549 cell을 직경 100mm 플레이트에 세포밀집도(confluence)가 최대치의 80%정도 될 때까지 키웠다. plated cell을 PBS로 두 번 wash하고 Trypsin/EDTA로 cell을 plate에서 떼어낸 후 $2x10^5$/100ul cell을 1% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 PBS에 suspension하여 4℃에서 30분 동안 incubation하였다. human IL-4 Rα antibody (MAB230)를 1:1000으로 1% BSA가 포함된 PBS 버퍼에 희석한 후 4℃에서 1시간 incubation하여 IL-4 receptor를 blocking하였다. 실험은 위의 blocking 과정을 시행한 그룹과 시행하지 않은 두 그룹으로 나누고 아래의 실험은 두 그룹 모두 동일하게 진행하였다. PBS로 두 번 wash한 후 AP1이 삽입되지 않은 페리틴과 AP1이 삽입된 페리틴을 400nM의 농도로 20mM Tris, 150mM NaCl, 180mM Histidine 버퍼에 희석한 후 4℃에서 20분 binding시켰다. PBS로 두 번 wash한 후 ferritin light chain antibody(D-18,sc-14420)를 1:400의 비율로 1% BSA가 포함된 PBS 버퍼에 희석하여 30분 동안 얼음에서 incubation하였다. PBS로 두 번 wash한 후 Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG(H+L) antibody(invitrogen, 미국)를 1:200의 비율로 1% BSA가 포함된 PBS 버퍼에 희석하여 30분 동안 ice에서 incubation하였다.PBS로 두 번 wash하고 500ul PBS에 cell을 suspension한 후 FACS를 시행하였다.

<259>

<260> 실험결과 [도 5]에서 보는 바와 같이, IL-4 receptor가 많이 발현하고 있는 A549 cell에서 AP1이 삽입된 4종류의 페리틴은 모두 잘 binding하였고, wild type ferritin은 binding 하지 않았다. IL-4 receptor antibody를 이용하여 IL-4 receptor를 blocking시킨 후, binding test를 했을 경우에는 AP1이 삽입된 4종류의 페리틴 모두 binding하는 정도가 감소하였다. 이는 AP1이 삽입된 페리틴이 IL-4 receptor에 특이적으로 binding 함을 의미한다.

<261>

<262> **<3-2> 공초점 현미경(confocal microscope)을 이용한 세포 결합 테스트**

<263> AP1 peptide를 삽입한 페리틴이 IL-4 receptor에 binding하는지 확인하기 위하여, IL-4 receptor가 많이 발현하고 있는 A549 cell을 이용하여 confocal microscopy로 확인하였다.

<264> 먼저 A549 cell을 직경 100mm 플레이트에 세포밀집도(confluence)가 최대치의 80%정도 될 때까지 키웠다. plated cell을 PBS로 두 번 wash한 후, Trypsin/EDTA로 cell을 plate에서 떼어낸 후, $2x10^5$/100ul cell을 1% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 PBS에 suspension한 후 4℃에서 30분간 incubation하였다. PBS로 두 번 wash한 후 AP1이 삽입되지 않은 페리틴과 AP1이 삽입된 페리틴을 400nM의 농도로 20mM Tris, 150mM NaCl, 180mM Histidine 버퍼에 희석한 후 4℃에서 20분 binding시켰다. PBS로 두 번 wash한 후 ferritin light chain antibody (D-18,sc-14420)를 1:400의 비율로 1% BSA가 포함된 PBS 버퍼에 희석하여 30분 동안 얼음에서 incubation하였다. PBS로 두 번 wash한 후 Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG(H+L) antibody를 1:200의 비율로 1% BSA가 포함된 PBS 버퍼에 희석하여 30분 동안 ice에서 incubation하였다. PBS로 두 번 wash한 후, cell을 fixation하기 위하여 4% 파라포름알데히드(PFA)를 넣은 후 cell을 suspension 하여 8 well slide chamber에 넣고 1000rpm으로 10분 간 centrifuge를 돌려 cell을 chamber에 부착시켰다.

<265> PBS로 두 번 wash한 후 어두운 곳에서 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)를 3분 동안 incubation하여 cell을 염색하고, antifade reagent로 mounting하여 cover glass를 덮고 Z-stack 방식으로 confocal microscopy를 확인하였다.

<266> FACS결과와 마찬가지로 wild type은 A549 cell에 결합하지 않았지만, AP1이 삽입된 4종류의 페리틴은 cell의 membrane에 모두 잘 결합하는 것을 확인하였다(도 6).

<267>

<268> **<실시예 4>**

<269> **수용체매개 세포내섭취(receptor mediated endocytosis)**

<270>

<271> AP1 펩타이드를 삽입한 페리틴이 A549 cell에 발현하고 있는 IL-4 receptor를 통해 cell 안으로 uptake가 잘 되는지를 확인하고자 본 실험을 시행하였다.

<272> 8 well slide chamber에 $1x10^4$/200ul을 seeding하고 overnight으로 키워서 chamber에 잘 부착되도록 하였다. PBS로 두 번 wash한 후 AP1이 삽입되지 않은 페

리틴과 삽입된 페리틴을 400nM의 농도로 20mM Tris, 150mM NaCl, 180mM Histidine 버퍼에 희석한 후 37℃에서 1시간 incubation하였다. PBS로 두 번 wash한 후 차갑게 보관된 Methanol을 넣고 20℃에서 20분 동안 incubation하여 cell membrane을 permeable하게 만든다. PBS로 두 번 wash한 후 1%가 BSA가 포함된 PBS를 넣고 상온에서 30분 동안 blocking하였다. PBS로 두 번 wash한 후 anti His-probe (H-15) Alexa Fluor 647 antibody를 1:40의 비율로 PBS에 희석하여 4℃에서 overnight으로 incubation하였다. PBS로 두 번 wash한 후 어두운 곳에서 DAPI를 3분 동안 incubation하여 cell을 염색하고, antifade reagent로 mounting하여 cover glass를 덮고 confocal microscopy를 확인했다.

<273>

<274> 그 결과 [도 7]에서 보여지는 바와 같이 AP1이 삽입된 4종류의 페리틴이 cell안의 cytosol로 uptake가 됨을 확인할 수 있었다.

<275>

<276> **<실시예 5>**

<277> **활성 폴리펩티드의 결합력 분석**

<278>

<279> **<5-1> 표면 플라스몬 공명(SPR:Surface plasmon resonance) 분석**

<280> 분석을 위하여 0.74mg/ml농도의 IL-4 receptor 단백질 50ul에 200mM 소듐 아세테이트(NaOAC, sodium acetate, pH 4.0)를 50ul넣어서 섞어준 후 20mM sodium acetate buffer가 되도록 H_2O로 총 volume 500ul가 되게 만들었다.

<281> Carboxymethyl dextran chip의 각 channel(left, right)에 40mM EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride)/ 10mM NHS(N-Hydroxy-succinimide)을 7분 흘려 표면을 activation 시킨 후 준비된 IL-4 receptor 단백질 200ul을 left channel에 7분 동안 흘려주어 immobilization 하였다. 이때 right channel은 reference channel로 사용하였다. Left channel과 right channel의 두 channel을 미 반응된 표면을 비특이적 흡착을 줄이기 위해 1M ethanolamine pH8.5 용액으로 7분 동안 흘려서 blocking하였다. 모든 실험은 25℃의 온도에서 진행하였고, 흐름속도는 25ul/min으로 하였다.

<282>

<283> 버퍼는 20mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 180mM Histidine, 62.5ug/ml BSA, 0.005% tween 20을 filtering, degasing을 하여 사용하였고, wild type ferritin과 AP1이 삽입된 페리틴을 각각 0.65nM, 1.3nM, 2.6nM, 5.2nM, 10.4nM, 20.8nM,

41.6nM의 농도로 3분 동안 흘려주고, 상동의 버퍼를 3분간 흘려주었다. 2M NaCl을 1분 동안 흘려서 해리되지 않고 남아있는 단백질을 씻어주는 regeneration을 하였다. 0.65nM부터 10.4nM까지의 농도에서 left channel 값에서 right channel 값을 빼서 특이적인 binding 값을 graph로 나타내었다.

<284> AP1 펩타이드와 IL-4R의 Kd값을 구하기 위해서 버퍼는 10mM Hepes pH8.4, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 62.5ug/ml BSA, 0.005% tween 20을 filtering, degasing을 하여 사용하였고, AP1 펩타이드를 3.125uM, 6.25uM, 12.5uM, 25uM, 50uM의 농도로 3분 동안 흘려주고 상동의 버퍼를 3분 동안 흘려주었다. 2M NaCl을 1분 동안 흘려서 해리되지 않고 남아있는 단백질을 씻어주는 regeneration을 하였다. 각 농도에서 left channel 값에서 right channel 값을 빼서 특이적인 binding 값을 graph로 나타내었다(도 8 참조).

<285> binding graph는 scrubber software를 이용하여 Blank(buffer)값과 reference channel(right channel)을 빼주어 결합된 단백질 양을 표현하는 RU값을 측정하였다. 각 농도에서 측정된 결합 RU(Req)를 KaleidaGraph software를 사용하여 K_D value를 구하였다. 이때, K_D 값은 near-equilibrium values (Req)에 도달하기 위한 association phage의 R values를 위해서 충분한 시간의 association phage 값을 측정하여 K_D의 10배 범위내의 각각 단백질의 4~5개 이상의 다른 농도와 SPR에서 측정된 Req를 plotting한 후 방정식 m1/(1+m2/m0);m1=1;m2=1 (m1; Vmax, m2; Kd)을 사용하여 curve fitting 한 후 K_D를 구하였다.

<286>

<287> 앞선 논문에서 IL-4와 IL-4 receptor의 K_D값은 $3.82x10^{-10}$ 정도로 알려져 있다 (Andrews AL, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE. J Immunol. 2006 Jun 15;176(12):7456-7461.).

<288> 측정된 AP1의 농도별 결합 RU로 AP1 peptide와 IL-4 receptor의 K_D값을 계산한 결과, K_D값은 $5.54x10^{-3}$으로 계산되었다.

<289>

<290> 【표 2】

<291>

IL4R, AP-1 및 본 발명 융합폴리펩티드의 K_D(평형상수) 값

IL-4R		K_D(M)
IL-4		$3.82x10^{-10}$
AP-1 peptide		$5.54x10^{-3}$
FTL	GG-AP1S	$1.19x10^{-9}$
	GP-AP1S	$4.29x10^{-9}$
	GG-AP1L	$25.9x10^{-9}$
	GP-AP1L	$9.9x10^{-9}$

<292> 이에 반해 AP1이 삽입된 페리틴의 K_D값은 위의 [표 2]와 같이 계산되었다. AP1이 삽입된 페리틴의 IL-4 receptor와의 affinity가 AP1 peptide에 비해 10^5~10^6 배 정도 좋아진 것을 알 수 있다. 4종류의 AP1이 삽입된 ferritin mutant간의 binding peak의 차이가 있었는데 AP1-S가 삽입된 페리틴과 AP1-L이 삽입된 페리틴의 association과 dissociation의 pattern이 다름을 알 수 있다. 양쪽에 Cysteine이 없는 AP1-S ferritin은 association(Ka)과 dissociation(Kd)이 빠르며 농도 dependent하게 saturation되면서 binding하는 반면, 양 끝에 Cysteine이 있는 AP1-L ferritin은 그에 비해 낮은 농도에서는 association과 dissociation이 AP1-S ferritin 과 크게 다르지 않게 binding하였고, RU가 차이가 없었지만 농도가 높아짐에 따라 RU값이 많이 binding하고 dissociation이 느린 것으로 확인되었다(도 9).

<293>

<294> **<5-2> 농도에 따른 결합력 분석(SPR analysis)**

<295> 4종류의 AP1이 삽입된 ferritin mutant들이 IL-4 receptor 와 binding 하는 정도의 차이를 비교하기 위해 SPR분석을 하였다. 실험방법은 실시예 <5-1>과 같이 진행하였으며, 0.65nM부터 41.6nM까지의 농도에 따라 나타난 RU값을 GraphPad prism 4 프로그램을 사용하여 그래프로 나타내었다.

<296> 그 결과, AP1S가 삽입된 페리틴은 농도가 증가할수록 addictive하게 RU값이 증가하지만, AP1L이 삽입된 페리틴은 농도가 증가할수록 RU값이 significant하게 증가하는 것을 볼 수 있다. AP1L이 삽입된 페리틴이 AP1S가 삽입된 페리틴보다 농도가 증가할수록 RU값이 증가하는 정도가 훨씬 증가함을 확인할 수 있었다(도 10).

<297>

<298> **<실시예 6>**

<299> **N 말단에 제2폴리펩티드단편이 융합된 페리틴 제조를 위한 발현벡터 제조 및 정제**

<300>

<301> **<6-1> 발현벡터의 제조**

<302> 실시예 1에서 제조한 융합 폴리펩티드에 AP1 펩타이드를 추가로 삽입하였다. human ferritin light chain의 4번째와 5번째 α-helix사이, 즉 4번째 loop지역인 Glycine과 Glycine사이(GG 카세트)에 AP1 펩타이드(short form인 AP1S)가 삽입된 clone의 N-terminal에 AP1 펩타이드를 추가로 삽입하여서 하나의 페리틴 모노머에 AP1펩타이드가 2군데 삽입된 융합폴리펩티드(FTL-AP1_AP1)를 제작하였다.

<303> 사용된 융합폴리펩티드는 GG 카세트에 AP1S를 접어 넣은 융합폴리펩티드(FTL_GG-AP1S)이며, 실시예에서 FTL-AP1으로 명명하였다. 추가로 삽입되는 AP1의 아미노산 서열은 AP1S인 RKRLDRN이며 삽입되는 위치는 융합폴리펩티드의 N-말단이다. 실시예에서 FTL_GG-AP1S(FTL-AP1)의 N-말단에 AP1S를 융합시킨 융합폴리펩티드는 FTL-AP1_AP1으로 명명하였다.

<304> 또한 human ferritin light chain에 AP1 펩타이드 및 RGD 펩타이드가 연결된 융합 단백질을 제조하였다.

<305> human ferritin light chain의 4번째와 5번째 α-helix사이, 즉 4번째 loop 지역인 Glycine과 Glycine사이(GG 카세트)에 RGD 펩타이드가 삽입된 clone의 N-terminal에 AP1 펩타이드를 삽입하여서 하나의 페리틴 모노머에 AP1 펩타이드와 RGD 펩타이드가 삽입된 융합폴리펩티드(FTL-AP1_RGD)를 제작하고 AP1 펩타이드와 RGD 펩타이드 자리를 바꾸어 삽입하여 FTL-RGD-AP1 융합폴리펩티드를 제작하였다.

<306>

<307> 아래의 표 3과 같이 AP1 펩타이드의 서열과 linker의 서열(GGGSG)을 가지는 정방향 프라이머와 FTL의 염기서열을 가지는 역방향 프라이머를 이용하고 FTL_GG-AP1S construct를 주형(template)으로 사용하여 본 발명의 융합 단백질의 유전자를 PCR(denaturation 95℃(30sec), annealing temp. 60℃(30sec), extension temp. 72℃(1min), 35 cycles)로 증폭하였다. 상기 PCR 증폭산물을 아가로스 겔(agarose gel) 전기영동을 통해 크기를 확인하고 추출(gel extraction)하였다. 이후 NdeI, XhoI (TAKARA 구입)를 이용하여 37℃에서 2시간동안 증폭된 유전자를 처리하였다. pET28a(+) 발현벡터 역시 동일한 제한효소처리를 하고 정제를 한 후 T4 DNA ligase

를 이용하여 상기 유전자를 결합시켰다. 유전자의 삽입여부는 sequencing을 통해 검증하였다.

<308>

<309> 【표 3】

<310> FTL-AP1_AP1제조를 위한 프라이머 조합

프라이머	프라이머 서열	서열번호
정방향 프라이머	5-GGGCATATGCGTAAGCGTCTTGATCGGAATGGAGGAGGAAG TGGAATGAGCTCCCAGATTCGTCAG-3	21
역방향 프라이머	5-GCTCGAGTTAGTCGTGCTTGAGAGTGAGC-3	22

<311>

<312> **<6-2> 벡터의 발현 및 분리정제**

<313> 제조된 발현벡터로 대장균을 형질 전환하여 융합단백질을 대량 생산하였다. FTL-RGD_AP1, FTL-GRGDSP-AP1, FTL-AP1-RGD, FTL-AP1-GRGDSP, FTL-AP1-AP1 각각의 유전자가 삽입된 발현벡터를 BL21 숙주세포에 형질변환을 시킨 후, LB배지에서 37℃에서 키운 후 OD_{600}값이 0.5에 도달하면 IPTG 1mM을 이용하여 발현을 유도하였다. 이 후 20℃에서 18시간을 더 배양한 후 세포를 수거하고 lysis 버퍼 (50mM Tris, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1% tripton X-100, 1mM PMSF, 0.5mM DTT)를 이용하여 세포를 파괴한 후 세포의 pellet을 8M urea가 들어간 binding 버퍼 (20mM Tris, 500mM NaCl, 5mM imidazole)로 용해한 후 Ni-NTA bead상에서 urea를 서서히 제거하여 protein을 refolding시켜서 정제하였다.

<314> 상기 정제를 위하여 affinity 크로마토그래피를 이용하여 단백질을 순수하게 정제하고 정제된 단백질의 분자량을 변성 SDS-PAGE 전기영동을 통해 확인하였다. 구체적으로 affinity 크로마토그래피는 Ni-NTA 컬럼을 사용하였으며 wash 버퍼 (20mM Tris, 500mM NaCl, 20mM imidazole)로 단백질 로딩 후 wash하였다. elution 버퍼 (20mM Tris, 150mM NaCl, 180mM Histidine)로 컬럼에 붙어있는 단백질을 용출시킨 후 전기영동을 통하여 확인하였다.

<315>

<316> 그 결과, [도 11] 및 에서 보는 바와 같이 약 23kDa의 protein이 정제된 것을 SDS-PAGE에서 확인할 수 있었다.

<317>

<318> **<실시예 7>**

<319> **펩타이드 삽입 페리틴의 Cage 형성 테스트**

<320>

<321> **<7-1> 고속 단백질 액체 크로마토그래피 (FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography)를 이용한 페리틴 단백질 형성 테스트**

<322>

<323> 실시예 <2-1>에서와 동일한 방법으로 FPLC를 시행하였다.

<324> 그 결과 [도 15]에서 보는 바와 같이 펩타이드를 삽입한 FTL-AP1-RGD와 FTL-AP1-GRGDSP 둘 다 cage를 잘 형성하는 것으로 확인 되었다. 펩타이드가 삽입된 페리틴이 wild type에 비해 size가 작게 보이지만, elution volume 10~11ml사이에서 peak가 형성되는 것을 확인하였다.

<325>

<326> **<7-2> 생물 투과 전자현미경 관찰**

<327> 펩타이드를 삽입한 페리틴들이 cage를 잘 형성하는지 확인하기 위하여 생물투과전자현미경 촬영을 하였다.

<328> 각 sample의 농도는 0.2mg/ml로 만들었으며, 촬영은 실시예 <2-2>에서와 동일한 방법으로 기초과학지원연구원(KBSI)에 의뢰하여 촬영을 하였다.

<329>

<330> 실험결과, FPLC와 같은 결과로 wild type과 마찬가지로 cage를 잘 형성하는 것을 확인하였다([도 12] 참조).

<331>

<332> **<실시예 8>**

<333> **FACS를 이용한 세포 결합 실험**

<334>

<335> AP1 peptide를 두 군데 삽입한 페리틴(FTL-AP1_AP1)이 IL-4 receptor에 잘 결합하는지 비교하기 위하여, IL-4 receptor가 많이 발현하고 있는 A549 cell을 이용하여 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 세포결합실험을 하였다.

<336> 먼저 A549 cell을 100파이 플레이트에 confluence가 80%정도 될 때까지 키웠다. plated cell을 PBS로 두 번 wash하고 Trypsin/EDTA로 cell을 plate에서 떼어낸 후 $2x10^5$/100ul cell을 1% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 PBS에 suspension하여 4℃에서 30분 동안 incubation하였다. PBS로 두 번 wash한 후 FTL-AP1과 FTL-AP1_AP1을 400nM, 200nM, 40nM의 농도로 20mM Tris, 150mM NaCl, 180mM Histidine 버퍼에 희석한 후 4℃에서 20분 binding시켰다. PBS로 두 번 wash한 후 ferritin light chain antibody (D-18,sc-14420)를 1:400의 비율로 1% BSA가 포함된 PBS 버

퍼에 희석하여 30분 동안 ice에서 incubation하였다. PBS로 두 번 wash한 후 Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG(H+L) antibody를 1:200의 비율로 1% BSA가 포함된 PBS 버퍼에 희석하여 30분 동안 ice에서 incubation하였다. PBS로 두 번 wash하고 500ul PBS에 cell을 suspension한 후 FACS를 시행하였다.

<337> 실험 결과, [도 13]에서 보는 바와 같이, 400nM과 200nM에서 FTL-AP1_AP1이 FTL-AP1보다 IL-4 receptor에 더 많이 결합하는 것을 확인하였다.

<338>

<339> **<실시예 9>**

<340> **표면 플라스몬 공명(SPR:Surface plasmon resonance) 분석**

<341>

<342> **<9-1> RGD 펩타이드 및 AP1 펩타이드가 삽입된 인간 페리틴의 인테그린 alphavbeta3과의 결합력 분석**

<343> 분석을 위하여 0.25mg/ml농도의 alphavbeta3 단백질 35ul에 200mM 소듐 아세테이트(NaOAC, sodium acetate, pH 4.0)를 35ul넣어서 섞어준 후 20mM sodium acetate buffer가 되도록 H_2O로 총 volume 350ul가 되게 만들었다.

<344> Carboxymethyl dextran chip의 각 channel(left, right)에 40mM EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride)/ 10mM NHS(N-Hydroxy-succinimide)을 7분 흘려 표면을 activation 시킨 후 준비된 alphavbeta3 단백질 200ul을 left channel에 7분 동안 흘려주어 immobilization 하였다. 이때 right chsnnel은 reference channel로 사용하였다. Left channel과 right channel의 두 channel을 미 반응된 표면을 비특이적 흡착을 줄이기 위해 1M ethanolamine pH8.5 용액으로 7분 동안 흘려서 blocking하였다. 모든 실험은 25℃의 온도에서 진행하였고, 흐름속도는 25ul/min으로 하였다.

<345> 버퍼는 10mM Hepes pH7.4, 150mM NaCl, 180mM Histidine, 1mM $MgCl_2$, 0.005% tween 20을 filtering, degasing을 하여 사용하였고, wild type 페리틴과 RGD가 삽입된 페리틴을 각각 0.65nM, 1.3nM, 2.6nM, 5.2nM, 10.4nM, 20.8nM, 41.6nM의 농도로 3분 동안 흘려주고, 상동의 버퍼를 3분간 흘려주었다. 2M NaCl을 1분 동안 흘려서 해리되지 않고 남아있는 단백질을 씻어주는 regeneration을 하였다. 0.65nM부터 10.4nM까지의 농도에서 left channel 값에서 right channel 값을 빼서 특이적인 binding 값을 graph로 나타내었다.

<346> Binding graph는 scrubber software를 이용하여 Blank(buffer)값과 reference channel(right channel)을 빼주어 결합된 단백질 양을 표현하는 RU값을

측정하였고 상기의 software를 이용해 K_D value를 구하였다.

<347> 측정된 RGD가 삽입된 페리틴의 농도별 결합 RU로 RGD가 삽입된 페리틴과 alphavbeta3의 K_D값을 계산한 결과, K_D값은 $6.86x10^{-8}$으로 계산되었다.

<348> 실험 결과, [도 16]에서 보는 바와 같이 FTL-RGD-AP1과 FTL-GRGDSP-AP1이 인테그린 alphavbeta3 농도에 의존적으로 binding함을 알 수 있다.

<349>

<350> **<9-2> FTL-AP1_AP1의 결합력 비교 측정**

<351> FTL-AP1과 FTL-AP1_AP1의 결합력 비교를 위하여 표면 플라스몬 공명 분석을 실시하였다. 방법은 실시예 <5-1>과 동일한 방법으로 하였으며, FTL-AP1농도는 0.26nM, 1.041nM, 2.083nM, 4.166nM에서 각각 binding하여 분석하고, FTL-AP1_AP1의 농도는 0.520nM, 1.041nM, 2.083nM, 4.166nM에서 binding한 후 분석하였다.

<352>

<353> 실험결과 [도 14] 및 [표 4]에서 보는 바와 같이, FTL-AP1의 K_D값은 443pM이고, FTL-AP1_AP1의 K_D값은 45.8pM로 FTL-AP1_AP1의 결합력이 FTL-AP1에 비하여 10배 정도 증가한 것을 확인하였다.

<354>

<355> 【표 4】

Ligand	Kon($M^{-1}S^{-1}$)	Koff(S^{-1})	K_D (M^{-1})
FTL-AP1	$1.22\pm0.64\times10^{6}$	$1.25\pm0.4\times10^{-3}$	$1.44\pm0.9\times10^{-9}$
FTL-AP1-AP1	8.26×10^{5}	3.8×10^{-5}	4.58×10^{-11}

<356>

<357>

<358> **<실시예 10>**

<359> **유효물질 전달 실험**

<360>

<361> 본 발명의 페리틴 유래 융합폴리펩티드의 약물전달체 효과를 확인하기 위하여, 페리틴 cage에 삽입된 AP1펩타이드가 천식에 효과가 있는지 동물실험을 통하여 확인하였다.

<362>

<363> **<10-1> 천식 동물모델 제조**

<364> 야생형 C57BL/6J 마우스를 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME, USA)으로부

터 구입하여 무균 사육 시설에서 사육하였다. 모든 동물은 정상식이(PMI Lab Diet) 및 물을 자유 공급 하였다. 실험에는 6~8주령 female 마우스가 사용되었다. 실험동물의 관리 및 실험 절차는 KAIST의 동물실험윤리위원회()의 승인 하에 진행되었다.

<365> 천식 유도는 기존 방법(Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, et al. (1996) J Exp Med 183: 109117.)에 의해 진행되었다.

<366> 간단히 설명하면, Aspergillus oryzae protease(1mg/mL in PBS, Sigma-Aldrich) 및 계란 ovalbumin(OVA, 0.5 mg/mL in PBS, Sigma-Aldrich)의 allergen(APO)을 1:9(v/v)로 투여직전 혼합하여 사용하여 천식을 유도하였다. 마우스는 50uL의 allergen로 4회의 복강 내 감작(intraperitoneal sensitizations) 및 비강 내 유도(intranasal challenge)를 매 4일(0, 4, 8, 12, 16)마다 수행하였다. 비강 내 유도를 위하여 마우스는 isoflurane 흡입(Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA)으로 간이 마취 하였다. 알레르기 유도 1시간 전 PBS에 1mg/ml로 희석된 AP-1 보유 페리틴 cage (GG-AP1L, 157cysAP1-PBNC) 또는 AP-1이 삽입되지 아니한 페리틴 cage(wt FTL)를 50uL씩 투여하였다.

<367>

<368> **<10-2> 천식 증상 유발 시험**

<369> 알레르기성 천식 표현형 측정을 위하여, AHR, BAL cytology, BAL glycoprotein assay, 및 lung histopathology 시험을 기존 방법(Lee, S. H., et al. (2003) Nat. Med. 9, 128111286.)에 의해 수행하였다.

<370> 간단히 설명하면, 마지막 비강 내 유도 16시간 후, AHR는 FlexiVent system (SCIREQ Inc., Montreal, Canada)으로 측정하였다. pentobarbital sodium (Hanlim Pharma Co., Seoul, Korea, 60mg/kg)으로 마취한 후, 20게이지 캐뉼러 삽관 후 마우스는 기관 내 캐뉼러를 통하여 FlexiVent system과 연결되었다.

<371> pancuronium bromide (Sigma-Aldrich, 1 mg/kg)으로 마비시킨 후, 마우스는 호기말양압(positive end expiratory pressure) 3 CmH_2O에서 일회 환기량 10mL/kg으로 150회/min의 호흡속도로 호흡시켰다.

<372> 폐 저항을 측정하기 위하여 마우스는 흡입기로 methacholine (Sigma-Aldrich)를 증가량 흡입 시켰다(0 = normal saline only, 1, 3, 9, 18, 27 mg/mL).

<373>

<374> **<10-3> 천식 증상 측정 시험**

<375> 기도 저항은 각 증가량의 methacholine 흡입후 기준치로 회복시켰다.

<376> 이후 기도 과반응성(AHR, airway hyper-responsiveness), BAL cytology, and

secreted glycoprotein assays를 기존 방법(Lee, S. H. et al., (2004) J. Allergy Clin. Immunol. 113, 72778.)에 따라 측정하였다.

<377>

<378> 측정 결과, [도 17a]에서 보는 바와 같이, AP1을 포함하는 페리틴을 투여한 군(APO+^{157}cysAP1-PBNC)이 대조군 페리틴에 비하여 기도 과반응성(AHR, airway hyper-responsiveness)이 현저하게 억제되는 것을 확인하였다.

<379> 또한 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage(BAL) fluid) 내의 염증 세포 특히 호산구(eosinophils)의 수도 AP1을 포함하는 페리틴을 투여한 군(^{157}cysAP1-PBNC)이 대조군 페리틴에 비하여 현저하게 감소하는 것을 확인하였다([도 17b, c] 참조).

<380>

<381> **<10-4> BAL fluid 내의 glycoprotein 분비 측정**

<382> 분비된 glycoprotein의 수준은 기존의 방법(Lee, S. H. et al., (2004) J. Allergy Clin. Immunol. 113, 72778.)에 따라 변형된 ELISA로 측정되었다.

<383> 간단히 설명하면, 뮤신 standard(돼지 위 유래, Sigma-Aldrich)를 PBS로 2배씩 순차적으로 희석하여 준비하고, BAL fluid 샘플은 1:100에서 시작하여 동일하게 PBS로 2배씩 순차적으로 희석하였다.

<384> 각 샘플 40ul을 ELISA plate(Greiner, Kremsmunster, Austria)에 옮긴 후 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 및 세척 후 plate는 200ul의 0.2% I-block (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)으로 block하고, 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 세척 후 40ul의 biotinylated jacalin(5ug/mL glycoprotein binding lectin, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 투여한 후 4℃에서 밤새 반응시켰다. 다음날 세척 후 40ul의 alkaline phosphatase가 conjugate 된 streptavidin (1:1000 dilution, BD Biosciences)을 추가하고, 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 종료 후 마지막 세척을 하고, 70ul의 alkaline phosphatase substrate (5 mmol in 0.1 mol/L alkaline buffer, Sigma-Aldrich)를 투여하고, 뮤신 standard 커브가 명백해질 때까지 발색 시킨 후, 40ul의 0.5N sodium hydroxide를 추가하여 반응을 중단시킨 후 405nm 파장에서 ELISA reader (BioRad, Hercules, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다.

<385>

<386> 측정 결과, 분비된 BAL fluid 내의 glycoprotein의 양도 AP1을 포함하는 페

리틴을 투여한 군(^{157}cysAP1-PBNC)에서 현저히 감소하는 것을 확인하였다([도 17d] 참조).

<387>

<388> **<10-5> 현미경 조직 관찰**

<389> 마지막으로 실험 마우스를 희생시켜 periodic acid Schiff (PAS)로 염색된 폐 슬라이드 표본을 제조한 후, inflammatory cell 및 goblet cell의 변화를 관찰하였다. (arrowhead: mucin-positive goblet cell, arrow: inflammatory cell)

<390>

<391> 그 결과, 기관지주위 염증세포(peribronchial inflammatory cell, 화살표 표시) 및 점액 생산 goblet 세포(mucus-producing goblet cell, arrowhead 표시)의 수가 AP1을 포함하는 페리틴을 투여한 군에서 현저히 감소하는 것을 확인하였다([도 17e] 참조).

<392>

<393> 이러한 결과를 종합하면, AP1을 포함하는 페리틴을 투여한 군에서 천식 증상 완화 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 이는 페리틴 cage가 약물 전달체로서 효과적으로 작용한다는 것을 시사한다.

<394>

【산업상 이용가능성】

<395> 따라서, 본 발명은 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 5개 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드단편이 융합된 융합폴리펩티드를 제공한다. 본 발명의 융합폴리펩티드는 단백질 케이지를 형성하여 내부에 유효물질의 봉입이 가능하며, 폴리펩티드단편의 특정 분자, 세포 또는 조직과의 결합력을 매우 향상시켜 질병의 진단, 치료제 개발에 효과적이어서 산업상 이용가능성이 높다.

<396>

【청구의 범위】

【청구항 1】

인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이에 5개 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 제1폴리펩티드단편이 융합된 융합폴리펩티드.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 융합폴리펩티드는 상기 인간유래 페리틴 모노머의 N 말단에 5개 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 제2폴리펩티드단편이 추가로 융합된 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 인간 유래 페리틴 모노머는 인간 유래 페리틴 라이트 체인(light chain)인 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 인간 유래 페리틴 모노머는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 인간 유래 페리틴 모노머의 4번째 루프(loop)의 첫 번째 내지 다섯 번째 아미노산 사이는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 154번째 내지 158번째 아미노산 사이인 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 융합폴리펩티드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 154번째 내지 158번째 아미노산 사이에 5개 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 제1폴리펩티드단편이 융합되며, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 154번째 내지 158번째 아미노산 중 일부가 결실되는 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

【청구항 7】

제1항에 있어서, 상기 제1폴리펩티드단편은

하기 서열 일반식(I)로 표시되는 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

일반식 (I)

[N말단-X1-X2-X3-C말단]

상기 X1 및 X3은 각각 1개 내지 3개의 임의의 아미노산으로 이루어진 링커이며, 상기 X2는 1개 내지 28개의 임의의 아미노산으로 이루어진 활성폴리펩티드이다.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 링커는 제한효소 절단부위인 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

【청구항 9】

제7항에 있어서, 상기 X1은 글리신-세린이며, X3은 글리신-프롤린 또는 글리신-글리신-프롤린인 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

【청구항 10】

제7항에 있어서, 상기 X2는 7개 내지 9개의 임의의 아미노산으로 이루어진 활성 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

【청구항 11】

제7항에 있어서, 상기 X2는 서열번호 6, 7, 33, 34로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 활성 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

【청구항 12】

제1항에 있어서, 상기 융합폴리펩티드는 서열번호 2 내지 서열번호 5로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

【청구항 13】

제2항에 있어서, 상기 융합폴리펩티드는 서열번호 23, 25, 27, 29 및 31로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로

하는 융합폴리펩티드.

【청구항 14】

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1폴리펩티드단편 또는 제2폴리펩티드단편은 상기 융합폴리펩티드 간 또는 상기 융합폴리펩티드와 인간 유래 패리틴 모노머 간의 결합을 방해하지 않는 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

【청구항 15】

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 융합폴리펩티드를 포함하는 페리틴 단백질.

【청구항 16】

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 융합폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 17】

제16항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

【청구항 18】

제17항의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체.

【청구항 19】

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 융합폴리펩티드를 포함하는 단백질 케이지.

【청구항 20】

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합폴리펩티드는 목적하는 물질에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 융합폴리펩티드.

【청구항 21】

제1항 또는 제2항의 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 약물전달시스템.

【청구항 22】

제21항에 있어서, 상기 약물전달시스템은 인터루킨-4 수용체를 특이적으로 표적하는 것을 특징으로 하는 약물전달시스템.

【청구항 23】

제21항에 있어서, 상기 융합폴리펩티드는 서열번호 2 내지 5, 23, 25, 27, 29 및 31로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 약물전달시스템.

【청구항 24】

제1항 또는 제2항의 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 인터루킨-4 매개 질병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 25】

제24항에 있어서, 상기 융합폴리펩티드는 서열번호 2 내지 5, 23, 25, 27, 29 및 31로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 26】

제24항에 있어서, 상기 인터루킨-4 매개 질병은 암, 알레르기, 동맥경화 및 천식으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 27】

제1항 또는 제2항의 융합폴리펩티드를 이를 필요로 하는 개체에 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 인터루킨-4 매개 질병 예방 또는 치료 방법.

【청구항 28】

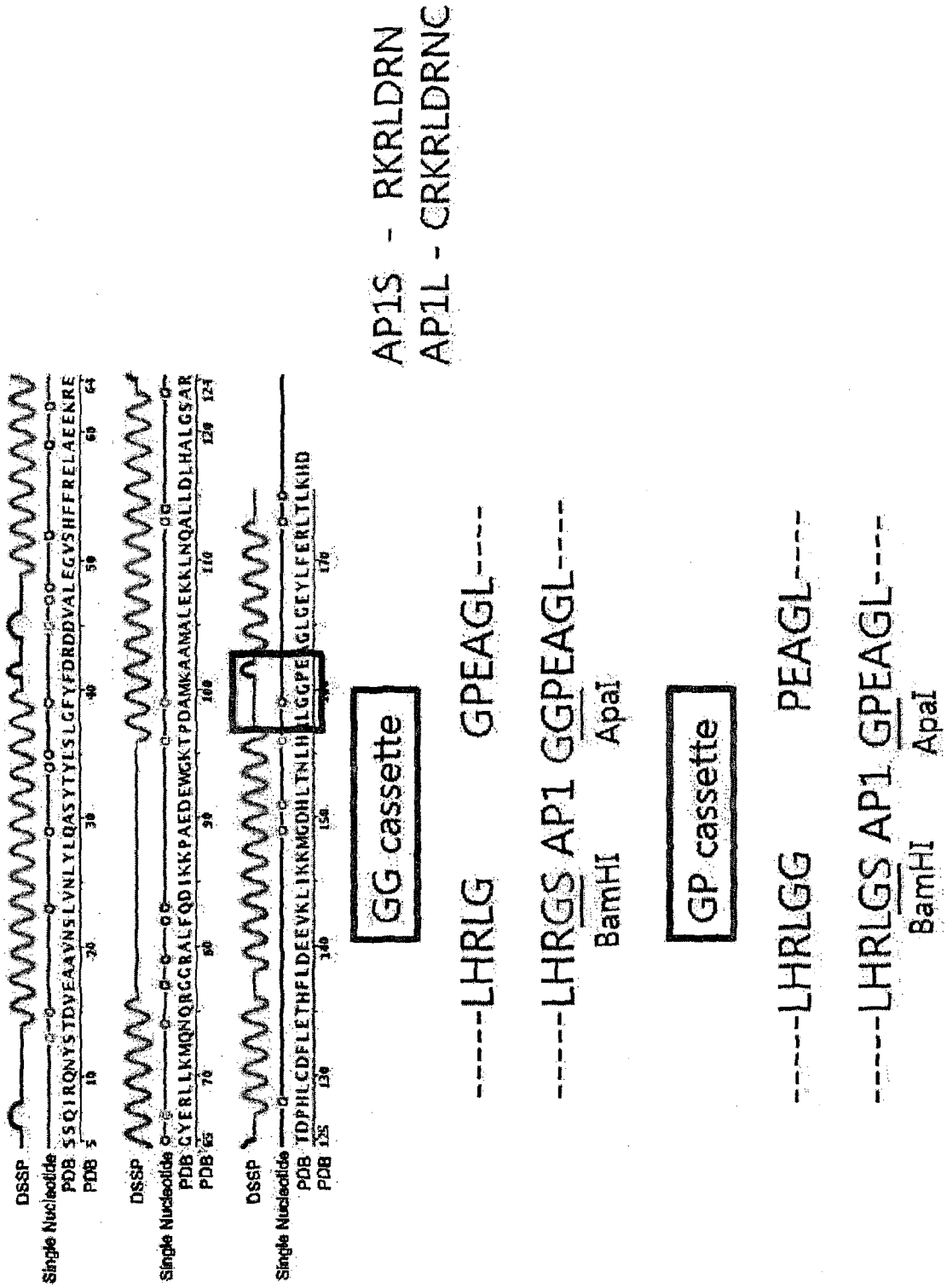
제1항 또는 제2항의 융합폴리펩티드의 인터루킨-4 매개 질병 예방 또는 치료제 제조를 위한 용도.

【청구항 29】

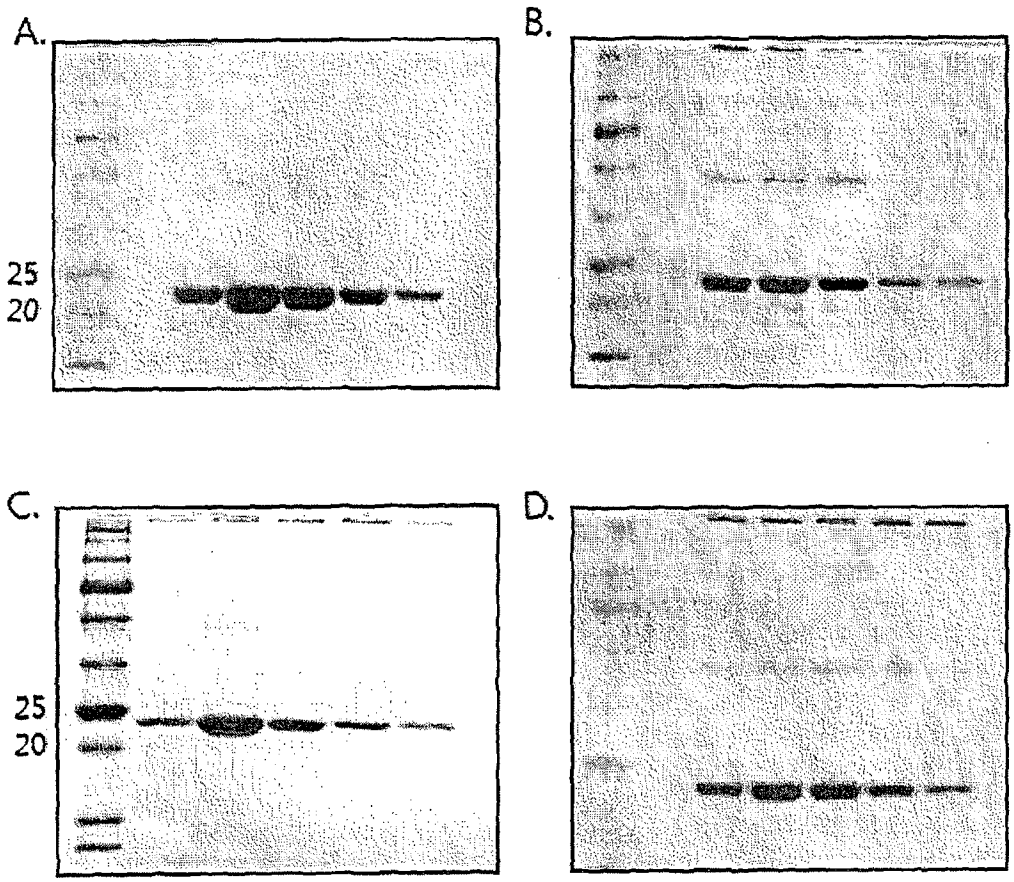
서열번호 2 내지 5, 23, 25, 27, 29 및 31로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 융합폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 천식 치료제.

【도면】

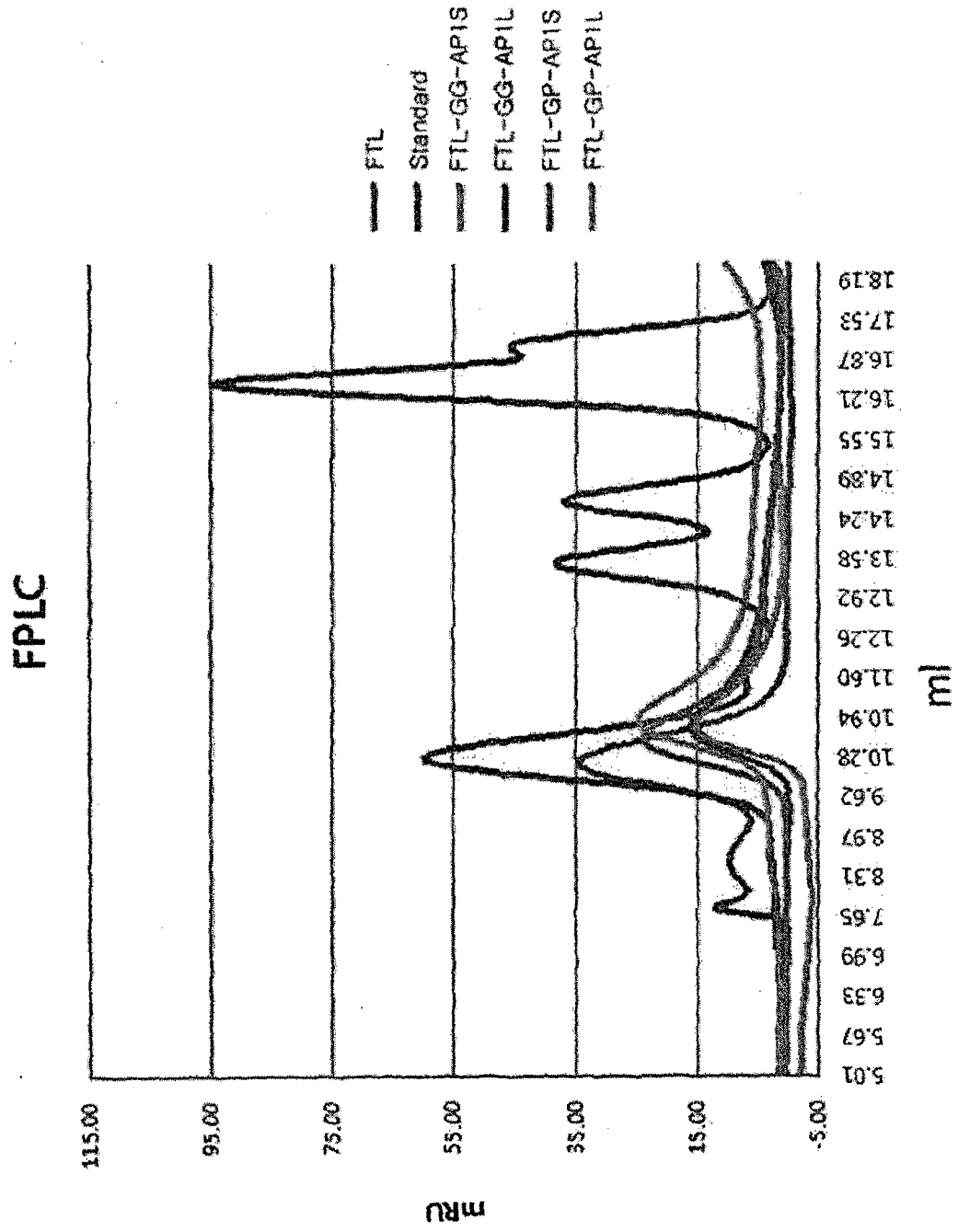
【도 1】


AP1S - RKRLDRN
AP1L - CRKRLDRNC
GG cassette
-----LHRLG GPEAGL----
-----LHRGS AP1 GGPEAGL----
BamHI ApaI
GP cassette
-----LHRLGG PEAGL----
-----LHRLGS AP1 GPEAGL----
BamHI ApaI

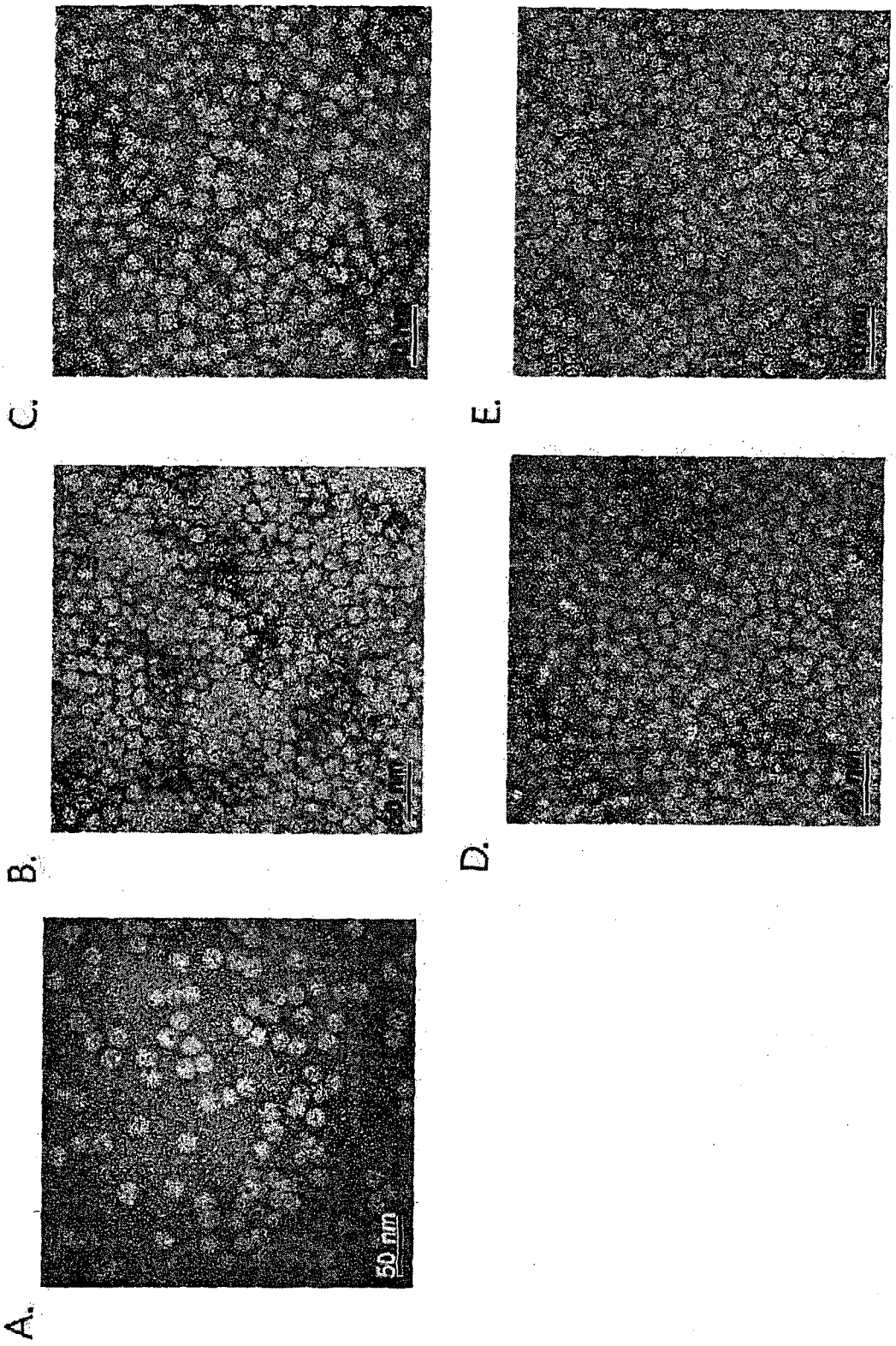
【도 2】



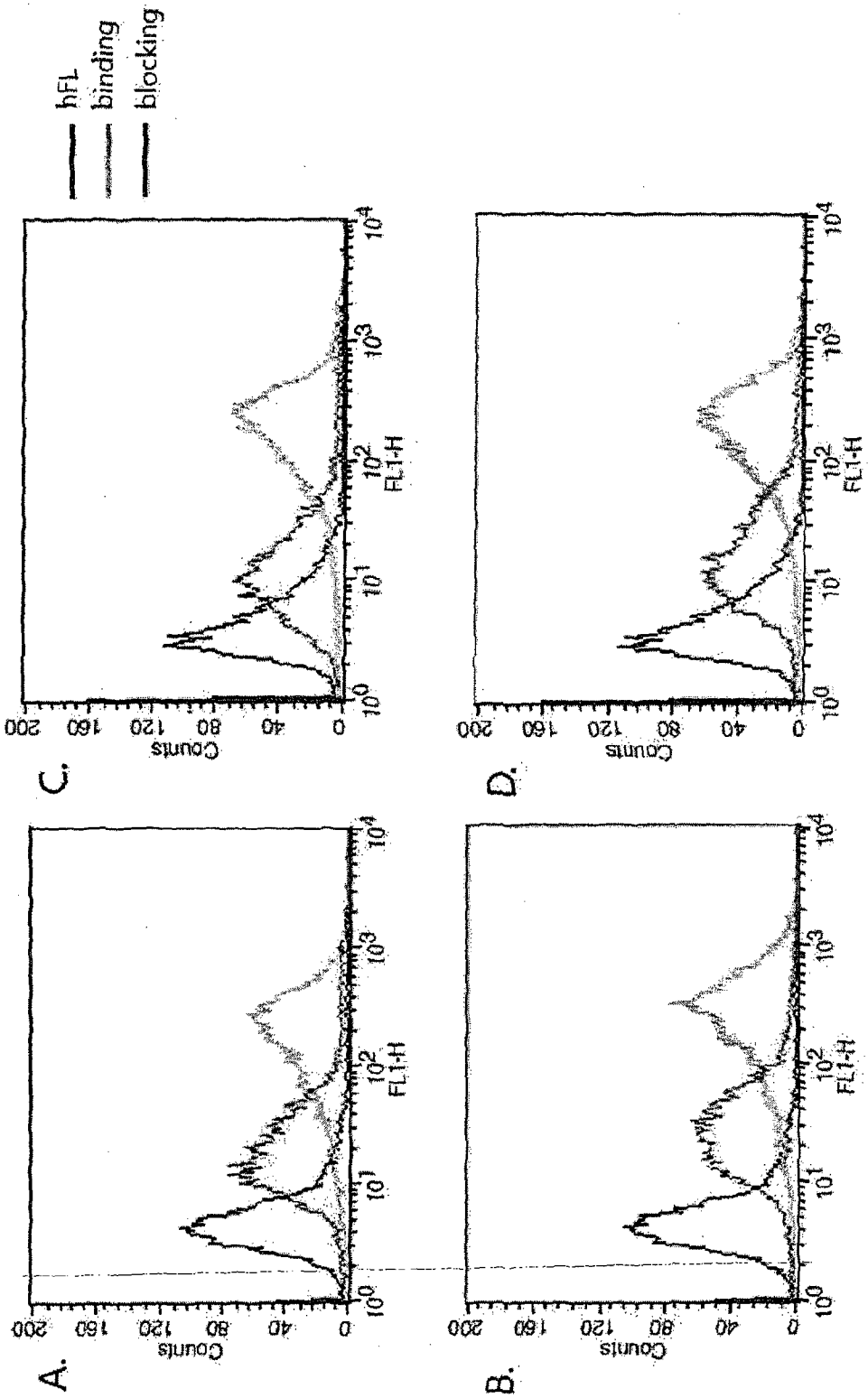
【도 3】


FPLC
FTL
Standard
FTL-GG-AP1S
FTL-GG-AP1L
FTL-GP-AP1S
FTL-GP-AP1L
mAU
115.00
95.00
75.00
55.00
35.00
15.00
-5.00
ml
5.01
5.67
6.33
6.99
7.65
8.31
8.97
9.62
10.28
10.94
11.60
12.26
12.92
13.58
14.24
14.89
15.55
16.21
16.87
17.53
18.19

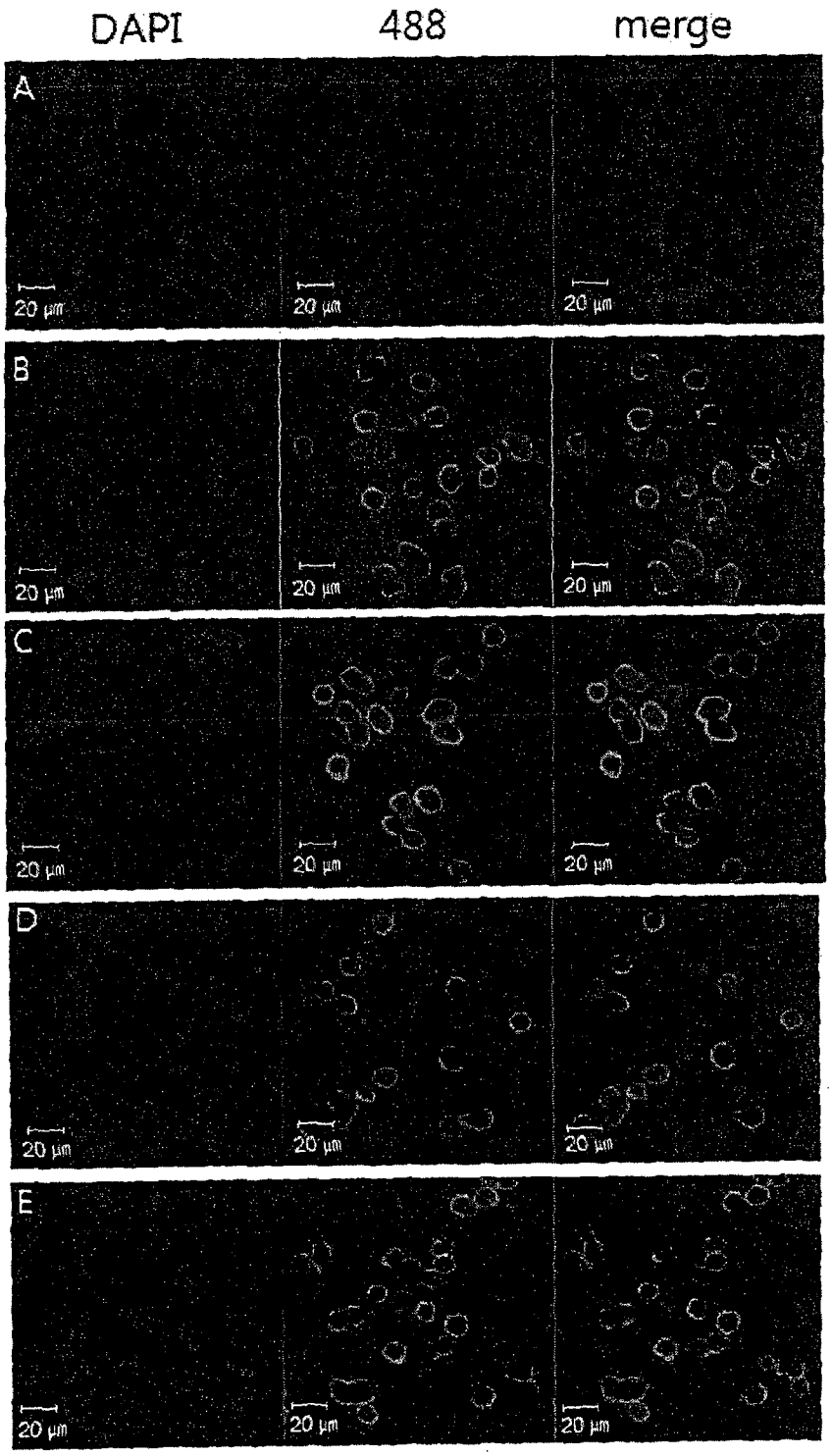
【도 4】



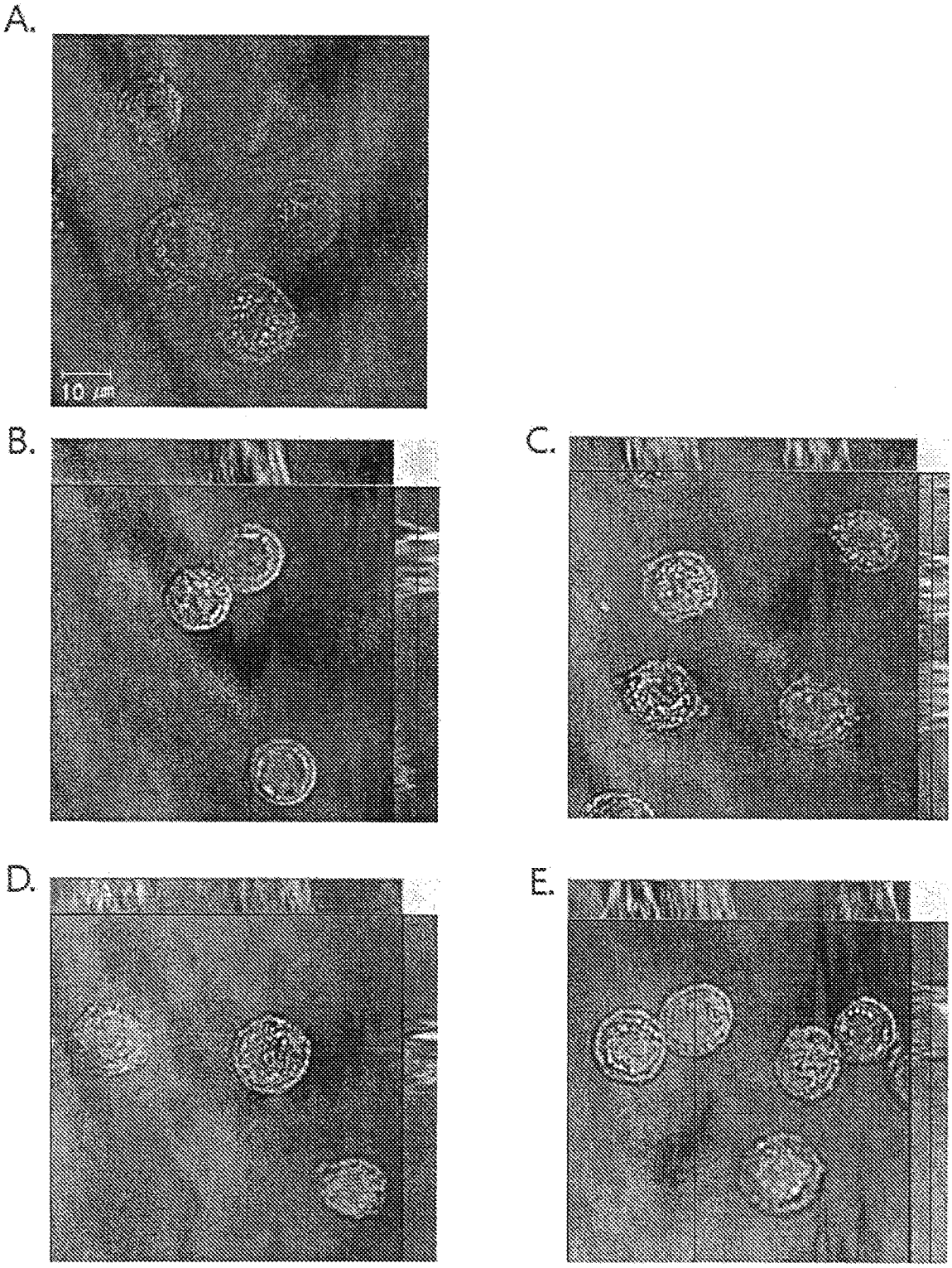
【도 5】



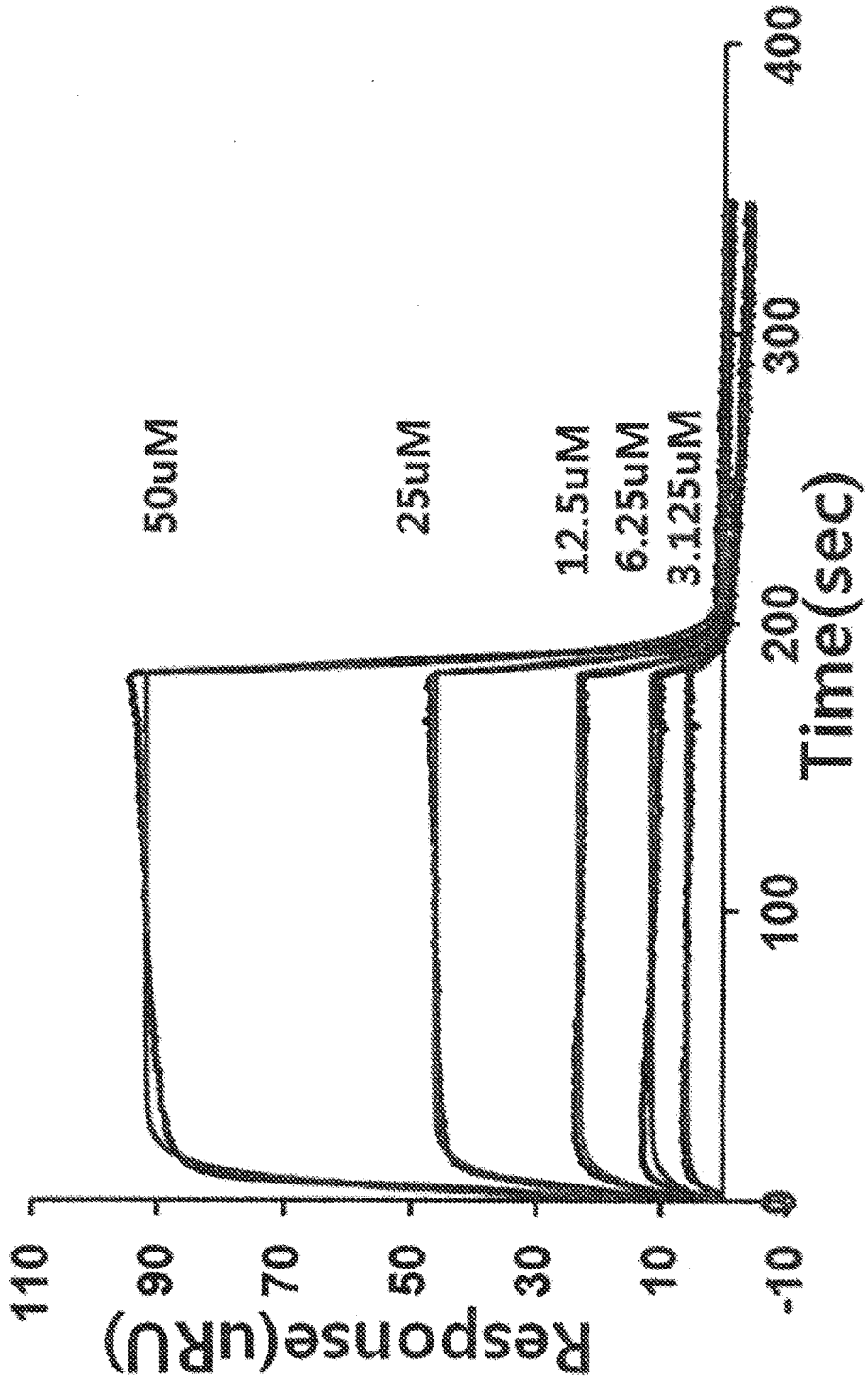
【도 6】



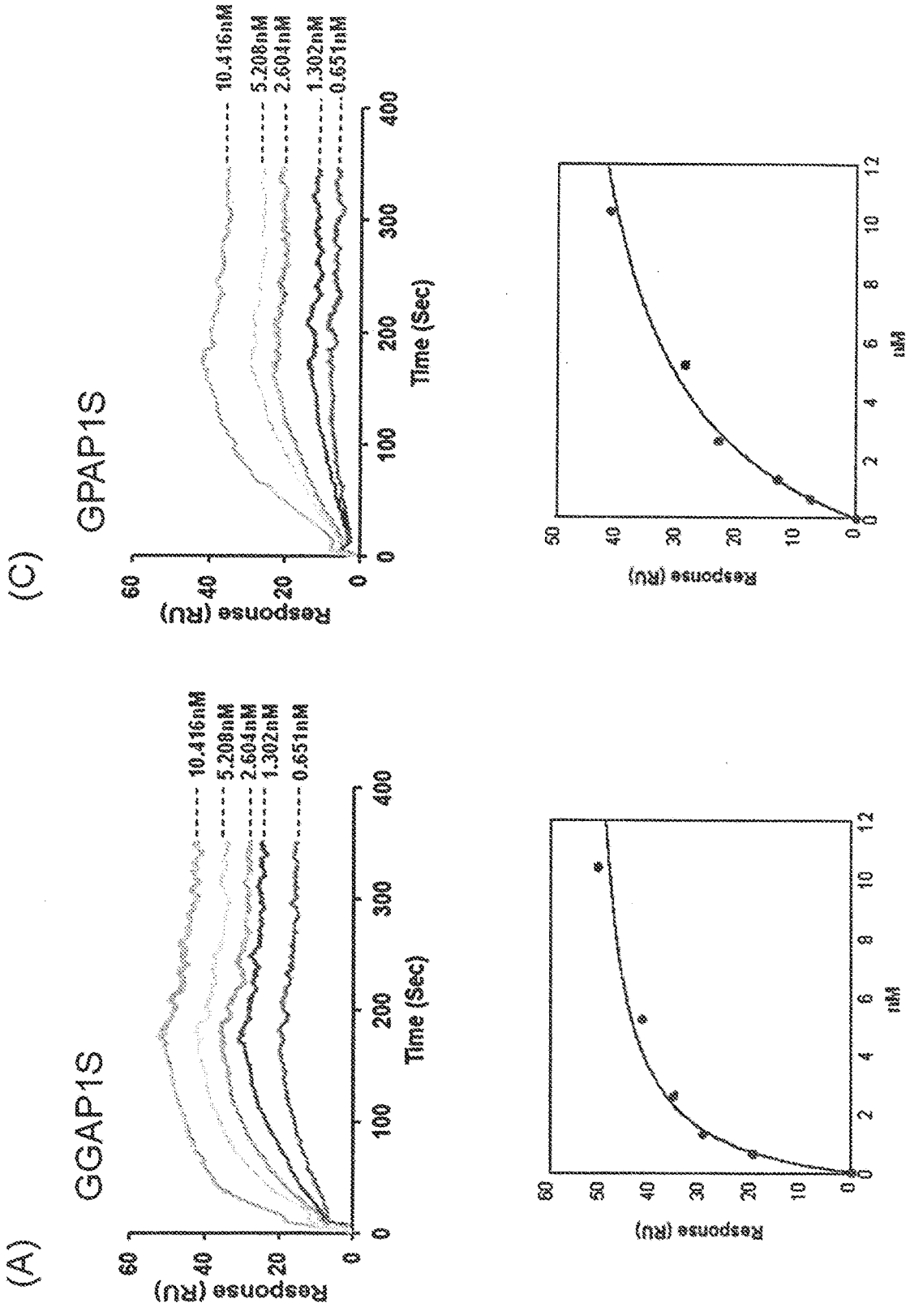
【도 7】

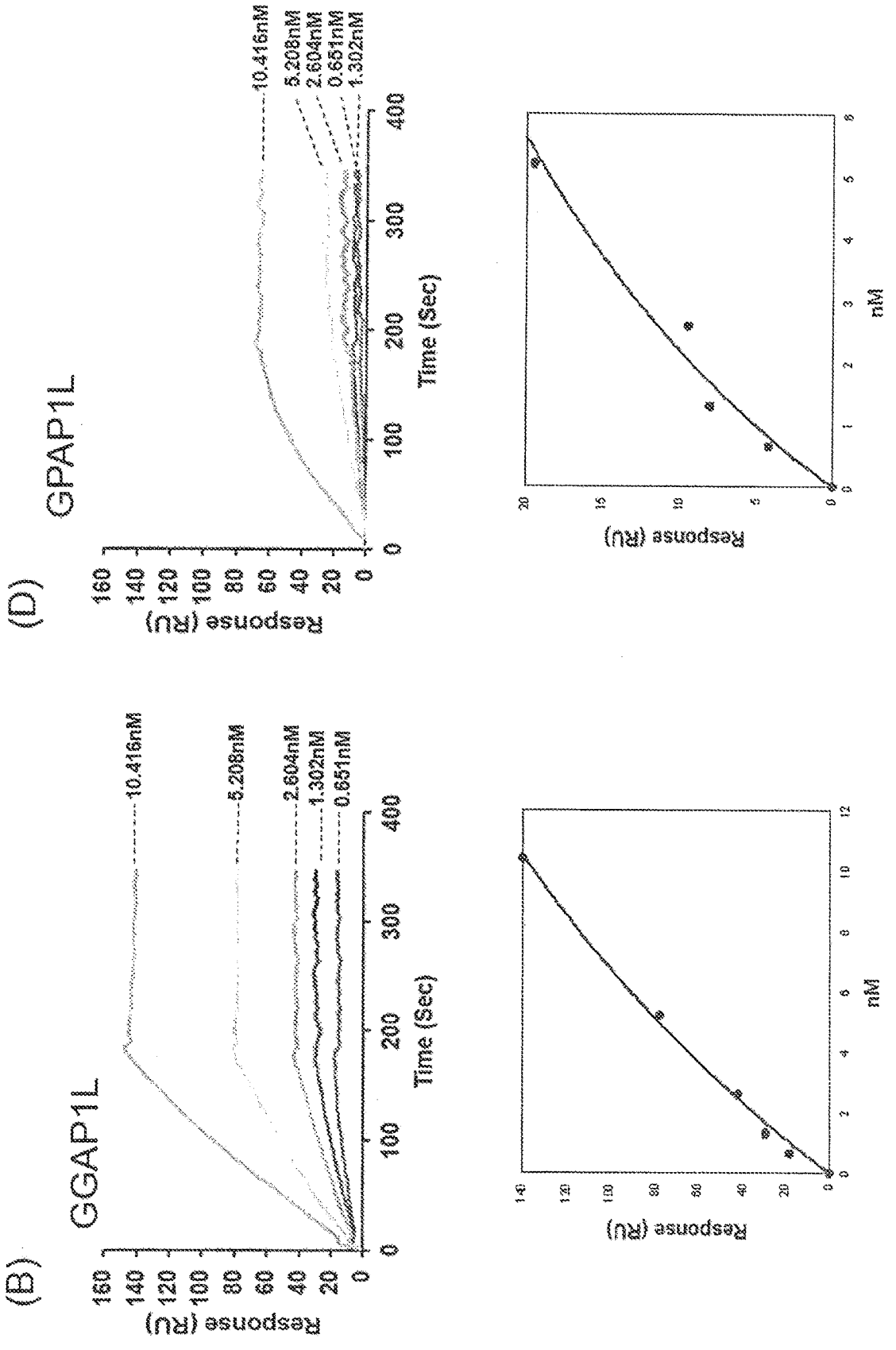


【도 8】

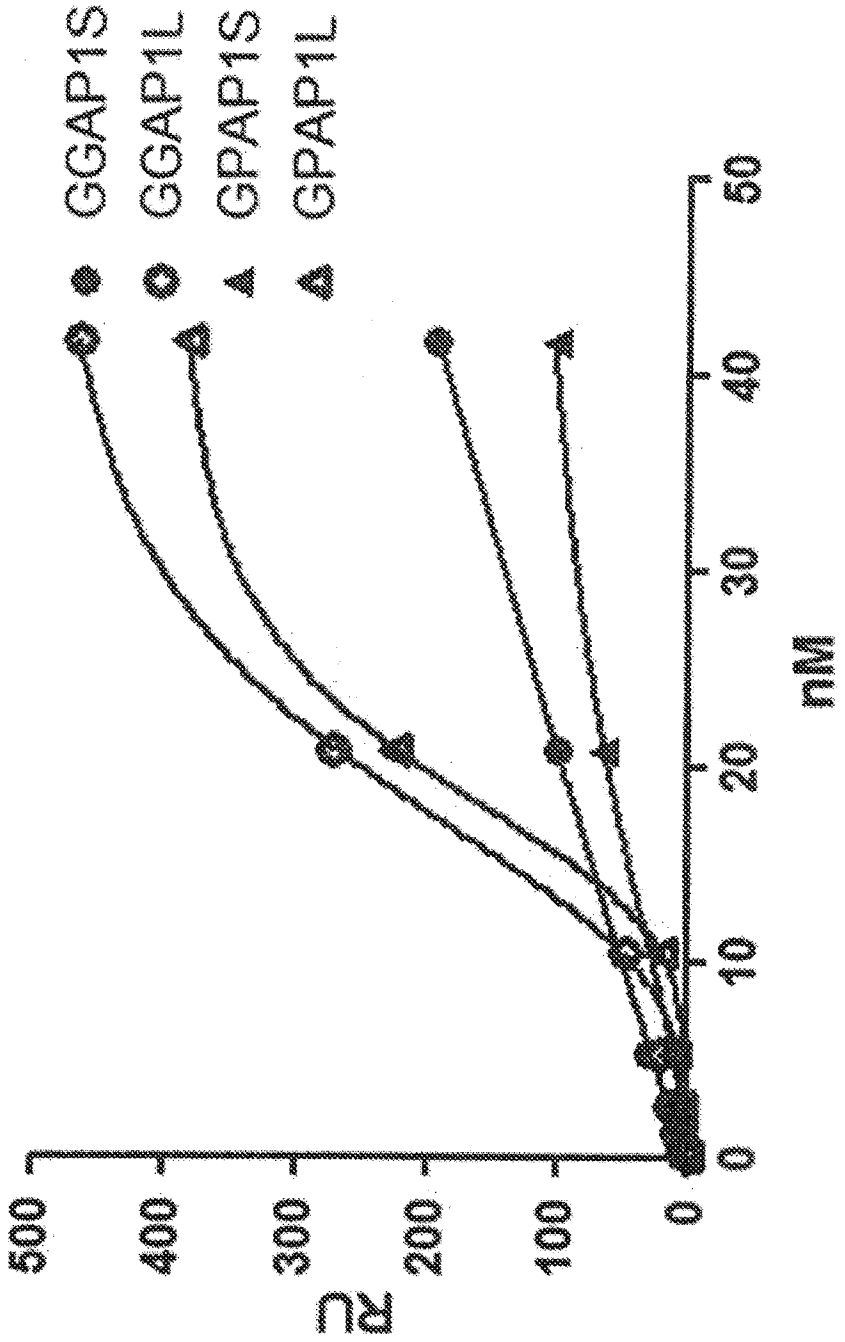

50uM
25uM
12.5uM
6.25uM
3.125uM
Response(uRU)
110
90
70
50
30
10
-10
100
200
300
400
Time(sec)

【도 9】

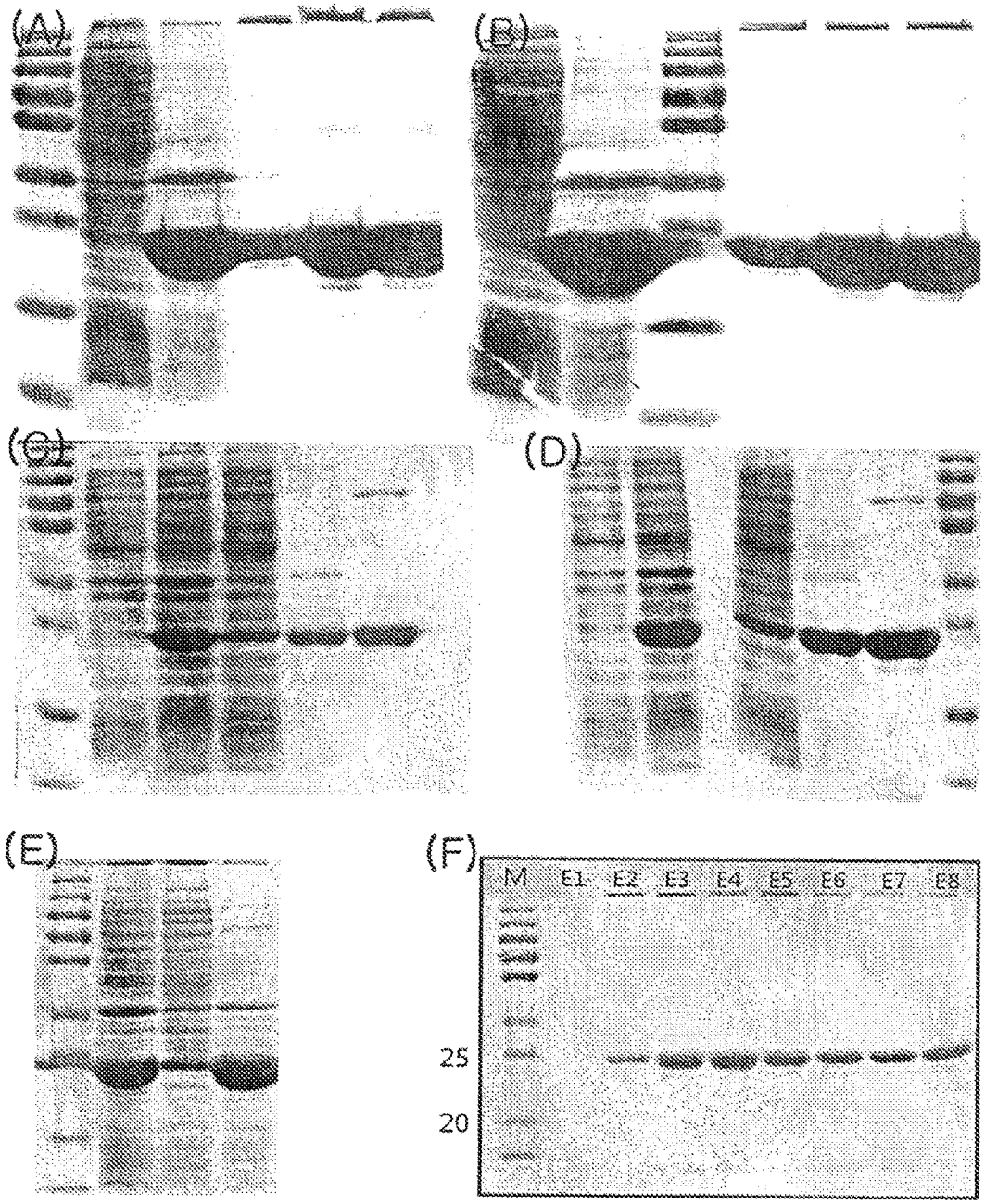

(A)
GGAP1S
Response (RU)
Time (Sec)
10.416nM
5.208nM
2.604nM
1.302nM
0.651nM
(C)
GPAP1S
Response (RU)
Time (Sec)
10.416nM
5.208nM
2.604nM
1.302nM
0.651nM
Response (RU)
nM
Response (RU)
nM


(B)
GGAP1L
Response (RU)
Time (Sec)
10.416nM
5.208nM
2.604nM
1.302nM
0.651nM
Response (RU)
nM
(D)
GPAP1L
Response (RU)
Time (Sec)
10.416nM
5.208nM
2.604nM
0.651nM
1.302nM
Response (RU)
nM

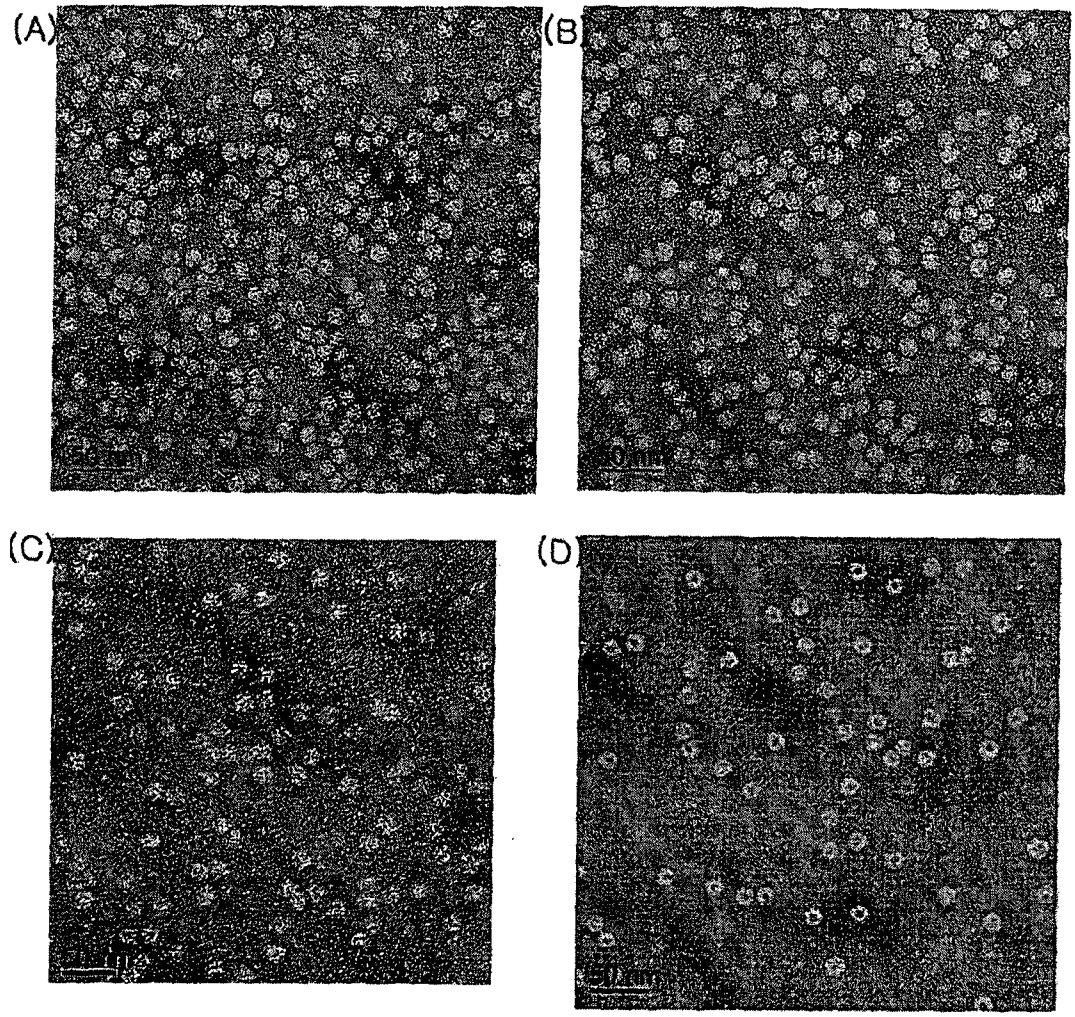
【도 10】


GGAP1S
GGAP1L
GPAP1S
GPAP1L
RU
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
nM

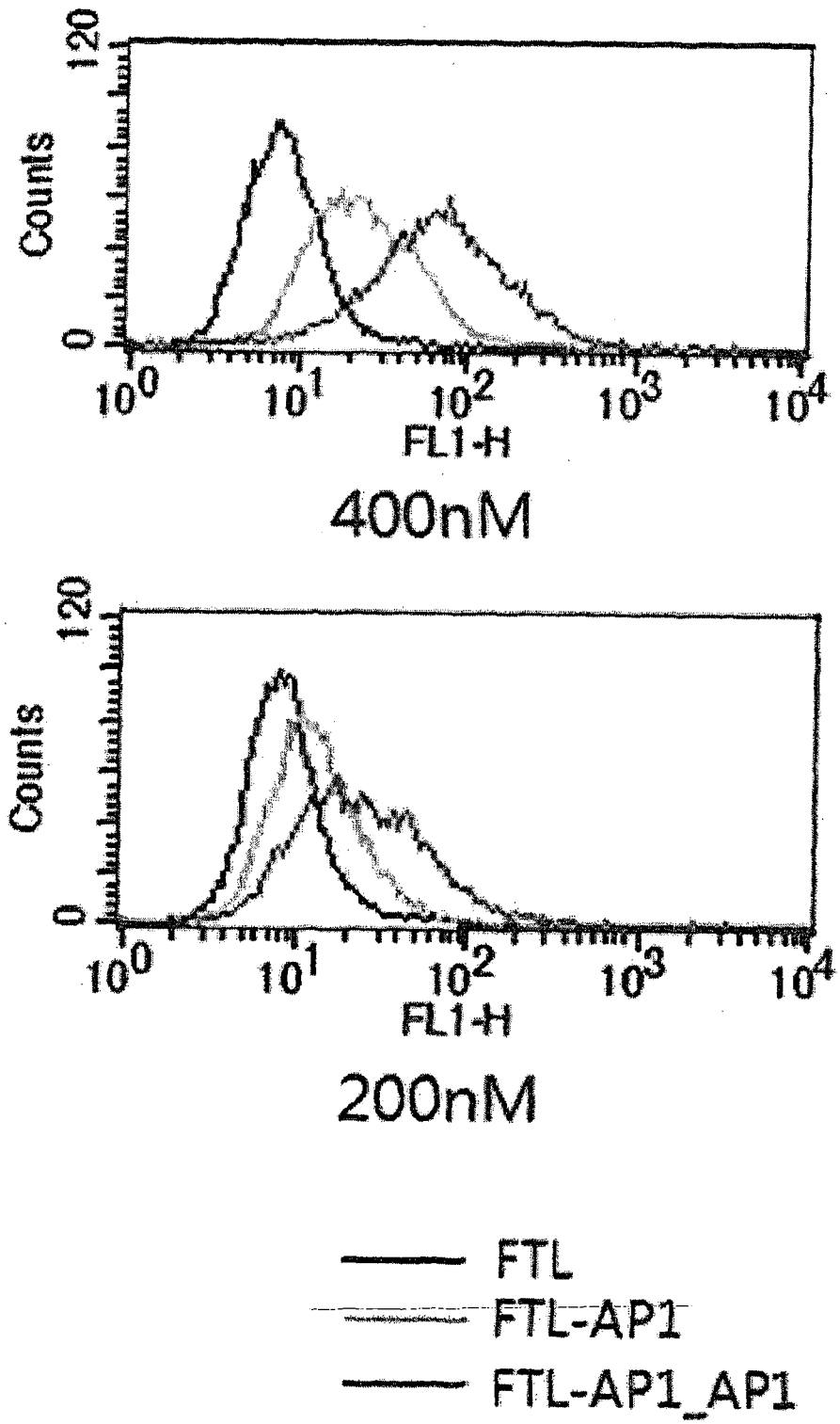
【도 11】



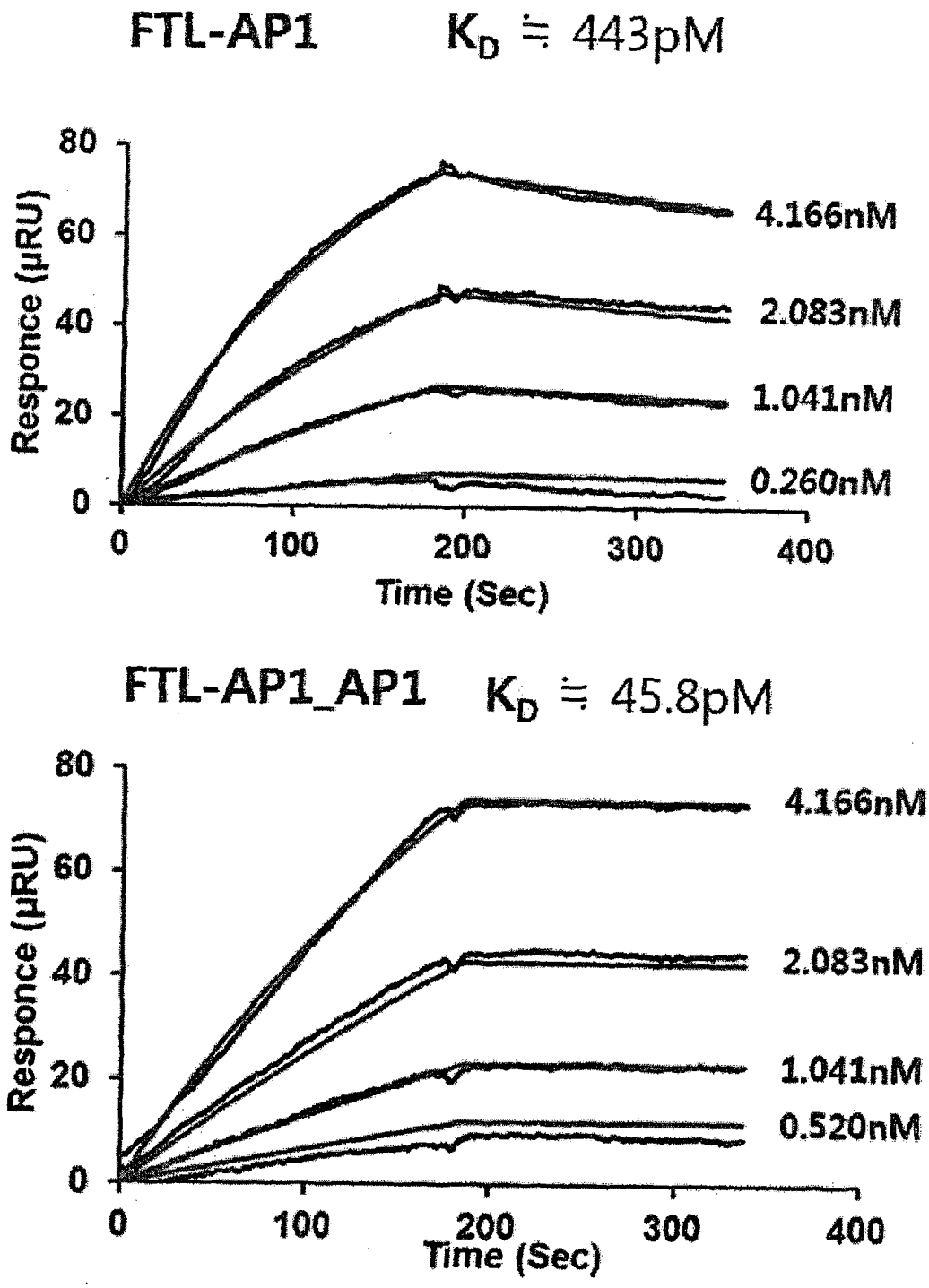
【도 12】



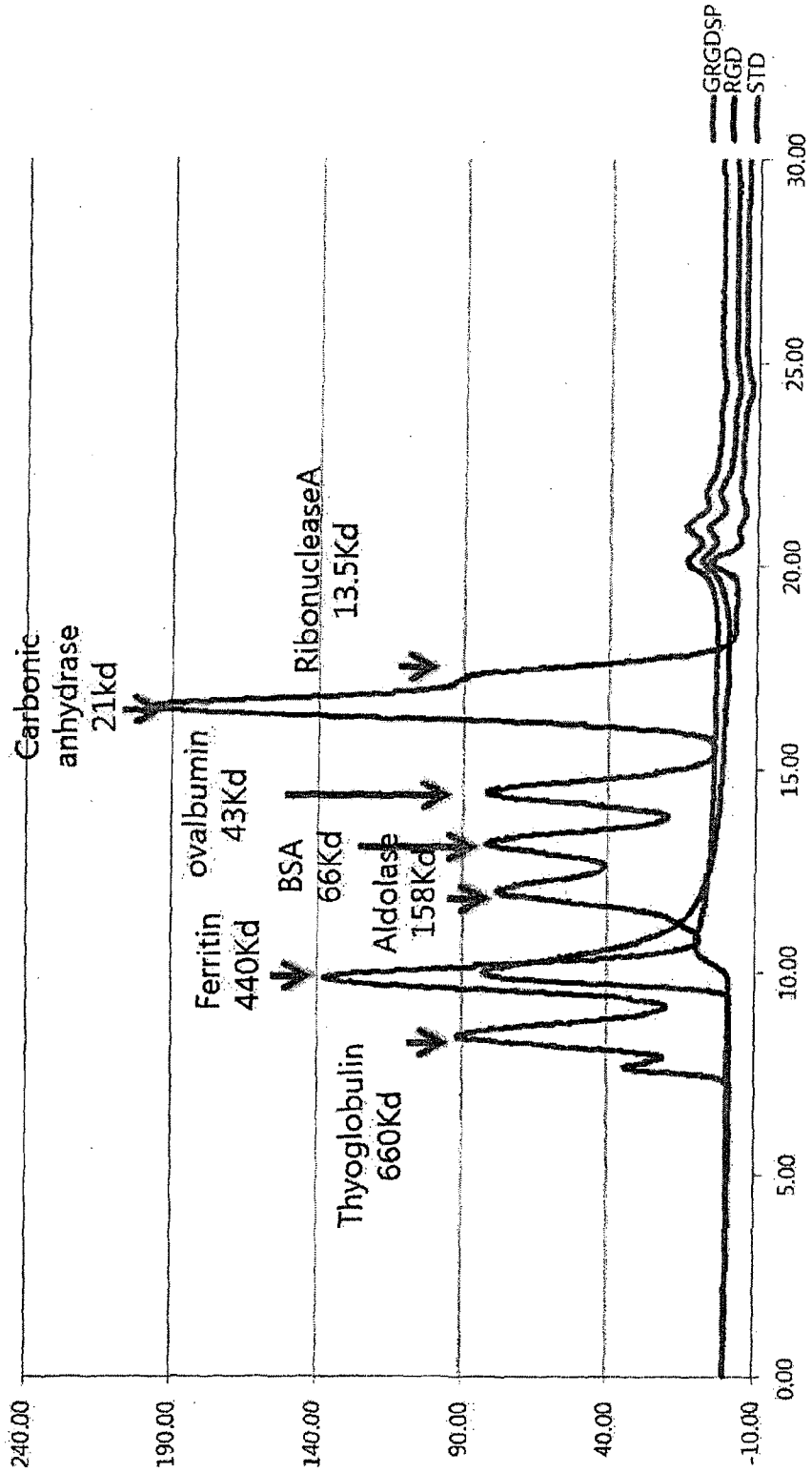
【도 13】


Counts
120
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H
400nM
Counts
120
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H
200nM
FTL
FTL-AP1
FTL-AP1_AP1

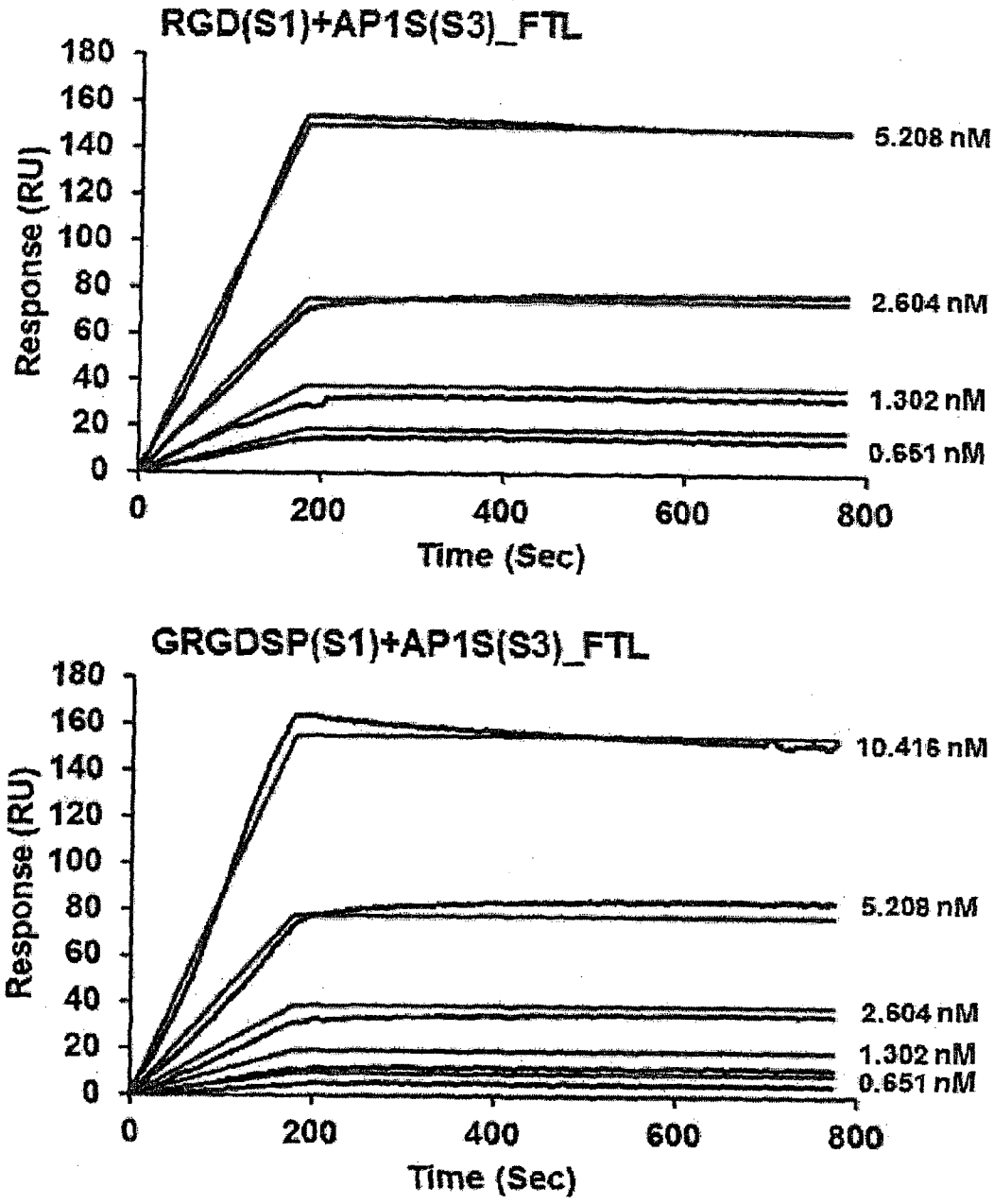
【도 14】


FTL-AP1 K_D ≒ 443pM
Responce (μRU)
Time (Sec)
4.166nM
2.083nM
1.041nM
0.260nM
FTL-AP1_AP1 K_D ≒ 45.8pM
Responce (μRU)
Time (Sec)
4.166nM
2.083nM
1.041nM
0.520nM

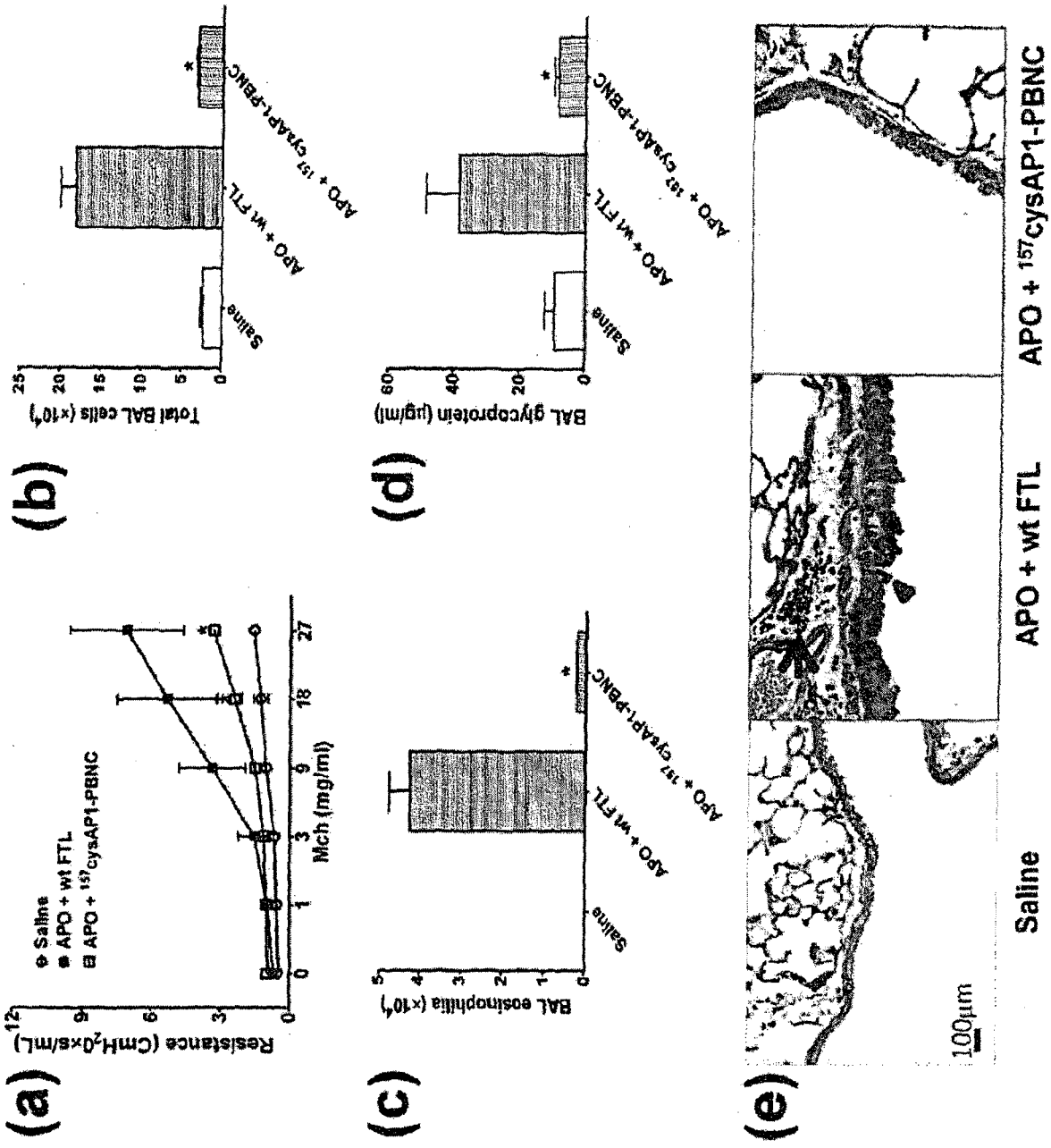
【도 15】


GRGDSP
RGD
STD
Carbonic anhydrase 21kd
RibonucleaseA 13.5Kd
ovalbumin 43Kd
BSA 66Kd
Aldolase 158Kd
Ferritin 440Kd
Thyoglobulin 660Kd
240.00
190.00
140.00
90.00
40.00
-10.00
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00

【도 16】


RGD(S1)+AP1S(S3)_FTL
Response (RU)
Time (Sec)
5.208 nM
2.604 nM
1.302 nM
0.651 nM
GRGDSP(S1)+AP1S(S3)_FTL
Response (RU)
Time (Sec)
10.416 nM
5.208 nM
2.604 nM
1.302 nM
0.651 nM

【도 17】


(a)
Resistance (cmH2O×s/mL)
Mch (mg/ml)
Saline
APO + wt FTL
APO + 157cysAP1-PBNC
(b)
Total BAL cells (×10⁴)
Saline
APO + wt FTL
APO + 157 cysAP1-PBNC
(c)
BAL eosinophilia (×10⁴)
Saline
APO + wt FTL
APO + 157 cysAP1-PBNC
(d)
BAL glycoprotein (μg/ml)
Saline
APO + wt FTL
APO + 157 cysAP1-PBNC
(e)
Saline
APO + wt FTL
APO + 157cysAP1-PBNC
100μm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/001094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, C12N 15/63(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; B82B 3/00; C12N 15/12; C01B 31/02; C07K 14/705; C12N 15/62; C12N 15/63

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: ferritin monomer light chain, fusion protein, drug delivery, target delivery, RKRLDRN, CRKRLDRNC, RGD, GRGDSP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kramer, R. M., Engineered Protein Cages for Nanomaterial Synthesis. J. Am. Chem. Soc. 126(41): 13282-13286(20 October 2004) See figure 1 etc.	1-10,14-20
Y		11-13,21-26,28,29
Y	Hong, H. Y. etc.. Phage display selection of peptides that home to atherosclerotic plaques : IL-4 receptor as a candidate target in atherosclerosis. J. Cell Mol. Med. 12(5B): 2003-2014(October 2008) See abstract etc.	11-13,21-26,28,29
A		1-10,14-20
A	Wu, X. L. etc.. Tumor-targeting peptide conjugated pH-responsive micelles as a potential drug carrier for cancer therapy. Bioconjug. Chem. 21(2): 208-213(17 February 2010) See abstract etc.	1-26,28,29
A	Gollan, T. J. & Green, M. R. Redirecting retroviral tropism by insertion of short, nondisruptive peptide ligands into envelope. J. Virol. 76(7): 3558-3563(April 2002) See abstract etc.	1-26,28,29

☒ 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	Date of mailing of the international search report
19 JUNE 2014 (19.06.2014)	**20 JUNE 2014 (20.06.2014)**
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.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/001094

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hart, S. L. etc.. Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly-Asp-containing peptide. J. Biol. Chem. 269(17): 12468-12474(29 April 1994) See abstract etc.	1-26,28,29
A	KR 10-2012-0118186 A (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 26 October 2012 Claims 1-4	1-26,28,29
A	KR 10-2007-0089236 A (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 30 August 2007 Claims 1-3	1-26,28,29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/001094

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.: 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 27 pertains to a treatment method of the human, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of 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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2014/001094

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0118186 A	26/10/2012	EP 2700649 A2	26/02/2014
		US 2014-0079643 A1	20/03/2014
		WO 2012-144799 A2	26/10/2012
		WO 2012-144799 A3	17/01/2013
KR 10-2007-0089236 A	30/08/2007	CA 2592180 A1	29/06/2006
		CA 2592180 C	09/02/2010
		EP 1840082 A1	03/10/2007
		EP 1840082 B1	18/07/2012
		JP 04-843505 B2	21/12/2011
		US 2010-0029910 A1	04/02/2010
		US 8017729 B2	13/09/2011
		WO 2006-068250 A1	29/06/2006

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/001094

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 19/00; B82B 3/00; C12N 15/12; C01B 31/02; C07K 14/705; C12N 15/62; C12N 15/63

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: ferritin monomer light chain, fusion protein, drug delivery, target delivery, RKRLDRN, CRKRLDRNC, RGD, GRGDSP

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	Kramer, R. M., Engineered Protein Cages for Nanomaterial Synthesis. J. Am. Chem. Soc. 126(41): 13282-13286(2004. 10. 20.) 그림 1 등 참조	1-10,14-20
Y		11-13,21-26,28,29
Y	Hong, H. Y. 등. Phage display selection of peptides that home to atherosclerotic plaques : IL-4 receptor as a candidate target in atherosclerosis. J. Cell Mol. Med. 12(5B): 2003-2014(2008. 10.) 초록 등 참조	11-13,21-26,28,29
A		1-10,14-20
A	Wu, X. L. 등. Tumor-targeting peptide conjugated pH-responsive micelles as a potential drug carrier for cancer therapy. Bioconjug. Chem. 21(2): 208-213(2010. 02. 17.) 초록 등 참조	1-26,28,29
A	Gollan, T. J. & Green, M. R. Redirecting retroviral tropism by insertion of short, nondisruptive peptide ligands into envelope. J. Virol. 76(7): 3558-3563(2002. 04.) 초록 등 참조	1-26,28,29

☒ 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	국제조사보고서 발송일
2014년 06월 19일 (19.06.2014)	2014년 06월 20일 (20.06.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
조경주
전화번호 +82-42-481-3486

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2014/001094

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	Hart, S. L. 등. Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly-Asp-containing peptide. J. Biol. Chem. 269(17): 12468-12474(1994. 04. 29.) 초록 등 참조	1-26,28,29
A	KR 10-2012-0118186 A (경북대학교 산학협력단) 2012. 10. 26. 청구항 1-4	1-26,28,29
A	KR 10-2007-0089236 A (도꾸리쯔교세이호징 가가꾸 기쥬쯔 신꼬 기꼬) 2007. 08. 30. 청구항 1-3	1-26,28,29

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/001094

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: 27
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제27항은 사람을 치료하는 방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당하는 것으로 인정됩니다.

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/KR2014/001094

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0118186 A	2012/10/26	EP 2700649 A2	2014/02/26
		US 2014-0079643 A1	2014/03/20
		WO 2012-144799 A2	2012/10/26
		WO 2012-144799 A3	2013/01/17
KR 10-2007-0089236 A	2007/08/30	CA 2592180 A1	2006/06/29
		CA 2592180 C	2010/02/09
		EP 1840082 A1	2007/10/03
		EP 1840082 B1	2012/07/18
		JP 04-843505 B2	2011/12/21
		US 2010-0029910 A1	2010/02/04
		US 8017729 B2	2011/09/13
		WO 2006-068250 A1	2006/06/29