



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0110651
(43) 공개일자 2016년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0033207
(22) 출원일자 2015년03월10일
심사청구일자 2015년03월10일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)
김현아
서울특별시 강남구 남부순환로 2803 102동 802호 (도곡동, 삼성래미안아파트)
(74) 대리인
강성혜

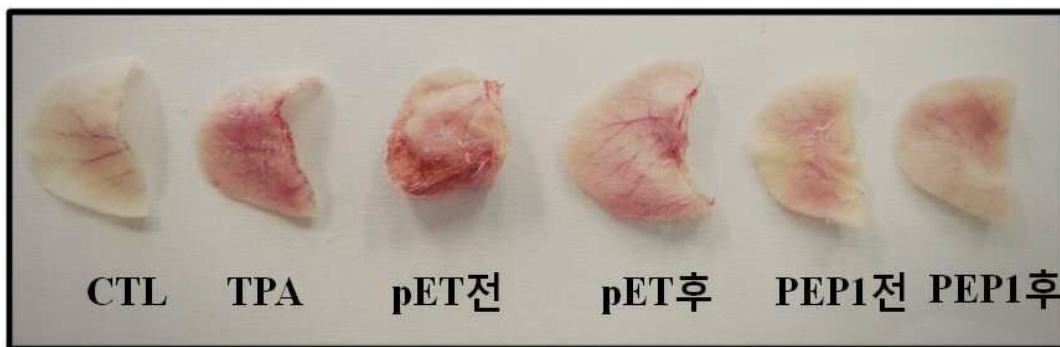
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 PEA15 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 세포투과성 PEA15 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것으로서, 본 발명자들은 세포투과성 PEP-1-PEA15 융합단백질을 제조하여 LPS 또는 과산화수소로 처리된 Raw 264.7 세포 및 TPA 처리된 피부염증 동물모델에서 이 융합단백질이 염증에 대한 보호효과를 나타내는지 시험하였다. 그 결과, PEP-1-PEA15 융합단백질은 효과적으로 Raw 264.7 세포 내로 투과하여 LPS 또는 과산화수소로 유도되는 염증 및 세포사멸에 대해 현저한 세포 보호작용을 나타내었다. 뿐만 아니라, 국소적용된 PEP-1-PEA15 융합단백질은 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)로 유도된 귀 부종에 대해 현저한 개선효과를 유도함으로써 PEP-1-PEA15 융합단백질이 다양한 염증 및 산화 스트레스 관련 질병에 대한 치료제로 이용 가능성을 밝혔다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 9/20 (2013.01)

A61K 9/48 (2013.01)

(72) 발명자

조용준

강원도 춘천시 우석로101번길 86 110동 802호 (석사동, 대우아파트)

박진서

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

음원식

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

신민재

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가동 389-1 그린빌 301호

김대원

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A120960

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건복지부

연구사업명 보건의료연구기술개발사업

연구과제명 표적단백질 세포 및 연골조직 침투기술 개발

기 여 율 1/4

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01121401

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대 바이오 그린21 사업-농생명 바이오 신의약 소재 개발사업

연구과제명 실크를 이용한 외과 수술용 생체막 개발

기 여 율 1/4

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2015.01.15 ~ 2015.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A1076058

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자사업(신진)

연구과제명 간질성 뇌손상시 해마에서 PEA-15(Phosphoprotein enriched in astrocytes 15)에 대한 기

전연구 및 치료제 개발

기 여 율 1/4

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.12.01 ~ 2015.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환 치료제 개발 : 질환치료용 생리활성

고분자 신소재 물질 탐색 및 개발

기 여 율 1/4

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

PEA15의 C-말단과 N-말단 중 어느 한 곳 이상에 단백질 수송도메인이 공유결합된 PEA15 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 PEP-1 펩타이드 또는 HIV-1 Tat 펩타이드임을 특징으로 하는 항염증 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 PEA15 융합단백질의 아미노산 서열은 서열번호 4임을 특징으로 하는 항염증 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 염증은 피부염증임을 특징으로 하는 항염증 약학 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 피부염증은 아토피염증을 특징으로 하는 항염증 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 세포투과성 PEA15 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것으로서, PEA15 단백질에 단백질 수송 도메인을 융합한 융합단백질이 인비보 및 인비트로에서 염증반응에 대해 세포 보호효과를 나타냄을 통하여 세포투과성 PEA15 융합단백질이 염증 관련 질환에 대한 치료제 용도로 이용 가능성을 밝혔다.

배경 기술

[0002]

PEA15(phosphoprotein enriched in astrocytes 15)(15KDa)는 신경세포에서 많이 발현되는 단백질이다. PEA15는 ERK1/2 (extra-cellular signal receptors, activated kinases) 및 RSK2 (ribosomal S6 kinase2)와의 상호작용을 통하여 다양한 세포 기능을 조절한다 [Joseph Krueger, Fan-Li Chou, Angela Glading, Erik Schaefer, Mark H. Ginsberg. Phosphorylation of Phosphoprotein Enriched in Astrocytes (PEA-15) Regulates Extracellular Signal-regulated Kinase-dependent Transcription and Cell Proliferation. Molecular Biology of the Cell(2005) 16:3552-3561., Angeles Estelles, Carol A, Cherlton, Helen M. Blau. The phosphoprotein Protein PEA-15 Inhibits Fas-but Increases TNF-R1-Mediated Caspase-8 Activity and Apoptosis. Developmental Biology(1999) 216: 16-28., Xiao C, Yang BF, Asadi N, Beguinot F & Hao C. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its

modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in glioma cells. *Journal of Biochemistry* (2002) 277: 25020-25025., Vaidyanathan H & Ramos JW. RSK2 activity is regulated by its interaction with PEA-15. *Journal of Biochemistry* (2003) 278:32367-32372., Greig FH, Nixon GF. Phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA)-15: A potential therapeutic target in multiple disease states. *Pharmacology & Therapeutics* (2014) 20.pii: S0163-7258(14)00067-9.].

[0003] 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. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 52-56; 2002, Schwarze, S. et al., *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].

[0004] 지다당 (Lipopolysaccharide; LPS)은 그람 음성균 외부 막 구성요소로 잘 알려져 있고, 이는 염증반응과 COX-2 (cyclooxygenase-2), 사이토카인 (인터루킨-1 β ; IL-1 및 IL-6), 종양괴사인자- α (TNF- α) 및 활성산소종 생산을 유도한다. 이러한 염증성 매개자들은 다양한 염증성 질환의 발병과 밀접하게 관련되어 있다 [Goraca A. et al., (2013) *Pharmacol Rep* 65: 179-186, Hewett J.A. et al., (1993) *Pharmacol Rev* 45: 382-411, Yoshino S. et al., (2000) *Immunobiol* 99: 607-614, Bertolini A. et al., (2002) *Curr Med Chem* 9: 1033-1043]. 또한, 생성된 활성산소종은 세포의 구조와 기능을 변화시켜 세포사멸에 기여한다 [Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, Hald A, Lotharius J. (2005) *Exp Neurol* 193: 279-290].

[0005] 단백질을 치료제로 사용하는 것은 분자량, 낮은 투과성 및 생화학적 특성으로 인해 한계가 있었다 [Van den Berg A, Dowdy SF. (2011) *Curr Opin Biotechnol* 22: 888-893, Zhao B, Guo Y, Fu A. (2012) *Appl Biochem Biotechnol* 166: 1463-1471]. 그러나, 많은 연구자들이 단백질 수송 도메인을 이용하여 치료용 단백질을 세포 및 조직 내로 전달하는 것이 가능하며 의료용으로 이용할 수 있음을 밝혔다 [van den Berg A, Dowdy SF. (2011) *Curr Opin Biotechnol* 22: 888-893, Zhao B, Guo Y, Fu A. (2012) *Appl Biochem Biotechnol* 166: 1463-1471, Wadia JS, Dowdy SF. (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13: 52-56, Morris MC et al. (2001) *Nat Biotechnol* 19: 1173-1176, Dietz GP. (2010) *Curr Pharm Biotechnol* 11: 167-174, Embury J et al. (2001) *Diabetes* 50: 1706-1713, Kubo E et al. (2008) *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C842-C855]. 본 발명자들은 단백질 수송 도메인과 융합된 단백질이 세포 및 조직 내로 잘 투과되며, 뿐만 아니라, 피부염증 및 신경질환을 포함하는 다양한 질환에 대해 보호기능을 함을 밝혔다 [Eum WS et al. (2004) *Free Radic Biol Med* 37: 1656-1669, Sohn EJ et al. (2012) *Biochim Biophys Acta* 1820: 1647-1655, Lee YP et al. (2012) *FEBS J* 279: 1929-1942, Ahn EH et al. (2013) *Free Radic Biol Med* 55: 36-45, Kim SY et al. (2011) *J Invest Dermatol* 131: 1477-1485, Kim MJ et al. (2013) *Free Radic Biol Med* 63: 432-445, Kim DW et al. (2013) *BMB Rep* 46: 124-129, Kim SY et al. (2011) *Immunobiol* 216: 771-781, Kim DS et al. (2012) *BMB Rep* 45: 532-537].

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 피부염증을 비롯한 염증관련 질환에 유용한 치료용 약학 조성물을 제공하려는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 PEA15 융합단백질이 세포 및 조직 내로 잘 투과하여 LPS 또는 과산화수소로 유도되는 염증 및 산화 스트레스에 보호작용을 나타내는지를 시험하였다. 그 결과, PEP-1-PEA15 융합단백질은 효과적으로 Raw 264.7 세포 내로 투과하여 LPS 또는 과산화수소로 유도되는 염증 및 세포사멸에 대해 현저한 세포 보호작용을 나타내었다. 뿐만 아니라, 국소적용된 PEP-1-PEA15 융합단백질은 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)로 유도된 귀 부종에 대해 현저한 개선효과를 유도함으로써 PEP-1-PEA15 융합단백질이 다양한 염증 및 산화 스트레스

관련 질병에 대한 치료제로 이용 가능성을 밝혔다.

- [0008] 본 발명은 PEA15의 C-말단과 N-말단 중 어느 한 곳 이상에 단백질 수송도메인이 공유결합된 PEA15 융합단백질을 포함하는 항염증, 특히 아토피 등의 피부염에 사용 가능한 항피부염증 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 PEP-1 펩타이드 또는 HIV-1 Tat 펩타이드임을 특징으로 하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0010] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 PEA15 융합단백질의 아미노산 서열이 서열번호 4임을 특징으로 하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0011] PEA15 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구, 주사 또는 연고제 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, 텔크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘 염 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 보조제(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] 나아가, 본 발명은 상기 PEP-1-PEA15 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 아토피, 피부소양증과 같은 피부염증을 비롯한 염증질환의 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 PEA15 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 PEA15 단백질 분자의 세포 내 전달은 PEP-1 펩타이드를 비롯한 단백질 수송 도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 PEP-1 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 PEP-1 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, PEP-1의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결어로 PEP-1 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, 7~15개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 다수 포함하는 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.
- [0015] 구체적으로, 본 발명은 PEP-1-PEA15 융합단백질, 이 융합단백질을 제조하기 위한 재조합 뉴클레오타이드와 벡터, 이 융합단백질을 포함하는 피부염증질환 치료, 예방 목적의 약학 조성물 등에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0017] "PEA15 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 PEA15 단백질을 포함하며, 수송 도메인과 목표 단백질 (즉, 본 발명에서는 PEA15 단백질을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 "PEP-1-PEA15", "PEP-1-PEA15 융합단백질" 등과 혼용하였다.
- [0018] "목표 단백질"이란 본래 표적 세포로 들어갈 수 없거나, 본래 유용한 속도로 표적 세포로 들어갈 수 없는 수송 도메인 또는 이의 단편이 아닌 분자로서, 수송도메인과 융합되기 전의 분자 그 자체 또는 수송도메인-목표 단백질 복합체의 목표 단백질 부분을 의미한다. 목표 단백질로서는 폴리펩티드, 단백질, 펩타이드를 포함하며, 본 발명에서는 PEA15 단백질을 의미한다.

- [0019] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.
- [0020] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0021] 또한, "표적 세포"란 수송도메인에 의해 목표 단백질이 전달되는 세포를 의미하는 것으로서, 표적 세포는 체내 또는 체외의 세포를 말한다. 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.
- [0022] 본 발명에서의 "단백질 수송 도메인"은 고분자 유기화합물, 예컨대 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드, 단백질, 올리고당 또는 다당류 등과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 유기화합물들을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말한다.
- [0023] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0024] 본 발명의 PEA15 융합단백질은 9 내지 15개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 PEA15의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 PEA15 융합단백질을 말한다. 또한, 상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, PEP-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고 (라이신,아르기닌) 중의 1종 이상을 말한다.
- [0025] 또한, 본 발명의 상기 PEA15 융합단백질 아미노산 서열은 서열번호 4를 포함한다. PEA15 융합단백질 제조에서 제한부위 서열의 선택 등에 따라 다양한 서열의 융합단백질을 얻을 수 있으며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에서 보통의 지식을 가진 사람에게 자명하다. 위 아미노산 서열은 예시적인 것일 뿐 PEA15 융합단백질 아미노산 서열이 위의 서열로 한정되는 것이 아님은 자명하다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 PEA15 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 염증의 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 PEA15 융합단백질을 유효성분으로 하며, 염증의 예방 및 개선 효과가 있는 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명은 9~15개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 포함하는 단백질 수송 도메인이 PEA15 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포도입성 (cell-transducing) PEA15 융합단백질에 관한 것이다. 또한, 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.
- [0029] 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. 음성 전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합단백질과 아미노산 서열 간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85~100% 범위 내의 동일 유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.
- 발명의 효과**
- [0030] 본 발명의 PEP-1-PEA15 융합단백질은 투여량 및 처리시간 의존적으로 세포 내로 투과하였다.
- [0031] 본 발명의 PEP-1-PEA15 융합단백질은 LPS-유도된 COX-2와 iNOS 단백질 발현 수준을 투여량 의존적으로 현저히 감소시켰다. 또한, PEP-1-PEA15 융합단백질은 고농도 LPS로 유도된 염증반응을 억제하였다.
- [0032] 또한, 본 발명의 PEP-1-PEA15 융합단백질은 LPS로 유도되는 MAPKs와 NF- κ B 활성화에 대해 세포 보호효과를 나타

내었다. PEP-1-PEA15 융합단백질 처리세포에서는 인산화된 ERK, p38의 발현수준이 현저히 감소하였다.

[0033] 또한, 본 발명의 PEP-1-PEA15 융합단백질은 세포로 투과되어 LPS 처리한 세포에서 활성산소종 수준을 감소시킴으로써 세포 보호효과를 나타내었다.

[0034] 뿐만 아니라, LPS 처리한 세포에서 세포생존율은 투과된 PEP-1-PEA15 융합단백질에 의해 투여량 의존적으로 최대 64%까지 현저히 증가하였다. 투과된 PEP-1-PEA15 융합단백질은 생물학적으로 활성을 나타내며, 활성산소종 생성 및 DNA 단편화를 저해하여 LPS로 유도되는 세포사멸로부터 세포를 보호한다.

[0035] 뿐만 아니라, PEP-1-PEA15 융합단백질은 TPA로 유도되는 동물 염증모델에서 피부 염증에서 초기에 일어나는 단핵세포 (monocyte)와 같은 염증세포의 침윤을 현저히 저해하였다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 PEP-1-PEA15 융합단백질 벡터 제조 및 정제에 관한 도면이다.

도 2는 Raw 264.7 세포 내로 PEP-1-PEA15 융합단백질의 투과를 나타낸다.

도 3은 Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도한 세포사멸에 대한 PEP-1-PEA15 융합단백질의 억제효과를 나타낸다.

도 4는 LPS로 유도된 DNA 단편화에 대한 PEP-1-PEA15 융합단백질의 억제효과를 나타낸다.

도 5는 LPS로 유도된 활성산소종에 대한 PEP-1-PEA15 융합단백질의 억제효과를 나타낸다.

도 6은 LPS로 유도된 MAPK 활성화에 대한 PEP-1-PEA15 융합단백질의 억제효과를 나타낸다.

도 7은 TPA로 유도된 염증 동물모델에서 PEP-1-PEA15 융합단백질의 염증 완화 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 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-PEA15 융합단백질에 대하여만 기술하였으나, Tat-PEA15 융합단백질, PEA15-Tat 융합단백질, Tat-PEA15-Tat 융합단백질, PEA15-PEP-1 융합단백질 및 PEP-1-PEA15-PEP-1 융합단백질도 PEP-1-PEA15 융합단백질과 같이 세포 투과성을 나타내며, 세포 및 모델동물 실험에서 PEP-1-PEA15 융합단백질과 유사한 정도의 결과를 나타낸다.

[0038] **재료**

[0039] 12-*O*-TPA(tetradecanoylphorbol-13-acetate)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Ni²⁺ 나이트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우 (Ni²⁺ nitrilotri-acetic acid Sepharose superflow)는 Qiagen (Valencia, CA, USA)에서 구입하였다. DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)은 Lonza (Walkersville, MD, USA)에서 구입하였고, FBS와 항생제는 Gibco BRL에서 구입하였다. 합성 PEP-1 펩타이드는 Peptron (Daejeon, Korea)에서 구입하였고, 기본 항체와 액틴은 각각 Cell Signaling Technology (Beverly MA, USA) and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 다른 화학물질 및 시약들은 입수 가능한 최상급의 제품을 이용하였다.

[0040] **실시예 1: PEP-1-PEA15 융합단백질의 발현 및 정제**

[0041] PEA15 단백질 및 PEP-1-PEA15 융합단백질의 발현 벡터를 구축하였다. 인간의 유전자 중의 하나인 PEA15를 cDNA와 함께 2개의 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)으로 증폭시켰다. 센스 프라이머는 5'-CTCGAGGGCAACGCGCAG-3'으로 구성되어 있고, *XhoI*이라는 제한효소 작용부위가 5' 쪽에 존재한다. 그리고 안티센스 프라이머는 5'-GGATCCTCAGGAATCTTCGACTC-3'으로 구성되어 있고, *BamHI*이라는 제한효소 작용부위가 5' 쪽에 존재한다. PCR을 통하여 얻은 결과물을 TA 벡터에 연결하고 *XhoI*과 *BamHI*을 이용하여 자른 후에 발현 벡터에 연결하여 PEP-1-PEA15 융합단백질을 제조하였다. 이와 마찬가지로 대조군인 PEA15는 PEP-1 펩타이드가 결합된 벡터를 이용하여 제조하였다. 제조합된 PEP-1-PEA15 플라스미드를 대장균인 BL21로 형질변환시킨 후 0.5mM

IPITG(isopropyl- β -D-thiogalactoside)로 유도하여 18℃에서 하룻밤 배양하였다. 배양한 세포를 초음파로 분쇄하여 PEP-1-PEA15 융합단백질을 얻기 위해 Ni^{2+} -니트릴로삼초산 세파로즈 슈퍼플로우 컬럼을 이용하여 정제하였다. 단백질 농도는 브래드포드 방법으로 우혈청 알부민을 표준물질로 이용하여 결정하였다.

[0042] 실시예 2: Raw 264.7 세포 내로 PEP-1-PEA15 융합단백질의 투과

[0043] 쥐 대식세포 Raw 264.7 세포는 20 mM Hepes/NaOH (pH 7.4), 5 mM NaHCO_3 , 10% FBS 및 항생제 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신, 100 U/ml 페니실린)를 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-PEA15 융합단백질의 세포투과가 농도 및 시간 의존적인지를 평가하기 위해, 다양한 농도의 PEP-1-PEA15 융합단백질 (0.2~1 μM)로 세포를 한 시간 동안 처리하거나 1 μM 의 PEP-1-PEA15 융합단백질로 0~60분 동안 처리하였다. PEP-1-PEA15 융합단백질 처리 후 세포는 트립신-EDTA로 처리하고 PBS (phosphate-buffered saline)로 세척한 후 세포를 모으고, 세포추출물은 웨스턴 블랏 분석에 이용하였다.

[0044] 실시예 3: 웨스턴 블랏 분석

[0045] 용균된 단백질은 SDS-PAGE로 분리한 다음 나이트로셀룰로스 막 또는 PVDF (polyvinylidene difluoride) 막으로 옮겼다. 막은 5% 저지방유와 0.1% Tween 20이 함유된 TBS 완충액 (TBST)으로 블로킹하였다. 블로킹된 막은 지시된 일차항체와 HRP 결합된 이차항체로 면역 블랏팅하였다. 목표 단백질은 제조자 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)의 지시에 따라 화학발광으로 탐지하였다 [Kim, M. J. et al., *J Neurol Sci.* **298**:64-69; 2010].

[0046] 실시예 4: 형광 공초점 현미경 분석

[0047] 공초점 현미경 분석은 종래기술과 같이 수행하였다 [Kim, D. W. et al. *Free Radic Biol Med.* **48**:969-977; 2010, Sohn, E. J. et al., *Biochim Biophys Acta.* **1820**:1647-1655; 2012]. Raw 264.7 세포를 커버슬립에 시딩하고 좀 더 안전한 부착을 위해 오버나잇 배양하였다(12h). PEP-1-PEA15 융합 단백질 (1 μM)로 처리한 Raw 264.7 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 세 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 Raw 264.7 세포는 FV-300 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 관찰하였다.

[0048] 실시예 5: 세포 생존율 분석

[0049] WST-1 분석은 과산화수소 처리된 Raw 264.7 세포의 생존율 평가에 이용되었다. 0.1~1 μM 의 PEP-1-PEA15 융합단백질 및 대조군 PEA15으로 한 시간 동안 Raw 264.7 세포를 선처리한 후, 세포를 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS에 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.

[0050] 실시예 6: Raw 264.7 세포내 활성산소종 수준 측정

[0051] 활성산소종은 DCF-DA를 형광 DCF로 변화시키며, 그리하여 세포 내 활성산소종 수준을 측정하는데 이용할 수 있다 Raw 264.7 세포는 PEP-1-PEA15, 대조군 PEA15 또는 PEP-1 펩타이드로 무혈청 배지에서 한 시간 동안 선처리한 후 LPS (1 $\mu\text{M}/\text{ml}$)을 이용하여 3시간 동안 처리한 후, 1 mM의 과산화수소를 이용하여 1시간 동안 활성산소종을 유도하였다. 이 세포들은 PBS로 두 번 세척한 후 DCF-DA (20 μM)를 이용하여 30분간 배양하였다. 형광 현미

경 (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.

[0052] 실시예 7: MAPKs 활성화 분석

[0053] Raw 264.7 세포에서 LPS는 MAPKs (mitogen-activated protein kinases)와 NF- κ B 활성화를 통해 염증을 유도한다. LPS로 유도되는 MAPKs 활성화에 대한 PEP-1-PEA15 융합단백질의 보호효과를 시험하기 위해 세포를 1 μ g/ml LPS로 15분간 처리하였다. 마우스의 귀에 TPA(1 μ g/한쪽 귀)를 하루 한 번씩 3일간 처리한 다음, 3일간 TPA 처리한 시간 후 PEP-1-PEA15 융합 단백질을 국소 도포하였다. 귀 생검으로부터 추출한 세포 추출물을 웨스턴 블랏하여 p38 및 ERK 단백질 키나아제와 같은 MAPKs 활성화를 분석하였다. 이때 항체는 MAPK에 대한 인산-특이적 항체 (phosphor-specific antibodies)를 이용하였다.

[0054] 실시예 8: TUNEL 측정법

[0055] DNA 단편화 (DNA fragmentation)를 시험하기 위해 PEP-1-PEA15 (4 μ M)으로 한 시간 동안 세포를 선처리한 후 1 mM의 H₂O₂로 18시간 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. 염색 후, 세포핵은 0.1 μ g/ml의 DAPI로 염색하였고, PBS로 세 번 세척하였다. 세포시료 사진은 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)으로 촬영하였다.

[0056] 실시예 9: TPA로 유도된 피부염증 및 조직학적 분석

[0057] 6 ~ 8주령 수컷 ICR 마우스를 일정 온도 23 $^{\circ}$ C 및 일정 상대습도 60%로 12시간은 밝게, 12시간은 어둡게 조절하고, 사료와 물에 자유롭게 접근 가능하도록 하여 사육하였다. 동물과 관련된 모든 실험 절차와 관리는 국립수의학검역원 (National Veterinary Research & Quarantine Service of Korea)의 실험동물 보호 및 이용에 관한 가이드를 따랐고, 이를 한림대학교 의과대학 동물 보호 및 이용 위원회가 입증한다.

[0058] TPA를 국부적용하여 피부염증을 유도하였다 [Lee, M. J. et al., *Life Sci.* **89**:896-904; 2011]. 다섯 마리의 마우스를 한 군으로 하였다. TPA (1.0 μ g)를 20 μ l 아세톤에 용해시켜 마우스 귀 안쪽 표면 및 바깥 표면에 3일 동안 매일 적용하였다. TPA 처리한 다음 한 시간 후 PEP-1-PEA15 융합단백질 (10 μ g)과 대조군 PEA15 단백질 (20 μ g)을 각각 마우스 귀에 국부 적용하였다. 대조군도 20 μ l 아세톤에 용해시켜 마우스 귀 안쪽 표면 및 바깥 표면 적용하였다.

[0059] 통계학적 분석

[0060] 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 각 군간 비교는 Student's t-test와 일방 ANOVA를 이용하였다. 오차는 P < 0.01일 때 유의한 것으로 하였다.

[0061] 결과 1 : 세포 침투성 PEP-1-PEA15 융합단백질의 벡터 제조 및 정제

[0062] 세포 침투성 PEP-1-PEA15 융합단백질을 제조하기 위해 세포침투 효율을 갖는 PEP-1 펩타이드와 인간 PEA15 유전자를 융합하여 PEP-1-PEA15 융합단백질 발현벡터를 제조하였다. 제조한 PEP-1-PEA15, 대조군 PEA15 융합단백질을 발현벡터를 과대 발현시킨 뒤 이를 정제하여 SDS-PAGE를 이용한 겔 염색법과 웨스턴 블랏 분석을 통해 순수하게 분리 정제된 것을 히스티딘 항체를 통해 확인하였다.

[0063] 결과 2 : 세포 침투성 PEP-1-PEA15 융합단백질의 농도 및 시간 의존적으로 세포 내 침투 효능 확인

[0064] 정제된 침투성 PEP-1-PEA15 융합단백질이 세포 내로 잘 침투되는지를 확인하기 위하여 단백질을 세포 내로 농도 및 시간 의존적으로 침투시켜 그 효능을 확인하였다. 본 실험에서는 대식세포주의 Raw 264.7 세포주를 사용하였

다. 먼저, 세포침투성 PEP-1-PEA15 융합단백질을 세포 내로 침투시킨 결과 농도(0.2~1 μ M) 및 시간 의존적으로 침투되는 것을 히스티딘 항체를 통해 웨스턴 블랏 분석으로 확인할 수 있었으며, PEP-1 펩타이드가 융합되지 않은 대조군 PEA15 단백질은 세포 내로 침투되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 공초점 현미경 분석을 통해서 확인한 결과에서도 마찬가지로 PEP-1-PEA15 1 μ M를 처리한 그룹에서는 녹색 형광이 강하게 발색되는 것을 확인함으로써 세포 내로의 침투가 잘 이루어진 것을 확인하였다.

[0065] **결과 3 : 세포 침투성 PEP-1-PEA15 융합단백질의 Raw 264.7 세포에서 LPS에 유도된 세포사멸 억제효과**

[0066] 침투성 PEP-1-PEA15 융합단백질의 세포 보호효능을 확인하기 위하여 살아있는 세포 수를 측정하는 방법인 MTT 분석을 수행하였다. LPS 6 μ g/ml를 세포 내에 처리하였을 경우, 살아있는 세포 수가 약 50%로 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 세포 침투성 PEP-1-PEA15 융합단백질을 농도별(0.2 μ M~1 μ M)로 처리하였을 경우, 세포 생존도가 최대 64%까지 증가함을 확인할 수 있었다.

[0067] **결과 4 : LPS로 유도된 DNA 단편화에서 PEP-1-PEA15 융합단백질의 보호 효과**

[0068] LPS로 인해 생겨난 활성산소가 DNA 단편화를 일으키게 되는데, TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase)라는 효소를 이용해 UTP(Uridine triphosphate)를 DNA 단편 말단에 붙여 그 DNA 단편화가 일어났는지 여부를 확인해 보았다.

[0069] LPS만 처리한 군에서의 푸른색으로 염색된 강도가 매우 강하게 발색됨을 확인할 수 있었는데, 이는 LPS에 의해 생겨난 활성산소가 DNA 단편화를 일으킨 것을 의미한다.

[0070] 그러나, PEP-1-PEA15 융합단백질을 1 μ M 처리한 군에서는 그 정도가 매우 감소되었고, 대조군 PEA15를 처리한 그룹에서는 그 보호효과를 확인하지 못했다. 이런 결과를 통해 PEP-1-PEA15 융합단백질이 Raw 264.7 세포에서 DNA 단편화를 보호해주는 역할을 하는 것을 확인하였다.

[0071]

[0072] **결과 5 : LPS로 인해 유도된 세포내 활성산소종 표지자인 DCFH-DA 염색에서 PEP-1-PEA15 융합단백질의 보호 효과**

[0073] LPS로 인해 생겨난 세포 내 활성산소종 표지자인 DCFH-DA는 비극성 분자로 세포 내로 들어가면서 DCFH로 분해되고, 세포 내의 활성산소종에 의해 녹색형광을 나타내는 DCF로 변한다. 이로써 세포 내의 활성산소종 정도를 확인해 보았다.

[0074] LPS만 처리한 그룹에서의 푸른색으로 염색된 강도가 매우 강하게 발색됨을 확인할 수 있었는데, 이는 LPS에 의해 활성산소종이 생겨난 것을 의미한다.

[0075] 그러나, PEP-1-PEA15 융합단백질을 1 μ M 처리한 그룹에서는 그 정도가 매우 감소되었고, 대조군 PEA15를 처리한 그룹에서는 보호효과를 확인하지 못했다. 이런 결과를 통해 PEP-1-PEA15가 Raw 264.7 세포에서 활성산소종을 막아주는 역할을 확인하였다.

[0076]

[0077] **결과 6 : MAPK 활성화에 대한 PEP-1-PEA15 융합단백질의 억제 효과**

[0078] 인산화된 MAPK(Mitogen-activated protein kinases)인 p38, ERK를 조절함으로써 Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도된 세포사멸을 보호하는 효과를 확인해 보았다.

[0079] 인산화된 p38에서 PEP-1-PEA15 융합단백질을 농도별로 0.2~1 μ M 처리했을 때 줄어드는 것을 확인하였고, PEP-1-PEA15 융합단백질이 Raw 264.7 세포에서 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 대조군 PEA15를 처리한 그룹에서는 그 효과를 확인하지 못했다.

[0080] 또, 인산화된 p38에서 PEP-1-PEA15 융합단백질을 농도별로 0.2~1 μ M 처리했을 때 줄어드는 패턴으로 PEP-1-PEA15 융합단백질이 Raw 264.7 세포에서 효과가 있음을 확인할 수 있었고, 대조군 PEA15를 처리한 그룹에서는 그 효과를 확인하지 못했다.

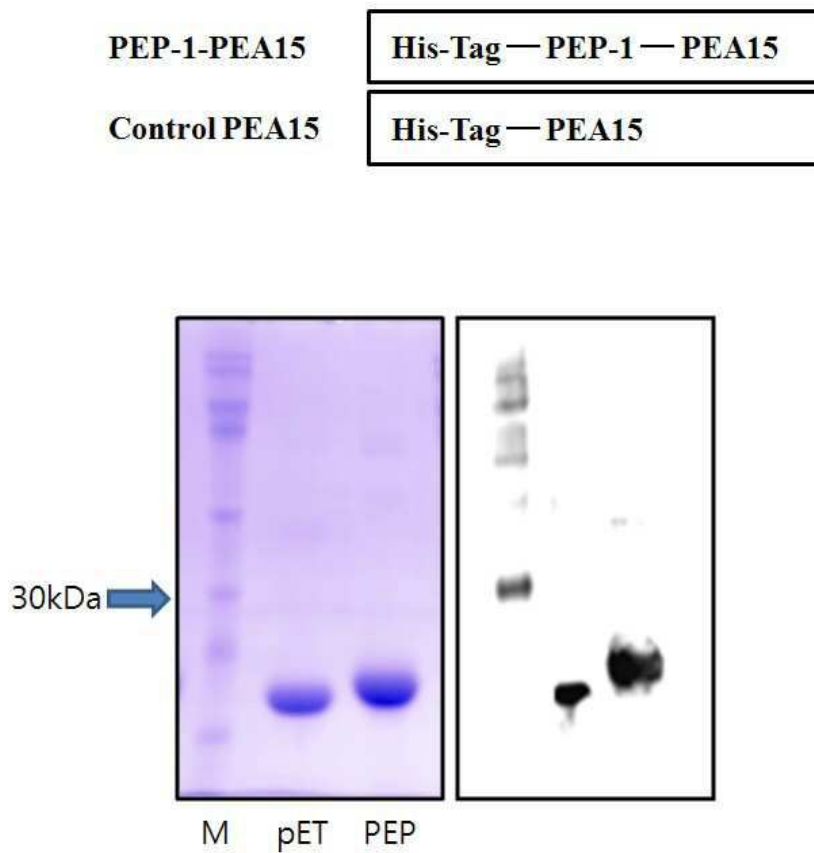
[0081] 결과 7 : TPA (12-O-tetradecarbonlyphorbol-13-acetate)로 유도된 염증 동물모델에서 PEP-1-PEA15 융합단백질로 인한 염증 완화 효과

[0082] 단기간 동안 마우스에게 LPS를 처리함으로써 염증반응이 마우스들에게 나타나기 시작한다. 본 실험에서 TPA 1 μ g/ear로 하루에 한 번씩 총 3일을 처리하여 귀의 염증반응 정도를 확인하였다.

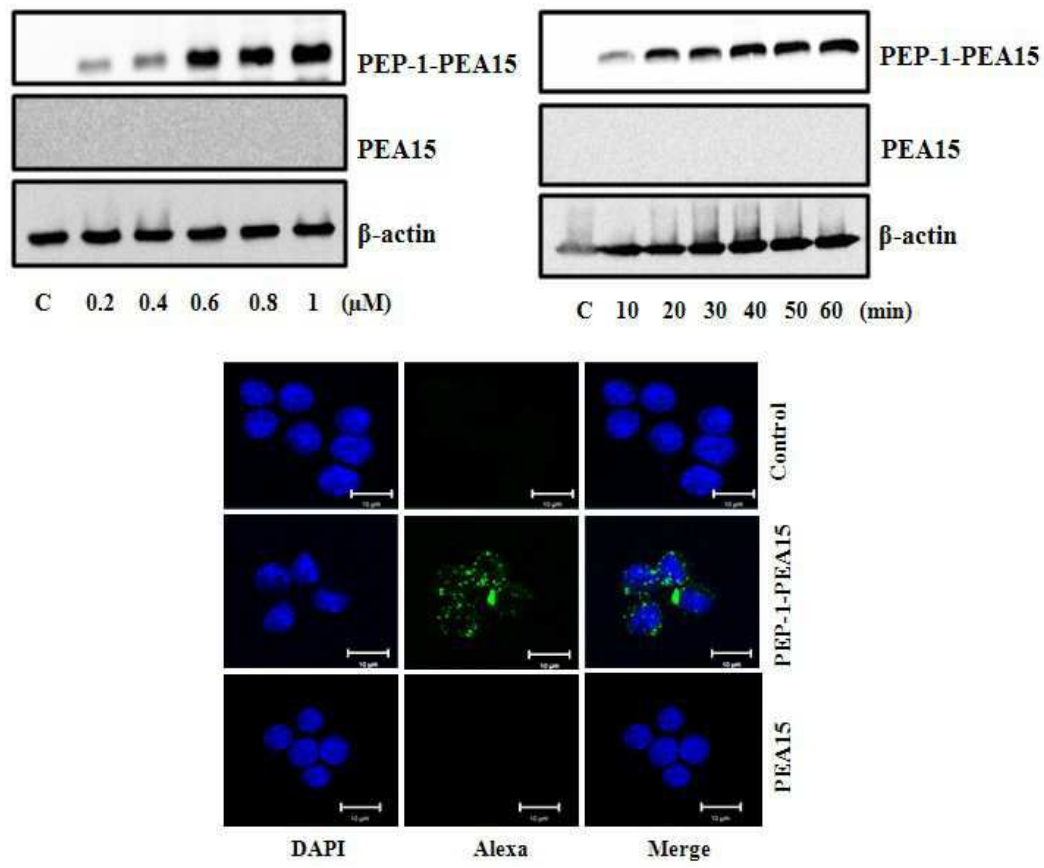
[0083] 도 7과 같이 CTL(음성 대조군), TPA(TPA 처리군), "pET"(대조군 PEA15 단백질) 전, 후 처리군의 염증반응은 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비하여 상이하게 나타났다. 그러나 "PEP1"(PEP-1-PEA15 융합단백질) 전, 후 처리군에서는 대조군과 별다른 큰 차이를 보이지 않음으로써 PEP-1-PEA15 융합단백질의 치료제로서의 가능성을 확인하였다.

도면

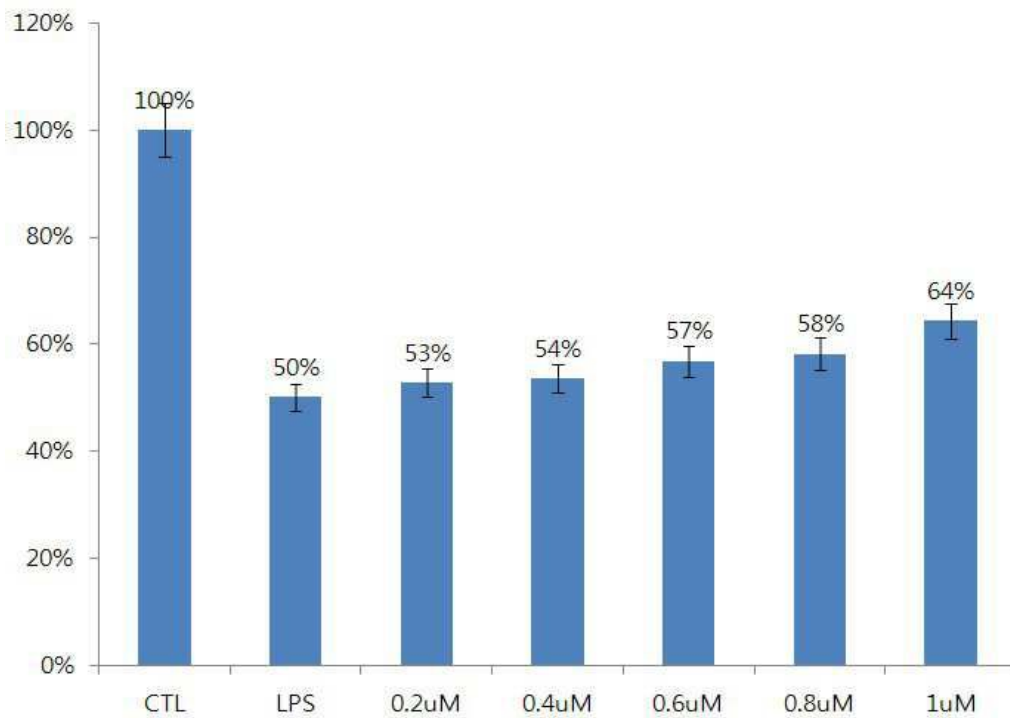
도면1



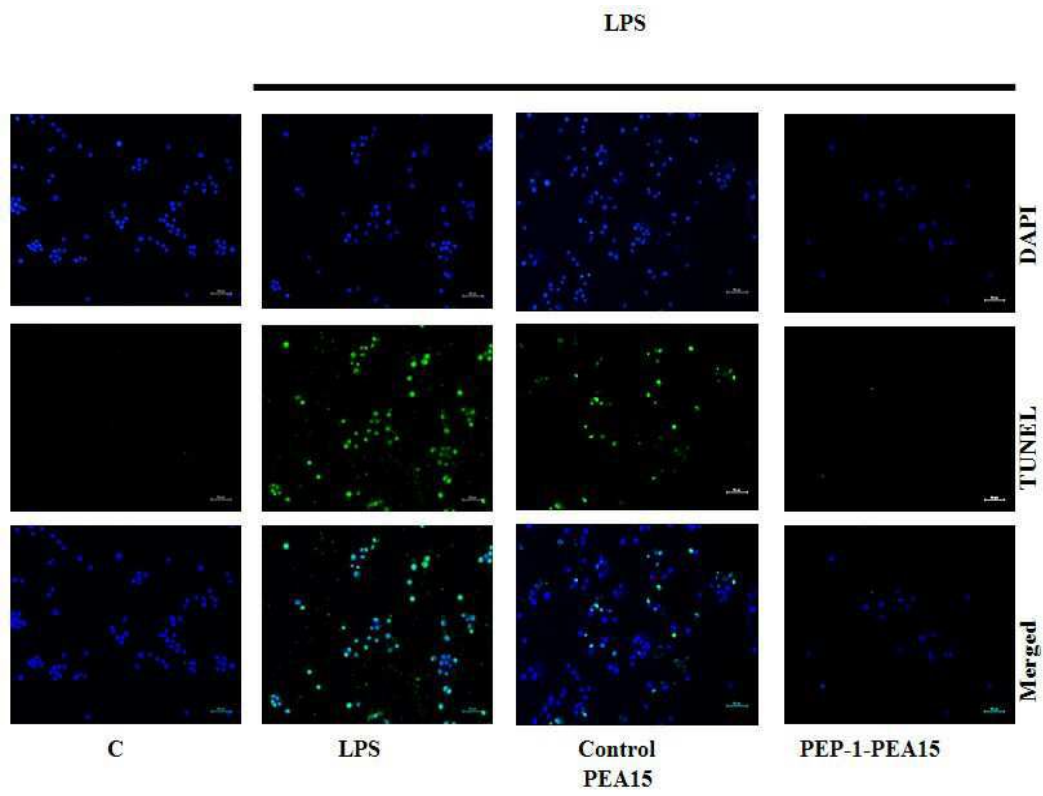
도면2



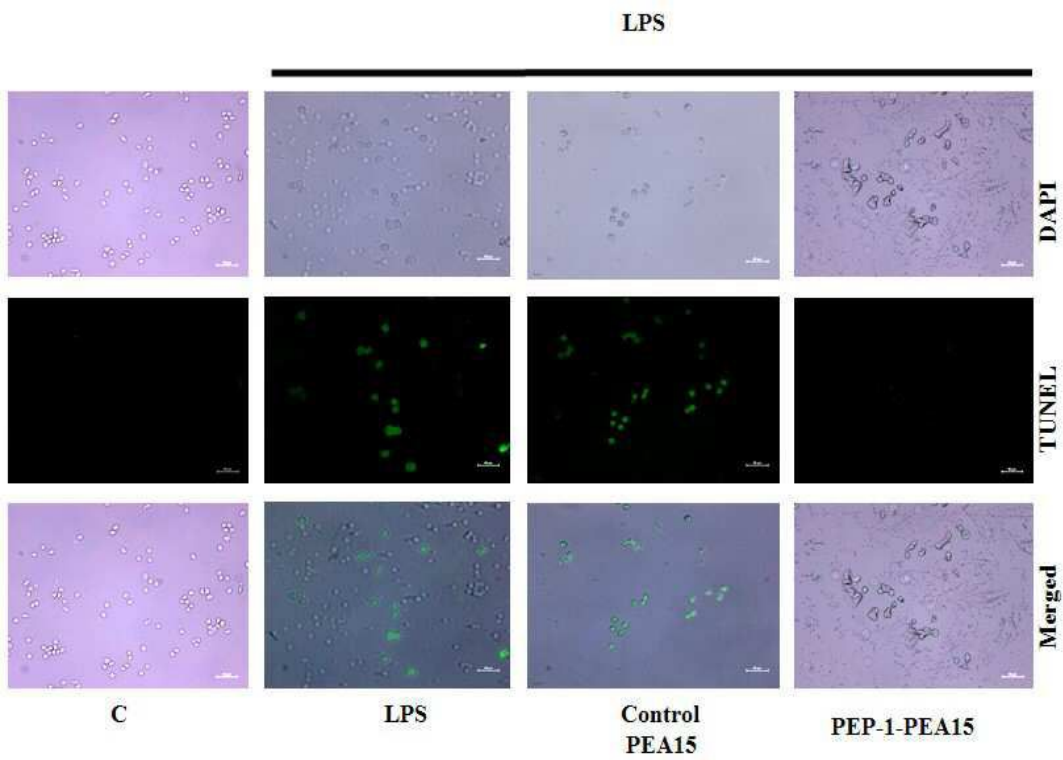
도면3



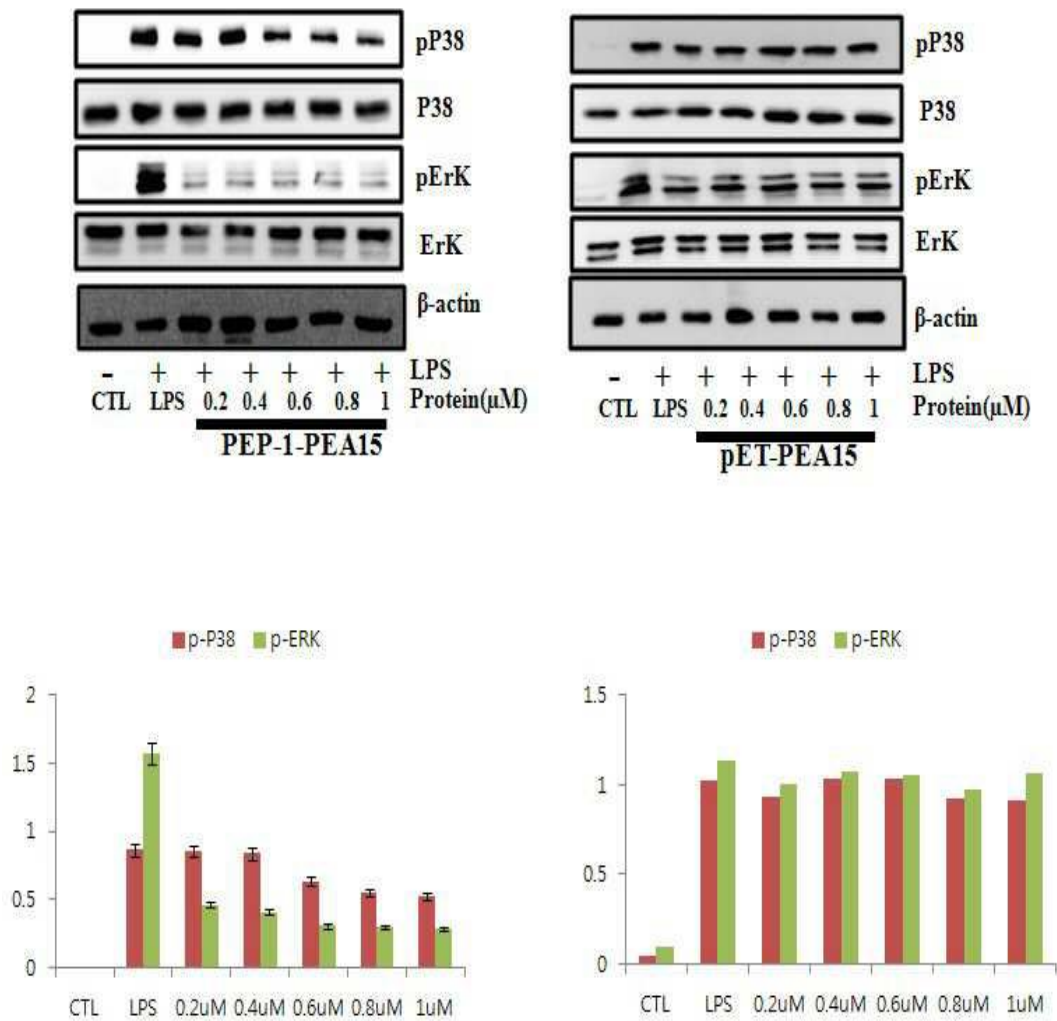
도면4



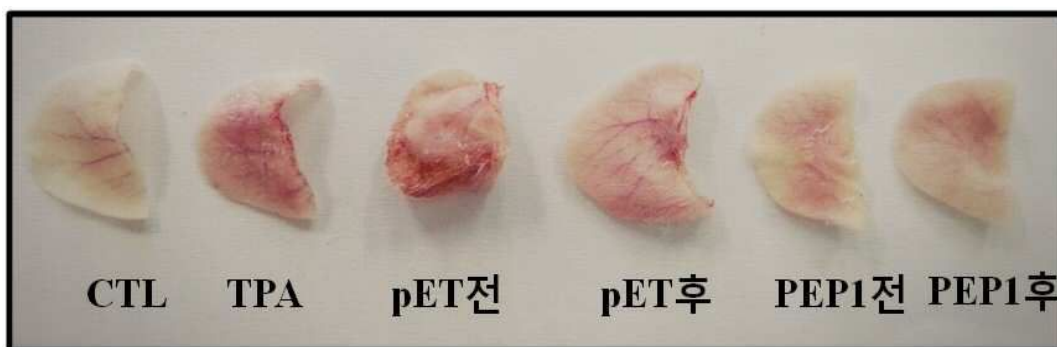
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Anti-inflammatory pharmaceutical composition containing PEA15 fusion protein

<130> HALLYMU-SYCHOI-PEP-PEA15-INFLAMMATION

<160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of PEA15

<400> 1

ctcgagggca acgcgcag 18

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of PEA15

<400> 2

ggatcctcag gaatcttcgg actc 24

<210> 3

<211> 464

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence of PEP-1-PEA15 fusion protein

<400> 3

taaaagaaac ctggtgggaa acctggtgga ccgaatggtc tcagccgaaa aaaaaacgta 60

aagtgtctga gatggctgag tacgggaccc tctgcaaga cctgaccaac aacatcaccc 120

ttgaagatct agaacagctc aagtcggcct gcaaggaaga catccccagc gaaaagagtg 180

aggagatcac tactggcagt gcctggttta gcttcctgga gagccacaac aagctggaca 240

aagacaacct ctctacatt gagcacatct ttgagatctc ccgccgtcct gacctactca 300

ctatggtggt tgactacaga acccgtgtgc tgaagatctc tgaggaggat gagctggaca 360

ccaagctaac ccgtatcccc agtgccaaga agtacaaga cattatccgg cagccctctg 420

aggaagagat catcaaattg gctccccac cgaagaaggc ctga 464

<210> 4

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP-1-PEA15 fusion protein

<

400> 4

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 Ala Glu Tyr Gly Thr Leu Leu Gln

20 25 30

Asp Leu Thr Asn Asn Ile Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Leu Lys Ser

35 40 45

Ala Cys Lys Glu Asp Ile Pro Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Thr Thr

50 55 60

Gly Ser Ala Trp Phe Ser Phe Leu Glu Ser His Asn Lys Leu Asp Lys

65 70 75 80

Asp Asn Leu Ser Tyr Ile Glu His Ile Phe Glu Ile Ser Arg Arg Pro

85 90 95

Asp Leu Leu Thr Met Val Val Asp Tyr Arg Thr Arg Val Leu Lys Ile

100 105 110

Ser Glu Glu Asp Glu Leu Asp Thr Lys Leu Thr Arg Ile Pro Ser Ala

115 120 125

Lys Lys Tyr Lys Asp Ile Ile Arg Gln Pro Ser Glu Glu Glu Ile Ile

130 135 140

Lys Leu Ala Pro Pro Pro Lys Lys Ala

145 150