

MTD 紹介資料

(Macromolecule Transduction Domain)

BPMed Co., Ltd.

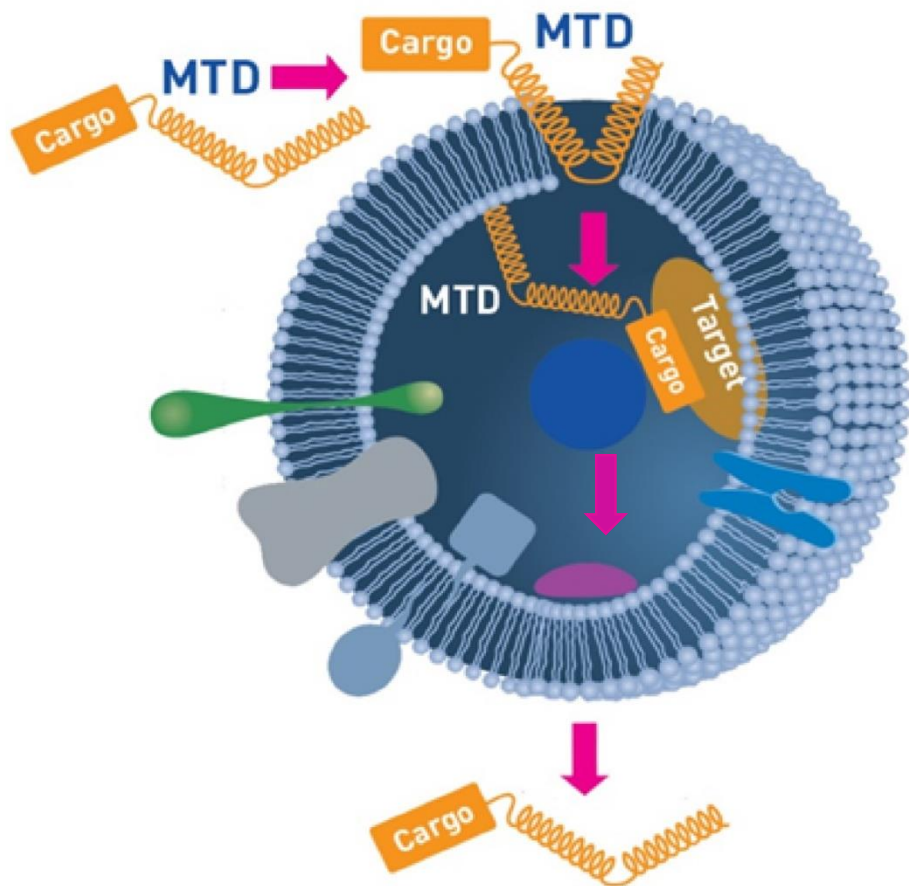
Address 4F, 8, Bongeunsa-ro 84-gil, Gangnam-gu, Seoul, Republic of Korea

Tel +82-2-1577-0622 Fax +82-2-565-0622

E-mail bpmedcosmetic@bpmedcosmetic.com

www.bpmedcosmetic.com

※ MITT : Macromolecule Intracellular Transduction Technology



■ MTD (Macromolecule Transduction Domain)

- ✓ 巨大分子内伝送ドメイン
- ✓ Cargoの細胞内伝送及び透過

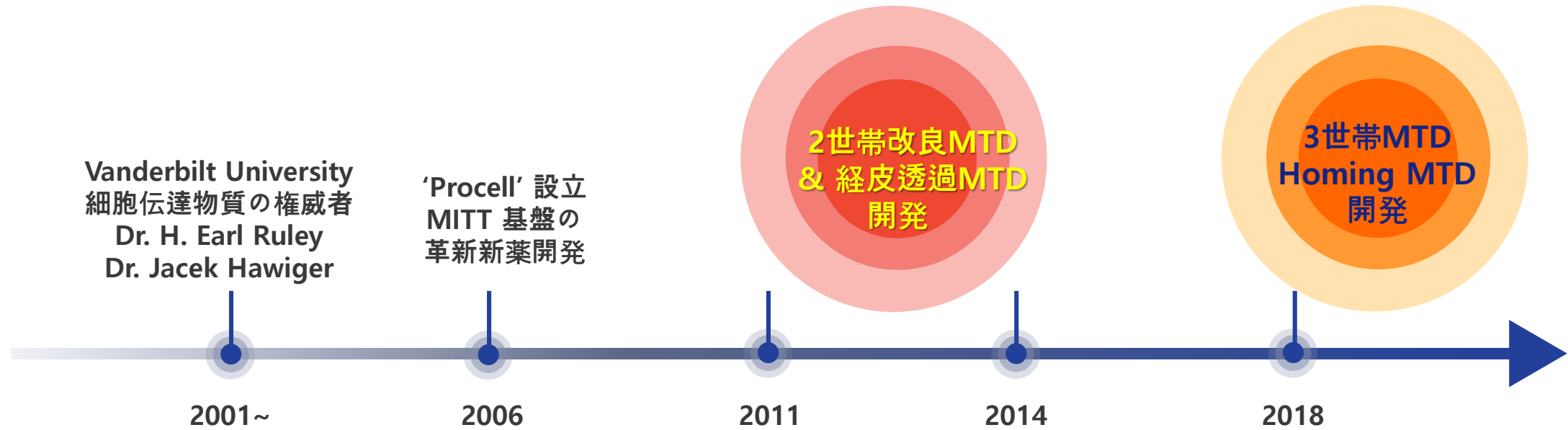
■ Cargo Therapeutic Materials (治療用 巨大分子物質)

- ✓ 各種 治療用抗体
- ✓ 組換えタンパク質
- ✓ ペプチド
- ✓ siRNA及び遺伝子(DNA or RNA)
- ✓ 低分子化合物
- ✓ Nano粒子

MITT
源泉技術
特許現況

源泉MITT – アメリカ、日本、中国、EU、オーストラリア、カナダ等 6ヶ国 特許登録
(NOVEL MACROMOLECULE TRANSDUCTION DOMAINS AND METHODS FOR IDENTIFICATION AND USES THEREOF)
改良型MTD – アメリカ、韓国、日本、EU、中国など 5ヶ国 特許登録 (細胞透過能を改善した2世帯MTD)

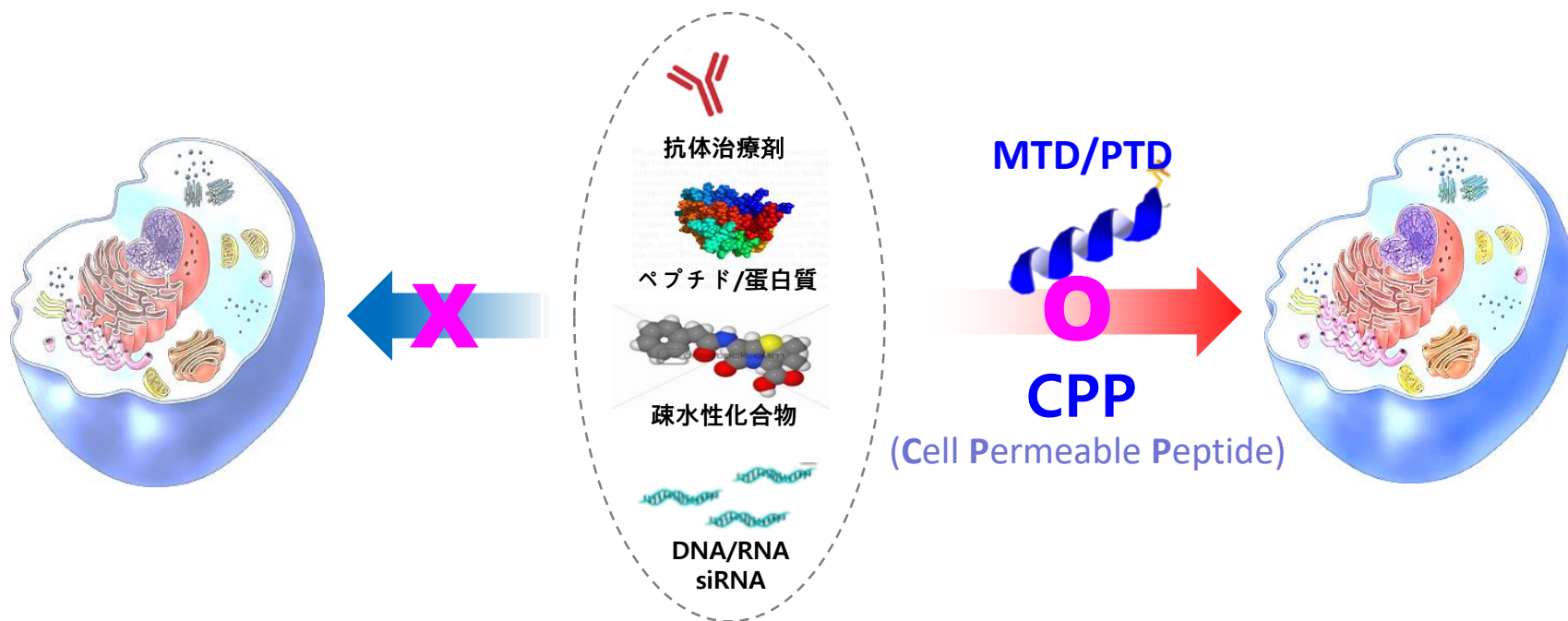
□ MITT：細胞透過ペプチドを用いた生理活性化物質の革新的な細胞伝達技術



“Topレベル論文発表によって、MTD技術に対する細胞伝達の効用性検証”



□ 細胞内薬物伝送の模式図



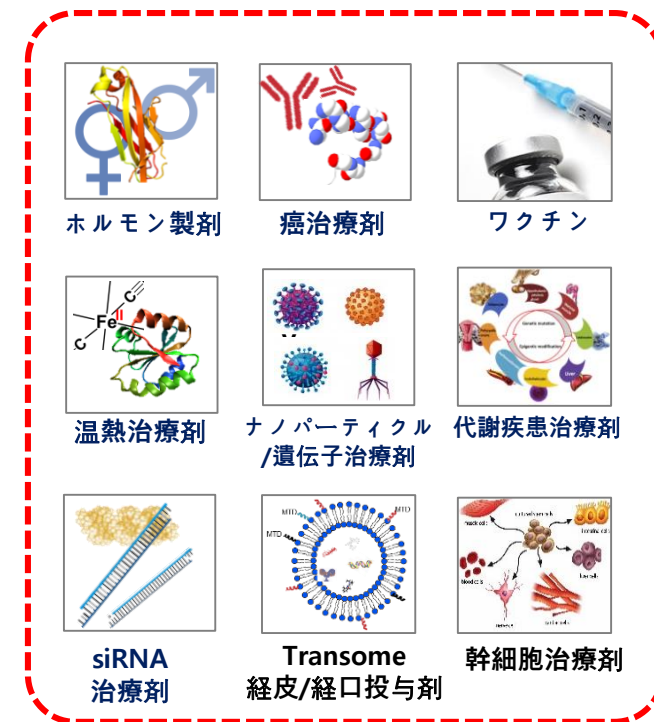
A. 細胞内伝送の難しさ

- ✓ **効率的な細胞内伝送技術不在**
siRNA, Peptide, rProtein(Ab & Enz.), iPSC factor そして、疎水性化合物など
- ✓ **新薬開発の障壁**
細胞外部に存在する薬物 Targetの枯渇による革新的な新薬開発の難しさ。

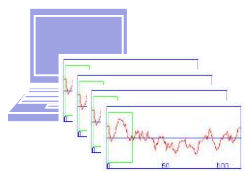
革新的な薬物伝送
MTDの利用で
新薬開発障壁を
克服

B. 細胞内伝送技術(MITT)

- ✓ **新薬開発の為の革新的な伝送技術**
MTDが細胞内 Target まで活性成分(Active Ingredient)を効果的に伝送
- ✓ **多様な生理活性物質の効率的細胞内伝送**
siRNA, Peptide, rProtein, iPSC factor そして、疎水性低分子薬物の細胞内伝送



A. MTD開発プロセス



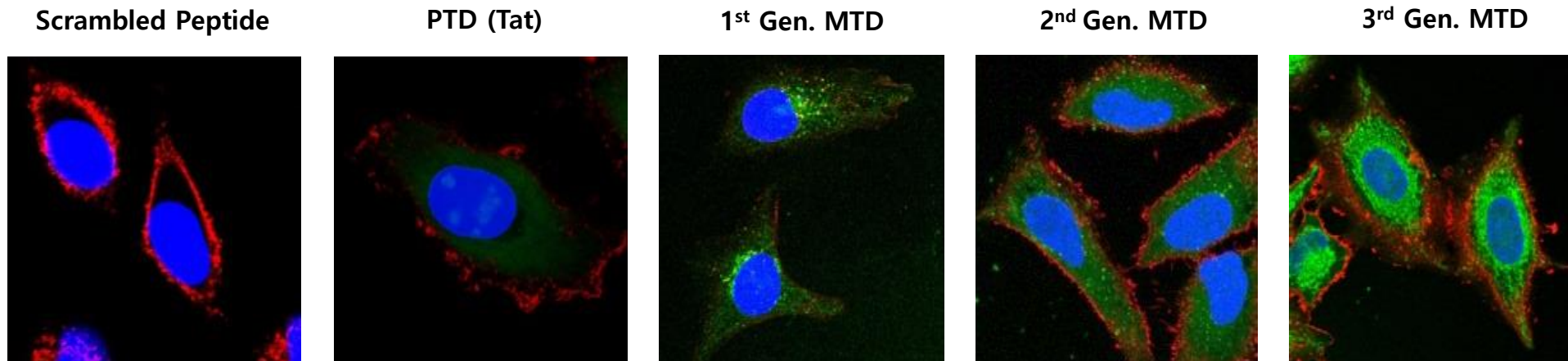
- 7~15個 アミノ酸
- Alpha helix
- 疎水性
- 蛋白質分解酵素 切断部位排除
- プロリン位置
- GPF-MTD 融合蛋白質
- 細胞透過度分析

B. MTD改良ポイント



□ FITC-labeled 1, 2, 3世帯 MTDのHeLa Cell 透過度 比較

- Cell membrane : Con A staining
- Nucleus : DAPI staining
- Cytosol : Green Fluorescens by Transduced FITC conjugated with CPP

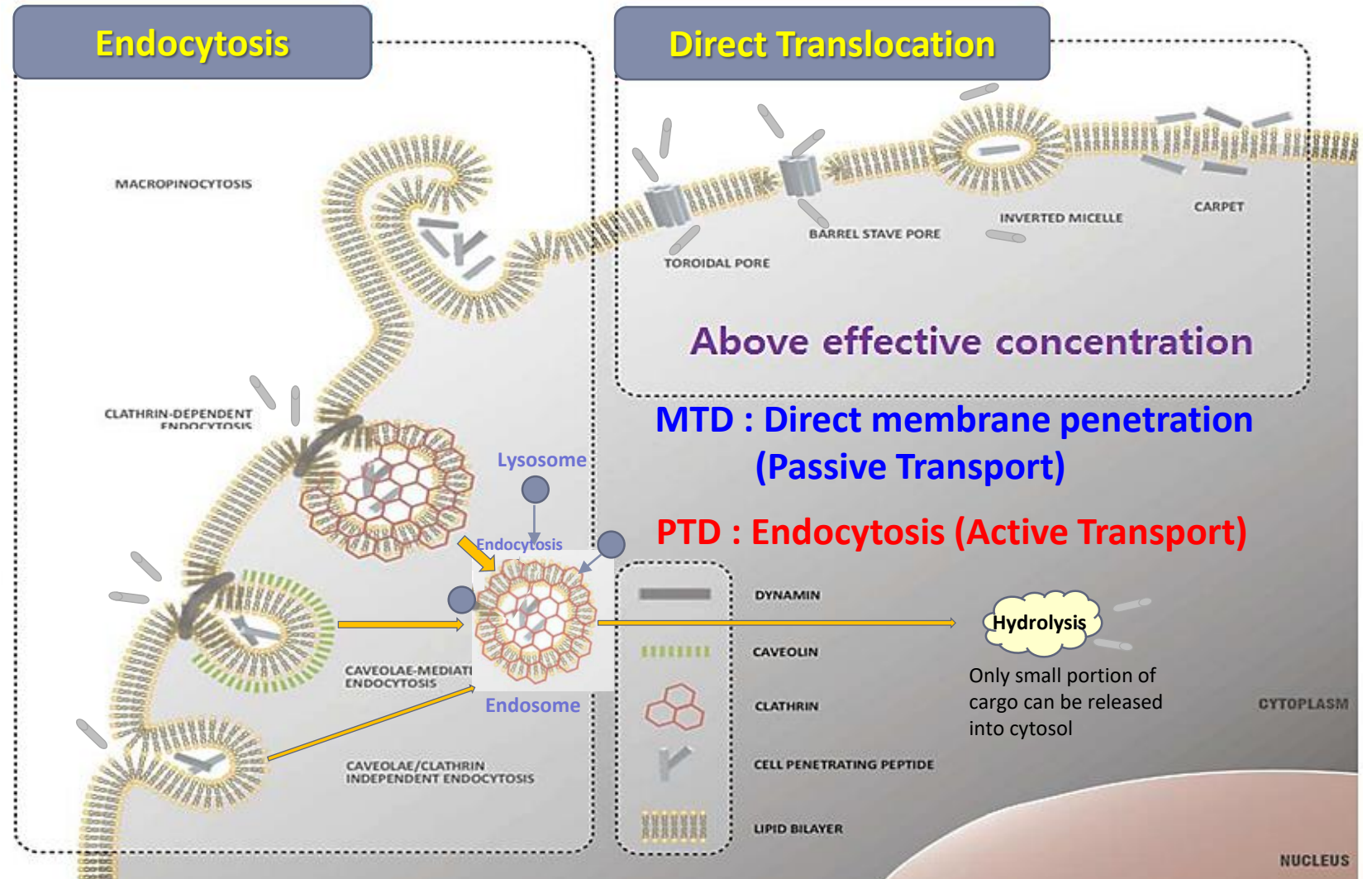
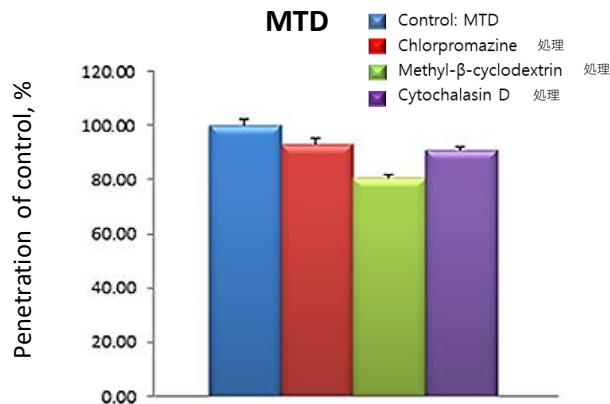
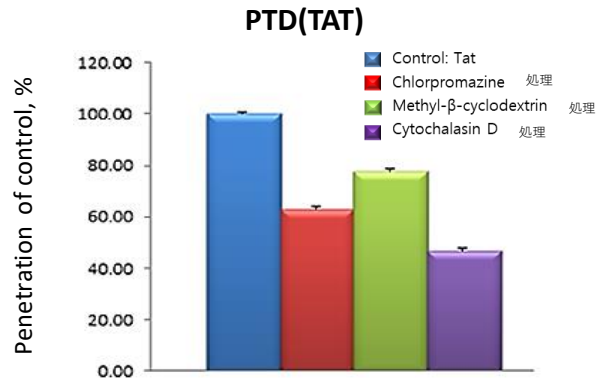


Confocal microscopy, HeLa cell, 2.5uM, 6hr treatment, 倍率 X 400

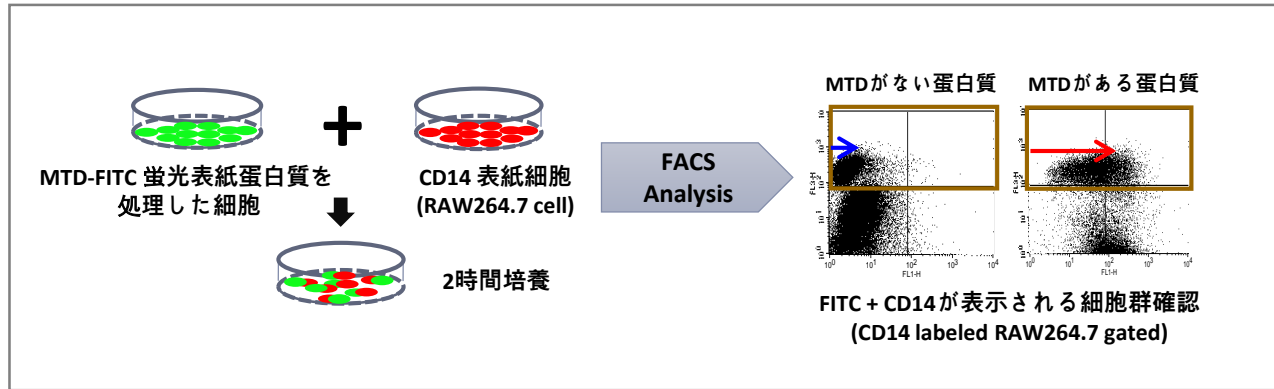
- ❖ **Tat-FITC treated cell : cell membrane integrity was damaged and swollen**
- ❖ **MTD-FITC treated cell : cell membrane integrity was maintained and MTD-FITC efficiently localized in cytosol**

Endocytosis Inhibitor Treatment

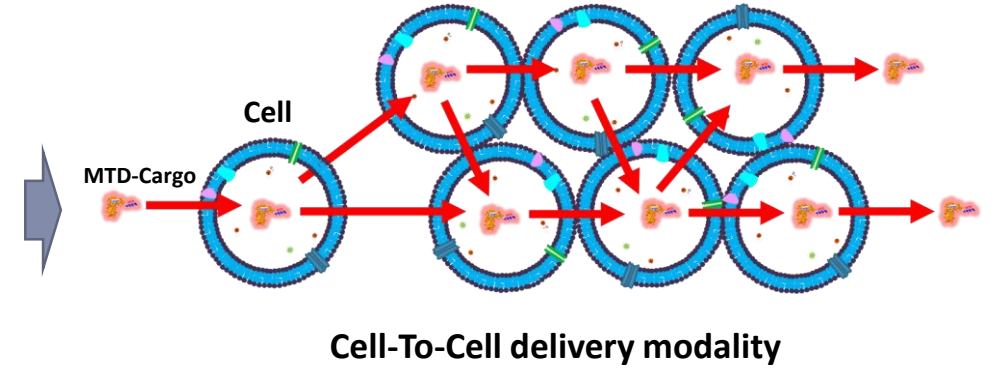
- Chlorpromazine: Clathrin dependent endocytosis inhibitor
- Methyl- β -cyclodextrin : Caveolae dependent endocytosis inhibitor
- Cytochalasin D : Macropinocytosis inhibitor



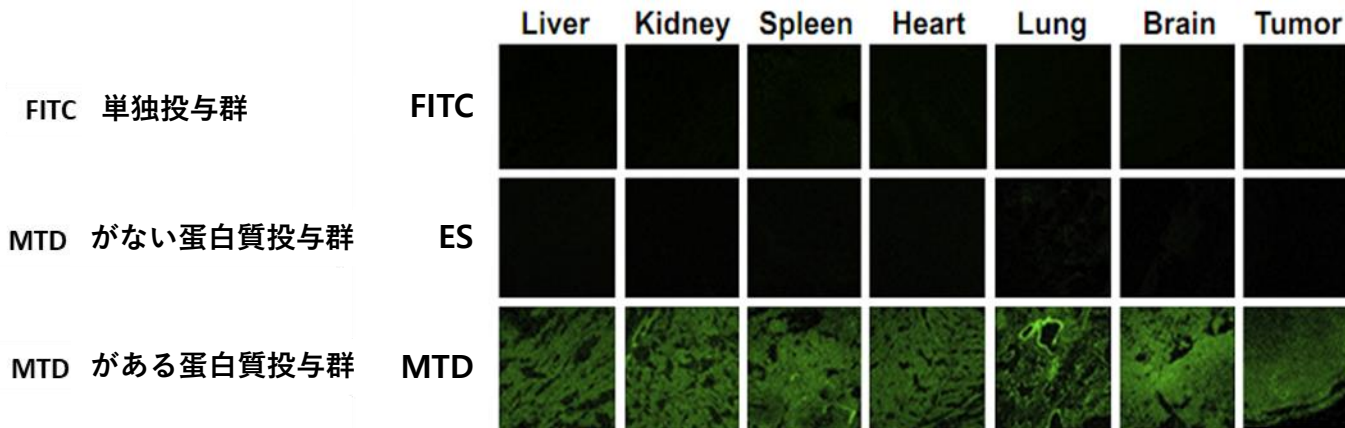
A. *In vitro* Cell-To-Cell Delivery



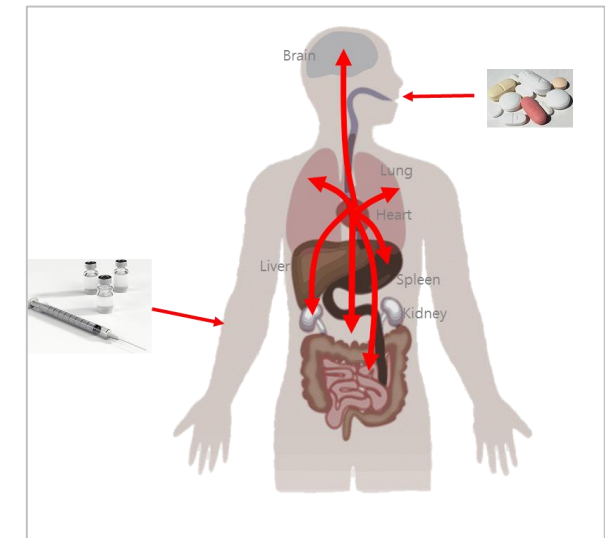
Mol Ther. 2012, 20 (8); 1540–1549



B. *In vivo* Cell-To-Cell Delivery



➤ 臓器の奥部まで FITC-labeled MTD-ES(Endostatin)が効率的に伝送



Tissue Distribution of MTD-Therapeutics

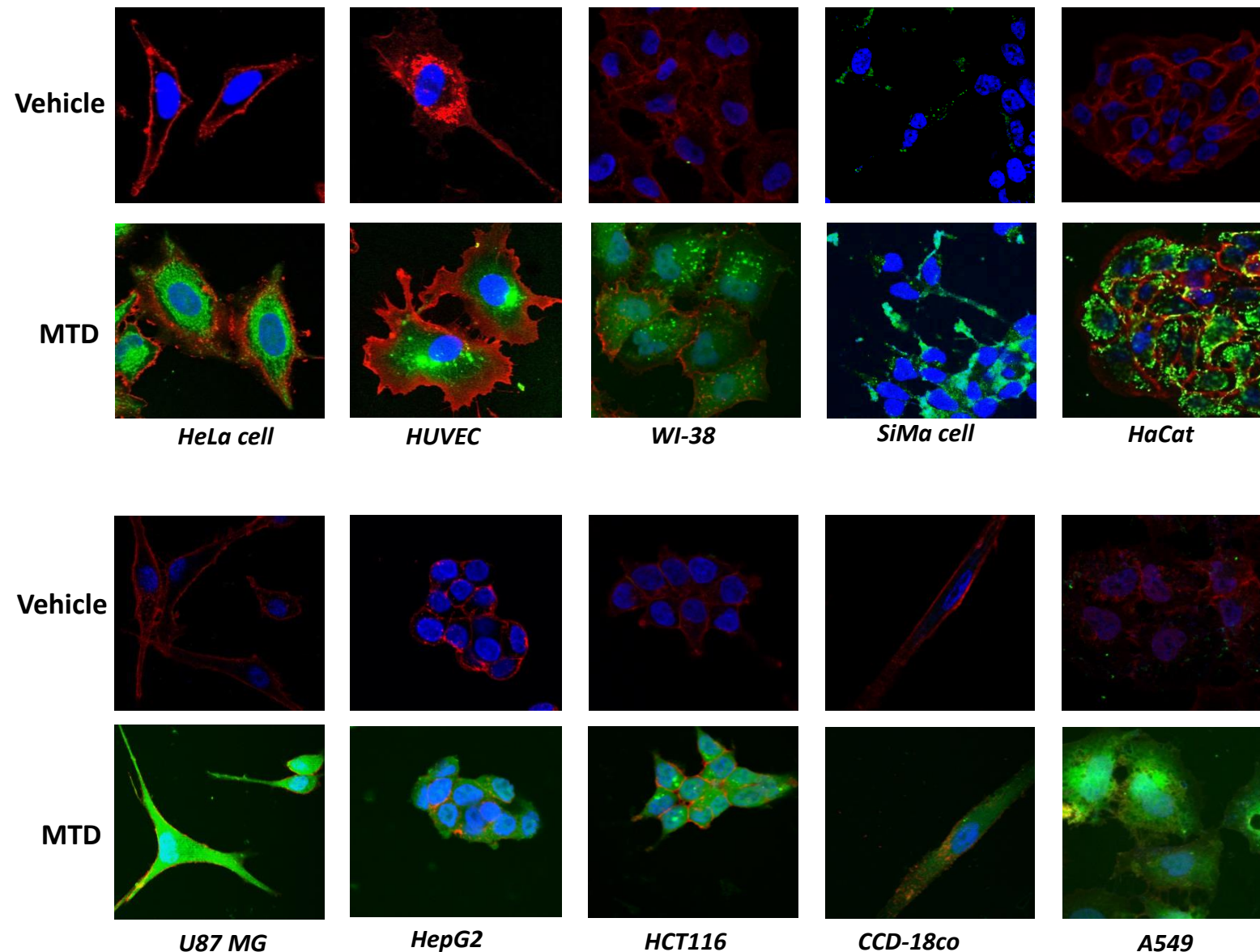
In vitro permeability test of MTD-FITC

試験細胞株 :

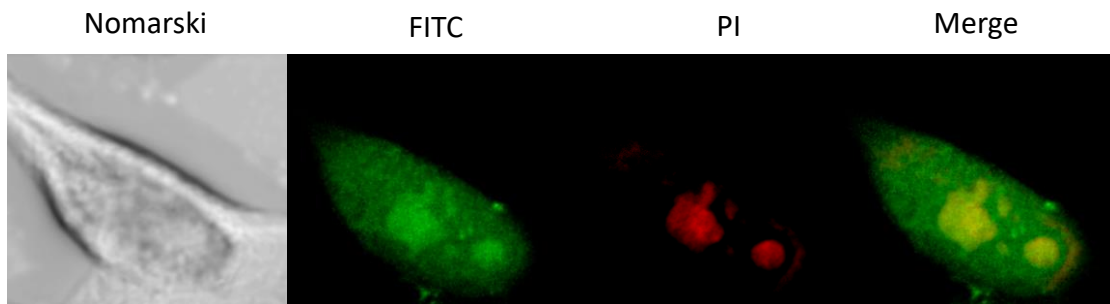
HeLa cell, HUVEC, WI-38, SiMa
cell, HaCat, U87 MG, HepG2,
HCT116, CCD-18co, A549

- ✓ 処理濃度 : 5 μ M
- ✓ 処理時間 : 2 hrs
- ✓ 処理条件 : Serum free media
- ✓ Image: Confocal Microscopy
(X 400)

❖ MTDは、一般細胞より癌細胞
透過率が高い

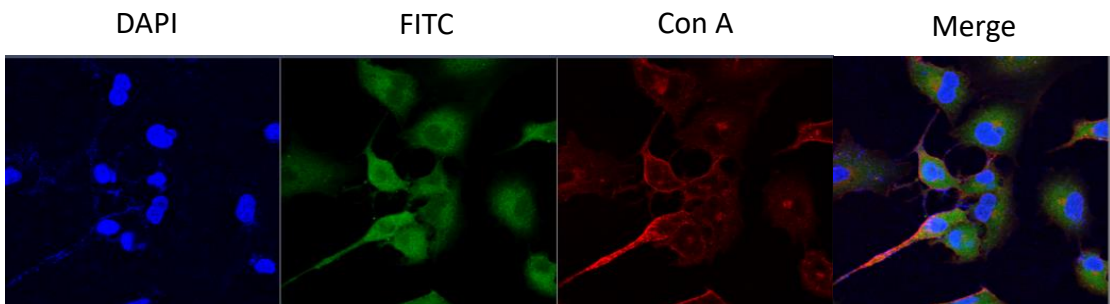


A. Cytosol & Nuclear localization of MTD-Cargo (Ob-R)



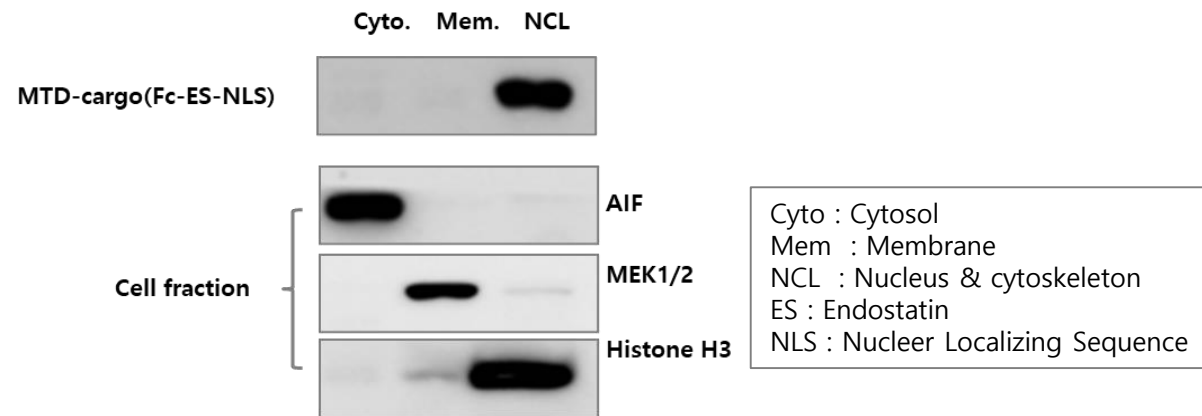
❖ MTD-cargoが核まで伝送されたことを確認

B. Cytosol localization of MTD

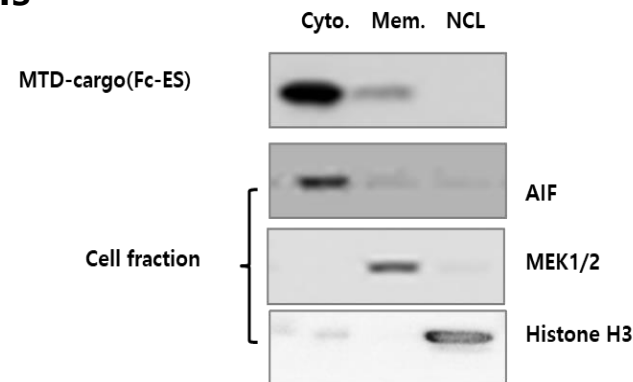


❖ MTD-cargoがcytosolまで効率的に伝送されたことを確認

Cytosol localization of MTD-cargo in A549 cells



Nuclear(or cytoskeletal) localization of MTD-cargo in A549 cells

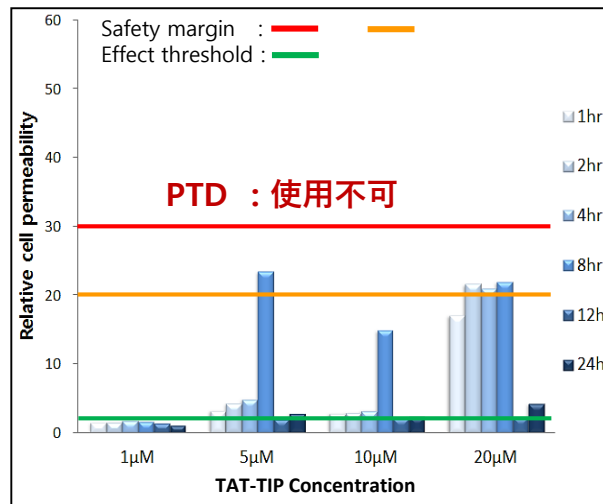


❖ Homing Peptide 併用時にcell organelleへの選択的伝送が可能

PTD

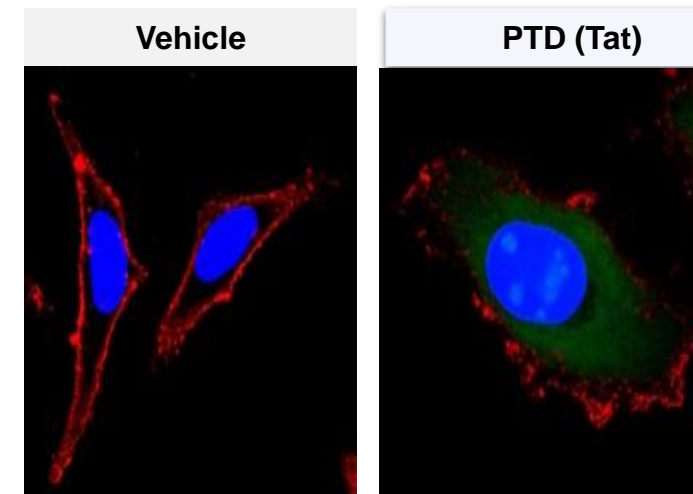
- 濃度及び処理時間に非依存的細胞透過
- 細胞内Endocytosisによる一時的な細胞内透過
- PTDの特性による細胞膜吸着
- 一定濃度以上で急激な細胞内透過によって細胞膜安定性損傷
- 新薬開発に活用不可 (安全性)

表) Peptideに適用した各透過能 比較表



* Cell line: HCT116, Analysis: FACS
* TIP : Thioredoxin Insert Protein Peptide(reference peptide)

写真) 細胞透過能 比較

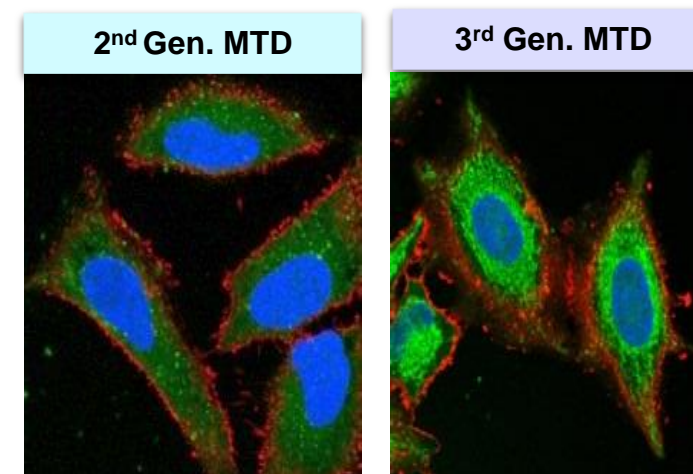
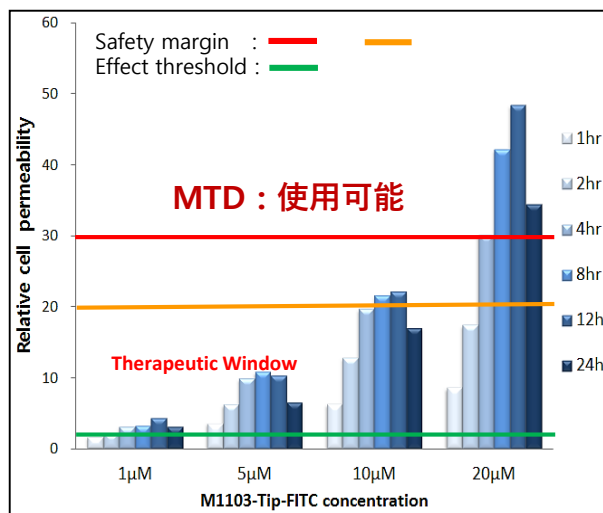


Confocal microscopy, HeLa cell, 2.5uM, 6hr treatment, X400

MTD

* MITTの核心物質

- 濃度及び処理時間に依存的な細胞透過
- 直接透過(Direct penetration)による細胞膜損傷最少化
- 親水性及び疎水性アミノ酸の調合による細胞及び組織特異的透過
- 新薬開発に相応しいDDS技術



Confocal microscopy, HeLa cell, 2.5uM, 6hr treatment, X400

※ MITT : Macromolecule Intracellular Transduction Technology



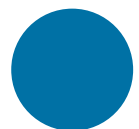
Cosmeceuticals

Peptide、成長因子、Herb Extract、Biopolymer etc.



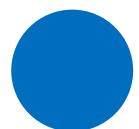
MITT適用可能性模索研究

iMAb、siRNA、iPSC、温熱治療、mRNA/DNA伝送



ゲームチェンジャープロジェクト発掘

代謝疾患、脳疾患、抗癌剤、ワクチン、遺伝子治療剤、幹細胞治療剤



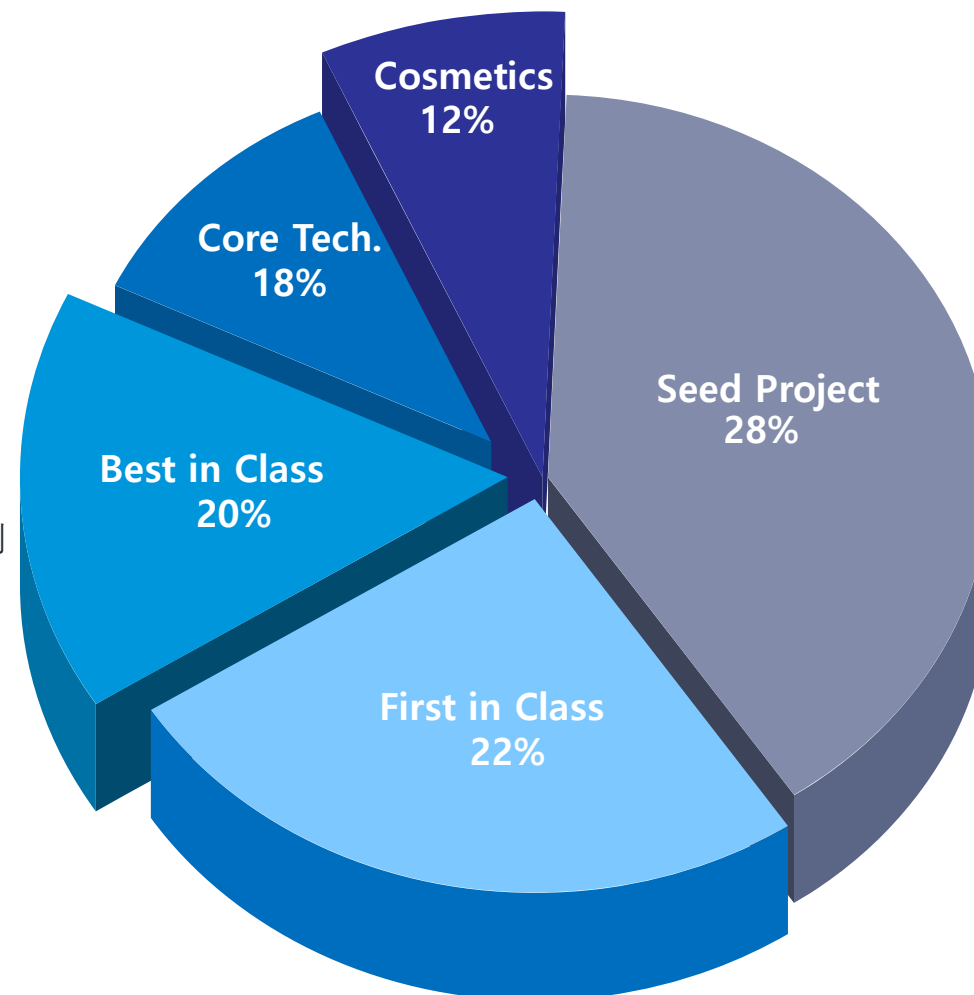
新規治療剤開発/技術応用

癌、代謝疾患、siRNA治療剤



共同研究/委託研究

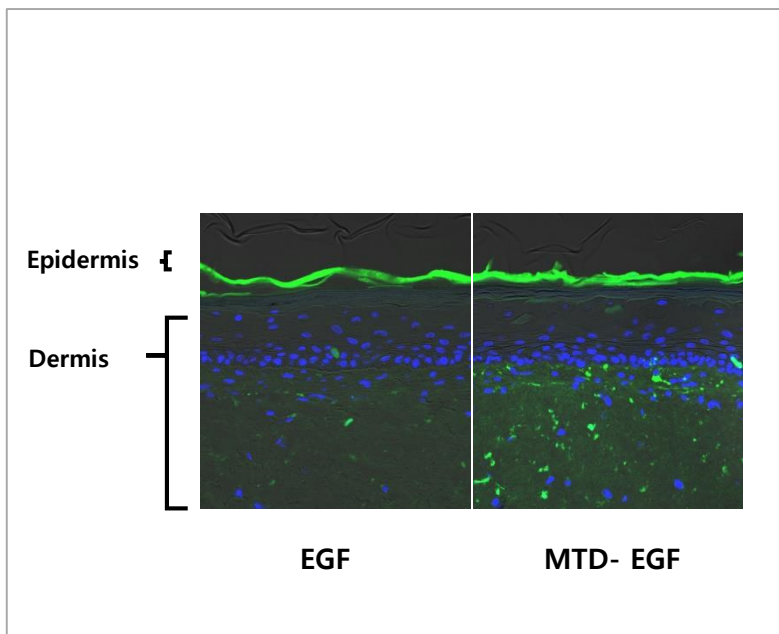
蛋白質、ワクチン、遺伝子及び細胞治療剤



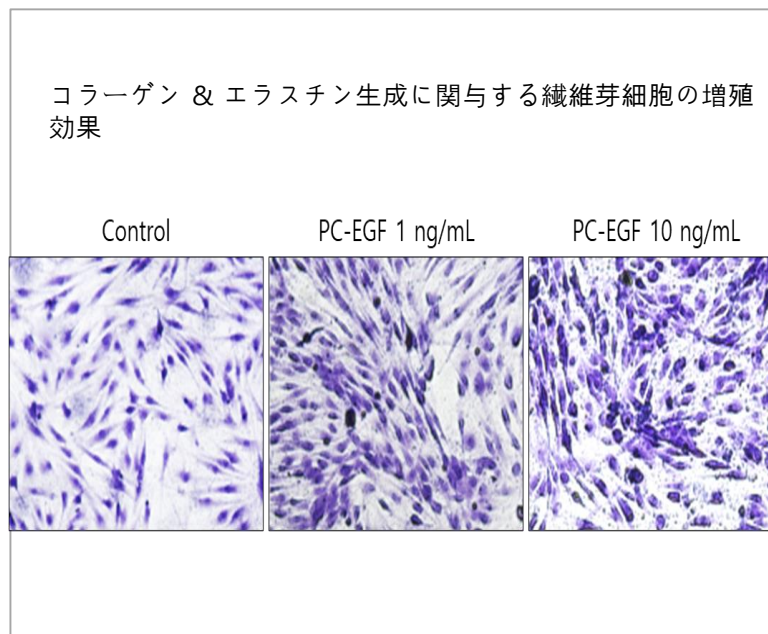
□ 経皮透過MTDの機能性検証

- 皮膚透過成長因子の場合、純度が95%以上で高純度活性型タンパク質精製技術立証
- 皮膚透過機能をPorcine Skin及び人工皮膚、人間皮膚で各々検証済み
- 透過効率を比較群と検証した結果、原料によって6～30倍の透過効能を示す

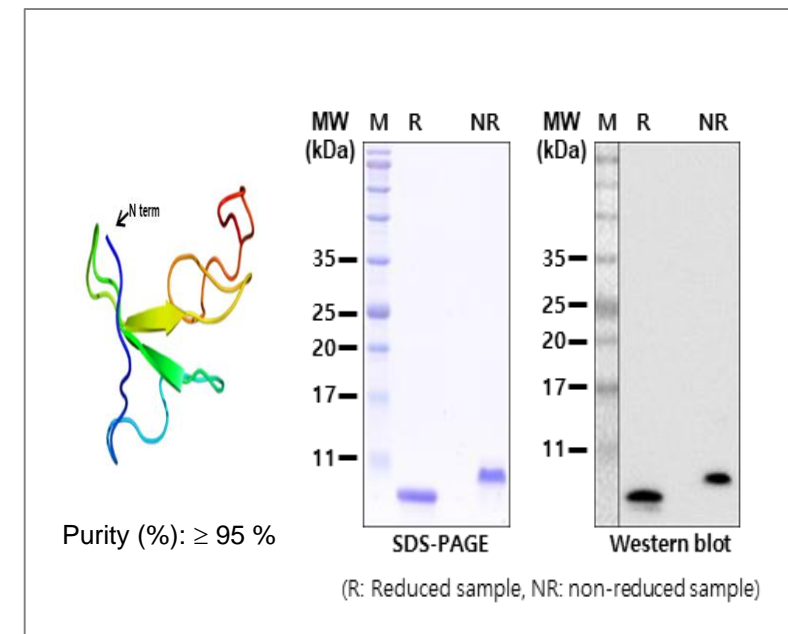
[3D Artificial Skinからの皮膚透過能確認]



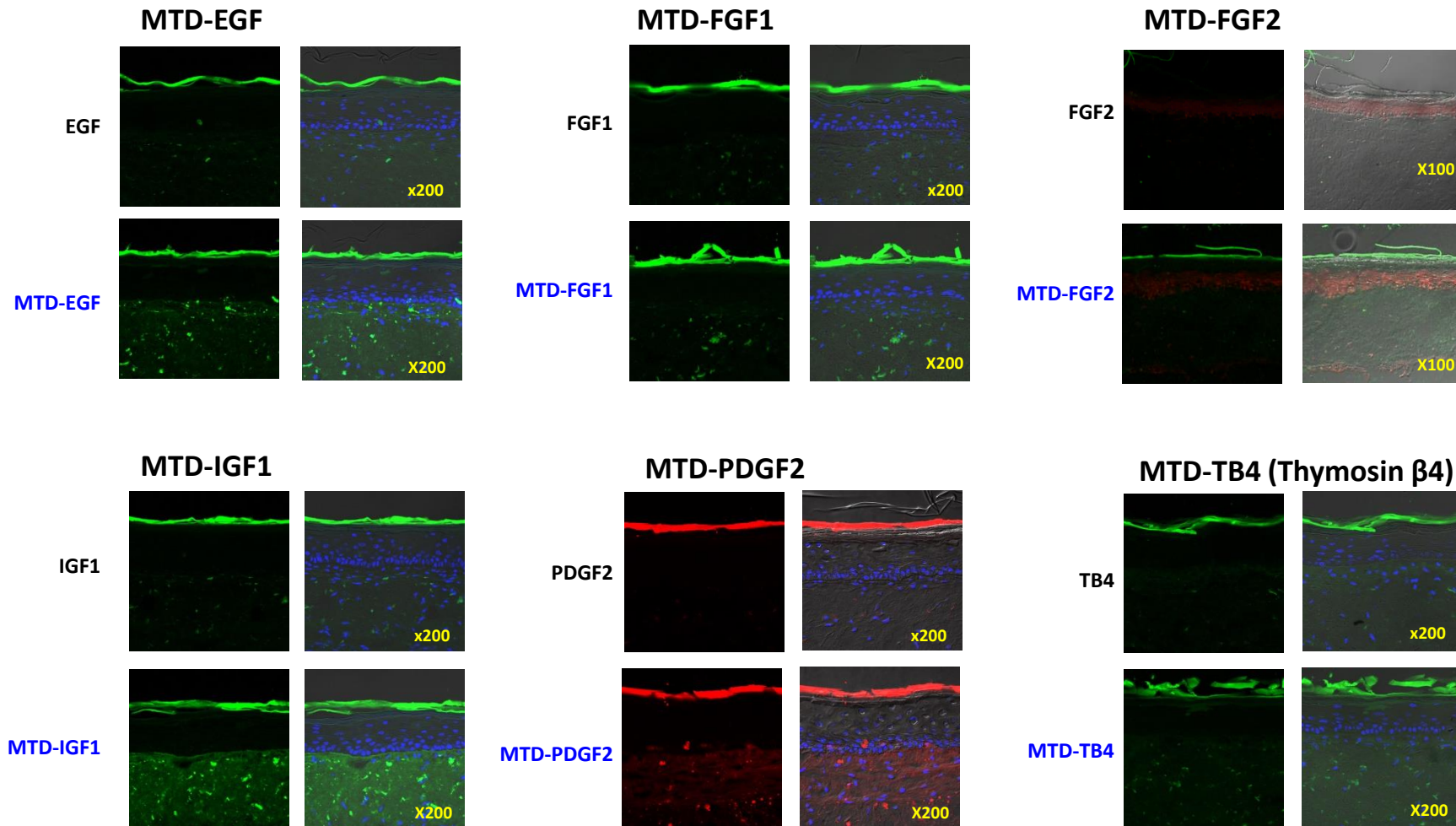
[MTD-EGF 再生効果]



[高純度活性型タンパク質精製技術]



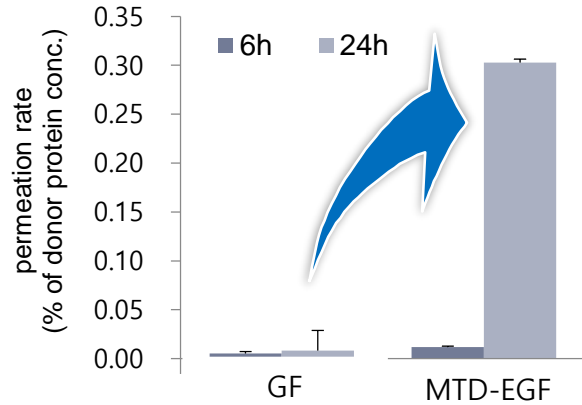
□ 皮膚透過成長因子の3D Artificial Skin 透過試験結果



成長因子にMTD
付着時に10-80倍
経皮透過率増加

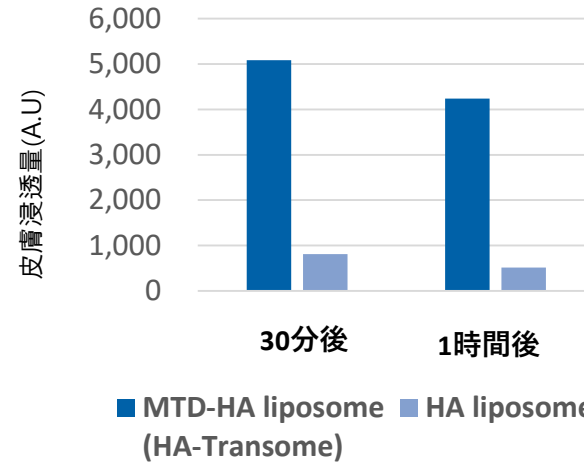
FITC conjugated MTD-GF were loaded on 3D artificial skin. After 24 hour, the tissue samples were cryo-sectioned and observed with confocal microscope.

EGF 人工皮膚で一般EGFと比べて30倍透過



*In vitro skin absorption assay (Franz Cell Diffusion)

PC-HA 人間の角質皮膚で6~8倍透過



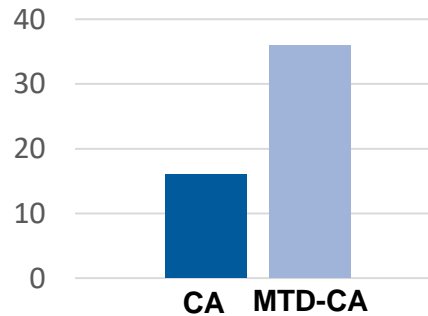
試験機関：ELLEAD
試験方法：Raman confocal microspectroscopy

透過効能試験

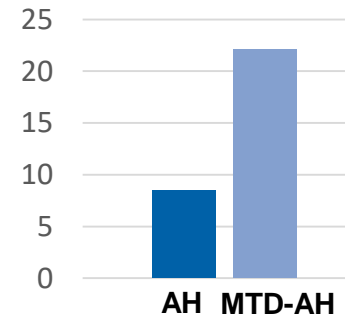
試験方法：Human cadaver skin(人間皮膚)
試験機関：亜州大学校
試験結果：CA 100% 増加
AH 160% 増加
AP 2,800% 増加

Skin Diffusion Percentage (%)

CA(クマリン酸)



Acetyl-Hexapeptide



Acetyl-Pentapeptide

