



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월29일

(11) 등록번호 10-1607282

(24) 등록일자 2016년03월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 19/00 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0183331

(22) 출원일자 2014년12월18일

심사청구일자 2014년12월18일

(56) 선행기술조사문헌

WO2009076524 A2

KR100877151 B1

Thakur S. et al., Experimental & Molecular Medicine 46:pp.1-21 (2014. 7.18.)

Park MS. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 435:pp.621-626(2013. 5.17.)

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

전병화

대전광역시 서구 둔산남로 127 204동 803호

주희경

대전광역시 서구 만년로 25 102동 701호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

전체 청구항 수 : 총 11 항

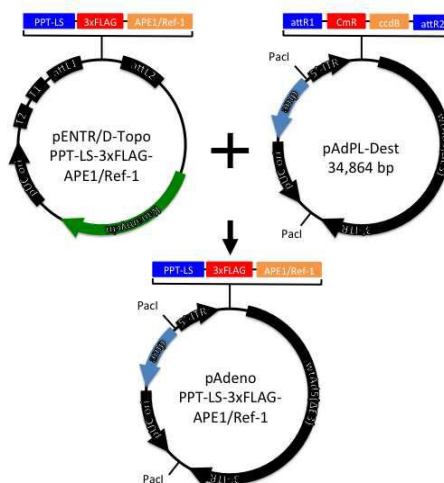
심사관 : 박정웅

(54) 발명의 명칭 유리형 산화환원조절단백-1 및 이를 함유하는 항염증 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 항 염증 활성을 갖는 산화환원조절단백-1의 새로운 작용 타겟인 세포 밖 염증유도수용체에 효과적으로 작용할 수 있게 하기 위하여 산화환원조절단백-1을 세포밖으로 배출될 수 있도록 한 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 1의 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질(PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1)에 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

최성아

대전광역시 서구 문정로170번길 167-13

이유란

충청북도 보은군 보은읍 향교1길 3-3 에스엠아파트
102동 603호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2007-0054932
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터육성지원사업(MRC)
연구과제명 감염신호네트워크응용연구센터
기 여 율 4/10
주관기관 충남대학교
연구기간 2007.05.01 ~ 2016.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NFC-2014R1A6A1029617
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중점연구소지원사업
연구과제명 혈관염증제어 및 유효성평가기술개발
기 여 율 5/10
주관기관 충남대학교
연구기간 2014.09.01 ~ 2023.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014B7243010122
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 LINC사업
연구과제명 항염증 유효단백질을 함유한 기능성 화장품소재 공동개발
기 여 율 1/10
주관기관 충남대학교
연구기간 2014.07.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질.

청구항 2

제 1 항의 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제 2 항에 있어서,
서열번호 2의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 4

제 1 항의 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질을 발현시키는 제2항의 유전자를 포함하는 발현벡터.

청구항 5

제 4 항에 있어서,
상기 발현벡터는 아데노바이러스 발현벡터인 발현벡터.

청구항 6

제 1 항의 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 염증질환 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서,
상기 융합단백질은 상기 융합단백질을 코딩하는 유전자의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서,
상기 융합단백질을 코딩하는 유전자가 발현 벡터 내에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 발현백터는 아데노바이러스 벡터인 약학 조성물.

청구항 10

제 6 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 염증질환은 패혈증 또는 암으로 인한 염증질환인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 11

제 6 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 피부도말제제, 경구제, 정맥주사제 또는 근육주사제로 제형화되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 항 염증 활성을 갖는 산화환원조절단백-1이 새로운 작용 타겟인 세포 밖 염증유도수용체에 효과적으로 작용할 수 있게 하기 위하여 산화환원조절단백-1을 세포밖으로 배출될 수 있도록 한 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

산화환원조절단백-1(APE1/Ref-1)은 산화적 스트레스를 방어하는 세포내 주요 단백질이다. 대표적으로 손상된 DNA를 수리 또는 복구 시켜주는 기능과 전사인자의 산화환원을 조절하여 세포 내 유전자 발현을 정상적으로 유지시키는 데 중요한 기능을 담당하고 있다.

[0003]

산화환원조절단백-1은 318개 아미노산으로 구성되어 있으며 N-terminus 부위에 핵 위치신호(nuclear localization signal, NLS)와 핵 유출신호(Nuclear export signal, NES)가 존재하여 세포 내 위치를 조절하고 있다. 정상적 조건에서 산화환원조절단백-1은 주로 핵에 위치하고 있지만 산화적 스트레스 등 세포 내 손상을 유도하는 자극에 의해 세포질로 이동됨이 보고되어 있으며 세포 내 산화환원상태 등 환경변화에 따라 산화환원조절단백-1의 위치이동이 나타나는 것으로 알려져 있다.

[0004]

혈관내피세포에서 APE1/Ref-1를 과발현시키면, 산화질소의 생성증가 및 활성산소종의 생성을 억제하며, 염증반응의 원인이 되는 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)의 발현이 억제되고 혈관내피세포에 단백질의 유착도 억제된다는 것이 알려져 있다. 이에 착안하여, 본 발명자들은 혈관질환의 치료에 유용한 항염증질환 치료용 세포투과성 APE1/Ref-1 융합단백질에 대하여 등록특허 제10-0877151호에 개시한 바 있다.

[0005]

세포 내 여러 단백질 중 필요에 따라 세포 밖으로 배출되어 기능하는 단백질이 있다. 그 중 High mobility group protein-1(HMG-1) 단백질은 핵 위치신호부위 특정 잔기에 아세틸화가 나타나 세포 외로 배출되는 것으로 알려져 있으며 세포 밖에 노출되어 있는 염증을 유도하는 수용체에 결합하여 염증성 사이토카인 분비를 촉진시킴이 보고되어 있다.

[0006]

최근 들어 APE1/Ref-1에 대해서도 특정 조건에서는 세포 밖으로 배출됨이 보고되었다. 즉, Histone deacetylases inhibitor인 trichostatin A에 의한 APE1/Ref-1의 아세틸화는 정상조건에서 주로 핵에 위치하던 APE1/Ref-1의 위치변화를 유도하여 세포 밖으로 배출시키는 작용을 하는 것으로 보고되었다(Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jun 7; 435(3): 403-7). 또한 패혈증 동물 모델에서도 APE1/Ref-1이 혈중으로 배출됨을 확인하였다(Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jun 14; 435(4): 621-6). 등록특허 제10-1251222호에서는 방광암에서 혈청 내 APE1/Ref-1의 농도가 증가하는 것을 이용하여, 환자로부터 채취한 혈액으로부터 APE1/Ref-1이 농도를 측정하여 방광암을 진단하는 것을 보고하고 있다. 이러한 보고들로부터 평상 시 APE1/Ref-1은 세포 내에서 과다 생성된 ROS억제 등을 통한 항염증 기능을 수행하지만, APE1/Ref-1 단백질이 배출되는 특정상황 예를 들면

폐혈증이나 암 등의 조건에서는 세포 밖에서의 작용이 새로운 작용 target으로 역할을 담당하고 있을 것이라 기대된다.

- [0007] 이에 본 발명자들은 산화환원조절단백-1의 새로운 작용기전으로서 세포 밖으로 배출된 산화환원조절단백-1의 기능을 알아보기 위해 세포에서 과발현되어 단백질 만들어지도록 플라즈미드 및 아데노 바이럴 형태의 유리형 산화환원단백-1을 제작하고, 제작된 유리형 산화환원단백-1이 염증억제에 효과를 나타내어 항염증 치료물질로써 작용함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-0877151호
(특허문헌 0002) 등록특허 제10-1251222호

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jun 7; 435(3): 403-7
(비특허문헌 0002) Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jun 14; 435(4): 621-6

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 새로운 작용기전으로서 세포 밖으로 배출된 산화환원조절단백-1이 염증 지표물질의 저하에 현저한 효과가 있는 것을 확인하고, 산화환원조절단백-1이 세포 밖으로 효율적으로 배출될 수 있는 새로운 융합단백질을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 융합단백질의 발현을 위하여 상기 융합단백질을 코딩하는 유전자와, 상기 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 염증질환의 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 서열번호 1의 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질(PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1)에 관한 것이다. 본 발명은 항 염증 활성을 갖는 산화환원조절단백-1의 새로운 작용 타겟인 세포 밖 염증유도수용체에 효과적으로 작용할 수 있게 하기 위하여 산화환원조절단백-1을 세포밖으로 배출될 수 있도록 한 것에 특징이 있다.
- [0014] 또한 본 발명은 상기 융합단백질을 코딩하는 유전자에 관한 것이다. 상기 유전자는 특히 서열번호 2의 서열을 갖는 것이 바람직하다.
- [0015] 본 발명에 의한 융합단백질을 혈관내피세포와 마우스의 대식세포에서 과발현 아데노바이러스 발현벡터에 의해 과발현시킨 결과, 세포배양액에 융합단백질이 아데노바이러스의 감염 농도에 비례하여 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 상기 융합단백질의 과발현에 의해 각 세포에서의 염증 지표 물질인 VCAM-1과 iNOS 및 COX-2가 효과적으로 감소하여 상기 융합단백질의 항염증 효능이 우수함을 확인할 수 있었다.
- [0016] 이에, 본 발명은 상기 유리형 산화환원단백-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0017] 상기 융합단백질은 분리, 정제된 융합단백질의 형태로서 뿐 아니라 융합단백질을 코딩하는 유전자의 형태로 제

공될 수도 있다. 상기 유전자는 DNA, RNA 또는 PNA를 포함하며, 바람직하게는 서열번호 2의 서열로 표시되는 유전자이다.

[0018] 상기 유전자는 발현벡터 내에 포함된 형태로 상기 발현벡터를 당업계에서 공지된 다양한 방법으로 감염 또는 형질도입하여 발현형으로 표적 세포 내에 도입시킬 수 있다. 특히 상기 발현벡터로는 이에 한정되는 것은 아니나 아데노바이러스 벡터인 것이 바람직하다. 아데노 바이러스 벡터는 다량의 DNA 단편을 운반하고, 매우 높은 역가로 비-복제세포를 감염시킬 수 있다.

[0019] 상기 약학 조성물은 약제학적 분야에 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 피부도말제제, 경구, 정맥주사 및 근육주사형태로 제형화할 수 있다. 또한 피부의 염증이 발생 시 바르는 소염제나, 캡슐이나 정제의 경구투여제제로 만들어 염증질환치료 및 예방용 약으로 이용될 수 있다. 상기 융합단백질을 유효성분으로 하는 약제학적 조성물은 생체내 기능조절 특히 활성산소 및 유전인자복구, 혈관염증치료제, 패혈증, 암에 기인한 염증질환 등의 모든 치료법에 응용될 수 있으며 그 기법은 향후 세포내 유전질환의 치료 및 새로운 질환치료법으로 활용될 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다

발명의 효과

[0021] 이상과 같이 본 발명의 융합단백질에 의하면 산화환원조절단백-1이 세포 외로 효과적으로 배출되므로 새로운 작용 타겟인 세포밖 염증유도수용체의 산화환원조절을 통하여 염증질환을 효과적으로 억제할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 발현벡터의 개열지도.
 도 2는 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 아데노바이러스 발현벡터의 개열지도.
 도 3은 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질 및 이를 코딩하는 유전자의 서열.
 도 4는 염증이 유도된 혈관내피세포에서 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질의 과발현에 의한 VCAM-1의 발현량의 변화를 보여주는 면역침강 및 웨스턴블랏에 의한 분석결과 사진.
 도 5는 혈관내피세포에서 세포밖으로 배출된 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질의 정량 그래프.
 도 6은 염증이 유도된 마우스 대식세포에서 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질의 과발현에 의한 iNOS 및 COX-2의 발현량의 변화를 보여주는 면역침강 및 웨스턴블랏에 의한 분석결과 사진.
 도 7은 마우스 대식세포에서 세포밖으로 배출된 유리형 산화환원조절단백-1 융합단백질의 정량 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0024] 실시예

[0025] **실시예 1 : 유리형 산화환원조절단백-1 발현벡터의 제작 및 감염**

[0026] 세포 외 배출 신호를 포함하고 있는 유리형 산화환원조절단백-1의 과발현을 위하여 p3xFLAG-CMV-8 (Sigma-Aldrich, USA) 벡터를 이용하여 3개의 FLAG 염기서열과 세포 외 배출신호인 PPT-LS를 포함한 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1를 제작하였다. 아데노 바이러스 벡터에 클로닝 하기 위해 attL사이트를 포함하는 Gateway vector인 pENTR-TOPO-CMV vector (Invitrogen, USA) 를 사용하여 pENTR-TOPO-CMV-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1유전자를 재조합 하였다.

[0027] 구체적으로는, 세포 외 배출 신호인 PPT-LS를 포함한 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1를 제작하기 위해 pCMV-tag2A 벡터에 삽입되어 있는 전장 APE1/Ref-1 cDNA (NM_001641)(Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jun 7; 435(3): 403-7)를 이용하여 HindIII 부위와 함께 개시코돈인 ATG가 추가되어 있는 서열번호 3의 정방향 프라이머와 말단에 EcoRI과 함께 종결코돈인 TGA가 추가되어 있는 서열번호 4의 역방향 프라이머를 사용하여 p3xFLAG-CMV-8 vector에 클로닝 하였다. PCR 반응은 제조사의 설명서(Intron, Korea)에 따라 고성능 DNA 증합효소를 이용하여 수행하였으며, PCR은 94℃, 58℃, 72℃를 25사이클로 실험하였다.

[0028] 서열번호 3 : 5'-CCA AGC TTA TGC CGA AGC GTG GGA A-3'

[0029] 서열번호 4 : 5'-GGA ATT CCGTCA CAG TGC TAG GTA TA-3'

[0030] 제작된 p3xFLAG-CMV-8/APE1/Ref-1(도 1)은 BamHI 부위를 포함한 서열번호 5의 정방향 프라이머와 말단에 XhoI 부위를 포함하고 있는 서열번호 6의 역방향 프라이머를 사용하여 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1유전자를 증폭 분리 하였다. 증폭된 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 유전자는 pENTR-TOPO-CMV 벡터에 재조합하여 pENTR-TOPO-CMV/PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 벡터를 제조하였다.

[0031] 서열번호 5 : 5'-AAG GAT CCG CCA CCA TGT CTG CAC TTC TGA TCC-3'

[0032] 서열번호 6 : 5'-AAC TCG AGT CAC AGT GCT AGG TAT AGG G-3'

[0033] 모든 재조합 DNA는 시퀀싱하여 서열을 확인하였다.

[0034] 이후 pENTR-TOPO-CMV/PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1과 pAd/PL-DEST (Invitrogen, USA) 두 개의 벡터를 LR clonase II (Invitrogen, USA)로 반응시켜 pENTR-TOPO-CMV 벡터에 재조합되어 있는 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 유전자를 아데노바이러스 벡터인 pAd/PL-DEST 벡터에 유전자 재조합하는 것에 의해 pAd/PL-PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1를 제작하였다.

[0035] 아데노바이러스형태의 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1를 제작하기 위해 플라스미드형태의 Ad/PL-PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 유전자 10 µg를 PacI 효소 (New England Biolabs, UK)로 절단하여 cDNA를 확보하였다. 확보한 Ad/PL-PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 cDNA 1.6 µg를 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA)시약을 이용하여 제조사의 방법에 따라 HEK293A (LifeTechnologies, USA) 세포에 형질감염시켰다. 형질 감염 후 80% 이상의 세포병변효과가 관측되면, 세포를 모아 염화세슘 구배 원심분리법을 이용하여 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1발현하는 아데노바이러스를 정제하고, -80℃에 저장하며 사용하였다.

[0036] 도 1과 도 2는 각각 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 및 아데노바이러스 발현벡터의 개열지도이며, 도 3은 각각 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1에 대한 DNA 염기서열과 아미노산 서열이다.

[0037] **실시예 2 : 혈관내피세포에서 융합단백질에 의한 염증억제 기능 확인**

[0038] 배양혈관내피세포(HUVEC)에서 Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)에 의하여 유도되는 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) 발현에 유리형 산화환원조절단백-1이 미치는 영향을 규명하였다.

[0039] 2×10^5 /ml의 개수로 희석된 HUVEC 배양 세포(Lonza, USA)를 2ml씩 6 well plate에 분주하고, 18시간동안 37℃ 수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 이후, 실시예 1에서 정제한 아데노바이러스로 감염시키고(50 또는 100 MOI), 37℃에서 추가로 24시간 배양하였다. 바이러스 감염 24시간 후 TNF-α(15ng/ml)을 처리 하여 12시간 배양하였다. 대조를 위하여 TNF-α를 처리하지 않거나, 아데노바이러스 형태의 β-galactosidase를 감염시킨 군에 대해서도 동일한 실험을 진행하였다.

[0040] 세포 내 VCAM-1발현을 확인하기 위해 약물이 처리된 세포는 RIPA buffer를 이용하여 세포를 용해시켰으며,

Bradford단백질 정량법을 이용하여 세포내 단백질을 정량 후 웨스턴 블랏에 의해 VCAM-1발현을 확인하였다. 세포 배양액으로 유리된 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1단백질을 검출하기 위해 TNF- α 처리 12시간 후 세포배양액을 걷어 새로운 튜브에 옮긴 후 세포배양액의 부유물들을 제거하기 위해 3000rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 상층액에 APE1/Ref-1 항체 1 μ g을 넣어 면역반응한 후, agarose A/G (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 넣어 면역침전하여 얻은 결과물을 이용, 웨스턴 블랏에 의해 검출된 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1을 확인하였다. 또한 세포 외로 유리된 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1단백질의 양을 확인하기 위해 세포배양액을 걷어 등록특허 10-1251222에 기재된 방법에 따라 ELISA kit를 사용하여 정량 하였다.

[0041] 도 4는 면역침강 및 웨스턴블랏에 의한 분석결과를 나타내는 것으로, TNF- α 에 의해 염증 시 발현되는 단백질인 VCAM-1의 발현이 유도되었으며, 아데노바이러스의 처리군에서 세포외로 유리된 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1단백질의 유리 증가에 따라 VCAM-1의 발현이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0042] 이에 HUVEC에서 아데노바이러스에 의한 유리형 산화환원조절단백-1이 세포 외로 분비된 양을 상기 세포 배양액으로부터 얻어 등록특허 10-1251222에 기재된 방법에 따라 ELISA kit를 사용하여 정량하고 그 결과를 도 5에 도시하였다. 도 5에 의하면, 아데노바이러스를 50 또는 100 MOI의 농도로 처리하였을 때, 세포 외로 150~300 ng/ml 정도의 융합단백질이 배출되었으며 분비된 양은 감염농도에 비례하였다.

[0043] **실시예 3 : 대식세포에서 융합단백질에 의한 염증억제 기능 확인**

[0044] 마우스의 대식세포인 Raw264.7세포에서 LPS에 의하여 유도된 염증에 유리형 산화환원조절단백-1이 미치는 영향을 규명하였다.

[0045] 2×10^5 /ml의 개수로 희석된 Raw264.7세포 (ATCC, USA)를 2ml씩 6 well에 분주하고, 18시간 동안 37 $^{\circ}$ C 수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 이후, 실시예 1에서 정제한 아데노바이러스로 감염시키고(50 또는 100 MOI), 37 $^{\circ}$ C에서 추가로 24시간 배양하였다. 바이러스 감염 24시간 후 LPS (300ng/ml)을 처리 하여 12시간 배양 하였다. 대조를 위하여 LPS를 처리하지 않거나, 아데노바이러스 형태의 β -galactosidase를 감염시킨 군에 대해서도 동일한 실험을 진행하였다.

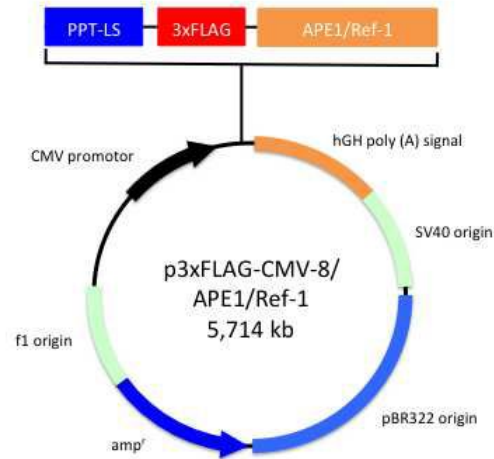
[0046] 세포 내 iNOS와 COX-2의 발현변화를 확인하기 위해 LPS를 처리한 세포는 RIPA buffer를 이용하여 용해시켰으며, bradford 단백질 정량법을 이용하여 세포내 단백질을 정량 후 웨스턴 블랏에 의해 iNOS와 COX-2의 발현변화를 확인하였다. 세포 배양액으로 유리된 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1단백질을 검출하기 위해 LPS 처리 12시간 후 세포배양액을 걷어 새로운 튜브에 옮긴 후 세포배양액의 부유물들을 제거하기 위해 3000rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 걷어 APE1/Ref-1 항체 1 μ g을 넣어 면역반응한 후, agarose A/G (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 넣어 면역침전하여 얻은 결과물을 이용, 웨스턴 블랏에 의해 검출된 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1을 확인하였다. 또한 실시예 2에 기재된 방법에 의해 세포 외로 유리된 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 단백질의 양을 정량하였다.

[0047] 도 6는 면역침강 및 웨스턴블랏에 의한 분석결과를 나타내는 것으로, LPS에 의해 염증 시 발현되는 단백질인 iNOS 및 COX-2의 발현이 유도되었으며, 아데노바이러스의 처리군에서 세포외로 유리된 PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 단백질의 유리증가에 따라 iNOS와 COX-2의 발현이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0048] Raw264.7세포에서 아데노바이러스에 의한 유리형 산화환원조절단백-1이 세포 외로 분비된 정도를 상기 세포 배양액으로부터 ELISA 방법에 의해 정량한 결과, 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이 아데노바이러스를 50 또는 100MOI의 농도로 처리하였을 때, 세포 외로 100~200ng/ml 정도의 융합단백질이 배출되었으며 분비된 양은 감염 농도에 비례하였다.

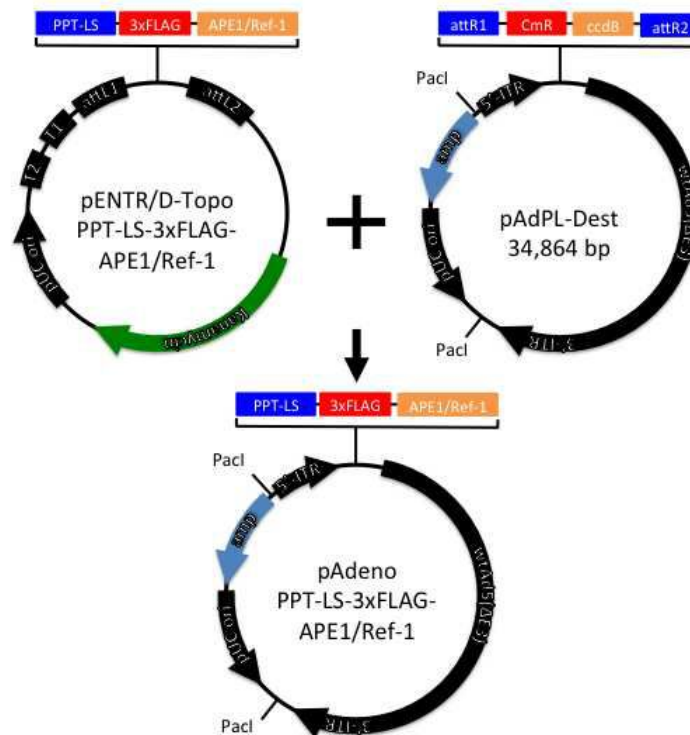
도면

도면1

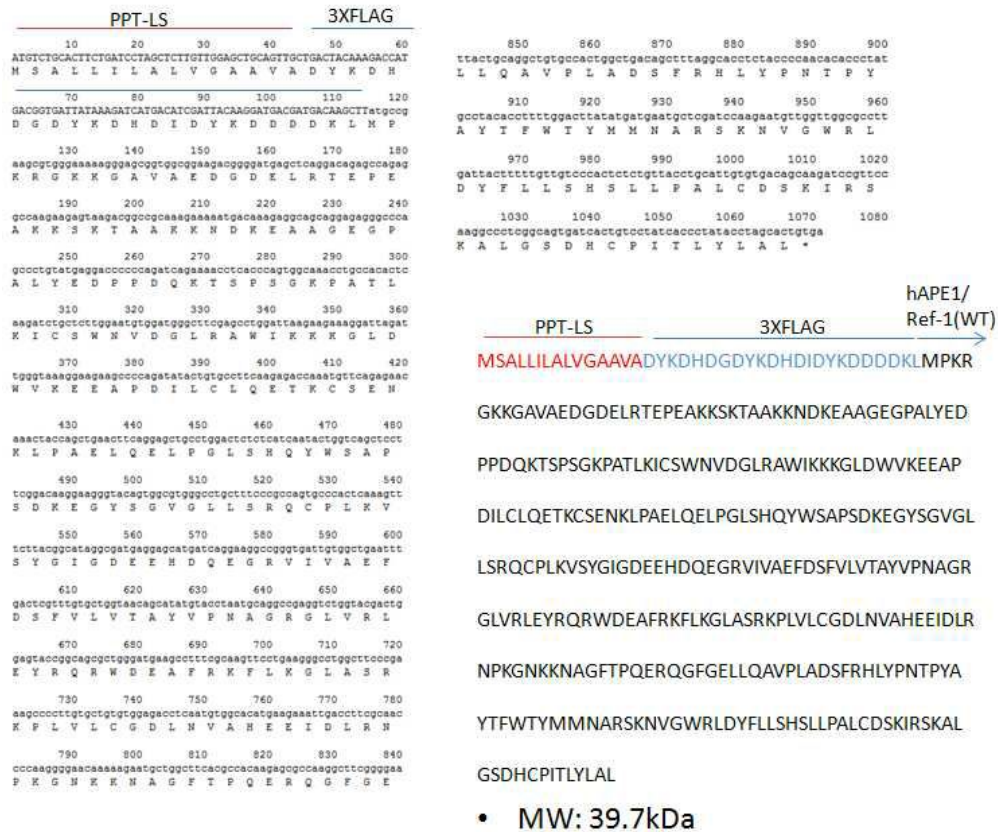


Full length of human APE1/Ref-1 cDNA is inserted in HindIII/EcoRI of MCS

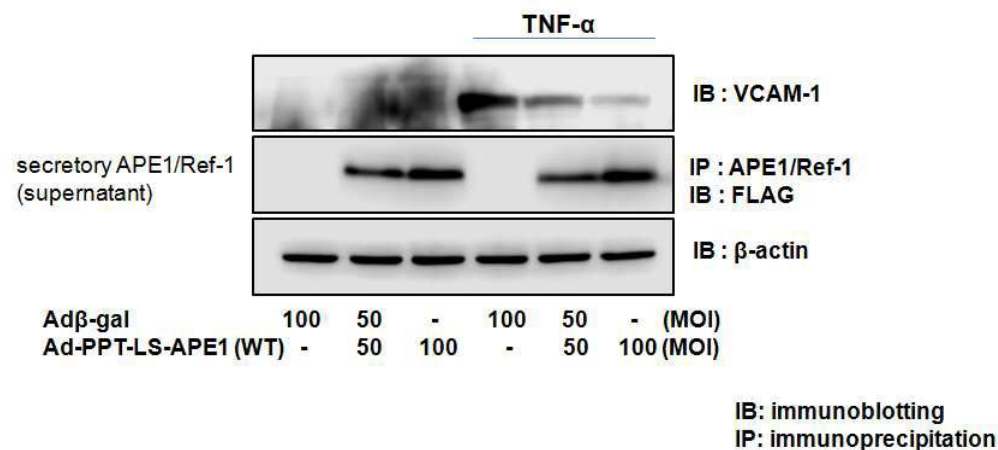
도면2



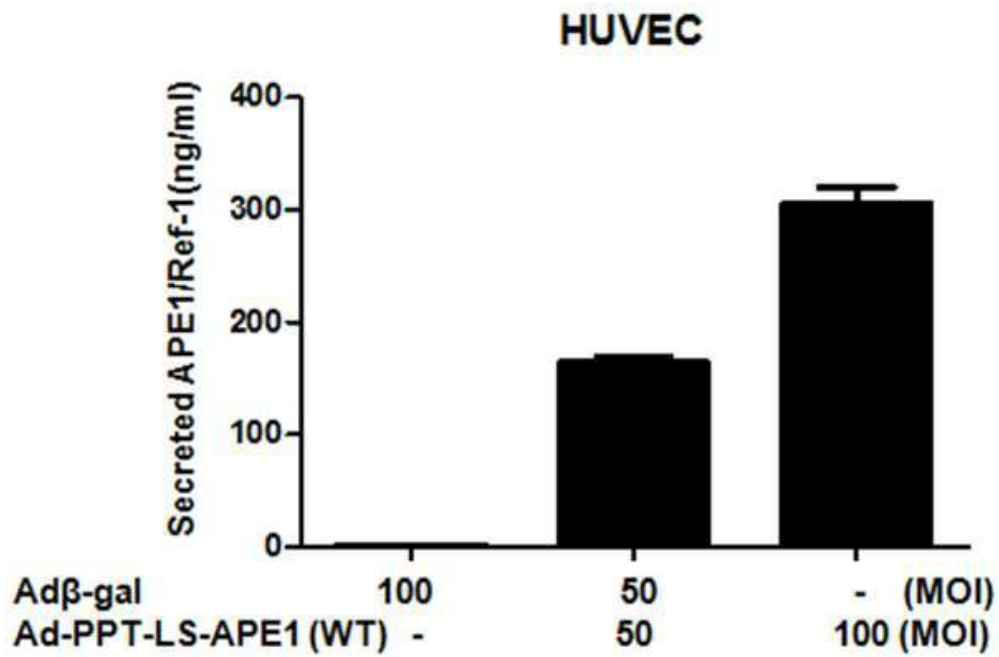
도면3



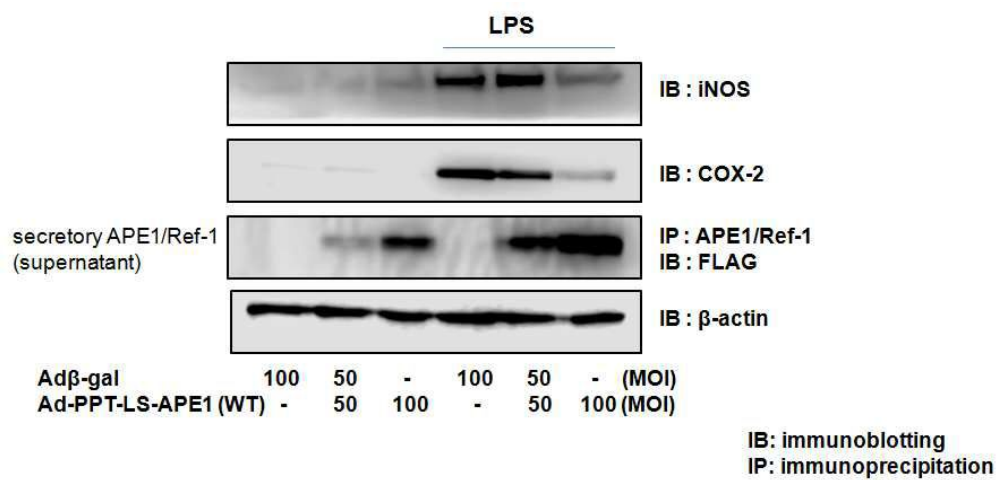
도면4



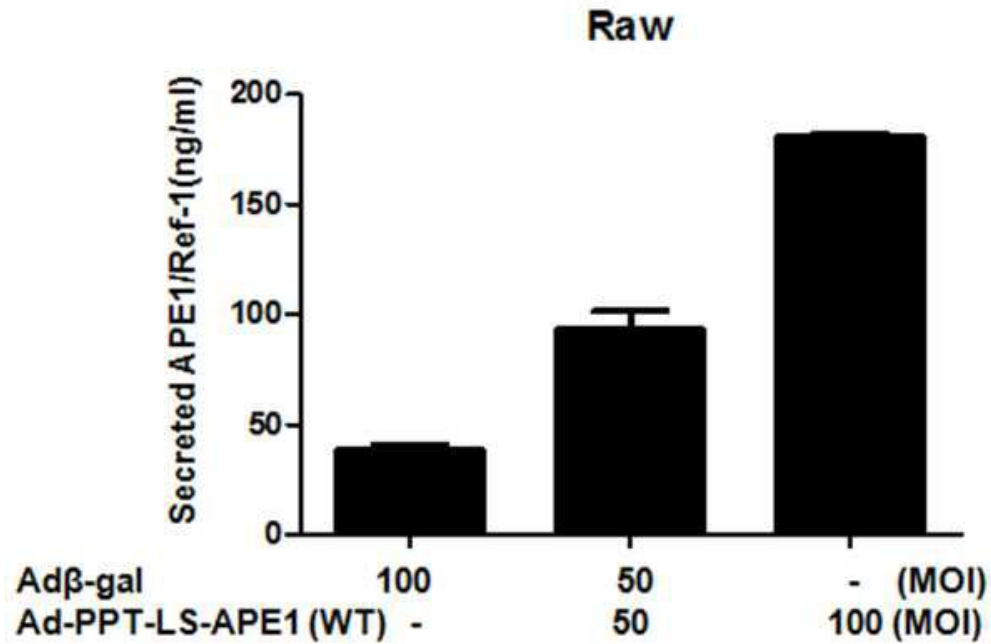
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Secretory APE1/Ref-1 Fusion Protein and Pharmaceutical
Composition Containing the Protein

<130> P1214-605

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 fused protein

<400> 1

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp

1 5 10 15

Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys

20 25 30

Asp Asp Asp Asp Lys Leu Met Pro Lys Arg Gly Lys Lys Gly Ala Val

35 40 45

Ala Glu Asp Gly Asp Glu Leu Arg Thr Glu Pro Glu Ala Lys Lys Ser
50 55 60
Lys Thr Ala Ala Lys Lys Asn Asp Lys Glu Ala Ala Gly Glu Gly Pro
65 70 75 80
Ala Leu Tyr Glu Asp Pro Pro Asp Gln Lys Thr Ser Pro Ser Gly Lys
85 90 95
Pro Ala Thr Leu Lys Ile Cys Ser Trp Asn Val Asp Gly Leu Arg Ala
100 105 110
Trp Ile Lys Lys Lys Gly Leu Asp Trp Val Lys Glu Glu Ala Pro Asp
115 120 125
Ile Leu Cys Leu Gln Glu Thr Lys Cys Ser Glu Asn Lys Leu Pro Ala
130 135 140
Glu Leu Gln Glu Leu Pro Gly Leu Ser His Gln Tyr Trp Ser Ala Pro
145 150 155 160
Ser Asp Lys Glu Gly Tyr Ser Gly Val Gly Leu Leu Ser Arg Gln Cys
165 170 175
Pro Leu Lys Val Ser Tyr Gly Ile Gly Asp Glu Glu His Asp Gln Glu
180 185 190
Gly Arg Val Ile Val Ala Glu Phe Asp Ser Phe Val Leu Val Thr Ala
195 200 205
Tyr Val Pro Asn Ala Gly Arg Gly Leu Val Arg Leu Glu Tyr Arg Gln
210 215 220
Arg Trp Asp Glu Ala Phe Arg Lys Phe Leu Lys Gly Leu Ala Ser Arg
225 230 235 240
Lys Pro Leu Val Leu Cys Gly Asp Leu Asn Val Ala His Glu Glu Ile
245 250 255
Asp Leu Arg Asn Pro Lys Gly Asn Lys Lys Asn Ala Gly Phe Thr Pro
260 265 270
Gln Glu Arg Gln Gly Phe Gly Glu Leu Leu Gln Ala Val Pro Leu Ala
275 280 285
Asp Ser Phe Arg His Leu Tyr Pro Asn Thr Pro Tyr Ala Tyr Thr Phe

290 295 300

Trp Thr Tyr Met Met Asn Ala Arg Ser Lys Asn Val Gly Trp Arg Leu

305 310 315 320

Asp Tyr Phe Leu Leu Ser His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Cys Asp Ser

325 330 335

Lys Ile Arg Ser Lys Ala Leu Gly Ser Asp His Cys Pro Ile Thr Leu

340 345 350

Tyr Leu Ala Leu

355

<210> 2

<211> 1071

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding PPT-LS-3xFLAG-APE1/Ref-1 fused protein

<400> 2

atgtctgcac ttctgacccct agctcttgtt ggagctgcag ttgctgacta caaagaccat 60

gacggtgatt ataaagatca tgacatcgat tacaaggatg acgatgacaa gcttatgccg 120

aagcgtggga aaaagggagc ggtggcggaa gacggggatg agctcaggac agagccagag 180

gccaagaaga gtaagacggc cgcaaagaaa aatgacaaag aggcagcagg agagggccca 240

gccctgtatg aggacccccc agatcagaaa acctcaccca gtggcaaacc tgccacactc 300

aagatctgct cttggaatgt ggatgggctt cgagcctgga ttaagaagaa aggattagat 360

tgggtaaagg aagaagcccc agatatactg tgccttcaag agaccaaagt ttcagagAAC 420

aaactaccag ctgaacttca ggagctgcct ggactctctc atcaatactg gtcagctcct 480

tcggacaagg aagggtacag tggcgtgggc ctgctttccc gccagtgcc actcaaagtt 540

tcttacggca taggcgatga ggagcatgat caggaaggcc ggggtattgt ggctgaattt 600

gactcgtttg tgctggtaac agcatatgta cctaatagcag gccgaggtct ggtacgactg 660

gagtaccggc agcgtggga tgaagccttt cgcaagttcc tgaaggcctt ggcttccga 720

aagccccttg tgctgtgtgg agacctcaat gtggcacatg aagaaattga ccttcgcaac 780

cccaagggga acaaaaagaa tgctggcttc acgccacaag agcgccaagg cttcggggaa 840

ttactgcagg ctgtgccact ggctgacagc ttaggcacc tctacccaa cacacctat 900

gcctacacct tttggactta tatgatgaat gctcgatcca agaattgttg ttggcgctt 960

gattactttt tgttgccca ctctctgtta cctgcattgt gtgacagcaa gatccgttcc 1020

aaggccctcg gcagtgatca ctgtcctatc accctatacc tagcactgtg a 1071

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ccaagcttat gccgaagcgt gggaa 25

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ggaattccgt cacagtgcta ggtata 26

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

aaggatccgc caccatgtct gcacttctga tcc 33

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

aactcgagtc acagtgctag gtataggg 28