



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0070626
(43) 공개일자 2015년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0157068

(22) 출원일자 2013년12월17일

심사청구일자 2013년12월17일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

주식회사 지한

경기도 성남시 분당구 미금로 40, 지하1층B101 (구미동)

(72) 발명자

최수영

강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)

박진서

강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 1404호 (후평동, 동아아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 3 항

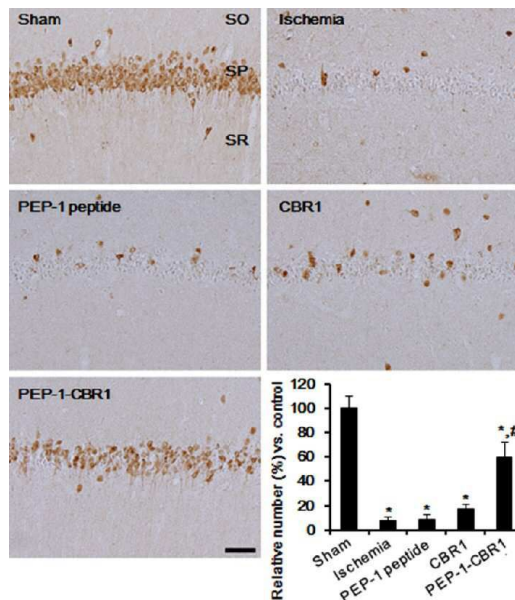
(54) 발명의 명칭 세포침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질

(57) 요약

인간 카보닐기 환원효소 1 (CBR1)은 NADPH-의존적 짧은 사슬 탈수소효소/환원효소 슈퍼패밀리의 구성원이며, 이 패밀리는 항산화 기능을 통하여 신경세포 생존에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 PEP-1-CBR1 융합단백질이 산화 스트레스로 유도되는 신경세포 손상을 보호하는지를 시험하였다. PEP-1-CBR1 융합

(뒷면에 계속)

대표도 - 도8



단백질은 효과적으로 해마 신경 세포인 HT-22 세포 내로 투과되었고, 과산화수소로 유도되는 신경세포사멸에 대해 보호효과를 나타내었다. 세포로 투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질은 활성산소종 생성, 세포내 거대분자의 산화, 세포자기사멸뿐만 아니라 MAPKs 활성화를 급격히 저해하였다. 또한, 본 발명자들은 세포 내로 투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질이 동물모델에서 허혈손상으로부터 기인하는 해마 CA1 부위의 신경세포 사멸로부터 신경세포를 현저히 보호함을 밝혔다. 뿐만 아니라, PEP-1-CBR1 융합단백질은 동물모델에서 신경교세포 활성화와 지방 과산화를 급격히 감소시켰다. 이러한 결과들은 PEP-1-CBR1 융합단백질이 인비트로와 인비보에서 산화 스트레스에 의해 유도되는 신경세포사멸로부터 신경세포를 현저히 보호함을 말해준다. 따라서, PEP-1-CBR1 융합단백질은 신경세포 손상 및 사멸과 같은 허혈손상의 치료제로서 이용될 수 있다.

(72) 발명자

한규형

강원 춘천시 새청말길 26, 107동 1402호 (우두동, 강변코아루아파트)

황인구

서울 관악구 관악로 1, C동 402호 (봉천동, 교수아파트)

음원식

강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 112동 802호 (후평동)

유동환

경기 성남시 분당구 미금로 40, (구미동)

이영승

강원 춘천시 행촌로 14, 209동 1302호 (퇴계동, 현대2차아파트)

김대원

강원 춘천시 칠전서길 15-2, 203동 701호 (칠전동, 칠전대우2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0141588

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업청

연구사업명 산학협력 기술개발사업

연구과제명 피부 침투성 CBR1융합 단백질 제조를 통한 포졸란 기반 기능성 항노화 화장품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

카보닐기 환원효소의 C-말단과 N-말단 중 어느 한 곳 이상에 단백질 수송도메인이 공유결합된 세포 침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 뇌 허혈 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 PEP-1 펩타이드 또는 HIV-1 Tat 펩타이드임을 특징으로 하는, 세포 침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 뇌 허혈 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 세포 침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질은 서열번호 4, 6, 8, 10, 12 및 14 중 선택된 1종임을 특징으로 하는, 세포 침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 뇌 허혈 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 세포침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질 및 이를 포함하는 뇌 허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 카보닐기 환원효소의 C-말단 및/또는 N-말단에 단백질 수송도메인이 공유결합된 융합단백질은 신경세포 내로 원활하게 투과되어 신경세포 사멸에 대해 보호효과를 나타내었으며, 동물모델에서도 허혈손상에 의한 신경세포사멸로부터 신경세포를 현저히 보호하였다.

배경기술

[0002]

뇌로의 혈류가 차단되면 뇌기능 유지에 필수적인 글루코스와 산소의 결핍이 일어난다. 뇌로 지속적인 에너지와 산소의 공급이 차단되면 발작, 허혈 또는 호흡곤란과 같은 산화 스트레스 손상을 통해 신경 기능손상 또는 신경 사멸이 급속히 유도된다 [Lo, E. H.; Dalkara, T.; Moskowitz, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**: 399-415; 2003]. 뇌의 미토콘드리아는 허혈/재관류 이후 활성산소종을 생산한다 [Piantadosi, C. A.; Zhang, J. Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. *Stroke* **27**: 327-332; 1996]. 뇌허혈은 산화 스트레스에 의해 유도되는 대표적인 질병이다. 산화 스트레스는 알츠하이머 병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 근위축성 측색 경화증 (amyotrophic lateral sclerosis)을 포함하는 많은 신경퇴행성 질환의 원인 중 하나이다 [Sayre, L. M.; Smith, M. A.; Perry, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.* **8**: 721-738; 2001, Floyd, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* **4**: 2587-2597; 1990, Dawson, T. M.; Dawson, V. L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* **302**: 819-822; 2003]. 활성산소종이 생산되면 DNA, 단백질 및 지방과 같은 세포 거대분자들이 변형되어 인간의 다양한 질병, 산화스트레스 손상 및 허혈을 일으키게 된다 [Pradeep, H.; Diya, J. B.; Shashikumar, S.; Rajanikant, G. K. Oxidative stress-assassin behind the ischemic stroke. *Folia Neuropathol.* **50**: 219-230; 2012, Loh, K. P.; Huang, S. H.; De, Silva, R.; Tan, B. K.; Zhu, Y. Z. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Curr. Alzheimer Res.* **4**: 327-337; 2006]. 뉴런에서 허혈 손상은 주로 혈액 흐름 방해, 산소 부족 및 뇌허혈-재관류에 뒤이은 재산화에 기인한다 [Frantseva, M. V.; Carlen, P. L.; Perez, Velazquez, J. L. Dynamics of intracellular calcium and free radical production

during ischemia in pyramidal neurons. *Free Radic. Biol. Med.* **31**: 1216-1227; 2001]. 비록 허혈에서 신경 손상의 정확한 기작은 아직 완전히 밝혀지지 않았지만, 활성산소종은 신경퇴화 및 대뇌 허혈을 일으키는 것으로 보인다 [Chan, P. H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**: 2-14; 2001]. 따라서, 활성산소종 조절은 신경질환에서 중요한 역할을 수행한다.

[0003]

인간 카보닐기 환원효소 1 (carbonyl reductase 1; CBR1)은 NADPH-의존적이고, 모노머이며, 짧은 사슬 탈수소 효소/환원효소 슈퍼패밀리에 속하는 세포질효소이다. CBR1은 간, 신장 및 신경세포를 포함하는 다양한 인간 조직에 분포한다 [Forrest, G. L.; Gonzalez, B. Carbonyl reductase. *Chem. Biol. Interact.* **129**: 21-40; 2000, Rashid, M. A.; Lee, S.; Tak, E.; Lee, J.; Choi, T. G.; Lee, J. W.; Kim, J. B.; Youn, J. H.; Kang, I.; Ha, J.; Kim, S. S. Carbonyl reductase 1 protects pancreatic β -cells against oxidative stress-induced apoptosis in glucotoxicity and glucolipotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* **49**: 1522-1533; 2010]. 몇몇 연구결과는 CBR1이 산화 스트레스, 신경퇴화 및 세포자기사멸에서 보호 역할을 수행함을 보여준다 [Ismail, E.; Al-Mulla, F.; Tsuchida, S.; Suto, K.; Motley, P.; Harrison, P.R.; Birnie, G. D. Carbonyl reductase: a novel metastasis-modulating function. *Cancer Res.* **60**: 1173-1176; 2000, Botella, J. A.; Ulschmid, J. K.; Gruenewald, C.; Moehle, C.; Kretzschmar, D.; Becker, K.; Schneuwly, S. The Drosophila carbonyl reductase sniffer prevents oxidative stress-induced neurodegeneration. *Curr. Biol.* **14**: 782-786; 2004]. 뿐만 아니라, CBR1은 세포에서 산화스트레스 동안 지방 알데하이드를 불활성화한다. 따라서, CBR1은 산화 스트레스에서 유래하는 세포손상에 관한 보호역할을 수행하는 것으로 보인다 [Doorn, J. A.; Master, E.; Blum, A.; Claffey, D.J.; Petersen, D. R. Human carbonyl reductase catalyzes reduction of 4-oxonon-2-enal. *Biochem.* **43**: 13106-13114; 2004, Maser, E. Neuroprotective role for carbonyl reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**: 1019-1022; 2006]. 그러나, 허혈에서 CBR1 단백질의 생물학적 기능과 기작은 거의 알려지지 않았다.

[0004]

외부 거대분자들이 내부 세포막을 투과하기는 어렵다. 아미노산 서열 짧은 사슬로 이루어진 단백질 수송 도메인은 외부 거대분자들이 포유류 세포 내로 투과되는 것을 용이하게 해준다 [Wadia, J. S.; Dowdy, S. F. Protein transduction technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 52-56; 2002, Schwarze, S.; Ho, A.; Vocero-Akbani, A.; Dowdy, S. In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **285**: 1569-1572; 1999]. 본 발명자들은 인비트로와 인비보에서 단백질 수송도메인과 융합된 다양한 재조합 단백질들을 세포 및 조직 내로 투과하는 것을 보고한바 있고, 이들 융합단백질들은 세포 사멸에 대응하여 세포를 효과적으로 보호하였다 [An, J. J. et al., *FEBS J.* **275**: 1296-1308; 2008, Ahn, E. H. et al., *Toxicol.* **276**: 192-197; 2010, Kim, S. Y. et al., *J. Invest. Dermatol.* **131**: 1477-1485; 2011, Eum, W. S. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **37**: 1656-1669; 2004, Ahn, E. H. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **55**: 36-45; 2013, Sohn, E. J. et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1820**: 1647-1655; 2012, Kim, D. W. et al., *BMB Rep.* **46**: 124-129; 2013, Kim, M. J. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **63**: 432-445; 2013].

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

본 발명은 허혈손상 및 허혈손상에 의한 신경세포 손상 및 사멸을 치료하기 위한 효과적인 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006]

인간 카보닐기 환원효소 1 (CBR1)은 NADPH-의존적 짧은 사슬 탈수소효소/환원효소 슈퍼패밀리의 구성원이며, 이 패밀리는 항산화 기능을 통하여 신경세포 생존에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 산화 스트레스는 허혈을 포함하는 퇴행성 장애의 주요 원인 중 하나이다. 그러나, 허혈손상과 관련된 CBR1의 역할은 아직 잘 알려져 있지 않다. PEP-1과 같은 단백질 수송도메인은 치료단백질을 세포 내로 수송하는데 이용되고 있다. 본 발명자들은 PEP-1-CBR1 융합단백질이 산화 스트레스로 유도되는 신경세포 손상을 보호하는지를 시험하였다. PEP-1-CBR1 융합단백질은 효과적으로 해마 신경 세포인 HT-22 세포 내로 투과되었고, 과산화수소로 유도되는 신경세포사멸에 대해 보호효과를 나타내었다. 세포로 투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질은 활성산소종 생성, 세포내 거대분자의 산화, 세포자기사멸뿐만 아니라 MAPKs 활성화를 급격히 저해하였다. 또한, 본 발명자들은 세포 내로 투

과된 PEP-1-CBR1 융합단백질이 동물모델에서 허혈손상으로부터 기인하는 해마 CA1 부위의 신경세포 사멸로부터 신경세포를 현저히 보호함을 밝혔다. 뿐만 아니라, PEP-1-CBR1 융합단백질은 동물모델에서 신경교세포 활성화와 지방 과산화를 급격히 감소시켰다. 이러한 결과들은 PEP-1-CBR1 융합단백질이 인비트로와 인비보에서 산화 스트레스에 의해 유도되는 신경세포사멸로부터 신경세포를 현저히 보호함을 말해준다. 따라서, PEP-1-CBR1 융합단백질은 신경세포 손상 및 사멸과 같은 허혈손상의 치료제로서 이용될 수 있다.

[0007] 본 발명자들은 단백질 수송 도메인을 CBR1에 융합하여 CBR1 융합단백질을 제조하고, HT-22 신경세포에 처리하였다. 또한, 산화 스트레스로 유도된 신경세포 손상에 대한 보호효과를 시험하였다. 뿐만 아니라, 본 발명자들은 뇌허혈 동물모델을 통하여 CBR1 융합단백질의 보호효과를 증명하였다. 그 결과, CBR1 융합단백질은 다양한 산화 스트레스 질환의 치료에 효과가 있는 것으로 나타났다.

[0008] 본 발명은 카보닐기 환원효소의 C-말단과 N-말단 중 어느 한 곳 이상에 단백질 수송도메인이 공유결합된 세포투과성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 뇌 허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 PEP-1 펩타이드 또는 HIV-1 Tat 펩타이드임을 특징으로 하는, 세포투과성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 뇌 허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 세포투과성 카보닐기 환원효소 융합단백질이 서열번호 4, 6, 8, 10, 12 및 14 중 선택된 1종임을 특징으로 하는, 세포 침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 뇌 허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0011] CBR1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보존제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0012] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.01 μ g~100mg/kg을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0013] 본 발명에 따른 CBR1 단백질 분자의 세포 내 전달은 CBR1에 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인(hydrophobic domain), 라이신을 4개 이상 다수 포함하는 친수성 도메인(hydrophilic domain) 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이스(spacer)로 구성된 수송 도메인이 공유결합된, Pep-1을 비롯한 세포투과성 수송도메인 또는 HIV Tat 세포투과성 도메인이 목표 단백질인 CBR1의 N-말단 및/또는 C-말단과 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 21개의 아미노산으로 구성되고 서열번호 3과 같은 아미노산 서열로 이루어진 PEP-1 펩타이드, HIV Tat 49~57 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 서열번호 3의 PEP-1 펩타이드, HIV Tat 49~57 잔기 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, PEP-1 또는 HIV Tat의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 PEP-1 펩타이드 또는 HIV Tat 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인(hydrophobic domain), 라이신을 4개 이상 다수 포함하는 친수성 도메인(hydrophilic domain) 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이스(spacer)로 구성된 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인, 또는 6 내지 12개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인, 6 내지 12개의 라이신으로 구성

되는 올리고라이신 수송 도메인, 6 내지 12개의 아르기닌으로 구성되는 올리고아르기닌 수송 도메인 또는 6 내지 12개의 라이신 또는 아르기닌으로 구성되는 올리고(라이신,아르기닌) 수송 도메인도 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

[0014] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0015] "CBR1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 CBR1 단백질을 포함하며, 단백질 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 CBR1을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서와 도면에서 구체적인 일 실시예로서 "PEP-1-CBR1"은 CBR1 융합단백질 중 CBR1의 N-말단에 PEP-1 단백질 수송 도메인이 결합된 것을 말한다.

[0016] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0017] 또한, "표적 세포"란 수송 도메인에 의해 화물 분자가 전달되는 세포를 의미하는 것으로서 즉, 표적 세포는 체내 세포, 다시 말하여 살아있는 동물 또는 인간의 장기 또는 조직을 구성하는 세포 또는 살아있는 동물 또는 인간에서 발견되는 미생물을 포함하는 의미이다. 또한, 표적 세포는 체외 세포, 즉 배양된 동물 세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다. 구체적으로 본 명세서에서 표적 세포는 뇌세포를 의미한다.

[0018] 본 명세서의 "단백질 수송 도메인"은 화물 분자(목표 단백질) 펩타이드 또는 단백질과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 펩타이드나 단백질을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말하며, 예를 들면 PEP-1 펩타이드를 말한다.

[0019] 본 명세서의 "목표 단백질"은 PEP-1 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미한다. "화물 분자"와 동일한 의미이다.

[0020] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0021] 본 발명에서 단백질 수송 도메인으로서는 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인, 라이신을 다수 포함하는 친수성 도메인 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서로 구성된 단백질 수송 도메인, 6 내지 12개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인, 6 내지 12개의 라이신으로 구성되는 올리고라이신 수송 도메인, 6 내지 12개의 아르기닌으로 구성되는 올리고아르기닌 수송 도메인 또는 6 내지 12개의 라이신 또는 아르기닌으로 구성되는 올리고(라이신,아르기닌) 수송 도메인을 들 수 있다. 또한, 목표 단백질(화물 분자)는 CBR1이다. 상기 단백질 수송 도메인 및 목표 단백질은 silent change에 따라 서열 내에서 하나 이상의 아미노산이 기능적으로 동등하게 작용하는 유사한 극성의 다른 아미노산(들)로 치환될 수 있다. 서열 내 아미노산 치환은 그 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성원들로부터 선택될 수 있다. 예컨대, 소수성 아미노산 분류는 알라닌, 발린, 류이신, 이소류이신, 페닐알라닌, 발린, 트립토판, 프롤린 및 메티오닌을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양성 염기성 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 히스티딘을 포함한다. 음성전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합단백질과 아미노산 서열간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내에서 동일·유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성 CBR1 융합단백질이 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12 또는 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송도메인(protein transducing domain; "PTD")이 CBR1 단백질의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 공유결합된 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 CBR1 융합단백질은 효과적으로 해마 신경 세포인 HT-22 세포 내로 투과되었고, 과산화수소로 유도되

는 신경세포사멸에 대해 보호효과를 나타내었다.

[0025] 세포로 투과된 CBR1 융합단백질은 활성산소종 생성, 세포내 거대분자의 산화, 세포자기사멸뿐만 아니라 MAPKs 활성화를 급격히 저해하였다.

[0026] 또한, 세포 내로 투과된 CBR1 융합단백질은 동물모델에서 허혈손상으로부터 기인하는 해마 CA1 부위의 신경세포 사멸로부터 신경세포를 현저히 보호하였다.

[0027] 뿐만 아니라, CBR1 융합단백질은 동물모델에서 신경교세포 활성화와 지방 과산화를 급격히 감소시켰다.

[0028] 따라서, CBR1 융합단백질은 신경세포 손상 및 사멸과 같은 허혈손상의 치료제로서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 CBR1 융합단백질 발현벡터 모식도와 정제에 대한 SDS-PAGE 및 웨스턴블랏 사진이다. CBR1 단백질 발현벡터는 pET15b에 기초하여 제조하였고, 단백질은 BL21(DE3)에서 발현되었고 IPTG로 유도되었다. PEP-1 올리고머는 인간 CBR1 cDNA의 *Nde*I 과 *Xho*I 부위 사이에 삽입되어 pET-15b 다중 클로닝 부위의 *Xho*I 과 *Bam*HI 부위 사이에 연결되었다. 대조군 CBR1 단백질은 PEP-1 펩타이드와 연결하지 않았다. 각 단백질은 N-말단에 여섯 개의 히스티딘 잔기를 붙였다 (A). 발현 및 정제된 PEP-1-CBR1 융합단백질은 12% SDS-PAGE로 분리하였고 (B), 단백질은 항 토끼 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏하여 확인하였다 (C).

도 2는 PEP-1-CBR1 융합단백질의 HT-22 세포 내로의 투과를 나타낸다. PEP-1-CBR1 융합단백질과 대조군 CBR1 단백질 (0.5~4 μ M)을 60분간 배양배지에 처리하고 (A), PEP-1-CBR1 융합단백질과 대조군 CBR1 단백질 (4 μ M)을 15~60분간 배양배지에 처리하였다 (B). 세포로 침투된 PEP-1-CBR1 융합단백질이 HT-22 세포 내에 얼마나 오랫동안 유지되는지는 웨스턴 블랏팅으로 분석하였고, 띠의 강도는 밀도계로 측정하였다 (C). 세포 투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질은 공초점 현미경 영상으로 확인하였다 (D). 크기 막대 = 20 μ m.

도 3은 산화 스트레스로 유도되는 세포생존율, 세포내 활성산소종 수준 및 DNA 조각화에 대한 PEP-1-CBR1 융합단백질의 효과를 나타낸다. HT-22 세포는 PEP-1-CBR1 융합단백질 및 대조군 CBR1 단백질 (0.5~4 μ M)로 미리 처리한 다음 배양배지에 200 μ M의 과산화수소를 가하였다. 세포생존율은 WST-1을 이용한 발색반응으로 평가하였다 (A). 그래프는 최소 세 번의 개별 실험을 대표한다. * $P < 0.05$ 와 ** $P < 0.01$ 은 H_2O_2 처리한 세포와 비교한 것이다. DCF 형광은 DCF-DA (B)의 산화를 통하여 세포내 활성산소종 수준에 따라 증가되었고, DNA 조각화는 TUNEL 염색에 의해 탐지되었다 (C). 사진은 형광현미경으로 촬영하였다. 그래프는 최소 세 번의 개별실험을 대표한다. ** $P < 0.01$ 은 H_2O_2 처리한 세포와 비교한 것이다. 크기막대 = 50 μ m.

도 4는 HT-22 세포에서 세포내 거대분자의 산화에 대한 세포투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질의 효과를 나타낸다. PEP-1-CBR1 융합단백질과 대조군 CBR1 단백질을 배양배지에 가한 후 세포에 여섯 시간 동안 200 μ M의 과산화수소를 처리하였다. 4-HNE (A)와 단백질 카보닐 형성 (protein carbonyl formation) (B)은 웨스턴 블랏팅으로 측정하였고, 띠의 강도는 밀도계로 측정하였다. 8-OHdG로 양성 염색된 핵은 면역염색에 의해 산화 DNA 손상을 나타내는 것으로 측정되었다 (C).

도 5는 Akt와 MAPK 활성화에 대한 PEP-1-CBR1 융합단백질의 저해효과를 나타낸다. 세포는 PEP-1-CBR1 융합단백질 및 대조군 CBR1 단백질 (0.5~4 μ M)로 한 시간 동안 처리한 후 과산화수소로 30분간 처리하였다. 세포내 Akt, JNK, ERK 및 p38 수준은 웨스턴 블랏팅으로 평가하였고, 띠의 강도는 밀도계로 측정하였다.

도 6은 PEP-1-CBR1 융합단백질이 과산화수소로 유도된 내인성 세포사멸 활성화를 저해함을 나타낸다. HT-22 세포를 PEP-1-CBR1 융합단백질로 한 시간 동안 처리한 후 10% 우태혈청 배지 내에서 100 μ M의 과산화수소에 30 시간 동안 노출하였다. 세포내 DNA 함량에 따른 세포주기 분석은 플로우 사이토메트리로 수행하였다 (A). p53과 p21이 세포주기 휴지 (cell cycle arrest) (G_2/M phase)의 마커이므로, 이 단백질들의 수준을 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다 (B). 전 세포 추출물 동량을 SDS-PAGE로 분리한 후 Bax, Bcl-2 및 caspase-3의 농도를 웨스턴 블랏팅 분석으로 탐지하고, 띠의 강도는 밀도계로 측정하였다 (C).

도 7은 사이토크롬 c 방출과 미토콘드리아 막 전위에 대한 PEP-1-CBR1 융합단백질의 효과를 나타낸다. PEP-1-CBR1 융합단백질은 한 시간 동안 세포투과된 후 세포는 열 시간 동안 200 μ M의 과산화수소로 처리하였다. 미토

콘드리아 분획과 세포질 분획은 미토콘드리아 분리 키트를 이용하여 분리하였다. 사이토크롬 c 수준은 웨스턴 블랏팅으로 탐지하였다. COX-4는 미토콘드리아 마커이고 β -튜블린은 세포질 마커이며, 이들을 오염 확인 대조군으로 이용하였다 (A). 미토콘드리아 막전위는 미토콘드리아 막전위 분석키트를 이용하여 JC-1으로 평가하였다 (B). 크기막대 = 50 μ m.

도 8은 허혈동물모델에서 신경세포사멸에 대한 PEP-1-CBR1 융합단백질의 효과를 나타낸다. 허혈/재관류 4일 후 대조군, 허혈군, PEP-1 펩타이드 처리군, CBR1 단백질 처리군 및 PEP-1-CBR1 융합단백질 처리군의 해마 CA1 부위의 NeuN 면역조직화학이다. SP, 피라미드층 (stratum pyramidale); SO, 지향층 (stratum oriens); SR, 방사층 (stratum radiatum). 크기막대 = 50 μ m. 모든 군에서 절편 별 NeuN-면역반응성 신경 대 대조군의 상대적 수 (군당 n = 5; *P < 0.05, 대조군과 현저한 차이, #P < 0.05, 허혈군과 현저한 차이). 막대는 평균의 표준편차를 나타낸다.

도 9는 허혈 외상 이후 PEP-1-CBR1 융합단백질에 의한 정상세포 및 소교세포의 감소를 나타낸다. 허혈/재관류 4일 후 대조군 (A와 B), 허혈군 (C와 D), PEP-1 펩타이드 처리군 (E와 F), CBR1 단백질 처리군 (G와 H) 및 PEP-1-CBR1-융합단백질 처리군 (I와 J)의 CA1 부위에서 GFAP (A, C, E, G 및 I)와 Iba-1 (B, D, F, H 및 J)의 면역조직화학을 나타낸다. SP, 피라미드층 (stratum pyramidale); SO, 지향층 (stratum oriens); SR, 방사층 (stratum radiatum). 크기막대 = 50 μ m.

도 10은 인비보에서 일반운동활성 및 산화에 미치는 PEP-1-CBR1 융합단백질의 영향을 나타낸다. 허혈군, PEP-1 펩타이드 처리군, CBR1 단백질 처리군 및 PEP-1-CBR1 융합단백질 처리군에서 허혈/재관류 이전 및 1일 후 저빌의 일반운동활성을 나타낸다. 자율운동활성은 허혈/재관류 전 및 1일 후 달린 총 거리 (m)로 평가하였다 (군당 n = 5; *P < 0.05, 허혈/재관류 전 군과 현저한 차이, #P < 0.05, 허혈군과 현저한 차이). 막대는 표준편차를 나타낸다 (A). 대조군, 허혈군, PEP-1 펩타이드 처리군, CBR1 단백질 처리군 및 PEP-1-CBR1 융합단백질 처리군의 해마에서 HNE 농도 분석은 허혈/재관류 3시간 이후에 수행하였다 (각 군의 n = 5, *P<0.05, 대조군과 현저한 차이, #P < 0.05, 허혈군과 현저한 차이). 막대는 표준편차를 나타낸다 (B).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030]

아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 특히, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 PEP-1-CBR1 융합단백질에 대하여만 기술하였으나, Tat-CBR1 융합단백질, CBR1-Tat 융합단백질, Tat-CBR1-Tat 융합단백질, CBR1-PEP-1 융합단백질 및 PEP-1-CBR1-PEP-1 융합단백질도 PEP-1-CBR1 융합단백질과 같이 세포 투과성을 나타내며, 세포 및 모델동물 실험에서 PEP-1-CBR1 융합단백질과 유사한 정도의 결과를 나타낸다.

[0031]

재료

[0032]

Ni²⁺ 나이트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우 (Ni²⁺ nitrilotri-acetic acid Sepharose superflow)는 Qiagen (Valencia, CA, USA)에서 구입하였다. 지시된 일차 항체 및 액틴은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)와 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. HNE (4-hydroxy-2-nonenal)와 8-OHdG 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품이다. PCR 기술은 인간 CBR1 cDNA를 분리하기 위해 적용하였다. 다른 화학물질 및 시약들은 입수 가능한 최상급의 제품을 이용하였다.

[0033]

CBR1 융합단백질 발현 및 정제

[0034]

CBR1은 HepG2 세포주에서 올리고-dT 프라이머를 이용하여 역전사 PCR로 얻은 cDNA로 서브클론하였다. CBR1은 PCR을 통해 센스 프라이머 5'-CCG CTC GAG TCG TCC GGC ATC-3'과 안티센스 프라이머 5'-CGG GAT CCT TAT CAC CAC TGT TCA AC-3'을 이용하여 증폭하였다. PCR로 얻은 CBR1 산물은 TA 클로닝벡터로 *E. coli* 내에서 증폭하였고, PEP-1 발현벡터에 삽입하였다. PEP-1 발현벡터는 종래기술과 같이 제조하였다 [Eum, W. S. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **37**: 1656-1669; 2004].

[0035]

PEP-1-CBR1 단백질을 발현하고 정제하기 위해, 플라스미드는 BL21 (DE3)에 형질변환되었고, 0.5 mM의 IPTG

(isopropyl- β -D-thio-galactoside) (Duchefa, Haarlem, Netherlands)를 이용하여 18 °C에서 12시간 동안 과발현하였다. 하비스트한 세포는 초음파 처리로 용균한 다음, Ni^{2+} -니트릴로삼초산 세파로즈 친화컬럼과 PD-10 컬럼 크로마토그래피 (Amersham, Braunschweig, Germany)를 이용하여 제조자의 지시대로 PEP-1-CBR1 융합단백질을 정제하였다 [Eum, W. S. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **37**: 1656-1669; 2004, Ahn, E. H. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **55**: 36-45; 2013, Sohn, E. J. et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1820**: 1647-1655; 2012]. 정제된 단백질 농도는 우혈청 알부민을 표준으로 하여 브래드포드 방법으로 측정하였다 [Bradford, M. A. et al., *Anal. Biochem.* **72**: 248-254; 1976].

[0036]

HT-22 세포 내로 PEP-1-CBR1 융합단백질의 투과

[0037]

마우스 해마 HT-22 세포는 10% 우태혈청 및 항생제 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신, 100 U/ml 페니실린)을 함유하는 DMEM (Dulbecco's minimum essential medium; Lonza BioWhittaker, MD, USA) 내에서 95% 공기 및 5% CO_2 의 습한 조건 하에서 37 °C로 배양하였다. PEP-1-CBR1 융합단백질의 세포투과가 투여량 및 농도 의존적임을 평가하기 위해, 다양한 농도의 PEP-1-CBR1 융합단백질 (0.5~4 μM)로 세포를 한 시간 동안 처리하였고, 또 처리시간 (10~60분)을 달리하여 4 μM 의 PEP-1-CBR1 융합단백질로 처리하였다. PEP-1-CBR1 융합단백질 처리 후 세포는 트립신-EDTA로 처리하고 PBS (phosphate-buffered saline)로 세척한 후 세포를 하비스트하고, 세포추출물은 웨스턴 블랏 분석에 이용하였다 [Kim, M. J. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **63**: 432-445; 2013].

[0038]

웨스턴 블랏 분석

[0039]

용균된 단백질은 SDS-PAGE로 분리한 다음 나이트로셀룰로스 막 또는 PVDF 막으로 옮겼다. 막은 5% 저지방유와 0.1% Tween 20이 함유된 TBS 완충액 (TBST)으로 블로킹하였다. 블로킹된 막은 지시된 일차항체와 HRP 결합된 이차항체로 면역블랏팅하였다. 타겟 단백질은 제조자 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)의 지시에 따라 화학발광으로 탐지하였다 [Eum, W. S. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **37**: 1656-1669; 2004, Ahn, E. H. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **55**: 36-45; 2013, Sohn, E. J. et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1820**: 1647-1655; 2012].

[0040]

형광 공초점 현미경 분석

[0041]

공초점 현미경 분석은 종래기술과 같이 수행하였다 [Kim, M. J. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **63**: 432-445; 2013]. HT-22 세포를 커버슬립에 시딩하고 좀 더 안전한 부착을 위해 오버나잇 배양하였다 (12h). PEP-1-CBR1 융합 단백질 (4 μM)로 처리한 HT-22 세포를 37 °C에서 한 시간 동안 배양한 후, 세포는 PBS로 두 번 세척하고 4% 파라포름알데하이드로 5분간 실온에서 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 두 번 세척한 다음, 삼투가 용이하게 하고 3% 우혈청 알부민과 0.1% Triton X-100이 함유된 PBS (PBS-BT)로 40분간 블로킹하였다. 일차 항체 (His-probe, Santa Cruz Biotechnology)는 2000:1 비율로 PBS-BT로 희석하여 3 시간 동안 실온에서 배양하였다. 이차항체 (Alexa fluor 488, Invitrogen)는 15000:1 비율로 희석한 후 어두운 곳에서 실온으로 한 시간 동안 배양하였다. 세포핵은 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Roche, Mannheim, Germany)로 2분간 염색하였다. 모든 절차 사이에 세포는 PBS-BT로 세 번씩 세척하였다. 염색된 HT-22 세포는 FV-300 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 관찰하였다.

[0042]

세포 생존율 분석

[0043]

WST-1 분석은 과산화수소 처리된 HT-22 세포의 생존율 평가에 이용되었다. 0.5~4 μM 의 PEP-1-CBR1 융합단백질 및 대조군 CBR1으로 한 시간 동안 HT-22 세포를 선처리한 후, 세포를 200 μM 의 H_2O_2 에 8시간 동안 노출시켜 세포사멸을 유도하였다. 세포생존율은 WST-1 키트 (Daeillab service, Seoul, South-korea)를 제조자의 지시에 따라 이용하여 평가하였다. ELISA 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC/340)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 표준으로서 대조군을 이용하여 백분율로 나타내었다.

[0044]

산화로 유도되는 세포내 활성산소종 수준 측정

[0045]

활성산소종은 DCF-DA를 형광 DCF로 변화시키며, 그리하여 세포 내 활성산소종 수준을 측정하는데 이용할 수 있다 [Sohn, E. J. et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1820**: 1647-1655; 2012]. HT-22 세포는 PEP-1-CBR1 (4 μ M), 대조군 CBR1 또는 PEP-1 펩타이드로 무혈청 배지에서 한 시간 동안 선처리한 후 200 μ M의 과산화수소를 이용하여 8시간 동안 활성산소종을 유도하였다. 이 세포들은 PBS로 두 번 세척한 후 DCF-DA (20 μ M)를 이용하여 30분간 배양하였다. 형광 현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)을 이용하여 사진을 촬영하였다. 세포내 형광강도는 Fluoroskan ELISA 플레이트 판독기 (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)를 이용하여 여기 485 nm 및 방출 538 nm에서 세포내 형광강도를 측정하였다.

[0046]

TUNEL 측정법

[0047]

DNA 조각화 (DNA fragmentation)를 시험하기 위해 PEP-1-CBR1 (4 μ M)으로 한 시간 동안 세포를 선처리한 후 1 mM의 H_2O_2 로 여섯 시간 동안 배양하였다. 제조자의 지시에 따라 세포 사멸 탐지 키트 (Roche Applied Science)를 이용하여 절단된 DNA 쇄를 탐지하기 위해 TUNEL (Biotinylated dUTP nick end labeling) 염색을 수행하였다 [Kim, M. J. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **63**: 432-445; 2013]. 염색 후, 세포핵은 0.1 μ g/ml의 DAPI로 염색하였고, PBS로 세 번 세척하였다. 세포시료 사진은 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)으로 촬영하였다.

[0048]

단백질 내 카보닐기 측정

[0049]

HT-22 세포를 PEP-1-CBR1 (0-4 μ M) 또는 대조군 CBR1으로 한 시간 동안 선처리한 후 세포를 200 μ M의 과산화수소에 여섯 시간 동안 노출시켰다. 세포내 단백질의 카보닐기 함량은 제조자의 지시대로 카보닐기 탐지키트 (Cell Biolabs, Inc, CA, USA)를 이용하여 결정하였다.

[0050]

미토콘드리아 막 포텐셜 (mitochondrial membrane potential; MMP) 측정

[0051]

MMP의 변화는 JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazoly-carbocyanine iodine) 분석 키트 (Cayman MI, USA)를 이용하여 측정하였다 [Sohn, E. J. et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1820**: 1647-1655; 2012, Kim, M. J. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **63**: 432-445; 2013]. 모든 과정은 제조자의 지시대로 수행하였고, 사진은 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)으로 촬영하였다.

[0052]

플로우 사이토메트리를 이용한 세포사멸 분석

[0053]

종래 기술을 이용한 분석을 위해 세포시료를 준비하였다 [Nunez, R. *Curr. Issues Mol. Biol.* **3**: 67-70; 2001]. 세포를 100 μ M의 과산화수소로 30 시간 동안 처리하였다. 세포는 2000 g로 5분간 원심분리하여 하비스트한 다음 차가운 PBS로 한 번 세척하고, 12 시간 동안 -20 $^{\circ}$ C에서 75% 에탄올로 고정한 후 원심분리하여 에탄올을 제거하였다. 세포는 1 ml의 신선한 염색용액 (50 μ g/ml의 프로피움 아이오다이드, 1 mg/ml RNase A, 1.5% Triton X-100)으로 어두운 곳에서 4 $^{\circ}$ C로 오버나잇 염색하였다. 세포 사이클 분포 및 서브-G₁ 세포는 FACS caliber flow cytometer (BD Biosciences, CA, USA)를 이용하여 동시에 측정하였다.

[0054]

실험동물

[0055]

50마리 수컷 저빌을 Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan)에서 구입하였다. 동물은 23 $^{\circ}$ C, 60% 습도 조건에서 12 시간 밝게/12시간 어둡게 하여 사육하였고, 사료와 물은 자유롭게 접근할 수 있도록 공급하였다. 실험동물 취급 및 관리는 최근의 국제법과 정책에 따라 수행하였고 [NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, 1985, revised 1996], 서울대 연구동물 관리 및 사용에 관한 위원회 (IACUC)에서 승인받았다 (SNU-100611-1). 모든 실험에서는 이용되는 동물수와 본 발명에서 사용되는 공정에 의해 고통을 최소화하기 위해 노력하였다.

[0056] **PEP-1, CBR1 및 PEP-1-CBR1 처리**

[0057] 허혈손상에 대한 PEP-1-CBR1 융합단백질의 보호효과를 시험하기 위해 동물을 다섯 군으로 나누었다; 허혈수술 없는 삼 대조군 (n = 10), 담체 허혈군 (n = 10), PEP-1 펩타이드 처리군 (n = 10), CBR1 단백질 처리군 (n = 10) 및 허혈수술한 PEP-1-CBR1 융합단백질 처리군 (n = 10)이다. The PEP-1 펩타이드, CBR1 및 PEP-1-CBR1 융합단백질은 재관류 이후 30분간 복막주사하였다.

[0058] **일과성 전뇌허혈 유도**

[0059] 동물은 33% 산소, 67% 산화질소 하에서 2.5% 아이소플루란 (Baxter, Deerfield, IL) 혼합물로 마취시켰다. 양측 총경동맥을 분리하여 비외상성 동맥류 클립을 이용하여 폐색하였다. 혈류의 완전한 차단은 검안경을 이용하여 중앙 망막동맥을 관찰함으로써 확인하였다. 폐색 5분 후, 동맥류 클립은 총경동맥에서 제거되었다. 조절이 없는 상태에서의 체온 또는 정상체온 (37 ± 0.5 °C) 조건은 직장 온도 탐침 (TR-100; Fine Science Tools, Foster City, CA)으로 모니터링하였고, 마취 전, 마취 동안 및 동물이 마취로부터 완전히 회복할 때까지 온열담요를 이용하여 유지하였다. 그 후 동물은 안락사할 때까지 체온 유지를 위해 온열 인큐베이터 (Mirae Medical Industry, Seoul, South Korea)에 두었다.

[0060] **자율운동활성**

[0061] 허혈손상에 대한 PEP-1-CBR1 융합단백질의 신경보호효과를 확인하기 위하여 종래기술과 같이 자율운동활성을 측정하였다 [Hwang, I. K. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **48**: 1242-1251; 2010]. 저빌 (군당 n=5)을 Plexiglas 케이지 (25 cm X 20 cm X 12 cm)에 각각 넣고, 방음실 내부에 넣었다. 운동활성도 Photobeam Activity System - Home Cage (San Diego Instruments)로 기록하였다. 자율운동활성은 24시간 넘어 모니터링하였고, 동시에 사육한 각 동물 수와 털 손질에 소요되는 시간(초 단위)을 기록하였다. 각 동물은 4 X 8 포토빔을 통해 지속적으로 관찰되었다. 스코어는 직접관찰을 통해 얻었고, 비디오 순서는 뒤이은 재분석에 이용되었다.

[0062] **조직학을 위한 조직 가공**

[0063] 조직학적 분석을 위해 자율운동활성 평가에 이용되는 동물은 허혈/재관류 이후 4일째에 30 mg/kg Zoletil 50 (Virbac, Carros, France)으로 마취하고 0.1 M PBS (pH 7.4)로 심장을 관통하여 관류한 후 4% 파라포름알데하이드 함유 0.1 M 인산 완충액 (pH 7.4)으로 처리하였다. 뇌는 제거하여 같은 고정액에 6시간 동안 후고정하였다. 뇌조직은 30% 수크로스 용액으로 오버나잇 침윤하여 동결방지처리하였다. 그런 다음, 동결된 조직은 cryostat (Leica, Wetzlar, Germany) 상에서 순차적으로 절단하여 30 μ m의 환상 절편으로 만들고 PBS 함유 6-웰 플레이트에 수집하였다. 면역조직화학 데이터를 군 간에 비교가능하게 하기 위해 절편은 동일 조건 하에서 조심스럽게 처리하였다.

[0064] 조직절편들은 각 동물에 대하여 저빌 아틀라스 [Loskota, W. A.; Lomax, P.; Verity, M. A. A stereotaxic atlas of the Mongolian Gerbil Brain (*Meriones unguiculatus*). *Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers Inc.* 70-79; 1974]와 관련하여 브레그마에서 뒤쪽 -1.4 mm와 -2.0 mm 사이에서 선택하였다. 절편들은 수화되고 PBS 내에서 0.3% 과산화수소로 30분간 처리하였다. 세척 후 절편들은 30분간 PBS 내 10% 정상 염소혈청 내에서 연속적으로 배양하였다. 이들은 회석된 마우스 항-NeuN (anti-neuronal nuclei, 1:1,000, Chemicon International, Temecula, CA), 토끼 항-GFAP (rabbit anti-glial fibrillary acidic protein, 1:1,000, Chemicon International) 및 토끼 항-Iba-1 (rabbit anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1, 1:500, Wako, Osaka, Japan)으로 48시간 동안 4 °C로 배양하였다. 그런 다음, 이들은 바이오틴 결합된 염소 항-토끼 IgG 또는 염소 항-마우스 IgG, 스트렙타비딘 퍼옥시데이즈 복합체 (diluted 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA)에 노출된 후 0.1 M Tris-HCl 완충액 내의 3,3'-다이아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드로 시각화되었다.

[0065] **면역조직화학 데이터 정량**

[0066] 모든 군에서 NeuN-면역반응성 세포의 측정은 컴퓨터 기반 CCD 카메라 (software: Optimas 6.5, CyberMetrics,

Scottsdale, AZ)를 장착한 이미지 분석시스템을 이용하여 수행하였다. 뿐만 아니라, NeuN-면역반응성 구조의 이미지는 컴퓨터와 연결된 디지털 카메라 (DP71, Olympus)가 장착된 BX51 광 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 통하여 해마 CA1 부분을 촬영하였다. 그런 다음 각 해마 CA1 부분의 각 절편 내의 NeuN-면역반응성 세포는 Optimas 6.5 소프트웨어 (CyberMetrics)를 이용하여 계수하였다. 모든 저질의 절편에서 계수된 세포는 평균값을 내었다.

[0067] 지방과산화 측정

[0068] 허혈손상에 대한 PEP-1-CBR1 융합단백질의 신경보호기작을 밝히기 위하여 지방 과산화 지시약으로서 HNE (4-hydroxy-2-nonenal)를 이용하였다 [Wang, Q. et al., *Brain Res.* **1090**: 182-189; 2006]. 대조군과 허혈수술동물 (각 군 n=5)들은 재관류 후 30 mg/kg Zoletil 50으로 마취하고 해마를 제거하고 Bioxytech HAE-586 흡광측정키트 (OxisResearch, Portland, OR)를 이용하여 HNE를 측정하였다. 이것은 재관류 세 시간 후 수행하였는데, 이는 이 시각에 지방 과산화가 피크에 이르기 때문이다 [Hwang, I. K. et al., *J. Neurosci. Res.* **87**: 2126-2137; 2009]. 해마는 200 mM 만니톨, 70 mM 수크로스, 1 mM EGTA 및 5 mM 부틸화 하이드록시톨루엔을 함유한 10 mM HEPES (pH 7.5) 완충액 내에서 균질화되었다. 1 ml의 균질액은 다이클로로메탄으로 추출하고, 저층의 유기상은 건조한 후 물을 가하였다. 시료는 아세토나이트릴과 메탄술폰산 내의 N-메틸-2-페닐인돌과 혼합하고, 혼합물은 배양하여 원심분리하였다. 상층액의 흡광도는 Beckman DU-64 spectrophotometer (Beckman, Fullerton, CA)로 586 nm에서 측정하였다. 실험시료에서 HNE 농도는 측정키트에 제공된 HNE 표준물질에 대하여 결정하였다.

[0069] 통계분석

[0070] 데이터는 평균값으로 나타내었다. 평균값 간의 차이는 2-way ANOVA (two-way analysis of variance)로 통계학적으로 분석한 후 Bonferroni's post-hoc test를 수행하였다.

[0071] 결과 1: HT-22 세포주로 PEP-1-CBR1 융합단백질의 정제와 세포도입

[0072] 도 1A는 PEP-1 서열, 여섯 개의 히스티딘 및 CBR1 유전자를 가진 pET-15b에 기반한 PEP-1-CBR1 융합단백질 발현 벡터를 나타낸다. PEP-1-CBR1 융합단백질은 IPTG를 가하여 과대발현되었고, Ni²⁺-나이트로삼초산 세포파괴 침출물 및 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 과대발현한 *E. coli* 전 추출물 (whole extract)로부터 정제하였다. 도 1B와 1C에서 나타난 바와 같이, 정제된 PEP-1-CBR1 단백질은 SDS-PAGE와 폴리히스티딘 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다. 정제된 PEP-1-CBR1 융합단백질의 예측 분자량은 약 33 kDa였고, 단백질은 해당 띠 위치에서 탐지되었다.

[0073] HT-22 세포주를 다른 농도 (0.5~4 μ M)의 PEP-1-CBR1 융합단백질로 한 시간 동안 처리했을 때, 웨스턴 블랏팅은 세포 내로 PEP-1-CBR1 융합단백질 투여량 의존적으로 투과하는 것으로 나타났다 (도 2A). 같은 양의 PEP-1-CBR1 융합단백질을 시간을 달리 하여 (15~60분간) HT-22 세포주에 처리한 결과, 세포 내에 존재하는 PEP-1-CBR1 융합단백질의 수준은 웨스턴 블랏팅을 이용하여 평가하였다. 도 2B와 같이, PEP-1-CBR1 융합단백질의 세포로의 투과는 시간이 흐를수록 현저히 증가하였다. 반면, 대조군 CBR1 단백질은 HT-22 세포 내로 투과하지 않았다. 또한, 본 발명자들은 HT-22 세포 내로 투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질의 안정성을 한 시간 동안 4 μ M PEP-1-CBR1 융합단백질로 처리한 후 웨스턴 블랏팅으로 측정하였다 (도 2C). 세포 내에 존재하는 PEP-1-CBR1 융합단백질의 양은 24시간 이후 점차 감소하였고, 최대 60시간까지 존재하였다. 뿐만 아니라, 본 발명자들은 DAPI 및 Alexa fluor-488 이중염색을 통하여 HT-22 세포 내로 투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질을 공초점 현미경 분석을 이용하여 확인하였다. 이러한 공정을 통하여 본 발명자들은 PEP-1-CBR1 융합단백질이 세포질 내에 존재함을 밝힐 수 있었다 (도 2D). 위의 결과들로부터, PEP-1-CBR1 융합단백질은 HT-22 세포 내로 효과적으로 침투함을 알 수 있었다.

[0074] 결과 2: 산화 스트레스에 의해 유도되는 세포생존율, 활성산소종 농도 및 DNA 조각화에 대한 세포 투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질의 보호효과

[0075] 본 발명자들은 H₂O₂로 유도되는 세포사멸에 대한 PEP-1-CBR1 융합단백질의 보호효과를 평가하였다. 세포를 200

μM 의 H_2O_2 로 8시간 동안 처리하였을 때, 세포생존율은 48%였다. 이와 대조적으로 PEP-1-CBR1 융합단백질을 처리한 세포에서 생존율은 82%까지 증가하였다. 그러나, 대조군 CBR1 단백질 처리군은 동일 조건에서 HT-22 세포에 대하여 보호 효과가 없었다 (도 3A). 뿐만 아니라, 본 발명자들은 DCF-DA를 이용하여 PEP-1-CBR1 융합단백질의 활성산소종 형성 저해능을 확인하였다. HT-22 세포를 H_2O_2 로 처리하였을 때 활성산소종 농도 증가는 도 3B와 같이 확인하였다. PEP-1-CBR1 융합단백질을 처리한 세포에서는 활성산소종의 현저한 감소가 탐지되었다. 뿐만 아니라, 본 발명자들은 TUNEL 염색을 이용하여 활성산소종에 의한 DNA 조각화를 관찰하였다. DNA 조각화 또는 핵 농축 (pycnosis) 정도는 대조군 CBR1 단백질 또는 과산화수소 단독 처리군과 비교하여 PEP-1-CBR1 융합단백질 처리군에서 현저히 감소하였다 (도 3C). 따라서, PEP-1-CBR1 융합단백질이 DNA 조각화를 제한하고 과산화수소로 유도되는 활성산소종 생성에 의해 유발되는 세포사멸을 방지함을 확인할 수 있었다.

[0076] **결과 3: PEP-1-CBR1 융합단백질은 단백질, 지질 및 DNA의 산화로부터 세포를 보호한다.**

[0077] 본 발명자들은 세포투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질이 과산화수소로 유도되는 단백질, 지방 및 DNA와 같은 거대분자의 손상을 저해할 수 있는지를 세포 내 분자 마커인 4-HNE, 단백질 카보닐기 및 8-OHdG 각각의 수준을 측정함으로써 시험하였다. 산화 스트레스에 의한 세포 손상은 대조군과 비교하여 지방 산화 및 단백질 카보닐기 수준에서는 날카롭게 증가하였다. 그러나, PEP-1-CBR1 융합단백질 처리 세포에서는 손상세포의 양이 투여량 의존적으로 급격히 감소하였다 (도 4A와 4B). PEP-1-CBR1 융합단백질 처리세포에서 현저한 산화 감소정도는 활성산소종으로 유도되는 DNA 손상 마커인 8-OHdG 수준으로 나타내었다 (도 4C). 따라서, 상기 결과들은 PEP-1-CBR1 융합단백질이 과산화수소에 의해 변형된 세포내 거대분자들을 환원시킴으로써 HT-22 세포를 보호함을 보여준다.

[0078] **결과 4: PEP-1-CBR1 융합단백질은 과산화수소로 유도되는 Akt, MAPK 활성화를 보호한다.**

[0079] H_2O_2 는 잘 알려진 활성산소종 약품이다. 산화 스트레스로 유도되는 손상은 다양한 세포형에서 MAPK 및/또는 PI3K/Akt 신호를 증가시킨다 [Lahair, M. M. et al., *Antioxid. Redox Signal.* **8**: 1749-1756; 2006, Son, Y. et al., *J. Signal Transduct.* **2011**: 792639; 2011]. 그리하여, 본 발명자들은 JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 및 ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2)과 같은 MAPKs와 Akt의 신호전달경로에 대한 세포 투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질의 효과를 웨스턴 블랏팅을 통해 시험하였다. H_2O_2 로 처리한 세포에서, MAPKs와 Akt의 인산화는 급격히 증가하였다. PEP-1-CBR1 융합단백질로 선처리한 세포에서 처리농도가 증가함에 따라 인산화 정도는 감소하였다 (도 5A와 5B).

[0080] **결과 5: PEP-1-CBR1 융합단백질에 의한 세포주기 휴지 및 미토콘드리아 기능장애 보호**

[0081] H_2O_2 에 의해 일어나는 세포주기 변화는 궁극적으로 G_2/M 기 휴지 증가에 따른 서브- G_1 기 증가에 의한 세포사멸을 일으킨다 [Chung, Y. W. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**: 1248-1253; 2002, Shingu, T. et al., *Neuro. Oncol.* **12**: 1269-1277; 2010]. 이러한 p21-의존적 세포주기에서 p21 증가는 p53 활성화와 관련이 있다 [Kiyoshima, T. et al., *Int. J. Mol. Med.* **5**: 1007-1012; 2012]. 10% 우태혈청과 100 μM H_2O_2 를 포함하는 DMEM 배지에서 30시간 동안 HT-22 세포를 침지했을 때, G_1 상의 감소 및 G_2/M 상의 증가가 관찰되었다. H_2O_2 처리로 G_1 상은 약 20% 감소한 반면, G_2/M 상은 15% 정도 증가하였다. 이 단계 이후 서브- G_1 상은 약 5% 증가하여 약 7배 증가를 나타내었다. 또한, 세포를 4 μM 의 PEP-1-CBR1 융합단백질로 처리하였을 때 이 세포주기의 백분율은 대조군의 것과 나란히 놓았다 (도 6A). 뿐만 아니라, 세포로 투과된 PEP-1-CBR1 단백질은 투여량 의존적으로 p53 및 p21의 인산화 수준을 현저히 감소시켰다 (도 6B).

[0082] 본 발명자들은 또한 항세포사멸 단백질들과 Bcl-2, Bax 및 caspase-3와 같은 친세포사멸 단백질 수준에 대한 세포로 투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질의 효과를 시험하였다. 도 6C와 같이, Bax 발현 수준은 H_2O_2 에 노출되었을 때 급격히 증가한 반면, PEP-1-CBR1 융합단백질을 세포 내로 투과시킨 경우에는 투여량 의존적으로 Bax 발현 수준이 현저히 감소하였다. 대조적으로, H_2O_2 단독으로 처리한 세포와 비교할 때 PEP-1-CBR1 융합단백질 처리세포는 투여량 의존적으로 Bcl-2와 caspase-3의 수준이 점차 증가하였다.

[0083] 다음으로, 본 발명자들은 사이토크롬 c 방출 수준과 미토콘드리아 막전위 기능장애에 대해 시험하였다. 미토콘드리아로부터 방출되는 사이토크롬 c 수준은 H_2O_2 에 의해 증가하였다. 그러나, 세포로 투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질은 H_2O_2 에 의해 유도되는 사이토크롬 c 방출 수준을 현저히 완화시켰다 (도 7A). H_2O_2 로 유도되는 세포사멸은 미토콘드리아 막전위 장애에 기인하는 것으로 알려져 있다 [Green, D. R.; Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312; 1998]. 그리하여, 본 발명자들은 JC-1이라 불리는 미토콘드리아 특이적 양이온성 형광안료를 이용하여 PEP-1-CBR1 융합단백질로 처리된 세포에서 미토콘드리아 막전위를 관찰하였다. PEP-1-CBR1 융합단백질은 H_2O_2 에 의해 유도되는 막전위 변화를 억제함으로써 미토콘드리아 기능을 유지시켰다 (도 7B). 그러나, PEP-1 펩타이드 처리군 및 대조군인 CBR1 단백질 처리군에서는 H_2O_2 에 노출시킴으로써 유도되는 변화와 유사하였다. 이러한 결과들은 PEP-1-CBR1 융합단백질이 활성산소종으로부터 미토콘드리아를 보호함으로써 세포사멸 기작을 저해함을 말해준다.

[0084] **결과 6: 허혈손상에 대한 PEP-1-CBR1 융합단백질의 보호효과**

[0085] 대조군에서 많은 NeuN-면역반응성 뉴런들이 해마 CA1 부위에서 탐지되었다. 허혈군에서는 NeuN-면역반응성 뉴런의 수가 대조군에 비해 현저히 감소하였고, NeuN-면역반응성 뉴런의 평균 수는 대조군의 7.1%였다. PEP-1 펩타이드 처리군에서는 NeuN-면역반응성 뉴런이 대조군의 11.3%이었다. CBR1 처리 대조군에서 NeuN-면역반응성 뉴런의 수는 대조군의 15.7%였다. PEP-1-CBR1 융합단백질 처리 허혈군에서는 NeuN-면역반응성 뉴런이 대조군의 49.8%로 허혈군과 비교하여 CA1 부위에서 NeuN-면역반응성 뉴런이 풍부하게 탐지되었다 (도 8).

[0086] **결과 7: 허혈에 의해 유도되는 반응성 신경교증에 대한 PEP-1-CBR1 융합단백질의 효과**

[0087] 대조군에서, GFAP-면역반응성 정상세포는 제한적인 세포질과 실과 유사한 돌기 (thread-like processes)가 있는 해마 CA1 부위에서 그리고 탐지되었다 (도 9A). 허혈군에서, 많은 GFAP-면역반응성 정상세포들이 이곳저곳에 위치한 세포질 및 비대한 돌기와 함께 반응성 형태로 변화하였다 (도 9C). PEP-1 펩타이드 처리군 및 CBR-1 단백질 처리군에서는 GFAP-면역반응성 정상세포의 형태와 분포는 허혈군과 유사하였다 (도 9E와 9G). PEP-1-CBR1 융합단백질 처리 허혈군에서, GFAP-면역반응성 정상세포는 휴지 형태 및 활성화된 형태가 혼합되어 있었다 (도 9I).

[0088] 대조군에서, Iba-1-면역반응성 세교세포는 긴 돌기가 있는 둥근 세포질을 갖는 해마 CA1 부위에서 탐지되었다 (도 9B). 허혈군에서, Iba-1-면역반응성 세교세포들은 식세포 형태 및 활성화 형태로 현저히 변화하였다. Iba-1-면역반응성 세교세포들은 피라미드층에서 비대해진 둥근 세포질과 함께 농축되었다 (식세포 형태). 또한, Iba-1-면역반응성 세교세포는 지향층 (strata oriens)과 방사층 (stratum radiatum)에서 수축된 돌기가 있는 비대해진 세포질을 가졌다 (도 9D). PEP-1 펩타이드 처리군 또는 CBR1 단백질 처리군에서, Iba-1-면역반응성 세교세포의 형태와 분포는 허혈군과 유사하였다 (도 9F 및 9H). PEP-1-CBR1 융합단백질을 처리한 허혈군에서는 피라미드층에서 Iba-1-면역반응성 세교세포의 식세포 형태가 감소하였고, 어떤 Iba-1-면역반응성 세교세포는 길고 가는 돌기가 있는 작은 세포질을 가졌다 (도 9J).

[0089] **결과 8: 자율 운동 활성**

[0090] PEP-1-CBR1 융합단백질 처리 후 허혈에 의해 유도되는 활동과다 증세의 완화를 관찰하기 위하여, 허혈/재관류 이전 및 1일 후 운동활성을 체크하였다. 운동활성은 허혈/재관류 후 현저히 증가하였다. 허혈군에서, 운동활성은 허혈/재관류 이후 2.7배 증가하였다. 이러한 운동활성 증가는 또한 PEP-1 펩타이드 처리군 및 CBR1 단백질 처리군에서도 유사하게 탐지되었다. PEP-1-CBR1 융합단백질 처리군에서는 허혈에 의해 유도되는 활동과다가 허혈군과 비교할 때 현저히 감소하였다. 이 군에서, 운동활성은 허혈/재관류 이후 1.7배 증가하였다 (도 10A).

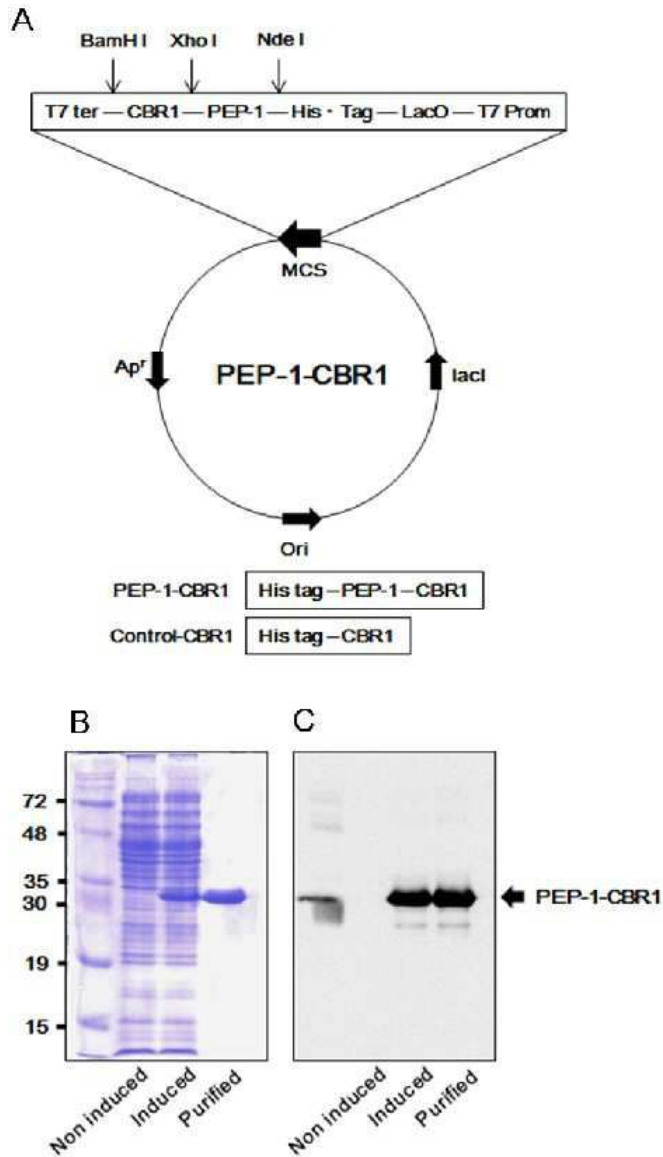
[0091] **결과 9: 해마에서 지방 산화에 대한 PEP-1-CBR1 융합단백질의 효과**

[0092] 대조군에서는, 해마에서 HNE로 판단한 지방산화 수준은 1.41 nmol/g 단백질이었다. 허혈군에서 HNE 수준은 허혈 3시간 후 대조군과 비교해서 현저히 증가하였다 (3.57 nmol/g 단백질). PEP-1 펩타이드 처리군 또는 CBR1 단백

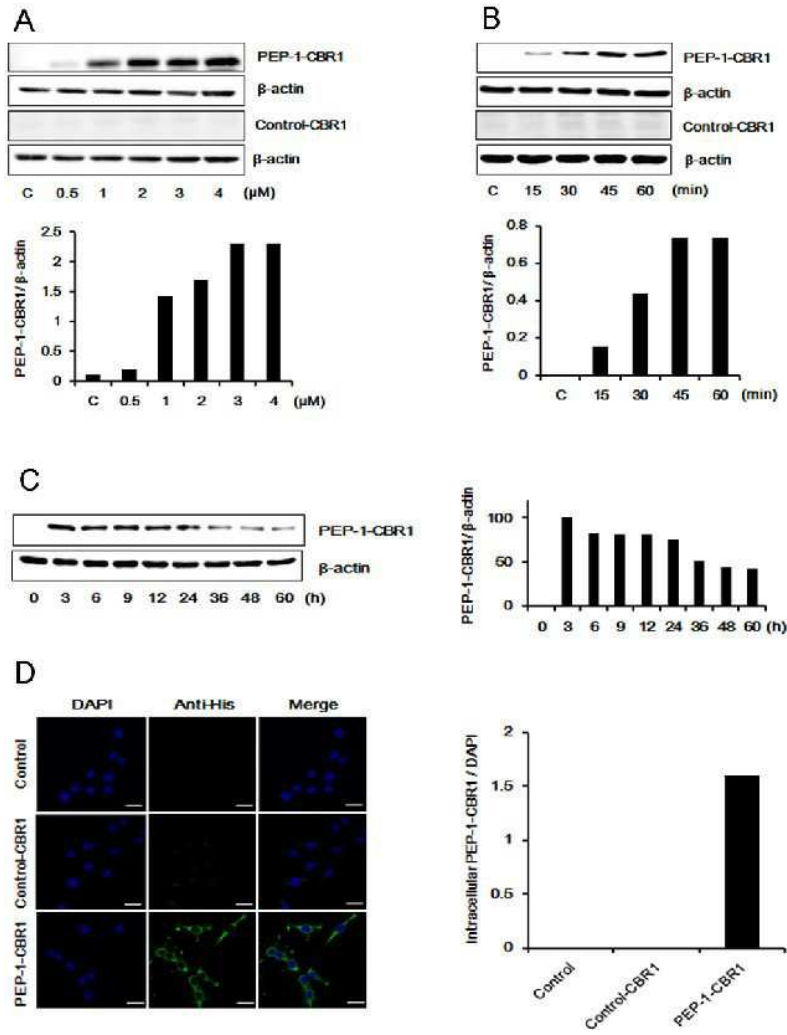
질 처리군에서 HNE 수준은 대조군과 비교하여 허혈/재관류 3시간 후 현저히 높아졌고, 허혈군과 유사하였다. PEP-1-CBR1 융합단백질군에서 HNE 단백질 수준은 허혈군과 비교하여 허혈/재관류 3시간 후 현저히 감소하였다. 이 군에서 HNE 수준은 1.93 nmol/g 단백질 (도 10B)이었다.

도면

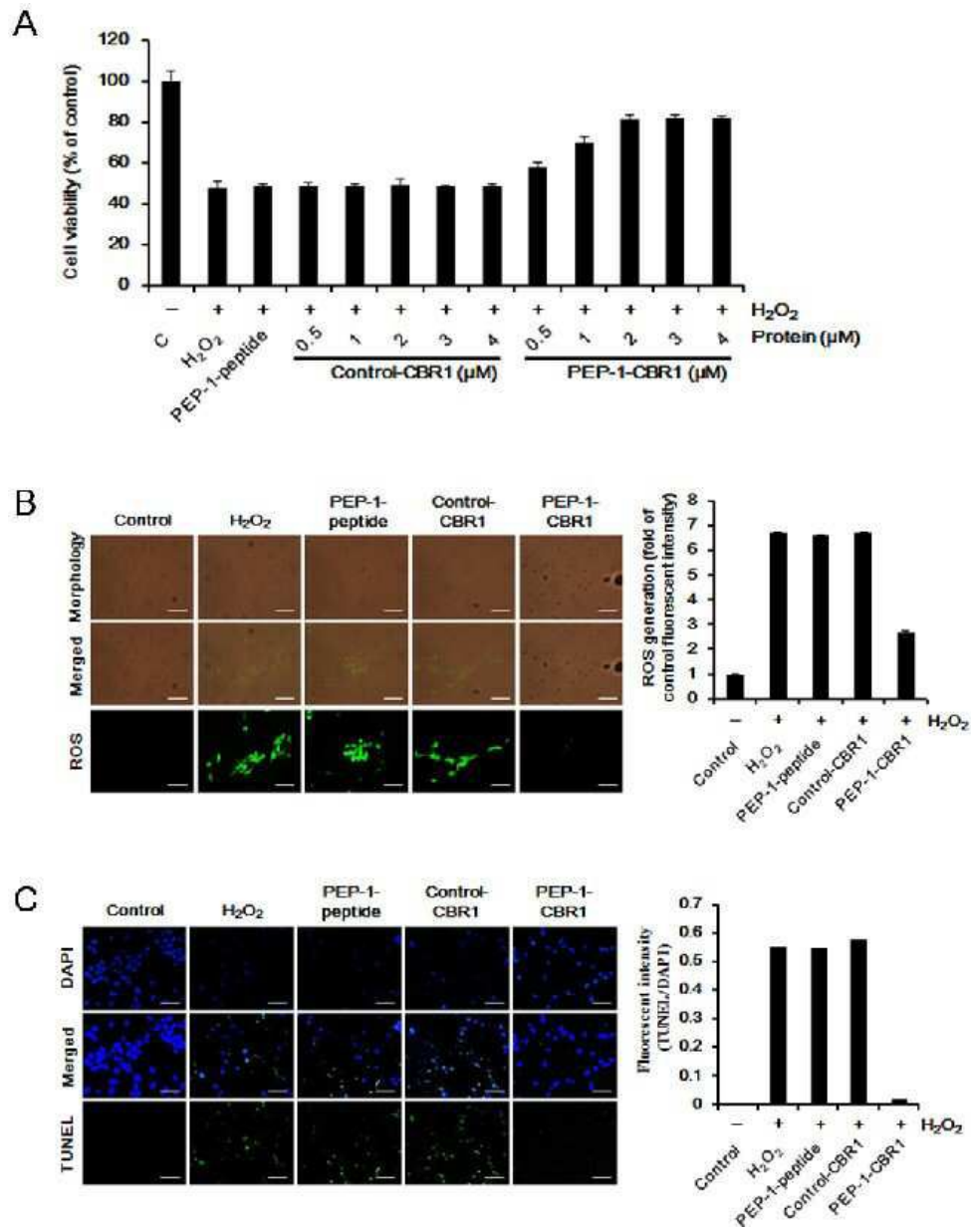
도면1



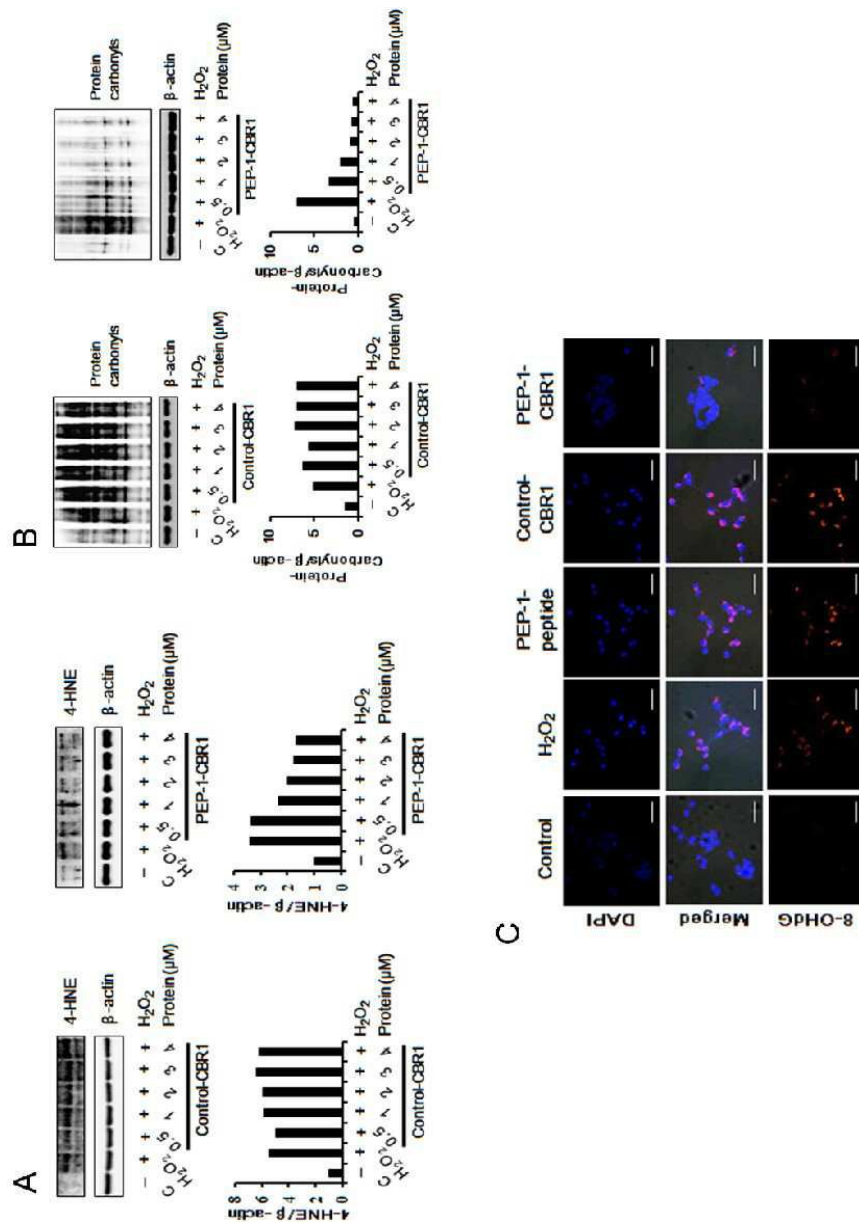
도면2



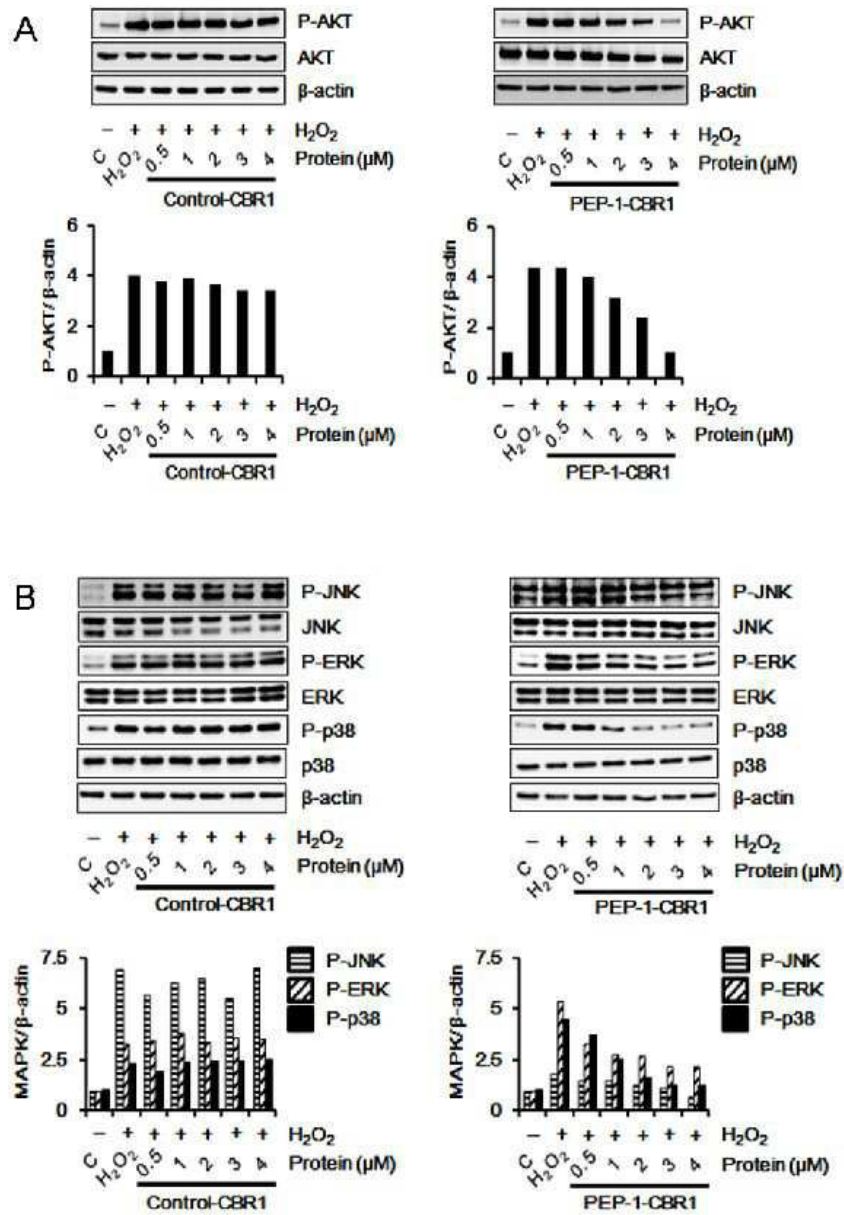
도면3



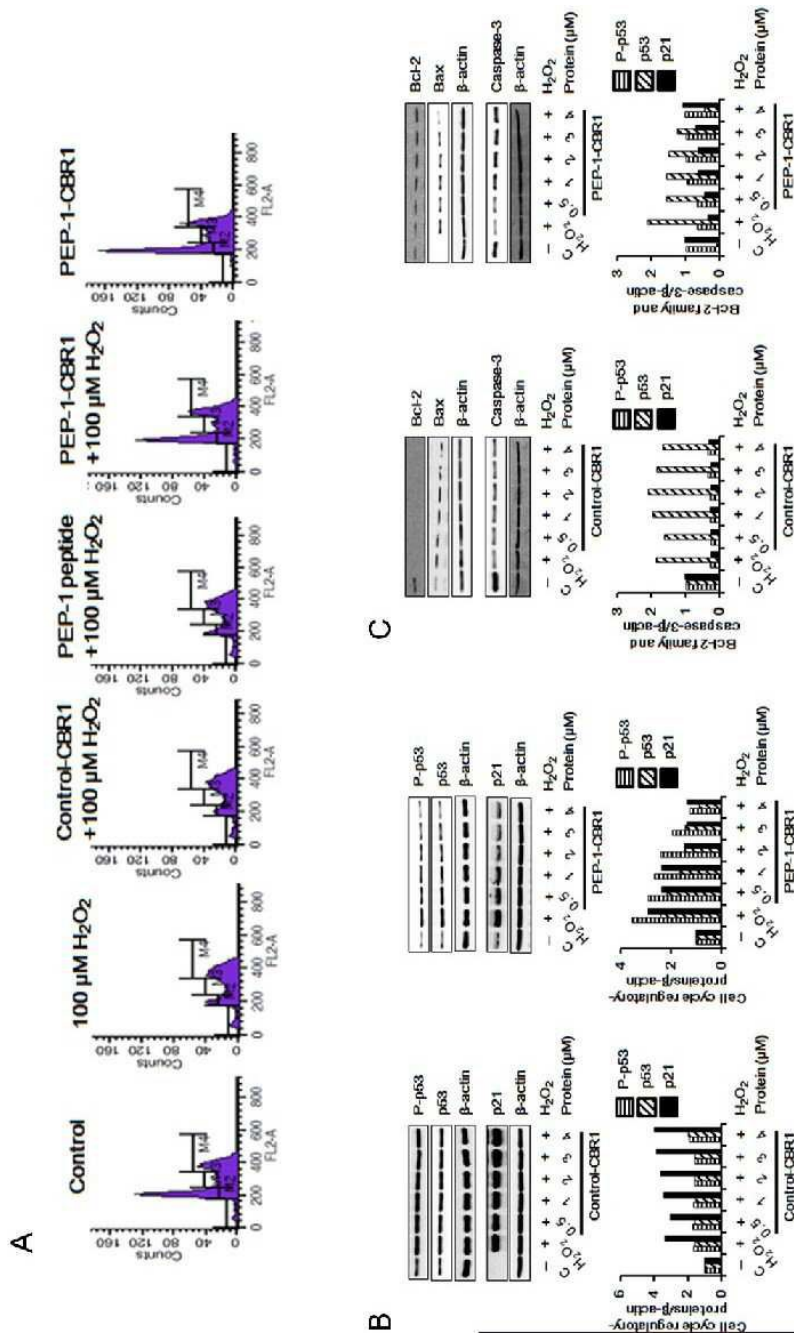
도면4



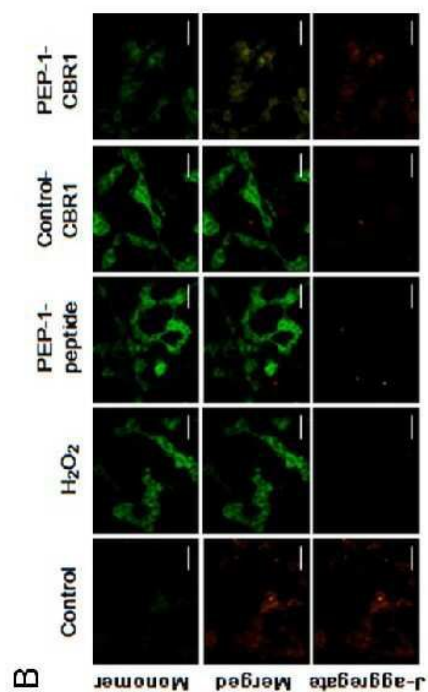
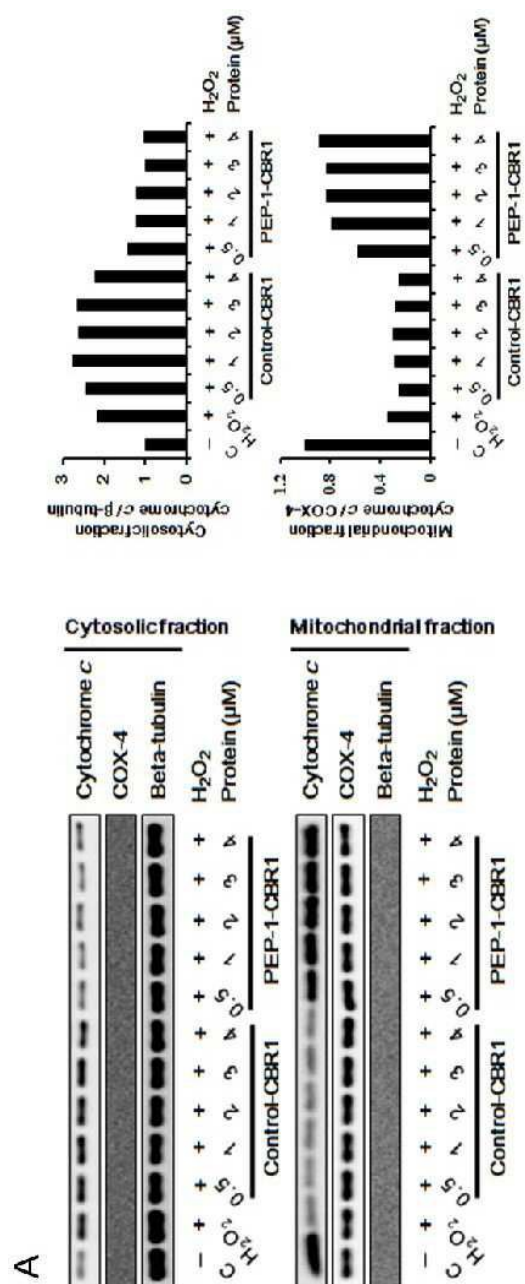
도면5



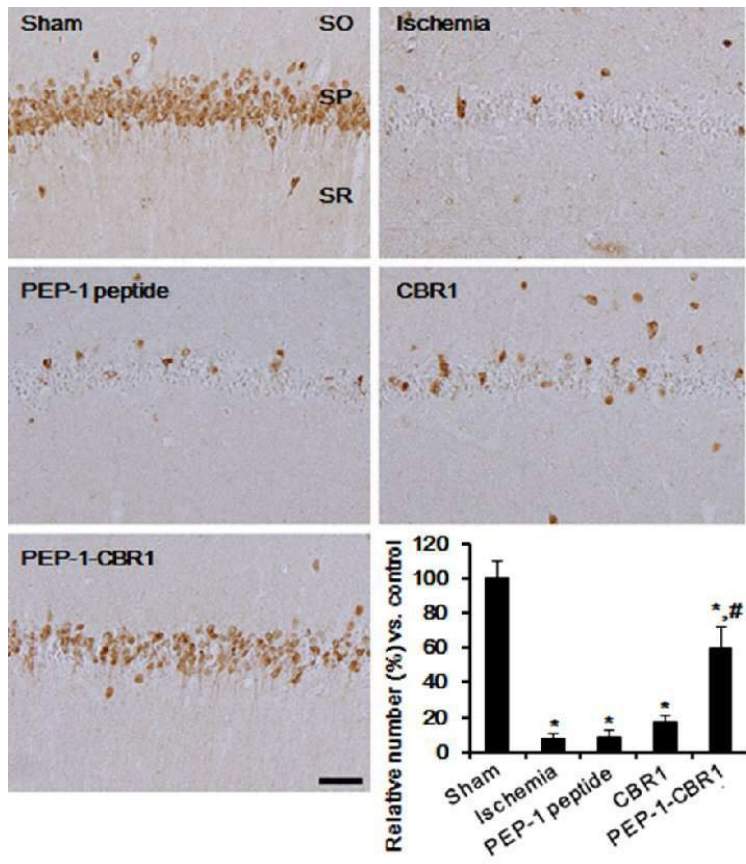
도면6



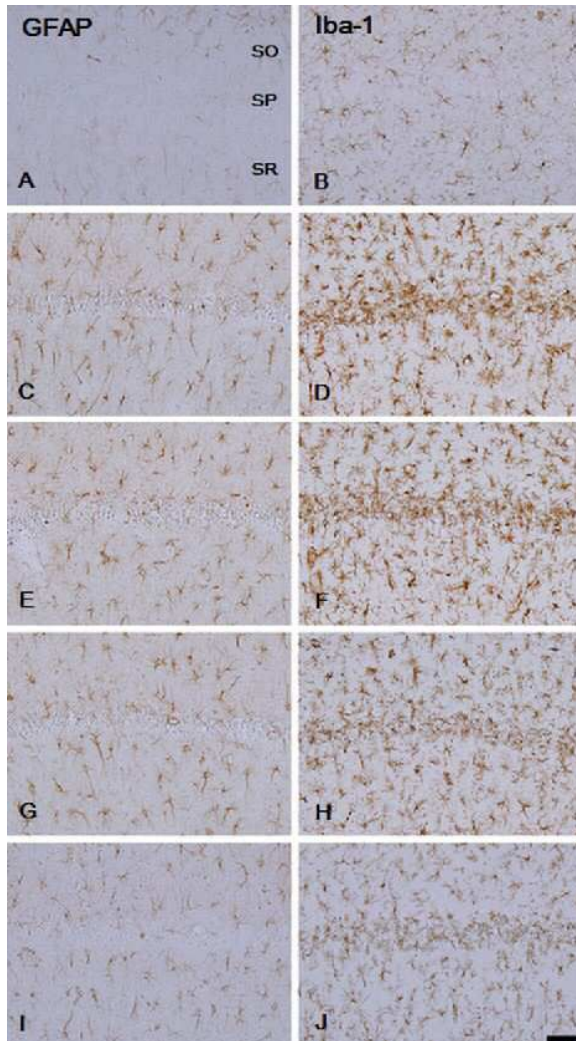
도면7



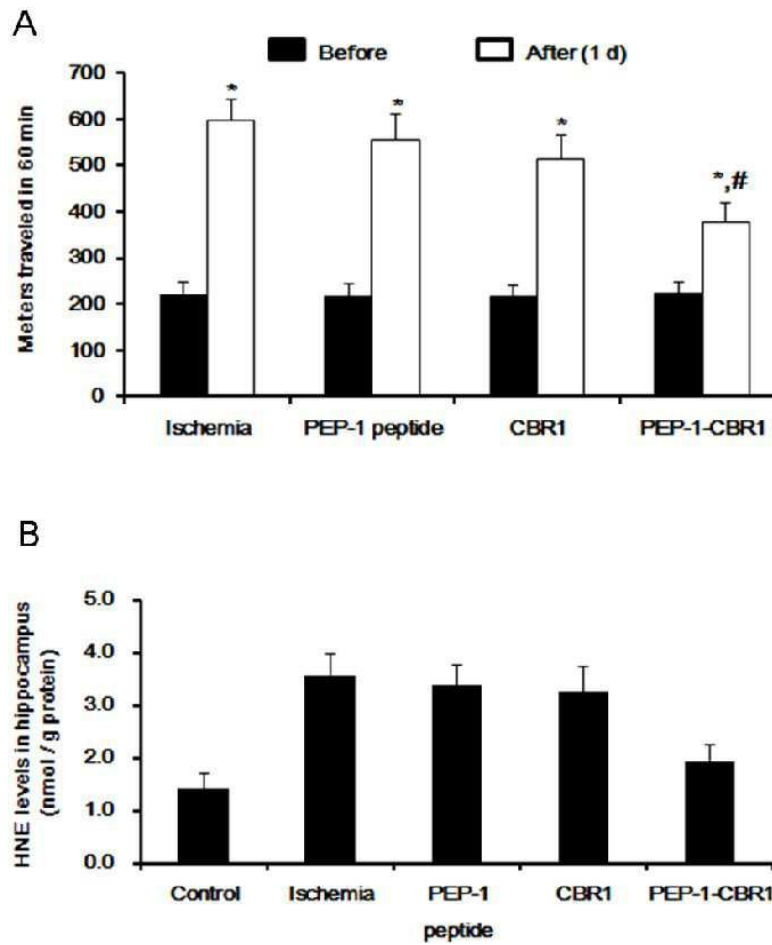
도면8



도면9



도면10



서열목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Cell-transducing carbonyl reductase fusion protein

<130> HallymU-sychoi-CBR1

<160> 14

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ccgctcgagt cgtccggcat c

21

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

cgggatcctt atcaccactg ttcaac 26

<210> 3

<211> 868

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding Tat-Carbonyl Reductase 1 fusion protein

<400> 3

taggaagaag cggagacagc gacgaagact cgagatgtcg tccggcatcc atgtagcgt 60

ggtgactgga ggcaacaagg gcatcggctt ggccatcgtg cgcgacctgt gccggctgtt 120

ctcgggggac gtggtgctca cggcgcggga cgtgacgcgg ggccaggcgg ccgtacagca 180

gctgcaggcg gagggcctga gcccgcgctt ccaccagctg gacatcgacg atctgcagag 240

catccgcgcc ctgcgcgact tcctgcgcaa ggagtacggg ggcctggacg tgctgggtcaa 300

caacgcgggc atgccttca aggttgctga tcccacaccc ttccatattc aagctgaagt 360

gacgatgaaa acaaatctct ttggtaccg agatgtgtgc acagaattac tccctctaat 420

aaaaccccaa gggagagtgg tgaacgtatc tagcatcatg agcgtcagag cccttaaaag 480

ctgcagccca gagctgcagc agaagttccg cagtgcagacc atcactgagg aggagctggt 540

ggggctcatg aacaagtttg tggaggatag aaagaaggga gtgcaccaga aggagggtctg 600

gcccagcagc gcatcggggg tgacgaagat tggcgtcacc gttctgtcca ggatccacgc 660

caggaaactg agtgagcaga ggaaagggga caagatcctc ctgaatgcct gctgcccagg 720

gtgggtgaga actgacatgg cgggacccaa ggccaccaag agcccagaag aaggtgcaga 780

gaccctgtg tacttgcccc ttttgcccc agatgctgag ggtcccatg gacaatttgt 840

ttcagagaag agagttgaac agtgggtga 868

<210> 4

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-Carbonyl Reductase 1 fusion protein

<400> 4

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ser Ser Gly Ile
 1 5 10 15
 His Val Ala Leu Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly Ile Gly Leu Ala Ile
 20 25 30
 Val Arg Asp Leu Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp Val Val Leu Thr Ala
 35 40 45
 Arg Asp Val Thr Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln Gln Leu Gln Ala Glu
 50 55 60
 Gly Leu Ser Pro Arg Phe His Gln Leu Asp Ile Asp Asp Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Ile Arg Ala Leu Arg Asp Phe Leu Arg Lys Glu Tyr Gly Gly Leu Asp
 85 90 95
 Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys Val Ala Asp Pro Thr
 100 105 110
 Pro Phe His Ile Gln Ala Glu Val Thr Met Lys Thr Asn Phe Phe Gly
 115 120 125
 Thr Arg Asp Val Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu Ile Lys Pro Gln Gly
 130 135 140
 Arg Val Val Asn Val Ser Ser Ile Met Ser Val Arg Ala Leu Lys Ser
 145 150 155 160
 Cys Ser Pro Glu Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser Glu Thr Ile Thr Glu
 165 170 175
 Glu Glu Leu Val Gly Leu Met Asn Lys Phe Val Glu Asp Thr Lys Lys
 180 185 190
 Gly Val His Gln Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser Ala Tyr Gly Val Thr
 195 200 205
 Lys Ile Gly Val Thr Val Leu Ser Arg Ile His Ala Arg Lys Leu Ser
 210 215 220
 Glu Gln Arg Lys Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn Ala Cys Cys Pro Gly
 225 230 235 240
 Trp Val Arg Thr Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala Thr Lys Ser Pro Glu

	245	250	255	
	Glu Gly Ala Glu Thr Pro Val Tyr Leu Ala Leu Leu Pro Pro Asp Ala			
	260	265	270	
	Glu Gly Pro His Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys Arg Val Glu Gln Trp			
	275	280	285	
<210>	5			
<211>	871			
<212>	DNA			
<213>	Artificial Sequence			
<220><223>	Polynucleotide encoding Carbonyl Reductase 1-Tat fusion protein			
<400>	5			
	atgtcgtccg gcatccatgt agcgtctggtg actggaggca acaagggcat cggcttggcc	60		
	atcgtgcgcg acctgtgccg gctgttctcg ggggacgtgg tgctcacggc gcgggacgtg	120		
	acgcggggcc aggcggccgt acagcagctg caggcggagg gcctgagccc gcgcttcac	180		
	cagctggaca tcgacgatct gcagagcatc cgcgccctgc gcgacttcct gcgcaaggag	240		
	tacgggggcc tggacgtgct ggtcaacaac gcgggcatcg ccttcaaggt tgctgatccc	300		
	acaccctttc atattcaagc tgaagtgcg atgaaaacaa atttctttgg taccgagat	360		
	gtgtgcacag aattactccc tctaataaaa cccaaggga gagtgggtgaa cgtatctagc	420		
	atcatgagcg tcagagccct taaaagctgc agcccagagc tgcagcagaa gttccgcagt	480		
	gagaccatca ctgaggagga gctggtgggg ctcatgaaca agtttgtgga ggatacaaag	540		
	aaggagtgac accagaagga gggctggccc agcagcgcac acggggtgac gaagattggc	600		
	gtcaccgttc tgtccaggat ccacgccagg aaactgagtg agcagaggaa aggggacaag	660		
	atcctcctga atgcctgctg ccaggggtgg gtgagaactg acatggcggg acccaaggcc	720		
	accaagagcc cagaagaagg tgcagagacc cctgtgtact tggccctttt gccccagat	780		
	gctgagggtc cccatggaca atttgtttca gagaagagag ttgaacagtg gtgaggatcc	840		
	taggaagaag cggagacagc gacgaagata g	871		
<210>	6			
<211>	286			
<212>	PRT			
<213>	Artificial Sequence			
<220><223>	Carbonyl Reductase 1-Tat fusion protein			
<400>	6			

Met Ser Ser Gly Ile His Val Ala Leu Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly
1 5 10 15
Ile Gly Leu Ala Ile Val Arg Asp Leu Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp
20 25 30
Val Val Leu Thr Ala Arg Asp Val Thr Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln
35 40 45
Gln Leu Gln Ala Glu Gly Leu Ser Pro Arg Phe His Gln Leu Asp Ile
50 55 60
Asp Asp Leu Gln Ser Ile Arg Ala Leu Arg Asp Phe Leu Arg Lys Glu
65 70 75 80
Tyr Gly Gly Leu Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys
85 90 95
Val Ala Asp Pro Thr Pro Phe His Ile Gln Ala Glu Val Thr Met Lys
100 105 110
Thr Asn Phe Phe Gly Thr Arg Asp Val Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu
115 120 125
Ile Lys Pro Gln Gly Arg Val Val Asn Val Ser Ser Ile Met Ser Val
130 135 140
Arg Ala Leu Lys Ser Cys Ser Pro Glu Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser
145 150 155 160
Glu Thr Ile Thr Glu Glu Glu Leu Val Gly Leu Met Asn Lys Phe Val
165 170 175
Glu Asp Thr Lys Lys Gly Val His Gln Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser
180 185 190
Ala Tyr Gly Val Thr Lys Ile Gly Val Thr Val Leu Ser Arg Ile His
195 200 205
Ala Arg Lys Leu Ser Glu Gln Arg Lys Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn
210 215 220
Ala Cys Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala
225 230 235 240
Thr Lys Ser Pro Glu Glu Gly Ala Glu Thr Pro Val Tyr Leu Ala Leu

	245	250	255	
	Leu Pro Pro Asp Ala Glu Gly Pro His Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys			
	260	265	270	
	Arg Val Glu Gln Trp Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg			
	275	280	285	
<210>	7			
<211>	905			
<212>	DNA			
<213>	Artificial Sequence			
<220><223>	Polynucleotide encoding Tat-Carbonyl Reductase 1-Tat fusion protein			
<400>	7			
	taggaagaag cggagacagc gacgaagact cgagatgtcg tccggcatcc atgtagcgt			60
	ggtgactgga ggcaacaagg gcatcggtt ggccatcgtg cgcgacctgt gccggctgtt			120
	ctcgggggac gtggtgctca cggcgcggga cgtgacgcgg ggccaggcgg ccgtacagca			180
	gctgcaggcg gagggcctga gcccgcgtt ccaccagctg gacatcgacg atctgcagag			240
	catccgcgcc ctgcgcgact tcctgcgcaa ggagtacggg ggcttgacg tgctgggtcaa			300
	caacgcgggc atgccttca aggttgctga tcccacacc tttcatattc aagctgaagt			360
	gacgatgaaa acaattttct ttggtaccg agatgtgtgc acagaattac tccctctaat			420
	aaaaccccaa gggagagtgg tgaacgtatc tagcatcatg agcgtcagag cccttaaag			480
	ctgcagccca gagctgcagc agaagttccg cagtgcagacc atcactgagg aggagctggt			540
	ggggctcatg aacaagtttg tggaggatac aaagaaggga gtgcaccaga aggagggtg			600
	gcccagcagc gcatcagggg tgacgaagat tggcgtcacc gttctgtcca ggatccacgc			660
	caggaaactg agtgagcaga ggaaagggga caagatcctc ctgaatgcct gctgccagg			720
	gtgggtgaga actgacatgg cgggacccaa ggccaccaag agcccagaag aaggtgcaga			780
	gaccctgtg tacttggecc ttttgcccc agatgctgag ggtcccatg gacaattgt			840
	ttcagagaag agagttgaac agtggtagg atcctaggaa gaagcggaga cagcgacgaa			900
	gatag			905
<210>	8			
<211>	299			
<212>	PRT			

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-Carbonyl Reductase 1-Tat fusion protein

<400> 8

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ser Ser Gly Ile

1 5 10 15

His Val Ala Leu Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly Ile Gly Leu Ala Ile

20 25 30

Val Arg Asp Leu Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp Val Val Leu Thr Ala

35 40 45

Arg Asp Val Thr Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln Gln Leu Gln Ala Glu

50 55 60

Gly Leu Ser Pro Arg Phe His Gln Leu Asp Ile Asp Asp Leu Gln Ser

65 70 75 80

Ile Arg Ala Leu Arg Asp Phe Leu Arg Lys Glu Tyr Gly Gly Leu Asp

85 90 95

Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys Val Ala Asp Pro Thr

100 105 110

Pro Phe His Ile Gln Ala Glu Val Thr Met Lys Thr Asn Phe Phe Gly

115 120 125

Thr Arg Asp Val Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu Ile Lys Pro Gln Gly

130 135 140

Arg Val Val Asn Val Ser Ser Ile Met Ser Val Arg Ala Leu Lys Ser

145 150 155 160

Cys Ser Pro Glu Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser Glu Thr Ile Thr Glu

165 170 175

Glu Glu Leu Val Gly Leu Met Asn Lys Phe Val Glu Asp Thr Lys Lys

180 185 190

Gly Val His Gln Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser Ala Tyr Gly Val Thr

195 200 205

Lys Ile Gly Val Thr Val Leu Ser Arg Ile His Ala Arg Lys Leu Ser

210 215 220

Glu Gln Arg Lys Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn Ala Cys Cys Pro Gly

<210> 10
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PEP-Carbonyl Reductase 1 fusion protein
 <400> 10
 Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Ser Ser Gly Ile His Val Ala Leu
 20 25 30
 Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly Ile Gly Leu Ala Ile Val Arg Asp Leu
 35 40 45
 Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp Val Val Leu Thr Ala Arg Asp Val Thr
 50 55 60
 Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln Gln Leu Gln Ala Glu Gly Leu Ser Pro
 65 70 75 80
 Arg Phe His Gln Leu Asp Ile Asp Asp Leu Gln Ser Ile Arg Ala Leu
 85 90 95
 Arg Asp Phe Leu Arg Lys Glu Tyr Gly Gly Leu Asp Val Leu Val Asn
 100 105 110
 Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys Val Ala Asp Pro Thr Pro Phe His Ile
 115 120 125
 Gln Ala Glu Val Thr Met Lys Thr Asn Phe Phe Gly Thr Arg Asp Val
 130 135 140
 Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu Ile Lys Pro Gln Gly Arg Val Val Asn
 145 150 155 160
 Val Ser Ser Ile Met Ser Val Arg Ala Leu Lys Ser Cys Ser Pro Glu
 165 170 175
 Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser Glu Thr Ile Thr Glu Glu Glu Leu Val
 180 185 190
 Gly Leu Met Asn Lys Phe Val Glu Asp Thr Lys Lys Gly Val His Gln
 195 200 205

Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser Ala Tyr Gly Val Thr Lys Ile Gly Val
 210 215 220
 Thr Val Leu Ser Arg Ile His Ala Arg Lys Leu Ser Glu Gln Arg Lys
 225 230 235 240
 Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn Ala Cys Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr
 245 250 255

Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala Thr Lys Ser Pro Glu Glu Gly Ala Glu
 260 265 270
 Thr Pro Val Tyr Leu Ala Leu Leu Pro Pro Asp Ala Glu Gly Pro His
 275 280 285
 Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys Arg Val Glu Gln Trp
 290 295 300

<210> 11

<211> 905

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide encoding Carbonyl Reductase 1-PEP-1 fusion protein

<400> 11

atgtcgtccg gcatccatgt agcgtgtgtg actggaggca acaaggcat cggtttggcc 60
 atcgtgcgcg acctgtgccg gctgtttctcg ggggacgtgg tgctcacggc gcgggacgtg 120
 acgcggggcc aggcggccgt acagcagctg caggcggagg gcctgagccc gcgtttccac 180
 cagctggaca tcgacgatct gcagagcatc cgcgccctgc gcgacttctt gcgcaaggag 240
 tacggggggc tggacgtgct ggtcaacaac gcgggcatcg ccttcaaggt tgctgatccc 300
 acaccctttc atattcaagc tgaagtgcg atgaaaacaa atttctttgg taccgagat 360
 gtgtgcacag aattactccc tctaataaaa cccaaggga gagtgggtgaa cgtatctagc 420

atcatgagcg tcagagccct taaaagtgc agcccagagc tgcagcagaa gttccgcagt 480
 gagaccatca ctgaggagga gctggtgggg ctcatgaaca agtttgtgga ggatacaaag 540
 aaggagtgcc accagaagga gggctggccc agcagcgcgt acggggtgac gaagattggc 600
 gtcaccgttc tgtccaggat ccacgccagg aaactgagtg agcagaggaa aggggacaag 660
 atcctcctga atgcctgtcg ccagggtgg gtgagaactg acatggcggg acccaaggcc 720
 accaagagcc cagaagaagg tgcagagacc cctgtgtact tggccctttt gccccagat 780

gctgagggtc cccatggaca atttgtttca gagaagagag ttgaacagtg gtaggatcc 840

taaaagaac ctggtgggaa acctggtgga ccgaatggtc tcagccgaaa aaaaaacgta 900

aagtg 905

<210> 12

<211> 300

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Carbonyl Reductase 1-PEP-1 fusion protein

<400> 12

Met Ser Ser Gly Ile His Val Ala Leu Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly

1 5 10 15

Ile Gly Leu Ala Ile Val Arg Asp Leu Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp

20 25 30

Val Val Leu Thr Ala Arg Asp Val Thr Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln

35 40 45

Gln Leu Gln Ala Glu Gly Leu Ser Pro Arg Phe His Gln Leu Asp Ile

50 55 60

Asp Asp Leu Gln Ser Ile Arg Ala Leu Arg Asp Phe Leu Arg Lys Glu

65 70 75 80

Tyr Gly Gly Leu Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys

85 90 95

Val Ala Asp Pro Thr Pro Phe His Ile Gln Ala Glu Val Thr Met Lys

100 105 110

Thr Asn Phe Phe Gly Thr Arg Asp Val Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu

115 120 125

Ile Lys Pro Gln Gly Arg Val Val Asn Val Ser Ser Ile Met Ser Val

130 135 140

Arg Ala Leu Lys Ser Cys Ser Pro Glu Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser

145 150 155 160

Glu Thr Ile Thr Glu Glu Glu Leu Val Gly Leu Met Asn Lys Phe Val

165 170 175

Glu Asp Thr Lys Lys Gly Val His Gln Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser
180 185 190
Ala Tyr Gly Val Thr Lys Ile Gly Val Thr Val Leu Ser Arg Ile His
195 200 205
Ala Arg Lys Leu Ser Glu Gln Arg Lys Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn
210 215 220
Ala Cys Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala
225 230 235 240
Thr Lys Ser Pro Glu Glu Gly Ala Glu Thr Pro Val Tyr Leu Ala Leu

245 250 255
Leu Pro Pro Asp Ala Glu Gly Pro His Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys
260 265 270
Arg Val Glu Gln Trp Gly Ser Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp
275 280 285
Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
290 295 300

<210> 13

<211> 976

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide encoding PEP-1-Carbonyl Reductase 1-PEP-1 fusion

protein

<400> 13

taaaagaac ctggtgggaa acctggtgga ccgaatggtc tcagccgaaa aaaaaacgta	60
aagtgtctga gatgtctgcc ggcatccatg tagcgtggt gactggaggc aacaagggca	120
tggcttggc catcgtgcgc gacctgtgcc ggctgttctc gggggacgtg gtgctcacgg	180
cgcgggacgt gacgcggggc caggcggccg tacagcagct gcaggcggag ggcctgagcc	240
cgcgcttcca ccagctggac atcgacgac tgcagagcat ccgcgccctg cgcgacttcc	300
tgcgcaagga gtacgggggc ctggacgtgc tggtaacaa cgcgggcatc gccttcaagg	360
ttgctgatcc cacacccttt catattcaag ctgaagtgc gatgaaaaca aatttcttg	420
gtacccgaga tgtgtgcaca gaattactcc ctctaataaa accccaaggg agagtgggtga	480
acgtatctag catcatgagc gtcagagccc ttaaaagctg cagcccagag ctgcagcaga	540

agttccgcag tgagaccatc actgaggagg agctggtggg gtcacgaac aagtttgtgg 600
 aggatacaaa gaaggagtg caccagaagg agggctggcc cagcagcgca tacggggtga 660
 cgaagattgg cgtcaccgtt ctgtccagga tccacgccag gaaactgagt gagcagagga 720
 aaggggacaa gatcctcctg aatgcctgct gccaggggtg ggtgagaact gacatggcgg 780
 gacccaaggc caccaagagc ccagaagaag gtgcagagac ccctgtgtac ttggcccttt 840

tgccccaga tgctgagggt ccccatggac aattgtttc agagaagaga gttgaacagt 900
 ggtgaggatc ctaaaagaaa cctggtggga aacctggtgg accgaatggt ctcagccgaa 960
 aaaaaaacgt aaagtg 976

<210> 14

<211> 323

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP-1-Carbonyl Reductase 1-PEP-1 fusion protein

<400> 14

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Ser Ser Gly Ile His Val Ala Leu

20 25 30

Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly Ile Gly Leu Ala Ile Val Arg Asp Leu

35 40 45

Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp Val Val Leu Thr Ala Arg Asp Val Thr

50 55 60

Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln Gln Leu Gln Ala Glu Gly Leu Ser Pro

65 70 75 80

Arg Phe His Gln Leu Asp Ile Asp Asp Leu Gln Ser Ile Arg Ala Leu

85 90 95

Arg Asp Phe Leu Arg Lys Glu Tyr Gly Gly Leu Asp Val Leu Val Asn

100 105 110

Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys Val Ala Asp Pro Thr Pro Phe His Ile

115 120 125

Gln Ala Glu Val Thr Met Lys Thr Asn Phe Phe Gly Thr Arg Asp Val

130 135 140

Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu Ile Lys Pro Gln Gly Arg Val Val Asn
145 150 155 160

Val Ser Ser Ile Met Ser Val Arg Ala Leu Lys Ser Cys Ser Pro Glu
165 170 175

Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser Glu Thr Ile Thr Glu Glu Glu Leu Val
180 185 190

Gly Leu Met Asn Lys Phe Val Glu Asp Thr Lys Lys Gly Val His Gln
195 200 205

Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser Ala Tyr Gly Val Thr Lys Ile Gly Val
210 215 220

Thr Val Leu Ser Arg Ile His Ala Arg Lys Leu Ser Glu Gln Arg Lys

225 230 235 240

Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn Ala Cys Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr
245 250 255

Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala Thr Lys Ser Pro Glu Glu Gly Ala Glu
260 265 270

Thr Pro Val Tyr Leu Ala Leu Leu Pro Pro Asp Ala Glu Gly Pro His
275 280 285

Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys Arg Val Glu Gln Trp Gly Ser Lys Glu
290 295 300

Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys
305 310 315 320

Arg Lys Val