

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 1 월 16 일 (16.01.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/010971 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 7/08 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 49/04 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/006218
- (22) 국제출원일: 2013 년 7 월 11 일 (11.07.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0075444 2012 년 7 월 11 일 (11.07.2012) KR
10-2012-0104173 2012 년 9 월 19 일 (19.09.2012) KR
10-2012-0109207 2012 년 9 월 28 일 (28.09.2012) KR
10-2013-0017046 2013 년 2 월 18 일 (18.02.2013) KR
10-2013-0043635 2013 년 4 월 19 일 (19.04.2013) KR
- (71) 출원인: 주식회사 카엘젬팩스 (KAEL-GEMVAX CO., LTD.) [KR/KR]; 463-440 경기도 성남시 분당구 운중동 939 젬팩스타워 9 층, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김
- (71) 출원인: 김상재 (KIM, Sang Jae) [KR/KR]; 135-947 서울시 강남구 광평로 10 길 15 상록수아파트 101 동 405 호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김순영 (KIM, Sun-young); 110-727 서울시 중로구 수송동 80-6 석탄회관빌딩 10 층, Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

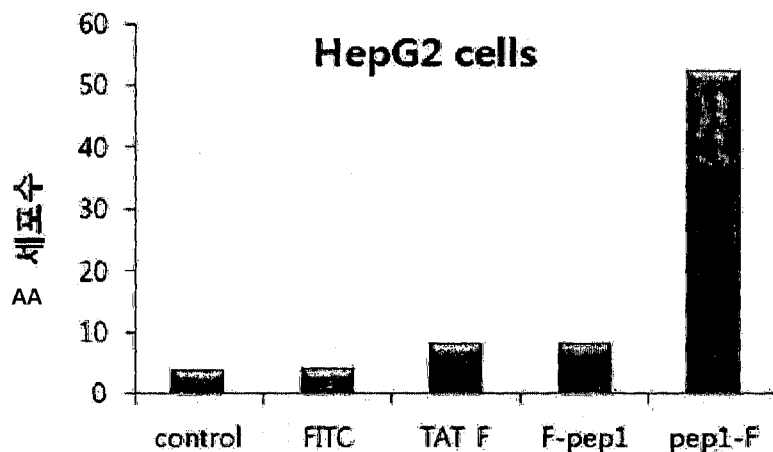
공개:

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

(54) Title: CELL-PENETRATING PEPTIDE, CONJUGATE COMPRISING SAME AND COMPOSITION COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭: 세포 투과성 펩티드, 그를 포함한 컨쥬게이트 및 그를 포함한 조성물

【도 6】



AA ... Number of cells

(57) Abstract: Disclosed are a conjugate of a cell-penetrating peptide and an active ingredient, and a use for same. More particularly, disclosed are: a peptide having the sequence of sequence number 1 constituting a cell-penetrating peptide; and a conjugate comprising a peptide constituting a fragment of the sequence of sequence number 1 or a peptide having a sequence similarity of at least 80% with the peptide sequence; and a composition comprising same.

(57) 요약서: 본 명세서에는 세포 투과성 펩티드 및 유효성분의 컨쥬게이트 (conjugate), 및 그 용도가 개시된다. 특히, 세포 투과성 펩티드로서 서열 번호 1의 서열을 갖는 펩티드, 서열 번호 1 서열의 단편인 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드를 포함하는 컨쥬게이트 및 그것을 포함하는 조성물이 개시된다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

세포 투과성 펩티드, 그를 포함한 컨쥬게이트 및 그를 포함한 조성물

【기술분야】

<1> 본 명세서에는 텔로머라제로부터 유래된 세포 투과성 펩티드, 그 세포 투과성 펩티드와 유효성분과의 컨쥬게이트 및 상기 컨쥬게이트를 포함한 조성물에 관한 것이다.

<2>

【배경기술】

<3> 저분자 물질, 핵산, 단백질 또는 나노입자 등은 분자 수준의 치료 물질로서 큰 잠재력을 가지고 있으나, 조직 침투 및 세포막의 침투 저항성 때문에 사용이 제한 될 수 밖에 없다. 상기 물질들을 세포 내로 이동 시켜 줄수 있는 시스템의 개발은 분자적 방법의 치료에서 화두가 되어 왔다. 저분자 물질, 핵산, 또는 나노입자의 경우, 다양한 시약, 전기천공법(electroporation) 또는 열충격(heatshock) 등의 방법으로 세포 내 수송을 가능케 하였으나, 단백질의 경우, 활성을 그대로 유지하면서 세포 내로 이동하는 것은 매우 어려운 문제로 해결의 실마리를 얻지 못하고 있었다. 그런데, 1980년대에 HIV의 세포막을 투과하는 연구과정에서 특정 11개의 아미노산 서열로 이루어진 HIV-TAT 단백질이 세포 내로의 전달과정에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀져 1990년대부터 본격적으로 단백질의 세포내 전달 연구가 진행되었다.

<4> 텔로미어(telomere)는 염색체의 말단에 반복적으로 존재하는 유전 물질로서, 해당 염색체의 손상이나 다른 염색체와의 결합을 방지한다고 알려져 있다. 세포가 분열할 때마다 텔로미어의 길이는 조금씩 짧아지는데, 일정한 횟수 이상의 세포 분열이 있게 되면 텔로미어는 매우 짧아지고, 그 세포는 분열을 멈추고 죽게 된다. 반면 텔로미어를 길게 하면 세포의 수명이 연장된다고 알려져 있으며, 그 예로 암세포에서는 텔로머라제(telomerase)라는 효소가 분비되어 텔로미어가 짧아지는 것을 막기 때문에, 암세포가 죽지 않고 계속 증식할 수 있다고 알려져 있다.

<5>

【발명의 상세한 설명】**【기술적 과제】**

<6> 본 발명의 일측면은 세포 투과성 펩티드를 제공하고자 한다.

<7> 본 발명의 일측면은 세포 내 유효성분 전달체로서 유용한 펩티드를 제공하고 자 한다.

<8> 본 발명의 다른 측면은 세포 내 유효성분 전달체로서 특히 미토콘드리아로 국소 전달하는 유용한 펩티드를 제공하고자 한다.

<9> 본 발명의 다른 측면은 미토콘드리아 관련 질병 또는 장애의 개선, 예방 또는 치료용 유효성분을 미토콘드리아로 국소 전달하는 유용한 펩티드를 제공하고자 한다.

<10> 본 발명의 일측면은 세포 투과성 펩티드와 유효성분이 접합된 (conjugated) 컨쥬게이트(conjugate)를 제공하고자 한다.

<11> 본 발명의 일측면은 세포 투과성 펩티드와 유효성분의 컨쥬게이트를 포함하는 조성물을 제공하고자 한다.

<12> 본 발명의 일측면은 세포 투과성 펩티드와 유효성분의 컨쥬게이트를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하고자 한다.

<13> 본 발명의 일측면은 세포 투과성 펩티드와 유효성분의 컨쥬게이트를 포함하는 기능성 화장품 조성물을 제공하고자 한다.

<14> 본 발명의 일측면은 세포 투과성 펩티드와 유효성분의 컨쥬게이트를 포함하는 건강식품 조성물을 제공하고자 한다.

<15> 본 발명의 일측면은 세포 투과성 펩티드와 유효성분의 컨쥬게이트를 포함하는 조영제를 제공하고자 한다.

<16>

【기술적 해결방법】

<17> 본 발명의 일측면에 따른 컨쥬게이트는, 세포 투과성 운반 펩티드 (carrier peptide) 및 유효성분의 컨쥬게이트(conjugate)로서, 상기 운반 펩티드는, 서열번호 1을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드, 또는 그것의 단편이며, 상기 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 세포 투과성을 보유한 것인 컨쥬게이트이다.

<18> 본 발명의 다른 측면에 따른 컨쥬게이트에서, 상기 단편은 3개 이상의 아미노산으로 구성된 단편일 수 있다.

<19> 본 발명의 다른 측면에 따른 컨쥬게이트에서, 상기 운반 펩티드는, 30개 이하의 아미노산으로 구성된 펩티드일 수 있다.

<20> 본 발명의 다른 측면에 따른 컨쥬게이트에서, 상기 운반 펩티드는, 서열번호 1의 서열을 갖는 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을

갖는 펩티드일 수 있다.

<21> 본 발명의 일 측면에 따른 조영제는, 상기에서 언급된 어느 한 컨쥬게이트를 포함하는 조영제일 수 있다.

<22> 본 발명의 다른 측면에 따른 조영제에 있어서, 상기 조영물질은 세포를 조영하기 위한 것일 수 있다.

<23> 본 발명의 다른 측면에 따른 조영제에 있어서, 상기 세포는 줄기세포일 수 있다.

<24> 본 발명의 한 측면에 따른 조성물은, 상기에서 언급된 어느 한 컨쥬게이트를 포함할 수 있다.

<25> 본 발명의 다른 측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 질병의 치료 또는 예방을 위한 유효성분이며, 상기 조성물은 의약 조성물일 수 있다.

<26> 본 발명의 다른 측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 기능성 화장품의 유효성분이며, 상기 조성물은 화장품 조성물일 수 있다.

<27> 본 발명의 다른 측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 기능성 건강식품의 유효성분이며, 상기 조성물은 건강식품 조성물일 수 있다.

<28> 본 발명의 한 측면에 따른 세포질 타겟팅 유효성분 전달 시스템은, 상기에서 언급된 어느 한 컨쥬게이트(conjugate)를 포함하며, 운반 펩티드는, 세포질 내로 국소적으로 이동하는 펩티드로서 상기 유효성분의 세포질 국소 전달을 수행하는 펩티드이며, 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 세포질 타겟팅능을 보유한 것인, 세포질 타겟팅 유효성분 전달 시스템일 수 있다.

<29> 본 발명의 한 측면에 따른 미토콘드리아 타겟팅 유효성분 전달 시스템은, 상기에서 언급된 어느 한 컨쥬게이트(conjugate)를 포함하며, 운반 펩티드는, 세포 내 미토콘드리아로 국소적으로 이동하는 펩티드로서 상기 유효성분의 미토콘드리아 국소 전달을 수행하는 펩티드이며, 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 미토콘드리아 타겟팅능을 보유한 것인, 미토콘드리아 타겟팅 유효성분 전달 시스템일 수 있다.

<30> 본 발명의 일 측면에 따른 미토콘드리아 활성 조절용 조성물은, 상기에서 언급된 컨쥬게이트 중 어느 한 컨쥬게이트(conjugate)를 포함하며, 운반 펩티드는, 세포 내 미토콘드리아로 국소적으로 이동하는 펩티드로서 상기 유효성분의 미토콘드리아 국소 전달을 수행하는 펩티드이며, 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 미토콘드리아 타겟팅능을 보유한 것인, 미토콘드리아 활성 조절용 조성물일 수 있다.

<31> 본 발명의 다른 측면에 따른 미토콘드리아 활성 조절용 조성물에 있어서, 상기 조성물은 미토콘드리아 관련 질병 또는 장애의 치료, 예방, 진행의 억제, 또는 증상 완화용 약제학적 조성물이며, 상기 유효성분은 미토콘드리아 관련 질병 또는 장애의 치료, 예방, 진행의 억제, 또는 증상 완화 기능을 나타내는 성분일 수 있다.

<32> 본 발명의 일 측면에 따른 방법은, 유효성분을 세포 내로 전달하기 위한 방법으로서, 상기 언급된 컨쥬게이트들 중 어느 한 컨쥬게이트(conjugate)를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 운반 펩티드는 세포 투과성 펩티드로서 상기 유효성분의 세포 내 전달을 수행하는 펩티드이며, 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 세포 투과성을 보유한 것일 수 있다.

<33> 본 발명의 다른 측면에 따른, 유효성분을 세포 내로 전달하기 위한 방법 방법은 유효성분을 세포 내 미토콘드리아로 국소 전달하는 것일 수 있다.

<34> 본 발명의 일 측면에 따른 세포 투과성 펩티드는, 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 서열번호 1의 단편인 펩티드이며, 서열번호 1의 단편인 펩티드는 3개 내지 7개의 아미노산으로 구성된 펩티드일 수 있다.

<35> 상기 펩티드는, 서열번호 1을 포함하는 17 aa 이상의 펩티드로 구성된 세포 투과성 펩티드일 수 있다.

<36> 본 발명의 일 측면에 따른 폴리뉴클레오티드는, 상기 언급된 세포 투과성 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

<37> 본 발명의 일 측면에 따른 벡터는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터일 수 있다.

<38> 본 발명의 일 측면에 따른 형질전환세포는, 상기 벡터를 포함하는 형질전환 세포일 수 있다.

<39>

【유리한 효과】

<40> 본 명세서에 개시된 펩티드, 또는 상기 펩티드와 유효성분이 결합된 컨쥬게이트를 이용하면, 세포 내로 투과되기 어려운 유효성분들을 용이하게 세포 내로 전달할 수 있다. 이를 통해 유효성분의 효능을 높일 수 있고, 그 결과 투여량을 낮출 수 있으므로, 약물 투여에 따른 부작용을 최소화하고 치료 효율을 높일 수 있다. 특히, 미토콘드리아로 국소 전달함으로써 미토콘드리아 관련 질병 또는 장애의 개선, 예방 또는 치료 효능을 높일 수 있다. 화장품의 경우에도 극소량의 유효성분만

으로도 뛰어난 효과를 낼 수 있다. 조영물질과의 컨쥬게이트를 이용하면 세포치료에서의 세포 이식 과정 또는 이식된 세포를 모니터링하기 위한 조영제로 활용될 수 있다. 특히, 생체 내에 주입된 줄기세포를 위한 조영제로서 효과적으로 이용될 수 있다

<41>

【도면의 간단한 설명】

<42>

도 1은 서열번호 1(pep1)의 펩티드와 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)의 컨쥬게이트 생산을 위한 프라이머 서열을 도식화한 것이다.

<43>

도 2는 서열번호 1의 펩티드와 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)의 컨쥬게이트 생산을 위한 벡터를 도식화한 것이다.

<44>

도 3은 CHO 세포주에 FITC(CHO-F, 대조군, 파랑색 선), TAT에 FITC에 접합시킨 CHO-TAT-F(연두색 선), pep1의 N-말단에 FITC를 접합시킨 CHO-F-pep-1(하늘색 선) 및 pep1의 C-말단 리신(lysine)에 FITC를 접합시킨 CHO-pep1-F(분홍색 선)를 처리하여 1시간동안 배양하고, 유세포 분석기(FACS)를 이용하여, cellular uptake 양상을 분석한 결과이다. 빨강색 선은 CHO 세포주를 그대로 분석한 것으로 배경(background) 값에 해당한다.

<45>

도 4는 HepG2 세포주에 FITC(HepG2-F, 대조군, 파랑색 선), TAT에 FITC에 접합시킨 HepG2-TAT-F(연두색 선), pep1의 N-말단에 FITC를 접합시킨 HepG2-F-pep1(주황색 선) 및 pep1의 C-말단 리신(lysine)에 FITC를 접합시킨 HepG2-pep1-F(하늘색 선)를 처리하여 1시간동안 배양하고, 유세포 분석기(FACS)를 이용하여, cellular uptake 양상을 분석한 결과이다. 빨강색 선은 HepG2 세포주를 그대로 분석한 것으로 배경(background) 값에 해당한다.

<46>

도 5는 CHO 세포에서 FITC, TAT에 FITC에 접합시킨 TAT-F, pep1의 N-말단에 FITC를 접합시킨 F-pep1 및 pep1의 C-말단 리신(lysine)에 FITC를 접합시킨 pep1-F를 처리하여 1시간동안 배양하고, 유세포 분석기(FACS로 분석 결과 세포 uptake 된 세포의 수를 나타낸 도면이다. (대조군(control)은 CHO 세포주 배경(background) 값에 해당한다.)

<47>

도 6은 HepG2 세포에서 FITC, TAT에 FITC에 접합시킨 TAT-F, pep1의 N-말단에 FITC를 접합시킨 F-pep1 및 pep1의 C-말단 리신(lysine)에 FITC를 접합시킨 pep1-F를 처리하여 1시간동안 배양하고, 유세포 분석기(FACS로 분석 결과 세포 uptake 된 세포의 수를 나타낸 도면이다. (대조군(control)은 HepG2 세포주 배경(background) 값에 해당한다.)

- <48> 도 7 은 서열번호 1 의 펩티드에 FITC를 결합시킨 후 각각 HeLa 세포주에 처리하고 유세포 분석기(FACS로 분석 결과 세포 uptake 된 세포의 수를 나타낸 도면이다. 대조군은 FITC만을 처리한 것이다.
- <49> 도 8은 서열번호 1의 펩티드에 FITC를 결합시킨 후 각각 HeLa 세포주에 처리하고 배양한 후 세포생존율과 독성을 측정한 결과이다.
- <50> 도 9, 도 10은 pep1의 Huh7 세포주에서의 유세포 분석을 통한 세포침투능 분석결과이다.
- <51> 도 11, 도 12는 pep1의 사람 T 림프구 세포주에서의 유세포 분석을 통한 세포 침투능 분석결과이다.
- <52> 도 13 및 도 14는 PEP1의 FITC 합성 위치에 따른 유세포분석과 공초점 현미경 분석을 통한 세포침투능 분석 결과이다.
- <53> 도 15, 도 16은 MCF7, Huh7, HepG2 세포주에서 TAT 펩티드와 PEP1의 세포 내 흡수 양상이 다름을 보여 주기 위해 공초점 현미경 분석을 실시한 결과이다.
- <54> 도 17은 MCF7, Huh7, HepG2 세포주에서 TAT 펩티드와 PEP1의 세포 내 Pearson's Coeff.의 평균의 분산을 나타낸 그래프이다.
- <55> 도 18 내지 도 23은 Huh7, bmDC(마우스 골지 유래 수지상 세포주), CHO, COS7 세포주에서의 PEP1 농도에 따른 분석결과이고, 도 24 내지 도 26은 시간에 따른 분석결과이다.
- <56> 도 27 내지 도 31은 부유 세포주로서 사람 T 세포주인 Jurkat, 사람 단핵구 세포주인 THP1, B 세포주인 Raji 세포주, 사람 백혈병 세포주인 K562 세포주를 이용하여 pep1의 농도, 온도, 시간에 따라 처리하여 유세포 분석과 공초점 현미경 분석으로 세포 침투능을 분석한 결과이다.
- <57> 도 32 내지 도 34은 사람 PBMC 에서 pep 1의 농도, 온도, 시간에 따른 유세포 분석결과이다.
- <58> 도35 내지 도 36은 사람 PBMC 와 Jurkat 에서의 화학 처리제에 따른 유세포 분석을 실시한 결과이다.
- <59> 도 37은 여러 가지 항체에 의한 pep1의 세포침투능 비교 분석을 하기 위해서 HSP70, enolase, GAPDH (santacruz), HSP90 항체를 처리한 후 유세포 분석을 실시한 결과이다.
- <60> 도 38은 페로센카복실릭-pep1(Ferrocenecarboxylic-pep1)을 신경줄기세포에 처리한 후 시간 경과에 따른 상태를 측정한 사진이다.
- <61> 도 39는 페로센카복실릭-pep1(Ferrocenecarboxylic-pep1)을 신경줄기세포에

처리한 후 DAPI로 세포 핵을 염색한 다음 공초점 레이저 스캐닝 시스템(Confocal laser scanning system)으로 신경줄기세포 투과 상태를 측정한 사진이다.

<62> 도 40은 페로센카복실릭-pep1(Ferrocenecarboxylic-pep1) 자체의 독성실험 결과로서 셀 카운팅 키트-8(cell counting kit-8, CCK-8) 어세이 및 락테이트 디하이드로지네이즈(lactate dehydrogenase, LDH) 활성 어세이를 이용하여 각각 세포 생존율과 세포독성률의 변화를 나타낸다.

<63> 도 41은 페로센카복실릭-pep1(Ferrocenecarboxylic-pep1)을 처리한 신경줄기세포를 이식한 군(Stem cells with Ferrocenecarboxylic-pep1 군)의 뇌를 MRI 촬영한 사진이고, 도 42는 페로센카복실릭-pep1을 처리하지 않은 신경줄기세포를 이식한 군(Stem cells without Ferrocenecarboxylic-pep1 군)의 뇌를 MRI 촬영한 사진이며, 도 43은 페로센카복실릭-pep1을 이식한 군(Ferrocenecarboxylic-pep1 군)의 뇌를 MRI 촬영한 사진이고, 도 44는 생리 식염수를 이식한 군(Saline 군)의 뇌를 MRI 촬영한 사진이다.

<64> 도 45는 서열번호 1의 펩티드와 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)의 컨쥬게이트를 제조하기 위한 pET28a(+) 벡터(Promega)를 나타낸 것이다.

<65> 도 46은 pET-28a vector 모식도를 나타낸 것이고, 도 47은 클로닝 모식도이다.

<66> 도 48은 pET-GFP의 클로닝을 통한 over expression 과정을 도시한 것이다.

<67> 도 49는 IPTG induction의 원리를 도시한 것이다.

<68> 도 50은 다양한 세포주에서 pep 1이 결합된 GFP 단백질의 세포 침투 능력을 형광현미경으로 분석한 결과이다.

<69> 도 51은 여러가지 세포주에서 pep1이 결합된 GFP 단백질의 변화에 따른 유세포 분석 결과를 나타낸 것이다.

<70> 도 52는 DNA (poly-lysine)-CPP 컨쥬게이트 제조에서 사용된 펩티드의 1차 구조이고, 도 53은 상기 펩티드의 모식도이다.

<71> 도 54는 펩티드와 결합된 DNA의 mobility를 나타낸 것이다.

<72> 도 55는 여러가지 세포주에서 poly-lysine 이 결합된 pep1에 의한 DNA의 세포 침투능을 분석한 결과이다.

<73> 도 56은 Poly-lysine-pep1-FITC 가 결합된 siRNA 의 세포 내 수송 능력을 분석한 결과이다.

<74> 도 57은 Huh7 세포주에서의 pep1 luciferase siRNA 활성 분석 결과이다.

<75> 도 58은 CHO 세포주에서의 pep1 luciferase siRNA 활성 분석 결과이다.

<76> 도 59는 pep1-FITC 컨쥬게이트와 미토콘드리아 국소화 마커인 mitotracker[®] deep red FM 644/665nm(Invitrogen)로 염색한 결과로 (A) MCF-7 세포에 pep1-GFP 컨쥬게이트를 단독 처리, (B) 미토콘드리아 국소화 마커인 mitotracker deep red FM 644/665nm(Invitrogen) 단독 처리, (C) 세포의 위상차대비 (Phase contrast), (D) A와 B의 이미지의 결합 이미지이다.

<77> 도 60는 pep1-GFP 컨쥬게이트를 인간의 유방암 유래의 MCF7(Human breast adenocarcinoma) 부착 세포주에 처리한 후 미토콘드리아의 hsp70 항체로 웨스턴 블랏을 수행한 결과이다.

<78> 도 61은 pep1-GFP의 HepG2 세포주에의 uptake를 나타내는 사진이다.

<79>

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

<80> 본 발명의 바람직한 구체예들은 다음과 같다:

<81> 1. 세포 투과성 운반 펩티드 (carrier peptide) 및 유효성분의 컨쥬게이트(conjugate)로서, 상기 운반 펩티드는, 서열번호 1을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드, 또는 그것의 단편이며, 상기 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 세포 투과성을 보유한 것인 컨쥬게이트.

<82> 2. 제 1 항에 있어서, 상기 단편은 3개 이상의 아미노산으로 구성된 단편인 컨쥬게이트.

<83> 3. 제 1 항에 있어서, 상기 운반 펩티드는, 30개 이하의 아미노산으로 구성된 컨쥬게이트.

<84> 4. 제 1 항에 있어서, 상기 운반 펩티드는, 서열 번호 1의 서열을 갖는 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드인 컨쥬게이트.

<85> 5. 제 1 항에 있어서, 상기 유효성분은, 단백질, 핵산, 펩티드, 지질, 당지질, 미네랄, 당, 나노 입자, 생물학적 제제, 조영물질, 약물(drugs) 및 화학 물질(compounds) 중 선택된 하나 이상인 컨쥬게이트.

<86> 6. 제 5 항에 있어서, 상기 유효성분은 DNA 또는 RNA인 컨쥬게이트.

<87> 7. 제1항에 있어서, 상기 운반 펩티드와 유효성분은 공유결합에 의해, 선택적으로 링커에 의해 매개됨으로써, 접합된 것인 컨쥬게이트.

<88> 8. 제1항에 있어서, 상기 운반 펩티드와 유효성분은 비공유결합에 의해 접합된 것인 컨쥬게이트.

- <89> 9. 제5항에 있어서, 상기 유효성분은 단백질 또는 펩티드인 컨쥬게이트.
- <90> 10. 제9항에 있어서, 상기 유효성분은, 사이토카인, 항체, 항체 단편, 치료 용 효소, 가용성 수용체, 또는 리간드인, 컨쥬게이트.
- <91> 11. 제 1 항에 있어서, 상기 운반 펩티드는 플루오레세인 이소티오시아네이트 (fluorescein isothiocyanate)와 결합한 것인 컨쥬게이트.
- <92> 12. 제 1 항에 있어서, 상기 운반 펩티드는 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)과 결합한 것인 컨쥬게이트.
- <93> 13. 제 1 항에 있어서, 상기 유효성분은 상기 운반 펩티드의 C-말단에 결합한 것인 컨쥬게이트.
- <94> 14. 제 1 항에 있어서, 상기 유효성분은 그것의 효능 타겟이 암세포, 면역세포 또는 섬유아세포인 컨쥬게이트.
- <95> 15. 제 14 항에 있어서, 상기 암세포는 간암 세포, 유방암 세포 및 백혈병 세포로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 암세포이며, 상기 면역세포는 T 림프구, B 세포 및 단핵구로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 면역세포인, 컨쥬게이트.
- <96> 16. 제 1 항에 있어서, 상기 유효성분은 세포질로 국소화될 필요가 있는 것이며, 상기 운반 펩티드는 상기 유효성분의 세포질로의 국소 전달을 수행하는 것인, 컨쥬게이트.
- <97> 17. 제 16 항에 있어서, 상기 유효성분은 미토콘드리아로 국소화될 필요가 있는 것이며, 상기 운반 펩티드는 상기 유효성분의 미토콘드리아로의 국소 전달을 수행하는 것인, 컨쥬게이트.
- <98> 18. 제5항에 있어서, 상기 조영물질은 방사선 비투과성 조영물질(radiopaque contrast agent), 상자성(paramagnetic) 조영물질, 초상자성(superparamagnetic) 조영물질, 및 CT 조영물질로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 컨쥬게이트.
- <99> 19. 제5항에 있어서, 상기 조영물질은 철-기반 물질인 컨쥬게이트.
- <100> 20. 제19항에 있어서, 상기 조영물질은 페로센 카복실레이트인 컨쥬게이트.
- <101> 21. 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 컨쥬게이트를 포함하는 조영제.
- <102> 22. 제21항에 있어서, 상기 조영제는 세포를 조영하기 위한 것인 조영제.
- <103> 23. 제22항에 있어서, 상기 세포는 줄기세포인 조영제.
- <104> 24. 유효성분으로서, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 컨쥬게이트를 포함하는 조성물.

- <105> 25. 제 24항에 있어서, 상기 유효성분은 질병의 치료 또는 예방을 위한 유효 성분이며, 상기 조성물은 약학 조성물인 조성물.
- <106> 26. 제 24 항에 있어서, 상기 유효성분은 기능성 화장료의 유효성분이며, 상기 조성물은 화장료 조성물인 조성물.
- <107> 27. 제 24항에 있어서, 상기 유효성분은 기능성 건강식품의 유효성분이며, 상기 조성물은 건강식품 조성물인 조성물.
- <108> 28. 세포질 타겟팅 유효성분 전달 시스템으로서, 상기 유효성분 전달 시스템은 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 컨쥬게이트(conjugate)를 포함하며, 운반 펩티드는, 세포질로 국소적으로 이동하는 펩티드로서, 상기 유효성분의 세포질 국소 전달을 수행하는 펩티드이며, 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 세포질 타겟팅능을 보유한 것인, 세포질 타겟팅 유효성분 전달 시스템.
- <109> 29. 미토콘드리아 타겟팅 유효성분 전달 시스템으로서, 상기 유효성분 전달 시스템은 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 컨쥬게이트(conjugate)를 포함하며, 운반 펩티드는, 세포 내 미토콘드리아로 국소적으로 이동하는 펩티드로서, 상기 유효성분의 미토콘드리아 국소 전달을 수행하는 펩티드이며, 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 미토콘드리아 타겟팅능을 보유한 것인, 미토콘드리아 타겟팅 유효성분 전달 시스템.
- <110> 30. 미토콘드리아 활성 조절용 조성물로서, 상기 조성물은, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 컨쥬게이트(conjugate)를 포함하며, 운반 펩티드는, 세포 내 미토콘드리아로 국소적으로 이동하는 펩티드로서, 상기 유효성분의 미토콘드리아 국소 전달을 수행하는 펩티드이며, 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 미토콘드리아 타겟팅능을 보유한 것인, 미토콘드리아 활성 조절용 조성물.
- <111> 31. 제30항에 있어서, 상기 조성물은 미토콘드리아 관련 질병 또는 장애의 치료, 예방, 진행의 억제, 또는 증상 완화용 약제학적 조성물이며, 상기 유효성분은 미토콘드리아 관련 질병 또는 장애의 치료, 예방, 진행의 억제, 또는 증상 완화 기능을 나타내는 성분인, 미토콘드리아 활성 조절용 조성물.
- <112> 32. 유효성분을 세포 내로 전달하기 위한 방법으로서, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 컨쥬게이트(conjugate)를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 운반 펩티드는, 세포 투과성 펩티드로서, 상기 유효성분의 세포 내 전달을 수행하는 펩티드이며, 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서

열번호 1 펩티드의 세포 투과성을 보유한 것인, 유효성분의 세포 내 전달 방법.

<113> 33. 제 32항에 있어서, 상기 방법은 유효성분을 세포 내 미토콘드리아로 국소 전달하는 것인, 유효성분의 세포 내 전달 방법.

<114> 34. 세포 투과성 펩티드로서, 상기 펩티드는, 서열번호 1을 포함하는 17 aa 이상의 펩티드로 구성된 세포 투과성 펩티드.

<115> 35. 세포 투과성 펩티드로서, 상기 펩티드는 서열번호 1의 단편인 펩티드이며, 3개 내지 7개의 아미노산으로 구성된 것인 세포 투과성 펩티드.

<116> 36. 제34항 또는 제35항에 따른 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

<117> 37. 제36항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

<118> 38. 제37항에 따른 벡터를 포함하는 형질전환세포.

<119>

<120> 단백질, 핵산, 펩티드 또는 바이러스 등은 치료 물질로서 큰 잠재력을 가지고 있으나, 분자 수준의 크기를 가지므로 조직 및 세포막을 침투하지 못해 그 사용이 매우 제한적이었다. 또한 크기가 작은 물질이라 하더라도, 그 성질이나 구조상 세포막의 지질 이중층을 투과하지 못 하는 경우가 많다. 이에, 전기천공법(electroporation) 또는 열 충격(heatshock) 등으로, 단백질, 핵산, 펩티드 또는 바이러스 등을 세포 내로 이동시키려는 시도가 있었으나, 세포막에 손상을 주지 않음과 동시에 상기 물질들의 활성을 그대로 유지하면서 상기 물질들을 세포 내로 이동시키기는 곤란하였다. 그러던 중 인간 면역 결핍 바이러스(Human Immuno-deficiency Virus: HIV)로부터 유래된 TAT(Trans-Activating Transcriptional activator) 단백질이 거대 활성 물질들을 세포 내로 이동시킬 수 있는 세포 투과성 펩티드(Cell Penetrating Peptide)로 작용할 수 있음이 알려지면서, 이에 대한 연구가 활발히 진행되었다. 구체적으로 세포 내 독성을 야기한다고 알려진 TAT 단백질과는 달리 생체 내 독성을 야기하지 않으면서도, 더욱 효과적으로 단백질, 핵산, 펩티드 또는 바이러스 등과 같은 거대 분자를 표적 세포 내로 이동시킬 수 있는 물질에 대한 연구가 진행되었다. 이에 본 발명자들은 지속적인 연구를 통해, 텔로머라제로부터 유래된 펩티드가 세포 독성이 거의 없으면서도 세포 투과성 펩티드로서 우수한 효과를 가짐을 발견하였다.

<121> 서열번호 1 에 기재된 펩티드는 아래 표 1과 같다. 서열번호 2는 인간의 텔로머라제 전장 단백질의 서열이다. 서열번호 1 은 텔로머라제로부터 유래된 펩티드로서 16개 아미노산으로 구성된 펩티드이다. 아래 표 1의 "이름"은 펩티드를 구별하기 위해 명명한 것이다. 본 발명의 다른 일측면에서, 서열 번호 1에 기재된 펩티

드 중 하나 이상의 펩티드는 텔로머라제에 포함된 펩티드 중 해당 위치의 펩티드를 선별해 합성한 "합성 펩티드"를 포함한다. 본 명세서에서 "pep"이라 함은 서열번호 1의 서열을 갖는 펩티드, 또는 그 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드, 또는 상기 서열의 단편을 총칭하는 용어이다.

<122>

<123>

[표 1]

서열 번호	이름	텔로머라제 상 위치	서열	길이
1.	pep1	[611-626]	EARPALLTSRLRFIPK	16 aa
2.	Telomerase	[1-1132]	MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRR LGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSF RQVSKLKLVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPP EAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLL ARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPR RRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLP KRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPA RPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPW DTPCPPVYAETKHFYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGAR RLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGN HAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQGSVAAPPEE EDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSR HNERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTW KMSVRDCAWLRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSV YVVELLRSEFFVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQH LKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI VNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVNLNERARRPG LLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTG AYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVR KAFKSHVSTLTDLPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSS LNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIQGSILS TLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDG LLLRLVDDFLVTPHLTH AKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFVEDEALGGTAPV QMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFN RGFKAGRNMRRKLFGLRLKCHSLFLDLQ VNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTF FLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQW LCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLPGTTLT ALEAAANPALPSDFKTILD	1132 aa

<124>

<125>

<126> 펩티드의 생물학적 특성에 있어서의 실재적인 변형은 (a) 치환 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들면 시트 또는 나선 입체 구조를 유지하는데 있어서의 이들의 효과, (b) 표적 부위에서의 상기 분자의 전하 또는 소수성을 유지하는데 있어서의 이들의 효과, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는데 있어서의 이들의 효과가 상당히 상이한 치환부를 선택함으로써 수행된다. 천연 잔기는 통상의 측쇄 특성에 기준하여 다음 그룹으로 구분된다:

<127> (1) 소수성: 노르루이신, met, ala, val, leu, ile;

<128> (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

<129> (3) 산성: asp, glu;

<130> (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

<131> (5) 측쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

<132> (6) 방향족: trp, tyr, phe.

<133> 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또다른 부류로 교환함으로써 이루어질 것이다. 펩티드의 적당한 입체 구조를 유지하는 것과 관련이 없는 어떠한 시스테인 잔기도 일반적으로 세린으로 치환되어 상기 분자의 산화적 안정성을 향상시키고 이상한 가교결합을 방지할 수 있다. 역으로 말하면, 시스테인 결합(들)을 상기 펩티드에 가하여 그의 안정성을 향상시킬 수 있다

<134> 펩티드의 다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 글리코실화 패턴이 변화된 것이다. 변화란 의미는 펩티드에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 잔기의 결실 및(또는) 펩티드 내에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 부가를 나타낸다.

<135> 펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된 것이다. N-연결된이란 탄수화물 잔기가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 말한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 잔기를 아스파라긴 측쇄에 효소적 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이들 트리펩티드 서열 중의 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써, 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸 갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중의 하나를 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 의미하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신을 사용할 수도 있다.

<136> 펩티드로의 글리코실화 부위의 부가는 하나 이상의 상기 언급된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변화시킴으로써 편리하게 수행된다 (N-연결된

글리코실화 부위의 경우). 이러한 변화는 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 최초 항체의 서열에 부가하거나 이들 잔기로 치환함으로써 이루어질 수도 있다 (0-연결된 글리코실화 부위의 경우).

<137>

본 발명의 일측면은 세포 투과성 펩티드로서 서열번호 1, 또는 그 단편들인 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드를 제공한다. 본 발명의 일측면은 하나 이상의 유효성분을 전달하기 위한 약물 전달체로서 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 서열번호 1을 포함하는 펩티드, 또는 그의 단편들인 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드는 안전하면서도 우수한 세포 투과성 펩티드로 작용할 수 있으므로, 약물과 결합하여 약물을 세포 내로 효과적으로 전달할 수 있다.

<138>

본 발명의 일측면은 서열번호 1을 포함하는 펩티드, 또는 그의 단편들인 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드와 이동 대상인 유효성분이 서로 컨쥬게이션된 컨쥬게이트를 제공한다. 본 발명의 일측면에서, 유효성분은 단백질, 핵산, 펩티드, 지질, 당지질, 미네랄, 당, 조영물질, 약물(drugs) 및 화학 물질(compounds) 중 선택된 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 일측면에서, 상기 유효성분은 펩티드일 수 있다. 본 발명의 일측면에서, 상기 유효성분인 펩티드는, 사이토카인, 항체, 항체 단편, 치료용 효소, 가용성 수용체, 또는 리간드일 수 있다.

<139>

본 명세서에서, "세포 투과성 펩티드(Cell Penetrating Peptide, CPP)"는 인 비트로(*in vitro*) 및/또는 인비보(*in vivo*)에서 이동 대상(cargo)을 세포 내로 이동시킬 수 있는 펩티드를 의미한다. 본 명세서에서, "이동 대상(cargo)"은 세포 투과성 펩티드와 결합하여 세포 내로 이동할 수 있는 물질을 모두 포함하며, 예를 들어 세포 투과 효율을 높이길 원하는 모든 물질, 구체적으로 약물, 화장품 또는 건강 식품의 유효 물질, 더 구체적으로 일반적인 경로를 통해서는 세포 내로 이동이 용이하지 않은 물질, 보다 더 구체적으로 단백질, 핵산, 펩티드, 미네랄, 포도당을 예로 들 수 있는 당, 나노 입자, 생물학적 제제, 바이러스, 조영물질 또는 기타 화학 물질을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에서, "약물"은 질병, 상처 또는 특정 증상을 완화, 예방, 치료 또는 진단하기 위한 물질을 포함하는 광범위한 개념이다.

<140>

본 명세서에서 "운반 펩티드 (carrier peptide)"는 유효성분과 결합하여 유

효성분을 원하는 부위로 이동시키는 역할을 수행하는 펩티드를 의미한다.

<141>

본 발명의 일측면에서, 이동 대상으로서의 단백질 또는 펩티드는 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소 저해제, 신호 전달 단백질(또는 펩티드), 항체 및 백신 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일측면에서, 핵산은 자연발생적 또는 인공적 DNA 또는 RNA 분자일 수 있고, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 핵산 분자는 하나 이상일 수 있는데, 동일한 유형의 (예컨대, 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는) 핵산 분자일 수도 있고, 다른 유형으로 핵산 분자들일 수도 있다. DNA, cDNA, decoy DNA, RNA, siRNA, miRNA, shRNA, stRNA, snoRNA, snRNA, PNA, 안티센스 올리고머(antisense oligomer), 플라스미드(plasmid) 및 그 외 변형된 핵산 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일측면에서, 바이러스는 바이러스 전체 또는 바이러스의 핵산을 포함하는 바이러스 코어를 포함할 수 있다. 본 발명의 일측면에서, 화학 물질은 약물로서 기능할 수 있는 화학 물질을 포함하는 광범위한 개념으로, 천연 또는 합성 화학 물질을 포함한다.

<142>

유전자의 발현과정에서 이중가닥의 RNA(dsRNA)에 의하여 특정 유전자 발현이 조절되는 현상을 RNA 간섭현상(RNA interference; RNAi)이라고 한다. 이러한 현상은 *C. elegans*에서 1998년 처음 발견된 이래로 식물, 초파리, 포유동물에도 공통적으로 존재한다는 사실이 밝혀졌다(Fire et al., *Nature*, 391:806-811, 1998; Novina & Sharp, *Nature*, 430:161-164, 2004).

<143>

RNA 간섭현상이 일어나는 과정은 19-25bp의 dsRNA가 세포내로 들어오면 RISC(RNA-induced silencing complex) 복합체와 결합하고 안티센스(가이드) 가닥만이 mRNA와 염기서열 상보적으로 결합하여 RISC 복합체에 존재하는 엔도뉴클라제 도메인에 의하여 표적 mRNA를 분해하는 것으로 알려져 있다(Rana, T.M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8: 23-36, 2007; Tomari, Y. and Zamore, P.D., *GenesDev.*, 19: 517-529, 2005). 즉, siRNA는 특정 단백질의 생산을 억제함으로써 유전자 발현을 방해하는 것으로 RNA 간섭에 관여한다. 19 ~ 23개의 뉴클레오티드로 구성된 siRNA는 특정 전령 RNA(mRNA)가 이중가닥 RNA(double-stranded RNA)를 형성하도록 mRNA의 상보적인 순서에 맞춰 염기쌍을 형성한다. 그 다음 이러한 이중가닥RNA는 세포로부터 전령 RNA를 제거함과 동시에 특수하게 분해된다. siRNA는 최근 동물세포에서 특정 유전자의 발현을 저해시키는데 탁월한 효과를 나타내는 것으로 밝혀져 유전자 치료제로 각광을 받고 있는 물질로써, 이들의 높은 활성과 정밀한 유전자 선택성으로 인해 지난 20년간 연구되어 현재 치료제로 활용 중인 안티센스 올리고뉴

클레오티드를 대체할 치료제로 기대되고 있다. 이에, 많은 제약회사들에 의해 siRNA에 기반을 둔 치료제 개발이 이루어지고 있다. siRNA는 기존의 안티센스 올리고뉴클레오티드에 비해 10배 정도 적은 양으로도 유전자 발현을 저해할 수 있으며, 유전자 선택성이 더욱 우수하여 표적 유전자만을 저해할 수 있는 것으로 알려져 있다. 특히 치료를 목적으로 siRNA 기법은 다른 의약품에 비하여 쉽게 디자인이 가능하고, 높은 목표 선택성과 특정 유전자의 발현을 저해하는 특징을 갖기 때문에 큰 장점을 갖는다. 또한 RNA 간섭에 의한 유전자 발현 억제는 생체 내에서 자연적으로 존재하는 기작을 이용하는 것이므로 독성이 낮다. 그러나 siRNA는 생체내에서의 안정성이 낮아서 단시간내에 분해되고 음이온을 띄기 때문에 세포막을 쉽게 투과하기 어려워 세포내로의 전달 효율이 떨어지는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점은 본 명세서에 개시된 운반 펩티드가 siRNA와 접합함으로써 해결될 수 있다.

<144> 본 발명의 일측면에서, 이동 대상인 유효성분은 그것의 효능 타겟이 암세포, 면역세포 또는 섬유아세포일 수 있다. 구체적으로, 상기 암세포는 간암 세포, 유방암 세포 및 백혈병 세포로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 암세포이며, 상기 면역세포는 T 림프구, B 세포 및 단핵구로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 면역세포일 수 있다.

<145> 본 발명의 일측면에서, 상기 유효성분은 세포질로 국소화될 필요가 있는 것이며, 상기 운반 펩티드는 상기 유효성분의 세포질로의 국소 전달을 수행하는 것일 수 있다.

<146> 본 발명의 일측면에서, 상기 유효성분은 미토콘드리아로 국소화될 필요가 있는 것이며, 상기 운반 펩티드는 상기 유효성분의 미토콘드리아로의 국소 전달을 수행하는 것일 수 있다.

<147> 본 발명의 일측면에서, 세포 투과성 펩티드에 의해 세포 내로 전달되는 약물은 리포솜, 미셀, 나노 입자, 자성 입자 또는 콤팩트 도트와 같은 약물 전달체를 더 포함할 수 있다.

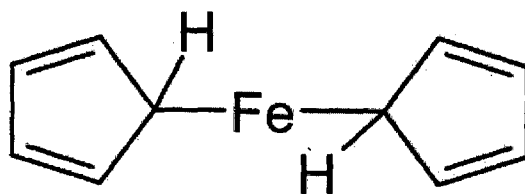
<148> 본 명세서에서 "조영물질"이라 함은 의학적 영상 촬영(imaging)에서 생체 내 구조 또는 유체의 조영을 위해 사용되는 모든 물질을 포함하는 광범위한 개념이다. 적합한 조영물질은 방사선비투과 조영물질(radiopaque contrast agent), 상자성 조영물질(paramagnetic contrast agent), 초상자성 조영물질(superparamagnetic contrast agent), CT (computed tomography) 조영물질 및 기타 조영물질을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 예를 들면, 방사선비투과 조영물질(X-레이 영상용)은 무기 요오드 화합물 및 유기 요오드 화합물(예를 들면, 디아트리지아트), 방사선비

투과 금속 및 그의 염(예를 들면, 은, 금, 백금 등) 및 기타 방사선비투과 화합물(예를 들면, 칼슘염, 황산바륨과 같은 바륨염, 탄탈륨 및 산화 탄탈륨)을 포함할 것이다. 적합한 상자성 조영물질(MR 영상용)는 가돌리늄 디에틸렌 트리아민펜타아세트산(gadolinium diethylene triaminepentaacetic acid, Gd-DTPA) 및 그의 유도체, 및 기타 가돌리늄, 망간, 철, 디스프로시움(dysprosium), 구리, 유로피움(europium), 에르비움(erbium), 크롬, 니켈 및 코발트 복합체, 예를 들면, 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA), 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,-N',N''-트리아세트산(D03A), 1,4,7-트리아자시클로노난-N,N',N''-트리아세트산(NOTA), 1,4,8,10-테트라아자시클로테트라데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산 (TETA), 히드록시벤질에틸렌-디아민 디아세트산(HBED) 등을 포함한다. 적합한 초상자성 조영물질(MR 영상용)는 자철석(magnetite), 초상자성 산화철 (super-paramagnetic iron oxide, SPIO), 초소 초상자성 산화철(ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIO) 및 단결정성(monocrystalline) 산화철을 포함한다. 다른 적합한 조영물질은 요오드화 및 비요오드화(non-iodinated), 이온성 및 비이온성 CT 조영물질, 및 스핀-표지(spin-label)와 같은 조영물질, 또는 기타 진단 활성제(diagnostically effective agent)이다.

<149> 조영물질의 다른 예들은 β -갈락토시다아제, 녹색 형광 단백질, 청색 형광 단백질, 루시페라아제, 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 세포에서 발현되는 경우, 용이하게 검출가능한 단백질을 코딩하는 마커 유전자를 포함한다. 방사선헤종(radionuclide), 형광물질(fluor), 효소, 효소 기질, 효소 보조인자, 효소 저해제, 리간드 (특히, 합텐) 등과 같은 다양한 표지들이 이용될 수 있다.

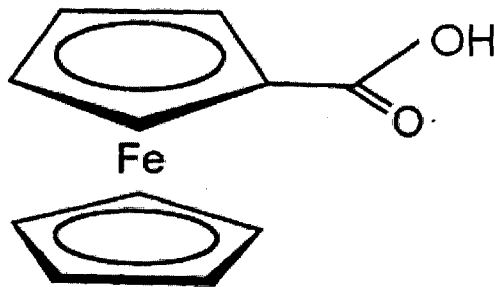
<150> 본 발명의 일실시예에서, 조영물질은 하기 화학식2의 페로센카복실산(ferrocenecarboxylic acid)일 수 있다. 페로센의 구조는 화학식 1에 나타나 있다.

<151> [화학식 1]



<152>

<153> [화학식 2]



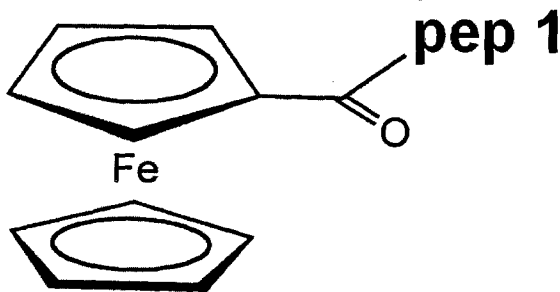
<154>

<155>

본 발명의 일실시예에서, 세포 투과성 펩티드와 조영물질의 컨쥬게이트는 하기 화학식 3의 페로센카복실릭-pep1(Ferrocenecarboxylic-pep1)일 수 있다.

<156>

[화학식 3]



<157>

<158>

본 발명의 일측면에서, 펩티드 또는 조성물은 하나 이상의 검출가능한 표지(label)와 융합될 수 있다. 표지는 화학적, 물리적, 또는 효소적 반응에서 검출 가능한 화합물 또는 신호를 직접 또는 간접적으로 발생시키는 화합물일 수 있다. 표지 및 그 이후의 검출은 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다(예컨대, Sambrook, J., and Russel, D.W.(2001); 및 Lottspeich, F., and Zorbas H. (1998) Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, Germany). 표지는 형광 표지, 효소 표지, 발색(chromogenic) 표지, 발광 표지, 방사선 표지, 헵텐, 바이오틴, 금속 복합체, 금속 및 콜로이달 금속을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 모든 유형의 표지는 당업계에 잘 알려져 있고 다양한 공급업체로부터 상업적으로 입수할 수 있다.

<159>

본 발명의 일측면에서, 펩티드에 이동 대상(cargo)을 직접 결합시킬 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에서, 공유 결합 또는 비공유 결합을 예로 들 수 있는 여러 결합 방법을 통해, 펩티드에 이동 대상을 결합시킬 수 있다. 이동 대상은 예컨대, 본 발명의 일측면에 따른 펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 결합할 수 있다. 예를 들어, 디설파이드(disulfide) 결합, 또는 펩티드 N-말단 글루타메이트(E)의 알파 아민(alpha-amine) 또는 C-말단 라이신(K) 잔기의 아민에 이동 대상을 결합시키는 공유 결합을 통해 펩티드에 이동 대상을 결합시킬 수 있다. 또는 펩티드와 이동 대상 중 어느 하나가 다른 하나를 캡슐 형태를 예로 들 수 있는 형태로 감싸는

비공유 결합을 통해 펩티드와 이동 대상을 결합시킬 수 있다.

<160>

본 발명의 다른 일측면에서, 링커(linker)를 통해 펩티드와 이동 대상을 결합시킬 수 있다. 예를 들어, 펩티드 N-말단 글루타메이트의 알파 아민(alpha-amine) 또는 C-말단 라이신 잔기의 아민에 Hynic(6-하이드라지노피리딘-3-카르복시산, 6-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid) 링커와 같은 링커를 도입한 후, 링커에 이동 대상을 결합시킴으로써, 펩티드에 이동 대상을 결합시킬 수 있다.

<161>

본 발명의 또 다른 일측면에서, 이동 대상이 DNA 또는 RNA인 경우, 펩티드에는 SH 기(thiol 기)를 도입하고 DNA 또는 RNA에는 말레이미드 기(maleimide group)를 도입한 후, 펩티드의 SH 기와 DNA 또는 RNA의 말레이미드 기를 결합시킴으로써, 펩티드에 이동 대상을 결합시킬 수 있다.

<162>

본 발명의 또 다른 일측면에서, 이동 대상이 단백질 또는 펩티드인 경우, 이동 대상을 발현하는 DNA에 운반 펩티드를 발현하는 DNA를 결합시킨 후 이를 발현시킴으로써, 이동 대상과 펩티드의 융합 단백질 형태로 운반 펩티드와 이동 대상을 결합시킬 수 있다. 융합 단백질에 의한 결합의 구체적인 예는 다음과 같다: 융합 단백질을 생산하기 위한 프라이머(primer) 제작시, 이동 대상을 발현하는 뉴클레오티드 앞에 운반 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드를 붙인 다음, 수득한 뉴클레오티드를 제한 효소로 pET 벡터를 예로 들 수 있는 벡터에 삽입하고, BL-21(DE3)을 예로 들 수 있는 세포에 도입(transformation)하여 발현시킨다. 이때, IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)와 같은 발현 유도제를 처리하여 융합 단백질이 효과적으로 발현되도록 할 수 있다. 이후, His tag 정제(purification)와 같은 방법을 통해 발현시킨 융합 단백질을 정제한 후, PBS를 이용하여 투석하고, 키트에 넣어 예컨대, 2,000 내지 4,000 rpm에서 5 내지 20 여 분간 원심 분리하여 농축시킬 수 있다.

<163>

본 발명의 일측면에서, 운반 펩티드는 염색 물질 또는 형광 물질, 구체적으로 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC, fluorescein isothiocyanate) 또는 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)과 결합할 수 있다. 본 발명의 일측면에서 FITC는 운반 펩티드의 N-말단 또는 C-말단 Lys의 아미노기(NH₃⁺)와 결합할 수 있다. 말단에 Lys가 존재하지 않는 펩티드인 경우 Lys를 포함하는 링커에 의해 펩티드와 FITC를 결합시킬 수 있다.

<164>

운반 펩티드로 기능하는 본 명세서에 개시된 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖

는 펩티드는 이동 대상(cargo)과 1:1의 몰비로 결합할 수 있지만, 그 외 다른 몰비로 결합하는 것도 가능하다. 예컨대, CPP : 이동 대상의 몰비가 2:1 이상일 수 있다. 구체적으로, 2:1 이상, 3:1 이상, 4:1 이상, 5:1 이상, 6:1 이상, 7:1 이상, 8:1 이상, 9:1 이상 또는 10:1 이상일 수 있다. 이는 복수개 분자의 운반 펩티드가 하나의 이동 대상 분자와 결합할 수 있음을 의미한다. 복수개의 운반 펩티드 분자는 서로 직렬 또는 병렬로 연결될 수 있다. 직렬로 연결된다는 것은 운반 펩티드의 말단 아미노산 부위에서 서로 결합함을 의미하며, 병렬로 연결된다는 것은 운반 펩티드의 말단 아미노산 이외의 부분에서 서로 결합함을 의미한다. 반대로, 운반 펩티드 : 이동 대상의 몰비가 1:2 이상일 수 있다. 이는 하나의 운반 펩티드 분자에 복수개의 이동 대상 분자가 결합할 수 있음을 의미한다. 예컨대, 운반 펩티드 : 이동 대상의 몰비가 1:2 일 수 있다. 구체적으로, 1:2 이상, 1:3 이상, 1:4 이상, 1:5 이상, 1:6 이상, 1:7 이상, 1:8 이상, 1:9 이상 또는 1:10 이상일 수 있다.

<165> 플루오레세인 이소티오시아네이트와 결합한 펩티드는 그 이동 경로를 쉽게 파악할 수 있으므로, 본 발명의 일측면에 따른 운반 펩티드는 세포 이미징용 또는 세포 내 약물 전달 경로 추적용으로 활용될 수 있다.

<166> 본 발명의 일측면은 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드의, 하나 이상의 유효성분을 전달하기 위한 약물 전달체로서의 용도를 제공한다. 상기 용도는 치료적 용도일 수도 있고, 비치료적 용도일 수도 있다.

<167> 본 발명의 일측면은 약물; 및 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드를 포함하는 조성물을 대상에게 적용하는 것을 포함하는 대상의 세포 내로 약물을 전달하는 방법을 제공한다.

<168> 본 발명의 일측면은, 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드, 및 조영 물질을 대상에게 적용하는 것을 포함하는 대상의 적용 약물 전달 경로 추적 방법을 제공한다.

<169> 본 발명의 일측면은, 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드와 조영 물질의 컨쥬게이트를 대상에게 적용하는 것을 포함하는 대상의 적용 약물 전달 경로 추적 방법을 제공한다.

<170> 본 발명의 일측면은 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티

드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 이동 대상인 약물의 컨쥬게이트를 포함하는 조성물; 및 조성물의 투여량, 투여 경로, 투여 횟수 및 적응증 중 하나 이상을 개시한 지시서를 포함하는 대상의 세포 내 약물 전달용 키트를 제공한다.

<171> 본 발명의 일측면은 유효성분; 및 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드, 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드를 포함하는 화장품 또는 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 다른 측면은 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드, 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드와 유효성분의 컨쥬게이트를 포함하는 화장품 또는 식품 조성물을 제공한다.

<172> 본 발명의 일측면은 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드, 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드와 유효성분의 컨쥬게이트를 포함하여, 유효성분을 세포 내로 전달하는 효과가 우수한 약학, 화장품 또는 식품 조성물을 제공한다.

<173> 미토콘드리아는 유핵세포의 에너지 대사의 중심기관으로서 인간 질병과의 관련성이 최초로 밝혀진 세포 내 기관이다(Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B: A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study, J Clin Invest 41:1776-804, 1962).

<174> 미토콘드리아는 세포의 에너지 대사와 세포사멸(apoptosis) 조절에 중요한 역할을 하기 때문에 다양한 치료 약물의 주된 표적으로 작용한다. 또한 이 기관은 세포 내 칼슘 농도 조절에 관여하며, 미토콘드리아 호흡 체인은 에너지 생산에 중요한 전자전달계로서 작용하고, 활성 산소의 생산을 야기할 수 있다. 결과적으로 미토콘드리아 기능 이상은 당뇨병, 심근병증, 불임, 실명, 신장/간 질환, 뇌졸중 등의 성인 질병과 밀접한 관계가 있다 (Modica-Napolitano KS, Singh KK: April mitochondria as targets for detection and treatment of cancer. Expert Rev Mol Med 11:1-19, 2002). 아울러 미토콘드리아 유전자의 돌연변이는 노화, 퇴행성 신경 질환, 암 질환 등의 발명에 관여할 가능성이 제기되고 있다.

<175> 본 명세서에서 "미토콘드리아 관련 질병"은 다음을 포함할 수 있지만 이에 제한되는 것은 아니다: 헌팅톤 질환; 근위축 측의 경화증; MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidemia and Stroke-like episodes, 락트산 산성

혈증 및 발작-유사 에피소드를 갖는 미토콘드리아 뇌심근병); MERRF (Myoclonus, epilepsy, and myopathy with ragged red fibers, 단편화된 레드 파이버를 갖는 간대성 근경련의 간질 및 근장애); NARP/ MILS (Neurogenic muscular weakness, ataxia, retinitis pigmentosa/Maternally inherited Leigh syndrome, 신경성 근육 약화, 실조증 및 색소성 망막염/모계 유전성 라이 증후군); LHON (Lebers hereditary optic neuropathy, 레버의 유전적 시신경병, 미토콘드리아 맹증); KSS (Kearns-Sayre Syndrome, 칸스-사이레 증후군); PMPS (Pearson Marrow-Pancreas Syndrome, 피어슨 골수-췌장 증후군); CPEO(Chronic progressive external ophthalmoplegia, 만성 진행성 외안근마비); 라이 증후군; 알퍼스 증후군; 다발성 mtDNA 결손 증후군; mtDNA 소모 증후군; 복합체 I 결함; 복합체 II(SDH) 결함; 복합체 III 결함; 시토크롬 c 산화효소 (COX, 복합체 IV) 결함; 복합체 V 결함; 아테닌 뉴클레오티드 운반자 (ANT) 결함; 피루베이트 탈수소효소 (PDH) 결함; 락트산 산성혈증을 갖는 에틸말론산 산성노증; 락트산 산성혈증을 갖는 3-메틸 글루타콘산 산성노증; 감염 동안 쇠미를 나타내는 무반응성 간질; 감염 동안 쇠미를 나타내는 아스퍼저 증후군; 감염 동안 쇠미를 나타내는 자폐증; 주의 결함 고향동성 질환(ADHD); 감염 동안 쇠미를 나타내는 뇌성마비; 감염 동안 쇠미를 나타내는 실독증; 모계 유전성 혈소판 감소증; 백혈병; MNGIE (Mitochondrial myopathy, peripheral and autonomic neuropathy, gastrointestinal dysfunction. And epilepsy, 미토콘드리아 근장애, 말초신경 및 자율신경 장애, 위장 기능부전, 및 간질); MARIAHS 증후군 (미토콘드리아 실조증, 재발성 감염, 실어증, 자요산혈증/저수초증, 급발작, 및 디카볼실산 산성노증); ND6 이긴장증; 감염 동안 쇠미를 나타내는 순환성 구토 증후군; 락트산 산성혈증을 갖는 3-히드록시 이소부트릭산 산성노증, 락트산 산성혈증을 갖는 당뇨병; 유리딘 반응성 신경성 증후군(URNS); 가계성 양측의 선조체 괴사 (FBSN); 아미노글리코시드-관련 난청; 이완된 심근장애; 비장 림프종; 볼프람 증후군; 다발성 미토콘드리아 DNA 결손 증후군; 및 신세뇨관성 산증/당뇨/실조증 증후군.

<176>

다른 양태에서 본원은 상기 폴리펩타이드를 코딩하는, 핵산 분자를 제공하며, 이의 염기서열은 예를 들면 GAA GCG CGC CCG GCG CTG CTG ACC AGC CGC CTG CGC TTT ATT CCG AAA 서열(서열번호 3)을 가진다. 핵산 분자는 당업자에게 공지된 기법에 따라 숙주 세포 안에 도입될 수 있다. 예를 들면 칼슘 포스페이트법, 리포솜, 일렉트로포레이션, 바이러스와 세포를 접촉시키는 것에 의한 형질전환, 또는 직접 세포내로 마이크로 주사하는 방법 등이 있다. 숙주 세포는 고등 진핵

세포, 예컨대 포유류 세포, 또는 하급 진핵 세포, 예컨대 효모 세포이거나, 또는 원핵 세포, 예컨대 박테리아 세포일 수 있다. 형질전환에 적당한 원핵 숙주로는 대장균, 바실러스 서브틸리스, 살모넬라 타이피뮤리움, 슈도모나스, 스트렙토마이세스, 마이코박테리아 속에 속하는 종들을 예로 들 수 있다.

<177>

상기 핵산 분자를 포함하는 벡터는 일반적으로 재조합 발현 벡터로 숙주 세포의 형질전환을 가능하게 하는 복제 기원 및 선택가능한 마커(예컨대 진핵 세포 배양을 위한 디하이드로폴레이트 환원효소 또는 네오마이신 내성, 또는 이. 콜라이에서의 테트라사이클린 또는 암피실린 내성, 또는 *S. cerevisiae* TRP1 유전자), 및 단백질 코팅서열의 전사를 조절하는 프로모터를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 유용한 발현 벡터는 예를 들면 SV40 및 pcDNA의 유도체 및 col E1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX(Smith, et al., Gene 67:31-40 (1988))와 같은 공지된 박테리아 플라스미드, pMB9 및 이것의 유도체 RP4와 같은 플라스미드, NM989와 같은 파지 I의 수많은 유도체와 같은 파지 DNA, 및 M13 및 필라멘트형 단일 가닥의 파지 DNA와 같은 파지 DNA; 효모 플라스미드, 예컨대 파지 DNA 또는 발현 제어 서열을 사용하기 위해 변형된 플라스미드와 파지 DNA의 조합으로부터 유도된 벡터 등이 있다. 포유류 발현 벡터는 복제 기원, 적당한 프로모터 및 인핸서를 포함한다. 또한 필수 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여체 및 수용체 부위, 전사 종결 서열, 및 5' 플랭킹 비전사 서열을 포함할 수 있다. 포유류 발현 벡터는 유도성 프로모터, 예컨대 디하이드로폴레이트 환원효소 프로모터를 포함하는 벡터, DHFR 발현 카세트를 포함하는 어떠한 발현 벡터 또는 pED와 같은 DHFR/메토타렉세이트 공-증폭 벡터(Randal J. Kaufman, 1991, Randal J. Kaufman, Current Protocols in Molecular Biology, 16, 12 (1991))를 포함한다. 또는 글루타민 합성 효소/메티오닌 술폰시민 공-증폭 벡터, 예컨대 pEE14(Celltech). 엡스타인 바 바이러스(EBV) 또는 핵 항원(EBNA)의 제어하에 에피솜성 발현을 지시하는 벡터, 예컨대 pREP4(Invitrogen), pCEP4(Invitrogen), pMEP4(Invitrogen), pREP8(Invitrogen), pREP9(Invitrogen), 및 pEBVHis(Invitrogen)가 사용될 수 있다. 선택성 포유류 발현 벡터로는 Rc/CMV(Invitrogen), pRc/RSV(Invitrogen) 등이 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 백시니아 바이러스 포유류 발현 벡터는 pSC11, pMJ601, pTKgptF1S 등이 있다.

<178>

본 발명에 사용될 수 있는 효모 발현 시스템으로는 비-융합 pYES2 벡터(Invitrogen), 융합 pYESHisA, B, C(Invitrogen), pRS 벡터 등이 있다.

<179>

상기 벡터는 다양한 세포 포유류 특히 인간 유래 세포, 또한 박테리아,

효모, 진균, 곤충, 선충류 및 식물 세포로 도입될 수 있다. 적당한 세포의 예로는, VERO 세포, HELA 세포, 예컨대 ATCC No. CCL2, CHO 세포주, 예컨대 ATCC No. CCL61, COS 세포, 예컨대 COS-7 세포 및 ATCC No. CRL 1650 세포, W138, BHK, HepG2, 3T3, 예컨대 ATCC No. CRL6361, A549, PC12, K562 세포, 293 세포, Sf9 세포, 예컨대 ATCC No. CRL1711 및 Cv1 세포, 예컨대 ATCC No. CCL70 등이 있다.

<180> 본 발명에 사용될 수 있는 다른 적당한 세포로는 원핵 숙주 세포 균주, 예컨대 대장균(예컨대 DH5- α 균주), 바실러스 서브틸리스, 살모넬라 타이피뮤리움, 또는 슈도모나스, 스트렙토마이세스 및 스태필로코쿠스 속에 속하는 균주들이 있다.

<181>

<182> 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그의 단편들인 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드를 0.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 내지 1 mg/mg , 구체적으로 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 내지 0.5 mg/mg , 더 구체적으로 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 내지 0.1 mg/mg 함량으로 포함할 수 있다. 상기 범위로 포함하는 경우 본 발명의 의도한 효과를 나타내기 위해 적절할 뿐만 아니라, 조성물의 안정성 및 안전성을 모두 만족할 수 있으며, 비용 대비 효과의 측면에서도 상기 범위로 포함하는 것이 적절할 수 있다.

<183> 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 인간, 개, 닭, 돼지, 소, 양, 기니아피그 또는 원숭이를 포함하는 모든 동물에 적용될 수 있다.

<184> 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 경구, 직장, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 골수 내, 경막 내 또는 피하 등으로 투여될 수 있다.

<185> 경구 투여를 위한 제형은 정제, 환제, 연질 또는 경질 캡셀제, 과립제, 산제, 액제 또는 유탁제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비경구 투여를 위한 제형은 주사제, 점적제, 로션, 연고, 겔, 크림, 현탁제, 유제, 좌제, 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

<186> 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 필요에 따라 희석제, 부형제, 활택제, 결합제, 붕해제, 완충제, 분산제, 계면 활성제, 착색제, 향료 또는 감미제 등의 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 당업계의 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.

<187> 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물의 유효성분은 투여 받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 내지 1 $\text{g}/\text{kg}/\text{일}$, 구체적으로는 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$

일 내지 10 mg/kg/일, 더 구체적으로는 10 μ g/kg/일 내지 1 mg/kg/일, 보다 더 구체적으로는 50 μ g/kg/일 내지 100 μ g/kg/일이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 1일 1회 내지 3회 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

<188>

<189>

본 발명의 일측면에 따른 화장품 조성물은 국소 적용에 적합한 모든 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들면, 용액, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 유상에 수상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 고체, 젤, 분말, 페이스트, 포말(foam) 또는 에어로졸의 제형으로 제공될 수 있다. 이러한 제형은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

<190>

본 발명의 일측면에 따른 화장품 조성물은 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분들을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 일측면에 따른 화장품 조성물은 보습제, 에몰리언트제, 계면활성제, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, pH 조정제, 유기 또는 무기 안료, 향료, 냉감제 또는 제한(制汗)제를 더 포함할 수 있다. 상기 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하며, 그 배합량은 화장품 조성물 전체 중량을 기준으로 0.01 내지 5 중량%, 구체적으로 0.01 내지 3 중량%일 수 있다.

<191>

<192>

본 발명의 일측면에 따른 식품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 분말제, 액제, 고형 제제 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형은 유효성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

<193>

상기 유효성분의 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 구체적으로는 1 μ g/kg/일 내지 10 mg/kg/일, 더 구체적으로는 10 μ g/kg/일 내지 1 mg/kg/일, 보다 더 구체적으로는 50 μ g/kg/일 내지 100 μ g/kg/일이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 투여하고자 하는 대상의 연령, 건강 상태, 합병증 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있다.

<194>

<195>

본 명세서에서 사용된 용어들은 특정 구체예들을 설명하기 위한 목적으로만 의도된 것이지 본 발명을 한정하고자 하는 의도가 아니다. 명사 앞에 개수가 생략

된 용어는 수량을 제한하고자 하는 것이 아니라 언급된 명사 물품이 하나 이상 존재하는 것을 나타내는 것이다. 용어 "포함하는", "갖는", 및 "함유하는"은 열린 용어로 해석된다(즉, "포함하지만 이에 한정되지는 않는"의 의미).

<196> 수치의 범위를 언급하는 것은 단지 그 범위 내에 속하는 각각의 별개의 수치들을 개별적으로 언급하는 것을 대신하는 쉬운 방법이기 때문이며, 그것이 아님이 명시되어 있지 않는 한, 각 별개의 수치는 마치 개별적으로 명세서에 언급되어 있는 것처럼 본 명세서에 통합된다. 모든 범위의 끝 값들은 그 범위 내에 포함되며 독립적으로 조합 가능하다.

<197> 본 명세서에 언급된 모든 방법들은 달리 명시되어 있거나 문맥에 의해 명백히 모순되지 않는 한 적절한 순서로 수행될 수 있다. 어느 한 실시예 및 모든 실시예 또는 예시적 언어 (예컨대, "~과 같은")를 사용하는 것은, 청구범위에 포함되어 있지 않는 한, 단지 본 발명을 더 잘 기술하기 위함이지 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 명세서의 어떤 언어도 어떤 비청구된 구성요소를 본 발명의 실시예에 필수적인 것으로 해석되어져서는 아니된다. 다른 정의가 없는 한, 본 명세서에 사용되는 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 갖는 사람에 의해 통상 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다.

<198> 본 발명의 바람직한 구체예들은 본 발명을 수행하기 위해 발명자에게 알려진 가장 최적의 모드를 포함한다. 바람직한 구체예들의 변이들이 앞선 기재를 읽으면 당업자에게 명백하게 될 수 있다. 본 발명자들은 당업자들이 그러한 변이를 적절히 이용하길 기대하고, 발명자들은 본 명세서에 기재된 것과 다른 방식으로 본 발명이 실시되기를 기대한다. 따라서, 본 발명은, 특허법에 의해 허용되는 것과 같이, 첨부된 특허청구범위에서 언급된 발명의 요지의 균등물 및 모든 변형들을 포함한다. 더욱이, 모든 가능한 변이들 내에서 상기 언급된 구성요소들의 어떤 조합이라도 여기서 반대로 명시하거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 본 발명에 포함된다. 본 발명은 예시적인 구체예들을 참조하여 구체적으로 나타내어지고 기술되었지만, 당업자들은 하기 청구범위에 의해 정의되는 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고서도 형태 및 디테일에서 다양한 변화가 행해질 수 있음을 잘 이해할 것이다.

<199>

【발명의 실시를 위한 형태】

<200>

실시예 1: 펩티드의 합성

<201>

<202>

서열번호 1 의 펩티드를 종래에 알려진 고상 펩티드 합성법에 따라 제조하였

다. 구체적으로, 펩티드들은 ASP48S(Pepton, Inc., 대한민국 대전)를 이용하여 Fmoc 고상 합성법(solid phase peptide synthesis, SPPS)을 통해 C-말단부터 아미노산 하나씩 커플링함으로써 합성하였다. 다음과 같이, 펩티드들의 C-말단의 첫번째 아미노산이 수지에 부착된 것을 사용하였다. 예컨대 다음과 같다:

<203> $\text{NH}_2\text{-Lys(Boc)-2-chloro-Trityl Resin}$

<204> $\text{NH}_2\text{-Ala-2-chloro-Trityl Resin}$

<205> $\text{NH}_2\text{-Arg(Pbf)-2-chloro-Trityl Resin}$

<206>

<207> 펩타이드 합성에 사용한 모든 아미노산 원료는 N-term이 Fmoc으로 보호(Protection)되고, 잔기는 모두 산에서 제거되는 Trt, Boc, t-Bu (t-butylester), Pbf (2,2,4,6,7-pentamethyl dihydro-benzofuran-5-sulfonyl) 등으로 보호된 것을 사용하였다. 예컨대 다음과 같다:

<208> Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Trt-Mercaptoacetic acid.

<209> 커플링 시약(Coupling reagent)으로는 HBTU[2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetamethylaminium hexafluorophosphate] / HOBt [N-Hydroxybenzotriazole] / NMM [4-Methylmorpholine] 를 사용하였다. Fmoc 제거는 20%의 DMF 중 피페리딘(piperidine in DMF)을 이용하였다. 합성된 펩타이드를 Resin에서 분리 및 잔기의 보호기 제거에는 절단 콕테일(Cleavage Cocktail) [TFA (trifluoroacetic acid) / TIS (triisopropylsilane) / EDT (ethanedithiol) / H_2O =92.5/2.5/2.5/2.5] 를 사용하였다.

<210> 아미노산 보호기가 결합된 출발 아미노산이 고상 지지체에 결합되어 있는 상태를 이용하여 여기에 해당 아미노산들을 각각 반응시키고 용매로 세척한 후 탈보호하는 과정을 반복함으로써 각 펩티드를 합성하였다. 합성된 펩티드를 수지로부터 끊어낸 후 HPLC로 정제하고, 합성 여부를 MS로 확인하고 동결 건조하였다.

<211>

<212> 서열번호 1 의 Pep 1의 구체적인 과정을 설명하면 다음과 같다.

<213>

<214> 1) 커플링

- <215> NH_2 -Lys(Boc)-2-chloro-Trityl Resin 에 보호된 아미노산(8당량)와 커플링 시약 HBTU(8당량)/HOBt(8당량)/NMM(16당량) 을 DMF에 녹여서 첨가한 후, 상온에서 2시간 동안 반응하고 DMF, MeOH, DMF순으로 세척하였다.
- <216> 2) Fmoc 탈보호
- <217> 20%의 DMF 중의 피페리딘(piperidine in DMF) 을 가하고 상온에서 5분 간 2회 반응하고 DMF, MeOH, DMF순으로 세척하였다.
- <218> 3) 1과 2의 반응을 반복적으로 하여 펩타이드 기본 골격 NH_2 -E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-chloro-Trityl Resin)을 만들었다.
- <219> 4) 절단(Cleavage) : 합성이 완료된 펩타이드 Resin에 절단 콕테일(Cleavage Cocktail) 을 가하여 펩타이드를 Resin에서 분리하였다.
- <220> 5) 얻어진 mixture에 Cooling diethyl ether를 가한 후, 원심 분리하여 얻어진 펩타이드를 침전시킨다.
- <221> 6) Prep-HPLC로 정제 후, LC/MS로 분자량을 확인하고 동결하여 powder로 제조하였다.

<222>

<223> 실시예 2: CPP-FITC 컨쥬게이트의 세포 투과능 실험

<224> 1. 컨쥬게이트의 제조

<225> (1) FITC-CPP 컨쥬게이트의 제조

<226> 서열번호 1의 펩티드들을 FITC와 접합시킨 컨쥬게이트를 다음과 같이 제조하였다. 예를 들어 서열번호 1의 pep1과 FITC의 컨쥬게이트, 즉 FITC-링커-pep1을 다음과 같이 제조하였다.

<227>

<228> 상기 실시예 1과 같이 하여 얻어진 펩타이드 기본 골격 NH_2 -

링커-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-chloro-Trityl Resin)에 FITC를 반응시켰다. 구체적으로, 플루오레세인-5-이소씨오시아네이트(fluorescein-5-isothiocyanate, FITC) (8당량)과 N,N-디이소프로필에틸아민(N,N-Diisopropylethylamine, DIPEA)(16당량) 을 DMF에 녹여서 첨가한 후, 상온에서 2시간 동안 반응하고 DMF, MeOH, DMF순으로 세척하였다. 그 결과, FITC-링커-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-chloro-Trityl Resin를 얻었다. 여기서 링커는 6-아미노헥사노산 (6-aminohexanoic

acid, Ahx)이다. 상기 합성이 완료된 펩타이드 Resin에 TFA/TIS/H₂O=95/2.5/2.5 을 가하여 컨쥬게이트를 Resin에서 분리하였다. 얻어진 혼합물에 쿨링 디에틸 에테르(Cooling diethyl ether)를 가한 후, 원심 분리하여 얻어진 컨쥬게이트를 침전시켰다. 그 후 Prep-HPLC로 정제 후, 분석적(analytical) HPLC로 순도를 확인하고, LC/MS로 분자량을 확인하였다. 분자량 확인을 통해 얻어진 물질이 FITC-pep1임이 입증되었다. 그 후 동결건조를 하였다.

<229>

<230>

(2) CPP-FITC 컨쥬게이트의 제조

<231>

상기 실시예 2의 1. (1)과 같이 펩타이드 기본

골격(NH₂-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Dde)-2-chloro-Trityl Resin)을 제조하였다. 제조된 펩타이드 기본 골격의 C-term에 FITC를 선택적으로 도입하기 위해서 N-term을 Boc으로 보호하였다. 그 후 Di-tert-부틸 디카보네이트(30당량)와 DIPEA(30당량)을 DMF에 녹여서 첨가한 후, 상온에서 2시간 동안 반응하고 DMF, MeOH, DMF순으로 세척하였다. 그 결과, Boc-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Dde)-2-chloro-Trityl Resin을 얻었다. 그런 다음, C-term K의 잔기에 FITC를 붙이기 위하여 2% DMF 중의 히드라진(hydrazine in DMF)을 처리하여 C-term Lys의 잔기 보호기인 Dde를 제거하였다. 그 결과 Boc-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(NH₂)-2-chloro-Trityl Resin를 얻었다. 그런 다음, FITC(8당량)과 DIPEA(16당량)을 DMF에 녹여서 첨가한 후, 상온에서 2시간 동안 반응하고 DMF, MeOH, DMF순으로 세척하였다. 그 결과, Boc-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(FITC)-2-chloro-Trityl Resin를 얻었다. 상기 합성이 완료된 펩타이드 Resin에 TFA/TIS/H₂O=95/2.5/2.5을 가하여 펩타이드를 Resin에서 분리하였다. 얻어진 혼합물에 쿨링 디에틸 에테르를 가한 후, 원심 분리하여 얻어진 펩타이드를 침전시켰다. 그런 다음 Prep-HPLC로 정제 후, 분석적(analytical) HPLC로 순도를 확인하고, LC/MS로 분자량을 확인하였다. 그 결과 얻어진 물질이 pep1-FITC임이 입증되었다. 그 후 동결건조하였다.

<232>

<233>

1. 1차 실험

<234> (1) 세포주의 배양

<235> 중국 햄스터의 난소 세포주 CHO (Chinese hamster ovary cell line), 인간의 간세포 암의 세포주인 Huh7 (human hepatocellular carcinoma cell line), HepG2 (human hepatocellular carcinoma cell line), 인간의 유방암 세포주 MCF7 (Human breast adenocarcinoma cell line), 원숭이 신장 섬유아 세포주 COS7 (monkey kidney fibroblast cell line)의 부착 세포주들과 인간 T 림프구 세포주 Jurkat (Human T-cell leukemia cell line), 사람 B 세포주 Raji (human B cell line), 사람 단핵구 세포주 THP1 (human monocyte cell line), 사람 백혈병 세포주 K562 (human leukemia cell line) 의 부유 세포주를 사용하였다. 또한 인간 섬유아세포의 활액세포와 활액 조직(synovial fluid, synovial tissue)에서 유래한 세포를 얻어 1차 배양 세포주를 만들고 쥐의 골수에서 유래된 수지상 세포 bmDCs(bone marrow derived dendritic cells)의 세포주를 사용하였다. Huh7, MCF7, Jurkat, Raji, THP1, K562 세포주는 RPMI 1640 배지, CHO, 세포주는 DMEM 배지, HepG2 세포주는 MEM 배지를 사용한다. 각각의 배지에는 10% 우태아혈청(Invitrogen, USA)과, 100 ug/ml penicillin, 100 units/ml streptomycin를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

<236> bmDCs는 마우스 골수에서 세포를 얻어 GM-CS(20ng/ml)와 IL-4(20ng/ml)를 넣은 RPMI 1640 배지에서 수지상세포로 분화시킨다. 24-well plate에 세포를 1×10^6 분주하고 이틀에 한번씩 배지를 갈아주어 7일째 되는 날의 성숙된 수지상 세포를 사용한다.

<237> 사람 유래 PBMC 및 림프구(lymphocyte) 분리: 건강한 사람에게서 혈액을 채혈 (50 ml)한 후 Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin, Germany)를 사용하여 peripheral blood mononuclear cells (PBMC) 층 및 림프구를 회수한다.

<238> HeLa 세포주는 MEM(Minimum Essential Medium)에 10% 우태아혈청 (Invitrogen, USA)과 Earle's salts, non-essential amino acids, sodium pyruvate 및 100 µg/ml 페니실린과 100 units/ml 스트렙토마이신(streptomycin)를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포주를 준비하였다.

<239> 상기 언급된 모든 세포주는 ATCC(American Type Cell Culture)로부터 구입한 세포주들이다.

<240>

<241> (2) in vitro에서의 pep1-FITC의 uptake 분석

<242> 상기 세포주에 pep1 (서열번호 1) 를 처리하여 기존의 알려진 HIV의 PTD인

TAT(YGRKKRRQRRR)(서열번호 10)과의 uptake 정도를 비교하기 위해 유세포 분석기(Flow cytometry)와 공초점현미경(Confocal microscopy) 분석을 실시하였다.

<243>

<244> 유세포분석 (Flow cytometry)

<245> 부착 세포주는 plate에 세포주가 90~100% 분주하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양한다. 배지를 제거하고 PBS washing 후 세포의 starvation을 위해 각각의 well에 OPTI-MEM 1mL을 넣어 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한다. OPTI-MEM으로 한번 washing 한 후 100ul의 OPTI-MEM에 10uM 농도의 FITC와 결합된 펩타이드를 처리한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한다. 배지를 제거한 후 1X PBS로 Washing을 3번 한 후 Trysin/EDTA로 떼어 FACS tube에 넣어 다시 PBS로 Washing을 3번 한다. 처리하지 않은 세포주를 control로 하여 FITC와 나머지 FITC-conjugated peptide의 cellular uptake 양상을 비교 분석한다. (도 3 내지 6 참조).

<246>

본 실시예의 결과에서, 종래에 알려진 TAT 보다 pep1이 세포내 투과 효율이 높은 것을 확인 하였으며, 특히, C-말단에 존재하는 리신 잔기에 FITC가 접합된 경우, 세포 내 투과효율이 가장 좋은 것을 확인하였다.

<247>

<248> 공초점 현미경(Confocal Microscopy) 분석

<249> 상기 배양된 세포주를 챔버 웰(chamber well)에 분주하여 배지에 10% 우태아 혈청 (Invitrogen, USA)과, 100 ug/ml penicillin, 100 units/ml streptomycin를 첨가한 배지에서 세포주가 2-camber glass slide (NUNC, Lab-Tek)에 50% 차지하게 분주하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양한다.

<250>

배지를 제거한 후 PBS로 washing 후에 OPTI-MEM 1ml에 1시간의 starvation을 시킨다. 처리하고자 하는 5uM의 FICT 결합된 펩타이드를 각 chamber에 50ul 넣고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양한다. 배지를 제거 한 후 PBS Washing로 3번 한다. 각 chamber에 0.5mL 4% Paraformalehyde를 넣고 실온에서 20분간 고정 시킨다. PBS로 빠르게 4% PFA를 2번 washing한다. TO-PRO³ Iodide 642/661nm(Invitrogen)를 500nM(Invitrogen)처리하여 10분 동안 room temperature에서 세포의 핵을 염색한다. 용액을 제거 한 후 1XPBS Washing을 3번 한 후 플라스틱 chamber를 제거하고 slide 위에 VECTASHIELDTM mounting medium(Vector Laboratories)을 떨어뜨려 No. 1.5 thickness cover slip를 기포가 생기지 않게 잘

덮는다. cover slip의 가장자리를 투명 네일 폴리쉬를 발라 샘플을 만든다. Fluorescence를 보기 전 샘플을 4℃에서 빛을 피해 보관 후 Confocal laser scanning system로 비교 분석하였다. 분석에는 FV1000 laser scanning confocal microscope (Olympus)을 사용하였다.

<251>

<252> (i) ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 분석

<253>

Pep1을 처리한 상기 세포주는 PBS 완충용액을 사용하여 두 번 세척하고, 침전물은 50mM Tris pH7.5, 10 mM EDTA pH8.0, 1mM PMSF, 2mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 0.1% NP 40, 100g/μl Leupeptin, 100g/μl Aprotinin을 섞어서 만든 분해 완충용액(lysis buffer)에 재부유하였다.

<254>

부유된 세포를 초음파 분쇄기(Sonicator Ultrasonic processor, Misonix, NY, USA)를 이용하여 얼음에서 15 초동안 두 번 초음파 분쇄 한 뒤 4℃, 13,000 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 상청액(세포 용해질)을 획득하였다. 브레트포드 단백질 어세이(Bradford Protein Assay, Bio-Rad, USA)를 이용하여 단백질 농도를 정량하고 형광 ELISA를 실시하였다.

<255>

<256>

1. 2차 실험

<257>

(1) HeLa 세포주에서의 세포 침투능

<258>

상기 준비된 상기 세포주에 실시예 2.1로부터 준비된 pep1과 FITC의 컨쥬게이트(CPP)를 처리하여 기존의 알려진 HIV의 PTD(protein transduction domain)인 TAT(YGRKKRRQRRR)과의 uptake 정도를 비교하기 위해 유세포 분석기(Flow cytometry)와 공초점현미경(Confocal microscopy) 분석을 실시하였다.

<259>

세포주를 6-well plate에 분주하여 배지에 10% 우태아혈청 (Invitrogen, USA)과, 100 μg/ml 페니실린과 100 units/ml 스트렙토마이신(streptomycin)를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. PBS로 세척한 후, MEM(Minimum Essential Medium)에 1시간 동안 starvation을 시킨다. 각 운반 펩티드 20 μM을 처리하여 37℃에 1시간 배양하였다. PBS로 세척과정을 3번 반복하고 Trypsin-EDTA를 37℃에서 10분간 처리하여 세포 바깥쪽에 붙은 운반 펩티드를 제거한다. 냉장된 PBS로 세포를 수거한 후 3번 세척 과정을 원심분리를 통해서 반복하였다. 그 후 4% Paraformaldehyde가 포함된 0.5ml PBS에 suspension시켜 FACS Calibur(Becton Dickinson)로 형광을 분석하였다. 처리하지 않은 세포(Control)와 다양한 FITC 접합 펩티드의 cellular uptake 양상을 MFI(mean fluorescence intensity)로 비교 분

석하였다.

<260> 상기 배양된 세포주를 챔버 웰(chamber well)에 분주하여 배지에 10% 우태아 혈청 (Invitrogen, USA)과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin과 100 units/ml streptomycin를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. PBS 세척 후, MEM(Minimum Essential Medium)에 1시간의 starvation을 시켰다. 각 운반 펩티드 10 μM 을 처리하여 37°C에 1시간 배양하였다. PBS로 세척 과정을 3번 반복하고 2%(v/v) Paraformaldehyde로 room temperature에서 15분간 고정 시킨 후 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 상온에서 핵을 염색하고, 공초점 현미경으로 관찰하여 비교 분석하였다.

<261> 그 결과는 도 7에 나타난 바와 같다.

<262> 한편, 세포 생존율 및 독성분석을 위해 상기 배양된 세포주를 96-well plate)에 분주하여 배지에 10% 우태아혈청 (Invitrogen, USA)과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin과 100 units/ml streptomycin를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. PBS 세척 후, MEM(Minimum Essential Medium)에 1시간의 starvation을 시켰다. 각 운반 펩티드 20 μM 을 처리하여 37°C에 24시간 배양한 후 MTT assay 방법을 이용하여 세포생존율 및 독성을 분석하였다. 그 결과는 도 8에 나타난 바와 같다.

<263>

<264> (2) Huh7 세포주에서의 유세포 분석을 통한 세포침투능 분석

<265> PEP1의 세포침투능을 살펴보고자 PEP1을 처리한 Huh7세포에서 유세포 분석을 하였다. 분석 방법은 상기 (1)의 HeLa 세포주 분석에 기재된 바와 같다. 분석 결과, PEP1은 TAT에 비해 낮은 세포침투능을 보이지만 대조군에 비해 높은 세포 침투능을 보이는 것으로 확인되었다. (도 9, 도 10).

<266>

<267> (3) 사람 T 림프구 세포주의 세포 침투능 분석

<268> PEP1의 세포침투능을 확인하고자 펩타이드를 사람 T 림프구에 처리하여 유세포 분석 방법으로서 FACS 분석을 하였다. 분석방법은 상기 (1)의 HeLa 세포주 분석에 기재된 바와 같다. 분석 결과, pep 1이 대조군(control FITC)에 비해 약 25배 침투능을 보였고 이는 HIV에서 유래된 TAT에 비해 약 6배 이상 높은 것으로 관찰되었다. (도 11, 도 12)

<269>

<270> (4) PEP1의 FITC 합성 위치에 따른 유세포분석과 공초점 현미경 분석을 통한 세

포침투능

<271> PEP1에 FITC를 N-말단 및 C-말단에 결합한 컨쥬게이트를 이용하여 여러 세포 주에서의 침투능을 확인하고자 유세포분석 및 공초점 현미경 분석을 실시하였다. 사용된 분석법은 상기 (1)의 HeLa 세포주 분석에 기재된 바와 같다. 사용된 세포주는 Huh7, HepG2, CHO, bmDC이다. 그 결과, 모든 세포주에서 C-말단에 FITC가 결합된 PEP1이 약 3배에서 10배 정도 높은 세포 침투능을 관찰 할 수 있었다 (도 13). 또한, 형광현미경으로 관찰하여 보았을 때 N-말단에 결합된 펩타이드에 비해 C-말단에 FITC가 결합된 PEP1이 세포질 내로의 침투능이 높은 것으로 관찰되었다 (도 14).

<272>

<273> (5) 다양한 세포주에서의 TAT 과 PEP1 의 공초점 현미경 분석을 통한 세포침투능

<274> TAT 펩티드와 PEP1의 세포 내 흡수 양상이 다름을 보여 주기 위해 공초점 현미경 분석을 세포주별(MCF7, Huh7, HepG2)로 실시하였다. 도 15 및 도 16은 분석 결과 이미지이다. 그린(488nm) 염색은 FITC를 나타내고 TOPRO-3로 염색한 레드(633nm) 부분은 세포 내 핵을 보여준다. 핵과 펩티드의 co-localization을 보이기 위해 핵 부분을 레드로 지정하였다. 이미지에서 co-localization을 나타나게 되면 그린 색과 레드 색이 합쳐진 오렌지 색을 보이게 된다. 실험 결과 TAT을 처리한 핵 부분의 오렌지 색을 나타내는 부분이 펩타이드와 세포의 핵이 co-localization 되었음을 의미한다. 이에 비해 PEP1을 처리한 세포 내 핵에서는 오렌지 색을 나타내는 부분이 없다.

<275> 이러한 결과는 PEP1이 세포 내에서 TAT과는 다른 위치로 흡수된다 것을 의미한다. 이를 수치화하여 나타낸 그래프가 도 17이다.

<276> 모든 공초점 현미경 분석 이미지들은 FV1000 laser scanning confocal microscope (Olympus)을 사용한 것이다. co-localization을 의미하는 Pearson's Coeff.를 사용하여 그림에 제시하였다. 각각의 세포주 MCF7, Huh7, HepG2 에서 ROI(region of interest)를 지정하여 Pearson's Coeff.의 평균의 분산을 보여준다. P값은 모든 세포주에서 0.0001보다 낮은 결과가 나왔고 이를 통해 TAT은 세포의 핵에 localization되는 반면 PEP1은 세포 핵에 localization되지 않고 세포질에 머무른다는 사실을 확인할 수 있다. 이와 같이 PEP1이 세포의 세포질에 국소화되는 특성은, TAT을 포함한 기존의 CPP들에 비해 차별화되는 가장 중요한 점이라고 할 수 있을 것이다.

<277>

<278> 실시예 3: 환경조건에 따른 침투능 분석

<279> (1) 여러 가지 세포주에서의 PEP1 펩타이드의 농도, 시간에 따른 유세포 분석

<280> 여러가지 세포주를 이용하여 PEP1을 농도, 시간에 따라 처리하여 침투능을 확인하고자 하였다. 세부적인 분석방법은 실시예 2에 기재된 바에 따른다. 분석 결과, Huh7, bmDC(마우스 골지 유래 수지상 세포주), CHO, COS7 세포주 모두 에서는 TAT 과 마찬가지로 농도에 따라 증가하는 경향을 보였다. HepG2 의 경우 TAT 은 증가하는 반면 PEP1은 50uM 농도에서 다소 떨어지는 양상이 관찰되었고, MCF 세포주 에서는 다른 세포들과 달리 10uM 이하 농도에서도 pep1이 TAT에 비해 약 4배 이상 증가되는 것이 관찰되었으며 역시 농도에 따라서 증가하는 것을 확인 할 수 있었다 (도 18 내지 도 23). 시간에 따라 관찰 하였을 때도 Huh7 세포주와 MCF 세포주, HeLa 세포주 모두에서 증가하는데 특히 MCF7 세포주에서 5uM을 처리하였을 때 모든 시간에서 약 10배 이상 증가된 세포 침투능이 관찰되었다 (도 24 내지 도 26).

<281>

<282> (2) 부유 세포주에서의 농도, 온도, 시간에 따른 유세포 분석과 공초점 현미경 분석을 통한 세포침투능 분석

<283> 부유 세포주로서 사람 T 세포주인 Jurkat, 사람 단핵구 세포주인 THP1, B 세포주인 Raji 세포주, 사람 백혈병 세포주인 K562 세포주를 이용하여 펩타이드의 농도, 온도, 시간에 따라 처리하여 분석하였다. 그 결과, Jurkat 세포주와 THP1 세포주에서는 TAT 에 비해 PEP1 이 각각 1.5배, 2배 이상 높은 침투능을 보였으나 B세포주인 Raji 세포주와 K562 세포주는 TAT 이 더 높은 침투능을 보임을 확인 하였다. 농도에 따라서는 모든 세포에서 증가하는 경향을 관찰 할 수 있었고 시간에 따라서는 Jurkat 은 지속적으로 3배 이상 증가하나 THP1 은 시간이 지나감에 따라 다소 감소하는 것을 관찰 할 수 있었고 온도에 따라서는 모든 세포주에서 차이를 발견하지 못했다. 이와 같은 분석결과로부터 PEP1 은 T세포와 단핵구 세포주에서의 침투능이 더 우수한 것을 확인할 수 있다. (도 27 내지 도 31).

<284>

<285> (3) 사람 PBMC 에서의 농도, 온도, 시간에 따른 유세포 분석

<286> 사람 혈액에서 분리한 PBMC 를 이용하여 펩타이드의 농도, 시간에 따라 처리하여 분석하였다. 그 결과, 전체 PBMC 에서 TAT 에 비해 PEP1 이 1.4배 높은 침투능을 보였고 농도와 시간에 따라 모두 TAT 과 PEP1 모두 증가하는 경향을 보였고, 림프구에서는 PEP1 이 약 1.8배 증가를 보였으나 단핵구에서는 TAT 과 비슷한 침투능으로 관찰되었다. 농도에 따라서는 림프구나 단핵구나 모두 증가 양상을 보였고

시간에 따라서는 림프구, 단핵구 모두 증가하는 경향이 관찰되었으나 특히 단핵구는 시간이 지남에 따라 PEP1의 침투능이 증가되어 3시간까지는 TAT과 비슷하게 증가하는데 5시간째에는 TAT에 비해 약 20% 더 증가됨을 확인할 수 있었다. (도 32 내지 도 34).

<287> (4) 사람 PBMC와 Jurkat에서의 화학 처리제에 따른 유세포 분석

<288> 사람 혈액에서 분리한 PBMC를 이용하여 침투 메커니즘 연구를 확인할 수 있는 화학적 처리제 이용 분석을 실시하였다. 본 세포 침투 메커니즘을 확인하기 위한 화학처리제는 2003년 JBC(278(36), 34141-34149)에 보고된 자료를 참고하여 농도를 정하였다. 화학처리제는 PEP1 펩타이드 처리하기 한 시간 전에 OPTI-MEM에 미리 처리한 후 PBS로 wash 해 준 후 PEP1 펩타이드를 처리한 후 유세포 분석을 하였다.

<289> 분석 결과, 전체 PBMC에서 TAT에 비해 PEP1이 plasma membrane cholesterol extraction인 M β CD를 처리했을 때 침투능을 억제시키는 경향을 보이고 다른 처리제는 비슷한 경향을 보였다. 그에 반해 TAT은 모든 처리제에서 오히려 더 증가하는 경향을 보였다. Jurkat 세포주에서도 M β CD가 침투능을 억제시키는 경향을 보였고 PEP1에 대해서는 모든 처리제가 억제하는 경향을 보이는 반면 TAT은 영향이 없는 결과로 보였다. 이를 토대로 PEP1은 PBMC나 Jurkat에서 plasma membrane을 통해 이동(translocation)한 것으로 확인할 수 있다. (도 35 내지 도 36).

<290>

<291> (5) 여러 가지 항체를 이용한 PEP1의 세포 침투능 분석

<292> Pep1의 CPP 기능에 HSP70/90가 중요한 역할을 한다는 것을 HSP70/90 항체를 이용하여 분석하였다. 분석을 위해 사람 혈액에서 분리한 PBMC 및 림프구와 Jurkat, THP1 세포주에서 GAPDH, HSP70, HSP 90 및 enolase의 항체를 처리하여 유세포 분석을 실시하였다. GAPDH 및 enolase의 항체는 대조군으로 사용된 것이다. 항체를 이용해 pep1과 HSP70/90 사이의 결합 및 상호작용을 억제하였을 경우 pep1의 세포 투과 능력이 현저히 떨어지는 것은 이를 뒷받침해 줄 수 있다.

<293> 여러 가지 항체에 의한 세포침투능 비교 분석하기 위해서 HSP70, enolase, GAPDH (santacruz), HSP90 항체를 사용하여 수행하였다. 세포들은 펩타이드로 배양하기 한 시간 전에 헤파린(10ug/ml), 메틸베타사이클로덱스트린(5mM), 노코다졸(20uM), 브레펠딘A(10uM), 사이토 칼라신F (5uM) 또는 클로로퀸(100uM)으로 처리하였다. 그 다음 PBS로 씻어낸 후, 펩타이드 처리는 실시예 2에 기재된 바

와 같은 방법으로 유세포 분석을 진행하였다. Anti-HSP70, anti-Enolase 그리고 anti-GAPDH 항체들은 Santacruz에서 구매하였고, anti-HSP90 항체는 Abcam에서 구매하였다. 세포 내 침투에 각각의 단백질들이 어떠한 역할을 하는지 분석하기 위해 그에 해당하는 단백질의 항체를 모든 세포에 같은 방법으로 처리하였다.

<294> 도 37에서 보는 것처럼, HSP70과 HSP90 특이적 항체를 처리하였을 때, GV1001-F가 hPBMC 내로 흡수되는 것이 현저하게 줄어들었고, 반면에 GAPDA 또는 Enolase 특이적 항체를 처리한 경우에는 영향을 받지 않는 것을 발견하였다.

<295> 또한, TAT 펩타이드의 세포 내 침투능은 HSP70과 HSP90 특이적 항체의 처리에 영향을 받지 않는 것으로 보였는데, 이는 HSP들이 GV1001의 세포 내 침투(세포질)에 특이적인 역할을 한다는 것을 증명해준다. 이러한 비슷한 경향은 THP-1, human lymphocytes 그리고 Jurkat cells을 이용한 실험에서도 관찰 되었다.

<296> HSP90와 HSP70의 과다발현 (유전자 및 단백질 표현)은 여러 종류의 암에서 보고되어 왔다. 그러므로 GV1001은 정상세포보다 암세포에서 보다 더 효율적으로 결합된 물질들을 (Cargoes) 세포 내로 끌고 들어갈 수 있을 것이고, 그렇기 때문에 GV1001이 HSP70 또는 HSP90이 과다 발현되는 암세포에 특이적으로 표적 할 수 있는 능력을 어느 정도 가진다고 할 수 있다.

<297>

<298> 실시예 4: 페로센카복실릭(Ferrocenecarboxylic)-CPP 컨쥬게이트의 세포 투과능 실험

<299> 1. 페로센카복실릭(Ferrocenecarboxylic)-CPP 컨쥬게이트의 제조

<300>

<301> 커플링을 위해 $\text{NH}_2\text{-Lys(Dde)-2-클로로-트리틸 Resin}$ 에 보호된 아미노산(8당량)과 커플링 시약 HBTU(8당량)/HOBt(8당량)/NMM(16당량)을 DMF에 녹여서 첨가한 후, 상온에서 2시간 동안 반응하고 DMF, MeOH, DMF순으로 세척하였다. 그 후 Fmoc 탈보호(deprotection)를 위해 20% DMF 중의 피페리딘(piperidine in DMF)을 가하고 상온에서 5분 간 2회 반응하고 DMF, MeOH, DMF순으로 세척하였다. 상기 반응을 반복적으로 수행하여 펩타이드 기본 골격($\text{NH}_2\text{-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Dde)-2-클로로-트리틸 Resin}$)을 만들었다. 여기에 2% DMF 중의 하이드라진(hydrazine in DMF)을 처리하여 C-말단 Lys의 잔기 보호기인 Dde를 제거하였다. 그런 다음 페로센카복실산(Ferrocenecarboxylic acid) (Sigma Aldrich cat.#46264, 16당량)와 커플링 시약 HBTU(16당량)/HOBt(16당량)/NMM(32당량)을 DMF에 녹여서 첨가한 후, 상온

에서 2시간 동안 반응하고 DMF, MeOH, DMF순으로 세척하였다. 합성이 완료된 펩타이드 Resin에 TFA/TIS/H₂O=95/2.5/2.5 을 가하여 펩타이드를 Resin에서 분리하였다. 얻어진 혼합물에 쿨링 디에틸 에테르(Cooling diethyl ether)를 가한 후, 원심 분리하여 얻어진 펩타이드를 침전시켰다. 이를 HPLC로 정제한 후, MS로 확인하고 동결 건조하였다.

<302>

<303> 2. 신경줄기세포 투과 실험

<304>

<305>

실험에는 래트(Sprague-Dawley, SD)(Orient bio, Kyungki, Korea) 임신 13일째의 배아의 머리에서 대뇌 피질을 분리해 poly-L-ornithine/fibronectin in Ca²⁺/Mg²⁺-free PBS (GIBCO, Grand Island, NY, USA)로 코팅해둔 플레이트에 2 x 10⁴ cells/cm² 으로 분주하고 N2 medium (DMEM/F12, 4.4 IM 인슐린, 100 mg/l 트랜스페린, 30 nM 셀레나이트, 0.6 IM 푸트레신(putrescine), 20 nM 프로세스테론, 0.2mM 아스코르브산, 2 nM L-글루타민, 8.6 mM D(+) 글루코오스, 20 nM NaHCO₃ (Sigma, St. Louis, MO))에 매일 기본 섬유아세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor, BFGF) (R&D Systems, Minneapolis, MN) 10 ng/ml를 처리해 37°C, 5% CO₂ 환경에서 4-6일 후 95%이상의 신경줄기세포를 얻었다.

<306>

<307>

상기 얻어진 신경줄기세포를 챔버 웰 플레이트에 1x10⁵으로 분주하였다. 여기에 페로센카복실릭-pep1을 10 μM을 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 0 내지 24시간 배양하였다. PBS로 2회 세척하고 4% 파라포름알데히드로 실온에서 20분간 고정시킨 후 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 마운트 배지(mount medium with DAPI) (Vetor Laboratories, CA, USA)로 세포의 핵을 염색하였다. 그 후에 공초점 레이저 스캐닝 시스템(Confocal laser scanning system)으로 각각 430-500nm의 블루 파장과 620-700nm의 레드 파장, 그리고 그 둘의 통합 파장에서 비교 분석하였다.

<308>

그 결과는 도 38 및 도 39에 나타나 있다.

<309>

도 38은 페로센카복실릭-pep1(Ferrocenecarboxylic-pep1)을 신경줄기세포에 처리한 후 시간 경과에 따른 상태를 측정한 사진이다.

310>

도 38에 나타난 바와 같이, 신경줄기세포에 페로센카복실릭-pep1을 처리한

후 비교 분석한 결과 10 μ M의 농도의 페로센카복실릭-pep1이 2시간부터 세포 내로 침투함을 확인할 수 있었고 시간이 경과함에 따라 더 많은 양이 세포 내로 침투함을 확인하였다.

<311> 도 39는 페로센카복실릭-pep1(Ferrocenecarboxylic-pep1)을 신경줄기세포에 처리한 후 DAPI로 세포 핵을 염색한 다음 공초점 레이저 스캐닝 시스템(Confocal laser scanning system)으로 신경줄기세포 투과 상태를 측정한 사진이다. 도 39에서, 430-500nm의 파장에서 블루로 보이는 부분이 DAPI로 염색된 핵이며, 620-700nm의 파장에서 레드로 보이는 부분이 페로센카복실릭-pep1이다. 두 파장의 통합 사진에 나타나 있듯이, 세포의 핵 주변에 페로센카복실릭-pep1이 모여 있는 것으로 보아, 페로센카복실릭-pep1이 세포 내로 침투해 세포질 내에 이동했음을 알 수 있다.

<312>

<313> 3. 독성시험

<314>

<315> 페로센카복실산(Ferrocenecarboxylic acid)과 컨쥬게이트된 pep1 자체의 독성실험을 위해, 신경줄기세포를 96웰과 24웰 플레이트에 각각 4×10^4 과 2.5×10^5 으로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에 최소 12시간 배양하였다.

페로센카복실릭-pep1(Ferrocenecarboxylic-pep1)을 각각 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M 농도로 처리하여 배양기에 24시간까지 배양한 후 셀 카운팅 키트-8(cell counting kit-8, CCK-8) 어세이 및 락테이트 디하이드로지네이즈(lactate dehydrogenase, LDH) 활성 어세이를 이용하여 각각 세포 생존율과 세포독성률의 변화를 확인하였다. 그 결과는 도 40에 나타나 있다.

<316> 도 40에 나타난 바와 같이, 신경줄기세포에서는 100 μ M까지 세포생존율과 세포독성에 영향이 없음을 확인하였다.

<317>

<318> 4. 인비보 실험

<319>

<320> A. 신경줄기세포의 준비

<321>

<322> 상기 (2)에서 얻어진 신경줄기세포를 100 mm 디쉬에 5×10^6 으로 분주하였다.

페로센카복실릭-pep1을 10uM을 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에 24시간 배양 후 TrypLE (GIBCO)로 플레이트로부터 세포를 분리하여 프리 배지(free media)로 세척

한 후 카운팅하여 1마리당 페로센카복실릭-pep1 표지된 신경줄기세포를 3×10^5 $10 \mu l$ 준비하였다.

<323>

<324> B. 페로센카복실릭-pep1 처리된 신경줄기세포(NSC)의 이식

<325>

<326>

본 명세서에 기재된 모든 동물실험은 대한민국 한양대학교(Hanyang University) IACUC의 승인을 득한 후 진행하였다. 8주령의 SD 래트를 구입하여 1주일간 적응기간을 거친 후 290 g $\pm$ 15g 정도의 몸무게가 된 래트를 본 실험에 사용하였다. 동물은 4군으로 나누어 실험을 진행하였는데, NSCs with Ferrocenecarboxylic-pep1 군, NSCs without Ferrocenecarboxylic-pep1 군, Ferrocenecarboxylic-pep1 군, 생리 식염수 군(Saline 군)으로 하였다. 각 군에 세포, 페로센카복실릭-pep1 혹은 saline을 이식할 때, stereotaxic surgery를 이용하여 SD 래트의 뇌 내에 이식하였다. 이식 수술 전 케타민(ketamin)과 롬펀(rompun)을 이용하여 마취하였으며, 두피의 면도 후 두개골을 일부 갈아서 제거하였다. 이후 좌표 AP = +0.7, R = +2, V = -5.5에 stereotaxic하게 이식하였다.

<327>

<328> C. MRI 촬영

<329>

<330>

이식된 NSCs과 페로센카복실릭-pep1의 생체 내 관찰을 위해 MRI를 이용하여 확인하였다. MRI는 이식 후 3기간이 경과하여 진행하였으며, Philips의 Best 3T MRI 장비를 이용하여 촬영하였다. 마취는 역시 케타민(ketamin)과 롬펀(rompun)을 사용하였으며, 멀티플래너 그라디언트-리콜드(multiplanar gradient-recalled, MPGR) 펄스 시퀀스(TR= 596 ms, TE = 16 ms, 섹션 두께 = 0.7 mm, 인-플레인 해상도(in-plane resolution): $292 \times 290 \mu m$ (화소 사이즈 $0.0593 mm^3$), and number of acquisitions = 1)를 이용하여 촬영하였다.

<331>

그 결과는 도 41 내지 도 44에 나타나 있다. 도 41은 페로센카복실릭-pep1을 처리한 신경줄기세포를 이식한 군(Stem cells with Ferrocenecarboxylic-pep1 군)의 뇌를 MRI 촬영한 사진이고, 도 42는 페로센카복실릭-pep1을 처리하지 않은 신경줄기세포를 이식한 군 (Stem cells without Ferrocenecarboxylic-pep1 군)의 뇌를 MRI 촬영한 사진이며, 도 43은 페로센카복실릭-pep1을 이식한 군 (Ferrocenecarboxylic-pep1 군)의 뇌를 MRI 촬영한 사진이고, 도 44는 생리 식염수를 이식한 군(Saline 군)의 뇌를 MRI 촬영한 사진이다. 도 41 내지 도 44에 나타난

바와 같이, 페로센카복실릭-pep1으로 처리된 신경줄기세포의 생체 내 검출이 매우 우수함을 알 수 있었다. 도 41와 도 42을 비교하면 Ferrocenecarboxylic-pep1으로 처리되지 않은 신경줄기세포는 검출되지 않는 반면, 페로센카복실릭-pep1으로 처리된 신경줄기세포는 검출이 매우 우수하다. 한편, 생리 식염수만을 이식한 군(도 44)에 비해, 페로센카복실릭-pep1을 이식한 군(도 43)이 훨씬 더 검출이 우수함을 알 수 있다.

<332>

<333> 실시예 5: 매크로분자(단백질, DNA 및 siRNA)의 수송기능 확인

<334> 1. CPP-GFP 컨쥬게이트의 세포 투과능 실험

<335> (1) CPP-GFP 컨쥬게이트의 제조

<336> 서열번호 1의 펩티드와 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)의 컨쥬게이트를 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

<337> 먼저, 도 45에 도시된 바와 같이, 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP) (서열번호 6, 서열번호 7)을 pET28a(+) 벡터(Promega)에 클로닝 하기 위하여 프라이머를 제작하였다. 프라이머는 5'에 EcoRI 절단 부위, 3'에 HindIII 절단 부위를 포함하고, 상기 EcoRI 부위 뒤에는 GFP 전반부 서열 약 21bp를 포함하고, HindIII 부위 뒤에는 종결코돈을 포함하도록 제작하였다. GFP-CPP 단백질 유전자의 제작을 위해서는 5'쪽은 GFP와 동일하지만 GFP 앞쪽에 CPP를 코딩하는 서열을 포함하도록 제작하였다. 예컨대, 서열번호 1(Pep 1) 펩티드의 경우, 다음의 서열을 포함하도록 제작하였다: GAA GCG CGC CCG GCG CTG ACC AGC CGC CTG CGC TTT ATT CCG AAA (서열번호 3). 비교예로서, TAT-GFP를 제조하기 위해 GFP 앞에 "TAT GGT CGT AAA AAA CGT CGT CAA CGT CGT CGT (서열번호 11)" 서열을 붙였다.

<338> EGFP는 도 45에 도시된 벡터를 template으로 하여서 PCR하여 얻음. EGFP-16P는 primer 제작시 EGFP 앞에 16P를 붙여준다. *16P(GAA GCG CGC CCG GCG CTG CTG ACC AGC CGC CTG CGC TTT ATT CCG AAA) EGFP-TAT은 primer 제작시 EGFP 앞에 TAT을 붙여준다. *TAT(TAT GGT CGT AAA AAA CGT CGT CAA CGT CGT CGT)

<339> *Ecoli에서 expression 시킬 경우 위의 16P, TAT을 Ecoli codon usage에 맞게 변형시킨다.

<340> 도 46은 pET-28a vector 모식도를 나타낸 것이다. 47은 클로닝 모식도이다.

<341> 이어 상기 프라이머를 사용하여 pET-28a-GFP 벡터를 주형으로, 포워드(forward) 프라이머는 CPP 코딩 서열 뒤에 21개의 GFP 서열을 첨가하여 제작하였고, 리버스(reverse) 프라이머는 GFP의 C-말단 서열 일부를 첨가하여 제작한

후, PCR을 수행하였다. 95℃, 5min, 30cycle 95℃ 5min(denaturation), 63℃ 30sec(annealing), 72℃ 1min(elongation), 72℃ 7min 조건으로 PCR 하였고, 각 프라이머는 10 pmol로 사용하였다. 이러한 PCR 조건을 이용하여, GFP, GFP-CPP DNA 단편을 증폭한 후, pET28a(+) 벡터의 EcoRI 및 HindIII 부위에 클로닝하여, GFP, GFP-CPP를 발현하는 벡터를 수득하였다(도 47).

<342> 이어 상기 벡터를 박테리아에 형질전환하여 단백질을 분리하였다. 구체적으로 이콜라이(*E.coli*) BL21(DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 상기 각 벡터로 형질전환시킨 후 5ml LB/카나마이신 배지에서 키운 후 100ml 배지로 옮겨 배양하였다. 이 경우 카나마이신을 1/1000 부피비율로 첨가하였다. 이어 37℃에서 약 2-3시간 교반 배양한 후 흡광도를 측정하여 약 0.6-0.8범위 내까지 키운 뒤, IPTG (Isopropyl 베타-D-1-thiogalactopyranoside) 1mM을 처리하여 주었다. 이어 3-4시간 추가 배양한 후 세포를 5000rpm에서 5분 원심분리 하였다.(도 48)

<343> 여기에서 IPTG 1mM을 처리하는데 그 원리는 다음과 같다. 처리 조건은 IPTG를 처리하기 전 BL-21 transformant(100ml)를 온도 37에서 약 2-3시간 키워서 O.D 약 0.6-0.8 내외로 키운 후 IPTG 1mM을 처리한 후 온도 37에서 약 3-4시간 더 키운 후 protein을 추출하면 된다.*EGFP-TAT의 경우에는 IPTG 처리 후 온도 16에서 o/n 한다. 이렇게 해서 얻어진 샘플은 His tag purification이라는 방법을 이용하여서 우리가 원하는 정제 단백질을 얻을 수 있다.(도 49)

<344> 발현시킨 단백질은 원심분리 결과, 세포가 녹색 빛을 띠게 되면 과발현된 것을 육안으로 확인할 수 있다. 이를 His 태그 정제 키트인 단백질 분리 키트 (Prod, #21277, Thermo Scientific, IL, USA)를 제조자의 안내대로 분리하였다.

<345> 분리 후 단백질을 투석하여 정제하고, 농축하였다. 구체적으로 멸균된 4℃ PBS를 사용하여 투석하였다. 우선 투석액을 미리 PBS로 평형화시킨 후, 여기에 5ml 주사기를 이용하여 위에서 분리한 단백질 용액을 취해 투석 백에 넣어준 후, 교반하면서 4℃에서 하룻밤 투석하였다. 이어 단백질의 농도를 높여주고 불필요한 물질을 제거해 주기 위하여, BIBASPIN 20 (Prod, #VS2092, Sartorius Stedin biotech, Germany) 에 투석한 단백질을 넣고 3,000rpm으로 4℃에서 원심분리 하는 방법으로 농축하였다.

<346>

<347> (2) 세포주의 배양 (Cell Culture)

<348> ATCC로부터 얻어진 간세포 암의 세포주인 HepG2 cells(human hepatocellular carcinoma cells)를 이용하여 세포주를 6-well plate에 5×10^5 로 분주 후 MEM배지에

10% 우태아혈청(Invitrogen, USA)과, 100 ug/ml penicillin, 100 units/ml streptomycin를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. CHO (Chinese Hamster Ovary cells) 와 HeLa (human cervical cancer cells), 그리고 Huh7 (human hepatocellular carcinoma cells) 과 MCF7 (human breast cancer cells) 세포주는 각각 DMEM, RPMI 1640 배지에 10% 우태아혈청 (Invitrogen, USA) 과, 2 mmol/ml L-glutamin, 100 ug/ml penicillin과 100 units/ml streptomycin를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다

<349> (3) 형광현미경 (Fluorescence Microscope)

<350> 세포주를 PBS washing 후 OPTI-MEM에 1시간의 starvation을 시켰다. GFP(서열번호 6, 서열번호 7), TAT(YGRKKRRQRRR)-GFP(실시예5.1(1)에서 제조됨), pep1-GFP(실시예5.1(1)에서 제조됨)를 1uM을 처리하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에 18시간 배양하였다. 세포주를 PBS washing 후 1ml의 PBS 분주한 상태에서 광원 488nm에서 관찰하였다. 형광현미경 분석에서는 TAT 은 세포 침투되어 핵에 위치하는 반면 pep1 은 세포질에 위치하는 것이 관찰 되었다. 따라서 본 연구결과로 보아 pep1 은 MCF 세포주에서 pep1 이 TAT 에 비해 높은 침투율을 보이고 세포에 침투하여 세포 질에 위치하는 것 관찰된다 (도 50).

<351>

<352>

<353> (4) 유세포분석 (Flow cytometry)

<354> 세포주를 PBS washing 후 OPTI-MEM에 1시간의 starvation을 시켰다. GFP, TAT-GFP, 16merGFP를 1uM을 처리하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에 2시간 배양하였다. PBS 로 Washing 과정을 3번 반복한 후 0.5ml 1X FACS buffer에 suspension시켜 FACS Calibur(Becton Dickinson)로 fluorescence를 분석하였다. 처리하지 않은 세포주를 control로 하여 GFP, TAT-GFP, pep1-GFP의 cellular uptake 양상을 비교 분석하였다. 여러가지 세포주를 이용하여 pep1 이 결합된 GFP 단백질을 처리하여 유세포 분석하였다. 그 결과, MCF7 세포주에서는 TAT에 비해 pep1 이 약 두 배 더 증가된 경향을 보였으나 다른 세포주에서는 TAT에 비해 증가율은 높지 않았다 (도 51).

<355>

<356> 1. DM 콘쥬게이트의 세포 투과능 실험

<357> (1) DNA와 (poly-lysine)-CPP 콘쥬게이트 제조

<358> 기존에 세포침투능이 있는 것으로 알려진 펩티드 (GGG, TAT)와 텔로머라아제

유래 펩티드인 hTERT에 라이신 15mer를 결합하였다. 폴리라이신은 양이온이 많기 때문에 음이온을 띄는 DNA와 잘 결합한다. 펩티드 합성은 펩트론에 의뢰하였고 합성된 펩티드는 증류수에 1mg/ml 농도로 용해하였다. 도 52는 본 실험에 사용된 펩티드의 1차 구조이다.

<359> 도 53은 본 실험에 사용된 펩티드의 모식도이다.

<360>

<361> (2) 세포주 배양 (Cell Culture)

<362> CHO, HepG2 그리고 Huh7과 MCF7 세포주는 각각 DMEM, MEM 그리고 RPMI 1640 배지에 10% 우태아혈청 (Invitrogen, USA)과, 2 mmol/ml L-glutamin, 100 ug/ml penicillin과 100 units/ml streptomycin를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

<363>

<364> (3) 전기영동 (Electrophoresis)

<365> DNA-peptide complex의 결합정도를 확인하기 위하여 0.05-5ug의 펩티드 0.5ug의 Generuler 1kb DNA ladder (Fermentas)에 섞어 상온에서 10분간 대기하였다. DNA-peptide complex를 0.5 mg/ml Ethidium Bromide (EtBr)이 포함된 1% 아가 로즈 겔에 주입하여 1x TAE 버퍼에서 100V, 30분간 반응하였다.

<366> Peptide-DNA complex 전기영동 결과 모든 펩티드는 DNA와 잘 결합됨이 확인되었다 (도 54). 펩타이드와 DNA와 잘 결합되면 DNA가 neutralize되어 DNA의 immobilization이 일어나는데 본 실험의 결과에 의하면 DNA 대비 펩티드의 비율 (w/w)이 1 이상일 때 immobilization이 확인되었다.

<367>

<368> (4) pep1 펩티드를 이용한 Luciferase DNA 수송 능력 분석

<369> 상기 명시된 세포주를 12-well plate에 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ /well로 배양하고 다음날 PBS wash 후 Opti-MEM으로 배지를 교체하였다. Opti-MEM에 pIRES2-EGFP vector에 luciferase 유전자를 삽입하여 제작한 pIRES2-EGFP luciferase vector 2ug과 각 펩티드를 1, 2, 4, 8 배수 (w/w)를 섞어 최종 용량 100ul/well의 complex를 제작하였다. 제작된 DNA-peptide complex를 각 well에 주입하고 37℃에서 CO₂ 5% 조건에서 4시간동안 배양하였다. Cell wash 후 complete media로 교체한 후 37℃에서 CO₂ 5% 조건에서 추가 20시간동안 배양하였다. DNA-peptide complex 주입 후 24시간 뒤 배지를 제거하고 PBS로 2회 wash 후 1x lysis buffer 50ul/well을 주입하

고 상온에서 15분간 shaking 후 획득된 cell lysate에 대하여 luciferase assay를 실시하였다. 100ul의 luciferase substrate에 cell lysate 20ul을 넣어 luminescence를 측정하였다. 실험결과는 BSA assay로 표준화된 평균값을 기록하였다.

<370> Luciferase assay 결과 hTERT-pK는 모든 농도에서 비교 그룹 (TAT-pK, GGG-pK)보다 높은 luciferase expression이 확인되었다. hTERT-pK는 농도가 dependent한 luciferase expression activity를 보였으며, 특히 DNA 대비 8배 농도에서 TAT-pK, GGG-pK와 비교할 때 유의한 수준 (GGG-pK 대비)의 결과가 확인되었다 (도 55)

<371>

<372> 1. siRNA-CPP 컨쥬게이트의 세포 투과능 실험

<373> (1) siRNA-CPP 컨쥬게이트의 제조

<374> 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 펩타이드 기본 골격

Trt-Mercaptoacetyl-Ahx-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-chloro-Trityl Resin)을 제조하였다. 여기서 Ahx는 6-아미노헥사노산 (6-aminohexanoic acid)을 의미한다. 제조된

Trt-Mercaptoacetyl-Ahx-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-chloro-Trityl Resin)은 HPLC 분석 및 질량 분석을 통해 그 합성을 확인하였다.

<375> 상기 합성된 pep1에 siRNA의 서열을 컨쥬게이션시켜 siLuc-pep1 [siLuc conjugation with Mercaptoacetyl-Ahx-EARPALLTSRLRFIPK] 컨쥬게이트를 제조하였다. 구체적으로, pep1에 컨쥬게이션시키는 siRNA 서열로는 아래와 같은 서열을 사용하였다.

<376> SiLuc 센스 (5'→3'): CUUACGCUGAGUACUUCGA(dTdT) (서열번호: 4)

<377> SiLuc 안티센스 (5'→3'): UCGAAGUACUCAGCGUAAG(dTdT) (서열번호: 5)

<378> 그 제조방법은, pep1을 대한민국의 바이오니아에서 공급받은 Maleimide modified SiLuc(75umol)과 PBS 버퍼(1X 1ml)에 녹이고 상온에서 2시간 반응시켜 컨쥬게이션시켰다. 컨쥬게이션은 펩티드 상의 씨올(thiol)기와 siRNA 상의 말리이미드(Maleimide)와의 반응을 통해 이루어진다. 컨쥬게이션 반응은 엘만 시약(Ellman's reagent) (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) 또는 DTNB)을 이용하여 확인하였다. 엘만 시약은 샘플 중의 씨올(thiol)기의 수 또는 농도를 정량하기 위해 사용되는 케미칼이다.

<379> 실험에 사용된 siRNA의 서열은 luciferase 유전자를 목적으로 하며 펩트론으

로 합성을 의뢰하여 제공받은 다음과 같은 siLuc-scrambled pep1 [siLuc conjugation with Mercaptoacetyl-Ahx-LRALPKRPFISRLTEA], siLuc-Tat(47-57) [siLuc conjugation with Mercaptoacetyl-Ahx-YGRKKRRQRRR], siLuc-Penetratin[siLuc conjugation with Mercaptoacetyl-Ahx-RQIKIWFQNRMMKWKK], siLuc-pep1 [siLuc conjugation with Mercaptoacetyl-Ahx-EARPALLTSRLRFIPK]의 siRNA 를 사용하였다. 대조군으로 siCont-scrambled pep1, siCont-Tat(47-57), siCont-Penetratin, siCont-pep1를 사용하였다. 상기 siRNA들은 모두 상기 실시예5의 제조방법과 같이 하여 제조하였다. 양성 대조군으로 바이오니아에서 상업적으로 판매하고 있는 luciferase siRNA 와 음성 대조군으로 negative siRNA (Cat # : SN-1012, AccuTarget Negative control siRNA)를 사용하였다.

<380> siRNA의 서열은 다음과 같다.

<381> SiLuc 센스 (5'→3'): CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT (서열번호: 4)

<382> SiLuc 안티센스 (5'→3'): UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT (서열번호: 5)

<383> SiCont의 서열은 다음과 같다.

<384> SiCont 센스 (5'→3'): GCACCUAUAACAACGGUAGdTdT (서열번호: 8)

<385> SiCont 안티센스 (5'→3'): CUACCGUUGUUAUAGGUGCdTdT (서열번호: 9)

<386> (2) 세포주 배양 (Cell Culture)

<387> 사람 유래 간세포암 세포주 ATCC로부터 얻은 Huh7(Human hepatocellular carcinoma) 는 RPMI 1640 배지에(Hyclon) 10% 우태아혈청(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)과, 2 mmol/ml L-글루타민, 100 ug/ml 페니실린과 100 units/ml 스트렙토마이신을 첨가하여 37℃, 5% CO2 배양기에서 배양하였다.

<388> (3) 루시페라제 활성 측정 (Luciferase assay)

<389> Huh7 세포를 24well plate에 2×10^5 개씩 주입하여 키운 후 luciferase 목적유전자 2ug 을 lipofectamin 2000 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 을 이용하여 일시적 트랜스펙션(transient transfection)하였다. 4시간 후, lipofectamin 2000 을 완벽하게 PBS 로 여러 차례 씻어 낸 후 Opti-MEM (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 500ul 에 siRNA 를 최종 농도 400nM 로 처리한 후 37℃ 세포 배양기에서 16시간 반응시켰다. 반응 종료하기 위하여 PBS 로 씻어 낸 후 Reporter Lysis Buffer (Promega Co., Madison, WI, USA) 용액을 이용하여 단백질을 용해한 후 luciferase reagent (Promega Co., Madison, WI, USA) 를 이용하여 luminometer (Turner BioSystem, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다. siRNA 효율을 보정하고자 Bradford assay를 이용한 단백질 정량으로 보정하였다.

<390> pep1 의 세포침투능을 확인 하고자 루시퍼라제를 목적으로 하는 siRNA 를 제작하여 사람 유래 간세포암 세포주인 Huh7 세포와 CHO세포주를 이용하여 루시퍼라제의 활성을 측정하였다. 그 결과, Huh7 세포주에서는 penetratine 과 pep1 이 루시퍼라제와 결합된 siRNA 에서 penetratine 과 pep1 이 대조군과 결합된 siRNA 에 비해 약 28%, 20% 정도 감소된 활성이 나타난 것에 반면 scrambled 와 Tat 이 대조군과 루시퍼라제가 결합된 siRNA 는 특별한 활성의 차이를 보이지 않았다. 또한, 루시퍼라제가 결합된 scrambled 와 Tat, penetratin, pep1 의 siRNA 의 루시퍼라제의 활성의 차이를 비교해볼 때, 각각 27%, 55%, 40% 의 활성 억제를 관찰할 수 있었다 (도 57).

<391> CHO세포주에서는 다른 siRNA 와 달리 pep1이 결합된 siRNA에서 약 30% 루시퍼라제 활성이 억제됨이 관찰되었다. 이와 같이 siRNA 를 이용한 pep1 의 루시퍼라제의 활성 억제를 관찰 함으로써 GV1001 의 세포 침투능이 있음을 확인 할 수 있었다 (도 58).

<392>

<393> (4) 유세포분석 (Flow cytometry) 을 통한 siRNA수송 능력 분석

<394> 실험에 사용된 siRNA의 서열은 HBx 유전자를 target으로 하며 (siHBV, sense-5' GAG GAC UCU UGG ACU CUC A dTdT-3' (서열번호 12), antisense-5' UGA GAG UCC AAG AGU CCU C dTdT-3') 3' (서열번호 13)에 fluorescein을 결합하였다. siRNA 합성은 바이오니아에 의뢰하였고 합성된 siRNA는 HPLC에 의하여 정제되었다.

<395> 전일 24-well plate에 1 x 10⁵/well로 배양된 HepG2를 Opti-MEM으로 배지를 교체하였다. 4시간 배양 후 Opti-MEM 300ul에 FITC-labeled siRNA (siHBV)와 각 농도별 (molar ratio) 펩티드를 잘 섞어 complex를 제작하였다. siRNA의 최종농도가 10uM이 되도록 주입하고 37℃에서 CO2 5% 조건에서 1시간 동안 배양하였다. Trypsin을 처리하고 상온에서 5분 대기 후 PBS로 3회 wash하고 500ul/well FACS 버퍼를 주입한 후 300rpm, 4℃의 조건으로 원심분리를 3회 반복하여 세포의 형광물질을 제거하였다. FITC fluorescence는 flow cytometry (BD FACSCalibur System; Becton Dickinson, France)에 의하여 총 10,000개 세포가 측정되었다. 유세포분석을 이용한 cellular uptake 실험결과 hTERT-pK는 20 molar ratio 이상의 농도에서 비교 그룹 (RGD-pK, GGG-pK)보다 약 2. 5배 높은 FITC-labeled siRNA cellular uptake가 확인되었다 (도 56).

<396>

<397> 실시예 6: CPP-FITC 컨쥬게이트의 미토콘드리아 국소 전달 효능 실험

<398>

<399>

1. 현미경 분석

<400>

<401>

(1) 세포배양.

<402>

ATCC로부터 얻은 인간의 유방암 유래의 MCF7(Human breast adenocarcinoma) 부착 세포주를 사용하였다. 세포주는 10% 우태아혈청 (Invitrogen, USA)과, 100 μ g/ml 페니실린, 100 units/ml 스트렙토마이신을 포함하는 RPMI 1640배지(Sigma)에서 배양되었다(37°C, 5% CO₂).

<403>

FITC가 서열번호 1의 펩티드의 C-말단에 결합된 컨쥬게이트는 상기 실시예 2에 따라 제조되었다.

<404>

<405>

(2) 공초점 현미경 분석

<406>

상기 세포주를 2-챔버 슬라이드 글라스 (NUNC, Lab-Tek)의 표면의 50%를 차지하도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. 이어 배지를 제거한 후 1X PBS로 세척한 후에 OPTI-MEM (Sigma) 1ml에 1시간 배양하여 스타베이션(starvation)하였다. 이어 100 μ M의 FITC가 서열번호 1의 펩티드의 C-말단에 결합된 컨쥬게이트를 상기 각 챔버의 50 μ l(10 μ M)로 추가한 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다.

<407>

이어 배지를 제거한 후 1X PBS(Phosphate buffered saline, pH7.4)로 3회 세척하였다. 각 챔버에 0.5mL 4% 파라포름알데히드(PFA)를 넣고 실온에서 20분간 고정시켰다. 이어 1X PBS로 세척한 후, 4% PFA로 신속하게 2회 세척하였다.

<408>

이어 상기 세포에 TO-PRO-3 Iodide 642/661nm (Invitrogen)를 500nM 처리하여 10분 동안 실온에서 세포의 핵을 염색하였으며, mototrackerTM deep red FM 644/665nm (Invitrogen) 250nM로, 15분간 실온에서 처리하여 미토콘드리아를 염색하였다. 용액을 제거한 후 1XPBS로 3회 세척한 후 플라스틱 챔버를 제거하고 슬라이드 위에 VECTASHIELD mounting medium(Vector Laboratories)을 떨어뜨려 슬라이드글라스를 덮은 후, 4에서 빛을 피해 보관 후 콘포칼레이저 스캐닝 시스템을 이용하여 FITC는 488nm에서 TO-PRO-3 Iodide(Invitrogen)와 mitotrackerTM deep red (Invitrogen)는 633nm 파장에서 측정하였다.

<409>

결과는 도 59에 있다. FITC가 서열번호 1의 펩티드의 C-말단에 결합된 컨쥬게이트와 미토콘드리아 국소화 마커인 mototrackerTM deep red FM 644/665nm

(Invitrogen)로 염색한 결과로 (A) MCF- 세포에 FITC가 서열번호 1의 펩티드의 C-말단에 결합된 컨쥬게이트 단독 처리, (B) 미토콘드리아 국소화 마커인 mototracker deep red FM 644/665nm (Invitrogen) 단독처리, (C) 세포의 위상차대비 (Phase contrast), (D) A와 B 이미지의 결합 이미지이다. 상기 결과로부터 텔로머라제 유래 펩타이드가 미토콘드리아로 국소화함을 확인할 수 있었다.

<410>

<411> 1. 항체 결합 실험

<412>

<413> 실시예 5. 1(1)에 따라 제조된 pep1-GFP 컨쥬게이트를 ATCC로부터 얻어진

2×10^7 개의 인간의 유방암 유래의 MCF7(Human breast adenocarcinoma) 부착 세포주에 처리한 후 미토콘드리아의 hsp70 항체로 웨스턴 블랏을 수행하였다.

비교예로서, GFP만 처리, 11mer-GFP 처리, ccg-GFP 처리를 하고 동일하게 미토콘드리아의 hsp70 항체로 웨스턴 블랏을 수행하였다. 구체적으로 아래와 같은 방법으로 수행하였다.

<414>

2×10^7 개의 MCF7 세포주를 준비하여 Mitochondria 분리 키트 (Thermo science, #89874)를 사용하여 해당 프로토콜 대로 미토콘드리아를 분리하였다. 구체적으로, 세포 펠릿에 Reagent A 800ul를 넣고 중간 정도의 세기로 5초 동안 볼텍스 하였다. 그 다음 얼음에 2분간 방치한 후 세포 현탁액(cell suspension)을 Dounce 조직 그라인더(tissue grinder)로 옮기고 얼음 위에서 갈아주었다. 라이시스된 세포를 원래의 튜브에 옮겨 담았다. 여기에 Reagent C를 800ul 넣고, 그라인더에 200ul Reagent A를 넣고 행구었다. 약하게 혼합(gently mix)하고 700g을 4°C에서 10분 원심분리하였다. 상등액을 새 튜브에 옮겨서 다시 3,000g, 15분 원심분리하였다. 상등액을 버리고, 미토콘드리아가 있는 펠릿에 500ul Reagent C를 넣고, 12,000g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고, 펠릿을 얼음에 꽂아두었다. TBS (25mM Tris, 0.15M NaCl, pH7.2)에 2% CHAPS를 넣은 버퍼를 100ul 넣고 1분간 볼텍스하였다. 12,000g에서 2분간 원심분리 하고, 그 상등액(soluble mitochondria protein)을 테스트 단백질과 아래와 같이 면역 침강하였다.

<415>

테스트 단백질은 실시예 5. 1(1)에 따라 제조된 pep1-GFP 컨쥬게이트이고 대조군으로 GFP, 11mer-GFP, ccg-GFP를 사용하였다. 11mer-GFP는 HBV로부터 유래된 11개 aa으로 구성된 11mer 단백질이 GFP와 컨쥬게이션된 것이다. ccg는 Hepatitis B virus의 복제 기원(replication origin)이다.

<416>

상기 테스트 단백질과 대조군 단백질을 각각 레진에 붙이기 위해 6xHis가 표

지 된 코발타(cobalt) 레진을 준비하였다 (Prod. #89964, Thermo Scientific, UL, USA). 컬럼에 50-100 μ l의 레진을 넣고, 워싱버퍼(washing buffer)로 500 μ l씩 5번 씻어주었다. 여기에 각 발현 단백질을 넣고, 4℃에서 돌려가면서 30분 내지 1시간 동안 잘 섞이도록 방치하였다. 이 후 다시 워싱버퍼로 발현단백질-레진 중합체를 500 μ l씩, 5번 씻어주었다. 이어 여기에 위에서 준비한 미토콘드리아 상등액 추가한 후 4℃에서 하룻밤 돌려가면서 방치하였다. 다음날 레진을 워싱버퍼로 같은 방법으로 씻어주고 용출(elution)버퍼 200 μ l를 넣어 최종 용출하였다. 그 결과는 도 60에 나타나 있다. 그 결과 미토콘드리아의 hsp70 항체가 pep1-GFP에만 결합한 것을 알 수 있었다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

세포 투과성 운반 펩티드 (carrier peptide) 및 유효성분의
컨쥬게이트(conjugate)로서,

상기 운반 펩티드는,

서열번호 1을 포함하는 펩티드, 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성
을 갖는 펩티드, 또는 그것의 단편이며,

상기 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의
세포 투과성을 보유한 것인 컨쥬게이트.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

상기 단편은 3개 이상의 아미노산으로 구성된 단편인 컨쥬게이트.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서,

상기 운반 펩티드는, 30개 이하의 아미노산으로 구성된 컨쥬게이트.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서,

상기 운반 펩티드는,

서열 번호 1의 서열을 갖는 펩티드 또는 상기 펩티드 서열과 80% 이상의 서
열 상동성을 갖는 펩티드인 컨쥬게이트.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서,

상기 유효성분은, 단백질, 핵산, 펩티드, 지질, 당지질, 미네랄, 당, 나노
입자, 생물학적 체제, 조영물질, 약물(drugs) 및 화학 물질(compounds) 중 선택된
하나 이상인 컨쥬게이트.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 유효성분이 DNA일 때 상기 운반 펩티드는 폴리라이
신을 매개로 하여 DNA와 결합된 것이고,

또는 RNA인 컨쥬게이트.

【청구항 7】

제1항에 있어서, 상기 운반 펩티드와 유효성분은 공유결합에 의해, 선택적으
로 링커에 의해 매개됨으로써, 접합된 것인 컨쥬게이트.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 상기 운반 펩티드와 유효성분은 비공유결합에 의해 접합된 것인 컨쥬게이트.

【청구항 9】

제5항에 있어서, 상기 유효성분은 단백질 또는 펩티드인 컨쥬게이트.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 유효성분은, 사이토카인, 항체, 항체 단편, 치료용 효소, 가용성 수용체, 또는 리간드인, 컨쥬게이트.

【청구항 11】

제 1 항에 있어서,
상기 운반 펩티드는 플루오레세인 이소티오시아네이트 (fluorescein isothiocyanate)와 결합한 것인 컨쥬게이트.

【청구항 12】

제 1 항에 있어서,
상기 운반 펩티드는 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)과 결합한 것인 컨쥬게이트.

【청구항 13】

제 1 항에 있어서,
상기 유효성분은 상기 운반 펩티드의 C-말단에 결합한 것인 컨쥬게이트.

【청구항 14】

제 1 항에 있어서,
상기 유효성분은 그것의 효능 타겟이 암세포, 면역세포 또는 섬유아세포인 컨쥬게이트.

【청구항 15】

제 14 항에 있어서,
상기 암세포는 간암 세포, 유방암 세포 및 백혈병 세포로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 암세포이며, 상기 면역세포는 T 림프구, B 세포 및 단핵구로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 면역세포인, 컨쥬게이트.

【청구항 16】

제 1 항에 있어서,
상기 유효성분은 세포질로 국소화될 필요가 있는 것이며, 상기 운반 펩티드는 상기 유효성분의 세포질로의 국소 전달을 수행하는 것인, 컨쥬게이트.

【청구항 17】

제 16 항에 있어서,

상기 유효성분은 미토콘드리아로 국소화될 필요가 있는 것이며, 상기 운반 펩티드는 상기 유효성분의 미토콘드리아로의 국소 전달을 수행하는 것인, 컨쥬게이트.

【청구항 18】

제5항에 있어서,

상기 조영물질은 방사선 비투과성 조영물질(radiopaque contrast agent), 상자성(paramagnetic) 조영물질, 초상자성(superparamagnetic) 조영물질, 및 CT 조영물질로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 컨쥬게이트.

【청구항 19】

제5항에 있어서, 상기 조영물질은 철-기반 물질인 컨쥬게이트.

【청구항 20】

제19항에 있어서, 상기 조영물질은 페로센 카복실레이트인 컨쥬게이트.

【청구항 21】

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 컨쥬게이트를 포함하는 조영제.

【청구항 22】

제21항에 있어서, 상기 조영제는 세포를 조영하기 위한 것인 조영제.

【청구항 23】

제22항에 있어서, 상기 세포는 줄기세포인 조영제.

【청구항 24】

유효성분으로서, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 컨쥬게이트를 포함하는 조성물.

【청구항 25】

제 24항에 있어서,

상기 유효성분은 질병의 치료 또는 예방을 위한 유효성분이며, 상기 조성물은 약학 조성물인 조성물.

【청구항 26】

제 24 항에 있어서,

상기 유효성분은 기능성 화장료의 유효성분이며, 상기 조성물은 화장료 조성물인 조성물.

【청구항 27】

제 24항에 있어서,

상기 유효성분은 기능성 건강식품의 유효성분이며, 상기 조성물은 건강식품 조성물인 조성물.

【청구항 28】

세포질 타겟팅 유효성분 전달 시스템으로서,

상기 유효성분 전달 시스템은 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 컨쥬게이트(conjugate)를 포함하며,

운반 펩티드는, 세포질로 국소적으로 이동하는 펩티드로서, 상기 유효성분의 세포질 국소 전달을 수행하는 펩티드이며,

80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 세포질 타겟팅능을 보유한 것인, 세포질 타겟팅 유효성분 전달 시스템.

【청구항 29】

미토콘드리아 타겟팅 유효성분 전달 시스템으로서,

상기 유효성분 전달 시스템은 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 컨쥬게이트(conjugate)를 포함하며,

운반 펩티드는, 세포 내 미토콘드리아로 국소적으로 이동하는 펩티드로서, 상기 유효성분의 미토콘드리아 국소 전달을 수행하는 펩티드이며,

80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 미토콘드리아 타겟팅능을 보유한 것인, 미토콘드리아 타겟팅 유효성분 전달 시스템.

【청구항 30】

미토콘드리아 활성 조절용 조성물로서,

상기 조성물은, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 컨쥬게이트(conjugate)를 포함하며,

운반 펩티드는, 세포 내 미토콘드리아로 국소적으로 이동하는 펩티드로서, 상기 유효성분의 미토콘드리아 국소 전달을 수행하는 펩티드이며,

80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 미토콘드리아 타겟팅능을 보유한 것인, 미토콘드리아 활성 조절용 조성물.

【청구항 31】

제30항에 있어서,

상기 조성물은 미토콘드리아 관련 질병 또는 장애의 치료, 예방, 진행의 억제, 또는 증상 완화용 약제학적 조성물이며,

상기 유효성분은 미토콘드리아 관련 질병 또는 장애의 치료, 예방, 진행의

억제, 또는 증상 완화 기능을 나타내는 성분인, 미토콘드리아 활성 조절용 조성물.

【청구항 32】

유효성분을 세포 내로 전달하기 위한 방법으로서,

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 컨주게이트(conjugate)를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하며,

운반 펩티드는, 세포 투과성 펩티드로서, 상기 유효성분의 세포 내 전달을 수행하는 펩티드이며,

80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 및 단편은 서열번호 1 펩티드의 세포 투과성을 보유한 것인, 유효성분의 세포 내 전달 방법.

【청구항 33】

제 32항에 있어서,

상기 방법은 유효성분을 세포 내 미토콘드리아로 국소 전달하는 것인, 유효성분의 세포 내 전달 방법.

【청구항 34】

세포 투과성 펩티드로서,

상기 펩티드는, 서열번호 1을 포함하는 17 aa 이상의 펩티드로 구성된 세포 투과성 펩티드.

【청구항 35】

세포 투과성 펩티드로서, 상기 펩티드는 서열번호 1의 단편인 펩티드이며, 3개 내지 7개의 아미노산으로 구성된 것인 세포 투과성 펩티드.

【청구항 36】

제34항 또는 제35항에 따른 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 37】

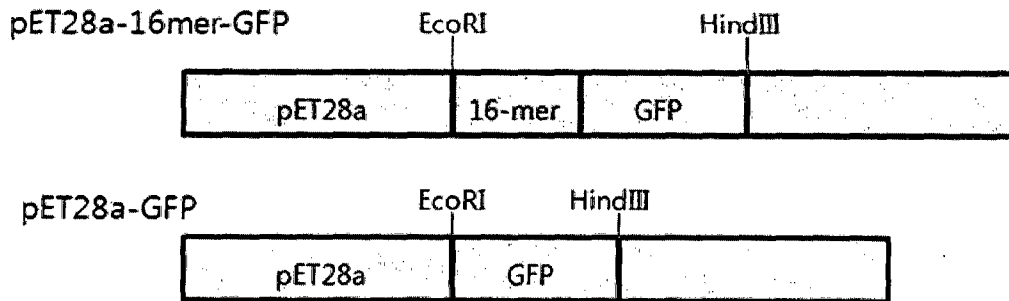
제36항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

【청구항 38】

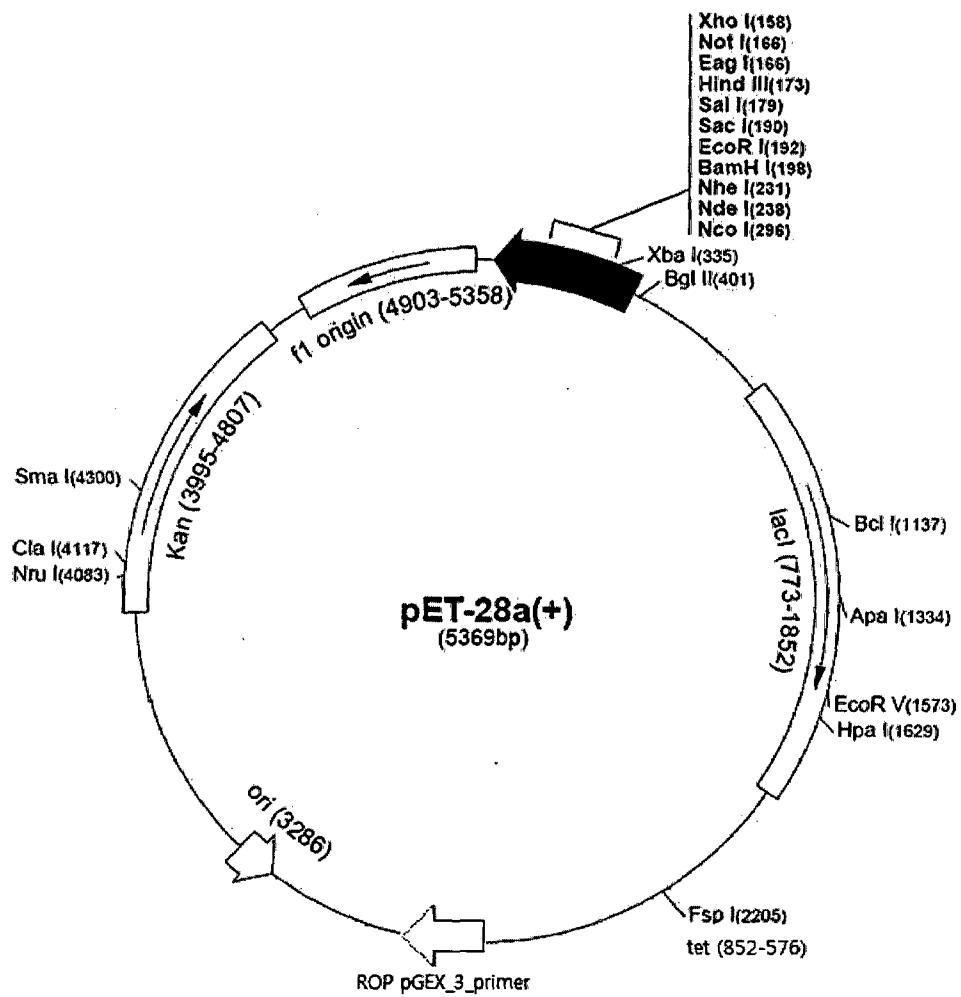
제37항에 따른 벡터를 포함하는 형질전환세포.

【도면】

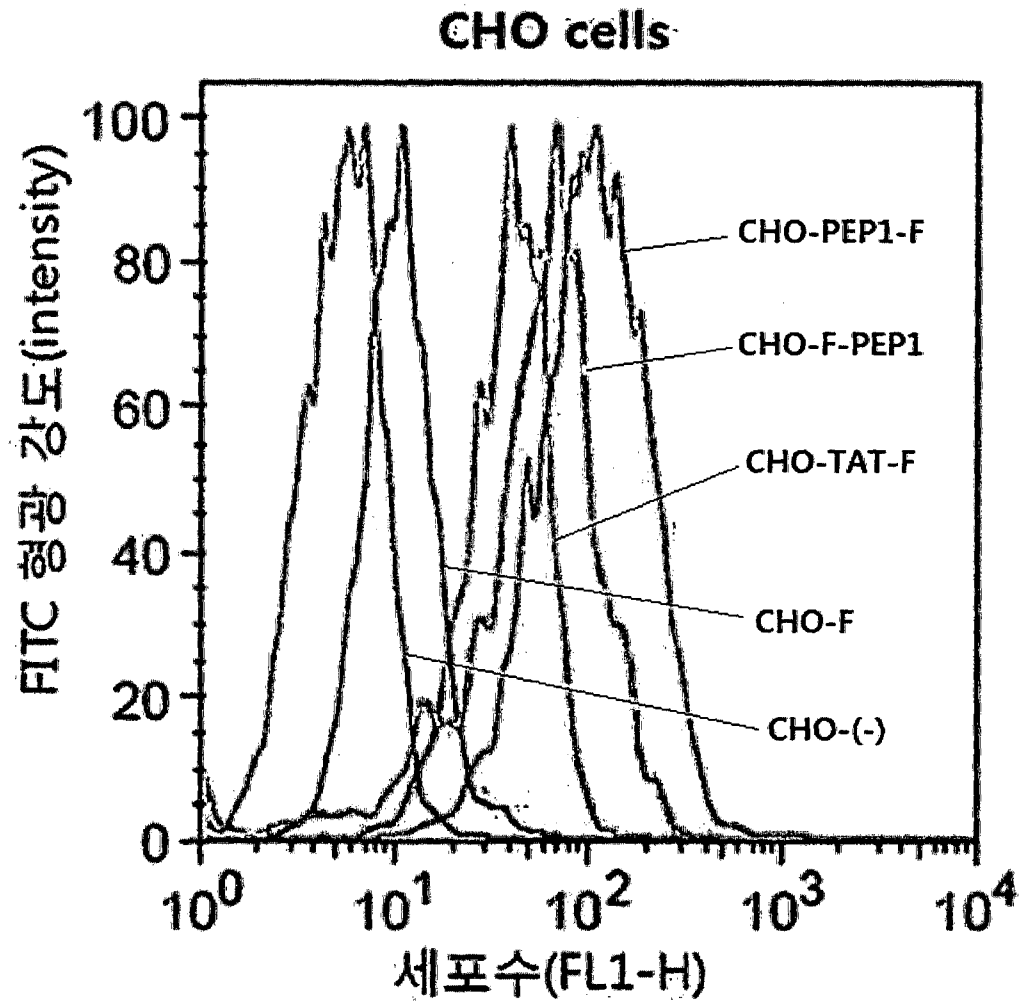
【도 1】



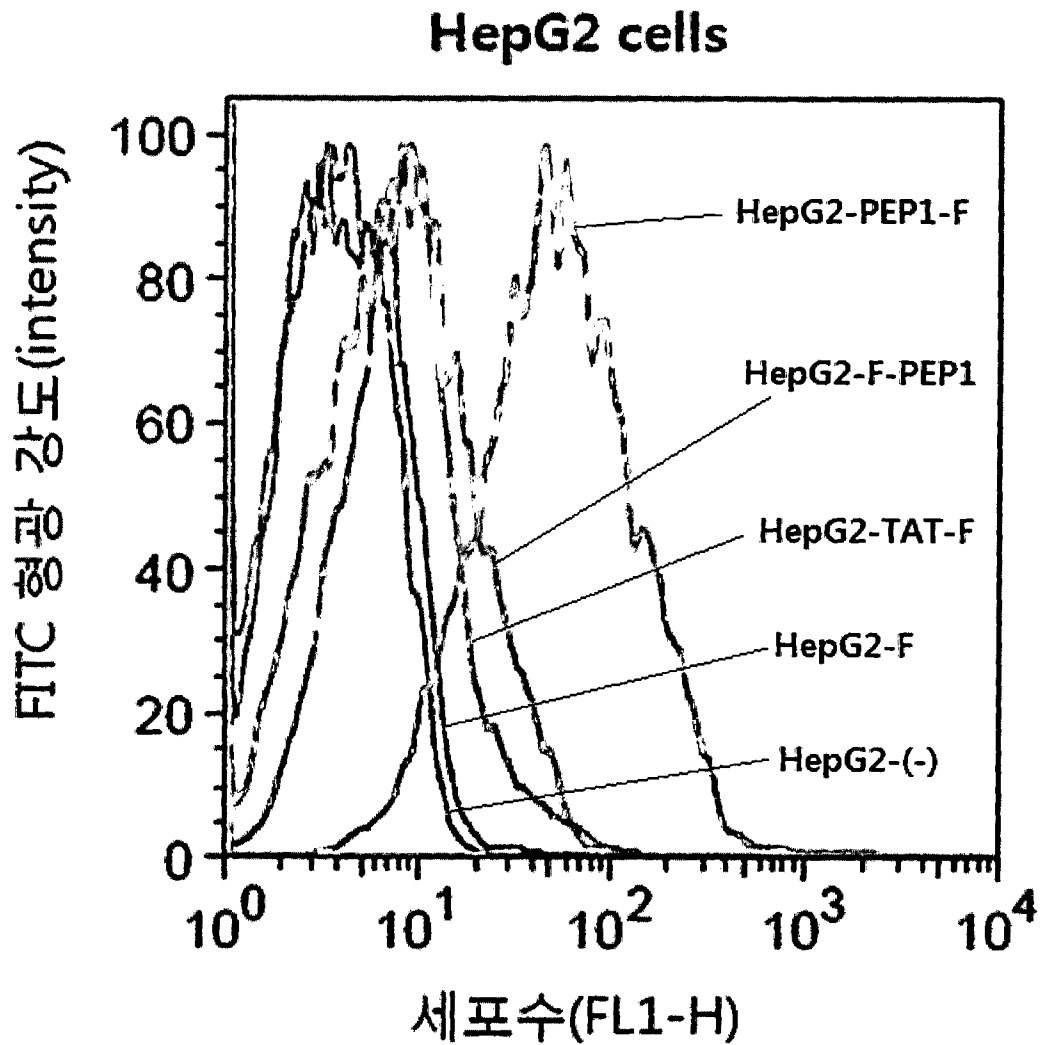
【도 2】



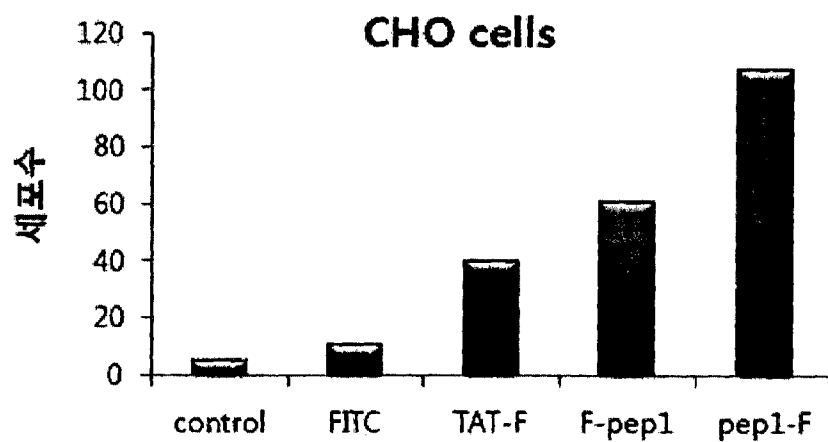
【도 3】



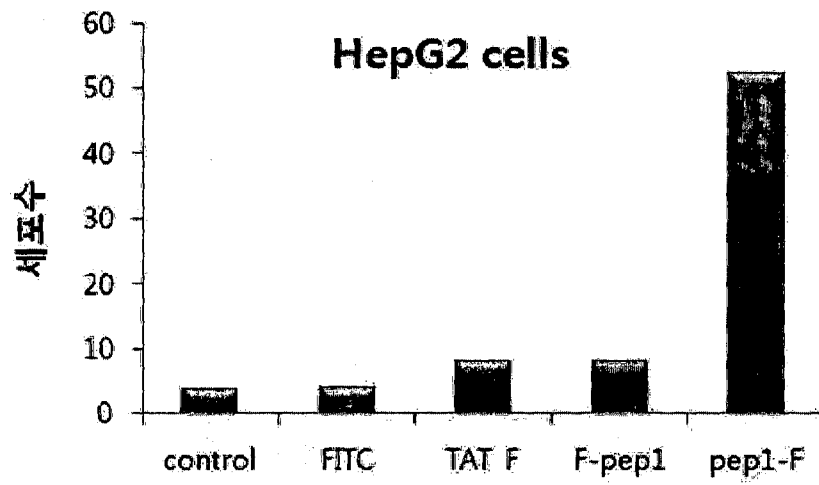
【도 4】



【도 5】

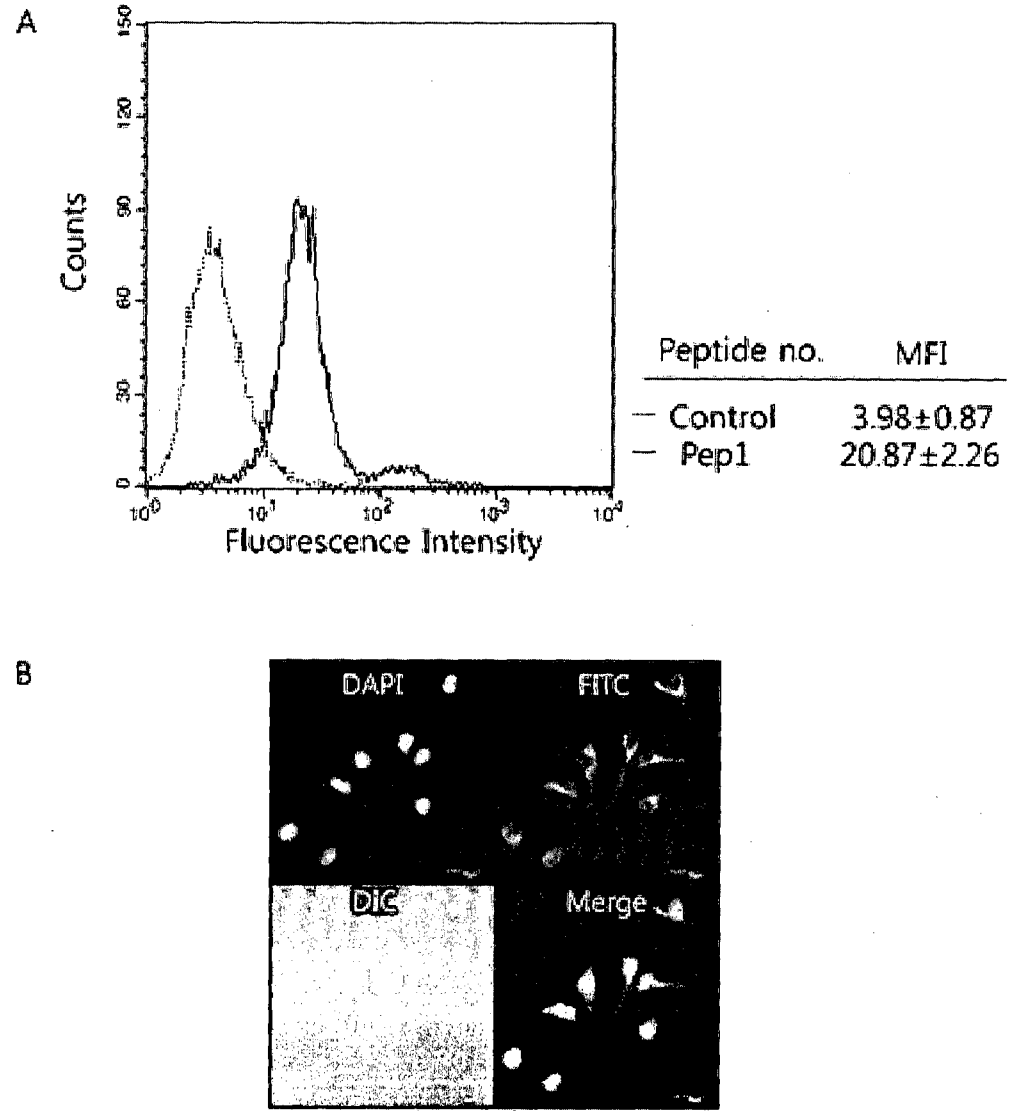


【도 6】

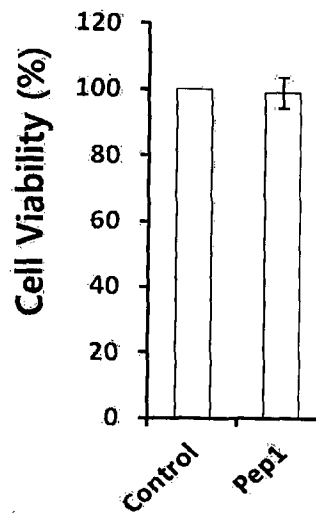


【도 7】

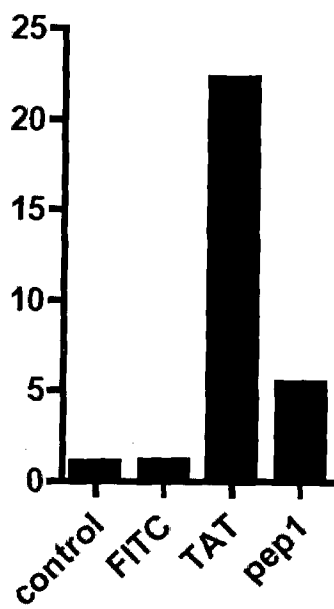
[Pep1 - FITC]



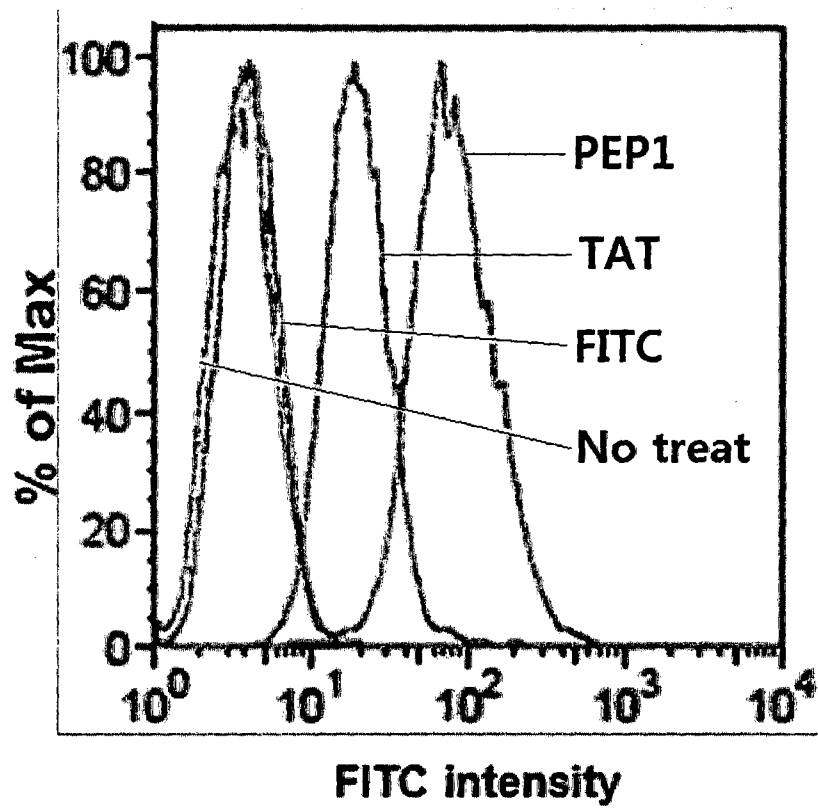
【도 8】



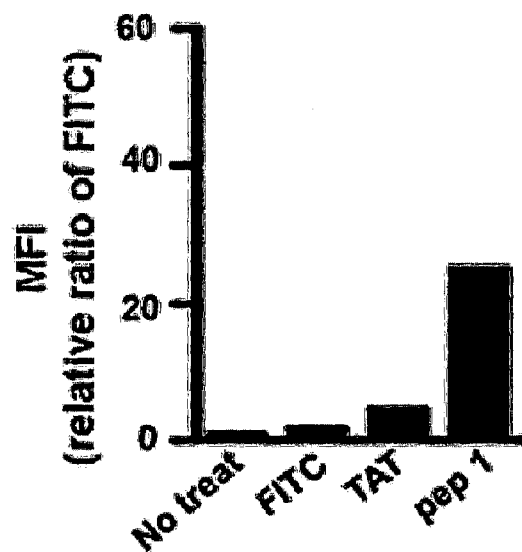
【도 9】



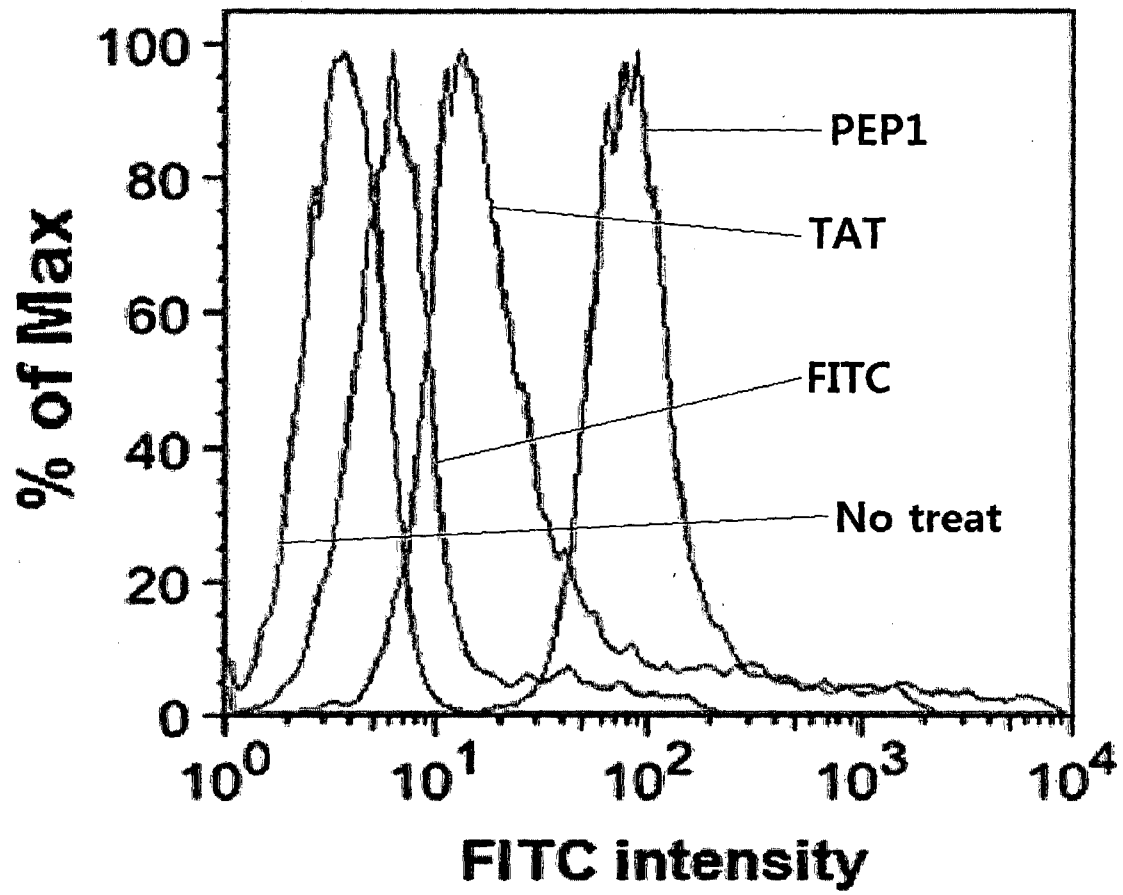
【도 10】



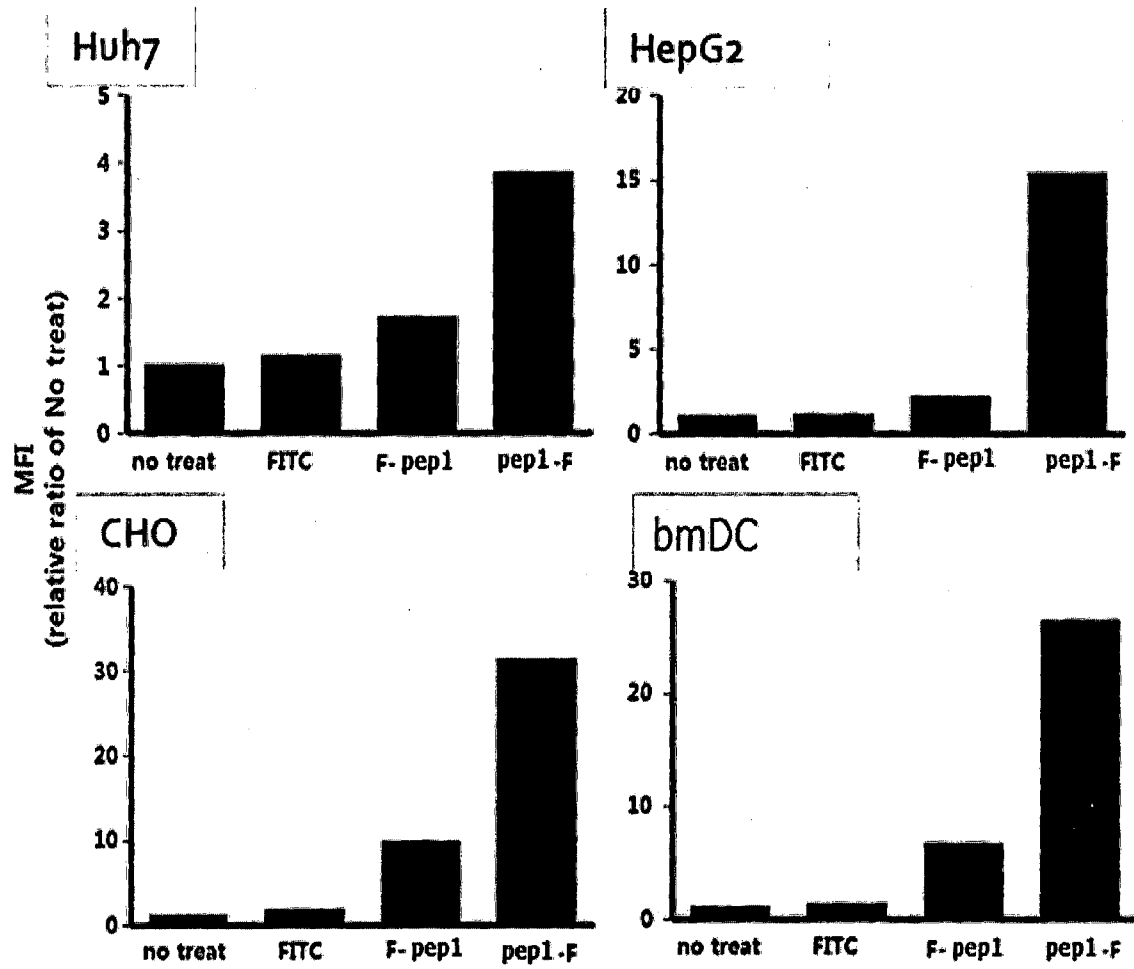
【도 11】



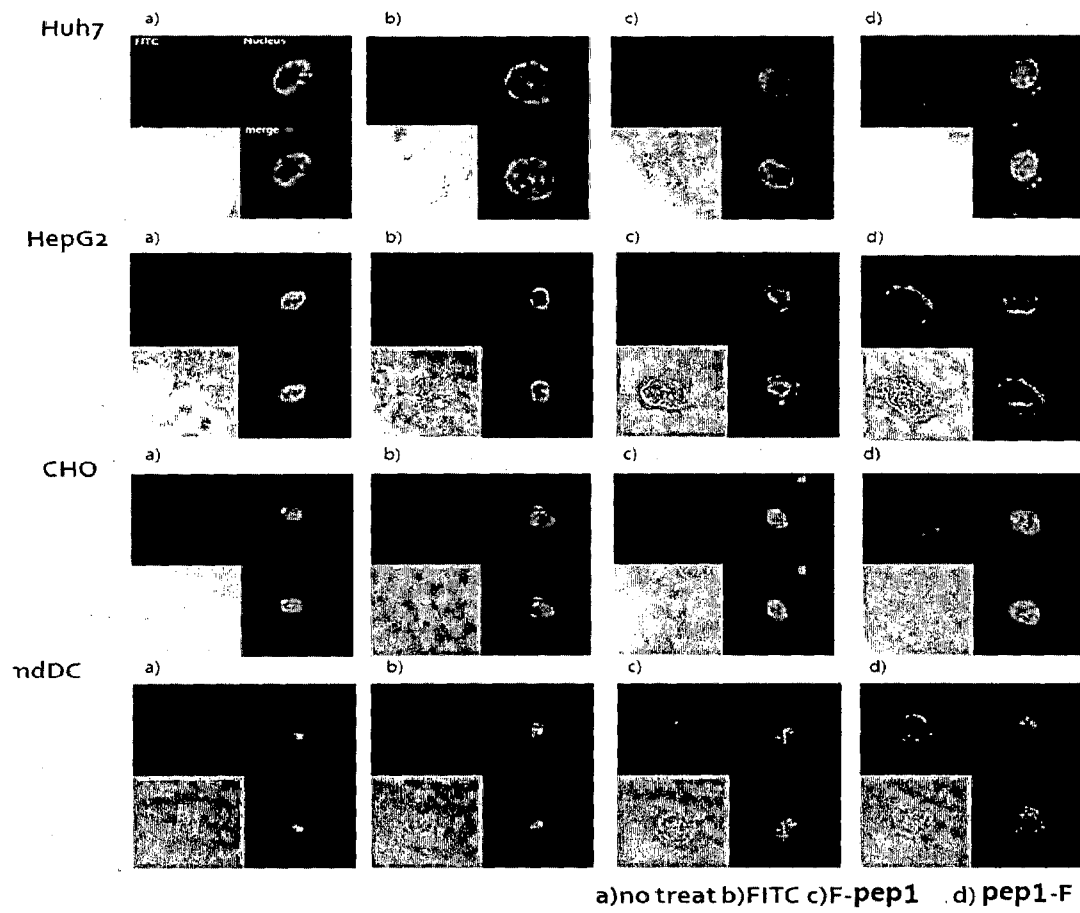
【도 12】



【도 13】

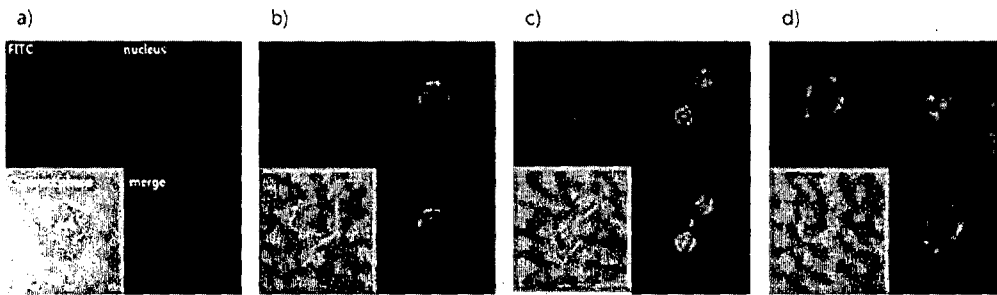


【도 14】

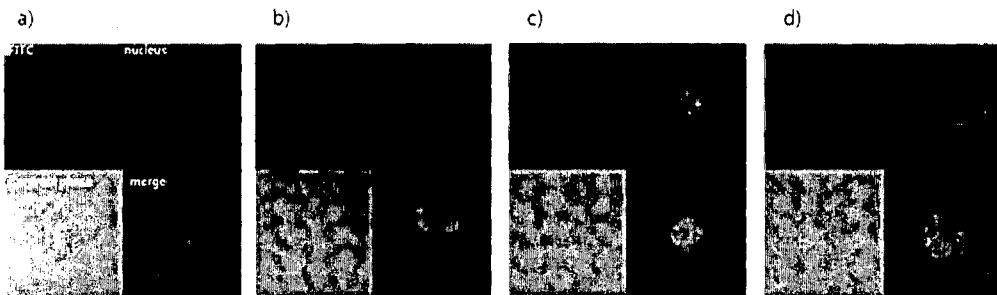


【도 15】

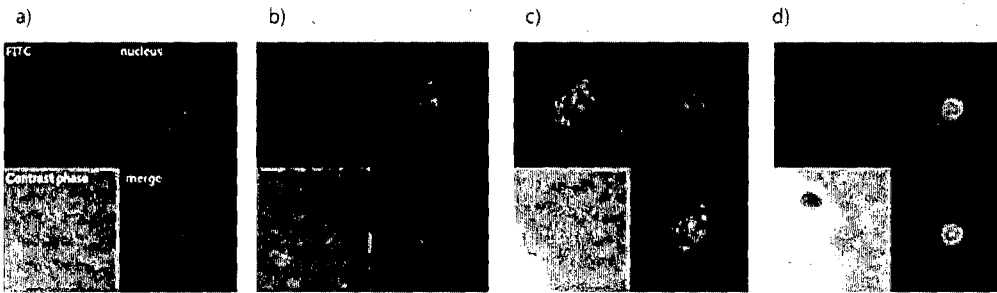
MCF7



Huh7

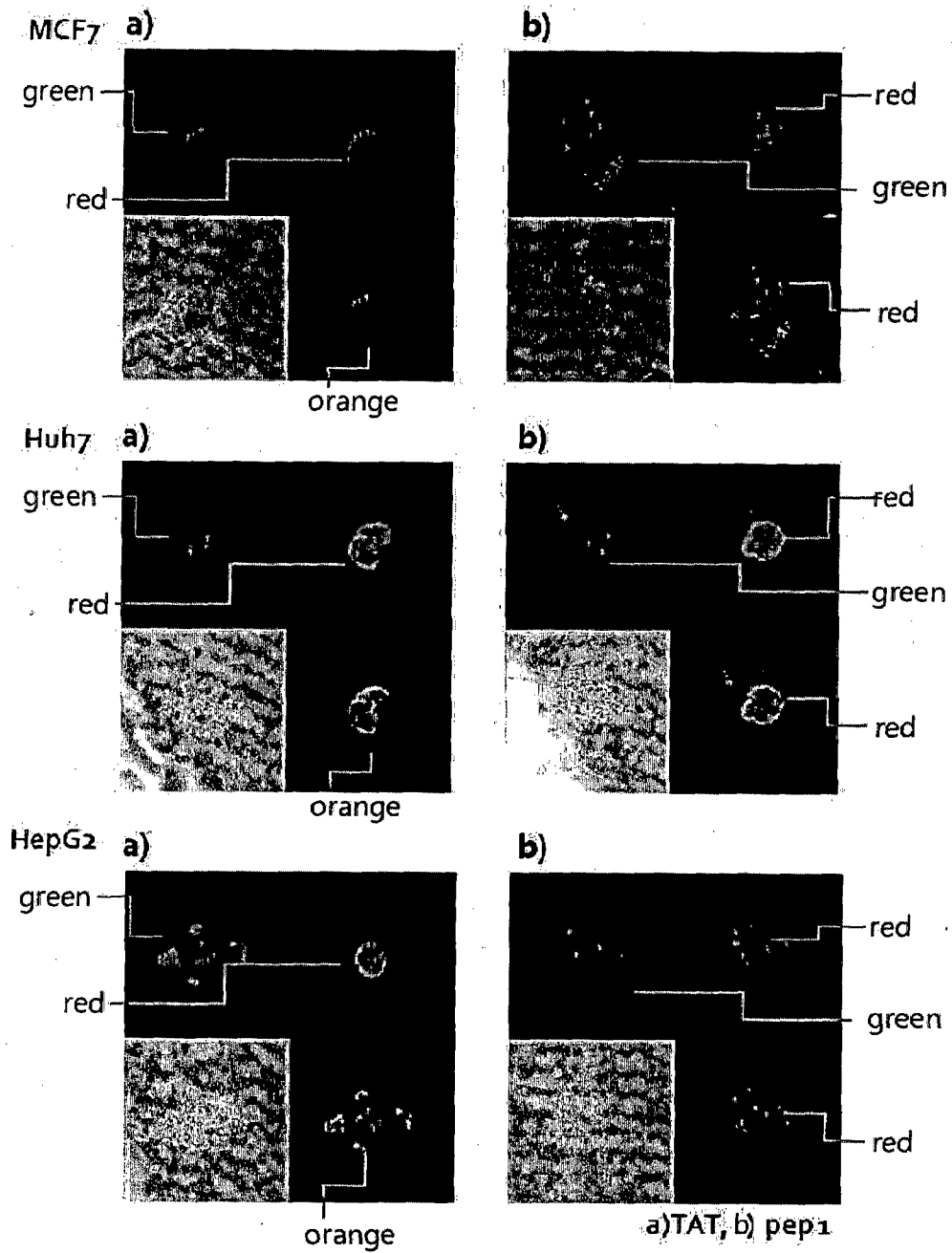


HepG2

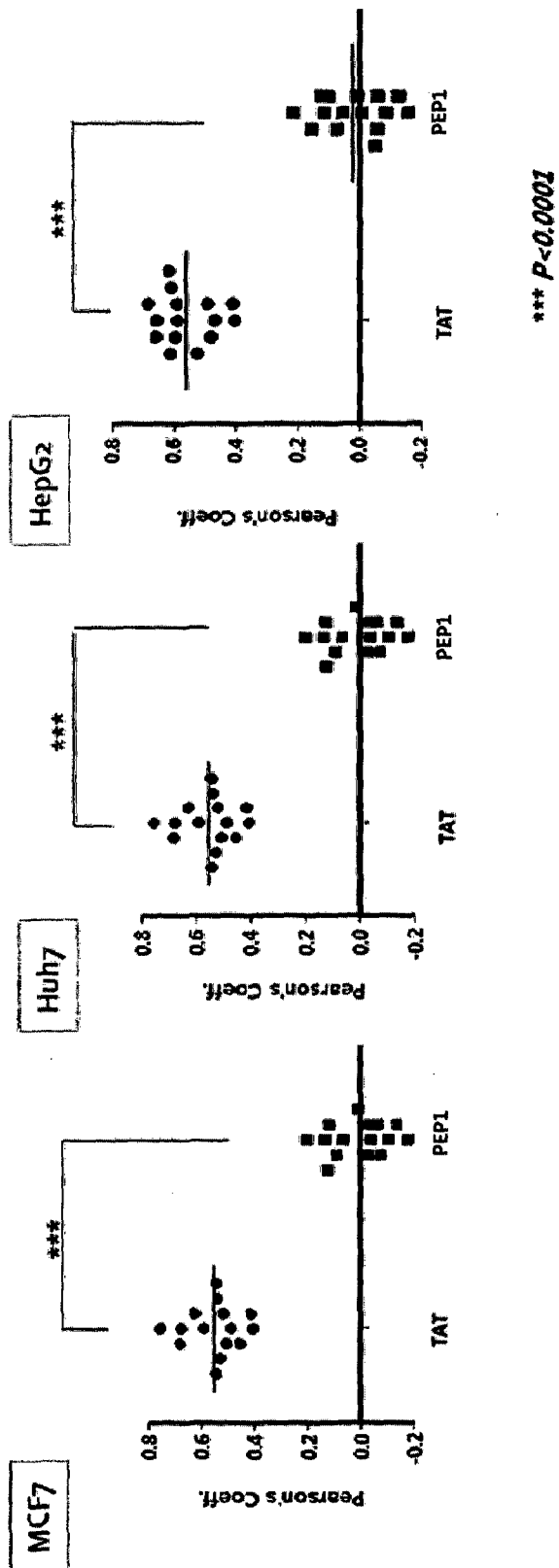


a)no treat b)FITC c)TATd) pep1

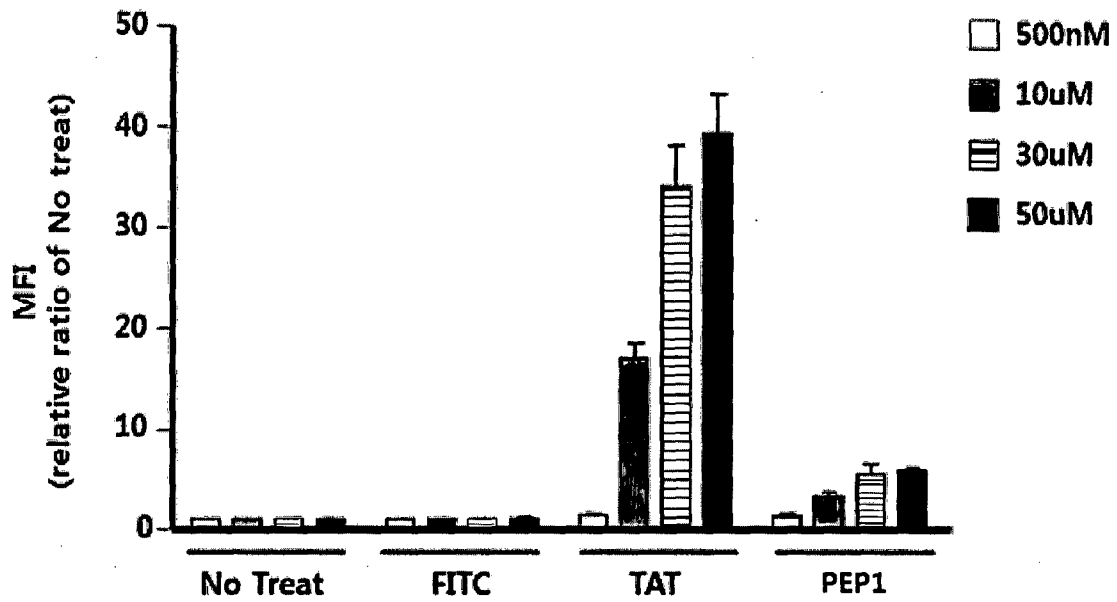
【도 16】



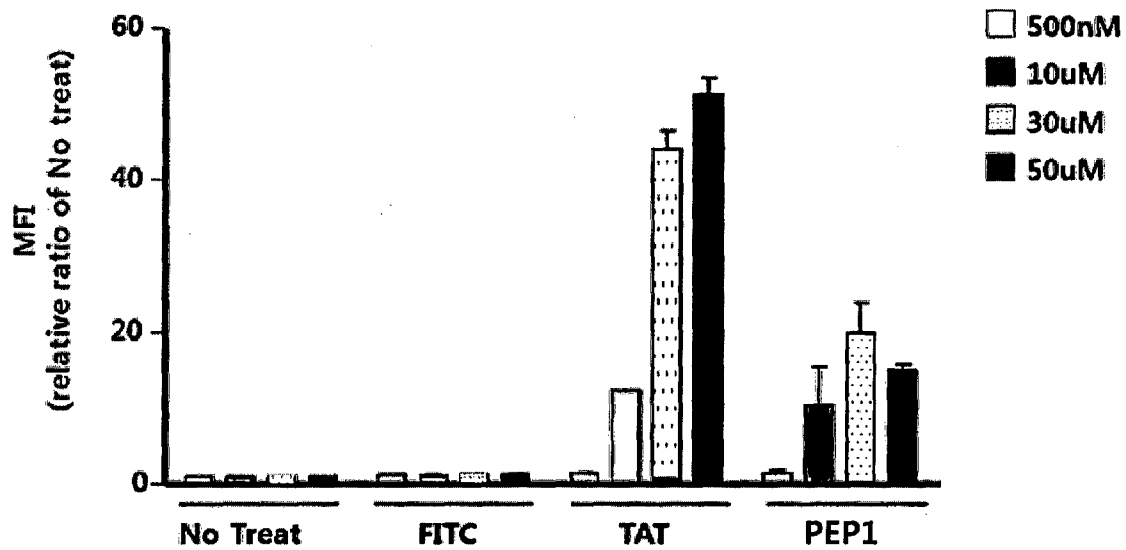
【도 17】



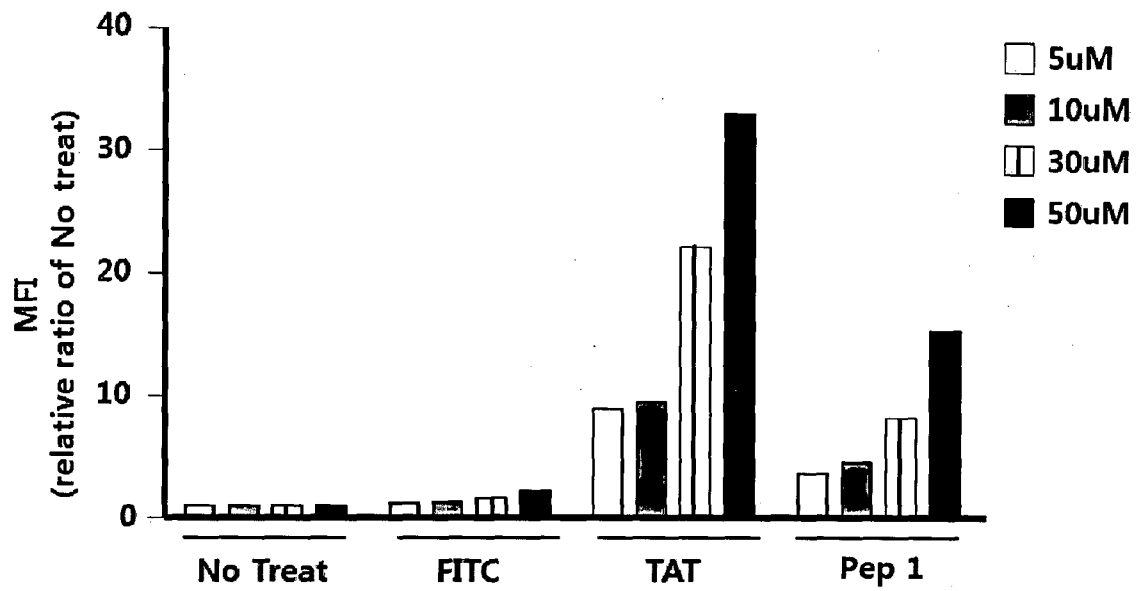
【도 18】



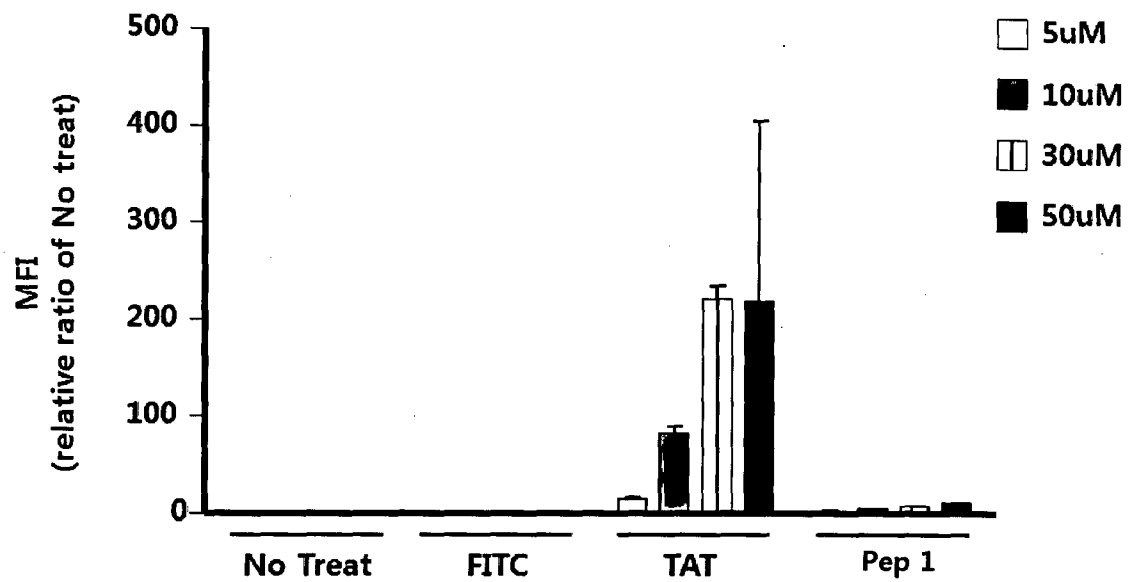
【도 19】



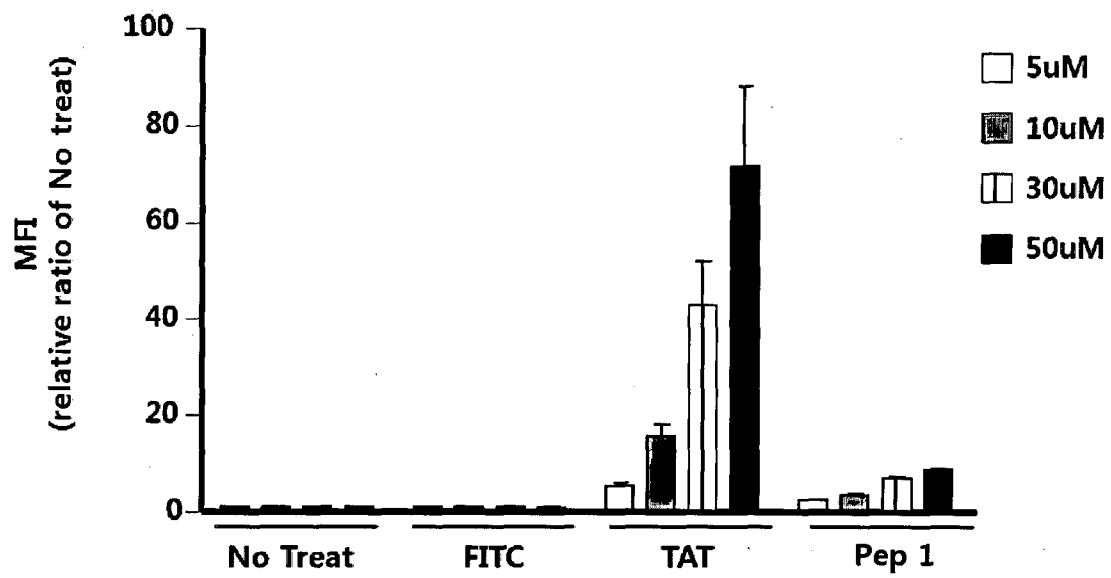
【도 20】



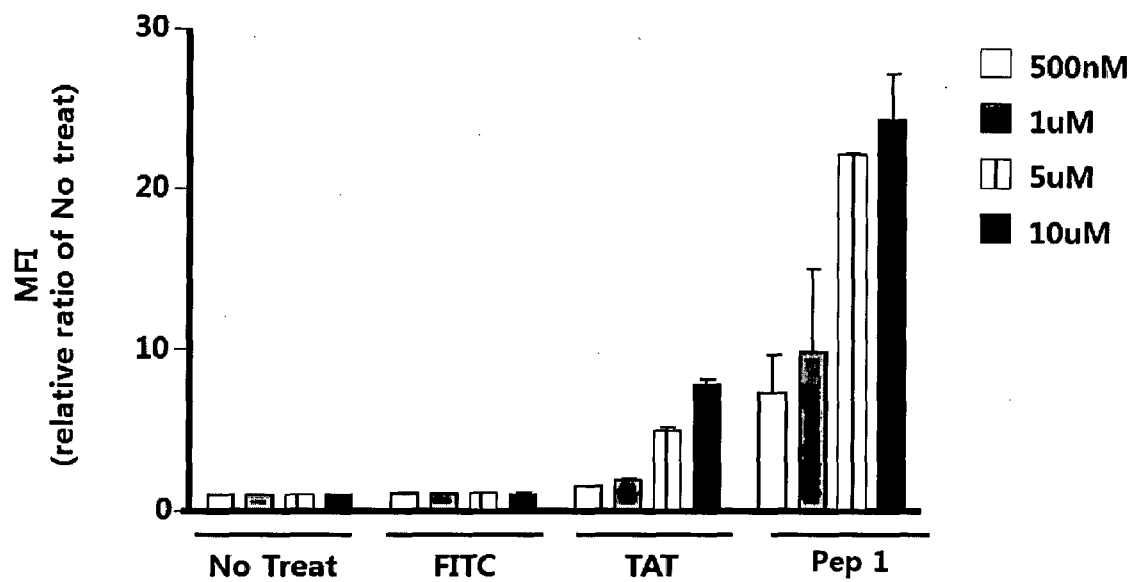
【도 21】



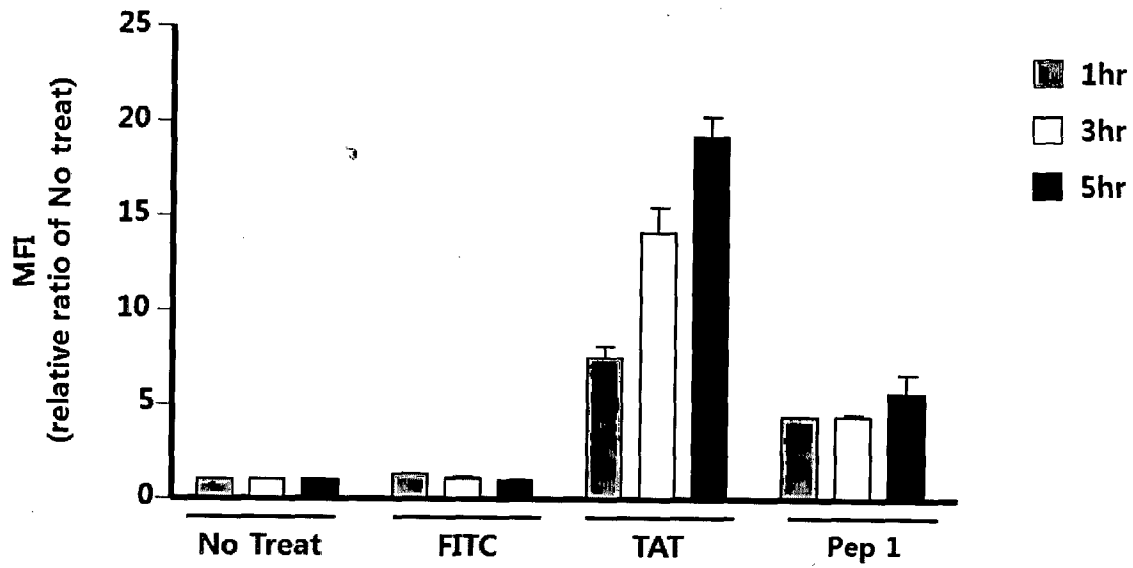
【도 22】



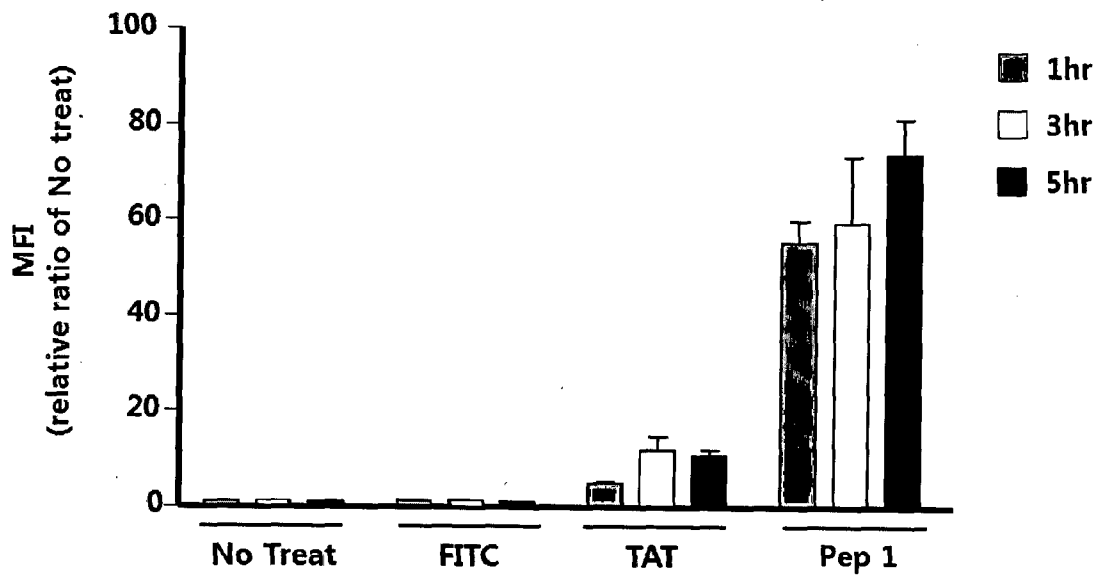
【도 23】



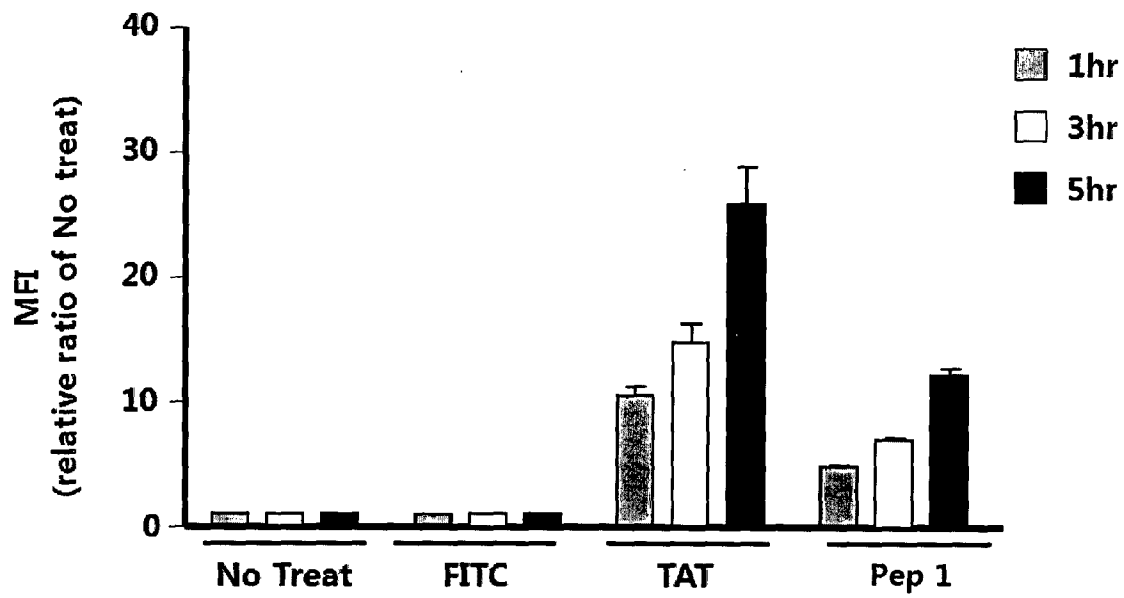
【도 24】



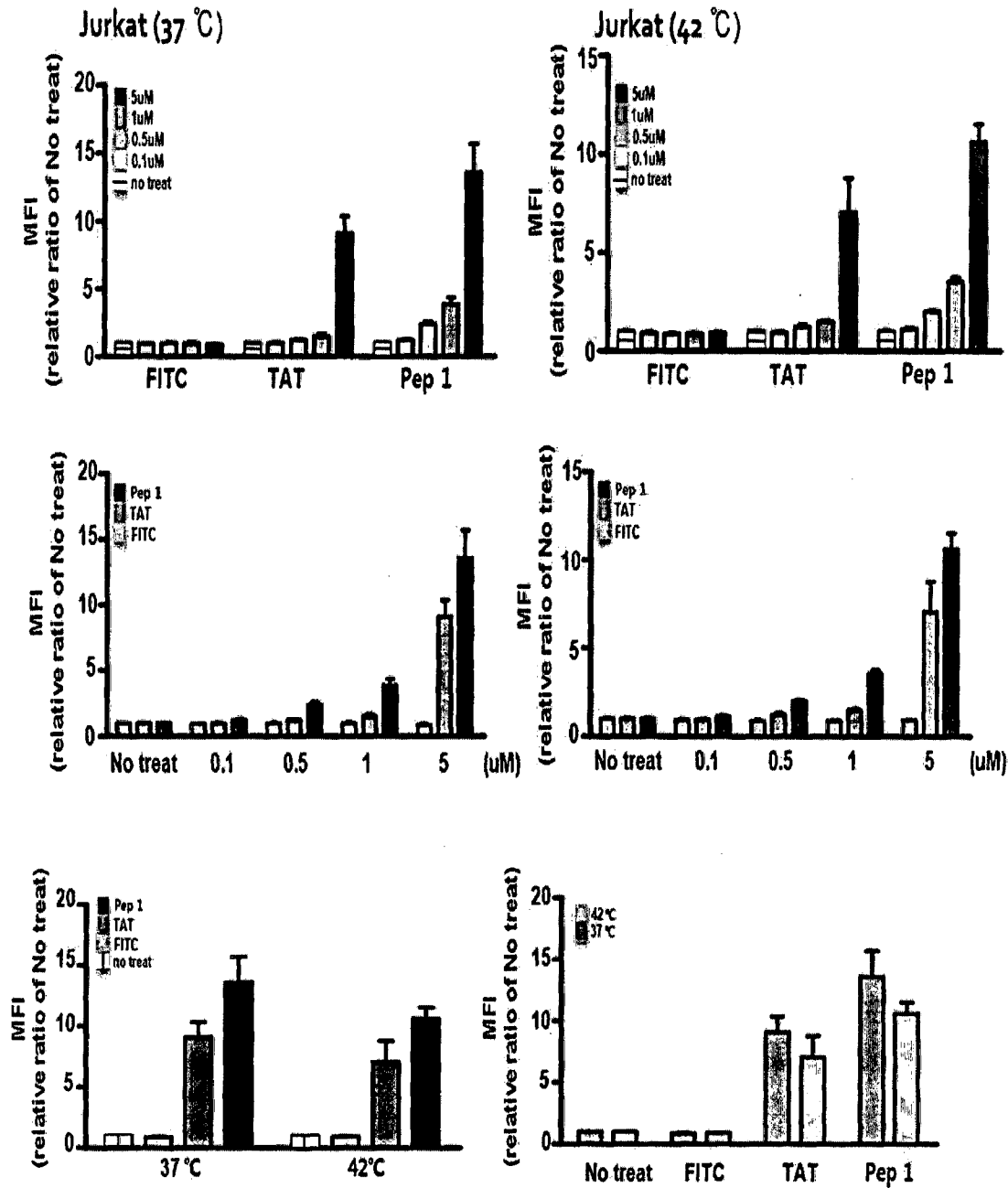
【도 25】



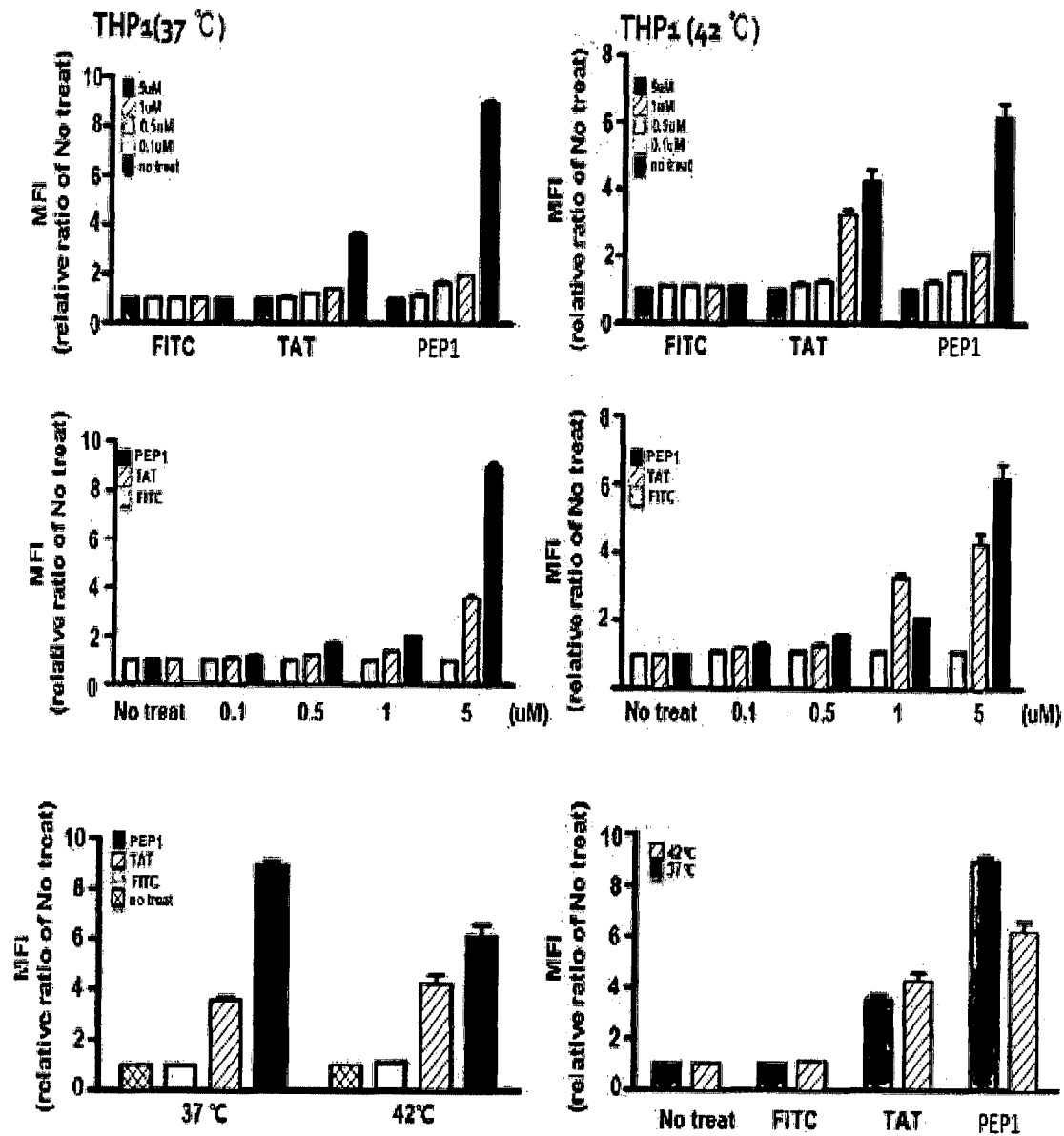
【도 26】



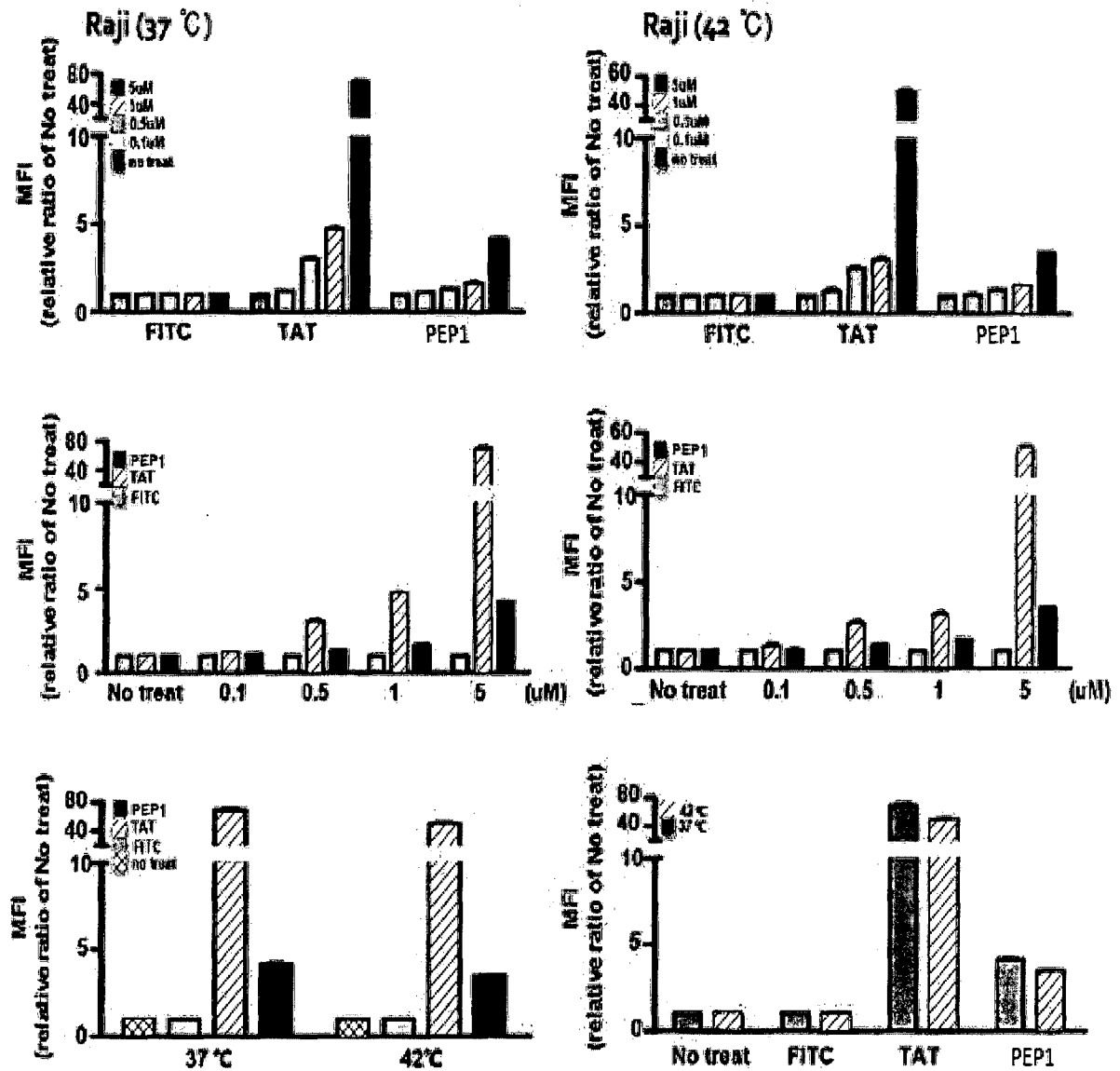
【도 27】



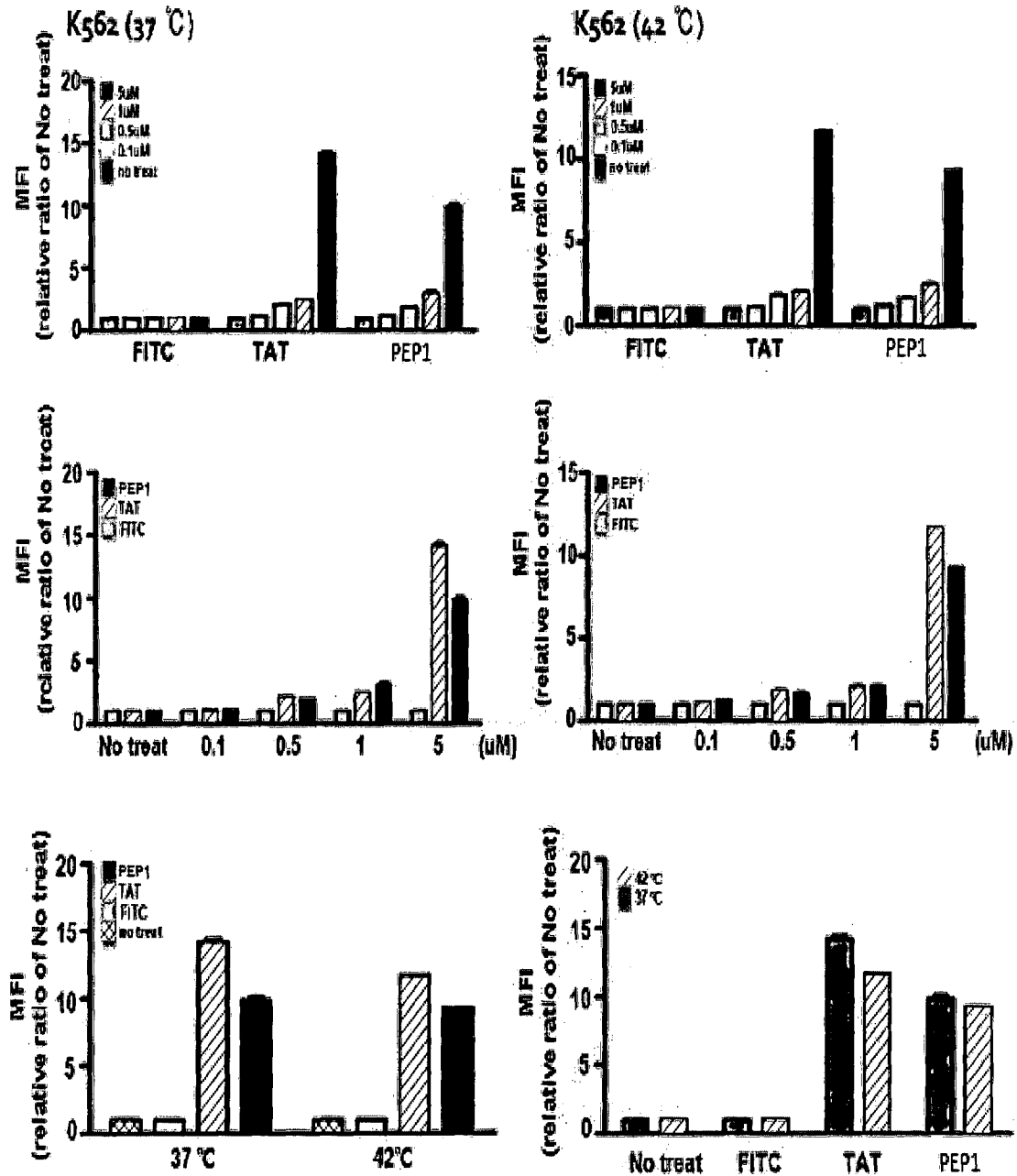
【도 28】



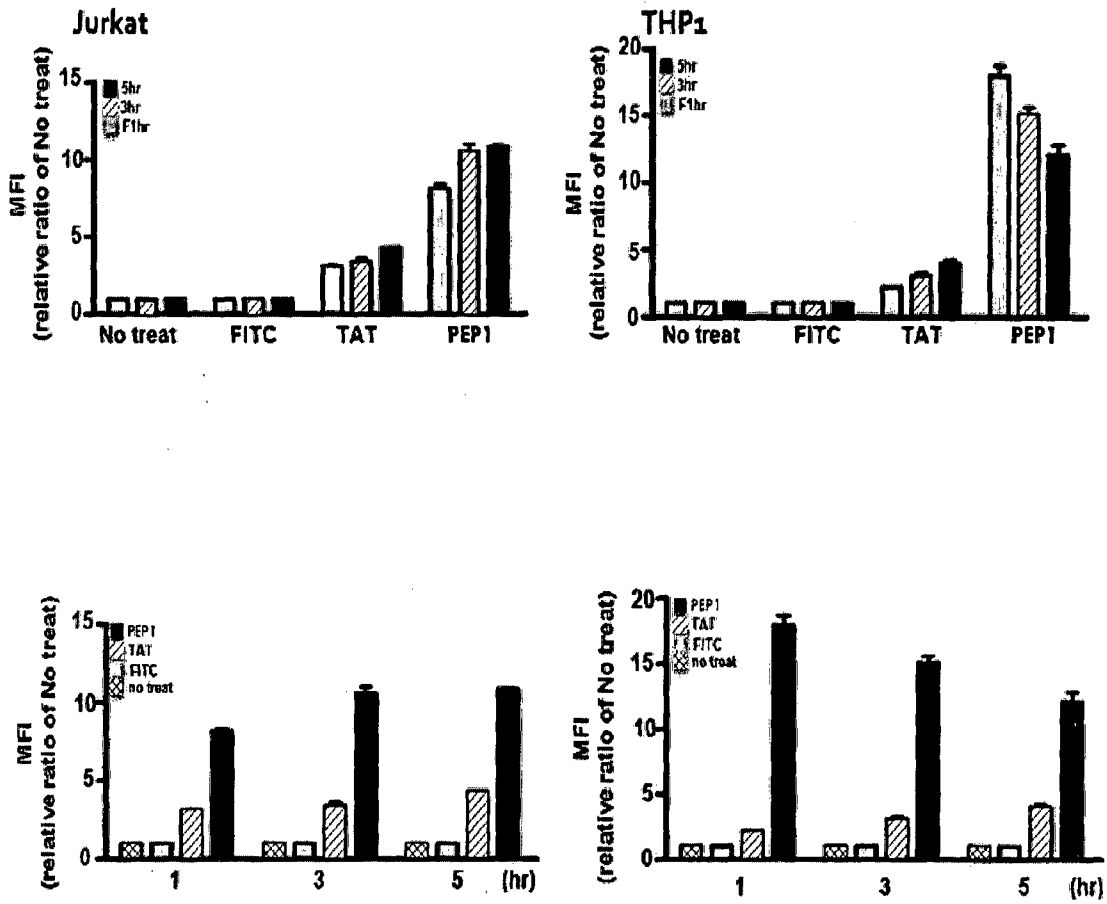
【도 29】



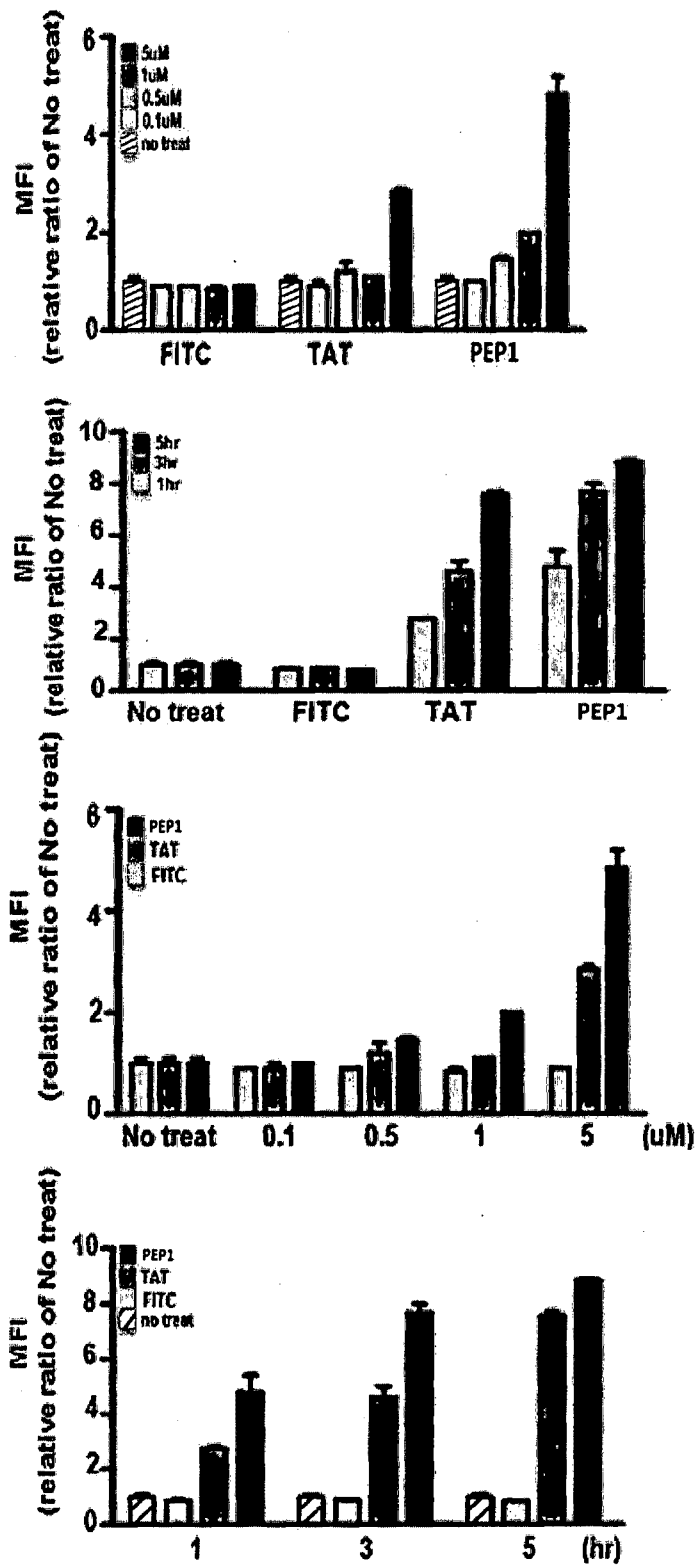
【도 30】



【도 31】

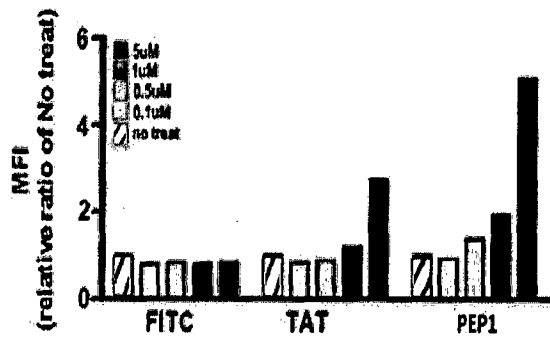


【도 32】

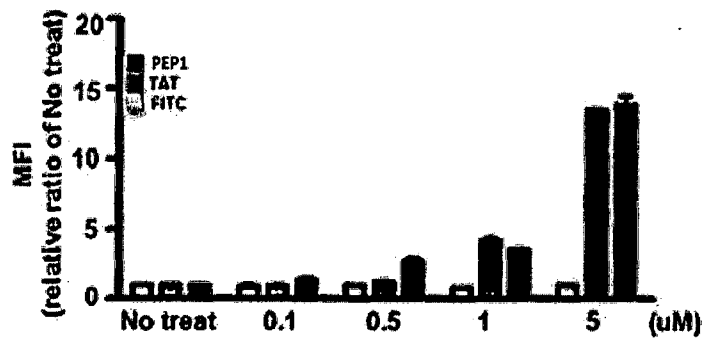
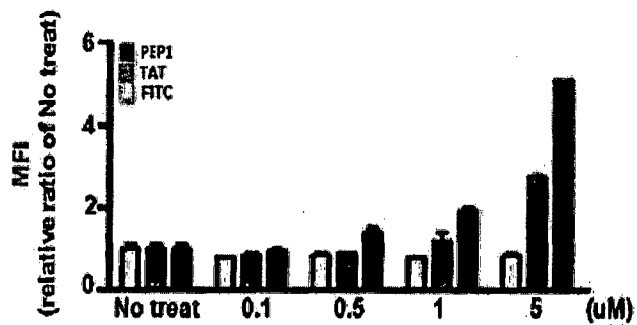
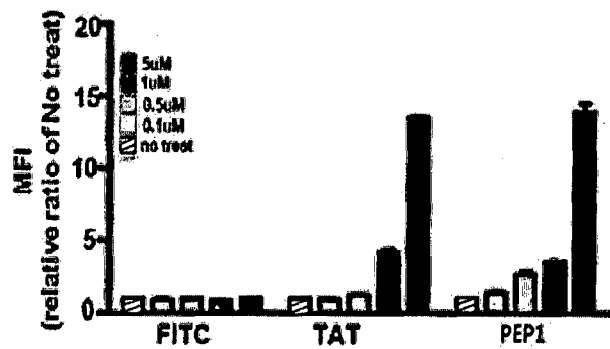


【도 33】

Lymphocyte

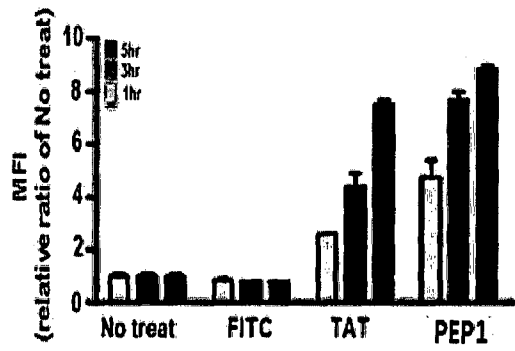


monocyte

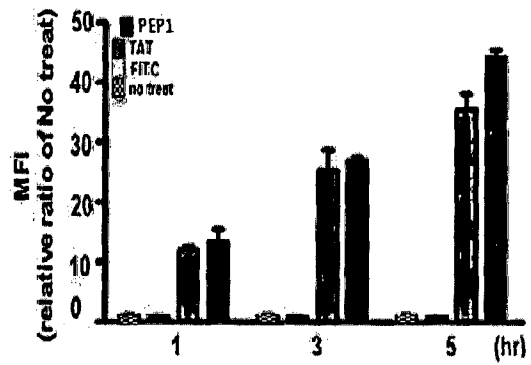
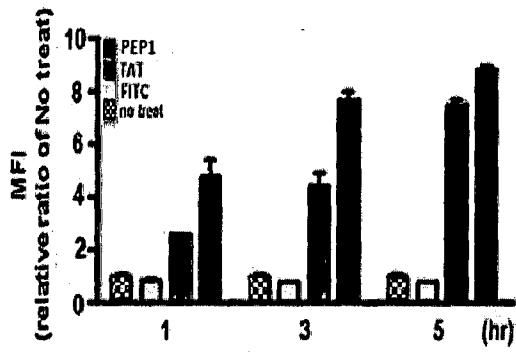
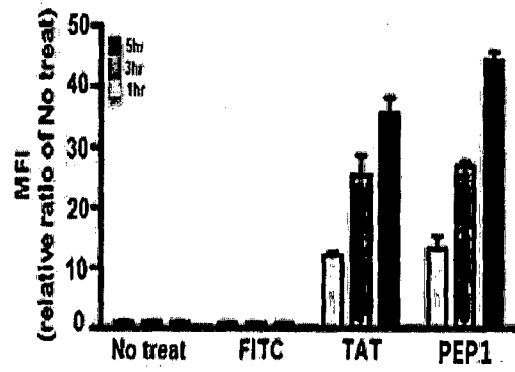


【도 34】

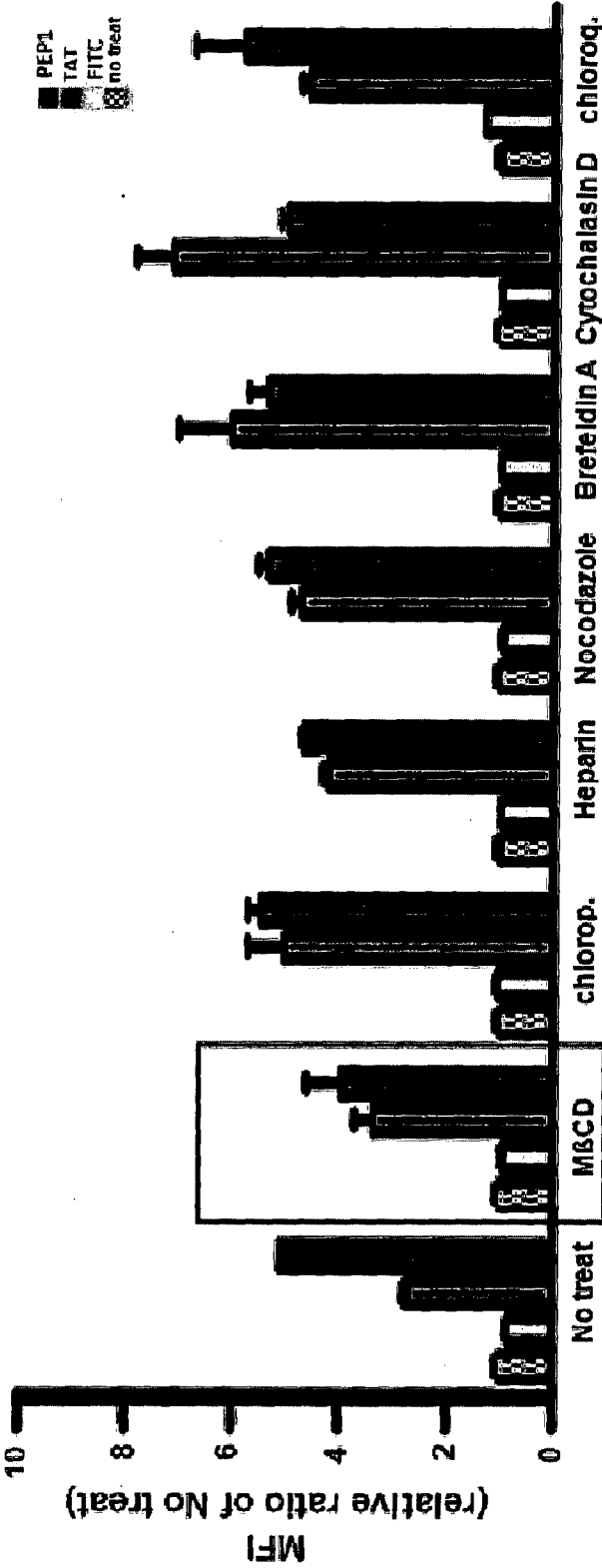
Lymphocyte



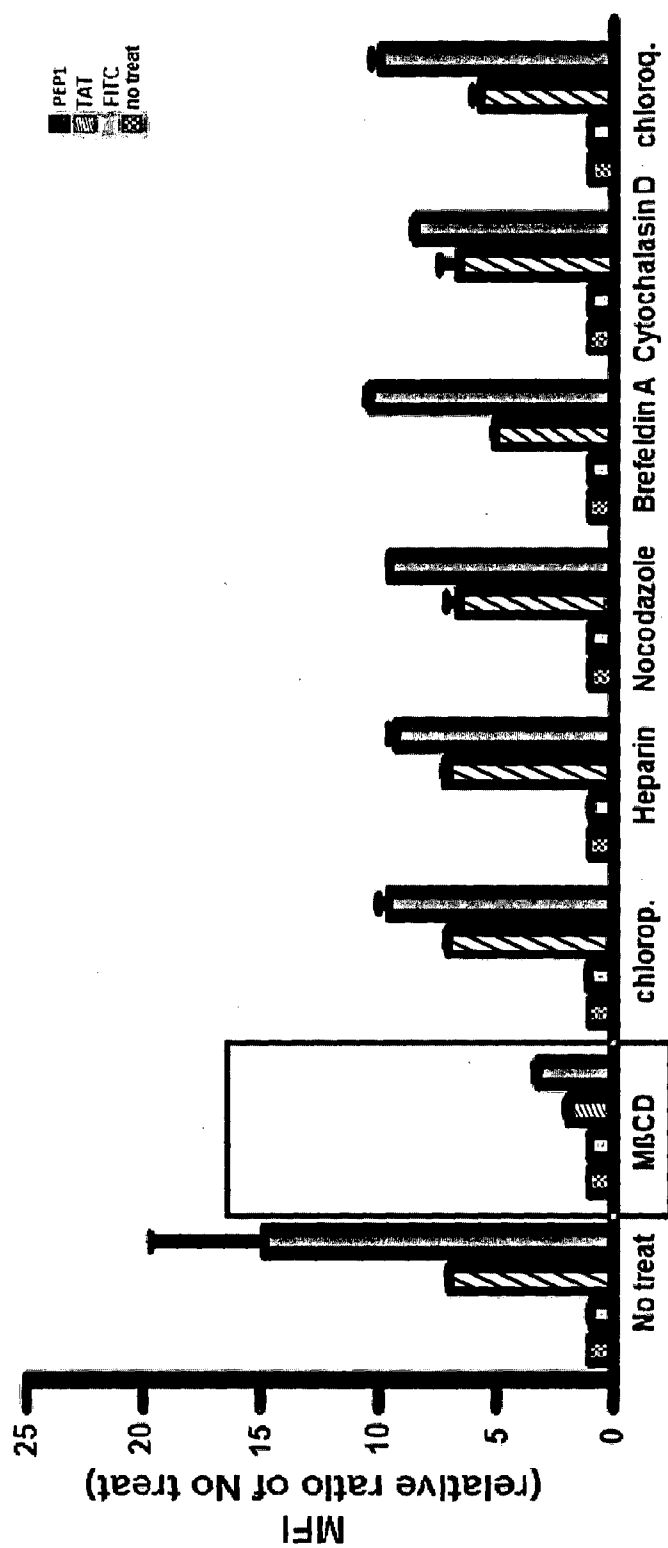
monocyte



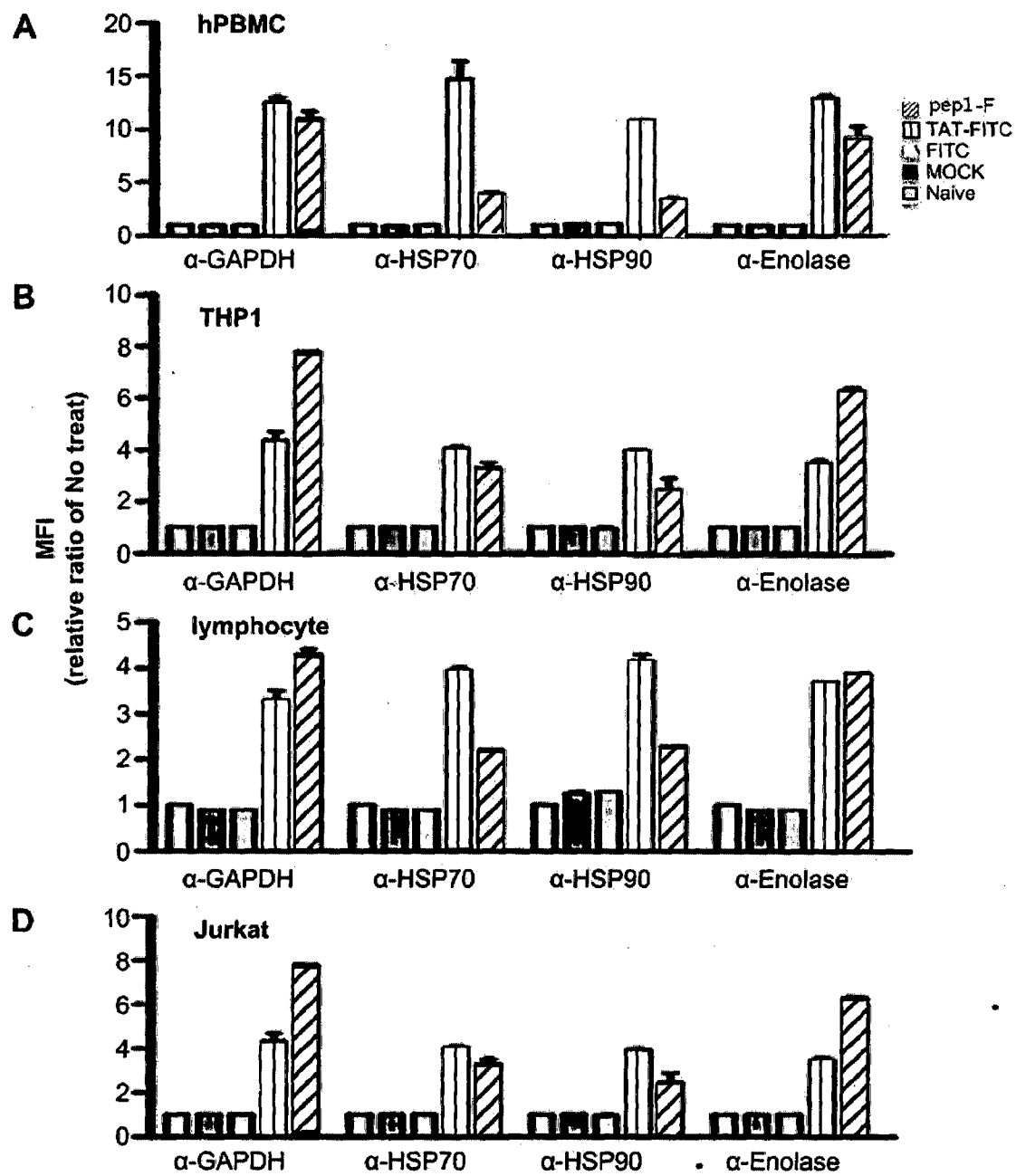
【도 35】



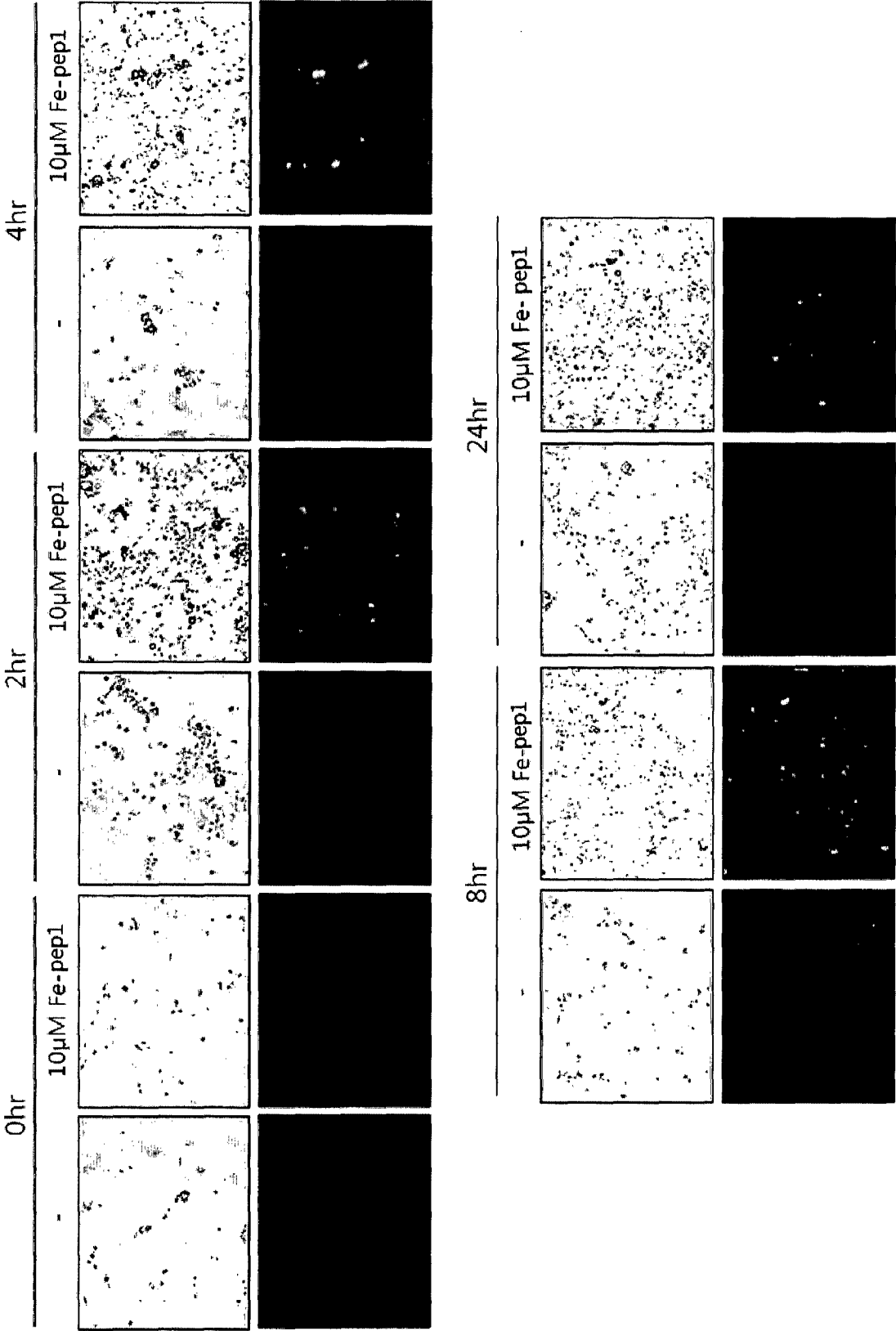
【도 36】



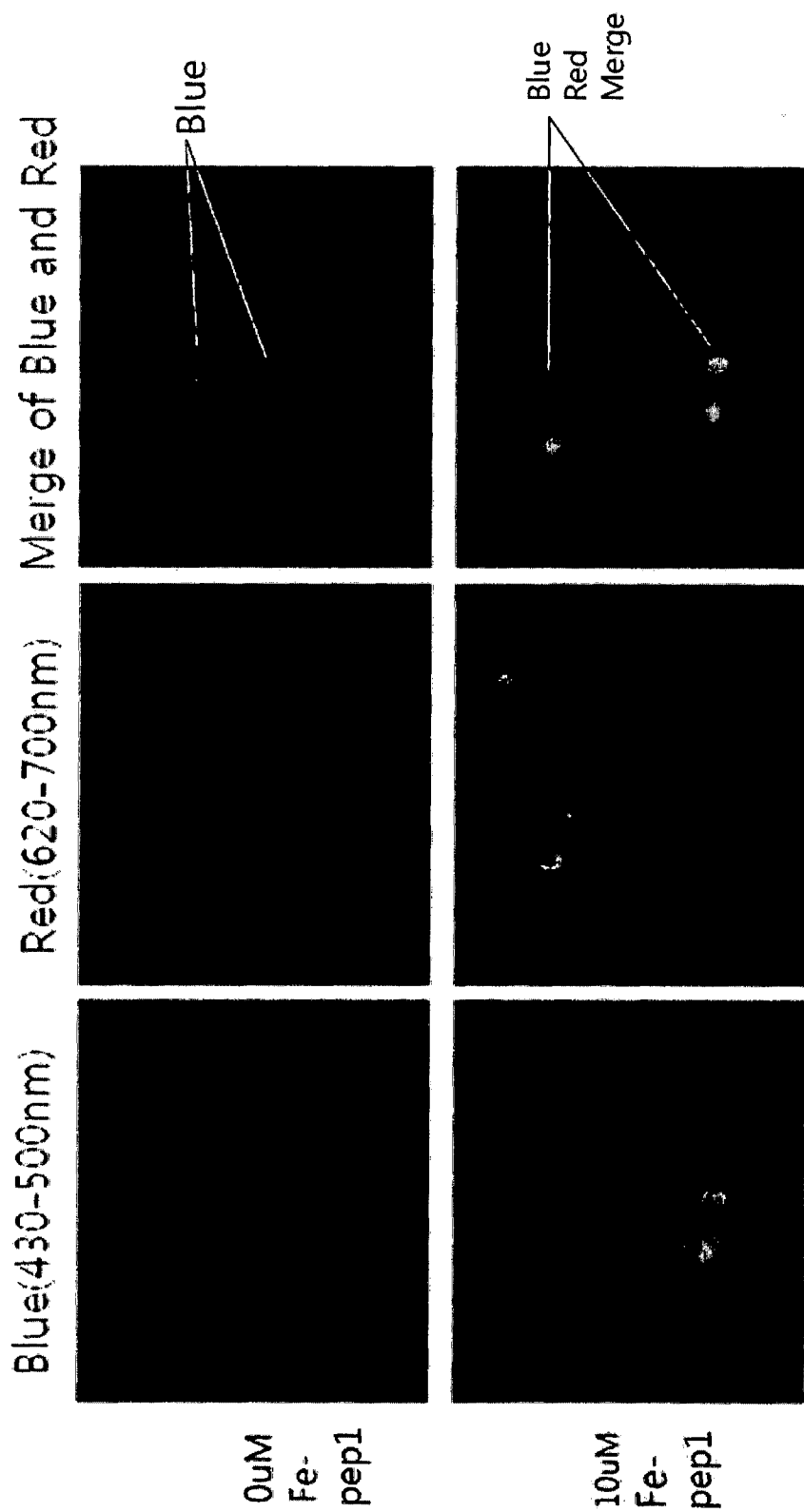
【도 37】



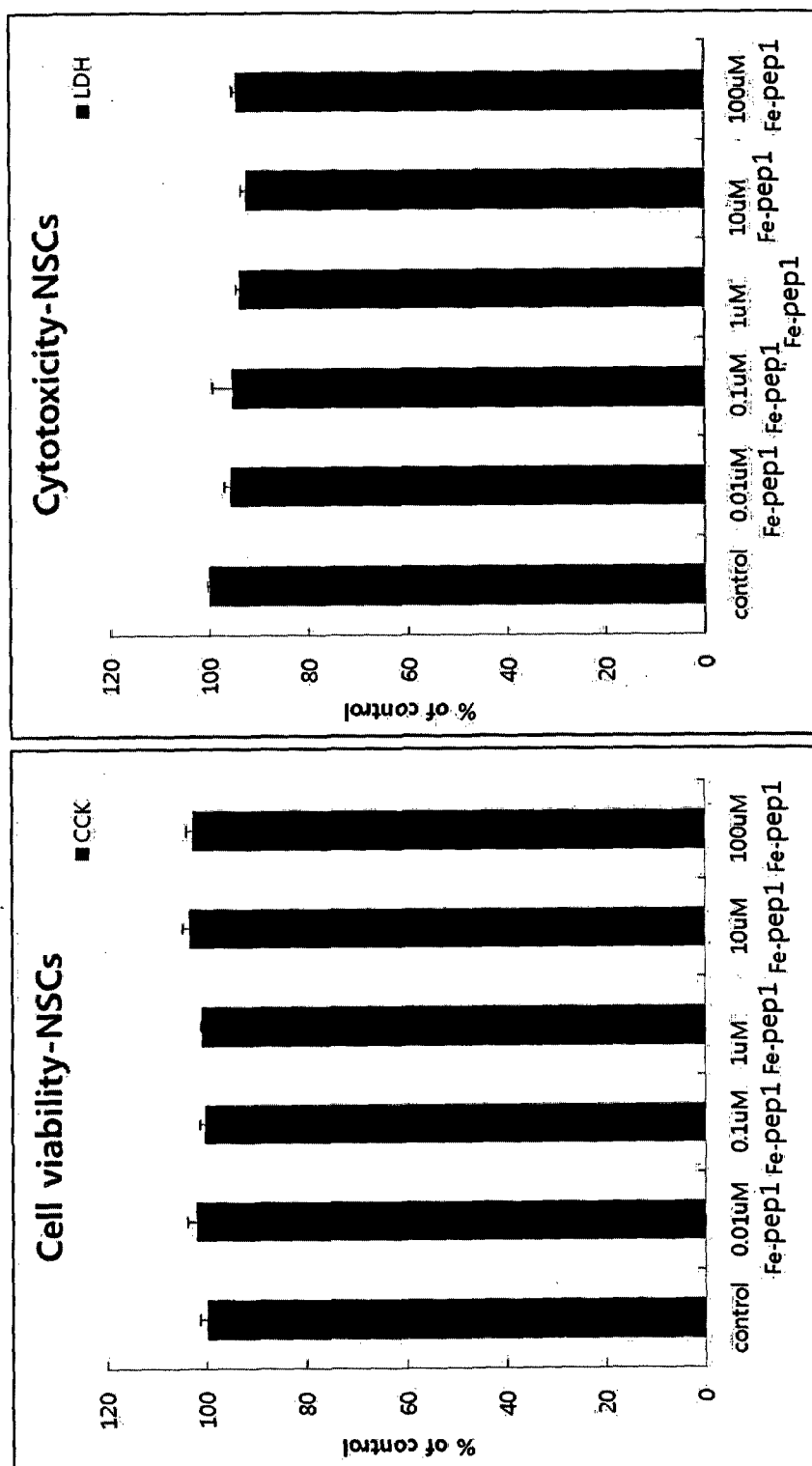
【도 38】



【H 39】

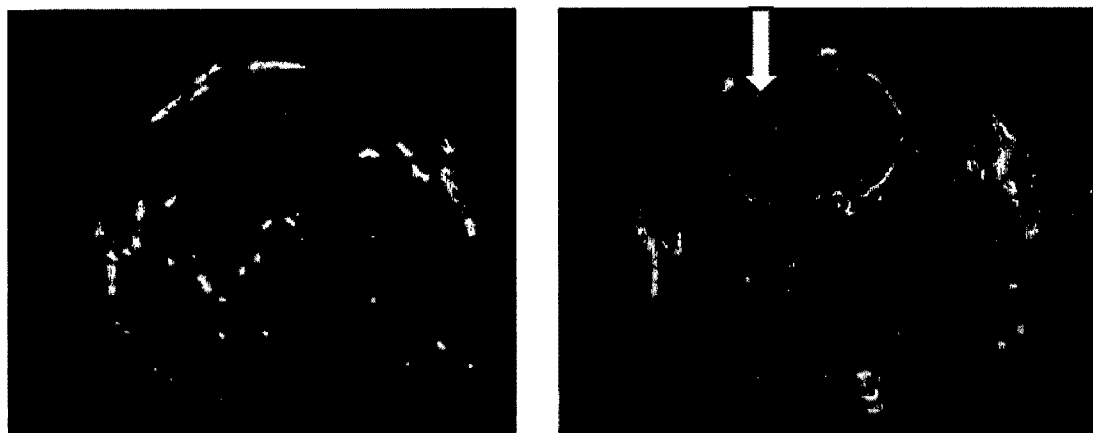


【E 40】



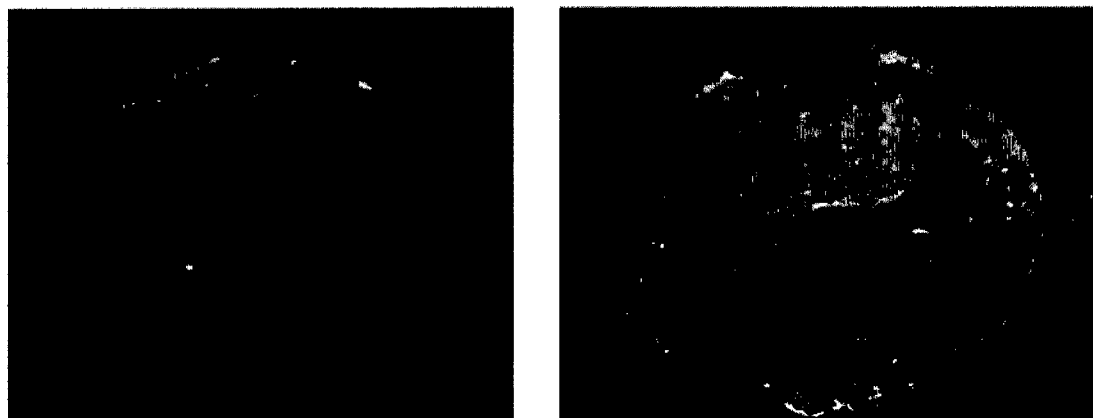
【도 41】

Stem cells with pep1-Fe



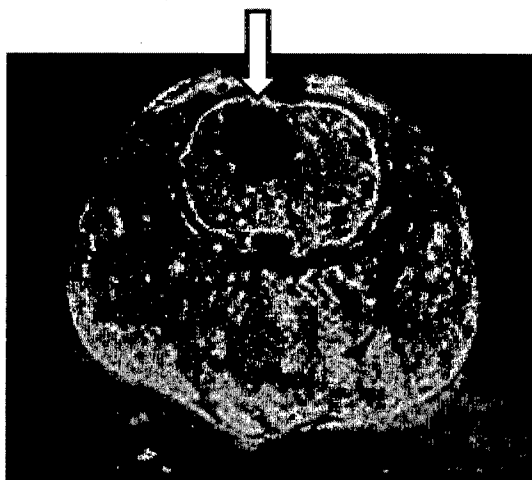
【도 42】

Stem cells without pep1-Fe



【도 43】

pep1-Fe

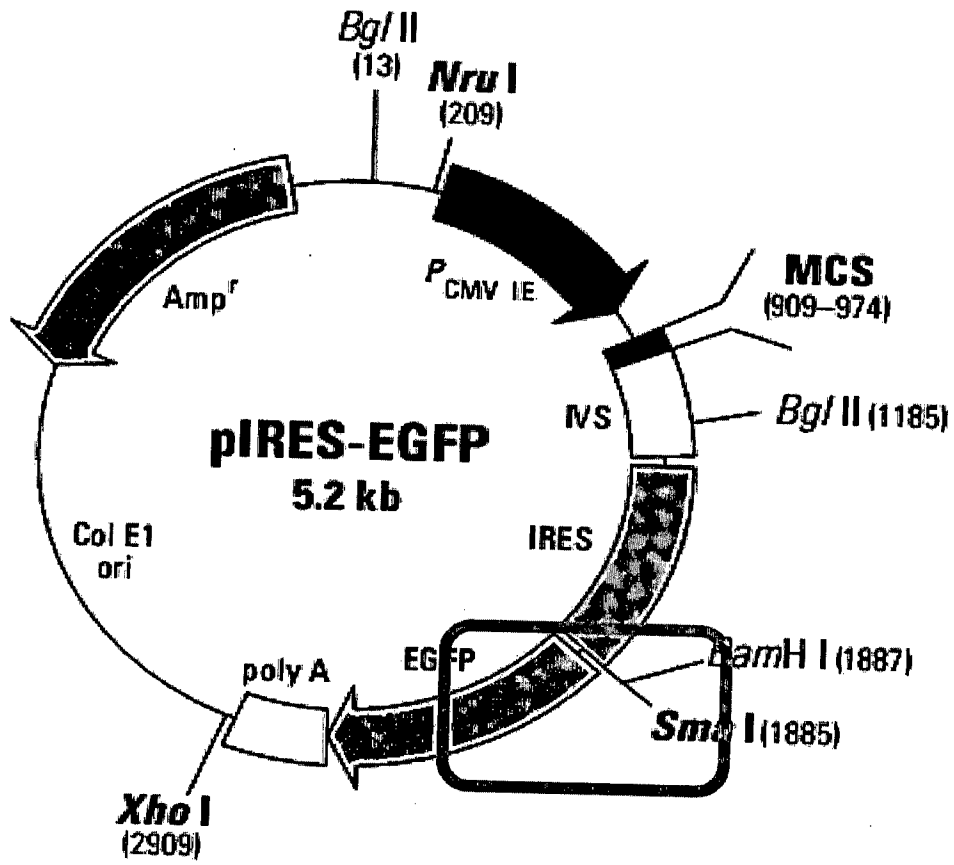


【도 44】

Saline

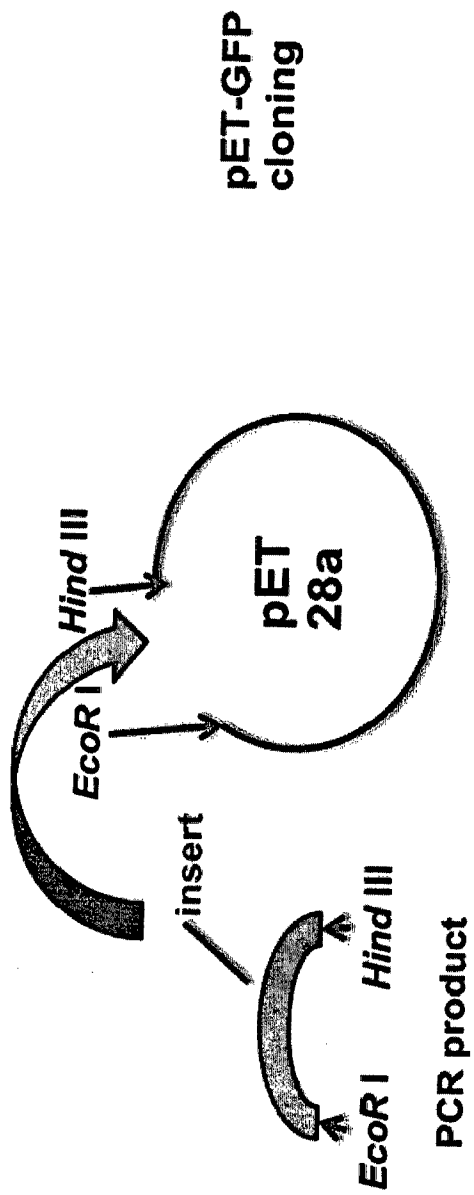


【도 45】



【도 47】

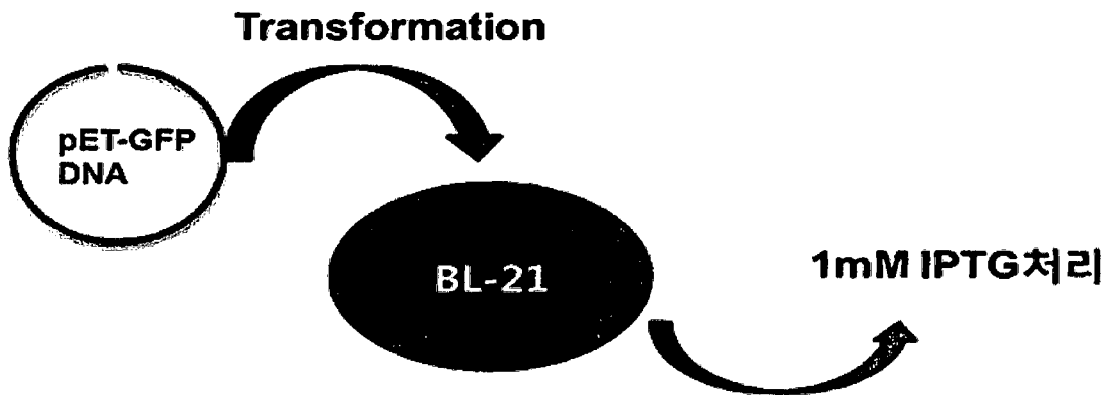
Cloning 모식도



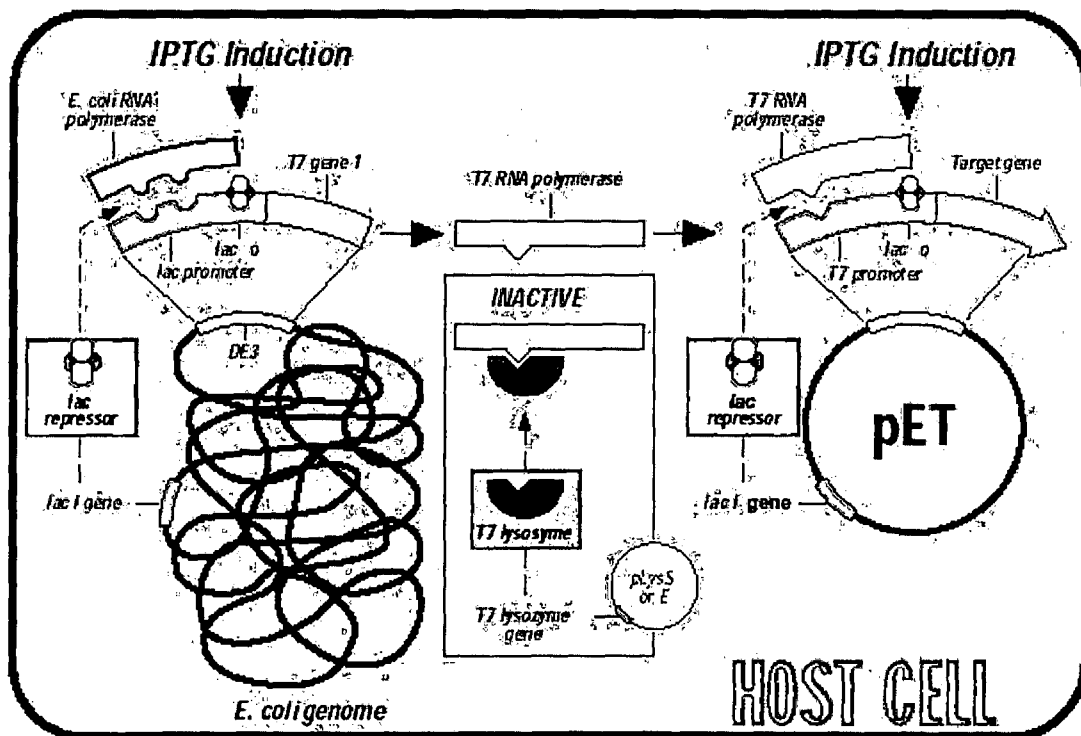
【도 48】

Over-expression

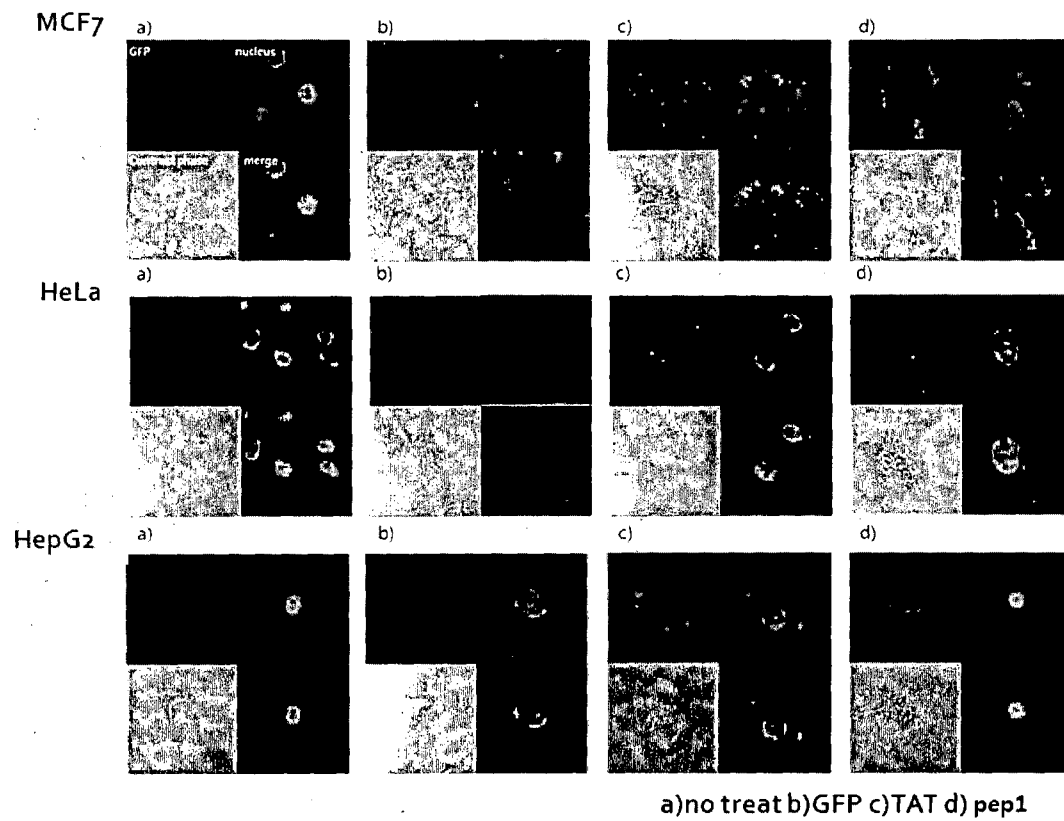
pET-GFP cloning DNA BL-21 transformation
and 1mM IPTG 처리



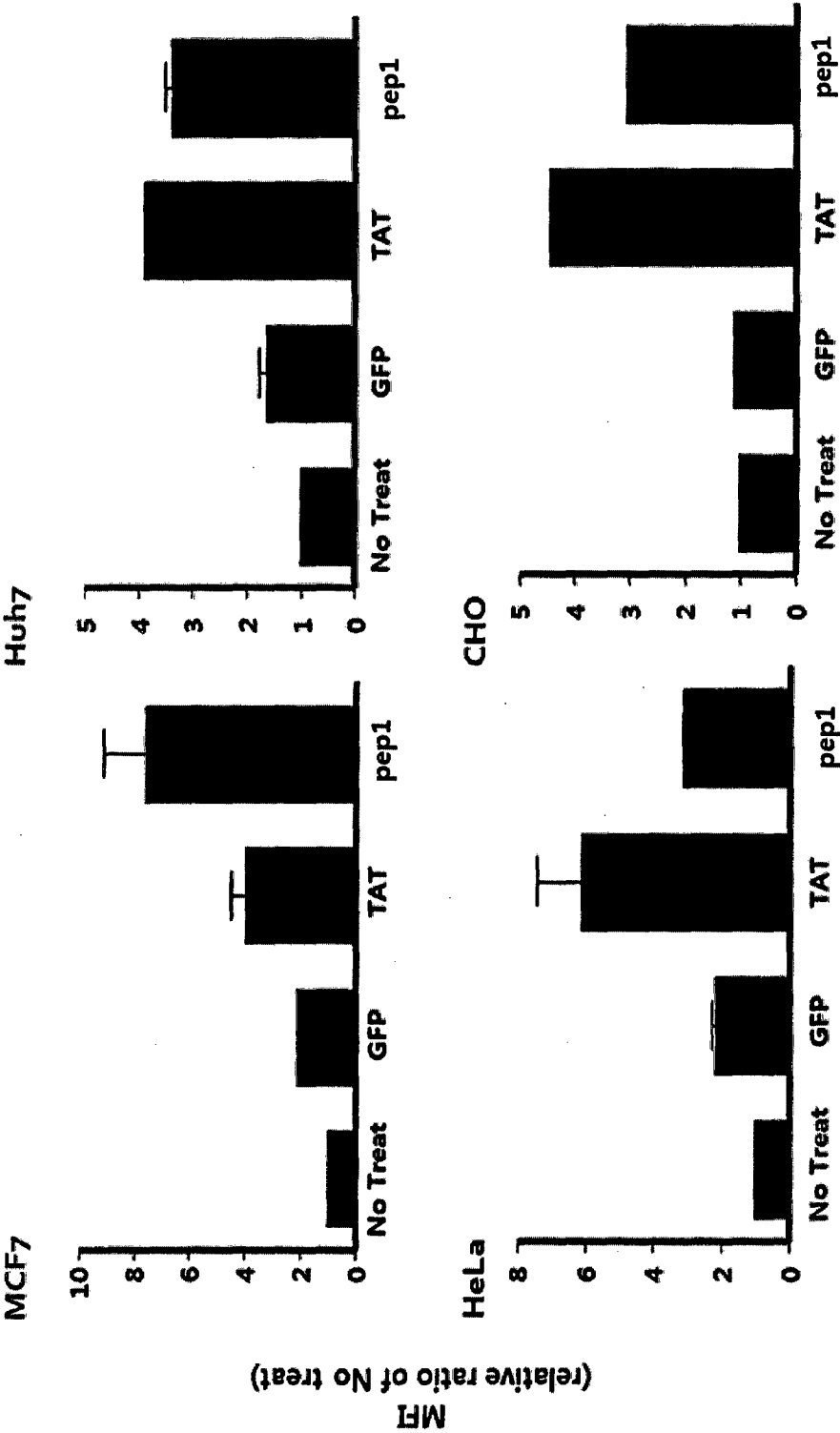
【도 49】



【도 50】



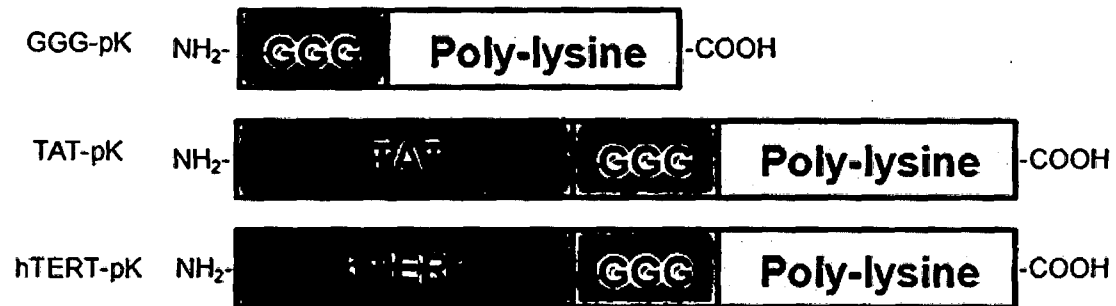
【도 51】



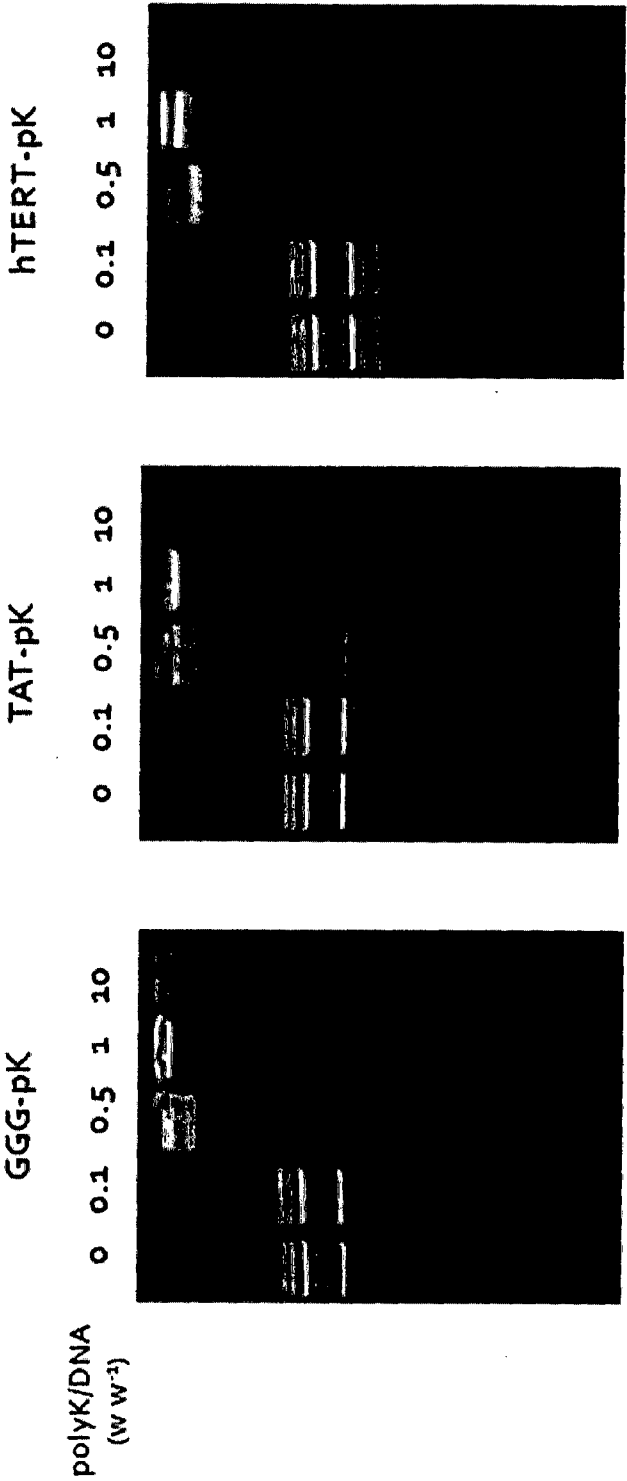
【도 52】

Peptides	Sequences
GGG-pK	NH ₂ -GGG-pK-COOH
TAT-pK	NH ₂ -YGRKKRRQRRR-GGG-pK-COOH
hTERT-pK	NH ₂ -EARPALLTSRLRFIPK-GGG-pK-COOH

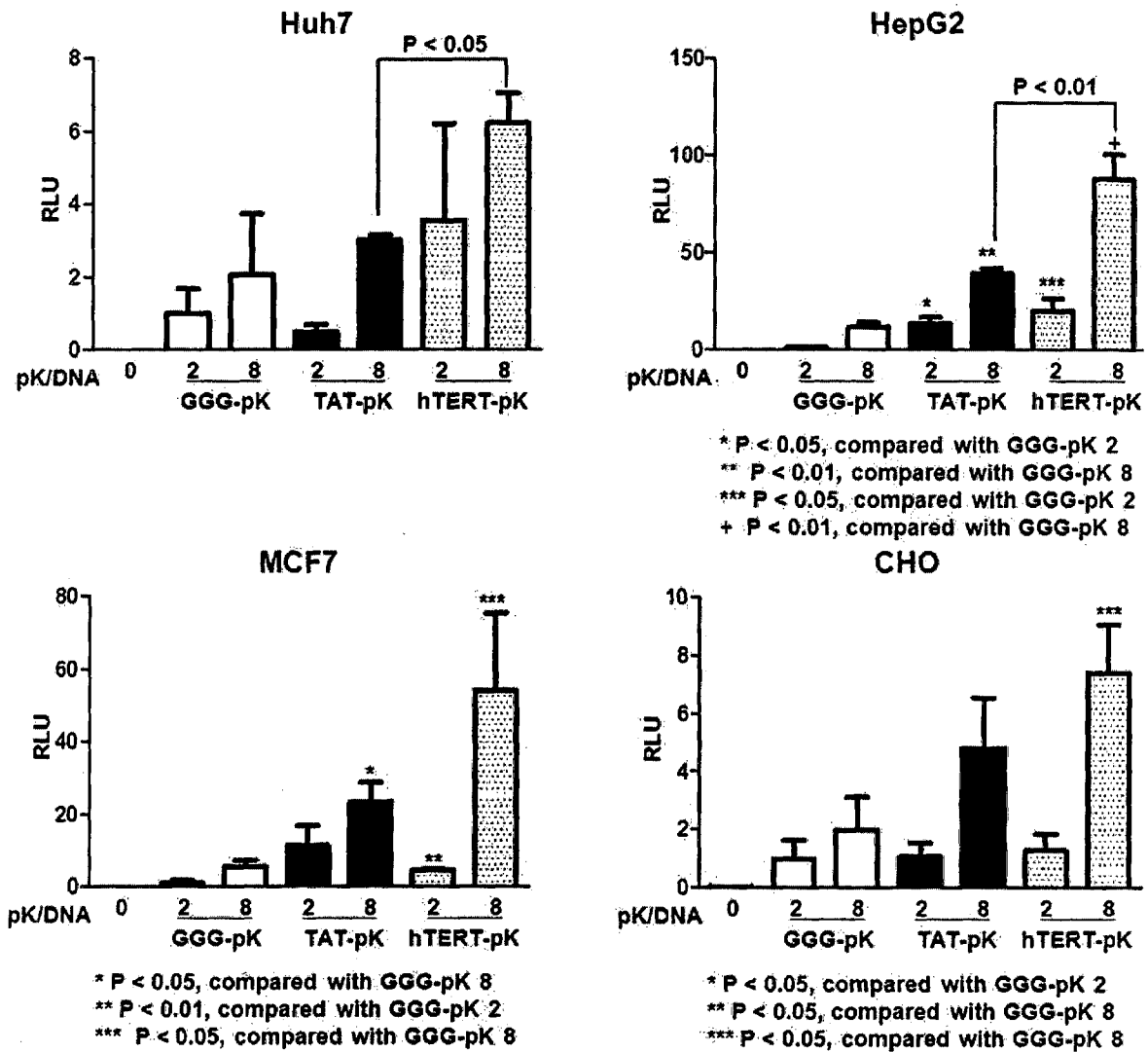
【도 53】



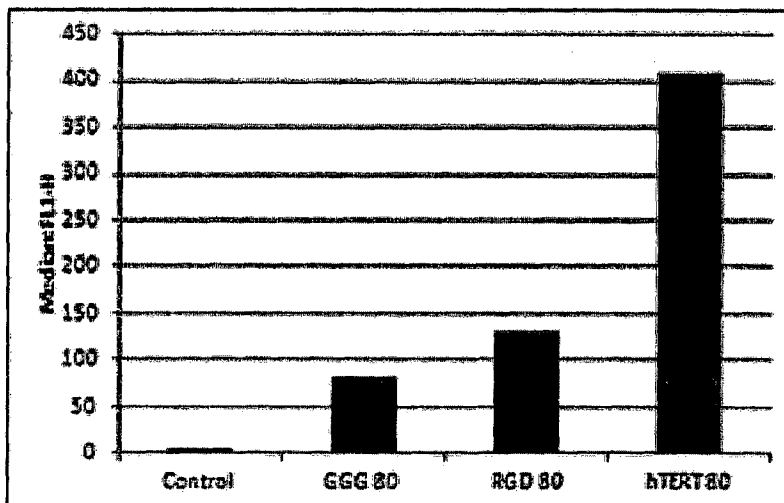
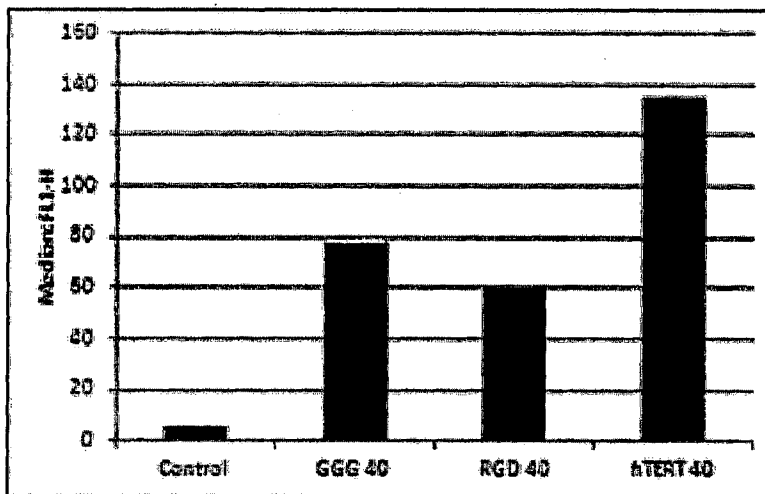
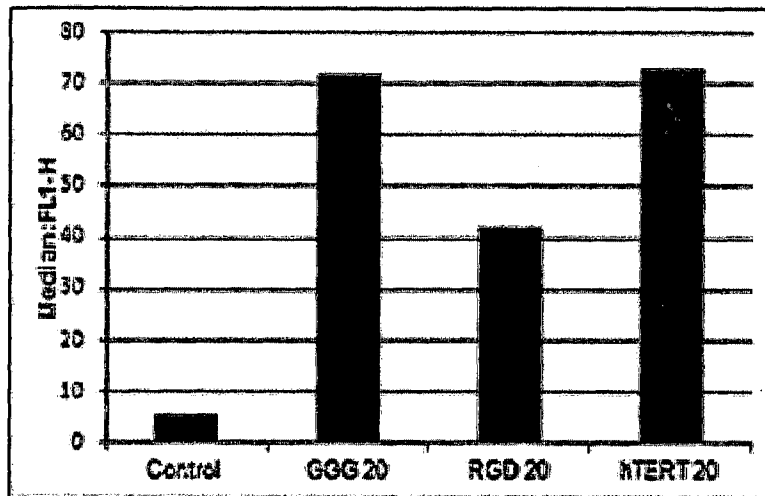
【도 54】



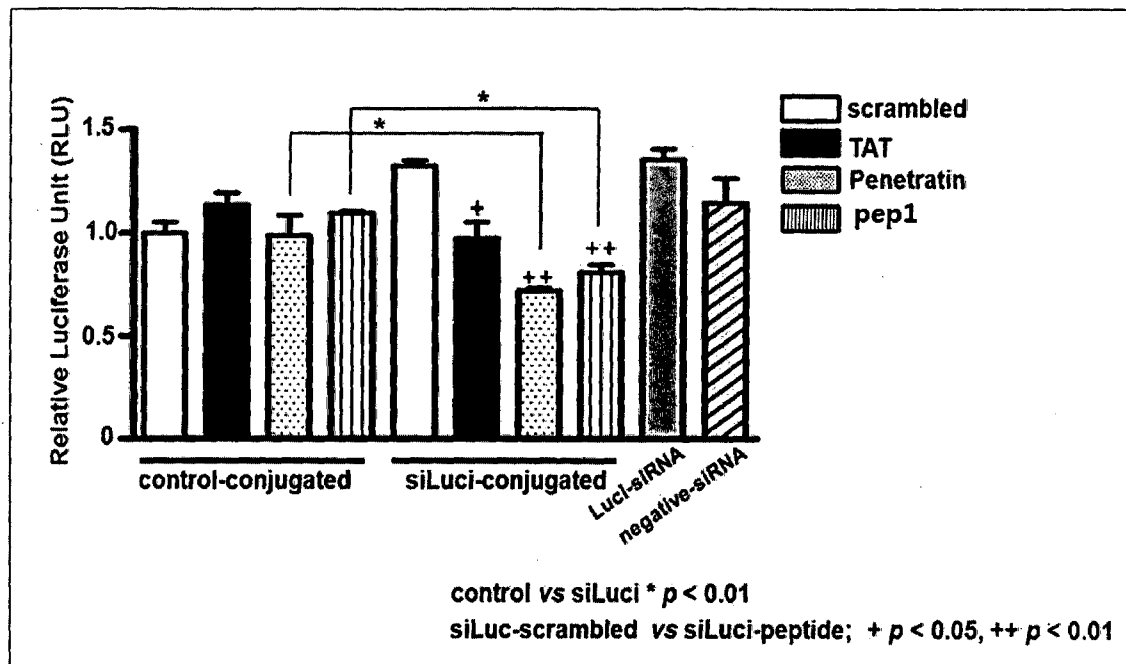
【도 55】



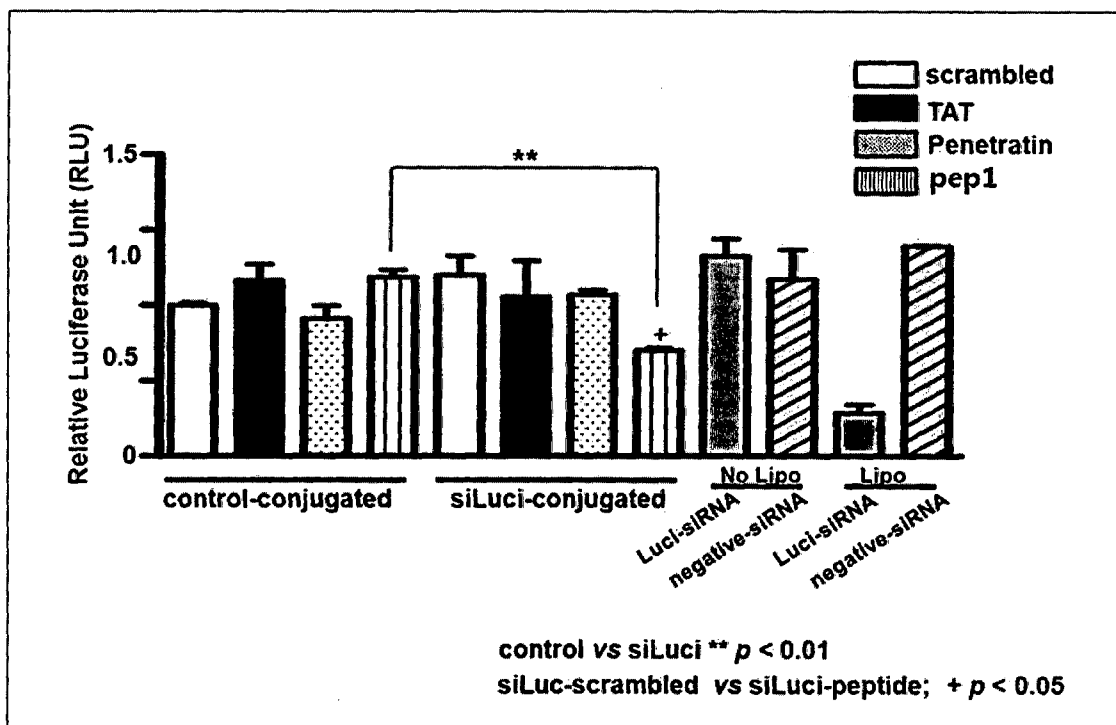
【도 56】



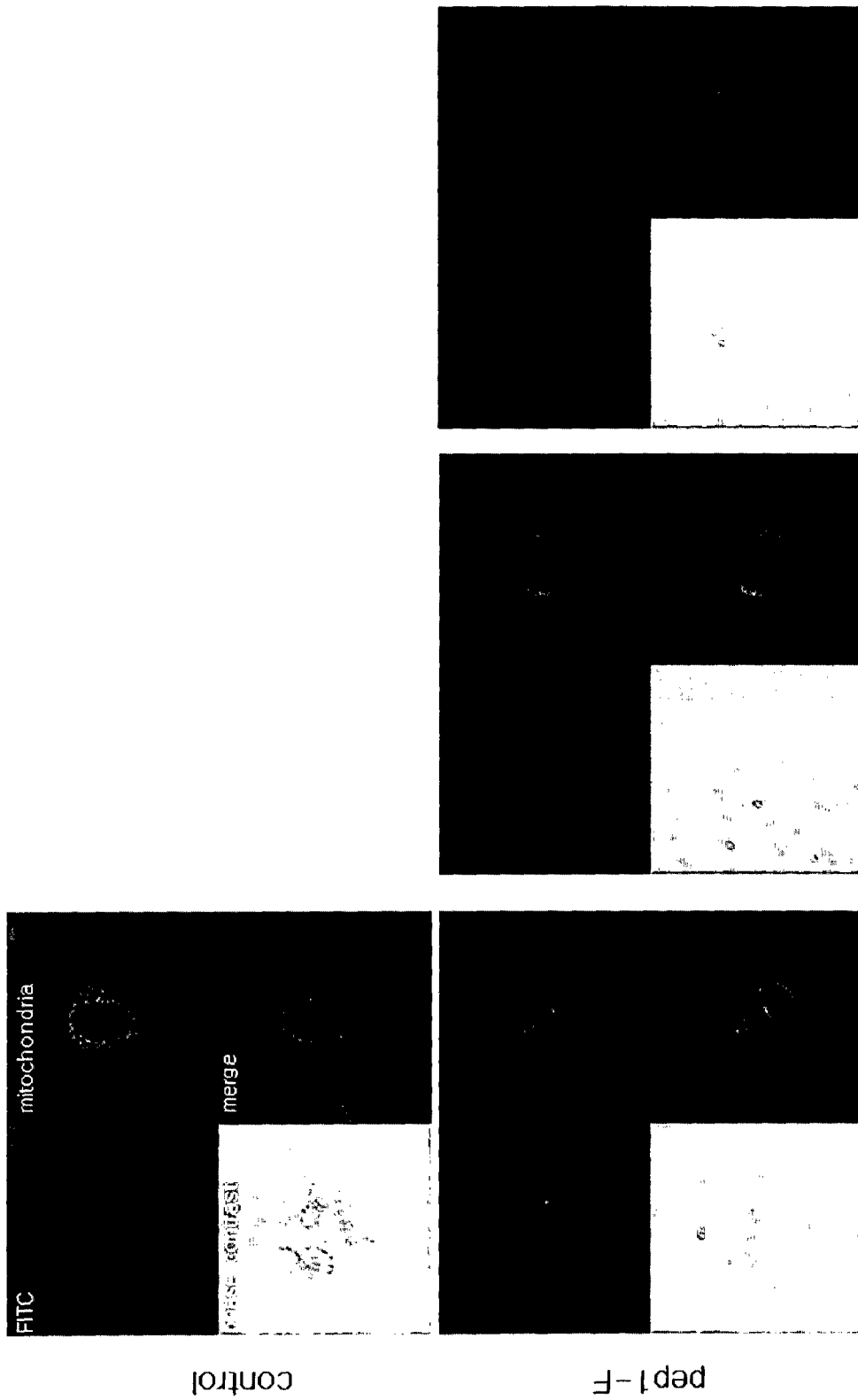
【図 57】



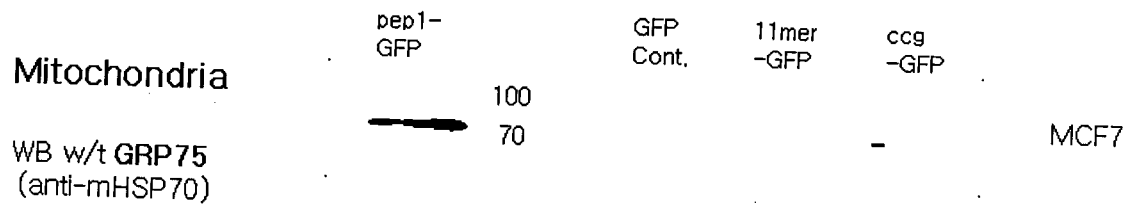
【図 58】



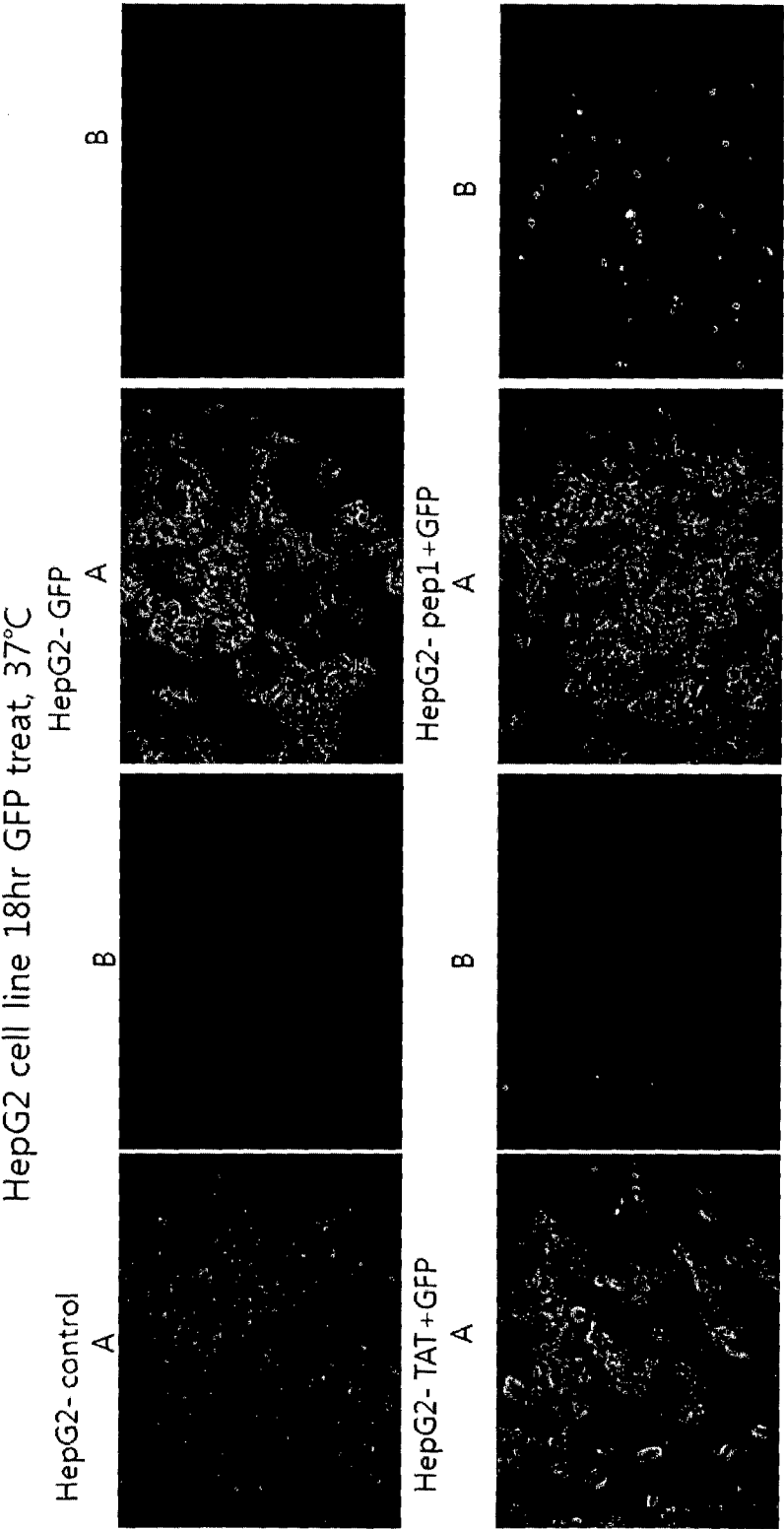
【도 59】



【도 60】



【도 61】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/006218**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 7/08(2006.01)i, A61K 49/04(2006.01)i, A61K 38/17(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 7/08; C07K 19/00; C07K 7/06; A61K 38/02; C07K 14/00; A61K 47/42; C07K 7/00; A61K 49/04; A61K 38/17

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: cell penetration peptide, CPP, cell penetration peptide, mitochondria, telomerase, telomerase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2010-0085527 A (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 29 July 2010	1-3,5-31,35-38
A	See claims 1 and 7 and paragraphs [0031], [0034], [0042] and [0059].	4,34
A	KR 10-2012-0026408 A (SNU R&DB FOUNDATION et al.) 19 March 2012 See abstract and claims 1-10.	1-31,34-38
A	KR 10-2011-0130943 A (SUNGSHIN WOMEN'S UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 06 December 2011 See abstract and claims 1-11.	1-31,34-38
A	US 2012-0065124 A1 (MORISHITA, M. et al.) 15 March 2012 See the entire document.	1-31,34-38
A	KR 10-2007-0083218 A (EWAH UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 23 August 2007 See the entire document.	1-31,34-38



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

26 SEPTEMBER 2013 (26.09.2013)

Date of mailing of the international search report

26 SEPTEMBER 2013 (26.09.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/006218

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.: **32, 33**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 32 and 33 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain 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/KR2013/006218

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0085527 A	29/07/2010	KR 10-1169030 B1 WO 2010-085100 A2	20/07/2013 29/07/2010
KR 10-2012-0026408 A	19/03/2012	EP 2615105 A1 WO 2012-033272 A1	20/07/2013 15/03/2012
KR 10-2011-0130943 A	06/12/2011	KR 10-1263212 B1	20/05/2013
US 2012-0065124 A1	15/03/2012	AU 2010-250452 A1 CA 2762551 A1 CN 102428096 A EP 2433953 A1 KR 10-2012-0064650 A MX 2011011960 A RU 2011151877 A WO 2010-134537 A1	20/01/2013 25/11/2010 25/04/2012 28/03/2012 19/06/2012 06/12/2011 27/06/2013 25/11/2010
KR 10-2007-0083218 A	23/08/2007	EP 1991560 A1 JP 2009-527251 A US 2010-0168034 A1 US 2013-0129726 A1 US 2013-0136742 A1 WO 2007-097561 A1	20/01/2013 30/07/2009 01/07/2010 23/05/2013 30/05/2013 30/08/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C07K 7/08(2006.01)i, A61K 49/04(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 7/08; C07K 19/00; C07K 7/06; A61K 38/02; C07K 14/00; A61K 47/42; C07K 7/00; A61K 49/04; A61K 38/17

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: 세포 투과 펩티드, CPP, cell penetration peptide, 미토콘드리아, 텔로머라제, telomerase

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2010-0085527 A (광주과학기술원 외 1명) 2010.07.29 청구항 1 및 7 및 단락 [0031], [0034], [0042] 및 [0059] 참조.	1-3,5-31,35-38
A		4,34
A	KR 10-2012-0026408 A (서울대학교산학협력단 외 1명) 2012.03.19 요약 및 청구항 1-10 참조.	1-31,34-38
A	KR 10-2011-0130943 A (성신여자대학교 산학협력단) 2011.12.06 요약 및 청구항 1-11 참조.	1-31,34-38
A	US 2012-0065124 A1 (MORISHITA, M. 외 3명) 2012.03.15 전문 참조.	1-31,34-38
A	KR 10-2007-0083218 A (이화여자대학교 산학협력단) 2007.08.23 전문 참조.	1-31,34-38

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 09월 26일 (26.09.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 09월 26일 (26.09.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

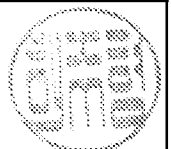
 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



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: 32, 33
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제32항 및 제33항은 사람의 치료방법에 관한 것으로, PCT 조약 제17조(2)(a)(1) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0085527 A	2010/07/29	KR 10-1169030 B1 WO 2010-085100 A2	2012/07/20 2010/07/29
KR 10-2012-0026408 A	2012/03/19	EP 2615105 A1 WO 2012-033272 A1	2013/07/17 2012/03/15
KR 10-2011-0130943 A	2011/12/06	KR 10-1263212 B1	2013/05/06
US 2012-0065124 A1	2012/03/15	AU 2010-250452 A1 CA 2762551 A1 CN 102428096 A EP 2433953 A1 KR 10-2012-0064650 A MX 2011011960 A RU 2011151877 A WO 2010-134537 A1	2010/11/25 2010/11/25 2012/04/25 2012/03/28 2012/06/19 2011/12/06 2013/06/27 2010/11/25
KR 10-2007-0083218 A	2007/08/23	EP 1991560 A1 JP 2009-527251 A US 2010-0168034 A1 US 2013-0129726 A1 US 2013-0136742 A1 WO 2007-097561 A1	2008/11/19 2009/07/30 2010/07/01 2013/05/23 2013/05/30 2007/08/30